



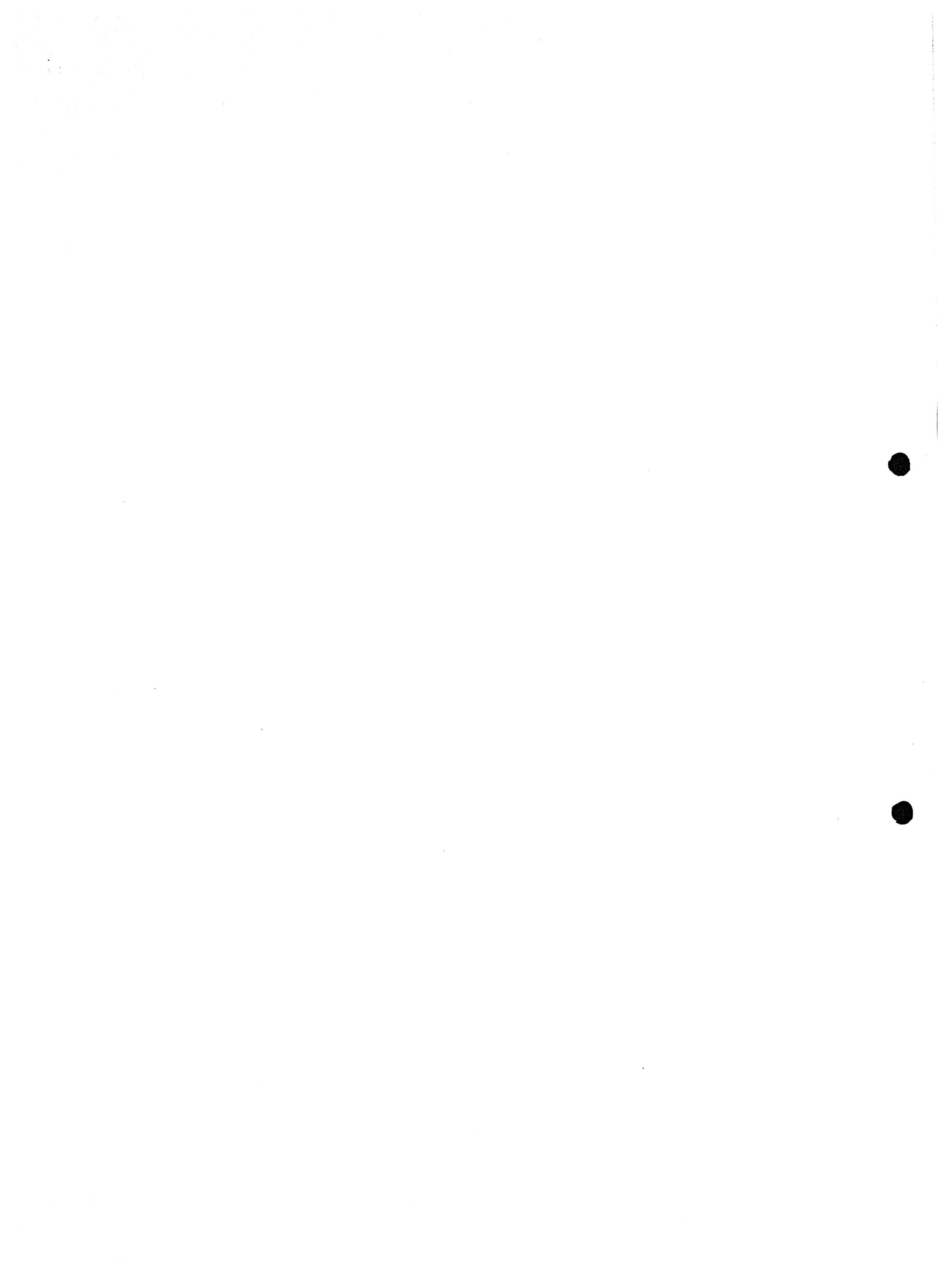
GESELLSCHAFT FÜR TOXIKOLOGISCHE UND FORENSISCHE CHEMIE

**Toxichem**

**+**

**Krimtech**

**63 (1)**





T + K (1996) 63 (1): 1-20  
Bd. 63 Nr. 1 April 1996

# TOXICHEM + KRIMTECH

Mitteilungsblatt der  
Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

Das Mitteilungsblatt erscheint dreimal 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. Frank Mußhoff  
Institut für Rechtsmedizin  
Heinrich-Heine-Universität  
Postfach 10 10 07  
D-40001 Düsseldorf

---

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

---

## Inhaltsverzeichnis

Seite

Vorankündigung: GTFCh-Workshop 10.10. - 11.10.1996 in Frankfurt am Main	2
U. Demme und R. Werner Erfahrungen mit EMIT II - Drogentests	3
A.J. Poortman-van der Meer and H. Huizer First Encounter with P-Fluorofentanyl in the Netherlands	7
H.M. Wolf und J.P. Weller Ultrafiltration als Probenvorbereitung in der toxikologischen Analytik	15

## **VORANKÜNDIGUNG:**

**Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie**

### **GTFCh-Workshop**

**10. und 11. Oktober 1996 in Frankfurt am Main  
im Zentrum der Rechtsmedizin**

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

anläßlich des letzten Workshops in Jena wurde beschlossen, daß der diesjährige Workshop der GTFCh vom 10. bis 11. Oktober in Frankfurt/Main stattfindet. Dieser Workshop ist dem Gedenken an Prof. Dr. Manfred Donike gewidmet.

- Themen:
- Derivatisierungsmethoden in der Haar- und Serumanalytik von Betäubungsmitteln
  - Nachweis von Designerdrogen
  - LSD-Analytik
  - Toxikologische Datenbanken im Internet
  - Erkennen von tierischen und pflanzlichen Vergiftungen

Der Workshop beginnt am 10.10. 96 um 13.00 Uhr und endet am 11.10.96 gegen 14.00 Uhr mit einer Abschlußdiskussion.

**Das endgültige Programm wird nach Anmeldung übersandt.**

Anmeldung zum Workshop bis zum 13.09.96: Prof. Dr. G. Kauert, z.Hd. Frau Appelbaum, Zentrum der Rechtsmedizin, Abt. II, Kennedyallee 104, 60596 Frankfurt am Main, Tel.: 069-6301 7573, Fax: 069-6301 5882.

Tagungsgebühr: DM 100.-

Im Hotel Ibis, Frankfurt/Main, Friedensbrücke, sind Hotelzimmer vorreserviert. Bitte dort unter dem Stichwort „Workshop 96“ selbst Zimmer bestellen (EZ: DM 125.- oder DZ DM 125.- + DM 15.- Frühstück pro Person). Tel. 069-273030, Fax 069-237024.

Das Hotel Ibis liegt direkt am Main auf dem Weg vom Hauptbahnhof zum Institut und ist von Frankfurt-Hauptbahnhof in ca. 10 Minuten Fußweg zu erreichen oder eine Haltestelle (Baseler Platz) mit den Straßenbahnlinien 16, 19 oder 21. Das Zentrum der Rechtsmedizin liegt vom Hotel ca. 10 Gehminuten entfernt.

G. Kauert

## Erfahrungen mit EMIT II - Drogentests

U. Demme und R. Werner

*Institut für Rechtsmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07740 Jena*

Seit 1993 sind die EMIT II - Reagentien für Drogentests im Urin auch in Deutschland erhältlich. Sie bestehen aus zwei lyophilisierten Komponenten und sind nach deren Auflösung gebrauchsfertig, d.h. die zusätzliche Verdünnung zu Arbeitslösungen wie bei den EMIT d.a.u.-Tests ist nicht mehr erforderlich. Nach Angaben des Herstellers (SYVA Diagnostika, jetzt Behring Diagnostika) sind die Assays für alle gängigen Analysengeräte geeignet. Sie sind zwölf Wochen haltbar, sollen - je nach Analysgerät - für mindestens 550 Bestimmungen ausreichen und eine erheblich stabilere Kalibrationskurve als die d.a.u.-Tests aufweisen. Als Beispiel ist im Firmenprospekt die Stabilität der Cocain-Eichkurve mit 14 Tagen angegeben.

Neben der Empfindlichkeit (d.h. ausreichender Anstieg der Absorptionsrate ( $\Delta E/\text{min}$ ) auch bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen) ist für die Brauchbarkeit eines Immunoassays derartiger Packungsgröße (550 Bestimmungen) seine Stabilität ausschlaggebend.

Die Stabilität folgender EMIT II - Immunoassays wurde nach der Anwendungsvorschrift des Herstellers an dem Analysenautomaten COBAS MIRA S (Fa. Hoffmann La Roche) getestet:

- Barbiturate
- Benzodiazepine
- Cannabinoide
- Cocain-Metaboliten
- Opiate.

Als Bewertungskriterien dienten die Absorptionsdifferenzen (und ihre Konstanz) zwischen "Null"- und "High"-Kalibrator sowie "Null"- und "Low(cut off)"-Kalibrator (Tab. 1) und insbesondere die zeitliche Stabilität der Eichkurven, die sich aus täglich durchgeführten Messungen der Konzentration des LOW-Kalibrators ergab.

Sowohl von der Höhe der Absorptionsdifferenzen (Spalten 2 und 5 in Tab. 1) als auch ihrer Standardabweichung schneidet der Barbiturat-Assay am besten ab. Alle anderen Assays weisen entweder niedrigere Absorptionsraten und/oder höhere Streuungen auf.

