

**Anwendungen der Headspace-Festphasenmikroextraktion
in der forensischen Analytik unter besonderer
Berücksichtigung der Haaranalyse**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Lebensmittelchemiker Frank Sporkert

geboren am 06. November 1969 in Brandenburg an der Havel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. Jürgen Liebscher

2. Prof. Dr. Fritz Pragst

3. Prof. Dr. Hans Jürgen Stan

Tag der mündlichen Prüfung:

07. Dezember 2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1 Festphasenmikroextraktion	4
2.1.1 Konstruktionsprinzip und Ablauf	4
2.1.2 Theorie der Festphasenmikroextraktion	8
2.1.2.1 Zwei- und Dreiphasengleichgewichte	8
2.1.2.2 Extraktion bei Nichterreichen des Gleichgewichtszustandes	10
2.1.2.3 Einflüsse von SPME-Parametern	12
2.2 Haaranalytik	19
2.2.1 Morphologische und physiologische Grundlagen der Haaranalytik	19
2.2.1.1 Morphologie und Histochemie	19
2.2.1.2 Wachstumsphasen der Haare	21
2.2.1.3 Einlagerung von Substanzen ins Haar	21
2.2.2 Extraktions- und Nachweismethoden von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen	25
2.2.2.1 Probennahme und Probenvorbereitung	25
2.2.2.2 Extraktionsverfahren	26
2.2.2.4 Instrumentelle Analytik	28
2.3 Grundlagen der Kapillargaschromatographie und Massenspektrometrie	29
2.3.1 Kapillargaschromatographie	29
2.3.2 Massenspektrometrie	29
2.3.2.1 Funktionsprinzip	29
2.3.2.2 Ionisierungsverfahren	30
2.3.2.3 Messmodi des Massenspektrometers	31
3 LITERATURÜBERSICHT ZU ANWENDUNGEN DER HEADSPACE-FEST-PHASEN-MIKROEXTRAKTION IN DER TOXIKOLOGISCHEN ANALYSE	32
4 EXPERIMENTELLER TEIL	34
4.1 Geräte	34
4.1.1 SPME	34
4.1.2 Geräte der Probenvorbereitung	34
4.1.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	35
4.2 Chemikalien	35
4.3 Probenasservierung	37
4.3.1 Haarproben	37
4.3.2 Haarvorbehandlung	37
4.3.3 Anlegen eines Haarpoools	37
4.3.4 Blut- und Serumproben	38

4.4 Probenaufarbeitung und Festphasenmikroextraktion	38
4.4.1 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge bei manueller SPME	38
4.4.2 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge bei automatischer SPME	38
4.4.3 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge, <i>in sample</i> Derivatisierung mit Alkylchloroformiaten und automatischer SPME	39
4.4.4 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge bei automatischer SPME und anschließender <i>on fiber</i> Derivatisierung mit MBTFA	39
4.4.5 Lösungsmittlextraktion der Haare zum Nachweis von Fettsäureethylestern	39
4.4.6 Lösungsmittlextraktion zum Nachweis von Clomethiazol aus Haaren	40
4.4.7 Extraktion von Valproinsäure und Trichlorethanol aus Serum- und Urinproben	40
4.4.8 Extraktion und <i>on fiber</i> Derivatisierung zum Nachweis von Monofluoressigsäure aus Serum, Urin, Mageninhalt und Niere	41
4.4.9 Übersicht zur Probenvorbereitung	41
4.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	43
4.6 Kalibration, Quantifizierung, Extraktionsausbeuten	45
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	47
5.1 Kombination der alkalischen Hydrolyse von Haarproben mit der HS-SPME	47
5.1.1 Einfluss der Struktur und Siedepunkte einzelner Substanzen auf die Eignung für die HS-SPME	47
5.1.2 Lidocain	54
5.1.2.1 Allgemeines	54
5.1.2.2 Methodenoptimierung	55
5.1.2.3 Lidocainkonzentrationen in Haarproben von Drogentodesfällen	59
5.1.3 Methadon und Metabolite	64
5.1.3.1 Allgemeines	64
5.1.3.2 Methodenoptimierung	66
5.1.3.3 Anwendung auf Haarproben von Drogentodesfällen	71
5.2 Kombination der alkalischen Hydrolyse von Haarproben mit Derivatisierung und HS-SPME	73
5.2.1 Synthetische Drogen vom Amphetamintyp	74
5.2.1.1 Allgemeines	74
5.2.1.2 Analytik	74
5.2.1.3 Optimierung der „in sample“ Derivatisierung mit n-Butylchloroformiat (BCF)	76
5.2.1.4 „On fiber“ Derivatisierung mit MBTFA	80
5.2.1.5 Anwendungen beider Derivatisierungsmethoden auf reale Haarproben	82
5.2.2 Antidepressiva	84
5.2.2.1 Allgemeines	84
5.2.2.2 Analytik	85
5.2.2.3 Methodenoptimierung	89
5.2.2.4 Untersuchung von realen Proben	92
5.2.3 Diphenhydramin und Nordiphenhydramin	95
5.2.3.1 Allgemeines	95
5.2.3.2 Analytik	95
5.2.3.3 Untersuchung von realen Proben	97

5.2.4 Amantadin	98
5.2.4.1 Allgemeines	98
5.2.4.2 Analytik	99
5.2.4.3 Untersuchung einer realen Probe	100
5.3 Kombination der Lösungsmittelextraktion von Haaren mit der HS-SPME	102
5.3.1 Fettsäureethylester als Alkoholismusmarker im Haar	102
5.3.1.1 Allgemeines	102
5.3.1.2 Analytik der FSEE	103
5.3.1.3 Optimierung des Verfahrens	105
5.3.1.4 Anwendungen auf Haarproben	111
5.3.2 Clomethiazol	116
5.3.2.1 Allgemeines	116
5.3.2.2 Analytik	116
5.3.2.3 Clomethiazol in Haarproben von Todesfällen	117
5.4 Untersuchungen aus Blut, Urin und Mageninhalt	118
5.4.1 Monofluoressigsäure	118
5.4.1.1 Allgemeines	118
5.4.1.2 Analytik	119
5.4.1.3 Optimierung	120
5.4.2 Valproinsäure	124
5.4.2.1 Allgemeines	124
5.4.2.2 Analytik	125
5.4.2.3 Nachweis aus klinischen und forensischen Proben	127
5.4.3 Trichlorethanol	127
5.4.3.1 Allgemeines	127
5.4.3.2 Analytik	128
5.4.3.3 Nachweis aus klinischen und forensischen Proben	130
6 SCHLUSSFOLGERUNGEN	131
7 ZUSAMMENFASSUNG	134
8 LITERATURVERZEICHNIS	138
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	148
LEBENS LAUF	149

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALAT	Alaninaminotransferase
BCF	n-Butylchloroformiat
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CDT	Carbohydrat deficient Transferrin (Kohlenhydrat-defizitäres Transferrin)
DTT	1,4-Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzen
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin
EI	Electron Impact (Elektronenstoßionisation)
EMDP	2-Ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrrolin
FID	Flammenionisationsdetektor
FSEE	Fettsäureethylester
GC	Gaschromatographie
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Headspace (Dampfraum)
ID	Innendurchmesser
ISTD	Interner Standard
LC	Liquid Chromatography
LLE	Liquid/Liquid Extraction (Flüssig/Flüssig-Extraktion)
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
M ⁺	Molpeak
MA	Methamphetamin
MAM	Monoacetylmorphin
MBTFA	N-Methyl-bis-trifluoracetamid
MCF	Methylchloroformiat
MCV	Mittleres korpuskulares Erythrocytenvolumen
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylendioxyethamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
MFAA	Monofluoroacetic acid (Monofluoressigsäure)
MG	Molgewicht in g/mol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
PA	Polyacrylat
PDAM	1-Pyrenyldiazomethan
PDMS	Polydimethylsiloxan
RIA	Radioimmunoassay
RT	Retentionszeit
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SPME	Solid Phase Microextraction
TEA	Triethylamin
TFAA	Trifluoroacetic acid anhydride
THC	Tetrahydrocannabinol
TPR	Templated Resin (Harz)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Geserick für die Möglichkeit, dieses Thema am Institut für Rechtsmedizin der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin bearbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. F. Pragst für die fachliche Betreuung, die immer wieder fruchtbringenden und inspirierenden Diskussionen und für die zahlreichen Motivationsschübe bei der Erstellung der Arbeit. Dank auch für die finanzielle Unterstützung zur Teilnahme an Kongressen und Weiterbildungsveranstaltungen.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung Toxikologische Chemie und die Ärzte und Assistenten der Sektionsabteilung für die Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten.

Besonderer Dank gebührt Herrn V. Auwärter und Herrn M. Bohnenkamp für ihr Engagement bei der Bearbeitung von Teilprojekten der Arbeit und für die Probenbeschaffung.

Last but not least danke ich ganz herzlich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung bei der Bewältigung alltäglicher Probleme und für die Geduld und Akzeptanz bei Studium und Promotion sowie meinen Freunden für die moralische Aufbauarbeit und die zahlreichen Anregungen.

Diese Arbeit wurde finanziell u.a. durch Projektfördermittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

1 Einleitung

Neben moderner gerätetechnischer Ausstattung, die heute in fast jedem chemisch analytischem Labor zur Verfügung steht, ist die Probenaufarbeitung von besonderer Bedeutung. Das gilt nicht nur für eine ausreichende Empfindlichkeit durch spezifische Reinigung und Aufkonzentrierung der Probenmatrix, sondern auch aus ökonomischer Sicht. Gerade die Haaranalytik bedarf einer zeitintensiven Probenvorbereitung. Je nach zu untersuchendem Analyten sind hier von der Probennahme bis zur Auswertung bis zu zwei Arbeitstage nötig.

Für gewöhnlich erfordert die Analyse von illegalen Drogen oder von therapeutisch verabreichten Medikamenten aus Haaren durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie die Extraktion oder Hydrolyse der gereinigten und zerkleinerten Haarmatrix, einen anschließenden Anreicherungs- und Reinigungsschritt durch Festphasenextraktion und eine Derivatisierung [1;2]. Diese Arbeitsschritte sind zeitaufwendig, und qualifiziertes Personal ist erforderlich, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Probenaufarbeitung über den Dampfraum durch Anwendung der einfachen Headspace-Gaschromatographie ist andererseits beschränkt auf flüchtige Substanzen, und die Kombination mit der Massenspektrometrie ist wegen des hohen Anteils an Luft in der injizierten Probe problematisch. Des Weiteren ist die Empfindlichkeit in der Regel nicht ausreichend, um Substanzen im zu erwartenden Konzentrationsbereich nachzuweisen. Andererseits liefert die Headspace-Technik sehr saubere Extrakte auch aus problematischen Matrices, wozu auch die Haare gezählt werden können.

Die Festphasenmikroextraktion, engl. Solid-Phase Microextraction (SPME), hat sich als eine Möglichkeit erwiesen, Vorteile der Festphasenextraktion mit denen der Probennahme aus dem Dampfraum zu verbinden.

Die SPME wurde Anfang der 90er Jahre von Pawliszyn und Mitarbeitern an der University of Waterloo entwickelt und hat sich, seit erste kommerzielle Anwendungen erhältlich waren, in der Umwelt-, der Lebensmittel-, der pharmazeutischen und der forensischen Toxikologie wie auch in der Aromaanalytik als Alternativmethode für die empfindliche und schnelle, qualitative wie auch quantitative Analyse etabliert. Als Vorteile erwiesen sich dabei die Vereinigung von Extraktions- sowie Injektionsmedium, die lösungsmittelfreie Extraktion, die Zeitersparnis, die mehrmalige Verwendbarkeit der eingesetzten Spezialfasern sowie die geringen apparativen Voraussetzungen und die gute Kopplungsmöglichkeit mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie, aber auch mit der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und der Kapillarelektrophorese (CE).

Am Anfang lag der Schwerpunkt des Einsatzes der SPME im Bereich der Umweltanalytik und der chemischen Industrie bei der Analyse von Wasserproben [3-6], von Luft, Kohlenwasserstoff- oder Lösungsmittelgemischen. Schnell etablierte sich die SPME auch bei Untersuchungen von Aromakomponenten in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie [7;8]. In der forensischen Analytik setzte sich die SPME dann zunächst bei der Identifizierung von Benzinproben und Brandbeschleunigergemischen durch.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Anwendungen der SPME in der toxikologischen und forensischen Chemie unter besonderer Berücksichtigung der Haaranalytik. In der Literatur beziehen sich die meisten Applikationen auf den Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen aus Blut und Urin, da diese Matrices die größte Bedeutung für die forensische Analytik aufweisen. Aber die Haaranalytik hat in den letzten zehn Jahren dank empfindlicherer Gerätetechnik und verstärkter Forschung auf dem Gebiet der Extraktion in der Forensik stark an Bedeutung gewonnen. Während Jahrzehnte lang die Bestimmung von Schwermetallen wie Blei, Arsen, Thallium und Quecksilber im Vordergrund stand [9-12], wird die Haaranalyse seit den 80er Jahren auch für den Nachweis organischer Verbindungen wie Drogen und Medikamentenwirkstoffe herangezogen. Dabei machte man sich als Analysetechnik zunächst den Radioimmunoassay (RIA) und die Dünnschichtchromatographie zu nutze [13-16]. Mit immer breiterer Verfügbarkeit preiswerter Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Benchtop-Geräte mit Quadrupol-Technologie kam es ab Ende der 80er Jahre zu einem rasanten Anstieg der Publikationen zu diesem Thema. Kintz et al. gelang der Nachweis von 6-Monoacetylmorphin als Marker des Heroins [17], Goldberger et al. wiesen erstmals Heroin im Haar nach [18], Balabanova et al. Cocain [19], Methadon [20] und Tetrahydrocannabinol (THC) [21] und Ishiyama et al. Methamphetamin, Antidepressiva und Nicotin [22]. So ist es heute möglich, durch Haaranalyse einen länger zurückliegenden Drogen- oder Medikamentenkonsum zu diagnostizieren, einen chronischen Abusus nachzuweisen oder eine Abstinenz- oder Therapiekontrolle durchzuführen. Das ist besonders dann wichtig, wenn es um die Frage der Fahreignung nach einem nachgewiesenen Drogenmissbrauch oder um eine verminderte Schuldfähigkeit nach einer Straftat unter Drogeneinfluss und Abhängigkeit geht. Große Probleme bereitet nach wie vor die Interpretation der analytisch gewonnenen Ergebnisse, da kein direkter Zusammenhang zwischen aufgenommener Dosis und Konzentration im Haar besteht. Hinzu kommt, dass kein einheitliches Verfahren zur Bestimmung der einzelnen Wirkstoffe existiert. Das führt zu beträchtlichen Schwankungen der Ergebnisse durch unterschiedliche Extraktionsverfahren [2]. Das bewiesen die ersten, Mitte der 90er Jahre unter Leitung der „Society of Hair Testing“ durchgeführten Ringversuche. Auch zeitliche Rückschlüsse zum Konsum bzw. zur Aufnahme der Substanzen bereiten aufgrund schwankender und nicht exakt bestimmter Wachstumsgeschwindigkeit der Haare des

Probanden und ungenauer Probennahme Probleme [23].

In der forensischen Analytik darf natürlich auch nicht die Bedeutung der Haare als wichtige Spur vergessen werden. Die Polymerase Chain Reaction (PCR) hat es ermöglicht, die DNA aus dem Haar zu vervielfältigen. Nach DNA-Sequenzierung und Vergleich kann die Haarprobe idealerweise einer Person zugeordnet werden [24;25].

Nachdem für viele forensisch bedeutende Substanzen eine Nachweismethode erarbeitet wurde, bestand die Zielstellung dieser Arbeit darin, mit Hilfe der Festphasenmikroextraktion neue und schnellere Analyseverfahren zum Nachweis relevanter Substanzen im Haar zu entwickeln. Das sollte vor allem durch die alkalische Hydrolyse der Haare und anschließende Headspace-SPME erreicht werden. Dafür sind die Hydrolysestabilität und ein ausreichender Dampfdruck der Substanzen die wichtigsten Voraussetzungen. Es sollte überprüft werden, inwieweit durch Kombination mit Derivatisierungsmethoden die Anwendbarkeit der SPME auch auf die polareren Wirkstoffmetabolite, die häufig durch Demethylierung entstehen, ausgedehnt werden kann. Die fehlenden Derivatisierungsmöglichkeiten und damit verbundene beschränkte Aussage- und Beweiskraft der Analysen mussten bislang als ein Nachteil der SPME angesehen werden. Des Weiteren sollte in Fortsetzung der Dissertationsarbeit von Spiegel [26] mit Hilfe der SPME eine Methode zum Nachweis von Fettsäureethylester als Alkoholmarker im Haar entwickelt werden. Schließlich sollte die Anwendbarkeit der SPME in der Routine- und Notfallanalytik vor allem für den Nachweis mittelflüchtiger Verbindungen aus Blut und Urin, die bei routinemäßiger Untersuchung des Probenmaterials mittels Headspace-GC-FID, Festphasenextraktion und GC-MS bzw. Flüssig/Flüssig-Extraktion und HPLC-DAD nicht erfasst wurden, beispielhaft für einige relevante toxikologische Substanzen untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Festphasenmikroextraktion

2.1.1 Konstruktionsprinzip und Ablauf

Die Festphasenmikroextraktion (SPME) ist eine lösungsmittelfreie Probenaufarbeitungsmethode. Sie beruht wie alle anderen Aufarbeitungsmethoden auf der Verteilung des Analyten zwischen Probenmatrix und Extraktionsmedium. Die SPME ist wie die Festphasenextraktion (SPE) eine sorbensbezogene Extraktion im Gegensatz zur sorbensfreien Gasphasen- bzw. Headspace-Extraktion. Das Sorbens stellt hier eine beschichtete Quarzglasfaser von 1,5 cm Länge und einem Durchmesser von ca. 0,3 mm (je nach Beschichtung) dar. Die Firma Supelco stellt verschiedene Beschichtungen her, die die unterschiedliche Polarität und Flüchtigkeit der Analyten berücksichtigen. Die letzten 0,5 cm der Faser werden mittels Epoxykleber in eine Mikrokanüle aus Metall eingeklebt. Von außen wird die Faser durch eine Spritzennadel geschützt, die auch ein Durchstechen von Septen ermöglicht. Die Faser kann, wie in Abbildung 1 dargestellt ist, über einen Stempel für den Adsorptions- und Desorptionsvorgang aus der Kanüle ausgefahren werden.

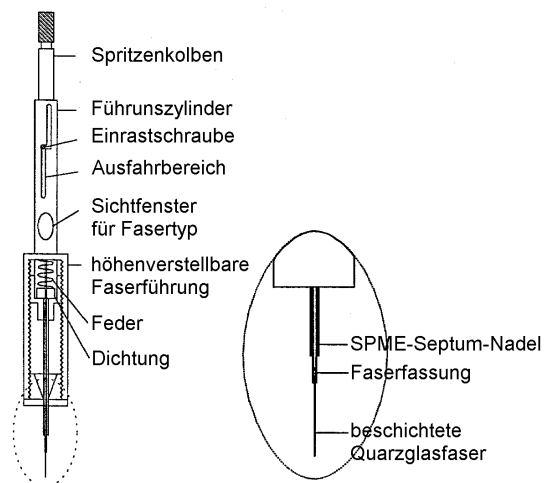


Abbildung 1: Design des manuellen SPME-Probensamplers von Supelco

Pawliszyn nutzte bei seinen ersten Versuchen Ende der 80er Jahre unbeschichtete und mit flüssigen oder festen Polymerphasen beschichtete Quarzfasern, die er in wässrige Lösungen eintauchte und anschließend in den GC-Injektor einführte [27]. Nach erfolgreichen Versuchen ersetzte er den Kolben einer 7000 Hamilton[®]-Mikrospritze mit einer Mikrokanüle mit

einem Innendurchmesser leicht größer als der Außendurchmesser der beschichteten Quarzglasfaser. In den darauffolgenden Jahren entwickelte er verschiedene Probennehmer, die die unterschiedlichen Matrices und wichtige Einflussgrößen auf die Extraktion berücksichtigten. So wurden modifizierte SPME-Sampler für die Atem-, Luft- und Feldanalytik sowie ein CO₂-gekühlter für bessere Extraktionsausbeuten konstruiert. Diese sind aber heute nicht oder nur abgewandelt kommerziell erhältlich. Der alleinige Hersteller Supelco bietet im 2001er Katalog für die Chromatographie und Probenvorbereitung einen Faserhalter für die manuelle und einen für die automatische Extraktion und Injektion (gleichzeitig für die GC-MS und die HPLC-Analyse) sowie einen mobilen Field-Sampler an.

Für alle Halter gibt es verschiedene Fasertypen, die nicht nur im Material, sondern auch in der Schichtdicke und der Stabilität differieren. Tabelle 1 zeigt die derzeit bei Supelco angebotenen Fasern und die entsprechenden Verwendungszwecke (Herstellerangaben).

Tabelle 1: SPME-Fasern und vorgesehener Einsatzbereich (Angaben des Herstellers)

Material	Schichtdicke in μm	Bindung an den Fused-Silica-Kern	Einsatzbereich
Polydimethylsiloxan (PDMS)	7	gebunden	für unpolare, hochmolekulare Verbindungen (MG: 125-600)
	30	ungebunden	für unpolare, halbflüchtige Verbindungen (MG: 80-500)
	100	ungebunden	für flüchtige Verbindungen (MG: 60-275)
Polyacrylat (PA)	85	partiell vernetzt	für polare, halbflüchtige Verbindungen (MG: 80-300)
PDMS/Divinylbenzen (DVB)	65	partiell vernetzt	für flüchtige Verbindungen, Amine und Nitroaromaten (MG: 50-300)
	60	partiell vernetzt	für Amine und polare Verbindungen (nur für HPLC)
Carboxen/PDMS	75 und 85	partiell vernetzt	für Gase und niedermolekulare Verbindungen (MG: 30-225)
Carbowax/DVB	65 und 70	partiell vernetzt, fest gebunden	für Alkohole und polare Verbindungen (MG: 40-275)
DVB/Carboxen an PDMS	50/30	fest gebunden	für Aromen und Geruchsstoffe (MG: 40-275)
Carbowax/Harz	50	partiell vernetzt	für oberflächenaktive Stoffe (nur für HPLC)

Die SPME-Fasern sind nach Konditionierung im Injektorblock (Temperatur und Zeit abhängig vom Fasertyp) und einem GC-Leerlauf für die Analyse einsetzbar. Im Gegensatz zu den bei der Säulenextraktion verwendeten Festphasenextraktionskartuschen sind die SPME-Fasern nach Desorption bzw. Konditionierung wiederholt einsetzbar. Je nach Matrix und Injekti-

onsmodus sind so bis zu 200 Extraktionen und Injektionen möglich. Die Kosten je Extraktion betragen bei 100 maliger Verwendung nur 0,65 € gegenüber ca. 2 € bei einer SPE-Kartusche (Preise nach 2000er Katalogen gerundet). Da auch kein Lösungsmittel verbraucht wird, ergibt sich aus ökonomischer Sicht ein bedeutender finanzieller Vorteil gegenüber der SPE.

Die SPME benötigt normalerweise nur zwei Arbeitsschritte: 1. Adsorption der Substanzen aus der vorbereiteten Probenmatrix und 2. Desorption der adsorbierten Verbindungen im GC-Injektor bei hohen Temperaturen. Optional kann noch eine Derivatisierung hinzukommen. Der Adsorptionsschritt erfolgt entweder bei direkt in die Probe eingetauchter SPME-Faser, mittels Headspace-Extraktion der Substanzen über der Probenlösung oder über festem Probenmaterial (z.B. Boden- oder Organproben) oder durch membrangeschützte SPME.

Für die praktische Durchführung der Extraktion im manuellen Modus werden, wie in Abbildung 2 ersichtlich, ein SPME-Halter (Stativ o.ä.), ein Heizblock sowie optional eine Magnetrührplatte und ein Rührfisch benötigt. Der Einsatz eines Magnetrührers sollte nur bei exakt einstellbarer Rührgeschwindigkeit erfolgen, da es ansonsten zu verzögerter bzw. beschleunigter Gleichgewichtseinstellung kommt.

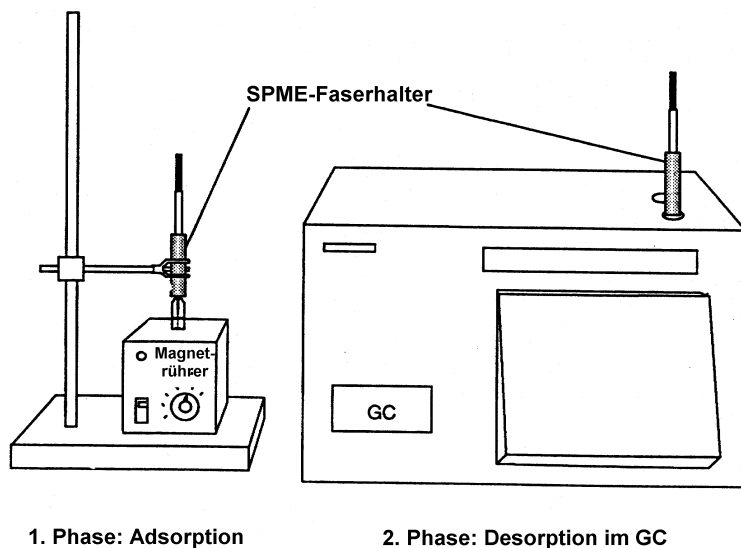


Abbildung 2:
SPME in manueller Durchführung:
1.Phase: Gleichgewichtseinstellung
zwischen Faser und Probenmatrix,
2. Phase: Transfer der Faser in das
Analysegerät und Desorption.

Mittlerweile lässt sich die SPME auch automatisieren. Die Firmen Varian und CTC bieten Autosampler für die Extraktion an, die ein Temperieren und Schütteln der Probe ermöglichen. Abbildung 3 zeigt den von Gerstel als MPS2 vertriebenen Mehrzweckautosampler mit SPME-Option.

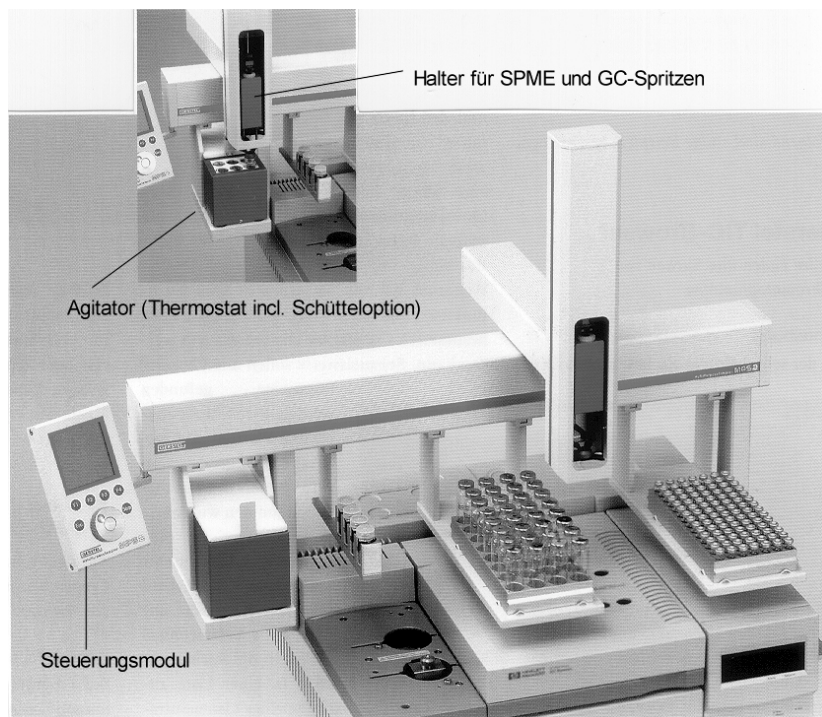


Abbildung 3:
Darstellung des MPS2 Auto-
samplers von Gerstel auf einem
HP 6890 GC, im Bildausschnitt die
Agitatoreinheit.

Die Desorption erfolgt bei der GC ohne zusätzliches Interface im Injektorblock. Für leichtflüchtige Verbindungen sollte ein spezieller SPME-Insertliner mit nur 0,75 mm Innendurchmesser verwendet werden, da es bei den sonst üblichen Linern mit einem ID von meist 4 mm zu einer Peakverbreiterung infolge des größeren Volumens im Injektor und somit zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis kommt. Für die HPLC ist eine Kopplungsvorrichtung nötig, was Mehrkosten von derzeit ca. 1750 € bedeutet.

Da die Extrahierbarkeit polarer Substanzen aus biologischen Matrices und/oder die chromatographische Trennung an Kapillarsäulen Probleme bereiten, ist für die Analyse häufig eine Derivatisierung notwendig. Dafür gibt es theoretisch verschiedene Möglichkeiten:

- Direkte Derivatisierung in der Probenmatrix:

Das Derivatisierungsreagenz wird direkt in die Probenlösung gegeben. Nach Ablauf der Reaktionszeit bei optimierten Bedingungen erfolgt die Extraktion der derivatisierten Analyten aus der Probenmatrix. Da die meisten Derivatisierungsreagenzien hydrolyseempfindlich sind, eignen sich nur wenige für die *in vivo* Derivatisierung. Als Beispiel für hydrolysestabile Derivatisierungsreagenzien seien hier die Chlorameisensäureester erwähnt, die auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen [28].

- Derivatisierung an der SPME-Faser:

Bei dieser Form der Derivatisierung lassen sich hinsichtlich der Durchführung zwei Verfahren anwenden, die sich hinsichtlich der Reihenfolge bei der Extraktion unterscheiden:

1. Die Analyten werden aus der Lösung mittels SPME extrahiert. Anschließend taucht die Faser direkt in das Derivatisierungsreagenz oder in den Dampfraum darüber bei vorher optimierten Bedingungen ein. Die Umsetzung der Analyten erfolgt dabei direkt an der SPME-Faser. Geeignet sind hierfür sowohl Acetylierungs- als auch Silylierungsreagenzien.
 2. Die SPME-Faser wird zunächst durch Eintauchen in das Derivatisierungsreagenz beladen. Anschließend erfolgt die Adsorption der Analyten an der Faser in einem separaten Gefäß. Die Umsetzung mit dem Derivatisierungsreagenz sollte dabei möglichst sehr schnell erfolgen. Hierfür eignen sich besonders reaktive und schwer verdampfbare Derivatisierungsreagenzien wie das auch in dieser Arbeit verwendete Pyrenyldiazomethan für die Derivatisierung von kurzkettigen Fettsäuren.
- Derivatisierung im GC-Injektorblock [27]
 Sie findet bei hohen Temperaturen im Injektorblock des Gaschromatographen statt. So lassen sich z.B. langkettige Fettsäuren als Ionenpaar extrahieren, wenn die Probe mit Tetramethylammoniumhydrogensulfat versetzt wurde [29]. Im Injektor werden die Analyten desorbiert und derivatisiert.

2.1.2 Theorie der Festphasenmikroextraktion

2.1.2.1 Zwei- und Dreiphasengleichgewichte

Die SPME ist eine Gleichgewichtstechnik, deren Grundlage die Verteilung der Analyten zwischen einer wässrigen oder gasförmigen Phase und der beschichteten Phase der SPME-Faser ist. Im einfachsten Fall handelt es sich um ein Zweiphasensystem, bei dem die Faser direkt in die zu untersuchende Lösung eintaucht. Die Konzentrationsverhältnisse im Gleichgewicht werden durch Gl. (1) beschrieben.

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

mit

- c_0 = Anfangskonzentration des Analyten in der Probenmatrix
- V_s = Probenvolumen
- c_f^∞ = Gleichgewichtskonzentration in der Faser
- V_f = Volumen der Faser
- c_s^∞ = Gleichgewichtskonzentration in der Matrix

Wenn man für c_f^∞ / c_s^∞ die Faser/Probenmatrix-Gleichgewichtskonstante K_{fs} einsetzt und Gl. (1) umstellt, lässt sich die extrahierte Stoffmenge $n = c_f^\infty V_f$ nach Gl. (2) unter Berücksichtigung folgender Annahmen und Voraussetzungen berechnen:

- Die Matrix wird als homogene Phase betrachtet.

- Adsorptionsinteraktionen in komplexen Matrices zwischen einzelnen Analyten oder zwischen Analyten und Gefäßwand bleiben unberücksichtigt.
- Es finden keine Biodegradationsprozesse oder ein thermisch bedingter Abbau während der Analyse statt.
- Das Sorbens der Faserbeschichtung ist von konstanter Porösität.
- Die thermische Ausdehnung der Polymere in der Faser wird vernachlässigt.
- Es wird solange extrahiert, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist.

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

K_{fs} = Verteilungskoeffizient Faser/Probe

Aus Gl. (2) ergibt sich für sehr große Probenvolumina ($V_s \gg V_f K_{fs}$) Gl. (3)

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot c_0 \quad (3)$$

Die extrahierte Stoffmenge ist demnach nicht mehr vom Probenvolumen abhängig. Sie ist direkt proportional zum Verteilungskoeffizienten K_{fs} , zur Probenkonzentration c_0 und Faservolumen V_f . Unter konstanten Bedingungen ergibt sich somit eine direkte Proportionalität zwischen Probenkonzentration und extrahierter Stoffmenge.

Bei der in dieser Arbeit ausschließlich angewandten Headspace-SPME handelt es sich um ein Dreiphasengleichgewichtssystem, bei dem sich die Analyten während der Extraktion in der Probenmatrix, im Dampfraum und im Faserpolymer befinden. Auch hier sollte die totale Menge während der Extraktion konstant bleiben, so dass die Anfangsstoffmenge n_0 des Analyten in der Matrix der Summe der Stoffmengen in den einzelnen Phasen zum Zeitpunkt des Erreichens des Gleichgewichtszustandes entspricht (Gl. 4).

$$c_0 V_s = c_f^\infty V_f + c_h^\infty V_h + c_s^\infty V_s \quad (4)$$

mit

c_h^∞ = Gleichgewichtskonzentration im Dampfraum

V_h = Volumen des Dampfraums

Wenn man für c_f^∞ / c_h^∞ die Faser/Headspace-Gleichgewichtskonstante K_{fh} und für c_h^∞ / c_s^∞ die Headspace/Matrix-Gleichgewichtskonstante K_{hs} einsetzt und die Gültigkeit des idealen Gasgesetzes annimmt, dann erhält man für die Menge des an der Faser adsorbierten Analyten, $n = c_f^\infty V_f$, die Gl. (5):

$$n = \frac{K_{fh} \cdot K_{hs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fh} \cdot K_{hs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (5)$$

Setzt man für $K_{fh} \cdot K_{hs}$ den Verteilungskoeffizienten K_{fs} ein, was zulässig ist, wenn der Dampfdruck des Lösungsmittels vernachlässigt wird, so erhält man Gl. (6):

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (6)$$

Die Terme im Nenner geben Auskunft über die Aufnahmekapazität jeder einzelnen Phase, $K_{fs} \cdot V_f$ über die Faser, $K_{hs} \cdot V_h$ über den Dampfraum und V_s über die Probe selbst. Für die meisten Analyten ist K_{hs} relativ klein (z.B. Benzol $K_{hs} = 0,26$ [27]). Wenn man außerdem das Headspace-Volumen gegenüber dem Probenvolumen klein halten kann, wird der Term $K_{hs} \cdot V_h$ vernachlässigbar und Gl. (6) geht in Gl. (2) und gegebenenfalls in Gl. (3) über. Unter dieser Annahme gelten Gl. (2) und Gl. (3) für SPME-Analysen sowohl mit als auch ohne Dampfraum, so dass die Extraktionsausbeuten beider Verfahren ähnliche Ergebnisse liefern sollten.

Aus praktischen Gründen konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Dampfraum nicht kleiner als das Probenvolumen gehalten werden, da es durch die Funktionsweise des Agitators des MPS2-Autosamplers ansonsten zu einer Beschädigung der Faser infolge Benetzung mit Matrix gekommen wäre. Jedoch ist K_{hs} für die untersuchten Verbindungen sehr viel kleiner als 1, so dass die obige Annahme trotzdem weitgehende Gültigkeit besitzt.

Während der HS-SPME variieren die Konzentrationen innerhalb der Probenlösung und in der Faser durch die Ausbildung von Konzentrationsgradienten sehr stark, während sie im Dampfraum relativ konstant bleiben. Das beruht auf den im Dampfraum um bis zu 5 Zehnerpotenzen größeren Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu den kondensierten Phasen. Der Konzentrationsgradient, der in der Faser und in der Lösung (nur bei statischer HS-SPME ohne Agitation) bei Beginn der Extraktion besteht, sinkt mit fortschreitender Dauer.

2.1.2.2 Extraktion bei Nichterreichen des Gleichgewichtszustandes

Wird die Extraktion nicht bis zum vollständigen Erreichen des Gleichgewichtes zwischen den einzelnen Phasen durchgeführt, dann muss der Massentransfer zwischen Probenmatrix und Faserpolymer und von der Oberfläche der Polymerphase in die inneren Schichten der SPME-Faser berücksichtigt werden. Diese Massendiffusion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Extraktion. Das kann für das Zweiphasensystem Probenmatrix/SPME-Faserpolymer durch das erste Fick'sche Diffusionsgesetz (Gl. 7) ausgedrückt werden. Es besagt, dass der Massenfluss F proportional zum Konzentrationsgradienten ist.

$$F = -D_1 \frac{dc_s}{dx} = -D_2 \frac{dc_f}{dx} \quad (7)$$

mit

F = Massenflussrate des Analyten von der Probenmatrix an die Polymeroberfläche
 D_1 = Diffusionskoeffizient des Analyten in der Probenmatrix
 D_2 = Diffusionskoeffizient des Analyten in der Polymerphase
 dc/dx = Konzentrationsgradient

Der Massentransfer für ein ausbalanziertes System sollte in beiden Phasen gleich sein. Die Flussrate F sollte der SPME-Adsorptionsrate dn/dt proportional und zur Oberfläche A der SPME-Faser umgekehrt proportional sein:

$$F = \frac{1}{A} \frac{dn}{dt} \quad (8)$$

Unter der Annahme, dass es einen konstanten Massentransfer durch gleichmäßiges Rühren oder Schütteln der Probe gibt und die Diffusionsschicht der Polymerfilm ist, gilt das 2. Ficksche Gesetz, die Diffusionsgleichung, die besagt, dass die Geschwindigkeit, mit der sich die Konzentration ändert, proportional zur zweiten Ableitung der Konzentration nach dem Ort ist.

$$\frac{\delta c(x,t)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c(x,t)}{\delta x^2} \quad (9)$$

Gleichung (7) und (8) können dann dargestellt werden als:

$$\frac{1}{A} \frac{dn}{dt} = \frac{D_1}{\delta_1} (c_s - c_s') = \frac{D_2}{\delta_2} (c_f - c_f') \quad (10)$$

mit

- c_s = Konzentration in der Probenmatrix
- c_s' = Oberflächenkonzentration in der Probenmatrix am Polymerfilm
- c_f = Konzentration im Polymerfilm an der Faseroberfläche
- c_f' = Konzentration im Polymerfilm an der Oberfläche des Fused-Silica-Kerns der Faser
- δ_1 = Diffusionsschichtdicke in der Probenmatrix
- δ_2 = Diffusionsschichtdicke des Polymerfilms

Wenn D_1/δ_1 und D_2/δ_2 durch den Massentransfer m_1 bzw. m_2 und $c_s = c_0 \cdot n/V_s$ und $c_s' = c_f/K$ ersetzt werden, dann erhält man Gl. (11):

$$m_1 \left(c_0 - \frac{n}{V_s} - \frac{c_f}{K} \right) = m_2 (c_f - c_f') \quad (11)$$

Unter der Voraussetzung eines linearen Konzentrationsgradienten innerhalb des Polymerfilms mit $(c_f + c_f')/2$ kann die Stoffmenge innerhalb des Films mit Gl. (12) berechnet werden.

$$n = V_f (c_f + c_f')/2 \quad (12)$$

Werden Gl. (11) und (12) nach c_f und c_f' aufgelöst und der erhaltene Term in Gl. (10) eingesetzt, dann erhält man unter der Annahme $t = 0$ und $n = 0$ die Gleichung (13). Dabei werden die Stoffmenge n und die Anfangskonzentration c_0 als Funktion der Zeit t ausgedrückt.

$$n = \left[1 - \exp \left(-2A \frac{m_1 \cdot m_2 \cdot K \cdot V_f + m_1 \cdot m_2 \cdot V_s}{m_1 \cdot V_s \cdot V_f + 2m_2 \cdot K \cdot V_s \cdot V_f} \cdot t \right) \right] \frac{KV_s V_f}{KV_f + V_s} c_0 \quad (13)$$

Die an die Faser adsorbierte Stoffmenge n ist proportional zur Anfangskonzentration in der Probenmatrix. Bei Erreichen des Gleichgewichts bei $t \rightarrow \infty$ wird der exponentielle Term 0 und

damit Gleichung (13) zu:

$$n_0 = \frac{KV_s V_f}{KV_f + V_s} C_0 \quad (14)$$

Der Term

$$2A \frac{m_1 \cdot m_2 \cdot K \cdot V_f + m_1 \cdot m_2 \cdot V_s}{m_1 \cdot V_s \cdot V_f + 2m_2 \cdot K \cdot V_s \cdot V_f} = a \quad (15)$$

ist bei gleichmäßigem Rühren bzw. Schütteln eine Konstante a , die beschreibt, wie schnell es zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes bei der SPME kommt. Sie ist bestimmt durch den Massentransfer, durch Gleichgewichtskonstanten und physikalische Dimensionen der Probenmatrix (Volumen etc.) und des Polymerfilms. Die Gl. (13) kann dadurch vereinfacht dargestellt werden als:

$$n = n_0 [1 - \exp(-at)] \quad \text{bzw.} \quad n/n_0 = 1 - \exp(-at) \quad (16)$$

Da es eine lineare Proportionalität zwischen der extrahierten Stoffmenge n und der Anfangskonzentration c_0 gibt, muss bei gleichbleibender Adsorptionszeit nicht bis zum Erreichen des Gleichgewichts extrahiert werden. Das ist sehr wichtig für die Konkurrenzfähigkeit der SPME gegenüber anderen Methoden. Bei ausreichender SPME- und chromatographischer Empfindlichkeit sind somit sehr kurze Analysenzeiten möglich.

2.1.2.3 Einflüsse von SPME-Parametern

- Temperatur:

Für die extrahierte Stoffmenge ist hauptsächlich der Verteilungskoeffizient K_{fs} verantwortlich. Bei richtiger Faserwahl sollte der Analyt an der Faser eine geringere potentielle Energie (negative freie Enthalpie) besitzen als im Dampfraum bzw. in der Probenmatrix. Damit sollte $K_{fs} > 1$ sein. Die Adsorption an die Faser wäre somit ein exergoner Prozess. Wenn die Änderung der molaren Enthalpie ΔH während einer bei der SPME üblichen Temperaturänderung als vernachlässigbar angenommen wird, dann führt eine Temperaturänderung von T_0 nach T nach Gl. (17) zu einer Veränderung des Verteilungskoeffizienten K_{fs} :

$$K_{fs} = K_0 \cdot \exp \frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (17)$$

mit

ΔH = molare Enthalpieänderung des Analyten beim Transport von der Probe in die Faser
 R = ideale Gaskonstante
 K_0 = Gleichgewichtskonstante bei T_0
 T = Endtemperatur [K]
 T_0 = Ausgangstemperatur [K] zum Zeitpunkt t_0

Eine Temperaturerhöhung führt demnach bei negativem ΔH zu einer Verringerung von K_{fs} . Eine verbesserte Extraktionsausbeute wäre dadurch erreichbar, dass die SPME-Faser gekühlt wird. Das ist z.B. durch ein Kühlen der Faser mit Kohlendioxid möglich, wie von Zhang und Pawliszyn [30] beschrieben. Sie konstruierten eine SPME-Apparatur, bei der das gekühlte Kohlendioxid in einer inneren Kapillare durch die an der äußeren Kapillare befindliche Faserschicht geleitet wurde. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist neben der Nichtverfügbarkeit solcher Fasern, dass es mit gesteigerter Faserkapazität zu einem Verlust der Selektivität kommt, da nicht nur der Analyt, sondern auch andere Komponenten der Matrix besser adsorbiert werden.

- Fasereigenschaften:

Ist der Faser/Headspace-Verteilungskoeffizient K_{fh} sehr groß, d.h. die Faser hat eine sehr hohe Affinität zum Analyten, wird eine längere Adsorptionszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes bei konstantem Headspace/Matrix-Verteilungskoeffizienten K_{hs} benötigt. Natürlich wird dieser „Nachteil“ durch die höhere Extraktionsausbeute kompensiert.

- Henrysche Konstante und Octanol/Wasser-Koeffizient:

Der schon erwähnte Headspace/Matrix-Verteilungskoeffizient K_{hs} wird auch durch die Henrysche Konstante K_H beschrieben, die nach dem Henryschen Gesetz für reale Lösungen mit geringer Konzentration einer Substanz in ihrem Lösungsmittel das Verhältnis des Dampfdrucks des gelösten Stoffes zu seinem Molenbruch in der Lösung darstellt. Je kleiner der Koeffizient K_{hs} ist, desto geringer ist der Stoffmengeanteil in der Gasphase. Für schwerflüchtige Verbindungen steht daher der geringe Dampfdruck und der damit verbundene kleine K_{hs} -Koeffizient höheren Extraktionsausbeuten entgegen. Bei leichtflüchtigen Verbindungen ist die Wahl der Faser mit einem möglichst großen K_{fs} bzw. K_{fh} -Wert von größerer Bedeutung, da der hohe Dampfdruck zu einer starken Anreicherung der Komponente im Dampfraum führt. Bei gleichzeitig kleinem K_{fh} -Wert würde eine daraus resultierende absolut geringe Extraktionsausbeute den Vorteil einer HS-SPME zunichte machen. In diesem Fall wäre eine normale Headspace-Injektion der SPME vorzuziehen.

Für eine Abschätzung der Affinität eines Analyten zur SPME-Faser kann der für Analyten oder Analoge des Analyten häufig bekannte Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient K_{OW} herangezogen werden. Dieser Koeffizient beschreibt die Verteilung einer Substanz in einem gesättigten n-Octanol-Wasser-Lösungsmittelgemisch Gl. (18):

$$K_{OW} = c_O/c_W \quad (18)$$

c_O = Konzentration des Analyten in der n-Octanol-Phase
 c_W = Konzentration des Analyten in der wässrigen Phase

Je größer der Koeffizient ist, desto größer ist in der Regel auch die Affinität zur organischen

Phase, d.h. zu einem apolaren Polymerfilm [31;32].

- Aussalzeffekt:

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Extraktionsausbeuten ist das Aussalzen der Probelösung. Es kann in Abhängigkeit von der Struktur der Substanz und der Salzkonzentration eine Erhöhung oder Erniedrigung der Ausbeuten hervorrufen. Im Allgemeinen führt der Aussalzeffekt bei erhöhter Polarität der Substanzen zu einer Erhöhung der Extraktionsausbeute. Verwendung finden dazu anorganische Salze mit einer sehr guten Löslichkeit und einer geringen Flüchtigkeit wie z.B. Natriumchlorid oder Natriumsulfat. Diese starken Elektrolyte hydratisieren sehr gut, d.h. sie entziehen anderen Analyten die Hydrathülle. Damit erhöht sich der Dampfdruck des Analyten über der Lösung. Der Verteilungskoeffizient K_{hs} ist nach Gl. (19) direkt proportional zum Dampfdruck p_i^0 und zum Aktivitätskoeffizienten γ_i der Komponente i:

$$K_{hs} \sim p_i^0 \cdot \gamma_i \quad (19)$$

Der Verteilungskoeffizient erhöht sich somit mit steigendem Dampfdruck und steigendem Aktivitätskoeffizienten und zeigt so eine höhere Konzentration im Dampfraum an. Des Weiteren kommt es durch die Zugabe einer größeren Menge an Salz – z.B. 0,5 g auf 1 ml Probelösung – zu einer Volumenerhöhung und damit zu einer Verschiebung des Phasenverhältnisses β von gasförmiger Phase V_h und Probelösung V_s .

$$\beta = V_h/V_s \quad (20)$$

Nach Gl. (20) führt diese Erhöhung des Volumens der flüssigen Phase zu einer Erniedrigung von β . Die Bilanz für den Dampfraum lässt sich in folgender Weise ableiten:

$$c_0 \cdot V_s = c_h \cdot V_h + c_s \cdot V_s \quad (21)$$

$$\text{mit } K_{hs} = c_h/c_s \quad (22)$$

$$\text{wird } c_0 \cdot V_s = c_h \cdot V_h + c_h/K_{hs} \cdot V_s \quad (23)$$

Umformung und Einsetzen von Gl. (20) führt zu (24) bis (26).

$$c_0 \cdot V_s = c_h \cdot \left(V_h + \frac{1}{K_{hs}} \cdot V_s \right) \quad (24)$$

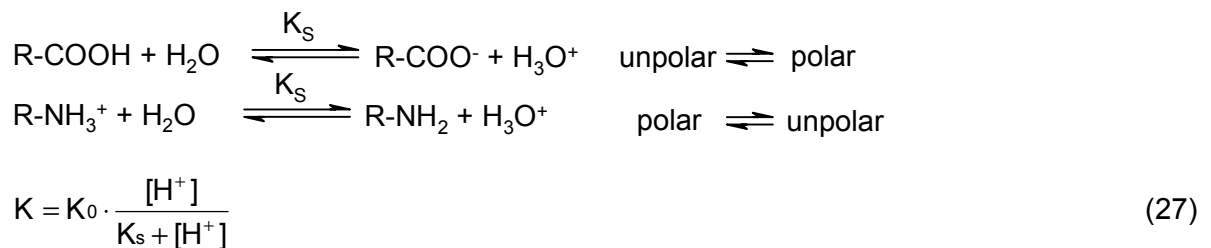
$$c_0 = c_h \cdot \left(\frac{V_h}{V_s} + \frac{1}{K_{hs}} \right) = c_h \cdot \left(\beta + \frac{1}{K_{hs}} \right) \quad (25)$$

$$c_h = \frac{c_0}{\left(\beta + 1/K_{hs} \right)} \quad (26)$$

Nach Gl. (26) steigt also die Konzentration im Dampfraum nach Salzzugabe durch Erhöhung des Verteilungskoeffizienten K_{hs} zwischen Dampfraum und flüssiger Phase und Erniedrigung des Phasenverhältnisses β [33].

- pH-Wert:

Um eine Extraktion aus dem Dampfraum zu ermöglichen, sollte der pH-Wert so eingestellt werden, dass der Analyt im undissoziierten Zustand in der Lösung vorliegt. Bei einem sauren Analyten sollte der pH-Wert mindestens 2 Einheiten unter dem pK_s -Wert liegen, bei einem basischen Analyten 2 Einheiten über dem pK_s -Wert der protonierten Form, was Gl. (27) als Beispiel für saure Substanzen zum Ausdruck bringt.



mit K_0 = Gleichgewichtskonstante zwischen Probe und Faser in undissoziierter Form
 K_s = Dissoziationskonstante der Säure
 K = Gleichgewichtskonstante der Phasenverteilung bei gegebenem pH-Wert

Bei $[\text{H}^+] \gg K_s$ geht die Dissoziationskonstante K der Säure in K_0 über.

- Polarität:

Von großer Bedeutung für das Erreichen bestmöglicher Extraktionsausbeuten sind weiterhin die Polarität der Probenmatrix und das Material der verwendeten Faser. Durch Vorhandensein eines organischen Lösungsmittels in der Probe kommt es zu Polaritätsveränderungen in der Lösung und damit eventuell zu Extraktionseinbußen. Außerdem kann ein erhöhter Lösungsmittelanteil in der Probe zur Konkurrenz um Adsorptionsstellen an der Faser führen. Nach Gl. (28) sind Konzentrationen von über 1% an einem organischen Solvent nötig, um Veränderungen des Faser/Proben-Verteilungskoeffizienten K_{fs} zu bewirken. Zu berücksichtigen ist dieser Umstand aber bei der Zugabe von in Lösungsmitteln gelösten Standards zur Probe. Daher sollten die Standardlösungen nach Möglichkeit wässrig sein.

$$K_{fs} = 2,303 \cdot K_{fw} \cdot \exp\left(\frac{P_1 - P_2}{2}\right) \quad (28)$$

$$\text{mit } P_2 = c \cdot P_s + (1-c)P_1 \quad (29)$$

K_{fw} = Verteilungsgleichgewichtskonstante für pures Wasser
 P_1 = Polaritätsparameter für Wasser (10,2)
 P_2 = Polaritätsparameter für die Wasser/Solvent-Mischung
 P_s = Polaritätsparameter für den Solvent
 c = Konzentration des Solvents

Nach Conzen et. al [34] haben Komponenten mit ähnlicher Dielektrizitätskonstante wie das Faserpolymer eine besonders hohe Affinität zur Faser.

- Probenvolumen:

Wie schon in Abschnitt 2.1.2.1 erwähnt, nimmt die Extraktionsausbeute mit steigendem Probenvolumen und damit steigender Analytmenge bis zum Erreichen der maximalen Faserkapazität zu. Da aber die Faserkapazität infolge des geringen Gehaltes an Faserpolymer begrenzt ist, macht es nicht immer Sinn, das Probenvolumen dem maximal möglichen Volumen im Analysengefäß anzupassen. Außerdem steht in der forensischen Analytik auch nicht unbegrenzt Probenmaterial zur Verfügung.

Bei der Extraktion im Headspace-Modus ist nach Gl. (6) für höhere Extraktionsausbeuten das Headspace-Volumen möglichst klein zu wählen. Das trifft besonders für leicht flüchtige Verbindungen zu, die im Headspace akkumulieren und einen Headspace/Matrix-Verteilungskoeffizienten K_{hs} von nahe 1 besitzen. Bei großem Headspace-Volumen wird dadurch der Term im Nenner von Gl. (6) erhöht, und es kommt zu einem Verlust an Sensitivität. Gorecki und Pawliszyn [35] untersuchten so das Verhältnis von Headspace/Probenvolumen zur extrahierten Stoffmenge. Sie konnten an praktischen Beispielen von Substanzen mit bekannten Verteilungskoeffizienten K_{hs} und K_{fs} beweisen, dass sich ein größeres Headspacevolumen auf flüchtige Substanzen mit hohen K_{hs} -Werten (hier Trichlorethan mit 1,24) stärker auf die extrahierte Stoffmenge auswirkt als auf Chloroform mit geringerem K_{hs} von 0,15 [35]. Für mittel- und schwerflüchtige Substanzen wird der K_{hs} -Wert um Zehnerpotenzen kleiner, wodurch selbst ein Volumenverhältnis Headspace/Matrix $V_h/V_s = 10$ nach Gl. (6) keine signifikanten Auswirkungen auf die Extraktionsausbeuten hat.

- Bewegung (Agitation):

Die Bewegung der Probenmatrix kann durch Schütteln bzw. Rühren der Probe oder bei einigen Autosamplern durch ein ständiges Kreisen der Faser in bzw. über der Probe erfolgen. Taucht die Faser in die Probe ein, bildet sich eine Grenzschicht zwischen Faser und Probe aus, in der sich die Flüssigkeitsbewegung mit zunehmender Entfernung vom Fused-Silica-Kern der SPME-Faser bis zum Erreichen der durchschnittlichen Molekülbewegung in der Probe erhöht. Die Dicke der Diffusionsschicht wird durch die Viskosität und Bewegung in der Probe beeinflusst. Der nach dem Eintauchen der Faser entstandene Konzentrationsgradient wird ohne Proben- bzw. Faserbewegung nur langsam bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes abgebaut. Die Extraktionszeit bis zum Erreichen von 95% des Gleichgewichtszustandes $t_{95\%}$ lässt sich nach Gl. (30) abschätzen:

$$t_{95\%} = 3 \frac{\delta K_{fs}(b-a)}{D_s} \quad (30)$$

mit

(b-a) = Dicke des Polymerfilms

δ = effektive Dicke der Diffusionsschicht

D_s = Diffusionskoeffizient des Analyten in der Probe

K_{fs} = Faser/Probenmatrix-Verteilungskoeffizient

Demnach sinkt die bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands nötige Extraktionszeit mit einer dünneren Grenzschicht und einem dünneren Polymerfilm. Ein gleichmäßiges Rühren oder Schütteln der Probe führt somit durch eine Verringerung der Diffusionsschicht δ zu kürzeren Extraktionszeiten. Eine weitere Reduzierung der Extraktionszeit ist möglich, wenn die Faser nicht direkt in das Zentrum der Probe eintaucht. Die dann durch die Bewegung an der Faser auftretenden Tangentialkräfte führen zu einer zusätzlichen Verringerung der Diffusionsschichtdicke.

Erfolgt die Extraktion aus dem Dampfraum über der Probe, so bleiben der Substanztransport von der Probe in den Dampfraum und vom Dampfraum zur Faser die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte, wobei die Diffusion der Moleküle durch den Gasraum sehr schnell erfolgt. Eine Grenzschicht zum Faserpolymer bildet sich hierbei nicht aus. Die Verarmung der Probenoberfläche infolge des Verdampfens von Teilchen und des Konzentrationsgradienten bei einer nicht durchmischten Probe führt zu deutlich längeren Extraktionszeiten. Das Schütteln bzw. Rühren der Probe bewirkt dagegen eine höhere Konvektion in der Probe, die zu einer Verringerung, bestenfalls Beseitigung, der Diffusionsgrenzschicht an der Oberfläche der Probenmatrix und somit zu einem schnelleren Übergang der Teilchen in den Dampfraum führt. Autosamplern, die nur die Faser und nicht die Probe schütteln können (z.B. Varian Autosampler 8200), bringen bei der Durchführung der SPME im Headspace-Modus somit keine Einsparung der Extraktionszeiten.

- Wahl des Derivatisierungsreagenzes:

Derivatisierungsreagenzien haben nur dann einen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten, wenn sie vor bzw. während der Extraktion durch Reaktion mit dem Analyten zu einer Dampfdruckerniedrigung der Substanz oder zu einer erhöhten Affinität der Substanz zur Faser als Derivat führen. Eine Derivatisierung nach erfolgter Extraktion in einem zweiten Schritt verbessert „nur“ die Sensitivität und eventuell die Selektivität bei der Detektion oder/und die chromatographischen Eigenschaften der Substanz. Für den eigentlichen Prozess der SPME bringt die Derivatisierung aufgrund der Komplexität der Kinetik bei der Extraktion und zusätzlich bei der Reaktion mit dem Reagenz neue Probleme mit sich. Das Derivatisierungsreagenz sollte von daher so gewählt werden, dass es sehr schnell und quantitativ mit den Analyten reagiert, idealerweise keine Reaktionen mit dem Fasermaterial eingeht, keine Schädigungen der Kapillarsäule verursacht und vollständig von der Faser desorbierbar ist. Auf die

in dieser Arbeit verwendeten Derivatisierungsreagenzien wird in Abschnitt 5.2 (s.S. 74 ff) und im experimentellen Teil näher eingegangen.

- Desorption:

Ziel bei der Desorption im GC-Injektor muss ein schnelles und vollständiges Desorbieren der Substanzen von der Faser sein. Das ist am besten bei der für die Faser maximal empfohlenen Temperatur zu erreichen. Diese variiert je nach Fasertyp zwischen 250 und 300°C. Die Zone höchster Temperatur befindet sich in der Mitte der Linerlänge, was bei der Einstellung der Einstichtiefe der SPME-Faser zu berücksichtigen ist. Wenn die zu untersuchenden Substanzen thermostabil sind, ist nur noch die notwendige Desorptionszeit zu ermitteln, ohne dass es zu einer Analytverschleppung (Carry over) kommt. Nach der Desorption sollte es nicht zu einer Peakverbreiterung oder sogar zu einem Peaksplitting kommen. Da herkömmliche Insertliner einen ungefähren Durchmesser von 3-5 mm aufweisen, kann es gerade bei leichtflüchtigen Substanzen, die nicht auf dem Kapillarsäulenanfang fokussiert werden, zu einer Peakverbreiterung infolge von Verwirbelungen bei großen Linervolumen und geringen Gasstromgeschwindigkeiten kommen. Um das zu verhindern, gibt es Liner mit geringerem Durchmesser (siehe auch Kapitel 2.1.1). Bei diesen Linern ist darauf zu achten, dass es nicht zu einer Verstopfung des Liners mit Septumresten kommt. Wenn verfügbar, sollte auf ein Teflonseptum (Merlin Microseal®) und dafür angebotene SPME-Faserführungen zurückgegriffen werden.

2.2 Haaranalytik

2.2.1 Morphologische und physiologische Grundlagen der Haaranalytik

2.2.1.1 Morphologie und Histochemie

Das Haar ist aus morphologischer Sicht ein äußeres Hautanhangsgebilde. Die Haarwurzel ragt als schlauchartige Stülpung bis in die Dermis (Lederhaut). Das an der Kopfoberfläche erscheinende, voll ausgereifte, im Durchschnitt 70 µm dicke Haar [36] besteht im Querschnitt betrachtet aus der Cuticula, dem Cortex, dem Zellmembrankomplex, der Medulla und den Melanineinlagerungen. Die Dermis ist in die unterste Zone der Haarwurzel, das Keratinocy- tengewebe, eingestülpt. Zahlreiche Blutkapillargefäße versorgen Haarwurzel, Bulbus sowie die angrenzende Talgdrüse mit Nährstoffen.

Der Aufbau eines Haarfollikels ist in Abbildung 4 dargestellt.

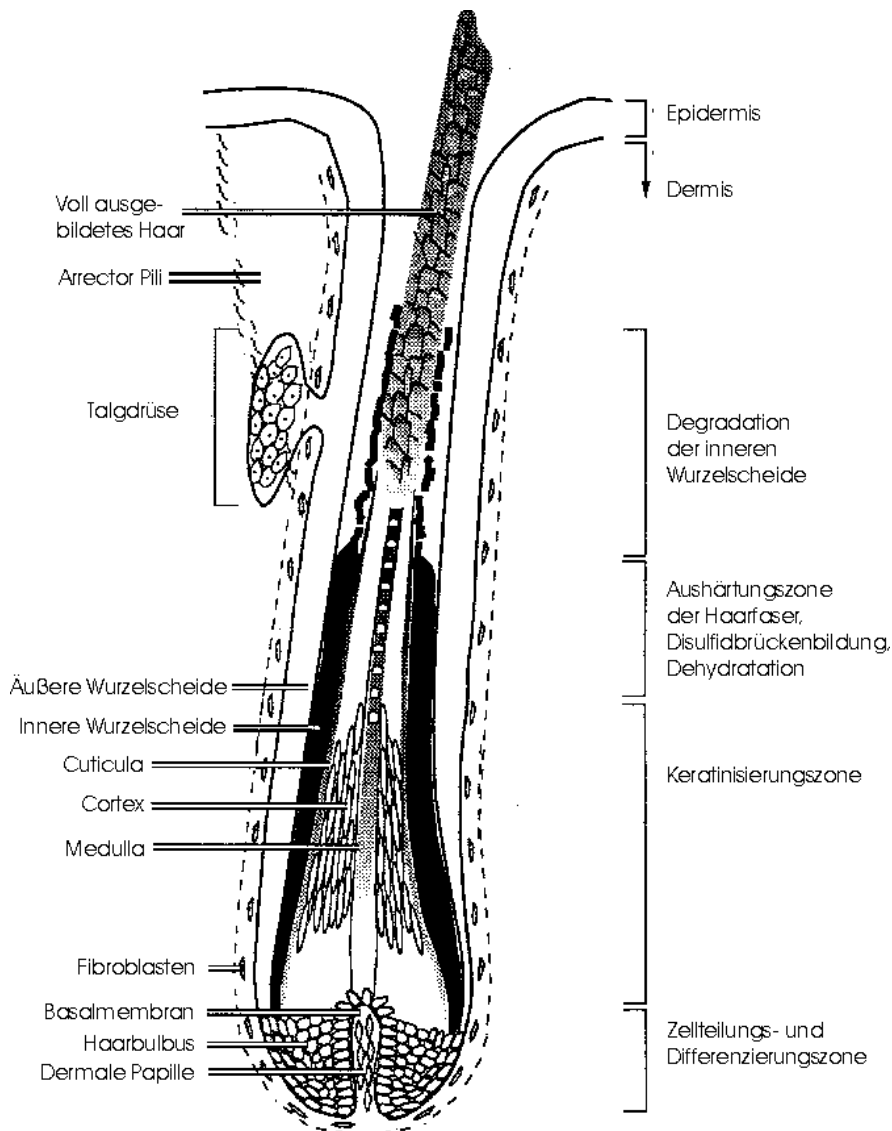


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Haarfollikels [37]

Die 4-5 µm dicke **Cuticula** ist für den Schutz des Haares vor physikalischen und chemischen Beeinflussungen (Licht, kosmetische Behandlung etc.) verantwortlich. Sie teilt sich in eine stark cysteinhaltige (25-30%), proteolysestabile Exocuticula und eine proteolyseempfindliche Endocuticula [37;38].

Der **Cortex** enthält die Makrofibrillen, die aus mehreren α -helikalen Intermediatfilamenten (IF), den Keratinfasern, bestehen. Die Fasern enthalten große Mengen an Cystein, das über Disulfidbrücken zum Cystin vernetzt ist und den entscheidende Grund für die mechanische und chemische Stabilität der Haarfaser darstellt. Die hydrophilen Aminosäuren Glutamin- (1,0 mmol/g Faser) und Asparaginsäure (0,45 mmol/g) [39] sind nach außen gekehrt und sorgen für die hohe Wasseraufnahmekapazität der Haare von bis zu 30% des Eigengewichts und für die Kationenaustauschereigenschaften.

Die **Medulla** wird von den Cortexzellen umschlossen und weist neben Lufteinschlüssen einige ungeordnete Proteingranula auf, die über Isopeptidbindungen verknüpft und nicht in gewöhnlichen Proteinsolventien löslich sind [37].

