

Screening tetrazyklischer Benzodiazepine* mittels EMIT-st (Benzodiazepines) und TDx***, ****, *******

H. Schütz und W.-R. Schneider

Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen, Frankfurter Strasse 58, D-6300 Gießen,
Bundesrepublik Deutschland

Screening of Tetracyclic Benzodiazepines with EMIT-st (Benzodiazepines) and TDx

Summary. The article reports threshold ranges and detection limits for the screening of tetracyclic benzodiazepines (adinazolam, alprazolam, brotizolam, estazolam, loprazolam, midazolam, triazolam and many metabolites) using the EMIT-st and TDx system (FPIA). In most cases, the cross reactivities of the two systems are comparable, but there are also remarkable differences. Detection limits are mainly in the range between 0.2 and 0.5 mg/l but, in some cases, the limits are also considerably higher. The within-day precision is 1.1% (TDx) and 16.5% (EMIT-st); day-to-day precision is 4.7% (TDx) and 12.6% (EMIT-st), respectively.

Key words: Tetracyclic benzodiazepines, screening – EMIT-st, benzodiazepines – TDx, benzodiazepines

Zusammenfassung. In der Arbeit werden Schwellenwert-Bereiche und Nachweisgrenzen für das Screening tetrazyklischer Benzodiazepine (Adinazolam, Alprazolam, Brotizolam, Estazolam, Loprazolam, Midazolam und Triazolam sowie zahlreiche Metaboliten) mittels EMIT-st und TDx-System (FPIA) mitgeteilt. In den meisten Fällen sind die Kreuzreaktivitäten für beide Systeme vergleichbar, aber andererseits wurden auch beträchtliche Ausnahmen beobachtet. Die Nachweisgrenzen liegen hauptsächlich im Bereich zwischen 0,2 und 0,5 mg/l, in einigen Fällen aber auch beträchtlich hö-

* Adinazolam, Alprazolam, Brotizolam, Estazolam, Loprazolam, Midazolam, Triazolam

** Enzyme-Multiplied-Immunoassay-Technique-single-test (Firma Syva-Merck, D-6100 Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland)

*** Fluoreszenz-Polarisation-Immuno-Assay, FPIA (Firma Abbott, D-6200 Wiesbaden-Delkenheim, Bundesrepublik Deutschland)

**** Diese Arbeit enthält Ergebnisse der geplanten Dissertation von W.-R. Schneider

***** Herrn Dr. Kalman Szendrei (United Nations Vienna) in Dankbarkeit gewidmet
Sonderdruckanfragen an: H. Schütz (Adresse siehe oben)

her. Die Präzision in der Serie liegt bei 1,1% (TDx) bzw. 16,5% (EMIT-st), die Präzision von Tag zu Tag bei 4,7% (TDx) bzw. 12,6% (EMIT-st).

Schlüsselwörter: Tetrazyklische Benzodiazepine, Screening – EMIT-st, Benzodiazepine – TDx, Benzodiazepine

Die meisten 1,4-Benzodiazepine¹ lassen sich mit einem dünn-schichtchromatographischen Screeningverfahren erfassen, dem folgendes Funktionsschema zugrunde liegt:

- Hydrolyse der 1,4-Benzodiazepine,
- Neutralisation des Hydrolysates und Extraktion der Hydrolyseprodukte,
- Dünnschichtchromatographie des Extraktes,
- Photolytische Entalkylierung,
- Diazotierung,
- Kupplung zu Azofarbstoffen.

Die Methodik und ihre Grundlagen wurde in zahlreichen Arbeiten beschrieben und publiziert [5, 6, 8, 16].

