

**Methodenentwicklung und Qualitätssicherung bei forensisch-
toxikologischen Übersichtsanalysen unter Anwendung
statistischer Versuchsplanung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne-Kathrin Gottzein

aus

Lüneburg

Bonn 2012

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

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Mußhoff
2. Gutachter: Prof. Dr. K.-J. Steffens

Tag der Promotion: 10.12.2012

Erscheinungsjahr: 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2007 bis April 2012 am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Apl.-Prof. Dr. Frank Mußhoff durchgeführt.

Zusammenfassung

Der Alltag der Rechtsmedizin wird nicht nur durch die forensische Medizin bestimmt, sondern zeichnet sich zu einem großen Teil durch die Beantwortung toxikologischer Fragestellungen aus.

In Fällen von Intoxikationen mit oder ohne Todesfolge, zur Beurteilung einer Schuldfähigkeit oder bei auffälligem Verhalten im Straßenverkehr ist es beispielsweise häufig nötig, verschiedene biologische Proben wie Blut, Urin, Gewebeproben oder auch Haare umfassend auf verschiedenste Arzneimittel, Suchtstoffe und Toxine im Rahmen einer systematischen toxikologischen Analyse zu untersuchen. Hier kommen vor allem Screening-Methoden zum Einsatz, mit deren Hilfe in biologischen Proben nach entsprechender Aufbereitung möglichst viele Analyten unterschiedlichster Substanzklassen detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und Optimierung von analytischen Methoden, die sich in ihrer Gesamtheit für die Durchführung einer systematischen toxikologischen Analyse eignen, vorgestellt.

Um den grundsätzlichen Anforderungen jedweder Analytik gerecht zu werden, wurden zunächst bestehende Qualitätssicherungssysteme auf ihre Eignung untersucht, anschließend den aktuellen technischen Standards angepasst und verfeinert.

Es wurde eine Methode mittels Mikrofestphasenextraktion und anschließender gaschromatographischer Auftrennung mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt, die für den Nachweis flüchtiger organischer Substanzen geeignet ist. Ein am Ende der Arbeit beschriebener Bericht über einen authentischen Suizid-Fall liefert den Beleg für die zwingende Einbeziehung dieser Methode in eine systematische toxikologische Analyse.

Da sich im Laufe der Untersuchungen aufgrund einer Vergleichsstudie gezeigt hat, dass auf eine gaschromatographische Analytik (GC-MS) trotz der Fortschritte bezüglich der Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) nicht verzichtet werden kann, war eine Optimierung der GC-MS-Methodik der nächste logische Schritt. Hierzu wurde eine Festphasenextraktionsmethode entwickelt und ihre Anwendbarkeit in einem erneuten Vergleich bewiesen.

Abschließend erfolgte die Optimierung der hausinternen HPLC-MS/MS-Methode. Hierbei wurde ein Schwerpunkt auf den optimalen Verdünnungsgrad von Urin gelegt.

Alle (Weiter)entwicklungen wurden unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung durchgeführt. Diese Vorgehensweise hat im Gegenzug zur „one-by-one“-Methodik den Vorteil, dass Interferenzen zwischen einzelnen ausgewählten Faktoren erkannt und quantifiziert werden können, sämtliche Ergebnisse eine statistische Signifikanz aufweisen können und dadurch keinen Raum für (Fehl)interpretationen zulassen. Durch die vorliegende Arbeit werden die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten vorgestellt. Dieses leistet einen Beitrag für die zukünftige Implementierung von statistischer Versuchsplanung in die Entwicklung und Optimierung forensisch-toxikologischer Analysen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Frank Mußhoff, Toxikologische Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich sehr für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit sowie für die stete Diskussionsbereitschaft.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Klaus-Jürgen Steffens, Pharmazeutische Technologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Zweitbetreuungsverhältnisses und der damit verbundenen Unterstützung.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Burkhard Madea, Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für die fortwährende Unterstützung und die wohlwollende Begleitung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft zur Beteiligung an der Promotionskommission.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Uta Küpper. Ihre uneingeschränkte fachliche Unterstützung und die Freundschaft zu ihr haben bedeutend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sehr gerne denke ich an die schöne Zeit zurück.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin für die Kollegialität und tatkräftige Unterstützung bedanken. Für die unvergessliche Zeit am Schreibtisch, im Labor und bei Tagungen gebührt mein Dank vor allem Elena Albermann und Cornelius Heß.

Dem Fachgebiet 14 des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte unter der Leitung von Dr. Susanne Brendler-Schwaab danke ich herzlich für die herausragende Arbeitsatmosphäre, welche die Vereinbarkeit von Berufstätigkeit und Promotion ermöglicht hat.

Dr. Marcus Hubert danke ich sehr für die stete konstruktive Unterstützung und die Inspiration zur Durchführung der Doktorarbeit.

Von Herzen danke ich allen meinen Freunden, die fortwährend an meiner Seite standen, ganz besonders Dr. Dorothee Atzler, Carina Mohn, Irene Müller, Andra Schaz und Ninja Schulz.

Schließlich gilt mein größter Dank meinen Eltern Renate und Rolf-Rüdiger Gottzein und meinem Freund Christian Raffauf, die jederzeit für mich da waren, mich liebevoll unterstützt und mir Kraft gegeben haben. Herzlichen Dank für eure Geduld und euer Verständnis.

Publikationen

Veröffentlichungen

Gottzein, A. K.; Musshoff, F.; Doberentz, E.; Madea, B. Combined suicide by oxydemeton-methyl (Metasystox) ingestion and hanging. *Forensic Sci. Int.* **189** (2009); e21-e25

Gottzein, A. K.; Musshoff, F.; Madea, B. Qualitative screening for volatile organic compounds in human blood using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **45** (2010); 391-397

Gottzein, A. K.; Musshoff, F.; Madea, B. Optimization of solid-phase extraction for general unknown analysis in human blood using gas chromatography-mass spectrometry via experimental design. *J. Forensic Sci.* In Vorbereitung.

Gottzein, A. K.; Musshoff, F.; Madea, B. Systematic toxicological analysis revealing a rare case of captan ingestion. *J. Forensic Sci.* Angenommen.

Vorträge

30. - 31. Mai 2008: 17. Frühjahrstagung Region Nord der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; A. K. Gottzein, E. Doberentz, F. Musshoff, B. Madea: *Kombinierter Suizid durch Oxydemeton-methyl-Intoxikation und Erhängen*, Essen

14. - 16. April 2011: XVII. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh); A. K. Gottzein, C. Schyma, F. Musshoff, B. Madea: *Systematic toxicological analysis revealing a rare case of captan ingestion*, Mosbach

Poster

24. - 29. September 2007: 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; A. K. Gottzein, F. Musshoff, B. Madea: *Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen*, Mainz

24. - 27. September 2008: 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin;
A. K. Gottzein, J. Bayer, F. Musshoff, B. Madea: *GC-MS versus LC-MS/MS: Methodenvergleich bei forensisch-toxikologischen Suchanalysen*, Dresden

22. - 26. September 2009: 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin;
A. K. Gottzein, F. Musshoff, B. Madea: *Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS*, Basel

22. - 25. September 2010: 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin;
A. K. Gottzein, F. Musshoff, B. Madea: *Screening mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie - Methodenentwicklung*, Berlin

Hinweis

Um Verwechslungen mit Kommata im fortlaufenden Text zu vermeiden, werden Dezimalzahlen nach angelsächsischer Konvention mit Dezimalpunkten geschrieben.

Inhalt

Zusammenfassung.....	I
Danksagung.....	III
Publikationen.....	V
Hinweis.....	VI
Inhalt.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Ziele der Arbeit.....	2
2 Grundlagen und Stand der Technik	3
2.1 Grundlagen der GC-MS.....	3
2.1.1 Prinzip der Gaschromatographie.....	3
2.1.2 Prinzip der Massenspektrometrie.....	3
2.2 Grundlagen der HPLC-MS/MS	4
2.3 Grundlagen der HPLC-DAD	5
2.4 Grundlagen der SPME	5
2.4.1 Theoretische Aspekte des Verteilungsgleichgewichts.....	7
2.4.2 Kinetische Aspekte.....	8
2.5 Grundlagen der Festphasenextraktion	9
2.6 Statistische Grundlagen	10
2.6.1 Normalverteilung	10
2.6.2 Signifikanz	11
2.6.3 Varianz und Standardabweichung.....	11
2.6.4 Standardfehler und Konfidenzniveau.....	12
2.6.5 F-Test	12
2.6.6 Freiheitsgrade.....	13
2.6.7 Varianzanalyse	13

2.7	Statistische Versuchsplanung	13
2.7.1	Grundlagen der statistischen Versuchsplanung	13
2.7.2	Response surface methodology und Central composite design	14
2.8	Probenmatrices.....	15
2.9	Stand der Screening-Analytik mittels GC-MS	16
2.10	Stand der Screening-Analytik mittels HPLC-MS(/MS)	20
2.11	Stand der Analytik mittels SPME	22
2.12	Stand der Methodenoptimierung mittels statistischer Versuchsplanung	24
2.13	Beispielanalyten zur Methodenoptimierung	25
2.13.1	Beispielanalyten für die Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Verbindungen I: flüchtige organische Verbindungen	25
2.13.2	Beispielanalyten für die Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Verbindungen II: Inhalationsnarkotika	28
2.13.3	Beispielanalyten für die Entwicklung einer SPE-Methode	29
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Chemikalien	32
3.2	Laufmittel.....	32
3.3	Geräte und Materialien	33
3.3.1	GC-MS	33
3.3.2	HPLC-MS/MS	33
3.3.3	HPLC-DAD	33
3.3.4	Festphasenextraktion.....	33
3.3.5	Festphasenmikroextraktion	34
3.3.6	Software	34
3.4	Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen	34
3.4.1	Qualitätskontrolle HPLC-DAD	35
3.4.2	Qualitätskontrolle GC-MS	35
3.5	Methodenvergleich bestehender forensisch-toxikologischer Suchanalysen.....	36
3.5.1	Suchanalyse mittels GC-MS	36
3.5.2	Suchanalyse mittels HPLC-MS/MS	37

3.6	Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS	38
3.6.1	Herstellung der Standardlösungen und Proben	38
3.6.2	Auswahl der Faser	39
3.6.3	Aussalzeffekt	39
3.6.4	pH-Wert	39
3.6.5	Wasserzugabe	39
3.6.6	Agitation	39
3.6.7	Eintauchtiefe	40
3.6.8	Desorptionstemperatur	40
3.6.9	Central Composite Design (für SPME)	40
3.6.10	Chromatographie und MS-Bedingungen (SPME)	42
3.6.11	Methodenvalidierung (SPME)	42
3.7	Entwicklung einer Screening-Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS	43
3.7.1	Herstellung der Standardlösungen und Proben	43
3.7.2	Probenvorbereitung	43
3.7.3	Auswahl der SPE-Kartuschen	44
3.7.4	Konditionierung	44
3.7.5	Waschschritt	44
3.7.6	Central Composite Design (für SPE)	45
3.7.7	Chromatographie und MS-Bedingungen (SPE)	48
3.7.8	Methodenvalidierung (SPE)	48
3.7.9	Methodenvergleich: GC-MS versus HPLC-MS/MS	48
3.8	Optimierung der Screening-Methode mittels HPLC-MS/MS	49
3.8.1	Standardlösung für die Methodenoptimierung	50
3.8.2	„One Factor Response Surface Design“ (Urinverdünnung HPLC-MS/MS)	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen	51
4.1.1	Qualitätskontrolle HPLC-DAD	51
4.1.2	Qualitätskontrolle GC-MS	52
4.2	Methodenvergleich bestehender forensisch-toxikologischer Suchanalysen	53

4.3	Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS	55
4.3.1	Einfluss der Faserbeschichtung.....	55
4.3.2	Aussalzeffekt.....	55
4.3.3	pH-Wert.....	55
4.3.4	Wasserzugabe.....	55
4.3.5	Agitation	56
4.3.6	Inkubationszeit, Eintauchtiefe und Desorptionstemperatur	56
4.3.7	Central Composite Design (für SPME)	57
4.4	Entwicklung einer Screening-Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS .	62
4.4.1	Probenvorbereitung.....	62
4.4.2	Auswahl der SPE-Kartuschen.....	63
4.4.3	Konditionierung	63
4.4.4	Waschschritt	63
4.4.5	Central Composite Design (für SPE).....	64
4.4.6	Methodenvergleich: GC-MS versus HPLC-MS/MS	69
4.5	Optimierung der Screening-Methode mittels HPLC-MS/MS	75
4.5.1	Lineares Modell	75
4.5.2	Lineares versus quadratisches Modell	77
4.5.3	„Mean“ Modell	79
5	Diskussion.....	81
5.1	Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen	81
5.1.1	Qualitätskontrolle HPLC-DAD	81
5.1.2	Qualitätskontrolle GC-MS	82
5.2	Methodenvergleich bestehender forensisch-toxikologischer Suchanalysen.....	83
5.3	Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS.....	83
5.4	Screening-Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS	88
5.5	Optimierung der Screening-Methode mittels HPLC-MS/MS	91
6	Fallbeispiel.....	93
6.1	Einleitung (Fallbeispiel)	93

6.2	Fallbericht	94
6.3	Sektion und histologische Befunde.....	95
6.4	Systematische toxikologische Analyse (Fallbeispiel).....	96
6.4.1	ELISA	97
6.4.2	Probenaufbereitung für HS-SPME-GC/MS.....	97
6.4.3	Probenaufbereitung für die Quantifizierung von THPI mittels GC-MS.....	97
6.5	Ergebnisse (Fallbeispiel).....	98
6.6	Diskussion (Fallbeispiel)	101
6.7	Zusammenfassung (Fallbeispiel)	102
7	Schlussfolgerung.....	103
8	Ausblick.....	106
9	Abbildungsverzeichnis.....	107
10	Tabellenverzeichnis	109
11	Formelverzeichnis.....	110
12	Literatur	111

Abkürzungsverzeichnis

AS	Arzneistoffe
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AUC	Peakfläche (<i>area under the curve</i>)
BImSchV	Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes
CCD	<i>central composite design</i> (zentraler, zusammengesetzter und drehbarer Versuchsplan)
CMR	cancerogen, mutagen, reproduktionstoxisch (Klassifizierung Gefahrstoffe)
DAD	Mehrkanalphotometer-Detektor (<i>diode array detector</i>)
DDA	<i>data-dependent acquisition</i>
df	Freiheitsgrade (<i>degrees of freedom</i>)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DoE	statistische Versuchsplanung (<i>Design of Experiments</i>)
DVB	Divinylbenzen
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (Methadon-Metabolit)
EI	Elektronenstoßionisation
ELISA	Immunochemisches Verfahren (<i>immunosorbent enzyme linked assay</i>)
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FVB	Femoralvenenblut
GC	Gaschromatographie
GtfCh	Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie
GUS	<i>general unknown screening</i>
HB	Herzblut
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HS	Gasphase (<i>headspace</i>)
IDA	<i>information-dependent acquisition</i>
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>)
MCP	Metoclopramid
MPPH	5-p-Methylphenyl-5-phenylhydantoin
MS	Massenspektrometrie

NMVOC	flüchtige organische Verbindungen unter Ausschluss von Methan (<i>non methane volatile organic compounds</i>)
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PDMS	Polydimethylsiloxan
RRT	relative Retentionszeit
RSM	Antwortflächenmethode (<i>response surface methodology</i>)
SI	<i>similarity index</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
STA	systematische toxikologische Analyse
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid-phase extraction</i>)
SPME	Mikrofestphasenextraktion (<i>solid-phase microextraction</i>)
TCA	tricyclisches Antidepressivum
THC	Tetrahydrocannabinol
TIC	Totalionenchromatogramm (<i>total ion chromatogram</i>)
VOC	flüchtige organische Verbindungen (<i>volatile organic compounds</i>)

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Der Alltag der Rechtsmedizin wird nicht nur durch die forensische Medizin bestimmt, sondern zeichnet sich zu einem großen Teil durch die Beantwortung toxikologischer Fragestellungen aus.

Bei der forensisch-toxikologischen Analyse ist das Interesse nicht nur auf einige ausgewählte Substanzen beschränkt. In Fällen von Intoxikationen mit oder ohne Todesfolge, zur Beurteilung einer Schuldfähigkeit oder bei auffälligem Verhalten im Straßenverkehr ist es beispielsweise häufig nötig, verschiedene biologische Proben wie Blut, Urin, Gewebeproben oder auch Haare umfassend auf verschiedenste Arzneimittel, Suchtstoffe und Toxine im Rahmen einer systematischen toxikologischen Analyse (STA) zu untersuchen.

Diese umfasst neben Vortests, beispielsweise mittels Immunoassays, vor allem Screening-Verfahren, auch als „general unknown“-Analysen (*general unknown screening*, GUS) bezeichnet. Hierbei sollen mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) oder Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) größtenteils mit massenspektrometrischer Detektion in den biologischen Proben nach entsprechender Aufbereitung möglichst viele Analyten unterschiedlichster Substanzklassen detektiert werden.

Um hierbei systematische Fehler auszuschließen und die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse zu erweisen, sind Qualitätskontrollen unerlässlich. Auch muss sichergestellt sein, dass der Zustand des Analysengerätes zum Zeitpunkt der Messung den Anforderungen entspricht, zum Beispiel eine ausreichende Sensitivität aufweist. In forensisch-toxikologischen Laboratorien ist dies vor allem auch im Hinblick auf die Gerichtsverwertbarkeit der Befunde relevant.

Um eine neue Analysen- oder Extraktionsmethode zu entwickeln, müssen die einflussnehmenden Faktoren erkannt und im Anschluss optimiert werden. Letzteres kann insofern geschehen, dass jeder Faktor für sich genommen (sog. „one-by-one“-Methode) untersucht wird.

Bei der statistischen Versuchsplanung werden mehrere Faktoren gleichzeitig variiert. Diese Strategie hat erstens den Vorteil einer enormen Zeitersparnis, zweitens werden vor

allem Abhängigkeiten zwischen den untersuchten Faktoren erkannt und können in die Optimierung einfließen.

Die ständigen technischen Errungenschaften auf dem Sektor der instrumentellen Analytik auf der einen Seite, aber auch die Neueinführungen auf dem Arzneimittelmarkt und die Neuentwicklungen im Bereich der illegalen Betäubungs- und Rauschmittel auf der anderen Seite, machen neue, den aktuellen Gegebenheiten angepasste Screening-Methoden unerlässlich.

1.2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die systematische Entwicklung von Analysemethoden zur simultanen Detektion von Arzneimitteln, Suchtstoffen und Toxinen. In diesem Kontext liegt der Fokus auf der Bestimmung möglichst unterschiedlicher Substanzklassen mit vorzugsweise wenigen Arbeitsschritten, so dass der Zeit- und Kostenaufwand ebenfalls minimiert wird. Grundsätzlich werden auch bei der qualitativen Analyse niedrige Nachweisgrenzen im therapeutischen Bereich angestrebt.

Um die optimalen apparativen Bedingungen sicherzustellen, ist ein Qualitätssicherungssystem vorausgesetzt. Bereits angewendete Maßnahmen werden auf ihre Eignung geprüft und an Routine-Gegebenheiten und den aktuellen Fortschritt angepasst. Die Entwicklung und Optimierung der Methoden, vor allem hinsichtlich der Extraktionsverfahren, erfolgt unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*, DoE). Die entwickelten Methoden werden nach wissenschaftlich anerkannten Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert, um die Gerichtsverwertbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) gilt nach wie vor als Goldstandard bei der Bearbeitung von Screening-Analysen. Jedoch hat die HPLC in Kombination mit Massenspektrometrie (HPLC-MS bzw. HPLC-MS/MS) in den letzten Jahren in der forensischen Analytik an Einfluss gewonnen. Beide Methoden werden hinsichtlich ihrer Eignung für Screening-Verfahren gegenüberstellend geprüft, Vor- und Nachteile präsentiert und diskutiert.

Am Beispiel von Realfällen wird die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden in der Praxis belegt. Besonders seltene Analyten und bemerkenswerte Kasuistiken werden näher beleuchtet.

2 Grundlagen und Stand der Technik

2.1 Grundlagen der GC-MS

2.1.1 Prinzip der Gaschromatographie

In den letzten Jahrzehnten wird die Gaschromatographie in der analytischen Chemie mit Erfolg zur Trennung von komplexen Substanzgemischen eingesetzt und ist vor allem auch in forensisch-toxikologischen Laboratorien als Routinemethode etabliert.

Nach Injektion eines Substanzgemisches bzw. Extraktes oder Desorption von einer Mikrofaser, wird dieses verdampft und mittels der mobilen Phase (inertes Gas, z.B. Helium) über eine Kapillarsäule transportiert. Durch Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase (z.B. Dimethylpolysiloxan) erfolgt die Trennung. Die Säule befindet sich in einem Ofen, der verschiedenen Temperaturprogrammen ausgesetzt werden kann. Voraussetzung für die Analyse mittels GC ist die Verdampfbarkeit der Substanzen. Dies kann im Zweifelsfall durch vorhergehende Derivatisierung erreicht werden. Am Ende der Säule gelangen die eluierenden Substanzen an den Detektor [1].

2.1.2 Prinzip der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht bei Kopplung mit einem chromatographischen Trennsystem eine Strukturaufklärung sowie eine quantitative Analyse von komplexen Substanzgemischen.

Der Ablauf der Massenspektrometrie setzt sich grundsätzlich aus drei Vorgängen zusammen: die Ionisation der Moleküle inklusive einer eventuellen Fragmentierung, eine Massen-Fokussierung und die Registrierung im Massenspektrum. Das heißt, dass aus dem Zerfall eines ionisierten Moleküls verschiedene strukturspezifische Fragmente resultieren, die nach ihrem Masse/ Ladungsverhältnis (m/z) in einem (elektro)magnetischen Feld aufgetrennt und im Spektrum registriert werden.

Bei der Elektronenstoßionisation (EI) wird das Molekül im Gaszustand mit Energie (üblich sind 70 eV) beschossen, es erfolgt eine Ionenbildung und eine oft ausgeprägte Fragmentierung. Bei labilen Strukturen besteht der Nachteil, dass kein Molekülion mehr vorhanden ist, welches wichtige Informationen hinsichtlich einer Identifizierung liefert.

Der Ionenstrahl gelangt zum Quadrupol-Analysator, wo er in Längsrichtung zwischen vier parallel angeordnete Metallstäbe geleitet wird, an die ein elektromagnetisches Feld angelegt wird. Bei einer gegebenen Spannung hängt die Bahn der Ionen von ihrer Masse ab; nur Teilchen mit einer bestimmten Masse können passieren. Wird die Spannung verändert, kann die nächsthöhere Masse den Austrittspalt erreichen [1].

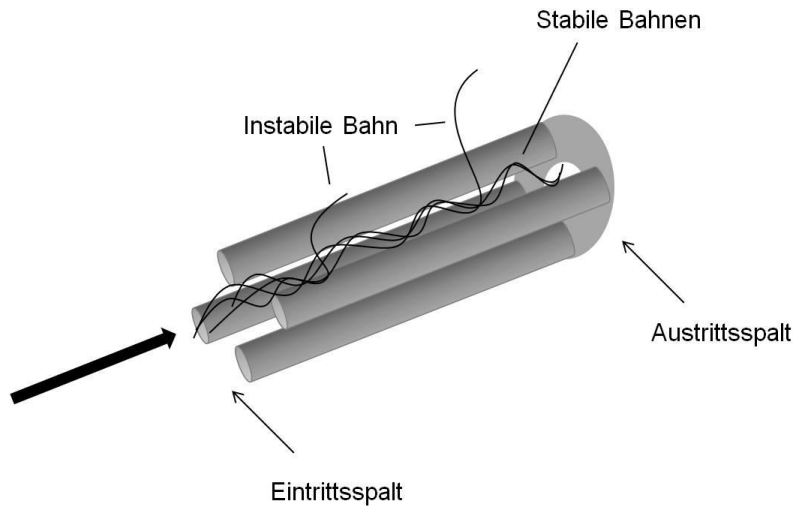


Abbildung 1: Quadrupol-Fokussierung

Anschließend erfolgt die Aufzeichnung im Massenspektrum. Für die vorliegende Arbeit wurde der „Fullscan“ als Messmodus verwendet. Hierbei werden alle Ionen in einem wählbaren Bereich (häufig m/z 50 -550) fortlaufend aufgenommen. Es kann eine Bestimmung mit Hilfe der Spektrenbibliothek folgen. Nachteil des Fullscan-Modus ist die geringere Empfindlichkeit.

2.2 Grundlagen der HPLC-MS/MS

Die HPLC-MS/MS-Technologie hat im letzten Jahrzehnt verstärkt an Bedeutung gewonnen und ist zu einer wichtigen Methode in der instrumentellen Analytik und der forensischen Chemie gereift.

Bei der HPLC liegen die Analyten in Laufmittel gelöst vor. Dieses wird mit Hilfe von Pumpen mit hohem Druck durch die eng gepackte Säule transportiert. Üblich sind vor allem Kieselgel-Säulen mit einem geringen Durchmesser, die je nach Anforderung modifiziert sein können. Die Trennung erfolgt auch hier hauptsächlich durch Adsorptions- und/ oder Verteilungsvorgänge zwischen mobiler und stationärer Phase.

Nach erfolgter Trennung wird der Eluentenstrom mit Hilfe einer Ionenquelle in die Gasphase überführt und die Analyten werden ionisiert. Hierfür sind verschiedene Techniken gebräuchlich, im Folgenden soll auf die verwendete Elektronenspray-Ionisation (ESI) näher eingegangen werden.

Bei der ESI wird die Analytlösung durch eine Kapillare geleitet, an der eine Spannung angelegt ist. Es bildet sich ein Nebel aus geladenen, fein verteilten Lösemitteltröpfchen. Durch Zuführen eines inerten Gases, z.B. N₂, kann dieser Vorgang intensiviert bzw. ein konstantes Spray erzeugt werden. Die Polarität der angelegten Hochspannung bestimmt die Ladung der entstehenden Ionen. Es kann ein Überschuss von positiven oder negativen Ionen erfolgen. Die Ionen werden durch das elektrische Feld in Richtung des Massenspektrometers beschleunigt.

Das in der Tandem-Massenspektrometrie häufig eingesetzte Triple-Quadrupol-System besteht aus einer Kombination von zwei Quadrupolen (Q1 + Q3), die als Massensfilter fungieren und einem weiteren zwischengeschalteten Quadrupol (Q2) als Kollisionzelle, in der die in Q1 selektierten Ionen fragmentiert werden. Anschließend erfolgt eine Trennung in Q3.^[1]

2.3 Grundlagen der HPLC-DAD

Die HPLC-Kopplung mit einem Mehrkanalphotometer-Detektor (DAD) soll hier nur kurz behandelt werden, da dieses analytische System ausschließlich in Hinblick auf die laborinterne Qualitätskontrolle evaluiert wurde.

Das Prinzip der HPLC wurde bereits in Abschnitt 2.2 erläutert. Im Anschluss an die Chromatographie erreicht das Eluat den Detektor, wo die Lichtabsorption gemessen wird. Voraussetzung ist hierbei, dass das verwendete Lösungsmittel bei der entsprechenden Wellenlänge keine (messbare) Eigenabsorption zeigt. Ein Vorteil des DAD liegt darin, dass die Messung gleichzeitig bei mehreren Wellenlängen erfolgen oder ein vollständiges Absorptionsspektrum der Analyten aufgenommen werden kann ^[1].

2.4 Grundlagen der SPME

Bei der SPME handelt es sich um ein Extraktionsverfahren, das Probenaufbereitung und Injektion ohne Einsatz von Lösungsmitteln vereint. Da in der vorliegenden Arbeit

ausschließlich die Methodik der Headspace-SPME (HS-SPME), also die Extraktion aus der Gasphase, angewendet wurde, soll auch nur diese beschrieben werden.

Die SPME-Faser ist eine Quarzglas-Kapillare, die mit einer stationären Phase beschichtet und in eine Injektionsvorrichtung eingebracht ist, die auch das Durchstechen von Septen ermöglicht. Der Handel hält Fasern mit diversen Beschichtungen bereit, die für unterschiedliche Polaritäten und Flüchtigkeiten möglicher Analyten geeignet sind.

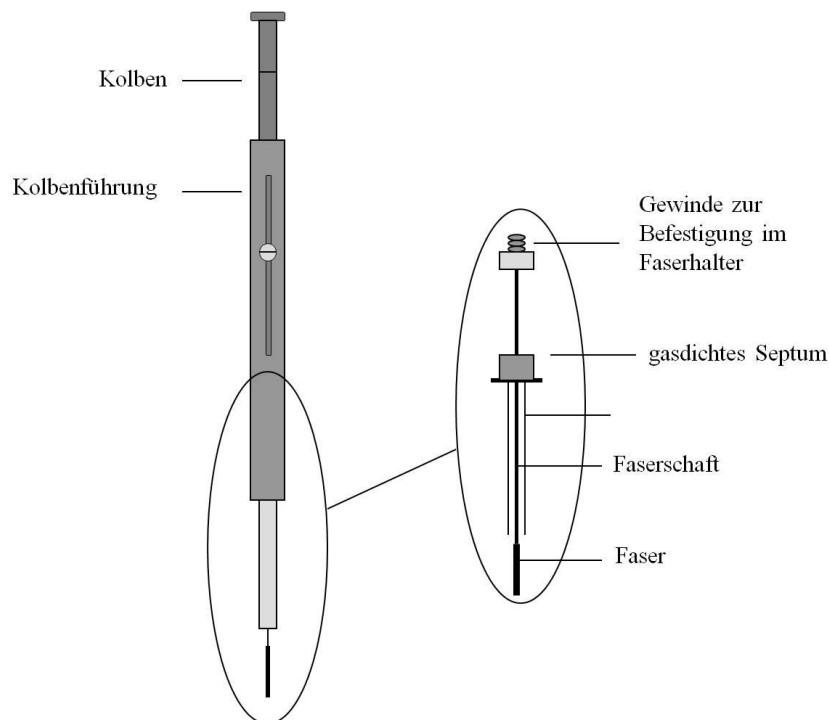


Abbildung 2: Aufbau der SPME-Vorrichtung

Abbildung 3 stellt das Prinzip der HS-SPME dar. Zunächst wird die Probe eine kurze Zeit inkubiert, das heißt in diesem Fall erwärmt und ggf. gerüttelt, um die Analyten in die Gasphase zu überführen. Anschließend taucht die SPME-Faser in das Probengefäß ein. An der Oberfläche der SPME-Faser werden die Analyten für die Zeit der Extraktion absorbiert und konzentriert. Dies geschieht wie die Inkubation in einem temperierbaren Agitator. Die Desorption erfolgt im Injektor des Gaschromatographen durch Hitzeeinwirkung.

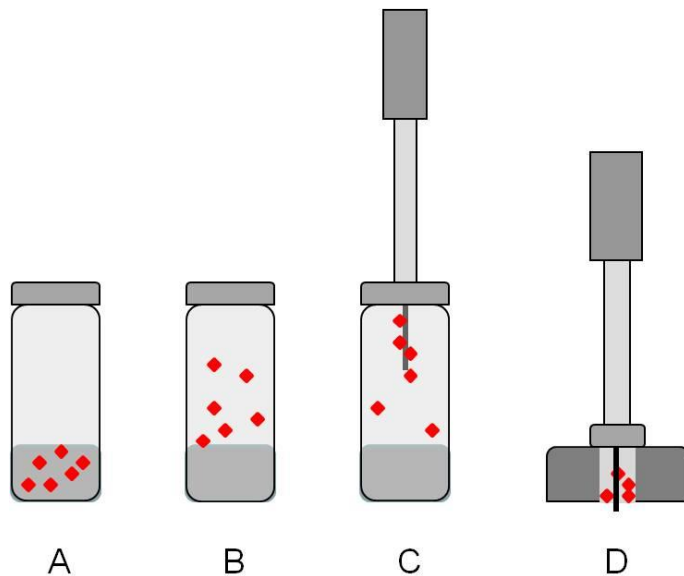


Abbildung 3: Schema der Headspace-SPME

A) Probe mit Analyten; B) Inkubation fördert Übertritt der Analyten in die Gasphase; C) Extraktion durch Absorption an der Faser; D) Desorption im Injektor des GC

2.4.1 Theoretische Aspekte des Verteilungsgleichgewichts

Der HS-SPME liegt vereinfacht betrachtet ein 3-Komponenten-System zu Grunde: Die Probenmatrix, die Beschichtung der SPME-Faser und die Gasphase. Es wurde ausschließlich eine mit Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichtete Faser verwendet, wobei es sich um eine flüssige Polymerphase handelt, die die Analyten absorbiert. Während der Extraktion stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht der Analyten zwischen diesen Phasen ein.

Die Gesamtmenge des Analyten bleibt während der Extraktion konstant. Bei Erreichung des Verteilungsgleichgewichts entspricht also die Anfangskonzentration an Analyt in der Probe der Summe des Analyten in den drei Phasen:

Formel 1: Konzentration des Analyten in den verschiedenen Phasen

$$c_0 \times V_s = c_f^\infty \times V_f + c_h^\infty \times V_h + c_s^\infty \times V_s \quad \text{Formel 1}$$

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 Gasraums

V_s = Volumen der Probenmatrix

Die absorbierte Menge an Analyt in der Faserbeschichtung kann durch

Formel 2: Absorbierte Menge an Analyt in der Faserbeschichtung

$$n = c_f^\infty \cdot V_f \quad \text{Formel 2}$$

beschrieben werden. Wird der Verteilungskoeffizient Faserbeschichtung/ Gasraum K_{fh} als c_f^∞ / c_h^∞ und der Verteilungskoeffizient Gasraum/ Probenmatrix K_{hs} als c_h^∞ / c_s^∞ definiert, ergibt sich folgende Gleichung:

Formel 3: Umformung Formel 2

$$n = \frac{K_{fh} \cdot K_{hs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fh} \cdot K_{hs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad \text{Formel 3}$$

Aufgrund der Beziehung

Formel 4: Verteilungskoeffizient Faserbeschichtung/ Probenmatrix

$$K_{fh} \cdot K_{hs} = \frac{c_f^\infty}{c_h^\infty} \cdot \frac{c_h^\infty}{c_s^\infty} = \frac{c_f^\infty}{c_s^\infty} = K_{fs}, \quad \text{Formel 4}$$

die zum Verteilungskoeffizienten Faserbeschichtung/Probenmatrix K_{fs} führt, lässt sich Formel 3 vereinfachen:

Formel 5: Vereinfachung von Formel 3

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad \text{Formel 5}$$

Der Nenner beschreibt die Aufnahmekapazität jedes Kompartiments. Aus Formel 5 lässt sich ableiten, dass die Extraktionsausbeute gesteigert werden kann, je kleiner der Dampfraum ist [2].

2.4.2 Kinetische Aspekte

Die Verteilung der Analyten beim Extraktionsprozess ist kinetischen Gesetzen unterworfen. Diese Theorien basieren zu einem Großteil auf dem 2. Fick'schen Diffusionsgesetz, welches das Massengleichgewicht in einem dynamischen System

beschreibt und sind entscheidend für die Extraktionszeit. Die SPME-Faser fungiert hierbei als Diffusionsschicht und der Massentransfer wird (bei Probendurchmischung) als konstant angenommen. Diese Annahmen führen zu folgender Gleichung:

Formel 6: Konzentration des Analyten

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} \quad \text{Formel 6}$$

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

D = Diffusionskoeffizient des Analyten

Die Analytmenge, die von der Faserbeschichtung absorbiert wird, hängt von der Dicke der Faserbeschichtung L_f und der Länge des Gasraumes L_h ab:

Formel 7: Von der Faserbeschichtung absorbierte Analytmenge

$$M(t) = \int_{L_f}^{L_h+L_f} c(x, t) dx \quad \text{Formel 7}$$

Aus Formel 7 lässt sich entnehmen: Je dicker die Faserbeschichtung, umso größer ist die absorbierte Analytmenge und somit die Extraktionsausbeute [³].