Der **Zellmembrankomplex** formt ein Netzwerk um Cortex- und Cuticula-Zellen. Er besteht aus mehreren Membranschichten, die einen bis zu 50%igen Anteil an 18-Methyleicosaensäure aufweisen [40].

Die genetisch determinierte Bildung von **Melanin** erfolgt in den **Melanocyten**, die im oberen Teil des Bulbus' oberhalb der Papille lokalisiert sind. Im ausgereiften Haar sind die Melaningranula in Cortex und Medulla zu finden. Die Zusammensetzung und Konzentration des Melanins bestimmen die Haarfarbe. Die Melanine lassen sich in zwei Hauptkategorien einteilen, dem Eumelanin und dem Phaeomelanin. Eumelanin ist für den braunen bzw. schwarzen Haartypen verantwortlich, Phaeomelanin für den blonden und rothaarigen Typus. Die unterschiedlichen Schattierungen der Haare werden durch die Anzahl und das Verhältnis der Eu- und Phaeomelaningranula zueinander hervorgerufen. Der Gewichtsanteil beträgt 0,1 – 5% [39;41], wobei schwarzes, mongolides und negroides Haar die höchsten Melaninmengen enthält, während blondes caucasoides Haar weniger und kleinere Melaninpigmente aufweist [42;43]. Eumelanin wird ausgehend vom Tyrosin über die Stationen 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA), Dopachinon, Dopachrom, Dihydroxyindol bzw. Dihydroxyindolessigsäure und Indolchinon synthetisiert, wobei das Indolchinon das Ausgangsmonomer für eine Polymerisation darstellt. Phaeomelanin entsteht durch Anlagerung von Cystein an DOPA zum Cysteiny-DOPA und anschließender Zyklisierung und oxidativer Polymerisation. Die ebenfalls aus Cysteiny-DOPA gebildeten gelben bis violetten Trichochrom-Dimere sind auch für blonde und rötliche Haartöne verantwortlich [39;44].

2.2.1.2 Wachstumsphasen der Haare

Das Kopfhaar durchläuft in seiner zum Teil diskontinuierlichen, bis zu 10 jährigen Entwicklung drei Wachstumszyklen: die durchschnittlich 2-6 jährige Anagenphase, die 2-3 wöchige Katagenphase und die bis zu 6 monatige Telogenphase [39;45;46]. Während der Anagenphase wächst das Haar nach Angaben einiger Autoren individuell verschieden zwischen 0,2 und 0,5 mm/Tag [23]. In der Katagenphase bildet sich die Haarwurzel innerhalb von 2-3 Wochen zurück, die Nährstoffversorgung und damit das Wachstum werden unterbrochen. Das Haar bleibt jedoch noch für bis zu 6 weiteren Monaten in der Kopfhaut (Telogenphase) bis ein neues Haar gebildet wird, das das alte herauschiebt. Dieser Prozess ist in Abbildung 5 dargestellt. Der Anteil von Haaren im anagenen Status beträgt 80-85%, im katagenen 1-3% und im telogenen 10-15%. Während eines krankhaften Haarausfalls (Alopecia) kann der anagene Anteil auf bis zu 30% sinken [47]. Die Wachstumsgeschwindigkeiten und die Anteile der Haare in den einzelnen Entwicklungsstadien variieren sehr stark bei Haaren verschiedener Körperregionen (Kopf-, Scham-, Achsel-, Brust-, Arm- und Beinhaar sowie Augenbrauen und Wimpern).

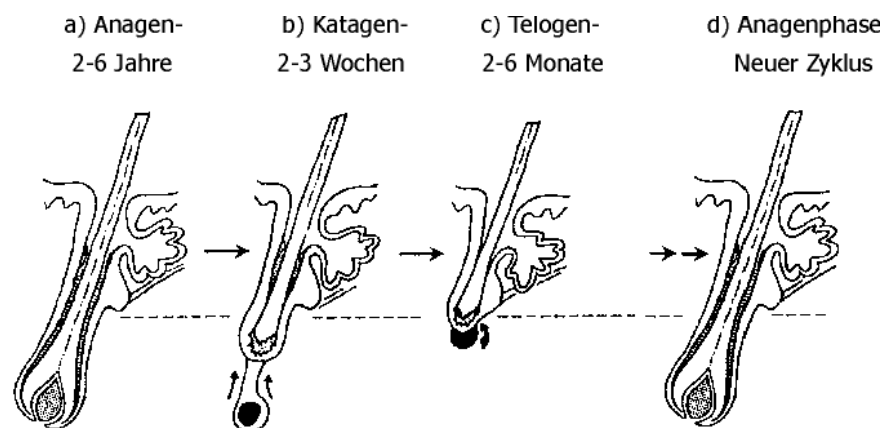


Abbildung 5: Stadien des Wachstumszyklusses des menschlichen Kopfhaares

2.2.1.3 Einlagerung von Substanzen ins Haar

Seit den ersten Nachweisen von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen wird über den Einlagerungsmechanismus ins Haar diskutiert. Als erstes erklärendes Modell stellten Baumgartner et al. [48] 1989 das „Entrapment-Model“ vor, wonach eine Einlagerung von Substanzen und deren Metaboliten in sogenannte „inaccessible regions“ über die Blutversorgung erfolgt. So eingelagerte Substanzen wären vor externen Einflüssen geschützt. Eine Einlagerung von Substanzen durch äußere Quellen wäre nicht möglich, sondern nur eine Anhaftung, die sich aber durch eine entsprechend sorgfältige Probenvorbereitung mit dekontaminierenden

Waschvorgängen beseitigen ließe [49;50].

Die Anfang der 90er Jahre verstärkten Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der Haaranalytik zeigten aber, dass das „Entrapment-Model“ für die Erklärung der Substanzeinlagerungen ins Haar nicht ausreichend ist. Vielmehr ist von einem komplexeren Mechanismus auszugehen, bei dem mehrere Kompartimente (Blut, Schweiß, Talg, angrenzende Hautschichten, externe Kontamination) beteiligt sind. Henderson postulierte 1993 in seiner Arbeit „Mechanism of drug incorporation into hair“ auf Basis dieser Erkenntnisse sein Multikompartimenten-Modell [51]. Auch das von Chittleborough und Steel für die Einlagerung von Mineralstoffen und Spurenelementen bereits 1980 vorgeschlagene „Pool Model“ [52] beschreibt die Aufnahmewege zutreffend. Abbildung 6 zeigt die möglichen Einlagerungswege ins Haar.

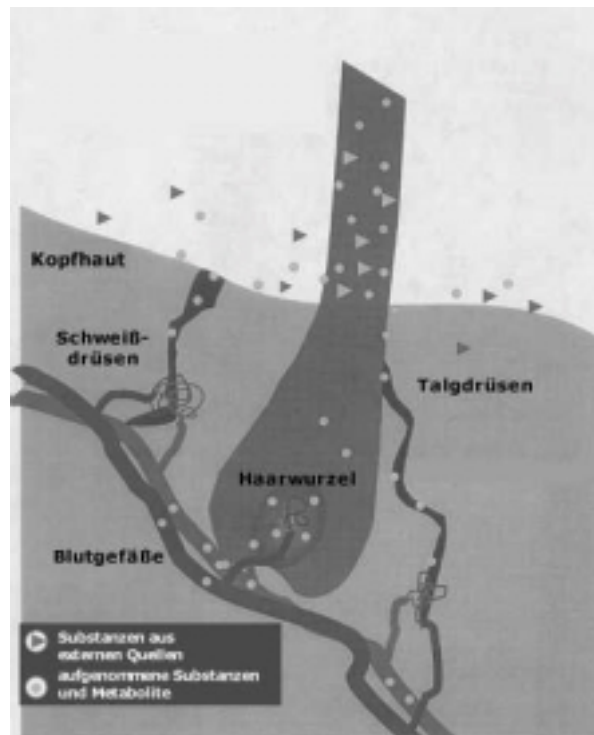


Abbildung 6: Einlagerung von endogenen und exogenen Substanzen aus Blutgefäßen, Talg- und Schweißdrüsen sowie aus der Umgebung ins menschliche Haar nach dem Multikompartimenten-Modell von Henderson [1;51]

- Einlagerung über die Blutversorgung

Den Haupteinlagerungsweg für Drogen und Pharmaka stellt das Blutgefäßsystem dar. Über Zellmembranen gelangen hauptsächlich basische, nicht proteingebundene undissoziierte, lipophile Stoffe entlang von Konzentrations- und pH-Gradienten in das Keratinocytingewebe, in Matrixzellen und Melanocyten der Haarwurzel des anagenen Haares. Weitere Einflussfaktoren für den Transport durch Biomembranen sind das Mikroklima, der Octanol/Wasser-

Verteilungskoeffizient, die Plasmaproteinbindung sowie Größe und Geometrie des Moleküls. Besondere Bedeutung für die Einlagerung von Substanzen haben dabei die Melanocyten. Sie weisen intrazelluläre pH-Werte von 3-5 auf [53] im Unterschied zum keratinisierten Haar mit einem pH-Wert von 6 [39]. Da auch das Cytosol der Matrixzellen einen niedrigeren pH-Wert als das Plasma besitzt, kommt es zu einer bevorzugten Aufnahme und Anreicherung von basischen Substanzen entlang des pH-Gradienten in Melanocyten und Matrixzellen [54]. Diese werden dann in die Melaningranula, in die Haarproteine und -lipide eingelagert. Mit dem wachsenden Haar werden die Substanzen dann in proximale Richtung aus der Kopfhaut heraus transportiert. Dass das Melanin eine Hauptbindungsstelle für Drogen und Pharmaka darstellt, wurde bei den Betrachtungen zur Synthese des Melanins schon erwähnt. Allerdings erfolgt auch eine Einlagerung von Molekülen unabhängig von einer aktiven Melanogenese in unpigmentiertes Haar [55]. Gygi et al. zeigten am Beispiel der Einlagerung von Codein in das Haar von Ratten, dass die Aufnahme sowohl in pigmentierte als auch in unpigmentierte Haare gleichschnell verläuft, dass Codein aber im pigmentierten Haar länger gebunden bleibt [56]. Dabei bieten die in hoher Prozentzahl in den Keratinfasern vorhandenen und nach außen gerichteten Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure Bindungsstellen über die Carboxylfunktionen. Liegen diese deprotoniert vor, so können basische Substanzen im protonierten Zustand gebunden werden. Kidwell und Blank bewiesen diese Vermutung, indem sie Haare in Lösungen mit Cocain, Benzoyllecgonin und Morphin bei unterschiedlichen pH-Werten inkubierten. Die danach im Haar gefundenen Konzentrationen waren bei pH-Werten von 7-8 am höchsten [1].

- Einlagerung über Schweiß und Sebum

Die Ausscheidungen von Schweiß- und Talgdrüsen befeuchten und bedecken das Haar, und darin gelöste Stoffe können so in das Haar diffundieren. Da die ekkrinen Schweißdrüsen und die Talgdrüsen auf der Kopfhaut sehr eng beieinander liegen, lässt sich nicht trennen, aus welchem Sekret die Einlagerung erfolgt. Die Detektion von Drogen aus Schweiß hat sich in den letzten Jahren zu einer bedeutenden, schnellen und einfach durchführbaren Methode bei der Drogenkontrolle besonders im Straßenverkehr entwickelt [57-62]. Bei der Beurteilung der Ergebnisse der Haaranalyse muss berücksichtigt werden, dass eine starke Schweißsekretion zu einer Verbreiterung der Drogenzone im Haar und damit zu zeitlichen Fehlinterpretationen führen kann [23]. Wie Kidwell et al. in einer Studie zeigten, muss ein positiver Schweißwischtest (Drugwipe) an der Stirn nicht unbedingt ein positives Haarergebnis nach sich ziehen [63]. Das unterschiedliche Ergebnis kann auf eine externe Kontamination, auf einen kurz zurückliegenden Konsum oder auf eine unzureichende Einlagerung der Droge ins Haar zurückzuführen sein.

- Einlagerung aus angrenzendem Hautgewebe

Ein verzögerte Einlagerung von Drogen aus tieferen Hautschichten in das Haar kann ebenfalls zu einer Verbreiterung der drogenpositiven Zone im Haar führen. Besonders stark lipophile Substanzen werden sehr gut im adipösen Gewebe der Hypodermis oder des Stratum corneum gespeichert. Auch eine Aufnahme von Substanzen aus externen Quellen in die Haut mit späterer Einlagerung ins Haar ist denkbar [51;64].

- Einlagerung aus externen Quellen

Eine Kontamination der Haare kann über den Rauch von z.B. Cannabis-, Nikotin- bzw. Crack-Rauchern [65;66] oder durch Staub nach Hantieren mit Pulverproben erfolgen, der direkt ins Haar gelangen kann oder aber über Schweiß oder Wasser in das Haar transportiert wird. So wies Mieczkowski Cocain im Waschwasser der Haare von mehreren nicht drogenabhängigen Drogenfahndern nach, die ständig mit Cocain in Berührung kamen [67]. Eine Gefahr von falsch positiven Haaranalysen besteht aber bei gründlicher Probenvorbehandlung (Dekontaminierung) und differenzierter Beurteilung positiver Haaranalysen nicht, da bisher nach äußerer Kontamination keine Metaboliten der entsprechenden Ausgangssubstanzen nachgewiesen werden konnten [49;50;67].

- Einfluss von kosmetischen Behandlungen und Witterungsbedingungen

Unter normalen Bedingungen stellt die Cuticula eine stabile Barriere gegen den Verlust von Substanzen dar. Bei normaler Haarwäsche sind eingelagerte Substanzen noch Jahre nach dem Konsum nachweisbar. Allerdings rufen kosmetische Behandlungen der Haare mit Bleichmitteln, Färben der Haare und Dauerwellen morphologische, physikalische und chemische Veränderungen am Haar hervor. Es kommt zu Schädigungen von Cuticula und Cortex, aber auch zu Konzentrationsverlusten an eingelagerten Substanzen in Folge von Instabilitäten der Moleküle gegen einige chemische Mittel (Wasserstoffperoxid, Ammoniak) und Strukturveränderungen der Haarfaser sowie zu verringerter Aufnahmefähigkeit der geschädigten Haarfaser für Substanzen. Pötsch et al. berichten über eine deutliche Konzentrationsabnahme an Morphin, Monoacetylmorphin und Cocain nach Bleichung der Haarproben von Drogenopfern [68] und nach Bleichung und Dauerwellenbehandlung von Haaren Drogenabhängiger [69]. Yegles et al. stellten bei Benzodiazepinen einen Verlust von ca. 60% der eingelagerten Wirkstoffmenge nach einem 20 minütigem Bleichvorgang fest [70]. Kidwell et al. beobachteten eine Umwandlung von Cocain zum Benzoyllecgonin nach Haarwäsche mit alkalischem Shampoo [63]. Röhrich et al. stellten eine deutliche Abnahme der Drogenkonzentrationen nach einmaliger Anwendung eines Szene-Shampoos zur Drogenentfernung fest, wengleich alle Drogen noch deutlich nachweisbar waren [71].

Wenn Haare Sonneneinstrahlung, Regen und Wind ausgesetzt werden, führt dieses zu physikochemischer Alterung. Durch UV-Strahlung entstehende Radikale lösen Lipidoxidatio-

nen, Veränderungen von Peptiden und Melaninabbau aus [39]. Skopp et al. beobachteten in Haarproben von Drogenkonsumenten nach dreimonatiger Exposition im Freien eine Verringerung der Morphin-, Monoacetyl- und Benzoylcegonin-Konzentrationen [72]. In einem weiteren Experiment stellten sie eine Abnahme der THC- (zwischen 50-90%), Cannabinol und Cannabidiol-Konzentrationen bei 10 Wochen dem Sonnenlicht ausgesetzten Haaren im Vergleich zu im Dunkeln gelagerten Haaren fest [73].

2.2.2 Extraktions- und Nachweismethoden von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen

Methoden zur Bestimmung von illegalen oder therapeutischen Drogen aus Haaren beinhalten im allgemeinen die Extraktion oder den Aufschluss der Haare und einen Aufreinigungsschritt durch eine Flüssig/Flüssig-Extraktion oder eine Festphasenextraktion. Die anschließende gerätetechnische Analyse basiert hauptsächlich auf der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). In den letzten Jahren zeichnet sich ein zunehmender Einsatz der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) ab. Aber auch die Kombination der HPLC mit Photodiodenarray-Detektor (DAD) oder Fluoreszenzdetektor hat zahlreiche neue Anwendungen erfahren. Im folgenden soll auf einige wesentliche Extraktionsmethoden und auf die instrumentelle Analytik näher eingegangen werden.

2.2.2.1 Probennahme und Probenvorbereitung

Die Haarprobe wird in der Regel am Hinterkopf des Probanden, in der Region vertex posterior, als ein ca. 2-3 mm starkes Büschel direkt über der Kopfhaut entnommen. Die Haarlänge wird gemessen und die Haarfarbe anhand von Vergleichstabellen festgestellt. Das Haar wird je nach dem Untersuchungsziel in Segmente geteilt und einer äußeren Dekontamination unterzogen.

Zur Dekontamination wird das Haar je nach Verschmutzungsgrad gewaschen. Eine einheitliche Prozedur wurde dabei bisher noch nicht festgelegt. So gibt es meist einen je nach Institut favorisierten Waschvorgang. Im wesentlichen kann man unterscheiden in:

- Waschen mit Tensidlösungen und destilliertem Wasser
Eingesetzt werden 0,05–1%ige Dodecylsulfatlösungen [74-77] oder Tweenlösungen [78;79]. Sie sind gut geeignet für die Beseitigung grober Verschmutzungen. Problematisch ist dabei allerdings die Untersuchung des Waschwassers auf mögliche äußere Kontaminationen mit Drogen.
- Waschen mit Wasser bzw. wässrigen Pufferlösungen [19;20;80]
Diese sind ebenfalls gut für die Beseitigung grober Verschmutzungen geeignet. Allerdings wird das Haar nur mangelhaft entfettet, wodurch im Sebum gespeicherte Substan-

zen nur schlecht entfernt werden.

- Waschen mit organischen Lösungsmitteln

Hierbei werden hauptsächlich Methanol [81;82], Ethanol [83;84], Aceton [26;89], Dichlormethan [85;86] oder n-Hexan [87] verwendet. Der Vorteil ist die direkte Nachweisbarkeit von Substanzen aus dem Waschextrakt. Hauptnachteil ist die schlechte Entfernung grober Verschmutzungen der Haare z.B. bei blut- oder schmutzbehafteten Haaren des Sektionsgutes.

- Kombination von wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln [88-91]

Sie führt zu einer sehr guten Dekontamination der Haare. Allerdings können bereits Verluste von ins Haar eingelagerten Substanzen [92] bis hin zu falsch negativen Ergebnissen bei der Haaranalyse entstehen [93].

Um den Dekontaminationsvorgang effektiver zu gestalten, wird häufig mehrmals mit Unterstützung von Ultraschall oder bei leicht erhöhter Temperatur gewaschen. Blank und Kidwell gehen in einem allerdings umstrittenen Artikel davon aus, dass eine Unterscheidung zwischen Substanzen, die nach äußerer Kontamination und Wirkstoffen, von denen die über Blut oder Sebum ins Haar eingelagert wurden, nicht möglich ist [94].

2.2.2.2 Extraktionsverfahren

Nach Zerkleinerung bzw. Pulverisierung der Haare bieten sich eine Reihe von Möglichkeiten der Extraktion der Wirkstoffe aus dem Haar. Hydrolysierte man in den Anfangsjahren der Haaranalytik das Haar meist komplett, so haben sich mit fortschreitender Forschung zahlreiche milde Extraktionsverfahren etabliert, die je nach Zielsetzung der Analyse, technischer Ausstattung und Institut eingesetzt werden. Da auf diese Verfahren in mehreren Veröffentlichungen detailliert eingegangen worden ist [2;95;96], seien hier nur die prinzipiell verschiedenen Herangehensweisen erwähnt.

- Aufschluss der Haare mit NaOH-Lösungen unterschiedlicher Konzentration [97-99]

Es kommt zur Zerstörung der Haarmatrix. Eine Erhöhung der Temperatur auf 80°C bewirkt eine deutliche Beschleunigung des Aufschlusses. Die im Haar eingelagerten Substanzen gehen in Lösung. Baseninstabile Substanzen wie Ester (z.B. Cocain, Heroin), aber auch Benzodiazepine werden durch diesen Aufschluss zersetzt.

- Saure Extraktion der Haare

Meist gelangen Lösungen von wässriger Salzsäure zum Einsatz [85;100;101], zum Teil in Kombination mit Methanol [102;103], aber auch ein Gemisch von Trifluoressigsäure mit Methanol wird verwendet [104;105]. Hydrolysestabile Substanzen wie Amphetamine werden in die ionische Form überführt und sind dadurch gut wasserlöslich. Das Haar

bleibt unzerstört, wodurch nicht alle Wirkstoffe quantitativ in das Extrakt überführt werden.

- Enzymatische Zersetzung der Haarmatrix bzw. enzymunterstützte Extraktion

Zur Anwendung kommen proteinlösende Enzyme wie Pronase und Kinase unterstützt von Disulfidbrücken-spaltenden Substanzen wie Perameisensäure oder Dithiothreitol [76;106-108]. Das Haar wird hierbei nahezu aufgelöst. Andere Verfahren verwenden Pufferlösungen mit Glucuronidase/Arylsulfatase zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfatmetaboliten der Wirkstoffe, wobei die Haarstruktur aber intakt bleibt [90;109].

- Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Die zerkleinerten oder pulverisierten Haare werden meist mit Methanol [91], das gute Quell- und Lösemittleigenschaften vereint, im Ultraschallbad oder bei erhöhter Temperatur extrahiert. Die Extraktionszeiten variieren dabei sehr stark. Der Extrakt wird nach Einengung direkt oder nach einem weiteren Reinigungsschritt mittels SPE oder LLE zur Analyse eingesetzt. Am Beispiel der Opiate wurden auch Versuche mit anderen organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Toluol, Dioxan, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethanol, Acetonitril, Propanol und 2-Propanol durchgeführt [110]. Die Extraktionsausbeuten waren aber im Vergleich zu Wasser und Methanol deutlich reduziert.

- Superkritische Fluidextraktion (SFE)

Mit Hilfe überkritischen Kohlendioxids wurden Amphetamine mit Chloroform/iso-Propanol als chemische Modifier [111], Opiate und Cocain mit verschiedenen Modifier-Verhältnissen von Methanol/Triethylamin/Wasser [80;112] sowie Opiate mit Ethylacetat als Modifier [113] effizient aus dem Haar gelöst.

- Beschleunigte Lösemittlextraktion (Accelerated Solvent Extraction – ASE) [114]

Dieses Verfahren ermöglicht die schnelle Extraktion der Haare mit organischen Lösungsmitteln wie Methanol oberhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels und erhöhtem Druck bei subkritischen Bedingungen. Die Extraktionszeiten betragen nur ca. 30 min. Allerdings sind wie bei der SFE die apparativen Voraussetzungen sehr kostspielig.

Die erhaltenen Haarextrakte lassen oftmals keine direkte Verwendung für chromatographische Verfahren zu. Zum einen, weil durch organische Lösungsmittel zu viel störende Matrixbestandteile extrahiert wurden, zum anderen, weil wässrige Extrakte nicht direkt für die Gaschromatographie einsetzbar sind. Aus diesem Grund wird meist eine Reinigung der Extrakte mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion durchgeführt. Die LLE gestattet bei geringer Probenanzahl eine schnelle Extraktion allerdings ohne große Selektivität. Die SPE bietet durch entsprechende Wahl des Sorbens eine gute Selektivität. Ein Zeitnachteil ergibt sich bei größerer Probenzahl durch die mögliche Zusammenbearbeitung und

Automatisierbarkeit nicht. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Abtrennung von Matrixbestandteilen wie Haarfette und -proteine. Da die meisten Medikamentenwirkstoffe basischer Natur sind, ermöglicht der Einsatz von Mischphasensorbentien wie mit Octylgruppen (C8) und Benzolsulfonsäuregruppen (SCX = strong cationic exchange) modifiziertes Kieselgel eine hervorragende Reinigung bei hoher Selektivität.

2.2.2.4 Instrumentelle Analytik

Der instrumentellen Analytik geht im Falle der hauptsächlich in der Haaranalytik eingesetzten gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung in der Regel eine Derivatisierung voraus. Die Vielfalt der untersuchten Wirkstoffe bedingt die Verwendung fast aller bekannten Acylierungs- und Silylierungs-, aber auch Alkylierungsreagenzien [115].

Die in den Anfangsjahren der Haaranalytik verwendeten radioimmunochemischen Methoden (RIA) [13-15;84;116] wurden wegen der bedingten Haltbarkeit der Kits und der problematischen Anforderungen an die Labore fast vollständig verdrängt, obwohl zunächst dieses Verfahren die notwendige Empfindlichkeit für einen Nachweis im ng/mg-Bereich brachte. Heute kommen aber weiterhin immunochemische Verfahren als ein schnelles Drogenscreening bzw. als Vortest zum Einsatz [105;117].

In den Folgejahren setzte sich die GC-MS-Technik wegen der geringen Kosten von Quadrupol-GC-MS-Geräten bei hoher Empfindlichkeit in der Haaranalytik durch. Sie ist auch heute noch das Standardverfahren für die Routineanalytik von Drogenwirkstoffen im Haar [90;91;99;105;108;118]. Die Verfügbarkeit von hochauflösenden Massenspektrometern, der MS/MS-Technik und Quadrupol-Geräten mit negativer chemischer Ionisation (NCI) führte zur Nachweisbarkeit von Wirkstoffen im unteren pg/mg-Bereich. Dadurch wurde die Bestimmung von anabolen Steroiden [119-124], des für die Absicherung eines positiven Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)-Befundes notwendigen Metaboliten 11-Nor- Δ^9 -THC-COOH [97;125;126], von Benzodiazepinen [103;118;127] und einiger gering dosierter Opioide [92;128] möglich.

Die weiter ausgereiften und problemloser zu wartenden LC-MS-Anlagen haben auch zu einer Reihe von Anwendungen in der Haaranalytik besonders beim Nachweis polarer, schwer verdampfbarer und thermolabiler Substanzen geführt [129-132]. Für ein toxikologisches Screening der Haarproben ist diese Detektionsart aber noch nicht geeignet, da wegen zahlreicher unterschiedlicher Ionisierungsverfahren keine vergleichbaren und ausreichend umfangreichen Bibliotheken existieren. Aus diesem Grund kommt für ein Screening [101] und für den Nachweis von Substanzen mit hohen therapeutischen Dosen [133;134] auch die HPLC mit Photodiodenarray-Detektion (DAD) in Frage. Für einige Substanzen wie z.B. LSD bietet die HPLC mit Fluoreszenzdetektion hervorragende Empfindlichkeiten im pg/mg-

Bereich [135].

In den letzten Jahren wurden erste Anwendungen der Capillarelektrophorese (CE) zur Bestimmung von Cocain, Morphin und MDMA [78;136] sowie von Methaqualon [137] publiziert. Allerdings werden die Nachweisgrenzen der in der Routine eingesetzten GC-MS noch nicht annähernd erreicht.

2.3 Grundlagen der Kapillargaschromatographie und Massenspektrometrie

2.3.1 Kapillargaschromatographie

Die Gaschromatographie ist die am weitesten verbreitete Methode in der Umweltanalytik. Unabdingbare Voraussetzung für die gaschromatographische Separation sind verdampfbare, flüchtige Substanzen in einem Temperaturbereich von 50-300°C.

Die flüchtigen Substanzen werden in einem Trägergasstrom (Inertgase wie He, Ar und N₂) durch die Säule geführt, auf der eine stationäre Phase fixiert ist. Kapillarsäulen für die GC bestehen aus mit Polyimid beschichtetem Borosilikat- oder Quarzglas, das innen im allgemeinen mit einem Polysiloxan-Gerüst als stationärer Phase belegt ist. Je nach Anforderungen für die Analytik kann zwischen Säulen unterschiedlicher Polarität gewählt werden. Eine höhere Polarität wird durch Phenyl-, Trifluorpropyl-, Cyanopropyl- o.ä. funktionellen Gruppen anstelle der üblichen Methylgruppen erreicht.

Die Trennung beruht dabei auf Adsorption und Desorption der Komponenten von der stationären Phase und im temperaturprogrammierten Betrieb auf der Verdampfungstemperatur. Der Detektor wird so von den Substanzen nach verschiedenen Strömungszeiten, den Retentionszeiten, erreicht.

Die Länge von Kapillarsäulen beträgt meist 25 bis 50 m, der Durchmesser 0,15 bis 0,53 mm, die Filmdicke der stationären Phase 0,2 bis 0,5 µm.

2.3.2 Massenspektrometrie

2.3.2.1 Funktionsprinzip

Die Massenspektrometrie zählt heute zu den wichtigsten Detektionsmethoden, da sie neben der Strukturaufklärung wegen der unkomplizierten Kopplungsmöglichkeit zu den Kapillarsäulen auch zur quantitativen Rückstandsanalytik genutzt werden kann.

Aus den Probesubstanzen werden in einer Ionenquelle gasförmige Ionen erzeugt, die im elektrischen Feld beschleunigt und zu einem Ionenstrahl gebündelt werden. In einem weiteren elektrischen und/oder magnetischen Feld werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) abgelenkt (Massenanalysator) und mit einem Detektor, meist

einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), registriert. Der im SEV erzeugte Entladungsstrom wird von einem Datenverarbeitungssystem in ein Massenspektrum umgesetzt, bei dem die Ionenhäufigkeit gegen das m/z-Verhältnis aufgetragen wird. Da in der Ionenquelle fast ausschließlich einfach geladene Ionen entstehen, stimmt das m/z-Verhältnis mit der Molekülmasse des Ions überein.

Bei den Massenspektrometern unterscheidet man zwischen hoch- und niedrigauflösenden Geräten. Hochauflösende Geräte wie die doppelfokussierenden Sektorfeldgeräte ermöglichen Aussagen über die exakte Masse. Sie sind deshalb besonders für die Strukturaufklärung von Bedeutung. Niedrigauflösende Massenspektrometer wie Quadrupol und Ion Trap führen zu einer Trennung nach ganzen Massen (Einheitsmassenauflösung). Für die qualitative und quantitative Rückstandsanalytik ist diese Auflösung meist ausreichend.

Für die vorliegende Arbeit wurde das Quadrupol-Massenspektrometer HP 5973 als massenselektiver Detektor (MSD) genutzt.

2.3.2.2 Ionisierungsverfahren

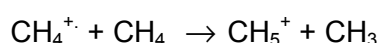
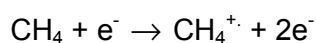
a) Elektronenstoßionisation (EI)

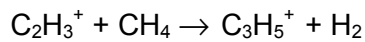
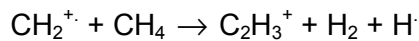
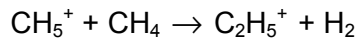
Die EI ist das Standardionisierungsverfahren bei GC/MS-Geräten. Die Ionisierungsenergie beträgt hier 70 eV. Zur Ionisierung von Molekülen wären auch ca. 10 eV ausreichend, doch ist bei 70 eV eine größtmögliche Ionenausbeute mit konstantem Fragmentierungsmuster bei gleichen Molekülen erhältlich. Als Konsequenz dieser hohen Energiezufuhr tritt eine größere Fragmentierung des Moleküls auf.

Die Aufnahme von Energie führt zum Verlust eines Elektrons aus einem Orbital der Probe-substanz und somit zur Bildung eines positiv geladenen radikalischen Molekülions M^+ . Durch die hohe Energiezufuhr und der damit verbundenen Fragmentierung ist das Molekülion nur in den seltensten Fällen der Basispeak, z.T. fehlt es völlig.

b) Chemische Ionisation (CI)

Diese Form der Ionisierung erzeugt hauptsächlich Molekül- bzw. Quasimolekülionen. Hierbei unterscheidet man zwischen negativ chemischer (NCI) und positiv chemischer Ionisierung (PCI). Für diese „sanfte“ Form der Ionisierung ist ein Reaktandgas nötig. Verwendung finden dafür vor allem Methan, Ammoniak, iso-Butan und Methanol. In den meisten Fällen wird das als „hartes“ Reaktandgas bekannte Methan für die PCI verwendet. In einer Primärreaktion wird durch die Energiezufuhr zum eingeleiteten Reaktandgas ein stabiles Cluster von Reaktandgasen erzeugt.





In der Sekundärreaktion setzen sich die Probemoleküle mit den Reaktandgasmolekülen um. Dadurch entsteht mit den Massen $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5)^+ = (\text{M}+29)^+$ und $(\text{M}+\text{C}_3\text{H}_5)^+ = (\text{M}+41)^+$ ein typisches Reaktandgascluster, das zur Absicherung der Molekülmasse herangezogen werden kann.

2.3.2.3 Messmodi des Massenspektrometers

a) Full Scan Modus

Hierbei wird ein vom Anwender festgelegter Massenbereich zyklisch vermessen. Die Ionenströme werden summiert als Total Ion Chromatogramm (TIC) dargestellt. Aus dem TIC können Massenspektren oder rekonstruierte Ionenchromatogramme (RIC) der einzelnen Ionen abgerufen werden.

b) Selected Ion Monitoring (SIM)

Hierbei kann der Anwender individuell ausgewählte Ionen vom MSD messen lassen. Da nur die gewählten Ionen gemessen werden, steht fast die gesamte Scanzeit (dwell time) für diese Ionen zur Verfügung. Dadurch ist eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung (bis zu 100 fach) möglich. Die Steigerung der Empfindlichkeit hat aber einen Informationsverlust zur Folge.

Die Ionenströme der ausgewählten Massen werden zum Multiple Ion Detection-Chromatogramm (MID) aufsummiert. Auch hier lassen sich die Ionenspuren einzeln aus dem MID extrahieren und darstellen.

3 Literaturübersicht zu Anwendungen der Headspace-Festphasenmikroextraktion in der toxikologischen Analyse

Seit der Einführung der Festphasenmikroextraktion Ende der 80er Anfang der 90er Jahre ist es zu einem sprunghaften Anstieg der Publikationen zu deren Anwendung gekommen. Diese betrafen zunächst einmal die Bestimmung flüchtiger und mittelflüchtiger Verbindungen aus Umweltproben. Erste Publikationen zum Nachweis von Substanzen aus klinischen und toxikologischen Proben erschienen 1994 von Yashiki et al. zum Nachweis von Amphetaminen und leicht entflammaren Substanzen aus Blut und Urin [138] sowie von Chiarotti und Marsili zur Bestimmung von Methadon aus Urinproben [139]. Mittlerweile existieren zahlreiche Veröffentlichungen zu einer großen Anzahl an Wirkstoffen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Nachweismethoden, die auf die direkte Extraktion der Analyten mit der SPME-Faser aus verdünntem Urin oder Serum basieren. Da in dieser Arbeit die faserschonende Headspace-SPME im Vordergrund stand, sei hier auf einige Review-Artikel verwiesen, die ausführlich auf den Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen aus diesen Matrices eingehen [140-144].

Die Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung von HS-SPME-Applikationen zum Nachweis von toxikologisch relevanten Substanzen aus biologischem Material. Die zahlreichen Anwendungen zur Bestimmung von Lösungsmitteln in Körperflüssigkeiten sind in dieser Tabelle nicht berücksichtigt. Es handelt sich dabei um alle gängigen Lösungsmittel wie Alkohole, Formaldehyd, Ketone, Ester, Benzen, Toluol, Xylen sowie halogenierte Kohlenwasserstoffe. Einen guten Überblick über Applikationen zu diesen Substanzen veröffentlichten Mills und Walker in einem Übersichtsartikel zur HS-SPME [145] sowie Namera et al. [146]. Guidotti und Vitali berichten über den HS-SPME-Nachweis von toxisch relevanten Substanzen, die am Arbeitsplatz oder über die Umgebungsluft oder über Lebensmittel und Trinkwasser aufgenommen werden [147].

Tabelle 2: Publikationen zu Anwendungen der HS-SPME in Humanproben

Substanz	Matrix	Matrixzusatz	Extraktions- temperatur in °C	Extraktionszeit in min	Fasertyp	Detektion	Ref.
Amphetamine:							
Amphetamin (A), MA	Urin	K ₂ CO ₃	80	5	PDMS	GC-MS-EI	[148]
A, MA	Blut	NaOH	80	5	PDMS	GC-MS-EI	[149]
A, MA, MDA, MDMA	Urin	NaCl	75	15	PDMS	GC-MS-EI	[150]
MDMA	Urin	NaCl	60	15	PDMS-DVB	GC-FID	[151]
A, MA, MDA, MDMA	Urin	NaOH, NaCl	100	10	PDMS	GC-MS-EI	[152]
Fenfluramin, A, MA	Blut	NaOH	70	15	PDMS	GC-MS-EI	[153]
A, MA	Blut	NaOH	90	30	PDMS	GC-MS-EI	[154]

Fortsetzung Tabelle 2:

Antidepressiva:							
Amitriptylin, Imipramin,	Urin	NaOH	100	15	PDMS	GC-FID	[155]
Clomipramin, Trimipramin	Blut	NaOH	100	60	PDMS	GC-FID	[156]
Setiptilin, Maprotilin, Mianserin	Blut	NaOH	120	45	PDMS	GC-MS-EI	[157]

Alkaloide:							
Nikotin, Cotinin	Urin	K ₂ CO ₃	80	5	PDMS	GC-MS-EI	[158]

Anaesthetica:							
Halothan	Blut, Urin, Leber, Hirn	H ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄				GC-MS-EI	[159]
Lidocain, Bupivacain, Mepivacain, Prilocain, Dibucain	Blut	NaOH	120	45	PDMS	GC-MS-EI	[160]

Antihistaminica	Blut, Urin	NaOH	98	10	PDMS	GC-FID	[161]
GHB	Blut, Urin	6N HCl	70	10	Carbowax/ TPR	GC-MS- PCI	[162]

Phenothiazin	Blut, Urin	NaOH	140	40	PDMS	GC-FID	[163]
	Blut, Urin		25		PA	LC-MS/MS	[164]
Phencyclidin	Blut, Urin	NaOH, K ₂ CO ₃	90	30	PDMS	GC-SID	[165]
Pethidin	Blut, Urin	NaOH, K ₂ CO ₃	100	30	PDMS	GC-FID	[166]
Cyanid	Blut	Na ₂ SO ₄	50	45	Carbowax/ DVB	GC-NPD	[167]

Organophosphorinsektizide	Blut	H ₂ SO ₄	120	10	PDMS	GC-MS-EI	[168;169]
	Blut, Urin	HCl, NaCl	100	25	PDMS	GC-NPD	[170]
Malathion	Blut	H ₂ SO ₄	90	5	PDMS	GC-MS-EI	[171]
Carbamate	Blut, Urin	NaCl	70	30	PDMS	GC-NPD	[172]
Dinitroanilin-Herbizide	Blut, Urin	Na ₂ SO ₄	90	30	PDMS	GC-ECD	[173]
Fettsäuren	Faeces	NaCl	50	30	PA	GC-MS-EI	[174]
Trimethylamin	Urin	HCl, K ₂ CO ₃	50	15	Carboxen/ PDMS	GC-MS-EI	[175]

Obwohl vergleichbar in der Art der Extraktion existieren nur wenige Veröffentlichungen zum Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen bzw. von Metabolismusprodukten mittels SPME aus Haaren. In Tabelle 3 sind die bisher, abgesehen von der vorliegenden Arbeit, im Haar nachgewiesenen Substanzen, verwendete Fasern und Extraktionsbedingungen sowie festgestellte Konzentrationen aufgelistet.

Tabelle 3: Anwendungen der SPME in der Haaranalytik

Substanz	Matrixzusatz	SPME-Bedingungen (Extraktionsart, Faser, Zeit, Temperatur)	Detektion	LOD/LOQ in ng/mg	Ref
Methadon, EDDP	Pronase E + DTT/TRIS-Puffer (pH 7,2), Borax-Puffer (pH 9,2), NaCl	Direktes Eintauchen, PDMS für 30 min bei 25°C	GC-MS-EI	2,5/3,5 0,15/0,36	[176]
Cannabinoide: THC, Cannabinol, Cannabidiol	NaOH, neutralisiert mit HCl und Phos- phatpuffer (pH 7,5)	Direktes Eintauchen, PDMS für 15 min bei 25°C	GC-MS-EI	0,1/k.A.*	[177]
Amphetamin (A), Methamphetamin (MA)	NaOH	HS-SPME, PDMS für 20 min bei 55°C	GC/NPD	0,1/k.A. (A) 0,4/k.A. (MA)	[178]

*k.A. = keine Angaben

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte

4.1.1 SPME

Die automatische Durchführung der SPME erfolgte mit dem Mehrzweckprobengeber MPS2 der Firma Gerstel, Mühlheim/Ruhr, Deutschland (siehe Abbildung 3). Die Steuerung der Extraktion erfolgte mit Hilfe der PAL-Loader-Software 2.2.1 (Handheld) bzw. der Gerstel Master-Software 1.78 (computerbasiert).

Die Faserhalter für die manuelle und automatische Probennahme, die verwendeten Fasern, die SPME-Insertliner mit einem Innendurchmesser von 0,75 mm sowie die SPME-Halterführung für die manuelle Injektion in den GC wurden von Supelco, Deisenhofen, Deutschland, bezogen.

Als Fasern wurden für die verschiedenen Untersuchungen eingesetzt:

- 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS)
- 65 µm PDMS/Divinylbenzen (DVB)
- 85 µm Polyacrylat (PA)
- 65 µm Carbowax/DVB
- 50/30 µm DVB/Carboxen an PDMS (Stable flex)

Die Fasern für die manuelle Injektion ließen sich durch Abdrehen der Feder auch für die automatische Probennahme nutzen, wenn keine speziell dafür produzierten Fasern vorhanden waren.

4.1.2 Geräte der Probenvorbereitung

Für den Aufschluss der Haare mit Natronlauge, die manuelle Probennahme mit der SPME-Faser, das Abdampfen von Lösungsmitteln sowie die Derivatisierung bei manueller Arbeitsweise wurde ein digital zwischen 30 und 120°C regulierbarer Heizblock der Firma Liebisch, Bielefeld, Deutschland, verwendet. Je nach Probengefäß wurde ein Metallblock mit angepassten Bohrungen in den Thermostat eingesetzt.

Das Schütteln der Proben erfolgte mit einem Vortex-Rüttler VF2 der Firma Jahnke & Kunkel GmbH und Co. KG, IKA Labortechnik Staufen, Deutschland, oder mit dem Mixer 5432 der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland. Ultraschallbehandlungen wurden mit dem Sonorex TK 52 Ultraschallbad (120 W, 35 kc/s) der Firma Bandelin, Berlin, Deutschland, durchgeführt.

Das Pulverisieren der Haarproben erfolgte, soweit erforderlich, mit der Schwingmühle M 2000 der Firma Retsch, Haan, Deutschland.

Für die Zentrifugation wurde eine Heraeus-Labofug 400 der Firma Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland, mit max. 3500 U/min verwendet.

Für die Homogenisierung der Nierenproben bei der Monofluoressigsäurebestimmung kam der Ultraturrax T25 der Firma Jahnke & Kunkel GmbH und Co. KG, IKA Labortechnik Staufen, Deutschland, zum Einsatz.

4.1.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für die Messungen standen zwei GC-MS-Anlagen mit folgenden Konfigurationen zur Verfügung:

- Gaschromatograph HP 5890/Serie II mit elektronischer Druckkontrolle (EPC) gekoppelt mit einem Massenspektrometer HP 5971 MSD und einem Autosampler HP 7673 gesteuert von der HP Chemstation-Software G1034C Version C.02.00 mit Hilfe eines HP-Vectra-Computers. Die chromatographische Trennung erfolgte an einer 30 m langen Kapillarsäule vom Typ HP 5-MS (95% Dimethylsiloxan, 5% Diphenylsiloxan) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Beschichtung von 0,25 µm. Als Trägergas wurde Helium 5.0 verwendet. Für den Probeneinlass wurden vorgebohrte Thermogreen LB2-Septen von Supelco, Deisenhofen, Deutschland, eingesetzt.
- Gaschromatograph HP 6890 plus, gekoppelt mit einem Massenspektrometer HP 5973 MSD, gesteuert von der HP Chemstation-Software G1701BA Version B.00.00 durch einen HP-Vectra-Computer. Auf diesem Gerät war der o.g. automatische Mehrzweckprobengeber MPS2 zur Durchführung der SPME montiert. Es wurden der gleiche Kapillarsäulentyp und die gleichen Septen wie bei dem zuerst beschriebenen Gerät verwendet.

4.2 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Lösungsmittel, Standards und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Merck, Darmstadt, Deutschland: Aceton, Methanol, n-Propanol, n-Hexan, Dimethylsulf-oxid (DMSO), Chloroform jeweils in Uvasol-Qualität, Natriumhydroxid, Natriumhydrogen-carbonat, Natriumsulfat, Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat x 2H₂O, Kaliumdi-hydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS) jeweils p.A., N-Methylbis-(trifluoracetamid) (MBTFA), Thionylchlorid p.A.
- Sigma, Deisenhofen, Deutschland: Myristinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure,

Ethylmyristat, Ethylpentadecanoat, Ethylpalmitat, Ethyloleat, Ethylstearat, D₆-Ethanol, Amitriptylin, Benzfetamin, Clomipramin, Desipramin, Fluoxetin, Lidocain, Phencyclidin

- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland: Chlorameisensäuremethylester, Chlorameisensäure-n-butylester,
- Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland: Monofluoressigsäure (Na-Salz)
- Radian, Austin, Texas, USA: Amphetamin, D₅-Amphetamin, EDDP, D₃-EDDP, EMDP, MA, D₅-MA, MDA, D₅-MDA, MDMA, D₅-MDMA, MDE, D₆-MDE, Methadon, D₃-Maprotilin, D₉-Methadon, Nortriptylin, D₃-Nortriptylin, Trichlorethanol und Valproinsäure
- Molecular Probes, Leiden, Niederlande: 1-Pyrenyldiazomethan

Folgende Vergleichssubstanzen wurden uns von den angegebenen Firmen für wissenschaftliche Zwecke dankenswerterweise zur Verfügung gestellt: Dimetacrin, Diphenhydramin, Ethylbenzhydramin, Imipramin, Nordiphenhydramin, Promethazin und Trimipramin (AWD-Pharmawerk Dresden), Doxepin und Nordoxepin (Boehringer Mannheim), Maprotilin und Norclomipramin (Ciba-Geigy, Basel, Schweiz), Clomethiazol und Etidocain (Astra-Zeneca, Lund, Schweden), Nikotin (Berlin-Chemie AG), Amfepramon (Marion Merrell Dow, USA), Metamfepramon (Temmler-Pharma, Marburg), Ketamin (Gödecke, Freiburg), Tramadol (Grünenthal, Aachen), Phendimetrazin (Alphapharm-Isis, Langenfeld), Chlorphenamin (Schering, Berlin), Propipocain (Jenapharm, Jena), Amantadin (Ratiopharm, Ulm), Memantin (Merz & Co. GmbH, Frankfurt/M.).

Phosphatpuffer (pH 7,6) nach Sörensen: 3,52 g Kaliumdihydrogenphosphat und 9,1 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2H₂O auf 1l bidestilliertes Wasser

Synthese der deuterierten Fettsäureethylester

Die deuterierten Standards D₅-Ethylmyristat, D₅-Ethylpalmitat, D₅-Ethyloleat und D₅-Ethylstearat wurden nach der Vorschrift von Blau und Dabre [115] auf folgende Weise synthetisiert: In ein 5 ml Glasgefäß wurden 50 µl D₆-Ethanol zu 10 mg der freien Säure gegeben. Die Mischung wurde mit Trockeneis auf -78°C abgekühlt. Danach wurden 10 µl Thionylchlorid (SOCl₂) zupipettiert. Unter wiederholtem Schütteln wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 40°C erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurden überschüssiges SOCl₂ und D₆-Ethanol bei Raumtemperatur mit Stickstoff abgedampft. Zur vollständigen Entfernung wurde das Reaktionsprodukt dreimal mit 1 ml n-Hexan aufgelöst und wieder eingedampft. Der ölige Rückstand (ca. 11-12 mg) wurde mit Chloroform so aufgenommen, dass sich eine Konzentration von 2 mg/ml ergab. Diese Stammlösungen wurden unter Lichtausschluss bei 0-4°C gelagert. Für die Analysen wurde eine Mischung der vier deuterierten FSEE von je 2 µg/ml in Chloroform eingesetzt. Die Identität der D₅-FSEE wurde durch GC-MS im Scan-Modus überprüft. Dabei konnten keine Rückstände der freien Fett-

säuren und anderer Verunreinigungen entdeckt werden.

4.3 Probenasservierung

4.3.1 Haarproben

Der größte Teil der Haarproben stammte vom im Institut für Rechtsmedizin der Charité obduzierten Todesfällen. Die Haare wurden bei der Sektion entweder mit Wurzel gewonnen oder mit einer Schere direkt über der Kopfhaut abgeschnitten. Die Haarproben wurden bei sichtbarer äußerer Verschmutzung mit einer 0,1%igen SDS-Lösung gewaschen, mit dest. Wasser gespült, zwischen Filterpapier und anschließend an Luft getrocknet. Die Aufbewahrung der getrockneten Haarproben erfolgte lichtgeschützt in verschlossenen PE-Gefäßen.

Angaben zur Vorgeschichte der Todesfälle wie Alter, Geschlecht und soweit bekannt zu Art und Häufigkeit der eingenommenen Medikamente oder Drogen und zu den Trinkgewohnheiten wurden den Obduktionsgutachten entnommen.

Haarproben von lebenden Probanden wurden von Freunden, Bekannten und Verwandten sowie von Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Charité durch Abschneiden eines 2-3 mm dicken Haarbüschels direkt über der Kopfhaut am Hinterhaupt gewonnen. Die Haare wurden mit einer Schnur fixiert, mit Klebestreifen auf einem Blatt Papier befestigt und das kopfnahere Ende wurde gekennzeichnet. Auf einem Fragebogen wurden Angaben zu Trinkverhalten, Medikamenteneinnahme, Neigung zum Schwitzen und Haarkosmetik sowie Alter und Geschlecht erfasst. Um den Datenschutz zu gewährleisten, wurden sämtliche persönnengebundenen Angaben in dieser Arbeit anonymisiert. Zur Durchführung dieser Untersuchungen liegt ein Votum der Ethikkommission in der Charité der Humboldt-Universität vor.

4.3.2 Haarvorbehandlung

Die Haarproben wurden bei starker Verschmutzung wie oben beschrieben mit 0,1%iger SDS-Lösung vorgewaschen. Vor den Untersuchungen erfolgte für alle Haarproben zunächst eine 3 minütige Wäsche mit dest. Wasser und anschließend eine 5 minütige Wäsche mit Aceton jeweils im Ultraschallbad. Danach wurden die Haarproben zwischen Filterpapier getrocknet. Für die weitere Bearbeitung wurden sie mit einer Schere in 2-5 mm lange Stücke zerschnitten.

4.3.3 Anlegen eines Haarpools

Für die Methodenoptimierung wurde ein Haarpool aus Proben von Freiwilligen angelegt, die keine Drogen oder andere in dieser Arbeit untersuchte Substanzen eingenommen hatten.

Die Haarproben der Freiwilligen wurden separat mit dest. Wasser für 3 min und mit Aceton für 5 min im Ultraschallbad gewaschen. Nach Trocknung der Haare zwischen Filterpapier

wurden sie in 3-5 mm Stücke geschnitten und anschließend in Edelstahlbehälter mit Metallkugeln gegeben, worin sie dann mit Hilfe der Schwingmühle in 10 min zu Haarpulver zermahlen wurden. Das Haarpulver der verschiedenen Proben wurde vereinigt und gründlich durchmischt.

4.3.4 Blut- und Serumproben

Blutproben wurden auf freiwilliger Basis von Mitarbeitern des Instituts durch einen Arzt in ein Vacutainerröhrchen ohne Zusatz von Gerinnungshemmern entnommen. Das Blut wurde für 10 min bei 3500 U/min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei -21°C gelagert. Bei Todesfällen asserviertes Schenkkelvenenblut wurde bis zur Untersuchung in PE-Gefäßen bei 4°C aufbewahrt.

4.4 Probenaufarbeitung und Festphasenmikroextraktion

In diesem Abschnitt werden die Vorschriften angegeben, wie sie nach Optimierung der Bedingungen erhalten wurden. Die Methodenoptimierung wird im Abschnitt Ergebnisse und Diskussion beschrieben. Die konkreten SPME-Bedingungen sind in Abschnitt 4.4.9 tabellarisch für alle untersuchten Analyten zusammengefasst.

4.4.1 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge bei manueller SPME

10 mg der wie nach 4.3.1 beschriebenen vorbehandelten und in Stücke geschnittenen Haare wurden in ein 4 ml Schraubgläschen eingewogen. Alternativ dazu wurden 10 mg des Haarpoils für die Methodenoptimierung eingesetzt. Dazu wurden 1 ml 1 N Natronlauge und 0,5 g NaCl bzw. Na_2SO_4 sowie 10 ng des jeweiligen internen Standards in dem jeweiligen Lösungsmittel gegeben. Die mit einem Septum verschlossenen Gefäße wurden 20-30 min bei 80°C zur Hydrolyse der Haare erhitzt. Zwischendurch wurde das Probengefäß mehrfach geschüttelt, um eventuell an der Glaswand haftende Haarsegmente einzubeziehen.

Im Anschluss an die Hydrolyse wurde die SPME-Faser mittels der Septumnadel durch das Septum in das Gefäß eingebracht und zur Adsorption für 15-30 min bei 80°C in den Dampfraum über der Lösung ausgefahren. Danach wurde sie zur Desorption der Analyten und zur Regeneration für 5 min in den abhängig von der Art der Faser $250-290^{\circ}\text{C}$ heißen Injektor des Gaschromatographen überführt.

4.4.2 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge und automatischer SPME

10 mg der gewaschenen und zerkleinerten Haarproben wurden in ein 10 ml Headspace-Gefäß eingewogen. Nach Hinzufügen von 1 ml 1 N Natronlauge und 0,5 g NaCl bzw. Na_2SO_4 sowie 10 ng des jeweiligen internen Standards wurde das Gefäß mit einer magnetischen Stahlkappe zugekrimpmt und in den Probenständer des MPS2 Autosamplers

gestellt. Die Analysenparameter der jeweiligen Untersuchung wurden am Bedienmodul des MPS2 eingegeben und die Messung gestartet. Je nach verwendeter Methode betrug die Vorheizzeit 20-30 min bei 80-100°C, die Adsorptionszeit 15-30 min bei gleichen Temperaturen, die Schüttelgeschwindigkeit 150 U/min und die Desorptionstemperatur 250-290°C.

4.4.3 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge *in sample* Derivatisierung mit Alkylchloroformiaten und automatischer SPME

Die Teilschritte dieser Analyse sind im oberen Teil der Abbildung 7 dargestellt.

Das wie in 4.4.2 beschrieben vorbereitete und verschlossene Probengefäß wurde zur Hydrolyse der Haarprobe für 30 min bei 80°C in einem Heizblock erwärmt. Nach dem Abkühlen des so erhaltenen Haarhydrolysats wurden das Gefäß geöffnet, 1 ml 0,1 M HCl, 60 mg Natriumhydrogencarbonat sowie 4 µl Methyl- bzw. Butylchloroformiat hinzugegeben. Nach erneutem Verschließen der Probe erfolgte die automatische Bearbeitung unter folgenden Bedingungen: Adsorption an einer 100 µm PDMS-Faser im Agitator bei 150 U/min und 100°C für 30 min (Vortemperierung 5 min), Desorption für 10 min bei 260°C im Injektor des GC durchgeführt.

4.4.4 Haaraufschluss mit 1 N Natronlauge bei automatischer SPME und anschließender *on fiber* Derivatisierung mit MBTFA

Die Teilschritte dieser Analyse sind im unteren Teil der Abbildung 7 dargestellt.

Zu 10 mg der gewaschenen und zerkleinerten Haarprobe wurden in ein 10 ml Headspace-Gefäß 1 ml 1 N Natronlauge und 0,5 g NaCl sowie 10 ng des jeweiligen internen Standards hinzugefügt. Das mit einer magnetischen Stahlkappe zugedrückte Gefäß wurde dann zum Zweck der Hydrolyse 20 min bei 80°C und 250 U/min im Agitator des MPS2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Adsorption an einer 85 µm PA-Faser für 30 min bei 80°C und 150 U/min. Die Faser wurde dann in den Dampfraum eines auf einer anderen Position im Agitator stehenden Headspace-Gefäßes, in den sich 30 µl MBTFA befanden, überführt. Nach 20 min Derivatisierung bei 80°C wurde 10 min bei 260°C im GC-Injektor desorbiert.

4.4.5 Lösungsmittlextraktion der Haare zum Nachweis von Fettsäureethylestern

50 mg mit 0,1% SDS gewaschene und anschließend getrocknete und zerkleinerte Haare wurden in ein 4 ml Schraubdeckelgläschen eingewogen. Es wurden 0,5 ml DMSO und 2 ml n-Hexan sowie 20 µl der D₅-FSEE-Lösung in Chloroform (s. Abschnitt 4.2), d.h. 40 ng von jedem der vier deuterierten Ester, hinzugefügt. Das zugeschraubte Vial wurde 14 h geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die Hexan-Phase wurde abpipettiert und in ein 10 ml Headspace-Gefäß überführt. Nach vorsichtigem Abdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurden 0,5 g NaCl und 1 ml Phosphatpuffer nach Sørensen pH 7,6 in das Gefäß

gegeben. Das mit einer Stahlkappe zugeklimmte Gefäß wurde zum Inkubieren für 5 min bei 100°C in den Agitator des MPS2 gestellt. Die Adsorption erfolgte an einer 65 µm PDMS/DVB-Faser für 30 min bei 100°C und 150 U/min, die anschließende Desorption im GC-Injektorblock für 10 min bei 250°C.

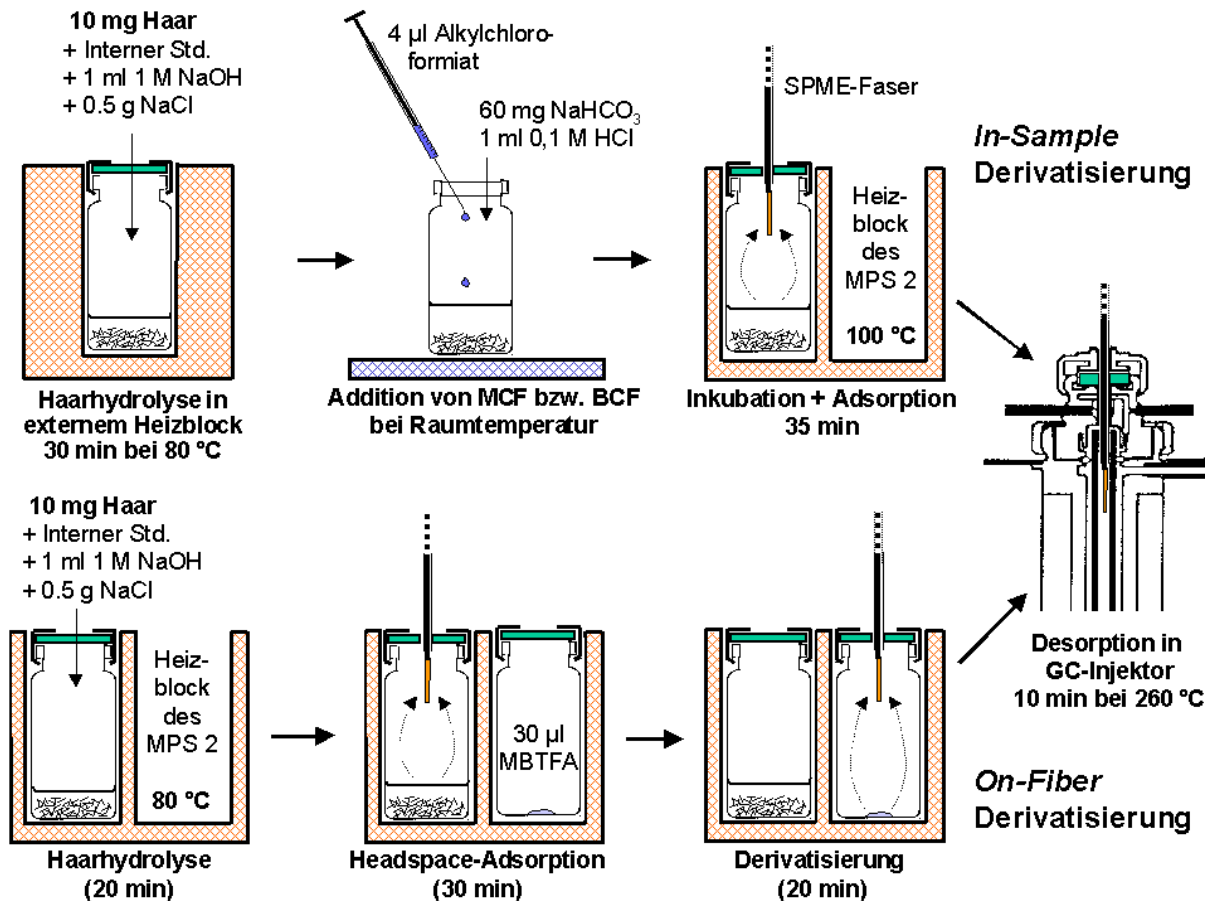


Abbildung 7: Schritte bei der Analyse von Haaren auf Drogen- und Medikamentenwirkstoffe nach Kombination von alkalischer Haarhydrolyse, Headspace-SPME, Derivatisierung und GC-MS.

4.4.6 Lösungsmittelextraktion zum Nachweis von Clomethiazol aus Haaren

Zu 10 mg der nach 4.3.2 vorbereiteten Haare wurden 1 ml Phosphatpuffer pH 6,0 und 10 ng/mg Diethylanilin als interner Standard gefügt. Die Probe wurde 12 h im Ultraschallbad extrahiert. Nach Zugabe von 0,5 g Na₂SO₄ zum abgetrennten wässrigen Extrakt wurde mit einer 65 µm Carbowax-DVB-Faser für 15 min bei 60°C im Heizblock adsorbiert. Die Desorption im Injektor wurde für 5 min bei 250°C durchgeführt.

4.4.7 Extraktion von Valproinsäure und Trichlorethanol aus Serum- und Urinproben

Zu 10 oder 20 µl Blut oder Serum bzw. zu 10 µl Urin wurden 1 ml Phosphatpuffer pH 2,3, 0,5 g Na₂SO₄ und 5 µg des internen Standards (= 50 µl der Standardlösungen Trichlorethanol 100 µg/ml bei einer Valproinsäurebestimmung bzw. Valproinsäure 100 µg/ml jeweils in dest. Wasser bei einer Trichlorethanolbestimmung) gegeben. Parallel wurden zu einer

zweiten, gleichermaßen vorbereiteten Probe zusätzlich 50 µg Trichlorethanol- bzw. Valproinsäure-Standard (= 50 µl bei einer Konzentration von 1 mg/ml) dotiert (Verfahren der Standardaddition). Nach Verschließen der Gefäße erfolgte die automatisierte HS-SPME mit dem MPS2 mittels einer 65 µm PDMS/DVB-Faser für 15 min bei 60°C, die Desorption für 10 min bei 250°C. Um die glucuronierten Metabolite zu erfassen, wurde vor der Untersuchung eine Glucuronidspaltung der Blut- und Urinproben mit β-Glucuronidase (50 µl für 1 ml Probe) für 60 min bei 45°C durchgeführt.

4.4.8 Extraktion und *on fiber* Derivatisierung zum Nachweis von Monofluoressigsäure aus Serum, Urin, Mageninhalt und Niere

Zu 200 µl Serum oder Vollblut, 20 µl Urin bzw. 20 µl Mageninhalt wurden 1,2 ml 1 M Schwefelsäure, 200 ng D₃-Essigsäure und 0,7 g Na₂SO₄ in ein 10 ml Headspace-Gefäß gegeben. Zu 1 g Niere wurde 1 ml 0,9% ige Kochsalzlösung und 200 ng D₃-Essigsäure gegeben. Nach Homogenisierung mit dem Ultraturrax wurde 1 g des Homogenisats mit 3 ml dest. Wasser verdünnt und danach 15 min im Ultraschallbad behandelt. Davon wurden dann 200 µl ebenso wie die Blutproben weiterverarbeitet. Das zugekrimpste Gefäß wurde 15 min bei 90°C und 250 U/min inkubiert. Eine PDMS/DVB/Carboxen-Faser wurde parallel dazu 15 min in eine Pyrenyldiazomethan-Lösung (PDAM 2,5 mg/ml in n-Hexan) eingetaucht. Die so mit PDAM beladene SPME-Faser wurde dann in den Dampfraum über der Probenlösung überführt. Dort verblieb sie 30 min bei 90°C und 150 U/min für die Adsorption. Die Desorption im Injektor erfolgte bei 250°C für 10 min.

4.4.9 Übersicht zur Probenvorbereitung

Für die in den vorangegangenen Abschnitten allgemein gegebenen Vorschriften sind in Tabelle 4 die konkreten Bedingungen für die jeweils analysierten Wirkstoffe angegeben.

