

Probleme beim analytischen Nachweis des Alkoholentwöhnungsmittels Disulfiram in Blut- und Haarproben

A. Bakdash¹, T. Nadulski², S. Herre¹ und F. Pragst¹

¹ Institut für Rechtsmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Hittorfstr 18, 14195 Berlin

² Labor Dr. Krone und Partner, Siemensstr. 40, 32105 Bad Salzungen

Zusammenfassung

Das Alkoholentwöhnungsmittel Disulfiram, dessen Wirkung auf der Blockade der Aldehyddehydrogenase beruht, wird in der Praxis nach wie vor häufig eingesetzt. Der analytische Nachweis in Humanproben ist neben der klinischen Bedeutung zur Compliance-Kontrolle auch von forensischem Interesse bei der Aufklärung von Todesfällen, bei Fällen der heimlichen Beibringung oder zur Unterstützung von Abstinenzbehauptungen früherer Alkoholiker in Führerscheinfällen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit neben einem Literaturüberblick die methodischen Möglichkeiten des Nachweises einer Disulfirameinnahme oder –beibringung durch Analyse von Blut- und Haarproben anhand von vier Fällen untersucht. Disulfiram ist im Blut nicht stabil und wird reaktiv sehr schnell zu N,N-Diethyldithiocarbamat und dann weiter zu CS₂ und Diethylamin abgebaut. S-Methylierung des primären Spaltproduktes führt zu S-Methyl-N,N-diethyldithiocarbamat, das zu weiteren Metaboliten sulfoxidiert oder hydrolysiert wird. Während in der Blutprobe eines Todesfalles Disulfiram nachweisbar war und die Metabolite, insbesondere CS₂ gute analytische Ansatzpunkte bieten, gelang der Nachweis in Haarproben nicht. Die Möglichkeit, bei der Haarhydrolyse aus gespeicherten Disulfiram oder dessen Metaboliten freigesetztes CS₂ für den Nachweis heranzuziehen, scheiterte, da bereits unbelastetes Haar unter diesen Bedingungen durch Abbau von Cystin sehr hohe CS₂-Werte lieferte.

1. Einleitung

Disulfiram (Bis-N,N-diethyldithiocarbamoyl-disulfid, Formel s. Abb. 1) ist seit über 50 Jahren in Deutschland zur Behandlung der Alkoholabhängigkeit zugelassen. Es wird in den letzten Jahren wieder zunehmend zu Lasten der gesetzlichen Krankenkassen verordnet, wie die Zahl von 1,1 Mio. Tagesdosen im Jahre 2005 zeigt [1]. Erfolge in der Anwendung werden vor allem in multimodalen ambulanten Therapieprogrammen gesehen. Der Wirkungsmechanismus beruht auf einer irreversiblen Hemmung der Aldehyddehydrogenase ALDH, die nach Konsum von Alkohol zu einer Akkumulation von Acetaldehyd und in deren Folge zu einem höchst unangenehmen vegetativen Symptomkomplex mit u. a. Flushsyndrom, Übelkeit, Erbrechen, Hypotonie und Tachycardie führt. Die Wirkung nach höheren Alkoholdosen kann durchaus lebensbedrohlich sein, wie in der Literatur beschriebene Todesfälle zeigen [2,3]. Diese Gefahr ist besonders hoch, wenn Disulfiram in gutgemeinter Absicht ohne Wissen des Betroffenen von Angehörigen heimlich verabreicht wird, um ihn vom Trinken abzubringen.

Disulfiram (Antabus[®]) ist zur oralen Applikation vorgesehen, wobei nach einer Eindosierungsphase eine Tagesdosis von 0,2-0,4 g empfohlen wird. Daneben hat es in der Vergangenheit auch Versuche gegeben, Disulfiram-Implantate einzusetzen [4-7]. Diese erwiesen sich jedoch wegen gefährlicher Nebenwirkungen als nicht empfehlenswert.

Die Compliance gegenüber Disulfiram wird als ausgesprochen gering eingeschätzt, wenn das Medikament den Patienten zur freien Einnahme überlassen wurde. Analytische Untersuchungen von Blut- und Haarproben auf diesen Wirkstoff sollten daher hauptsächlich der Compliance-Kontrolle dienen. Darüber hinaus hat sie Bedeutung bei der Aufklärung von Todesfällen oder zur Klärung von missbräuchlicher Beibringung bei unerwarteter Alkoholunverträglichkeit. In diesem Beitrag wird über vier Fälle aus unserem Untersuchungsgut berichtet, bei de-

metrischer Atemtest auf CS₂ zur Compliancekontrolle der Disulfiramtherapie empfohlen [31,32]. Schließlich wurden N-Acetylcysteinokonjugate im Urin durch LC-MS-MS [33,34] und CS₂ im Blut durch Headspace-GC-MS [35] bestimmt. 2-Thiazolidin-4-carbonsäure wurde als Indikator für die Freisetzung von CS₂ herangezogen [36,37]. CS₂ wurde auch mit Hilfe von 3,4-Dimercaptotoluol im Blut analysiert [38,39].

4. Fallbeschreibungen

Fall 1: Todesfall mit Disulfiram-Implantat

Der Ermittlungsakte war zu entnehmen, dass die 47jährige Betroffene in der Nacht gegen 00.50 Uhr von ihrem Lebensgefährten tot in ihrer Wohnung aufgefunden worden sei, nachdem er sie am Morgen des vorangegangenen Tages letztmalig lebend gesehen habe. Sie habe sich seit drei bis vier Tagen nicht wohl gefühlt und die Medikamente Paracetamol und Grip-poststad eingenommen. Von Beruf sei sie Kinderärztin in einem Krankenhaus gewesen. Die Obduktion habe eine Lungenentzündung ergeben. Im Gesäßbereich habe man in zwei ca. 1 cm tiefen Wunden insgesamt 5 Tabletten festgestellt (Abb. 2). Das umgebende Gewebe sei stark nekrotisch gewesen. Die systematische toxikologische Analyse ergab im Blut 0,02 µg/ml Nordazepam und 9,2 µg/ml Salicylsäure. Eine alkoholische Beeinflussung lag nicht vor. Im Haar (kopfnahes Segment 0-6 cm) wurden 0,32 ng/mg Cocain und 0,04 ng/mg Benzoylcegonin bestimmt. Die Konzentration der Fettsäureethylester (Summe von Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat) im Haar lag mit 0,53 ng/mg nur leicht über dem für mäßige Normaltrinker typischen Bereich (< 0,5 ng/mg).

