



BBGes
Berlin

Institut für Toxikologie des BBGes
Kursus „Klinische Toxikologie“ zur Weiterbildung Fachtoxikologe/in (DGPT)
vom 28. September bis 2. Oktober in Berlin.

Systematische toxikologische Analytik (STA)

Torsten Binscheck
und
Dagmar Lampe

Systematische toxikologische Analytik

Definition & Untersuchungsmaterial

→ **Aufklärung akuter Vergiftungen mit unbekannter Ursache**
typisch: Vergiftungsverdacht bei bewusstlos aufgefundenem Patienten

Untersuchungsmaterial

- Blut, Plasma, Serum
- Urin
- Mageninhalt, Magenspülflüssigkeit
- Substanzproben, Asservate

Grundsätzlich sollte die Klinik veranlasst werden,
alle verfügbaren Untersuchungsmaterialien einzusenden.

2

Systematische toxikologische Analytik

Untersuchungsstrategie

A

1. Identifikation im Urin
- ↓
2. Quantifizierung der identifizierten Substanzen in Blut/Plasma/Serum

B

Identifikation und Quantifizierung (Blut/Plasma/Serum) in mehreren gleichzeitig ablaufenden, sich gegenseitig ergänzenden Analysengängen

3

Systematische toxikologische Analytik

Essentielle Rahmenbedingungen

- Verfügbarkeit rund um die Uhr
- Zeitbedarf max. 2 Stunden
- Verbindlicher schriftlicher Befund nach Abschluss der Analyse
- Der jeweiligen Institution angemessener Aufwand
 - apparativ
 - personell - selbständig durch eine(n) techn. Assist.
- optional/optimal außerhalb der Arbeitszeit akademischer/ärztlicher Hintergrunddienst oder Kooperation mit einem Giftnotrufzentrum.

Die Rahmenbedingungen verursachen Einschränkungen im Substanzspektrum, das durch eine „general unknown“-Analytik abgedeckt werden kann.

4

Systematische toxikologische Analytik

Welche Substanzen müssen identifiziert werden?

Vergiftungen, die unverzüglich eine spezifische Therapie erfordern:	Vergiftungen, bei denen ein sekundäres Eliminationsverfahren (Detoxikation) erfolgversprechend ist	Vergiftungen, die häufig vorkommen
<ul style="list-style-type: none"> • Paracetamol • Salicylsäure • Organophosphate • Methanol 	<ul style="list-style-type: none"> • Phenobarbital • Salicylsäure • Valproinsäure • Lithium • (Ethanol) 	<p>ZNS-wirksam</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ethanol • Antidepressiva • Neuroleptika • Antiepileptika • Missbrauchssubstanzen <p>Herzwirksam</p> <ul style="list-style-type: none"> • B-Blocker • Kalziumantagonisten • Antiarrhythmika • Herzglykoside

5

Untersuchungsmaterial Blut/Plasma/Serum

- Optimal: Nativblut in inerten Gefäßen → illusorisch
- Standard: Kommerzielle Abnahmesysteme

Probleme bei chromatographischen Verfahren

↓

Systemspezifische Signalartefakte durch Freisetzung von Kunststoffbestandteilen (z.B. Weichmacher) aus dem Gefäßmaterial

↓

Systemspezifische Signalartefakte aus Serumgefäßen durch Freisetzung von Bestandteilen aus Trenngelen und/oder Gerinnungshilfen.

Die Artefaktensignale sollten methodenspezifisch überwacht und dokumentiert werden.

6

Untersuchungsmaterial Urin

- Aus pharmakokinetischen Gründen:
Überwiegend Abbauprodukte der Substanz(en)
- Nachweisbarkeit hängt von der Konzentration der Substanz ab.
- Nachweisbarkeit hängt von der Konzentration der Substanz ab:
 1. Aufgenommene Dosis
 2. Zeit seit Aufnahme der Substanz
 3. Pharmakokinetik: unverändert renal ausgeschiedene Fraktion
 4. Wassergehalt des Urins
- Insbesondere zur Beurteilung eines negativen Analyseergebnisses im Urin muss die aktuelle Kreatininkonzentration berücksichtigt werden.

