

## II – 2.1.4.3 Chromatographische Verfahren

### Analytik-Möglichkeiten mit chromatographischen Verfahren

**Tabelle 1** Einteilung der Gifte nach ihren physikalischen Eigenschaften

	Beispiele	Nachweis durch
1. Leicht flüchtige Gifte	Alkohole Trichlorethylen Azeton	Gaschromatographie
2. Extrahierbare Gifte (organisch)	Barbiturate Benzodiazepine Phenothiazine Betäubungsmittel Insektizide	verschiedene chromatographische Methoden
3. Nicht-extrahierbare Gifte (organisch)	Paraquat Prajmaliumbitartrat	Farbreaktion Chromatographie
4. Direkt nachweisbare Gifte	CO-Hb, Met-Hb; Paraquat, Salizylate, Phenothiazine	
5. Metallgifte	Blei Arsen Quecksilber Thallium Kadmium Kupfer	Atomabsorptionsspektrometrie

**Tabelle 2** Gegenüberstellung verschiedener wichtiger chemisch-toxikologischer Nachweismethoden

Methode	Charakterisierung unbekannter Substanzen
Dünnschichtchromatographie (DC)	Geringe Trennschärfe, Screeningmethode, teils spezifische Anfärbung
Gaschromatographie (GC)	Sehr gute Trennleistungen, besonders bei Kapillarsäulen, Detektion mit FID und N-FID unspezifisch
Massenspektrometrie (GC-MS)	Empfindlich, sehr spezifisch (teuer in der Anschaffung und Unterhaltung)
Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	Gute Trennleistung, Detektion zumeist unspezifisch (photometrisch)
Photometrie	Unspezifisch für extrahierbare Wirkstoffe, bewährt für CO-Hb- oder Met-Hb-Bestimmungen
Radioimmunologie (RIA) Enzymimmunologie (EMIT)	Gruppenspezifisch, Screeningmethoden
Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	Nur Metallgifte, sehr spezifisch, sehr empfindlich

FID = Flammenionisationsdetektor

N-FID = stickstoffspezifischer Flammenionisationsdetektor

**Gaschromatographie (GC)\***

Die Gaschromatographie ist ein Trennverfahren für verdampfbare Stoffe. Für schwerflüchtige Verbindungen besteht die Möglichkeit der Umwandlung in verdampfbare Derivate, zum Beispiel durch Methylierung (Barbiturate) oder Silylierung (Morphin).

**Prinzip**

Das zu trennende Gemisch wird bei erhöhter Temperatur im Injektor in einen Gasstrom, meist Stickstoff oder Helium, gebracht. Dieses Trägergas transportiert die verdampften Komponenten zuerst durch eine Trennsäule und anschließend durch einen Detektor.

Die Trennsäule besteht aus einem Rohr, das mit feinkörnigem Material gefüllt ist. Dieses kann ein Adsorbens sein oder ein mit einer stationären flüssigen Phase belegter Träger. Neben diesen »gepackten« Säulen werden auch Kapillarsäulen verwendet, bei denen die stationäre Phase an der Innenwand der Glaskapillare haftet.

Am Säulende befindet sich ein Detektor, der eine Eigenschaft des durchfließenden Gases mißt. Ist eine Fremdschubstanz im Trägergas vorhanden, so registriert der Schreiber einen Ausschlag. Die Zeit, die eine Verbindung zum Durchwandern der Säule benötigt, die Retentionszeit, ist eine substanz-spezifische Größe. Meist benutzt man zur Charakterisierung relative Retentionszeiten, d.h. man mißt die Retentionszeit an derjenigen einer bekannten Vergleichssubstanz.

**Apparative Ausrüstung**

Die nachstehenden Ausführungen sind als Empfehlung für eine Grundausrüstung zu werten und können je nach Bedarf variiert werden:

Zu einer Grundausrüstung gehört ein temperaturprogrammierbarer Säulenofen mit gesondert beheizbarem Injektor und Detektor, sowie zumindest ein Schreiber mit Integrator. Es hat sich als zweckmäßig herausgestellt, die beiden letztgenannten Geräte durch einen kombinierten »Printer/Plotter« (schließt Integrator mit ein) zu ersetzen. Als wichtigste einfache Detektoren werden in der Toxikologie ein Flammenionisationsdetektor (FID) und ein Stickstoffdetektor (NPD) benötigt. Auch hier kann ein moderner Detektor beide Funktionen in sich vereinen und wahlweise in der einen oder anderen Betriebsart benutzt werden.

\* Quelle: DFG-Empfehlung zur klinisch-toxikologischen Analytik. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol. 20, pp. 699–701 (1982)

Der Flammenionisationsdetektor eignet sich für die Erfassung aller brennbaren Verbindungen, insbesondere Lösungsmittel. Da die meisten Arzneistoffe Stickstoff enthalten, ist wegen der höheren Empfindlichkeit und Selektivität für diese Stoffgruppe ein Stickstoffdetektor einzusetzen.

Zusätzliche Detektoren, die jedoch unter Umständen erhöhte Anforderungen an die Bedienung stellen, sind:

#### Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Dieser Detektor spricht auf die elektronenaffinen Substanzen (Halogen-, Phosphor- und Nitroverbindungen, gewisse Diketone und kondensierte aromatische Verbindungen) äußerst empfindlich an und eignet sich deshalb sehr gut für die Erfassung zum Beispiel der Benzodiazepine, der meisten Pestizide und der chlorierten Lösungsmittel. Als Strahlungsquelle kann wegen der universellen Anwendbarkeit nur der  $^{63}\text{Ni}$ -Detektor empfohlen werden, der einen Betrieb bis 400 °C ermöglicht. Der empfindlichere Tritiumdetektor ist nur bis 200 °C betriebssicher. Als Trägergas genügt bei modernen Detektoren (gepulster Gleichstrom) nachgereinigter Stickstoff.

