

## Zum Nachweis des Clomethiazol im Urin

E. Klug und P. Toffel

Institut für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin, Hittorfstr. 18, D-1000 Berlin 33

### On the Detection of Clomethiazole in Urine

**Summary.** It may become necessary to prove that clomethiazole (Distraneurin) has been taken when supervising addicts, with traffic accidents under the influence of drugs and when the cause of death is unclear. Since the compound is almost completely metabolized in the body, a method has been developed to detect its main metabolite, 4-methyl-5-thiazole acetic acid in the urine. The acid can be precisely identified and determined by a combination of selective extractions, high-voltage electrophoresis and UV measurements.

**Key words:** Clomethiazole, detection in urine – Distraneurin, detection.

**Zusammenfassung.** Der Nachweis einer Clomethiazol-Einnahme (Distraneurin) kann bei der Suchtüberwachung, bei Verkehrsunfällen unter Medikamenteneinfluß sowie bei unklaren Todesfällen erforderlich sein. Da die Verbindung im Organismus praktisch völlig verstoffwechselt wird, wurde ein Verfahren zur Bestimmung ihres Hauptmetaboliten 4-Methyl-5-thiazolessigsäure im Harn ausgearbeitet. Durch Kombination gezielter Extraktionen, Hochspannungselektrophorese und UV-Messung ist die Säure empfindlich zu identifizieren und zu bestimmen.

**Schlüsselwörter:** Clomethiazol, Nachweis im Urin – Distraneurin, Nachweis – Sucht, Clomethiazol.

Clomethiazol ist als Wirkstoff in dem Medikament „Distraneurin“ enthalten, das vor allem als schnell wirkendes Beruhigungsmittel bei Unruhezuständen, nach Alkoholdelirien und Entzugserscheinungen eingesetzt wird. Der Nachweis einer Einnahme dieses Medikamentes spielt in der Praxis des forensisch-toxikologischen Chemikers vor allem aus 3 Gründen eine Rolle:

1. Bei der ambulanten nicht bestimmungsgemäßen Verwendung dieses Arzneimittels wird in zunehmendem Maße über Fälle von Mißbrauch berichtet. Hier sind vor allem Alkoholiker, aber auch andere zur Sucht disponierte Personen gefährdet. Die Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft hat daher eine strenge Indikationsstellung für Clomethiazol gefordert und vor kurzem auf die potentielle Gefährdung bei längerfristiger Therapie hingewiesen [1]. Zum Nachweis einer Distraneurin-Abhängigkeit und zur Kontrolle einer Entziehungskur sind ständige Untersuchungen

des Patienten, in erster Linie durch Urin-Analysen, erforderlich. Aufgrund klinischer Untersuchungen allein ist der Ausschluß einer Einnahme nicht möglich.

2. Nach Verkehrsunfällen wird häufig eine Beeinflussung durch Distraneurin angegeben, wobei offenbar u. a. die falsche Meinung eine Rolle spielt, man könne z. B. durch 2 Tabletten Distraneurin die Folgen eines Alkoholkonsums beseitigen. Dies führte schon mehrmals zu schweren Unfällen, da zwischen Alkohol und Distraneurin ein Summationseffekt besteht [2]. Zur Beurteilung eines Fehlverhaltens im Straßenverkehr ist somit der sichere Nachweis einer Einnahme bzw. ihr Ausschluß von großer Bedeutung.

3. Hin und wieder treten Todesfälle durch Überdosierung des Mittels auf. In diesen Fällen ist anhand der Organkonzentrationen die Todesursache abzuklären.

Der Nachweis der Reinsubstanz ist bei Beachtung einiger Kautelen (leichte Flüchtigkeit, Verwechslungsgefahr mit Nikotin und Fäulnisstoffen im UV-Spektrum) einfach zu führen, da es sich bei Clomethiazol um eine aus alkalischem Medium mit den üblichen Lösungsmitteln gut extrahierbare Verbindung handelt, die sowohl gaschromatographisch, als auch durch UV-Messungen empfindlich zu bestimmen und zu identifizieren ist. Die Abklärung von Todesfällen bietet somit keine besondere Schwierigkeiten, da unverändertes Clomethiazol sowohl in den ersten, als auch in den zweiten Giftwegen in verhältnismäßig hohen Konzentrationen auftritt. Befunde bei Suiziden wurden u. a. von Oliver und Stewart (1 Fall), Iffland (1 Fall), Pöhlmann (1 Fall), Jakobssohn und Möller (9 sichere Fälle) beschrieben. Weitere Resultate haben Müller und Wehran (1 Fall), Richardson (2 Fälle) und Humphreys (3 Fälle) mitgeteilt (3–9).

