

CHROM. 4938

GASCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS VON STICKSTOFFHALTIGEN PHARMAKA IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN MIT DEM STICKSTOFFDETEKTOR

M. DONIKE, L. JAENICKE, D. STRATMANN UND W. HOLLMANN

Institut für Biochemie der Universität Köln und Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln (B.R.D.)

(Eingegangen am 12. Mai 1970)

SUMMARY

Gas chromatographic detection of nitrogen-containing drugs in aqueous solutions by means of the nitrogen detector

The nitrogen detector (N-FID), a nitrogen-specific and nitrogen-selective version of the thermionic detector, offers many advantages in the qualitative and quantitative determination of nitrogen-containing drugs in aqueous solutions and especially in biological fluids. Without further preparation the excretion rate of known drugs can be followed by direct injection of the urine samples. Temperature-programmed screening analysis, necessary in the forensic field and in doping controls, is possible after a one-step extracting procedure. Optimal conditions for the use of the N-FID and columns adapted for the gas chromatography of aqueous solutions of drugs in the p.p.m. range are described.

EINLEITUNG

Die Gaschromatographie hat einen festen Platz beim Nachweis von basischen Pharmaka in Körperflüssigkeiten gefunden¹⁻⁴. Wegen der geringen Konzentration der Wirkstoffe bzw. ihrer Metaboliten neben grossen Mengen an störenden Begleitstoffen ist jedoch eine umfangreiche und zeitraubende Probenvorbereitung nötig, die vor allem bei der Durchführung einer grossen Anzahl von Analysen stört. Die Verwendung von thermionischen Detektoren sollte diesen Aufwand wesentlich verringern. Es ist bekannt⁵, dass bei der Auswahl von geeigneten Alkalisalzen, verglichen mit dem FID, ein empfindlicherer und zudem spezifischer Nachweis von Stickstoffverbindungen erreicht werden kann. Dass dieser Detektortyp bisher noch nicht auf dem Gebiet der Arzneimittelanalytik eingesetzt wurde, dürfte seinen Grund im Fehlen einer für Routineuntersuchungen geeigneten und kommerziell erhältlichen Konstruktion haben. Mit der neuerdings verfügbaren, als "Stickstoffdetektor" (N-FID) bezeichneten Version eines N-spezifischen thermionischen Detektors (Hewlett & Packard GmbH, Böblingen), prüften wir, ob die von uns angestrebte und für viele Fragestellungen wünschenswerte Reduzierung des Aufwands der Probenvorbereitung realisierbar ist.

EXPERIMENTELLES

Gaschromatographische Anordnung

Gerät. Für die gaschromatographischen Untersuchungen verwendeten wir das Modell 5755 B der Firma Hewlett & Packard GmbH, Böblingen, ausgerüstet mit einem Doppelkanalschreiber (Moseley H 10-7128 A) und einem elektronischen Integrator HP Modell 3370. Der Einbau des Stickstoffdetektors, Modell 15161 A erfolgte auf der A-Seite des FID. Anstelle des serienmässigen Detektordeckels verwendeten wir eine Eigenkonstruktion mit einer durch ein Nadelventil regelbaren Austrittsöffnung für die Brenngase. Ein in 50 Einheiten pro Umdrehung eingeteilter Antrieb (Duodial, Serie 2606) ersetzte den Regelknopf des Zehngangpotentiometers.

Säulen. Glassäulen; aus Alkaliboratglas; 2.5 mm i.D., 6.0 mm ä.D., vom Einspritzblock bis zum Detektoranschluss ohne Verbindungsstück durchgeführt; mit KOH gewaschener Glaswatte beidseitig auf ca. 1.5 cm Länge verschlossen, so dass die Injektion mit einer 10- μ l Mikrospritze auf das Säulenmaterial erfolgt.

Säule 1: 1.06 m lang, 5 % Polyäthylenglykol 20 M (HP) auf Chromosorb W, AW-DMSCS, 80-100 mesh (HP). Der Träger wurde vor dem Imprägnieren mit flüssiger Phase mit 10 % methanolischer Kalilauge behandelt.

Säule 2: 1.50 m lang, 2 % Igepal CO-880 (HP) und 10 % Apiezon L (HP) auf Chromosorb P (Serva). Die Behandlung des Trägers entspricht Säule 1.

Betriebsbedingungen. Die Temperatur des Einspritzblocks bei Säule 1 war 190°, bei Säule 2240°, die des N-FID 320°.

Für den Ofen ist die Temperatur wie bei den Abbildungen angegeben. Für das temperaturprogramm, siehe Tabelle I.

Gase: He, 55-60 ml/min; H₂, 25.5 \pm 1.5 ml/min; und Luft, 180-200 ml/min.

Elektrometer- und Integrioreinstellung: Bereich, 10²; Abschwächung, 1; Integratorausgang, 10 bzw. 20 mV; Neigungsdetektor, 1.0 mV im Anstieg, 0.3 mV im Abfall des Peaks; Geräuschdämpfung, 3.

TABELLE I

TEMPERATURPROGRAMM FÜR DEN OFEN

	Säule 1	Säule 2
Anfangstemperatur, °C	110	100
Isotherm nach der Injektion, min	1	1
Anstiegsrate, °C/min	8	8
Endtemperatur, °C	190	250
Isotherm bei der Endtemperatur, min	10	4

