

**Aufbau und Anwendung einer Methode zur Identifizierung  
und Quantifizierung von Giften und deren Metaboliten in  
Blut und Haaren in der Systematischen Toxikologischen  
Analyse mittels Flüssigchromatographie-Quadrupol-  
Flugzeitmassenspektrometrie-Kopplung (LC-QTOF-MS)**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Chemiker Sebastian Broecker

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:           1. Prof. Dr. rer. nat. Fritz Pragst  
                          2. Prof. Dr. rer. nat. Michael W. Linscheid

Tag der mündlichen Prüfung:   10. Februar 2012



## **Danksagung:**

Allem voran möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Fritz Pragst für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die hervorragende fachliche Unterstützung während der gesamten Promotionsarbeit bedanken. Herrn Prof. Dr. med. Michael Tsokos danke ich für die Bereitstellung der instrumentellen Mittel und der Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Den Mitarbeitern von Agilent Technologies Herrn Bernhard Wüst, Dr. Jerry Zweigenbaum, Dr. Frank Kuhlmann, Dr. Peter Stone und Herrn Friedbert Ruppel danke ich für die technische Unterstützung sowie die zahlreichen hilfreichen Diskussionen. Für den großzügigen Gestaltungsfreiraum der Forschungstätigkeit sei an dieser Stelle Frau Dr. Sieglinde Herre gedankt. Des Weiteren danke ich meinen lieben Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Zusammenarbeit. Ein großer Dank geht an die zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben. Herrn Prof. Dr. Michael Linscheid danke ich für die fachliche Unterstützung sowie seine Ratschläge. Danken möchte ich auch meiner Familie, die viel Geduld und großes Verständnis mit mir und meiner Arbeit hatte.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1. Einleitung und Zielstellung .....	1
2. Grundlagenteil.....	4
2.1 Systematische Toxikologische Analyse.....	4
2.1.1 Analytische Problemstellung und Lösungswege .....	4
2.1.2 Bedeutung der Massenspektrometrie in der STA .....	7
2.2 Grundlagen zum QTOF-Massenspektrometer .....	14
2.2.1 Aufbau und Funktionsweise.....	14
2.2.2 Möglichkeiten der Datenakquisition .....	20
2.3 TOF-MS und QTOF-MS in der Systematischen Toxikologischen Analyse..	25
2.4 Besonderheiten von Haaren als Probenmaterial.....	32
3. Experimenteller Teil .....	40
3.1 Messinstrumente .....	40
3.1.1 HPLC-DAD-Konfiguration .....	40
3.1.2 LC-QTOF-MS-Konfiguration .....	41
3.2 Laborequipment .....	42
3.3 Software .....	42
3.3.1 MassHunter Workstation.....	42
3.3.2 ChemStation .....	43
3.3.3 „Metaboliten-Tool“ .....	43
3.3.4 Tool „Estimate Concentration“ .....	43
3.4 Lösungsmittel, Referenzsubstanzen und Chemikalien .....	43
3.4.1 Lösungsmittel und Reagenzien.....	43
3.4.2 Laufmittel, Extraktions- und Pufferlösungen .....	44
3.4.3 Referenzsubstanzen .....	45
3.5 Probenmaterial .....	45
3.5.1 Drogen- und Medikament-freie Referenzmatrix .....	45
3.5.2 Postmortale Blut- und Haarproben.....	45
3.6 Probenvorbereitung .....	46
3.6.1 Herstellung von Referenzsubstanzlösungen für die Spektrenbibliothek	46
3.6.2 Aufarbeitung von Blutproben .....	46
3.6.3 Aufarbeitung von Haarproben .....	47

## Inhaltsverzeichnis

---

3.7	Messmethoden.....	48
3.7.1	Direktinjektion .....	48
3.7.2	Flüssigchromatographie.....	48
3.7.3	DAD-Datenakquisition.....	49
3.7.4	QTOF-MS-Datenakquisition.....	49
3.8	Methodenvalidierung des Screenings in Haaren .....	52
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	54
4.1	LC-QTOF-MS-Messung und Datenauswertung in der STA.....	54
4.1.1	Aufbau der theoretischen, semiempirischen Datenbank [139].....	55
4.1.2	Aufbau der Spektrenbibliothek [140].....	56
4.1.3	Erweiterung der Datenbank und Bibliothek um Retentionszeiten [141].....	63
4.1.4	Optimierung der LC- und MS-Parameter für die STA .....	67
4.1.5	Datenakquisition und Datenauswertung in der STA.....	72
4.1.6	Untersuchung von dotierten Blut- und Urinproben.....	82
4.2	Kombinierte Anwendung von HPLC-DAD und LC-QTOF-MS zur STA von Blutproben und Methodenvergleich [142].....	87
4.2.1	Praktische Durchführung der HPLC-DAD und LC-QTOF-MS Kombination .....	88
4.2.2	Substanzidentifizierung in der Datenanalyse .....	90
4.2.3	Fallbeispiele .....	91
4.3	Systematische Toxikologische Analyse in Haaren [146] .....	104
4.3.1	Optimierung der Probenvorbereitung.....	104
4.3.2	Methodenvalidierung für ausgewählte Wirkstoffe.....	107
4.3.3	STA in postmortalen Haarproben.....	114
4.4	Nachweis von Metaboliten in der STA [157].....	126
4.4.1	Aufbau und Funktionsweise des Metaboliten-Tools.....	129
4.4.2	Anwendung des Metaboliten-Tools in der Haaranalyse.....	136
4.5	Semiquantitative Konzentrationsbestimmung in der STA [175].....	147
4.5.1	Aufbau der LC-TOF-QUANT-Datenbank .....	149
4.5.2	Funktionsweise des Tools „Estimate Concentration“ .....	152
4.5.3	Praktische Erprobung des Tools „Estimate Concentration“ .....	155
5.	Schlussfolgerungen.....	162
	Zusammenfassung .....	165
	Abstract .....	169
	Literaturverzeichnis .....	173

## Inhaltsverzeichnis

---

Publikations- und Vortragsverzeichnis.....	185
--	-----

## Abkürzungsverzeichnis

6-AM	6-Acetylmorphin
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADC	Analog-to-Digital-Converter
amu	atomic mass unit
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
BE	Benzoylecgonin
Btm.	Betäubungsmittel
CAS	Chemical Abstracts Service
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CE	Collision Energy
CI	Chemical Ionization
CID	Collision Induced Dissociation
CLND	Chemiluminescent Nitrogen Detection
CO-Hb	Carboxy-Hämoglobin
csv	comma-separated values
CYP	Cytochrom P450
DAD	Diode Array Detector
DB	Datenbank
DCM	Dichlormethan
ECC	Extracted Compound Chromatogram
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin
EI	Electron Impact
EIC	Extracted Ion Chromatogram
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	Electrospray Ionization
FP	Flush Port
FT	Fouriertransformation
GC	Gaschromatographie
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie

## Abkürzungsverzeichnis

---

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Headspace
ICP	Inductively Coupled Plasma
ICR	Ion Cyclotron Resonance
IDA	Information Dependent Acquisition
IP	Injection Port
IT	Ion Trap
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Liquid Chromatography
LIT	Linear Ion Trap
LLE	Liquid/Liquid Extraction
LM	Lösungsmittel
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
m/z	mass to charge
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mAU	milli Absorbance Units
MDA	3,4-Methylenedioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylenedioxy-N-ethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin
MFE	Molecular Feature Extraction
MOLGEN	Molecular Structure Generation
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus Aureus
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS <sup>3</sup>	dreifach gekoppelte Massenspektrometrie-Experimente
MSI	Mass Spectrometry Imaging
n. d.	nicht detektiert
NAT	N-Acetyltransferase
NIH	National Institutes of Health
NIST	National Institute of Standards and Technology
PCDL	Personal Compound Database and Library
PCP	Phencyclidin

## Abkürzungsverzeichnis

---

ppm	parts per million
Q	Quadrupol
QC	Quality Control
QQQ	Triple Quadrupole
R <sup>2</sup>	quadratischer Korrelationskoeffizient oder Bestimmtheitsmaß
RP	Reversed Phase
RRT	Relative Retention Time
RT	Retention Time
S/N	Signal to Noise
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SRM	Single Reaction Monitoring
STA	Systematische Toxikologische Analyse
TCC	Total Compound Chromatogram
TDC	Time to Digital Converter
THC	$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol
THC-COOH	11-Nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure
TIC	Total Ion Chromatogram
TOF	Time Of Flight
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VCap	Voltage Capillary
Vis	Visible
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung und Zielstellung

Unter dem Begriff „Systematische Toxikologische Analyse“ (STA) wird allgemein die Aufklärung akuter Vergiftungen ohne bekannte Ursache bei Lebenden sowie bei Todesfällen verstanden. Während sich die gerichtete Analyse (Targeted-Screening) einer konkreten Fragestellung – wie der Identifizierung spezieller Substanzen oder Substanzklassen – widmet, befasst sich die Systematische Toxikologische Analyse mit der ungerichteten Suche (non-Targeted-Screening) nach toxikologisch relevanten Substanzen. Hierbei sind in der Regel keine Informationen über das Vorhandensein und die Art des Giftes bekannt. Je nach Fragestellung, wie zum Beispiel einer akuten Beeinflussung durch berauschende Substanzen oder einem chronischen Missbrauch von Drogen, erfolgt die Analyse aus entsprechendem biologischen Material wie Blut, Urin, Gewebeproben oder Haaren.

Die STA stellt nach wie vor auf Grund der großen und stetig zunehmenden Vielzahl möglicher Gifte sowie deren Stoffwechselprodukte und der sehr niedrigen Konzentrationen, in der sie in sehr komplexer Matrix vorliegen, eine der größten Herausforderungen der analytischen Chemie dar. Das Spektrum toxikologisch relevanter Substanzen ist umfangreich und lässt sich nach den physikalisch-chemischen Eigenschaften in giftige Gase, flüchtige Substanzen, Metallionen und die wohl größte Gruppe, die organischen Verbindungen mit geringer Flüchtigkeit, kategorisieren. Von besonderer toxikologischer Bedeutung in der zuletzt genannten Gruppe sind illegale Drogen, Medikamente, Pestizide, chemische Reagenzien und Alkaloide. Die chemische Analyse zum Nachweis dieser Substanzen besteht in der Regel aus einer geeigneten Probenvorbereitung, die so viele Gifte wie möglich aus der Matrix erfassen sollte, und einer Kombination von Chromatographie und Molekülspektrometrie, um das extrahierte Gemisch zu trennen und die einzelnen Komponenten zu charakterisieren. Die gängigsten Methoden sind die Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) [1] und die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diodenarraydetektor (HPLC-DAD) [2]. Bis heute gibt es keine Möglichkeit die genaue Struktur einer Substanz ausschließlich aus dem UV/Vis-Spektrum oder dem MS-Spektrum zu ermitteln. Daher ist für die Identifizierung eines Giftes immer der Vergleich des unbekanntes Spektrums mit den Spektren einer Bibliothek von toxikologisch relevanten Verbindungen nötig. Für diesen Zweck wurden zahlreiche In-Haus- und kommerziell erhältliche Spektrenbibliotheken für GC-MS [1, 3-7], HPLC-DAD [8, 9] und LC-

MS/MS-Instrumente [4, 10-19] entwickelt. Allerdings ist deren Anwendung meistens an spezielle Instrumente unter Nutzung definierter Geräteparameter gebunden.

Durch den Einsatz hochauflösender Massenspektrometer mit Flugzeit-Analysatoren (TOF-MS) mit einer Massenauflösung  $>10\,000$  und einer Massengenauigkeit  $<5$  ppm ergaben sich in den letzten Jahren neue Möglichkeiten der Systematischen Toxikologischen Analyse [16, 20-36]. Das Funktionsprinzip dieser Instrumente ermöglicht eine umfassende Registrierung aller relevanten Informationen einer Probe. Vor der Messung erfolgt keine Vorgabe oder a priori Einschränkung der zu identifizierenden Substanzen. Die hohe Massenauflösung ermöglicht eine gute Selektivität auch bei überlappenden Peaks und starker Matrixbelastung. Der wesentliche Vorteil hochauflösender, akkurater Massenspektren liegt in der Möglichkeit der Summenformelidentifizierung. So lassen sich auch noch bei einem später aufkommenden Verdacht eines Giftes anhand des Isotopenmusters und der akkuraten monoisotopischen Masse Analyte nachweisen bzw. ausschließen. Für TOF-Massenspektrometer wurden zum Zwecke der Identifizierung toxikologisch relevanter Verbindungen anhand ihrer exakten Massen oder Summenformeln Datenbanken verwendet [16, 20-23, 25-28, 30, 31, 33-35]. Allerdings ist wegen der riesigen Anzahl möglicher Isomere die ermittelte Summenformel einer unbekannt Substanz lediglich der erste Schritt der Substanzidentifikation. Daher sind weitere Parameter wie Retentionszeit, Metabolitenmuster oder MS-Fragmentspektren erforderlich, um ein Gift eindeutig zu identifizieren.

Die Flüssigchromatographie mit Hybrid-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (LC-QTOF-MS) stellt hierfür eine optimale Erweiterung der Möglichkeit von LC-TOF-MS dar, indem zusätzlich von jedem relevanten chromatographischen Signal hochaufgelöste, akkurate CID-Spektren gemessen werden können. Diese können dann mit Hilfe einer Bibliothekssuche oder durch eine Auswertung der Fragmentierung eine eindeutige Substanzzuordnung ermöglichen.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, diese neue Technik für die Systematische Toxikologische Analyse (STA) zu erschließen. In diesem Zusammenhang war es nötig eine für die STA möglichst universelle Aufarbeitung von Blut- und Haarproben für die Analyse mit diesem Verfahren zu finden und eine LC-QTOF-MS-Messmethode zu entwickeln, die den Nachweis möglichst vieler Substanzen gestattet. Für die Identifizierung toxikologisch relevanter Substanzen sollte eine Datenbank und Spektrenbi-

bibliothek aufgebaut werden. Weiterhin sollte eine Methode zur systematischen Suche nach Metaboliten identifizierter Substanzen im LC-QTOF-MS-Datenfile entwickelt und eine Methode zur Konzentrationsbestimmung aus den Peakflächen geschaffen werden. Die Methode sollte an ausgewählten toxischen Substanzen validiert werden. Schließlich sollte die Anwendung des Verfahrens von der Probenvorbereitung für Blut- und Haarproben, deren Analyse mit der entwickelten LC-QTOF-MS-Methode und der Substanzidentifizierung mittels Datenbank und Spektrenbibliothek, der Suche nach Metaboliten und der Konzentrationsabschätzung anhand von realen Proben im Routinebetrieb überprüft werden.

## **2. Grundlagenteil**

In diesem Kapitel wird zunächst auf die Thematik der Systematischen Toxikologischen Analyse (STA) im Allgemeinen eingegangen und anschließend die Funktionsweise und die spezielle Anwendung von hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometern in der STA behandelt. Abschließend werden die Besonderheiten von Haaren als Probenmaterial erörtert.

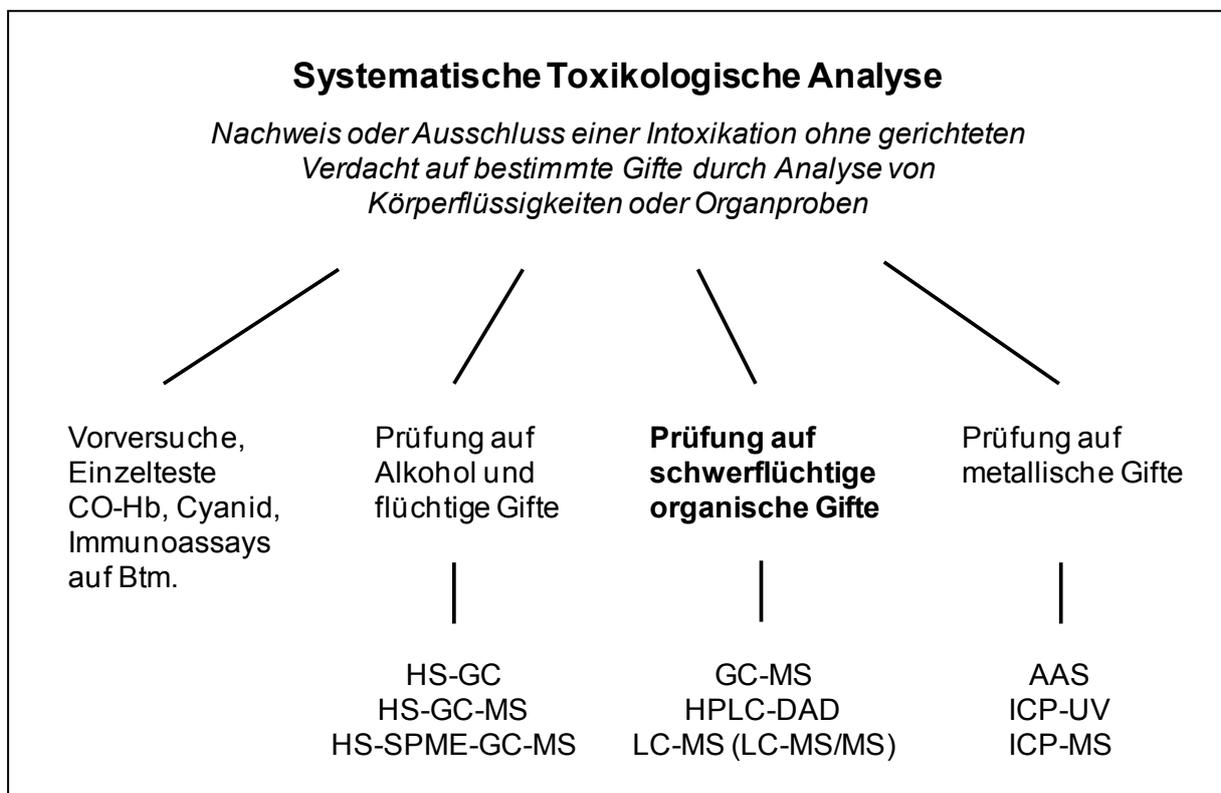
### **2.1 Systematische Toxikologische Analyse**

Im ersten Teil dieses Abschnitts wird die Systematische Toxikologische Analyse (STA) definiert und es werden allgemeine Möglichkeiten der Durchführung dargestellt. Im zweiten Teil wird dann speziell auf den Einsatz von Massenspektrometern und die Verwendung von Spektrenbibliotheken eingegangen.

#### **2.1.1 Analytische Problemstellung und Lösungswege**

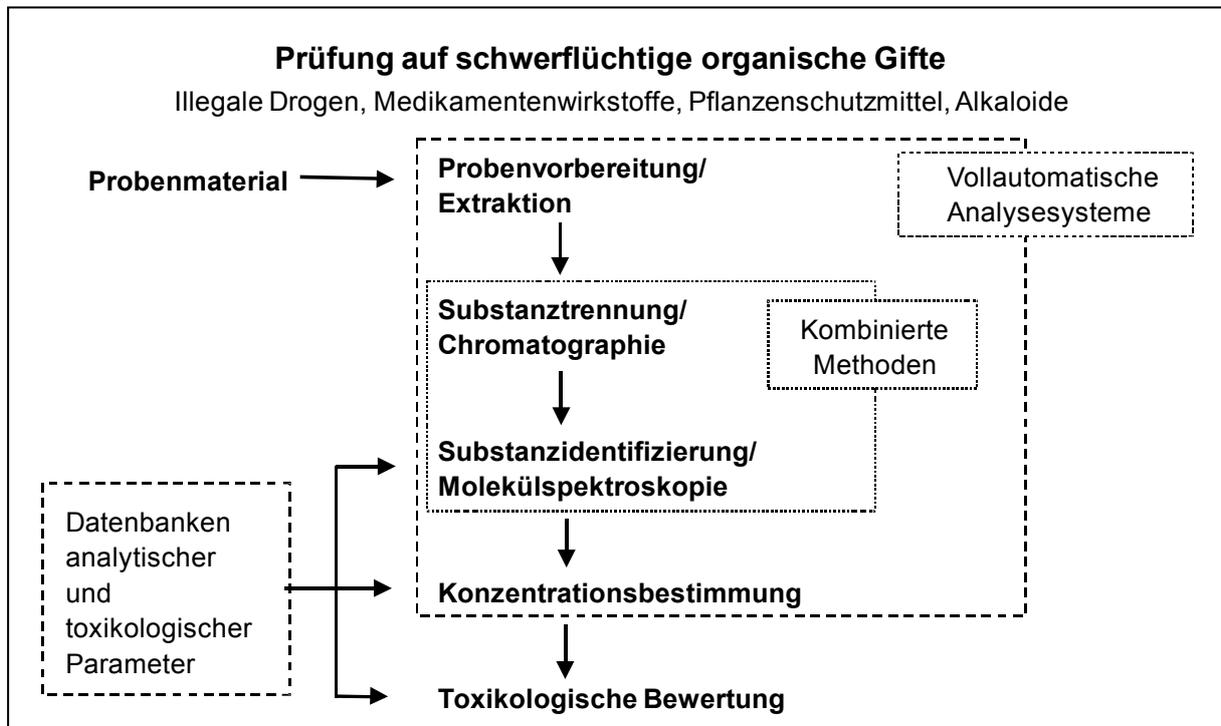
Die Systematische Toxikologische Analyse (STA) ist die allgemeine Suche nach toxischen Substanzen in einer biologischen Probe – wie zum Beispiel menschlichem Blut, Urin, Organgeweben oder Haaren – ohne Informationen über das Vorhandensein und die Art des Giftes. Die mit dieser Suche verbundenen Herausforderungen stellen eine der schwierigsten Aufgaben in der analytischen Chemie dar und werden wohl niemals vollständig lösbar sein. So beläuft sich die Anzahl zurzeit bekannter, definierter chemischer Verbindungen auf über 60 Millionen [37]. Das Spektrum toxikologisch relevanter Substanzen umfasst Verbindungen unterschiedlichster Eigenschaften wie giftige Gase, flüchtige Substanzen, Metallionen und als größte Gruppe die organischen Verbindungen mit geringer Flüchtigkeit. Zu der zuletzt genannten Gruppe gehören die toxikologisch wichtigsten Substanzen wie illegale Drogen, Arzneimittel, Pestizide, chemische Reagenzien und Alkaloide. Insgesamt sind mehr als 100 000 Substanzen in praktischer Nutzung, zu denen über 16 000 Medikamentenwirkstoffe und 1500 Pflanzenschutzmittel zählen. Eine Darstellung von Nachweismöglichkeiten der unterschiedlichen Substanzklassen ist in Abbildung 2.1 gegeben. Der Einsatz bzw. das Vorkommen von Wirkstoffen umfasst weite Konzentrationsbereiche im Untersuchungsmaterial. So liegt zum Beispiel der letale Blutspiegel von Digoxin bei  $>5 \text{ ng/ml}$  [38], wohingegen der von Salizylsäure bei  $>0,5 \text{ mg/ml}$  [38] liegt. Daher müssen bei einer STA die nachzuweisenden Substanzen innerhalb großer Konzentrationsspannen detektiert werden. Erschwerend kommt bei der STA hinzu,

dass die Analyse Störungen durch körpereigene Stoffe sowie Fäulnisprodukte unterliegt. Eine Probenvorbereitung muss daher wohl bedacht vorgenommen werden, und es muss stets berücksichtigt werden, dass bei einer Matrixabtrennung auch immer toxikologisch relevante Analyte verloren gehen können. Zudem sind die Medikamentenwirkstoffe nicht immer in der Verabreichungsform nachweisbar. Oftmals ist die Einnahme von Drogen oder Medikamenten nur noch durch den Nachweis von Wirkstoffmetaboliten möglich. Insbesondere bei suizidalen Handlungen sind Mischintoxikationen für den Todeseintritt relevant. Daher muss bei der Interpretation eines Befunds immer das Zusammenwirken evtl. mehrerer verschiedener Medikamente berücksichtigt werden. So können zum Beispiel fünf oder mehr unterschiedliche Medikamente für eine Vergiftung verantwortlich sein.



**Abbildung 2.1:** Analyseumfang und Methoden der Systematischen Toxikologischen Analyse. CO-Hb = Kohlenmonoxid gebundenes Hämoglobin, Btm. = Betäubungsmittel, HS-GC = Headspace-Gaschromatographie, HS-GC-MS = Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie, HS-SPME-GC-MS = Headspace-Festphasenmikroextraktion-Gaschromatographie-Massenspektrometrie, GC-MS = Gaschromatographie-Massenspektrometrie, HPLC-DAD = Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarraydetektor, LC-MS = Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie, LC-MS/MS = Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie, AAS = Atomabsorptionsspektroskopie, ICP-UV = Induktiv gekoppeltes Plasma-Ultraviolett-Spektroskopie, ICP-MS = Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometrie.

Der allgemeine Ablauf einer Systematischen Toxikologischen Analyse bei der Untersuchung einer Probe auf schwerflüchtige organische Gifte ist in Abbildung 2.2 wiedergegeben.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Systematischen Toxikologischen Analyse (STA) [39].

Methoden zur STA organischer Verbindungen beginnen in der Regel mit geeigneten Probenvorbereitungen, bei denen so viele Gifte wie möglich aus der Matrix extrahiert werden. Der Extrakt wird dann mittels einer Kombination von Chromatographie – zur Trennung der Komponenten des Extrakts – und molekularer Spektrometrie – zur Charakterisierung der Substanzen – analysiert. Die Identifizierung der Spektren erfolgt schließlich durch Computersuche in Spektrenbibliotheken. Die populärsten Methoden sind die Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) [1] und die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) [2]. In den letzten zehn Jahren wurden mehrere Ansätze unternommen um die Verwendung der Flüssigchromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie (LC-MS oder LC-MS/MS) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) oder chemischer Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) für die Systematische Toxikologische Analyse zu nutzen [10-13, 16, 20-36, 40-51]. Nach der Identifizierung der toxikologisch relevanten Substanzen erfolgt deren zumindest semiquantitative Konzentrationsbestimmung. Dies ermöglicht bei der toxikologischen Bewertung eine Einordnung der vorliegenden Konzentration in den nicht wirksamen, den therapeutischen, den toxischen

oder den letalen Bereich. Unter Berücksichtigung der zur Vergiftung bzw. zum Todeintritt geführten Umstände, sowie der individuellen Gegebenheiten (Alter, Geschlecht, Konstitution, Vorerkrankungen, etc.) und dem analytischen Befund wird abschließend ein Gutachten erstellt.

### **2.1.2 Bedeutung der Massenspektrometrie in der STA**

Die hohen Ansprüche der STA – die Erfassung einer Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher, vor der Analyse nicht bekannter Substanzen – stellen eine besondere Herausforderung an die instrumentellen Voraussetzungen dar. Die rasanten Entwicklungen in der analytischen Instrumentierung innerhalb der letzten Jahre hatten einen entscheidenden Einfluss auf das klinisch- und forensisch-toxikologische Labor. Dabei erwies sich das Massenspektrometer zur instrumentellen Methode der Wahl. Der Einsatz von GC-MS-Instrumenten mit Elektronenstoß-Ionisation (EI) und später mit chemischer Ionisation (CI) stellte den goldenen Standard jedes forensischen Labors dar. Bis vor ca. 10 Jahren waren dies die einzigen im Labor eingesetzten Massenspektrometer. In den letzten Jahren fanden weitere Kopplungstechniken sowie modernere massenspektrometrische Analysatoren Einzug in die Laborroutine.

Insbesondere die Kopplungstechnik der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (LC-MS) erwies sich als besonders wertvoll. Schwer- und nicht-flüchtige sowie thermisch labile Verbindungen wurden unter Verwendung von Elektrospray-Ionisationsquellen (ESI) oder unter Atmosphärendruck arbeitenden chemischen Ionisationsquellen (APCI) direkt aus der Messlösung nachweisbar. Der Einsatz mehrerer hintereinandergeschalteter Massenanalysatoren wie bei Tandem-Massenspektrometern (MS/MS) sowie die Verwendung von Flugzeitspektrometern (TOF-MS) lieferten eine hohe Spezifität. Mit Hilfe dieser technischen Neuerungen wurde die Identifizierung von Spuren in komplexen Gemischen mit einer hohen Empfindlichkeit ermöglicht.

Bislang existiert für kein Analyseverfahren die Möglichkeit einer Strukturaufklärung allein anhand der gemessenen Spektren. Eine eindeutige Identifizierung einer Substanz kann daher nur über den Vergleich des unbekanntes, gemessenen Spektrums mit denen aus einer Bibliothek von Referenzspektren toxikologisch relevanter Substanzen erfolgen. Die Verwendung von Spektrenbibliotheken zur Identifizierung unbekannter Substanzen in einer Probe stellt seit der Verfügbarkeit von Computern

eine Standardmethode in der STA dar. Hierbei wird eine Vielzahl verschiedener Substanzen, ohne dass hierfür Standards nötig sind, durch Vergleich mit empirisch gemessenen Bibliotheksspektren identifiziert.

Die Verwendung der Massenspektrometrie hat gegenüber anderen Analysetechniken wie zum Beispiel der UV/Vis-Spektroskopie den Vorteil, dass Strukturinformationen von Verbindungen zugänglich sind. Geeignete massenspektrometrische Verfahren zur Erzeugung von Molekülfragmenten sind zum Beispiel die Elektronenstoß-Ionisation (EI), die In-Source-Fragmentierung oder die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Dabei werden durch strukturabhängige Bindungsdissoziationen substanzspezifische Fragmentspektren erzeugt, welche als Fingerprint einer Substanz zu deren Identifizierung verwendet werden können. Die Vergleichbarkeit dieser Spektren ist jedoch immer an Standardbedingungen und spezielle Instrumente gebunden. Die Identifikation anhand von Bibliotheken unter Einsatz von GC-MS oder LC-MS/MS basiert auf der Anwesenheit von Fragmentationen und deren relativer Häufigkeit [52].

Man unterscheidet harte und weiche Ionisationstechniken. So stellt die Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV), bedingt durch die Erzeugung von Fragmenten, eine harte Ionisation dar, während die im Allgemeinen ohne wesentliche Fragmentierung der Substanz stattfindende CI, APCI und ESI unter Erzeugung von Quasimoleküllionen schonende Techniken sind. Bei der harten Elektronenstoßionisation (EI) werden durch den Beschuss der zu analysierenden Moleküle mit Elektronen, und die dabei stattfindende Entfernung eines Elektrons, Radikalkationen des Moleküls erzeugt. Diese fragmentieren auf Grund der Überschussenergie in der Regel im Anschluss an ihre Entstehung, und es ergeben sich Spektren mit Molekülionenpeaks geringer Intensität und Fragmentmassen hoher Intensität.

Dahingegen werden bei der schonenden Ionisation durch CI, APCI oder ESI zunächst relativ stabile Quasimoleküllionen ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  und Addukte des Moleküls mit  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $HCO_2^-$ ,  $CH_3CO_2^-$ ) erzeugt, bei denen erst eine gezielte Fragmentierung eingeleitet werden muss, um Fragmentspektren zu erhalten. Dazu werden die Ionen in einem elektrischen Feld auf die nötige Kollisionsenergie beschleunigt und durch Zusammenstöße mit Molekülen eines Kollisionsgases aktiviert. Dabei wird die Translationsenergie der Ionen teilweise in Schwingungsenergie umgewandelt. Die zugeführte Energie wird schnell im Molekül über alle Freiheitsgrade verteilt. Anschließend kann eine unimolekulare Dissoziation der durch

Stöße aktivierten Ionen erfolgen. Dabei werden die entstehenden Fragmentspektren maßgeblich durch die verwendete CID-Einheit beeinflusst.

Bei der In-Source-Fragmentierung, welche in der Quelle im Hochdruckbereich zwischen der Transferkapillare und dem Skimmer stattfindet, werden die Ionen unspezifisch fragmentiert. Durch die fehlende Möglichkeit einer Selektion ausgewählter Ionen für die CID werden Mischfragmentspektren erzeugt. Dahingegen liefert die Verwendung einer Kollisionszelle in Kombination mit einem vorgeschalteten Massenfilter, in der Regel einem Quadrupol, die Möglichkeit einer Selektion ausgewählter Ionen für die CID, wodurch selektiv für ein Ion Fragmentspektren erhalten werden. Diese Technik wird zum Beispiel bei Triple-Quadrupol- (QQQ) und QTOF-Massenspektrometern angewendet. Dabei wird mit dem ersten Quadrupol das zu fragmentierende Ion selektiert und anschließend in der Kollisionszelle fragmentiert. Der nachfolgende Massenanalysator (Q bzw. TOF) analysiert dann die entstandenen Fragmente. Da es sich zur Selektion und Fragmentierung von Ionen um physikalisch getrennte Analysatoren handelt, wird diese Technik als „MS/MS in space“ bezeichnet. Demgegenüber stellt die Verwendung einer Ionenfalle (IT) zur Erzeugung von Fragmentspektren die sogenannte „MS/MS in time“-Technik dar. Hierbei erfolgt zeitlich versetzt die Selektion, sowie Fragmentierung von Ionen in demselben Massenanalysator. Auch hier werden selektiv für ein Ion Fragmentspektren erhalten.

CID-Spektren hängen insbesondere von folgenden Parametern ab:

- Ionisationstechnik (CI, APCI, ESI)
- Art der erzeugten Ionen (Radikationen, Quasimolekülionen)
- Ladungszustand des Vorläuferions (einfach, mehrfach geladen)
- Kollisionsgas (Stickstoff, Argon)
- Kollisionsenergie
- Struktur des Moleküls
- Art der CID-Einheit (Ionenfalle, Kollisionszelle)
- Geometrie der CID-Einheit (verschiedene Kollisionszellen)

Die Ionisationstechnik (CI, APCI, ESI) beeinflusst die Art der erzeugten Ionen (Radikationen, Quasimolekülionen) und deren Ladungszustand (einfach, mehrfach gela-

den). Durch eine Zunahme des Ladungszustandes wird die Fragmentierung desselben Moleküls bereits bei geringeren Kollisionsenergien erreicht. Bei gleicher Kollisionsenergie wird durch die Verwendung von Argon als Kollisionsgas eine höhere Energieanregung des Ions verursacht, wodurch es stärker als bei der Verwendung von Stickstoff fragmentiert. Umgekehrt bewirkt eine Erhöhung der Kollisionsenergie bei gleichem Kollisionsgas eine stärkere Fragmentierung. Die zur Bindungsdissoziation nötige Energie hängt stark von der Struktur des Moleküls ab. Je größer die Anzahl an Freiheitsgraden ist, über die sich die zugeführte Energie verteilen kann, und je stabiler die Bindungen im Molekül sind, umso höher muss die Kollisionsenergie sein, um eine Bindungsdissoziation herbeizuführen. Auch die Art der CID-Einheit, sowie deren Geometrie wirken sich auf die stattfindenden Stöße der Ionen mit dem Inertgas und dadurch auf die entstehenden Spektren aus.

Es gibt eine Vielzahl von Massenspektrenbibliotheken (Sammlungen von Fragmentspektren von Verbindungen) für unterschiedliche Anwendungen und unter Verwendung verschiedener Techniken. Im Folgenden soll entsprechend der verwendeten Analyseinstrumente auf einige in der Praxis angewandte Bibliotheken sowie dazu publizierte Arbeiten eingegangen werden.

### *GC-MS in der STA*

Für den Vergleich von GC-MS-Spektren stehen umfangreiche Bibliotheken zur Verfügung, die bei einer Elektronenstoßionisationsenergie von 70 eV gemessen wurden. So enthält die „Wiley Registry™ of Mass Spectral Data“ zurzeit mehr als 660 000 Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI) [3]. Die NIST / EPA / NIH Massenspektrenbibliothek enthält aktuell 191 436 EI-Spektren [4]. Für die toxikologische Analyse ist die Spektrenbibliothek von Maurer, Pflieger und Weber mit 7840 Spektren besonders wertvoll, die neben den unveränderten Giften auch viele Metabolite und die Spektren verschiedener Derivate enthält [1]. Der Einsatz dieser unter Standard-EI-Bedingungen erstellten Bibliotheken ist weit verbreitet und es wurden daraus viele kleinere Bibliotheken für spezielle Anwendungsbereiche bestimmter Verbindungsklassen erstellt. Diese finden häufig Verwendung zur Identifizierung von gerichteten (im Allgemeinen Vorhandensein von Standards mit Retentionszeiten) und ungerichteten Analysen (im Allgemeinen Abwesenheit von Referenzstoffen) [5-7]. Die für das Tunen und Screening mittels GC-MS verwendeten Standardbedingungen

lieferten gute Ergebnisse der Bibliothekssuche bei einem breiten Spektrum von Verbindungen.

### *LC-MS/MS in der STA*

Die Anwendung von LC-MS-Instrumenten wie Single-Quadrupol- [45, 53-56] oder TOF-Massenspektrometern [33, 35] unter Verwendung von CID-Spektrenbibliotheken ist für die STA begrenzt. Spektren können nur durch In-Source-Fragmentierung erzeugt werden und stellen Mischspektren dar, was insbesondere bei hoher Matrixbelastung und koeluierenden Peaks erhebliche Störungen darstellt.

Die Anwendung von Ionenfallen (IT), bei denen zunächst Ionen gesammelt, anschließend selektiert und dann gezielt fragmentiert werden können, stellt in Bezug auf die erhaltenen CID-Spektren eine deutliche Verbesserung dar. Lui et al. berichteten von einer Methode mit einer Ionenfalle (IT), die für die routinemäßige Bestimmung von Drogen in postmortalen Proben geeignet ist [14] und ein schnelles Screening unter Verwendung einer selbst erstellten Spektrenbibliothek von mehr als 800 toxikologisch relevanten Substanzen und deren Retentionszeiten ermöglicht [15]. Auch Pihlainen et al. [19] und Hoizey et al. [18] setzten IT-Massenspektrometer zusammen mit CID-Bibliotheken erfolgreich für die STA ein.

Die Verwendung von IT-Massenspektrometern weist jedoch eine deutlich begrenzte Kapazität auf. Insbesondere ohne vorgeschalteten, weiteren Massenfilter wird die Kapazität der IT schnell erreicht, indem sie mit Ionen in hoher Konzentration gefüllt wird und Ionen in niedriger Konzentration nicht ausreichend gesammelt werden können. Im Gegensatz zu „MS/MS in space“-Massenspektrometern (zum Beispiel QQQ- oder QTOF-Massenspektrometer) ist die Zykluszeit durch die zeitlich nacheinander abfolgenden Experimente von „MS/MS in time“-Massenspektrometern (zum Beispiel IT-Massenspektrometer) deutlich länger. Daher wird mit dieser Technik eine umfangreiche Erfassung vieler Substanzen nicht realisiert.

Gegenüber LC-MS-Techniken mit In-Source-Fragmentierung und IT-Analysen, bei denen entweder eine hohe Matrixbelastung oder geringe Kapazität und lange Scanzeit gegeben ist, stellen Hybrid-Techniken eine wesentliche Verbesserung dar. Bei dieser Technik wird die zu identifizierende Substanz durch einen Massenanalysator erst selektiert und anschließend in einer Kollisionszelle oder einer Ionenfalle

fragmentiert und die entstandenen Fragmentationen mit einem weiteren Analysator analysiert.

Eine wesentliche Verbesserung der Selektivität und Empfindlichkeit brachte die Anwendung von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern und vor allem von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern mit linearer Ionenfalle mit sich. Bei jedem dieser Instrumente ist jedoch nur ein Multi-Targeted-Screening möglich [10-13, 44-51]. Dies bedeutet, dass Substanzen nur nachgewiesen werden können, wenn sie vor der Messung in der Methode erfasst sind. Die Anzahl an Analyten in einem solchen Verfahren wird durch das Minimum der Verweilzeit für jeden Multi Reaction Monitoring (MRM) Übergang im Messzyklus bestimmt. Ein leistungsfähiges Screeningverfahren mit der Erfassung von bis zu 700 Substanzen in einem chromatographischen Lauf wurde von Dresen et al. entwickelt. Dies wurde mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle durch Verwendung von 2 min Retentionszeitfenster für die entsprechenden Analyte realisiert. Die informationsabhängige Akquisition (IDA) mit dem empfindlichen Produktionenscan durch die Ionenfalle und die Vereinigung der Fragmentationen aus drei Kollisionsenergien in der Falle zu einem gemischten Massenspektrum („Kollisionsenergie-Spread“) wurde zur Identifizierung verwendet [12]. Generelle LC-Screenings mit MS/MS-Identifizierung bestehen aus einem Übersichtsscan um die Analyte zu detektieren und einem korrespondierenden MS/MS-Scan um eine Identifizierung mittels Bibliotheksabgleichs zu erhalten. Beide Scans – Übersichtsscan und abhängiger Scan – können im selben analytischen Lauf durch die automatische Auswahl der Vorläuferionen und Messung derer MS/MS-Spektren unverzüglich nach ihrer Detektion im Übersichtsscan erfolgen. Hierbei muss zwischen „Daten-abhängiger Akquisition“ und „Informations-abhängiger Akquisition“ unterschieden werden. Ersteres bedeutet, dass aus der aktuellen Messung Vorläuferionen für das folgende MS/MS-Experiment ausgewählt werden, wohingegen letzteres Verfahren nach einer vorab erstellten Liste ausgewählter Vorläuferionen erfolgt.

Massenspektren-Bibliotheken für LC-MS mit In-Source-Fragmentierung und LC-MS/MS mit der Fragmentierung in der Kollisionszelle zwischen den beiden MS-Einheiten wurden mehrfach beschrieben und enthalten zwischen 301 und 1253 Substanzen [10, 11, 13, 50].

Diaz et al. berichteten von einer am QTOF-Massenspektrometer entwickelten „empirischen“ Spektrenbibliothek, unkorrigierter, akkurater CID-Spektren, von 230 organischen Schadstoffen [17]. Deren Anwendung auf dotierte Lebensmittel- und Wasserproben zeigte auch in Anwesenheit hoher Matrixbelastung gute Ergebnisse.

Die NIST / EPA / NIH Massenspektrenbibliothek beinhaltet MS/MS-Spektren für mehr als 14 802 Substanzen. Die Spektren wurden überwiegend mit Ionenfallen-Massenspektrometern akquiriert. Die fehlende Standardisierung erwies sich bei der Bibliothekssuche unter Verwendung von MS/MS-Spektren als problematisch. Die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) einer Verbindung hängt, wie bereits oben geschildert, stark von den instrumentellen Bedingungen ab.

Die Vergleichbarkeit von MS/MS-Spektren, die an verschiedenen LC-MS/MS-Instrumenten und in unterschiedlichen Labors (inter-Laborvergleich) aufgenommen wurden, sowie deren Reproduzierbarkeit über mehrere Jahre wurden von Gergov et al. [57] und Bristow et al. [58] untersucht. Dabei zeigte sich eine grundlegende Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Hopley et al. führten weitere Untersuchungen durch und verglichen MS/MS-Spektren von 48 Substanzen, welche an 11 verschiedenen Massenspektrometern (6x IT, 2x QQQ, 1x QQQ/LIT, 2x QTOF) aufgenommen wurden [59]. Die Reproduzierbarkeit der CID-Spektren erhöhte sich bei der Unterteilung in „MS/MS in time“- und „MS/MS in space“-Bibliotheken und beim Vergleich innerhalb der beiden getrennten Instrumentengruppen. Es zeigte sich, dass auf diesem Wege gute Ergebnisse in Bezug auf die Substanzidentifizierung (Spektrenähnlichkeit) an verschiedenen LC-MS/MS-Instrumenten des gleichen Typs jedoch von verschiedenen Herstellern erzielt werden konnten. In einer weiteren Studie wurden verschiedene Instrumente in unterschiedlichen Laboratorien verwendet, um Suchergebnisse einer verwendeten Bibliothek von 402 Substanzen mit 3759 Spektren mit einem vorgegebenen Suchalgorithmus zu vergleichen [60, 61]. Es zeigte sich, dass in 98,1 % der Fälle die richtige Verbindung erhalten wurde. In 1,9 % der Fälle wurde die richtige Substanz auf dem zweiten Platz der Ergebnisliste angegeben. Der beobachtete hohe Prozentsatz richtiger Zuordnungen zeigte, dass die entwickelte massenspektrometrische Bibliothekssuche zu einem großen Teil instrumentenunabhängig ist. Im Gegensatz zum Einsatz von MS/MS-Bibliotheken in der Protein- und Peptid-Analyse [62-67] hat die routinemäßige Verwendung von MS/MS-Bibliotheken in der ungerichteten Analyse kleiner Moleküle bislang nur eingeschränkten Erfolg gezeigt.

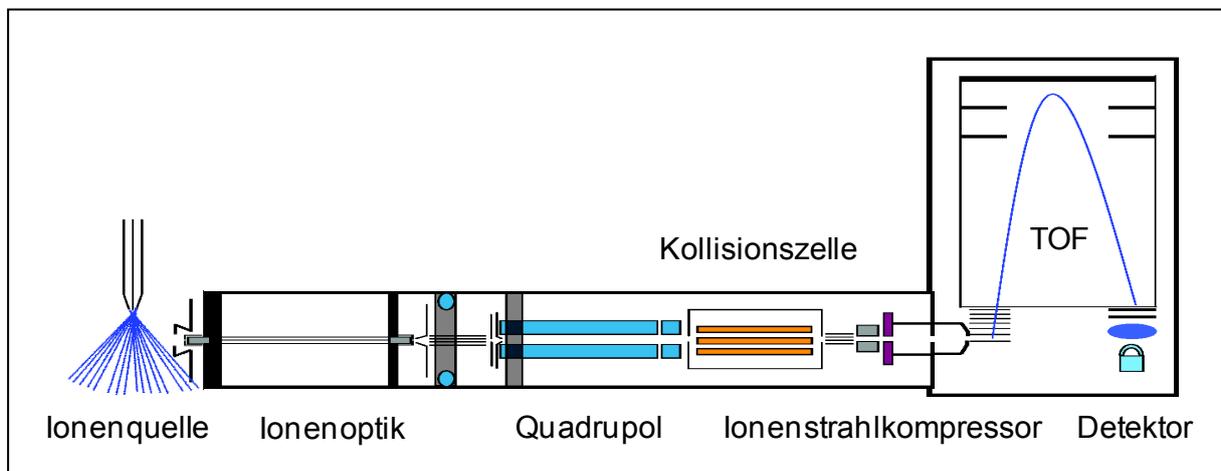
## 2.2 Grundlagen zum QTOF-Massenspektrometer

In diesem Abschnitt wird der grundlegende Aufbau des QTOF-MS 6530 Massenspektrometers von Agilent Technologies dargestellt. Anschließend werden die sich daraus ergebenden Möglichkeiten der Datenakquisition erläutert.

### 2.2.1 Aufbau und Funktionsweise

Der Aufbau und die Funktionsweise des QTOF-Massenspektrometers können auf Grund der Komplexität in diesem Rahmen nicht in vollem Umfang erläutert werden. Daher wird in diesem Abschnitt nur auf die wesentlichen, zum Verständnis dieser Arbeit beitragenden, Aspekte eingegangen.

Der schematische Aufbau des QTOF-MS 6530 ist in Abbildung 2.3 wiedergegeben. Die chronologische Abfolge der Entstehung von Gasphase-Ionen (Ionenquelle und Transferkapillare), deren mögliche Selektion (Quadrupol) und Fragmentierung (Kollisionszelle), Separation im TOF-Analysator und Registrierung (Detektor) wird zunächst in einem allgemeinen Überblick dargestellt. Einige für diese Arbeit besonders wichtige Komponenten werden anschließend speziell behandelt.



**Abbildung 2.3:** Aufbau des QTOF-MS 6530 von Agilent Technologies [68].

Unter Verwendung von Kopplungstechniken, die einen Probentransport mit Hilfe von Flüssigkeiten beinhalten, wie zum Beispiel die Flüssigchromatographie (LC) oder lediglich eine Pumpe für die Direktinjektion, müssen die in Lösung vorliegenden Analyte ionisiert und in die Gasphase überführt werden. Dies erfolgt mit Hilfe von Ionenquellen wie zum Beispiel der ESI-, APCI- oder deren Kombination der Multimode-Quelle. Die Entfernung des Lösungsmittels wird in der Regel durch Stickstoff als Trocknungsgas bei hohen Temperaturen von 200-400 °C unterstützt. Geladene

Tröpfchen, Cluster sowie freie Gasphasenionen werden durch ein elektrisches Feld zur Transferkapillare, dem Eingang zum Massenspektrometer und damit verbundenen Übergang vom Atmosphärendruck zum Vorvakuum, gelenkt. In dieser Kapillare erfolgen eine weitere Trocknung sowie ein Declustering. Am Ausgang der Transferkapillare werden Stickstoffmoleküle und neutrale Teilchen entfernt. Die Ionen gelangen anschließend zum Quadrupol, welcher eine Selektion von Ionen ermöglicht (siehe Abschnitt 2.2.2.) und entweder nur diese oder alle Ionen passieren lässt. In der sich anschließenden Kollisionszelle ist eine gezielte Fragmentierung zuvor durch den Quadrupol selektierter Ionen möglich. Die aus der Kollisionszelle kommenden Ionen werden durch einen Ionenstrahlkompressor zu einem feinen Ionenstrahl fokussiert, welcher anschließend durch einen Schlitz weiter geformt wird (idealerweise in eine Fläche senkrecht zum TOF-Analysator). Im TOF-Analysator werden dann aus diesem Strahl Ionenpakete ins Reflektor-TOF gepulst. Dort werden sie nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt und schließlich am Detektor registriert.

Für die wesentlichen Komponenten des Massenspektrometers und deren Funktionsweise wird in Bezug auf diese Arbeit näher eingegangen.

### *Ionenquelle*

Zur Erzeugung der Ionen wurde eine ESI-Quelle mit Jet Stream Technologie verwendet. Diese verfügt gegenüber konventionellen ESI-Quellen über eine effizientere Desolvatisierung und Komprimierung des Sprays durch einen sie umgebenden zylindrischen Stickstofffluss (in der Regel von 10-12 l/min bei 300-400 °C), dem Jet Stream. Durch die senkrechte Anordnung des Zerstäubers zur Transferkapillare werden nicht ionisierte, neutrale Teilchen weitestgehend am Eingang des Massenspektrometers vorbeigeleitet, wodurch der Untergrund in den gemessenen Spektren reduziert wird. Diese Technik gestattet eine direkte Kopplung der LC mit der MS selbst bei LC-Flussraten über 1 ml/min. Die ESI verläuft ebenso wie bei der APCI und MALDI sehr schonend, wobei überwiegend Quasimolekülionen sowohl im positiven ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ) wie auch im negativen Ionisationsmodus ( $[M-H]^-$ ,  $[M+HCO_2]^-$ ,  $[M+CH_3CO_2]^-$ ) entstehen.

