



GESELLSCHAFT FÜR TOXIKOLOGISCHE UND FORENSISCHE CHEMIE

Toxichem

+

Krimtech

61 (3)





T + K (1994) 61 (3) 53-82
Bd.61 Nr.3 November 1994

TOXICHEM + KRIMTECH

Mitteilungsblatt der
Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

Das Mitteilungsblatt erscheint in zwangloser Folge, im Schnitt viermal jährlich. Alle Mitglieder der GTFCh erhalten die Zeitschrift im Rahmen ihres Mitgliedsbeitrages.

SCHRIFTLÉITUNG:

Prof.Dr.Thomas Daldrup
Institut für Rechtsmedizin
Heinrich-Heine-Universität
Postfach 10 10 07
D-40001 Düsseldorf

VERTRIEB:

Geschäftsstelle der GTFCh
Karl Schmidt

Landgrabenstraße 74
D-61118 Bad Vilbel

SATZ:

Dr. Hans Sachs
Institut für Rechtsmedizin
Universitätsklinik
Prittwitzstr. 6
D-89070 Ulm

Bankverbindung der GTFCh: Prof.Dr. M.R. Möller, GTFCh, Postgiroamt Saarbrücken (BLZ: 590 100 66) Kontonummer: 257 54-669

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

MOSBACH '95

54

Einladung zur Mitgliederversammlung 1995

56

Ido C. Dijkhuis

Qualitätskontrolle bei der klinischen Toxikologie in den Niederlanden

1977-1994: Ein 17 Jahre lang erprobtes Modell, attraktiv für Europa?

58

Pascal Kintz

Amineptine abuse detected by hair analysis

70

Michael Edler, Roland Schlüter

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Flunitrazepam(Rohypnol^R) im Urin

74

Personalia

80

Buchbesprechungen

82

MOSBACH '95

**9. Symposium der GTFCh
20. bis 22. April 1995**

Mosbach - Neckarelz (Pattberghalle)

Vorläufiges Programm

Donnerstag, 20. April 1995

14.00 Uhr:

**Kurs zum Symposium:
Drogen im Straßenverkehr - Analytische Verfahren**

Detailliert vorgestellt bzw. gegenübergestellt werden die in verschiedenen Arbeitskreisen etablierten Analysenverfahren für Serum bzw. Vollblut zum Nachweis des Konsums von Cannabis, Opiaten, Cocain bzw. Amphetaminen. Die Kurs wird von der Firma Hewlett Packard unterstützt.
Kursgebühr: Mitglieder DM 30,-; Nichtmitglieder DM 60,-.

Freitag, 21. April 1995

9.00 Uhr:

Eröffnung des Symposiums

Themen und vorgesehene Referentinnen/Referenten

vormittags:

Schwerpunktthema I: Drogen und Arzneimittel im Straßenverkehr

- Juristische Aspekte (Meininger, Moers)
- Opiat- bzw. Methadonkonsum und Verkehrssicherheit (Gerchow, Frankfurt)
- Cannabis- bzw. Cocainkonsum und Verkehrssicherheit (NN)
- Medikamentenkonsum und Verkehrssicherheit (Hobi, Basel)

Diskussion, anschließend Pause

- Grenzwertkommission (Möller, Homburg)
- Analytische Aspekte (Daldrup, Düsseldorf)
- Einsatz des mobilen Nystagmometers (Joachim, Heidelberg)
- Interpretation der Analysenbefunde (Iten, Zürich)

Diskussion, anschließend Mittagspause

Freitag, 21. April 1995

nachmittags:

Schwerpunktthema II: Chemische Spuren bei Verkehrsunfällen

- Der Verkehrsunfall aus kriminaltechnischer Sicht (Wasilewski, Hamburg)
- Kriminaltechnische Lackuntersuchungen bei Verkehrsunfällen (Göser, München)
- Wie leitet eine Faserspur zum Fahrer? (Decke, Hamburg)

anschließend:

Freie Vorträge/Poster

(Vorträge zu allen Bereiche der Forensischen Toxikologie und Chemie)

abends:

STAS - Festsitzung und Festabend

Samstag, 22. April 1995

9.00 Uhr:

Freie Vorträge/Poster
(Fortsetzung)

11.00 Uhr:

Mitgliederversammlung

ca. 13.00 Uhr:

Ende des Symposiums

Teilnahmegebühren:

A: Kurs zum Symposium am 20.4.94:	Mitglieder der GTFCh:	DM 30,-
	Nichtmitglieder:	DM 60,-
B: Symposium am 21. und 22.4.94:	Mitglieder der GTFCh:	DM 120,-
	Nichtmitglieder:	DM 190,-
	Begleitpersonen:	DM 60,-

Einladung zur Mitgliederversammlung

In Namen des Vorstandes der GTFCh lade ich zur nächsten Ordentlichen Mitgliederversammlung am 22. April 1995, 11.00 Uhr, in Mosbach - Neckarelz (Pattberghalle) ein.

Tagesordnung:

1. Feststellung und Genehmigung der Tagesordnung
2. Genehmigung des Protokolls der letzten Mitgliederversammlung vom 17.04.1993 (siehe T+K (1993) 60:90-92)
3. Jahresbericht des Präsidenten und der Arbeitsgruppenleiter
4. Antrag auf Satzungsänderung
5. Antrag auf Änderung der Richtlinien für die Erteilung der Anerkennung als Forensischer Toxikologe GTFCh
6. Bericht des Schatzmeisters und der Kassenprüfer
7. Entlastung des Vorstandes
8. Wahl des Vorstandes
9. Verschiedenes

gez. Prof.Dr. M. Möller, Präsident der GTFCh

Ausschreibung:

Förderpreis für junge Wissenschaftler der GTFCh

1985 wurde von der Mitgliederversammlung in Mosbach beschlossen, einen Förderpreis zu verleihen. Die Auszeichnung wird an Wissenschaftler verliehen, die nicht älter als 40 Jahre sind und die sich durch Arbeiten auf dem Gebiet der Forensischen Chemie oder Forensischen Toxikologie, die neue und originelle Ideen enthalten und Anstöße zu neuen Erkenntnissen geben, hervorgetan haben.

Der Preis ist mit einer Geldzuwendung verbunden.

Mitglieder der GTFCh können sich selbst um den Förderpreis bewerben oder andere vorschlagen.

Qualitätskontrolle in der klinischen Toxikologie in den Niederlanden 1977-1994: Ein über 17 Jahre erprobtes Modell. Attraktiv für Europa?

Ido C. Dijkhuis

Gesellschaft für Qualitätskontrolle klinischer Arzneimittelanalysen und Toxikologie (KKGTT), Zentrale Krankenhausapotheke, Postbus 43100, NL-2504 AC Den Haag, Niederlande.

Einleitung

Die ersten Vorstudien für unsere Ringversuche im 'therapeutic drug monitoring' (TDM) und in der klinischen Toxikologie fanden 1973 statt. In diesem Jahr entschlossen sich 8 Krankenhausapotheker und 2 klinische Chemiker zu einem Ringversuch für Phenobarbital und Phenytoin im Serum. Die Materialien, Seren mit exakt eingewogenen Mengen an Medikamenten, wurden in der Zentralapotheke der Den Haager Krankenhäuser hergestellt. Obwohl die Ergebnisse für diese Zeit nicht schlecht waren - die photometrischen Methoden waren schon durch die Gaschromatografie ersetzt worden - sollten sie noch erheblich verbessert werden, um mit Hilfe der Laborergebnisse die Dosierung von diesen Medikamenten steuern zu können.

In Großbritannien war Richens schon einige Jahre mit Phenytoin-Ringversuchen beschäftigt, in den USA führte Pippenger 1974 mit ca. 100 Laboratorien einen Ringversuch mit 4 Antiepileptika durch, worüber 1976 in *Arch. Neurology* berichtet wurde: die Streuung der Laborwerte war enorm. Für die Glaubwürdigkeit der TDM-Labors war es also dringend notwendig, an den Analysemethoden und an der 'Lab Performance' zu arbeiten. Was bis dahin nur ausprobiert worden war, wurde ab 1977 professionalisiert.

1977 wurden die Ringversuche strukturell begonnen, d.h. gegen eine bestimmte Jahresgebühr konnten Krankenhauslabors an den TDM-Programmen 'Antiepileptika' und 'Cardiaca' und an dem Programm 'klinische Toxikologie' teilnehmen. Diese Jahresbeiträge sorgten von Anfang an dafür, daß die Organisation eine gewisse Unabhängigkeit besaß.

1978 haben wir den Ringversuchskoordinatoren Richens aus London, Pippenger aus New York und Nyberg aus Helsinki einen gemeinsamen Ringversuch mit 8 Antiepileptika vorgeschlagen. Dieser Ringversuch war ein großer Erfolg: ca. 630 Labors haben teilgenommen!

In späteren Jahren erweiterte sich das ganze Programm und besteht jetzt aus 5 TDM-Programmen, 2 toxikologischen und einem experimentellen Programm (schwierige Bestimmungen). Das Antibiotika-Programm ist ein edukatives kinetisches Programm, hauptsächlich zur Berechnung der Medikamentendosierungen. Übersicht in *Tabellen 1 und 2*.

Tabelle 1

KKGT EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME

<u>START</u>	<u>PROGRAM</u>	<u>COMP</u>	<u>1994</u>	<u>LABS</u>
1973	Antiepileptics	2		9
1977	Antiepileptics	8	5x	46→96
1977	Cardiacs	10	5x	33→84
➤ 1977	Toxicology	7	5x	29→61
1980	Antidepressants	9	5x	21→65
1980	Benzodiazepines	8	5x	21→42
1982	Antibiotics	6	5x	30→67
1988	"Experimentals"	2-4	5x	53→54
1994	Drugs of Abuse	6	3x?	46

Tabelle 2

INTERNATIONAL COOPERATION IN EQAS ON TDM/TOX

1976	AED's	NL (50) + BARTS (LONDON) (150)	200
1977	..	NORDKEM (SCAND.) (45)	45
1978	..	NL(50) + USA(420) + UK(100) + SC(60)	630
1980	..	INT. EXPERT GROUP BCR (20)	20
1980	DIGOXIN	NL (40) + LWBA (NL) (60)	100
1983	THEO/CAFF	NL (60) + HEATH (UK) (100)	160
1983	ANTIDEPR	NL (30) + HEATH (UK) (40)	70
1983	EUROTOX I	NL (45) + TIAFT (40)	85
1984	EUROTOX II	NL (49) + TIAFT (38) + CALIF. (47)	134
1990	EUROTOX III	NL (47) + EUR (54) + OTHER (30)	131
1993	TOXICOLOGY	NL (53) + GFTCH (30) + BLT (6)	89
1994	ANTIBIOTICS	NL (65) + HEATH (40) + OTHER(15)	120

Wie erwähnt, wurden in den Niederlanden die Serumproben für die Ringversuche von Anfang an in der Zentralapotheke in Den Haag hergestellt. Dieses Institut verfügt über eine Gefriertrocknungsabteilung, ein gut ausgestattetes Labor, gute Möglichkeiten zur Distribution der Materialien und Verarbeitung der Teilnehmerergebnisse. Da die Arzneimittel (und Gifte) körperfremde Substanzen sind, welche in reiner Form zur Verfügung stehen, können Test- und Referenzsera mit bekannten Konzentrationen ('true values') hergestellt werden.