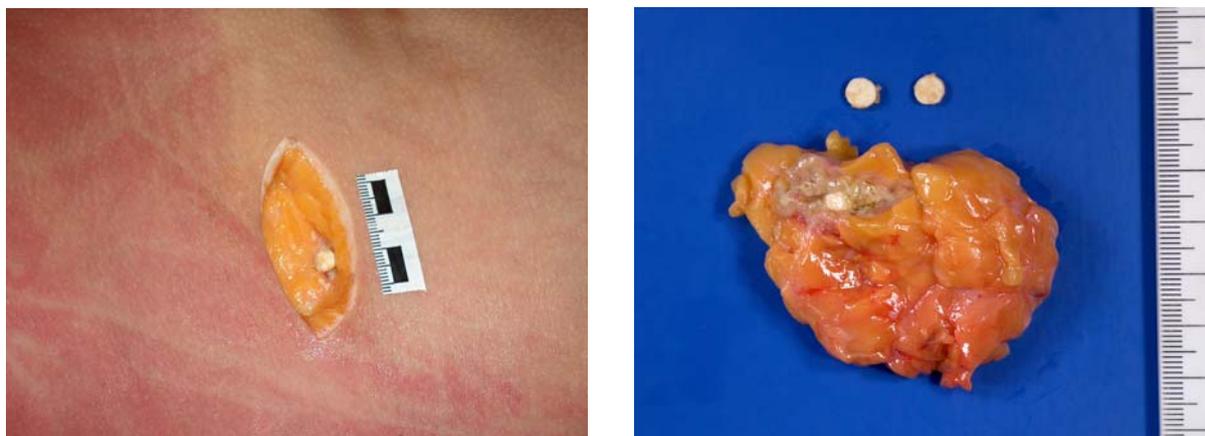


Abb. 2. Implantierte Disulfiram-Tabletten im Gesäßbereich der Betroffenen im Fall 1.

Durch Analyse der Tabletten mittels HPLC-DAD [40] wurde Disulfiram eindeutig identifiziert. Es war daher zu klären, ob dieser Wirkstoff zur Todesursache der Betroffenen beigetragen haben könnte. Weiterhin sollte durch Haaranalyse geprüft werden, ob eine chronische Applikation von Disulfiram erfolgt ist.

Fall 2: Todesfall eines trocknen Alkoholikers nach Rückfall unter Disulfiram-Behandlung

Der polizeilichen Ermittlungsakte war zu entnehmen, dass der 68jährige Betroffene als hilflose Person auf einer Parkbank aufgefunden worden sei. Neben ihm habe ein teils geleerte Flasche Wodka gestanden. Er sei durch einen Gefangenentransportwagen der Gefangenen-sammelstelle zugeführt worden, habe zunächst noch laut geschnarcht und sei nicht mehr an-

sprechbar gewesen. Der hinzu gerufene Notarzt habe nach erfolglosen Reanimationsversuchen den Tod festgestellt. Der Betroffene sei trockener Alkoholiker und depressiv gewesen. Er sei mit den Medikamenten Antabus, Acetylsalicylsäure, Mirtazapin, Opipramol, Zolpidem, Metodura und Valproinsäure behandelt worden. Zwei Tage vor seinem Tode habe er wieder angefangen zu trinken. Die systematische toxikologisch-chemische Untersuchung mittels HPLC-DAD, GC-MS und Immunoassay habe 34,9 µg/ml Valproinsäure, 0,09 µg/ml Opipramol, 4,4 µg/ml Salicylsäure und einen positiven Befund für Mirtazapin ergeben. Die Alkoholbestimmung mittels Headspace-GC und ADH ergab 4,2 ‰ im Blut und 3,3 ‰ im Urin. Die Konzentrationssumme der Fettsäureethylester im Haar als Marker für chronischen Alkoholmissbrauch habe mit 4,06 ng/mg exzessives Trinkverhalten bestätigt. Es war zu klären, ob der Todeseintritt bei der hohen Alkoholkonzentration durch die Einnahme von Antabus begünstigt wurde.

Fall 3: Vermutete heimliche Beibringung von Disulfiram durch Ehefrau

Der 43jährige Mann gab in der toxikologisch-chemischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin der Charité eine Untersuchung privat in Auftrag, da er vermutete, dass seine nun von ihm getrennt lebende Ehefrau ihm in der letzten Zeit mehrfach ohne sein Wissen das Alkoholentwöhnungsmittel Antabus verabreicht habe. Er habe nur in diesen Fällen, nachdem er in ihrer Anwesenheit alkoholische Getränke zu sich genommen habe, Rötung und Anschwellen des Gesichts sowie starke Übelkeit verspürt. Da das letzte dieser Ereignisse schon einige Wochen zurück lag, wurde von der Entnahme bzw. Abgabe von Blut- und Urinproben abgesehen und es wurden lediglich drei Haarproben asserviert. Der Proband wurde darüber informiert, dass bislang eine Methode zum Nachweis von Disulfiram im Haar nicht bekannt sei, und dass es daher ungewiss sei, ob ein solcher Nachweis methodisch möglich ist.

Fall 4: Compliancekontrolle eines Entzugspatienten

Die Haarprobe eines Probanden mit bekanntem zurück liegenden Alkoholmissbrauch wurde zur Überprüfung der behaupteten Abstinenz segmentweise auf Fettsäureethylester (FSEE) untersucht. Der Proband wurde zur Unterstützung des Alkoholentzugs mit Disulfiram behandelt. Daher sollte versucht werden, zusätzlich zu den FSEE auch diesen Wirkstoff in den Haarsegmenten nachzuweisen.