### *Quadrupol (Q)*

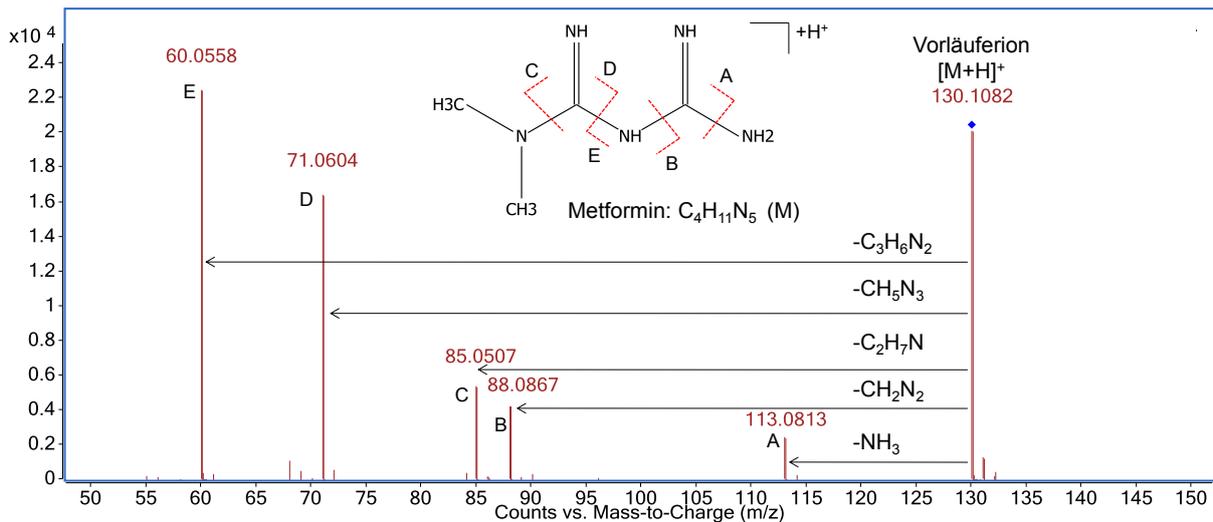
Der Quadrupol dient im MS-Experiment nur als Ionenguide, eine Selektion von Massen erfolgt nicht. Im MS/MS-Experiment hingegen fungiert er als Massenfilter. Er

bietet die Möglichkeit mit einer Auflösung von 1,3, 4 oder 9 amu Vorläuferionen für CID-Experimente zu selektieren. Die höchste Auflösung von 1,3 amu liefert CID-Spektren mit der höchsten Reinheit, da Massen außerhalb des kleinen Isolationsfensters nicht fragmentiert werden. Durch Reduzierung der Auflösung des Quadrupols und somit der breiteren Isolation von Vorläuferionen mit zum Beispiel 4 amu werden insbesondere bei starker Matrixbelastung weitere Vorläuferionen fragmentiert, wodurch stärker Matrix belastete CID-Spektren, Mischspektren entstehen. Die Empfindlichkeit der CID-Spektren wird jedoch erhöht, da die asymmetrische Isolation des Vorläuferions (-0,3 bis +3,7 amu um das selektierte  $m/z$  des Vorläuferions bei einer Auflösung von 4 amu) dazu führt, dass weitere Isotope neben dem monoisotopischen Signal mit erfasst werden. Insbesondere bei chlorierten und bromierten Molekülen mit intensiven M+2 Isotopen ist eine Empfindlichkeitssteigerung möglich. Die asymmetrische Isolation von 9 amu ist insbesondere für große Moleküle mit ausgeprägtem Isotopenmuster geeignet.

### *Kollisionszelle*

Während der MS-Experimente fungiert die lineare Hexapol-Kollisionszelle nur als Ionenguide, wohingegen sie bei MS/MS-Experimenten zur Fragmentierung von Quasimolekülonen dient. Zur Erzeugung von Fragmentationen werden die Ionen durch eine Spannung beschleunigt und durch Zusammenstöße mit einem Inertgas fragmentiert. Als Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet, der sich bei einem Druck von ca.  $8 \times 10^{-3}$  Torr in dieser Zelle befindet. Die verwendete Kollisionsenergie lag in der Regel im Bereich zwischen 0 und 40 eV. Das Niederenergie CID-Spektrum bei 10 eV von Metformin, einem oralen Antidiabetikum, ist in Abbildung 2.4 anhand eines realen Beispiels einer analysierten Blutprobe dargestellt.

Das vom Quadrupol mit einer Auflösung von 4 amu isolierte Vorläuferion (130,1082  $m/z$ ) wurde mit einer Kollisionsenergie von 10 eV auf inerte Stickstoffmoleküle in der Kollisionszelle beschleunigt. Durch Stöße und damit verbundener Anregung von Schwingungszuständen kommt es zur Bindungsdissoziation im Molekül, bevorzugt an den schwächsten Bindungen und der Entstehung von Fragmenten, welche die Ladung besonders gut stabilisieren. Das sich ergebende Fragmentmuster ist spezifisch für eine Verbindung, da es deren Struktur widerspiegelt. Das CID-Spektrum des Metformins lässt sich durch eine Abspaltung von Ammoniak (A), Cyanamid (B), Dimethylamin (C), Guanidin (D) und Cyanodimethylamin (E) erklären.



**Abbildung 2.4:** Beispiel eines CID-Spektrums anhand von Metformin mit einer Isolation des Vorläuferions von 4 amu und einer Fragmentierungsenergie von 10 eV.

### Flugzeit-Analysator (TOF)

Da bei der TOF-MS die Flugzeit von Ionen ermittelt wird und diese im Prinzip beliebig lange gemessen werden kann, weisen TOF-Analysatoren praktisch keine Limitierung der zu ermittelnden Massen auf. Der hier verwendete TOF-Analysator kann in unterschiedlichen Bereichen mit bis zu 20 000, 3200 oder 1700 m/z betrieben werden. Durch die Einschränkung des zu analysierenden Bereichs erfolgt eine höhere Pulsfrequenz wodurch mehr Spektren in derselben Zeiteinheit erzeugt werden.

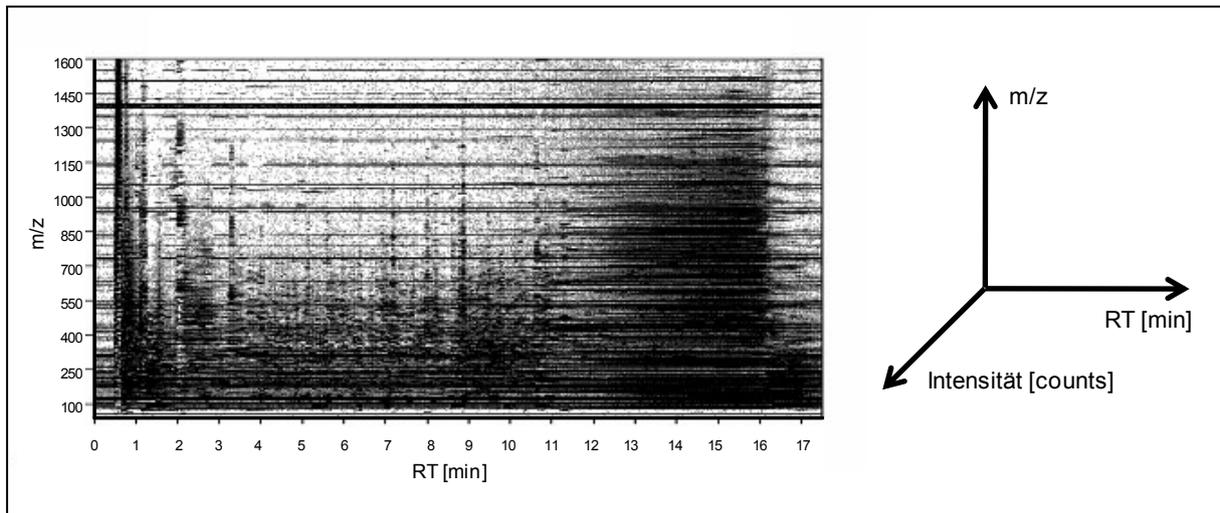
Aus dem in den TOF-Analysator gelangten Ionenstrahl wird alle ca. 0,07 ms (Massenbereich bis 1700 m/z) bzw. ca. 0,1 ms (Massenbereich bis 3200 m/z) ein Ionenpaket senkrecht in das Reflektor-TOF gepulst. Dabei erhalten die Ionen alle die gleiche kinetische Energie und werden im feldfreien Raum entsprechend ihrem Masse zu Ladung-Verhältnis (m/z) getrennt. Um energetische Inhomogenitäten, hervorgerufen durch Brownsche Molekularbewegung, von Ionen derselben Verbindung zu kompensieren, werden diese im TOF-Analysator reflektiert, sodass sie zeitgleich auf den Detektor treffen. Aus der Flugzeit kann dann das m/z ermittelt werden. Durch die effiziente Trennung der Masse zu Ladungs-Verhältnisse durch den TOF-Analysator werden hochaufgelöste Spektren erzeugt. Ein aus einem Puls resultierendes Primärspektrum wird als Transient bezeichnet. Bei einer Scanfrequenz von 1 Hz werden ca. 10 000 (Massenbereich bis 3200 m/z) bzw. 14 000 (Massenbereich bis 1700 m/z) solcher Transienten zu einem Spektrum akkumuliert und als solches im Datenfile gespeichert.

### *Detektor*

Der Detektor kann mit unterschiedlichen Frequenzen von 1, 2 oder 4 GHz betrieben werden. Deren Wahl hat keinen Einfluss auf die Trennung der Ionen, d. h. auf die Auflösung, im TOF-Analysator. Sie sind jedoch von Bedeutung für die Darstellung eines Signals bedingt durch die Anzahl erfasster Datenpunkte. Ein Transient beinhaltet bei einer Detektorfrequenz von 1 GHz (1 ns/Punkt) 100 000, 2 GHz (0,5 ns/Punkt) 200 000 und 4 GHz (0,25 ns/Punkt) 400 000 Datenpunkte. Mit zunehmender Frequenz steigt das Auflösungsvermögen des Detektors. In der Praxis finden am häufigsten der 2 und 4 GHz Betrieb Anwendung. Daraus ergibt sich im 2 GHz Betrieb eine Massenauflösung zwischen 5500 und 11 000 (100 bis 1000 m/z) im 4 GHz Betrieb zwischen 11 000 und 20 000 (100 bis 1000 m/z). Der Vorteil des 2 GHz Betriebs gegenüber dem 4 GHz Betrieb liegt im größeren dynamischen Bereich. Im 2 GHz Betrieb wird durch die Schaltung zweier parallel verwendeter Kanäle, bei dem einer unempfindlicher geschaltet ist und erst bei Eintritt der Sättigung des anderen (oberes Limit des Detektors, um eine Änderung einer Signalzunahme zu erfassen) aktiv wird, ein größerer dynamischer Bereich geschaffen. Der 4 GHz Betrieb weist eine Sättigung bereits bei 1/8 (ca. 1 Dekade) der Sättigungsgrenze des 2 GHz Betriebs auf. Bei unzureichender chromatographischer Trennung koeluerender isobarer Verbindungen mit geringer Massendifferenz kann ggf. eine Erhöhung der Detektorfrequenz eine bessere Auflösung liefern. Das Detektorsignal wird mittels Analog to Digital Converter (ADC) als Spektrum auf dem Computer abgespeichert. Dieser Konverter liefert im Gegensatz zum Time to Digital Converter (TDC) einen größeren dynamischen Bereich, was eine Verbesserung im Nachweis schwacher Signale in Anwesenheit von intensiven Signalen mit sich bringt.

### *Datenfile*

In Abhängigkeit von der gewählten Messfrequenz wie zum Beispiel 4 Hz wird jede 0,25 s aus den einzelnen Transienten ein hochaufgelöstes Massenspektrum erzeugt und auf dem Computer gespeichert. Das somit aus einer Messung resultierende dreidimensionale Datenfile beinhaltet die zeitliche Änderung (RT) der Signalintensität von detektierten hochaufgelösten Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z) (siehe Abbildung 2.5). Daraus lassen sich Spektren (Intensität aller m/z-Werte zu einer definierten Retentionszeit) und Chromatogramme (Intensität eines definierten m/z-Bereichs in Abhängigkeit von der Retentionszeit) erhalten.



**Abbildung 2.5:** Darstellung des dreidimensionalen Datenfiles einer LC-(Q)TOF-MS-Messung [68]. Zeitliche Änderung der Signalintensität der hochaufgelösten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ). Mit zunehmender Stärke des Grautons steigt die Intensität an.

Spektren mit hochaufgelösten Masse zu Ladungs-Verhältnissen stellen die notwendige Voraussetzung der Bestimmung der akkuraten Masse von Ionen dar. Allein das Vorhandensein hochaufgelöster Spektren liefert Informationen bzgl. des Isotopenmusters. Diese gemessenen Isotopenmassen weisen immer eine Differenz zur theoretischen Masse auf. Ohne effiziente Kalibrierung der Massenachse ist die Massengenauigkeit unzureichend, woraus eine starke Zunahme an möglichen Summenformeln resultiert (vergleiche Abschnitt 2.3. und Tabelle 2.1). Die Kalibrierung der Massenachse kann extern oder intern, während der Messung, erfolgen. Bei Verwendung dieses TOF-Massenspektrometers wurden im Abstand von mehreren Monaten eine Optimierung der Spannungen (Tuning) und eine arbeitstägliche externe Kalibrierung vorgenommen. Darüber hinaus wurden während der Messung mindestens zwei Substanzen kontinuierlich injiziert und deren Massen für eine permanente Kalibrierung verwendet. Erst durch die akkurate Masse, der Feinmasse eines Moleküls, wird deren elementare Zusammensetzung zugänglich. Mit Hilfe der akkuraten Masse, welche eine gute Kalibration und hohe Massengenauigkeit voraussetzt, und dem Isotopenmuster, welches sich durch eine hohe Massenauflösung erschließt, wird die Summenformel zugänglich. Die Massengenauigkeit in den erhaltenen TOF-Datenfiles liegt bei MS-Experimenten bei  $<3$  ppm und bei CID-Experimenten  $<5$  ppm. Die Massengenauigkeit berechnet sich nach Gleichung (1). Ein Fehler von 3 ppm lässt eine Detektion eines Ions der Masse von 300,000 amu mit  $\pm 0,0009$  amu zu.

$$\Delta m = \frac{(Masse_{theoretisch} - Masse_{gemessen})}{Masse_{theoretisch}} \times 10^6 \times ppm \quad (1)$$

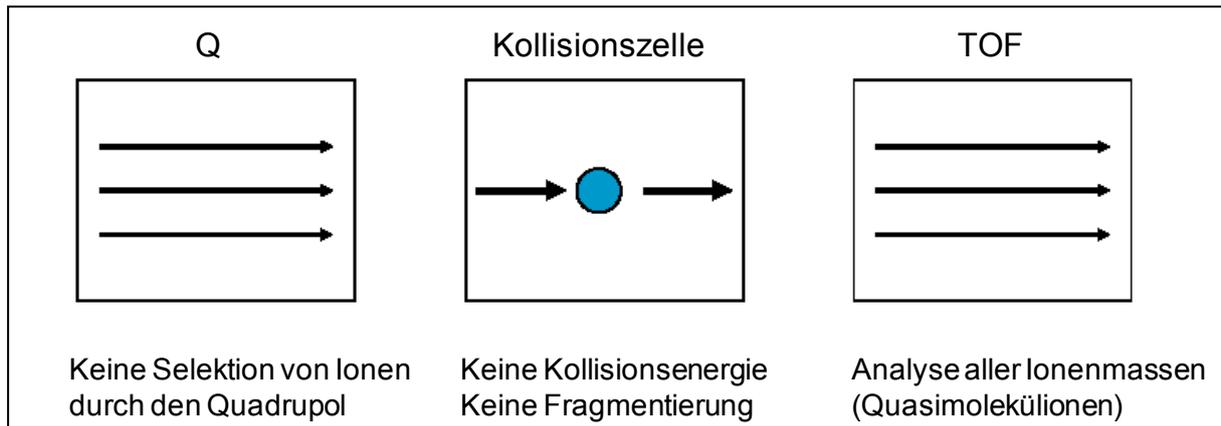
### 2.2.2 Möglichkeiten der Datenakquisition

Die massenspektrometrische Analyse, die Trennung und Detektion von Ionen, erfolgt entsprechend der nachzuweisenden Ionen im positiven (Detektion der Kationen) oder im negativen (Detektion der Anionen) Modus. Einige wie auch dieses Massenspektrometer erlauben eine kombinierte Anwendung beider Modi, einem Fast-Polarity-Switching-Modus, zur alternierenden Detektion von Anionen und Kationen in einer einzigen Messung. Auf Grund der langen Umschaltzeit zwischen beiden Polaritäten, bedingt durch die langsame Umpolung des TOF und dem damit verbundenen Empfindlichkeitsverlust wurde dieser Modus im Rahmen der Arbeit nicht verwendet.

Durch die Erweiterung des TOF-Massenspektrometers um einen Quadrupol zum QTOF-Massenspektrometer ergeben sich insgesamt drei unterschiedliche Messmodi. Neben dem MS-Modus, welcher den einzigen Modus bei TOF-Massenspektrometern darstellt, ermöglicht die Verwendung des Quadrupols eine gezielte Erzeugung von CID-Spektren ausgewählter Vorläuferionen. Diese CID-Spektren können entweder vor der Messung definiert (Targeted-MS/MS) oder während der Messung datenabhängig (Auto-MS/MS) erzeugt werden. In allen drei Modi werden hochaufgelöste Full-Scan-Spektren in MS-Experimenten aufgenommen. Für die Modi Targeted-MS/MS und Auto-MS/MS werden zusätzlich hochaufgelöste Full-Scan-Spektren in MS/MS-Experimenten akquiriert.

#### *MS-Modus*

Im MS-Modus werden ausschließlich MS-Experimente durchgeführt, d. h. es erfolgt keine Fragmentierung. Die komplette Messzeit wird für die Akquisition von MS-Spektren verwendet und verteilt sich somit nicht wie in den übrigen Modi auf verschiedene Experimente. Da MS-Spektren die höchste Empfindlichkeit aufweisen, ist dieses der empfindlichste Modus. In Abbildung 2.6 sind die Schaltung des Quadrupols und der Kollisionszelle sowie die vom TOF analysierten Ionen im MS-Experiment schematisch dargestellt. Der Quadrupol wie auch die Kollisionszelle dienen bei MS-Experimenten ausschließlich zur Ionenfokussierung. Es erfolgt weder eine Selektion von Ionen durch den Quadrupol noch eine Fragmentierung in der Kollisionszelle. Es werden ausschließlich die von der Quelle erzeugten Quasimolekülonen vom TOF analysiert und anschließend detektiert.

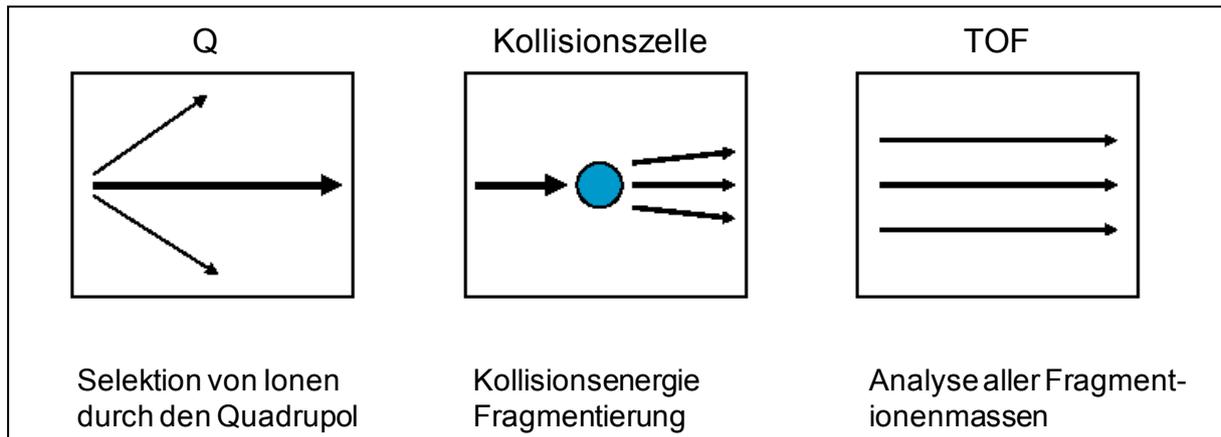


**Abbildung 2.6:** Schaltung des Quadrupols und der Kollisionszelle und vom TOF analysierte Ionen im MS-Experiment [68]. Der Quadrupol lässt alle von der Quelle kommenden Ionen zur Kollisionszelle durch. An dieser liegt keine Kollisionsenergie an, wodurch keine Fragmentierung erfolgt. Im TOF werden die Quasimolekülionen analysiert.

### *Auto-MS/MS-Modus*

Der Auto-MS/MS-Modus ist eine Kombination aus MS- und MS/MS-Experimenten. Bei diesem datenabhängigen Akquisitionsmodus erfolgt keine Vorgabe der zu selektierenden Vorläuferionen für MS/MS-Experimente. Da während eines Zyklus mehrere verschiedene Experimente stattfinden, ist die Empfindlichkeit jedes einzelnen auf den zeitlichen Anteil im Zyklus reduziert. Der gewonnene Informationsgehalt ist jedoch deutlich höher als der bei Verwendung des MS-Modus.

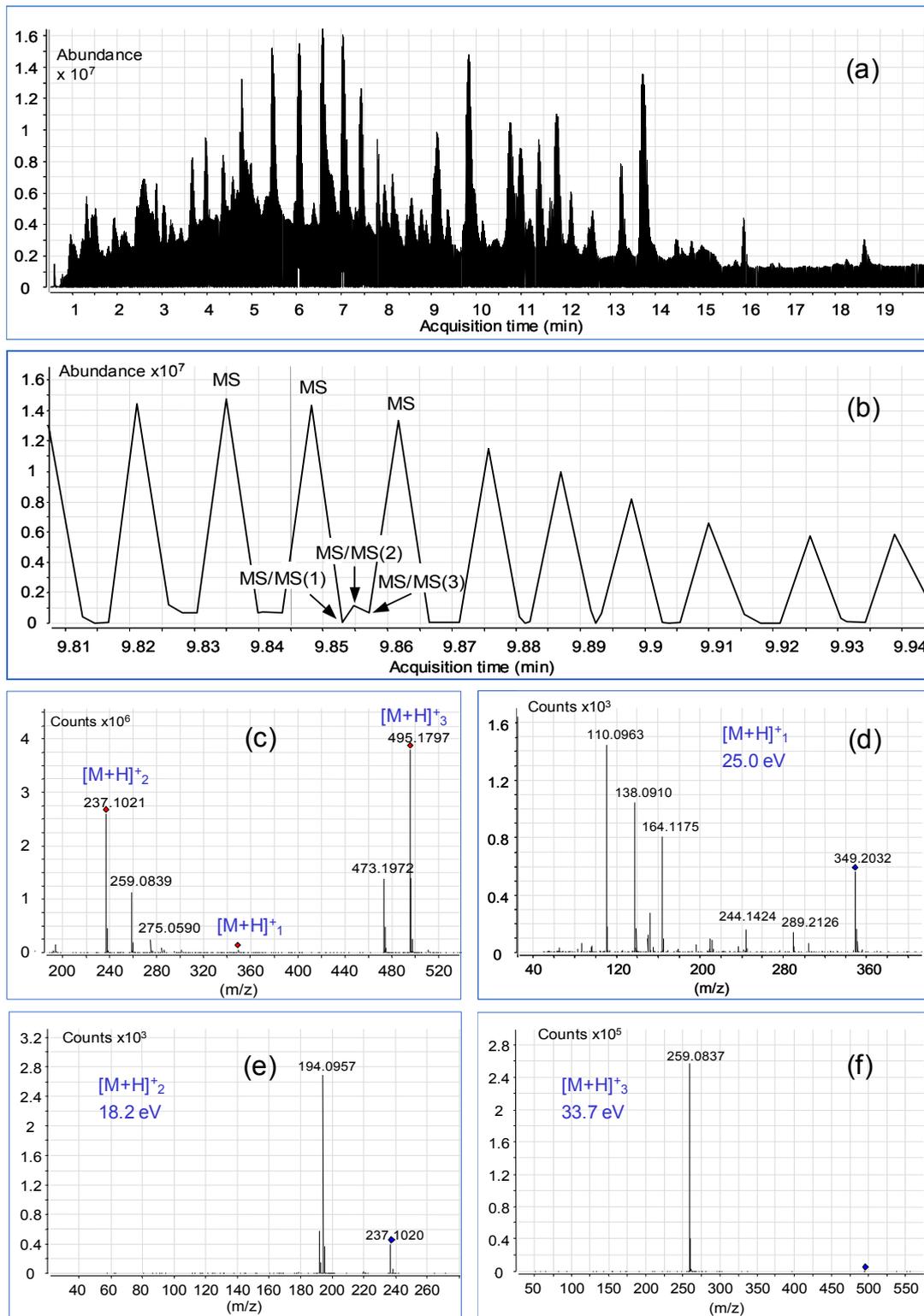
Die Schaltung des Quadrupols und der Kollisionszelle sowie die vom TOF analysierten Ionen sind in Abbildung 2.6 für MS-Experimente und in Abbildung 2.7 für MS/MS-Experimente schematisch dargestellt. Im MS/MS-Experiment selektiert der Quadrupol mit einer vorgegebenen Auflösung Ionen eines bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ), welche in die nachgeschaltete Kollisionszelle gelangen. An dieser liegt eine Kollisionsenergie an, welche eine Fragmentierung der Ionen durch Zusammenstöße mit den Stickstoffmolekülen in der Zelle zur Folge hat. Die entstandenen Fragmentionen werden vom TOF analysiert und anschließend detektiert.



**Abbildung 2.7:** Schaltung des Quadrupols und der Kollisionszelle und vom TOF analysierte Ionen im MS/MS-Experiment [68]. Der Quadrupol selektiert ausgewählte von der Quelle kommende Ionen. Diese werden in der Kollisionszelle durch eine angelegte Kollisionsenergie fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden im TOF analysiert.

Das Prinzip der Messung im Auto-MS/MS-Modus ist in Abbildung 2.8 am Beispiel einer realen Probe dargestellt. Dabei befindet sich das Instrument im stetigen Wechsel zwischen MS- und MS/MS-Experimenten mit einer festen Zykluszeit. Zur Verdeutlichung des Messzyklus wurde in Abbildung 2.8 (a) eine Vergrößerung des Gesamtionenchromatogramms (TIC) vorgenommen. Ein Messzyklus besteht aus einem MS-Experiment mit konstanter Akquisitionszeit (z. B. 0,3 s) und mehreren sich anschließenden MS/MS-Experimenten. Die während eines MS/MS-Experiments verwendete Kollisionsenergie kann entweder vor der Messung fest vorgegeben oder massenabhängig während der Messung berechnet werden. Im MS-Experiment wird für eine definierte Akkumulationszeit ein Full-Scan-MS-Spektrum aufgezeichnet, mehrere Vorläuferionen vom Messinstrument automatisch ausgewählt und im Falle der Verwendung einer massenabhängigen Kollisionsenergie (CE) diese nach Gleichung (2) berechnet.

$$CE = \left( \frac{a}{100} \times \frac{m}{z} + b \right) eV ; a, b \in \mathbb{N} \quad (2)$$



**Abbildung 2.8:** Beispiel einer LC-QTOF-MS-Analyse im Auto-MS/MS-Modus anhand des Fallbeispiels 09/994, Proteinfällung einer Venenblutprobe. (a) Totalionenchromatogramm (TIC). (b) vergrößerter Ausschnitt des TICs zwischen 9,81 und 9,94 min zur Verdeutlichung der Abfolge der MS- und der drei automatisch selektierten Ionen  $[M+H]^+_1$ ,  $[M+H]^+_2$  und  $[M+H]^+_3$  bei 9,850, 9,852 und 9,854 min für die folgenden MS/MS-Messungen (d) CID-Spektrum des  $[M+H]^+_1$  mit einer Kollisionsenergie von 25,0 eV. (e) CID-Spektrum des  $[M+H]^+_2$  mit einer Kollisionsenergie von 18,2 eV. (f) CID-Spektrum des  $[M+H]^+_3$  mit einer Kollisionsenergie von 33,7 eV. Die Kollisionsenergien wurden automatisch nach Gleichung (3) berechnet.

Danach selektiert der Quadrupol nacheinander die ausgewählten Massen, welche in der Kollisionszelle für die restliche Zykluszeit fragmentiert werden. Nach einem CID-Experiment wird das für dieses Experiment zugrundeliegende Vorläuferion für eine definierte Zeitspanne (z. B. 0,1 min) für weitere MS/MS-Messungen ausgeschlossen. Somit ist gewährleistet, dass auch koeluiierende, weniger intensive Ionen als Vorläufer ausgewählt werden können. Die resultierenden vier Massenspektren aus MS- und MS/MS-Experimenten sind in den Abbildungen 2.8 (c) bis 2.8 (f) wiedergegeben.

Die Zykluszeit, die Zeit für MS- und MS/MS-Messungen innerhalb des Zyklus sowie die Anzahl der Vorläuferionen können in bestimmten Grenzen vorgegeben werden. In Gleichung (2) wird berücksichtigt, dass die nötige Kollisionsenergie für eine ausreichende Fragmentierung mit zunehmender Molekülmasse zunimmt. Da die Fragmentierung jedoch auch stark von der spezifischen Struktur abhängt, ist die automatische Wahl der Kollisionsenergie nicht immer optimal und die Messung muss in speziellen Fällen bei einer abweichenden Kollisionsenergie im Targeted-MS/MS-Modus wiederholt werden.

In einem Auto-MS/MS-Datenfile sind alle wesentlichen Informationen einer Probe enthalten. Daher eignet sich diese Datenakquisition besonders für die STA, da auch bei einer später aufkommenden Fragestellung noch Informationen aus dem Datenfile zugänglich sind, ohne dass eine weitere Messung nötig ist.

### *Targeted-MS/MS-Modus*

Der Targeted-MS/MS-Modus stellt wie der Auto-MS/MS-Modus eine Kombination von MS- und MS/MS-Experimenten dar. Die Schaltung des Quadrupols und der Kollisionszelle sowie vom TOF analysierte Ionen ist in Abbildung 2.6 für das MS-Experiment und in Abbildung 2.7 für das MS/MS-Experiment schematisch dargestellt. Die Messung von CID-Spektren verläuft analog zum Auto-MS/MS-Modus, jedoch werden die Vorläuferionen vor der Messung festgelegt, wodurch sichergestellt ist, dass entsprechende Vorläuferionen fragmentiert werden. Die Empfindlichkeit und Spektrenqualität sind im Targeted-MS/MS-Modus in der Regel höher als im Auto-MS/MS-Modus. Gründe dafür liegen in der Wahl einer günstigen Kollisionsenergie für eine optimale Fragmentierung, sowie der Möglichkeit einer längeren Akkumulationszeit im MS/MS-Experiment (z. B. 4 Hz im MS- und 1 Hz im MS/MS-Experiment). Darüber hinaus wird im Targeted-MS/MS-Modus eine Vielzahl an MS/MS-Spektren erhalten, welche über den kompletten chromatographischen Peak verteilt sind. Demgegenüber

werden im Auto-MS/MS-Modus nur vereinzelt CID-Spektren an einer beliebigen Stelle des chromatographischen Peaks akquiriert. Anwendung findet er bei einer gezielten Fragestellung bzgl. spezieller Substanzen oder zur Bestätigung ausschließlich aus MS-Experimenten resultierenden Ergebnissen durch zusätzliche CID-Spektren. Wie im Auto-MS/MS-Modus kann eine massenabhängige oder feste Kollisionsenergie vorgegeben werden. Da in diesem Modus in der Regel einer konkreten Fragestellung nachgegangen wird, empfiehlt sich die Verwendung fester Kollisionsenergien unter Berücksichtigung der optimalen Kollisionsenergie in Bezug auf die vermutete Substanz.

### **2.3 TOF-MS und QTOF-MS in der Systematischen Toxikologischen Analyse**

Wie aus den Abschnitten 2.1.2. und 2.2. hervorgeht, liegt ein besonderer Vorteil der hochauflösenden Massenspektrometrie in der Ermittlung der Summenformel einer unbekannt Substanz aus der akkuraten Ionenmasse und dem Isotopenmuster. Dieses ist jedoch wegen der riesigen Zahl möglicher Isomere noch weit entfernt von der Identifizierung der Verbindung. Mit Hilfe der Software Molgen (molecular structure generation [69]) soll am Beispiel von Cathinon mit der nominalen Molekülmasse  $M = 149$  verdeutlicht werden, worin die Stärken und Einschränkungen der Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie liegen (Tabelle 2.1). Insgesamt sind 27 verschiedene Summenformeln theoretisch möglich, sofern nur die Elemente C, H, N und O in der Verbindung enthalten sind. Werden auch S und P einbezogen, erhöht sich die Zahl auf 38, und wenn die Halogene F, Cl und Br hinzukommen sogar auf 120. Ein TOF-Massenspektrometer mit einer Massengenauigkeit von  $<3$  ppm ermöglicht eine eindeutige Unterscheidung zwischen den 27 aus C, H, N und O bestehenden Summenformeln. So lässt sich im Rahmen der bekannten Massengenauigkeit der Datenakquise die zur gemessenen Masse gehörige Summenformel ermitteln. Für die Summenformel  $C_9H_{11}NO$  mit der exakten Molekülmasse von 149,084060 Dalton lieferte die Molgen-Software unter Berücksichtigung von chemischen Bindungsregeln 25 895 621 theoretische Strukturisomere (Stereoisomere nicht mit inbegriffen). Von diesen waren 724 Stoffe in der Beilstein-Datenbank erfasst und nur 45 im NIST Register enthalten. Die Software „Chemspider“ [70] lieferte Strukturformeln für 829 Verbindungen mit der Summenformel  $C_9H_{11}NO$ . Darunter befinden sich neben Cathinon zum Beispiel N,N-Dimethylbenzamid, p-Dimethylaminobenzaldehyd, 3,4-Dimethyl-

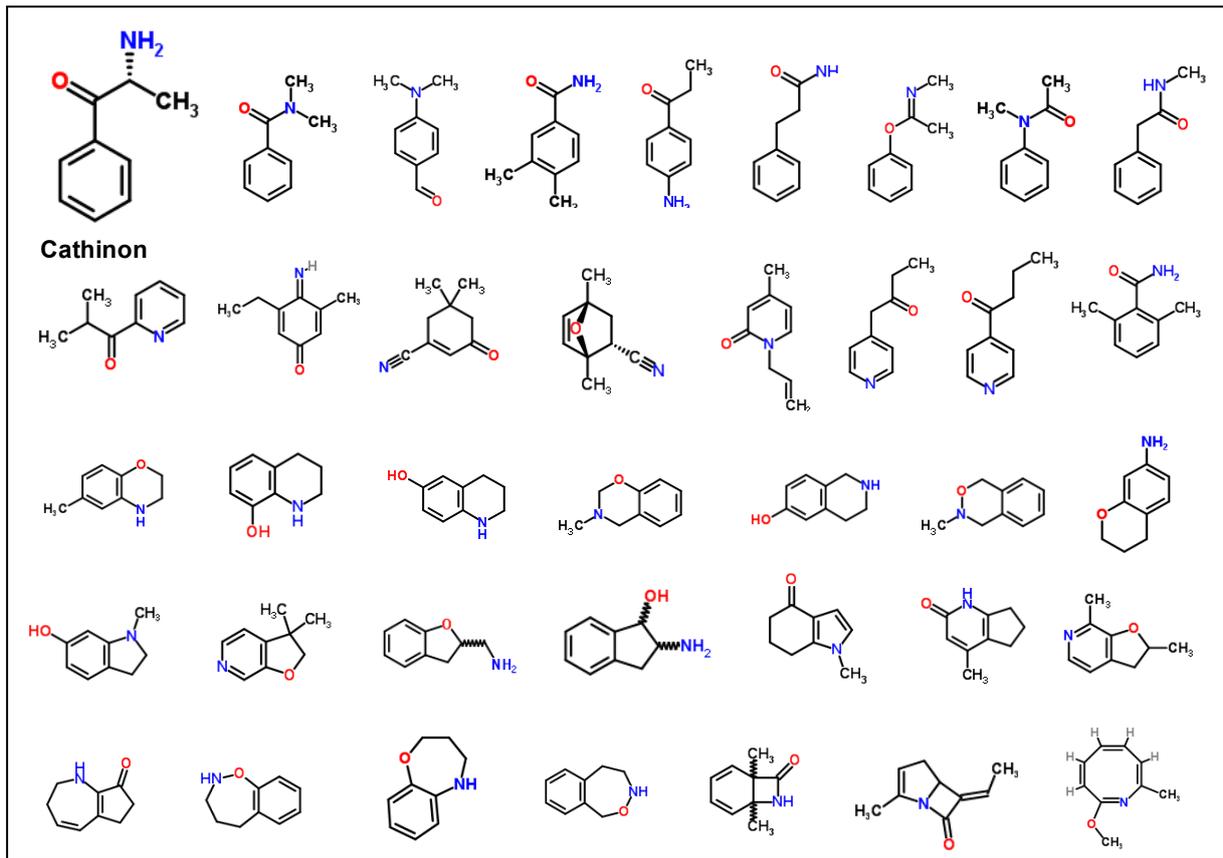
benzamid, p-Aminopropiophenon sowie heterocyclische Substanzen wie 6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinolin oder N-Methyl-6-hydroxy-2,3-dihydroindol (Abbildung 2.9).

**Tabelle 2.1:** Nach der Software Molgen (molecular structure generation) [69] berechnete Summenformeln zur nominalen Molekülmasse 149 mit den Elementen C, H, N und O und Anzahl der theoretisch möglichen Isomere. Die grün hervorgehobene Zeile beinhaltet die Summenformel des Cathinons. Mit Hilfe der Hochauflösung und der akkuraten Masse gelingt es, zwischen allen möglichen Summenformeln zu unterscheiden.

Summenformel	Anzahl Isomere (MOLGEN)	Anzahl Beilstein	Anzahl NIST	Exakte Masse	Relative Isotopenverteilung			
					M	M+1	M+2	M+3
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>6</sub>	41580	0	0	148,996038	100	3,89	1,29	0,05
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	152977	0	0	149,007271	100	3,51	1,08	0,04
C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	11449751	3	0	149,011293	100	8,10	0,90	0,06
CH <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	99306	0	0	149,018504	100	3,13	0,86	0,03
C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	50459744	2	0	149,022526	100	7,72	0,67	0,04
C <sub>11</sub> H <sub>3</sub> N	53109027	0	0	149,026548	100	12,31	0,69	0,02
C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub>	202072	10	0	149,032421	100	4,99	1,13	0,05
C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O	39760215	5	0	149,033759	100	7,34	0,44	0,02
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	822099	2	0	149,043654	100	4,61	0,91	0,04
C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> N <sub>7</sub>	6505400	0	0	149,044992	100	6,96	0,21	0,00
C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	48687255	265	13	149,047676	100	9,20	0,79	0,05
C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	633408	0	0	149,054887	100	4,23	0,69	0,03
C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	166085562	222	7	149,058909	100	8,82	0,55	0,03
CH <sub>7</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	121630	0	0	149,066120	100	3,85	0,47	0,02
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	121350	52	0	149,068805	100	6,09	0,98	0,05
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	77737459	129	10	149,070142	100	8,44	0,32	0,01
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	473871	1	0	149,080038	100	5,71	0,75	0,04
<b>C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO</b>	<b>25 895 621</b>	<b>724</b>	<b>45</b>	<b>149,084060 *</b>	<b>100</b>	<b>10,31</b>	<b>0,68</b>	<b>0,03</b>
C <sub>3</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	355574	0	0	149,091271	100	5,33	0,53	0,02
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub>	49755227	182	5	149,095293	100	9,93	0,44	0,01
C <sub>2</sub> H <sub>11</sub> N <sub>7</sub> O	67609	0	0	149,102504	100	4,95	0,31	0,01
C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	13539	23	2	149,105188	100	7,20	0,84	0,05
CH <sub>11</sub> N <sub>9</sub>	2766	0	0	149,113737	100	4,57	0,09	0,00
C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	44621	0	0	149,116421	100	6,82	0,61	0,03
C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N	2569697	558	40	149,120443	100	11,41	0,59	0,02
C <sub>4</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	26983	0	0	149,127654	100	6,44	0,39	0,02
C <sub>3</sub> H <sub>15</sub> N <sub>7</sub>	3483	0	0	149,138887	100	6,06	0,16	0,00

\* Eine Massengenauigkeit von 3 ppm entspricht bei der Masse 149 Dalton einer Abweichung von +/- 0,0004 Dalton.

Dieses Beispiel demonstriert, dass die fast unbegrenzte strukturelle Vielfalt der organischen Chemie bei der Systematisch Toxikologischen Analyse bedacht werden muss. Anhand einer Summenformel ist die Identität einer Substanz noch lange nicht bewiesen. Daher sind weitere Kriterien für eine Unterscheidung von Isomeren notwendig und es müssen Einschränkungen bezüglich der toxikologischen Relevanz und Auftretenswahrscheinlichkeit vorgenommen werden.



**Abbildung 2.9:** Beispiele isomerer Substanzen des Cathinons mit der Summenformel  $C_9H_{11}NO$ . Insgesamt wurden von den theoretisch möglichen 25 895 621 Strukturisomeren (Stereoisomere nicht inbegriffen) 829 verschiedene Substanzen mit dieser Summenformel durch die Software ChemSpider [70] gefunden.

Zur Lösung der Problematik der strukturellen Substanzvielfalt identifizierter Summenformeln wurden dabei mehrere Ansätze unternommen. So wurden zur Unterscheidung von Isomeren Retentionszeiten unter definierten chromatographischen Bedingungen für 100 bis 400 Substanzen in einigen In-Haus Datenbanken erfasst [21-26, 28, 30, 33, 35]. Die Identifizierung von Metaboliten in einem metabolischen Ansatz ist eine weitere Möglichkeit der Bestätigung oder des Ausschlusses einer vermeintlichen Substanz als Ergebnis aus einer theoretischen Datenbank [21, 32]. So wird zum Beispiel die Anwesenheit des Neuroleptikums Clozapin in einer Blutprobe durch das gleichzeitige Auftreten von Demethylclozapin und Clozapin-N-oxid abgesichert, während das Fehlen entsprechender Metabolitensignale darauf hinweist, dass es sich um eine andere Substanz handelt.

Die Beschränkung auf nur toxikologisch relevante Substanzen in theoretischen Datenbanken, die Verwendung von Retentionszeiten unter standardisierten Bedingungen sowie die Suche nach Metaboliten sind sehr hilfreich. Einen wesentlich größeren Informationsgehalt weisen jedoch CID-Spektren auf, die strukturspezifische Daten

der Substanzen enthalten. Aus diesem Grund wurden von einigen Autoren „In-Source CID-Spektren“ an LC-TOF-MS-Instrumenten verwendet [33, 35]. Hierbei handelt es sich um CID-Spektren, die in der Ionenquelle durch Kollisionen von Ionen mit Gasmolekülen im Hochdruckbereich des LC-TOF-MS (zwischen Transferkapillare und Skimmer) erzeugt werden. Der Nachteil dieser „In-Source-Fragmentierung“ liegt in der Fragmentierung aller Ionen und der Erzeugung von MS- und CID-Mischspektren. Bei der Fragmentierung ausgewählter Vorläuferionen und deren Fragmentierung in einer Kollisionszelle oder Ionenfalle (IT) werden hingegen vorläuferspezifische Spektren erhalten. Kaufmann et al. zeigten, dass das Monitoring klassenspezifischer In-Source-CID-Fragmentmassen den Nachweis von Analyten in einem ungezielten Screening ermöglicht [35]. Der Einsatz von Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometern (LC-QTOF-MS) hat den Vorteil, dass im Gegensatz zur In-Source-Fragmentierung die CID-Spektren nicht durch Matrix und koeluiierende Substanzen gestört sind. Eine CID-Spektrenbibliothek von 319 Substanzen, welche mit einem LC-QTOF-MS-Instrument bei zehn Kollisionsenergien gemessen wurde, wurde von Pavlic et al. beschrieben [16]. Weitere Ansätze liegen in der Nutzung spezieller Software für die Vorhersage einer Fragmentierung, um zwischen Strukturisomeren einer Datenbank unter Verwendung von LC-QTOF-MS zu differenzieren [27]. Darüber hinaus bietet das LC-QTOF-MS-Instrument einen für die Systematische Toxikologische Analyse sehr vorteilhaften datenabhängigen Akquisitionsmodus (Auto-MS/MS-Modus). Wie bereits in Abschnitt 2.2.2. gezeigt wurde, kombiniert dieser Modus den Vorteil einer TOF-MS-Messung für eine umfassende Datenerfassung und der Messung akkurater CID-Spektren aller wesentlichen Komponenten der Probe durch Isolierung des entsprechenden Vorläuferions durch den Quadrupol (QTOF-MS).

Auf Grund der Fülle an Informationen, die sich aus einem TOF-Datenfile ergeben, bedarf es besonderer Auswertetechniken. Die Gruppe von Ojanperä und Pelander verwendet eine umgekehrte Suche (reverse search), bei der die Informationen des TOF-Datenfiles der Probe mit den Einträgen (Massen) einer Datenbank abgeglichen werden [20-28, 51]. Diese Strategie empfiehlt sich insbesondere bei der Verwendung kleiner Datenbanken. Polettini et al. hingegen verwenden eine sogenannte vorwärts Basispeaksuche (forward basepeak search), wobei die Basismassenpeaks des unbekanntes chromatographischen Peaks im analysierten Datenfile nach Subtraktion eines Protons in einer großen theoretischen Datenbank von 50 500 toxikologisch relevanter Substanzen inklusive vieler Phase-I- und Phase-II-Metabolite gesucht wer-

den [31, 32]. Diese Suche kann auf Grund der sonst großen Zahl falsch positiver Treffer bzw. zu bestätigenden Ergebnissen nur für eine geringe Anzahl von Peaks, die intensivsten des Chromatogramms, erfolgen.

Das große Potential hochauflösender Flugzeitmassenspektrometer gekoppelt mit der Flüssigchromatographie (LC-TOF-MS), keine a priori Einschränkung bzgl. der zu identifizierenden Substanzen, der effizienten chromatographischen und massenspektrometrischen Trennung sowie des ausschließlichen Scan-Modus mit der Möglichkeit der Summenformelidentifikation, wurde bereits bei toxikologischen Screenings in Blut, Urin, Haaren, Mekonium und im Glaskörper angewendet [16, 20-36].

In Tabelle 2.2 ist ein Überblick über bisherige Anwendungen von LC-TOF-MS und LC-QTOF-MS in der Systematischen Toxikologischen Analyse wiedergegeben. Bei allen diesen Arbeiten spielt die Anwendung von Datenbanken eine Rolle.

**Tabelle 2.2:** Literaturübersicht zur bisherigen Anwendung von LC-TOF-MS oder LC-QTOF-MS zum toxikologischen Screening.

Autoren	LC-TOF-Modus	Massengenauigkeit	Kriterien für Substanz-Ident.	Datenbank / Bibliothek	Proben-Vorbereitung	praktische Anwendung
Gergov et al. 2001 [20]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, RT, Metabolite	In-Haus, 433 Verbindungen	SPE	Urin
Pelander et al. 2003 [21]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, RT, Metabolite	In-Haus, 637 Verbindungen	SPE	Urin
Decaestecker et al. 2004 [30]	LC-QTOF	-	IDA, CID-Spektren	In-Haus, 300 Verbindungen	SPE	Blut
Ojanperä et al. 2006 [23]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, RT, Isotopenmuster, Metabolite	In-Haus, 735 Verbindungen	SPE	Urin
Kaufmann et al. 2007 [35]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, In-Source-CID-Spektren	In-Haus, 100 Verbindungen	Verdünnung mit Acetonitril	Urin
Kolmonen et al. 2007 [24]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, RT, Isotopenmuster	In-Haus, 124 Verbindungen und 70 Metabolite	SPE	Urin
Pelander et al. 2008 [25]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, RT, Isotopenmuster	In-Haus, 815 Verbindungen	Aufschluss in NaOH, SPE	Haare
Polettini et al. 2008 [31]	CE-TOF	5 ppm	Exakte Masse	PubChem, 50 500 Substanzen	LLE	Haare, Blut, Urin.
Lee et al. 2009 [33]	LC-TOF	5 ppm	Exakte Masse, In-Source-CID-Spektren	In-Haus, 300 Verbindungen	LLE	Urin

2001 wurde erstmalig durch Gergov et al. ein Konzept zum Screening nach Drogen und Arzneimitteln sowie deren Metaboliten im Urin mittels LC-TOF-MS vorgestellt [20]. Die Identifizierung für 433 Substanzen erfolgte anhand der exakten Masse und, sofern Referenzstoffe zur Verfügung standen, unter Verwendung von Retentionszeiten. Die Methode wurde von Pelander et al. weiterentwickelt und validiert [21].

In einer Arbeit von Ojanperä et al. [22] wurden postmortale Urinproben zunächst mittels LC-TOF-MS analysiert und anschließend die Ergebnisse mit LC-FT-MS bestätigt. Dabei wurde eine Massentoleranz von 20-30 ppm für die TOF-MS-Messung und 3 ppm für die FT-MS-Analyse unter Verwendung einer theoretischen Datenbank von 7640 Substanzen [71] zur Identifizierung genutzt. Während mittels TOF-MS ein bis drei mögliche Summenformeln in Frage kamen, wurde mittels FT-MS immer nur eine vorgeschlagen. Es zeigte sich somit, dass bei Verwendung von TOF-Massenspektrometern auf Grund der umfangreichen Datenbank bzw. des größeren Massenfehlers gegenüber FT-MS-Instrumenten die Anzahl vorgeschlagener Substanzen zunahm. Aus dieser Studie schlussfolgerten Ojanperä et al., dass zur Identifizierung mittels TOF-MS neben der akkuraten Masse zusätzliche Informationen wie die Retentionszeit oder die Verwendung weiterer Methoden erforderlich sind. In einer weiteren Arbeit zeigten Ojanperä et al. anhand von Urinproben, dass bei einer Datenbanksuche nach Medikamentenwirkstoffen, basierend auf der akkuraten Masse und der Retentionszeit, die Verwendung des Isotopenmusters der Substanz zugrundeliegenden Summenformel zu einer Reduzierung von falsch positiven Ergebnissen führt [23]. Für diesen Zweck wurde eine In-Haus-Datenbank mit 735 toxikologisch oder pharmazeutisch relevanten Substanzen einschließlich Medikamentenwirkstoffen, illegalen Drogen, Designerdrogen und Metaboliten aufgebaut.