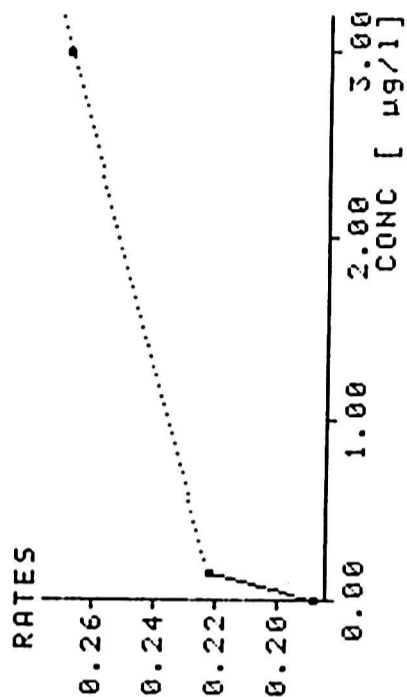
Je höher die Absorptionsrate am cut-off im Vergleich zur Gesamt-Absorptiondifferenz ist, desto besser sind positive Werte von Leerwerten zu unterscheiden, desto geringer ist andererseits die Linearität der Eichkurve. Abb.1 zeigt als Beispiel für beide Fälle die Kalibrationskurven für Cocain-Metaboliten und Opiate.

Aussagekräftiger ist die zeitliche Stabilität der Kalibrierkurven. In Abb.2 sind die über einen Zeitraum von 50 - 64 Tagen gemessenen cut-off-Werte für Barbiturate, Benzodiazepine und Opiate dargestellt. An einigen Tagen, an denen relativ viele Patientenproben zu messen waren, wurden zusätzlich die Mittelwerte von Leerurinen und ihre Standardabweichungen berechnet und in Abb.2 eingetragen. Die Abbildung zeigt, daß in allen Fällen die Unterscheidung zwischen Leerwert und cut-off eindeutig möglich war (Die Mittelwert der Leerurine und ihre 3-fache Standardabweichung sind deutlich kleiner als der aktuelle cut-off-Wert).

COBAS MIRA 27-2433

UNI JENA  
INST. FUER RECHTSMEDIZIN

I3 KALIBR. KONTROLLE ROUTINE  
COCA 08:57/22-FEB-95

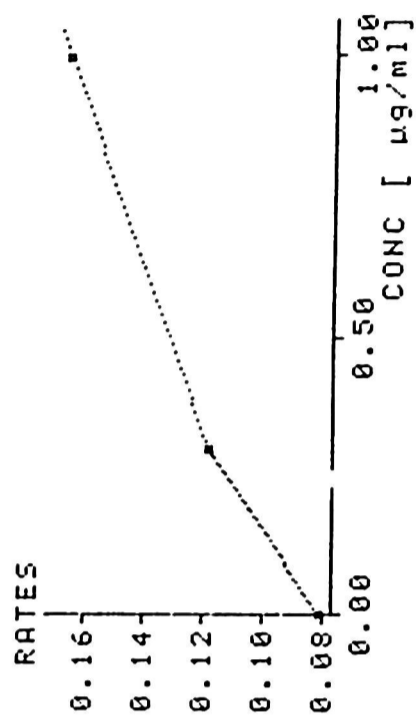


22-FEB-95 / 09:37

COBAS MIRA 27-2433

UNI JENA  
INST. FUER RECHTSMEDIZIN

I3 KALIBR. KONTROLLE ROUTINE  
OPIA 12:48/11-NOV-94



22-FEB-95 / 09:35

Abb. 1: Kalibrationskurven für EMIT II-Assays:  
Cocain-Metaboliten (links) und Opiate (rechts)

Gemessene Konzentrationen des LOW-Kalibrators (cut-off)

Sollwert: Barbiturate: 0.20, Benzodiazepine: 0.20, Opiate: 0.30

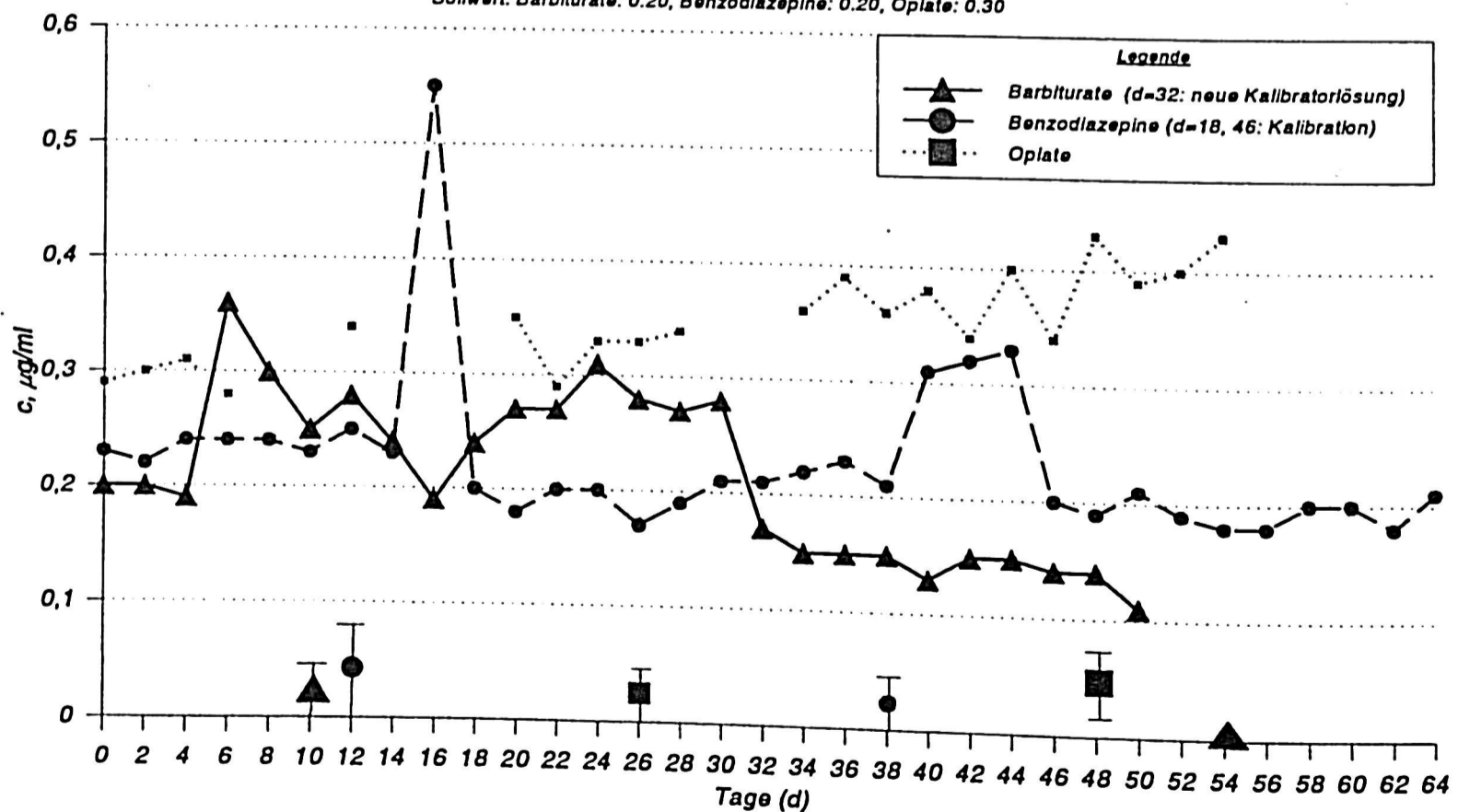


Abb. 2: Zeitliche Abhängigkeit der Meßwerte für den LOW-Kalibrator und Leerwerte der EMIT II-Assays Barbiturate, Benzodiazepine und Opiate.

Im Fall der Opiate und Barbiturate kann von einer Stabilität der Eichkurve von mindestens 50 Tagen (längere Zeiträume wurden nicht getestet) ausgegangen werden. Relativ stabil ist auch der Benzodiazepin - Assay, auf Grund des Anstiegs der cut-off-Werte am 18. und 46. Tag ist an diesen Tagen kalibriert worden. Eine etwas häufigere Kalibrierung ist hier auch wegen der Bedeutung des Nachweises von Benzodiazepinen mit niedrigerer Kreuzreaktivität zu empfehlen.

Assay	Absorptionsdifferenz: High - Null			Absorptionsdifferenz: Low - Null			n
	$\Delta E$	s	VK	$\Delta E$	s	VK	
Barbiturate	0,128	0,029	2,3	0,051	0,005	9,2	5
Benzodiazepine	0,104	0,011	10,3	0,022	0,003	15,9	14
Cannabinoide	0,065	0,003	3,8	0,018	0,004	2,3	8
Cocain-Metab.	0,088	0,007	7,8	0,041	0,005	11,2	10
Opiate	0,079	0,003	4,2	0,041	0,003	8,0	10

