

Auftretens größerer Fludiazepam-Signale im GC/MS Screening

H. Andresen, S. Hinrichsen, A. Müller

Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Butenfeld 34, 22529 Hamburg

Bei der Untersuchung auf sog. „andere berauschende Mittel“ einer Blutprobe (NaF-versetztes Entnahmegefäß) fiel im „general unknown“-Screening ein hohes Signal auf. Nach Abgleich mit der PMW-Datenbank (2. Ed.) ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung des Spektrums mit dem des Benzodiazepins Fludiazepam (Abb.1).

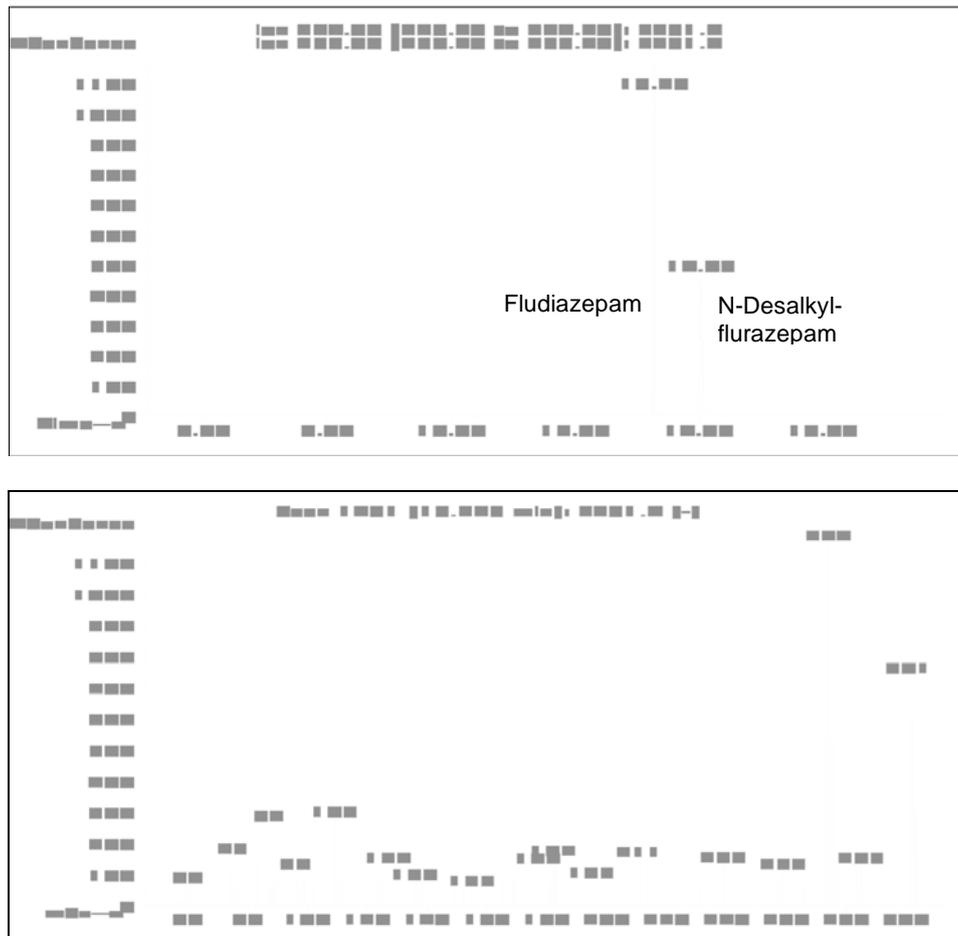


Abb. 1. Nachweis von Fludiazepam in einer Probe mit Desalkylflurazepam – Chromatogramm (oben) und Massenspektrum (unten)

Im immunologischen Vortest hatte sich bereits ein Hinweis auf die Gruppe der Benzodiazepine ergeben. Dieses positive Ergebnis konnte nach alkalischer Flüssig/Flüssig-Extraktion und nachfolgender GC/ECD-Detektion mit dem Nachweis von Desalkyl-Flurazepam, dem hauptsächlichsten Metaboliten von Flurazepam, erklärt werden. Es fand sich nach Abgleich mit der Reinsubstanz mit dieser Methode kein übereinstimmendes Signal für Fludiazepam.