Nicht nur in der forensischen und klinischen Toxikologie wurden die Vorzüge von TOF-Massenspektrometern erkannt. So nutzen Kolmonen et al. [24] diese Technik in der Dopinganalyse. Neben der Verwendung der Retentionszeit und der exakten Masse der zu identifizierenden Substanzen wurden hier die Isotopenmuster als weiteres Identifizierungskriterium verwendet.

EISohly et al. [72] untersuchten mittels LC-TOF-MS 156 verschiedene Urine von mutmaßlichen Opfern sexuellen Missbrauchs nach Beibringung von K.O.-Mitteln. Insgesamt wurden 19 der 22 häufigsten auftretenden Benzodiazepine nachgewiesen. Die

Nachweisgrenzen der Methode lagen zwischen 0,5 und 3,0 ng/ml. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte anhand einer Datenbank von Summenformeln.

Polettini et al. verwendeten eine Kombination aus einer Datenbanksuche basierend auf 50 500 toxikologisch relevanten Substanzen aus der PubChem Datenbank [73] sowie Phase-I- und Phase-II-Metaboliten zur Bestätigung der vermeintlichen Wirkstoffe [31].

Kaufmann et al. berichteten über eine Datenbank mit mehr als 100 Tierarzneistoffen, die für Urinscreenings angewendet wurde. Die Nützlichkeit von Metaboliten zur Bestätigung von Ergebnissen sowie der Verwendung von charakteristischen In-Source-Fragmenten für bestimmte Substanzklassen wurde dargelegt [35].

Hayashida et al. verwendeten für die Identifizierung von 41 verschiedenen Benzodiazepinen eine Datenbank bestehend aus der Summenformel, Retentionszeit und exakten Masse [74]. In der durchgeführten Studie wurden Proben von Patienten, die mehr als 2 Benzodiazepine eingenommen hatten, mittels LC-TOF-MS analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Selektivität mit Hilfe der Datenbank exakter Massen bei der TOF-MS-Analyse gesteigert wurde.

Lee et al. berichteten von einer validierten Methode zum Screening von 300 toxikologisch relevanten Substanzen im Urin [33]. Die abnehmende Massengenauigkeit bei Signalintensitäten im Bereich der Detektorsättigung, d. h. das obere Limit des Detektors Signale zu registrieren, verursacht durch hohe Analytkonzentrationen, wurde mit Hilfe entsprechender Identifizierungskriterien gelöst. So wurden falsch negative Ergebnisse im Falle einer Sättigung durch eine geringere Massengenauigkeit reduziert und die damit verbundene Zunahme falsch positiver Ergebnisse durch eine Kombination von Retentionszeiten, akkurater Masse und In-Source-CID-Spektren (nominale Massenfragmentmuster) kompensiert.

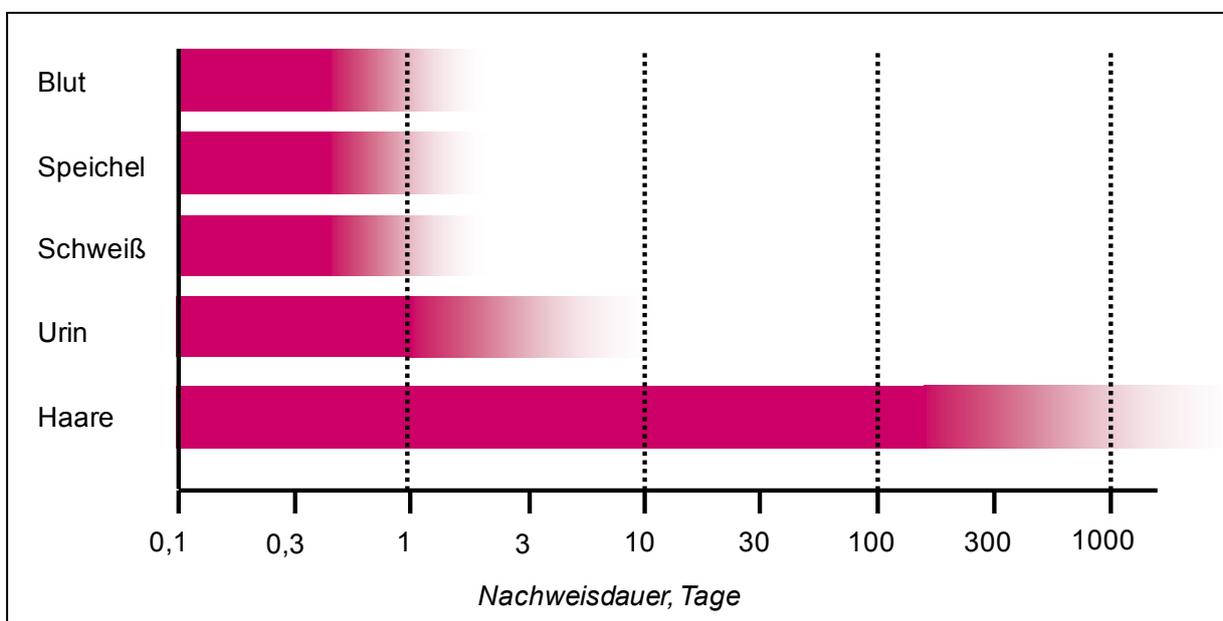
Der Nachweis von Drogen ist ein fester Bestandteil von kriminaltechnischen Labors. Laks et al. zeigten, dass Straßendrogen auch bei Fehlen von Referenzstandards durch eine Kombination zweier moderner Techniken analysiert werden können. Die Identifizierung der Summenformel erfolgte mittels LC-TOF-MS und die Quantifizierung mit Hilfe eines Stickstoff-Chemilumineszenz-Detektors (LC-CLND) unter Verwendung des Standards Coffein als äquimolares Stickstoffsignal [75]. Die Empfind-

lichkeit von LC-TOF-MS-Instrumenten lässt neben Drogentests in Blut und Urin auch den Nachweis von Cannabis im Speichel [76] und Drogen im Haar [25, 36, 77] zu.

Der Einsatz des Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometers (QTOF-MS) zur toxikologischen Analyse wurde erstmalig von Decaestecker et al. beschrieben [29, 30]. In den Arbeiten wurden die Vorzüge der informationsabhängigen MS/MS-Spektrenakquisition (IDA) dargestellt. So erfolgte die Unterscheidung von Isomeren bzw. die Substanzidentifizierung durch den Vergleich gemessener CID-Spektren mit denen einer CID-Bibliothek. Die Vorteile der akkuraten Masse wurden in den Arbeiten jedoch nicht genutzt. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit einer Quantifizierung im verwendeten IDA-Modus anhand von MS-Spektren verwirklicht.

## 2.4 Besonderheiten von Haaren als Probenmaterial

Der wohl wichtigste Unterschied der Haare als Probenmaterial für toxikologische Untersuchungen im Vergleich zu anderen menschlichen Matrices besteht in der viel längeren Nachweiszeit der retrospektiven Erfassung einer chronischen Exposition von Drogen und Giften [78]. Abbildung 2.10 zeigt für die toxikologisch interessanten biologischen Untersuchungsmaterialien die zeitlichen Nachweisfenster.



**Abbildung 2.10:** Zeitfenster unterschiedlicher Probenmaterialien beim Nachweis von Substanzmissbrauch.

Während man aus einer Blutprobe Informationen zur akuten Beeinflussung erhält, lassen Matrices wie Speichel, Schweiß und Urin nur Aussagen über einen akuten Missbrauch zu. Das erfasste Zeitfenster beträgt hierbei nur Stunden bis wenige

Tage. Haare lassen hingegen einen Nachweis eines erfolgten Konsums über Monate bis Jahre zu. Mittels einer segmentweisen Haaranalyse ist mit gewissen Einschränkungen sogar der zeitliche Verlauf eines Konsums oder der ungefähre Zeitpunkt einer Exposition nachzuvollziehen.

Die physiologischen Grundlagen der Haaranalyse wie Haarwachstum und Wachstumszyklus, Mechanismus der Einlagerung ins Haar und Störeffekte sowie Nachweis illegaler Drogen und Medikamentenwirkstoffe in Haaren sind in umfangreichen Übersichtsartikeln publiziert [79-82] und sollen daher hier nicht erneut behandelt werden. Da in der vorliegenden Arbeit die Systematische Toxikologische Analyse von Haarproben im Vordergrund steht, beschränken sich die nachfolgenden Ausführungen stattdessen auf eine Übersicht über bisherige Arbeiten zur STA im Haar und auf Extraktionsverfahren für Haarproben, bei denen möglichst alle relevanten Substanzen von dieser Matrix abgetrennt werden sollten.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Haaranalyse betreffen im Allgemeinen einzelne Substanzen oder Substanzgruppen. Es gibt jedoch Fälle mit forensischem oder klinischem Hintergrund, in denen die chronische Exposition gegenüber Drogen oder Giften ohne spezifische Informationen über die Stoffe und ob ein Stoff überhaupt verabreicht wurde, geklärt werden muss. Beispiele dafür sind chronische kriminelle Verabreichung von Drogen oder Giften, zum Beispiel zur Sedierung von Kindern oder älteren unter Pflege stehenden Personen, die Klärung der chronischen, medizinischen Behandlung in Todesfällen oder bei klinischen Fällen mit unbekannter Vorgeschichte. Ein Wirkstoff-Screening im Haar kann auch zur Identifizierung von unbekanntem Leichen beitragen. In solchen Fällen sollte eine Systematische Toxikologische Analyse (STA), welche die allgemeine Suche nach toxischen Substanzen in der Haarprobe bedeutet, durchgeführt werden [15, 25, 31].

Aus analytischer Sicht unterscheidet sich Haar von anderen menschlichen Materialien durch die geringere Probemenge, die empfindlicherer Methoden bedarf, und durch seinen festen Zustand, der spezifische Methoden der Extraktion oder des Aufschlusses benötigt, und der es schwierig macht, realistische Standards und Kontrollproben für die Kalibrierung und Validierung von quantitativen Verfahren herzustellen. Abgesehen von diesen Besonderheiten, folgt die STA im Haar den gleichen Grundsätzen wie zum Beispiel im Blut oder Urin: Herstellen eines Extraktes, der möglichst viele toxikologisch relevante Stoffe enthält und Matrixbestandteile so weit wie mög-

lich ausschließt, die chromatographische Trennung des Extraktes in die Komponenten, die Charakterisierung der Komponenten durch Retentionszeit und Molekülspektren (MS bevorzugt, aber auch UV), die Identifizierung durch Bibliothekssuche und die (ungefähre) Quantifizierung mit Hilfe der chromatographischen Peakflächen.

Aufgrund dieser Einschränkungen des Haares wurden Arbeiten zur STA in diesem Material nur selten publiziert. Ein Verfahren, mit kombiniertem Einsatz von Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Diodenarraydetektor (HPLC-DAD) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) nach der Extraktion von 200-250 mg Haar in zwei Fraktionen mit 0,1 M HCl (basische Wirkstoffe) und mit Wasser (neutrale und saure Medikamentenwirkstoffe) und Aufreinigung durch Festphasenextraktion (SPE) wurde von Gaillard und Pepin bereits im Jahr 1997 [83] beschrieben. Die Autoren zeigten, dass Haar als eine sehr nützliche, alternative Matrix für die toxikologische Analyse dienen kann. Anhand von Fallbeispielen demonstrierten sie, wie Informationen zur Drogen- und Medikamentengeschichte einer Person durch die Haaranalyse zugänglich waren, und wie die Identifizierung unbekannter Leichen anhand des Vergleichs analytischer Haarergebnisse mit bekannten Medikationen vermisster Personen möglich war. Eine Übersicht der Screening-Strategien in Haar wurde von Sachs [84] im Jahr 2006 gegeben. Es wurde gefolgert, dass zum damaligen Zeitpunkt eine echte Systematische Toxikologische Analyse für Tausende von Wirkstoffen nicht mit der erforderlichen Empfindlichkeit möglich ist. Stattdessen wurde ein Multianalytverfahren mittels LC-MS/MS, das 49 Antidepressiva und Neuroleptika, 23 Benzodiazepine und 20 Opiode umfasste, als die vielversprechendste Alternative gesehen [84, 85].

Klose Nielsen et al. entwickelten ein Screenings- und Quantifizierungsverfahren für 52 Drogen und Medikamentenwirkstoffe im Haar mittels LC-TOF-MS [36]. Bei der Verwendung von 10 mg Haarmaterial lagen die Nachweisgrenzen (LODs) zwischen 0,01 und 0,10 ng/mg, die Quantifizierungsgrenze (LOQ) lag bei 87 % aller Analyte bei 0,05 ng/mg.

Vogliardi et al. stellten eine LC-MS-Methode unter Verwendung eines Orbitrap-Massenspektrometers zur Identifizierung und Quantifizierung von 28 Benzodiazepinen, inklusive 6 Metaboliten, in Haaren vor [86]. Die validierte Methode zeigte für die Analyte sehr gute Quantifizierungsgrenzen (LOQ) von 1-10 pg/mg.

Bis auf wenige Ausnahmen erfordert der Nachweis von Wirkstoffen in Haaren eine der Analyse vorangehende Extraktion oder den Aufschluss der Haarmatrix mit anschließender Extraktion der erhaltenen Lösung. Verfahren zum direkten Nachweis von Substanzen im Haar bestehen in der Anwendung der bildgebenden Technik unter Verwendung der matrixunterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MSI). Miki et al. analysierten ein mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure, welche zur Erzeugung protonierter Molekülonen verwendet wird, behandeltes, gespaltenes Einzelhaar eines chronischen Methamphetaminkonsumenten mittels MALDI-TOF-MSI und MALDI-FTICR-MSI [87]. Mit Hilfe dieser Techniken ließ sich die wiederholte Einnahme der Droge nachweisen. Porta et al. verwendeten die MALDI-MSI-Technik in Kombination mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle um anhand eines intakten Einzelhaares die Verteilung von Cocain und seinen Metaboliten darzustellen [88]. Das gezielte Screening sowie die Quantifizierung wurden im Single Reaction Monitoring (SRM) durchgeführt. Für die sichere Substanzidentifizierung wurden MS/MS- und MS<sup>3</sup>-Spektren der entsprechenden Vorläuferionen akquiriert. Mit einer Auflösung von 1 mm wurden Cocain und seine Metabolite Benzoyllecgonin, Cocaethylen und Norcocain chronologisch über mehrere Monate wiedergeben. Allerdings lag die Empfindlichkeit noch bei 5 ng/mg. Es ist denkbar, dass dieses Verfahren mit weiterer Empfindlichkeitssteigerung für die STA einsetzbar wird.

Methoden, die neben der Identifizierung eine Quantifizierung von Wirkstoffen im Haar erlauben, verlangen bislang eine Extraktion oder einen Aufschluss der Haarmatrix als Bestandteil der Probenvorbereitung. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu gewährleisten, wird eine Extraktion mit möglichst großer Ausbeute angestrebt. Darüber hinaus ist für die Quantifizierung ebenfalls wichtig, dass die Extraktion annähernd vollständig verläuft. Insbesondere bei der Verwendung von Cut-Off-Werten wie sie beispielsweise bei der Fahreignungsbegutachtung Anwendung finden [89], ist es wichtig, nicht nur die Substanz nachzuweisen, sondern deren Konzentration korrekt wiederzugeben. Schließlich sollte der Wirkstoff oder der Metabolit auch unter den Extraktionsbedingungen stabil sein. Je nach chemischer Beschaffenheit der nachzuweisenden Analyte wird bei gezielten Analysen das entsprechende Verfahren zur Probenvorbereitung gewählt. Für die systematische Suche nach toxischen Substanzen sollten diese Bedingungen für möglichst viele Verbindungen gleichzeitig erfüllt sein. Daher soll im Folgenden ein Überblick über die wichtigsten Extraktions- und

Aufschlussverfahren für Haar unter dem Gesichtspunkt dieser universellen Einsetzbarkeit gegeben werden.

### *Methanolextraktion mittels Ultraschall:*

Ein universelles und häufig verwendetes Verfahren, das auch für die STA in Frage kommt, besteht in der Verwendung von Methanol als Extraktionsmittel im Ultraschallbad für 5-18 Stunden [85, 90-95]. Im Gegensatz zu wässrigen Extraktionslösungen solvatisiert Methanol als organisches Lösungsmittel auch neutrale und lipophile Substanzen. Das hydrophile Methanol dringt in die Haarmatrix ein, wodurch diese aufquillt und die Wirkstoffe in die Extraktionslösung diffundieren können. Dies wird zusätzlich durch den Einsatz des Ultraschallbads unterstützt, welches die Haarstruktur zerstört. Dieses Verfahren eignet sich zum Nachweis von hydrolyseempfindlichen Substanzen wie Heroin [96, 97] und sehr lipophilen Substanzen wie THC [92]. Als leicht flüchtiges Lösungsmittel lässt sich Methanol einfach entfernen. Dadurch ist eine Aufkonzentration der Messlösung zur Empfindlichkeitssteigerung möglich. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch in der relativ hohen Verunreinigung des Extrakts durch Matrixbestandteile [94]. Daher werden häufig im Anschluss an die Methanolextraktion Reinigungsschritte wie die Verwendung der Flüssig/Flüssig- oder Festphasen-Extraktion durchgeführt. Auch durch wiederholte und verlängerte Methanolextraktion mittels Ultraschallbad lassen sich die meisten Analyte nicht vollständig extrahieren. Im Vergleich zu anderen Verfahren ist die Extraktionsausbeute daher häufig niedriger. Weiterhin ist zu beachten, dass es bei Estern leicht zur Umesterung kommen kann, zum Beispiel werden Fettsäureethylester in die entsprechenden Methylester umgewandelt.

### *Extraktion mit wässrigen Säuren oder Pufferlösungen:*

Ein für basische Wirkstoffe und Drogen (Amphetamine, Cocain sowie seine Metabolite, Methadon und Opiate) sehr geeignetes Verfahren besteht in der Extraktion mittels wässriger Säuren (0,01-0,5 M Salzsäure) [98] oder Phosphat-Puffer (pH 6,4 oder 7,6) [99]. Dieses Verfahren liefert viel reinere Extrakte als die methanolische Extraktion und selbst Benzodiazepine lassen sich durch Inkubation in einem Puffer extrahieren [100, 101]. Jedoch vollzieht sich während der Extraktion unter sauren Bedingungen zum Beispiel eine partielle Hydrolyse des Cocains unter Abspaltung von Methanol zu Benzoyllecgonin sowie eine Desacetylierung des 6-Acetylmorphins zu Morphin. Informationen bzgl. der im Haar vorliegenden Substanz-

verhältnisse gehen hierbei verloren. Dies ist bei der Interpretation des analytischen Befundes zu berücksichtigen. Heroin (diacetyliertes Morphin) stellt eine sehr gut im Haar einlagernde Substanz dar. Unter Anwendung wässriger Säuren wird sie jedoch nicht nachgewiesen, da es zu einer schnellen Desacetylierung kommt. Die methanolische Extraktion hingegen ermöglicht deren Nachweis. Ein entscheidender Nachteil, der den Einsatz für die STA ausschließt, ist, dass saure und lipophile Substanzen nicht ausreichend extrahiert werden. Weiterhin kann die erforderliche anschließende Aufreinigung durch Festphasenextraktion (SPE) oder Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) zu weiteren Substanzverlusten führen.

### *Behandlung mit Harnstoff und Thioglykolsäure:*

Die Extraktion in wässrigem Medium unter sauren Bedingungen (pH 3,2) kann durch die Anwesenheit von Denaturierungsmitteln wie Harnstoff (8 mol/l) und Thioglykolsäure (0,2 mol/l) erleichtert werden. Diese bewirken eine Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen sowie eine Reduktion der Disulfidbrücken im Haarprotein zu Thiolen. Die Anwendung dieses Verfahrens zeigte gute Ergebnisse bei der Extraktion von Benzodiazepinen [102], jedoch ist eine universelle Anwendung im Sinne der STA analog zu wässrigen Puffern und Säuren eingeschränkt.

### *Haaraufschluss mit wässriger Natronlauge:*

Dieses Verfahren eignet sich für Analyte, die unter alkalischen Bedingungen stabil sind. Die Haare werden hierbei zum Beispiel für eine Stunde bei 80 °C in 1 M Natronlauge inkubiert. Diese Methode erwies sich als vorteilhaft für den Nachweis von zum Beispiel Nikotin [103, 104], Amphetaminen [98, 105-110], THC [111-116], Antidepressiva und Neuroleptika [117-121]. Beim Haaraufschluss mittels Natronlauge wird von einer vollständigen Überführung des Wirkstoffs vom Haar in die Messlösung ausgegangen. Auch hier müssen die Analyte vor der Analyse mit Chromatographie und Massenspektrometrie durch SPE oder LLE aus der wässrigen Phase entfernt werden. Obwohl hier alle Substanzen aus der Matrix freigesetzt werden, wird der Einsatz für die STA durch die Instabilität vieler Wirkstoffe in dem stark basischen Milieu eingeschränkt.

### *Enzymatischer Aufschluss der Haarmatrix:*

Mit Hilfe der Enzyme Pronase und Proteinase K kann eine hydrolytische Spaltung von Haarproteinen durchgeführt werden. Die Verwendung von Dithiothreitol und der

damit herbeigeführten Spaltung von Disulfidbindungen führt zu einer erheblichen Verbesserung des enzymatischen Aufschlusses [122-124]. So wurden innerhalb von 4-6 Stunden 10-30 mg Haare mit Hilfe von 100 mg Proteinase K und 200 mg Dithiothreitol in Tris-Puffer (pH 8,0) bei 37 °C vollständig hydrolysiert [124]. Weitere enzymatische Verfahren wurden u. a. von Nakahara et al. beschrieben [125]. Obwohl dieses Verfahren weit schonender als der alkalische Haaraufschluss ist, erscheint die Anwendung zur STA aufgrund der nachfolgenden Aufreinigung und Extraktionsschritte unzweckmäßig.

### *Überkritische Fluidextraktion:*

Der Einsatz von überkritischen Fluiden wurde auf Grund ihrer einzigartigen Eigenschaften, der niedrigen Viskosität und schnellen Extraktion mit hoher Mobilität bei der Haarextraktion angewendet [126-130]. Die pulverisierte Haarprobe wurde bei 300 bar und 60 °C mit CO<sub>2</sub> behandelt. Zusätze wie Chloroform, Ethylacetat oder Isopropanol können verwendet werden, um die Lösungsmittleigenschaften des CO<sub>2</sub> zu verbessern. Trotz der zahlreichen Vorteile wie der schnellen Extraktion, hohen Extraktionsausbeute, Miniaturisierung und Automatisierung wird diese Methode auf Grund der hohen Kosten nur selten angewendet und scheidet für die STA aus.

### *Extraktion mittels Lösungsmittelgemischen:*

Unterschiedliche Mischungen von Methanol und Salzsäure wurden zur Extraktion von Amphetaminen eingesetzt. So wurde Methanol mit 5 M Salzsäure im Verhältnis von 20/1 (v:v) [131], 2/1 (v:v) [132] oder Methanol mit 1 % Salzsäure für 20 Stunden bei 38 °C verwendet [133].

Vogliardi et al. verwendeten für die Extraktion von Cocain und seinen Metaboliten ein Gemisch aus Methanol und Trifluoressigsäure bei 45 °C für 15 Minuten [134]. In einer folgenden Publikation berichteten sie von einer effizienteren, schnellen Extraktion. Hierbei wurde ein Aliquot von 2,5 mg Haaren mit Hilfe einer Kugelmühle in Anwesenheit eines sauren Lösungsmittelgemischs bestehend aus Wasser, Acetonitril und 1 M Trifluoressigsäure (8/1/1, v:v:v) für 5 Minuten pulverisiert und gleichzeitig extrahiert [135].

Kronstrand et al. verwendeten ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol und 20 mM Ammoniumformiat-Puffer (pH 3,0) (10/10/80, v:v:v) für 18 h bei 37 °C [136]. Diese Extraktion wurde durch Klose Nielsen et al. optimiert. Es zeigte sich, dass eine Mi-

schung aus Methanol, Acetonitril und 2 mM Ammoniumformiat mit 8 % Acetonitril (pH 5,3) im Verhältnis 25/25/50 (v:v:v) für 18 h bei 37 °C [36] eine effizientere Extraktion darstellte. Im Gegensatz zu anderen wässrigen und methanolischen Extraktionsverfahren waren die Ausbeuten äquivalent oder höher. Die Matrixbelastung war deutlich geringer als bei der Verwendung von Methanol und einer Ultraschallbehandlung.

Von diesen Lösungsmittelgemischen scheint das letztgenannte für die STA mit LC-QTOF-MS am besten geeignet zu sein, da es geringe chemische Reaktivität mit gutem Aufquellvermögen für Haare, guten Löslichkeitsvermögen auch für lipophile Substanzen und direkte Injektion des Extrakts in die LC-QTOF-MS-Analyse gestattet.

### **3. Experimenteller Teil**

#### **3.1 Messinstrumente**

Die Abkürzungen „HPLC“ und „LC“ für Flüssigchromatographie wurden in Übereinstimmung mit der Literatur jeweils nach der Art des eingesetzten Detektors verwendet. Beim Einsatz des DAD wurde HPLC (HPLC-DAD) und beim Massenspektrometer LC (LC-MS) gewählt. Diese begriffliche Trennung ist historisch gewachsen und stellt keinen Unterschied der Messinstrumente dar.

Trotz der zum Teil kombinierten Anwendung sollen beide Systeme separat und unter den jeweiligen Bedingungen, mit denen sie betrieben wurden, betrachtet werden.

##### **3.1.1 HPLC-DAD-Konfiguration**

Die in der HPLC-DAD-Analyse verwendeten Module stammten alle aus der Agilent 1200 SL Serie und können bis zu einem Druck von 600 bar betrieben werden. Diese wurden in folgender Konfiguration mit entsprechenden Bedingungen betrieben:

Module (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland):

- Entgaser: Degasser
- Binäre Pumpe: Bin Pump SL
- Autoinjektor: HiP-ALS SL
- Temperierter Säulenofen: TCC SL
- Diodenarraydetektor: DAD SL

Die Trennsäule sowie die mobilen Phasen waren identisch mit den für die UV-Spektrenbibliothek geforderten Bedingungen.

Analytische Trennsäule:

- Lichrospher RP8 Säule (250 x 4,0 mm, 5 µm, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Mobile Phasen:

- A: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (37/63, v:v)
- C: Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (20/80, v:v)

### 3.1.2 LC-QTOF-MS-Konfiguration

Die in der LC-QTOF-MS-Analyse verwendeten LC-Module stammten ebenfalls alle aus der Agilent 1200 SL Serie und können bis zu einem Druck von 600 bar betrieben werden. Diese wurden in folgender Konfiguration mit entsprechenden Bedingungen betrieben:

LC-Module (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland):

- Entgaser: Degasser
- Binäre Pumpe: Bin Pump SL
- Autoinjektor: HiP-ALS SL
- Temperierter Säulenofen: TCC SL

MS-Module:

- Ionenquelle: ESI + Agilent Jet Stream technology (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Massenspektrometer Detektor: 6530 Accurate-Mass QTOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Stickstoffgenerator: N2-14-K727 (Parker Hannifin, Cleveland, USA)
- Vorvakuumpumpe: E2M28 (Edwards Limited, Crawley, UK)

Analytische Trennsäulen (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland):

- Zorbax Eclipse Plus C18 Säule (2,1 x 100 mm, 3,5 µm)
- Poroshell 120 EG-C18 Säule (2,1 x 100 mm, 2,7 µm)

Mobile Phasen:

- A1: 5 mM Ammoniumformiat + 0,01 % Ameisensäure (pH 4,5)
- A2: 10 mM Ammoniumacetat (pH 6,8)
- B1: Methanol + 0,01 % Ameisensäure
- B2: Methanol

### **3.2 Laborequipment**

Sämtliche Einwaagen wurden an einer Feinanalysenwaage R180D der Firma Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) vorgenommen. Zum Zentrifugieren von Blut-, Urin- und Haarproben wurde die Zentrifuge Centrifuge 5415D der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für die Haarextraktion wurde ein Thermomixer TMix 220 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) eingesetzt. Die Dekontamination und Extraktion von Haarproben erfolgte in einem Ultraschallbad Sonorex RK 103H (Bandelin electronic, Berlin, Germany). Zum kurzzeitigen Schütteln von Proben diente ein Vortex-Rüttler VF 2 der Firma Janke & Kunkel GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland). Einengen und Verdampfen der Lösungsmittel und Temperieren von Proben und Extrakten wurde mittels eines Metallblockthermostaten Evaporator 2366-DA der Firma Liebisch (Gebr. Liebisch GmbH, Bielefeld, Deutschland) mit einer Stickstoffzufuhr über ein Multiplex Ventildepot durchgeführt. Zur Bestimmung des pH-Werts bei der Herstellung von Pufferlösungen wurde eine Glaselektrode Sure-Flow Silver-Chloride in Kombination mit dem Messgerät PerpHecT Meter Serie Modell 370 der Firma ATI (ATI Orion Inc., Boston, USA) verwendet.

### **3.3 Software**

Für die Steuerung der Geräte und Auswertung der Datenfiles kamen die MassHunter Software (Agilent Technologies) und die ChemStation Software (Agilent Technologies) zum Einsatz. Zur Datenauswertung wurden zusätzliche, eigen programmierte Software-Tools (Metaboliten-Tool und Semiquantifizierungs-Tool) angewendet.

#### **3.3.1 MassHunter Workstation**

Alle Module der LC-QTOF-MS-Kopplung wurden durch die MassHunter Workstation Acquisition B.04.00 Software für Agilent TOF- und QTOF-Instrumente gesteuert. Für die Datenauswertung wurde die MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.04.00 sowie Quantitative Analysis B.04.00 Software verwendet. Für die Peakidentifizierung wurde die „Broecker, Herre & Pragst Forensics and Toxicology accurate mass MS/MS spectral library“, welche mehr als 2720 toxikologisch relevante Substanzen beinhaltet, genutzt. Desweiteren wurde der Personal Compound Database and Library (PCDL) Manager B.04.00 verwendet.

### **3.3.2 ChemStation**

Der DAD sowie die in der HPLC-DAD-Analyse enthaltene Pumpe wurden mit der ChemStation Software Revision B.04.03 betrieben. Die Datenauswertung erfolgte ebenfalls mit dieser Software in Kombination mit der Spektrenbibliothek „UV Spectra of Toxic Compounds“, welche mehr als 3300 toxikologisch relevante Substanzen beinhaltet [9].

### **3.3.3 „Metaboliten-Tool“**

Für die Metabolitensuche wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Software-Tool entwickelt. Dieses wurde in der Programmiersprache Python geschrieben (Python Software Foundation) und wird im Abschnitt 4.4.1. ausführlich dargestellt.

### **3.3.4 Tool „Estimate Concentration“**

Für die semiquantitative Konzentrationsbestimmung wurde ein weiteres Software-Tool als Bestandteil dieser Arbeit entwickelt. Dieses wurde ebenfalls in der Programmiersprache Python geschrieben (Python Software Foundation) und wird im Abschnitt 4.5.2. ausführlich dargestellt.

## **3.4 Lösungsmittel, Referenzsubstanzen und Chemikalien**

### **3.4.1 Lösungsmittel und Reagenzien**

Lösungsmittel und Reagenzien wurden von folgenden Herstellern erworben und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet:

- Firma Merck (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland): Acetonitril (Uvasol, für die Spektroskopie) und Dichlormethan (Uvasol, für die Spektroskopie)
- Firma Fisher Scientific (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland): Methanol (LC-MS Qualität) und Acetonitril (LC-MS Qualität)
- Firma Acros Organics (Geel, Belgien): Wasser (HPLC Qualität)
- Firma Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland): Ammoniumacetat (HPLC Qualität)
- Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland): Ammoniumformiat (LC-MS Qualität)

- Firma Acros Organics (Geel, Belgien): Ameisensäure (99 +% zur Analyse)
- Firma Merck (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland): Kaliumdihydrogenphosphatmonohydrat p.A., Phosphorsäure 85 %ig und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.A..

### 3.4.2 Laufmittel, Extraktions- und Pufferlösungen

Folgende Pufferlösungen wurden nach den beschriebenen Vorschriften selbst hergestellt.

*Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,3 (0,1 M):*

6,66 g Kaliumdihydrogenphosphatmonohydrat wurden in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde unter kontinuierlicher Messung des pH-Wertes mittels Glaselektrode mit konzentrierter Phosphorsäure (85 %ig, ca. 2,8 ml) auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt. Danach wurde die Lösung in einen 1000 ml Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

*Trislösung mit einem pH-Wert von 9,0 (0,2 M):*

24,3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurden in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde in einen 1000 ml Maßkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Folgende Laufmittel für die HPLC-DAD-Analyse wurden hergestellt:

*Mobile Phase A:*

Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (37/63, v:v)

*Mobile Phase C:*

Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (20/80, v:v)

Folgende Laufmittel für die LC-QTOF-MS-Analyse wurden hergestellt:

*10 mM Ammoniumacetat::*

1,928 g Ammoniumacetat wurden in 2,5 l Wasser aufgelöst (10 mM).

*5 mM Ammoniumformiat + 0,01 % Ameisensäure:*

2,5 l Wasser wurden mit 2,5 ml Ammoniumformiatlösung (5 M) sowie 250 µl 99 %ige Ameisensäure versehen.

*Methanol + 0,01 % Ameisensäure:*

In 2,5 l Methanol wurden 250 µl 99 %ige Ameisensäure gegeben.

*Extraktionspuffer für die Haaranalyse:*

Für die Extraktion der Haarproben wurde nach geringer Modifikation das von Nielsen et al. beschriebene Lösungsmittelgemisch bestehend aus Methanol, Acetonitril und 2 mM wässrigem Ammoniumformiat (pH 4,5) (1/1/2, v:v:v) hergestellt.

### **3.4.3 Referenzsubstanzen**

Mehr als 3000 Referenzsubstanzen standen in der Abteilung für Forensische Toxikologie für diese Untersuchung zur Verfügung. Sie waren im Verlauf von ca. 20 Jahren großzügig von zahlreichen pharmazeutischen Herstellern gespendet oder von Chemieunternehmen wie LGC Promochem, Sigma, Radian, Riedel de Haen, Dr. Ehrenstorfer oder Lipomed gekauft worden und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Die UV-Spektren dieser Substanzen wurden bereits zuvor mittels HPLC-DAD für die UV-Spektrenbibliothek „UV Spectra of Toxic Compounds“ gemessen, welche eine vollständige Liste aller Substanzen angibt [9]. Darüber hinaus sind 52 deuterierte Standards von illegalen Drogen, legalen Opioiden und Benzodiazepinen mit aufgenommen worden. Die Identität sowie die ausreichende Reinheit aller Substanzen wurden stets mittels Massenspektrometrie überprüft.

## **3.5 Probenmaterial**

### **3.5.1 Drogen- und Medikament-freie Referenzmatrix**

Für die Entwicklung, Optimierung und Validierung der Methoden wurden Blut- und Haarproben von Freiwilligen aus dem Labor und deren Verwandten verwendet, die keinerlei Medikamente und Drogen eingenommen haben. Lediglich ein Konsum von Kaffee, Tee und zum Teil von Zigaretten war gegeben.

### **3.5.2 Postmortale Blut- und Haarproben**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden postmortales Blut aus der Vena femoralis von 77 Autopsien sowie 90 postmortale Haarproben, welche während der Autopsie direkt über der Haut am Hinterkopf der Betroffenen abgeschnitten wurden, untersucht. In allen Fällen war der Konsum illegaler Drogen oder therapeutischer Medikamente zur Lebenszeit bekannt. Das Probenmaterial wurde im Institut für Rechtsmedizin des

Universitätsklinikums Charité Berlin entnommen und asserviert. Die verwendeten Blutproben stammen aus dem Zeitraum von Juli 2009 bis Juni 2010 und wurden bis zur Untersuchung luftdicht verschlossen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die untersuchten Haarproben kommen aus dem Zeitraum von Juli 2009 bis April 2010 und wurden trocken und bei Raumtemperatur gelagert. Die Polizeiberichte mit Information zur Fallgeschichte, insbesondere zu Erkrankungen sowie verordneten und aufgefundenen Medikamenten, und die Obduktionsprotokolle standen in allen Fällen zur Verfügung. Ebenso lagen die toxikologisch-chemischen Analyseergebnisse aller Fälle von Blut, Urin und Mageninhalt aus den im Institut validierten Routineverfahren mittels Enzym-Immunoassay (EMIT), HPLC-DAD und GC-MS vor.

### **3.6 Probenvorbereitung**

#### **3.6.1 Herstellung von Referenzsubstanzlösungen für die Spektrenbibliothek**

Für die Messung der CID-Bibliotheksmassenspektren wurden Stammlösungen aller Substanzen in Methanol zu je 1 mg/ml hergestellt und auf 1 µg/ml verdünnt. Bei unzureichender Löslichkeit erfolgte die Zugabe von Ameisensäure, die Verwendung von Wasser oder Acetonitril oder eines größeren Volumens an Lösungsmittel. 1 ng jeder Substanz (1 µl der 1 µg/ml Lösung) wurde direkt und ohne chromatographische Trennung für die Messung mittels QTOF-MS injiziert.

#### **3.6.2 Aufarbeitung von Blutproben**

Die in der Routine der forensisch-toxikologischen Abteilung des Instituts verwendete Probenvorbereitung [2] wurde nur geringfügig modifiziert und für die LC-QTOF-MS- und HPLC-DAD-Messung verwendet.

##### *Saure und basische Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan*

500 µl Vollblut wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt und mit 100 µl 0,1 M HCl (saure Extraktion) oder 100 µl Tris-Substanz Lösung (24,3 g in 1 l Wasser, pH 9,0, basische Extraktion) und 400 µl Dichlormethan versetzt. Danach wurde für 1 min gevortext und für 5 min bei 13 200 U/min zentrifugiert. 200 µl der Dichlormethanphase wurden mit einer Hamilton-Spritze abgetrennt und bei 40 °C im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 µl Acetonitril / 0,1 % HCOOH (35/65, v:v) gelöst. Davon wurden 50 µl für die HPLC-DAD- und 5 µl für LC-QTOF-MS-Messung direkt injiziert.

### *Proteinfällung mit Acetonitril*

100 µl Vollblut wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt und mit 400 µl Acetonitril versetzt. Danach wurde für 1 min gevortext und für 5 min bei 13 200 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 400 µl des Überstandes abgetrennt und bei 40 °C im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 80 µl Acetonitril / 0,1 % HCOOH (35/65, v:v) gelöst. Davon wurden 20 µl für die HPLC-DAD- und 5 µl für LC-QTOF-MS-Messung direkt injiziert.

### **3.6.3 Aufarbeitung von Haarproben**

Bei längeren Haarproben wurde das proximale Segment von 0-6 cm vom Rest der Probe abgetrennt und analysiert. Kürzere Haarproben wurden in voller Länge der Analyse zugeführt. Zur Dekontamination und zur Entfernung anhaftender Verunreinigungen wurden die Haare unter leichtem Schwenken für 1 min mit ca. 20 ml Wasser und zwei Mal für 1 min mit jeweils ca. 20 ml Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Haare auf einem Filterpapier getrocknet und auf diesem in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Ca. 20 mg wurden exakt in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen. Nach Zugabe einer Lösung aus deuterierten Standards (5 µl einer 1 ng/µl Lösung bestehend aus Amphetamin-D5, Methamphetamin-D5, MDMA-D5, MDEA-D6, MDA-D5, Cocain-D3, Benzoyllecgonin-D3, Methylecgonin-D3, Cocaethylen-D3, Morphin-D3, 6-Acetylmorphin-D3, Codein-D3, Dihydrocodein-D3, Methadon-D9, EDDP-D3, Alprazolam-D5,  $\alpha$ -Hydroxyalprazolam-D5, Diazepam-D5, Nordiazepam-D5, Oxazepam-D5, 7-Aminoflunitrazepam-D7, Flunitrazepam-D7 und Lorazepam-D4) und 0,5 ml einer Extraktionslösung aus Methanol / Acetonitril / 2 mM Ammoniumformiat (25/25/50, v:v:v) wurden die Haare für 18 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 13 200 U/min zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde abgetrennt und die Inkubation der Haare wurde dann mit 0,5 ml der Extraktionslösung für 18 h wiederholt. Beide Extrakte wurden vereinigt und im Stickstoffstrom auf 0,5 ml eingengt, um den größten Anteil an organischem Lösungsmittel zu entfernen. 5 µl der Lösung wurden ohne weitere Aufreinigung direkt für die Messung mittels LC-QTOF-MS injiziert.

## 3.7 Messmethoden

### 3.7.1 Direktinjektion

Die Messung der Bibliotheksspektren erfolgte ohne chromatographische Trennung durch Direktinjektion (Flow-Injektion) der einzelnen Referenzstandardlösungen in die mobile Phase bestehend aus 5 mM Ammoniumformiat und 0,01 % Ameisensäure in Wasser / 0,01 % Ameisensäure in Methanol (50/50). Um Carry-Over Effekte zu minimieren wurde vor jeder Injektion die Nadel des Autoinjektors für 10 s in einem Gemisch aus Methanol / Acetonitril / Isopropanol / Wasser / Ameisensäure (50/25/15/10/0,1, v:v:v:v:v) von außen gewaschen.

### 3.7.2 Flüssigchromatographie

#### *HPLC-Bedingungen der HPLC-DAD-Analyse*

Die chromatographischen Bedingungen der HPLC-DAD-Kopplung entsprachen den Standardbedingungen unter denen die UV-Spektrenbibliothek aufgebaut wurde [2, 9]. Die isokratische Elution erfolgte durch die wahlweise Verwendung der mobilen Phase A (Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3 (37/63, v:v)) oder C (Acetonitril / Phosphatpuffer pH 2,3 (20/80, v:v)). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als stationäre Phase wurde eine Lichrospher RP8 Säule (250 x 4,0 mm, 5 µm, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur verwendet.

#### *LC-Bedingungen der LC-QTOF-MS-Analyse*

Zwei verschiedene chromatographische Bedingungen (I) und (II) wurden angewandt:

LC (I): Die Trennung erfolgte mit einer Zorbax Eclipse Plus C18 Säule (2,1 x 100 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei 30 °C. Die Elutionsmittel A = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser und B = Methanol wurden in folgendem zeitabhängigen Gradienten verwendet: 0 min 10 % B, linear auf 90 % B in 16 min, konstant bei 90 % B bis 19,8 min, auf 10 % B in 20 min. Die anschließende Äquilibrierung erfolgte für 3 min. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,4 ml/min.

LC (II): Die Trennung erfolgte mit einer Poroshell 120 EG-C18 Säule (2,1 x 100 mm, 2,7 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei 50 °C. Die Elutionsmittel A = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser und B = Methanol wurden in folgendem zeitabhängigen Gradienten verwendet: 0 min 10 % B, linear auf 50 % B in 8 min, linear auf 100 % B in 20 min, konstant bei 100 % B bis 23,9 min, auf 10 % B in 24 min. Die

anschließende Äquilibration erfolgte für 3 min. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,4 ml/min.

### *Kombination von HPLC-DAD und LC-QTOF-MS*

Bei der kombinierten Anwendung beider parallel betriebener Detektoren (DAD und MS) wurden zunächst 50 µl (20 µl bei der Proteinfällung) der Probe in die mobile Phase für die HPLC-DAD-Analyse injiziert. Danach wurde der Autoinjektor über ein Ventil aus der HPLC-DAD in die LC-QTOF-MS-Kopplung geschaltet. Die Pumpe für die LC-QTOF-MS-Analyse verdrängte daraufhin die für die HPLC-DAD-Analyse verwendete mobile Phase, wobei sich die Injektionsnadel des Autoinjektors über der Waschposition befand. Danach erfolgte die Injektion von 5 µl der Probe in die mobile Phase für die LC-QTOF-MS-Analyse. Detaillierte Angaben zum Schaltplan und zum zeitlichen Schaltprogramm der Ventile sind in Abbildung 4.16 und in Abschnitt 4.2.1. in Tabelle 4.8 beschrieben.

### **3.7.3 DAD-Datenakquisition**

Die DAD-Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 195 bis 380 nm mit einer spektralen Auflösung von 1 nm und einer Akkumulationszeit (Response time) von 2,0 s akquiriert. Die Darstellung des Chromatogramms erfolgte durch die extrahierte Wellenlänge von 225 nm mit einer Bandbreite von 10 nm (220-230 nm).

### **3.7.4 QTOF-MS-Datenakquisition**

#### *Verwendete MS-Parameter*

Zur Erzeugung von Ionen wurde eine Elektrosprayionisationsquelle (ESI + Agilent Jet Stream technology) im positiven oder negativen Ionisierungsmodus verwendet. Für die Zerstäubung der mobilen Phase sowie deren Trocknung wurde Stickstoff aus Druckluft mit Hilfe eines Stickstoffgenerators erzeugt und herangezogen. Als Kollisionsgas wurde Stickstoff in einer Reinheit von 4.0 eingesetzt. Die Parameter der Ionenquelle lagen für das Trocknungsgas bei einer Temperatur von 320 °C mit einem Fluss von 8 l/min, das Sheathgas bei einer Temperatur von 380 °C mit einem Fluss von 11 l/min, der Zerstäubendruck bei 35 psi, die Nozzle-Spannung bei 0 V und die VCap-Spannung bei 3000 V. Die Fragmentor-Spannung betrug 150 V und die Skimmer-Spannung 65 V. Während der Messung erfolgte eine kontinuierliche Massenachsenkalibration durch die Zuführung von Referenzsubstanzen, welche in einem

Massenfenster von 30 ppm und einer Mindesthöhe von 1000 Counts detektiert werden mussten. Die verwendeten Referenzsubstanzen waren: Purin 121,050873  $[M+H]^+$  und 119,036319  $[M-H]^-$ , HP-921 = Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazen 922,009798  $[M+H]^+$  und 966,000725  $[M+HCO_2]^-$ . Der aufgezeichnete Massenbereich betrug im MS-Experiment 50-1000 m/z und im MS/MS-Experiment 50-600 m/z. Nur in speziellen Fällen wurde der Bereich bis 1700 m/z aufgezeichnet. Gespeichert wurden im MS-Experiment nur Signale ab einer absoluten Höhe von 200 Counts und einer relativen Intensität von 0,01 % des intensivsten Signals. Im MS/MS-Experiment lag die Mindesthöhe gespeicherter Signale bei 5 Counts. Neben Centroid-Daten, die in der Regel zur Auswertung herangezogen wurden, wurden auch immer Profile-Daten aufgenommen, auf die nur in speziellen Fällen zurückgegriffen wurde.

### *Messung von Bibliotheksspektren*

Die Akquisition von Bibliotheksspektren erfolgte ausschließlich im Targeted-MS/MS-Modus. Hierbei wurde für jede Referenzsubstanz eine individuelle Methode mit dem Eintrag der entsprechenden exakten Quasimolekülionenmasse  $[M+H]^+$  oder  $[M-H]^-$  erstellt. Mit einer Massenauflösung von 1,3 amu wurden diese Massen im Quadrupol gefiltert und nachfolgend bei CID-Energien von 0 eV isoliert sowie 10, 20 und 40 eV fragmentiert und im Produktionen-Scan erfasst. Die Scanfrequenz betrug 8 Hz im MS- und MS/MS-Experiment. Abweichend von den beschriebenen MS-Parametern wurde das Trocknungsgas bei einer Temperatur von 250 °C mit einem Fluss von 6 l/min, das Sheathgas bei einer Temperatur von 300 °C mit einem Fluss von 10 l/min, die VCap-Spannung von 3500 V und die Nozzle-Spannung von 100 V verwendet.

### *Probenmessung im MS-Modus*

Die Datenakquisition im MS-Modus, dem empfindlichsten Messmodus, fand bei einer Scanfrequenz von 1 Hz statt. CID-Experimente finden in diesem Modus nicht statt.

### *Probenmessung im Auto-MS/MS-Modus (I) und (II)*

Im Auto-MS/MS-Modus findet eine alternierende Messung von MS- und datenabhängigen MS/MS-Spektren statt. Für die Akquisition von CID-Spektren erfolgte eine Selektion des Vorläuferions durch den Quadrupol mit einer Auflösung von 4 amu und

eine anschließende Fragmentierung dieses mit einer massenabhängigen Kollisionsenergie nach Gleichung (3) in der Kollisionszelle.

$$CE = \left( \frac{6}{100} \times \frac{m}{z} + 4 \right) eV \quad (3)$$

Die Scanfrequenz war für die beiden chromatographischen Bedingungen (I) und (II) (siehe Abschnitt 3.7.2.) verschieden und lag bei (I) 3 Hz im MS- und MS/MS-Experiment bzw. (II) 4 Hz im MS- und MS/MS-Experiment (siehe Abschnitt 3.7.4.). Die Zykluszeit betrug 1,1 s. In einem Zyklus wurden nach der Messung für (I) 0,33 s bzw. (II) 0,25 s eines MS-Spektrums (I) 2 bzw. (II) 3 Vorläuferionen mit einer Mindestintensität von 1000 Counts im Bereich von 130-600 m/z ausgewählt und nacheinander separat fragmentiert. Dabei wurde die Akquisitionszeit eines CID-Spektrums automatisch auf die Empfindlichkeit des Vorläuferions angepasst, sodass ggf. von der Akkumulationszeit von (I) 0,33 s bzw. (II) 0,25 s eines CID-Spektrums geringe Abweichungen auftraten. Diese datenabhängig ausgewählten Vorläuferionen wurden nach einem CID-Experiment aktiv für (I) 0,15 min bzw. (II) 0,1 min für eine erneute Auswahl ausgeschlossen.