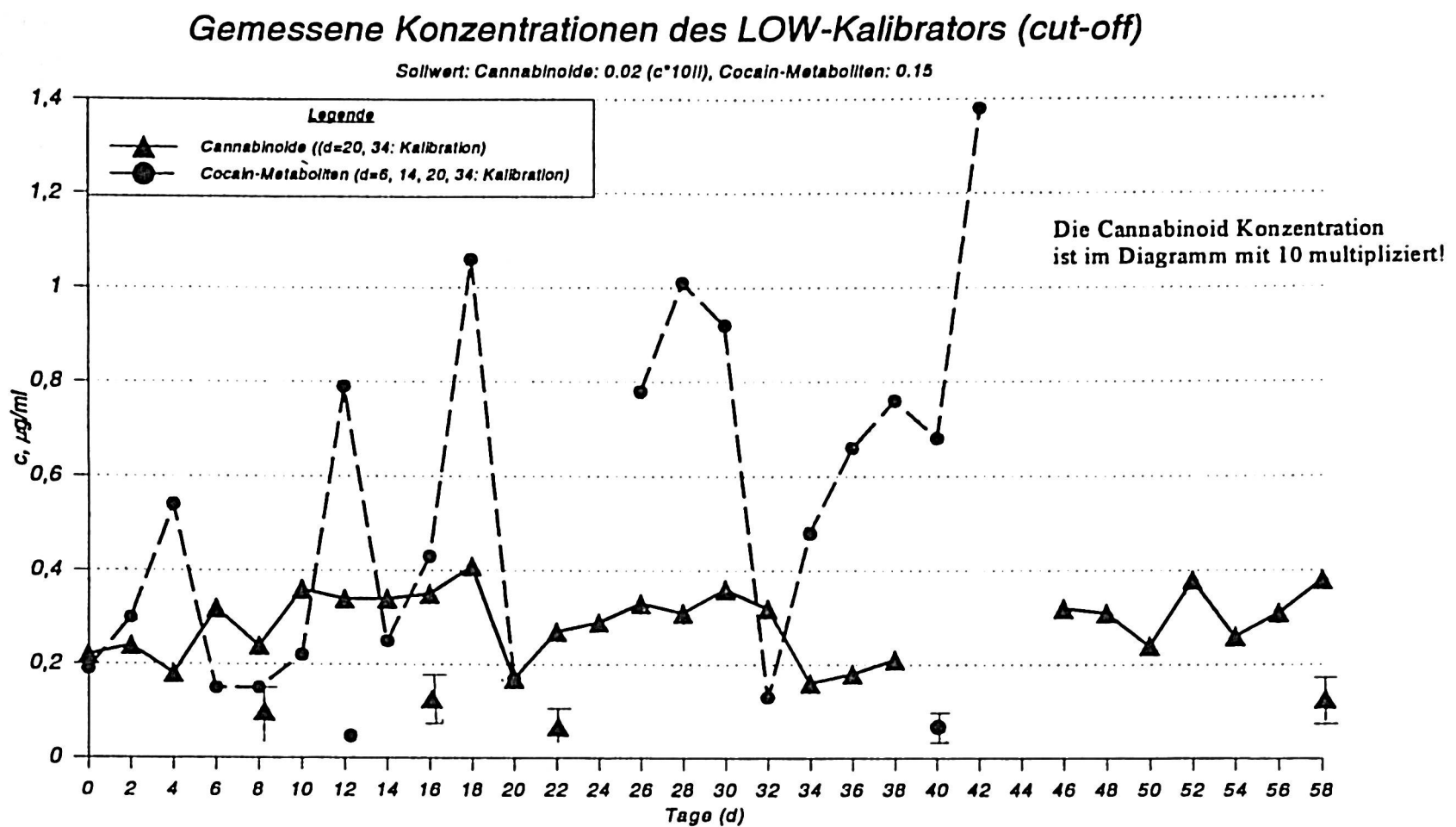
**Tab. 1:** Mittlere Absorptionsdifferenzen  $\Delta E$  von n Kalibrationskurven sowie ihre Standardabweichungen s und Variationskoeffizienten VK (in %).

Abb. 3 zeigt die analogen Kurven für Cannabinoide und Cocain - Metaboliten. Während der cut-off für Cannabinoide eine ähnliche Stabilität zeigt wie im Fall der Benzodiazepine (Kalibrierung alle 2 - 3 Wochen), ist der Test auf Cocain - Metaboliten der einzige Assay, der eine deutlich geringere zeitliche Stabilität aufweist (wöchentliche Kalibrierung erforderlich). Aber auch hier war - wie bei den Cannabinoiden - eine Unterscheidung von Leerwerten jederzeit möglich (Abb. 3).

Auf Grund der relativ selten notwendigen Kalibrierungen bei vier Assays konnte trotz oft kleiner Probenserien (1 - 4 Proben, bei jeder Probenserie (auch n=1) lief ein Test mit) ein Preis pro Test und Patient von etwas weniger als 5 DM erreicht werden. Im Fall des Cocains war er wegen der häufigen Kalibrierung entsprechend höher (6 - 7 DM).

Diese Messungen zeigen, daß die EMIT II - Drogentests bei Beachtung bestimmter - einfach zu realisierender - Lagerungsbedingungen auch in Labors mit relativ geringem Probenanfall (in der Größenordnung von 50 - 100/Monat) anwendbar sind. Die angegebene Zahl von 550 Testen konnte nicht ganz erreicht werden, 500 waren aber in jedem Fall zu messen.

Die Messungen erlauben keine Aussage zur Störanfälligkeit der Assays (z.B. gegenüber Fremdstoffen im Urin), über falsch positive und falsch negative Resultate. Auch systematische Untersuchungen zur Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Derivaten einer Substanzgruppe (z.B. der Benzodiazepine) waren nicht Gegenstand dieser Untersuchungen.



**Abb. 3:** Zeitliche Abhängigkeit der Meßwerte für den LOW-Kalibrator und Leerwerte der EMIT II-Assays Cannabinoide und Cocain-Metabolite.

### Stellengesuch:

Herr Anatol Bittner (47 J) hat 17 Jahre als Gerichtschemiker in Kasachstan gearbeitet. Er wohnt jetzt in Schwäbisch-Hall (Tel. 0791-490689). Er würde sich freuen, wieder in einem forensisch-toxikologischen Labor arbeiten zu können.



## First Encounter with *P*-Fluorofentanyl in the Netherlands

---

Anneke J. Poortman-van der Meer and Henk Huizer

---

*Forensic Science Laboratory, Ministry of Justice, Volmerlaan 17, NL-2288 GD Rijswijk, The Netherlands*

### Introduction

In June 1995, several related cases of seized capsules, tablets and powders appeared to contain *p*-fluorofentanyl (*p*-FF). One powder consisted of (nearly) pure *p*-FF and could be identified by IR and GC/MSD analysis. In the other exhibits only limited clues for its presence were obtained in the standard screening procedure and more extensive investigations were necessary. Similar *p*-FF containing capsules were also seized in Lille (France). Fentanyl analogs, including *p*-FF, have been seen in the USA [1-6]. In Europe, 3-methylfentanyl was found on the Russian drug market [7,8] and recently, a seizure of *o*-, *m*- and *p*-FF precursors has been reported in Germany [9].

The manufacturer of *p*-FF was a PhD organic chemist. The investigations did not clarify whether the capsules and tablets had already been sold on the user market. So far this production seems to be an isolated occurrence.

### Description of the materials

More than 100 exhibits were involved, many of them containing MDA, bromamphetamine (DOB, 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine), caffeine, amphetamine and/or *p*-FF. The five most important exhibits are described below.

1. 4300 g; 15357 red/yellow and red/dark yellow capsules with an average weight of 0.28 g, containing approximately 0.20 g of white powder. The powder contained caffeine, starch and *p*-FF. The amount of *p*-FF per capsule was estimated at 90 mg.
2. 569 g; 2473 transparent capsules. There was a wide variation in weight; average capsule weight 0.24 g, contents approximately 0.23 g of white powder. The powder contained caffeine, starch and *p*-FF. The amount of *p*-FF per capsule was estimated at 80 mg.
3. 5051 g; 20204 white tablets with an average weight of 0.28 g (wide variation). The diameter varied over the tablet from 9.06 to 9.18 mm, showing the tablets were not perfectly round. The thickness varied from 3.52 to 4.80 mm. The tablets contained caffeine, starch and *p*-FF. The amount of *p*-FF per tablet was estimated at 400 mg.
4. 2098 g; 6993 white tablets with an average weight of 0.28 g. The diameter was 9.06 mm; in some examples the diameter varied over the tablet from 9.09 to 9.17, showing the tablets were not perfectly round. The thickness varied from 3.54 to 4.69 mm. The tablets contained caffeine, starch and *p*-FF. The amount of *p*-FF per tablet was estimated at 400 mg.

- 102 g; 425 white tablets with an average weight of 0.24 g. The diameter was 9.04 to 9.08 mm. The thickness of the tablets varied from 2.96 to 3.38 mm. The tablets contained caffeine, starch, bromamphetamine and p-FF. The amount of p-FF per tablet was estimated at 30 mg.

