

WOOLF, L. J.: Gene expression in Heterozygotes. *Nature* (Lond.) **194**, 609 (1962).
YU-SHIH-CHEN: Microdetermination of parathion (and related compounds). *Bull. Ass. Agr. Chem. Natl. Taiwan Univ. (FORMOSA)* **8**, 21 (1959); *Chem. Abstr.* **53**, 22707i (1959).

Privat-Dozentin Dr. med. et phil. nat. GELDMACHER-V. MALLINCKRODT
Institut für gerichtliche Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Erlangen, Universitätsstraße 22

A. KAMM (Marburg): Papierchromatographischer Nachweis einiger Cumarinderivate. (Erscheint in *Arch. Toxikol.*)

G. MACHATA (Wien): Der chemische Nachweis des Dopings beim Sport.

Die meisten nationalen Sportverbände besitzen Verordnungen gegen das Doping. Die Verordnungen sind nicht alle gleich, doch ist ihr wesentlicher Inhalt, daß das Dopen prinzipiell verboten ist. In den Bestimmungen ist für uns der wesentlichste Teil, welche Tatbestände zum Doping führen. Die österreichische Dopingkommission legt diesen Tatbestand mit folgendem Satz fest: „Doping ist die Verabreichung oder der Gebrauch von körperfremden Mitteln in jeder Form und physiologischen Mitteln, in abnormaler Dosis oder auf abnormalem Wege zugeführt, mit dem Ziel der unfairen Leistungssteigerung.“

Dieser Satz ist in den weiteren Bestimmungen ausführlich erläutert und durch namentliche Anführung verschiedener Drogen eindeutig festgelegt. Dazu gehören z. B. Psychopharmaca, Analeptica, Morphinalkaloide und Strychnin, ebenso wie auch Äthylalkohol.

Bei solchen weitgehenden Forderungen muß auch die Möglichkeit geschaffen werden, Kontrollen durchzuführen. Jeder Teilnehmer an einer Wettveranstaltung ist daher verpflichtet, seine Kleider, Sportgeräte, Gepäck, Verpflegung sowie seine Körperausscheidungen (Harn) untersuchen zu lassen.

Die Frage an den forensischen Chemiker ist nun die Nachweisbarkeit verschiedener, zum Dopen verwendeter Substanzen, die Möglichkeit einer allfälligen Aussage über Dosierung und Körperpassage^{1, 2, 3, 4, 5}. Dazu kommt, daß das Untersuchungsergebnis eindeutig sein und auch rasch vorliegen muß. Deswegen ist es nicht einfach, solche Untersuchungen durchzuführen. Schon aus Gründen der größten Erfahrung, kommen nach unserer Meinung nur größere toxikologisch-chemische Laboratorien, allenfalls gut eingerichtete klinisch-chemische Laboratorien, in Frage. Zur Forderung der Schnelligkeit der Analyse sei nur darauf verwiesen, daß zum Beispiel nach Beendigung eines Rennens in der Zeit bis zur Siegerehrung die Analyse fertig sein muß, da es nicht angängig ist, nachträglich eine Reihung zu ändern und einen Siegespreis abzuerkennen.

Als Untersuchungsmaterial kommt beim Sportler im Gegensatz zur Untersuchung bei Pferden⁶, abgesehen von beschlagnahmten Tabletten oder verdächtigen Getränken, der Harn in Frage. Der Harn wird bei uns direkt bei alkalischer Reaktion mit Äther extrahiert und der Extrakt auf übliche Weise weiterverarbeitet. Beim Abdunsten des Lösungsmittel-extraktes kann es allerdings zu Verlusten an leicht flüchtigen Basen, wie Methamphetamin, kommen. Um diese Verluste zu verringern, läßt man die Lösungsmittel-extrakte nur vorsichtig abdunsten und führt die Analyse sofort weiter durch. Dennoch konnte dem Harn zugesetztes Methamphetamin nur zu 45% wieder aufgefunden werden.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, ein Fällungsverfahren mit Tphb* (Tetraphenylborat) durchzuführen⁷. Tphb ist als Fällungsmittel für Kalium und stickstoffhaltige Basen seit langem bekannt. In der systematischen toxikologischen Analyse wurde Tphb jedoch noch nicht eingesetzt. Bei einem pH von 3,0—3,5 fallen die organischen Basen in Form eines voluminösen Niederschlages, der leicht filtrierbar ist, aus. Schon mit 10 Mikrogramm organischer Base kann ein gut isolierbarer Niederschlag erhalten werden. Die Analyse nach diesem Verfahren gestaltet sich wie folgt:

Der Harn wird bei saurer Reaktion am Wasserbad, allenfalls unter Vakuum, eingengt, mit der vierfachen Menge Aceton oder Alkohol ausgefällt, der filtrierte Alkohol-extrakt nochmals eingengt und mit heißem Wasser aufgenommen. Der nun eiweißfreie, filtrierte Extrakt wird mit einer 2%igen wäßrigen Tphb-Lösung versetzt und der erhaltene Niederschlag filtriert. Die in dem Niederschlag als Komplexverbindungen enthaltenen stickstoffhaltigen Basen werden in wenig Aceton gelöst und die Lösung ebenso wie der Rückstand des aus dem Harn direkt erhaltenen Lösungsmittel-extraktes dünnschichtchromatographisch untersucht.

Die Ausbeuten an Methamphetamin betragen nach diesem Verfahren 88% und liegen damit doppelt so hoch als beim Extraktionsverfahren. Das Schema des Untersuchungsganges ist aus der Abb. ersichtlich.

Rf-Werte von sechs näher untersuchten Dopingmitteln sind in der Tabelle 1 für vier verschiedene Laufmittel angegeben. Besonders wichtig ist, daß die Tphb-Komplexe auf der Dünnschichtplatte zerlegt wer-

Tabelle 1. *Rf*-Werte bezogen auf Sudan R, *Rf* 0,90 Kieselgel, G, Kammerübersättigung

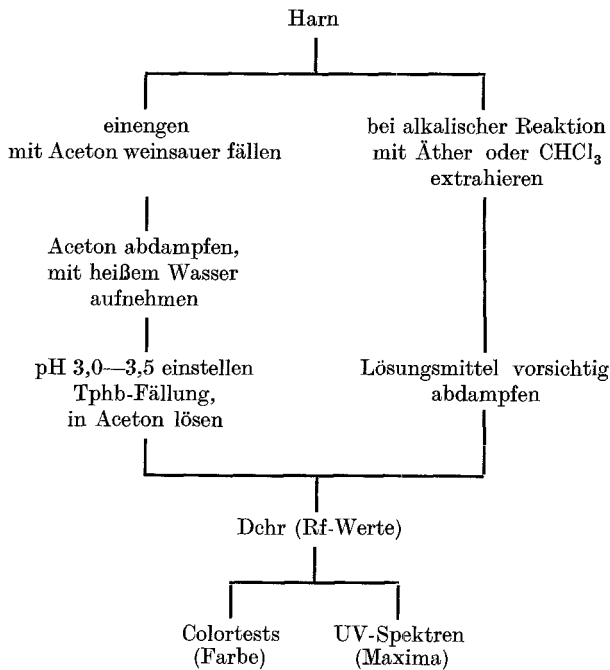
	CH ₃ OH	CHCl ₃ + 10% Aceton	CHCl ₃ + 10% EtOH	CHCl ₃ + 20% EtOH
Ephedrin	0,15	0,04	0,12	0,16
Coffein	0,64	0,35	0,61	0,74
Methamphetamin	0,17	0,04	0,14	0,18
Reactivan	0,25	0,06	0,19	0,23
Ritalin	0,54	0,12	0,55	0,68
Micoren	0,84	0,31	0,61/0,66	0,70/0,79

* Natriumtetraphenylborat, Merck, Art. Nr. 6669.

den und für die freigesetzten Basen die angegebenen Rf-Werte gelten. Der Komplex $(\text{Ph}_4\text{B})\text{Na}$ bleibt mit allen Laufmitteln am Start zurück, die Verbindung $(\text{Ph}_4\text{B})\text{H}$ läuft mit der Front. Die Varianten des Untersuchungsganges sind aus dem abgebildeten Schema ersichtlich.

Zur Detektion werden bei uns außer der Betrachtung im UV-Licht bei 254 nm, das Jodoplatinatreagens** und das Chlor-Kaliumjodid-Benzidinreagenz nach VIDIC verwendet***⁸. Während im UV-Licht und mit

Untersuchungsgang auf Dopingmittel



dem Platinatreagens Mengen ab 10 Mikrogramm nachgewiesen werden können, ist die Empfindlichkeit mittels der Chlorierungsreaktion, die Chlorimine ergibt, etwa eine Zehnerpotenz höher. Als nachteilig muß dagegen angesehen werden, daß die Färbung nicht so spezifisch ist.