Tabelle 4: Probenvorbereitung und SPME-Bedingungen für die untersuchten Substanzen

Substanz	ISTD*	Matrix	Probenvorbereitung	Referenz- kapitel	Faser	SPME-Bedingungen	Derivatisierung
Amantadin	Memantin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.4	PA	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C	MBTFA
Amfepramon	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Amitriptylin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Amphetamin	D ₅ -Amphetamin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.4	PA	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C	MBTFA
				4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	BCF
Benzfetamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Chlorphenamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Clomethiazol	Diethylanilin	Haar	Extraktion mit Phosphatpuffer pH 6,0	4.4.6	PDMS/DVB	Ads.: 15 min, 60°C	keine

Fortsetzung Tabelle 4: Probenvorbereitung und SPME-Bedingungen

Clomipramin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Diphenhydramin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Doxepin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Doxylamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
EDDP	D ₃ -EDDP	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.2	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
EMDP	D ₃ -EDDP	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.2	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Ethylmyristat	D ₅ -Ethylmyristat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	4.4.5	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Ethyloleat	D ₅ -Ethyloleat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	4.4.5	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Ethylpalmitat	D ₅ -Ethylpalmitat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	4.4.5	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Ethylstearat	D ₅ -Ethylstearat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	4.4.5	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Fluoxetin	D ₃ -Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF
Imipramin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Ketamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Lidocain	Etidocain	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	Carbowax/DVB	Ads.: 20 min, 80°C	keine
MA	D ₅ -MA	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.4	PA	Ads.: 30 min, 80°C	MBTFA
				4.4.3	PDMS	Deriv.: 25 min, 80°C	BCF
Maprotilin	D ₃ -Maprotilin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine
MDA	D ₅ -MDA	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.4	PA	Ads.: 30 min, 80°C	MBTFA
				4.4.3	PDMS	Deriv.: 25 min, 80°C	BCF
MDEA	D ₆ -MDEA	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.4	PA	Ads.: 30 min, 80°C	MBTFA
				4.4.3	PDMS	Deriv.: 25 min, 80°C	BCF
MDMA	D ₅ -MDMA	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.4	PA	Ads.: 30 min, 80°C	MBTFA
				4.4.3	PDMS	Deriv.: 25 min, 80°C	BCF
Metamfepramon	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Methadon	D ₃ -Methadon	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.2	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine
Methaqualon	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Monofluoressigsäure	D ₃ -Essigsäure	Blut	1 M H ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄	4.4.8	PDMS/DVB/Carboxen	Ads.: 30 min, 90°C	PDAM
Nicotin	N,N-Diethylanilin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Norclomipramin	D ₃ -Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF
Nordiphenhydramin	Fluoxetin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF
Nordoxepin	D ₃ -Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF
Nortriptylin	D ₃ -Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.3	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF

Fortsetzung Tabelle 4: Probenvorbereitung und SPME-Bedingungen

Phencylidin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Phendimetracin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Promethazin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Tramadol	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Trichlorethanol	Valproinsäure	Blut, Urin	Phosphatpuffer pH 2,3, Na ₂ SO ₄	4.4.7	PDMS/DVB	Ads.: 15 min, 60°C	keine
Trimipramin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	4.4.1	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine
Valproinsäure	Trichlorethanol	Blut, Urin	Phosphatpuffer pH 2,3, Na ₂ SO ₄	4.4.7	PDMS/DVB	Ads.: 15 min, 60°C	keine

[†] Ads. = Adsorptionsbedingungen, Deriv. = Derivatisierungsbedingungen, ISTD = interner Standard

4.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die anfangs 30 m lange GC-Säule wurde in regelmäßigen Abständen injektorseitig um ca. 0,5 m gekürzt, um eine optimale Trennleistung zu gewährleisten. Die Trägergasgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min. Die Injektionen erfolgten im Split/Splittless-Modus für 3 min bei geschlossenem Split.

GC-Ofenprogramme:

- Programm I: Initialtemperatur 50°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 250°C, gehalten für 5 min
- Programm II: Initialtemperatur 70°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 300°C, gehalten für 5 min
- Programm III: Initialtemperatur 100°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 300°C, gehalten für 2 min
- Programm IV: Initialtemperatur 150°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 300°C, gehalten für 2 min
- Programm V: Initialtemperatur 100°C für 2 min, Heizrate 30°C/min bis 205°C, dann mit 2,5°C/min bis 240°C und weiter mit 30°C bis 290°C

Für die Massenspektrometrie wurde die in Kapitel 4.1.3 beschriebene GC-MS-Kombination eingesetzt. Die MS-Interface-Temperatur des MSD 5973 betrug 280°C, die Quelltemperatur 230°C und die Quadrupoltemperatur 106°C. Die Ionisierung lag bei 70 eV, die Elektronenmultiplier-Spannung bei 200 V über der nach dem Standard-Spectra-Autotune erhaltenen Spannung. Die Dwell-time, die Zeit, die für die Messung jeder einzelnen vorgegebenen Masse zur Verfügung steht, wurde so gewählt, dass alle Massen mindestens zweimal je Sekunde gemessen wurden. Für jeden Analyten wurden anhand des Massenspektrums mindestens zwei charakteristische und intensive Ionen (m/z) für das Selected Ion Monitoring (SIM-

Modus) ausgewählt. In Tabelle 5 sind die für die hier untersuchten Substanzen verwendeten Ionen mit ihrem m/z und das Temperaturprogramm aufgeführt.

Tabelle 5: Detektierte Ionen (m/z) der nachgewiesenen Substanzen und der internen Standards (fett markierte Ionen zur Quantifizierung)

Substanz	Temperaturprogramm	Detektierte Ionen im SIM-Modus
Amantadin-TFA	III	92, 190, 247
Amfepramon	V	72, 77, 100
Amitriptylin	III	58 , 202, 215
Amphetamin-BC	III	118, 144
D ₅ -Amphetamin-BC		123, 148
Amphetamin-TFA	III	118, 140
D ₅ -Amphetamin-TFA		123, 144
Benzfetamin	V	91, 148
Chlorphenamin	V	58, 167, 203
Clomethiazol	I	85, 112 , 161, 163
Clomipramin	IV	58 , 85, 269 , 314
N,N-Diethylanilin	I	77, 106 134 149
Dimetacrin	IV	58, 86, 279, 294
Diphenhydramin	II	58 , 152, 167
Doxepin	IV	58 , 202, 219
Doxylamin	V	58 , 71, 167
EDDP	III	262, 276, 277
D ₃ -EDDP		265, 279, 280
EMDP	III	115, 130, 208
D ₃ -Essigsäure-PDAM	III	215, 277
Ethylbenzhydramin	III	58, 86 , 165, 167
Ethylmyristat	II	88, 101, 157, 213, 256
D ₅ - Ethylmyristat		93, 106, 162, 218, 261
Ethyloleat	II	88, 101, 310
D ₅ - Ethyloleat		93, 106, 315
Ethylpalmitat	II	88, 101, 157, 241, 284
D ₅ - Ethylpalmitat		93, 106, 162, 246, 289
Ethylstearat	II	88, 101, 157, 269, 312
D ₅ - Ethylstearat		93, 106, 162, 274, 317
Etidocain	II	86, 128 , 247
Fluoxetin-MC	II	102 , 206, 229
Imipramin	V	58 , 193, 234, 280
Ketamin	V	180 , 182, 209
Lidocain	II	86 , 234
MA-BC	II	158 , 176
D ₅ -MA-BC		162 , 181
MA-TFA	II	118, 154
D ₅ -MA-TFA		119, 158
Maprotilin-MC	IV	102, 128, 307
D ₃ -Maprotilin-MC	IV	105, 131, 310

Fortsetzung Tabelle 5: Detektierte Ionen (m/z)

MDA-BC	II	144 , 162, 279
D ₅ -MDA-BC		148 , 167, 284
MDA-TFA	II	135 , 275
D ₅ -MDA-TFA		136 , 280
MDEA-BC	II	172 , 234, 307
D ₅ -MDEA-BC		178 , 240, 313
MDEA-TFA	II	168 , 303
D ₅ -MDEA-TFA		174 , 309
MDMA-BC	II	135, 158 , 293
D ₅ -MDMA-BC		136, 162 , 298
MDMA-TFA	II	154 , 289
D ₅ -MDMA-TFA		158 , 294
Memantin-TFA	II	106, 204, 218, 275
Methadon	III	72 , 294
D ₉ -Methadon		78 , 303
Methaqualon	V	233, 235 , 250
Monofluoressigsäure-PDAM	III	215, 292
Nicotin	V	84 , 133, 161, 162
Norclomipramin-MC	IV	130, 227, 242
Nordiphenhydramin-MC	II	102 , 152, 167, 183
Nordoxepin-MC	IV	102 , 221, 323
Nortriptylin-MC	IV	102 , 321
D ₃ -Nortriptylin-MC		105 , 324
Phencyclidin	V	91, 200 , 243
Phendimetracin	V	57 , 85, 191
Promethazin	V	72 , 180, 213, 284
Propipocain	II	121 , 163 , 178
Tramadol	V	58 , 135, 263
Trichlorethanol	I	77 , 82 , 113 , 115 , 148
Trimipramin	V	58 , 234, 249
Valproinsäure	I	73 , 102 , 115

4.6 Kalibration, Quantifizierung, Extraktionsausbeuten

Für die Quantifizierung wurde das in Kapitel 4.5 durch Fettdruck hervorgehobene Ion zur Flächenermittlung herangezogen. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und der im charakteristischen Peakflächenverhältnis vorliegenden Massenspuren. Für die sichere Quantifizierung wurde eine Abweichung der Verhältnisse der einzelnen Ionen voneinander von 20% toleriert, im Bereich der Nachweisgrenze sind aber Abweichungen von bis zu 40% möglich.

Die Flächenberechnung erfolgte rechnergestützt mit dem Chemstation Integrator. Alle Peakintegrationen wurden nachträglich kontrolliert und bei ungenauer Basislinienerkennung oder Peaktrennung manuell nachintegriert.

Für die Kalibration wurden mindestens fünf Messpunkte herangezogen. Dabei wurden die

Kalibrationsproben wie reale Proben behandelt. Das bedeutet, dass Leerhaar- bzw. Leerserumproben mit verschiedenen Mengen des jeweiligen Analytstandards und gleichbleibender Menge des internen Standards vor der Aufarbeitung dotiert und dann wie die Realproben aufgearbeitet und gemessen wurden. Für die Kalibrationskurven wurde jeweils das Verhältnis der Peakfläche des Analyten zum internen Standard verwendet.

Die Nachweisgrenzen wurden bestimmt, indem das Grundrauschen von Negativproben ermittelt wurde. Eine Analyt galt dann als nachgewiesen, wenn er bei mindestens zwei (bei Substanzen mit nur zwei charakteristischen Ionen) bzw. drei Ionen ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 3:1 aufwies. Für die Bestimmungsgrenze musste das Signal-Rausch-Verhältnis bei dem für die Quantifizierung verwendeten Ionen 10:1 betragen.

Angegebene HS-SPME-Extraktionsausbeuten von Wirkstoffen wurden bestimmt, indem die Peakfläche einer direkt injizierten Menge mit der verglichen wurden, die nach optimierten SPME-Bedingungen aus der mit gleicher Absolutmenge dotierten Probenmatrix erhalten wurde. Angaben zu relativen Extraktionsausbeuten beziehen sich auf den Vergleich der nach SPME ermittelten Peakfläche des Analyten aus einer matrixfreien wässrigen Lösung und aus einer mit der gleichen Menge dotierten matrixbehafteten Lösung.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Kombination der alkalischen Hydrolyse von Haarproben mit der HS-SPME

Die Auflösung bzw. „Verdauung“ der Haarmatrix in alkalischer Lösung, z.B. mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung, ist eine der effizientesten und bequemsten Probenaufarbeitungsmethoden, sofern die Analyten unter diesen Bedingungen stabil sind. Als Beispiele hierfür seien hier nur Carbamazepin [179], Amphetamine [89] und tricyclische Antidepressiva [180] genannt. Ester, wie die forensisch besonders wichtigen Drogen Heroin und Cocain, hydrolysieren allerdings bei dieser Aufarbeitung. Bei Verwendung der HS-SPME nach alkalischer Hydrolyse ergibt sich der Vorteil, dass in dem Gefäß weitergearbeitet werden kann, das auch für die Hydrolyse genutzt wurde. Notwendige Voraussetzung für die Headspace-Extraktion ist, dass die Analyten in nicht ionisierter Form vorliegen. Das ist im alkalischen Medium bei basischen und neutralen Substanzen der Fall. Verbindungen mit COOH-, phenolischer OH- oder SH-Gruppe sind generell von diesem in einer Stufe ablaufenden Hydrolyse/HS-SPME-Verfahren ausgeschlossen. Sie benötigen eine pH-Einstellung nach der Haarauflösung. Für primäre und sekundäre Amine kann andererseits eine Derivatisierung als Voraussetzung für die GC-MS-Analyse unumgänglich sein.

In den folgenden Abschnitten wird auf die Ergebnisse der Untersuchungen zu allgemeinen strukturellen Voraussetzungen für die HS-SPME in Kombination mit der alkalischen Haarhydrolyse und auf die Optimierung und Anwendung von SPME-Methoden für ausgewählte toxikologisch und forensisch relevante Substanzen eingegangen.

5.1.1 Einfluss der Struktur und Siedepunkte einzelner Substanzen auf die Eignung für die HS-SPME

Für diese Untersuchungen wurden die in Tabelle 6 aufgeführten basischen und hydrolysestabilen Drogen- und Medikamentenwirkstoffe mit verschiedenen Siedepunkten (hauptsächlich tertiäre Amine) ausgewählt. Mit Hilfe dieser Substanzen sollte die generelle Eignung der HS-SPME nach alkalischer Hydrolyse überprüft werden. Zunächst wurde ein Gemisch dieser Substanzen mit einer Konzentration von 100 ng/µl direkt in den GC injiziert, um Retentionszeiten und Massenspektren zu erhalten. Ausgehend davon wurde eine SIM-Methode erstellt, durch die in 9 Zeitfenstern alle Wirkstoffe erfasst wurden und eine HS-SPME aus dem Extraktionsgemisch von 1 ml 1 M NaOH und 0,5 g Na₂SO₄ mit je 100 ng/ml der Wirkstoffe in Abwesenheit der Haarmatrix für 15 min bei 70°C an einer 85 µm Polyacrylat-Faser durchgeführt. In der nächsten Phase der Untersuchungen wurden zu je 10 mg Haar 1, 3, 10, 30 bzw. 100 ng der Analyten und das Extraktionsgemisch gegeben. Nach 30 min Hydrolyse bei 80°C wurde die HS-SPME wie zuvor beschrieben durchgeführt. So sollten erste Anhaltspunkte für die Empfindlichkeit der Methode aus dem Haarhydrolysat gewonnen werden. In Tabelle 6

sind für die untersuchten Substanzen die nach Temperaturprogramm V erhaltenen Retentionszeiten, die im SIM-Programm registrierten m/z-Werte und die Nachweisbarkeit bei den fünf zugesetzten Mengen aufgelistet.

Tabelle 6: Nachweis einiger Drogen- und Medikamentenwirkstoffe mittels HS-SPME und GC-MS aus dotierten Haarproben.

Substanz	Retentionszeit in min ^{a)}	Detektierte Ionen m/z, Basispeak fett	Detektion in 10 mg Haar nach Zugabe von ng/mg: ^{b)}				
			0.1	0.3	1.0	3.0	10.0
Nicotin	5.49	84 , 133, 161, 162	-	-	+	+	+
Metamfepramon	5.63	72 , 120, 175	+	+	+	+	+
Phendimetrazin	6.14	57 , 85, 191	+	+	+	+	+
Amfepramon	6.13	100 , 72, 77	+	+	+	+	+
Benzfetamin	8.85	91 , 148	+	+	+	+	+
Diphenhydramin	9.11	58 , 165, 73	+	+	+	+	+
Ketamin	9.11	180 , 182, 209	+	+	+	+	+
Phencyclidin	9.51	200 , 91, 243	-	+	+	+	+
Doxylamin	9.68	58 , 71, 167	-	+	+	+	+
Tramadol	10.07	58 , 135, 263	+	+	+	+	+
Ethylbenzhydramin	10.69	86 , 58, 152, 165, 167	+	+	+	+	+
Chlorphenamin	10.88	203 , 58, 167	-	-	+	+	+
Methadon	13.05	72 , 223, 295	+	+	+	+	+
Methaqualon	13.38	235 , 233, 250	-	-	+	+	+
Amitriptylin	13.98	58 , 202, 215	+	+	+	+	+
Trimipramin	14.45	58 , 234, 249	-	+	+	+	+
Imipramin	14.52	58 , 193, 234, 280	-	+	+	+	+
Doxepin	14.61	58 , 234	-	+	+	+	+
Promethazin	15.63	72 , 180, 213, 284	-	+	+	+	+
Dimetacrin	16,50	58 , 86, 279, 294	-	-	+	+	+
D ₉ -Methadon (ISTD)	12,90	78 , 303					

Abbildung 8 zeigt das SIM-Chromatogramm einer mit je 10 ng der Analyten dotierten 10 mg Haarprobe (Ausnahme Ethylbenzhydramin: 100 ng). Diphenhydramin und Ketamin ließen sich erst nach der Extraktion der einzelnen Ionenspuren trennen. Methaqualon konnte bei diesen Bedingungen gerade noch detektiert werden. Nicht detektiert werden konnten die nicht in Tabelle 6 aufgelisteten Substanzen Carbamazepin, Coffein, Maprotilin und Phenzon. Maprotilin als sekundäres Amin weist underivatisiert zu schlechte chromatographische Eigenschaften auf. Mit einer speziellen, für polare Substanzen geeigneten Kapillarsäule wäre eine zufriedenstellende Detektion erreichbar, wie Namera et al. bei der SPME von tetracyclischen Antidepressiva aus Blutproben bewiesen [157]. Carbamazepin und Coffein sind wegen ihrer hohen Hydrophilie mittels HS-SPME nicht bzw. nur ungenügend extrahierbar.

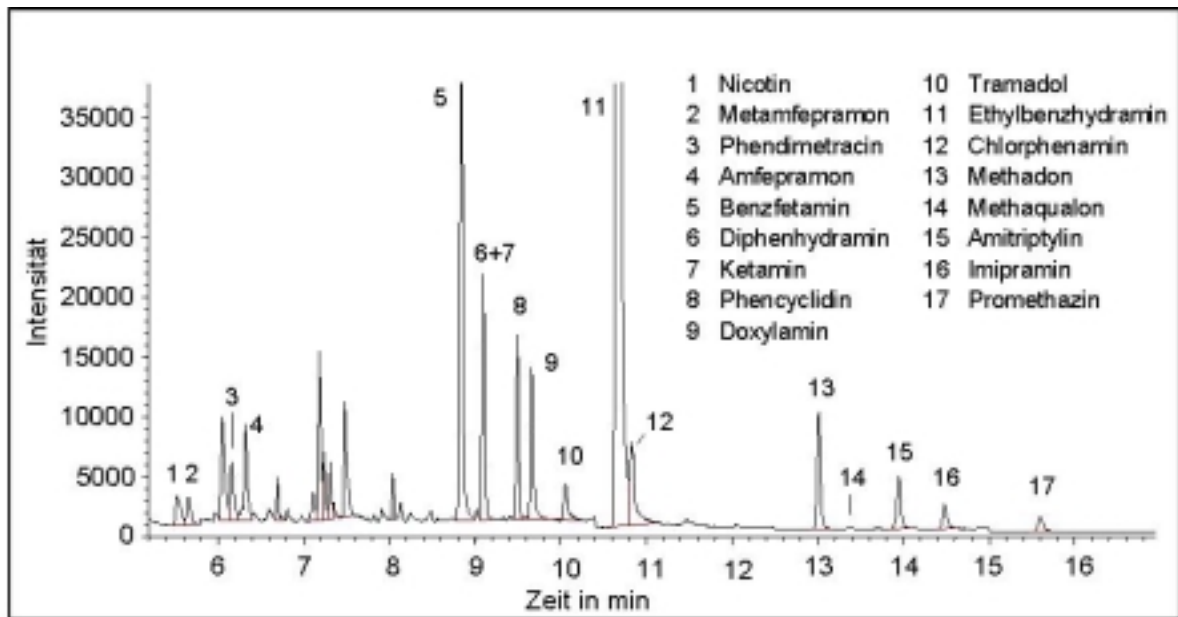


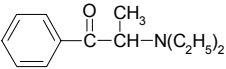
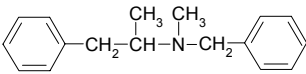
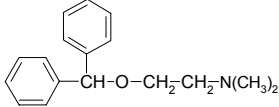
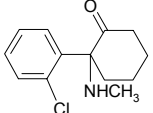
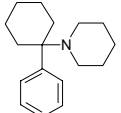
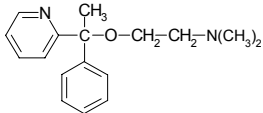
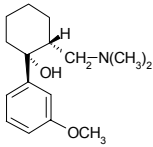
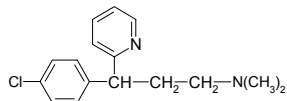
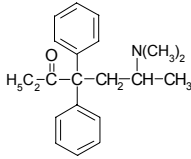
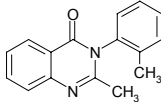
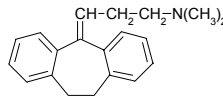
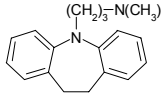
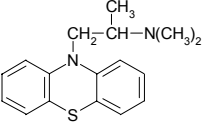
Abbildung 8: GC-MS/SIM-Chromatogramm einer mit 17 Substanzen dotierten 10 mg Haarprobe eines Nichtrauchers nach HS-SPME. Konzentration je 1 ng/mg, Ethylbenzhydramin 10 ng/mg. HS-SPME-Bedingungen: 15 min bei 70°C an einer 85 µm PA-Faser. SIM-Messung in 9 Zeitfenstern unter Verwendung der in Tabelle 6 angegebenen Ionen.

Um die Effizienz der HS-SPME für die untersuchten Wirkstoffe bei den gewählten Bedingungen abzuschätzen, wurden die absoluten und relativen Extraktionsausbeuten bestimmt. Dabei wurden die nach HS-SPME aus 10 mg Haar erhaltenen Peakflächen mit denen, die nach direkter Injektion der gleichen Menge (absolute) bzw. nach Extraktion aus der matrixfreien Lösung (relative Ausbeute) erhalten wurden, verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung für 15 der 17 Substanzen bei 4 verschiedenen Konzentrationen (0,3, 1,0, 3,0 und 10 ng/mg) im Beisein von 10 mg Haarpool zeigt die Tabelle 7. Darin enthalten sind ebenfalls, soweit vorhanden, die Literaturdaten zu den Siedepunkten einzelner Wirkstoffe bei reduziertem Druck. Die absoluten Extraktionsausbeuten aus dotiertem Haar lagen zwischen 0,04% (für Methaqualon) und 5,7% für Benzfetamin, aus der matrixfreien Probe zwischen 0,07% (für Methaqualon) und 18% für Benzfetamin.

Tabelle 7: HS-SPME-Ausbeuten einiger Wirkstoffe aus alkalischer und dotierter Lösung in Abwesenheit und im Beisein von 10 mg Haar, Strukturformeln der Wirkstoffe und ihre Siedepunkte bei reduziertem Druck.

Substanz	Strukturformel	Extraktionsausbeute ¹⁾ , %		Siedetemperatur (°C) bei reduziertem Druck [181]
		ohne Haar ²⁾ , %	mit 10 mg Haarpool ³⁾	
Metamfepramon	<chem>CC(=O)C(c1ccccc1)N(C)C</chem>	1.3	1.7 – 2.6	126 (1.73 kPa)
Phendimetrazin	<chem>CN1CC[C@H](C1)c2ccccc2</chem>	2.7	2.4 – 3.4	123 (1.07 kPa)

Fortsetzung Tabelle 7: Extraktionsausbeuten und Siedetemperaturen

Amfepramon		1.9	1.2 – 2.8	keine Daten
Benzfetamin		18	4.8 – 5.7	127 (2.7 kPa)
Diphenhydramin		5.6	0.7 – 1.7	150-165 (266 Pa)
Ketamin		0.2	0.17 – 0.32	keine Daten
Phencyclidin		15	1.8 – 3.4	135-137 (133 Pa)
Doxylamin		14.5	1.5 – 2.5	137-141 (66 Pa)
Tramadol		18	1.7 – 2.1	keine Daten
Chlorphenamin		9.9	0.8 – 1.2	142 (133 Pa)
Methadon		4.5	1.4 – 2.0	keine Daten
Methaqualon		0.07	0.04 – 0.06	keine Daten
Amitriptylin		6.2	0.4 – 2.3	keine Daten
Imipramin		5.0	0.9 – 1.4	160 (13 Pa)
Promethazin		3.3	0.4 – 0.8	190 (400 Pa)

¹⁾ Berechnet nach Vergleich mit der Direktinjektion einer gleichen Menge ²⁾ je eine Messung ³⁾ Vier Messungen bei Konzentrationen von 0.3, 1.0, 3.0 und 10 ng/mg.

Die höchsten Wiederfindungen aus dotiertem Haar ließen sich erwartungsgemäß bei den Verbindungen mit den kürzesten Retentionszeiten und damit in der Regel den niedrigsten Siedetemperaturen finden (Amfepramon, Metamfepramon, Benzfetamin, Phendimetrazin). Vergleichbare absolute Wiederfindungen fanden Watanabe et al. bei der Analyse von fünf Lokalanästhetika mit Werten zwischen 0,6 und 8,5% [160] und Namera et al. für tetracyclische Antidepressiva mit Werten zwischen 0,12 und 0,53% [157]. Koide et al. berichteten für Amphetamin und MA sogar von absoluten Wiederfindungen von 48 bis 62% aus Haaren [178]. Solche hohen Headspace-Extraktionsausbeuten sind überraschend, weil die Siedetemperaturen der meisten Komponenten bei Extrapolation auf Normaldruck über 300°C liegen sollten. Vermutet wird hier, dass ein eventueller Teilchentransport über Mikrotröpfchen die Gleichgewichtseinstellung mit der SPME-Faser beschleunigt.

Aus struktureller Sicht weisen die meisten der mittelflüchtigen Substanzen mit guten HS-SPME-Ausbeuten aus wässrigem Medium, wie sie in dieser Arbeit oder den anderen erwähnten Publikationen ermittelt wurden, eine aliphatische oder eine alicyclische Gruppe im Molekül auf, die zu erhöhter Lipophilie und Oberflächenaktivität beitragen.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der Haarmenge auf die Extraktionsausbeuten einzelner Wirkstoffe untersucht. Dazu wurden die nach HS-SPME aus 10 bzw. 50 mg des mit je 50 ng der Wirkstoffe dotierten Haars erhaltenen Peakflächen mit denen der nach Extraktion aus der alkalischen Lösung ohne Haar erhaltenen verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Abbildung 9. Die Substanzen sind nach ihren in Tabelle 6 angegebenen Retentionszeiten geordnet.

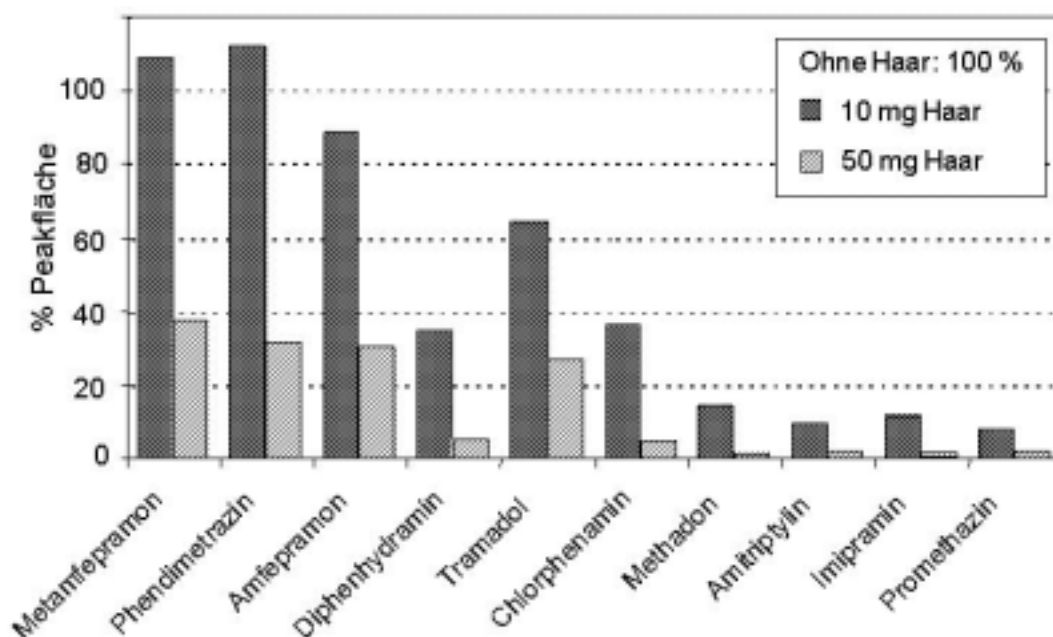


Abbildung 9: Einfluss der Haarmenge auf die GC-MS-Peakflächen einiger Wirkstoffe aus 1 ml alkalischem Haarhydrolysat. Alle Proben waren mit je 50 ng der Wirkstoffe dotiert. 100% bedeutet die Peakfläche in Abwesenheit von Haar. HS-SPME-Bedingungen. 15 min bei 70°C an 85 µm PA.

Mit der Ausnahme von Metamfepramon, Amfepramon und Phendimetracin wurde bei Anwesenheit von 10 mg Haar eine Verringerung der Peakflächen auf 8-60% (Abwesenheit von Haar = 100%) festgestellt. Für 50 mg Haar wurde eine Absenkung auf 2-38% gemessen. Somit führt die Verwendung von 50 mg Haar anstelle von 10 mg nicht zu dem erwarteten Anstieg des GC-MS-Signals um den Faktor 5, sondern es ergibt sich hier nur ein Faktor von maximal 2. Für Diphenhydramin, Chlorphenamin, Methadon und Imipramin war im Vergleich zu 10 mg Haar sogar eine Verringerung der Peakflächen auf Werte zwischen 0,6 und 0,75% zu beobachten. Weiterhin ist aus dem Diagramm eine Abnahme der Peakflächen mit zunehmender Retentionszeit – das bedeutet in der Regel mit geringerer Flüchtigkeit der Substanzen – ersichtlich. Ein ähnlicher Effekt der biologischen Matrix wurde von Nagasawa et al. beschrieben [149], wobei die Wiederfindungen bei Amphetamin und Methamphetamin aus Blut auf 27-58% im Vergleich zur wässrigen Lösung zurückgingen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Löslichkeit der Substanzen in der Probenmatrix selbst bei Überschuss von Na_2SO_4 durch Produkte der Haarhydrolyse erhöht wird. Aber es sind auch mögliche kinetische Effekte zu berücksichtigen, da die Viskosität der Lösung nach der Haarhydrolyse deutlich zunimmt. Ein weiterer Grund muss in der begrenzten Kapazität der SPME-Faser gesucht werden, so dass bei Extraktion aus stark matrixhaltigen Proben eine Fasersättigung durch Hydrolyseprodukte der Haarmatrix erreicht werden könnte.

Aus analytischer Sicht sollte die Probenmenge demnach so klein wie möglich gewählt werden. Es muss weiterhin darauf geachtet werden, dass Kalibration und Analyse immer mit der gleichen Matrixmenge durchgeführt werden, da die Auswirkungen auf den Analyten und den internen Standard durch die Probenmatrix unterschiedlich sind. Ideal wäre auch aus diesem Grund die Verwendung deuterierter Standards.

Da die Siedepunkte stark differieren, wären eigentlich verschiedene Extraktionsbedingungen angeraten. Für die Analyse von realen Haarproben auf bestimmte Wirkstoffe wurden daher auch höhere Extraktionstemperaturen gewählt (siehe Tabelle 8). Eine Optimierung der Parameter Extraktionstemperatur und –zeit erfolgte für einige Wirkstoffe und Wirkstoffgruppen, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

Die in 4.4.1 beschriebene Methode wurde zunächst auf Haarproben einiger klinischer und forensischer Fälle angewendet, bei denen eine reguläre therapeutische Einnahme oder ein regelmäßiger Missbrauch bekannt war. Die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen sind in Tabelle 8 dargestellt. Alle diese Substanzen sind tertiäre Amine, die durch Desalkylierung zu sekundären Aminen metabolisiert werden. Diese Metabolite ließen sich allerdings mit der verwendeten Methode nicht nachweisen, da hier die bei diesen Substanzen aus chromatographischer Sicht gebotene Derivatisierung fehlte.

Tabelle 8: Ergebnisse der Haaranalyse einiger forensischer und klinischer Fälle mit bekanntem Medikamentenkonsum. Analyse durch HS-SPME nach alkalischer Hydrolyse von 10 mg Haar in 1 ml 1 M NaOH und 0,5 g Na₂SO₄.

Substanz	Interner Standard	HS-SPME-Bedingungen	LOD/LOQ ng/mg	Fall-Nr.	Alter, Geschlecht	Haarkonzentration, ng/mg
Amitriptylin	Dimetacrin	PA, 90 °C, 20 min	0.05 / 0.15	T336/97	31w	4.84
				T380/97	53w	0.22
				T164/99	56w	0.29
Diphenhydramin	Ethylbenzhydramin	PA, 90 °C, 20 min	0.05 / 0.15	T098/97	57m	2,0
				T025/97	28m	3,7
Doxepin	Dimetacrin	PA, 90 °C, 20 min	0.2 / 0.7	Z999/99	60w	6.1
		PA, 90 °C, 20 min		T141/99	37w	3.2
Methadon	D ₉ -Methadon	PA, 90 °C, 20 min	0.1 / 0.4	T096/97	38m	20,1
				T264/97	29m	9,9
Nicotin	N,N-Diethylanilin	PA, 60 °C, 15 min	1 / 3.5	T096/97	38m	135
				T264/97	29m	334
				T463/96	81w	19,6
Tramadol	Ethylbenzhydramin	PA, 90 °C, 20 min	0.1 / 0.4	T035/96	50m	0.78
				T463/96	81w	1.14
Trimipramin	Dimetacrin	PA, 90 °C, 20 min	0.2 / 0.7	T051/97	69w	0.56
				T164/99	56w	10.4

Die Quantifizierung erfolgte nach externer Kalibrierung und Bezug auf den internen Standard bei den in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen. Die Linearität bei Regressionsfaktoren $R^2 > 0,991$ war in allen Fällen gegeben.

Als Beispiel sind hier in Abbildung 10 für einige Proben die SIM-Chromatogramme übereinandergelegt. Es handelt sich dabei um einen Fall nach regelmäßiger Diphenhydramin-Einnahme (Sedativum und Antihistaminikum) (A), einen Fall nach chronischer Einnahme des Opioid-Analgetikums Tramadol (B) sowie um einen Fall nach verordneter Heroinsubstitution mit Methadon (C).

Als großer Vorteil der HS-SPME gegenüber herkömmlichen Probenvorbereitungsverfahren wie der Flüssig-Flüssig- und der Festphasenextraktion erwies sich bei diesen ersten Untersuchungen das geringe Untergrundrauschen der Ionenspuren bei der Chromatographie. Das ermöglicht es, auch relativ kleine Fragmente mit m/z 58 $[\text{CH}_2=\text{N}(\text{CH}_3)_2]^+$ bzw. 72 $[\text{CH}_2=\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]^+$, wie sie durch Spaltung tertiärer Amine am α -C-Atom häufig als Hauptfragmente bei der Ionisierung entstehen, mit ausreichender Empfindlichkeit zu messen.

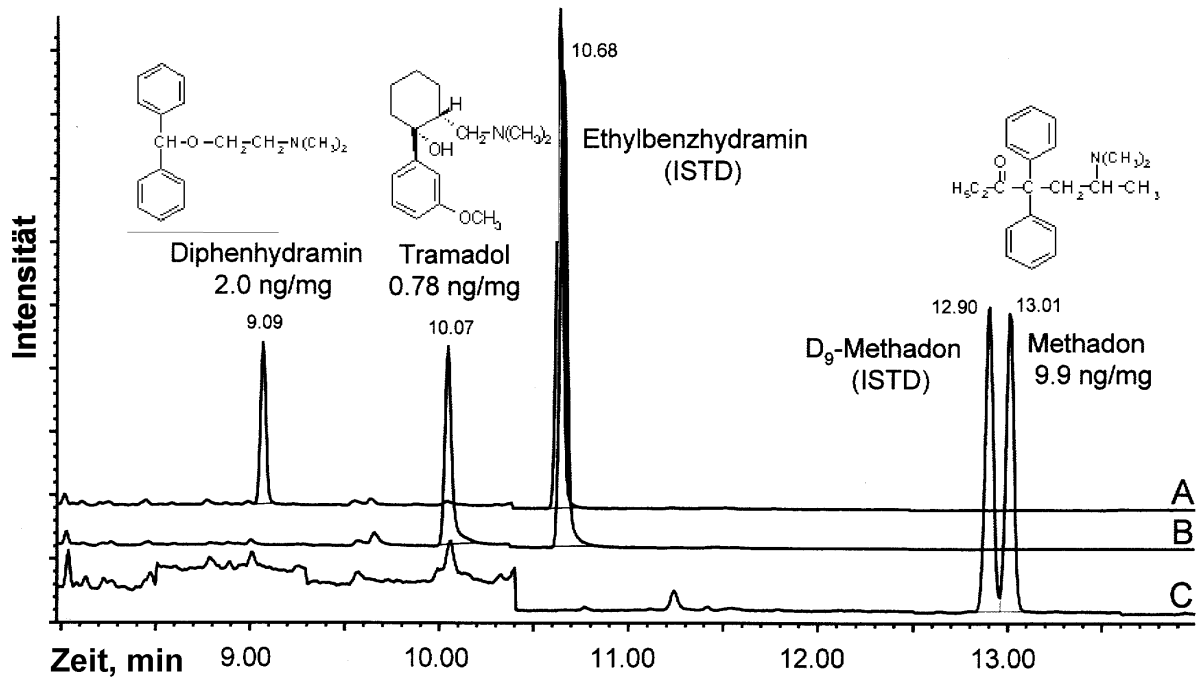


Abbildung 10: GC-MS-SIM-Chromatogramme einiger Medikamentenwirkstoffe aus Haarproben (je 10 mg) nach alkalischer Hydrolyse und HS-SMPE. Interne Standards: 10 ng/mg Ethylbenzhydramin (in A und B) und 10 ng/mg D₉-Methadon (C). HS-SPME an PA-Faser für 20 min bei 90°C. m/z siehe Tabelle 6. Fall A (T098/97): Person mit regelmäßiger Diphenhydramin-Aufnahme. Fall B (T035/96): Person mit missbräuchlichem Tramadol-Konsum. Fall C (T264/97): Person mit verordneter Methadon-Einnahme.

Bei den in den nächsten Kapiteln genauer behandelten Wirkstoffen und Wirkstoffgruppen wird anhand der Massenspektren näher auf die Fragmentierung der Substanzen eingegangen. Ausführlich wird über die Methodenoptimierung, über die Ausweitung der Analyse auf die Metabolite durch Derivatisierung, über die Vorteile der automatischen Durchführung und über die Anwendung auf reale Proben größerer Fallzahlen berichtet.

5.1.2 Lidocain

5.1.2.1 Allgemeines

Lidocain ist ein synthetisches Lokalanästhetikum ohne psychostimulativen Effekt. Es blockiert reversibel die Entstehung und Fortleitung des Aktionspotentials der Nervenfasern durch Blockade der spannungsabhängigen Natrium-Kanäle und verhindert so die Schmerzempfindung ohne Ausschaltung des Bewusstseins. Deshalb wird es hauptsächlich von Zahnärzten verwendet. Gleichzeitig ist Lidocain als Antiarrhythmikum zur Verhinderung des infarktbedingten Herzkammerflimmerns in der Notfallmedizin im Einsatz. Eine Überdosierung kann aber umgekehrt durch eine zu lange Öffnung des Na⁺-Kanals zum Herzstillstand führen [186].

Lidocain wird häufig als Streckmittel Cocain- und Heroin-Zubereitungen beigemischt, da es durch den Zungentest wegen seiner lokalanästhetischen Wirkung nicht vom Cocain unterschieden werden kann. Teilweise wurde sogar ausschließlich Lidocain in den Drogenpräparationen nachgewiesen. Toxische Wirkungen des Lidocain können besonders nach Bolusinjektion solcher Zubereitungen auftreten. Sie sind gekennzeichnet durch Erregung, Unruhe, Krämpfe, Koma und zentrale Atemlähmung, Bradykardie bis hin zum Herzstillstand. In diesem Zusammenhang sollten bei einigen Drogentodesfällen die Haarproben auf Lidocain untersucht werden.

Lidocain ist von der Struktur her ein Carbonsäureamid mit einem lipophilen Aromatenanteil und einer nach Protonierung bei physiologischem pH-Wert hydrophilen Diethylaminogruppe. Abbildung 11 zeigt die Struktur des Lidocains und der analog analysierbaren, hier aber als interne Standards verwendeten, strukturähnlichen Lokalanästhetika Etidocain (Carbonsäureamid-Typ) und Propipocain.

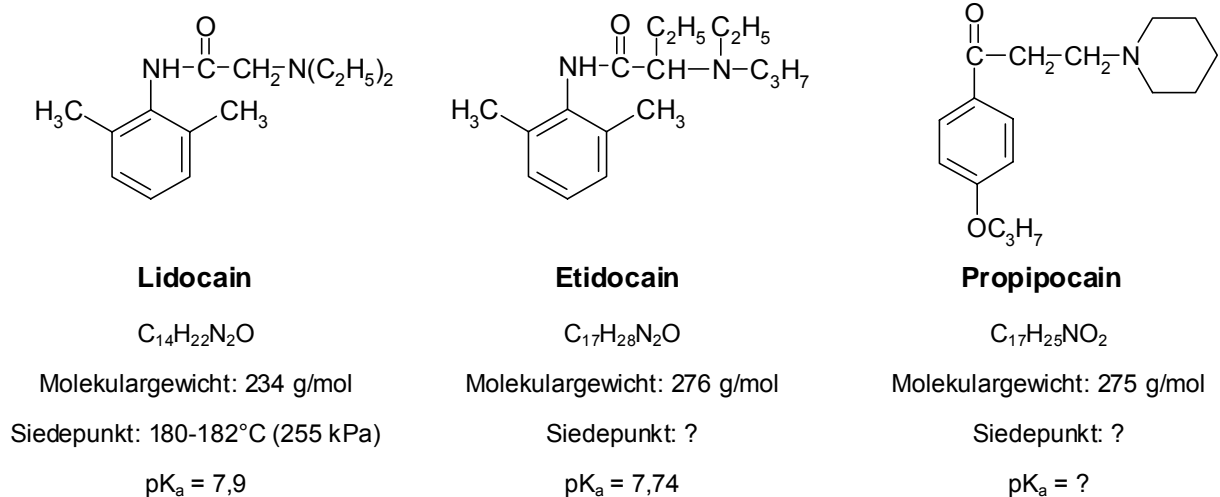


Abbildung 11: Struktur und physikalisch chemische Daten der Lokalanästhetika Lidocain, Etidocain und Propipocain (Für Etidocain und Propipocain ließen sich Siedepunkt bzw. Siedepunkt und pK_a -Wert nicht ermitteln.) [181].

Lokalanästhetika vom Estertyp (z.B. Tetracain, Mepivacain) sind wegen ihrer Hydrolyseempfindlichkeit im alkalischen Milieu für diese Methode nicht geeignet.

Ein interner Standard ist wegen starker individueller Matrixeinflüsse und insbesondere bei manueller Durchführung der HS-SPME, wie in diesem Fall, zwingend erforderlich, da nicht alle experimentellen Bedingungen exakt eingehalten werden können.

5.1.2.2 Methodenoptimierung

Wie Voruntersuchungen zeigten, besitzt Lidocain trotz des hohen Siedepunktes von 180-182°C bei 522 Pa [181], d.h. bei Normaldruck über 300°C, einen ausreichenden Dampfdruck, um sich aus alkalisch-wässrigem Milieu der Haaraufschluslösung über dem

Dampfraum mit genügender Ausbeute auf der SPME-Faser anzureichern. Möglich wird das durch die in alkalischer NaOH-Lösung erfolgende Deprotonierung der Diethylaminogruppe und der damit verbundenen erhöhten Lipophilie des Moleküls. Das Totalionenchromatogramm einer mit Lidocain, Etidocain und Propipocain (10 ng/mg) gespickten und danach mit 30 %iger NaOH hydrolysierten Haarprobe ist in Abbildung 12 (oben) dargestellt. Alle drei Verbindungen ergeben deutliche Signale, jedoch erweist sich Etidocain als innerer Standard als am besten geeignet. Die Massenspektren von Lidocain und von Etidocain (Abbildung 12 unten) sind jeweils nur durch den intensiven, aber wenig charakteristischen Basispeak ($m/e = 86$ bzw. 128) und sehr schwache Peaks bei höheren Massen (Lidocain M^+ und $M-15$, Etidocain $M-29$) gekennzeichnet. Wegen der sehr geringen Matrixeffekte der HS-SPME erscheint dieses aber bei Kontrolle der Retentionszeiten ausreichend.

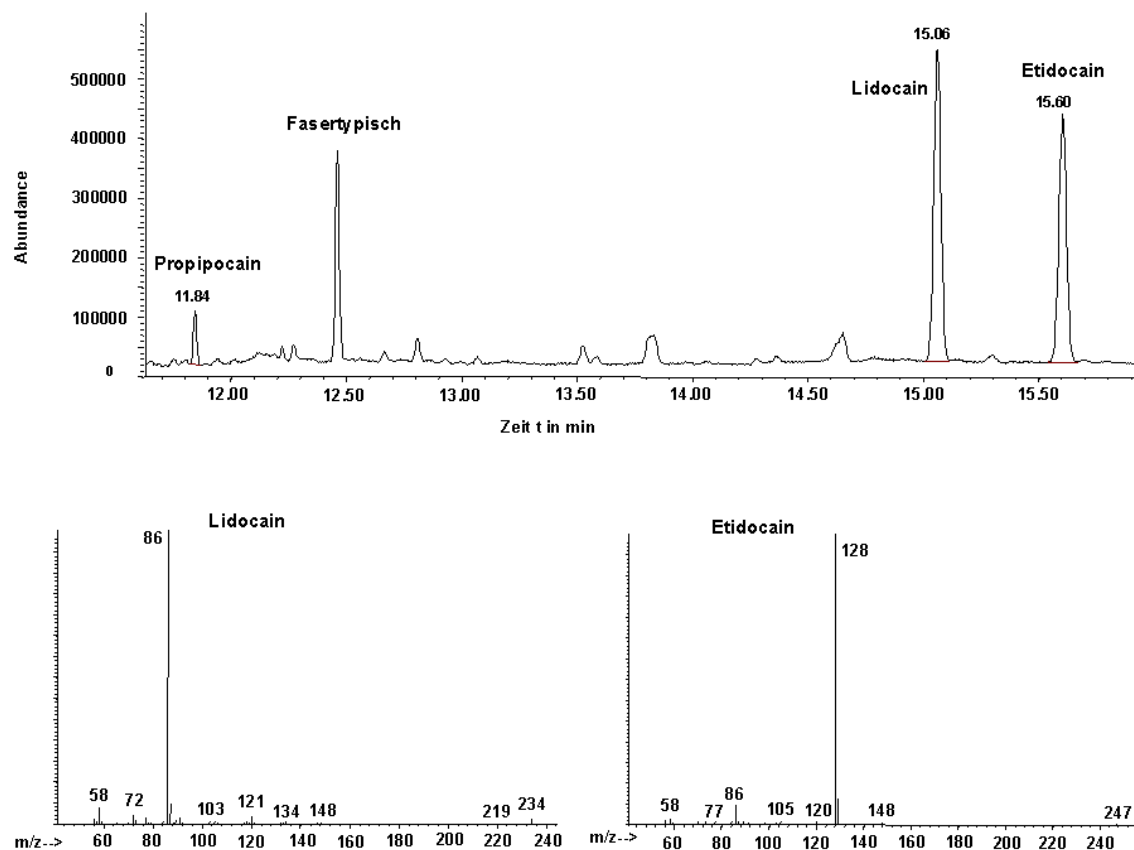


Abbildung 12: Totalionenchromatogramm (oben) einer Haarprobe (10 mg), die mit je 1 μg Lidocain, Etidocain und Propipocain dotiert war, nach Hydrolyse mit 30 %iger NaOH und HS-SPME (Faser: 65 μm Carbowax/DVB, Adsorption 10 min bei 80°C) sowie zugehörige Massenspektren von Lidocain und Etidocain (unten).

Zur Optimierung der SPME-Bedingungen stand eine Carbowax/DVB-Faser (65 μm Schichtdicke) zur Verfügung. Alle Untersuchungen wurden im manuellen Modus durchgeführt. Haaraufschluss und Adsorption erfolgten nach der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Aufarbeitung im selben Gefäß. Zunächst wurden verschiedene Extraktionsgemische getestet. Neben

30 %iger NaOH wurden 1 ml 4 %ige NaOH, 1 ml 4%ige NaOH + 0,5 g Na₂SO₄ und 1 ml Phosphatpuffer pH = 6,0 + 0,5 g Na₂SO₄ in Anwesenheit von 10 mg der dotierten Leerhaarprobe (je 10 ng/mg der drei Lokalanästhetika) unter gleichen Bedingungen (30 min Hydrolyse bzw. Vortemperierung und 15 min Adsorption bei 70°C) untersucht. Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit 4 %iger NaOH und Na₂SO₄ für alle drei Verbindungen die höchsten Peakintensitäten erreicht werden. Hier machen sich offenbar der höhere Aussalzeffekt von Na₂SO₄ und die geringere Reaktivität der 4%igen NaOH gegenüber der 30%igen NaOH bemerkbar. Ein pH-Wert von 6,0 ist andererseits ungeeignet, da er deutlich unter dem pK-Wert der Verbindungen liegt und damit die Konzentration der verdampfenden unprotonierten Form in der Lösung vermindert.

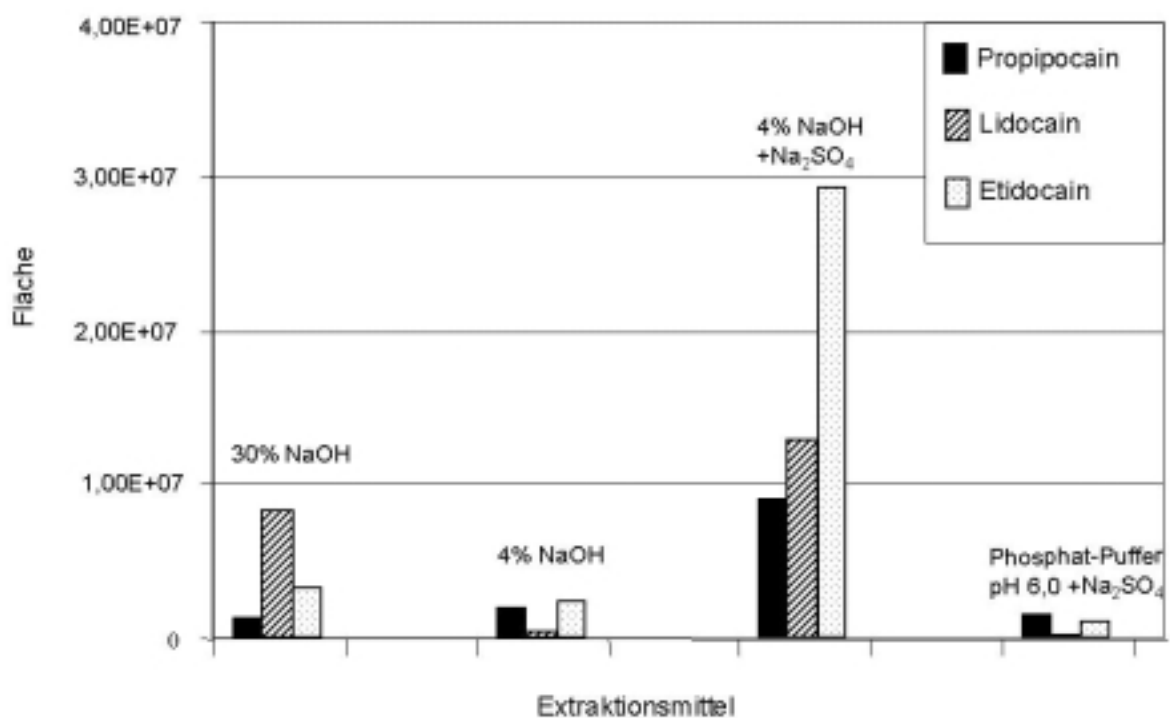


Abbildung 13: Abhängigkeit der absoluten Peakflächen für die Lokalanästhetika Propipocain, Lidocain und Etidocain (je 10 ng/mg Haar) von der Wahl des Extraktionsmittels. GC-MS/SIM: Propipocain m/z = 121, 163, 178, Lidocain m/z = 86, 234, Etidocain m/z = 86, 128, 247.

Weiterhin wurden Adsorptionstemperatur und -zeit optimiert. Steigende Temperatur erhöht einerseits den Dampfdruck über der Lösung, führt aber andererseits zu einer Verringerung des Faser/Headspace-Verteilungskoeffizienten K_{fh} und zu eventuellen Zersetzungsreaktionen durch die NaOH. Aus Abbildung 14(A) ist ersichtlich, dass im vorliegenden Fall bei 70 °C ein Optimum vorliegt.

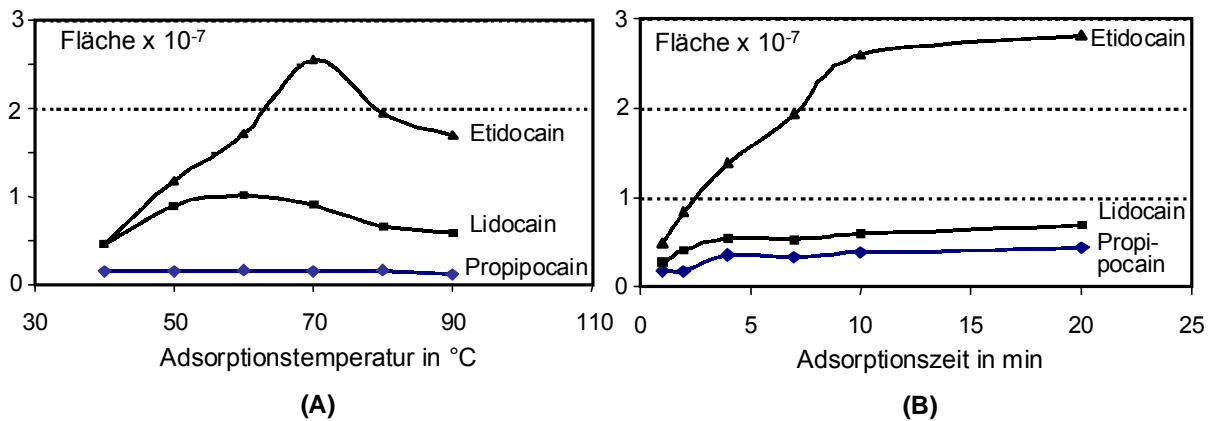


Abbildung 14: Peakflächen für Propipocain, Lidocain und Etidocain bei der HS-SPME-Analyse (je 100 ng/10 mg Haar in 1 ml 4 %iger NaOH) in Abhängigkeit von: (A) der Adsorptionstemperatur bei 15 min Adsorptionszeit (n = 3) und (B) der Adsorptionszeit bei 70°C Adsorptionstemperatur (n = 3).

Für die Optimierung der Extraktionszeit wurde aus dem Dampfraum der hydrolysierten Haarprobe mit je 100 ng der untersuchten Lokalanästhetika bei 70°C für 1, 2, 4, 7, 10 und 20 min adsorbiert. Insbesondere ergab sich, wie in (B) ersichtlich, für Etidocain eine deutliche Intensitätserhöhung im Zeitraum bis 10 min. Zwischen 10 und 20 min fand jedoch für alle drei Verbindungen keine wesentliche Signalerhöhung mehr statt, so dass routinemäßig 15 min Adsorptionszeit als sinnvoller Kompromiss zwischen hoher Extraktionsausbeute und Probandendurchsatz angesehen wurden.

Unter den so optimierten Bedingungen (15 min Adsorption bei 70°C in einem Extraktionsgemisch aus 1 ml 4 %iger NaOH und 0,5 g Na₂SO₄) wurde eine Kalibrierung zwischen 1 ng und 1000 ng Lidocain/10 mg Leerhaarprobe mit Etidocain als internem Standard vorgenommen. Die Kalibrierkurve war, wie in Abbildung 15 ersichtlich, in diesem Konzentrationsbereich mit einem Regressionskoeffizienten $R^2 = 0,9976$ linear. Die Nachweisgrenze betrug dabei 0,1 ng/mg und die Bestimmungsgrenze 0,4 ng/mg.

Die Reproduzierbarkeit betrug für Lidocain innerhalb einer Serie von 6 Messungen einer dotierten Leerhaarprobe mit einer Konzentration von 10 ng/mg 8,2 %.

Die Extraktionsausbeuten wurden sowohl im Vergleich zu einer Direktinjektion als auch im Vergleich zu einer Adsorption aus dem matrixfreien Reagenziengemisch bestimmt. Bei der Direktinjektion wurden 10 ng (1 µl einer 10 µg/ml Lösung von Lidocain und Etidocain in Methanol) in den Gaschromatographen injiziert. Bei der Bestimmung der relativen Wiederfindung wurden je 100 ng Lidocain und Etidocain zum Reagenziengemisch und zum anderen zu einer 10 mg Leerhaarprobe im Reagenziengemisch dotiert. Es ergaben sich bei jeweils drei Messungen Wiederfindungsraten von 1,8–2,4 % für Lidocain und 2,3–2,5 % für Etidocain bezogen auf die Direktinjektion bzw. 16–18 % für Lidocain und 19–21 % für Etidocain im Vergleich zur Adsorption aus dem matrixfreien Reagenziengemisch.

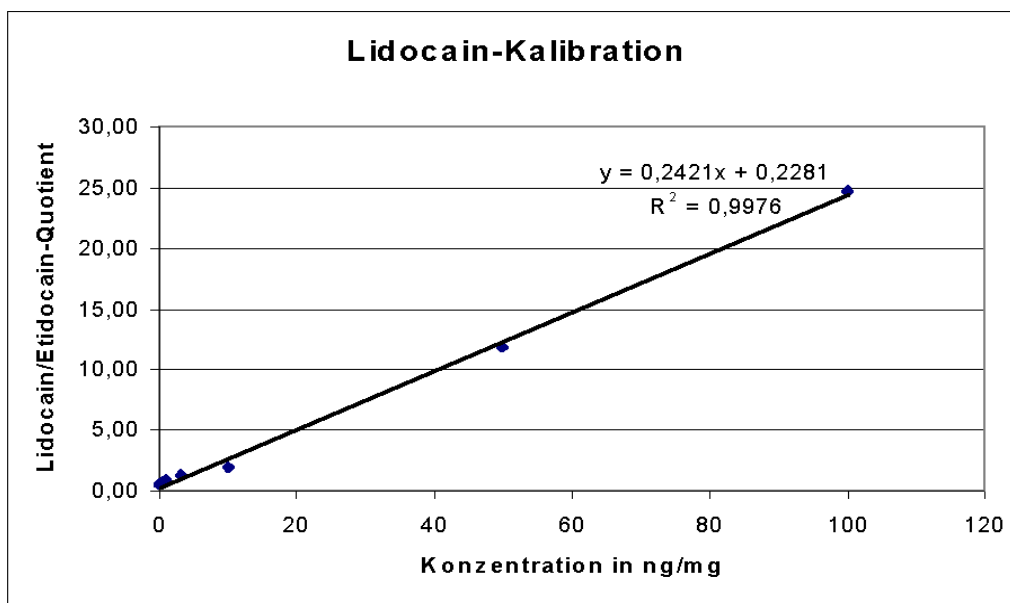


Abbildung 15: Lidocain-Kalibration zwischen 0,1 und 100 ng/mg mit 0,1, 1,0, 3,3, 10, 50 und 100 ng Lidocain/mg Leerhaarprobe bezogen auf 1 ng/mg Etidocain als internen Standard.

5.1.2.3 Lidocainkonzentrationen in Haarproben von Drogentodesfällen

Für 49 Drogentodesfälle der Jahrgänge 1997/98 wurde nach der oben beschriebenen Methode eine Untersuchung auf Lidocain für die gesamte Haarlänge durchgeführt. Weiterhin wurden im Rahmen der toxikologischen Analyse die Drogenwirkstoffe bzw. deren Metabolite 6-Acetylmorphin (Heroin-Metabolit), Morphin (Heroin-Metabolit und Medikamentenwirkstoff), Codein (natürliche Heroin-Begleitsubstanz, aber auch Medikamentenwirkstoff), Dihydrocodein (Substitutionsmittel und Medikamentenwirkstoff), Cocain, Benzoylcegonin und Methadon (Substitutionsmittel) ebenfalls für die gesamte Haarlänge bestimmt. Diese Nachweise erfolgten nach der herkömmlichen, in der Routineanalytik eingesetzten Extraktion der Haare im Ultraschallbad mit einem Phosphatpuffer, nachfolgender Festphasenextraktion und Derivatisierung und abschließender GC-MS/SIM-Messung wie bei Rothe et al. beschrieben [110]. Der Nachweis von Lidocain im Blut wurde nach Flüssig/Flüssig-Extraktion im Basischen mit Dichlormethan und anschließender Messung und Quantifizierung mittels HPLC-Photodiodenarray-Detektion nach Pragst et al. [182] und Herre et al. [183] durchgeführt. Lidocain wurde in 32 Fällen mit Konzentrationen zwischen 0,4 ng/mg und 675 ng/mg festgestellt, wobei 18 Proben unter 10 ng/mg und 4 Proben über 150 ng/mg lagen. Die einzelnen Werte für Lidocain und die untersuchten Drogenwirkstoffe im Haar und deren Metabolite sowie die Lidocain-Konzentrationen im Blut sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Diese hohen Konzentrationen zeigen, dass Lidocain zu den am besten im Haar gespeicherten Verbindungen gehört, wenn man die von Nakahara et al. vorgenommene Einstufung nach ICR-Werten (index of incorporation rate) [184] zugrunde legt. Der ICR-Wert gibt Auskunft darüber, mit welcher Affinität sich eine Substanz bei einer bestimmten Dosis in das Haar einlagert. Es ist denkbar, dass die auch in der lokalanästhetischen Wirkung zum Ausdruck kommende strukturelle Verwandtschaft zum Cocain sowie die Ähnlichkeit von pK-Werten und Lipophilie beider Verbindungen auch die Einlagerungsrate ins Haar bestimmt. Vergleichbar hohe Werte für Lidocain mit 116 ng/mg Haar fanden Gaillard und Pepin [185] auch bei einem Todesfall nach mehrfachen Selbstverstümmelungsversuchen unter diesem Anästhetikum.

Tabelle 9: Konzentrationen an Lidocain, Opiaten, Methadon, Cocain und Benzoylcegonin im Haar (gesamte Haarlänge) und von Lidocain im Blut von 49 Drogentodesfällen.

Fall-Nr.	Alter u. Geschlecht	Konzentrationen im Haar in ng/mg ¹⁾								Lidocain im Blut in µg/ml	Letale Intoxikation mit ¹⁾
		Lidocain	Morphin	6-AM	Codein	DHC	Methadon	Cocain	BE		
008-97	34m	n. n.	0.17	0.72	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her
044-97	24m	163	5.1	17.6	1.2	1.0	n. n.	44	18.6	1.5	Tet-Lid-Coc
072-97	33m	1.0	0.48	1.6	0.19	2.8	n. n.	0.8	0.1	n. n.	Her-Alk
074-97	17w	n. n.	0.44	1.0	0.13	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her-Met
079-97	44m	2.8	n. d.	n. n.	16.3	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Cod
096-97	38m	7.4	1.5	7.6	0.55	58	15.7	11.4	4.9	n. n.	Met-Her
143-97	29m	n. n.	0.12	0.22	0.08	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her-Dia
148-97	18w	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	5.18	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	DHC
152-97	31m	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	3.31	1.3	n. n.	Coc-Amp
153-97	27m	n. n.	n. n.	n. n.	1.82	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Met
218-97 ³⁾	28m	385	4.1	29.5	0.88	0.34	n. n.	112	42	17.3	Lid-Coc-Her
223-97	18m	1.06	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0.29	0.04	7.8	Lid-Amp
244-97	27w	n. n.	0.02	0.08	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her
256-97 ³⁾	14w	6.5	0.03	0.12	n. n.	n. n.	n. n.	1.1	0.45	1.5	Her-Coc
264-97	30m	Pos.	8.0	36	6.0	186	8.0	4.6	2.95	n. n.	DHC-Her-Meth
316-97	42m	n. n.	1.4	1.7	0.31	145	n. n.	n. n.	n. n.	3.7	Met-Mor-Dia
325-97	32m	99	0.28	2.1	n. n.	9.0	n. n.	34	15	n. n.	Her-Alk
374-97	24m	65	1.7	10.4	1	4.4	n. n.	14	2.8	n. n.	Her-Coc
416-97 ³⁾	30w	2.2	0.02	0.07	0.08	1.4	n. n.	2.6	1.5	n. n.	Met-Cod-Dia
428-97	29m	0.4	0.92	6.9	n. n.	72	4.8	0.66	0.45	n. n.	DHC-Met
446-97	29m	7.2	0.56	1.9	0.19	0.19	n. n.	1.3	0.39	n. n.	Her
453-97	35m	4.0	0.31	0.49	0.12	n. n.	0.55	5.2	0.8	n. n.	Unbekannt ²⁾

Fortsetzung Tabelle 9

001-98	31w	10.9	4.8	18.7	1.7	n. n.	n. n.	0.62	0.1	n. n.	Her
002-98	26w	13.8	0.32	0.94	0.12	0.51	3.6	2.7	1.5	14.7	Lid-Met-Coc-Her
037-98	42w	37	0.17	0.31	0.09	16	15	10.9	3.7	15	Lid-Coc-Met
074-98	36m	98	6.3	14.6	2.5	1.1	n. n.	32	14.5	1.65	Her-Coc
078-98	27m	63	0.74	1.9	0.13	15.8	n. n.	11.4	4.8	3.5	Her-Coc-Alk
079-98	38m	2.10	0.02	0.04	0.02	n. n.	n. n.	0.88	0.1	n. n.	Met
084-98	32m	n. n.	0.82	1.55	n. n.	13.3	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Suizid, DHC
098-98 ³⁾	40w	675	1.9	8.7	0.9	46	n. n.	64	28	15.4	Lid-Her-DHC-Coc
129-98	35w	0.72	0.1	0.48	0.06	n. n.	n. n.	1.6	0.38	n. n.	Her
130-98	23m	11.8	1.1	13	0.04	n. n.	n. n.	17.8	6.45	n. n.	Her
134-98	39m	1.1	1.6	3.6	1.4	8.6	n. n.	n. n.	0.05	n. n.	Suizid, Her
142-98	28m	n. n.	0.06	0.1	0.04	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Dia-Flu-Her
164-98	49w	n. n.	0.01	0.06	0.02	0.03	0.35	n. n.	n. n.	n. n.	Met
174-98	38m	n. n.	n. n.	n. n.	9.3	n. n.	n. n.	226	63	n. n.	Cod-Dox-Pro-Cod
206-98	35m	0.65	1.3	1.4	0.93	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Met-Dia
222-98	37m	0.4	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	39	10.6	n. n.	Coc
257-98	40w	n. n.	0.03	0.03	0.03	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her-Alk
263-98	20m	0.94	5.4	2.3	0.45	n. n.	n. n.	4.5	1.0	n. n.	Met-Her-Dia
268-98	15w	300	1.93	13.6	0.8	n. n.	n. n.	20	6.2	12.4	Lid-Her-Coc
283-98	36m	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	10.7	n. n.	n. n.	n. n.	Met
326-98	30w	1.4	0.06	0.14	0.05	n. n.	2.0	4.4	1.7	n. n.	Met-Dia
343-98	25m	n. n.	0.12	0.28	0.12	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her-Alk
373-98	27w	38	0.06	0.14	0.06	n. n.	138	7.4	2.3	n. n.	Met-Coc
382-98	20w	11.9	0.07	0.18	0.03	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Suizid, Her
419-98	22m	n. n.	1.4	1.4	0.9	n. d.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	Her-Dia
426-98	27m	4.4	0.7	1.3	0.19	0.1	1.2	1.6	0.25	n. n.	Her-Dia
446-98	31m	n. n.	0.47	0.97	0.09	0.43	n. n.	0.74	0.61	n. n.	Her-Alk

1) Abkürzungen: Alk = Alkohol, 6-AM = 6-Acetylmorphin, Amp = Amphetamin, BE = Benzoylcegonin, Coc = Cocain, Cod = Codein, Dia = Diazepam, DHC = Dihydrocodein, Dox = Doxepin, Flu = Flunitrazepam, Her = Heroin, Met = Methadon, Pro = Promethazin, Tet = Tetracain.

