

**Einsatzmöglichkeiten der Headspace-Festphasenmikroextraktion
(HS-SPME) zum Nachweis von forensisch-toxikologisch relevanten
Verbindungen in biologischen Matrices**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Heike Pauline Junker

aus

Rheine

Bonn 2004

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Glombitza

2. Referent: Prof. Dr. med. Burkhard Madea

Tag der Promotion:

**Gewidmet meinem Mann Thorsten,
der mit unendlicher Geduld und Verständnis stets für mich da war
und mir immer wieder die nötige Motivation gab.**

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Madea für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn durchführen zu dürfen.

Für die Übernahme der Betreuung seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät danke ich Herrn Prof. Dr. K. W. Glombitza vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter der toxikologischen Abteilung, Dr. F. Musshoff für die fachliche Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. L. Kröner und meinem Kollegen Dr. Dirk Lachenmeier möchte ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung danken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der toxikologischen Abteilung für die freundliche Integration in die Abteilung sowie die vielseitige Unterstützung, insbesondere bei der Arbeit mit der GC/MS-Technik, bedanken: Jörg Bayer, Leonid Janzen, Lilo Knippenberg, Ute Mays, Diana Meyer, Sandra Lade, Jens Müller, Petra Pfeiffer, Maja Seibel, Simone Willms.

Publikationen

F. Musshoff, H. Junker, B. Madea:

Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace SPME and GC-MS.

Clin. Chem. Lab. Med. 1999, 37:639-642.

F. Musshoff, H. Junker, B. Madea

Rapid analysis of Halothane in Biological Samples using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry- A Case of a Double Homicide.

J. Anal. Toxicol. 2000, 24:372-376.

F. Musshoff, H. Junker, B. Madea:

Simple Determination of 22 Organophosphorus Pesticides in Human Blood Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gaschromatography with Mass Spectrometric Detection.

J. Chromatogr. Sci. 2002, 40:29-34.

F. Musshoff, H. Junker, D. Lachenmeier, L. Kröner, B. Madea:

Fully Automated Determination of Amphetamines and Synthetic Designer Drugs in Hair Samples Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

J. Chromatogr. Sci. 2002, 40:359-364.

F. Musshoff, H. Junker, D. Lachenmeier, L. Kröner, B. Madea:

Fully Automated Determination of Cannabinoids in Hair Samples using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

J. Anal. Toxicol. (2002), 26:1-6.

F. Musshoff, H. Junker, B. Madea:

An unusual case of driving under the influence of enflurane.

Forensic Sci. Int. (2002), 128:187-189.

Tagungsbeiträge

H. Junker, D. Lachenmeier, L. Kröner, F. Musshoff, B. Madea

Vollautomatisierte Bestimmung von Drogen in Haarproben mittels alkalischer Hydrolyse sowie Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) mit Derivatisierung auf der Faser und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).

Tagungsband des XII. Symposiums der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, 26. – 28. April 2001, Mosbach (Baden).

Poster

F. Musshoff, H. Junker, B. Madea:

Einfaches Screening auf Organophosphate in biologischem Material mittels HS-SPME und GC-MS.

XI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, 22. – 24. April 1999, Mosbach (Baden).

H. Junker, F. Musshoff, B. Madea:

Einfaches Screening auf Organochlor-Pestizide in biologischem Material mittels HS-SPME und GC-MS.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie, 08. – 09. Oktober 1999, Koblenz.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Veröffentlichungen.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Verzeichnis der Tabellen.....	VIII
Verzeichnis der Abbildungen.....	X
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	XV

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Ziel der Arbeit	2
1.3	Stand der Technik	2
1.3.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion	2
1.3.2	Festphasenextraktion	3
1.3.3	Extraktion mit überkritischen Fluiden	4
1.3.4	Headspace-Extraktion	4
2	Headspace-Festphasenmikroextraktion	6
2.1	Beschreibung der Methode	6
2.2	Theoretische Aspekte der HS-SPME	11
2.2.1	Gleichgewichtstheorie	11
2.2.2	Kinetische Theorie	13
2.3	SPME-Probenahmetechniken	15
2.3.1	Direktimmersion	16
2.3.2	Headspace-SPME	16
2.3.3	Extraktion mit membrangeschützter Faser	17
2.4	Derivatisierung	17
2.5	Kopplung der SPME mit anderen Analysetechniken	19
2.6	Extraktionsparameter	20
2.6.1	Henry'sche Konstante	20
2.6.2	Octanol/Wasser-Koeffizient	21
2.6.3	Faserbeschichtung	21
2.6.4	Extraktionstemperatur	23
2.6.5	Extraktionszeit	24
2.6.6	Probendurchmischung	25
2.6.7	pH-Wert	27
2.6.8	Salzzusätze	27
2.6.9	Organische Lösemittel	29
2.6.10	Eintauchtiefe der Faser in das Probengefäß	30
2.6.11	Probenvolumen	30
2.6.12	Desorptionsbedingungen	31
3	Gaschromatographie / Massenspektrometrie	33
3.1	Grundlagen zur Kapillargaschromatographie	33
3.2	Grundlagen zur Massenspektrometrie	34
3.2.1	Prinzip	34
3.2.2	Ionisierungsmethoden	34
3.2.2.1	Elektronenstoßionisation	35
3.2.2.2	Chemische Ionisation	36

3.2.3	Registrierung der Ionen.....	37
3.2.3.1	Full Scan Modus.....	37
3.2.3.2	Selected Ion Monitoring.....	38
4	Experimenteller Teil.....	39
4.1	Materialien und Methoden.....	39
4.1.1	Chemikalien.....	39
4.1.2	Vergleichssubstanzen.....	39
4.1.3	Geräte.....	40
4.1.3.1	SPME.....	40
4.1.3.2	Gaschromatographie/Massenspektrometrie.....	41
4.1.4	Probenmaterial (Asservierung und Vorbehandlung).....	43
4.2	Optimierung der SPME-Methoden.....	44
4.2.1	Inkubations- und Extraktionstemperatur.....	44
4.2.2	pH-Wert.....	45
4.2.3	Salzzusätze.....	45
4.2.4	Extraktionszeit.....	45
4.2.5	Probendurchmischung.....	45
4.2.6	Eintauchtiefe der Faser in das Vial.....	45
4.2.7	Injektortemperatur.....	46
4.2.8	Eintauchtiefe der Faser in den Injektor.....	46
4.2.9	Desorptionszeit.....	46
4.2.10	Derivatisierung.....	46
4.3	Nachweis und Quantifizierung.....	47
4.4	Validierung.....	47
4.4.1	Peakreinheit und Selektivität.....	47
4.4.2	Linearität der Kalibration.....	47
4.4.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	48
4.4.4	Präzision.....	48
4.4.5	Genauigkeit.....	49
4.4.6	Wiederfindungen.....	49
4.5	Statistische Berechnungen.....	50
4.5.1	Korrelationskoeffizient.....	50
4.5.2	Standardabweichung.....	51
4.5.3	Relative Standardabweichung.....	51
4.6	Durchführung der Analysen.....	51
4.6.1	Inhalationsnarkotika.....	52
4.6.2	Organophosphate.....	53
4.6.3	Organochlor-Pestizide.....	55
4.6.4	Cannabinoide und Opioide aus Haaren.....	56
4.6.5	Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom Amphetamin-Typ aus Haaren.....	58

4.6.6	Trizyklische Antidepressiva.....	59
4.6.7	Injektionsnarkotika.....	61
5	Ergebnisse und Diskussion.....	63
5.1	Allgemeine Erläuterungen.....	63
5.2	Inhalationsnarkotika.....	63
5.2.1	Allgemeine Erläuterungen.....	63
5.2.2	Optimierung der SPME-Parameter.....	65
5.2.3	Validierung.....	69
5.2.4	Anwendung der Methode auf reale Proben.....	70
5.3	Pestizide.....	75
5.3.1	Allgemeine Erläuterungen.....	75
5.3.2	Organophosphate.....	75
5.3.2.1	Optimierung der SPME-Parameter.....	78
5.3.2.2	Validierung.....	83
5.3.3	Organochlor-Pestizide.....	88
5.3.3.1	Optimierung der SPME-Parameter.....	89
5.3.3.2	Validierung.....	95
5.4	Nachweis psychoaktiver Verbindungen in Haaren.....	99
5.4.1	Allgemeine Erläuterungen.....	99
5.4.2	Cannabinoide.....	100
5.4.3	Methadon und EDDP.....	101
5.4.4	Codein und Dihydrocodein.....	102
5.4.4.1	Derivatisierung.....	104
5.4.4.2	Optimierung der SPME-Parameter.....	106
5.4.4.3	Validierung.....	115
5.4.4.4	Anwendung der Methode auf reale Proben.....	118
5.4.5	Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom Amphetamintyp.....	120
5.4.5.1	Derivatisierung.....	122
5.4.5.2	Optimierung der SPME-Parameter.....	123
5.4.5.3	Validierung.....	130
5.4.5.4	Anwendung der Methode auf reale Proben.....	133
5.5	Trizyklische Antidepressiva.....	135
5.5.1	Allgemeine Erläuterungen.....	135
5.5.2	Optimierung der SPME-Parameter.....	136
5.5.3	Validierung.....	147
5.6	Injektionsnarkotika.....	151
5.6.1	Allgemeine Erläuterungen.....	151
5.6.1.1	Barbiturate.....	151
5.6.1.2	Ketamin.....	151
5.6.1.3	Etomidat.....	152

5.6.1.4	Propofol.....	153
5.6.1.5	Benzodiazepine.....	153
5.6.2	Optimierung der SPME-Parameter.....	155
5.6.3	Validierung.....	160
5.6.4	Anwendung der Methode auf reale Proben.....	164
5.7	Zusammenfassung (Ergebnisse und Diskussion).....	166
5.7.1	Auswahl der SPME-Faser.....	166
5.7.2	Inkubations- und Extraktionstemperatur.....	166
5.7.3	pH-Wert.....	167
5.7.4	Salzzusätze.....	167
5.7.5	Extraktionszeit.....	167
5.7.6	Probendurchmischung.....	168
5.7.7	Eintauchtiefe der Faser in das Vial.....	168
5.7.8	Injektortemperatur.....	168
5.7.9	Eintauchtiefe der Faser in den Injektor.....	168
5.7.10	Desorptionszeit.....	169
5.7.11	Derivatisierung.....	169
6	Zusammenfassung.....	171
7	Fazit.....	174
8	Literaturverzeichnis.....	176
9	Anhang.....	188
9.1	Inhalationsnarkotika.....	188
9.2	Organophosphate.....	191
9.3	Organochlor-Pestizide.....	199
9.4	Cannabinoide.....	207
9.5	Opioide.....	209
9.6	Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom Amphetamintyp.....	211
9.7	Trizyklische Antidepressiva.....	215
9.8	Injektionsnarkotika.....	220

Verzeichnis der Tabellen

	Seite
Tabelle 1: Kommerziell erhältliche SPME-Fasern und deren Anwendungsmöglichkeiten (Angaben des Herstellers).....	23
Tabelle 2: Standardmäßige SPME- und GC-Bedingungen zu Beginn einer jeden Methodenoptimierung. Die Angaben in Klammern gelten für die manuelle SPME.....	44
Tabelle 3: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Inhalationsnarkotika.....	52
Tabelle 4: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Organophosphate.....	54
Tabelle 5: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Organochlor-Pestizide.....	56
Tabelle 6: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der TMS-Derivate der untersuchten Cannabinoide, Opioide und den entsprechenden deuterierten internen Standards.....	57
Tabelle 7: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der TFA-Derivate von Amphetamin, synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp und den entsprechenden deuterierten internen Standards.....	59
Tabelle 8: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten trizyklischen Antidepressiva.....	60
Tabelle 9: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Injektionsnarkotika.....	62
Tabelle 10: Methodenparameter zum Nachweis von Inhalationsnarkotika in biologischen Matrices mittels manueller SPME.....	69
Tabelle 11: Daten zur Reproduzierbarkeit des Nachweises von Halothan in biologischen Matrices mittels manueller SPME.....	70
Tabelle 12: Halothankonzentrationen, die mittels konventioneller Headspace-GC/FID bzw. HS-SPME/GC-MS nach einem Doppelmord in Blut, Urin, Mageninhalt, Niere, Leber, Galle und Hirn gefunden wurden.....	71
Tabelle 13: Ergebnisse der toxikologischen Analyse der Blutprobe des beeinträchtigten Fahrers.....	73
Tabelle 14: Methodenparameter zum Nachweis von Organophosphaten in biologischen Matrices mittels manueller SPME.....	82
Tabelle 15: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten und Nachweisgrenzen der untersuchten Organophosphate bei Verwendung der manuellen SPME.....	85
Tabelle 16: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Organophosphaten in Blut mittels manueller SPME.....	86
Tabelle 17: Absolute Wiederfindungen der untersuchten Organophosphate bei Verwendung der manuellen SPME.....	87
Tabelle 18: Methodenparameter zum Nachweis von Organochlor-Pestiziden in biologischen Matrices mittels manueller SPME.....	95
Tabelle 19: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten und Nachweisgrenzen der untersuchten Organochlor-Pestizide bei Verwendung der manuellen SPME.....	96
Tabelle 20: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Organochlor-Pestiziden in Blut mittels manueller SPME.....	97
Tabelle 21: Absolute Wiederfindungen der untersuchten Organochlor-Pestizide.....	98

Tabelle 22:	Literaturübersicht zum Nachweis von Cocain, Benzoyllecgonin, Cannabinoiden, Methadon und EDDP mittels SPME.....	103
Tabelle 23:	Optimierte SPME-Parameter zum Nachweis von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC in Haaren.....	115
Tabelle 24:	Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC bei Verwendung der automatisierten SPME.....	116
Tabelle 25:	Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC in Haaren bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen.....	117
Tabelle 26:	Absolute Wiederfindungen von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC.....	118
Tabelle 27:	Cannabinoid-Konzentrationen, die in Haarproben von 25 Drogenkonsumenten ¹ gefunden wurden.....	118
Tabelle 28:	Literaturübersicht zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp in unterschiedlichen Matrices mittels SPME.....	122
Tabelle 29:	Methoden-Parameter zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ in Haaren mittels automatisierter SPME.....	130
Tabelle 30:	Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG/BG) von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ bei Verwendung der automatisierten SPME.....	131
Tabelle 31:	Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ in Haaren bei drei unterschiedlichen Konzentrationen.....	132
Tabelle 32:	Absolute Wiederfindungen von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ.....	133
Tabelle 33:	Konzentrationen von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ, die in Haarproben von 20 Drogenkonsumenten ¹ gefunden wurden.....	134
Tabelle 34:	Methodenparameter zum Nachweis von trizyklischen Antidepressiva in biologischen Matrices mittels manueller SPME.....	146
Tabelle 35:	Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG/BG) der untersuchten trizyklischen Antidepressiva.....	148
Tabelle 36:	Daten zur Reproduzierbarkeit des Nachweises der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus Blut mittels automatisierter SPME bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen.....	149
Tabelle 37:	Absolute Wiederfindungen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei Verwendung der automatisierten SPME bei 2 unterschiedlichen Konzentrationen.....	150
Tabelle 38:	Methoden-Parameter zum Nachweis von Injektionsnarkotika in biologischen Matrices mittels automatisierter SPME.....	160
Tabelle 39:	Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG,BG) der untersuchten Injektionsnarkotika.....	162
Tabelle 40:	Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Injektionsnarkotika in biologischen Matrices bei drei unterschiedlichen Konzentrationen.....	163
Tabelle 41:	Absolute Wiederfindungen der untersuchten Injektionsnarkotika.....	164
Tabelle 42:	Propofolkonzentrationen, die mittels automatisierter SPME in Herzblut bzw. Blut, Gehirn und Lunge zweier Leichen gefunden wurden.....	165

Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: SPME-Faserhalter für die manuelle und die automatische Probenahme bzw. HPLC-Analyse.....	7
Abbildung 2: SPME-Probenahmetechniken.....	8
Abbildung 3: Versuchsanordnung bei der manuellen SPME. (1 = Heizrührer, 2 = Gefäß-Puck, 3 = manueller SPME-Faserhalter, 4 = digitales Kontaktthermometer).....	9
Abbildung 4: Mehrzweckprobengeber CombiPAL der Firma CTC Analytics, montiert auf einem Gaschromatographen (Modell 6890 Serie II Plus) der Firma Agilent. (1 = Bedienpanel, 2 = beweglicher Roboterarm, 3 = Agitator, 4 = Halter für Probenvials).....	10
Abbildung 5: Strukturformeln von Halothan, Enfluran und Isofluran.....	63
Abbildung 6: Strukturformeln von Chloroform und Diethylether.....	64
Abbildung 7: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Extraktionsausbeute von Halothan aus dotierten Blutproben (4,7 µg/mL).....	65
Abbildung 8: Einfluss verschiedener Zusätze auf die Extraktionsausbeute von Halothan aus dotierten (4,7µg/mL) Blutproben. (ohne = keine Zusätze, AS = Ammoniumsulfat, S = Schwefelsäure).....	66
Abbildung 9: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeute von Halothan aus dotierten (4,7 µg/mL) Blutproben.....	67
Abbildung 10: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierte Menge von Halothan.....	67
Abbildung 11: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC auf die desorbierte Menge von Halothan.....	68
Abbildung 12: Vergleich der SIM-Chromatogramme einer dotierten Blutprobe (4,7 µg/mL, schwarze Linie) und einer nicht dotierten Leerblutprobe (rote Linie).....	69
Abbildung 13: Strukturformeln der untersuchten Organophosphate.....	77
Abbildung 14: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organophosphate aus dotierten Blutproben (1 µg/mL), demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.....	78
Abbildung 15: Einfluss der Absorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organophosphate aus dotierten Blutproben (1 µg/mL), demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.....	79
Abbildung 16: Einfluss von Salzzusätzen auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organophosphate aus dotierten Blutproben (1 µg/mL), demonstriert am Beispiel von Chlorfenvinphos, Chlorpyriphos, Bromophos-methyl und Bromophos-ethyl. (ohne = keine Zusätze, AS = Ammoniumsulfat, S = Schwefelsäure).....	80
Abbildung 17: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen der untersuchten Organophosphate, demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.....	81
Abbildung 18: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC auf die desorbierten Mengen der untersuchten Organophosphate, demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.....	82

Abbildung 19: Vergleich der SIM-Chromatogramme von zwei mit Organophosphaten dotierten Blutproben (1 µg/g, schwarze Linie) mit dem Chromatogramm einer undotierten Leerblutprobe (rote Linie). (a) 1 = Dichlorvos, 2 = Mevinphos, 3 = Azobenzen, 4 = Diazinon, 5 = Parathion-methyl, 6 = Malathion, 7 = Chlorpyriphos, 8 = Chlorfenvinphos, 9 = Bromophos-ethyl; (b) 1 = Azobenzen, 2 = Disulfoton, 3 = Fenthion, 4 = Parathion-ethyl, 5 = Bromophos-methyl, 6 = Quinalphos, 7 = Edifenphos.....	84
Abbildung 20: Strukturformeln der untersuchten Organochlor-Pestizide und des internen Standards 2,4-Dichlor-1-naphthol.....	89
Abbildung 21: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeute der untersuchten Organochlor-Pestizide aus dotierten Blutproben (20 bzw. 100 ng/mL), demonstriert am Beispiel von γ-HCH, Heptachlor-exo-epoxid, Dieldrin, o,p'-DDD, Endosulfan-sulfat, Methoxychlor und Endrin.....	90
Abbildung 22: Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus jeweils 0,5 mL dotiertem Vollblut (20 bzw. 100 ng/mL) unter Zusatz von je 2 mL Wasser (W), 1 M Natronlauge (N) bzw. 0,1 M Schwefelsäure (S), demonstriert am Beispiel von δ-HCH, Heptachlor, Aldrin, o,p'-DDD, β-Endosulfan und Methoxychlor.....	91
Abbildung 23: Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus jeweils 0,5 mL dotiertem Vollblut (20 bzw. 100 ng/mL) unter Zusatz von jeweils 2 mL 0,1 M Schwefelsäure (S) und 0,2 g NaCl bzw. Ammoniumsulfat (AS) mit den Extraktionsausbeuten einer dotierten Probe mit alleinigem Schwefelsäure-zusatz, demonstriert am Beispiel von Lindan, Heptachlor-exo-epoxid, Dieldrin, o,p'-DDE, Endosulfan-sulfat und Methoxychlor.....	92
Abbildung 24: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus 0,5 mL dotiertem Vollblut (20 bzw. 100 ng/mL), demonstriert am Beispiel von α-HCH, Heptachlor, Aldrin, o,p'-DDE, α-Endosulfan und Methoxychlor.....	92
Abbildung 25: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Analytmengen der untersuchten Organochlor-Pestizide, demonstriert am Beispiel von γ-HCH, Heptachlor-exo-epoxid, α-Endosulfan, o,p'-DDD, Endrin und Methoxychlor.....	93
Abbildung 26: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des Gaschromatographen auf die desorbierten Analytmengen der untersuchten Organochlor-Pestizide, demonstriert am Beispiel von β-HCH, Heptachlor, Aldrin, o,p'-DDE, β-Endosulfan und Methoxychlor.....	94
Abbildung 27: Strukturformeln der untersuchten Cannabinoide.....	100
Abbildung 28: Strukturformeln von Methadon und seinem Metaboliten EDDP.....	102
Abbildung 29: Strukturformeln von Codein und Dihydrocodein (DHC).....	102
Abbildung 30: Derivatisierung von Δ ⁹ -THC mittels MSTFA.....	104
Abbildung 31: Einfluss der Derivatisierungstechnik auf die Empfindlichkeit des Nachweises von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	105
Abbildung 32: Einfluss der Dauer der Derivatisierung auf die Empfindlichkeit des Nachweises von THC, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	106
Abbildung 33: Einfluss der NaOH-Konzentration auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Cannabinoide und Opioide aus dotierten Haarproben (20 ng/10mg; dargestellt sind die Mittelwerte aller hier untersuchten Verbindungen).....	107
Abbildung 34: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, CBN, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	108

Abbildung 35: Einfluss verschiedener Salzzusätze auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg). (AS = Ammoniumsulfat, KC = Kaliumcarbonat, NaC = Natriumcarbonat, NaHC = Natriumhydrogencarbonat, NaS = Natriumsulfat, ohne = kein Salzzusatz).....	109
Abbildung 36: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBN, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	110
Abbildung 37: Einfluss der Agitatorgeschwindigkeit auf die Extraktionsausbeuten von THC, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	110
Abbildung 38: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in das Vial auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	111
Abbildung 39: Einfluss der Injektortemperatur auf die desorbierten Mengen von THC, Methadon und Codein.....	112
Abbildung 40: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen von THC, CBD, Methadon und Codein.....	113
Abbildung 41: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor auf die desorbierten Mengen von THC, Methadon und Codein.....	113
Abbildung 42: Einfluss verschiedener Septumtypen auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, CBN, Methadon und EDDP.....	114
Abbildung 43: Vergleich der Chromatogramme einer dotierten (5 ng/mg, schwarze Linie) und einer undotierten Haarprobe (rote Linie).....	116
Abbildung 44: SIM-Chromatogramm einer authentischen Haarprobe, welche CBD (1,33 ng/mg), THC (0,42 ng/mg) und CBN (0,91 ng/mg) enthält.....	119
Abbildung 45: Strukturformeln der untersuchten Designerdrogen vom Amphetamintyp.....	120
Abbildung 46: Derivatisierung von MDMA (Ecstasy) mit MBTFA.....	123
Abbildung 47: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	124
Abbildung 48: Einfluss der NaOH-Konzentration auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	125
Abbildung 49: Einfluss verschiedener Salzzusätze auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg). (NaC = Natriumcarbonat, NaS = Natriumsulfat, NaHC = Natriumhydrogencarbonat, AS = Ammoniumsulfat, ohne = kein Salzzusatz).....	126
Abbildung 50: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).....	127
Abbildung 51: Einfluss der Derivatisierungszeit auf die Empfindlichkeit des Nachweises von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp.....	127
Abbildung 52: Einfluss der Injektortemperatur auf die desorbierten Mengen von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp.....	128
Abbildung 53: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp.....	129
Abbildung 54: Vergleich der Chromatogramme einer dotierten (5 ng/mg, schwarze Linie) und einer undotierten Haarprobe (rote Linie).....	131
Abbildung 55: SIM-Chromatogramm einer authentischen Haarprobe, welche Amphetamin (0,55 ng/mg) und Methamphetamin (0,22 ng/mg) enthält.....	134

Abbildung 56: Strukturformeln der untersuchten trizyklischen Antidepressiva und der internen Standards Maprotilin und Mianserin.....	135
Abbildung 57: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL). (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.....	138
Abbildung 58: Einfluss der Vorinkubationszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL). (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.....	139
Abbildung 59: Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotiertem Blutproben (125 ng/mL) unter Zusatz von 1 mL destilliertem Wasser, 1 M Natronlauge bzw. 1 M Schwefelsäure mittels manueller SPME.....	140
Abbildung 60: Einfluss von Salzzusätzen (jeweils 0,5 g) auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL) bei Verwendung der manuellen SPME. (ohne = keine Zusätze, AS = Ammoniumsulfat).....	141
Abbildung 61: Einfluss der Absorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL). (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.....	143
Abbildung 62: Einfluss der Injektortemperatur auf die desorbierten Mengen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei Verwendung des CombiPAL.....	144
Abbildung 63: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.....	145
Abbildung 64: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC auf die desorbierten Mengen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei Anwendung der manuellen SPME.....	146
Abbildung 65: Vergleich der SIM-Chromatogramme von zwei mit trizyklischen Antidepressiva dotierten Leerblutproben (125 ng/mL, schwarze Linie) mit dem Chromatogramm einer undotierten Leerblutprobe (rote Linie).....	148
Abbildung 66: Strukturformeln von Thiopental und Methohexital.....	151
Abbildung 67: Strukturformel von Ketamin.....	152
Abbildung 68: Strukturformel von Etomidat.....	152
Abbildung 69: Strukturformel von Propofol.....	153
Abbildung 70: Strukturformel von Midazolam.....	153
Abbildung 71: Biotransformation von Diazepam.....	154
Abbildung 72: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Ketamin, Etomidat, Diazepam, Pentobarbital, Methohexital und Thiopental aus dotierten Blutproben.....	155
Abbildung 73: Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam aus dotierten Blutproben.....	156
Abbildung 74: Einfluss verschiedener Salzzusätze auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Ketamin, Etomidat, Diazepam, Pentobarbital, Methohexital und Thiopental aus dotierten Blutproben. (NaC = Natriumcarbonat, NaF = Natriumfluorid, NS = Natriumsulfat, AS = Ammoniumsulfat, ohne = kein Salzzusatz).....	157
Abbildung 75: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam aus dotierten Blutproben.....	158
Abbildung 76: Einfluss der Injektortemperatur auf die Effektivität der Desorption von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam.....	159

- Abbildung 77: Einfluss der Desorptionszeit auf die Effektivität der Desorption von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam..... 159
- Abbildung 78: Vergleich der SIM-Chromatogramme einer dotierten Blutprobe (5 µg/ml, schwarze Linie) und einer undotierten Leerblutprobe (rote Linie).
(1 = Propofol, 2 = 2,4-Di-tert-butylphenol, 3 = Pentobarbital, 4 = Methohexital, 5 = Thiobutabarbital, 6 = Thiopental, 7 = Ketamin, 8 = Hexobarbital, 9 = Etomidat, 10 = Diazepam, 11 = Midazolam)..... 161

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AED	Atomemissionsdetektor
AFS	Atomfluoreszenzspektroskopie
amu	atomic mass units
BDB	1-(1,3- Benzodioxol -5-yl) butan -2-ylazan
BG	Bestimmungsgrenze
BSTFA	N,N- Bis (trimethylsilyl) trifluoracetamid
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
CAR	carbowax
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CI	chemical ionisation (Chemische Ionisation)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
DDE	Dichlordiphenyldichlorethen
DHC	Dihydrocodein
DI	Direktimmersion
DVB	Divinylbenzen
EDDP	DL-2- Ethylidin -1,5- dimethyl -3,3- diphenylpyrrolidin
EI	electron impact ionization (Elektronenstossionisation)
EMDP	2- Ethyl -5- methyl -3,3- diphenylpyralin
eV	Elektronenvolt
FID	flame ionization detection (Flammenionisationsdetektor)
FPD	flame photometric detection (Flammenphotometrischerdetektor)
GC	Gaschromatographie
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie
HCH	Hexachlorcyclohexan
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HPTLC	high performance thin layer chromatography (Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie)
HS	Headspace (Dampf-/Gasraum)
HWZ	Halbwertszeit
ICP	inductively coupled plasma (Induktiv gekoppeltes Plasma)
I.D.	internal diameter (innerer Durchmesser)
i.m.	intramuskulär
IR	infrarot
ISTD	Interner Standard

i.v.	in travenös
k. A.	keine Angaben gefunden
LC	liquid chromatography
LLE	liquid-liquid-extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
MAC	minimale alveoläre Konzentration
MBDB	(1-(1,3- Benzodioxol -5-yl) butan -2-yl)(methyl)azan
MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoracetamid)
MDA	DL-3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin
MDMA	DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin
M _R	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektiver Detektor
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NG	Nachweisgrenze
o	ortho
p	para
PA	Polyacrylat
p.a.	pro analysi
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PED	photo emission detection (Fotoemissionsdetektor)
p.m.	post mortem
r	Korrelationskoeffizient
RSD	relative standard deviation (Relative Standardabweichung)
RT	retention time (Retentionszeit)
s.c.	subcutan
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SFC	supercritical fluid chromatography
SFE	supercritical fluid extraction
SIM	selected ion monitoring
SPDE	solid-phase dynamic extraction
SPE	solid-phase extraction (Festphasenextraktion)
SPME	solid-phase microextraction (Festphasenmikroextraktion)
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoracetamid
THC	Tetrahydrocannabinol
TMA	Tetramethylammonium
TR	templated resin

UV	ultraviolett
VSA	volatile substance abuse
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Das Erzielen korrekter und reproduzierbarer Analysenergebnisse hängt in besonderem Maße von der vorhergehenden Probenaufarbeitung des Untersuchungsmaterials ab. Das Untersuchungsgut in einem forensisch-toxikologischen Labor besteht in der Regel aus komplexen biologischen Matrices wie Blut, Urin, Haare und Gewebe von Organen. Aus diesem Probenmaterial müssen die interessierenden Analyten extrahiert und aufkonzentriert werden, wobei üblicherweise die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) oder die Festphasenextraktion (SPE) zum Einsatz kommen. Es handelt sich dabei um Methoden, die seit vielen Jahren etabliert sind und für die eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in allen Bereichen der Analytik existieren [1-4].

Diese Verfahren weisen aber auch einige gravierende Nachteile auf, wie hoher zeitlicher und personeller Aufwand, sowie große benötigte Mengen an umweltschädlichen organischen Lösemitteln. Des Weiteren sind die erhaltenen Extrakte, trotz der Aufreinigung durch die Extraktion, oftmals noch sehr stark matrixbelastet, was sich negativ auf die Wartungszyklen an den Analysengeräten (Gaschromatographen, Hochdruckflüssigchromatographen) niederschlägt. D.h. die Chromatographiesäulen müssen häufiger gewechselt und die Ionenquellen von Massenspektrometern häufiger gereinigt werden, wodurch sich die Geräteausfallzeiten erhöhen.

Die 1990 von PAWLISZYN entwickelte Festphasenmikroextraktion (engl. **solid-phase microextraction** = SPME) wirkt diesen Nachteilen entgegen. Es handelt sich bei dieser Technik um ein Extraktionsverfahren, das einfach und schnell ist, ohne organische Lösemittel auskommt und bei dem es, insbesondere bei Anwendung der Headspace-Technik, nur zu einer minimalen Matrixbelastung der Analysengeräte kommt. Weitere Vorteile liegen in der Wiederverwendbarkeit der speziellen Extraktionsfasern (bis zu 100 Mal), der Möglichkeit der vollständigen Automatisierung und einer unproblematischen Möglichkeit der Kopplung mit chromatographischen Trennverfahren wie der Gaschromatographie (GC) [5-7], der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [8,9] oder der Kapillarelektrophorese (CE) [10].

Ursprünglich für die Umweltanalytik, vor allem die Wasseranalytik, entwickelt [5-9,11-22], hat die Festphasenmikroextraktion mittlerweile auch in anderen Bereichen, wie der klinischen und forensischen Toxikologie [23-37], der pharmazeutischen Analytik [38] sowie der Lebensmittel- und der Aromaanalytik [39,40] Eingang gefunden.

Die Festphasenmikroextraktion ist als alternatives Extraktionsverfahren zu den bereits etablierten Methoden zu sehen, ihre Leistungsfähigkeit muss sie noch unter Beweis stellen.

1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Erarbeitung von Einsatzmöglichkeiten der Festphasenmikroextraktion in einem forensisch-toxikologischen Labor, unter besonderer Berücksichtigung ökonomischer Gesichtspunkte (Arbeits- und Zeitaufwand, Kosten).

Da die SPME ursprünglich für die Wasseranalytik entwickelt wurde, musste zunächst die generelle Eignung dieses Verfahrens für die in einem forensisch-toxikologischen Labor anfallenden Proben überprüft werden, um anschließend die Methoden entsprechend zu optimieren und zu validieren.

1.3 Stand der Technik

1.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das wohl älteste und auch am weitesten verbreitete Verfahren zur Isolierung einer Verbindung aus einer Matrix ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (eng. liquid-liquid-extraction, LLE). Hierbei wird die zu untersuchende Probe mit einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösemittel versetzt und kräftig durchmischt, wodurch die Analyten, gemäß ihres Verteilungsgleichgewichtes, in die organische Phase übergehen. Anschließend wird die Lösemittelphase abgetrennt und eingeeengt, um eine Aufkonzentrierung der Analyten zu erreichen.

Von großem Nachteil ist der hohe Verbrauch organischer Lösemittel, welche z. T. erhebliche Toxizität aufweisen und die dadurch anfallenden hohen Beschaffungs- wie auch Entsorgungskosten. Um dieses Problem zu verringern, wurden von JEANNOT et al. eine sogenannte Mikroextraktionsmethode entwickelt [41] bei welcher der Lösemittelverbrauch erheblich vermindert werden konnte. Die Handhabung dieses Verfahrens ist jedoch sehr aufwändig, so dass es als Routinemethode weniger geeignet ist.

Ein weiterer Nachteil der LLE ist, dass es während der Extraktion zur Emulsionsbildung kommen kann, wodurch die Phasentrennung erschwert und somit der Extraktionsprozeß verlängert wird. Ferner besteht nur eine eingeschränkte Möglichkeit der Automatisierung, da diese lediglich mit aufwändigen Analysenrobotern realisiert werden kann [42].

Ein Spezialfall der LLE ist die Extraktion mittels Extrelut®-Säulen. Diese bestehen, wie in der Festphasenextraktion (SPE), aus Glas oder Polypropylen, sind jedoch mit hochporösem Kieselgel gefüllt. Dieses ist chemisch inert und kann über einen weiten pH-Bereich (pH 1–13) eingesetzt werden. Das Kieselgel wird mit der wässrigen Probe beladen (= flüssige Phase 1) und anschließend werden die Analyten mit einem organischen Lösemittel (= flüssige Phase 2) eluiert. Die Vorteile sind ähnlich wie bei der SPE: keine Emulsionsbildung, Einsparung von Lösemitteln und Zeit, höhere Wiederfindungen, reinere Extrakte und die Möglichkeit der Automatisierung.

In der forensischen Analytik ist die LLE weit verbreitet, da sie eine seit vielen Jahrzehnten etablierte Methode mit vielen beschriebenen Applikationen ist. Nahezu jede Matrix kann mit ihrer Hilfe extrahiert werden und die erhaltenen Extrakte sind für die meisten Analysenmethoden geeignet [1-3]. Nachteilig ist, dass die Extrakte auf Grund der in der Forensik häufig vorkommenden komplexen Matrices wie Vollblut und Organproben, oft noch stark matrixbelastet sind.

1.3.2 Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion (eng. **solid-phase extraction**, SPE) findet der Extraktionsprozess zwischen einer flüssigen und einer stationären festen Phase statt. Das Probenvolumen wird hierzu durch eine Kartusche aus Polypropylen oder Glas geleitet, welche mit einem Adsorbens gefüllt ist. Wie bei GC- oder der HPLC-Säulen gibt es auch hier für unterschiedliche Substanzklassen die unterschiedlichsten Füllmaterialien (in der Regel modifizierte Kieselgele). Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Polarität und ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Die SPE ist in fünf Schritte gegliedert: Säulenkonditionierung, Probenaufgabe, Waschen der Säule und pH-Wert-Einstellung, Trocknen der Säule und Elution der Analyten. Vorteile gegenüber der LLE sind der geringere Lösemittelverbrauch und Zeitaufwand, Vermeidung von Emulsionsbildung, höhere Wiederfindungen, reinere Extrakte und die Möglichkeit Automatisierung.

Aus diesen Gründen, insbesondere jedoch wegen der reineren Extrakte und des geringeren Bedarfs an Probenmaterial, wird auch die SPE in der forensischen Analytik auf breiter Ebene eingesetzt [4].

1.3.3 Extraktion mit überkritischen Fluiden

Als überkritisches Fluid bezeichnet man ein Gas, welches sich oberhalb seiner kritischen Temperatur und seines kritischen Druckes befindet. In diesem Zustand besitzt es sowohl die Eigenschaften von Gasen, (schneller Massentransfer aufgrund des hohen Diffusionskoeffizienten), als auch die guten Solvatisierungseigenschaften von Flüssigkeiten. Nach der Extraktion werden die Analyten in einem geeigneten Lösemittel aufgefangen, ausgefroren (cryogenic trapping) oder an einem Sorbens absorbiert.

Die Vorteile der Extraktion mit überkritischen Fluiden (eng. **supercritical fluid extraction**, SFE) liegen in der einfachen Handhabung, den kurzen Extraktionszeiten, der hohen Selektivität (durch die Anpassung von Druck und Temperatur an die jeweiligen Analyten), den niedrigen Kosten und der Reduzierung der Extraktionsschritte, was gleichzeitig zu einer Verringerung der Fehlermöglichkeiten und somit des Analytverlustes führt. Des Weiteren wird der Einsatz von Lösemitteln auf ein Minimum beschränkt, da diese lediglich in Form von sogenannten Modifiern zur Optimierung der Extraktion bzw. zum Auffangen der Extrakte eingesetzt werden. Als Extraktionsmittel selbst dient überwiegend Kohlendioxid, welches nicht toxisch und preiswert zu beschaffen ist.

Eine Automatisierung ist möglich, jedoch relativ aufwändig und kostenintensiv [43].

Die Anwendung der SFE in der forensischen Analytik ist bei weitem nicht so verbreitet wie die LLE und die SPE, dennoch ist sie geeignet, viele Analyten aus unterschiedlichen Matrices zu extrahieren [43,44].

1.3.4 Headspace-Extraktion

Bei der Headspace-Extraktion unterscheidet man zwischen einem statischen und einem dynamischen Verfahren. Bei der statischen Headspace-Extraktion wird die Probe in ein Probengefäß gefüllt, mit einer Aluminiumkappe und einem Septum verschlossen und inkubiert. Dabei stellt sich sukzessive ein Gleichgewicht der flüchtigen Analyten zwischen Dampfraum (**headspace**, HS) und Probe ein. Nach dem Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes wird ein Aliquot mit einer gasdichten, temperierten Spritze aus dem Headspace entnommen und auf die Säule des Gaschromatographen überführt. Nachteilig ist, dass die Konzentration der Analyten in der Gasphase stark von der Probenmatrix beeinflusst wird. D.h. wird die Inkubationstemperatur bei der Analyse von z.B. Blut oder Organteilen zu hoch gewählt, erschwert die Denaturierung von Proteinen den Übergang der zu untersuchenden Substanzen in den Dampfraum. Wird andererseits jedoch

die Temperatur zu niedrig gewählt, werden schwerer flüchtige Substanzen nicht reproduzierbar erfasst bzw. die Zeit bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes wird unverhältnismäßig verlängert.

Bei der dynamischen Headspace-Extraktion, auch Purge and Trap genannt, werden die Analyten mit einem Inertgas aus der Probe gestrippt und durch ein mit einem Adsorbens gefülltes Röhrchen geleitet. Wie in der SPE, der GC und der HPLC sind auch hier unterschiedliche Sorbenzien für unterschiedliche Substanzgruppen erhältlich. Anschließend werden die Analyten thermisch wieder desorbiert und der Gaschromatographie zugeführt. Vorteile dieser Methode sind die Wiederverwendbarkeit der Röhrchen und die Aufkonzentrierung der Analyten auf dem Sorbens, da die Probe kontinuierlich von dem Inertgas durchströmt und auf diese Weise die Substanzen mitgerissen und absorbiert werden.

Sowohl die statische wie auch die dynamische Headspace-Extraktion sind voll automatisierbar, wobei die dynamische Methode den Nachteil hat, dass es zu einer Zersetzung der Analyten auf Grund von sogenannten aktiven Stellen kommen kann, die sich in den Transferleitungen und Ventilschaltungen bilden können. Auch schwerer flüchtige Substanzen können negative Auswirkungen in Form von Verschleppungen haben, da sie sich im System niederschlagen und erst bei der Analyse der nachfolgenden Probe in Form von sogenannten Geisterpeaks im Chromatogramm auftauchen können.

In der forensischen Analytik wird die Headspace-Extraktion insbesondere zur Bestimmung des Blutalkoholspiegels verwendet, aber auch zur Alkohol-Begleitstoffanalyse, sowie zum Nachweis weiterer flüchtiger Verbindungen [45,46,47,48].

2 Headspace-Festphasenmikroextraktion

2.1 Beschreibung der Methode

Das Verfahren der Festphasenmikroextraktion (SPME) wurde erstmals 1989 von PAWLISZYN und Mitarbeitern beschrieben [49]. Es handelt sich hierbei um eine schnelle und einfache Technik der Probenvorbereitung, welche Probenahme, Extraktion und Anreicherung in einem Schritt beinhaltet. Sie kommt ohne Lösemittel aus und ist für eine Vielzahl von sowohl leicht- wie auch mittel- und schwerflüchtigen Substanzen geeignet [7-10,13-40,50-72]. Die Analyse der extrahierten Substanzen erfolgt meist gas- oder flüssigchromatographisch.

Ein SPME-System besteht aus einer 1,5 cm langen Quarzglasfaser, welche mit einem Polymermaterial beschichtet ist und einen Durchmesser von etwa 0,3 mm (abhängig von der Beschichtung) aufweist. Die Faser ist mit hochtemperaturfestem Epoxykleber in eine Mikrokanüle aus Edelstahl eingeklebt, die sich wiederum in einer, ebenfalls aus Edelstahl bestehenden, Hohlzylinder, ähnlich der Kanüle einer Spritze, befindet. Diese Kanüle dient dem Schutz der sehr empfindlichen Faser beim Durchstechen der Septen von Probengefäßen oder Injektoren.

Der Einbau der Faser in den Faserhalter erfolgt über ein Gewinde aus hochtemperaturfestem Kunststoff. Abb. 1 zeigt die schematischen Darstellungen der Faserhalter für die manuelle und die automatisierte Probenahme bzw. HPLC-Analyse.

Um eine optimale Positionierung der Faser im Probenvial bzw. Injektor des Gaschromatographen zu erzielen, kann deren Eintauchtiefe variiert werden. Dieses geschieht beim Faserhalter für die automatisierte Probenahme millimetergenau über die Software des Probengebers und beim manuellen System über eine manuell einstellbare Führung, welche aus einem langen Gewinde besteht.

Nachteilig beim manuellen Faserhalter sind die vergleichsweise ungenau in 0,5-cm-Schritten einstellbare Eintauchtiefe, sowie deren Fixierung mittels eines Gummiringes, welcher sich relativ leicht verschieben lässt.

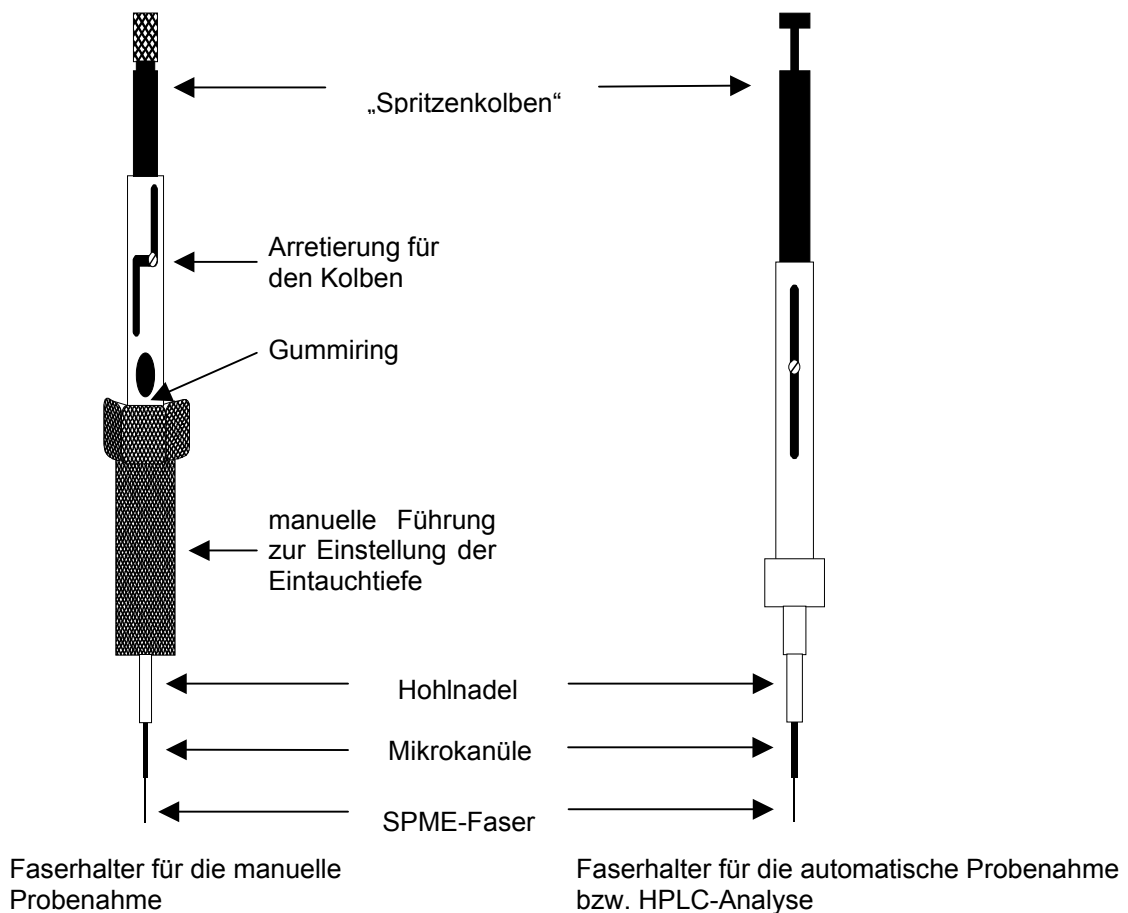


Abbildung 1: SPME-Faserhalter für die manuelle und die automatische Probenahme bzw. HPLC-Analyse.

Für die ersten Versuche zur Festphasenmikroextraktion Ende der 80er Jahre wurden von Pawliszyn sowohl beschichtete wie auch unbeschichtete Quarzglasfasern in wässrige Lösungen eingetaucht und anschließend die mit den Analyten beladenen Fasern in den heißen Injektor des GC überführt. Dabei lag der ursprüngliche Sinn der Beschichtung darin, das Abbrechen der empfindlichen Quarzglasfasern zu verhindern. Die ersten Faserhalter bestanden aus modifizierten Hamilton®-Mikroliterspritzen der 7000er Serie, bei denen die Kolben durch Mikrokanülen ausgetauscht wurden, in deren unteres Ende die Fasern mit hochtemperaturfestem Epoxykleber eingeklebt wurden. Im weiteren Verlauf entwickelte Pawliszyn Faserhalter für die Entnahme von Atem- und Raumluftproben, für die Probenahme direkt vor Ort (field-sampling), um die Analyten während des Rücktransportes zum Labor auf der Faser zu halten, sowie eine innerlich gekühlte Faser zur Erhöhung der Extraktionsausbeuten [73].

Für die Durchführung der Extraktion mittels HS-SPME wird das Septum des Probenfläschchens mit der die Faser schützenden Kanüle durchstoßen und der Kolben der „Spritze“ heruntergedrückt, um die Faser dem Dampfraum auszusetzen. Die Analyten

werden nun so lange extrahiert und auf der Faser aufkonzentriert, bis sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Probe, Dampfraum und Faser eingestellt hat. Anschließend wird die Faser wieder in die schützende Kanüle zurückgezogen und aus dem Probengefäß entfernt. Für die gaschromatographische Analyse wird die Kanüle in den heißen Injektor des GC überführt und die Faser erneut exponiert, um die Analyten thermisch wieder zu desorbieren. Nach dem Zurückziehen der Faser in die Kanüle und Entfernen aus dem Injektor, kann die Faser direkt für die nächste Extraktion verwendet werden, da Verschleppungen nach dem Ausheizen der Faser in der Regel nicht auftreten. Störende Matrixbestandteile werden nicht oder nur in sehr geringem Maße mitextrahiert, was zu vergleichsweise sehr saubereren Chromatogrammen führt. Im Falle einer Verunreinigung der Faser kann diese im heißen Injektor ausgeheizt werden.

In Abb. 2 sind die beiden gebräuchlichsten SPME-Probenahmetechniken, die Direktimmersion und die Headspace-Technik, schematisch dargestellt.

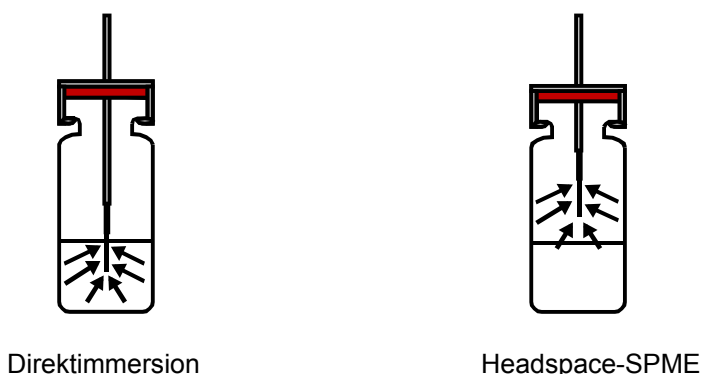


Abbildung 2: SPME-Probenahmetechniken

Für die manuelle SPME wurde ein sogenannter Gefäß-Puck mit Platz für acht 15-mL-Vials (kommerziell erhältlich bei der Firma Supelco, Deisenhofen, Deutschland) auf einem mit einem Kontaktthermometer ausgestatteten Heizrührer platziert und der manuelle Faserhalter mit einer Klemme an einem Stativ befestigt.

Bei diesem Gefäß-Puck handelt es sich um einen Aluminiumblock zum Heizen/Rühren für die Headspace-Analyse mit SPME. Die Versuchsanordnung ist in Abb. 3 dargestellt.

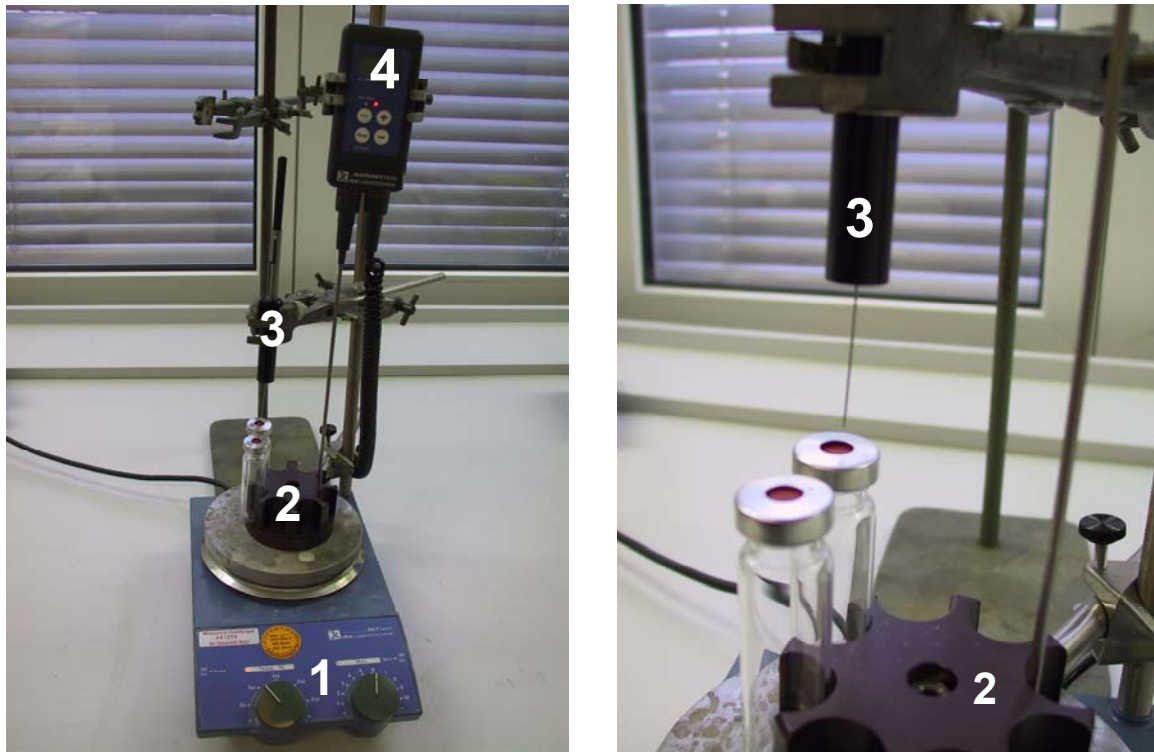


Abbildung 3: Versuchsanordnung bei der manuellen SPME (1 = Heizrührer, 2 = Gefäß-Puck, 3 = manueller SPME-Faserhalter, 4 = digitales Kontaktthermometer).

Sowohl die Firma Varian wie auch die Firma CTC Analytics bieten mittlerweile automatische Probengeber für die SPME an, wobei an dieser Stelle nur auf den Mehrzweckprobengeber CombiPAL der Firma CTC Analytics näher eingegangen werden soll, da dieser für die vorliegende Arbeit verwendet wurde.

Der CombiPAL ist nicht nur für die SPME, sondern auch für die Flüssiginjektion, die statische Headspace-Analyse und die dynamische Festphasenextraktion (engl. **solid-phase dynamic extraction**, SPDE) geeignet und bietet die Möglichkeit der Durchmischung und gleichzeitigen Inkubation der Proben mit Hilfe eines sogenannten Agitators. Über die mitgelieferte Software des Herstellers können sämtliche Arbeitsschritte individuell programmiert werden, so dass unterschiedlichste Proben nacheinander abgearbeitet werden können, ohne dass zwischendurch Interventionen durch einen Mitarbeiter notwendig sind. Abb. 4 zeigt eine fotografische Darstellung des Mehrzweckprobengebers CombiPAL, montiert auf einem GC Modell 6890 Serie II Plus der Firma Agilent.



Abbildung 4: Mehrzweckprobengeber CombiPAL der Firma CTC Analytics, montiert auf einem Gaschromatographen (Modell 6890 Serie II Plus) der Firma Agilent (1 = Bedienpanel, 2 = beweglicher Roboterarm, 3 = Agitator, 4 = Halter für Probenvials).

Auch die Kopplung der SPME mit anderen chromatographischen Verfahren ist möglich (siehe 2.5). Bei Anwendung z.B. der HPLC wird die Faser mit Hilfe eines speziellen SPME/HPLC-Interface (Supelco) in Kontakt mit der mobilen Phase des HPLC-Systems gebracht, wodurch die Analyten desorbiert und auf die Trennsäule überführt werden. Für weitere Details wird auf die einschlägige Literatur verwiesen, da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Kopplung SPME/GC beschäftigt.

Vorteile der SPME sind die einfache Handhabung und die enorme Zeitersparnis im Vergleich zu herkömmlichen Extraktionstechniken (SPE, LLE). Sie ist sowohl manuell wie auch automatisiert durchführbar und mit jedem GC-System kompatibel. Durch die Wiederverwendbarkeit der Faser (bis zu 100 Extraktionen sind möglich) und den Verzicht auf Lösemittel ist die Methode zudem kostengünstig und umweltverträglich.

2.2 Theoretische Aspekte der HS-SPME

Bei der Festphasenmikroextraktion handelt es sich um einen Multiphasengleichgewichtsprozess, dessen Extraktionssystem sich häufig sehr komplex gestaltet. So besteht z.B. eine Blutprobe aus einer flüssigen Phase (Serum) und den darin suspendierten zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten), welche verschiedene Adsorptionsinteraktionen mit den Analyten eingehen, plus einer sich darüber befindlichen Gasphase.

Bei einigen Analyseproblemen sind spezifische Faktoren zu betrachten, wie biologische Abbauprozesse oder Adsorptionsprozesse der Analyten an die Wände der Probengefäße. Um das System zu vereinfachen, werden lediglich drei Phasen betrachtet: die Probenmatrix, der Gasraum über der Probe (Headspace) und die Beschichtung der SPME-Faser. Während der Extraktion bewegen sich die Analyten zwischen diesen drei Phasen, bis sich ein Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat.

Die folgende theoretische Betrachtung wird auf das Verteilungsgleichgewicht begrenzt, welches für flüssige Polymerphasen wie Polydimethylsiloxan (PDMS) und Polyacrylat (PA) gültig ist. Das Analysenverfahren für feste Sorbenzien (z.B. Divinylbenzol, Carbowax) ist analog, da die Totalfläche, die für die Adsorption vorhanden ist, dem Volumen der Beschichtung proportional ist, wenn eine konstante Porosität des Sorbens angenommen wird.

2.2.1 Gleichgewichtstheorie [74]

Die an dieser Stelle beschriebenen theoretischen Aspekte der Festphasenmikroextraktion beziehen sich auf die HS-SPME und gelten für die Faserbeschichtungen Polydimethylsiloxan und Polyacrylat. Diese stellen immobilisierte Flüssigkeiten dar, welche die Analyten **absorbieren** (im Gegensatz zu festen Adsorbentien wie Divinylbenzol und Carbowax (poröser Kohlenstoff), welche die Analyten **adsorbieren**). Hierbei wird von einem Dreiphasensystem ausgegangen, welches die Probe, den Gasraum über der Probe und die Polymerbeschichtung der Faser umfasst. Im Gegensatz dazu liegt bei der Technik der Direktimmersion ein Zweiphasensystem vor, auf dessen Theorie an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll, da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Headspace-Technik befasst.

Die Menge an Analyt, die durch die flüssige Polymerschicht absorbiert wird, ist abhängig vom Gesamtgleichgewicht des Analyten im Dreiphasensystem. Dabei sollte die

Gesamtmenge an Analyt während der Extraktion konstant bleiben. Das bedeutet, dass bei Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes die Summe der Analytkonzentrationen in den oben genannten drei Phasen gleich der Anfangskonzentration des Analyten in der Probe ist (Gleichung 1).

$$c_0 \cdot V_s = c_f^\infty \cdot V_f + c_h^\infty \cdot V_h + c_s^\infty \cdot V_s \quad (1)$$

c_0 = Anfangskonzentration des Analyten in der Probe

c_f^∞ = Konzentration des Analyten in der Faserbeschichtung

c_h^∞ = Konzentration des Analyten im Gasraum

c_s^∞ = Konzentration des Analyten in der Probenmatrix

V_f = Volumen der Faserbeschichtung

V_h = Volumen des Gasraumes

V_s = Volumen der Probenmatrix

Definiert man den Verteilungskoeffizienten Faserbeschichtung/Gasraum K_{fh} als c_f^∞ / c_h^∞ und den Verteilungskoeffizienten Gasraum/Probenmatrix K_{hs} als c_h^∞ / c_s^∞ , kann die von der Faserbeschichtung absorbierte Menge an Analyt, $n = c_f^\infty \cdot V_f$, mit folgender Gleichung ausgedrückt werden:

$$n = \frac{K_{fh} \cdot K_{hs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fh} \cdot K_{hs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (2)$$

Vernachlässigt man den Dampfdruck des Lösemittels, ist es legitim, für $K_{fh} \cdot K_{hs}$ den Verteilungskoeffizienten Faserbeschichtung/Probenmatrix K_{fs} einzusetzen, so dass sich Gleichung (2) folgendermaßen zu Gleichung (3) vereinfacht:

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (3)$$

Anhand der drei Terme im Nenner von Gleichung (3) kann die Aufnahmekapazität einer jeden Phase bestimmt werden, wobei $K_{fs} \cdot V_f$ für die Kapazität der Faser, $K_{hs} \cdot V_h$ für die Kapazität des Dampfraumes und V_s für die Kapazität der Probe steht. Aus Gleichung (3) ist ebenfalls ersichtlich, dass es für die Extraktionsausbeute unerheblich ist, ob die Faser im Dampfraum über der Probe exponiert wird oder direkt in die Probe eintaucht, solange die Volumina von Faser, Dampfraum und Probe konstant bleiben.

Gleichung (3) lässt sich weiter vereinfachen zu Gleichung (4), wenn man das Volumen des Dampfraumes wesentlich kleiner als das der Probe hält ($V_h \ll V_s$), bzw. wenn im Idealfall überhaupt kein Dampfraum vorhanden ist.

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + V_s} \quad (4)$$

Zur Erzielung hoher Extraktionsausbeuten sollte daher der Gasraum über der Probe so weit wie möglich minimiert werden.

2.2.2 Kinetische Theorie

Die Kinetik des Extraktionsprozesses befasst sich mit der Geschwindigkeit der Verteilung der Analyten. Die bei der HS-SPME stattfindenden Vorgänge wurden von ZHANG und PAWLISZYN beschrieben [75]. Dabei basiert der Großteil der Theorie des Massentransportes auf dem 2. Fick'schen Diffusionsgesetz, welches das Massengleichgewicht in einem dynamischen System beschreibt. Hierbei wird die Faserbeschichtung als Diffusionsschicht betrachtet und es wird angenommen, dass eine Probendurchmischung einen konstanten Massentransfer zur Folge hat. Dieses kann mathematisch folgendermaßen dargestellt werden:

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} \quad (5)$$

$c(x,t)$ = Konzentration des Analyten an Position x zum Zeitpunkt t

D = Diffusionskoeffizient des Analyten

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Konzentration ändert ist demnach proportional zur zweiten Ableitung der Konzentration nach dem Ort.

Die Analytmenge, die dabei von der Faserbeschichtung absorbiert wird, kann zu jedem Zeitpunkt mittels folgender Gleichung berechnet werden:

$$M(t) = \int_{L_h}^{L_h+L_f} c(x,t) dx \quad (6)$$

L_f = Dicke der Faserbeschichtung

L_h = Länge des Gasraumes

Die von der Beschichtung absorbierte Analytmenge ist demnach umso größer, je dicker die Faserbeschichtung ist.

Die Analytkonzentration sowohl in der Faserbeschichtung als auch in der Probe variiert zu Beginn der Extraktion relativ stark, während sie im Gasraum nahezu konstant bleibt. Die Begründung hierfür liegt darin, dass der Diffusionskoeffizient D_h in der Gasphase um 3 bis 5 Größenordnungen höher liegt als in den beiden anderen Phasen.

Das Drei-Phasen-Gleichgewicht ist erreicht, wenn die Analytkonzentration in jeder der drei Phasen homogen ist. Dabei dauert die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes umso länger, je größer K_{fh} ist, da die Analytmoleküle in der Probe nur sehr langsam diffundieren. Obwohl der Diffusionskoeffizient in der Faserbeschichtung kleiner als in der Probe ist, nimmt die Diffusion der Analyten nur sehr wenig Zeit in Anspruch, da die Dicke der Beschichtung, im Vergleich mit den beiden anderen Phasen, äußerst gering ist.

Auf Grund des geringen Volumens der Faserbeschichtung (ca. 10^{-4} cm^3) ist die absorbierte Analytmenge flüchtiger Verbindungen mit vergleichsweise kleinen K_{fh} - und großen K_{hs} -Werten vernachlässigbar gering, im Vergleich zu der im Gasraum vorhandenen Analytmenge. Dadurch bleibt die Analytmenge in der Probe praktisch unverändert. Die Extraktionszeit hängt damit im wesentlichen von der Diffusion im Gasraum ab, wodurch die Einstellung des Drei-Phasen-Gleichgewichtes binnen kurzer Zeit erreicht ist.

Die Zeit die zum Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes benötigt wird, kann, unter der Voraussetzung dass die extrahierte Analytmenge nur ein Bruchteil der in der Probe enthaltenen Menge beträgt, mit Hilfe folgender Gleichung abgeschätzt werden:

$$t_e = t_{95\%} = 1,8 \left(\frac{L_h}{K_{hs} D_h} + \frac{L_s}{1,6 D_s} \right) K_{fs} L_f \quad (7)$$

- K_{hs} = Verteilungskonstante Gasraum/Probe
 D_h = Diffusionskoeffizient des Analyten in der Gasphase
 L_h = Länge der Gasphase
 D_s = Diffusionskoeffizient des Analyten in der Probe
 L_s = Länge der Probe
 K_{fs} = Verteilungskonstante Faser/Probe
 L_f = Dicke der Faserbeschichtung

Wie der Gleichung zu entnehmen ist, dauert die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes umso länger, je größer die Ausdehnungen von Gasraum L_h und Probe L_s und je kleiner die Verteilungskonstante Gasraum/Probe K_{hs} und die Diffusionskoeffizienten des Analyten in der Gasphase D_h und in der Probe D_s sind. Auch eine große Faserkapazität $K_{fs}L_f$ verlängert die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes.

Die theoretische Betrachtungsweise zeigt dem Analytiker einerseits die Grenzen der Festphasenmikroextraktion auf, gibt ihm andererseits aber auch Strategien zur Steigerung der Extraktionseffizienz bzw. -geschwindigkeit an die Hand. Allerdings muss bedacht werden, dass die Theorie Interaktionen zwischen Analyt und Vial-Oberfläche bzw. Faserkern nicht berücksichtigt und davon ausgeht, dass alle Diffusionsvorgänge nach dem Fick'schen Gesetz ablaufen. Faktoren wie Interaktionen zwischen den Einzelnen Analyten, Wärmeausdehnung der Faser und das Quellen der Faser werden ebenfalls als vernachlässigbar angesehen.

2.3 SPME-Probenahmetechniken

Bei der Festphasenmikroextraktion kann zwischen drei Probenahmetechniken unterschieden werden: Direktimmersion, Headspace-SPME und Extraktion mit membrangeschützter Faser. Jede dieser Techniken hat ihre spezifischen Vor- und Nachteile, die bei der Entscheidung für eine bestimmte Methode, unter Berücksichtigung der Art des Probenmaterials und der zu bestimmenden Analyten, abzuwägen sind.

2.3.1 Direktimmersion

Bei der Direktimmersion wird die Faser unmittelbar in die flüssige Probe eingetaucht, so dass die Analyten auf direktem Wege von der Probenmatrix in die Beschichtung der Faser wandern können. Mit der Zeit bildet sich jedoch eine an Analyt verarmte Grenzschicht um die Faser herum aus, da die Diffusion der Analyten aus der wässrigen Phase in die Grenzschicht langsamer vonstatten geht als die Diffusion von der Grenzschicht in die Beschichtung der Faser. Um dieses Phänomen zu vermindern und damit die Extraktion zu beschleunigen, ist es erforderlich, dass entweder die Probe durchmischt oder die Faser bewegt wird. Für gasförmige Proben genügt die natürliche Konvektion um eine schnelle Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Hierbei kann die Faser z.B. auch direkt der Raumluft oder der Ausatemluft eines Menschen [76,77] ausgesetzt werden.

Nachteil der Direktimmersion ist, dass die Faser mit der Probenmatrix in Kontakt kommt, wodurch sie kontaminiert und die Haltbarkeit herabgesetzt werden kann. Die Analyse einer Vollblutprobe wäre auf diese Weise nicht möglich, da die Faser schon nach einer Extraktion unbrauchbar wäre.

2.3.2 Headspace-SPME

Bei der Headspace-SPME erfolgt die Extraktion der Analyten im Gasraum über der festen oder flüssigen Probe. Dabei ist es nicht unbedingt erforderlich, dass die Analyten leicht flüchtig sind, auch mittel- und schwerflüchtige Substanzen können auf diese Weise erfasst werden [78]. Die Headspace-Technik dient vornehmlich dem Schutz der Faser vor Verschmutzung und Beschädigung durch die Probenmatrix (wie z.B. Vollblut oder Organteile), aber auch Veränderungen der Matrix, wie pH-Wertänderungen, können ohne Schaden der Faser durchgeführt werden. Die Menge an Analyt die von der Faser extrahiert wird, ist bei eingestelltem Gleichgewichtszustand identisch, unabhängig davon, ob die Direktimmersion oder die HS-SPME angewendet wurde. Voraussetzung ist jedoch, dass sowohl das Proben- wie auch das Headspacevolumen gleich sind. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Sensitivität zwischen Direktimmersion und HS-SPME besteht nur für äußerst flüchtige Substanzen. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt bei der HS-SPME in der Regel schneller als bei der Direktimmersion, da die Analyten zuerst aus dem Gasraum extrahiert werden, gefolgt von einer indirekten Extraktion aus der Matrix. Hierbei werden flüchtige Analyten schneller extrahiert als halb- und schwerflüchtige Substanzen, da sie in einer höheren Konzentration im Gasraum vorliegen, woraus eine schnellere Massentransportrate durch den Gasraum resultiert.

Im Vergleich zur statischen Headspace-Analyse, bei der ein definiertes Volumen aus dem Gasraum entnommen wird, reichern sich bei der SPME die Analyten auf der Faser an, wodurch die Empfindlichkeit der Methode gesteigert wird.

2.3.3 Extraktion mit membrangeschützter Faser

Bei dieser Technik befindet sich die Faser in einer Hohlmembran aus Cellulose, wobei die Membran so beschaffen ist, dass sie während der Extraktion niedermolekulare Substanzen passieren lässt, die störenden höhermolekularen jedoch nicht. Auf diese Weise wird die Faser, ähnlich der HS-SPME, vor Verunreinigungen geschützt. Vorteile bietet diese Technik beim Nachweis von Analyten, deren Flüchtigkeit zu gering für die HS-SPME ist. Zusätzlich kann bei entsprechender Materialauswahl für die schützende Membran die Selektivität gesteigert werden. Der Nachteil dieser Technik liegt darin, dass die Analyten zunächst durch die Membran hindurch diffundieren müssen, bevor sie die Beschichtung der Faser erreichen. Hierdurch verlängert sich die Zeit bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes erheblich. Um diesem Effekt entgegenzuwirken und somit die Extraktionszeit zu verkürzen, ist die Erhöhung der Extraktionstemperatur und die Verwendung besonders dünner Membranen vorteilhaft [79].

2.4 Derivatisierung

Viele Substanzen können auf Grund ihrer hohen Polarität, ihrer Thermolabilität oder ihrer zu geringen Flüchtigkeit nicht oder nur unzureichend gaschromatographisch getrennt werden. Die Modifizierung funktioneller Gruppen eines Moleküls versetzt den Analytiker jedoch in die Lage, diese Substanzen trotzdem gaschromatographisch zu trennen.

Ziele, die durch eine Derivatisierung erreicht werden können:

- die Möglichkeit der Analyse schwer flüchtiger Verbindungen
- Erhöhung der Stabilität der Analyten
- Verbesserung der Trennung der einzelnen Peaks
- Verbesserung der Peaksymmetrie
- Verbesserung der Auflösung und Verminderung des Peaktailing bei der Analyse polarer Verbindungen (-OH, -COOH, =NH, -NH₂, -SH etc.)
- positive Beeinflussung des Ansprechens des Detektors

Auch für die HS-SPME ist die ausreichende Flüchtigkeit der Analyten eine wichtige Voraussetzung. Um eine genügende Stabilität und Flüchtigkeit der Probenmoleküle zu erreichen, können diese silyliert, methyliert, acetyliert oder auf andere Weise derivatisiert werden. Die Auswahl des Derivatisierungsreagenzes erfolgt unter Berücksichtigung der vorhandenen funktionellen Gruppen der zu untersuchenden Verbindung und des Zieles, welches durch die Derivatisierung erreicht werden soll. Weiterhin sollte es schnell und quantitativ mit den Analyten, nicht jedoch mit der Polymerbeschichtung der Faser oder der GC-Säule reagieren und es sollte vollständig wieder von der Faser desorbieren.

Die Herstellung der Derivate kann dabei auf verschiedene Arten durchgeführt werden:

- *Direkte Derivatisierung der Analyten in der Probenmatrix:* Bei dieser Methode wird das Derivatisierungsreagenz direkt zur Probe in das Vial gegeben und die Umsetzungsreaktion kann unter definierten Bedingungen stattfinden. Im Anschluss daran erfolgt die Extraktion der derivatisierten Verbindungen mittels SPME. CANCHO et al. derivatisierten Aldehyde in Trinkwasser mit Pentafluorbenzylhydroxylamin [80], OKAJIMA et al. verwendeten diese Methode, um in Blut Amphetamin und Methamphetamin mit Pentafluorbenzylbromid zu derivatisieren [34], UGLAND et al. wiesen Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA nach direkter Derivatisierung mit Propylchlorameisensäure in Urin nach [35] und HALL et al. derivatisierten Benzoyllecgonin in Urin mit Hexylchlorameisensäure [36]. Nachteil dieses Verfahrens ist, dass viele Derivatisierungsreagenzien, insbesondere Silylierungs- und Acetylierungsmittel wie BSTFA, MSTFA, MBTFA und TFA, äußerst hydrolyseempfindlich sind, wodurch eine Derivatisierung in biologischen Matrices, wie z.B. Blut und Urin, nicht möglich ist.
- *Derivatisierung auf der SPME-Faser (on-fiber derivatization):* Hierbei erfolgen die Umsetzungsreaktionen direkt auf der Faser. Dabei sind zwei Vorgehensweisen zu unterscheiden: a) Die Faser wird zuerst mit dem Derivatisierungsreagenz gesättigt, indem sie in das Reagenz, welches sich in einem separaten Vial befindet, eingetaucht oder im Dampfraum darüber exponiert wird. Im Anschluss daran werden die Analyten mit der so vorbehandelten Faser absorbiert. MILLS et al. nutzten diese Technik, um kurzkettige Fettsäuren in Stuhl mit 1-Pyrenyldiazomethan zu derivatisieren [81]. Besonders geeignet für diese Verfahrensweise sind schwerflüchtige und reaktive Reagenzien. b) Es werden zuerst die Analyten mittels Faser extrahiert und danach wird die Faser in das Derivatisierungsreagenz eingetaucht oder im Dampfraum darüber exponiert. JURADO et al. und SPORKERT et al. wiesen mit dieser Methode Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom

Amphetamintyp in Urin bzw. Haaren nach, indem sie die Faser nach der Extraktion der Analyten im Headspace eines Vials mit TFA bzw. MBTFA exponierten [71,72].

- *Derivatisierung auf der Säule (on-column derivatization)*: Hierbei werden die Analyten zunächst mit Hilfe der Faser extrahiert. Anschließend wird das Derivatisierungsreagenz, direkt vor der Überführung der Faser in den Injektor des Gaschromatographen, mit einer Mikroliterspritze in diesen injiziert, und die Analyten werden während der Desorption im heißen Injektor derivatisiert. Dieses Verfahren wurde von NAGASAWA et al. [28] und NAMERA et al. [37] zum Nachweis von Amphetamin und Methamphetamin in Blut mittels SPME angewendet.
- *Derivatisierung im Injektor des Gaschromatographen*: PAN und PAWLISZYN verwendeten diese Technik für die Derivatisierung von Fettsäuren ($C_{10} - C_{22}$). Durch die Zugabe von Tetramethylammoniumhydrogensulfat ($TMA-HSO_4$) oder Tetramethylammoniumhydroxid ($TMA-OH$) zur Probe werden Ionenpaare gebildet, die von der SPME-Faser extrahiert werden. Während der Desorption der Faser im heißen Injektor des GC erfolgt dann die Umsetzung der Analyten in die jeweiligen Methylester [82].

2.5 Kopplung der SPME mit anderen Analysetechniken

Auch die Kopplung der SPME mit anderen chromatographischen sowie spektroskopischen Methoden ist möglich, was vor allem im Hinblick auf schwer flüchtige und thermisch labile Substanzen von Vorteil sein kann.

Neben der Kopplung mit der GC wird SPME häufig in Kombination mit der HPLC betrieben. Hierbei wird die Faser mit Hilfe eines speziellen SPME/HPLC-Interface in Kontakt mit der mobilen Phase des HPLC-Systems gebracht, wodurch die Analyten desorbiert und auf die Trennsäule überführt werden. Diese Methode wurde z. B. eingesetzt zum Nachweis von Pestiziden [8,55], Tensiden [9], polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen [83] und Carbonsäuren, Phthalaten und Tensiden [84]. Das entsprechende Interface zur Kopplung mit der HPLC wurde von CHEN und PAWLISZYN entwickelt [83] und wird kommerziell von der Firma Supelco vertrieben. Eine Automatisierung der SPME in Kombination mit HPLC wurde von EISERT et al. zur direkten Extraktion von Phenylharnstoff-Pestiziden aus Wasser mittels in-tube SPME beschrieben [54].

HIRATA et al. [85] und MEDVEDOVICI et al. [86] haben Verfahren zur Kopplung der SPME mit der SFC (eng. supercritical fluid chromatography) entwickelt und LI et al. [55] sowie

NGUYEN et al. [10] verwendeten die SPME in Kombination mit der Kapillarelektrophorese (CE).

Weiterhin wurden spektroskopische Verfahren wie UV- [16,17], IR- [87] und Raman-Spektroskopie [18], ICP-MS [56], AED [57,58], AFS [88] und PED [89] mit der SPME gekoppelt.

Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Kopplung SPME/GC-MS beschäftigt, wird für weitere Details auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen.

2.6 Extraktionsparameter

Bei der Festphasenmikroextraktion handelt es sich um einen Gleichgewichtsprozess, woraus sich ergibt, dass die maximale Menge an Analyt die von der SPME-Faser extrahiert werden kann (= Extraktionsausbeute), von dessen Verteilungskoeffizienten K abhängig ist. Die nachfolgend aufgeführten Parameter besitzen alle einen mehr oder minder großen Einfluss auf K und sollten deshalb für die Entwicklung einer möglichst spezifischen und empfindlichen SPME-Methode optimiert werden.

2.6.1 Henry'sche Konstante

Die Henry-Konstante K_H ist ein Maß für die Gleichgewichtsverteilung einer Substanz zwischen einer wässrigen Phase und der Luft. Sie ist definiert als das Verhältnis des Dampfdrucks einer Substanz zu ihrer Löslichkeit bzw. Sättigungskonzentration im Wasser und ist nach dem Gesetz von Henry gültig für reale Lösungen mit einer geringen Konzentration einer Verbindung in ihrem Lösungsmittel.

Übertragen auf die SPME bedeutet dieses, dass der Verteilungskoeffizient Dampfraum/Probe K_{hs} auch durch die Henry'sche Konstante K_H ausgedrückt werden kann, wobei die Konzentration einer Verbindung im Dampfraum über der Probe umso höher ist, je größer K_{hs} ist. Hieraus folgt, dass die Extraktionsausbeuten schwerflüchtiger Analyten mit ihren niedrigen Dampfdrücken auf Grund ihres niedrigen Verteilungskoeffizienten K_{hs} niedriger sind, als diejenigen von flüchtigen Verbindungen mit hohen K_{hs} -Werten.

2.6.2 Octanol/Wasser-Koeffizient

Mit Hilfe des Octanol/Wasser-Koeffizienten kann die Verteilung einer Verbindung in einem gesättigten n-Octanol-Wasser-Gemisch veranschaulicht werden. Dabei gilt:

$$K_{OW} = \frac{c_O}{c_W} \quad (8)$$

Wobei c_O die Konzentration der Verbindung in der n-Octanol-Phase und c_W die Konzentration der Verbindung in der Wasser-Phase angibt.

Hieraus folgt, dass die Affinität einer Verbindung zur organischen Phase umso größer ist, je größer ihr Octanol/Wasser-Koeffizient ist. Diesen Effekt kann man sich zu Nutze machen, um die Affinität einer chemischen Verbindung zur Beschichtung der SPME-Faser abzuschätzen.

2.6.3 Faserbeschichtung

Analog der GC oder der HPLC, wo für fast jede Klasse von Verbindungen eine Chromatographiesäule mit der entsprechenden Füllung oder Beschichtung erhältlich ist, gibt es auch bei der SPME Fasern mit den unterschiedlichsten Polymerbeschichtungen in diversen Schichtdicken, jeweils abgestimmt auf die unterschiedlichen Polaritäten und Flüchtigkeiten der zu bestimmenden Analyten.

Bei den homogenen polymeren Faserbeschichtungen Polydimethylsiloxan (PDMS) und Polyacrylat (PA) handelt es sich um immobilisierte, hochviskose Flüssigkeiten, welche die Analyten **absorbieren**. Vorteil dieser Beschichtungen ist, dass, im Vergleich zu anderen Beschichtungen, welche die zu extrahierenden Substanzen **adsorbieren**, kaum Störungen durch die Verdrängung der Analyten durch andere Probenbestandteile mit größerer Affinität zur Faser auftreten. Des Weiteren weisen Fasern mit flüssigen Phasen eine höhere Kapazität (kaum Sättigung) sowie einen weiteren linearen Bereich (> 100 ppm) bei der Extraktion größerer (halbflüchtiger) Moleküle auf, als Fasern mit festen Beschichtungen. Dieses wird jedoch für den Preis höherer Nachweisgrenzen erkaufte [90].

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den heterogenen Beschichtungen (Carbowax/DVB, PDMS/DVB, Carbowax/TR/DVB) um Polymere mit eingebetteten Partikeln (fest-flüssig). Hierbei erfolgt die Extraktion durch **Adsorption** der Analyten an der Oberfläche des porösen

Feststoffes; d.h. der Nernst'sche Verteilungssatz ist nicht mehr gültig, es gelten Adsorptionsisothermen. Nachteile dieser Beschichtungen sind der schmalere Linearitätsbereich sowie die erhöhte Störanfälligkeit durch Fremdstoffen und daraus folgend eine stärkere Matrixbelastung.

Mitbestimmend für die Empfindlichkeit ist auch die Filmdicke der Beschichtungen. Hierbei führen größere Filmdicken zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung. Weiterhin hat jede Substanz, ausgehend von ihrem spezifischen Verteilungskoeffizienten, eine definierte Affinität zu einem bestimmten Fasermaterial; d.h. je größer der Faser/Headspace-Verteilungskoeffizient K_{fh} (bei konstantem Headspace/Matrix Verteilungskoeffizienten K_{hs}), desto größer ist die Affinität der Faser zum Analyten und desto länger dauert es bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes. Vorteil eines großen K_{fh} ist jedoch eine höhere Extraktionsausbeute.

Durch geschickte Auswahl des Polymermaterials entsprechend der Polarität und der Flüchtigkeit der zu bestimmenden Verbindungen kann folglich die Extraktionsausbeute positiv beeinflusst werden.

Nachfolgend eine kurze Zusammenstellung der Kriterien für die Auswahl der geeigneten Faserbeschichtung:

- Die PDMS-Beschichtung deckt den größten Bereich, was die Flüchtigkeit und Polarität der einzelnen Substanzklassen betrifft, ab und kann daher als universell einsetzbar betrachtet werden.
- Die PA-Phase eignet sich insbesondere für polare Verbindungen.
- Geringere Filmdicken verkürzen die Zeit bis zu Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes (PDMS) und führen zu einer Verbesserung der Selektivität.
- Größere Filmdicken sind vor allem für die Extraktion niedermolekularer Analyten geeignet.
- Poröse Phasen eignen sich insbesondere für flüchtige Verbindungen, wobei Carbowax/DVB besser für polare Verbindungen wie Alkohole und Ketone geeignet ist.
- Cave! Poröse Beschichtungen können diskriminierend auf höher molekulare Verbindungen wirken, PDMS/DVB stärker als Carbowax/TR/DVB.

In Tab. 1 sind alle zur Zeit bei der Firma Supelco (alleiniger Hersteller) kommerziell erhältlichen Fasertypen mit den jeweiligen Besonderheiten und Anwendungsmöglichkeiten (Angaben des Herstellers) aufgelistet.

Tabelle 1: Kommerziell erhältliche SPME-Fasern und deren Anwendungsmöglichkeiten (Angaben des Herstellers).

Beschichtung	Filmdicke [µm]	Besonderheiten	Anwendung
Polydimethylsiloxan (PDMS)	100	ungebundene Phase	flüchtige Verbindungen (M_R 60 – 275)
	30	ungebundene Phase	unpolare halbflüchtige Verbindungen (M_R 80 – 500)
	7	gebundene Phase	unpolare hochmolekulare Verbindungen (M_R 125 – 600)
Polyacrylat (PA)	85	partiell vernetzte Phase	polare halbflüchtige Verbindungen (M_R 80 - 300)
Carboxen/PDMS	75	partiell vernetzte Phase	Gase und niedermolekulare Verbindungen (M_R 30 – 225)
PDMS/Divinylbenzen (DVB)	65	partiell vernetzte Phase	flüchtige Verbindungen, Amine, Nitroaromaten (M_R 50 – 300)
Carbowax/DVB	65	partiell vernetzte Phase	Alkohole, polare Verbindungen (M_R 40 – 275)
DVB/ Carboxen auf PDMS	50/30	partiell vernetzte Phase	flüchtige und halbflüchtige Aromen, $C_3 - C_{20}$ (M_R 40 – 275)
PDMS/DVB	60	partiell vernetzte Phase	Amine und polare Verbindungen (nur HPLC)
Carbowax/templated resin	50	partiell vernetzte Phase	oberflächenaktive Stoffe (nur HPLC)

Vor der Erstanwendung müssen die Fasern, in Abhängigkeit von der jeweiligen Beschichtung, unterschiedlich lange bei definierten Temperaturen im Injektor des GC konditioniert werden.

2.6.4 Extraktionstemperatur

Die Extraktionstemperatur ist ein wichtiger Faktor, den es zu optimieren gilt. Ist die Temperatur so hoch, dass die Analyten von der Probe in den Gasraum wandern, erfolgt die Extraktion ausschließlich aus dem Gasraum. Hieraus resultiert eine schnellere Einstellung

des Verteilungsgleichgewichtes, so dass im Idealfall sogar auf eine Probendurchmischung verzichtet werden könnte.

Der Effekt, der durch die Erhöhung der Temperatur erzielt wird, beruht auf einer Erhöhung der Diffusionskoeffizienten bei gleichzeitiger Erniedrigung der Verteilungskonstanten. Hierdurch wird eine schnellere Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes erzielt, allerdings mit dem Nachteil, dass sich gleichzeitig die Empfindlichkeit für weniger flüchtige Verbindungen verschlechtert. Insgesamt gesehen überwiegt jedoch der positive Einfluss den die Temperatur auf die Wanderung der Analyten von der Probe in den Gasraum hat.

Vorteilhaft wäre in diesem Fall die Erwärmung der Probe bei gleichzeitiger Kühlung der Faser. Entsprechende Versuche wurden von ZHANG et al. durchgeführt [73]. Dabei leiteten sie gekühltes Kohlendioxid in einer inneren Kapillare durch die Beschichtung der Faser, welche sich an der äußeren Kapillare befindet und erzielten so eine Erhöhung der Aufnahmekapazität der Faser. Auf diese Weise erhöhte sich jedoch nicht nur die Extraktionsausbeute der interessierenden Analyten sondern auch diejenige von störenden Matrixbestandteilen, so dass einer verbesserten Sensitivität eine verminderte Selektivität gegenüberstand.

2.6.5 Extraktionszeit

Die Dauer der Extraktion hat einen erheblichen Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Prinzipiell ist es erstrebenswert, ein Verteilungsgleichgewicht in dem System Faser/Gasraum/Probe zu erreichen, da unter diesen Bedingungen das System stationär ist und Veränderungen im Massentransfer das Endergebnis nicht beeinflussen.

Je nach Analyt und verwendeter Faser kann es jedoch, insbesondere bei Verwendung der Direktimmersion, sehr lange dauern bis sich das Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat. Dieses ist vor allem bei hohem Probenaufkommen in der Routineanalytik hinderlich.

Dauert die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes sehr lange, können die Extraktionszeiten verkürzt werden. Hierbei ist zu beachten, dass der Fehler bezüglich der Extraktionsausbeute umso größer wird, je kürzer die Extraktionszeit ist. Verläuft der ansteigende Ast der Extraktionszeitkurve sehr steil, bedeuten geringste Abweichungen der Extraktionszeit große Unterschiede in der Extraktionsausbeute, was insbesondere bei Anwendung der manuellen SPME zum Tragen kommt. Die Verwendung eines Autosamplers erlaubt hingegen die präzise Einhaltung der zuvor eingestellten Zeiten, so dass

reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden, auch wenn die Extraktion vor Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes abgebrochen wird.

Die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes erfolgt um so schneller, je kleiner K_{fh} ist (bei gleichbleibendem K_{hs}). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei die Diffusion der Analyten in der Probe, obwohl deren Diffusionskoeffizient in der Faserbeschichtung geringer ist. Die Dicke der Beschichtung ist, verglichen mit den anderen beiden Phasen, jedoch so gering, dass die Diffusion der Analyten innerhalb der Beschichtung schneller erfolgt als in der Probe. Dabei ist die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtes unabhängig von der Konzentration des Analyten in der Probe [75].

Ist K_{hs} jedoch klein, so ist die Analytkonzentration im Gasraum gering. Dadurch beeinflusst die Extraktion aus dem Gasraum die Analytkonzentration in der Probe und es dauert lange, bis sich das Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat.

Wie Gleichung (7) unter Punkt 2.2.2 zu entnehmen ist, verlängert sich die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes mit zunehmender Faserkapazität. Eine hohe Faserkapazität bedeutet andererseits aber auch eine hohe Sensitivität. Im Sinne kurzer Analysenzeiten sollte die Faserbeschichtung so dünn wie möglich gewählt werden, wobei gleichzeitig auf eine ausreichende Sensitivität geachtet werden muss.

2.6.6 Probendurchmischung

Bei der Direktimmersion bildet sich mit der Zeit eine an Analyt verarmte, statische Grenzschicht um die Faser herum aus, da die Diffusion der Analyten aus der wässrigen Phase in die Grenzschicht langsamer vonstatten geht als die Diffusion von der Grenzschicht in die Beschichtung der Faser. Die Dicke der Grenzschicht ist dabei abhängig von der Durchmischung der Probe und deren Viskosität. D.h. je visköser die Probenlösung und je schlechter deren Durchmischungsgrad, desto dicker die Grenzschicht und desto länger die Zeit bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes. Um dem entgegenzuwirken, sollte die Probe durchmischt werden.

Die Zeit, die dabei in einer perfekt gerührten Lösung bis zum Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes Faser/Probe verstreicht, ist proportional zur Filmdicke der Faser und umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten der Verbindung in der Beschichtung [91]. Das heißt, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist unter diesen idealen Bedingungen die Diffusion des Analyten in die Polymerbeschichtung der Faser. Unter realen Bedingungen ist eine perfekt gerührte Lösung jedoch nicht zu erreichen, so dass sich die

Grenzschicht zwar minimieren, aber nicht eliminieren lässt. Rechnerisch kann die Zeit, die bis zum Erreichen von 95% des Verteilungsgleichgewichtes verstreicht, mit folgender Gleichung abgeschätzt werden:

$$t_e = t_{95\%} = 3 \cdot \frac{\delta K_{fs} (b - a)}{D_s} \quad (9)$$

$(b - a)$ = Dicke der Faserbeschichtung

D_s = Diffusionskoeffizient des Analyten in der Probenlösung

K_{fs} = Verteilungskoeffizient Faser/Probenmatrix

Die Reduzierung der Grenzschicht und damit die Beschleunigung der Gleichgewichtseinstellung, kann auf unterschiedliche Art und Weise durchgeführt werden. Die Probe kann mit einem Magnetrührer gerührt [64,65,67,69,92], in einem Agitator geschüttelt [93] oder im Ultraschallbad [94] behandelt werden. GEPPERT versetzt nicht die Probe in Bewegung, sondern bewegt die Faser durch Rotation [95] und beim SPME-Autosampler der Firma Varian besteht die Möglichkeit, die Faser vibrieren zu lassen.

Bei der Verwendung eines Magnetrührers ist darauf zu achten, dass die Rührgeschwindigkeit und damit der Massentransfer, von der Mitte zum Rand hin ansteigt und es zu einer Art Strudelbildung (Kegel) im Vial kommt. Für reproduzierbare Ergebnisse bei der Direktimmersion ist daher die Position der Faser im Probengefäß konstant zu halten, wobei eine Exponierung der Faser in der Mitte des Strudels vermieden werden sollte.