2.5 Grundlagen der Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (SPE) ermöglicht eine Konzentration und Isolation von Analyten aus einer Probenmatrix durch Adsorption an einer festen Phase. Das Sorbens befindet sich in einer Kartusche, durch die das flüssige Probenmaterial - ggf. unter Anlegung eines Vakuums - gegeben wird. SPE-Säulen können mit verschiedenen chemischen Modifikationen bezogen werden. Die Vorteile der SPE liegen in einem relativ geringem Lösungsmittelverbrauch, sauberen Extrakten und einer einfachen Durchführung. Die Entwicklung innovativer SPE-Säulen ermöglicht eine breitgefächerte Anwendung.

Das Prinzip der Festphasenextraktion ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt:

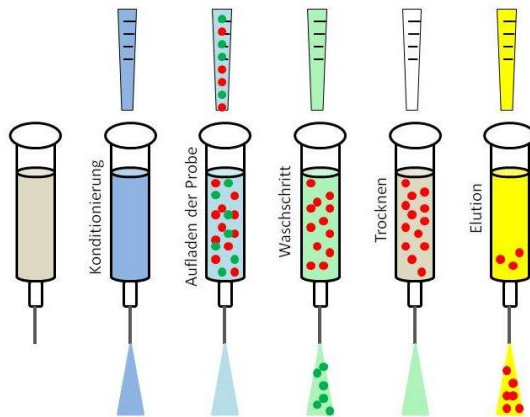


Abbildung 4: Schematische Darstellung der SPE-Extraktion

Die Konditionierung ist essentiell, um die SPE-Säulen auf die Absorption wässriger Proben vorzubereiten, die Oberfläche muss auch in den Poren des Sorbensmaterial ausreichend benetzt sein. Anschließend kann das Aufladen der Probe erfolgen. Mittels Waschen der Säulen können Matrixbestandteile entfernt und die Analyten auf der Säule ggf. chemisch modifiziert werden. Um diese nicht vorzeitig zu eluieren, müssen polarere organische Lösungsmittel vorsichtig dosiert werden. Die Proben werden durch einen Luftstrom getrocknet, der restliche Waschlösung entfernt. Die Elution erfolgt meist mit Hilfe einer Kombination aus unpolaren und eher polaren Lösungsmitteln und kann in mehreren Schritten durchgeführt werden.

2.6 Statistische Grundlagen

Bevor auf die Aspekte der statistischen Versuchsplanung näher eingegangen wird, sollen im Folgenden grundlegende statistische Parameter erläutert werden [4].

2.6.1 Normalverteilung

Die Normalverteilung (oder Gauß'sche Glockenkurve, nach dem Mathematiker Carl Friedrich Gauß) ist eine häufig zu beobachtende Idealform einer Häufigkeitsverteilung. Sie ist durch einen symmetrischen Kurvenverlauf gekennzeichnet; Median und Mittelwert sind identisch. Mittlere Ausprägungen kommen am häufigsten vor, extreme Werte sind selten. Für die Normalverteilung gilt, dass 68.2 % aller Messwerte innerhalb der Entfernung einer Standardabweichung zum Mittelwert liegen, bei zwei Standardabweichungen sind es bereits 95.4 %, wie in Abbildung 5 dargestellt.

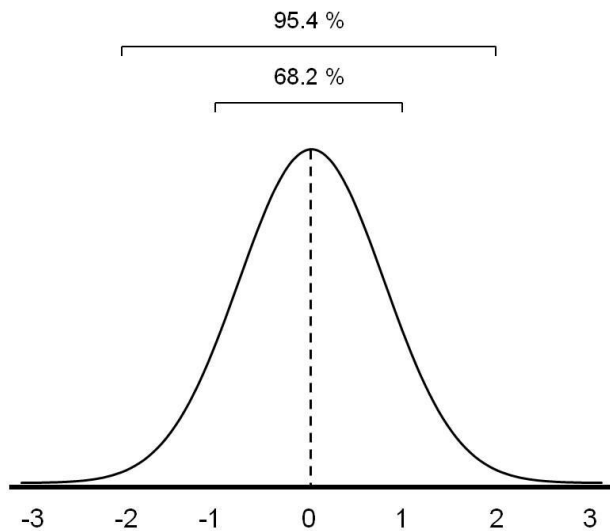


Abbildung 5: Normalverteilung

2.6.2 Signifikanz

Tritt zwischen zwei Variablen einer Stichprobe ein gemessener Zusammenhang nicht zufällig auf, sondern trifft er auch auf die Grundgesamtheit zu, so ist das Ergebnis als signifikant zu betrachten. Lediglich Hypothesen können auf Signifikanz geprüft werden, bei Einzelmerkmalen ist dies nicht möglich.

2.6.3 Varianz und Standardabweichung

Da der Mittelwert bei extremen Abweichungen ein verfälschtes Ergebnis darstellt, bedient man sich zusätzlich der Varianz und Standardabweichung.

Die Varianz beschreibt die Verteilung von Werten um den Mittelwert und erfasst dabei alle Werte:

Formel 8: Varianz

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n - 1} \quad \text{Formel 8}$$

Problematisch ist, dass die Varianz aufgrund des Quadrierens eine andere Einheit als die beobachteten Messwerte besitzt, die zumeist die Aussagekraft verschwimmen lässt, z.B. Jahre² bei einer angenommenen Betrachtung von Altersverteilungen. Daher wird häufig die Standardabweichung zur Beschreibung herangezogen. Sie ist ebenfalls ein Maß der

Streubreite der Werte eines Merkmals und lässt sich aus der Wurzel der Varianz berechnen.

Formel 9: Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n - 1}}$$

Formel 9

2.6.4 Standardfehler und Konfidenzniveau

Der Standardfehler (auch Fehlergrenze) ist ein Maß für die maximale Abweichung eines Stichprobenergebnisses vom wahren Wert. Die Berechnung erfolgt, indem vom Quotienten aus Standardabweichung und Anzahl der Stichproben die Wurzel gezogen wird. Das bedeutet in logischer Konsequenz, dass der Fehler mit steigender Anzahl geringer wird.

Das Konfidenzniveau gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Lageschätzung eines Parameters aus einer Stichprobenerhebung auch für die Grundgesamtheit zutreffend ist. Zu Beginn einer Untersuchung wird dieses festgelegt, üblich sind vor allem 95 %, aber auch Werte von 90 % oder 99 %. Das Konfidenzintervall umspannt einen Bereich, innerhalb dessen erhobene Werte dem wahren Wert mit dieser festgesetzten Wahrscheinlichkeit entsprechen.

2.6.5 F-Test

Mittels des F-Tests kann man zu zwei Antworten gelangen: Erstens kann geprüft werden, ob der Zusammenhang zwischen zwei Variablen nicht nur für die Stichprobe gilt, sondern auch für die Grundgesamtheit, also statistisch signifikant ist. Zweitens kann ermittelt werden, ob sich zwei Stichproben von unterschiedlichen Grundgesamtheiten bezüglich ihrer Varianz signifikant unterscheiden. Ist dies der Fall, müssen die Grundgesamtheiten getrennt voneinander betrachtet werden, wenn nicht, können sie hinsichtlich des untersuchten Merkmals zusammengefasst werden.

Formel 10: F-Test

$$F = \frac{nS_{\bar{Y}}^2}{S_{pooled}^2}$$

Formel 10

Bewegt sich F in der Nähe von 1, ist kein Unterschied auszumachen. Wird der Wert größer, wird es immer unwahrscheinlicher, dass dies aus einem Zufall heraus geschieht. Mit Hilfe statistischer Tabellen kann diese Wahrscheinlichkeit quantifiziert werden. Der resultierende p-Wert eignet sich als Indikator für die Signifikanz. Wird F so groß, dass der p-Wert unter 0.05 fällt, kann man mit 95 %-iger Sicherheit aussagen, dass ein Effekt auf das untersuchte Merkmal vorliegt (vergleiche auch Abschnitt 2.6.4).

2.6.6 Freiheitsgrade

Die Anzahl der Freiheitsgrade (*degrees of freedom*, df) gibt die Anzahl der frei wählbaren Variablen wieder, ohne dass eine Änderung am System erfolgt. Wird beispielsweise ein Kollektiv aus $n = 10$ Parametern mit einem vorgegebenen Mittelwert betrachtet, so liegen $n-1$ Freiheitsgrade vor, d.h. neun Parameter können frei gewählt werden, ohne dass sich der Mittelwert ändert.

2.6.7 Varianzanalyse

Die Varianzanalyse (ANOVA) ist eine statistische Methode, die - basierend auf dem F-Test - die Signifikanz experimenteller Ergebnisse abschätzt. Sie beinhaltet eine Untergliederung der gesamten Abweichung eines Datensatzes in Einzelteile. Der Einfluss unabhängiger Variablen auf abhängige Variablen wird geprüft. Von einem Zusammenhang zwischen den Variablen wird ausgegangen. ANOVA ist das bedeutendste Verfahren der statistischen Versuchsplanung.

2.7 Statistische Versuchsplanung

2.7.1 Grundlagen der statistischen Versuchsplanung

Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung wird mit möglichst wenigen Einzelerperimenten der Zusammenhang zwischen einflussnehmenden Faktoren, also unabhängigen Variablen, und Zielgrößen, den abhängigen Variablen, bestimmt. Der Vorteil liegt hier also in der gleichzeitigen Optimierung mehrerer Faktoren. Hierzu wird

zunächst ein Versuchsplan erstellt. Dieser legt die Anzahl und Art (nominal oder quantitativ) der zu untersuchenden Faktoren fest, sollte bestehende Informationen erfassen und bestimmt die gewünschte Genauigkeit der resultierenden Aussagen.

2.7.2 Response surface methodology und Central composite design

Eine besondere Anwendung der statistischen Versuchsplanung ist die *Response surface methodology* (Antwortflächenmethode, RSM). Diese kombiniert statistische und mathematische Techniken, die sich für die Entwicklung, Weiterführung und Optimierung von Prozessen eignet.

Hauptsächlich findet ein experimentelles Design wie das *central composite design* (zu Deutsch etwa: zentraler, zusammengesetzter und drehbarer Versuchsplan, CCD) Anwendung. CCD ist eine multivariante statistische Methode, bei der jede der in Betracht gezogenen unabhängigen Variablen auf verschiedenen Levels untersucht wird. Das Ziel der Optimierung liegt in der Bewertung der Faktorkoordinaten, die die gegenständliche Antwort γ - im Falle der vorliegenden Arbeit die Peakfläche (AUC) der untersuchten Analyten - maximiert.

Allgemein formuliert beinhaltet ein CCD für k Faktoren drei Gruppen von Versuchsplan-Punkten, im Folgenden als design points bezeichnet: (a) zwei-Level faktorielle design points, die eine Gesamtheit von $n_{\text{fact}}=2^k$ mit den Koordinaten $x_i=-1$ oder $x_i=+1$, für $i=1, \dots, k$ beinhalten; (b) axiale Punkte („star points“), gebildet aus $n_{\text{ax}}=2k$ mit allen Faktoren gleich 0 gesetzt, bis auf einen Faktor, der den Wert $\pm \alpha$ trägt (rangiert standardmäßig im Bereich von 1 bis \sqrt{k}); und (c) Mittelpunkte (center points), die Punkte sind, die in allen Levels kodiert gleich 0 gesetzt sind, also den Mittelpunkt jedes Faktor-Bereiches.

Eine Gleichung beschreibt, wie die Variablen die Antwort beeinflussen und determiniert die Wechselbeziehungen [5].

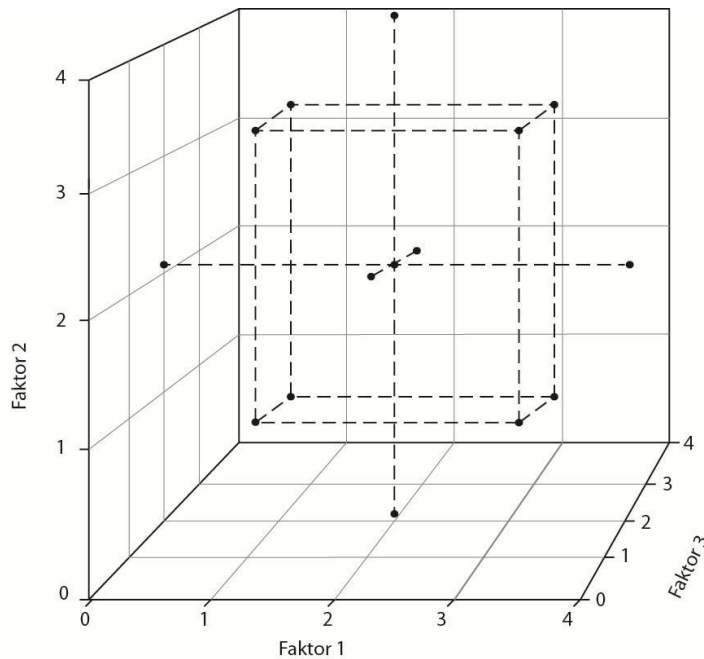


Abbildung 6: Exemplarisches CCD für drei Faktoren inklusive der benötigten Experimente

2.8 Probenmatrices

Die zur Verfügung stehenden Probenmatrices sind ausschlaggebend für die folgenden Analysen und die Interpretation der Ergebnisse. In allen Fällen, denen sich ein Screening anschließt, sollten post mortem möglichst vielseitige Materialasservierungen vorgenommen werden. Hierdurch lassen sich bei positiven Befunden Aussagen über die Verteilung im Organismus treffen, die nähere Einblicke in Tatvorgänge und Zeitabläufe geben können [6;7]. Auch im Hinblick auf den Zustand aufgefundener Leichen, z.B. Brandleichen, ist die Wahl der Probenmatrix von Bedeutung.

Vollblut bzw. daraus durch Zentrifugation gewonnenes Plasma eignet sich grundsätzlich für die qualitative und quantitative Analytik. Erhaltene Konzentrationen können mit klinischen und pharmakokinetischen Daten verglichen werden [8]. Zu beachten ist allerdings, dass bei einer sehr frühzeitigen Blutentnahme nach einer oralen Aufnahme die Verteilung ins Blut ggf. noch nicht abgeschlossen ist. Im Gegensatz dazu kann die Nachweiszeit von Substanzen aufgrund einer möglichen geringen Plasmahalbwertszeit bei einer späten Blutabnahme abgelaufen sein.

Herzblut eignet sich bei postmortalen Untersuchungen ebenfalls für qualitative Untersuchungen. Von quantitativen Analysen ist wegen möglicher Redistribution, also der Rückverteilung vor allem lipophiler Substanzen in das Blut, abzusehen [9].

Urin hat den Vorteil der nicht-invasiven Probenentnahme. Des Weiteren sind Substanzen über ein längeres Zeitintervall und meist auch in höherer Konzentration nachweisbar als im Blut. Aufgrund dieser Tatsache ist Urin eine bevorzugte Matrix für qualitative Analysen [10]. Da lipophile Substanzen allerdings erst ausgeschieden werden können, wenn sie durch Metabolisierungsreaktionen in hydrophile Stoffe überführt wurden, liegen bei diesen im Urin nicht mehr (ausschließlich) die Muttersubstanzen, sondern Metabolite bzw. Konjugate vor [11].

Die Untersuchung diverser Organe wie Leber, Niere und Gehirn ist unerlässlich, um Informationen über die Verteilung im Organismus zu erlangen. Des Weiteren kann es vorkommen, dass einige Analyten in verschiedenen Kompartimenten akkumulieren, so dass sie dort sicher nachweisbar sind. Für die Analyse auf Brandbeschleuniger oder flüchtige Substanzen kommen vor allem Haut, Gehirn und Lungengewebe infrage.

Mageninhalt hat als Untersuchungsgut den Vorteil, dass eine orale Aufnahme von Substanzen innerhalb von Stunden in Hinblick auf den Todeszeitpunkt nachgewiesen werden kann. Die Anwesenheit von diversen Substanzen im Mageninhalt kann entscheidend für die Einschätzung der Blutkonzentration sein [8].

2.9 *Stand der Screening-Analytik mittels GC-MS*

Die Analytik via GC-MS ist seit vielen Jahren Standard in der forensischen Toxikologie, wobei ein Großteil der Publikationen aus den 90er Jahren stammt. Es besteht eine langjährige Erfahrung mit dieser Technik, da auf der Basis verschiedener Extraktionsverfahren nahezu jede biologische Matrix untersucht werden kann und die entwickelten Methoden in verschiedenen Laboratorien mittels unterschiedlicher Gerätetypen angewendet werden können.

Viele veröffentlichte Arbeiten beziehen sich auf die Detektion ausgewählter Substanzklassen, hierbei hat sich vor allem die Arbeitsgruppe um Maurer hervorgetan, welche beispielsweise Multi-Target-Methoden bezüglich Antikonvulsiva, Sedativa, Antiarrhythmika, ACE-Hemmer und AT-II-Antagonisten, Diuretika, Laxantien und Antidepressiva durchgeführt haben [12-17]. In diesen Arbeiten werden ausgewählte, charakteristische Ionen für die einzelnen Substanzklassen gescannt [18]. Ein Vorteil dieses Vorgehens ist die erhöhte Selektivität, falls das bestimmte Fragment sich nicht in koeluiierenden Interferenzen zeigt. Sollten allerdings auch Fragment-Ionen der

unbekannten Substanz nicht in den vorher festgelegten enthalten sein, so gibt es keine Möglichkeit der Detektion und ein falsch-negatives Ergebnis wird erzielt [19].

Eine geeignete Probenvorbereitung bzw. Extraktion ist die Grundlage bei der Analytik biologischer Proben. Bei der Arbeitsgruppe Maurer kommt für eher saure Substanzen die Kombination aus Derivatisierung mittels Methyljodid und Flüssig-Flüssig-Extraktion (*liquid-liquid extraction*, LLE) als Probenvorbereitung zum Einsatz; für eher basische und neutrale Analyte wird häufig eine LLE mit Dichlormethan/ Isopropanol/ Ethylacetat mit anschließender Acetylierung durchgeführt.

Bereits 1991 haben Brooks und Smith eine fullscan-Methode mit vorhergehender LLE und Acetylierung entwickelt. Als Testsubstanzen wählten sie 13 Arzneistoffe mit basischen, neutralen oder schwach sauren Eigenschaften. Bis auf Theophyllin mit 20 % erreichten alle weiteren Substanzen eine Extraktionsausbeute von ca. 80 %. Eine Verifizierung der Eignung anhand von Realproben wurde jedoch nicht durchgeführt [20].

Chen et al. entwickelten eine SPE-Methode, deren Elution eine sauer-neutrale sowie eine basische Fraktion beinhaltet. Die Optimierung wurde mit Hilfe gespikten Kalbsblutes mit mehreren Beispielanalyten durchgeführt, allerdings geht aus dem Artikel nicht klar hervor, in welchem Fall wie viele der insgesamt 15 Substanzen zugesetzt wurden. Auch gibt die Publikation keine Auskunft über die spektrometrischen Bedingungen, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob es sich um ein GUS oder eine Multi-Target-Analyse handelt [21].

Polettini et al. haben eine vollautomatische Screening-Methode für Vollblut, Plasma und Urin inklusive Extraktion mittels SPE, Derivatisierung der Analyten (Trimethylsilylierung), GC-MS-Analyse, Auswertung der Daten und Erstellen von Reports entwickelt [22]. Die Messung wurde im Scan-Modus durchgeführt, die sechzehn Beispielanalyten stammten aus den vier Substanzklassen Barbiturate, Benzodiazepine, tricyclische Antidepressiva und missbräuchlich verwendete Substanzen (hier: Benzoyllecgonin und Morphin).

Selbst die beste Probenvorbereitung und Extraktion kann kein positives Ergebnis liefern, wenn der unbekannte Analyt bei einer „general unknown“-Analyse nicht in der Spektrenbibliothek verzeichnet ist. Zudem stellt sich die Frage, ob Signale zu einer relevanten Substanz gehören oder Matrix-basiert sind. Um diesem Problem zu begegnen, haben Stimpfl et al. eine Suchmethode entwickelt, die die untersuchte Matrix mit in

Betracht zieht („*sample-inherent mass spectra libraries*“). Post mortem-Blut und Organproben wurden mit einer halbautomatischen SPE-Methode extrahiert. Um Retentionszeit-Variationen zu erfassen, wurden in drei aufeinanderfolgenden Tagen Standardlösungen von n-Alkanen und gespikte Leberextrakte vermessen, der Retentionsindex wurde berechnet. Zur Erstellung der Bibliothek wurden charakteristische Spektren von negativen Proben, die ein „Muster“ aufgrund von Verunreinigungen durch Matrixbestandteilen und Interferenzen aus der Extraktion widerspiegeln, aufgenommen. Diese Spektren wurden mit Hilfe der entwickelten Software FORGE (*Forensic GC-MS Data Exploration*) vom Totalionenchromatogramm möglicher positiver Proben subtrahiert, so dass „verdächtige“ Peaks hervorgehoben und „isoliert“ werden [23].

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter publizierter Arbeiten zur GC-MS-Analytik

Substanzklasse bzw. Fullscan	Arzneistoffe (beispielhaft)	Matrix	Extraktion	Referenz
Antikonvulsiva	Carbamazepin, Diazepam	Urin	Hydrolyse + LLE	[¹²]
Sedativa	Phenobarbital, Pentobarbital, Methaqualon	Urin	Hydrolyse + LLE	[¹³]
Antiarrhythmika	Lidocain, Phenytoin, Verapamil	Urin	Hydrolyse + LLE	[¹⁴]
ACE-Hemmer + AT-II-Antagonisten	Enalapril, Valsartan	Urin	Extraktive Methylierung	[¹⁵]
Diuretika	HCT, Furosemid	Urin	Extraktive Methylierung	[¹⁶]
Laxantien	Bisacodyl, Picosulfat	Urin	Extraktive Methylierung	[¹⁷]
Fullscan ¹	Diazepam, Phenobarbital	Plasma	LLE	[²⁰]
Fullscan ¹	Codein, Lidocain, Pentobarbital	Blut	SPE	[²¹]
Fullscan ¹	Phenobarbital, Diazepam, Amitriptylin	Blut, Plasma, Urin	SPE	[²²]

¹Die Messung im Fullscan-Modus impliziert das Vorliegen eines General-unknown-Verfahrens

2.10 *Stand der Screening-Analytik mittels HPLC-MS(/MS)*

Angesichts der Tatsache, dass die Methodik der GC-MS Einschränkungen bezüglich polarer oder schwer flüchtiger Analyten aufweist, scheint die Verwendung von HPLC-MS(/MS) für die systematische toxikologische Analyse die logische Weiterentwicklung zu sein. Jedoch bezieht sich die Mehrzahl der Publikationen des letzten Jahrzehntes - hinsichtlich der Verwendung von HPLC-MS(/MS) als Screening oder zwecks therapeutischer Überwachung - auf die Detektion einzelner Substanzklassen [24;25;25-37]. Grund dafür ist vor allem die Problematik, reproduzierbare Spektren mit unterschiedlichen Instrumenten zu erzeugen und die Verfügbarkeit entsprechender Referenzbibliotheken, was die Identifizierung von Fullscan-Aufzeichnungen äußerst diffizil gestaltet [38;39]. Neben der Untersuchung verschiedener Kombinationen von Ionisationsenergien und Instrumentenkonfigurationen inklusive der Scan-Modi scheint die „Normalisierung“ der Massenspektren durch verschiedene Kollisionsenergien erfolversprechend [32;40]. Ziel ist es, Massenspektren hoher Intensitäten zu generieren, die eine gute Übereinstimmung mit den Standardspektren der Datenbanken aufweisen. Liu et al. haben durch die Variation von Fragmentationsspannung von 30 % bis 200 % aussagekräftige Spektren erzeugt und unter weiterer Zuhilfenahme von Retentionszeiten eine Bibliothek erstellt, die sich in einer sechsmonatigen Testphase als geeignet erwiesen hat [41].

Dresen et al. haben eine Methode entwickelt, die den Nachweis und die Identifizierung von 700 Analyten umfasst, aber auch hier handelt es sich um ein Multi-Target-Screening, welches für jede Substanz bestimmte Ionenübergänge zugrunde legt [42].

Eine Weiterentwicklung besteht in der Methodik der „*data-* oder *information-dependent acquisition*“ (DDA/IDA). Allgemein gesprochen setzt sich eine Messung aus einem „*survey scan*“ und einem „*dependent scan*“ zusammen. Tritt ein zuvor definiertes Ereignis im „*survey scan*“ ein, wechselt das Instrument in einen anderen, vom vorherigen Ergebnis abhängigen Messmodus. Zum Beispiel werden zunächst alle Ionen im fullscan-Modus „durchgeschleust“, bis ein Schwellenwert an Intensität überschritten wird. Diese Auswahl an Ionen wird anschließend fragmentiert und detektiert [43]. Decaestecker et al. haben die Vorgehensweise zuerst angewandt [44]. Problematisch hierbei ist allerdings die Festsetzung des Grenzwertes. Wird eine hohe Intensität gewählt, so verringert sich die Sensitivität des Verfahrens, wird die Intensität niedrig angesetzt, so werden zu viele Informationen erhalten, die gerade in der forensischen Analytik durch

Hintergrundrauschen entstehen. Sturm et al. konnten mit Hilfe der DDA von 365 ausgewählten Substanzen nur dreizehn nicht nachweisen [45].

In einer aktuellen Studie von 2011 haben Lynch et al. einen Vergleich von GC-MS, REMEDi und dreier LC-MS(/MS)-Methoden anhand von 48 realen Urinproben durchgeführt, wobei es sich auch hier um Multi-Target-Analysen handelt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle kurz zusammengestellt [46]:

Tabelle 2: Methodenvergleich Lynch et al.

Methodenvergleich Lynch et al.				
Methode	Detektierte erwartete Substanzen	Nicht-detektierte erwartete Substanzen	Unerwartete detektierte Substanzen	insgesamt
REMEDi	73	83	5	78
GC-MS	124	32	7	131
LC-ZQ-MS ¹⁾	94	62	13	107
LC-MS/MS I ²⁾	122	34	4	126
LC-MS/MS II ³⁾	130	26	21	151

1) ZQTM Single Quadrupol Massenspektrometer

2) Ionenfallen-Massenspektrometer

3) Linear-Ionenfallen-Massenspektrometer

Die Autoren gelangen zu dem Ergebnis, dass die Verwendung komplementärer Methoden, vor allem von GC-MS und HPLC-MS(/MS) die größte Bandbreite erreicht und somit nach wie vor empfehlenswert ist. Einschränkungen des Studiendesigns liegen in der Anwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden.

Ein weiteres Problem der HPLC-MS(/MS) sind sogenannte Matrixeffekte, die die Nachweisbarkeit von Substanzen einschränken bzw. verändern können. Koeluiierende Substanzen aus der Matrix wirken sich derart auf die Ionisierung der gesuchten Analyten aus, dass entweder eine Ionensuppression oder ein gesteigertes Analytsignal (Ionenhancement) die Folge sein kann [47]. Diese Problematik tritt eher bei der quantitativen Analyse in den Vordergrund, kann bei einer ausgeprägten Ionensuppression aber auch bei einer qualitativen Analyse zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Elektrospray-Ionisation ist der Ionensuppression gegenüber empfindlicher, hat aber den Vorteil der besseren Sensitivität vor allem hinsichtlich polarer und thermolabiler

Substanzen [41]. Die Probenvorbereitung bzw. eine sorgfältige Extraktion können Matrixeffekte eindämmen.

2.11 *Stand der Analytik mittels SPME*

Das Prinzip der SPME wurde von der Arbeitsgruppe um Pawliszyn entwickelt und als exzellente Methode für die Extraktion von vor allem flüchtigen und semi-flüchtigen Substanzen vorgestellt [2;3;48-51].

Ein Großteil der SPME-Methodik findet in der Analyse von (Ab- und Regen)wasser Anwendung, es erfolgt simultan eine Extraktion sowie Konzentration. Hierbei spielen vor allem Pestizide, Fungizide und Herbizide im Rahmen der Umwelt-Analytik eine große Rolle. Ein Schwerpunkt der publizierten Arbeiten liegt bei der Auswahl der SPME-Faser und den Bedingungen der Extraktion, wie zum Beispiel Temperatur und Zeit [52-56]. Auch Rückstände aufgrund industrieller Vorgänge liegen im Focus der Wasseranalytik. Die Substanzen sind oft flüchtiger Natur und daher besonders für die SPME, vor allem in Kopplung mit GC-MS, geeignet [57].

Publizierte Arbeiten existieren auch zu weniger gewöhnlichen Matrices, z.B. die Analyse von Tabak und Zigarettenrauch [58;59], die Untersuchung zu geschmacksgebenden Inhaltsstoffen in Orangensaft in Form von Monoterpenen [60] oder gar der Nachweis von 1,8-Cineol in der Atemluft des Fuchskusus (*Trichosurus vulpecula*) [61]. Die humane Atemluft ist Grundlage diverser SPME-Analytik, z.B. der Nachweis von Isopren als Marker der Cholesterolsynthese, Aceton bei Diabetes-Patienten oder einige Kohlenwasserstoffe zur Diagnose von Lungenkrebs [49;62;63].

Für die Analytik von Arzneistoffen in biologischen Proben ist die SPME aufgrund ihrer einfachen Probenvorbereitung mittlerweile verbreitet. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Arzneistoffklassen, Matrix und verwendete Faser.

Tabelle 3: Übersicht ausgewählter publizierter Arbeiten zur SPME-Analytik

Substanzklasse	Arzneistoffe (beispielhaft)	Matrix	Faser ^{1,2)}	Referenz
Amphetamine	Amphetamin, Methamphetamin	Blut, Urin, Haare, Tabletten	PDMS	[⁶⁴⁻⁶⁷]
Benzodiazepine	Flunitrazepam, Clonazepam, Diazepam, Bromazepam,	Plasma, Serum, Urin	PDMS	[⁶⁸⁻⁷⁰]
Cannabinoide	Tetrahydrocannabinol (THC)	Speichel, Haare	PDMS	[^{71;72}]
Kokain	Kokain, Benzoylcegonin	Urin	PDMS	[⁷³]
Anästhetika	Halothan	Blut	PDMS	[⁷⁴]
Lokalanästhetika	Lidocain	Plasma, Haare	Carbowax/ DVB	[^{75;76}]
Antidepressiva	Maprotilin, Mianserin, Citalopram, Paroxetin	Blut, Plasma, Urin	PDMS	[⁷⁷⁻⁸⁰]
Antikonvulsiva	Valproinsäure	Plasma	PDMS	[⁸¹]
Antihistaminika	Diphenhydramin, Doxylamin	Blut, Urin	PDMS	[⁸²]
Barbiturate	Barbital, Pentobarbital, Phenobarbital	Urin	Carbowax/ DVB	[⁸³]
Neuroleptika	Clozapin	Plasma	PDMS	[⁸⁴]

1) Polydimethylsiloxan (PDMS)

2) Divinylbenzen (DVB)

2.12 *Stand der Methodenoptimierung mittels statistischer Versuchsplanung*

Die Methodik der statistischen Versuchsplanung gehört bei der Entwicklung und Optimierung von Analysemethoden in der forensischen Toxikologie bislang noch nicht zu den Standardverfahren.

Ein Großteil der bisherigen Publikationen beinhaltet die Optimierung von SPME-Methoden bzw. die Determination flüchtiger Substanzen, beispielsweise in Wasser, Weinessig oder Safran [^{54;55;57;60;85;86}]. García-Rodríguez et al. haben Extraktionstemperatur und Probenvolumen für die Determination von Organophosphat- und Pyrethroid-Pestiziden in Meerwasser mittels CCD optimiert und erkannt, dass die Temperatur auf alle Substanzen einen signifikanten Effekt ausübt, das Probenvolumen jedoch nur auf Dichlorvos. Es hat sich herausgestellt, dass bei beiden Substanzklassen die optimalen Bedingungen bezüglich der Temperatur genau konträr liegen. Anhand der „desirability“ (Definition siehe Abschnitt 4.3.7) konnte ein geeigneter Kompromiss festgesetzt werden [⁵⁴].

Bei der Optimierung einer SPME-Methode für flüchtige Phenole in Wasser konnten Mousavi et al. mit Hilfe einer fraktionierten, faktoriellen Versuchsplanung feststellen, dass fünf von sechs Faktoren (z.B. Extraktionszeit, pH-Wert der Probe) signifikante Interaktionen zeigten. Im Anschluss wurde mit vier Faktoren ein CCD durchgeführt [⁵⁷].

Die Arbeitsgruppe Kristoffersen et al. entwickelte eine Methode für die simultane Determination von Citalopram, Fluoxetin und Paroxetin und deren Metabolite in Plasma und Blut mittels HPLC-DAD. Für die Festphasenextraktion wurden neun Faktoren mittels einer fraktionierten, faktoriellen Versuchsplanung untersucht. Es zeigte sich, dass die Komposition des Elutionsmittels und die Trockenperiode einen signifikanten Effekt auf die Extraktionsausbeute von Paroxetin ausüben. Die Robustheit des chromatographischen Systems wurde via CCD untersucht, optimiert wurden der pH-Wert und der absolute Anteil an Acetonitril in der mobilen Phase. Die Ergebnisse zeigten, dass die HPLC-Methode hinsichtlich Auflösung und Retention robust ist, wenn der Anteil von Acetonitril im Bereich von 29-31 % und der pH-Wert bei 3.7-4.4 liegen [⁸⁷]. Die Gruppe optimierte einige Jahre später ebenfalls mit Hilfe eines Response Surface Designs eine Festphasenextraktion für die simultane Determination von ausgewählten β -Blockern, Calciumkanal-Antagonisten, Angiotensin-II-Antagonisten und Antiarrhythmika [⁸⁸].

Decaestecker et al. optimierten eine Festphasenextraktionsmethode, indem sie elf Faktoren zunächst auf ihre Signifikanz hin überprüften und anschließend die

„verbliebenen“ drei Faktoren mittels CCD optimierten [89]. Das Extrakt wurde im Anschluss der HPLC-MS/MS der chromatographischen Trennung zugeführt.

Costa et al. haben die Eignung der statistischen Versuchsplanung anhand der Optimierung der sauren Hydrolyse von Urin am Beispiel von Morphin-Glucuroniden bewiesen. Untersucht wurden via CCD die Temperatur, das Volumen der Säure sowie die Zeit [90].

Die Anwendung von statistischen Untersuchungen bezieht sich in der Toxikologie nicht ausschließlich auf die Optimierung von analytischen Methoden. So wurde zum Beispiel ein faktorielles Design zur Untersuchung von neurologischen Verhaltensänderungen eines wiederholten kurzzeitigen Aussetzens verschiedener Konzentrationen dreier Umweltgifte durchgeführt, um potentielle Interaktionen zu erkennen. Als Response wurde die motorische Aktivität von weiblichen Ratten beobachtet [91].

