

Dünnschichtchromatographische Arzneimittelnachweise im Harn und Magensaft – Ein systematischer Analysengang

E. Interschick und H. Wüst

Med.-diagnostisches Institut der Städt. Krankenanstalten Karlsruhe

Zusammenfassung:

Es wird über einen systematischen dünnschichtchromatographischen Analysengang zum Nachweis von Arzneimitteln in Harn und Magensaft berichtet. Die Befundsicherung geschieht neben den Rf-Werten und den Sprühreaktionen durch charakteristische Metabolitenmuster und sog. „Kontrollplatten“.

Der Analysengang eignet sich zur Notfalldiagnostik und zur Überwachung von Patienten mit Arzneimittelmißbrauch. Er läßt sich von eingearbeitetem Personal in maximal 2 Stunden durchführen.

Schlüsselwörter:

Toxikologie – Arzneimittelanalyse – Dünnschichtchromatographie – Urinalyse – Magensaftanalyse.

Summary:

The paper reports on systematical thin layer chromatographic separations of drugs in the urin and the gastric juices. The identification of drugs can be brought about by Rf-values, spray reactions and especially by typical patterns of metabolic substances in the urin and by "control plates". The method described can be used in emergency diagnostics and for control of drug abuse.

The people involved with this method take a maximum of two hours to perform it.

Key words:

Toxicology – Drug analysis – Thin layer chromatography – Urin analysis – Gastric juice analysis.

Der beschriebene Analysengang eignet sich zum qualitativen Arzneimittelnachweis in der akuten, toxikologischen Notfalldiagnostik und zur Überwachung von Patienten bei Arzneimittelmißbrauch.

Es bietet sich u. E. derzeit als praktikable Lösung die Dünnschichtchromatographie an, die außerdem den Vorteil relativ geringer Investitions- und laufender Kosten hat. Die Methode ist einfach und nach kurzer Zeit zu beherrschen. Die Nachweise sind empfindlich und bei systematischer Anwendung weitgehend sicher und spezifisch (1–4, 6).

Die Methode ist schnell durchführbar. Ein vollständiger Analysengang der wichtigsten Medikamentengruppen läßt sich in ca. 2 Stunden bewältigen.

Es werden die wichtigsten klinisch-relevanten Arzneimittelgruppen erfaßt.

Ein Analysengang, der sich bei uns praktisch bewährt hat, ist mit detaillierter Arbeitsanleitung und Hinweisen zur Interpretation dargestellt. Die Arbeit soll gleichzeitig ein Beitrag zu der dringend notwendigen Standardisierung dünnschichtchromatographischer Analytik im klinischen Labor sein.

Extraktion der Arzneimittel aus Harn

Als Untersuchungsmaterial stehen im Notfall meist Magensaft und Harn, bei Arzneimittelabusus nur Harn zur Verfügung. Während im Magensaft die Substanzen

unverändert vorliegen, ist im Harn mit Metaboliten zu rechnen. Dies erschwert einerseits die Analytik, eröffnet andererseits durch Nachweis mehr oder weniger typischer Metaboliten oder Metabolitenmuster zusätzliche diagnostische Möglichkeiten.

Zur Anreicherung der Arzneimittel und zur Abtrennung störender Substanzen ist eine Extraktion erforderlich. Sie kann entweder mit dem Scheidetrichter oder mit Hilfe spezieller Extraktionssäulen (Extrelut[®]) durchgeführt werden.

Die unterschiedliche Löslichkeit der Medikamente erfordert saure und alkalische Extraktion, bei Vorliegen von Konjugaten vorher eine HCl-hydrolytische Spaltung. (8)

Dünnschichtchromatographische Trennung und Detektion

Die in Isopropanol gelösten Rückstände und die jeweiligen Standards werden auf DC-Platten strichförmig teils nebeneinander teils überlappend aufgetragen. Man verwendet 5 µl Auftragekapillaren, ggf. unter Benutzen von Auftragegeräten. Es empfiehlt sich zur Arbeitserleichterung mit einer Auftrageschablone zu arbeiten

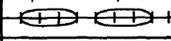
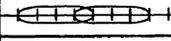
und die Auftragestellen vorher mit Bleistiftpunkten zu markieren. Da bei 10 µl und 15 µl Auftragevolumen 2 bzw. 3 mal an gleicher Stelle aufgetragen werden muß, ist zu beachten, daß nach Applikation jeweils die Auftragestelle luftgetrocknet ist. Die in der folgenden Übersicht gegebenen Hinweise auf Laufzeiten, Trocknungsart, Trocknungstemperaturen und Trocknungszeiten, sowie Angaben zur Sprühtechnik sollten eingehalten werden. Bei zu langen Laufzeiten ist mit stärkerer Diffusion der Substanzen und geringerer Empfindlichkeit zu rechnen, bei zu kurzen Laufzeiten ist die Trennung nicht ausreichend.

Gute Erfahrungen in der Sprühtechnik haben wir mit käuflichen Treibgas-Sprühdosen gemacht. Der Sprühvorgang muß in einem im Abzug installierten Sprühkabinett vorgenommen werden. Zum Besprühen sind die Reagenzien möglichst gleichmäßig auf die schräg aufgestellten Platten zu verteilen. Erfahrungsgemäß gelingt dies gut, wenn in einem Abstand von ca. 25 cm bei schnellem vertikalen und horizontalen Bewegen der Sprühdose gearbeitet wird (2).

Aus den nachfolgenden Übersichten sind die Analysenschritte und das detaillierte Vorgehen ersichtlich (Tab. 1 und 2).