Reagenzien

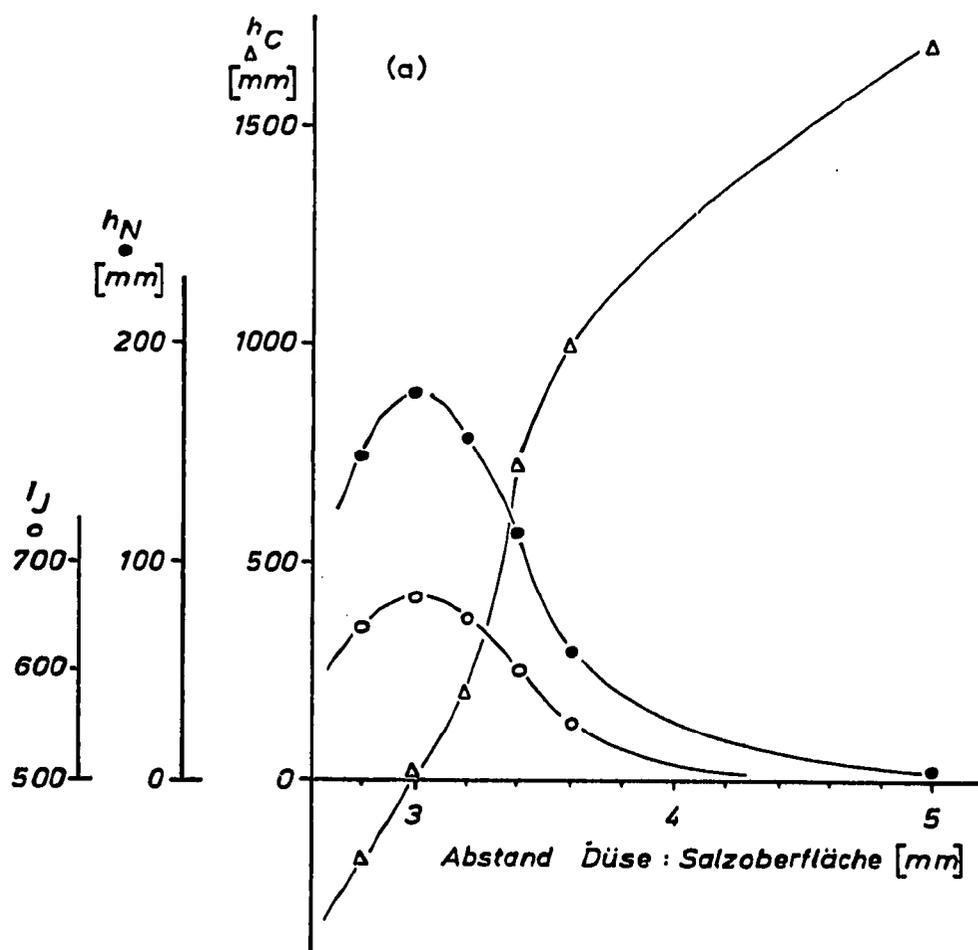
Die folgende Reagenzien wurden verwendet: Bidestilliertes Wasser; Diäthyläther, über Calciumhydrid aufbewahrt und vor Gebrauch frisch destilliert; Coffein, Ephedrin, *n*-Alkane (Merck); Amphetamin, Triglym (Triäthylenglykoldimethyläther) (EGA-Chemie); Methamphetamin, Dimethylamphetamin (Temmler), Nikethamid, Pentamethylentetrazol und Heptaminol, isoliert aus Arzneimittelspezialitäten der

Firmen Ciba, Knoll und Delalaude; Cyclohexylacetamid, aus Cyclohexylamin und Essigsäureanhydrid dargestellt, mehrfach umkristallisiert.

Optimierung des Detektors

Nach dem Äquilibrieren der Gasströme und Temperaturen wird, vom unteren Totpunkt ausgehend, der Abstand der Elektrode zur Düse schrittweise vergrößert, anfangs in Intervallen von 0.2 mm, entsprechend 1/4 Umdrehung der Justierschraube, später in grösseren Abständen. Der Ionisationsstrom, gemessen in den Einheiten des Potentiometers, steigt mit grösser werdendem Abstand auf einen Maximalwert (I_{\max}) an und fällt wieder ab. Er erreicht nach 2.5–3.5 Umdrehungen den Wert des unmodifizierten FID (I_0).

Nach jeder Veränderung des Abstandes werden, nachdem die Basislinie nicht mehr driftet, 2 μ l der Eichlösung (10 p.p.m. Pervitin + 1 % Triglym in Wasser) eingespritzt. Sind die Signalhöhen der Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen bei drei aufeinanderfolgenden Injektionen gleich, so wird das Rauschen bei erhöhter Empfindlichkeit festgestellt. Dann kann die nächste Einstellung vorgenommen werden. Als Funktion des Abstandes werden der Ionisationsstrom (I_J), die Peakhöhen von Methamphetamin und Triglym (h_N , h_C), die Selektivität ($S_{N/C}$), sowie die untere Nachweisgrenze (UG) notiert und in einem Diagramm (s. Fig. 1) dargestellt. Der Stickstofferhöhungswert (ΔN) wird aus den N-Signalen bei I_0 und I_{\max} berechnet



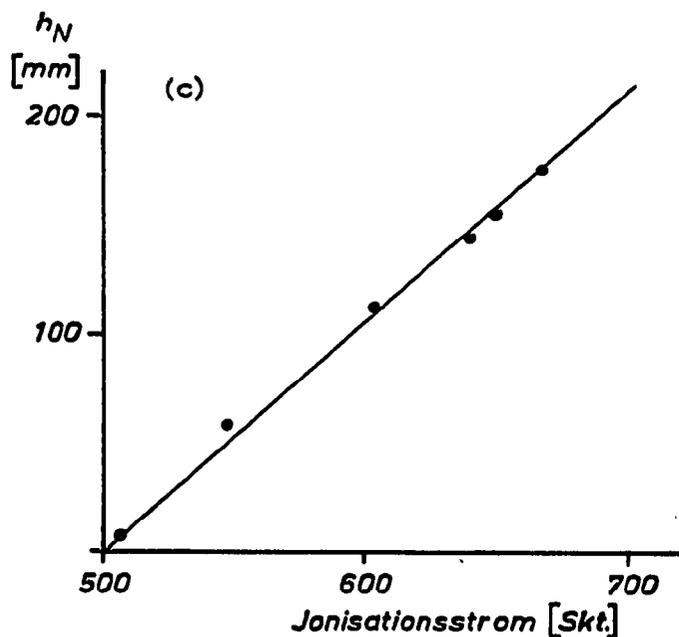
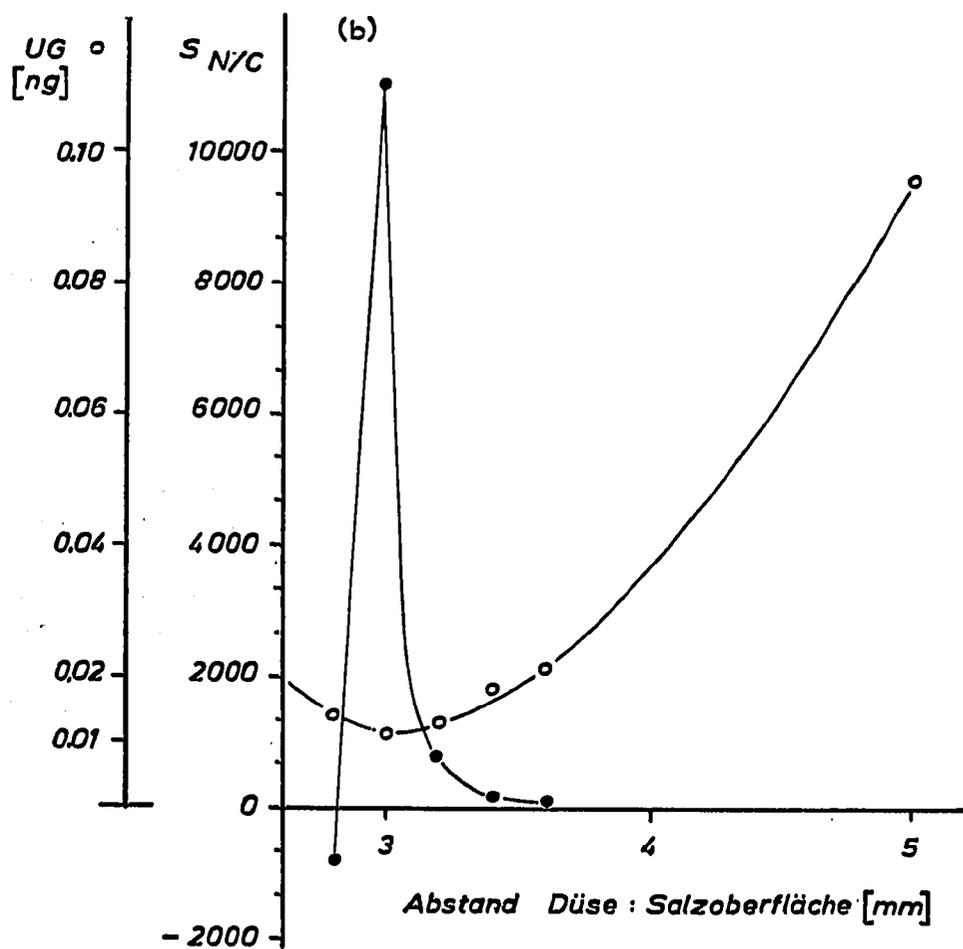


