

Der Nachweis von Arzneimitteln in Leichenorganen nach therapeutischen Dosen mit verschiedenen forensisch-toxikologischen Methoden

GUGLIELMO FALZI, NICOLÓ GRUDEN und EMILIO MAROZZI

Institut für gerichtliche und Versicherungsmedizin der Universität, Mailand
(Direktor: Prof. C. M. CATTABENI) und

Institut für psychiatrische und Nervenkrankheiten „Fatebenefratelli“, Cerhusco
S/N (Direktor: Prof. A. DONATI)

Eingegangen am 5. September 1966

Durch die vorliegenden Untersuchungen sollten die gebräuchlichen Verfahren der gerichtlich-toxikologisch analytischen Praxis auf ihre Brauchbarkeit zum Nachweis von zu therapeutischen Zwecken verabreichten Arzneimitteln in Leichenorganen geprüft werden. Immer häufiger wird der Gerichtsmediziner vor die Aufgabe gestellt, toxikologische Untersuchungen zur Identifizierung von organischen toxischen nichtflüchtigen Stoffen durchzuführen. Auf Grund der Untersuchungsergebnisse hat er dann zu der Frage Stellung zu nehmen, ob diese Substanzen durch fremde Hand beigebracht wurden, ob sie in selbstmörderischer Absicht eingenommen wurden, oder ob sie lediglich im Rahmen der Therapie Anwendung fanden.

Durch entsprechende Vorbehandlung des zu prüfenden biologischen Materials werden Extrakte gewonnen, die die toxischen Stoffe, bzw. die verabreichten Arzneimittel und deren Metaboliten, in unterschiedlicher Menge enthalten. Bei den spektrophotometrischen, Papier-, Dünnschicht- oder gaschromatographischen Bestimmungen können diese Arzneimittel in mehr oder weniger beträchtlichem Maße, abhängig von zahlreichen Faktoren, interferieren. Zum Teil werden diese Faktoren durch die Art des Arzneimittels, seine Dosierungs- oder Verabreichungsart sowie seine Metabolisierung bestimmt, zum anderen Teil sind sie in den angewandten Verfahren, in deren Empfindlichkeit und Spezifität sowie in der individuellen Schwierigkeit der durchgeführten Untersuchungen zu erblicken. Somit sind Abschätzungsfehler der erhaltenen Befunde nicht auszuschließen.

Diese Situation rechtfertigt das Studium und die Durchführung systematischer Untersuchungen der häufig gebrauchten Arzneimittel hinsichtlich ihrer p.m. Nachweisbarkeit durch chemisch-toxikologische Untersuchungen und der Empfindlichkeit unserer Routine-Verfahren. Da in den von uns untersuchten Fällen sowohl Art als auch Dosierung der verabreichten Medikamente bekannt war und somit die Aufnahme feststand, kommt insbesondere den negativen Befunden Bedeutung zu.

Material und Methoden

Voraussetzungen. Zum Nachweis einer im allgemeinen toxischen, nichtflüchtigen Substanz führen wir grundsätzlich eine papierchromatographische Voranalyse durch. Diese bietet neben dem technischen Vorteil der einfachen Durchführung die Möglichkeit der Anwendung für jede Extrakt-Art, vor allem die leichte Wiedergewinnung von gut getrennten und mittelmäßig gereinigten Eluaten. Weitere Vorteile bilden die Möglichkeit der Wiederholung und die Konstanz der R_f -Werte.

Die mit einem einzigen Lösungsmittel erhaltenen Befunde haben lediglich orientierenden Charakter. Zu beachten sind die wohlbekannten Einschränkungen, die sowohl durch die geringe Selektivität der Analyse (ein Fleck besteht fast immer aus einem Substanzgemisch) als auch durch die Unmöglichkeit, Vergleichsmethoden anzuwenden, gegeben sind; schließlich dadurch, daß nicht alle Reagentien im „colour test“ angewandt werden können.

Diese allgemeinen Einschränkungen gelten auch für die spektrophotometrische Analyse der Eluate, abgesehen von selteneren Ausnahmen für Substanzen, die charakteristische Spektren besitzen (MAROZZI, FALZI, 1965). Als Bestätigungsmethoden werden gewöhnlich die Dünnschichtchromatographie und diejenige in Dampfphase verwendet.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie der Eluate bzw. der Extrakte ist eine bessere Trennung der Gemische der zu untersuchenden Substanzen möglich. Der Vergleich der Ergebnisse mit bekannten Kontrollsubstanzen und anderen Methoden sowie die Berücksichtigung der Anamnese ergeben weitere wertvolle Hinweise. Es ist so möglich, relative R_f -Werte und „colour test“-Befunde zu erhalten, denen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Die Gaschromatographie der Extrakte oder Eluate hat auf Grund ihrer hohen Spezifität des mit den zahlreichen Arbeitsbedingungen (Wahl der Kolonne, der Temperatur usw.) verbundenen Ergebnisses dieselbe elektive und optimale Verwendung als Bestätigungsmethode gefunden. Jede Verwendung dieser Methode ohne entsprechende orientierende Unterlagen erscheint problematisch.

Untersuchungsgut

Es wurden Organe von 18 Personen geprüft, die sich im Institut für Neuropsychiatrie „Fatebenefratelli“ von Cerhusco am Naviglio in Pflege befanden und dort aus natürlichen Ursachen verstarben.