#### Photoionisationsdetektor (PID)

Er kann je nach Wahl der UV-Lampe (Ionisierungsstrahler) als Allgemein-Detektor für alle Substanzen mit nicht zu hohem Ionisierungspotential oder substanzspezifisch verwendet werden. Er gilt als bester Detektor für Schwefelkohlenstoff und eignet sich daher zur Erfassung von Dithiocarbamaten. Zu empfehlen ist eine UV-Lampe vom 10,2 eV.

#### Massenspektrometer (MS)

Die Kopplung Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) ergibt eine erhöhte Selektivität. Sie beizt zur Zeit die höchste Beweiskraft. Allerdings erfordert diese Detektion einen hohen apparativen und arbeitstechnischen Aufwand und ist daher nur für spezielle Laboratorien geeignet. Auf die Empfehlungen zur GC-MS-Kopplung (in Vorbereitung) wird hingewiesen.

#### Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)

Er eignet sich für die Erfassung von Inertgasen (Atemgase, Kohlenmonoxid) und für gewisse Lösungsmittel. Um die Empfindlichkeit dieses Detektors auszunützen, sollte er bei der Detektion von Substanzen mit niederem Molekulargewicht mit Helium oder Wasserstoff als Trägergas betrieben werden.

Zur Beschreibung der Chromatogramme dienen die Retentionswerte. Diese sollen mit jenen der Testsubstanzen verglichen und in Kovars-Indices umgerechnet werden. Dazu werden die Retentionswerte der aliphatischen Kohlenwasserstoffe bestimmt (nur mit FID möglich). Es entspricht zum Beispiel der Retentionsindex des Kohlenwasserstoffes  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$  1200. In der Literatur finden sich die Zusammenstellungen der Kovars-Indices vieler Substanzen.

Die genaue Bestimmung der Kovars-Indices erfolgt isotherm. Da die Analysen aber meist mit einem Temperaturprogramm durchgeführt werden, können, wenn man gewisse Schwankungen in Kauf nimmt, die Indices auch mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen werden.

#### Arbeitsbedingungen

Damit ein Vergleich der Retentionsindices zwischen verschiedenen Laboratorien möglich wird, ist eine Beschränkung auf wenige Trennsäulen erforderlich. Zur Überprüfung der gaschromatographischen Einrichtung dienen Testgemische. Damit kann insbesondere die Qualität der Säule, die Trennleistung und die Nachweisempfindlichkeit kontrolliert werden.

#### Gaschromatographische Bedingungen und Testgemische

##### a) für Arzneistoffe und Suchtstoffe

Trägermaterial:	Chromosorb G HP (80 – 100 mesh)
Belegung:	1.OV 1 3%
	2.OV 17 3%
	3.OV 225 3%
Temperatur:	100–280 °C (programmiert)
Testgemisch:	Enthält die folgenden Komponenten in Methanol, je 1 g/l (Tab. 3).

Tabelle 3 Zusammensetzung des Testgemisches.

Komponente	Kovats-Index auf OV-1
Barbital	1495
Pentobarbital	1745
Diphenhydramin	1870
Phenobarbital	1960
Methaqualon	2115
Codein	2385
Morphin	2435
Chinin	2785

1 µl der 1:10 verdünnten Lösung wird eingespritzt. Je 100 ng der Einzelkomponenten müssen noch erkannt werden. Mit einer gepackten Säule muß eine Auflösung erreicht werden (vgl. Chromatogramm in Abb. 1), die eine Trennung aller Komponenten ermöglicht.

b) für Lösungsmittel

Trägermaterial: Kieselgur<sup>1)</sup>  
 Belegung: Polyethylenglykol (Carbowax) 1500 (15%)  
 Temperatur: isotherm zwischen 60–100 °C  
 Testgemisch: enthält die folgenden Komponenten  
 in Wasser, je 1 g/l  
 Methanol  
 Aceton  
 Ethanol  
 Isopropanol

1 µl wird eingespritzt. Die Einzelkomponenten müssen noch getrennt werden.

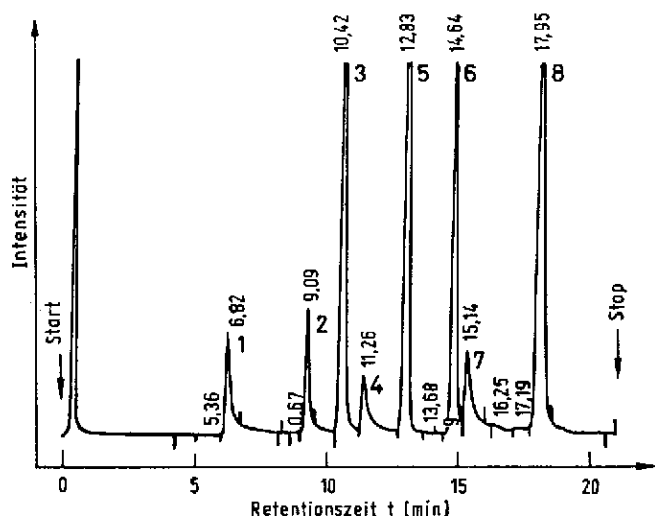


Abb. 1 Gaschromatogramm des oben (Tab. 3) angegebenen Arzneimittel- und Suchtstoff-Testgemisches auf OV-1, weitere Bedingungen wie darüber angegeben. 1 = Barbital, 2 = Pentobarbital, 3 = Diphenhydramin, 4 = Phenobarbital, 5 = Methaqualon, 6 = Codein, 7 = Morphin, 8 = Chinin.