Fig. 1. (a) Ionisationsstrom, Peakhöhe des Methamphetamins und Peakhöhe des Triglyms als Funktion des Abstandes zwischen Düse und Salzoberfläche. (b) Selektivität und untere Nachweisgrenze als Funktion des Abstandes zwischen Düse und Salzoberfläche. (c) Peakhöhe des Metamphetamins als Funktion des Ionisationsstroms.

TABELLE II

WERTETABELLE ZU DEN FIG. 1a-c ABHÄNGIGKEIT DER PARAMETER DES N-FID VOM ABSTAND ELEKTRODE-DÜSE

Legende: u = Umdrehungen der Justierschraube, vom unteren Anschlag der Mechanik aus gezählt; d = Abstand zwischen Düse und Salzoberfläche in mm; I_J = Relativer Ionisationsstrom in Skalenteile; h_N = Peakhöhe des Methamphetamins in mm; h_C = Peakhöhe des Triglyms in mm; R_{min} = Breite des Rauschbandes in mm (h_N , h_C und R_{min} sind auf die Verstärkung $10^3 \times 1$ und 10 mV Integratorausgang berechnet); $S_N/C = (h_N \cdot 1000)/h_C$; $UG = (2R_{min} \cdot G_N)/h_N$ [ng], wobei G_N = Menge an Methamphetamin in ng; $\Delta N = h_{N-FID}/h_{FID}$.

u	d	I_J	h_N	h_C	R_{min}	S_N/C	UG	ΔN
0	2.8	640	144	-176	0.05	-820	0.014	36
0.25	3.0	668	176	16	0.05	11000	0.011	44
0.5	3.2	651	156	204	0.05	765	0.013	39
0.75	3.4	604	112	720	0.05	155	0.018	28
1.0	3.6	548	58	988	0.03	58	0.021	14.5
2.8	5.0	506	4	1680	0.01	2.5	0.096	—

(s. Tabelle II). Durch geringfügige Veränderungen der übrigen Parameter kann das Verhältnis der Signalhöhen zum Rauschen und die Selektivität weiter optimiert werden.

Probenvorbereitung und Injektionstechnik

In ein 15 ml fassendes Zentrifugenglas mit Schliff (NS 14.5) werden 3.2 g ge-
glühtes Natriumsulfat eingefüllt. 5.0 ml Urin, 2.0 ml Äther und 0.5 ml 5 N Kalilauge
werden nacheinander in dieser Reihenfolge zugegeben. Nach 10-minütigem mecha-
nischen Schütteln wird 5 min bei 1000 r.p.m. zentrifugiert. Von der klaren ätherischen
Phase werden 2 μ l mit einer im Eisschrank vorgekühlten Spritze injiziert.

Lösungen der Wirkstoffe in Wasser werden direkt auf den Säulenansatz injiziert.

Bestimmung der Wiedergewinnungsraten

Eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 4 p.p.m. an Metham-
phetamin, Heptaminol, Ephedrin, Nikethamid und Pentamethylenetetrazol wird
nach dem oben beschriebenen Verfahren extrahiert. Zum Vergleich werden weitere
Proben mit festem Natriumkarbonat (250 mg/Probe) bzw. mit 0.5 ml konzentriertem
Ammoniak alkalisiert.

Von der ätherischen Phase werden 2 μ l auf die Säule 1 injiziert, von der wäs-
rigen Phase verdünnt man 1 ml mit 2 ml Wasser und injiziert bei 5-fach erhöhter Emp-
findlichkeit 4 μ l. (Eine Injektion der gesättigten Na_2SO_4 -Lösung blockiert die Spritze!)
Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren erfolgt die Auswertung über den
Integrator und nach der Höhenmethode. Hierbei wird die Summe der Wirkstoffe in
der ätherischen und wässrigen Phase gleich 100 % gesetzt und der Anteil in den
einzelnen Phasen berechnet.

Eichlösungen

Für Säule 1 war die Eichlösung 10 p.p.m. Methamphetamin und 1 % Triglym
in bidestilliertem Wasser; für Säule 2 war sie 10 p.p.m. Amphetamin und 1 % Triglym
in bidestilliertem Wasser.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Spezifität und N-Selektivität

Zwei Bedingungen sind nach den Ergebnissen von KARMEN⁶ zur Erzielung einer guten N-Spezifität notwendig:

Eine Verbrennung nahe dem Alkalisalz und ein geringer Abstand von Auffangelektrode zur Düse: Die vorliegende Detektorkonstruktion erfüllt diese Bedingungen, denn der in der Zylinderelektrode fixierte Rubidiumbromidkristall muss bis auf wenige Millimeter an die Düse angenähert werden, damit die Flamme die Kristalloberfläche berührt. Der wenig überstehende Rand des Platinzylinders wirkt als nahe der Verbrennungszone gelegener Kollektorring.

Der Detektor arbeitet wie ein FID, wenn die Flamme die Kristalloberfläche wegen eines zu gross gewählten Abstandes nicht erreicht. Das Verhältnis der Signale von Methamphetamin zu Triglym entspricht, unter Berücksichtigung der stoffspezifischen Korrekturfaktoren, den Gewichtsverhältnissen. Beim Absenken der Elektrode in die Flammenzone wird das N-Signal vergrössert. Die beginnende Behinderung der optimalen Verbrennung vermindert das C-Signal, das bei weiterer Verringerung des Abstandes sogar negativ wird (vergl. Fig. 2a-2c).