Aufgrund der Diskrepanz dieser Ergebnisse und im Hinblick darauf, dass Fludiazepam ein Benzodiazepin-Abkömmling ist, der in Deutschland (und laut Pharmazeutischer Stoffliste auch außerhalb Deutschlands) nicht als Arzneimittel auf dem Markt ist, sollte die Herkunft des deutlichen Fludiazepam-Signals genauer untersucht werden.

Die Angaben zu Fludiazepam in der uns zur Verfügung stehenden PMW-Datenbank führten nicht weiter. Allerdings ließ sich anhand des Strukturvergleiches von Fludiazepam und Desalkylflurazepam leicht erkennen, dass durch eine Methylierung das Erstere aus Letzterem (das nachgewiesenermaßen in der Probe vorhanden war) entstehen kann (Abb. 2).

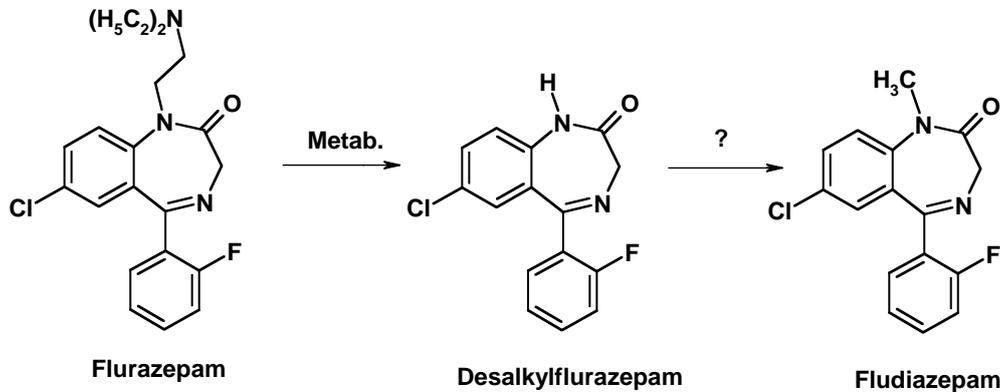


Abb. 2. Struktur von Flurazepam, dessen Hauptmetaboliten Desalkylflurazepam und Fludiazepam.

Andererseits stellte sich heraus, dass bei Einspritzen von Desalkylflurazepam-Reinsubstanz in Methanol (Temperatur im Einspritzblock = 250°C) nur ein sehr geringer Anteil als Fludiazepam-Artefakt im Chromatogramm erschien. Bei Verwendung von iso-Oktan als Lösungsmittel blieb, wie erwartet die Artefakt-Bildung aus (Abb.3).