5. Experimentelles

5.1 Referenzsubstanzen und Reagenzien

Disulfiram wurde von der Firma Philopharm GmbH (Quedlinburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Thiram (Bis-N,N-dimethyldithiocarbamoyl-disulfid), das Methylanalogue von Disulfiram, wurde von der Firma Promochem (Wesel, Deutschland) bezogen. Natriumdithiocarbamat, Natriumdiethyldithiocarbamat und Schwefelkohlenstoff stammten von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz).

S-Methyl-N,N-dimethyldithiocarbamat und S-Methyl-N,N-diethyldithiocarbamat wie folgt hergestellt:

1 g Natriumdithiocarbamat bzw. und 1 ml Methyljodid wurden in 5 ml Isooctan 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde filtriert. Die nach dem Eindampfen des Lösungsmittels und überschüssigen Methyljodids zurückbleibenden Kristalle wurden aus Methanol umkristallisiert. In gleicher Weise wurde das Ethylanalogue aus Natriumdiethyldithiocarbamat synthetisiert. Beide Produkte wurden durch Massenspektrometrie identifiziert.

5.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodearray-Detektor (HPLC-DAD)

Alle Untersuchungen wurden mit einer Shimadzu-HPLC-DAD-Anlage unter den zur systematischen toxikologischen Analyse unter Nutzung der Datenbank „UV Spectra of Toxic Compounds“ verwendeten experimentellen Bedingungen durchgeführt. Die Details wurden an anderer Stelle ausführlich beschrieben [40-42].

5.2 Headspace Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HS-GC-MS)

Die HS-GC-MS-Messungen wurden mit einem Gaschromatographen HP6890N plus mit einer Kapillarsäule HP5-MS inert und einem massenselektiven Detektor HP2973 MSD Agilent GmbH, Waldbronn, Deutschland) in Kombination mit einem Multi-Purpose-Sampler MPS2 (Gerstel GmbH, Mühlheim/Ruhr, Deutschland) durchgeführt. Die Instrumente wurden durch die Software ChemStation, Version D.00.01, Agilent) gesteuert. Trägergas war Helium (1ml/min). Folgendes Temperaturprogramm wurde angewendet: 2 min bei 70°C, dann auf 300°C mit 15°/min.

6. Versuche zum Nachweis von Disulfiram und seinen Metaboliten im Blut durch HPLC-DAD

Disulfiram erwies sich in der mobilen Phase (Phosphat-Puffer pH 2,3 / Acetonitril 33 : 67 v/v) als stabil, so dass ein charakteristisches UV-Spektrum der Reinsubstanz erhalten wurde (Abb. 3a). Desgleichen lässt sich auch das als innerer Standard vorgesehene Thiram unzersetzt messen. Die HPLC-DAD-Daten beider Substanzen sind bereits in der Datenbank enthalten [42]. Für die Analyse in Blutproben wurde als Probenvorbereitung die 1 : 1 Proteinfällung mit Acetonitril gewählt. 1 ml einer frisch entnommenen Blutprobe wurde mit 1 µg der Substanz versetzt. Nach einigen Minuten wurde 1 ml Acetonitril hinzugefügt, 1 min gevortext, zentrifugiert, der Überstand abgetrennt und 50 µl zur HPLC injiziert. Für beide Substanzen wurde nur ein Peak bei gleicher Retentionszeit (RRT = 1,16) erhalten, der nach Bibliothekssuche in der Datenbank als CS₂ identifiziert wurde (UV-Spektrum s. Abb. 3b). Offensichtlich werden beide Substanzen in Übereinstimmung mit der Literatur [15] in der isolierten Blutprobe sehr schnell reaktiv gespalten und weiter zu CS₂ und Diethylamin oder Dimethylamin abgebaut.

Die Instabilität der als Zwischenstufen auftretenden Dimethyldithiocarbamat- bzw. Diethyldithiocarbamat-Anionen wurde durch die Untersuchung der Natriumsalze bestätigt. Die lieferten bereits in der sauren mobilen Phase nur noch den CS₂-Peak. HPLC-DAD-Versuche mit einem neutralen Acetonitril-Wasser-Gemisch (50 : 50, v/v) führten zu keiner Veränderung, und auch die mit diesen Natriumsalzen versetzten Blutproben ergaben nach Proteinfällung nur den CS₂-Peak. Eine Erfassung des Primärmetaboliten Diethyldithiocarbamat von Disulfiram ist somit auf diesem Wege nicht möglich.

Hingegen erwiesen sich beide S-Methyl-Verbindungen sowohl in der mobilen Phase als auch in den Blutproben als stabil. Das UV-Spektrum des Disulfiram-Metaboliten S-Methyl-N,N-diethyl-dithiocarbamat ist in Abb. 3c dargestellt. Neben CS₂ ist daher dieser Metabolit für die Prüfung auf Disulfiram-Einnahme durch HPLC-DAD geeignet.