In jedem einzelnen Falle war die während des ganzen Klinikaufenthaltes durchgeführte Therapie bekannt. Für unsere Untersuchungen fanden jedoch nur diejenigen Arzneimittel Berücksichtigung, die während der letzten 15 Tage vor dem Tode verabfolgt worden waren. Es handelte sich um Präparate, die im Rahmen der neuropsychiatrischen Erhaltungs-

therapie Anwendung fanden: Tranquilizer, Arzneistoffe der Phenothiazinreihe, herzwirksame Stoffe, Analeptica, Alkaloide, wobei die letzteren im allgemeinen nur während der letzten Lebenstage verabreicht worden waren.

Orientierungsmethoden

Organextrakte aus Gehirn, Leber, Lunge und Nieren (je 500—600 g) wurden nach dem Verfahren von STAS-OTTO gewonnen. In den Fällen, in denen in den letzten 15 Lebenstagen im „sauren Gemisch“ lösliche Stoffe verabreicht worden waren, wurden mit dem Extrakt sechs Chromatogramme auf Whatman-Papier Nr. 1 hergestellt. Die Entwicklung erfolgte nach dem Verfahren ALGERI-WALKER mit einem Butanol-Ammoniakgemisch im Verhältnis 1:1. Bei zwei dieser Chromatogramme haben wir zur Entwicklung der Flecken Quecksilber-nitrat (SCHMIDT) und Parri's Reagens (MAROZZI) angewandt.

Bei positivem Ausfall einer oder beider Reaktionen aus den restlichen vier Chromatogrammen wurden nach Kontrolle in UV, die vermutlichen R_f entsprechenden Zonen mit Ätznatron 0,5 N eluiert. Von dem mit der gewöhnlichen Technik erhaltenen Eluaten wurden die UV-Absorptionsspektren bestimmt.

Die Ergebnisse der chromatographischen Wanderungsgeschwindigkeit, die Reaktivität und das UV-Absorptionsspektrum erlauben eine orientierende Diagnose über die Anwesenheit oder das Fehlen von während des Lebens verabreichten Substanzen. In allen Fällen wurde außerdem die „alkalische Ausschüttelung“ geprüft.

Die sechs vorbereiteten Chromatogramme wurden nach JATZKEWITZ mit dem Gemisch Butanol/Ameisensäure/Wasser (12:1:7 Volumteile) entwickelt. Bei drei dieser Chromatogramme wurden zum Nachweis der Flecken folgende Reagentien verwendet: Dragendorffs Reagens, Kalium-Jodplateat, Schwefelsäure 50%. Wie schon für die „saure Ausschüttelung“ beschrieben, wurden aus den restlichen drei Chromatogrammen mit 0,1 N Chlorsäure die Zonen, die mit den erwähnten Reagentien positiv reagierten, eluiert. Auch die bei dieser zweiten analytischen Gruppe erhaltenen Ergebnisse lieferten einen Beitrag zur Stellung einer An- oder Abwesenheitsdiagnose für die aus den Krankenblättern bekannten Substanzen.

Bestätigungs- oder Ausschließungsmethoden

Zur Bestätigung unserer Ergebnisse haben wir die Gaschromatographie (direkt aus dem Extrakt) und die Dünnschichtchromatographie sowohl des Extraktes als auch des Eluates des auf dem Papierchromatogramm beobachteten Fleckes, verwendet. Auf Grund der Untersuchungsergebnisse und des Spektralverhaltens war davon auszugehen, daß die verabreichte Substanz in diesem Fleck enthalten sein mußte.

Gaschromatographische Kontrolle

Wir verwendeten den Gaschromatograph „Fractovap“ Mod PAID der Firma C. Erba, Mailand, mit Flammenionisationsdetektor. Die Arbeitsbedingungen entsprachen denen von LODI und MAROZZI (1965) (Tabelle I, letzte Spalte und Beschreibung). Es ist zu beachten, daß die Temperaturen bei den Untersuchungen den optimalen der für die zu

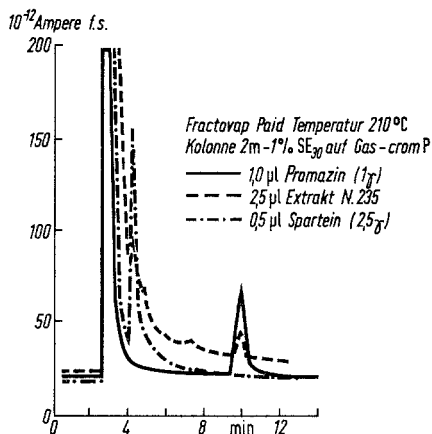


Abb. 1

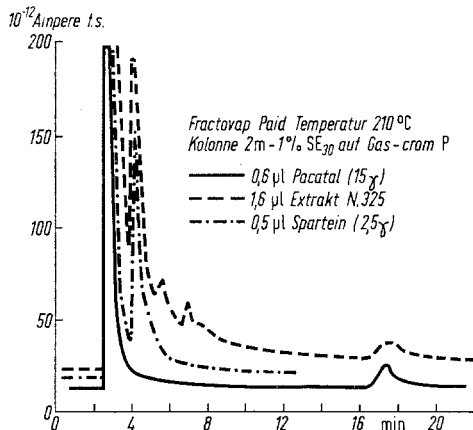


Abb. 2

untersuchenden Substanz in reiner Form ausgeführten Vorkontrollen entsprechen.