Tab. 1:

Harn – Chromatographie – Saurer Extrakt ohne Hydrolyse

Arbeitsvorgänge	Barbiturate Chromatogramm 1	Barbiturate Chromatogramm 2	Bromureide Chromatogramm 3	Salicylate Chromatogramm 4	Paracetamol Chromatogramm 5
Trennkammer Nr. Laufmittel	Nr. 1 Chloroform 80 Aceton 20	Nr. 1 Chloroform 80 Aceton 20	Nr. 1 Chloroform 80 Aceton 20	Nr. 2 Toluol 120 Äther 60 Eisessig 18 Methanol 1	Nr. 3 Äthylacetat 85 Methanol 10 Ammoniak (25%) 5
Auftragung	Probe 10 µl Standard 1 10 µl 	Probe 10 µl Standard 1 10 µl 	Probe 10 µl Standard 1 10 µl 	Probe 10 µl Standard 1 10 µl 	Probe 15 µl Standard 2 10 µl 
Trocknen u. Einstellen in Kammer	Gebläse 5 min 20°C	Gebläse 5 min 20°C			
Laufzeit	7 Minuten	7 Minuten	7 Minuten	10 Minuten	10 Minuten
Trocknen min/°C	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20
UV — 254 nm	Carbromalstandard markieren			Blau fluoreszierende Flecken markieren	Fehlen fluoreszenzmindernde Substanzen in Standardhöhe, entfällt Sprühen
Sprühen 1	Hg-1-Nitrat bis beginnende Transparenz	Hg-2-Nitrat bis Transparenz	Fluoreszein wenig	Fe-3-Chlorid wenig	Diazot. Nitranilin bis Transparenz
Trocknen min/°C	5 Min. liegen lassen	Gebläse 3/120-150			Gebläse 5/60-75
Sprühen 2		Hg-2-Nitrat bis Transparenz	H ₂ O ₂ / Eisessig bis Transparenz		
Trocknen min/°C		Gebläse 5/120-150 5/20	Trockenschrank 15 min 110°C		
Sprühen 3		Diphenylcarbazon wenig			
Ergebnis Probe positiv Standard Untergrund	grau-schwarz grau-schwarz weiß	rot-violett rot-violett weiß	rot; UV 365 dunkel rot; UV 365 dunkel gelb; UV 365 hell	violett-braun violett gelb	braun-violett braun gelb

Auswertung der Chromatogramme

An Auswertkriterien stehen zur Verfügung:

- Fluoreszenzminderung im UV-Licht bei 254 nm und 365 nm
- Eigenfluoreszenz im UV-Licht bei 254 nm und 365 nm
- Wanderungsgeschwindigkeit unveränderter Arzneimittel oder Metaboliten (Rf-Werte) in Relation zu den mitgeführten Standards
- Farbreaktionen der Arzneimittel mit den Sprühreagenzien auf den DC-Platten
- Nachweis typischer Metabolitenmuster (nur im Harn).

Im UV-Licht bei 254 nm zeigen die meisten Arzneimittel aber auch einige natürliche Harnsubstanzen Fluoreszenzminderung. In den Auswertschemata sind die im UV-254 nm Licht erkennbaren Standards für die einzelnen Platten aufgeführt. Soweit angegeben, empfiehlt es sich, mit Bleistift Flecke seitlich zu markieren. Ein Umranden ist zu vermeiden, da sonst schwache Farbreaktionen bei späterem Besprühen schlechter zu sehen sind.

Tab. 3: Chromatographie der Kontrollplatten

Extrakt ohne Hydrolyse		Saurer Extrakt nach Hydrolyse	
Barbiturate Kontrollplatte K 1	Novonal Kontrollplatte K 2	Methaqualon Kontrollplatte K 3	
Nr. 5 Chlorof. 80 Äthanol 15 Ammoniak(25%) 5	Nr. 5 Chlorof. 80 Äthanol 15 Ammoniak(25%) 5	Nr. 2 Toluol 120 Äther 60 Eisessig 18 Methanol 1	
Probe 15 µl Stand. 1. 10 µl	Probe 15 µl Stand. 1. 10 µl	Probe 15 µl Stand. 4. 10 µl	
Gebläse 5 min 20° C	Gebläse 5 min 20° C	Gebläse 5 min 20° C	
15 min	15 min	10 min	
Gebläse 5 min 120-150° C 5 min 20° C	Gebläse 5 min 120-150° C 5 min 20° C	Gebläse 5 min 120-150° C 5 min 20° C	
		Phenacetinstandard markieren	
Wie Chromatogramm 2	Wie Chromatogramm 1	Wie Chromatogramm 7	

Tab. 2:

Harn – Chromatographie – Saurer Extrakt und basischer Extrakt mit Hydrolyse

Arbeitsvorgänge	Saurer Extrakt		Basischer Extrakt		
	Benzodiazepine Chromatogramm 6	Methaqualon Chromatogramm 7	Phenothiazine Chromatogramm 8	Codein / Morphin Chromatogramm 9	Codein / Morphin Chromatogramm 10
Trennkammer Nr. Laufmittel	Nr. 4 Toluol 95 Aceton 5	Nr. 1 Chloroform 80 Aceton 20	Nr. 5 Chloroform 80 Äthanol 15 Ammoniak (25%) 5	Nr. 5 Chloroform 80 Äthanol 15 Ammoniak (25%) 5	Nr. 3 Äthylazetat 85 Methanol 10 Ammoniak (25%) 5
Auftragung	Probe 15 µl Standard 3 10 µl	Probe 15 µl Standard 4 10 µl	Probe 15 µl Standard 5 10 µl	Probe 15 µl Standard 5 10 µl	Probe 15 µl Standard 5 10 µl
Trocknen u. Einstellen in Kammer	Gebläse 5 min 20°C	Gebläse 5 min 20°C	Gebläse 5 min 20°C	Gebläse 5 min 20°C	Gebläse 5 min 20°C
Laufzeit	7 Minuten	7 Minuten	10 Minuten	10 Minuten	10 Minuten
Trocknen min/°C	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20	Gebläse 5/120-150 5/20
UV – 254 nm	Fluoreszenzmindernde Substanzen in Höhe des Standards markieren	Phenacetinstandard markieren			
Sprühen 1	Na-Nitrit bis zur beginnenden Transparenz Standard verblaßt	Dragendorff bis beginnende Transparenz	Alkohol, Schwefels. bis Transparenz	K-Jodplatinat bis beginnende Transparenz	K-Jodplatinat bis beginnende Transparenz
Trocknen min/°C			Gebläse 3/120-150		
Sprühen 2	Naphthyläthylen-diamin wenig				
Ergebnis	Probe positiv violett-rot Standard violett-rot Untergrund weiß	orange orange gelb	blau-rot-violett violett weiß	dunkelblau-violett violett-braun Morphin: dunkelblau rotbraun	dunkelblau-violett violett-braun Morphin: dunkelblau rotbraun