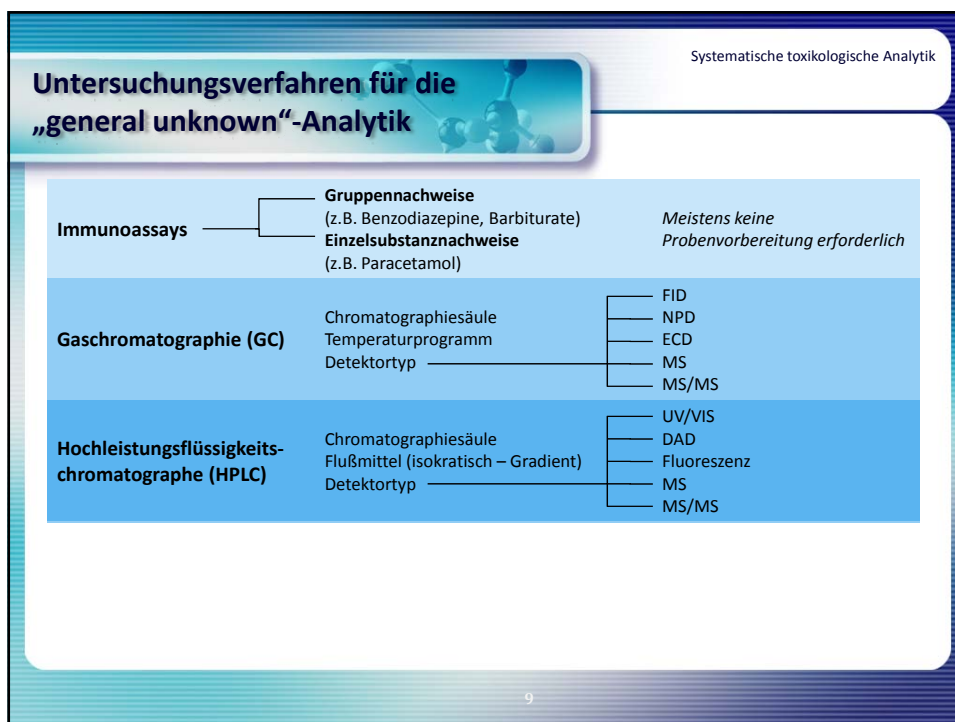
7

Probenvorbereitung für chromatographische Verfahren

Systematische toxikologische Analytik

1. Derivatisierung	2. Extraktion	3. Anreicherung
Chemische Umsetzung der Analyte, um die Nachweisbarkeit mit einem bestimmten Verfahren zu verbessern.	<ul style="list-style-type: none"> • Flüssig/flüssig-Extraktion Nach pH-Anpassung (sauer/alkalisch) ausschütteln der Analyte aus der wässrigen biologischen Matrix in eine organische Phase • Festphasen-Extraktion (SPE) • Online-Extraktion In HPLC-Systeme integrierte und automatisierte SPE durch elektronische Ventilschaltungen • Thermische Extraktion Hitze zur Überführung leichtflüchtiger Kohlenwasserstoffe und Alkohole (Headspace-GC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eindampfen der organischen Phase • Elution mit geringem Volumen

8



Klinisch-toxikologische „general-unknown“-Analytik
Dr. D. Lampe

Durchführung der „general unknown“-Analytik

- **Ziel:**
Ein möglichst breites Spektrum klinisch relevanter Substanzen soll in möglichst kurzer Zeit mit adäquatem Aufwand identifiziert und (möglichst) quantifiziert werden.
- **Methodik:**
Kombination von verschiedenen (immunologischen und chromatographischen) Analyseverfahren in Abhängigkeit von der „analytischen Philosophie“ und der personellen und technischen Ausstattung der Institution.

10

Systematische toxikologische Analytik

Literatur

- W.R. Külpmann (Hrsg.)
Klinisch-toxikologische Analytik
Verfahren, Befunde, Interpretation
Handbuch für Labor und Klinik
Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002
- A.C. Moffart, M.D. Osselton, B. Widdop (eds.)
Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem
material, 3rd edition
Pharmaceutical Press, 2004
- R. J. Flanagan, A. Taylor, I.D. Watson, R. Whelpton (eds.)
Fundamentals of Analytical Toxicology
John Wiley & Sons, Ltd. 2007

11

Systematische toxikologische Analytik

Beispiel: Einfachste Methodik

Gelegentlich integriert in Zentrallaboren entsprechend ausgerichteter Krankenhäuser

- Qualitative und quantitative **Immunoassays** sowie weitere mit Hilfe von Laborautomaten messbare toxikologische relevante Parameter (z.B. Ethanol)
Untersuchungsmaterial: Blut/Plasma/Serum und Urin
- Automatisiertes **HPLC-Urinscreening**
 - **REMEDI® MS** (Rapid emergency drug identification HPLC-System)
Fa. BioRad, inzwischen eingestellt
 - **TOX.I.S.** (Toxikologisches Identifizierungssystem)
Fa. Shimadzu

Achtung!
Scheinbar einfache Verfahren erfordern besonders gründliche Kenntnisse
ihrer methodischen Grenzen.

12

Methodik am Institut für Toxikologie des BBGes

Systematische toxikologische Analytik

	Untersuchungs-material	Probenvorbereitung	Nachweisverfahren
Gleichzeitig	Blut/Plasma/Serum	<ul style="list-style-type: none"> alkalische flüssig/flüssig-Extraktion alkalische flüssig/flüssig-Extraktion saure flüssig/flüssig-Extraktion Headspace 	<ul style="list-style-type: none"> HPLC/DAD GC/NPD GC/FID GC/FID
		<ul style="list-style-type: none"> Immunoassays 	<ul style="list-style-type: none"> Salicylsäure Paracetamol Trizyklische Antidepressiva
	Urin (ersatzweise Serum)	<ul style="list-style-type: none"> Immunoassays 	<ul style="list-style-type: none"> Opiate Kokain-Metabolite Cannabinoide Amphetamine / Ecstasy

Falls Hinweise auf Substanzen vorliegen, die nicht im Screening erfasst werden, müssen spezielle Nachweise (z.B. GC/MS, LC/MS) durchgeführt werden.