Erheblich schwieriger ist der Nachweis der Einnahme jedoch bei der Suchtkontrolle und der Beurteilung auffällig gewordener Verkehrsteilnehmer zu führen, da hier in der Regel nur Harn in ausreichendem Maße als Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht.

Eine Arzneimittelwirkung bzw. eine eventuelle Beeinflussung ist nicht alleine aufgrund eines Harnbefundes zu sichern, so daß zumindest bei Verkehrsstrafen die Bestimmung des Blutspiegels zwingend erscheint. In Anbetracht der meist sehr geringen Restblutproben von der Alkoholbestimmung ist es aber auch hier sinnvoll und notwendig, zumindest durch eine Harnuntersuchung festzustellen, ob und welches Medikament überhaupt eingenommen wurde.

Anders bei der Suchtüberwachung: hier genügt im allgemeinen der sichere Nachweis bzw. Ausschluß einer Einnahme. Eine Harnuntersuchung ist somit ausreichend.

Infolge der in letzter Zeit ansteigenden Zahl von Anfragen nach einem Distraneurin-Nachweis in Harnproben erschien es erforderlich, einen einfachen Nachweis der Substanz bzw. ihrer Abbauprodukte im Urin auszuarbeiten.

Clomethiazol wird im Organismus sehr rasch abgebaut, so daß es nur nach massiver Überdosierung in geringen Mengen unverändert im Harn auftritt [10]. Hauptmetabolite bei Mensch und Ratte sind die 4-Methyl-5-thiazolelessigsäure sowie ihre Konjugate mit Glutaminsäure wie Untersuchungen mit  $^{35}\text{S}$ -Clomethiazol von Allgen ergaben [11]. Herbertz, der gleichfalls mit markierten Verbindungen den Stoffwechsel in der Ratte untersuchte, fand 5 Ausscheidungsprodukte mit 2-Hydroxy-4-methyl-thiazolacetyl-5-glycin als Hauptmetabolit [12].

Moore et al. haben sich eingehend mit dem Stoffwechsel der Verbindung beim Menschen befaßt [13]. Nach einmaliger oraler Gabe konnten sie in 3 Fällen im Harn insgesamt ca. 16% der Verbindung mit metabolisierter Form nachweisen. Dabei lagen die Anteile an Clomethiazol bei 0,01%, und die der 4-Methyl-5-thiazolelessigsäure bei 13,7, 14,2 bzw. 11,9% der eingenommenen

Dosis im 36-Stunden-Harn. Das Schicksal von mehr als 80% der eingenommenen Dosis bleibt jedoch ungeklärt; es erscheint aber wahrscheinlich, daß die Verbindung durch Oxydation und Konjugation abgebaut wird.

Nach diesen Ergebnissen erschien es sinnvoll, die 4-Methyl-5-thiazoleessigsäure, im folgenden als MTS bezeichnet, als Indikator einer Clomethiazol-Einnahme heranzuziehen.

Bedingt durch die gute Wasserlöslichkeit und dem amphoteren Charakter der Verbindung haben sowohl Allgèn et al. als auch Herbertz keine Extraktion und Anreicherung durchgeführt und die Harnen direkt untersucht. Die Analyse der Verbindungen wurde nach DC, PC und Elektrophorese autoradiographisch bzw. durch Auswertung mit dem Geigerzähler durchgeführt.