Das gleiche gilt für Substanzen, die Eigenfluoreszenz haben, z.B. Salicylsäure und Salicylsäuremetaboliten.

Nach dem letzten Besprühen bzw. Trocknen der Platten ist es notwendig, die Auswertung sofort vorzunehmen, da viele Farbreaktionen schnell verblassen. Geringe Farbunterschiede zwischen Arzneimitteln und Standard kommen vor und sind meist konzentrationsbedingt, z. B. beim Paracetamol.

Die Laufhöhen (Rf-Werte) von Standard und Arzneimittel müssen bei Gruppenreaktionen nicht unbedingt übereinstimmen. Diese Arzneistoffe werden nur anhand der Farbreaktionen nachgewiesen.

Bei direktem Vergleich mit dem Standard ist wegen häufiger, meist geringfügiger Verschiebungen der Rf-

Werte im Harnextrakt überlappendes Auftragen erforderlich.

Auf einigen Platten sind sogenannte Hilfsstandards eingeführt, die zwar chemisch einen anderen Aufbau zeigen, aber durch typische Lokalisation (Phenacetin beim Methaqualon), oder größere Stabilität (Cholesterin bei Phenothiazinen) die Identifikation erleichtern.

Bewertung:

Fällt der Nachweis positiv aus, muß zum Ausschluß anderer Schlafmittel der Befund durch ein zusätzliches Chromatogramm (Kontrollplatte) gesichert werden.

Barbiturate und Novonal

Barbiturate werden teils unverändert, teils metabolisiert im Harn ausgeschieden.

Im Laufmittel Chloroform/Aceton wandern unveränderte Barbiturate zwischen die Standardsubstanzen Luminal und Prominal („Barbituratzone“), ihre Metaboliten liegen meist unterhalb von Luminal („Metabolitenzone“). Eine Ausnahme bilden die Thiobarbiturate, wie Thiopental, das über die „Barbituratzone“ hinauswandert. Da es im Körper teilweise zu Pentobarbital oxidiert wird, ist es im Harn gegebenenfalls als solches in der „Barbituratzone“ nachweisbar.

Barbiturate und ihre Metaboliten färben sich mit dem Sprühreagenz Hg(I)nitrat grau bis schwarz, mit Hg(II)nitrat/DPC violett an. Dabei reagieren unveränderte Barbiturate deutlich empfindlicher mit Hg²⁺ DPC, Metaboliten stärker mit Hg¹⁺.

Nachweis von Barbituraten und barbituratfreien Schlafmitteln

Präparate:

Barbital	= Veronal®
Phenobarbital	= Luminal®
Cyclobarbital	= Phanodorm®
Cyclopentobarbital	= Cyclopal®
Aprobarbital	= Allional®
Novonal	= Novo-Dolestan®
Glutethimid	= Doriden®
Methyprylon	= Noludar®
Amobarbital	= Stadadorm®
Pentobarbital	= Repocal®, Neodorm®
Secobarbital	= Seconal®
Heptabarbital	= Medomin®
Hexabarbital	= Medomin®
Hexabarbital	= Evipan®
Phenytoin	= Zentropil®
Ethinamat	= Valamin®
Centalun	= Centalun®

Tab. 4:

Standard 1

Dieser Mischstandard wird zum Nachweis von Barbituraten, Novonal, Bromureiden und Salicylsäure verwendet.

Zusammensetzung		Auftrag- menge µg/10µl	Befunde im UV-254 nm	Befunde auf besprühten Platten	
				Hg-1 Nitrat	Hg-2 Nitrat Diphenylcarbazon
Pro	Prominal	50	Fluoreszenz- minderung	grau	rot-violett
Evi	Evipan	20	Fluoreszenz- minderung	grau	rot-violett
Car	Carbromal	20	Fluoreszenz- minderung	negativ	negativ
Lu	Luminal	20	Fluoreszenz- minderung	grau	rot-violett
Nov	Novonal	10	negativ	grau- bräunlich	negativ
Sal	Salicylsäure	20	Eigenfluoreszenz	negativ	negativ

Vorgehen: siehe Tab. 1.

Demzufolge ergeben im Harn stark metabolisierte Barbiturate deutlich positive Flecken in der Metabolitenzone und nur schwach positive in der Barbituratzone, die sich gelegentlich nur mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$ darstellen lassen. Werden auf Platte 1 und 2 nur Metaboliten gefunden, bleibt der Befund unsicher. Man kann jedoch davon ausgehen, daß eine Barbituratintoxikation dann unwahrscheinlich ist. Bei gering metabolisierten Barbituraten (Barbital, Phenobarbital, Aprobarbital) ist auf beiden Platten mit positiven Reaktionen in der Barbituratzone zu rechnen.

Bei gesichertem Barbituratbefund ist also immer auf Platte 2 die Barbituratzone positiv, auf Platte 1 die Barbiturat- und Metabolitenzone entweder allein oder gemeinsam positiv. Die Reaktion der Metaboliten mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$ ist dagegen wenig typisch.