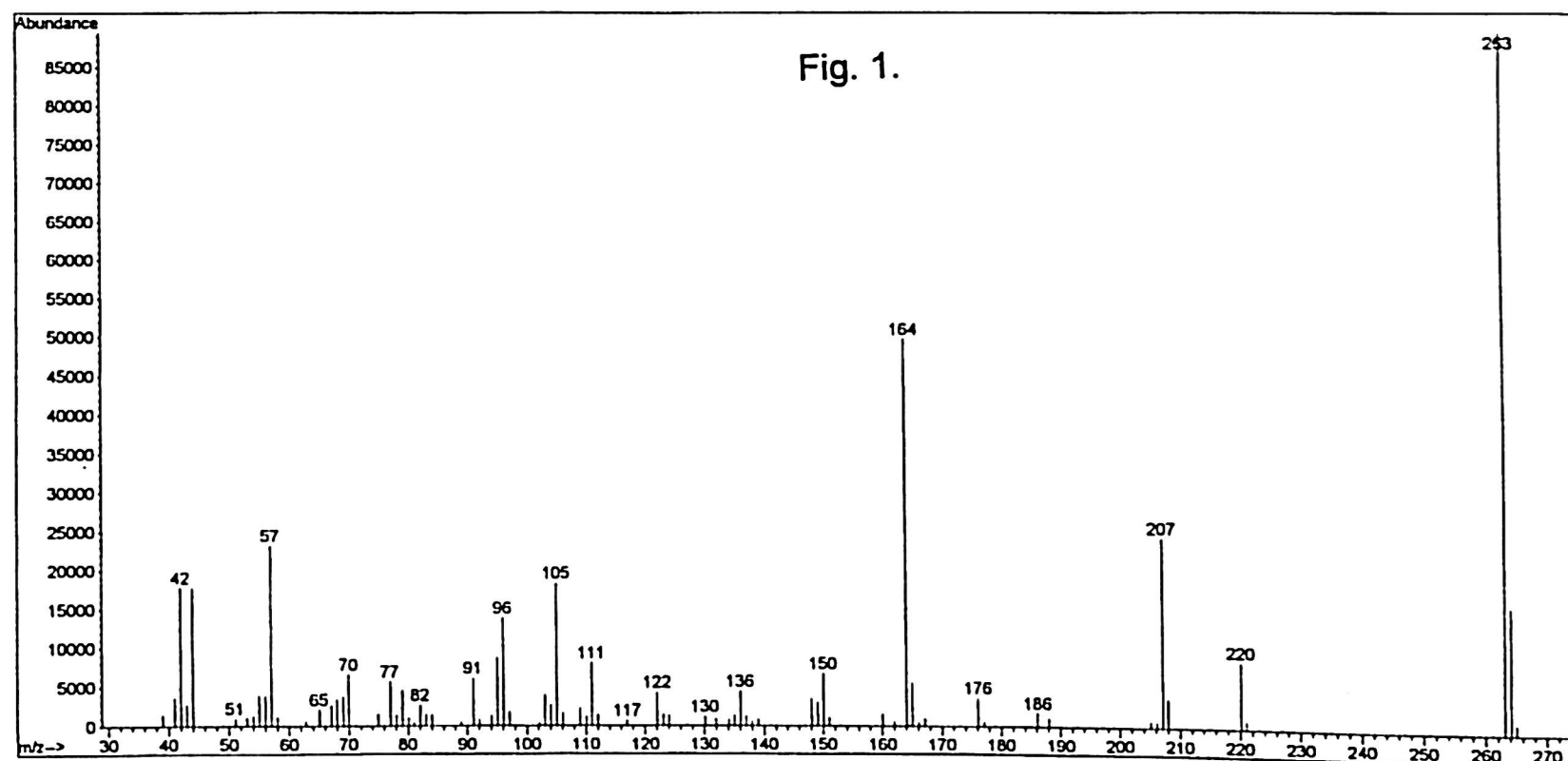
## Identification

The analysis of p-FF has been previously reported [4,10] and p-FF is included in a number of commercially available mass spectral and infrared libraries. Our initial identification was based on the mass spectrum and, for the purified compound, on the IR spectrum as well. Later, comparison was performed with a reference compound, which was kindly provided by the Drug Enforcement Administration, Special Testing and Research Laboratory, McLean, USA. A summary of the analytical techniques and some additions are presented.

## Colour test

P-FF shows an orange colouration with the Marquis reagent; a concentration of 0.15% p-FF, as found in some items, gave no reaction.

```
File       : A:\1001013.D
Operator   : ap
Acquired   : 13 Jul 95   9:11 pm using AcqMethod 100280SR
Instrument  : GC/MS
Sample Name: 95.06.12.28/BC.4.1.7
Misc Info  : ALKALISCHE HEXAAN
Vial Number: 10
```



## Thin-layer chromatography

- Toluene-acetone-ethanol-ammonia 25% (45:45:7:3).  $R_f = 0.87$  (compared with lidocaine = 0.83)
- Cyclohexane-toluene-diethylamine (75:15:10).  $R_f = 0.52$  (compared with pethidine = 0.49; methadone = 0.74)[11]
- Methanol-ammonia 25% (100:1.5). Compound near solvent front.

Under UV-light (254 nm), p-FF showed as an absorbing spot; spraying with iodoplatinate spray gave a purple colouration, soon turning to yellow/white.

#### *Gas chromatography*

Using a 100% methylsilicone column and a temperature program of 100°C to 300°C at 10°C/min, a retention index of 2688 was found.

#### *Mass Spectrometry*

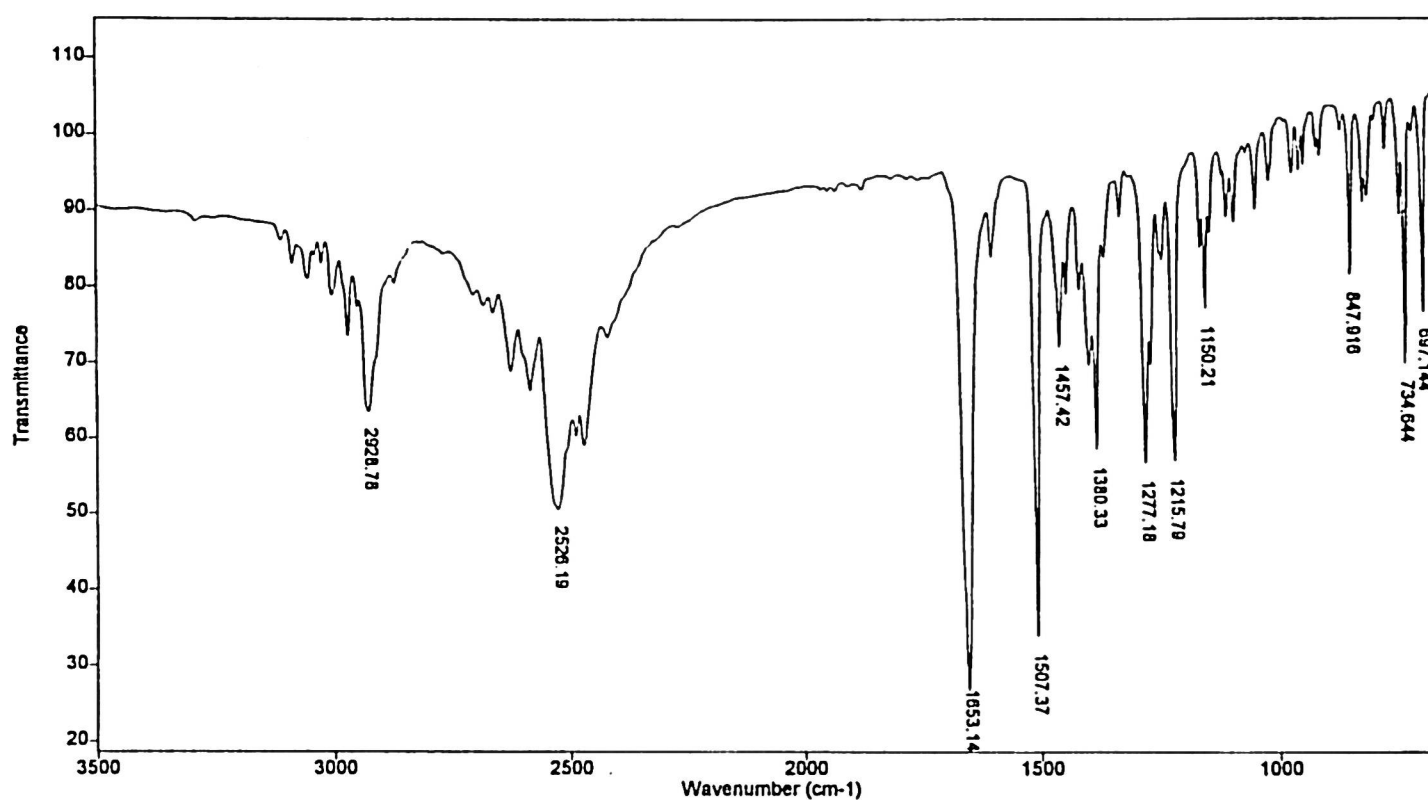
The EI spectrum is given in Fig. 1. The spectrum is explained in ref [10].

#### *Infrared Spectrometry*

Fig. 2 shows the spectrum of the p-FF hydrochloride salt.

Bio-Rad Win-IR

Fig. 2



File # 1 : BIORAD1

Number of Scans:

Comment:

View Mode: Peaks

28-07-95 12:15 Res=4. cm-1

### **Extraction and purification procedure**

In general the doses of p-FF in the exhibits were so low that during routine analysis no clear indication about its presence was obtained. This means no Marquis colouration, (very) weak positive iodoplatinate reaction on TLC and no distinct gas chromatographic peaks. Therefore, concentration had to take place. To separate the p-FF from the large amounts of caffeine, the aqueous extract of one tablet or capsule was made alkaline with NaOH and extracted with hexane. The extract was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 200 ml chloroform.