2) 7 Tage nach Injektion überlebt. 3) Durchschnittswerte aller Segmente.

Die genaue Verteilung der Lidocainkonzentrationen in den untersuchten Proben ist denen von Cocain und Benzoylcegonin (Abbildung 16) bzw. von 6-Acetylmorphin und Morphin (Abbildung 17) gegenübergestellt.

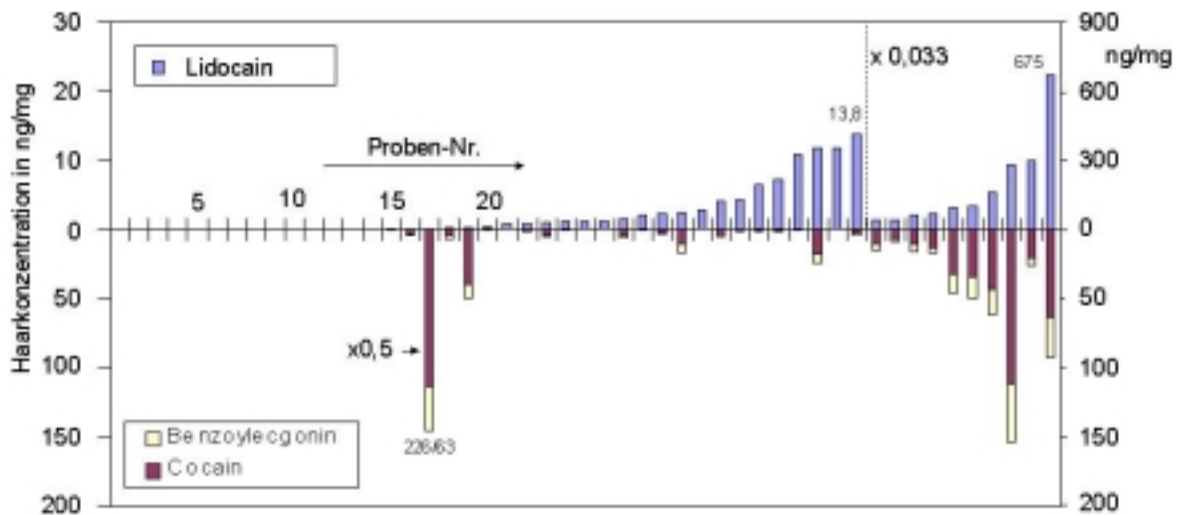


Abbildung 16: Konzentrationen von Lidocain, Cocain und dessen Metaboliten Benzoylcegonin in den Haarproben von 49 Drogentodesfällen (untersucht wurde die gesamte Haarlänge).

Abgesehen von Probe 17 werden die höchsten Lidocain-Werte auch bei den Fällen mit den höchsten Cocain-Werten gefunden, während bei negativem Lidocainbefund auch kein Cocain nachgewiesen werden konnte. Das bestätigt, dass Lidocain in erster Linie zur Streckung von Cocainzubereitungen verwendet wurde, die die Drogenopfer mehr oder weniger häufig missbraucht haben.

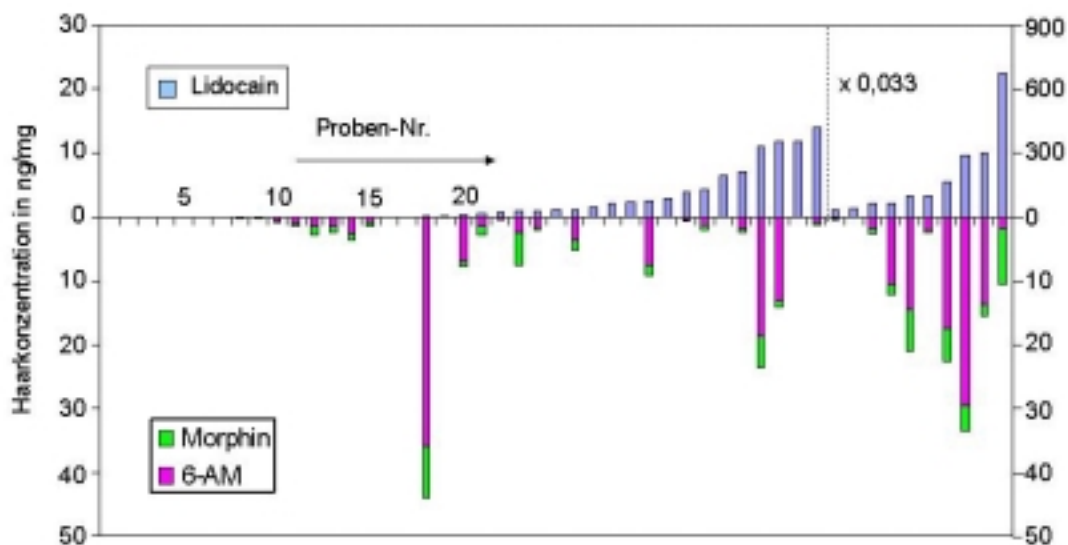


Abbildung 17: Konzentrationen von Lidocain, 6-Acetylmorphin und Morphin in den Haarproben von 49 Drogentodesfällen (untersucht wurde die gesamte Haarlänge).

Der Zusammenhang zwischen Lidocain- und Opiatkonzentrationen ist, wie in Abbildung 17 ersichtlich, weniger deutlich, obwohl auch hier die stark positiven Opiatproben gehäuft bei hohen Lidocain-Konzentrationen liegen.

Eine Gegenüberstellung von positiven und negativen Lidocainbefunden und den nachgewiesenen Drogenwirkstoffen wird in Tabelle 10 vorgenommen. Dabei waren unter 32 positiven Lidocainproben 26 sowohl cocain- als auch heroinpositiv. Bei den lidocainnegativen Fällen

im Haar waren hingegen 11 mit positivem Heroin- aber nur 2 mit positivem Cocainbefund. Es wird auch hier deutlich, dass das Lidocain zu einem größeren Teil aus den Cocainzubereitungen stammt.

Aus Tabelle 9 ist ersichtlich, dass in fast allen heroinspezifischen Fällen auch Codein festgestellt wurde. In weiteren 21 Fällen wurden DHC sowie in 9 Fällen Methadon in Kombination mit anderen Drogen nachgewiesen. Bei den meisten lidocainpositiven Fällen handelte es sich demnach um Polytoxikomane, die sowohl Cocain als auch Heroin und andere Opiate konsumierten. Fälle mit negativem Lidocainbefund sind überwiegend bei reinen Heroin- bzw. Opiatkonsumenten zu finden.

Tabelle 10: Kombination von Lidocainbefunden mit anderen Wirkstoffen, zusammengestellt nach den in Tabelle 9 aufgelisteten Ergebnissen der Haaranalyse von 49 Drogentodesfällen.

Wirkstoffe	Anzahl der Fälle	
	Lidocain positiv (Σ 32)	Lidocain negativ (Σ 17)
Cocain + Heroin	26	1
Cocain	2	2
Heroin	3	11
Nur Codein ^{a)}	1	1
Nur Dihydrocodein ^{b)}	-	1
Nur Methadon ^{c)}	-	1

a) Codein wurde darüber hinaus auch in fast allen Heroin-Fällen festgestellt. b) Dihydrocodein wurde in Kombination mit den anderen Drogen in insgesamt 20 weiteren Fällen gefunden. c) Methadon wurde in Kombination mit anderen Drogen in insgesamt 9 weiteren Fällen gefunden.

In einigen der Todesfälle mit positivem Lidocainbefund war dank ausreichender Haarlänge eine segmentweise Bestimmung der Wirkstoffe möglich. Dabei wurde die Segmentlänge zum distalen Ende der Haare erhöht, da zeitliche Aussagen in der Haaranalytik von längeren Haaren durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Haare, wie bei Pragst et al. [23] dargestellt, mit zunehmendem Abstand von der Haarwurzel ohnehin ungenauer werden. Die Abbildung 18 und Abbildung 19 lassen Rückschlüsse auf das Konsumverhalten zu. Bei beiden Beispielen kann von einem längeren Konsum lidocainhaltiger Drogenmischungen ausgegangen werden. Im Fall 256/97 (Abbildung 18) ist eine stetige Abnahme aller Konzentrationen von proximal nach distal sichtbar, wobei die festgestellten niedrigen Morphinwerte nicht aufgetragen wurden. Neben einer zeitlichen Steigerung der Konsummenge der erst 14jährigen Betroffenen ist hier auch ein Auswascheffekt in distaler Richtung anzunehmen. Bereits früher wurde festgestellt, dass der Cocain-Metabolit Benzoyllecgonin fester an das Haar gebunden wird und nicht so stark der Auswaschung unterliegt wie das Cocain [110]. In Übereinstimmung hiermit sinkt auch die Cocainkonzentration zum Haarende hin schneller als die Benzoyllecgoninkonzentration.

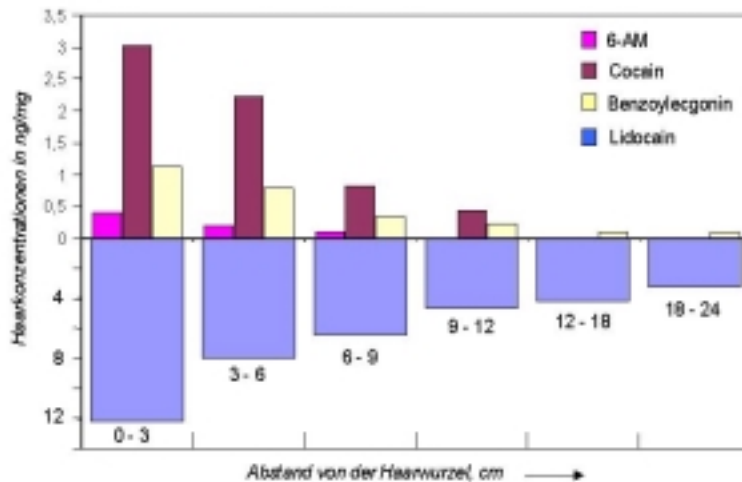


Abbildung 18: Haarkonzentrationen im Fall 256/97. Die 14jährige Betroffene wurde in einem Abrisshaus aufgefunden und hat nach Reanimation im Krankenhaus 14 Tage ohne Bewusstsein überlebt. Untersuchungsergebnis: Injektion eines Cocain-Lidocain-Tetracain-Gemisches.

Die Haarkonzentrationen der 30jährigen Frau im Fall 416/97 (Abbildung 19), die an einer Methadonüberdosis verstarb, zeigen einen stetigen Cocainabusus. Opiate wurden dabei nur in Spuren in zwei mittleren Segmenten festgestellt und daher nicht aufgetragen.

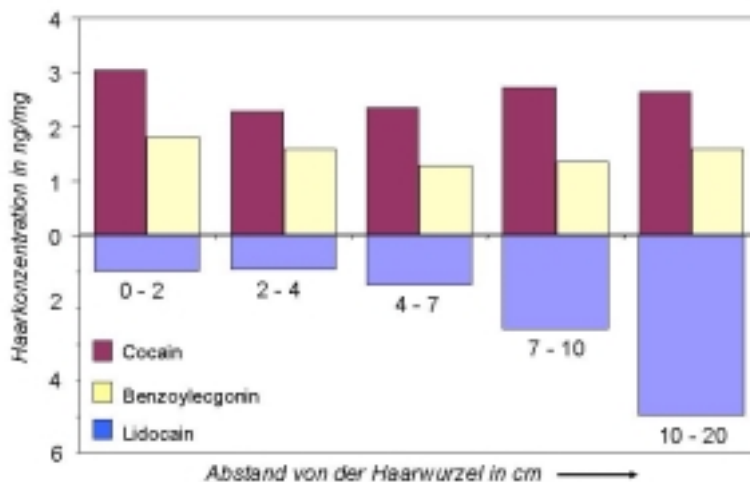


Abbildung 19: Haarkonzentrationen im Fall 416/97. Die 30jährige Betroffene wurde in einem Obdachlosenheim tot aufgefunden. Todesursache: Methadonüberdosis.

Die Lidocainkonzentration fällt im Gegensatz zu den etwa gleichbleibenden Werten des Cocains und des Benzoyllecgonins von distal nach proximal stetig ab, was für eine abnehmende Aufnahme lidocainhaltiger Zubereitung, wahrscheinlich durch bessere Qualität des Straßencocains, spricht.

5.1.3 Methadon und Metabolite

5.1.3.1 Allgemeines

Methadon ist ein Opiod-Analgetikum. Es wird in vielen Ländern für die Substitutionstherapie Heroinabhängiger eingesetzt. Es wirkt als reiner, selektiver Agonist am Opiodrezeptor und hemmt dabei die synaptische Übertragung von Schmerzimpulsen zu den Neuronen in Ge-

hirn und Rückenmark. Im Gegensatz zum Morphin und Heroin fehlt allerdings die euphorisierende Wirkung. Um die Rückfall- oder Wechselbereitschaft zu anderen euphorisierenden Drogen während der Substitutionstherapie Opiatabhängiger zu minimieren, ist deshalb eine psychosoziale Betreuung dringend erforderlich. Durch eine Lockerung in der Verschreibungspraxis von Methadon in Deutschland kam es in den letzten Jahren zu vielen Todesfällen durch Methadonüberdosierungen.

Methadon wird, wie in Abbildung 20 ersichtlich, im Körper durch Mono- und Di-N-Desmethylierung mit spontaner Zyklisierung metabolisiert. Als deren Resultat entstehen im Blut mit einer Plasmahalbwertszeit für Methadon von 15-55 h (Durchschnitt 20 h) die Hauptmetaboliten 2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP) und 2-Ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrrolin (EMDP). Bei täglicher oraler Einnahme von 100-200 mg Methadon erreicht die Plasmakonzentration nach ca. 4 h mit 0,57-1,06 µg/ml (im Mittel 0,83 µg/ml) ihr Maximum. Zu einem geringeren Teil werden alle drei Komponenten in p-Stellung des Phenylringes hydroxyliert und anschließend glucuronidiert. Der pK-Wert von Methadon ist 8,6 [186].

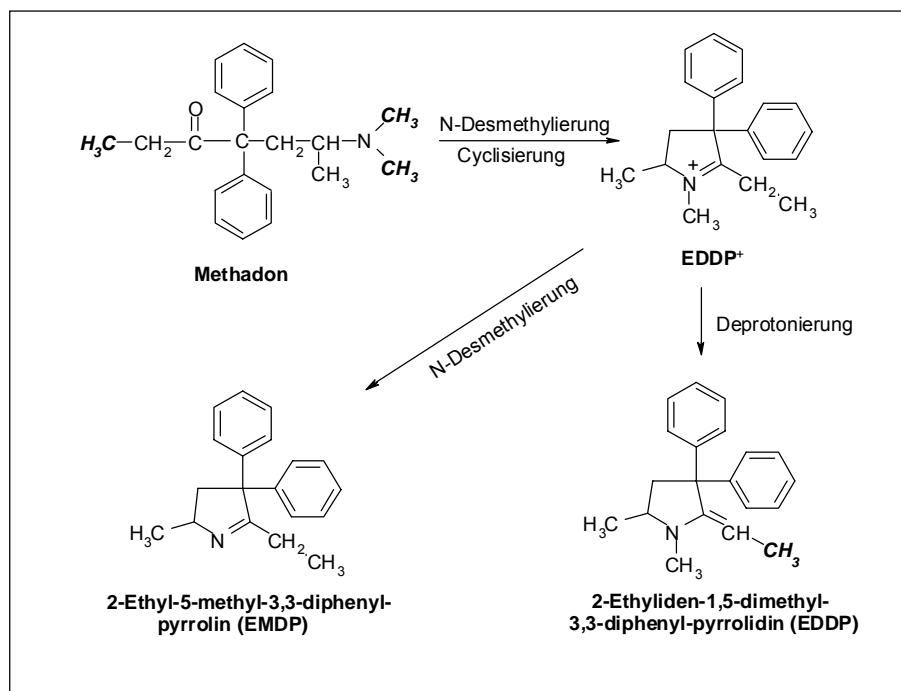


Abbildung 20: Struktur von Methadon und seiner Hauptmetaboliten EDDP und EMDP. Fettgedruckt erscheinen die bei den verwendeten deuterierten Standards substituierten Methylgruppen.

Verschiedene Methoden wurden zum Nachweis von Methadon und seiner Metaboliten aus Haaren beschrieben. Marsh et al. wiesen Methadon mittels Radioimmunoassay aus dem Haarextrakt nach [116]. GC-MS-Methoden wurden von Möller et al. nach Extraktion der Haare mit einem Phosphatpuffer (pH 7,6) und anschließender Aufreinigung mittels SPE [90] und von Goldberger et al. nach Methanolextraktion der Haare und SPE-Clean-up beschrieben [187]. Wilkins et al. hydrolysierten die Haare mit 1 M NaOH und wiesen Methadon, EDDP und EMDP nach LLE mit einem Butylchlorid-Acetonitril-Gemisch und GC-MS mit positiv

chemischer Ionisation (PCI) nach [188]. Einen Nachweis mittels LC-Ionspray-MS an einer chiralen Säule entwickelten Kintz et al. für die enantioselektive Bestimmung von R- und S-Methadon nach enzymatischer Hydrolyse des pulverisierten Haares [189]. Eine SPME-GC-MS-Methode zur Bestimmung von Methadon und EDDP wurde kürzlich von Lucas et al. beschrieben [176]. Sie extrahierten die Analyten nach einer 12 stündigen Behandlung des Haares mit Pronase E in einem Borax-Puffer durch direktes Eintauchen der SPME-Faser in das Hydrolysat.

5.1.3.2 Methodenoptimierung

Auf ein direktes Eintauchen der Faser wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da dies nur zu verstärkter Matrixbelastung und einer verkürzten Lebensdauer der Faser führen würde. Die Optimierung erfolgte so ausschließlich nach alkalischer Hydrolyse der Haare im Headspace-Modus. Diese Untersuchungen wurden unter Nutzung des Multipurpose Samplers MPS2 automatisch durchgeführt.

Die Messungen erfolgten nach Aufnahme der EI-Massenspektren (Abbildung 21) im SIM-Modus. Dabei wurden für Methadon die Fragmente mit m/z 72 und 294 (D_9 -Methadon: 78, 303), für EDDP die Fragmente mit m/z 277, 276 und 262 (D_3 -EDDP: 280, 279, 265) sowie für EMDP die Fragmente 208, 130 und 115 ausgewählt.

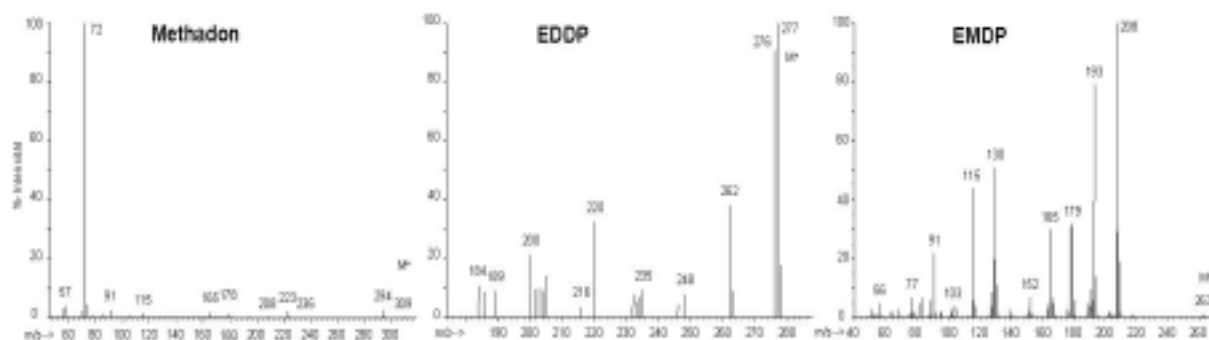


Abbildung 21: EI-Massenspektren von Methadon, EDDP und EMDP. Mit M^+ ist der Molpeak gekennzeichnet.

Ausgehend von den Empfehlungen des Herstellers der SPME-Fasern Supelco wurden zunächst zwei für die Analyse polarer, semivolatiler Substanzen geeignete **Fasern** getestet. Dabei handelte es sich um eine 65 μm PDMS-DVB- und um eine 85 μm PA-Faser. Der Vergleich der nach der Extraktion von je 100 ng Methadon und EDDP aus einem Extraktionsgemisch von 1 M NaOH und 0,5 g Na_2SO_4 erhaltenen Peakflächen ist in Abbildung 22 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Extraktion von Methadon mit der PA-Faser eine um 20% höhere Ausbeute im Vergleich zur PDMS/DVB-Faser liefert, während bei EDDP mit der

PDMS/DVB-Faser um 25% höhere Ausbeuten erzielt werden. Da nach Literaturdaten für EDDP geringere Haarkonzentrationen zu erwarten waren und die absolute Peakflächen von EDDP bei gleicher Absolutmenge deutlich geringer als beim Methadon ausfielen, wurde im weiteren Verlauf mit der PDMS/DVB-Faser gearbeitet.

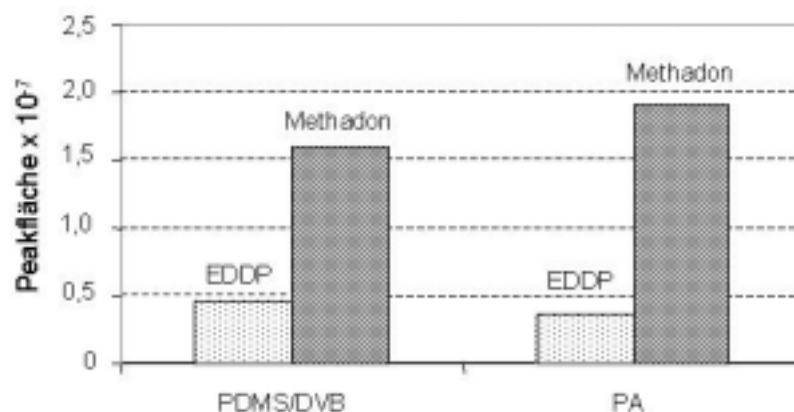


Abbildung 22: Vergleich der 65 µm PDMS/DVB- mit der 85 µm PA-Faser bei der HS-SPME von je 100 ng Methadon und EDDP aus 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g Na₂SO₄ bei 20 min Adsorption bei 90°C (n = 3)

Neben der Freisetzung der Analyten aus der Haarmatrix hat die Zusammensetzung des **Extraktionsgemisches** einen Einfluss auf die GC-MS-SIM-Peakflächen. Daher wurden wie in Abbildung 23 dargestellt 4 Extraktionsgemische verschiedener Basenstärke und Salzkonzentration auf ihre Eignung überprüft. Im einzelnen wurden 1 ml 7,5 M NaOH, 1 ml 1 M NaOH, 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g Na₂SO₄ und 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl eingesetzt. Beste Ausbeuten lieferte dabei 1 M NaOH + 0,5 g NaCl. Für alle weiteren Untersuchungen wurde daher dieses Gemisch eingesetzt.

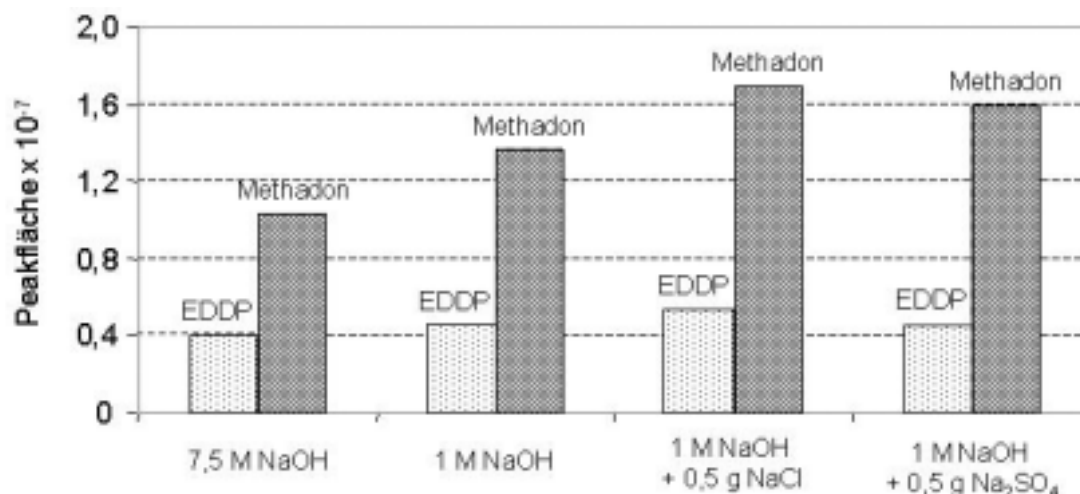


Abbildung 23: Effekt der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches für die Haarhydrolyse und Extraktion auf die Extraktionseffizienzen (n = 2). Faser: 65 µm PDMS/DVB, Adsorption von je 100 ng Methadon und EDDP für 20 min bei 90°C.

Der Einfluss der **Adsorptionstemperatur** auf die Peakflächen wurde zwischen 60 und 120°C sowie der Einfluss der Adsorptionszeit zwischen 10 und 50 min untersucht

(Abbildung 24 a und b). Dabei wurde für Methadon und EDDP bis zu einer Temperatur von 110°C eine stetige Zunahme der Peakflächen beobachtet. Eine weitere Erhöhung auf 120°C war ohne Effekt. Deshalb wurde für die Optimierung der Adsorptionszeit und alle weiteren Versuche und Bestimmungen eine Adsorptionstemperatur von 110°C gewählt.

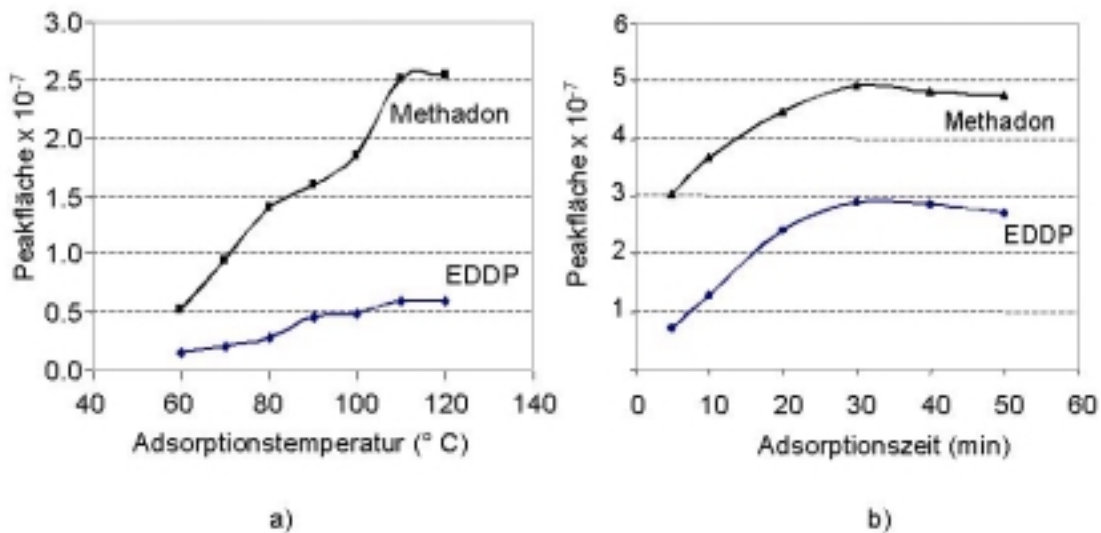


Abbildung 24: a) Einfluss der Adsorptionstemperatur (Adsorptionszeit 20 min) und b) Einfluss der Adsorptionszeit (Adsorptionstemperatur 110°C) auf die HS-SPME-Peakflächen (n = 2). Je 100 ng Methadon und EDDP in 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl, Inkubation: 5 min bei 110°C.

Erwartungsgemäß steigen, wie in Abbildung 24 b erkennbar, die Peakflächen mit zunehmender **Adsorptionszeit** stetig bis 30 min. Danach ist ein leichter Abfall zu beobachten, der eventuell mit einem beginnenden Abbau der Substanzen bei der hohen Temperatur erklärt werden kann. Aus Gründen eines höheren Probendurchsatzes wurde für die weiteren Untersuchungen eine Adsorptionszeit von 20 min gewählt.

Um die einzusetzende **Haarmenge** zu optimieren, wurden je 100 ng Methadon und EDDP sowie das Extraktionsgemisch zu 0, 3, 10, 30 bzw. 100 mg drogenfreiem Haar dotiert. Für die Hydrolyse wurde eine Vorheizzeit des Agitators von 20 min bei 110°C gewählt. Der Einfluss der Haarmatrix ist in Abbildung 25 graphisch dargestellt. Es wird ersichtlich, dass bei Methadon mit zunehmender Haarmenge die Peakfläche abnimmt. Bei 100 mg Haar beträgt die Ausbeute nur noch 10% im Vergleich zur Probe ohne Haarsatz. Bei EDDP hingegen ist bis 10 mg Haar zunächst eine Zunahme der Peakflächen zu verzeichnen. Dieser starke Matrixeffekt kann folgendermaßen erklärt werden. Die im Basischen lipophilen Analyten konzentrieren sich, noch verstärkt durch den Aussalzeffekt, an der Oberfläche der wässrigen Lösung. Die hohe Oberflächenkonzentration ist besonders wichtig für die Headspace-Extraktion von Komponenten mit einer sehr geringen Flüchtigkeit. In Anwesenheit von Haaren könnte die Oberflächenkonzentration der Analyten infolge Verdrängung durch andere lipophile Bestandteile aus der Haarmatrix oder durch eine Lösungsvermittlung aufgrund von

oberflächenaktiven Hydrolyseprodukten verringert werden. Bei EDDP ist das offensichtlich erst bei höheren Haarmengen der Fall, so dass erst bei 30 mg Haar eine deutliche Abnahme der Extraktionsausbeuten festzustellen ist.

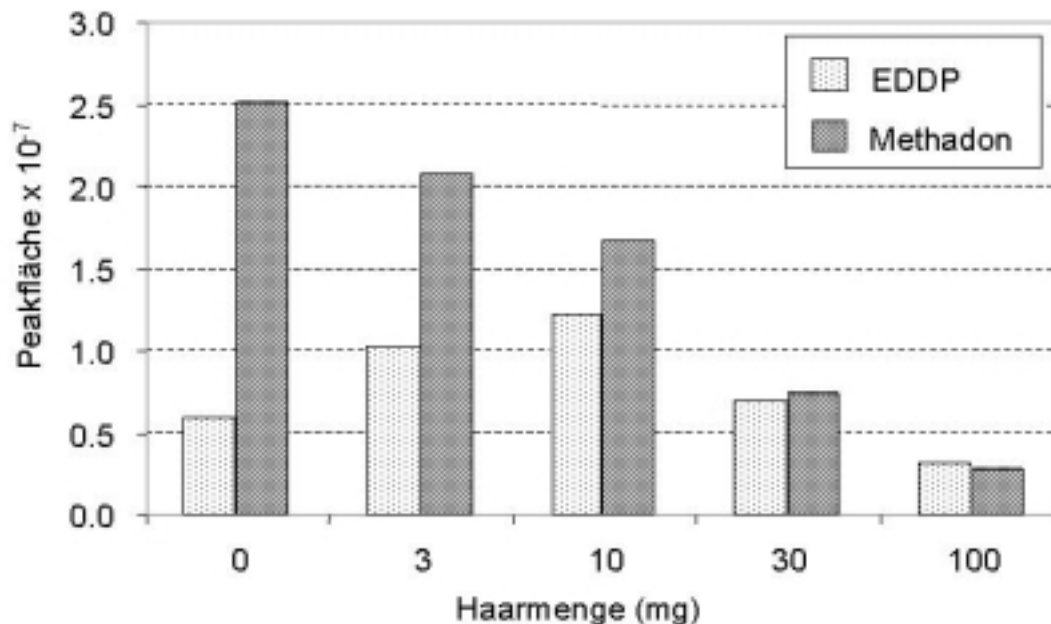


Abbildung 25: Einfluss der eingesetzten Haarmenge (0, 3, 10, 30, 100 mg Leerhaar) auf die Peakflächen von je 100 ng Methadon und EDDP aus dem Extraktionsgemisch von 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl. Inkubation: 20 min bei 110°C, Adsorption: 20 min bei 110°C (n = 2).

Aufgrund der Ergebnisse zur Untersuchung des Matrixeinflusses und der ausreichenden Sensitivität wurden für die weiteren Experimente und Bestimmungen 10 mg Haar eingesetzt. Eine Zunahme an Sensitivität mit zunehmender Haarmenge wäre bei gleicher Konzentration der Analyten im Haar nur teilweise möglich, da die Peakfläche abnimmt, gleichzeitig aber die Viskosität und die Konkurrenz anderer Substanzen bei der Adsorption durch die begrenzte Faserkapazität stark zunimmt. Außerdem führt die erhöhte Viskosität auch zu längeren Adsorptionszeiten. Bei Benutzung deuterierter interner Standards kommt dem Matrixeffekt bei der Quantifizierung nur eine untergeordnete Bedeutung zu. Bei Verwendung anderer interner Standards kann dies aber durchaus relevant sein, wie das unterschiedliche Matrixverhalten von EDDP und Methadon bis 10 mg Haarmenge zeigt. Deshalb sollten Kalibration und Analysen bei gleichen Haarmengen durchgeführt werden.

Für die **Kalibrierung** wurden 10 mg drogenfreies Haar mit 11 verschiedenen Konzentrationen an Methadon und EDDP zwischen 0,03 und 30 ng/mg in Anwesenheit von je 10 ng D₉-Methadon und D₃-EDDP als interne Standards dotiert. Für EMDP wurden sieben verschiedene Konzentrationen zwischen 0,03 und 3 ng/mg mit 10 ng D₃-EDDP als internem Standard gemessen. Die Kalibrationskurven sind in Abbildung 26 dargestellt.

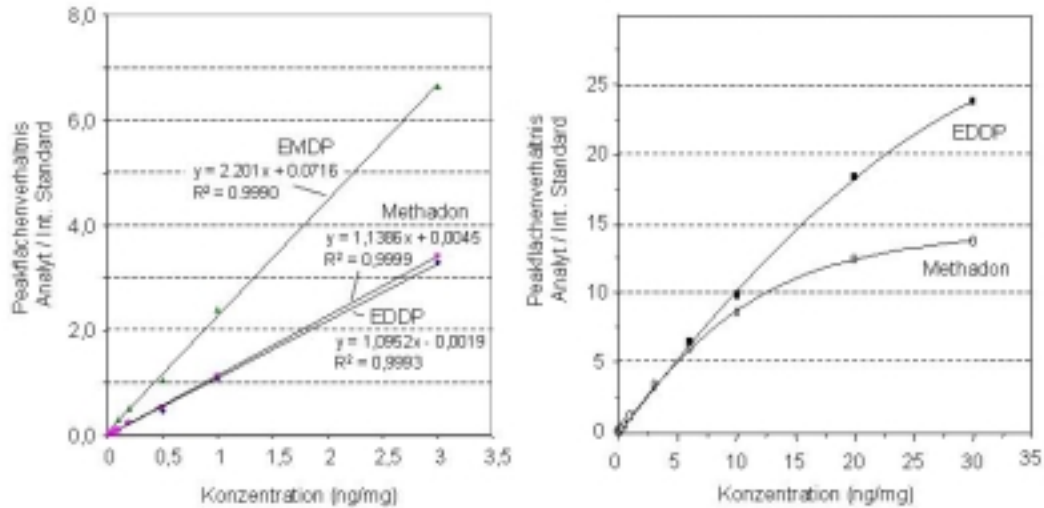


Abbildung 26: Kalibrationskurven von Methadon, EDDP und EMDP. Lösung: 10 mg drogenfreies Haar, 10 ng D₉-Methadon und 10 ng D₃-EDDP in 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl. Inkubation 20 min bei 110°C, Adsorption 20 min bei 110°C (n = 2). Konzentrationen: 0,03, 0,06, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 3,0, 6,0, 10, 20 und 30 ng/mg (EMDP nur bis 3 ng/mg).

Die Kalibration war für Methadon und EMDP bis zu 3 ng/mg und für EDDP bis zu 10 ng/mg mit Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,9999$, $0,999$ bzw. $0,9974$ linear. Bei Konzentrationen darüber konnte ein Abweichen von der Linearität beobachtet werden, das für Methadon deutlich stärker ausfiel als für EDDP. Eine genaue Erklärung ließ sich nicht finden. Aufgrund dieser Abweichung von der Linearität wurde bei Haarproben mit hohen Konzentrationen eine geringere Haarmenge eingewogen, um in den linearen Bereich der Kalibration zu gelangen.

Die **Nachweisgrenzen** wurden mit 0,03 ng/mg für Methadon, mit 0,05 ng/mg für EDDP und EMDP und die Bestimmungsgrenzen mit 0,10 ng/mg für Methadon sowie 0,16 ng/mg für EDDP und EMDP bestimmt. Diese Werte wurden bestätigt durch Messung gespikter Haarproben im Konzentrationsbereich zwischen 0,03 und 0,3 ng/mg.

Durch die Durchführung aller Messungen zur Methadonbestimmung mit dem Autosampler konnten alle Schritte der HS-SPME kontrolliert werden. Das führte zu einer guten **Reproduzierbarkeit**. Für 16 Messungen innerhalb einer Serie mit einer dotierten 10 mg Haarprobe wurden Variationskoeffizienten von 4,9% für Methadon und 7,2% für EDDP berechnet.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der gesamten Methode wurden je 10 mg der Haarprobe des Falles 316/97 12 mal innerhalb von drei Tagen gemessen. Dabei ergab sich für die erhaltene Konzentration von 2,66 ng/mg für Methadon eine absolute Standardabweichung von 0,25 ng/mg und ein Variationskoeffizient von 9,2% sowie für EDDP bei 0,67 ng/mg eine absolute Standardabweichung von 0,08 ng/mg, was einem Variationskoeffizienten von 11,8% entspricht.

Die absoluten **Extraktionsausbeuten** im Vergleich zu einer direkt injizierten Probe gleicher Absolutmassen betragen bei je vier Messungen 10,5-11,2% für Methadon, 11,0-14,5% für EDDP und 15,9-17,4% für EMDP.

5.1.3.3 Anwendung auf Haarproben von Drogentodesfällen

Die Methode wurde auf 26 Drogentodesfälle des Sektionsgutes der Jahre 1997/98 angewendet. Nur in 13 Fällen war ein Methadonkonsum entweder aus der Vorgeschichte oder aus den Ergebnissen der Blut- und Urinanalysen bekannt. In allen Fällen wurde das proximale 3 cm Segment untersucht. Die Massenspuren der SIM-Chromatogramme der Analyten für den Fall 164/98 sowie für 037/98 im Falle des EMDP sind in Abbildung 27 dargestellt.

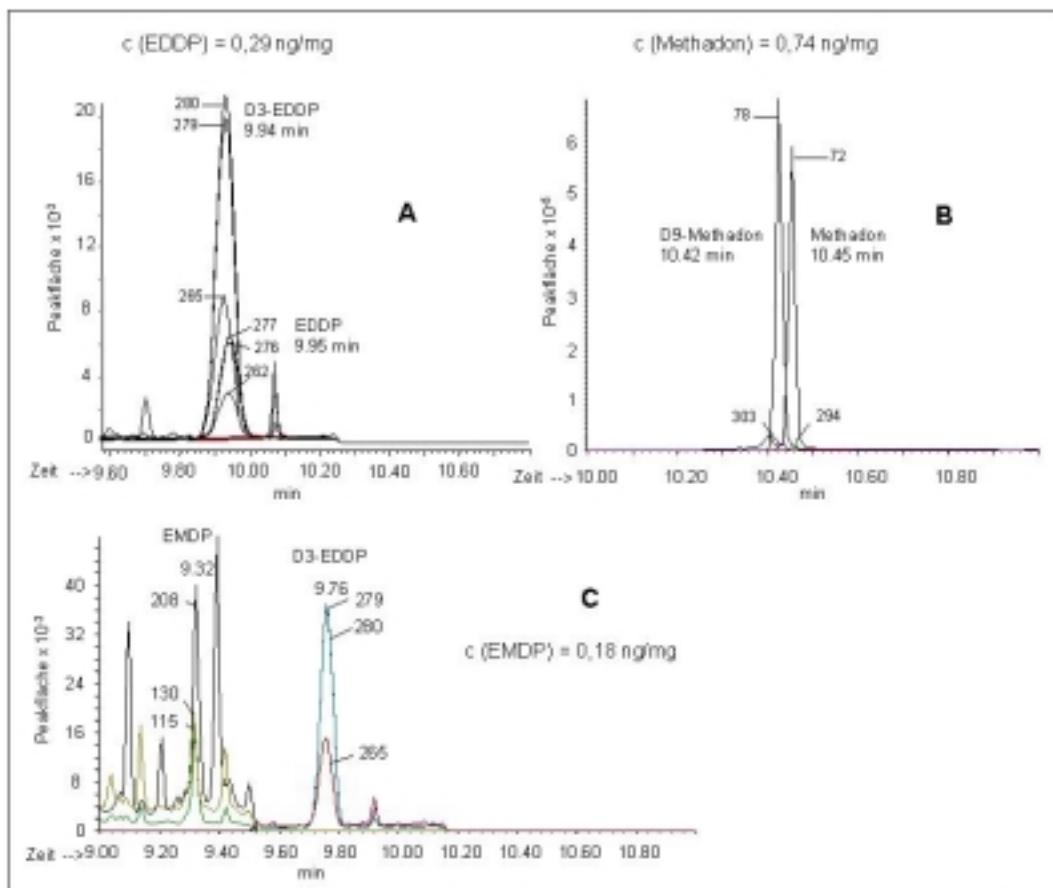


Abbildung 27: Massenspuren der GC-MS-SIM-Chromatogramme für EDDP (A) und Methadon (B) der Haarprobe 164/98 (10 mg) sowie für EMDP (C) der Haarprobe 037/98 (10 mg) mit je 10 ng der deuterierten Standards. Die Retentionszeit für $\text{D}_3\text{-EDDP}$ ist im Fall C wegen des Kürzens der Kapillarsäule geringer im Vergleich zu A.

Methadon wurde, wie Abbildung 28 zeigt, in 19 der 26 Fälle zwischen 0,36 und 11,8 ng/mg Haar nachgewiesen. EDDP war in 17 dieser Fälle mit 0,19 bis 10,1 ng/mg Haar nachweisbar. In allen 13 Fällen mit einem bekannten Methadonkonsum lieferte auch die Haaranalytik einen positiven Befund. In den 6 anderen Fällen konnte der Gebrauch von Methadon nur durch die Haaranalyse bewiesen werden.

Die Bestimmung von EMDP erfolgte nur in sieben methadonpositiven Fällen. Diese sind in Abbildung 28 mit einem „↓“ markiert. Dabei konnte EMDP nur in den Fällen 037/98 und 283/98 mit Konzentrationen von 0,18 ng/mg bzw. 0,84 ng/mg Haar nachgewiesen werden,

also bei Fällen mit den höchsten Methadonkonzentrationen. Das spricht für eine nur geringe Einlagerungsrate dieses Metaboliten in das Haar. Vergleichswerte für EMDP aus der Literatur lagen nicht vor.

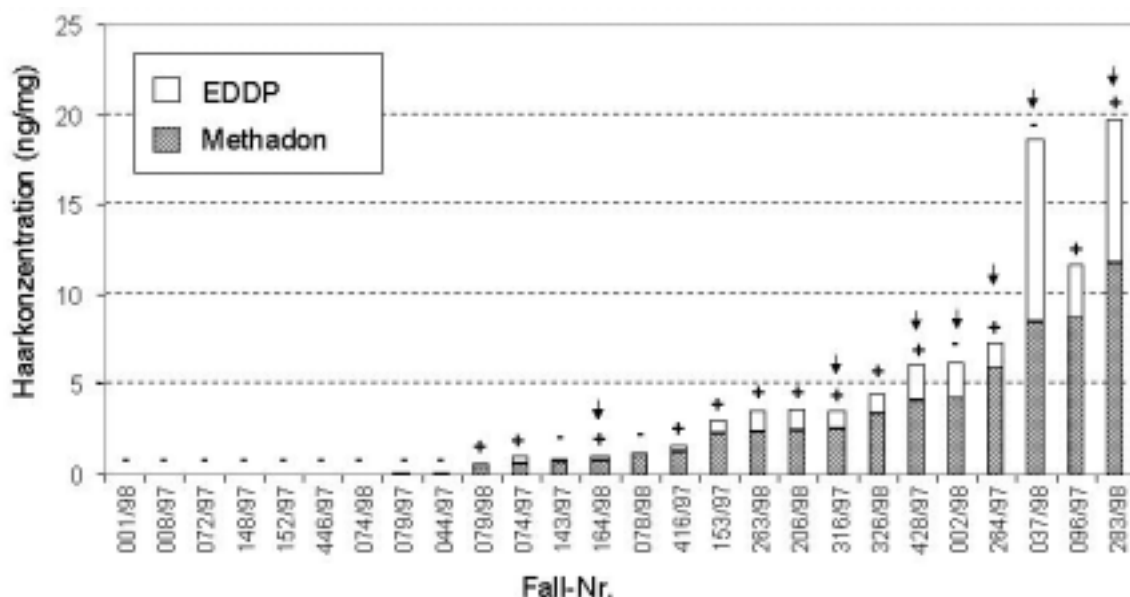


Abbildung 28: Konzentrationen von Methadon und EDDP im Haar von 26 Drogentodesfällen. In den mit „+“ markierten Fällen war ein Methadonkonsum aufgrund der Vorgeschichte bzw. der Blut- und Urinanalysen bekannt. Die mit „↓“ gekennzeichneten Fälle wurden auch auf EMDP untersucht.

In vier Fällen konnten für die Methadonkonzentrationen Vergleichsdaten herangezogen werden, die aus einer vorherigen Bestimmung derselben Proben nach Phosphatpuffer-Extraktion (pH 7,6) mittels SPE und GC-MS-SIM vorlagen [110]. Dabei wurde allerdings kein EDDP bestimmt. Die gegenübergestellten Ergebnisse sind in Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11: Vergleich der Methadonkonzentrationen im Haar von vier Drogentodesfällen, bestimmt mittels GC-MS nach HS-SPME bzw. nach Pufferextraktion und folgender SPE.

Fall-Nr.	Methadonkonzentration (ng/mg)	
	HS-SPME/GC-MS	SPE/GC-MS
264-97	5,94	7,98
428-97	4,10	4,76
002-98	4,21	3,55
283-98	11,75	10,70

Wenn man die vielen Fehlerquellen bei der Haaranalytik berücksichtigt (unterschiedliche Verteilung der Analyten in verschiedenen Haarregionen, schlechte Durchmischung der Haarprobe, verschiedene Arten der Extraktion), dann stehen die erhaltenen Ergebnisse durchaus in befriedigender Übereinstimmung.

Die Bandbreite der gefundenen Methadonkonzentrationen ist mit denen anderer Autoren vergleichbar. Allerdings sind die nach HS-SPME erhaltenen EDDP-Werte deutlich höher

als die in der Literatur beschriebenen [90;176;187-190]. Girod und Staub erhielten bei der Untersuchung von 26 Haarproben von Probanden eines kontrollierten Substitutionsprogrammes Konzentrationen von 0,7-43 ng/mg für Methadon (im Mittel 8,2 ng/mg) und von 0-5,0 ng/mg für EDDP (im Mittel 0,85 ng/mg) [190], wobei EDDP in 13 Fällen nicht nachgewiesen werden konnte.

Mit Ausnahme der zwei Extremfälle 037/98 und 238/98 beträgt das Konzentrationsverhältnis zwischen EDDP und Methadon zwischen 0,19 und 0,67 (im Mittel 0,39), während aus der Literatur Verhältnisse zwischen 0,05 und 0,23 bekannt sind [90;176;188]. EMDP wurde das erste Mal im Haar bestimmt. Wilkins et al. erhielten negative Ergebnisse bei Probanden mit einer Methadonkonzentration von 10,1 und 21,0 ng/mg Haar. Im Haar von mit Methadon gefütterten Ratten konnte EMDP nur unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/mg qualifiziert werden [188]. Auch in forensischen Blutproben konnte EMDP nicht nachgewiesen werden [191]. Daher sind die in zwei Haarproben geringen EMDP-Konzentrationen und in den anderen Fällen negativen Ergebnisse nicht verwunderlich.

5.2 Kombination der alkalischen Hydrolyse von Haarproben mit Derivatisierung und HS-SPME

Viele Drogen- und Medikamentenwirkstoffe bedürfen aufgrund ihrer hohen Polarität infolge von primären oder sekundären Aminogruppen, von Hydroxy- oder Carboxyfunktionen und den damit verbundenen unzureichenden chromatographischen Eigenschaften vor der GC-MS-Analyse einer Derivatisierung. Der Einsatz der SPME war lange durch fehlende geeignete Derivatisierungsverfahren in der toxikologischen und forensischen Analytik beschränkt. Problematisch sind dabei die hohe Reaktivität der Derivatisierungsreagenzien. So greifen z.B. Säureanhydride durch ihren niedrigen pH-Wert die SPME-Faser an und führen so zu deutlich reduzierter Lebensdauer der Faser. Silylierungsreagenzien können ebenfalls mit funktionellen Gruppen an der Faser reagieren. Ein weiteres Problem ist die Hydrolyseempfindlichkeit vieler Derivatisierungsreagenzien in wässrigen Extrakten. Eine von der Extraktion getrennte Derivatisierung würde die Zeitersparnis als größtem Vorteil der SPME gegenüber herkömmlichen SPE-Verfahren wieder aufheben. Mittlerweile sind aber in einigen Publikationen Möglichkeiten für die Kombination der SPME mit einer Derivatisierung beschrieben worden, auf die bei den folgenden Anwendungsbeispielen eingegangen wird.

5.2.1 Synthetische Drogen vom Amphetamintyp

5.2.1.1 Allgemeines

Amphetamine und Ecstasywirkstoffe gehören zu den am häufigsten missbrauchten Stimulanzien. Sie sind relativ lipophil und überwinden als schwache bis mäßig starke Basen die Blut-Hirn-Schranke. Sie sind indirekte Sympathomimetika, setzen in Gehirn und Peripherie Noradrenalin (verantwortlich für erhöhte Aufmerksamkeit und Leistungsbereitschaft, angeregte Atmung und Motorik, Appetitsdämpfung und Müdigkeitsverminderung) und im Gehirn Dopamin (verantwortlich für die euphorisierende Wirkung) frei und hemmen deren Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt in das Axoplasma. Die Ecstasy-Wirkstoffe MDMA, MDEA und deren Metabolit MDA üben zusätzlich halluzinogene Wirkungen aus, die wahrscheinlich auf eine Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) zurückzuführen sind. Abbildung 29 zeigt die Struktur der am häufigsten missbrauchten Wirkstoffe.

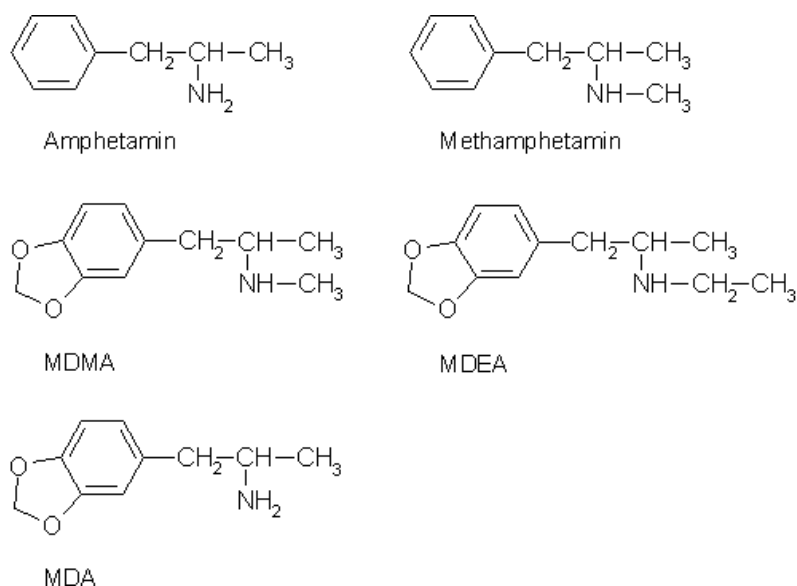


Abbildung 29: Strukturformeln der forensisch wichtigsten Amphetaminderivate: Amphetamin („Speed“), Methamphetamin („Crystal Speed“, „YABA“), MDMA (Ecstasy, „XTC“, „Adam“), MDEA („Eve“), und MDA (wirksamer Metabolit des MDMA und MDEA).

Folgende Plasmahalbwertszeiten wurden beschrieben [89;186]: 4-13 h (Amphetamin), ca. 9 h für MA, 7 h für MDMA und MDEA sowie 6 h für MDA. 30% einer Amphetamindosis werden unter normalen Bedingungen innerhalb von 24 h unverändert ausgeschieden, MA wird zu 43% unverändert und zu 7% als desalkylierter Metabolit Amphetamin und MDMA und MDEA werden zu 65% unverändert und zu 7% desalkyliert als MDA in den Harn abgegeben [89;186].

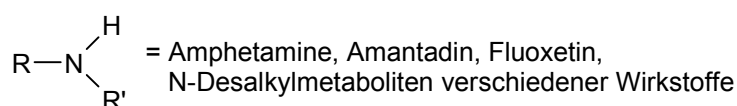
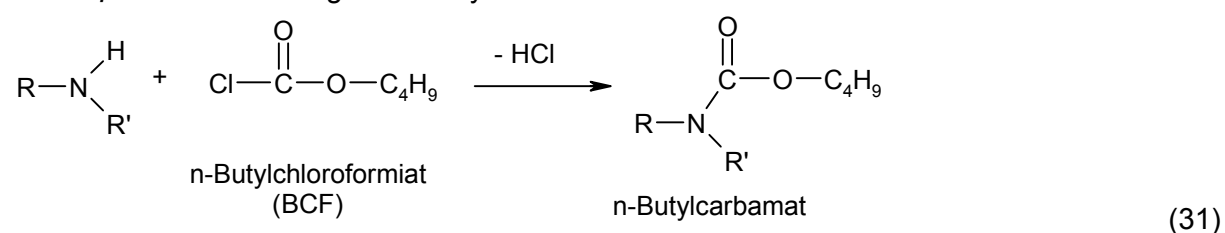
5.2.1.2 Analytik

Amphetaminderivate sind basenstabile Substanzen und besitzen hohe pK-Werte (Ampheta-

min und MA je 9,9 [186]). Deswegen bietet sich für die Extraktion der Wirkstoffe aus den Haaren die alkalische Hydrolyse mit anschließender Festphasenmikroextraktion an. Da sich Amphetamine relativ leicht und unzersetzbar verdampfen lassen und zu den begrenzt flüchtigen Substanzen zu zählen sind, sollte eine Headspace-Anreicherung an einer SPME-Faser geeignet sein. Allerdings bereitet die chromatographische Trennung der Amphetamine aufgrund ihrer Polarität durch primäre und sekundäre Aminogruppen an Standardchromatographie-säulen große Probleme. Es kommt zu Adsorptionserscheinungen an aktiven Stellen des Liners und der Säule. Daher ist eine Derivatisierung der Amphetamine dringend geboten. In der Routineanalytik von Amphetaminen kommen so hauptsächlich Acetylierungsverfahren wie die Derivatisierung mit Säureanhydriden [89-91;192] sowie eine Silylierung mit BSTFA [99;193] in Frage.

Primäre und sekundäre Amine lassen sich mit Chlorameisensäureestern im basisch wässrigen Milieu bei Raumtemperatur unter Abspaltung von Salzsäure vollständig zu wasserstabilen Carbamaten umsetzen. Einen Überblick über die *in situ* Derivatisierung mit Chlorameisensäureestern in wässrigem Milieu gab Hušek [28]. Für die Derivatisierung von Amphetaminen in Zusammenhang mit der SPME haben Ugland et al. [194;195] und Krogh et al. [196] Amphetamine in wässrigem Urin mit Chlorameisensäureestern wie Propylchloroformiat bei einem pH-Wert von 10,8 umgesetzt. Die entstehenden Carbamate wurden dann durch direktes Eintauchen der SPME-Faser extrahiert. Das Reaktionsschema mit dem in dieser Arbeit u.a. verwendetem n-Butylchloroformiat zeigt Gl. 31.

In sample Derivatisierung mit n-Butylchloroformiat:

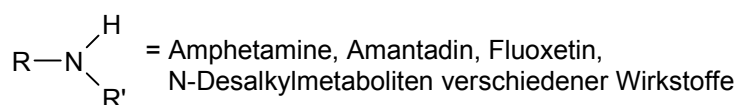
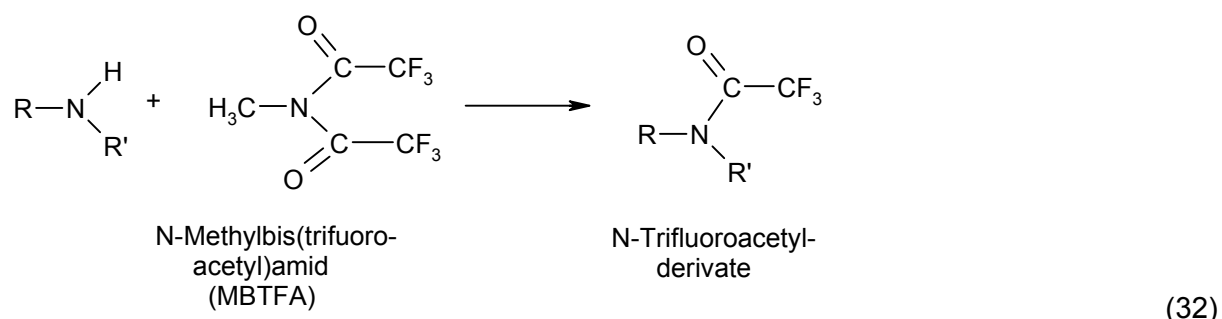


Eine andere Möglichkeit der Derivatisierung ist die Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) nach erfolgter Adsorption der Amphetamine an der SPME-Faser. Jurado et al. führten die Extraktion mit einer 100 µm PDMS-Faser im Dampfraum über alkalisch eingestellten Urinproben durch [152]. Die Derivatisierung erfolgte im Anschluss in einem Gefäß mit einer TFAA-Atmosphäre. Namera et al. derivatisierten aus Blutproben (alkalisch mit 1 M NaOH) adsorbiertes Amphetamin und MA während der Desorption im GC-Injektor nach vorherigem Injizieren von Heptafluorbuttersäureanhydrid

(HFBA) [153]. Allerdings ist die Lebensdauer bei den Derivatisierungen mit den Säureanhydriden wie schon erwähnt deutlich reduziert. Deswegen wurden in dieser Arbeit die Derivatisierung der Amphetamine mit Alkylchloroformiaten und mit dem milden Acetylierungsreagenz N-Methylbis(trifluoroacetyl)amid (MBTFA) auf ihre Eignung für die Analyse der Amphetamine aus dem alkalischen Haarhydrolysat überprüft.

MBTFA wird als mildes Acetylierungsreagenz beschrieben, das gut flüchtig ist, keine gaschromatographischen Probleme verursacht, nicht zu Schädigungen der Kapillarsäule führt und nach Gl. 32 stabile Derivate bei primären und sekundären Aminogruppen sowie bei Hydroxy- und Thiolgruppen bildet [193;197].

On fiber Derivatisierung mit MBTFA



Für die HS-SPME nach *in sample* Derivatisierung mit n-Butylchloroformiat (Gl. 31) wurde eine 100 µm PDMS-Faser verwendet, die für die Adsorption mittelflüchtiger, unpolarer Substanzen geeignet ist. Bei der *on fiber* Derivatisierung wurde hingegen auf eine für mittelflüchtiger, polare Substanzen geeignete Faser zurückgegriffen, da die Adsorption der Analyten vor der Derivatisierung erfolgte, zu einem Zeitpunkt also, zu dem die Analyten noch die unveränderten primären bzw. sekundären Aminogruppen aufweisen. Die praktische Durchführung beider Derivatisierungsmöglichkeiten von der Probeneinwaage bis zur Desorption im GC-Injektor ist in Abbildung 7 (siehe Abschnitt 4.4.4) dargestellt. Die Methoden eignen sich z.T. auch zur Analyse der im Abschnitt 5.2.2 behandelten Desmethylmetabolite von tricyclischen Antidepressiva.

5.2.1.3 Optimierung der „in sample“ Derivatisierung mit n-Butylchloroformiat (BCF)

Bei der Optimierung der Derivatisierungs- und Extraktionsbedingungen bei der HS-SPME von Amphetaminderivaten wurde auf die Erfahrungen von Krogh et al. [194-196] und Hall et al. [198] bei der Derivatisierung von Drogenwirkstoffen in wässrigen, alkalischen Lösungen

zurückgegriffen. Das betrifft hauptsächlich den ungefähren Volumeneinsatz an Derivatisierungsreagenz, die Wahl der Faser sowie die Reaktionszeiten.

Zunächst wurde zusätzlich zum n-Butylchloroformiat auch die Eignung von Methylchloroformiat zur Umsetzung der Amphetamine getestet, um die höheren Dampfdrücke der gebildeten Derivate besser ausnutzen zu können. Allerdings ließen sich die dabei entstehenden Carbamate des Amphetamins und des Methamphetamins chromatographisch nicht mehr trennen, so dass auf einen weiteren Einsatz von MCF verzichtet wurde. Die bei der Derivatisierung mit BCF erhaltenen Amphetaminderivate lieferten, wie in Abbildung 30 ersichtlich, scharfe, gut separierte Peaks mit spezifischen Massenspektren. Nur die Ausbeute an MDA-Derivat fällt gegenüber den anderen Amphetaminderivaten deutlich zurück, genügt aber dennoch den Empfindlichkeitsansprüchen.