Die verwendete Lösung bestand aus einem Viertel des Trockenrückstandes, gelöst in 80—100 ml absolutem Äthylalkohol, aufbewahrt in Prüfgläsern, die denen von CARTONI und DI STEFANO ähnlich waren (Abb. 1—3).

Die gaschromatographische Kontrolle wurde mit 2—3 ml der so vorbereiteten Lösung durchgeführt. Die Gaschromatogramme wurden verglichen mit denen, die nach Injektion einer Menge von 5—10 meg der zu untersuchenden Substanz erzielt wurde. Die Standardsubstanzen wurden in nicht versalzter Form geprüft.

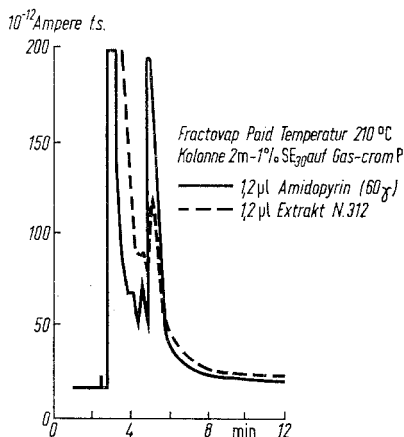


Abb. 3

Dünnschicht-Chromatographische Kontrolle

Die Kontrolle wurde immer auf Platten von 20×20 cm mit einer Schichtdicke von 0,25 mm Kieselgel GF₂₅₄ Merck, nach dem Verfahren von STAHL durchgeführt. Die Platten wurden für $\frac{1}{2}$ Std auf 80°C erhitzt. Zur Entwicklung wurde ein Gemisch von Chloroform-Aceton im Verhältnis 9:1 für das saure Gemisch und ein Gemisch von Methanol-Ammoniak im Verhältnis 100:1,5 für das alkalische Gemisch verwendet (SUNSHINE). Die chromatographische Kontrolle im Dünnschichtverfahren wurde immer mit Eluat den aus den Papierchromatogrammen erhaltenen Flecken durchgeführt, da wir in diesen Flecken, auf Grund ihres Verhaltens, die Anwesenheit einer oder mehrerer der verabreichten Substanzen vermuteten. In einigen Fällen haben wir diese Untersuchung auch mit den aus dem biologischen Material erhaltenen Extrakten durchgeführt. In allen Fällen erfolgte ein Vergleich der Dünnschichtchromatogramme, die mit Eluat oder Extrakt gewonnen wurden mit denen, die mit der Substanz oder den Substanzen, die im Material vermutet wurden, erzielt worden sind.

Ergebnisse

Tabelle 1 bringt einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen von uns angewandten Untersuchungsmethoden. In der ersten Spalte werden die analysierten 18 Substanzen für insgesamt 19 Fälle wiedergegeben. In der zweiten werden die mit Papierchromatographie erhaltenen Ergebnisse aufgezeigt.

Tabelle 1. Für die Dünnschichtchromatographie gebrauchte Sprühreagentien

Gesuchte Substanzen	Orientierungsbefunde		Bestätigungs- und Ausschließungsbefunde				
			Dünnschichtchromatographie			Gaschromatographie	
	Papierchromatographie	Eluate aus Papierchromatographie	Extrakte aus Viscera	Extrakte aus Harn	Reagentien	Extrakte aus Viscera	Temperatur der Kolonne in °C
Luminal	2 (3)	1 (1)	—	—	Hg	—	—
Chlorpromazin	3 (3)	1 (2)	1 (2)	—	H, D, Pt	0 (2)	190—210
Promazin	8 (9)	1 (5)	0 (1)	1 (1)	H, D, Pt	2 (4)	174—210
Promethazin	4 (4)	0 (3)	1 (2)	1 (1)	H, D, Pt	1 (2)	174—210
Haloperidol	4 (4)	2 (3)	2 (2)	1 (2)	D	—	—
Librium	3 (4)	2 (3)	2 (3)	2 (2)	D, Pt, Fe	1 (2)	174—210
Morphin	1 (4)	0 (1)	2 (3)	2 (2)	D, Ma, Me	—	—
Sparteïn	8 (10)	3 (7)	2 (2)	—	D, Pt	3 (4)	174—210
Atropin	1 (4)	1 (2)	—	—	D, Pt	0 (1)	174—210
Orfenadrine	1 (1)	1 (1)	1 (1)	—	D, Pt	1 (1)	190—210
Papaverin	5 (6)	1 (5)	1 (3)	—	D, Ma, DMAB	0 (2)	190—210
Coramin	1 (1)	0 (1)	1 (1)	—	D, Pt	—	—
Pacatal	1 (1)	1 (2)	—	—	H, D, Pt	1 (1)	174—210
Amitriptylin	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	H, D, Pt	0 (1)	174—210
Thioridazin	1 (1)	1 (1)	—	—	H, D, Pt	—	—
Lobelin	1 (1)	1 (1)	1 (1)	—	D	—	—
Reserpin	1 (1)	1 (1)	2 (2)	—	D, Pt, DMAB	—	—
Amidopyrin	5 (5)	1 (4)	3 (5)	3 (3)	D, Pt, Fe	3 (3)	174—190—210

3 (8): 3 = Gesamtzahl der erhaltenen positiven Daten, (8) = Gesamtzahl der durchgeführten Untersuchungen. Hg = gesättigte Quecksilber-I-nitrat-Lösung. D = DRAGENDORFFS Reagens nach MUNIER-MACHEBOEUF. Pt = Kaliumjodplatcat nach GOLDBAUM-KAZJAK. H = konzentrierte Schwefelsäure. Fe = 1%ige alkoholische Lösung von Eisenchlorid. Ma = MARQUISS Reagens. Me = Mecke-Reagens. DMAB = Wesicky-Reagens.