Fig. 3a DMX-600 1H NMR 25 sept. 1995

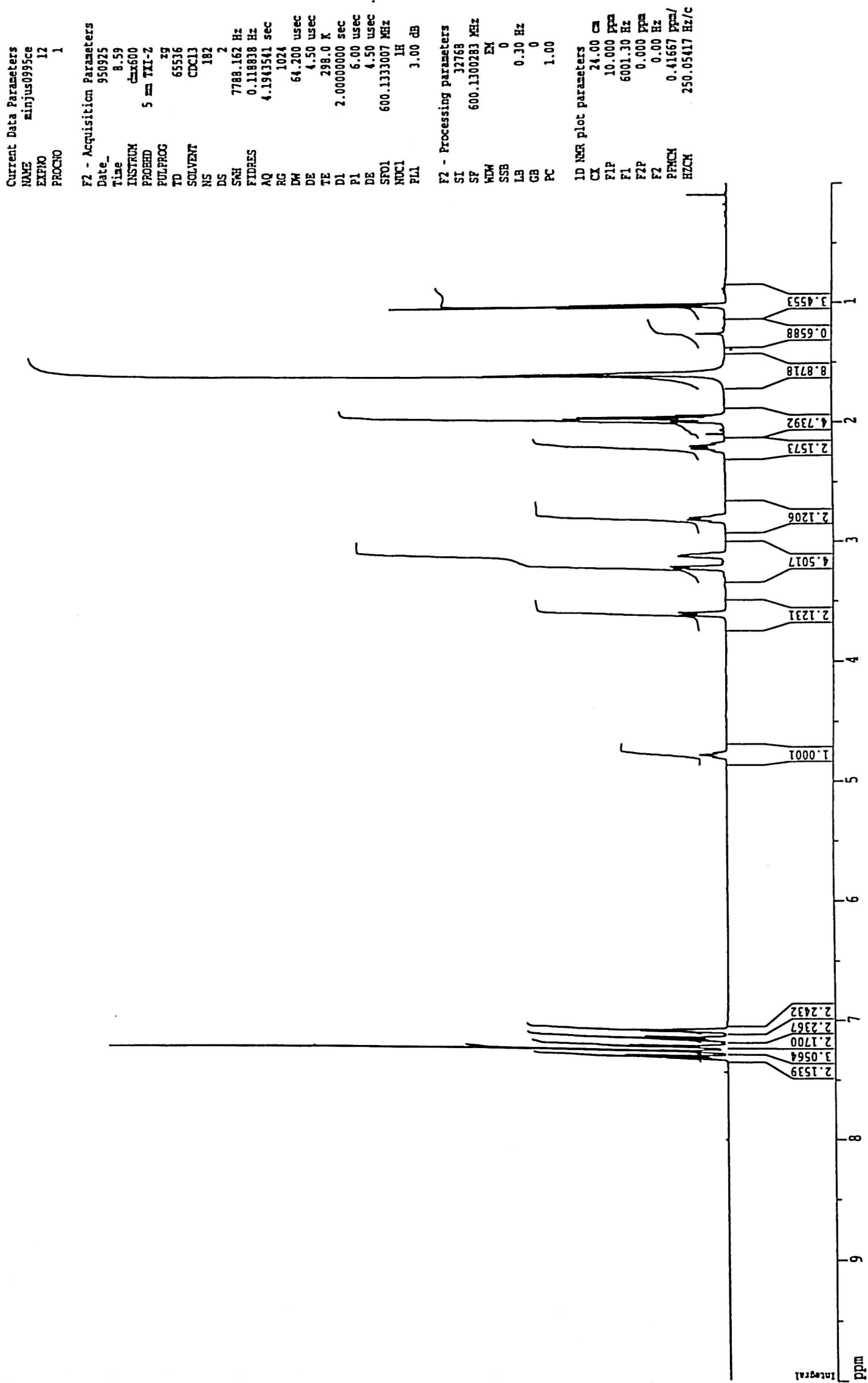
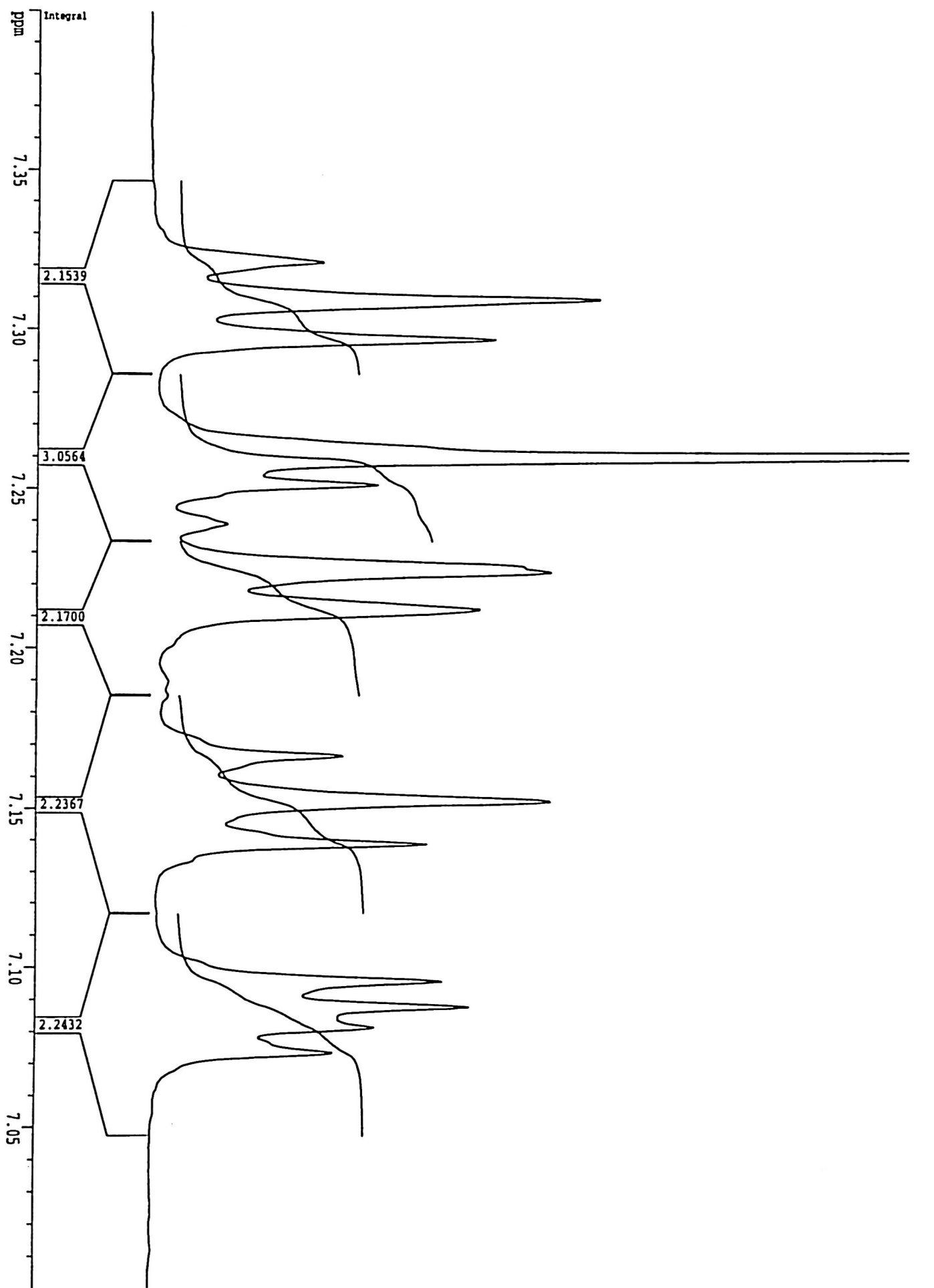


Fig. 3b

HCL zout DMX-600 1H NMR 25 sept. 1995



Current Data Parameters  
 NAME mlujus0935ce  
 EXPNO 12  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date\_ 950925  
 Time 8.59  
 INSTRUM dmx600  
 PROBRD 5 mm TXI-2  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 182  
 DS 2  
 SFR 7788.162 Hz  
 FIDRES 0.118838 Hz  
 AQ 4.194341 sec  
 RG 1024  
 DM 64.200 usec  
 DE 4.50 usec  
 TE 298.0 K  
 D1 2.00000000 sec  
 P1 6.00 usec  
 D2 4.50 usec  
 SFO1 600.1333007 MHz  
 NUC1 1H  
 P11 3.00 dB

F2 - Processing parameters

SI 32768  
 SF 600.1300283 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

1D NMR plot parameters

CK 24.00 cm  
 FIP 7.400 ppm  
 F1 4440.96 Hz  
 F2P 7.000 ppm  
 F2 4200.91 Hz  
 PPMCK 0.01667 ppm/  
 HZCK 10.00217 Hz/c

For IR and NMR analysis, the extraction procedure was used as described by Heagy [2]. This resulted in pure p-FF hydrochloride.

### The fluoro position

In the Netherlands, only the para-isomer is controlled by law.

The mass spectra, as given in the commercially available mass spectral library, show no apparent differences between the ortho-, meta- and para-isomer.

IR and NMR (600 MHz) are considered as excellent techniques for discriminating the positional isomers [4,10,12]. The NMR of p-FF hydrochloride is given in Fig. 3a.

The NMR spectrum of the case was in excellent agreement with that of p-FF reference and with the literature spectrum. The symmetry of the para isomer causes, in accordance with theory, two signals, one triplet and a double doublet (7.15 and 7.08 ppm, Fig. 3b). The spectra of both the ortho and meta isomers would produce a much more complex spectrum.

Since several items consisted of large amounts of tablets and capsules, IR and NMR spectra could be easily obtained. If there is insufficient material for IR or NMR, then GC may be used. The relative gas chromatographic retention times (5% phenylmethylsilicone) of the three fluoro isomers are given as [10]:

<i>ortho</i> -fluorofentanyl	0.866
<i>meta</i> -fluorofentanyl	0.920
<i>para</i> -fluorofentanyl	0.951
fentanyl	1.000

The results found in our laboratory for p-FF were in excellent agreement (0.953) with the published value. Because of this consistency with the literature, we consider the relative retention time on 5% phenylmethylsilicone sufficiently reliable for discriminating among the three isomers in general case work.

### Quantitative determination

Since only a limited amount of reference p-FF was available, quantitative analysis was performed using fentanyl as the reference compound. According to the Effective Carbon Number concept [13,14], the flame ionisation detector response of molecules is related to the number of carbon atoms, while functional groups like ketones and amines cause some degree of signal reduction. The structure of fentanyl is identical to p-FF except for one fluoro atom. Since the presence of a single halogen atom on a carbon has a negligible effect on response, it can be predicted that the molecular response of fentanyl will be equal to p-FF. So the amount of p-FF in samples can be estimated from the response factor of fentanyl after correction for the difference in molecular weight (multiplying factor = 0.95)

### Samples

A constituent of the samples, probably starch, caused clotting of the material after adding NaOH to the solutions and also caused emulsion formation on extraction. Therefore the

exhibits were first extracted with methanol, in which p-FF and caffeine are readily soluble and the interfering additives are not.

The content of one capsule, one tablet or an amount of about 200 mg powder was extracted with 5 ml methanol HPLC grade in an ultrasonic water bath for 30 min. After centrifuging, the clear methanol was pipetted off. This was repeated twice, and the combined methanol extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream at 50°C.