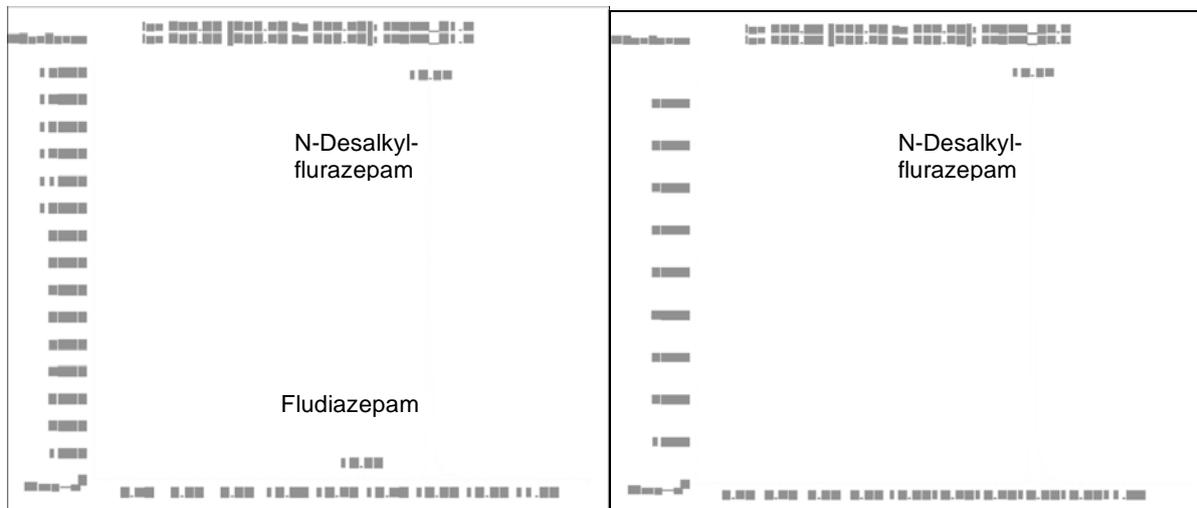


Abb. 3. Chromatogramme von Desalkylflurazepam (50µg/mL) nach Einspritzung in Methanol (links) und in Iso-Oktan (rechts)

Erst nach Festphasen-Extraktion (C18 Säulen, Varian) einer mit Desalkylflurazepam dotierten Serumprobe unter alkalischen Bedingungen (Phosphat-Puffer, pH 9,5), Elution mit Methanol, Einengung unter Stickstoffstrom bei 40°C bis zur Trockne und anschließendem Aufnehmen in Ethanol entstand unter den hohen Temperaturen im Gaschromatographen das Fludiazepam in relevanten Mengen (Abb.4). Eine Analyse desselben Extraktes mittels HPLC-DAD ergab kein Signal für Fludiazepam zusätzlich zum Desalkylflurazepam.

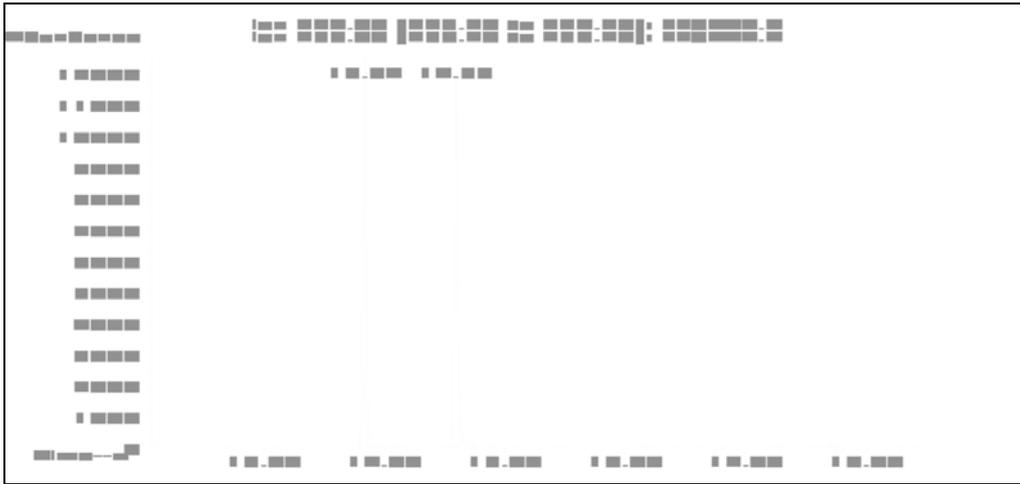


Abb. 4: Sehr hohes Signal für Fludiazepam nach alkalischer Festphasenextraktion einer mit Desalkyl-Flurazepam dotierten Serumprobe (0,2 mg/L)

Obwohl allgemein bekannt ist, dass das Auftreten von Methyl-Artefakten ein typisches Problem bei Anwesenheit von auch nur kleinen Methanol-Resten in der Probe darstellt, war es in diesem Fall überraschend, zu welchem hohem Anteil das Desalkylflurazepam umgewandelt wurde. Außerdem ist es interessant, dass die Kombination aus alkalischer Festphasenextraktion und hoher Einspritztemperatur eine Art Katalysator für diese Umwandlung darstellt. Offenbar begünstigt der bei der Einspritzung noch vorhandene basische pH-Wert durch die Deprotonierung des leicht sauren Amidstickstoffs (pK_a um 12) die Methylierung.

Anmerkung: In der neusten, 3. Auflage der MPW-Datenbank (2007) ist bei Fludiazepam die Bemerkung „Flurazepam-M (dealkyl-) ME“ ergänzt worden.