<sup>1)</sup> Da Kieselgur weltweit nicht mehr erhältlich ist, wird statt dessen als Trägermaterial Chromosorb W, NAW, 80–100 mesh empfohlen. Die Trennleistung der damit hergestellten Säulenfüllung entspricht der Belegung auf Kieselgur.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)\*)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein Trennverfahren für Stoffe, die in Lösung gebracht werden können. Wie bei allen chromatographischen Prozessen wird die Trennwirkung erreicht durch Verteilung der Stoffe zwischen zwei Phasen. Bei der HPLC besteht die stationäre Phase aus modifizierten Kieselgelteilchen oder aus anorganischen oder organischen Makromolekülen, die z.T. an der Oberfläche modifiziert sind (Korngröße 3, 5, 7 und 10 µm) und die strömende Phase aus dem Laufmittel. Die Laufmittel sind zusammengesetzt entweder aus organischen Lösungsmitteln oder aus mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln und Wasser. Zusätze von Säuren oder Salzen bzw. Puffern zur pH-Einstellung sind möglich.

Je nach Art und Beschaffenheit der stationären Phase unterscheidet man zwischen Adsorptionschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Verteilungs- und Reversed-Phase-Chromatographie und Gelchromatographie. Welches Verfahren zur Anwendung kommt, hängt von der Problemstellung ab. Die HPLC kann verwendet werden für analytisches und präparatives Arbeiten. Für letzteres sind spezielle Säulen und eventuell auch spezielle Aufgabesysteme notwendig, worauf nicht weiter eingegangen wird. Zur Lösung eines Problems empfiehlt es sich zunächst, die Reversed-Phase-Chromatographie einzusetzen, da dieses Verfahren im Routinebetrieb die wenigsten Probleme zeigt. Es stehen verschiedene Säulen zur Verfügung, z.B. Silicagel mit kovalent gebundenen Alkyl-, Phenyl-, Diol- oder Aminogruppen. Außerdem kann der pH-Wert in einem weiten Bereich variiert werden, und es ist Ionenpaar-Chromatographie möglich. Üblicherweise reicht eine Korngröße von 10 µm beim Säulenmaterial aus. Für schwierige Trennungen kann auf feinkörnigeres Material übergegangen werden.

#### Apparative Ausrüstung

Die Grundkomponenten für die HPLC sind:

- Laufmittelreservoir
- Pumpe
- Probenaufgabesystem
- Trennsäule
- Detektor mit Schreiber
- Auffanggefäß für Laufmittel.

Ob einem Komponentengeräte, aufgebaut aus verschiedenen Bausteinen, oder einem Kompaktgerät, Bauteile von einem Hersteller in ein Gerät integriert, der Vorzug zu geben ist, soll dem Betreiber überlassen werden.

#### Labor Ausbaustufe B

Mit den genannten Komponenten können einfache chemisch-toxikologische Untersuchungen durchgeführt werden, z.B. Bestätigungsanalysen oder quantitative Bestimmungen bekannter Substanzen. Als Detektor sollte ein variabler UV-Detektor mit einem Wellenlängenbereich von z.B. 200–450 nm verwendet werden.

#### Labor Ausbaustufe C

Zusätzlich sollte vorhanden sein:

- Ausrüstung für Gradientenelution;
- UV-Detektor, der ansteuerbar ist und ein UV-Spektrum von einem Peak schreiben kann;
- ein bis 60 °C heizbarer Säulenofen, um reproduzierbare Analysen zu erhalten;
- weitere Detektoren, z.B. Fluoreszenzdetektor oder elektrochemischer Detektor.

Als weitere Ausrüstung wäre zu nennen: Integrator, Fraktionssammler, Autosampler, Möglichkeiten zur EDV-Auswertung.

Bei der Kopplung HPLC-MS sollte noch die weitere Entwicklung abgewartet werden.

#### Literatur

als Laboratoriumshandbuch:

MEYER, V. (1980) Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Diesterweg-Salle-Sauerländer, Arau, Frankfurt;

\*Quelle: DFG-Empfehlung zur klinisch-toxikologischen Analytik. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol. 20, pp. 697–698 (1982)

als ausführliches Grundlagenbuch:

SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. (1974) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley, New York.

In diesen Büchern wird auf weitere Literatur verwiesen.

### Dünnschichtchromatographie<sup>4)</sup>

Den *Arzneimittelnachweis* führt man durch *nach Extraktion dünn-schichtchromatographisch aus Magensaft und Harn*. Während im Magensaft die Medikamente unverändert vorliegen, findet man im Harn oft nur Metaboliten, die, soweit mit Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert, nicht direkt extrahierbar sind. Rf-Werte der Reinsubstanzen sind im Harn nur bedingt verwertbar. Bei der Harnanalyse müssen zur Identifikation, möglichst nach Stoffklassen und unter Berücksichtigung ihrer Biotransformation geordnet, zusätzliche Kriterien herangezogen werden:

Verwendung relativ spezifischer Sprühreagenzien	Barbiturate, Bromharnstoff, Salizylate
Nachweis gemeinsamer Metaboliten	Benzodiazepine
Nachweis eines typischen Metabolitenmusters	Mechaqualon
Verwendung mehrerer Laufmittel	Codcin, Morphin
Verwendung mehrerer Sprühmittel	Phenothiazine

### Methodik

#### 1. Extraktion

Zur Abtrennung störender Substanzen und zur Anreicherung werden die Arzneistoffe bei saurem und alkalischem pH extrahiert, Harnkonjugate vorher durch HCl-Hydrolyse gespalten.