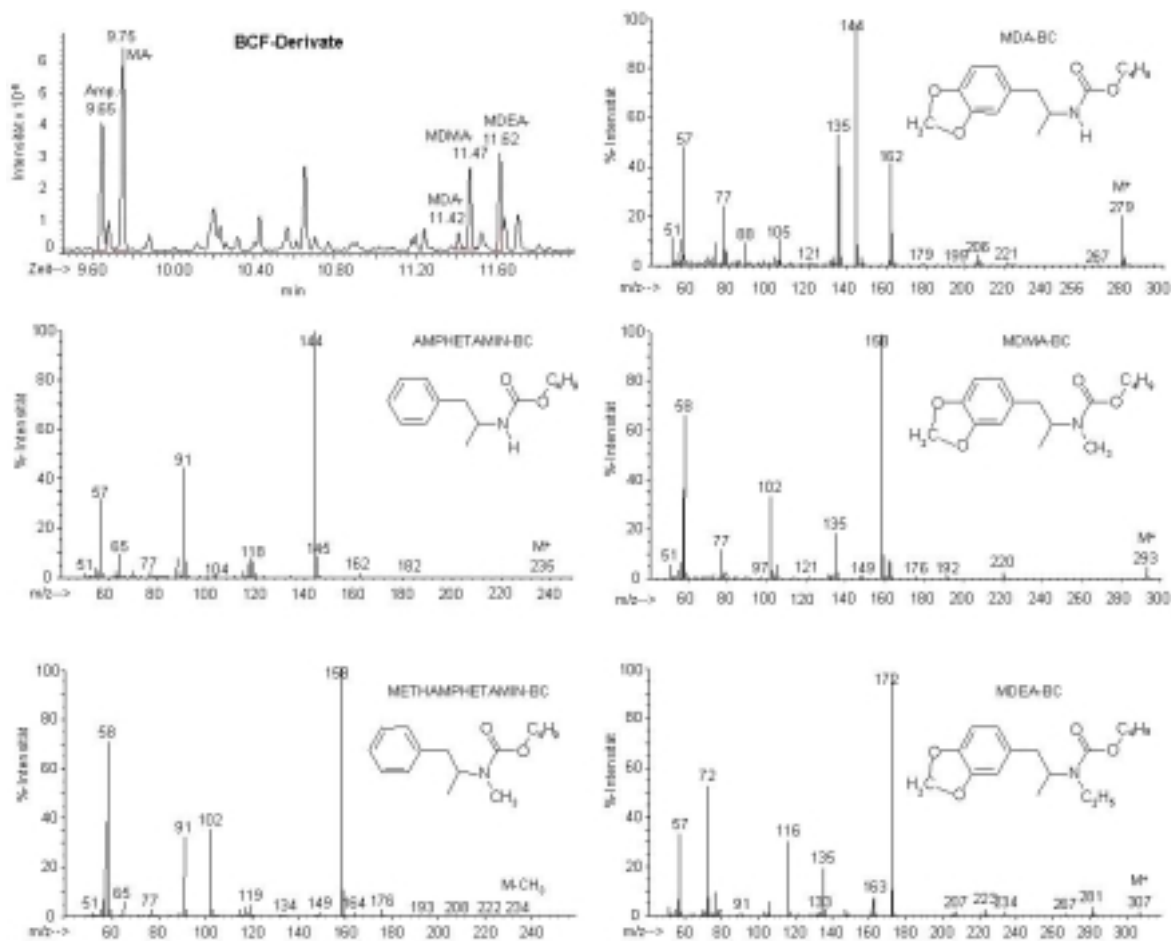


Abbildung 30: Fullscan-Chromatogramm eines Standard-Amphetamingemisches (je 50 ng/ml) nach *in sample* Derivatisierung mit 4 μ l BCF und Massenspektren der resultierenden Amphetamin-Carbat-Derivate. SPME-Bedingungen (noch nicht optimiert): 100 μ m PDMS-Faser, 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl, 20 min Adsorption bei 90°C.

Der Molpeak ist im Scan-Modus nur im Fall des Metaboliten MDA (279) gut erkennbar. Da aber die hohen m/z ein sehr geringes Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen, wurden auch die m/z der Molpeaks der Derivate von MDMA (293) und MDEA (307) für das danach erstellte

SIM-Programm genutzt. Die Basispeaks der Amphetamin-Derivate waren in allen Fällen die Spaltprodukte nach Fragmentierung am α -C-Atom mit m/z 144 für Amphetamin und MDA, 158 für MA und MDMA bzw. 172 für MDEA. Diese Massen wurden auch als Quantifizierungsmassen in der SIM-Methode verwendet.

Zur Klärung der **optimalen Menge an n-Butylchloroformiat** zur Derivatisierung der Amphetamine wurden zu 10 mg drogenfreies Haar je 30 ng Amphetamin, MA, MDA, MDMA und MDEA, 1 ml 1 M NaOH sowie 0,5 g NaCl gegeben. Nach erfolgter Hydrolyse der Haare bei 80°C wurden nach Abkühlen auf Raumtemperatur 2, 4, 6 bzw. 8 μ l BCF zu dem Haarhydrolysat pipettiert. Nach ca. 15 min wurde mit der HS-SPME begonnen. Die danach resultierenden Peakflächen für die einzelnen Analyten sind in Abbildung 31 (linkes Bild) dargestellt. Dabei kann man erkennen, dass bei 4 μ l eingesetzten BCF-Volumens maximale Peakflächen erzielt wurden. Die Abnahme bei höheren Volumina lässt sich mit dem bei der Hydrolyse des überschüssigen Butylchloroformiats entstehenden Butanol erklären, das ebenfalls an die Faser adsorbieren kann. Bei der nur begrenzten Faserkapazität sollte das zu einer Abnahme der Extraktionsausbeuten führen. Im weiteren Verlauf wurden daraufhin 4 μ l BCF zur Derivatisierung eingesetzt.

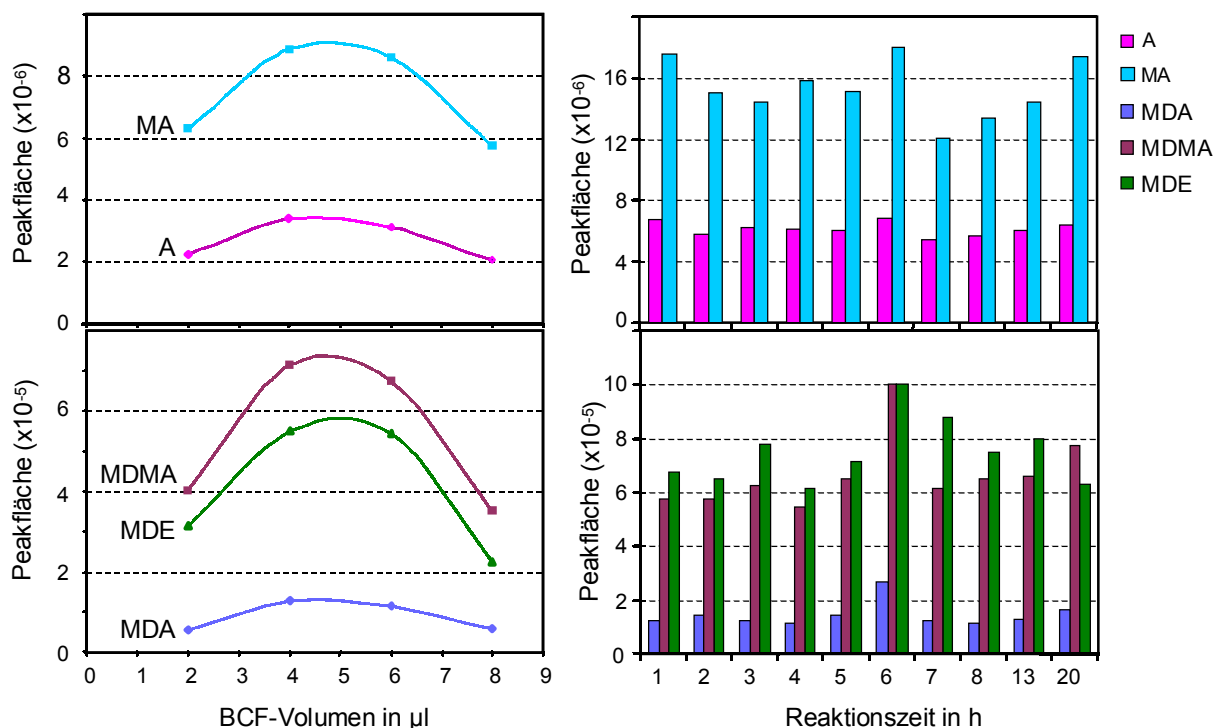


Abbildung 31: Linkes Bild: Optimierung des zur Derivatisierung der Amphetamine eingesetzten BCF-Volumens (2, 4, 6 bzw. 8 μ l BCF) (n = 3). Rechtes Bild: Stabilität der gebildeten Carbamate in 1 M NaOH über einen Zeitraum von 20 h, 4 μ l BCF. Je 3 ng Analyt /mg Haar SPME-Bedingungen: Adsorption 30 min bei 100°C an 100 μ m PDMS.

Da Carbamate im allgemeinen bei hohen pH-Werten hydrolyseempfindlich sind, wurde ein Versuch zur **Stabilität der Carbamatderivate** durchgeführt. Dazu wurden 10 mit dem

Amphetaminstandardmix (je 3 ng/mg) und anschließend mit 4 µl BCF derivatisierte dotierte Haarproben nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, und 20 Stunden mittels HS-SPME/GC-MS-SIM gemessen. Dabei wurde im üblichen Schwankungsbereich der HS-SPME-Messungen keine Abnahme der Peakflächen registriert, wie in Abbildung 31 (rechtes Bild) ersichtlich. Die untersuchte Zeitspanne von 20 h stellt dabei für Serienuntersuchungen eine übliche Sequenzlänge dar.

Zur Optimierung der **Adsorptionstemperatur** wurden 10 mg drogenfreies Haar mit 1 ml 1 M NaOH, 0,5 g NaCl, 30 µl des Amphetaminstandardgemisches (je 1 µg jedes Standards in 1 ml Wasser \cong 3 ng/mg) versetzt, bei 80°C hydrolysiert, mit 4 µl BCF derivatisiert und 30 min mittels HS-SPME bei 50, 60, 70, 80, 90 und 100°C ex-trahiert. Der Verlauf der Extraktionsausbeuten ist in Abbildung 32 (linkes Bild) dargestellt. Amphetamin (A) und Methamphetamin (MA) erreichen bei 90°C ein Maximum, während bei MDA, MDMA und MDEA ein deutlicher Anstieg der Extraktionseffizienzen bis 100°C zu beobachten ist, der sich mit Sicherheit zu höheren Temperaturen noch fortsetzen würde. Da aber die Reproduzierbarkeiten infolge höheren Innendrucks im Extraktionsgefäß im Bereich des Siedepunktes von Wasser schlechter werden, wurde hier nur bis 100°C gemessen. Diese Temperatur wurde für die Optimierung der Adsorptionszeiten und alle weiteren Messungen genutzt.

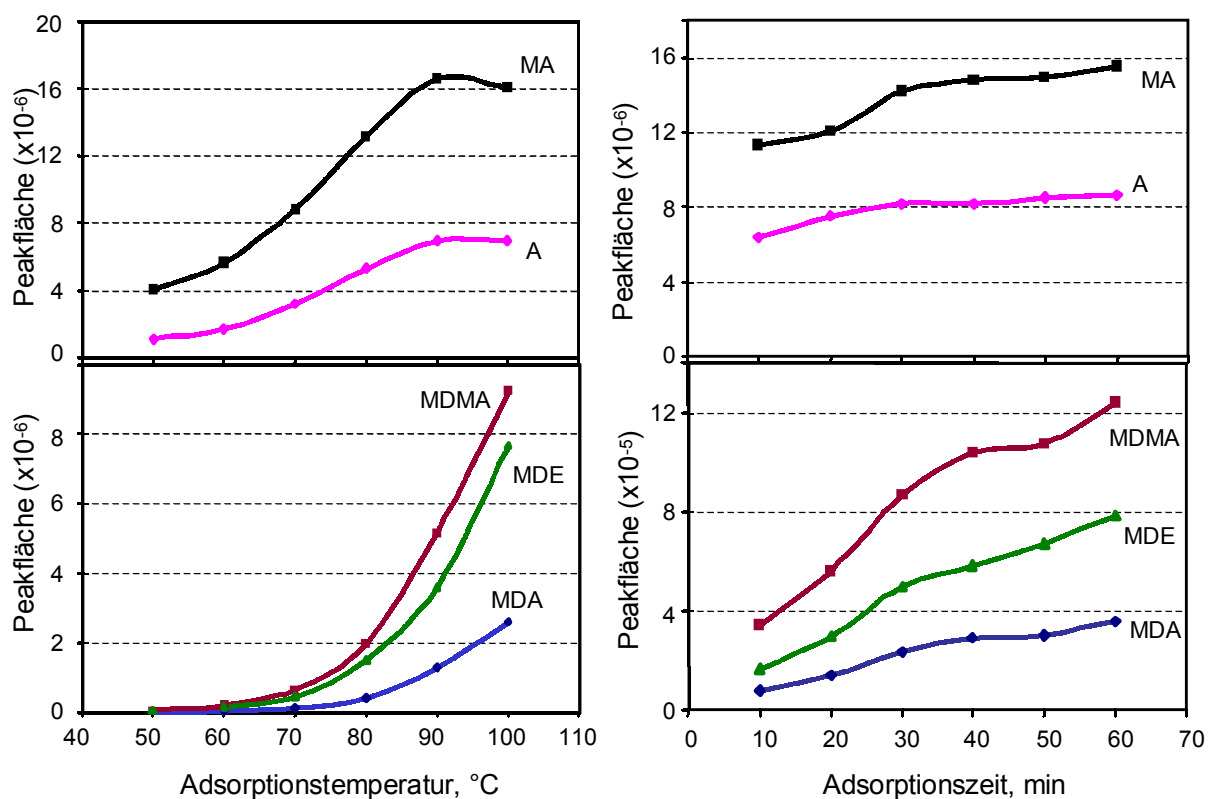


Abbildung 32: Optimierung der Extraktionsbedingungen, 10 mg Leerhaar mit je 3 ng/mg Amphetamin, (A), MA, MDA, MDMA, MDEA: linkes Bild: Abhängigkeit der Extraktionseffizienzen von der Adsorptionstemperatur, Adsorptionszeit 30 min. Rechtes Bild: Abhängigkeit der Peakflächen von der Extraktionsdauer, Adsorptionstemperatur 100°C.

Die Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten von der Adsorptionszeit ist im rechten Bild von Abbildung 32 zu sehen. Sie steigen für alle Analyten bis 70 min an, wobei für Amphetamin und MA die Änderungen nur noch marginal sind. Da aber die Empfindlichkeiten für alle Analyten nach 30 min Extraktion ausreichend waren und ein möglichst hoher Probendurchsatz gewährleistet werden sollte, wurden 30 min Adsorptionszeit als gut vertretbarer Kompromiss gewählt.

Für die Kalibration und die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie für die praktischen Anwendungen wurden zu 10 mg der Haarprobe je 10 ng der deuterierten Standards D₅-Amphetamin, D₅-MA, D₅-MDA, D₅-MDMA sowie D₆-MDEA gegeben. Die Kalibrationen erfolgten im Bereich zwischen 0,02 und 10 ng/mg und waren mit Regressionskoeffizienten $r^2 > 0,99$ linear bezogen auf die internen deuterierten Standards. Die Nachweisgrenzen betragen 0,02 ng/mg für Amphetamin, 0,02 ng/mg für MA, 0,06 ng/mg für MDA, 0,03 ng/mg für MDMA sowie 0,03 ng/mg für MDEA, die Bestimmungsgrenzen je 0,06 ng/mg für Amphetamin und MA, 0,13 ng/mg für MDA sowie 0,10 ng/mg für MDMA und MDEA.

5.2.1.4 „On fiber“ Derivatisierung mit MBTFA

Als zweite Variante der Derivatisierung wurde die für Amphetamine routinemäßige Trifluoracetylierung angewendet, mit dem Unterschied, dass nicht ein perfluoriertes Anhydrid wie z.B. TFAA als Derivatisierungsreagenz verwendet wurde, sondern das mildere MBTFA, und dass die Derivatisierung im Headspace an der Faser stattfand. Der Ablauf wurde bereits in Abschnitt 5.2.1.2 und Gl. (32) beschrieben

Dazu wurden zu 10 mg einer Haarprobe zunächst je 50 ng der deuterierten Standards 1 ml 1 M NaOH und 0,5 g NaCl gegeben. Für die Adsorption wurde im Gegensatz zur Adsorption der Carbamat-Derivate die für polarere mittelflüchtige Verbindungen geeignete 85 µm Polyacrylat-Faser verwendet. Nach Adsorption der Analyten aus dem Headspace wurde die Faser dann dem Dampfraum über 30 µl MBTFA ausgesetzt, wo sie für ca. 20 min bei 80°C zur Derivatisierung verblieb. Die Derivatisierung lieferte scharfe, gut getrennte Peaks mit sehr hoher Empfindlichkeit. Das Fullscan-Chromatogramm des Testgemisches und die dazugehörigen Massenspektren sind in Abbildung 33 dargestellt.

Wie auch bei den Carbamat-Derivaten sind die Molpeaks nur bei den Methylendioxy-Derivaten erkennbar und für die Messung im SIM-Modus nutzbar. Die Basispeaks stellen wieder die nach Spaltung am α -C-Atom erhaltenen Fragmente dar. Diese wurden auch für die Quantifizierung genutzt.

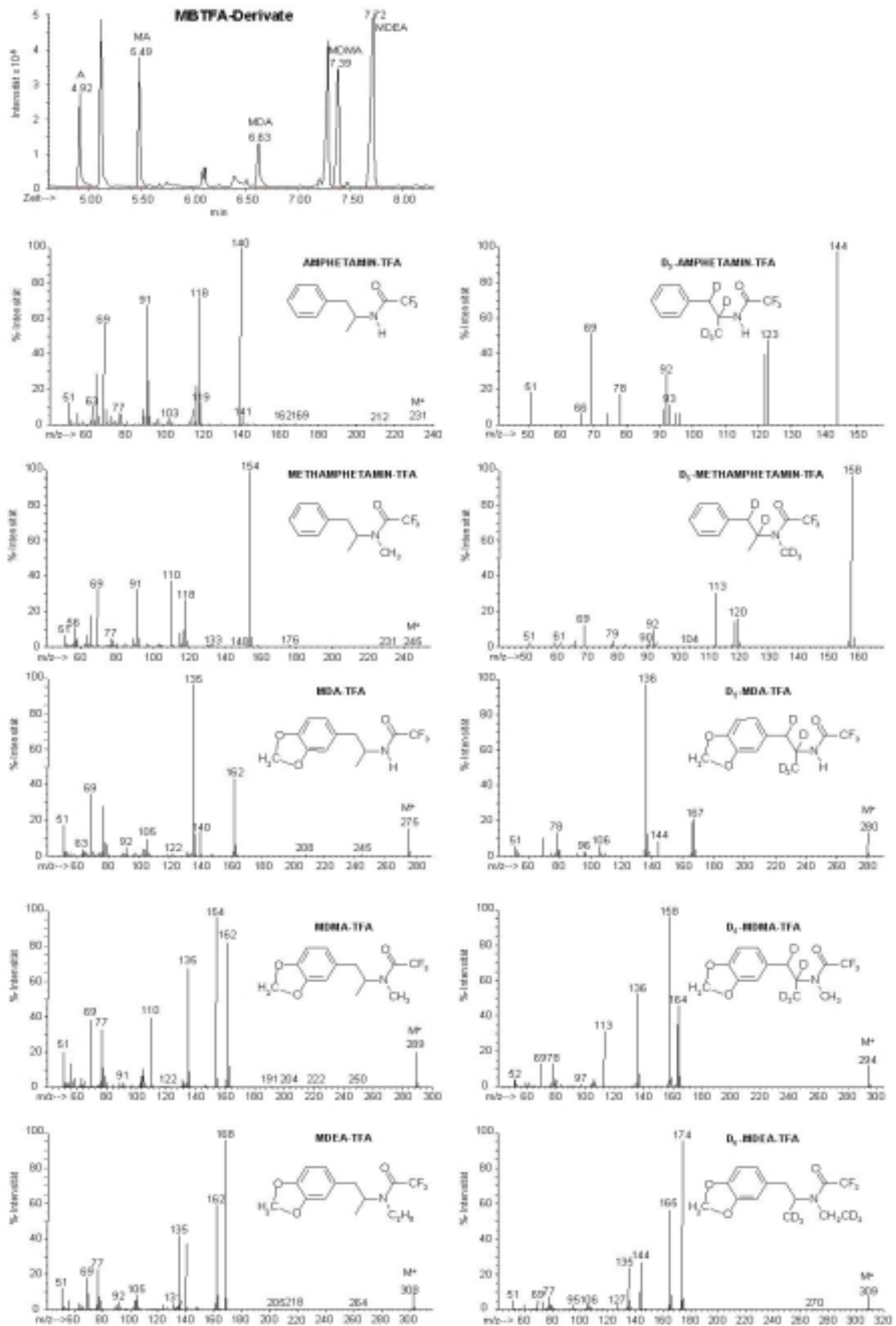


Abbildung 33: Fullscan-Chromatogramm eines Standard-Amphetamingemisches (je 50 ng/ml) nach erfolgter HS-Adsorption und *on fiber* Derivatisierung mit MBTFA und Massenspektren der resultierenden Amphetamin-TFA-Derivate. SPME-Bedingungen: 85 μ m PA-Faser, 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl, 20 min Adsorption bei 80°C, 20 min Derivatisierung bei 80°C über 30 μ l MBTFA.

Für die Messungen der Haarproben wurde nach einer 20minütigen Hydrolyse der Haare bei 80°C wieder eine Adsorptionszeit von 30 min gewählt. Die Derivatisierung wurde für 25 min ebenfalls bei 80°C durchgeführt. Eine weitere Optimierung der Methode fand nicht statt. Hierzu muss gesagt werden, dass die automatische Durchführung der Analyse im MPS2-Autosampler zwar Temperaturänderungen während der einzelnen Arbeitsschritte (Hydrolyse, Adsorption, Derivatisierung) gestattet, dass der Autosampler aber nicht über eine Aktivkühlung verfügt, die ein schnelles Abkühlen während der Analyse erlauben würde. Das aber wäre in diesem Falle wünschenswert, da bei einer Extraktionstemperatur von 100°C höhere Adsorptionsausbeuten zu erwarten wären. Allerdings sind die entstehenden Derivate sehr flüchtig, was Erfahrungen bei der Routineanalytik mit Amphetamin-TFA-Derivaten (besonders bei Abdampfen überschüssigen Derivatisierungsreagenzes) beweisen. Das Gleichgewicht Faser/Headspace würde so deutlich zugunsten des Dampfraumes verschoben und niedrigere Ausbeuten wären die Folge. Auf längere Adsorptions- oder Derivatisierungszeiten wurde ebenfalls verzichtet, da die Analysendauer so unakzeptabel lang werden würde.

Die Kalibrationen wurden wie bei der *in sample* Derivatisierung durchgeführt. Zu 10 mg Leerhaar wurden zwischen 0,2 und 100 ng der Amphetaminstandards (2-50 µl von 0,1 µg/ml und 10-100 µl von 1 µg/ml des Amphetamingemisches in Wasser) sowie 1 ml 1 M NaOH und 0,5 g NaCl gegeben. Die Volumendifferenzen wurden mit Wasser ausgeglichen. Die Regressionskoeffizienten waren mit jeweils über 0,99 bezogen auf die entsprechenden deuterierten Standards linear. Die Nachweisgrenzen (in Klammern Bestimmungsgrenzen) betragen 0,04 ng/mg (0,13 ng/mg) für Amphetamin und MDEA sowie je 0,02 ng/mg (0,06 ng/mg) für MA, MDA bzw. MDMA.

5.2.1.5 Anwendungen beider Derivatisierungsmethoden auf reale Haarproben

An zwei Beispielproben aus dem Sektionsgut des Institutes, bei denen ein Amphetaminkonsum durch Blut- und Urinanalyse abgesichert war, wurden die Derivatisierungsverfahren angewandt. Die Quantifizierungsmassenspektren der Analyten und deuterierten Standards der SIM-Chromatogramme sind in Abbildung 34 für die *in sample* Derivatisierung mit BCF sowie in Abbildung 35 für die *on fiber* Derivatisierung mit MBTFA dargestellt.

Die Ergebnisse der Haaruntersuchungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Bei der Probe 223/97 stand ausreichend Material zur Verfügung, so dass eine Untersuchung mit beiden Verfahren möglich war. Dabei konnten im Rahmen der Reproduzierbarkeit der Haaranalyse gute Übereinstimmungen erzielt werden. Deutliche und nicht erklärbare Unterschiede gab es nur beim Ergebnis für MDA (0,14 bzw. 0,58 ng/mg) auch nach mehrfacher Bestimmung (n = 3).

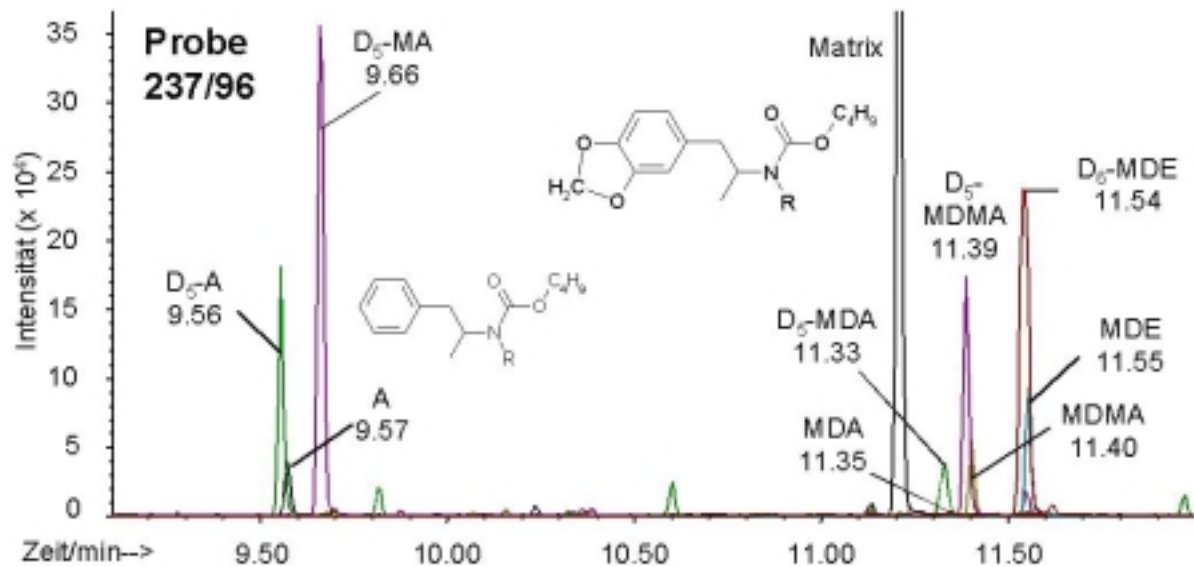


Abbildung 34: Massenspuren aus dem SIM-Chromatogramm der N-Butoxycarbonyl-Derivate der Amphetamine und der entsprechenden deuterierten Standards nach HS-SPME und *in sample* Derivatisierung mit BCF von 10 mg der Haarprobe 237/96. Konzentrationen: Amphetamin (A): 0,50 ng/mg, MDMA: 0,59 ng/mg, MDEA: 0,47 ng/mg, MDA: pos.

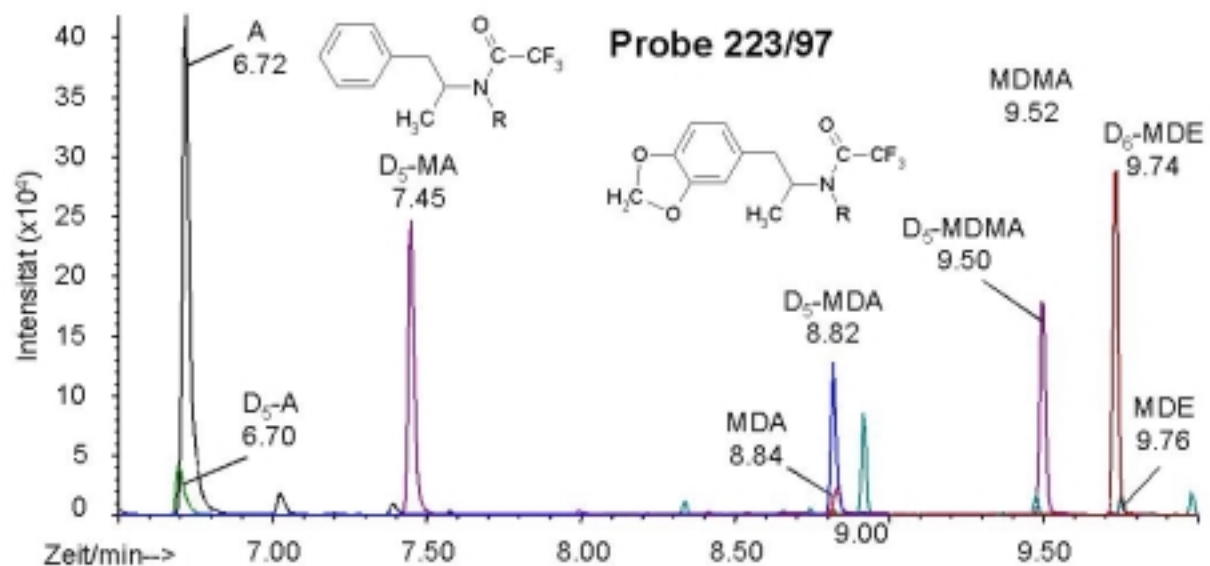


Abbildung 35: Aus dem SIM-Chromatogramm extrahierte Massenspuren der Amphetamin-TFA-Derivate und der entsprechenden deuterierten Standards nach HS-SPME und *on fiber* Derivatisierung mit MBTFA von 10 mg der Haarprobe 223/97. Konzentrationen: Amphetamin (A): 17,8 ng/mg, MA: pos., MDMA: 2,90 ng/mg, MDEA: 0,10 ng/mg, MDA: 0,58 ng/mg.

Die positiven Ergebnisse bestätigen auch den nach Blut- und Urinanalyse zum früheren Zeitpunkt (1996 bzw. 1997) festgestellten Amphetamin- und Ecstasymissbrauch. Die Konzentrationen für Amphetamin liegen im Fall 223/97 (im Mittel 19 ng/mg) in einem Bereich, der nach Literaturwerten auf einen starken Konsum schließen lässt [2;89;199]. Die MDMA- und MDA-Konzentrationen bestätigen in dem Fall einen gelegentlichen Konsum an Ecstasy. Das MDEA wurde nur selten oder als Beimischung in den MDMA-Tabletten aufgenommen.

Die Konzentrationen im Fall 237/96 befinden sich in einem Bereich, der auf einen seltenen Konsum von Ecstasy und von Amphetamin schließen lässt [2;89].

Tabelle 12: Konzentrationen an Amphetaminen in zwei verschiedenen Haarproben nach alkalischer Hydrolyse und HS-SPME mit BCF- bzw. MBTFA-Derivatisierung

Probe	Derivatisierung	Amphetamin in ng/mg	MA in ng/mg	MDA in ng/mg	MDMA in ng/mg	MDEA in ng/mg
237/96	BCF	0,50	n.n.*	pos.	0,59	0,47
223/97	BCF	19,8	pos.	0,14	2,92	pos.
	MBTFA	17,8	pos.	0,58	2,90	pos.

*n.n. = nicht nachweisbar, pos. = positiv, bedeutet $LOD < c < LOQ$

5.2.2 Antidepressiva

5.2.2.1 Allgemeines

Antidepressiva sind Substanzen, die eine pathologisch gesenkte Grundstimmung heben. Sie beseitigen depressive Wahngedanken, steigern oder dämpfen den vitalen Antrieb. Zu ihnen gehören die tricyclischen Antidepressiva und deren Verwandte, selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI) sowie die Monoaminoxidase-Inhibitoren. Depressionen werden meist durch einen Mangel an Catecholaminen (insbesondere Noradrenalin) und Serotonin (5-Hydroxytryptamin) erzeugt, der dadurch entsteht, dass diese Neurotransmitter verstärkt in die präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen und/oder durch einen Überschuss an Monoaminoxidase abgebaut werden.

Die tricyclischen Antidepressiva und das verwandte tetracyclische Maprotilin hemmen sowohl die neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin als auch die des Serotonins. Dadurch wird die noradrenerge bzw. serotoninerge Signalübertragung verstärkt. Strukturell gehören zu den tricyclischen Antidepressiva die hier untersuchten Dibenzazepine Imipramin, Desipramin und Clomipramin, die Dibenzocycloheptadiene Amitriptylin und Nortriptylin sowie das Dibenzoxepin Doxepin. Hauptnebenwirkungen sind Sedation und Schläfrigkeit und Delirien durch Blockade von Muscarinrezeptoren. Bei akuter Vergiftung stehen die Hyperthermie, die Tachykardie sowie zentralnervöse Symptome bis hin zur zentralen Atemlähmung im Vordergrund. In Zusammenhang mit Alkohol kommt es zu einer Verstärkung der zentralen dämpfenden Wirkungen.

Die selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer sind, wie der Name schon sagt, für die Inhibition der Rückaufnahme des Serotonins verantwortlich. Zu ihnen gehört das hier untersuchte Fluoxetin. Die SSRI weisen wegen geringer oder fehlender Affinität zu Muscarinrezeptoren kaum Nebenwirkungen auf. Bei Intoxikation kommt es zu Übelkeit und Erbrechen, Unruhe und Krämpfen.

Die Monoaminoxidase-Hemmer verhindern den Abbau von Noradrenalin zum 3,4-Dihy-

droxyphenylglycolaldehyd und von Serotonin zur 5-Hydroxyindolessigsäure. Substanzen dieser Gruppe wurden hier nicht untersucht.

Einen Überblick über die Strukturformeln der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen und ihrer Hauptmetaboliten gibt Abbildung 36.

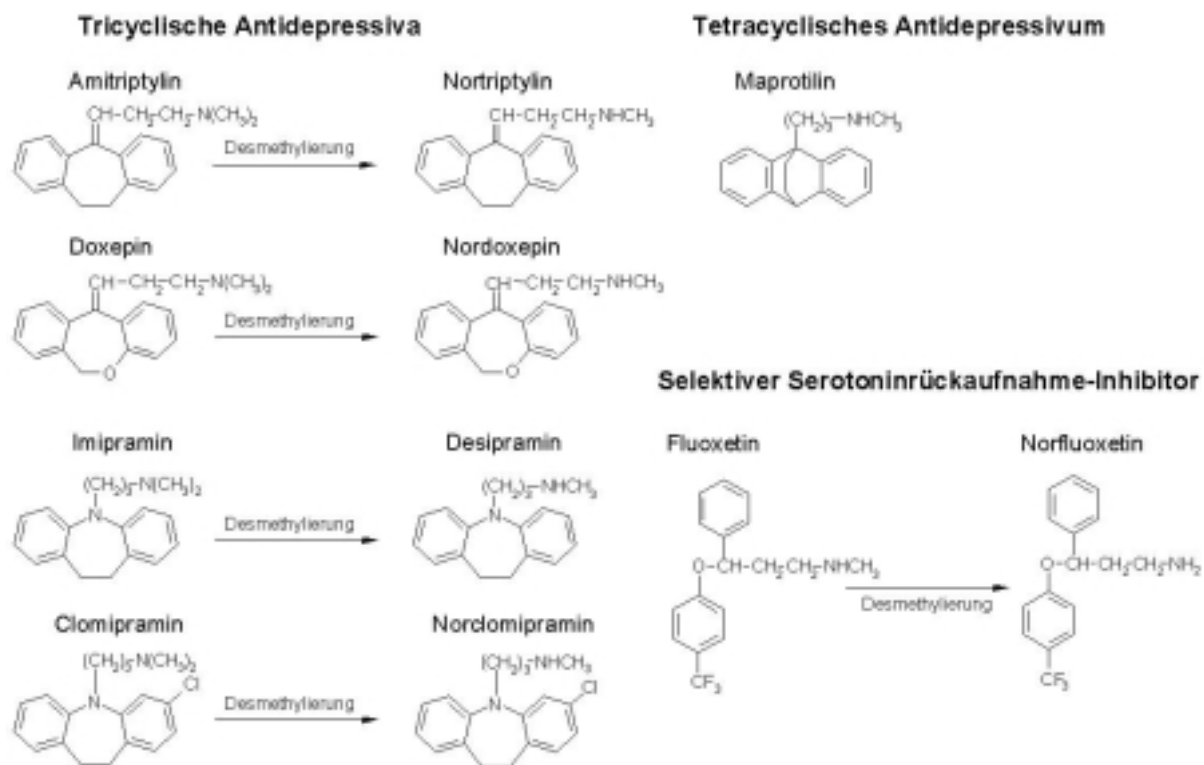


Abbildung 36: Strukturformeln untersuchter Antidepressiva und ihrer Metaboliten.

Die Antidepressiva sind basenstabile Substanzen und lassen sich gut aus alkalischer Lösung extrahieren. Die Antidepressiva weisen, wie in Tabelle 13 aufgelistet, hohe pK_S -Werte und sehr lange Halbwertzeiten im Blutplasma auf. Die Plasmaeiweißbindung ist für alle Substanzen größer als 90%. Ihre Lipophilie bei gleichzeitiger Basizität führt zu einer guten Anreicherung dieser Substanzen im Haar [110].

5.2.2.2 Analytik

Die tricyclischen Antidepressiva sind relativ schwerflüchtige Substanzen, die sich aber aufgrund ihrer Lipophilie bei basischem pH-Wert aus dem Dampfraum an eine SPME-Faser anreichern lassen. Erstmals beschrieben wurde eine HS-SPME-Methode 1995 von Kumazawa et al. [155], die tricyclische Antidepressiva aus alkalischem Urin mit einer 100 μm PDMS-Faser extrahierten. Dabei wurden allerdings wegen einer fehlenden Derivatisierung nicht die Desmethylmetaboliten erfasst.

Tabelle 13: pK_s -Werte und pharmakologische Daten der Antidepressiva und einiger Metabolite nach [181;186;200], Angaben in Klammern bezeichnen Mittelwerte.

Substanz	pK_s -Wert	Ungefähre tägliche Dosis	Plasmakonzentration in $\mu\text{g/ml}$	Plasmahalbwertszeit in h
Amitriptylin	9,4	50-150 mg	0,04-0,24 (0,13)	8-51 (28)
Nortriptylin	9,7	30-150 mg	0,02-0,26 (0,11)	15-90 (30)
Imipramin	9,5	75-300 mg	0,01-0,11 (0,05)	8-20 (14)
Desipramin	10,2	75-300 mg	0,01-0,33 (0,09)	10-54 (22)
Clomipramin	9,5	75-300 mg	0,08-0,48 (0,23)	20-48 (36)
Doxepin	9,0	75-150 mg	0,05-0,15 (0,10)	8-45 (17)
Maprotilin	10,5	75-300 mg	0,05-0,72 (0,14)	20-105 (45)
Fluoxetin	?	20-80 mg	0,02-0,47 (0,11)	48-168

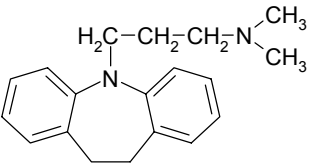
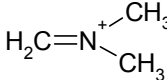
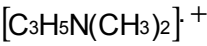
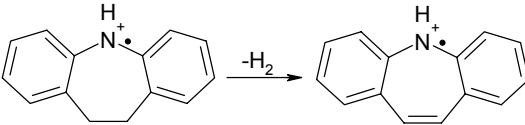
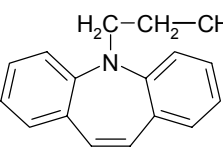
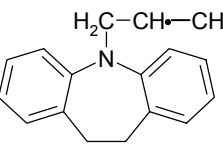
Als vorherrschende Derivatisierungsmethoden für die Umsetzung von Antidepressiva bzw. derer Metaboliten werden Acetylierungen wie bei Rothe et al. [180] mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) oder mit Essigsäureanhydrid wie bei Maurer et al. [201;202] verwendet.

Neben der Acetylierung wäre auch die Silylierung der Metabolite denkbar. Da Acetylierungen mit Säureanhydriden, aber auch Silylierungen hydrolyseempfindlich sind, wäre nur eine nach erfolgter Extraktion stattfindende *on fiber* Derivatisierung in Frage gekommen. Dafür müssten die Analyten eine ausreichende Flüchtigkeit aufweisen. Gerade aber die desmethylierten Metabolite weisen infolge ihrer höheren Polarität eine geringere Flüchtigkeit auf. Die Temperaturerhöhung bei der HS-SPME ist aber aufgrund des steigenden Drucks durch den Siedepunkt des Wasser auf 110°C begrenzt, wie die vorherigen Versuche mit den Amphetaminen und Methadon zeigten. Für eine bessere Reproduzierbarkeit sind sogar nur 100°C empfehlenswert. Daher wurde die Umsetzung der Metabolite zu flüchtigeren Derivaten im wässrigen Milieu als Derivatisierung der Wahl getestet. Wie schon bei den Amphetaminen bot sich hierfür die Reaktion von primären und sekundären Aminen mit Chloroformiaten im alkalischen pH-Bereich an. Allerdings wurde nicht das Butylchloroformiat, sondern das zu leichter flüchtigen Derivaten führende Methylchloroformiat verwendet.

Zunächst wurden die jeweiligen Standards in 1 ml 1 M NaOH und 0,5 g NaCl nach Zugabe von 4 μl Methylchloroformiat untersucht. Die quantitative Umsetzung erfolgt nach Husek et al. [28] und Ugland et al. [194] innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur. Die Adsorption der entstandenen Methylcarbamat-Derivate wurde mit einer 100 μm PDMS-Faser für 30 min bei 100°C unter ständigem Schütteln der Probe durchgeführt (siehe auch Abbildung 7). Die Massenspektren der Antidepressiva bzw. ihrer Derivate und der Derivate ihrer Metaboli-

ten zeigt die Abbildung 37. Clomipramin, Imipramin und das als interner Standard genutzte Dimetacrin weisen Spektren mit ausreichend intensiven und charakteristischen Fragmenten auf. Molpeak sowie die α -Spaltprodukte (sowohl zum Ringstickstoff als auch zum aliphatischen N-Atom) wurden für die weiteren Analysen genutzt. Als Beispiel sind in Tabelle 14 die Spaltprozesse, Fragmentationen und ihre Intensitäten für Imipramin angegeben.

Tabelle 14: Fragmentierung von tricyclischen Antidepressiva am Beispiel des Imipramins

Ausgangsmolekül	Spaltprozesse und Fragmente	m/z	Intensität in %
	Abspaltung von Dimethylamin mit H-Übertragung (α -Spaltung zum aliphatischen N-Atom)	58	90
			
Imipramin, M = 280 g/mol Intensität ca. 30%	C-N-Spaltung mit H-Übertragung	85	45
			
	C-N-Spaltung mit H-Übertragung und H ₂ -Abspaltung	195 193	35 40
			
	Abspaltung von H ₂ und der Dimethylaminogruppe	234	100
			
	Abspaltung der Dimethylaminogruppe mit H-Übertragung und Ladungswanderung	235	90
			

Die Derivate des Nortriptylins, Nordoxepins und Fluoxetins weisen jeweils das nach Spaltung am α -C-Atom (bezogen auf das aliphatische N-Atom) entstehende Fragment (α -Spaltprodukt $[\text{CH}_2=\text{NCH}_3\text{-CO-OCH}_3]^+$) mit m/z 102 als Basispeak auf. Die Ionisierung von Desipramin und Norclomipramin führt ebenfalls zu einem analogen α -Spaltprodukt als Hauptfragment mit m/z 208 bzw. 242, allerdings bezogen auf den Ringstickstoff. Dazu kommt wie beim Nortriptylin-MC, Nordoxepin-MC, Norclomipramin-MC und Desipramin-MC ein Molpeak mit der Intensität von mindestens 15% bezogen auf den Basispeak zur Absicherung hinzu. Es lassen sich auch ausreichend andere charakteristische Ionen mit guter Intensität für die Verwendung in einem SIM-Programm finden.

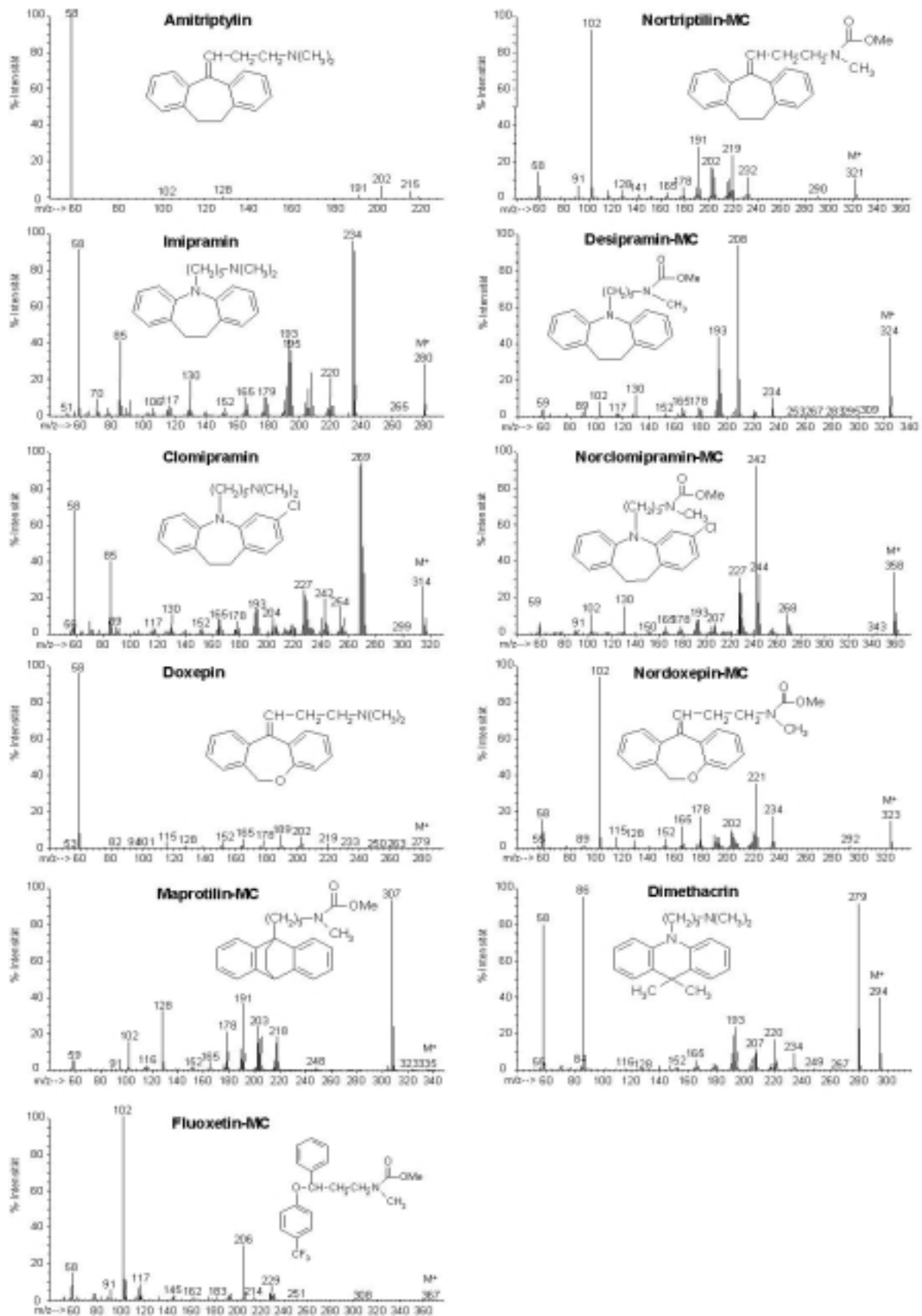


Abbildung 37: Massenspektren tricyclischer Antidepressiva, Methylcarbamat-Derivate der Antidepressiva und ihrer Metaboliten, erhalten nach *In Sample* Derivatisierung in alkalischer Lösung mit 4 μ l Methylchloroformiat und HS-SPME. Adsorption an 100 μ m PDMS für 30 min bei 100°C.

Beim Maprotilin-MC ist das Molekülion kaum noch existent. Dafür erscheint aber das Ion (M-28)⁺ mit m/z 307 als Hauptfragment im Massenspektrum, dass nach Abspaltung der 9,10-Ethylenbrücke entsteht und zum aromatischen Anthracensystem führt. Uncharakteristischere Massenspektren erhält man dagegen für Amitriptylin und Doxepin. Neben dem Hauptfragment nach α -Spaltung mit m/z 58 wurden die mit allerdings nur noch geringer Intensität auftretenden Fragmente mit m/z 202 und 215 für Amitriptylin bzw. 202 und 219 für Doxepin für das SIM-Programm verwendet. Allerdings bereitet die Verwendung des relativ kleinen Ions mit m/z 58 im Gegensatz zu herkömmlichen Aufarbeitungsverfahren wie LLE oder SPE aufgrund des geringen Untergrundrauschens bei der Arbeit im Headspace-Modus kein Problem.

5.2.2.3 Methodenoptimierung

Neben der Optimierung der Menge an Derivatisierungsreagenz wurde die Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten vom pH-Wert untersucht. Dazu wurden je 100 ng Amitriptylin und Dimetacrin in 1 ml 1 M NaOH und 0,5 g NaCl für die Adsorption an einer 100 μ m PDMS-Faser eingesetzt. Für Amitriptylin und Dimetacrin wurden exemplarisch die Adsorptionszeit von 10-60 min und die Adsorptionstemperatur von 50-120°C optimiert. Aus Abbildung 38 ist erkennbar, dass die eine Temperaturerhöhung bis 120°C auch höhere Extraktionsausbeuten liefert. Bei der Adsorptionszeit wird bei ca. 50 min scheinbar der Gleichgewichtszustand erreicht. Namera et al. [157] fanden für tetracyclische Antidepressiva wie Maprotilin, dass ein Anstieg der Extraktionsausbeuten bis 140°C Adsorptionstemperatur bei 15 min Extraktionsdauer zu verzeichnen ist. Ebenso bei der Adsorptionszeit ist auch nach 120 min bei 120°C ein Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht. Da aber die Empfindlichkeiten für den Nachweis der Antidepressiva völlig ausreichend waren, wurde im Interesse eines höheren Probendurchsatzes und besserer Reproduzierbarkeit eine Adsorptionstemperatur von 100°C bei 30 min Extraktionszeit gewählt.

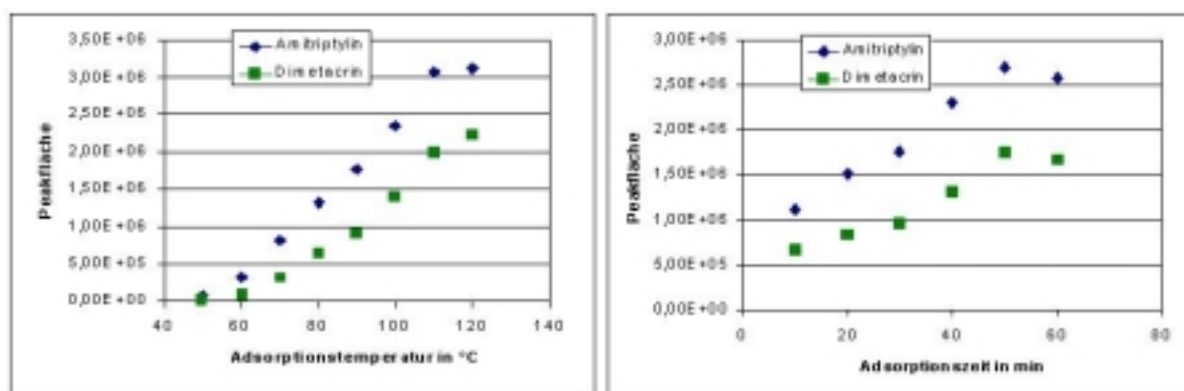


Abbildung 38: Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten an Amitriptylin und Dimetacrin von der Adsorptionstemperatur bei 30 min Extraktionsdauer (links) und der Adsorptionszeit bei 100°C (rechts).

Für die Untersuchung der optimalen Menge an Derivatisierungsreagenz wurden 2, 4, 6 bzw. 8 μ l Methylchloroformiat (MCF) zum Hydrolysat aus 10 mg Haar, 1 ml 1 M NaOH, 0,5 g

NaCl sowie je 30 ng Nortriptylin, Maprotilin, Amitriptylin sowie 300 ng Dimetacrin (ISTD) gegeben. Die Adsorption fand bei 100°C für 30 min frühestens 15 min nach Zugabe des MCF statt. Den Verlauf der dabei erhaltenen Extraktionsausbeuten zeigt Abbildung 39. Die Flächen für die underivatisierten Antidepressiva Amitriptylin und Dimetacrin bleiben bei allen Volumina konstant, während bei den Derivaten deutliche Anstiege zwischen 2 und 4 µl MCF zu verzeichnen sind. Darüber hinaus ist keine signifikante Erhöhung der Peakflächen zu beobachten. Um das bei der Hydrolyse des überschüssigen MCF entstehende Volumen an Methanol möglichst klein zu halten, wurden für die weiteren Versuche 4 µl MCF eingesetzt.

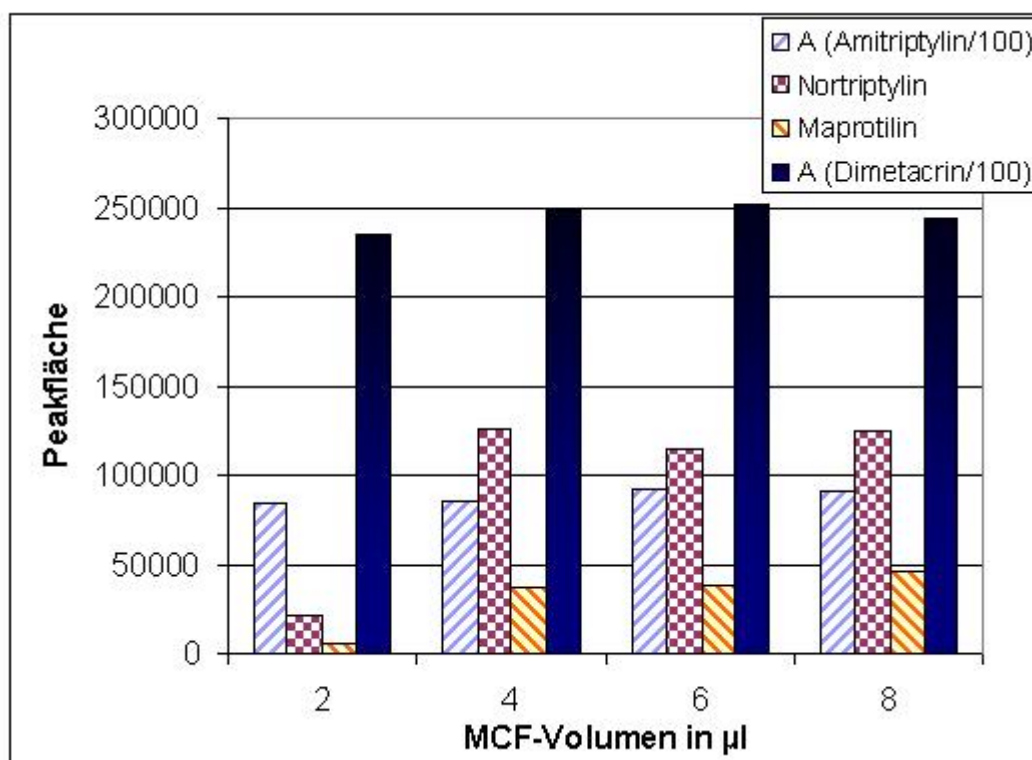


Abbildung 39: Einfluss der Menge an Methylchloroformiat auf die Derivat- und Extraktionsausbeuten von Amitriptylin, Nortriptylin, Maprotilin und Dimetacrin. Je 10 mg Negativhaar in 1 ml 1 M NaOH + 0,5 g NaCl + je 30 ng Amitriptylin, Nortriptylin, Maprotilin sowie 300 ng Dimetacrin. Derivatisierung mind. 15 min bei Raumtemperatur. Extraktion 30 min bei 100°C. (n = 2). Die Flächen von Amitriptylin und Dimetacrin wurden zur besseren graphischen Darstellung durch 100 geteilt.

Da die Ausbeuten und Reproduzierbarkeiten für Nortriptylin-MC und Maprotilin-MC noch unbefriedigend waren, wurde untersucht, inwieweit der pH-Wert einen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten hat. Hierbei sind als mögliche Ursachen eine Hydrolyse des Methylchloroformats oder die Instabilität der entstandenen Methylcarbamate-Derivate in der zur Haarauflösung verwendeten 1 M NaOH anzusehen. Daher wurde die Basizität des mit je 30 ng Amitriptylin, Nortriptylin und Maprotilin sowie 50 ng Dimetacrin dotierten Haarhydrolysats mit 2 ml Wasser, 2 ml 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M bzw. 0,475 M HCl bzw. 1 ml 0,1 M HCl und 60 mg festem NaHCO₃ vor Zugabe von 4 µl MCF verringert. Nach erfolgter Umsetzung wurde jeweils für 30 min bei 100°C extrahiert. Abbildung 40 zeigt die Auswirkungen auf die Peakflä-

chen. Dabei ist zu erkennen, dass durch Zugabe von verdünnter Salzsäure die Ausbeute an den Methylcarbamaten des Nortriptylins und des Maprotilins stark zunimmt. Bei Amitriptylin und Dimetacrin ist bis zur Zugabe von 2 ml 0,4 M HCl keine Abnahme der Peakflächen erkennbar, bei 2 ml 0,4 M HCl fallen sie dann aber deutlich, um bei 2 ml 0,475 M HCl gegen null zu gehen. Das ist mit dem Unterschreiten des pK_s -Wertes erklärbar. Die Antidepressiva liegen dann überwiegend in der polaren protonierten Form vor. Bei den unpolaren MC-Derivaten dagegen werden maximale Extraktionsausbeuten bei Zugabe der 0,4 M HCl, der 0,475 M HCl und bei Zugabe von 1 ml 0,1 M HCl und 60 mg festem NaHCO_3 erhalten. Da bei Verwendung von 0,1 M HCl und NaHCO_3 sowohl die Antidepressiva als auch die MC-Derivate beste Extraktionsausbeuten liefern, wurde dieser Zusatz vor der Derivatisierung gewählt.

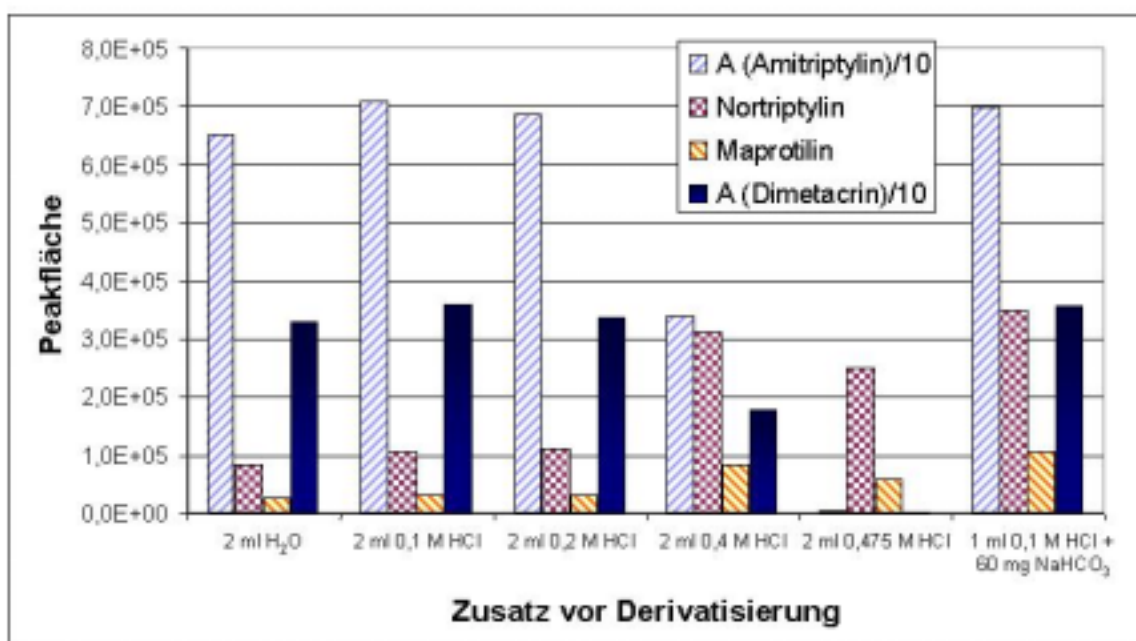


Abbildung 40: Einfluss der Zugabe von Wasser, verschiedener HCl-Konzentrationen bzw. NaHCO_3 zu der durch alkalische Hydrolyse der Haare mit 1 M NaOH erhaltenen Lösung auf die durch Derivatisierung mit MCF und HS-SPME und GC-MS erhaltenen Peakflächen ($n = 2$). Die Flächen für Amitriptylin sowie Dimetacrin wurden zur besseren graphischen Darstellung durch 10 geteilt.

Die Kalibration erfolgte für die Antidepressiva und die MC-Derivate mit 6 Messpunkten (0,2, 0,6, 1,0, 3,0, 10 und 20 ng/mg) durch Zusatz der entsprechenden Menge sowie 30 ng des internen Standards zu 10 mg Negativhaar. Für die Derivatisierung und HS-SPME wurden die vorher optimierten Parameter gewählt. Tabelle 15 zeigt für die jeweiligen Substanzen die Geradengleichungen mit den linearen Regressionskoeffizienten sowie die Nachweisgrenzen (LOD).

Tabelle 15: Kalibrationsdaten für die HS-SPME untersuchter Antidepressiva und ihrer Metaboliten.

Substanz	Interner Standard	Geradengleichung	Linearer Regressionskoeffizient r^2	LOD in ng/mg Haar
Amitriptylin	Dimetacrin	$y = 0,5656x + 0,1363$	0,991	0,03
Nortriptylin	D ₃ -Nortriptylin	$y = 0,2756x - 0,0172$	0,995	0,05
Maprotilin	D ₃ -Maprotilin	$y = 0,3348x + 0,0772$	0,998	0,10
Doxepin	Dimetacrin	$y = 0,4476x - 0,0237$	0,992	0,03
Nordoxepin	D ₃ -Nortriptylin	$y = 0,2078x + 0,0409$	0,990	0,05
Clomipramin	Dimetacrin	$y = 0,0815x - 0,0086$	0,989	0,10
Norclomipramin	D ₃ -Nortriptylin	$y = 0,0354x + 0,0138$	0,988	0,10
Fluoxetin	D ₃ -Nortriptylin	$y = 2,6868x + 0,5917$	0,992	0,03

Die relativen Standardabweichungen für Amitriptylin und den internen Standard Dimetacrin betragen bei 14 Messungen innerhalb einer Serie 9,5 bzw. 9,4%.

5.2.2.4 Untersuchung von realen Proben

Aus dem Sektionsgut des Instituts wurden exemplarisch einige asservierte Haarproben mit einer bekannten verordneten bzw. missbräuchlichen Einnahme von Antidepressiva auf die genannten Medikamentenwirkstoffe untersucht. Positive bzw. Verdachtshaarproben für die Einnahme von Imipramin konnten nicht gefunden werden. In Abbildung 41 sind die Chromatogramme für je eine positive Probe dargestellt. Tabelle 16 zeigt die bei den Sektionsfällen bestimmten Konzentrationen der einzelnen Analyten im Haar.

Die hier nur beispielhaft untersuchten Haarproben lieferten Ergebnisse, die in den Konzentrationsbereichen der von anderen Autoren gefundenen Werte lagen. Das von den Antidepressiva am meisten untersuchte und missbrauchte Amitriptylin wurde von Tracqui et al. in einer Studie an 30 mit Amitriptylin behandelten Patienten in Konzentrationen von 0,0-17,2 ng/mg (Mittel: 4,1 ng/mg) [203] und von Pragst et al. bei 25 Patienten in einer Konzentration von 0,6-11,0 ng/mg (Mittel: 4,0 ng/mg) nachgewiesen [180]. Der Metabolit Nortriptylin wurde von Pragst et al. zwischen 0,5 und 3,6 ng/mg Haar vorgefunden [180].

Das weniger verschriebene Doxepin wurde von Rothe in sechs Fällen zwischen 0,75 und 3,0 ng/mg Haar (Mittel: 1,6 ng/mg), der Metabolit Nordoxepin zwischen 0,5 und 2,1 ng/mg (Mittel: 1,2 ng/mg) nachgewiesen [110]. Negrusz et al. bestimmten Doxepin und Nordoxepin im Haar eines Patienten 5 Monate nach einem Therapiebeginn in einer Konzentration von 0,59 bzw. 0,40 ng/mg [204]. Die hier in zwei Fällen ermittelten Konzentrationen von 1,35 und 0,37

ng/mg für Doxepin bzw. 0,38 und 0,16 ng/mg für den Metaboliten werden dadurch gestützt.

Tabelle 16: Konzentrationen der Medikamentenwirkstoffe bzw. derer Metaboliten im Haar bestimmt nach alkalischer Hydrolyse, Derivatisierung, HS-SPME und GC-MS.

Fall-Nr.	Substanz	Derivatisierung	Konzentration im Haar in ng/mg
209/99	Amitriptylin	---	8,4
	Nortriptylin	MCF	8,3
456/99	Amitriptylin	---	1,4
	Nortriptylin	MCF	1,75
513/99	Amitriptylin	---	16,6
	Nortriptylin	MCF	0,46
	Maprotilin	MCF	12,3
546/99	Amitriptylin	---	0,4
	Nortriptylin	MCF	pos.
	Doxepin	---	3,3
	Nordoxepin	MCF	0,2
294/99	Maprotilin	MCF	17,1
128/00	Doxepin	---	1,35
	Nordoxepin	MCF	0,38
130/00	Doxepin	---	0,37
	Nordoxepin	MCF	0,16
	Fluoxetin	MCF	0,27
327/99	Clomipramin	---	13,1
	Norclomipramin	MCF	0,3
420/99	Clomipramin	---	0,3
	Norclomipramin	MCF	pos.
327/00	Fluoxetin	MCF	7,2

Clomipramin und Norclomipramin wurden von Rothe et al. in sieben Fällen zwischen 0,44 und 3,9 ng/mg (Mittel: 2,0 ng/mg) bzw. zwischen 0 und 1,5 ng/mg (Mittel: 0,56 ng/mg) nachgewiesen [110]. Kintz et al. fanden in zwei Fällen, bei denen sie nur Clomipramin bestimmten, Konzentrationen von 0,37 und 0,79 ng/mg [99]. Die in dieser Arbeit in einem Fall gefundenen 13,1 ng/mg sind zwar deutlich über den bisher gefundenen Werten, können aber bei den nur gering vorliegenden Daten über Konzentrationen nach Clomipramin-Missbrauch nur schwer beurteilt werden.

Maprotilin weist mit den auch hier sehr hohen Werten von 12,3 und 17,1 ng/mg Konzentrationen auf, wie sie auch von Rothe bei der Untersuchung von 13 mit Maprotilin behandelten Probanden mit einem Konzentrationsbereich von 1,4-40 ng/mg (Mittel: 7,4 ng/mg) festgestellt wurden.