13

HPLC-Chromatogramm (UV/DAD): Amitriptylin-Vergiftung

Systematische toxikologische Analytik

The chromatogram displays a series of peaks over a 40-minute run. The x-axis represents time in minutes (0 to 40), and the y-axis represents detector response. Key peaks are identified with their retention times (RRT):

- Nortriptylin (RRT 0,883)
- Internal Standard [5-(4-Methylphenyl)-5-phenyl-hydantoin] MPPH (RRT 1)
- Amitriptylin (RRT 1,170)

An inset plot shows the UV spectrum at RRT 1,170, which is overlaid with a UV spectrum from a library reference, confirming the identification of Amitriptylin.

14

Systematische toxikologische Analytik

Interpretation der gemessenen Substanzkonzentrationen

- Therapeutischer Konzentrationsbereich
- (Toxikologisch) „kritische“ Konzentrationen
- Vorhersage der Detoxifikationsgeschwindigkeit
 - Spontan: HWZ (o. adäquater P.)
 - Maschinell
 - Hämodialyse /-perfusion: Verteilungsvolumen
 - HWZ (o. adäquater P.)
 - Plasmaeiweißbindung
 - „Maschinenparameter“
- Messung und Bewertung der Detoxifikationsgeschwindigkeit (bei Verlaufskontrollen) (Vergleich mit vorhergesagten Daten)
- Abschätzung der „bioverfügbaren“ Dosis (Vergleich mit der Anamnese)
 - HWZ (o. adäquater P.)
 - Verteilungsvolumen

15

Systematische toxikologische Analytik

Der Befund einer systematische toxikologische Analytik

1. Der Hinweis, dass ein toxikologisches Screening durchgeführt wurde.
2. Stellungnahme zu allen
 - vermuteten**
 - verabreichten**
 - identifizierten / quantifizierten** Substanzen
3. Wenn die vermuteten oder verabreichten Substanzen
 - nicht gefunden wurde: Nachweisgrenze angeben
 - nicht im Untersuchungsprogramm ist: Umstand angeben
 - aus technischen Gründen in der aktuellen Analyse nicht zu beurteilen ist (z.B. Überlappung): Umstand angeben
4. Verfügbare Referenzdaten zu allen
 - vermuteten**
 - verabreichten**
 - identifizierten / quantifizierten** Substanzen angeben.

16

Systematische toxikologische Analytik

Beispiel für einen einfachen toxikologischen Befund

Proben-ID: 080917 0701-1
 Eing: (55709) 17.09.2008 / 07:07 - Freigabe durch: am 17.09.2008 / 09:32
Einsender: St. Gertrauden-Krankenhaus
 10713 Berlin, Paretzer Straße 12, Telefon: 82722220 / Fax: 82722224

Patient: / **Geb.-Dat:** (Pat.-ID: 32246 /Barcode: 08091703)

Vermutliche Intoxikationszeit: 16.09.2008 - 03:30 Uhr **Allgemeine Suchanalyse wurde durchgeführt**
Vermutete Gifte: **Verabreichte Substanzen:**

Plasma / Serum		Untersuchungsmaterial vom:			
Bezeichnung (Methode)	Einheit	17.09.08 - 04:40			
Ethanol (GC - HS)	mg/ml	n.n. <0,03			
GHB (GC - Sauer)	µg/ml	368,00			
Paracetamol (Immunologisch)	µg/ml	n.n. <1,67			

Populationskinetik: (Plasma bzw. Blut)

Substanzname	Bioverfüg.	Vert.-Volumen	Halbwertszeit	Eiweißbind.	therap.Konz.-Bereich	krit.Konz.
Ethanol	100 %	0,54 l/kg	? h	? %	? - ? mg/ml	2 mg/ml
GHB	78 %	0,27 l/kg	0,5 h	? %	45 - 100 µg/ml	100 µg/ml
Paracetamol	80 %	0,85 l/kg	? h	30 %	10 - 20 µg/ml	? µg/ml

17

Systematische toxikologische Analytik

Zusammenfassung

- Rahmenbedingungen: zeitkritisch, ständige Verfügbarkeit, ökonomisch vertretbarer Aufwand
- Die Rahmenbedingungen erzwingen Einschränkungen in Bezug auf das erfasste Substanzspektrum, das an klinischen Erfordernissen orientiert sein muss.
- Das zu erfassende Substanzspektrum erfordert auf Grund der physikochemischen Eigenschaften der nachzuweisenden Substanzen den Einsatz einer Kombination verschiedener Analyseverfahren (ohne dass es dazu prinzipielle Festlegungen gibt).
- Die Konzentrationsbestimmung von Substanzen im Blut/Plasma/Serum ist unbedingt anzustreben.
- Ein qualifizierter schriftlicher Befund muss unmittelbar nach Abschluss der Analytik erstellt werden und muss substanzspezifische Referenzdaten enthalten.

18