Auch bei der HS-SPME führt eine Probendurchmischung zu einer Verringerung der Extraktionszeit, im Gegensatz zur Direktimmersion verarmt hier jedoch die Probenoberfläche auf Grund des Übertritts der Probenmoleküle in den Gasraum. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist in diesem Fall der Massentransfer von der Probenmatrix in den Dampfraum, denn der Diffusionsprozess der Moleküle im Gasraum ist äußerst schnell. Eine Durchmischung der Probe führt somit zu einer Verkleinerung der Grenzschicht, da der Übertritt der Moleküle in den Dampfraum beschleunigt wird.

2.6.7 pH-Wert

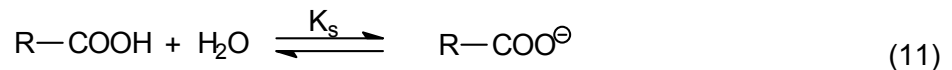
Die Einstellung des pH-Wertes einer wässrigen Lösung führt zu einer Änderung der Verteilungskonstanten K für dissoziierbare Verbindungen, da nur die undissoziierte Form einer Säure oder Base von der Faser extrahiert wird [74]:

$$K = K_0 \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (10)$$

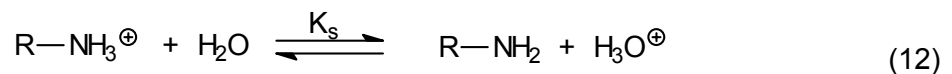
K_0 = Verteilungskoeffizient der undissoziierten Form zwischen Probe und Faser

K = Verteilungskoeffizient der Phasenverteilung bei gegebenem pH-Wert

Je niedriger der pH-Wert, desto mehr Säure liegt in ihrer undissoziierten Form vor und desto höher ist die Empfindlichkeit. Optimale Bedingungen herrschen, wenn der pH-Wert zwei Einheiten unterhalb des pK_s -Wertes der korrespondierenden Säure liegt.



Für Basen gilt dementsprechend, dass der pH-Wert optimal eingestellt ist, wenn er zwei Einheiten über dem pK_s -Wert liegt.



2.6.8 Salzzusätze

Ein weiteres Verfahren für das Erzielen höherer Extraktionsausbeuten ist der von der Flüssig-Flüssig-Extraktion bekannte Zusatz von Salzen (Aussalzeffekt). In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Substanz und der Salzkonzentration kann ein Salzzusatz entweder zu einer Erhöhung oder zu einer Erniedrigung der Extraktionsausbeute führen [19-22, 59,98]. Häufig sind die positiven Auswirkungen einer Salzzugabe um so höher, je höher die Polarität der Analyten ist.

Bei den verwendeten Salzen, wie z.B. Natriumsulfat, Natriumchlorid oder Natriumhydrogencarbonat, handelt es sich um starke Elektrolyte, die auf Grund ihrer hydratisierenden Eigenschaften den interessierenden Verbindungen die Hydrathülle entziehen, wodurch sich deren Dampfdruck erhöht. Diese Erhöhung des Dampfdruckes p_i^0 und der damit verbundene Anstieg des Aktivitätskoeffizienten γ_i führen zu einer Erhöhung des Verteilungskoeffizienten K_{hs} , da K_{hs} direkt proportional zu p_i^0 und γ_i ist:

$$K_{hs} \sim p_i^0 \cdot \gamma_i \quad (13)$$

Weiterhin führt die Zugabe des Salzes zu einer Erhöhung des Probenvolumens V_s , wodurch sich naturgemäß das Dampfraumvolumen V_h vermindert. Daraus resultiert, nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes (es befinden sich genauso viele Analytmoleküle in der Probenlösung wie im Dampfraum), eine höhere Analytkonzentration c_h im Gasraum (siehe auch 2.2.1) und folglich eine Erhöhung der Extraktionsausbeute. Es verschiebt sich somit das Phasenverhältnis β der gasförmigen (V_h) und der flüssigen (V_s) Phase zugunsten der flüssigen Phase:

$$\beta = \frac{V_h}{V_s} \quad (14)$$

Mathematisch lassen sich die Konzentrationsverhältnisse im Gasraum folgendermaßen darstellen:

$$c_o \cdot V_s = c_h \cdot V_h + c_s \cdot V_s \quad (15)$$

da

$$K_{hs} = \frac{c_h}{c_s} \quad (16)$$

folgt daraus

$$c_o \cdot V_s = c_h \cdot V_h + \frac{c_h}{K_{hs}} \cdot V_s \quad (17)$$

Nach der Umformung von Gleichung (17) erhält man:

$$c_0 \cdot V_s = c_h \cdot \left(V_h + \frac{1}{K_{hs}} \cdot V_s \right) \quad (18)$$

Und aus dem Einsetzen von Gleichung (14) in Gleichung (18) folgt:

$$c_0 = c_h \left(\frac{V_h}{V_s} + \frac{V_s}{K_{hs} \cdot V_s} \right) = c_h \cdot \left(\beta + \frac{1}{K_{hs}} \right) \quad (19)$$

$$c_h = \frac{c_0}{\left(\beta + \frac{1}{K_{hs}} \right)} \quad (20)$$

Der Grund für die Erhöhung der Analytkonzentration im Gasraum nach dem Zusatz eines Salzes ist demnach in der Verschiebung des Phasenverhältnisses β zugunsten der flüssigen Phase, sowie in der Erhöhung des Verteilungskoeffizienten K_{hs} zu sehen [98].

2.6.9 Organische Lösemittel

Organische Lösemittel senken nicht nur den Dampfdruck der Analyten in der Probe (Verkleinerung von K_{sh}), sie verändern auch die Polarität der Probenmatrix und konkurrieren mit den Analyten um Absorptionsstellen an der Polymerbeschichtung der Faser, was zu einer Verminderung der Extraktionsausbeute führen kann.

Um die Eigenschaften von Wasser und somit den Verteilungskoeffizienten Faser/Probe K_{fs} zu verändern, ist gemäß Gleichung (21) eine Lösemittelkonzentration von über 1% notwendig, die bei der Verwendung lösemittelhaltiger Standards durchaus erreicht werden kann.

$$K_{fs} = 2,303 \cdot K_{fw} \cdot \exp\left(\frac{P_1 - P_2}{2}\right) \quad (21)$$

K_{fw}	= Verteilungskoeffizient von reinem Wasser
$P_1 = 10,2$	= Polaritätsparameter von Wasser (10,2)
$P_2 = cP_s + (1 - c) \cdot P_1$	= Polaritätsparameter einer Wasser/Lösemittel-Mischung mit der Lösemittelkonzentration c und dem Polaritätsparameter P_s
P_s	= Polaritätsparameter des Lösemittels

Aus diesem Grunde sollte zunächst das Lösemittel unter Stickstoff abgedampft werden, bevor die Probe der SPME zugeführt wird, oder es sollten wässrige Standardlösungen verwendet werden. Sind organische Bestandteile bereits in der Probenmatrix enthalten, sollte bei der Quantifizierung dieser Proben mit internen Standards gearbeitet werden.

Bei der Direktimmersion ist zu bedenken, dass die Fasern durch Lösemittel quellen und beim Zurückziehen in die schützende Kanüle Schaden nehmen können.

2.6.10 Eintauchtiefe der Faser in das Probengefäß

Bei der HS-SPME weisen die Analyten in der Gasphase über der Probe sehr hohe Diffusionskoeffizienten auf. Aus diesem Grund sollte die Position der Faser im Gasraum über der Probe keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute haben.

2.6.11 Probenvolumen

Untersuchungen zum Einfluss des Probenvolumens auf die Extraktionsausbeute wurden von GÓRECKI et al. durchgeführt [98]. Bei der Anwendung der Headspace-Technik führt die Erhöhung des Probenvolumens bei gleichzeitiger Verkleinerung des Gasraumvolumens, durch die damit verbundene Erhöhung der Analytkonzentration im Gasraum, zu einer Steigerung der Extraktionsausbeute (siehe 2.2.1).

Für die Erzielung hoher Extraktionsausbeuten sollte deshalb der Gasraum über der Probe so klein wie möglich gehalten werden. Diese Minimierung des Dampftraumes ist bei Anwendung des CombiPAL jedoch nur bedingt möglich, da durch die Schüttelbewegungen des Agitators die Faser mit Probenmatrix (z.B. Blut) kontaminiert und somit unbrauchbar werden würde.

2.6.12 Desorptionsbedingungen

Nach der Extraktion erfolgt die thermische Desorption der auf der Faser angereicherten Substanzen im heißen Injektor des Gaschromatographen, da mit steigender Temperatur der Diffusionskoeffizient der Analyten in der Polymerbeschichtung steigt und der Verteilungskoeffizient Gas/Polymerbeschichtung K_{hf} sich vermindert.

Dabei sollte die Injektortemperatur einige Grade über dem Siedepunkt des höchst siedenden Analyten liegen, um möglichst rasch eine vollständige Desorption zu erreichen. Allerdings ist auch die vom Hersteller angegebene maximale Temperaturbelastung der Fasern zu beachten, die je nach Faser zwischen 270 °C (PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS) und 340 °C (7 µm PDMS) liegt.

Um scharfe Peaks im Chromatogramm zu erhalten, ist es notwendig, dass die Analyten möglichst schnell auf die Säule gelangen. Dazu muss ein hoher linearer Trägerfluss um die Faser herum geschaffen werden. Dieses wird durch eine Verminderung des Innendurchmessers (I.D.) des Liners erreicht, wobei der I.D. so gering wie möglich gewählt werden sollte (z.B. 0,8 mm). Liner mit großen Innendurchmessern (I.D.) von 3 – 5 mm, wie sie für die Flüssiginjektion verwendet werden, sind für die SPME daher ungeeignet, weil sie nur sehr niedrige Flussraten im Injektor erzeugen. Hieraus resultiert ein nur langsamer Transport der verdampften Verbindungen auf den Anfang der GC-Säule.

Ein anderer Vorteil eines raschen Abtransportes der Analyten ist die Vermeidung von weiteren Interaktionen mit der Faserbeschichtung, was zur einer Verlängerung der Desorptionszeiten führen würde.

Nicht nur die Geschwindigkeit des Trägergases spielt eine Rolle für die Erzielung scharfer Peaks, sondern auch die Geschwindigkeit, mit der die Faser im Injektor ausgefahren wird. Die Faser heizt sich sehr schnell nach dem Einführen in den heißen Injektor auf. Bei zu langsamem Ausfahren der Faser beginnen die Analyten bereits zu desorbieren, noch bevor die Faser komplett exponiert ist. Dieses kann sich in Form von Doppelpeaks äußern.

Die Temperatur im Injektor ist nicht an allen Stellen gleich. Für eine effektive und reproduzierbare Desorption der Analyten ist es jedoch notwendig, dass die SPME-Faser in der heißesten Zone des Injektors exponiert wird. Sowohl die manuelle wie auch die automatisierte SPME bieten die Möglichkeit, die Faser unterschiedlich tief in den Liner des Injektors eintauchen zu lassen. Beim manuellen Faserhalter befindet sich dazu eine Skala von 0 – 5 cm auf dem Spritzenkörper. Durch entsprechende Positionierung eines Gummiringes kann der Faserhalter unterschiedlich weit in das Gewinde zum Einstellen der Eintauchtiefe hineingedreht werden, so dass die Faser unterschiedlich tief im Injektor

positioniert wird. Bei Verwendung des CombiPAL Autosamplers wird die Eintauchtiefe mit Hilfe der Software am Computer eingestellt. Vorteil ist hierbei, dass die Eintauchtiefe reproduzierbar millimetergenau eingestellt werden kann.

Auch die Dauer der Desorption spielt eine Rolle für die Empfindlichkeit einer SPME-Methode. Exponiert man die Faser zu kurz im Injektor, werden die Analyten nicht vollständig von der Faserbeschichtung desorbiert und die Empfindlichkeit verschlechtert sich, zudem sind Verschleppungen möglich. Eine zu lange Desorptionszeit verkürzt hingegen die Lebensdauer der Faser und verlängert die Analysenzeiten. Um einen Kompromiss zwischen vollständiger Desorption der Analyten und möglichst langer Haltbarkeit der Faser, kurzen Analysenzeiten und Vermeidung von Verschleppungen zu finden, sind ebenfalls Experimente zur Optimierung der Desorptionszeit durchzuführen.

3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie [99,100]

3.1 Grundlagen zur Kapillargaschromatographie

Die Kapillargaschromatographie hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer Hochleistungstrenntechnik entwickelt, die in nahezu jedes Labor ihren Eingang gefunden hat. Voraussetzung für die gaschromatographische Trennung ist, dass die zu untersuchenden Substanzen in Gasform vorliegen oder sich durch Verdampfen unzersetzt in den gasförmigen Zustand überführen lassen.

Im Injektor des Gaschromatographen werden die flüchtigen Analyten in den Trägergasstrom (i.d.R. inerte Gase wie Stickstoff, Helium oder Wasserstoff) überführt, nicht flüchtige Verbindungen werden zunächst dort verdampft. Mit Hilfe des Trägergasstromes werden die gasförmigen Substanzen durch die Trennsäule transportiert, welche sich in einem bis auf etwa 350°C beheizbaren Ofen befindet. Die Trennung der Verbindungen erfolgt auf Grund von Verteilungsvorgängen (Adsorption und Desorption) zwischen der mobilen Phase (Trägergas) und der stationären Phase, welche auf der Innenseite der Kapillare aufgebracht ist. Am Ende der Trennsäule befindet sich ein Detektionssystem, mit dessen Hilfe die nach unterschiedlichen Zeiten eluierten Verbindungen registriert und in messbare Signale umgewandelt werden. Diese können in Form eines Gaschromatogramms grafisch dargestellt werden.

Kapillartrennsäulen bestehen aus Quarzglas (engl. fused silica) und sind zur Verbesserung der Stabilität außen mit einer Polyimid-Beschichtung versehen. Ihre Länge beträgt zwischen etwa 10 und über 100 m, gebräuchlich sind jedoch Längen von 25 bis 60 m; der Innendurchmesser liegt zwischen etwa 0,1 und 0,5 mm. Auf die Innenseite der Kapillare wird in dünner Schicht (0,2 bis 0,5 µm) die stationäre Phase aufgebracht, welche in der Regel aus einem dünnen Film aus Silikonölen (Polysiloxane) und/oder Polyethylenglykolen besteht. Durch Austausch der Methylgruppen der Polysiloxane gegen andere funktionelle Gruppen (z.B. Phenyl-, Vinyl-, Cyanopropyl-, Trifluorpropylgruppen) und durch Kombination mit Polyethylenglykolen kann die Polarität der stationären Phase variiert und zur Verbesserung der Trennleistung den zu untersuchenden Verbindungen angepasst werden.

3.2 Grundlagen zur Massenspektrometrie

3.2.1 Prinzip

Die Massenspektrometrie ist eine Methode, welche bei Kopplung mit einem chromatographischen Trennsystem in der Lage ist, neben der Strukturidentifizierung auch eine quantitative Analyse von komplexen Substanzgemischen mit unzähligen Verbindungen zu ermöglichen.

Das Prinzip beruht darauf, dass aus dem Zerfall eines ionisierten Moleküls verschiedene strukturspezifische Fragmente resultieren, die gemäß ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) in einem magnetischen oder elektromagnetischen Feld getrennt werden können.

Hierzu werden in der sogenannten Ionenquelle die ankommenden Moleküle im gasförmigen Zustand in positive oder negative Ionen überführt (Ionisation). Diese werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und zu einem Ionenstrahl fokussiert. Auf Grund ihrer Instabilität zerfallen die geladenen Ionen in geladene und ungeladene Bruchstücke (Fragmentierung), welche in einem weiteren magnetischen bzw. elektromagnetischen Feld (Massenanalysator) entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses getrennt werden (Massenfokussierung). Damit die gebildeten Ionen weder mit Luft- noch mit Probenmolekülen kollidieren bzw. reagieren, finden diese Vorgänge bei niedrigen Drücken im Hochvakuum statt. Die entstandenen Fragmente werden schließlich im Elektronenvervielfacher (Detektor) durch Aufprall auf speziell beschichtete Oberflächen in Elektronen umgewandelt und zu einem messbaren Strom verstärkt. Dieser kann mit Hilfe eines Datenverarbeitungssystems in Form eines Massenspektrums grafisch dargestellt werden, indem die Häufigkeit der Ionen gegen ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetragen wird.

In vielen Fällen lässt sich aus dem Massenspektrum die relative Molekülmasse bestimmen, da fast ausschließlich einfach geladene Ionen entstehen, so dass das Masse-zu-Ladungsverhältnis der relativen Molekülmasse entspricht.

3.2.2 Ionisierungsmethoden

Nur ionisierte Moleküle bzw. deren Fragmente können mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Dabei sollte der Ionisierungsprozess kontrollierbar und reproduzierbar sein, sowie die Informationen über die Struktur der Verbindung möglichst erhalten bleiben. Bei Quadrupolmassenspektrometern, wie sie in dieser Arbeit verwendet

wurden, sind die am häufigsten verbreiteten Ionisierungstechniken die Elektronenstoßionisation (EI) und die chemische Ionisation (CI).

3.2.2.1 Elektronenstoßionisation

Unter der Elektronenstoßionisation versteht man die direkte Ionisierung eines Moleküls mit Hilfe eines Elektronenstrahls hoher Energie. Die EI ergibt sehr gut reproduzierbare Massenspektren, wobei die erhaltenen Fragmente vielfach die Identifizierung der Molekülstruktur einer Verbindung ermöglichen, oder zumindest Informationen über Teilstrukturen liefern. Ein Nachteil dieser Technik ist, dass isomere Verbindungen zu identischen Massenspektren führen können.

Durch den Beschuss eines Moleküls mit energiereichen Elektronen wird sehr viel Energie auf das Molekül übertragen, wodurch es zu einer intensiven Fragmentierung kommt. Dieses führt bei labilen Strukturen dazu, dass kein Molekülion mehr erhalten wird und wichtige Informationen bezüglich der Molekülmasse und der Elementarzusammensetzung nicht direkt zugänglich sind.

Bei der EI lässt man üblicherweise Elektronen mit einer Energie von etwa 70 eV auf die zu untersuchenden Moleküle einwirken. Von dieser Energie verbleibt nach der Ionisierung ein gewisser Teil im Molekülion. Entspricht diese Überschussenergie mindestens der Aktivierungsenergie einer Zerfallsreaktion, erfolgt eine Spaltung chemischer Bindungen, d.h. es kommt zur Fragmentierung (Zerfall des Molekülions). Molekülionen ohne oder mit nur geringer Überschussenergie fragmentieren nicht und werden mit ihrer Massenzahl, die der relativen Molekülmasse entspricht, im sogenannten Molpeak registriert.

Reaktionen, die bei der Elektronenstoßionisation ablaufen können:

a) Aus dem Molekül wird ein Elektron herausgeschlagen:



Bei Heteroatomen (O, S, N) wird eines der Elektronen der freien Elektronenpaare entfernt.

b) Das Molekül nimmt ein Elektron auf:



In beiden Fällen entstehen geladene Teilchen mit einem ungepaarten radikalischen Elektron, woraus entweder positiv geladene Radikal-Kationen oder negativ geladene Radikal-Anionen resultieren. Bei der i.d.R. verwendeten Elektronenenergie von 70 eV ist die Bildung von Radikal-Kationen jedoch etwa um den Faktor 1000 wahrscheinlicher als die Bildung von Radikal-Anionen.

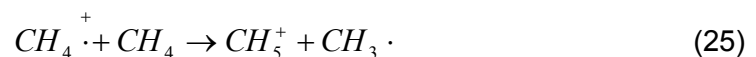
3.2.2.2 Chemische Ionisation

Unter der chemischen Ionisation versteht man verschiedene Ion-Molekül-Reaktionen, die bei vergleichsweise hohen Ionenquellendrücken (0,1 – 1 mbar) ablaufen. Dabei entstehen positiv und/oder negativ geladene Ionen, wobei das Vorzeichen der an der Ionenquelle angelegten Spannungen und die Reaktionsbedingungen entscheiden, ob Kationen oder Anionen entstehen.

Die CI gehört zu den schonendsten Ionisierungsmethoden. Die Probe wird hierbei zusammen mit einem Reaktandgas (z.B. Methan, H₂, Isobutan, Alkohole, He, CO₂, N₂, NO, NH₃) in die übliche Elektronenstoß-Ionenquelle eingeführt. Anschließend erfolgt zunächst eine Elektronenstoßionisation des Reaktandgases, hier am Beispiel von Methan dargestellt:



Durch den relativ hohen Methandruck (10² Pa) werden infolge von Zusammenstößen von Methanmolekülen mit noch nicht ionisierten Methanmolekülen Protonen auf die noch nicht ionisierten Methanmoleküle übertragen:



Die gebildeten CH_5^+ -Kationen (protoniertes Methan) können durch Abgabe von Protonen die Probe (M) ionisieren:



Die Quasi-Molekülonen MH^+ fragmentieren und man erhält ein CI-Massenspektrum. Bei der Verwendung nicht wasserstoffhaltiger Reaktandgase kommt es durch Ladungsaustausch mit Probenmolekülen zur Bildung von Radikalkationen, hier am Beispiel von Helium dargestellt:



Durch die richtige Auswahl des Reaktandgases kann die Intensität der Ionisation und der Fragmentierung gesteuert werden.

3.2.3 Registrierung der Ionen

Die massenspektroskopische Information kann auf unterschiedliche Weise erhalten werden, wobei bei Quadrupolmassenspektrometern im Wesentlichen die nachfolgend beschriebenen Techniken zur Anwendung kommen.

3.2.3.1 Full Scan Modus

Im sogenannten Full Scan Modus (FSCAN) werden vollständige Massenspektren registriert. Dieses dient insbesondere der Identifizierung von (unbekannten) Verbindungen. Zur Registrierung der Massenspektren und des Gaschromatogramms wird zunächst der gewählte Massenbereich mit einer Auflösung von 0,1 amu und einer Integrationszeit von etwa 50 bis 200 μs pro Messpunkt abgetastet, wobei die totale Messzeit für einen Bereich von 500 amu ca. 0,25 bis 1 s beträgt. Danach werden die Massensignale rekonstruiert, das

Signalmaximum und die Signalfäche berechnet und alle Werte, die größer als eine vorher gewählte Signalintensität sind, abgespeichert. Zum Schluss werden alle Signalintensitäten eines Massenscans zum Totalionenstrom aufsummiert und das Gaschromatogramm anhand der für jeden Massenscan berechneten Totalionenstromintensitäten rekonstruiert. Das hierdurch erhaltene Gaschromatogramm wird auch als Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) bezeichnet.

3.2.3.2 Selected Ion Monitoring

Beim Selected Ion Monitoring (SIM) handelt es sich um eine selektive Ionendetektion, bei der nur wenige ausgewählte Ionen registriert werden. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass die Detektion von nur wenigen ausgewählten Ionen eine längere Messzeit pro Ion (dwell time) ermöglicht, was zu einer Erniedrigung der Nachweisgrenze um den Faktor 10 bis 100 führt.

Nachteil der SIM-Technik ist, dass sie nur bedingt zur Identifizierung von unbekanntem Verbindungen geeignet ist, da die Informationen zur sicheren Identifizierung stark reduziert sind. Der Hauptanwendungsbereich des Selected Ion Monitoring ist daher die Quantifizierung bestimmter Analyten in einer Probe.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien und Methoden

4.1.1 Chemikalien

Die Derivatisierungsreagenzien N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) und N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) wurden von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen.

Merck (Darmstadt, Deutschland) lieferte, jeweils in p.a.-Qualität, Ammoniumsulfat, Kaliumcarbonat, Kaliumchlorid, Kaliumnitrat, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumfluorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumsulfat, 10 M Natronlauge, 1 M Salzsäure, 1 M Schwefelsäure und Phosphatpuffer der pH-Werte 2 – 10.

Für die aus den Reinsubstanzen hergestellten Stammlösungen und weiteren Verdünnungen wurde jeweils Methanol (HPLC grade, Baker, Groß-Gerau, Deutschland) als Lösungsmittel verwendet.

4.1.2 Vergleichssubstanzen

Inhalationsnarkotika

Chloroform und Ether stammten von Baker (Groß-Gerau, Deutschland), Enfluran und Isofluran von Abbott (Wiesbaden, Deutschland) und Halothan von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

Pestizide

Die Phosphorsäureester Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Demethon-S-methylsulfon, Diazinon, Dichlorvos, Dicrotophos, Dimethoat, Disulfoton, Edifenphos, Fenitrothion, Fenthion, Malathion, Methidathion, Mevinphos, Monocrotophos, Omethoat, Parathion-ethyl, Parathion-methyl und Quinalphos, sowie die chlorierten Kohlenwasserstoffe Aldrin, o,p'-DDD, o,p'-DDE, Dieldrin, α - Endosulfan, β - Endosulfan, Endosulfan-sulfat, Endrin, α -HCH, β -HCH, γ -HCH (= Lindan), Heptachlor, Heptachlor-exo-epoxid und Methoxychlor wurden von Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland) bezogen.

Die internen Standards Azobenzen (Organophosphate) und 2,4-Dichlor-1-naphthol (chlorierte Kohlenwasserstoffe) stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland).

Psychoaktive Substanzen

Cannabidiol (CBD), Cannabinol, Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC), Δ -9-Tetrahydrocannabinol- d_3 (THC- d_3), DL-Amphetamin, DL-Amphetamin- d_5 , DL-Methamphetamin, DL-Methamphetamin- d_{11} , DL-3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), DL-3,4-Methylendioxyamphetamin- d_5 (MDA- d_5), DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA), DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin- d_5 (MDEA- d_5), DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin (MDMA), DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin- d_5 (MDMA- d_5), (1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)butan-2-yl)(methyl)azan (MBDB), (1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)butan-2-yl)(methyl)azan - d_5 (MBDB- d_5), 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)butan-2-ylazan (BDB), Codein, Codein- d_3 , Dihydrocodein (DHC), DL-2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin Perchlorat (EDDP Perchlorat), DL-2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin - d_3 Perchlorat (EDDP- d_3 Perchlorat), DL-Methadon, DL-Methadon- d_9 , wurden von Promochem (Wesel, Deutschland) bezogen.

Trizyklische Antidepressiva

Amitriptylin, Clomipramin, Desipramin, Dibenzepin, Dosulepin, Doxepin, Imipramin, Nortriptylin, Opipramol, Trimipramin, Maprotilin (ISTD) und Mianserin (ISTD) stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland).

Injektionsnarkotika

Diazepam, Etomidat, Ketamin, Methohexital, Midazolam, Nordazepam, Oxazepam, Pentobarbital, Propofol, Thiopental, sowie die internen Standards 2,4-Di-tert-butylphenol, Thiobutabarbital und Hexobarbital wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

4.1.3 Geräte

4.1.3.1 SPME

Die Faserhalter für die manuelle und die automatisierte SPME, sowie die SPME-Fasern wurden von Supelco (Deisenhofen, Deutschland) bezogen, wobei für die Untersuchung aller in dieser Arbeit behandelten Substanzgruppen Fasern mit einer 100 μ m PDMS-Beschichtung und einer 23er Nadelstärke (für die Verwendung mit dem Merlin Microseal Dichtungssystem) verwendet wurden. Vor dem ersten Einsatz wurden die Fasern jeweils, entsprechend den

Vorschriften des Herstellers, eine Stunde bei 250°C im Injektor des Gaschromatographen konditioniert.

Bei der manuellen SPME wurde zum Inkubieren und Extrahieren der Proben ein sogenannter Gefäß-Puck zur Aufnahme von acht 15 mL-Vials der Firma Supelco verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Aluminiumblock zum Heizen/Rühren für die HS-SPME, welcher mittels eines Heizrührers, unter Kontrolle eines Kontaktthermometers, auf die entsprechende Temperatur gebracht wurde.

Die automatisierte SPME wurde mit Hilfe eines voll programmierbaren Mehrzweckprobengebers der Firma CTC Analytics (Chromtech, Idstein, Deutschland), dem CTC CombiPAL, durchgeführt. Dieser ist mit einem sogenannten Agitator ausgestattet. Hierbei handelt es sich um einen kleinen beheizbaren Ofen mit Platz für sechs Probengefäße, der durch Schütteln für eine gleichmäßige Durchmischung der Proben sorgt. Die Programmierung erfolgt mit der Software des Herstellers.

4.1.3.2 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die gaschromatographische Trennung und die massenspektrometrische Detektion erfolgten an zwei unterschiedlichen GC-MS-Geräten, je nachdem ob die manuelle oder die automatisierte SPME verwendet wurde:

Manuelle SPME

Gaschromatograph:	HP 5890/Serie II Plus (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)		
Detektor:	Massenspektrometer:	5972 N MSD (Hewlett Packard)	
	Ionisierungsart:	Elektronenstoß, 70 eV, 0.5 s/Scan	
	Ionenquellentemperatur:	230°C	
	Quadrupoltemperatur:	150°C	
	Interfacetemperatur:	280°C	
Datenaufnahme:	HP-Chemstation		
Injektor:	Liner:	Glas, I.D. 0,8 mm (Supelco,Deisenhofen,Deutschland)	
	Betriebsart:	splitlos	
	Septum:	Merlin Microseal	
GC-Säule:	HP-5MS, I.D. 30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 mm (Hewlett Packard)		
Trägergas:	Helium, 1 mL/min		

Automatisierte SPME

Gaschromatograph:	Agilent 6890/Serie II Plus (Chromtech, Idstein, Deutschland)		
Detektor:	Massenspektrometer:	5973 N MSD (Agilent)	
	Ionisierungsart:	Elektronenstoß, 70 eV, 0.5 s/Scan	
	Ionenquellentemperatur:	230°C	
	Quadrupoltemperatur:	150°C	
	Interfacetemperatur:	280°C	
Datenaufnahme:	HP-Chemstation		
Injektor:	Liner:	Glas, I.D. 0,8 mm (Supelco, Deisenhofen, Deutschland)	
	Betriebsart:	splitlos	
	Septum:	Merlin Microseal	
GC-Säule:	HP-5MS, I.D. 30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 mm (Hewlett Packard)		
Trägergas:	Helium, 1 ml/min		
Probengeber:	Mehrzweckprobengeber CTC CombiPAL (Chromtech, Idstein, Deutschland) mit Cycle Composer Steuerungssoftware		

Von allen interessierenden Analyten wurden zunächst methanolische Lösungen hergestellt. Aliquote Teile dieser Lösungen wurden in das GC/MS-System injiziert, um die entsprechenden Retentionszeiten und charakteristischen Massenspektren der Substanzen zu erhalten und die chromatographische Trennung zu optimieren. Die daraus resultierenden Temperaturprogramme sind unter Punkt 4.6 bei der Beschreibung der Analysendurchführung der einzelnen Substanzklassen aufgeführt.

Für die massenspektrometrische Detektion der getrennten Verbindungen wurde anschließend eine Methode für das Selected Ion Monitoring (SIM-Modus) erstellt, wobei für jeden Analyten mindestens zwei, wenn möglich jedoch drei oder mehr charakteristische Ionenspuren (m/z) ausgewählt wurden. Die charakteristischen Massenfragmente der einzelnen Verbindungen sind ebenfalls unter Punkt 4.6 aufgeführt, wobei die zur Quantifizierung verwendete Masse (target ion) jeweils fett gedruckt ist. Die dwell-time (Dauer der Messung einer einzelnen Masse) wurde dabei so eingestellt, dass alle ausgewählten Massen möglichst dreimal pro Sekunde gemessen wurden.

4.1.4 Probenmaterial (Asservierung und Vorbehandlung)

Blutproben

Unbelastete Vollblutproben wurden von der Blutbank der Universitätsklinik Bonn bezogen und mittels GC-MS auf die Abwesenheit der jeweils zu untersuchenden Analyten getestet. Die Proben enthielten keine gerinnungshemmenden Mittel und wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Auf Grund des hohen Probendurchsatzes wurde auf die Verwendung von Serum für die Methodenentwicklung verzichtet und die verwendeten Vollblute nicht weiter behandelt. Weiterhin konnten mit Hilfe des Vollblutes komplexe Matrices, wie Organmaterial, besser simuliert werden.

Bei Obduktionen asserviertes Blut wurde in PE-Röhrchen gefüllt und bei -30°C gelagert.

Haarproben

Die Leerproben für die Haaranalytik stammten von der Verfasserin dieser Arbeit selbst, wodurch die Abwesenheit der zu untersuchenden Substanzen garantiert war.

Die Haarproben von Todesfällen wurden bei Obduktionen im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn gewonnen. Sie wurden direkt über der Kopfhaut mit einer Schere abgeschnitten und an der kopfhautnahen Seite mit einem Band fixiert, um bei Bedarf Aussagen über den Zeitraum eines möglichen Drogenkonsums treffen zu können.

Die Vorbehandlung der Haarproben erfolgte in Anlehnung an KAUERT et al. [101]. Dazu wurden die Haarproben jeweils 5 Minuten mit Aqua dest., danach mit Petrolether und anschließend mit Dichlormethan, unter Zuhilfenahme eines Vortexmischers (Vortex Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz), gewaschen. Nach dem Trocknen zwischen Papiertüchern erfolgte eine mechanische Zerkleinerung.

Bei Analysen authentischer Proben wurden die Waschlösungen asserviert und gegebenenfalls analysiert, um mögliche Kontaminationen von außen feststellen zu können.

Gewebeproben

Organproben wurden bei Obduktionen im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn gewonnen und in Braunglasgefäßen asserviert; die Aufbewahrung erfolgte bei -30°C.

Vor der Durchführung der Analysen wurden die Proben mit Hilfe eines Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) homogenisiert und anschließend eingewogen.

4.2 Optimierung der SPME-Methoden

Für die Durchführung der Optimierungsexperimente wurden die Standards und internen Standards in 10 mL-Headspace-Vials gegeben und eventuell vorhandene organische Lösemittel im Abdampfblock unter Stickstoffbegasung abgedampft. Anschließend wurden die Matrix und ggf. weitere Zusätze hinzugefügt und die Vials sofort mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer Aluminium- (manuelle SPME) bzw. einer magnetischen (automatisierte SPME) Bördelecke verschlossen und analysiert. Bei jeder Untersuchung eines Parameters wurden alle übrigen Bedingungen konstant gehalten, wobei die Standardbedingungen zu Beginn einer jeden Methodenoptimierung wie folgt aussahen:

Tabelle 2: Standardmäßige SPME- und GC-Bedingungen zu Beginn einer jeden Methodenoptimierung. Die Angaben in Klammern gelten für die manuelle SPME.

Parameter	Einstellung
Inkubations- und Extraktionstemperatur	90°C
Inkubationszeit	5 min (15 min)
Extraktionszeit	15 min
Eintauchtiefe der Faser in das Vial (nur CombiPAL)	23 mm
Injektortemperatur	250°C
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	52 mm (3 cm)
Desorptionszeit	5 min

Nach jeder Optimierung eines Parameters wurde mit dem ermittelten Optimum weitergearbeitet. Die massenspektrometrische Detektion nach der gaschromatographischen Trennung erfolgte im SIM-Modus, die Optimierungsexperimente wurden jeweils als Doppel- (manuelle SPME) bzw. Dreifachbestimmung (automatisierte SPME) durchgeführt.

4.2.1 Inkubations- und Extraktionstemperatur

Zur Ermittlung der optimalen Inkubations- und Extraktionstemperatur wurden die Proben bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und extrahiert, wobei die Anfangstemperatur entsprechend der Flüchtigkeit der jeweils untersuchten Verbindungen gewählt und dann in 10°C-Schritten erhöht wurde.

4.2.2 pH-Wert

Der Einfluss verschiedener pH-Bedingungen auf die Extraktionsausbeute der Analyten wurde anhand des Zusatzes verschiedener Säuren, Basen und Pufferlösungen zu dotierten Leerproben untersucht.

4.2.3 Salzzusätze

Um die Auswirkungen des Aussalzens der Proben auf die Extraktionsausbeute zu untersuchen, wurden Leerproben dotiert, mit unterschiedlichen Salzen versetzt und extrahiert.

4.2.4 Extraktionszeit

Für die Bestimmung der Zeit die bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes verstreicht, wurden Extraktionen von unterschiedlicher Dauer durchgeführt. Dabei wurden die Extraktionszeiten so lange gesteigert, bis das Verteilungsgleichgewicht erreicht war.

Das Verteilungsgleichgewicht ist erreicht, wenn trotz Zunahme der Absorptionszeit die Extraktionsausbeute konstant bleibt.

4.2.5 Probendurchmischung

Zur Optimierung der Probendurchmischung wurden dotierte Proben bei unterschiedlichen Agitatorgeschwindigkeiten extrahiert und die Auswirkungen auf die Extraktionsausbeute untersucht.

4.2.6 Eintauchtiefe der Faser in das Vial

Um zu überprüfen, ob die Position der Faser im Dampfraum des Vials einen Einfluss auf die Extraktionsausbeute der Analyten hat, wurden Proben dotiert und bei unterschiedlicher Eintauchtiefe der Faser in den Headspace extrahiert und analysiert.

4.2.7 Injektortemperatur

Die Bestimmung der optimalen Injektortemperatur erfolgte durch die Extraktion dotierter Proben mit der SPME-Faser und anschließender thermischer Desorption bei unterschiedlich hohen Injektortemperaturen.

4.2.8 Eintauchtiefe der Faser in den Injektor

Analog der Eintauchtiefe der Faser in das Vial, wurden dotierte Proben extrahiert und zur Desorption der Analyten unterschiedlich tief im Injektor des Gaschromatographen exponiert.

4.2.9 Desorptionszeit

Zur Optimierung der Desorptionszeit wurden dotierte Leerproben extrahiert und die Faser anschließend unterschiedlich lange zur Desorption im Injektor exponiert.

4.2.10 Derivatisierung

Die Derivatisierung der Cannabinoide und Opioide wurde mit MSTFA, die der synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp mit MBTFA, jeweils auf der Faser im Dampfraum über dem Derivatisierungsreagenz durchgeführt. Für die Optimierungsexperimente wurde die Faser sowohl vor der Extraktion mit Derivatisierungsreagenz beladen, als auch nach erfolgter Extraktion im Vial mit dem Derivatisierungsreagenz exponiert (siehe 2.4).

Weiterhin wurden Versuche mit unterschiedlichen Volumina an Derivatisierungsreagenz durchgeführt, sowie die Dauer der Derivatisierung variiert und jeweils die Auswirkungen auf die erhaltenen Peakflächen untersucht.

4.3 Nachweis und Quantifizierung

Die Analyten wurden anhand ihrer Retentionszeiten und der Peakflächenverhältnisse ihrer charakteristischen Ionenspuren identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Kalibrationskurven unter Verwendung interner Standards, wobei jeweils das Peakflächenverhältnis des für die Quantifizierung verwendeten Massenfragmentes (target ions) von Analyt und zugehörigem internen Standard gebildet wurde.

Jede Kalibration bestand aus mindestens 5 Messpunkten, wobei zur Herstellung der einzelnen Kalibrationslevels die gleiche Matrix verwendet wurde, wie für die Optimierungsexperimente der einzelnen Methoden.

4.4 Validierung

Die Validierung der entwickelten Methoden erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben des Journal of Chromatography B [102]. Dafür wurden Peakreinheit und Selektivität, die Linearität der Kalibration, die Reproduzierbarkeit, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Wiederfindungen bzw. absoluten Wiederfindungen bestimmt. Sämtliche Analysen wurden mit dotierten Leerproben unter den optimierten SPME-Bedingungen durchgeführt; die Detektion der Analyten im Massenspektrometer erfolgte im Selected-Ion-Monitoring (SIM-Modus).

4.4.1 Peakreinheit und Selektivität

Für die Bestimmung der Peakreinheit und Selektivität wurden jeweils 3 Leerproben und 3 dotierte Proben analysiert und die Chromatogramme auf Interaktionen von Substanz- und Matrixpeaks untersucht.

4.4.2 Linearität der Kalibration

Zur Bestimmung der Linearitätsbereiche der Kalibrationen wurden Leerproben mit aufsteigenden Konzentrationen der Verbindungen, angefangen im Bereich der Nachweisgrenze und über einen Bereich von mehreren Größenordnungen, dotiert und analysiert. Die Kalibrationskurven wurden anschließend durch Berechnung der Peakflächenverhältnisse der target ions der einzelnen Verbindungen und der

entsprechenden internen Standards erhalten. Die Beurteilung der Linearität erfolgte auf Grundlage des Korrelationskoeffizienten der linearen Regression.

4.4.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte bei den Pestiziden und den Inhalationsnarkotika auf Basis eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 3. Dazu wurden Leerproben mit absteigenden Konzentrationen der Analyten, beginnend im Arbeitsbereich bis hinunter zu einer Konzentration bei der keine Peaks mehr im Chromatogramm erkennbar waren, dotiert.

Für die übrigen Substanzklassen wurde zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG und BG) das Software-Programm „B.E.N“ verwendet. Hierbei handelt es sich um ein auf Excel basierendes Programm zur Berechnung analytischer Grenzwerte nach DIN 32645, das von HERBOLD und SCHMITT (Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin, Heidelberg) entwickelt wurde [103].

4.4.4 Präzision

Nach den Richtlinien der GTFCh beschreibt die Präzisionskontrolle das Ausmaß der Übereinstimmung der Ergebnisse wiederholter Messungen, wobei zwischen der Präzision in der Serie (auch **intraday**-Präzision genannt) und der Präzision von Tag zu Tag (auch **interday**-Präzision genannt) unterschieden wird.

Für die **intraday**-Präzision wurden 6 Wiederholmessungen von dotierten Leerproben an einem Tag und für die **interday**-Präzision je 3 Wiederholmessungen an 6 unterschiedlichen Tagen durchgeführt und jeweils die Relative Standardabweichung RSD (Variationskoeffizient) bestimmt (siehe 4.5.2).

Gemäß Journal of Chromatography [102] sollten die Messungen jeweils bei einer hohen und einer niedrigen Konzentration durchgeführt werden, wobei darunter keine definierten Konzentrationen zu verstehen sind. Die Begriffe hoch und niedrig sind immer in Bezug zur Kalibriergeraden des jeweiligen Analyten zu sehen.

4.4.5 Genauigkeit

Die Genauigkeit definiert die Annäherung von einzelnen Messergebnissen an den **wahren Wert** (= zudotierte Analytmenge) und beschreibt systematische und zufällige Abweichungen. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\text{Genauigkeit}[\%] = \frac{\text{gemessene Konzentration} - \text{Zielkonzentration}}{\text{Zielkonzentration}} \cdot 100 \quad (29)$$

Unter Zielkonzentration wird in diesem Zusammenhang diejenige Menge an Analyt verstanden, die der Leerprobe zudotiert wurde.

Die Vorgaben sind erfüllt, wenn sowohl die Werte für die Präzision, wie auch die Werte für die Genauigkeit 10% (hohe Konzentration) bzw. 20% (niedrige Konzentration) nicht überschreiten.

4.4.6 Wiederfindungen

Für die Bestimmung von Wiederfindungen wurde der Gehalt von dotierten Leerproben anhand von Kalibriergeraden unter Verwendung interner Standards ermittelt, wobei jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden.

Absolute Wiederfindungen wurden in Anlehnung an OKAJIMA et al. [34] bestimmt, indem die Peakfläche einer definierten Menge eines mittels SPME analysierten Standards mit der Peakfläche einer gleich hohen, direkt injizierten Menge desselben Standards verglichen wurde. Dabei versteht man unter der absoluten Wiederfindung den kompletten Transfer eines Analyten von der Matrix in die zu vermessende Lösung. Übertragen auf die SPME bedeutet das, den Transfer des Analyten von der Matrix auf die Faser.

Hierbei ist darauf zu achten, dass das Volumen welches flüssig injiziert wird, dieselbe **absolute** Menge an Analyt enthält, wie das Vial, das der SPME zugeführt wird. Die Berechnung der absoluten Wiederfindung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Extraktionsausbeute}[\%] = \frac{\text{Peakfläche (SPME)}}{\text{Peakfläche (Flüssiginjektion)}} \cdot 100 \quad (30)$$

Unter Peakfläche wird in diesem Zusammenhang derjenige Wert verstanden, der aus dem Quotienten der Peakflächen des target ions des Analyten und des target ions des entsprechenden internen Standards erhalten wird.

4.5 Statistische Berechnungen

Nachfolgend sind die Grundlagen für die verwendeten statistischen Berechnungen aufgeführt.

4.5.1 Korrelationskoeffizient

Beim Korrelationskoeffizienten handelt es sich um eine dimensionslose Indexzahl, deren Wertebereich zwischen -1 und $+1$ liegt. Er ermöglicht es, die Streuung der Punkte von der Regressionsgeraden mit der Gesamtstreuung des Verfahrens zu vergleichen und gibt auf diese Weise Auskunft über die lineare Abhängigkeit zwischen zwei Datensätzen (z.B. die Größe der Peakfläche in Abhängigkeit von der injizierten Menge an Analyt).

Beträgt der Wert -1 oder $+1$, liegen alle Punkte auf der berechneten Regressionsgeraden, wobei das Vorzeichen Auskunft über die Steigung der Geraden gibt ($+$ aufsteigend; $-$ absteigend). Ist $r = 0$, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Wertepaaren.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach:

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (31)$$

r = Korrelationskoeffizient

y_i = Signalwert

\bar{y} = Mittelwert der Signalwerte

4.5.2 Standardabweichung

Die Standardabweichung s_x ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um ihren Mittelwert. Mit ihrer Hilfe können Aussagen über das Ausmaß des zufälligen Fehlers getroffen werden. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (32)$$

x_i = Konzentrationswert

\bar{x} = Mittelwert der Konzentrationswerte

N = Anzahl der Daten

4.5.3 Relative Standardabweichung

Die Relative Standardabweichung V (auch Variationskoeffizient genannt) erhält man, indem die Standardabweichung s_x auf den Mittelwert \bar{x} bezogen wird; die Angabe der Werte erfolgt in Prozent. Berechnet wurde die relative Standardabweichung folgendermaßen:

$$V[\%] = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (33)$$

4.6 Durchführung der Analysen

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise bei der Durchführung der Festphasenmikroextraktion entspricht den Bedingungen **nach** der Optimierung der einzelnen Parameter.

4.6.1 Inhalationsnarkotika

Die Methodenoptimierung erfolgte mit Halothan, Enfluran wurde als interner Standard (ISTD) verwendet. In die Validierung wurden zusätzlich Chloroform, Ether und Isofluran miteinbezogen.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanz in Methanol wurde eine Stammlösung hergestellt, welche Halothan in einer Konzentration von 1,9 mg/mL enthielt und bei -30°C aufbewahrt. Aus dieser Lösung wurden methanolische Arbeitslösungen in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Der interne Standard (ISTD) Enfluran wurde in einer Konzentration von 1,5 mg/mL in Methanol gelöst und auf gleiche Weise behandelt.

Manuelle SPME

In ein 10 mL-Headspace-Vial wurden 0,5 mL Blut, 0,2 g Ammoniumsulfat, 2 mL 0,1 M Schwefelsäure sowie 10 µL des internen Standards (1,5 mg Enfluran/mL) gegeben und direkt mit einem Silikonseptum und einer Aluminiumbördelkappe verschlossen. Nach einer 15minütigen Inkubation des Vials bei 100°C wurde die Faser zur Extraktion für 10 Minuten im Headspace exponiert. Anschließend wurde 2 Minuten lang bei 250°C im Injektor des GC desorbiert, wobei die Eintauchtiefe der SPME-Faser 2 cm betrug.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur: 40°C, 2 min halten
1. Stufe: 30°C/min bis 280°C

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus

Tabelle 3: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Inhalationsnarkotika.

Substanz	m/z
Halothan	117 , 129, 179, 198 ^M
Enfluran	51, 117 , 147, 170
Isofluran	51, 73, 117, 149
Chloroform	47, 83 , 85, 118 ^M ,
Ether	59, 73, 74 ^M , 76

M = Molekülmasse; fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

Konventionelle Headspace GC (siehe 5.2.4 Fall A)

1 g Blut, Urin, Galle, Leber, Niere, Hirn bzw. Mageninhalt und 2 g Natriumsulfat wurden in ein 20 mL-Headspace-Vial gegeben und sofort mit einem Silikonseptum und einer Aluminiumbördelkappe verschlossen. Nach einer 45minütigen Inkubation bei 80°C wurde die Probe mittels Headspace GC in Kombination mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer externen Kalibriergeraden, wobei wässrige Halothan-Standards in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 100 µg/g verwendet wurden.

GC-Bedingungen:

GC:	Modell 8500 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland)
Detektor:	FID
Säule:	gepackte Stahlsäule (4 m x 1/8 in.) 5% Carbowax 20 M auf Carbopack B (60/80 mesh), (Supelco, Deisenhofen, Deutschland)
Trägergas:	N ₂ , 40 mL/min
Temperaturprogramm GC-Säule:	70°C bis 170°C
Injektortemperatur:	170°C
Detektortemperatur:	250°C

4.6.2 Organophosphate

In die Untersuchung einbezogen wurden: Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos, Chlorpyriphos, Demethon-S-methylsulfon, Diazinon, Dichlorvos, Dicrotophos, Dimethoat, Disulfoton, Edifenphos, Fenitrothion, Fenthion, Malathion, Methidathion, Mevinphos, Monocrotophos, Omethoat, Parathion-ethyl, Parathion-methyl und Quinalphos. Als interner Standard diente Azobenzen.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanzen in Methanol wurden Stammlösungen hergestellt, welche die Verbindungen jeweils in einer Konzentration von 1000 µg/mL enthielten und bei –30°C aufbewahrt. Aus diesen Lösungen wurden, durch Verdünnen mit Methanol, Arbeitslösungen in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit dem internen Standard (ISTD) Azobenzen wurde in gleicher Weise verfahren, die Konzentration der Stammlösung betrug hier 1 µg/mL.

Manuelle SPME

Für die Analyse der Proben wurden 0,5 mL Blut, 10 ng Azobenzen als Interner Standard, 0,2 g Ammoniumsulfat und 2 mL 0,1 M Schwefelsäure in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben und sofort mit einem Silikonseptum und einer Aluminiumbördelkappe verschlossen. Anschließend wurde das Vial 15 Minuten bei 120°C im Gefäß-Puck inkubiert. Für die Extraktion wurde die Faser 10 Minuten lang, ebenfalls bei 120°C, im Gasraum über der Probe exponiert. Die Desorption der Analyten erfolgte für 2 Minuten bei einer Temperatur von 250°C und einer Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des Gaschromatographen von 3 cm.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur: 120°C, 1 min halten
 1. Stufe: 10°C/min bis 290°C, 1 min halten

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus**Tabelle 4: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Organophosphate.**

Substanz	m/z
Bromophos-ethyl	97, 303, 357, 359
Bromophos-methyl	125, 213, 329, 331
Chlorfenvinphos	81, 109 , 267, 323
Chlorpyriphos	97, 197 , 286, 314
Diazinon	137 , 152, 179, 304 ^M
Dichlorvos	79, 109 , 145, 185
Disulfoton	88, 125, 186, 274^M
Edifenphos	109 , 173, 201, 310 ^M
Fenthion	109, 125, 169, 278^M
Malathion	93, 127 , 173, 285
Methidathion	85, 125, 145 , 302 ^M
Mevinphos	109, 127 , 164, 192
Parathion-ethyl	97, 109 , 139, 291 ^M
Parathion-methyl	79, 109 , 125, 263 ^M
Quinalphos	118, 146 , 157, 298 ^M
Azobenzen (ISTD)	77, 105, 152, 182

M = Molekülmasse; fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

4.6.3 Organochlor-Pestizide

Folgende Verbindungen aus der Klasse der chlorierten Kohlenwasserstoffe wurden untersucht: Aldrin, o,p'-DDD, o,p'-DDE, Dieldrin, α -Endosulfan, β -Endosulfan, Endosulfansulfat, Endrin, α -HCH, β -HCH, γ -HCH (= Lindan), Heptachlor, Heptachlor-exo-epoxid und Methoxychlor. Als interner Standard wurde 2,4-Dichlor-1-naphthol verwendet.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanzen in Methanol wurden Stammlösungen hergestellt, welche die Verbindungen jeweils in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ enthielten und bei -30°C aufbewahrt. Aus diesen Lösungen wurden durch Verdünnen mit Methanol, Arbeitslösungen in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit dem internen Standard (ISTD) 2,4-Dichlor-1-naphthol wurde in gleicher Weise verfahren.

Manuelle SPME

Für die Probenvorbereitung wurden 0,5 mL Blut mit 100 ng 2,4-Dichlor-1-naphthol als internem Standard, 0,2 g Natriumchlorid und 2 mL 0,1 M Schwefelsäure versetzt und in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben, welches sofort mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer Aluminiumbördelkappe verschlossen wurde. Nachdem das Vial 15 Minuten bei 100°C im Gefäß-Puck inkubiert wurde, erfolgte eine 15minütige Exponierung der SPME-Faser im Headspace über der Probe, gefolgt von einer 4minütigen Desorption bei 220°C im Injektor des GC. Die Eintauchtiefe der Faser betrug dabei 3,5 cm.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur:	170°C, 1 min halten
1. Stufe:	10°C/min bis 290°C, 1 min halten

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus**Tabelle 5: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Organochlor-Pestizide.**

Substanz	[m/z]
Aldrin	66, 263 , 293, 329, 362 ^M
o,p'-DDD	165, 199, 235 , 318 ^M
o,p'-DDE	176, 210, 246 , 281, 316 ^M
Dieldrin	79, 108, 237, 263 , 378 ^M
α -Endosulfan	159, 195 , 237, 265, 339 ^M
β -Endosulfan	159, 195 , 237, 265, 339 ^M
Endosulfan-sulfat	85, 227, 272 , 387, 420 ^M
Endrin	81, 113, 263 , 281, 345 ^M
α -HCH	51, 109, 181 , 217, 252 ^M
β -HCH	51, 109 , 181, 217, 252 ^M
γ -HCH = Lindan	109, 181 , 217, 252, 288 ^M
δ -HCH	51, 109 , 181, 217, 252 ^M
Heptachlor	135, 100 , 272, 337, 370 ^M
Heptachlor-exo-epoxid	81, 135, 183 , 253, 351 ^M
Methoxychlor	152, 212, 227 , 274, 344 ^M
2,4-Dichlor-1-naphthol (ISTD)	113, 149, 183, 212

M = Molekülmasse; fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

4.6.4 Cannabinoide und Opioide aus Haaren

Aus der Gruppe der Cannabinoide wurden Δ -9-Tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC), Cannabidiol (CBD) und Cannabinol (CBN), aus der Gruppe der Opioide Methadon, EDDP, Codein und Dihydrocodein untersucht. Als interne Standards dienten die entsprechenden deuterierten Verbindungen, wobei für CBD und CBN deuteriertes THC und für DHC deuteriertes Codein verwendet wurde, da hierfür keine eigenen internen Standards zur Verfügung standen.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanzen in Methanol wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 5 mg/L hergestellt und bei -30°C aufbewahrt. Aus diesen Lösungen wurden, durch Verdünnen mit Methanol, Arbeitslösungen und Standard-Gemische in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit den deuterierten internen Standards wurde in gleicher Weise verfahren.

Automatisierte SPME

10 mg Haare, 1 mL 1 M NaOH, 0,5 g Natriumcarbonat und je 20 ng der deuterierten internen Standards wurden in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben und mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. In ein separates Vial wurden 25 µL MSTFA pipettiert und beide Vials wurden 5 Minuten lang bei 80°C im Agitator des Autosamplers vorinkubiert und geschüttelt (650 U/min, Agitator on time 5 s, Agitator off time 2 s). Anschließend wurde die SPME-Faser 25 Minuten lang im Dampfraum der Probe und danach 8 Minuten im Dampfraum des Derivatisierungsreagenz exponiert (Eintauchtiefe der Faser jeweils 23 mm). Die Desorptionszeit im Injektor des GC betrug 5 Minuten bei 250°C und einer Eintauchtiefe der Faser von 52 mm.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur:	160°C, 1 min halten,
1. Stufe:	15°C/min bis 190°C, 10 min halten
2. Stufe:	5°C/min bis 250°C, 3 min halten
3. Stufe:	13°C/min bis 300°C, 3 min halten

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus

Tabelle 6: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der TMS-Derivate der untersuchten Cannabinoide, Opioiden und den entsprechenden deuterierten internen Standards.

Analyt	m/z
THC-di-TMS	303, 371 , 386
d ₃ -THC-di-TMS	315, 374 , 389
CBD-di-TMS	301, 337, 390
CBN-TMS	367 , 368, 382
Methadon-TMS	223, 294 , 295
d ₉ -Methadon-TMS	72, 226, 297
EDDP	262, 276, 277
d ₃ -EDDP	265 , 279, 280
Codein-TMS	196, 234, 343, 371
d ₃ -Codein-TMS	237 , 346, 374, 375
DHC-TMS	236, 282, 373

fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

4.6.5 Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom Amphetamin-Typ aus Haaren

In die Untersuchung einbezogen wurden: Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDEA, MDMA, BDB und MBDB. Als interne Standards dienten die entsprechenden deuterierten Verbindungen, wobei für BDB deuteriertes MBDB verwendet wurde, da kein eigener ISTD zur Verfügung stand.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanzen in Methanol wurden Stammlösungen hergestellt, welche alle Verbindungen in einer Konzentration von jeweils 5 mg/L enthielten und bei -30°C aufbewahrt. Aus diesen Lösungen wurden, durch Verdünnen mit Methanol, Arbeitslösungen und Standard-Gemische in den benötigten Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit den entsprechenden deuterierten internen Standards wurde in gleicher Weise verfahren.

Automatisierte SPME

10 mg Haare, 1 mL 10 M NaOH und 20 ng interner Standard-Mix wurden in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben und mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. In ein separates 10 mL-Vial wurden 25 µL MBTFA pipettiert und beide Vials wurden 5 Minuten lang bei 50°C im Agitator des Probengebers vorinkubiert und geschüttelt (650 U/min, Agitator on time 5 s, Agitator off time 2 s). Anschließend wurde die SPME-Faser 10 Minuten lang im Dampfraum über der Probe und danach 2 Minuten im Dampfraum über dem Derivatisierungsreagenz (Eintauchtiefe der Faser in das Vial jeweils 23 mm) exponiert. Die Desorptionszeit bei 240°C im Injektor des GC betrug 4 Minuten bei einer Eintauchtiefe der Faser von 52 mm.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur:	110°C, 1 min halten
1. Stufe:	8°C/min bis 210°C, 2 min halten
2. Stufe:	30°C/min bis 280°C, 5 min halten

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus**Tabelle 7: Im SIM Verwendete Massenfragmente (m/z) der TFA-Derivate von Amphetamin, synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp und den entsprechenden deuterierten internen Standards.**

Analyt	m/z
Amphetamin-TFA	91, 118, 140
d ₅ - Amphetamin-TFA	92, 123, 144
Methamphetamin-TFA	110, 118, 154
d ₁₁ - Methamphetamin-TFA	113, 126, 160
MDA-TFA	135 , 162, 275
d ₅ - MDA-TFA	136 , 167, 280
MDMA-TFA	110, 135, 154
d ₅ - MDMA-TFA	113, 136, 158
MDEA-TFA	140, 168 , 303
d ₅ - MDEA-TFA	141, 173 , 308
BDB-TFA	135 , 176, 289
MBDB-TFA	168 , 176, 303
d ₅ - MBDB-TFA	172 , 178, 308

fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

4.6.6 Trizyklische Antidepressiva

In die Untersuchung einbezogen wurden: Amitriptylin, Clomipramin, Desipramin, Dibenzepin, Dosulepin, Doxepin, Imipramin, Nortriptylin, Opipramol und Trimipramin. Die tetrazyklischen Antidepressiva Maprotilin und Mianserin fungierten als interne Standards.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanzen in Methanol wurden Stammlösungen hergestellt, welche die Verbindungen jeweils in einer Konzentration von 5 mg/L enthielten und bei -30°C aufbewahrt. Aus diesen Lösungen wurden, durch Verdünnen mit Methanol, Arbeitslösungen in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit den internen Standards (ISTD) Maprotilin und Mianserin wurde in gleicher Weise verfahren.

Manuelle SPME

1 mL Blut, 1 mL 1 M NaOH und je 500 ng Maprotilin und Mianserin wurden in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben und mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer Aluminium-Bördelkappe verschlossen. Nachdem 15 Minuten bei 120°C im Gefäß-Puck inkubiert wurde, erfolgte bei gleicher Temperatur eine 10minütige Absorption der Analyten im Headspace über der Probe. Die Desorption erfolgte 2,5 Minuten lang bei 250°C und einer Eintauchtiefe zwischen 3 und 3,5 cm im Injektor des GC.

Automatisierte SPME

1 mL Blut, 1 mL 1 M NaOH und je 500 ng Maprotilin und Mianserin wurden in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben und mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. Nachdem die Proben 3 Minuten lang bei 120°C im Agitator des Autosamplers vorinkubiert und geschüttelt (650 U/min, Agitator on time 5 s, Agitator off time 2 s) wurden, erfolgte die Extraktion der Analyten für 12,5 Minuten im Dampfraum über der Probe. Die Desorptionszeit im Injektor des GC betrug 2,5 Minuten bei 250°C, die Eintauchtiefe lag bei 52 mm.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur: 150°C, 1 min halten
 1. Stufe: 10°C/min bis 290°C, 1 min halten

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus

Tabelle 8: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten trizyklischen Antidepressiva.

Analyt	m/z
Amitriptylin	58 , 91, 202, 215,
Clomipramin	58 , 85, 227, 269, 314 ^M
Desipramin	71, 195 , 208, 235, 266 ^M
Dosulepin	58 , 202, 221, 234, 295 ^M
Doxepin	58 , 165, 178
Imipramin	58, 85, 193, 234 , 280 ^M
Nortriptylin	91, 189, 202 , 220, 263 ^M
Trimipramin	58, 99, 193, 249 , 294 ^M
Maprotilin (ISTD)	59, 70, 191, 203, 277 ^M
Mianserin (ISTD)	58 , 72, 165, 178, 193, 264 ^M

M = Molekülmasse; fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

4.6.7 Injektionsnarkotika

Untersucht wurden Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat, Diazepam, Oxazepam, Nordazepam und Midazolam, als interne Standards dienten 2,4-Di-tert-butylphenol, Thiobutabarbital und Hexobarbital.

Herstellung der Standardlösungen

Durch Lösen der Reinsubstanzen in Methanol wurden Stammlösungen hergestellt, welche die Verbindungen in einer Konzentration von jeweils 100 µg/mL enthielten und bei -30°C aufbewahrt. Aus dieser Lösung wurden, durch Verdünnen mit Methanol, Arbeitslösungen in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit den internen Standards (ISTD) wurde in gleicher Weise verfahren.

Automatisierte SPME

1 mL Blut, 1 mL Phosphatpuffer pH 7, 0,5 g Natriumsulfat und 0,25 µg/mL (2,4-di-tert-Butylphenol) bzw. 1 µg/mL (Pentobarbital, Thiobutabarbital) der internen Standards wurden in ein 10 mL-Headspace-Vial gegeben und mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 100°C im Agitator des CombiPAL inkubiert und geschüttelt (650 U/min; Agitator on time 5 s; Agitator off time 2 s). Nach einer 25minütigen Extraktion der Analyten aus dem Gasraum über der Probe (Eintauchtiefe der Faser in das Vial 23 mm), ebenfalls bei 100°C, erfolgte eine 1minütige Desorption bei 220°C im Injektor des GC. Die Eintauchtiefe der Faser in den Injektor betrug 52 mm.

Temperaturprogramm des GC-Säulenofens

Anfangstemperatur:	120°C, 1 min halten
1. Stufe:	10°C/min bis 190°C, 3 min halten
2. Stufe:	10°C/min bis 250°C, 4 min halten
3. Stufe:	10°C/ min bis 300°C, 2 min halten

Verwendete Massenfragmente (m/z) im SIM-Modus**Tabelle 9: Im SIM verwendete Massenfragmente (m/z) der untersuchten Injektionsnarkotika.**

Analyt	m/z
Diazepam	165, 221, 256 , 283, 284 ^M
Etomidat	77, 105 , 199, 244 ^M
Ketamin	138, 152, 180 , 209, 237 ^M
Methohexital	178, 221 , 233, 261, 262 ^M
Midazolam	163, 297, 310 , 325 ^M ,
Nordazepam	207, 235, 242 , 269, 270 ^M
Oxazepam	205 , 233, 239, 268,
Pentobarbital	55, 141, 156 , 226 ^M
Propofol	117, 121, 163 , 178
Thiopental	157, 172 , 213, 242 ^M
2,4-di-tert-Butyl-phenol (ISTD)	57, 191 , 206 ^M
Hexobarbital (ISTD)	157, 221 , 236 ^M
Thiobutabarbital (ISTD)	157, 172 , 228

M = Molekülmasse; fett dargestellt = zur Quantifizierung verwendete Masse

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Allgemeine Erläuterungen

Auf Grund der höheren Aussagekraft der grafischen Darstellungen der Ergebnisse wurden die erhaltenen Peakflächen jeweils in relative Extraktionsausbeuten bzw. relative desorbierte Analytmengen umgerechnet, indem die höchste Peakfläche einer jeden Verbindung gleich 100% gesetzt wurde. Die übrigen Peakflächen wurden entsprechend umgerechnet.

Bei der Darstellung mehrerer Analyten in einem Diagramm (gilt nicht für die Balkendiagramme) entspricht die schwarze Linie den Mittelwerten **aller** Verbindungen der jeweiligen Substanzklasse, auch wenn aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht immer alle Verbindungen dargestellt sind.

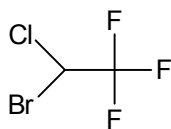
Diese Darstellungsweise wurde gewählt, um besser beurteilen zu können, bei welcher Einstellung eines Methodenparameters die Mehrheit der Analyten einer Substanzklasse ihr Optimum hat.

5.2 Inhalationsnarkotika

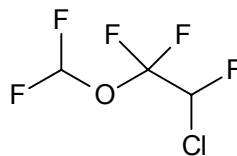
5.2.1 Allgemeine Erläuterungen

Bei den Inhalationsnarkotika werden die gasförmigen (z.B. Distickstoffoxid = Lachgas) von den flüssigen Verbindungen unterschieden. Die flüssigen Narkotika lösen sich in der Regel besser im Blut und fluten langsamer an, dafür hält die Wirkung länger vor.

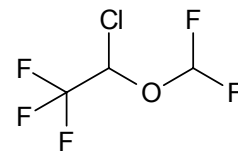
Halothan (2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan) wird als potentes, nicht entzündliches Inhalationsnarkotikum in der Anästhesie eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein halogeniertes Alkan, wohingegen seine strukturellen Isomere, Enfluran und Isofluran, Methylethylether darstellen (Abb. 5).



Halothan



Enfluran

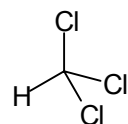


Isofluran

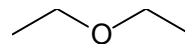
Abbildung 5: Strukturformeln von Halothan, Enfluran und Isofluran.

Halothan wird, mit einem Blut-/Gasverteilungskoeffizienten von 2,4 [105], rasch inhalativ absorbiert. Unterschiedliche Anteile der inhalierten Dosis werden in der Leber mittels Debromierung und Dechlorierung metabolisiert, bis zu 20% können über die Nieren eliminiert und mit dem Urin als Trifluoressigsäure (TFA) und deren Salze ausgeschieden werden. Das Bromid-Ion verlässt nur sehr langsam mit dem Urin wieder den Körper. Enfluran wird ebenfalls rasch aufgenommen aber auch schnell wieder eliminiert und erlaubt so eine einfache Steuerung der Narkose. Die minimalen alveolären Konzentrationen (MAC) von Halothan und Enfluran betragen 0,75% bzw. 1,7% [106]. Im Vergleich zu Halothan besitzt Enfluran, auf Grund seiner relativ geringen Affinität zu Fettgewebe und seiner niedrigeren Biotransformationsrate, eine geringere Nephro- und Hepatotoxizität [106,107]. Halothan, Enfluran und Isofluran werden als moderne Inhalationsnarkotika betrachtet, die jedoch einige Nachteile aufweisen. Dosisabhängig wirken sie atemdepressiv und sensibilisieren das Myokard gegen Catecholamine (Gefahr von Herzrhythmusstörungen bis hin zu Kammerflimmern). Halothan wirkt zudem in höheren Konzentrationen bzw. bei wiederholter Anwendung hepatotoxisch [108,109].

Chloroform und Ether (Abb. 6) werden, zumindest in den Industrienationen, nicht mehr für die Narkose verwendet, sie wurden jedoch der Vollständigkeit halber in die Untersuchungen miteinbezogen.



Chloroform



Diethylether

Abbildung 6: Strukturformeln von Chloroform und Diethylether.

Inhalationsnarkotika werden aber nicht nur zu Narkosezwecken angewendet, analog zu anderen flüchtigen Verbindungen wie Klebstoff, Lösemittel, Feuerlöschschaum, Korrekturflüssigkeit und Aerosole (Haarspray, Deodorants), werden auch sie wegen ihrer psychoaktiven Eigenschaften missbräuchlich verwendet (VSA = volatile substance abuse), wobei es bis hin zu letalen Intoxikationen kommen kann [110-118].

Forensische Bedeutung erlangen diese Verbindungen, wenn mit ihrer Hilfe Straftaten begangen werden [52] oder unter ihrem Einfluss ein Kraftfahrzeug im Straßenverkehr bewegt wird [119].

5.2.2 Optimierung der SPME-Parameter

Die Versuchsreihen zur Optimierung der SPME-Parameter wurden mit dem manuellen Faserhalter an Blutproben durchgeführt, die mit Halothan in einer Konzentration von 4,7 µg/mL dotiert waren.

Dazu wurde zunächst der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Extraktionsausbeute untersucht. Hierfür wurden die Probenials jeweils 15 Minuten bei unterschiedlichen Temperaturen (60, 70, 80, 90, 100, 110°C) in einem Trockenschrank inkubiert und anschließend extrahiert. Wie Abb. 7 entnommen werden kann, stieg die Extraktionsausbeute mit zunehmender Temperatur nur geringfügig bis zu einem schwach ausgeprägten Maximum bei 100°C an. Der Grund für den nur minimalen Einfluss Temperatur ist in dem hohen Dampfdruck des Halothans zu sehen, der Siedepunkt liegt bei nur 50,2°C.

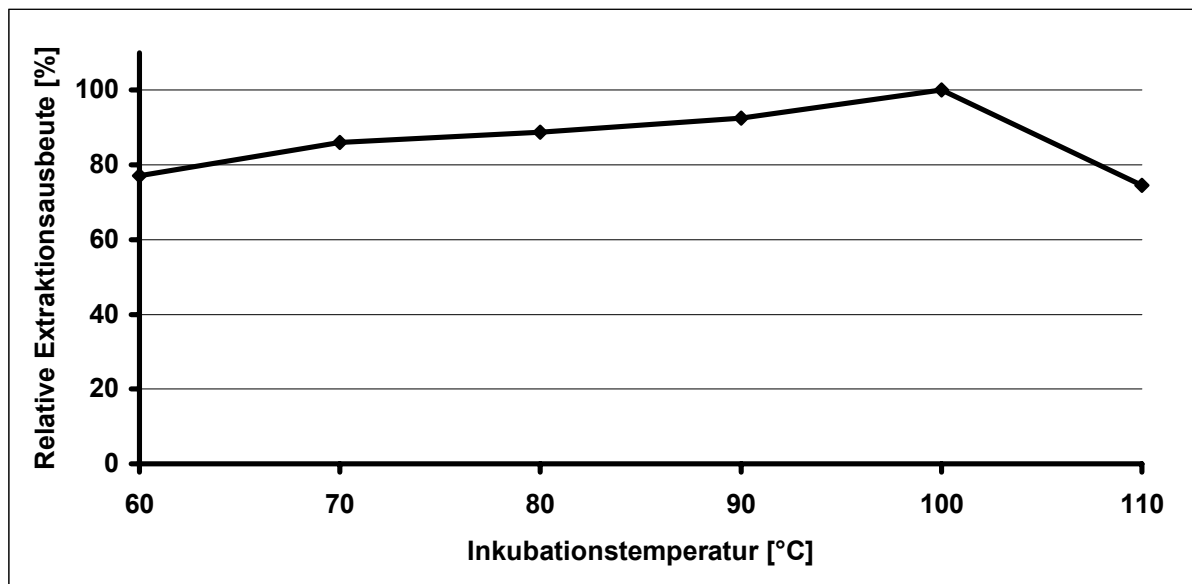


Abbildung 7: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Extraktionsausbeute von Halothan aus dotierten Blutproben (4,7 µg/mL).

Da bei der Entwicklung der hier vorgestellten Methode noch kein Gefäß-Puck zur Verfügung stand, mussten die noch heißen Proben direkt nach der Inkubation im Trockenschrank bei Raumtemperatur extrahiert werden. Um möglichst lange von der Temperaturerhöhung zu profitieren, wurde für die weiteren Untersuchungen eine Inkubationstemperatur von 100°C ausgewählt. Bei Verwendung des CombiPAL könnte die Inkubations- und Extraktionstemperatur auf Grund der effektiveren Inkubation, die auch während der Extraktion beibehalten wird, vermutlich reduziert werden.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Zusätze auf die Extraktionsausbeute von Halothan wurden die dotierten Blutproben mit 0,2 g Kochsalz bzw. Ammoniumsulfat, 2 mL 0,1 M Schwefelsäure oder einer Kombination aus einem der Salze und Schwefelsäure versetzt und analysiert. Die erhaltenen Ausbeuten wurden mit der Ausbeute einer Blutprobe verglichen, welche, zwecks Schaffung gleicher Volumenverhältnisse, als Zusatz lediglich 2 mL destilliertes Wasser enthielt.

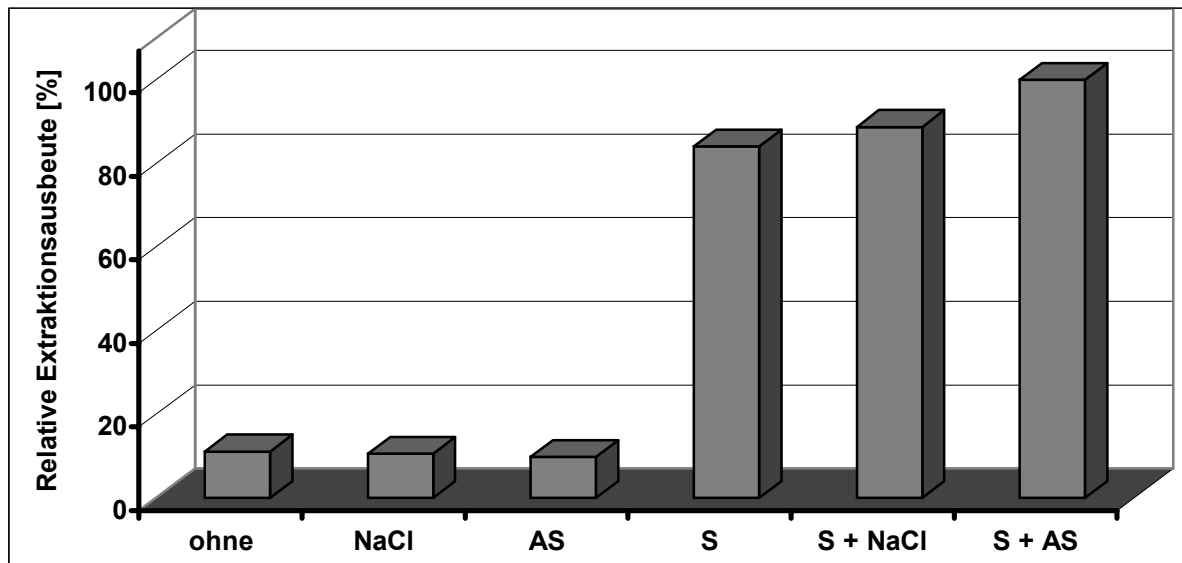


Abbildung 8: Einfluss verschiedener Zusätze auf die Extraktionsausbeute von Halothan aus dotierten ($4,7 \mu\text{g/mL}$) Blutproben (ohne = keine Zusätze, AS = Ammoniumsulfat, S = Schwefelsäure).

Wie in Abb. 8 dokumentiert ist, führte der alleinige Zusatz von Kochsalz bzw. Ammoniumsulfat zu keiner Verbesserung der Extraktionsausbeute, erst der Zusatz von Schwefelsäure ließ die Extraktionsausbeute um ein Mehrfaches ansteigen. Durch Kombination der Schwefelsäure mit einem der Salze konnte die Ausbeute weiter gesteigert werden, wobei Ammoniumsulfat einen leichten Vorteil gegenüber Kochsalz aufwies. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb den Proben jeweils 2 mL 0,1 M Schwefelsäure und 0,2 g Ammoniumsulfat zugesetzt.

Zur Bestimmung der optimalen Extraktionszeit wurde die SPME-Faser für 1, 2, 5, 10, 15 bzw. 20 Minuten dem Dampfraum über der Probe ausgesetzt. Abb. 9 zeigt eine Extraktionszeitkurve mit typischem Sättigungscharakter, wie sie optimalerweise bei der Festphasenmikroextraktion erwartet wird. Bereits nach 10 Minuten hatte sich das Verteilungsgleichgewicht eingestellt. Der Grund ist wiederum in der leichten Flüchtigkeit des Halothans zu sehen.

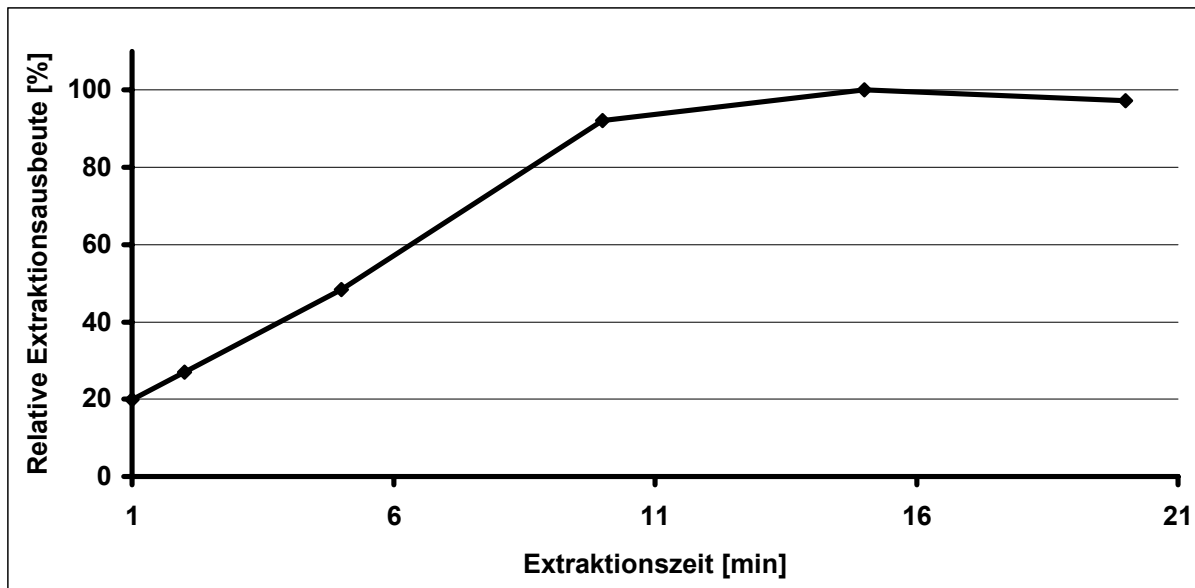


Abbildung 9: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeute von Halothan aus dotierten (4,7 µg/mL) Blutproben.

Auch die Dauer der Desorption wurde optimiert. Dazu wurde die Faser nach der Extraktion für 1, 2, 5 bzw. 10 Minuten bei 250°C im Injektor des GC exponiert. In Abb. 10 ist zu sehen, dass bereits nach 1 Minute eine fast vollständige Desorption der Analyten erreicht war.

Um Verschleppungen auszuschließen wurde für die weiteren Untersuchungen die Desorptionszeit auf 2 Minuten ausgedehnt, obwohl die Retentionszeiten von Halothan und Enfluran (ISTD) weniger als 2 Minuten betragen. Auf Grund dieser kurzen Retentionszeiten konnte auch der leichte Abfall der Desorptionszeitkurve nicht erklärt werden.

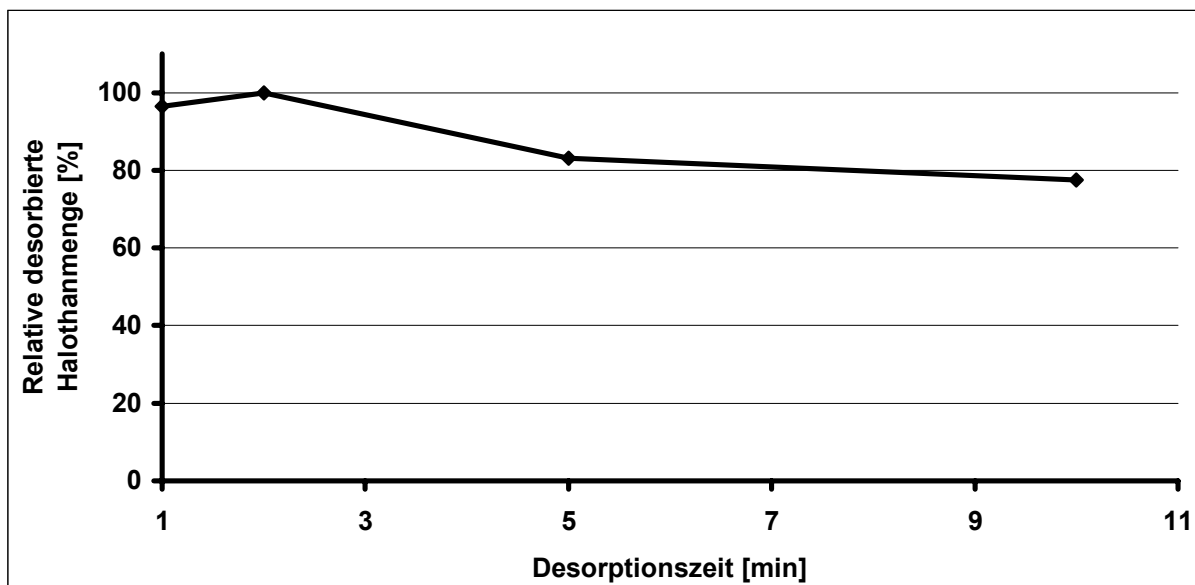


Abbildung 10: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierte Menge von Halothan.

Zum Austesten der optimalen Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC erfolgte nach der Extraktion eine 2minütige Desorption bei 250°C im Injektor des GC, wobei die Eintauchtiefe der Faser wie folgt variiert wurde: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 bzw. 4,5 cm.

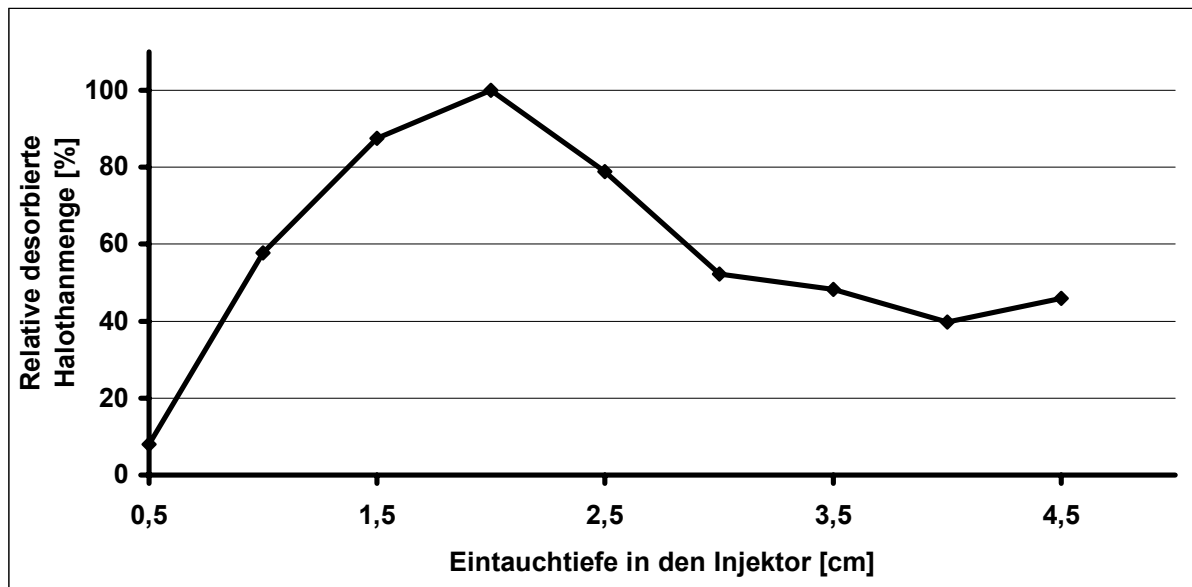


Abbildung 11: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC auf die desorbierte Menge von Halothan.

Die optimale Eintauchtiefe der Faser lag bei 2 cm, wobei besonders das ausgeprägte Maximum bei dieser Eintauchtiefe und der dadurch bedingte sehr schmale optimale Bereich ins Auge fallen (Abb. 11). Dieses könnte ggf. zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit führen, da sich die Eintauchtiefe bei der manuellen SPME nur relativ ungenau mittels eines Gummiringes einstellen lässt. Begründend auf das ausgeprägte Maximum wurde für alle weiteren Untersuchungen eine Eintauchtiefe von 2 cm verwendet.

In Tab. 10 sind im Überblick nochmals alle Parameter der optimierten Methode zum Nachweis von Inhalationsnarkotika in biologischen Matrices mittels manueller SPME dargestellt.

Tabelle 10: Methodenparameter zum Nachweis von Inhalationsnarkotika in biologischen Matrices mittels manueller SPME.

Parameter	Einstellung
Zusätze	2 mL 0,1 M Schwefelsäure + 0,2 g Ammoniumsulfat
Inkubations- und Extraktionstemperatur	100°C
Inkubationszeit	15 min
Extraktionszeit	10 min
Injektortemperatur	250°C
Desorptionszeit	2 min
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	2 cm

5.2.3 Validierung

Die Validierung der Methode erfolgte mit dotierten Blutproben (0,5 mL), wobei der interne Standard Enfluran immer in einer Konzentration von 30 µg/mL zugegeben wurde.

Die für die Bestimmung der Peakreinheit und Selektivität verwendeten dotierten Blutproben enthielten Halothan in einer Konzentration von 4,7 µg/mL. Abb. 12 zeigt die SIM-Chromatogramme einer dotierten und einer Leerblutprobe im Vergleich. Es sind keinerlei Interferenzen von Substanzpeaks mit Peaks aus der Blutmatrix zu erkennen; Peakreinheit und Selektivität der Methode sind somit gegeben.

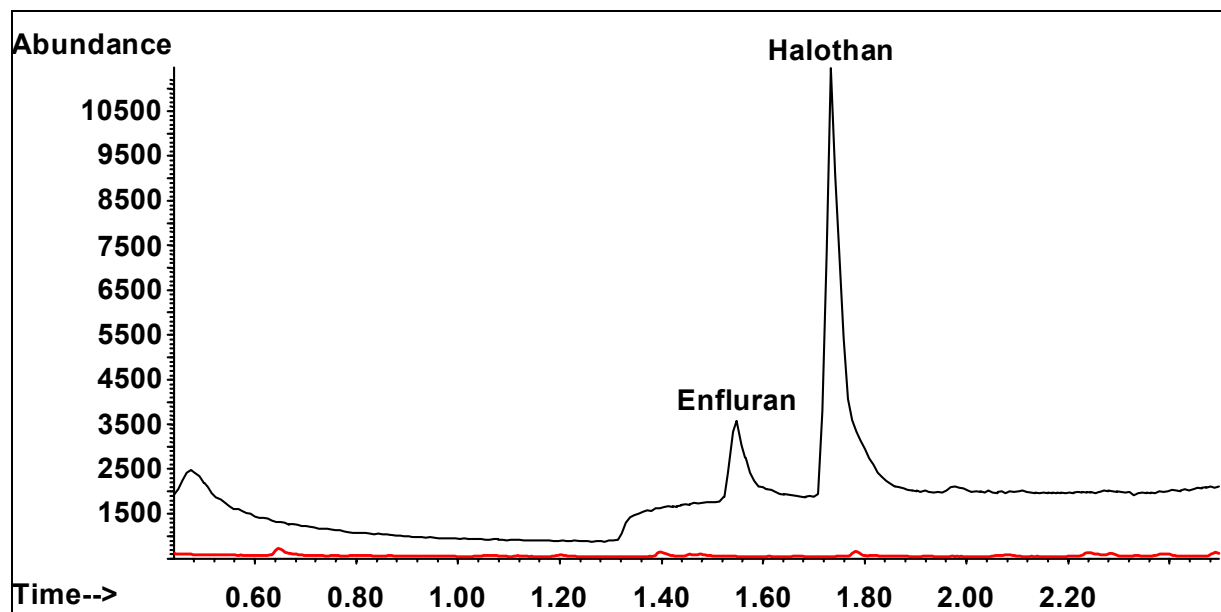


Abbildung 12: Vergleich der SIM-Chromatogramme einer dotierten Blutprobe (4,7 µg/mL, schwarze Linie) und einer nicht dotierten Leerblutprobe (rote Linie).

Zur Bestimmung der Linearität wurde eine Kalibration über einen Konzentrationsbereich von 0,1 bis 100 µg/g erstellt. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,996$ war die Kalibriergerade über den getesteten Konzentrationsbereich linear.

Die Nachweisgrenze wurde über das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt (S/N 3:1) und betrug 0,004 µg/g.

Für die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Methode wurden Leerblutproben mit Halothan in einer Konzentration von 4,7 µg/g aufgestockt und die Messungen zur intraday- und interday-Präzision durchgeführt. Die Wiederfindungen wurden anhand von Kalibriergeraden ermittelt, welche jeden Tag erneuert wurden. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden jeweils die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) berechnet, die Ergebnisse sind in Tab. 11 dargestellt.

Tabelle 11: Daten zur Reproduzierbarkeit des Nachweises von Halothan in biologischen Matrices mittels manueller SPME.

	Dotierung [µg/g]	Wiederfindung¹ [µg/g]	± SD [µg/g]	RSD [%]
intraday-Präzision (n = 6)	4.7	4.42	0,46	10,4
interday-Präzision (n = 12)	4.7	4.22	0,39	9,2

¹ Durchschnittswerte

Eine relative Standardabweichung von etwa 10% ist als ausreichend anzusehen, zumal sich die Reproduzierbarkeit bei Verwendung des CombiPAL vermindern dürfte.

Mit der hier beschriebenen Methode konnten ebenfalls Isofluran, Chloroform und Diethylether sowohl qualitativ als auch quantitativ aus dotierten Blutproben bestimmt werden. Hierbei wurden Nachweisgrenzen von 0,006 µg/g für Isofluran, 0,001 µg/g für Chloroform und 0,002 µg/g für Diethylether erreicht.

5.2.4 Anwendung der Methode auf reale Proben

Die hier beschriebene Methode wurde u.a. zur toxikologischen Analyse von menschlichem Probenmaterial, das bei Obduktionen im Rahmen eines Doppelmordes erhalten wurde, sowie einer Blutprobe, die im Rahmen eines Verkehrsdelikts entnommen wurde, eingesetzt.

Fall A:

Während eines Raubüberfalls wurden die Opfer, eine 82jährige Frau und ihr 75jähriger Ehemann, mit halothangetränkten Handtüchern betäubt und die Handtücher anschließend

hinter den Köpfen der Opfer verknötet. Die Obduktionen ergaben Zeichen äußerlicher Gewalt mit abrasiven Verletzungen von Nase, Wangen und Perioralregion, kleinen Hämatomen an Lippen und Mundschleimhaut, sowie petechialen Blutungen der Bindehäute. Beide Opfer hatten Vorerkrankungen in Form einer fortgeschrittenen Arteriosklerose der Aorta und der großen Gefäße, sowie Lungenemphyseme. Die Todesursache konnte im Rahmen der Obduktion nicht geklärt werden, ein toxikologisches Gutachten wurde in Auftrag gegeben.

Die erste Analyse von Halothan wurde 3 Monate postmortem (p.m.) mittels konventioneller Headspace-GC und FID durchgeführt, eine zweite Analyse erfolgte 15 Monate postmortem, dieses Mal sowohl mittels konventioneller Headspace-GC und FID wie auch mit HS-SPME und GC-MS. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte bei -30°C im Gefrierschrank. Die Quantifizierung wurde mittels einer Kalibriergeraden unter Zusatz von Enfluran als internem Standard ($30\ \mu\text{g/mL}$) durchgeführt. Die in den Proben gefundenen Halothankonzentrationen sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Halothankonzentrationen, die mittels konventioneller Headspace-GC/FID bzw. HS-SPME/GC-MS nach einem Doppelmord in Blut, Urin, Mageninhalt, Niere, Leber, Galle und Hirn gefunden wurden.