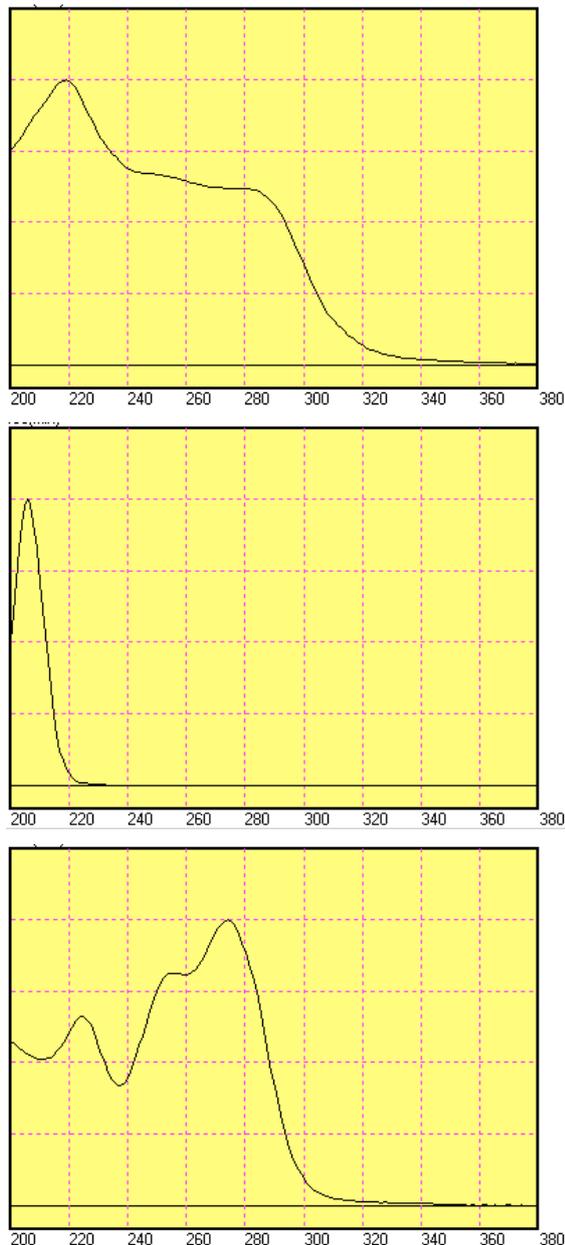


Abb. 3. UV-Spektren von

(a) Disulfiram, D083b, RRT = 0,736,
Mob. Phase B

(b) Schwefelkohlenstoff, C310, RRT =
1,159, mob. Phase A

(c) S-Methyl-N,N-diethyldithiocarbamat,
RRT = 2,395, mob. Phase A

in Phosphatpuffer pH 2,3 / Acetonitril 37 : 63
(v/v, B) bzw. 63 : 37 (v/v, A).

7. Untersuchung von Disulfiram und Metaboliten im Blut mittels GC-MS

Disulfiram konnte nicht unzersetzt durch GC-MS gemessen werden. Aus diesem Grunde und wegen der Instabilität des Wirkstoffs im Blut wurden vor allem die Metabolite untersucht.

S-Methyl-N,N-diethyl-dithiocarbamat ist aus Blut mit Dichlormethan extrahierbar und liefert nach Injektion in Ethylacetat eine stabiles Massenspektrum (Abb. 4). Für die Bestimmung im SIM Modus wurden folgende Massen ausgewählt: S-Methyl-N,N-diethyldithiocarbamat: m/z 163, 116 und 88; S-Methyl-N,N-dimethyldithiocarbamat (innerer Standard) 135, 88, 73.

Der primäre Methabolit Diethyldithiocarbamat und dessen Methylanalogen sind wegen ihres ionischen Zustandes nur nach Derivatisierung mittels GC-MS messbar. Als geeignetes Derivatisierungsreagenz bot sich Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) an, durch das im Injektor die entsprechenden S-Methylderivate entstehen. Blutproben wurden wie folgt aufgearbeitet:

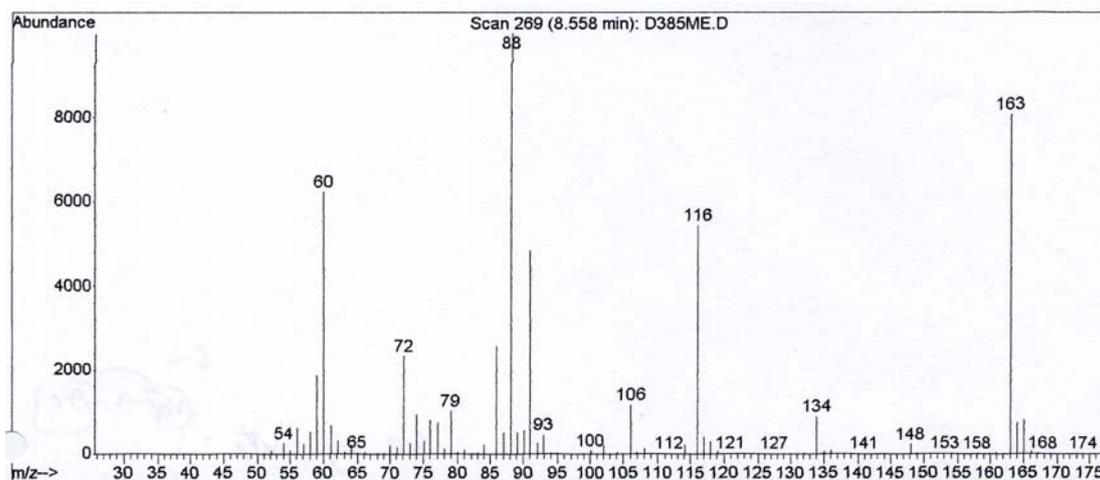


Abb. 4. Massenspektrum von S-Methyl-N,N-diethyldithiocarbamat

0,5 ml Blut wurden mit 0,5 ml Acetonitril versetzt, 1 min gevortext, zentrifugiert, 0,5 ml des Überstandes abgetrennt und im Stickstoffstrom bis zur Trocken eingedampft. Dann wurden 10 μ l einer Lösung von Natriumdimethyldithiocarbamat (1 mg/ml in Methanol) als innerer Standard und 50 μ l TMSH (0,25 M in Methanol, Firma Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) hinzugefügt. Hiervon wurde 1 μ l ins GC-MS injiziert. Zu beachten ist, dass das Methylierungsprodukt mit dem methylierten Metaboliten identisch ist, beide Substanzen können nach dieser Methode also nicht getrennt bestimmt werden.

Zur Untersuchung der Stabilität des Diethyldithiocarbamat-Anions im Blut wurden 5 ml einer frisch entnommenen Probe mit 25 μ l einer 1 μ g/ml Lösung des Na-Salzes in Methanol versetzt. Von dieser Probe wurden in Abständen von 30 jeweils 0,5 ml entnommen und nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Das Peakflächenverhältnis des Analyten zum inneren Standard ist in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt sich, dass bereits sofort nach dem Ansetzen (0 min) nur etwa 30 % der hinzugefügten Konzentration erfasst werden. Nach 150 min waren nur noch ca. 12 % erfassbar.