Arbeitsbedingungen für die Gas-Chromatographie. Flammenionisationsdetektor. Kolonne 2 m lang gefüllt mit SE₃₀ 1% auf Gas-Crom P. Trägergas: Helium (Druck 0,85 Atm gleich einem Durchfluß von 9,23 ml/min). Wasserstoff (Druck 0,35 Atm gleich einem Durchfluß von 200 ml/min). Luft (Druck 0,85 Atm gleich einem Durchfluß von 20 ml/min).

Was die Dünnschichtchromatographie betrifft, finden sich in der Tabelle 1 sowohl die Ergebnisse mit den Eluaten (Spalte 3) als auch mit den Extrakten (Spalte 4—5). Schließlich werden die zum Nachweis verwendeten Reagentien beschrieben.

Bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse wurde neben der Wanderungsgeschwindigkeit der Substanzen auch der chromatische Befund berücksichtigt, der in der Tabelle nicht erscheint.

Es sei hervorgehoben, daß die Phenothiazinderivate und deren zahlreiche Metaboliten, Substanzen, die sich häufiger in unserem Material fanden, bei der Behandlung mit Schwefelsäure die Bildung von intensiven

und verschiedenfarbigen Flecken verursachten (Chlorpromazin und Prometazin: violett-rot, Promazin: ziegelrot, Levopromazin: violett, Thioridazin: smaragdgrün) (NOIRFALISE). Wegen ihrer leichten Nachweisbarkeit mit auffälliger Wirkung auch bei Anwesenheit von sehr kleinen Mengen können sie ein beachtliches Hindernis für die Ermittlung anderer gesuchter Substanzen bilden und deren Anwesenheit besonders in der Phase der Voruntersuchungen vortäuschen.

Tabelle 2. Werte der Wellenlänge der Maxima

Substanzen	Werte der Wellenlänge bei der das UV-Absorptionsspektrum ein Maximum zeigt			Nr. der untersuchten Fälle
	Minimalwerte	Maximalwerte	Werte der reinen Substanzen	
Chlorpromazin	248	250—295	250—310	3
Promazin	248	260	250—300	7 (8)
Promethazin	248	250	250—300	4
Haloperidol	—	—	—	4
Sparteïn *	—	260	270	7 (8)
Thioridazin	260	260	260	1 (2)
Papaverin	250	250	250	4 (5)
Morphin *	255	255	—	1 (4)
Atropin *	—	—	—	1 (4)
Coramin	255	255	260	1
Amidopyrin	255	260	255	4 (5)
Librium	—	250	245	3 (4)
Pacatal	250—295	255	250—300	1
Reserpin	—	—	268	1
Orfenadrine *	—	—	260	1
Luminal	255 (pH 14)	265 (pH 14)	255 (pH 14)	2 (3)

* Substanzen mit niedrigem Exstinktionskoeffizient.

Der Nachweis einiger Alkaloide, wie Atropin und Sparteïn mußte sich einzig auf die Beweglichkeit und die Positivität zum Dragendorff- und zum Kalium-Jodplateat-Reagens gründen, da es sich um Substanzen handelt, die mit allen Reagentien, die konzentrierte Schwefelsäure enthalten, negativ reagieren (Fiori und Marigo, Marozzi und Falzi). Zum Nachweis anderer Alkaloide werden dagegen Reagentien verwendet, die sich nach allgemeiner Erfahrung als besonders geeignet für ihren Nachweis erwiesen haben (Marquis, Mecke, Wasicky).

Im Laufe dieser Untersuchungen hat sich gezeigt, daß einige Reagentien die allgemeine Anwendung finden, bisher in der Literatur nicht beschriebene Ergebnisse zeitigten, die bezeichnend sind für die Identifizierung einiger synthetischer Stoffe.

Insbesondere empfehlen wir die Eisenchloridlösung für die Identifizierung von „Librium“. Diese Substanz hat in der Tat mit dem genannten

Reagens, das gewöhnlich für den Nachweis von Phenolgruppen verwendet wird (SCHMIDT und CURRY), einen grau-weißen Fleck hervorgebracht, der sehr gut erkennbar und charakteristisch sowohl in Farbe als auch Form ist.

Tabelle 2 zeigt die mit den spektrophotometrischen Bestimmungen erzielten Werte. In Spalte 4 finden sich die Ergebnisse, die mit den reinen Substanzen erzielt wurden. In der zweiten und dritten Spalte sind die Minimal- und Maximalwerte niedergelegt, in deren Umkreis die im Extrakt nachgewiesenen Spitzen sich befinden sollten, um als positiv betrachtet zu werden. In der letzten Spalte sind die positiven Ergebnisse im Verhältnis zur Gesamtzahl der durchgeführten Untersuchungen verzeichnet.