Probe	konv. Headspace GC (3 Monate p.m.¹) [$\mu\text{g/g}$]	konv. Headspace GC (15 Monate p.m.¹) [$\mu\text{g/g}$]	HS-SPME mit GC-MS (15 Monate p.m.¹) [$\mu\text{g/g}$]
<u>weiblich (82 Jahre)</u>			
Blut	8,3	6,7	7,2
Urin	n.n. ²	n.n. ²	n.n. ²
Niere	11,7	10,5	8,9
Leber	1,7	1,4	0,6
Galle	8,6	6,8	7,5
Hirn	103,6	85,6	91,5
<u>männlich (75 Jahre)</u>			
Blut	3,4	3,2	3,0
Urin	n.n. ²	n.n. ²	n.n. ²
Mageninhalt	10,3	14,7	10,0
Niere	14,5	12,5	11,4
Leber	21,3	13,5	11,5
Galle	1,6	1,5	1,3
Hirn	120,2	91,2	94,4

1 p.m. = postmortem

2 n.n. = nicht nachweisbar

Wie den Daten zu entnehmen ist, liegen die Halothankonzentrationen 15 Monate p.m. ein wenig niedriger als diejenigen, die 3 Monate p.m. ermittelt wurden. Die Werte, die mittels konventioneller HS-GC bzw. der HS-SPME ermittelt wurden, liegen jedoch im vergleichbaren Konzentrationsbereich. Dieses ist dadurch zu erklären, dass zum Zeitpunkt der Obduktion noch kein Verdacht auf eine Intoxikation mit flüchtigen Substanzen vorlag und die Asservate deshalb nicht in absolut gasdichten Gefäßen aufbewahrt wurden.

In dem hier beschriebenen Fall von zwei tödlichen Intoxikationen mit Halothan betrug die niedrigste mit der SPME bestimmte Konzentration 0,6 µg/g (Leber) und die höchste 94,4 µg/g (Hirn). In Anbetracht dieser hohen Analytmengen und bei Vergleich mit Konzentrationen, die in der Literatur [120-123] bei halothaninduzierten Todesfällen gefunden wurden (7 – 720 µg/g), kann die Empfindlichkeit der hier vorgestellten SPME-Methode (NG 0,004 µg/g) als absolut ausreichend angesehen werden. Die hohen Konzentrationen, vor allem in den Hirnproben, erlaubten zudem die Aufnahme von Massenspektren im full-scan Modus, was eine zusätzliche Absicherung bezüglich der eindeutigen Identifizierung von Verbindungen darstellt.

Nach Abschluss der toxikologischen Untersuchungen in diesem Fall wurde die Todesursache mit tödlicher Vergiftung durch Zwangseinatmung von Halothan in Verbindung mit Erstickten angegeben, was mit dem Geständnis, das einer der Täter abgegeben hatte, übereinstimmte. Beide Täter wurden wegen schwerem Raub mit Todesfolge gemäß §§ 250 und 251 StGB zu langjährigen Freiheitsstrafen verurteilt.

Fall B:

Ein 42-jähriger Anästhesist wurde zunächst in einem parkenden Auto sitzend unter einer Brücke und anschließend noch einmal 100 m weiter beobachtet, wobei er sich beide Male ein Taschentuch unter seine Nase hielt. Dann fuhr er los und stieß an einer roten Ampel mit einem Lastwagen zusammen. Nach diesem Unfall konnte ein merkwürdiges Verhalten des Unfallfahrers beobachtet werden. Der offensichtlich affektierte Arzt tröpfelte etwas aus einer kleinen braunen Flasche in das Taschentuch und inhalierte die Dämpfe. Während des Zeitintervalls bis zum Eintreffen der Polizei schlief er ein und konnte nur schwer wieder aufgeweckt werden. Zunächst nahm er keine Notiz von der Polizei, später war er extrem unsicher, zitterte von Kopf bis Fuß, taumelte, schwankte von Seite zu Seite und hielt sich an seinem Auto fest, um nicht zu fallen. Das Taschentuch in seinem Wagen roch nach dem Inhalt der braunen Flasche, welche mit „Ethrane®“ beschriftet war. In einem medizinischen Bericht, der 2 h später im Rahmen der Blutentnahme verfasst wurde, wurden folgende Symptome dokumentiert: Schwanken nach Drehen um seine vertikale Achse; Finger-zu-

Nase-Test unsicher. Der Anästhesist räumte die Einnahme von Voltaren® und Novalgin® ein.

Die entnommene Blutprobe wurde mit den in unserem Labor etablierten Methoden sowohl auf Alkohol als auch auf saure, neutrale und basische Drogen untersucht. Hierzu wurden immunchemische Methoden (CEDIA DAU unter Verwendung eines Hitachi 911, Microgenics, Passau, Deutschland) verwendet, sowie eine Flüssig-Flüssig- und eine Festphasenextraktion mit anschließender gaschromatographischer/massenspektrometrischer (GC-MS) und flüssigchromatographischer (HPLC-DAD) Untersuchung durchgeführt. Der Rest wurde für den quantitativen Nachweis von Diclofenac und 4-Aminophenazon verwendet. Für die Identifizierung und Quantifizierung von Enfluran wurde die oben beschriebene SPME-Methode zum Nachweis von Inhalationsnarkotika verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Ergebnisse der toxikologischen Analyse der Blutprobe des beeinträchtigten Fahrers.

Diclofenac [mg/L]	4-Aminophenazon [mg/L]	Enfluran [mg/L]
0,28	24,4	2,92

Die toxikologische Analyse bestätigte sowohl die Einnahme der Analgetika Voltaren® (= Diclofenac) und Novalgin® (= Metamizol) als auch die Aufnahme des Inhalationsnarkotikums Ethrane® (= Enfluran). Ein typischer aktiver Metabolit von Metamizol, 4-Aminophenazon, und Diclofenac wurden in (sub)therapeutischen Konzentrationen gefunden. Zusätzlich wurde in der Blutprobe, welche erst 2 h nach dem Vorfall entnommen wurde, Enfluran in einer Konzentration von 2,92 mg/L nachgewiesen. In Vergleich dazu wurde bei 10 Personen, die eine Narkose mit 0,5 – 2% (v/v) Enfluran erhielten, nach 30 Minuten eine Blutkonzentration von 95 mg/L gefunden, welche rasch abnahm und 90 Minuten nach Beendigung der Narkose nur noch < 0,5 mg/L betrug [124].

Für die Interpretation der Untersuchungsergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die entnommene Blutprobe erst 2 Tage nach der Entnahme im Labor eintraf und zuvor lediglich bei Raumtemperatur in einem gewöhnlichen Blutentnahme-Röhrchen gelagert wurde. Nach dem Eintreffen der Blutprobe im Labor wurde sofort ein Aliquot in ein Headspace-Vial überführt, luftdicht verschlossen und für weitere Analysen bei -30°C gelagert. Das Ausmaß eines möglichen Verlustes des überaus flüchtigen Enflurans war nicht bekannt.

Die Einnahme von Enfluran vor dem Unfall wurde durch die Beobachtungen eines Zeugen bestätigt. Generell sollten Blutproben, bei Verdacht auf Missbrauch flüchtiger Substanzen (VSA), in sehr dichten Gefäßen entnommen und unmittelbar nach der Entnahme untersucht werden.

Berichte über das Führen eines Kraftfahrzeugs unter dem Einfluss flüchtiger Lösungsmittel oder Inhalationsnarkotika sind rar. BREWER et al. berichten über die Bedeutung von flüchtigen Substanzen bei der Untersuchung von zwei Verkehrsunfällen [125]. Im ersten Fall wurde in einer Urinprobe Methylenchlorid in einer Konzentration von 23 mg/L gefunden, im zweiten Fall Grillanzünder-Öl im Mageninhalt. BROUSSARD et al. fanden im Blut eines 18-jährigen Autofahrers Ethanol und Difluorethan (Freon 152) in Konzentrationen von 130 mg/L bzw. 78 mg/L und im Blut seines 17-jährigen Beifahrers 35 mg/L Difluorethan [126]. Sie starben, nachdem ihr Fahrzeug den Mittelstreifen eines 4-spurigen Highway durchbrochen hatte und mit einem Minivan zusammenstieß. Im Fahrzeug der Verstorbenen wurde eine Dose Airbrush-Treibmittel gefunden. GJERDE et al. berichten über das Fahren unter Toluol-Einfluss, das ein nicht zu unterschätzendes Problem in Norwegen darstellt [127]. Hierbei wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren 114 Autofahrer festgenommen, deren Toluolkonzentrationen im Blut bei über 10 µM lagen.

In dem hier vorliegenden Fall konnten sowohl die Fahrweise als auch der Unfall und die Ausfälle mit den zentral dämpfenden Wirkungen des Enflurans erklärt werden, die möglicherweise durch die gleichzeitige Einnahme der Analgetika Diclofenac und Metamizol noch verstärkt wurden. Im rechtsmedizinischen Sinne war der betroffene Anästhesist als beeinträchtigt zu betrachten und nicht in der Lage, zu dem angegebenen Zeitpunkt ein Fahrzeug zu führen. Er wurde nach § 315c StGB angeklagt. Wenige Tage vor der Gerichtsverhandlung verstarb der Angeklagte, die Todesursache ist nicht bekannt.

5.3 Pestizide

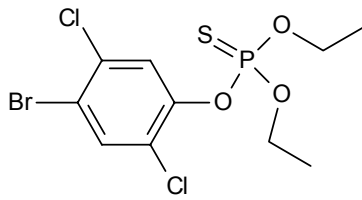
5.3.1 Allgemeine Erläuterungen

Pestizide sind nicht nur in der Landwirtschaft, sondern auch im Garten, sowie im Haushalt (z.B. Lindan zur Behandlung von Kopfläusen) noch immer weit verbreitet in Gebrauch. Aus diesem Grunde treten Intoxikationen mit diesen Substanzen immer wieder auf, seien sie nun akzidenteller Art, oder in suizidaler Absicht herbeigeführt. Eine schnelle Identifizierung des verursachenden Pestizids ist daher nicht nur hilfreich, um dem behandelnden Arzt Entscheidungshilfen für die zu treffenden Gegenmaßnahmen an die Hand zu geben, sondern auch in forensischen Fragestellungen von großer Wichtigkeit.

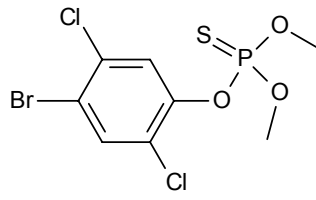
Die meisten analytischen Methoden zum Nachweis von Pestiziden wurden für Matrices wie Pflanzen, Wasser, Erde oder Nahrungsmittel entwickelt [128-136] und sind nicht direkt anwendbar auf biologische Proben, welche in Notfällen oder während einer Autopsie genommen werden. Es existieren einige Veröffentlichungen über den Nachweis von Organophosphaten in Urin mittels GC-FPD [137,138], in Urin und Plasma mittels GC-FID und GC-FPD [139,140], in Mageninhalt, Blut und Urin mittels GC-FID, GC-FPD und GC-MS [141], in Standardgemisch, Blut, Lunge und Leber mittels HPLC [142,143], in Blut mittels LC-MS [144] und in Blut mittels HPTLC [145], jedoch ist für all diese Verfahren eine mehr oder weniger aufwändige Probenvorbereitung notwendig, so dass sie für akute Notfälle, in denen ein möglichst schnelles Ergebnis von Vorteil wäre, eher ungeeignet sind. Die Festphasenmikroextraktion bietet hier aufgrund ihrer Schnelligkeit und leichten Handhabbarkeit viele Vorteile.

5.3.2 Organophosphate

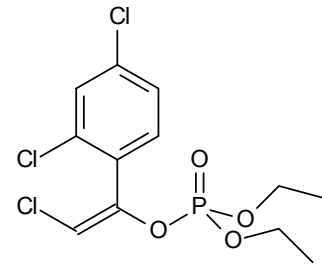
Organophosphate sind Ester der Phosphorsäure oder der Thiophosphorsäure (Abb. 13) und stellen sehr effektive Kontaktinsektizide dar; d.h. sie werden von den Insekten, bzw. von Menschen die damit in Kontakt kommen, über die Haut resorbiert. Jedoch nicht alle dieser Verbindungen sind per se toxisch, die Thiophosphorsäureester entfalten ihre negativen Eigenschaften erst im Körper, indem der Schwefel durch Sauerstoff ausgetauscht wird. Dieser Vorgang wird als Giftung bezeichnet.



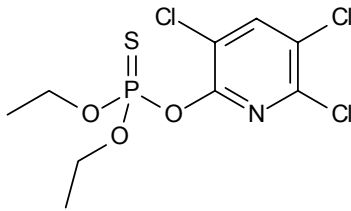
Bromophos-ethyl



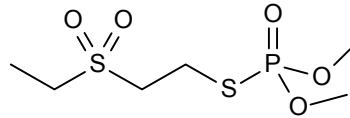
Bromophos-methyl



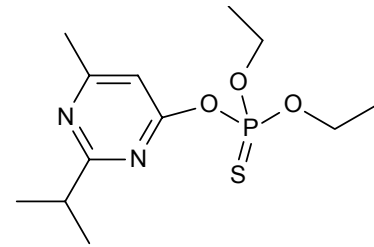
Chlorfenvinphos



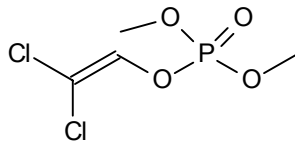
Chlorpyrifos



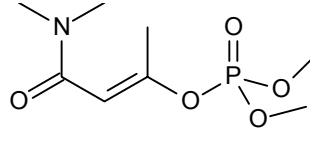
Demethon-S-methylsulfon



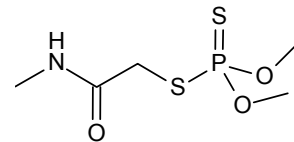
Diazinon = Dimpylate



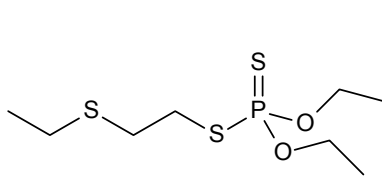
Dichlorvos



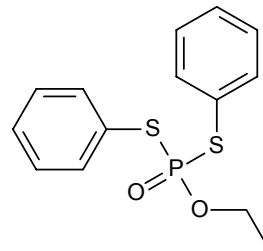
Dicrotophos



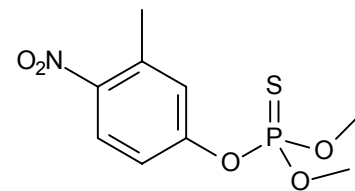
Dimethoat



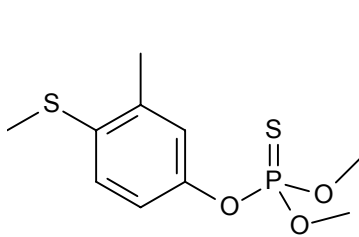
Disulfoton



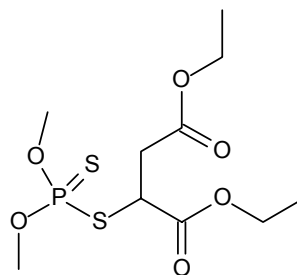
Edifenphos



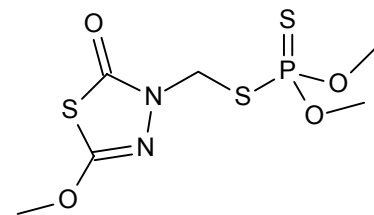
Fenitrothion



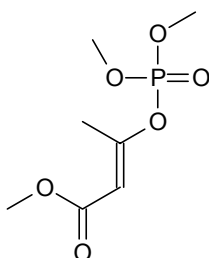
Fenthion



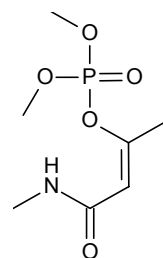
Malathion



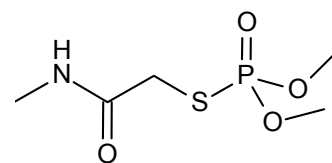
Methidathion



Mevinphos



Monocrotophos



Omethoat

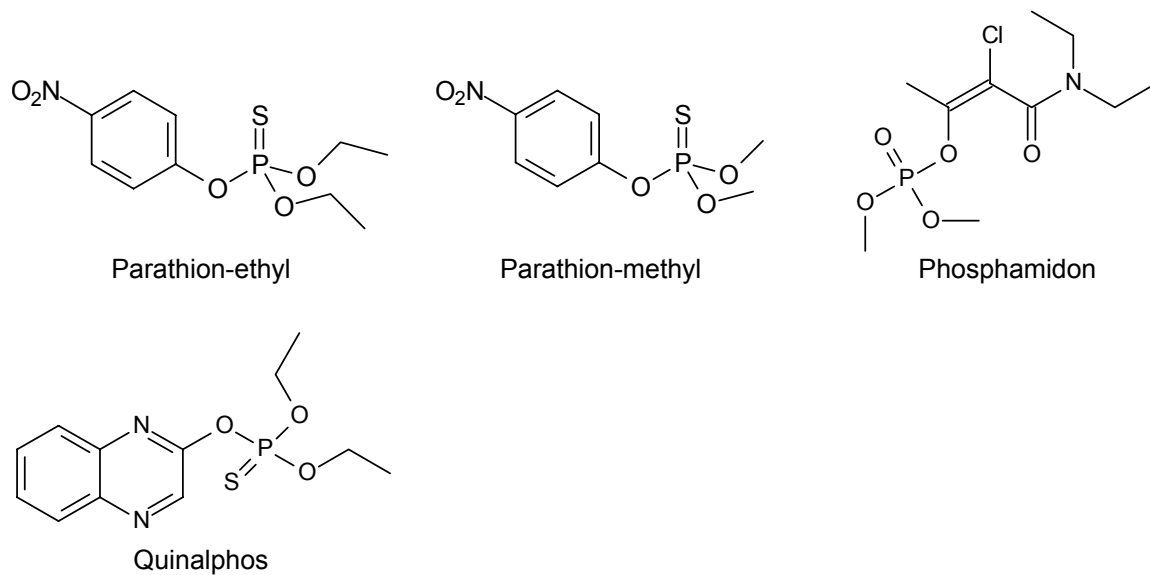


Abbildung 13: Strukturformeln der untersuchten Organophosphate.

Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen besteht darin, dass sie mit dem esteratischen Zentrum der Acetylcholinesterase reagieren und so die Spaltung von Acetylcholin hemmen. Zur Aufrechterhaltung des Muskeltonus der glatten und quergestreiften Muskulatur ist es jedoch notwendig, dass das ständig an den Ganglien, den postganglionären Nervenendigungen und den motorischen Endplatten freigesetzte Acetylcholin direkt wieder gespalten wird. Wird diese Spaltung verhindert, reichert sich Acetylcholin im synaptischen Spalt der Nervenendigungen an und es kann zu Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Schweißausbrüchen, Bronchokonstriktion, Bradykardie, fibrillären Zuckungen, zentralnervösen Störungen (Angst, Kopfschmerzen, Krämpfe, Atemlähmung), sowie Leber- und Nierenschäden kommen. Bei schwerwiegenden Vergiftungen tritt der Tod infolge einer Atemlähmung oder eines Lungenödems ein (tödliche Dosis bei Erwachsenen ca. 100 – 200 mg Parathion).

Aufgrund ihres lipophilen Charakters akkumulieren Organophosphate im Fettgewebe des menschlichen oder tierischen Organismus und werden nur sehr langsam wieder eliminiert, so dass auch die chronische Zufuhr geringer Mengen im Laufe der Zeit zu Intoxikationserscheinungen führen kann (z.B. bei berufsbedingtem Umgang mit Pestiziden).

5.3.2.1 Optimierung der SPME-Parameter

Für die Optimierungsexperimente wurden Leerblutproben (0,5 mL) mit jeweils 1 µg/mL der zu untersuchenden Organophosphate und, in Anlehnung an WYLIE et al. [146], 10 ng/mL Azobenzen als internem Standard dotiert und mit der manuellen SPME-Methode extrahiert und gaschromatographisch untersucht.

Zunächst wurde die Inkubations- und Extraktionstemperatur optimiert. Dazu wurden die dotierten Blutproben jeweils 15 Minuten bei 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 bzw. 130°C im Gefäß-Puck inkubiert und extrahiert. Die Inkubation der Proben führte zu einer deutlichen Erhöhung der Extraktionsausbeute, wobei die Optima zwischen 90°C (Parathion-ethyl, Parathion-methyl) und 120°C (Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl) lagen. Wie auf Abb. 14 zu sehen ist, hätte für die dargestellten Substanzen eine weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur möglicherweise auch die Extraktionsausbeute weiter gesteigert. Die hohen Temperaturen führten in den Vials jedoch zu einem enormen Anstieg des Innendrucks, so dass sich die verwendeten Septen stark wölbten und die Gefahr von Undichtigkeiten bestand. Aus diesem Grunde wurde auf höhere Temperaturen verzichtet.

Die meisten der untersuchten Verbindungen erreichten ihre maximale Ausbeute bei 120°C, so dass die weiteren Untersuchungen mit dieser Extraktionstemperatur durchgeführt wurden.

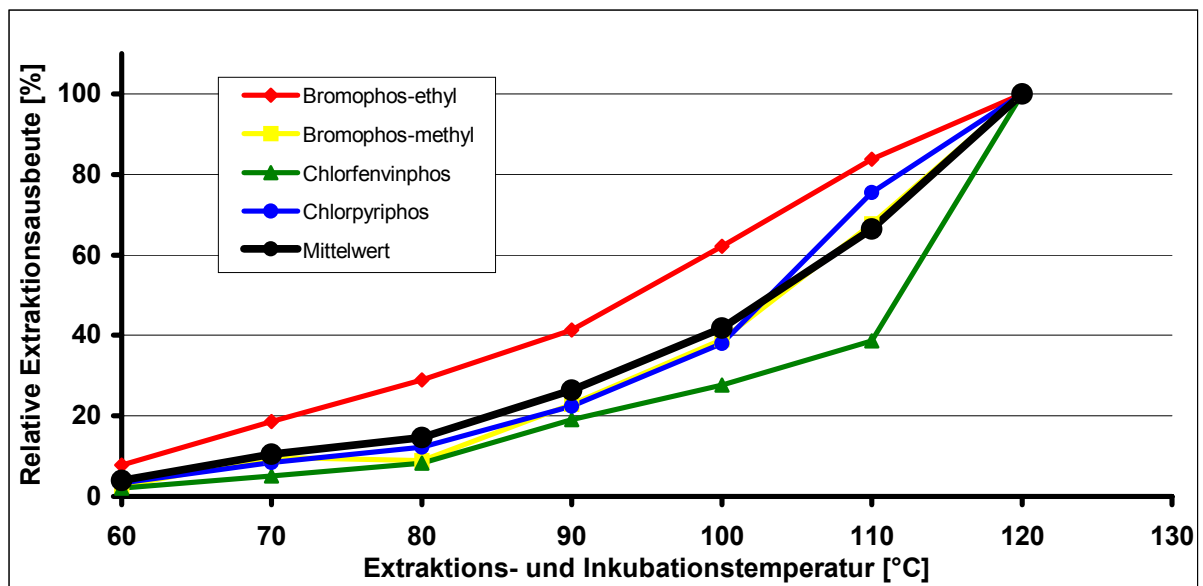


Abbildung 14: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organophosphate aus dotierten Blutproben (1 µg/mL), demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.

Für die Optimierung der Extraktionszeit wurden die dotierten Blutproben 15 Minuten bei 120°C inkubiert und danach die Faser für 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 bzw. 20 Minuten im Dampfraum über der Probe exponiert. Abb. 15 zeigt den Einfluss, den die Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeute von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos ausübte.

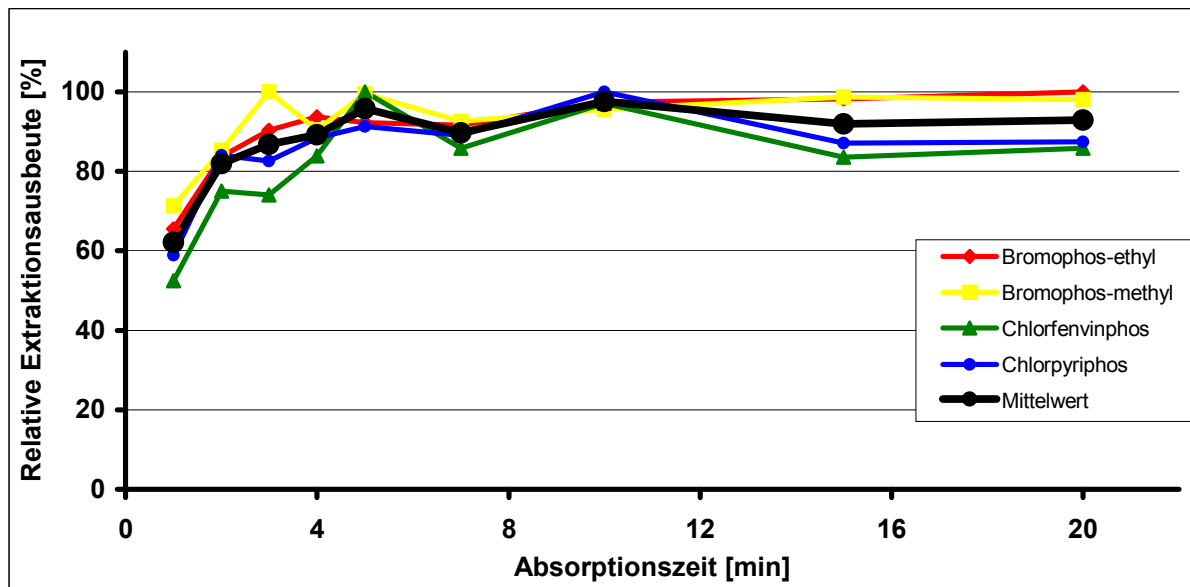


Abbildung 15: Einfluss der Absorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organophosphate aus dotierten Blutproben (1 µg/mL), demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.

Das Verteilungsgleichgewicht war bereits nach 5 Minuten erreicht, obwohl es sich bei Organophosphaten um nur mittelflüchtige Verbindungen handelt, deren Siedepunkte meist deutlich über 100°C liegen.

Auf Grund der Tatsache, dass die Methode mit der manuellen SPME erarbeitet wurde und hinsichtlich einer besseren Reproduzierbarkeit (siehe 2.6.5), wurde jedoch eine Extraktionszeit von 10 Minuten als vorteilhafter angesehen und für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Um die Auswirkungen verschiedener pH-Werte auf die Ausbeute zu untersuchen, wurde den dotierten Blutproben vor der Inkubation und Extraktion jeweils 2 mL von verschiedenen Pufferlösungen (Phosphatpuffer pH 2 – 10), 1 M Natronlauge bzw. 0,1 M Schwefelsäure zugesetzt. Der Zusatz der Pufferlösungen und der NaOH führte zu ungenügenden Ergebnissen, erst in Anwesenheit der Schwefelsäure konnte eine Erhöhung der Extraktionsausbeute beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden im weiteren Verlauf

der Methodenoptimierung die aufgestockten Blutproben jeweils mit 2 mL 0,1 M Schwefelsäure versetzt.

Zur Untersuchung des Aussalzeffektes wurde den dotierten Leerblutproben jeweils 0,2 g Kochsalz bzw. Ammoniumsulfat und, in einem zweiten Schritt, eine Kombination aus einem der Salze mit 2 mL 0,1 M Schwefelsäure zugesetzt.

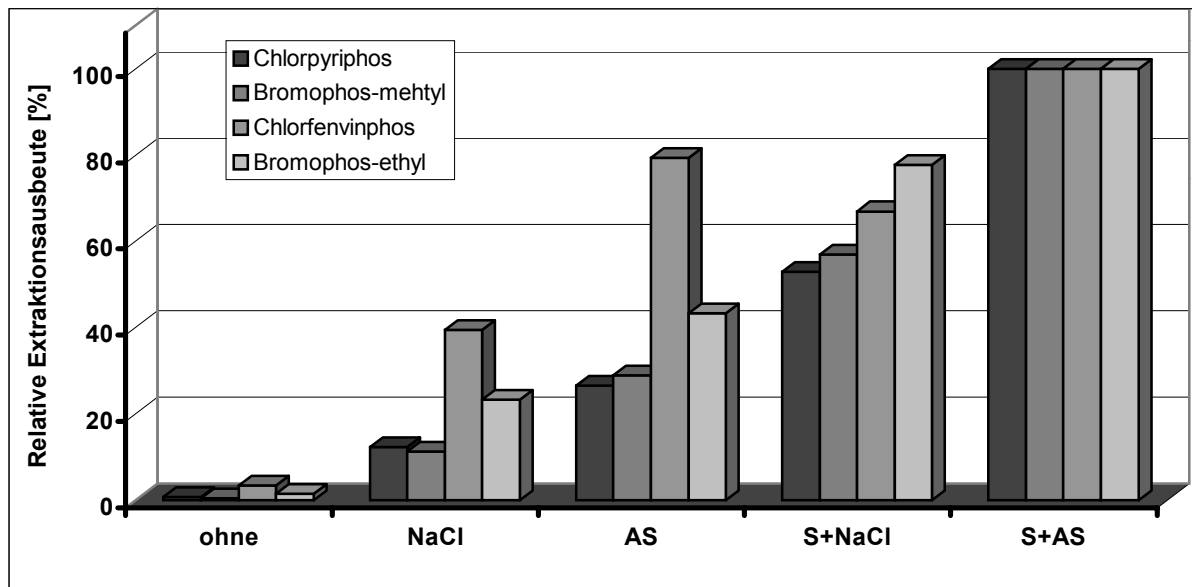


Abbildung 16: Einfluss von Salzzusätzen auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organophosphate aus dotierten Blutproben (1 µg/mL), demonstriert am Beispiel von Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Bromophos-methyl und Bromophos-ethyl. (ohne = keine Zusätze, AS = Ammoniumsulfat, S = Schwefelsäure)

Abb. 16 dokumentiert, dass bereits der Zusatz der Salze zu einer deutlichen Erhöhung der Extraktionsausbeute führte, wobei der Zusatz von Ammoniumsulfat bessere Resultate lieferte als der Zusatz von Kochsalz. Die Kombination der Salze mit Schwefelsäure steigerte die Empfindlichkeit nochmals deutlich, wobei auch hier das Ammoniumsulfat zu besseren Ergebnissen führte. Bei Chlorfenvinphos zeigte bereits der alleinige Zusatz von Ammoniumsulfat eine stärkere Wirkung als die Kombination Schwefelsäure/Kochsalz.

Ein Zusatz von Ammoniumsulfat führte auch bei den meisten anderen Organophosphaten zu höheren Extraktionsausbeuten als der Zusatz von Kochsalz, so dass den Proben bei allen weiteren Untersuchungen jeweils 0,2 g Ammoniumsulfat zugesetzt wurde.

Für die Optimierung der Desorptionszeit wurde die Faser nach der Extraktion der dotierten Blutproben unterschiedlich lange (1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7 bzw. 8 min) bei 250°C im

Injektor des GC desorbiert. In Abb. 17 ist zu sehen, dass die Desorptionszeitkurve nahezu konstant verläuft. Bereits nach einer Minute waren die Analyten fast vollständige desorbiert.

Um eine vollständige Desorption zu erreichen und mögliche Verschleppungen zu vermeiden, wurde die Desorptionszeit für die weiteren Untersuchungen auf 2 Minuten festgelegt.

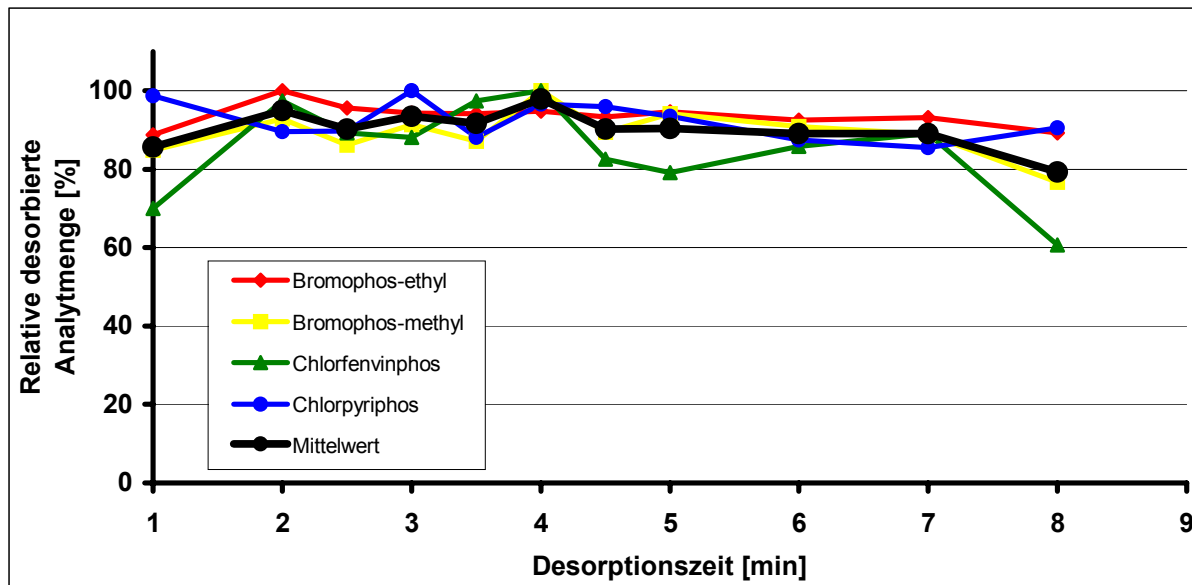


Abbildung 17: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen der untersuchten Organophosphate, demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyriphos.

Die Eintauchtiefe der Faser in den Injektor wurde optimiert, indem die Faser nach der Extraktion 2 Minuten bei 250°C unterschiedlich tief (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 bzw. 4,5 cm) im Injektor exponiert wurde. Abb. 18 macht deutlich, dass die Eintauchtiefe einen großen Einfluss auf die desorbierte Menge der untersuchten Organophosphate ausübte. Tauchte die Faser nicht tief genug ein, führte dieses auf Grund der unterschiedlichen Temperaturen im Bereich des Injektors (siehe 2.6.12), zu einem deutlichen Empfindlichkeitsverlust. Erst ab einer Eintauchtiefe von 2 cm wurden weitgehend konstante Analytmengen desorbiert.

Da sich die Eintauchtiefe beim manuellen Faserhalter, wie bereits beschrieben, nur recht ungenau mit Hilfe eines Gummiringes einstellen lässt und ein tieferes Eintauchen, im Gegensatz zu einem nicht genügend tiefen Eintauchen, keine Verminderung der Extraktionsausbeute zur Folge hatte, wurde eine Eintauchtiefe von 3 cm ausgewählt.

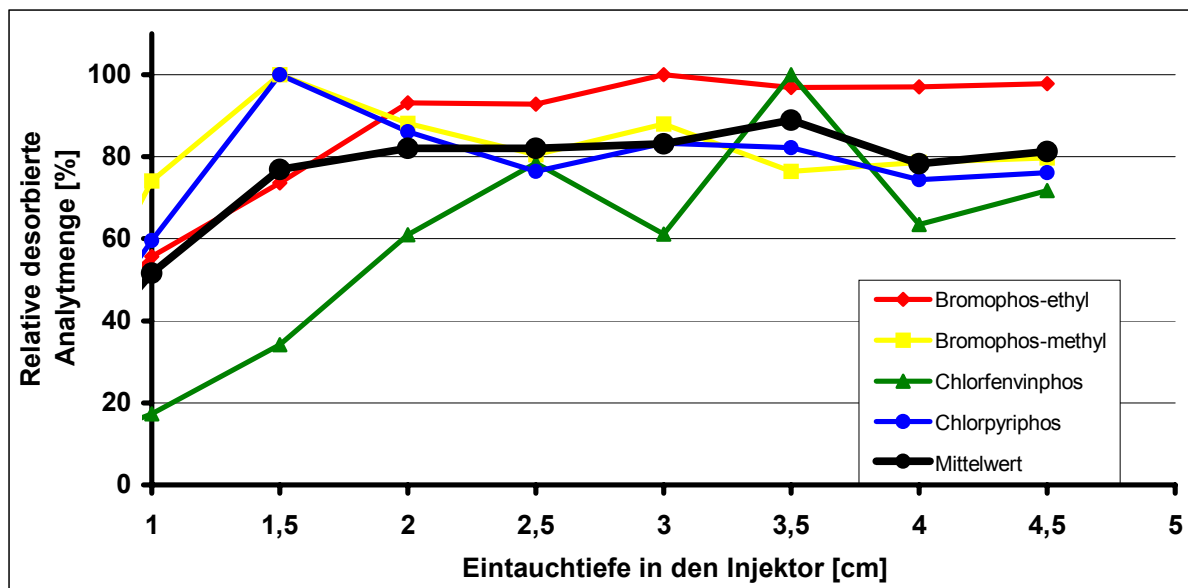


Abbildung 18: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC auf die desorbierten Mengen der untersuchten Organophosphate, demonstriert am Beispiel von Bromophos-ethyl, Bromophos-methyl, Chlorfenvinphos und Chlorpyrifos.

Eine Übersicht der optimierten Parameter der hier vorgestellten Methode zum Nachweis von Organophosphaten in biologischen Matrices mittels manueller SPME ist in Tab. 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Methodenparameter zum Nachweis von Organophosphaten in biologischen Matrices mittels manueller SPME.

Parameter	Einstellung
Zusätze	2 mL 0,1 M Schwefelsäure + 0,2 g Ammoniumsulfat
Inkubations- und Extraktionstemperatur	120°C
Inkubationszeit	15 min
Extraktionszeit	10 min
Injektortemperatur	250°C
Desorptionszeit	2 min
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	3 cm

5.3.2.2 Validierung

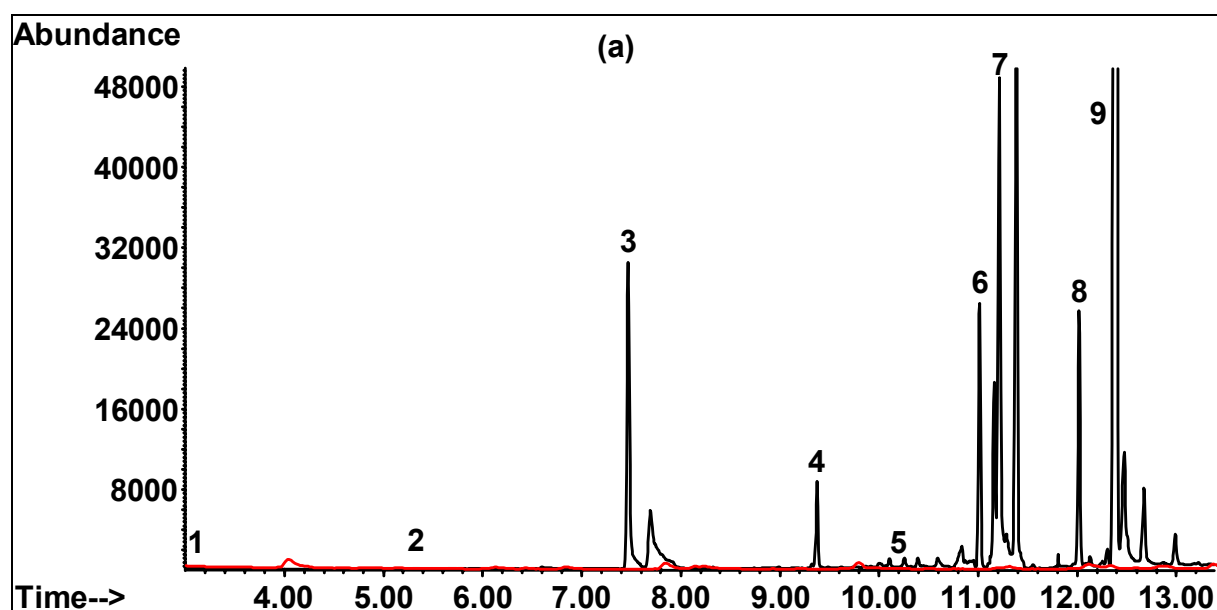
Für die Validierung wurden Leerblutproben (0,5 mL) mit den Organophosphat-Standards dotiert und unter den optimierten Bedingungen (Tab. 14) analysiert. Der interne Standard Azobenzen wurde immer in einer Konzentration von 10 ng/mL zugegeben.

Zur Beurteilung der Peakreinheit und Selektivität wurden die Blutproben mit den Organophosphaten in einer Konzentration von 1 µg/mL dotiert und analysiert. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte im Single Ion Monitoring Modus (SIM). Der besseren Übersicht halber wurden die Standards auf zwei Blutproben verteilt, da die Retentionszeiten der Substanzen zum Teil sehr nahe beieinander liegen.

Wie in Abb. 19 (b) zu erkennen ist, wies die Leerblutprobe keine Peaks auf, die im Bereich der Retentionszeiten der Analyten lagen und gegebenenfalls zu Interaktionen mit den Analytpeaks hätten führen könnten

In Abb. 19 (b) ist zu sehen, dass für Fenthion (3) und Parathion-ethyl (4) keine Basislinientrennung erzielt werden konnte. Auf Grund der eindeutig zuzuordnenden Massenfragmente bereitete dieses bei der Quantifizierung jedoch keine Probleme.

Besonders auffällig sind die kaum sichtbaren Peaks von Dichlorvos und Mevinphos, obwohl alle Verbindungen in der gleichen Konzentration in der dotierten Blutprobe enthalten waren. Dieses hängt mit den unterschiedlichen Polaritäten der einzelnen Substanzen zusammenhängen. Dichlorvos und Mevinphos sind vergleichsweise polar und weisen eine geringere Affinität zur unpolaren PDMS-Faser auf, als unpolare Analyten wie z.B. Bromophos-ethyl und Fenthion.



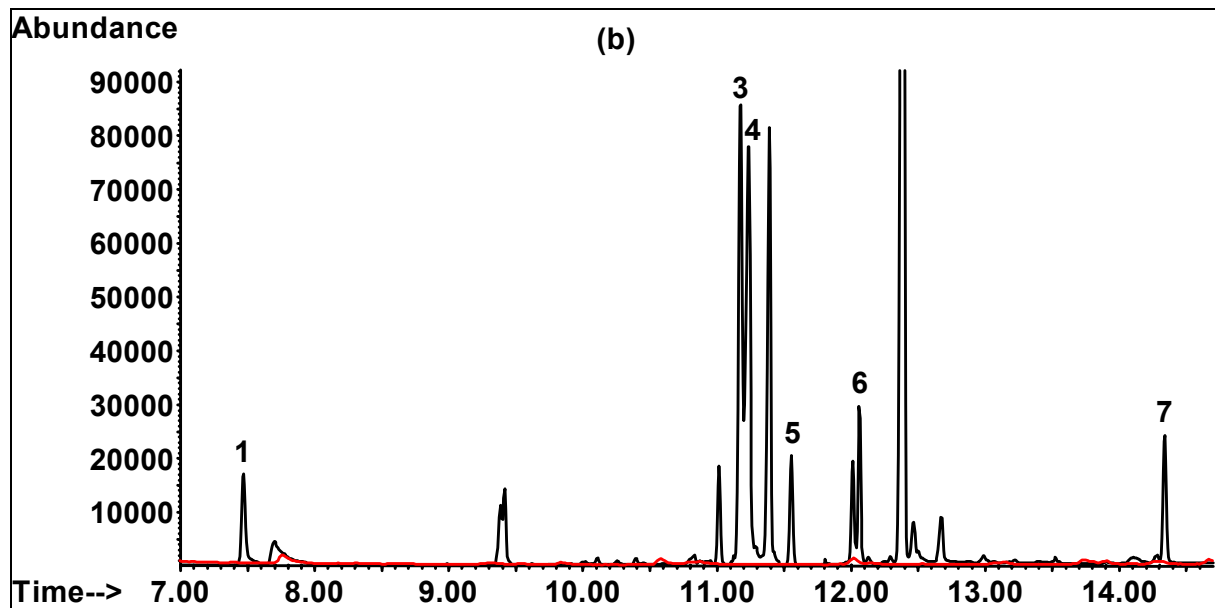


Abbildung 19: Vergleich der SIM-Chromatogramme von zwei mit Organophosphaten dotierten Blutproben (1 µg/g, schwarze Linie) mit dem Chromatogramm einer undotierten Leerblutprobe (rote Linie).

(a) 1 = Dichlorvos, 2 = Mevinphos, 3 = Azobenzene, 4 = Diazinon, 5 = Parathion-methyl, 6 = Malathion, 7 = Chlorpyrifos, 8 = Chlorfenvinphos, 9 = Bromophos-ethyl; (b) 1 = Azobenzene, 2 = Disulfoton, 3 = Fenthion, 4 = Parathion-ethyl, 5 = Bromophos-methyl, 6 = Quinalphos, 7 = Edifenphos

Zur Bestimmung des Linearitätsbereichs der Kalibration wurden die Leerblutproben mit dem Organophosphat-Standardmix im Konzentrationsbereich von 0,025 – 5 µg/g dotiert und analysiert. Mit Korrelationskoeffizienten zwischen $r = 0,991$ und $r = 0,998$ konnte das Verfahren über die in Tab. 15 aufgeführten Konzentrationsbereiche als linear angesehen werden, obwohl der Korrelationskoeffizient von Edifenphos mit $r = 0,987$ ein wenig niedrig lag.

Die Nachweisgrenzen wurden anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses ($S/N = 3$) bestimmt und waren mit Werten zwischen 0,01 und 0,3 µg/g vergleichbar mit den Nachweisgrenzen wie sie in der Literatur bei Verwendung konventioneller Methoden gefunden wurden [104,147-149]. Die vergleichsweise schlechte Empfindlichkeit der Methode für Edifenphos (NG 0,3 µg/g) schlug sich auch in einer geringeren Korrelation der Kalibration nieder.

Tabelle 15: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten und Nachweisgrenzen der untersuchten Organophosphate bei Verwendung der manuellen SPME.

Substanz	Linearitätsbereich [µg/mL]	r	NG [µg/mL]
Bromophos-ethyl	0,04 – 5	0,997	0,04
Bromophos-methyl	0,05 – 5	0,991	0,05
Chlorfenvinphos	0,05 – 5	0,998	0,05
Chlorpyriphos	0,03 – 5	0,994	0,03
Diazinon	0,025 – 5	0,991	0,01
Dichlorvos	0,1 – 5	0,991	0,10
Disulfoton	0,025 – 5	0,997	0,01
Edifenphos	0,3 – 5	0,987	0,30
Fenthion	0,025 – 5	0,995	0,01
Malathion	0,05 – 5	0,998	0,05
Methidathion	0,2 – 5	0,998	0,20
Mevinphos	0,1 – 5	0,992	0,10
Parathion-ethyl	0,025 – 5	0,993	0,02
Parathion-methyl	0,03 – 5	0,996	0,03
Quinalphos	0,025 – 5	0,998	0,01

Die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode wurde bestimmt, indem Leerblutproben mit den Organophosphat-Standards dotiert (1 µg/g) und analysiert wurden. Für die intraday-Präzision wurden 6 Proben an einem Tag und für die interday-Präzision jeweils 2 Proben an 6 unterschiedlichen Tagen gemessen und die Wiederfindungen mit Hilfe der Kalibriergeraden ermittelt. Die einzelnen Kalibrierlösungen wurden ebenfalls unter Zusatz von Matrix hergestellt und die Kalibriergerade jeden Tag neu erstellt. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 dargestellt.

Die meisten der untersuchten Verbindungen wiesen relative Standardabweichungen (RSD) unter 15% auf. Bromophos-ethyl und Dichlorvos überschritten diesen Wert sowohl bei der intra- als auch bei der interday-Präzision, Chlorpyriphos wies nur bei der Präzision zwischen den Tagen einen Wert über 15% auf. Bedenkt man, dass diese Werte nicht nur die Reproduzierbarkeit der GC-MS-Analytik, sondern auch die Reproduzierbarkeit der manuellen Extraktion widerspiegeln, sind relative Standardabweichungen zwischen 15 und 20% jedoch noch akzeptabel. Werte über 30%, wie sie bei Disulfoton erhalten wurden, sind jedoch nicht mehr tragbar, weshalb bei einer Quantifizierung von Disulfoton mit der hier vorgestellten Methode Vorsicht geboten ist.

Tabelle 16: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Organophosphaten in Blut mittels manueller SPME.

Substanz	Dotierung [µg/mL]	intraday-Präzision (n = 6)			interday-Präzision (n = 12)		
		Wiederfindung [µg/mL]	SD [µg/mL]	RSD [%]	Wiederfindung [µg/mL]	SD [µg/mL]	RSD [%]
Bromophos-ethyl	1	1,23	0,23	19,3	1,21	0,21	17,9
Bromophos-methyl	1	1,09	0,06	5,5	1,16	0,11	9,9
Chlorfenvinphos	1	1,09	0,06	5,3	1,10	0,07	5,9
Chlorpyriphos	1	1,20	0,14	11,4	1,29	0,21	16,8
Diazinon	1	1,10	0,06	5,0	1,19	0,11	9,4
Dichlorvos	1	1,32	0,20	15,4	1,37	0,23	17,6
Disulfoton	1	1,15	0,36	31,5	1,15	0,35	30,7
Edifenphos	1	1,28	0,14	11,5	1,29	0,15	12,3
Fenthion	1	1,13	0,04	3,7	1,36	0,07	5,7
Malathion	1	1,21	0,04	3,3	1,25	0,05	5,1
Methidathion	1	1,14	0,03	2,9	1,19	0,05	4,7
Mevinphos	1	1,25	0,07	6,3	1,31	0,09	7,8
Parathion-ethyl	1	0,98	0,04	4,1	0,97	0,07	6,9
Parathion-methyl	1	0,97	0,09	9,3	0,96	0,11	11,4
Quinalphos	1	1,05	0,10	9,5	1,06	0,12	11,0

Für die absolute Wiederfindung wurden Blutproben mit 500 ng eines jeden Organophosphates dotiert und unter den optimierten SPME-Bedingungen im SIM-Modus analysiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden mit denjenigen einer flüssig injizierten methanolischen Lösung verglichen, welche die Organophosphate in einer absoluten Menge von 10 ng enthielt. Die Berechnung der absoluten Wiederfindung erfolgte, abweichend zu Gleichung (29) in Abschnitt 4.4.5, nach folgender Formel:

$$\text{absolute Wiederfindung [\%]} = \frac{\text{Peakfläche}_{SPME} \cdot 100}{\text{Peakfläche}_{\text{Flüssiginjektion}} \cdot 50} \quad (34)$$

Es fällt auf, dass die Wiederfindungen mit Werten zwischen 0,1 und 19,6% sehr unterschiedlich ausfielen (Tab. 17). Der Grund ist wieder in der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Verbindungen zur PDMS-Beschichtung der Faser zu sehen.

Tabelle 17: Absolute Wiederfindungen der untersuchten Organophosphate bei Verwendung der manuellen SPME.

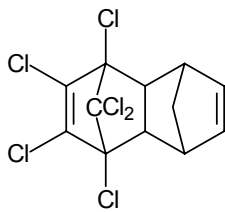
Substanz	Absolute Wiederfindung [%]
Bromophos-ethyl	8,2
Bromophos-methyl	9,7
Chlorfenvinphos	1,7
Chlorpyriphos	8,3
Diazinon	2,9
Dichlorvos	0,1
Disulfoton	3,8
Edifenphos	10,6
Fenthion	2,7
Malathion	6,6
Methidathion	1,3
Mevinphos	0,1
Parathion-ethyl	4,7
Parathion-methyl	19,6
Quinalphos	1,3

Die folgenden Organophosphate konnten auf Grund ihrer hohen Polarität mit der hier vorgestellten Methode nicht nachgewiesen werden: **Demeton-S-methylsulfon, Dicrotophos, Dimethoat, Fenitrothion, Monocrotophos, Omethoat und Phosphamidon.**

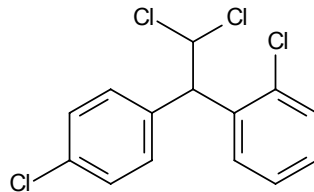
Zum Nachweis dieser Verbindungen wären weiterführende Untersuchungen, ggf. mit einer polarerer Faserbeschichtung, erforderlich gewesen, die den Rahmen dieser Arbeit jedoch gesprengt hätten.

5.3.3 Organochlor-Pestizide

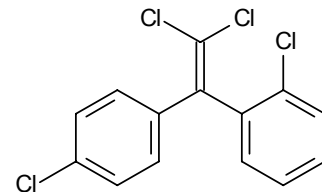
Bei Organochlor-Pestiziden handelt es sich um äußerst lipophile und chemisch sehr stabile Verbindungen (Abb. 20), deren Halbwertszeit z.T. bei über 10 Jahren liegt. Dieses führt zu einer Akkumulation in der Nahrungskette und bedingt dadurch, sowie durch die langsame Eliminierung, auch zu einer Anreicherung im Organismus von Menschen und Tieren.



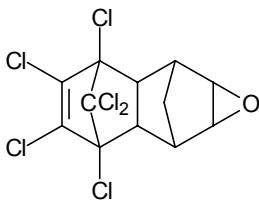
Aldrin



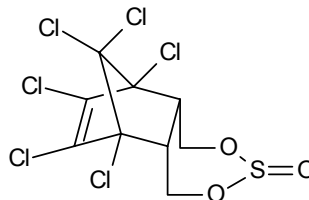
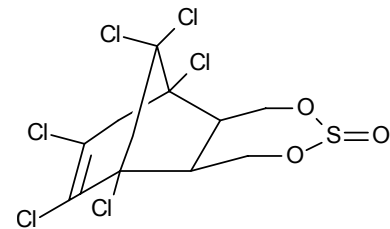
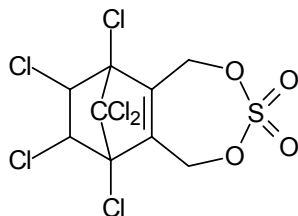
o,p'-DDD



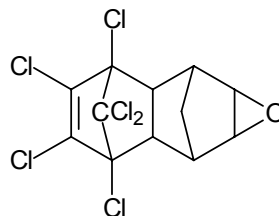
o,p'-DDE



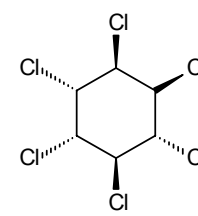
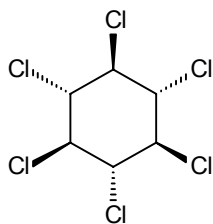
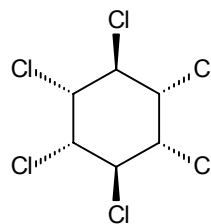
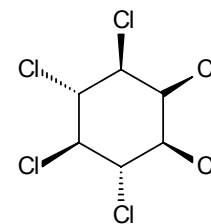
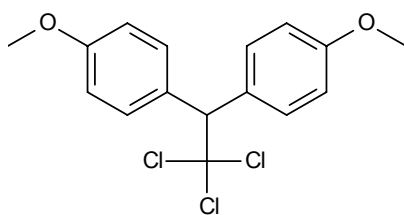
Dieldrin

 α -Endosulfan β -Endosulfan

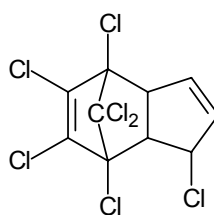
Endosulfan-sulfat



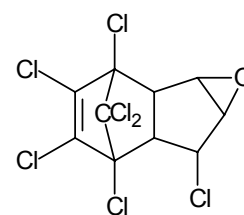
Endrin

 α -HCH β -HCH γ -HCH δ -HCH

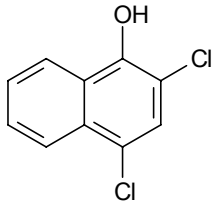
Methoxychlor



Heptachlor



Heptachlor-exo-epoxid



2,4-Dichlor-1-naphthol

Abbildung 20: Strukturformeln der untersuchten Organochlor-Pestizide und des internen Standards 2,4-Dichlor-1-naphthol.

Chlorierte Kohlenwasserstoffe lagern sich an Rezeptoren der Natriumkanäle von Nervenmembranen an und verzögern so deren Schließung. Dieses führt einerseits zu einer erleichterten Wiedererregbarkeit der Neuronen, andererseits ist aber auch ein Erregungsblock möglich. Die daraus resultierenden Symptome bei einer Intoxikation äußern sich in zentralnervösen Störungen wie Übererregbarkeit, Tremor, Zuckungen der Gesichtsmuskulatur bis hin zu tonisch-klonischen Krämpfen, Koma und schließlich Tod.

5.3.3.1 Optimierung der SPME-Parameter

Die Optimierungsexperimente wurden mit Leerblutproben (0,5 mL), welche mit 20 ng/mL (α -HCH, *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, Aldrin, Heptachlor, Heptachlor-exo-epoxid und Methoxychlor) bzw. 100 ng/mL (β -, γ -, δ -HCH, Dieldrin, Endrin, α -, β -Endosulfan und Endosulfan-sulfat) Pestizid-Mix und 200 ng/mL 2,4-Dichlor-1-naphthol dotiert waren, durchgeführt. Die unterschiedlichen Dotierungen wurden gewählt, um die Unterschiede in den Peakflächen, welche aus den unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Verbindungen zur Faserbeschichtung resultieren, auszugleichen.

Für die Ermittlung der optimalen Inkubations- und Extraktionstemperatur wurden die dotierten Leerblutproben bei 60, 70, 80, 90, 100, 110 und 120°C jeweils 15 Minuten inkubiert und 15 Minuten extrahiert. Dabei führte eine Erhöhung der Inkubations- und Extraktionstemperatur bei allen untersuchten Organochlor-Pestiziden zu einem Anstieg der Extraktionsausbeute (Abb. 21). Das Verteilungsgleichgewicht wurde bei 100°C erreicht, lediglich bei Endrin führten Temperaturerhöhungen über 70°C zu einem extremen Abfall der Ausbeute. Auf Grund der Strukturähnlichkeit wäre hier ein ähnliches Temperaturverhalten wie bei Dieldrin zu erwarten gewesen.

Da alle anderen untersuchten Verbindungen dieser Substanzklasse ihr Verteilungsgleichgewicht bei 100°C erreicht hatten und auch für Endrin eine befriedigende

Nachweisgrenze erzielt werden konnte, wurde für die weiteren Untersuchungen eine Extraktions- und Inkubationstemperatur von 100°C verwendet.

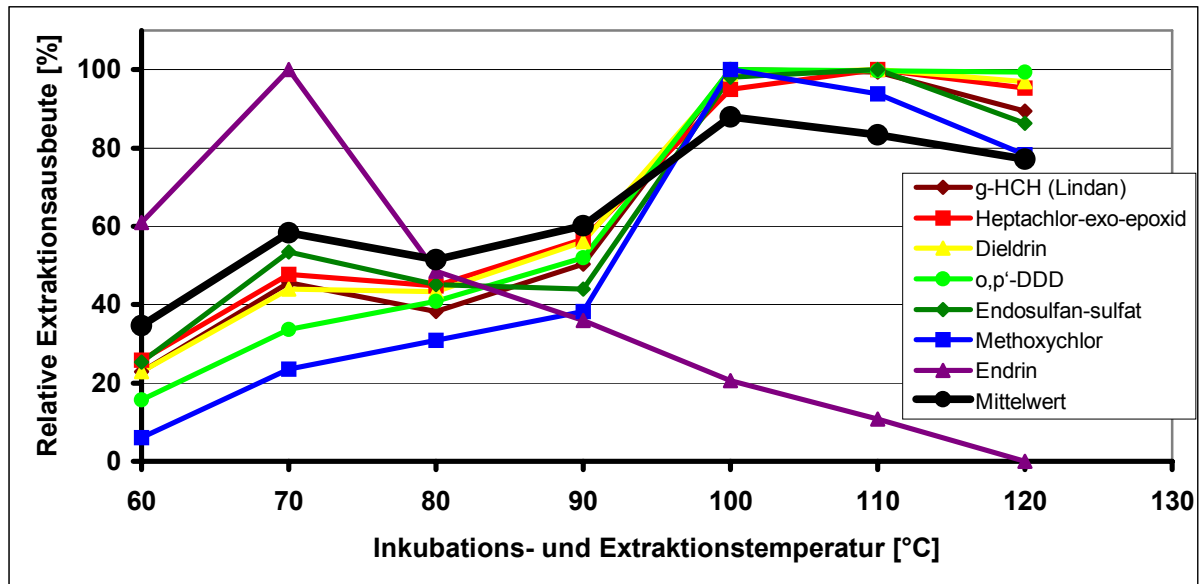


Abbildung 21: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus dotierten Blutproben (20 bzw. 100 ng/mL), demonstriert am Beispiel von γ -HCH, Heptachlor-exo-epoxid, Dieldrin, o,p'-DDD, Endosulfan-sulfat, Methoxychlor und Endrin.

Um zu bestimmen, welchen Einfluss der Zusatz einer Säure bzw. einer Base auf die Extraktionsausbeute der untersuchten Organochlor-Pestizide hat, wurden die aufgestockten Leerblutproben mit jeweils 2 mL destilliertem Wasser, 2 mL 1 M Natronlauge bzw. 2 mL 0,1 M Schwefelsäure versetzt und analysiert.

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, führte die Extraktion in Anwesenheit von Natronlauge lediglich bei einigen wenigen der untersuchten Verbindungen zu besseren Extraktionsausbeuten als aus Wasser. Bei allen übrigen Substanzen wurden schlechtere oder überhaupt keine Ausbeuten erreicht.

In Anwesenheit der Schwefelsäure hingegen wurden für alle Verbindungen gleiche oder bessere Extraktionsausbeuten als in Anwesenheit von Wasser erreicht, so dass alle folgenden Untersuchungen mit einem Zusatz von 2 mL 0,1 M Schwefelsäure durchgeführt wurden.

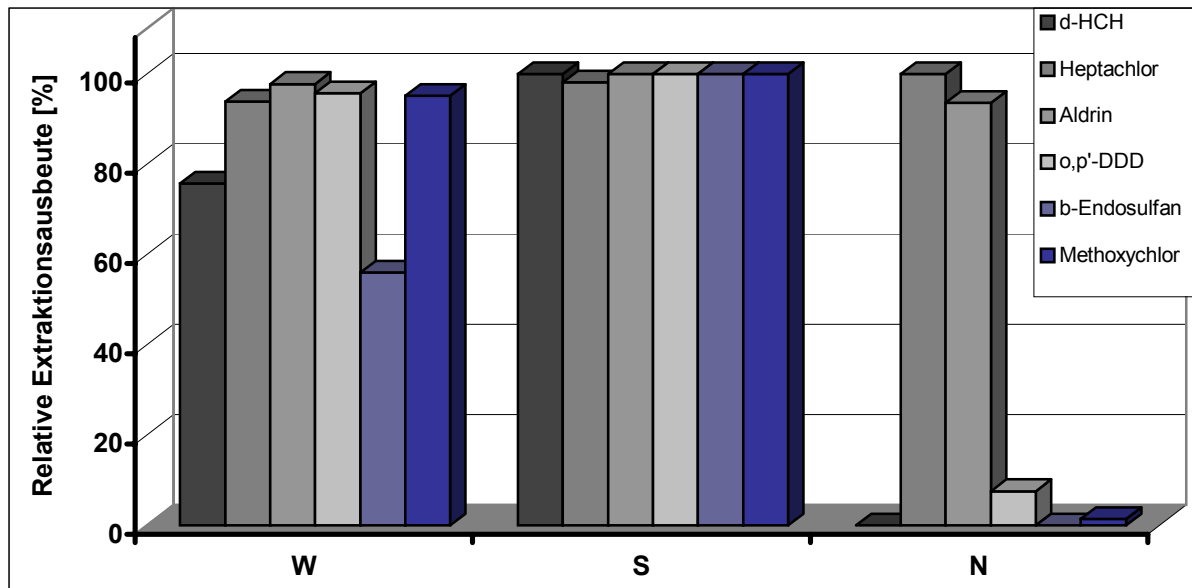


Abbildung 22: Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus jeweils 0,5 mL dotiertem Vollblut (20 bzw. 100 ng/mL) unter Zusatz von je 2 mL Wasser (W), 1 M Natronlauge (N) bzw. 0,1 M Schwefelsäure (S), demonstriert am Beispiel von δ -HCH, Heptachlor, Aldrin, o,p'-DDD, β -Endosulfan und Methoxychlor.

Der Einfluss des Aussalzeffektes auf die Extraktionsausbeute wurde untersucht, indem die dotierten Vollblutproben (0,5 mL) mit 2 mL 0,1 M Schwefelsäure und 0,2 g Kochsalz bzw. Ammoniumsulfat versetzt und vermessen wurden.

Abb. 23 dokumentiert, dass die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide, im Vergleich zu einer Probe mit alleinigem Schwefelsäurezusatz, durch einen Zusatz von 0,2 g Ammoniumsulfat deutlich gesteigert werden konnten. Im Gegensatz dazu führte eine Kochsalzzugabe nur zu einer geringen Erhöhung der Ausbeuten. Im weiteren Verlauf wurde deshalb allen Proben 0,2 g Ammoniumsulfat zugesetzt.

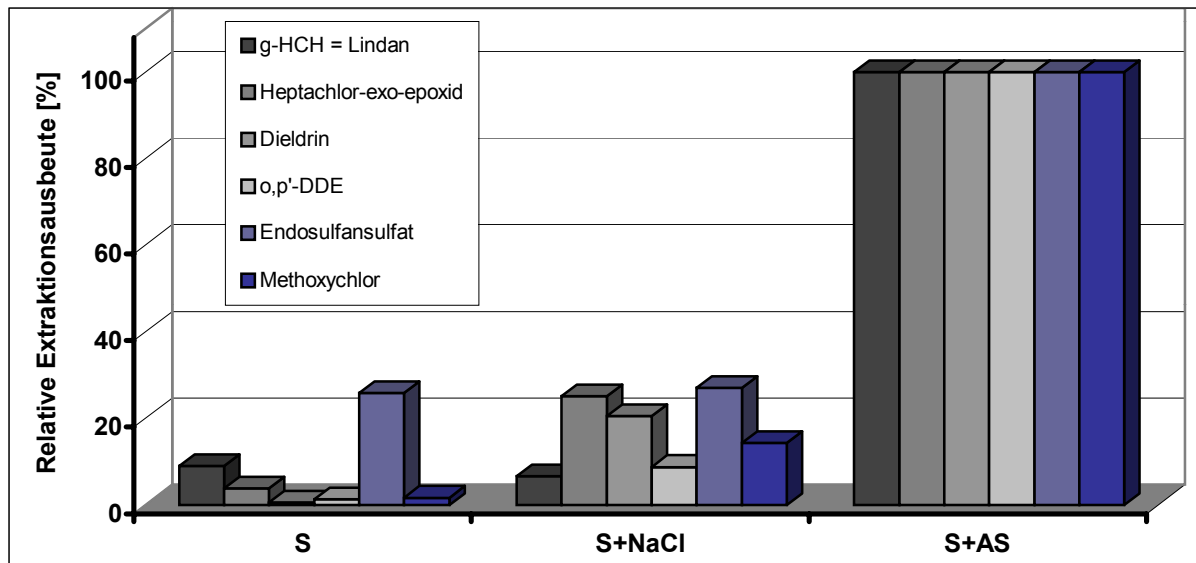


Abbildung 23: Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus jeweils 0,5 mL dotiertem Vollblut (20 bzw. 100 ng/mL) unter Zusatz von jeweils 2 mL 0,1 M Schwefelsäure (S) und 0,2 g NaCl bzw. Ammoniumsulfat (AS) mit den Extraktionsausbeuten aus einer dotierten Probe mit alleinigem Schwefelsäurezusatz, demonstriert am Beispiel von Lindan, Heptachlor-exo-epoxid, Dieldrin, o,p'-DDE, Endosulfan-sulfat und Methoxychlor.

Zur Optimierung der Extraktionszeit wurden die dotierten Vollblutproben 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 bzw. 20 Minuten lang bei 100°C extrahiert.

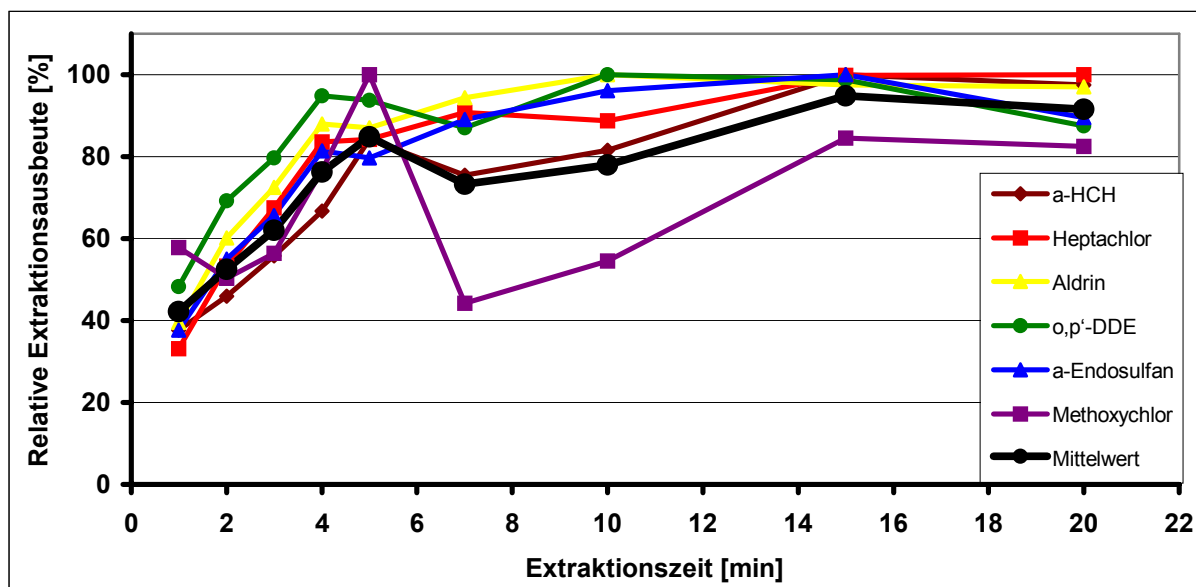


Abbildung 24: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Organochlor-Pestizide aus 0,5 mL dotiertem Vollblut (20 bzw. 100 ng/mL), demonstriert am Beispiel von α -HCH, Heptachlor, Aldrin, o,p'-DDE, α -Endosulfan und Methoxychlor.

In Abb. 24 ist zu sehen, dass die meisten der untersuchten Organochlor-Pestizide ihr Verteilungsgleichgewicht bereits nach etwa 10 Minuten erreicht hatten, lediglich α -HCH und insbesondere Methoxychlor benötigen mehr Zeit, wobei für den Abfall des Kurvenverlaufs von Methoxychlor bei 7 und 10 Minuten keine zufriedenstellende Erklärung gefunden wurde.

Da eine Extraktionszeit von 15 Minuten im Sinne kurzer Analysenzeiten als akzeptabel angesehen werden kann, und um auch α -HCH und Methoxychlor in den Bereich des Verteilungsgleichgewichtes zu bringen, wurde für die weiteren Untersuchungen mit einer Extraktionszeit von 15 Minuten gearbeitet.

Die Optimierung der Desorptionszeit erfolgte, indem die SPME-Faser nach der Extraktion der dotierten Blutproben jeweils 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 und 20 Minuten lang bei 250°C im Injektor des GC exponiert wurde.

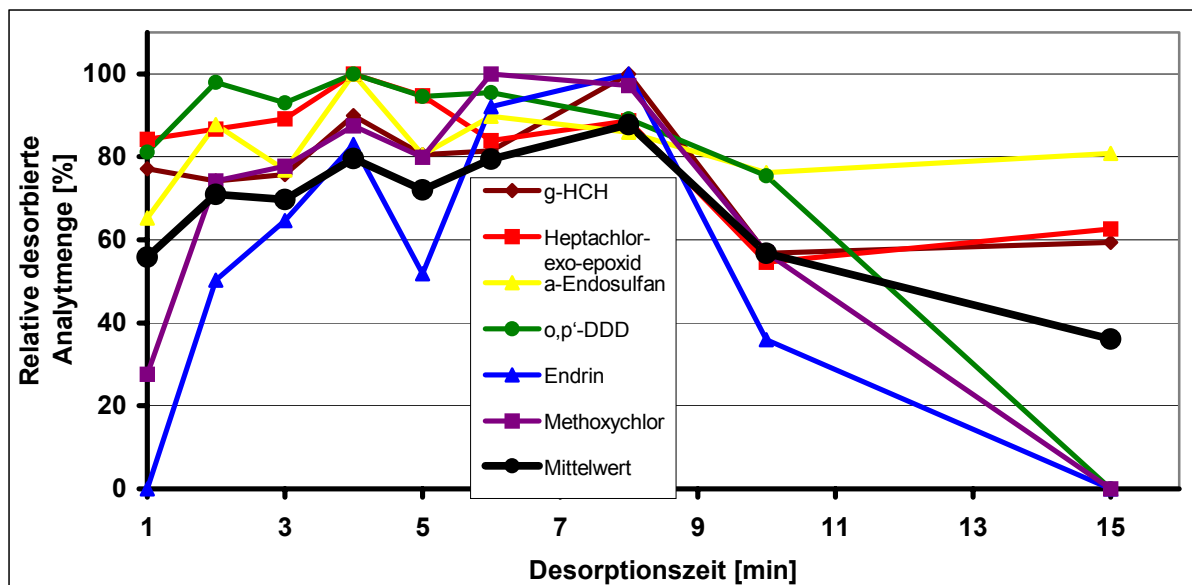


Abbildung 25: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Analytmengen der untersuchten Organochlor-Pestizide, demonstriert am Beispiel von γ -HCH, Heptachlor-exo-epoxid, α -Endosulfan, o,p'-DDD, Endrin und Methoxychlor.

Bei Betrachtung der Desorptionszeitkurven in Abb. 25 ist erkennbar, dass bereits nach etwa 2 Minuten die meisten Analyten fast vollständig desorbiert waren. Lediglich Endrin benötigte mit 8 Minuten bis zur Vollständigen Desorption sehr lange, wobei der Abfall des Kurvenverlaufs von bei 5 Minuten nicht erklärt werden konnte.

Längere Desorptionszeiten als 8 Minuten führten zu einem teilweise rapiden Abfall der desorbierten Analytmengen. Eine mögliche Erklärung dafür könnten Zersetzungsreaktionen der Analyten sein, bedingt durch eine zu lange Exponierung der Faser im heißen Injektor.

In Anbetracht der Tatsache, dass für viele der Analyten die optimale Desorptionszeit bei 4 Minuten lag und auch Endrin innerhalb dieser Zeit zu 80% desorbiert war, wurde als Kompromiss die Desorptionszeit für alle weiteren Untersuchungen auf 4 Minuten festgelegt.

Für die Bestimmung der optimalen Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des Gaschromatographen wurden die dotierten Leerblutproben extrahiert und die Faser anschließend 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 und 4,5 cm tief zur Desorption im Injektor des GC exponiert.

Abb. 26 macht deutlich, wie wichtig die Optimierung der Eintauchtiefe in den Injektor ist. Während die desorbierten Analytmengen bei einer Eintauchtiefe von 0,5 cm durchschnittlich nur bei etwa 10% lagen, erfolgte mit zunehmender Tiefe eine kontinuierliche Erhöhung der desorbierten Analytmengen, bis bei 3,5 cm das Maximum erreicht wurde. Bei noch tieferer Exponierung nahmen die Analytmengen wieder ab.

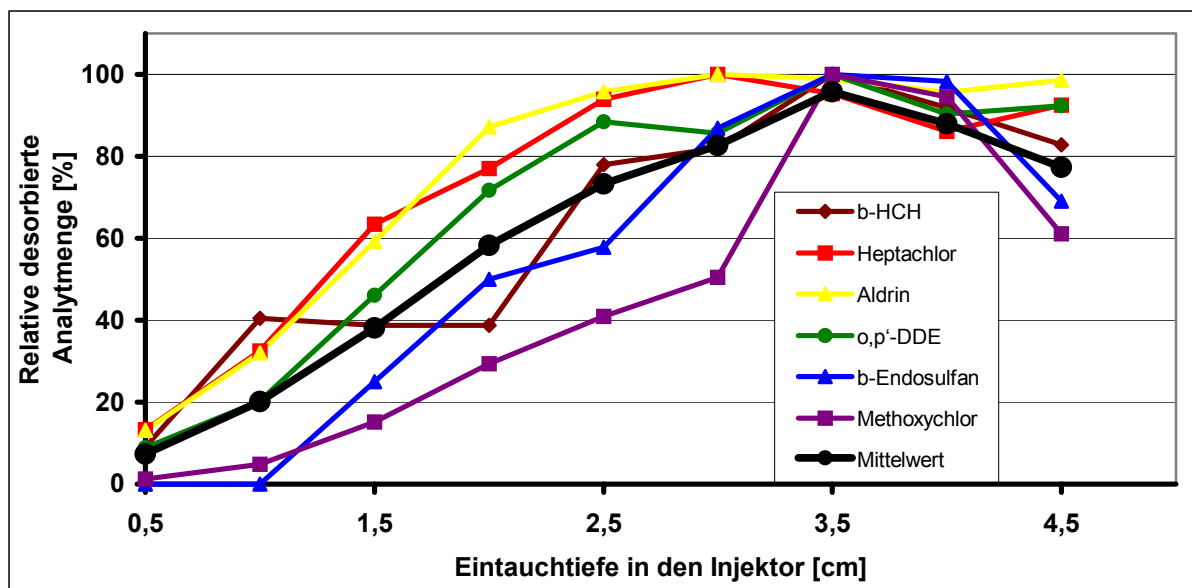


Abbildung 26: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des Gaschromatographen auf die desorbierten Analytmengen der untersuchten Organochlor-Pestizide, demonstriert am Beispiel von β -HCH, Heptachlor, Aldrin, o,p'-DDE, β -Endosulfan und Methoxychlor.

Diese Verlaufsform der Kurven resultiert daraus, dass die Injektortemperatur nicht an allen Stellen gleich ist (vgl. 2.6.12).

Das Optimum für alle untersuchten Verbindungen lag bei einer Eintauchtiefe von 3,5 cm, so dass im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit dieser Einstellung weitergearbeitet wurde.

Eine Übersicht der Parameter der optimierten Methode zum Nachweis von Organochlor-Pestiziden in biologischen Matrices mittels manueller SPME ist in Tab. 18 dargestellt.

Tabelle 18: Methodenparameter zum Nachweis von Organochlor-Pestiziden in biologischen Matrices mittels manueller SPME.

Parameter	Einstellung
Zusätze	2 mL 0,1 M H ₂ SO ₄ + 0,2 g (NH ₄) ₂ SO ₄
Inkubations- und Extraktionstemperatur	100°C
Inkubationszeit	15 min
Extraktionszeit	15 min
Desorptionszeit	4 min
Injektortemperatur	250°C
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	3,5 cm

5.3.3.2 Validierung

Die Validierung erfolgte mit Hilfe dotierter Leerblutproben, welche mit der optimierten SPME-Methode extrahiert und anschließend gaschromatographisch und massenspektrometrisch bestimmt wurden. Der interne Standard 2,4-Dichlor-1-naphthol wurde jeweils in einer Konzentration von 200 ng/mL zugegeben.

Die zur Bestimmung der Peakreinheit und Selektivität verwendeten aufgestockten Leerblutproben enthielten die untersuchten Verbindungen in einer Konzentration von 20 ng/mL (α -HCH, o,p'-DDD, o,p'-DDE, Aldrin, Heptachlor, Heptachlor-exo-epoxid und Methoxychlor) bzw. 100 ng/mL (β -, γ -, δ -HCH, Dieldrin, Endrin, α -, β -Endosulfan und Endosulfan-sulfat).

Interaktionen zwischen Analyt- und Matrixpeaks konnten nicht beobachtet werden, so dass die Methode als selektiv bewertet werden konnte.

Um den Linearitätsbereich der Kalibration zu bestimmen, wurden Blutproben mit den Pestizid-Standards in einem Konzentrationsbereich von 2 – 200 ng/mL dotiert und analysiert. Hierbei konnten für die Kalibriergeraden aller untersuchten Verbindungen dieser Substanzklasse Korrelationskoeffizienten > 0,992 erzielt werden. Das Verfahren konnte somit über die in Tab. 19 angegebenen Konzentrationsbereiche als linear angesehen werden.

Die Nachweisgrenzen wurden über das Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N = 3) bestimmt und sind ebenfalls in Tab. 19 aufgeführt. Sie lagen zwischen 0,02 und 6 ng/mL und sind

vergleichbar mit Werten, die mittels konventioneller Methoden erzielt wurden [150]. GALLELLI et al. fanden im Fettgewebe von 28 Personen, die auf Grund von Unfällen mit Organochlor-Pestiziden verstorben waren, Konzentrationen zwischen 17 und 395 ng/g [151], so dass die Empfindlichkeit der hier vorgestellten Methode genügt, um eine Intoxikation mit Organochlor-Pestiziden zu erkennen.

Tabelle 19: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten und Nachweisgrenzen der untersuchten Organochlor-Pestizide bei Verwendung der manuellen SPME.

Substanz	Linearitätsbereich [ng/mL]	r	Nachweisgrenze [ng/mL]
α -HCH	2 - 200	1,000	0,02
β -HCH	4 - 200	0,999	4
γ -HCH	4 - 200	0,990	4
δ -HCH	6 - 200	0,991	6
o,p'-DDD	2 - 200	0,993	0,04
o,p'-DDE	2 - 200	0,995	0,04
Aldrin	2 - 200	0,992	0,04
Dieldrin	4 - 200	0,999	4
Endrin	4 - 200	0,993	4
α -Endosulfan	2 - 200	0,990	2
β -Endosulfan	4 - 200	0,993	4
Endosulfan-Sulfat	4 - 200	0,990	4
Heptachlor	3 - 200	0,998	3
Heptachlor-exo-epoxid	3 - 200	0,997	3
Methoxychlor	2 - 200	0,992	0,02

Für die intraday- und interday-Präzision wurden Leerblutproben mit 20 bzw. 100 ng/mL aufgestockt und unter den optimierten Bedingungen vermessen; die Ergebnisse sind in Tab. 20 aufgeführt.

Die relativen Standardabweichungen lagen bei den meisten Verbindungen unterhalb von 15%. Lediglich für o,p'-DDD und o,p'-DDE (intra- und interday-Präzision) sowie α -Endosulfan und Methoxychlor (interday-Präzision) wurden höhere RSD erhalten, wobei jedoch in keinem Fall Werte über 20% erreicht wurden. In Anbetracht der Tatsache, dass die in Tab. 20 aufgeführten Daten nicht nur die Reproduzierbarkeit der gaschromatographischen /massenspektrometrischen Analytik widerspiegeln, sondern auch die Reproduzierbarkeit der manuellen SPME, können relative Standardabweichungen bis 20% als akzeptabel

angesehen werden, zumal sich diese Werte bei der Übertragung der hier vorgestellten Methode auf die automatisierte Variante noch verbessern dürften.

Tabelle 20: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Organochlor-Pestiziden in Blut mittels manueller SPME.

Substanz	Dotierung [µg/mL]	intraday-Präzision (n = 6)			interday-Präzision (n = 12)		
		Wiederfindung [µg/mL]	SD [µg/mL]	RSD [%]	Wiederfindung [µg/mL]	SD [µg/mL]	RSD [%]
α-HCH	20	17,22	1,75	10,1	18,37	1,87	10,2
β-HCH	100	91,29	8,81	9,7	92,77	7,28	7,8
γ-HCH	100	110,10	6,93	6,3	122,95	10,15	8,3
δ-HCH	100	92,90	6,08	6,5	94,20	8,02	8,5
o,p'-DDD	20	17,60	3,46	19,7	17,66	3,15	17,9
o,p'-DDE	20	19,20	3,17	16,5	17,00	3,17	18,6
Aldrin	20	15,10	1,44	9,5	13,90	1,69	12,2
Dieldrin	20	16,67	2,31	13,9	21,71	2,89	13,3
Endrin	100	104,73	10,73	10,2	94,01	14,32	15,2
α-Endosulfan	100	76,03	10,20	13,4	72,44	12,26	16,9
β-Endosulfan	100	91,13	6,18	6,8	93,47	5,4	5,8
Endosulfan-Sulfat	100	93,17	7,18	7,7	95,06	6,33	6,7
Heptachlor	20	16,48	2,09	12,7	15,03	2,20	14,6
Methoxychlor	20	14,93	2,01	13,5	16,00	3,06	19,1
Heptachlor-exo-epoxid	20	21,44	2,63	12,3	21,10	2,81	13,3

Die absoluten Wiederfindung wurden bestimmt, indem jeweils 0,5 mL Leerblut mit 10 bzw. 50 ng Organochlor-Standard dotiert und unter den optimierten SPME-Bedingungen im SIM-Modus analysiert wurden. Die erhaltenen Peakflächen wurden mit denjenigen einer flüssig injizierten methanolischen Lösung verglichen, welche die Organochlor-Standards in derselben absoluten Menge (10 bzw. 50 ng/2 µL) enthält.

Die absoluten Wiederfindungen lagen in einem für die SPME üblichen Bereich zwischen ca. 2 und 10%, wobei eine niedrige Affinität des Analyten zur Faser (= hohe Dotierung) nicht unbedingt auch eine niedrige absolute Wiederfindung bedeuten muss, wie bei γ- und δ-HCH zu sehen ist.

Tabelle 21: Absolute Wiederfindungen der untersuchten Organochlor-Pestizide.

Substanz	Dotierung [ng]	Absolute Wiederfindung [%]
α -HCH	10	6,5
β -HCH	50	6,9
γ -HCH	50	10,3
δ -HCH	50	10,1
o,p'-DDD	10	1,7
o,p'-DDE	10	2,1
Methoxychlor	10	7,1
Aldrin	10	3,7
Dieldrin	50	6,4
Endrin	50	4,2
α -Endosulfan	50	9,8
β -Endosulfan	50	8,9
Endosulfan-Sulfat	10	4,9
Heptachlor	10	4,1
Heptachlor-exo-epoxid	10	5,3

5.4 Nachweis psychoaktiver Verbindungen in Haaren

5.4.1 Allgemeine Erläuterungen

Die Analyse von Haarproben hat sich im Laufe der letzten Jahre als wichtiges Instrument in der klinischen und forensischen Toxikologie etabliert. Sie ist eine hilfreiche Methode, um einen Konsum von Opiaten [152-157], Cocain [152-155,157], Cannabinoiden [153,155,157], Methadon [60,61], Amphetaminen [152,153,158], sowie einer Reihe von Arzneimitteln [62,155,159] bei klinischen oder forensischen Fragestellungen, sowie bei Fahrtauglichkeitsprüfungen festzustellen. Ein großer praktischer Vorteil von Haaranalysen liegt in einem vergleichsweise großen Nachweisfenster begründet. Je nach Länge des Haarschaftes können über einen Zeitraum von Monaten und sogar Jahren näherungsweise Aussagen zu Konsumgewohnheiten getroffen werden.

Dabei kann die Aufnahme von Drogen, Arzneimitteln und anderen Verbindungen in die Haarmatrix über verschiedene Wege erfolgen. Die Hauptaufnahme erfolgt aus den Blutgefäßen, welche die Haarwurzeln versorgen. Bei besonders lipophilen Verbindungen besteht die Möglichkeit, dass diese im Unterhautfettgewebe (Subkutis) und in der Hornschicht der Haut (stratum corneum) akkumulieren und von dort aus nach und nach in die Haarmatrix gelangen können. Auch die Diffusion von durch Schweiß- und Talgdrüsen ausgeschiedenen Verbindungen in die Haarmatrix ist möglich. Bei den beiden letztgenannten Wegen ist jedoch zu beachten, dass es hierbei zu einer Verbreiterung der Drogen enthaltenden Abschnitte im Haar kommen kann, so dass die Gefahr von Fehlinterpretationen der erhaltenen Ergebnisse besteht [160,161]. Die vierte Möglichkeit eines positiven Drogennachweises besteht in einer Kontamination der Haare von außen, z.B. durch den Umgang, auch berufsbedingt, mit pulverisierten Drogen oder durch den Aufenthalt in der Nähe von Personen, welche Drogen durch Rauchen konsumieren [162-164].

Damit es nicht zu falsch positiven Ergebnissen kommt, sollten Haarproben vor der Analyse einer gründlichen Dekontaminierung, z.B. durch Waschen mit Wasser und organischen Lösemitteln (vgl. 4.1.4), unterworfen und bei Verdacht das Waschwasser gesammelt und ebenfalls analysiert werden. Bei negativem Drogenbefund im Waschwasser und insbesondere bei positivem Nachweis von Metaboliten in der Haarmatrix, kann eine Kontamination der Haare von außen in der Regel ausgeschlossen werden, denn lediglich bei aktivem Konsum von psychoaktiven Verbindungen werden durch Abbauprozesse im Körper die Metaboliten gebildet [162,165,166].

Die Aufnahme und Retention von Drogen in Haaren wird von drei Hauptfaktoren beeinflusst: Melaninaffinität, Lipophilie und Basizität der eingenommenen Substanzen [158]. Dieses ist auch der Grund, weshalb die lipophileren Muttersubstanzen oft in höheren Konzentrationen

gefunden werden als ihre hydrophileren Metaboliten [156], so dass für die Analysen die unpolare PDMS-beschichtete Faser besonders geeignet ist.

5.4.2 Cannabinoide

Cannabis gehört, gemeinsam mit den synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp, zu den am weitesten verbreiteten psychoaktiven Substanzen. Es werden üblicherweise die getrockneten oder fermentierten Zweigspitzen und Blüten (Marihuana) oder das aus den weiblichen Blüten gewonnene Harz (Haschisch) von *Cannabis sativa* (aus der Familie der Hanfgewächse (Cannabaceae)) geraucht. Hauptwirkstoff ist das Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), weitere Inhaltsstoffe sind Cannabidiol (CBD) und Cannabinol (CBN). Die Strukturformeln sind in Abb. 27 dargestellt.

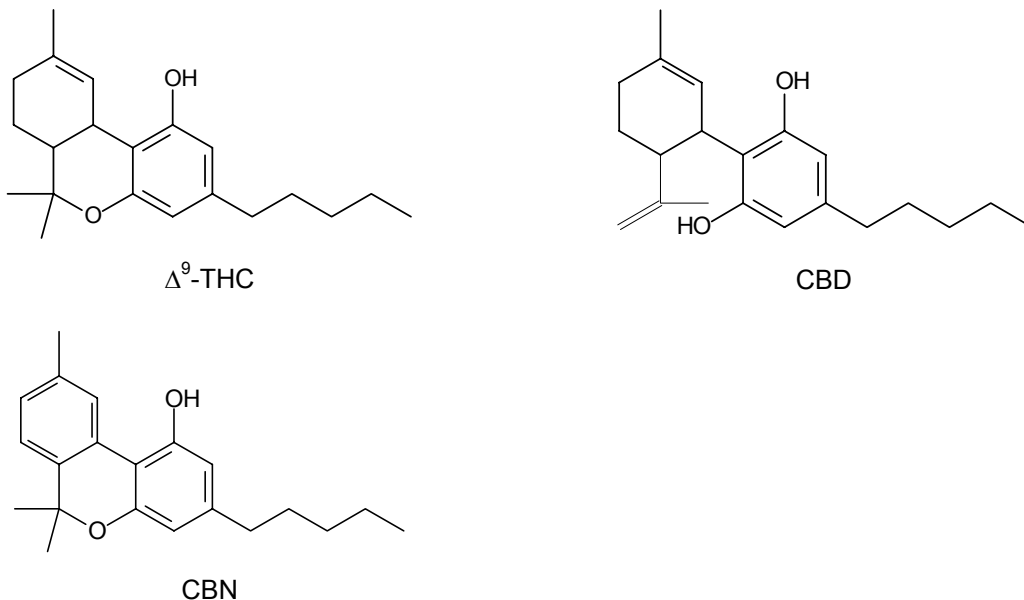


Abbildung 27: Strukturformeln der untersuchten Cannabinoide.

Für Δ^9 -THC und seine Analoga existiert im menschlichen Organismus ein eigener Rezeptor, der sogenannte Cannabinoid-Rezeptor (CB₁-Rezeptor), über dessen Aktivierung die Adenylatzyklase gehemmt und somit Calciumkanäle blockiert werden. Hierbei wirkt das (-)-Enantiomer ca. 10 – 100mal stärker als das (+)-Enantiomer. Auf Grund der starken Lipophilie akkumulieren Δ^9 -THC und seine Metabolite, das noch wirksame 11-Hydroxy- Δ^9 -THC (THC-OH) und die nicht mehr wirksame Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC (THC-COOH), im Fettgewebe und werden nur sehr langsam über die Leber oxidativ abgebaut und eliminiert. Bei chronischem Konsum kann THC-COOH noch Wochen bis

Monate im Urin nachgewiesen werden. Die Nachweisbarkeit im Blut beträgt dagegen nur wenige Tage, für Δ^9 -THC sogar nur wenige Stunden.