#### *Probenmessung im Targeted-MS/MS-Modus*

Bei der gezielten Akquisition von CID-Spektren wurde der Targeted-MS/MS-Modus verwendet. Hierbei wurden die Massen der Vorläuferionen, deren Retentionszeiten sowie ein Retentionszeitfenster von  $\pm 0,5$  bis  $\pm 1,5$  min, in denen CID-Spektren erzeugt werden sollen, vorgegeben. Der Quadrupol wurde mit einer Auflösung von  $m/z = 1,3$  oder 4 amu verwendet. Sofern eine höhere Empfindlichkeit bei der Erzeugung von CID-Spektren erforderlich war, wurde die geringere Auflösung von 4 amu gewählt. Sollten jedoch weniger matrixbelastete CID-Spektren akquiriert werden und war die geringere Empfindlichkeit unerheblich, so wurde die Auflösung von 1,3 amu vorgegeben. Um eine effiziente Fragmentierung zu erzielen, wurde mit Hilfe der Bibliothek die günstigste Kollisionsenergie ermittelt und für die jeweilige Vorläufermasse vorgegeben. In einigen Fällen wurde jedoch die massenabhängige Kollisionsenergie nach Gleichung (3) verwendet. Die Scanfrequenz wurde für MS-Experimente zwischen 3 und 5 Hz und im MS/MS-Experiment in Abhängigkeit von der erforderlichen Empfindlichkeit zwischen 1 und 4 Hz gewählt.

### 3.8 Methodenvalidierung des Screenings in Haaren

Für eine Auswahl von 24 häufig auftretenden illegalen Drogen oder deren Metaboliten (siehe Abschnitt 4.3.2. in Tabelle 4.11) wurde eine Kalibrierung und Methodenvalidierung nach den internationalen Richtlinien [137] durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Valistat 2.0 Software der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) [138]. Für diesen Zweck wurden 6 verschiedene drogenfreie Haarproben mit den 24 Drogen bzw. deren Metaboliten bei verschiedenen Konzentrationen sowie 0,25 ng/mg der deuterierten Standards dotiert und analysiert. Die Methode wurde für folgende Parameter validiert: Empfindlichkeit (Nachweisgrenzen (LODs) und Grenzen der Quantifizierung (LOQs)), Linearität und Carry-Over, Intra- und Inter-Tage-Präzision und Richtigkeit, Spezifität und Matrixeffekte. Die Daten sind im Abschnitt 4.3.2. in Tabelle 4.11 dargestellt.

#### *Empfindlichkeit*

Zur Bestimmung der LODs und LOQs wurden 20 mg drogenfreies Haar mit allen 24 Drogen in Konzentrationen zwischen 1 und 10 pg/mg (in 1 pg/mg Schritten) und den deuterierten Standards in einer Konzentration von 0,25 ng/mg dotiert. Die LODs und LOQs wurden entsprechend der DIN 32645 ermittelt. In einigen Fällen waren die berechneten LODs niedriger als die Konzentration bei der noch ein Signal vorhanden war. In diesen Fällen wurde das LOD gleich der Konzentration mit noch erkennbarem Signal gesetzt.

#### *Linearität und Carry-Over*

Sieben Kalibratoren (0,025, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 1,0 und 2,5 ng/mg) wurden in einer 6fach Bestimmung analysiert. Zwei weitere Kalibratoren (5,0 und 10 ng/mg) wurden ebenfalls gemessen und sollten nur in Fällen eingesetzt werden, bei denen die ermittelte Konzentration höher als der normale Arbeitsbereich ist. Nach dem höchsten Kalibrator wurde eine Blindprobe gemessen, um den Carry-Over-Effekt zu ermitteln.

#### *Präzision und Richtigkeit*

Die Präzision und die Richtigkeit der Methode wurden anhand zweier Qualitätskontrollproben von 0,05 und 1,0 ng/mg bestimmt. Diese wurden jeweils in sechs Wiederholmessungen für die Intra-Tag-Präzision sowie an 5 verschiedenen Tagen für die Inter-Tag-Präzision gemessen. Die Präzision wurde als prozentuale relative Stan-

Standardabweichung und die Richtigkeit als Prozentsatz des Messwertes in Bezug zum Referenzwert berechnet.

### *Spezifität*

Drogenfreie Haarproben von sechs verschiedenen Freiwilligen wurden analysiert, um Signalinterferenzen zwischen Matrix und Analyten bzw. deuterierten Standards auszuschließen.

### *Matrix-Effekt*

Die Ionen-Unterdrückung bzw. -Verstärkung wurde durch Messung des Substanzgemisches in einer Konzentration von 0,05 und 1,0 ng/mg ohne und mit Anwesenheit des Haarextrakts für sechs verschiedene Haarproben untersucht. Der prozentuale Matrixeffekt wurde nach Gleichung (4) berechnet:

$$\text{Matrixeffekt} = \left( \frac{\text{Peakfläche Analyt in Anwesenheit von Matrix}}{\text{Peakfläche Analyt in Abwesenheit von Matrix}} - 1 \right) \times 100 \% \quad (4)$$

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

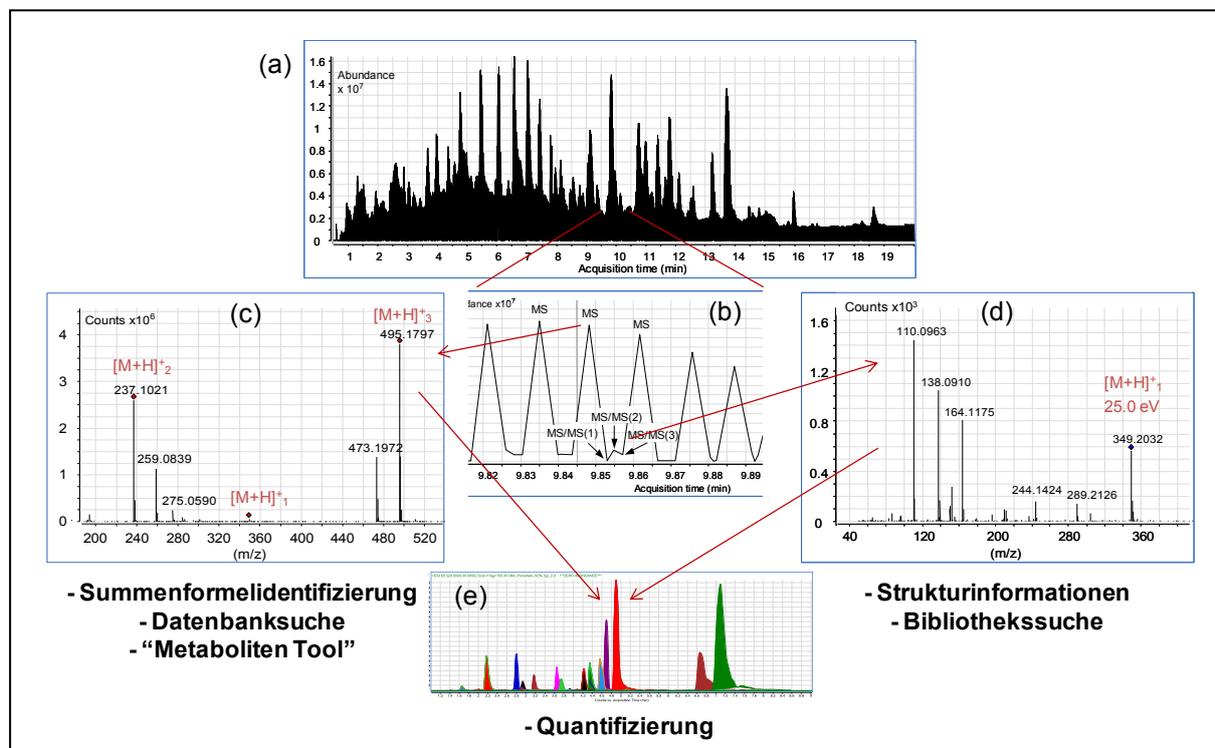
Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Verfahrensweise zur Anwendung der LC-QTOF-MS für die Systematische Toxikologische Analyse (STA) komplex bearbeitet. Zu diesem Zweck wurden eine Datenbank, eine Bibliothek, ein Metaboliten-Tool und ein Semiquantifizierungs-Tool zur Identifizierung und Konzentrationsabschätzung von toxischen Substanzen in der STA geschaffen und in der Praxis erprobt. Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen den in Kombination zur Analyse von Blutproben angewendeten Methoden HPLC-DAD und LC-QTOF-MS durchgeführt und eine Methode für die STA in Haaren entwickelt.

### **4.1 LC-QTOF-MS-Messung und Datenauswertung in der STA**

In diesem Abschnitt sollen der Aufbau und die Funktionsweise der entwickelten Identifikationssoftware sowie deren kombinierte Anwendung in der STA vorgestellt werden. Die Begriffe Datenbank und Bibliothek sollen strikt voneinander getrennt verwendet werden, auch wenn deren Informationen in einer gemeinsamen Datenbank und Bibliothek vereint sind. Als Datenbank wird ein Kollektiv von textbasierenden Informationen betrachtet. Hierbei kann in eine theoretische bzw. semiempirische Datenbank mit Einträgen wie zum Beispiel dem Substanznamen, der Strukturformel, der Masse und der Summenformel und eine empirische Datenbank mit experimentell gewonnenen Informationen wie zum Beispiel den ermittelten Retentionszeiten von Substanzen in einem definierten System unterschieden werden. Davon abzugrenzen ist die Bibliothek, die ein Kollektiv an experimentell bestimmten, substanzspezifischen Spektren beinhaltet.

Einen Überblick über die Messung und Auswertung einer Probe gibt Abbildung 4.1. Das Chromatogramm einer im Auto-MS/MS-Modus gemessenen Blutprobe ist in Abbildung 4.1 (a) sowie die zyklische Abfolge von MS- und MS/MS-Experimenten in Abbildung 4.1 (b) dargestellt. Anhand von Full-Scan-MS-Spektren mit akkuraten Quasimolekülionmassen lässt sich die Summenformel einer Substanz identifizieren und mit dieser dann eine Datenbanksuche oder Metabolitensuche mittels Metaboliten-Tools zum Nachweis möglicher Wirkstoffe oder Metabolite vornehmen (Abbildung 4.1 (c)). Durch Full-Scan-MS/MS-Spektren mit akkuraten Fragmentionmassen werden Strukturinformationen einer Verbindung zugänglich, sowie eine eindeutige Identifizierung einer Substanz mittels Bibliothekssuche möglich (Abbildung 4.1 (d)).

Aus den Peakflächen extrahierter Ionenchromatogramme (EIC) ist schließlich auch eine Quantifizierung möglich (Abbildung 4.1 (e)).



**Abbildung 4.1:** Messung und Möglichkeiten der Auswertung einer mit LC-QTOF-MS untersuchten Probe: (a) Chromatogramm einer im Auto-MS/MS-Modus gemessenen Blutprobe, (b) zyklische Abfolge von MS- und MS/MS-Experimenten, (c) Full-Scan-MS-Spektrum mit akkuraten Quasimolekülionmassen zur Summenformelidentifizierung, Datenbanksuche und Metabolitensuche mittels Metaboliten-Tools, (d) Full-Scan-MS/MS-Spektrum mit akkuraten Fragmentionmassen enthält Strukturinformationen einer Substanz und ermöglicht eine Bibliothekssuche zur Identifizierung einer Substanz, (e) Peakflächen extrahierter Ionenchromatogramme (EIC) dienen der Quantifizierung.

### 4.1.1 Aufbau der theoretischen, semiempirischen Datenbank [139]

Ausgehend vom Substanzbestand der GC-Spektrenbibliothek „Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites“ der Autoren Maurer, Pflieger und Weber [1] wurde von Agilent Technologies eine Datenbank (Forensics and Toxicology Database) entworfen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt [139]. Die in dieser Datenbank beinhalteten Substanzeinträge wurden überprüft und ggf. aussortiert oder ergänzt. Acetylierte und silylierte Substanzderivate wie sie in der GC-MS-Analyse Anwendung finden und nur zu diesem Zweck enthalten waren, sowie nicht LC-MS taugliche Substanzen wurden aus der Datenbank entfernt. Weiterhin wurden die Wirkstoffe aus der Spektrenbibliothek „UV Spectra of Toxic Compounds“ (3300 Verbindungen) [9], weitere dort als nicht UV-aktiv vermerkte Verbindungen und darüber hinaus neu erworbene Substanzen hinzugefügt. Dadurch war gesichert, dass alle in die Spektrenbibliothek aufgenommenen Wirkstoffe (siehe Ab-

schnitt 4.1.2.) auch in der Datenbank vorhanden waren. Die sich daraus ergebende Datenbank beinhaltet 7360 toxikologisch relevante Substanzen. Für alle existieren weitere über den Substanznamen hinausgehende theoretische bzw. semiempirische Informationen wie die monoisotopische neutrale Masse, die Summenformel, die CAS-Nummer, die ChemSpider-ID, der IUPAC-Name und die Strukturformel. Zusätzlich sind für die Substanzen Einträge (Notes) wie zum Beispiel die Kategorie „Wirkung oder Anwendung“ gegeben. In Abbildung 4.2 ist ein Beispiel eines Datenbankeintrags anhand der Substanz Ketoprofen dargestellt.

The screenshot shows a database entry for Ketoprofen. On the left, there are input fields for Name (Ketoprofen), IUPAC (2-(3-Benzoylphenyl)propanoic acid), Mass (254.09429), CAS (22071-15-4), ChemSpider (3693), and Formula (C16H14O3). Below these is an 'Ion type' section with radio buttons for Neutral (selected), Anion, and Cation. On the right, there is a 'Molecule' section with 'Structure' and 'MDL Text' tabs, showing the chemical structure of Ketoprofen. Below that is a 'Notes' section with the text 'Antirheumatic'.

**Abbildung 4.2:** Beispiel eines Datenbankeintrags (Forensics and Toxicology Database) der Substanz Ketoprofen [139].

### 4.1.2 Aufbau der Spektrenbibliothek [140]

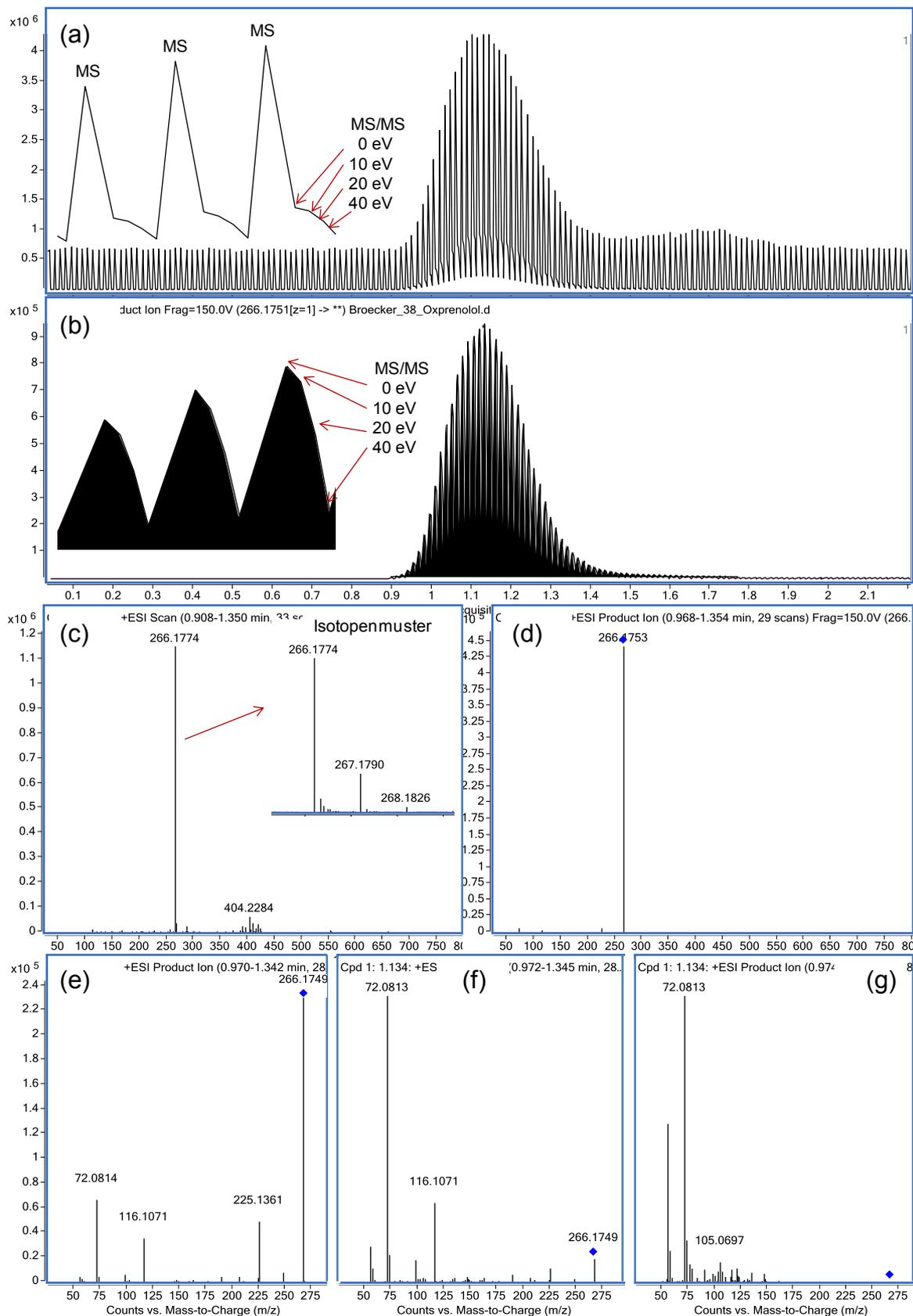
Da die Spektrenbibliothek für die Systematische Toxikologische Analyse (STA) konzipiert wurde, war es wichtig, dass möglichst viele toxikologisch relevante Substanzen erfasst wurden. Die Substanzauswahl richtete sich nach dem im Labor befindlichen Substanzpool, welcher auch für die Spektrenbibliothek „UV Spectra of Toxic Compounds“ [9] zur Verfügung stand. Darüber hinaus wurden auch Substanzen ohne UV-Absorption verwendet. Die Messung der Bibliotheksspektren erfolgte bislang nur unter Verwendung einer ESI-Quelle im positiven und negativen Modus. Aus diesem Grund sind Verbindungen mit unzureichender Ionisation unter diesen Bedingungen noch nicht in der Bibliothek vorhanden. Dabei handelt es sich u. a. um sehr unpolare Verbindungen, die ggf. unter Verwendung einer APCI-Quelle ionisiert werden können und dann der Bibliothek zugänglich wären. In Tabelle 4.1 ist die Zusammensetzung der Bibliothek nach dem gegenwärtigen Stand der verschiedenen Gruppen von toxischen Verbindungen wiedergegeben.

**Tabelle 4.1:** Zusammensetzung der exakten CID-Massenspektrenbibliothek toxischer Substanzen. Die Anordnung in Gruppen ist teilweise willkürlich, da viele Substanzen mehr als einen Effekt oder medizinische Verwendung haben. Alkaloide und Pflanzengifte wie Aconitin, Nikotin oder Strychnin wurden nach ihrer Wirkung in die Gruppen eingeordnet. Metabolite befinden sich in der gleichen Gruppe wie ihre Ausgangssubstanzen. Ca. 100 weitere Substanzen mit Bibliothekseintrag sind hier nicht aufgeführt, da sie keiner der genannten Gruppen angehören.

Gruppe Nummer	Effekt oder Anwendung	Anzahl von Substanzen	Beispiele
1	Illegale Drogen, Stoffe mit Suchtpotential, Hypnotika	234	Cocain, Fentanyl, Mescaline, Pentobarbital, THC
2	Psychopharmaka, Benzodiazepine, ZNS-Wirkstoffe	300	Amitriptylin, Carbamazepin, Diazepam, Fluoxetin, Perazin
3	Nicht-Opioid-Analgetika, Antirheumatika, Antitussiva und ähnliches	224	Ambroxol, Etoricoxib, Metamizol, Paracetamol,
4	Weitere ZNS Wirkstoffe, Antihistaminika, Antiallergika	159	Astemizol, Benserazid, Pyridostigmin, Talastin
5	Herz-Kreislauf-Mittel	240	Amiodaron, Digoxin, Flecainid, Metoprolol, Propafenon
6	Diuretika, Antidiabetika, Antikoagulantien, verschiedene Medikamente	190	Carbutamid, Furosemid, Glipizid, Phenprocoumon
7	Steroide, Hormone, Vitamine, körpereigene Stoffe	219	Ascorbinsäure, Ethinylestradiol, Flucinonid, Stanazolol
8	Antibiotika, Malariamittel, Cytostatika, Virustatika und ähnliches	290	Ampicillin, Atazanavir, Lincomycin, Ofloxacin, Sulfamerazin
9	Fungizide, Desinfektionsmittel, Hilfsstoffe, Diagnostik	191	Fluconazol, Hexachlorophen, Iloglicinsäure, Terbinafin,
10	Insektizide, Akarizide, Nematizide und ähnliches	233	Bromuron, Fluazuron, Parathion, Propoxur, Tetramethrin
11	Herbizide	308	Atrazin, Dalapon, Glyphosat, Diuron, Imazapyr, Paraquat
12	Karzinogene, chemische Reagenzien, Riechstoffe	39	Anilin, Acrylamid, Diethylphthalat, Pyridin
13	Deuterierte Standards	52	Cocaethylen-D3, Diazepam-D5, Fentanyl-D5, Haloperidol-D4

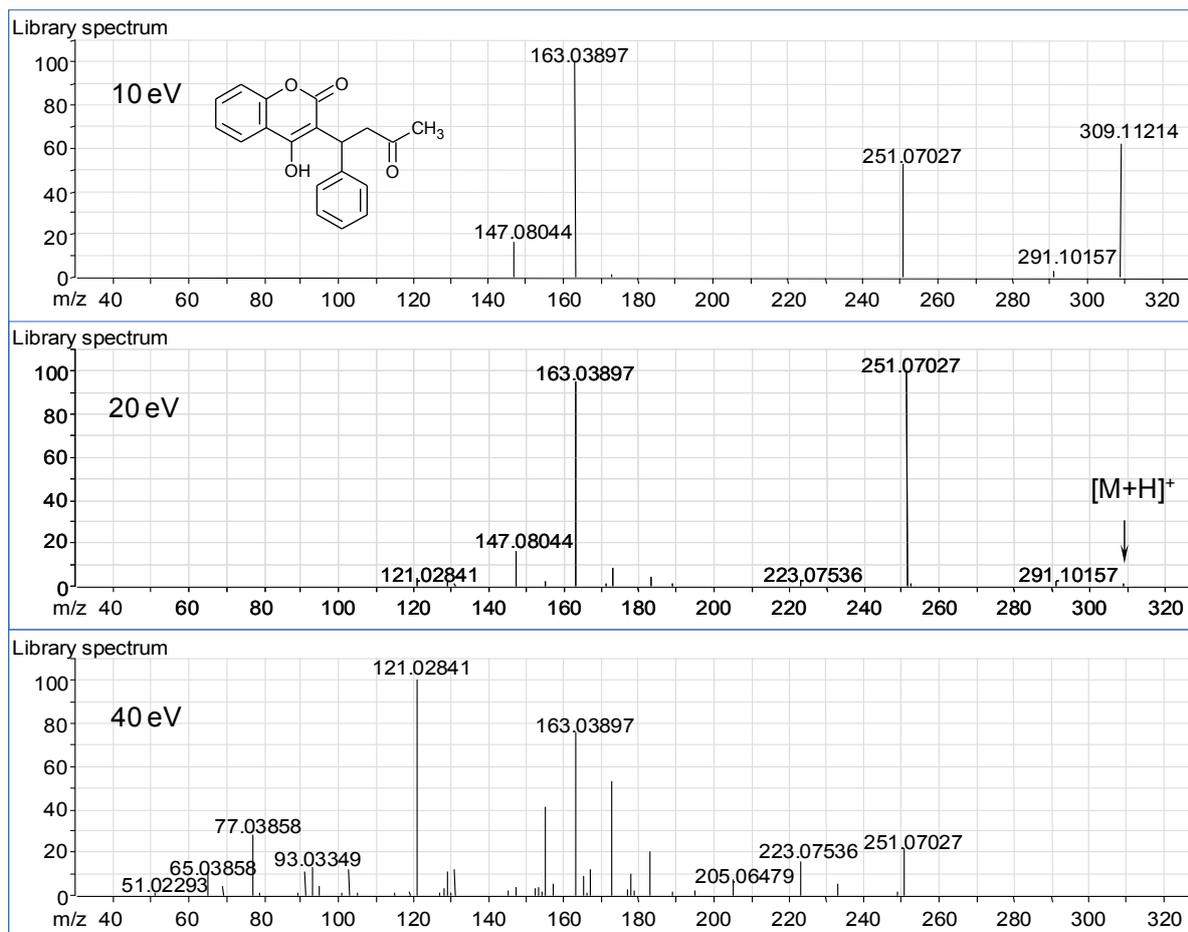
Die Messung der CID-Spektren erforderte keine chromatographische Trennung, da es sich bei den Standards um Reinstoffe handelte, deren Reinheit bereits früher mittels HPLC-DAD verifiziert wurde. Sie wurde daher durch Flow-Injection in 5 mM Ammoniumformiat und 0,01 % Ameisensäure in Wasser / 0,01 % Ameisensäure in Methanol (50/50) als mobile Phase vorgenommen. Ein wesentlicher Vorteil beim Verzicht auf die chromatographische Trennung bestand in der kurzen Analysenzeit von 2,2 min pro Substanz (siehe Abbildung 4.3 (a) und (b)). Weitere Vorteile lagen darin, dass kein Rauschen von der Säule die Spektrenqualität reduzierte und die Peaks eine ausreichende Breite aufwiesen (0,6-0,8 min). Diese Peakbreite war nötig, um genügend Spektren für eine Mittelwertbestimmung zu akquirieren. Um Carry-Over-Effekte möglichst gering zu halten, wurde vor jeder Injektion die Injektionsnadel für 10 s in einem Lösungsmittelgemisch gewaschen. Im Falle doch auftretender Verunreinigungen wurden diese zwar im MS-Spektrum registriert (siehe Abbildung 4.3 (c)), in den nachfolgenden MS/MS-Experimenten jedoch durch den Quadrupol ausgeschlossen (siehe Abbildung 4.3 (d)-(g)). Dieser filterte mit einem Massenfenster von 1,3 amu nur die theoretisch berechneten monoisotopischen  $[M+H]^+$ - oder  $[M-H]^-$ -Ionen der zu analysierenden Substanz heraus. Alle weiteren Ionen wurden ausgeblendet. Die den Quadrupol passierenden Quasimolekülionen wurden in der folgenden mit Stickstoff gefüllten Kollisionszelle bei 0 eV isoliert und bei 10, 20 und 40 eV nacheinander fragmentiert. Pro Substanz wurden zwischen 20 und 30 Spektren pro Kollisionsenergie mit einer Akkumulation von 1600 Transienten pro Spektrum erhalten. In Abbildung 4.3 (a) ist die alternierende Abfolge des MS-Übersichtsscans, der Isolation des Vorläuferions bei 0 eV und der drei MS/MS-Experimente bei 10, 20 und 40 eV im TIC dargestellt. Die so erhaltenen MS/MS-Rohspektren (siehe Abbildung 4.3 (e)-(g)) wurden anschließend untergrundbereinigt. Dies erfolgte durch Subtraktion der Spektren vor und nach dem Peak. Fragmentmassen mit einer Intensität kleiner als 100 Counts wurden ebenfalls aus dem Spektrum entfernt. Die daraus resultierenden Spektren wurden auf Plausibilität überprüft. Dazu wurde zunächst die akkurate Masse und das Isotopenmuster des gemessenen MS-Spektrums mit dem theoretischen verglichen (siehe Abbildung 4.3 (c)). Darüber hinaus wurde das Molekül theoretisch fragmentiert und ein Abgleich zwischen diesen und den gemessenen Fragmentmassen vorgenommen. Bei Übereinstimmung wurde die gemessene Masse auf die theoretische korrigiert, wobei die Intensität der gemessenen Fragmentmassen beibehalten wurde.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.3:** Resultierender Peak sowie Spektren einer Direktinjektion dargestellt anhand des Beispiels Oxprenolol: (a) TIC basierend auf MS- und CID-Spektren, (b) Find Compounds by Targeted-MS/MS Peak basierend auf CID-Spektren bei 0, 10, 20 und 40 eV, (c) MS-Spektrum, (d) Isolation des Vorläuferions bei 0 eV, (e) 10 eV CID-Spektrum, (f) 20 eV CID-Spektrum und (g) 40 eV CID-Spektrum.

Die so erhaltenen bereinigten, korrigierten über einem Abundance-Schwellenwert von 100 Counts liegenden Fragmentmassen der gemittelten Spektren bei 10, 20 und 40 eV wurden nach ihrer Kollisionsenergie differenziert in die Bibliothek importiert. Hierbei erfolgte jeweils eine Normierung auf die intensivste Fragmentmasse. Dieser Algorithmus liefert die Voraussetzung einer bestmöglichen Vergleichbarkeit der exakten CID-Spektren mit einem Fehler von 0 ppm mit baugleichen oder ähnlichen Massenspektrometern.



**Abbildung 4.4:** Bibliothekseintrag der exakten CID-Spektren von Warfarin bei CID-Energien von 10, 20 und 40 eV.

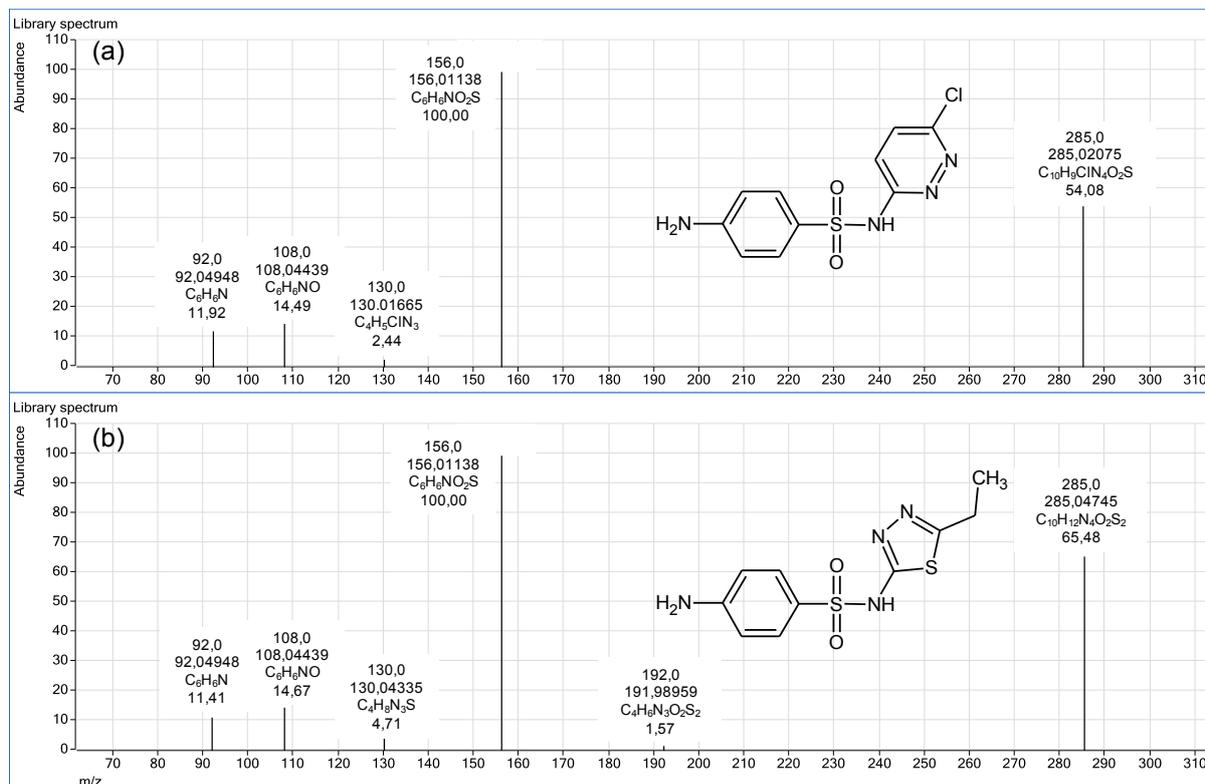
Als Beispiel eines Bibliothekseintrags sind die drei Spektren für das Antikoagulans Warfarin in Abbildung 4.4 wiedergegeben. Betrachtet man das monoisotopische Quasimolekülion  $[M+H]^+$  ( $m/z = 309,11214$ ) in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie, so zeigt sich, dass es bei 10 eV noch den zweitintensivsten Peak darstellt, bei 20 eV nur noch sehr schwach vorhanden ist und bei 40 eV komplett fragmentiert wurde. Mit abnehmender Intensität der Vorläufermasse erfolgt eine Zunahme der Anzahl und Intensität der Fragmentationen. Die beiden am häufigsten vorkommenden

Fragmente von  $m/z = 163,0389$  und  $251,0702$  entsprechen der Fragmentierung in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position der Seitenkette (Verlust von  $C_3H_6O$  und  $C_{10}H_{10}O$ ). Abhängig vom Molekulargewicht und von der Struktur der Verbindungen variierte der Grad der Fragmentierung bei den drei unterschiedlichen CID-Energien. So waren zum Beispiel Amphetamin und Piracetam bereits bei 10 eV stark fragmentiert und bei 40 eV komplett zerstört. Demgegenüber fragmentieren zum Beispiel Morphin und Strychnin bei 10 eV kaum, selbst bei 20 eV dominieren die Quasimolekülionenpeaks und erst bei 40 eV erfolgt eine optimale Fragmentierung. Insgesamt lieferte die große Mehrheit der Verbindungen Spektren mit ausreichender Fragmentierung, die strukturspezifische Informationen der Substanzen widerspiegeln. Einige der Substanzen wie Digoxin und Digitoxin bildeten keine oder nur in sehr geringem Umfang protonierte Ionenspezies. Stattdessen waren Addukte mit Natrium und Kalium vorhanden.

Der besonders wertvolle Informationsgehalt von akkuraten gegenüber nominalen CID-Massenspektren soll anhand eines Beispiels von zwei Isobaren gezeigt werden (siehe Abbildung 4.5). Sulfachloropyridazin und Sulfathidol weisen beide dieselbe protonierte monoisotopische Nominalmasse von 285,0 Dalton auf. Die bei der Fragmentierung bei 10 eV entstehenden CID-Spektren unterscheiden sich weder in der Nominalmasse der Fragmente (92,0, 108,0, 130,0 und 156,0  $m/z$ ), sofern das Signal von 192,0  $m/z$  bei Sulfathidol aufgrund der geringen Intensität nicht berücksichtigt wird, noch signifikant in den relativen Intensitäten der Fragmentationen. Analysetechniken wie zum Beispiel QQQ, die ausgewählte Übergänge eines Vorläuferions zu Produktionen (MRM) nutzen, würden identische Signale und ähnliche Signalverhältnisse für die vier intensivsten Produktionen erhalten. Ungeachtet der unterschiedlichen Isotopenmuster der beiden Substanzen und des in niedriger Konzentration und in Anwesenheit hoher Matrixbelastung untergehenden Signals 192,0  $m/z$  kann zwischen diesen Verbindungen nicht durch das monoisotopische Vorläuferion und die bei der verwendeten Kollisionsenergie auftretenden Fragmentationen differenziert werden. Ein Nominalmassenspektrum könnte daher unter Umständen zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Werden jedoch die Feinmassen der beiden Verbindungen verglichen, so zeigt sich, dass schon die Vorläuferionen eine Differenz von 0,0267 Dalton aufweisen. Die Fragmentationen 92,04948  $m/z$  ( $C_6H_6N$ ), 108,04439  $m/z$  ( $C_6H_6NO$ ) und 156,01138  $m/z$  ( $C_6H_6NO_2S$ ) sind bei beiden Substanzen identisch. Sulfachloropyridazin weist das

zur Unterscheidung beitragende Ion 130,01665 m/z ( $C_4H_5ClN_3$ ) auf (siehe Abbildung 4.5 (a)), wohingegen Sulfaethidol das Ion 130,04335 m/z ( $C_4H_8N_3S$ ) liefert (siehe Abbildung 4.5 (b)). Dieses Beispiel zeigt, dass die Unterscheidung von Isobaren anhand ihrer akkuraten CID-Spektren möglich ist, wohingegen Nominalmassenspektren eine Unterscheidung nicht bzw. nicht sicher gewährleisten.



**Abbildung 4.5:** Bibliotheksspektren der Substanzen (a) Sulfachloropyridazin und (b) Sulfaethidol bei einer Kollisionsenergie von 10 eV. Vergleichend angegeben sind die Nominalmassen, exakten Massen, Summenformeln und relativen Intensitäten der Fragment- und Vorläufermasse.

Zu der in Abschnitt 4.1.1. vorgestellten theoretischen bzw. semiempirischen Datenbank „Forensics and Toxicology Database“ [139], die lediglich textbasierte Informationen beinhaltet, wurden für mehr als 2720 der mehr als 7360 enthaltenen toxikologisch relevanten Substanzen die CID-Spektren bei den drei Kollisionsenergien hinzugefügt. Dies ist in Abbildung 4.6 in der Spalte „Num Spectra“ mit einem Eintrag von 3, sofern nur im Negativ- oder Positivmodus Spektren generiert wurden, bzw. 6, sofern in beiden Modi Spektren akquiriert wurden, vermerkt. Aus der Datenbank wurde durch den Import von Spektren eine Datenbank und Bibliothek.

## Ergebnisse und Diskussion

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS	ChemSpider	IUPAC Name	Num Spectra
Naphazoline	C14H14N2	210,11570	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5,510	<a href="#">835-31-4</a>	<a href="#">4283</a>	2-(1-Naphthylmethyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole	3
Minoxidil	C9H16N5O	210,13549	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5,550	<a href="#">38304-91-5</a>	<a href="#">10438564</a>	6-(1-Piperidinyl)-2,4-pyrimidinediamine 3-oxide	3
Altretamine	C9H18N6	210,15929	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	13,050	<a href="#">645-05-6</a>	<a href="#">2038</a>	N,N,N',N',N'',N''-Hexamethyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine	3
Pexantel	C12H22N2O	210,17321	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">10001-13-5</a>	<a href="#">580874</a>	Cyclohexyl(4-methyl-1-piperazinyl)methanone	0
Nitromide	C7H5N3O5	211,02292	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4,490	<a href="#">121-81-3</a>	<a href="#">4355</a>	3,5-Dinitrobenzamide	3
Chlorthexoxazine	C10H10ClN2O2	211,04001	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	9,540	<a href="#">132-89-8</a>	<a href="#">8283</a>	2-[2-Chloroethyl]-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazin-4-one	3
Nicorandil	C8H9N3O4	211,05931	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">65141-46-0</a>	<a href="#">43240</a>	2-[(3-Pyridinylcarbonyl)amino]ethyl nitrate	0
Milrinone	C12H9N3O	211,07456	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3,830	<a href="#">78415-72-2</a>	<a href="#">4052</a>	2-Methyl-6-oxo-1,6-dihydro-3,4'-bipyridine-5-carbonitrile	3
Propachlor	C11H14ClNO	211,07639	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10,470	<a href="#">1918-16-7</a>	<a href="#">4762</a>	2-Chloro-N-isopropyl-N-phenylacetamide	3
Fenaclon	C11H14ClNO	211,07639	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">306-20-7</a>	<a href="#">9008</a>	3-Chloro-N-(2-phenylethyl)propanamide	0
Methylidopa	C10H13NO4	211,08446	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">555-30-6</a>	<a href="#">35562</a>	3-Hydroxy-alpha-methyl-L-tyrosine	3
Presinol	C10H13NO4	211,08446	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">133161-54-3</a>	<a href="#">3995</a>	3-Hydroxy-alpha-methyltyrosine	3
Zalcitabine	C9H13N3O3	211,09569	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1,140	<a href="#">7481-89-2</a>	<a href="#">22498</a>	4-Amino-1-[(2R,5S)-5-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furanyl]-2(1H)-pyrimidinone	3
Nor-letimol	C14H13ClNO	211,09971	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">886-08-8</a>	<a href="#">16736286</a>	2-[(Benzylimino)methyl]phenol	0
Mefenorex	C12H18ClNO	211,11278	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	7,850	<a href="#">17243-57-1</a>	<a href="#">20467</a>	3-Chloro-N-(1-phenyl-2-propargyl)-1-propanamine	3
Pramipexole	C10H17N3S	211,11432	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1,830	<a href="#">104632-26-0</a>	<a href="#">106770</a>	(6S)-N-(6'-propyl-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-2,6-diamine	3
Dimetan	C11H17NO3	211,12084	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<a href="#">122-15-6</a>	<a href="#">28942</a>	5,5-Dimethyl-3-oxo-1-cyclohexen-1-yl dimethylcarbamate	0
Dioxyethidine	C11H17NO3	211,12084	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0,960	<a href="#">497-75-6</a>	<a href="#">64697</a>	4-[2-(Ethylamino)-1-hydroxypropyl]-1,2-benzenediol	3

**Abbildung 4.6:** Darstellung eines Auszuges aus der „Broecker, Herre & Pragst Forensics and Toxicology accurate mass MS/MS spectral library“ mittels „Personal Compound Database and Library (PCDL) Manager“. Für mehr als 7360 Substanzen existieren Einträge u. a. zum Namen, der Summenformel, der Masse, CAS-Nummer und IUPAC-Name. Für mehr als 2720 Substanzen sind Spektren bei drei Kollisionsenergien (10, 20 und 40 eV) hinterlegt. Für mehr als 2140 Substanzen sind Einträge zur Retentionszeit, welche unter den LC-Bedingungen (II) (siehe Abschnitt 3.7.2.) ermittelt wurden, vorhanden (siehe Abschnitt 4.1.3.).

Die Anwendung der Spektrenbibliothek ist unabhängig von der verwendeten Chromatographie und nicht wie bei der Verwendung von Retentionszeiten an Standard-LC-Parameter gekoppelt. Bei der Analyse von komplexen Matrices empfiehlt sich eine gute chromatographische Trennung, um Mischspektren durch koeluiierende Isomere oder Isobare zu minimieren. Neben diesem Aspekt ist die Übereinstimmung der Bibliotheksspektren mit den aus einer Probe stammenden Spektren nicht durch die Chromatographie beeinflusst.

Zur Überprüfung der Kompatibilität der exakten CID-Spektrenbibliothek wurden mehr als 30 Datenfiles mit über 50 verschiedenen Substanzen, welche an unterschiedlichen Agilent LC-QTOF-MS-Instrumenten der Serien 6520, 6530 und 6540 akquiriert wurden, herangezogen. Es zeigte sich, dass die Peakidentifizierung in allen Fällen zum gleichen Ergebnis führte und somit unabhängig vom verwendeten Instrument war.

### 4.1.3 Erweiterung der Datenbank und Bibliothek um Retentionszeiten [141]

Aus der in Abschnitt 4.1.1. vorgestellten Datenbank, die nur theoretische bzw. semiempirische Informationen enthielt, wurde zusammen mit der in Abschnitt 4.1.2. entwickelten Spektrenbibliothek eine gemeinsame Datenbank und Spektrenbibliothek konzipiert. Für mehr als 2130 dieser Substanzen wurden unter den LC-Bedingungen

(II) die Retentionszeiten ermittelt und in die Datenbank aufgenommen. Deren Verteilung über den chromatographischen Lauf ist in Abschnitt 4.5.1. in Abbildung 4.41 dargestellt. Für diesen Zweck wurden Mischstandardlösungen von jeweils 50 Wirkstoffstandards, die immer dieselben 32 deuterierten Standards enthielten, in einer Konzentration von je 100 pg/ $\mu$ l hergestellt und 1  $\mu$ l injiziert. Die Messung wurde im Auto-MS/MS-Modus durchgeführt. Die Identifizierung der Peaks erfolgte dann anhand der CID-Spektren der Bibliothek. Die Verwendung von deuterierten Standards ermöglichte die Überprüfung stabiler chromatographischer Bedingungen. Es zeigte sich, dass keine wesentliche Retentionszeitverschiebung (lediglich bis zu 6 Sekunden) der deuterierten Standards der insgesamt 68 unterschiedlichen gemessenen Standardmischungen innerhalb einer Messserie auftrat. Bei der Erfassung weiterer Retentionszeiten in späteren Messserien ergab sich jedoch, dass eine Korrektur der Retentionszeiten anhand der deuterierten Standards sehr nützlich war. Hierbei traten Verschiebungen bis zu 30 Sekunden auf. Die Möglichkeit der Verwendung von relativen Retentionszeiten (RRT) und die damit direkt verbundene Korrektur unterschiedlicher Retentionszeiten dergleichen Substanz in verschiedenen Proben ist durch den erfassten Datensatz gegeben. Da die Auswertesoftware die Verwendung relativer Retentionszeiten (RRT) nicht gestattet, wurde diese daher nicht verwendet. Die Injektion jeder Standardmischung erfolgte drei Mal nacheinander. Aus den bestimmten Retentionszeiten der identifizierten Substanzen wurde der Mittelwert gebildet, welcher dann in die Datenbank in der Spalte „RT“ aufgenommen wurde. Da zu diesem Zeitpunkt bereits Bibliotheksspektren der meisten Substanzen vorhanden waren, wurden diese zur eindeutigen Identifizierung herangezogen. Retentionszeiten von Substanzen ohne Bibliothekseintrag wurden ebenfalls aufgenommen, sofern diese Substanz ausschließlich Addukte mit Natrium, Kalium und/oder Ammonium gebildet hatte. Die Identifizierung konnte in diesen Fällen nur durch die akkurate Masse sowie das Isotopenmuster und das Wissen, dass diese Substanz in der Standardmischung enthalten war, erfolgen. Da für diese Substanzen unter den verwendeten LC-MS-Parametern keine CID-Spektren der protonierten Ionenspezies zugänglich waren, liegt in der ermittelten Retentionszeit die einzige Möglichkeit einer Identifizierung und einer Unterscheidung von isomeren Verbindungen. Im Gegensatz zu den akquirierten MS-Spektren ist die Verwendung der Retentionszeit an definierte chromatographische Bedingungen gekoppelt. Unter Einhaltung dieser Vorgaben kann die Retentionszeit als Identifikationskriterium herangezogen werden. Somit las-

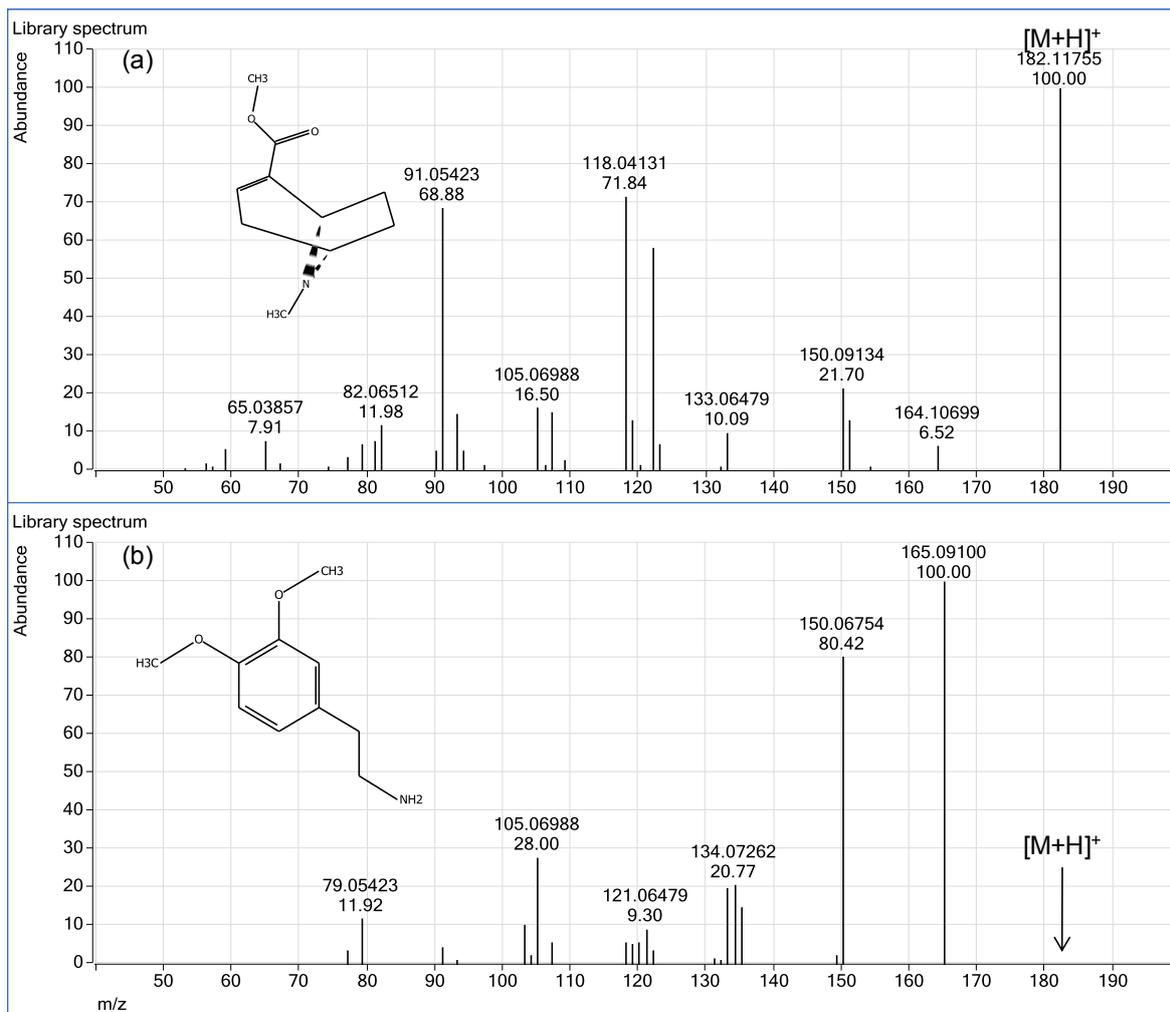
sen sich häufig falsch positive Datenbankergebnisse eliminieren. Wie Abbildung 4.6 zeigt, enthalten nicht alle Substanzeinträge in der Datenbank Retentionszeiten. Für den Substanznachweis mittels Datenbank kann eine Auswahl bzgl. der Verwendung von Retentionszeiten erfolgen. So kann zum Beispiel vorgegeben werden, dass nur Substanzen mit einem Retentionszeiteintrag für die Identifizierung verwendet werden. Es zeigte sich, dass ein Retentionszeitfenster von  $\pm 1$  min beim Datenbankabgleich geeignet war. Dadurch wurden durch evtl. auftretende chromatographische Schwankungen verursachte Retentionszeitverschiebungen berücksichtigt. Sollten mehrere isomere Substanzen innerhalb dieses Suchfensters identifiziert werden, so kann die Retentionszeit des deuterierten Standards herangezogen werden, um eine Unterscheidung zu ermöglichen.