Conditio sine qua non für den Einsatz dieses Screeningverfahrens ist neben der Azomethingruppe eine Laktamstruktur im Benzodiazepinring, die eine Ringöffnung und damit die Bildung aromatischer Amine ermöglicht. In jüngerer Zeit erschienen jedoch zahlreiche 1,4-Benzodiazepine², bei denen die für eine Hydrolyse erforderliche 2-Oxo-Struktur fehlt und die daher von dem oben näher beschriebenen DC-Screening nicht erfaßt werden. Diese neuen Benzodiazepinderivate, die besonders wirksam sind und daher extrem niedrig dosiert werden können, haben als gemeinsames Strukturelement ein 5-gliedriges Ringsystem zwischen der N-1- und der C-2-Position des 1,4-Benzodiazepin-Grundgerüsts. Gelegentlich werden sie in ihrer Gesamtheit als Triazolobenzodiazepine bezeichnet. Dies ist jedoch nicht korrekt, da Loprazolam und Midazolam einen Imidazol- (also keinen Triazol-) Ring aufweisen. Daher wird neuerdings immer häufiger die Bezeichnung tetrazyklische Benzodiazepine verwendet, um diese Untergruppe zu kennzeichnen.

Als besonderer Nachteil erweist sich, daß bei den tetrazyklischen Benzodiazepinen auf die hochempfindliche³ und auch relativ spezifische Detektion nach Bratton und Marshall [2] verzichtet werden muß. Zwar lassen sich alle von uns untersuchten tetrazyklischen Benzodiazepine mit den gängigen Basendetektionsmitteln Jodoplatinat und Dragendorff-Reagens anfärben; diese Indizierungsmöglichkeit muß jedoch als wenig spezifisch angesehen werden, da sie praktisch alle basischen Substanzen erfaßt. Eine verbesserte dünn-schichtchromatographische Identifizierungsmöglichkeit bietet der korrigierte R_f -Wert, der insbesondere bei der Verwendung mehrerer Fließmittelsysteme eine beträchtliche „identification power“ besitzt [1, 4, 10, 12]. Man kann so die Nachteile einer unspezifischeren Detektion zumindest teilweise durch ein engeres „search

¹ Bromazepam, Camazepam, Chlordiazepoxid, Clonazepam, Clorazepat, Diazepam, Flunitrazepam, Flurazepam, Halazepam, Ketazolam, Lorazepam, Lormetazepam, Nitrazepam, Oxazepam, Oxazolam, Prazepam und Temazepam

² Adinazolam, Alprazolam, Brotizolam, Estazolam, Loprazolam, Midazolam, Triazolam

³ Nachweisgrenze z. B. 0,05 mg Oxazepam/l Harn

window“ der korrigierten R_F -Werte ausgleichen. Dieses Konzept bewährt sich in unserer Laborpraxis insbesondere dann, wenn die erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen (z. B. bei Überdosierungen) vorliegen. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse wird in Kürze publiziert [10]. In dieser Arbeit soll über die besonders gut praktikablen Screeningmöglichkeiten mit Hilfe von zwei weit verbreiteten Immunoassays (EMIT-st und TDx) berichtet werden. Bereits kurz nach der Einführung der ersten tetrazyklischen 1,4-Benzodiazepine zeigte sich, daß diese neue Untergruppe trotz der gegenüber „konventionellen“ Benzodiazepinen nicht unbeträchtlichen Strukturunterschiede günstige Kreuzreaktivitäten besitzt.

Material und Methoden

Enzymimmunoassay (EMIT-st (Benzodiazepines))

Enzymimmunoassay (EMIT-st). Der käufliche Kit enthält Schafantikörper gegen Oxazepam, als Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit kovalent gebundenem Oxazepam, als Coenzym NAD, als Substrat Glucose-6-Phosphat, weiterhin Tris-Puffer und Stabilisatoren. Art. Nr. 448503 (Syva-Merck).

EMIT-st Urine Calibrator A. Der lyophilisierte Humanurin (der neben Oxazepam noch Amphetamin, Benzoyllecgonin, Methadon, Morphin, Phencyclidin, Propoxyphen und Secobarbital enthält) wird mit 3 ml dest. Wasser rekonstituiert; die Oxazepamkonzentration beträgt dann 0,3 mg/l. Art. Nr. 448510 (Syva-Merck).

EMIT-st Urine Control Set A. Die „negative control“ enthält keine Benzodiazepine, die „positive control“ Oxazepam in einer Konzentration von 1,0 mg/l (daneben die weiter oben angegebenen Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen). Es wird ebenfalls mit 3 ml dest. Wasser rekonstituiert.