Als psychoaktive Wirkungen werden in der Regel ein Gefühl der Entspannung, des Abrückens von Alltagsproblemen, eine angenehme Apathie und eine milde Euphorie angegeben. Z.T. werden aber auch ängstliche Unruhe oder aggressive Gereiztheit empfunden. Optische und auditive Wahrnehmungen werden intensiver erlebt und auch das Zeitempfinden wird beeinflusst. Als nicht psychotrope Effekte treten eine leichte Tachykardie, Hungergefühl, Mundtrockenheit und „rote Augen“ infolge einer verstärkten Durchblutung der Konjunktiva auf. Der Langzeitgebrauch kann zu Persönlichkeitsveränderungen führen. Eine physische Abhängigkeit wird in der Regel nicht beobachtet, es kann jedoch zu einer psychischen Abhängigkeit kommen.

5.4.3 Methadon und EDDP

Bei Methadon ((\pm)-6-Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-heptanon) handelt es sich um eine optisch aktive Verbindung mit den Isomeren L-Methadon (= R-Methadon = Levomethadon) und D-Methadon (= S-Methadon). Es gehört zur Gruppe der Opioid-Analgetika und ist etwa viermal stärker und auch länger wirksam als Morphin, jedoch mit geringeren Nebenwirkungen, geringerem Suchtpotenzial und auch die euphorisierende Wirkung ist nur schwach ausgeprägt. Weiterhin dient Methadon als orales Substitutionsmittel bei der Behandlung der Heroinabhängigkeit. Hierzu wird in Deutschland vorwiegend das Levomethadon eingesetzt, es sind aber beide Isomere nach Anlage III, § 1 Abs. 1 BtMG verkehrs- und verschreibungsfähig.

Für Opioide existieren im menschlichen Körper eigene sogenannte Opioid-Rezeptoren mit unterschiedlichen Subtypen (μ , κ , δ), deren Erregung auch zu unterschiedlichen Wirkungen führt. Der Wirkmechanismus ist jedoch bei allen gleich. Werden sie stimuliert, hemmen sie die Adenylatzyklase, was zu einer Öffnung von Kaliumkanälen und/oder einer Schließung von Calciumkanälen führt. Die Applikation erfolgt oral, s.c., i.m., i.v. oder rektal und führt zu einer Einschränkung des Reaktionsvermögens und der Konzentrationsfähigkeit, zu Enthemmung, erhöhter Risikobereitschaft, Wahrnehmungsstörungen, sowie Miosis (Pupillenverengung).

Im Körper wird Methadon zu 2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP) und 2-Ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pyralin (EMDP) metabolisiert. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei etwa 15 – 60 Stunden, die Nachweisbarkeit im Urin beträgt ca. 3 Tage. Im Blut ist die HWZ wegen der unterschiedlichen Kinetik der beiden Verbindungen nur schwer abschätzbar.



Abbildung 28: Strukturformeln von Methadon und seinem Metaboliten EDDP.

5.4.4 Codein und Dihydrocodein

Auch Codein (4,5 α -Epoxy-3-methoxy-17-methyl-7-morphinen-6 α -ol) und Dihydrocodein (4,5 α -Epoxy-3-methoxy-17-methyl-6 α -morphinanol), die Strukturformeln sind in Abb. 29 dargestellt, gehören zu den Opioiden und sind verkehrs- und verschreibungsfähig nach Anlage III, § 1 Abs. 1 BtMG.



Abbildung 29: Strukturformeln von Codein und Dihydrocodein (DHC).

Die pharmazeutische Anwendung beruht jedoch insbesondere auf der antitussiven, weniger auf der analgetischen Wirkung, wobei die analgetische Wirkung von DHC etwa dreimal so stark ist wie diejenige von Codein.

Die forensische und verkehrsmedizinische Bedeutung liegt vor allem im Beikonsum zu anderen psychoaktiven Substanzen und Methadon, oder in der Verwendung als Ersatzdroge, wenn nicht genügend Heroin zur Verfügung steht. Unter bestimmten Voraussetzungen [167] ist der Einsatz von Codein und DHC auch als Substitutionsmittel bei der Behandlung der Heroinabhängigkeit erlaubt.

Die Einnahme erfolgt oral, i.v., i.m. oder rektal und hat eine Sedierung, ggf. auch eine euphorisch-enthemmende Wirkung zur Folge, die chronische Zufuhr kann zu Wesensveränderungen und Persönlichkeitsstörungen führen. Codein wird zum Teil

unverändert ausgeschieden, zum Teil aber auch zu Norcodein und Morphin (Grund für die analgetische Wirkung) metabolisiert, so dass ein positiver Morphinnachweis nicht zwangsläufig auf den Konsum von Morphin rückschließen lässt. DHC wird dagegen zu Nordihydrocodein, Dihydromorphin und Nordihydromorphin verstoffwechselt, jedoch nicht zu Morphin. Das Suchtpotenzial von Codein ist als eher gering einzustufen, während es bei DHC, auf Grund der Metabolisierung zu Dihydromorphin, deutlich stärker ausgeprägt ist. Die Eliminationshalbwertszeiten liegen bei 2 – 4 (Codein) bzw. 3 – 5 (DHC) Stunden. Die Nachweisbarkeit im Blut beträgt, je nach Dosis, für beide Verbindungen mehrere Stunden bis wenige Tage, im Urin 2 – 3 Tage und in Haaren Tage bis Wochen bis Monate (je nach Haarlänge).

Der Nachweis von Cannabinoiden, Methadon und EDDP in unterschiedlichen Matrices mittels SPME wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Tab. 22), wobei vornehmlich die Technik der Direktimmersion (DI), aber auch die Headspace-Extraktion (HS) zum Einsatz kamen. Eine Derivatisierung wurde jedoch von keiner der aufgeführten Arbeitsgruppen durchgeführt und auch der Nachweis von Morphin, Codein und Dihydrocodein, sowie von Cocain und BE in Haaren mittels HS-SPME wurde bisher nicht beschrieben.

Tabelle 22: Literaturübersicht zum Nachweis von Cocain, Benzoyllecgonin, Cannabinoiden, Methadon und EDDP mittels SPME.

Verbindungen	Matrix	Technik	Derivatisierung	Nachweisgrenze	Literatur
Methadon EDDP	Haare	DI	nein	2,48 ng/mg 0,15 ng/mg	Lucas et al. [60]
Methadon EDDP, EMDP	Haare	HS	nein	0,03 ng/mg 0,05 ng/mg	Sporkert et al. [61]
CBN, THC CBD	Haare	DI	nein	0,1 ng/mg 0,2 ng/mg	Strano-Rossi et al. [63]
CBN, THC CBD	Wasser Speichel	DI	nein	0,1 ng/g 0,2 ng/g	Hall et al. [64]
CBD, CBN, THC	Haare	HS	nein	k. A. ¹	Sporkert et al. [66]
Cocain	Urin	DI	nein	6 ng/0,5 ml	Kumazawa et al. [65]
Benzoyllecgonin (BE)	Urin	DI	ja	0,03 µg/ml	Hall et al. [36]

¹ Es erfolgten keine Angaben, der Autor bezeichnet die Sensitivität als unzureichend.

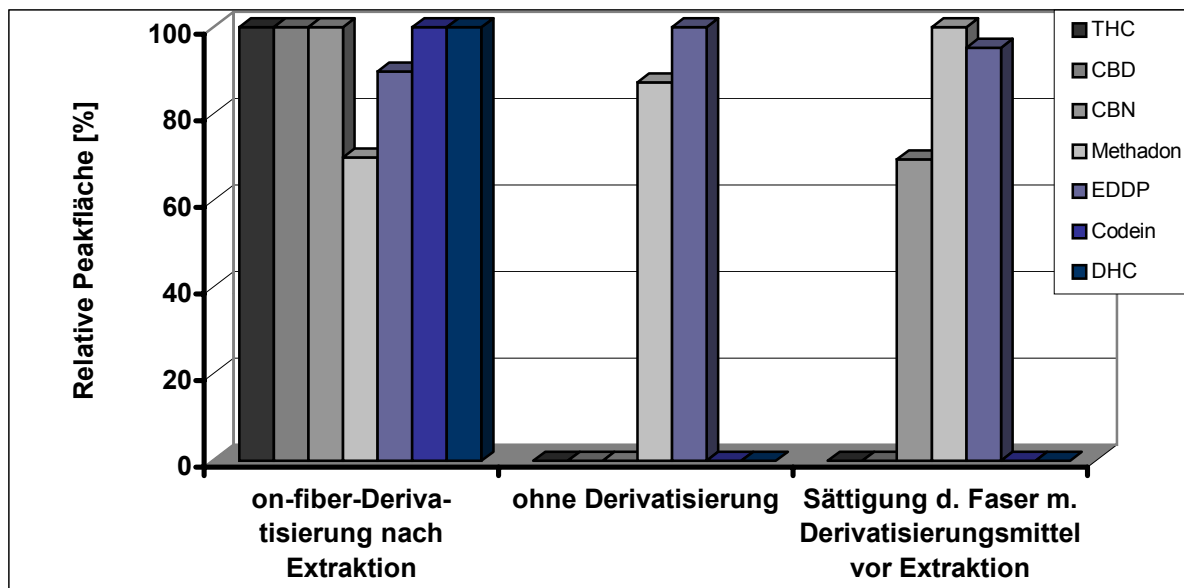


Abbildung 31: Einfluss der Derivatisierungstechnik auf die Empfindlichkeit des Nachweises von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Wie Abb. 31 zu entnehmen ist, war mit Ausnahme von Methadon und EDDP der analytische Nachweis der anderen Substanzen ohne eine Derivatisierung nicht möglich. Bei der Fragestellung, ob es günstiger ist, die Faser vor oder nach der Extraktion dem Derivatisierungsreagenz auszusetzen, fiel die Entscheidung eindeutig zugunsten der letztgenannten Variante aus, da THC, CBD, Codein und DHC bei vorheriger Sättigung der Faser mit Derivatisierungsreagenz nicht erfasst werden konnten.

Abschließend wurde die Dauer der Derivatisierung optimiert. Hierzu wurden die dotierten Haarproben extrahiert und unterschiedlich lange (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 min) auf der Faser derivatisiert. Abb. 32 dokumentiert, dass die Derivatisierungszeit einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit des Nachweises der hier untersuchten Verbindungen hatte. Die besten Ergebnisse wurden mit Derivatisierungszeiten zwischen 2 und 8 Minuten erzielt. Bei zu kurzer Derivatisierung (< 2 min) wurde nur ein Bruchteil der Analyten derivatisiert, aber auch die Ausdehnung der Derivatisierung über 8 Minuten hinaus hatte einen deutlichen Abfall der Sensitivität zur Folge. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich mit der Zeit ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Faser, Headspace und Derivatisierungsreagenz ausbildet, so dass Analyten von der Faser in den Headspace und von dort in das Derivatisierungsreagenz wandern und umgekehrt Moleküle des Derivatisierungsreagenzes von der Lösung in den Dampfraum gelangen und dort von der Faser absorbiert werden. Hierdurch vermindert sich die Konzentration der Analyten in der Faserbeschichtung und die Empfindlichkeit des Nachweises verringert sich.

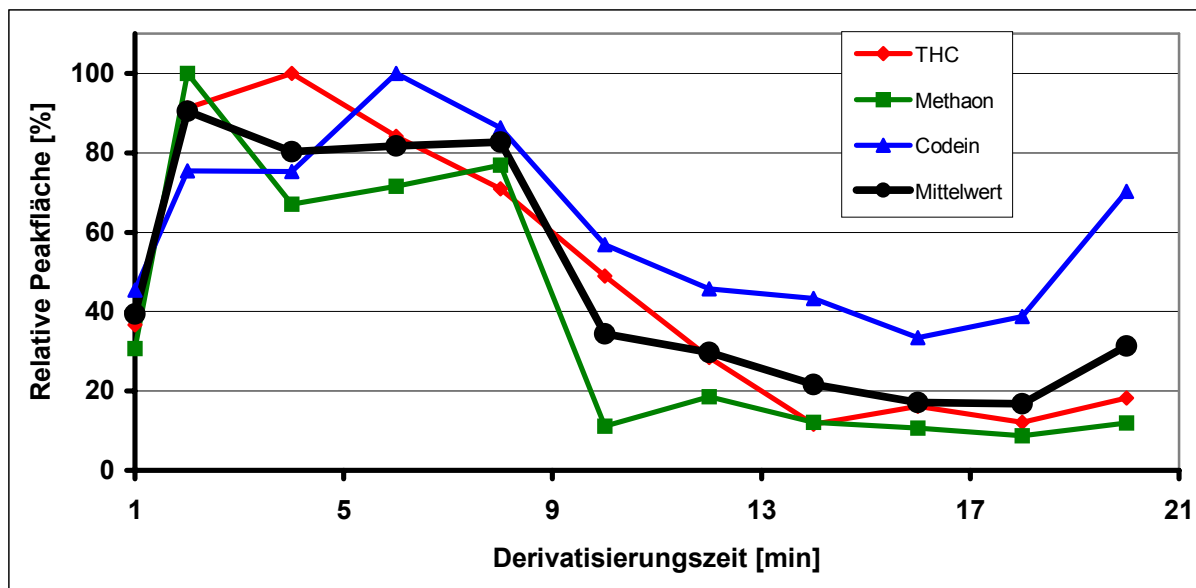


Abbildung 32: Einfluss der Dauer der Derivatisierung auf die Empfindlichkeit des Nachweises von THC, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Als Kompromiss zwischen einer möglichst vollständigen Derivatisierung der auf der Faser befindlichen Analyten und dem geringst möglichen Verlust an Nachweisempfindlichkeit wurde für die weiteren Untersuchungen eine Derivatisierungszeit von 8 Minuten als geeignet angesehen.

5.4.4.2 Optimierung der SPME-Parameter

Alle Optimierungsexperimente wurden mit der automatisierten SPME durchgeführt. Dazu wurden Haarproben (10 mg) mit je 20 ng Standard bzw. deuteriertem internem Standard dotiert und analysiert.

Da sich die Metabolite von Methadon und Codein, EDDP bzw. DHC, jeweils identisch zu ihren Muttersubstanzen verhielten, wurde der besseren Übersicht halber auf deren grafische Darstellung verzichtet.

Zunächst wurden Versuchsreihen zur Optimierung der Hydrolysebedingungen der Haare durchgeführt. Dabei führte die automatisierte Extraktion von Haarproben in Anwesenheit Pufferlösungen (1 mL Phosphatpuffer verschiedener pH-Werte von 2 bis 10) bzw. eine saure Hydrolyse mit 1 mL 1 M Schwefelsäure, jeweils für 15 Minuten bei 90°C im Agitator, zu unbefriedigenden Ergebnissen. Erst eine alkalische Hydrolyse mit 1 mL 1 M Natronlauge erbrachte zufriedenstellende Resultate. Daraufhin erfolgten Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaOH (1 – 10 mol/L). Abb. 33 zeigt, welchen Einfluss die Variation der Natronlaugekonzentration auf die Extraktionsausbeute hatte. Dabei wurden aus Gründen der

Übersichtlich die Mittelwerte der relativen Extraktionsausbeuten gebildet und der höchste Mittelwert gleich 100% gesetzt.

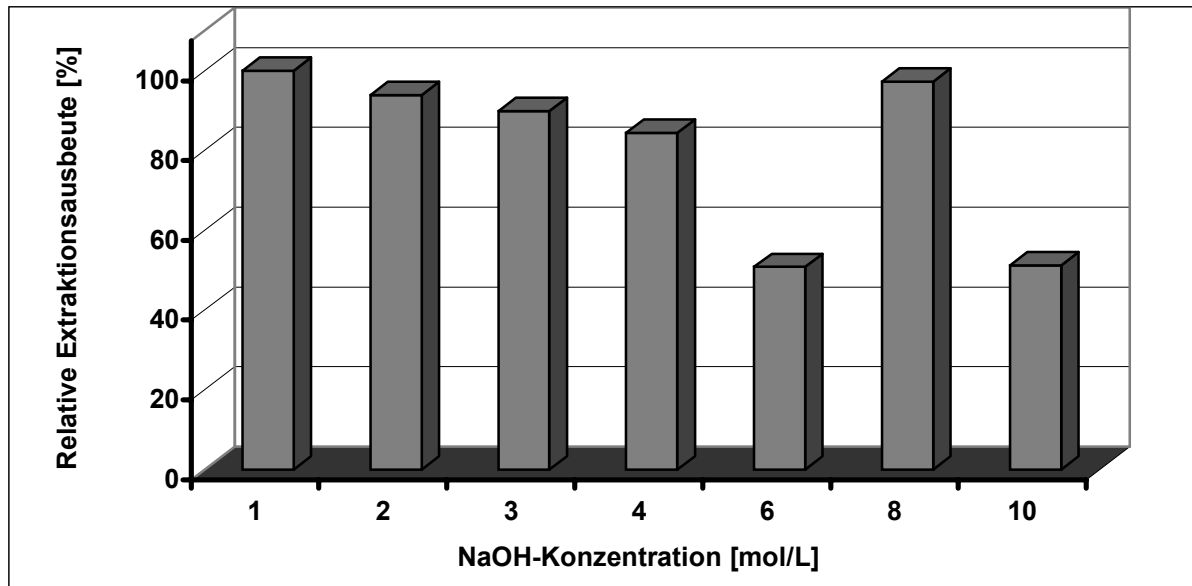


Abbildung 33: Einfluss der NaOH-Konzentration auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Cannabinoide und Opioiden aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg; dargestellt sind die Mittelwerte aller hier untersuchten Verbindungen).

Wie Abb. 33 zu entnehmen ist, verminderten sich die Extraktionsausbeuten mit zunehmender Natronlaugekonzentration immer weiter, wobei der Anstieg der Ausbeute bei einer NaOH-Konzentration von 8 mol/L nicht erklärt werden konnte. Bedenkt man die Ausführungen zum pH-Wert unter Punkt 2.6.7, dann erstaunt dieses Ergebnis, da die Cannabinoide in alkalischem Milieu in Form ihrer Phenolate vorliegen und auch Codein und DHC auf Grund einer negativen Ladung nur eine geringe Affinität zur SPME-Faser aufweisen dürften. Die abnehmende Ausbeute bei zunehmender NaOH-Konzentration spricht jedoch dafür, dass eine Konzentration von 1 mol/L nicht genügt, um diesen Effekt ausreichend zum Tragen zu bringen.

Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb die Hydrolyse der Haarmatrix in 1 mL 1 M Natronlauge durchgeführt, zumal auch nur im Alkalischen eine Auflösung der Haarmatrix erzielt werden konnte, wodurch die Abtrennung der Analyten von der Matrix erleichtert wird.

Zur Optimierung der Inkubations- und Extraktionstemperatur wurden die dotierten Haarproben bei 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 und 120°C zunächst 5 Minuten inkubiert und dann 15 Minuten extrahiert. Abb. 34 zeigt, dass die drei Cannabinoide sehr verschieden auf die unterschiedlichen Temperaturen reagieren. Während sich die Extraktionsausbeute von Δ^9 -THC bei Erhöhung der Temperatur von 60 auf 100°C zunächst deutlich verminderte, um

anschließend wieder stark anzusteigen und bei 120°C ein Maximum zu erreichen, verhielten sich CBD und CBN genau umgekehrt. Hier war die maximale Extraktionsausbeute bereits bei 70 (CBD) bzw. 80°C (CBN) erreicht und fiel danach wieder stark ab.

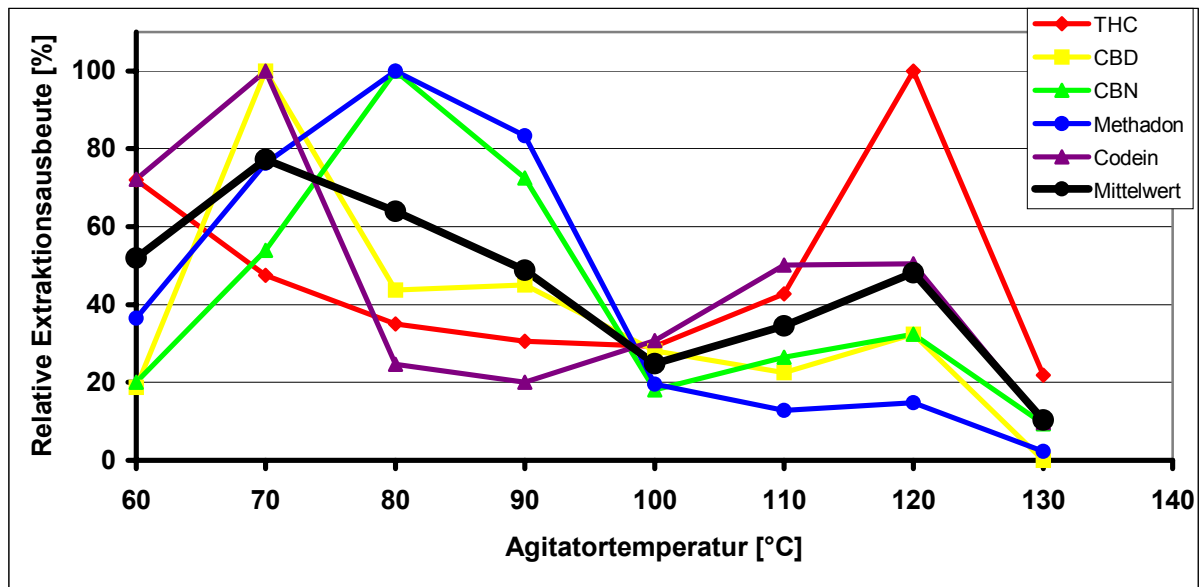


Abbildung 34: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, CBN, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Die maximalen Extraktionsausbeuten der Opiode wurden ebenfalls bei 70 bzw. 80°C erreicht und fielen anschließend, analog zu CBD und CBN, wieder rapide ab.

Auf Grund der unterschiedlichen Temperaturoptima der einzelnen Verbindungen musste ein Kompromiss bezüglich der Inkubations- und Extraktionstemperatur gefunden werden, der es ermöglichte, alle Substanzen mit hinreichenden Ausbeuten zu extrahieren, da alle Analyten in einem Analysengang erfasst werden sollten. Als günstig erschien in diesem Zusammenhang eine Temperatur von 80°C.

Die Effekte von Salzzusätzen auf die Extraktionsausbeuten wurden untersucht, indem den dotierten Haarproben jeweils 0,5 g Ammoniumsulfat, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Kochsalz bzw. Natriumsulfat zugesetzt wurde, bevor sie extrahiert und analysiert wurden. Die erhaltenen Extraktionsausbeuten wurden mit der Ausbeute einer Probe verglichen, welcher lediglich 1 mL Natronlauge (1 mol/L) zugefügt wurde. Wie Abb. 35 dokumentiert, hatte der Zusatz von Salzen eine deutliche Erhöhung der Extraktionsausbeuten zur Folge.

Während ein Zusatz von Ammoniumsulfat, Kochsalz oder Natriumsulfat kaum Unterschiede zu den Extraktionsausbeuten aus einer Probe ohne Salzzusatz aufwies, führte ein Zusatz

von Kaliumcarbonat, Natriumcarbonat bzw. Natriumhydrogencarbonat zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeuten. Dabei wurden die höchsten Extraktionsausbeuten durch einen Zusatz von Natriumcarbonat erzielt, so dass im weiteren Verlauf der Untersuchungen den Proben jeweils 0,5 g Natriumcarbonat zugesetzt wurde.

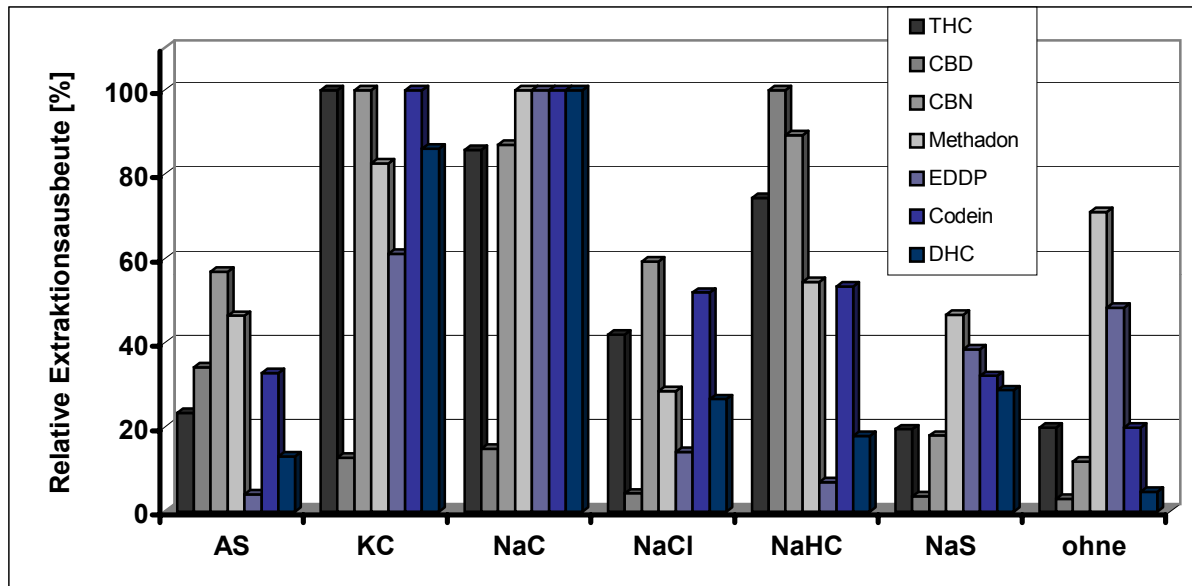


Abbildung 35: Einfluss verschiedener Salzzusätze auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg). (AS = Ammoniumsulfat, KC = Kaliumcarbonat, NaC = Natriumcarbonat, NaHC = Natriumhydrogencarbonat, NaS = Natriumsulfat, ohne = kein Salzzusatz)

Zur Optimierung der Extraktionszeit wurden die dotierten Haarproben 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 bzw. 45 Minuten lang bei 80°C im Agitator extrahiert; die Ergebnisse sind in Abb. 36 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Extraktionszeitkurven der Cannabinoide und Opioiden zum Teil sehr unterschiedlich verlaufen. Während die Ausbeuten von CBN und CBD bei Absorptionszeiten über 25 Minuten rapide zurückgingen, schien das Verteilungsgleichgewicht von THC auch nach 45 Minuten noch nicht erreicht zu sein. Das Verteilungsgleichgewicht der Opioiden war nach etwa 35 Minuten erreicht, wobei die Extraktionsausbeuten von Codein und DHC bei Absorptionszeiten über 35 Minuten wieder rückläufig waren. Für diese Verminderung der Extraktionsausbeuten bei CBN, CBD, Codein und DHC konnte keine befriedigende Erklärung gefunden werden; den unter Punkt 2.2.2 gemachten Ausführungen zufolge hätten sich Extraktionszeitkurven mit Sättigungscharakter ergeben müssen.

Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der Mittelwerte erschien eine Extraktionszeit von 25 Minuten als guter Kompromiss und wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

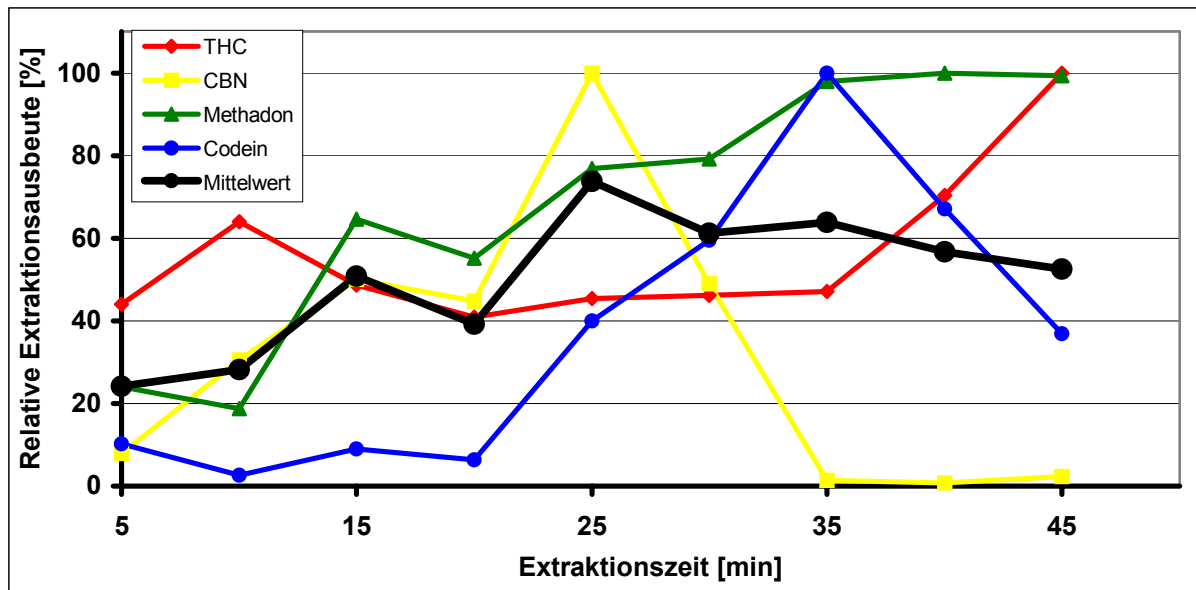


Abbildung 36: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBN, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Zur Untersuchung des Einflusses der Agitatorgeschwindigkeit auf die Extraktionsausbeute wurden die dotierten Haarproben 5 Minuten bei 80°C inkubiert und anschließend 15 Minuten lang, ebenfalls bei dieser Temperatur, extrahiert. Die Extraktionszeit wurde bewusst vor Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes abgebrochen, um einen möglichen Effekt besser zu verdeutlichen.

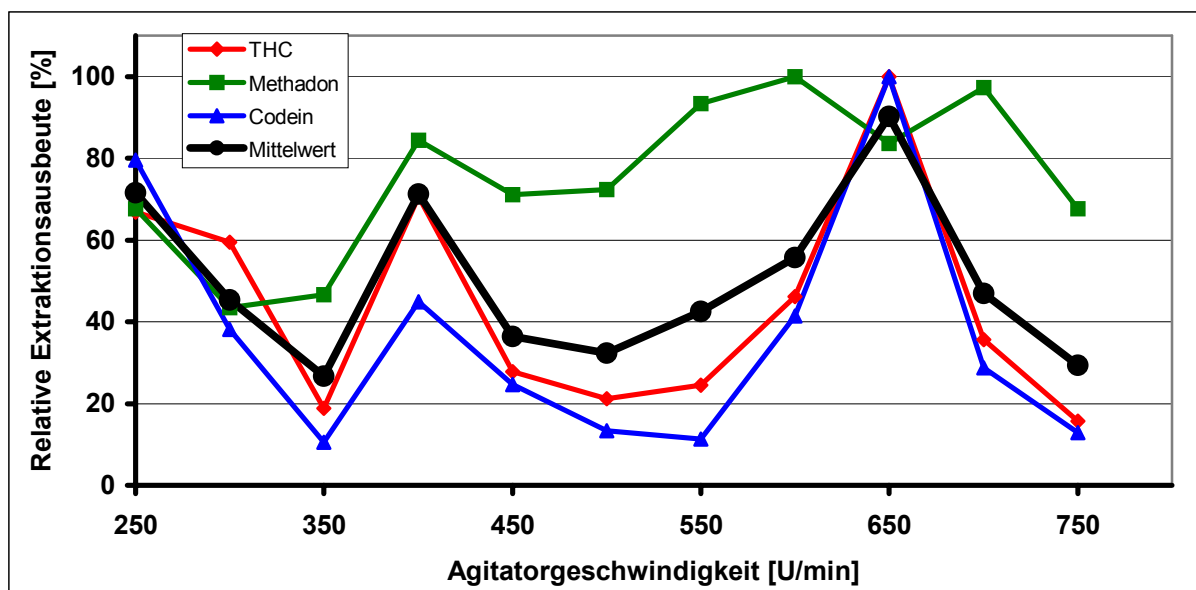


Abbildung 37: Einfluss der Agitatorgeschwindigkeit auf die Extraktionsausbeuten von THC, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Wie in Abb. 37 dargestellt ist, hatte die Umdrehungsgeschwindigkeit des Agitators zwar einen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten Substanzen, es war jedoch kein eindeutiger Trend zu erkennen.

Da die meisten der Verbindungen bei einer Geschwindigkeit von 650 U/min ein ausgeprägtes Maximum zeigten, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen der Agitator mit dieser Einstellung betrieben.

Der Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in das Vial wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden die dotierten Haarproben bei unterschiedlichen Eintauchtiefen (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 und 29 mm) extrahiert.

Anhand von Abb. 38 ist zu erkennen, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Eintauchtiefe und den dabei erzielten Extraktionsausbeuten bestand. Dieses bestätigte die unter Punkt 2.6.10. getroffenen Ausführungen.

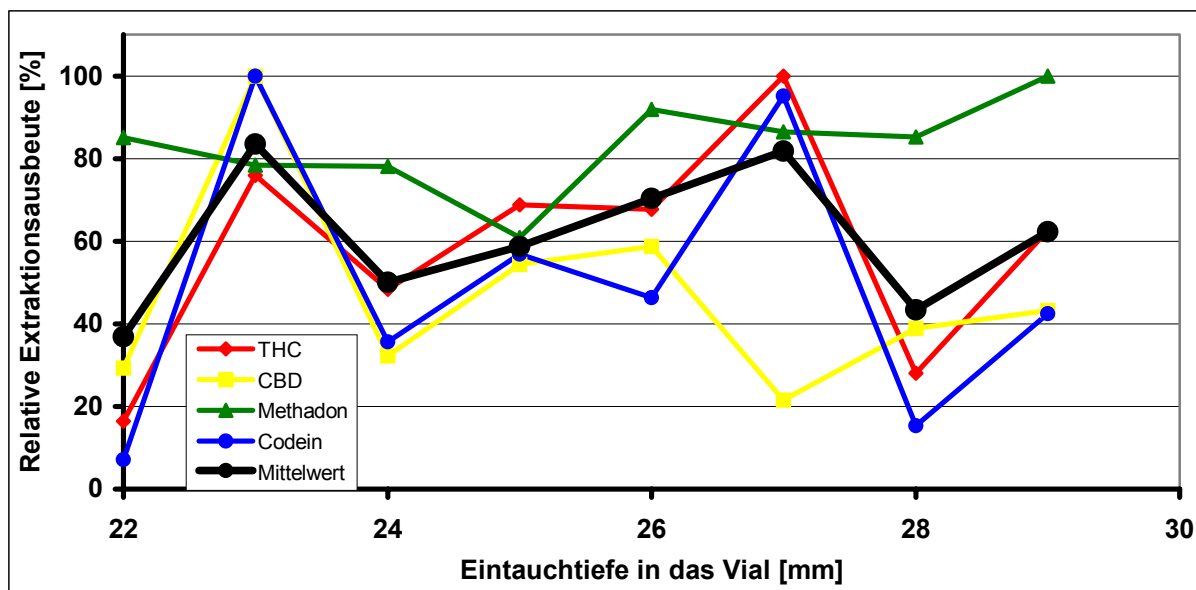


Abbildung 38: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in das Vial auf die Extraktionsausbeuten von THC, CBD, Methadon und Codein aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Um zu vermeiden, dass die Faser bei zu tiefer Exposition mit der Probe in Berührung kommt und dadurch Schaden nimmt, wurde eine Eintauchtiefe von 23 mm ausgewählt.

Für die Optimierung der Injektortemperatur wurden die Analyten zunächst aus den dotierten Haarproben extrahiert und anschließend bei unterschiedlichen Injektortemperaturen (200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270°C) thermisch wieder desorbiert.

Auf Abb. 39 ist zu sehen, dass die desorbierten Analytmengen bis zu einer Temperatur von 240°C relativ konstant blieben, um bei 250°C dann ein Maximum zu erreichen. Eine weitere

Erhöhung der Temperaturen führte zu gleichbleibenden bis wieder abnehmenden Peakflächen.

Da die höchste Empfindlichkeit für alle Verbindungen bei einer Injektortemperatur von 250°C erreicht wurde, erfolgte die Desorption im Verlauf der weiteren Untersuchungen bei dieser Temperatur.

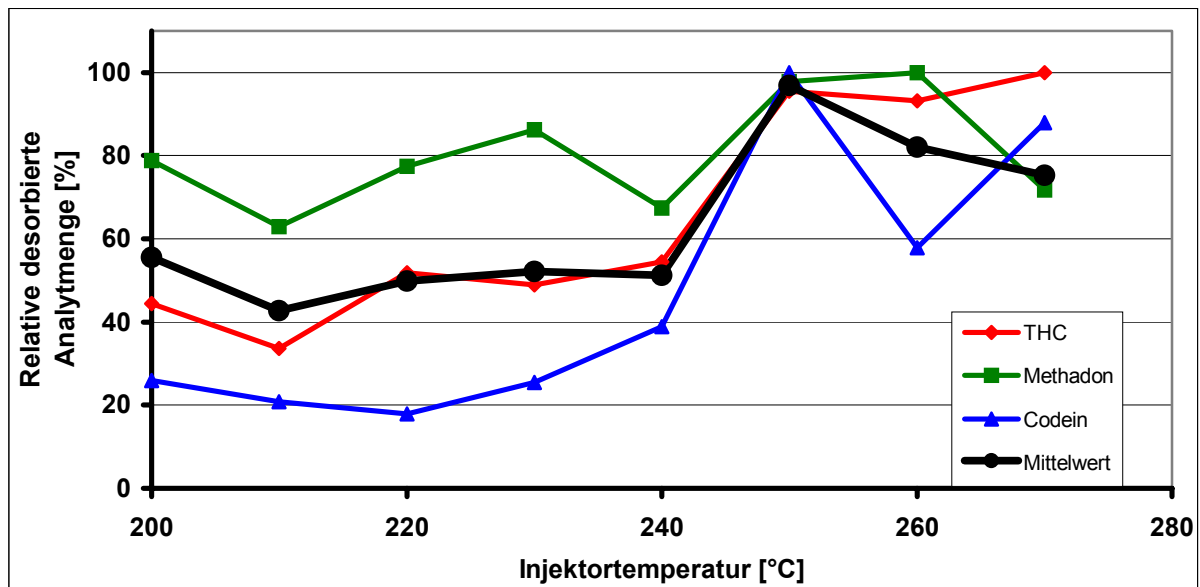


Abbildung 39: Einfluss der Injektortemperatur auf die desorbierten Mengen von THC, Methadon und Codein.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Dauer der Desorption einen Einfluss auf die Empfindlichkeit des Nachweises der untersuchten Verbindungen hatte. Dazu wurden die dotierten Haarproben extrahiert und die SPME-Faser 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Minuten lang bei 250°C im Injektor exponiert.

Abb. 40 zeigt, dass CBD, Methadon und EDDP bereits nach 0,5 Minuten vollständig desorbiert waren. THC benötigte dafür 5 Minuten, Codein und DHC waren sogar erst nach 9 Minuten vollständig desorbiert.

Als Kompromiss wurde eine Desorptionszeit von 5 Minuten gewählt und für die weiteren Untersuchungen verwendet, da hier einerseits die Desorptionszeitkurve von THC ein Maximum aufwies und andererseits die Desorption der restlichen Analyten als befriedigend angesehen werden konnte. Die Maxima in den Kurvenverläufen von Codein und DHC (hier nicht dargestellt) bei einer Desorptionszeit von 9 Minuten blieben unberücksichtigt, da die desorbierten Analytmengen der übrigen Verbindungen zu diesem Zeitpunkt nur noch sehr gering ausfielen.

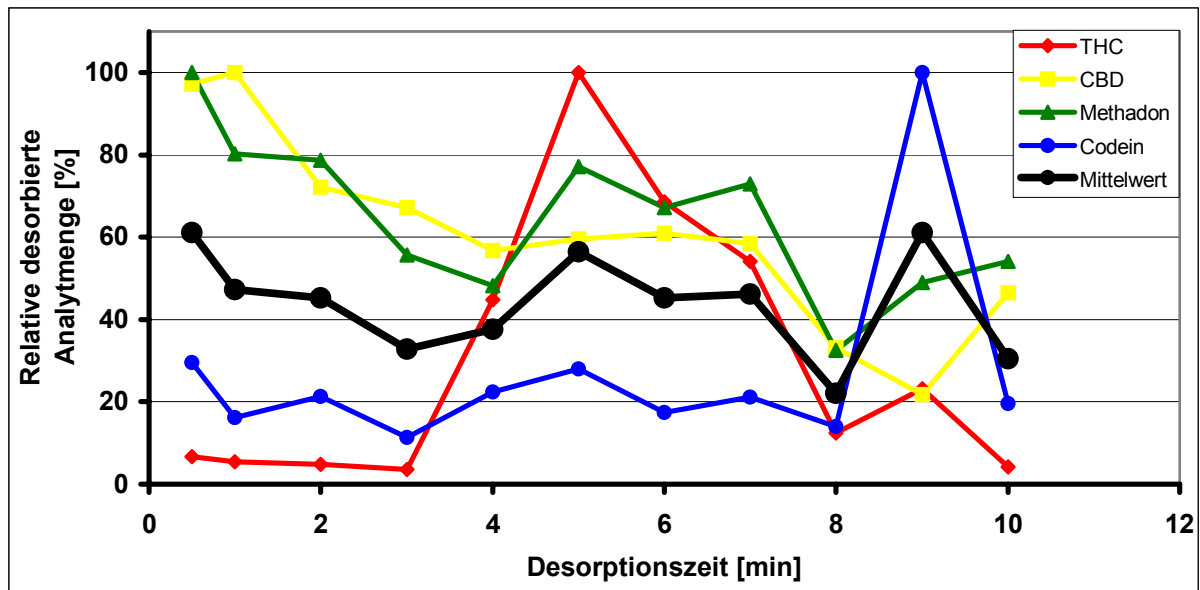


Abbildung 40: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen von THC, CBD, Methadon und Codein.

Zur Optimierung der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor wurden die dotierten Haarproben extrahiert und die Analyten 5 Minuten lang bei 250°C und unterschiedlichen Eintauchtiefen (44, 46, 48, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 59 und 60 mm) desorbiert.

Die optimale Eintauchtiefe lag für die meisten Verbindungen bei 52 mm, so dass diese Einstellung für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

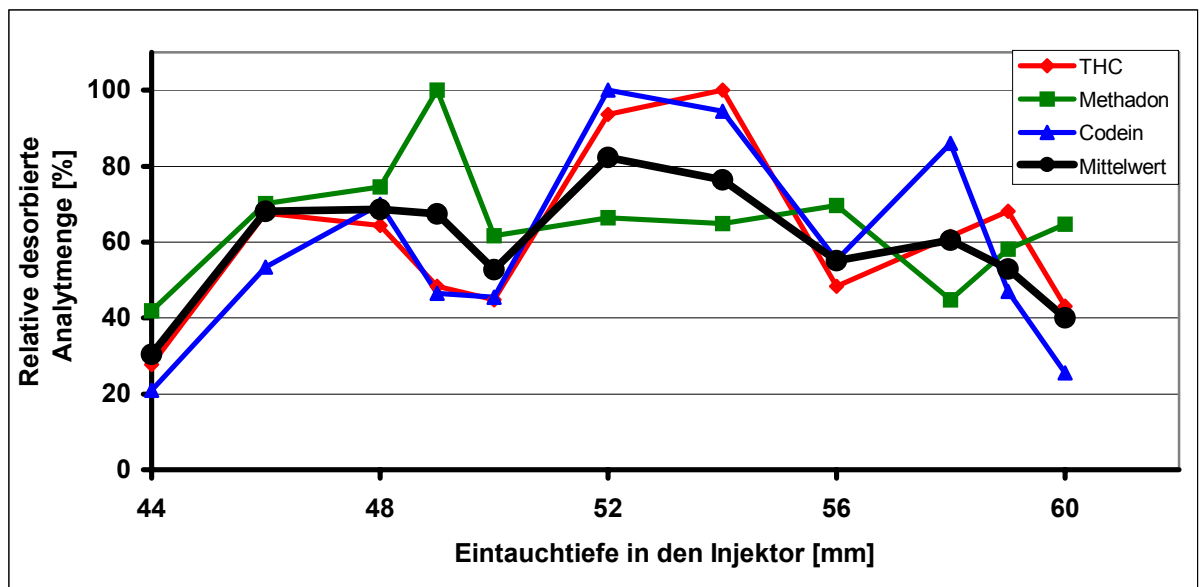


Abbildung 41: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor auf die desorbierten Mengen von THC, Methadon und Codein.

Obwohl es kein üblicher Bestandteil einer Methodenoptimierung für die Festphasenmikroextraktion ist, wurden die Auswirkungen verschiedener Septumtypen auf die Extraktionsausbeuten untersucht. Hierzu wurden Probenvials mit dotierten Haarproben (20 ng/10 mg) versehen, mit Septen verschiedener Hersteller verschlossen und unter den optimierten Bedingungen analysiert.

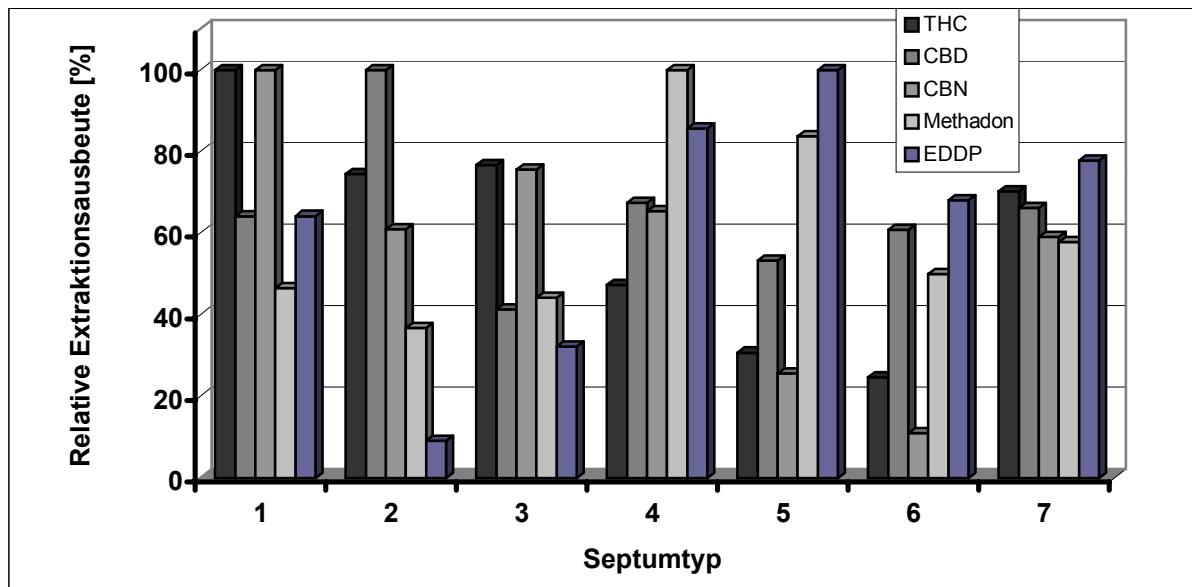


Abbildung 42: Einfluss verschiedener Septumtypen auf die Extraktionsausbeute von THC, CBD, CBN, Methadon und EDDP.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass nahezu jede Verbindung ihre maximale Extraktionsausbeute bei einem anderen Septumtyp erreichte, nur THC und CBN bevorzugten den gleichen Typ. Auf Grund dieses indifferenten Ergebnisses und zum Niedrighalten der Analysenkosten konnte deshalb im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf die Septen des preisgünstigsten Anbieters zurückgegriffen werden.

Tab. 23 zeigt im Überblick nochmals die Parameter der optimierten Methode zum Nachweis von Cannabinoiden und Opioiden in Haaren mittels automatisierter SPME.

Tabelle 23: Optimierte SPME-Parameter zum Nachweis von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC in Haaren.

Parameter	Bedingungen
Haarhydrolyse	alkalisch mit 1 mL 1 M NaOH
Inkubations- und Extraktionstemperatur	80°C
Vorinkubationszeit	5 min
Salzzusatz	0,5 g Na ₂ CO ₃
Extraktionszeit	25 min
Agitatorgeschwindigkeit	650 U/min, 5 s Agitator on, 2 s Agitator off
Eintauchtiefe der Faser in das Vial	23 mm
Derivatisierung	nach der Extraktion, 8 min lang bei 80°C auf der Faser
Injektortemperatur	250°C
Desorptionszeit	5 min
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	52 mm

5.4.4.3 Validierung

Die Validierung erfolgte mittels Haarproben (jeweils 10 mg), welche mit den Cannabinoid- und Opioid-Standards und jeweils 20 ng der entsprechenden deuterierten internen Standards dotiert und unter den optimierten Bedingungen analysiert wurden.

Für die Bestimmung der Peakreinheit und Selektivität wurden die Haarproben in einer Konzentration von 5 ng/mg dotiert und die erhaltenen Chromatogramme mit denjenigen von undotierten Haarproben verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass Peaks, die durch die Haarmatrix verursacht wurden (Abb. 43, rote Linie), nicht mit Peaks interferierten, die von den Analyten stammten (Abb. 43, schwarze Linie).

Peakreinheit und Selektivität waren somit gegeben.

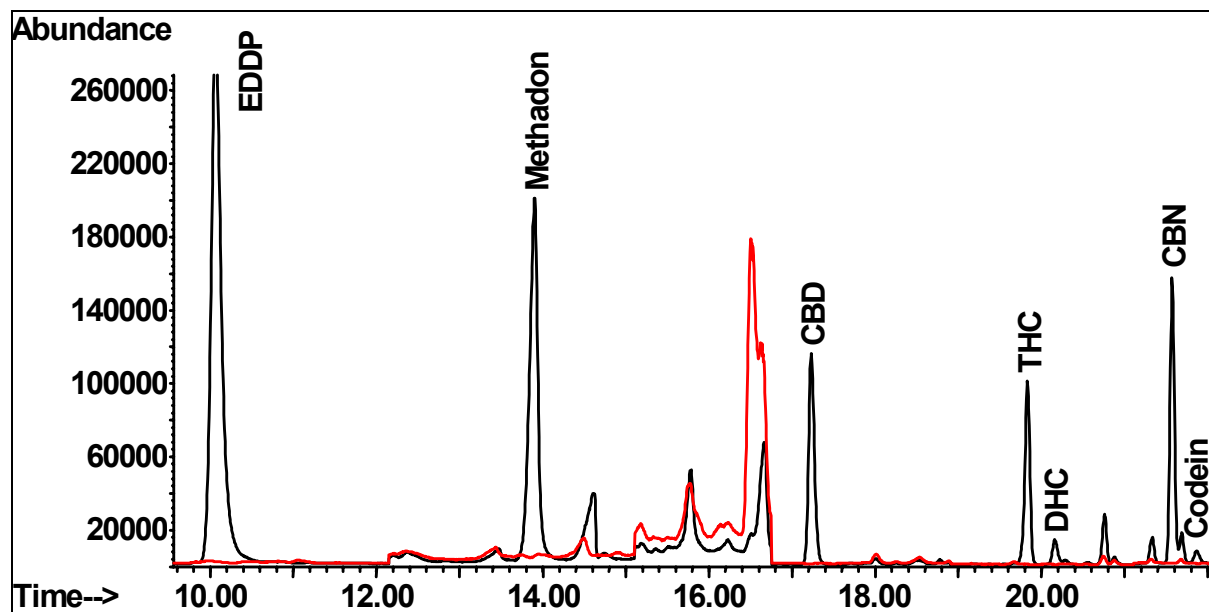


Abbildung 43: Vergleich der Chromatogramme einer dotierten (5 ng/mg, schwarze Linie) und einer undotierten Haarprobe (rote Linie).

Die Linearitätsbereiche der Kalibrationen wurden mit Haarproben bestimmt, welche mit den Standards in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 50 ng/mg dotiert waren. Mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,994 und 0,999 war die Linearität über die in Tab. 24 angegebenen Konzentrationsbereiche gegeben.

Für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG und BG) wurden Haarproben mit den Standards in einer Konzentration von 0,1 – 5 ng/mg dotiert und analysiert. Die entsprechenden Grenzen wurden anschließend mit Hilfe der Computersoftware B.E.N. berechnet; die Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC bei Verwendung der automatisierten SPME.

Substanz	Linearitätsbereich [ng/mg]	r	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]
THC	0,1 - 20	0,999	0,08	0,27
CBD	0,2 - 20	0,999	0,05	0,27
CBN	0,1 - 20	0,998	0,14	0,51
Methadon	0,3 - 20	0,998	0,59	2,34
EDDP	0,05 - 20	0,994	0,01	0,06
Codein	0,4 – 20	0,999	1,15	2,30
DHC	1 - 20	0,998	0,39	1,38

Die erhaltenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen waren vergleichbar oder lagen unterhalb der in der Literatur angegebenen Werte, die mit herkömmlichen Extraktionsmethoden [168] oder SPME-Methoden [60,61,63,64] erhalten wurden. Die hier beschriebene Methode kann somit als sensitiv bezeichnet werden.

Die Bestimmung der intraday- und interday-Präzision erfolgte, indem Haarproben mit den Standards in zwei unterschiedlichen Konzentrationen dotiert und analysiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 25 dargestellt.

Tabelle 25: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC in Haaren bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen.

Konzentration [ng/mg Haar]		Wiederholbarkeit (n=6)		Vergleichbarkeit (n=18)	
		Präzision [%] ¹	Genauigkeit [%] ²	Präzision [%]	Genauigkeit [%]
THC	0,5	5,1	9,6	5,5	15,5
	20	1,9	2,0	3,3	6,7
CBD	0,5	7,2	9,9	12,6	15,9
	20	6,1	4,7	9,9	8,6
CBN	0,5	6,8	9,1	7,2	14,6
	20	3,3	3,6	6,7	7,9
Methadon	0,5	4,3	9,0	5,5	9,9
	20	0,9	6,7	4,7	4,0
EDDP	0,5	2,4	6,0	4,6	10,3
	20	0,5	2,2	1,8	6,0
Codein	0,5	6,4	9,7	16,6	14,6
	20	4,8	3,4	6,2	13,2
DHC	0,5	2,6	9,8	14,5	15,2
	20	1,0	2,7	6,2	6,0

¹ RSD = (Standardabweichung/Mittelwert)·100

² [(gemessene Konzentration – Zielkonzentration)/Zielkonzentration]·100

Die angestrebten Vorgaben, Präzision und Genauigkeit < 10% bei der hohen und < 20% bei der niedrigen Konzentration [102,169], wurden von allen Verbindungen erfüllt, so dass die Reproduzierbarkeit der Methode gegeben ist.

Für die absolute Wiederfindung wurden Haarproben (10 mg) mit 20 ng eines jeden Standards dotiert und unter den optimierten Bedingungen analysiert. Die zum Vergleich injizierten 2 µL einer methanolischen Lösung enthielten ebenfalls 20 ng eines jeden Standards; die Ergebnisse sind in Tab. 26 dargestellt.

Tabelle 26: Absolute Wiederfindungen von THC, CBD, CBN, Methadon, EDDP, Codein und DHC.

Substanz	Absolute Wiederfindung [%]
THC	1,9
CBD	7,5
CBN	0,3
Methadon	9,5
EDDP	6,4
Codein	5,7
DHC	1,3

5.4.4.4 Anwendung der Methode auf reale Proben

Um die Anwendbarkeit der hier vorgestellten Methode in der Routineanalytik zu demonstrieren, wurden die Haarproben von 25 Personen mit bekanntem Cannabiskonsum untersucht. Unter diesen Drogenkonsumenten befanden sich 18 Männer und 7 Frauen in einem Alter zwischen 18 und 40 Jahren; die Ergebnisse sind in Tab. 27 aufgeführt.

Für die Untersuchungen wurden jeweils 10 mg Haare in ein Headspace-Vial eingewogen, mit je 20 ng der entsprechenden deuterierten internen Standards versetzt und mit der hier vorgestellten Methode extrahiert und analysiert.

In zwei Fällen wurde, neben den erwarteten Cannabinoiden, zusätzlich der Konsum von Opioiden nachgewiesen. Zum einen wurde Methadon und zum anderen Codein, jeweils mit dem entsprechenden Metaboliten (EDDP bzw. DHC) gefunden. In einem dritten Fall wurde Amphetamin als weitere psychoaktive Verbindung gefunden.

Tabelle 27: Cannabinoid-Konzentrationen, die in Haarproben von 25 Drogenkonsumenten¹ gefunden wurden.

Verbindung	Konzentration [ng/mg]	Mittelwert [ng/mg]
THC	0,29 – 2,20	1,7
CBN	0,55 – 4,54	1,2
CBD	0,53 – 18,36	1,3

¹ n = 25 (18 männlich, 7 weiblich, Alter 18 – 40 Jahre)

Abb. 44 zeigt das SIM-Chromatogramm einer authentischen Haarprobe eines Drogenkonsumenten. Die grafische Darstellung wurde so gewählt, dass je Analyt zwei Ionenspuren zu sehen sind (target ion und erster qualifier). Dabei wurde THC in einer Konzentration von 0,42 ng/mg, CBN in einer Konzentration von 0,91 ng/mg und CBD in einer Konzentration von 1,33 ng/mg gefunden.

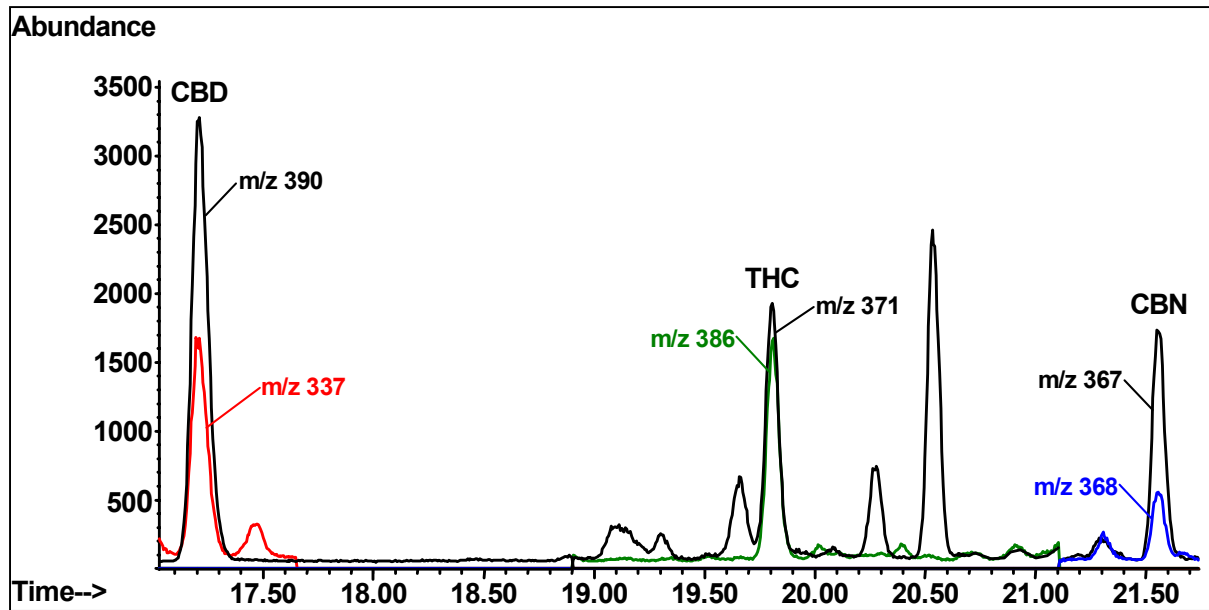


Abb. 44: SIM-Chromatogramm einer authentischen Haarprobe, welche CBD (1,33 ng/mg), THC (0,42 ng/mg) und CBN (0,91 ng/mg) enthält.

5.4.5 Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom Amphetamintyp

Amphetamin und seine synthetischen Analoga Methamphetamin, MDMA (DL-3,4-Methylendioxyamphetamin), MDEA (DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin) und MDA (DL-3,4-Methylendioxyamphetamin) stellen, gemeinsam mit Cannabis, beliebte Partydrogen dar. Sie werden unter so phantasievollen Namen wie „Amph“ und „Pep“ für Amphetamin, „Speed“, „Cristal“, „Crank“ und „Meth“ für Methamphetamin, „Ecstasy“, „XTC“ und „Adam“ für MDMA und „Eve“ für MDEA gehandelt. Chemisch gesehen handelt es sich bei diesen Verbindungen um Derivate des Phenylethylamins, welche als schwache bis mäßig starke Basen in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dabei ist zu beachten, dass die rechtsdrehenden (S)-(+)-Enantiomere ungefähr 3- bis 4mal stärker zentral wirksam sind als die linksdrehenden (R)-(-)-Enantiomere. MDA, MDEA und MDMA haben zusätzlich eine LSD-artige halluzinogene Wirkung, da sie in Position 3 und 4 Sauerstoffatome besitzen, die über eine Methylenebrücke zu einem fünfgliedrigen Ring verknüpft sind. Die Strukturformeln der hier untersuchten Verbindungen sind in Abb. 45 dargestellt.

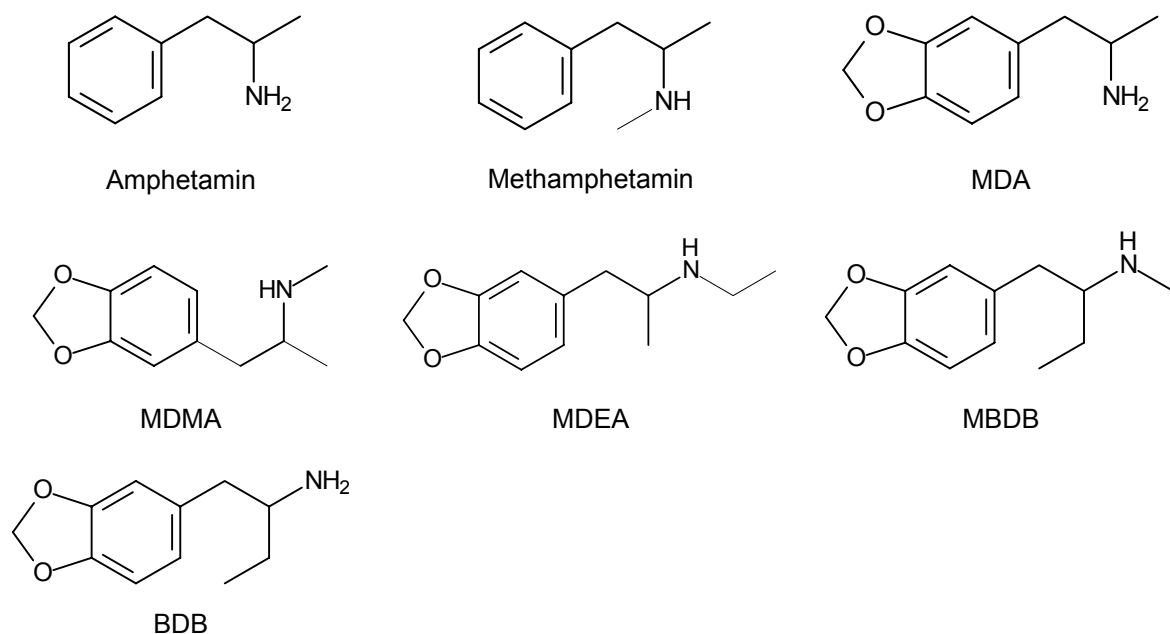


Abbildung 45: Strukturformeln der untersuchten Designerdrogen vom Amphetamintyp.

Amphetamin und seine synthetischen Analoga konkurrieren insbesondere mit Noradrenalin und Dopamin um die Aufnahme in die entsprechenden Nervenendigungen und Vesikel, so dass es indirekt zu einer Erhöhung der Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt kommt. Die erhöhte NoradrenalinKonzentration wird für die stimulierende und antriebssteigernde Wirkung verantwortlich gemacht und führt zu Symptomen wie Hypertonie, Schwitzen, Tremor, Mundtrockenheit, Bradykardie und im Extremfall zum Myokardinfarkt. Dahingegen wird die euphorisierende Wirkung auf Dopamin zurückgeführt. Weitere Folgen

eines Amphetaminkonsums sind eine vorübergehende Leistungssteigerung, ein vermindertes Hungergefühl und ein vermindertes Schlafbedürfnis. Sehr hohe Amphetamin-Dosen führen zu einer massiven Freisetzung von Dopamin im zentralen Nervensystem (ZNS) mit psychotischen Zuständen wie Halluzinationen und Wahnvorstellungen, zudem können Krämpfe und Delirien auftreten. Das Suchtpotenzial ist geringer als bei Opiaten und Cocain [170].

Für den Nachweis von Amphetaminen und synthetischen Designerdrogen in unterschiedlichen Matrices mittels SPME finden sich in der Literatur bereits einige Arbeiten, wobei Verfahren mit direkter Immersion (DI) der Faser in die Probe, Headspace-Extraktion (HS), sowie Methoden mit und ohne Derivatisierung, bei vergleichbarer Sensitivität, beschrieben sind (Tab. 28).

Bei der Wahl der SPME-Faser erfolgte in der Mehrzahl der Arbeiten ein Rückgriff auf die PDMS-Beschichtung, lediglich SPORKERT et al. [72] verwendeten eine Polyacrylat-Beschichtung (PA).

Tabelle 28: Literaturübersicht zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp in unterschiedlichen Matrices mittels SPME.

Verbindungen	Matrix	Technik	Derivatisierung	Nachweisgrenze	Literatur
Amphetamin Methamphetamin	Haare	HS ¹	keine	0,1 ng/mg 0,4 ng/mg	Koide et al. [27]
Amphetamin, MA	Urin	DI ²	keine	10 ng/ml	Ishii et al. [67]
Amphetamin, MA	Blut	HS ¹	PFBB ³ -Zugabe zur Probe	0,5 ng/g	Okajima et al. [34]
Amphetamin, MA	Blut	HS ¹	HFB ⁴ -Einspritzung in Injektor	0,01 µg/g	Nagasawa et al. [28]
Amphetamin MA	Urin	HS ¹	keine	0,5 ng/ml 1,1 ng/ml	Lord et al. [68]
Amphetamin MA	Blut	HS ¹	HFB ⁴ -Einspritzung in Injektor	10 ng/g 5 ng/g	Namera et al. [37]
Amphetamin, MA Dimethylamphetamin	Urin	DI ²	keine	10 ng/ml 1 ng/ml	Myung et al. [69]
Amphetamin, MA	Urin	HS ¹	keine	0,1 µg/ml	Yashiki et al. [70]
Amphetamin, MDA MA, MDMA, MDEA	Urin	DI ²	PCF ⁵ -Zugabe zur Probe	15 ng/ml 5 ng/ml	Ugland et al. [35]
Amphetamin, MA, MDMA, MDEA	Urin	HS ¹	keine	keine Angabe	Centini et al. [29]
Amphetamin, MA MDA, MDMA	Urin	HS ¹	TFA ⁶ auf der Faser	10 ng/ml 20 ng/ml	Jurado et al. [71]
Amphetamin MA,MDMA,MDEA, MDA	Haare	HS ¹	MBTFA auf der Faser	0,04 ng/mg 0,02 ng/mg 0,06 ng/mg	Sporkert et al. [72]

¹Headspace-SPME, ²Direktimmersion, ³Pentafluorbenzylbromid, ⁴Heptafluorbuttersäureanhydrid, ⁵Propylchlorameisensäure, ⁶Trifluoressigsäure-anhydrid

5.4.5.1 Derivatisierung

Auf Grund ihrer Aminstruktur sind Amphetamine vergleichsweise polare Verbindungen, deren gaschromatographische Trennung an den routinemäßig im Labor verwendeten unpolaren Säulen (siehe 4.1.3.2) mit Schwierigkeiten behaftet ist, da sich die Analyten gerne an aktive Stellen von GC-Säulen und Glasliner anlagern. Um dem Abhilfe zu schaffen, erfolgte bei der bisher routinemäßig angewendeten Methode nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion eine Derivatisierung mit MBTFA (N-Methyl-bis(trifluoracetamid)). Um die bisherigen guten Erfahrungen mit diesem Derivatisierungsreagenz auszunutzen, lag es nahe, MBTFA auch bei der SPME einzusetzen.

Bei MBTFA handelt es sich um ein vergleichsweise mildes Derivatisierungsreagenz, das stabile Trifluoracetylderivate mit Hydroxy- und Thiol-, sowie primären und sekundären Aminogruppen bildet. In Abb. 46 ist die Derivatisierungsreaktion am Beispiel von MDMA dargestellt.

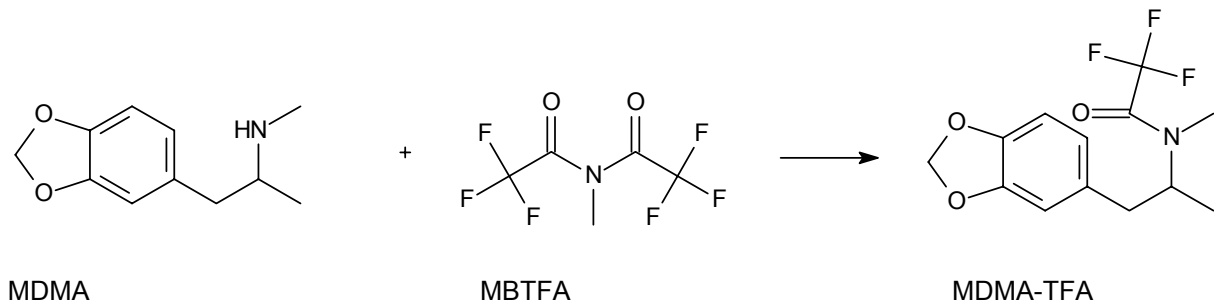


Abbildung 46: Derivatisierung von MDMA (Ecstasy) mit MBTFA.

Die Durchführung der Derivatisierung erfolgte, analog den Cannabinoiden und Opioiden, auf der Faser und ebenfalls nach der Extraktion.

5.4.5.2 Optimierung der SPME-Parameter

Die Optimierung der Parameter wurde mit der automatisierten SPME durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 mg Haare in ein Probengefäß eingewogen und mit je 20 ng der Amphetaminstandards und der entsprechenden deuterierten internen Standards dotiert.

Zunächst wurde wieder die Inkubationstemperatur optimiert, indem die dotierten Haarproben 15 Minuten bei 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100°C im Agitator inkubiert und geschüttelt wurden, bevor die Extraktion erfolgte. Wie Abb. 47 zu entnehmen ist, zeigten alle untersuchten Verbindungen dieser Substanzklasse eine sehr deutliche Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Nach einem steilen Anstieg der Extraktionsausbeute bis zum Erreichen eines Maximums bei 50°C, war die Ausbeute bei 60°C bereits wieder deutlich zurückgegangen und nahm mit steigender Temperatur immer weiter ab.

Eine Inkubationstemperatur von 50°C stellte somit für Amphetamin und seine synthetischen Analoga das Optimum dar und wurde für die weiteren Untersuchungen dieser Gruppe verwendet.

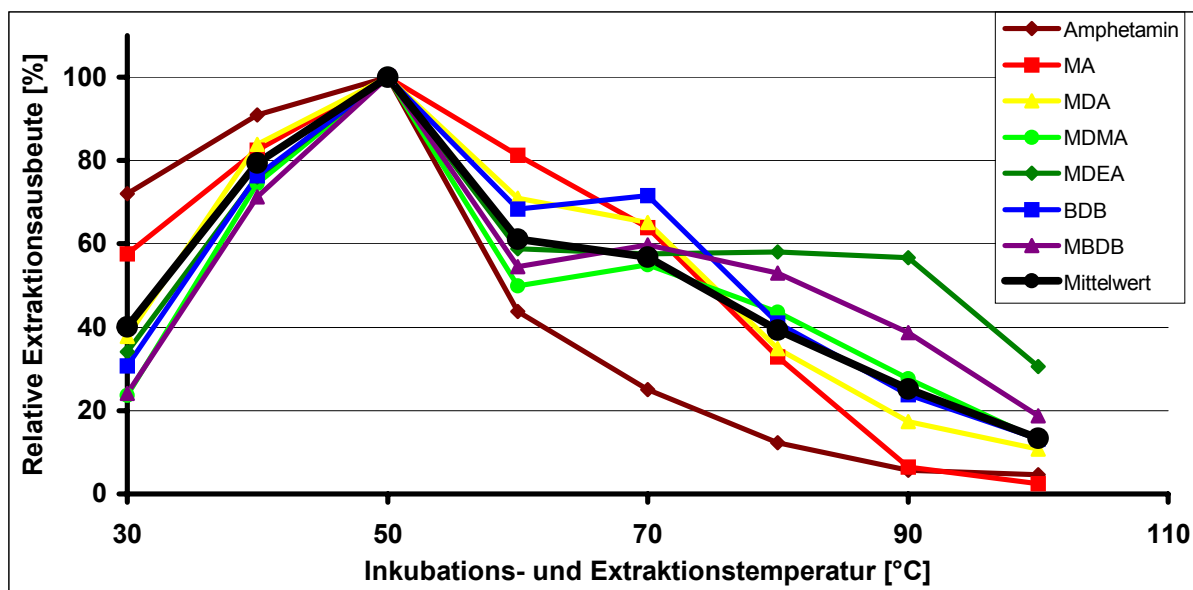


Abbildung 47: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktion von Amphetaminen aus dotierten Haarproben wurde untersucht, indem den dotierten Haarproben jeweils 1 mL 0,1 M Schwefelsäure, 1 M Salzsäure, 1 M Natronlauge bzw. Phosphatpuffer der pH-Werte 2 – 10 zugesetzt wurde. Der Zusatz der Pufferlösungen bzw. die saure Hydrolyse mittels Salz- oder Schwefelsäure erbrachte, wie bei den Cannabinoiden, ungenügende Ergebnisse. Dagegen führte die alkalische Hydrolyse der Haarmatrix mit Natronlauge zu einer deutlichen Zunahme der Extraktionsausbeute. Aus diesem Grunde wurden weitere Versuche mit unterschiedlichen Natronlaugekonzentrationen (1 – 10 mol/L) gemacht. Abb. 48 dokumentiert, dass mit zunehmender Natronlaugekonzentration die Extraktionsausbeuten immer weiter anstiegen. Bei einer Natronlaugekonzentration von 10 mol/L hatten, mit Ausnahme von MDEA, alle untersuchten Verbindungen dieser Gruppe ihre maximale Ausbeute erreicht.

Da bei MDEA eine Extraktionsausbeute von etwa 80 % als völlig ausreichend angesehen werden konnte, wurde den Haarproben bei allen weiteren Untersuchungen jeweils 1 mL 10 M Natronlauge zugesetzt.

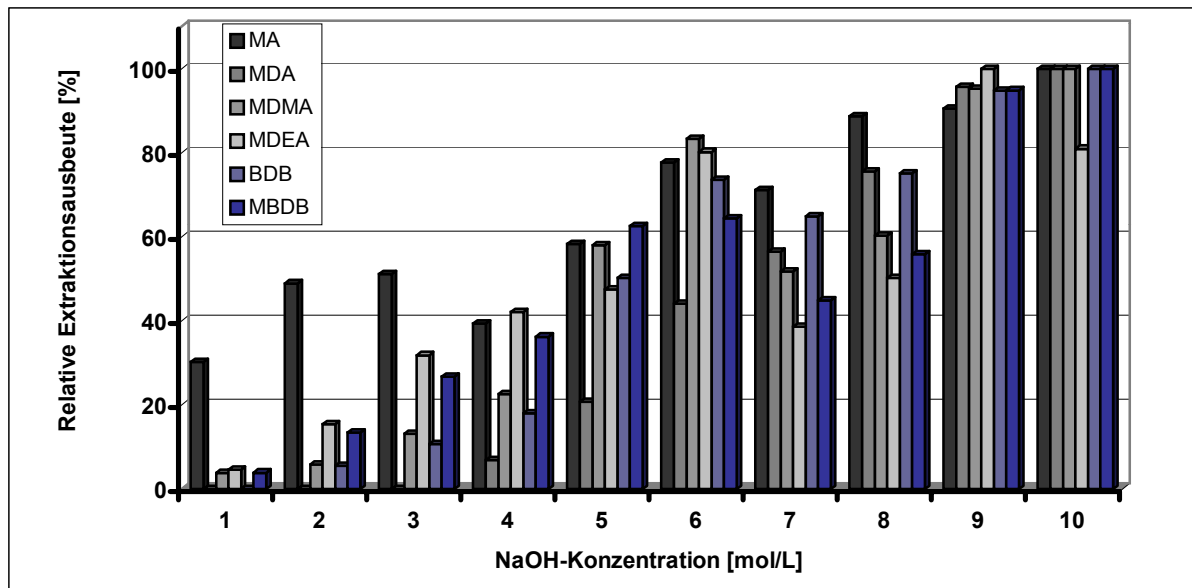


Abbildung 48: Einfluss der NaOH-Konzentration auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg) .

Auch die Auswirkungen eines Aussalzeffektes auf die Extraktionsausbeute wurden untersucht. Dazu wurde den dotierten Haarproben je 1 mL 10 M NaOH und je 0,5 g Natriumcarbonat (NC), Natriumsulfat (NS), Kochsalz (K), Natriumhydrogencarbonat (NHC) bzw. Ammoniumsulfat (AS) zugesetzt, bevor sie 5 Minuten bei 50°C vorinkubiert und anschließende bei gleicher Temperatur extrahiert wurden. Die Ergebnisse wurden mit den Extraktionsausbeuten aus dotierten Proben verglichen, denen lediglich 1 mL 10 M NaOH zugesetzt wurde.

Wie aus Abb. 49 hervorgeht, sind Amphetamin und synthetische Designerdrogen ein Beispiel dafür, dass sich ein Zusatz von Salzen auch negativ auf die Extraktionsausbeute auswirken kann. Ausnahmslos alle Analyten zeigten ohne Salzzusatz die höchsten Ausbeuten. Während mit einem Zusatz von Natriumcarbonat, Natriumsulfat, Kochsalz oder Natriumhydrogencarbonat noch Ausbeuten von ca. 50 % der maximalen Ausbeuten erzielt wurden, führte ein Zusatz von Ammoniumsulfat dazu, dass die Ausbeuten auf durchschnittlich 10 % zurückgingen.

Auf Grund dieses sehr eindeutigen Ergebnisses wurde bei den weiteren Untersuchungen auf den Zusatz von Salzen verzichtet.

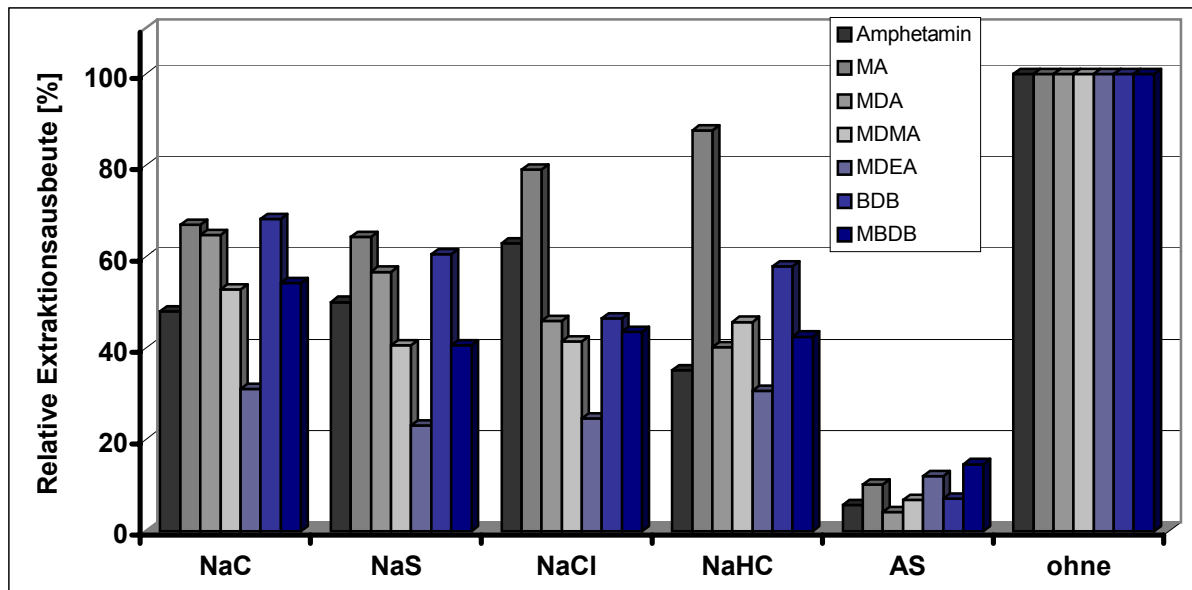


Abbildung 49: Einfluss verschiedener Salzzusätze auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg). (NaC = Natriumcarbonat, NaS = Natriumsulfat, NaHC = Natriumhydrogencarbonat, AS = Ammoniumsulfat, ohne = kein Salzzusatz)

Die Extraktionszeit wurde optimiert, indem die dotierten Haarproben 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 Minuten lang bei 50°C extrahiert wurden. Bei Betrachtung der Extraktionszeitkurve in Abb. 50 ist zu erkennen, dass bereits nach 10 Minuten das Verteilungsgleichgewicht erreicht war. Eine Verlängerung der Absorptionszeit erbrachte keine wesentlichen Verbesserungen bezüglich der Extraktionsausbeuten.

Somit wurde im Interesse möglichst kurzer Analysenzeiten für die Amphetamine und synthetischen Designerdrogen eine Extraktionszeit von 10 Minuten als ausreichend angesehen, zumal mit dem CombiPAL die exakte Einhaltung der Extraktionszeit möglich ist, und für alle weiteren Untersuchungen dieser Substanzgruppe verwendet.

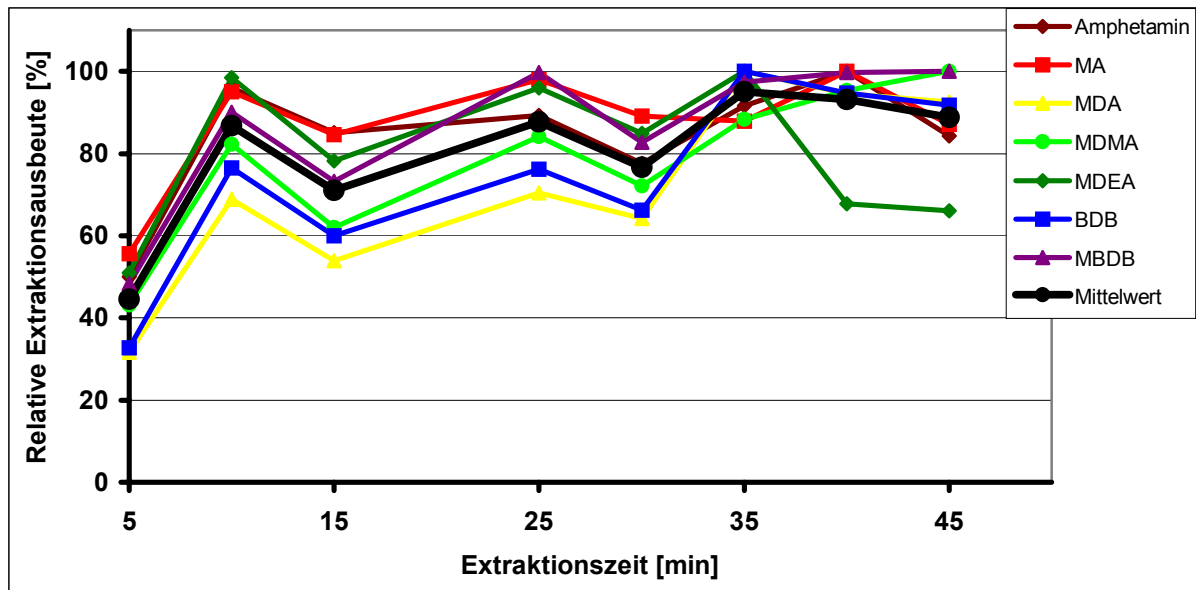


Abbildung 50: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp aus dotierten Haarproben (20 ng/10 mg).

Um zu überprüfen welchen Einfluss die Dauer der Derivatisierung auf die Empfindlichkeit der GC-MS-Messung hat, wurde die Faser nach der Extraktion der Analyten unterschiedlich lange im Dampfraum eines mit 25 μ L MBTFA beschickten Vials exponiert.

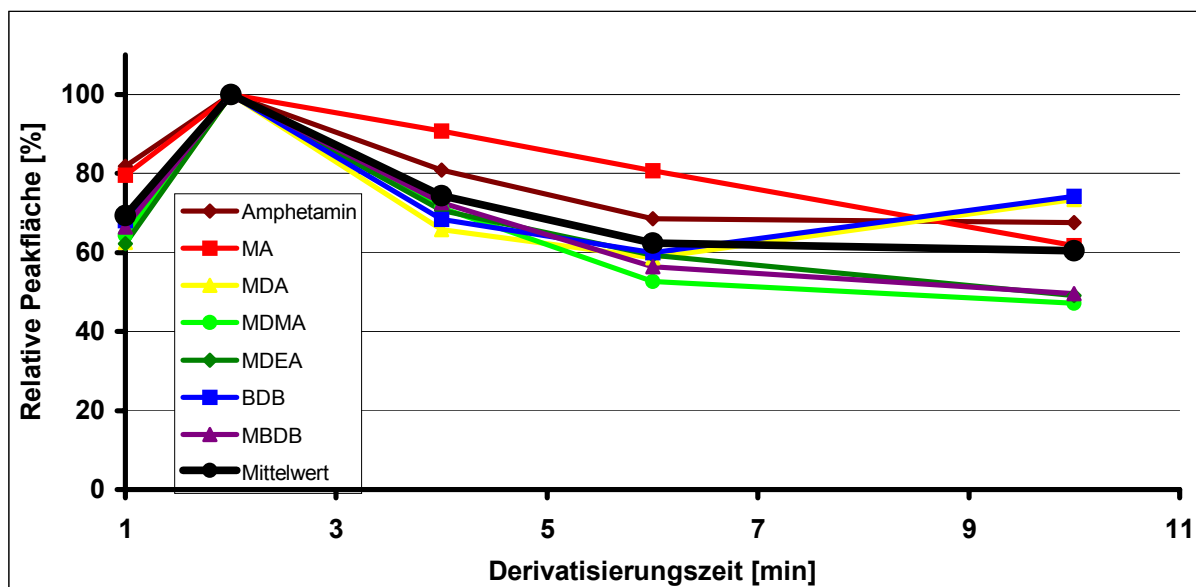


Abbildung 51: Einfluss der Derivatisierungszeit auf die Empfindlichkeit des Nachweises von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp.

Wie Abb. 51 zu entnehmen ist, hat die Derivatisierungszeit einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Sensitivität der Messung. Wird zu kurz derivatisiert, genügt die Reaktionszeit nicht, um alle Analyten umzusetzen, wird zu lange derivatisiert, nimmt die Empfindlichkeit stark ab.

Eine Mögliche Erklärung für diesen Abfall des Kurvenverlaufs wäre, wie bereits bei den Cannabinoiden und Opioiden beschrieben (vgl. 5.4.4.1), die Einstellung eines 3-Phasengleichgewichtes im Vial mit dem Derivatisierungsreagenz, wodurch die Belegung der Faser mit Analyt abnimmt.

Als optimal wurde eine Derivatisierungszeit von 2 Minuten angesehen, und für die weiteren Untersuchungen dieser Substanzgruppe verwendet.

Weiterhin wurde die Desorption bei unterschiedlichen Injektortemperaturen untersucht. Dazu wurden die dotierten Haarproben extrahiert und die SPME-Faser anschließend jeweils 5 Minuten bei 200, 240, 250, 260 bzw. 270°C im Injektor des GC exponiert.

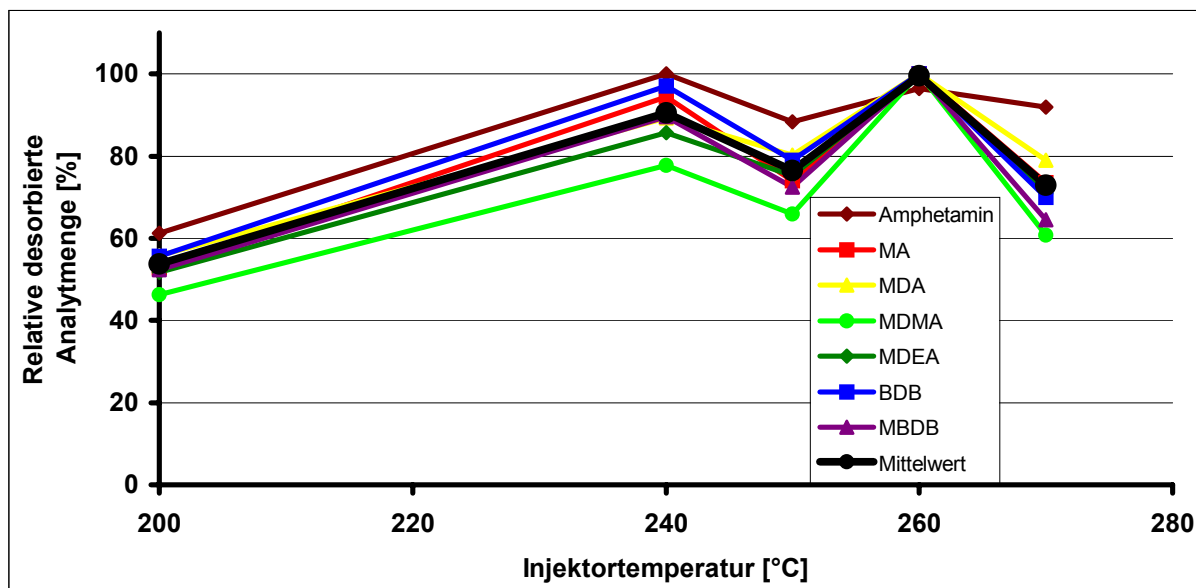


Abbildung 52: Einfluss der Injektortemperatur auf die desorbierten Mengen von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp.

Abb. 52 belegt, dass, mit Ausnahme von Amphetamin, bei allen anderen Verbindungen die höchsten desorbierten Analytmengen bei einer Injektortemperatur von 260°C erzielt wurden. Aus Gründen der Faserschonung und weil bei forensisch-toxikologischen Proben jedem GC-Analysenlauf ein Leerlauf vorgeschaltet ist (d.h. die Faser wurde bei gleichem GC-Programm 5 Minuten im Injektor ausgeheizt und das erhaltene Chromatogramm auf Verschleppungen überprüft), wurde jedoch eine Temperatur von 240°C gewählt. Hierbei betragen die relativen

Peakflächen immer noch im Durchschnitt 90% der jeweils maximal erreichbaren Peakfläche, was in anbetracht der erzielten Nachweisgrenzen als absolut hinreichend angesehen wurde.

Zur Untersuchung des Einflusses der Desorptionszeit auf die desorbierten Analytmengen wurden die dotierten Haarproben extrahiert und derivatisiert und die Faser anschließend für 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 bzw. 10 Minuten bei 240°C im Injektor des GC exponiert. Wie aus Abb. 53 hervorgeht, wurden für alle untersuchten Verbindungen dieser Gruppe die maximalen desorbierten Analytmengen bei einer Desorptionszeit von 4 Minuten erreicht. Eine längere Desorption führte dazu, dass sich die desorbierten Analytmengen wieder verringerten. Auch bei Erhöhung der Injektortemperatur auf 260°C wurde ein vergleichbarer Verlauf der Desorptionszeitkurve beobachtet.

Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte sein, dass es trotz Derivatisierung zu einer Zersetzung der Analyten durch eine zu lange Exponierung der Faser im heißen Injektor kommt.

Die weiteren Untersuchungen dieser Substanzklasse erfolgten deshalb mit einer Desorptionszeit von 4 Minuten bei einer Injektortemperatur von 240°C.