Die genannten Sprühreaktionen sind für Barbiturate nicht spezifisch. Natürliche Harnsubstanzen, Desinfektionsmittelspuren und andere Medikamente, meist ebenfalls Schlafmittel, können ähnliche Färbungen ergeben. Letztere spielen nach unserer Erfahrung mit Ausnahme von Novonal in der klinischen Toxikologie allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Es ist aber notwendig, um Verwechslungen zu vermeiden, einen positiven Barbiturat- oder Novonalbefund über eine Kontrollplatte zu sichern. Im Folgenden wird auf die wichtigsten störenden Medikamente eingegangen.

Novonal (Novo-Dolestan®)

Das rezeptfreie Schlafmittel (Ersatzsubstanz für das jetzt rezeptpflichtige Carbromal) wurde in den letzten zwei Jahren häufig zu Suicidversuchen verwendet. Es wird zum Teil unverändert ausgeschieden. Im Laufmittel Chloroform/Azeton wandert Novonal in die Metabolitenzone der Barbiturate. Mit Hg^{1+} reagiert es bräunlich-schwarz, mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$ wird es nicht angefärbt. Die Abgrenzung von Barbituratmetaboliten bei positivem Novonalbefund erfolgt auf der Kontrollplatte K2.

Glutethimid (Doriden[®])

Glutethimid reagiert empfindlich mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$, dagegen nur in größeren Mengen mit Hg^{1+} . Im Laufmittel Chloroform/Aceton wandert es in der Barbituratzone. Auf der Kontrollplatte für Barbiturate (K1) wird es von den Barbituraten abgetrennt. Da es unverändert praktisch nicht ausgeschieden wird, erscheint es uns fraglich, ob selbst bei Intoxikationen die hier beschriebenen Methoden zum Nachweis der Reinsubstanz ausreichen.

Methypylon und Metaboliten (Nodular[®])

Im Gegensatz zu Methypylon reagieren seine Metaboliten mit Hg^{1+} und mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$. Im Laufmittel Chloroform/Azeton erscheinen nach unseren Erfahrungen in der Metabolitenzone und Barbituratzone positive Flecken. Auf der Kontrollplatte K1 liegen sie jedoch außerhalb der Barbituratzone.

Bromureide

Metaboliten und Carbromal können mit Hg^{1+} reagieren, Carbromal selbst aber nur in sehr hohen Konzentrationen (z.B. Magensaft). Da sich Bromureide mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$ nicht, aber mit Fluoreszein/ H_2O_2 rotanfärben, ist auf diesen Platten eine Identifikation möglich. Um einen Hg^{1+} positiven Fleck auf Platte 1 ggf. dem Carbromalstandard zuordnen zu können, ist es zweckmäßig, diesen vor dem Besprühen mit Bleistift zu markieren.

Hg^{1+} -positive Carbromalmetaboliten, die wir selten beobachteten, wandern im Laufmittel Chloroform/Aceton in die Metabolitenzone und sind alleine nicht ohne weiteres von Barbituratmetaboliten zu unterscheiden.

Distraneurin

Bei Patienten mit hoher therapeutischer Distraneurinmedikation fanden wir regelmäßig Hg^{1+} -positive Flecke in der Barbiturat- und teilweise auch in der Metabolitenzone. Mit $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$ färben sich die Flecke nur schwach bläulich-bräunlich an. Unverändertes Distraneurin reagiert weder mit Hg^{1+} noch $\text{Hg}^{2+}/\text{DPC}$. Die Befundsicherung geschieht mit dem Sprühmittel Dinitrobenzol/KOH auf einer zweiten Platte. Die Metaboliten geben eine rötlich-bräunliche Reaktion ähnlich den Ketobarbituraten (= Barbituratmetaboliten). Letztere wandern aber nicht in der Barbituratzone.

UV-Spektren Hg^{1+} -positiver Arzneimittelmetaboliten

Nachdem von verschiedenen Autoren (1, 3) immer wieder auf die Befundsicherung DC-getrennter Arzneimittel durch UV-Spektren hingewiesen worden ist, haben wir mit der Überprüfung unter den Bedingungen im klinisch-chemischen Labor begonnen.

Wir gehen wie bei Geldmacher-Mallinckrodt beschrieben vor (4), besprühen aber vor dem Auskratzen der Flecke die DC-Platte kurz mit Wasser.

Barbiturate wiesen im alkalischen das typische Maximum bei ca. 240 nm auf, Metaboliten gelegentlich ein zusätzliches bei 340 nm.

Abbauprodukte von *Methypylon* ließen sich durch ihr Maximum bei 310 nm gut unterscheiden.

Distraneurinmetaboliten waren dagegen in ihrem UV-Verhalten recht uneinheitlich. Sie scheinen in gefrorenem Harn sich außerdem zu verändern. Die Maxima verhielten sich teilweise ähnlich denen der Barbiturate mit einem Nebenmaximum bei 340 nm. Einige zeigten Maxima bei ca. 260 nm (pH 1).

Es bedarf unseres Erachtens noch beträchtlicher Arbeiten, um die UV-Spektren in klinischen Analysengängen routinemäßig einzusetzen.

Nachweis von Bromureiden (Bromharnstoffderivaten)

Preparate: Adalin*, Bromural*, Sekundal*

Vorgehen siehe Tab 1.
Chromatogramm 3

Zum Nachweis der Bromureide findet der Carbromal enthaltende Mischstandard-1 Verwendung. Da die DC-Trennung im gleichen Laufmittel wie die der Barbiturate erfolgt, stellen sich die Standards im UV- bei 253 nm wie bei den Barbituraten dar. Mit dem Sprühreagenz Fluoreszein/H₂O₂ färbt sich aber nur Carbromal an, so daß auf der entwickelten Platte nur der einzelne Carbromalfleck zu erkennen ist.