Tabelle 3

	Minimal- und Maximalwerte der Eluate aus Papierchromatographie				Minimal- und Maximalwerte, erhalten direkt aus Extrakten mit Dünnschichtchromatographie			
	Minimalwert		Maximalwert		Minimalwert		Maximalwert	
	R _f	reine Substanz R _{fr}	R _f	reine Substanz R _{fr}	R _f	reine Substanz R _{fr}	R _f	reine Substanz R _{fr}
Thiolidazin	0,230	0,850	0,260	1,05	—	—	—	—
Atropin	0,045	0,92	0,055	0,99	—	—	—	—
Papaverin	0,512	0,1845	0,57	1,045	0,855	1,00	0,89	1,017
Amidopyrin	0,84	1,00	0,87	1,005	0,7	0,885	0,91	1,07
Promazin	0,335	1,06	0,375	1,15	0,395	0,37	0,47	0,985
Haloperidol	0,685	1,00	0,815	1,05	0,645	0,955	0,804	1,065
Librium	0,83	1,01	0,935	1,05	0,804	0,99	0,905	1,02
Amitriptylin	0,715	0,98	0,725	1,006	0,12	0,725	0,16	1,00
Sparteïn	0,041	0,50	0,065	0,65	0,07	0,6	0,15	1,45
Pacatal	0,47	1,02	0,48	1,03	—	—	—	—
Chlorpromazin	0,62	1,00	0,64	1,05	0,515	0,99	0,56	1,02
Orfenadrine	0,544	0,93	0,55	1,035	—	0,91	—	0,93
Luminal	0,752	0,915	0,76	1,002	—	—	—	—
Reserpin	0,77	1,001	0,815	1,01	0,7	—	0,8	—
Lobelin	—	—	—	—	0,64	0,95	0,66	0,99
Coramin	—	—	—	—	0,640	0,94	0,655	0,98
Promethazin	—	—	—	—	0,33	0,804	0,565	0,925

Außer dem Luminal (diese Substanz wurde dünnschicht-chromatographiert mit dem Fließmittel Chloroform-Aceton 9/1), wurden alle anderen wiedergegebenen R_f mit dem Fließmittel Methanol/NH₃ 100/1,5 erhalten (SUNSHINE).

Tabelle 3 bringt die Minimal- und Maximalwerte der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen. Es erschien zweckmäßig, die R_f-Werte der vom biologischen Mittel isolierten Substanzen einzubeziehen und die Untersuchung als positiv zu betrachten, zusammen mit den relativen R_f, berechnet im Verhältnis zur reinen Substanz, die man immer im Vergleich wandern ließ.

Wie aus der ersten Spalte der Tabelle 1 ersichtlich, hat die Papierchromatographie positive Ergebnisse erbracht, die in der Gesamtheit der Fälle, für die Anwesenheit einer generischen Substanz mit einem der gesuchten Substanz ähnliches Verhalten zeigten.

Aus den Spalten der „Bestätigungs- und Ausschließungsmethode“ ersieht man deutlich, daß die positiven Befunde in 75% für die Extrakt-Dünnschichtchromatographie, bis 50% für die Eluat-Dünnschichtchromatographie und für die mit der Gaschromatographie untersuchten Extrakte, sich ändert. Bei oberflächlicher Betrachtung würde dies uns veranlassen, die Papierchromatographie als die Methode der höchsten Empfindlichkeit zur Identifizierung einer toxischen nichtflüchtigen Substanz, die Extraktchromatographie, die Methode mittlerer Empfindlichkeit und die Dünnschichtchromatographie aus Eluat und die Gaschromatographie als die beiden weniger empfindlichen Methoden zu betrachten. Dies trifft nicht zu, weil die positiven Befunde im Papierchromatogramm nur eine Aussage über die Anwesenheit einer generischen Substanz gestatten.

Bei einer kritischen vergleichenden Analyse der Beweglichkeit der Substanzen auf Papier und im Dünnschichtverfahren muß daran gedacht werden, daß die positiven Befunde auf Papier nicht durch eine einzige Substanz hervorgerufen sein könne, sondern unter Umständen mehreren Substanzen zuzuschreiben sind. Somit ist ein Teil der positiven Papierchromatogramme der Voruntersuchung zumindest strittig, wenn nicht falsch. Der sich aus den gewonnenen Ergebnissen im Dünnschichtverfahren (Extrakt und Eluat) ergebende Widerspruch und die anscheinend geringere Empfindlichkeit dieser Analyse ist der Tatsache zuzuschreiben, daß die Technik des Wiedererlangungsverfahrens mit dem Eluieren des Papierfleckes, auch bei idealen Verhältnissen und mit dem erfahrensten Chemiker, immer einen Stoffverlust mit sich bringt. Somit ist ein guter Teil der negativen Befunde der dünnschichtchromatographischen Analysen mit Eluat die Folge des Materialverlustes während der technischen Durchführung (verfehlte totale Wiedergewinnung).

Hinsichtlich der negativen Befunde in den Gaschromatogrammen muß gesagt werden, daß mindestens ein Teil dieser Ergebnisse einen technischen Grund hat. Es ist daran zu denken, daß die mit einem Verfahren nachgewiesene Substanz durch die Technik der drei Methoden (Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie auf Extrakt und auf Eluat) gänzlich verbraucht wurde und der Extrakt in der Endphase außerordentlich arm an Material war.

Für die Erklärung der positiven und negativen Ergebnisse mit den verschiedenen Methoden, haben wir uns an folgende Kriterien gehalten.