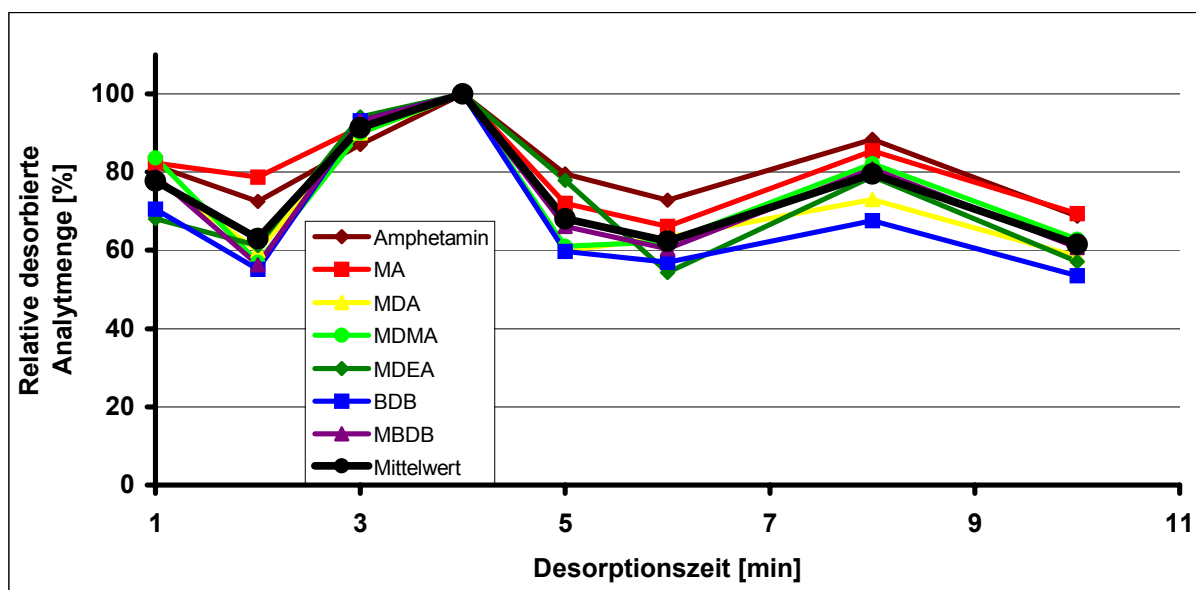


Abbildung 53: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierten Mengen von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp (20 ng/10 mg).

Eine Übersicht der Parameter der hier vorgestellten Methode zum Nachweis von Amphetamin und den synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ mittels automatisierter SPME ist in Tab. 29 dargestellt.

Tabelle 29: Methoden-Parameter zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ in Haaren mittels automatisierter SPME.

Parameter	Einstellung
Zusätze	1 mL 10 M Natronlauge, kein Salzzusatz
Inkubations- und Extraktionstemperatur	50 °C
Schüttelbedingungen des Agitators	650 U/min, 5 s Agitator on, 2 s Agitator off
Vorinkubationszeit	5 min
Eintauchtiefe der Faser in das Vial	23 mm
Extraktionszeit	10 min
Derivatisierungszeit	2 min
Injektortemperatur	240°C
Desorptionszeit	4 min
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	52 mm

5.4.5.3 Validierung

Für die Validierung wurden unbelastete Haarproben mit Amphetamin-Standards und den entsprechenden deuterierten internen Standards (stets 2,0 ng/mg) dotiert und unter den optimierten SPME-Bedingungen (Tab. 29) im SIM-Modus analysiert.

Peakreinheit und Selektivität wurden beurteilt, indem Haarproben mit den Standards in einer Konzentration von 5 ng/mg dotiert und analysiert und die erhaltenen Chromatogramme mit denjenigen von undotierten Haarproben verglichen wurden. Die Chromatogramme sind in Abb. 54 zu sehen, wobei die rote Linie die Leerprobe und die schwarze Linie die dotierte Probe darstellt. Es ist zu erkennen, dass die Peaks nahezu aller Verbindungen Doppelspitzen aufweisen. Diese stammen von den deuterierten internen Standards und sind nicht die Folge einer unzureichenden chromatographischen Trennung, was auch daran zu erkennen ist, dass BDB, für das kein eigener interner Standard zur Verfügung stand, keine Doppelspitze aufweist.

Weiterhin ist zu erkennen, dass keinerlei Interferenzen zwischen Analytpeaks und Peaks aus der Haarmatrix auftraten; Peakreinheit und Selektivität der Methode sind somit gewährleistet.

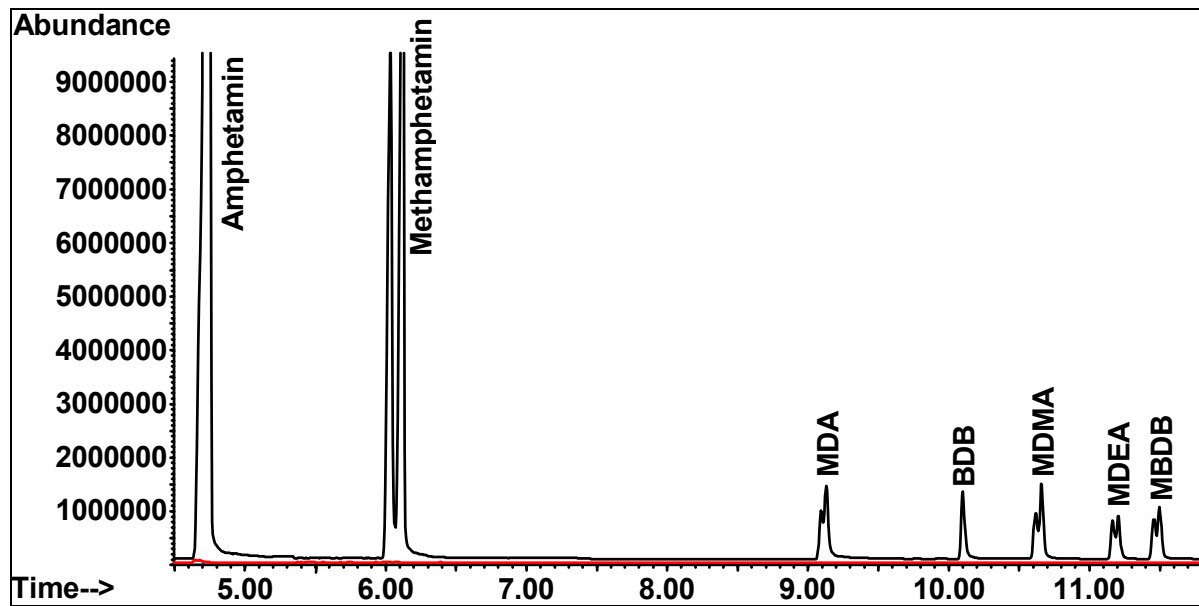


Abbildung 54: Vergleich der Chromatogramme einer dotierten (5 ng/mg, schwarze Linie) und einer undotierten Haarprobe (rote Linie).

Der Linearitätsbereich der Kalibration wurde bestimmt, indem die Haarproben in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 50 ng/mg dotiert wurden. Die berechneten Korrelationskoeffizienten der linearen Regression wiesen bei allen Verbindungen Werte von $r > 0,996$ auf, so dass die Methode über die in Tab. 30 aufgeführten Konzentrationsbereiche als linear angesehen werden kann.

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden die Haarproben mit Standards in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 ng/mg aufgestockt und analysiert. Die Berechnung der Grenzen erfolgte mit dem Computerprogramm B.E.N.; die Ergebnisse sind in Tab. 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG/BG) von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ bei Verwendung der automatisierten SPME.

Substanz	Linearitätsbereich [ng/mg]	r	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]
Amphetamin	0,1-50	0,9991	0,01	0,03
Methamphetamin	0,1-50	0,9998	0,01	0,05
MDA	0,1-10	0,9968	0,10	0,33
MDMA	0,1-10	0,9992	0,06	0,20
MDEA	0,1-50	1,0000	0,04	0,14
BDB	0,1-50	0,9988	0,17	0,54
MBDB	0,1-50	0,9999	0,10	0,31

Die für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erhaltenen Werte waren vergleichbar oder lagen unterhalb der in der Literatur angegebenen Werte die mit herkömmlichen Extraktionsmethoden [168,171] oder SPME-Methoden [27,28,34,35,37,67,69,70,168] erhalten wurden.

Die hier vorgestellte Methode zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen kann somit als sensitiv bezeichnet werden.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden die Messungen für die intraday- und interday-Präzision bei drei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt; die Ergebnisse sind in Tab. 31 dargestellt.

Bei Betrachtung der Daten ist zu erkennen, dass die Vorgaben aus Punkt 4.4.4. von allen untersuchten Verbindungen erfüllt wurden. Lediglich BDB zeigte bei einer Konzentration von 0,5 ng/mg eine etwas schlechtere interday-Präzision; der Wert für die Genauigkeit lag ein wenig über der Vorgabe von 20 %. Die Ursache könnte darin begründet liegen, dass für BDB kein eigener deuterierter interner Standard zur Verfügung stand.

Tabelle 31: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ in Haaren bei drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Konzentration [ng/mg]		Intraday-Präzision (n = 6)		Interday-Präzision (n = 18)	
		Präzision [%]	Genauigkeit [%]	Präzision [%]	Genauigkeit [%]
Amphetamin	0,5	2,1	9,2	3,2	9,9
	2	1,6	3,1	2,1	4,7
	40	0,9	0,9	1,7	2,4
Methamphetamin	0,5	6,8	2,3	8,2	3,7
	2	5,7	0,3	8,0	3,3
	40	2,6	0,8	3,6	2,0
MDA	0,5	13,2	1,8	15,1	7,0
	2	6,8	0,8	9,9	2,7
	40	6,0	6,5	5,9	7,6
MDMA	0,5	2,3	1,6	8,2	5,1
	2	3,5	2,9	7,4	3,1
	40	1,8	6,9	4,2	7,0
MDEA	0,5	3,3	7,8	8,0	9,6
	2	1,7	2,7	4,1	1,5
	40	1,8	7,5	2,1	4,3
BDB	0,5	8,1	17,5	12,1	22,4
	2	6,2	6,6	9,6	8,1
	40	4,1	3,3	4,2	6,7
MBDB	0,5	9,8	3,8	17,0	11,1
	2	4,5	11,7	7,1	14,0
	40	2,9	7,8	4,8	8,2

Die Bestimmung der absoluten Wiederfindungen erfolgte durch Dotierung von Haarproben (10 mg) mit 20 ng eines jeden Standards und Analyse dieser Proben unter den optimierten SPME-Bedingungen. Die erhaltenen Peakflächen wurden mit denen einer direkt injizierten Menge eines Standardgemisches, welches in 2 µL ebenfalls 20 ng eines jeden Standards enthielt, verglichen. Wie Tab. 32 zu entnehmen ist, befinden sich die absoluten Wiederfindungen der Amphetamine und synthetischen Designerdrogen alle im gleichen Bereich, was auf die strukturellen Ähnlichkeiten und den damit verbundenen ähnlichen Affinitäten der einzelnen Verbindungen zur Faserbeschichtung zurückzuführen sein dürfte.

Tabelle 32: Absolute Wiederfindungen von Amphetamin und den untersuchten synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ.

Substanz	Absolute Wiederfindung [%]
Amphetamin	10,2
Methamphetamin	8,0
MDA	11,4
MDMA	12,6
MDEA	11,1
BDB	10,3
MBDB	9,2

5.4.5.4 Anwendung der Methode auf reale Proben

Die Anwendbarkeit der hier vorgestellten Methode zum Nachweis von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ auf reale Proben wurde überprüft, indem Haarproben von 20 Drogenkonsumenten im Alter von 17 – 33 Jahren, davon 11 Männer und 9 Frauen, untersucht wurden.

Dazu wurden jeweils 10 mg Haare in ein Headspace-Vial eingewogen, mit je 20 ng der entsprechenden deuterierten internen Standards versetzt und anschließend extrahiert und analysiert; die Ergebnisse sind in Tab. 33 aufgeführt.

Tabelle 33: Konzentrationen von Amphetamin und synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ, die in Haarproben von 20 Drogenkonsumenten¹ gefunden wurden.

Verbindung	Konzentration [ng/mg]
Amphetamin	0,2 – 21,8
Methamphetamin	0,1 – 9,6
MDA	1,3 – 26,4
MDMA	0,5 – 12,4
MDEA	0,1 – 9,9
MBDB	0,2 – 0,9

¹ n = 20 (11 männlich, 9 weiblich, Alter 17 – 33 Jahre)

Abb. 55 zeigt das Chromatogramm der Haarprobe eines Drogenkonsumenten, aufgenommen im SIM-Modus. Dabei wurden Amphetamin in einer Konzentration von 0,55 ng/mg und Methamphetamin (MA) in einer Konzentration von 0,22 ng/mg gefunden.

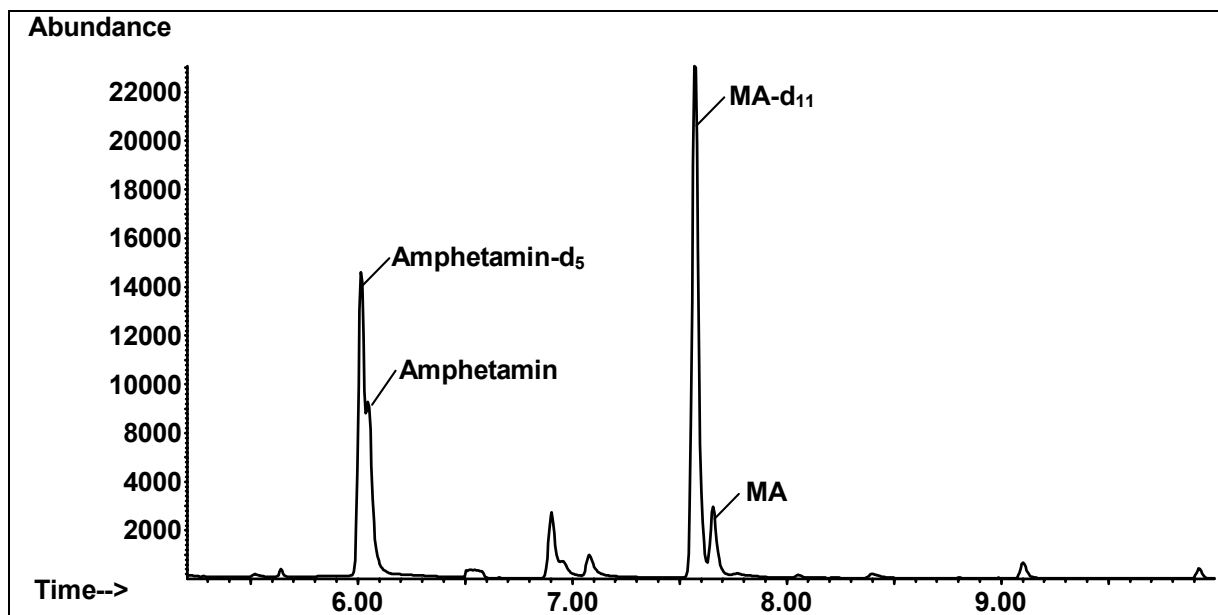


Abbildung 55: SIM-Chromatogramm einer authentischen Haarprobe, welche Amphetamin (0,55 ng/mg) und Methamphetamin (0,22 ng/mg) enthält.

5.5 Trizyklische Antidepressiva

5.5.1 Allgemeine Erläuterungen

Bei trizyklischen Antidepressiva (TCA) handelt es sich um basisch substituierte trizyklische Diphenylamin- und Diphenylmethanderivate welche geeignet sind, depressive Symptome zu bessern. Die Strukturformeln der hier untersuchten Verbindungen sind in Abb. 56 dargestellt, gemeinsam mit den als interne Standards verwendeten tetrazyklischen Antidepressiva Maprotilin und Mianserin.

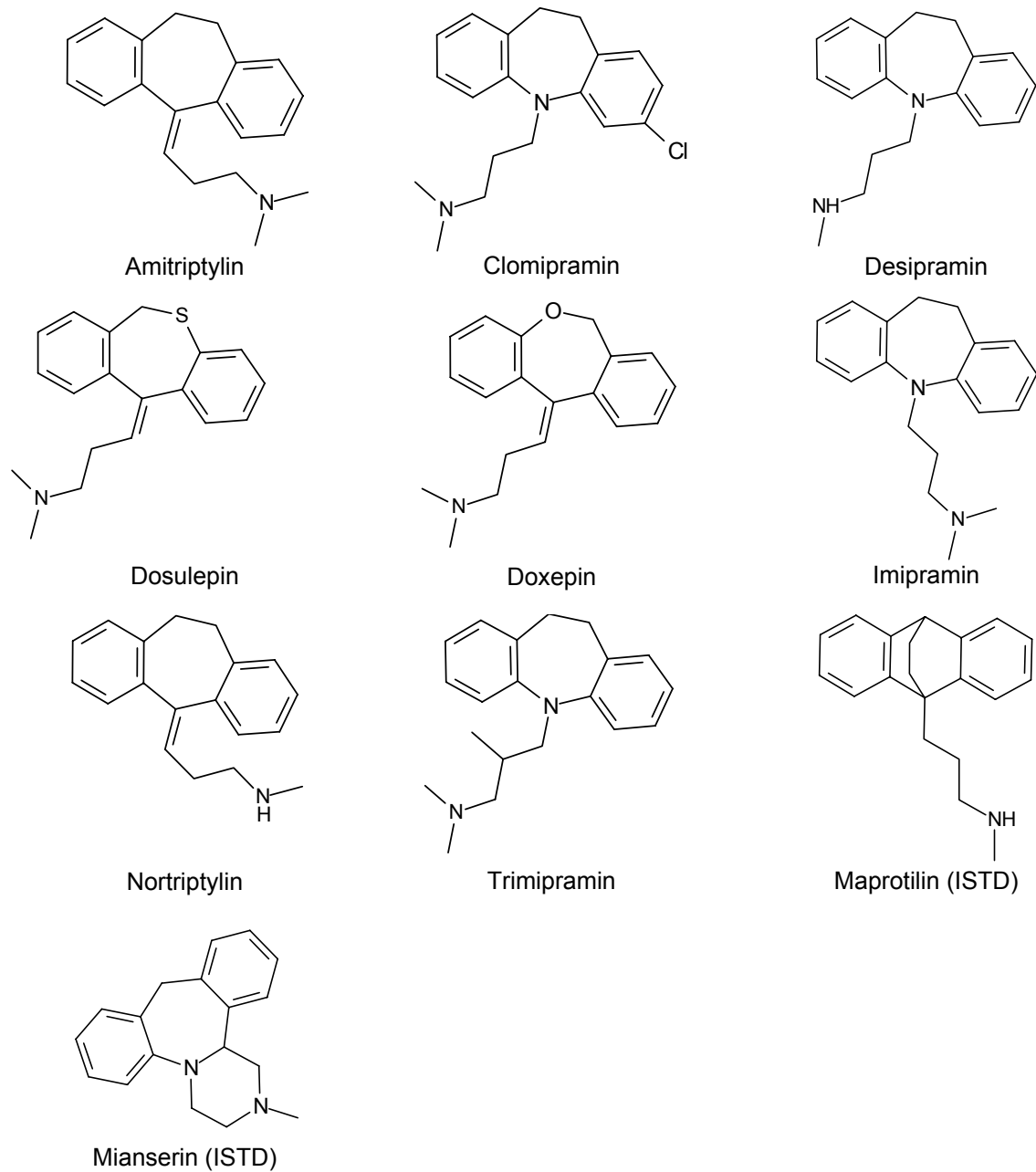


Abbildung 56: Strukturformeln der untersuchten trizyklischen Antidepressiva und der internen Standards Maprotilin und Mianserin.

Antidepressiva können anhand ihrer unterschiedlichen Wirkungen in drei Gruppen eingeteilt werden:

- Antidepressiva vom Amitriptylin-Typ → antriebshemmend, psychomotorisch dämpfend, angstlösend.
- Antidepressiva vom Desipramin-Typ → antriebssteigernd, psychomotorisch aktivierend, angstfördernd
- Antidepressiva vom Imipramin-Typ → keine Beeinflussung von Antrieb und Psychomotorik

Diese Wirkungen werden durch die Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme von Noradrenalin und/oder Serotonin aus dem synaptischen Spalt und durch die Blockade verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren (u.a. cholinerge, α -adrenerge und Histamin-Rezeptoren) hervorgerufen. Die Wirkung tritt meist erst nach etwa 2 Wochen ein, wohingegen mögliche Nebenwirkungen sofort auftreten. Diese äußern sich, bedingt durch die anticholinergen Effekte, in Form von Mundtrockenheit, Obstipation, Miktionsbeschwerden, Hypotonie, Tachykardie und Reizleitungsstörungen des Herzens. Zentralnervöse Nebenwirkungen sind Erregungs- und Verwirrheitszustände, Schlaflosigkeit, Tremor, Krampfanfälle und eine Appetitsteigerung. Weiterhin kann es zu Störungen der Leber- und der Sexualfunktion, sowie zu allergischen Reaktionen kommen. Eine Überdosierung kann zu lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen führen. Die Applikation erfolgt in der Regel oral, aber auch eine i.m.- oder i.v.-Gabe ist möglich.

Die Zunahme von Intoxikationen mit trizyklischen Antidepressiva könnte darin begründet liegen, dass zur Therapie der Depression immer weniger Benzodiazepine und dafür immer mehr TCA eingesetzt werden, welche dann in suizidaler Absicht eingenommen werden. Leitsymptome einer Intoxikation sind Hyperthermie, Blutdruckabfall, Tachykardie, Herzrhythmusstörungen, sowie Delirien und Krämpfe. In schweren Fällen kann es zu Herz- und Atemstillstand kommen.

5.5.2 Optimierung der SPME-Parameter

Während der Entwicklung der hier vorgestellten Methode zum Nachweis von trizyklischen Antidepressiva wurde ein Gaschromatograph mit dem Mehrzweckprobengeber CTC CombiPAL neu angeschafft. Zum Vergleich wurde deshalb ein Teil der bereits mit dem manuellen Faserhalter erfolgten Optimierungen mit dem automatischen Probengeber wiederholt, wobei die Werte in Klammern jeweils für die automatisierte SPME gelten.

Für die Optimierungsexperimente wurden Leerblutproben (0,5 mL) mit den TCA-Standards in einer Konzentration von 125 ng/mL dotiert und analysiert.

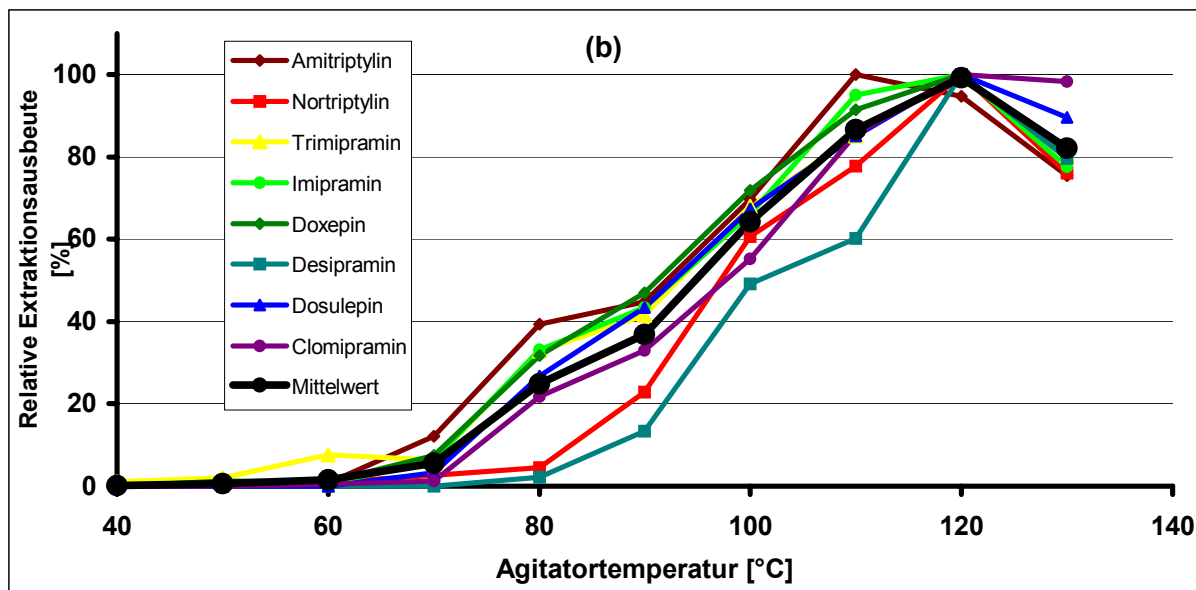
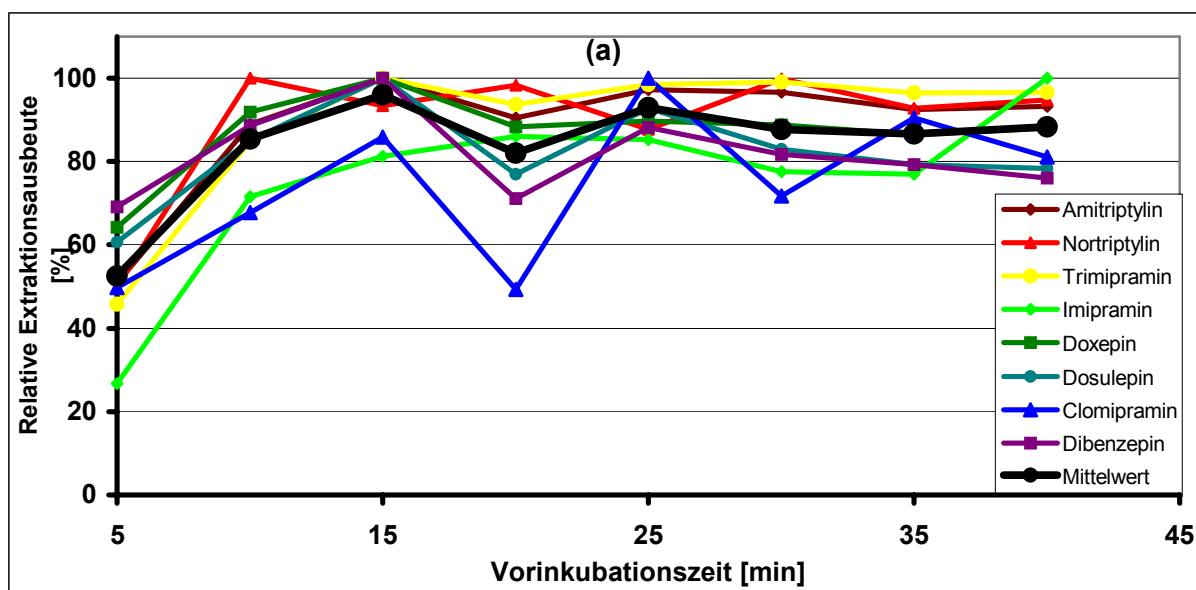


Abbildung 57: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL). (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.

Zur Bestimmung der optimalen Vorinkubationszeit wurden die dotierten Blutproben unterschiedlich lange (manuelle SPME: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min; CombiPAL: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30 min) bei 120°C inkubiert, bevor sie 15 Minuten lang, ebenfalls bei 120°C, extrahiert wurden.



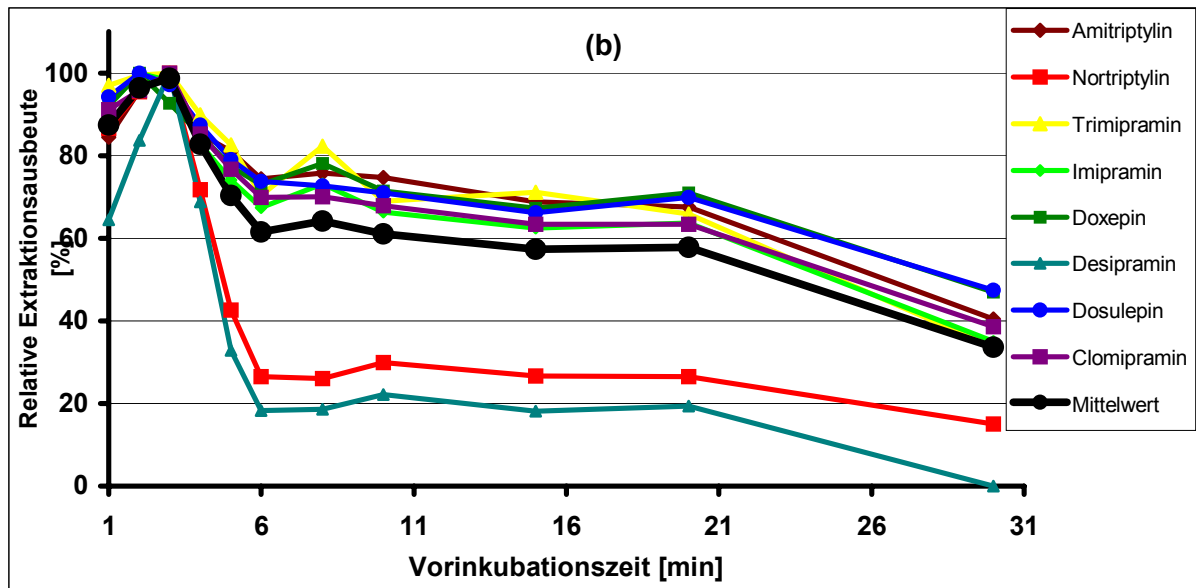


Abbildung 58: Einfluss der Vorinkubationszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL). (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.

Abb. 58 (a) dokumentiert, dass die Extraktionsausbeuten zunächst stetig anstiegen, bis sie ab einer Inkubationsdauer von 15 Minuten auf gleichbleibend hohem Niveau verblieben. Dieser Kurvenverlauf deutete darauf hin, dass sich ab etwa 15 Minuten das Verteilungsgleichgewicht ausgebildet hatte. Eine weitere Ausdehnung der Vorinkubationszeit hätte keinen Sinn gemacht, sondern lediglich die Analysenzeiten verlängert.

Betrachtet man im Vergleich dazu den Kurvenverlauf in Abb. 58 (b), so fällt auf, dass die maximalen Extraktionsausbeuten bereits nach einer Inkubation von 3 Minuten erreicht wurden. Eine längere Inkubation führte, insbesondere bei Nortriptylin und Desipramin, zu einem deutlichen Abfall der Ausbeute. Ein derartiger Kurvenverlauf erschien unplausibel, denn nach Erreichen der vorgesehenen Temperatur innerhalb der Probe und Einstellen des Verteilungsgleichgewichtes, hätte die Extraktionsausbeute, analog der manuellen SPME, auf gleichbleibend hohem Niveau verbleiben müssen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Abfall der Extraktionsausbeute wäre die unterschiedliche Art und Weise der Inkubation der Probengefäße. Bei der manuellen SPME wurde ein Gefäß-Puck verwendet, welcher mittels einer Heizplatte und unter Kontrolle eines elektronischen Kontaktthermometers erhitzt wurde. Dabei waren die einzelnen Plätze für die Aufnahme der Vials sowohl nach oben wie auch zu den Seiten hin offen, was ein gleichmäßiges und schnelles Erhitzen der Probengefäße erschwerte. Im Gegensatz dazu ist der Agitator des CombiPAL nach allen Seiten hin geschlossen und auch der Deckel wird nur für kurze Zeit geöffnet, während Probengefäße im Agitator platziert oder aus ihm entfernt werden, wodurch eine konstante Temperatur gewährleistet ist. Dieses bedeutet, dass die Proben bei

Verwendung des Agitators gleichmäßiger und vor allem schneller die gewünschte Temperatur und somit auch das Verteilungsgleichgewicht erreichen als bei der Verwendung des Gefäß-Pucks. Hinzu kam, dass durch die relativ hohe Temperatur von 120°C die mit der wässrigen Natronlauge versetzten Blutproben zu sieden begannen. Bei einer längeren Vorinkubation als 3 Minuten könnte der Druck im Vial bereits so groß sein, dass beim Durchstechen der Septen mit der Schutzkanüle der SPME-Faser ein Teil der im Gasraum befindlichen Analyten entweicht und somit der Extraktion nicht mehr zugänglich ist.

Aus diesem Grund wurde bei Verwendung der manuellen SPME eine Vorinkubationszeit von 15 Minuten und bei Verwendung des CombiPAL eine Vorinkubationszeit von 3 Minuten gewählt.

Um festzustellen, inwiefern der pH-Wert einen Einfluss auf die Extraktionsausbeute der untersuchten trizyklischen Antidepressiva ausübt, wurden die dotierten Leerblutproben mit 1 mL destilliertem Wasser, 1 M Natronlauge bzw. 0,1 M Schwefelsäure versetzt, bevor sie extrahiert und analysiert wurden.

Wie anhand der Strukturformeln (Abb. 56) zu erkennen ist, handelt es sich bei trizyklischen Antidepressiva um basische Verbindungen. Da i.d.R. nur die undissoziierte Form einer Verbindung extrahiert wird (siehe 2.6.7), war erwartungsgemäß die Extraktionsausbeute unter Zusatz von Natronlauge deutlich höher als diejenige in Anwesenheit von destilliertem Wasser oder 0,1 M Schwefelsäure (Abb. 59).

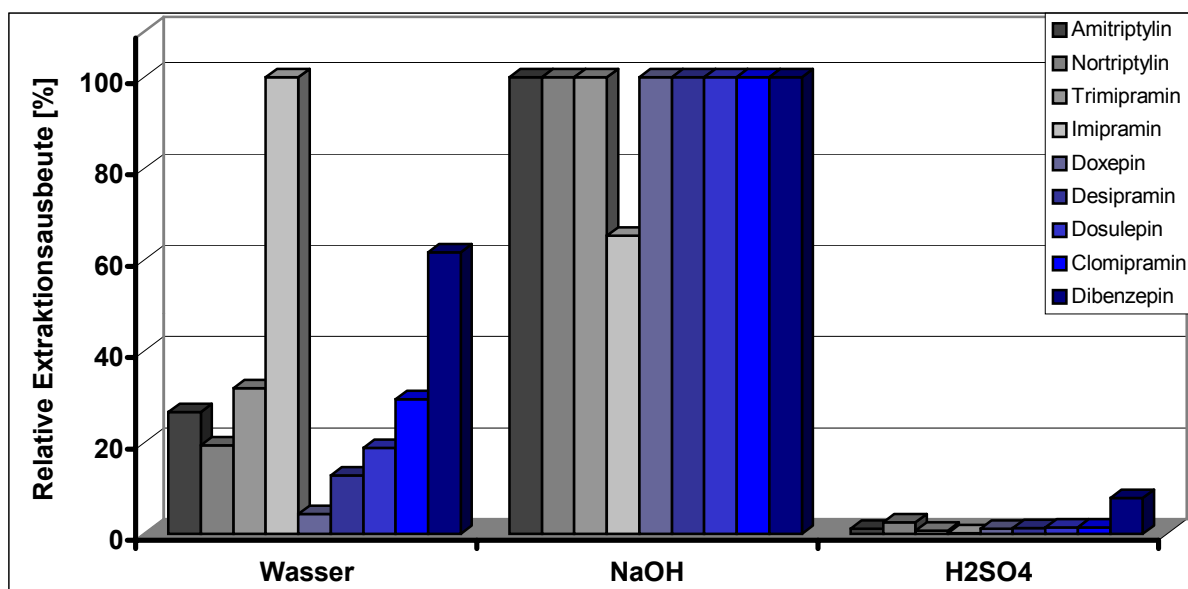


Abbildung 59: Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL) unter Zusatz von 1 mL destilliertem Wasser, 1 M Natronlauge bzw. 1 M Schwefelsäure mittels manueller SPME.

Für alle weiteren Untersuchungen wurde den Proben deshalb 1 mL 1 M Natronlauge zugesetzt. Da keine weiteren Erkenntnisse zu erwarten waren, wurden diese Versuche mit der automatisierten SPME nicht wiederholt.

Die Auswirkungen eines Salzzusatzes auf die Extraktionsausbeute von trizyklischen Antidepressiva wurden getestet, indem den dotierten Blutproben vor der Extraktion, zusätzlich zur Natronlauge, jeweils 0,5 g Kochsalz bzw. Ammoniumsulfat zugesetzt wurde.

Wie bei den Amphetaminen und synthetischen Designerdrogen wirkte sich auch bei den trizyklischen Antidepressiva ein Zusatz von Salzen eher negativ auf die Extraktionsausbeuten aus (Abb. 60). Im Vergleich zu einer Blutprobe ohne jegliche Zusätze steigerte ein Salzzusatz zwar bei fast allen Verbindungen die Ausbeuten deutlich (insbesondere der Zusatz von Kochsalz), die besten Ergebnisse wurden jedoch mit dem alleinigen Zusatz von Natronlauge erzielt.

Aus diesem Grunde wurde bei allen weiteren Untersuchungen auf den Zusatz von Salzen verzichtet. Auch bei diesem Parameter wurde, aus den o.g. Gründen, auf die Wiederholung der Experimente mit dem CombiPAL verzichtet.

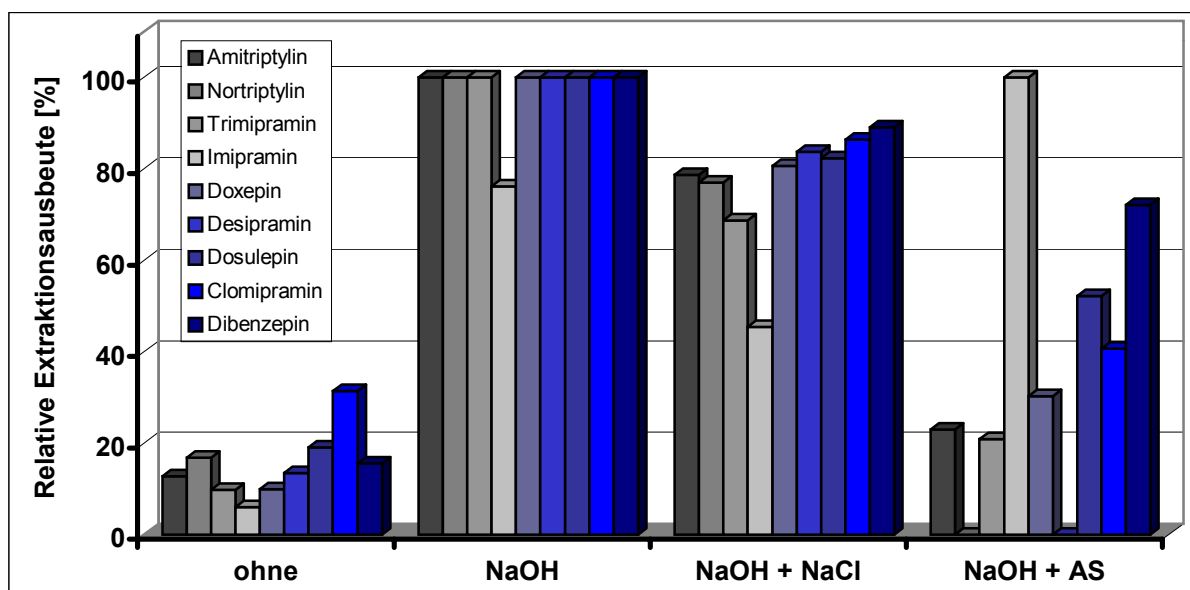
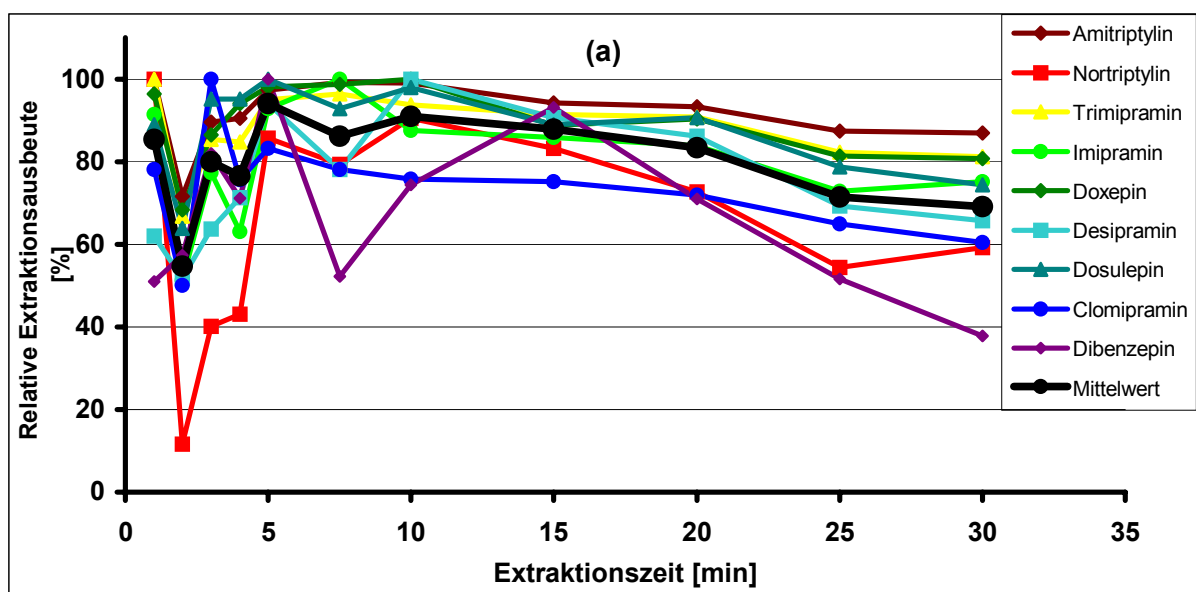


Abbildung 60: Einfluss von Salzzusätzen (jeweils 0,5 g) auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL) bei Verwendung der manuellen SPME. (ohne = keine Zusätze, AS = Ammoniumsulfat).

Die Extraktionszeit wurde optimiert, indem die SPME-Faser unterschiedlich lange (manuell: 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30 min; CombiPAL: 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 min) bei 120°C im Dampfraum über den dotierten Blutproben exponiert wurde.

Abb. 61 dokumentiert, dass bei der manuellen SPME bereits nach 5 Minuten das Verteilungsgleichgewicht erreicht war, obwohl es sich bei den trizyklischen Antidepressiva um relativ schwerflüchtige Verbindungen handelt. Bei der automatisierten SPME dauerte das Erreichen des Gleichgewichtes hingegen mit 12 – 15 Minuten etwa dreimal so lange. Diese sehr unterschiedlichen Werte sollten jedoch nicht isoliert betrachtet werden, sondern im Zusammenhang mit den Vorinkubationszeiten. Bei der Addition der jeweiligen Extraktions- und Vorinkubationszeiten ergaben sich für die automatisierte SPME insgesamt kürzere Zeiten, was auf die effektivere Inkubation zurückgeführt wurde.

Betrachtet man jeweils die ersten 5 Minuten der Extraktionszeiten, so fallen die deutlichen Schwankungen in den Extraktionsausbeuten bei der manuellen SPME auf. Im Gegensatz zum CombiPAL, bei dem die Dauer der einzelnen Extraktionsschritte mit Hilfe der Software einprogrammierbar ist und die Zeiten somit exakt reproduzierbar sind, wurde bei der manuellen SPME mit einer Stoppuhr gearbeitet, wodurch die sekundengenaue Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte gewissen Schwankungen unterlag. Derartige Schwankungen machen sich vor allem bei sehr kurzen Extraktionszeiten, d.h. im steilen Anstieg der Extraktionszeitkurve bemerkbar, weshalb bei der manuellen SPME möglichst das Verteilungsgleichgewicht vollständig erreicht sein sollte, bevor die Extraktion abgebrochen wird (siehe 2.6.5).



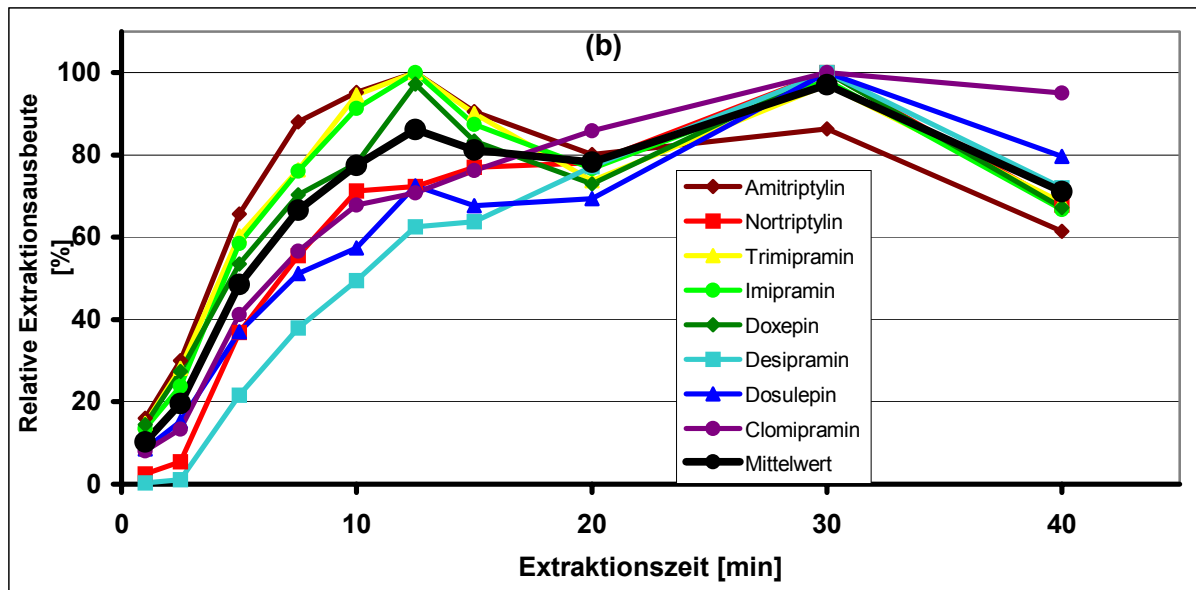


Abbildung 61: Einfluss der Absorptionszeit auf die Extraktionsausbeuten der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus dotierten Blutproben (125 ng/mL). (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.

Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb die Extraktionszeit bei der manuellen SPME von 5 auf 10 Minuten ausgedehnt, bei der automatisierten SPME konnte die Extraktion nach 12,5 Minuten abgebrochen werden.

Zur Optimierung der Injektortemperatur wurden die dotierten Blutproben mittels automatisierter SPME extrahiert und die Analyten anschließend 5 Minuten lang bei 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 bzw. 270°C im Injektor des Gaschromatographen wieder desorbiert.

Wie Abb. 62 zu entnehmen ist, übte die Injektortemperatur keinen besonderen Einfluss auf die Desorption aus. Bei Betrachtung des Mittelwertes ist zu erkennen, dass die größten Analytmengen bei etwa 250 – 260°C desorbiert wurden.

Aus Gründen der Faserschonung wurde für die weiteren Untersuchungen eine Injektortemperatur von 250°C ausgewählt, da jede Erhöhung der Injektortemperatur zu einem schnelleren Verschleiß der Faser führt.

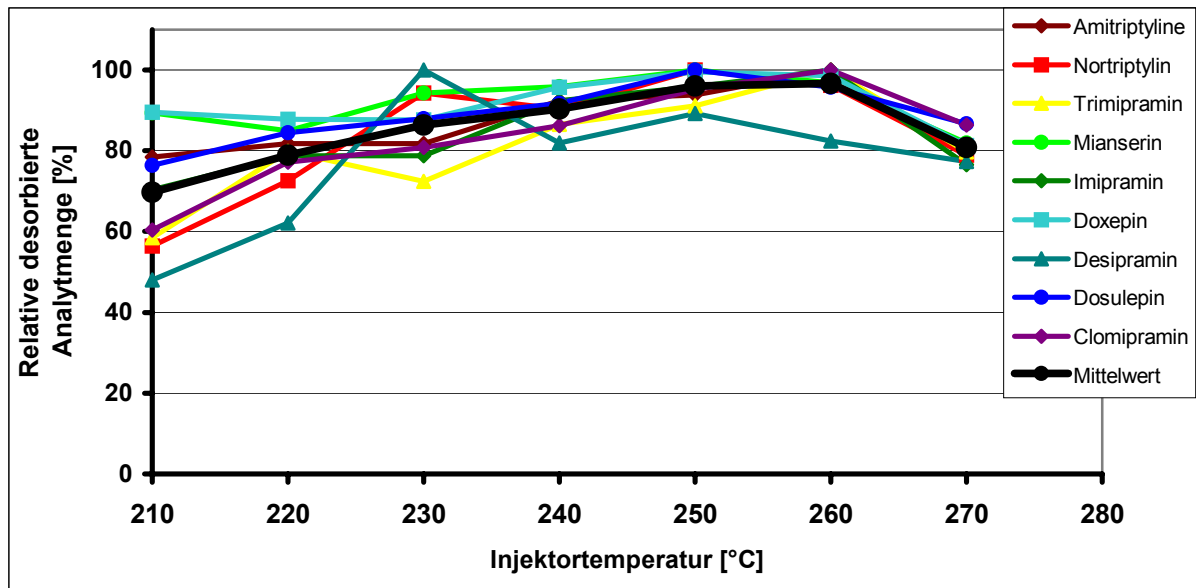


Abbildung 62: Einfluss der Injektortemperatur auf die desorbierten Mengen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei Verwendung des CombiPAL.

Die Bestimmung des Einflusses der Desorptionszeit auf die desorbierte Menge der untersuchten Antidepressiva erfolgte durch Extraktion der dotierten Blutproben und anschließender Exponierung der Faser für 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5 bzw. 15 Minuten (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9 bzw. 10 min) bei 250°C im Injektor des Gaschromatographen.

Abb. 63 (a) zeigt, dass die desorbierten Analytmengen bei der manuellen SPME nur relativ geringen Schwankungen unterlagen und die Desorption bereits nach 2 Minuten abgeschlossen war. Bei der automatisierten SPME hingegen schwankten die Mengen erheblich, insbesondere bei Zeiten über 3 Minuten. Eine befriedigende Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden. Dennoch war auch hier die Desorption etwa im gleichen Zeitraum abgeschlossen wie bei der manuellen Methode.

Aus diesem Grunde wurde für beide Methoden eine Desorptionszeit von 2,5 Minuten als optimal erachtet und im weiteren Verlauf der Untersuchungen verwendet.

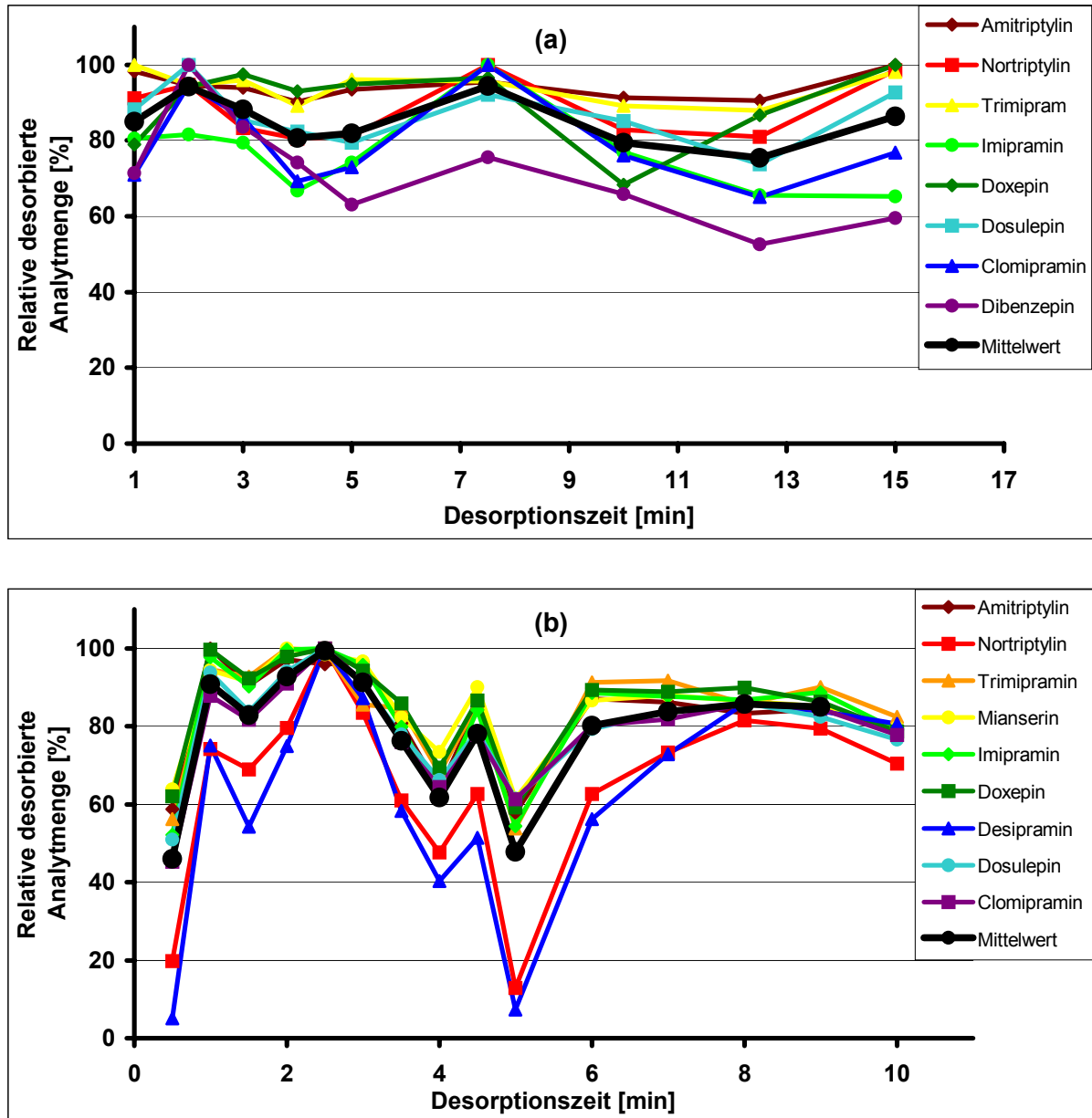


Abbildung 63: Einfluss der Desorptionszeit auf die desorbierte Menge der untersuchten trizyklischen Antidepressiva. (a) manuelle SPME, (b) automatisierte SPME.

Die Eintauchtiefe der Faser in den Injektorblock des GC wurde optimiert, indem die dotierten Blutproben extrahiert und die Analyten anschließend 2,5 Minuten lang bei 250°C und variierenden Eintauchtiefen (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 bzw. 4,5 cm) desorbiert wurden.

In Abb. 64 ist zu sehen, dass die Desorption aller hier untersuchten Verbindungen bei einer Eintauchtiefe zwischen 3 und 3,5 cm am effektivsten war. Auf Grund des schmalen optimalen Bereiches und des sehr steilen Kurvenverlaufes zwischen 2,5 und 3,0 cm wurde bei den weiteren Untersuchungen eine Eintauchtiefe zwischen 3 und 3,5 cm eingestellt.

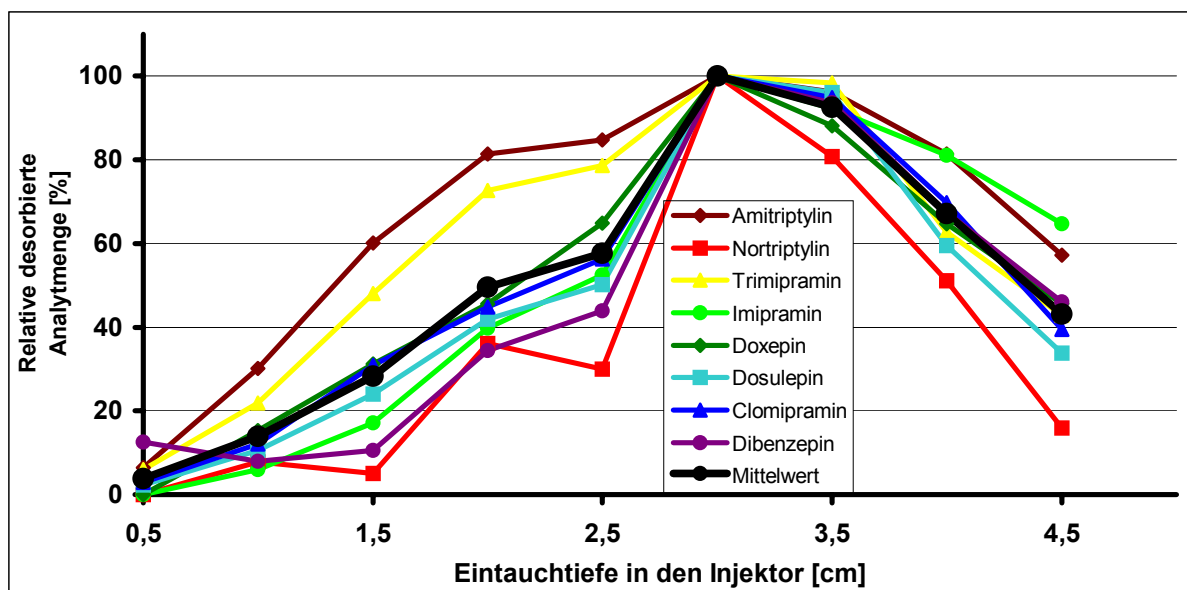


Abbildung 64: Einfluss der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC auf die desorbierten Mengen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei Anwendung der manuellen SPME.

Bei der automatisierten SPME wurde die Eintauchtiefe entsprechend auf 52 mm eingestellt. Hierbei ist zu beachten, dass die cm-Angaben des Faserhalters für die manuelle Extraktion nicht den mm-Angaben des Faserhalters für die automatische Extraktion entsprechen.

In Tab. 34 ist eine Übersicht aller Parameter der hier vorgestellten Methode dargestellt, wobei die Werte in Klammern dieses Mal für die manuelle Methode gelten, da die Validierung mit dem CombiPAL durchgeführt wurde.

Tabelle 34: Methodenparameter zum Nachweis von trizyklischen Antidepressiva in biologischen Matrices mittels manueller SPME.

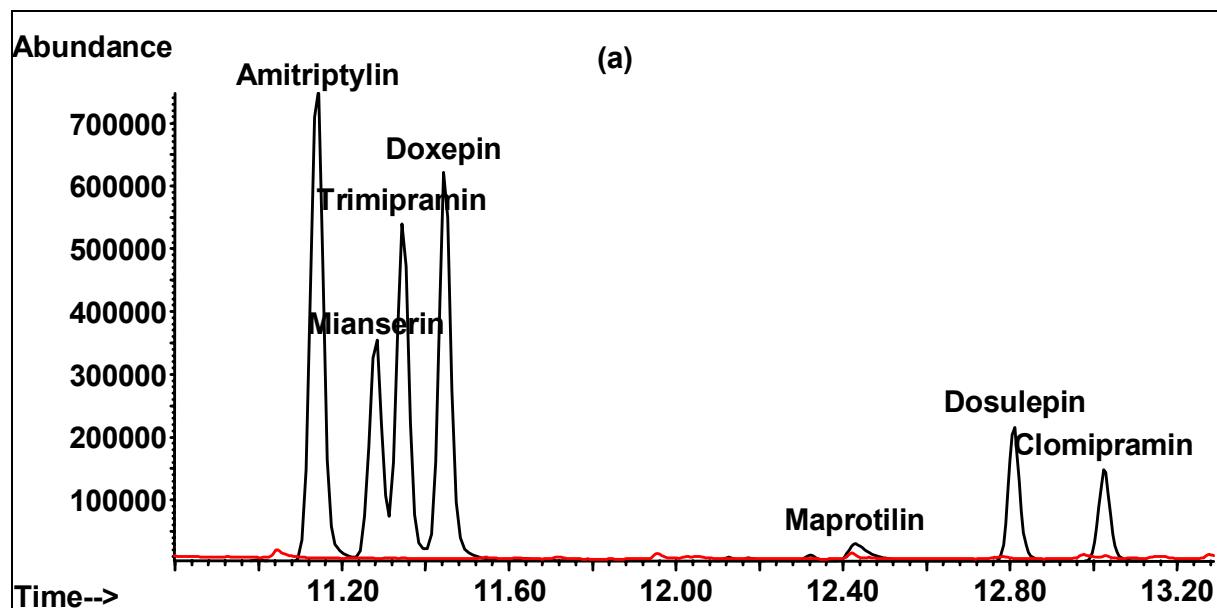
Parameter	Optimum
Zusätze	1 mL 1 M NaOH, kein Salzzusatz
Inkubations- und Extraktionstemperatur	120°C
Schüttelbedingungen des Agitators	650 U/min, 5 s Agitator on, 2 s Agitator off
Vorinkubationszeit	3 min (15 min)
Eintauchtiefe der Faser in das Vial	23 mm
Extraktionszeit	12,5 min (10 min)
Injektortemperatur	250°C
Desorptionszeit	2,5 min
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	52 mm (3 - 3,5 cm)

5.5.3 Validierung

Die Validierung wurde mit dem CombiPAL durchgeführt, da hiermit reproduzierbarere Ergebnisse zu erzielen sind. Zudem bedeutet die für eine Validierung erforderliche hohe Anzahl an Analysen mit der manuellen SPME einen erheblich höheren Arbeitsaufwand als mit der automatisierten Variante. Hierfür wurden Leerblutproben (je 1 mL) mit den TCA-Standards dotiert, wobei die internen Standards Maprotilin und Mianserin immer in einer Konzentration von 125 ng/mL zugegeben wurden.

Peakreinheit und Selektivität wurden bestimmt, indem dotierte (125 ng/mL) und nicht dotierte Leerblutproben unter den optimierten Bedingungen extrahiert und im SIM-Modus gemessen wurden. Die erhaltenen Chromatogramme wurden anschließend auf Interaktionen von Matrix- und Substanzpeaks untersucht.

Wie in Abb. 65 zu sehen ist, traten keinerlei Interferenzen zwischen Analyt- und Matrixpeaks auf, Peakreinheit und Selektivität konnten somit als gewährleistet angesehen werden.



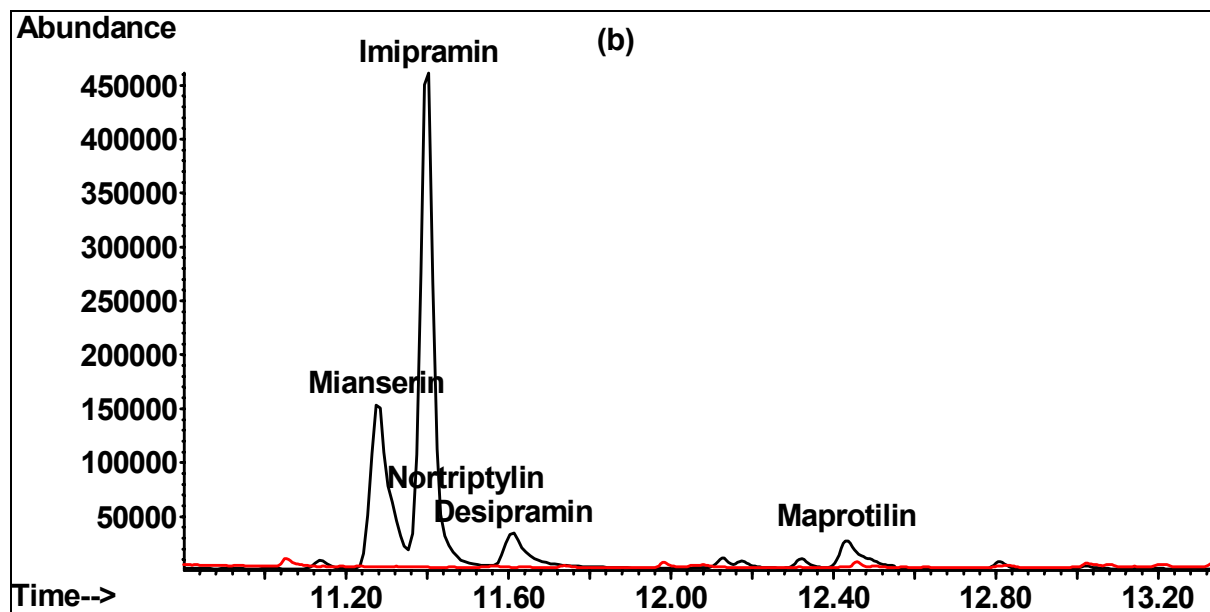


Abbildung 65: Vergleich der SIM-Chromatogramme von zwei mit trizyklischen Antidepressiva dotierten Leerblutproben (125 ng/mL, schwarze Linie) mit dem Chromatogramm einer undotierten Leerblutprobe (rote Linie).

Zur Bestimmung des Linearitätsbereiches der Kalibration wurden Leerblutproben über einen Konzentrationsbereich von 0,125 – 250 ng/mL mit den TCA-Standards aufgestockt und analysiert. Dabei zeigte lediglich die Kalibrationskurve von Doxepin Linearität über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (Tab. 35). Bei allen anderen Verbindungen flachten die Kurven bei höheren Konzentrationen zunehmend ab, was auf eine Sättigung der Aufnahmekapazität der Faserbeschichtung schließen lässt.

Tabelle 35: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG/BG) der untersuchten trizyklischen Antidepressiva.

Substanz	Linearitätsbereich [ng/mL]	r	NG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Amitriptylin	0,125 - 75	0,9998	0,07	0,25
Clomipramin	0,125 - 75	0,9997	0,54	2,14
Desipramin	0,125 - 75	0,9999	0,46	1,76
Dosulepin	0,125 - 75	0,9999	0,27	0,94
Doxepin	0,125 - 250	0,9993	0,03	0,12
Imipramin	0,125 - 50	1,0000	0,06	0,21
Nortriptylin	0,5 - 75	0,9999	0,28	1,04
Trimipramin	0,125 - 75	0,9998	0,57	2,60

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG,BG) wurden mit der Computersoftware B.E.N [103] berechnet und sind vergleichbar mit den Grenzen, die in der Literatur bei der Verwendung konventioneller Methoden [172-174] gefunden wurden.

Für die Reproduzierbarkeit der Methode wurden die intraday- und die interday-Präzision bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 und 50 ng/mL) bestimmt; die Ergebnisse sind in Tab. 36 dargestellt.

Die Vorgaben aus Punkt 4.4.4 wurden von allen hier untersuchten trizyklischen Antidepressiva erfüllt, so dass die vorgestellte Methode als reproduzierbar angesehen werden kann.

Tabelle 36: Daten zur Reproduzierbarkeit des Nachweises der untersuchten trizyklischen Antidepressiva aus Blut mittels automatisierter SPME bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen.

Substanz	Dotierung [ng/mL]	Intraday-Präzision (n = 6)			Interday-Präzision (n = 18)		
		Wiederfindung [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Wiederfindung [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]
Amitriptylin	2,5	3,53	0,43	12,0	3,65	0,49	13,4
	50	46,46	1,02	2,2	46,13	1,34	2,9
Clomipramin	2,5	3,24	0,38	10,6	3,18	0,43	11,7
	50	48,13	5,36	7,42	45,20	1,57	3,4
Desipramin	2,5	4,16	0,35	8,5	3,71	0,73	19,6
	50	72,06	7,15	9,9	66,13	6,3	9,5
Dosulepin	2,5	2,90	0,23	8,1	2,79	0,35	12,4
	50	45,82	2,03	4,4	40,39	3,78	9,4
Doxepin	2,5	3,74	0,21	5,7	3,63	0,42	11,4
	50	49,57	0,92	1,9	49,38	1,90	3,8
Imipramin	2,5	3,76	0,37	9,9	3,80	0,35	9,2
	50	49,65	1,40	2,8	50,34	2,64	5,2
Nortriptylin	2,5	3,31	0,46	14,0	3,26	0,62	18,0
	50	64,67	5,04	7,8	61,24	3,85	6,3
Trimipramin	2,5	3,34	0,50	15,1	3,23	0,39	12,0
	50	40,88	5,10	12,5	39,52	3,85	9,8

Für die Bestimmung der absoluten Wiederfindungen wurden Leerblutproben zum einen mit je 2,5 und zum anderen mit je 10 ng TCA-Standard dotiert und analysiert. Die Ergebnisse wurden mit denjenigen einer Flüssiginjektion der gleichen TCA-Mengen verglichen und sind in Tab. 37 aufgeführt. Auffällig waren hierbei die vergleichsweise sehr hohen absoluten Wiederfindungen. Dieses wurde mit der hohen Lipophilie der Verbindungen erklärt, aus der eine starke Affinität zur PDMS-Beschichtung der Faser resultiert.

Tabelle 37: Absolute Wiederfindungen der untersuchten trizyklischen Antidepressiva bei Verwendung der automatisierten SPME und bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen.

Substanz	Absolute Wiederfindung [%]	
	2,5 ng	10 ng
Amitriptylin	86,8	39,7
Clomipramin	73,5	58,9
Desipramin	7,6	13,4
Dosulepin	122,1	79,5
Doxepin	101,8	42,4
Imipramin	83,8	94,0
Nortriptylin	43,2	33,8
Trimipramin	117,8	54,1

5.6 Injektionsnarkotika

5.6.1 Allgemeine Erläuterungen

Als Injektionsnarkotika finden verschiedene Substanzklassen wie Barbiturate, Ketamin, Etomidat, Propofol und Benzodiazepine Verwendung. Vorteil dieser Verbindungen ist, im Gegensatz zu den Inhalationsnarkotika, der sofortige Wirkungseintritt. Dem steht jedoch der Nachteil der schlechten Steuerbarkeit der Narkose entgegen, denn mit Ausnahme der Benzodiazepine, bei denen Flumazenil (Anexate®) als Antagonist injiziert werden kann, besteht keine Möglichkeit, die Wirkung der Injektionsnarkotika aufzuheben.

5.6.1.1 Barbiturate

Aus der Gruppe der Barbiturate werden häufig Thiopental und Methohexital (Abb. 66) eingesetzt, die bereits während der Injektion zum Verlust des Bewusstseins führen; eine Muskelrelaxation oder Analgesie treten jedoch nicht ein. Als mögliche Nebenwirkungen werden eine Atemdepression und eine negative Inotropie beschrieben. Methohexital wird zu über 80% zu unwirksamen Metaboliten abgebaut, während Thiopental in das lang wirksame Pentobarbital und weiter zu unwirksamen Metaboliten abgebaut wird.

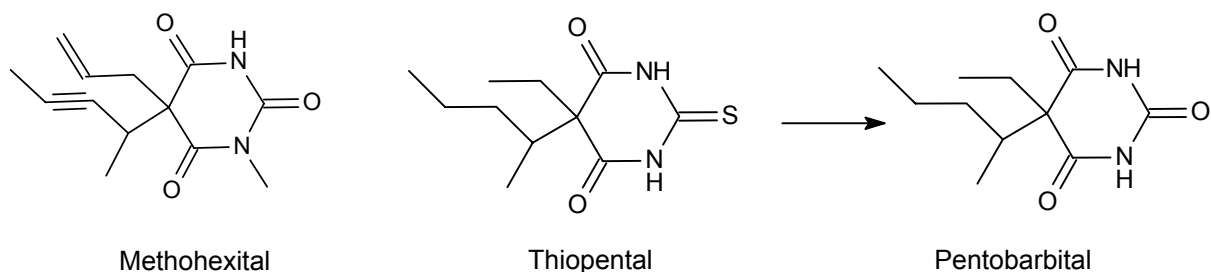


Abbildung 66: Strukturformeln von Thiopental und Methohexital mit seinem Metaboliten Pentobarbital.

5.6.1.2 Ketamin

Ketamin (Abb. 67) weist eine Cyclohexanonstruktur auf, deren (S)-(+)-Enantiomer ca. 2 – 4mal stärker wirksam ist als das (R)-(-)-Enantiomer. Es bindet an NMDA-Rezeptoren, wodurch die zugehörigen Ionenkanäle blockiert werden.

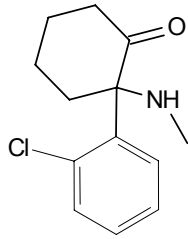


Abbildung 67: Strukturformel von Ketamin.

Die Injektion kann sowohl i.v. als auch i.m. erfolgen, wobei innerhalb einer Minute eine generelle Analgesie, begleitet von einer 10minütigen Bewusstlosigkeit einsetzt, jedoch keine Muskelrelaxation. Nachteil dieses Narkotikums sind die Alpträume, die vom Patienten beim Nachlassen der Wirkung erlebt werden, wobei Kinder und Senioren nicht davon betroffen sind. In der Leber erfolgt die Metabolisierung zu Norketamin und Dehydronorketamin, 3% der injizierten Menge werden unverändert renal ausgeschieden.

5.6.1.3 Etomidat

Bei Etomidat (Abb. 68) handelt es sich um einen Imidazolcarbonsäureester, bei dem nur das (R)-(+)-Enantiomer narkotisch wirksam ist.

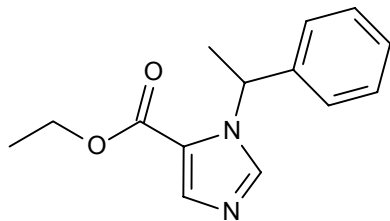


Abbildung 68: Strukturformel von Etomidat.

Unmittelbar nach i.v.-Applikation tritt Bewusstseinsverlust ein, der ca. 4 – 8 Minuten. anhält. Analog den Barbituraten sind auch hier weder Analgesie noch Muskelrelaxation zu beobachten, vorteilhaft ist jedoch, dass es weder cardio- noch atemdepressiv wirkt. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber in Form von Esterspaltung und N-Desalkylierung, nur ca. 2% werden unverändert renal eliminiert.

5.6.1.4 Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) stellt ein Phenol-Derivat mit zwei Isopropylresten dar (Abb. 69). Nach i.v.-Injektion tritt innerhalb von einer Minute ein Bewusstseinsverlust auf, welcher ca. 5 – 10 Minuten anhält.

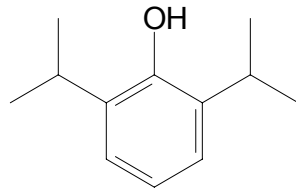


Abbildung 69: Strukturformel von Propofol.

Nebenwirkungen können in Form von Blutdruckabfall (durch Vasodilatation und negative Inotropie), reflektorischer Tachykardie und Apnoe (bei zu schneller Injektion) auftreten. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber durch Hydroxylierung, Glucuronidierung und Sulfatierung.

5.6.1.5 Benzodiazepine

Benzodiazepine gehören nicht zu den Narkosemitteln im engeren Sinne. Oft werden sie zur Prämedikation vor Operationen eingesetzt, in höheren Dosierungen und bei intravenöser Applikation dienen sie der Narkoseeinleitung sowie, in Kombination mit stark wirksamen Analgetika, der Ataranalgesie. Neben Diazepam (Abb. 71) findet insbesondere das kurzwirksame Midazolam (Dormicum®, Abb. 70) Verwendung. Von Vorteil ist, dass sie eine hohe therapeutische Breite aufweisen und das kardio-vaskuläre System kaum beeinflussen. Außerdem stellen Benzodiazepine die wichtigste Substanzgruppe innerhalb der Tranquillanzien dar. Sie wirken anxiolytisch, sedativ/hypnotisch, muskelrelaxierend und antikonvulsiv.

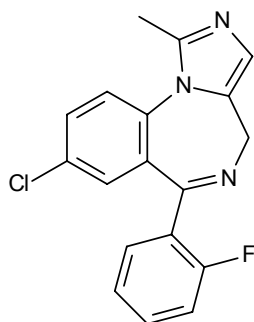


Abbildung 70: Strukturformel von Midazolam.

Forensische Relevanz erlangen Benzodiazepine bei akuten Intoxikationen (z.B. Suizid), im verkehrsmedizinischen Bereich (Enthemmung, erhöhte Risikobereitschaft, verminderte Aufmerksamkeit, eingeschränktes Reaktionsvermögen) und als Ersatz- und Ausweichdrogen. Die Applikation erfolgt je nach Indikation oral, i.v. oder i.m.. Im Körper wird Diazepam zum größten Teil zu Nordazepam (Desmethyldiazepam, HWZ 30 – 90 Stunden) desalkyliert und anschließend zu Oxazepam (HWZ 6 – 12 Stunden) hydroxyliert. In einem Nebenweg entsteht Temazepam, welches durch Demethylierung ebenfalls in Oxazepam umgewandelt wird. Dieses wird glucuronidiert und anschließend renal eliminiert. Es ist zu bemerken, dass alle drei Metabolite (Abb. 71) pharmakologisch wirksam sind.

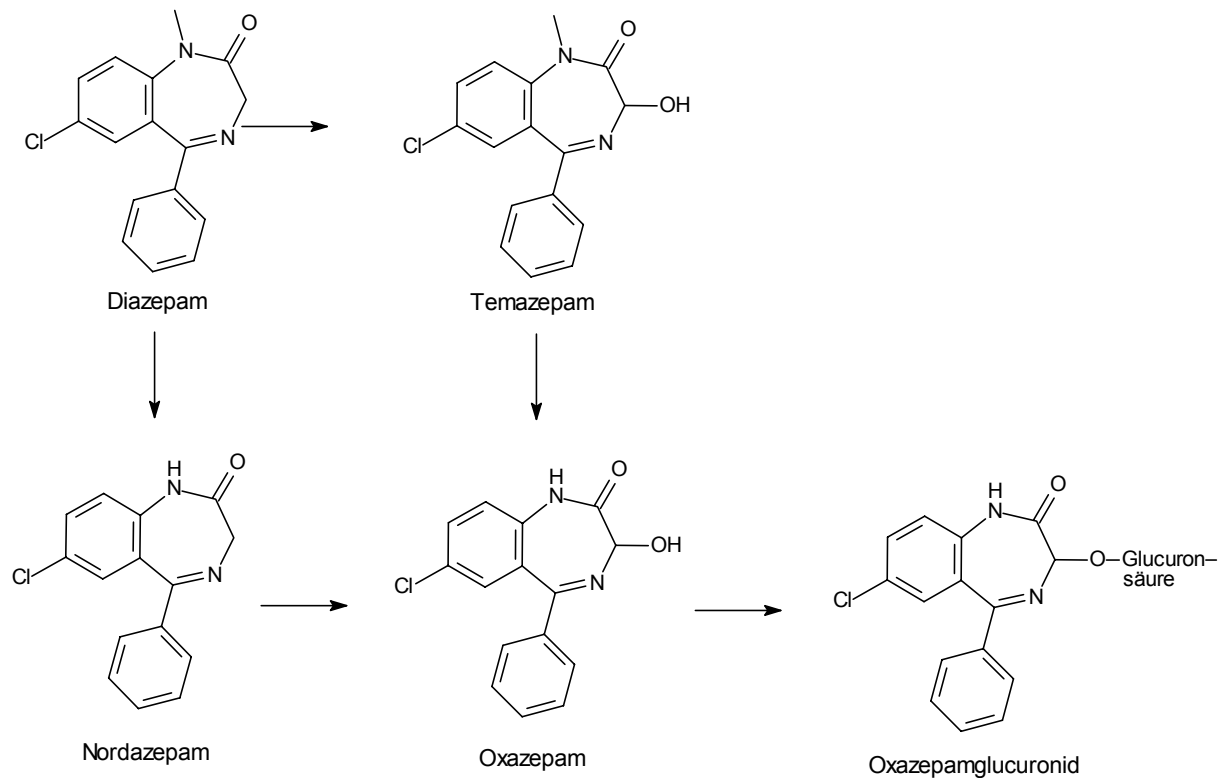


Abbildung 71: Biotransformation von Diazepam.

5.6.2 Optimierung der SPME-Parameter

Die Durchführung der Optimierungsexperimente erfolgte mit Leerblutproben (1 mL), welche mit den Injektionsnarkotika in folgenden Konzentrationen dotiert waren: 0,25 µg/mL (Propofol, 2,4-di-tert-Butylphenol, Ketamin, Etomidat), 0,75 µg/mL (Methohexital), 1 µg/mL (Pentobarbital, Thiobutabarbital, Hexobarbital), 2,5 µg/mL (Midazolam, Thiopental) und 5 µg/mL. Die Versuchsreihen wurden mit der automatisierten SPME durchgeführt.

Für die Optimierung der Inkubations- und Extraktionstemperatur wurden die Proben 15 Minuten bei 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 und 130°C inkubiert und geschüttelt (600 U/min; 0,05 min Agitator on time; 0,02 min Agitator off time), bevor sie weiter analysiert wurden.

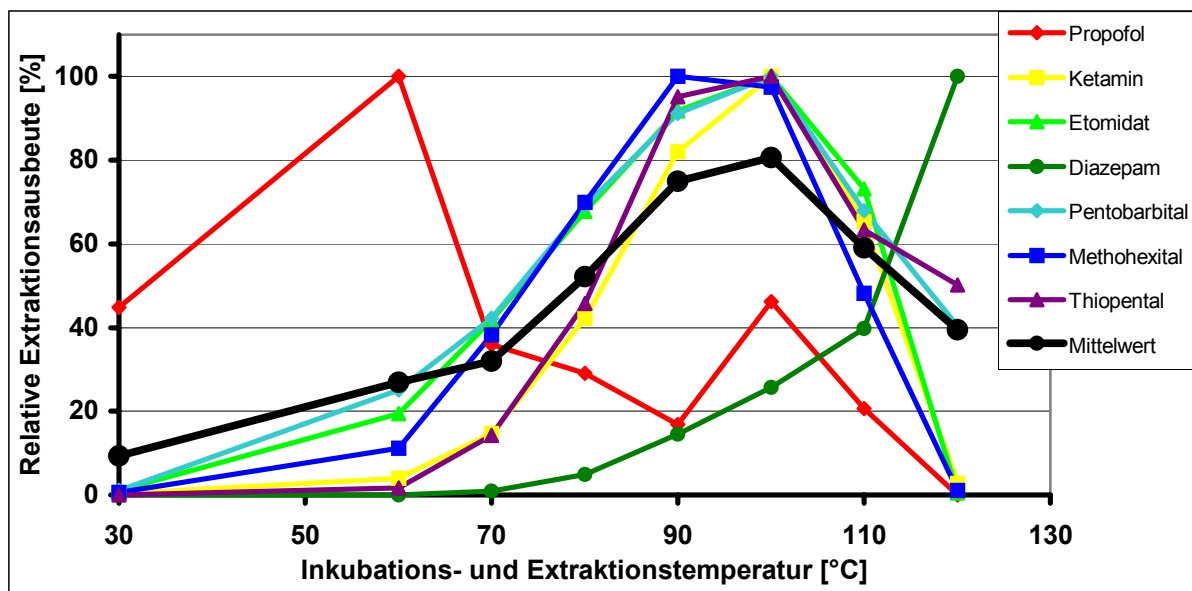


Abbildung 72: Einfluss der Inkubations- und Extraktionstemperatur auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Ketamin, Etomidat, Diazepam, Pentobarbital, Methohexital und Thiopental aus dotierten Blutproben.

Wie in Abb. 72 zu sehen ist, lag für die meisten Verbindungen das Optimum bei 100°C, lediglich Propofol und Diazepam verhielten sich abweichend. Bei Propofol schien das Optimum bereits bei 60°C erreicht zu sein, höhere Temperaturen führten zu einem starken Abfall der Extraktionsausbeuten. Dieses lässt sich damit erklären, dass bei der Dotierung der Proben zunächst die methanolischen Standards in die Vials gegeben wurden und das Methanol, zur Vermeidung von Effekten wie sie unter 2.6.9 beschrieben sind, unter Stickstoffbegasung abgedampft wurde. Bei Propofol handelt es sich jedoch um eine relativ flüchtige Verbindung, so dass beim Abdampfen wahrscheinlich nicht nur das Methanol, sondern auch Anteile vom Propofol mitentfernt wurden.

Bei Diazepam hingegen schien auch bei 120°C das Maximum noch nicht erreicht zu sein. Die Extraktionsausbeuten der anderen Verbindungen verminderten sich jedoch bei dieser Temperatur in großem Maße wieder, so dass als Kompromiss für die weiteren Untersuchungen eine Inkubations- und Extraktionstemperatur von 100°C verwendet wurde.

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher pH-Werte auf die Extraktionsausbeute der Injektionsnarkotika wurde den dotierten Blutproben jeweils 1 mL Phosphatpuffer der pH-Werte 2, 3, 5, 7, 9 bzw. 10 zugesetzt, nachdem Versuche mit einem Zusatz von 1 mL 1 M Natronlauge bzw. 0,1 M Salzsäure nur unbefriedigende Ergebnisse geliefert hatten. Betrachtet man Abb. 73, so fällt auf, dass alle Verbindungen ihre maximalen Extraktionsausbeuten bei einem pH-Wert von 7 erreichten, eine Ausnahme bildete wieder Propofol, was auf die o.a. Gründe zurückgeführt wurde.

Für die weiteren Untersuchungen wurde den Proben deshalb jeweils 1 mL Phosphatpuffer pH 7 zugesetzt.

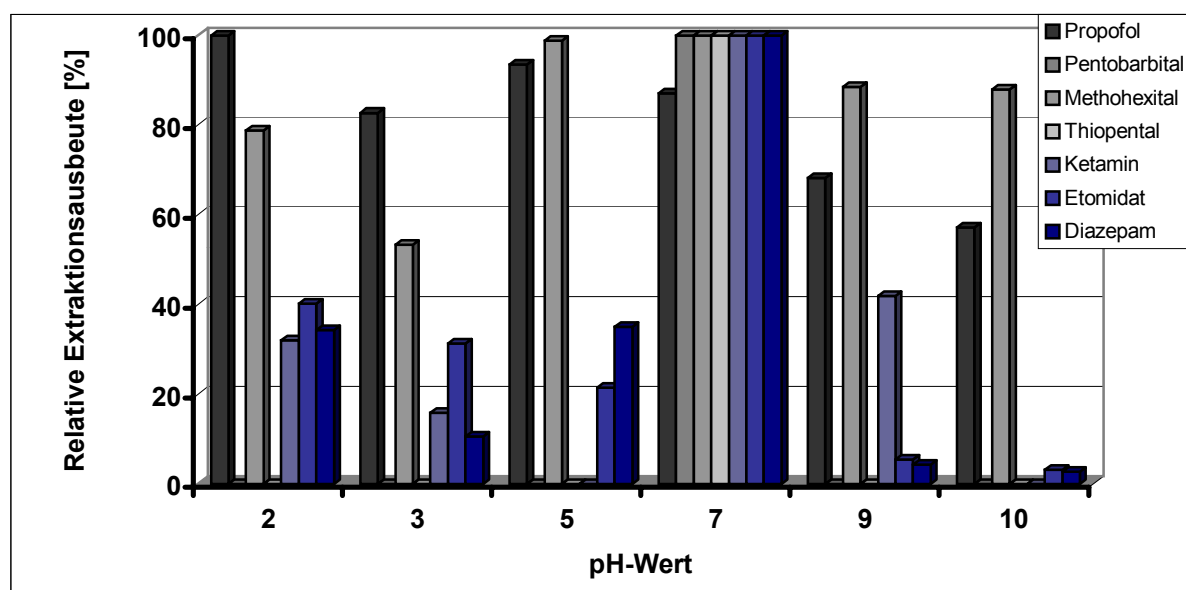


Abbildung 73: Einfluss des pH-Wertes auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam aus dotierten Blutproben.

Um zu prüfen, welche Auswirkungen das Aussalzen der Proben auf die Extraktionsausbeute hat, wurden dotierte Blutproben mit jeweils 0,5 g Kochsalz, Natriumcarbonat, Natriumfluorid, Natriumsulfat bzw. Ammoniumsulfat versetzt und analysiert. Die gefundenen Extraktionsausbeuten wurden anschließend mit der Ausbeute einer Probe ohne Salzzusatz verglichen; die Ergebnisse sind in Abb. 74 zu sehen.

Abgesehen von Natriumfluorid, führte der Zusatz der anderen Salze zu einer mehr oder weniger deutlichen Erhöhung der Ausbeute. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Zusatz von Natriumsulfat erzielt; lediglich Diazepam und Ketamin zeigten in Anwesenheit von Natriumcarbonat höhere Extraktionsausbeuten. Aber auch für diese beiden Verbindungen konnten durch die Zugabe von Natriumsulfat befriedigende Nachweisgrenzen erzielt werden, so dass für die weiteren Untersuchungen ein Zusatz von 0,5 g Na_2SO_4 verwendet wurde.

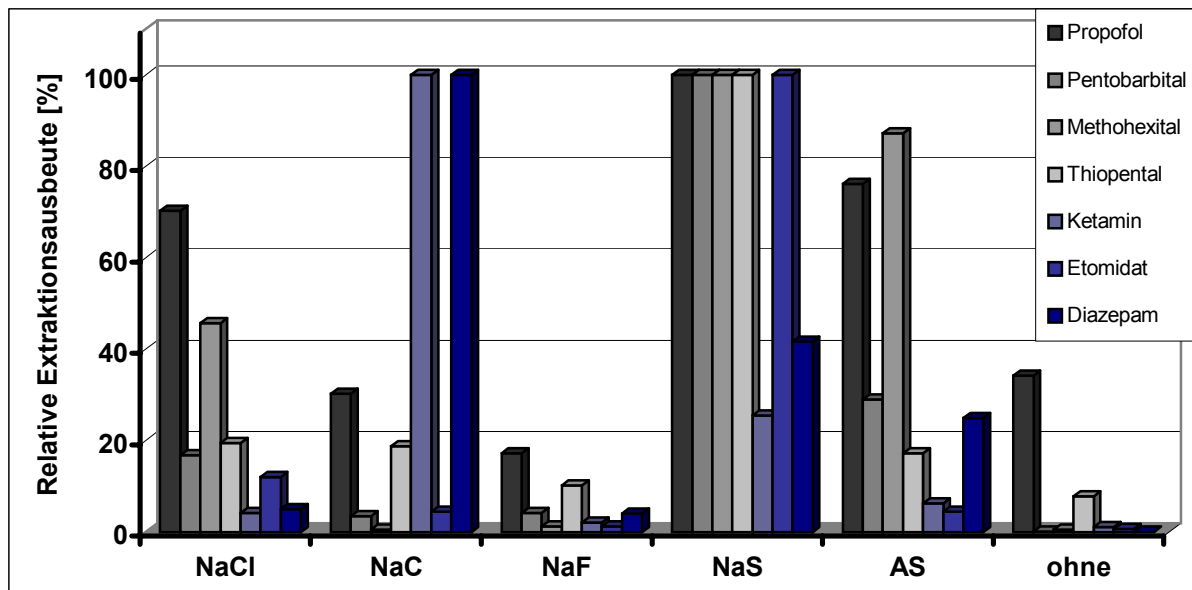


Abbildung 74: Einfluss verschiedener Salzzusätze auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Ketamin, Etomidat, Diazepam, Pentobarbital, Methohexital und Thiopental aus dotierten Blutproben. (NaC = Natriumcarbonat, NaF = Natriumfluorid, NS = Natriumsulfat, AS = Ammoniumsulfat, ohne = kein Salzzusatz)

Für die Optimierung der Extraktionszeit wurde die SPME-Faser bei einer Agitatortemperatur von 100°C für 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten im Headspace der Probenvials exponiert.

Erwartungsgemäß stiegen die Extraktionsausbeuten mit zunehmender Dauer der Absorption kontinuierlich an (ausgenommen Propofol aus den genannten Gründen), bis nach 25 Minuten für die meisten Analyten das Verteilungsgleichgewicht erreicht war (Abb.75). Lediglich für Thiopental und Diazepam stieg der Kurvenverlauf noch weiter an und auch Propofol zeigte wieder ein abweichendes Verhalten. Da das Verteilungsgleichgewicht für die Mehrheit der Verbindungen nach 25 Minuten erreicht war, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit dieser Extraktionszeit weitergearbeitet.

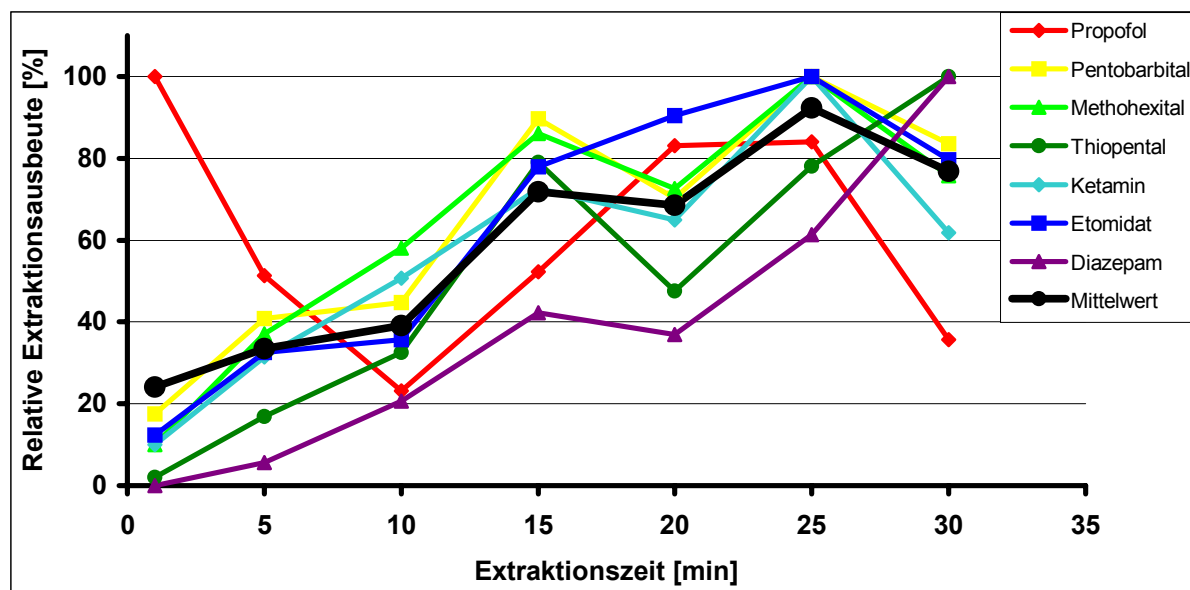


Abbildung 75: Einfluss der Extraktionszeit auf die Extraktionsausbeuten von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam aus dotierten Blutproben.

