

Originalarbeiten / Original Works

**Zum Screening der Benzo- und Thienodiazepine
im Urin mit dem Emit ST und der DC
im Rahmen eines Suchtestes auf Medikamentenmißbrauch**

H. Gruhl

Institut für Laboratoriumsmedizin, Zentralklinikum, Stenglinstr. 2, D-8900 Augsburg,
Bundesrepublik Deutschland

**Detection of Benzo- and Thienodiazepines by Emit ST and TLC
as Part of a Drug Screening Program**

Summary. All 24 Benzo- and Thienodiazepines which are used in drugs in the FRG were added to drug free urine in different concentrations and examined by Emit ST as well as by TLC. In addition the acid hydrolysis products of diazepines were analysed by TLC. A modification of the extraction procedure is described, which shortens analysis time considerably. The detection limits were determined and it will be discussed how both methods, Emit and TLC, are suited for a wide-ranging drug screening program.

Key words: Benzodiazepines – Thienodiazepines – Emit ST – TLC drug screen

Zusammenfassung: Alle 24 zur Zeit in der BRD auf dem Markt befindlichen Benzo- und Thienodiazepine (abgek. Diazepine) wurden in verschiedenen Konzentrationen einem medikamentenfreien Urin zugesetzt und sowohl mit dem Emit ST als auch mittels Dünnschichtchromatografie (DC) untersucht. Dünnschichtchromatografisch wurden zusätzlich die sauren Hydrolyseprodukte analysiert. Eine modifizierte Extraktionsmethode wird vorgestellt, welche einen erheblichen Zeitgewinn mit sich bringt. Die Nachweisgrenzen für Emit und DC wurden ermittelt, und es wird die Eignung beider Methoden im Rahmen eines breitgefächerten Drogensuchprogramms diskutiert.

Schlüsselwörter: Benzodiazepine – Thienodiazepine – Emit ST – DC Suchtest auf Drogen

Einleitung

Benzodiazepine gehören zu den am häufigsten gebrauchten und mißbrauchten Medikamenten. Deshalb ist dem Nachweis von Benzodiazepinen im Rahmen eines Screeningprogramms zur Diagnostik von Vergiftungen besondere Beachtung zu widmen. Als Suchprogramm für die Erkennung eines Medikamentenmißbrauchs hat sich die Dünnschichtchromatografie bewährt [1–4]. In den letzten Jahren kommt auch der von der Fa. Syva-Merck vertriebene Emit ST vermehrt zum Einsatz. Beide Verfahren weisen die Medikamente als Gruppe nach, wobei bei der DC-Methode eine Teildifferenzierung möglich ist [5].

Ziel der Arbeit war es, beide Verfahren zum Nachweis der Diazepine im Urin zu vergleichen. Hierbei ging es darum, die Analytik der Diazepine nicht isoliert, sondern als Teil des routinemäßig durchgeführten, breitgefächerten Drogensuchprogramms zu betrachten. Die Nachweisgrenzen sollten durch Einsatz definierter Mengen bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/l abgeschätzt werden. Schließlich interessierte uns besonders, wie sich die neu auf den Markt gekommenen Imidazol-(Midazolam) und Triazol-(Alprazolam, Brotizolam, Triazolam) substituierten 1,4-Benzodiazepine, das 1,5-Benzodiazepin (Clobazam) und die Thienodiazepine (Brotizolam, Clotiazepam) in den beiden Nachweisverfahren verhalten.

Methoden

Emit ST. Die Untersuchungen mit dem Emit ST (Syva-Merck, Darmstadt) erfolgte gemäß der beigefügten Gebrauchsanweisung.