Ein positiver Befund im Dünnschichtchromatogramm aus Extrakten ist glaubwürdig, wenn dieser durch das Dünnschichtchromatogramm des Eluats bestätigt wird. Fällt letztere negativ aus, so könnte dies infolge

Mengenverlustes der Substanz während der Elution zustande gekommen sein. In diesen Fällen pflegen wir in unserem Laboratorium die gaschromatographische Kontrolle mit dem Extrakt durchzuführen; liefert diese ein positives Ergebnis, so ist in ihr ohne weiteres eine Bestätigung zu erblicken. Werden die an Extrakten direkt erhaltenen positiven Ergebnisse des Dünnschichtverfahrens nicht durch andere Bestätigung oder Ausschließungsmethoden bestätigt, so sind sie nur dann glaubwürdig, wenn sie hochspezifische Reaktionen ergeben, wie z.B. diejenigen für Strychnin mit dem Reagens von MANDELIN.

Fallen die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie eines Extraktes und eines Eluates, sowie die der Gaschromatographie negativ aus, so ist daraus zu erschließen, daß die gesuchte Substanz im untersuchten Material nicht vorhanden ist. Fällt lediglich das Papierchromatogramm positiv aus, so kann dieses auf der Anwesenheit endogener oder anderer Substanzen beruhen, deren Beweglichkeitsmerkmale auf Papier ähnlich denjenigen der gesuchten Substanz sind.

Schlußfolgerungen

Es hat sich gezeigt, daß mit Hilfe einer chemischen Analyse, die den Erfordernissen der gerichtlichen Toxikologie mit Methoden allgemeiner Verwendung entspricht für die Untersuchung von biologischem Material, für die Auffindung organischer toxischer Stoffe (verabreicht zur Therapie in therapeutischen entsprechenden Dosen) geeignet ist. Der Nachweis der Arzneimittel und deren Metaboliten mit Hilfe der Papierchromatographie aus Extrakt gelingt in der Regel, negative Befunde sind selten. Wenn diese Befunde auch nicht kritiklos zur Grundlage von Entscheidungen gemacht werden können, so kommt ihnen doch für die Beurteilung des weiteren Untersuchungsganges wesentliche Bedeutung zu. Nach den Ergebnissen der Untersuchungen können die von uns studierten Arzneimittel, die in therapeutischen Dosen verabreicht wurden, verwertbare Ergebnisse liefern, wenn sie bei Kenntnis der erfolgten Verabreichung gesucht werden.

Im Gegensatz dazu gelingt ihre Identifizierung ohne Kenntnis der Vorgeschichte, mit Ausnahme der Phenothiazine, des Sparteins und der Substanzen der Pyramidonreihe, die auch bei niedrigen Verabreichungsdosen eindeutige Befunde ergeben, nicht.

Die Untersuchung darf nicht auf die Vorphase beschränkt werden, da die zuletzt genannten Substanzen in dieser Phase andere verdecken können. Solche Fehler lassen sich durch die Untersuchung mit weiteren Methoden ausschließen.

Als positives Ergebnis gilt auch der Nachweis kleiner Mengen von Arzneimitteln mit Hilfe der Bestätigungsmethoden im Vergleich zur Papierchromatographie. Sie beruhen nicht auf der geringeren Empfindlichkeit, sondern darauf, daß sie in der Lage sind, sichere Ergebnisse

für den Vergleich zwischen der Beweglichkeit und dem „colour test“ der im Extrakt anwesenden Substanzen und der Bezugssubstanzen zu liefern. Daraus geht hervor, daß positive Ergebnisse mit Hilfe Papierchromatographie in einem nur geringen Prozentsatz zu erzielen waren.

Im allgemeinen hat die von uns angewandte dünn-schichtchromatographische Analyse der Extrakte in 75% der Fälle positive Ergebnisse erbracht und somit hochspezifische Angaben ermöglicht.

Wird die Dünnschichtchromatographie an Stelle der Papierchromatographie als „screening“ Vormethode, ohne direkten Vergleich durchgeführt, so kann man nur bei Durchführung einer Serie von Reaktionen (WALDI, MACEK usw.) zu einer sicheren Diagnose gelangen. Die Durchführung derselben ist schwierig und ihre Ergebnisse sind nur mit Einschränkungen verwertbar. So fehlt die Angabe der Beweglichkeit auf Papier. Sie wird durch den Nachweis des R_{fr} einer Standardsubstanz bei der Dünnschichtchromatographie nicht genügend ersetzt (vgl. MAROZZI, FALZI und SUNSHINE).

Sehr gute Resultate ergaben die direkten Gaschromatogramme aus Extrakten. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich forensisch-toxikologische Untersuchungen durchführen. Wir benutzten sowohl Kolonnen und Säulenmaterial hoher Spezifität, als auch Kolonnen, mit Hilfe deren große Reihen von Stoffen identifiziert werden können. Die Anregung für die erste Anwendungsart gaben uns CARTONI und DI STEFANO für den Nachweis der Amphetamine im Urin. Diese Untersuchungsverfahren, sei es die in unserem chemisch-toxikologischen Laboratorium angewandte Methode (normale Kolonnen 2 m lang, anstatt des capillaren Typus von 80 cm) oder nach dem Verfahren von BECKETT und ROWLAND (Bestimmung der Amphetamine als solche und als Acetonderivate) gestatten die Identifizierung der allgemeinen aromatischen Amine mit besonderer Rücksicht auf diejenigen der Amphetamin-Reihe.