The residue was dissolved in 4.0 ml of 0.1 N HCl, then 1 ml of 2N NaOH was added. To monitor the extraction efficiency 1.0 ml of fentanyl solution, containing 0.05 mg fentanyl base, was added.

The alkaline solution was extracted once with 15 ml of hexane in a "Turbula" shaking machine for 10 min. The clear hexane layer was pipetted off and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 200 ml internal standard solution (0.5 mg/ml n-octacosane in chloroform).

#### *Reference substance*

Fentanyl Janssen 0.05 mg/ml (Beerschot, Belgium); 10 ml ampoule (contains fentanyl citrate, concentration 0.05 mg fentanyl base/ml). For calibration 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 ml were pipetted (0.05; 0.10; 0.15 and 0.20 mg fentanyl respectively). After adjusting the volume, 1 ml 2N NaOH was added and the solution was extracted with 15 ml hexane. Further procedure was as described earlier.

#### *Gas chromatography*

The analysis was performed using an HP 5890 gas chromatograph equipped with a flame ionisation detector. An HP Ultra-1 column 25 m x 0.32 mm ID x 0.52 mm was used. The carrier gas was nitrogen; flow rate 1.0 ml/min; split 25:1. The injection temperature was 275°C, detector temperature 300°C; the column oven temperature was held at 250°C.

#### *Results*

The calibration curve with formula  $8.7829x + 0.0010$  had a correlation coefficient of 0.99996. The amount of p-FF in the samples was calculated on the response of fentanyl. The recovery of the fentanyl added to the samples was 103% (n=6, CV=1.9%). The doses in the five reported exhibits were 90, 80, 400, 400 and 30 micrograms respectively.

#### **The dose**

Since as far as we know the compound has not been used in any medical or pharmaceutical setting, comments on the dose can only be made in general terms. Fentanyl is used in medical practice in an intravenous dose of 0.05 - 0.6 mg (2mg/kg; max. 50 mg/kg). Above 0.2 mg or 15mg/kg a significant respiratory depression can be expected [15]. The estimated minimum lethal dose is 2 mg [11]. For the fentanyl analog (+) cis-3-methylfentanyl a fatal dose below 300 mg has been suggested. No clear data for other fentanyl derivatives were given, but a toxicity between these extremes has been suggested [10]. In the five exhibits examined, there was a wide range in p-FF content.

### Possible route of manufacture

The most likely synthesis of p-FF uses N-(1-phenylethyl)-piperidin-4-one, p-fluoroaniline and propionic anhydride. In this case, there were some indications that an alternative synthesis may have been used, but this matter was not investigated further. It was assumed that final product was the citrate salt.

### References

- [1] Allen, A., Cooper, D., Kram, T., "China White, alpha-Methyl Fentanyl," *Microgram* Vol. XIV, No. 3, March 1981, pp. 26-32
- [2] Heagy, J. A., "Cleanup for IR alpha-Methyl fentanyl," *Microgram*, Vol. XIV, No. 5, May 1981, pp. 61-64
- [3] Kram, T., Cooper D., Allen, A., "Behind the Identification of China White," *Analytical Chemistry*, Vol. 53, No. 12, Oct. 1981, pp. 1379A-1386A
- [4] Cooper, D., Allen, A. and Lurie, I., "p-Fluorofentanyl," *Microgram*, Vol. XIV, No. 11, Nov. 1981, pp. 154-160
- [5] Allen, A. C. and Lurie, I. S., "The Identification of a Methyl Homolog of alpha-Methyl Fentanyl," *Microgram*, Vol. XVII, No. 1, Jan. 1984, pp. 8-14
- [6] Henderson, G. L., "Designer drugs: Past History and Future Prospects," *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 33, No. 2, March 1988, pp. 569-575
- [7] Sorokin V. I., Semkin E. P. and Savilov A. P., "Expert Examination of 3-Methylfentanyl," *Microgram*, Vol. XXVII, July 1994, pp. 221-226
- [8] Sorokin V. I., "Clandestine synthesis of 3-Methylfentanyl," *Journal of the Clandestine Laboratory Investigating Chemists Association*, Vol. 4, No. 2, April 1994, pp. 28-29
- [9] Fritschi, G. and Klein, B., "Zwischen- und Nebenprodukte bei der illegalen Herstellung von Fentanyl und Fluorfentanylen und die Synthese ihrer Acetylhomologen", *Archiv fuer Kriminologie*, Band 196, Heft 5+6, Nov/Dec 1995, pp. 149-155
- [10] Cooper, D., Jacob, M. and Allen, A., "Identification of Fentanyl Derivatives," *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 31, No. 2, April 1986, pp. 511-528
- [11] Moffat, A. C. (ed), *Clarke's "Isolation and Identification of Drugs,"* The Pharmaceutical Press, 1986, London
- [12] Perillo, B., "Personal Communication," Washington, 1995
- [13] Sternberg, J. C., Gallaway, W. C. and Jones, D. T., "The mechanism of response of flame ionisation detectors." In "Gas Chromatography", Brenner, N., Callen, J. E. and Weiss, M. D., (eds), Academic Press, New York, 1962, pp. 231-276
- [14] Jorgensen, A. D., Picel, A. C. and Stamoudis, V. C., "Prediction of Gas Chromatography Flame Ionization Detector Response Factors from Molecular Structures", *Analytical Chemistry*, Vol. 62, 1990, pp. 683-689
- [15] Reynolds, J. E. F. (ed), "Martindale, The Extra Pharmacopoeia," London, The Pharmaceutical Press, 1993



## Ultrafiltration als Probenvorbereitung in der toxikologischen Analytik

Präsentiert auf der 3. Frühjahrstagung der Region Nord 1994 (Magdeburg)

---

H. M. Wolf und J. P. Weller

---

*Institut für Rechtsmedizin, Konstanty-Gutschow-Str. 8, 30625 Hannover*

Die Anwendung von Einweg-Ultrafiltrationsröhrchen als Probenvorbereitung für die Extraktion von Arzneimittelwirkstoffen aus Blut wurde bereits 1984 von KÖHLER-SCHMIDT untersucht, fand in der Folgezeit jedoch wegen fehlender Eignung als universell anwendbarer Technik keine weite Verbreitung im forensischen Bereich. Für gezielte Fragestellungen z.B. in der Begleitstoffanalytik (KÜHNHOLZ u. BONTE) oder für die immunchemische Vorprüfung auf Morphinderivate in Vergiftungsfällen (WELLER u. WOLF) wurde diese Probenvorbereitung aufgegriffen.

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei weitere Anwendungen vorgestellt werden:

- 1.) die Erweiterung des immunchemischen Blutscreenings auf den Cocain-Metaboliten Benzoylecgonin
- 2.) der direkte gaschromatographische Nachweis von Ethylenglycol / Diethylenglycol aus Ultrafiltraten.

### *Probenvorbereitung:*

Die Ultrafiltration erfolgt mit folgenden kommerziellen Röhrchen jeweils unter Kühlung: Centricon-30 (Fa. Amicon) bei ca. 3000 g im Winkelrotor bzw. für Centrisart (Fa. Sartorius) bei ca. 2000 g im Ausschwingrotor.

### *1.) Benzoylecgonin*

#### *Methodik:*

ADx-Analysator und ADx-Assay Cocain-Metabolite (Fa. Abbott)

#### *Untersuchungen und Ergebnisse:*

Zur Überprüfung der Matrixeigenschaften erfolgte über den gesamten Meßbereich ein Vergleich der Nettopolarisation einer Eichreihe im Ultrafiltrat mit dem Urinkalibrator (Abb. 1). Erwartungsgemäß ist wegen der sehr geringen Steigung im oberen Bereich mit einer größeren Streuung zu rechnen. Für den Einsatz als Vorprüfung erscheint jedoch die Urinkalibration als Bezug geeignet. Das Problem der mangelhaften Kreuzreaktion für unverändertes Cocain - nach akuter Aufnahme wurden in frischen Blutproben falsch negative bzw. nur schwach positive, bei der Lagerung ansteigende Werte beobachtet - bleibt auch bei der Ultrafiltration bestehen.

Zwei verschiedene Seren sowie ein hämolysiertes Vollblut wurden anschließend definiert mit Benzoylecgonin-tetrahydrat (Fa. Sigma-Chemie) versetzt. Nach Inkubation über Nacht ergab die Messung der Ultrafiltrate gegen die bestehende Urinkalibration ausreichende "Wiederfindungsraten" (Tab. 1). Die von MAIER et al. beobachtete schlechte Ausbeute

konnte bei der gewählten Vorgehensweise nicht bestätigt werden. Wie bei Morphinderivaten ist auch hier eine Messung bei entsprechender Verdünnung von Serum oder Blut - allerdings mit entsprechender Empfindlichkeitseinbuße - direkt möglich, wie die ergänzend angeführten Werte zeigen.

Tabelle 1: FPIA-"Wiederfindungsraten" für Benzoylcegonin bei der Aufarbeitung von Serum bzw. Blut (in %).