Parallel zu der Grösse des N-Signals verläuft der Grundionisationsstrom

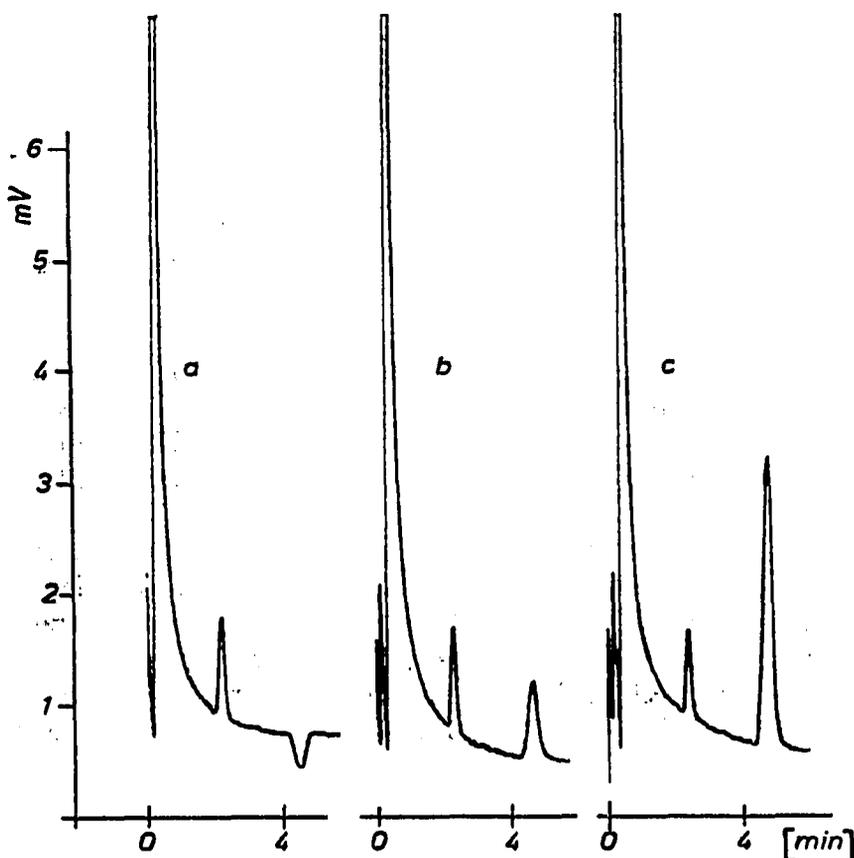


Fig. 2. Einfluss des Abstandes zwischen Düse und Salzoberfläche auf das Chromatogramm: (a) 2.8 mm, (b) 3.0 mm und (c) 3.4 mm Abstand. Retentionszeit: Methamphetamin, 2.0 min; Triglym, 4.6 min.

(Fig. 1c), der in relativen, willkürlich eingeteilten Einheiten des Zehngangpotentiometers abgelesen wird. Im Gegensatz zu den mit Salz-Sinterspitzen modifizierten FID ist diese Anordnung streng selektiv, denn sie unterdrückt die Kohlenstoffanzeige bis hin zu negativen Werten.

So erlaubt bereits die Variation des Abstandes die geeignete und zur Lösung eines Problems günstigste Selektivität einzustellen. Sie kann, angefangen von FID-Bedingungen bis zu einem Maximum, das bei einigem Optimierungsaufwand bei 1:3000 liegt, gewählt werden. Negative Werte für die Selektivität, die laut Definition aus negativen Kohlenstoff-Peaks resultieren, schieden für unsere Problemstellung aus, können aber unter Umständen für die Lösung anderer Probleme interessant sein.

Die untere Nachweisgrenze des N-FID

Die untere Nachweisgrenze ist ein wesentliches Charakteristikum eines Analyseverfahrens. Wie aus der Formel (siehe Tabelle I) hervorgeht⁷, bestimmen bei vorgegebener Konzentration der Substanz zwei Messgrößen ihren Wert: die Signalhöhe und das Rauschen. Beide werden durch die Detektorparameter und, wenn auch in

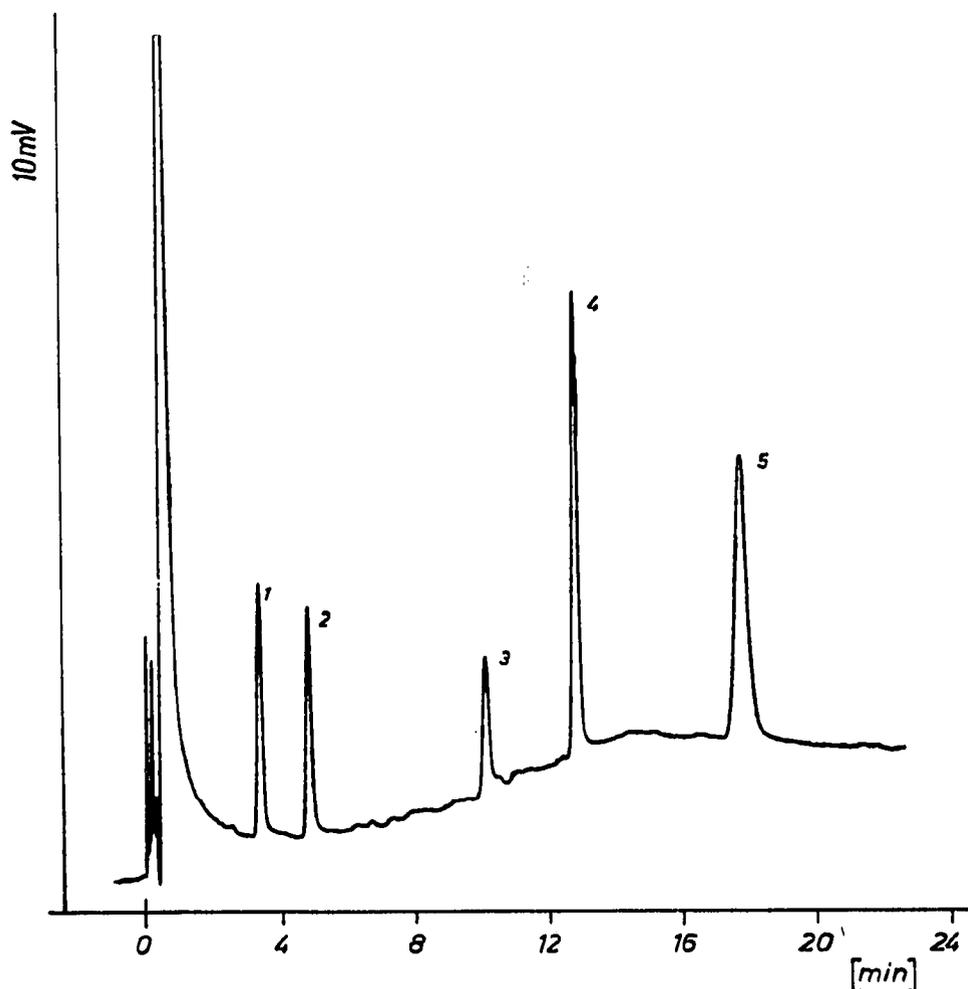


Fig. 3. Trennung einer wässrigen Lösung von Wirkstoffen auf Polyäthylenglykol 20 M (Säule 1, N = 840 für Methamphetamin). Konzentration: 5 p.p.m.; Einspritzmenge: 2 μ l; 1 = Methamphetamin; 2 = Heptaminol; 3 = Ephedrin; 4 = Nikethamid; 5 = Pentamethylentetrazol.

unterschiedlichem Masse, durch die Qualität der Säule beeinflusst. Symmetrische Peaks und keine Verluste durch Adsorption sind Vorbedingungen für das Erreichen einer niedrigen Nachweisgrenze.