Bewertung:

Akute Vergiftungen allein und in Kombination mit anderen Medikamenten sind häufig. Die Wirksubstanz wird zwar schnell debromiert, und im Harn sind nur wenig unveränderte Bromureide nachzuweisen, bei akuten Vergiftungen findet sich aber regelmäßig im Harn oder Magensaft organisch gebundenes Brom, das mit Fluoreszein/H₂O₂ reagiert und den Nachweis ermöglicht. Schwieriger wird die Diagnose des chronischen Abusus (Bromismus). Der Bromureidnachweis ist oft nur gering, während offenbar wegen langsamer renaler Ausscheidung, anorganisches Brom im Serum exzessive Werte erreichen kann (1000–2000 mg/l therapeutische Norm: 5–10 mg/l). Es empfiehlt sich in solchen Fällen, die quantitative Bromidbestimmung (z. B. nach Kisser 1967) zusätzlich durchzuführen.

Das am häufigsten verwandte Bromureid ist Carbromal, wie es auch im Standard enthalten ist. Der Rf-Wert anderer Bromureide, wie z. B. Bromisoval ist aber geringer. Der Bromureidnachweis ist also auch dann positiv, wenn auf dem Chromatogramm kürzer laufende Substanzen, ausgenommen positive Reaktionen innerhalb der Startzone Rotfärbung zeigen.

Befund:

*Carbromal positiv
In Höhe des Carbromalstandards rötlicher
Fleck.*

Zum Bromureidnachweis wird das Chromatogramm 3 verwendet. Da die DC-Trennung mit gleichem Laufmittel und gleichem Standardgemisch wie die der Barbiturate erfolgt, stellt sich das Bild im UV – bei 254 nm wie bei den Barbituraten dar. Mit dem Sprühreagenz Fluoreszein/H₂O₂ färbt sich von den Standards aber nur Carbromal rötlich an.

Nachweis von Salicylaten

Vorgehen siehe Tab. 1.

Die im Mischstandard-1 (s. S. 80) enthaltene freie Salicylsäure wandert im Laufmittel Toluol/Ather/Essig/Methanol mit einem Rf-Wert über 50. Sie ist an ihrer UV-Eigenfluoreszenz bei 254 nm leicht zu erkennen. Die übrigen Standardsubstanzen mit Fluoreszenz-minderung liegen eng beieinander, reagieren aber nicht mit FeCl₃. Auf der besprühten Platte ist daher nur der violette Salicylsäurestandard (= 20 µg/10 µl) sichtbar.

Bewertung:

Oral aufgenommene Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und Salicylamid werden nach schneller Resorption teils unverändert, teils metabolisiert mit dem Hauptmetaboliten Salicylursäure in den Harn ausgeschieden. Die Ausscheidung kann durch Alkalisieren des Harns beträchtlich gesteigert werden. Vergiftungsfälle durch perkutane Resorption von Salicylsäure und Methylsalicylsäure sind besonders bei Kindern bekannt.

Die Erkennung stützt sich im Harn und Magensaft auf die typische bläuliche Eigenfluoreszenz bei 254 nm und die violette Farbreaktion aller Salicylsäurederivate mit FeCl₃. Durch Markierung typisch fluoreszierender Zonen vor dem Sprühen werden Salicylate unabhängig von ihrem Rf-Wert erkannt und lassen sich von anderen FeCl₃-positiven Substanzen unterscheiden.

Da die anderen Ausscheidungsprodukte, wie der Hauptmetabolit Salicylursäure, geringe Rf-Werte als freie Salicylsäure haben, liegen bei positiven Salicylatbefunden im Harn die positiven Flecke meist unterhalb der Standardzone.

Befund:

*Salicylate positiv
Violett brauner Fleck an im UV bei 254 nm
stark fluoreszierender Stelle.*

Nachweis der Phenazetingruppe (Phenazetin, Paracetamol, Acetanilid)

Preparate: Phenazetin: zahlreiche Mischpräparate;
Paracetamol: Ben-uron®.

Tab. 5:**Standard 2**

Der Standard enthält ausschließlich Paracetamol als gemeinsamen Metaboliten der Phenazetingruppe.

Zusammensetzung	Auftragmenge µg/10µl	Befund im UV-254 nm	Befund auf besprühten Platten Diaz. Nitranilin
Paracetamol (N-Acetyl-aminophenol)	50	Fluoreszenz- minderung	braun

Bewertung:

Paracetamol, selbst ein Arzneistoff, ist gemeinsamer Metabolit von Phenacetin und Acetanilid. Alle 3 Verbindungen wirken analgetisch und antipyretisch. Nach schneller Resorption auch im Dickdarm erscheint im Harn überwiegend Paracetamol zu 70 bis 80% in konjugierter Form. Nach unseren Erfahrungen reicht auch bei therapeutischer Dosierung der frei ausgeschiedene Anteil von Paracetamol aus, um einen sicheren Nachweis zu führen.

Ein positiver Befund erfordert obligat eine in Höhe des Standards im UV 254 nm erkennbare Fluoreszenzminderung und Braunfärbung nach Sprühen mit diazotiertem Nitranilin. Fehlt die Fluoreszenzminderung, ist der Befund als negativ anzusehen, und es kann der Sprühvorgang entfallen.

Aus einem positiven Paracetamolbefund kann naturgemäß nicht entschieden werden, welcher Art die Medikation innerhalb der Phenazetingruppe war.

Befund:

„Phenazetin“ positiv
Überlappend aufgetragen findet sich in Höhe des Standards brauner Fleck.

Nachweis von Benzodiazepinen

Präparate:
Chlordiazepoxid = Librium®
Diazepam = Valium®
Medazepam = Nobrium®
Nitrazepam = Mogadan®
Oxazepam = Adumbran®
Präzepam = Demetrin®
Dikaliumchlorazepat = Tranxilium®
Nachweis siehe Tab. 2.

Bewertung:

Unveränderte Benzodiazepine lassen sich im Harn meist nicht nachweisen. Typische Metaboliten sind als Konjugate ausgeschiedene Benzophenone, die gewisse Rückschlüsse auf die eingenommene Substanz zulassen.