DC. Die dünn-schichtchromatografische Untersuchung folgte im Prinzip den von Breiter [1], Interschick et al. [3] und Winkelmann et al. [4] angegebenen Schemata. Die Extraktion der Urine wurde von uns jedoch modifiziert, da hiermit, bezogen auf den gesamten Suchtest, ein erheblicher Zeitgewinn ohne nennenswerte Einbuße an Nachweisempfindlichkeit erreicht wird. Das Eindampfen der Extraktionslösungen mittels Rotationsverdampfer entfällt hierbei. Zudem sind die nach unserer Methode gewonnenen Extrakte sauberer. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

Proben ohne Hydrolyse. Je 20 ml Urin wurden auf pH 2 (saurer Extrakt) bzw. 9–10 (basischer Extrakt) eingestellt und auf je eine Extrakt 20 ml Extraktionssäule (Merck, Darmstadt) aufgezogen. Für den sauren Urinextrakt wurden 10 ml Ether auf die Säule gegeben, eine Minute gewartet und dann weitere 10 ml Ether nachgegeben. Von dem dann austretenden Eluat wurden die ersten 4 ml aufgefangen und das Lösungsmittel durch Überblasen von Stickstoff bei 54°C verdampft. Der basische Extrakt wurde in gleicher Weise gewonnen, nur daß statt Ether Dichlormethan/Isopropanol 85/15 (v/v) zur Elution verwendet wurde.

Die Extraktionsausbeuten wurden u. a. für die Benzophenone 2-Amino-5-chlorbenzophenon (ACB), 2-Amino-5-nitrobenzophenon (ANB) und 2-Amino-5-bromphenyl(pyridin-2-yl)-methanon (ABP) mit der herkömmlichen Extraktionsmethode (Elution mit 40 ml Ether, Einrotieren, Aufnehmen in 2 ml Methanol, Verblasen, Aufnehmen in Isopropanol) verglichen. Dabei wurden die genannten Benzophenone in absteigender Konzentration bis zur Nachweisgrenze parallel untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Extraktionsverfahren.

Die Rückstände wurden in 50 µl Isopropanol aufgenommen und 5 µl hiervon in einem 1 cm langen Strich auf die DC Platte Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Substanzen wurden 7 min im Laufmittel Ethylacetat/Methanol/Ammoniak 25% 85/10/5 (v/v/v) entwickelt. Nach Trocknen der Platten erfolgte die Detektion durch Besprühen mit

Kaliumjodoplatinat [1], wobei sich die Benzodiazepine braun anfärben, bzw. mit Dragendorffs Reagenz [1], mit dem sich die Diazepine als orangegelbe Flecke darstellen lassen.

Proben mit Hydrolyse. 30 ml Urin wurden 15 min mit 10 ml konz. HCL unter Rückfluß gekocht. Der hydrolysierte Urin wurde geteilt; je 20 ml auf pH 2 (saurer Extrakt) bzw. 9–10 (basischer Extrakt) eingestellt und wie oben beschrieben extrahiert. Neben den Proben wurden als Referenzsubstanzen die Hydrolyseprodukte des Diazepams (MACB), Oxazepams (ACB), Nitrazepams (ANB) und Bromazepams (ABP) mit aufgetragen. Die Platten wurden anschließend in Toluol/Aceton 95/5 (v/v) 7 min entwickelt und nach dem Trocknen zur Desalkylierung der Substituenten an N₁ 15 min mit einer Höhensonne bestrahlt [6]. Die Höhensonne wurde auf ihre Brauchbarkeit mit 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (MACB) gemäß Schütz [5] geprüft und erwies sich als geeignet. Anschließend wurde die Diazokupplung nach Bratton und Marshall [7] mit kaltem Sprühreagenz (Nitrit/Naphtylethylendiamin) durchgeführt. Hierbei färben sich die Diazepinhydrolyseprodukte, sofern sie eine kupplungsfähige Aminogruppe enthalten, rot bzw. violett an.

Alle Untersuchungen wurden mit aufgestocktem, medikamentenfreien Urin durchgeführt, und zwar in folgenden Diazepinkonzentrationen: 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 mg/l.

Ergebnisse

Emit Test. Mit dem Emit ST werden alle Substanzen erfaßt (Tabelle 1). Nach Firmenangabe liegt die Nachweisgrenze, bezogen auf Oxazepam, bei 0,5 mg/l. Dies kann für die meisten Verbindungen bestätigt werden. Einige wurden bei 1 mg/l positiv, Oxazolam erst bei 5 mg/l und Camazepam bei 20 mg/l.