2.13 *Beispielanalyten zur Methodenoptimierung*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nicht nur mit einem Analyten und seinen Metaboliten oder einer Gruppe von Analyten aus einer Substanzklasse, wie es häufig der Fall ist. Im Gegenteil gilt es zu erreichen, Methoden zu entwickeln, die für die Detektion von möglichst vielen unterschiedlichen Analyten geeignet sind. Dennoch muss man für die Entwicklung und Optimierung dieser Methoden einzelne Substanzen mit ausgewählten physikochemischen Eigenschaften herausgreifen.

2.13.1 **Beispielanalyten für die Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Verbindungen I: flüchtige organische Verbindungen**

Unter flüchtigen organischen Verbindungen (*volatile organic compounds*, VOC) versteht man grundsätzlich kohlenstoffhaltige Stoffe, die aufgrund ihres hohen Dampfdruckes respektive niedrigen Siedepunktes leicht verdampfen bzw. schon bei niedrigen Temperaturen als Gas vorliegen. Bei den *non methane organic volatile compounds* (NMVOC) wird das Gas Methan ausgeschlossen. Eine einheitliche, länderübergreifende Definition, was ein VOC tatsächlich ist, gibt es nicht. Im Folgenden wird die in Deutschland geltende Definition, die sich nach dem Dampfdruck richtet, verwendet. Demnach ist ein VOC eine organische Verbindung, die bei 293,15 Kelvin einen Dampfdruck von 0,01 Kilopascal oder mehr hat oder unter den jeweiligen Verwendungsbedingungen eine entsprechende Flüchtigkeit aufweist [92]. Ausgewählt

wurden VOC, die häufig Verwendung als Lösungsmittel finden, sich in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden und den Retentionsbereich möglichst abdecken.

Als Quelle der physikochemischen Eigenschaften aller VOC und auch der folgenden Inhalationsnarkotika wurde der Internetauftritt des Institutes für Arbeitsschutz zu Rate gezogen [⁹³].

Tabelle 4: Physikochemische Eigenschaften der VOC I [⁹³]

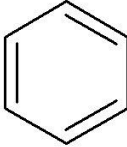
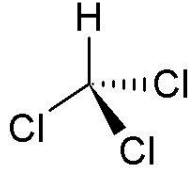
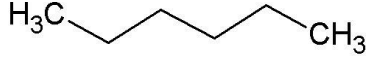
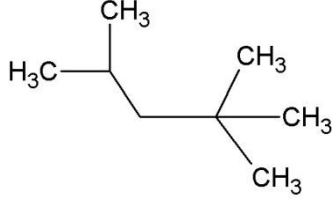
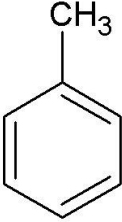
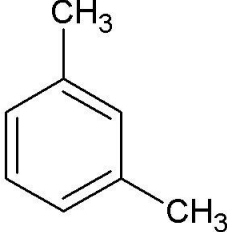
	Bezeichnung	Benzol
	Siedepunkt	80°C
	Dampfdruck	100 hPa (20°C)
	Löslichkeit in Wasser	1.8 g/l (20°C)
	log $k_{O/W}$	2.13
	RRT (bez. auf Isooctan)	0.885
	Bezeichnung	Chloroform
	Siedepunkt	61°C
	Dampfdruck	233 hPa (20°C)
	Löslichkeit in Wasser	8.2 g/l (20°C)
	log $k_{O/W}$	1.97
	RRT (bez. auf Isooctan)	0.706
	Bezeichnung	n-Hexan
	Siedepunkt	69°C
	Dampfdruck	162 hPa (20°C)
	Löslichkeit in Wasser	0.5 mg/l
	log $k_{O/W}$	3.9
	RRT (bez. auf Isooctan)	0.678
	Bezeichnung	Isooctan
	Siedepunkt	99°C
	Dampfdruck	51 hPa (20°C)
	Löslichkeit in Wasser	0.7 - 2.5 mg/l
	log $k_{O/W}$	4.09
	RRT (bez. auf Isooctan)	1.0

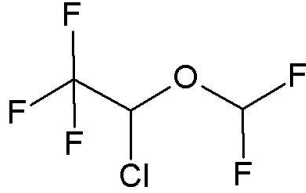
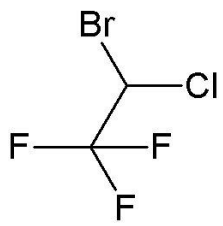
Tabelle 5: Physikochemische Eigenschaften der VOC II [⁹³]

	Bezeichnung	Toluol
	Siedepunkt	111 °C
	Dampfdruck	29.1 hPa (20 °C)
	Löslichkeit in Wasser	0.47 g/l
	log $k_{O/W}$	2.73
	RRT (bez. auf Isooctan)	1.558
	Bezeichnung	m-Xylol
	Siedepunkt	139 °C
	Dampfdruck	8.32 hPa (20 °C)
	Löslichkeit in Wasser	0.2 g/l
	log $k_{O/W}$	3.2
	RRT (bez. auf Isooctan)	2.302

2.13.2 Beispielanalyten für die Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Verbindungen II: Inhalationsnarkotika

Inhalationsnarkotika sind Arzneistoffe, die zur Einleitung und vor allem zur Aufrechterhaltung einer Narkose eingesetzt und durch Inhalation aufgenommen werden. Inhalationsnarkotika gehören nicht zu den klassischen VOC. Allerdings handelt es sich bei den sog. Dampfnarkotika (im Gegensatz zu Gasnarkotika) auch um Flüssigkeiten mit einem hohen Dampfdruck. Der Wirkmechanismus von Anästhetika ist bis heute noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt, verschiedene Theorien zusammenfassend lässt sich sagen, dass komplexe Wechselwirkungen der Inhalationsnarkotika mit Lipiden, Proteinen und Wasser in den Membranen die narkotische Wirkung bedingen [⁹⁴].

Tabelle 6: Physikochemische Eigenschaften der Inhalationsnarkotika [⁹³]

	Bezeichnung	Isofluran
	Siedepunkt	48.5°C
	Dampfdruck	440 hPa (25°C)
	Löslichkeit in Wasser	k. A.
	Log $k_{O/w}$	2.06
	RRT (bez. auf Isooctan)	0.511
	Bezeichnung	Halothan
	Siedepunkt	50.2
	Dampfdruck	242 hPa (20°C)
	Löslichkeit in Wasser	4.5 g/l
	Log $k_{O/w}$	2.3
	RRT (bez. auf Isooctan)	0.610

2.13.3 Beispielanalyten für die Entwicklung einer SPE-Methode

Die Substanzen, die zur Entwicklung einer Festphasenextraktions-Methode herangezogen wurden, sind sowohl im pharmazeutischen Alltag als auch in forensischer Hinsicht relevant. Ausgenommen wurden bewusst „klassische“, missbräuchlich angewendete Analyten, wie z.B. Amphetamine oder Cannabinoide, da bei einer systematischen toxikologischen Analyse eine Untersuchung auf diese Substanzen ohnehin stattfindet. Ein Schwerpunkt wurde auf unterschiedliche Säure-Base-Eigenschaften und die Lipophilie gelegt. Auch hier wurde der Retentionsbereich abgedeckt.

Die Eigenschaften aller verwendeten Substanzen können via Datenbank der U.S. National Library of Medicine nachvollzogen werden [⁹⁵].

Tabelle 7: Eigenschaften der Beispielanalyten zur SPE-Methodenentwicklung I [⁹⁵]

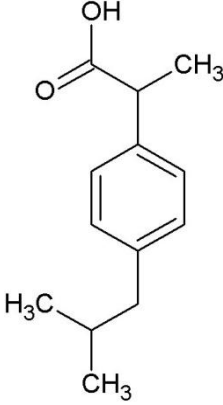
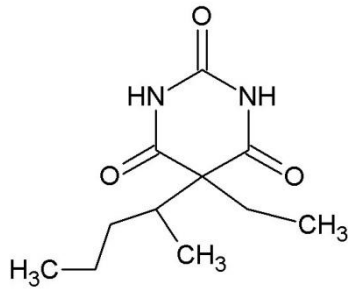
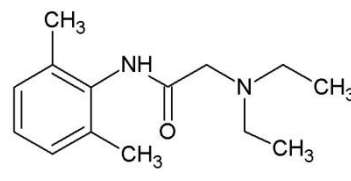
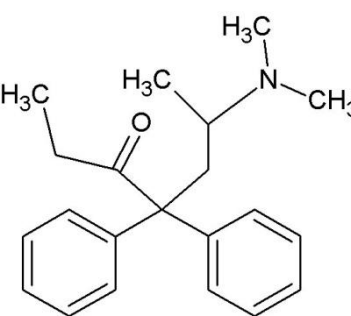
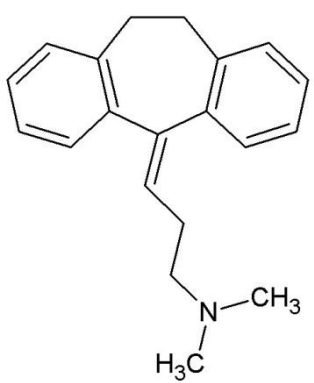
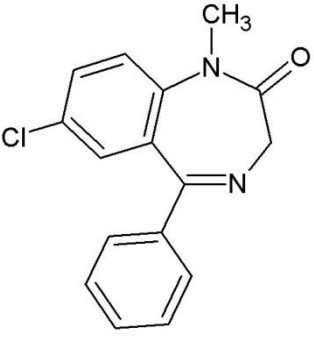
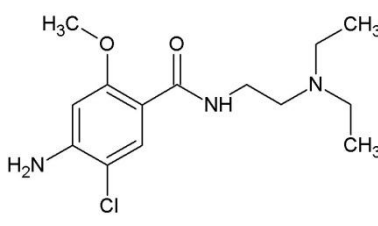
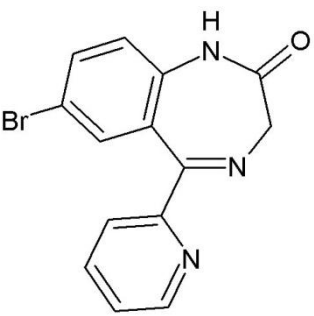
	Bezeichnung	Ibuprofen
	Substanzklasse	Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)
	Anwendung	Analgetikum, Antirheumatikum
	pka	4.91
	Löslichkeit in Wasser	21 mg/l
	Log k _{0/w}	3.97
	RRT (bez. auf Methadon)	0.659
	Bezeichnung	Pentobarbital
	Substanzklasse	Barbiturate
	Anwendung	Sedativum (obsolet)
	pka	8.11
	Löslichkeit in Wasser	679 mg/l
	Log k _{0/w}	2.1
	RRT (bez. auf Methadon)	0.747
	Bezeichnung	Lidocain
	Substanzklasse	Amid
	Anwendung	Lokalanästhetikum, Antiarrhythmikum
	pka	8.01
	Löslichkeit in Wasser	4.1 g/l
	Log k _{0/w}	2.44
	RRT (bez. auf Methadon)	0.832
	Bezeichnung	Methadon
	Substanzklasse	Opioid
	Anwendung	Analgetikum, Substitutionspräparat
	pka	8.94
	Löslichkeit in Wasser	48.5 mg/l
	Log k _{0/w}	3.93
	RRT (bez. auf Methadon)	1

Tabelle 8 Eigenschaften der Beispielanalyten zur SPE-Methodenentwicklung II [⁹⁵]

	Bezeichnung	Amitriptylin
	Substanzklasse	Tricyclisches Antidepressivum (TCA)
	Anwendung	Antidepressivum, Analgetikum
	pka	9.4
	Löslichkeit in Wasser	9.71 mg/l
	Log k _{0/w}	4.92
	RRT (bez. auf Methadon)	1.038
	Bezeichnung	Diazepam
	Substanzklasse	Benzodiazepin
	Anwendung	Anxiolytikum, Anticonvulsivum
	pka	3.4
	Löslichkeit in Wasser	50 mg/l
	Log k _{0/w}	2.82
	RRT (bez. auf Methadon)	1.187
	Bezeichnung	Metoclopramid (MCP)
	Substanzklasse	Amid
	Anwendung	Antiemetikum
	pka	9.27
	Löslichkeit in Wasser	200 mg/l
	Log k _{0/w}	2.62
	RRT (bez. auf Methadon)	1.279
	Bezeichnung	Bromazepam
	Substanzklasse	Benzodiazepin
	Anwendung	Anxiolytikum
	pka	2.9
	Löslichkeit in Wasser	175 mg/l
	Log k _{0/w}	2.05
	RRT (bez. auf Methadon)	1.308

3 Material und Methoden

3.1 *Chemikalien*

Organische Lösungsmittel waren von analysenreiner respektive HPLC-Qualität. Acetanhydrid, Aceton, Acetonitril, Chlorbutan, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Ethylacetat, Hexan, Isooctan, Isopropanol, Methanol, Petrolether, Pyridin, Toluol und Xylol wurden von E. Merck (Darmstadt) bezogen, ebenso Ameisensäure, Ammoniak, Essigsäure, Natronlauge, Pufferlösungen, Schwefelsäure und HPLC-reines Wasser.

Demineralisiertes Wasser wurde der hausinternen Millipore-MilliQ Anlage entnommen.

Amitriptylin, Ammoniumformiat, Barbital, Chinin, Codein, Coffein, Diphenhydramin, Haloperidol, Halothan, Histamin, Ibuprofen, Methaqualon, Methyljodid, Metoclopramid, Natriumsulfat, 5-p-Methylphenyl-5-phenylhydantoin (MPPH), Morphin, Strychnin und Tetrahexylammoniumhydrogensulfat entstammten Sigma-Aldrich (Steinheim), Isofluran wurde von Abbott (Wiesbaden) und Benzol von C. Roth (Karlsruhe) geliefert. Buprenorphin, β -Glucuronidase, Bromazepam, Diazepam, Doxepin, Flupenthixol, Lidocain, Methadon, Phenobarbital, Pentobarbital, Sulpirid und Verapamil sowie die internen Standards Diazepam-d₅, Phenobarbital-d₅ und Trimipramin-d₃ wurden von LGC (Wesel) bezogen.

3.2 *Laufmittel*

Mobile Phase HPLC-DAD: Acetonitril/ Phosphatpuffer pH 2.3 (37:63, v/v)

Mobile Phase X HPLC-MS/MS (Screening I): 5 mM Ammoniumformiat in H₂O/ Acetonitril (90:10, v/v)

Mobile Phase Y HPLC-MS/MS (Screening I): 5 mM Ammoniumformiat in H₂O/ Acetonitril (10:90, v/v)

Mobile Phase A HPLC-MS/MS (Screening II): 1 M Ammoniumformiat in H₂O/ Ameisensäure/ Wasser (2:2:996, v/v/v)

Mobile Phase B HPLC-MS/MS (Screening II): 1 M Ammoniumformiat in H₂O/ Ameisensäure/ Acetonitril (2:2:996, v/v/v)

3.3 *Geräte und Materialien*

3.3.1 GC-MS

Alle Untersuchungen mittels GC-MS wurden auf einem HP Model 5890 Series II Plus (Hewlett Packard, Waldbronn) gekoppelt mit einem HP 5972 Mass Selective Detector durchgeführt. Die Daten wurden anhand der vom Hersteller gestellten Standard-Software erhoben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Maurer-Pfleger-Weber-Bibliothek [⁹⁶] in der dritten Auflage. Das System war mit einer Quarzglas-Kapillar-Säule HP-5-MS (Hewlett Packard, Waldbronn) mit den Maßen 30 m x 0.25 mm Innendurchmesser ausgestattet.

3.3.2 HPLC-MS/MS

Für die Analysen mittels HPLC-MS/MS wurde eine LC-20 A Series Anlage von Shimadzu (Duisburg) verwendet. Als Detektor fungierte ein 4000 Q-Trap System mit einer Elektrospray Turbo V™ Ion Ionenquelle von Applied Biosystems (Darmstadt). Die Trennung erfolgte auf einer Allure PFP Propyl 5 µm Säule von Restek (Bad Homburg).

3.3.3 HPLC-DAD

Die chromatographische Trennung der Funktionslösung für die laborinterne Qualitätskontrolle (vgl. 3.4.1) erfolgt auf einem LC-6A HPLC-System mit SOD-M10AVP als Detektor (Shimadzu), ausgestattet mit einer Lichrosorb RP8-5µg Säule.

3.3.4 Festphasenextraktion

Bezüglich des Vergleichs bestehender Methoden zwischen GC-MS und LC-MS/MS kamen für die Aufarbeitung des Urins Chromabond®-OH-Säulen zum Einsatz. Es handelt sich hierbei um eine Diol-modifizierte Kieselgelphase.

Während der Optimierung der Extraktion wurden unterschiedliche Chromabond®-Säulen der Firma Macherey-Nagel (Düren) getestet. Es handelt sich hierbei zum Einen um „C8“ und „C18“, beides Silizium-basierte Säulen, beschichtet mit einer Octyl- bzw. Octadecyl-Phase (nicht nachsilyliert). Zum Anderen wurde „Easy“ verwendet, eine polar modifizierte Polystyren-Divinylbenzol-Copolymer Säule mit einem schwachen Anionenaustauscher, sowie „Drug“, welche durch eine bifunktionale Modifikation

(Octylphase modifiziert mit Benzensulphonsäure) charakterisiert ist. Die Festphasenextraktion wurde in einer Vakuum-Arbeitsstation mit manueller Bedienung durchgeführt.

Alle verwendeten Säulen wiesen ein Sorbensvolumen von 3 ml auf.

3.3.5 Festphasenmikroextraktion

Sowohl die Injektionsvorrichtung als auch die SPME-Faser-Einheit mit einer Beschichtung von 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS) wurden von Supelco (Bad Homburg) bezogen.

3.3.6 Software

Die Datenerhebung wurde bei GC-MS-Methoden mit MSD ChemStation E.01.00.137 von Agilent Technologies durchgeführt. Die Identifizierung der Spektren wurde mittels der Bibliothek von Maurer, Pflieger und Weber in der 3. Auflage vorgenommen [⁹⁶].

Bei der vom Hersteller bereitgestellten Software der HPLC-MS/MS-Methoden handelt es sich um Analyst 1.5.1.

Die statistische Versuchsplanung erfolgte mit der Software DesignExpert 7.0. Mit Hilfe dieses Programmes wurden ebenfalls die statistischen Auswertungen vorgenommen und auch diverse Graphiken bezüglich der Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung wurden hiermit generiert.

3.4 *Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen*

Bei forensisch-toxikologischen Suchanalysen sind Qualitätskontrollen grundsätzlich unerlässlich, um sicherzustellen, dass systematische Fehler ausgeschlossen werden und die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse gegeben ist.

Die arbeitstägliche Prüfung der chromatographischen Analysensysteme (hier: HPLC-DAD und GC-MS) auf Funktionstüchtigkeit können z.B. mit Hilfe von Testlösungen gemäß der Richtlinie der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) für die HPLC-DAD [⁹⁷] bzw. nach Empfehlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) [⁹⁸] für Analysen mittels GC-MS erfolgen. Die erhobenen Daten werden in Kontrollkarten eingetragen, so dass Abweichungen, Ausreißer oder Trends auf einen Blick erfasst und

ggf. Korrekturmaßnahmen, z.B. Reinigen der Ionenquelle oder Austausch der D₂-Lampe, ergriffen werden können.

3.4.1 Qualitätskontrolle HPLC-DAD

Als Funktionslösung für die HPLC-DAD-Anlage wird eine Mischung aus Histamin, Coffein, MPPH und Benzol jeweils in der Konzentration von 0.1 mg/ml verwendet. Aufgrund der Toxizität des Benzols - wegen der Gefährlichkeit auch geringster Konzentrationen gibt es keine Grenzwerte für eine chronische Exposition^[94] - wurde auf die empfohlene 10-fach höhere Konzentration ^[97] verzichtet.

Histamin dient zur Kontrolle der Totzeit, Coffein wird zur Bestimmung der Peakfläche herangezogen und überwacht so das injizierte Volumen durch den Autoinjektor. MPPH wird als Standard zur Berechnung der relativen Retentionszeit (RRT) verwendet, Benzol dient der Kontrolle der Wellenlängen-Richtigkeit und des spektralen Auflösungsvermögens des Detektors.

Als isokratische mobile Phase wird Acetonitril/ Phosphatpuffer pH 2.3 im Verhältnis 37:63 (v/v) verwendet. Es werden 10 µl der Funktionslösung injiziert.

Die Retentionszeiten bzw. relativen Retentionszeiten sowie die Peakflächen des Coffeins werden arbeitstäglich dokumentiert, wöchentlich erfolgt die Auswertung der Breite auf halber Peakhöhe ($b_{0,5}$, im Folgenden als Halbwertsbreite bezeichnet), der Peaksymmetrie, Übereinstimmung der UV-Spektren mit der Spektrenbibliothek, Richtigkeit der λ_{\max} -Werte der Schwingungsbanden des Benzols sowie die Auflösung bewertet durch den Extinktionsquotient E_{254}/E_{258} . An einer peakfreien Stelle des Chromatogramms wird ebenfalls wöchentlich das Rauschen anhand von Ausschlägen des UV-Detektors bewertet.

3.4.2 Qualitätskontrolle GC-MS

Zur Sicherstellung der Funktionstüchtigkeit der GC-MS-Anlage wird arbeitstäglich eine Lösung aus Barbitol, Pentobarbital, Diphenhydramin, Phenobarbital, Methaqualon, Codein, Morphin, Chinin, Haloperidol und Strychnin in der Konzentration von jeweils 0.01 mg/ml vermessen. Von dieser Lösung werden 50 µl injiziert, so dass eine absolute Menge von 50 ng aufgegeben wird. Alle Substanzen sollten im Chromatogramm mit einer Basislinientrennung zu detektieren sein. Beobachtet werden die Konstanz der Retentionszeiten und Peakflächen. Eine Herausforderung für das Analysensystem stellt

die Detektion des underivatisierten Morphins dar. Die Peakfläche sollte mindestens $\frac{1}{10}$ der des Codeins erreichen.

Die Lösung wird im Fullscan-Modus vermessen. Das Temperaturprogramm startet bei 70°C (1 min), mit einer Heizrate von 10°C/ min werden 300°C erreicht, die für sechs Minuten gehalten werden [98].

3.5 *Methodenvergleich bestehender forensisch-toxikologischer Suchanalysen*

Um die Eignung des Verfahrens der hauseigenen LC-MS/(MS)-Methode für Suchanalysen einzuschätzen, wurde es in Hinblick auf Ergebnissicherheit, Arbeitsaufwand und auch wirtschaftliche Aspekte einer etablierten GC-MS-Methode vergleichend gegenüber gestellt.

Fünzig reale Fälle des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Bonn aus dem Jahre 2008 wurden mittels beider Methoden der Suchanalyse unterzogen. Als Untersuchungsmatrices dienten Blut und Urin.

3.5.1 **Suchanalyse mittels GC-MS**

Die Proben wurden im Fullscan-Modus vermessen. Das Temperaturprogramm startet bei 80°C (Initialzeit 3 min) und wird mit einer Rate von 30°C/ min auf 310°C hochgefahren. Die finale Temperatur wird für 8 min gehalten, es resultiert eine Analysenzeit von 18.67 min.

Für die Extraktion von Blut bzw. Serum wurde 1 ml Probe mit 100 µl methanolischer Trimipramin-D₃-Lösung (10 µg/ml) als internen Standard versetzt. 2 ml gesättigte Natriumsulfat-Lösung werden hinzugegeben, anschließend erfolgt die Extraktion mit 4 ml Diethylether/ Ethylacetat (1:1, v/v). Nach Vortexen erfolgt die Zentrifugation bei 3000 U/ min. Die organische Phase wird überführt, die wässrige Phase mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und abermals wie beschrieben extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand mit 100 µl Methanol aufgenommen. 1 µl hiervon wird der Gaschromatographie zugeführt.

Für die basische Extraktion von Urin werden 2.5 ml der Probe zur Spaltung möglicher Glucuronide mit 100 µl β-Glucuronidase versetzt, im Vorfeld erfolgt eine pH-Wert-Einstellung mittels 1 M Salzsäure auf 4-5. Die so behandelte Probe wird bei 37°C für 24 h

inkubiert. Anschließend werden 2 ml 30 %-ige Ammoniumsulfat-Lösung und wenige Tropfen 10 M Natronlauge (gewünschter pH = 8-9) hinzugefügt. Die Mischung wird mit 2.5 ml Nativurin versetzt. Die Extraktion erfolgt mittels 5 ml Ethylacetat/ Dichlormethan/ Isopropanol (3:1:1, v/v/v), nach Vortexen wird bei 3000 U/ min für 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wird bei max. 60°C unter mildem Stickstoffstrom eingedampft, der Rückstand mit 100 µl Acetylierungsgemisch (Pyridin/ Acetanhydrid 2:3, v/v) versetzt. Die Derivatisierung erfolgt für 30 min bei 60°C. Anschließend wird das derivatisierte Extrakt eingedampft und in 50 µl Methanol aufgenommen. 1 µl hiervon wird der Gaschromatographie zugeführt [98].

Für die saure Extraktion von Urin werden 2 ml Phasentransferkatalysator-Lösung (0.02 ml/ l Tetrahexylammoniumhydrogensulfat in 1 mol/ l Phosphatpuffer pH 12) versetzt. Als Derivatisierungsreagenz fungiert eine Lösung von Methyljodid in Toluol (5 ml, 1 mol/ l). Die Reagenzgläser werden luftdicht verschlossen und zur Derivatisierung bei 50°C für 30 min in den Ofen verbracht. Anschließend werden die Proben unter fließendem Wasser abgekühlt und bei 3000 U/ min für 5 min zentrifugiert.

Für die Festphasenextraktion werden Diol-Säulen (500 mg/ ml, non endcapped) mit 5 ml Methanol gewaschen und mit 5 ml Toluol konditioniert. Nach der Aufgabe von 5 ml Probe erfolgt die Elution mit Diethylether/ Ethylacetat (95:5, v/v). Das Eluat wird unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 50 µl Ethylacetat aufgenommen. 1 µl hiervon wird der Gaschromatographie zugeführt [98].

Diese Methode kann ebenfalls für Blut bzw. Serum angewandt werden.

3.5.2 Suchanalyse mittels HPLC-MS/MS

Die Analyten werden über eine Phenomenex Security Guard + Synergi Aqua 150 x 2 (4 µm) Säule getrennt, der Flow beträgt 200 µl/ min. Als Laufmittel dienen 90 % Ammoniumformiat-Puffer/ 10 % Acetonitril (A) bzw. 10 % Puffer/ 90 % Acetonitril (B). Es wird ein Gradient von 50 % Laufmittel A auf 100 % A innerhalb von 10 min gefahren. Die Gesamtanalysenzeit beträgt 17 min.

Zur Extraktion von Blut bzw. Serum wird 1 ml der Probe mit 1 ml Boratpuffer pH 9 gevortext, anschließend mit 5 ml Chlorbutan extrahiert. Als interner Standard fungiert Diazepam-d₅ (10 µl, 1 µg/ ml). Nach Zentrifugation (4000 U/ min, 8 min) werden 4 ml der organischen Phase abgezogen und unter Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wird

in 100 μl Laufmittel A aufgenommen. 10 μl davon werden der Flüssigchromatographie zugeführt [99].

Für die Extraktion von Urin werden 200 μl der Urinprobe mit 200 μl Wasser verdünnt. Auch hier wird Diazepam- d_5 (10 μl , 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als interner Standard verwendet. Es erfolgt eine Fällung mit 100 μl Acetonitril, die Proben werden anschließend kurz zentrifugiert. 10 μl werden der Flüssigchromatographie zugeführt [100].

3.6 *Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS*

Zahlreiche Variable haben einen Einfluss auf die Qualität der SPME-Methode, zum Beispiel die Beschaffenheit der Faser, Agitation, Temperatur und Dauer der Extraktion und der Desorption im Injektor des Gaschromatographen.

Variable mit einem geringeren Einfluss auf das Extraktionsgeschehen bzw. solche, die einen direkten Einfluss auf die Extraktionszeit aufweisen (Faser, Agitation), wurden im Vorfeld optimiert, anschließend erfolgte ein CCD, welches die Optimierung der Extraktionszeit, der Extraktionstemperatur sowie der Desorptionszeit beinhaltet.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Beispielanalyten sind in den Abschnitten 2.13.1 und 2.13.2 aufgeführt. Sämtliche Vorversuche wurden dreifach durchgeführt.

3.6.1 **Herstellung der Standardlösungen und Proben**

Stammlösungen von Isofluran, Halothan, Hexan, Chloroform, Benzol, Isooctan, Toluol und Xylol wurden mit je 50 mg/ml in Methanol hergestellt und bei -20°C gelagert. Aus diesen wurde eine Standardlösung, die alle Testanalyten enthält, angefertigt. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass Methanol in diesem Fall keinen Bestandteil der analysierten Substanzen darstellt.

Leerblutproben (1 ml) wurden mit 50 μl der Standardlösung versetzt, daraus resultierten Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Isofluran, 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Halothan, 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hexan, 19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloroform, 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Benzol, 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Isooctan, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Toluol und 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Xylol.

Im Vorfeld wurde jede Charge von Leerblut auf die Abwesenheit der entsprechenden Analyten getestet.

3.6.2 Auswahl der Faser

Die Faser wurde aufgrund theoretischer Überlegungen und Erfahrungswerten ausgewählt, die in Abschnitt 4.3.1 näher erläutert werden.

3.6.3 Aussalzeffekt

Die Zugabe von Salzen, z.B. Natriumsulfat, kann genutzt werden, um die Matrix zu modifizieren und die Ionenstärke zu erhöhen. Dadurch wird die Löslichkeit der Analyten herabgesetzt und das Gleichgewicht zugunsten der Gasphase verschoben [2].

Fünf Salze (NaCl, Na₂SO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃ und (NH₄)₂SO₄; jeweils 200 mg) wurden zu gespikten Blutproben hinzugegeben und mit gespikten Proben ohne Salzzugaben verglichen.

3.6.4 pH-Wert

Gespikte Blutproben wurden mit Hilfe von H₂SO₄ bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 3, 7 und 10 eingestellt.

3.6.5 Wasserzugabe

Grundsätzlich reduziert die Verdünnung mit Wasser den Effekt von Matrixproteinen, die sich irreversibel an die Faser anlagern oder Analyten binden können. Des Weiteren werden durch die resultierende Herabsetzung der Matrixviskosität die Diffusionskoeffizienten gesteigert und das Volumen der Gasphase reduziert. Beides erlaubt eine höhere Extraktionsausbeute.

Proben ohne Wasserzugabe wurden denen mit 2 ml Wasserzugabe gegenübergestellt.

3.6.6 Agitation

Agitation oder das Rühren der Probe können die Extraktionsausbeute erhöhen, da der Transfer der Analyten durch den kontinuierlichen Aufbau einer „neuen Oberfläche“ in die Gasphase beschleunigt ist. Während der Inkubation und Extraktion wird die Probe automatisch mit einem Intervall von 5 s Agitation/ 3 s Pause gerüttelt. Diese Prozedur wurde mit nicht-agitierten Proben verglichen.

3.6.7 Eintauchtiefe

Die Eintauchtiefe in den Injektor der GC-Apparatur hat einen Einfluss auf die Desorption der Analyten und insofern auf die Extraktionsausbeute. Ein Bereich von 48 mm bis 56 mm wurde untersucht.

3.6.8 Desorptionstemperatur

Grundsätzlich sollte sich die Desorptionstemperatur an die Empfehlungen des Herstellers der SPME-Faser (z.B. max. 280°C bei einer PDMS-100µm-Faser) anlehnen. Zugleich sollte eine Verschleppung von Analyten vermieden werden. Es wurde mit Temperaturen von 200° bis 280°C experimentiert.

3.6.9 Central Composite Design (für SPME)

Wie unter Punkt 2.7 beschrieben, benötigt ein CCD fünf Levels jeden Faktors. Da die Faktoren Extraktionszeit, Extraktionstemperatur sowie Desorptionszeit mit dieser Methode optimiert werden sollten, enthält dieser Versuchsplan also $2^3 = 8$ Testläufe, sechs center points und sechs axial points mit $\alpha = 1.682$, also insgesamt 20 Experimente. Mit einer axialen Entfernung von $\alpha = 1.682$ ist sichergestellt, dass das Design drehbar ist.

Tabelle 9: Kodierte Design-Matrix (SPME)

Kodierte Matrix der Experimente ¹⁾				
Test	Typ	Extraktionstemperatur	Extraktionszeit	Desorptionszeit
1	Center	0	0	0
2	Center	0	0	0
3	Center	0	0	0
4	Fact	1	-1	1
5	Fact	-1	-1	-1
6	Center	0	0	0
7	Fact	-1	1	1
8	Center	0	0	0
9	Axial	-1.682	0	0
10	Axial	0	-1.682	0
11	Fact	-1	-1	1
12	Axial	0	0	-1.682
13	Axial	0	0	1.682
14	Fact	1	1	1
15	Fact	1	-1	-1
16	Fact	1	1	-1
17	Center	0	0	0
18	Axial	1.682	0	0
19	Fact	-1	1	-1
20	Axial	0	1.682	0

Bemerkungen: 1) Fünf Levels jeden Faktors, sechs center points und sechs axial points mit $\alpha = 1.682$

Zur Festlegung des experimentellen Bereiches wurden sowohl instrumentelle und operative Grenzen als auch eigene Vortests in Betracht gezogen:

Bei toxikologischen Fragestellungen bedarf es oft schneller Resultate, vor allem bei klinischen Fällen. Aus diesem Grund sollte die Extraktionszeit nicht zu beträchtlich sein und es sollte ein Kompromiss zwischen Zeit und Sensitivität gefunden werden. Daher wurde das Maximum auf 25 min gelegt.

Eine genügende Desorptionszeit ist für eine komplette Desorption relevant und verhindert Verschleppungseffekte. Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein Bereich von 120 s bis 180 s festgelegt.

Die Extraktionstemperatur hat den bedeutendsten Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Aufgrund des hohen Dampfdruckes können VOC bei niedrigeren Temperaturen extrahiert werden. Hohe Temperaturen können sogar dazu führen, dass Analyten wieder von der Faser gelöst werden und so die Gesamtmenge an extrahierten Analyten sinkt. Andererseits sind die beteiligten Substanzen in einer Screening-Analyse nicht vorhersehbar und es ist

eine breite Anwendbarkeit gefordert. Aufgrund der beschriebenen Tatsachen wurde ein ausgedehnter Bereich bis zu 75°C untersucht.

Die analysierten Levels sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Experimente wurden randomisiert durchgeführt, um einen systematischen Fehler zu vermeiden.

Tabelle 10: Nicht-kodierte Levels der Faktoren Extraktionstemperatur, Extraktionszeit und Desorptionszeit

	Low (-1)	High (+1)	Center (0)	Axial (- α)	Axial (+ α)
Extraktions-T [°C]	45	75	60	35	85
Extraktions-t [min]	15	25	20	12	28
Desorptions-t [s]	120	180	150	100	200

3.6.10 Chromatographie und MS-Bedingungen (SPME)

Das Temperaturprogramm startet bei 36°C (Initialzeit 4 min) und wird mit 10°C/ min auf 120°C hochgefahren. Diese Temperatur wird für 1 min gehalten; daraus resultiert eine Analysenzeit von 13.4 min. Es wird ein spezieller Liner mit einem kleinen Durchmesser verwendet, der sich besonders für Analysen mittels SPME eignet.

Als Trägergas dient Helium mit einem Druck von 40.1 kPa. Die Injektortemperatur liegt bei 260°C, wohingegen die Transferline-Temperatur auf 280°C eingestellt ist.