Die optimale Injektortemperatur wurde ermittelt, indem die Faser nach der Extraktion der dotierten Blutproben 5 Minuten lang bei unterschiedlichen Temperaturen (200, 210, 220, 230, 240, 250°C) im Injektor des GC exponiert wurde.

Abbildung 76 dokumentiert, dass die desorbierten Analytmengen im Mittels zunächst leicht anstiegen, bis sie zwischen 210°C und 230°C konstante Werte annahmen. Anschließend erfolgte wieder eine Abnahme der desorbierten Mengen.

Auch hier bildeten Propofol und Diazepam wieder Ausnahmen. Während die Propofolmenge schon bei Temperaturen über 210°C stark abnahm, stieg die desorbierte Diazepammenge bis 230°C weiter an, um bei Temperaturen über 240°C wieder leicht abzunehmen. Der Abfall der desorbierten Analytmengen wurde, wie schon bei den Organochlor-Pestiziden und den Amphetaminen, mit beginnenden Zersetzungserscheinungen der Verbindungen bei hohen Temperaturen erklärt. Als Kompromiss wurde eine Injektortemperatur von 220°C ausgewählt, da die meisten Verbindungen hier ihr Optimum besaßen und auch die desorbierten Analytmengen von Propofol und Diazepam als ausreichend angesehen werden konnten.

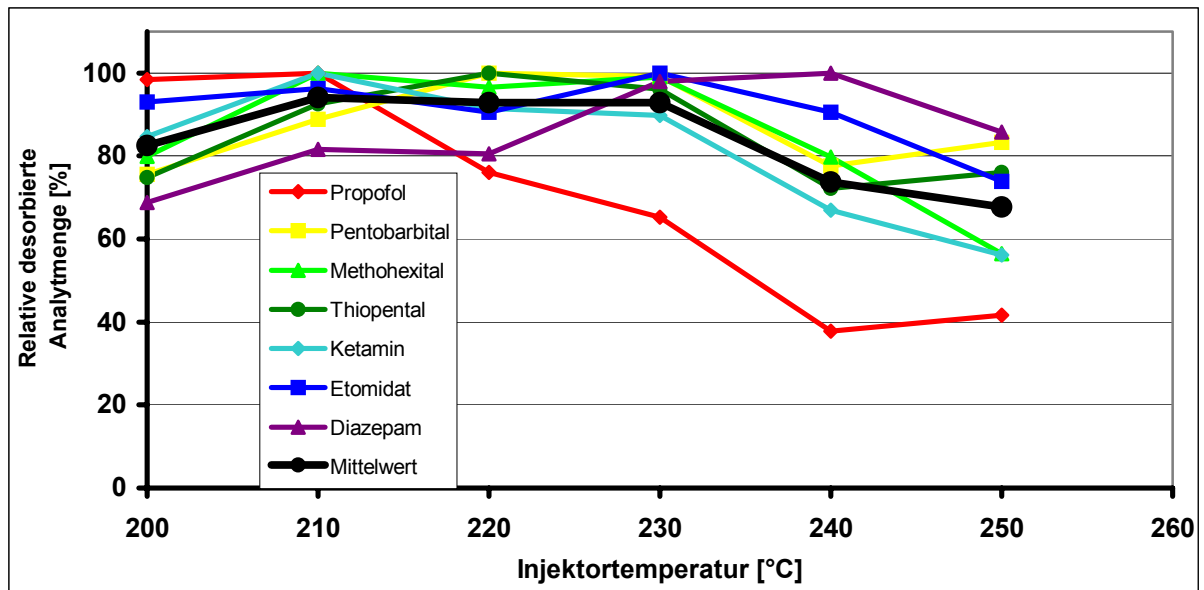


Abbildung 76: Einfluss der Injektortemperatur auf die Effektivität der Desorption von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam.

Um den Zeitpunkt zu ermitteln, zu dem einerseits die Analyten vollständig von der Faser desorbiert sind und andererseits die Faser nicht zu sehr beansprucht wird, wurde die Faser, nach Extraktion der dotierten Blutproben, für 0,1, 0,5, 1, 1,5 und 2 Minuten bei 220°C im Injektor des GC exponiert.

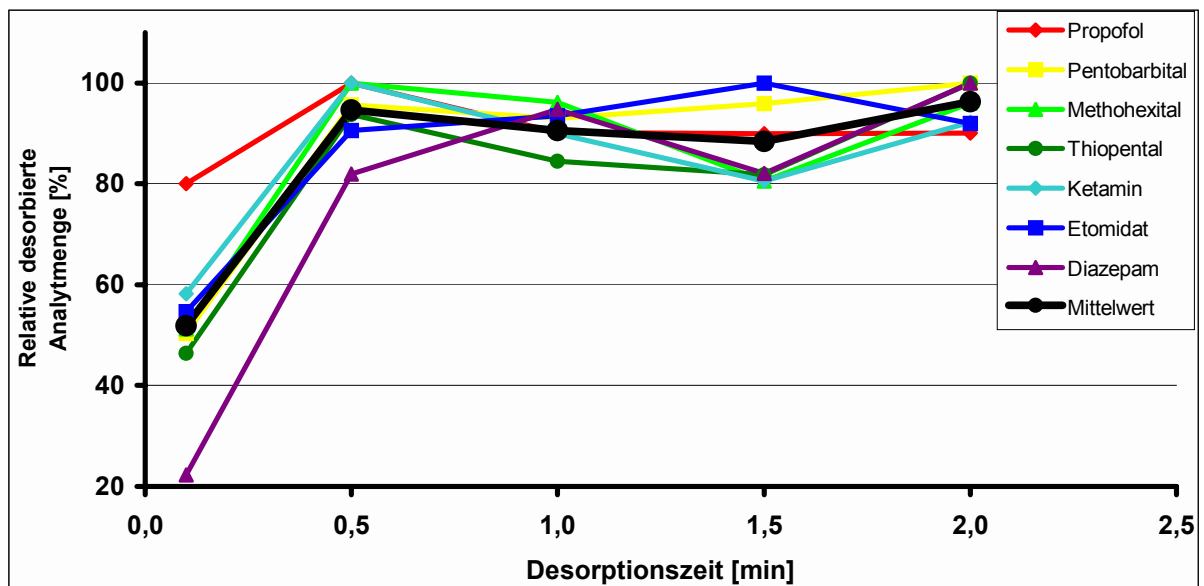


Abbildung 77: Einfluss der Desorptionszeit auf die Effektivität der Desorption von Propofol, Pentobarbital, Methohexital, Thiopental, Ketamin, Etomidat und Diazepam.

Wie in Abb. 77 zu sehen ist, war die Desorption durchschnittlich nach einer halben Minute abgeschlossen. Lediglich Diazepam benötigte etwas mehr Zeit. Um dem Rechnung zu tragen und um die Gefahr möglicher Verschleppungen zu vermindern, wurde für die weiteren Untersuchungen eine Desorptionszeit von 1 Minute verwendet.

In die Testreihen zur Optimierung der SPME-Methode wurden auch die Diazepammetabolite Oxazepam, Nordazepam und Temazepam einbezogen, die Ergebnisse waren jedoch nicht verwertbar. Für einen sicheren Nachweis dieser Verbindungen wären weitere Versuchsreihen, ggf. mit Derivatisierung, notwendig, da nicht alle Benzodiazepine bei den hohen Temperaturen wie sie für die Gaschromatographie erforderlich sind, stabil sind. Z.B. unterliegt Oxazepam einer Ringbildung, wodurch eine Verbindung entsteht, welche nur sehr schlecht GC-gängig ist [175].

Tab. 38 zeigt im Überblick die Parameter der optimierten Methode zum Nachweis von Injektionsnarkotika in biologischen Matrices mittels automatisierter HS-SPME.

Tabelle 38: Methoden-Parameter zum Nachweis von Injektionsnarkotika in biologischen Matrices mittels automatisierter SPME.

Parameter	Optimum
Zusätze	1 mL Puffer pH 7 + 0,5 g Natriumsulfat
Inkubations- und Extraktionstemperatur	100°C
Schüttelbedingungen des Agitators	650 U/min, 5 s Agitator on, 2 s Agitator off
Inkubationszeit	15 min
Eintauchtiefe der Faser in das Vial	23 mm
Extraktionszeit	25 min
Injektortemperatur	220°C
Desorptionszeit	1 min
Eintauchtiefe der Faser in den Injektor	52 mm

5.6.3 Validierung

Die Validierung der Methode erfolgte mit dotierten Blutproben (1 mL), wobei die internen Standards immer in einer Konzentration von 0,25 µg (2,4-di-tert-Butylphenol) bzw. 1 µg/mL (Thiobutabarbital und Hexobarbital) zugegeben wurden.

Zur Bestimmung der Peakreinheit und Selektivität wurden jeweils eine dotierte und eine nicht dotierte Leerblutprobe extrahiert und analysiert. Die erhaltenen Chromatogramme der aufgestockten Blutprobe (Abb. 78, schwarze Linie) wurden mit denen der nicht dotierten Blutprobe (Abb. 78, rote Linie) verglichen.

Wie anhand der roten Linie erkennbar ist, treten zwar keinerlei Interferenzen mit Peaks aus der Blutmatrix auf, dennoch finden sich relativ viele Peaks, welche sich im SIM-Modus jedoch nicht zuordnen lassen. Weiterhin fallen auch hier, trotz identischer Konzentrationen der Standards bei der Dotierung, die äußerst unterschiedlichen Peakgrößen der einzelnen Verbindungen auf. Die Erklärung dafür ist wieder in der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Verbindungen zur Beschichtung der SPME-Faser zu sehen.

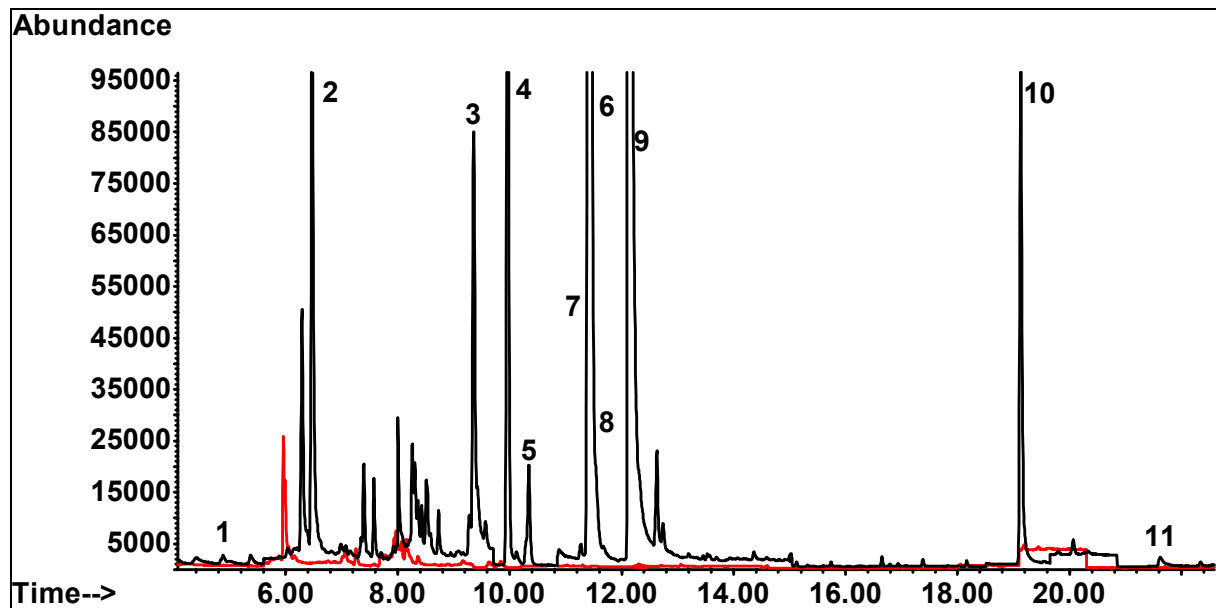


Abbildung 78: Vergleich der SIM-Chromatogramme einer dotierten Blutprobe (5 µg/ml, schwarze Linie) und einer undotierten Blutprobe (rote Linie).
(1 = Propofol, 2 = 2,4-Di-tert-butylphenol, 3 = Pentobarbital, 4 = Methohexital, 5 = Thiobutabarbital, 6 = Thiopental, 7 = Ketamin, 8 = Hexobarbital, 9 = Etomidat, 10 = Diazepam, 11 = Midazolam)

Zur Bestimmung der Linearitätsbereiche wurde eine Kalibration über einen Konzentrationsbereich von 25 – 5000 ng/mL erstellt. Die Methode erwies sich für die untersuchten Substanzen, mit Ausnahme von Methohexital, jedoch nur bis zu einer Konzentration von 4000 ng/mL als linear. Darüber hinaus nahmen die Kalibriergeraden, analog den trizyklischen Antidepressiva, den Verlauf von Sättigungskurven an, d.h. die Aufnahmekapazität der Faserbeschichtung war erreicht.

Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden lagen zwischen $r = 0,9968$ und $r = 1,000$ (Tab. 39); die Linearität war somit gegeben.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind ebenfalls in Tab. 39 angegeben. Sie lagen im Bereich der Werte, die in der Literatur gefunden wurden oder darunter [175,176].

Von der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) wurden Vorgaben bezüglich der empfohlenen unteren Messbereichsgrenzen im Rahmen der Hirntod-Diagnostik herausgegeben [177]. Diese werden von der hier vorgestellten Methode erfüllt, wobei im Fall von Midazolam lediglich die untere Grenze des therapeutischen Bereichs (40 mg/mL), nicht jedoch die empfohlene untere Messbereichsgrenze (20 ng/mL) erreicht wurde.

Tabelle 39: Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG,BG) der untersuchten Injektionsnarkotika.

Substanz	Linearitätsbereich [ng/mL]	r	NG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Propofol	25-4000	0,9986	2,6	9,6
Pentobarbital	25-4000	0,9997	9,2	54,5
Methohexital	25-5000	0,9987	2,2	13,0
Thiopental	25-4000	0,9997	15,6	59,4
Ketamin	25-5000	1,0000	8,6	50,5
Etomidat	25-4000	0,9994	4,2	18,2
Diazepam	25-4000	0,9968	9,2	39,8
Midazolam	25-4000	0,9988	9,8	33,1

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden die Messungen für die intraday- und die interday-Präzision mit dotierten Blutproben in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Sowohl für die intraday- als auch für die interday-Präzision wurden anschließend die Präzision und die Genauigkeit rechnerisch bestimmt. Da in die Gleichung für die Genauigkeit die Wiederfindung mit eingeht, wurde zusätzlich zu den Wiederholmessungen eine Kalibration in Blut erstellt, die täglich erneuert wurde. Die Ergebnisse sind in Tab. 40 aufgeführt.

Obwohl die Vorgaben nach Punkt 4.4.4 nur z.T. erfüllt wurden, ist die Reproduzierbarkeit der hier vorgestellten Methode als noch ausreichend zu betrachten. Über die Gründe für die zum Teil unbefriedigende Reproduzierbarkeit kann an dieser Stelle nur spekuliert werden:

Die für die Durchführung der Versuchsreihen benötigten Probenvials wurden alle zum selben Zeitpunkt präpariert. Die noch nicht benötigten Vials wurden bis zur Bestimmung der interday-Präzision einige Tage bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Denkbar wäre, dass die Analyten in dieser Zeit unterschiedliche Wechselwirkungen mit Bestandteilen der Matrix (Blut) eingegangen sind, wodurch es zu Schwankungen in der Extraktionsausbeute kommen konnte. Z. B. wird Ketamin nach einer Injektion in die Blutbahn zu 50%, Etomidat zu 75% und Propofol zu 98% an Plasmaeiweiße gebunden [178].

Auch muss bedacht werden, dass die ermittelten Daten nicht nur die Reproduzierbarkeit der gaschromatographischen Trennung und Detektion, sondern auch die Reproduzierbarkeit der Extraktion und Anreicherung durch die SPME beinhalten.

Tabelle 40: Daten zur Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode zum Nachweis von Injektionsnarkotika in biologischen Matrices bei drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Konzentration [ng/mL]		intraday-Präzision (n=6)		interday-Präzision (n=18)	
		Präzision [%] ¹	Genauigkeit [%] ²	Präzision [%]	Genauigkeit [%]
Propofol	500	17,0	13,6	21,4	14,4
	2000	12,1	12,7	23,5	10,4
Pentobarbital	100	16,1	2,1	18,2	11,1
	500	10,4	13,6	9,4	7,2
	2000	5,9	11,6	8,9	10,6
Methohexital	100	4,2	16,5	9,8	11,2
	500	11,0	15,0	9,2	9,1
	2000	7,8	0,2	8,6	3,4
Thiopental	100	8,4	20,1	16,9	16,0
	500	7,5	19,3	12,0	13,1
	2000	8,1	1,1	9,9	7,8
Ketamin	100	7,0	9,2	12,2	14,8
	500	11,1	2,6	11,7	7,0
	2000	10,8	1,7	9,7	4,3
Etomidat	100	12,6	4,9	12,7	13,9
	500	8,1	15,2	11,4	9,6
	2000	5,8	12,5	9,8	6,8
Diazepam	500	11,8	12,6	17,4	9,1
	2000	8,9	15,1	10,9	11,7
Midazolam	500	12,7	16,0	18,6	16,0
	2000	5,9	14,5	14,2	11,3

Die Bestimmung der absoluten Wiederfindungen erfolgte mit Proben, welche mit jeweils 50 ng eines jeden Narkotikums dotiert waren und unter den optimierten Bedingungen analysiert wurden. Die zum Vergleich injizierten 2 μ L einer methanolischen Lösung enthielten die Narkotika ebenfalls in einer Menge von je 50 ng; die Ergebnisse sind Tab. 41 zu entnehmen.

Auffällig sind hier die für die SPME ungewöhnlich hohen Absoluten Wiederfindungen. Dieses könnte, wie bei den TCA, auf die vergleichsweise hohe Lipophilie und die damit verbundene hohe Affinität der Verbindungen zur PDMS-Beschichtung der Faser zurückzuführen sein.

Tabelle 41: Absolute Wiederfindungen der untersuchten Injektionsnarkotika.

Substanz	Absolute Wiederfindung [%]
Propofol	47,2
Pentobarbital	4,5
Methohexital	50,1
Thiopental	19,7
Ketamin	56,8
Etomidat	54,7
Diazepam	49,3
Midazolam	2,9

5.6.4 Anwendung der Methode auf reale Proben

Um die Anwendbarkeit der hier vorgestellten Methode auf reale Proben zu demonstrieren, bot sich menschliches Probenmaterial an, welches im Rahmen der Obduktionen zweier Todesfälle aus einer Klinik erhalten wurde. In den Unterlagen fanden sich Hinweise auf die Gabe von Propofol. Die in den verschiedenen Organen gefundenen Propofolkonzentrationen sind in Tab. 42 aufgeführt.

Da es sich bei Propofol um ein zentral wirksames Arzneimittel handelt, welches sehr rasch im Gehirn anflutet, wurden die höchsten Konzentrationen erwartungsgemäß auch dort gefunden. Innerhalb weniger Minuten nach Einsetzen der Wirkung kommt es jedoch zu Verteilungsvorgängen im Körper, was erklärt, dass Propofol auch in den anderen Organen gefunden wurde.

Tabelle 42: Propofolkonzentrationen, die mittels automatisierter SPME in Herzblut bzw. Blut, Gehirn und Lunge zweier Leichen gefunden wurden.

Probe	Propofolkonzentration [ng/g]
<u>S162/00</u>	
Herzblut	8,4
Gehirn	26,1
Lunge links	10,7
Lunge rechts	17,3
<u>S275/00</u>	
Blut	8,34
Lunge	31,98
Gehirn	152,1

5.7 Zusammenfassung

5.7.1 Auswahl der SPME-Faser

Die in dieser Arbeit verwendeten Gaschromatographen sind routinemäßig mit Kapillarsäulen bestückt, deren stationäre Phasen zu 95% aus PDMS bestehen (siehe 4.1.3.2). Da sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Substanzklassen in der Routineanalytik des Labors auf diesen Säulen getrennt werden, erschien eine SPME-Faser mit PDMS-Beschichtung am geeignetsten für die anstehenden Untersuchungen.

Weiterhin gelten Fasern mit PDMS-Beschichtung als universell einsetzbar, da sie einen relativ weiten Einsatzbereich bezüglich der Polarität und Flüchtigkeit der Analyten aufweisen. Lediglich sehr polare Substanzen sind nicht damit erfassbar.

Bei der forensisch-toxikologischen Analytik handelt es sich oft um Untersuchungen im Spurenbereich, so dass im Hinblick auf eine höhere Nachweisempfindlichkeit eine Schichtdicke von 100 μm PDMS ausgewählt wurde. Dass die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes dadurch mehr Zeit in Anspruch nimmt als mit einer 7- bzw. 30- μm -Beschichtung, wurde zugunsten der höheren Nachweisempfindlichkeit in Kauf genommen.

Die Verwendung von Fasern mit heterogener Beschichtung (z.B. PDMS/DVB) wurde nicht in Betracht gezogen, da bei diesen Verdrängungseffekte durch Matrixbestandteile auftreten können, insbesondere bei komplexen Matrices, wie sie in der forensischen Toxikologie üblich sind (siehe 2.6.3).

5.7.2 Inkubations- und Extraktionstemperatur

Die Inkubation und Extraktion bei erhöhten Temperaturen führte bei allen untersuchten Substanzklassen zu einer Erhöhung der Extraktionsausbeute, wobei der Effekt bei sehr flüchtigen Verbindungen, wie dem Halothan, deutlich weniger ausgeprägt war (5.3.2), als bei weniger flüchtigen Verbindungen wie den trizyklischen Antidepressiva (5.6.2), wo eine Verdoppelung der Temperatur von 60 auf 120°C zu einer Verzehnfachung der Extraktionsausbeute führte.

Im Hinblick auf die Erzielung kurzer Analysenzeiten und hoher Empfindlichkeiten kommt der Optimierung der Inkubations- und Extraktionstemperatur deshalb, insbesondere bei schwerer flüchtigen Verbindungen, eine große Bedeutung zu.

5.7.3 pH-Wert

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass für jede Stoffklasse ein individueller pH-Wert, abhängig vom pK_s -Wert der jeweiligen Analyten, einzustellen ist. Der Einfluss von Säuren, Basen oder Pufferlösungen auf das Extraktionsverhalten der zu untersuchenden Verbindungen ist jedoch nicht immer vorherzusagen. Er kann, wie am Beispiel der Cannabinoide deutlich wird (5.5.4.2), auch zu unerwarteten Ergebnissen führen. Aus diesem Grunde sollten für jede Substanzklasse entsprechende Versuche durchgeführt werden.

5.7.4 Salzzusätze

Unter Ausnutzung des Aussalzeffektes lässt sich, insbesondere bei polaren Analyten, das Gleichgewicht zugunsten des Gasraumes über der Probe verschieben. Dieses führt zu einer Erhöhung der Extraktionsausbeute und somit der Empfindlichkeit. Besonders deutlich kam dieser Effekt bei den untersuchten Injektionsnarkotika zum tragen (5.7.5).

Ein Salzzusatz kann sich aber auch negativ auf die Ausbeute auswirken, wie am Beispiel der synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp (5.5.3.3) und der trizyklischen Antidepressiva (5.6.2) zu erkennen ist.

5.7.5 Extraktionszeit

Das Verteilungsgleichgewicht ist erreicht, wenn trotz Zunahme der Absorptionszeit das Detektorsignal konstant bleibt. Werden die Extraktionen aus Zeitgründen vor Erreichen des Gleichgewichtes abgebrochen, was bei Konstanthalten der Absorptionszeiten durchaus legitim ist (siehe 2.6.5), ist die Kenntnis über die Dauer der Gleichgewichtseinstellung dennoch hilfreich, da eine unzureichende Empfindlichkeit und Präzision durch Verlängerung der Absorptionszeiten, d.h. Arbeiten in einem weniger steilen Bereich des Absorptionszeitprofils, verbessert werden kann.

Das Verteilungsgleichgewicht der in dieser Arbeit untersuchten Substanzgruppen wurde immer innerhalb akzeptabler Zeiten erreicht, so dass darauf verzichtet werden konnte, die Extraktionen vor Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes abzubrechen.

5.7.6 Probendurchmischung

Wie unter 5.4.4.2 ausgeführt ist, zeigte die Variation der Agitatorgeschwindigkeit keinen definierten Effekt auf die Extraktionsausbeute.

Leider ließ sich die Agitatorgeschwindigkeit nicht auf weniger als 250 U/min einstellen. So konnten die erhaltenen Extraktionsausbeuten nicht mit der Ausbeute bei still stehendem Agitator verglichen werden, um zu überprüfen, ob das Schütteln überhaupt einen Effekt auf die Ausbeute hat.

5.7.7 Eintauchtiefe der Faser in das Vial

Die Untersuchung des Einflusses der Eintauchtiefe der Faser in das Vial bestätigte die unter Punkt 2.6.10 getroffene Aussage, dass die Position der Faser bei der HS-SPME auf Grund der hohen Diffusionskoeffizienten der Analyten im Gasraum des Vials keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute haben dürfte.

5.7.8 Injektortemperatur

Die Desorption der Analyten erfolgt auf thermischem Wege im heißen Injektor des Gaschromatographen. Ziel ist eine möglichst rasche und vor allem vollständige Desorption, um die Analysenzeiten möglichst gering zu halten und Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optima der einzelnen Substanzklassen lagen zwischen 220 und 250°C, mit insgesamt relativ geringen Schwankungen (außer bei den Cannabinoiden und Opioiden), so dass Temperaturabweichungen von 10°C nach oben oder unten i.d.R. nicht ins Gewicht fallen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Lebensdauer der SPME-Faser mit steigender Injektortemperatur abnimmt, was einen Kompromiss zwischen einer genügend hohen Temperatur für die erschöpfende Desorption der Analyten und einer möglichst langen Lebensdauer der Faser erfordert.

5.7.9 Eintauchtiefe der Faser in den Injektor

Die Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC hatte, je nach Substanzklasse, einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Messungen. Während die Eintauchtiefe bei den Organophosphaten, den Cannabinoiden und Opioiden eher wenig Einfluss auf die desorbierte Analytmenge ausübte, befanden sich die optimalen Eintauchtiefen bei Halothan, den Organochlor-Pestiziden und den trizyklischen Antidepressiva lediglich in einem sehr schmalen Bereich.

Je nach Anforderung an die Empfindlichkeit einer Nachweismethode ist eine Optimierung der Eintauchtiefe der Faser in den Injektor des GC empfehlenswert.

5.7.10 Desorptionszeit

Die Desorptionszeit lag bei den einzelnen Substanzklassen zwischen einer und fünf Minuten, wobei im Zweifelsfall eher eine längere Desorptionszeit gewählt werden sollte, um das Risiko von Verschleppungen, insbesondere bei Verbindungen mit hoher Affinität zur Faser, so gering wie möglich zu halten.

5.7.11 Derivatisierung

Die Auswahl eines Derivatisierungsreagenzes erfolgt unter Berücksichtigung der vorhandenen funktionellen Gruppen der Analyten und des Zieles, welches durch die Derivatisierung erreicht werden soll (z.B. Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften, Erhöhung der Extraktionsausbeute). Das Reagenz sollte schnell und quantitativ mit den Analyten, nicht jedoch mit der Polymerbeschichtung der Faser oder der GC-Säule reagieren und es sollte vollständig wieder von der Faser desorbieren.

Für die Derivatisierung der synthetischen Designerdrogen vom Amphetamintyp und der Cannabinoide wurden Reagenzien ausgewählt, die in der Routineanalytik bereits zuverlässig eingesetzt wurden. Zudem sollte die Derivatisierung automatisierbar sein, so dass die Entscheidung bezüglich der Methode zugunsten der on-fiber-Derivatisierung ausfiel.

Eine Derivatisierung auf der Säule (vgl. 2.4) wäre zwar ebenfalls automatisierbar gewesen, jedoch mit deutlich höherem Aufwand, da hierfür ein zweiter CombiPAL für die simultane Durchführung von SPME und Flüssiginjektion des Derivatisierungsreagenzes notwendig gewesen wäre. Eine derartige Geräteausstattung stand jedoch nicht zur Verfügung.

Bei der Auswahl eines Derivatisierungsverfahrens ist weiterhin zu berücksichtigen, dass eine Derivatisierung **nach** vorhergehender Extraktion der Analyten lediglich deren chromatographische Eigenschaften bzw. Detektierbarkeit verbessert. Soll die Extraktionsausbeute erhöht werden, ist die Methode der direkten Derivatisierung anzuwenden. Bei Anwendung der Derivatisierung auf der Faser müsste dazu zunächst die Faser mit dem Derivatisierungsreagenz belegt werden, anschließend erfolgt dann die Extraktion der Analyten.

Diese Annahme konnte durch die durchgeführten Optimierungsexperimente jedoch nicht unterstützt werden, da bei vorheriger Belegung der Faser mit Derivatisierungsreagenz einige Analyten überhaupt nicht nachgewiesen werden konnten.

Versuche mit nur einem mit Derivatisierungsreagenz gefüllten Vial für eine ganze Probensequenz zeigten, dass diese Vorgehensweise zu Verschleppungen führt. Möglicherweise desorbiert ein Teil der bereits absorbierten Analyten wieder von der Faser, wenn diese im Vial mit dem Derivatisierungsreagenz exponiert wird (Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes im Vial mit dem Derivatisierungsreagenz). Eine andere Erklärung wären Verdrängungseffekte der Analyten durch das im Überschuss vorliegende Derivatisierungsmittel. Bei der Derivatisierung der folgenden Probe würden dann die Analyten der vorhergehenden Proben von der Faser absorbiert, was zu unkorrekten Ergebnissen führen würde. Aus diesem Grunde wurde für jede Probe ein eigenes Vial mit Derivatisierungsreagenz verwendet.

Um den Verbrauch dieser kostenintensiven Reagenzien in Grenzen zu halten und mögliche Verdrängungseffekte der Analyten durch zu große Mengen an Derivatisierungsreagenz zu vermeiden, wurden Versuche mit unterschiedlichen Volumina an Derivatisierungsreagenz durchgeführt.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Einsatz von 25 μL Reagenz je Vial vollkommen ausreichend war. Größere Volumina verminderten die Empfindlichkeit sogar, was mit Verdrängungseffekten der Analyten durch das Derivatisierungsmittel erklärt wurde.

Um die Analysenzeiten nicht unnötig zu verlängern und um herauszufinden, welchen Einfluss die Dauer der Derivatisierung auf die Empfindlichkeit hat, wurden auch hierzu Optimierungsexperimente durchgeführt. Wie die Ausführungen unter 5.4.4.1 belegen, führte die Optimierung der Derivatisierungsbedingungen zu einer nicht unerheblichen Erhöhung der Sensitivität.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME), in Verbindung mit der Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS), exemplarisch Methoden zum Nachweis forensisch/toxikologisch relevanter Analyten in biologischen Matrices erarbeitet.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte an zwei Kapillargaschromatographen, die jeweils mit einem Quadrupol-Massenspektrometer verbunden waren und von denen einer mit einem Mehrzweckprobengeber zur automatisierten Durchführung der SPME ausgestattet war.

Sämtliche Extraktionen erfolgten mit der 100 µm-PDMS-Faser, wobei für die meisten Substanzklassen folgende Parameter optimiert wurden: Inkubations- und Extraktionstemperatur, pH-Wert, Zusatz von Salzen, Injektortemperatur und Eintauchtiefe der Faser in den Injektor. Beispielhaft wurde bei einigen Verbindungen der Einfluss untersucht, den die Geschwindigkeit der Probendurchmischung, die Eintauchtiefe der Faser in das Probengefäß, der Zeitpunkt der Derivatisierung, die Menge an Derivatisierungsreagenz und die Dauer der Derivatisierung auf die Extraktionsausbeute bzw. die Empfindlichkeit des Nachweises der jeweiligen Analyten ausübt.

Weiterhin wurden Kalibrationen erstellt, und die entwickelten Methoden validiert, indem die Peakreinheit und Selektivität, die Reproduzierbarkeit, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und z. T. die absoluten Wiederfindungen bestimmt wurden.

Für den Nachweis von Inhalationsnarkotika in biologischen Matrices wurde am Beispiel von Halothan eine manuelle SPME-Methode optimiert und validiert. Dazu wurden Blutproben mit Halothan und Enfluran als ISTD, Schwefelsäure und Ammoniumsulfat versetzt, 15 min bei 100°C inkubiert, 10 min extrahiert und 2 min bei 250°C desorbiert. Das entwickelte Verfahren war im Konzentrationsbereich von 0,1 – 100 µg/g Blut mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,996$ linear, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen betragen 0,004 bzw. 0,05 µg/g, die relativen Standardabweichungen 10,4 % für die Wiederholbarkeit und 9,2 % für die Vergleichbarkeit. Die Methode wurde erfolgreich an Blut-, Urin- und Gewebeproben von zwei Mordopfern und an einer Blutprobe einer im Straßenverkehr auffällig gewordenen Person getestet, wobei Konzentrationen von 0,6 – 94,4 mg/kg gemessen wurden. Mit der o.a. Nachweisgrenze kann die entwickelte Methode somit als ausreichend sensitiv angesehen werden.

Zur Bestimmung von Pestiziden in biologischen Matrices wurden zwei unterschiedliche Verfahren für den Nachweis von Phosphorsäureestern und chlorierten Kohlenwasserstoffen mit der manuellen SPME entwickelt und validiert. Für die Phosphorsäureester erwiesen sich 15 min Inkubation und 10 min Extraktion bei jeweils 120°C, ein Zusatz von Schwefelsäure und Ammoniumsulfat, 2 min Desorption bei 250°C und 3 cm Eintauchtiefe der Faser in den Injektor als optimal, für die chlorierten Kohlenwasserstoffe stellten 15 min Inkubation und 15 min Extraktion bei jeweils 100°C, ein Zusatz von Schwefelsäure und Ammoniumsulfat, 8 min Desorption bei 220°C und eine Eintauchtiefe von 3,5 cm in den Injektor die Optima dar. Beide Verfahren erwiesen sich mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,987 - 0,998$ (Organophosphate) bzw. $r = 0,990 - 1$ (chlorierte Kohlenwasserstoffe) über die getesteten Konzentrationsbereiche als linear und mit relativen Standardabweichungen von 2,9 – 19,3% (Organophosphate) bzw. 2,8 – 22,3% als ausreichend reproduzierbar. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,01 und 0,3 µg/g (Organophosphate) bzw. 0,02 und 6 ng/g und waren vergleichbar oder niedriger als die in der Literatur beschriebenen Werte.

Ein wichtiger Teilbereich der forensischen Toxikologie ist die Haaranalytik, insbesondere der Nachweis von berauschenden Mitteln. Hierzu wurden kurz die Prinzipien der Haaranalytik erläutert und der Vergleich zu bisherigen Nachweisverfahren in der Haaranalytik gezogen. Mit Hilfe der automatisierten HS-SPME wurden zwei Verfahren zum Nachweis von synthetischen Designerdrogen vom Amphetamin-Typ und zum Nachweis von Cannabinoiden, Methadon, EDDP, Codein und DHC mit Derivatisierung der Analyten auf der Faser (on-fiber derivatisation) entwickelt und validiert. Nach dem Waschen der Haare mit organischen Lösungsmitteln und Wasser erfolgte eine alkalische Hydrolyse mit 10 M NaOH (Amphetamin und synthetische Designerdrogen) bzw. 1 M NaOH (Cannabinoiden, Methadon, EDDP, Codein und DHC) zum Aufschluss der Haarmatrix. Nach der Extraktion der Verbindungen aus dem alkalischen Haarhydrolysat erfolgte die Derivatisierung auf der Faser bei 50°C im Headspace über N-Methyl-bis-trifluoracetamid (Amphetamin und synthetische Designerdrogen) bzw. bei 90°C im Headspace über N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (Cannabinoiden, Methadon, EDDP, Codein, DHC). Die Linearität der Kalibrationskurven war mit Korrelationskoeffizienten von $r > 0,9968$ (Amphetamine und synthetische Designerdrogen) und $r > 0,994$ (Cannabinoiden, Methadon, EDDP, Codein und DHC) gegeben, ebenso die Reproduzierbarkeit mit Werten zwischen 0,3 und 22,4% (Amphetamin und synthetische Designerdrogen) bzw. 1,8 und 16,6% (Cannabinoiden, Methadon, EDDP, Codein und DHC). Die erzielten Nachweisgrenzen von 0,01 – 0,17 ng/mg (Amphetamin und synthetische Designerdrogen) bzw. 0,01 – 1,15 ng/mg (Cannabinoiden, Methadon, EDDP, Codein und DHC) waren mit den in der Literatur beschriebenen vergleichbar oder niedriger. Der Nachweis der Anwendbarkeit auf reale Proben erfolgte anhand der Haarproben von 25 Cannabiskonsumenten.

Die automatisierte HS-SPME ist auch für den Nachweis von trizyklischen Antidepressiva in biologischen Matrices geeignet. Die hierfür optimierte und validierte Methode zeigte mit Korrelationskoeffizienten $r > 0,9993$ sehr gute Linearität über den getesteten Konzentrationsbereich. Weiterhin ist die Methode hinreichend reproduzierbar (RSD 1,9 – 19,6%), empfindlich (NG 0,03 – 0,57 ng/mL) und selektiv.

Ebenfalls mit Hilfe der automatisierten HS-SPME wurde eine Methode zum Nachweis von Injektionsnarkotika in biologischen Matrices entwickelt und validiert. Hierbei erwiesen sich der Zusatz von 1 mL Phosphatpuffer pH 7 und 0,5 g Natriumsulfat, eine 15minütige Inkubation bei 100°C, eine 25minütige Extraktion bei 100°C und eine 1minütige Desorption bei 220°C Injektortemperatur als optimal; die Eintauchtiefen betragen 23 mm (Vial) bzw. 52 mm (Injektor). Mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,9968 und 1,0000 erwies sich die Methode als linear über einen Konzentrationsbereich von 25 bis 4000 ng/mL Blut (Methohexital: 25-5000 ng/mL). Die Reproduzierbarkeit war mit Werten zwischen 4,2 und 23,5% (Präzision) bzw. 0,2 und 20,1% (Genauigkeit) akzeptabel. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 2,18 und 15,57 ng/mL und waren damit im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Die Methode erwies sich als ausreichend selektiv und sensitiv. Die Anwendbarkeit auf reale Proben wurde an Organmaterial zweier Leichen demonstriert.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Headspace-Festphasenmikroextraktion geeignet ist, eine Reihe forensisch-toxikologisch relevanter Verbindungen empfindlich und reproduzierbar nachzuweisen und zu quantifizieren. Während die Extraktion von unpolaren und schwach- bis mittelpolaren Analyten meist problemlos möglich war, konnten polare Substanzen wie z.B. einige Phosphorsäureester, THC-Carbonsäure, Cocain, Morphin, Benzoylcegonin und Derivate des Diazepam mit der Headspace-Technik nicht oder nur äußerst ungenügend erfasst werden.

Durch die Anwendung des automatischen Probengebers CombiPAL konnte der Arbeitsaufwand erheblich vermindert werden, wodurch nicht nur Zeit eingespart, sondern auch personelle Ressourcen anderweitig sinnvoll eingesetzt werden konnten. Weiterhin konnte die Reproduzierbarkeit, im Vergleich zur manuellen SPME, verbessert werden.

Die HS-SPME bietet dem Analytiker somit eine einfache, schnelle und kostengünstige Alternative zu etablierten Extraktionsverfahren.

7 Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Einbindung der Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) als schnelles und Lösungsmittelfreies Extraktionsverfahren in die Routineanalytik eines forensisch-toxikologischen Labors. Dabei sollten die durchgeführten Untersuchungen dazu beitragen, die herkömmlichen zeit- und kostenintensiven Verfahren zur Probenaufarbeitung, wie Flüssig-Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion, nach Möglichkeit zu ersetzen, zumindest aber zu ergänzen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, mit Hilfe der Headspace-Festphasenmikroextraktion in Kombination mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) sensitive und reproduzierbare Analysenverfahren zur Bestimmung verschiedener, für die forensische Toxikologie relevanter Substanzklassen aus biologischen Matrices zu erarbeiten.

Die entwickelten Methoden sind herkömmlichen Extraktionsverfahren sowohl hinsichtlich des Arbeits- und Zeitaufwandes, als auch im Hinblick auf anfallende Kosten und Umweltfreundlichkeit, überlegen. Diese Überlegenheit begründet sich auf der Einfachheit und Schnelligkeit des Verfahrens, die Wiederverwendbarkeit der Faser und den Verzicht auf organische Lösungsmittel.

Durch die Möglichkeit der vollständigen Automatisierung der erarbeiteten Verfahren mit Hilfe des Mehrzweckprobengebers CombiPAL, reduziert sich der Anteil manuell durchzuführender Arbeitsschritte auf das Befüllen der Probengefäße und deren Überführung auf den Probenteller. Dieses führt zu einer Verminderung von Fehlerquellen und kommt somit der Reproduzierbarkeit zugute.

Die Anwendung von Derivatisierungstechniken führt zu einer Erweiterung des nachzuweisenden Substanzspektrums auch auf polarere und schwer flüchtige Substanzen. Der besondere Vorteil der hier verwendeten on-fiber-Derivatisierung liegt in der Möglichkeit der einfachen Automatisierung.

Die Headspace-Festphasenmikroextraktion stellt somit ein schnelles, einfaches und lösungsmittelfreies Verfahren zur Probenaufarbeitung dar, deren besonderer Vorteil in der vollständigen Automatisierbarkeit liegt.

Insbesondere unpolare Verbindungen können empfindlich und reproduzierbar erfasst und quantifiziert werden. Probleme treten hingegen bei der Analyse polarer Substanzen auf, die wegen ihrer geringen Affinität zur PDMS-Beschichtung und ihres niedrigen Dampfdruckes nicht für die hier vorgestellten Headspace-Methoden geeignet sind. Speziell der Nachweis von Cocain und Opiaten, der eine wesentliche Erleichterung in der Routineanalytik mit sich gebracht hätte, war nicht möglich, hier erscheint weiterer Forschungsbedarf notwendig.

Die erzielten Ergebnisse bei der Validierung der einzelnen Methoden erlauben die Einführung der erarbeiteten Verfahren in die Routineanalytik. Die Headspace-Festphasenmikroextraktion stellt somit eine schnelle und kostengünstige Alternative für die etablierten Extraktionsmethoden dar.

8 Literaturverzeichnis

- [1] M. Bogusz, M. Erkens. Influence of Biological Matrix on Chromatographic Behaviour and Detection of Selected Acidic, Neutral and Basic Drugs Examined by Means of a Standardized HPLC-DAD System. *J. Anal. Toxicol.* (1995), 19:49-55.
- [2] I. Rasanen, I. Ojanperä, E. Vuori. Quantitative Screening for Benzodiazepines in Blood by Dual-Column Gas Chromatography and Comparison of the Results with Urine Immunoassay. *J. Anal. Toxicol.* (2000), 24:46-53.
- [3] M. Hok Chi Chu, O.H. Drummer. Determination of Δ^9 -THC in Whole Blood using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* (2002), 26:575-581.
- [4] H. Schütz, J.C. Gotta, F. Erdmann, G. Weiler. Screening und Nachweis von Amphetaminderivaten in biologischem Spurenmaterial. *Forensic Sci. Int.* (2002), 126:191-196.
- [5] K. Buchholz, J. Pawliszyn. Determination of phenols by spme and gc analysis. *J. Env. Sci. Technol.* (1993), 27:2844-2848.
- [6] R. Eisert, K. Levsen. Determination of organophosphorous, triazine, and 2,6-dinitroaniline pesticides in aqueous samples via SPME and GC with NPD-detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* (1995), 351:555-562.
- [7] D.W. Potter, J. Pawliszyn. Detection of substituted benzenes in water at the pg/ml level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr.* (1992), 625:247-255.
- [8] K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn. Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase micro-extraction-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (1996), 754:137-144.
- [9] A.A. Boyd-Boland, J. Pawliszyn. Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Water. *Anal. Chem.* (1996), 68:1521-1529.
- [10] A.-L. Nguyen, J.H.T. Luong. Separation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by solid phase microextraction/cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* (1997), 69:1726-1731.
- [11] C. Arthur, D. Potter, K. Buchholz, S. Motlagh, L. Killam, J. Pawliszyn. Solid-phase microextraction for the direct analysis of water. Theory and practice. *LC-GC* (1992), 10:656-661.
- [12] C. Arthur, D. Potter, M. Lim, S. Motlagh, L. Killam, J. Pawliszyn. Analysis of substituted benzene compounds in groundwater using spme. *J. Env. Sci. Technol.* (2000), 26:979-983.
- [13] J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller. Quantitative analysis of fuel-related hydrocarbons in surface water and wastewater samples by solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* (1996), 68:144-155.
- [14] M.T. Sng, F.K. Lee, H.A. Lakso. Solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from water. *J. Chromatogr. A* (1997), 759:225-230.
- [15] J. Beltran, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez. Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* (1998), 808:257-263.

- [16] B.L. Wittkamp, S.B. Hawthorne, D.C. Tilotta. Determination of Aromatic Compounds in Water by Solid Phase Microextraction and Ultraviolet Absorption Spectroscopy. 1. Methodology. *Anal. Chem.* (1997), 69:1197-1203.
- [17] B.L. Wittkamp, S.B. Hawthorne, D.C. Tilotta. Determination of Aromatic Compounds in Water by Solid Phase Microextraction and Ultraviolet Absorption Spectroscopy. 2. Application to Fuel Aromatics. *Anal. Chem.* (1997), 69:1204-1210.
- [18] B.L. Wittkamp, D.C. Tilotta. Determination of BTEX Compounds in Water by Solid-Phase Microextraction and Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* (1995), 67:600-605.
- [19] T. Górecki, J. Pawliszyn. Determination of Tetraethyllead and Inorganic Lead in Water by Solid Phase Microextraction/Gas Chromatography. *Anal. Chem.* (1996), 68:3008-3014.
- [20] M. Möder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp. Determination of phenolic compounds in waste water by solid-phase micro extraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* (1997), 357:326-332.
- [21] L. Müller, E. Fattore, E. Benfenati. Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples. *J. Chromatogr. A* (1997), 791:221-230.
- [22] A.A. Boyd-Boland, S. Magdic, J.B. Pawliszyn. Simultaneous Determination of 60 Pesticides in Water Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatograph-Mass Spectrometry. *Analyst* (1996), 121:929-937.
- [23] X.-P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato. A simple analysis of 5 thinner components in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME). *Int. J. Legal Med.* (1995), 107:310-313.
- [24] A. Namera, M. Yashiki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, T. Kojima. Rapid analysis of malathion in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Sci. Int.* (1997), 88:125-131.
- [25] S. Ulrich, S. Kruggel, H. Weigmann, C. Hiemke. Fishing for a drug: solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma. *J. Chromatogr. B* (1999), 731:231-240.
- [26] C. Battu, P. Marquet, A.L. Fauconnet, E. Lacassie, G. Lachâtre. Screening Procedure for 21 Amphetamine-Related Compounds in Urine Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* (1998), 36:1-7.
- [27] I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka. Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr. B* (1998), 707:99-104.
- [28] N. Nagasawa, M. Yashiki, Y. Iwasaki, K. Hara, T. Kojima. Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Sci. Int.* (1996), 78:95-102.
- [29] F. Centini, A. Masti, I.B. Comparini. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by headspace/solid phase micro extraction (SPME) GC/MS. *Forensic Sci. Int.* (1996), 83:161-166.

- [30] A. Namera, T. Watanabe, M. Yashiki, Y. Iwasaki, T. Kojima. Simple Analysis of Tetracyclic Antidepressants in Blood using Headspace-Solid-Phase Microextraction and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* (1998), 22:396-400.
- [31] K.J. Reubsaet, H.R. Norli, P. Hemmersbach, K. Rasmussen. Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase micro extraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experetermination of benimental design strategies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1998), 18:667-680.
- [32] F. Guan, H. Seno, A. Ishii, K. Watanabe, T. Kumazawa, H. Hattori. O. Suzuki. Solid-Phase Microextraction and GC-ECD of Benzophenones for Detection of Benzodiazepines in Urine. *J. Anal. Toxicol.* (1999), 23:54-61.
- [33] D. Poli, E. Bergamaschi, P. Manini, R. Andreoli, A. Mutti. Solid-phase microextraction gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of inhalation anesthetics in urine. *J. Chromatogr. B* (1999), 732:115-125.
- [34] K. Okajima, A. Namera, M. Yashiki, I. Tsukue, T. Kojima. Highly sensitive analysis of methamphetamine and amphetamine in human whole blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* (2001), 116:15-22.
- [35] H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen. Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatisation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1999), 19:463-475.
- [36] B.J. Hall, A.R. Parikh, J.S. Brodbelt. Aqueous phase hexylchloroformate derivatization and solid phase microextraction: Determination of benzoylecgonine in urine by gas chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Forensic Sci.* (1999), 44: 527-534.
- [37] A. Namera, M. Yashiki, J. Liu, K. Okajima, K. Hara, K. Imamura, T. Kojima. Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry after headspace-solid phase microextraction and derivatization. *Forensic Sci. Int.* (2000), 109:215-223.
- [38] C.C. Camarasu, M. Mezei-Szűts, G.B. Varga. Residual solvents determination in pharmaceutical products by GC-HS and GC-MS-SPME. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1998), 18:623-638.
- [39] A.L. Simplício, L.V. Boas. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A* (1999), 833:35-42.
- [40] A.J. Matich, D.D. Rowan, N.H. Banks. Solid Phase Microextraction for Quantitative Headspace Sampling of Apple Volatiles. *Anal. Chem.* (1996), 68:4114-4118.
- [41] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell. Solvent Microextraction into a Single Drop. *Anal. Chem.* (1996), 68:2236-2240.
- [42] E.C. Goosens, D. De Jong, G.J. De Jong, U.A.T. Brinkmann. A Continuous Liquid-Liquid Extraction System Coupled On-line with Capillary Gas Chromatography for Environmental and Ecotoxicological Analysis. *J. High Resol. Chromatogr.* (1997), 20:325-332.

- [43] T.L.Chester, J.D. Pinkston, D.E. Raynie. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. *Anal. Chem.* (1996), 68:487R-514R.
- [44] S.-M. Wang, Y.-S. Giang, Y.-C. Ling. Simultaneous supercritical fluid extraction and chemical derivatization for the gas chromatographic, isotope dilution mass spectrometric determination of amphetamine and methamphetamine in urine. *J. Chromatogr. B* (2001), 759:17-26.
- [45] D.J.Brown, W.C. Long. Quality Control in Blood Alcohol Analysis: Simultaneous Quantitation and Confirmation. *J. Anal. Toxicol.* (1988), 12:279-283.
- [46] R.C. Charlebois, M.R. Corbett, J.G. Wigmore. Comparison of Ethanol Concentrations in Blood, Serum, and Blood Cells for Forensic Application. *J. Anal. Toxicol.* (1996), 20:171-178.
- [47] H. Ise, K. Kudo, N. Jitsufuchi, T. Imamura, N. Ikeda. Simple and rapid determination of enflurane in human tissues using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1997), 698:97-102.
- [48] J. Schuberth. Post-mortem test for low-boiling arson residues of gasoline by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (1994), 662:113-117.
- [49] R.P. Belardi, J. Pawliszyn. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. *Water Pollution Res. J. Can.* (1989), 24:179-191.
- [50] S. Magdic, J. Pawliszyn. Analysis of Organochlorine pesticides using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* (1996), 723:111-122.
- [51] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea. Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). *Clin. Chem. Lab. Med.* (1999), 37:639-642.
- [52] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea. Rapid analysis of halothane in biological samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry – a case of a double homicide. *J. Anal. Toxicol.* (2000), 24:372-376.
- [53] B.J. Hall, J.S. Brodbelt. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (1997), 777:275-282.
- [54] R. Eisert, J. Pawliszyn. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* (1997), 69:3140-3147.
- [55] S. Li, S.G. Weber. Determination of Barbiturates by Solid-Phase Microextraction and Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* (1997), 69:1217-1222.
- [56] L. Moens, T. De Smaele, R. Dams, P. Van Den Broeck, P. Sandra. Sensitive, Simultaneous Determination of Organomercury, -lead, and -tin Compounds with Headspace Solid Phase Microextraction Capillary Gas Chromatography Combined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* (1997), 69:1604-1611.
- [57] S. Tutschku, S. Mothes, R. Wennrich. Preconcentration and determination of Sn- and Pb-organic species in environmental samples by SPME and GC-AED. *Fresenius J. Anal. Chem* (1996), 354:587-591.
- [58] R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch. Element-selective detection of pesticides by gas chromatography-atomic emission detection and solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* (1994), 683:175-183.

- [59] R. Eisert, K. Levsen. Determination of Pesticides in Aqueous Samples by Solid-Phase Microextraction In-Line Coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (1995), 6:1119-1130.
- [60] A.C.S. Lucas, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, P. Fernández, S. Strano-Rossi. Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci. Int.* (2000), 107:225-232.
- [61] F. Sporkert, F. Pragst. Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* (2000), 746:255-264.
- [62] F. Sporkert, F. Pragst. Determination of Lidocaine in Hair of Drug Fatalities by Headspace Solid-Phase Microextraction. *J. Anal. Toxicol.* (2000), 24:316-322.
- [63] S. Strano-Rossi, M. Chiarotti. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *J. Anal. Toxicol.* (1999), 23:7-10.
- [64] B.J. Hall, M. Satterfield-Doerr, A.R. Parikh, J.S. Brodbelt. Determination of cannabinoids in water and human saliva by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* (1998), 70:1788-1796.
- [65] T. Kumazawa, K. Watanabe, K. Sato, H. Seno, A. Ishii, O. Suzuki. Detection of cocaine in human urine by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection. *Jpn. J. Forensic Toxicol.* (1995), 13:207-210.
- [66] F. Sporkert, F. Pragst. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Sci. Int.* (2000), 107:129-148.
- [67] A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, M. Nishikawa, K. Watanabe, H. Hattori, O. Suzuki. Simple clean-up of methamphetamine and amphetamine in human urine by direct-immersion solid-phase microextraction (DI-SPME). *Jpn. J. Forensic Toxicol.* (1996), 14:228-232.
- [68] H.L. Lord, J. Pawliszyn. Method Optimization for the Analysis of Amphetamines in Urine by Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* (1997), 69:3899-3906.
- [69] S.-W. Myung, H.-K. Min, S. Kim, K. Kim, J.-B. Cho, T.-J. Kim. Determination of amphetamine, methamphetamine and dimethamphetamine in Human Urine by Solid-Phase Microextraction (SPME)-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* (1998), 716:359-365.
- [70] M. Yashiki, T. Kojima, T. Miyazaki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, K. Hara. Detection of amphetamines in urine using headspace solid-phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring. *Forensic Sci. Int.* (1995), 76:169-177.
- [71] C. Jurado, M.P. Giménez, T. Soriano, M. Menéndez, M. Repetto. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* (2000), 24:11-16.
- [72] F. Sporkert, F. Pragst. Analysis of amphetamines and other basic drugs in hair by combined alkaline digestion, headspace solid-phase microextraction and derivatization. *Proceedings of 38th TIAFT International Meeting, Tallinna Raamatutrukikoja, Helsinki, Finland, (2000), S. 429-439.*

- [73] Z. Zhang, J. Pawliszyn. Quantitative Extraction Using an Internally Cooled Solid Phase Microextraction Device. *Anal. Chem.* (1995), 67:34.
- [74] J. Pawliszyn. *Solid Phase Microextraction – Theory and Practice*, Wiley-VCH New York, USA (1997).
- [75] Z. Zhang, J. Pawliszyn. Headspace Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* (1993), 65:1843-1852.
- [76] M. Chai, J. Pawliszyn. Analysis of Environmental Air Samples by Solid Phase MicroExtraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol* (1995), 29:693-701.
- [77] C.Grote, J. Pawliszyn. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Human Breath. *Anal. Chem.* (1997), 69:587-596.
- [78] J.-Y. Horng, S.-D. Huang. Determination of the Semi-volatile Compounds Nitrobenzene, Isophorone, 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene in Water Using Solid-Phase Microextraction with Polydimethylsiloxane-Coated Fibre. *J. Chromatogr. A* (1994), 678:313-318.
- [79] Z. Zhang, J. Poerschmann, J. Pawliszyn. Direct Solid Phase Microextraction of Complex Aqueous Samples With Hollow Fibre Membrane Protection. *Anal. Comm.* (1996), 33:219-222.
- [80] B. Cancho, F. Ventura, M.T. Galceran. Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorbenzylhydroxylamine derivatization and solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* (2002), 943:1-13.
- [81] G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal. Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids. *J. Chromatogr. B Biomed Sci Appl.* (1999), 730:113-122.
- [82] L. Pan, J. Pawliszyn. Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes. *Anal. Chem.* (1997), 69:196-205.
- [83] J.A. Chen, J. Pawliszyn. Solid Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* (1995), 67:2530-2533.
- [84] M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn. Characterization of water-soluble components of slurries using solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Microcolumn Sep.* (1998), 10:225-234.
- [85] Y. Hirata, J. Pawliszyn. Solvent-Free Sample Introduction for Supercritical Fluid Chromatography Using Polymer Coated Fibres. *J. Microcolumn Sep.* (1994), 6:443-447.
- [86] A. Medvedovici, P. Sandra, F. David. Construction of an Interface for SPME-PCSF. *J. High Resol. Chromatogr.* (1997), 20:619-620.
- [87] D.L. Heglund, D.C. Tilotta. Determination of Volatile Organic Compounds in Water by Solid Phase Microextraction and Infrared Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* (1996), 30:1212-1219.
- [88] Y. Cai, S. Monsalud, K.G. Furton, R. Jaffe, R.D. Jones. Determination of methylmercury in fish and aqueous samples using solid-phase microextraction followed by gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Appl. Organometal. Chem.* (1998), 12:565-569.

- [89] B. Rosenkranz, J. Bettmer, W. Buscher, C. Breer, K. Cammann. The behaviour of different organometallic compounds in the presence of inorganic mercury(II): transalkylation of mercury species and their analysis by the GC-MIP-PED system. *Appl. Organometal. Chem.* (1997), 11:721-725.
- [90] B. Shirey. Vortrag zum Thema „SPME Adsorption Versus Absorption: Which Fiber Type is Best for Your Application? PITTCON 2000.
- [91] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn. Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers. *Anal. Chem.* (1992), 64 (10):1187-1199.
- [92] J. Ai. Headspace Solid Phase Microextraction. Dynamics and Quantitative Analysis before Reaching a Partition Equilibrium. *Anal. Chem.* (1997), 69:3260-3266.
- [93] H. Lord, J. Pawliszyn. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A.* (2000), 885:153-193.
- [94] J. Ai. Solid Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Anal. Chem.* (1997), 69:1230-1236.
- [95] H. Geppert. Solid-Phase Microextraction with Rotation of the Microfiber. *Anal. Chem.* (1998), 70:3981-3982.
- [96] J. Dewulf, H. Van Langenhove, M. Everaert. Solid-phase microextraction of volatile organic compounds Estimation of the sorption equilibrium from the Kováts index, effect of salinity and humic acids and the study of the kinetics by the development of an „agitated/static layer“ model. *J. Chromatogr. A* (1997), 761:205-217.
- [97] B. Kolb. *Headspace-Gaschromatographie mit Kapillar-Trennsäulen.* Würzburg, Deutschland, Vogel-Verlag, 1986.
- [98] T. Górecki, J. Pawliszyn. Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction. Part 1. Theoretical considerations. *Analyst* (1997), 122:1079-1086.
- [99] M. Oehme. *Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen.* Hüthig Verlag Heidelberg, 1996.
- [100] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2. Auflage 1992.
- [101] G. Kauert, L.V. Meyer, I. Herrle. Drogen- und Medikamentennachweis in Kopfhair ohne Extraktion des Haaraufschlusses, mittels GC-MS. *Z. Rechtsmed.* (1992), 38:33.
- [102] W. Lindner, I.W. Wainer. Requirements for initial assay validation and publication in *J. Chromatography B.* *J. Chromatogr. B* (1998), 707:1-2.
- [103] M. Herbold, G. Schmitt. B.E.N. – Programm zur Berechnung der Bestimmungsgrenze, Erfassungsgrenze und Nachweisgrenze nach DIN 32645 © (1998). Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg.
- [104] A.C. Moffat, J.V. Jackson, M.S. Moss, B. Widdop. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs.* The Pharmaceutical Press, London, England, 1986.
- [105] A.W. Quail. Modern inhalational anaesthetic agents. A review of halothane, isoflurane and enflurane. *Med. J. Aust.* (1989), 150:95-102.
- [106] R.L. Carpenter, E.I. Eger II, B.H. Johnsson, J.D. Unadkat, L.B. Sheiner. The extend of metabolism of inhaled anaesthetics in humans. *Anaesthesiology* (1986), 65:201-205.

- [107] R.E. Chase, D.A. Holaday, V. Fiserova-Bergerova, L.J. Saidman, F.E. Mack. The biotransformation of Ethrane® in man. *Anaesthesiology* (1971), 35:262-267.
- [108] J. Hobbhahn, P. Conzen, H. Forst, K. Peter. Influence of inhalation anesthetics on the myocardium. *Anaesthesist* (1989), 38:561-596.
- [109] G. Smith. Halothane in clinical practice. *Br. J. Anaesth.* (1981), 53:17-25.
- [110] J.M. Bland, J. Taylor. Deaths from accidental drug poisoning in teenagers. Deaths due to volatile substance misuse are greatly underestimated. *BMJ* (1998), 316:146.
- [111] T.L. Kurtzman, K.N. Otsuka, R.A. Wahl. Inhalant abuse by adolescents. *Adolesc. Health* (2001), 28:170-180.
- [112] F.B. Walker, R.A. Morano. Fatal Recreational Inhalation of Enflurane. *J. Forensic Sci.* (1990), 35:197-198.
- [113] R.W. Lingenfelter. Fatal Misuse of Enflurane. *Anesthesiology* (1981), 55:603.
- [114] B. Jacob, C. Heller, T. Daldrup, K.F. Bürrig, J. Barz, W. Bonte. Fatal Accidental Enflurane Intoxication. *J. Forensic Sci.* (1989), 34:1408-1412.
- [115] M. Yamashita, A. Matsuki, T. Oyama. Illicit use of modern volatile anaesthetics. *Can. Aneasth. Soc. J.* (1984), 31:76-79.
- [116] A.M. Weeks, M.R. Buckland, E.B. Morgan, P.S. Myles. Chemical Dependence in Anaesthetic Registrars in Australia and New Zealand. *Anaesth. Intens. Care* (1993), 21:151-155.
- [117] I. Lutsky, M. Hopwood, S.E. Abram, J.M. Cerletty, R.G. Hoffman, J.P. Kampine. Use of psychoactive substances in three medical specialties: anaesthesia, medicine and surgery. *Can. J. Anaesth.* (1994), 41:561-567.
- [118] C.B. Berry, I.B. Crome, M. Plant. Substance misuse amongst anaesthetists in the United Kingdom and Ireland. The results of a study commissioned by the Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland. *Anaesthesia* (2000), 55:946-952.
- [119] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea. An unusual case of driving under the influence of enflurane. *Forensic Sci. Int.* (2002), 128:187-189.
- [120] P. Berman, M. Tattersall. Self-poisoning with intravenous halothane. *Lancet* (1982), 1:340.
- [121] S. Block, R. Rosenblatt. A halothane-abuse fatality. *Anaesthesiology* (1980), 52:524.
- [122] B. Randall, B. Corbett. Fatal Halothane Poisoning During Anaesthesia with Other Agents. *J. Forensic Sci.* (1982), 27:225-230.
- [123] A.E. Spencer, N.M. Green. Suicide by ingestion of halothane. *J. Am. Med. Assoc.* (1968), 168:702-703.
- [124] I.M. Corall, K.M. Knights, L. Strunin. Enflurane (Ethane®) anaesthesia in man. Metabolism and effects on biochemical and haematological variables. *Br. J. Anaesth.* (1977), 49:881-885.
- [125] W.E. Brewer, R.C. Galipo, S.L. Morgan, K.H. Habben. The confirmation of volatiles by solid-phase microextraction and GC-MS in the investigation of two traffic fatalities. *J. Anal. Toxicol.* (1997), 21:286-290
- [126] L.A. Broussard, T. Brustowicz, T. Pittman, K.D. Atkins, L. Presley. Two traffic fatalities related to the use of Difluorethan. *J. Forensic Sci.* (1997), 42:1186-1187.
- [127] H. Gjerde, A. Smith-Kielland, P.T. Normann, J. Mørland. Driving under the influence of toluene. *Forensic Sci. Int.* (1990), 44:77-83.

- [128] I. Kaur, R.P. Mathur, S.N. Tandon, P. Dureja. Identification of metabolites of Malathion in plant, water and soil by GC-MS. *Biomed. Chromatogr.* (1997), 11:352-355.
- [129] I. Tolosa, B. Douy, F.P. Carvalho. Comparison of the performance of graphitized carbon black and poly(styrene-divinylbenzene) cartridges for the determination of pesticides and industrial phosphates in environmental waters. *J. Chromatogr. A* (1999), 864:121-136.
- [130] M. Psathaki, E. Manoussaridou, E.G. Stephanou. Determination of organophosphorus and triazine pesticides in ground- and drinking water by solid-phase extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus or mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* (1994), 667:241-248.
- [131] C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé. Identification of pesticides by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry using electron ionization and chemical ionization. *J. Chromatogr. A* (1998), 805:127-135.
- [132] F.J. Schenck, R. Wagner, M.K. Hennessy, J.L. Okrasinski Jr.. Screening Procedure for Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues in Eggs using a Solid-Phase Extraction Cleanup and Gas Chromatographic Detection. *J. AOAC Int.* (1994), 77:1036-1140.
- [133] D.A. Bennett, A.C. Chung, S.M. Lee. Multiresidue method for analysis of pesticides in liquid whole milk. *J. AOAC Int.* (1997), 80:1065-1077.
- [134] R.E. Baynes, J.M. Bowen. Rapid Determination of Methyl Parathion and Methyl Paraoxon in Milk by Gas Chromatography with Solid-Phase-Extraction and Flame Photometric Detection. *J. AOAC Int.* (1995), 78:812-815.
- [135] A. Di Muccio, P. Pelosi, I. Camoni, D.A. Barbini, R. Dommarco, T. Generali, A. Ausili. Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. *J. Chromatogr. A* (1996), 754:497-506.
- [136] A.M. Gillespie, S.L. Daly, D.M. Gilvydis, F. Schneider, S.M. Walters. Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup of Organophosphorus and Organochlorine Pesticide Residues in Vegetable Oils and Butterfat. *J. AOAC Int.* (1995), 78:431-437.
- [137] T.F. Moate, C. Lu, R.A. Fenske, R.M.A. Hahne, D.A. Kalman. Improved Cleanup and Determination of Dialkyl Phosphates in the Urine of Children Exposed to Organophosphorus Insecticides. *J. Anal. Toxicol.* (1999), 23:230-236.
- [138] C. Aprea, G. Sciarra, L. Lunghini. Analytical Method for the Determination of Urinary Alkylphosphates in Subjects Occupationally Exposed to Organophosphorus Pesticides and in the General Population. *J. Anal. Toxicol.* (1996), 20:559-563.
- [139] J. Liu, O. Suzuki, T. Kumazawa, H. Seno. Rapid isolation with SEP-PAK C₁₈ cartridges and wide-bore capillary gas chromatography of organophosphate pesticides. *Forensic Sci. Int.* (1989), 41:67-72.
- [140] F.A. Tarbah, T. Daldrup, O. Temme. "Sensitive Determination of Prathion Ethyl and Other Phosphorous Esters in Blood and Other Biological Specimens". In *GTFCh-Symposium 1999*. F. Pragst und R. Aderjan, Eds Verlag Dr. D. Helm, Heppenheim, Deutschland (1999) S. 184-190.
- [141] T. Kojima, M. Yashiki, T. Miyazaki, F. Chikasue, M. Ohtani. Detection of S-methylfenitrothion, aminofenitrothion, aminofenitroxon and acetylaminofenitroxon in the urine of a fenitrothion intoxication case. *Forensic Sci. Int.* (1989), 41:245-253.

- [142] V.K. Sharma, R.K. Jadhav, G.J. Rao, A.K. Saraf, H.Chandra. High performance liquid chromatographic method for the analysis of organophosphorus and carbamate pesticides. *Forensic Sci. Int.* (1990), 48:21-25.
- [143] Y. Cho, N. Matsuoka, A. Kamiya. Determination of Organophosphorus Pesticides in Biological Samples of Acute Poisoning by HPLC with Diode-Array Detector. *Chem. Pharm. Bull.* (1997), 45:737-740.
- [144] S. Kawasaki, H. Ueda, H. Itoh, J. Tadano. Screening of organophosphorus pesticides using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* (1992), 595:193-202.
- [145] K. Futagami, C. Narazaki, Y. Kataoka, H. Shuto, R. Oishi. Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning. *J. Chromatogr. B* (1997), 704:369-373.
- [146] P.L. Wylie, K. Uchiyama. Improved gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides with pulsed splitless injection. *J. AOAC Int.* (1996), 79:571-577.
- [147] K. Futagami, K. Otsubo, Y. Nakao, T. Aoyama, E. Imori, S. Urakami, M. Ide, R. Oishi. Acute Organophosphate Poisoning After Disulfoton Ingestion. *Clin. Toxicol.* (1995), 33:151-155.
- [148] T.S. Thompson, R.G. Treble, A. Magliocco, J.R. Roettger, J.C. Eichhorst. Case study: fatal poisoning by Malathion. *Forensic Sci. Int.* (1998), 95:89-98.
- [149] Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Orientierende Angaben zu therapeutischen und toxischen Konzentrationen von Arzneimitteln und Giften in Blut, Serum oder Urin. Mitteilung XV der Senatskommission für Klinisch-toxikologische Analytik. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, 1990.
- [150] J.W. Brock, V.W. Burse, D.L. Ashley, A.R. Najam, V.E. Green, M.P. Korver, M.K. Powell, C.C. Hodge, L.L. Needham. An Improved Analysis for Chlorinated Pesticides and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Human and Bovine Sera Using Solid-Phase Extraction. *J. Anal. Toxicol* (1996), 20:528-536.
- [151] G. Gallelli, S. Mangini, C. Gerbino. Organochlorine Residues In Human Adipose And Hepatic Tissues from Autopsy Sources in Northern Italy. *J. Toxicol. Environ. Health* (1995), 46:293-300.
- [152] R. Kronstrand, R. Grundin, J. Jonsson. Incidence of opiates, amphetamines, and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose. *Forensic Sci. Int.* (1998), 92:29-38.
- [153] R.L. DuPont, W.A. Baumgartner. Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues. *Forensic Sci. Int.* (1995), 70:63-76.
- [154] F. Tagliaro, Z. De Battisti, G. Lubli, C. Neri, G. Manetto, M. Marigo. Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving licence: a casework study. *Forensic Sci. Int.* (1997), 84:129-135.
- [155] M. Deveaux, P. Kintz, J.-P. Goullé, J. Bessard, G. Pépin, D. Gosset. The hair analysis proficiency testing program of the French Society of Analytical Toxicology. *Forensic Sci. Int.* (2000), 107:389-394.
- [156] P. Kintz, P. Mangin. What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values. *Forensic Sci. Int.* (1995), 70:3-11.

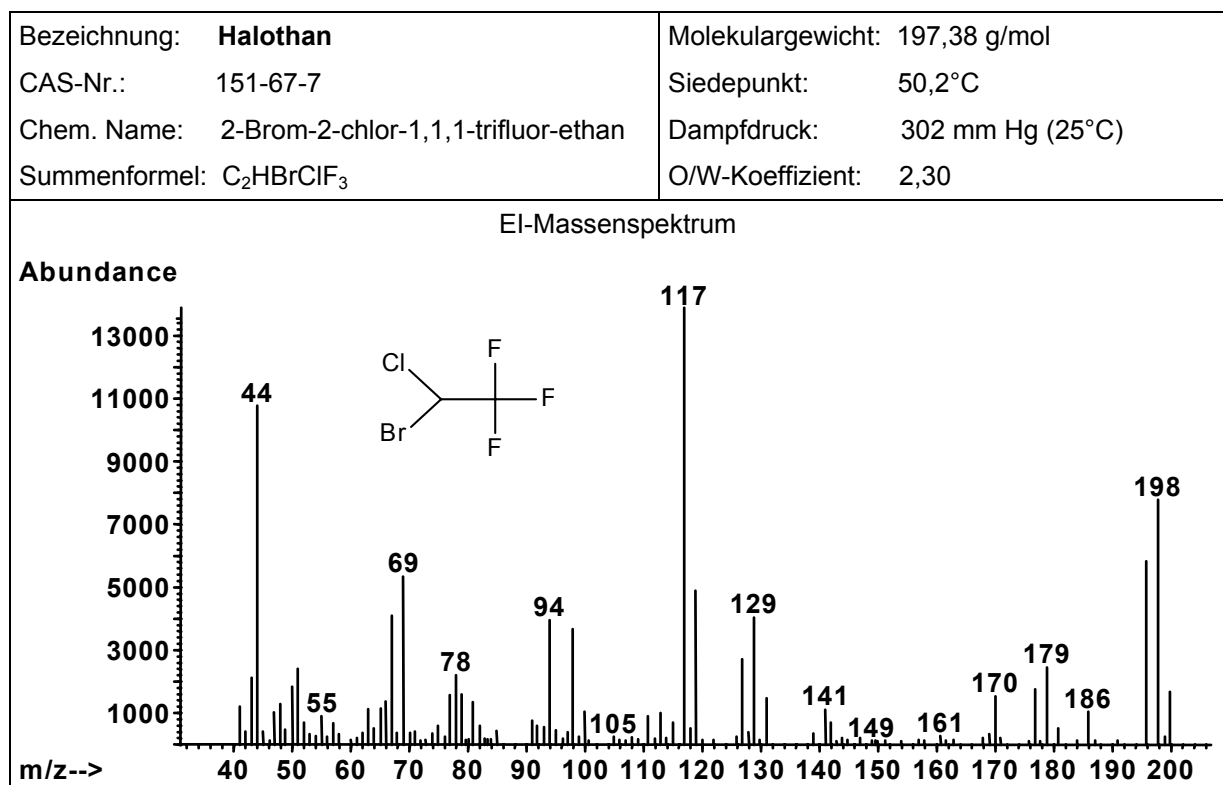
- [157] C. Jurado, M.P. Giménez, M. Menéndez, M. Repetto. Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci. Int.* (1995), 70:165-174.
- [158] Y. Nakahara, R. Kikura. Hair analysis for drugs of abuse XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Arch. Toxicol.* (1996), 70:841-849.
- [159] M. Yegeles, F. Mersch, R. Wennig. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forensic Sci. Int.* (1997), 84:211-218.
- [160] G.L. Henderson. Mechanism of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* (1993), 63:19-29.
- [161] L. Pötsch, G. Skopp, M.R. Möller. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: VI. Mögliche Einflüsse der Hautfunktionen. *Rechtsmedizin* (1997), 8:2-6.
- [162] T. Mieczkowski. Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Sci. Int.* (1997), 84:87-111.
- [163] W.L. Wang, E.J. Cone. Testing human hair for drugs of abuse.IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. *Forensic Sci. Int.* (1995), 70:39-51.
- [164] G. Koren, J. Klein, R. Forman, K. Graham. Hair Analysis of Cocaine: Differentiation Between Systemic Exposure and External Contamination. *J. Clin. Pharmacol.* (1992), 32:671-675.
- [165] W.A. Baumgartner, V.A. Hill. Hair analysis for drugs of abuse: Decontamination issue. Paper. NIDA-conference on hair (1990), Conference Proceeding.
- [166] W.A. Baumgartner, V.A. Hill. Sample preparation techniques. *Forensic Sci. Int.* (1993), 63:121-135.
- [167] § 5 der Verordnung über das Verschreiben, die Abgabe und den Nachweis des Verbleibs von Betäubungsmitteln (Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung - BtmVV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 16.09.1993 (BGBl I S. 1637), zuletzt geändert durch das 15. BtMÄndG vom 19.01.2001
- [168] O. Quintela, A.M. Bermejo, M.J. Taberner, S. Strano-Rossi, M. Chiarotti, A.C.S. Lucas. Evaluation of cocaine, amphetamines, and cannabis use in university students through hair analysis: preliminary results. *Forensic Sci. Int.* (2000), 107:273-279.
- [169] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Sci.* (1992), 81:309-312.
- [170] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 7. Auflage, 1996.
- [171] M. Rothe, F. Pragst, K. Spiegel, T. Harrach, K. Fischer, J. Kunkel. Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. *Forensic Sci. Int.* (1997), 89:111-128.
- [172] D. Badenhorst, F.C. Sutherland, A.D. de Jager, T. Scanes, H.K. Hundt, K.J. Swart, A.F. Hundt. Determination of doxepin and desmethyldoxepin in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* (2000), 742:91-98.

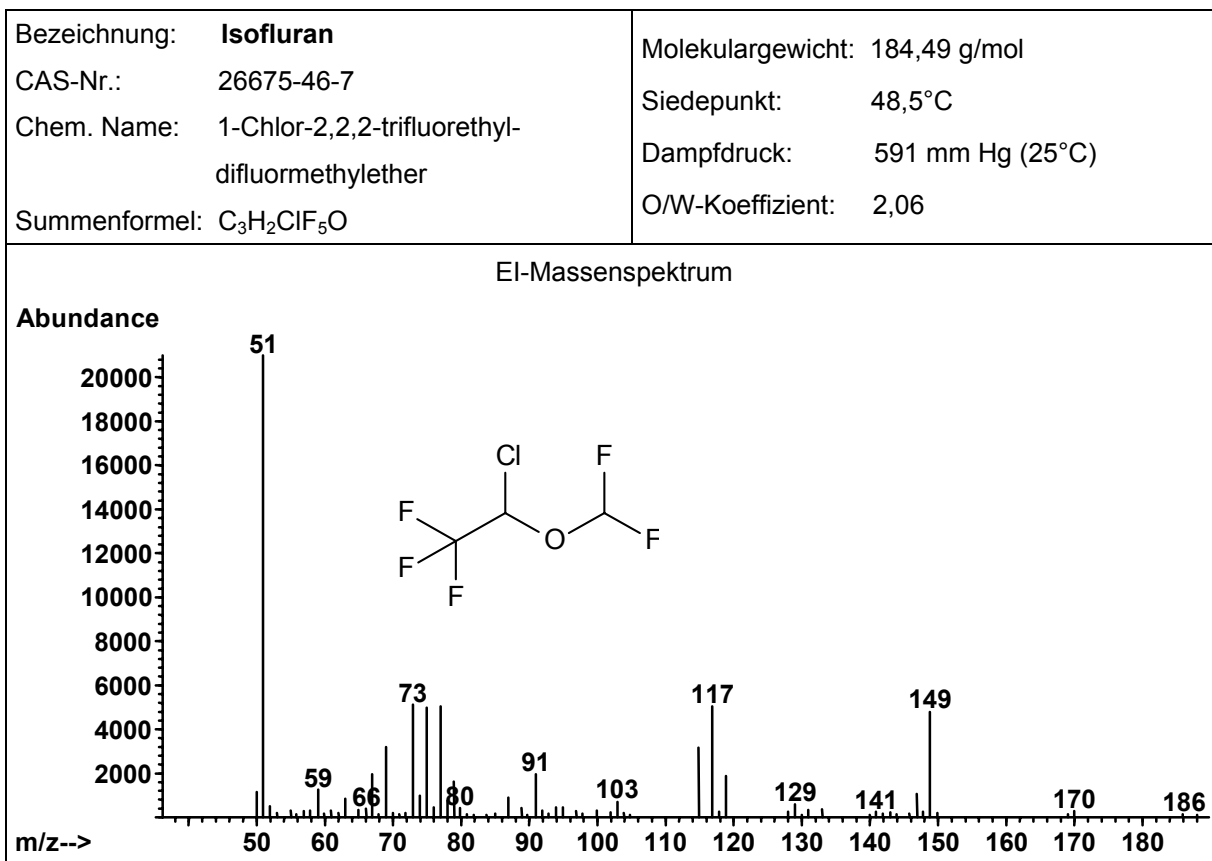
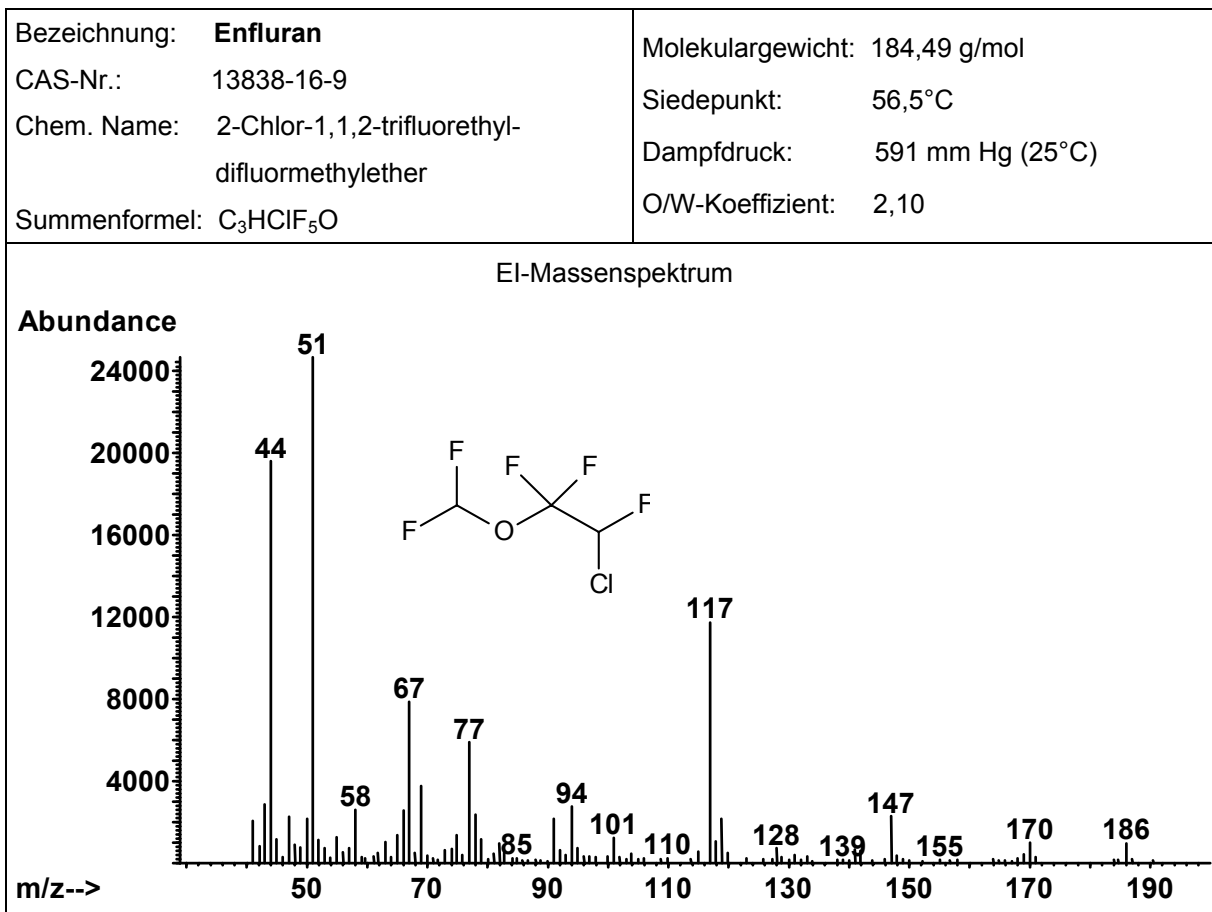
-
- [173] M.L. Rao, U. Staberock, P. Baumann, C. Hiemke, A. Deister, C. Cuendet, M. Amey, S. Hartter, M. Krämer. Monitoring tricyclic antidepressant concentrations in serum by fluorescence polarization immunoassay compared with gas chromatography and HPLC. *Clin. Chem.* (1994), 40:929-933.
- [174] I.M. McIntyre, C.V. King, S. Skafidis, O.H. Drummer. Dual ultraviolet wavelength high-performance liquid chromatographic method for the forensic or clinical analysis of seventeen antidepressants and some selected metabolites. *J. Chromatogr.* (1993), 621:215-223.
- [175] D. Simpson, R.A. Braithwaite, D.R. Jarvie, M.J. Stewart, S. Walker, I.W. Watson, B. Widdop. Screening for drugs of abuse (II): cannabinoids, lysergic acid diethylamide, buprenorphine, methadone, barbiturates, benzodiazepines and other drugs. *Ann. Clin. Biochem.* (1997), 34:460-510.
- [176] J. Martens-Lobenhoffer. Stability of thiopental und pentobarbital in human plasma determined with a new easy and specific gas chromatography-mass spectrometry assay. *Pharmazie* (1999), 54:597-599.
- [177] J. Hallbach, L. von Meyer, H.H. Maurer. Empfehlungen des Arbeitskreises Klinische Toxikologie der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung. *T + K* (2002), 124-127.
- [178] E. Mutschler. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Auflage 1996, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

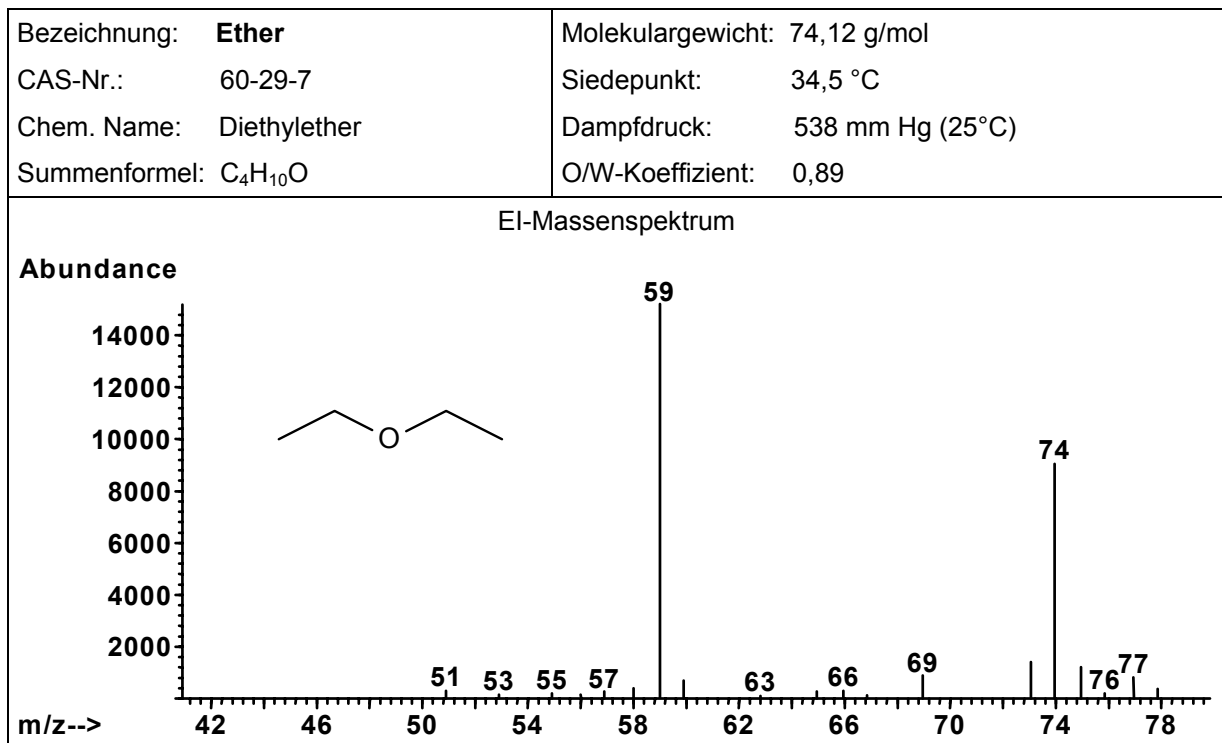
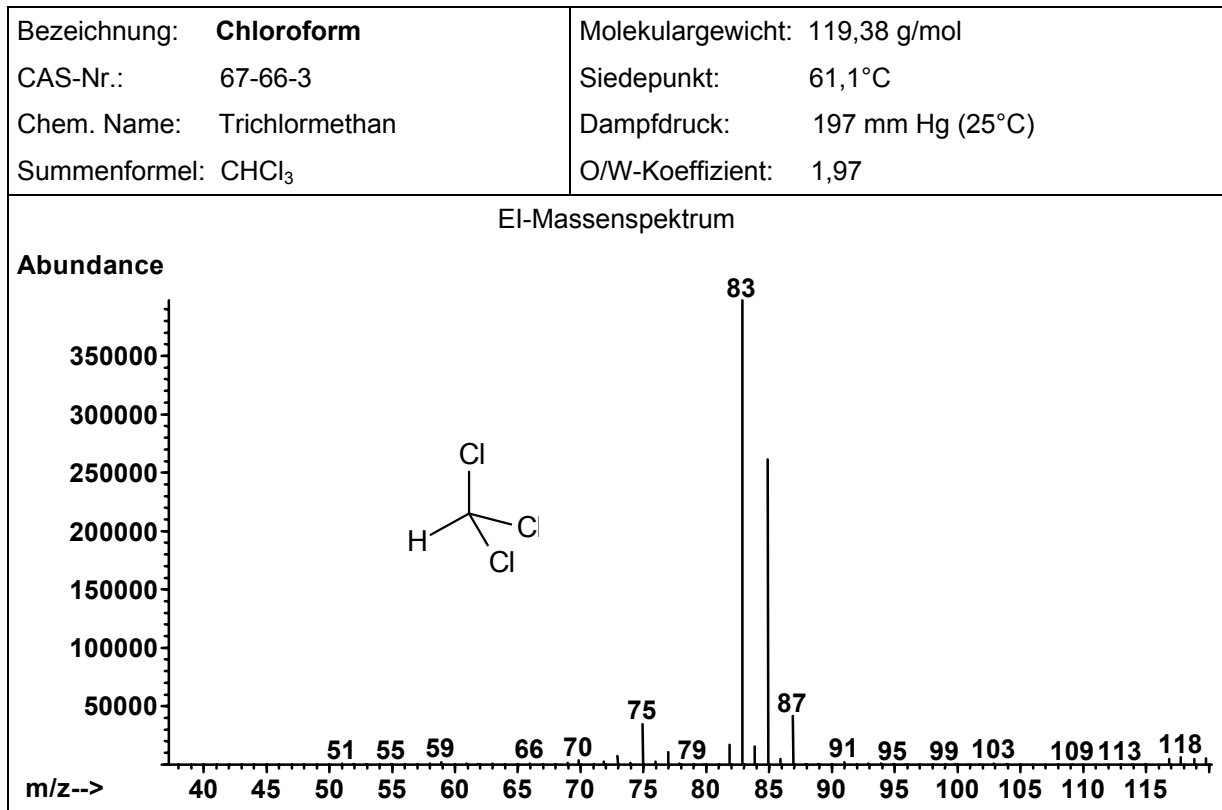
9 Anhang

Im Folgenden sind die EI-Massenspektren, Strukturformeln und einige für die Methodenoptimierung nützliche physikalische Daten aller untersuchten Verbindungen aufgeführt.