##### a) Harn

*Saurer Extrakt:* 20 ml Harn werden mit 20%iger Weinsäure auf pH 2 (pH-Papier) eingestellt, zweimal mit je 60 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten Etherphasen nach Trocknen mit Natriumsulfat eingedampft. Der Rückstand wird mit 2 ml Methanol aufgenommen und das Methanol in einem Tablettengläschen im Luftstrom abgeblasen.

*Saurer Extrakt nach Hydrolyse:* 20 ml Harn, ggf. nach saurer Extraktion, werden mit 20 ml 25%iger HCl versetzt und 15 Minuten am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Abkühlen wird durch Zugabe von 6 g festem NaOH und 20%iger Natronlauge annähernd neutralisiert, mit 20%iger Weinsäure auf pH 2 (pH-Papier) eingestellt und wie oben extrahiert. Ein Überschuß an Weinsäure kann zu störenden Niederschlägen führen.

*Basischer Extrakt nach Hydrolyse:* Die verbleibende wäßrige Phase wird mit Karbonatpuffer (15 Vol.-Teile 2,5 mol.  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und 19 Vol.-Teile 3 mol.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung) auf pH 9 bis 10 eingestellt und zweimal mit je 60 ml eines Chloroform/Isopropanol (4:1, v/v) Gemisches extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden wie oben weiterverarbeitet.

##### b) Magensaft

20 ml Magensaft werden wie Harn sauer und alkalisch extrahiert, jedoch ohne Hydrolyse. Dickflüssiger Mageninhalt bzw. Erbrochenes wird ggf. mit Wasser verdünnt und grob filtriert (Porzellannutsche ohne Filterpapier).

#### 2. Chromatographie

Die Extrakte werden mit 100 µl Isopropanol aufgenommen und ca. 10 µl mit einer Glaskapillare strichförmig auf Dünnschichtplatten Kieselgel F254 Merck aufgetragen, daneben Vergleichssubstanzen, z.T. mit dem Extrakt überlappend wegen möglicher Rf-Wert-Verschiebung. Der vollständige Analysengang (siehe

<sup>4)</sup> Quelle: INTERSCHICK E., WÜST H.; Therapiewoche 26, 5313–5321 (1976)

Abb. 2) erfordert insgesamt 9 (Magensaft) bzw. 10 (Harn) DC-Platten und 5 Trennkammern mit verschiedenen Laufmitteln. Die Trennzeiten betragen bei den neuen DC-Fertigplatten ca. 10 Minuten. Die Trocknung nach der Entwicklung, für die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der wäßrigen Sprühreagenzien kritisch (vor allem bei  $\text{Hg}(\text{I})\text{NO}_3$ ), erfolgt nicht im Trockenschrank, sondern in einer eigens hierfür entwickelten Gebläsanlage. Die Plattenreihen werden dabei gleichmäßig 10 Minuten mit Warmluft und 5 Minuten mit Kaltluft abgeblasen.

### 3. Identifikation

Eine erste unspezifische Orientierung vermittelt die Fluoreszenzlöschung bzw. Eigenfluoreszenz der aufgetrennten Substanzen im UV-Licht bei 254 nm. Zur Identifikation ist das Aufsprühen eines Nachweisreagenzes notwendig. Die Befundsicherung über UV-Spektren ausgekratzter und eluierter Zonen ist zwar grundsätzlich möglich, meist aber für den Gruppennachweis nicht erforderlich. Wenn nur Arzneimittelspuren vorliegen, stößt die Methode auf Schwierigkeiten.

#### Harnanalyse

##### Arzneimittel im sauren Extrakt ohne Hydrolyse

Dieser Extrakt enthält alle sauren und neutralen Arzneistoffe und ihre Metaboliten, soweit sie nicht an Glukuronsäure oder Sulfat gebunden sind, wie Barbiturate, Bromureide, Salizylate, Paracetamol. Bei Intoxikationen findet man hier häufig auch freies Methaqualon, doch läßt sich der Nachweis sicherer über dessen Metabolitenmuster nach Hydrolyse führen.

#### Barbiturate

Barbiturate werden in unveränderter Form und als Metaboliten ausgeschieden. Metaboliten wandern auf dem Chromatogramm kürzer. Beide reagieren durch Schwarzfärbung mit Hg I-Nitrat. Mit Hg II-Nitrat/Diphenylcarbazon (= violette Flecken) färben sich die unveränderten Barbiturate empfindlicher an. Ausschlaggebend für die Empfindlichkeit ist nach unserer Erfahrung der Trocknungsvorgang vor dem Besprühen. Nach Modifikation des Hg II-Reagenzes (Tab. 4) färbt sich der Plattenuntergrund nicht mehr, die Flecken werden kontrastreicher und haben größere Beständigkeit. Auch Metaboliten von Bromureiden (z.B. Diethylacetylcarbamid und andere Substanzen), die in ihren Rf-Werten sich nicht von den Barbituratmetaboliten unterscheiden lassen, können mit Hg I-Nitrat positiv reagieren. Fälle, in denen sich nur Hg I-positive Metaboliten nachweisen lassen, aber weder unverändertes Barbiturat noch Bromureide, erlauben keine eindeutige Aussage. Zumindest aber bei Intoxikationen läßt sich fast immer unverändertes Barbiturat nachweisen. In Zweifelsfällen muß zur Klärung die Magensaftanalyse oder die UV-Spektrometrie herangezogen werden.

Im Magensaft finden sich häufig Substanzen, die mit Hg II/Diphenylcarbazon, nicht aber mit Hg I-Nitrat reagieren, außerdem färben diese sich beim Aufsprühen von 10%iger Schwefelsäure blau an, während Barbiturate sich nicht verändern.