3.6.11 Methodvalidierung (SPME)

Für die Validierung von qualitativen Methoden werden nach Peters et al.^[101] Selektivität, Nachweisgrenze (LOD) und Wiederfindung evaluiert. Die Selektivität wurde anhand der bewiesenen Abwesenheit der Testsubstanzen in der Leerprobe ermittelt. Die LOD wurde als das dreifache Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt.

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurde sechs extrahierte Proben hoher und niedriger Konzentrationen analysiert und mit nicht-extrahierten Standardlösungen verglichen. „Niedrige“ (*low*) und „hohe“ (*high*) Level wurden bezüglich der entsprechenden therapeutischen Konzentrationsbereiche der unterschiedlichen Substanzen definiert.

3.7 *Entwicklung einer Screening-Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS*

Für die Optimierung der Festphasenextraktion sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen, die einen Einfluss auf die Qualität des Extraktionsprozesses haben. Die Wahl der SPE-Säule ist essentiell und richtet sich nach der grundsätzlichen Fragestellung und den damit verbundenen Analyten. Des Weiteren spielen beispielsweise der pH-Wert der Pufferlösung für die Probenverdünnung und die Zusammensetzung der Elutionslösung(en) eine entscheidende Rolle.

Analog zur Entwicklung der Screening-Methode mittels HS-SPME/GC-MS wurden auch hier einige Faktoren im Vorfeld untersucht, während der Anteil an Methanol in der Waschlösung, die Molarität der Essigsäure sowie die Zusammensetzung der Elutionslösungen I und II mittels CCD optimiert wurden.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Beispielanalyten sind im Abschnitt 2.13.3 aufgeführt. Sämtliche Vorversuche wurden dreifach durchgeführt.

3.7.1 **Herstellung der Standardlösungen und Proben**

Stammlösungen von Ibuprofen, Pentobarbital, Lidocain, Methadon, Amitriptylin, Diazepam, MCP und Bromazepam wurden hergestellt (je 1 mg/ ml, mit der Ausnahme von Pentobarbital mit 2 mg/ ml) und bei -20°C gelagert. Aus diesen wurde eine Standardlösung, die alle Testanalyten enthält, angefertigt.

Leerblutproben (1 ml) wurden mit 50 µl der Standardlösung versetzt, daraus resultierten Konzentrationen von 16 mg/ ml Ibuprofen, 1 mg/ ml Pentobarbital, 0.4 mg/ ml Lidocain, 0.4 mg/ ml Methadon, 0.4 mg/ ml Amitriptylin, 1 mg/ ml Diazepam, 1 mg/ml MCP sowie 1 mg/ ml Bromazepam. Trimipramin-d₃ und Phenobarbital-d₅ wurden als interne Standards in Konzentrationen von 1 mg/ ml bzw. 2 mg/ ml verwendet.

Im Vorfeld wurde jede Charge von Leerblut auf die Abwesenheit der entsprechenden Analyten getestet.

3.7.2 **Probenvorbereitung**

Die Einstellung des pH-Wertes ist vor allem für polarere Analyten entscheidend. Um sowohl sauren als auch basischen Substanzen gerecht zu werden, empfiehlt sich ein moderater pH-Wert. Des Weiteren ist eine Verdünnung der Proben für die Extraktion von

Bedeutung, vor allem bei Verwendung von Vollblut, da die SPE-Kartuschen von gering viskosen Flüssigkeiten leichter passiert werden können.

Aufgrund von theoretischen Überlegungen können pH-Werte von kleiner sechs oder größer acht ausgeschlossen werden. Daher wurde ausschließlich dieser pH-Bereich untersucht.

2 ml Phosphatpuffer mit pH 6, 7 bzw. 8 wurde zur Blutprobe gegeben und die Mischung gevortext. Eine anschließende Behandlung im Ultraschallbad sowie eine Zentrifugation sind bei Serumproben nicht nötig, können allerdings für Vollblutproben nützlich sein.

3.7.3 Auswahl der SPE-Kartuschen

Um Unterschiede zwischen verschiedenen Herstellern zu eliminieren, wurden alle getesteten Kartuschen von Macherey-Nagel bezogen. Es gibt verschiedene SPE-Säulen im Handel, die sich für unterschiedlichste chemische Strukturen eignen. Es wurden Chromabond® „C8“, „C18“, „Easy“ und „Drug“ im Vorfeld der Optimierung verwendet. Die charakteristischen Eigenschaften und chemischen Modifikation der Kartuschen sind Abschnitt 3.3.4 zu entnehmen. Die Blutproben wurden zur Auswahl der Säulen gemäß den Empfehlungen des Herstellers behandelt.

3.7.4 Konditionierung

Im Normalfall wird Methanol, Puffer und/ oder Wasser zur Konditionierung verwendet. Zunächst wurden 3 ml Methanol aufgegeben, gefolgt von 3 ml Pufferlösung und 3 ml Wasser.

3.7.5 Waschschrift

Da eine vorzeitige Elution von Analyten zu diesem Zeitpunkt vermieden werden sollte, muss die Verwendung von Methanol vorsichtig gehandhabt werden. Als ein erster Waschschrift hat sich Pufferlösung mit einem geringen Prozentsatz an Methanol als geeignet erwiesen. Des Weiteren könnte ein unpolares Lösungsmittel wie Hexan von Vorteil sein, um Matrixbestandteile wie Cholesterol zu entfernen.

Der erste Waschschrift wurde mit Pufferlösung pH 7 und Methanol (95:5, v/v) durchgeführt. Hexan und Isooctan wurden als zusätzliche Waschlösungen untersucht und zudem wurde Wasser als dritter Schritt angeschlossen.

3.7.6 Central Composite Design (für SPE)

Wie unter Abschnitt 2.7 beschrieben, benötigt ein CCD fünf Levels jeden Faktors. Da der Anteil an Methanol in der ersten Waschlösung, die Molarität der Essigsäure, der Anteil an Aceton in der ersten Elutionslösung, der Anteil an Isopropanol und der Zusatz von Ammoniak in der zweiten Elutionslösung mit dieser Methode optimiert werden sollten, enthält dieser Versuchsplan also $2^5 = 32$ Testläufe, acht center points und zehn axial points mit $\alpha = 1.682$, also insgesamt 50 Experimente. Mit einer axialen Entfernung von $\alpha = 1.682$ ist sichergestellt, dass das Design drehbar ist.

Tabelle 11: Kodierte Design-Matrix

Kodierte Matrix der Experimente ¹⁾						
Test	Typ	Anteil Methanol	Molarität Essigsäure	Anteil Aceton	Anteil Isopropanol	Zusatz von Ammoniak
1	Fact	1	1	-1	-1	1
2	Center	0	0	0	0	0
3	Fact	-1	-1	-1	1	-1
4	Fact	-1	-1	1	1	-1
5	Fact	1	-1	1	1	-1
6	Axial	0	0	-1.682	0	0
7	Fact	1	1	-1	1	-1
8	Fact	-1	-1	-1	-1	1
9	Fact	1	-1	1	-1	1
10	Axial	0	0	0	0	1.682
11	Axial	0	1.682	0	0	0
12	Axial	1.682	0	0	0	0
13	Fact	1	-1	1	1	1
14	Center	0	0	0	0	0
15	Fact	-1	1	-1	-1	-1
16	Fact	1	1	1	-1	-1
17	Fact	-1	1	1	1	1
18	Fact	-1	1	-1	1	1
19	Fact	-1	-1	1	-1	-1
20	Axial	-1.682	0	0	0	0
21	Fact	-1	-1	-1	-1	-1
22	Fact	1	-1	-1	1	-1
23	Fact	-1	-1	-1	1	1
24	Fact	1	-1	-1	1	1
25	Center	0	0	0	0	0
26	Fact	1	-1	1	-1	-1
27	Fact	1	1	1	-1	-1
28	Center	0	0	0	0	0
29	Fact	1	1	1	1	1
30	Axial	0	-1.682	0	0	0
31	Fact	1	1	-1	-1	-1
32	Fact	1	-1	-1	-1	-1
33	Fact	1	1	1	1	-1
34	Center	0	0	0	0	0
35	Axial	0	0	0	-1.682	0
36	Fact	-1	1	-1	1	-1
37	Axial	0	0	1.682	0	0
38	Fact	-1	1	1	-1	-1
39	Fact	1	-1	-1	-1	1
40	Fact	-1	-1	1	1	1
41	Fact	-1	1	1	-1	1
42	Center	0	0	0	0	0
43	Fact	-1	1	-1	-1	1
44	Axial	0	0	0	1.682	0
45	Fact	-1	1	1	1	-1
46	Fact	1	1	-1	1	1
47	Center	0	0	0	0	0
48	Center	0	0	0	0	0
49	Fact	-1	-1	1	-1	1
50	Axial	0	0	0	0	-1.682

Bemerkungen: 1) Fünf Levels jeden Faktors, acht center points und zehn axial points mit $\alpha = 1.682$

Der experimentelle Bereich wurde sowohl aufgrund theoretischer Überlegungen als auch vorhergehender Untersuchungen definiert.

Wie bereits erwähnt, sollte der Anteil an Methanol in der Waschlösung nicht zu hoch sein, um eine vorzeitige Elution von Analyten zu vermeiden. Andererseits ist der Waschschrift umso effektiver je größer der Part an Methanol ist. Daher wurde das Maximum auf 10 % festgesetzt.

Die Essigsäure muss stark genug sein, um saure Komponenten in ungeladene Moleküle zu transferieren. Ein Minimum wurde bei 0.25 M angesetzt.

Wenn man die verschiedenen chemischen Charakteristiken der Substanzen bei einem Screening bedenkt, sind zwei Elutionsschritte mit unterschiedlichen Lösungen nötig. Zunächst werden die sauren Analyte eluiert, nachdem sie von der Essigsäure in ungeladene Moleküle überführt wurden. Die zweite Lösung, welche mit Ammoniak versetzt ist, deprotoniert und eluiert gleichzeitig die basischen Substanzen. Die Mischung aus polaren und unpolaren Lösungsmitteln ist für die Elution essentiell. Dichlormethan hat sich für diesen Einsatz bewährt. Es wurde in Kombination mit Aceton im ersten Elutionsschritt und Isopropanol im zweiten Elutionsschritt getestet. Die Maxima der polaren Lösungsmittel wurden auf 60 % bzw. 40 % festgelegt.

Der Zusatz von Ammoniak ist wichtig um die basischen Komponenten im zweiten Schritt zu eluieren. Es wurde eine Lösung von 25 %-igem Ammoniak verwendet. Als Minimum wurden 2 ml/ 100 ml bestimmt.

Die analysierten Levels aller Faktoren sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die Experimente wurden randomisiert durchgeführt, um einen systematischen Fehler zu vermeiden.

Tabelle 12: Nicht-kodierte Level der mittels CCD untersuchten Faktoren

	Low (-1)	High (+1)	Center (0)	Axial (- α)	Axial (+ α)
Methanol [%]	5	10	7.5	1.5	13.5
Essigsäure [M]	0.25	1.0	0.63	0.1	1.5
Aceton [%]	40	60	50	26	74
Isopropyl-alkohol [%]	20	40	30	6	53
Ammoniak [ml/ 100 ml]	2	6	4	0.7	8.75

3.7.7 Chromatographie und MS-Bedingungen (SPE)

Das Temperaturprogramm startet bei 100°C (Initialzeit 3 min) und wird mit einer Rate von 30°C/ min auf 160°C und 10°C/ min auf 300°C hochgefahren. Die finale Temperatur wird für 3 min gehalten; es resultiert eine Analysenzeit von 22 min.

Als Trägergas dient Helium mit einem Fluss von 1 ml/ min. Die Injektor-Temperatur liegt bei 250°C, wohingegen die Transferline-Temperatur auf 280°C eingestellt ist. Die Messung erfolgt im Fullscan-Modus (m/z 50 - 550) und es wird eine Ionisationsenergie von 70 eV mit einer Ionenquellen-Temperatur von 230°C verwendet.

3.7.8 Methodvalidierung (SPE)

Auch in diesem Fall erfolgte die Validierung von der qualitativen Methode nach Peters et al. [101], wobei die Selektivität, Nachweisgrenze und Wiederfindung bestimmt wurden. Das konkrete Vorgehen wurde bereits unter 3.6.11 beschrieben.

3.7.9 Methodenvergleich: GC-MS versus HPLC-MS/MS

Um die Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS zu belegen und einzuordnen, wurde sie vergleichend der bestehenden HPLC-MS/MS-Methode gegenüber gestellt.

Hierzu wurden 128 Realproben gaschromatographisch retrospektiv analysiert, d. h. diese Proben wurden im Routinebetrieb mittels Flüssigchromatographie vermessen und anschließend der Gaschromatographie zugeführt.

Die finale Aufarbeitung via Festphasenextraktion kann Abschnitt 4.4.5 entnommen werden. Die Proben wurden sowohl underivatisiert als auch acetyliert vermessen.

Für die Analyse mittels HPLC-MS/MS wird zur Extraktion von Blut bzw. Serum 200 µl der Probe mit 50 µl Tris-Puffer pH 11 gevortext und anschließend mit 5 ml Chlorbutan extrahiert. Als interner Standard fungiert Diazepam-d₅ (10 µl, 1 µg/ml). Nach Zentrifugation (4000 U/min, 8 min) werden 4 ml der organischen Phase abgezogen und unter Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wird in 100 µl Laufmittel A aufgenommen. 10 µl davon werden der Flüssigchromatographie zugeführt.

Zur Aufarbeitung von Urin wird lediglich eine Verdünnung durchgeführt. Hierzu werden 200 µl Urin mit 400 µl Wasser verdünnt. Sollte eine starke Trübung vorliegen, kann eine anschließende Zentrifugation empfehlenswert sein [¹⁰⁰].

Die instrumentellen Bedingungen können Abschnitt 3.5.2 entnommen werden.

3.8 *Optimierung der Screening-Methode mittels HPLC-MS/MS*

Wie dem vorherigen Abschnitt zu entnehmen ist, ist die in der Routine verwendete Methode in der Durchführung unkompliziert und zeitsparend. Gerade Urin wird lediglich mittels Verdünnung „aufgearbeitet“. Allerdings ist der Grad der Verdünnung ein Parameter, bei dem es gilt, einen Kompromiss zwischen ausreichender Konzentration der Analyten und genügender Verdünnung der Matrixkomponenten zu wählen, da letztere einen Einfluss auf die Detektion der Substanzen ausüben können. Matrixeffekte sind definiert als Effekte koeluerender Matrixkomponenten auf die Ionisation der Zielanalyten [^{47;102}]. Die führt zu Ionendepression oder -steigerung, die wiederum eine verminderte Präzision und Richtigkeit zur Folge haben. Dieses Phänomen ist bei rein qualitativen Analysen zwar von geringerer Bedeutung, kann aber dennoch zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Der Verdünnungsgrad wurde anhand des Parameters „Wasserzugabe“ variiert.

Bei der Optimierung der Wasserzugabe wurden die Proben zu den analytischen Bedingungen vermessen, wie sie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben sind.

3.8.1 Standardlösung für die Methodenoptimierung

Als Standardlösung zur Optimierung diente ein Mix aus Diazepam 1 µg/ ml, Verapamil 1 µg/ ml, Doxepin 1 µg/ ml, Sulpirid 2 µg/ ml, Lidocain 1 µg/ ml Methadon 2 µg/ ml und Buprenorphin 2 µg/ ml in Laufmittel B.

3.8.2 „One Factor Response Surface Design“ (Urinverdünnung HPLC-MS/MS)

Auch bei einer Optimierung, die lediglich einen Parameter beinhaltet, eignet sich die Anwendung statistischer Methoden, um gleichzeitig ein Minimum an Testläufen mit signifikanten Ergebnissen zu verknüpfen.

Fünf verschiedene Verdünnungsstufen wurden untersucht, hierzu wurden zu 400 µl gespikten Urin je 200 µl, 400 µl, 600 µl, 800 µl und 1000 µl Wasser hinzugegeben. Um signifikante Ergebnisse erhalten zu können, wurden sieben Testläufe durchgeführt, wobei die Extrempunkte 200 µl und 1000 µl Wasserzugabe zweifach vermessen werden.

Der Ablauf der Experimente ist in der Design-Matrix mit kodierten und nicht-kodierten Werten dargestellt:

Tabelle 13: Design-Matrix (HPLC-MS/MS)

Test	Wasserzugabe kodiert	Wasserzugabe [µl]
1	0.5	800
2	1	1000
3	1	1000
4	-1	200
5	-0.5	400
6	-1	200
7	0	600

Die Auswahl des Testbereiches orientiert sich an der im Institut für Rechtsmedizin üblichen Wasserzugabe von 400 µl.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse werden abschnittsweise getrennt nach den verschiedenen entwickelten Methoden bzw. durchgeführten Untersuchungen präsentiert.

4.1 Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen

4.1.1 Qualitätskontrolle HPLC-DAD

Alle Substanzen ergeben im Chromatogramm einen deutlichen Peak:

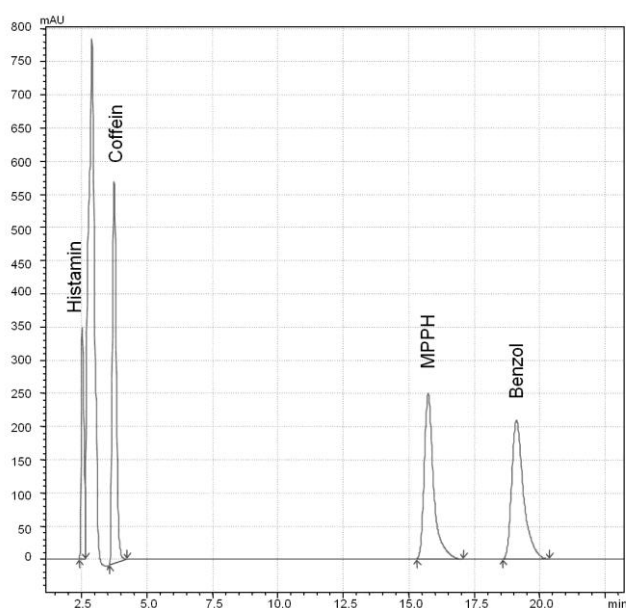


Abbildung 7: Chromatogramm Funktionslösung HPLC-DAD

Die Retentionszeiten zeigen über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten eine relative Standardabweichung von 1.65 % (Benzol) bis 4.20 % (Histamin).

Die Peakflächen des Coffeins unterliegen einem Variationskoeffizienten von 10.00 %. Bis auf Benzol zeigen alle Substanzen durchgängig einen Similarity Index (SI) oberhalb der geforderten 0.999 in Bezug auf die hinterlegten Sollspektren. Der SI von Benzol nimmt nach etwa zwei Monaten stetig ab.

Der Extinktionsquotient der Feinstruktur des Benzolspektrums liegt bei allen Messungen über dem geforderten Mindestwert von 2. Die vier Maxima zwischen 242 und 260 nm zeigen sich gleichbleibend in ihren Werten, allerdings liegt das zweite Maximum entgegen der GTFCh-Vorgaben nicht zwischen 247/248 nm, sondern zwischen 248/249 nm - dies allerdings konstant.

Das Hintergrundrauschen bewegt sich stetig zwischen 0.25 und 0.75 mAbs.

Vor allem MPPH und Benzol zeigen mit durchschnittlich 1.5 bzw. 1.4 ein leichtes Tailing, liegen damit nicht im geforderten Bereich von 0.8 - 1.2 und sind mit einer Abweichung von maximal 15.2 % (Histamin) leicht schwankend. Die Schwankungen bei den ermittelten Halbwertsbreiten erreichen sogar bis zu 33.6 % (Histamin und Coffein). Tabelle 14 fasst Mittelwert und relative Standardabweichung der Parameter zusammen, die von allen vier Substanzen ermittelt wurden.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse einiger Parameter der Funktionslösung für die HPLC-DAD

	RRT bzw. RT		SI		Halbwertsbreite		Symmetrie	
Histamin	0.211	1.21 %	0.9997	0.04 %	0.123	33.64 %	1.25	15.24 %
Coffein	0.100	3.57 %	0.9998	<0.001 %	0.133	33.63 %	1.33	14.27 %
MPPH	11.996	4.05 %	0.9998	<0.001 %	0.295	16.78 %	1.50	11.72 %
Benzol	1.283	1.65 %	0.9993	0.03 %	0.351	13.99 %	1.43	12.38 %

4.1.2 Qualitätskontrolle GC-MS

Alle Substanzen zeigen sich im Chromatogramm, Basislinientrennung wird über den gesamten Retentionsbereich erreicht.

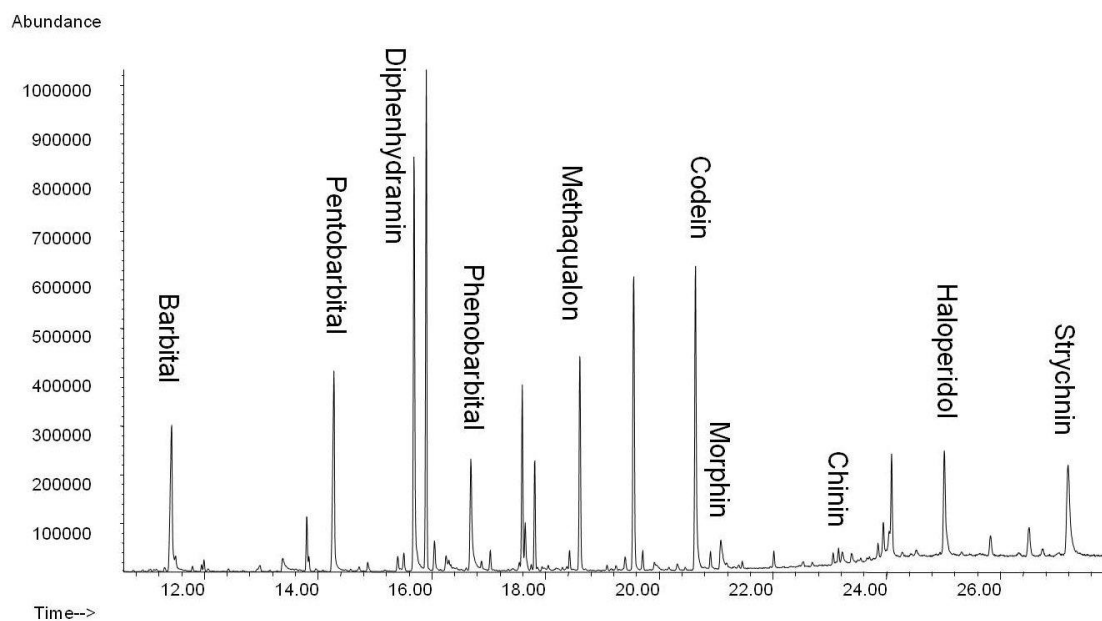


Abbildung 8: Chromatogramm Funktionslösung GC-MS

Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigen vor allem Codein und Haloperidol bezüglich der Peakflächen Schwankungen, während Diphenhydramin Ausreißer sowohl nach oben als auch nach unten aufweist. Die Peakflächen des Morphins liegen durchschnittlich bei 4.31 % der Peakflächen des Codeins. Die Vorgaben des 10 %-Anteiles werden somit nicht erfüllt.

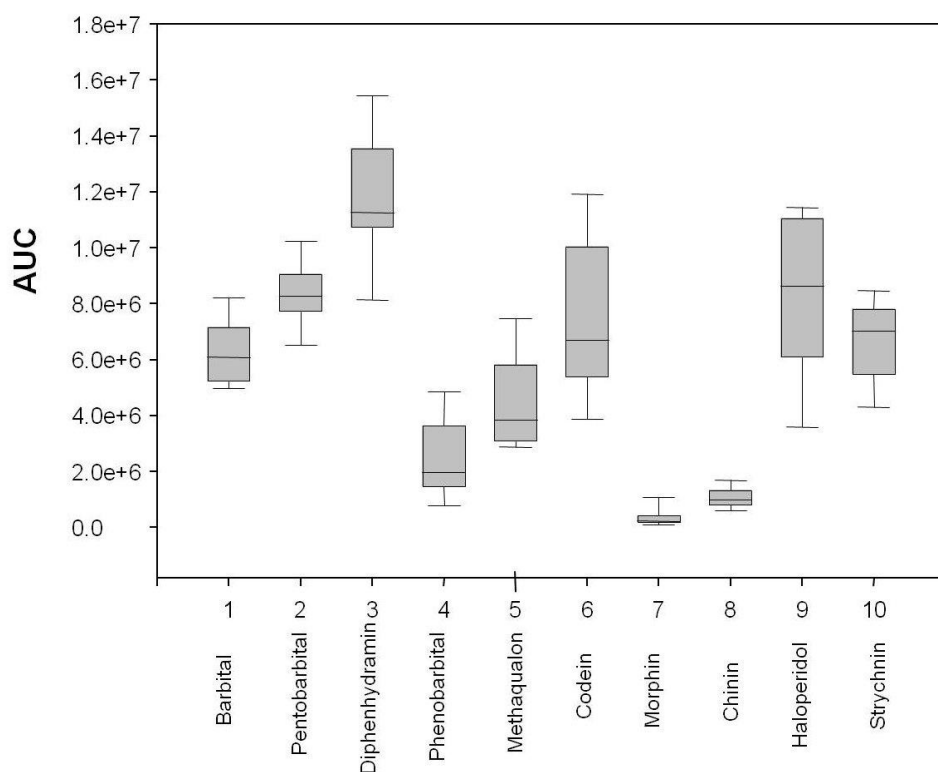


Abbildung 9: Peakflächenverteilung Funktionslösung GC-MS

4.2 Methodenvergleich bestehender forensisch-toxikologischer Suchanalysen

Die Ergebnisse des GUS an Realproben wurden vor allem hinsichtlich der Ergebnissicherheit betrachtet. Abbildung 10 zeigt die Verteilung der detektierten Substanzen mit Bezug auf Matrix und Analysenmethode, ausgewertet wurde hierbei nur die Anzahl als erster Überblick.

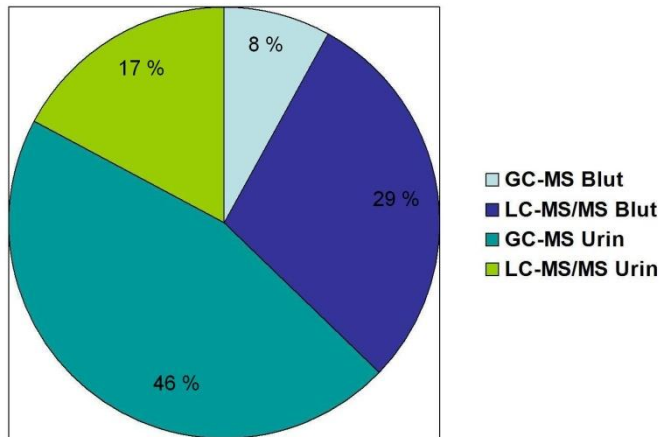


Abbildung 10: Verteilung der detektierten Substanzen in Bezug auf Matrix und Analysenmethode

Für Urinproben scheint die GC-MS-Methode zunächst überlegen zu sein, allerdings wurden hier besonders toxikologisch nicht relevante Nebenbefunde erhalten, wie z.B. Coffein, Nikotin und Cotinin (in Abbildung 11 als „Diverse“ deklariert). Betrachtet man nun das Ergebnis bezüglich einzelner Substanzgruppen näher, zeigten sich große Probleme bei der Detektion von Benzodiazepinen, die fast ausschließlich mittels LC-MS/MS detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten allerdings deutlich mehr Substanzen aus der Gruppe der Amphetamine per GC-MS gefunden werden. Es zeigten sich ebenfalls Vorteile der GC-MS-Analytik hinsichtlich der „Bandbreite“: Es konnten mehr Arzneistoffe (AS) aus anderen Substanzklassen detektiert werden, so zum Beispiel Neuroleptika oder nicht opioide Analgetika. Die Ergebnisse sind in untenstehendem Diagramm zusammengefasst.

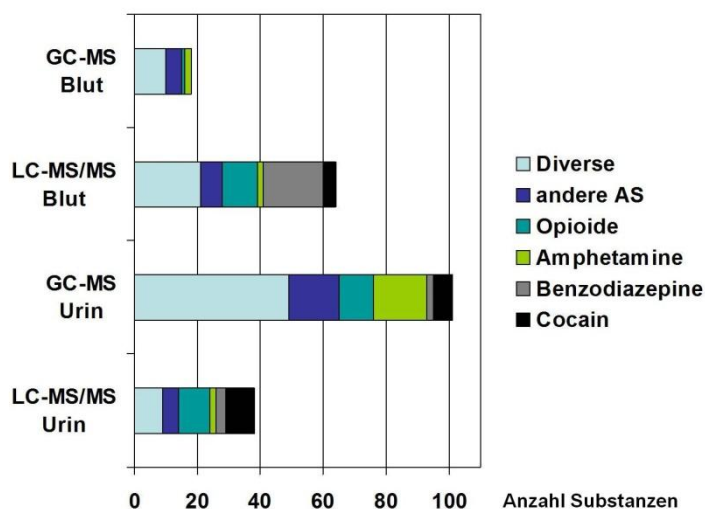


Abbildung 11: Verteilung nach Substanzklassen

4.3 *Entwicklung einer Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS*

Zunächst erfolgten die Untersuchungen bezüglich der Faktoren, die einen geringeren Einfluss auf die Extraktion haben, anschließend wurde die Optimierung von Extraktionszeit, Extraktionstemperatur und Desorptionszeit mittels statistischer Versuchsplanung durchgeführt. Hierbei wurden die Ergebnisse der anderen Variablen aus den Vorproben zu Grunde gelegt.

4.3.1 Einfluss der Faserbeschichtung

Eine mit PDMS beschichtete Faser ist für die Adsorption unpolarer Analyten gut geeignet. Des Weiteren ist sie außerordentlich robust, langlebig und gebräuchlich [¹⁰³]. Zusätzlich ist die PDMS-Faser für viele unterschiedliche chemische Strukturen verwendbar und somit vorteilhaft für Screening-Analysen. Es wurde eine Filmdicke von 100 µm gewählt und eine etwas längere Extraktionszeit (in Vergleich zu einem Film von 7 µm) mit dem Vorteil der höheren Sensitivität in Kauf genommen.

4.3.2 Aussalzeffekt

Aufgrund des hohen Dampfdruckes der VOC zeigte keines der Salze einen signifikanten Einfluss. Dieser Effekt kann für weniger flüchtige oder vergleichsweise polare Substanzen beobachtet werden.

4.3.3 pH-Wert

Der pH-Wert der Analytlösung ist für Substanzen mit einer pH-abhängigen, dissoziierbaren Gruppe entscheidend, da nur die undissoziierte Form des Analyten von der Faserbeschichtung extrahiert wird [²]. Aus diesem Grund haben pH-Wert-Modifikationen in diesem Fall keinen Einfluss.

4.3.4 Wasserzugabe

Eine Wasserzugabe von 2 ml hatte in dem Fall der zur Optimierung verwendeten Analyte keinen signifikanten Effekt auf die Extraktionsausbeute, empfiehlt sich aus den unter 3.6.5 beschriebenen Gründen aber dennoch.

4.3.5 Agitation

Wie Abbildung 12 zeigt, wurden die Ergebnisse mit einer höheren Ausbeute für die agitierten Proben erzielt.

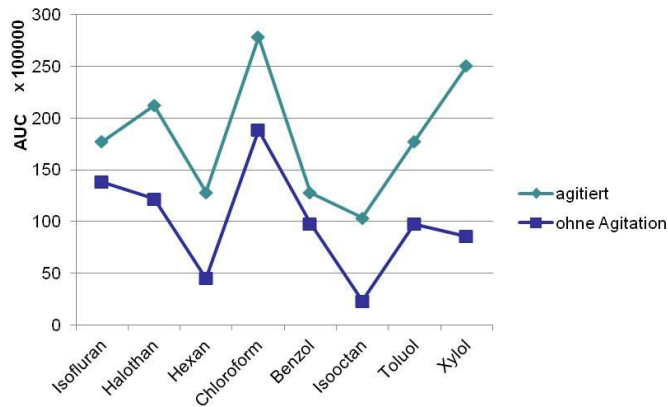


Abbildung 12: Agitation der Proben

4.3.6 Inkubationszeit, Eintauchtiefe und Desorptionstemperatur

Die Inkubationszeit ist vor allem für die manuelle SPME oder bei der Analyse weniger flüchtiger Substanzen bei höheren Extraktionstemperaturen relevant. In diesem Fall hat sich eine Inkubationszeit von 90 s als ausreichend erwiesen.

Eine Eintauchtiefe von 54 mm hat sich als Optimum herausgestellt. Die Desorption erfolgt idealer Weise bei 260°C. Die Ergebnisse sind am Beispiel von Isooctan dargestellt.

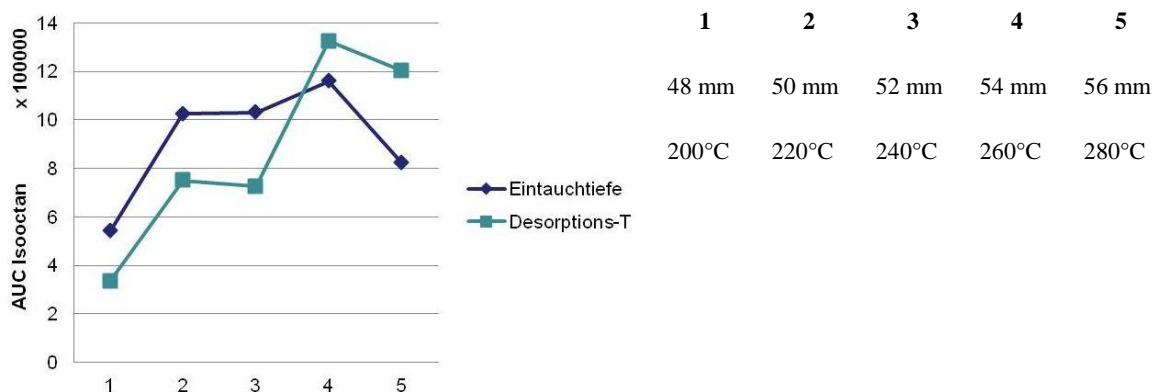


Abbildung 13: Optimierung der Eintauchtiefe und Desorptionszeit am Beispiel von Isooctan

4.3.7 Central Composite Design (für SPME)

Wie bereits erwähnt, wurden die Extraktionstemperatur (A), die Extraktionszeit (B) und die Desorptionszeit als die Hauptfaktoren zur Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen Probe, Gasraum und Faser betrachtet.

Zunächst ist festzustellen, dass alle Analyte ein ähnliches Resultat zeigten, so dass die folgenden Ergebnisse im Sinne der Übersichtlichkeit am Beispiel von Toluol präsentiert werden.

Um die Signifikanz der Hauptfaktoren und Wechselwirkungen zu erheben, wurde die Varianzanalyse angewendet. Die experimentellen Ergebnisse konnten einem linearen Modell angepasst werden. In kodierten Faktoren ausgedrückt, hat sich folgende Gleichung ergeben:

Formel 11: Lineares Modell am Beispiel Toluol

$$\text{Toluol} = 1.031 \cdot 10^7 - 2.542 \cdot 10^6 A + 3.357 \cdot 10^5 B + 3.752 \cdot 10^5 C \quad \text{Formel 11}$$

Trägt man die experimentellen Werte der Peakflächen gegen die durch die Formel berechneten auf, zeigt sich eine hohe Übereinstimmung, wie in Abbildung 14 dargestellt. Dies ist an der gleichmäßigen Verteilung der Werte entlang der Diagonalen festzumachen. Die Diskrepanz zwischen vorhergesagten Werten und den tatsächlich beobachteten, wird als Residuum bezeichnet.