Die Organisation wurde 1984 von der Gesellschaft für Ringversuche in TDM und klinischer Toxikologie (KKGT) übernommen. Da das Programm interkollegial ist,

Abb. 1

KKGT	Stichting Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelanalyse en Toxicologie		
CERTIFICAAT 1994			
Het klin. farm. & tox. laboratorium van het Ziekenhuis in onder supervisie van			
I heeft in 1993 in voldoende mate* deelgenomen aan onderstaande programma's en met voldoende resultaat** de uitslagen geleverd van de componenten:			
Antiepileptica	Cardiaca	Antidepressiva	Benzodiazepines
fenobarbital fenytoïne carbamazepine cbz-epoxide ethosuximide valproïnezuur clonazepam	theofylline coffeïne procaïnamide N-acetyl-PA digoxine flecaïnide	amitriptyline nortriptyline maprotiline desm.maprotiline imipramine desipramine clomipramine desm.clomipramine lithium	diazepam desm.diazepam temazepam oxazepam nitrazepam flunitrazepam desm.flunitrazepam
II heeft in 1993 in voldoende mate* deelgenomen aan onderstaande programma's:			
Antibiotica	Toxicologie	Experimenteel	
gentamicine tobramycine amikacine neltilmicine flucytosine			
* minimaal 3 uit 5 rondzendingen, ** minimaal 55 van 100 punten.			
dr. I.C. Dijkhuis voorzitter	drs. J.B.G.M. Noten secretaris		

hat kein Teilnehmer Sanktionen bei schlechten Ergebnissen zu befürchten. Es ist aber wichtig, daß man teilnimmt: für das KKG-T-Jahreszertifikat werden mindestens 3 Reports bei 5 Ringversuchen benötigt. Bei den routinemäßigen TDM-Programmen muß man dabei im Durchschnitt auch gute Testergebnisse haben. Bei dem Programm Toxikologie werden die Laborergebnisse nicht mitberechnet. Ein Beispiel eines KKG-T-Zertifikates 1994 zeigt Abbildung 1.

TDM sowie klinische Toxikologie gehören bei uns hauptsächlich zum Fachgebiet der Krankenhausapotheker, aber auch Klinische Chemiker nehmen an den Ringversuchen teil. Auch ausländische Krankenhauslabors können sich daran beteiligen: alle Labordaten sind auch in niederländisch einfach zu lesen; Kommentare, z.B. in toxikologischen Fällen, werden in englisch übersetzt.

Tabelle 3

CCKL - SECTIE I: BEROEPSBEOEFENAREN

<u>VAKGEBIED</u>	<u>VERENIGING</u>	<u>RING-ORG.</u>	<u>N</u>
THROMBOSE	F.N.T.	FNT + RELAC	170
STOLLINGS-LAB	C.C.K.L.	CCKL-CIE	130
HEMATOLOGIE	N.V.H.	S.K.H.L.	150
HEM.-ONCOLOGIE		S.I.H.O.N.	25
IMMUNOLOGIE	N.V.I.	S.K.M.I.	30
PARASITOLOGIE		C.P.L.D.	80
PATHOLOGIE	N.V.P.		
NUCL. GENEESK.	N.V.N.G.		
MICROBIOLOGIE	N.V.V.M.	S.K.M.M.	75
► FARMACIE/TOX.	N.V.Z.A.	K.K.G.T.	115
KLIN. CHEMIE	N.V.K.C.	S.K.Z.L.	220

Tabelle 3 zeigt einen Überblick über Fachgebiete, Berufsgesellschaften und Ringversuchs-Organisationen der niederländischen Krankenhauslabors. Alles wird von der *Koordinations Kommission Klinischer Laboratorien (CCKL)* koordiniert. In Zukunft wird die CCKL wahrscheinlich auch die Zertifizierung der Berufs- oder Ringversuchorganisationen übernehmen (wie in Großbritannien die NEQAS).

Toxikologische Ringversuche

Im Unterschied zu den TDM-Ringversuchen, bei denen 'Direktbestimmungen' durchgeführt werden, müssen beim toxikologischen Ringversuch sowohl vor als auch nach der Laborarbeit Fallinterpretationen vorgenommen werden. Den Teilnehmern wird, wie in der klinischen Praxis, die Probe mit dem Hinweis 'Verdacht einer Vergiftung' zugesandt. Zunächst soll durch eine Identifizierung dieser Verdacht bestätigt werden. Erst dann erfolgt eine Quantifizierung. Nach jedem Schritt erfolgt der Abgleich mit

der Fallbeschreibung, d.h. die Interpretation der Laborbefunde: stimmen diese mit der Fallbeschreibung überein oder muß man weitersuchen?

Der niederländische Ringversuch für die klinische Toxikologie ist ein edukatives Programm, wobei jeder Fall eine bestimmte 'Botschaft' vermitteln soll. Später wird diese Botschaft bei der Besprechung der -anonymen- Laborergebnisse erklärt.

Es folgen einige Beispiele von toxikologischen Ringversuchen, 1977-1994.

Beispiel 1 (1980/'83).

'Ein Frühgeborenes (6 Monate, 900 Gramm) bekommt wegen Apnoe intravenös Theophyllin. Der Arzt ist sich über den Theophyllin-Blutwert unsicher und bittet das Labor, eine schnelle Theophyllinbestimmung durchzuführen.'

Diese Originalkasuistik im Grenzgebiet zwischen TDM und klinischer Toxikologie wurde den Teilnehmern 1980 vorgelegt; je 0.4 ml Serum wurde verteilt. (Wegen den damaligen chromatografischen Bedingungen hätte man zwar gerne mehr Material bekommen, bei solch einem kleinen Baby wollte man aber nicht mehr Blut abnehmen).

Die Botschaft dieses Falles war folgende: Bei normaler Schwangerschaftsdauer wird Theophyllin, wie bei Kindern und Erwachsenen, hydroxyliert und demethyliert. Bei Frühgeborenen findet diese Metabolisierung aber noch nicht statt. Theophyllin wird sogar *methyliert* und es entsteht Coffein. Dazu kommt, daß Frühgeborene für Coffein eine stark verlängerte Halbwertszeit haben: Coffein kumuliert also zu einer toxischen Konzentration!

Bei Frühgeborenen muß man darum nicht nur Theophyllin, sondern auch Coffein bestimmen.

Tabelle 4

THEOPHYLLINE TDM , THE HAGUE 1980

Premature newborn 950 g, treated for apnea: Theophyllin i.v. 8 mg/24 hrs. After temporary improvement it now seems to be intoxicated. Administration of T. is stopped until serum level is known. Material: 0,4 ml serum (heel prick blood).

<u>Assay method</u>	<u>Theophylline</u>	<u>Caffeine</u>
Chromatography	26	19
Assay ± 20%	24	13
Immunoassay	—	—
.....		
Theophylline 16.5 mg/l + Caffeine 38.4 mg/l		

Tabelle 5

THEOPHYLLINE-TDM, HAGUE & HEATH 1983***Theophyllin request:****"Premature newborn, receives theophylline I.V."**Note: Relevant metabolites should also be assayed.*

<u>EQAS</u>	<u>CROMATOGRAPHIC</u>		<u>Immuno</u>
	Theo + Caf	Theo	Theo
HEATH (60)	13	19	34
HAGUE (56)	28	16	12
.....			
Theophylline 10.02 mg/l + Caffeine 18.91 mg/l			

Für unseren Ringversuch haben wir, genau wie im Originalfall, Serumproben mit therapeutischer Theophyllinkonzentration und toxischem Coffeinwert hergestellt.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse: es gab 1980 bei uns noch keine immunchemische Methoden für Theophyllin, daher mußte die Bestimmung chromatografisch durchgeführt werden. Ca 50% der Labors bestimmten Coffein gut. Die Prüfung wurde 3 Jahre später, nachdem EMIT eingeführt worden war, wiederholt. Bei diesem Ringversuch haben die Teilnehmer von Heath Controll (Cardiff) auch mitgewirkt.

Tabelle 5 zeigt auch, daß von vielen Teilnehmern Immunoassays benutzt wurden, als wäre es eine Routine-Theophyllin-Bestimmung! Gerade dies sollte aber bei diesem Fall verhindert werden. Aber auch bei Labors mit chromatografischen Methoden waren die Ergebnisse bei langem nicht optimal: man hätte doch zwei Peaks sehen müssen!

Beispiel 2.(1978/'86/'88/'94)

'Ein 70-jähriger Mann mit folgenden Symptomen wurde eingeliefert: Koma III-IV .Grades (Reeds scale), Pupillenreflex positiv, Atemdepression, Temperatur normal, Blutdruck niedrig, EKG-unregelmässig. Die Familie erzählte, daß er die letzte Zeit depressiv gewesen sei und möglicherweise 2-3 Stunden vorher Medikamente eingenommen haben könnte. In seiner Wohnung fand man Verpackungen mit Mandrax, Diazepam, Barbitol, Chloral hydrat, Saridon und APC.

Im Krankenhaus wurde sofort eine Magenspülung vorgenommen: es wurden keine Tablettenreste gefunden. Die Beatmung wurde nach Intubation künstlich übernommen.

Ins Krankenhaus werden häufiger Patienten im Coma eingeliefert. Vor 20 Jahren war dann die erste Vermutung Barbitursäurevergiftung. Bei einem Coma mit Herzproblemen kamen die tricyclische Antidepressiva wie Amitryptiline in Frage. Aber auch Chloralhydrat erzeugt diese Symptome. Der Sinn dieses Ringversuchs war, die Teilnehmer darauf aufmerksam zu machen. Chloralhydrat wird schnell zu Trichlorethanol (TCE) transformiert, welches mittels der GC nachweisbar ist, aber oft vergessen wird. Van Heijst wies schon 1977 in der 'Ned.Tijdschrift voor Geneeskunde' darauf hin: 'Chloralhydrat, das vergessene Gift'.