In Tabelle 4.2 sind alle in der Datenbank und Spektrenbibliothek enthaltenen Isomere – insgesamt 9 – der Summenformel  $C_{10}H_{15}NO_2$  aufgelistet. 6 von ihnen enthalten Retentionszeiteinträge sowie Bibliotheksspektren. Beim Vergleich der Retentionszeiten der beiden Isomere Anhydroecgoninmethylester (RT 2,54 min) und Dimethylmescaline (RT 2,71 min) zeigt sich, dass allein anhand der Summenformel und der Retentionszeit keine sichere Identifizierung bzw. Unterscheidung beider Substanzen auf Grund des geringen Retentionszeitunterschieds von nur 0,17 min möglich ist.

**Tabelle 4.2:** Substanzen aus der Datenbank und Spektrenbibliothek mit der Summenformel  $C_{10}H_{15}NO_2$  und der exakten monoisotopischen Masse 181,1102787 Da. Für 6 dieser 9 Isomere sind Retentionszeiten und CID-Spektren vorhanden.

Substanzname	Formel	Masse (Da)	RT (min)	Anzahl Spektren
2,5-Dimethoxyphenethylamin	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787		0
3,5-Dimethoxyphenethylamin	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787	4,15	3
Anhydroecgoninmethylester	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787	2,54	3
Dimethylmescaline	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787	2,71	3
Ethypicon	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787		0
Etilefrin	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787	1,20	3
Hexapropylat	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787		0
N-Methylpyrithyldion	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787	6,30	3
Oxilofrin	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,1102787	0,90	3

Die CID-Spektren beider Substanzen besitzen jedoch signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 4.7), sodass diese eine eindeutige Identifizierung beider Isomere und somit deren Unterscheidung ermöglichen.



**Abbildung 4.7:** CID-Spektren bei 20 eV der Isomere (a) Anhydroecgoninmethylester und (b) Dime-thylmescaline.

Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass selbst unter Standardbedingungen ermittelte Retentionszeiten neben der sicher identifizierten Summenformel für eine Substanzidentifizierung nicht ausreichen. CID-Spektren werden aber nur von  $[M+H]^+$ - oder  $[M-H]^-$ -Quasimolekülonen erhalten. In Abschnitt 4.5.1. (Abbildung 4.42) ist der Anteil an protonierter Spezies in Bezug auf alle detektierten Ionenspezies für alle Substanzen mit bekannter Retentionszeit dargestellt. Insbesondere für Substanzen wie zum Beispiel Azidamfenicol, Bromadiolon, Digitoxin oder Tacrolimus (Bildung von Natrium- und Ammoniumaddukten), die keine oder kaum CID-Spektren auf Grund einer geringen Bildung protonierter Ionen aufweisen, kann nur auf die Retentionszeit und die identifizierte Summenformel zurückgegriffen werden. Auch beim Fehlen von CID-Spektren in der Spektrenbibliothek oder im Datenfile sowie bei einer schlechten Spektrenqualität kann ein Substanzvorschlag ggf. ausgeschlossen oder in Betracht gezogen werden, sofern eine Retentionszeit in der DB vorhanden ist.

### 4.1.4 Optimierung der LC- und MS-Parameter für die STA

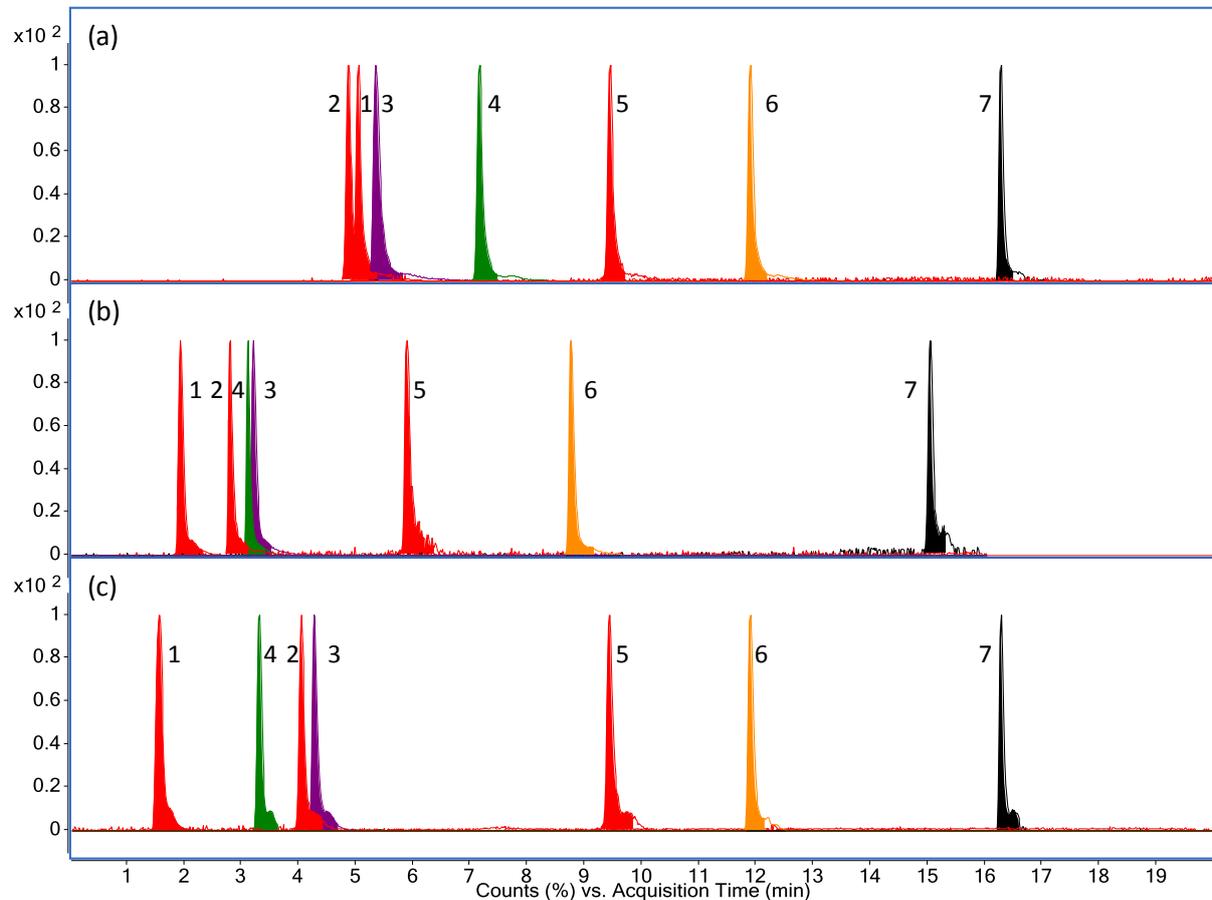
Nachfolgend soll die Wahl der LC- und MS-Bedingungen und deren Optimierung erörtert werden.

#### *Optimierung der LC-Bedingungen*

Um möglichst viele Informationen aus einer Probe zu erhalten, sollte auch unter Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers eine chromatographische Trennung vorgeschaltet werden. Zum einen wird dadurch der in biologischen Proben stark präsente Matrixeffekt reduziert und zum anderen dem Massenspektrometer ausreichend Zeit für möglichst viele Experimente gegeben. Insbesondere bei Verwendung des Auto-MS/MS-Modus sollte ein langer chromatographischer Lauf erfolgen. Die damit einhergehende Reduzierung koeluerender Substanzen stellt eine günstige Voraussetzung für die datenabhängige Selektion von Vorläufermassen für CID-Experimente dar.

Die Laufmitteloptimierung wurde unter den LC-Bedingungen (I) aus dem experimentellen Teil (siehe Abschnitt 3.7.2.) durchgeführt. Für diesen Zweck wurde ein toxikologisch repräsentativer Mischstandard bestehend aus Morphin, Amphetamin, Methamphetamin, Codein, Bromazepam, Diazepam und THC in einer Konzentration von je 100 pg/µl hergestellt und 1 µl injiziert. In Abbildung 4.8 sind die Testchromatogramme zur Optimierung der mobilen Phase dargestellt. Es wurde eine Zorbax Eclipse Plus C18 Säule (2,1 x 100 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei 30 °C verwendet. Als Elutionsmittel wurden (a) A2 = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser pH 6,8 und B2 = Methanol, (b) A2 = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser pH 6,8 und B1 = Acetonitril und (c) A1 = 5 mM Ammoniumformiat in Wasser + 0,01 % Ameisensäure pH 4,5 und B2 = Methanol untersucht. Zusätzlich, nicht in der Abbildung dargestellt, wurde 0,1 % wässrige Ameisensäure (pH 2,8) als weitere wässrige Komponente verwendet. Es wurde folgender zeitabhängige Gradient verwendet: 0 min 10 % B1/B2, linear auf 90 % B1/B2 in 16 min, konstant bei 90 % B1/B2 bis 19,8 min, auf 10 % B1/B2 in 20 min. Die anschließende Äquilibrierung erfolgte für 3 min. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,4 ml/min. Morphin, als polarste Verbindung, eluierte unter allen Bedingungen als erste, THC, als unpolarste, als letzte Substanz. Neben der Trennung bzw. Verteilung der einzelnen Substanzen über das Chromatogramm, war die Elution der ersten (Morphin) und der letzten (THC) Substanz von Interesse. Besonders günstig ist neben einer gleichmäßigen

Verteilung der unterschiedlich chemisch beschaffenen Substanzen, eine möglichst späte Retentionszeit des Morphins sowie eine nicht zu späte Elution des THC's.



**Abbildung 4.8:** Testchromatogramme zur Optimierung der mobilen Phase. Verwendung einer Zorbax Eclipse Plus C18 Säule (2,1 x 100 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei 30 °C. Elutionsmittel waren (a) A2 = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser pH 6,8 und B2 = Methanol, (b) A2 = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser pH 6,8 und B1 = Acetonitril und (c) A1 = 5 mM Ammoniumformiat in Wasser + 0,01 % Ameisensäure pH 4,5 und B2 = Methanol. Es wurde folgender zeitabhängige Gradient verwendet: 0 min 10 % B1/B2, linear auf 90 % B1/B2 in 16 min, konstant bei 90 % B1/B2 bis 19,8 min, auf 10 % B1/B2 in 20 min. Die anschließende Äquilibration erfolgte für 3 min. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,4 ml/min. Injektion von 1 µl einer Lösung mit je 1 ng/µl Morphin (1), Amphetamin (2), Methamphetamin (3), Codein (4), Bromazepam (5), Diazepam (6) und THC (7).

Die möglichst späte Retentionszeit des Morphins war wichtig, da die Methode auch für andere Matrices wie Urin Anwendung finden sollte und die Matrixbelastung sowie die Anwesenheit von Salzen in den ersten Minuten der Chromatographie sehr hoch sind. Unter Verwendung von Acetonitril als organisches und 5 mM Ammoniumformiat + 0,01 % Ameisensäure oder 0,1 % wässrige Ameisensäure als wässriges Laufmittel zeigte sich, dass Morphin eine sehr kurze (nahe der Totzeit) Retentionszeit hatte. Diese Solventen wurden daher ausgeschlossen. Die verkürzte Retentionszeit von THC durch die Verwendung von Acetonitril trug nicht wesentlich zu einer verbesserten Trennung bei. Aus diesen Gründen, vor allem durch die passable Retentionszeit

des Morphins, wurden als Laufmittel Methanol und 10 mM Ammoniumacetat verwendet. Der Einsatz eines bei neutralem pH-Wert liegenden Laufmittels bringt den Vorteil mit sich, dass neben den basischen auch saure Substanzen ionisiert werden. Die Signalintensität blieb bei vielen Substanzen bei Verwendung aller drei wässrigen Laufmittel gleich. Lediglich die neutralen oder basischen Substanzen wie die Benzodiazepine zeigten eine höhere Empfindlichkeit bei Reduzierung des pH-Werts.

Eine Verbesserung der chromatographischen Auflösung wurde durch die Wahl einer Säule mit kleineren Partikeln von 2,7 anstatt 3,5  $\mu\text{m}$  bewerkstelligt. Durch den höheren Rückdruck musste die Temperatur im Säulenofen von 30 auf 50  $^{\circ}\text{C}$  erhöht werden. Dies brachte ebenfalls eine bessere Peaksymmetrie mit sich. Der insbesondere bei Methanol langsam stattfindende Massentransfer wird bei höheren Temperaturen beschleunigt. Das zuvor beobachtete Peaktailing war damit stark reduziert. Eine Temperaturerhöhung von 10  $^{\circ}\text{C}$  brachte für die Analyte Morphin, Amphetamin, Methamphetamin, Codein, Bromazepam, Diazepam und THC eine Retentionszeitverkürzung von 0,2-0,4 min mit sich. Um eine ausreichende Trennung, schmale Peaks und genügend Zeit für die Akquisition von CID-Spektren zu erhalten, wurde die Laufzeit von 16 auf 20 Minuten erhöht. Eine Variation der Fließgeschwindigkeit zeigte im Bereich zwischen 0,3 und 0,5 ml/min keine wesentliche Änderung der Empfindlichkeit, jedoch leicht breiter werdende Peaks bei niedrigeren Flüssen. Bei noch höheren Flussraten nimmt die Empfindlichkeit der Messung ab, da keine ausreichende Desolvatisierung in der Ionenquelle gewährleistet ist. Die unter den LC-Bedingungen (II) im experimentellen Teil (siehe Abschnitt 3.7.2.) beschriebenen Parameter stellten die optimalen Bedingungen dar, unter denen auch die im Abschnitt 4.1.3. beschriebenen Retentionszeiten gemessen wurden.

### *Optimierung der MS-Bedingungen und Datenakquisition*

Die Optimierung der MS-Parameter – Spannungen, Temperaturen und Flüsse – erfolgte anhand einiger repräsentativer Substanzen. Insgesamt wurden über 100 Vertreter von Amphetaminen, Opioiden, Cocain und seinen Metaboliten, Benzodiazepinen, Cannabinoiden und Psychopharmaka mittels Direktinjektionen und unter Variation der MS-Parameter analysiert. Dabei wurde die Nozzle-Spannung zwischen 0 und 2000 in 250 V Schritten, die VCap-Spannung zwischen 1500 und 5000 V in 250 V Schritten, die Fragmentor-Spannung zwischen 60 und 300 V in 10 V Schritten, die Temperaturen des Trocknungsgases und des Sheathgases zwischen 200 und

400 °C in 25 °C Schritten sowie deren Gasflüsse zwischen 5 und 12 l/min in 1 l/min Schritten variiert. Es zeigte sich bei allen Substanzklassen, dass die höchste Empfindlichkeit bei einer möglichst hohen Sheathgas-Temperatur (380 °C) mit einem Fluss von 11 l/min, einem Trocknungsgas von 320 °C bei 6 l/min, einer VCap-Spannung von 3000 V, einer Nozzle-Spannung von 0-100 V und einer Fragmentor-Spannung zwischen 120 und 180 V lag. Da nicht für jeden Standard dessen optimale Bedingungen in einem Screeningverfahren verwendet werden können, wurden Kompromisse gemacht und gewichtete Mittelwerte zwischen den optimalen Parametern der verschiedenen Substanzen verwendet. Die optimierten Parameter wurden für alle MS-Methoden angewendet und sind im experimentellen Teil (siehe Abschnitt 3.7.4.) wiedergegeben.

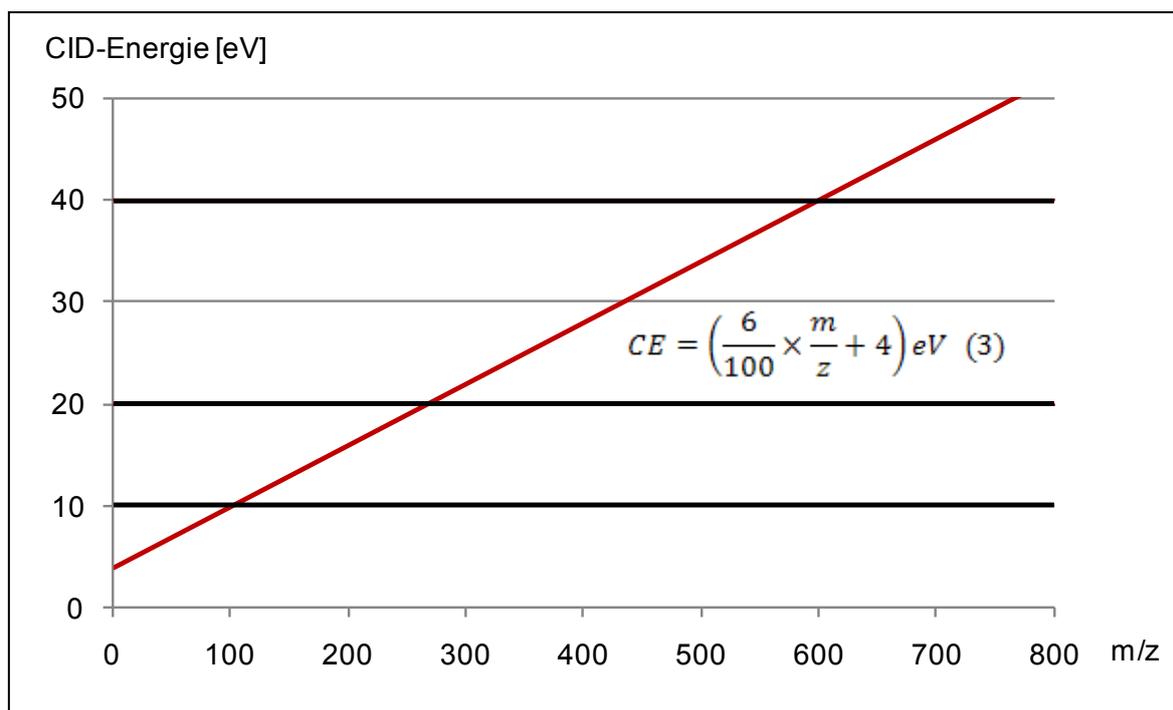
Die Zykluszeit von MS-Experimenten wurde auf 1 Sekunde im MS-Modus bzw. 1,1 Sekunden im Auto-MS/MS-Modus in Anpassung an die chromatographische Peakbreite festgesetzt. So war bei 10-20 Sekunden breiten chromatographischen Peaks (für LC-Bedingungen (I) und (II)) gewährleistet, dass genügend Datenpunkte für eine Quantifizierung vorhanden waren. Für den Auto-MS/MS-Modus wurden je nach verwendeter LC-Methode (I) oder (II) die optimierten MS-Bedingungen (I) oder (II) verwendet (siehe Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3:** Parameter der MS-Methode (I) und (II), die unter LC-Bedingungen (I) und (II) angewendet wurden.

Parameter	MS (I)	MS (II)
Scanzeit MS	0,33 s	0,25 s
Frequenz MS	3	4
Frequenz MS/MS	3	4
Anzahl an Vorläuferionen	2	3
Ausschlusszeit	0,15 min	0,1 min
Mittlere Peakbreite	0,3 min (LC (I))	0,2 min (LC (II))
Zykluszeit	1.1 s	1.1 s

Um für die meisten Verbindungen bei MS/MS-Experimenten eine ausreichende Fragmentierung zu erzielen, wurde eine massenabhängige Kollisionsenergie verwendet. Die Berechnungsgleichung (3) (siehe Abschnitt 3.7.4.) wurde über verschiedene Experimente im Rahmen dieser Arbeit als günstigste ermittelt. Bei der Wahl der Koeffizienten der linearen Gleichung wurde berücksichtigt, dass die meisten zu identifi-

zierenden Gifte im Bereich von 100 bis 600 Dalton liegen. Des Weiteren sollten die während der Messung automatisch berechneten Kollisionsenergien möglichst nah an den Referenzspektren der Bibliothek von 10, 20 und 40 eV liegen. Gleichung (3) berücksichtigt diese Faktoren, wobei für das Ion 100 m/z eine errechnete Kollisionsenergie von 10 eV und für das Ion 600 m/z eine von 40 eV bestimmt wird. Der Graph der massenabhängigen Funktion nach Gleichung (3) sowie die massenunabhängigen aufgenommenen Spektren der in der Bibliothek enthaltenen Substanzen bei drei Kollisionsenergien sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Da die Fragmentierung jedoch auch stark von der spezifischen Struktur abhängt, ist die automatische Wahl der Kollisionsenergie nicht immer optimal und muss in speziellen Fällen bei einer abweichenden Kollisionsenergie wiederholt werden. Im Falle, dass die nach Gleichung (3) berechnete Kollisionsenergie keine ausreichende oder zu starke Fragmentierung eines Vorläuferions verursachte, so wurden bei einer weiteren Messung im Targeted-MS/MS-Modus eine oder mehrere feste Kollisionsenergien, vorzugsweise 10, 20 oder 40 eV, verwendet.



**Abbildung 4.9:** Nach Gleichung (3) berechnete massenabhängige Kollisionsenergie eines zu fragmentierenden Ions in einer Probe. Die horizontalen hervorgehobenen Linien bei 10, 20 und 40 eV stellen die Kollisionsenergien dar, bei denen für jede Substanz Spektren in der Bibliothek hinterlegt wurden.

### 4.1.5 Datenakquisition und Datenauswertung in der STA

In diesem Abschnitt soll die Wahl des geeigneten Messmodus zur Datenakquisition diskutiert und die kombinierte Verwendung der Identifizierungssoftware dargelegt werden. Des Weiteren soll der gesamte Prozess von der Probenmessung bis zum Ergebnis in Form eines Schemas wiedergegeben und abschließend an einer Probe exemplarisch demonstriert werden.

#### *Datenakquisition*

In Abschnitt 2.2.2. wurden bereits die drei grundlegenden Möglichkeiten der Datenakquisition mittels LC-QTOF-MS vorgestellt. Für die Systematische Toxikologische Analyse ergeben sich daraus zwei unterschiedliche Strategien. Die empfindlichere von beiden erfolgt zunächst über die alleinige Akquisition von MS-Spektren im MS-Modus. Hieraus werden jedoch nur Informationen zur Summenformel erhalten, die anschließend für eine Datenbanksuche genutzt werden. Zur Bestätigung der Datenbankergebnisse folgt dann eine zweite Messung im Targeted-MS/MS-Modus. Die daraus resultierenden CID-Spektren werden für eine Bibliothekssuche zur eindeutigen Identifizierung verwendet. Die Anzahl zu verifizierender Substanzen in einer definierten Targeted-MS/MS-Methode ist limitiert, sodass nur wenige Datenbankvorschläge durch eine einzige Targeted-MS/MS-Methode bestätigt oder ausgeschlossen werden können.

Der drei- bis viermal unempfindlichere Auto-MS/MS-Modus stellt eine alternative Möglichkeit dar. Hierbei werden in einer einzigen Messung MS-Spektren für die Datenbanksuche und datenabhängig CID-Spektren zur Bestätigung/Identifizierung der Datenbankergebnisse erzeugt. Nur im Falle, dass für eine potentiell toxikologisch relevante Substanz in diesem Experiment keine MS/MS-Daten vorliegen, wird eine zweite Messung im Targeted-MS/MS-Modus benötigt. Bei dieser werden die fehlenden CID-Spektren der zu bestätigenden Substanzen gezielt akquiriert und mittels Bibliothekssuche identifiziert. Mit diesem Verfahren werden falsch Positive, die in einem einfachen MS-Experiment und Datenbanksuche erhalten werden, größtenteils sofort ausgeschlossen. Die Möglichkeit, in einem Experiment sofort Strukturinformationen zur eindeutigen Identifizierung einer Substanz zu erhalten, prädestiniert den Auto-MS/MS-Modus trotz der geringeren Empfindlichkeit für die STA. Nur in wenigen Fällen ist eine sich anschließende Targeted-MS/MS-Messung nötig. Darüber hinaus erhält man im Auto-MS/MS auch eine Vielzahl an CID-Spektren, die in einer späteren

Fragestellung genutzt werden können, ohne dass gezielt weitere Messungen nötig sind.

Das grundlegende Prinzip einer Messung im Auto-MS/MS-Modus wurde bereits in Abschnitt 2.2.2. in Abbildung 2.8 am Beispiel einer realen Probe dargestellt. Da bei einer STA nicht bekannt ist, welche Wirkstoffe sich in der Probe verbergen und welche Kollisionsenergie zur optimalen Fragmentierung beiträgt, wurde eine massenabhängige Berechnung dieser Energie gewählt.

Während der Arbeit zeigte sich, dass die Akquisition von CID-Spektren verbessert werden konnte, wenn anstelle der in MS-Methode (I) die Parameter der MS-Methode (II) verwendet wurden (siehe Abschnitt 4.1.4. und Tabelle 4.3). Diese Optimierung korrespondierte mit den verbesserten LC-Bedingungen (II).

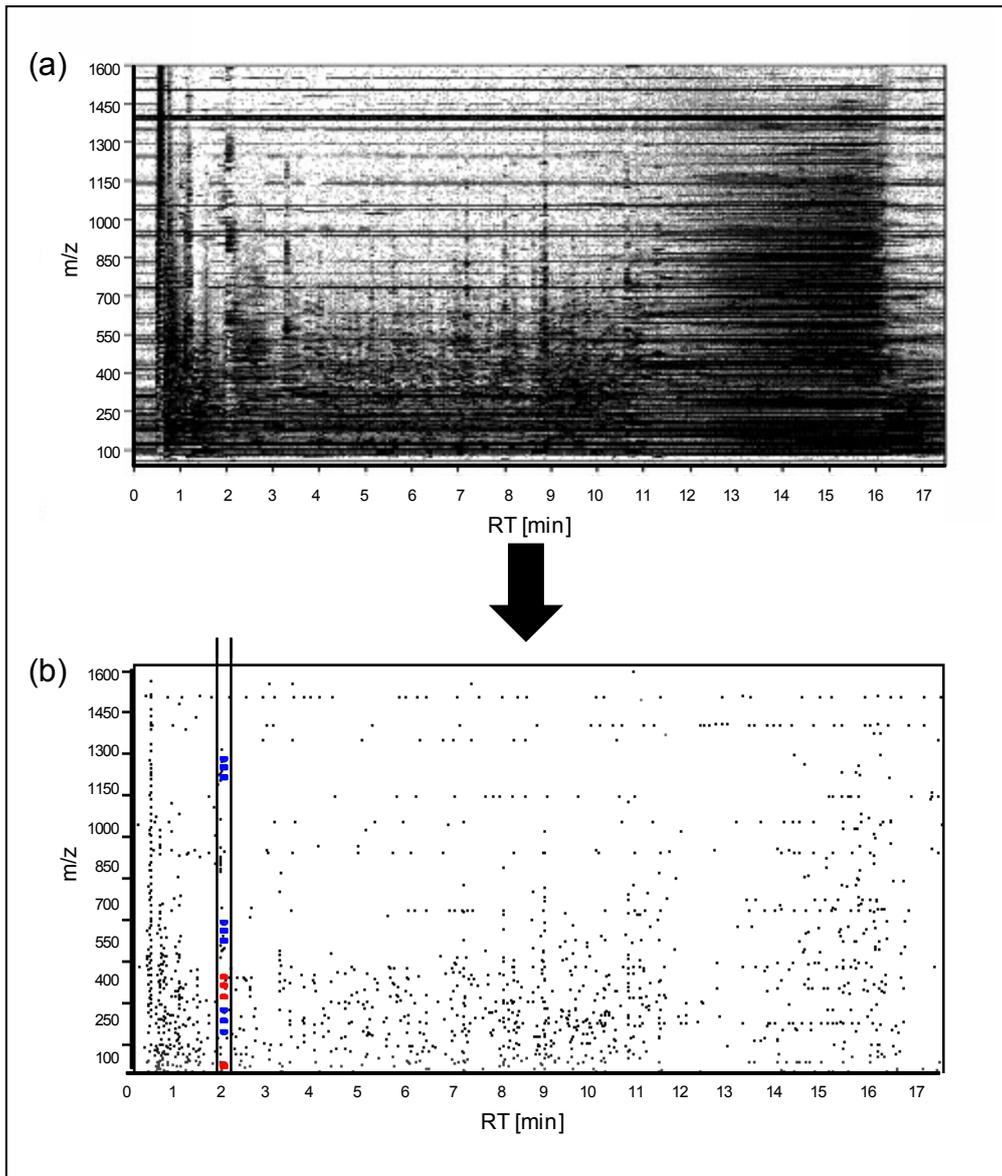
Die Auswahl von Vorläuferionen im Auto-MS/MS-Modus wurde durch einige Parameter limitiert. So wurde ein Schwellwert von mindestens 1000 Counts für  $[M+H]^+$ - oder  $[M-H]^-$ -Ionen vorgegeben, um nur CID-Spektren der wesentlichen Komponenten aufzunehmen. Trotzdem kann auch bei Substanzen mit hoher Konzentration das erste CID-Spektrum nur bei relativ niedriger Intensität, d. h. in der Flanke des ansteigenden Peaks, aufgezeichnet worden sein. Die daraus resultierenden CID-Spektren liefern oft nur eine unzureichende Qualität für die Substanzidentifizierung. Um dennoch Spektren mit ausreichender Aussagekraft zu erhalten, wurde die Ausschlusszeit der Vorläuferionen entsprechend kürzer (0,1 min) als die chromatographische Peakbreite (0,2 bis 0,3 min) gewählt, sodass weitere CID-Experimente mit dem gleichen Vorläuferion nahe dem Peakmaximum erfolgen konnten.

In einem Auto-MS/MS-Datenfile sind somit alle wesentlichen Informationen einer Probe vereint. So ist aus den akkuraten MS-Spektren die Bestimmung der Summenformel möglich, wohingegen die CID-Spektren akkurater Fragmentmassen Strukturinformationen liefern, die die Grundlage für eine Substanzidentifizierung darstellen.

### *Erfassung chromatographischer Peaks*

Im Folgenden wird der Ablauf der umfangreichen Auswertung eines mittels LC-QTOF-MS erzeugten Auto-MS/MS-Datenfiles in der STA erläutert. Im ersten Schritt erfolgt die Erfassung von Peaks sowie deren Gruppierung und Zuordnung relevanter CID-Spektren (siehe Abbildung 4.10). Dazu wird zunächst das Elutionsprofil jeder

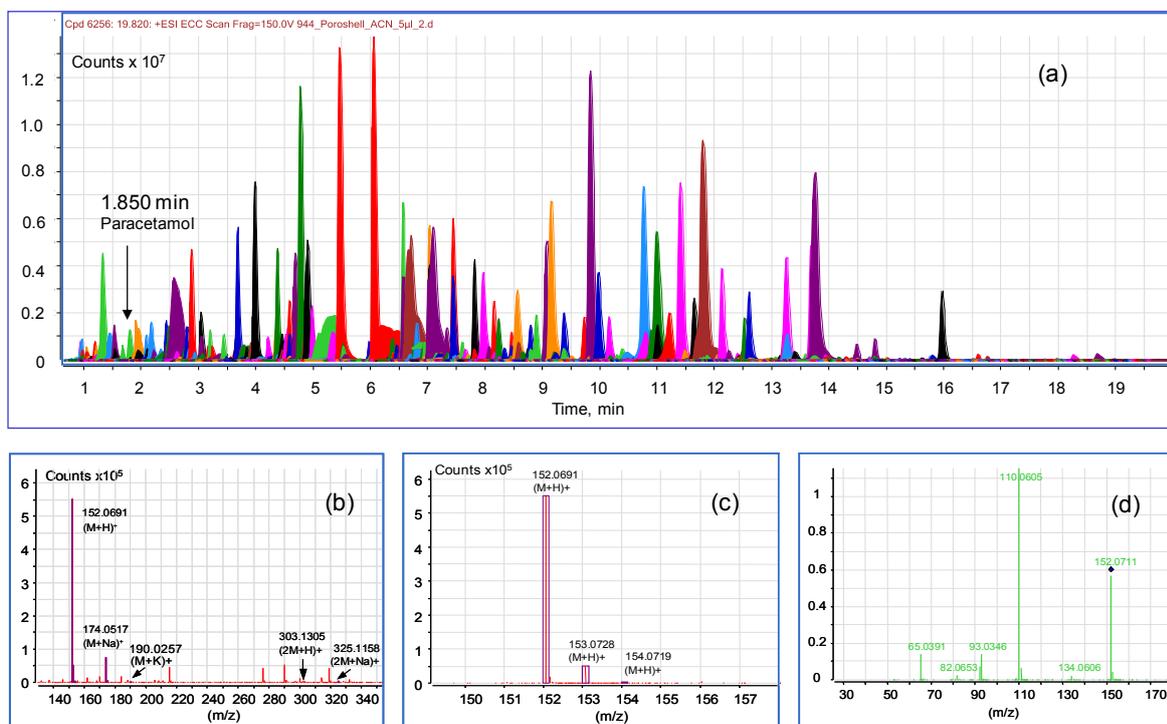
Masse extrahiert. Konstante oder sich langsam ändernde Signale, die von der Matrix oder den Reagenzien stammen, werden ausgeschlossen.



**Abbildung 4.10:** Algorithmus der Molecular Feature Extraction (MFE): (a) Rohdatenfile; (b) Untergrund bereinigtes Datenfile und Gruppierung verschiedener Ionenspezies ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ) und dazugehörige CID-Spektren einer Verbindung.

Danach wird ein Algorithmus „Find Compounds“ angewendet, bei dem Peaks mit gleichem Elutionsprofil, deren Massen durch chemische Regeln in Zusammenhang zu bringen sind, automatisch zu einer „Verbindung“ gruppiert. Eine solche „Verbindung“ besteht zum Beispiel aus dem protonierten Molekülion  $[M+H]^+$ , Addukten mit Natrium-, Kalium- oder Ammoniumionen, Dimeren der jeweiligen Ionenspezies, den entsprechenden Isotopenpeaks sowie aus den CID-Spektren des  $[M+H]^+$ -Ions im entsprechenden Retentionszeitbereich des Peaks. Das nach diesem Befehl erhal-

tene Chromatogramm ist in Abbildung 4.11 (a) anhand einer realen Blutprobe nach Proteinfällung mit Acetonitril dargestellt. In diesem Fall wurden 6256 solcher „Verbindungen“ gefunden. In den Abbildungen. 4.11 (b), (c) und (d) werden das unbereinigte sowie das bereinigte MS-Spektrum eines Peaks bei 1,850 min (identifiziert als Paracetamol) und das entsprechende CID-Spektrum gezeigt.



**Abbildung 4.11:** Fallbeispiel 09/994, Proteinfällung einer Venenblutprobe: (a) Chromatogramm eines im Auto-MS/MS akquirierten Datenfiles nach Untergrundbereinigung und Anwendung des Tools „Find Compounds“. In diesem Fall wurden 6256 „Verbindungen“ gefunden. (b) MS-Spektrum des Peaks bei 1,850 min (Paracetamol). Diese „Verbindung“ enthält Ionen der Spezies:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ , (c) Die korrespondierenden Isotopenpeaks und (d) das CID-Spektrum bei 1,850 min.

### Substanzidentifizierung mittels Datenbank und Bibliothek

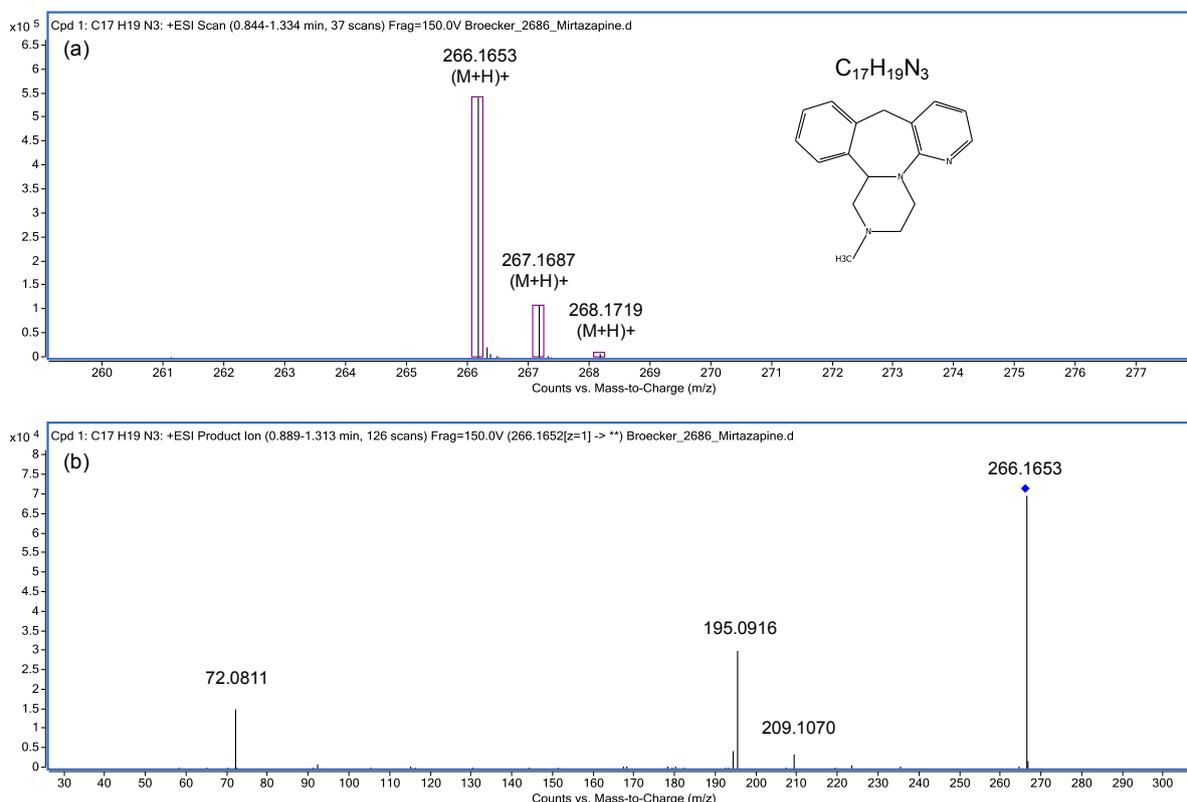
Das sich der Peakerfassung anschließende Tool „Identify Compounds“ führt eine automatisierte Datenbank- und Bibliothekssuche für alle „Verbindungen“ durch. Hierbei können Parameter wie z.B. die Verwendung von Retentionszeiten und eine minimale Übereinstimmung von MS- sowie CID-Spektren vorgegeben werden, die zum Ausschluss von potentiellen Kandidaten führen können. Für die Identifizierung einer Substanz mittels Datenbank werden ausschließlich MS-Spektren verwendet. Dazu werden zunächst die gemessenen ionischen Massen auf die neutralen Massen durch Subtraktion der Protonen-, Natrium-, Kalium- und Ammoniummassen umgerechnet. Diese werden dann innerhalb eines vorgegebenen Massenfensters von typischerweise 5 ppm mit den Massen aus der Datenbank abgeglichen. Darüber hinaus wer-

den die Isotopenmuster der gemessenen Spektren mit denen aus der Datenbank unter Berücksichtigung des Intensitätsverhältnisses und des Massenabstandes der Isotopenpeaks verglichen. Das Ergebnis der Übereinstimmung wird als kombinierter, gewichteter Score, bestehend aus den Scores der Massengenauigkeit, des Abundance-Verhältnisses der Isotopenpeaks, des Abstandes der Isotopenpeaks und optional der Retentionszeit, ausgegeben. Als Ergebnis kann keine, eine oder mehrere Übereinstimmungen aus dem Datenbankabgleich resultieren. Mehr als eine Übereinstimmung tritt bei Isomeren oder Isobaren mit sehr geringem Massenabstand von Substanzen in der Datenbank auf (siehe Abschnitt 4.1.3. und Tabelle 4.2). Da die bei diesem Abgleich verwendeten Informationen Summenformeln sind, werden auch nur diese und nicht die in der Datenbank vermerkten Substanzen nachgewiesen. Daher stellt die Liste erhaltener Substanzen lediglich einen Vorschlag potentiell in der Probe befindlicher Substanzen dar. Unter Verwendung von Retentionszeiten kann eine substanzspezifische Information in die Suche eingehen. Da jedoch auch isomere Verbindungen sehr ähnliche bzw. gleiche Retentionszeiten aufweisen können, liefert diese nur einen hinreichenden Nachweis und keine Identifizierung einer Substanz. Die Verwendung von Retentionszeiten bei einem Datenbankabgleich ermöglicht es aber falsch positive Substanzvorschläge zu reduzieren.

Als zusätzliches, orthogonales Tool kann der „Molecular Formula Generator“ verwendet werden. Dieses Tool berechnet ausgehend von der akkuraten Masse und dem Isotopenmuster des gemessenen Spektrums eines Peaks dessen mögliche Summenformeln. Dieser Algorithmus erfolgt unabhängig von einer Datenbanksuche. Dies ist insbesondere für intensive Peaks ohne Datenbankvorschlag von Bedeutung. Des Weiteren kann auf diesem Wege neben dem Datenbankabgleich, welcher nur eine beschränkte Anzahl verschiedener Summenformeln vorgibt, eine Datenbank unabhängige Prüfung auf in Frage kommende alternative Summenformeln mit einer besseren Übereinstimmung der experimentellen Daten erfolgen. Der „Molecular Formula Generator“ kann nicht nur für MS-Spektren Summenformeln berechnen, sondern auch für Fragmentmassen aus CID-Spektren. Die Kombination beider Informationen – aus MS- und MS/MS-Experimenten – liefert eine Verbesserung der vorgeschlagenen Summenformeln alleine aus einem MS-Experiment.

In Abbildung 4.12 ist dies anhand des Beispiels Mirtazapin mit der Summenformel  $C_{17}H_{19}N_3$  dargestellt. Aus der akkuraten Masse und dem Isotopenmuster des MS-

Spektrums wird als beste übereinstimmende Summenformel  $C_{17}H_{19}N_3$  mit einem MS-Score von 99,64, der sich aus dem Mass Match von 99,88, Abundance Match (99,85) und Spacing Match (98,89) zusammensetzt, vorgeschlagen (siehe Tabelle 4.4). Die nächstbeste übereinstimmende Summenformel  $C_9H_{23}N_5O_2S$  hat nur noch einen MS-Score von 78,38. Mit Hilfe der Zuordnung von Fragmentationen zu Fragmentsummenformeln, basierend auf der vorgeschlagenen Molekülsummenformel, und unter Verwendung sich daraus ergebender Neutralverluste kann aus dem CID-Spektrum eine zusätzliche Absicherung der Summenformel erfolgen (Tabelle 4.5). Die Übereinstimmung einer Fragmentsummenformel und des Neutralverlustes mit der möglichen Molekülsummenformel wird in Form eines MS/MS-Scores wiedergegeben. Dieser liefert für den besten Treffer einen Wert von 100. Aus beiden Scores (MS und MS/MS) wird dann ein gemeinsamer Score gebildet (siehe Tabelle 4.4).



**Abbildung 4.12:** Identifizierung der Summenformel am Beispiel Mirtazapin. (a) MS-Spektrum mit dem Isotopenmuster des  $[M+H]^+$ -Ions von Mirtazapin. (b) CID-Spektrum des  $[M+H]^+$ -Ions (Summe aus 10, 20 und 40 eV) mit Zuordnung der Fragmentmassen und dem Neutralverlust.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.4:** Vorgeschlagene Summenformeln zum Spektrum aus Abbildung 4.12. Dabei ergibt sich der Gesamtscore (Score) aus dem MS- und MS/MS-Score. Der MS-Score errechnet sich aus dem Mass Match, Abundance Match und Spacing Match.

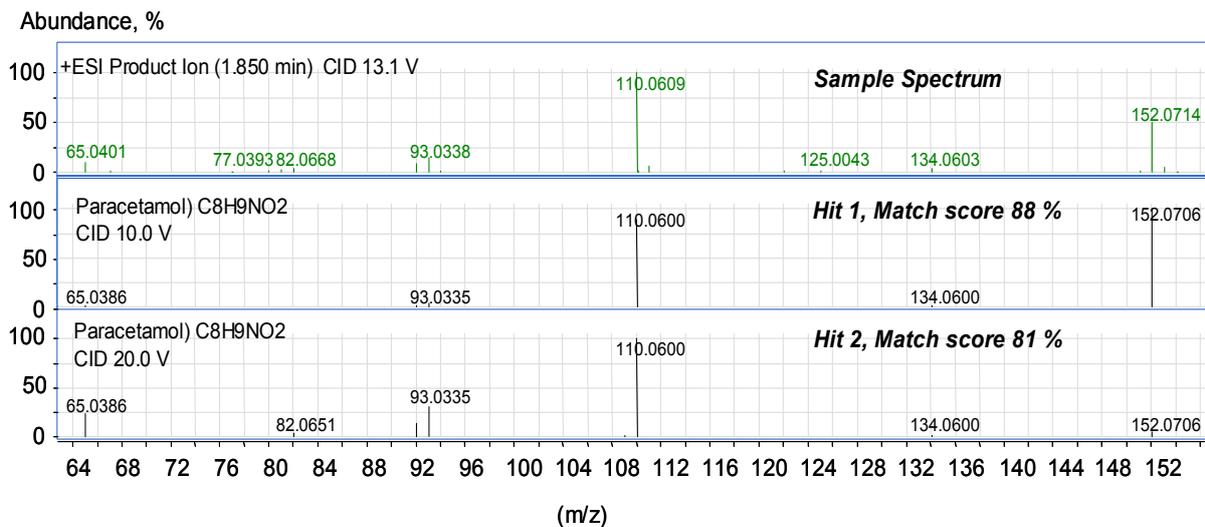
Formula (M)	Score	MS Score	MS/MS Score	Coverage	Diff (ppm)	Mass Match	Abund Match	Spacing Match
C17H19N3	99,71	99,64	100	100	-0,44	99,88	99,85	98,89
C9H23N5O2S	82,53	78,38	99,95	100	-2,89	95,14	45,24	84,65
C16H24CIN	66,53	59,51	96,04	100	6,43	78,65	0,05	92,57
C14H23N3S	64,19	62,69	70,51	100	12,22	42,07	73,28	91,19
C11H24CIN3O2	60,33	52,27	94,2	100	-8,68	64,41	0,02	90,7

**Tabelle 4.5:** Zuordnung von Fragmentsummenformeln zu den Fragmentationen, sowie Angabe von Neutralverlusten aus der vorgeschlagenen Summenformel C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub> aus Tabelle 4.4 zum Spektrum aus Abbildung 4.12.

m/z	Formula	Abund %	Diff (ppm)	Loss Mass	Loss Formula
72,0811	C4 H10 N	28,63	-4,41	194,0844	C13 H10 N2
194,0838	C13 H10 N2	8,57	0,33	72,0813	C4 H10 N
195,0916	C13 H11 N2	56,21	0,29	71,0735	C4 H9 N
209,107	C14 H13 N2	6,59	1,33	57,0578	C3 H7 N

Für einen Bibliotheksabgleich werden die CID-Spektren der „Verbindungen“ herangezogen. Als Kriterien für die Identität der Spektren wurden verwendet: die Anzahl der übereinstimmenden Peaks, die Anzahl der nicht übereinstimmenden Peaks, die Massendifferenz der akkuraten Fragmentmassen und das Fragmentmassen-Intensitätsverhältnis. Die Übereinstimmung wird als Gesamt-Score aus den gewichteten Einzel-Scores angegeben. Unabhängig von der verwendeten Kollisionsenergie des CID-Experiments wurden alle Bibliotheksspektren von 10, 20 und 40 eV Kollisionsenergie in den Suchvorgang einbezogen. Obwohl die bei der Kollision verwendete Energie für unbekannte Substanzen nach Gleichung (3) berechnet wurde und in der Regel verschieden von 10, 20 oder 40 eV war, wurde fast immer das Bibliotheksspektrum mit der nächst höheren oder nächst niedrigeren Energie als bester Bibliothekstreffer angegeben. Oftmals wurde als zweitbesten Treffer das Spektrum derselben Substanz mit der anderen benachbarten Kollisionsenergie vorgeschlagen. Diese Tatsache beruht darauf, dass die akkurate Masse eine stärkere Wichtung als das Intensitätsverhältnis beim Suchalgorithmus hat. Die Verwendung der strukturspezifischen, substanzcharakteristischen Fragmentspektren stellt eine wertvolle Voraussetzung für die Identifizierung dar.

Unter Verwendung des dargestellten Suchverfahrens wurden im Chromatogramm der Abbildung 4.11 29 Peaks mittels Bibliotheks- und Datenbankabgleichs identifiziert. Ein oder mehrere Substanzen wurden für 266 weitere Peaks mit einem Score >75 % und einer Massengenauigkeit <5 ppm durch die Datenbank vorgeschlagen. Spektren zur Identifizierung dieser Substanzen waren in der Bibliothek nicht vorhanden. In Abbildung 4.13 ist das Suchergebnis des Peaks bei 1,850 min des Chromatogramms, welches als Paracetamol identifiziert wurde, aus Abbildung 4.11 wiedergegeben.



**Abbildung 4.13:** Fallbeispiel 09/994, Proteinfällung der Venenblutprobe. Ergebnis der Datenbank- und Bibliothekssuche für den Peak bei 1,850 min in Abbildung 4.11.

### *Gesamtablauf der Messung und Datenanalyse im Überblick*

Die in den vergangenen Abschnitten dargelegten Teilschritte ermöglichen es, so viele Informationen wie möglich aus der Probe zu erhalten. Hierbei findet die Anwendung der Datenbank, der Bibliothek sowie des Metaboliten-Tools (siehe Abschnitt 4.4.) auf dem im Auto-MS/MS-Modus akquirierten Datenfile statt. In Tabelle 4.6 ist der Ablauf der Operationen nochmals im Überblick zusammengefasst.

**Tabelle 4.6:** Überblick über die Teilschritte der LC-QTOF-MS-Messung im Auto-MS/MS (datenabhängigen) Modus und Datenauswertung mittels MassHunter Software.