#### Bromureide

Bromureide werden im Harn in relativ kleiner Menge unverändert ausgeschieden. Der Nachweis geschieht nach Oxydation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Anlagerung von Brom an Fluorescein, wobei rote Eosinflecken entstehen. Im UV-Licht (350 nm) geben diese Fluoreszenzlöschung. Bekannt sind bromfreie Metaboliten, wie 2-Ethylbutyrylhamstoff. Dieser gibt mit Hg I-Sprühreagenz positive Reaktion, dagegen nicht mit Fluorescein. Wie entsprechende Versuche gezeigt haben, verläuft die Ausscheidung der Bromureide in den Harn langsam. Die maximale Ausscheidung ist erst nach einigen Tagen zu erwarten. Hiermit stehen eigene Erfahrungen in Einklang, daß bei frischen akuten Intoxikationen bei positivem Magensaftbefund noch ein negativer Harnbefund vorliegen kann.

#### Salizylate

Schon nach therapeutischer Dosierung erscheinen Salizylate als großer bei 254 nm blau fluoreszierender Fleck mit relativ kleinem Rf-Wert. Mit  $\text{FeCl}_3$  reagiert dieser blaviolett.

#### Phenazetin und Paracetamol

Phenazetin erscheint als N-Azetylamino-phenol (Paracetamol) im Harn, das sich an diazotiertes Nitranilin kuppeln läßt und dabei braun anfärbt. Von dem Medikament Paracetamol, das unverändert im Harn vorliegt, kann Phenazetin damit nicht unterschieden werden.

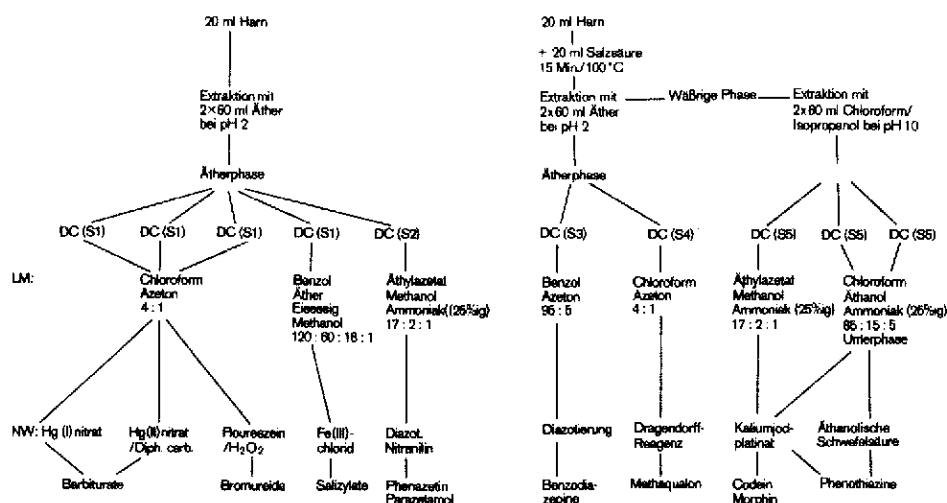


Abb. 2 Toxikologischer Analysengang bei Harn

DC = Dünnschichtplatte

S 1-6 = aufgetragene Standardlösungen

LM = Laufmittel, Angaben in Volumenanteilen

NW = Sprühreagenzien

### Arzneimittel in Extrakten nach Hydrolyse

Nach Hydrolyse sind auch konjugierte Arzneistoffderivate extrahierbar. Der saure Extrakt enthält die Metaboliten der Benzodiazepine und des Methaqualons, der basische Extrakt die Phenothiazin-Metaboliten und deren Hydrolyseprodukte sowie Morphin und Codein.

#### Benzodiazepine

Benzodiazepine liegen im Harn nach Hydrolyse als gelb gefärbte Aminobenzophenone vor. In eigenen Versuchen konnte bestätigt werden, daß Oxazepam (Adumbran, Praxiten), Chlordiazepoxid (Librium), Dikaliumpchlorazepat (Tranxilium) und Diazepam (Valium) im Harn über den gemeinsamen Metaboliten 2-Amino-5-Chlorbenzophenon erfassbar sind, Nitrazepam dagegen als 2-Amino-5-Nitrobenzophenon. Beide Substanzen zeigen nach Diazotierung und Kupplung mit Naphthylethylendiammoniumdichlorid rote bzw. blaue Farbreaktionen, Diazepam wird u.a. aber auch zu 2-Methylamino-5-Chlorbenzophenon abgebaut, das sich als sekundäres Amin nicht diazotieren läßt. Durch seine Eigenfarbe bzw. Fluoreszenzlösung im UV-Licht kann aber dadurch Diazepam von den übrigen Benzodiazepinen unterschieden werden.

#### Methaqualon

Der Methaqualonnachweis im Harn stützt sich auf ein typisches Metabolitenmuster (4 Flecken). Mit Dragendorff-Reagenz färben diese sich orange. Mit Phenazetin als Lokalisationsstandard, das unter den gegebenen Bedingungen zwischen der 1. und 2. Metabolitenzone wandert, ist auch in Zweifelsfällen eine eindeutige Zuordnung möglich. Da Phenazetin nicht mit Dragendorff-Reagenz reagiert, muß es vor dem Besprühen im UV-Licht mit Bleistift gekennzeichnet werden. Bei Intoxikationen werden gelegentlich Methaqualon-Stoffwechselprodukte in solchen Mengen ausgeschieden, daß sie sich chromatographisch nicht mehr sauber voneinander trennen. Es empfiehlt sich dann, das Chromatogramm mit verdünntem Extrakt zu wiederholen.