Bei der Hydrolyse wandeln sich auch unveränderte Benzodiazepine noch in Benzophenone um, so daß im sauren Extrakt nach Hydrolyse nur noch Benzophenone vorliegen. Im UV-254 zeigen alle eine Fluoreszenzminderung, mit dem Sprühreagenz sind als violette bzw. rötliche Flecke aber nur ACB und ANB nachweisbar. Die methylierte Aminogruppe des MACB läßt sich nicht diazotieren.

In eigenen Versuchen konnte das Auftreten obengenannter Metaboliten nach oraler Verabfolgung von Handelspräparaten bestätigt werden.

Tab. 6:**Standard 3**

Der Standard enthält die drei typischen Benzophenonmetaboliten der wichtigsten Benzodiazepine (s. unten).

Zusammensetzung	Auftragmenge µg/10µl	Befunde im UV-254 nm	Befunde auf besprühter DC-Platte Na-Nitrit/Naphthyl- äthylendiamin
MACB 2-Methylamino- 5-chlorbenzophenon	5	Fluoreszenzminderung	negativ
ACB 2-Amino-5-chlor- benzophenon	5	Fluoreszenzminderung	violett
ANB 2-Amino-5-nitro- benzophenon	5	Fluoreszenzminderung	violett

Größere Mengen an Benzophenonen lassen sich auf der DC-Platte bereits an der gelben Eigenfarbe erkennen. Die Farbreaktion mit dem Sprühreagenz ist sehr empfindlich und oft noch positiv, wenn im UV-Licht eine Fluoreszenzminderung bereits fehlt. In der Regel lassen solche Befunde darauf schließen, daß in den letzten Tagen keine Benzodiazepine eingenommen wurden. Die lange Ausscheidungsdauer bei wiederholter Einnahme über Wochen nach Absetzen der Medikation muß besonders in der Beurteilung bei Suchtpatienten berücksichtigt werden.

Befund:

Benzodiazepine positiv
Bei überlappendem Auftragen in Höhe des Metaboliten ACB violetter typischer Fleck.

Nachweis von Methaqualon

Präparate: Revonal[®], Dormigon[®], Dormutil[®], Somnotropon[®].

Bewertung:

Die Methaqualonmetaboliten ergeben auf dem Chromatogramm ein typisches Muster. Der Hilfsstandard Phenazetin ist zwischen dem ersten und zweiten Metaboliten lokalisiert und erlaubt so eine genaue chromatographische Zuordnung. Auf diese Weise werden Verwechslungen mit anderen Medikamenten vermieden. Unverändertes Methaqualon aber auch der Metabolit 3 können fehlen. Bei Ausscheidung großer Mengen werden Metaboliten so massiv gefunden, daß sie sich chromatographisch nicht mehr einwandfrei trennen lassen. Das Chromatogramm muß dann mit einem 1:10 verdünnten Extrakt wiederholt werden.

Ist kein unverändertes Methaqualon nachweisbar oder fehlt eine Metabolitenzone, ist eine Kontrollplatte erforderlich.

Tab. 7:**Standard 4**

Die Standardlösung enthält Methaqualon und den sog. Hilfsstandard Phenazetin zur besseren Lokalisation der Metaboliten M1 und M2. Beide sind im UV-254 nm an der Fluoreszenzminderung zu erkennen. Vor dem Sprühen muß Phenazetin mit Bleistift unter UV-Licht markiert werden, da es nicht mit Dragendorff-Lösung reagiert und somit auf der besprühten Platte nicht mehr nachweisbar ist. Die besprühte Platte läßt also nur noch den Standardfleck unveränderten Methaqualons erkennen.

Zusammensetzung	Auftragmenge µg/10 µl	Befunde im UV-254 nm	Befunde auf besprühter DC-Platte Dragendorff R.
Methaqualon	20	Fluoreszenzminderung	orange
Phenazetin	50	Fluoreszenzminderung	negativ

derlich. Einige andere Medikamente, z. B. Prothipendyl liefern ähnliche Muster. Im Gegensatz zu diesen bleibt auf der Kontrollplatte das Metabolitenmuster des Methaqualons praktisch unverändert.

Befund:

Methaqualon und Metaboliten positiv
Dragendorff positiver Fleck in Höhe des überlappend aufgetragenen Standards Methaqualon.
3 positive Flecke in der Metabolitenzone mit typischer Lokalisation zum Hilfsstandard.

Tab. 8:**Standard 5**

Zusammensetzung		Auftragmenge µg/10 µl	Befunde im UV-254 nm	Befunde auf besprühten DC-Platten	
				Alkoh. H ₂ SO ₄	K-Jodplat.
Chol	Cholesterin	10	negativ Fluoreszenzminderung	violett	negativ
Cod	Codein	20		negativ	braun-violett
Morph	Morphin	10	Fluoreszenzminderung	negativ	dunkelblau
Pthp	Prothipendyl	5	Fluoreszenzminderung	negativ	braun-violett

**Nachweis von
Phenothiazinen, Morphin (Heroin), Codein**

Präparate:
Phenothiazine: Atosil[®], Megaphen[®], Psyquil[®], Neurocil[®], Melleril[®].
Codein: zahlreiche Mischpräparate.
Morphin.

Phenothiazine, Morphin, Codein:

Befund positiv, wenn mit den beiden Laufmitteln von Platte 9 und 10 braunviolette bzw. dunkelblaue Flecke in Höhe des jeweiligen Standards nachweisbar sind.

Bewertung:

Von der umfangreichen Gruppe basischer Medikamente werden in diesem Analysegang die Phenothiazine, das Phenothiazinderivat Prothipendyl und Morphinderivate erfaßt.