EMIT-st System. Es besteht aus Photometer und Diluter (50 µl). Art. Nr. 448810 (Syva-Merck).

Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA)

Verwendet wurde das TDx-Meßsystem von Abbott Diagnostics Products GmbH mit dem neuen *TDx Benzodiazepine Urine Assay* (Chargennummer 96-204-SV Control bzw. 96-266-SV Reagent Pack).

Benzodiazepines Reagent Pack. Bestehend aus: W (= Wash Solution): Puffer mit Protein-stabilisatoren, S (= Serum): Benzodiazepin-Schafantisera mit Proteinstabilisator, T (= Tracer): Benzodiazepin-Fluoresceintracer in Puffer mit Netzmittel (Surfactant) und Protein-stabilisator, P (= Pretreatment Solution): wäßrige Salzlösung (nicht näher spezifiziert). Art. Nr. 9674-20 (Abbott).

Benzodiazepines Calibrator. Es sind folgende Konzentrationen von N-Desmethyldiazepam (Nordiazepam) in den einzelnen Vials enthalten: Vial A: 0,0 ng/ml; Vial B: 200,0 ng/ml; Vial C: 400,0 ng/ml; Vial D: 800,0 ng/ml; Vial E: 1200,0 ng/ml; Vial F: 2400,0 ng/ml. Die mit den Kalibrierungsstandards erstellten Eichkurven sollen lt. Herstellerangaben bis zu 2 Monate stabil bleiben. Art. Nr. 9674-01 (Abbott); garantiert wird eine „Mindesthaltbarkeit“ der Kalibrationskurve von 2 Wochen.

Benzodiazepines Controls. Hierbei handelt es sich um 2 Proben mit N-Desmethyldiazepam in Humanurin: Low Vial: 300 ng/ml; High Vial: 1000 ng/ml. Art. Nr. 9674-10 (Abbott).

Proben

Wir setzten medikamentenfreien Leerurin ein, der mit dem jeweiligen tetrazyklischen Benzodiazepin bzw. seinen Metaboliten aufgestockt wurde. Es ergaben sich zunächst beträchtliche

Schwierigkeiten, da diese Wirkstoffe in wäßrigen Medien größtenteils sehr schlecht löslich sind. Dies bedeutete eine erhebliche Fehlerquelle, die wir folgendermaßen umgingen: Das betreffende Benzodiazepin wird zunächst in einem Rundkolben (250 ml) in 20 ml Diethylether gelöst, nachdem es mit einem Glasstab möglichst fein zerkleinert wurde. Anschließend wird der Ether im Rotationsverdampfer abgezogen, wobei keine Substanzverluste zu befürchten sind. Das auf der inneren Kolbenwand feinstverteilte Benzodiazepin löst sich im nun zugegebenen Leerharn rasch und praktisch quantitativ auf.

Von den Stammlösungen (Konzentration etwa 10 mg Benzodiazepin/l Harn) wurden durch Zugabe von Leerurin Verdünnungsreihen hergestellt (5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1 mg/l).

Praktische Durchführung und Prinzip der Methoden

Auf das Prinzip beider Methoden soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, da beide Firmen ausführliches Schriftenmaterial zur Verfügung stellen. Bei der Durchführung der Analysen wurden die den Kits beigegebenen Vorschriften befolgt.

Auswertung

EMIT-st (Benzodiazepines). Beim EMIT-st erscheinen im Ausdruck nicht näher definierte Extinktionswerte (Readings) des Kalibrators und der Probe; weiterhin die Bewertung „+“ oder „-“. Als Entscheidungsgrenze (Schwellenwert) dienen die „Readings“ des Kalibrators (0,3 mg Oxazepam/l). Für statistische Betrachtungen benutzen wir, wie auch andere Autoren [3], die Differenz der „Readings“.

TDx-System. Beim TDx-System werden die Konzentrationen (ng/ml) ausgedruckt. Bei einem vorgegebenen Schwellenwert von 0,2 mg/l wird zusätzlich jeweils angezeigt, ob die gemessene Konzentration unterhalb der Schwelle [Threshold ($< T$)] oder darüber ($> T$) liegt. Als weitere Angaben erscheinen die Netto-Polarisation (NET P) und die Leerwert-Intensität (BLK I).