Die mit dem Platinatreagens angefärbten oder unter UV-Licht markierten Flecken, können von der Platte isoliert, die Substanzen extrahiert und desweiteren spektrophotometrisch untersucht werden. Die

** 3 ml 10%ige H_2PtCl_6 -Lösung in 97 ml Wasser + 100 ml 6%ige KJ-Lösung.

*** Einstellen der Platte in eine Chloratmosphäre (etwa 1 min), Trocknen der Platte, Besprühen mit einer Mischung von gleichen Teilen gesättigter Benzidinacetatlösung und 2%iger KJ-Lösung in Wasser.

meisten zum Dopen verwendeten Substanzen besitzen ein ausgeprägtes UV-Absorptionsspektrum, das eine einwandfreie Identifizierung ermöglicht. Nur ist leider allen diesen Substanzen eine relativ geringe Absorption zu eigen, die es erforderlich macht, mit größeren Konzentrationen oder Schichtdicken (Mikrocuvetten) zu arbeiten. In der Tabelle 2 sind

Tabelle 2. *Maxima der UV-Spektren bis 220 nm registriert (Fettdruck), Hauptmaximum Extinktion für 1 cm Schichtdicke und 10 mg/100 ml Äthanol berechnet*

	kein Maximum					—
Micoren	272					5,0
Coffein	265	259	253			0,10
Ritalin	267	263	257	252	247	0,06
Ephedrin	268	264	259	253	248	0,16
Methamphetamin	269	264	262	259	254	0,11
Reactivan					248	

die Anzahl der Maxima, die Lage des Hauptmaximums und die Extinktion für 10 mg%ige Lösungen in Alkohol angegeben.

Zum Verifizieren der angeführten Verfahren oder unabhängig davon, können auch Farbreaktionen von Nutzen sein. Diese Farbreaktionen^{9, 10, 11} sind im allgemeinen sehr empfindlich und zum Teil auch selektiv. Wir führen folgenden Colortest aus⁹:

Etwas der isolierten Substanz wird mit 3 ml konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen, mit etwa 0,1 g Kaliumnitrat versetzt und 20 min am siedenden Wasserbad erwärmt. Danach wird die Lösung mit Wasser verdünnt und mit Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt muß scharf abgetrennt werden und wird verworfen. Die wäßrige Lösung wird ammoniakalisch gemacht, erneut mit Chloroform extrahiert, der Chloroformauszug eingedampft, der Rückstand mit etwa 3 ml Aceton aufgenommen und mit 1 bis 2 Tropfen 2 n-Natronlauge versetzt. Beim positiven Ausfall der Reaktion erhält man nach einigen Minuten die Färbung. Der Farbton kann colorimetrisch quantitativ ausgewertet werden. Nachweisgrenze für Methamphetamin etwa 10 Mikrogramm, für Reactivan erst ab 50 Mikrogramm.

Auf die Möglichkeit der gaschromatographischen Untersuchung von Harnextrakten zum Nachweis flüchtiger Basen sei an dieser Stelle verwiesen. Ausführliche Arbeiten^{12, 13} liegen vor und lassen die Brauchbarkeit erkennen. Wir ziehen bis jetzt noch das einfachere und schnellere Verfahren der Dünnschichtchromatographie vor.

Es war aus verschiedenen Gründen für uns sehr wichtig, zu erfahren, nach welchen Mengen der Einnahme von Dopingmittel ein Nachweis möglich ist. Es wurde wiederholt in Sportkreisen behauptet, daß nur bei massiver Dosierung (die meistens mit schweren Folgen verbunden war) ein Nachweis möglich sei. Bei geringerer Dosierung könnten Dopingmittel im Harn nicht aufgefunden werden. Wir haben nun in Selbstversuchen Methamphetamin, Reactivan, Micoren, Ephedrin und Ritalin eingenommen und die Harnausscheidung über einen Zeitraum bis zu 24 Std kontrolliert. In jedem Fall wurden nur pharmazeutische

Mindestdosen, die auf den Packungen angegeben waren, eingenommen. Irgendwelche subjektive Erscheinungen konnten in keinem Fall festgestellt werden. Erfahrungsgemäß liegen die Dosen bei Doping im Sport sehr wesentlich über denen, die hier eingenommen wurden^{14, 15, 16, 17}.

In jedem Fall gelang es, bei diesen fünf Substanzen, einen eindeutigen, positiven Nachweis zu führen, und zwar waren übereinstimmend in den ersten Harnanteilen (meistens 4 Std nach der Einnahme) die größten Mengen nachweisbar. Die Ergebnisse der Versuche sind aus der Tabelle 3 ersichtlich.