#### Phenothiazine

Nach Hydrolyse des Harns liefern Phenothiazine ein Muster von zahlreichen Metaboliten und Spaltprodukten, das mit Kaliumjodplatinat braun bis violett und mit alkoholischer Schwefelsäure teils rot, teils

blau reagiert. Verwandte Substanzen der Phenothiazingruppe verhalten sich ähnlich, jedoch lassen sich deren Metaboliten mit Schwefelsäure, wenn überhaupt, nur schwach anfärben. Bei der Vielzahl an Substanzen dieser Stoffklassen sind Überschneidungen nicht immer auszuschließen. Die Farbreaktion mit Schwefelsäure wird mit Cholesterin als Standard kontrolliert, das im Gegensatz zu den Phenothiazinen stabil ist.

#### *Codein und Morphin*

Codein und Morphin werden im Harn zum größten Teil unverändert frei oder als Konjugat ausgeschieden. Nur selten konnten wir einen Umbau von Codein in Morphin oder umgekehrt beobachten. Heroin wird dagegen zu Morphin transformiert und ist als solches im Harn nachweisbar. Mit Kaliumjodplatinat färben sich beide Alkaloide blau bis braunviolett an. Da auch die Spaltprodukte der Phenothiazine und anderer Psychopharmaka ähnlicher Struktur die gleiche Reaktion geben, ist es notwendig, zwei Chromatogramme mit überlappendem Standard in verschiedenen Laufmitteln zu entwickeln, um falsch positive Resultate zu vermeiden.

#### *Magensaftanalyse*

Da im Magensaft Arzneimittel unverändert vorliegen, sind Störungen durch Metaboliten und Konjugate nicht zu erwarten, und es erübrigt sich die Hydrolyse. Die Trennung erfolgt, wie für Harn angegeben, aus saurem und basischem Extrakt. Bei Vorliegen von Dragendorff-positiven Substanzen, wie Methaqualon, Benzodiazepine u.a., ist es erforderlich, den Befund über ein zweites Laufmittel zu sichern, da das Reagenz zu wenig Spezifität zeigt und im Magensaft die Identifikation über das Metabolitenmuster nicht möglich ist.

**Tabelle 4** Verzeichnis der Sprühreagenzien

#### *Ethanolische Schwefelsäure*

Schwefelsäure: 5%ig in Ethanol

Nach dem Besprühen Chromatogramm mit Heißluft abblasen

#### *Diazotierung und Kupplung mit N-Naphthylethylendiamin*

I. 2 ml Natriumnitrit: 5%ig

(Im Kühlschrank mehrere Monate haltbar)

8 ml Salzsäure: 1 normal

miteinander mischen (ca. einen Tag haltbar)

II. N-Naphthylethylendiammoniumdichlorid: 0,4%ig in Methanol (Im Kühlschrank mehrere Monate haltbar)

Nacheinander mit Lösung I und II besprühen

#### *Diazotiertes Nitranilin*

5 ml p-Nitranilin: 0,5%ig in 2 n Salzsäure

(Im Kühlschrank mehrere Monate haltbar)

0,5 ml Natriumnitrit: 5%ig

miteinander mischen

15 ml Natriumazetat: 3molar

dazugeben (ca. eine halbe Stunde haltbar)

Nach dem Besprühen Chromatogramm mit Heißluft abblasen

#### *Dragendorff-Reagenz*

Vorratslösung:

I. 1,7 g bas. Wismutnitrat

20 g Weinsäure

miteinander in 80 ml Wasser lösen

II. 32 g Kaliumjodid in 80 ml Wasser lösen

Gleiche Volumina von Lösung I und II mischen (Im Kühlschrank mehrere Monate haltbar)

Sprühlösung:

3 ml Vorratslösung

30 ml Weinsäure: 20%ig

miteinander mischen (ca. zwei Wochen haltbar)

*Eisen(III)-chlorid*

Eisen(III)-chlorid: 2%ig in 0,5 n Salzsäure

*Fluoreszein/Wasserstoffperoxid*

I. Natriumfluoreszein: 0,1%ig in 50%igem Ethanol

II. 10 ml Wasserstoffperoxid: 30%ig

10 ml Eisessig

miteinander mischen (ca. einen Tag haltbar)

Nacheinander mit Lösung I und II besprühen. Chromatogramm ca. 20 Min. bei 110 °C trocknen

*Kaliumjodplatinat*

7 ml Kaliumjodid: 10%ig

(Im Kühlschrank mehrere Monate haltbar)

0,4 ml Hexachloroplatinsäure: 10%ig

6 ml Salzsäure: 25%ig

miteinander mischen (ca. einen Tag haltbar)

*Quecksilber(I)-nitrat*

5 g Quecksilber(I)-nitrat-Kristalle in 100 ml Wasser zerreiben

Solange der ungelöste Bodensatz weiß ist und sich nicht gelb oder grau verfärbt, ist der Überstand als Sprühreagenz verwendbar

*Quecksilber(II)-nitrat/Diphenylcarbazon*

I. Quecksilber(II)-nitrat: 0,2%ig in 0,1 n Salpetersäure

II. a) Diphenylcarbazon: 0,1%ig in Ethanol

(Im Kühlschrank ca. einen Monat haltbar)

b) 40 g Ammoniumacetat in Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen,

mit 65%iger Salpetersäure auf pH 3,5 (pH-Meter) einstellen.

26 ml Lösung b) mit 4 ml Lösung a) mischen

(ca. eine Woche haltbar)

Mit Lösung I bis zur Transparenz besprühen, Chromatogramm 5 Min. mit Heißluft abblasen, Sprüh- und Trocknungsvorgang wiederholen. Anschließend 5 Min. mit Kaltluft abblasen und wenig Lösung II aufsprühen

---

Soweit keine anderen Angaben gemacht wurden, sind die oben beschriebenen Lösungen praktisch unbegrenzt haltbar.