<b>Schritt</b>	<b>Operation</b>
<b>Probenextrakt</b> 	<b>Messung im Auto-MS/MS-Modus (Datenabhängige Akquisition)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wechsel von MS und MS/MS, Zykluszeit 1,1 s</li> <li>- MS-Experiment 0,25 s, Full-Scan-MS-Spektrum, Auswahl von 3 Vorläuferionen und Berechnung der CID-Energien</li> <li>- MS/MS-Experiment 0,85 s, 3 MS/MS-Spektren</li> <li>- aktiver Ausschluss dieser Vorläuferionen für 0,1 min</li> </ul>
<b>TIC Totalionen-chromatogramm</b> 	<b>Tool „Find Compounds“</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Extraktion des Elutionsprofil jeder Masse</li> <li>- Ausschluss konstanter und sich langsam ändernder Signale (Hintergrundbereinigung)</li> <li>- Gruppierung von Massen mit demselben Elutionsprofil zu „Compounds“ bestehend aus <math>[M+H]^+</math>, Addukten mit <math>Na^+</math>, <math>K^+</math>, <math>NH_4^+</math>, korrespondierende Isotopenpeaks und MS/MS-Spektren der <math>[M+H]^+</math>-Ionen</li> </ul>
<b>Extraktion der Ionenchromatogramme aller „Compounds“</b> 	<b>Tool „Identify Compounds“, automatische Datenbank- und Bibliothekssuche für alle „Verbindungen“</b> <b>MS-Daten:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Berechnung der neutralen monoisotopischen Masse zu allen <math>m/z</math> Ionenspezies <math>[M+H]^+</math>, <math>[M+Na]^+</math>, etc.</li> <li>- Berücksichtigung des Massenabstandes und Abundance-Verhältnisses von Isotopenpeaks</li> <li>- Abgleich mit Datenbankeinträgen</li> <li>- Gewichteter Score aus der Massengenauigkeit, dem Isotopenverhältnis, Isotopenpeakabstand und falls vorhanden einer Retentionszeitübereinstimmung</li> </ul> <b>MS/MS-Daten:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suche in der CID-Spektrenbibliothek exakter Massen</li> <li>- Gewichteter Score bestehend aus der Anzahl übereinstimmender und nicht übereinstimmender Peaks, Übereinstimmung der akkuraten Fragmentmassen und der Abundance-Verhältnisse der Fragmentpeaks</li> </ul>
<b>Liste von Datenbankvorschlägen und Bibliotheksergebnissen</b> 	<b>Manuelle Separation falsch positiver Ergebnisse</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Übereinstimmung von MS-Daten, MS/MS-Spektren und Retentionszeit → ggf. weitere Targeted-MS/MS-Messungen für „Verbindungen“ ohne oder mit schlechten CID-Spektren</li> <li>- Tool „Molecular Formula Generator“</li> <li>- Metaboliten-Tool unter Verwendung des Algorithmus „Find Metabolites“ und ggf. „Find Parent Drug“</li> </ul>
<b>Liste identifizierter Substanzen</b> 	<b>Erstellen des Reports</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Liste identifizierter Substanzen, für jede Substanz:</li> <li>- Ausdruck chromatographischer Peaks mit MS- und MS/MS-Spektrum</li> </ul>
<b>Ergebnis-Report</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identifikations-Scores, Übereinstimmung zwischen Proben- und Bibliotheksspektren, Vergleich von Isotopenmustern und ggf. Retentionszeiten der Datenbank mit den Verbindungen der Probe</li> </ul>

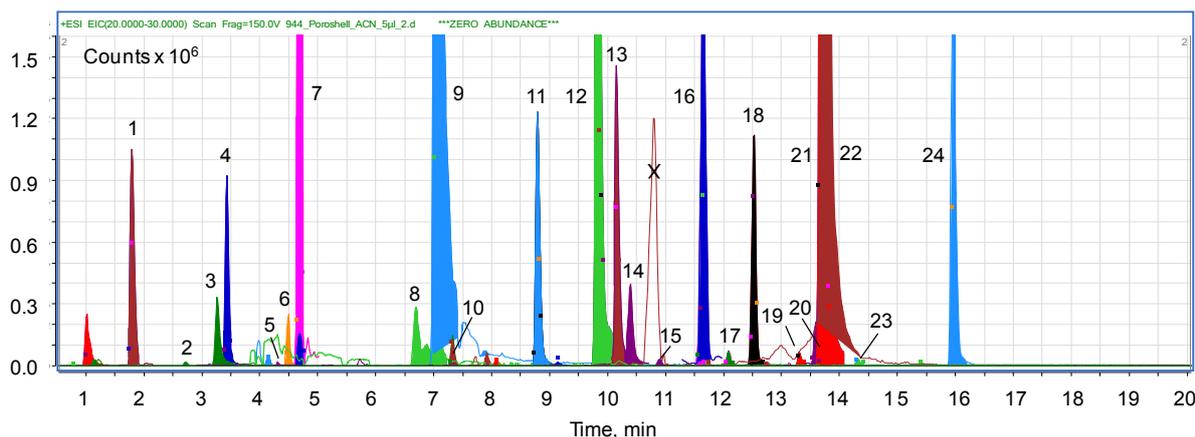
### *Fallbeispiel 09/994*

Anhand einer realen Probe soll die Auswertung einer STA demonstriert werden.

Wie aus dem Obduktionsprotokoll ersichtlich war, sei die 54 Jahre alte Frau nach einem starken Hustenanfall in ihrer Wohnung verstorben. Wiederbelebungsversuche seien ohne Erfolg verlaufen. Sie habe mehrere Bandscheibenvorfälle sowie einen Schlaganfall erlitten und sei seitdem einseitig gelähmt. Zudem sei sie starke Kettenraucherin gewesen. Auf Grund einer seit vier Tagen vorhandenen Lungenentzündung habe sie Clarithromycin A eingenommen. Als Dauermedikation verschriebene bzw. in der Wohnung befindliche Medikamente seien: Acetylsalicylsäure, Baclofen, Beclometasondipropionat, Bisacodyl, Carbamazepin, Clemastin, Codein, Estriol, Fenoterol, Formoterol, Ipratropium Lactulose, Levomepromazin, Loperamid, Metoprolol, Mirtazapin, Propiverin, Ranitidin, Tilidin und Tizanidin gewesen. Zum Ausschluss einer Vergiftung wurde eine toxikologische Analyse angefordert.

Durch Untersuchung des venösen Blutes mittels HPLC-DAD und GC-MS wurden folgende Ergebnisse erhalten: Codein (1,1 µg/ml), Tramadol (8,4 µg/ml), Carbamazepin (9,6 µg/ml), Carbamazepin-10,11-epoxid (0,8 µg/ml), Ranitidin (0,7 µg/ml) und Levomepromazin (0,3 µg/ml). Wie aus diesem Befund nach Vergleich mit therapeutischen und toxischen Daten ersichtlich war, lag eine schwere Überdosierung von Codein und Tramadol vor, die zur Todesursache beigetragen haben kann.

Das aus der Proteinfällung des venösen Blutes mittels LC-QTOF-MS erhaltene Chromatogramm wurde nach den oben beschriebenen Algorithmen „Find Compounds“ und „Identify Compounds“ ausgewertet und ist in Abbildung 4.14 wiedergegeben. Die mittels HPLC-DAD und GC-MS festgestellten Substanzen wurden alle mit Ausnahme von Ranitidin identifiziert. Darüber hinaus wurden auch Baclofen, Clarithromycin, Clemastin, Clomipramin, Fentanyl, Loperamid, Midazolam, Methiomeprazin, Morphin, Nortilidin, Paracetamol, Paroxetin, Propiverin, Tilidin und Tizanidin nachgewiesen. Aus dem Dichlormethanextrakt konnten als weitere Substanzen Lidocain, Nikotin und Ofloxacin identifiziert werden. Diese Ergebnisse standen zum großen Teil in Einklang mit der Anamnese aus der Vorgeschichte. Das häufige Rauchen wurde durch den Nachweis von Nikotin und Cotinin bestätigt.



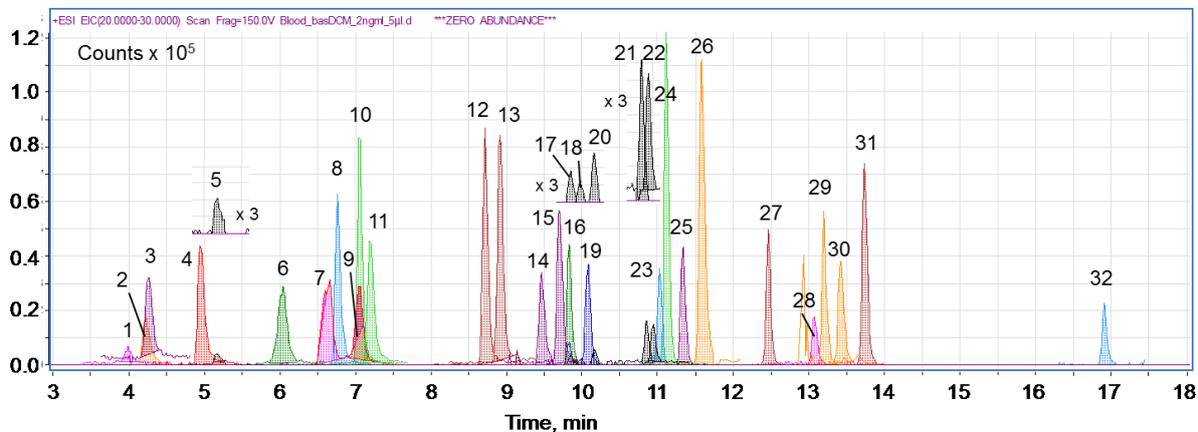
**Abbildung 4.14:** Fallbeispiel 09/994, Proteinfällung einer Venenblutprobe. Durch die Bibliothek identifizierte Substanzen. 1 = Paracetamol; 2 = Baclofen; 3 = Morphin; 4 = Cotinin; 5 = Tizanidin; 6 = Codeinglucuronid; 7 = O-Demethyltramadol; 8 = Codein; 9 = Tramadol; 10 = Carbamazepin-9,10-epoxid; 11 = Nortilidin; 12 = Carbamazepin; 13 = Hydrocortison; 14 = Methiomeprazin; 15 = Paroxetin; 16 = Clomipramin; 17 = Tilidin; 18 = Midazolam; 19 = Loperamid; 20 = Fentanyl; 21 = Clemastin; 22 = Clarithromycin; 23 = Clemastin; 24 = Propiverin.

### 4.1.6 Untersuchung von dotierten Blut- und Urinproben

Die Anwendung von LC-QTOF-MS im Auto-MS/MS-Modus und der Substanzidentifizierung mittels Datenbank und Bibliothek toxischer Substanzen wurde anhand von dotierten Blut- und Urinproben geprüft. Hierbei sollten die Vorteile sowie Einschränkungen des Verfahrens für die qualitative Identifizierung von Substanzen untersucht werden. Insbesondere sollte geprüft werden, mit welcher Empfindlichkeit Verbindungen durch diese Methode identifiziert werden können. Zu diesem Zweck wurden drogenfreie Blut- und Urinproben in einer Kalibrierreihe mit 33 Wirkstoffen bei 7 Konzentrationen zwischen 0,5 und 500 ng/ml dotiert und wie unter Abschnitt 4.1.5. beschrieben analysiert. Anschließend erfolgte eine Datenbank- und Bibliothekssuche. Alle Testsubstanzen waren in der Bibliothek vorhanden und erfüllten die strukturellen Voraussetzungen für eine effiziente Ionisation im positiven ESI-Modus. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Es wurden jeweils fünf Blut- und Urinproben von Freiwilligen, die keine Drogen oder Medikamente zu sich nahmen – mit Ausnahme von Kaffee oder Tee – analysiert. Neben Coffein und seinen Metaboliten konnten in diesen „Leerproben“ Piperin (Bestandteil von Pfeffer), Benzododecinium (Desinfektionsmittel, Stabilisator), Diethylphthalat (Weichmacher), Carnitin (Aminosäure), Adenosin und Thiamin (Vitamin B1) identifiziert werden.

Das Chromatogramm einer dotierten Blutprobe bei einer Konzentration von 2 ng/ml nach Extraktion mit Dichlormethan ist in Abbildung 4.15 dargestellt.



**Abbildung 4.15:** Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) einer dotierten Serumprobe bei 2 ng/ml von: 1 = 3,4-Methylendioxyamphetamin; 2 = Methamphetamin; 3 = Methylendioxymethamphetamin; 4 = 3,4-Methylenedioxyethamphetamin (MDEA); 5 = Phentermin; 6 = Oxycodon; 7 = Codein; 8 = Metoprolol; 9 = Tramadol; 10 = Hydrocodon; 11 = Strychnin; 12 = Cocain; 13 = Meperidin (Pethidin); 14 = Phencyclidin (PCP); 15 = Citalopram; 16 = Carbamazepin; 17 = Nitrazepam; 18 = Clonazepam; 19 = Ketamin; 20 = Flunitrazepam; 21 = Oxazepam; 22 = Lorazepam; 23 = Alprazolam; 24 = Zolpidem; 25 = Temazepam; 26 = Methadon; 27 = Diazepam; 28 = Verapamil; 29 = Trazodon; 30 = Amitriptylin; 31 = Clozapin; 32 = Proadifen; 33 =  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (nicht detektiert). Die Substanzen 5, 16, 17, 20, 21 und 22 sind in einer dreifachen Vergrößerung im oberen Teil des Chromatogramms dargestellt und wurden nur durch die Datenbank vorgeschlagen. Alle anderen Substanzen wurden durch Bibliothekssuche anhand ihrer CID-Spektren identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Teilvalidierung der Methode sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Der Nachweis einer Substanz kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Bei höheren Konzentrationen kann die Substanz sowohl durch den Datenbankabgleich wie auch über den Bibliotheksabgleich der vorhandenen CID-Spektren identifiziert werden. Die durch die Datenbank und Bibliothek identifizierten Substanzen wurden durch das Symbol "I" in Tabelle 4.7 vermerkt. Der Extrakt einer Blutprobe bei einer Konzentration von 2 ng/ml lieferte zum Beispiel eine Identifikation von 26 der 33 Substanzen (siehe Abbildung 4.15).

Bei sehr geringen Konzentrationen sind jedoch oft keine CID-Spektren für eine Identifizierung vorhanden. Grund dafür kann eine sehr hohe Matrixbelastung sein, sodass bevorzugt Matrixmassen fragmentiert werden, oder dass die Intensität unter dem Schwellenwert von 1000 Counts liegt und somit nicht für ein CID-Experiment ausgewählt wird. Dennoch ist der Nachweis der Substanz über die MS-Spektren und eine Datenbanksuche möglich. Dies wird in Tabelle 4.7 als "D" wiedergegeben. Erst mit einer Wiederholung der Messung im Targeted-MS/MS-Modus sind CID-Spektren zugänglich, die eine Identifizierung der Substanz mittels Bibliotheksvergleichs ermög-

lichen. Auf Grund der 5-10 mal höheren Empfindlichkeit akquirierter CID-Spektren bei der Targeted-MS/MS gegenüber der Auto-MS/MS-Analyse wurden in allen Fällen, in denen die Substanz im MS-Spektrum nachweisbar war, der Auto-MS/MS-Modus jedoch keine CID-Spektren lieferte, im Targeted-MS/MS-Modus für die Identifizierung geeignete Spektren erhalten. Dies war der Fall für 6 Substanzen aus Abbildung 4.15. Bei noch geringeren Konzentrationen wurde die Substanz selbst mit einer Datenbanksuche nicht nachgewiesen, selbst wenn durch das EIC des  $[M+H]^+$ -Ions ein Peak noch detektiert werden konnte. Dies ist der Fall für  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in Abbildung 4.15.

Die Ergebnisse der Tabelle 4.7 der im Auto-MS/MS-Modus akquirierten Daten zeigen, dass typische basische Medikamentenwirkstoffe wie Amitriptylin, Cocain oder Strychnin bei einer Probenvorbereitung von Blut mittels Dichlormethanextraktion bis zu einer Konzentration von 0,5 ng/ml anhand der in diesem Modus akquirierten CID-Spektren identifiziert werden konnten. Die sechs Benzodiazepine wurden mit niedrigerer Empfindlichkeit zwischen 0,5 ng/ml (Diazepam) und 20 ng/ml (Clonazepam, Lorazepam) identifiziert. Ein Nachweis mittels Datenbank konnte im Bereich von 0,5 oder 2 ng/ml erfolgen. Es zeigte sich, dass im Falle von Oxazepam und Lorazepam der Hauptgrund für die geringere Präsenz an CID-Spektren in der bevorzugten Bildung von Natrium-Addukten anstelle von  $[M+H]^+$ -Ionen lag.

Die unteren Nachweisgrenzen waren in den in Tabelle 4.7 gewählten Konzentrationen um den Faktor 4-10 höher für die Proteinfällung und um den Faktor 10-40 höher für die verdünnten Urine. Der Nachweis mittels Datenbank war in der Regel um den Faktor 4-10 empfindlicher als die Identifizierung durch Bibliotheksspektren.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol wurde nur im Dichlormethanextrakt bei 20 ng/ml nachgewiesen und lieferte nur bei einer Konzentration von 200 ng/ml CID-Spektren, die eine Identifizierung mittels Bibliotheksabgleichs zuließen.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.7:** Nachweis und Identifizierung von Wirkstoffen bei verschiedenen Konzentrationen in dotierten Blut- und Urinproben mittels LC-QTOF-MS im Auto-MS/MS-Modus. Probenvorbereitung: B-Extr. = Flüssig/Flüssig Extraktion von Blut mittels Dichlormethan, B-Prüz. = Proteinfällung von Blut mit Acetonitril, U-Verd. = 1:5 Verdünnung von Urin mit Wasser. Auswertung/Identifikation: D = Datenbankvorschlag resultierend aus MS-Spektren, zusätzliche CID-Spektren waren im Auto-MS/MS-Datenfile nicht akquiriert. Die Bestätigung erfolgte in einer folgenden Targeted-MS/MS-Messung mit Bibliothekssuche der akquirierten CID-Spektren. I = Identifizierung der CID-Spektren des Auto-MS/MS-Datenfiles.

Substanz	Proben-Prüz.	Konzentration, ng/ml						
		0,5	2	5	20	50	200	500
Alprazolam	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	D	I	I	I	I
Amitriptylin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	I	I	I	I	I
Carbamazepin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	D	I	I	I	I	I	I
Citalopram	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	I	I	I	I	I
Clonazepam	B-Extr.	--	D	D	I	I	I	I
	B-Prüz.	--	--	D	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	--	--	D	I	I
Clozapin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	I	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	D	I	I	I	I	I
Cocain	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	I	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	I	I	I	I	I
Codein	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	I	I	I	I	I	I
Diazepam	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	--	I	I	I	I
Flunitrazepam	B-Extr.	D	D	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	--	D	D	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	--	I	I	I	I
Hydrocodon	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	D	I	I	I	I
Ketamin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	D	I	I	I	I
Lorazepam	B-Extr.	D	D	D	I	I	I	I
	B-Prüz.	--	D	D	D	I	I	I
	U-Verd.	--	--	--	D	D	I	I
Methadon	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	I	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	I	I	I	I	I	I
Methamphetamin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	--	--	D	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	D	I	I	I	I
3,4-Methylendioxyamphetamin	B-Extr.	--	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	--	D	I	I	I	I	I
	U-Verd.	D	D	D	D	D	I	I
3,4-Methylenedioxyethamphetamin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	D	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	--	D	I	I	I	I
3,4-Methylenedioxymethamphetamin	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	I	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	D	D	D	I	I	I	I
Metoprolol	B-Extr.	I	I	I	I	I	I	I
	B-Prüz.	I	I	I	I	I	I	I
	U-Verd.	--	D	I	I	I	I	I

## Ergebnisse und Diskussion

**Fortsetzung Tabelle 4.7:**

Substanz	Proben-Präp.	Konzentration, ng/ml						
		0,5	2	5	20	50	200	500
Nitrazepam	B-Extr.	--	D					
	B-Präz.	--	--	D				
	U-Verd.	--	D	D	D	D		
Oxazepam	B-Extr.	D	D					
	B-Präz.	--	D	D				
	U-Verd.	--	--	D	D	D		
Oxycodon	B-Extr.							
	B-Präz.	D						
	U-Verd.	--	--	D				
Pethidin	B-Extr.							
	B-Präz.							
	U-Verd.	--						
Phencyclidin	B-Extr.							
	B-Präz.	D						
	U-Verd.	--	--					
Phentermin	B-Extr.	--	D					
	B-Präz.	--	--	--	D	D		
	U-Verd.	--	--	--	D			
Proadifen	B-Extr.							
	B-Präz.	D						
	U-Verd.	--						
Strychnin	B-Extr.							
	B-Präz.							
	U-Verd.	--	--	D				
Temazepam	B-Extr.	D						
	B-Präz.	D	D					
	U-Verd.	--	--	D	D			
$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol	B-Extr.	--	--	--	D	D		
	B-Präz.	--	--	--	--			
	U-Verd.	--	--	--	--	--		
Tramadol	B-Extr.							
	B-Präz.							
	U-Verd.							
Trazodon	B-Extr.							
	B-Präz.	D						
	U-Verd.	--	D					
Verapamil	B-Extr.	D						
	B-Präz.							
	U-Verd.	D	D					
Zolpidem	B-Extr.							
	B-Präz.							
	U-Verd.	--						

Es ist offensichtlich, dass die unteren Grenzwerte der Identifikation, wie sie in Tabelle 4.7 dargestellt sind, abhängig von der Probenvorbereitung (Extraktionsausbeute und Reinheit des Extraktes) und von der injizierten Menge sind. Für diese Untersuchung wurden sehr einfache Probenvorbereitungen gewählt. Die injizierte Lösung entsprach je nach Probenvorbereitung einer absoluten Menge von 12,5  $\mu$ l Blut (basische Extraktion mit Dichlormethan), 5  $\mu$ l Blut (Proteinfällung) oder 1  $\mu$ l Urin (Verdünnung). Der Hauptgrund für die unterschiedliche Empfindlichkeit der drei in Tabelle 4.7 verglichenen Probenvorbereitungen liegt somit hauptsächlich in den verschiedenen, jeweiligen Injektionsmengen der Proben.

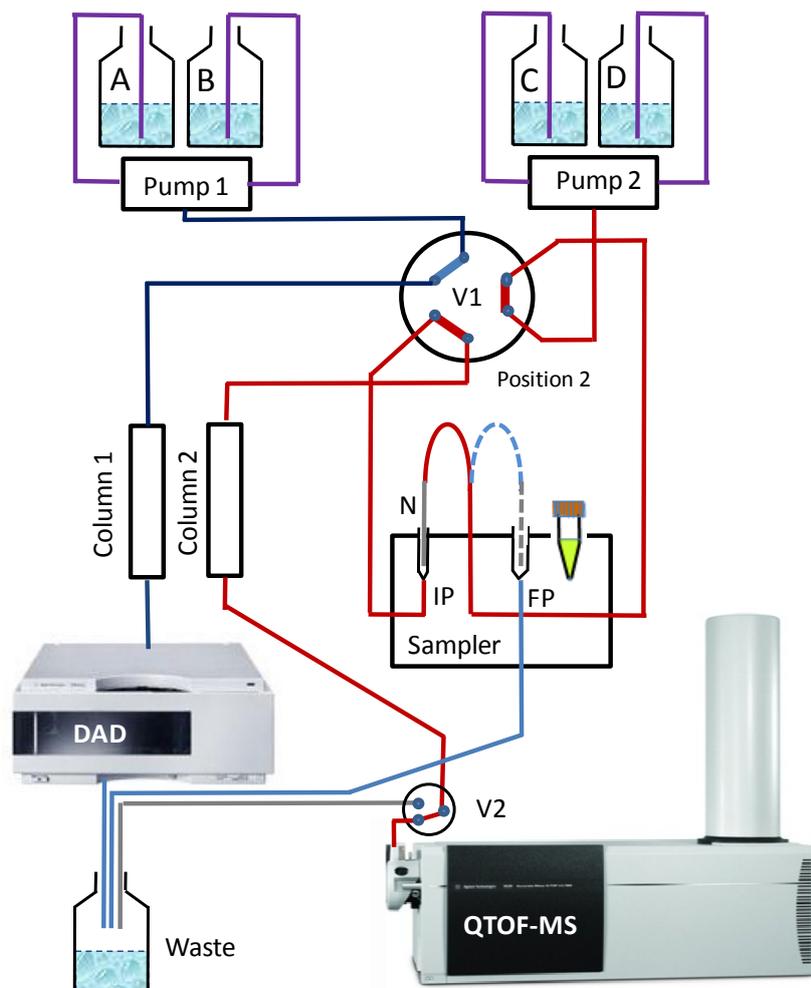
#### **4.2 Kombinierte Anwendung von HPLC-DAD und LC-QTOF-MS zur STA von Blutproben und Methodenvergleich [142]**

Trotz der in Abschnitt 4.1. gezeigten Leistungsfähigkeit der LC-QTOF-MS-Methode bedarf es in vielen Fällen doch der zusätzlichen Anwendung weiterer Methoden, um nicht erfasste Wirkstoffe in die Suche einzubeziehen oder die Ergebnisse zusätzlich abzusichern. Dies ist angesichts der möglichen Tragweite forensischer Untersuchungsergebnisse besonders wichtig. Die HPLC-DAD mit UV-Spektrenbibliothek hat sich in der Vergangenheit als leistungsfähige und robuste Methode in der Systematischen Toxikologischen Analyse erwiesen [2]. Ein zusätzlicher Vorteil ist die Möglichkeit der semiquantitativen Konzentrationsbestimmung auf der Basis spezifischer Peakflächen unter definierten Bedingungen.

In dieser Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, beide Methoden kombiniert anzuwenden. Gleichzeitig sollte ein Vergleich zwischen beiden Methoden vorgenommen werden. Für diesen Zweck wurden 77 Venenblute von Verstorbenen mit beiden Methoden untersucht. Die Auswahl der Fälle erfolgte anhand der Vorgeschichte. Aus dieser war ersichtlich, ob und in welchem Umfang ein Konsum an illegalen Drogen oder therapeutischen Medikamenten zu Lebzeiten vorlag. Die Vorbereitung der Blutproben erfolgte durch basische Extraktion mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sowie durch Eiweißfällung. Die Messung erfolgte anschließend nach positiver Elektrospray-Ionisation. Lediglich in speziellen Fällen, in denen anionische Wirkstoffe aus der Vorgeschichte oder der HPLC-DAD-Analyse bekannt waren, wurde eine saure Extraktion durchgeführt. Die Messung erfolgte dann mit negativer Ionisation. In der anschließenden Datenanalyse wurde mit den jeweiligen Datenbanken und Bibliotheken nach toxikologisch relevanten Substanzen gesucht. Die aus der Auswertung resultierenden Ergebnisse wurden mit der Vorgeschichte verglichen. Im Falle eines nicht korrelierenden Ergebnisses beider Verfahren nach der Erstauswertung wurde eine gezielte Suche der nicht identifizierten Substanz im entsprechenden Datenfile vorgenommen. In den folgenden Abschnitten sollen die praktische Durchführung, die Vor- und Nachteile sowie Einschränkungen dieser Methodenkombination dargestellt und diskutiert werden.

### 4.2.1 Praktische Durchführung der HPLC-DAD und LC-QTOF-MS Kombination

Die einfachste Variante der Kombination beider Detektoren bestände in deren Serienschaltung unter Verwendung einer LC. Auf Grund der für beide Detektoren unterschiedlichen optimalen chromatographischen Bedingungen, insbesondere der Anforderungen an die mobilen Phasen, ist dies jedoch nicht möglich. Für die Detektion mittels DAD ist eine optische Transparenz bis zu 195 nm nötig, was durch die Verwendung eines Gemisches aus Acetonitril und Phosphatpuffer ermöglicht wird. Des Weiteren ist die Einhaltung der Bedingungen, unter denen alle UV-Spektren und relativen Retentionszeiten (RRT) für die UV-Spektrenbibliothek erfasst wurden, insbesondere aber des pH-Wertes 2,3 nötig, um die maximale Selektivität bei einer UV-Bibliothekssuche zu erzielen. Diese mobile Phase kann jedoch nicht bei Verwendung des QTOF-MS Gerätes verwendet werden. Dies liegt insbesondere am nicht flüchtigen Puffer sowie der Ionensuppression durch das Phosphat. Auf der anderen Seite weisen die flüchtigen Formiat-, Acetat- oder Trifluoracetat-Puffer, wie sie bei der LC-MS-Analyse eingesetzt werden, eine UV-Absorption bis zu 230 nm auf. Daher ist ihre Verwendung bei der HPLC-DAD-Analyse nicht sinnvoll, da viele Substanzen nur eine UV-Absorption unterhalb 250 nm aufweisen. Der kurzweilige Bereich zwischen 195 und 230 nm weist häufig eine hohe Spezifität auf und ist daher oftmals von entscheidender Bedeutung für die Identifizierung der Substanz. Aus diesen Gründen wurden beide Detektoren chromatographisch voneinander getrennt und unter ihren jeweiligen optimalen Bedingungen betrieben. Trotzdem wurde versucht, beide chromatographische Linien durch Schaltventile miteinander zu verknüpfen und die Messlösungen aus der gleichen Probenvorbereitung einzusetzen. Der Aufbau sowie der zeitliche Schaltplan sind in Abbildung 4.16 und Tabelle 4.8 dargestellt. Bei der Schaltung musste gewährleistet sein, dass kein Austausch der unterschiedlichen mobilen Phasen stattfinden konnte. Dies wurde durch das Ventil des Säulenofens, die Spülposition des Autoinjektors und das Ventil zum Massenspektrometer bewerkstelligt.



**Abbildung 4.16:** Kombination von HPLC-DAD und LC-QTOF-MS. Das zeitliche Zusammenspiel des Säulenofenventils V1, des Einlassventils des QTOF-MS-Instruments V2 und der Position der Injektionsnadel zwischen dem Injektionsport IP und der Spülposition FP ist in Tabelle 4.8 wiedergegeben. Hierdurch wird eine simultane Messung der Probe unter den optimalen Bedingungen beider Methoden gewährleistet, ohne dass dabei eine Kontamination der mobilen Phasen erfolgt. Dargestellt ist Schritt 5 (Datenakquisition beider Methoden – run/run) des zeitlichen Ablaufs.

**Tabelle 4.8:** Zeitliche Abfolge der chromatographischen Flüsse und Ventilschaltungen bei LC-QTOF-MS-Bedingungen (I) sowie (II) (siehe Abschnitt 3.7.2. und 3.7.4.) der kombinierten Anwendung von HPLC-DAD und LC-QTOF-MS. Der zugrundeliegende Aufbau ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

Schritt	Zeit, min LC (I) <sup>a)</sup>	Zeit, min LC (II) <sup>b)</sup>	Ventil 1	Ventil 2	Injektionsnadel	HPLC-DAD	LC-QTOF Fluss, ml/min
1	0-0,25	0-0,25	Pos. 1	Abfall	Injektionsport	Injektion 50 µl	Waschen/0,4
2	0,25-1,25	0,25-1,25	Pos. 2	Abfall	Spülport	Lauf	Nadelwaschen/2,0
3	1,25-4,25	1,25-4,25	Pos. 2	Abfall	Injektionsport	Lauf	Waschen/0,4
4	4,25-5	4,25-5	Pos. 2	Abfall	Injektionsport	Lauf	Injektion 5 µl/0,4
5	5-25	5-29	Pos. 2	QTOF	Injektionsport	Lauf	Lauf/0,4
6	25-30	29-30	Pos. 2	Abfall	Injektionsport	Lauf	Waschen/0,6
7	30-31	30-31	Pos. 1	Abfall	Spülport	Waschen	Waschen/0,4

a) Verwendung der MS-Methode (I); b) Verwendung der MS-Methode (II)

Die in der Routine verwendete Probenvorbereitung für HPLC-DAD-Analysen [2, 9] wurde durch geringfügige Modifikation so gestaltet, dass sie für beide Systeme verwendet werden konnte. Bei der Proteinfällung mittels Acetonitril wurde das Volumen auf ein Verhältnis von 1:4 statt 1:1 geändert. Dies ermöglichte eine effizientere Abtrennung von Matrixbestandteilen. Um eine damit verbundene Verdünnung zu kompensieren, wurde der Überstand bis zur Trockene eingeeengt. Die aus der Proteinfällung und der Dichlormethanextraktion erhaltenen Rückstände wurden für die folgenden Messungen in ACN / 0,1 % HCOOH (35/65, v:v) gelöst. Der Acetonitril-Anteil von 35 % wurde auf Grund einer besseren Löslichkeit lipophiler Bestandteile der Probe verwendet. Dies führte jedoch zu einer Peakverbreiterung im LC-MS-Chromatogramm. Die geringe Menge an Ameisensäure, welche bei der Injektion in den HPLC-DAD-Fluss gelangte, störte die UV-Detektion nicht, da sie zusammen mit hydrophilen Matrixbestandteilen zu Anfang der Chromatographie eluierte.

Die automatische Analysendurchführung, wie sie in Abbildung 4.16 dargestellt ist, verlief reproduzierbar und ohne Störungen. Die Gesamtlaufzeit der kombinierten Anwendung betrug 31 min und wurde durch die HPLC-DAD-Messung (30 min Messung + 1 min zur Beendigung des Datenfiles) bestimmt. Die relativ langen LC-QTOF-MS-Laufzeiten (LC (I) 20 min und LC (II) 24 min) lieferten eine sehr gute chromatographische Trennung. Nach Beendigung der LC-QTOF-MS-Messung war noch genügend Zeit für Wasch- und Konditionierungsschritte gegeben. Unter Berücksichtigung einer einmaligen Messung wurde die Messkapazität des LC-QTOF-MS allerdings nur bis zu 65 % (LC (I)) oder 77 % (LC (II)) ausgelastet. Ein wesentlicher Nachteil lag in der Verwendung zweier unterschiedlicher Softwareprogramme. Als diese Studie durchgeführt wurde, war MassHunter noch nicht für die Akquisition von UV-Spektren ausgelegt. So erfolgte die Erstellung der Worklist separat für die ChemStation sowie für die MassHunter Software. Beide Softwareprogramme konnten jedoch zeitgleich vom selben Computer betrieben werden.

### **4.2.2 Substanzidentifizierung in der Datenanalyse**

Für die Substanzidentifizierung der HPLC-DAD-Messungen wurden die UV-Spektren aller Peaks mit den Spektren der UV-Bibliothek von ca. 3300 toxischen Verbindungen verglichen. Die Grundlagen hierfür wurden in der Literatur ausführlich beschrieben [2, 9]. Dabei wurde durch die Software die Übereinstimmung der Spektren berechnet und in der Reihenfolge fallender Ähnlichkeit geordnet. Für die drei ersten

Treffer konnte zusätzlich die Übereinstimmung anhand der überlagerten Spektren visuell beurteilt werden. Darüber hinaus wurden die relativen Retentionszeiten (RRT) als Kriterium für eine Identifizierung herangezogen. Peaks identifizierter Substanzen konnten mit Hilfe von Standardpeakflächen (Integral des resultierenden Peaks einer absolut injizierten Menge von 1 µg des reinen Standards) semiquantitativ ausgewertet werden. Für häufig vorkommende Substanzen wurden dabei vorausbestimmte Extraktionsausbeuten in die Rechnung einbezogen [2, 9]. In anderen Fällen wurde die Quantifizierung mittels Standardadditionsverfahren durchgeführt.

Alle LC-QTOF-MS-Messungen wurden im Auto-MS/MS-Modus durchgeführt. Die in den Datenfiles enthaltenen akkuraten MS- und CID-Spektren wurden, wie in Abschnitt 4.1.5. beschrieben, ausgewertet.

Beide Methoden ließen nur dann eine eindeutige Identifizierung einer Substanz zu, wenn diese in der entsprechenden Bibliothek enthalten war. Darüber hinaus bot das LC-QTOF-MS-Datenfile die Möglichkeit einer Summenformelzuordnung sowie struktureller Informationen aus den CID-Spektren unbekannter Peaks.

### 4.2.3 Fallbeispiele

Anhand von vier Fällen soll die kombinierte Anwendung von HPLC-DAD und LC-QTOF-MS exemplarisch dargestellt werden. Nachfolgend wird eine Übersicht aller 77 analysierten Fälle gegeben.

#### *Fallbeispiel 09/462 - Erstickten unter einer Plastiktüte*

Der 59 Jahre alte Mann sei tot in seinem Zimmer im Gefängnis-Krankenhaus mit einer Plastiktüte über dem Kopf und einem Abschiedsbrief aufgefunden worden. Wie aus der Ermittlungsakte hervorging, habe der Verstorbene an einer psychischen Erkrankung gelitten. Als Medikamente seien Enalapril, Pregabalin, Metformin, Tramadol, Amlodipin und Mirtazapin verordnet gewesen.

In Abbildung 4.17 (a) ist das HPLC-DAD-Chromatogramm des basischen Dichlormethanextraktes aus der Venenblutprobe dargestellt. Es konnten folgende Medikamentenwirkstoffe identifiziert und semiquantitativ über deren Peakflächen bestimmt werden: Mirtazapin 1,2 µg/ml, Tramadol 1,2 µg/ml, Zolpidem 0,1 µg/ml, Amitriptylin 0,7 µg/ml, Nortriptylin 0,4 µg/ml und Trimipramin 0,2 µg/ml. Zusätzlich konnten bei gezielter Suche Zopiclon 0,3 µg/ml, Amlodipin 0,04 µg/ml und Amitriptylin-N-oxid

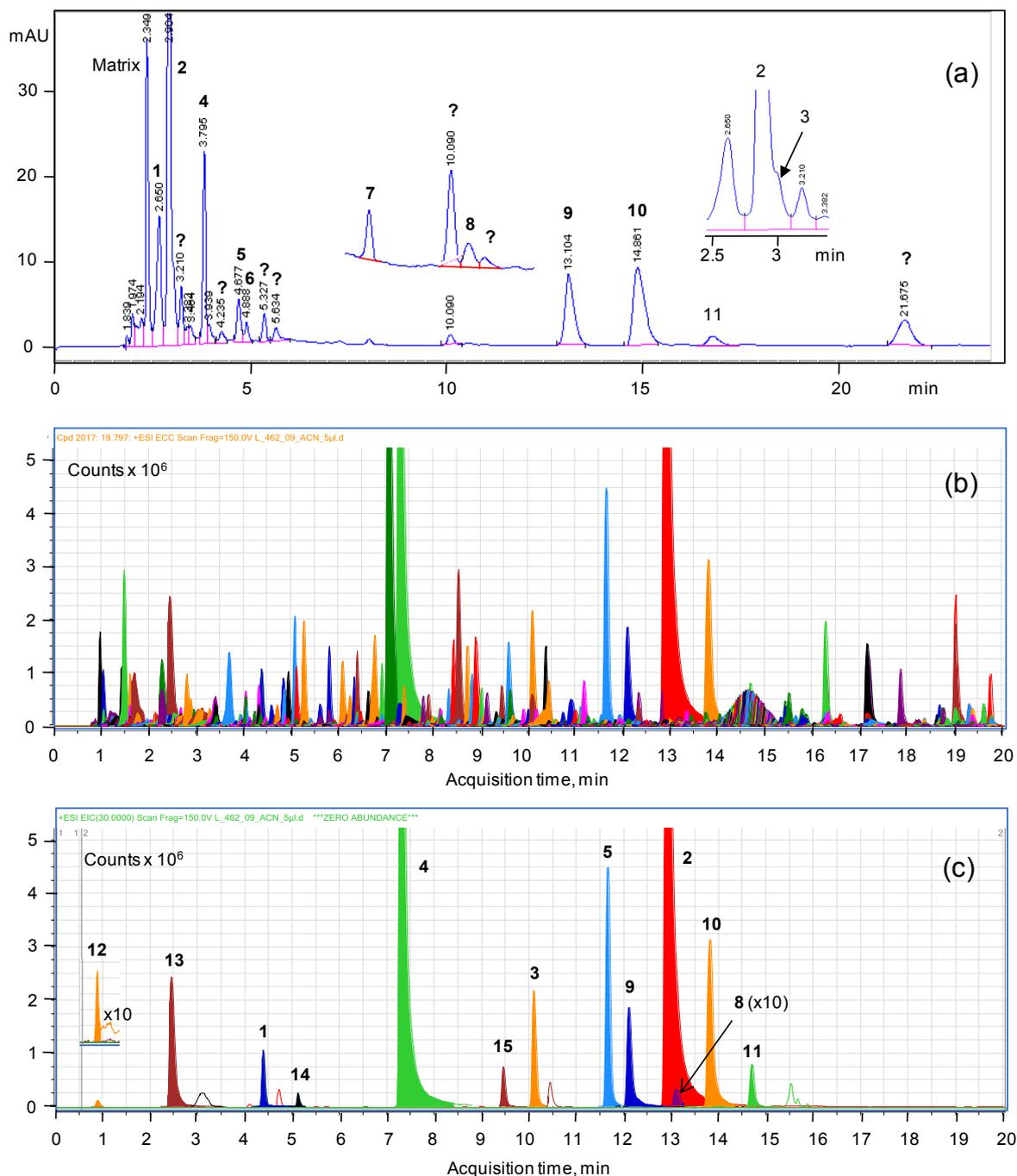
nachgewiesen werden, nachdem diese Substanzen mittels LC-QTOF-MS identifiziert wurden. Dies lag zum einen daran, dass die Peaks sehr klein waren und daher bei der ersten Suche nicht berücksichtigt wurden, oder zum anderen daran, dass sie durch interferierende Peaks gestört waren, wodurch kein sicheres Suchergebnis erhalten wurde.

In Abbildung 4.17 (b) und (c) sind die Chromatogramme der LC-QTOF-MS-Messung der mittels Proteinfällung aufgearbeiteten Proben dargestellt. Die Peaksuche erfolgte über den automatischen Algorithmus „Find Compounds“ und deren Identifizierung mittels Datenbank- und Bibliothekssuche. Von den in Abbildung 4.17 (b) gezeigten 2083 „Verbindungen“ wurden nur 12 über die CID-Spektrenbibliothek identifiziert. Weitere 24 Substanzen wurden über die Datenbank vorgeschlagen. Wobei, wie oben beschrieben, lediglich eine Übereinstimmung der theoretischen Daten vorliegt und Bibliotheksspektren für deren Identifizierung nicht vorhanden waren. Alle mittels HPLC-DAD nachgewiesenen Substanzen konnten durch die LC-QTOF-MS-Messung identifiziert werden. Zusätzlich konnten mittels LC-QTOF-MS Pregabalin und Enalapril identifiziert werden. Beide Medikamentenwirkstoffe waren aus der Vorgeschichte bereits bekannt. Darüber hinaus konnte das verordnete hydrophile Metformin nur im Chromatogramm aus der Proteinfällung nachgewiesen werden.

Der Vergleich zwischen Abbildung 4.17 (b) und (c) zeigt, dass die Mehrheit der intensiven Peaks identifiziert werden konnte. Der große Peak bei 7,1 min konnte weder über die Bibliothek noch über die Datenbank einer Substanz zugeordnet werden. Mit dem Metaboliten-Tool (Algorithmus „Find Metabolites“) wurde N-Demethyltramadol auf Grund der Übereinstimmung der akkuraten Masse und des Isotopenmusters vorgeschlagen. Eine Reihe weiterer kleinerer Peaks konnte nicht identifiziert werden.

Der analytische Befund dieses Falls wurde wie folgt interpretiert: Die Konzentrationen der Wirkstoffe Amitriptylin, Nortriptylin, Mirtazapin und Tramadol lagen im toxischen Bereich. Auf Grund der kombinierten Wirkung sollte eine starke physische und mentale Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit des Betroffenen vorgelegen haben. Diese Beeinflussung kann dazu geführt haben, dass die über den Kopf gezogene Plastiktüte nicht durch natürliche Reflexe beseitigt wurde, was letztendlich zum Tod durch Ersticken führte.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.17:** Fallbeispiel 09/462, Venenblutprobe. (a) HPLC-DAD-Chromatogramm bei 225 nm des basischen Dichlormethanextraktes. (b) LC-QTOF-MS-Chromatogramm des Überstandes der Acetonitril-Proteinfällung nach der Anwendung des Tools „Find Compounds“. (c) EICs der durch Datenbank und Bibliothek identifizierten Substanzen. 1 = Coffein, 2 = Mirtazapin (1,2 µg/ml), 3 = Zopiclon (≈ 0,3 µg/ml), 4 = Tramadol (1,2 µg/ml), 5 = Zolpidem (0,1 µg/ml), 6 = Amitriptylin-N-oxide, 7 = Cresol, 8 = Amlodipin (0,04 µg/ml), 9 = Nortriptylin (0,4 µg/ml), 10 = Amitriptylin (0,7 µg/ml), 11 = Trimipramin (0,2 µg/ml), 12 = Metformin, 13 = Pregabalin, 14 = Enalaprilat, 15 = 10-Hydroxyamitriptylin.

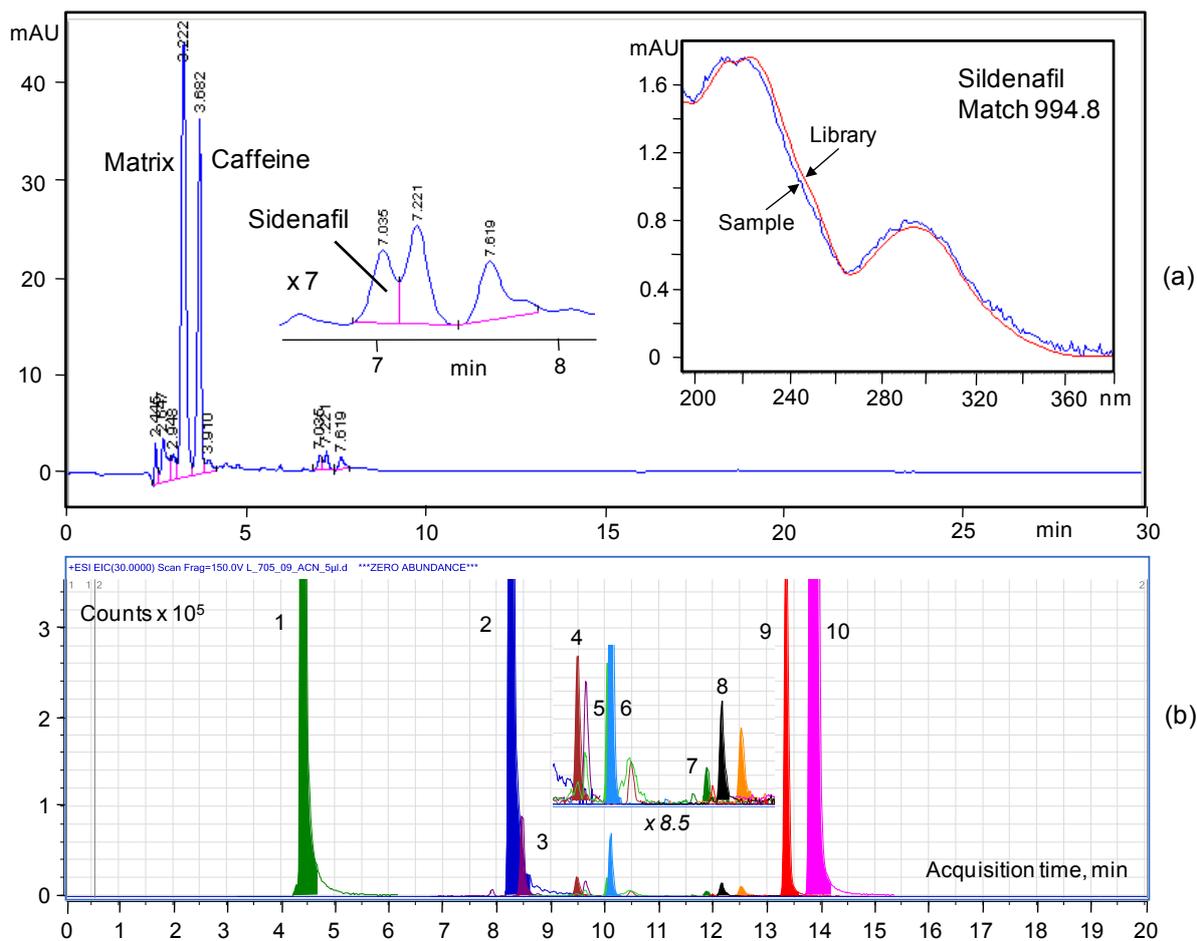
### Fallbeispiel 09/705 - Tod nach Einnahme von Sildenafil

Der 69 Jahre alte Mann sei in Anwesenheit einer Frau in ihrer Wohnung während des Vorspiels zu einvernehmlichen Geschlechtsverkehr verstorben. Kurz zuvor habe er eine 50 mg Tablette Viagra (Sildenafil) eingenommen. Reanimationsmaßnahmen

seien erfolglos verlaufen. Der Betroffene habe an einer Herzkrankheit gelitten und sei 15 Jahre zuvor am Herzen operiert worden. Als Medikamente seien Torasemid (Diuretikum), Valsartan (Angiotensin-Antagonist), Simvastatin (Cholesterin-Synthese-Hemmer) und Acetylsalicylsäure (Thrombozytenaggregationshemmer) verordnet gewesen. Organische Nitrate wie Glyceroltrinitrat oder Pentaerithryltetranitrat seien nicht Bestandteil seiner Medikation gewesen. Aufgrund seines Herzleidens sei ihm von seinem Hausarzt die Verschreibung von Viagra verwehrt gewesen. Entgegen der ärztlichen Einwände sei die Beschaffung auf illegalem Weg erfolgt. Während der Autopsie zeigte sich ein frischer Herzinfarkt mit starker Sklerose der Herzkranzgefäße sowie des Bypasses. Das Herzgewicht überstieg den kritischen Wert um 110 g.

In Abbildung 4.18 (a) ist das HPLC-DAD-Chromatogramm des basischen Dichlormethanextraktes dargestellt. Sildenafil wurde mittels Bibliothekssuche mit einem Match von 994,8 identifiziert. Die semiquantitative Auswertung lieferte eine Konzentration von 75 ng/ml. Neben Coffein wurden keine anderen Wirkstoffe gefunden.