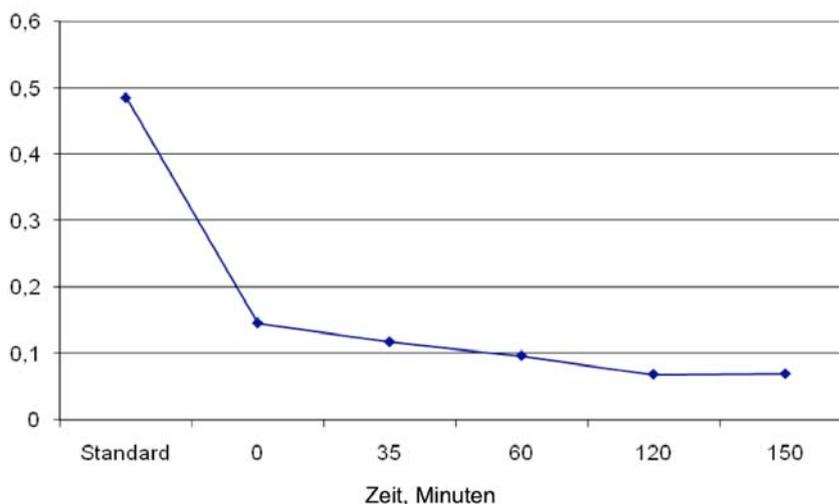


Abb. 5. Ausbeute der Bestimmung von N,N-Diethyldithiocarbamat aus gespikten Blutproben in Abhängigkeit von der Zeit nach der Dotierung

8. Versuche zum Nachweis von Disulfiram oder dessen Metaboliten im Haar

Zum Nachweis von Disulfiram oder dessen Metaboliten im Haar kam wegen der erforderlichen hohen Empfindlichkeit von den zur Verfügung stehenden Methoden nur GC-MS im SIM-Modus in Betracht. Weiterhin war wegen der Instabilität die Bestimmung des Wirkstoffs selbst und des N,N-Diethyldithiocarbamats wenig erfolgversprechend. Daher wurde versucht, CS₂ als Endprodukt des Abbaus dieser Substanzen zum Nachweis heranzuziehen. Falls Disulfiram oder N,N-Diethyldithiocarbamat im Haar eingelagert worden sind, sollte bei hydrolytischem Haaraufschluss CS₂ durch Headspace-GC-MS nachweisbar sein.

Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe des MultiPurpose-Samplers MPS2 im Headspace-Modus unter Verwendung von 10 ml Headspace Vials. Kapillarsäule und Temperaturprogramm wurden wie im Abschnitt 5 beschrieben beibehalten. Da CS₂ unter diesen Bedingungen eine sehr kurze Retentionszeit hatte, wurde das Solvent-Delay auf 0 min gesetzt. CS₂ wurde über die Molmasse und den zugehörigen Isotopenpeak $m/z = 76$ und 78 verfolgt. Als innerer Standard zur Kontrolle der Headspace-Bedingungen wurde das in der Luft vorhandene Argon ($m/z = 40$) herangezogen. Die Inkubationstemperatur betrug 45 °C und das Headspace-Injektionsvolumen 0,5 ml. Der Injektionsmodus war splitless.

CS₂ wird in basischer Lösung in erheblichem Maße zurückgehalten. Daher war es notwendig, die Lösungen zur Headspace-Bestimmung anzusäuern. Das gleiche trifft für biologische Materialien zu, in denen CS₂ im Neutralen und Basischen in erheblichem Maße unter Dithiocarbamatbildung an freie Aminogruppen gebunden ist [43,44].

Zur Kalibration wurden Bedingungen ähnlich des Haarausschlusses gewählt. 1 µl CS₂ wurde in 1 ml Ethylenglycol gelöst. Davon wurden 5, 10, 20, 50, 100 und 150 µl zu 1 ml 1 M NaOH aufgefüllt und in das Headspace-Gefäß gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen und bei 80°C 30 min inkubiert. Dann wurde mittels einer Spritze 1 ml 1 M HCl durch das Septum hinzugefügt und unter den oben genannten Bedingungen die Headspace-Messung vorgenommen. Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, wurde eine lineare Kalibrationskurve erhalten. Ohne Zugabe von HCl ergaben sich viel kleinere Peakflächen bei fehlender Linearität.

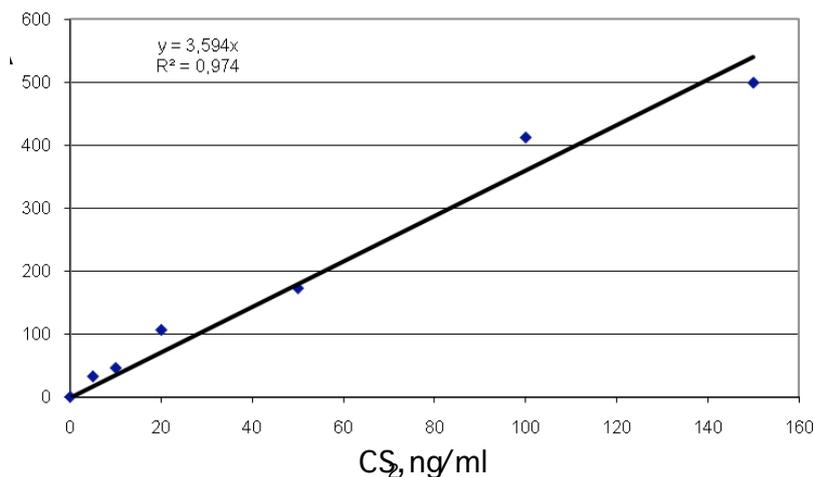


Abb. 6 Kalibrationskurve zur Bestimmung von CS₂ durch Headspace-GC-MS

Um zu überprüfen, in welchem Maße CS₂ aus Disulfiram und dessen Metaboliten durch NaOH unter den Bedingungen der Haarhydrolyse freigesetzt wird, wurden 10 µg der jeweiligen Substanz nach 30 min Reaktion mit 1 ml 1 M NaOH oder 1 ml 1 M HCl mittels HS-GC-MS untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Es bestätigt sich, dass die Messungen unter sauren Bedingungen vorgenommen werden müssen.