Moore et al. extrahierten Harnproben bei pH  $5,0 \pm 0,1$  mit Äther bzw. Äthylacetat und veresterten in den konzentrierten Extrakten die Säure mit Diazomethan. Die so erhaltenen Ester wurden gaschromatographisch bestimmt. Als innerer Standard diente die 1-Cyclohexylcyclohexancarbonsäure. Die Anwendung dieses Verfahrens erschien für die forensische Praxis nicht so geeignet, da es zum einen den Einsatz des giftigen, instabilen Diazomethans erforderlich macht und zum anderen zur sicheren Identifizierung des Esters in der Vielzahl der mit Äthylacetat extrahierbaren Substanzen ein Massenspektrometer als Detektor notwendig erscheint.

Zunächst wurden mit wässrigen Lösungen Versuche zur Extraktion, Anreicherung und quantitativen Bestimmung der Säuren durchgeführt:

### *1. Extraktion und Anreicherung*

Die Extraktion mit Äthylacetat bei pH 2 bis 6 ergab eine befriedigende Ausbeute. Die Verwendung von Äther, Chloroform und anderen Lösungsmitteln lieferte stets geringere Werte. Eine Abtrennung über XAD-2-Säulen bei verschiedenen pH-Bereichen gelang nicht, auch die Verwendung von basischen bzw. sauren Ionen-Austauschern führte zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

### *2. Nachweis der Säure*

Wie zahlreiche Versuche mit Leerharnen zeigten, sind die von Herbertz vorgeschlagenen dünnschichtchromatographischen Systeme nicht geeignet, die Säuren von anderen harnpflichtigen, extrahierbaren Substanzen abzutrennen. Diese Störsubstanzen fallen um so mehr ins Gewicht, als die Säure lediglich aufgrund ihrer Absorption im kurzwelligen UV-Licht auf Kieselgel GF-Platten zu lokalisieren war. Dieser empfindliche Nachweis erlaubt weniger als  $5 \mu\text{g}$  der Verbindung nachzuweisen. Eine andere Möglichkeit der Anfärbung wurde trotz Überprüfung zahlreicher Reagenzien nicht gefunden.

Nach Allgèn und Herbertz lassen sich die einzelnen Metabolite papierelektrophoretisch sowohl im schwach-sauren, als auch im schwach-basischen Bereich auftrennen. Allerdings gelang ihnen der Nachweis der Verbindungen nur aufgrund der Radioaktivität der Substanzen. Anfärbereagenzien wurden von den Autoren nicht angegeben.

Bei den Versuchen, den Nachweis der Verbindungen über die Absorption im UV-Licht auch auf dem Papier zu führen, wurde gefunden, daß eine ausgezeichnete Lokalisationsmöglichkeit auch sehr geringer Mengen ( $1-5 \mu\text{g}$ ) auf dem Papier dann möglich ist, wenn man den noch angefeuchteten Streifen auf eine Aluminiumoxid-F 254-Fertigplatte auflegt und im kurzwelligen UV-Licht beobachtet. Der Fleck kann nun ohne

weiteres gekennzeichnet und zur weiteren Identifizierung bzw. quantitativen Bestimmung verwendet werden.

Die Elektrophorese wurde – wie von Klug zur Auftrennung von basischen Arzneistoffen beschrieben – bei 4000 Volt, mit einem Puffergemisch von pH 1,9 durchgeführt. Das System von Hertz wurde wegen des stark riechenden Pyridinanteils nicht verwendet [14].

Bei den Versuchen zeigte sich, daß die Säure bei diesem pH-Bereich zur Kathode hin wandert und eine relative Wanderungsstrecke von 1,2 bezogen auf Pethidin besitzt.

Die Untersuchung zahlreicher Harn, bei denen eine Distraneurin-Einnahme durch die Vorgeschichte ausgeschlossen werden konnte, ergab, daß an dieser Stelle keine harnpflichtigen Substanzen auftreten, die die Analyse stören könnten.

### 3. Identifizierung und quantitative Bestimmung

MTS besitzt ein ausgeprägtes UV-Spektrum mit einem Maximum bei 256,5 nm, das Minimum liegt bei 225 nm.