DC Untersuchungen. Da im Emit Test vermutlich das Diazepin Grundgerüst erkannt wird, wurden dem Emit Test in Tabelle 1 die Ergebnisse der DC Untersuchungen der unhydrolysierten Harnproben (also mit intakter Diazepinstruktur) gegenübergestellt. Benzodiazepine können beim Nachweis anderer basischer Substanzen (Sprühreagenz ebenfalls Kaliumjodoplatinat) stören. Andererseits kann ein mit Kaliumjodoplatinat positiver Fleck ein Hinweis auf ein Diazepin sein, welches mit der üblichen Nachweisreaktion für Benzodiazepine (Bratton-Marshall) nicht erfaßt wird. Deshalb wurde die Benzodiazepin-Detektionsmöglichkeit durch Kaliumjodoplatinat in der Tabelle 1 mit aufgenommen. Die Nachweisgrenzen in der DC (Detektion mit Kaliumjodoplatinat) liegen höher als im Emit Test. Zu beachten ist auch, daß einige Verbindungen im sauren, andere besser im basischen Extrakt nachweisbar sind. Die Nachweisgrenze nach Besprühen der Platten mit Dragendorffs Reagenz lag gegenüber Kaliumjodoplatinat bei den meisten Diazepinen um die Hälfte niedriger (nicht in die Tabelle aufgenommen).

Weder das Sprühreagenz nach Dragendorff noch Kaliumjodoplatinat weisen eine Spezifität für Diazepine auf. Deshalb hat es sich eingebürgert, die Benzodiazepine zu den Benzophenonen zu hydrolysieren und die entstehenden primären Amine durch die Diazokupplung nach Bratton und Marshall nachzuweisen. An N₁ substituierte, also sekundäre Amine, lassen sich zum Teil durch UV-Bestrahlung zu primären Aminen desalkylieren und können anschließend ebenfalls durch Diazokupplung nachgewiesen werden [6]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Interschick et al. [3] weisen die Benzophenone im sauren Extrakt nach, während üblicherweise die Detektion im alkalischen Extrakt erfolgt. Um zu prüfen, ob Unterschiede in der Nachweisempfindlich-

Tabelle 1. Nachweisgrenzen der Diazepine ohne Hydrolyse im Emit ST und in der DC. Angegeben ist jeweils die niedrigste Konzentration, bei der der Test positiv ausfiel. *s* steht, wenn zuerst der saure, *b*, wenn zuerst der basische Extrakt positiv wurde. Bei *s/b* zeigten beide Extrakte die gleiche Nachweisempfindlichkeit. Sprühreagenz für die DC war Kaliumjodoplatinat

Name	Emit ST Konzentration mg/l							DC Konzentration mg/l						
	0,5	1	2	5	10	20	50	0,5	1	2	5	10	20	50
Alprazolam	+									b				
Bromazepam	+												b	
Brotizolam	+									b				
Camazepam						+							s	
Clorazepat	+									s/b				
Chlordiazepoxid		+								b				
Clobazam		+												s
Clonazepam		+												s
Clotiazepam	+									s/b				
Diazepam	+									s/b				
Flunitrazepam	+										s			
Flurazepam	+									b				
Ketazolam	+									b				
Lorazepam		+												s
Lormetazepam		+											s/b	
Medazepam	+								b					
Midazolam	+											b		
Nitrazepam		+												s
Oxazepam	+												s/b	
Oxazolam				+									b	
Prazepam	+									s/b				
Temazepam		+											b	
Tetrazepam	+													s/b
Triazolam	+										b			

keit zwischen saurem und basischem Extrakt existieren, wurden beide Extrakte untersucht. Zudem wurden die Diazepine entsprechend ihrer Struktur in drei Gruppen geteilt. Gruppe I enthält nur Verbindungen, welche keine Substituenten an N₁ tragen. In Gruppe II sind die Benzodiazepine mit N₁-Alkylsubstituenten aufgenommen. Gruppe III enthält schließlich die Substanzen, welche weder nach Hydrolyse und UV-Bestrahlung noch durch Metabolisierung diazotierbare Amine liefern und somit dem Nachweis entgehen.