Tabelle 1. Mengen an CS₂, die unter basischen und sauren Bedingungen aus Disulfiram und dessen Metaboliten freigesetzt und mit HS-GC-MS bestimmt wurden.

Substanz	CS ₂ , pg/μg aus 1 M NaOH	CS ₂ , pg/μg aus 1 M HCl
Disulfiram	0,7	32,6
Natrium-N,N-diethyldithiocarbamat	2,0	176,9
S-Methyl-N,N-diethyldithiocarbamat	6,6	170,5

Für die Untersuchung der Haarproben lieferte folgende Verfahrensweise die besten Ergebnisse: 100 mg Haar wurden im 10 ml Headspace Gefäß mit 1 mL 1 M NaOH versetzt und das verschlossene Gefäß 30 min bei 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml 1 M HCl injiziert und die HS-GC-MS-Messung wie beschrieben durchgeführt. Es wurden zunächst 7 Haarproben mit verschiedener Farbe von Probanden ohne Disulfiram-Einnahme untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Es ergaben sich überraschenderweise für alle Proben gut messbare CS₂-Konzentrationen.

Tabelle 2. Konzentrationen an CS₂, freigesetzt beim Aufschluss von Haarproben mit 1 M NaOH und anschließender Zugabe von HCl von Probanden ohne Disulfiram-Einnahme.

Proband	Haarfarbe	CS ₂ im Haar, pg/mg
1	schwarz	324
2	dunkelbraun	367
3	dunkelbraun	390
4	grau (braun + weiß)	307
5	grau (dunkelbraun + weiß)	300
6	mittelblond	331
7	weiß	364

Diese Konzentrationen liegen erheblich über den in Tabelle 1 angegebenen Werten für den Zusatz von 10 μg Disulfiram oder seiner Metabolite. Daher führte auch die Untersuchung von diesen Haarproben nach Zugabe von 10 μg zu keiner signifikant feststellbaren Erhöhung der Messwerte. Auf 100 mg Haar bezogen entsprechen 10 μg einer Konzentration von 100 ng/mg, die in Praxis auch sicher nie im Haar erwartet werden konnten.

Als Quelle für das CS₂ ist vor allem das Cystin des Keratins anzusehen. Während für die Freisetzung bei der alkalischen Hydrolyse von Haar in der Literatur keine Angaben gefunden wurden, ist die Bildung bei der Pyrolyse von Haar bereits bekannt [45,46].

Die Bestimmung von CS₂ im Haar erwies sich somit nicht als ein geeigneter Weg, um die Einnahme oder Beibringung von Disulfiram zu beweisen. Insgesamt musste daher der Versuch, die Haaranalyse für diese Zwecke zu nutzen, mit den zur Verfügung stehenden Methoden aufgegeben werden.

9. Ergebnisse der Falluntersuchungen

Fall 1:

In der Blutprobe der Betroffenen konnte weder Disulfiram noch dessen Metabolite identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Literatur [6-8] ist die Wirkstoffabgabe aus solchen Implantaten im nekrotisierten Gewebe viel zu klein um eine messbare und letztlich auch

wirksame Blutkonzentration zu ermöglichen. Für die Todesursache war der Wirkstoff somit nicht relevant, insbesondere auch insofern nicht, als dass keine Blutalkoholkonzentration zum Zeitpunkt des Todeseintritts festgestellt wurde. Die CS₂-Konzentration im Haar lag im Bereich der anderen Haarproben und war, wie oben gezeigt, für eine Aussage hinsichtlich einer chronischen Einnahme von Disulfiram nicht relevant.

Fall 2:

Bei der Untersuchung der Blutprobe mittels HPLC-DAD nach Extraktion mit Dichlormethan wurde eindeutig Disulfiram im Blut nachgewiesen. Das Chromatogramm in der mobilen Phase B (Phosphatpuffer pH 2,3 Acetonitril 33 : 67 v/v) ist in Abb. 7 dargestellt. Die Bibliothekssuche für den Peak bei 8,823 min ergab Disulfiram mit einer Similarity zum Bibliotheksspektrum von 0,9997 und genauer Übereinstimmung der Retentionszeit mit der Referenzsubstanz. Die semiquantitative Bestimmung nach der Methode der Standardaddition lieferte eine Konzentration von 0,085 µg/ml.