Im Kommentar nach dem Ringversuch berichteten wir den Teilnehmern, daß Porapak-Säulen zwar für Methanol und Ethanol geeignet sind, aber daß man für höhere Alkohole, DEGS- oder Tenax-Säulen nehmen sollte. Mit Temperaturprogrammierung, z.B. bei Tenax, kann man alle Alkohole identifizieren und quantitativ bestimmen (Abb. 2). Serum kann direkt auf die Säule aufgetragen werden; wir empfehlen dies als *Routine* bei allen fraglichen Intoxikationen.

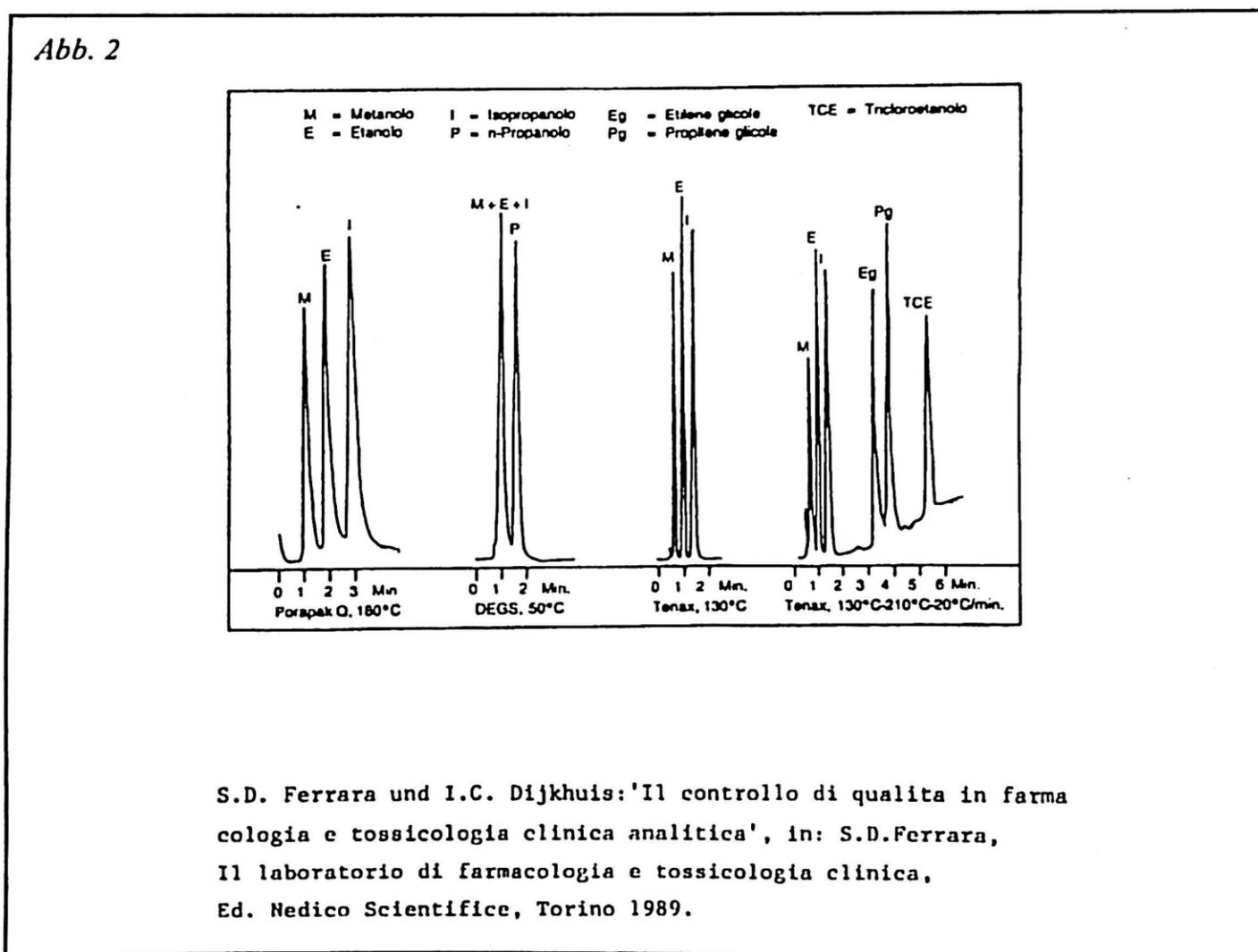


Tabelle 6 zeigt, daß es es sinnvoll ist, die Teilnehmer öfter an das 'vergessene Gift' zu erinnern! 1986, 1988 und 1994 wurde der Chloralhydrat Test wiederholt: in diesem Fallbericht war der Patient zwar komatös, aber Chloralhydrat wurde nicht als möglicher Verursacher des Komats erwähnt. Es ist bemerkenswert, daß in allen 4 Studi-

Tabelle 6

CHLORAL HYDRATE: THE FORGOTTEN POISON

	<u>1978</u>	<u>1986</u>	<u>1988</u>	<u>1994</u>
Participants	28	42	28	58
Identifications	9	19	5	14
Quantif. (± 30%)	7(5)	19(17)	5(3)	14(13)
<hr/>				
TCE, mg / L	168	128	24	63

en nur ca. 30% der Teilnehmer TCE identifiziert haben, daß aber nach der Identifikation die quantitative Bestimmung überhaupt kein Problem darstellte.

Beispiel 3 (1982)

'Eine 23-jährige Frau wurde nachts (0.05 Uhr) auf der Straße komatös aufgefunden; sie hätte spät am Abend nach einem Ehestreit die Wohnung verlassen. Bei Aufnahme ins Krankenhaus: tiefes Koma, totale Areflexie, weite, kaum auf Licht reagierende Pupillen, Atmung gut, Temperatur 35.6° C. Später 1 x Konvulsion und anschließend Atemstillstand: wird seitdem beatmet.

Blutdruck 105/70 mm Hg, Herzfrequenz 60/min., EKG zeigt Bundeltakblock rechts. Diurese 200 ml/U, Blutzucker 15.4 mmol. Ursache des Komas ist uns nicht klar: toxikologische Anhaltspunkte?'

Dieser Ringversuch wurde mit einem quasi Leerserum durchgeführt, da nur subtherapeutische Mengen an Diazepam und Desmethyldiazepam eingewogen waren: dies stellte eine Simulation eines komatösen Patienten mit einer Hirnblutung dar. Auch hier die übliche Praxis, daß der Arzt gleich alle Experten konsultiert: den Toxikologen, den klinischen Chemiker und den Neurologen.

Mit einer derartiger Frage sollte man im Labor im sauren und alkalischen Extrakt suchen und auch, wie bei Beispiel 2, ein Alkohol-Screening durchführen. Wenn man nichts finden kann, das Ergebnis aber in 3-4 Stunden vorliegen soll, dann sollte man den Mut haben, dem Arzt zu sagen: "Meiner Meinung nach ist es keine Vergiftung mit den üblichen Substanzen, die ein Koma verursachen können".

Toxikologische Ringversuche nutzen wir auch zur Untersuchung der 'Labor performance' bei systematischen Analysen; mit GC-MS (Beispiel 4) oder HPLC mit Diode Array (Beispiel 5).

Beispiel 4 (Eurotox 1990).

'Ein Labormitarbeiter wurde in seiner Wohnung subkomatös von seinen Freunden angetroffen. Er sagte, er habe nachts mit Strychnin Ratten-Giftwein hergestellt. Im Krankenhaus sehen wir aber keine für Strychnin typischen Spasmen. Der Mann hatte aber auch eine Verletzung an der Schulter: vielleicht ist er gefallen. Das klinische Labor berichtete, daß der CPK-Wert hoch sei.'

Tabelle 7

EUROTOX 1990-2. IDENTIFICATION OF STRYCHNINE		
<u>METHODS</u>	<u>POS</u>	<u>NEG</u>
TLC	20	8
GC-packed	3	-
GC-cap + NPD/FID	19	3
GC-cap + MS	9	5
HPLC-SP	6	-
HPLC-RP + UV	9	1
HPLC-RP + DAD	2	-

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse: obwohl Strychnin in der Kasuistik genannt wurde, haben viele Laboratorien es nicht gefunden; auch nicht mit GC-MS, vermutlich weil die Säulentemperatur ziemlich hoch sein muß und man offenbar vorher keine Strychnin Referenzen geprüft hatte. Dies war vielleicht die wichtigste Botschaft dieses Falles.

Die HPLC mit Diode Array, brachte viel bessere Ergebnisse. Auch die quantitativen Daten wurden mit HPLC gut bestimmt.

Beispiel 5 (Cito-Tox 1994)

Wir wollten untersuchen, ob man im Ringversuch, mit den heutigen Postverbindungen und Fax, eine klinische Frage in 4-5 Stunden lösen könnte.

Auch wollten wir untersuchen, welche Ergebnisse die HPLC-Labors mit systematischer Analyse durch Diode Array und mit Hilfe der Merck's Substanzliste -HPLC-

Tabelle 8

KKGT Citotest Clinical Toxicology 1994

Fax to KKG, The Hague. Deadline max. 8 hrs.

CLINICIAN'S LAB REQUEST

This patient, a 65 year old male, has been admitted to our hospital in coma grade II-III (Reeds scale). According to his neighbours, in the past the man was visiting a psychiatrist; as to the present situation, they could not give relevant information on this point.

Recent intake of drugs with or without alcohol is most likely, so we will perform stomach lavage. Please do some serumanalysis and send me your results as soon as possible. Afterwards we will discuss how to handle this case.

STIP genannt- bei Komponenten *ohne* UV-Spektrum erhalten würden: wie bei der DC mit Fluoreszenz quenching, *sieht* man die Substanzen ja in der systematischen HPLC-Analyse nicht!

Der Fall ist in *Tabelle 8* beschrieben. Wie bei allen unbekanntem Intoxikationen mit Coma, sollte man nach Schlafmitteln und nach Alkohol suchen. Der Patient befand sich in der Vergangenheit in psychiatrischer Behandlung, die Labors sollten hier also auch den Nachweis auf mögliche Antidepressiva führen.

Tabelle 9

KKGT Citotest 1994. Results identifications (61).

<u>COMPONENTS</u>	<u>TLC</u>	<u>GC</u>	<u>-MS</u>	<u>HPLC</u>	<u>-STIP</u>	<u>POS.</u>
Meprobamate	3	4	4	-	1	11
Cyclobarbital	9	5	4	8	19	35
Bromisoval	2	1	4	6	25	37
Ethanol	-	38	-	-	-	58
Amitriptyline	2	1	2	9	25	37
Nortriptyline	2	-	1	9	23	33

.....
Meprobamate 108.9, Cyclobarbital 13.41, Bromisoval 30.39,
Ethanol 2829, Amitriptyline 0.141, Nortriptyline 0.141 mg/l.
.....