Ergebnisse

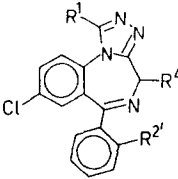
Die untersuchten tetrazyklischen Benzodiazepine und ihre Hauptmetaboliten (insgesamt 17 Substanzen) sind in Tabelle 1 aufgeführt. Diese Übersicht enthält weiterhin die derzeit gebräuchlichste Klasseneinteilung (Triazolobenzodiazepine, Thieno-triazolo-diazepine bzw. Imidazobenzodiazepine), die Substitutionsmuster und die Ergebnisse der Messungen mit dem EMIT-st- bzw. TDx-System.

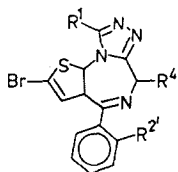
Jeweils für das EMIT-st- bzw. TDx-System sind *Schwellenbereiche* angegeben, deren niedrigster Wert einem eindeutig negativen Ausfall des Tests entsprach, während der obere Wert stets deutlich positiven Ergebnissen (higher than threshold) zuzuordnen war.

Der in Klammern angegebene *Schwellenwert* wurde durch lineare Interpolation erhalten. Zu diesem Vorgehen wurden wir durch einen quasilinearen Verlauf der Kalibrierkurven veranlaßt.

Im Zusammenhang mit unseren Messungen ermittelten wir auch die Präzision für beide Verfahren: Hierbei ist jedoch einschränkend festzustellen, daß der Einsatz des EMIT-st-Systems für quantitative Messungen grundsätzlich nicht propagiert wird. Andererseits erfolgt aber häufig eine zumindest halb-quantitative Auswertung des Verfahrens auf der Basis der Differenz der „Readings“. Das TDx-System stellt hingegen in jedem Fall ein quantitatives Meßsystem dar. Es konnten folgende Werte ermittelt werden:

Tabelle 1. Struktur der untersuchten tetrazyklischen Benzodiazepine sowie Schwellenbereiche und interpolierte Schwellenwerte für das EMIT-st- und TDx-System

Benzodiazepinklasse	Schwellenbereiche und interpolierte Schwellenwerte für das EMIT-st- und TDx-System					
Triazolobenzodiazepine:						
						
Name	R¹	R⁴	R²'	EMIT-st (mg/l)	TDx	(mg/l)
Adinazolam	-CH₂-N(CH₃)₂	-H	-H	0,5 – 1,0 (0,6)	0,5 – 1,0	(0,5)
Mono-N-demethyl- adinazolam	-CH₂-NH-CH₃	-H	-H	0,5 – 1,0 (0,7)	0,25– 0,5	(0,4)
Alprazolam	-CH₃	-H	-H	0,25– 0,6 (0,3)	0,1 – 0,25	(0,2)
α-Hydroxyalprazolam	-CH₂OH	-H	-H	0,25– 0,6 (0,3)	0,25– 0,6	(0,3)
4-Hydroxyalprazolam	-CH₃	-OH	-H	0,2 – 0,5 (0,3)	0,2 – 0,5	(0,3)
Estazolam	-H	-H	-H	0,25– 0,5 (0,3)	0,1 – 0,25	(0,2)
Triazolam	-CH₃	-H	-Cl	0,2 – 0,5 (0,4)	0,2 – 0,5	(0,3)
α-Hydroxytriazolam	-CH₂OH	-H	-Cl	0,2 – 0,5 (0,4)	0,2 – 0,5	(0,4)
4-Hydroxytriazolam	-CH₃	-OH	-Cl	5,5 –11,0 (8,7)	5,5 –11,0	(9,3)

Thieno-triazolodiazepine:

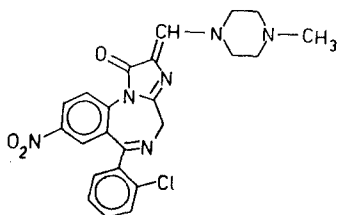
Name	R ¹	R ⁴	R ^{2'}	EMIT-st (mg/l)	TDx	(mg/l)
Brotizolam	-CH ₃	-H	-Cl	0,2 – 0,5 (0,5)	0,2 – 0,5	(0,4)
α-Hydroxybrotizolam	-CH ₂ OH	-H	-Cl	1,0 – 2,0 (1,8)	0,2 – 0,5	(0,4)
4-Hydroxybrotizolam	-CH ₃	-OH	-Cl	2,0 – 3,0 (2,3)	0,5 – 1,0	(0,6)

Diskussion der Ergebnisse

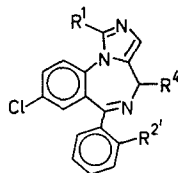
Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Empfindlichkeit beider Systeme in bezug auf einen bestimmten Wirkstoff häufig nahezu gleich groß ist (z. B. bei Adinazolam, Alprazolam und seinen Metaboliten, Estazolam, Triazolam und seinen Metaboliten, Brotizolam, Loprazolam, Midazolam und α,4-Dihydroxymida-

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Benzodiazepinklasse	Schwellenbereiche und interpolierte Schwellenwerte für das EMIT-st- und TDx-System					
---------------------	--	--	--	--	--	--

*Imidazobenzodiazepine:**a) Imidazo [1,2-a] [1,4]-benzodiazepine*

Name	R ¹	R ⁴	R ^{2'}	EMIT-st (mg/l)	TDx (mg/l)
Loprazolam	s. o.	-H	-Cl	2,0 – 5,0 (3,2)	2,0 – 5,0 (3,5)

b) 4H-Imidazo [1,5-a] [1,4]-benzodiazepine

Name	R ¹	R ⁴	R ^{2'}	EMIT-st (mg/l)	TDx (mg/l)
Midazolam	-CH ₃	-H	-F	0,2 – 0,5 (0,4)	0,2 – 0,5 (0,3)
α -Hydroxymidazolam	-CH ₂ OH	-H	-F	1,3 – 2,6 (1,6)	0,65– 1,3 (0,9)
4-Hydroxymidazolam	-CH ₃	-OH	-F	0,6 – 1,2 (0,6)	0,6 – 1,2 (1,1)
α ,4-Dihydroxy- midazolam	-CH ₂ OH	-OH	-F	0,6 – 1,2 (1,1)	0,6 – 1,2 (1,0)

^a Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die hier mitgeteilten Werte mit einer bestimmten Charge des betreffenden Kits erhalten werden. Aufgrund allgemeiner Erfahrungen kann davon ausgegangen werden, daß sich von Charge zu Charge Unterschiede ergeben, die z.B. durch die wechselnde Antikörperqualität bedingt sein können. Meist liegen die Resultate jedoch in der gleichen Größenordnung

zolam). Häufig ist das TDx-System empfindlicher als das EMIT-st-System (z. B. bei Mono-N-demethyladinazolam, α -Hydroxymidazolam); in einigen Fällen liegen umgekehrte Verhältnisse vor (z. B. bei 4-Hydroxymidazolam). Besonders auffällig erscheint, daß bei den Brotizolammetaboliten α -Hydroxybrotizolam und 4-Hydroxybrotizolam die Nachweisgrenze beim TDx-System etwa um den Faktor 4 niedriger liegt als beim EMIT-st. Weiterhin sind die extrem schwachen Kreuzreaktivitäten beider Systeme bezüglich 4-Hydroxytriazolam zu nennen. Wir dachten zunächst an Meßfehler, konnten aber im Rahmen ergänzender

Tabelle 2. Ergebnisse der Präzisionsmessungen in der Serie (within day precision) und von Tag zu Tag (day to day precision) für das EMIT-st- und das TDx-System

Methode	Präzision in der Serie			
	<i>n</i>	\bar{x}	σ	VK
EMIT-st	10	64 Readings	10,6	16,5%
TDx	10	0,357 mg/l	0,004	1,1%
Methode	Präzision von Tag zu Tag			
	<i>n</i>	\bar{x}	σ	VK
EMIT-st	10	57 Readings	7,2	12,6%
TDx	10	0,379 mg/l	0,018	4,7%

Untersuchungen zeigen, daß alle Benzodiazepine mit 3- und 4-Hydroxylierung und 2'-Chlorsubstitution höhere Nachweisgrenzen aufweisen, während bei 3- oder 4-Hydroxylierung und 2'-Wasserstoffsubstitution übliche Kreuzreaktivitäten der Fall sind⁴.