**Tabelle 5 Verzeichnis der Standardlösungen**

---

S 1: 200 mg Hexabarbital

125 mg Kalzium-Cyclobarbital

125 mg Carbomal (= 1 Tabl. Dormopan®)

200 mg Salizylsäure

in 10 ml Isopropanol

S 2: 50 mg p-N-Azetylamino-phenol

in 10 ml Isopropanol

S 3: 5 mg Nitrazepam (1 Tabl. Mogadan®)

5 mg Diazepam (1 Tabl. Valium 5®)

5 mg Chlordiazepoxid (1 Dragee Librium 5®)

mit 40 ml 12,5%iger Salzsäure 15 Min. kochen, bei pH 2 zweimal

mit je 60 ml Ether extrahieren, nach Eindampfen der Etherphasen Rückstand mit 10 ml Isopropanol aufnehmen.

S 4: 200 mg Methaqualon (1 Tabl. Revonal)

100 mg Phenazetin

in 10 ml Isopropanol

- S 5: 10 mg Morphinhydrochlorid  
 10 mg Codeinphosphat  
 10 mg Cholesterin  
 in 5 ml Isopropanol
- S 6: 40 mg Chlordiazepoxid (4 Kapseln Librium®)  
 20 mg Diazepam (4 Tabl. Valium S®)  
 20 mg Nitrazepam (4 Tabl. Mogadan®)  
 40 mg Oxazepam (4 Tabl. Oxazepam®)  
 in 10 ml Isopropanol

Die Standardlösungen werden, mit Ausnahme von S 1, mit dem zu untersuchenden Extrakt überlappend aufgetragen.

### Sprühreagenzien

- 1. Ameisensäure, wasserfrei (98–100%)**  
 (zum Nachweis von China-Alkaloiden)
- 2. Ammoniak, konzentrierte Lösung**  
 (zum Bedampfen in einer DC-Kammer beim Nachweis von Hydroxyanthracenderivaten, siehe Rhabarber)
- 3. Acetanhydrid-Schwefelsäure (9:1; (V/V))**  
 Nach dem Besprühen wird im UV<sub>365</sub> ausgewertet.  
 (zum Nachweis der Inhaltsstoffe von javanischer Gelbwurz)
- 4. Anisaldehyd-Schwefelsäure**  
 0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure in dieser Reihenfolge gemischt. Nach dem Besprühen wird 5 bis 10 Min. auf 105 bis 110 °C erhitzt.  
 (universell verwendetes Sprühreagenz zum Nachweis von etherischen Ölen, s. z.B. Salbeiblätter)
- 5. Antimon (III)-chlorid-Lösung**  
 3 g SbCl<sub>3</sub> werden zweimal mit je 1,5 ml ethanolfreiem Chloroform abgespült und dekantiert. Die Kristalle werden anschließend in 10 ml ethanolfreiem Chloroform unter Erwärmen gelöst.  
 (zum Nachweis von Vitamin A und seinen Estern)
- 6. Chloramin T – Trichloressigsäurelösung**  
 (Reagenz nach Jensen<sup>15</sup>)  
 Eine Mischung aus 2 ml einer frisch bereiteten 3%igen Chloramin T-Lösung und 8 ml einer 25%igen ethanolischen Trichloressigsäurelösung.  
 Nach dem Besprühen wird 5 bis 10 Min. auf 100 bis 105 °C erhitzt und sofort im UV<sub>365</sub> ausgewertet.  
 (zum Nachweis von Digitalisglykosiden)
- 7. Dichlorchinonchlorimid**  
 1%ige methanolische Lösung  
 Nach dem Besprühen wird kurz mit Ammoniak bedampft.  
 (zum Nachweis von Arbutin und Hydrochinon, siehe: Bärentraubenblätter)
- 8. Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs Reagenz)**  
 0,2 g Dimethylaminobenzaldehyd werden in einer Mischung aus 5 ml Salzsäure und 15 ml Methanol gelöst.  
 (zum Nachweis von primären aromatischen Aminen siehe: p-Aminosalicylsäures Natrium)
- 9. Diphenylamin – Anilin – Phosphorsäure**  
 0,5 g Diphenylamin werden in 25 ml Methanol gelöst und mit 0,5 ml Anilin und 2,5 ml 85%iger Phosphorsäure versetzt. Nach dem Besprühen wird ca. 10 Min. auf 120 °C erhitzt.  
 (zum Nachweis von Zuckern)