Response: < 4 hrs: 22, 4-6 hrs: 21, 6-8 hrs: 21, > 8 hrs: 2

Tabelle 10

KKGT PROGRAMMA TOXICOLOGIE AUGUSTUS 1977 - JANUARI 1994

<u>Naam</u>	<u>Informatie</u>	<u>Naam</u>	<u>Informatie</u>
Alkohol	77-I,78-A,78-G,82-C,85-C,86-C,87-A,89-A,90-Int,90-E,91-B,Prof-93	levomepromazine	83-D
Amantadine	87-A	lidocaïne	79-V
amfetamine	79-II,85-D	lithium	84-Int,88-A
amiodaron + M	85-E	lorazepam	88-E,90-Int
amitriptyline	77-III,79-V,83-Int,89-A	Maprotiline	81-C,84-Int,88-A
amobarbital	80-C,84-Int	meprobamaat	82-B,91-B
APC/aspirine	78-C	mesuximide	87-D
Barbital	77-V	methadon	79-II,85-D,92-C
benzoylecgonine	85-D	methanol	79-I,82-E,83-Int,90-E
boorzuur	81-A,91-D	methaqualon	77-IV,78-A,78-F
brallobarbital	77-II,78-B,83-Int,86-A,89-B	midazolam	88-E
bromazepam	88-F	moduretic	82-D
bromide	77-VI,78-D,78-H,83-C,84-5	morfine	79-II,83-Int,85-D,87-B,Prof-93
bromural	(77-VI),78-H,84-5	Nitrazepam	88-C
bupivacaïne	92-A	nortriptyline	79-V,83-Int,89-A
butalbital	88-B	Orfenadrine + M	79-III,83-B,84-Int,91-A
butobarbital	78-E,83-D	oxazepam	83-Int,88-E,90-Int,93-B
Carbamazepine	85-A,87-D	oxyfenbutazon	81-D
carbromal	87-D,83-C,84-5	Papaverine	83-E
chloordiazepoxide	77-III,87-A,89-A,90-D	paracetamol	77-I,78-C,80-B,89-D,90-Int,91-C
chloroquine	86-B,90-Int	paraldehyde	85-B
cimetidine + M	88-B	paraquat	82-A
clomipramine + M	81-C,93-E	parathion	93-A
codeïne	92-B	pentazocine	93-C
coffeïne	77-I,80-A,88-B	pentobarbital	81-A,87-C,92-E
cyanide	81-B,81-E	periciazine	90-F
cyclobarbital	82-B	pthidine	79-II
Desalkylflurazepam	80-C	promethazine	90-D
desmethyldiazepam	82-C,87-D,89-B,92-D,93-A	propranolol	79-IV,87-A
dextropropox + M	78-G,80-B,84-Int,90-Int	propyfenazon	88-B
diazepam	77-III,82-C,93-A,Prof-93	Salicylzuur	77-I,78-C,78-G,87-A
diethyleenglycol	85-C	secobarbital	77-II,80-C,83-Int,86-A,89-B,90-Int
difenhydramine	78-D,78-F	sotalol	88-D
digoxine	89-E	strychnine	89-C,90-Int
dosulepine + met.	87-E	Temazepam	88-E
Ethyleenglycol	79-I,85-C,90-E	tetracycline	80-D
Fenfluramine	91-E	thallium	78-B,88-C
fenobarbital	78-D,79-III,83-C	theofylline	80-A,84-Int,90-D
fenylbutazon	81-D	thiocyanaat	85-E
flecaïnide	86-D	thiopental	81-A,87-C
flunitrazepam + M	81-E,84-4,87-B,Prof-93	thioridazine	84-Int
flurazepam	80-C	tofencine	91-A
Gluthetimide	77-V,78-F	trazodon	93-A,93-C
Haloperidol	84-Int,88-A	triamtereen	82-D
heptabarbital	85-B	trichloorethanol	78-A,78-H,86-C,88-E
hexapropymaat	78-E,78-H,82-E	trimipramine	79-VI
Ibuprofen	81-D,89-D	Valnoctamide	79-IV,88-B,91-C,93-B
Ketamine	88-E	valproïnezuur	87-D
kinidine	83-E	verapamil + M	88-D
koolmonoxide	81-E	vinylbarbital	77-VI
kwik	81-F,83-Int	Warfarine	89-C
Lasix	82-D	Zuclopentixol	88-A

Als Basis hatten wir Serum mit therapeutischen Mengen Amitriptylin und Nortriptylin hergestellt. Dazu fügten wir 3 Schlafmittel in leicht toxischen Konzentrationen: Meprobamat, Cyclobarbitol und Bromisoval. Und zuletzt, logisch in solchen Fällen, viel Alkohol.

Tabelle 9 zeigt, daß für die HPLC-STIP auch die kleinen Mengen Amitriptylin und Nortriptylin keine Probleme darstellten, daß aber eine toxische Konzentration an Meprobamat nicht gefunden wurde. Bei der DC wurde dieser Substanz nur gefunden, wenn die Platten mit Ehrlich's Reagenz oder mit Furfural besprüht wurden. Mit GC-MS stellte die Analyse aber kein Problem dar. Cyclobarbitol kann mit allen Methoden gut identifiziert werden, aber von den 50 Labors die 'Barbiturat positiv' berichteten, haben nur 35 Cyclobarbitol identifiziert. Bromisoval kann am besten mittels HPLC identifiziert und quantifiziert werden. Alkohol stellt für kein Labor mehr ein Problem dar.

Der Rücklauf war unglaublich; um 90%! 61 Labors haben teilgenommen, dabei auch aus Berlin, Homburg, Zürich, Brüssel und London. Das Material wurde in den Niederlanden überall am folgenden Tag ausgeliefert, im Ausland nur einen Tag später.

20 Labors haben innerhalb von 4 Stunden ihre Ergebnisse gefaxt, ebenfalls 20 zwischen 4 und 6 Stunden, 19 zwischen 6 und 8 und nur 2 Labors brauchten mehr als 8 Stunden für die Analyse. Also ein großer Erfolg!

Die Zukunft

Das Modell der edukativen Ringversuche in der Toxikologie haben wir während nunmehr 17 Jahren erprobt; nach der Meinung der Teilnehmer ist es ein ausgezeichnetes Programm. Der durchschnittliche Rücklauf beträgt ca. 70%. In den vergangenen 17 Jahren wurden ca. 80 Fälle untersucht und damit 120 verschiedene Substanzen identifiziert und quantifiziert (*Tabelle 10*). Auch wurde bei jedem Fall die Interpretation und die Behandlung diskutiert. Wir sind davon überzeugt, daß nur interkollegiale Ringversuche ohne Sanktionen eine Chance haben, die Lab-Performance zu erhöhen.

Nach den Maastrichter Verträgen zu einem harmonisierten Europa sind wir noch mehr davon überzeugt, daß internationale Kooperationen von großem Nutzen sind. Daher werden wir unsere Bemühungen fortsetzen. Von diesem Jahr an wird unser Programm Toxikologie auch ins Englische übersetzt, um die Teilnahme von ausländischen Laboratorien zu erleichtern. Eine direkte Übertragung des niederländischen KKGIT-Programmes in ein europäisches Programm ist nicht leicht und war von uns nicht vorgesehen. Die mit klinischer Toxikologie beschäftigten professionellen Organisationen sind in den einzelnen Ländern sehr verschieden und auch die unterschiedlichen Sprachen stellen ein gewisses Problem dar. Ein Austausch der Kasuistik, der Materialien und der Laborergebnisse wäre aber gut möglich und sicher für alle befruchtend.

Amineptine abuse detected by hair analysis

P. Kintz

Institut deMedicine Legale, 11 Rue Humann, 67000 Strasbourg, France

Amineptine is a stimulant of the central nervous system whose biochemical and pharmacological effects appear to act on the dopaminergic system. In France, amineptine is marketed as an antidepressant since 1978 under the name survector^R (100 mg amineptine, tablets). The usual daily dose is 100 to 200 mg orally (1). Few cases of amineptine abuse have been reported in the literature, all involving severe acne lesions (2-4). The lesions appeared after self-administration of high doses of the drug over long periods of time. Recently, our laboratory was contacted by the Dermatology Unit of the Centre Hospitalier Universitaire of Strasbourg for a suspected case of amineptine abuse.

Case history

On August 8, 1994 our laboratory was requested to evidence amineptine abuse in a 45 year old man, admitted to the Dermatology Unit with extremely severe acne lesions. They mainly occurred on the face, back and thorax, but were also found on the extremities. The subject was previously admitted in a detoxification centre, and assumed to be amineptine free since July 28, 1994. The medical investigation revealed a daily consumption of 3 boxes of survector, which represents 60 tablets of 100 mg. As it was not possible to evaluate the degree of severity of the intoxication by blood analysis (as the patient had stopped since 10 days his consumption) a strand of hair was collected in the vertex region.

Sample extraction

The hair, about 6 cm, was decontaminated by washing the specimen two times in 5 ml dichloromethane for 2 min at room temperature, and then cut into 2 segments of 3 cm, each corresponding roughly to a growth period of 3 months. The segments of hair were pulverized in a ball mill and then incubated at 56°C overnight in 1 ml 0.1 M HCl, in presence of 100 ng of opipramol, used as internal standard. Samples were extracted with 10 ml ethyl acetate, under alkaline conditions (2 ml of phosphate buffer at 1 mol/l and pH 8.4). After agitation and centrifugation, the organic phase was removed and evaporated to dryness at 45°C in a Speed Vac Concentrator. Meth-Prep II (m-trifluoromethylphenyl-trimethylammonium hydroxyde, Alltech) (30 µl) was added to the dry extract, which was sealed and maintained at ambient temperature for 20 min. A 1 µl portion of the derivatized extract was injected into the GC column, via a 7673 HP autosampler. The GC/MS system consisted of a Hewlett Packard (5890) chromatograph with a mass selective detector (5989B), operated at 70 eV with an ion source temperature of 200°C. The electron multiplier voltage was set at +400 V above autotune voltage. The MSD was daily autotuned with perfluorotributylamine. Carrier gas (helium, purity grade N55) flow through the column (HP-5 MS capillary column, 5% phenyl-95% methyl siloxane, 30 m x 0.25 mm i.d.) was 1.0 ml/min. The column oven temperature was

programmed from an initial temperature of 60°C to 290°C at 30°C/min and maintained at 290°C for the final 5 min. Splitless injection with a split valve off-time of 0.75 min was employed. Injector temperature was 260°C. Analytes were identified and quantified based on comparison of retention times and relative abundance of two confirming ions to the internal standard. For quantification, the ions *m/z* 192 and 206 were used for amineptine and opipramol respectively. Standard calibration curves were obtained by adding 25 (0.5 ng/mg), 50 (1.0 ng/mg), 100 (2 ng/mg), 500 (10.0 ng/mg) and 2500 (50 ng/mg) ng of amineptine, prepared in methanol, to 50 mg of pulverized blank control hair (obtained from laboratory personnel and previously tested to be drug-free). Recovery and day to day precision were determined by adding 100 ng of amineptine to 50 mg of pulverized blank control, corresponding to 2 ng/mg hair.