Die Auswertung der LC-QTOF-MS-Messung aus dem Überstand der Eiweißfällung (Abbildung 4.18 (b)) bestätigte ebenfalls, dass eine Einnahme von Sildenafil erfolgt war. Eine gezielte Suche nach Metaboliten des Sildenafil ergab die Anwesenheit des Hauptmetaboliten N-Demethylsildenafil [143] (Peak 7 in Abbildung 4.18). Darüber hinaus wurden die verordneten Medikamentenwirkstoffe Torasemid und Simvastatin sowie Amiodaron, Amitriptylin, Nortriptylin und Doxylamin als weitere Medikamentenwirkstoffe durch eine Bibliothekssuche sowohl im Dichlormethanextrakt als auch im Überstand der Proteinfällung identifiziert. Die Einnahme der genannten Medikamentenwirkstoffe erfolgte wahrscheinlich einige Zeit vor Todeseintritt, da therapeutische Konzentrationen im HPLC-DAD-Chromatogramm nachweisbar gewesen wären. Die Analyse des Mageninhalts mittels HPLC-DAD bestätigte eine kurz vor dem Todeseintritt erfolgte Einnahme von Sildenafil, welches in einer Konzentration von 44 µg/ml vorlag. Obwohl die Konzentration im Blut mit 75 ng/ml im unteren therapeutischen Bereich (50 bis 500 ng/ml) lag, wurde das Ergebnis dahingehend beurteilt, dass die Einnahme von Sildenafil erheblich zum Todeseintritt beigetragen haben kann, da dieser Medikamentenwirkstoff angesichts der Herzerkrankung des Betroffenen stark kontraindiziert war.

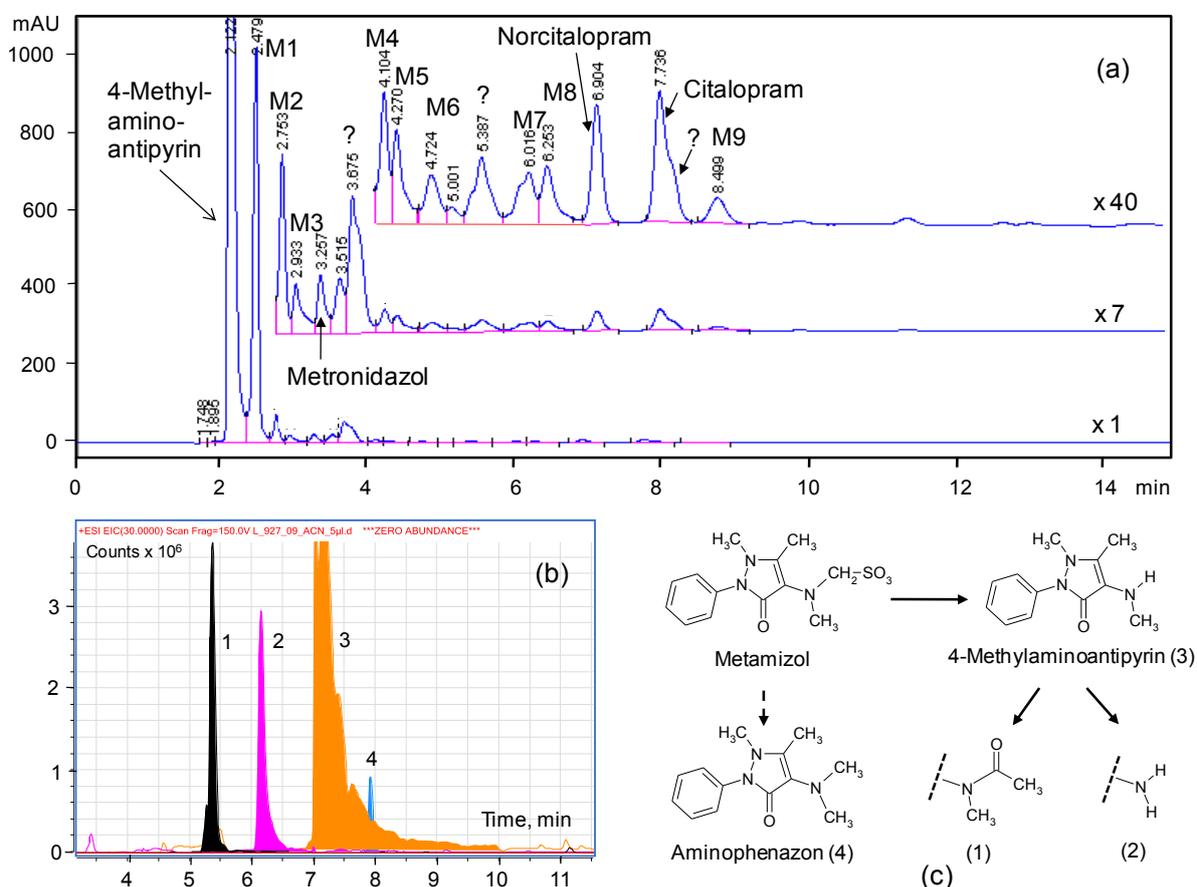


**Abbildung 4.18:** Fallbeispiel 09/705, Venenblutprobe. (a) HPLC-DAD-Chromatogramm bei 225 nm des basischen Dichlormethanextraktes und Ergebnis der Bibliothekssuche für den Peak bei 7,035 min (eingefügtes Proben- und Bibliotheksspektrum). (b) LC-QTOF-MS EICs der mittels Bibliothek identifizierter Substanzen aus dem Überstand der Acetonitril-Proteinfällung. 1 = Coffein, 2 = Doxylamin, 3 = 10-Hydroxynortriptylin, 4 = 10-Hydroxyamitriptylin, 5 = Valsartan, 6 = Torasemid, 7 = Demetylsildenafil, 8 = Nortriptylin, 9 = Sildenafil, 10 = Piperin.

#### Fallbeispiel 09/927 - Tod einer MRSA-Patientin

Die 79-jährige Frau sei in einem Pflegeheim in Gegenwart von zwei Krankenschwestern verstorben. Wie aus den Unterlagen hervorging, sei sie multimorbid gewesen und habe an einer MRSA-Infektion (Methicillin resistente Staphylococcus Aureus) sowie mehrerer Dekubiti 4. Grades gelitten. Da sie die Nahrungs- und Medikamentenaufnahme in den letzten Tagen verweigert habe, sei eine Nasensonde gelegt worden. Unter ihrer Schulter habe sich ein Fentanylpflaster mit einer Dosierung von 37,5 µg/h befunden, welches am Vortag angebracht worden sei. Weitere Medikamente waren im Polizeibericht nicht erfasst. Die Autopsie zeigte, dass eine Lungenentzündung vorlag. Zum Ausschluss einer Vergiftung wurde eine toxikologische Untersuchung angeordnet.

In Abbildung 4.19 (a) ist das HPLC-DAD-Chromatogramm des basischen Dichlormethanextraktes des Venenblutes dargestellt. Neben einer sehr hohen Konzentration des aktiven Metamizol-Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin (135 µg/ml) ließen sich leicht erhöhte Konzentrationen von Citalopram (0,8 µg/ml), Norcitalopram (0,6 ng/ml) und Metoclopramid nachweisen. Die Metamizoleinnahme ließ sich nicht über die Substanz selbst sondern nur über seine Metabolite nachweisen. Dieses ist dadurch bedingt, dass Metamizol als „Prodrug“ im Blut sehr schnell zu dem wirksamen Noramidoantipyrin umgewandelt wird. Die 9 nicht näher identifizierten Metabolite M1 bis M9 wurden anhand ihrer gleichen oder sehr ähnlichen UV-Spektren nachgewiesen. Das diuretische Medikament Torasemid wurde mittels HPLC-DAD nur im Mageninhalt gefunden.



**Abbildung 4.19:** Fallbeispiel 09/927, Venenblutprobe. (a) HPLC-DAD-Chromatogramm bei 225 nm des basischen Dichlormethanextraktes. (b) LC-QTOF-MS EICs von Metamizol-Metaboliten aus dem Überstand der Acetonitril-Proteinfällung. (c) Struktur von Metamizol-Metaboliten. 1 = 4-(N-Acetyl-N-methylamino)-antipyrin, 2 = 4-Aminoantipyrin, 3 = 4-Methylaminoantipyrin und 4 = Aminophenazon (Dimethylaminoantipyrin). Die Ausgangssubstanz Metamizol wurde nicht gefunden.

Die HPLC-DAD Ergebnisse ließen sich qualitativ mittels LC-QTOF-MS aus der Extraktion und der Proteinfällung bestätigen. Darüber hinaus wurden Fentanyl, Norfentanyl und Torasemid identifiziert. Fentanyl (6,7 ng/ml) und Norfentanyl (11,8 ng/ml)

wurden mit Hilfe deuterierter Standards anhand einer vorangegangenen Kalibrierung quantifiziert. Die hohe Konzentration an 4-Methylaminoantipyrin hatte zur Folge, dass die injizierte Menge eine Überladung der Säule bewirkte. In der Proteinfällung wurden die Peaks jedoch gut getrennt. 4-Methylaminoantipyrin sowie seine Metabolite 4-(N-Methyl-N-acetyl)-aminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin und Spuren von Aminophenazon konnten identifiziert werden (Abbildung 4.19 (b) und (c)). Letzteres stammt aus der reduktiven Abspaltung der Sulfonatgruppe des Metamizols. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturangaben zum Metabolismus von Metamizol überein.

Die sehr hohe Konzentration der Metamizol-Metabolite wurde nicht durch eine einmalige Überdosis, sondern hauptsächlich durch eine eingeschränkte Ausscheidung der multimorbiden Patientin bei chronischer Verabreichung verursacht. Es wurde angesichts des Gesamtbildes eingeschätzt, dass dieses nicht wesentlich zur Todesursache beigetragen hat.

### *Fallbeispiel 10/762 - Tod eines Säuglings nach Reanimation*

Der 2 Monate alte Junge sei leblos in ein Krankenhaus mit einer unbekanntem Infektion eingeliefert worden. Reanimationsmaßnahmen seien zunächst erfolgreich verlaufen. Es seien jedoch wiederholt Krämpfe aufgetreten, sodass eine Behandlung mit Midazolam, Morphin, Phenobarbital, Clonazepam, Thiopental, Ampicillin, Cefazolin, Cefotaxim und Tobramycin erfolgt sei. Trotz aller Bemühungen sei er zwei Tage nach der Einlieferung ins Krankenhaus verstorben. Während der Autopsie wurden Hirnschäden, hervorgerufen durch Sauerstoffmangel vor der Reanimation, festgestellt, welche die Todesursache darstellten.

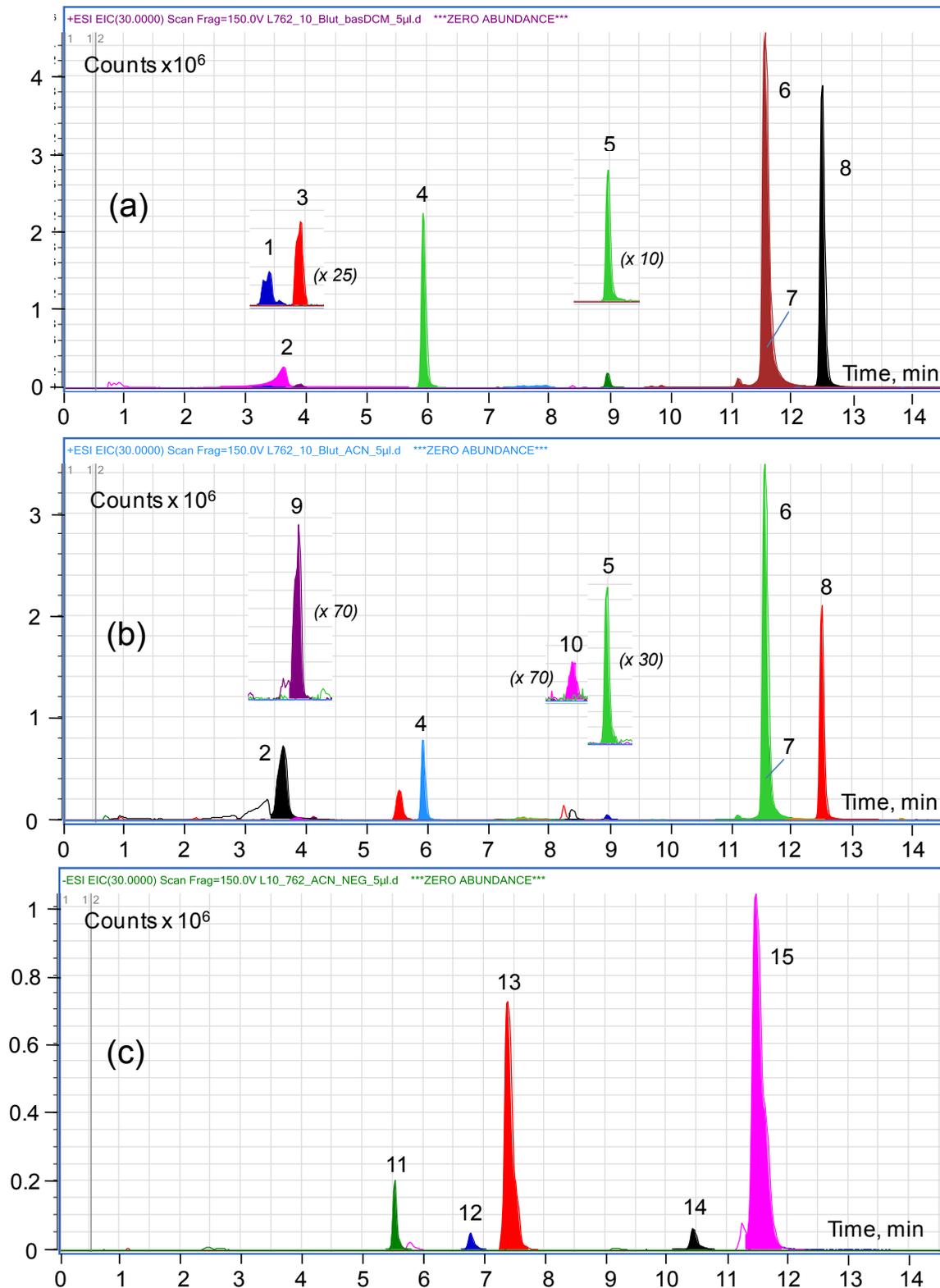
In diesem Fall wurde nur Herzblut asserviert, welches für die Analyse verwendet wurde. Die Ergebnisse sind für alle an diesem Probenmaterial vorgenommenen Untersuchungen in Tabelle 4.9 dargestellt und mit den Angaben aus der Vorgeschichte verglichen. Durch die HPLC-DAD-Messung des Dichlormethanextraktes ließen sich Thiopental und einige seiner Metabolite einschließlich Pentobarbital, Phenobarbital, Midazolam,  $\alpha$ -Hydroxymidazolam, 7-Aminoclonazepam und Lidocain nachweisen. Darüber hinaus ließ sich durch GC-MS-Analyse Morphin identifizieren. Die Konzentrationen lagen alle im therapeutischen Bereich. Durch die HPLC-DAD-Analyse des Überstandes der Eiweißfällung konnten keine weiteren Ergebnisse gewonnen werden. Von den mittels HPLC-DAD identifizierten Substanzen wurden nur Morphin, Midazolam  $\alpha$ -Hydroxymidazolam, 7-Aminoclonazepam und Lidocain mittels LC-

QTOF-MS im positiven ESI-Modus (Abbildung 4.20) identifiziert. Des Weiteren ließen sich einige kleine Peaks als Laudanosin, Cotinin und Coffein über die Bibliothekssuche nachweisen. Die Anwesenheit von Laudanosin kann als Metabolit und Abbauprodukt aus dem Muskelrelaxans Atracurium erklärt werden [144]. Der Nachweis an Lidocain steht nicht in Einklang mit der Anamnese. Die Anwesenheit von Coffein und Cotinin könnte durch das Stillen oder passive Rauchen erklärt werden. Neben diesen Substanzen wurden die Antibiotika Cefazolin und Tobramycin im positiven ESI-Modus aus dem Überstand der Proteinfällung (Abbildung 4.20 (b)) nachgewiesen. Die Verabreichung von Cefotaxim konnte nicht bestätigt werden. Im negativen ESI-Modus wurden in der Eiweißfällung die sauren Wirkstoffe Ampicillin, Thiopental, Pentobarbital, Phenobarbital und Furosemid identifiziert (Abbildung 4.20 (c)).

**Tabelle 4.9:** Detektierte Substanzen im Herzblut des Fallbeispiels 10/762.

Wirkstoff	HPLC-DAD	LC-QTOF-MS			Fallgeschichte
	Bas.CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> µg/ml	Bas.CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Pos. ESI	ACN-Präz. Pos. ESI	ACN-Präz. Neg. ESI	
7-Aminoclonazepam	0,03	+	+	n.d.	+
Ampicillin	n.d.	n.d.	n.d.	+	+
Cefazolin	n.d.	n.d.	+	n.d.	+
Cefotaxim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
Coffein	n.d.	+ (Spuren)	n.d.	n.d.	-
Cotinin	n.d.	+ (Spuren)	n.d.	n.d.	-
Furosemid	n.d.	n.d.	n.d.	+	-
Laudanosin	n.d.	+	+	n.d.	-
Lidocain	pos.	+	+	n.d.	-
3-Hydroxylidocain	n.d.	+	+	n.d.	-
Midazolam	0,02	+	+	n.d.	+
α-Hydroxymidazolam	pos.	+	+	n.d.	+
Morphin	n.d. <sup>1)</sup>	+	+	n.d.	+
Phenobarbital	18,6	n.d.	n.d.	+	+
Thiopental	8,5	n.d.	n.d.	+	+
Pentobarbital	1,6	n.d.	n.d.	+	+
Tobramycin	n.d.	n.d.	+	n.d.	+

<sup>1)</sup> Morphin mit GC-MS 0,12 µg/ml



**Abbildung 4.20:** Fallbeispiel 10/762, Herzblutprobe. EICs identifizierter Substanzen mittels LC-QTOF-MS. (a) Im positiven ESI-Modus gemessener basischer Dichlormethanextrakt. (b) Im positiven ESI-Modus gemessener Überstand der Proteinfällung. (c) Im negativen ESI-Modus gemessener Überstand der Proteinfällung. 1 = Cotinin, 2 = Morphin, 3 = Coffein, 4 = 7-Aminoclonazepam, 5 = Laudanosin, 6 = Lidocain, 7 =  $\alpha$ -Hydroxyimidazolam, 8 = Midazolam, 9 = Cefazolin, 10 = Tobramycin, 11 = Ampicillin, 12 = Furosemid, 13 = Phenobarbital, 14 = Pentobarbital, 15 = Thiopental.

Insgesamt wurde die medizinische Behandlung durch die analytischen Ergebnisse bestätigt. Es wurden keine Anzeichen einer Vergiftung gefunden. In diesem Fall war es wichtig den Dichlormethanextrakt sowie den Überstand der Eiweißfällung im positiven und negativen ESI-Modus zu analysieren, um das gesamte Substanzspektrum zu erfassen. Antibiotika wie Ampicillin, Cefazolin, Cefotaxim oder Tobramycin sind unter diesen Bedingungen nur mit geringer Empfindlichkeit nachweisbar. Unter den verwendeten Routinebedingungen werden von diesen Wirkstoffen neben den protonierten Ionenspezies auch Natrium- und Kalium-Addukte sowie mehrfach geladene Ionen gebildet. Diese Verteilung einer Substanz auf mehrere (detektierbare) Spezies führt zu dem hier aufgetretenen Empfindlichkeitsverlust.

### *Übersicht über die in 77 Todesfällen identifizierten Substanzen*

In Tabelle 4.10 sind alle Substanzen inkl. der Häufigkeit, mit der sie in den 77 postmortalen Blutproben identifiziert wurden, wiedergegeben. Insgesamt wurden 198 verschiedene Substanzen gefunden. Davon wurden 84 mindestens einmal mit jeder der beiden Methoden, 113 nur mittels LC-QTOF-MS und 3 nur mittels HPLC-DAD identifiziert. Die durch beide Methoden identifizierten Wirkstoffe wurden häufig mit einer deutlich höheren Frequenz bei der LC-QTOF-MS-Analyse nachgewiesen. Der Hauptgrund dafür ist die um mindestens eine Größenordnung höhere Empfindlichkeit, obwohl das injizierte Probenvolumen bei der LC-QTOF-MS-Methode mit 5 µl nur ein Zehntel des Injektionsvolumens der HPLC-DAD-Methode betrug. Wie in Tabelle 4.7 gezeigt wird, liegen die Nachweisgrenzen der meisten basischen Drogen bei einer Konzentration von 0,5 bis 5 ng/ml bei der LC-QTOF-MS-Analyse. Bei der HPLC-DAD-Analyse hingegen liegen diese Grenzen mit 30 bis 100 ng/ml deutlich höher [2, 9]. Eine Empfindlichkeitssteigerung wäre bei beiden Methoden durch eine entsprechende Anreicherung der Analyte mittels entsprechender Probenaufreinigung möglich. Es wurden häufig noch Wirkstoffe im sub-therapeutischen Konzentrationsbereich unter Verwendung der Massenspektrometrie nachgewiesen, welche durch die HPLC-DAD-Analyse nicht mehr detektierbar waren. Die Anwendung der LC-MS-Analyse erwies sich besonders wertvoll bei der Identifizierung von Substanzen wie Fentanyl, die bereits in niedrigen Konzentrationen hohes toxisches Potential aufweisen und in diesem Bereich nicht durch die HPLC-DAD-Analyse nachgewiesen werden können.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.10:** Häufigkeit detektierter Substanzen bei der HPLC-DAD- und LC-QTOF-MS-Analyse von Venenbluten von 77 Todesfällen. Metabolite sind nur erfasst, sofern sie in der Bibliothek enthalten waren. Durch das Metaboliten-Tool detektierte Metabolite sind nicht mit inbegriffen.

Substanz	QTOF	DAD	Substanz	QTOF	DAD	Substanz	QTOF	DAD
Lidocain	20	4	Telmisartan	2	2	Cilastatin	1	0
Paracetamol	17	5	Thiopental	2*	2	Cinnamoylcocain	1	0
Morphin	15	0	4-Hydroxymidazolam	2	1	Colchicin	1	0
4-Methylaminoantipyrin	14	14	Clomipramin	2	1	De(hydroxyethyl)-opipramol	1	0
Diazepam	13	6	Diclofenac	2	1	Denatonium	1	0
Carbamazepin	13	4	Dioxopromethazin	2	1	Desloratadin	1	0
Nordiazepam	12	8	Norsertalin	2	1	Demethylpromethazin	1	0
Mirtazapin	11	3	Opipramol	2	1	Digitoxin	1	0
Piperin	11	0	Pipamperon	2	1	Doxylamin	1	0
Saccharin	11	0	Tilidin	2	1	Ecgoninmethylester	1	0
Citalopram	10	9	3-Hydroxybromazepam	2	0	Emeprium	1	0
Midazolam	10	7	3-Hydroxylicocain	2	0	Enalaprilat	1	0
Amitriptylin	10	6	Aminophenazon	2	0	Etomidat	1	0
Nortriptylin	10	6	Biperiden	2	0	Fluconazol	1	0
Trimipramin	10	6	Cafedrin	2	0	Fludiazepam	1	0
Metoprolol	10	3	Clarithromycin	2	0	Flumazenil	1	0
Diphenhydramin	9	4	Clemastin	2	0	Flupentixol	1	0
Clozapin	8	3	Clindamycin	2	0	Fluphenazin	1	0
Codein	8	1	Cocaethylen	2	0	Gabapentin	1	0
Fentanyl	8	0	Cocain	2	0	Hordein	1	0
Methadon	7	5	Desipramin	2	0	Hyoscyamin	1	0
Tramadol	7	2	Demethylnortriptylin	2	0	Hypoxanthin	1	0
Norcitalopram	6	6	Dextromethorphan	2	0	Indapamid	1	0
Doxepin	6	5	Dihydrocodein	2	0	Irbesartan	1	0
Salizylsäure	6*	5	Laudanosin	2	0	Lenacil	1	0
Ciprofloxacin	6	1	Levorphanol	2	0	Levamisol	1	0
Oxazepam	6	0	Norfentanyl	2	0	Memantin	1	0
Quetiapin	5	5	Noscapin	2	0	Metanephrin	1	0
EDDP	5	4	Omeprazolsulfon	2	0	Milrinon	1	0
Furosemid	5*	3	Piritramid	2	0	N-Acetylmethionin	1	0
Phenprocoumon	5	2	Quinidin	2	0	Naloxon	1	0
Atropin	5	1	Ramipril	2	0	N-Butyl-3-(1-naphthoyl)-indol	1	0
Levomepromazin	5	1	Riboflavin	2	0	Norcyclizin	1	0
Norpseudoephedrin	5	0	Tazobactam	2	0	Nortilidin	1	0
Carbamazepin-9,10-epoxid	4	4	Temazepam	2	0	N-Pentyl-3-(1-naphthoyl)-indol	1	0
7-Aminoclonazepam	4	3	THC	2	0	Ondansetron	1	0
Amisulprid	4	3	Demethylidiphenhydramin	1	2	Oxprenolol	1	0
Bromazepam	4	3	Omeprazol	1	2	Paroxetin	1	0
Demethylloxepin	4	3	Desethylamiodaron	1	1	Phenacetin	1	0
Ofloxacin	4	1	Demethylclomipramin	1	1	Piracetam	1	0
Etomidat	4	0	Haloperidol	1	1	Propiverin	1	0
Hydrochlorothiazid	4	0	Ketamin	1	1	Prothipendyl	1	0
Papaverin	4	0	Linezolid	1	1	Pyracarbolid	1	0
Pantoprazol	3	4	Melperon	1	1	Quinin	1	0
Demethyltrimipramin	3	3	Moxifloxacin	1	1	Spironolacton	1	0
Zolpidem	3	3	Norverapamil	1	1	Tetrazepam	1	0
7-Aminoflunitrazepam	3	2	Oxcarbazepin	1	1	Tetryzolin	1	0
Leflunomidmetabolit	3	2	Phenytoin	1	1	Tiaprid	1	0
Lorazepam	3	2	Pregabalin	1	1	Tobramycin	1	0
Metoclopramid	3	2	Primidon	1	1	Trimethoprim	1	0
Torasemid	3	2	Propranolol	1	1	Urapidil	1	0
Amiodaron	3	1	Ranitidin	1	1	Valsartan	1	0
Amlodipin	3	1	Riluzol	1	1	Verapamil	1	0
α-Hydroxymidazolam	3	1	Sertralin	1	1	10-Hydroxyamitriptylin	1	0
6-Acetylmorphin	3	0	Sildenafil	1	1	Zotepin	1	0
Benzoyllecgonin	3	0	Theophyllin	1	1	Diphenylmethoxyessigsäure	0	2
Hydroxymetoprolol	3	0	Verapamil	1	1	Acetaminodantrolen	0	1
Imipramin	3	0	Zopiclon	1	1	10-Hydroxycarbazepin	0	1
Loperamid	3	0	7-Hydroxyquetiapin	1	0			
Nor-7-aminoflunitrazepam	3	0	Allopurinol	1	0			
Phenazon	3	0	Aminorex	1	0			
Tranlycypromin	3	0	Amitriptylinoxid	1	0			
Z-10-Hydroxynortriptylin	3	0	Ampicillin*	1	0			
Ibuprofen	2	4	Benperidol	1	0			
Demethylclozapin	2	3	Benzydamin	1	0			
Methylprednisolon	2	2	Bisnorcitalopram	1	0			
Pentobarbital	2*	2	Bromazin	1	0			
Phenobarbital	2*	2	Cathinon	1	0			
Promethazin	2	2	Cefazolin	1	0			

\* Detektion nur im negativ ESI-Modus

Weitere Gründe für die geringere Frequenz, mit der Substanzen durch die HPLC-DAD-Messung nachgewiesen wurden, sind u. a. die geringere Ausbeute bei der Dichlormethanextraktion und die kurze chromatographische Retentionszeit von hydrophilen Substanzen wie z. B. Morphin. Durch die verwendeten isokratischen Bedingungen, unter denen die UV-Spektrenbibliothek aufgebaut wurde, den dabei eingesetzten hohen organischen Laufmittelanteil und den niedrigen pH-Wert sind in den ersten Minuten der Chromatographie die UV-Spektren häufig durch überlappende Peaks und Matrix-Absorption gestört. Besonders bei der Messung des Überstandes der Proteinfällung machen sich diese Effekte stark bemerkbar. Dies ist nur von untergeordneter Bedeutung bei der LC-QTOF-MS-Messung, da eine zusätzliche effiziente Trennung durch den Massenanalysator und die Gradientenelution gegeben ist. Schließlich können Substanzen ohne UV-Absorption oberhalb von 195 nm nicht durch HPLC-DAD-Analysen nachgewiesen werden. Dies trifft für 6 der in Tabelle 4.10 gelisteten Substanzen zu (Acetylmethionin, Clarithromycin, Clindamycin, Ecgoninmethylester, Gabapentin und Tobramycin).

Unter ausschließlicher Verwendung des positiven ESI-Modus wurden einige wichtige Substanzen wie Furosemid, Ibuprofen, Pentobarbital, Phenobarbital, Salizylsäure, 11-Nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure (THC-COOH) oder Thiopental nicht gefunden. Auf Grund des sauren Charakters dieser Substanzen bilden sie bevorzugt Anionen, welche sich in einer separaten Analyse im negativen ESI-Modus nachweisen ließen. Diese zusätzliche Analyse wurde nur zur Bestätigung von zuvor erhaltenen HPLC-DAD-Ergebnissen durchgeführt. Allerdings konnte THC-COOH auch unter diesen Bedingungen nicht mit ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Der Grund liegt hierbei in der nicht ausreichenden Massenauflösung und darin, dass THC-COOH einen ähnlichen Massendefekt wie viele Matrixsubstanzen wie zum Beispiel Fettsäuren und Steroide besitzt, wodurch keine hinreichende massenspektrometrische Trennung von koeluiierenden Matrixkomponenten erfolgt.

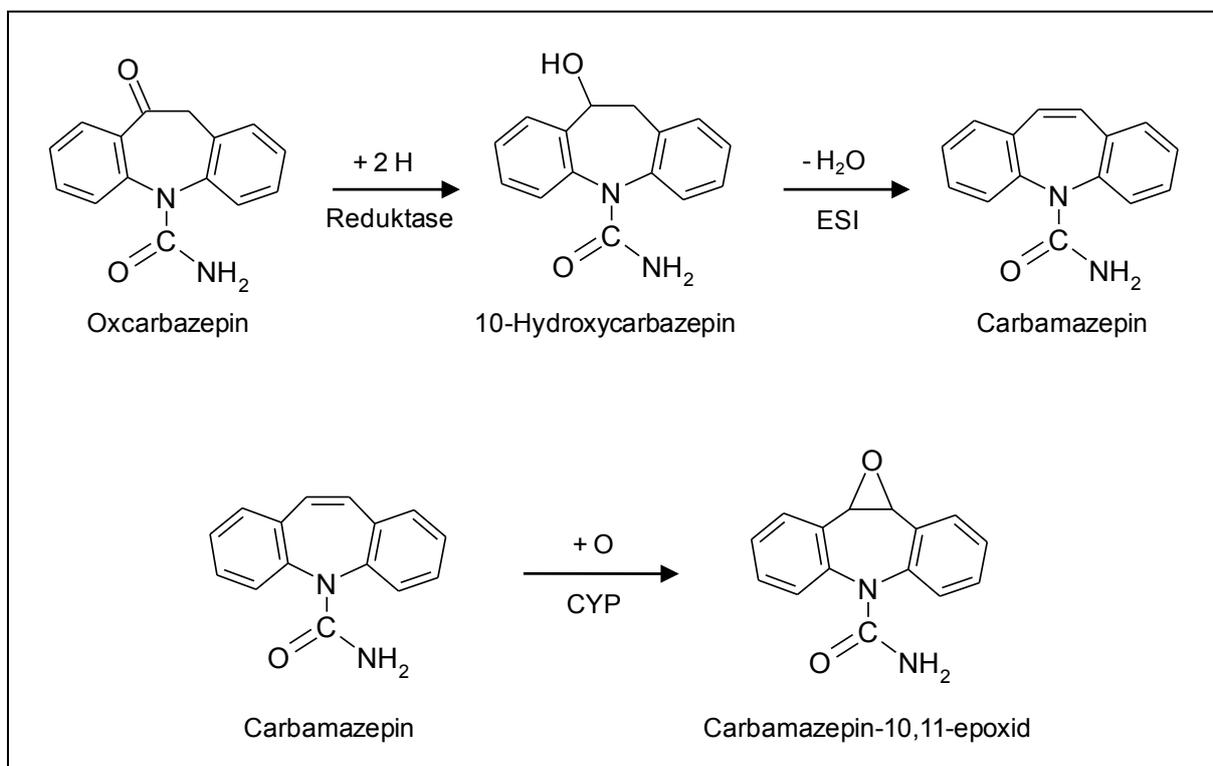
Im Folgenden soll auf einige der in Tabelle 4.10 erwähnten Wirkstoffe näher eingegangen werden.

Als häufigste Substanz wurde Lidocain gefunden. Dies resultiert aus der Tatsache, dass ein erheblicher Anteil der untersuchten Blutproben von Personen stammte, die während Wiederbelebungsversuchen oder auf der Intensivstation von Krankenhäusern verstorben sind und im Zuge der Behandlung Lidocain als Antiarrhythmikum

erhalten haben. In zwei Fällen handelte es sich um Drogentote, die sich bei der intravenösen Applikation von Drogen Lidocain als Streckmittel mit verabreicht hatten.

Das Antiepileptikum Carbamazepin und sein primärer Metabolit Carbamazepin-10,11-epoxid werden mittels HPLC-DAD-Analyse auch empfindlich unterhalb des therapeutischen Bereichs identifiziert. Die höhere Häufigkeit, mit der diese Substanzen durch LC-QTOF-MS-Analyse nachgewiesen wurden, erklärt sich durch die höhere Empfindlichkeit des Messinstruments. Dadurch wurden auch noch Fälle, bei denen die letzte Einnahme mehrere Tage vor Todeseintritt erfolgt war, erfasst.

Allerdings gab es bei der Einnahme von Oxcarbazepin falsch positive Ergebnisse durch die Detektion von Carbamazepin bei der LC-QTOF-MS-Messung. Oxcarbazepin wird rasch zum aktiven Metabolit 10-Hydroxycarbazepin (Abbildung 4.21) hydriert. Während der LC-QTOF-MS-Analyse erfolgt in der Ionenquelle zu einem hohen Anteil die Eliminierung von Wasser unter Bildung von Carbamazepin. Oxcarbazepin und Carbamazepin-10,11-epoxid sind Isomere, welche sich jedoch in ihren CID-Spektren und Retentionszeiten unterscheiden. Das Fehlen von Carbamazepin-10,11-epoxid kann als Hinweis dafür verwendet werden, dass Carbamazepin aus dem Oxcarbazepin stammt.



**Abbildung 4.21:** Bildung von Carbamazepin in der Ionenquelle bei der LC-QTOF-MS-Analyse nach Einnahme von Oxcarbazepin.

Metamizol ist trotz seiner bekannten Nebenwirkungen von Agranulozytose und der Gefahr von anaphylaktischen Reaktionen in Deutschland immer noch eines der am häufigsten verabreichten Analgetika. Als Prodrug ist es selbst nicht wirksam, sondern erst in Form seines rasch gebildeten aktiven Metaboliten Noramidoantipyrin. Dieser wird in weiteren Biotransformationen demethyliert und acetyliert [145]. Ein typisches Beispiel wurde im Fall 09/927 ausführlich beschrieben.

Paracetamol kann generell durch HPLC-DAD-Messung des Überstandes der Proteinfällung nachgewiesen werden. Hierbei werden sogar Konzentrationen im subtherapeutischen oberhalb von 0,2 µg/ml bestimmt. Spuren unterhalb dieser Konzentration wurden in 11 von 15 Fällen nur mittels LC-QTOF-MS gefunden.

### **4.3 Systematische Toxikologische Analyse in Haaren [146]**

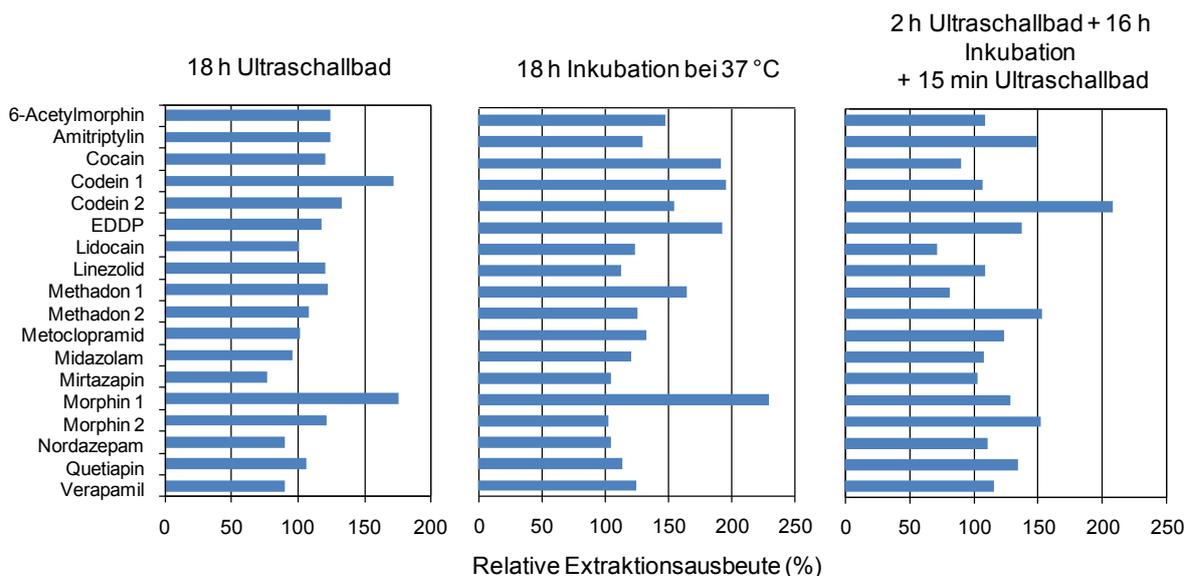
#### **4.3.1 Optimierung der Probenvorbereitung**

Das für die Systematische Toxikologische Analyse von Haaren verwendete Extraktionsverfahren sollte möglichst alle toxikologisch relevanten Substanzen erfassen. Daher sollte es so beschaffen sein, dass basische, neutrale und saure Substanzen mit hydrophilen sowie lipophilen Eigenschaften in einer hohen Extraktionsausbeute und ohne hydrolytische Zersetzung extrahiert werden. Im Abschnitt 2.4. wurden häufig verwendete Extraktionsverfahren vorgestellt. Für die STA kämen jedoch als universelle Extraktionsmittel nur Methanol oder Mischlösungsmittel mit wässrigem Puffer und organischem Lösungsmittel in Frage.

Um zu überprüfen, welche Bedingungen am geeignetsten sind, wurde ein Vergleich der Extraktion mit Methanol und mit Methanol / Acetonitril / 2mM Ammoniumformiat (25/25/50, v:v:v) für 5 Haarproben, die insgesamt 17 Wirkstoffe oder deren Metabolite (2x 6-Acetylmorphin, Amitriptylin, Benzoylcegonin, Cocain, 2x Codein, 2x EDDP, Hydrocortison, Lidocain, Linezolid, 2x Methadon, Metoclopramid, Midazolam, Mirtazapin, 2x Morphin, Nordiazepam, Quetiapin und Verapamil) enthielten, durchgeführt. Ein Aliquot von 20 mg jeder Haarprobe wurde mit 1 ml dieser Lösungsmittel unter drei verschiedenen Bedingungen extrahiert:

- (1) 18 h Ultraschallbad bei ca. 25 °C,
- (2) 18 h Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln oder Rühren und
- (3) 2 h Ultraschallbad + 16 h Inkubation bei 37 °C + 15 min Ultraschallbad.

Zur Kompensation instrumenteller Variationen wurde eine Mischung von 10 deuterierten Standards (7-Aminoflunitrazepam-D7, Amphetamin-D5, Benzoyllecgonin-D3, Codein-D3, Diazepam-D5, EDDP-D3, MDEA-D6, Methamphetamin-D5, Morphin-D3 und THC-D3) in einer Konzentration von jeweils 1 ng/mg vor der Extraktion der Probe hinzugesetzt. Nach Zentrifugation wurden 5 µl der Extraktionslösung für die LC-QTOF-MS-Analyse injiziert. In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse für die unterschiedlichen Extraktionsbedingungen dargestellt.

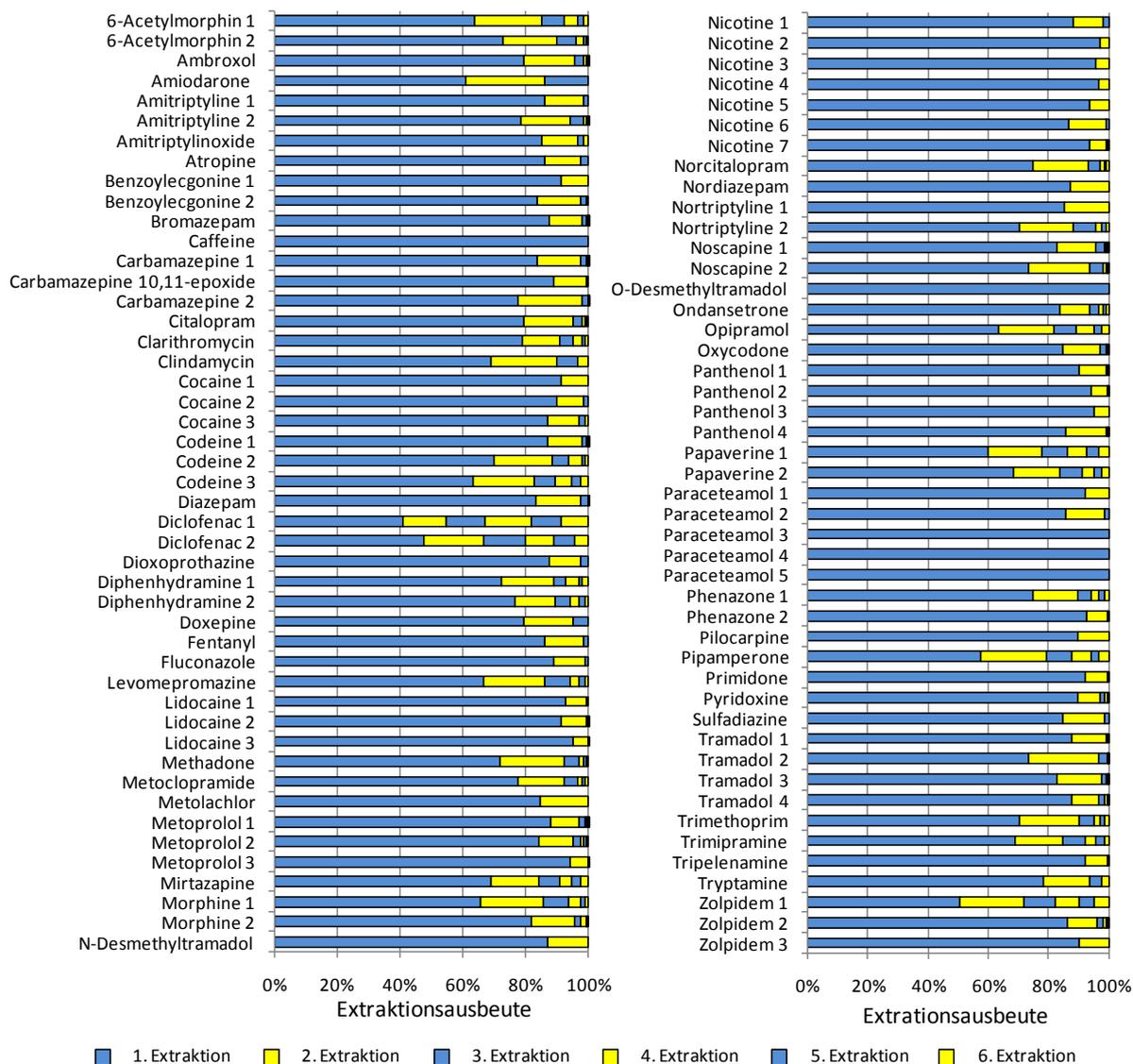


**Abbildung 4.22:** Vergleich der Extraktionsausbeuten zwischen den Extraktionsmitteln Methanol (100 %) und Methanol / Acetonitril / 2mM Ammoniumformiat (25/25/50, v:v:v) bei Verwendung eines Ultraschallbads, der Inkubation bei 37 °C und der Kombination von Ultraschallbad und Inkubation bei 37 °C.

Wie aus der Graphik zu entnehmen ist, waren die Extraktionsausbeuten im Allgemeinen beim Lösungsmittelgemisch besser als bei der methanolischen Extraktion. Eine Kombination von Ultraschallbad und Inkubation bei 37 °C zeigte keinen Vorteil gegenüber der reinen Inkubation. Alle weiteren Optimierungen wurden mit dem Lösungsmittelgemisch durchgeführt. Durch Verwendung eines Schüttlers während der Inkubation konnte die Extraktionsausbeute um 5 bis 10 % erhöht werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 60 und 80 °C zeigte keine signifikante Steigerung der Extraktionsausbeute. Unter diesen Bedingungen wurde weder eine Zersetzung der zugesetzten deuterierten Standards noch eine Instabilität der in den Haaren befindlichen Drogen beobachtet. Um die eventuelle Zersetzung anderer, nicht untersuchter Analyte zu vermeiden, wurde die Temperatur von 37 °C als Standardtemperatur beibehalten.

## Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung der Vollständigkeit der Extraktion wurden 17 Haarproben mit insgesamt 59 unterschiedlichen Wirkstoffen oder deren Metaboliten nacheinander sechs Mal mit 1 ml des Lösungsmittelgemisches für je 18 h inkubiert. Alle Extrakte wurden getrennt gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 wiedergegeben. Einige Substanzen wie Paracetamol, Cocain, Tramadol oder Zolpidem waren in mehreren Haarproben vorhanden und erscheinen deshalb mehrmals in der Abbildung 4.23.



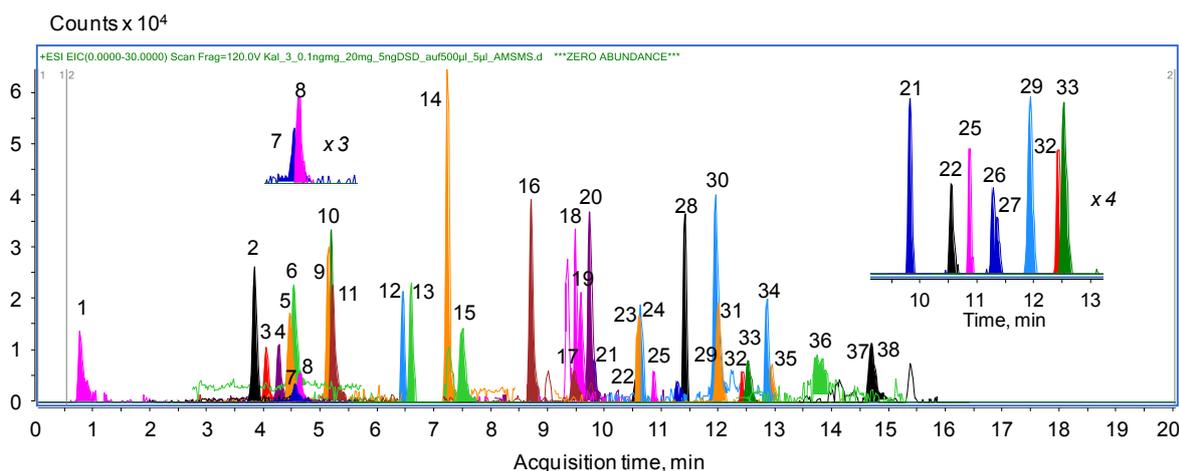
**Abbildung 4.23:** Extraktionsausbeuten von 59 Medikamentenwirkstoffen oder deren Metaboliten aus 17 postmortalen Haarproben bei sechs aufeinanderfolgenden Inkubationen für 18 h mit Methanol / Acetonitril / 2mM Ammoniumformiat (25/25/50, v.v.v). Die Gesamtmenge der sechs Extraktionsschritte wurde auf 100 % normiert.

Fast alle Substanzen wurden nach der ersten Inkubation mit einem Anteil von 60 bis 95 % der Gesamtmenge aller sechs Extraktionsschritte extrahiert. Bis auf wenige Ausnahmefälle wurde mit einer zweimaligen Extraktion ein Anteil von mehr als 90 %

extrahiert. Einige Substanzen wie Coffein, Lidocain, Nikotin oder Paracetamol wurden bereits nach der ersten oder zweiten Extraktion vollständig vom Haar in die Messlösung überführt. Dahingegen war die Extraktion von Diclofenac noch nach der sechsten Wiederholung unvollständig. Wirkstoffe wie Codein, Morphin oder Zolpidem, die bei mehr als einer Haarprobe auftraten, zeigten, dass die Extraktionsausbeute auch stark von der individuellen Haarprobe abhängt. Die aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse ergaben, dass eine zweimalige Inkubation von jeweils 18 Stunden für die meisten Wirkstoffe eine ausreichende Extraktionsausbeute für eine qualitative sowie quantitative Auswertung lieferte.

### **4.3.2 Methodvalidierung für ausgewählte Wirkstoffe**

Obwohl der Fokus der Systematischen Toxikologischen Analyse in erster Linie auf die Identifizierung von Substanzen gerichtet ist, ist es dennoch nötig die Empfindlichkeit, mit der diese Identifizierung möglich ist, zu kennen. Aus diesem Grund wurde eine Kalibrierung sowie vollständige Validierung der Methode für 24 Wirkstoffe mit Missbrauchspotential oder deren Metabolite, die regelmäßig im Rahmen der Fahreignungsprüfung im Labor quantitativ im Haar untersucht werden, durchgeführt (siehe Tabelle 4.11). Hierfür wurden je 20 mg dekontaminiertes drogenfreies Haar mit deuterierten internen Standards (0,25 ng/mg) versehen und mit den Analyten auf eine Konzentration von 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,5 ng/mg eingestellt. Zum Vergleich wurden 14 weitere, häufig verordnete Medikamentenwirkstoffe mitgemessen, die jedoch nicht in die Validierung einbezogen wurden. Die Messung jedes Kalibrierlevels erfolgte in einer sechsfachen Wiederholung. Als Beispiel sind die extrahierten Ionenchromatogramme einer mit diesen 38 Substanzen auf eine Konzentration von 0,1 ng/mg dotierten und im Auto-MS/MS-Modus analysierten Haarprobe in Abbildung 4.24 gezeigt.