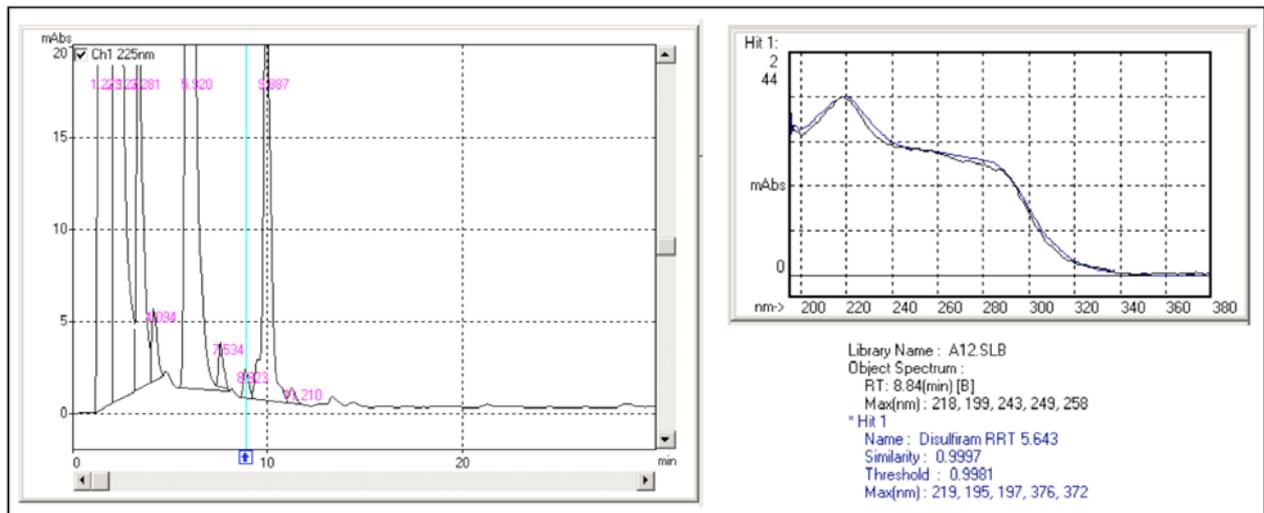


Abb. 3. HPLC-DAD-Chromatogramm (CH₂Cl₂-Extraktion, mobile Phase B) der Blutprobe im Fall 2 und Ergebnis der Bibliothekssuche für den Peak bei 8,823 min.

Nach Literaturangaben [47] wurde 5 h nach einer einmaligen Einnahme von 500 mg 0,38 µg/ml gemessen. Patienten mit einer täglichen Dosis von 200 mg wiesen 12 h nach der Einnahme Blutkonzentrationen von 0,27-1,43 µg/ml auf. Somit befindet sich der gemessene Wert eher im unteren Bereich der therapeutischen Konzentrationen. Andererseits bleibt wegen der Instabilität in Blutproben ungeklärt, ob die festgestellte Konzentration mit der zum Zeitpunkt des Todeseintritts vorgelegenen übereinstimmte. Bei Patienten in Disulfiramtherapie beginnen die toxischen Symptome bereits bei einer Blutalkoholkonzentration von 0,1 ‰ und sind bei 0,5 ‰ voll ausgeprägt [46]. Bei 1,2-1,5 ‰ tritt in der Regel Bewusstlosigkeit ein.

Insgesamt ist im vorliegenden Fall die Blutalkoholkonzentration von 4,2 ‰ schon für sich ausreichend, den Tod des Betroffenen herbeizuführen, das zusätzlich nachgewiesene Disulfiram sollte aber zumindestens eine den Todeseintritt begünstigende Wirkung gehabt haben.

Fall 3 und Fall 4

Aufgrund der Probleme beim Nachweis von Disulfiram im Haar konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden kein Beitrag zur Klärung dieser beiden Fälle geleistet werden.

10. Literatur

- [1] J. Mutschler, A. Diel, F. Kiefer. Klinische Pharmakologie von Disulfiram – eine aktuelle Übersicht. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 76 (2008) 225-231.
- [2] M. Amadoe, A. Gazdar. Sudden death during disulfiram-alcohol reaction. *J. Stud. Alcohol* 13 (1952) 16-26.
- [3] M.J. Heath, J.V. Pachar, A.L. Perez Martinez, P.A. Toseland. An exceptional case of lethal disulfiram-alcohol reaction. *Forensic Sci. Int.* 56 (1992) 45-50.
- [4] A. M. Kellam, J. M. Wesolkowski. Disulfiram implantation for alcoholism. *Lancet* 1 (1968) -925-926.
- [5] J. Johnsen, A. Stowell, T. Stensrud, A. Ripel, J. Mørland. A double-blind placebo controlled study of healthy volunteers given a subcutaneous disulfiram implantation. *Pharmacol. Toxicol.* 66 (1990) 227-230.
- [6] J. Johnsen, J. Mørland. Disulfiram implant: a double-blind placebo controlled follow-up on treatment outcome. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15 (1991) 532-536.
- [7] J. Johnsen, J. Mørland. Depot preparations of disulfiram: experimental and clinical results. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 369 (1992) 27-30.
- [8] J. Cobby, M. Mayersohn and S. Selliah. Methyl-diethyldithiocarbamate, a metabolite of disulfiram in man. *J. Pharmacol. Life Science* 21 (1977) 937-942.
- [9] J. Kaslander. Formation of an S-glucuronide from tetraethylthiuram disulfide (Antabuse) in man. *Biochim. Biophys. Acta.* 71(1963) 730–731.
- [10] T. Gessner, M. Jakubowski. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester- A metabolite of disulfiram. *Biochem Pharma* 21 (1972) 219-230.
- [11] B.W. Hart, M. D- Faiman. In vitro and in vivo inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by S-methyl N,N-diethyldithiocarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram. *Biochem Pharmacol* 43 (1992) 403-406.
- [12] A. Madan, M.D. Faiman. Characterization of diethyldithiocarbamate methyl ester sulfine as an intermediate in the bioactivation of disulfiram. *J Pharmacol Exp Ther* 272 (1995) 775-780.
- [13] A. Madan, A. Parkinson, M.D. Faiman. Identification of the human P-450 enzymes responsible for the sulfoxidation and thiono-oxidation of diethyldithiocarbamate ethyl ester : Role of P-450 enzymes in disulfiram bioactivation. *Alcohol Clin Exp Res* 22 (1998) 1212-1219.
- [14] M.D. Faiman, J.C. Jensen, R.B. Lacoursiere. Elimination kinetics of disulfiram in alcoholics after single and repeated doses. *Clin. Pharm. Ther.* 36 (1984) 520-526.
- [15] J. Cobby, M. Mayersohn, S. Selliah. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202 (1977) 724-730.
- [16] H. Linderholm and K. Berg. A method for determination of tetraethylthiuram disulfide (Antabus, Abstynyl) and diethyldithiocarbamate in blood and urine. Some studies on the metabolism of tetraethylthiuram disulfide. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 3 (1951) 96-102.
- [17] K.J. Divatia, C.H. Hine and T.N. Burbirge. A simple method for the determination of tetraethylthiuram disulfide (Antabus) and blood levels obtained experimentally in animals and clinically in man. *J. Lab. Clin. Med.* 39 (1952) 974-982.
- [18] S.L. Tompsett. The determination of disulfiram (Antabus) in blood and urine. *Acta Pharm. Tox.* 21 (1964) 20-22.
- [19] A.M. Sauter, J.P. von Wartburg. Quantitative analysis of disulfiram and its metabolite in human blood . *Arz. Forsch.* 26 (1976) 173-177.
- [20] W.K. Rogers, K.M. Wilson, C.E. Becker. Methods of detecting disulfiram in biologic fluids: application in studies of compliance and effect of divalent cations on bioavailability. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 2 (1978) 375-380.
- [21] A.V. Kovatsis. Progress in indirect atomic absorption spectroscopy. In *Human Toxicology* (A. Heyndrickx, ed.), European Press, Gehent, 1978, pp. 47-61.
- [22] F.K. Martens and A. Heyndrickx. Analysis of sodium diethyldithiocarbamate (NaDEDIC), a metabolite of tetraethylthiuram disulfide (TETD) in human serum and urine *J. Anal. Tox.* 2 (1978) 269-274.
- [23] W.J. Davidson and A. Wilson. Determination of nanogram quantities of disulfiram in human and rat plasma by gas-liquid chromatography . *J. Stud. Al.* 40 (1979) 1073-1077.
- [24] A.M. Sauter and J.P. von Wartburg. Quantitative analysis of disulfiram and its metabolite in human blood by gas-liquid chromatography. *J. Chrom.* 133 (1977) 167-172.