Aus den angestellten Versuchen über den Nachweis verschiedener, zum Dopen verwendeter Mittel im menschlichen Harn und aus den

Tabelle 3

<i>Methamphetamin, Dosis 7,5 mg (Bi)</i>	
1. Harn (450 ml) nach	4 Std 400 µg nachgewiesen
2. Harn (230 ml) nach	8 Std 180 µg nachgewiesen
3. Harn (220 ml) nach	12 Std 170 µg nachgewiesen
4. Harn (270 ml) nach	20 Std 160 µg nachgewiesen
<i>Ephedrin, Dosis 50 mg (Ki)</i>	
1. Harn (65 ml) nach	2,5 Std 50 µg nachgewiesen
2. Harn (95 ml) nach	5,5 Std 10 µg nachgewiesen
3. Harn (70 ml) nach	9,5 Std 10 µg nachgewiesen
4. Harn (85 ml) nach	13,5 Std 10 µg nachgewiesen
5. Harn (105 ml) nach	21 Std Spuren
<i>Ritalin, Dosis 20 mg (Li)</i>	
1. Harn (190 ml) nach	4 Std 40 µg nachgewiesen
2. Harn (210 ml) nach	10 Std 20 µg nachgewiesen
3. Harn (230 ml) nach	13 Std 10 µg nachgewiesen
4. Harn (150 ml) nach	20 Std negativ
<i>Micoren, Dosis 200 mg (Ma)</i>	
1. Harn (180 ml) nach	4 Std 200 µg nachgewiesen
2. Harn (150 ml) nach	8 Std 160 µg nachgewiesen
3. Harn (210 ml) nach	13 Std 120 µg nachgewiesen
4. Harn (240 ml) nach	19 Std 80 µg nachgewiesen
<i>Reactivan, Dosis 20 mg (Ma)</i>	
1. Harn (270 ml) nach	13 Std 300 µg nachgewiesen
2. Harn (190 ml) nach	20 Std negativ
<i>Reactivan, Dosis 10 mg (Li)</i>	
1. Harn (825 ml) nach	5 Std 120 µg nachgewiesen

Selbstversuchen, können folgende Schlüsse gezogen werden: Für Schnellanalysen, die allenfalls noch an vielen Proben vorgenommen werden müssen, empfiehlt sich trotz einer verminderten Ausbeute wegen der Zeitersparnis ein automatisches Extraktionsverfahren des alkalisierten Harnes mit Äther. Dabei können einige Harnproben parallel verarbeitet werden. Für Einzeluntersuchungen ist dem Fällungsverfahren mit Tphb der Vorzug zu geben. Die isolierten Substanzen werden dünnschichtchromatographisch untersucht und das Ergebnis allenfalls noch durch Aufnahme der UV-Absorption oder mittels Colortests gesichert. Es genügt in allen Fällen, daß der erste Harnanteil nach der Einnahme des Dopingmittels verarbeitet wird; das wird üblicherweise der erste Harn nach dem Wettkampf sein. Auch geringe Dosierung (Minimaldosierung) läßt sich mit Sicherheit bei zweckentsprechender Untersuchungstechnik nachweisen. Eine eindeutige Identifizierung der eingenommenen Pharmaka ist bei Vorliegen von genügend Untersuchungsmaterial (etwa 100—200 ml Harn) leicht möglich.

Das Institut hat einige Untersuchungsreihen auf Anregung von Prof. Dr. L. PROKOP (Inst. f. Leibeserziehung, Univ. Wien) bei verschiedenen Sportarten durchgeführt. In einem Fall konnten wir auch mit nur 65 ml Harn eines Radsportlers den Nachweis von Reactivan eindeutig führen.