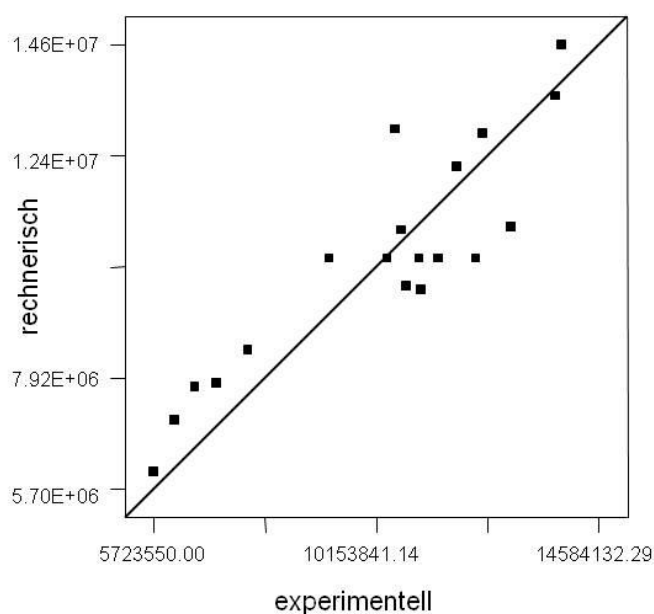


Abbildung 14: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Toluol

Tabelle 15 zeigt die ANOVA-Auswertung für die CCD-Matrix von Toluol und wird im Folgenden erläutert. Der „*model F value*“ von 20.15 impliziert die Signifikanz des Modells, das heißt, es existiert eine Wahrscheinlichkeit von nur 0.01 %, dass ein „*model F value*“ in dieser Größe durch Störsignale verursacht ist. P-Werte unter 0.0500 bedeuten, dass entsprechende Faktoren signifikant sind. In diesem Fall ist nur A, die Extraktionstemperatur, signifikant. Werte über 0.1000 besagen, dass für die Faktoren keine Signifikanz vorliegt. Der „*Lack-of-fit value*“ (zu Deutsch etwa: mangelnde Anpassung/ Übereinstimmung) von 1.71 bestätigt die Validität des Modells, da der „*lack of fit*“ relativ zum „*pure error*“ nicht signifikant ist.

Tabelle 15: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Toluol

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value (Prob > F)
Modell	$9.169 \cdot 10^{13}$	3	$3.056 \cdot 10^{13}$	20.15	<0.0001 signifikant
A	$8.822 \cdot 10^{13}$	1	$8.822 \cdot 10^{13}$	58.17	<0.0001
B	$1.539 \cdot 10^{12}$	1	$1.539 \cdot 10^{12}$	1.01	0.3288
C	$1.923 \cdot 10^{12}$	1	$1.923 \cdot 10^{12}$	1.27	0.2768
Lack of fit	$1.917 \cdot 10^{13}$	11	$1.743 \cdot 10^{12}$	1.71	0.2878 nicht signifikant
Pure error	$5.093 \cdot 10^{12}$	5	$1.019 \cdot 10^{12}$		

Die Residualanalyse kann zum Nachweis von Ausreißern genutzt werden. Abbildung 15 zeigt, dass jeder Datenpunkt zum ausgewählten Modell passt, d.h. im Bereich von -3.62 bis 3.62 liegt.

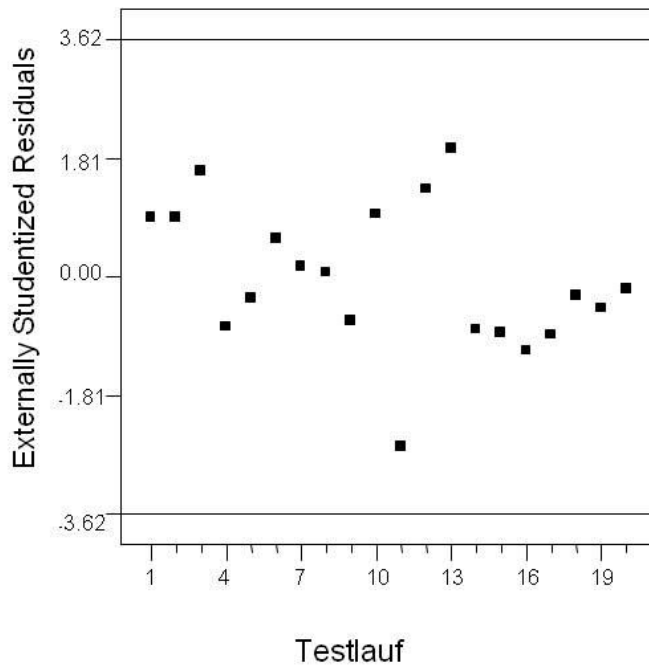


Abbildung 15: Ausreißeranalyse Toluol

Wie bereits erwähnt, haben die Extraktionszeit und Desorptionszeit in den untersuchten Bereichen keinen statistisch signifikanten Effekt auf das Ausmaß der Extraktion, gemessen anhand der AUC. Im Zuge der Auswertung der Ergebnisse ist die „desirability“ eine interessante Größe. Es handelt sich dabei um eine Zielfunktion die zwischen 0 (außerhalb der Grenzen) bis 1 (das Ziel) rangiert, welches in dem Fall die maximale AUC beschreibt; im Grunde genommen handelt es sich um einen Kompromiss der verschiedenen Anforderungen (in diesem Fall die AUC der unterschiedlichen Komponenten). Aufgrund der von der Software berechneten „desirability“ und zusätzlich praktischen Überlegungen, wurden die optimalen experimentellen Bedingungen wie folgt festgelegt: Extraktionszeit 20 min und Desorptionszeit 180 s.

Die Software empfiehlt eine Extraktionstemperatur von 45°C. Wie allerdings Abbildung 16 zeigt, war die Prozesseffizienz von Toluol bei 35°C ebenfalls hoch, das Gleiche gilt auch für die anderen untersuchten Substanzen.

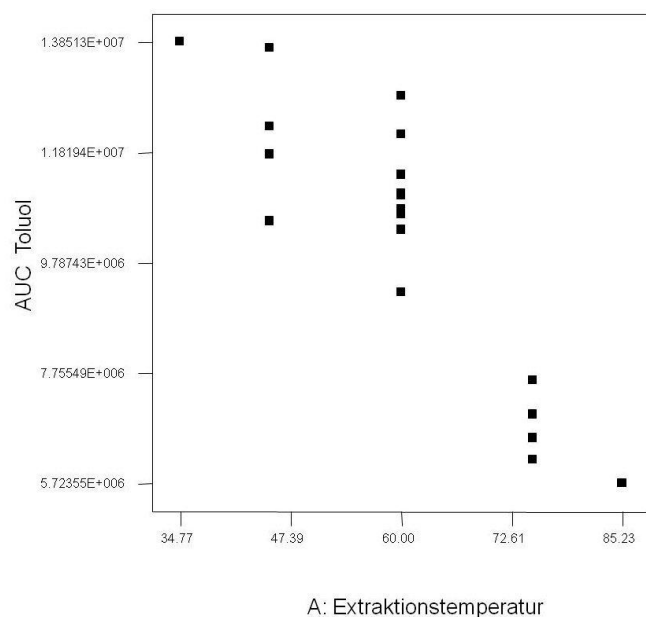


Abbildung 16: Auswirkung der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute am Beispiel Toluol

Aufgrund der Tatsache, dass keine Wechselwirkungen zwischen den Faktoren erkannt wurden, konnte die Extraktionstemperatur erneut für sich genommen einer Optimierung unterzogen werden. Hierzu wurde ein Bereich von 32°C bis 48°C untersucht. Als Optimum stellten sich 40°C heraus. Bei dieser Temperatur war es auch zugleich möglich, Analyten mit einem relativ geringen Dampfdruck zu extrahieren, zum Beispiel Xylol. Im Vergleich zu Isofluran hat diese Substanz einen etwa 40-fach geringeren Dampfdruck. In Abbildung 17 sind neben Toluol Isofluran und Benzol abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden nicht alle Substanzen dargestellt, sondern zusätzlich ein Graph, der den Mittelwert aller Analyte präsentiert, eingefügt.

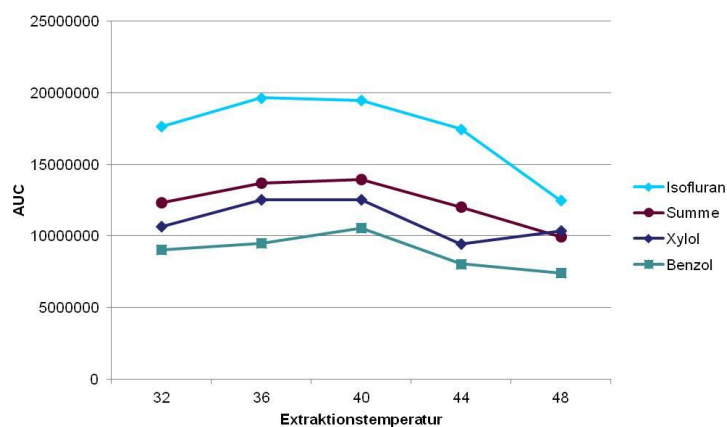


Abbildung 17: Erneute Optimierung der Extraktionstemperatur

Zusammenfassend stellt folgendes Prozedere nun also die optimierte Extraktion dar: Ein Aliquot der Probe (1 ml) wird in einem 10 ml-Gefäß mit 2 ml Wasser verdünnt und rasch mit einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. Die Probe wird bei 40°C für 90 s inkubiert. Anschließend wird eine PDMS-Faser in die Gasphase eingebracht und die Extraktion erfolgt für 20 min. Die Temperatur wird hierbei bei 40°C belassen und das Gefäß wird während des Vorgangs geschüttelt. Anschließend findet die Desorption im 260°C temperierten Injektor des Gaschromatographen für 3 min statt. Das Temperaturprogramm und die spektrometrischen Bedingungen sind Abschnitt 3.6.10 zu entnehmen.

Abbildung 18 zeigt ein Chromatogramm, das nach der Extraktion unter optimalen Bedingungen aufgezeichnet wurde (Isofluran 1 µg/ ml, Halothan 0.22 µg/ ml, Hexan 0.68 µg/ ml, Chloroform 0.38 µg/ ml, Benzol 0.22 µg/ ml, Isooctan 0.26 µg/ ml, Toluol 0.12 µg/ ml und Xylol 0.08 µg/ ml)

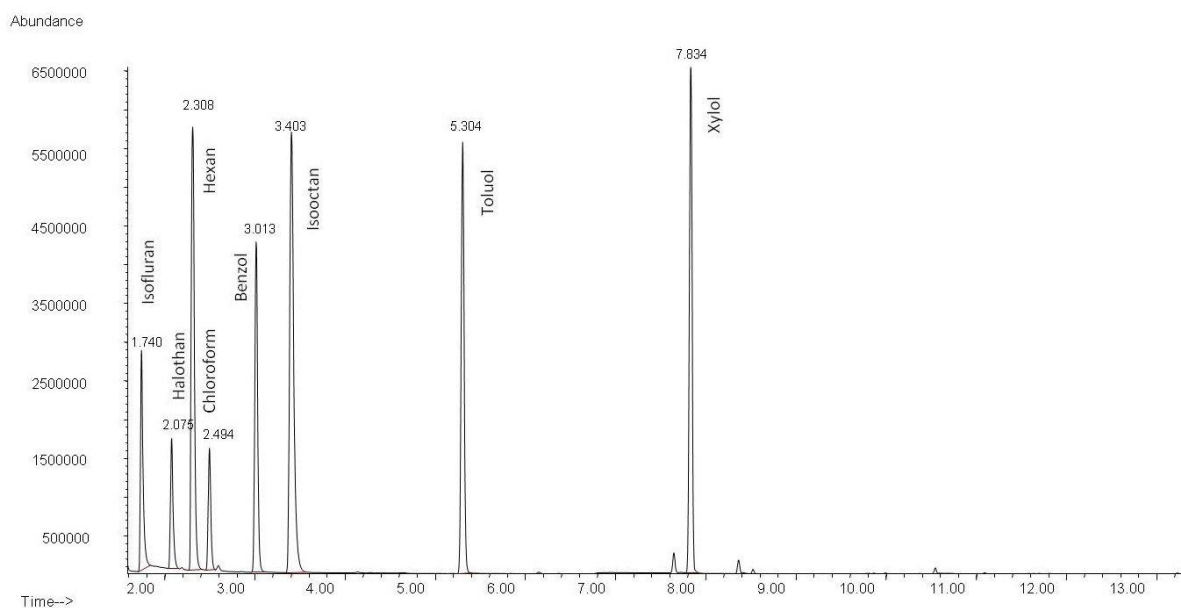


Abbildung 18: Chromatogramm unter optimalen Bedingungen

Für die Validierung dieser qualitativen Methode wurden, wie bereits unter 3.6.11 beschrieben, nach den Vorgaben von Peters et al. [101] die Selektivität, die Nachweisgrenze und die Wiederfindung evaluiert. Die Selektivität wurde mittels Abwesenheit von Peaks in Blankmatrix bewiesen. Die Nachweisgrenze im Fullscan-Modus wurde als das dreifache Signal-Rausch-Verhältnis definiert und rangierte von 2.9 µg/ l für Xylol bis 37.1 µg/ l für Isofluran. Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden sechs extrahierte Proben hoher

(*high*) und geringer (*low*) Konzentration analysiert und mit nicht-extrahierten Standardlösungen verglichen. Tabelle 16 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 16: Validierungsdaten

	Low [µg/ ml]	High [µg/ ml]	Wiederfindung [%]	LOD [µg/ l]
Isofluran	1	10	15.8	37.1
Halothan	0.22	2.2	22.9	7.8
Hexan	0.68	6.8	52.6	25.2
Chloroform	0.38	3.8	7.9	14.1
Benzol	0.22	2.2	61.5	8.5
Isooctan	0.26	2.6	22.5	9.3
Toluol	0.12	1.2	46.2	4.1
Xylol	0.08	0.8	40.9	2.9

4.4 *Entwicklung einer Screening-Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS*

Auch bei der Entwicklung dieser Methode wurden zunächst als Vorproben die Faktoren mit geringerem Einfluss auf die Extraktion untersucht. Im Anschluss erfolgte die Optimierung des Anteils an Methanol in der Waschlösung, der Molarität der Essigsäure, des Anteils an Aceton in der ersten Elutionslösung sowie des Anteil an Isopropanol und des Zusatzes von Ammoniak in der zweiten Elutionslösung mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung. Die zuvor ermittelten Ergebnisse der sonstigen Faktoren wurden für die Messung zu Grunde gelegt.

4.4.1 **Probenvorbereitung**

In dem untersuchten Bereich von pH 6 bis pH 8 erwies sich die Zugabe von 2 ml Pufferlösung pH 7 mit einer akzeptablen Standardabweichung von 9.63 % als Optimum.

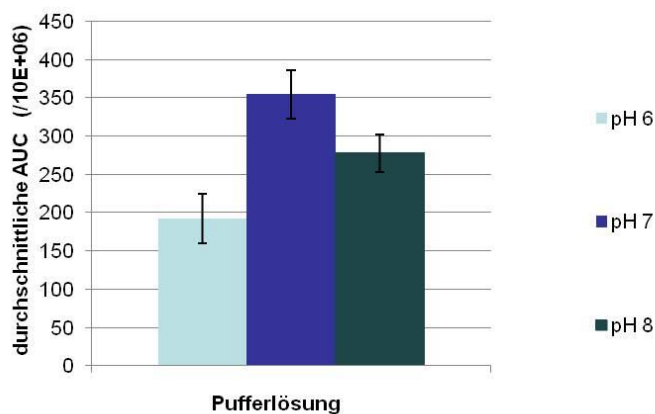


Abbildung 19: Effekt der unterschiedlichen Pufferlösungen auf die Extraktionsausbeute

4.4.2 Auswahl der SPE-Kartuschen

Bei der Extraktion nach den jeweiligen Empfehlungen des Herstellers haben sich die Chromabond[®] Drug-Extraktionssäulen mit Abstand als die Geeignetsten herausgestellt.

4.4.3 Konditionierung

Die Konditionierung mittels 3 ml Methanol und anschließend 3 ml Pufferlösung pH 7 zeigte sich als ausreichend. Eine zusätzliche Behandlung der Kartuschen mit Wasser ist unnötig und zudem äußerst zeitaufwendig.

4.4.4 Waschschrift

Die besten Ergebnisse wurden durch eine Kombination zweier Waschschriffe von Puffer/Methanol (95:5, v/v) und Hexan erzielt. Die Verwendung von Isooctan war hinsichtlich reinerer Extrakte und dadurch einer höheren Ausbeute weniger effektiv. Ein dritter Waschschrift mit Wasser erwies sich auch hier als unnötig und zeitintensiv. Die Extraktionsausbeute zeigte sich bei einigen Wasch-Mixturen als recht inkonstant, wie durch die Standardabweichung präsentiert werden kann. Für die im Endeffekt ausgewählte Kombination der Waschlösungen ergibt sich eine Standardabweichung von 8.8 %. Insofern ist das Risiko für falsch-negative Ergebnisse bei Analyten im Bereich der LOD wissenschaftlich vertretbar. Alle acht Testanalyten wurden bei diesem Versuch detektiert. Sie zeigten ein ähnliches Ergebnis, so dass aus Gründen der Übersichtlichkeit der Mittelwert in Abbildung 20 präsentiert wird.

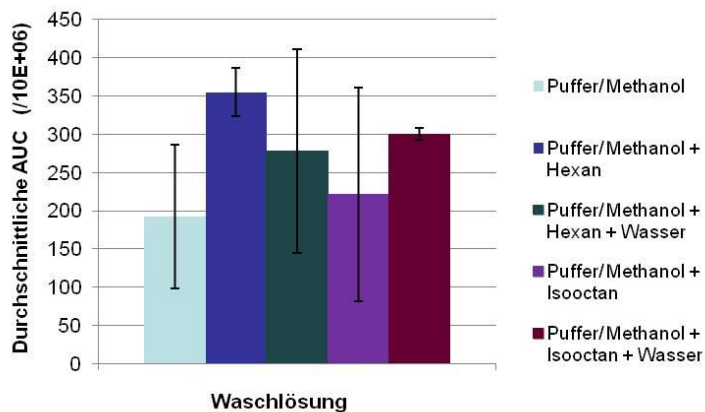


Abbildung 20: Effekt der unterschiedlichen Kombination von Waschlösungen auf die Extraktionsausbeute

4.4.5 Central Composite Design (für SPE)

Ein wichtiges Ergebnis sollte vorweggenommen werden: Der Anteil des Methanol in der Waschlösung (Faktor E) hat sich für alle Analyten als nicht signifikant erwiesen. Aus diesem Grund wurde dieser für die weitere statistische Analyse entfernt. Nichtsdestotrotz konnte eine Tendenz ermittelt werden und es wurde ein „Optimum“ des Methanol-Anteils bei 5 % gesetzt.

Auch bei der Entwicklung dieser Methode zeigten alle Analyten ein vergleichbares Ergebnis. Aufgrund dieser Tatsache und zwecks einer besseren Übersicht werden die Ergebnisse am Beispiel von Methadon präsentiert.

Via ANOVA wurden die Signifikanz der Hauptfaktoren sowie wechselseitige Beziehungen ermittelt. Die experimentellen Ergebnisse konnten einem quadratischen Modell angepasst werden. Die finale Gleichung der kodierten Faktoren lautet:

Formel 12: Quadratisches Modell am Beispiel Methadon

$$\text{Methadon} = 3.464 \cdot 10^8 + 2.353 \cdot 10^6 A + 1.838 \cdot 10^6 B + 3.693 \cdot 10^7 C + 2.619 \cdot 10^7 D - 2.948 \cdot 10^7 A^2 \quad \text{Formel 12}$$

Trägt man die experimentell ermittelten Werte gegen die mittels der Gleichung berechneten Werte auf, ergibt sich ein hohes Maß an Übereinstimmung, wie es in Abbildung 21 dargestellt und mathematisch durch das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.6217$ beschrieben wird.

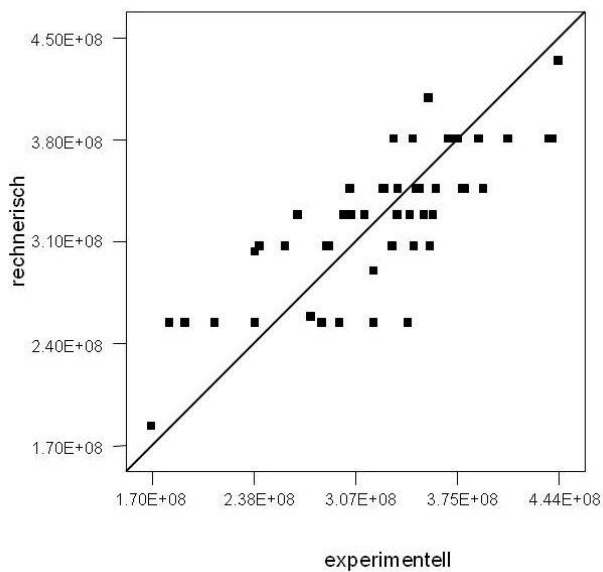


Abbildung 21: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Methadon

Tabelle 17 zeigt die ANOVA-Auswertung für die CCD-Matrix von Methadon. Hier liegt ein „*model F value*“ von 14.58 und ein P-Wert von < 0.0001 vor, die die Signifikanz des Modells implizieren, d.h. es existiert eine Wahrscheinlichkeit von nur 0.01 %, dass ein „*model F value*“ dieser Größe Störsignalen zuzuschreiben ist. Werte von „*Prob > F*“, die unter 0.0500 liegen, indizieren, dass entsprechende Faktoren signifikant sind. In diesem Fall sind die Faktoren C, D und A^2 signifikant, also Anteil an Isopropanol, die Zugabe von Ammoniak und das Quadrat der Zuführung von Essigsäure. Werte > 0.1000 bedeuten, dass die Faktoren nicht signifikant sind. Ein „*lack of fit-value*“ von 1.01 bestätigt die Validität des Modells.

Tabelle 17: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Methadon

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value (Prob > F)	
Model	$1.183 \cdot 10^{17}$	5	$2.366 \cdot 10^{16}$	14.58	<0.0001	signifikant
A	$2.043 \cdot 10^{14}$	1	$2.043 \cdot 10^{14}$	0.13	0.7245	
B	$1.463 \cdot 10^{14}$	1	$1.463 \cdot 10^{14}$	0.090	0.7654	
C	$5.906 \cdot 10^{16}$	1	$5.906 \cdot 10^{16}$	36.38	<0.0001	signifikant
D	$2.768 \cdot 10^{16}$	1	$2.768 \cdot 10^{16}$	17.05	0.0002	
A ²	$2.951 \cdot 10^{16}$	1	$2.951 \cdot 10^{16}$	18.18	0.0001	signifikant
Lack of fit	$3.106 \cdot 10^{16}$	19	$1.635 \cdot 10^{15}$	1.01	0.4805	nicht signif.
Pure error	$4.036 \cdot 10^{16}$	25	$1.614 \cdot 10^{15}$			

Die Residualanalyse wurde zur Darstellung von Ausreißern genutzt. Wie Abbildung 22 zeigt, passt jeder Datenpunkt zum gewählten Modell, es existieren keine Ausreißer.

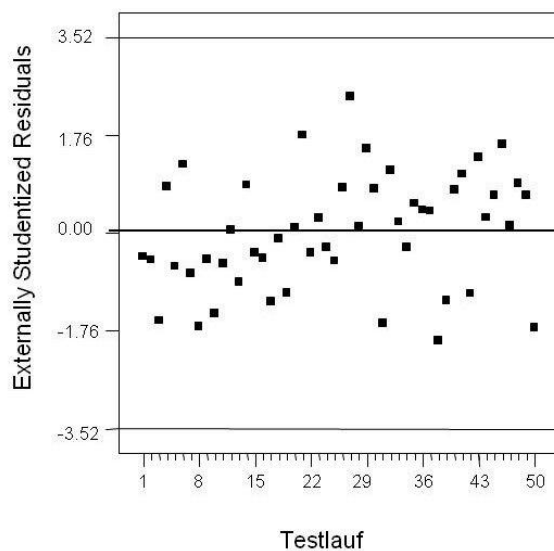


Abbildung 22: Ausreißeranalyse Methadon

Das Potential der graphischen Auswertung ist vielschichtig. Abbildung 23 zeigt die Auswirkung von Ammoniak und Essigsäure in einem Diagramm. Das absolute Maximum der Kurve bedeutet, dass zwischen den Faktoren im beobachteten Bereich keinerlei Interaktionen vorliegen. Des Weiteren können die optimalen Bedingungen abgelesen

werden. Das Maximum, und in diesem Fall konsequenter Weise die maximale Extraktionsausbeute von Methadon, wird bei der Verwendung von 0.63 M Essigsäure und einer Zugabe von 6 ml Ammoniak pro 100 ml Elutionslösung erreicht.

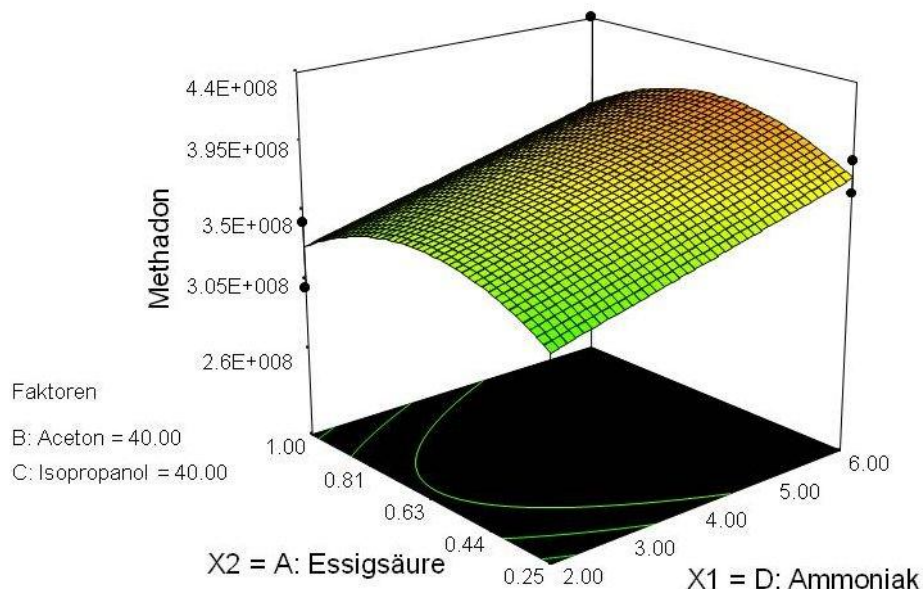


Abbildung 23: Darstellung der Optima und etwaiger Wechselwirkungen am Beispiel der Essigsäure und der Zugabe von Ammoniak

Für die finale Bestimmung der optimalen Parameter wurde auch in diesem Fall die „desirability“ herangezogen, praktische Überlegungen (z. B. bezüglich „gerader“ Werte: 0.5 M statt 0.63 M Essigsäure) wurden mit einbezogen.

Die optimierte Extraktion wird wie nachfolgend durchgeführt: Zu 1 ml der Probe werden 2 ml Phosphatpuffer pH 7 und 100 µl der internen Standardlösung hinzugegeben. Falls es sich um Vollblut handelt, ist eine anschließende Behandlung der Proben im Ultraschallbad (8 min bei Raumtemperatur) und der Zentrifuge (ca. 5400 x g, 8 min) dringend zu empfehlen. Die Chromabond® Drug Kartusche wurde mit Hilfe von 3 ml Methanol und 3 ml Phosphatpuffer pH 7 konditioniert. Anschließend wird die Probe aufgegeben. Die Extraktionssäule wird mit 3 ml Pufferlösung/ Methanol (95:5, v/v), 3 ml Hexan sowie 3 ml Essigsäure (0.5 M) gewaschen. Die Analyten werden mittels einer Mischung von 1.5 ml Dichlormethan/ Aceton (60:40, v/v) und 1.5 ml Dichlormethan/ Isopropanol/ Ammoniak (60:40+6, v/v/v) eluiert. Der Extrakt wird unter einem milden Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl Ethylacetat resuspendiert.

Abbildung 24 zeigt ein Chromatogramm, das nach der Extraktion unter optimalen Bedingungen aufgezeichnet wurde. Aufgrund der Tatsache, dass die erfolgreiche Extraktion anhand der Anwesenheit aller Testanalyten bewiesen ist, wurde auf den Zusatz der internen Standards aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

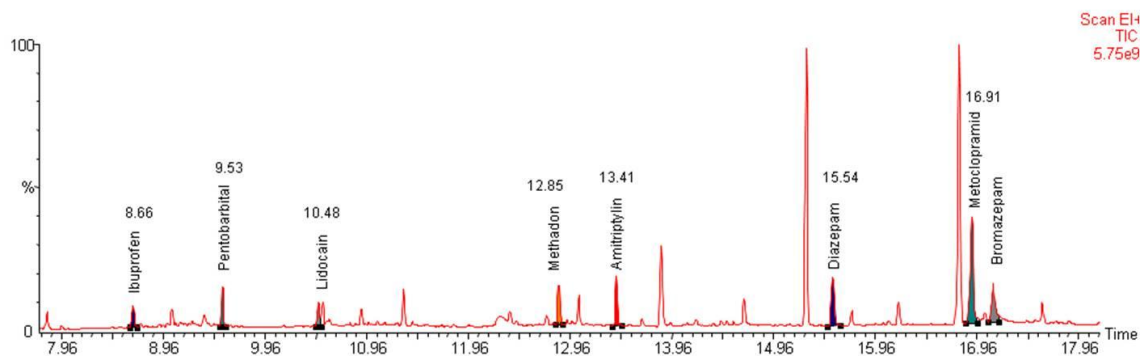


Abbildung 24: Chromatogramm unter optimalen Bedingungen (SPE)

Da es sich auch hier um eine quantitative Methode handelt, beinhaltete die Validierung die Selektivität, die LOD und die Wiederfindung. Die LOD lag in einem Bereich von 55 $\mu\text{g/l}$ für Methadon bis 3400 $\mu\text{g/l}$ für Ibuprofen. Tabelle 18 fasst die Ergebnisse der Validierung zusammen. Da die Werte der Wiederfindung für die geringe und hohe Konzentration nahezu identisch waren, wird der Mittelwert angegeben.

Tabelle 18: Validierungsdaten (SPE)

	Low [$\mu\text{g/ml}$]	High [$\mu\text{g/ml}$]	Wiederfindung [%]	LOD [ng/ml]
Ibuprofen	16.0	32.0	22.9	3400
Pentobarbital	0.5	2.0	62.9	130
Lidocain	0.2	0.8	82.1	62
Methadon	0.2	0.8	84.2	55
Amitriptylin	0.2	0.8	84.6	92
Diazepam	0.5	2.0	69.5	210
Metoclopramid	0.5	2.0	53.9	250
Bromazepam	0.5	2.0	56.4	270

4.4.6 Methodenvergleich: GC-MS versus HPLC-MS/MS

Mit Hilfe der neu entwickelten GC-MS-Methode konnten in den 128 analysierten Realproben 81 verschiedene Substanzen detektiert werden, ca. die Hälfte davon mehrfach. Es lagen auch Proben vor, die keinerlei Analyten enthielten.

In Tabelle 19 bis Tabelle 21 sind alle mittels GC-MS detektierten Substanzen aufgeführt, zudem ihre Einordnung nach chemischen bzw. therapeutischen Gesichtspunkten.

Tabelle 19: Mittels Festphasenextraktion und GC-MS detektierte Substanzen in 128 Realproben I

Analyt	Charakter
1 6-Monoacetylmorphin	Heroin-Metabolit
2 Amitriptylin	Tricyclisches Antidepressivum (TCA)
3 Amphetamin	Psychotrope Substanz
4 Amphetamin-M	Psychotrope Substanz
5 Benzoylcegonin	Cocain-Metabolit
6 Bromazepam	Benzodiazepin
7 Bromhexin	Mucolytikum
8 Carbamazepin	Antiepileptikum
9 Carbamazepin-M	Antiepileptikum (Metabolit)
10 Chinin	Alkaloid
11 Citalopram	Antidepressivum
12 Citalopram-M	Antidepressivum (Metabolit)
13 Clomethiazol-M	Sedativum (Metabolit)
14 Codein	Opiat
15 Coffein	Methylxanthin
16 Cotinin	Nikotin-Metabolit
17 Coumarinsäure	Hydroxyzimtsäure
18 Cyclamat-M	Zuckeraustauschstoff
19 Dextropropoxyphen	Opioid
20 Diazepam	Benzodiazepin
21 Diazepam-M	Benzodiazepin (Metabolit)
22 Dihydroergotamin-M	Alkaloid
23 Diltiazem-M	Calciumkanal-Blocker (Metabolit)
24 Doxylamin	Antihistamin
25 Doxylamin-M	Antihistamin (Metabolit)
26 Erythrit	Zuckeraustauschstoff
27 2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP)	Methadon-Metabolit
28 α-Ethyltryptamin	Stimulans
29 Ferulinsäure	Hydroxyzimtsäure
30 Glucose	Monosaccharid
31 Guafenisin-M	Expectorans
32 Ibuprofen	Analgetikum
33 Ibuprofen-M	Analgetikum (Metabolit)
34 Ketamin	Anästhetikum
35 Lidocain	Lokalanästhetikum
36 Mannose	Monosaccharid
37 Methylendioxyamphetamin-M	Psychotrope Substanz
38 Meloxicam-M	Analgetikum (Metabolit)

Tabelle 20: Mittels Festphasenextraktion und GC-MS detektierte Substanzen in 128 Realproben II

Analyt	Charakter
39 Memantin	Alzheimer-Medikation
40 Memantin-M	Alzheimer-Medikation (Metabolit)
41 Menthol	Ätherisches Öl
42 Metamizol-M	Analgetikum
43 Metandienon	Anabolikum
44 Methadon	Opioid
45 Methylparaben	Konservierungsmittel
46 Metoclopramid	Antiemetikum
47 Mirtazapin-M	Tetracyclisches Antidepressivum
48 Morphin	Opiat
49 Nikotin	Alkaloid
50 Nordazepam	Benzodiazepin
51 Oxcarbazepin	Antiepileptikum
52 Paracetamol	Analgetikum
53 Paracetamol-M	Analgetikum (Metabolit)
54 Phenobarbital	Barbiturat
55 Phenobarbital-M	Barbiturat (Metabolit)
56 Phenprocoumon	Antikoagulans
57 Phenytoin	Antiepileptikum
58 Phenytoin-M	Antiepileptikum (Metabolit)
59 Pipamperon	Neuroleptikum
60 Propofol	Anästhetikum
61 Saccharin	Zuckeraustauschstoff
62 Saccharose	Disaccharid
63 Sorbitol	Zuckeraustauschstoff
64 Synephrin	Anorektikum
65 Temazepam	Benzodiazepin
66 Tetrazepam	Benzodiazepin
67 Tetrazepam-M	Benzodiazepin
68 Theobromin	Methylxanthin
69 Theophyllin	Methylxanthin
70 Theophyllin-M	Methylxanthin (Metabolit)
71 Tilidin-M	Opioid
72 Topiramat	Antiepileptikum
73 Topiramat-M	Antiepileptikum
74 Tramadol	Opioid
75 Trimipramin-M	TCA (Metabolit)
76 Venlafaxin-M	Antidepressivum (Metabolit)

Tabelle 21: Mittels Festphasenextraktion und GC-MS detektierte Substanzen in 128 Realproben III

Analyt		Charakter
77	Verapamil	Calciumkanal-Blocker
78	Xylitol	Zuckeraustauschstoff
79	Zolpidem	Non-Benzodiazepin
80	Zopiclon	Non-Benzodiazepin
81	Zopiclon-M	Non-Benzodiazepin (Metabolit)

Diese 128 Proben wurden ebenfalls mittels LC-MS/MS vermessen, die genauen Angaben zur Probenaufarbeitung und den instrumentellen Bedingungen können 3.5.2 entnommen werden. Die Analytik ergab 67 verschiedene Substanzen, die in Tabelle 22 - Tabelle 23 aufgeführt sind. Auch hier konnten etliche Analyten in mehreren Proben detektiert werden.