9.1 Inhalationsnarkotika

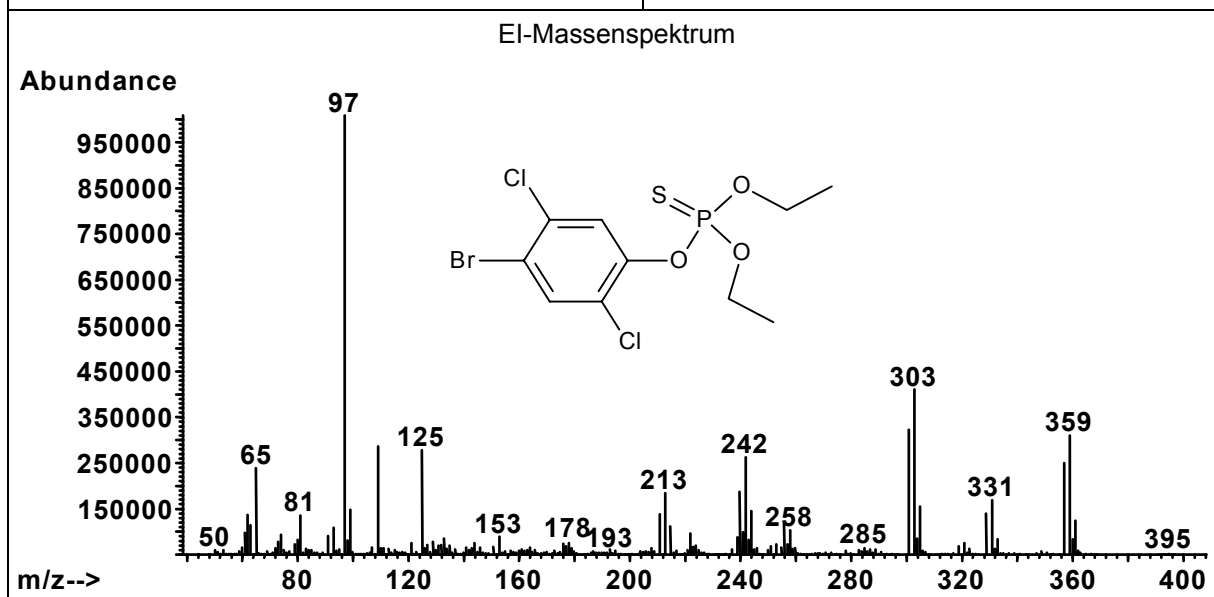




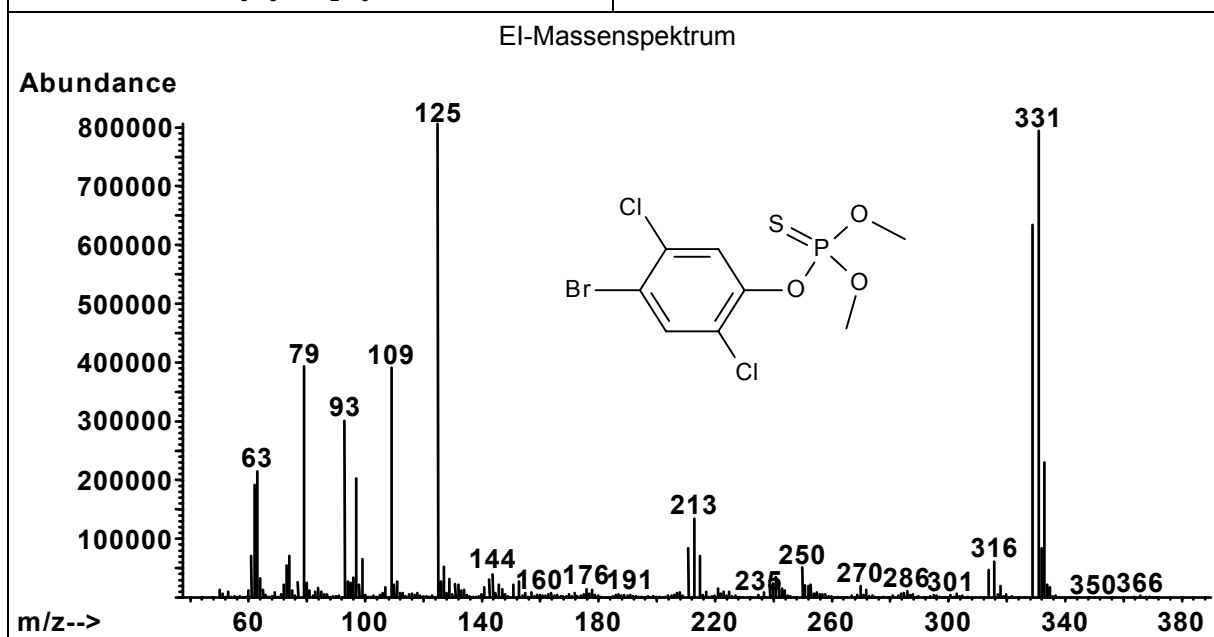


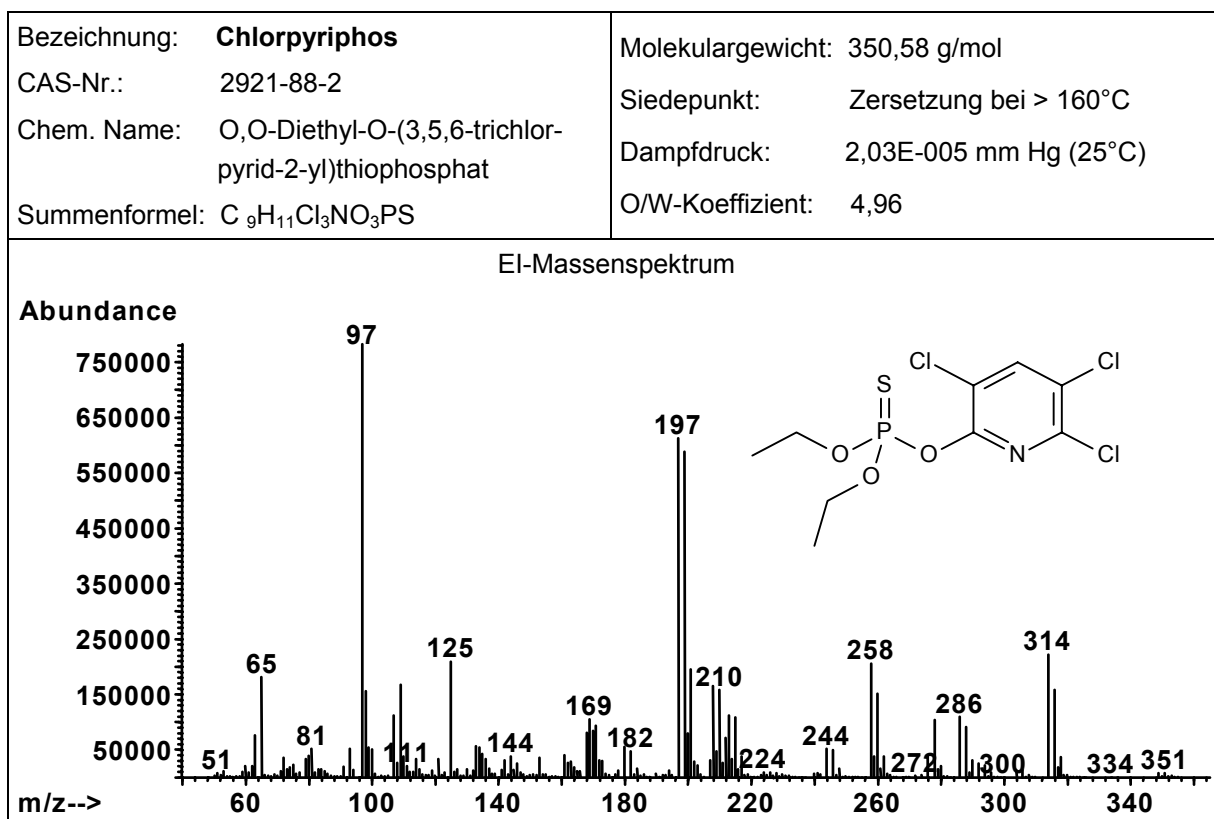
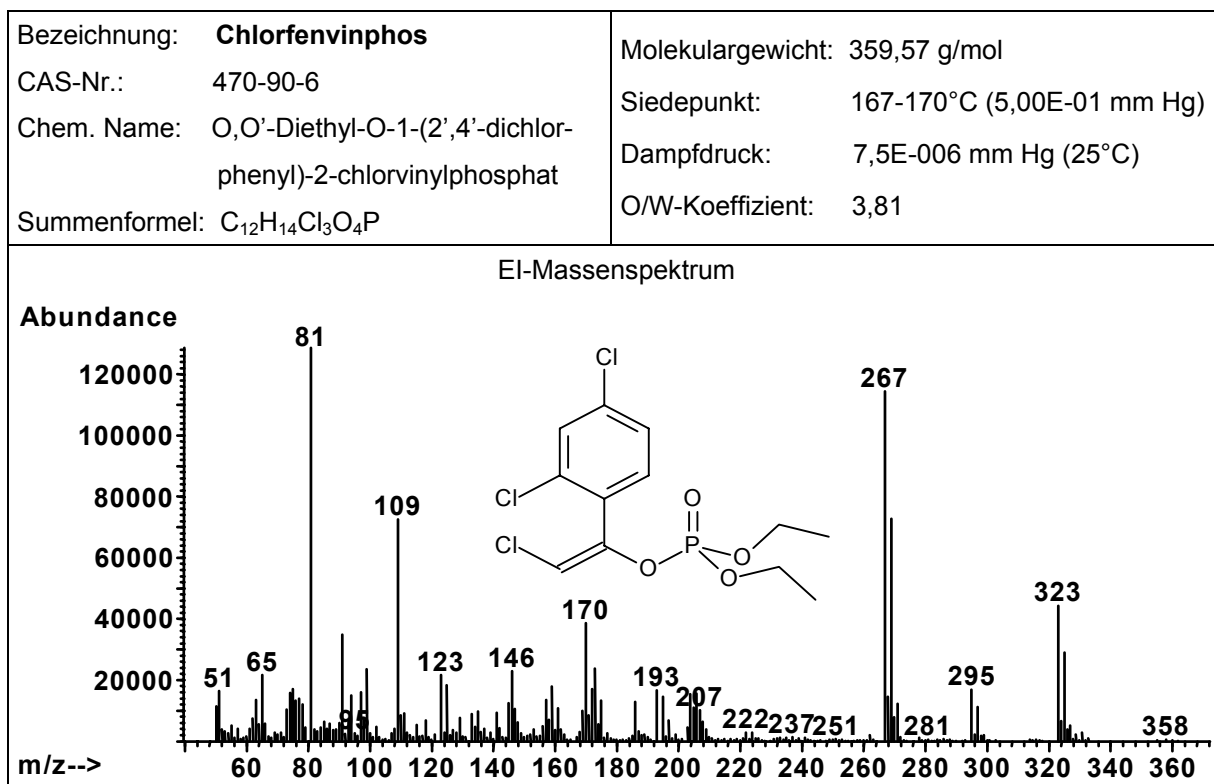
9.2 Organophosphate

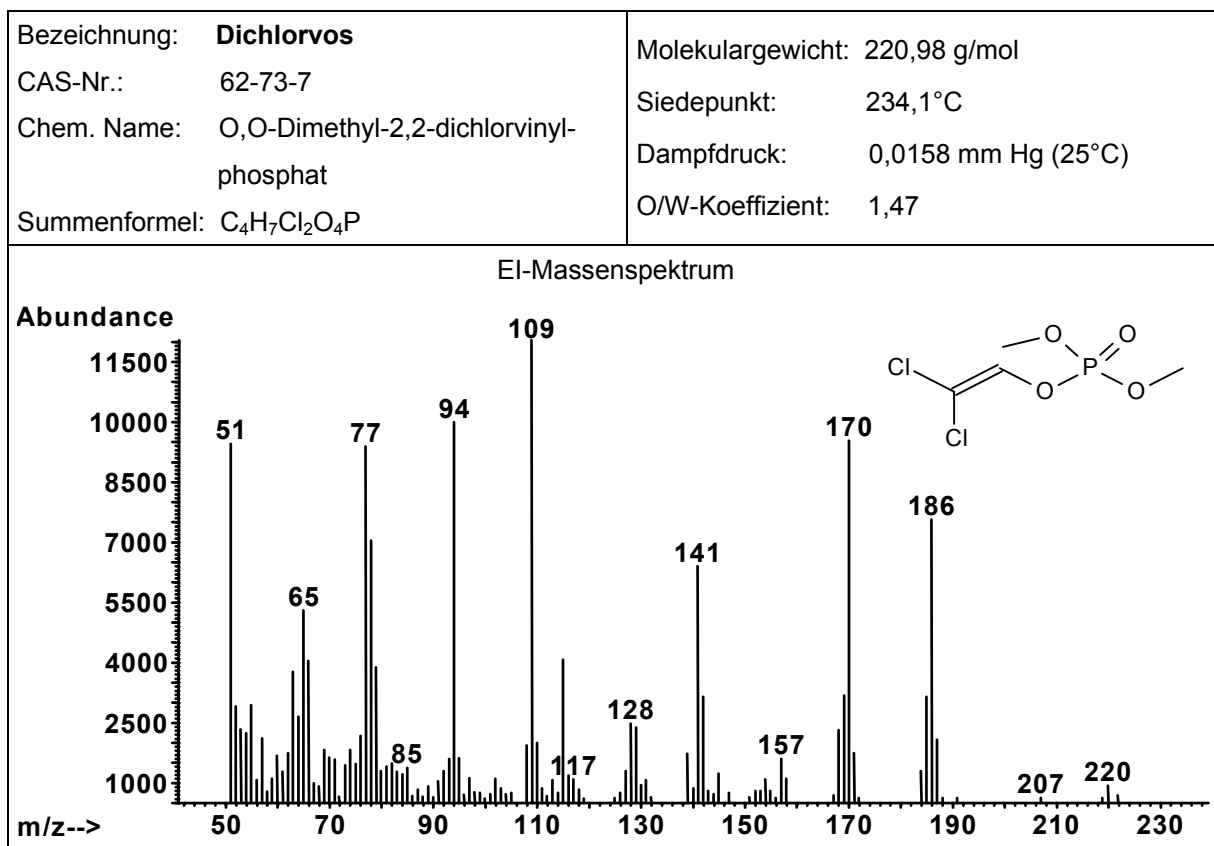
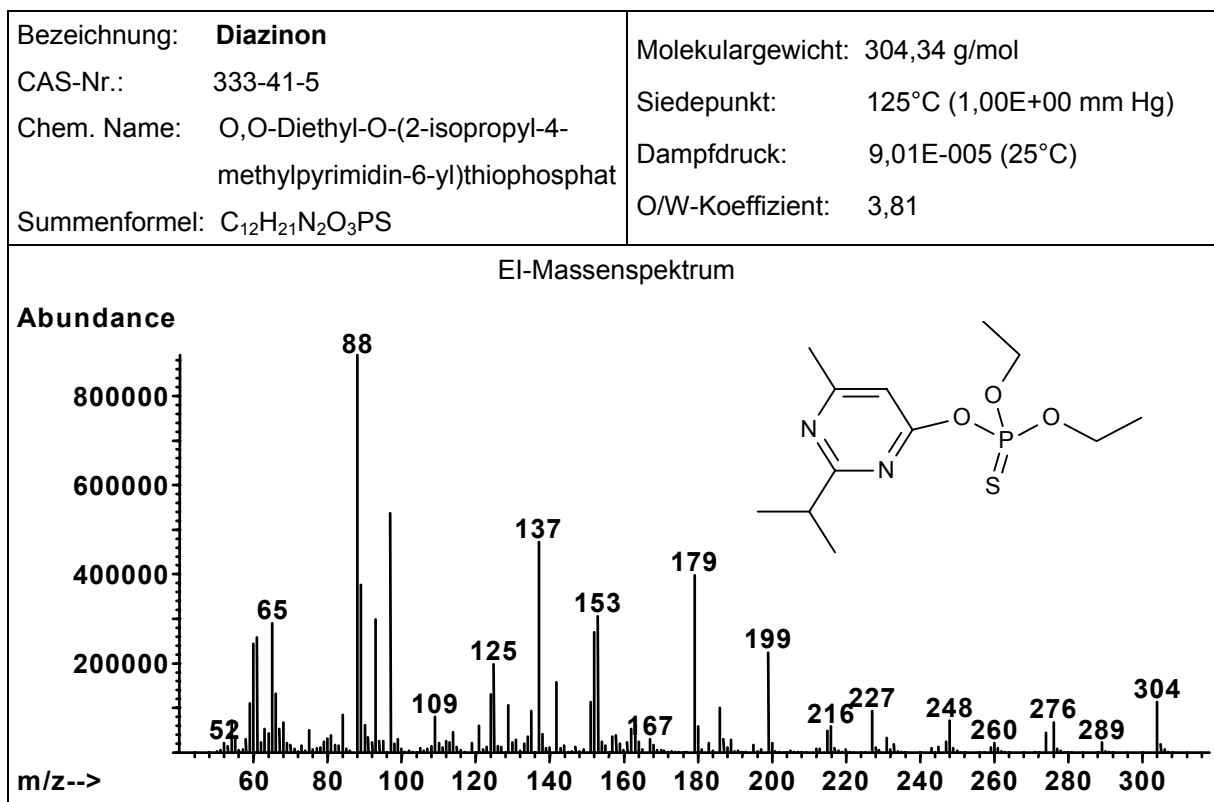
Bezeichnung: Bromophos-ethyl	Molekulargewicht: 394,05 g/mol
CAS-Nr.: 4824-78-6	Siedepunkt: 122 – 123°C
Chem. Name: O-(4-Brom-2,5-dichlorphenyl)- O,O'-diethylphosphorthioat	Dampfdruck: $4,6 \times 10^{-5}$ mm Hg bei 30°C
Summenformel: C ₁₀ H ₁₂ BrCl ₂ O ₃ PS	O/W-Koeffizient: 6,15

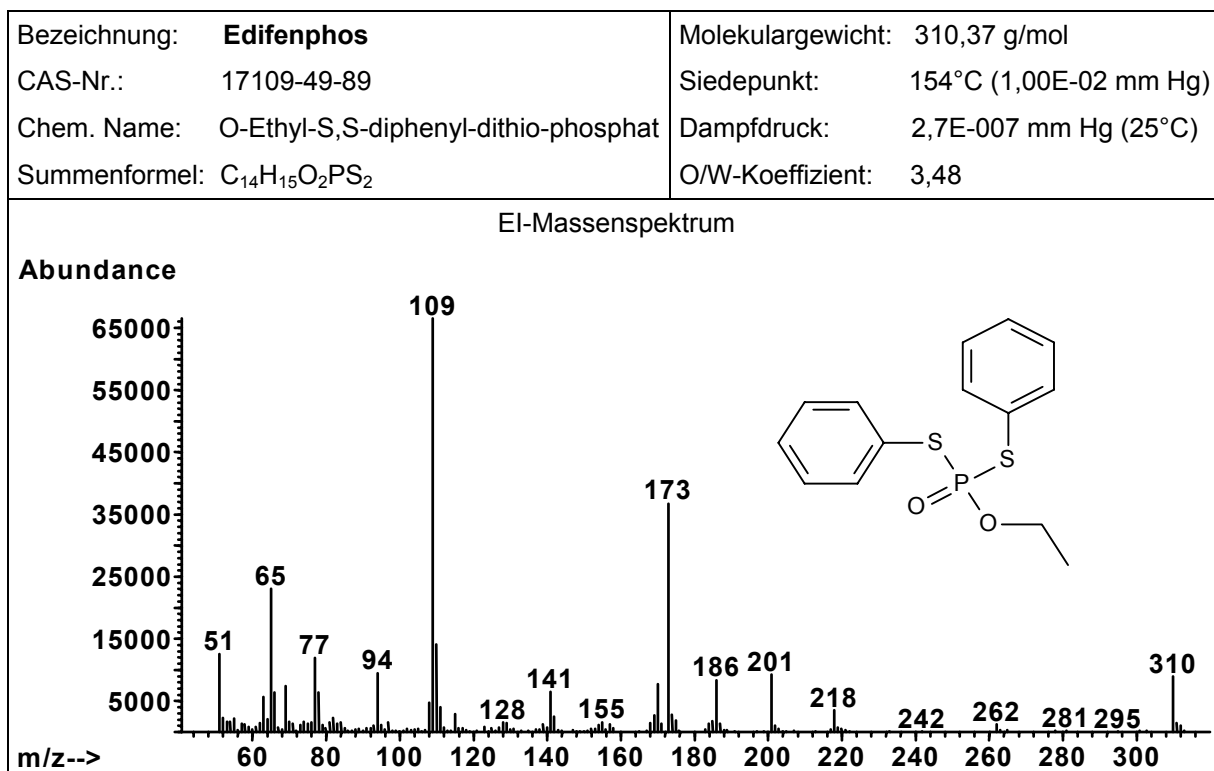
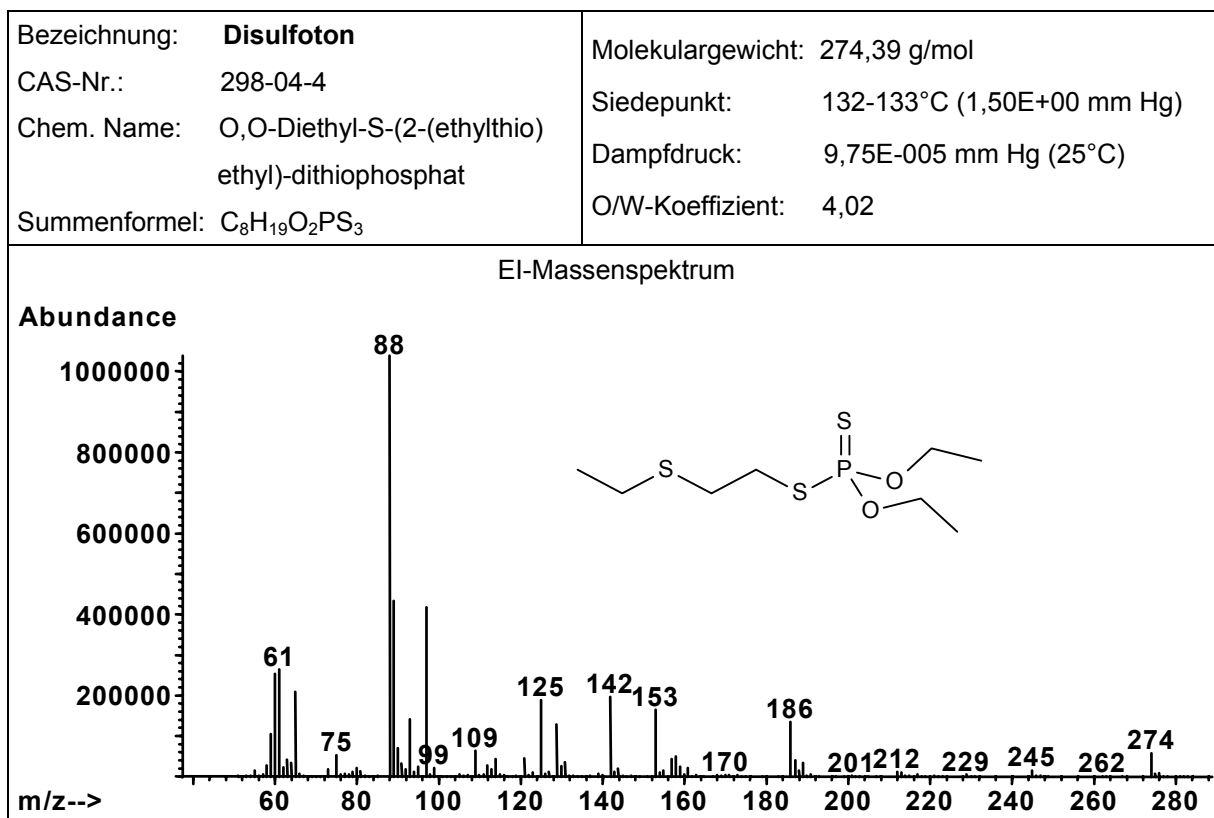


Bezeichnung: Bromophos-methyl	Molekulargewicht: 365,99 g/mol
CAS-Nr.: 2104-96-3	Siedepunkt: 140-142 °C (1,00E-02 mm Hg)
Chem. Name: O-(4-Brom-2,5-dichlorphenyl)- O,O'-dimethylphosphorthioat	Dampfdruck: 0,000128 mm Hg (20°C)
Summenformel: C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS	O/W-Koeffizient: 5,21

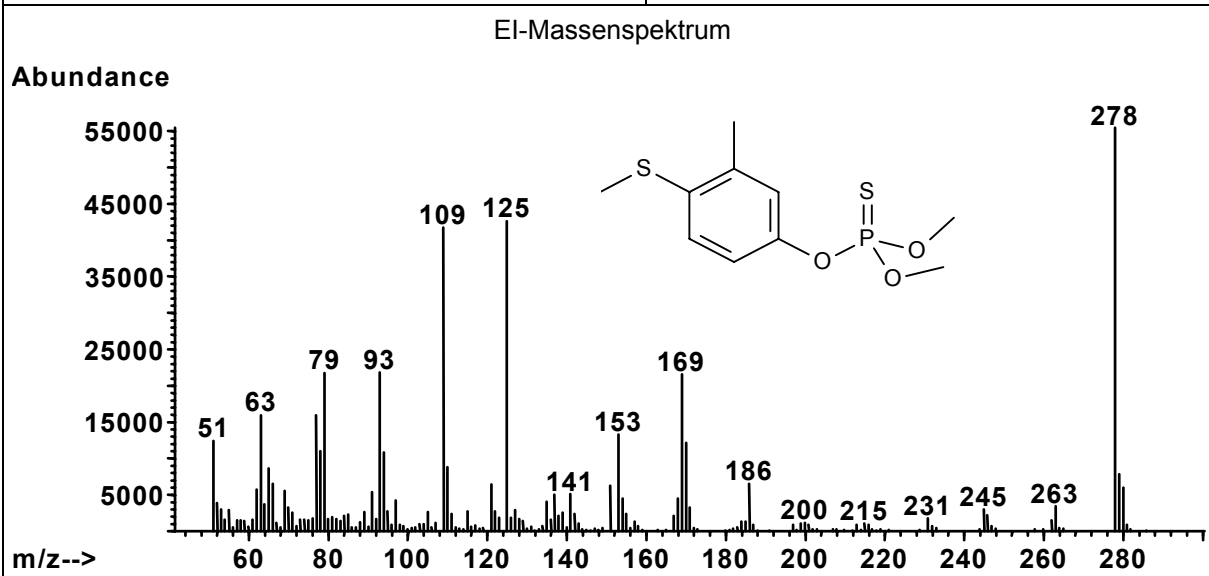




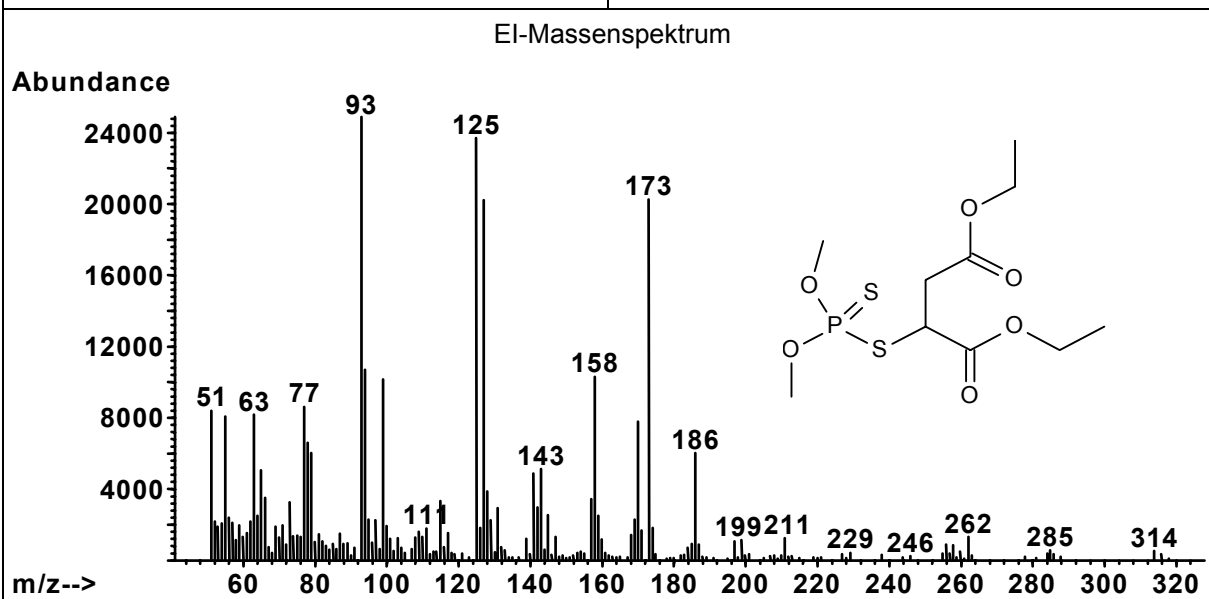


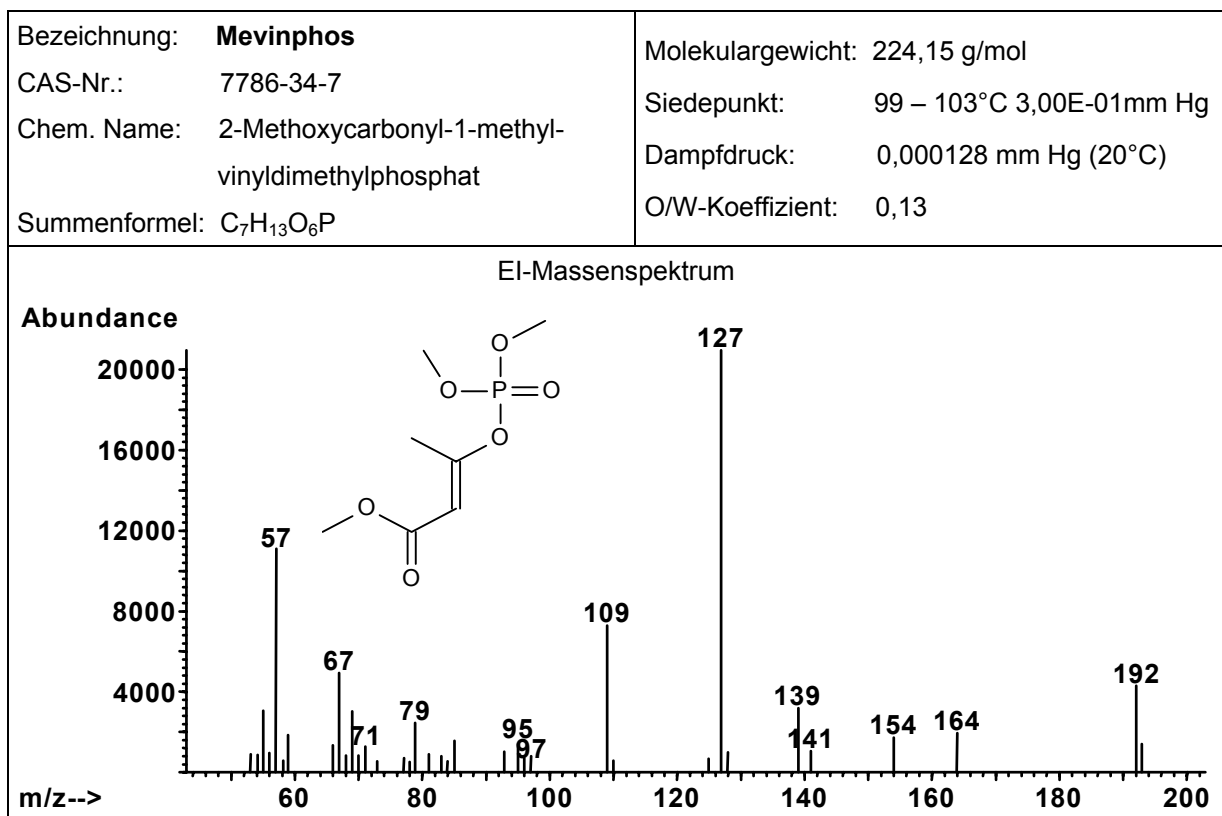
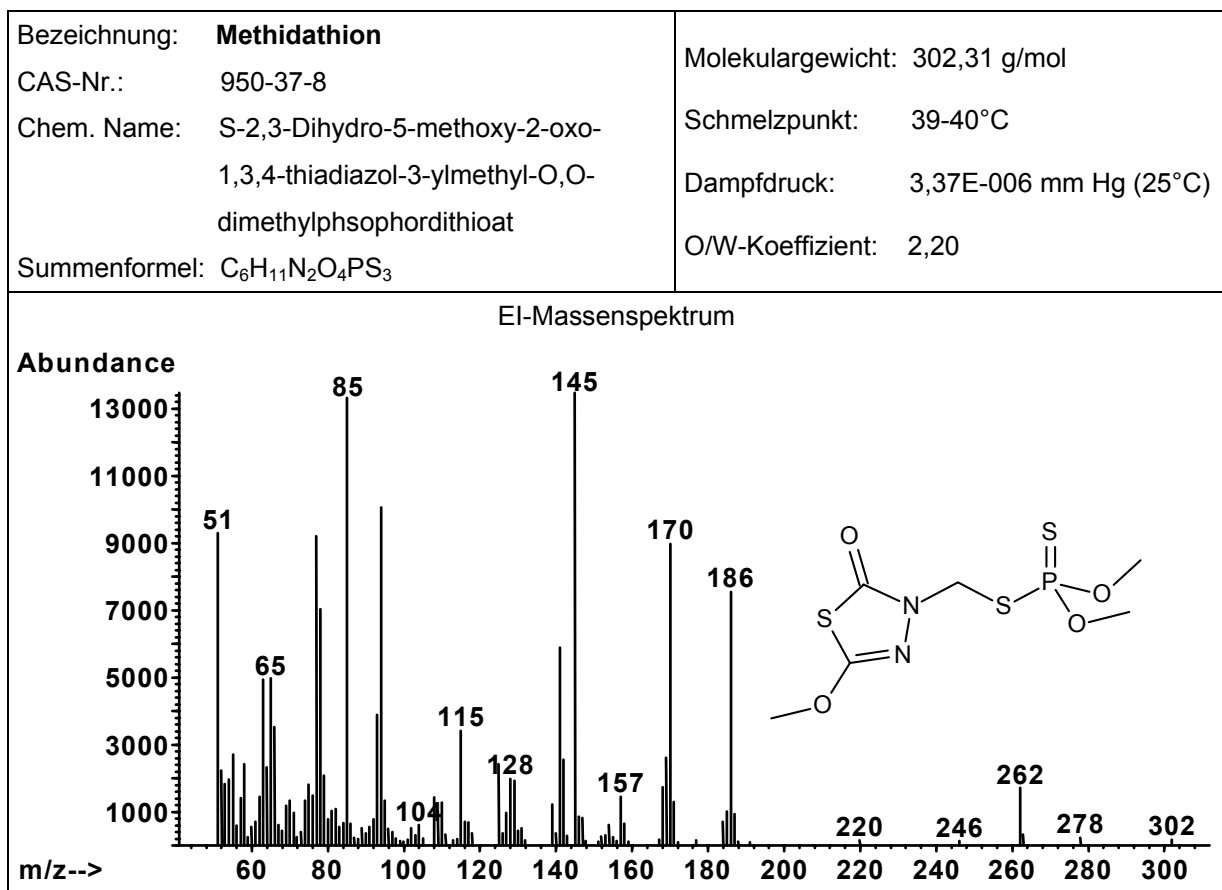


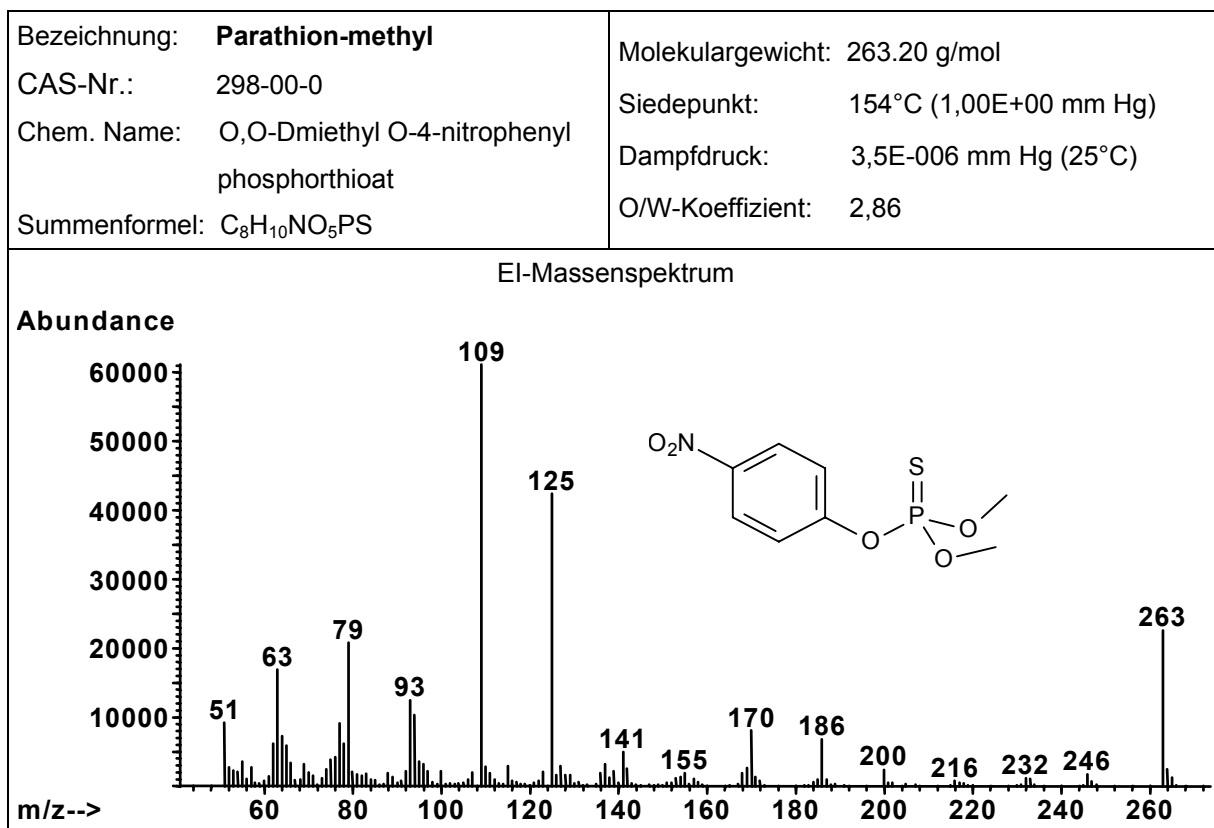
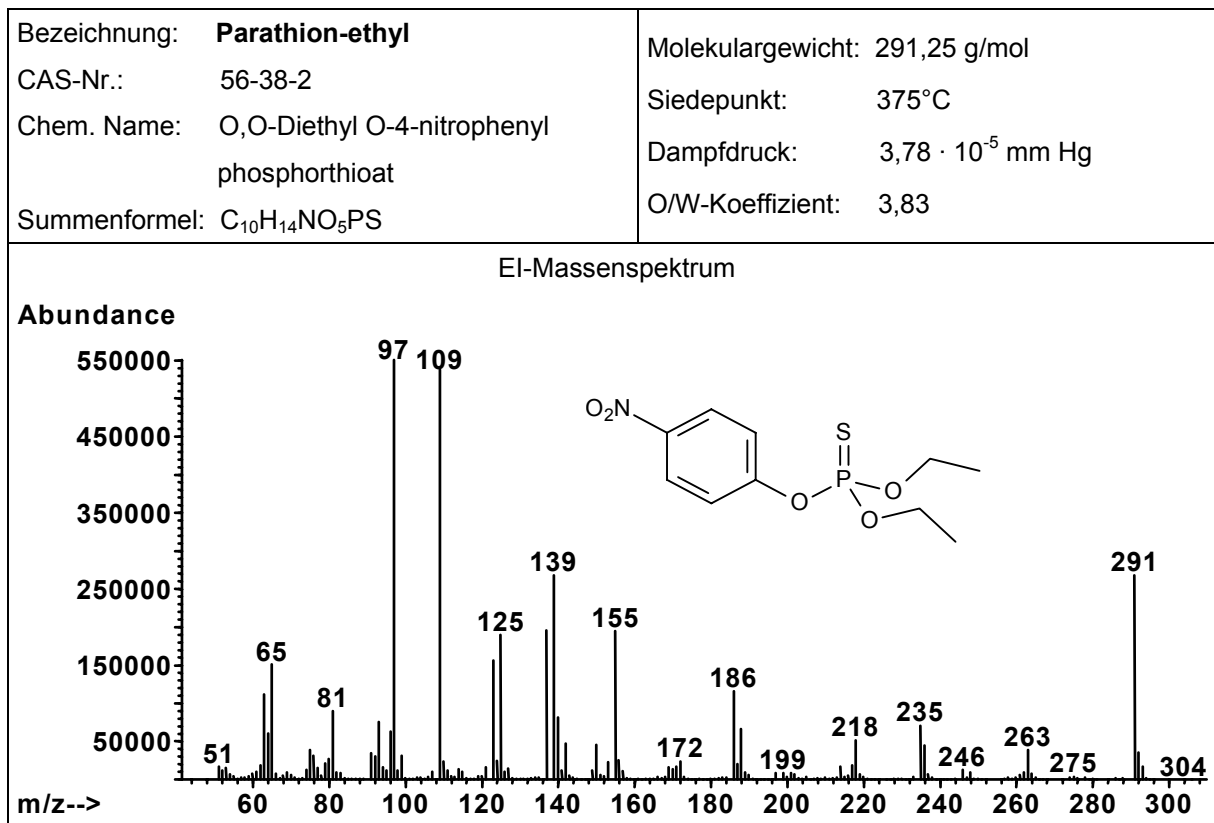
Bezeichnung: Fenthion	Molekulargewicht: 278,33 g/mol
CAS-Nr.: 55-38-9	Siedepunkt: 87°C (0,01 mm Hg)
Chem. Name: O,O-Dimethyl-O-3-methyl-4-methylthiophenylphosphorthioat	Dampfdruck: 1,05E-005 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	O/W-Koeffizient: 4,09

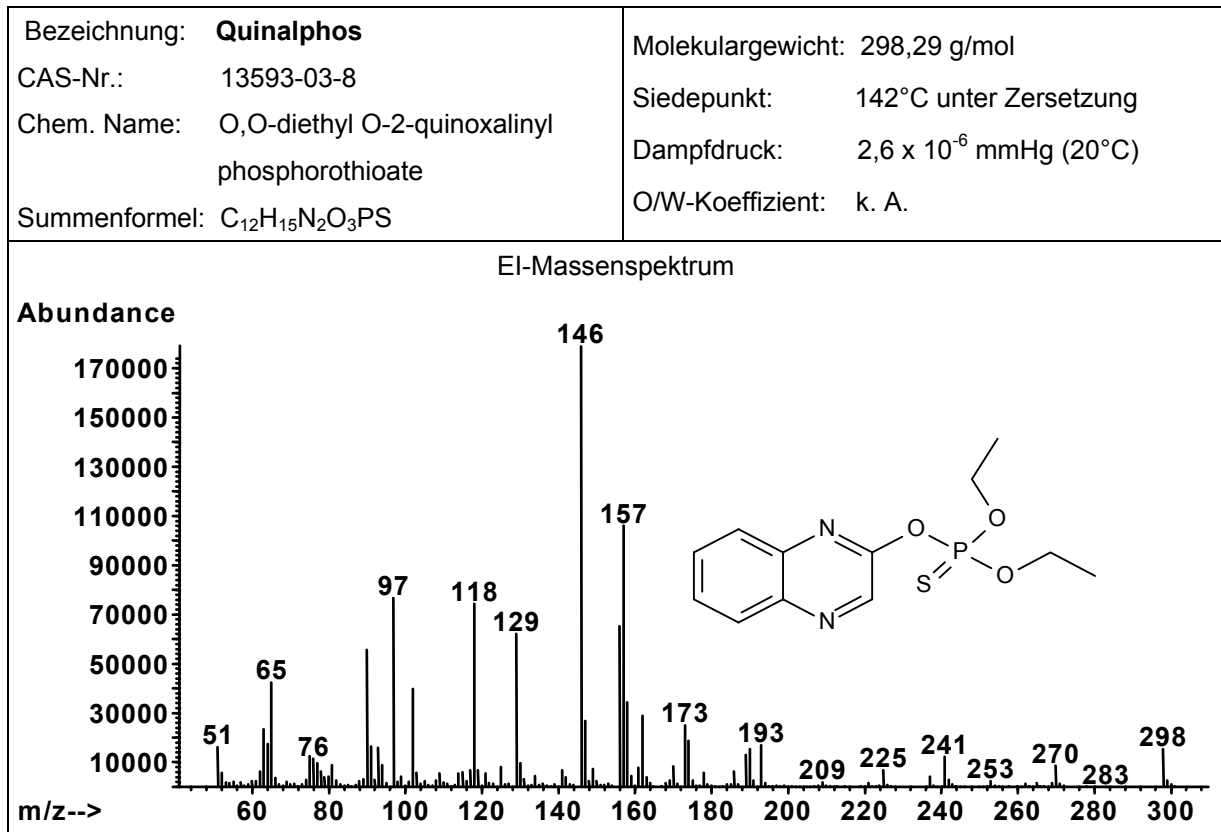


Bezeichnung: Malathion	Molekulargewicht: 330,35 g/mol
CAS-Nr.: 121-75-5	Siedepunkt: 156-157°C (7,00E-01 mm Hg)
Chem. Name: 1,2-Di(ethoxycarbonyl)ethyl-O,O-dimethylphosphordithioat	Dampfdruck: 3,38E-006 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	O/W-Koeffizient: 2,36



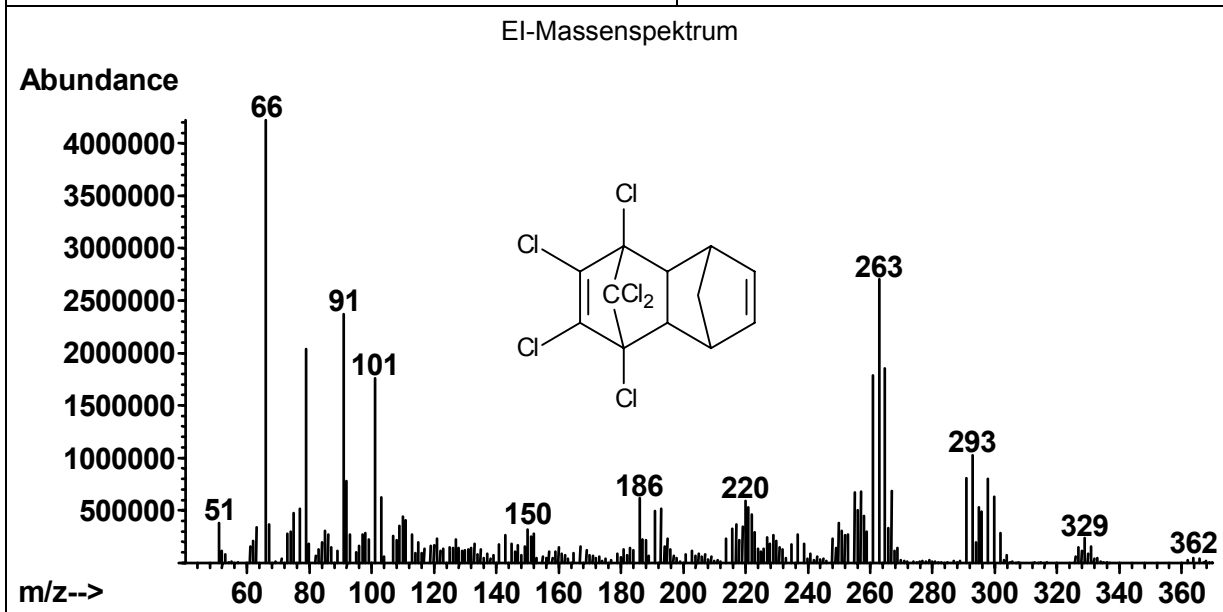




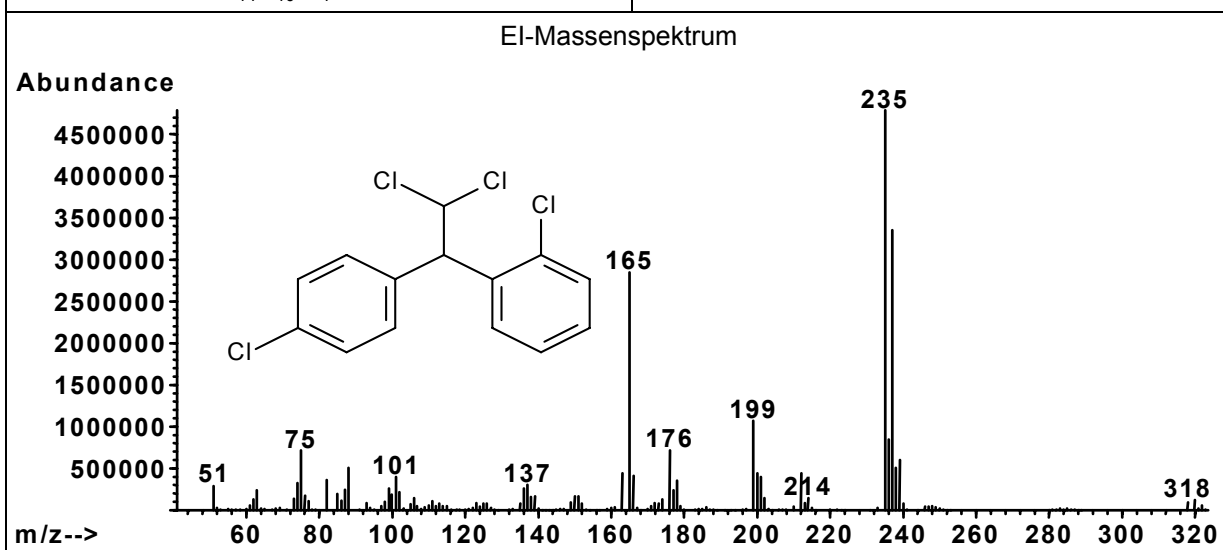


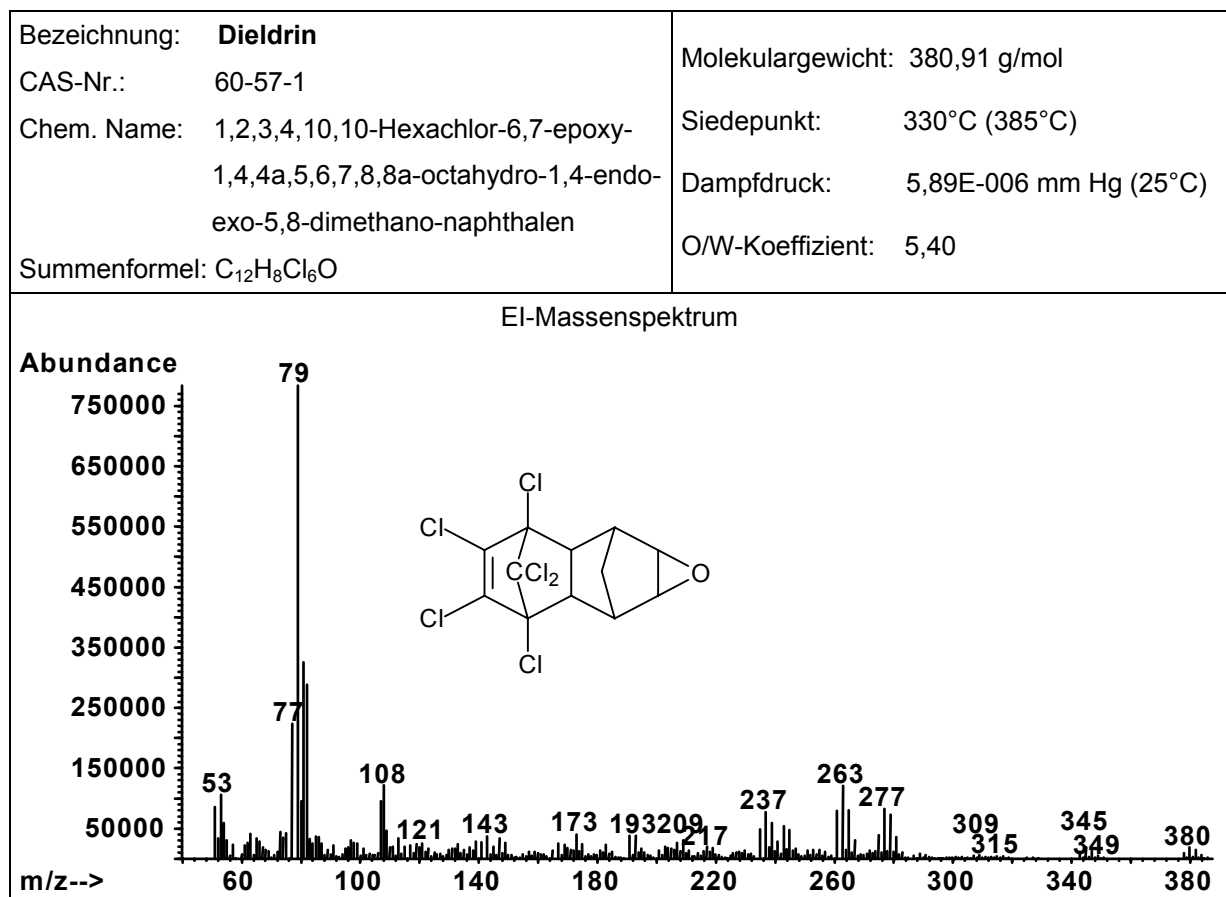
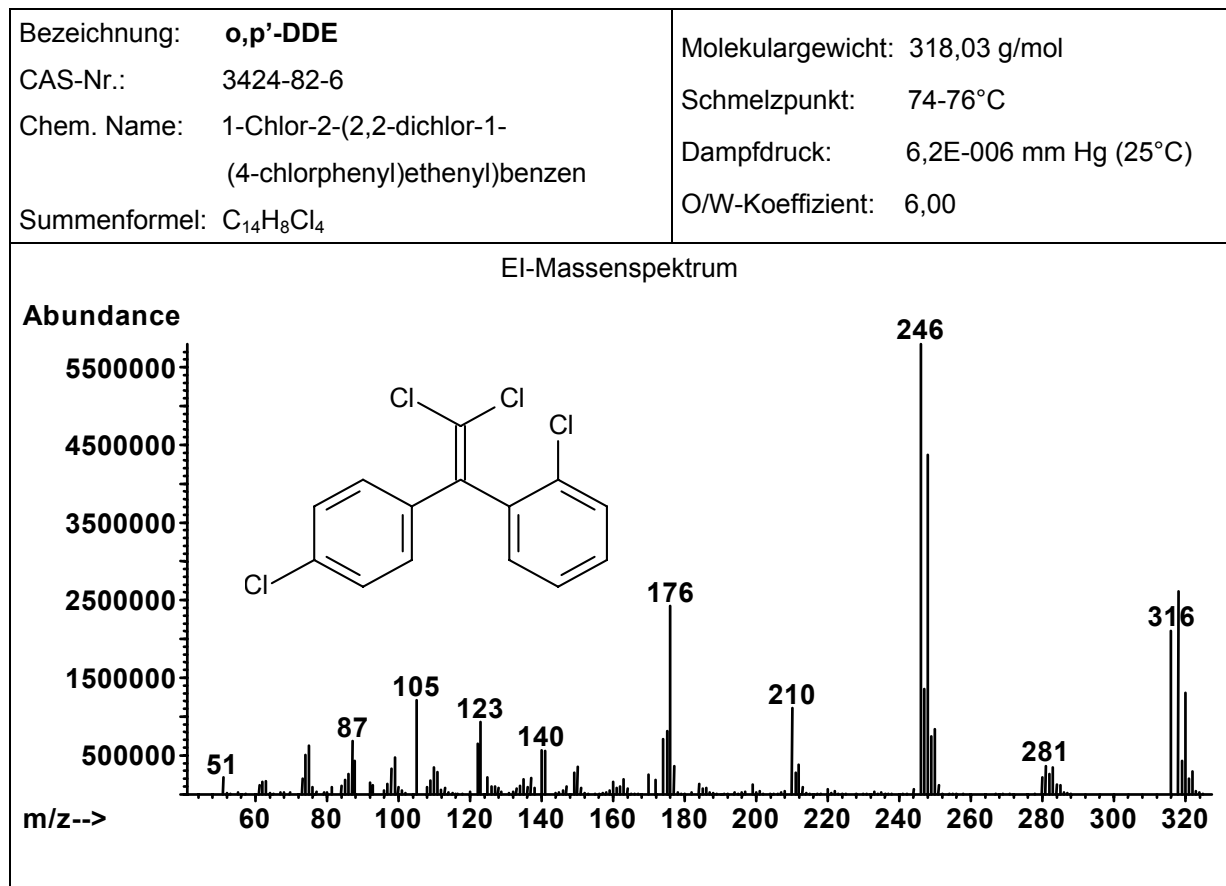
9.3 Organochlor-Pestizide

Bezeichnung: Aldrin	Molekulargewicht: 364,91 g/mol
CAS-Nr.: 309-00-2	Siedepunkt: 145°C (2,00E+00 mm Hg)
Chem. Name: 1,2,3,4,10,10-Hexachlor-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4:5,8-dimethano-naphthalen	Dampfdruck: 0,00012 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₁₂ H ₈ Cl ₆	O/W-Koeffizient: 6,50

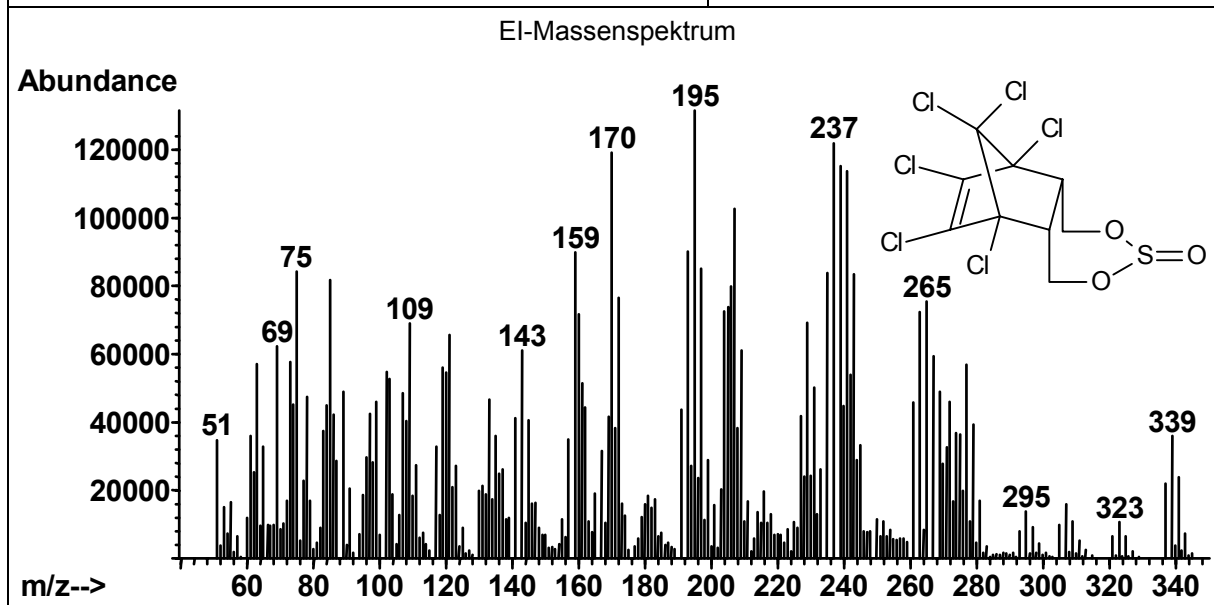


Bezeichnung: o,p'-DDD	Molekulargewicht: 320,05 g/mol
CAS-Nr.: 53-19-0	Siedepunkt: 193°C
Chem. Name: 2-(2Chlorphenyl)-2(4-chlorphenyl)-1,1-dichlorethan	Dampfdruck: 1,94E-006 mm Hg (30°C)
Summenformel: C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	O/W-Koeffizient: 5,87

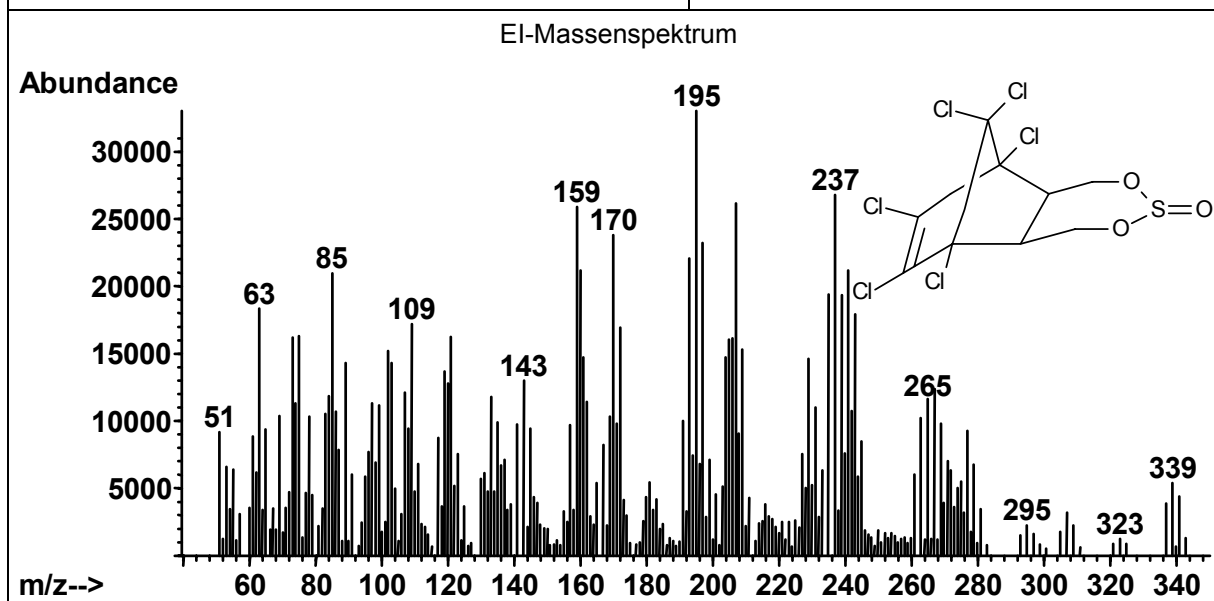




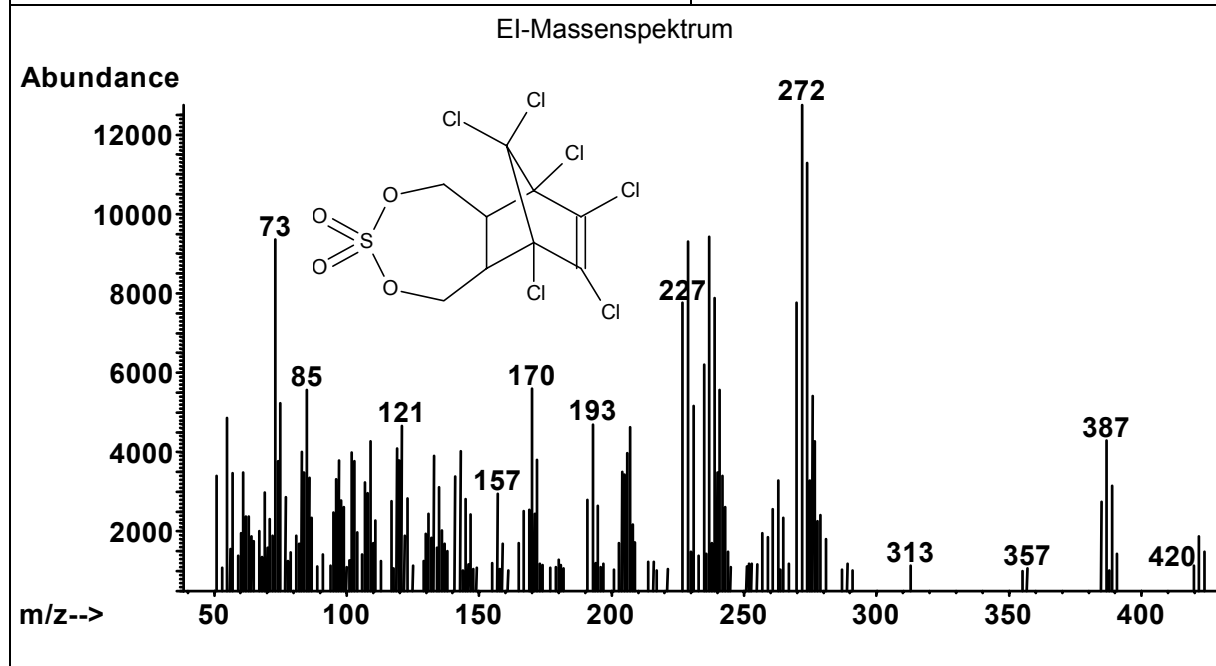
Bezeichnung: α-Endosulfan	Molekulargewicht: 406,92 g/mol
CAS-Nr.: 959-98-8	Siedepunkt: 200°C
Chem. Name: 6,7,8,9,10,10-Hexachlor-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxid	Dampfdruck: 3E-006 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	O/W-Koeffizient: 3,83



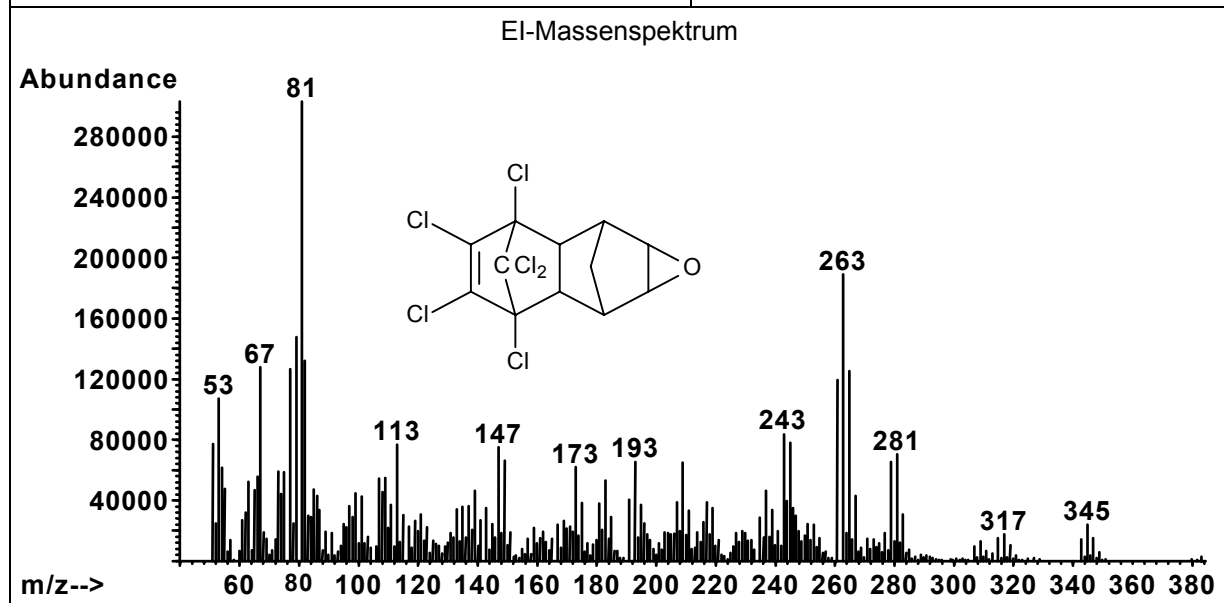
Bezeichnung: β-Endosulfan	Molekulargewicht: 406,92 g/mol
CAS-Nr.: 33213-65-9	Siedepunkt: 390°C
Chem. Name: 6,7,8,9,10,10-Hexachlor-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxid	Dampfdruck: 6E-007 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	O/W-Koeffizient: 3,83



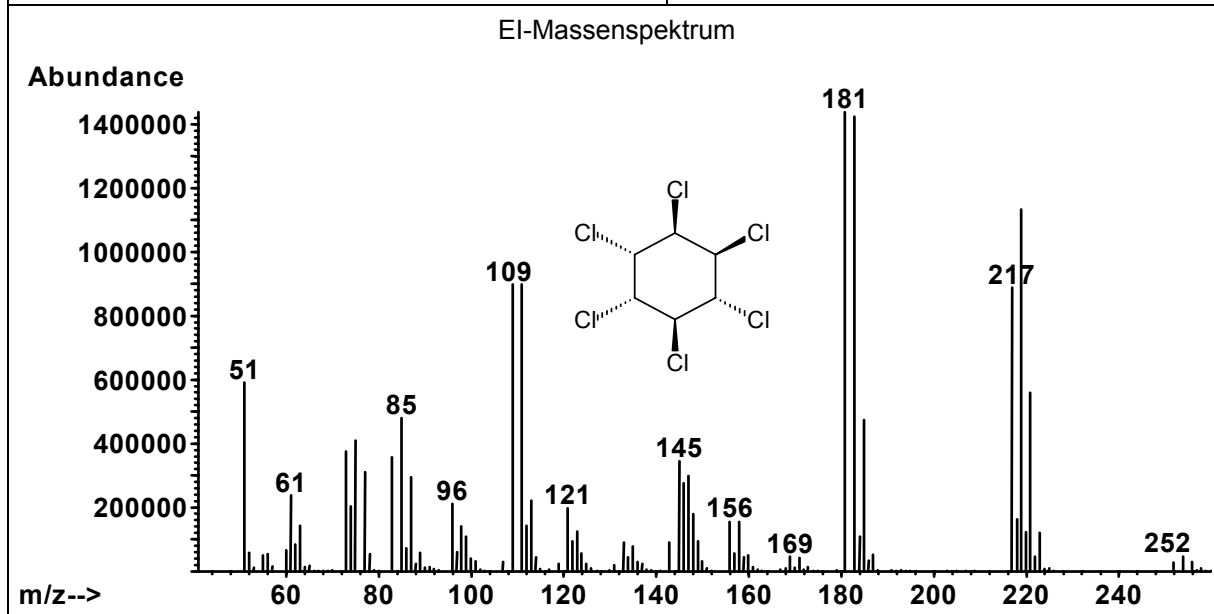
Bezeichnung: Endosulfan-Sulfat	Molekulargewicht: 422,92 g/mol
CAS-Nr.: 1031-07-8	Siedepunkt: 181 – 182°C (200°C)
Chem. Name: 6,7,8,9,10,10-Hexachlor-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3,3-dioxid	Dampfdruck: 2,8E-007 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	O/W-Koeffizient: 3,66



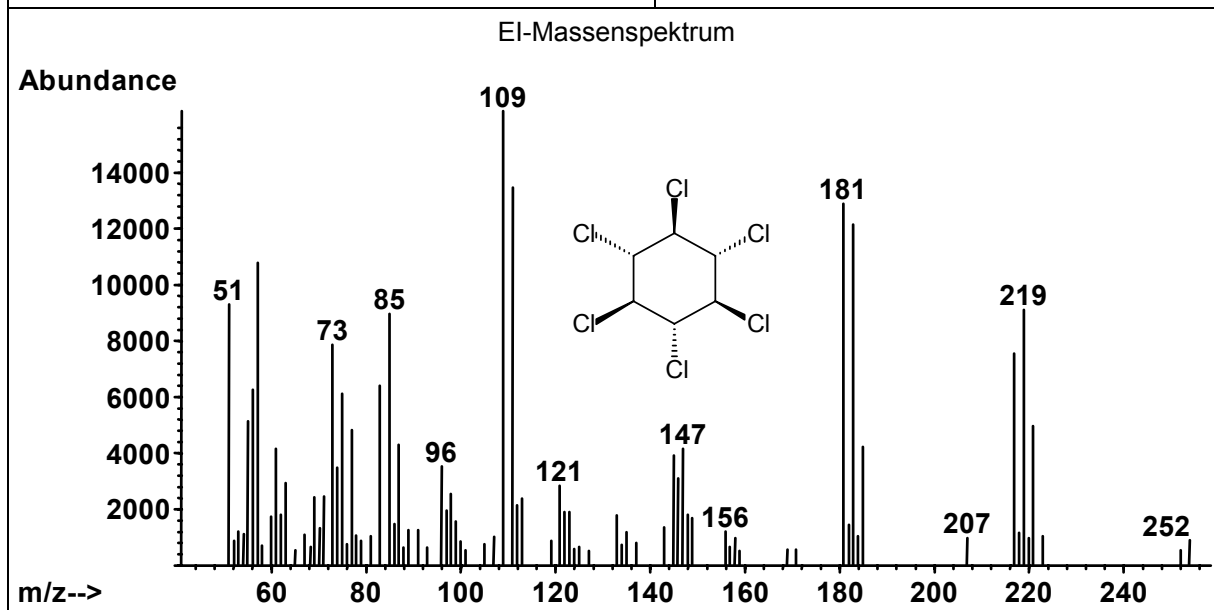
Bezeichnung: Endrin	Molekulargewicht: 380,91 g/mol
CAS-Nr.: 72-20-8	Siedepunkt: 226 –230°C
Chem. Name: 1,2,3,4,10,10-Hexachlor-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octa-hydro-1,4-endo-endo-5,8-dimethano-naphthalen	Dampfdruck: 3E-006 mm Hg (20°C)
Summenformel: C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	O/W-Koeffizient: 5,20

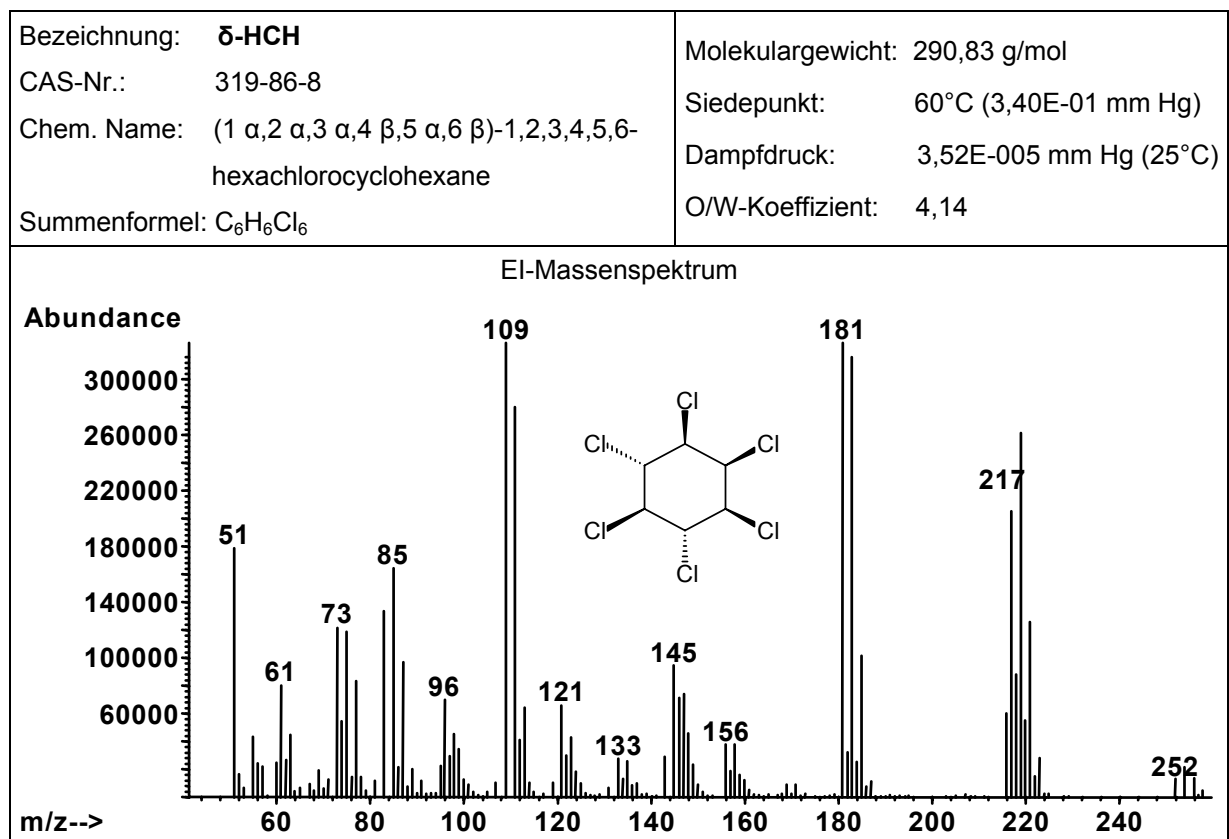
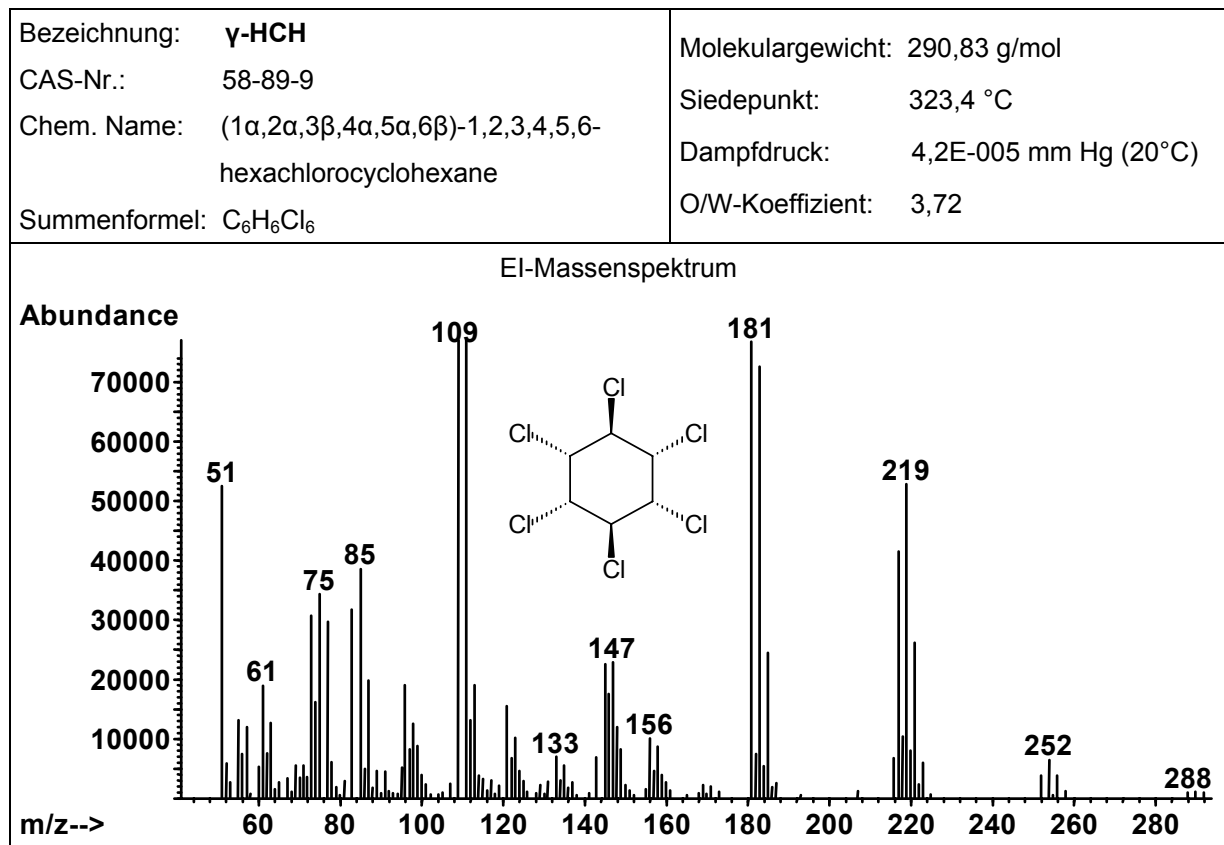


Bezeichnung: α-HCH	Molekulargewicht: 290,83 g/mol
CAS-Nr.: 319-84-6	Siedepunkt: 60°C (5,80E-01 mm Hg)
Chem. Name: (1 α ,2 α ,3 β ,4 α ,5 β ,6 β)-1,2,3,4,5,6-hexachlorcyclohexan	Dampfdruck: 3,6E-007 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₆ H ₆ Cl ₆	O/W-Koeffizient: 3,78

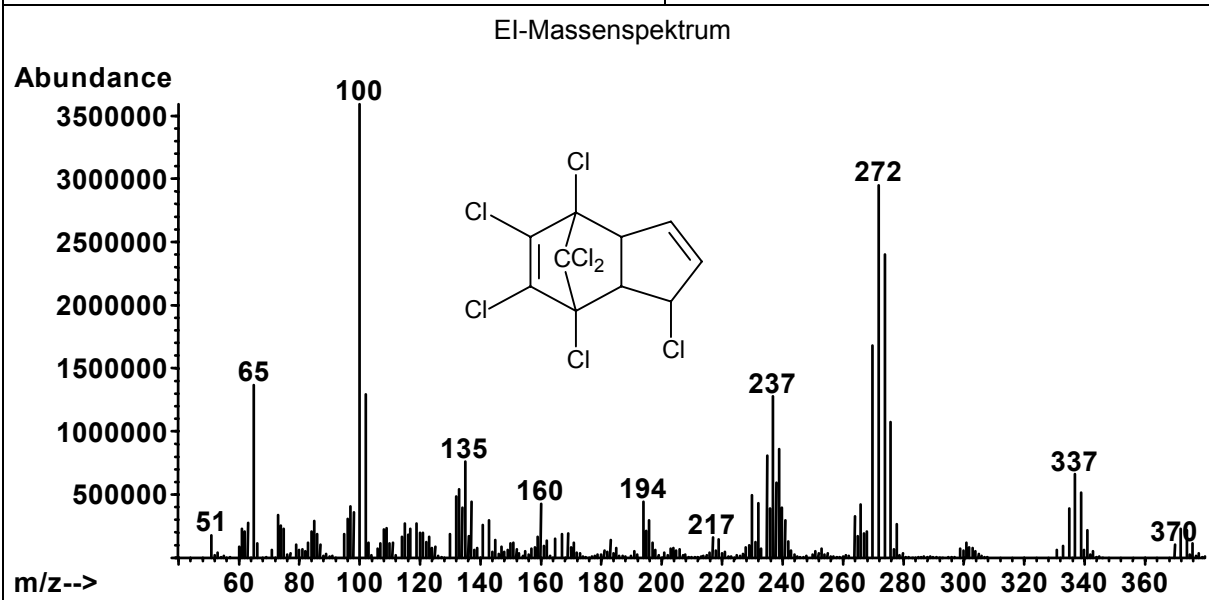


Bezeichnung: β-HCH	Molekulargewicht: 290,83 g/mol
CAS-Nr.: 319-85-7	Siedepunkt: 60°C (5,80E-01 mm Hg)
Chem. Name: (1 α ,2 β ,3 α ,4 β ,5 α ,6 β)-1,2,3,4,5,6-hexachlorcyclohexan	Dampfdruck: 3,6E-007 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₆ H ₆ Cl ₆	O/W-Koeffizient: 3,78

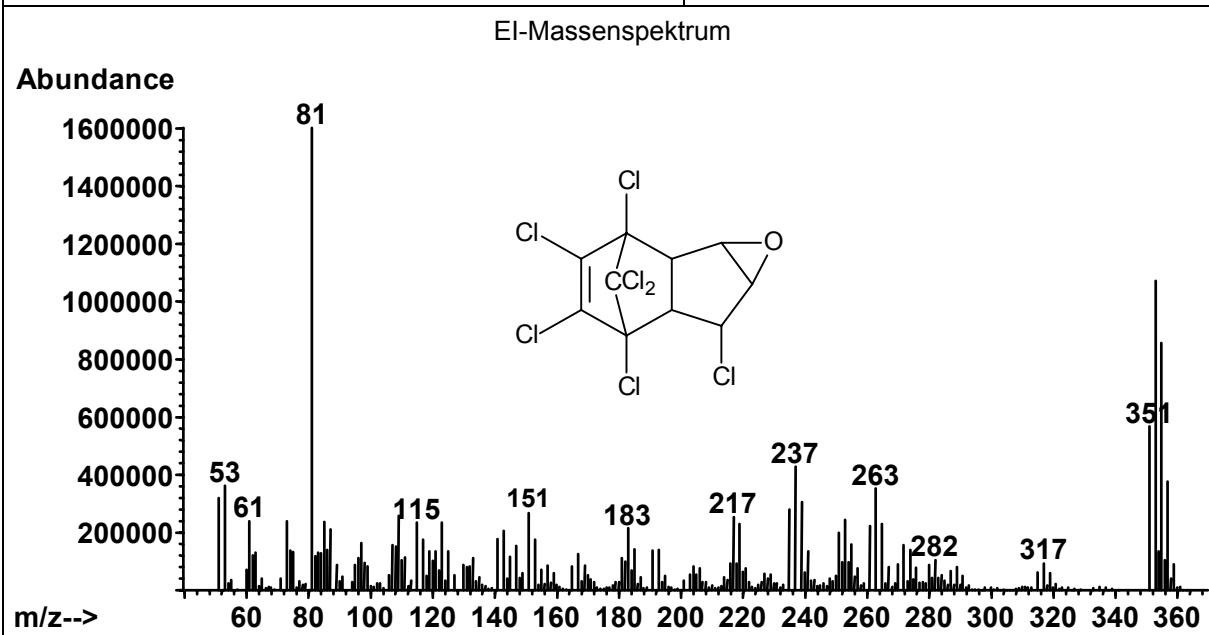


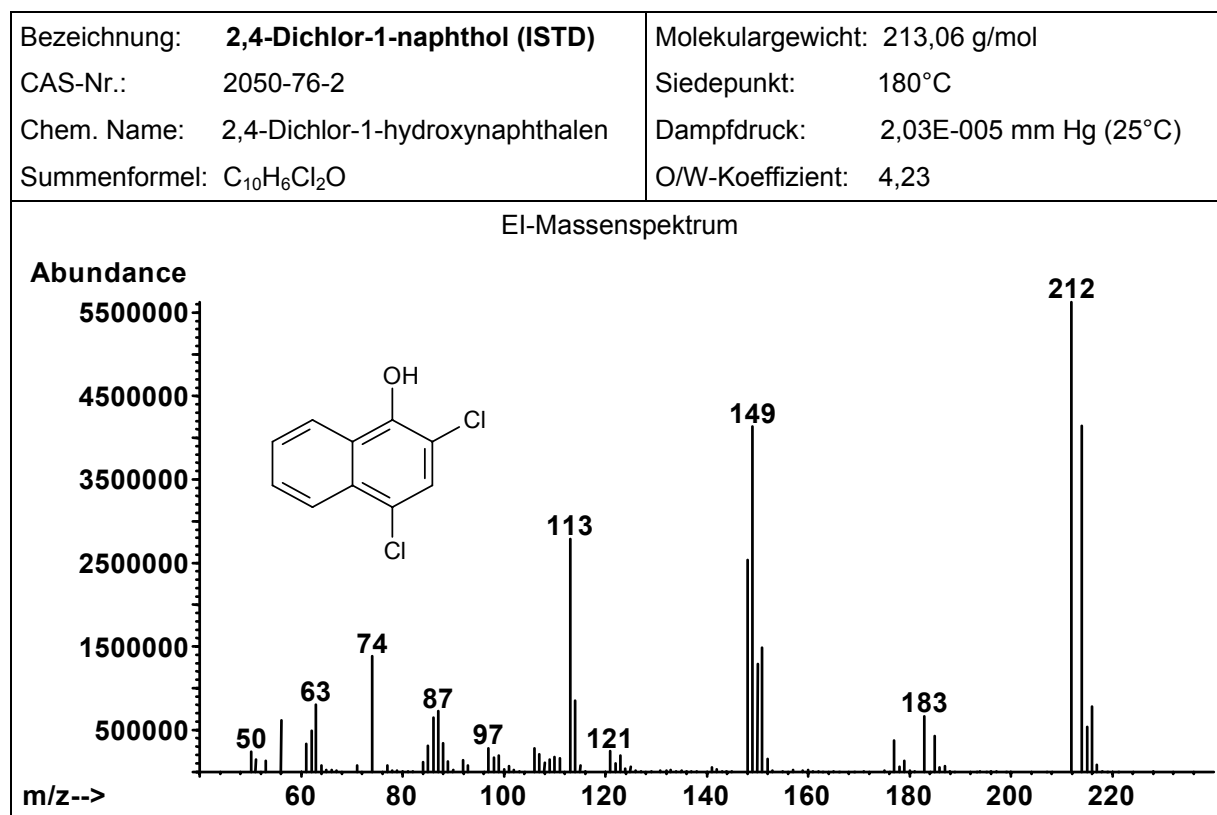
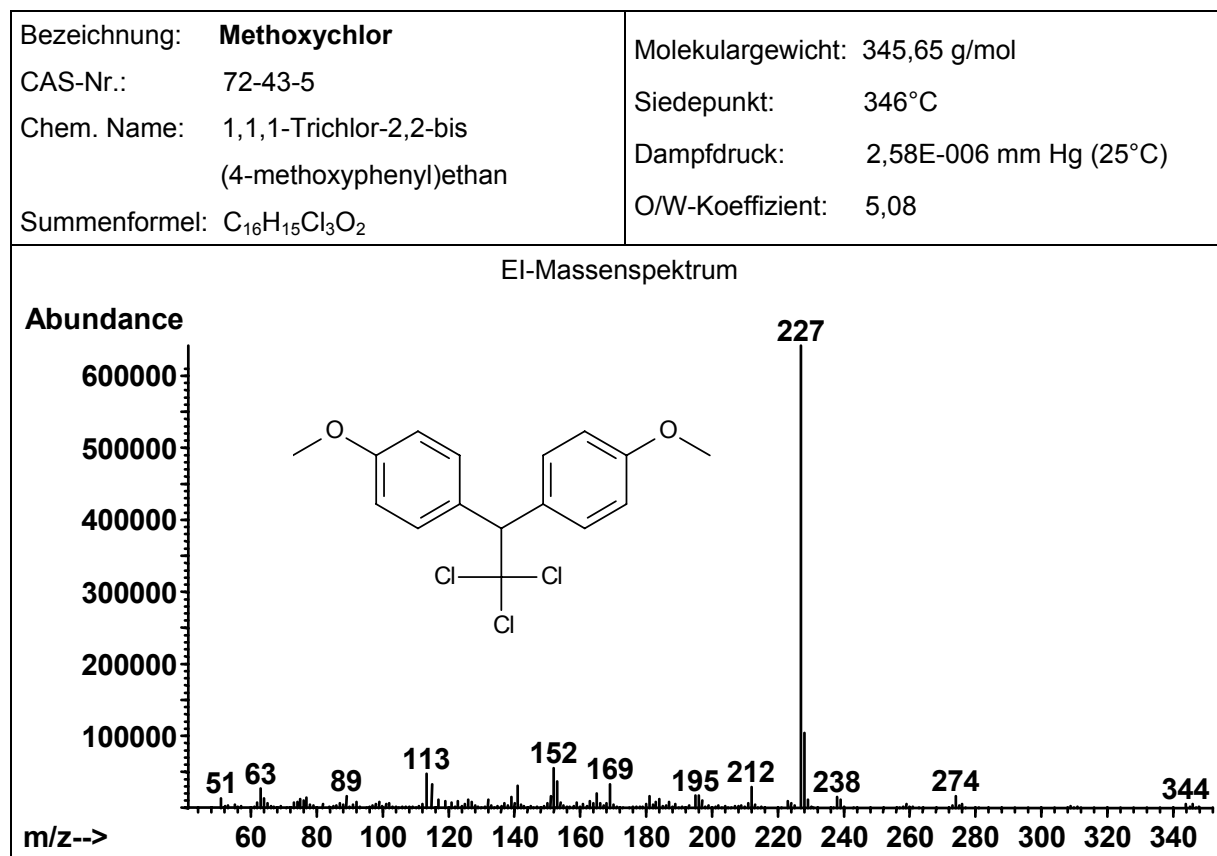


Bezeichnung: Heptachlor	Molekulargewicht: 373,32 g/mol
CAS-Nr.: 76-44-8	Siedepunkt: 310°C (135°C)
Chem. Name: 1,4,5,6,7,8,8-heptachlor-3a,4,7,7,7a-tetrahydro-4,7-methyleneindene	Dampfdruck: 0,0004 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₁₀ H ₅ Cl ₇	O/W-Koeffizient: 6,10



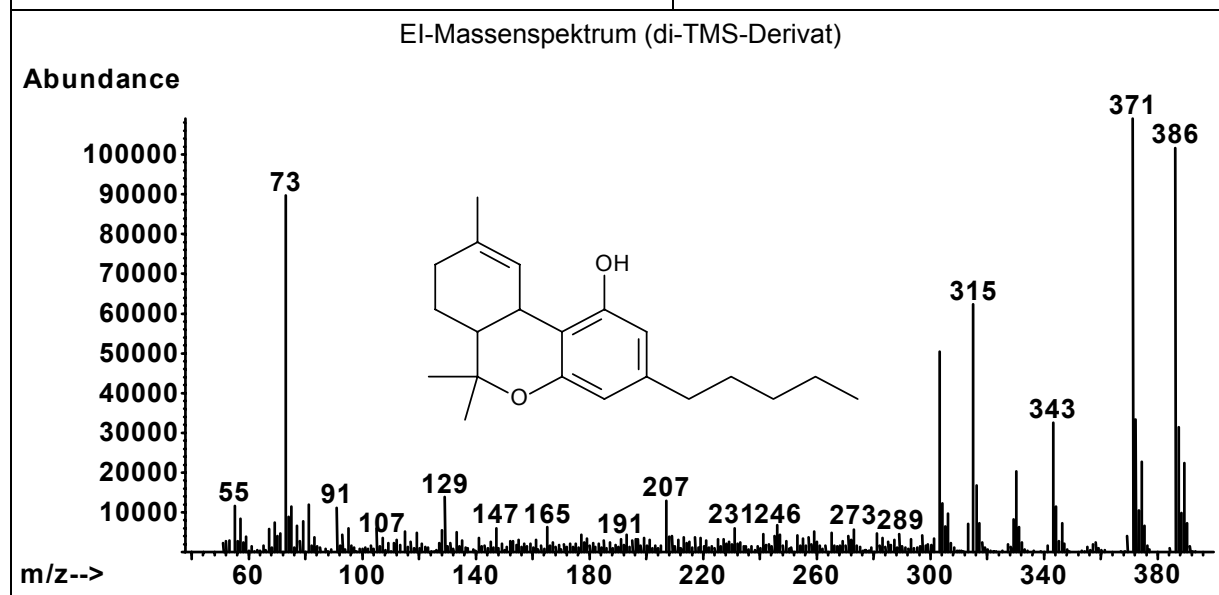
Bezeichnung: Heptachlor-exo-epoxid	Molekulargewicht: 389,32 g/mol
CAS-Nr.: 28044-83-9	Siedepunkt: 200°C
Chem. Name: 1,4,5,6,7,8-Heptachlor-2,3-epoxy-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoinden	Dampfdruck: 1,95E-005 mm Hg (30°C)
Summenformel: C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	O/W-Koeffizient: 4,98