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} : 275.$$

Zur quantitativen Bestimmung und Identifizierung können die auf dem Papier lokalisierten Substanzen mit 1 n Salzsäure wie üblich eluiert und gegen einen in gleicher Weise hergestellten Leerwert vermessen werden. Die Gesamtausbeute über den gesamten Arbeitsgang beträgt ca. 70 bis 80%.

Zur Überprüfung des Verfahrens wurden spontan gelassene Harnproben von 2 Personen nach der Einnahme je einer Tablette Distraneurin bis zu 30 Stunden nach der Einnahme untersucht. Es zeigte sich dabei, daß anfänglich Konzentrationen von etwa 4–5mg% gefunden wurden, und daß der Nachweis auch nach 15 Stunden stets noch eindeutig geführt werden konnte.

### Arbeitsvorschrift

1. *Extraktion:* 5 ml Harn werden mit Salzsäure auf einen pH-Wert zwischen 3 bis 5 eingestellt und zweimal mit 10 ml Äthylacetat extrahiert. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel auf dem Wasserbad eingedunstet und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen.

2. *Elektrophorese:* 1/5 bis 2/5 (1 bis 2 ml Harn entsprechend) des Rückstandes werden auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b (10x40cm) im Abstand von 2,5cm zusammen mit Pethidin als Test aufgetragen (10 µg).

Elektrophorese: CAMAG-Hochspannungselektrophorese-System

Puffergemisch: Essigsäure-Ameisensäure-Wasser  
15 : 8 : 80) pH 1,9

Spannung: 4000 V

Strom: 50–60 mA

Laufzeit: 20 Minuten

3. *Lokalisation* der Substanz im kurzwelligen UV (254) mit einer Aluminiumoxid-Fertigplatte F 254 als Unterlage.

4. *Extraktion* des trockenen Streifens mit 3 ml 1 n-Salzsäure. Ein evtl. Verdünnen ist erforderlich.

5. *UV-Messung* gegen das Eluat aus einem gleichgroßen Papierfleck in Höhe der Verbindung.

Auch an dieser Stelle sei Herrn Dr. G. Herberz sowie der Firma Astra Chemicals GmbH für die Überlassung der Metabolite und der Reinsubstanz herzlichst gedankt

## Literatur

1. Strenge Indikationsstellung f. Clomethiazol gefordert. Dtsch. Med. Wochenschrift **102**, 1012 (1977)
2. Distraneurin. Firmenschrift Pharma-Stern, Wedel/Holstein
3. Müller, R. K., Wehran, H. J.: Pers. Mitteilung (1971)
4. Richardson, A.: Pers. Mitteilung (1972)
5. Jakobsson, St., Möller, M.: Deaths due to Clomethiazole. Forens. Sci. **1**, 111 (1972)
6. Pöhlmann, E.: Gaschromatogr. Nachweis v. Clomethiazol. Beitr. z. Gerichtl. Med., **XXIX**, 414 (1972)
7. Humphreys, I. J.: Pers. Mitteilung (1974)
8. Oliver, J. S., Stewart, P. D.: Clomethiazole Poisoning (A Case Report). Med. Sci. Law **15**, 67 (1975)
9. Iffland, R.: Zum Nachweis therapeutischer Konzentrationen Clomethiazol im Blut. Z. Rechts-med. **80**, 27 (1977)
10. Bonnichsen, R., Maehly, A. C., Aquist, S.: Arzneimittel und Fahrtüchtigkeit. Blutalkohol **6**, 245 (1969)
11. Allgen, L.-G., Lindberg, U. H., Ullberg, S.: Tissue distribution, Excretion and metabolism of Heminevrin. Nordisk psykiatrisk Tidsskrift **17**, 13 (1963)
12. Herberz, G., Reinauer, H.: Stoffwechsel von Clomethiazol in der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmak. **270**, 192 (1971)
13. Moore, R. G., Robertson, A. V., Smyth, M. P., Thomas, J. P., Vine, J.: Metabolism and Urinary Excretion of Clomethiazole in Humans. Xenobiotica **5**, 687 (1975)
14. Klug, E.: Zur Auftrennung basischer Arzneistoffe mittels der Hochspannungselektrophorese. Archiv d. Pharmazie **309**, 715 (1975)

Eingegangen am 7. April 1978