Auswahl des Säulenmaterials. Da unsere Untersuchungen auf die direkte Injektion von wässrigen Lösungen basischer Wirkstoffe, vor allem aus der Gruppe der Phenylalkylamine im 0.1–10.0 p.p.m.-Bereich hinzielten, überprüften wir die in der Literatur für die Chromatographie dieser Substanzen empfohlenen flüssigen Phasen und Säulenmaterialien. Hierbei ergaben zunächst nur die Polyäthylenglykoltypen mit wässrigen Testlösungen in diesem Konzentrationsbereich gute Ergebnisse (Fig. 3). Thermostabilere Phasen, wie Apiezon L und verschiedene Silikongummitypen, wiesen ein nicht mehr tolerierbares "tailing" auf. Eine Vorbehandlung des Trägermaterials durch Silylieren mit Dimethyldichlorsilan, durch Waschen mit alkoholischer Kalilauge oder Imprägnieren mit Kalilauge, konnte das "tailing" nicht genügend unterdrücken. Lediglich das Zumischen von Polyäthylenglykol 20 M oder Polyester verbesserte die Trenneigenschaften, ohne jedoch ganz die Trennleistungen der Polyäthylenglykol-

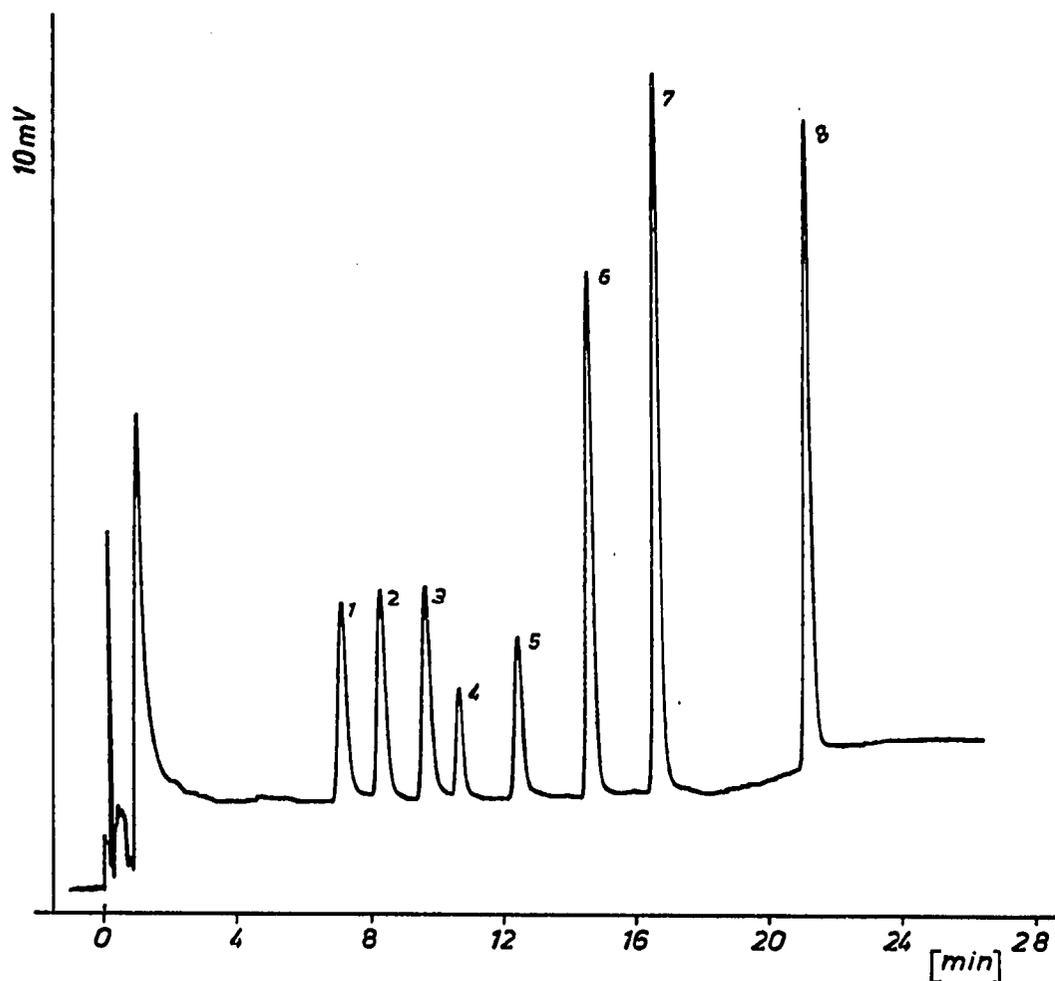


Fig. 4. Trennung einer wässrigen Lösung von Wirkstoffen auf Apiezon L-Igepal modifiziert (Säule 2). $N = 680$ für Methamphetamin. 1 = Amphetamin; 2 = Methamphetamin; 3 = Dimethylamphetamin; 4 = Cyclohexylacetamid (i.St.); 5 = Ephedrin; 6 = Nikethamid; 7 = Pentamethylentetrazol; 8 = Coffein.

typen zu erreichen (Fig. 4). Die Eichkurven wässriger Lösungen von Methamphetamin, Nikethamid, Ephedrin, Heptaminol und Pentamethylentetrazol (Fig. 5) verlaufen über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die Trennfähigkeit dieses Säulentyps wird durch wiederholte Injektionen wässriger Lösung nicht beeinflusst. Die theoretische Bodenzahl verändert sich über einen längeren Zeitraum nicht. Die gleiche Aussage gilt für die Injektion nicht getrockneter, mit Wasser gesättigter organischer Lösungsmittel, wie sie nach einem einmaligen Verteilungsschritt anfallen.