Andere organische, toxische nichtflüchtige Substanzen (Stoffe, enthalten im alkalischen Gemisch) sind sehr schwer mit einem Gaschromatograph, der mit den oben erwähnten Kolonnen ausgerüstet ist, auch wenn er einen Flammenionisationsdetektor besitzt, aus zwei Gründen erkennbar: erstens wird ein beträchtlicher Teil der Substanzen vom Säulenmaterial zurückgehalten, zweitens läßt sich die gewonnene Spitze von der Grundlinie nicht differenzieren, weil die Abgrenzbarkeit in der angewandten Kolonne zu gering ist.

Eine andere gaschromatographische Methode des ersten Typs zur Feststellung von „VALIUM“ im Blut beschrieben DE SILVA u. Mitarb.

Es sei angeführt, daß auch papier- und dünn-schichtchromatographische Methoden vorgeschlagen wurden, welche die Identifizierung von organischen Substanzen, gruppiert nach ihrer chemischen Zusammensetzung aus charakteristischen chemisch-physikalischen Befunden, erlauben. Diese Methoden haben, vom chemischen Standpunkt aus, einen

größeren theoretischen Aussagewert als die Methoden allgemeineren Charakters, die wir angewendet haben. Sie finden jedoch eine Einschränkung in der praktischen Durchführung. Sie wurden bisher angewandt zum Studium von Substanzen homologer Art (Schlafmittel, ALGERI und WALKER, Papierchromatographie; Antihistaminica, SUNSHINE, 1965; Phenotiazine, NOIRFALISE, Alkaloide, WALDI, MACEK u. Mitarb. Dünnschichtchromatographie). Von der Anwendung dieser Methoden in der forensisch toxikologischen Praxis ist vor allem wegen ihrer geringen Brauchbarkeit zu allgemeinen Untersuchungen abzuraten.

Hinsichtlich des zweiten Types gaschromatographischer Anwendung sei bemerkt, daß wir eine Kolonne mit einer Füllung angewandt haben, die die Ermittlung zahlreicher, auch analytisch sehr verschiedener, aber in kurzer Zeit mit einem beschränkten Chromatogramm ermittelbarer Substanzen erlaubt.

Diese Methode ist für die Auffindung fast aller organischer toxischer nichtflüchtiger Substanzen lediglich durch Veränderung der Temperatur geeignet. Wenn auch dabei keine absolut spezifischen Ergebnisse zu erwarten sind, so liefert sie doch Befunde, welche, vom chemisch-analytischen Standpunkt aus, die aus dem biologischen Material ermittelten Substanzen charakterisieren. Bei der chemisch-toxikologischen Untersuchung ist dies zu berücksichtigen, weil nicht nur eine, sondern die verschiedensten Substanzen vorliegen können. Die in Betracht kommenden Substanzen müssen, wenn nötig, mit verschiedenen Identifizierungsmethoden gesucht werden. Will man in der gerichtlich-toxikologischen Methodologie Fortschritte erzielen, so müssen neue Verfahren eingeführt werden, die eine selektive Analyse erlauben und die zu gleicher Zeit fähig sind, eine immer größere Anzahl von Substanzen nachzuweisen.

Die von uns angewendete Gaschromatographie ist in diesem Sinne ein gutes Beispiel. Sie ist eine neue, vorläufig nur zur Identifizierung nützliche Technik, die (mit Flammenionisationsdetektor) hohe Empfindlichkeit besitzt. Sie erlaubt sichere Ergebnisse auch für Substanzen, die bei der spektralen Untersuchung uncharakteristische Befunde liefern (z. B. Spartein), zu erhalten.

Bei kritischer Betrachtung der Ergebnisse der Bestätigungs- und Ausschließungsmethoden der dünnschichtchromatographischen Kontrolle aus Eluat und der Gaschromatographie interessiert in erster Linie der Prozentsatz der positiven Ergebnisse der verschiedenen Substanzen. Es sei bemerkt, daß dieser im allgemeinen relativ niedrig (50%) war. Nach unserer Ansicht ist dies einerseits dem mäßigen Wiedergewinnungsprozentsatz der Substanz aus dem Papierchromatogramm und andererseits der noch zu geringen Empfindlichkeit der uns zur Verfügung stehenden analytischen Mittel zuzuschreiben. Es sei betont, daß die Mengen der uns interessierenden Substanzen ca. 280 mcg/kg biologisches Material betragen haben. Bei der praktischen Begutachtung töd-

lich verlaufener Vergiftungsfälle ist in der Regel die Konzentration der toxischen Substanzen genügend hoch, um mit unseren Methoden identifiziert werden zu können. Selten sind die organischen toxischen nichtflüchtigen Substanzen, die schon in äußerst geringer und daher nicht nachweisbarer Menge tödlich sein können (z. B. herzwirksame Glykoside, parenteral verabreicht).

Bei der Begutachtung muß daran gedacht werden, daß in den Fällen mit längerem zeitlichen Intervall zwischen Giftaufnahme und Tod mit eventuellem Krankenhausaufenthalt ein weitgehender Abbau der toxischen Verbindungen erfolgen kann, daß nach dem Tode ähnliche Bedingungen vorliegen wie bei unseren Untersuchungen. Es sei auch bemerkt, daß sehr wahrscheinlich nicht alle Substanzen im selben Umfang aus dem Papierchromatogramm getrennt und wiedergewonnen werden können.

Zum Beispiel haben einige der Substanzen des alkalischen Gemisches eine hervorragende Löslichkeit in „Säuren“ und werden in einem höheren Prozentsatz als andere, die eine niedrigere Löslichkeit besitzen, wiedergewonnen.