10. **Diphenylboryloxyethylamin** (Naturstoffreagenz nach Neu)  
1%ige Lösung in Methanol  
Nach dem Besprühen erfolgt die Auswertung im UV<sub>365</sub>. Die Färbungen und Fluoreszenzen können durch anschließendes Besprühen mit einer 5%igen methanolischen Polyethylenglykol-PE400-Lösung intensiviert und stabilisiert werden.  
Anstelle der Diphenylboryloxyethylaminlösung kann auch eine Mischung aus 15 ml 3%igem Borwasser und 5 ml 10%iger Oxalsäurelösung verwendet werden, anschließend wird auf 120 °C einige Minuten erhitzt. Man erhält annähernd die gleichen Färbungen im UV<sub>365</sub> für Flavonoide.  
(zum Nachweis von Flavonderivaten siehe: Lindenblüten)
11. **Dragendorff Reagenz**  
Eine Mischung von 0,85 g basischem Bismutnitrat, 40 ml Wasser und 10 ml Eisessig wird mit einer Lösung von 8 g Kaliumiodid in 20 ml Wasser versetzt und filtriert.  
Diese Stammlösung (lichtgeschützt aufbewahren) wird zum Gebrauch mit einer 20%igen Essigsäure 1:9 verdünnt.  
(zum Nachweis von Alkaloiden, z.B. im Opium)
12. **Ehrlichs Reagenz**, siehe Dimethylaminobenzaldehyd
13. **Eisen(III)-Chlorid**  
1%ige wäßrige Lösung  
(zum Nachweis von Salicylsäure)
14. **Iod – Chloroform – Reagenz**  
0,5 g Iod werden in 100 ml Chloroform gelöst. Nach dem Besprühen wird 10 Min. auf 60 °C erwärmt und im UV<sub>365</sub> ausgewertet.  
(zum Nachweis von Ipecacuanha-Alkaloiden)
15. **Iod-Platinat (IV)-Lösung**  
3 ml einer 10%igen (G/V) Lösung von Hexachloroplatinat (IV)-Wasserstoffsäure werden mit 97 ml Wasser und 100 ml einer 6%igen (G/V) Lösung von Kaliumiodid versetzt (lichtgeschützt aufbewahren).  
(zum Nachweis von Equisetum palustre im Schachtelhalmkraut)
16. **Iod – Salzsäure**  
Lösung I: 0,1 g Kaliumiodid und 0,2 g Iod werden in 10 ml Ethanol gelöst.  
Lösung II: 5 ml 25%iger Salzsäure werden mit 5 ml Ethanol (96%) gemischt.  
Man besprüht mit Lösung I, wartet 1 bis 2 Min. und besprüht anschließend mit Lösung II.  
(Zum Nachweis von Purinderivaten, z.B. Coffein)
17. **Jensens Reagenz**, siehe Chloramin T-Trichloroessigsäurelösung
18. **Kalilauge**  
10%ige Lösung in Methanol  
(zum Nachweis von Hydroxyanthracenderivaten, siehe: Aloe, Sennesblätter)
19. **Molybdato-phosphorsäure**  
20%ige ethanolische Lösung  
Nach dem Besprühen wird 5 bis 10 Min auf 110 °C erhitzt.  
(zum Nachweis von ungesättigten Kohlenwasserstoffen, siehe: Pfefferminzblätter)
20. **Molybdato-phosphorsäure-Kaliumpermanganat-Schwefelsäure**  
Reagenz I: 5%ige ethanolische Molybdato-phosphorsäurelösung  
Reagenz II: (frisch zubereiten, Vorsicht!) 0,5 g KMnO<sub>4</sub> werden in 15 ml Schwefelsäure gelöst.  
Man besprüht mit Reagenz I, erhitzt 5 Min. auf 100 °C und besprüht dann die heiße Platte mit Reagenz II und erhitzt erneut 5 Min. auf 100 °C.  
(zum Nachweis von Fenchon und Campher)
21. **Naturstoffreagenz nach Neu**, siehe: Diphenylboryloxyethylamin

**22. Ninhydrinlösung**

0,3 g Ninhydrin werden in 100 ml n-Butanol und 3 ml Essigsäure gelöst.

Nach dem Besprühen wird einige Minuten auf 100 °C erhitzt.

*(zum Nachweis von Aminosäurederivaten sowie von Adrenalin und Piperazin)*

**23. Quecksilbernitratlösung**

1%ige wäßrige Lösung von  $\text{HgNO}_3$

*(zum Nachweis von Barbituraten z.B. Barbital)*

**24. 25%ige Salpetersäure – 5%ige ethanolische (50%) Kaliumhydroxidlösung**

Man besprüht zuerst mit der Salpetersäure, erhitzt 10 Min. auf 120 °C und besprüht dann mit der ethanolischen Kaliumhydroxidlösung.

*(zum Nachweis von Sennosiden in Sennesblättern)*

**25. methanolische Salzsäure:**

25%ige Salzsäure und Methanol werden 1:1 (V/V) gemischt.

Nach dem Besprühen wird 5–10 Min. auf 105–110 °C erhitzt.

*(Zum Nachweis von Baldrianinhaltsstoffen)*

**26. Schwefelsäure, 10%ige ethanolische**

*(zum Nachweis von Catechin-Gerbstoffen, siehe: Blutwurz)*

**27. Schwefelsäure, 20%ige ethanolische**

*(zum Nachweis von Corticosteroiden, z.B. Cortisonacetat)*

**28. Schweppes Reagenz**

Lösung I: 0,2 g Glucose werden in 2 ml Wasser gelöst.

Lösung II: 0,2 ml Anilin werden in 2 ml Methanol gelöst.

Vor Gebrauch werden Lösung I und II gemischt und mit n-Butanol auf 10 ml verdünnt.

Nach dem Besprühen wird 10 Min. auf 125 °C erhitzt.

*(zum Nachweis von Wein- u. Citronensäure, z.B. in Hibiscusblüten)*

**29. Vanillin-Salzsäure**

(1%ige Vanillinlösung in 90%igem Ethanol/konzentrierte Salzsäure)

Man besprüht nacheinander mit der Vanillinlösung und der Salzsäure.

*(zum Nachweis von Myrrhe-Inhaltsstoffen)*

**30. Vanillin-Phosphorsäure**

1%ige Vanillin-Lösung in 50%iger Phosphorsäure. Nach dem Besprühen wird 5 bis 10 Min. auf 110 °C erhitzt und im Tageslicht und UV<sub>365</sub> ausgewertet.

*(zum Nachweis der Inhaltsstoffe von Tausendgüldenkraut und Weißdornfrüchten)*

**31. Vanillin-Schwefelsäure**

Man besprüht zunächst mit 5%iger ethanolischer Schwefelsäure, wartet 5 Min. und sprüht dann eine 1%ige ethanolische Vanillinlösung auf die Platte und erhitzt 10 Min. auf 80°C

*(zum Nachweis der Inhaltsstoffe von Teufelskralle und Enzian)*