Tabelle 22: Mittels LC-MS/MS detektierte Substanzen in 128 Realproben I

	Analyt	Charakter
1	Alprazolam	Benzodiazepin
2	Amiodaron	Antiarrhythmikum
3	Amitriptylin	TCA
4	Benzoylcegonin	Cocain-Metabolit
5	Bisoprolol	β-Blocker
6	Carbamazepin	Antiepileptikum
7	Carbamazepin-M	Antiepileptikum (Metabolit)
8	Chinidin	Alkaloid
9	Chinin	Alkaloid
10	Chlorprothixen	TCA
11	Citalopram	Antidepressivum
12	Clonazepam	Benzodiazepin
13	Codein	Opiat
14	Coffein	Methylxanthin
15	Cotinin	Nikotin-Metabolit
16	Desipramin	TCA
17	Diazepam	Benzodiazepin
18	Doxepin	TCA
19	Doxylamin	Antihistamin
20	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP)	Methadon-Metabolit
21	Fenfluramin	Anorektikum
22	Fentanyl	Opioid
23	Fluconazol	Antimykotikum
24	Haloperidol	Neuroleptikum
25	Hydrocortison	Glucocorticoid
26	Hydroxyrisperidon	Neuroleptikum (Metabolit)
27	Imipramin	TCA
28	Ketamin	Anästhetikum
29	Lidocain	Lokalanästhetikum
30	Loperamid	Opioid
31	Lorazepam	Benzodiazepin
32	Melperon	Neuroleptikum
33	Metformin	Orales Antidiabetikum
34	Methadon	Opioid
35	Metoclopramid	Antiemetikum
36	Metoprolol	β-Blocker
37	Metronidazol	Antimykotikum
38	Midazolam	Benzodiazepin

Tabelle 23: Mittels LC-MS/MS detektierte Substanzen in 128 Realproben II

Analyt	Charakter
39 Minoxidil	Antihypertonikum
40 Mirtazapin	Tetracyclisches Antidepressivum
41 Morphin	Opiat
42 Morphin-3-glucuronid	Opiat (Metabolit)
43 Nikotin	Alkaloid
44 Nordazepam	Benzodiazepin
45 Nortriptylin	TCA (Metabolit)
46 Noscapin	Opiat
47 Oxazepam	Benzodiazepin
48 Oxcarbazepin	Antiepileptikum
49 Paracetamol	Analgetikum
50 Perazin	Neuroleptikum
51 Pipamperon	Neuroleptikum
52 Piroxicam	NSAR
53 Promethazin	Neuroleptikum
54 Quetiapin	Atypisches Neuroleptikum
55 Telmisartan	Antihypertensivum
56 Temazepam	Benzodiazepin
57 Tetrazepam	Benzodiazepin
58 Theobromin	Methylxanthin
59 Theophyllin	Methylxanthin
60 Tilidin	Opioid
61 Trimipramin	TCA
62 Urapidil	Antihypertensivum
63 Venlafaxin	Antidepressivum
64 Verapamil	Calciumkanal-Blocker
65 Warfarin	Antikoagulans
66 Zolpidem	Non-Benzodiazepin
67 Zopiclon	Non-Benzodiazepin

Die Substanzen, die fett gedruckt sind, wurden ausschließlich mittels der einen oder anderen Methode in den Realproben detektiert. Zusammenfassend wurden mit Hilfe der GC-MS-Methode insgesamt 81 verschiedene Analyte detektiert (Metabolite wurden eingeschlossen), 52 ausschließlich via GC-MS. Mittels der LC-MS/MS-Methode konnten in den 128 Proben 67 verschiedene Substanzen bestimmt werden, hier wiederum 38 Analyte ausschließlich mit Hilfe dieser Methode. Betrachtet man beide Methoden zusammen, konnten insgesamt 119 verschiedene Substanzen in 128 Realproben nachgewiesen werden.

4.5 Optimierung der Screening-Methode mittels HPLC-MS/MS

Bei dieser Optimierung zeigten die Analyte teils unterschiedliche Ergebnisse, so dass im Folgenden die Modelle betrachtet werden, an die die Ergebnisse angepasst werden konnten. Auch hier fungierte die AUC als Messergebnis und zu maximierendes Qualitätsmerkmal.

4.5.1 Lineares Modell

Die experimentellen Ergebnisse von Sulpirid, Methadon und Doxepin konnten dem linearen Modell angepasst werden, das bedeutet, dass der Faktor „Wasserzugabe“ (A) sich für diese Substanzen als signifikant erwiesen hat. Tabelle 24 zeigt die ANOVA-Auswertung am Beispiel Sulpirid.

Tabelle 24: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Sulpirid

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value (Prob > F)	
Model	$1.416 \cdot 10^{14}$	1	$1.416 \cdot 10^{14}$	16.00	0.0103	signifikant
A	$1.416 \cdot 10^{14}$	1	$1.416 \cdot 10^{14}$	16.00	0.0103	
Lack of fit	$3.697 \cdot 10^{13}$	3	$1.232 \cdot 10^{13}$	3.40	0.2356	nicht signif.
Pure error	$7.251 \cdot 10^{12}$	2	$3.626 \cdot 10^{12}$			

Der F-Wert von 16 beschreibt die Signifikanz des Modells, es liegt also eine Wahrscheinlichkeit von 1.03 % vor, dass dieser Wert aufgrund von Störsignalen entstanden ist. Auch hier liegt wieder ein nicht signifikanter „*lack of fit*“ vor, was positiv ist, da das Modell „passend“ sein soll.

Beim Vergleich der experimentellen Werte mit den vorausgesagten bzw. rechnerisch ermittelten, ergibt sich ein ausreichendes Maß an Übereinstimmung, wie in Abbildung 25 abgebildet.

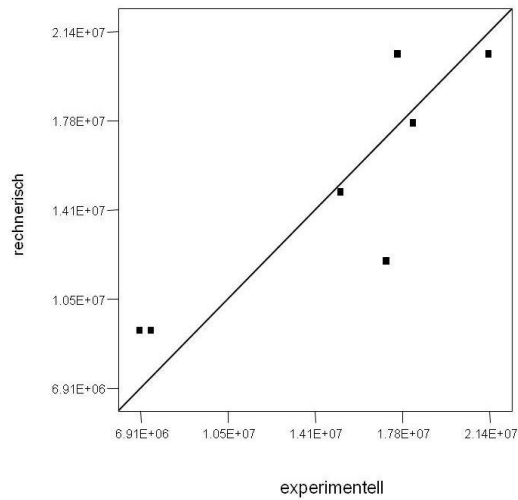


Abbildung 25: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Sulpirid

Die bereits angesprochene Linearität, stellt sich für Sulpirid wie folgt dar:

Formel 13: Lineares Modell am Beispiel Sulpirid

$$\text{Sulpirid} = 1.484 \cdot 10^7 - 5.609 \cdot 10^6 A$$

Formel 13

Aufgrund des negativen Vorzeichens ist bereits zu erkennen, dass mit zunehmender Wasserzugabe eine Abnahme der AUC erfolgt ist. Dieser Verlauf spiegelt sich deutlich in Abbildung 26 wider. Obwohl die Ergebnisse beider Substanzen nicht deckungsgleich sind, wenn man sich die Zugabe von 600 bzw. 800 μl genauer betrachtet, ist die Tendenz eindeutig.

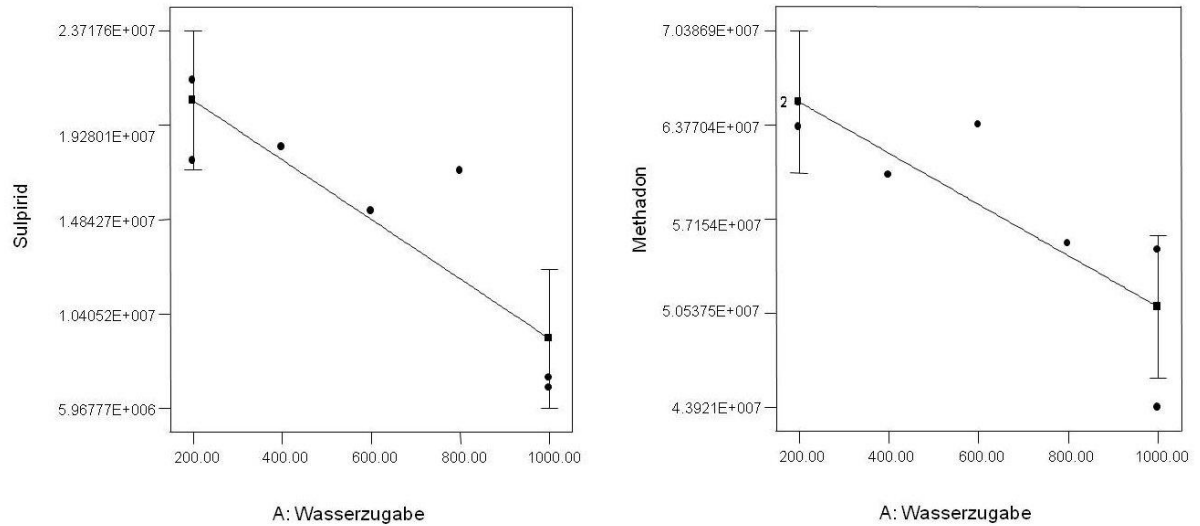


Abbildung 26: Linearer Verlauf am Beispiel Sulpirid und Methadon

Doxepin verhält sich ähnlich, allerdings ist der Abfall der AUC mit steigender Wasserzugabe hier nicht so deutlich ausgeprägt. Die experimentell ermittelten Werte weichen nur geringfügig voneinander ab.

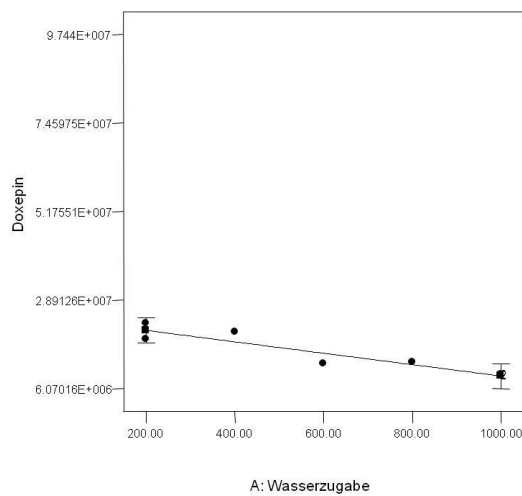


Abbildung 27: Linearer Verlauf von Doxepin

4.5.2 Lineares versus quadratisches Modell

Den Ergebnissen von Diazepam kann ein linearer Zusammenhang zugeordnet werden.

Tabelle 25: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Diazepam (linear)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value (Prob > F)	
Model	$2.591 \cdot 10^{14}$	1	$2.591 \cdot 10^{14}$	7.02	0.0454	signifikant
A	$2.591 \cdot 10^{14}$	1	$2.591 \cdot 10^{14}$	7.02	0.0103	
Lack of fit	$1.301 \cdot 10^{14}$	3	$4.336 \cdot 10^{13}$	1.60	0.4077	nicht signif.
Pure error	$5.436 \cdot 10^{13}$	2	$2.718 \cdot 10^{13}$			

Hier stellt sich der Sachverhalt allerdings konträr zu den unter 4.5.1 beschriebenen Analyten dar, wie bereits an der kodierten Gleichung zu erkennen ist:

Formel 14: Lineares Modell am Beispiel Diazepam

$$\text{Diazepam} = 3.796 \cdot 10^7 + 7.588 \cdot 10^6 A$$

Formel 14

Abbildung 28 macht nochmals graphisch deutlich, dass im Falle Diazepam mit steigender Verdünnung eine Zunahme der AUC erfolgt.

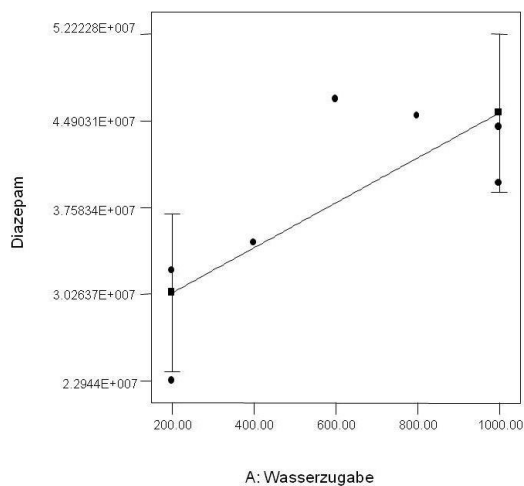


Abbildung 28: Linearer Verlauf Diazepam

Betrachtet man die Graphik eingehender, so fällt auf, dass die AUC zunächst bis zu einer Wasserzugabe von 600 μl ansteigt, dann aber wieder fällt. Die Werte scheinen auch einem quadratischen Modell angepasst werden zu können und Tabelle 26 zeigt, dass dieses tatsächlich signifikant ist.

Tabelle 26: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Diazepam (quadratisch)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value (Prob > F)	
Model	$3.704 \cdot 10^{14}$	2	$1.852 \cdot 10^{14}$	10.13	0.0272	signifikant
A	$2.591 \cdot 10^{14}$	1	$2.591 \cdot 10^{14}$	14.17	0.0197	
A ²	$1.113 \cdot 10^{14}$	1	$1.113 \cdot 10^{14}$	6.09	0.0691	
Lack of fit	$1.876 \cdot 10^{13}$	2	$9.380 \cdot 10^{12}$	0.35	0.7434	nicht signif.
Pure error	$5.436 \cdot 10^{13}$	2	$2.718 \cdot 10^{13}$			

Die Werte sind nun einem quadratischen Modell angepasst, es liegt ein Maximum bei einer Wasserzugabe von 600 µl vor.

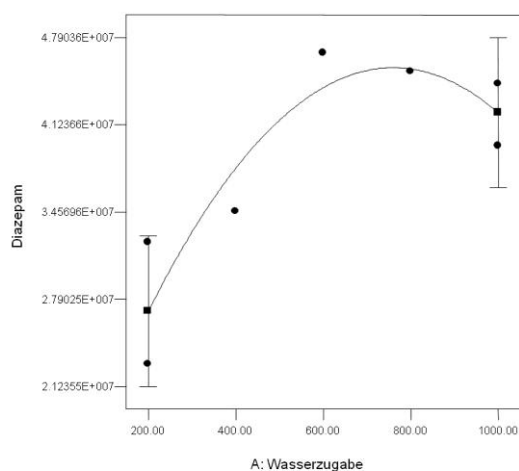


Abbildung 29: Quadratischer Verlauf Diazepam

4.5.3 „Mean“ Modell

Für die restlichen Substanzen Lidocain, Verapamil und Buprenorphin konnte keine Modellanpassung vorgenommen werden. Das bedeutet, es zeigte sich keine Signifikanz des Faktors Wasserzugabe, so dass Vorhersagen auf dem Mittelwert basieren, im Englischen als „mean“ bezeichnet, beispielhaft dargestellt in Abbildung 30. Aufgetragen sind die experimentell ermittelten Werte gegen die Vorhersagen (die bei anderen Modellen anhand der Gleichung berechnet werden) und in diesem Fall ausschließlich den Mittelwert repräsentieren.

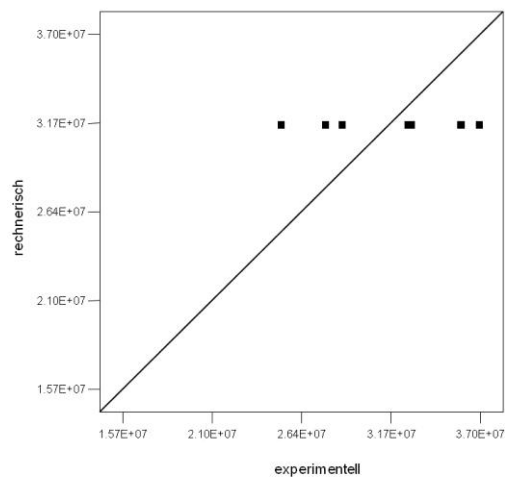


Abbildung 30: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Verapamil

Buprenorphin stellt zusätzlich einen Sonderfall dar, da diese Substanz nicht in allen Messungen detektiert werden konnte. Aus Abbildung 31 ist zu entnehmen, dass Buprenorphin sowohl bei einer Zugabe von 400 μl , 800 μl und 1000 μl je einmal nicht nachgewiesen werden konnte. Bei einer Zugabe von 200 μl Wasser zeigt sich ein Ergebnis recht nahe am Mittelwert, bei der zweiten Messung liegt ein Ausreißer nach oben vor; insgesamt zeigen sich also starke Schwankungen. Da die experimentellen Werte keinem Modell angepasst werden konnte, repräsentiert die waagerechte Linie den Mittelwert.

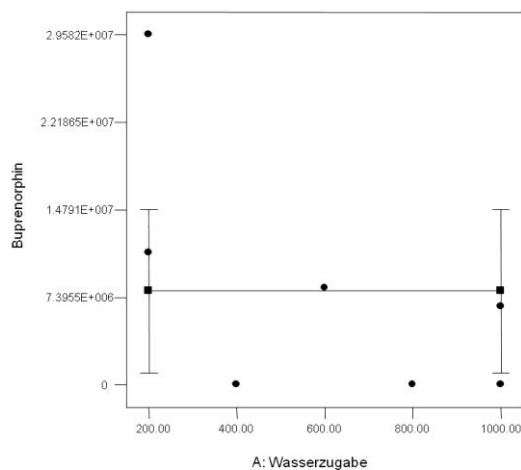


Abbildung 31: Messergebnisse Buprenorphin

5 Diskussion

5.1 *Laborinterne Qualitätskontrolle bei qualitativen Suchanalysen*

Grundsätzlich eignen sich die vorgeschlagenen Parameter zur Sicherstellung der Funktionstüchtigkeit der Analysensysteme, Abweichungen sind vor allem durch graphische Darstellung anhand von Kontrollkarten leicht zu erkennen und mögliche Ursachen können schneller ausgemacht werden. Jedoch haben sich auch einige Diskrepanzen zwischen den Vorgaben und den erhaltenen Ergebnissen in der Routine ergeben, die im Folgenden getrennt nach den chromatographischen Systemen diskutiert werden. Zusammenfassend lässt sich urteilen, dass einige Parameter gerätespezifisch festgelegt werden sollten, nachdem eine Beobachtung über mehrere Wochen erfolgt ist.

5.1.1 **Qualitätskontrolle HPLC-DAD**

Die Erfassung der Retentionszeiten ist sinnvoll, um zum Beispiel Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit oder Zusammensetzung des Elutionsmittels zu erkennen und auch arbeitstäglich ohne großen Aufwand zu erledigen. Ebenso eignet sich die Peakfläche des Coffeins für die Überwachung des Autoinjektors. Nach manueller Integrierung kann man diese anzeigen lassen und in die entsprechende Kontrollkarte eintragen. Mit einem Variationskoeffizienten von 10 % sind die Anforderungen an den Autosampler und auch an eine konstante Empfindlichkeit des Analysensystems erfüllt.

Ein SI der einzelnen Analyten über 0.999 bestätigt die Funktionstüchtigkeit des DAD-Detektors, allerdings sollte nicht der Umkehrschluss gezogen werden, dass bei einem etwas niedrigeren SI die von der Spektrenbibliothek vorgeschlagene Substanz ausgeschlossen wird. Die stetige Abnahme des SI des Benzols ab einem Zeitraum von zwei Monaten spiegelt die Stabilität des Benzols in der Testlösung wieder. Die Lösung sollte spätestens dann erneuert werden.

Die Peaksymmetrie enthält Informationen über das analytische System. So kann ein Tailing bei Totvolumina oder Verschmutzung auftreten, Leading entsteht bei Überladung [1]. Allerdings wurde bei den vorliegenden Untersuchungen im Mittelwert bei keiner Substanz der gewünschte Bereich von 0.8 bis 1.2 erreicht; es lag immer ein geringes Tailing vor, ohne dass das System beeinträchtigt gewesen wäre. Im Übrigen ist die Betrachtung der Peaks - im Gegensatz zum tatsächlichen Berechnen der Symmetrie - ausreichend, um Abweichungen zu registrieren.

Die Messung der Halbwertsbreite, welche natürlicher Weise mit der Retentionszeit zunimmt, kann Informationen über die Injektionstechnik liefern, die bei Verwendung von Autosamplern allerdings überholt ist. Des Weiteren unterliegt der Wert durch die manuelle Ermittlung einer nicht geringen Fehlerquelle, was sich auch anhand der relativen Standardabweichung widerspiegelt. Es kann auf die Auswertung der Halbwertsbreite verzichtet werden, was eine große Arbeitersparnis bedeutet.

Das Hintergrundrauschen übersteigt stetig den in der Richtlinie geforderten Wert von maximal 0.05. Ursache hierfür scheint die Verwendung von Analysensystemen bei der Erhebung der Daten zu sein, die nicht den Routinebedingungen entsprechen, beispielsweise eine neue Säule, frisch angesetztes Laufmittel etc.

Es wäre von Vorteil, auf das toxische Benzol in der Lösung verzichten zu können. Jedoch existiert zur Feinstruktur des Spektrums keine Alternative. Die um das Zehnfache geringer gewählte Konzentration zeigt hinsichtlich der Qualität des Spektrum und somit der Aussagekraft keinen Unterschied. Die Tatsache, dass das zweite Maximum nicht zwischen 247/ 248 nm, sondern zwischen 248/ 249 nm liegt, hat im Hinblick auf die Identifizierbarkeit keinerlei Einbußen gebracht. Gegebenenfalls liegt hier auch ein Fehler in der Literatur vor.

5.1.2 Qualitätskontrolle GC-MS

Die Auswahl an sauren und basischen Substanzen spiegelt die Situation eines GUS wider und ist daher optimal geeignet. Die Parameter Retentionszeit und Peakflächen sind ohne Aufwand zu ermitteln und der Verlauf ist in Kontrollkarten gut darstellbar.

Obwohl die Peakfläche des Morphins nicht den gewünschten Prozentsatz erreicht, ist das Ergebnis als ausreichend zu betrachten, wenn der Morphin-Peak deutlich zu detektieren ist.

Der Funktionstest wurde in Folge der Untersuchungen insofern optimiert, indem die Konzentrationen von Diphenhydramin und Codein verringert wurden, um die Intensitäten der Substanzen anzugleichen und ökonomischen Faktoren gerecht zu werden.

5.2 *Methodenvergleich bestehender forensisch-toxikologischer Suchanalysen*

Den Arbeitsaufwand betreffend ist die Methode mittels LC-MS/MS mit Abstand vorzuziehen. Bei Urinproben erfolgt lediglich eine Acetonitrilfällung, und auch bei den Blutproben ist der Arbeitsaufwand aufgrund der einschrittigen Flüssigextraktion als gering einzuschätzen. Dies führt zu einem geringen Verbrauch von Material, was sich in wirtschaftlicher Hinsicht ebenfalls bemerkbar macht. Die Festphasenextraktion führt zwar zu saubereren Extrakten, es handelt sich allerdings um eine recht kostspielige Methodik, da - abgesehen von der Beschaffung hochwertiger SPE-Säulen - durch Waschen, Konditionierung und Elution eine meist ebenso große Menge an Lösungsmitteln verwendet wird wie bei den meisten Flüssig-Flüssig-Extraktionen. Eine Derivatisierung lässt sich bei der GC-MS-Analytik oft nicht umgehen. Jedoch sollte auch hier auf eine schnell durchzuführende Methodik Wert gelegt und die Verwendung von CMR-Stoffen möglichst vermieden werden.

Wie unter 4.2 dargestellt, ist es nicht ausreichend, die Methoden bezüglich der Anzahl der detektierten Substanzen zu vergleichen, da hierbei auch toxikologisch irrelevante Stoffe in die Auswertung eingegangen sind. Betrachtet man jedoch die unterschiedlichen Substanzklassen, so zeigen sich auf beiden Seiten Vor- und Nachteile. Stärken der GC-MS liegen in der Detektion von Amphetaminen und die Methode zeigt eine größere Bandbreite, Benzodiazepine beispielsweise werden vermehrt via HPLC-MS/MS nachgewiesen. Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sich beide Methoden optimal ergänzen und keine die andere vollständig ersetzen kann.

5.3 *Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS*

Die Methodik der HS-SPME eignet sich außerordentlich für flüchtige Substanzen. Daher konnte auf Modifikationen wie Salzzugabe und pH-Wert-Einstellung, die bei „kritischen“ Analyten unerlässlich sind, verzichtet werden. Des Weiteren konnte die Auswahl der Parameter, die einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Extraktion nehmen, auf drei - Extraktionstemperatur, Extraktionszeit und Desorptionszeit - beschränkt werden.

Wie gezeigt wurde, waren Extraktions- und Desorptionszeit im beobachteten Bereich nicht signifikant. Dennoch konnte man anhand der AUC der einzelnen Substanzen eine Tendenz ausmachen, die dazu geführt hat, dass moderate Zeitspannen gewählt wurden und

nicht das jeweilige Minimum. Hierbei muss man auch bedenken, dass etwaige Analyten in Realproben „schwerfälliger“ reagieren könnten; dieser Möglichkeit wurde hiermit Rechnung getragen.

Die Ergebnisse wurden einem linearen Modell angepasst. Das bedeutet genau genommen, dass kein Optimum im beobachteten Bereich entdeckt werden konnte, wie es beispielsweise bei einem quadratischen Modell der Fall wäre. Aus diesem Grund wurde der signifikante Parameter, nämlich die Extraktionstemperatur, erneut optimiert. Da Wechselwirkungen durch die vorherige statistische Versuchsplanung bereits ausgeschlossen wurden, konnte die darauf folgende Messung unabhängig erfolgen.

Durch die Anwendung der statistischen Versuchsplanung konnte innerhalb kürzester Zeit die bestmögliche Analytik, die aufgrund der statistischen Parameter belegt ist, hervorgebracht werden. Zudem konnte die sichere Aussage getroffen werden, dass zwischen den einzelnen Faktoren keine Interaktionen auftreten.

Aufgrund der Tatsache, dass wegen der Flüchtigkeit der Analyten der pH-Wert und der Salzgehalt keinen Einfluss auf die Extraktion haben, sind sämtliche flüssige Matrices der Methode zugänglich. Wie der folgende Absatz zeigt, sind VOC auch aus Organen extrahierbar, ohne dass eine vorherige Homogenisierung erforderlich ist. Dies bedeutet einerseits eine immense Zeitersparnis und macht zudem die Analytik von „ungewöhnlichen“ Matrices, wie zum Beispiel Haut, möglich.

Ein weiterer Vorteil der entwickelten Methode liegt aufgrund der sorgfältigen Auswahl der Beispielanalyten bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften in der (theoretischen) Anwendbarkeit auf sämtliche flüchtige Substanzen. Wie Tabelle 3 (Kapitel 2.11) zeigt, bezieht sich die Anwendung der bisherigen Publikationen häufig auf einzelne Arzneistoffklassen oder ausgewählte Toxine im Rahmen der Umweltanalytik.

Um die Anwendbarkeit der vorliegenden Methode zu verifizieren, wurde noch während der Optimierungsphase, aber vor allem in weiterführenden Untersuchungen, eine Vielzahl von unterschiedlichen VOC analysiert, die mit der entwickelten Methode problemlos detektiert werden konnten, z.B. Isobutanol, Diethylether und Aceton. Feuerzeuggas, welches sich aus Propan und Butan zusammensetzt, konnte ebenfalls getrennt und nachgewiesen werden.

An dieser Stelle sollen zwei konkrete Beispiele für die Anwendbarkeit näher beschrieben werden:

Im ersten Fall wurden von einer Brandleiche Herzblut und diverse Organe (Gehirn, Haut, Lunge und Muskel) hinsichtlich der Verwendung von Brandbeschleunigern untersucht. Die Aufbereitung der Blutprobe fand wie beschrieben statt. Für die Extraktion der Organe ist eine Homogenisierung im Fall der SPME-Analyse nicht notwendig. 1 g jeden Organs wurde eingewogen, das Gefäß verschlossen und die Extraktion wurde analog zu flüssigen Proben fortgesetzt. Wie Tabelle 27 zeigt, konnten vier verschiedene Substanzen detektiert werden: Toluol, Benzol, Isooctan und Xylol.

Tabelle 27: Befunde in Blut und Organen der Brandleiche

	Gehirn	Haut	Herzblut	Lunge	Muskel
Toluol	X	X	X	X	
Benzol	X			X	X
Isooctan				X	
Xylol		X	X		

Einige Bereiche des Körpers waren stärker verbrannt als andere. Diese Tatsache - und die unterschiedliche chemische Affinität - könnte der Grund für die Verteilung der VOC im Organismus sein. Einige Substanzen, darunter auch Toluol und Benzol, können durch brennendes Plastik entstehen. Daher sollten zur Klärung der Frage, ob tatsächlich Brandbeschleuniger verwendet wurden, die Umstände am Tatort mit in Betracht gezogen werden.

Dennoch hat die entwickelte Methode auf leicht durchzuführende Weise wichtige Ergebnisse geliefert und scheint zudem auf Organe übertragbar zu sein. Natürlich muss die Methode, vor allem in Vergiftungsfällen, durch eine quantitative Analyse komplettiert werden.

Der zweite Fall ist ein sehr ungewöhnlicher. Ein alkoholabhängiger Mann wurde von seiner Ehefrau vermutlich wegen seines Alkoholismus der gemeinsamen Wohnung verwiesen und hielt sich ab diesem Zeitpunkt im Keller auf. Nachdem man den Mann tot aufgefunden hatte, wurde bei der Obduktion schnell ersichtlich, dass er Farbe zu sich

genommen hatte. Ob das aus einer Selbstmordabsicht oder aus der Absicht, einen alkoholähnlichen Rausch zu erzielen, geschehen ist, lässt sich nicht klären. Folgende Asservate wurden untersucht: Femoralvenenblut (FVB), Herzblut (HB), Urin, Galle, Niere, Mageninhalt, Dünndarminhalt, Gehirn, Leber und Dickdarminhalt. Magen- sowie Darminhalte waren tief blau gefärbt. Die Flasche, die nur noch einen Rest Farbe enthielt, wurde im Keller sichergestellt.



Abbildung 32: Farbe Todesfall S026/11

Die in Tabelle 28 aufgelisteten Bestandteile konnten in den einzelnen Asservaten mit der oben beschriebenen Methode detektiert werden.

Tabelle 28: Organverteilung der Farbbestandteile

	FVB	HB	Urin	Galle	Niere	Magen	Dünndarm	Gehirn	Leber	Dickdarm
Ethanol								X		
2-Methyl-1-penten						X				
2-Methylhexan										X
3-Methylhexan										X
3-Methyl-1-hexen										X
2,2-Dimethylbutan										X
2-Buten							X			
3-Methyl-1-buten										X
1-Dimethyl-cyclopropan						X				
Toluol				X	X			X	X	X
p-Xylol	X			X	X		X	X	X	X
m-Xylol	X	X	X	X	X			X	X	X
o-Xylol	X			X	X			X	X	X
1,2,3-Trimethylbenzol										X
Isopropylbenzol				X		X	X			X
Propylbenzol						X	X			X
1-Ethyl-4-methylbenzol	X							X	X	X
1-Ethyl-2-methylbenzol				X	X		X		X	
1,2,4-Trimethylbenzol	X			X	X			X	X	X
Decan										X
2-Methylpentan										X
Isobutylbenzol										X
Vinyltoluol						X				
Tetramethylbenzol						X				X
Ethyl-dimethylbenzol						X				X

Anhand der Organverteilung kann keine konkrete Gesetzmäßigkeit festgemacht werden. Bemerkenswert ist allerdings, dass Ethanol als polare Substanz ausschließlich im Gehirn detektiert werden konnte. Beim Dünndarm- und Mageninhalt war die Konzentration teilweise so hoch, dass nicht alle Komponenten zufriedenstellend identifiziert werden konnten. Vermutlich finden sich hier auch alle Substanzen analog zum Dickdarminhalt. Die Masse an Analyten, die simultan nachgewiesen werden konnte, ist ein weiterer Beweis für die vortreffliche Eignung der Methode in Bezug auf flüchtige Substanzen.

5.4 Screening-Methode mittels Festphasenextraktion und GC-MS

Das Screening mittels GC-MS ist in der Routine-Analytik nach wie vor das Mittel der Wahl. Aus diesem Grund ist die ständige Anpassung an aktuelle technische Standards und wissenschaftliche Erkenntnisse vor allem bei der Probenaufarbeitung von großer Bedeutung, um eine qualitativ hochwertige, aber zugleich auch schnell durchführbare Analytik zu gewährleisten. Durch Vortests in Kombination mit der Anwendung der statistischen Versuchsplanung konnte hier ein Optimum aus notwendigen Arbeitsabläufen und Zeitmanagement gefunden werden.

Das Vorgehen, auch entscheidende Faktoren (z.B. Wahl der SPE-Kartusche) im Vorfeld zu untersuchen und aus der statistischen Versuchsanalyse auszuklammern, kann dann sinnvoll sein, wenn der Parameter alle weiteren Faktoren beeinflusst, wie es zum Beispiel bei der Wahl der SPE-Kartusche der Fall ist. Auch Decaestecker et al. untersuchten und publizierten die Eignung verschiedener SPE-Säulen getrennt von der anschließenden Optimierung der Extraktion [^{89;104}].

Zum Beispiel hat sich bei Untersuchung der Waschlösungen gezeigt, dass fast alle Kombinationen ausreichende Ergebnisse erzielen, allerdings nicht mit der gleichen Reproduzierbarkeit. So können Empfehlungen von Herstellern durchaus als Anhaltspunkt betrachtet werden, sollten aber den konkreten Bedürfnissen angepasst und ggf. erweitert werden.

Hinsichtlich der ANOVA-Auswertung konnten die Ergebnisse einem quadratischen Modell angepasst werden. Hier liegt also der wünschenswerte Fall vor, indem im beobachteten, vorher festgelegten Bereich, das Optimum gefunden wurde.

Der Anteil an Methanol in der Waschlösung hat sich - im Gegensatz zu der Arbeit von Decaestecker et al. [⁸⁹] - als nicht signifikant erwiesen. Dennoch wurde in Abschnitt 3.7.5

postuliert, dass der Einfluss auf die Extraktionsausbeute nicht zu unterschätzen ist. Hier liegt kein Widerspruch vor. Es konnte lediglich im beobachteten Rahmen von 5 % bis 10 % (bzw. den axialen Werten 1.5 % und 13.5 %) keine Signifikanz ausgemacht werden. Da sich dennoch eine Tendenz zeigte, die anhand von Peakflächen ausgemacht wurde, konnte auf ein erneutes Abstecken der Rahmenbedingungen und Optimierung verzichtet werden.