Literatur

- ¹ JATZKEWITZ, H.: Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln im Harn. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **292**, 94 (1953).
- ² VIDIC, E.: Eine neue Schnellmethode zur Untersuchung von Urin auf Opiate und deren Derivate. *Z. analyt. Chem.* **135**, 81 (1952).
- ³ VIDIC, E.: Die Anwendung papierchromatographischer Methoden beim forensischen Suchtmittelnachweis. *Arzneimittel-Forsch.* **5**, 291 (1955).
- ⁴ FREUNDT, K. J., u. G. SCHWINGER: Der papierchromatographische Nachweis von Substanzen mit zentralstimulierender und/oder appetit beeinflussender Wirkung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **246**, 90 (1963).
- ⁵ FREUNDT, K. J. u. G. SCHWINGER: Farbreaktionen zur Identifizierung einiger Arzneistoffe mit zentralstimulierenden und/oder appetitbeeinflussenden Eigenschaften auf Papierchromatogrammen. *Arch. Toxikol* **20**, 257 (1964).
- ⁶ BÄUMLER, J., A. L. BRAULT u. J. IM OBERSTEG: Dopingnachweis im Speichel von Rennpferden. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **106**, 346 (1964).
- ⁷ SOLIMAN EL GENDI, W. KISSER u. G. MACHATA: Isolierung und Nachweis basischer Arzneimittel in der Toxikologie. *Mikrochim. Acta* **1965**, 120.
- ⁸ VIDIC, E.: Papierchromatographische und spektrophotometrische Identifizierung barbitursäurefreier Sedativa, insbesondere von Meprobamat. *Arch. Toxikol.* **17**, 373 (1959).
- ⁹ RATHENASINKAM, E.: The isolation, identification and determination of amphetamine in viscera. *Analyst* **77**, 135 (1952).
- ¹⁰ WEISER, M., u. M. K. ZACHERL: Über den Nachweis und die Bestimmung von Pervitin. *Mikrochim. Acta* **1957**, 577
- ¹¹ Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, herausgeg. von W. KERN, II. Erg.-Bd. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

- ¹² PARKER, K. D., Ch. R. FONTAN, and P. L. KIRK: Rapid gas chromatographic method for screening of toxikological extracts for alkaloids, barbiturates, sympathomimetic amines and tranquilizers. *Analyt. Chem.* **35**, 356 (1963).
- ¹³ KAZYAK, L., and E. C. KNOBLOCK: Application of gas chromatography to analytical toxicology. *Analyt. Chem.* **35**, 1448 (1963).
- ¹⁴ PROKOP, L.: Doping im Sport. *Ther. Ber.* **28**, 304 (1956).
- ¹⁵ PROKOP, L.: Sportphysiologie. *Sportmed. Schriftenreihe Wander* 1957. Doping. S. 63.
- ¹⁶ SCHÖNHOLZER, G., G. A. SPENGLER u. U. FREY: Doping und dessen Nachweis. *Festschrift Diem. Frankfurt/M. u. Wien: Wilhelm Limpert* 1962.
- ¹⁷ BERNHEIM, J., et J. U. COX: Coup de chaleur et intoxication amphetaminique chez un sportif. *Schweiz. med. Wschr.* **90**, 322 (1960).

Dozent Dr. G. MACHATA
 Institut für gerichtliche Medizin der Universität Wien
 Wien IX, Sensengasse 2

G. DÖRING und W. DOERING (Göttingen): Der infrarot-spektroskopische Nachweis von Pflanzenschutzmitteln aus Organmaterial*.

Infolge der heutigen weiten Verbreitung der Pflanzenschutzmittel werden vom Toxikologen immer häufiger chemische Untersuchungen auf diese Substanzen gefordert, und zwar sowohl Nachweise ganz bestimmter Pflanzenschutzmittel, die gezielt durchgeführt werden können, als auch Untersuchungen auf sämtliche Pflanzenschutzmittel, für die ein systematischer Analysengang zur Verfügung stehen sollte.

Für gezielte Untersuchungen auf einzelne Pflanzenschutzmittel sind bereits die verschiedensten Methoden ausgearbeitet worden. Ferner gibt es eine ganze Reihe von Verfahren, die es gestatten, eine größere Anzahl chemisch verwandter Verbindungen gleichzeitig zu erfassen. Die wichtigsten dieser Verfahren benützen die Papier- oder die Dünnschichtchromatographie (z. B. MITCHELL; BÄUMLER und RIPPSTEIN; LICHT). Für die Untersuchung auf sämtliche Pflanzenschutzmittel müssen aber eine Vielzahl von Chromatogrammen in den verschiedensten Systemen und mit den verschiedensten Färbemethoden hergestellt werden. Es fehlt daher zur Zeit noch ein einfacher, systematischer Analysengang zum Nachweis eines unbekanntes Pflanzenschutzmittels.

Ein zum Nachweis sämtlicher Pflanzenschutzmittel geeignetes Verfahren ist die IR-Spektroskopie. Da ein brauchbares IR-Spektrum aber nur bei Vorliegen sehr reiner Präparate gemessen werden kann, liegt die Schwierigkeit bei der Anwendung dieser Methode nicht im eigentlichen Nachweis, sondern in der Isolierung und Reinigung der nachzuweisenden Substanz. Wir stellten uns daher die Aufgabe, ein Isolierungs- und Reinigungsverfahren zu suchen, das es gestattet, in einem Arbeitsgang

* Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.