Zu Fluoxetin konnte nach eingehender Literaturrecherche nur eine Bestimmung in einem

Einzelfall gefunden werden. Das Fehlen größerer Studien über Fluoxetinkonzentrationen im Haar könnte daran liegen, dass bisher kaum letale Intoxikationen mit diesem Wirkstoff beschrieben wurden und seine forensische Bedeutung daher noch nicht als hoch eingeschätzt wird. Dass diese aber durchaus gegeben ist, bewiesen Gaillard und Pepin [101] im Falle eines vermissten, mit verschiedenen Medikamentwirkstoffen, u.a. Fluoxetin, behandelten stationären Patienten einer psychiatrischen Klinik. Sie fanden bei dem Toten neben den anderen verabreichten Wirkstoffen Fluoxetin in einer Konzentration von 4,3 ng/mg Haar. Der Befund half so bei der Identifizierung des Toten.

Eine weitere Wertung der Analyseergebnisse kann hier wegen fehlender genauer Anamnesen nicht erfolgen.

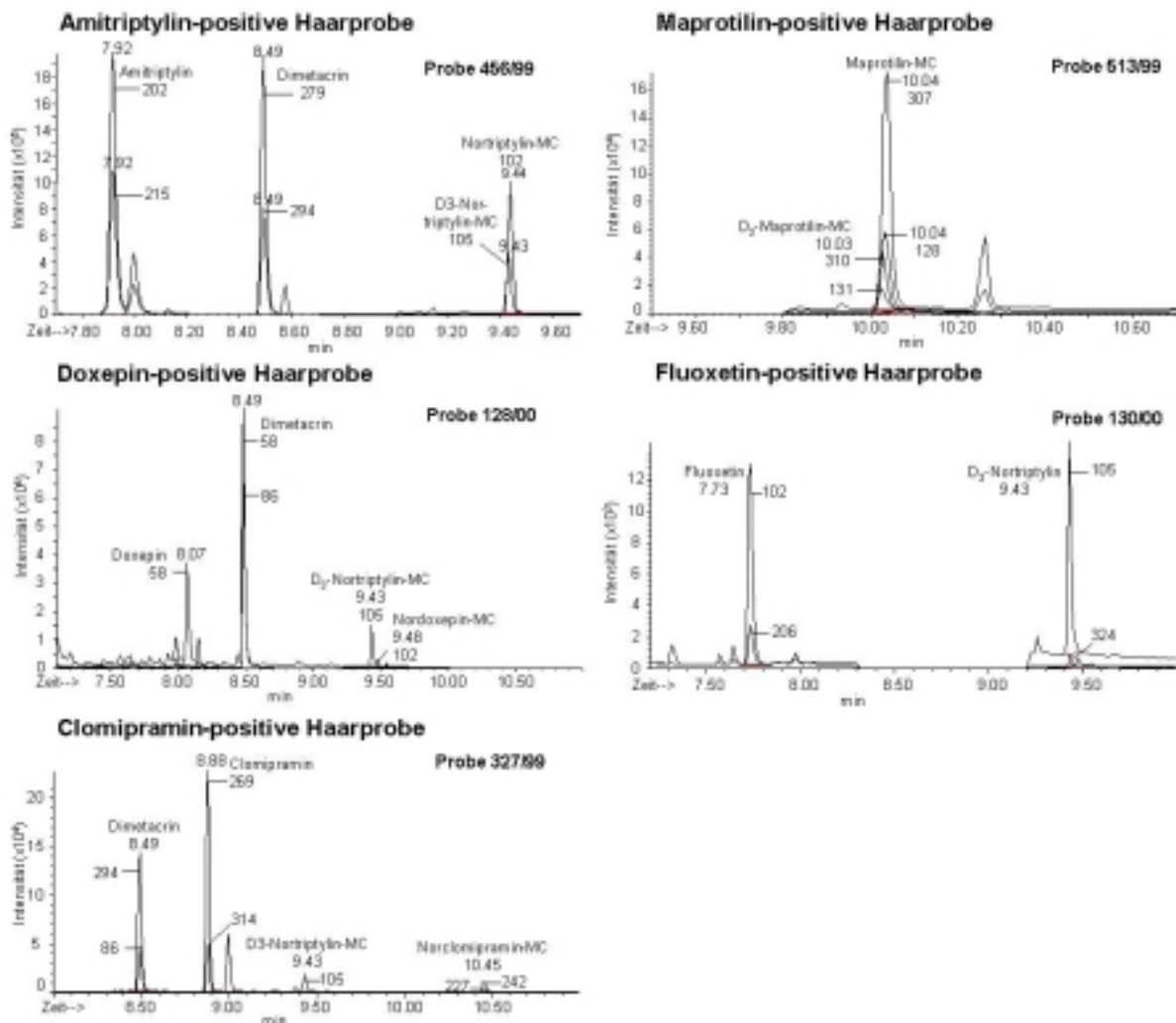


Abbildung 41: SIM-Chromatogramme von Antidepressiva-positiven Haarproben. Einsatz von 10 mg Haar und je 30 ng internen Standards (D₃-Nortriptylin, D₃-Maprotilin, Dimetacrin). Derivatisierung mit Methylchloroformiat. HS-SPME für 30 min bei 100°C.

5.2.3 Diphenhydramin und Nordiphenhydramin

5.2.3.1 Allgemeines

Diphenhydramin ist ein basisches, lipophiles Antihistaminikum (pK_a -Wert: 8,3 [186]). Es gehört zur Gruppe der H_1 -Rezeptorantagonisten. Die Wirkungen des Histamins (konstriktori-sche Wirkung auf die glatte Muskulatur der Bronchien und des Darms, permeabilitätserhö-hende Wirkung auf die Gefäße) werden durch Diphenhydramin gehemmt. Diphenhydramin passiert durch seine Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke und kann somit auch an die H_1 -Rezeptoren im Gehirn binden. Dadurch kommt es zu einer sedierenden Wirkung, einer Nebenwirkung, die heute aber therapeutisch genutzt wird. Deshalb und aufgrund geringer Wirk-samkeit gegen das weit verbreitete Asthmaleiden wird Diphenhydramin fast nur noch als Schlafmittel und gegen Reisebeschwerden verwendet.

Bei einer Intoxikation mit Diphenhydramin treten die zentral dämpfenden Wirkungen gegen-über Krampfwirkungen hervor. Es kommt mit zunehmender Plasmakonzentration erst zu Sedierung, dann zu einer paradoxen Erregung mit gelegentlichen Halluzinationen und schließlich zum Koma mit kardiorespiratorischem Kollaps. Da Diphenhydramin eines der wenigen freiverkäuflichen Sedativa in Deutschland ist, kommt es häufig in Folge von Über-dosierungen bei Suizidabsicht oder Verwirrtheit zu Vergiftungen und Todesfällen.

Diphenhydramin wird durch Desmethylierung zum Nordiphenhydramin und Dinordiphen-hydramin oder nach Desaminierung zur Diphenylmethoxyessigsäure oxidiert sowie durch Konjugation der Metaboliten mit Glutathion eliminiert. Die Halbwertszeit beträgt bei Erwach-senen im Durchschnitt 9,2 h, bei alten Menschen 13,5 h und bei Kindern 5,4 h [205].

5.2.3.2 Analytik

Bei den hier untersuchten Analyten Diphenhydramin und Nordiphenhydramin handelt es sich um mittelflüchtige Substanzen mit Molgewichten von 255 g/mol bzw. 241 g/mol. Nordiphen-hydramin bedarf für die gaschromatographische Trennung einer Derivatisierung, bei der wie schon bei den tricyclischen Antidepressiva (siehe Kapitel 5.2.2) die in sample Derivatisierung mit Methylchloroformiat vor der HS-SPME angewendet wurde. Als interne Standards (ISTD) wurden für das Diphenhydramin das strukturell ähnliche und nicht als Medikamentenwirkstoff verwendete Ethylbenzhydramin sowie für den Metaboliten Nordiphenhydramin das bei den Antidepressiva untersuchte Fluoxetin eingesetzt. Nach Dinordiphenhydramin wurde wegen der nur sehr geringen Halbwertszeit nicht gesucht. Diphenylmethoxyessigsäure sollte als sau-re Substanz nur sehr schlecht in das Haar eingelagert werden und ist auch wegen der hohen Polarität nicht für das angewendete Headspace-Verfahren geeignet.

Auf eine erneute Methodenoptimierung wurde in diesem Fall verzichtet. Es wurden die bei den tricyclischen Antidepressiva genutzten SPME-Bedingungen auf die Bestimmung von Diphenhydramin und seinen Metaboliten übertragen. Nach alkalischer Hydrolyse von 10 mg Haar in 1 ml 1 M NaOH bei 80°C wurde das Hydrolysat mit 1 ml Wasser und 60 mg NaHCO₃ sowie 4 µl Methylchloroformiat versetzt. Die Extraktion erfolgte mit einer 100 µm PDMS-Faser für 30 min bei 100°C aus dem Dampfraum.

Die erhaltenen Massenspektren der Analyten und internen Standards sind in Abbildung 42 dargestellt. Diphenhydramin und Ethylbenzhydramin sowie die MC-Derivate von Norddiphenhydramin und Fluoxetin lassen keinen bzw. kaum einen Molpeak mehr erkennen. Sie weisen als Basispeak die Fragmentationen der α-Spaltung mit m/z 58 und 86 bzw. 102 für die Derivate auf. Diese Ionen wurden auch für das SIM-Programm und zur Quantifizierung bei den Haarproben verwendet.

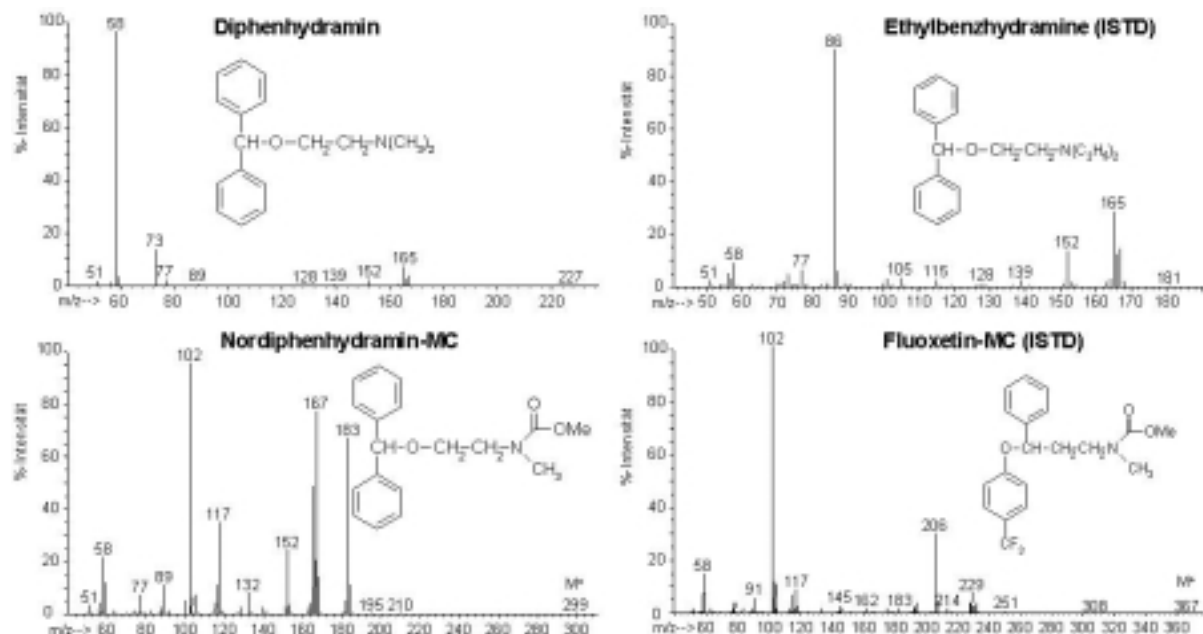


Abbildung 42: Massenspektren und Strukturformeln von Diphenhydramin und dem derivatisierten Metaboliten Norddiphenhydramin-MC sowie der internen Standards (ISTD) Ethylbenzhydramin und Fluoxetin-MC.

Die Kalibration erfolgte für Diphenhydramin in dotiertem Negativhaar mit Konzentrationen von 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 und 10 ng/mg in Bezug auf je 3 ng/mg Ethylbenzhydramin als internem Standard. Norddiphenhydramin wurde in derselben Haarprobe bei Konzentrationen von 0,2, 0,5, 2,0, 5,0 und 15 ng/mg bezugnehmend auf je 3 ng/mg Fluoxetin kalibriert. Die Kalibrationsdaten zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17: Kalibrationsdaten für Diphenhydramin und Nordiphenhydramin (bezogen auf die jeweiligen internen Standards).

Substanz	Interner Standard	Geradengleichung	Linearer Regressionskoeffizient r^2	LOD in ng/mg Haar
Diphenhydramin	Ethylbenzhydramin	$y = 0,281x + 0,1183$	0,998	0,03
Nordiphenhydramin	Fluoxetin	$y = 0,0421x + 0,0416$	0,996	0,05

5.2.3.3 Untersuchung von realen Proben

Beispielhaft wurden bei den genannten Bedingungen je 10 mg der Haarproben zweier Obduktionsfälle des Institutes (025/97 und 098/97) mit bekanntem Diphenhydramingebrauch auf die Anwesenheit von Diphenhydramin und dessen Metaboliten Nordiphenhydramin untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit der bei der Kalibration erhaltenen Geradengleichung unter Bezug auf je 3 ng/mg der internen Standards. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Konzentrationen von Diphenhydramin und Nordiphenhydramin im Haar bestimmt nach alkalischer Hydrolyse, Derivatisierung mit Methylchloroformiat, HS-SPME und GC-MS.

Fall-Nr.	Substanz	Derivatisierung	Konzentration im Haar in ng/mg
025/97	Diphenhydramin	---	5,4
	Nordiphenhydramin	MCF	5,2
098/97	Diphenhydramin	---	4,6
	Nordiphenhydramin	MCF	9,9

Die Ionenspuren aus dem SIM-Chromatogramm der Probe 098/97 sind in Abbildung 43 zu erkennen. Die chromatographische Trennung und massenspektrometrische Empfindlichkeit sind vollkommen ausreichend. Die größere Empfindlichkeit wird dabei für Diphenhydramin erzielt, was auch durch den geringen Anstieg bei Nordiphenhydramin in der Geradengleichung zum Ausdruck kommt.

Im Todesfall 025/97 handelte es sich um eine Diphenhydramin-Doxylamin-Intoxikation in suizidaler Absicht. Die routinemäßige HPLC-Analytik im Institut ergab dabei letale Konzentrationen an Diphenhydramin und seinen Metaboliten im Blut. Da aber dieser Konsum unmittelbar vor dem Todeseintritt stattfand, sind die vorgefundenen Konzentrationen im Haar nicht darauf zurückzuführen, sondern sie bestätigen eine zurückliegende Aufnahme dieses Medikamentenwirkstoffes.

Im Fall 098/97 (siehe Abbildung 43) handelte es sich um eine Alkohol-Benzodiazepin-Diphenhydramin-Mischintoxikation. Die mit der HPLC ermittelte Blutkonzentration für

Diphenhydramin lag im therapeutischen Bereich und wäre nicht allein todesursächlich. Aber in Kombination mit Alkohol und Benzodiazepinen werden die zentral dämpfenden Wirkungen verstärkt. Auch in diesem Fall deuten die recht hoch erscheinenden Konzentrationen im Haar auf eine längere Einnahme dieses Wirkstoffes. Da aber keine vergleichenden Untersuchungen zu Antihistaminikakonzentrationen im Haar in der Literatur zu finden waren, ist eine Beurteilung der Haarkonzentrationen nur schwer möglich.

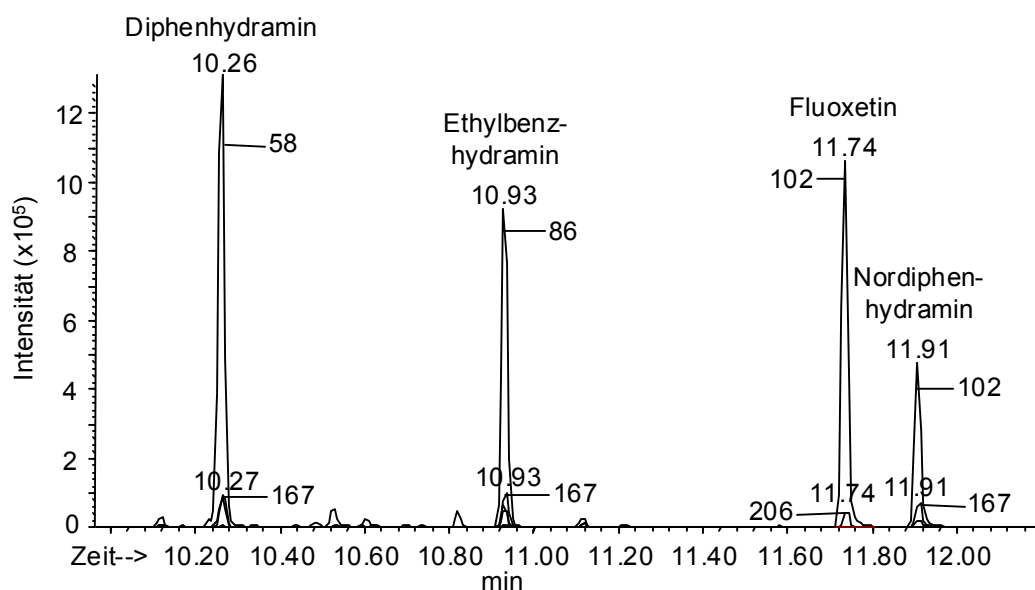


Abbildung 43: Ionenspuren aus dem SIM-Chromatogramm der Diphenhydramin-positiven Haarprobe 098/97. Konzentrationen für Diphenhydramin 4,6 ng/mg sowie Nordiphenhydramin 9,9 ng/mg.

5.2.4 Amantadin

5.2.4.1 Allgemeines

Amantadin (1-Aminoadamantan) ist ein basisches, lipophiles Amin (pK_s 10,1 [186]). Die Struktur zeigt (als TFA-Derivat) Abbildung 44. Es findet als Antiparkinson-Mittel, aber auch als Virustatikum seinen Einsatz.

Bei der Parkinsonschen Krankheit handelt es sich um ein vorwiegend bei älteren Menschen auftretendes neurologisches Leiden, das sich in Bewegungsstörungen (Akinese), gebeugter Ganghaltung, Muskelverkrampfungen (Rigor), Zittern, Sprach- und Kommunikationsproblemen, in verlangsamten geistigen Fähigkeiten sowie in Depressionen und Schlafstörungen äußert. Die Muskelverkrampfungen und die damit einhergehende Bewegungsblockade können im Endstadium bis zur Atemlähmung und damit zum Tod des Erkrankten führen.

Die Ursache des Morbus Parkinson liegt in der Degeneration der Dopamin-Neurone des Stammhirns. Amantadin bewirkt als Antagonist der N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptoren eine Hemmung der durch Dopaminmangel hervorgerufenen Überaktivität der GABA-

Neuronen und kann wie eine direkte Stimulation der Dopamin-Rezeptoren so zur Verbesserung der Symptomatik beitragen.

Als Virustatikum hemmt Amantadin die Freisetzung der Nukleinsäure aus den Viren. Es wird hauptsächlich zur Prophylaxe und Chemotherapie der „asiatischen Grippe“ bei Influenza-Patienten aus Risikogruppen (alte Menschen und AIDS-Kranke) eingesetzt.

Die Tagesdosis beträgt sowohl bei der Grippe- als auch bei der Parkinsontherapie 100-200 mg. Daraus resultieren Plasmaspiegel von ca. 0,3 µg/ml bei einer mittleren Halbwertszeit von 15-20 h, bei Niereninsuffizienz deutlich länger. Amantadin wird fast vollständig unverändert über den Urin ausgeschieden.

Bei Überdosierungen oder verzögerter Ausscheidung infolge von Nierenfunktionsstörungen kommt es zu Depressionen, Psychosen, Halluzinationen, Unruhe und Koma. Todesfälle sind dagegen sehr selten [186].

5.2.4.2 Analytik

Ein SPME-Verfahren zur Analytik von Amantadin konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Als interner Standard wurde aufgrund fehlender strukturell ähnlicher Substanzen das ebenfalls als Antiparkinson-Mittel verordnete Memantin eingesetzt. Da beide Substanzen eine primäre Aminogruppe aufweisen, war eine Derivatisierung für die Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften dringend geboten. In diesem Fall wurde auf die schon in Kapitel 5.2.1.4 bei den Amphetaminen genutzte *on-fiber* Derivatisierung mit MBTFA und den entsprechenden Extraktionsparametern zurückgegriffen. 10 mg Haarprobe wurden mit 1 ml 1 M NaOH im Beisein von 0,5 g NaCl 20 min bei 80°C hydrolysiert. Nach anschließender Headspace-Extraktion für 30 min bei 80°C erfolgte die Derivatisierung über MBTFA für 25 min bei 80°C. Die erhaltenen Massenspektren und die Strukturformeln der TFA-Derivate von Amantadin und Memantin sind in Abbildung 44 ersichtlich.

Beide Massenspektren zeigen charakteristische Fragmente, die sich je nach Fragment um 14 bzw. 28 Masseneinheiten voneinander unterscheiden. Für das SIM-Chromatogramm wurden für Amantadin die Ionen mit m/z 247, 190, 135 und 92, für Memantin die Ionen mit m/z 275, 218, 204 und 106 ausgewählt.

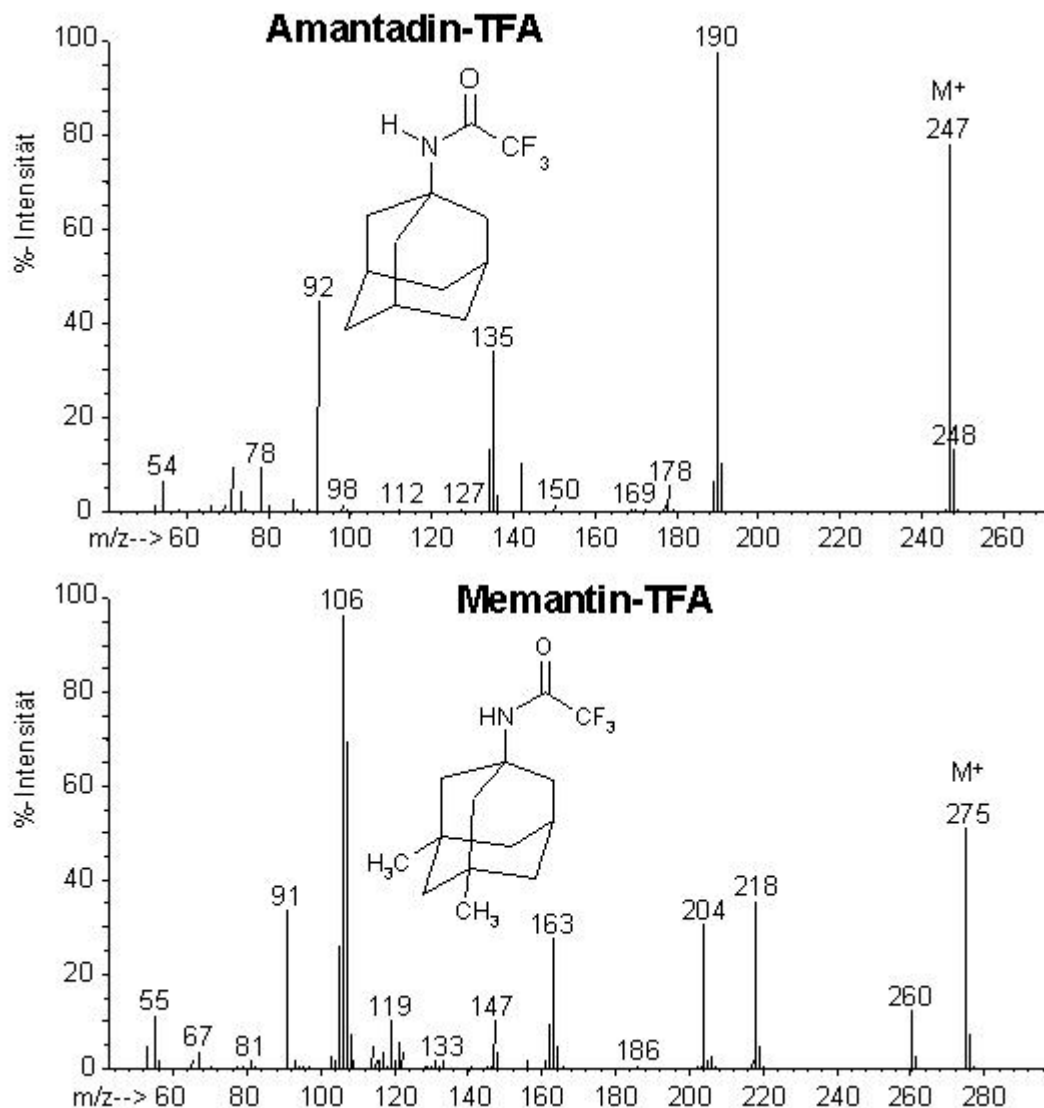


Abbildung 44: Struktur und Massenspektren der TFA-Derivate von Amantadin (oben) und des internen Standards Memantin (unten).

5.2.4.3 Untersuchung einer realen Probe

Haarproben von Asservaten des Sektionsgutes mit bekannter Amantadin- oder Memantin-Einnahme waren nicht verfügbar, was an der doch geringeren forensischen Bedeutung dieser Substanzen liegt. So konnte nur die Probe eines 52-jährigen Parkinson-Patienten mit Amantadin-Therapie (tägliche Dosis 200 mg) asserviert und untersucht werden. Das SIM-Chromatogramm dieser Probe zeigt Abbildung 45. Die Konzentrationsbestimmung ergab 17,9 ng/mg Haar. Vergleichswerte aus der Literatur zu Amantadin-Konzentrationen im Haar bzw. zum Einlagerungsverhalten von Amantadin lagen nicht vor. Eine mögliche Bedeutung der Haaranalyse liegt bei Amantadin in der Kontrolle einer langfristigen Einnahme.

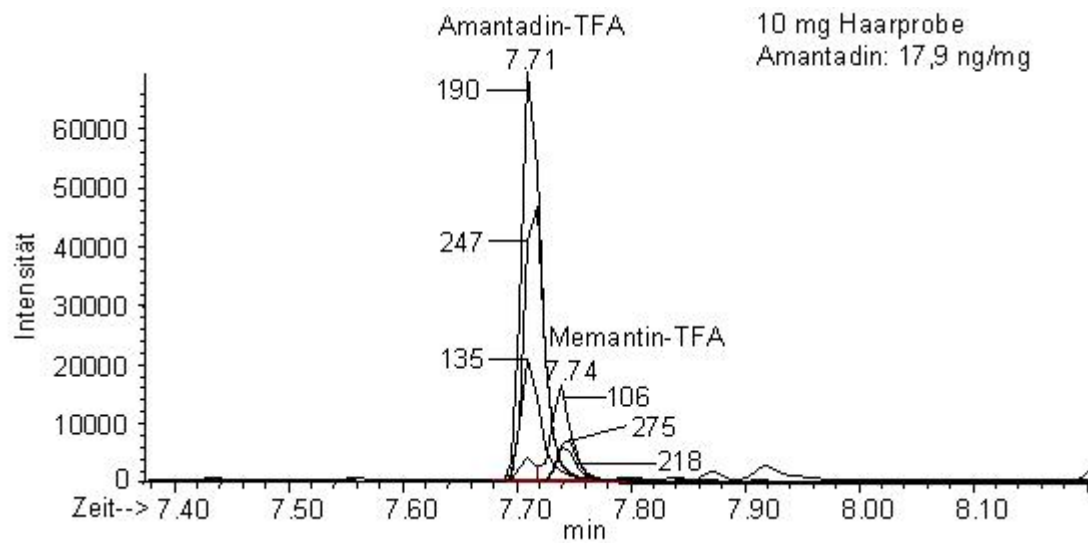


Abbildung 45: Ionenspur des SIM-Chromatogramms einer Amantadin-positiven Haarprobe mit Memantin als internem Standard.

5.3 Kombination der Lösungsmittelextraktion von Haaren mit der HS-SPME

Für hydrolyseempfindliche Substanzen wie Ester kann der alkalische Aufschluss der Haar-matrix bei 70-100°C zur Zersetzung dieser Substanzen führen. Aus dem forensischen Be-reich sei hier nur auf Cocain als Diester des Ecgonin und auf das Heroin, das zweifach acetylierte Morphin, und auf die ebenfalls alkaliinstabilen Benzodiazepine verwiesen. Von daher werden bei der Bestimmung solcher Substanzen meist wässrige Extraktionslösungen mit neutralem bzw. schwach saurem pH-Wert eingesetzt, aber auch Kombinationen polarer und apolarer Lösungsmittel [2;95;96].

5.3.1 Fettsäureethylester als Alkoholismuskmarker im Haar

5.3.1.1 Allgemeines

Fettsäureethylester sind Nebenmetabolite des Ethanolstoffwechsels. Sie werden nach Alko-holkonsum aus freien Fettsäuren, Triglyceriden, Lipoproteinen oder Phospholipiden durch Wirkung spezifischer Fettsäureethylester-Synthasen wie der cytosolischen und microsoma-len FSEE-Synthase, aber auch unspezifischer Esterasen wie der Carboxylesterase, der Li-poprotein-Lipase, der Carboxylester-Lipase sowie der Cholesterol-Esterase in Leber, Pank-reas, Myocard, Fettgewebe, verschiedenen Hirnregionen oder Leukozyten gebildet [206], wie aus dem Schema in Abbildung 46 ersichtlich. Erstmals wurde das durch Lange et al. im Blut alkoholbehandelter Ratten nachgewiesen [207]. Vertiefende Untersuchungen am menschl-ichen Organismus wurden durch Laposata, E.A. et al. [208-211] und Laposata, M. und Mitar-beitern publiziert [206;212-215].

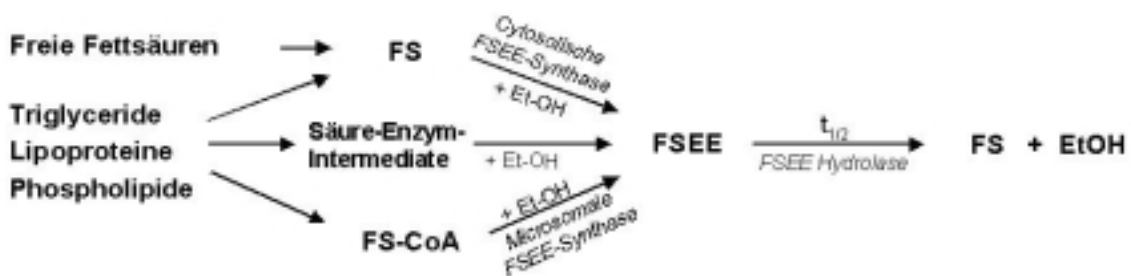


Abbildung 46: Bildung und Abbau von Fettsäureethylestern (FSEE). FS = Fettsäuren, Et-OH = Ethanol.

Fettsäureethylester werden heute als Ursache alkoholinduzierter Organschädigungen vor allem an Pankreas, Leber und Herz durch pathogene Mechanismen angesehen. So können derartige Schädigungen auf der Einlagerung der Ester in biologische Doppelmembranen mit der Folge der Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, der Erhöhung der Lysosomenfragilität, einer Absenkung der Proteinsynthese und der Zellwucherung beruhen [206].

Die primäre und terminale Halbwertszeit der FSEE in Blut ist mit 3 bzw. 10 h nur sehr kurz, weshalb die FSEE in Blut nur als Kurzzeitmarker für einen Zeitraum bis ca. 24 h nach Trink-

ende geeignet sind [79]. Im Fettgewebe von Ratten wurde eine Halbwertszeit von $16 \pm 1,6$ h bestimmt [209].

Die im Blut von Freiwilligen bei verschiedenen Studien bestimmten FSEE-Konzentrationen betragen zwischen 0,4 und 0,75 $\mu\text{g/ml}$ [216] und 1,8 und 3,8 $\mu\text{g/ml}$ Serum [217] bzw. zwischen 3 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Vollblut [217-219]. Im Organmaterial von verstorbenen Alkoholikern konnten 40-500 $\mu\text{g/g}$ Herz, 4-170 $\mu\text{g/g}$ Hirn [220] sowie 90 ± 14 $\mu\text{g/g}$ Fettgewebe [209] nachgewiesen werden. Im Meconium alkoholexponierter Neugeborener wurden bis 13,1 $\mu\text{g/g}$ gemessen [221].

Die Einlagerung der FSEE in das Haar sollte wie auch bei anderen Drogen über das Blut und über das Sebum erfolgen. Eine Bildung der FSEE aus Fettsäuren und Ethanol durch Synthesen sollte aber auch in den Basalzellen der Haarwurzeln, im angrenzenden Gewebe sowie in den Talgdrüsen möglich sein. Als Speicherort für die FSEE im Haar ist der stark lipidhaltige Zellmembrankomplex anzunehmen.

In jüngster Zeit wird auch die Eignung anderer Alkoholismusmarker im Haar geprüft. Skopp et al. [222] und Alt et al. [223] wiesen dabei Ethylglucuronid, ein Phase-II-Metabolit des Ethanols mit Glucuronsäure, nach. Allerdings bedingt vor allem die hohe Polarität und Hydrophilie von Glucuroniden eine schlechte Einlagerung ins Haar, analytische Probleme bei der Extraktion, Anreicherung und Chromatographierbarkeit und somit eine noch nicht zufriedenstellende Nachweisempfindlichkeit. Das zeigt sich daran, dass nicht bei allen Haarproben von Alkoholikern der Nachweis des Ethylglucuronids erbracht werden konnte.

Ein weiterer Ansatz ist der Nachweis Acetaldehyd-modifizierter Haarproteine nach Alkoholmissbrauch. Jelinkova et al. [224] wiesen diese im Haar von mit Alkohol gefütterten Ratten mittels Kapillarzonenelektrophorese (CE) nach. Watson et al. [225] nutzten einen Enzymimmunoassay zur Bestimmung dieser Proteine im Tierhaar. Allerdings sind beide Verfahren noch weit von einem praktischen Einsatz entfernt.

5.3.1.2 Analytik der FSEE

Eine Nachweismethode für FSEE aus Haaren wurde bisher nicht beschrieben. Literaturangaben zum qualitativen und quantitativen Nachweis der FSEE aus Blut- und Organproben orientierten sich an der von Bernhardt et al. beschriebenen Bestimmung [218]. Dabei wurden die Proben mit einem Aceton/Hexan-Gemisch (2/5, 1/3 bzw. 1/4 v/v) extrahiert. Nach Aufreinigung der Extrakte mittels SPE an einer Aminopropylsäule erfolgte die Bestimmung durch GC-FID. Alternativ wurden die Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 aufgereinigt [219;226]. Bei neueren Untersuchungen erfolgte die Bestimmung der FSEE durch GC-MS unter Verwendung von Ethylheptadecanoat als internem Standard [216-218]. In den meisten Fällen wurden die Ethylester der Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Öl-,

Linol- und Arachidonsäure nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung auf die Ester der in den höchsten Konzentrationen im Körper vorkommenden Fettsäuren Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure beschränkt.

Erste Untersuchungen zum Nachweis von Fettsäureethylester in Haaren stellte Spiegel in ihrer Dissertationsschrift vor [26]. Eine durchgeführte Methanol-Extraktion einer mit FSEE versetzten Haarprobe führte zu einer teilweisen Umesterung der FSEE zu den korrespondierenden Fettsäuremethylestern. Die FSEE waren durch Matrixüberlagerungen nicht mehr identifizierbar. Eine Pufferextraktion der Haare mit anschließender SPE an C18-Material führte bei Haarproben von Alkoholikern ebenfalls nicht zu einem Nachweis der FSEE.

FSEE sollten als relativ schwerflüchtige Substanzen mit Siedepunkten bis 224°C für Ethylstearat (Merck-Katalog) mittels HS-SPME extrahierbar sein. Das wurde zunächst mit einem Standardgemisch von je 1 µg Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat, Ethylstearat in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,6 untersucht. Nach 30 min Adsorption bei 100°C mit einer PDMS/DVB-Faser wurden Fullscan-Chromatogramme mit den Peaks aller zudotierten Ester erhalten. Die Massenspektren der Ester und der später als interne Standards eingesetzten deuterierten FSEE sind in Abbildung 47, die Chromatogramme in Abbildung 48 dargestellt.

Die Massenspektren aller Ester weisen ein breites Fragmentmuster auf. Die Molekülionen sind bei allen Estern mit mind. 15% relativer Intensität wegen ihres hohen Molgewichts und der damit verbundenen größeren Spezifität als Quantifizierungsionen gut geeignet. Als Hauptpeaks lassen sich die Fragmentionen m/z 88 bzw. 93 der Mc-Lafferty-Umlagerung (β -Spaltung nach γ -H-Wanderung zum Carbonyl-Sauerstoff) identifizieren. Die Fragmente m/z 101 bzw. 106 entstammen einer radikalisch induzierten γ -Spaltung. Als weitere charakteristische Fragmente sind für Ethylmyristat, -palmitat und -stearat und die entsprechenden deuterierten Vergleichssubstanzen die Ionen m/z 157 (162) nach radikalisch induzierter Alkylgruppenabspaltung ($M - C_nH_{2n+1}$)⁺ (mit $n = 7,9,11$) sowie die Ionen 213 (218), 241 (246) und 269 (274) nach Propylgruppenabspaltung zu erkennen. Für das einfach ungesättigte Ethyloleat ergibt sich ein komplexeres Fragmentierungsmuster mit allerdings nur wenig zusätzlichen charakteristischen Fragmentationen.

Eine Bestimmung der mehrfach ungesättigten FSEE Ethyllinoat und Ethyllinoleat wurde aufgrund der ungenügenden chromatographischen Trennleistung einer universellen HP-5 MS-Kapillarsäule für ungesättigte FSEE nicht durchgeführt.

Die gaschromatographischen und massenspektrometrischen Parameter sind in Kapitel 4.5 aufgeführt.

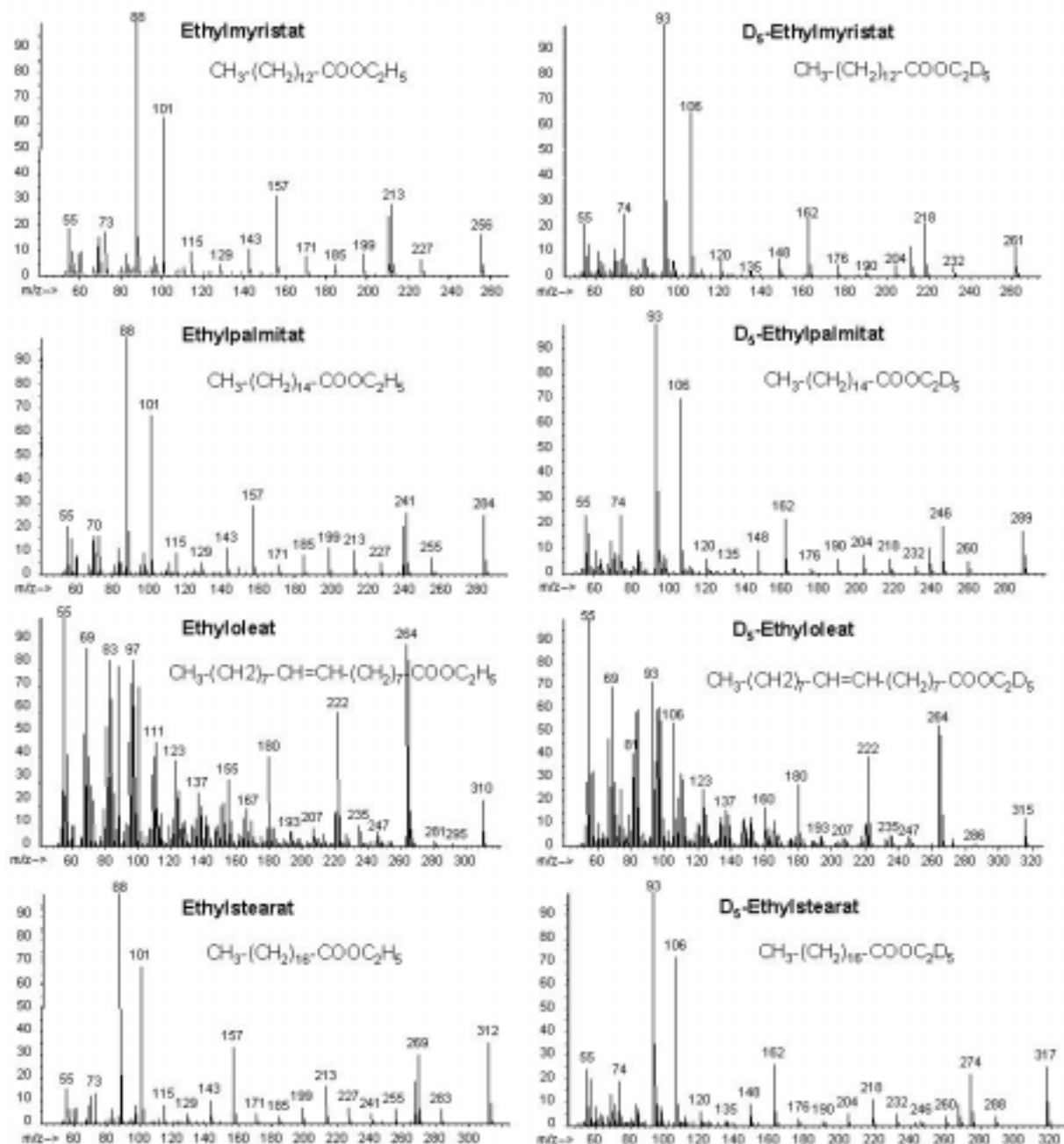


Abbildung 47: Massenspektren der Fettsäureethylester und ihrer entsprechenden deuterierten Standards.

5.3.1.3 Optimierung des Verfahrens

Bei der Optimierung kam es darauf an, sowohl die Faktoren mit Einfluss auf die HS-SPME-Ausbeuten (Adsorptionstemperatur und -zeit, Salzzusatz) als auch die für die Extraktion der FSEE aus der Haarmatrix (Extraktionsmittel, Extraktionszeit) zu berücksichtigen. Die Parameter Adsorptionstemperatur und -zeit sowie der Einfluss des zugesetzten Salzes wurden ohne Haarextrakt untersucht. Dabei wurden die Lösungen von je 100 ng der FSEE im Headspace-Gefäß eingedampft und danach mit 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6 und 0,5 g NaCl versetzt. Dieser Puffer wurde verwendet, da erste Untersuchungen zeigten, dass eine

Adsorption der FSEE aus dem eingedampften Extrakt ohne wässrige Phase zu deutlich geringeren Ausbeuten führte. Es ist anzunehmen, dass sich ein Lipidfilm auf der Pufferoberfläche bildet. Bei höherer Temperatur und ständigem Rühren kann sich die Oberfläche ständig erneuern, was zu einer schnelleren Gleichgewichtseinstellung führt. Der pH-Wert von 7,6 wurde gewählt, um einerseits eine Hydrolyse der Ester zu verhindern, gleichzeitig aber aus dem Haar in viel höheren Konzentrationen extrahierte freie Fettsäuren ($pK_s \approx 5$) als Salze in der Lösung zurückzuhalten.

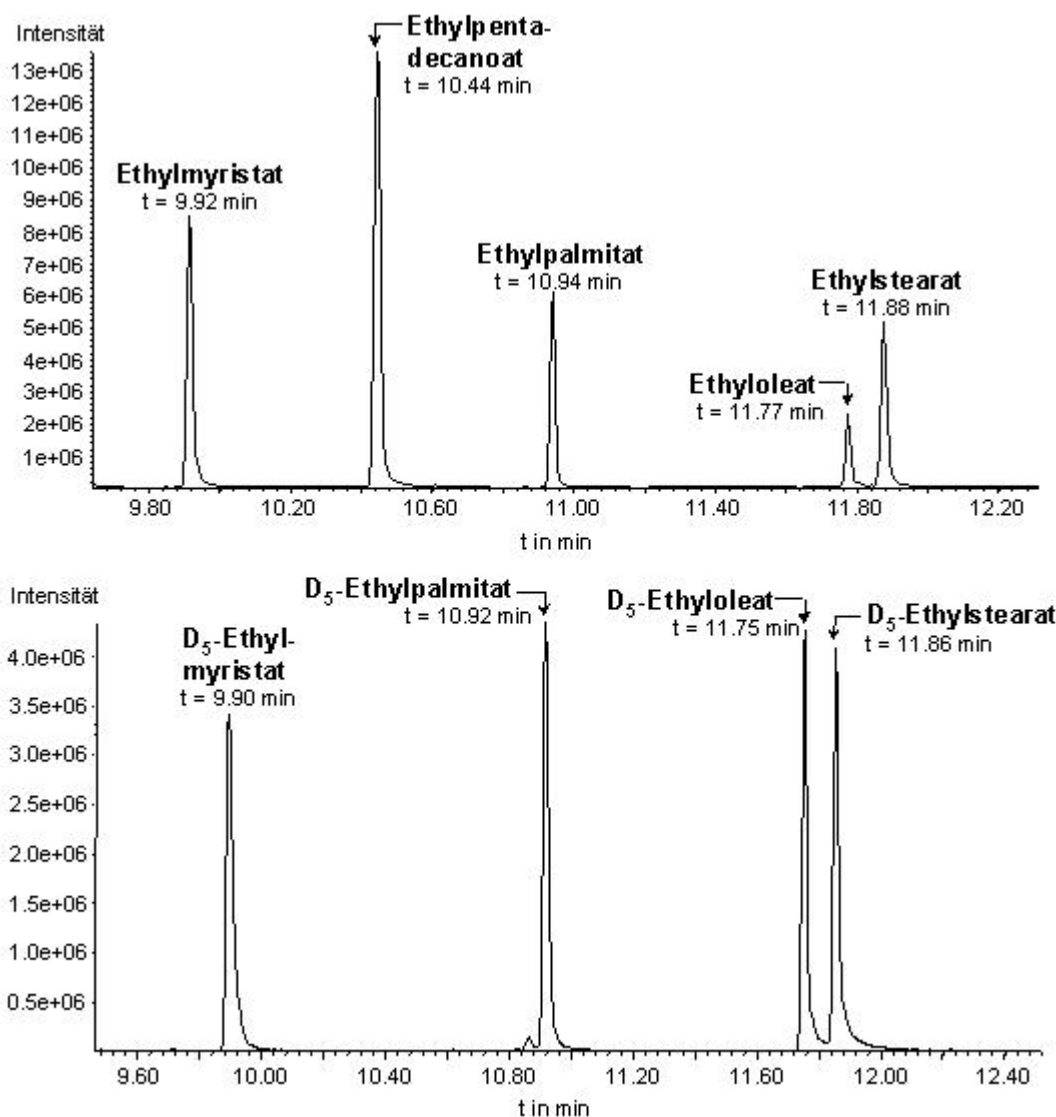


Abbildung 48: oben: SIM-Chromatogramm der untersuchten FSEE (je 20 ng) und Ethylpentadecanoat (50 ng) nach HS-SPME bei 100°C aus einer Lösung von Phosphatpuffer pH 7,6 und 0,5 g NaCl.
unten: Totalionenchromatogramm von je 20 ng der deuterierten FSEE nach Direktinjektion.

- Adsorptionstemperatur und -zeit

Die Optimierung der Adsorptionstemperatur erfolgte zwischen 40 und 120°C bei 30 min Adsorptionszeit, die der Adsorptionszeit zwischen 10 und 60 min bei 100°C Adsorptionstemperatur. Die Verläufe der Extraktionsausbeuten sind in Abbildung 49 dargestellt.

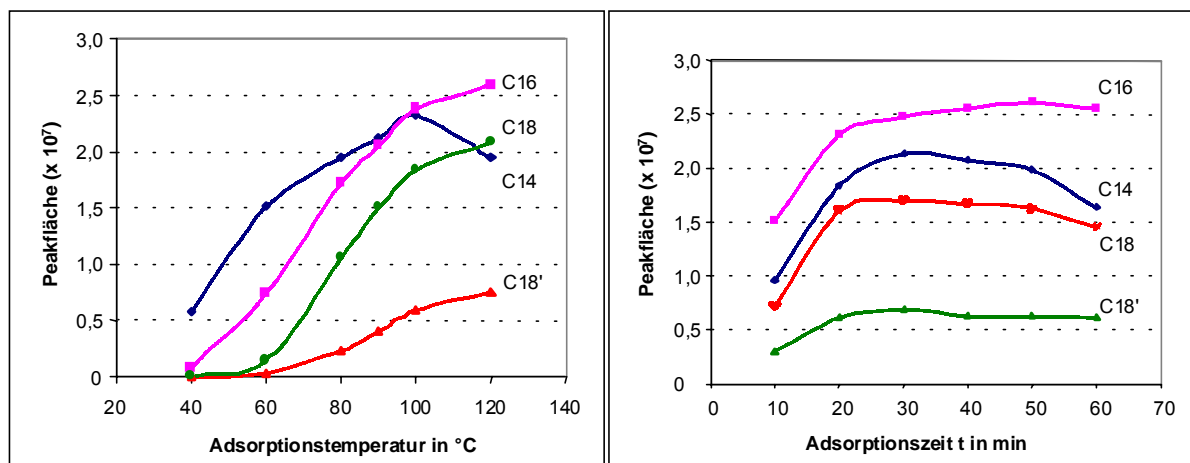


Abbildung 49: Einfluss der Extraktionstemperatur (links) und der Extraktionszeit (rechts) auf die Extraktionsausbeuten von je 100 ng Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (C18') und Ethylstearat (C18) aus 1 ml Phosphatpuffer pH 7,6 + 0,5 g NaCl. HS-SPME: 65 µm PDMS/DVB, 150 U/min Schüttelgeschwindigkeit, 30 min Adsorptionszeit (links), 100°C Adsorptionstemperatur (rechts).

Bis auf Ethylmyristat steigen mit zunehmender Temperatur die Extraktionsausbeuten im gesamten Untersuchungsbereich an. Bei 120°C führt aber der hohe Innendruck im Headspace-Gefäß wegen Problemen mit der Dichtigkeit zu schlechten Reproduzierbarkeiten. Daher wurde bei allen weiteren Untersuchungen eine Adsorptionstemperatur von 100°C eingestellt.

Bei der Adsorptionsdauer ist erkennbar, dass bis auf Ethylpalmitat bei 30 min die höchsten Extraktionsausbeuten erzielt wurden. Diese Zeit wurde auch für die folgenden Untersuchungen gewählt.

- Salzzusatz

Der Zusatz von je 0,5 g NaCl, Na₂SO₄ oder Na₂HPO₄ zu 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6 mit je 100 ng der FSEE wirkte sich, wie in Abbildung 50 ersichtlich, nicht sehr unterschiedlich auf die Peakflächen der einzelnen FSEE aus. Bei allen untersuchten FSEE sind die Ausbeuten bei Zusatz von NaCl am höchsten, so dass dieses Salz dann auch bei den nachfolgenden Untersuchungen dem mit Phosphatpuffer versetzten Haarextrakt vor der HS-SPME zugegeben wurde.

- Interner Standard

Die Wahl der internen Standards gestaltete sich bei der Analyse von Haarproben schwierig. Zunächst für den Einsatz verwendete strukturell ähnliche Substanzen wie n-Phenyldodecan oder Ethylpentadecanoat lieferten bei den in ihrer Menge und Zusammensetzung sehr unterschiedlichen Haarextrakten in der quantitativen Analyse keine reproduzierbaren Ergebnisse, weshalb dann nur noch mit den deuterierten Standards weitergearbeitet wurde.

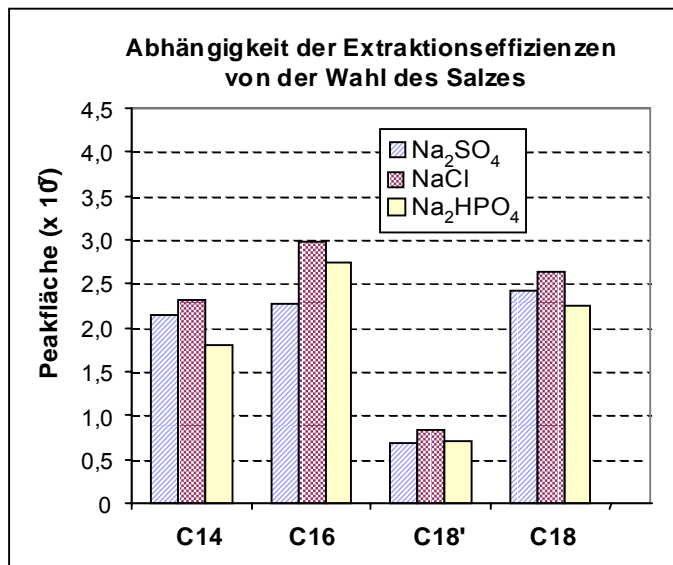


Abbildung 50: Abhängigkeit der Extraktionseffizienzen vom Salzzusatz zum Rückstand von je 100 ng Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (C18') und Ethylstearat (C18) in 1ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6. HS-SPME: Adsorption an 65 µm PDMS/DVB für 30 min bei 100°C.

- Lösungsmittel zur Haarextraktion:

Um die im Haar eingelagerten FSEE zu extrahieren, benötigt man ein Lösungsmittel mit guten Quelleigenschaften, das gleichzeitig die lipophilen FSEE ausreichend lösen kann. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass diese beiden Forderungen schwer in Übereinstimmung zu bringen sind. Apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Aceton weisen nur sehr schlechte Quelleigenschaften auf, können also nur schlecht in das Haar eindringen [227]. Ein guter Kompromiss zwischen Quellvermögen und Löslichkeitseigenschaften könnte Methanol sein. Allerdings werden dadurch, wie von Spiegel beschrieben [26], die FSEE zum Teil in die entsprechenden Methyl ester umgewandelt. Aus diesem Grund kamen Alkohole nicht für die Extraktion in Frage.

Alternativ wurden deshalb zweiphasige Lösungsmittelgemische von n-Hexan mit Ethylenglycol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Phosphat-Puffer pH 7,6 sowie 8 M Harnstoff und 0,2 M Mercaptoessigsäure in Wasser getestet. Alle in Kombination mit n-Hexan eingesetzten wässrigen Lösungsmittel weisen ein gutes Penetrationsvermögen für die Haarmatrix auf. Das gleiche trifft für Ethylenglycol und Dimethylsulfoxid zu. Harnstoff besitzt keratoplastische Eigenschaften, d.h. er führt zu einer Lockerung der Zellstruktur. Mercaptoessigsäure ist in der Lage, Disulfidbrücken zu spalten. Das Eindringen des Hexans in die so aufgelockerte Haarmatrix wird durch ein starkes Schütteln der Probe begünstigt, wodurch eine Suspension des Hexans im Lösungsmittel entsteht. Die schlechte Mischbarkeit der wässrigen Lösungsmittel bzw. des DMSO und des Ethylenglycols mit dem Hexan ermöglicht nach erfolgter Extraktion außerdem ein gutes Abtrennen der organischen Phase durch Zentrifugation.

Für die Extraktionsversuche wurden jeweils 0,5 ml des Lösungsmittels und 2 ml n-Hexan zu 50 mg des Alkoholiker-Haarpoils gegeben. Die Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur für

15 h. Die Ergebnisse der Extraktionsversuche sind in Tabelle 19 aufgelistet. Dabei wurden die mit DMSO/n-Hexan erzielten, höchsten Ausbeuten 100% gesetzt. Ebenfalls sehr gut geeignet war demnach das Harnstoff-Mercaptoessigsäure-Hexan-Gemisch mit 98%. Für alle weiteren Versuche wurde das DMSO/n-Hexan-Gemisch verwendet.

Tabelle 19: Relative Ausbeuten der Extraktion von Fettsäureethylestern aus einem Alkoholiker-Haarpool

Verwendetes Extraktionsgemisch	Relative Extraktionsausbeute in % (Mittelwert aller vier FSEE)
0,5 ml DMSO + 2 ml Hexan	100
0,5 ml 8-M Harnstoff / 0,2-M Mercaptoacetatlösung + 2 ml Hexan	98
0,5 ml Ethylenglycol / Puffer (pH 7,6) = 1:1 + 2 ml Hexan	71
0,5 ml Ethylenglycol + 2 ml Hexan	64
0,5 ml Puffer (pH 7,6) + 2 ml Hexan	47

- Dauer der Haarextraktion

Um den Verlauf der Extraktion zu kontrollieren, wurden je 50 mg des Alkoholiker-Haarpoons mit dem DMSO/n-Hexan-Gemisch 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 bzw. 24 h extrahiert. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 51. Während Ethylpalmitat bereits nach ca. 6 h vollständig aus dem Haar extrahiert wurde, sind bei den anderen FSEE 12 h nötig. Danach bleiben die Extraktionsausbeuten ungefähr konstant. Für die praktische Anwendung (Extraktion über Nacht) wurden 14 h gewählt. Zur Kontrolle wurden die nach 14 h Extraktion im Haar verbliebenen FSEE-Konzentrationen durch eine zweite Extraktion bestimmt. Dabei wurden weniger als 4% der nach der ersten, 14 stündigen Extraktion ermittelten Konzentrationen erhalten. Eine dritte Extraktion lieferte negative Ergebnisse.

- Einfluss der Matrixmenge, absolute HS-SPME-Ausbeuten

Im Abschnitt 5.1.1 wurde gezeigt, dass die eingesetzte Haarmenge einen wesentlichen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten hat. Obwohl bei der Analyse der FSEE nur die Flüssigextrakte der Haarproben zur HS-SPME eingesetzt werden, konnte trotzdem der gleiche Effekt festgestellt werden. Dieses Resultat wurde nach Untersuchung der Extrakte von 0, 5, 10, 20, 50 bzw. 100 mg eines FSEE-freien Abstinenzler-Haarpoons, die mit jeweils 40 ng der FSEE dotiert wurden, erhalten. Die HS-SPME-Ausbeuten sind in Abbildung 52 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die höchsten Ausbeuten bei einer Haarmenge von 5 mg erzielt wurden. Danach fallen sie deutlich ab. Im Vergleich zu einer Direktinjektion (= 100%) von je 40 ng der FSEE werden bei 5 mg Haarmenge 32-39% wiedergefunden, bis 100 mg sinken die Ausbeuten dann jedoch auf nur noch 5-10%. Es wird angenommen, dass Bestandteile der Haarmatrix mit Oberflächenaktivität wie Anionen freier Fettsäuren die Löslichkeit der Ester in der

wässrigen Phase erhöhen, wodurch der Verteilungskoeffizient zwischen SPME-Faser und Probe sinkt. Weil der Lipidgehalt von Haarproben natürlichen Variationen unterliegt, sollten die HS-SPME-Ausbeuten von Probe zu Probe unterschiedlich sein. Das konnte auch durch Messungen von Haarproben von Alkoholikern, Normaltrinkern und Abstinenzlern (siehe Abschnitt 5.3.1.4) bestätigt werden. Gleiche Konzentrationen der zugesetzten deuterierten Standards ergaben dabei stark voneinander abweichende Peakflächen. Für die weiteren Untersuchungen wurden 50 mg Haar eingesetzt, wobei bei weniger zur Verfügung stehendem Probenmaterial wegen der höheren Extraktionsausbeuten auch 10-20 mg ausreichend wären.

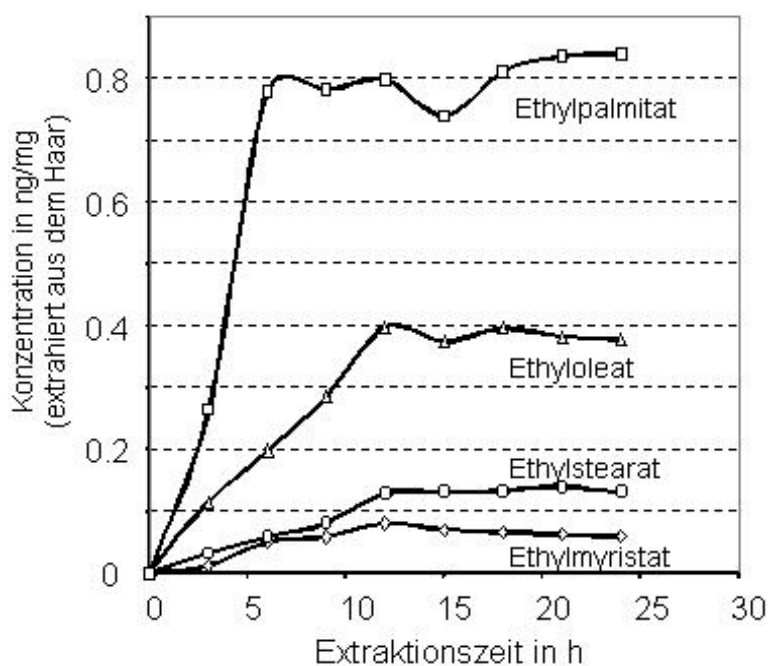


Abbildung 51: Gemessene FSEE-Konzentrationen nach DMSO/n-Hexan-Extraktion aus einem Alkoholiker-Haarpool in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer (n = 2).

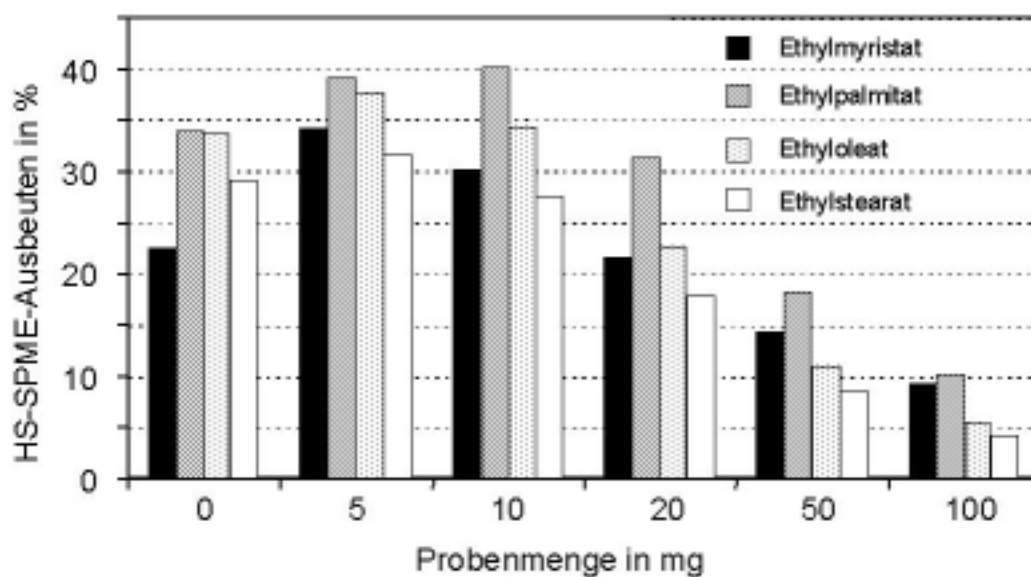


Abbildung 52: Einfluss der Haarprobenmenge auf die HS-SPME-Ausbeuten der FSEE. Je 40 ng FSEE zum Extrakt von 0, 5, 10, 20, 50 bzw. 100 mg Abstinenzler-Haarpool. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Direktinjektion von je 40 ng der FSEE (= 100%).

- Kalibrierung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Reproduzierbarkeit

Für die Kalibrierung wurden 50 mg Haar des Abstinenzler-Haarpoools mit 14 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,01 und 15 ng/mg der vier FSEE sowie je 40 ng der entsprechenden deuterierten FSEE (= 0,8 ng/mg) versetzt. Die Extraktion der Haare und die HS-SPME erfolgten unter den optimierten Bedingungen (s. auch Abschnitt 4.4.5). Die Kalibrationskurven waren bis 2,5 ng/mg linear. Danach war ein leichtes Abflachen des Anstieges zu beobachten, das nicht erklärbar war. Zu vermuten wäre eine Faserabsättigung infolge geringer Kapazität der SPME-Faser. Die charakteristischen Kalibrationsparameter sind in Tabelle 20 aufgelistet. Die Nachweisgrenzen wurden, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, bestimmt und lagen zwischen 0,01 ng/mg für Ethylstearat und 0,04 ng/mg für Ethyloleat, die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,04 für Ethylstearat und 0,12 ng/mg für Ethyloleat. Diese Werte wurden durch Messungen dotierter Haarproben im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,1 ng/mg bestätigt.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch je 10 Messungen des Alkoholiker-Haarpoools innerhalb einer Serie an 2 Tagen bestimmt. Die mittleren Konzentrationen, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sind ebenfalls aus Tabelle 20 ersichtlich. Der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) war bei Ethylmyristat bei einer mittleren Konzentration von 0,067 ng/mg mit 15,5% am höchsten. Bei den anderen FSEE mit höheren Konzentrationen lagen die Variationskoeffizienten zwischen 3,5 und 6,6%.

Tabelle 20: Parameter der Kalibrationskurven, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD und LOQ) und Reproduzierbarkeit der Analyse von FSEE

FSEE	c = a(A _{Probe} /A _{ISTD}) + b			LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Reproduzierbarkeit (n = 10)*		
	a	b	R ²			Mittelwert der Konzentrationen (ng/mg)	Stabw. (ng/mg)	VK in %
Ethylmyristat	1,094	0,024	0,9993	0,015	0,05	0,067	0,010	15,7
Ethylpalmitat	1,135	0,037	0,9990	0,02	0,07	0,796	0,052	6,6
Ethyloleat	1,083	0,023	0,9987	0,04	0,12	0,387	0,023	5,9
Ethylstearat	1,169	0,014	0,9937	0,01	0,04	0,133	0,005	3,5

*10 Messungen des Alkoholiker-Haarpoools in einer Serie

5.3.1.4 Anwendungen auf Haarproben

Die Methode wurde auf Haarproben von 21 Sektionsfällen des Institutes mit bekanntem starkem Alkoholkonsum und bei der Obduktion festgestellten alkoholbedingten pathologischen Veränderungen angewendet. Dabei wurde jeweils die gesamte Haarlänge untersucht.