Die Faktoren Essigsäure und Ammoniak zeigen keinerlei Wechselwirkungen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit der ersten Elution wie gewünscht saure Substanzen und etwaige Reste der Säure entfernt wurden. Die Komplexität der Festphasenextraktion wird hier deutlich gemacht und die Notwendigkeit einer simultanen Optimierung ist offensichtlich. Des Weiteren konnten auf diese Weise zusätzliche Rückschlüsse auf die Eignung der Elutionslösung I gezogen werden. Hätten Wechselwirkungen vorgelegen, wäre ein Austausch der Lösung notwendig geworden und die Versuchsreihe hätte erneut durchgeführt werden müssen.

Bei Decaestecker et al. wurden 17 neutrale und basische Substanzen in die Untersuchung einbezogen, saure Substanzen fehlten. Obwohl auch in dieser Publikation die Beispielsubstanzen in Hinblick auf physikochemische Unterschiede ausgewählt wurden, wurden die Analyten bezüglich des Ergebnisses nicht einzeln betrachtet, sondern die Gesamtextraktionsausbeute wurde als „*response*“ zu Rate gezogen. Auf diese Weise konnten keinerlei etwaige Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzklassen ausgemacht werden. Dies ist für ein Screening von Nachteil. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung alle Analyten ein gleichförmiges Ergebnis zeigten, sodass Methadon beispielhaft zur Darstellung herangezogen werden konnte, sollten gerade basische, neutrale und saure Substanzen getrennt betrachtet werden können, um den einzelnen Ansprüchen bei der Optimierung gerecht zu werden.

Bei der Gaschromatographie müssen einige Schwierigkeiten generell in Betracht gezogen werden, zum Beispiel für weniger flüchtige Analyte. In diesem Fall ist eine Derivatisierung mit Hilfe konventioneller Praktiken, zum Beispiel Acetylierung via Acetanhydrid/ Pyridin, unumgänglich. Auch in diesem Fall ist die Methode mit 100 min für beide Durchgänge mit und ohne Derivatisierung durchaus noch als zeitsparend zu bewerten.

Mit dem Methodenvergleich der neu entwickelten GC-MS-Methode mit der HPLC-MS/MS-Methode wird zugleich die Anwendbarkeit der ersteren geprüft. Diese ist bei 81

Substanzen in 128 zufällig gewählten Realproben gegeben. Auffällig ist, dass von insgesamt 119 Analyten 89 (74.8 %) ausschließlich entweder mit der einen oder anderen Methode detektiert werden konnten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Analytik mittels GC-MS keinesfalls durch die HPLC-MS/MS abgelöst werden sollte, wie auch bereits der Vergleich mit der „alten“ GC-MS-Methode ergeben hat (vergleiche 5.2). Liegt bei einer Untersuchung kein konkreter Verdachtsfall hinsichtlich einer bestimmten Substanzgruppe vor, sollten immer beide Methoden zum Einsatz kommen, um ein vollständiges Bild zu erlangen.

Betrachtet man die Analyte hinsichtlich ihrer Einordnung in Substanzklassen, lässt sich festhalten, dass beide Methoden Vorzüge bieten. Amphetamine und Barbiturate konnten ausschließlich mittels GC-MS nachgewiesen werden, ebenso Ibuprofen. Die „bewusste“ Extraktion von sauren Substanzen scheint hierbei ausschlaggebend zu sein. Bei den Benzodiazepinen empfiehlt sich die Analytik mittels Flüssigchromatographie, dennoch ist die Detektion via GC-MS möglich. Diese Ergebnisse decken sich auffallend mit der vorhergehenden Untersuchung, deren Ergebnisse unter 4.2 dargestellt sind. Vorreiter ist die LC-MS/MS-Methodik beim Nachweis von Neuroleptika. Eine Ursache könnte in der niedrigen Dosierung dieser liegen; die Flüssigchromatographie erreicht eine höhere Sensitivität. Eine weitere Auffälligkeit ist, dass mittels Gaschromatographie etliche Zucker und -austauschstoffe und weitere „Randanalyte“ wie zum Beispiel Coumarinsäure oder Menthol nachgewiesen wurden. Einerseits ist die Methodik für diese eher kleinen Moleküle gut geeignet, andererseits könnte eine Erklärung auch in den Einstellungen der verwendeten Spektrenbibliothek liegen. Da die toxikologische Relevanz der Substanzen im Prinzip nicht existent ist, ist es vorstellbar, dass diese in der Ergebnisliste verborgen werden.

Saint-Marcoux et al. haben ebenfalls eine vergleichende Untersuchung zwischen GC-MS, HPLC-DAD sowie HPLC-MS unternommen [105]. Von 27 Arzneistoffen und Metaboliten konnten dreizehn mittels HPLC-MS detektiert werden. Es wurde hier der Standardmix TDM Control Level 1 der Firma BIO-RAD (Ivry-sur-Seine, Frankreich) verwendet. Die detektierten Substanzen sind in einer Tabelle aufgelistet, es handelt sich in diesem Fall um gespikete Proben, wobei aus dem Artikel nicht hervorgeht, ob diese oder weitere Proben mehrfach vermessen wurde. Des Weiteren werden 51 Blutproben erwähnt, wobei im Anschluss an eine Festphasenextraktion 46 verschiedene Substanzen detektiert werden konnten, 75 % mittels HPLC-MS, 71.4 % mittels HPLC-DAD und 65.5 % mittels GC-MS. Lediglich 38.1 % konnten mit Hilfe aller Methoden erkannt werden, was mit dem

eigenen Ergebnis von 25.2 % vergleichbar ist. Zu beachten ist hier allerdings, dass bei der GC-Analytik keine Derivatisierung erfolgt ist, was das Ergebnis für diese Methodik verzerrt.

Liu et al., deren Entwicklung einer Spektren-Datenbank unter 2.10 näher erläutert wird, haben ebenfalls einen Vergleich zu ihrer routinemäßig durchgeführten GC-MS-Analytik gezogen. In zwölf post mortem-Proben konnten mittels HPLC-MS/MS insgesamt 122 Analyte detektiert werden, via GC-MS lediglich 31. Da aber keine Beschreibung der zuletzt genannten Methode vorliegt (z.B. bezüglich einer Derivatisierung) und die Anzahl der Proben recht gering ist, existiert zwar eine Aussagekraft für die Eignung der entwickelten Datenbank und HPLC-MS/MS-Methode, für einen Vergleich sollte allerdings eine größere Anzahl von Realproben untersucht werden. Des Weiteren wiesen alle Proben Opiate auf, was den Verdacht nahelegt, dass die Auswahl der Proben nicht repräsentativ ist [41].

5.5 Optimierung der Screening-Methode mittels HPLC-MS/MS

Obwohl nur ein Faktor - die Wasserzugabe und somit die Verdünnung des Urins - in die Methodenoptimierung eingeflossen ist, zeigt sich hierbei die grundlegende Problematik von Screening-Verfahren: Verschiedene Substanzen, die in realen Proben durchaus nebeneinander vorliegen können, erfordern unterschiedliche Voraussetzungen an die Probenaufarbeitung.

Während Sulpirid, Methadon und Doxepin mit zunehmender Verdünnung einen Abfall der AUC zeigten, wies Diazepam ein klares Optimum bei einer Wasserzugabe von 600 µl auf. Für Lidocain, Verapamil und Buprenorphin konnte keine Gesetzmäßigkeit gefunden werden. Die Detektion dieser Beispiel-Analyten scheint einerseits unabhängig von der Wasserzugabe zu fungieren, andererseits zeigten sich Schwankungen, die lediglich keiner Regel unterworfen werden konnten.

Buprenorphin ist hinsichtlich der Fullscan-Messung via HPLC-MS/MS ein schwieriger Analyt. Nach Poletini et al. kann bei Kollisionsenergien unter 40 eV keine signifikante Fragmentierung des Vorläufer-Ion beobachtet werden, wohingegen höhere Kollisionsenergien intensive Fragmentierung hervorrufen, die mit einem erheblichen Verlust an Sensitivität einhergehen [106]. Diese Beobachtung könnte ursächlich dafür sein,

dass Buprenorphin unabhängig vom entsprechenden Verdünnungsgrad teilweise nicht detektiert werden konnte.

Aus den teils widersprüchlichen Ergebnissen lässt sich ein Kompromiss von 600 µl Wasserzugabe als „Optimum“ ableiten. Allen Substanzen ist zu entnehmen, dass die AUC mit einer höheren Wasserzugabe abnimmt und auch die resultierende Verdünnung der Matrix ab diesem Wert keinen positiven Effekt ausübt. Nordgren et al. führen in ihren Artikeln, die sich mit der direkten Analyse von Urin beschäftigen, eine 1:10-Verdünnung durch [33;34;107]. Da es sich hier aber nicht um eine Messung im Fullscan-Modus handelt und durch die Festlegung ausgewählter Massenübergänge die Sensitivität der Methode erhöht ist, können keine Vergleiche zu der eigenen Vorgehensweise gezogen werden. Zudem werden die Wahl und damit auch die möglichen Vorteile dieser konkreten Verdünnung nicht näher erläutert.

Der Vollständigkeit halber muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass bei dieser Optimierung keine direkte Untersuchung der Matrixeffekte, also Ionensuppression oder -enhancement, stattgefunden hat und dies auch nicht Ziel der Experimente war. Matuszewski et al. haben in ihrem Artikel einen Leitfaden zur Erfassung von Matrixeffekten vorgestellt. Grundsätzlich benötigt man drei verschiedene Probensätze: pure Standardlösung (1), Leermatrix aus verschiedenen Quellen, die erst nach der Extraktion mit Analyten gespikt wird (2) und Leermatrix der gleichen Quellen, die bereits vor der Extraktion mit den in Frage kommenden Substanzen versetzt wird (3). Nach der Analyse können aus den erhaltenen Daten Matrixeffekte und Wiederfindung berechnet werden [108].

6 Fallbeispiel

Dieses Kapitel dient zum Nachweis der Anwendbarkeit der entwickelten bzw. optimierten Methoden und soll die Bedeutung einer systematischen toxikologischen Analyse darlegen. Der Fall beschreibt einen Selbstmord durch Intoxikation mit verschiedenen Arzneistoffen, vor allem Antikonvulsiva, kombiniert mit der Einnahme des Fungizids Captan. Im Folgenden werden kurz die Grundlagen, die Hintergründe des Falles sowie die Ergebnisse präsentiert.

6.1 Einleitung (Fallbeispiel)

Bei Captan handelt es sich um ein Breitspektrum-Fungizid, welches seit über 60 Jahren Anwendung findet. Es wird vor allem im Obst- und Gemüseanbau eingesetzt, aber auch als Zusatz in Bootsfarbe, um ein Algenwachstum einzudämmen [52:109]. In Pilzen hemmt Captan die Grundatmung, die Citratsynthese aus Acetat sowie die Kohlenhydrat- und Aminosäure-Dissimilation. Phosphat akkumuliert in den Sporen, wohingegen Lipide, Proteine und Nukleinsäuren schwinden. Des Weiteren wird die Glykolyse gehemmt.

Captan ist im menschlichen Organismus äußerst instabil. Wie in Abbildung 33 gezeigt, wird es beim Kontakt mit Blut durch Spaltung der N-S-Bindung durch Thiole abgebaut. Die Biotransformation in Säugetieren generiert Tetrahydrophthalimid (THPI) und Thiophosgen. Letzteres ist sehr reaktiv und wird rasch zu 2-Thiothiazolidin-4-carboxylsäure (TTCA) formiert [110].

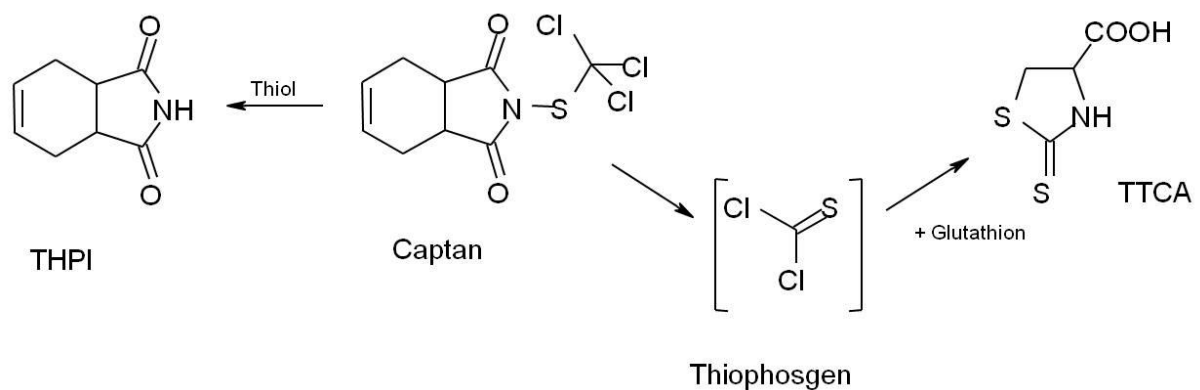


Abbildung 33: Metabolismus von Captan

THPI wurde bei Landwirten als Biomarker für die Captan-Belastung verwendet, vor allem im Urin. Studien dazu beinhalteten verschieden Zielsetzungen, beispielsweise wurden Urinproben von Anwendern mit Druckluftstrom mit denen verglichen, die

Handsprühgeräte verwendet oder sich zusätzlich mit Handschuhen gegen Captan geschützt haben [111-113].

Bisher wurde von keinem tödlichen Fall einer Captan-Ingestion berichtet. In Polen wurden zwei Fälle von Selbstmordversuchen von Chodorowski et al. beschrieben [114;115]. Bei den Patienten handelte es sich um junge Frauen (17 und 22 Jahre) mit Depressionen. In beiden Fällen dominierten unspezifische Symptome von anhaltender Übelkeit, Taubheit in beiden Beinen und Engegefühl in der Brust. Des Weiteren wurden ein temporärer Anstieg der Creatinkinase und eine Inversion der T-Wellen in V₁-V₄ beobachtet.

6.2 Fallbericht

Die Leiche einer 40-jährigen Frau wurde auf dem Rücken liegend in ihrem Badezimmer aufgefunden. undefinierbare Anhaftungen wurden in der Toilette und an deren Rand gefunden. Es lag eine beachtliche Anzahl von leeren und angebrochenen Tabletten-Packungen vor, etliche davon rezeptpflichtig: Diamox[®] (100 Tabletten, Acetazolamid), Kepra[®] 1000 mg (Levetiracetam), Vimpat[®] 100 mg (168 Tabletten, Lacosamid), Valdoxan[®] 25 mg (98 Tabletten, Agomelatin), Lamotrigin, Citalopram, Clobazam und Lorazepam. Teilweise fehlten Informationen zur Dosis oder Menge. Tabelle 29 zeigt die aktuell angeordnete Medikation.

Tabelle 29: aktuelle Medikation des Opfers

Arzneimittel	Morgens	Abends	Zeitraum
Lacosamid 100 mg	1	1½	-
Levetiracetam 1000 mg	1½	1½	-
Acetazolamid	1	1	-
Agomelatin	0	2	-
Lamotrigin 100 mg	1	1½	Woche 1
	1	2	Woche 2
	1½	2	Woche 3
	2	2	ab Woche 4
Lorazepam	bei Bedarf		

Citalopram und Clobazam wurden vermutlich abgesetzt. Die Tür der Wohnung war weit geöffnet und der Telefonhörer war abgenommen.

Es wurde kein Captan-Behältnis am Tatort gefunden, eine Entfernung durch Familienmitglieder konnte nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich keine Aussage über die eingenommene Menge des Captans treffen.

Das Opfer litt an einer ausgeprägten Epilepsie mit vor allem komplex-fokalen Anfällen. Aufgrund ihrer Krankheit hielt die Familie engen Kontakt. Nachdem sie telefonisch nicht erreichbar gewesen war, wurde sie von ihrem Schwager um halb neun abends gefunden - das letzte Mal wurde sie um vier Uhr nachmittags gesehen.

Einen Tag vor ihrem Tod hatte sie einen Arzttermin, von dem sie sich erhoffte, ihren Führerschein zurückzuerlangen, der ihr aufgrund der Krankheit entzogen wurde. Allerdings teilte der Arzt ihr mit, dass dies nicht möglich sei, solange sie für mindestens ein Jahr, besser zwei, frei von Anfällen wäre. Des Weiteren wurde ein leerer Umschlag gefunden, mit der handschriftlichen Bitte auf ihre Tiere aufzupassen und einen Müllcontainer zu bestellen.

6.3 *Sektion und histologische Befunde*

Es wurden Proben von Herzblut, Femoralvenenblut, Urin, Mageninhalt, Niere, Galle, Leber und Gehirn bei der Sektion asserviert. Die Todesursache war makroskopisch nicht zu ermitteln. Das Opfer hatte einen abgemagerten Körper mit einem Gewicht von 47 kg bei einer Körpergröße von 171 cm. Ein grau-bläulicher Mageninhalt mit einem durchdringenden Geruch fiel als verdächtig auf (siehe Abbildung 34a). Zusätzlich hatte das Opfer einen Vagusnervstimulator implantiert und befand sich im Stadium nach Trepanation. Am Kehlkopf und in den Bronchien wurde fadenziehender Schleim gefunden, allerdings nicht ausreichend, um eine Erstickung anzunehmen. Die Autopsie ließ also keine Todesursache erkennen.

Die histologischen Befunde waren ebenfalls unspezifisch. Die Magenschleimhaut war intakt, gut erhalten und zeigte keinerlei Entzündungen, wie in Abbildung 34b dargestellt ist.

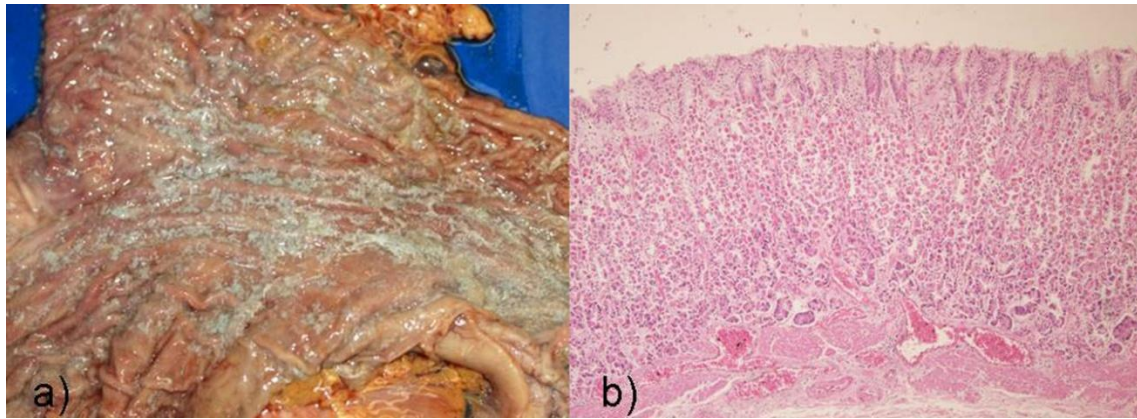


Abbildung 34: a) Grau-bläulicher Mageninhalt und b) Magenschleimhaut ohne jegliche Entzündungen

Die Leber zeigte eine geringe fokale Hohlrumbildung der Leberzellen. Es fand sich ein seichtes interstitielles und alveolares Lungenödem ohne Entzündungsherd. Die mikroskopische Untersuchung des Herzmuskels erbrachte keine Anomalitäten.

6.4 Systematische toxikologische Analyse (Fallbeispiel)

Im Anschluss an die Sektion wurde eine STA durchgeführt. Verschiedene Körperflüssigkeiten und Organe (siehe 6.3) wurden asserviert und bei -20°C gelagert, bevor sie zur Analyse gelangten. Tabelle 30 zeigt eine Übersicht über die durchgeführten analytischen Methoden; der Fokus lag hierbei auf der HS-SPME und dem Screening mittels GC-MS. Da diese Methoden detailliert unter vorangegangenen Kapiteln beschrieben werden und auch die verwendeten Materialien und instrumentellen Bedingungen der Arbeit bereits zu entnehmen sind, soll im folgenden Teil lediglich auf die bisher nicht genannten Methoden eingegangen werden.

Tabelle 30: Übersicht über die durchgeführten analytischen Methoden

Methode	Modus	Matrix
Immunochemischer Vortest (ELISA)		Serum, Urin
HPLC-DAD	Quantifizierung	Serum, Femoralvenenblut
LC-MS/MS	Screening	Urin, Mageninhalt
	Quantifizierung	Femoralvenenblut
SPME gekoppelt mit GC-MS	Screening	Femoralvenenblut, Mageninhalt
GC-MS	Screening	Herzblut, Mageninhalt, Niere
	Quantifizierung	Herzblut, Femoralvenenblut, Mageninhalt, Niere, Galle, Leber, Gehirn

6.4.1 ELISA

Für den immunochemischen Vortest wurde ein Hitachi 912 Autoanalyser der Firma Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet. Serum- und Urinproben wurden auf Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Kokain, Opiate, THC und tricyclische Antidepressiva getestet. Es wurden Qualitätskontrollen in geringer und hoher Konzentration vermessen und eine Fünf-Punkt-Kalibrierung inklusive Null durchgeführt.

6.4.2 Probenaufbereitung für HS-SPME-GC/MS

Pestizide werden zumindest in Deutschland mit Farbstoffen versetzt, um einen Missbrauch oder auch ein Verschütten rasch aufzudecken. Aufgrund der bläulichen Verfärbung des Mageninhalts und seinem durchdringenden Geruch wurde eine Analyse auf flüchtige organische Verbindungen als sinnvoll erachtet. Die genaue Vorgehensweise ist 4.3 zu entnehmen.

6.4.3 Probenaufbereitung für die Quantifizierung von THPI mittels GC-MS

Für die Quantifizierung von THPI wurde die Methode nach Angioni et al. (Nachweis in Trauben, [¹¹⁶]) für die Analytik von Körperflüssigkeiten und Organen abgewandelt.

Ein Gramm einer homogenisierten Probe (Femoralvenenblut, Herzblut, Mageninhalt, Galle, Leber, Niere und Gehirn) wird in ein Gläschen mit Drehverschluss eingewogen und

0.8 g NaCl sowie 2 ml Aceton/ Petrolether (50:50, v/v) werden hinzugegeben. Die Mischung wird für 15 min geschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wird die organische Phase zur Trockne eingedampft und in 100 µl Ethylacetat rekonstituiert. Die Analyse beinhaltete sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle (1 µg/ ml, Vollblut).

Das Temperaturprogramm der GC-MS-Methode startet bei 80°C für 1 min, mit einer Heizrate von 12°C/ min werden 280°C erreicht, die für 1 min gehalten werden (*solvent delay* 4 min, resultierende Analysenzeit insgesamt 18.67 min).

Die Analyse wurde im „*selected ion monitoring*“-Modus (SIM) durchgeführt: 51, 79, 106, 122, 151 (das Quantifier-Ion ist unterstrichen).

6.5 *Ergebnisse (Fallbeispiel)*

Der Vortest mittels ELISA ergab erste Hinweise von Benzodiazepinen in den untersuchten Proben.

Mittels HPLC-DAD konnten Clobazam, Citalopram und sein Metabolit sowie Lamotrigin nachgewiesen und quantifiziert werden.

Levetiracetam und Lacosamid wurden in Femoralvenenblut via LC-MS/MS quantifiziert, wohingegen das Screening Clonazepam nachwies.

Mit Hilfe von HS-SPME-GC/MS für VOC war es möglich, Captan im Mageninhalt zu detektieren, während es in Femoralvenenblut aufgrund der Thiole und dem damit verbundenen Abbau, der unter 6.1 beschrieben wird, nicht nachgewiesen werden konnte (vergl. Abbildung 33). Abbildung 35 zeigt das Totalionenchromatogramm (TIC) des Mageninhalts.

TIC Mageninhalt

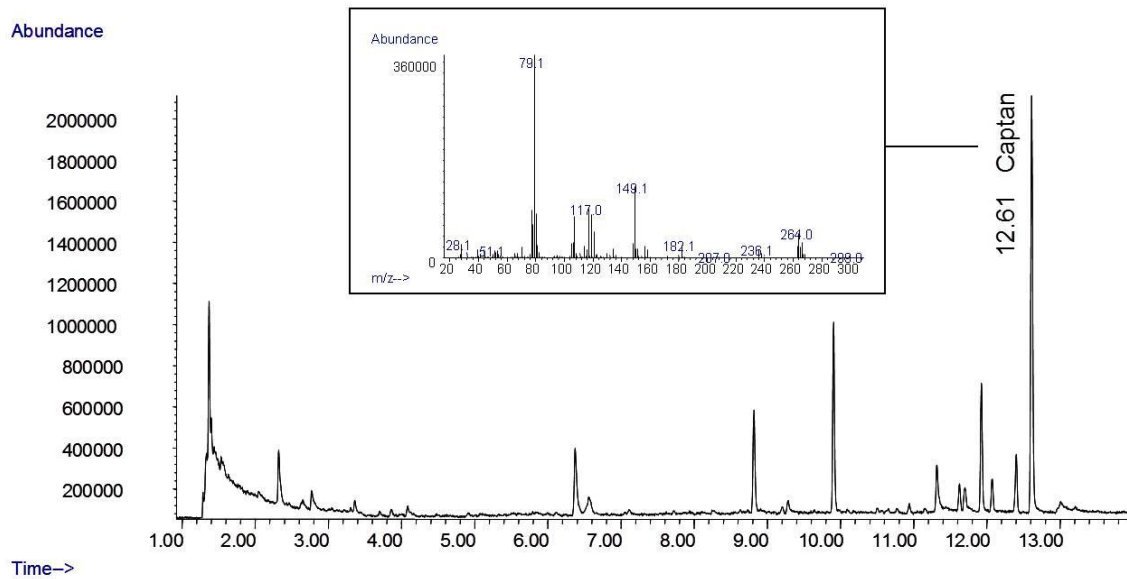


Abbildung 35: TIC des Mageninhalts mit deutlichem Captan-Peak

Zunächst schien es, als würde die GC-MS-Analyse kein Ergebnis erbringen. Das Chromatogramm, zu sehen in Abbildung 36, zeigte einen ausgeprägten Peak, der von der Spektrenbibliothek als „Verunreinigung“ deklariert wurde. Später - mit dem Wissen, dass das Opfer Captan genommen hatte -, konnte der Peak nach einem Vergleich mit einem Standard als THPI identifiziert werden.

TIC Mageninhalt

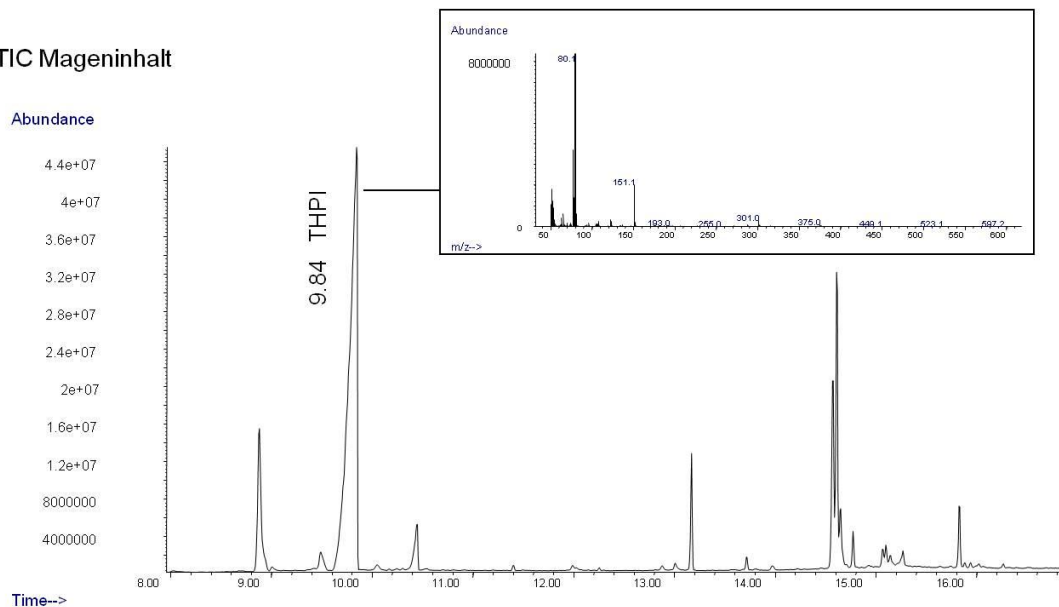


Abbildung 36: TIC des Mageninhalts mit nachträglich als THPI identifiziertem Peak

Für die Quantifizierung wurde eine Kalibration mit zehn Standardlösungen (plus Nullprobe) verschiedener Konzentration von 0.25 µg/ ml bis 2.5 µg/ ml durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt.

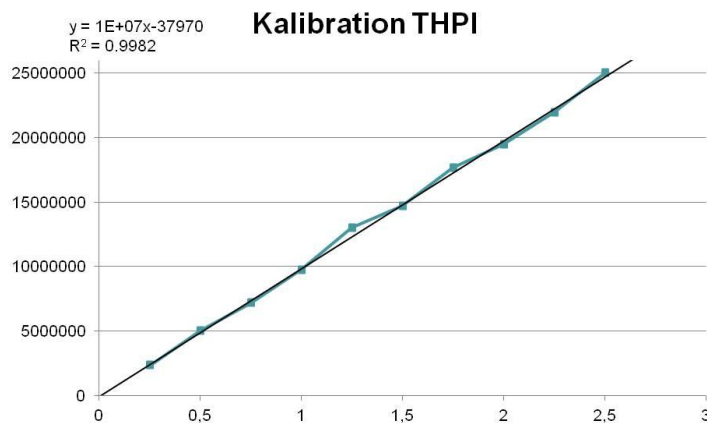


Abbildung 37: Kalibration für die quantitative Analyse von THPI

Die Linearität ist im gemessenen Bereich mit einem Determinationskoeffizient von $R^2 = 0.9982$ absolut gegeben.

Alle Ergebnisse der STA sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Wie zu erkennen ist, wurde THPI in allen analysierten Matrices nachgewiesen.

Tabelle 31: Ergebnisse der systematischen toxikologischen Analyse

Method	Matrix	Analyt
ELISA	Urin	Benzodiazepine
HPLC-DAD	Femoralvenenblut	Clobazam (50 ng/ ml), Citalopram (469 ng/ ml), Citalopram-Metabolit (172 ng/ ml), Lamotrigin (2310 ng/ ml)
LC-MS/MS	Femoralvenenblut	Levetiracetam (26.69 µg/ ml), Lacosamid (11.3 µg/ ml)
	Mageninhalt	Clonazepam
SPME-GC/MS	Mageninhalt	Captan
GC-MS	Diverse	THPI (Mageninhalt ca. 1.5 mg (total), Herzblut 0.35 µg/ ml, Galle 0.30 µg/ ml, Leber 0.24 µg/ g, Femoralvenenblut 0.22 µg/ ml, Niere 0.14 µg/ g und Gehirn 0.06 µg/ g)

6.6 Diskussion (Fallbeispiel)

Zum ersten Mal konnte THPI im menschlichen Körper nachgewiesen werden. Die Verteilung im Organismus korrespondiert mit den Erkenntnissen von Seidler et al. [117]. Die Arbeitsgruppe führte im Jahre 1971 Experimente an Ratten durch; die Verwendung von Sulphur-35-markiertem Captan erlaubte ihnen, die Ausscheidung und Verteilung in Leber, Niere, Milz, Gehirn, Muskulatur und Serum zu erfassen.

Die erhaltenen Werte von THPI indizieren den Verlauf der Verteilung. Der große Anteil im Mageninhalt, die kleinere Menge in Herzblut und Galle und der verhältnismäßig geringe Part in den Nieren zeigen, dass die Einnahme des Captan eine kurze Zeitspanne vor dem Tode erfolgt ist.

Die LD₅₀ von Captan beläuft sich auf 9 g/ kg; THPI selbst ist nicht toxisch [118]. Obwohl Captan nicht im (Femoralvenen)blut gefunden wurde, sollte es dennoch als mögliche Todesursache in Betracht gezogen werden.

Zunächst können relevante oder toxische Konzentrationen von Captan im Blut zum Zeitpunkt des Todes vorgelegen haben, die aufgrund einer raschen (post mortem) Degradation nicht mehr nachgewiesen werden können.

Zum anderen betrug das Körpergewicht des Opfers nur 47 kg bei einer Körpergröße von 171 cm. Es ist bekannt, dass die mittlere letale Dosis von Captan bei einer proteinarmen Diät oder im Hungerzustand signifikant abnimmt [119].

Des Weiteren kann angenommen werden, dass das Opfer unter cardiotoxischen Effekten gelitten hat. Die zwei Fälle von Selbstmordversuchen, die unter 6.1 beschrieben werden, zeigen, dass bei einer Captan-Intoxikation ernste Schädigungen des Herzens vorherrschend sind. Dies kann anhand der Inversion der T-Wellen, die auf Vorfälle von Arrhythmien hindeuten, als auch anhand des Anstiegs der Creatininkinase auf 309 U/l bzw. 329 U/l festgemacht werden [114;115]. Allerdings ist es aufgrund der kurzen Überlebenszeit des Opfers nach Captan-Einnahme in den meisten Fällen nicht möglich, die kardiotoxischen Effekte durch eine histologische Diagnostik zu belegen. Die toxikologische Analyse ist also von großer Bedeutung.

Lacosamid ist geringfügig überdosiert und auch die Citalopram-Konzentration liegt über dem therapeutischen Bereich; dies ist allerdings unzureichend, um den tödlichen Ausgang zu erklären, wie bei Anastos et al. beschrieben [120], welche Schwierigkeiten bei der Interpretation von post mortem Konzentrationen von Citalopram anführt. In

Übereinstimmung mit Greenaway et al. sollte die Serumkonzentration bei einer täglichen Dosis von 250 mg Lacosamid ungefähr bei 9 µg liegen [¹²¹].

Abschließend muss vor allem die Kombination des Fungizids Captan mit den diversen Arzneimitteln (und insbesondere deren kardiotoxische Effekte) als die Todesursache angenommen werden.

6.7 Zusammenfassung (Fallbeispiel)

Unter Ausschluss konkurrierender Todesursachen stellt sich die Kombination von Captan, Citalopram und Lacosamid (in hohen Konzentrationen) als tödlich heraus. Kardiotoxische Effekte, besonders durch Captan hervorgerufen, werden angenommen.

In diesem Fall hat der Mageninhalt als Matrix für die Screening-Analytik eine entscheidende Rolle gespielt. Ohne die Analyse mittels HS-SPME auf flüchtige organische Substanzen wären Captan und sein Metabolit THPI nicht detektiert worden und der Fall wäre nicht aufgeklärt worden. Die systematische toxikologische Analyse zeigte sich als ein wichtiger Bestandteil von post mortem Untersuchungen; jedoch sollte sie, wie dieser Fall zeigt, den Gegebenheiten angepasst werden, um zufriedenstellende und wahre Ergebnisse zu erzielen.

7 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit behandelt mit der Entwicklung und Optimierung unterschiedlicher Methoden die Thematik „Screening“ umfassend und aus verschiedenen Blickwinkeln und ist somit von breitem Nutzen für die forensisch-toxikologische Analytik.