Results and discussion

The use of trimethylphenylammonium hydroxyde as a methylating agent was recently proposed for the analysis of meprobamate (5) and found suitable for amineptine, with its amino acid side-chain attached to the tricyclic nucleus. After methylation of the acid function, no tailing peak was noticed. Retention times were 8.84 and 9.52 for amineptine and opipramol, respectively. Figure 1 is the SIM chromatogram obtained from segment 2. Figure 2 shows the corresponding electron impact of amineptine. The assay method is a modification of a previous paper where amineptine was identified in blood (6), and extended here to hair. Hair analysis for drugs provides long term information on an individual's drug use, in contrast to blood or urine analysis' short term informations of a few hours or days. In fact, the two tests complement each other (for hair testing, see the review on ref 7). Analytical parameters of the method are presented in Table 1. Linearity was observed from 0.5 to 50 ng/mg, with a coefficient of correlation of 0.997. The concentrations measured in the hair segments were

- segment 1 (root to 3 cm) : 12.23 ng/mg
- segment 2 (3 cm to end) : 8.06 ng/mg

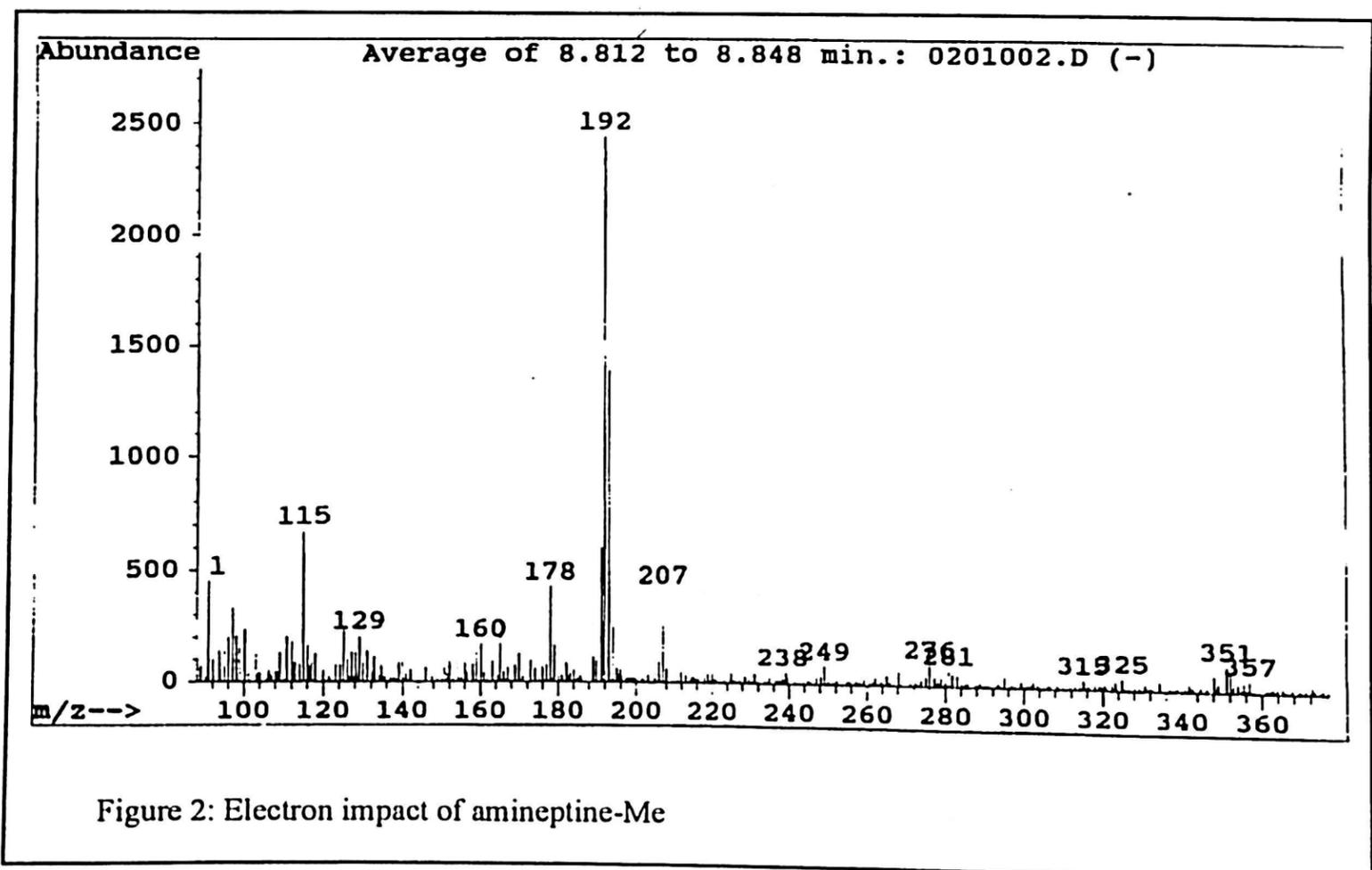
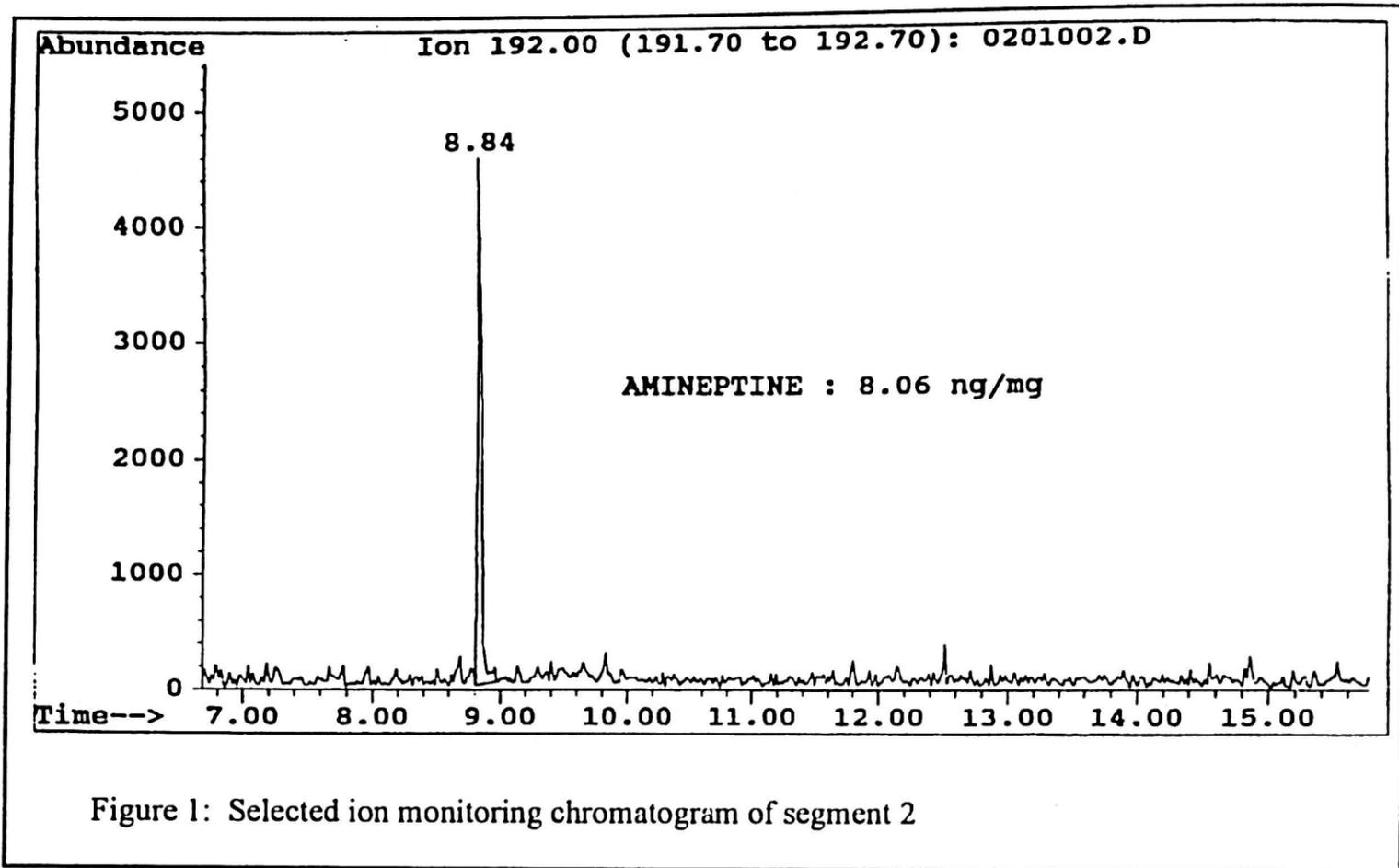
To the best of our knowledge this is the first report presenting data on amineptine testing in human hair. Beyond the analytical informations, the present paper clearly demonstrates the usefulness of hair testing when classic biological samples are without any interest.

Table 1

Analytical parameters of the method

Recovery (n=4) (%)	Within nun precision (n=8) (%)	Limit of detection (ng/mg)
78.2	9.4	0.1

Recovery and within nun precision were studied at 2 ng/mg.