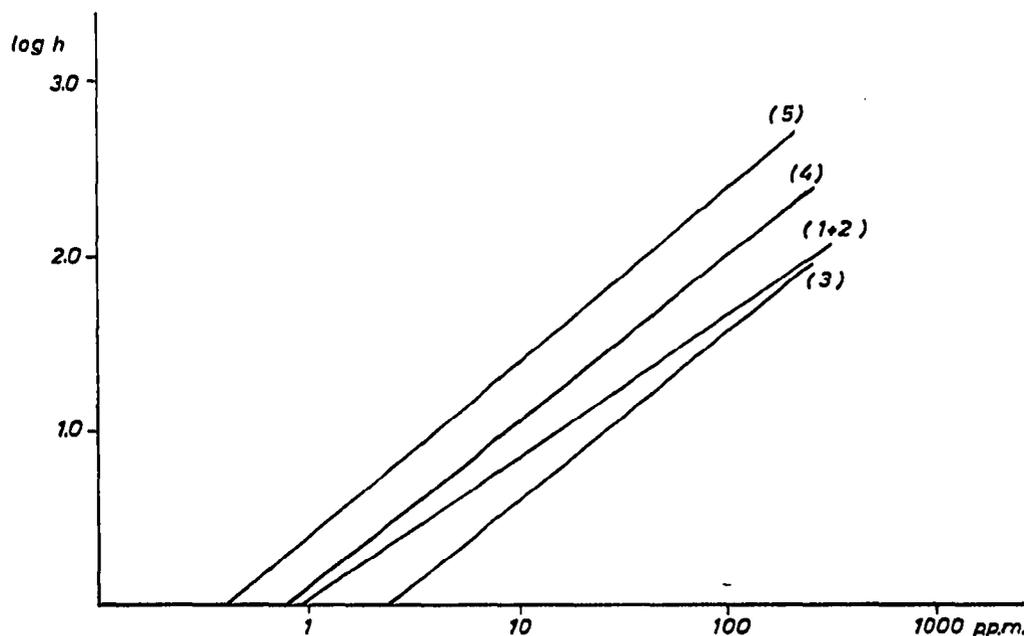


Fig. 5. Eichkurven von Methamphetamin (1), Heptaminol (2), Ephedrin (3), Nikethamid (4) und Pentamethylentetrazol (5).

Signal/Rauschverhältnis. Folgende Parameter beeinflussen das Signal/Rauschverhältnis: die Detektortemperatur, die Position des Salzes in der Kollektorelektrode, die Gasdurchflussmengen von Luft, Helium und Wasserstoff, sowie der Abstand der Elektrode zur Düse. Hierbei ist vorausgesetzt, dass die salzgefüllte Elektrode genau zentrisch über der Düsenbohrung montiert ist und somit auch bei einer Abstandsveränderung eine definierte Geometrie eingehalten wird.

Da mit Ausnahme des Elektrodenabstandes alle anderen aufgeführten Parameter nur in engen Grenzen verändert werden können, werden diese zweckmässigerweise fest eingestellt. So ist die Detektortemperatur durch die Beständigkeit der Silicongummiringe limitiert, die zum Abdichten der Glassäulen benutzt werden, obwohl eine Temperatursteigerung über die von uns gewählte obere Grenze von 330° hinaus noch eine Erhöhung des N-Signals ermöglichen würde. Das Rubidiumbromidsalz wird in dem Platinzylinder am besten so fixiert, dass dieser noch etwa 0.3 mm übersteht und somit als Kollektorring dient. Die Gasmengenströme sind so aufeinander abgestimmt, dass eine reduzierende und relativ kalte Flamme entsteht⁸, Bedingungen, die ein hohes N-Signal unter weitgehender Unterdrückung des C-Signals begünstigen. In Tabelle II und in den Fig. 1a-c wurden bereits die Ergebnisse, die durch Veränderung des Elektrodenabstandes erhalten werden, zusammengestellt.

Es wird deutlich, dass die Höhe des N-Signals und die Breite des Rauschbandes von der Grösse des Grundionisationsstromes abhängen (s. Fig. 1c). Die Selektivität, die zu Beginn wegen des negativen Kohlenstoffpeaks ein negatives Vorzeichen besitzt, fällt vom Maximalwert mit steigendem Abstand rasch ab.

Die N-Erhöhungswerte, die von AUE *et al.*⁵ und EBING⁹ mit etwa 100 angegeben werden, führen nicht im gleichen Ausmass zu einer Verringerung der unteren Nachweisgrenze, da der alkalimodifizierte FID ein stärkeres Rauschen aufweist. Eine genaue Analyse des bei hoher Empfindlichkeit erhaltenen Rauschbandes (s. Fig. 6) zeigt, dass es aus drei Anteilen besteht: einem Rauschen mit einer Frequenz von 5–10 Hertz, einer plötzlichen Verschiebung der Basislinie um etwa 5–8 mm, einer Schwingung mit einer Frequenz von ca. 1/7 Hertz.

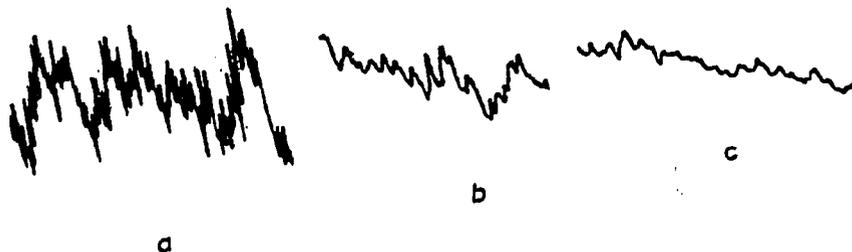


Fig. 6. Rauschen des N-FID: (a) ungefiltert, (b) mit Integrator und Geräuschdämpfung 3 und (c) mit geringem Überdruck im Verbrennungsraum, sonstige Parameter wie b. Bereich: 10×1 ; 0,5 mV Integratorausgang; Säule 1.

Das relativ schnelle Rauschen lässt sich mit der Inkonstanz der Flamme erklären. Elektronisch kann es mit Hilfe des Integrators unterdrückt werden (s. Fig. 6a und b). Das plötzliche Abweichen der Basislinie ist durch geringe Luftströmungen im Labor bedingt, wie sie z.B. schon durch langsames Vorbeigehen an dem Gerät in 1–2 m Abstand erzeugt werden. Das Öffnen der Labortür gibt zu extrem scharfen Peaks Anlass. Um von diesen geringen Luftdruckschwankungen unabhängig zu werden, ersetzen wir den üblichen Detektordeckel durch einen regelbaren Auslass. Wird das Abströmen der Brenngase behindert, so entsteht ein leichter Überdruck im Verbrennungsraum des N-FID. Hierdurch kann der Einfluss der äusseren Luftbewegung nahezu ausgeschlossen werden (s. Fig. 6c). Eine einfache, aber nicht ganz reproduzierbare Methode zur Reduzierung der Druckschwankungen ist das Verstopfen der Bohrungen im serienmässigen FID-Deckel mit Glaswolle.

Für die relativ langsamen und weniger intensiven Frequenzen von 1/7 Hertz fehlt uns zur Zeit eine Erklärung. Druckschwankungen der Brenngase können ausgeschlossen werden, da mehrfache Abwandlung der Gasversorgung keine Änderungen oder Verbesserungen ergaben.

Nach Optimierung aller Parameter und unter Ausschluss von Luftdruckschwankungen erzielten wir eine untere Nachweisgrenze von grössenordnungsmässig 10 pg pro Injektion. Dies stellt eine Verbesserung um den Faktor 10 dar, denn unter FID-Bedingungen erzielten wir auf dem gleichen Gerät eine Nachweisgrenze von 100 pg.