Unsere Beobachtungen sprechen dafür, daß die Einschränkung der Nachweisbarkeit der organischen, toxischen, nichtflüchtigen Substanzen mit den von uns bezeichneten Bestätigungs- oder Ausschließungsmethoden technischen Unzulänglichkeiten zuzuschreiben sind.

Wenn man in der gerichtlichen Toxikologie die bis jetzt gebrauchten Verfahren anwendet, wird es kaum möglich sein, diese Schwierigkeiten, die in der Vor- und Reinigungsphase zu suchen sind, zu überwinden. Nach unserer Ansicht können sie nur durch die Einführung von neuen Verfahren, wie z. B. der „präparativen“ Gaschromatographie, die in den letzten Jahren auch auf anderen Gebieten Anwendung gefunden hat, überwunden werden.

Mit diesem Verfahren ist die fast vollständige Wiedergewinnung der zu untersuchenden Substanzen in reiner Form möglich, wodurch die Schwelle der Nachweisbarkeit beträchtlich herabgesetzt wird. Abschließend sei betont, daß mit Hilfe der von uns angewandten Orientierungs- und Bestätigungsmethoden, Arzneimittel in therapeutischen Dosen verabreicht, im biologischen Material erfaßt werden können. In 50 % der Fälle konnten wir die verabreichten Substanzen mit Sicherheit nachweisen. Dieses Ergebnis möchten wir im Hinblick auf die niedrigen therapeutischen Dosierungen, als optimal bezeichnen. Freilich wäre es bei ähnlichen Arbeitsbedingungen *ohne* Kenntnis der Vorgeschichte *nicht möglich* gewesen, diese Ergebnisse zu erhalten, da wahrscheinlich viele der positiven Befunde als unspezifisch angesehen worden wären. Bei den von uns untersuchten Arzneimitteln können einige, wie die Phenothiazine, Spartein und Pyramidon eine Ausnahme machen. Diese Substanzen liefern auch in kleinen Mengen wesentliche Befunde. Bei

Untersuchungen unbekanntem Materials muß aber auch daran gedacht werden, daß diese Substanzen besonders in der Vorphase verschleiernd oder störend wirken können.

Literatur

- ALGERI, E., and J. T. WALKER: Paper chromatography for identification of common barbiturates. *Amer. J. clin. Path.* **22**, 37 (1952).
- BECKETT, A. H., and M. ROWLAND: Determination and identification of amphetamine in urine. *J. Pharm. Pharmacol.* **17**, 59 (1965).
- CARTONI, G. P., e F. DI STEFANO: Determinazione delle anfetamine mediante cromatografia in fase gassosa. *Ricerche sull'escrezione urinaria nel ratto e nell'uomo. G. Biochim.* **12**, 298 (1963).
- CURRY, A. S.: The analysis of basic nitrogenous compounds of toxicological importance. In: *Methods of biochemical analysis*, ed. by D. GLICK, vol. VII. New York: Interscience Publ. 1959.
- DE SILVA, J. A., M. A. SCHWARTZ, V. STEFANOVIC, and J. KAPLAN: Determination of diazepam (Valium) in blood by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.* **36**, 2099 (1964).
- FIORI, A., e M. MARIGO: Impiego dei reattivi all'acido solforico su cromatogrammi su strato sottile per l'analisi tossicologica degli alcaloidi. *Med. leg. Ass.* **12**, 607 (1964).
- LODI, F., e E. MAROZZI: Applicazioni della gas-cromatografia in tossicologia-forense. *Farmaco, Ed. prat.* **20**, 439 (1965).
- JATZKEWITZ, H.: Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln in Harn. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **292**, 94 (1953).
- MACEK, K., J. HACAPEROVA u. B. KAKAC: Systematische Analyse von Alkaloiden mittels Papierchromatographie. *Pharmazie* **11**, 533 (1956).
- MAROZZI, E.: La identificazione dei barbiturici in tossicologia forense. *Zacchia* **38**, 146 (1963).
- , e G. FALZI: Applicazione dei „color test“ alla identificazione delle sostanze tossiche organiche non volatili azotate in cromatografia su strato sottile. *Minerva med. leg.* **85**, 95 (1965).
- — L'impiego della cromatografia su strato sottile in tossicologia forense. Identificazione di sostanze tossiche organiche non volatili. *Farmaco, Ed. prat.* **20**, 303 (1965).
- NOIRFALISE, A.: Mise en evidence de quelques derivés phenothiazines par chromatographie en couche mince de silicagel. *J. Chromatogr.* **19**, 68 (1965).
- SCHMIDT, G.: Papierchromatographische Vorprobe bei der toxikologischen Harnanalyse. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 259 (1959).
- SUNSHINE, I.: Value of thin layer-chromatography in poisoning emergencies. *Mitt. zu III. Internat. Meeting in Forensic Immunology, Medicine, Pathology and Toxicology*, London, April 1963.
- , and M. FIKE: Identification of antihistamines in extracts of biological materials using thin layer chromatography. *Anal. Chem.* **37**, 127 (1965).
- WALDI, D.: Eine neue systematische Analyse von Alkaloiden mit Hilfe der Papierchromatographie. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **292**, 206 (1959).
- K. SCHNASCKERZ u. F. MUNTER: Eine systematische Analyse von Alkaloiden auf Dünnschichtplatten. *J. Chromatogr.* **6**, 61 (1961).

Dott. FALZI GUGLIELMO
Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Università di Milano
Via Mangiagalli 37, Milano