References

1. Lachatre G, Piva C, Riche C, Dumont D, Defrance R, Macaer E, Nicot G. Single dose pharmacokinetics of amineptine and of its main metabolites in healthy young adults. *Fundam Clin Pharmacol*, 1989, 3, 19-26.
2. Vexian P, Gourmel B, Castot A, Husson C, Rybojad M, Julien R, Fiet J, Hardy N, Puissant A, Cathelineau G. Severe acne due to chronic amineptine overdose. *Arch Dermatol Res*, 1990, 282, 103-107.
3. Vexian P, Gourmel B, Julien R, Husson C, Fiet J, Puissant A, Dreux C, Cathelineau G. Severe acne-like lesions caused by amineptine overdose. *Lancet*, 1988, Mar 12, 585.
4. Kamoun A. Amineptine. Clinical review. *L'Enéphale*, 1979, 5, 721-735.
5. Kintz P, Mangin P. Determination of meprobamate in human plasma, urine and hair by gas chromatography and electron impact mass spectrometry. *J. Anal Toxicol*, 1993, 17, 408-410.
6. Sbarra C, Negrini P, Fanelli R. Quantitative analysis of amineptine (S-1694) in biological samples by gas chromatography-mass fragmentography. *J Chromatogr*, 1979, 162, 31-38.
7. Kintz P. Forensic Scientific Examination of human hair : detection of drugs. In *Forensic Sciences*, Cyril Wecht ed, Matthew Bender Publisher, New York, 1993, 37D, 1-32.

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Flunitrazepam (Rohypnol^R) im Urin

M. Edler, R. Schlüter

Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Eberhard und Partner, Brauhausstr. 4, 44137 Dortmund

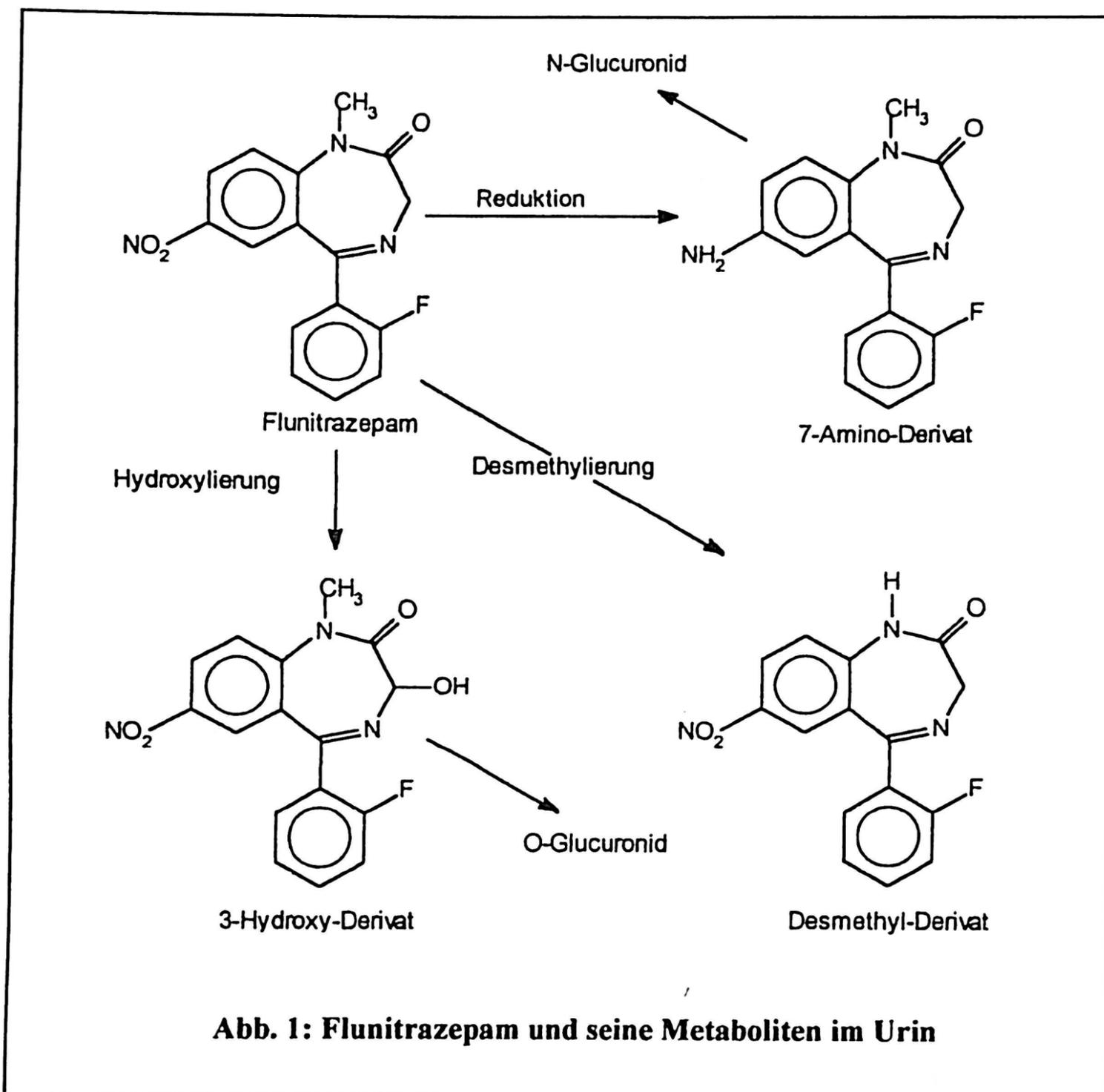
Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Flunitrazepam im Urin vorgestellt und mit anderen Methoden verglichen. Die einzelnen Arbeitsschritte wie Extraktion, Derivatisierung, DC-Trennung und -Detektion wurden optimiert und in ein bestehendes Drogenscreening-Programm integriert.

Einleitung

Flunitrazepam ist ein 1,4 - Benzodiazepin, das als sehr starkes Schlafmittel, besonders in Kreisen von Drogenabhängigen, mißbräuchlich verwendet wird. Dieser Mißbrauch macht es notwendig, Flunitrazepam mit Drogenscreeningmethoden sicher zu erfassen. Bestehende Screeningmethoden sind auf Patienten, die an Drogensubstitutionsprogrammen (z.B. Methadonprogramm) teilnehmen, zurechtgeschnitten. Als Untersuchungsmaterial dient dabei in der Regel der Urin des Patienten. In der Vergangenheit zeigte sich, daß bisher angewandte Screeningmethoden, wie z.B. EIT (enzymatisch immunologischer Test) keine zuverlässigen Ergebnisse liefern konnten¹⁾. Auch die Nachweisverfahren mittels GC/MS erwiesen sich als störanfällig. Dies beruht auf den geringen Konzentrationen der Flunitrazepammetaboliten im Urin im Vergleich zu den hohen Konzentrationen der konsumierten Drogen/Substitutionsmittel, z.B. Dihydrocodein (Remedacen^R). Deswegen besteht die Nachfrage für Methoden, die aus Urin kostengünstig zuverlässige Ergebnisse für den Nachweis von Flunitrazepam liefern. Als besonders kostengünstige und unkomplizierte Methode hat sich die Dünnschichtchromatographie seit langem für das Drogenscreening bewährt. Es erscheint notwendig, ein nachweisstarkes und zuverlässiges Verfahren des Flunitrazepamnachweises in ein bereits bestehendes dünnschichtchromatographisches Screeningverfahren zu integrieren. Diese Arbeit lehnt sich an das von E. INTERSCHICK et al. beschriebene Drogenscreening an²⁾.

Pharmakokinetische Untersuchungen zeigen, daß Flunitrazepam einer umfangreichen Biotransformation unterliegt³⁾. Das 7 - Amino - Derivat, das 3 - Hydroxy - Derivat und das Desmethyl-Derivat werden als Hauptmetaboliten mit dem Urin ausgeschieden. Diese Metaboliten treten im Urin als Glucuronsäureaddukte auf. Betrachtet man die funktionellen Gruppen, die allen drei Molekülen gemeinsam sind, so fällt als erstes die Anwesenheit von stickstoffhaltigen Gruppen auf, die durch Reduktion mit TiCl₃ Lösung in kupplungsfähige, primäre Amine überführt und letztlich leicht als Azofarbstoff detektiert werden können (Abb. 2)⁴⁾.



Die Abbildung 2 zeigt verschiedene Möglichkeiten der Derivatisierung von Flunitrazepam. Ziel dieser Derivatisierungen ist es, Flunitrazepam bzw. das Hauptfragment (Benzophenon) in visuell leicht detektierbare Stoffe (Azofarbstoffe/Acridon-Derivat) zu überführen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die einzelnen Schritte der Derivatisierung, die zu dem Azofarbstoff 1 führen, genauer beschrieben.

Durchführung

Geräte und Chemikalien:

Linomat III
DC-Platten:

Extrelut^R

Titantrichlorid-Lsg (30 % stabilisiert mit 10 % HCL)