Wir vermuten in diesem Zusammenhang eine Veränderung der Molekülgeometrie mit sterischen Effekten, die Einflüsse auf die Antigen-Antikörper-Reaktion haben.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, konnte beim TDx-System eine hervorragende Präzision in der Serie (VK = 1,1%), aber auch eine gute Präzision von Tag zu Tag (VK = 4,7%) ermittelt werden. Beim EMIT-System liegen die entsprechenden Werte insgesamt beträchtlich höher. Dazu kommt der Befund, daß die Werte der Präzision in der Serie (VK = 16,5%) über denen der Präzision von Tag zu Tag (12,6%) liegen. Dieser etwas ungewöhnliche Befund spiegelt auch die Beobachtungen anderer Institute wieder, wonach innerhalb umfangreicher Serienmessungen beim EMIT-st-System ähnliche Werte erhalten wurden. Es muß aber ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß man beide Systeme hinsichtlich der Präzision nur bedingt vergleichen kann. Zu berücksichtigen sind auch die sehr unterschiedlichen Anschaffungskosten, die beim TDx um Größenordnungen höher liegen (exakte Preise können hier nicht genannt werden, da diese je nach den Beschaffungsmodalitäten stark schwanken).

Hinsichtlich der Praktikabilität wäre auszuführen, daß das TDx-System sicher die Methode der Wahl bei Reihenuntersuchungen mit größerer Probenzahl darstellt. Probleme hinsichtlich der Kosten treten auf, falls nur gelegentlich die eine oder andere Probe zu untersuchen ist (z. B. im Rahmen der Notfallanalytik während der Nachtstunden). In diesen Fällen wird auch nach Auskunft anderer Untersuchungsstellen häufig dem EMIT-st-System der Vorzug gegeben, das besonders für die Screeninganalyse einzelner Proben günstig erscheint. Auch an dieser Stelle sollte nochmals auf die Überlegenheit des TDx-System im Hinblick auf die quantitative Auswertung hingewiesen werden.

Aufgrund unserer Erfahrungen können beide Systeme in jedem Fall zum Screening tetrazyklischer Benzodiazepine in Fällen der Überdosierung heran-

⁴ Z. B. Benzodiazepinpaare Oxazepam/Lorazepam bzw. Temazepam/Lormetazepam

gezogen werden. Aber auch nach regelmäßiger Einnahme therapeutischer Dosen (z.B. Triazolam) wurden positive Screeningresultate erzielt⁵. Grundsätzlich empfehlen wir in solchen Fällen einen Anreicherungsschritt (z.B. durch Flüssig-Flüssig- oder Festphasen-Extraktion, u. U. nach enzymatischer Konjugatspaltung). Über Teilaspekte dieser Probenaufbereitung wird in Kürze berichtet werden [15].

Es versteht sich von selbst und bedarf eigentlich keines besonderen Hinweises, daß alle enzymimmunologischen Befunde mit Hilfe anderer Verfahren abgesichert werden müssen (confirming methods). Wie eingangs erwähnt, erweist sich das Konzept des korrigierten R_f^c -Wertes als sehr brauchbare weitere Screeningstrategie. Eine entsprechende Publikation (unter Einschluß prächromatographischer Konzentrierungsverfahren) wird in Kürze erscheinen [10]. Daneben wurden für zahlreiche tetrazyklische Benzodiazepine (Alprazolam [14], Brotizolam [13], Midazolam [7] und Triazolam [11]) weitere analytische Daten mitgeteilt. Neueste Entwicklungen auf dem Arzneimittelmart berückichtigt eine Monographie [9].