Die Haarkonzentrationen der FSEE im Alkoholikerhaar sind für die einzelnen Fälle in Tabelle 21 aufgelistet. Sie liegen zwischen 0,045 und 2,4 ng/mg für Ethylmyristat, 0,35 und 13,5

ng/mg für Ethylpalmitat, 0,25 und 8,94 ng/mg für Ethyloleat sowie 0,05 und 3,85 ng/mg für Ethylstearat.

Tabelle 21: FSEE-Konzentrationen im Kopfhaar von Todesfällen mit bekanntem Alkoholmissbrauch.

Proben-Nr.	FSEE-Konzentration im Haar in ng/mg			
	Ethylmyristat	Ethylpalmitat	Ethyloleat	Ethylstearat
169/98	0,47	1,73	1,09	0,22
252/98	0,22	1,37	1,23	0,35
325/98	0,08	0,39	0,65	0,10
004/99	0,03	0,57	0,68	0,25
088/99	0,09	0,40	0,40	0,08
156/99	0,27	1,25	2,14	0,19
169/99	0,13	1,31	2,76	0,37
223/99	2,44	13,5	7,07	3,85
451/99	0,88	3,76	6,88	0,68
453/99	0,72	2,28	2,75	0,36
102/00	0,045	0,46	0,25	0,05
132/00	0,42	1,17	1,47	0,28
140/00	0,19	0,49	1,25	0,11
173/00	0,20	1,15	2,89	0,27
185/00	0,11	0,35	0,62	0,10
188/00	0,17	0,86	1,08	0,26
232/00	0,38	3,33	8,94	1,39
241/00	0,11	0,60	0,79	0,26
260/00	0,11	0,45	1,02	0,15
276/00	0,06	0,73	1,23	0,47
287/00	0,14	0,99	1,01	0,47

Als ein typisches Beispiel ist in Abbildung 53 das SIM-Chromatogramm einer solchen Haarprobe im mittleren Konzentrationsbereich dargestellt. Anhand der Ionenspuren ist ersichtlich, dass die Peakflächenverhältnisse der Ionen der Ester aus der Probe mit denen der deuterierten Standards übereinstimmen. Wie gewöhnlich weisen die deuterierten Standards eine etwas kürzere Retentionszeit auf (um 0.02 min). Zusammen mit den Peakflächenverhältnissen der Ionen diente das zur Identifizierung der FSEE.

Zum Vergleich wurden die Haarproben von 10 Gelegenheitstrinkern und 10 Abstinenzlern (Kinder bis 10 Jahre) auf das Vorhandensein von FSEE untersucht. Die Gelegenheitstrinker hatten nach eigenen Angaben einen durchschnittlichen Alkoholkonsum von 30-60 g Alkohol pro Woche. Die ermittelten FSEE-Konzentrationen sind in Tabelle 22 aufgelistet. Dabei wurden bei drei Abstinenzlerhaarproben Spuren von Ethylpalmitat nachgewiesen. Die Herkunft konnte nicht geklärt werden. Bei den Gelegenheitstrinkern lagen die Ethylpalmitat-Konzentrationen in einem Bereich zwischen der Nachweisgrenze und 0,40 ng/mg (Mittelwert:

0,12 ng/mg), also deutlich unter der für Alkoholiker gefundenen mittleren Konzentration von 1,69 ng/mg. Ethyloleat konnte nur in 8 Fällen mit Konzentrationen bis 0,32 ng/mg nachgewiesen werden, Ethylmyristat und Ethylstearat nur in ein bzw. zwei Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze.

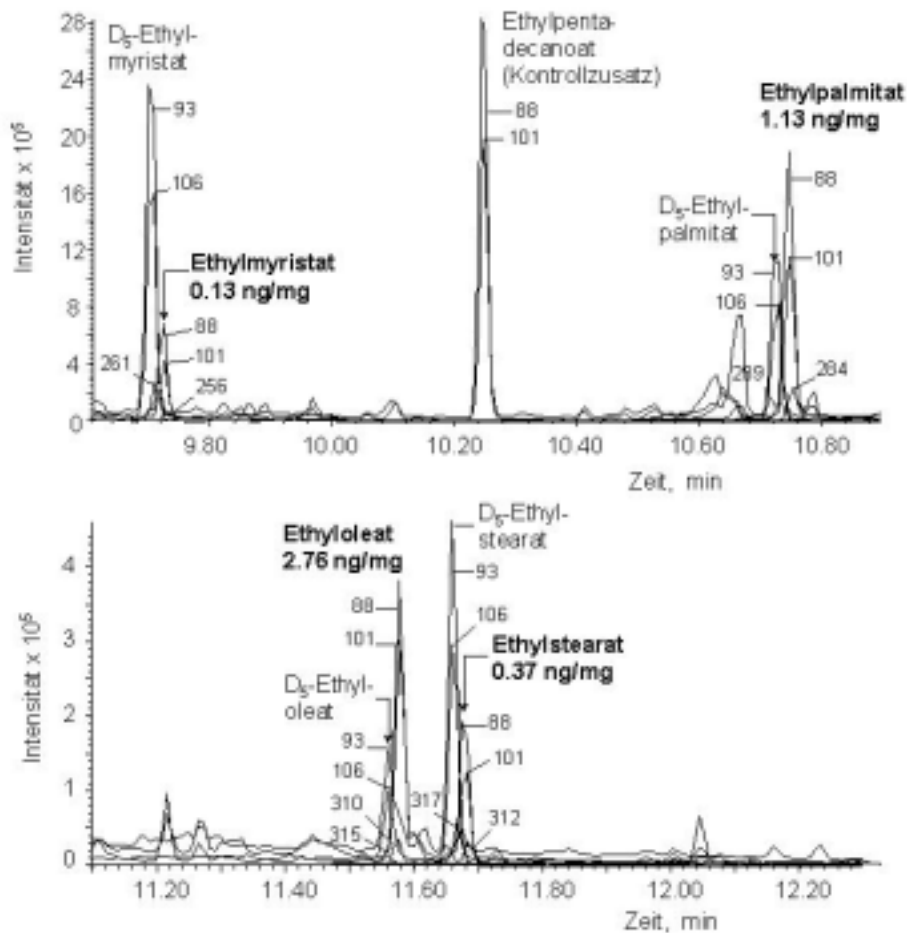


Abbildung 53: Ionenspuren der FSEE und ihrer korrespondierenden deuterierten Standards aus dem GC-MS-SIM-Chromatogramm erhalten nach HS-SPME des Falles 169/99.

Tabelle 22: FSEE-Konzentrationen im Haar von Abstinenzlern (T) und Gelegenheitsrinkern (G).

Proben-Nr.	FSEE-Konzentration im Haar in ng/mg*			
	Ethylmyristat	Ethylpalmitat	Ethyloleat	Ethylstearat
T01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T06	n.n.	pos.	n.n.	n.n.
T07	n.n.	pos.	n.n.	n.n.
T08	n.n.	pos.	n.n.	n.n.
T09	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

G01	pos.	0,40	0,32	0,12
G02	n.n.	pos.	n.n.	n.n.
G03	n.n.	0,07	pos.	n.n.
G04	n.n.	0,12	pos.	n.n.
G05	pos.	0,09	pos.	n.n.
G06	n.n.	0,08	n.n.	n.n.
G07	pos.	0,07	0,12	pos.
G08	0,05	0,22	0,23	0,04
G09	pos.	pos.	0,13	n.n.
G10	n.n.	pos.	pos.	n.n.

*n.n.: nicht nachweisbar, pos.: zwischen LOD und LOQ

Beispielhaft für eine negative Haarprobe sind in Abbildung 54 die Ionenspuren des SIM-Chromatogramms der Haarprobe eines 11 jährigen Jungen dargestellt. Neben den Peaks der internen Standards sind keine Spuren der untersuchten FSEE erkennbar.

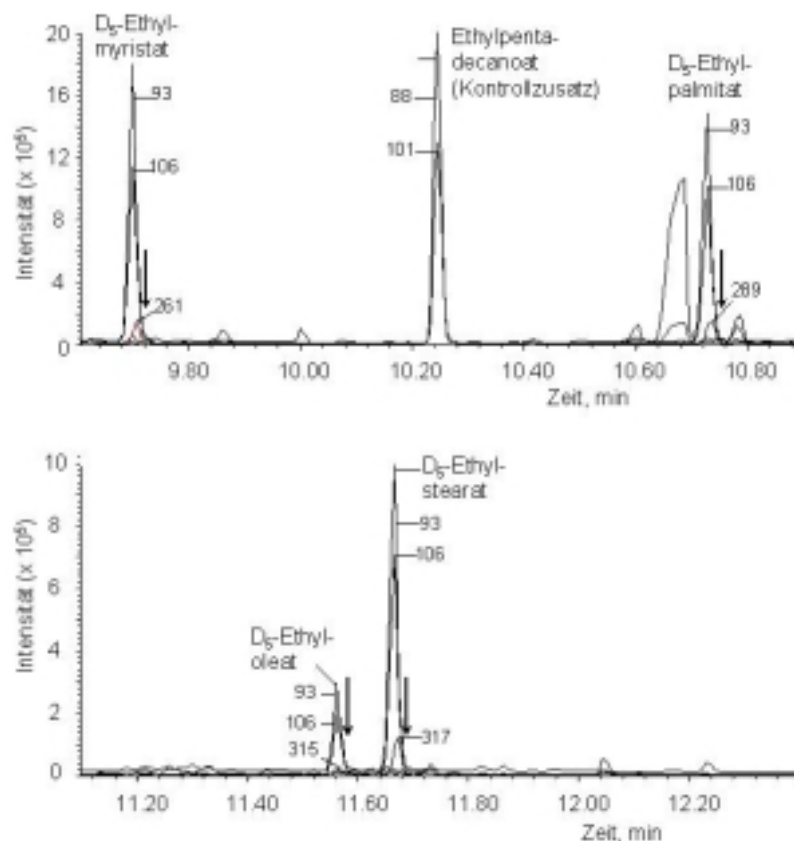


Abbildung 54: Ionenspuren der FSEE und ihrer korrespondierenden deuterierten Standards aus dem GC-MS-SIM-Chromatogramm erhalten nach HS-SPME der Haarprobe eines 11 jährigen Jungen. FSEE konnten nicht nachgewiesen werden. Die Peaks hätten an den mit Pfeilen markierten Stellen erscheinen müssen.

In Abbildung 55 sind die Konzentrationen der aus den Haarproben von Alkoholikern, Abstinenzlern und Gelegenheitstrinkern extrahierten FSEE gegenübergestellt. Dabei sind die vier FSEE übereinander aufsummiert dargestellt.

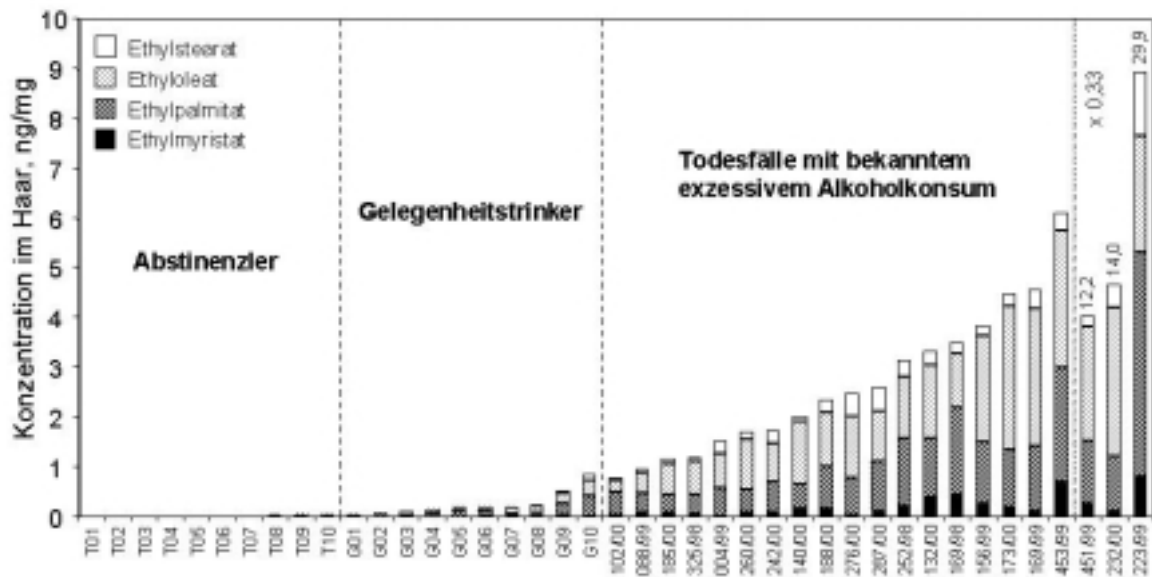


Abbildung 55: Aufsummierte FSEE-Konzentrationen im Haar von Abstänzern (Spuren von Ethylpalmitat), Gelegenheitsrinkern (0,0-0,87 ng/mg, Mittelwert: 0,27 ng/mg) und Alkoholikern (0,81-26,9 ng/mg, Mittelwert 4,6).

Die hier in ersten Untersuchungen ermittelten Konzentrationen für FSEE im Haar lassen nach Abbildung 55 eine Differenzierung zwischen Abstänzern und Alkoholikern zu. Bei Abstänzern konnten maximal Spuren von Ethylpalmitat festgestellt werden, während bei Alkoholikern die Summe der Konzentrationen der vier untersuchten FSEE im Durchschnitt 4,6 ng/mg (Bereich: 0,81-26,9 ng/mg) betrug. Bei Gelegenheitsrinkern mit bis zu 6 Trinkeinheiten/Woche (60 mg Alkohol) kann es zu Überlappungen des Konzentrationsbereichs von 0,0 bis 0,87 ng/mg bei Probe G10 mit dem der bei Alkoholikern bestimmten Werte kommen. Der Mittelwert von 0,27 ng/mg lässt aber einen deutlichen Unterschied erkennen.

Inwieweit diese Analysenmethode zur Alkoholabstinenzkontrolle in der Forensik oder der klinischen Therapie geeignet ist, muss erst durch weitere Untersuchungen geprüft werden. Im Vordergrund steht dabei die Untersuchung einer größeren Probenanzahl, besonders von Patienten aus der Entzugstherapie, aber auch von Abstänzern und Gelegenheitsrinkern. Weiterhin von großem Interesse sind der Einfluss der kosmetischen Haarbehandlung, die Stabilität der FSEE im Haar unter der Einwirkung von Licht, Untersuchungen zum Zusammenhang von Alkoholaufnahme und FSEE-Haarkonzentrationen, die Einbeziehung anderer Haararten und des Sebums sowie das Verhältnis der einzelnen FSEE zueinander.

5.3.2 Clomethiazol

5.3.2.1 Allgemeines

Clomethiazol (auch Chlormethiazol) ist ein Mittel zur Behandlung extremer Erregungszustände, wie sie beim alkoholbedingten Delirium tremens oder aber auch bei Delirien durch Schlafmittelmissbrauch auftreten. Clomethiazol wirkt krampflösend und sedativ-hypnotisch. Die orale Tagesdosis ist mit 1,5-3 mg/kg Körpergewicht sehr hoch. Die Halbwertszeit beträgt nur 3-5 h. Nach Einmaldosis von 200-400 mg wurden Serumkonzentrationen von 110-800 ng/ml festgestellt [186]. Die sedativ-hypnotische Wirkung bedingt ein hohes Missbrauchspotential. Es kommt schnell zu Gewöhnung und Abhängigkeit. Überdosierungen führen zu starkem Blutdruckabfall und Atemdepression.

Clomethiazol ist eine ölige Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 92°C (bei 933 Pa) und einem pK_s -Wert der protonierten Form von 3,2. Chemisch gesehen ist es ein Thiazol-Derivat. Die Strukturformel und das Massenspektrum sind in Abbildung 56 dargestellt.

5.3.2.2 Analytik

Daten zur Clomethiazol-Einlagerung und zu Haarkonzentrationen konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Der Nachweis in Blut und Urin erfolgt meist gaschromatographisch mit den gängigen Detektoren. Clomethiazol konnte nach basischer Hydrolyse der Haare nicht detektiert werden, da es zur Hydrolyse der Chloretyl- zur Hydroxyethylgruppe kam. Daher wurde zur Extraktion des Clomethiazols aus dem Haar ein wässriger Phosphatpuffer pH 6,0 eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte nach der in Abschnitt 4.4.6 beschriebenen Methode nach HS-SPME für 15 min bei 60°C an einer Carbowax-DVB-Faser mittels GC-MS-SIM. Als interner Standard wurde N,N-Diethylanilin (10 ng/mg Haar) eingesetzt (Massenspektrum s. Abbildung 56). Auf eine Optimierung der Methode wurde in diesem Fall verzichtet. Für die Wahl der HS-SPME-Bedingungen wurde auf die von anderen Autoren für Substanzen mit vergleichbarer Flüchtigkeit optimierten Parameter zurückgegriffen. Eine Temperatur über 60°C schien nicht angebracht, da sich bei relativ leicht flüchtigen Substanzen der Faser-Dampfraum-Verteilungskoeffizient zugunsten des Dampfraums verschieben würde.

Die Massenspektren (siehe Abbildung 56) zeigen für Clomethiazol und den internen Standard mehrere intensive und charakteristische Fragmentationen. Mit den Ionen m/z 161, 163, 112 und 85 für Clomethiazol sowie 134, 149, 106 und 77 für N,N-Diethylanilin wurden die Kalibration mit dotierten Haarproben und die Analyse von Proben nach Einnahme des Wirkstoffs durchgeführt. Die Kalibration erfolgte mit 5 Konzentrationen zwischen 1,0 und 20 ng/mg und 10 ng/mg internen Standard. Sie war im gesamten Bereich linear mit $R^2 = 0,993$. Die Nachweisgrenze wurde mit 0,5 ng/mg bestimmt.

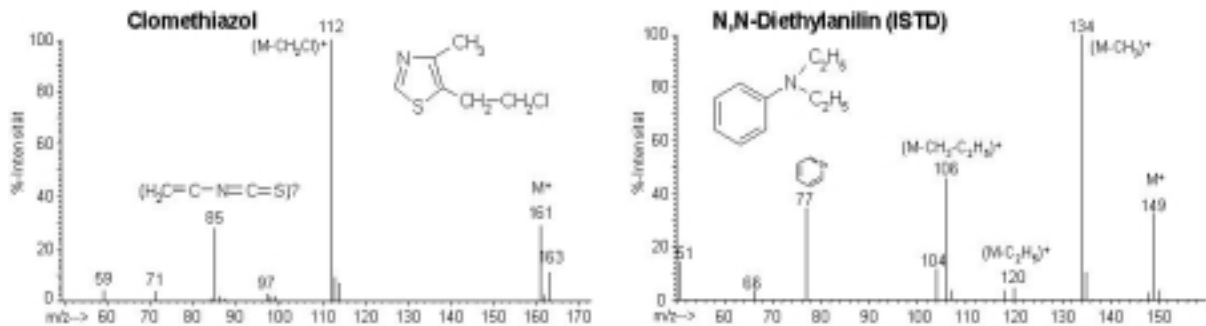


Abbildung 56: Massenspektren und Strukturformeln von Clomethiazol und N,N-Diethylanilin (interner Standard).

5.3.2.3 Clomethiazol in Haarproben von Todesfällen

An zwei Beispielen wurde die Anwendbarkeit der Methode überprüft. Dazu wurden Haare von zwei Todesfällen mit bekannter Clomethiazol-Einnahme wie in Abschnitt 4.4.6 beschrieben untersucht. Dabei wurden in einem Fall 15,3 ng/mg ermittelt. In der zweiten Probe konnte wegen der hohen Konzentration nur eine halbquantitative Bestimmung erfolgen, die ca. 115 ng/mg Haar ergab. Das SIM-Chromatogramm der positiven Clomethiazol-Haarprobe 156/99 ist in Abbildung 57 dargestellt.

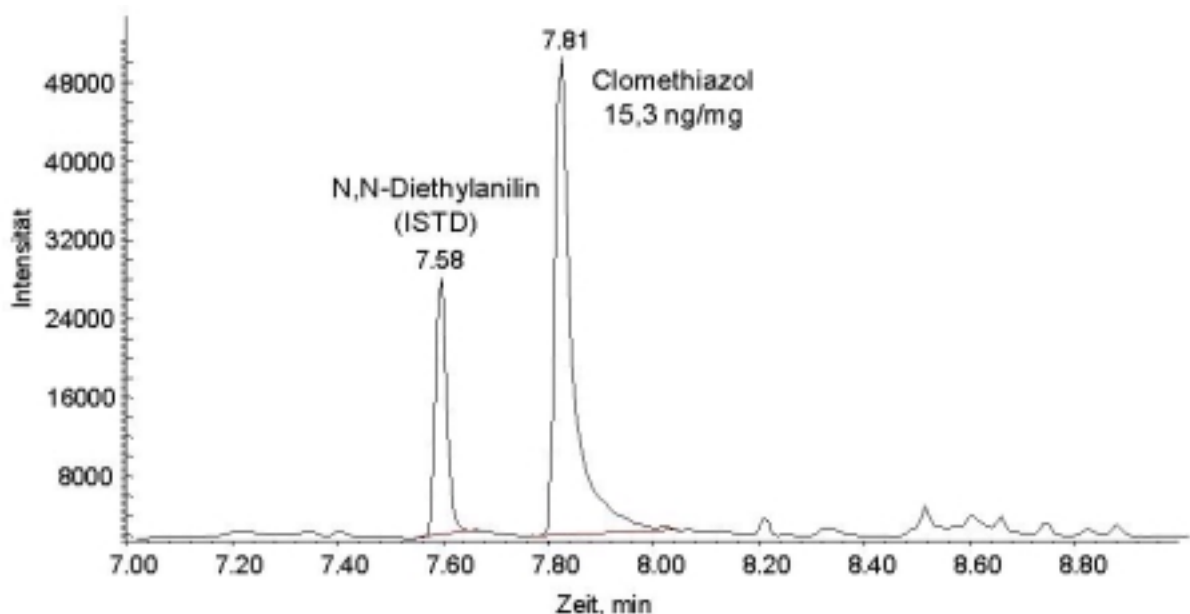


Abbildung 57: SIM-Chromatogramm der Haarprobe 156/99. HS-SPME-Bedingungen: 65 µm Carbowax-DVB, Adsorption für 15 min bei 60°C, 10 ng/mg N,N-Diethylanilin (ISTD).

Eine Einschätzung der Ergebnisse fällt wegen fehlender Literaturangaben sehr schwer. Doch kann davon ausgegangen werden, dass ein regelmäßiger Konsum wegen der hohen Einzeldosen problemlos nachweisbar ist. Die Methode sollte somit für eine Einnahme- und Missbrauchskontrolle geeignet sein.

5.4 Untersuchungen aus Blut, Urin und Mageninhalt

Für einige, z.T häufig in der toxikologischen und forensischen Chemie zu bestimmende Substanzen eignen sich die herkömmlichen analytischen Verfahren wie HPLC-DAD, Headspace-GC oder GC-MS nach Flüssig/Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion nicht. Das beruht bei der HPLC auf der fehlenden charakteristischen UV-Absorption, bei der Headspace-GC auf der nicht ausreichenden Empfindlichkeit bei Substanzen mit Siedepunkten deutlich über 100°C und bei der GC-MS auf den Problemen der Probenaufarbeitung (starke Abdampfverluste bei flüchtigen Verbindungen nach der Extraktion sowie unsaubere Extrakte). Für einige Analyten mit toxikologischer und forensischer Relevanz wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit HS-SPME-Methoden entwickelt, die mittlerweile routinemäßig zum Einsatz kommen oder für den routinemäßigen Einsatz geeignet sind. Es handelt sich dabei um das Antiepiletikum Valproinsäure, um den Metaboliten des Sedativum Chloralhydrat, Trichlorethanol, sowie um das Pestizid Monofluoressigsäure.

5.4.1 Monofluoressigsäure

5.4.1.1 Allgemeines

Bei der Monofluoressigsäure (MFAA) handelt es sich um ein heimtückisches Gift, das nicht im normalen toxikologischen Screening erfasst wird. Die besondere Gefahr einer Vergiftung rührt daher, dass es in Lösungen farb-, geruch- und weitestgehend geschmacklos ist. Monofluoressigsäure wird im Körper zum Fluoracetyl-CoA umgewandelt und dann in den energieliefernden Zitronensäure-Zyklus eingeschleust. Dort verbindet es sich wie im normalen Krebs-Zyklus durch Kondensation mit Oxalessigsäure. Die Umwandlung des dabei entstandenen Fluorcitrats zum entsprechenden Aconitat wird durch Hemmung des Enzyms Aconitat-Hydratase unterbunden. Der Tricarbonsäurezyklus und damit die biochemische Energiegewinnung werden gestoppt.

In der Natur kommt Monofluoressigsäure in den Samen und Blättern der afrikanischen Dichapetalum-Arten vor. Dort gibt es besonders unter Weidevieh regelmäßig Vergiftungsfälle. In Afrika werden Blätter- und Samenextrakte als Jagdgifte verwendet. Aus früheren Zeiten sind Brunnenvergiftungen durch rivalisierende Stämme oder Familien beschrieben [228].

Nachdem der Wirkungsmechanismus aufgeklärt worden war, gab es Bestrebungen, Monofluoressigsäure militärisch zu nutzen. Heute wird das Na-Salz unter der Bezeichnung „Compound 1080“ als Rodentizid, meist in Ködern verabreicht, zur Bekämpfung von Kojoten und Füchsen (bei Tollwut) besonders in Australien und in einigen Bundesstaaten der USA eingesetzt [229].

Als konkreter forensischer Fall der letzten Jahre konnte hier nur die Vergiftung einer Frau durch ihren Ehemann mit Hilfe von vergiftetem Tee 1997 in Indien recherchiert werden [230]. Allerdings ist vorstellbar, dass viele Fälle wegen schlechter Nachweisbarkeit im Screening nicht aufgedeckt wurden. Als letale Dosis (LD₅₀) gelten 2-5 mg/kg Körpergewicht [186]. Die Intoxikation führt zu Muskelspasmen, Zittern, Nierenversagen, Tachycardie, Herzkammerflimmern und letztendlich Atemstillstand.

5.4.1.2 Analytik

Obwohl Monofluoressigsäure ein chemisch sehr einfaches Molekül ist, lässt es sich mit den in der toxikologischen Routine angewendeten Verfahren nur sehr schwer nachweisen. Das liegt daran, dass die Monofluoressigsäure kein charakteristisches UV-Spektrum aufweist und daher nicht mittels den HPLC mit UV- bzw. Photodiodenarray-Detektion nachweisbar ist. Für eine Headspace-GC-Detektion wirken sich der hohe Siedepunkt von 157°C und die sehr hohe Polarität (pK_S-Wert 2,6) negativ aus, die auch bei der GC-MS Probleme bereitet. Die meisten Verfahren zur Bestimmung von Monofluoressigsäure sind deshalb verhältnismäßig aufwendig. Sie beinhalten meist eine Flüssig/Flüssig-Extraktion nach Probenverdünnung oder Proteinfällung mit anschließender Derivatisierung und Aufreinigung. Tabelle 23 gibt einen Überblick über in der Literatur beschriebene Bestimmungsmethoden.

Tabelle 23: Literaturangaben zur Bestimmung von Monofluoressigsäure aus Blut und Organproben

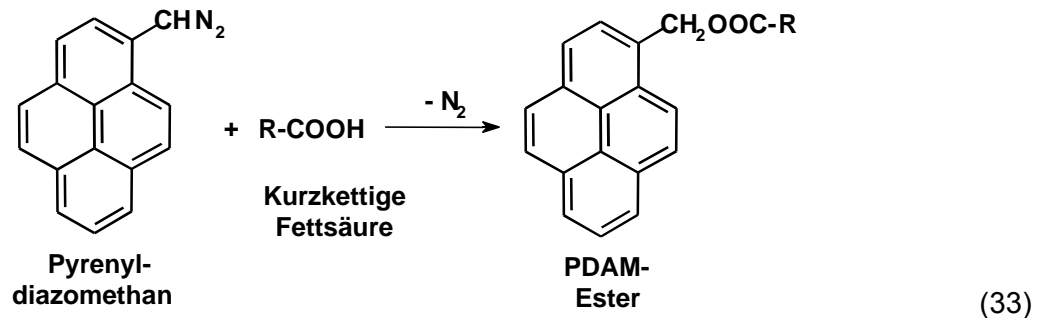
Autor/Jahr	Aufarbeitung	Derivatisierung	Aufreinigung	Bestimmung	Referenz
Stevens 1976	LLE mit Methyl-iso-butylketon	Diazomethan	-	GC-MS	[231]
Okuno 1984	Proteinfällung, LLE mit Ethylacetat	PFB-Br*	-	GC-ECD	[232]
Hogenboom 1987	Proteinfällung, LLE mit Ethylacetat	BDMPH**	Florisil	GC-ECD	[233]
Allender 1990	Proteinfällung	PFB-Br	Florisil, DC	GC-ECD	[234]
Mori 1995	Homogenisierung mit Wasser, Zentrifugation, Abdampfen von 1ml des Überstandes	Konz. H ₂ SO ₄ und Ethanol	-	HS-GC-FID HS-GC-MS	[235]
Miki 1998	Verdünnen mit Wasser	Extraktiv mit PFB-Br in Toluol	Florisil		[236]
Minnaar 2000	Organhomogenisierung, Ultraschallextraktion mit Phosphorsäure	-	Filtration	HPLC-UV (210 nm)	[237]

*PFB-Br: Pentafluorbenzylbromid

**BDMPH: Benzoldimethylphenylammoniumhydroxid 0,5 M in Wasser

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode beruht auf der von Mills et al. für die Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren aus Faeces-Proben eingesetzten HS-SPME mit *on-fiber*

Derivatisierung mit Pyrenyldiazomethan (PDAM) [174]. Dabei wird die SPME-Faser vor der Headspace-Extraktion in eine Lösung des Derivatisierungsreagenzes getaucht. Bei der nachfolgenden Extraktion aus dem Dampfraum reagieren die an die Faser gelangenden Fettsäuren sofort mit dem Pyrenyldiazomethan unter Bildung der entsprechenden Ester (s. Gl. 33). Diese Derivatisierungsmethode wurde auch von Pan und Pawliszyn [29] erfolgreich beim Nachweis kurzkettiger Fettsäuren in wässrigen und Milchproben eingesetzt. Monofluoressigsäure sollte ebenso wie die Fettsäuren mit PDAM reagieren.



Die nach HS-SPME und *on-fiber* Derivatisierung bei 90°C erhaltenen, in Abbildung 58 dargestellten Massenspektren bestätigen die Umsetzung mit Pyrenyldiazomethan.

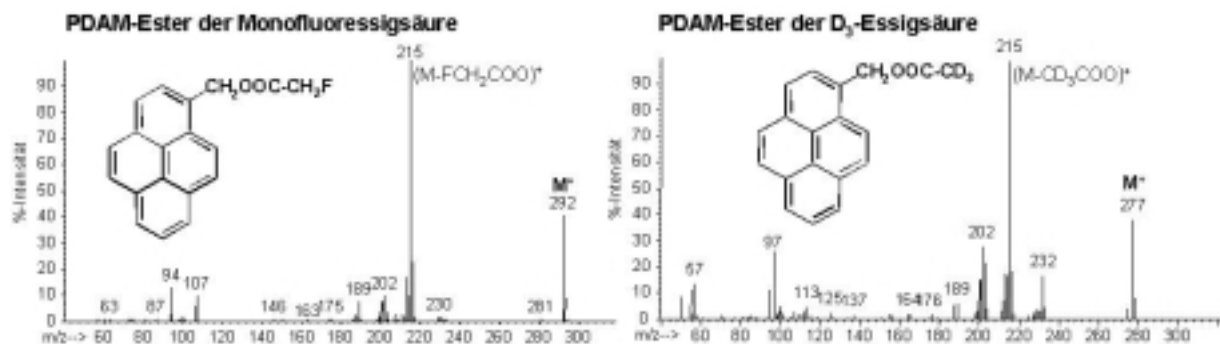


Abbildung 58: Massenspektren der Ester von Monofluoressigsäure und D₃-Essigsäure nach *on-fiber* Derivatisierung mit Pyrenyldiazomethan (PDAM).

Die Bestimmung der Monofluoressigsäure erfolgte mit einer PDMS/DVB/Carboxen-Faser analog Abschnitt 4.4.8. Nach Zugabe von 1 M Schwefelsäure und Na₂SO₄ und des internen Standards D₃-Essigsäure zu der Blutprobe wird das Headspace-Vial zugekappt und in den Autosampler gestellt. Die Faser taucht vor der HS-Extraktion bei Raumtemperatur in die Lösung von 2,5 mg PDAM in 1 ml n-Hexan ein. Danach erfolgt die Adsorption und direkte Umsetzung der Analyten an der Faser im Headspace.

5.4.1.3 Optimierung

Die hierzu durchgeführten Versuche zielten darauf ab, den Einfluss der Adsorptionstemperatur und –zeit, der Eintauchzeit in die PDAM-Lösung sowie des Probenvolumens zu optimieren.

- Temperatur und Dauer der Headspace-Adsorption und der Derivatisierung

Die Extraktions- und gleichzeitig auch Derivatisierungstemperatur wurde zwischen 40 und 100°C variiert. Dabei wurden je 2 µg Monofluoressigsäure und D₃-Essigsäure zu 200 µl Serum gegeben. Die Extraktion erfolgte für 30 min bei konstantem Schütteln (150 U/min). Die SPME-Faser war zuvor für 15 min in die PDAM-Lösung eingetaucht worden. Der Verlauf der Extraktionsausbeuten ist in Abbildung 59 dargestellt. Mit steigender Temperatur steigen für Monofluoressigsäure die Extraktionsausbeuten an. Bei der Essigsäure ist hingegen eine Abnahme der Ausbeuten bei > 80°C zu beobachten. Das könnte an den um ca. 50°C differierenden Siedepunkten beider Substanzen liegen. Für die weiteren Versuche wurden 90°C als Kompromiss gewählt.

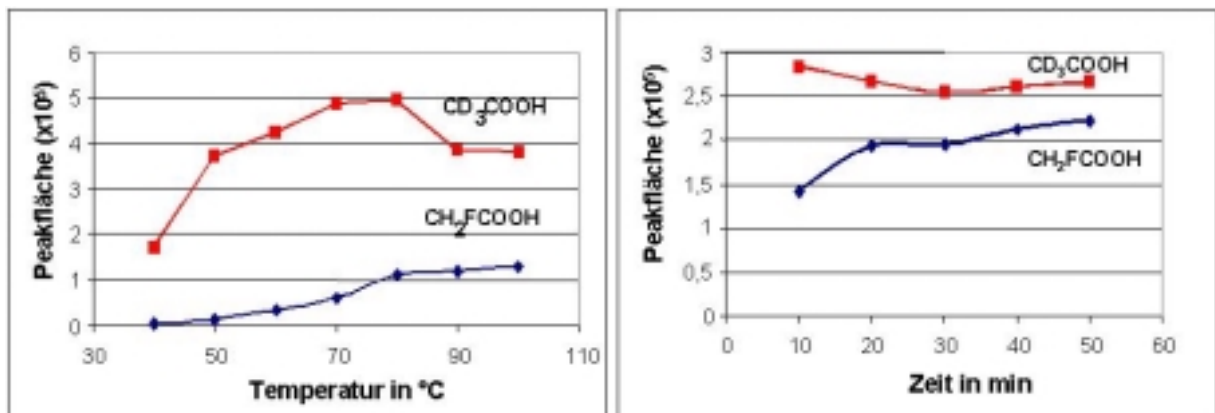


Abbildung 59: Links: Einfluss der Extraktions- und Derivatisierungstemperatur auf die Extraktionsausbeuten. Je 2 µg Monofluoressigsäure und D₃-Essigsäure in 200 µl Serum. HS-SPME-Adsorptionszeit: 30 min, Eintauchzeit in PDAM-Lösung: 15 min. Rechts: Einfluss der Extraktions- und Derivatisierungszeit auf die Extraktionsausbeuten. Je 2 µg Monofluoressigsäure und D₃-Essigsäure in 200 µl Serum. Adsorptionstemperatur: 90°C, 15 min Eintauchzeit in PDAM-Lösung.

Der Einfluss der Extraktions- und Derivatisierungszeit wurde zwischen 10 und 50 min untersucht. 200 µl Serumprobe waren mit je 2 µg der Analyten dotiert. Die Extraktion erfolgte bei 90°C und 150 U/min. Die Extraktionsausbeuten blieben, wie in Abbildung 59 ersichtlich, für D₃-Essigsäure relativ konstant, während sie für Monofluoressigsäure bis 50 min anstiegen. Im Interesse eines hohen Probendurchsatzes wurden 30 min Extraktionsdauer für die weiteren Untersuchungen gewählt.

- Eintauchzeit in die PDAM-Lösung

Das Eintauchen der Faser in die Lösung erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 25°C) für 5, 10 bzw. 15 min. Die anschließende Extraktion fand für 30 min bei 90°C statt. 200 µl Serum waren wiederum mit 2 µg der Analyten dotiert. Wie Abbildung 60 zeigt, konnte zwischen den hier untersuchten 5 und 15 min jeweils ein geringer Anstieg der Ausbeuten verzeichnet werden. Je länger die Faser in die Lösung eintaucht, desto mehr PDAM wird aufgrund der zeitabhängigen Gleichgewichtseinstellung adsorbiert und steht somit für die Derivatisierung zur Verfügung.

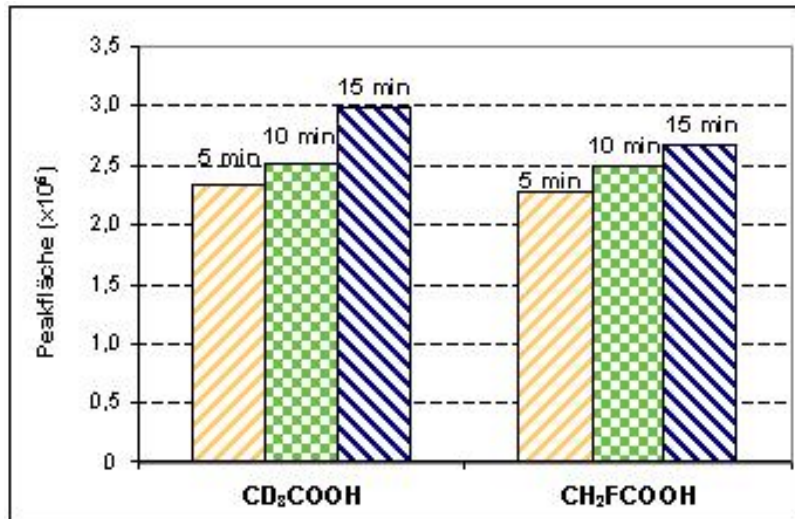


Abbildung 60: Einfluss der Eintauchzeit der Faser in die Pyrenyldiazomethan-Lösung (2,5 mg/ml) vor der Extraktion. Je 2 µg Monofluoressigsäure und D₃-Essigsäure in 200 µl Serum. HS-SPME-Bedingungen: 30 min, 90°C, 150 U/min.

- Einfluss der Probenmatrix

Zu diesem Zweck wurden 20, 50, 100, 200 bzw. 500 µl Serum so dotiert, dass jeweils eine Konzentration der Analyten von 1 µg/ml Serum vorlag. Die Volumendifferenz wurde durch entsprechende H₂SO₄-Zugabe ausgeglichen. Die HS-SPME wurde für 30 min bei 90°C nach 15 min Eintauchzeit der Faser in die PDAM-Lösung durchgeführt. Abbildung 61 stellt die Peakflächen den Probevolumina gegenüber. Idealerweise wäre ein linearer Anstieg mit steigender Absolutmasse zu erwarten. Das ist aber nur bis etwa 100 µl der Fall. Danach wächst die Peakfläche deutlich weniger als proportional mit der Probenmenge. Deshalb wurden 200 µl als geeignetes Probenvolumen angesehen.

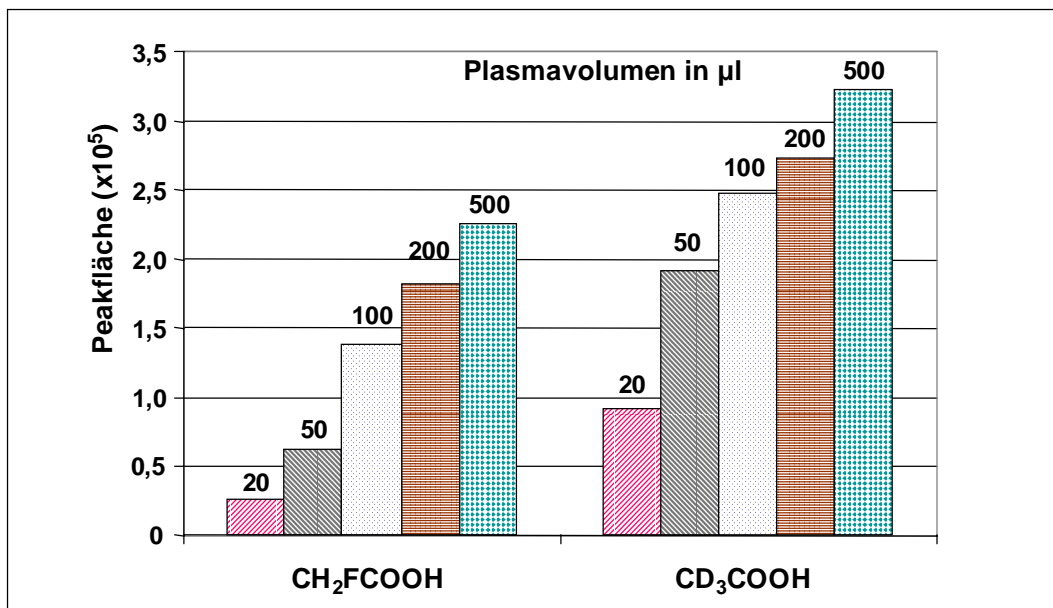


Abbildung 61: Einfluss der Probenmenge (Serum) auf die GC-MS-Peakflächen bei gleicher Analytenkonzentration (je 1 µg/ml).

- Aufarbeitung dotierter Matrices

Die Optimierungsschritte führten zu einer Methode, die dann in Ermangelung realer Proben auf dotierte Serum-, Leichenblut-, Urin-, Mageninhalt- und Nierenproben angewendet wurde. Bei Serum- und postmortalen Blutproben wurden, wie oben als zweckmäßig beschrieben, je 200 µl eingesetzt. Abbildung 62 zeigt Ionenspuren des SIM-Chromatogramms einer mit 0,5 µg/ml dotierten Serumprobe.

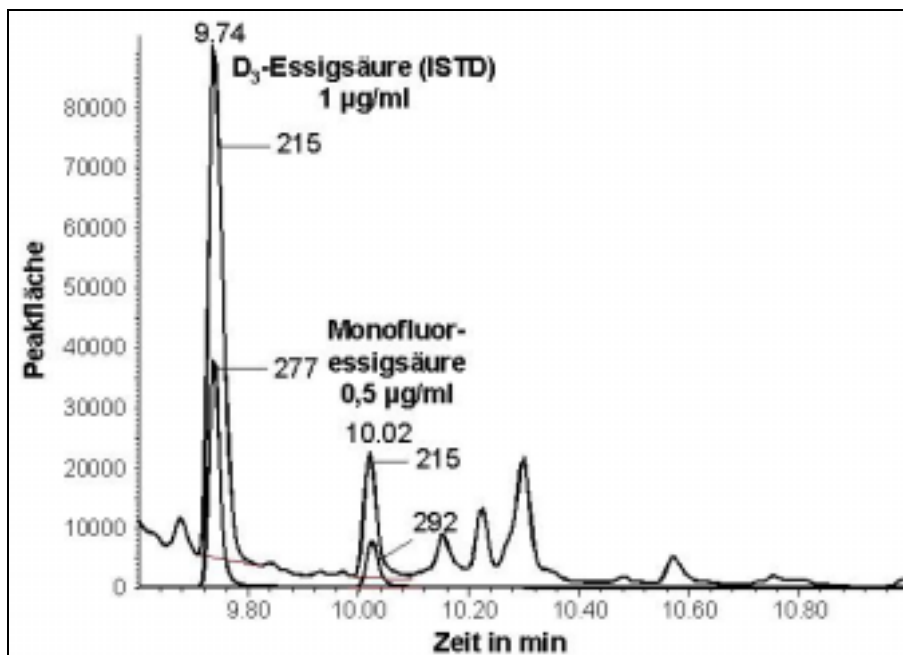


Abbildung 62: Ionenspuren aus dem SIM-Chromatogramm einer dotierten Serumprobe. Eingesetztes Volumen: 200 µl, HS-SPME: 15 min Eintauchzeit in PDAM-Lösung, 30 min bei 90°C Adsorption.

Die Ionenspuren der Molmassen (277 und 292) sind nahezu rauschfrei, die von $m/z = 215$, die vom Pyrenylmethylkation herrührt, zeigt dagegen ein deutliches Grundrauschen.

Eine Reihe überprüfter Proben zeigte bei Abwesenheit des Giftes keine matrixbedingten Störeffekte.

- Kalibrierung, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit

Die Kalibrierung für Monofluoressigsäure wurde mit dem optimierten Verfahren mit neun Konzentrationen zwischen 0,02 und 5,0 µg/ml Serum bei 200 µl Probeneinsatz in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierfunktion ist in Abbildung 63 dargestellt.

Die Nachweisgrenze für die Bestimmung aus Serumproben wurde mit 0,02 µg/ml, die Bestimmungsgrenze mit 0,07 µg/ml ermittelt. Eine Kalibrierung für die anderen Matrices erfolgte nicht. Die Reproduzierbarkeit lag im Rahmen der bei den anderen HS-SPME-Bestimmungen erhaltenen Werte. So betrug der Variationskoeffizient innerhalb einer Serie von 16 Proben für Monofluoressigsäure bei einer Konzentration von 1 µg/ml 10,6%.

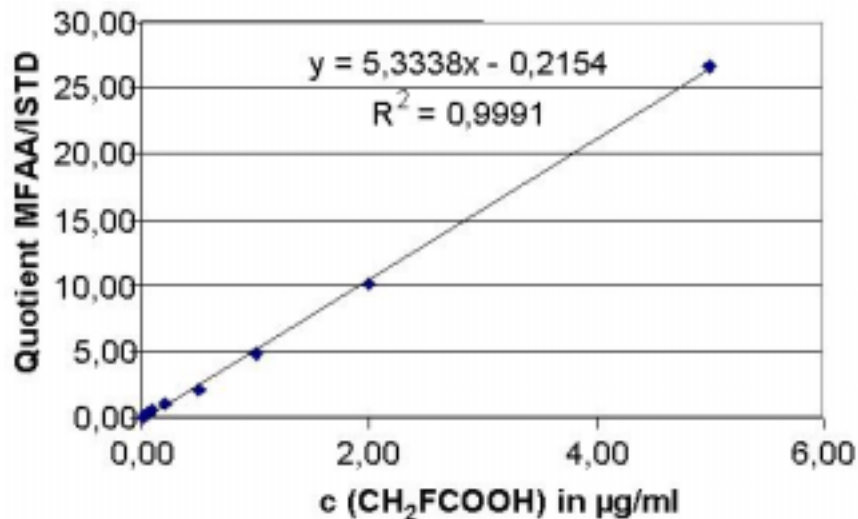


Abbildung 63: Kalibriergerade und –funktion für Monofluoressigsäure (MFAA) aus dotiertem Serum. Konzentrationsbereich: 0,02-5,0 µg/ml, n = 2. Interner Standard: 200 ng D₃-Essigsäure.

Bei den anderen Asservaten wurden wegen der bei realen Proben zu erwartenden deutlich höheren Konzentrationen für Urin und Mageninhalt nur je 20 µl bzw. bei Nierenproben ausgehend von 1 g Probe 200 µl des nach Abschnitt 4.4.8 aufgearbeiteten Homogenisatextraktes gewählt. Für diese Matrices fand allerdings keine Optimierung statt. Die Messungen erfolgten bei Konzentrationen von 40 µg/ml für Urin, 20 µg/ml für Mageninhalt bzw. 20 µg/g für Niere. Die dabei erzielte Empfindlichkeit liegt um jeweils ca. zwei Zehnerpotenzen über der geschätzten Nachweisgrenze.

Bei einer tödlichen Vergiftung wurden nach Literaturangaben Konzentrationen von 368 µg/ml Urin, 12 µg/ml Mageninhalt und 65 µg/g Niere bestimmt [186].

Die Empfindlichkeit der Methode ist somit für die bei einer Vergiftung zu erwartenden Konzentrationen ausreichend.

5.4.2 Valproinsäure

5.4.2.1 Allgemeines

Valproinsäure (2-Propylpentansäure) ist ein häufig eingesetztes Antiepileptikum. Es wirkt auf spannungsabhängige Na⁺-Kanäle und hemmt so die Erregbarkeit von Neuronen im Großhirn. Die tägliche Dosis liegt zwischen 250 und 2500 mg, woraus sehr hohe Plasmaspiegel von 50-100 µg/ml im therapeutischen Bereich resultieren [238]. Die Halbwertszeit liegt bei 8-12 h. Überdosierungen können zu Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit und Schwächegefühl sowie zu Schädigungen der Bauchspeicheldrüse und der Leber bis hin zum Koma führen [186].

Der pK_S-Wert der Valproinsäure beträgt 4,8, der Siedepunkt liegt bei 120-121°C (1,9 kPa) [181].

5.4.2.2 Analytik

Der Nachweis der Valproinsäure erfolgt meist nach Flüssig/Flüssig-Extraktion mit oder ohne Derivatisierung mittels GC-FID oder GC-MS [239;240], aber auch HPLC-Verfahren mit Nachsäulenderivatisierung und Photodiodenarray- und Fluoreszenz-Detektion sind beschrieben [241;242]. Ein Immunoassay steht ebenfalls zur Verfügung. Eine Bestimmung mittels SPME durch direktes Eintauchen in ein von Proteinen befreites Plasmadialysat und anschließende GC-MS-Bestimmung wurde von Krogh et al. vorgestellt [243].

Für die in einem toxikologischen Labor zu untersuchenden Proben ist ein spezifisches Immunoassay wegen der Vielzahl der möglichen Analyten und der nur kurzen Haltbarkeit der Reagenzien unökonomisch. Eine schnelle Bestimmung sollte gerade in Akutfällen trotzdem immer möglich sein. Eine HPLC-UV oder HPLC-DAD-Bestimmung ist wegen der fehlenden UV-Absorption ohne Derivatisierung nicht möglich. Bei den herkömmlichen GC-Verfahren bestand die Gefahr von Abdampfverlusten nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Die HS-SPME sollte hingegen wegen des relativ niedrigen Siedepunktes und der hohen Lipophilie der Valproinsäure gut für den Nachweis geeignet sein.

Als Untersuchungsmedien wurden Blut-, Urin- und Mageninhaltproben verwendet. Für die Extraktion wurden aufgrund der hohen Plasmakonzentrationen nur 20 µl Blut bzw.- Serum eingesetzt. Bei Urin und Mageninhalt waren jeweils 5 µl ausreichend. Die HS-SPME erfolgte nach der in Abschnitt 4.4.7 beschriebenen Methode bei 60°C für 15 min bei einem pH-Wert von 2,3 mit einer PDMS/DVB-Faser.

Das Massenspektrum der Valproinsäure und die Strukturformel sind in Abbildung 64 dargestellt. Die Fragmentationen m/z 73, 102 und 115 wurden für die SIM-Methode ausgewählt.

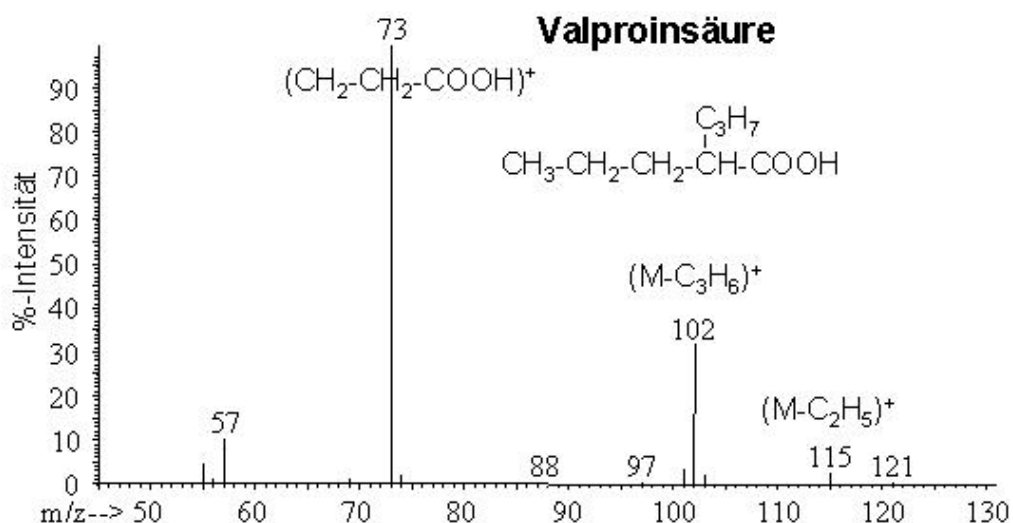


Abbildung 64: EI-Massenspektrum und Strukturformel von Valproinsäure.

Eine Optimierung der Methode wurde nicht durchgeführt, da bei den Bedingungen eine Emp-

findlichkeit bis weit unter den therapeutischen Bereich erzielt wurde. Die Quantifizierung bei praktischen Fällen erfolgte mit Trichlorethanol als internem Standard meist nach Standardaddition. Zusätzlich wurde in regelmäßigen Abständen eine externe Kalibrierung durchgeführt. Das SIM-Chromatogramm einer Serumprobe zeigt Abbildung 65.

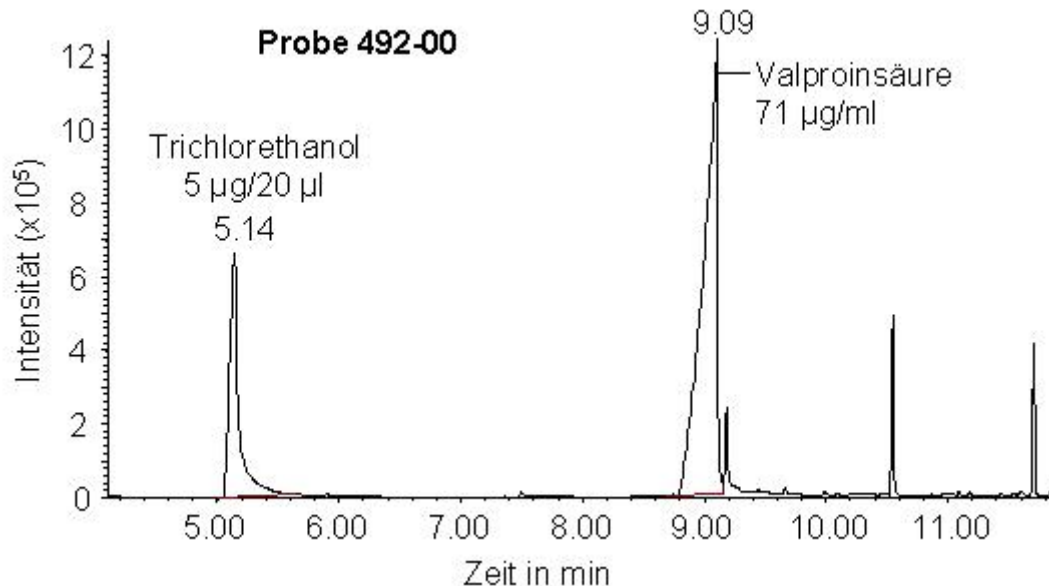


Abbildung 65: SIM-Chromatogramm der Blutprobe 492/00. HS-SPME: 60°C für 15 min, pH 2,3. Valproinsäure-Konzentration: 71 µg/ml, interner Standard Trichlorethanol: 5 µg/20 ml Serum.

Der zur Valproinsäure gehörende Peak zeigt aufgrund der hohen Konzentration ein Fronting, das polarere Trichlorethanol dagegen ein Tailing.

Die Kalibrierung der Valproinsäure wurde mit 5 Konzentrationen zwischen 10 und 250 µg/ml mit je zwei Messungen durchgeführt.

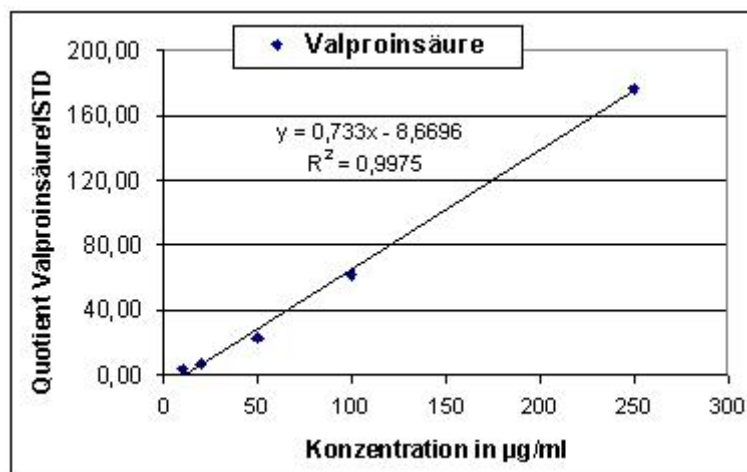


Abbildung 66: Kalibrierfunktion für Valproinsäure bei Konzentrationen von 10, 20, 50, 100 und 250 µg/ml (n = 2). Interner Standard Trichlorethanol: 5 µg/20 µl.

Die Kalibration ist im therapeutischen Bereich linear. Der nichtlineare Verlauf unterhalb von 20 µg/ml hat seine Ursache in der Wahl des internen Standards Trichlorethanol, der bei ho-

hen Valproinsäure-Konzentrationen schlechter an der SPME-Faser adsorbiert wird. Zu vermuten ist ein kleinerer Headspace-Faser-Verteilungskoeffizient. Außerdem deuten die extrem hohen Peakflächen im Chromatogramm auf eine Detektorüberladung. Als interner Standard wären kurzkettige, verzweigte Fettsäuren (z.B. Methylhexansäure) oder deuterierte Valproinsäure besser geeignet.

Der Variationskoeffizient für Valproinsäure lag bei 10 Messungen mit einer Konzentration von 20 µg/ml innerhalb einer Serie bei für die HS-SPME vertretbaren 9,9%. Die relative Wiederfindung aus einer mit 50 µg/ml dotierten 20 µl Serumprobe betrug im Vergleich zu einer Pufferlösung gleicher Konzentration 72% (n = 2). Die Nachweisgrenze lag bei 100 ng/ml und damit weit unter dem für die toxikologische Beurteilung relevanten therapeutischen Bereich ab 50 µg/ml.

5.4.2.3 Nachweis aus klinischen und forensischen Proben

Bei Sektionsfällen wurde bei begründetem Verdacht (Angaben von Verwandten, Arzt oder Polizei) eine Bestimmung der Valproinsäure durchgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmungen und ihre Beurteilung nach den in Abschnitt 5.4.2.1 angegebenen Kriterien sind für vier Beispiele in Tabelle 24 aufgelistet. Das SIM-Chromatogramm der Probe 492/00 zeigt Abbildung 65.

Tabelle 24: Valproinsäure-Konzentrationen im Blut von Sektionsfällen und ihre toxikologische Beurteilung.

Probe	Material	Konzentration in µg/ml	Beurteilung
SN 126/99	Blut	445	> therapeutischer Bereich
SN 226/00	Blut	24	< therapeutischer Bereich
SN 411/00	Blut	56	therapeutischer Bereich
SN 492/00	Blut	71	therapeutischer Bereich

5.4.3 Trichlorethanol

5.4.3.1 Allgemeines

2,2,2-Trichlorethanol ist der wirksame Hauptmetabolit des Chloralhydrats, eines Schlafmittels, das besonders bei der Behandlung von minderschweren Schlafstörungen bei alten Menschen und kleinen Kindern aber auch als Hypnotikum in der Kinderzahnheilkunde zum Einsatz kommt. Es entsteht durch die sehr schnelle Dehydratisierung des Chloralhydrats zum Aldehyd und anschließender Reduktion in den Erythrozyten (Halbwertszeit in Blut $t_{1/2} = 4$

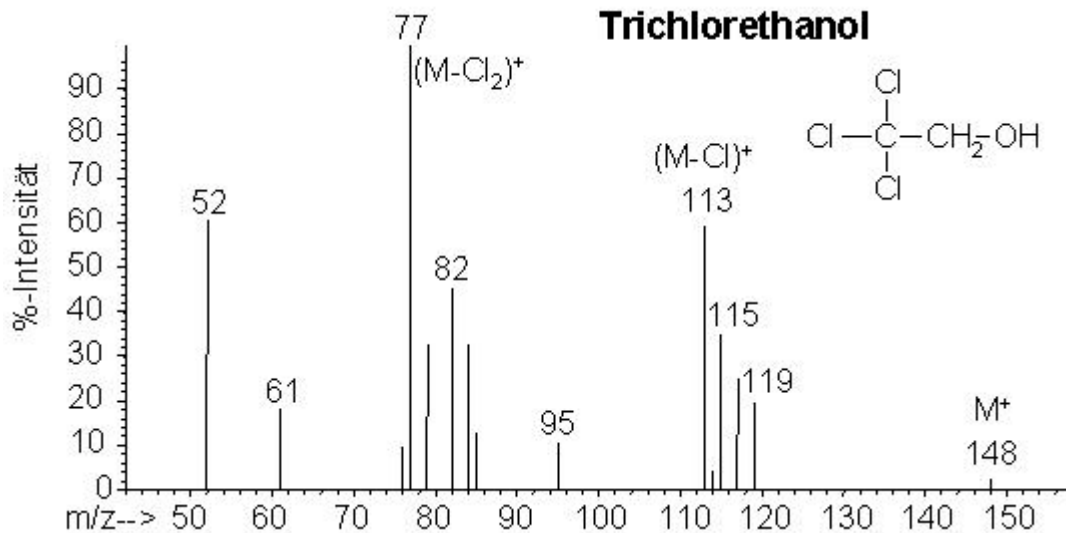
min) und Alkoholdehydrogenasen der Leber [186]. Durch die kurze Halbwertszeit des Chloralhydrats ist dessen Nachweis kaum möglich. Trichlorethanol selbst wird nach Konjugation mit Glucuronsäure über den Harn ausgeschieden. Ein weiterer, aber in geringerem Umfang erfolgender Abbauweg ist die Oxydation des Chloralhydrats zur Trichloressigsäure in Leber und Niere. Übliche orale Dosen sind 0,5-2,0 g [244], die zu therapeutischen Trichlorethanol-Konzentrationen im Blut von 2-12 µg/ml führen [186]. Der toxische Bereich beginnt bei Konzentrationen > 100 µg/ml, der letale bei > 250 µg/ml. Intoxikationen sind durch Atemdepression, Koma, Zuckungen und Herzarrhythmien gekennzeichnet, die auch zum Tod führen können.

5.4.3.2 Analytik

Trichlorethanol besitzt einen Siedepunkt von 50-52°C bei 15 hPa und einen pK_s -Wert von 10,0. [186]. Daher sollte sich Trichlorethanol gut für einen Nachweis mittels HS-SPME eignen. Trotzdem basieren die meisten Bestimmungsmethoden auf Flüssig/Flüssig-Extraktionen der Blutproben mit anschließender Derivatisierung und GC-MS bzw. GC-ECD-Bestimmung. Meyer et al. und Gorecki et al. extrahierten die homogenisierten und angesäuerten Proben mit Diethylether und derivatisierten die Trichloressigsäure mit Diazomethan, bevor die GC-ECD-Bestimmung durchgeführt wurde [220;245]. Eine weitere GC-ECD-Methode stammt von Humbert et al., die Trichlorethanol und Trichloressigsäure nach Diethyletherextraktion mit 3-Methyl-1-tolyltriazol methylierten [246]. Yan et al. wiesen Trichlorethanol und die weiteren Metaboliten Trichlor-, Dichlor- und Monochloressigsäure nach extraktiver Methylierung mit einem Bortrifluorid-Methanol-Gemisch mittels GC-MS nach [247]. Dem älteren spektrometrischen Nachweis von Chloralhydrat liegt die Bestimmung des Metaboliten Trichloressigsäure durch die Fujiwara-Reaktion zugrunde, bei der halogenierte, vorzugsweise chlorierte Kohlenwasserstoffe mit Pyridin und Natriumhydroxid eine Farbreaktion eingehen, bei der gelb bis tiefrote Produkte entstehen, die photometrisch bestimmt werden können. Da die Färbungen von verschiedenen Verbindungen herrühren können, ist die Methode nicht zur sicheren Identifizierung geeignet.

Eine HS-SPME-Bestimmung von Trichlorethanol wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben.

Die hier entwickelte Methode ist hauptsächlich für den Einsatz bei forensischen Bestimmungen oder akuten toxikologischen Bereitschaftsfällen vorgesehen. Dabei wurden die auch schon für die Valproinsäure verwendeten Extraktionsbedingungen gewählt (siehe Abschnitte 4.4.7 und 5.4.2.2). Eine weitere Optimierung wurde nicht durchgeführt. Das EI-Massenspektrum und die Strukturformel sind in Abbildung 67 dargestellt. Für die Quantifizierung im SIM-Modus wurden die Ionen m/z 77, 82, 113, 115 und 148 ausgewählt. Bei Blut-, Urin- und Mageninhaltproben wurden 10 µl zur Analyse eingesetzt.



Die Quantifizierung erfolgte nach Standardaddition von 0,5 µg Trichlorethanol zu 10 µl Probe mit Valproinsäure als internem Standard. Eine externe Kalibration erfolgte in regelmäßigen Abständen. Abbildung 68 zeigt eine solche Kalibrierung mit fünf Messpunkten zwischen 2,0 und 250 µg/ml. Die Linearität war über den gesamten Bereich gegeben.