Wie zu erwarten war, werden am besten die Benzodiazepine der ersten Gruppe nachgewiesen, da sie nach Hydrolyse direkt zum Azofarbstoff gekuppelt werden können. Etwas höher liegen z. T. die Nachweisgrenzen für die Benzodiazepine der Gruppe II. Zum Glück bilden alle Benzodiazepine der Gruppe II Desalkylmetabolite, so daß zumindest bei Überdosierung ein Nachweis über die Metaboliten erfolgen kann. Schwierigkeiten bereitet vor allem der Nach-

Tabelle 2. Nachweisgrenzen der Diazepine nach Hydrolyse. Sprühreagenz war Nitrit/Naphthylethylendiamin. Angegeben ist jeweils die Konzentration, bei der der Test zum erstenmal positiv wurde und zwar mit *s*, für den sauren, mit *b*, für den basischen Extrakt. *s/b* steht, wenn für beide Extrakte gleiche Nachweisgrenzen gefunden wurden und $-$, wenn selbst bei einer Konzentration von 100 mg/l weder mit dem sauren noch mit dem basischen Extrakt ein Nachweis erfolgte

	Name	DC							
		Konzentration mg/l							
		0,5	1	2	5	10	20	50	100
I	Bromazepam	s/b							
	Clorazepat	s/b							
	Chlordiazepoxid	s/b							
	Clonazepam			s/b					
	Lorazepam	b	s						
	Nitrazepam	s/b							
	Oxazepam	b	s						
	Oxazolam	b	s						
II	Camazepam		s/b						
	Diazepam	s/b							
	Flunitrazepam							s/b	
	Flurazepam								b
	Ketazolam		s/b						
	Lormetazepam		s/b						
	Medazepam								b
	Prazepam			s/b					
Temazepam		s	b						
III	Alprazolam								-
	Brotizolam								-
	Clobazam								-
	Clotiazepam								-
	Midazolam								-
	Tetrazepam								-
	Triazolam								-

weis von Flurazepam und Flunitrazepam. In einer Konzentration von 100 mg/l zeigt Flunitrazepam im sauren und basischen Extrakt intensive gelbe Banden etwas oberhalb von ACB, bei Flurazepam erhält man im basischen Extrakt eine gelbe Bande ca. 1 cm über der Auftragslinie. Diese Banden färben sich mit Bratton-Marshall grau an, z. T. mit violetter Umrandung. Die graue Farbe ist offenbar eine Mischfarbe aus der ursprünglich gelben und etwas Violett der Diazoreaktion. Um zu prüfen, ob die geringe Nachweisreaktion auf eine unvollständige Hydrolyse zurückzuführen ist, wurde 30 min hydrolysiert und die Reinsubstanzen mit auf die DC-Platte aufgetragen. Es ergab sich keine nennenswerte Verbesserung des Nachweises, auch keine Bande in Höhe der Rein-

substanzen. Im Falle des Flunitrazepams trat jedoch zusätzlich eine intensiv blau anfärbbare Bande unterhalb ABP auf, ebenso verstärkte sich eine bei 15 min Hydrolyse nur schwach ausgeprägte blau anfärbbare Bande oberhalb von ANB. Um zu prüfen, ob die fotolytische Desalkylierung bei 15 min UV-Bestrahlung unzureichend ist, wurde 60 min bestrahlt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Intensivierung des violetten Anteils in der grauen Farbe, was ein Hinweis darauf ist, daß die fotolytische Desalkylierung der fluorierten Benzophe-none nur in sehr geringem Maße abläuft. Im Urin werden jedoch zum Teil desalkylierte Metaboliten ausgeschieden, im Falle von Flurazepam 2-Amino-5-chlor-2'-fluorbenzophenon (ACFB), im Falle des Flunitrazepams 2-Amino-2'-fluor-5-nitrobenzophenon (ANFB). Eindeutigere Nachweisreaktionen, wenn-gleich auch erst in höherer Konzentration, erhielten wir, wenn man nach Auf-tragen der Proben auf die DC-Platte zuerst mit UV bestrahlt und anschließend das Chromatogramm entwickelt. Hierbei ergeben sich jeweils in den basischen Extrakten für Flunitrazepam eine rote Bande auf Höhe ANB und für Fluraze-pam eine violette Bande auf Höhe ACB.