Phenothiazine

Phenothiazine, die wichtigste Gruppe der Neuroleptica, liefern auf den Chromatogrammen zahlreiche Metabolitenzonen, die sich mit K-Jodplatinat braunviolett und mit alkoholischer Schwefelsäure rot, blau oder violett anfärben. Da das gleiche Laufmittel verwendet wird, erscheinen auf Platte 8 und 9 im positiven Fall identische Fleckenmuster. Sie variieren in ihrem Laufverhalten bei den einzelnen Phenothiazinen aber so stark, daß sie im Gegensatz zum Methaqualon und Prothipendyl nur über ihre Anfärbung erkannt werden können. Reagieren Flecke nur mit einem Sprühmittel, liegt ein negativer Befund vor. Cholesterin, stabiler als Phenothiazine, dient im Standard nur zur Kontrolle der Farb-reaktion mit alkoholischer Schwefelsäure.

Kontrollplatten

Zur Sicherung positiver oder nicht eindeutiger Befunde ist es erforderlich, folgende Kontrollplatten anzulegen: Kontrollplatte Barbiturate (K1) bei positivem Barbituratbefund im Harn oder Magensaft.

Kontrollplatte Novonal (K2) bei positivem Novonalbefund im Harn.

Kontrollplatte Methaqualon (K3) bei nicht eindeutigem Methaqualonbefund, wenn unverändertes Methaqualon oder eine Metabolitenzone fehlt.

Sprühreagentien, Reagentien zur Extraktion und Chromatographie, Standardlösungen, Laufmittel siehe in: Interschick, Wüst und Wimmer 1978.

Morphin (Heroin), Codein

Die Opiumalkaloide liegen im Harn überwiegend als Konjugate vor. Der Nachweis erfordert vorherige Hydrolyse. Codein (= Methymorphin) wird teils unverändert, in geringer Menge auch als Morphin ausgeschieden. In der Befundinterpretation ist dies zu beachten, besonders wenn im Harn neben wenig Morphin größere Mengen Codein gefunden werden. Wir konnten diese Transformation allerdings nur selten beobachten. Heroin (= Diacetylmorphin) erscheint im Harn als Morphin.

Die Ausscheidung im Harn erfolgt schnell. Bei therapeutischer Dosis ist mit dem Maximum nach 3–4 Stunden zu rechnen. Aber bereits nach 6–12 Stunden kann je nach verabfolgter Menge im Harn ein negativer Befund vorliegen.

Die Befundsicherung von Morphin und Codein erfolgt durch Trennung in zwei Laufmittel (Platte 9 und 10). Die Sprühreaktion ist empfindlich.

Kontrollplatte Barbiturate (K1)

Die Rf-Werte der Substanzen von Standard 1, der auch hier verwendet wird, sind entsprechend verändert. Die

Barbituratzone wird hier von Evipan und nicht von Luminal nach oben abgegrenzt. Carbomal und Novonal wandern über die Barbituratzone hinaus. Der Barbituratnachweis ist als positiv anzusehen, wenn innerhalb der Barbituratzone sich Substanzen mit Hg²⁺/DPC anfärben lassen.

Kontrollplatte Novonal (K2)

Das Chromatogramm entspricht im UV-Licht (254 nm) der Kontrollplatte K1, da gleicher Standard und Laufmittel verwendet werden. Durch das Sprühreagenz Hg(I)-Nitrat wird aber neben den Barbituraten auch Novonal angezeigt. Liegt in der Höhe des Novonalstandards eine Hg¹⁺-positive Substanz, ist der Befund positiv zu bewerten. Werden die Standardsubstanzen Evipan und Novonal nicht voneinander getrennt, ist das Laufmittel verbraucht. Das Chromatogramm muß dann in einer frisch gefüllten Trennkammer wiederholt werden.

Kontrollplatte Methaqualon (K3)

Methaqualon und Phenacetin (Standard 4) wandern in dem hier verwendeten Laufmittel Toluol/Äther/Eisessig/Methanol ähnlich wie in Chloroform/Aceton. Der Hilfsstandard Phenacetin muß ebenfalls im UV-Licht (254 nm) markiert werden. Der Methaqualonbefund ist gesichert, wenn ein ähnliches Dragendorff positives Fleckenmuster wie auf der in Chloroform/Aceton entwickelten Platte erscheint, wenigstens aber müssen 2 Metabolitenzonen (M1 und M2) in der Nähe des Phenacetinstandards liegen, wie aus der Abbildung zu entnehmen ist.

Schrifttum

- 1 BOSCHE J. Schlafmittelnachweis mittels Dünnschichtchromatographie. *Arzt Lab* 16 237 (1970)
- 2 BREITER J. Dünnschichtchromatographischer Suchtest zur Erkennung von Drogen- und Arzneimittelmißbrauch. *Kontakte (Merck)* 3/74, 17 (1974)
- 3 BREITER J. HELGER, R. INTERSCHICK, E. WUST, H. Thin Layer Chromatographic Screening for Methaqualon, Phenothiazines, Opiates and Benzodiazepines. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 127 (1978)
- 4 GELDMACHER, V. MALLINCKRODT, M. Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-chemischen Laboratorium. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1976.
- 5 KISSER, W. Über den Nachweis und die quantitative Bestimmung bromierter Harnstoffderivate in der Toxikologie. *Arch. Toxikol.* 22, 404 (1967).
- 6 INTERSCHICK, E., WUST, H. Dünnschichtchromatographischer Analysengang zum Nachweis von Medikamenten im Harn und Magensaft. *Therapiewoche* 26, 5313 (1976)
- 7 INTERSCHICK, E., WUST, H., WIMMER, H.: *GIT* 7, 22. Jhrg. 555, 625 (1978).
- 8 WIMMER, H., SACHS, A., BREITER, J.: *Diagnostica Merck* 1978.