Der lineare Bereich

Die bei quantitativen Bestimmungen interessierenden Eichfunktionen für Methamphetamin, Heptaminol, Ephedrin, Nikethamid und Pentamethylentetrazol

sind in Fig. 5 wiedergegeben. Der lineare Bereich umfasst vier Zehnerpotenzen. Beginnend mit einer unteren Nachweisgrenze von 20 pg reicht er bis etwa 200 ng pro Injektion. Diese Werte hängen vom prozentualen Stickstoffgehalt und der Halbwertsbreite der Signale ab, die unter den angegebenen Analysenbedingungen etwa 10 sec beträgt. Liegen höhere Konzentrationen an stickstoffhaltigen Verbindungen vor, so kann durch Verdünnung der Proben oder durch Splitten des Trägergasstromes der lineare Bereich aufgesucht werden.

Analyse wässriger Lösungen

Wie aus den oben beschriebenen Ergebnissen hervorgeht, ist die wiederholte Injektion von wässrigen Lösungen der reinen Wirkstoffe ohne weiteres möglich. Die weit komplexere Zusammensetzung von Urin bewirkt Störungen, die jedoch bei isothermer Arbeitsweise und Optimierung aller Parameter des N-FID so weit umgangen werden können, dass der qualitative und quantitative Nachweis einzelner Wirkstoffe gelingt. So können u.a. oral aufgenommenes Amphetamin, Methamphetamin, Dimethylamphetamin, Nikethamid, Pentamethylentetrazol und Coffein einwandfrei im Urin nachgewiesen werden (vergl. Fig. 7).

Zur Verfolgung der Ausscheidungsgeschwindigkeit dieser stickstoffhaltigen Drogen erwies sich die hier beschriebene direkte Injektion von Urin als beste Lösung¹⁰.

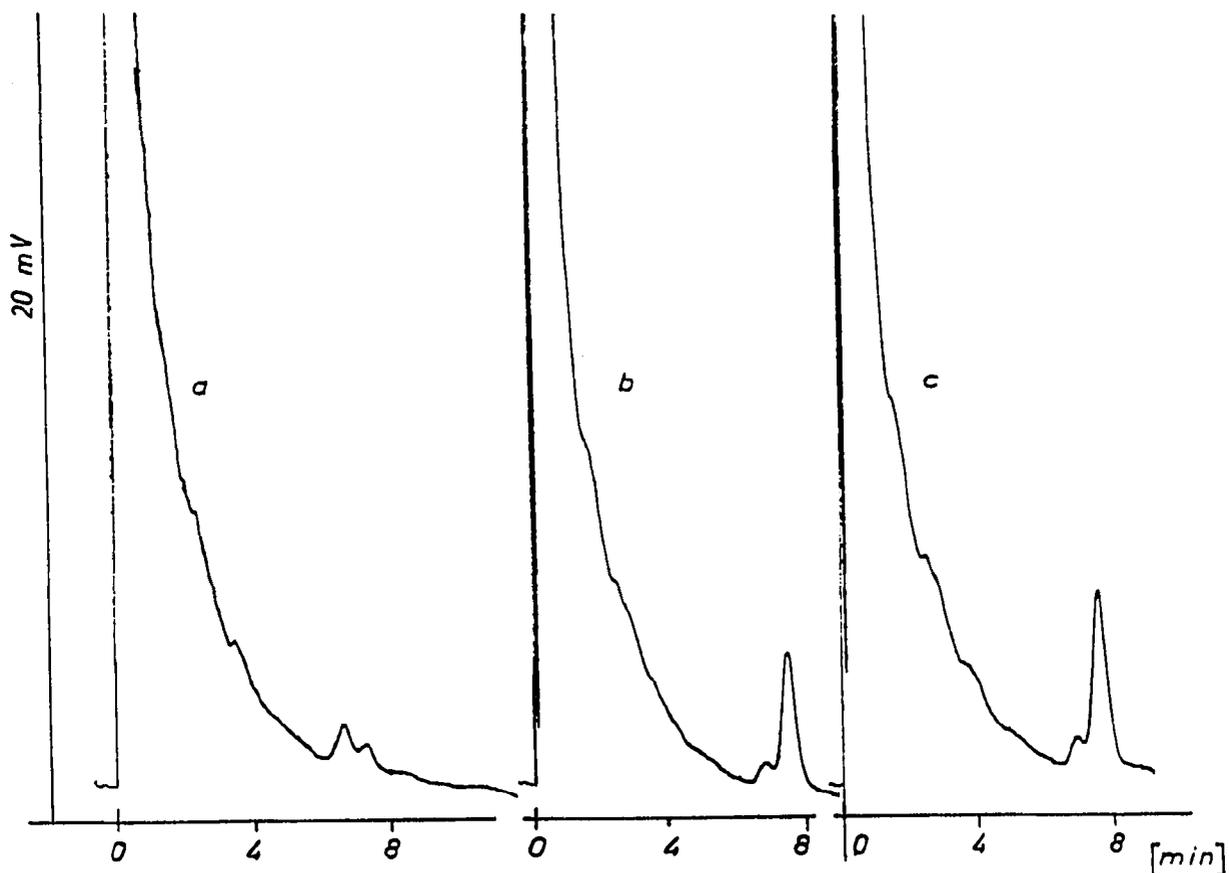


Fig. 7. Nachweis von Coffein nach oraler Applikation durch direkte Injektion von Urin auf die Säule. Säule 2, 220° isotherm, sonstige Parameter wie im experimentellen Teil angegeben. Coffeindosis: 300 mg. (a) Leerwert = 1.3 p.p.m.; (b) 90 min = 8.3 p.p.m. und (c) 150 min = 10.4 p.p.m.

Eine Übertragung auf andere Wirkstoffe ist möglich, da durch Wechsel der Polarität der flüssigen Phase oder durch höhere Trennleistung der benutzten Säulen störende Verbindungen abgetrennt werden können.

Diese Technik ist jedoch weniger geeignet bei temperaturprogrammierter Arbeitsweise, die bei Übersichtsanalysen wie Dopingkontrollen und forensischen Untersuchungen angezeigt ist. Bei der Vielzahl von Verbindungen, auf die geprüft werden soll, ist damit zu rechnen, dass Störsubstanzen und Wirkstoffe gleiche Retentionszeiten aufweisen. Ferner werden Zersetzungsprodukte von Rückständen aus dem Einspritzblock beim Abkühlen des Ofens im Säulenbeginn festgehalten und bei nachfolgenden temperaturprogrammierten Analysen eluiert.

Diese Nachteile lassen sich jedoch vermeiden, wenn ein einfacher Verteilungsschritt durchgeführt wird. Durch Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat werden aus der alkalisierten wässrigen Phase die Wirkstoffe nahezu quantitativ in den Äther übergeführt (s. Tabelle III). Dabei werden aus dem Urin nur noch wenige, störende Verbindungen extrahiert, so dass vorhandene Drogen sicher nachweisbar sind. Die nach Applikation von pharmakologischen Normdosen zu erwartenden Konzentrationen von ca. 1–10 p.p.m. liegen deutlich über der Nachweisgrenze von etwa 0.05 p.p.m. (Fig. 8).