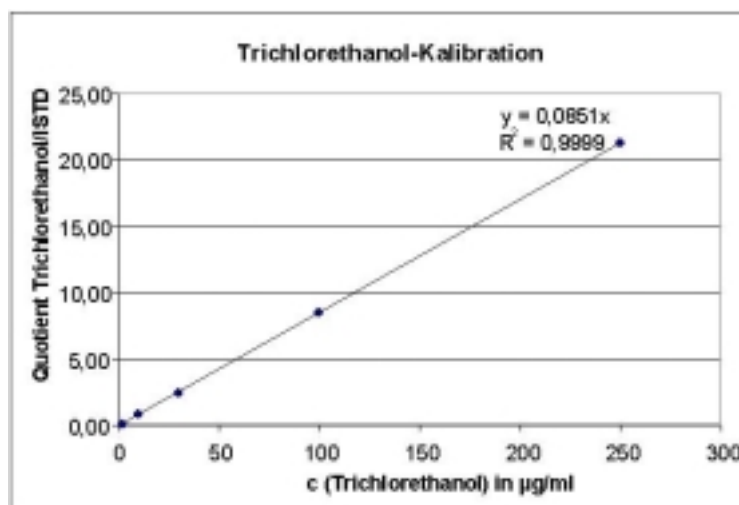


Abbildung 68: Kalibrierfunktion für Trichlorethanol bei Konzentrationen von 2, 10, 30, 100 und 250 µg/ml (n = 2). Interner Standard Valproinsäure: 0,2 µg/10 µl.

Trichlorethanol konnte aus einer Blutprobe mit einer Konzentration von 10 µg/ml im Vergleich zu einer gleich konzentrierten Pufferlösung mit 110% wiedergefunden werden (n = 3). Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen für Trichlorethanol betrug innerhalb einer Serie von 6 Messungen bei 10 µg/ml 7,1%. Die Nachweisgrenze von 0,3 µg/ml und die Bestimmungsgrenze von 1 µg/ml waren für den Anwendungszweck völlig ausreichend.

Eine zusätzliche Kalibrierung für Urin und Mageninhalt wurde nicht durchgeführt, da die toxikologische Aussagekraft quantitativer Werte bei diesen Matrices nur sehr gering ist. Die Quantifizierung erfolgte hier nur durch Standardaddition.

5.4.3.3 Nachweis aus klinischen und forensischen Proben

In Tabelle 25 sind die bei Sektionsfällen oder akuten Bestimmungen für die Klinik erhaltenen Konzentrationen aufgelistet. Die Beurteilung erfolgte nach den in Abschnitt 5.4.3.1 angegebenen Konzentrationsbereichen für Blutproben.

Tabelle 25: Konzentration von Trichlorethanol in verschiedenen Matrices und deren Beurteilung.

Probe	Material	Konzentration in µg/ml	Beurteilung
Z 1884/97	Blut	22,4	> therapeutischer Bereich
SN 341/99	Blut	244	Letaler Bereich
	Urin	106	
	Mageninhalt	1400	
Z 2225/99	Blut	19	> therapeutischer Bereich
SN 538/99	Blut	6,5	therapeutischer Bereich
	Mageninhalt	2,1	
Z 1089/00	Blut	8,2	therapeutischer Bereich

Das SIM-Chromatogramm einer Blutprobe des Sektionsfalls 341/99 ist in Abbildung 69 dargestellt.

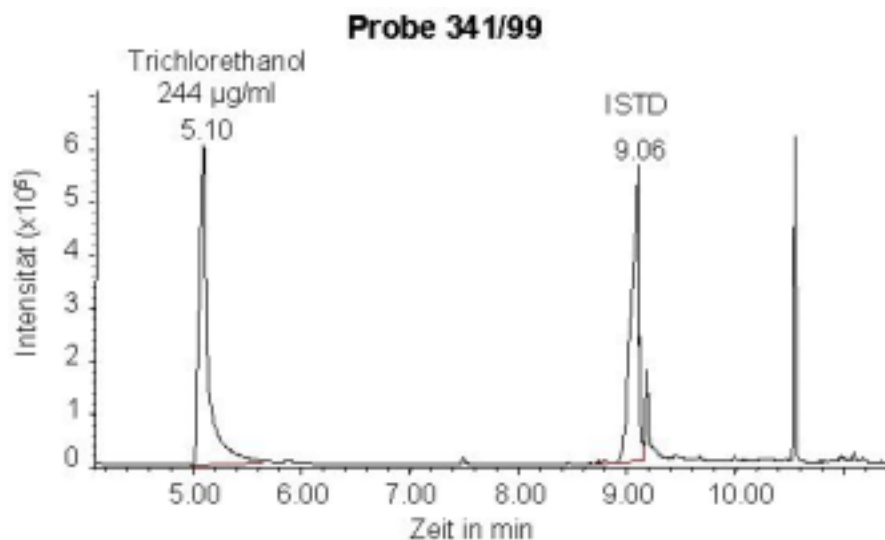


Abbildung 69: SIM-Chromatogramm einer positiven Trichlorethanol-Blutprobe (10 µl). HS-SPME: 15 min bei 60°C an PDMS/DVB.

Wenngleich bei der hier vorgestellten Methode nur die Bestimmung des Trichlorethanol möglich war, während das applizierte Chloralhydrat und der zweite Hauptmetabolit Trichlor-essigsäure unberücksichtigt bleiben, so ist diese Methode gerade wegen ihrer schnellen und unkomplizierten Durchführbarkeit in der klinischen Toxikologie eine ausgezeichnete Alternative.

6 Schlussfolgerungen

Die Festphasenmikroextraktion hat als neue Probenaufarbeitungsmethode in den letzten Jahren steigendes Interesse und rapide zunehmende Anwendungen auf den verschiedensten Gebieten der Analytik organischer Verbindungen gefunden. Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Beitrag zur Erschließung der Headspace-Variante des Verfahrens für forensische und toxikologische Fragestellungen, insbesondere für die Haaranalytik, zu leisten. Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die Headspace-Festphasenmikroextraktion ermöglicht eine schnelle, saubere und lösungsmittelfreie Probenaufarbeitung. In Kombination mit der GC-MS lassen sich vorzugsweise lipophile Substanzen qualitativ und quantitativ mit hervorragender Sensitivität und extrem geringer Matrixbelastung nachweisen. Überraschenderweise lassen sich auch relativ schwerflüchtige Wirkstoffe mit Molekulargewichten über 300 Dalton und Siedepunkten bis oberhalb von 300°C über dem Dampfraum mit guter Ausbeute anreichern.
- Durch Kombination von alkalischer Hydrolyse und HS-SPME in einem Einstufenprozess können viele wichtige im Basischen stabile Wirkstoffe wie Lidocain, Methadon, tricyclische Antidepressiva, Diphenhydramin, Ketamin u.a. sehr empfindlich bestimmt werden. Die Nachweisgrenzen sind mit 0,01-0,1 ng/mg Haar mit den nach herkömmlichen Extraktionsverfahren wie Flüssig/Flüssig- und Festphasenextraktion erhaltenen vergleichbar.
- Die Anzahl der durch HS-SPME und GC-MS bei der Haaranalyse erfassten Wirkstoffe kann durch Kopplung mit Derivatisierungsschritten erheblich erweitert werden. Insbesondere lassen sich so auch die N-Desmethyl-Metaboliten einbeziehen.
- Die *In Sample* Derivatisierung direkt im Haarhydrolysat mit Alkylchloroformiaten stellt eine außerordentlich schnelle und praktikable Möglichkeit zur Erfassung der primären und sekundären Amine und der Desmethyl-Metaboliten dar. Je nach Molekülgröße und chromatographischem Verhalten können Butylchloroformiat, z.B. für die Gruppe der Amphetamine, oder aber Methylchloroformiat für Substanzen mit höherem Molekulargewicht, wie z.B. tricyclische Antidepressiva, eingesetzt werden.
- Mit der *On Fiber* Derivatisierung mittels MBTFA konnte eine weitere schnelle und vollständige Umsetzungsmöglichkeit erfolgreich eingeführt werden. Bei der automatisierten Extraktion und Derivatisierung mit MBTFA muss ein Kompromiss zwischen HS-Extraktionsausbeute (möglichst hohe Temperatur) und Flüchtigkeit der Derivate nach Umsetzung mit MBTFA (Desorptionsgefahr) eingegangen werden.
- Durch ein vorheriges Beladen der SPME-Faser mit dem Derivatisierungsreagenz 1-Pyrenyldiazomethan ließ sich durch HS-SPME und *On Fiber* Derivatisierung die mit Stan-

dardverfahren schwer nachweisbare Monofluoressigsäure aus Blut-, Urin-, Mageninhalt- und Organproben mit ausreichender Sensitivität im ng/ml Bereich bestimmen.

- Die Verwendung interner Standards erwies sich bei allen Bestimmungen als unerlässlich, was insbesondere auf die zunächst manuell durchgeführte Extraktion im Rahmen der Lidocainstudie, aber ebenso auf die zu derivatisierenden Substanzen zutraf. Da der Einfluss der Matrix sich auf die verschiedenen Substanzen sehr unterschiedlich auswirkt, sollte nach Möglichkeit auf deuterierte Standards zurückgegriffen werden. Auch bei gleichzeitiger Bestimmung von strukturell sehr ähnlichen Metaboliten und Ausgangssubstanz kann daher die Verwendung mehrerer interner Standards notwendig sein.
- Die Automatisierung der HS-SPME-Durchführung mit Hilfe des Autosamplers MPS2 war entscheidend für einen hohen Probendurchsatz bei den zur Optimierung notwendigen zahlreichen Messungen, für gute Reproduzierbarkeiten durch exakte Einstellung der einzelnen Parameter und für eine deutlich verlängerte Einsatzdauer der SPME-Fasern. Einen weiteren Vorteil stellte die durch die Steuerungssoftware ermöglichte Kombination der Derivatisierung vor der Extraktion (bei der Umsetzung der Monofluoressigsäure mit Pyrenyldiazomethan) und nach der Extraktion (Trifluoracetylierung der Amphetamine mit MBTFA) dar, so dass eine vollautomatische Arbeitsweise von der Hydrolyse der Haarprobe bis zur Desorption im GC-Injektor möglich war.
- Bei der Analytik der meisten Drogen- und Medikamentenwirkstoffe erwies sich eine Probenmenge von 10 mg Haar als Optimum. Ein Einsatz größerer Probenmengen führt nicht in jedem Fall zu der erwarteten Empfindlichkeitssteigerung. Als Ursache hierfür sind die geringe Faserkapazität infolge der kleinen Oberfläche, zahlreiche konkurrierende Verbindungen aus den biologischen Matrices, die zunehmende Viskosität der Lösung bei größerer Probenmenge und die Tenseigenschaften von Matrixprodukten anzusehen.
- Der erstmalige, sensitive Nachweis der Fettsäureethylester als Alkoholismarker im Haar wurde erst durch den Einsatz der HS-SPME möglich. Die entwickelte Methode stellt im Vergleich zu der von Bernhardt et al. [218] mittels kombinierter LLE und anschließender SPE durchgeführten Bestimmung eine deutliche Zeitersparnis und einen erheblichen Empfindlichkeitsgewinn dar, wie er für Konzentrationen im vorgefundenen pg/mg bzw. unteren ng/mg Bereich notwendig ist. Als interne Standards sollten in dem Fall immer die entsprechenden deuterierten Standards dienen, die sich unkompliziert aus den Reinsubstanzen synthetisieren lassen. Die bisher gefundenen Konzentrationen der FSEE lassen eine Unterscheidbarkeit zwischen Abstinenzlern, Gelegenheitstrinkern und Alkoholikern zu.
- Der Einsatz der HS-SPME ermöglicht wie im Fall der Valproinsäure und des Trichlorethanols einen für die Notfalldiagnostik nötigen schnellen und unkomplizierten Nachweis.

Die HS-SPME schließt in diesem Zusammenhang eine analytische Lücke zwischen herkömmlicher Headspace-GC (geringe Empfindlichkeit und extrem lange Retentionszeit an einer für die Alkoholbestimmung vorgesehenen Standardchromatographiesäule für größere Moleküle wie z.B. Valproinsäure) und den Probenaufarbeitungsmethoden für die HPLC und GC-MS (hohe Flüchtigkeit beim Eindampfen, fehlende UV-Absorption).

- Ein wesentlicher Nachteil, der einem noch breiteren Einsatz der HS-SPME in der Routineanalytik im Wege steht, ist die begrenzte bzw. Nichteignung für sehr polare Substanzen, die einen zu geringen Dampfdruck, Extraktions- und Chromatographieprobleme mit sich bringen. Da auch nicht alle Derivatisierungsreagenzien problemlos einsetzbar sind (Hydrolyseempfindlichkeit, Acidität, z.T. Reaktion mit der SPME-Faser), ist eine wünschenswerte breite Screeningmethode für Drogen- und Medikamentenwirkstoffe derzeit nicht realisierbar.
- Die SPME-Fasern unterscheiden sich derzeit noch deutlich in ihrer mechanischen und chemischen Stabilität. Waren mit einem Einsatz einer PDMS-DVB-Faser bei der Analyse der FSEE mit Hilfe des MPS 2 Autosamplers bis zu 200 Analysen möglich, so waren es mit der im manuellen Modus durchgeführten Extraktion mit einer Carbowax-DVB-Faser (z.B. bei Lidocain) nur 20-50 Analysen.

7 Zusammenfassung

Die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie stellt eine zeit- und lösungsmittelsparende Alternative bzw. Ergänzung zu den herkömmlichen Extraktionsverfahren wie Flüssig/Flüssig- und Festphasenextraktion dar. In der vorliegenden Arbeit wurde ihre Anwendbarkeit für den Nachweis toxikologisch und forensisch relevanter Analyten untersucht. Schwerpunkt dabei war die Bestimmung aus Haarproben.

Das Prinzip der HS-SPME beruht auf der Anreicherung der zu analysierenden Substanz aus dem Dampfraum über der Probe an einer mit geeigneter Polymerschicht bedeckten ca. 0,3 mm dicken und 1,5 cm langen Quarzfaser und der anschließenden schnellen Desorption im Injektor des GC-MS-Gerätes. Als physikalisch-chemische Grundlagen dieser Methode wurden die Verteilungsgleichgewichte zwischen den drei Phasen Probe, Dampfraum und Faserschicht und die kinetischen Teilschritte dargelegt und auf dieser Basis als Einflussgrößen zur Erzielung erhöhter Extraktionsausbeuten die Temperatur, die Fasereigenschaft, die Lipophilie und Säure-Base-Eigenschaften des Analyten, der pH-Wert der Probe, das Probenvolumen und Durchführung der Derivatisierung des Analyten behandelt.

Es wurden die morphologischen und physiologischen Grundlagen der Haaranalytik erläutert und etablierte Extraktions- und Nachweismöglichkeiten in der Haaranalytik vorgestellt.

In einer Literaturübersicht wurde gezeigt, dass bisherige Publikationen zur Anwendung der SPME in der toxikologischen Analyse sich im wesentlichen auf die Untersuchung von Blut- und Urinproben beschränken, wobei für Wirkstoffe mit geringer Flüchtigkeit die Adsorption direkt aus der flüssigen Probe bevorzugt wird. Jedoch sind auch einige HS-SPME-Anwendungen in der Haaranalytik beschrieben.

Die Untersuchungen wurden mittels Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie an zwei Quadrupol-Geräten durchgeführt, wobei eines mit dem Mehrzweckprobengeber MPS 2 ausgestattet war. Je nach Flüchtigkeit und Polarität der Analyten wurde eine Vorauswahl über den Einsatz geeigneter SPME-Faser getroffen. Für die meisten untersuchten Substanzen erfolgte eine Optimierung der Einflussgrößen Extraktionstemperatur und -zeit, Extraktionsgemisch und Matrixmenge zur Erzielung optimaler Extraktionsausbeuten. Es wurden Kalibrierungen und z.T. Stabilitätsuntersuchungen von Derivaten durchgeführt, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie Reproduzierbarkeiten und Extraktionsausbeuten ermittelt.

Ein Untersuchungsschwerpunkt war die HS-SPME aus vollständig hydrolysiertem Haar, wie es nach der thermischen Behandlung mit 1 M NaOH erhalten wird. In orientierenden Versuchen wurde für eine Reihe lipophiler, basenstabiler Drogen- und Medikamentenwirkstoffe

mit stark differierenden Siedepunkten wie z.B. Nicotin, Ketamin, Phencyclidin, Tramadol, Diphenhydramin, Methadon und Amitriptylin die Nachweisbarkeit aus dotierten Haarproben mit einer 85 µm Polyacrylat-Faser für 15 min bei 70°C überprüft. Dabei zeigte sich, dass neben der Molekülgröße vor allem die Lipophilie des Analyten eine entscheidende Voraussetzung für ausreichende Extraktionsausbeuten ist. Der erniedrigende Einfluss der Haarmatrix bei gleicher Absolutmenge der Substanzen im Hydrolysat erwies sich für die meisten Analyten als ein wesentlicher Faktor bei der Erlangung optimaler Extraktionsbedingungen. Eine Probenmenge von 10 mg Haar stellte im allgemeinen einen praktikablen Kompromiss zwischen Sensitivität und Extraktionsausbeute dar. Da diese Einflüsse der Haarmatrix auf die Höhe des GC-MS-Signals von Substanz zu Substanz sehr unterschiedlich sind, hat die Wahl eines geeigneten internen Standards entscheidende Bedeutung für eine genaue Quantifizierung. Deuterierte Standards erwiesen sich als am besten geeignet.

Am Beispiel des Lokalanästhetikums Lidocain, welches im Zeitraum 1997-1998 gehäuft bei Todesfällen des Sektionsgutes auftrat, wurde eine Methodenoptimierung im manuellen Modus durchgeführt. Nach Auflösung der Haarprobe in 1 ml 1 M NaOH und unter Zusatz von 10 ng Ethylbenzhydramin als internen Standard wurde Lidocain durch HS-SPME für 15 min bei 70°C an einer Carbowax/DVB-Faser im Haar von 49 Drogentodesfällen bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 0,4 bis 675 ng/mg Haar gemessen. Die Methode erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng/mg als ausreichend sensitiv. Ein Vergleich mit den anderen Drogen ergab, dass Lidocain meist als Streckmittel von Cocainzubereitungen aufgenommen worden war.

Durch Kombination von alkalischem Haaraufschluss und HS-SPME in einem Schritt wurden auch der Heroinsubstitutionswirkstoff Methadon und seine Metaboliten EDDP und EMDP mittels vollautomatisierter HS-SPME mit dem Autosampler MPS2 von Gerstel an einer PDMS/DVB-Faser nach Methodenoptimierung in Haarproben von 26 Drogentodesfällen zwischen 0,9 und 11,8 ng/mg Haar nachgewiesen. Der Metabolit EMDP konnte dabei zum ersten Mal im Haar bestimmt werden.

Zur Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten der HS-SPME in der toxikologischen Analytik wurden Derivatisierungsverfahren für polare Wirkstoffe bzw. Wirkstoffmetaboliten untersucht werden. Dabei wurden drei verschiedene Wege aufgezeigt und auf klinische oder forensische Proben angewendet.

Die *on-fiber* Derivatisierung wurde nach Extraktion der Analyten aus einem Haarhydrolysat bei 80°C über N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) am Beispiel der Amphetamine und Ecstasywirkstoffe sowie des Antiparkinsonwirkstoffes Amantadin durchgeführt. Die erzielten Nachweisgrenzen von 0,02-0,04 ng/mg Haar waren mit den nach herkömmlicher SPE erhaltenen vergleichbar.

Die *in sample* Derivatisierung mit Alkylchloroformiaten direkt im Haarhydrolysat bei Raumtemperatur erfolgte zur Bestimmung von Antidepressiva bzw. ihrer Metaboliten mit n-Methylchloroformiat. Die entstandenen Carbamat-Derivate ließen sich mit ausreichender Empfindlichkeit nachweisen und waren im Hydrolysat sowie im GC-Injektor stabil. Als weiteres Beispiel für die *in sample* Derivatisierung wurden Amphetamine und Ecstasywirkstoffe mit n-Butylchloroformiat umgesetzt. Die Nachweisgrenzen entsprachen in etwa denen nach *on fiber* Derivatisierung mit MBTFA.

Als dritte Möglichkeit der Derivatisierung wurde die Umsetzung der stark toxischen Monofluoroesigsäure an einer mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM) beladenen PDMS/DVB/Carboxen-Faser aus Blut, Urin, Mageninhalt und Niere durchgeführt. Die nach der Headspace-Extraktion aus der mit Schwefelsäure angesäuerten Probenlösung und der *on fiber* Derivatisierung entstehenden Pyrenylmethylester ließen sich massenspektrometrisch mit einer Nachweisgrenze von 0,02 µg/ml analysieren.

Der Einsatz der HS-SPME ermöglichte den erstmaligen Nachweis der Fettsäureethylester (FSEE) Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat aus Haaren. Diese Marker für chronischen Alkoholkonsum konnten nach Lösungsmittelextraktion aus 50 mg Haar mit einem Dimethylsulfoxid/n-Hexan-Gemisch aus dem Extraktionsrückstand durch HS-SPME an einer PDMS/DVB-Faser für 30 min bei 100°C mit Gesamtkonzentrationen der vier Ester zwischen 0,81 und 26,9 ng/mg für Alkoholiker nachgewiesen werden. Als interne Standards wurden die entsprechenden deuterierten FSEE eingesetzt. Die Nachweisgrenzen für diese Bestimmung lagen zwischen 0,01 und 0,04 ng/mg bei absoluten Extraktionsausbeuten bis zu 18%. Eine Unterscheidung zwischen Abstinenzlern, Gelegenheitstrinkern und Alkoholikern scheint nach ersten Analysen von Haarproben der entsprechenden Gruppen möglich. Für den Einsatz in der Praxis muss das aber in fortführenden Untersuchungen bestätigt und vertieft werden.

Für die klinische und forensische Toxikologie ergaben sich durch die HS-SPME weitere Anwendungsmöglichkeiten für den schnellen und routinemäßigen Nachweis des Antiepileptikums Valproinsäure und des Chloralhydrat-Metaboliten Trichlorethanol aus Blutproben mit Nachweisgrenzen unterhalb des jeweiligen therapeutischen Bereichs.

Die HS-SPME erwies sich bei den untersuchten Substanzen als eine schnelle, unkomplizierte und preiswerte Alternative zu den herkömmlichen Extraktionsverfahren. Sie konnte aber auch völlig neue Möglichkeiten, wie den Nachweis der FSEE als Alkoholismarker im Haar, aufzeigen. Sie kann somit das analytische Spektrum erweitern und dem Toxikologen helfen, analytische Lücken in seinem Untersuchungsspektrum zu schließen. Die Durchführung der HS-SPME mit einem Autosampler erweitert deren Anwendungsmöglichkeiten, führt zu besseren Reproduzierbarkeiten der Methoden und erhöht die Lebensdauer einer SPME-

Faser deutlich. Die SPME kann aber die etablierten Extraktionsmethoden bislang nicht völlig ersetzen, da ihre Anwendbarkeit durch geringe Kapazität der Faser, Probleme durch die Probenmatrix bei direkter Extraktion oder aber durch hohe Siedepunkte und Polarität vieler Analyten bei der Dampfraumextraktion eingeschränkt wird.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Kidwell DA, Black DL. Environmental exposure - the stumbling block of hair testing. In: *Drug Testing in Hair* Herausgeber: Kintz P, Boca Raton, USA: CRC Press, Inc., 1996: 17-68.
- [2] Sachs H, Kintz P. Testing for drugs in hair. Critical review on chromatographic procedures since 1992. *J.Chromatogr.B* 1998; **713**:147-161.
- [3] Arthur C, Potter D, Buchholz K, Motlagh S, Pawliszyn J. Solid-phase microextraction for the direct analysis of water. Theory and practice. *LC-GC* 1992; **10**:656-661.
- [4] Arthur C, Potter D, Lim M, Motlagh S, Killam L, Pawliszyn J. Analysis of substituted benzene compounds in groundwater using spme. *J.Env.Sci.Technol.* 2000; **26** :979-983.
- [5] Buchholz K, Pawliszyn J. Determination of phenols by spme and gc analysis. *J.Env.Sci.Technol.* 1993; **27**:2844-2848.
- [6] Eisert R, Levsen K. Determination of organophosphorus, triazine, and 2,6-dinitroaniline pesticides in aqueous samples via SPME and GC with NPD-detection. *Fresenius J.Anal.Chem.* 1995; **351**:555-562.
- [7] Hawthorne S, Miller D, Arthur C, Pawliszyn J. Solventless determination of caffeine in beverages using spme with fused silica fibers. *J.Chromtogr.* 1992; **603**:185-191.
- [8] Page B, Lacroix G. Application of SPME to the headspace gc analysis of halogenated volatiles in selected food. *J.Chromatogr.* 1993; **648**:199-211.
- [9] Kijewski H. *Die forensische Bedeutung der Mineralstoffgehalte in menschlichen Kopffaaren. Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik.* Verlag Schmidt-Römhild, 1993.
- [10] Harada M, Fujiro T, Akagi T. Mercury contamination in human hair at Indian reserves in Canada. *Kumamoto.Med.J.* 1977; **30**:57-64.
- [11] Specht W, Rohner D. Bestimmung von Thalliumspuren in menschlichen Haaren. *Arch.Toxicol.* 1960; **18**:359-367.
- [12] Ziegelmann H. Ein Haar von Napoleon und das Gift der Madame Besnard. *Umschau* 1979; **79**:24-29.
- [13] Baumgartner AM, Jones PF, Baumgartner WA, Black CT. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J.Nucl.Med.* 1979; **20**:748-752.
- [14] Baumgartner WA, Black CT, Jones PF, Bland WH. Radioimmunoassay of cocaine in hair: Concise communication. *J.Nucl.Med.* 1982; **23**:790-792.
- [15] Klug E. Zur Morphinbestimmung in Kopffaaren. *Z.Rechtsmedizin* 1980; **84**:189-193.
- [16] Baumgartner AM, Jones PF, Black CT. Detection of phencyclidine in hair. *J.Forensic Sci.* 1981; **26**:181-186.
- [17] Kintz P, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ. Identification by GC/MS of 6-monoacetylmorphine as an indicator of heroin abuse. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 1989; **37**:531-532.
- [18] Goldberger BA, Caplan YH, Maguire T, Cone EJ. Testing human hair for drugs of abuse. III Identification of heroin and 6-monoacetylmorphine as indicators of heroin use. *J.Anal.Toxicol.* 1991; **15**:226-231.
- [19] Balabanova S, Homoki J. Determination of cocaine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Z.Rechtsmedizin* 1987; **98**:235-240.
- [20] Balabanova S, Arnold PJ, Brunner H, Luckow V, Wolf HU. Detection of methadone in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Z.Rechtsmedizin* 1989; **102**:495-501.
- [21] Balabanova S, Arnold PJ, Brunner H, Luckow V, Wolf HU. Tetrahydrocannabinol im Haar von Haschischrauchern. *Z.Rechtsmedizin* 1989; **102**:503-508.
- [22] Ishiyama I, Nagai T, Toshida S. Detection of basic drugs (methamphetamine, antidepressants and nicotine) from human hair. *J.Forensic Sci.* 1983; **28**:380-385.
- [23] Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F. Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments - a time table of drug exposure? *Forensic Sci.Rev.* 1998; **10**:81-111.
- [24] Wilson MR, Polansky D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques* 1995; **18**:662.
- [25] Linch CA, Smith SL, Prahlow JA. Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. *J.Forensic Sci.* 1998; **43**:305.
- [26] Spiegel, K. Untersuchungen zum Nachweis alkoholspezifisch metabolisierter Substanzen aus menschlichen Haaren mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin. 1997.
- [27] Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction – Theory and Practice.* New York, USA: 1997.
- [28] Husek P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J.Chromatogr.B* 1998; **717**:57-91.
- [29] Pan L, Pawliszyn J. Derivatization/solid-phase-microextraction: new approach to polar analytes. *Anal.Chem.* 1997; **69**:196-205.

- [30] Zhang Z, Pawliszyn J. Quantitative extraction using an internally cooled solid phase microextraction device. *Anal.Chem.* 1995; **67**:34.
- [31] Pawliszyn J. Theory of solid-phase microextraction. *J.Chromatogr.Sci.* 2000; **38**:270-278.
- [32] Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. *Environmental organic chemistry* New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993: 124-142.
- [33] Kolb B. *Headspace-Gaschromatographie mit Kapillar-Trennsäulen*. Würzburg, Deutschland: Vogel-Verlag, 1986.
- [34] Conzen JP, Burck J, Ache HJ. SPME. *Applied Spec.* 1993; **47**:753.
- [35] Gorecki T, Pawliszyn J. Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction. Part 1. Theoretical considerations. *Analyst* 1997; **122**:1079-1086.
- [36] Swift JA. Morphology and histochemistry of human hair. In: *Formation and structure of human hair*, 1. Edition, Herausgeber: Jollès P, Zahn H, Höcker H, Basel, Schweiz: Birkhäuser Verlag, 1997: 149-175.
- [37] Powell BC, Rogers GE. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. In: *Formation and structure of human hair*, 1. Edition, Herausgeber: Jollès P, Zahn H, Höcker H, Basel: Birkhäuser Verlag, 1997: 59-148.
- [38] Baden HP. Hair keratin. In: *Hair and hair diseases*, 2. Edition, Herausgeber: Orfanos CE, Happle R, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 45-71.
- [39] Robbins CR. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, 3. Edition, New York, USA: Springer-Verlag, 1994.
- [40] Wertz PW, Downing DT. Integral lipids of mammalian hair. *Comp Biochem Physiol B* 1989; **92**:759-761.
- [41] Mieczkowski T, Newel R. Statistical examination of hair color as a potential biasing factor in hair analysis. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:13-38.
- [42] Castanet J, Ortonne J-P. Hair melanin and hair color. In: *Formation and structure of human hair*, 1. Edition, Herausgeber: Jollès P, Zahn H, Höcker H, Basel, Schweiz: Birkhäuser Verlag, 1997: 209-226.
- [43] Joseph RE, Jr., Su T-P, Cone EJ. In vitro binding studies of drugs to hair: Influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and africoid hair. *J.Anal.Toxicol.* 1996; **20**:338-344.
- [44] Protá G. Structure and biogenesis of phaeomelanin. In: *Pigmentation: its genesis and biological control*, Herausgeber: Riley V, New York, USA: Meredith Corporation, 1972: 615-630.
- [45] Forslind B. The growing anagen hair. In: *Hair and hair diseases*, 3. Edition, Herausgeber: Orfanos CE, Happle R, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 73-97.
- [46] Parakkal PF. Catagen and telogen phases of the growth cycle. In: *Hair and hair diseases*, 3. Edition, Herausgeber: Orfanos CE, Happle R, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 99-116.
- [47] Orfanos CE. Androgenic alopecia: clinical aspects and treatment. In: *Hair and hair diseases*, 3. Edition, Herausgeber: Orfanos CE, Happle R, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 485-527.
- [48] Baumgartner WA, Hill VA, Bland WH. Hair Analysis for Drugs of Abuse. *J.Forensic Sci.* 1989; **34**:1433-1453.
- [49] Baumgartner WA, Hill VA. Sample preparation techniques. *Forensic Sci.Int.* 1993; **63**:121-135.
- [50] Baumgartner, W.A., Hill, and V.A. Hair Analysis for Drugs of Abuse: Decontamination Issue. Paper. NIDA-conference on hair. 1990. Conference Proceeding
- [51] Henderson G.L. Mechanism of drug incorporation into hair. *Forensic Sci.Int.* 1993; **63**:19-29.
- [52] Chittleborough G, Steel BJ. Is human hair a dosimeter for endogenous zinc and other trace elements? *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1980; **36**:429-445.
- [53] Bhatnagar V, Anjaiah S, Prui N, Ramaihah A. pH of melanosomes of B16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch.Biochem.Biophys.* 1993; **307** :183-192.
- [54] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84**:25.
- [55] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: II. Eine biochemische Erklärung für den endogenen Einbau von Pharmaka und illegalen Drogen ins Haar während der Anagenphase. *Rechtsmedizin* 1996; **7**:1-5.
- [56] Gygi SP, Joseph RE, Cone EJ, Wilkins DG, Rollins DE. Incorporation of codeine and metabolites into hair. Role of pigmentation. *Drug Metab.Dispos.* 1996; **24**:495-501.
- [57] Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers [In Process Citation]. *J Anal.Toxicol.* 2000; **24**:557-561.
- [58] Huestis MA, Cone EJ, Wong CJ, Umbricht A, Preston KL. Monitoring opiate use in substance abuse treatment patients with sweat and urine drug testing [In Process Citation]. *J Anal.Toxicol.* 2000; **24**:509-521.
- [59] Kintz P, Cirimele V, Mairot F, Muhlmann M, Ludes B. Drug tests on 198 drivers involved in an accident. *Presse Med.* 2000; **29**:1275-1278.

- [60] Samyn N, van Haeren C. On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *Int.J Legal Med.* 2000; **113**:150-154.
- [61] Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Codeine testing in sweat and saliva with the Drugwipe. *Int.J Legal Med.* 1998; **111**:82-84.
- [62] Mura P, Kintz P, Papet Y, Ruesch G, Piriou A. Evaluation of six rapid tests for screening of cannabis in sweat, saliva and tears. *Acta Clin.Belg.Suppl* 1999; **1**:35-38.
- [63] Kidwell DA, Blanco MA, Smith FP. Cocaine detection in a university population by hair analysis and skin swab testing. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84**:75-86.
- [64] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: VI. Mögliche Einflüsse der Hautfunktionen. *Rechtsmedizin* 1997; **8**:2-6.
- [65] Koren G, Klein J, Forman R, Graham K. Hair analysis of cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J.Clin.Pharmacol.* 1992; **32**:671-675.
- [66] Wang WL, Cone EJ. Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. *Forensic Sci.Int.* 1995; **70**:39-51.
- [67] Mieczkowski T. Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84**:87-111.
- [68] Pötsch L, Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Sci.Int.* 1996; **81**:95-102.
- [69] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: III. Veränderungen des Opiat- und Kokaingehaltes in Haaren von Drogenkonsumenten nach einmaliger Blondierung oder Dauerwellenbehandlung. *Rechtsmedizin* 1997; **7**:113-116.
- [70] Yegles M, Marson Y, Wennig R. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:87-92.
- [71] Röhrich J, Zornlein S, Pötsch L, Skopp G, Becker J. Effect of the shampoo Ultra Clean on drug concentrations in human hair. *Int.J Legal Med.* 2000; **113**:102-106.
- [72] Skopp G, Pötsch L, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: V. Auswirkung von Sonne, Regen und Wind auf den Drogengehalt in Kopfhhaaren von Drogenkonsumenten—ein Pilotprojekt. *Rechtsmedizin* 1997; **7**:176-179.
- [73] Skopp G, Pötsch L, Mauden M. Stability of cannabinoids in hair L samples exposed to sunlight. *Clin.Chem.* 2000; **46**:1846-1848.
- [74] Nakahara Y, Ochiai T, Kikura R. Hair analysis for drugs of abuse. V. The facility in incorporation of cocaine into hair over its major metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester. *Arch.Toxicol.* 1992; **66**:446-449.
- [75] Welch MJ, Sniegowski LT, Allgood CC, Habram M. Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. *J Anal.Toxicol.* 1993; **17**:389-398.
- [76] Henderson GL, Harkey MR, Zhou C, Jones RT. Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers. *J Anal.Toxicol.* 1992; **16**:199-201.
- [77] Pragst F, Auwärter V, Sporkert F. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci.Int.* 2001; submitted for publication.
- [78] Tagliaro F, Poiesi C, Aiello R, Dorizzi R, Ghielmi S, Marigo M. Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: determination of cocaine and morphine. *J Chromatogr* 1993; **638**:303-309.
- [79] Chiarotti M, Strano-Rossi S, Offidani C, Fiori A. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *J Anal.Toxicol.* 1996; **20**:555-558.
- [80] Morrison JF, Chesler SN, Yoo WJ, Selavka CM. Matrix and modifier effects in the supercritical fluid extraction of cocaine and benzoylecgonine from human hair. *Anal.Chem.* 1998; **70**:163-172.
- [81] Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T. Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J Anal.Toxicol.* 1991; **15**:250-255.
- [82] Martz R, Donnelly B, Fetterolf D, Lasswell L, Hime GW, Hearn WL. The use of hair analysis to document a cocaine overdose following a sustained survival period before death. *J Anal.Toxicol.* 1991; **15**:279-281.
- [83] Klein J, Greenwald M, Becker L, Koren G. Fetal distribution of cocaine: case analysis. *Pediatr.Pathol.* 1992; **12**:463-468.
- [84] Fritch D, Groce Y, Rieders F. Cocaine and some of its products in hair by RIA and GC/MS. *J Anal.Toxicol.* 1992; **16**:112-114.
- [85] Kintz P, Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci.Int.* 1995; **73**:93-100.

- [86] Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE. Narrow-bore HPLC in combination with fluorescence and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of cocaine and metabolites in human hair. *Anal.Chem.* 1998; **70**:2336-2344.
- [87] Haley NJ, Hoffmann D. Analysis for nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status. *Clin.Chem.* 1985; **31**:1598-1600.
- [88] Sporkert F, Pragst F. Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2000; **746**:255-264.
- [89] Rothe M, Pragst F, Spiegel K, Harrach T, Fischer K, Kunkel J. Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. *Forensic Sci.Int.* 1997; **111**:111-128.
- [90] Moeller MR, Fey P, Wennig R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci.Int.* 1993; **63**:185-206.
- [91] Kauert G, Röhrich J. Concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6- monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *Int.J Legal Med.* 1996; **108**:294-299.
- [92] Wilkins DG, Valdez AS, Krueger GG, Rollins DE. Quantitative analysis of l-alpha-acetylmethadol, l-alpha-acetyl-N- normethadol, and l-alpha-acetyl-N,N-dinormethadol in human hair by positive ion chemical ionization mass spectrometry. *J Anal.Toxicol.* 1997; **21**:420-426.
- [93] Nakahara Y. Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair. *Forensic Sci.Int.* 1995; **70**:135-153.
- [94] Blank DL, Kidwell DA. Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic Sci.Int.* 1995; **70**:13-38.
- [95] Gaillard Y, Pepin G. Testing hair for pharmaceuticals. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1999; **733**:231-246.
- [96] Nakahara Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1999; **733**:161-180.
- [97] Sachs H, Dressler U. Detection of THCCOOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:239-247.
- [98] Cirimele V, Sachs H, Kintz P, Mangin P. Testing human hair for Cannabis. III. rapid screening procedure for the simultaneous identification of delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol. *J Anal.Toxicol.* 1996; **20**:13-16.
- [99] Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications. *Int.J Legal Med.* 1992; **105**:1-4.
- [100] Cone EJ. Testing human hair for drugs of abuse. I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug-induced effects on pupils and behavior. *J Anal.Toxicol.* 1990; **14**:1-7.
- [101] Gaillard Y, Pepin G. Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. A powerful tool in forensic medicine. *J Chromatogr A* 1997; **762**:251-267.
- [102] Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Takeda Y. Hair analysis for drug abuse: I. Determination of methamphetamine and amphetamine in hair by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method. *J Forensic Sci.* 1991; **36**:70-78.
- [103] Negrusz A, Moore CM, Kern JL, Janicak PG, Strong MJ, Levy NA. Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair [In Process Citation]. *J Anal.Toxicol.* 2000; **24**:614-620.
- [104] Nakahara Y, Kikura R, Takahashi K. Hair analysis for drugs of abuse. VIII. Effective extraction and determination of 6-acetylmorphine and morphine in hair with trifluoroacetic acid-methanol for the confirmation of retrospective heroin use by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed.Appl.* 1994; **657**:93-101.
- [105] Segura J, Stramesi C, Redon A *et al.* Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1999; **724**:9-21.
- [106] Pötsch L, Skopp G, Becker J. Ultrastructural alterations and environmental exposure influence the opiate concentrations in hair of drug addicts. *Int.J Legal Med.* 1995; **107**:301-305.
- [107] Hold KM, Hubbard DL, Wilkins DG, Rollins DE. Quantitation of cocaine in human hair: the effect of centrifugation of hair digests. *J Anal.Toxicol.* 1998; **22**:414-417.
- [108] Hold KM, Wilkins DG, Rollins DE, Joseph RE, Jr., Cone EJ. Simultaneous quantitation of cocaine, opiates, and their metabolites in human hair by positive ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci.* 1998; **36**:125-130.
- [109] Yegles M, Mersch F, Wennig R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84**:211-218.

- [110] Rothe, M. Untersuchungen zur Abscheidung und zur analytischen Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen und Drogen im Haar. Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin. 1997.
- [111] Allen DL, Oliver JS. The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:191-199.
- [112] Edder P, Staub C, Veuthey JL, Pierroz I, Haerdi W. Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts. *J Chromatogr B Biomed.Appl.* 1994; **658**:75-86.
- [113] Sachs H, Uhl M. Opiatnachweis in Haarextrakten mit Hilfe von GC/MS/MS und Supercritical Fluid Extraction(SFE). *Toxichem + Krimtech* 1992; **59**:114-120.
- [114] Morales NS, Müller RK. Extraktion von Cocain und Opiaten aus Haaren mit beschleunigter Lösemittelextraktion (ASE). *Toxichem + Krimtech* 1999; **66**:146-149.
- [115] Blau K, Halket J. *Handbook of Derivatives for Chromatography*, New York, USA: John Wiley&Sons, 1993.
- [116] Marsh A, Evans MB, Strang J. Radioimmunoassay of drugs of abuse in hair. Part 2: The determination of methadone in the hair of known drug users. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 1995; **13**:829-839.
- [117] Spiehler V. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:249-259.
- [118] Uhl M. Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:169-179.
- [119] Thieme D, Grosse J, Sachs H, Mueller RK. Analytical strategy for detecting doping agents in hair. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:335-345.
- [120] Hold KM, Borges CR, Wilkins DG, Rollins DE, Joseph RE, Jr. Detection of nandrolone, testosterone, and their esters in rat and human hair samples. *J Anal. Toxicol.* 1999; **23**:416-423.
- [121] Gaillard Y, Vayssette F, Balland A, Pepin G. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair. Application in doping control and meat quality control. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1999; **735**:189-205.
- [122] Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Physiological concentrations of DHEA in human hair. *J Anal.Toxicol.* 1999; **23**:424-428.
- [123] Cirimele V, Kintz P, Ludes B. Testing of the anabolic stanozolol in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 2000; **740**:265-271.
- [124] Thieme D, Grosse J, Müller RK. Detection of exogenous anabolic steroids in hair. In: *Progress in hair analysis*, 1. Edition, Herausgeber: Müller RK, Thieme D, Köln: Sport und Buch Strauß GmbH, 2000: 103-110.
- [125] Uhl M. Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84**:281-294.
- [126] Cairns T, Kippenberger DJ, Scholtz H., and Baumgartner WA. Determination of THCCOOH in hair by gas chromatography-mass spectrometry. de Zeeuw, R. A., Al Hosani, I., Al Munthiri, S., and Magbool, A. 185-193. 1995. Abu Dhabi. Proceedings of the 1995 International Conference and Workshop for Hair Analysis in Forensic Toxicology.
- [127] Cirimele V, Kintz P, Ludes B. Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1997; **700**:119-129.
- [128] Sachs H, Uhl M, Hege-Scheuing G, Schneider E. Analysis of fentanyl and sufentanil in hair by GC/MS/MS. *Int.J Legal Med.* 1996; **109**:213-215.
- [129] Muller C, Vogt S, Goerke R, Kordon A, Weinmann W. Identification of selected psychopharmaceuticals and their metabolites in hair by LC/ESI-CID/MS and LC/MS/MS [In Process Citation]. *Forensic Sci.Int.* 2000; **113**:415-421.
- [130] Cirimele V, Kintz P, Lohner S, Ludes B. Buprenorphine to norbuprenorphine ratio in human hair [In Process Citation]. *J Anal.Toxicol.* 2000; **24**:448-449.
- [131] Bevalot F, Gaillard Y, Lhermitte MA, Pepin G. Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 2000; **740**:227-236.
- [132] Wilkins DG, Rollins DE, Valdez AS, Mizuno A, Krueger GG, Cone EJ. A retrospective study of buprenorphine and norbuprenorphine in human hair after multiple doses. *J Anal.Toxicol.* 1999; **23**:409-415.
- [133] Saris LA, Brekelmans GJ, van der Linden GJ, Rademaker RV, Edelbroek PM. High-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and metabolites in human hair. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1997; **691**:409-415.
- [134] Mersch F, Yegles M, Wennig R. Quantification of dextropropoxyphene and its metabolite by HPLC in hair of overdose cases. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84** :237-242.
- [135] Röhrich J, Zornlein S, Becker J. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying Immuno-Elute columns. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107** :181-190.
- [136] Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Scarcella D, Marigo M. Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *Forensic Sci.Int.* 1998; **92**:201-211.

- [137] Plaut O, Girod C, Staub C. Analysis of methaqualone in biological matrices by micellar electrokinetic capillary chromatography. Comparison with gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci.Int.* 1998; **92**:219-227.
- [138] Yashiki M, Miyazaki T, Kojima T. Detection of amphetamines and inflammable compounds in biological materials using GC/MS and SPME. *Jpn.J.Forensic Toxicol.* 1994; **12**:120-121.
- [139] Chiarotti M, Marsili R. Gas chromatographic analysis of methadone in urine samples after solid phase microextraction. *J.Microcolumn Sep.* 1994; **6**:577-581.
- [140] Furton KG, Wang J, Ya-Li H, Walton J, Almirall JR. The use of solid-phase microextraction-gas chromatography in forensic analysis. *J.Chromatogr.Sci.* 2000; **38**:297-306.
- [141] Lord HL, Pawliszyn L. Microextraction of drugs. *J Chromatogr A* 2000; **902**:17-63.
- [142] Snow NH. Solid-phase microextraction of drugs from biological matrices. *J.Chromatogr.A* 2000; **885**:445-455.
- [143] Juntong L, Peng C, Suzuki O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Sci.Int.* 1998; **97**:93-100.
- [144] Theodoridis G, Koster EH, de Jong GJ. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 2000; **745**:49-82.
- [145] Mills GA, Walker V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J Chromatogr A* 2000; **902**:267-287.
- [146] Namera A, Yashiki M, Kojima T. Analysis of drugs in biological fluids using SPME. In: *Applications of solid phase microextraction*, 1. Edition, Herausgeber: Pawliszyn J, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999: 510-526.
- [147] Guidotti M, Vitali M. Applications of SPME for the biomonitoring of human exposure to toxic substances. In: *Applications of solid phase microextraction* Herausgeber: Pawliszyn J, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999: 557-572.
- [148] 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 Sci.Int.* 1995; **76**:169-177.
- [149] 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 Sci.Int.* 1996; **78**:95-102.
- [150] Centini F, Masti A, Barni Comparini I. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by headspace/solid phase micro-extraction (SPME) and GC/MS. *Forensic Sci.Int.* 1996; **83**:161-166.
- [151] Lord HL, Pawliszyn J. Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction. *Anal.Chem.* 1997; **69**:3899-3906.
- [152] Jurado C, Gimenez MP, Soriano T, Menendez M, Repetto M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS. *J Anal.Toxicol.* 2000; **24**:11-16.
- [153] Namera A, Yashiki M, Liu J *et al.* Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry after headspace-solid phase microextraction and derivatization. *Forensic Sci.Int.* 2000; **109**:215-223.
- [154] Okajima K, Namera A, Yashiki M, Tsukue I, Kojima T. Highly sensitive analysis of methamphetamine and amphetamine in human whole blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci.Int.* 2001; **116**:15-22.
- [155] Kumazawa T, Lee XP, Tsai MC, Seno A, Ishii A, Sato K. Simple extraction of tricyclic antidepressants in human urine by headspace solid-phase microextraction (SPME). *Jpn.J.Forensic Toxicol.* 1995; **13**:25-30.
- [156] Lee XP, Kumazawa T, Sato K, Suzuki O. Detection of tricyclic antidepressants in whole blood by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *J.Forensic Sci.* 1997; **35**:302-308.
- [157] 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. *J.Anal.Toxicol.* 1998; **22**:396-400.
- [158] Yashiki M, Nagasawa N, Kojima T, Miyazaki T, Iwasaki Y. Rapid analysis of nicotine and cotinine in urine using headspace solid-phase microextraction and selected ion monitoring. *Jpn.J.Forensic Toxicol.* 1995; **13**:17-24.
- [159] 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.* 2000; **24**:372-376.
- [160] Watanabe T, Namera A, Yashiki M, Iwasaki Y, Kojima T. Simple analysis of local anaesthetics in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry-electron impact ionization selected ion monitoring. *J.Chromatogr.B* 1998; **709**:225-232.
- [161] Nishikawa M, Seno H, Ishii A *et al.* Simple analysis of diphenylmethane antihistaminics and their analogues in body fluids by headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *J.Chromatogr.Sci.* 1997; **35**:275-279.

- [162] Frison G, Tedeschi L, Maietti S, Ferrara SD. Determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in plasma and urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/positive ion chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 2000; **14**:2401-2407.
- [163] Seno H, Kumazawa T, Ishii A *et al.* Detection of some phenothiazines by headspace solid phase microextraction and gas chromatography. *Jpn.J.Forensic Toxicol.*, 1996; **14**:30-34.
- [164] Kumazawa T, Seno H, Watanabe-Suzuki K *et al.* Determination of phenothiazines in human body fluids by solid-phase microextraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000; **35**:1091-1099.
- [165] Ishii A, Seno H, Kumazawa T, Watanabe K, Hattori H, Suzuki O. Simple extraction of phencyclidine from human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME). *Chromatographia* 1996; **43**:331-333.
- [166] Seno H, Kumazawa T, Ishii A, Nishikawa M, Hattori H, Suzuki O. Detection of meperidine (pethidine) in human blood and urine by headspace solid phase microextraction. *Jpn.J.Forensic Toxicol.* 1995; **13**:211-215.
- [167] Takekawa K, Oya M, Kido A, Suzuki O. Analysis of cyanide in blood by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography. *Chromatographia* 1998; **47**:209-214.
- [168] Musshoff, F, Junker, H, Madea, B. Einfaches Screening auf Organophosphate in biologischem Material mittels HS-SPME und GC/MS. In: Proceedings of the XI. Symposium of the Society of Toxicological and Forensic Chemistry. Mosbach, April 22 – 24, 1999. Herausgeber: Pragst, F Aderjan R, Eppenheim: Verlag Dieter Helm, 1999: 281-294.
- [169] 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.* 1999; **37**:639-642.
- [170] Lee XP, Kumazawa T, Sato K, Suzuki O. Detection of organophorous pesticides in human body fluids by solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Chromatographia* 1996; **42**:135-140.
- [171] Namera A, Yashiki M, Nagasawa N, Iwasaki Y, Kojima T. Rapid analysis of malathion in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Sci.Int.* 1997; **88**:125-131.
- [172] Seno H, Kumazawa T, Ishii A *et al.* Determination of some carbamate pesticides in human body fluids by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Jpn.J.Forensic Toxicol.* 1996; **14**:199-203.
- [173] Guan F, Watanabe K, Ishii A *et al.* Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water. *J.Chromatogr.B* 1998; **714**:205-213.
- [174] Mills GA, Walker V, Mughal H. Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane on-fibre derivatisation for analysis of faecal short-chain fatty acids. *J Chromatogr B* 1999; **730**:113-122.
- [175] Mills GA, Walker V, Mughal H. Quantitative determination of trimethylamine in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1999; **723**:281-285.
- [176] Lucas AC, Bermejo A, Taberner MJ, Fernandez P, Strano-Rossi S. Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci.Int.* 2000; **107**:225-232.
- [177] Strano-Rossi S, Chiarotti M. Solid-phase microextraction for cannabis analysis in hair and its possible application to other drugs. *J.Anal.Toxicol.* 1999; **23**:7-10.
- [178] Koide I, Noguchi O, Okada K *et al.* Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J.Chromatogr.B* 1998; **707**:99-104.
- [179] Kintz P, Marescaux C, Mangin P. Testing human hair for carbamazepine in epileptic patients: is hair investigation suitable for drug monitoring? *Hum.Exp.Toxicol.* 1995; **14**:812-815.
- [180] Pragst F, Rothe M, Hunger J, Thor S. Structural and concentration effects on the deposition of tricyclic antidepressants in human hair. *Forensic Sci.Int.* 1997; **84**:225-236.
- [181] *Pharmazeutische Stoffliste* Eschenborn/Taunus: ABDA Pharma-Daten-Service, 2000.
- [182] Herre S, Pragst F, Rießelmann B, Roscher S, Tenczer J, Klug E. Zur toxikologischen Bewertung der Lokalanästhetika Lidocain und Tetracain bei Drogentodesfällen. *Rechtsmedizin* 1999; **9**:174-183.
- [183] Pragst F, Erxleben BT, Herre S, Aberger K. HPLC in der systematischen toxikologischen Analyse. *GIT Fachz.Lab.Spezial-Chromatographie* 1994; **94**:92-96.
- [184] Nakahara Y, Takahashi K, Kikura R. Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol.Pharm.Bull.* 1995; **18**:1223-1227.
- [185] Gaillard Y, Pepin G. Evidence of polydrug use using hair analysis: a fatal case involving heroin, cocaine, cannabis, chloroform, thiopental and ketamine. *J Forensic Sci.* 1998; **43**:435-438.
- [186] Baselt RC, Cravey RH. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, 4. Edition, Foster City, California: Chemical Toxicology Institute, 1995.

- [187] Goldberger BA, Darraj AG, Caplan YH, Cone EJ. Detection of methadon, methadone metabolites and other illicit drugs of abuse in hair of methadone-treatment subjects. *J.Anal.Toxicol.* 1998; **22**:526-530.
- [188] Wilkins DG, Nagasawa PR, Gygi SP, Foltz RL, Rollins DE. Quantitative analysis of methadone and two major metabolites in hair by positive chemical ionization ion trap mass spectrometry. *J.Anal.Toxicol.* 1996; **20**:355-361.
- [189] Kintz P, Eser HP, Tracqui A, Moeller MR, Cirimele V, Mangin P. Enantioselective separation of methadone and its main metabolite in human hair by liquid chromatography/ion spray-mass spectrometry. *J.Forensic Sci.* 1997; **42**:291-295.
- [190] Girod C, Staub C. Methadone and EDDP in hair from human subjects following a maintenance program: results of a pilot study. *Forensic Sci.Int.* 2001; **117**:175-184.
- [191] Cooper GA, Oliver JS. Improved solid-phase extraction of methadone and its two major metabolites from whole blood. *J Anal.Toxicol.* 1998; **22**:389-392.
- [192] Suzuki S, Inoue T, Hori H, Inayama S. Analysis of methamphetamine in hair, nail, sweat, and saliva by mass fragmentography. *J Anal.Toxicol.* 1989; **13**:176-178.
- [193] Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J Chromatogr B Biomed.Sci.Appl.* 1998; **713**:61-90.
- [194] Ugland HG, Krogh M, Rasmussen KE. Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *J.Chromatogr.A* 1997; **701**:29-38.
- [195] Ugland HG, Krogh M, Rasmussen KE. Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatisation. *J Pharm Biomed Anal* 1999; **19**:463-475.
- [196] Krogh M, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Propyl chloroformate derivatisation and SPME-GC for screening of amines in urine. In: *Applications of solid phase microextraction*, 1. Edition, Herausgeber: Pawliszyn J, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1999: 461-469.
- [197] Schoene K, Bruckert HJ, Steinhanses J, König A. Two stage derivatization with N-(tert.-butyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) and N-methyl-bis-(trifluoroacetamide) (MBTFA) for the gas-chromatographic analysis of OH-, SH- and NH-compounds. *Fresenius J.Anal.Chem.* 1994; **348**:364-370.
- [198] Hall BJ, Parikh AR, Brodbelt JS. Aqueous phase hexylchloroformate derivatization and solid phase microextraction: determination of benzoylecgonine in urine by gas chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Forensic Sci.* 1999; **44**:527-534.
- [199] Cirimele V. Cannabis and amphetamine determination in human hair. In: *Drug testing in hair*, 1. Edition, Herausgeber: Kintz P, Boca Raton: CRC Press, 1996: 181-190.
- [200] Göthert M, Bönisch H, Schlicker E. Psychopharmaka - Pharmakotherapie psychischer Erkrankungen. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Edition, Herausgeber: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 285-317.
- [201] Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J. Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal.Toxicol.* 2000; **24**:340-347.
- [202] Maurer H, Pflieger K. Screening procedure for detection of antidepressants and their metabolites in urine using a computerized gas chromatographic--mass spectrometric technique. *J Chromatogr* 1984; **305**:309-323.
- [203] Tracqui A, Kreissig P, Kintz P, Poulquen A, Mangin P. Determination of amitriptyline in the hair of psychiatric patients. *Hum.Exp.Toxicol.* 1992; **11**:363-367.
- [204] Negrusz A, Moore CM, Perry JL. Detection of doxepin and its major metabolite desmethyldoxepin in hair following drug therapy. *J Anal.Toxicol.* 1998; **22**:531-536.
- [205] Simons KJ, Watson WT, Martin TJ, Chen XY, Simons FE. Diphenhydramine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in elderly adults, young adults, and children. *J Clin.Pharmacol.* 1990; **30**:665-671.
- [206] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. *Prog.Lipid Res.* 1998; **37**:307-316.
- [207] Lange LG, Bergmann SR, Sobel BE. Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J Biol.Chem.* 1981; **256**:12968-12973.
- [208] Laposata EA, Harrison EH, Hedberg EB. Synthesis and degradation of fatty acid ethyl esters by cultured hepatoma cells exposed to ethanol. *J Biol.Chem.* 1990; **265**:9688-9693.
- [209] Laposata EA, Scherrer DE, Lange LG. Fatty acid ethyl esters in adipose tissue. A laboratory marker for alcohol-related death. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1989; **113**:762-766.
- [210] Laposata EA, Scherrer DE, Mazow C, Lange LG. Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *J Biol.Chem.* 1987; **262**:4653-4657.
- [211] Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 1986; **231**:497-499.

- [212] Laposata M. Assessment of ethanol intake. Current tests and new assays on the horizon. *Am.J.Clin.Pathol.* 1999; **112**:443-450.
- [213] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: nonoxidative ethanol metabolites with emerging biological and clinical significance. *Lipids* 1999; **34**:281-285.
- [214] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. *Clinical Chemistry* 1997; **43**:1527-1534.
- [215] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: current facts and speculations. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1999; **60**:313-315.
- [216] Doyle KM, Cluette-Brown JE, Dube DM, Bernhardt TG, Morse CR, Laposata M. Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *JAMA* 1996; **276** :1152-1156.
- [217] Soderberg BL, Sicinska ET, Blodget E *et al.* Preanalytical variables affecting the quantification of fatty acid ethyl esters in plasma and serum samples. *Clinical Chemistry* 1999; **45**:2183-2190.
- [218] Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.B* 1996; **675**:189-196.
- [219] Laposata M, Szczepiorkowski ZM, Brown JE. Fatty acid ethyl esters: non-oxidative metabolites of ethanol. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 1995; **52**:87-91.
- [220] Yamazaki K, Gilg T, Kauert G, von Meyer L, Eisenmenger W. Nonoxidative ethanol and methanol changes in the heart and brain tissue of alcohol abusers. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1997; **51**:380-387.
- [221] Klein J, Karaskov T, Koren G. Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report. *Ther Drug Monit.* 1999; **21**:644-646.
- [222] Skopp G, Schmitt G, Poetsch L, Droenner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol and Alcoholism* 2000; **35**:283-285.
- [223] Alt A, Janda I, Seidel S, Wurst FM. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol and Alcoholism* 2000; **35** :313-314.
- [224] Jelinkova D, Deyl Z, Miksik I, Tagliaro F. Capillary electrophoresis of hair proteins modified by alcohol intake in laboratory rats. *J Chromatogr A* 1995; **709**:111-119.
- [225] Watson RR, Solkoff D, Wang JY, Seeto K. Detection of ethanol consumption by ELISA assay measurement of acetaldehyde adducts in murine hair. *Alcohol* 1998; **16**:279-284.
- [226] Doyle KM, Bird DA, al Salihi S *et al.* Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *J Lipid Res.* 1994; **35**:428-437.
- [227] Rothe M, Pragst F. Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples. *J Anal.Toxicol.* 1995; **19**:236-240.
- [228] Neuwinger HD. *Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte: Chemie, Pharmakologie, Toxikologie*, 2. Edition, Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1998: 419-424.
- [229] Feldwick MG., Mead RJ, Kostyniak PJ. Biochemical effects of fluoroacetate and related pesticides: the potential of 4-methylpyrazole as an antidote. In: *Proceedings of the science workshop on 1080*. Herausgeber: Seawright AA, Eason CT, Wellington, The Royal Society of New Zealand 1994: 74-81.
- [230] Aggrawal A. Death by sodium monofluoroacetate (SMFA). *Science Reporter* 1998; **47**.
- [231] Stevens HM, Moffat AC, Drayton JV. The recovery and identification of fluoroacetamide and fluoroacetic acid from tissues. *Forensic Science* 1976; **8**:131-137.
- [232] Okuno I, Connolly GE, Savarie PJ, Breidenstein CP. Gas chromatographic analysis of coyote and magpie tissues for residues of compound 1080 (sodium fluoroacetate). *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 1984; **67**:549-553.
- [233] Hoogenboom JLL, Rammell CG. Determination of sodium monofluoroacetate (compound 1080) in tissues and baits as its benzyl ester by reaction-capillary gas chromatography. *J.Anal.Toxicol.* 1987; **11**:140-143.
- [234] Allender WJ. Determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in biological tissues. *J.Anal.Toxicol.* 1990; **14**:45-49.
- [235] Mori M, Nakajima H, Seto Y. Determination of fluoroacetate in aqueous samples by headspace gas chromatography. *J Chromatogr A* 1995; **736**:229-234.
- [236] Miki A, Tsuchihashi H, Yamashita M. GC and GC-MS determination of fluoroacetic acid and phenoxy acid herbicides via triphasal extractive pentafluorobenzoylation using a polymer-bound phase-transfer catalyst. *J Anal Toxicol.* 1998; **22**:237-245.
- [237] Minnaar PP, Swan GE, McCrindle RI, de Beer WH, Naude TW. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of monofluoroacetate. *J Chromatogr Sci.* 2000; **38** :16-20.
- [238] Mihaly GW, Vajda FJ, Miles JL, Louis WJ. Single and chronic dose pharmacokinetic studies of sodium valproate in epileptic patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979; **16**:23-29.
- [239] Lin W, Kelly AR. Determination of valproic acid in plasma or serum by solid-phase column extraction and gas-liquid chromatography. *Ther Drug Monit.* 1985; **7**:336-343.
- [240] Yu HY, Shih MC. Determination of valproic acid in human plasma by capillary gas chromatography. *Ther Drug Monit.* 1996; **18**:107-108.

- [241] Liu H, Montoya JL, Forman LJ, Eggers CM, Barham CF, Delgado M. Determination of free valproic acid: evaluation of the Centrifree system and comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit.* 1992; **14**:513-521.
- [242] Liu H, Forman LJ, Montoya J, Eggers C, Barham C, Delgado M. Determination of valproic acid by high-performance liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection. *J Chromatogr* 1992; **576**:163-169.
- [243] Krogh M, Johansen K, Tonnesen F, Rasmussen KE. Solid-phase microextraction for the determination of the free concentration of valproic acid in human plasma by capillary gas chromatography. *J Chromatogr B Biomed. Appl.* 1995; **673**:299-305.
- [244] Büch HP, Büch U. Hypnotika - Pharmakotherapie bei Schlafstörungen und Erregungszuständen. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Edition, Herausgeber: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 257.
- [245] Gorecki DK, Hindmarsh KW, Hall CA, Mayers DJ, Sankaran K. Determination of chloral hydrate metabolism in adult and neonate biological fluids after single-dose administration. *J Chromatogr* 1990; **528**:333-341.
- [246] Humbert L, Jacquemont MC, Leroy E, Leclerc F, Houdret N, Lhermitte M. Determination of chloral hydrate and its metabolites (trichloroethanol and trichloroacetic acid) in human plasma and urine using electron capture gas chromatography. *Biomed. Chromatogr* 1994; **8**:273-277.
- [247] Yan Z, Henderson GN, James MO, Stacpoole PW. Determination of chloral hydrate metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 1999; **19**:309-318.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und unter ausschließlicher Benutzung der angegebenen Mittel und Methoden angefertigt habe.

Berlin, 12. Dezember 2001

Lebenslauf

Name: Frank Sporkert
Geburtsdatum: 06.11.1969
Geburtsort: Brandenburg an der Havel
Familienstand: ledig

Ausbildung

Schule: Polytechnische Oberschule in Brandenburg a. d. Havel,
1976 – 1986
Abschluss: mittlere Reife
Gymnasium in Brandenburg a. d. Havel, 1986 – 1988
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: Unteroffizier in der Nationalen Volksarmee der DDR,
09/1988 – 08/1990

Praktische Tätigkeit: Pflegediensthelfer in der Neurologie Landesklinik Brandenburg
09/1990 – 07/1991

Hochschulstudium: Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Berlin,
10/1991 – 11/1996
Abschluss: I. Staatsexamen: 01/1996
Abschluss: Diplom: 11/1996 Thema: „Entwicklung einer
Analysemethoden zur Bestimmung der polaren Herbizide Glyphosat
und Glufosinate und ihrer Hauptmetaboliten aus Wasser“

Beruf: seit 01/1997 wissenschaftlicher Mitarbeiter und freier Gutachter am
Institut für Rechtsmedizin der HU-Berlin
Schwerpunkt: GC-MS-Analytik toxikologisch und forensisch relevanter
Drogen- und Medikamentenwirkstoffe

Promotion: seit 03/1997 am Institut für Rechtsmedizin der HU-Berlin
Thema: „Anwendungen der Headspace-Festphasenmikroextraktion
in der forensischen Analytik unter besonderer Berücksichtigung der
Haaranalyse“

Berlin, 12. Dezember 2001

Frank Sporkert