Im Gegensatz zu Flunitrazepam und Flurazepam liegt die geringe Nachweis-reaktion des Medazepams in einer ungenügenden Hydrolyse. Dies wurde durch Parallelauftrag der Reinsubstanz bewiesen. Das „Hydrolyseprodukt“ läuft fast vollständig auf Höhe der Reinsubstanz.

In Gruppe III der Diazepine wird in keinem Fall ein Nachweis erreicht.

Vergleich Emit ST-DC. 50 nicht selektierte Patientenerine, die zur toxikologi-schen Analyse ins Labor gesandt wurden, wurden sowohl mit Emit ST als auch mit dem routinemäßig durchgeführten DC Suchtest untersucht. In 20 Proben war nach der DC der Benzodiazepinnachweis positiv. Es fanden sich in 43 Pro-ben (86%) übereinstimmende Ergebnisse zwischen Emit ST und DC. In 6 Pro-ben (12%) war die DC positiv, der Emit Test negativ; in einem Fall (2%) war der Emit Test positiv, der DC Suchtest negativ.

Diskussion

Der Emit ST stellt einen sehr schnellen und unkomplizierten Test dar. Der Preis von ca. DM 15 pro Test liegt jedoch so hoch, daß der Emit ST als Screening Ver-fahren nicht tragbar erscheint. Für die Diskussion der Nachweisgrenze darf der hohe Variationskoeffizient im Emit ST nicht unerwähnt bleiben. Auch wenn es sich hier nicht um einen quantitativen Test handelt, so bestimmt doch die Diffe-renz der Extinktionen zwischen Probe und Kalibrator, ob der Test positiv oder negativ ausfällt. Sutheimer et al. [8] geben für den Serum-Benzodiazepintest bei einer Konzentration von 0,5 mg/l einen Variationskoeffizienten von 33% für die Differenz der Extinktionen an. Wir fanden für den Urin-Benzodiazepintest vergleichbare Werte. Für den Kalibrator fanden wir bei Messungen in der Serie eine Standardabweichung von 20,1 bei einem Mittelwert von 297 (N = 69). Eine Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Kalibrator von kleiner ± 20 ist daher als fragliches Ergebnis zu interpretieren. Auf keinen Fall sollte man nur auf den positiven oder negativen Befundausdruck achten. Möglicherweise ist die hohe

Ungenauigkeit des Tests auch der Grund, warum Schütz [5] für Bromazepam eine Nachweisgrenze von 2–5 mg/l, wir jedoch 0,5 mg/l finden. Zudem könnte auch ein Unterschied in der Antikörperqualität von Charge zu Charge eine Rolle spielen. So fanden wir zum Beispiel für Camazepam ursprünglich eine Nachweisgrenze von 50–100 mg/l, bei der Nachmessung mit einer anderen Charge jedoch 10–20 mg/l.

Betrachtet man die Ergebnisse der hydrolysierten Proben mit der DC (Tabelle 2), so sollte der Nachweis der Benzodiazepine der Gruppe I keine Schwierigkeiten bereiten. Der Nachweis einiger in Gruppe II aufgeführten Benzodiazepine kann wegen ungenügender fotolytischer Desalkylierung oder nicht ausreichender Hydrolyse bereits Schwierigkeiten bereiten. Der Erfolg hängt hier weitgehend davon ab, inwieweit desalkylierte Metaboliten bzw. Metabolite mit Benzophenonstruktur im Urin ausgeschieden werden. Die Diazepine der Gruppe III werden mit der Diazoreaktion nicht erfaßt. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um neuere Substanzen, welche zudem sehr niedrig dosiert werden. Der direkte Vergleich aus Patientenerurinen zwischen Emit und DC zeigt jedoch, daß immer noch bevorzugt Benzodiazepine der Gruppen I und II eingenommen werden. So fanden wir unter 50 Proben nur einen, der in der DC negativ und im Emit positiv war, wobei es sich möglicherweise um ein Benzodiazepin der Gruppe III gehandelt haben könnte. Häufiger trat der Fall auf: DC positiv – Emit negativ. Unklar ist, welche Region der Diazepine im Emit Test erkannt wird, da so unterschiedliche Verbindungen wie Thienodiazepine oder Triazolodiazepine, 1,5-Benzodiazepine etc. erfaßt werden. Da im Urin zum Teil nur Metaboliten ausgeschieden werden, ist es möglich, daß der Emit Test die Metaboliten nicht mehr erkennt und somit negativ wird, während in der DC nach Hydrolyse und Diazokupplung der Nachweis gelingt. Ebenso könnte bei Vorliegen von Konjugaten der 3'-OH-Benzodiazepine, welche in der DC erfaßt werden, ein negativer Emitbefund resultieren, wie dies von Schütz [5] für das Oxazepam beschrieben wurde.