Doppeltrogkammer (100x100x50 mm) CAMAG
CAMAG, Muttenz, Schweiz

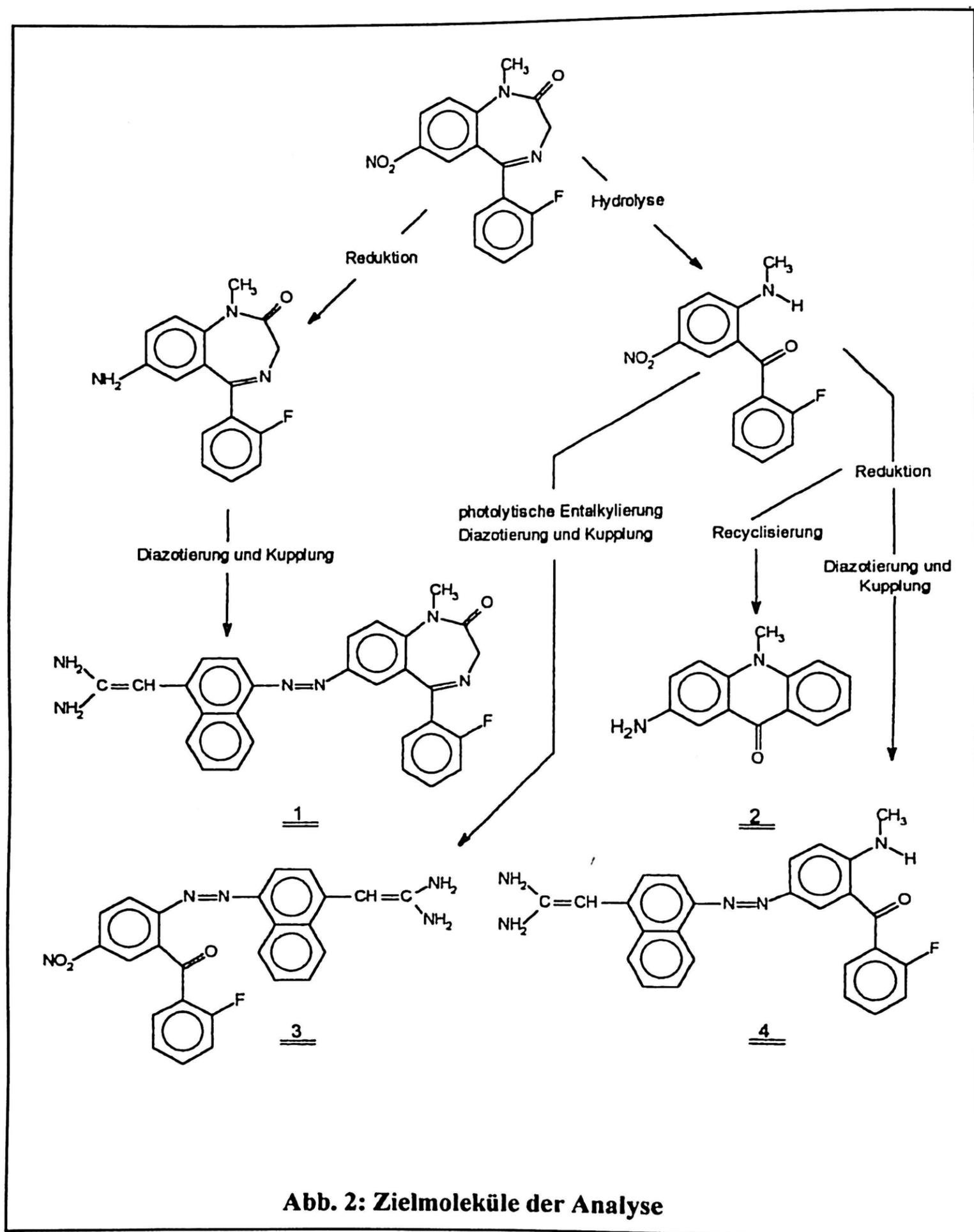
100 x 100 mm Kieselgel 60F251^R

E. MERCK, Darmstadt

E. MERCK, Darmstadt

E. MERCK, Darmstadt

Alle benutzten Lösungsmittel wiesen p.A. Qualität auf und wurden von der Fa. J. T. BAKER B. V., Deventer, Niederlande bezogen.



Da die Metaboliten des Flunitrazepams als Glucuronsäureaddukte im Urin auftreten, ist ein Aufschlußverfahren notwendig. Die saure Hydrolyse erwies sich als geeignetes Aufschlußverfahren. Bei der sauren Hydrolyse wurden 4 ml Urin mit 0,6 ml Salzsäure (12 m) versetzt und 10 min im Wasserbad bei 100 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 0,6 ml gekühlter (-25 °C) Kaliumhydroxidlösung (12 m) neutralisiert und durch Zugabe von 1 ml Ammoniumsulfatlösung (30%ig) auf den pH-Wert 9 bis 9,5 eingestellt.

Das erhaltene Hydrolysat wurde auf eine mit 4g Extrelut^R gefüllte Glassäule gegeben und nach einer Einwirkzeit von 10 min mit 15 ml eines Gemisches aus Dichlornethan und Isopropanol (85 : 15) eluiert. Nach der Extraktion wurden die Lösungsmittel durch Verdampfen unter Argonatmosphäre aus dem Eluat entfernt. Diethylether und Ethylacetat erwiesen sich ebenfalls als verwendbare Elutionsmittel. Hinsichtlich der Integrierbarkeit des Flunitrazepamnachweises in das bereits bestehende dünnschichtchromatographische Screeningverfahren empfiehlt es sich, das oben genannte Elutionsmittelgemisch zu verwenden, da dieses seit langem erfolgreich eingesetzt wird.

Der nach der extraktiven Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde in 50 µl Methanol aufgenommen. Die Reduktion der Nitrogruppe zum primären Amin erfolgte vor dem Entwickeln auf der DC-Platte durch Zusatz von 30%iger Titantrichloridlösung. In einer Mikroliterspritze wurden 5 µl salzsaurer Titantrichloridlösung vorgelegt und 5 µl des methanolischen Extraktes hinzugefügt, vermischt und mit Hilfe eines Auftragegerätes (CAMAG Linomat III) auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F254^R) aufgetragen. Die Spot-Breite betrug dabei 5 mm. Im Anschluß daran wurde die Reduktion eingeleitet, indem die DC-Platte im Warmluftstrom solange auf 130° C erhitzt wurde, bis die blaugraue Farbe des Titantrichlorids verblaßte. Durch Bedampfen der Auftragespots mit Ammoniak wurde die Reduktion bis zur vollständigen Umsetzung geführt.

Umfangreiche Versuche zur Ermittlung eines Laufmittels zeigten, daß ein ternäres Gemisch aus Chloroform/Aceton/Ammoniak (60/30/5 v/v) eine hohe Trennleistung bei gleichzeitiger Minimierung von Interferenzen gewährleistet. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte in mit Laufmitteldampf gesättigten Normalkammern. Die Trennstrecke betrug dabei ca. 85 mm.

Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit "Bratton-Marshall-Reagenz" behandelt. Bei dem Reagenz handelte es sich um zwei Lösungen, die nacheinander durch Sprühen auf das Chromatogramm aufgetragen wurden. Die erste Sprühlösung ist eine 5 %ige wäßrige Natriumnitritlösung in 1 n HCl und dient zur Diazotierung der Aminverbindungen. Als zweite Sprühlösung dient eine Phenylethylendiamin-Lösung (0,4 g gelöst in 100 ml Methanol).

Nach dem Besprühen erschienen die gesuchten Metaboliten als zwei pink-violette Fraktionen. Bei der oberen Fraktion ($R_f = 0.71$) handelt es sich um den Azofarbstoff des 4-Amino-1-Methylamino-2'-Fluor-Benzophenons. Die zweite Fraktion ($R_f = 0.49$) ist der Azofarbstoff von 7-Amino-Flunitrazepam.

Die Identifikation beider Fraktionen stützt sich auf Untersuchungen mit GC/MS, Dünnschichtchromatographie und ¹H-NMR. Eine Probe der oberen Fraktion ließ sich durch NMR-Spektroskopie als 1-Methylamino-4-Nitro-2'-Fluor-Benzophenon identifizieren und konnte auf der DC-Platte reduziert und anschließend durch Diazotierung und Kupplung in einen Azofarbstoff überführt werden. Dies weist darauf hin, daß es sich bei der ersten Fraktion um das Amino-Benzophenon handelt. Die zweite Fraktion wurde durch GC/MS-Untersuchung als 7-Amino-Flunitrazepam identifiziert.

Die Identifizierung mittels Dünnschichtchromatographie basierte auf dem Vergleich der drei Metaboliten, Desmethyl-Flunitrazepam, 7-Amino-Flunitrazepam und Desmethyl-7-Amino-Flunitrazepam mit einer Positivprobe.

Ergebnisse und Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ermöglichen einen Vergleich der verschiedenen Nachweisverfahren. In der Regel wird zu solchen vergleichenden Betrachtungen die Nachweisgrenze als wichtiges Kriterium herangezogen.

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte über die Zugabe einer definierten Menge Flunitrazepam zu 4 ml Negativurin. Die Aufarbeitung des Urins erfolgte wie oben beschrieben und das Flunitrazepam wurde als Azofarbstoff detektiert. Die Nachweisgrenze für den Nachweis als Azofarbstoff liegt zwischen 100 und 150 ng/ml. Sie kann durch Auftragung eines größeren Extraktvolumens kaum gesenkt werden, da die gesuchte Fraktion durch die Eigenfärbung der Extrakte überlagert wird.

Parallel zu dem oben beschriebenen Nachweisverfahren wurde versucht, das Flunitrazepam gemäß der von H. H. van ROOIJ et al. beschriebenen Methode als Acridonderivat nachzuweisen (vgl. Abb.: 2 Derivat 2)⁵⁾. Eine Ermittlung der Nachweisgrenze für dieses Nachweisverfahren konnte aufgrund der nicht abzuschätzenden Verluste bei den Derivatisierungen (Hydrolyse und Recyclisierung) nicht vorgenommen werden. Die durchgeführten Untersuchungen an Positivurinproben weisen aber auf eine sehr niedrige Nachweisgrenze hin. Vergleiche mit der GC/MS zeigen, daß die dünn-schichtchromatographischen Methoden nachweisstärker sind. Bei der GC/MS liegt die Nachweisgrenze bei ca. 300 ng/ml. Untersuchungen an einem freiwilligen Probanden zeigten, daß nach einer einmaligen Einnahme von 4 mg Flunitrazepam dieses noch nach 130 Stunden nachgewiesen werden konnte. Der enzymatisch - immunologische Test lieferte schon nach ca. 44 h ein negatives Ergebnis.

Zu der Problematik der falsch-negativen Befunde für Flunitrazepam bei enzymatisch-immunologischen Tests sei hier auf die Literatur verwiesen¹⁾.

Zur Ermittlung möglicher Interferenzen wurden gezielt chemisch homologe Substanzen des Flunitrazepams herangezogen. Hierbei handelt es sich um die ebenfalls nitrierten 1,4-Benzodiazepine Clonazepam und Nitrazepam. Es wurde festgestellt, daß keine der beiden Substanzen mit Flunitrazepam verwechselt werden kann. Andere 1,4-Benzodiazepine, wie Bromazepam, Diazepam und Oxazepam interferierten ebenfalls nicht. Untersuchungen an Urinen, die mit Substanzen versetzt waren, die im Screeningprogramm erfaßt werden (Opiate, Amphetamine, Barbiturate, Phenacetylgruppe, Phenothiazine, tricyclische Antidepressiva) zeigten, daß keine Interferenzen auftraten, da diese Substanzen weitestgehend keine Farbreaktion mit "Bratton - Marshall - Reagenz" ergeben. Einzige Ausnahmen bilden dort die Para - Aminophenole (Metaboliten des Paracetamols), doch konnten hier die Interferenzen durch die geeignete Wahl des Fließmittels ausgeschaltet werden. In neuerer Literatur wird darauf hingewiesen, daß bei dem Nachweis als Acridonderivat Interferenzen mit Carbamazepin, Diclofenac und tricyclischen Antidepressiva auftreten können⁶⁾.

Bezüglich dieser Tatsache, und aufgrund des großen Arbeitsaufwandes erscheint der Nachweis von Flunitrazepam als Acridonderivat nur als bestätigender Einzelnachweis bei Abwesenheit der oben genannten Medikamente sinnvoll. Der Nachweis des Flunitrazepams als Azofarbstoff bietet hingegen sichere Ergebnisse bei guter Integrierbarkeit in ein etabliertes Drogenscreeningprogramm.