	Serum <sup>1)</sup> 3 µg/ml	Serum <sup>2)</sup> 3 µg/ml	Serum <sup>2)</sup> 0,5 µg/ml	Blut <sup>3)</sup> 9 µg/ml	Blut <sup>3)</sup> 3 µg/ml	Blut <sup>3)</sup> 0,5 µg/ml	Serum 0,1 µg/ml
Centricon-30	88,8	99,1	113,8	98,5	91,7	98,8	93,5
Centrisart	89,7	89,7	107,4	87,7	83,5	93,1	88,8
direkt	79,0	-	-	-	-	-	-
1 : 3 verd.	-	95,4	120,6	101,8	95,0	-	-

- 1) leicht hämolytisches Serum ( 0.6 g % Hb )
- 2) Serum mit 7.5 g/% Hb ( lipämisch ! )
- 3) hämolysiertes Vollblut ( 16.6 g % Hb )

## 2.) Ethylen- / Diethylenglycol

### Methodik :

200 µl Ultrafiltrat werden mit 100 µl einer wäßrigen Lösung des internen Standards [1g/l Butandiol-(1,4) ] versetzt und davon 1 µl im Split-Mode in den GC injiziert. (Das Adsorptionsverhalten der Glycole erfordert besondere Sorgfalt bei der Spritzenreinigung.) Gaschromatograph: Carlo-Erba Mega 5330 mit Split/Splitless-Injektor (Insert mit Quarzwolle gefüllt); 1,5 bar Wasserstoff; Splitfluß 120 ml/min ; Injektor und Detektor (FID) 200 Grad ; Temperaturprogramm: 5 min bei 120 Grad; 5 Grad/min auf 200 Grad 1. Säule 60m DB-1701 (Fa. J&W Scientific) 0.25 mm I.D.; df =1 µm; 2. Säule 60m CP-Sil-8-CB (Fa. Chrompack) 0.32 mm; df = 3 µm; Simultaninjektion unter Verwendung eines Gradic-Säulenteilers (Fa. Seekamp)

### Untersuchungen und Ergebnisse :

Unter den gewählten Analysenbedingungen wurde zunächst das Trennverhalten für eine Reihe von Diolen sowie des als Feuchthaltemittel der Membranen verwendeten Glycerins

ermittelt (KOVATS-Indices s. Tab. 2). Lediglich auf Säule 2 ist eine Trennung von Glycerin und Diethylenglycol nicht möglich. Die Reproduzierbarkeit in der Serie lag unter Bezug auf den inneren Standard für wässrige Lösungen im Bereich von 2 bis 8 % (jeweils N=10). Sie erscheint ausreichend und in Anbetracht der wässrigen Matrix analytisch vertretbar. Auf eine Füllung des Inserts konnte bei unseren Versuchen jedoch nicht verzichtet werden.

Tabelle 2: Retentionsindizes relevanter Glycole auf den verwandten Säulen

	DB 1701	CP-Sil8-CB
Ethylenglycol	905	681
Propandiol-(1,2)	934	693
Butandiol-(2,3) [1]	964	774
Butandiol-(2,3) [2]	975	786
Butandiol-(1,2)	1035	834
Propandiol-(1,3)	1045	820
Butandiol-(1,3)	1075	857
Butandiol-(1,4)	1163	935
Diethylenglycol	1188	962
(Glycerin)	1263	957

[1],[2]: Das eingesetzte Butandiol-(2,3) ist ein Isomerengemisch der meso- und der racemischen Form.

Abbildung 2 zeigt eine wässrige Eichkurve von 0.1 bis 2.0 g/l. Die Bestimmungsgrenze liegt im Bereich von 0.1 g/l und kann durch Reduzierung des hohen Splitflusses, wenn erforderlich, erniedrigt werden.

Tabelle 3: Wiederfindungsraten für Ethylenglycol und Diethylenglycol bei der Ultrafiltration von Serum bzw. Blut (in %)

		Ethylenglycol	Diethylenglycol
Serum	(94,2 % Wassergehalt)	101-113 %	108-111 %
Serum	(91,5 % Wassergehalt)	99-108 %	120-121 %
Blut	(82,2 % Wassergehalt)	114-122 %	124-127 %
Blut	(76,4 % Wassergehalt)	133-146 %	124-134 %

Schließlich wurden 2 Serum- und 2 Vollblutproben (Leichen) mit 1 g/l Ethylen- und Diethylenglycol versetzt, über Nacht inkubiert, filtriert und wie oben untersucht. Die Streubereiche der Wiederfindungsraten, die erwartungsgemäß mit dem Wassergehalt des Materials korrelieren, sowie der Wassergehalt der Proben sind in Tab. 3 aufgelistet. Beispielhaft zeigt Abb. 3 Chromatogramme die nach Zusatz der entsprechenden Glycole zu Kontrollserum (Fluinorm, Behring) erhalten wurden. Es läßt sich daraus ableiten, daß auch leichter flüchtige Verbindungen (hier Ethanol) mit auswertbarem Retentionsverhalten abgetrennt werden.

### **Diskussion:**

Wenngleich die Ultrafiltration von Blutproben nicht als Probenvorbereitung für allgemeine Suchanalysen im Sinne einer "general-unknown"-Fragestellung geeignet ist, kann sie doch für gezielte Anwendungen eine nützliche Ergänzung, insbesondere am hämolytischen Vollblut, darstellen. So hat sich die Ultrafiltration an unserem Institut nicht nur im Bereich der Begleitstoffanalyse, sondern auch für die immunchemische Voruntersuchung bei fraglichen Drogentodesfällen zur Abklärung einer Opioid- bzw. Cocain-Kausalität seit mehreren Jahren bewährt, während sie sich zum Beispiel für Methadon als ungeeignet erwies (Wiederfindungsrate < 10 %). Daneben bietet sich der Einsatz für gut wasserlösliche Verbindungen geringer Eiweißbindung an, insbesondere wenn, wie für Glycole, aufgrund der Konzentrationsverhältnisse und der chromatographischen Eigenschaften auch ohne weitere Probenvorbehandlung eine anschließende chromatographische Untersuchung möglich ist. Bei der üblichen Beschaffenheit der Blutproben im forensischen Bereich ist ihr im Hinblick auf die Belastung von Injektor und Kapillarsäulen für eine Direktaufgabe von Serum (AARSTAD et al.) sicher der Vorzug zu geben. Vor allem wenn die Geräte für sehr unterschiedliche Analysen benutzt werden müssen, reduziert sich der Wartungsaufwand für die Systeme beträchtlich. In Anbetracht der komplexen Zusammensetzung postmortaler Probenmatrizes bedarf es einer ausreichenden Trennkapazität, um Fehlinterpretationen durch Koelutionen zu vermeiden (JONES et al.). Auch eine vorgeschaltete Derivatisierung kann bei unbekanntem Matrixkomponenten nur wenig Sicherheit erbringen (HOUZÉ et al.) und erfordert zusätzlich spezifische Detektion (MAURER u. KESSLER). Bei unspezifischer Detektion (wie z. B. FID) bietet die simultane Aufgabe auf zwei geeignete, unterschiedliche Kapillaren - auch wenn es nicht zur Umkehr der Elutionsfolge kommt - eine Möglichkeit, Ergebnisse qualitativ und quantitativ abzusichern.

### **Zusammenfassung:**

Nach unseren Erfahrungen sind Ultrafiltrate aus hämolytischen bzw. postmortal veränderten Vollblutproben geeignete Substrate für die immunologische Vorprüfung bei fraglichen Opioid- beziehungsweise Cocain-Intoxikationen. Können Ultrafiltrate wie am Beispiel der Glycole, direkt für weitere chromatographische Analysen eingesetzt werden, stellt die Ultrafiltration eine vergleichsweise einfache Probenvorbereitung dar. Eine hohe analytische Trennleistung (z. B. durch simultane 2-Säulen-Kapillar-GC) ist jedoch wie bei allen komplexen Gemischen unverzichtbar, zumindest wenn keine massenspektroskopische Detektion erfolgt.

06-05-94

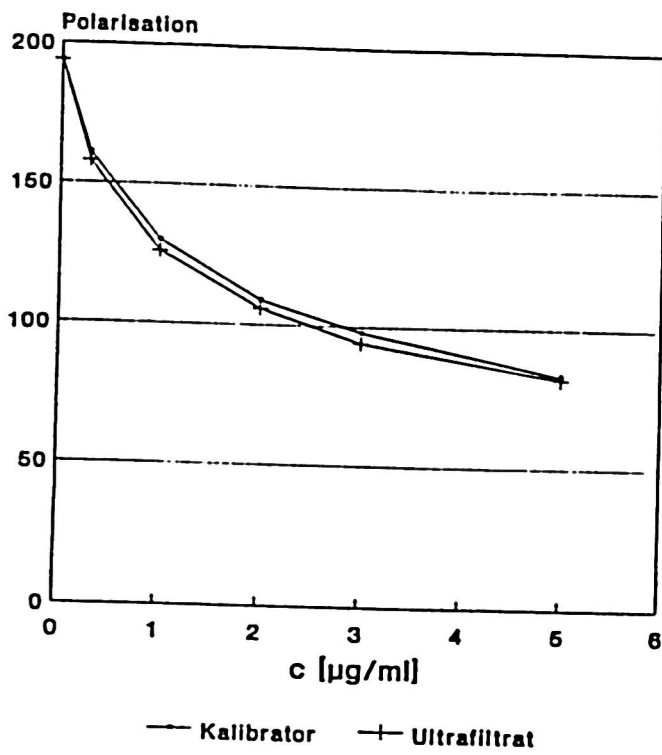
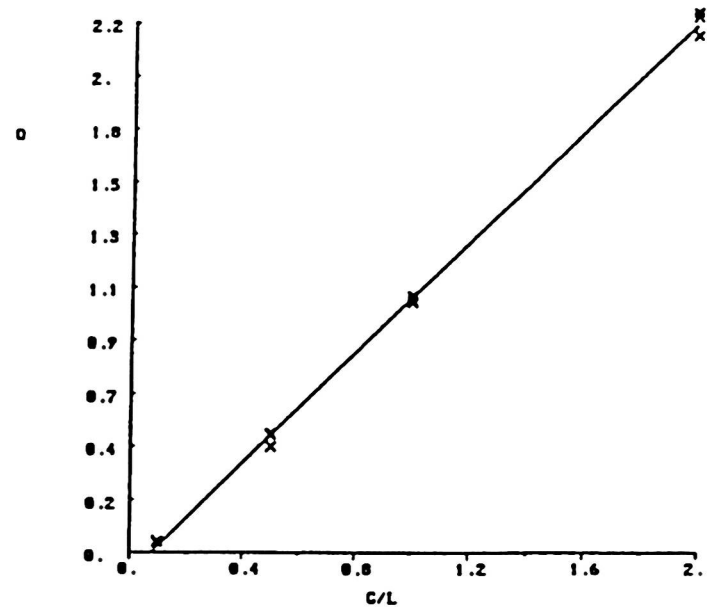