Anschrift der Autoren:

Dr. H. Wüst
Medizinisch-diagnostisches Institut
der Städt. Krankenanstalten Karlsruhe
Moltkestraße 14
7500 Karlsruhe

Eine ausführliche Darstellung der Methodik mit Beschreibung des Extraktionsverfahrens und Darstellung charakteristischer Chromatogramme sowie Angabe von Reagentien und sonstigen Hilfsmitteln findet sich in: *GIT*, 22. Jhrg. H. 7, 555–572 und 625–626 (1978).

Referate aus Zeitschriften

Toxoplasmose durch Blutübertragung? Morphologische Studien zur Frage des Befalls von Blutzellen durch *Toxoplasma gondii*

DMW, Heft 41, Jahrgang 103, 1978, S. 1598–1602

R. Werk und W. Bommer

Hygiene-Institut, Lehrstuhl für Allgemeine Hygiene,
Universität Göttingen

Verschiedene Untersucher haben in den vergangenen Jahren im Blut von infizierten Tieren Toxoplasmen nachgewiesen und konnten zeigen, daß *Toxoplasma gondii* in den Leukozyten des peripheren Blutes parasitieren können.

Siegel und Mitarbeiter konnten 1971 bei Leukämie-Patienten das Auftreten einer akuten disseminierten Toxoplasmose nach Leukozytentransfusion beobachten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Zellspezifität von *Toxoplasma gondii* im Hinblick auf Blutzellen. Die Untersuchungen wurden an folgenden Zellkulturen (Suspensionskulturen) durchgeführt: T-Zellen eines Hühnertumors und Mäuse-Mastozytomazellen (Gruppe: weiße Blutzellen), Friendvirustransformierte Erythroleukämiezellen sowie normale Erythrozyten von Mensch und Maus und Huhn (Gruppe: rote Blutzellen).

Weißer Blutzellen können nach den Untersuchungsergebnissen leicht von Toxoplasmen befallen werden. Diese Befunde entsprechen den Beobachtungen, daß durch Leukozyten-Transfusionen menschliche Toxoplasmose-Infektionen übertragen werden konnten. In den reifen

roten Blutkörperchen konnten niemals Toxoplasmen nachgewiesen werden. Es gelang jedoch Friendvirus-transformierte Erythroleukämie-Zellen der Maus, welche mit kernhaltigen Vorstufen der roten Blutreihe vergleichbar sind, mit Toxoplasmen zu infizieren.

Was die Gefahr einer Übertragung von Toxoplasmen durch Bluttransfusionen betrifft, so muß auch bei chronischen Infektionen des Spenders die Möglichkeit als gegeben angesehen werden. Es sollte bei jeder Bluttransfusion an die Möglichkeit der Toxoplasmose-Übertragung gedacht werden und deshalb der Toxoplasmose bei Blutspendern mehr Beachtung geschenkt werden.

Da klinische Erscheinungen nicht vorhanden sein müssen, auch wenn sich Parasiten im Blut befinden, bedarf die Beurteilung einer Infektionsgefährdung der Beobachtung der Antikörpertiter und deren Bewegung.

U.T.

Zur klinischen Manifestation der Toxoplasmose

Med. Klin. Nr. 50, Jahrg. 73/1978, S. 1769–1772

F. v. Seyerl

Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern –
Fachbereich Veterinärmedizin

Die unterschiedlichen Erscheinungsformen der Toxoplasmose des Menschen sind oft so wenig charakteristisch, daß in vielen Fällen aus der klinischen Symptomatologie keine sichere Diagnose möglich ist. Sie erfordert eine Untermauerung durch serologisch-diagnostische Tests.

Der serologische Nachweis toxoplasmose-spezifischer Antikörper hat sich allgemein durchgesetzt:

Gleichbleibende oder abfallende niedrige AK-Titer im Sabin-Feldmann-Test (SFT) oder im Immunfluoreszenztest (IFT) bei negativer Komplementbindungsreaktion (KBR) und fehlendem klinischen Verdacht sprechen für eine latente, nicht behandlungsbedürftige Durchseuchung.

Über die Grenzwerte (SFT: 1:1024, KBR: 1:10) hinausgehende AK-Titer bei klinisch verdächtiger Manifestation und einem eventuell nachzuweisenden Titerverlauf lassen eine Toxoplasmose annehmen, deren Behandlung gegebenenfalls erforderlich ist. Bei einem bestehenden, klinisch verdächtigen Krankheitsbild liegt der Infektionszeitpunkt bereits so weit zurück, daß im Falle einer ursächlichen Toxoplasmose beweisende Antikörper zu erwarten sind.

In welchem Umfang die Toxoplasmose als auslösendes Moment eines Krankheitsbildes verantwortlich gemacht werden kann, wurde an 14618 toxoplasmoseverdächtigen Patienten untersucht.

Die Patienten mit erhöhten AK-Titern wurden in drei Altersgruppen zusammengefaßt. Innerhalb dieser Gruppen wurden die Krankheits-symptome in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit aufgeschlüsselt. Es zeigt sich, daß die Rolle, die der Toxoplasmose als auslösendem Moment einer klinischen Verdachtsdiagnose zukommt, nach Infektionsmodus und Lebensalter verschieden ist.

Bei Säuglingen und Kleinkindern treten neben einer bevorzugten Lokalisation am Auge die Lymphadenitis toxoplasmatica, dann die Meningitiden, Enzephalitiden und deren Folgeerscheinungen auf.

Im Kindes- und Jugendlichenalter findet sich besonders häufig die lymphoglanduläre Form neben den toxoplasmosebedingten Augen- und Ohrenmanifestationen. Im Erwachsenenalter treten in der Reihenfolge der Beteiligung Lymphadenitiden, Spontanaborte, Meningitiden und Augenaffektionen auf.

Die Untersuchung zeigt, daß erst die Erfassung aller Fakten, wie Alter, Symptomatik und Serodiagnostik die Diagnose der Toxoplasmose mit ihren außerordentlich vielfältigen Erscheinungsformen sichern kann.

U.T. □