Sowohl der saure als auch der basische Extrakt läßt sich zum Nachweis der Benzodiazepin-Hydrolyseprodukte heranziehen. Es zeigten sich kaum Unterschiede in den Nachweisgrenzen, wengleich sich der basische Extrakt für einige Benzodiazepine als etwas vorteilhafter erwies.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Benzodiazepin-Detektionsmöglichkeit im Rahmen des Drogenscreenings mit DC seit der Einführung der neuen Diazepine erhebliche Lücken aufweist, da gerade diese nicht erfaßt werden. Hier kann der Versuch unternommen werden, über die nicht hydrolysierten Verbindungen durch Ansprühen mit Kaliumjodoplatinat oder Dragendorffs Reagenz, eventuell auch im Serum, den Nachweis zu führen. Anhaltspunkte kann die Tabelle 1, Spalte 3, geben. In den meisten Fällen wird jedoch die DC der hydrolysierten Proben richtige Ergebnisse liefern. In ausgewählten Fällen z. B. bei weiterem Verdacht auf Diazepinintoxikation bei negativem DC-Befund kann der Emit ST hilfreich sein.

Danksagung. Ich danke Herrn J. Seidel und Herrn G. Herrmann für die sorgfältige Durchführung der Versuche. Frau Neuberger, Toxikologische Abteilung der II. Medizinischen Klinik rechts der Isar der Technischen Universität München, bin ich für die Nachmessung einiger Proben zu Dank verpflichtet.

Literatur

1. Breiter J (1974) Dünnschichtchromatografischer Suchtest zur Erkennung von Drogen- und Arzneimittelmißbrauch. Kontakte Merck 3: 17–24
2. Breiter J, Helger R, Lang H (1976) Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids. Forensic Sci 7: 131–140
3. Interschick E, Wüst H, Wimmer H (1978) Dünnschichtchromatografische Arzneimittelnachweise in Harn und Magensaft – Ein systematischer Analysengang. GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 22: 555–572, 625–626
4. Winkelmann M, Schrader W, Thomas L (1978) Laborchemischer Nachweis von Arzneimittelvergiftungen und gewerblich bedingter Intoxikationen. Medica Fortbildungskurs 22. und 23. November 1978. Broschüre der Fa. Merck, Darmstadt
5. Schütz H (1986) Dünnschichtchromatografische Suchanalyse für 1,4-Benzodiazepine in Harn, Blut und Magensaft. DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft Mitteilung VI der Senatskommission für klinisch-toxikologische Analytik. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
6. Ebel S, Langerund BM, Schütz H (1977) Verbessertes Nachweis für N₁-alkylierte 1,4-Benzodiazepine durch fotolytische Abspaltung der N-Alkylgruppe. Mikrochim Acta II/3–4: 261–277
7. Bratton AC, Marshall EK (1939) A new coupling Component for Sulfanilamid Determination. J Biol Chem 128: 537–550
8. Sutheimer C, Heppler BR, Sunshine I (1982) Clinical Application and Evaluation of the Emit ST Drug Detection System. Am J Clin Pathol 77: 731–735

Eingegangen am 20. Februar 1987

Nachtrag

Bei der Drucklegung dieser Arbeit teilte die Firma Syva-Merck mit, daß inzwischen ein exakter und kostengünstiger arbeitendes Gerät (Selektivanalysator ETSTM) entwickelt wurde.