Da man bei dieser Art des Nachweises nicht an natürlich auftretende Metaboliten gebunden ist, sondern aus dem unmetabolisierten Wirkstoff den zur Detektion wichtigen Metaboliten (7-Amino-Flunitrazepain) generiert, besteht die Möglichkeit, auch aus Magenspülflüssigkeit den Nachweis von Flunitrazepam zu erbringen. Diese Tatsache macht diese Methode auch für die Notfalldiagnostik interessant, zumal bei akuten Intoxikationen ein Befund nach ca. 60 min vorliegen kann.

Literatur

- 1) H. SCHÜTZ, G. ROCHHOLZ, G. WEILER; *Klinisches Labor* **38**,150 (1992)
- 2) E. INTERSCHICK, H. WÜST, H. WIMMER; *GIT-Labor-Med.* **4**, 412-440 (1981)
- 3) R. C. BASELT; *Disposition of toxic drugs and chemicals in man (II)*, 328-329 Biomedical Publications Davis, California (1982)
- 4) H. SCHÜTZ; *J. of Chromatography* **168**, 429 (1979)
- 5) H. H. Van ROOIJ, A. FAKIERA, R. VERRIJK, W. SOUDIJN; *Anal. Chim. Acta*, **170**,153-158 (1985)
- 6) G. ROCHHOLZ, B. AHRENS, H. SCHÜTZ, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **44** (1),469-471(1994)

Personalia

Geburtstage

Frau Dr. Svetla Balabanova hat am 19. August 1994 ihren 65. Geburtstag gefeiert. Sie hat nach Erreichen der Altersgrenze das Institut für Rechtsmedizin der Universität Ulm verlassen und ist nun, wie sie mitteilte, freie Mitarbeiterin der Universität.

Verstorben:

Am Sonntag, den 20.11.94 ist unser Mitglied, Herr Leitender Chemiedirektor Dr. rer. nat. Emil Leucht, in Feldkirchen bei München verstorben. Herr Dr. Leucht war von 1972 bis 1979 Leiter der Abteilung Kriminaltechnik beim Bayerischen Landeskriminalamt.

Forensischer Toxikologe GTFCh

Herrn Dr. Bretislav Smysl vom Institut für Gerichtliche Medizin in Olomouc wurde im Kreis der "Forensischen Toxikologen GTFCh" aufgenommen. Die Anerkennungsurkunde wurde ihm in seiner Heimatstadt durch das Vorstandsmitglied der GTFCh, Dr. G. Megges, persönlich überreicht.

Neue Mitglieder

Herr Joachim Arlt, Institut für Pharmakologie u. Toxikologie, Universitätsklinikum Geb. 46, D-66241 Homburg/Saar. Tel.: 06841-166419, FAX: 06841-16605

Herr Alain Broillet, Institut für Rechtsmedizin, Bühlstr.20, CH- 3012 Bern. Tel.: 0041-31-6313967, FAX: 0041-31-6318580

Herr Dr. rer. nat. Michael Busley, Institut für Rechtsmedizin, Versbacherstr. 3, D-97078 Würzburg. Tel.: 0931-21380, FAX: 0931-29500

Herr Dr. rer. nat. Jose Cortes, Institut für Rechtsmedizin, Am Pulverturm 3, D-55131 Mainz. Tel.: 06131-172690 FAX: 06131-393183

Frau Dipl. Ing. Anja Galm, LC Labor Consult GmbH, Jahnstr. 116, D-64285 Darmstadt. Tel.: 06151-46767, FAX: 06151-495444

Herr Dr. Christian Giroud, Institut universitaire de Médecine légale, Rue du Bugnon 21 CH-1005 Lausanne. Tel.: +41-21-3132161, FAX: +41-21-3132191

Herr Dipl. Chem. Martin Hirsch, Institut für Rechtsmedizin, Prittwitzstr. 6, D-89075 Ulm. Tel.: 0731-5026872, FAX: 0731-5026875

Frau Dr. rer. nat. Stefanie Iwersen, Institut für Rechtsmedizin, Butenfeld 34, D-22529 Hamburg. Tel.: 040-47175417, FAX: 040-47173934

Herr Dr. sc. nat. Ivo Benedikt Niederer, Kantonspolizei KTD, Klosterhof 12, CH-9001 St. Gallen. Tel.: +41-71-214408, FAX: +41-71-232660

Herr Dr. Konrad Schlatter, Stadtpolizei Zürich, Wissenschaftlicher Dienst, Zeughausstr. 11/12, CH-8004 Zürich. Tel.: +41-12167840, FAX: +41-12413264

Herr Franz Schneider, Stadtpolizei Zürich, Wissenschaftlicher Dienst, Zeughausstr. 11/12, CH-8004 Zürich. Tel.: +41-12167842, FAX: +41-12413264

Herr Dr. rer. nat. Heiko Schwertner, ITMC-Marburg, Schwanallee 44, D-35005 Marburg. Tel.: 06421-13133, FAX: 06421-22147

Herr Dipl. Chem. Matthias Thoben, Institut für Rechtsmedizin, Fürstengraben 23, D-07743 Jena.
Tel.: 03641-632856, FAX: 03641-632837

Herr Dr. Kurt Zollinger, Stadtpolizei Zürich, Wissenschaftlicher Dienst, Zeughausstr. 11/12,
CH-8004 Zürich. Tel.: +41-12167840, FAX: +41-12413264

Austritte:

Herr Dipl.-Chem. Jon Magureau, Heidelberg

Videokassette Mosbach-Symposium 1993

Die auf Anforderung übersandte Videokassette (Länge ca. 2 1/2 Stunden) zum Mosbach-Symposium 15.-17. April 1993 enthält u. a.:

- *Bootsfahrt auf dem Neckar zur Burg Hornberg*
- *Vortrag von K. Nehm (BGH), weitgehend ungekürzt*
- *Laudatio und Festvortrag des Stas-Preisträgers M. Donike, weitgehend ungekürzt*
- *weitere Auszeichnungen und Titelverleihungen*
- *Ausschnitte aus einer größeren Anzahl von Vorträgen, deren Auswahl sich zufällig ergab, und zugehörige Diskussion*
- *Festbankett*
- *Ausschnitte aus der Mitgliederversammlung*

Interessenten wenden sich bitte mit Vorabzahlung des Unkostenbeitrages von DM 30,- an:
Doz. Dr. Fritz Pragst, Institut für Gerichtliche Medizin, Hannoversche Straße 6,
D-10115 Berlin

Buchbesprechung

Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluß

Forensische Interpretation und Begutachtung

Peter X. Iten, Institut für Rechtsmedizin der Universität Zürich 1994. 233 Seiten, 95 Abb.. ISBN 3-9520617-1-9. DM 50,- (Subskriptionspreis bis 31.12.94 DM 42,-).

F. Mußhoff, Düsseldorf

Mit dieser Monographie ist es dem Autor gelungen, ein hervorragendes Handbuch für Rechtsmediziner, Toxikologen, Ärzte und forensische Psychiater sowie ein Nachschlagewerk für Polizeibeamte und Juristen zu verfassen, das sich mit einem der aktuellsten Themen in unserem Fachbereich beschäftigt.

Die Zahl der Begutachtungen wegen Fahrens unter Drogen- und/oder Medikamenteneinfluss hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Gleichzeitig ist eine Diskussion um die Verminderung der Fahrtüchtigkeit und die mögliche Festsetzung von Grenzwerten entstanden. Bis heute gibt es noch keine festgelegten Normwerte und keine einheitliche Verfahrensweise bei der Begutachtung, ohnehin bedarf jeder einzelne Fall einer aufwendigen, individuellen Einzelexpertise. Dazu sollte der Gutachter neben seiner gesammelten Erfahrung über Kenntnisse aus dem Bereich der Pharmakokinetik sowie über Wirkungsverlauf und verkehrsmedizinisch relevante Wirkungen der Wirkstoffe verfügen.

Neben einer allgemeinen Einführung in die Thematik gibt das Buch praktische Anleitungen zur Begutachtung der Verminderung der Fahrfähigkeit durch Drogen/Medikamente, zur Interpretation und

Rückrechnung von Analysendaten und zum Aufbau von Gutachten im Textblocksystem, incl. zahlreicher Textbeispiele. Es werden Vorschläge für einen logischen Aufbau geboten, was Ordnung, Übersichtlichkeit und Vollständigkeit eines Gutachtens gewährleistet.

Hervorragend gestaltet sind die Datenblätter zu den am häufigsten mißbrauchten Stoffen (Opiate, Cocain, Cannabis, Amphetamine und Designer-Drogen, Methadon und Benzodiazepine). Sie enthalten jeweils umfassende Angaben zu Wirkungsverlauf bzw. den verkehrsmedizinisch relevanten Wirkungen, Pharmakokinetik (58 Blutspiegelgraphiken) und Pharmakodynamik. Neben einem allgemeinen Literaturverzeichnis ist für jede Substanzklasse die aktuelle Literatur ausgewertet und aufgelistet, so daß insgesamt ca. 500 Zitate zusammenkommen. Gerade dieser Teil erspart in seiner komplexen Zusammenfassung für jeden Betroffenen ein mühseliges Recherchieren nach relevanten Daten bzw. Arbeiten.

Somit kann das Buch jedem Gutachter, wie auch jedem Interessierten aus anderen Bereichen, wärmstens empfohlen werden.

Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

Präsident: Prof. Dr. Manfred Möller
Geschäftsstelle der GTFCh: Karl Schmidt
Landgrabenstraße 74 · D-61118 BAD VILBEL

Antrag auf Mitgliedschaft¹

Name:..... Titel:.....

Vorname:.....

Dienstanschrift

Institution:.....

Straße:.....Postfach:.....

PLZ:..... Stadt:.....Land:.....

Telefon: (.....).....FAX:.....

Diese Angaben werden im Mitgliederverzeichnis veröffentlicht!

Privatanschrift

Straße:.....

PLZ:..... Stadt:.....Land:.....

Telefon: (.....).....

Ich bin damit einverstanden, daß auch die Privatanschrift in dem Mitgliederverzeichnis veröffentlicht wird: ja/nein*

Geburtsdatum:.....

Korrespondenzadresse: Dienstanschrift/Privatanschrift*

* Nichtzutreffendes bitte streichen

.....
Ort

.....
Datum

.....
Unterschrift

¹Mitglieder können einzelne Personen und Personengemeinschaften werden. Für die Mitgliedschaft ist der Nachweis einer Tätigkeit im Bereich der toxikologischen und forensischen Chemie erforderlich. Sie kann auch von technischem Personal und von Studenten erworben werden. Kollektivmitglieder können Firmen und Institute werden (§2 der Satzung der GTFCh).