- [25] J.C. Jensen and M.D. Faiman. Determination of disulfiram and metabolites from biological fluids by HPLC. *J. Chrom.* 181 (1980) 407-416.
- [26] P.D. Masso and P.A. Karmer. Simultaneous determination of disulfiram and two of its metabolites in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom.* 224 (1981) 457-464.
- [27] B. Johansson. Rapid and sensitive on-line precolumn purification and high-performance liquid chromatography assay for disulfiram and its metabolite. *J. Chrom.* 378 (1986) 419-429.
- [28] H. Irth, G.J. deJong, V.A.T. Brinkman, R.W. Frei. Determination of disulfiram and two of its metabolites in urine by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom.* 424 (1988) 95-102.
- [29] D.H. Neiderhiser, R.K Fuller, L.J. Heijduk, H.P. Roth. Method for the detection of diethylamine, a metabolite of disulfiram, in urine. *J. Chrom.* 117 (1976) 187-192.
- [30] D.H. Neiderhiser, R.K Fuller. HPLC method for the determination of diethylamine, a metabolite of disulfiram, in urine. *J. Chrom.* 229 (1982) 470-474.
- [31] M. Kraml. A rapid test for Antabuse ingestion. *Can. Med. Asso. J.* 109 (1973) 578.
- [32] S.M. Paulson, S. Krause, F.L Iber. Development and evaluation of a compliance test for patients taking disulfiram. *Johns Hopkins Med. J.* 141 (1977) 119-125.
- [33] L. Jin, M.R. Davis, P. Hu, T.A. Baillie. Identification of novel glutathione conjugates of Disulfiram and diethyldithiocarbamate in rat bile by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 7 (1994) 526-533.
- [34] Pei Hu, Lixia Jin, T.A. Baillie. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary *N*-acetylcysteine conjugates. *J. Pharm. Exp. Ther.* 281 (1997) 611-617.
- [35] F. Brugnone, G. Maranelli, S. Zotti, P. De Paris, S. Caroldi, A. Betta. Blood concentration of CS₂ in normal subjects and in alcoholic subjects treated with disulfiram. *British J. Industrial Med.* 49 (1992) 658-663.
- [36] D.J. Johanson, D.G. Graham, V. Amarnath, K. Amarnath, W. M. Valentine. Determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid as index of the in vivo release of CS₂ by dithiocarbamate. *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 910-916.
- [37] T. Weis, J. Hardt, J. Angerer. Determination of urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid after exposure to alkylene bisdithiocarbamate using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 726 (1999) 85-94.
- [38] W. M. Valentine, H. L. Valentine, V. Amarnath, K. Amarnath. Toluene-3,4-dithiol analysis of blood for assessing carbon disulfide exposure. *Toxicol. Sci.* 50 (1999) 155-163.
- [39] D. J. Johanson, H. Valentine, V. Amarnath, K. Amarnath and W. M. Valentine. Characterizing the influence of structure and route of exposure on the disposition of dithiocarbamate using toluene-3,4-dithiol analysis of blood urinary carbon disulfide metabolites. *Toxicol. Sci.* 76 (2003) 65-74.
- [40] F. Pragst, M. Herzler, B. T. Erxleben. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 1325-1340.
- [41] F. Pragst, M. Herzler, B. T. Erxleben. Systematic toxicological analysis by HPLC-DAD. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 1325-1340.
- [42] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T. Erxleben, M. Rothe. UV-Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons. Book and CD. Heppenheim: Edition Dieter Helm, 2001:1034pp. Supplement 2007, Berlin: Edition Toxicological Chemistry, 2008, 407 pp.
- [43] F. Brugnone, G. Maranelli, S. Zotti, I. Zanella, P. De Paris, S. Caroldi, A. Betta. Blood concentration of carbon disulphide in "normal" subjects and in alcoholic subjects treated with disulfiram. *Br. J. Ind. Med.* 49 (1992) 658-663.
- [44] L. Perbellini, G. Maranelli, F. Lombardini, G. Gandini, F. Brugnone. Carbon disulfide in blood: a method for storing and analysing samples. *Med. Lav.* 85 (1994) 171-178.
- [45] S.Y. Choi, M.G. Kim, H. Inoue. Determination of sulfur in biologically important substances by pyrolysis-gas chromatography. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 32 (1995) 127-136.
- [46] M. Ohsawa, H. Ohtani, S. Tsuge. Determination of sulfur containing amino acids in proteins by pyrolysis-gas chromatography with flame photometric detection. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329 (1988) 781-785.
- [47] R. C. Baselt. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 7th edition. Biomedical Publications, Foster City, California 2004. Chapter Disulfiram, pp. 372-374.