Danksagung. Unser Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die ständige Förderung unserer Arbeiten. Den Herstellerfirmen Abbott Diagnostics Products (Wiesbaden-Delkenheim) und Syva-Merck GmbH (Darmstadt) danken wir für die freundliche Unterstützung durch Sachmittel und Informationsmaterial.

Literatur

1. Borchert A, Schneider WR, Schütz H (1987) Der korrigierte R_f^c -Wert in der forensischen Toxikologie – Untersuchungen und Erfahrungen. *Beitr Gerichl Med* 45: 193–201
2. Bratton AC, Marshall EK (1939) A new coupling component for sulfanilamide determination. *J Biol Chem* 128: 537–550
3. Gruhl H (1987) Zum Screening der Benzo- und Thienodiazepine im Urin mit dem EMIT-st und der DC im Rahmen eines Suchtestes auf Medikamentenmißbrauch. *Z Rechtsmed* 98: 221–228
4. Schneider WR, Schütz H, Zeller M (1986) Corrected data of 16 hydrolysis-derivatives of commonly used Benzodiazepines in 10 systems. *J Forensic Med* 2: 56–60
5. Schütz H (1981) Screening von Benzodiazepinen. *Ärztl Lab* 28: 117–132
6. Schütz H (1981) Benzodiazepines, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
7. Schütz H (1985) Analytische Daten des neuen Benzodiazepinderivates Midazolam (Dormicum) und seiner Metaboliten. *Z Rechtsmed* 94: 197–205
8. Schütz H (1986) Dünnschicht-chromatographische Suchanalyse für 1,4-Benzodiazepine in Harn, Blut und Mageninhalt. Mitt. VI der Senatskommission der DFG für Klinisch-toxikologische Analytik. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim
9. Schütz H (1988) Benzodiazepines, vol 2. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo (in preparation)
10. Schütz H, Borchert A, Koch EM, Schneider WR, Schölermann K (1987) Screening tetrazyklischer Benzodiazepine und ihrer Metaboliten mittels DC unter Verwendung des korrigierten R_f^c -Wertes. *Beitr Gerichl Med* (im Druck)

⁵ Selbst nach der einmaligen abendlichen Einnahme von 0,25 mg Triazolam konnte in 4 von 6 Fällen ohne Aufarbeitung des Harns in beiden Systemen ein positives Screeningresultat erzielt werden. Nach extraktiver Anreicherung (Einzelheiten hierzu in [15]) waren alle Proben mit Morgenharn positiv

11. Schütz H, Fitz H (1981) Analytik und Biotransformation von Triazolam (Halcion), einem neuen Benzodiazepin mit forensisch relevanten Nebenwirkungen. Beitr Gerichtl Med 39: 339–346
12. Schütz H, Schneider WR (1985) Corrected data of 61 benzodiazepines and metabolites in two systems. J Forensic Med 1: 22–29
13. Schütz H, Schneider WR (1986) Analytische Daten von Brotizolam (Lendormin) und seinen Hauptmetaboliten. In: Eisenmenger W, Liebhardt E, Schuck M (Hrsg) Medizin und Recht. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, S 584–595
14. Schütz H, Schneider WR (1986) Analytische Daten des neuen Benzodiazepinderivates Alprazolam (Tafil, Xanax) und seiner Metaboliten. Beitr Gerichtl Med 44: 487–496
15. Schütz H, Schneider WR, Borchert A, Kaatsch HJ (1987) Diskrepante Befunde zwischen EMIT-st (Benzodiazepines) und DC-Screening. Springer, Berlin Heidelberg New York (im Druck)
16. Suzuki O, Hattori H, Asano M, Takahashi T, Brandenberger H (1987) Positive und negative ion mass spectrometry of benzophenones, the acid-hydrolysis products of benzodiazepines. Z Rechtsmed 98: 1–10

Eingegangen am 25. Mai 1987

Nachtrag bei der Korrektur

Bei Brotizolam und seinen Metaboliten handelt es sich nicht um Benzodiazepine, sondern um Thienodiazepine. Wegen der Ähnlichkeit im Wirkungsspektrum wurden diese Verbindungen in dieser Arbeit ebenfalls behandelt.