TABELLE III

WIEDERGEGWINNUNGSRATEN VON METHAMPHETAMIN, HEPTAMINOL, EPHEDRIN, NIKETHAMID UND PENTAMETHYLENTETRAZOL

Auswertung: (a) Integrator, (b) Höhenmethode. GC-Bedingungen: Säule 1, sonstige Parameter siehe experimenteller Teil.

	<i>Methamphet- amin</i>		<i>Heptaminol</i>		<i>Ephedrin</i>		<i>Nikethamid</i>		<i>Pentamethylen- tetrazol</i>	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
% Gehalt der ätherischen Phase über KOH-Lösung	100	100	99	98	98	96	100	99	98	96
% Gehalt der ätherischen Phase über Na ₂ CO ₃ -Lösung	98	97	89	91	100	90	99	100	99	95
% Gehalt der ätherischen Phase über NH ₄ OH-Lösung	100	99	100	98	100	100	99	99	94	94

Gegenüber den bisherigen Verfahren bedeutet die Reduzierung der Probenvorbereitung auf einen einfachen Verteilungsschritt ein wesentlicher Fortschritt, weil nicht nur der Arbeitsaufwand eingeschränkt, sondern auch Fehlermöglichkeiten vermieden werden, die mit einer in viele Einzelschritte unterteilten Analysenvorschrift verbunden sind.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (M.D., L.J.) und dem Kuratorium für sportmedizinische Forschung (D.S., W.H.) schulden wir für die Unterstützung

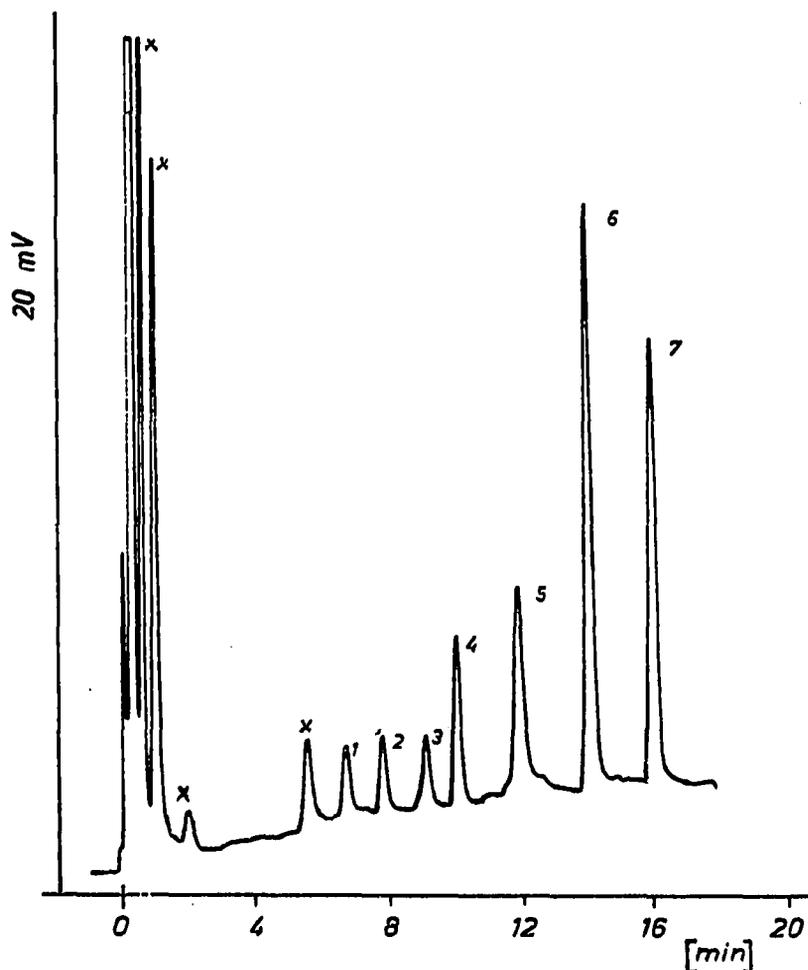


Fig. 8. Wiedergewinnung von Wirkstoffen aus Urin nach einem einfachen Verteilungsschritt. Zugemischt wurden: (1) Amphetamin, 1 p.p.m.; (2) Methamphetamin, 1 p.p.m.; (3) Dimethylamphetamin, 1 p.p.m.; (4) Cyclohexylacetamid (i.St.), 2 p.p.m.; (5) Ephedrin, 5 p.p.m.; (6) Nikethamid, 3 p.p.m.; (7) Pentamethylenetetrazol, 2 p.p.m.; (X) unbekannt.

der vorliegenden Arbeit Dank. Weiter danken wir den Temmler-Werken GmbH für die Überlassung von zahlreichen Vergleichssubstanzen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der "Stickstoffdetektor" (N-FID), eine N-spezifische und N-selektive Version des thermionischen Detektors, bietet Vorteile für die qualitative und quantitative Analyse von stickstoffhaltigen Pharmaka in wässrigen, vor allem biologischen Flüssigkeiten. Unter Verzicht auf eine Probenvorbereitung kann bei isothermer Arbeitsweise die Ausscheidungsgeschwindigkeit von Wirkstoffen durch direkte Injektion der Urinproben bestimmt werden. Temperaturprogrammierte Übersichtsanalysen, wie sie bei forensischen Untersuchungen oder Dopingkontrollen anfallen, sind nach einem einfachen Verteilungsschritt möglich. Die Optimierung des N-FID sowie geeignete Säulen für die Gaschromatographie von wässrigen Lösungen mit Wirkstoffkonzentrationen im p.p.m.-Bereich werden beschrieben.

LITERATUR

- 1 A. H. BECKETT, G. T. TUCKER UND A. C. MOFFAT, *J. Pharm. Pharmacol.*, 19 (1967) 273.
- 2 G. P. CARTONI UND A. CAVALLI, *J. Chromatog.*, 37 (1968) 158.
- 3 H. V. STREET, *J. Chromatog.*, 37 (1968) 162.
- 4 K. D. PARKER, C. R. FONTANA UND P. L. KIRK, *Anal. Chem.*, 34 (1962) 1345.
- 5 W. A. AUE, C. W. GEHRKE, R. C. TINDLER, D. L. STALLING UND C. D. RUYLE, *J. Gas Chromatog.*, 5 (1967) 381.
- 6 A. KARMEN, *J. Chromatog. Sci.*, 7 (1969) 541.
- 7 R. KAISER, *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. 1, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965, S. 134.
- 8 M. RIEDMANN, private Mitteilung.
- 9 W. EBING, *Chromatographia*, 1 (1968) 382.
- 10 M. DONIKE, in Vorbereitung.

J. Chromatog., 52 (1970) 237-250