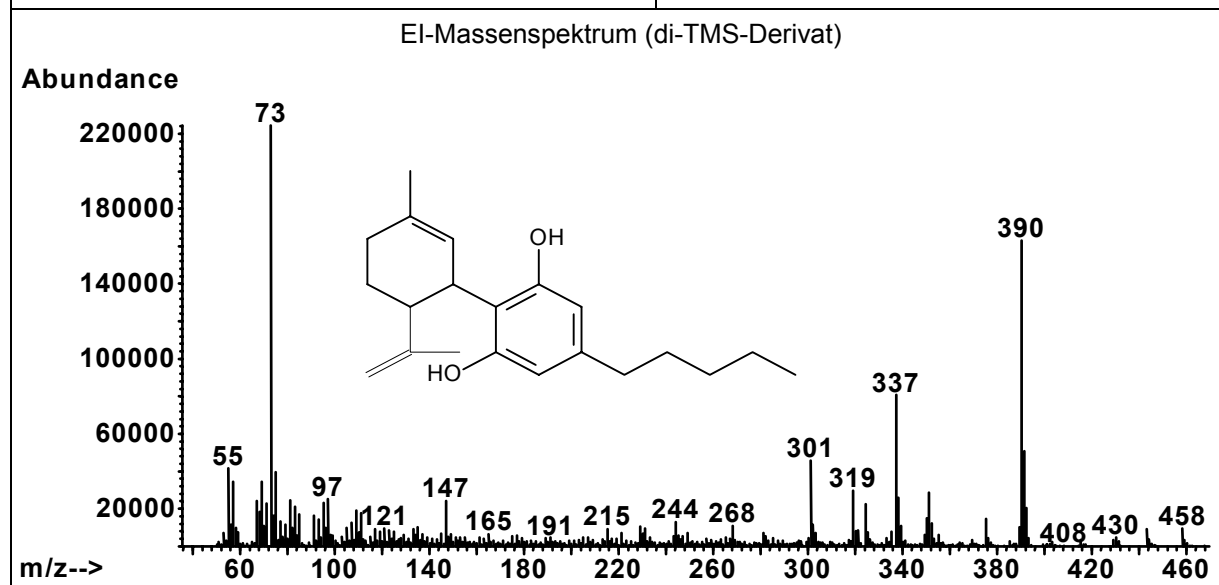


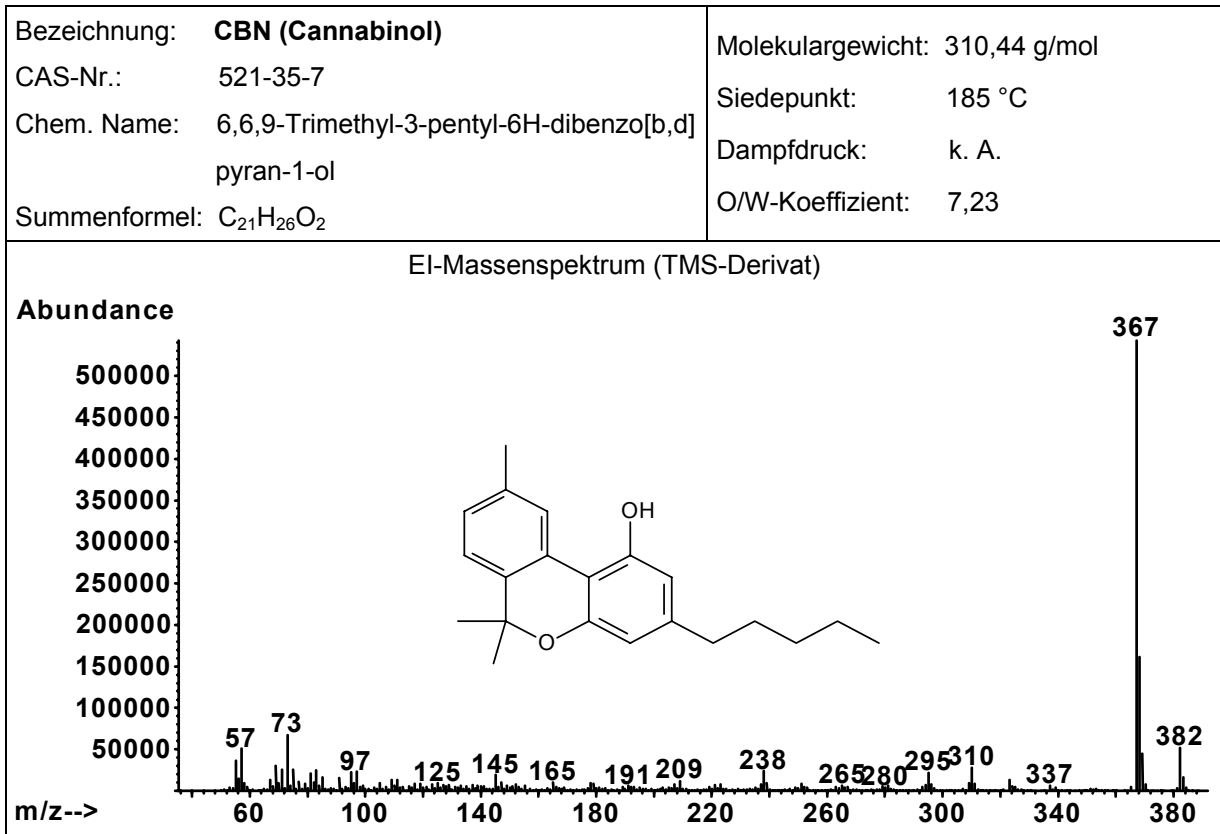
9.4 Cannabinoide

Bezeichnung: THC	Molekulargewicht: 314,47 g/mol
CAS-Nr.: 1972-08-3	Siedepunkt: 200°C (2,00E-02 mm Hg)
Chem. Name: 6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₂₁ H ₃₀ O ₂	O/W-Koeffizient: 7,60



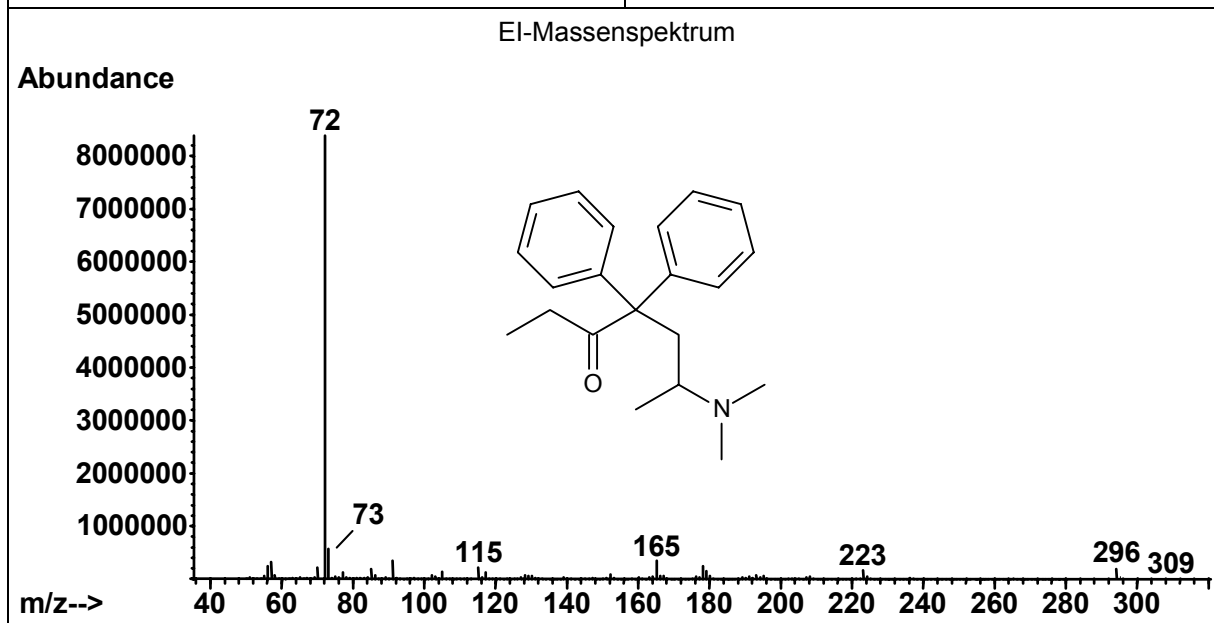
Bezeichnung: CBD (Cannabidiol)	Molekulargewicht: 314,47 g/mol
CAS-Nr.: 13956-29-1	Siedepunkt: 188,5°C (2,00E+00 mm Hg)
Chem. Name: 2-[3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-1,3-benzendiol	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₂₁ H ₃₀ O ₂	O/W-Koeffizient: 8,01



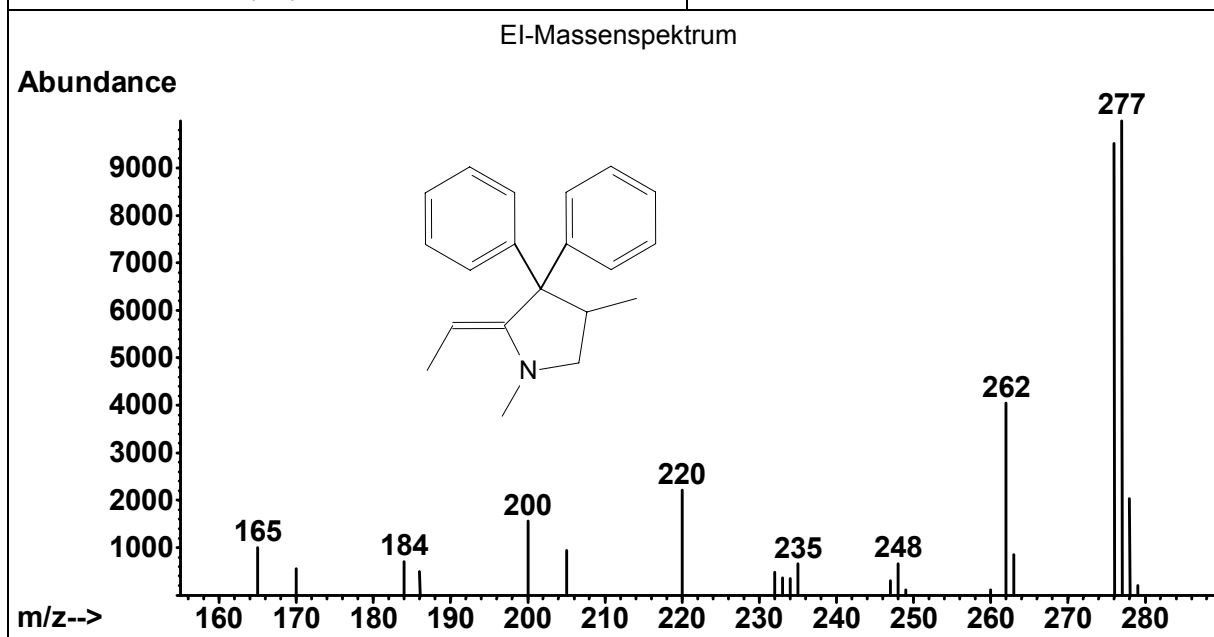


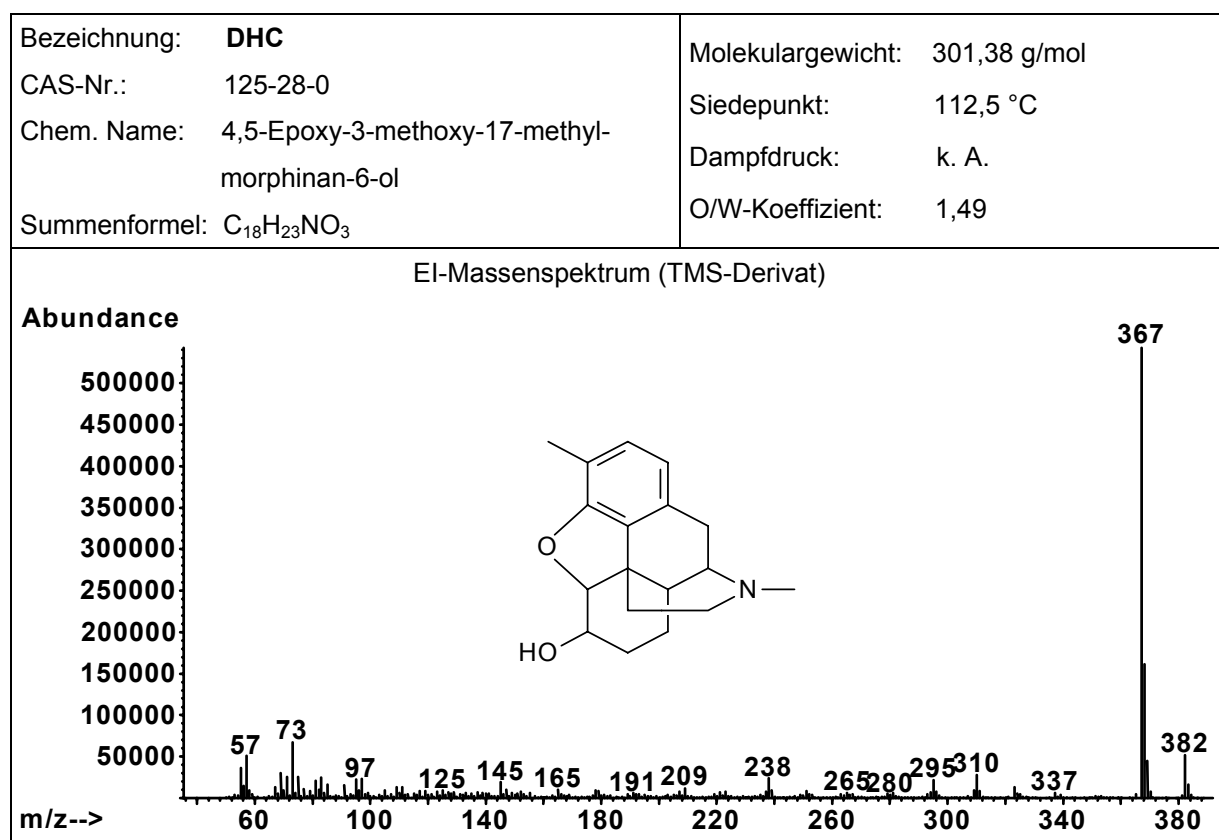
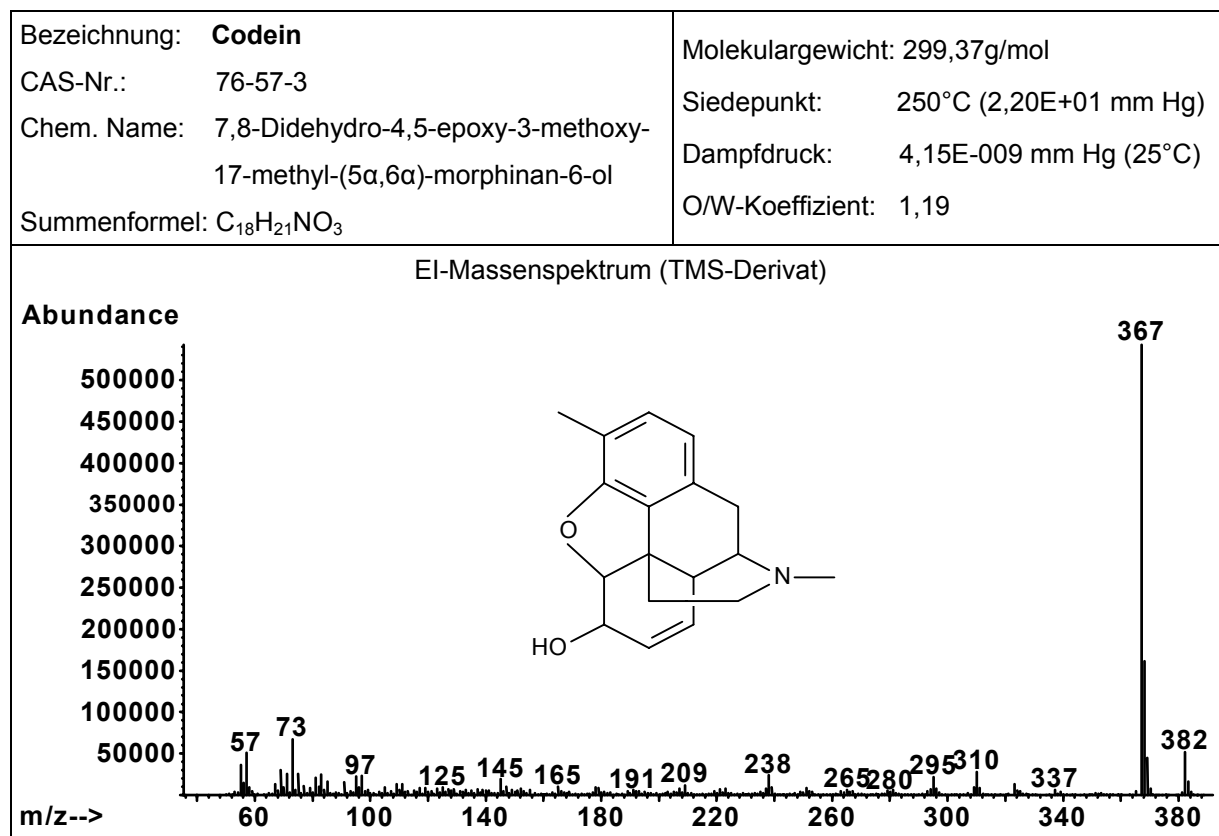
9.5 Opiode

Bezeichnung: (±)-Methadon	Molekulargewicht: 309,45 g/mol
CAS-Nr.: 76-99-3	Schmelzpunkt: 265°C
Chem. Name: 6-Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-heptanon	Dampfdruck: 1,12E-006 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₂₁ H ₂₇ NO	O/W-Koeffizient: 3,93

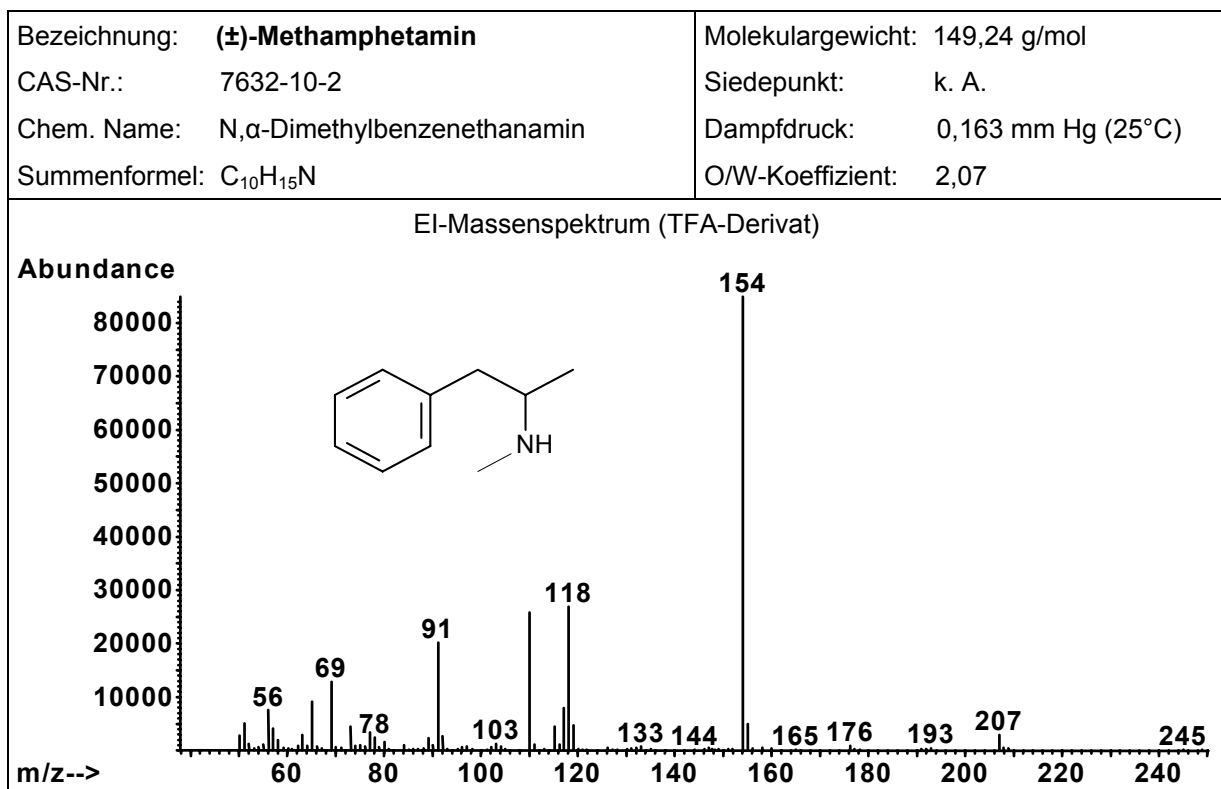
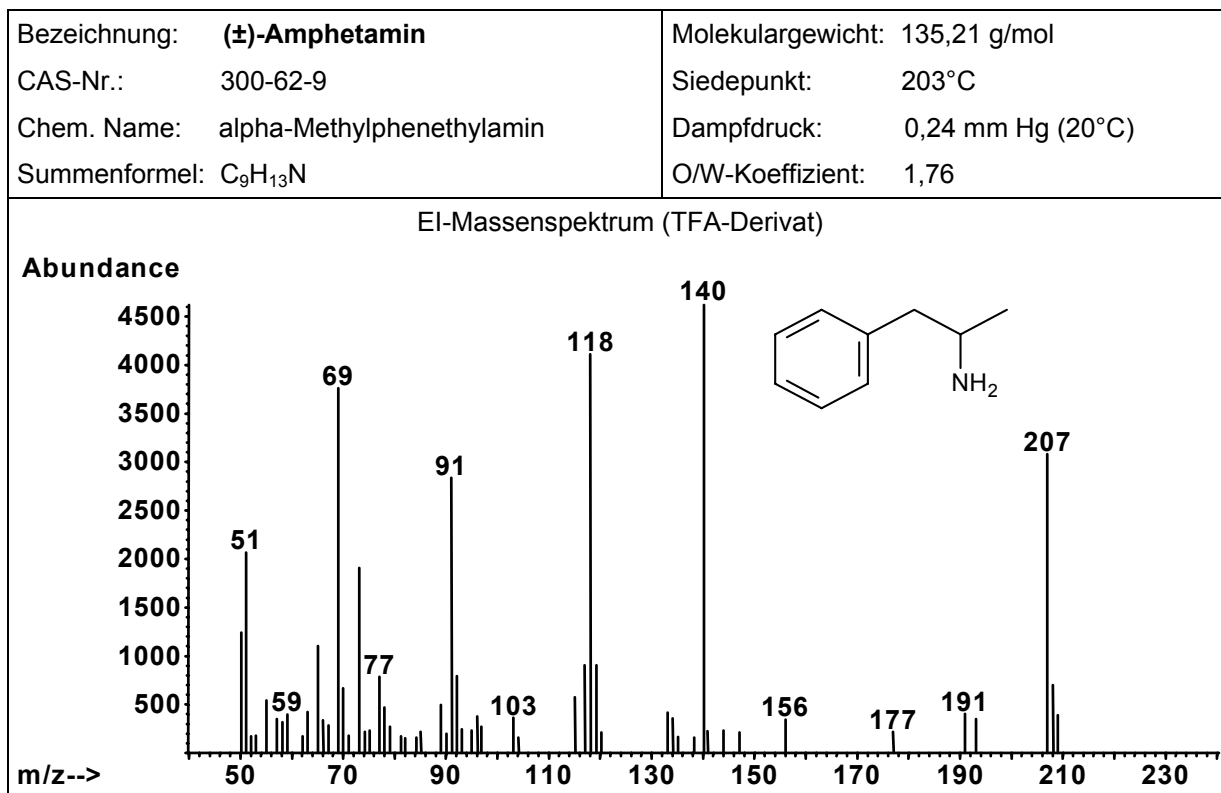


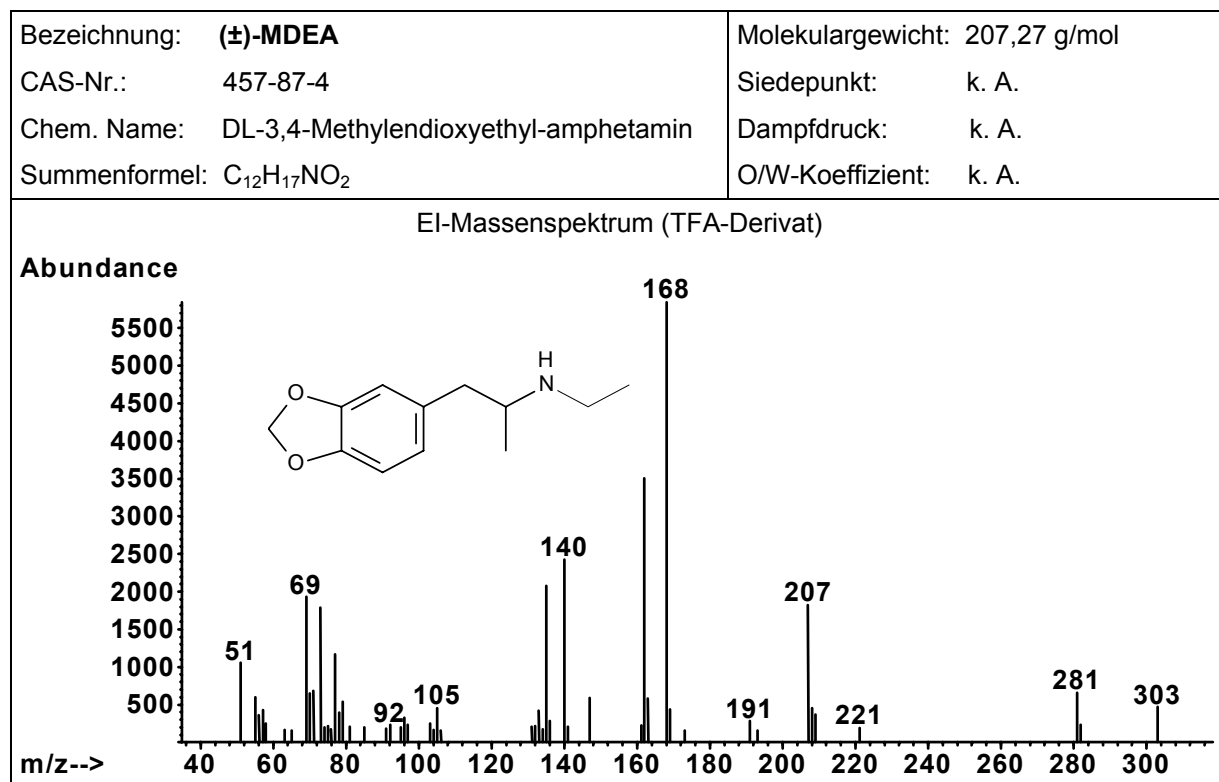
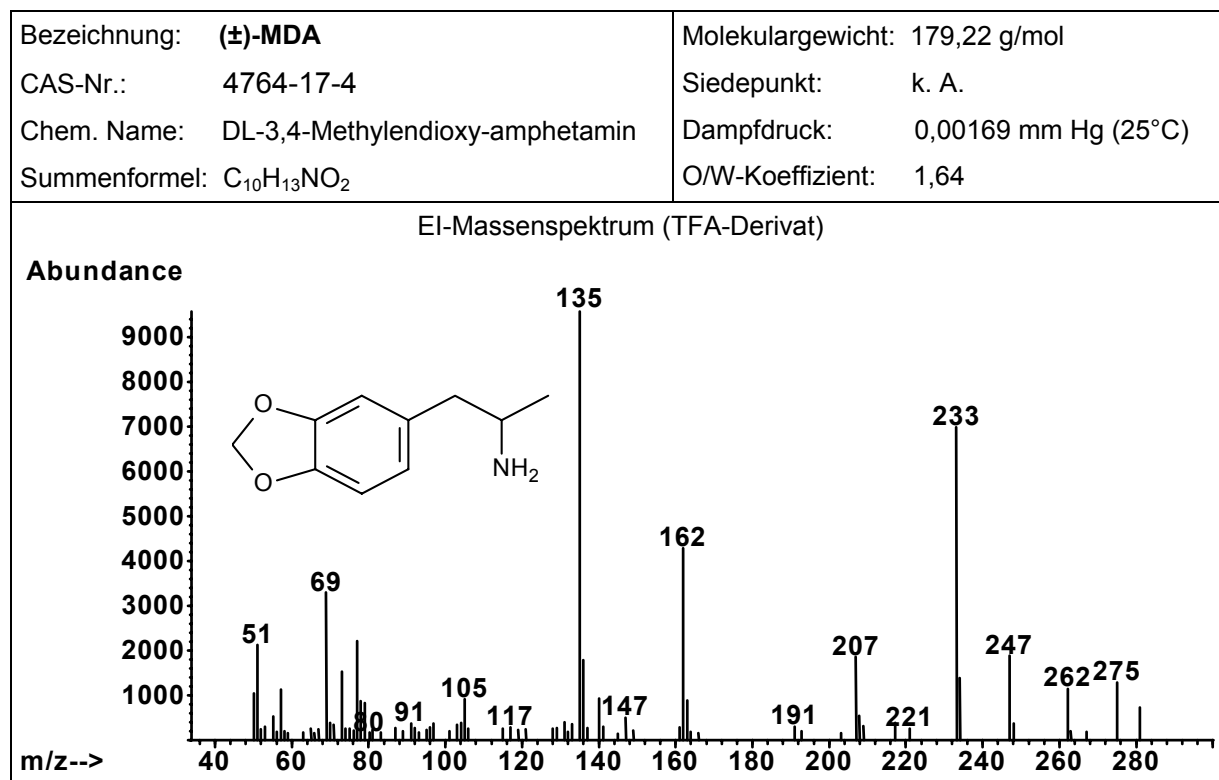
Bezeichnung: EDDP	Molekulargewicht: 277,40 g/mol
CAS-Nr.: 66729-78-0	Siedepunkt: k. A.
Chem. Name: DL-2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolinium	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₂₀ H ₂₃ N	O/W-Koeffizient: k. A.



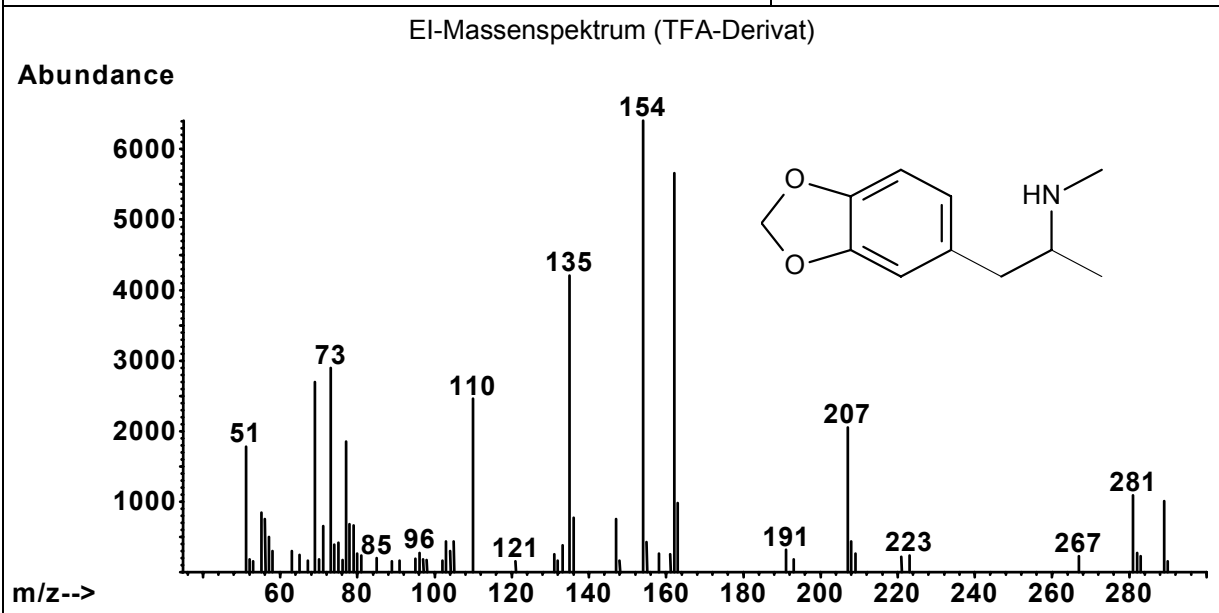


9.6 Amphetamin und synthetische Designerdrogen vom Amphetamintyp

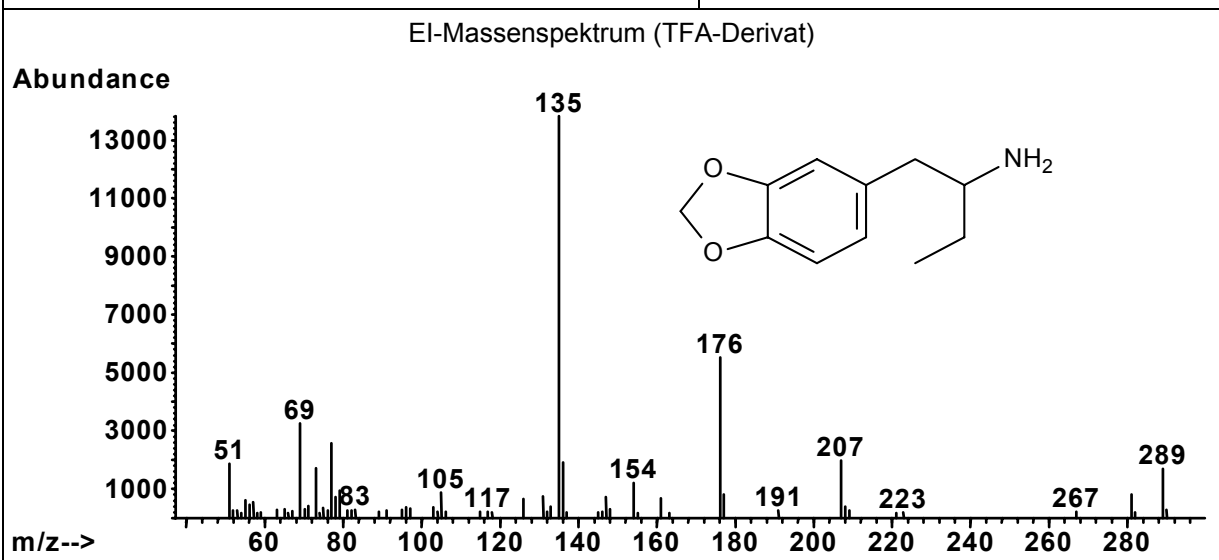


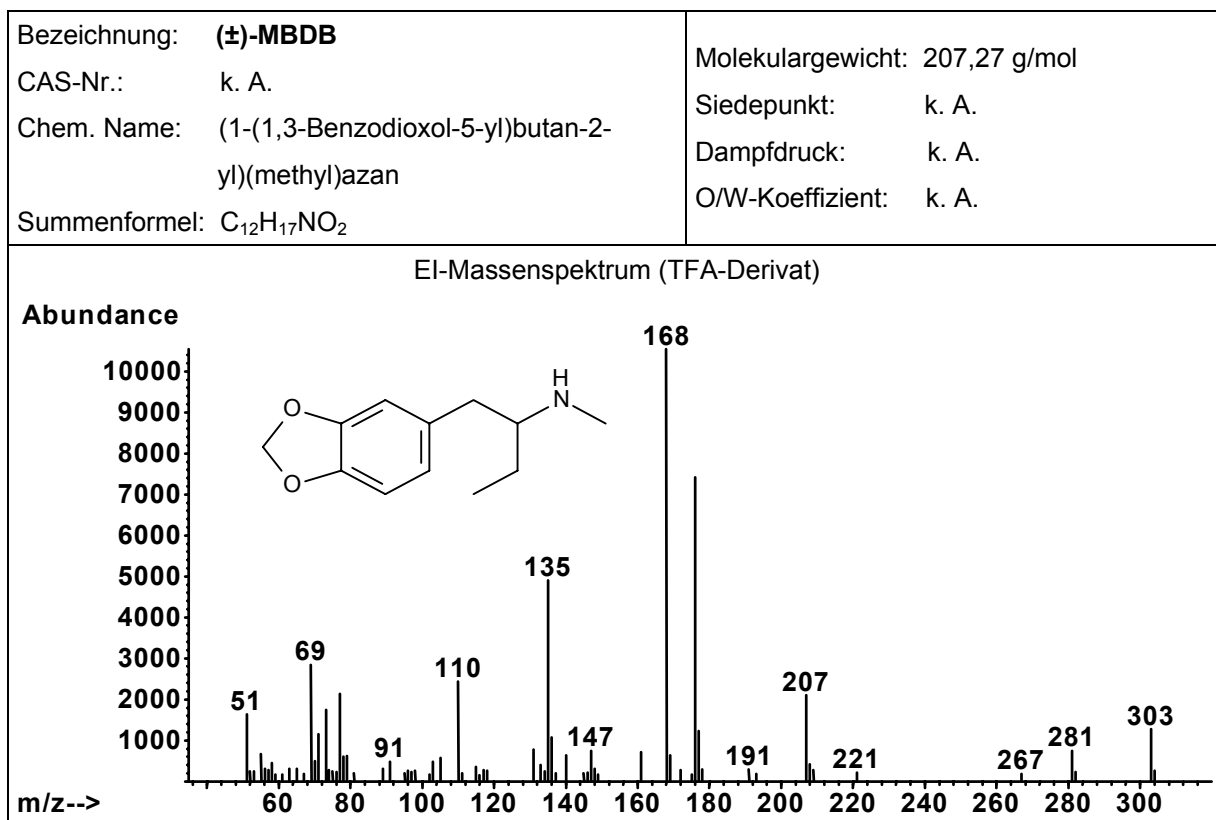


Bezeichnung: (±)-MDMA	Molekulargewicht: 193,25 g/mol
CAS-Nr.: 54946-52-0	Siedepunkt: 147 – 153°C
Chem. Name: DL-3,4-Methylenedioxyamphetamin	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	O/W-Koeffizient: k. A.

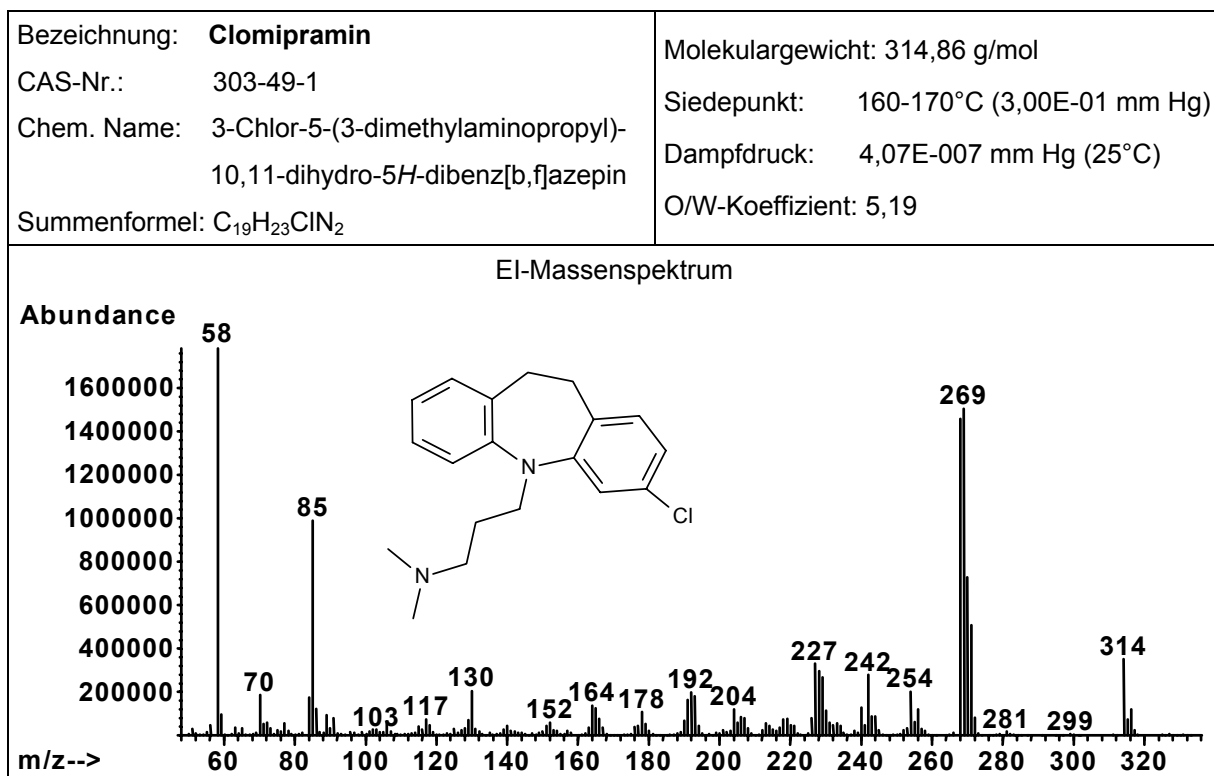
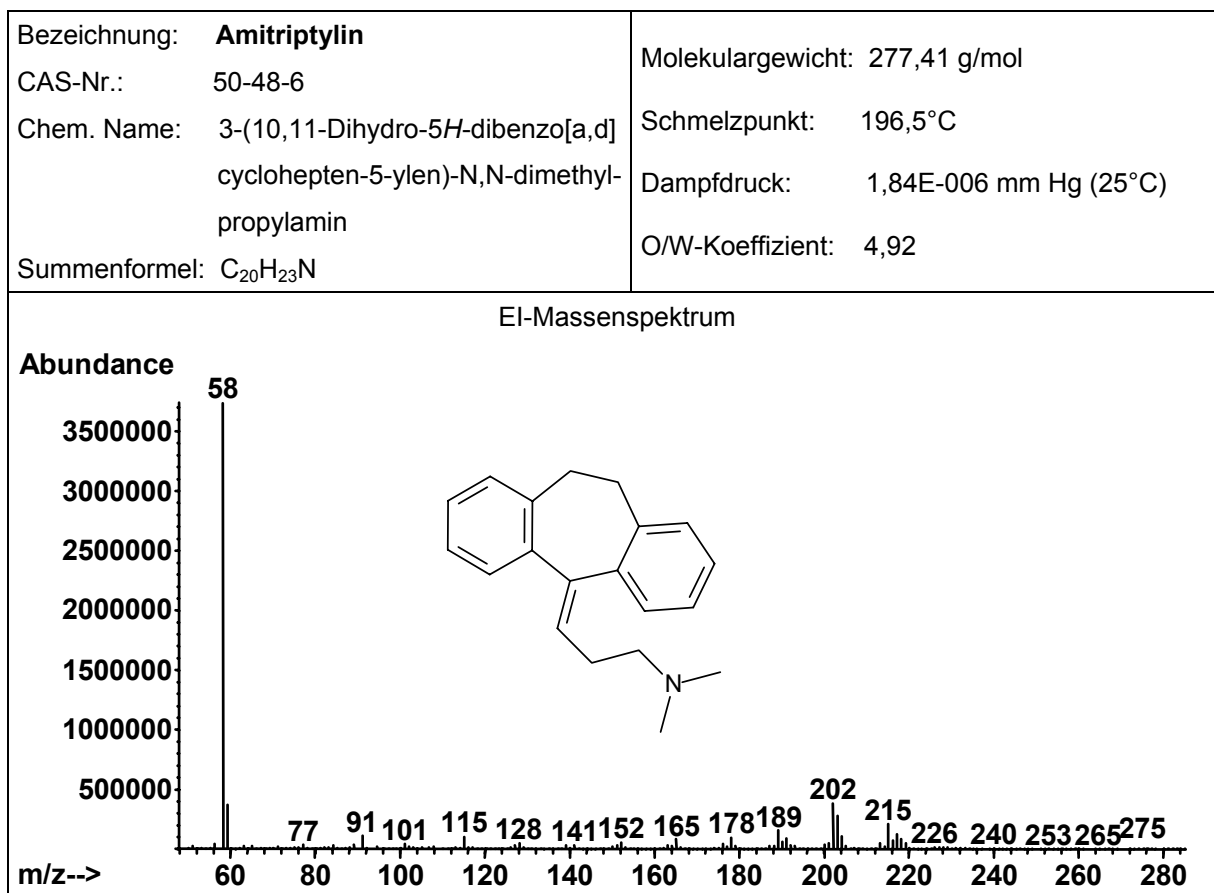


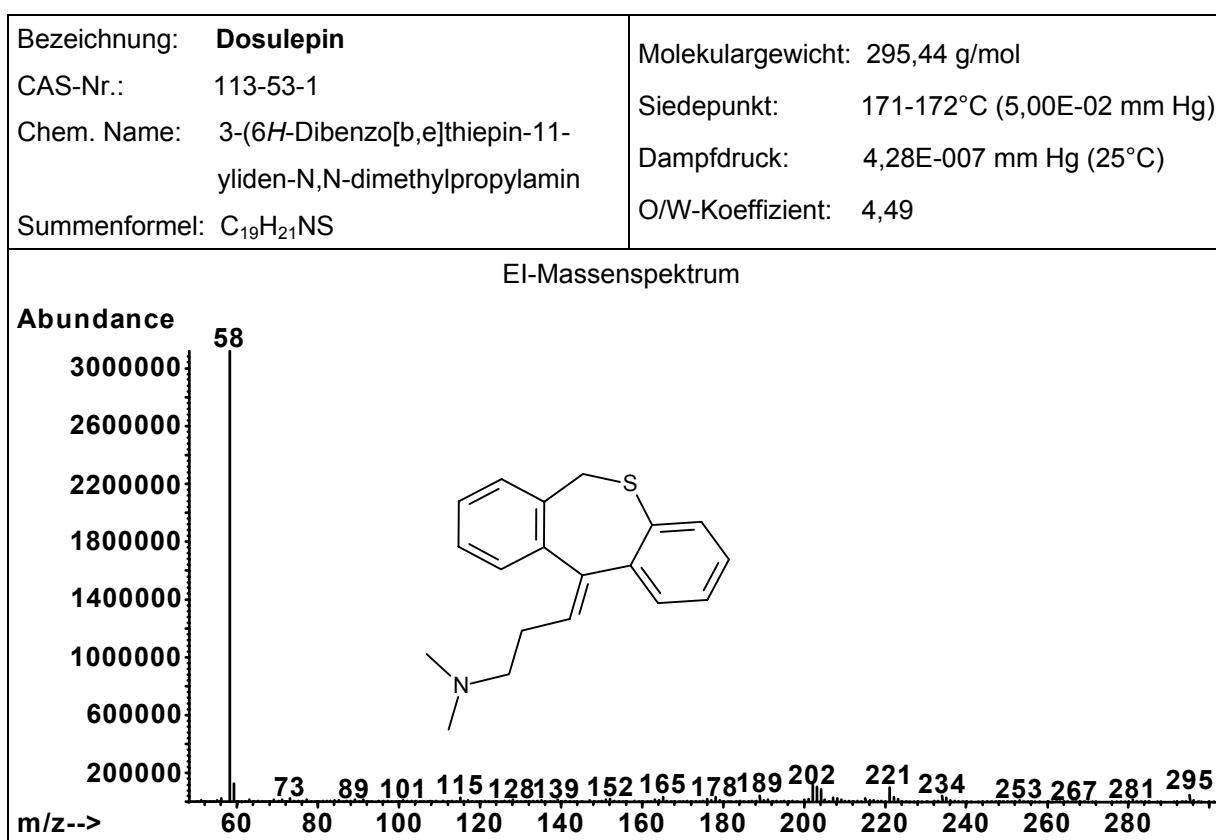
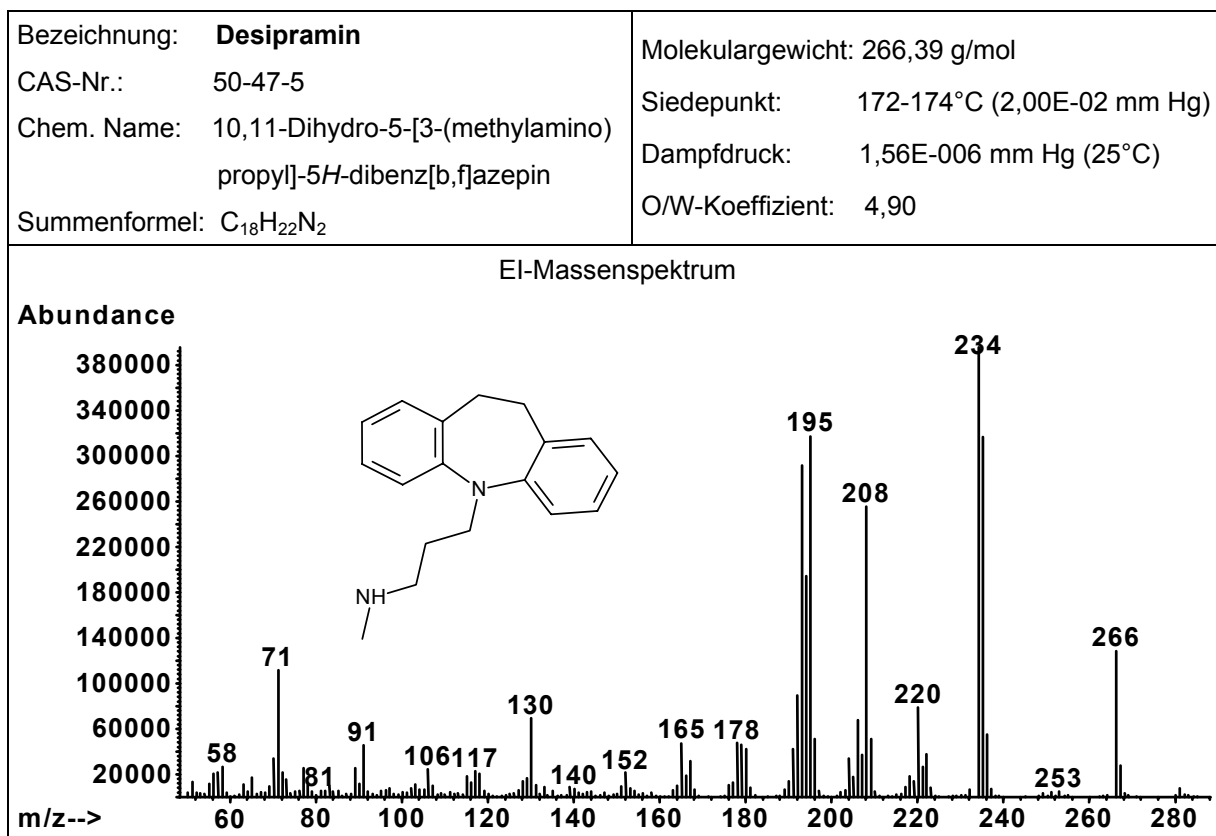
Bezeichnung: (±)-BDB	Molekulargewicht: 193,24 g/mol
CAS-Nr.: k. A.	Siedepunkt: k. A.
Chem. Name: 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)butan-2-ylazan	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	O/W-Koeffizient: k. A.

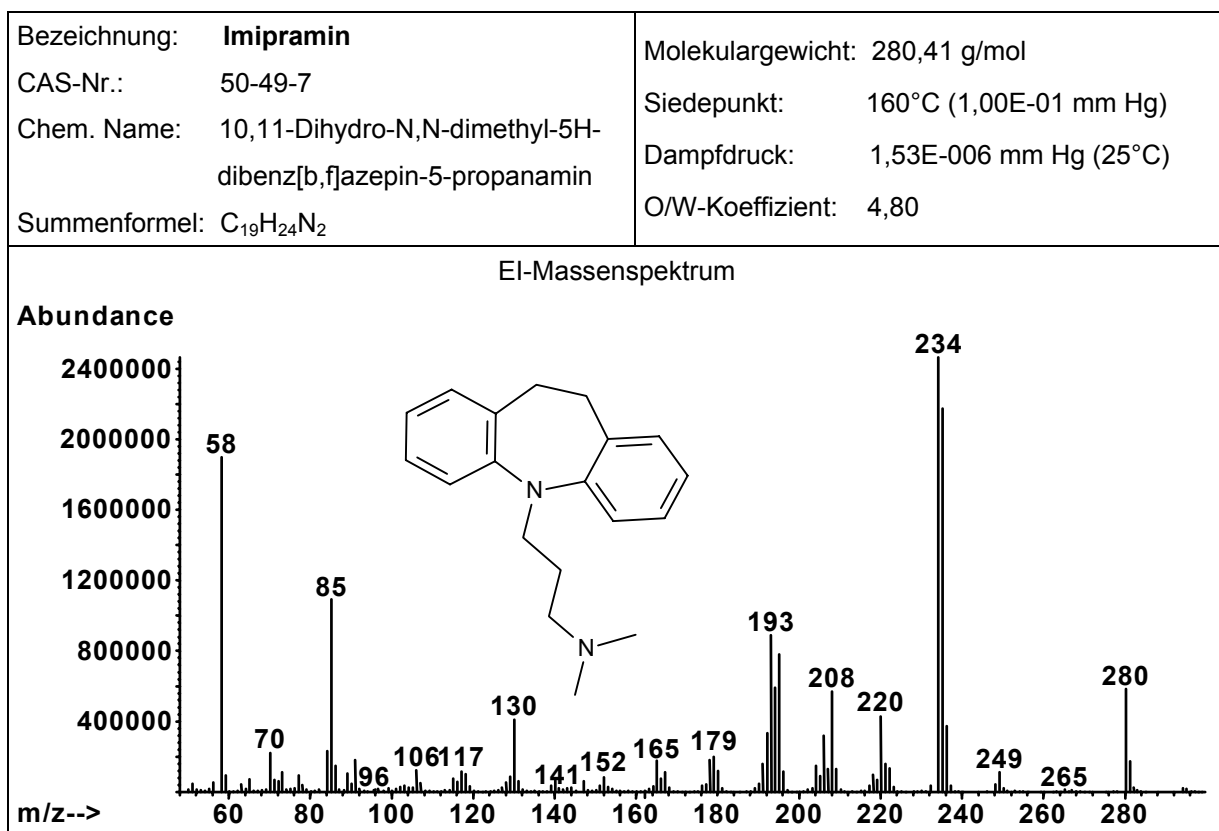
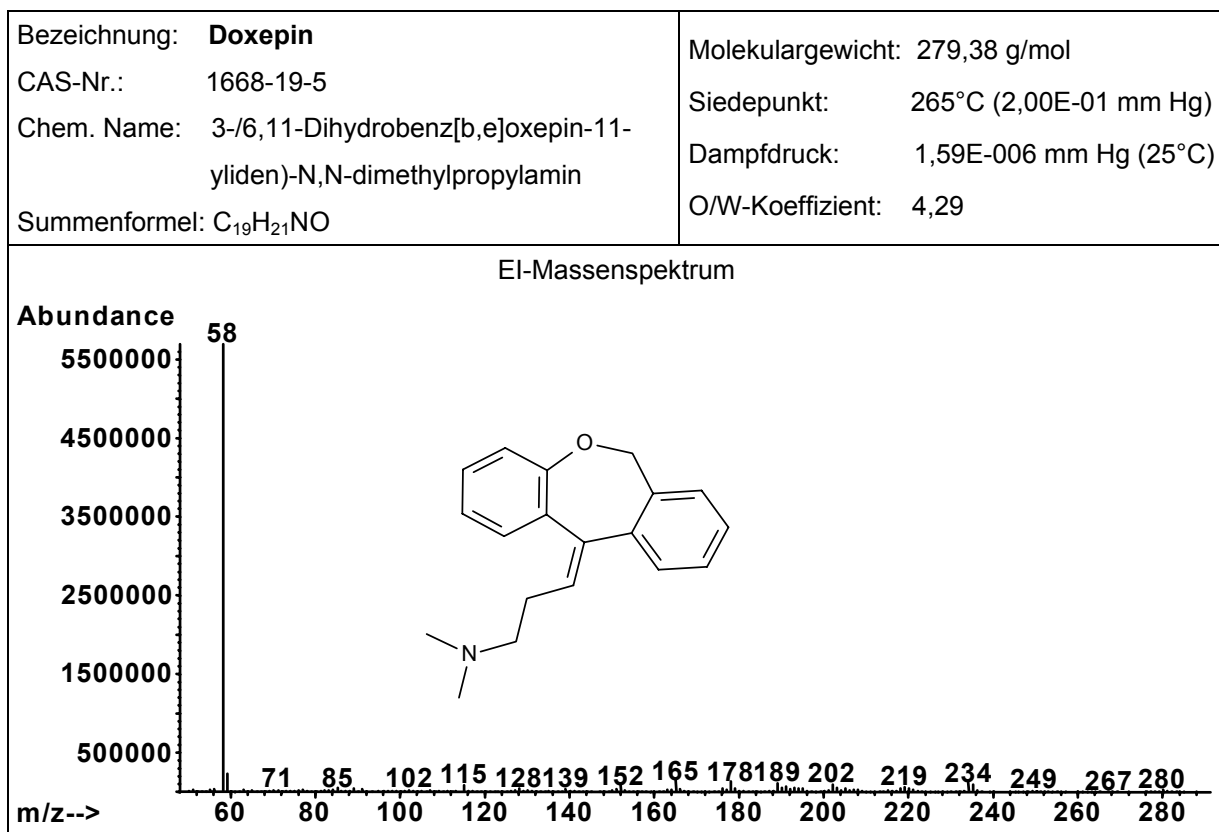


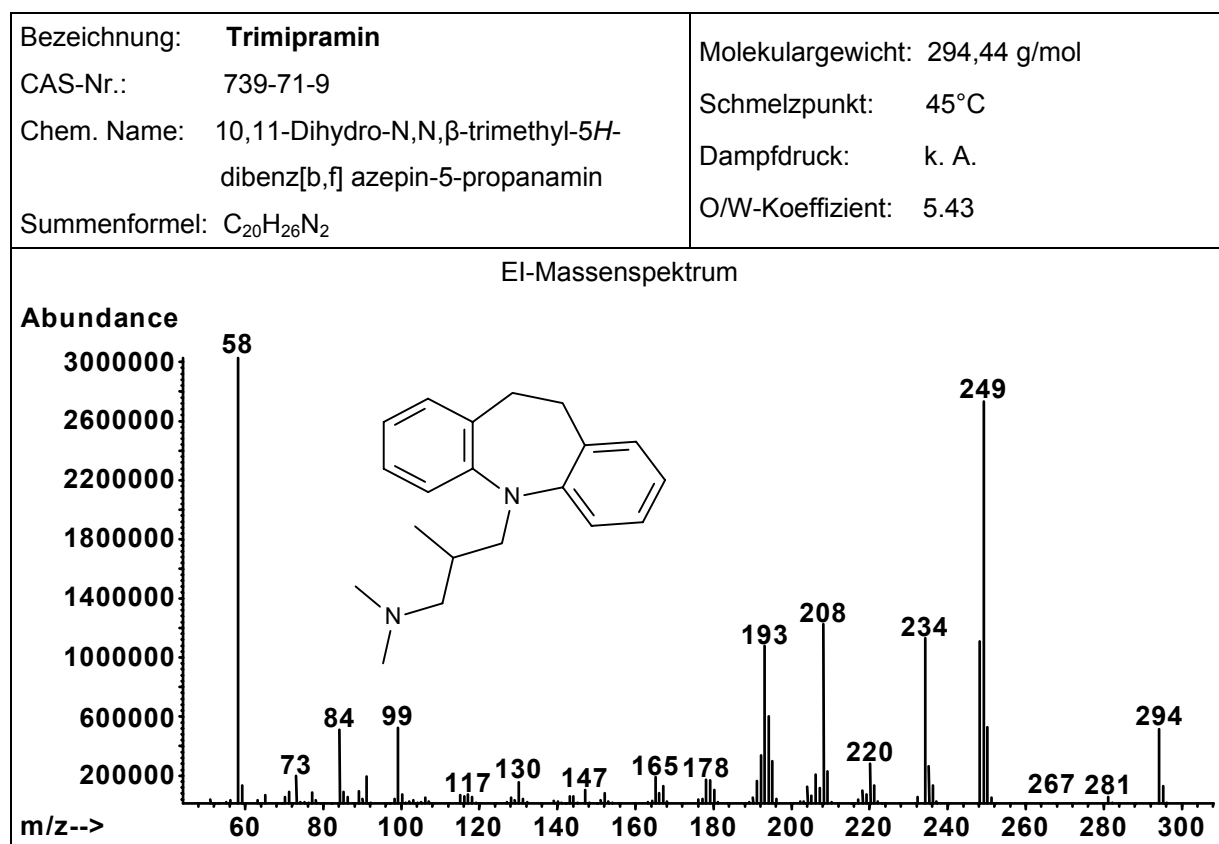
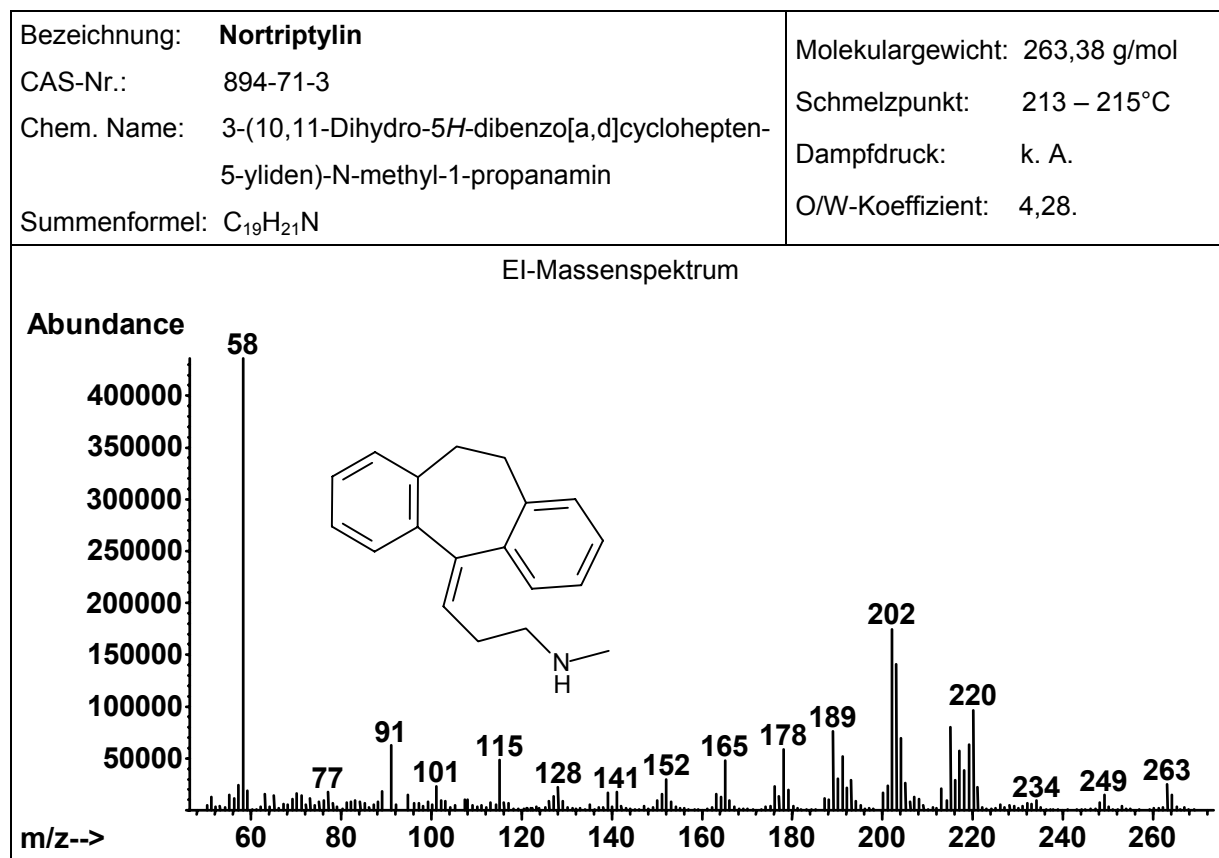


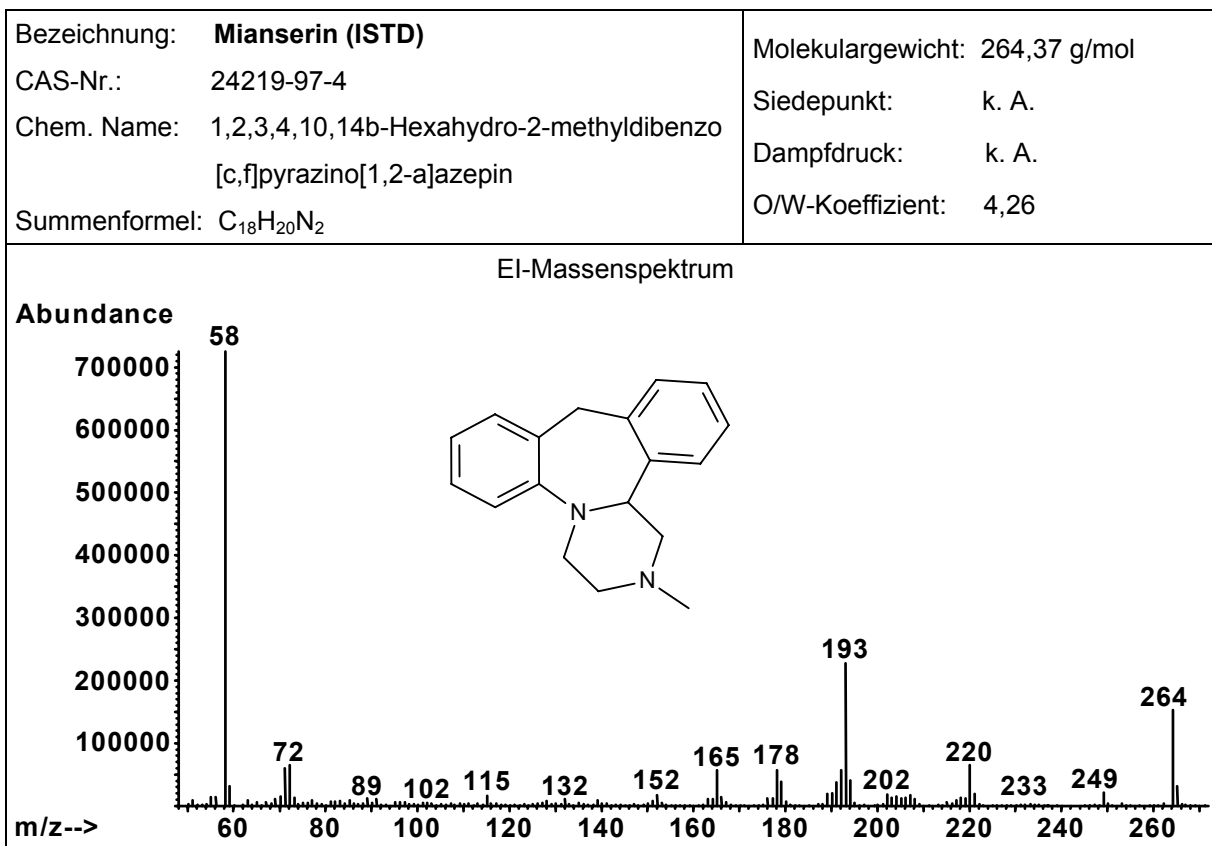
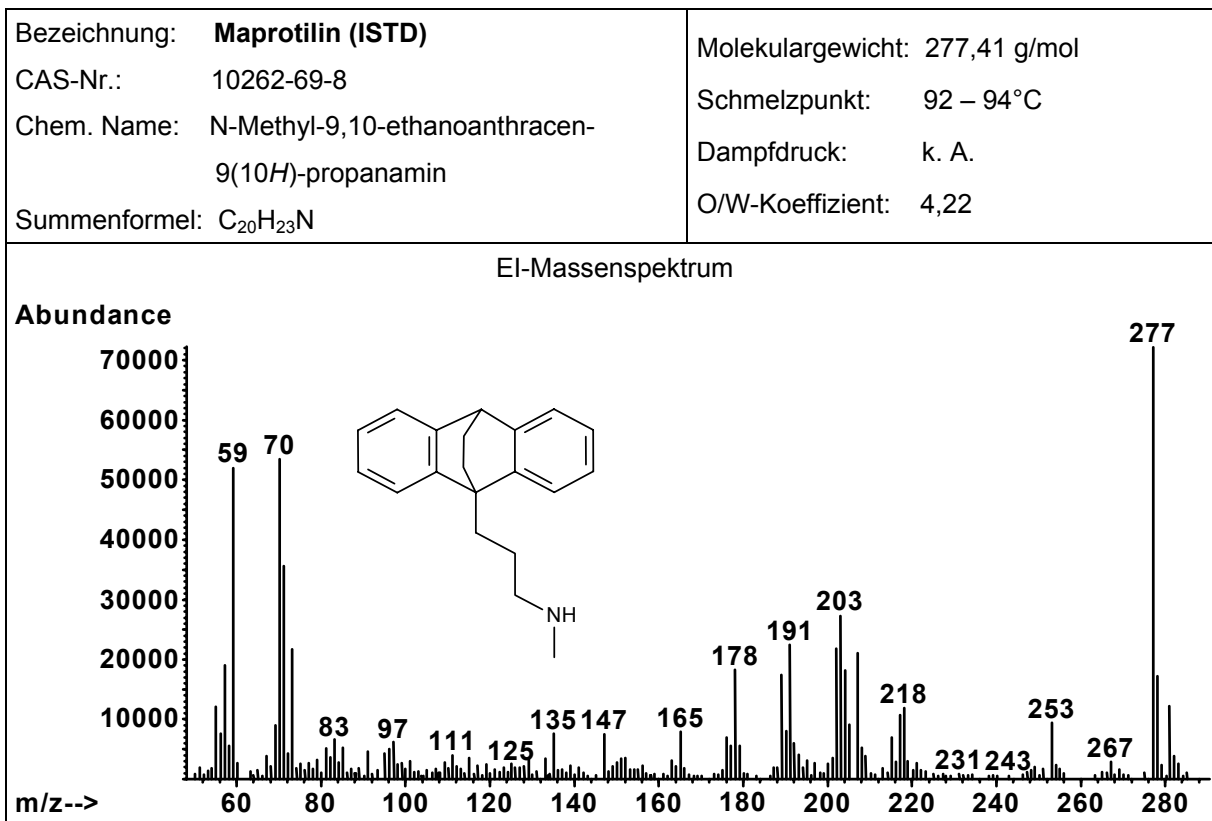
9.7 Trizyklische Antidepressiva



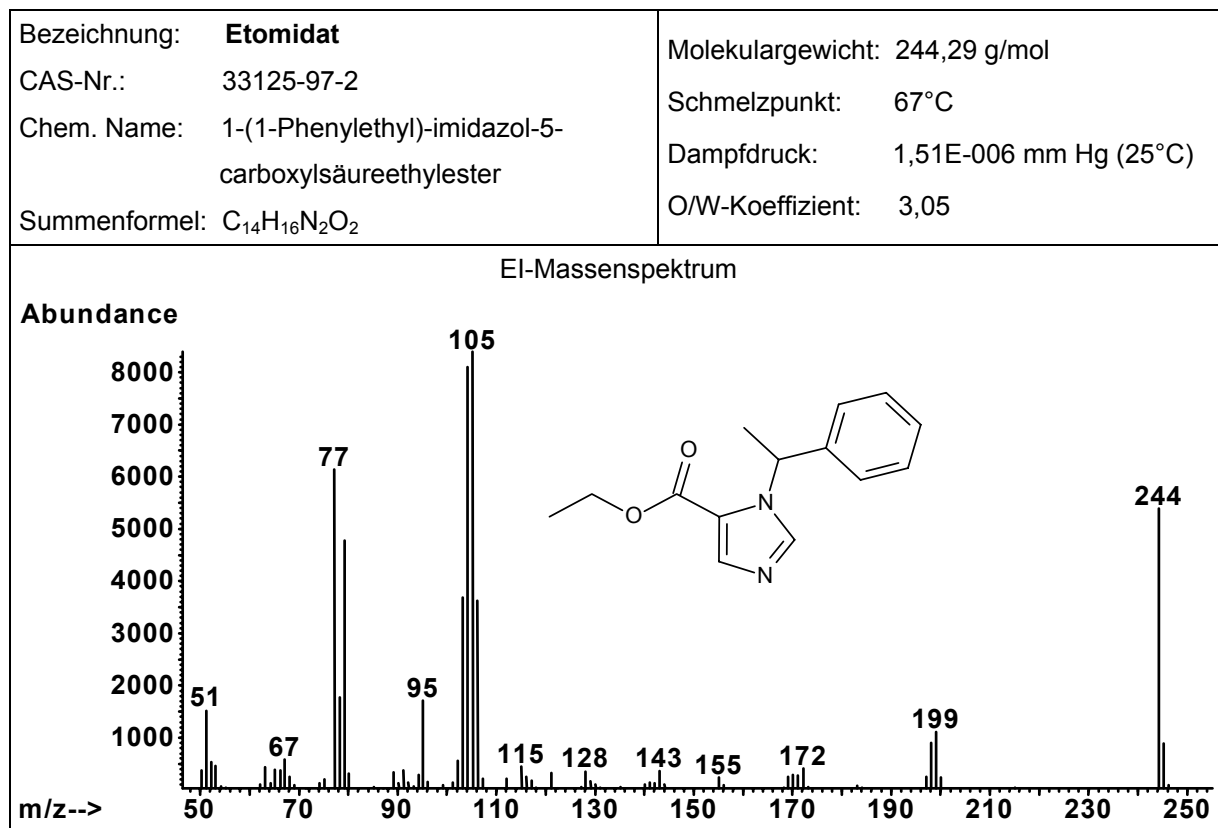
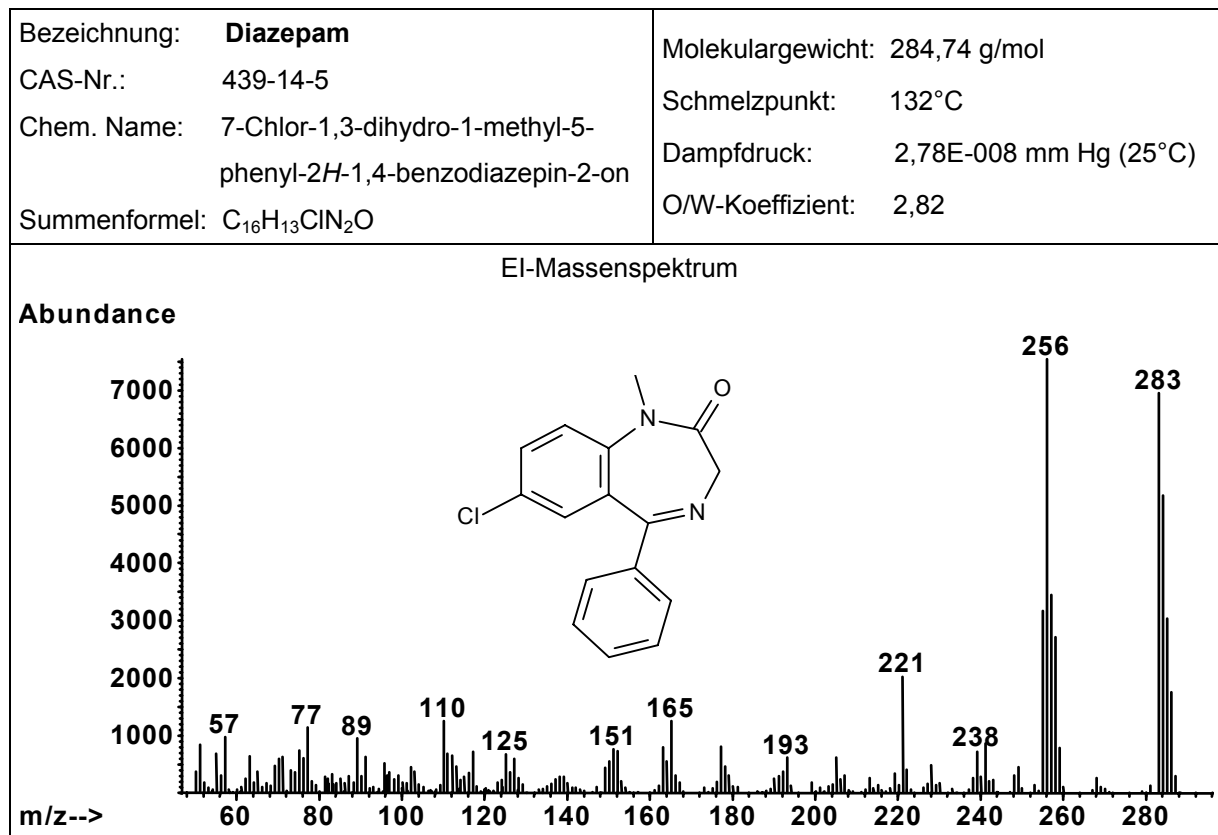




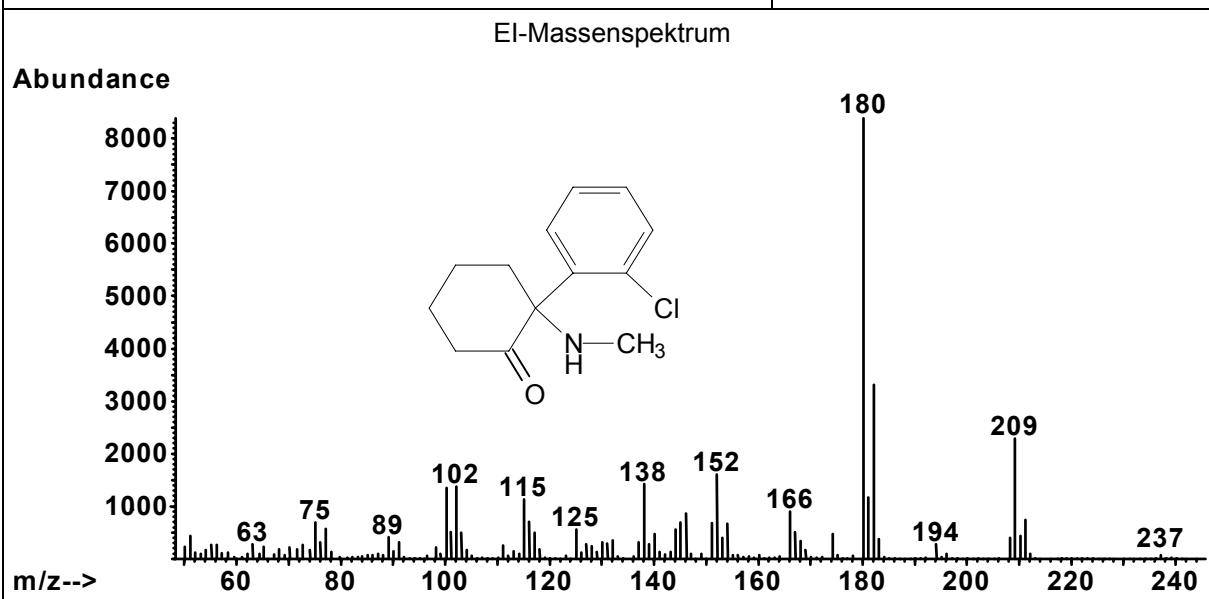




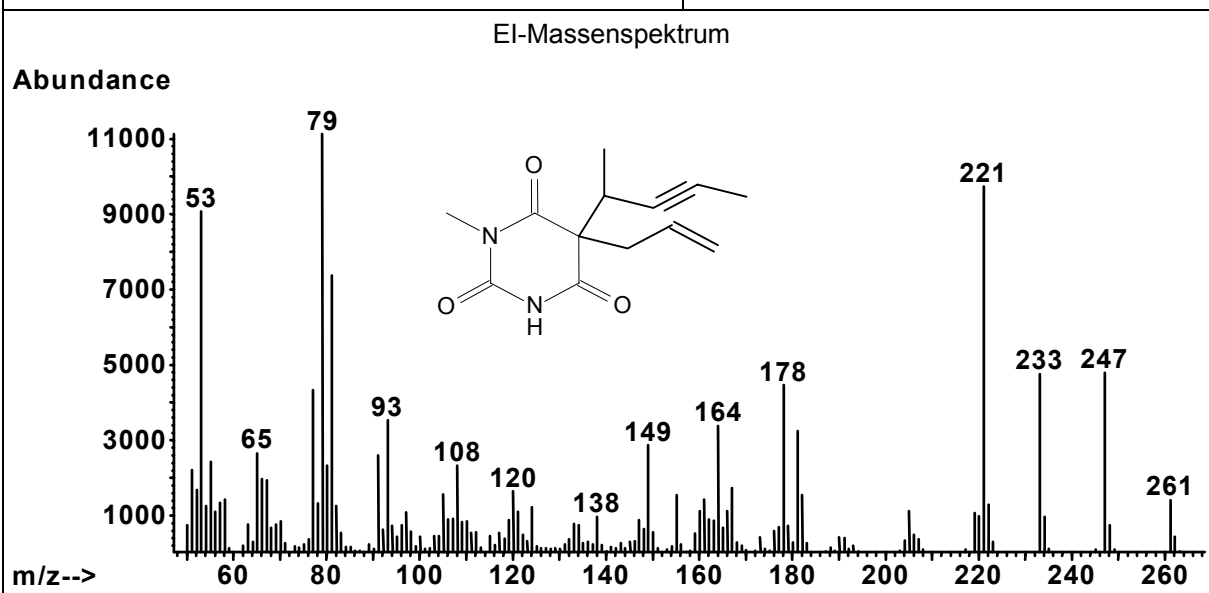
9.8 Injektionsnarkotika

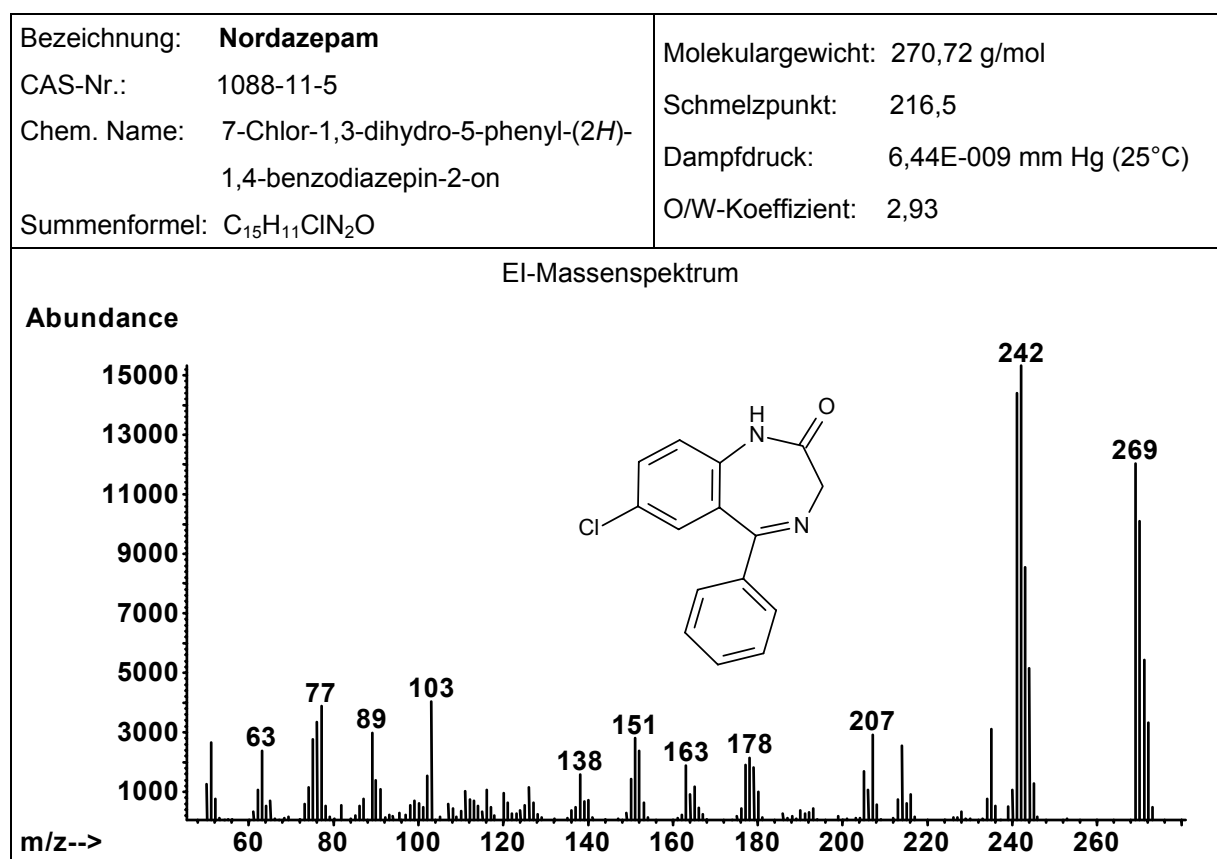
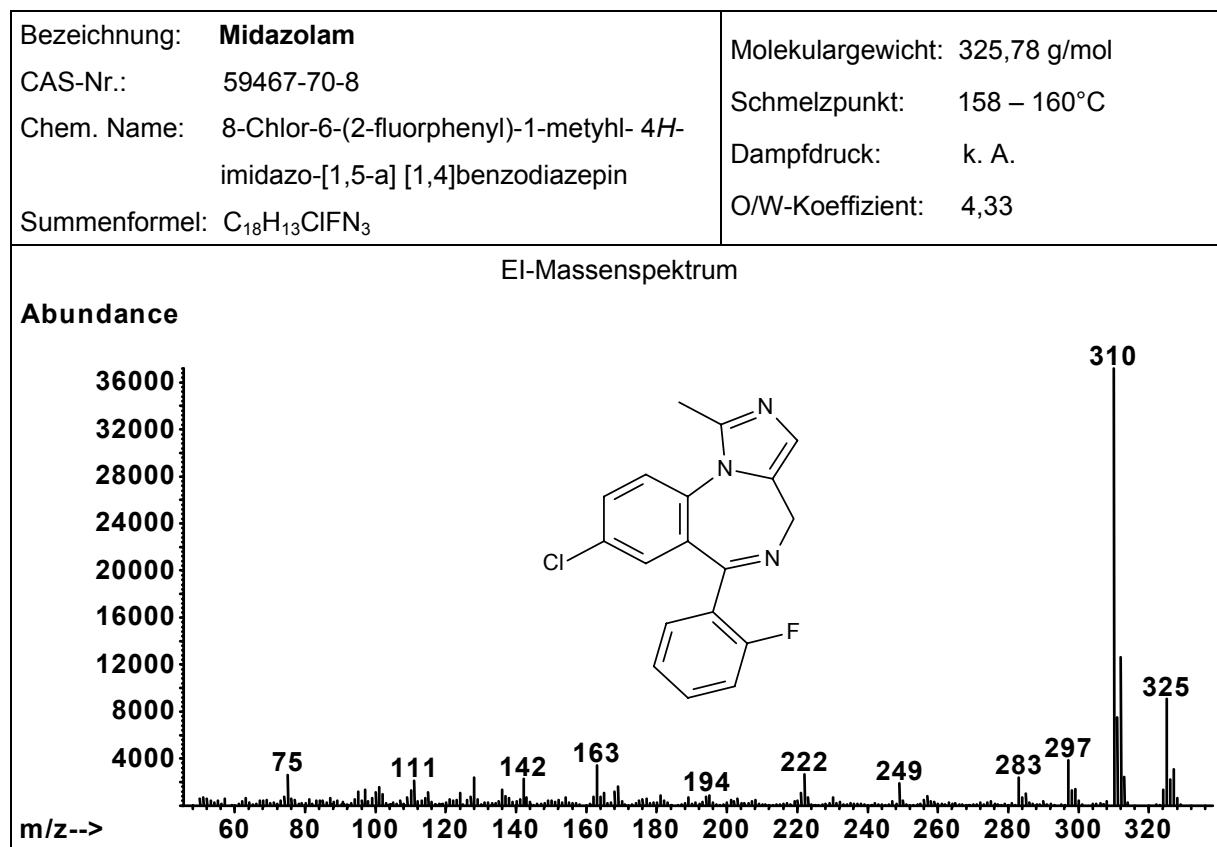


Bezeichnung: Ketamin	Molekulargewicht: 237,73 g/mol
CAS-Nr.: 6740-88-1	Schmelzpunkt: 262 – 263°C
Chem. Name: 2-(Chlorphenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₁₃ H ₁₆ ClNO	O/W-Koeffizient: 3,12

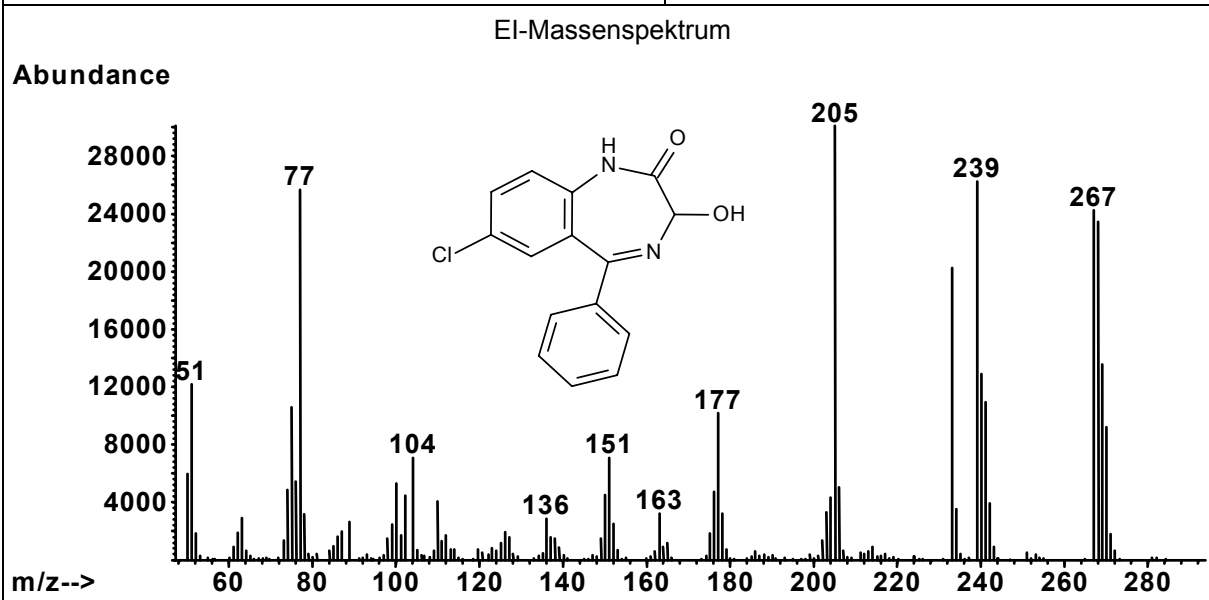


Bezeichnung: Methohexital	Molekulargewicht: 262,31 g/mol
CAS-Nr.: 151-83-7	Schmelzpunkt: 92 – 96°C
Chem. Name: (±)-5-Allyl-1-methyl-5-(1-methyl-2-pentynyl)-barbitursäure	Dampfdruck: k. A.
Summenformel: C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₃	O/W-Koeffizient: k. A.





Bezeichnung: Oxazepam	Molekulargewicht: 286,72 g/mol
CAS-Nr.: 604-75-1	Schmelzpunkt: 205 – 206°C
Chem. Name: 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-(2H)-1,4-benzodiaz-epin-2-on	Dampfdruck: 3,76E-012 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	O/W-Koeffizient: 2,24



Bezeichnung: Pentobarbital	Molekulargewicht: 226,27 g/mol
CAS-Nr.: 76-74-4	Schmelzpunkt: 129,5°C
Chem. Name: 5-Ethyl-5-(1-methylbutyl)-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-pyrimidintrion	Dampfdruck: 3,02E-010 mm Hg (25°C)
Summenformel: C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	O/W-Koeffizient: 2,10