Abb.1: Benzoylcocgonin ; Polarisation in Ultrafiltratmatrix bzw. Kalibrator



COEFFICIENTS OF LEAST SQUARES FIT TO A LINEAR EQUATION  
 KA= 0. KB= 1.1478614 KC= -.0867336  
 CORRELATION COEFFICIENT OF X-Y PAIRS = 0.999384  
 COEFFICIENT OF DETERMINATION = 0.9987684  
 STANDARD ERROR OF ESTIMATE = 0.0299174  
 RELATIVE STD ERROR OF ESTIMATE = 0.3361938

Abb. 2: Regressionsgerade für Ethylenglycol (Flächenquotienten auf DB 1701 bez. auf den ISDT; n = 4)

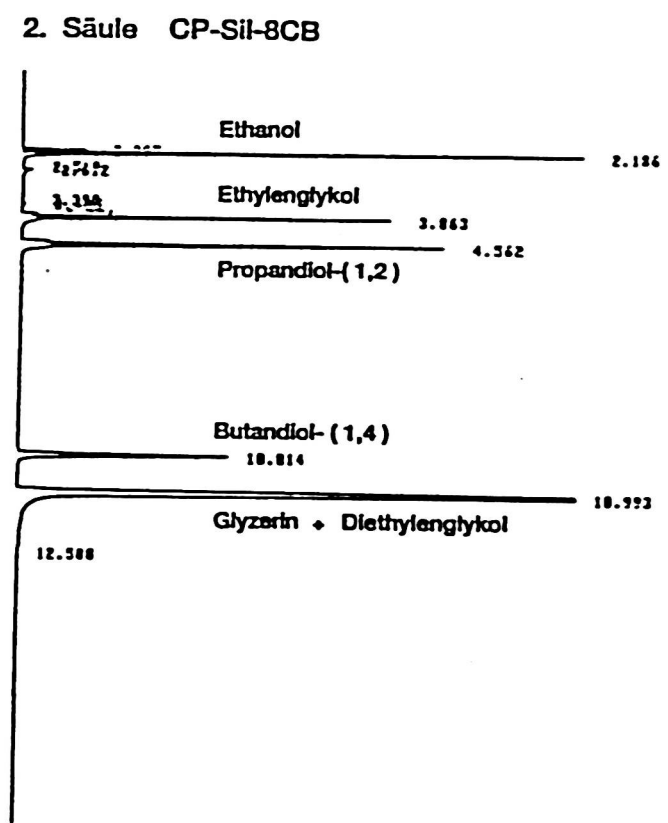
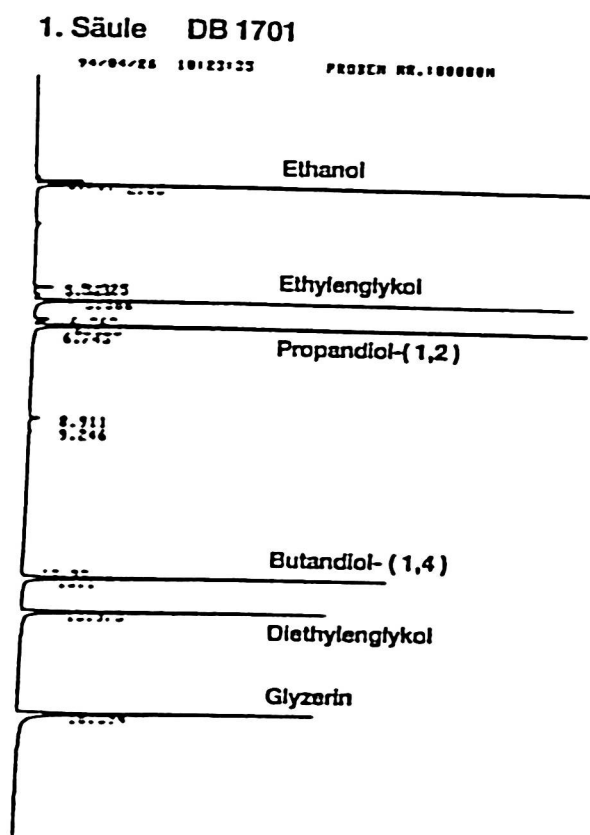


Abb. 3: Chromatogramme eines Ultrafiltrates aus Serum (Gehalt je ca. 1g/l Ethanol, Ethylenglycol, Diethylenglycol, Propandiol-(1,2)); ISTD = Butandiol-(1,4)

## Literatur:

- ARSTAD K, DALE O, AAKERVIK O, ØVREBØ S, ZAHLSEN K : A rapid gas chromatographic method for determination of ethylene glycol in serum and urine. *J Anal Toxicol* (1993) 15 : 218-221
- CUMMINGS KC, JATLOW PI : Sample preparation by ultrafiltration for direct gas chromatographic analysis of ethylene glycol in plasma. *J Anal Toxicol* (1982) : 324-326
- HOUZÉ P, CHAUSSARD J, HARRY P, PAYS M : Simultaneous determination of ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol and 2,3-butylene glycol in human serum and urine by wide-bore column gas chromatography. *J. Chromatogr.* (1993) 619 : 251-257
- JONES AW, NILSSON L, GLADH SA, KARLSSON K, BECK-FRIIS J : 2,3-Butanediol in plasma from an alcoholic mistakenly identified as ethyleneglycol by gas-chromatographic analysis. *Clin. Chem.* (1991) 37(8) : 1453-1455
- MAIER RD, ERKENS M, HOENEN H, BOGUSZ M : The screening for common drugs of abuse in whole blood by means of EMIT-ETS and FPIA-ADx urine immunoassays. *Int J Leg Med* (1992) 105 : 115-119
- MAURER H, KESSLER C : Identification and quantification of ethylene glycol and diethylene glycol in plasma using gas chromatography-mass spectrometry. *Arch Toxicol* (1988) 62 : 66-69
- KÖHLER-SCHMIDT H : Ultrafiltration als Probenvorbereitung für die Extraktion von Arzneiwirkstoffen aus Blut. *Zentralblatt Rechtsmedizin* (1984) 26(8) : 714
- KÜHNHOLZ B, BONTE W : Methodische Untersuchungen zur Verbesserung des Fuselalkoholnachweises in Blutproben. *Blutalkohol* (1983) 20 : 399-410
- WELLER JP, WOLF M : Zum immunchemischen Nachweis von Morphinderivaten im Leichenblut. *Toxichem Krimtech* (1990) 57 : 116-119

## Broschüre Designer-Drogen

Folgende Beiträge sind enthalten:

- Schautafel "Ecstasy/XTC"; BKA
- Ecstasy/XTC; R. Dahlenburg, A. Maack; BKA
- Toxikologischer Nachweis von Designer-Drogen des Methylendioxyphenylalkylamin-Typs (MDA, MDMA, MDE, BDB, MBDB) im Urin mittels Immunoassay und GC-MS; H. Maurer; Homburg/Saar
- Ecstasy und andere Designer-Drogen; K.-A. Kovar; Tübingen
- Risikobewertung von Amphetaminderivaten unter dem Aspekt der Behavioral Toxicology; D. Franke et al.; Berlin.

Die Broschüre kann kostenlos angefordert werden bei:

Abbott GmbH Diagnostika  
Literatur Service  
Sabine Befard  
Max-Planck-Ring 2  
65205 Wiesbaden

Tel. 06122-58-1869 oder -1669  
Fax: 06122-58-1277

# Informationsveranstaltung Qualitätsmanagement-Akkreditierung

**Ort** : Frankfurt a. M.  
**Zeit** : Mittwoch, den 12.06.1996  
**Tagungsstätte** : Verband der Chemischen Industrie (VCI) -- Nähe Hauptbahnhof  
Karlstrasse 21, 60329 Frankfurt, Tel. 069/25560  
**Teilnahme-Gebühr** : 100 DM  
**Anmeldeschluß** : 31. 05. 1996

---

**Programm** : 10.00 Uhr Begrüßung der Teilnehmer  
10.15 Uhr Qualitätsmanagement im Labor (Schellenberg)  
11.00 Uhr Diskussion  
11.15 Uhr Akkreditierung aus Sicht eines Akkreditierers (Kindler)  
12.15 Uhr Diskussion  
12.30 Uhr Mittagspause  
13.30 Uhr Internes Audit und Review (Christelsohn)  
14.15 Uhr Diskussion  
14.30 Uhr Akkreditierung aus Sicht eines akkreditierten  
Labors in den Niederlanden (Zweipfennig)  
15.15 Uhr Diskussion  
15.30 Uhr Kaffeepause  
16.00 Uhr Akkreditierung aus Sicht eines akkreditierten  
Labors in Deutschland (Andert)  
16.45 Uhr Diskussion  
17.00 Uhr Abschluss-Diskussion und Perspektiven

---

## **Organisatoren, Ansprechpartner und Diskussionsleiter:**

**G. Kauert, Rechtsmedizin, Frankfurt, F. Köhler, Bundeskriminalamt, Wiesbaden**  
**S. Motsch, Zollkriminalamt, Köln, H.U. Rösener, Chemisches Untersuchungsamt, Hagen**

**Anmeldung und Überweisung der Teilnahme-Gebühr bitte an:**

**Dr. H. U. Rösener, Chemisches Untersuchungsamt, 58099 HAGEN, Pappelstr. 1**  
**Tel.: 02331/2074733(19) -- FAX: 02331/2072454**  
**Konto-Nr.: 215067851 -- BLZ: 45050001 -- Sparkasse Hagen -- (Dr. H.U. Rösener)**