Da ein adäquates Qualitätssicherungssystem die Grundlage jeder Analytik darstellen sollte, ist die Überprüfung der bestehenden Methoden auf ihren aktuellen Nutzen der erste logische Schritt. Durch die kritische Betrachtung der bisherigen Qualitätskontrollen über eine mehrmonatige Zeitspanne, konnten einige Schwächen aufgedeckt werden. Bei der HPLC-DAD konnten wegen des Verzichts auf mittlerweile überholte Vorgehensweisen, wie zum Beispiel die manuelle Messung der Halbwertsbreite, die Abläufe bezüglich des Arbeitsaufwandes verbessert werden. Das Wissen, dass die Stabilität der Benzollösung nach einer zweimonatigen Verwendung nicht mehr gegeben ist und das bisher angestrebte Hintergrundrauschen im besten Fall mit unbenutzten Geräten erzielt werden kann, führt dazu, dass eine etwaige unnötige Fehlersuche an anderer Stelle eingespart werden kann. Die Verminderung der Konzentrationen der Analyten in der Funktionslösung für GC-MS ist aus ökonomischer Sicht ein Fortschritt.

Die Screening-Methode auf flüchtige Substanzen mittels HS-SPME/GC-MS stellt aufgrund der Anwendbarkeit für (fast) alle VOC eine Neuerung auf dem Gebiet der Mikrofestphasenextraktion dar. Die Grundvoraussetzung und zugleich größte Herausforderung bei GUS-Verfahren ist somit erfüllt. Die Methode fungiert zudem als wichtiger Bestandteil der systematischen toxikologischen Analyse, da das Prozedere für die Beantwortung verschiedenster forensischer und toxikologischer Fragestellungen geeignet ist, zum Beispiel Missbrauch von und Intoxikation durch „Schnüffelstoffe“, Verwendung von Brandbeschleunigern, Erkennen von pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper oder Umweltverschmutzung. Der beschriebene Fallbericht belegt, dass der Todesfall ohne die Anwendung dieser Methode nicht hätte aufgeklärt werden können. Die kurze Zeitspanne, die für den gesamten analytischen Prozess nötig ist, leistet einen weiteren Beitrag für die Eingliederung in die Routine-Analytik.

Trotz der langjährigen Erfahrung mit der GC-MS-Technik sind GUS-Verfahren im Fullscan-Modus relativ selten und aktuelle Publikationen auf diesem Gebiet so gut wie gar nicht anzutreffen. Durch die Anwendung der statistischen Versuchsplanung für die Optimierung der Festphasenextraktion konnten Einfluss und Abhängigkeiten der einzelnen Faktoren mit nur geringem Arbeitsaufwand untersucht werden. Ergebnis der

Experimente ist eine schnell durchführbare SPE, deren Eignung für saure, basische und neutrale Substanzen nicht nur gegeben scheint, sondern aufgrund der statistischen Auswertung belegt ist. Der Vergleich mit der routinemäßig durchgeführten HPLC-MS/MS-Methode beweist ihre Anwendbarkeit und ist dieser, wenn man vor allem die Anzahl der detektierten Analyten betrachtet, sogar überlegen. Des Weiteren führt sie erneut vor Augen, dass die GC-MS-Analytik vor allem bezüglich Screening-Verfahren nicht von der Flüssigchromatographie abgelöst werden kann, obwohl diese Technik in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erfahren hat. Da die Stärken der Gaschromatographie bei den Amphetaminen und Barbituraten liegen, die der HPLC-MS/MS im Gegenzug beispielsweise bei den Neuroleptika, führt eine Kombination der Methoden zum größtmöglichen Erkenntnisgewinn. Des Weiteren ist die Probenvorbereitung und Extraktion ein entscheidender Bestandteil der gaschromatographischen Analyse. Auf diese Weise kann ein konkretes Augenmerk auf die simultane Extraktion von basischen und sauren Substanzen gelegt werden, so dass diese Technik gerade für letztere Analyten besser geeignet ist.

Die Experimente bezüglich der hausinternen HPLC-MS/MS-Methodik nehmen nur einen kleinen Part ein. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch die Optimierung von an sich bereits unkomplizierten Vorgängen lohnenswert ist, um einen weiteren Fortschritt und Kenntnisgewinn zu erzielen.

In dieser Arbeit wurde die statistische Versuchsplanung bei der Entwicklung und Optimierung aller Methoden auf unterschiedliche Weise eingesetzt; ein Central Composite Design mit drei Faktoren, die simultane Untersuchung von fünf Faktoren und eine Ein-Faktor-Analyse wurden durchgeführt. Hierdurch werden die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der forensischen Toxikologie präsentiert. Im Rahmen der Mikrofestphasenextraktion ist diese Vorgehensweise bereits häufiger anzutreffen, wünschenswert wäre eine grundsätzliche Verankerung innerhalb sämtlicher Methodenentwicklungen. Hierfür gibt es gleich mehrere Argumente: Es können sowohl numerische als auch kategoriale Faktoren untersucht werden, Abhängigkeiten zwischen den Faktoren können nur mit Hilfe statistischer Parameter aufgedeckt werden und nicht zuletzt werden konkrete Ergebnisse erzielt, die keinen Spielraum für Interpretation oder Verzerrung bieten.

Durch die umfassende Bearbeitung verschiedenster Screening-Methode kann die vorliegende Arbeit als Leitfaden für die Durchführung einer systematischen toxikologischen Analyse dienen.

8 Ausblick

Arzneistoffe mit medizinischer Indikation, aber auch synthetische Drogen, die ausschließlich eine missbräuchliche Anwendung finden, werden ständig weiter entwickelt. Um diesen Tatsachen gerecht zu werden, ist eine fortlaufende Überprüfung der Eignung der existierenden analytischen Methoden unumgänglich. Dies gilt insbesondere für die Screening Verfahren.

Auch in Hinblick auf instrumentelle Gegebenheiten werden kontinuierlich neue Fortschritte getätigt. So wurde zum Beispiel für die Entwicklung der Festphasenextraktion mit der „Chromabond Drug“-Kartusche eine etablierte Extraktionssäule gewählt, da sie sich zum jetzigen Zeitpunkt als die Geeignetste erwiesen hat. Dennoch sollte der Markt auf diesem Gebiet beobachtet werden und ein möglicher zusätzlicher Nutzen von Neuentwicklungen durch strukturierte Versuchsreihen geprüft werden.

Eine Frage, die in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, ist der tatsächliche zusätzliche Nutzen der Optimierung der HPLC-MS/MS-Methode. Hier sollte in Zukunft untersucht werden, in wie weit sich der Unterschied in der Urinverdünnung auf die GUS bemerkbar macht und ob sich das Verhältnis der detektierten Substanzen in Vergleich zu der GC-MS-Analytik verschiebt. Durch die Weiterführung der Vergleichsstudie anhand von zufällig ausgewählten Realproben könnte die bisherige Liste von 119 Substanzen erweitert werden und ein Erkenntnisgewinn über Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode erzielt werden.

In dieser Arbeit hat sich der Hinweis ergeben, dass ein Grund für die Einschränkungen der HPLC-MS/MS-Analytik in der einfachen Probenvorbereitung liegt. Insofern sollten Überlegungen und Experimente angestrebt werden, die untersuchen, ob eine aufwendigere Extraktion trotz des höheren Zeitaufwandes sinnvoll wäre, da gegebenenfalls eine größere Bandbreite an detektierbaren Analyten hervorgerufen werden könnte.

Die grundsätzlichen Erfahrungen mit Screening-Verfahren haben in den letzten Jahrzehnten gezeigt, dass eine Anpassung an technische Entwicklungen und den Fortschritt auf dem Arzneimittel- und Suchtstoff-Markt vorgenommen werden sollte.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quadrupol-Fokussierung.....	4
Abbildung 2: Aufbau der SPME-Vorrichtung.....	6
Abbildung 3: Schema der Headspace-SPME.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der SPE-Extraktion.....	10
Abbildung 5: Normalverteilung	11
Abbildung 6: Exemplarisches CCD für drei Faktoren inklusive der benötigten Experimente	15
Abbildung 7: Chromatogramm Funktionslösung HPLC-DAD	51
Abbildung 8: Chromatogramm Funktionslösung GC-MS.....	52
Abbildung 9: Peakflächenverteilung Funktionslösung GC-MS.....	53
Abbildung 10: Verteilung der detektierten Substanzen in Bezug auf Matrix und Analysemethode	54
Abbildung 11: Verteilung nach Substanzklassen	54
Abbildung 12: Agitation der Proben	56
Abbildung 13: Optimierung der Eintauchtiefe und Desorptionszeit am Beispiel von Isooctan.....	56
Abbildung 14: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Toluol..	57
Abbildung 15: Ausreißeranalyse Toluol.....	59
Abbildung 16: Auswirkung der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute am Beispiel Toluol	60
Abbildung 17: Erneute Optimierung der Extraktionstemperatur.....	60
Abbildung 18: Chromatogramm unter optimalen Bedingungen.....	61
Abbildung 19: Effekt der unterschiedlichen Pufferlösungen auf die Extraktionsausbeute.....	63
Abbildung 20: Effekt der unterschiedlichen Kombination von Waschlösungen auf die Extraktionsausbeute.....	64
Abbildung 21: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Methadon.....	65
Abbildung 22: Ausreißeranalyse Methadon.....	66
Abbildung 23: Darstellung der Optima und etwaiger Wechselwirkungen am Beispiel der Essigsäure und der Zugabe von Ammoniak	67
Abbildung 24: Chromatogramm unter optimalen Bedingungen (SPE).....	68
Abbildung 25: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Sulpirid	76
Abbildung 26: Linearer Verlauf am Beispiel Sulpirid und Methadon	77
Abbildung 27: Linearer Verlauf von Doxepin.....	77
Abbildung 28: Linearer Verlauf Diazepam	78
Abbildung 29: Quadratischer Verlauf Diazepam	79

Abbildung 30: berechnete Werte versus experimentell ermittelte Werte am Beispiel Verapamil.....	80
Abbildung 31: Messergebnisse Buprenorphin	80
Abbildung 32: Farbe Todesfall S026/11.....	86
Abbildung 33: Metabolismus von Captan.....	93
Abbildung 34: a) Grau-bläulicher Mageninhalt und b) Magenschleimhaut ohne jegliche Entzündungen	96
Abbildung 35: TIC des Mageninhalts mit deutlichem Captan-Peak.....	99
Abbildung 36: TIC des Mageninhalts mit nachträglich als THPI identifiziertem Peak	99
Abbildung 37: Kalibration für die quantitative Analyse von THPI	100

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter publizierter Arbeiten zur GC-MS-Analytik	19
Tabelle 2: Methodenvergleich Lynch et al.	21
Tabelle 3: Übersicht ausgewählter publizierter Arbeiten zur SPME-Analytik	23
Tabelle 4: Physikochemische Eigenschaften der VOC I [⁹³]	27
Tabelle 5: Physikochemische Eigenschaften der VOC II [⁹³]	28
Tabelle 6: Physikochemische Eigenschaften der Inhalationsnarkotika [⁹³]	29
Tabelle 7: Eigenschaften der Beispielanalyten zur SPE-Methodenentwicklung I [⁹⁵].....	30
Tabelle 8 Eigenschaften der Beispielanalyten zur SPE-Methodenentwicklung II [⁹⁵]	31
Tabelle 9: Kodierte Design-Matrix (SPME)	41
Tabelle 10: Nicht-kodierte Levels der Faktoren Extraktionstemperatur, Extraktionszeit und Desorptionszeit	42
Tabelle 11: Kodierte Design-Matrix.....	46
Tabelle 12: Nicht-kodierte Level der mittels CCD untersuchten Faktoren.....	48
Tabelle 13: Design-Matrix (HPLC-MS/MS).....	50
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse einiger Parameter der Funktionslösung für die HPLC-DAD	52
Tabelle 15: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Toluol.....	58
Tabelle 16: Validierungsdaten	62
Tabelle 17: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Methadon.....	66
Tabelle 18: Validierungsdaten (SPE).....	68
Tabelle 19: Mittels Festphasenextraktion und GC-MS detektierte Substanzen in 128 Realproben I	70
Tabelle 20: Mittels Festphasenextraktion und GC-MS detektierte Substanzen in 128 Realproben II	71
Tabelle 21: Mittels Festphasenextraktion und GC-MS detektierte Substanzen in 128 Realproben III.....	72
Tabelle 22: Mittels LC-MS/MS detektierte Substanzen in 128 Realproben I.....	73
Tabelle 23: Mittels LC-MS/MS detektierte Substanzen in 128 Realproben II	74
Tabelle 24: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Sulpirid.....	75
Tabelle 25: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Diazepam (linear).....	78
Tabelle 26: ANOVA-Auswertung der CCD-Matrix von Diazepam (quadratisch).....	79
Tabelle 27: Befunde in Blut und Organen der Brandleiche	85
Tabelle 28: Organverteilung der Farbbestandteile	87
Tabelle 29: aktuelle Medikation des Opfers.....	94
Tabelle 30: Übersicht über die durchgeführten analytischen Methoden	97
Tabelle 31: Ergebnisse der systematischen toxikologischen Analyse.....	100

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Konzentration des Analyten in den verschiedenen Phasen	7
Formel 2: Absorbierte Menge an Analyt in der Faserbeschichtung	8
Formel 3: Umformung Formel 2	8
Formel 4: Verteilungskoeffizient Faserbeschichtung/ Probenmatrix	8
Formel 5: Vereinfachung von Formel 3	8
Formel 6: Konzentration des Analyten.....	9
Formel 7: Von der Faserbeschichtung absorbierte Analytmenge	9
Formel 8: Varianz	11
Formel 9: Standardabweichung.....	12
Formel 10: F-Test	13
Formel 11: Lineares Modell am Beispiel Toluol.....	57
Formel 12: Quadratisches Modell am Beispiel Methadon.....	64
Formel 13: Lineares Modell am Beispiel Sulpirid	76
Formel 14: Lineares Modell am Beispiel Diazepam.....	78

12 Literatur

- [1] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G. (2001) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [2] Pawliszyn, J. (1997) *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York
- [3] Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **65** (1993); 1843-1852
- [4] Anderson, M. J., Whitcomb, P. J. (2007) *DOE simplified*, 2. Aufl., CRC Press, Boca Raton
- [5] Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (2009) *Response surface methodology*, John Wiley & Sons, Hoboken
- [6] Madea, B., Brinkmann, B. (2003) *Handbuch gerichtliche Medizin*, Springer-Verlag, Heidelberg
- [7] Skopp, G.; von Meyer, L. Anhang D - Empfehlungen zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensisch-toxikologische Untersuchungen und spezielle Aspekte der Postmortem-Analytik. *Toxichem + Krimtech* **71** [2] (2004); 101-111
- [8] Drummer, O. H. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.* **388** [7] (2007); 1495-1503
- [9] Madea, B. (2006) *Praxis Rechtsmedizin: Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*, 2. Aufl., Springer, Berlin
- [10] Maurer, H. H. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin. Chem. Lab Med.* **42** [11] (2004); 1310-1324
- [11] Schütz, H.; Pain, A.; Erdmann, F.; Verhoff, M. A.; Weiler, G. [Drug screening in urine - common pitfalls in measurement and interpretation]. *Archiv für Kriminologie* **217** [1-2] (2006); 1-9
- [12] Maurer, H. H. Detection of anticonvulsants and their metabolites in urine within a "general unknown" analysis procedure using computerized gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Toxicol.* **64** [7] (1990); 554-561
- [13] Maurer, H. H. Identification and differentiation of barbiturates, other sedative-hypnotics and their metabolites in urine integrated in a general screening procedure using computerized gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **530** [2] (1990); 307-326

- [14] Maurer, H. H. Identification of antiarrhythmic drugs and their metabolites in urine. *Arch. Toxicol.* **64** [3] (1990); 218-230
- [15] Maurer, H. H.; Kraemer, T.; Arlt, J. W. Screening for the detection of angiotensin-converting enzyme inhibitors, their metabolites, and AT II receptor antagonists. *Ther. Drug Monit.* **20** [6] (1998); 706-713
- [16] Beyer, J.; Bierl, A.; Peters, F. T.; Maurer, H. H. Screening procedure for detection of diuretics and uricosurics and/or their metabolites in human urine using gas chromatography-mass spectrometry after extractive methylation. *Ther. Drug Monit.* **27** [4] (2005); 509-520
- [17] Beyer, J.; Peters, F. T.; Maurer, H. H. Screening procedure for detection of stimulant laxatives and/or their metabolites in human urine using gas chromatography-mass spectrometry after enzymatic cleavage of conjugates and extractive methylation. *Ther. Drug Monit.* **27** [2] (2005); 151-157
- [18] Maurer, H. H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **580** [1-2] (1992); 3-41
- [19] Poletini, A. Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **733** [1-2] (1999); 47-63
- [20] Brooks, K. E.; Smith, N. B. Efficient extraction of basic, neutral, and weakly acidic drugs from plasma for analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* **35** [11] (1991); 1975-1978
- [21] Chen, X. H.; Franke, J. P.; Wijsbeek, J.; de Zeeuw, R. A. Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column. *Journal of Analytical Toxicology* **16** (1992); 351-355
- [22] Poletini, A.; Groppi, A.; Vignali, C.; Montagna, M. Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **713** [1] (1998); 265-279
- [23] Stimpfl, T.; Demuth, W.; Varmuza, K.; Vycudilik, W. Systematic toxicological analysis: computer-assisted identification of poisons in biological materials. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **789** [1] (2003); 3-7
- [24] Kratzsch, C.; Tenberken, O.; Peters, F. T.; Weber, A. A.; Kraemer, T.; Maurer, H. H. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/ mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **39** [8] (2004); 856-872

- [25] Decaestecker, T. N.; Clauwaert, K. M.; Van Bocxlaer, J. F.; Lambert, W. E.; Van den Eeckhout, E. G.; Van Peteghem, C. H.; De Leenheer, A. P. Evaluation of automated single mass spectrometry to tandem mass spectrometry function switching for comprehensive drug profiling analysis using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** [19] (2000); 1787-1792
- [26] Maurer, H. H.; Kratzsch, C.; Kraemer, T.; Peters, F. T.; Weber, A. A. Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **773** [1] (2002); 63-73
- [27] Maurer, H. H.; Kraemer, T.; Kratzsch, C.; Peters, F. T.; Weber, A. A. Negative ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry of low-dosed and/or polar drugs in plasma. *Ther. Drug Monit.* **24** [1] (2002); 117-124
- [28] Rittner, M.; Pragst, F.; Bork, W. R.; Neumann, J. Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **25** (2001); 115-124
- [29] Gergov, M.; Nokua, P.; Vuori, E.; Ojanperä, I. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* **186** [1-3] (2009); 36-43
- [30] Gergov, M.; Boucher, B.; Ojanperä, I.; Vuori, E. Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated target library search based on elemental formulas. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (2001); 521-526
- [31] Goeringer, K. E.; McIntyre, M.; Drummer, O. H. LC-MS analysis of serotonergic drugs. *J. Anal. Toxicol.* **27** [1] (2003); 30-35
- [32] Mueller, C. A.; Weinmann, W.; Dresen, S.; Schreiber, A.; Gergov, M. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/ tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** [10] (2005); 1332-1338
- [33] Nordgren, H. K.; Beck, O. Multicomponent screening for drugs of abuse. *Ther. Drug Monit.* **26** [1] (2004); 90-97
- [34] Nordgren, H. K.; Holmgren, P.; Liljeberg, P.; Eriksson, N.; Beck, O. Application of direct urine LC-MS-MS analysis for screening of novel substances in drug abusers. *Journal of Analytical Toxicology* **29** [4] (2005); 234-239

- [35] Saint-Marcoux, F.; Sauvage, F. L.; Marquet, P. Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **388** (2007); 1327-1349
- [36] Gonzalez, O.; Alonso, R. M.; Ferreirós, N.; Weinmann, W.; Zimmermann, R.; Dresen, S. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. *Journal of Chromatography B* **879** [3-4] (2011); 243-252
- [37] Mazzarino, M.; de la Torre, X.; Botrè, F. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **392** [4] (2008); 681-698
- [38] Maurer, H. H. Hyphenated mass spectrometric techniques-indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. *J. Mass Spectrom.* **41** [11] (2006); 1399-1413
- [39] Peters, F. T. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clin. Biochem.* **44** [1] (2011); 54-65
- [40] Gergov, M.; Ojanperä, I.; Vuori, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Journal of Chromatography B* **795** [1] (2003); 41-53
- [41] Liu, H. C.; Liu, R. H.; Ho, H. O.; Lin, D. L. Development of an information-rich LC-MS/MS database for the analysis of drugs in postmortem specimens. *Anal. Chem.* **81** (2009); 9002-9011
- [42] Dresen, S.; Ferreirós, N.; Gnann, H.; Zimmermann, R.; Weinmann, W. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching. *Anal. Bioanal. Chem.* **396** [7] (2010); 2425-2434
- [43] Marquet, P. Is LC-MS suitable for a comprehensive screening of drugs and poisons in clinical toxicology? *Ther. Drug Monit.* **24** [1] (2002); 125-133
- [44] Decaestecker, T. N.; Vande, C., Sr.; Wallemacq, P. E.; Van Peteghem, C. H.; Defore, D. L.; Van Bocxlaer, J. F. Information-dependent acquisition-mediated LC-MS/MS screening procedure with semiquantitative potential. *Anal. Chem.* **76** [21] (2004); 6365-6373
- [45] Sturm, S.; Hammann, F.; Drewe, J.; Maurer, H. H.; Scholer, A. An automated screening method for drugs and toxic compounds in human serum and urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **878** [28] (2010); 2726-2732

- [46] Lynch, K. L.; Breaud, A. R.; Vandenberghe, H.; Wu, A. H.; Clarke, W. Performance evaluation of three liquid chromatography mass spectrometry methods for broad spectrum drug screening. *Clinica Chimica Acta* **411** [19-20] (2010); 1474-1481
- [47] Dams, R.; Huestis, M. A.; Lambert, W. E.; Murphy, C. M. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization Type, sample preparation, and biofluid. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **14** (2003); 1290-1294
- [48] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62** (1990); 2145-2148
- [49] Grote, C.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal. Chem.* **69** [4] (1997); 587-596
- [50] Lord, H.; Pawliszyn, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A* **902** [1] (2000); 17-63
- [51] Xie, W.; Pawliszyn, J.; Mullett, W. M.; Matuszewski, B. K. Comparison of solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction in 96-well format for the determination of a drug compound in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45** [4] (2007); 599-608
- [52] Lambropoulou, D. A.; Konstantinou, I. K.; Albanis, T. A. Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **893** (2000); 143-156
- [53] Scheyer, A.; Briand, O.; Morville, S.; Mirabel, P.; Millet, M. Analysis of trace levels of pesticides in rainwater by SPME and GC-tandem mass spectrometry after derivatisation with PFBBr. *Anal. Bioanal. Chem.* **387** [1] (2007); 359-368
- [54] Garcia-Rodriguez, D.; Carro, A. M.; Lorenzo, R. A.; Fernandez, F.; Cela, R. Determination of trace levels of aquaculture chemotherapeutants in seawater samples by SPME-GC-MS/MS. *J. Sep. Sci.* **31** [15] (2008); 2882-2890
- [55] Zhou, Y.; Jiang, Q.; Peng, Q.; Xuan, D.; Qu, W. Development of a solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of pentachlorophenol in human plasma using experimental design. *Chemosphere* **70** [2] (2007); 256-262
- [56] Musshoff, F.; Junker, H.; Madea, B. Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Clin. Chem. Lab Med.* **37** [6] (1999); 639-642

- [57] Mousavi, M.; Noroozian, E.; Jalali-Heravi, M.; Mollahosseini, A. Optimization of solid-phase microextraction of volatile phenols in water by a polyaniline-coated Pt-fiber using experimental design. *Anal. Chim. Acta* **581** [1] (2007); 71-77
- [58] Merckel, C.; Pragst, F.; Ratzinger, A.; Aebi, B.; Bernhard, W.; Sporkert, F. Application of headspace solid phase microextraction to qualitative and quantitative analysis of tobacco additives in cigarettes. *J. Chromatogr. A* **1116** [1-2] (2006); 10-19
- [59] Stanfill, S. B.; Ashley, D. L. Solid phase microextraction of alkenylbenzenes and other flavor-related compounds from tobacco for analysis by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **858** [1] (1999); 79-89
- [60] Lachenmeier, K.; Musshoff, F.; Madea, B.; Lachenmeier, D. W. Application of experimental design to optimise solid-phase microextraction of orange juice flavour. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* **5** [3] (2006); 1380-1388
- [61] Boyle, R. R.; McLean, S.; Brandon, S.; Pass, G. J.; Davies, N. W. Application of solid-phase microextraction to the quantitative analysis of 1,8-cineole in blood and expired air in a Eucalyptus herbivore, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **780** [2] (2002); 397-406
- [62] Hyspler, R.; Crhova, S.; Gasparic, J.; Zadak, Z.; Cizkova, M.; Balasova, V. Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **739** [1] (2000); 183-190
- [63] Ligor, M.; Ligor, T.; Bajtarevic, A.; Ager, C.; Pienz, M.; Klieber, M.; Denz, H.; Fiegl, M.; Hilbe, W.; Weiss, W.; Lukas, P.; Jamnig, H.; Hackl, M.; Buszewski, B.; Miekisch, W.; Schubert, J.; Amann, A. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab Med.* **47** [5] (2009); 550-560
- [64] Nagasawa, N.; Yashiki, M.; Iwasaki, Y.; Hara, K.; Kojima, T. Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Science International* **78** [2] (1996); 95-102
- [65] Yashiki, M.; Kojima, T.; Miyazaki, T.; Nagasawa, N.; Iwasaki, Y.; Hara, K. Detection of amphetamines in urine using head space-solid phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring. *Forensic Science International* **76** [3] (1995); 169-177
- [66] Centini, F.; Masti, A.; Comparini, I. B. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by head-space/solid phase microextraction (SPME) and GC/MS. *Forensic Science International* **83** [3] (1996); 161-166

- [67] Battu, C.; Marquet, P.; Fauconnet, A. L.; Lacassie, E.; Lachatre, G. Screening procedure for 21 amphetamine-related compounds in urine using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **36** [1] (1998); 1-7
- [68] Krogh, M.; Grefslie, H.; Rasmussen, K. E. Solvent-modified solid-phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* **689** [2] (1997); 357-364
- [69] Reubsaet, K. J.; Ragnar Norli, H.; Hemmersbach, P.; Rasmussen, K. E. Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase micro extraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experimental design strategies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18** [4-5] (1998); 667-680
- [70] Jinno, K.; Taniguchi, M.; Hayashida, M. Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17** [6] (1998); 1081-1091
- [71] Hall, B. J.; Satterfield-Doerr, M.; Parikh, A. R.; Brodbelt, J. S. Determination of cannabinoids in water and human saliva by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **70** [9] (1998); 1788-1796
- [72] Strano-Rossi, S.; Chiarotti, M. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *Journal of Analytical Toxicology* **23** [1] (1999); 7-10
- [73] Hall, B. J.; Parikh, A. R.; Brodbelt, J. S. Aqueous phase hexylchloroformate derivatization and solid phase microextraction: determination of benzoylecgonine in urine by gas chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences* **44** [3] (1999); 527-534
- [74] Musshoff, F.; Junker, H.; Madea, B. 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.* **24** [5] (2000); 372-376
- [75] Koster, E. H.; Wemes, C.; Morsink, J. B.; de Jong, G. J. Determination of lidocaine in plasma by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **739** [1] (2000); 175-182
- [76] Sporkert, F.; Pragst, F. Determination of lidocaine in hair of drug fatalities by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Analytical Toxicology* **24** [5] (2000); 316-322

- [77] Namera, A.; Watanabe, T.; Yashiki, M.; Iwasaki, Y.; Kojima, T. Simple analysis of tetracyclic antidepressants in blood using headspace-solid-phase microextraction and GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology* **22** [5] (1998); 396-400
- [78] Ulrich, S.; Martens, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **696** [2] (1997); 217-234
- [79] Saito, Y.; Kawazoe, M.; Havashida, M.; Jinno, K. Direct coupling of microcolumn liquid chromatography with in-tube solid-phase microextraction for the analysis of antidepressant drugs. *The Analyst* **125** [5] (2000); 807-809
- [80] Goncalves Silva, B. J.; Costa Queiroz, R. H.; Costa Queiroz, M. E. Simultaneous determination of nontricyclic antidepressants in human plasma by solid-phase microextraction and liquid chromatography (SPME-LC). *J. Anal. Toxicol.* **31** [6] (2007); 313-320
- [81] Krogh, M.; Johansen, K.; Tonnesen, F.; Rasmussen, K. E. Solid-phase microextraction for the determination of the free concentration of valproic acid in human plasma by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* **673** [2] (1995); 299-305
- [82] Nishikawa, M.; Seno, H.; Ishii, A.; Suzuki, O.; Kumazawa, T.; Watanabe, T. Simple analysis of diphenylmethane antihistaminics and their analogues in bodily fluids by headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **35** [6] (1997); 275-279
- [83] Hall, B. J.; Brodbelt, J. S. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **777** [2] (1997); 275-282
- [84] Ulrich, S.; Kruggel, S.; Weigmann, H.; Hiemke, C. Fishing for a drug: solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* **731** [2] (1999); 231-240
- [85] Callejon, R. M.; Gonzalez, A. G.; Troncoso, A. M.; Morales, M. L. Optimization and validation of headspace sorptive extraction for the analysis of volatile compounds in wine vinegars. *J. Chromatogr. A* **1204** [1] (2008); 93-103
- [86] Jalali-Heravi, M.; Parastar, H.; Ebrahimi-Najafabadi, H. Characterization of volatile components of Iranian saffron using factorial-based response surface modeling of ultrasonic extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* **1216** [33] (2009); 6088-6097
- [87] Kristoffersen, L.; Bugge, A.; Lundanes, E.; Slordal, L. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole

blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **734** (1999); 229-246

- [88] Kristoffersen, L.; Oiestad, E. L.; Opdal, M. S.; Krogh, M.; Lundanes, E.; Christophersen, A. S. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry - Method development and robustness testing by experimental design. *Journal of Chromatography B* **850** (2007); 147-160
- [89] Decaestecker, T. N.; Lambert, W. E.; Van Peteghem, C. H.; Deforce, D.; Van Bocxlaer, J. F. Optimization of solid-phase extraction for a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric general unknown screening procedure by means of computational techniques. *J. Chromatogr. A* **1056** [1-2] (2004); 57-65
- [90] Costa, S.; Barroso, M.; Castanera, A.; Dias, M. Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: a application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **396** (2010); 2533-2542
- [91] Moser, V. C.; MacPhail, R. C.; Gennings, C. Neurobehavioral evaluations of mixtures of trichloroethylene, heptachlor, and di(2-ethylhexyl)phthalate in a full-factorial design. *Toxicology* **188** (2003); 125-137
- [92] Bundesregierung der Bundesrepublik Deutschland. 31. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes. (2001) 31. BImSchV §2 Abs. 11
- [93] Institut für Arbeitsschutz. Flüchtige organische Substanzen. Zugriff am: 14-1-2011
- [94] Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M., . (2008) *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [95] U.S.National Library of Medicine. Substances. Zugriff am: 22-3-2011
- [96] Maurer, H. H., Pflieger, K., Weber, A. A. (2007) *Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites*, Wiley-VCH, Weinheim
- [97] Paul, L. D.; Musshoff, F. Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen (2009)
- [98] Külpmann, W. R. (2002) *Klinisch-toxikologische Analytik*, 1. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

- [99] Rivera, J. D.; Walker, G. S.; Sims, D. N.; Stockham, P. C. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of benzodiazepines in blood. *European Journal of mass spectrometry* **9** [6] (2003); 599-607
- [100] Fitzgerald, R. L.; Rivera, J. D.; Herold, D. A. Broad spectrum drug identification directly from urine, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* **45** [8] (1999); 1224-1234
- [101] Peters, F. T.; Drummer, O. H.; Musshoff, F. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165** [2-3] (2007); 216-224
- [102] Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** (1999); 1175-1185
- [103] Theodoridis, G.; Koster, E. H.; de Jong, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **745** [1] (2000); 49-82
- [104] Decaestecker, T. N.; Coopman, E. M.; Van Peteghem, C. H.; Van Bocxlaer, J. F. Suitability testing of commercial solid-phase extraction sorbents for sample clean-up in systematic toxicological analysis using liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **789** [1] (2003); 19-25
- [105] Saint-Marcoux, F.; Lachatre, G.; Marquet, P. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography--diode array detection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14** [1] (2003); 14-22
- [106] Poletti, A.; Huestis, M. A. Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphine, and buprenorphine-glucuronide in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **754** (2001); 447-459
- [107] Nordgren, H. K.; Beck, O. Direct screening in urine for MDMA and MDA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **27** [1] (2003); 1-5
- [108] Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75** [13] (2003); 3019-3030
- [109] Boran, H.; Capkin, E.; Altinok, I.; Terzi, E. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Exp. Toxicol. Pathol.* **in press** (2010)

- [110] Arce, G. T.; Gordon, E. B.; Cohen, S. M.; Singh, P. Genetic toxicology of folpet and captan. *Crit. Rev. Toxicol.* **40** [6] (2010); 546-574
- [111] van Welie, R. T. H.; van Duyn, P.; Lamme, E. K.; Jäger, P.; van Baar, B. L. M.; Vermeulen, N. P. E. Determination of tetrahydrophthalimide and 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid, urinary metabolites of the fungicide captan, in rats and humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **63** [3] (1991); 181-186
- [112] Krieger, R. I.; Dinoff, T. M. Captan fungicide exposures of strawberry harvesters using THPI as a urinary biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **38** [3] (2000); 398-403
- [113] Hines, C. J.; Deddens, J. A.; Jaycox, L. B.; Andrews, R. N.; Striley, C. A. F.; Alavanja, M. C. R. Captan exposure and evaluation of a pesticide exposure algorithm among orchard pesticide applicators in the agricultural health study. *Ann. Occup. Hyg.* **52** [3] (2008); 153-166
- [114] Chodorowski, Z.; Anand, J. S. Acute oral suicidal intoxication with captan - a case report. *Journal of Toxicology* **41** [5] (2003); 603
- [115] Chodorowski, Z.; Anand, J. S.; Waldman, W. Ostre doustne samobójcze zatrucie captanem - opis przypadku. *Przegląd Lekarski* **61** [4] (2004); 437-438
- [116] Angioni, A.; Garau, V. L.; Aguilera del Real, A.; Melis, M.; Minelli, E. V.; Tuberoso, C.; Cabras, P. GC-ITMS determination and degradation of captan during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003); 6761-6766
- [117] Seidler, H.; Härtig, H.; Schnaak, W.; Engst, R. Untersuchungen über den Metabolismus einiger Insektizide und Fungizide in der Ratte. *Die Nahrung* **15** [2] (1971); 177-185
- [118] Gordon, E. B.; Ehrlich, T. E.; Mobley, S.; Williams, M. Measurement of the reaction between the fungicides captan or folpet and blood thiols. *Toxicological Methods* **11** (2001); 209-223
- [119] Engst, R.; Raab, M. Zum Metabolismus fungizider Phthalimid-Derivate in lebensmittelchemisch-toxikologischer Sicht. *Die Nahrung* **17** [7] (1973); 731-738
- [120] Anastos, N.; McIntyre, I. M.; Lynch, M. J.; Drummer, O. H. Postmortem concentrations of citalopram. *Journal of Forensic Sciences* **47** (2002); 882-884
- [121] Greenaway, C.; Ratnaraj, N.; Sander, J. W.; Patsalos, P. N. Saliva and serum lacosamide concentrations in patients with epilepsy. *Epilepsia* **52** [2] (2011); 258-263