**Abbildung 4.24:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Auto-MS/MS-Analyse einer dotierten Haarprobe. Folgende Substanzen wurden bei einer Konzentration von 0,1 ng/mg detektiert: 1 = Methylecgonin, 2 = Morphin, 3 = Amphetamin, 4 = MDA, 5 = Methamphetamin, 6 = MDMA, 7 = Hydromorphon, 8 = Clonidin, 9 = Dihydrocodein, 10 = Benzoylcgonin, 11 = MDEA, 12 = 6-Acetylmorphin, 13 = Codein, 14 = 7-Aminoflunitrazepam, 15 = Tramadol, 16 = Cocain, 17 = Nortilidin, 18 = EDDP, 19 = Acetylcodein, 20 = Cocaethylen, 21 = Bromazepam, 22 = Flunitrazepam, 23 = Citalopram, 24 = Carbamazepin, 25 =  $\alpha$ -Hydroxyalprazolam, 26 = Oxazepam ( $\text{Na}^+$ -Addukt), 27 = Lorazepam ( $\text{Na}^+$ -Addukt), 28 = Alprazolam, 29 = Triazolam, 30 = Methadon, 31 = Zolpidem, 32 = Nordiazepam, 33 = Haloperidol, 34 = Diazepam, 35 = Tilidin, 36 = Imipramin, 37 = Amitriptylin, 38 = Clozapin.

Auf Grund der höheren Empfindlichkeit des MS-Modus gegenüber dem MS/MS-Modus erfolgte die Quantifizierung über die extrahierten Ionenchromatogramme der MS-Spektren. Für die Quantifizierung wurde diesbezüglich auf die Akquisition von CID-Spektren verzichtet und ausschließlich im MS-Modus gemessen. Da die Akquisitionszeit der MS-Spektren im MS-Modus (1,0 s) drei bis vier Mal höher ist als im Auto-MS/MS-Modus (0,33 bzw. 0,25 s), muss dies bei der Übertragung der Ergebnisse auf den Auto-MS/MS-Modus berücksichtigt werden. Je nachdem wie die Anzahl der Vorläuferionen und deren Akquisitionszeit während eines Zyklus gewählt werden, teilt sich ein Zyklus in ein MS-Experiment mit konstanter Akquisitionszeit sowie in MS/MS-Experimente mit variabler Akquisitionszeit auf. Die Gesamtzyklenzeit von 1,0 bzw. 1,1 s wird somit auf verschiedene Experimente verteilt und nicht wie im MS-Modus nur auf ein Experiment konzentriert. Zwischen beiden Modi kann eine Umrechnung der Nachweisgrenzen erfolgen. Dabei müssen die im MS-Modus erhaltenen Grenzen (Frequenz 1 Hz, MS-Experiment) mit der MS-Akquisitionsfrequenz (3 bzw. 4 Hz, MS-Experiment) des Auto-MS/MS-Modus multipliziert werden, um die entsprechenden Grenzen im Auto-MS/MS-Modus zu erhalten. Anhand einiger ausgewählter Peakflächen wurde diese Annahme experimentell überprüft und verifiziert.

**Tabelle 4.11:** Validierung der Haaranalyse mittels LC-QTOF-MS für 24 ausgewählte Analyte.

Analyt Interner Standard	[M+H] <sup>+</sup> oder [M+Na] <sup>+</sup> m/z	RT min	MS (Auto-MS/MS)		R <sup>2</sup> Typ Wich- tung	Richtigkeit, %		Präzision Intraday, %		Präzision Interday, %		Matrixeffekt <sup>2</sup> , % Standard- Abweichung, %	
			LOD <sup>1</sup> pg/mg	LOQ <sup>1</sup> pg/mg		0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg
6-Acetylmorphin 6-Acetylmorphin-D3	328,1543	6,28	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear 1/x	100	102	2,98	0,54	4,93	5,19	-11,46 4,75	-21,8 6,76
7-Aminoflunitrazepam 7-Aminoflunitrazepam-D7	284,1194	7,03	5 (15)	6 (18)	0,998 Linear 1/x	91	91	3,08	0,90	4,42	1,01	-16,8 5,49	-20,23 7,14
Acetylcodein Cocaethylen-D3	342,1700	9,46	1 (3)	3 (9)	0,998 Linear 1/x	98	98	2,93	1,17	3,89	1,79	-4,52 8,52	-24,34 11,48
Alprazolam Alprazolam-D5	309,0902	11,17	5 (15)	7 (21)	0,999 Linear 1/x	92	95	4,01	0,71	4,10	2,19	-27,43 17,22	-32,8 10,59
Amphetamin Amphetamin-D5	136,1121	3,81	2 (4)	2 (4)	0,999 Linear 1/x	88	96	1,79	0,19	1,86	2,37	-11,78 9,23	-23,05 8,50
Benzoylcegonin Benzoylcegonin-D3	290,1387	4,94	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear keine	99	96	1,92	1,47	3,20	2,26	-0,71 9,11	-15,96 4,80
Bromazepam α-Hydroxyalprazolam-D5	316,0080	9,57	2 (6)	4 (12)	0,998 Linear 1/x	98	93	1,38	3,41	8,50	4,62	-35,34 20,04	-37,6 15,12
Cocaethylen Cocaethylen-D3	318,1700	9,67	1 (3)	2 (9)	0,996 Linear 1/x	96	96	1,87	0,88	4,57	1,53	+4,25 2,41	-13,54 4,41

Fortsetzung Tabelle 4.11: Validierung der Haaranalyse mittels LC-QTOF-MS für 24 ausgewählte Analyte.

Analyt Interner Standard	[M+H] <sup>+</sup> oder [M+Na] <sup>+</sup> m/z	RT min	MS (Auto-MS/MS)		R <sup>2</sup> Typ Wich- tung	Richtigkeit, %		Präzision Intraday, %		Präzision Interday, %		Matrixeffekt <sup>2</sup> , % Standard- Abweichung, %	
			LOD <sup>1</sup> pg/mg	LOQ <sup>1</sup> pg/mg		0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg
Cocain Cocain-D3	304,1543	8,62	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear 1/x	97	102	1,38	0,37	8,15	3,40	+0,09 10,29	-13,22 4,10
Codein Codein-D3	300,1594	6,39	1 (3)	3 (9)	0,997 Linear 1/x	88	93	2,32	0,96	2,80	6,49	-7,57 10,42	-23,63 7,82
Diazepam Diazepam-D5	285,0789	12,61	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear keine	95	99	1,62	1,47	1,89	1,74	-41,13 11,51	-44,44 10,08
Dihydrocodein Dihydrocodein-D6	302,1751	5,04	1 (3)	3 (9)	0,997 Linear 1/x	93	101	2,44	0,63	4,94	5,06	+2,10 3,72	-12,41 3,49
EDDP EDDP-D3	278,1903	9,21	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear 1/x	100	99	1,81	0,64	2,03	1,11	+0,99 12,82	-9,74 2,79
Flunitrazepam α-Hydroxyalprazolam-D5	314,0935	10,30	4 (12)	6 (18)	0,997 Linear 1/x	96	92	4,41	2,67	5,52	4,09	-35,67 11,69	-33,94 11,43
Lorazepam Lorazepam-D4	343,0012 <sup>3</sup>	11,05	4 (12)	5 (15)	0,996 Linear 1/x	98	95	6,98	5,69	6,78	6,30	-56,47 16,92	-55,62 17,44
MDA MDA-D5	180,1019	4,03	2 (6)	3 (9)	0,999 Linear 1/x	92	93	2,76	1,23	5,76	2,63	-1,09 8,17	-25,93 8,36

Fortsetzung Tabelle 4.11: Validierung der Haaranalyse mittels LC-QTOF-MS für 24 ausgewählte Analyte.

Analyt Interner Standard	[M+H] <sup>+</sup> oder [M+Na] <sup>+</sup> m/z	RT min	MS (Auto-MS/MS)		R <sup>2</sup> Typ Wich- tung	Richtigkeit, %		Präzision Intraday, %		Präzision Interday, %		Matrixeffekt <sup>2</sup> , % Standard- Abweichung, %	
			LOD <sup>1</sup> pg/mg	LOQ <sup>1</sup> pg/mg		0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg	0,05 ng/mg	1,0 ng/mg
MDEA MDEA-D6	208,1332	5,00	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear keine	97	96	3,32	1,60	5,52	1,86	-0,16 5,51	-12,87 4,48
MDMA MDMA-D5	194,1176	4,30	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear keine	101	95	3,70	1,30	7,76	1,03	+6,88 16,74	-11,9 3,23
Methadon Methadon-D9	310,2165	11,65	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear 1/x	101	98	1,86	0,51	2,72	0,97	-5,28 3,27	-11,66 3,31
Methamphetamin Methamphetamin-D5	150,1278	4,28	3 (9)	3 (9)	0,999 Linear keine	93	100	1,95	0,68	2,09	1,45	+0,60 6,72	-13,78 3,75
Methylecgonin Methylecgonin-D3	200,1281	0,80	1 (3)	3 (9)	0,999 Linear keine	93	97	2,98	1,11	3,59	3,05	-24,95 5,62	-24,18 13,23
Morphin Morphin-D3	286,1438	3,63	1 (3)	3 (9)	0,998 Linear 1/x	98	99	0,33	0,62	1,04	1,42	-12,1 5,51	-20,36 6,40
Nordiazepam Nordiazepam-D5	271,0633	12,12	2 (6)	4 (12)	0,999 Linear keine	92	96	2,79	1,83	4,00	2,66	-49,2 15,13	-51,4 13,09
Oxazepam Oxazepam-D5	309,0401 <sup>4</sup>	10,91	1 (3)	3 (9)	0,997 Linear 1/x	94	98	3,14	2,65	3,34	8,05	-57,64 21,71	-55,48 19,85

<sup>1</sup> LOD und LOQ im MS-Modus bestimmt. Diese liegen um den Faktor 3 höher im Auto-MS/MS-Modus (Werte in Klammern). <sup>2</sup> Matrixeffekt (%) berechnet als (Peakfläche in Anwesenheit von Matrix / Peakfläche in Abwesenheit von Matrix - 1) x 100. <sup>3</sup> M+2 Isotopenpeak, Na<sup>+</sup> Addukt. <sup>4</sup> Na<sup>+</sup> Addukt.

Die quantitative Auswertung erfolgte über die extrahierten Ionenchromatogramme der monoisotopischen  $[M+H]^+$ -Ionen (bzw. für Lorazepam und Oxazepam  $[M+Na]^+$ -Ionen) der Analyte und der internen Standards. Die Wahl der Massenfenster der EICs jeder Substanz erfolgte zwischen 30 und 60 ppm in Abhängigkeit des chemischen Rauschpegels und einer evtl. gegebenen Matrixbeeinflussung. Zur Berechnung der Kalibrierfunktion sowie weiterer Validierungsparameter wurden die Peakflächenverhältnisse der Analyte und deuterierten Standards verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 dargestellt.

Sämtliche Kalibrierungen erfolgten über eine lineare Regression ( $R^2 = 0,996$  bis  $0,999$ ) und waren in einigen Fällen gewichtet ( $1/x$ ). Anhand von zwei Qualitätskontrollproben mit einer Konzentration von  $0,05$  und  $1,0$  ng/mg wurden alle weiteren Parameter für die Validierung ermittelt. Die Richtigkeit beider QC-Proben lag für alle Substanzen zwischen  $88$  bis  $102$  %. Diese Ergebnisse genügen den Richtlinien der GTFCh [137, 138], die eine Abweichung von bis zu  $\pm 30$  % (an der Bestimmungsgrenze sogar  $\pm 40$  %) als zulässig betrachten. Die Intraday- und Interday-Präzision beider QC-Proben lieferte Werte zwischen  $0,2$  und  $8,5$  %, was konform mit den Richtlinien einhergeht.

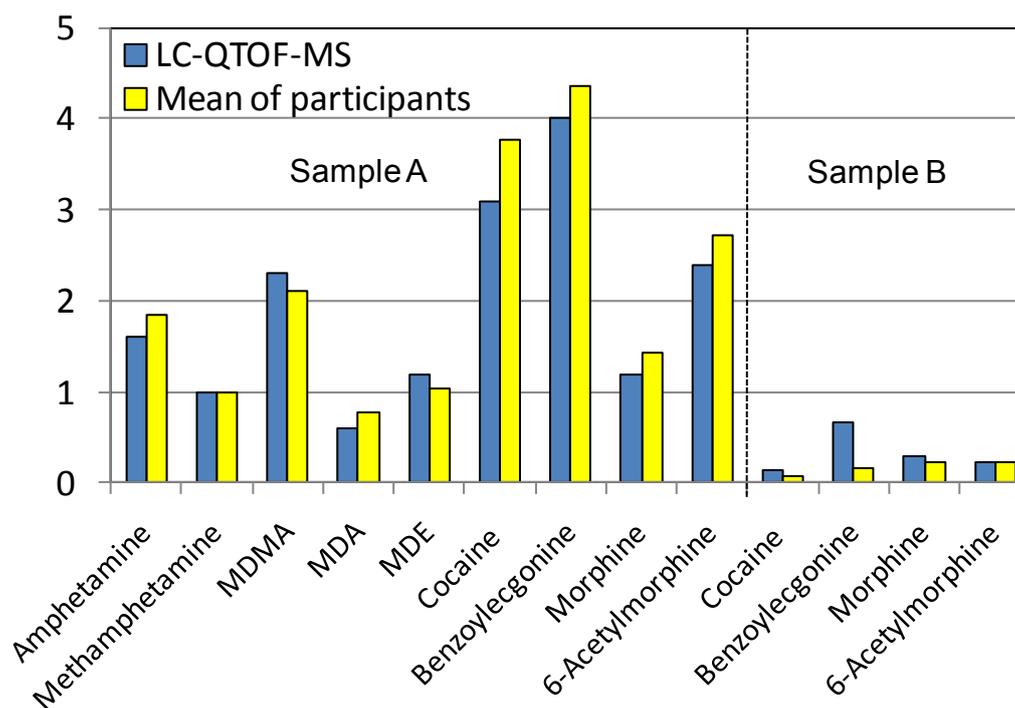
Eine Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LODs und LOQs) aus dem Signal-Rausch-Verhältnis war nicht möglich, da die EICs mit einem Massenfenster von bis zu  $60$  ppm im Allgemeinen kein chemisches Rauschen lieferten und da bei der Datenakquisition ein Schwellenwert von  $200$  Counts verwendet wurde, bis zum dem keine Daten aufgezeichnet und somit das elektronische Rauschen ausgeblendet war. Auf Grund dieser beiden Vorgaben war die Anwesenheit von Rauschen in den EICs nicht gegeben. Daher wurden LODs und LOQs aus separaten Kalibrierkurven nahe der Nachweisgrenze ( $1$  bis  $10$  pg/mg in äquidistanten  $1$  pg/mg Schritten) über die Streuung der Messwerte (DIN 32645) ermittelt. In Tabelle 4.11 sind die Nachweisgrenzen für den empfindlichsten Modus (MS-Modus mit einer Frequenz von  $1$  Hz) wiedergegeben. Wie bereits erläutert muss für den weniger empfindlichen Auto-MS/MS-Modus ein Faktor von  $3$  bzw.  $4$  (im Allgemeinen die Messfrequenz des MS-Experiments im Auto-MS/MS-Modus) zur Ermittlung dieser Grenzen berücksichtigt werden. Auch unter Anwendung des weniger empfindlichen Auto-MS/MS-Modus liegen die analytischen Grenzen deutlich unter den Cut-Off-Werten

für Betäubungsmittel oder deren Metabolite (50 bzw. 100 pg/mg [89]) wie sie für die Fahreignungsbegutachtung festgelegt sind.

Zur Überprüfung von Matrixeffekten, die in der ESI-Quelle in Form von Ionen-Suppression und -Verstärkung auftreten können, wurden ebenfalls die Konzentrationen der Qualitätskontrollproben gewählt. Die Bestimmung erfolgte durch den Quotienten der Peakflächen des Standards in Anwesenheit von Matrix und des reinen Standards im Lösungsmittel (in Abwesenheit von Matrix). Als Matrix wurden sechs verschiedene Leerhaarproben verwendet. Die Daten sind ebenfalls in Tabelle 4.11 angegeben. Der Matrixeffekt war für die basischen Medikamentenwirkstoffe akzeptabel und war bei 0,05 ng/mg mit -12 bis +7 % höher als bei 1 ng/mg mit -25 bis -10 %. Allerdings wurde bei den 7 Benzodiazepinen (mit Ausnahme des basischen 7-Aminoflunitrazepam) eine stärkere Ionensuppression von -58 bis -28 % ohne deutlichen Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen gefunden. Offensichtlich ist die Protonierung der weniger basischen Substanzen stärker durch die Matrix reduziert als für die basischeren Wirkstoffe. Dieser Sachverhalt konnte auch nicht durch die Einbeziehung aller ionischen Spezies dieser Substanzen (Addukte mit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{NH}_4^+$ ) beseitigt werden.

Die Bestimmung der Extraktionsausbeute bei der Haaranalyse, die ebenfalls zum Umfang der Validierung gehört, wurde bereits im Rahmen der Methodenoptimierung (Abschnitt 4.3.1. und Abbildung 4.23) beschrieben.

Die Methode wurde anhand der Ringversuchshaarproben DHF 1/10 von der Deutschen Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) überprüft. In Abbildung 4.25 sind die Ergebnisse im Vergleich zu den mittleren Konzentrationen aller Teilnehmer dargestellt. Bei der Probe A handelte es sich um eine dotierte Haarprobe und bei der Probe B lag ein Gemisch aus mehreren Haarproben von Drogenkonsumenten vor. Für alle Analyte wurde eine gute Übereinstimmung mit Ausnahme von Benzoylecgonin in der Probe B gefunden. Der Grund für diese Abweichung konnte nicht geklärt werden. Analytische Fehler sind unwahrscheinlich, da alle vier Analyte dieser Probe derselben Probenvorbereitung unterlagen. Auch der Vergleich der Benzoylecgonin-D3 Peakflächen beider in einer Serie aufgearbeiteten und gemessenen Proben zeigte eine sehr gute Übereinstimmung und führte somit ebenfalls nicht zu einer Erklärung der deutlichen Abweichung.



**Abbildung 4.25:** Die LC-QTOF-MS-Methode wurde anhand von Ringversuchshaarproben DHF 1/10 der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) überprüft. Probe A = dotierte Haarprobe, Probe B = Originalhaarprobengemisch von mehreren Drogenkonsumenten.

### 4.3.3 STA in postmortalen Haarproben

Für insgesamt 90 postmortale Haarproben, die im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Charité Berlin während der Obduktion asserviert wurden, wurde eine Systematische Toxikologische Analyse durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Verstorbene, von denen bekannt war, dass 30 illegale Drogen konsumiert und 60 Medikamente in der Zeit vor dem Todeseintritt eingenommen hatten. Informationen zur Fallgeschichte und der Medikament- bzw. Drogeneinnahme waren aus dem Polizeibericht zugänglich. Darüber hinaus wurden die Obduktionsbefunde und die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchung von Blut, Urin und Mageninhalt zum Vergleich herangezogen.

Anhand von zwei Fallbeispielen soll die Anwendung der Systematischen Toxikologischen Analyse in Haaren mittels LC-QTOF-MS demonstriert werden.

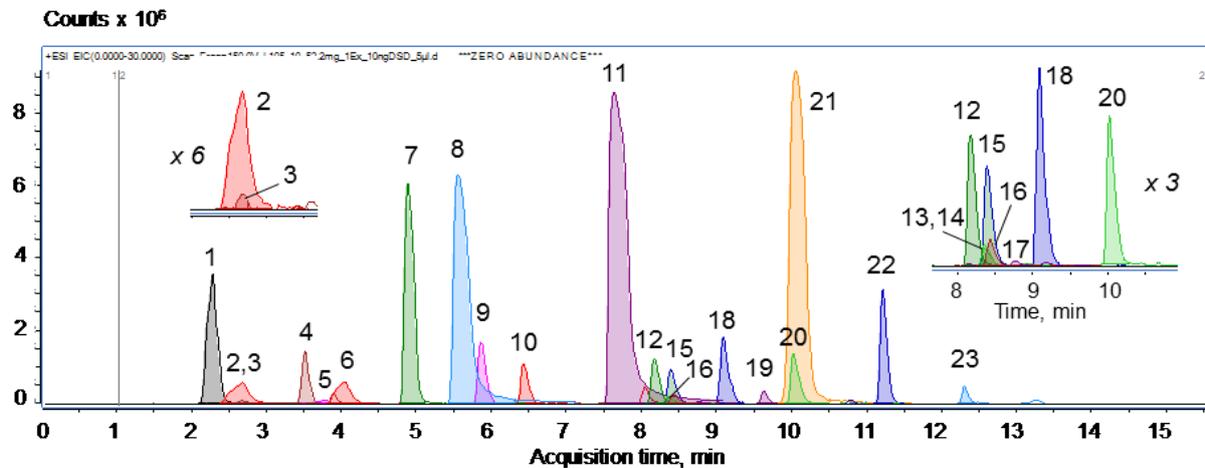
### *Fallbeispiel 10/105: Drogenmissbrauch*

Der 30-jährige Mann sei tot in seiner Wohnung auf dem Boden liegend von seinem Bruder, der der Polizei als Drogenhändler bekannt war, aufgefunden worden. Wie aus der Akte ersichtlich war, habe er an Psychosen gelitten und sei entsprechend medikamentös behandelt worden. Weitere Angaben zu Art und Umfang verschriebener Medikamente lagen nicht vor. Bei der Autopsie wurden 10 Päckchen mit Drogeninhalt im Magen gefunden. Zwei von diesen, verpackt in brauner Plastikfolie, waren beschädigt. Die braune Kunststoffolie eines Päckchens hatte sich im Magen abgewickelt und der Inhalt, bestehend aus Cocain und Lidocain war in den Mageninhalt ausgetreten. Die 8 weiteren Päckchen, verpackt in blauer Plastikfolie, waren intakt und enthielten eine typische illegale Heroinzubereitung bestehend aus Heroin, Noscapin, Papaverin, Coffein und Paracetamol. Die toxikologische Untersuchung des venösen Bluts, Urins, Mageninhalts und der Haare mittels Immunoassay, HPLC-DAD und GC-MS ergab eine Überdosis von Cocain und Lidocain als Todesursache sowie den chronischen Missbrauch von Cocain und Heroin.

Die Haarprobe wurde extrahiert und mittels LC-QTOF-MS im Auto-MS/MS-Modus analysiert. Die extrahierten Ionenchromatogramme der 23 mittels CID-Spektrenbibliothek identifizierten Substanzen sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Das Ergebnis der Haaranalyse zeigt sehr eindrucksvoll das typische Substanzmuster von Cocain- und Heroin-Konsumenten. Neben diesen beiden Drogen wurden deren Metabolite (Benzoylecgonin, Norcocain, Cocaethylen, Anhydroecgoninmethylester, 6-Acetylmorphin, Morphin), sowie natürliche Begleitstoffe (Noscapin, Papaverin, Acetylcodein, Cinnamoylcocain) und Streckmittel (Paracetamol, Lidocain, Tetramisol, Hydroxyzin) gefunden. Für die in der Methode validierten (siehe Abschnitt 4.3.2. und Tabelle 4.11) und in diesem Fall identifizierten Substanzen wurde eine Quantifizierung vorgenommen. Die Konzentrationen sind ebenfalls in Abbildung 4.26 angegeben. Der Vergleich mit den zuvor ermittelten GC-MS-Ergebnissen zeigte, dass die Konzentration für 6-Acetylmorphin, Morphin und Benzoylecgonin höher und für Cocain niedriger war (siehe auch Abbildung 4.28).

Des Weiteren wurden das Neuroleptikum Risperidon und sein Hauptmetabolit 9-Hydroxyrisperidon identifiziert. Dies bestätigte die Angabe aus der Vorgeschichte über die medikamentöse Behandlung mit Antipsychotika. Obwohl auch Hydroxyzin eine angstlösende Wirkung hat, wird es in erster Linie als Antihistaminikum verwen-

det. Es ist daher wahrscheinlicher, dass es als Drogenbegleitstoff anstatt als Medikament in den Körper gelangte.



**Abbildung 4.26:** Extrahierte Ionenchromatogramme identifizierter Substanzen der Haarprobe im Fallbeispiel 10/105: 1 = Paracetamol, 2 = Phenethylamin, 3 = Anhydroecgoninmethylester, 4 = Cotinin, 5 = Morphin (0,16 ng/mg), 6 = Nikotin, 7 = Benzoyllecgonin (22 ng/mg), 8 = Tetramisol, 9 = 6-Acetylmorphin (2,2 ng/mg), 10 = 3-Hydroxylicocain, 11 = Cocain (27 ng/mg), 12 = Norcocain, 13 = Heroin, 14 = Acetylcodein, 15 = Cinnamoylcocain Isomer 1, 16 = Cocaethylen, 17 = 9-Hydroxyrisperidon, 18 = Cinnamoylcocain Isomer 2, 19 = Papaverin, 20 = Risperidon, 21 = Lidocain, 22 = Noscapin, 23 = Hydroxyzin.

*Fallbeispiel 09/962: Tod eines multimorbiden neurologisch erkrankten Patienten*

Der 54 Jahre alte Mann sei tot in seinem Zimmer in einem Pflegeheim aufgefunden worden. Er habe an einem hypoxischen Hirnschaden mit hirnorganischem Psycho-Syndrom, Korsakow-Syndrom und Epilepsie gelitten. Sein Krankheitszustand sei soweit vorangeschritten, dass er bettlägerig und desorientiert gewesen sei. Nach einer Grippeimpfung habe er Fieber gehabt und sei mit Paracetamol, Vancomycin und Furosemid behandelt worden. Seine verordnete Dauermedikation habe Amitriptylin (50 mg/Tag), Diazepam (10 mg/Tag), Valproinsäure (1500 mg/Tag), Omeprazol (20 mg/Tag), Quetiapin (400 mg/Tag), Tamsulosin (0,4 mg/Tag) und Lactulose umfasst. Die toxikologische Untersuchung des venösen Bluts, Urins und Mageninhalts zeigte therapeutische Konzentrationen von Quetiapin, Amitriptylin und Diazepam sowie deren Metaboliten. Es wurden keine Anzeichen für eine tödliche Vergiftung gefunden.

Die Haarprobe wurde extrahiert und mittels LC-QTOF-MS im Auto-MS/MS-Modus analysiert. Die extrahierten Ionenchromatogramme der 26 identifizierten Substanzen sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Mit Ausnahme von zwei der drei Hydroxy-quetiapin-Metabolite wurde die Identifizierung aller Wirkstoffe mittels CID-Spektren-



## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.12:** Gesamtüberblick über detektierte Substanzen in postmortalen Haarproben.

Anzahl der Haarproben	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insgesamt: 90</li> <li>- Davon Drogenfälle: 30</li> <li>- Davon andere Todesfälle: 60</li> </ul>
Detektierte Substanzen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insgesamt: 212</li> <li>- Häufigkeit jeder Substanz<sup>1)</sup>: 1-40, Mittelwert 4,2, Median 2</li> <li>- Häufigkeit pro Fall<sup>1)</sup>: 2-33, Mittelwert 10,1, Median 8</li> </ul>
Substanzen vom Rauchen, Kaffee, Kakao, von Gewürzen und Haarpflegeprodukten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nicotin 48x, Cotinin 59x, 3-Hydroxycotinon 25x, Coffein 79x, Theophyllin 44x, Theobromin 48x, Piperin 32x, Panthenol 90x</li> </ul>
Illegale Drogen und drogenrelevante Substanzen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detektierte Substanzen insgesamt: 35</li> <li>- 15 illegale Drogen und Metabolite, 5 natürliche Begleitstoffe, 6 Streckmittel, 9 andere Opiode oder Metabolite, vgl. Tabelle 4.13</li> <li>- Nicht detektiert: Cannabinoide: THC, CBD, CBN, THC-COOH</li> </ul>
Medikamentenwirkstoffe und deren Metabolite	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insgesamt: 182, vgl. Tabelle 4.14</li> <li>- Medikamentenwirkstoffe oder Key-Metabolite<sup>2)</sup>: 154</li> <li>- Metabolite: 28</li> <li>- Häufigkeit pro Medikamentenwirkstoff: 1-28, Mittelwert 3,7, Median 2</li> <li>- Anzahl an Ergebnissen: 613</li> </ul>
In der Fallgeschichte beschriebene Medikamentenwirkstoffe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unterschiedliche Medikamentenwirkstoffe: 159</li> <li>- Häufigkeit pro Medikamentenwirkstoff: 1-12, Mittelwert 2,0,</li> <li>- Unterschiedliche im Haar identifizierte Medikamentenwirkstoffe aus der Fallgeschichte: 51 (32 %)</li> <li>- Häufigkeit jedes identifizierten Medikamentenwirkstoffs: 1-8, Mittelwert 1,96,</li> <li>- Gesamtzahl in Fallgeschichte beschriebener Medikamentenwirkstoffe<sup>3)</sup>: 318</li> <li>- Nachgewiesen im Haar von der Gesamtzahl: 100 (31,4 %)</li> </ul>
In Blut oder Urin nachgewiesene Medikamentenwirkstoffe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unterschiedliche Medikamentenwirkstoffe oder Key-Metabolite: 137</li> <li>- Häufigkeit pro Medikamentenwirkstoff: 1-14, Mittelwert 2,57</li> <li>- Unterschiedlich identifizierte Medikamentenwirkstoffe im Haar von Blut und Urin: 63 (33,3 %)</li> <li>- Häufigkeit jedes identifizierten Wirkstoffs: 1-13, Mittelwert 2,40</li> <li>- Gesamtzahl nachgewiesener Wirkstoffe in Blut oder Urin<sup>3)</sup>: 257</li> <li>- Nachgewiesen im Haar von der Gesamtzahl: 146 (56,8 %)</li> </ul>
Medikamentenwirkstoffe aus der Fallgeschichte und/oder Blut und Urin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unterschiedliche Medikamentenwirkstoffe oder Key-Metabolite: 189</li> <li>- Häufigkeit pro Medikamentenwirkstoff: 1-16, Mittelwert 2,52</li> <li>- Unterschiedlich identifizierte Medikamentenwirkstoffe: 75 (39,7 %)</li> <li>- Häufigkeit jedes identifizierten Wirkstoffs: 1-14, Mittelwert 2,61</li> <li>- Gesamtzahl nachgewiesener Medikamente aus der Fallgeschichte, in Blut oder Urin: 476</li> <li>- Nachgewiesen im Haar von der Gesamtzahl: 175 (36,8 %)</li> </ul>
Beispiele nicht gefundener Wirkstoffe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Saure Medikamentenwirkstoffe</i>: Salizylsäure, Furosemid, Torasemid, Ibuprofen, Phenobarbital, Pravastatin</li> <li>- <i>Neutrale Medikamentenwirkstoffe</i>: Phenprocoumon, Simvastatin, Spironolacton</li> <li>- <i>Medikamentenwirkstoffe in niedriger Dosis</i>: Digoxin, Digitoxin, Flupenthixol, Glimepirid, L-Thyroxin</li> <li>- <i>Peptidische Medikamentenwirkstoffe</i>: Insulin</li> <li>- <i>Andere</i>: Lithium</li> <li>- <i>Instabil in Blut</i>: Isosorbiddinitrat</li> </ul>

<sup>1)</sup> Substanzen vom Rauchen, Kaffee, Kakao, von Gewürzen und Haarpflegeprodukten sind hier nicht enthalten.

<sup>2)</sup> Key-Metabolite wurden in die Statistik einbezogen, wenn der Medikamentenwirkstoff nicht stabil oder nicht immer im Haar gefunden wurde wie zum Beispiel Noramidopyrin anstelle von Metamizol oder 7-Aminoflunitrazepam anstelle von Flunitrazepam.

<sup>3)</sup> Gesamtzahl beschriebener Medikamentenwirkstoffe der untersuchten Fälle, Mehrfachfindungen inbegriffen.

Zusätzlich wurden Substanzen die beim Kaffeetrinken oder Konsum von Kakaoprodukten (Coffein, Theophyllin, Theobromin), beim Rauchen (Nikotin, Cotinin, 3-Hydroxycotinin), beim Verzehr gewürzter Speisen (Piperin) und Verwendung von Haarpflegeprodukten und Cremes (Panthenol) auftreten, häufig gefunden. Die Anzahl unterschiedlicher Substanzen variierte zwischen 2 und 33 pro Fall. Alle in Tabelle 4.12 genannten Metabolite sind eindeutig mittels CID-Spektrenbibliothek nachgewiesen worden. Die aus dem Metaboliten-Tool vorgeschlagenen Metabolite sind nicht mit erfasst und werden exemplarisch in Abschnitt 4.4.2. separat behandelt.

*Illegale Drogen und drogenrelevante Substanzen*

In Tabelle 4.13 sind alle illegalen Drogen und damit zusammenhängende Substanzen, die in den 30 untersuchten Haarproben von Drogenkonsumenten identifiziert wurden, aufgeführt.

**Tabelle 4.13:** Häufigkeit identifizierter Substanzen mittels LC-QTOF-MS in Haarproben von 30 Drogenfällen.

<u>Heroin verwandte Substanzen</u>	<u>Andere Opioid</u> e	<u>Cocain verwandte Substanzen</u>
Heroin 4x	Methadon 13x	Cocain 20x
6-Acetylmorphin 19x	EDDP 11x	Benzoyllecgonin 18x
Morphin 19x	Hydromorphon 3x	Norcocain 5x
Normorphin 3x	Hydrocodon 2x	Cocaethylen 4x
Codein 15x	Oxycodon 1x	Anhydroecgoninmethylester 5x
Acetylcodein 13x	Norbuprenorphin 1x	Anhydroecgonin 1x
Papaverin 20x	Fentanyl 1x	Cinnamoylcocain 4x
Noscapin 17x	Nortilidin 1x	
	Tramadol 2x	<u>Streckmittel</u>
		Lidocain 17x
		3-Hydroxylidocain 9x
<u>Amphetamine</u>	<u>Andere Drogen</u>	Paracetamol 16x
Amphetamin 7x	Ketamin 1x	Tetramisol/Levamisol 13x
Methamphetamin 1x	Norpseudoephedrin 2x	Hydroxyzin 3x
MDMA 2x		Phenacetin 2x

In vielen Fällen wurde mehr als nur eine Droge missbraucht. Der Missbrauch von Heroin wurde in 19 Fällen eindeutig durch das Vorhandensein von 6-Acetylmorphin und Morphin nachgewiesen. Heroin selbst sowie sein nicht-hydrolytischer Metabolit

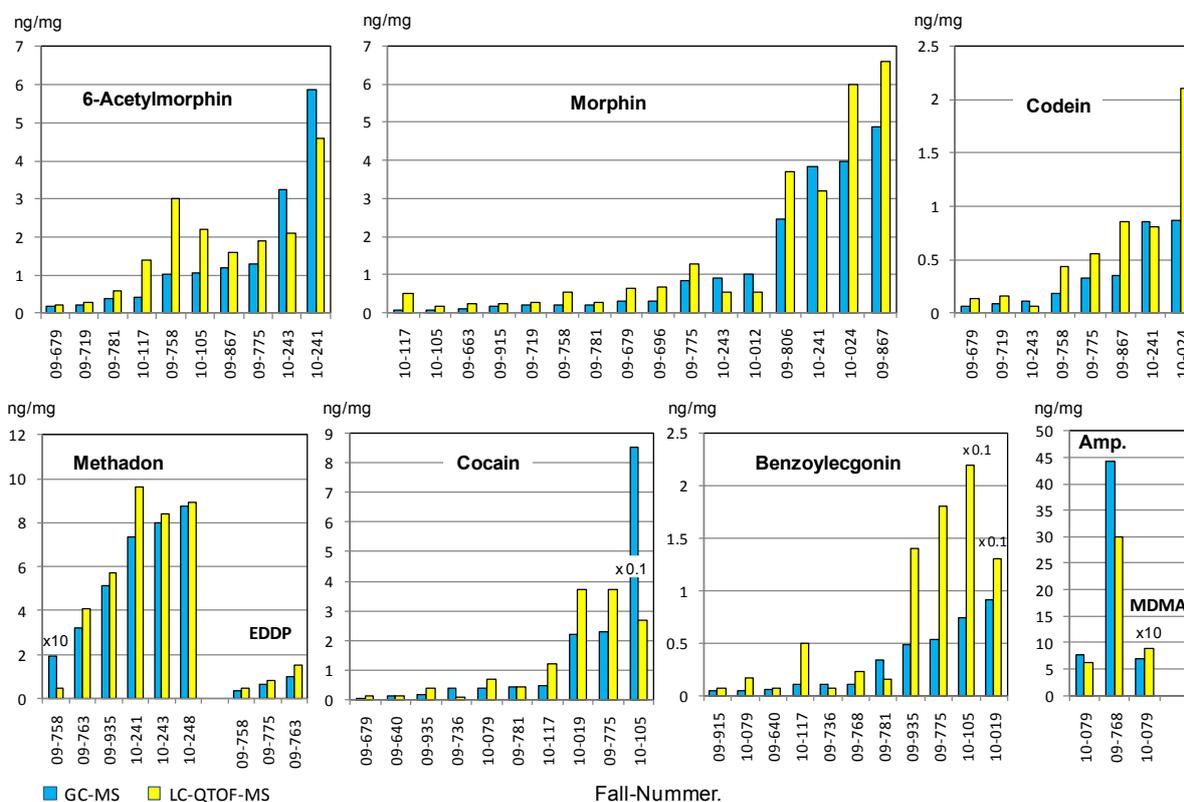
Normorphin wurden in nur vier bzw. drei Fällen identifiziert. In den meisten Fällen wurden auch die Begleitstoffe Codein, Acetylcodein, Noscapin und Papaverin gefunden. Das zur Heroinsubstitution verwendete Methadon (13x) war das am häufigsten gefundene Nicht-Heroin Opioid. Darüber hinaus wurden in einigen Fällen auch andere Opioide oder deren Metabolite wie Hydromorphon, Hydrocodon, Oxycodon, Buprenorphin, Fentanyl, Tilidin und Tramadol nachgewiesen.

Cocain und dessen Hauptmetabolit Benzoylecgonin wurden in 17 Haarproben identifiziert. Allerdings wurden die nicht-hydrolytischen Metabolite Norcocain und Cocaethylen nur in fünf bzw. vier dieser Fälle nachgewiesen. Ecgoninmethylester wurde nicht gefunden. Der Crack-Marker Anhydroecgoninmethylester wurde in 5 Proben und Anhydroecgonin in einer Probe nachgewiesen. Der Begleitstoff Cinnamoylcocain wurde in fünf Fällen festgestellt.

Amphetamin lag in 5 Proben vor. Eine von ihnen enthielt auch Methamphetamin und zwei weitere MDMA. Ketamin und Cathin wurden nur einmal gefunden.

Die validierte Methode zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von Betäubungsmitteln und deren Metaboliten aus Abschnitt 4.3.2. wurde für die Haarproben der 30 Drogenfälle angewendet. In Abbildung 4.28 sind die Konzentrationen von Morphin, 6-Acetylmorphin, Codein, Methadon, seinem Metabolit EDDP, Cocain, seinem Metabolit Benzoylecgonin, Amphetamin und Methylendioxyamphetamin (MDMA) vergleichend für die GC-MS- und die LC-QTOF-MS-Analyse dargestellt, sofern GC-MS-Ergebnisse vorlagen. Obwohl die mit beiden Methoden bestimmten Konzentrationen in der gleichen Größenordnung für alle untersuchten Drogenfälle lagen, gab es in mehreren Fällen erhebliche Unterschiede. Diese Abweichungen traten vor allem bei Cocain und Benzoylecgonin auf, während Morphin, Methadon, EDDP und Amphetamin eine gute Übereinstimmung beider Methoden aufwiesen. Neben den üblichen analytischen Fehlern können diese Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Methoden durch die Tatsache erklärt werden, dass die Proben nicht homogen waren, verschiedene Haarstränge analysiert wurden, die Extraktionsausbeuten der Haare sich unterschieden und dass Esterhydrolyse in unterschiedlichem Ausmaß für Cocain, Benzoylecgonin und 6-Acetylmorphin bei der Haarextraktion aufgetreten sein kann.

$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN) sowie 11-Nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure (THC-COOH) konnten im Haar nicht nachgewiesen werden. Die Anwesenheit dieser Substanzen war jedoch aus Blut- und Urinergebnissen bekannt. Auch lagen entsprechende Ergebnisse aus der GC-MS-Analyse von Haarproben von 5 Drogenopfern vor. Ein Grund für die geringe Empfindlichkeit der angewandten Methode für diese Analyte ist deren nicht basische Struktur, welche die Protonierung während der Ionisation mittels ESI reduziert. Darüber hinaus liegt ihre exakte Masse im Bereich von vielen Matrixbestandteilen, die zu einem hohen chromatographischen Rauschen im extrahierten Ionenchromatogramm führen. Selbst eine Massenauflösung des verwendeten Instruments von über 10 000 liefert hier keine ausreichende Trennung der Signale.



**Abbildung 4.28:** Vergleich vorhandener GC-MS-Ergebnisse mit später mittels LC-QTOF-MS bestimmten Konzentrationen von Drogen und Metaboliten in Haarproben von Drogenopfern.

Die nachgewiesenen Wirkstoffe Lidocain, Paracetamol, Tetramisol, Hydroxyzin und Phenacetin sind, wie in der Literatur beschrieben, als typische Streckmittel von Cocain und Heroin bekannt [147-149]. Es ist davon auszugehen, dass ihre Anwesenheit in den Haaren aus den Drogenzubereitungen stammt. Darüber hinaus wurden auch weitere Wirkstoffe wie Benzodiazepine, Antipsychotika, Antidepressiva, Antibiotika und Nicht-Opioid-Analgetika gefunden, sodass einige der Drogenabhängigen sich

anscheinend in medizinischer Behandlung befanden. Der Nachweis dieser Therapeutika bei Drogenopfern ist zusammen mit den Ergebnissen aus den anderen 60 Fällen in Tabelle 4.14 wiedergegeben.

### *Medikamentenwirkstoffe*

In den 90 Haarproben wurden 154 Medikamentenwirkstoffe und 28 Metabolite mit einer Häufigkeit von 1-28 (Tabelle 4.14, insgesamt 613 Ergebnisse) identifiziert. Dazu gehörten vor allem verordnete Medikamentenwirkstoffe mit typischerweise chronischer Einnahme wie 17 Antidepressiva, 15 Neuroleptika, 11 Wirkstoffe zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, 10 Opioid-Analgetika, 8 Nicht-Opioid-Analgetika, 7 Benzodiazepine, 6 Antiepileptika, 6 Antihistaminika und 5 Hypnotika. Darüber hinaus wurden auch 13 Antibiotika und 7 Fungizide nachgewiesen.

Diese Ergebnisse wurden mit den Informationen des Polizeiberichts über die Krankengeschichte und mit den Ergebnissen der toxikologischen Untersuchung von Blut, Urin und Mageninhalt mittels Immunoassay, HPLC-DAD und GC-MS verglichen. Dieser Vergleich stellt jedoch nur eine Orientierung dar. Die von der Polizei erfassten Informationen zur Krankengeschichte beruhen nur auf Angaben zu verschriebenen oder verabreichten Medikamenten anhand von Krankenakten oder am Tatort vorgefundener Medikamente. Diese Informationen waren nicht immer vollständig. Es war oftmals nicht klar, ob die Medikamente wirklich eingenommen wurden und ob es sich um eine chronische oder akute Behandlung handelte. Viele Medikamente sind jedoch in einer langfristigen Behandlung verabreicht worden und sollten daher im Haar gefunden werden.

Eine Übersicht über den Vergleich wurde bereits oben in Tabelle 4.12 wiedergegeben. Die Einnahme oder Verabreichung von 159 verschiedenen Medikamentenwirkstoffen war in den Fallgeschichten mit einer Häufigkeit von 1-12 pro Wirkstoff (Gesamtanzahl 318) dokumentiert. Von diesen wurden nur 51 verschiedene Wirkstoffe (32 %) im Haar gefunden. Auch von den 137 Wirkstoffen oder Key-Metaboliten, welche aus der Analyse von Blut, Urin oder Mageninhalt bekannt waren, wurden nur 63 (33,3 %) im Haar nachgewiesen. Die Kombination der Informationen aus der Anamnese und der toxikologischen Analyse führten zu 189 verschiedenen Wirkstoffen oder Key-Metaboliten, von denen 75 (39,7 %) im Haar identifiziert wurden.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.14:** Mittels LC-QTOF-MS in 90 Haarproben identifizierte Medikamentenwirkstoffe und Metabolite. Metabolite sind kursiv dargestellt. Die aufgeführten Metabolite sind ausschließlich durch die CID-Spektrenbibliothek identifiziert worden. Diese Tabelle beinhaltet keine Substanzen, die aus einem Heroin-, anderweitigen Opioid-, Cocain- oder Amphetamin-Missbrauch der 30 Fälle aus Tabelle 4.12 resultieren.

Wirkstoff, Häufigkeit	Wirkstoff, Häufigkeit	Wirkstoff, Häufigkeit
Noramidopyrin 28x	Quetiapin 6x	Imipraminex 3x
Metoclopramid 25x	<i>7-Hydroxyquetiapin</i> 3x	<i>Nortilidin</i> 3x
Lidocain 23x	Trimipramin 6x	Oxycodon 3x
<i>3-Hydroxylidocain</i> 5x	<i>Demethyltrimipramin</i> 1x	Sulfadiazin 3x
Tramadol 20x	Zolpidem 6x	Torasemid 3x
<i>O-Demethyltramadol</i> 8x	Amitriptylin 5x	Venlafaxin 3x
Metoprolol 17x	<i>Amitriptylinoxid</i> 2x	<i>O-Demethylvenlafaxin</i> 1x
<i>Hydroxymetoprolol</i> 6x	<i>E-10-Hydroxyamitriptylin</i> 2x	<i>7-Amino-flunitrazepam</i> 2x
Paracetamol 16x	<i>Z-10-Hydroxyamitriptylin</i> 2x	Atropin 2x
Diclofenac 13x	Ciprofloxacin 5x	Bisoprolol 2x
Diphenhydramin 11x	Morphin 5x	Bromazepam 2x
<i>Demethyldiphenhydramin</i> 6x	Pilocarpin 5x	Canrenon 2x
Climbazol 10x	Promethazin 5x	Codein 2x
Diazepam 10x	<i>Dioxopromethazin</i> 4x	<i>De(hydroxyethyl)-opipramol</i> 2x
Doxepin 10x	Zopiclon 5x	Dihydrocodein 2x
<i>N-Demethyldoxepin</i> 9x	Clarithromycin 4x	Dyclonin 2x
Nordiazepam 10x	Emepronium 4x	Hyoscyamin 2x
Trimethoprim 10x	Melperon 4x	Laudanosin 2x
Citalopram 9x	Midazolam 4x	Levamisol 2x
<i>Norcitalopram</i> 9x	<i>α-Hydroxymidazolam</i> 1x	Levomepromazin 2x
<i>Bisnorcitalopram</i> 4x	Pipamperon 4x	Memantin 2x
Mirtazapin 9x	Prilocain 4x	Pethidin 2x
Nortriptylin 9x	Propyphenazon 4x	Methiomeprazin 2x
<i>E-10-Hydroxynortriptylin</i> 4x	Verapamil 4x	Octodrin 2x
<i>Z-10-Hydroxynortriptylin</i> 4x	<i>Norverapamil</i> 4x	Omeprazol 2x
<i>Demethylnortriptylin</i> 1x	<i>N-Desalkylverapamil</i> 4x	Risperidon 2x
Carbamazepin 8x	Amisulprid 3x	<i>9-Hydroxyrisperidon</i> 1x
<i>Carbamazepinepoxid</i> 6x	Clozapin 3x	Sulfamethoxazol 2x
<i>Iminostilben</i> 2x	<i>N-Demethylclozapin</i> 3x	Tetrazepam 2x
Phenazon 8x	Denatonium 3x	Tiaprid 2x
Doxylamin 7x	Fentanyl 3x	Tranlycypromin 2x
Betazol 6x	Fluconazol 3x	Valpromid 2x
Metronidazol 6x	Haloperidol 3x	
Ondansetron 6x	Hydroxyzin 3x	

**Medikamentenwirkstoffe oder Metabolite, welche nur einmal detektiert wurden:**

*7-Aminoclonazepam, 7-Aminonitrazepam, Acebutolol, Acetyldigoxin, Allopurinol, Ambroxol, Aminophenazon, Amiodaron, Desethylamiodaron, Amphothericin, Amrinon, Anastrozol, Artocain, Atrazindesethyl, Bamipin, Benperidol, Bifonazol, Chlorhexidin, Chlorphenoxamin, Clemastin, Clindamycin, Clomipramin, Cyromazin, Desacetylmetipranolol, Desipramin, Desloratadin, Dexketoprofen, Dextromethorphan, Dextrophan, Diltiazem, Duloxetin, Etomidat, Febuprol, Gepefrin, Histapyrocin, Ibuprofen, Isoetarin, Lamivudin, Levetiracetam, Levofloxacin, Levomepromazin, Linezolid, Mazindol, Mecetronium, Metolachlor, Milrinon, Myosmin, Naloxon, Nitrazepam, Norcyclozin, Ofloxacin, Olanzapin, Opipramol, Oxcarbazepin, 10-Hydroxycarbazepin, Oxybenzon, Pantoprazol, Paroxetin, Phenytoin, Pimobendan, Piritramid, Pregabalin, Propranolol, Pseudoephedrin, Pyracarbolid, Ranitidin, Reboxetin, Salbutamol, Sertralin, Norsertralin, Simvastatin, Sotalol, Sulfapyridin, Sulpirid, Samsulosin, Terbinafin, Thiabendazol, Timolol, Tolycaïn, Triadimefon, Tripelenamin, Zotepin.*

In Tabelle 4.15 ist die Häufigkeit der 50 am stärksten vertretenen Medikamentenwirkstoffe oder Key-Metabolite aus den Fallgeschichten und / oder Analyseergebnissen von Blut, Urin und Mageninhalt von 90 Todesfällen im Vergleich zur Häufigkeit, mit der sie in Haarproben mittels LC-QTOF-MS detektiert wurden, dargestellt. Eine hohe Übereinstimmung wurde für die chronisch verabreichten Arzneimittel gefunden, wie zum Beispiel zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Metoprolol, Verapamil), Antidepressiva (Amitriptylin, Citalopram, Doxepin, Mirtazapin, Trimepramin), Neuroleptika (Amisulprid, Clozapin, Quetiapin), weitere Medikamentenwirkstoffe zur Behandlung von psychischen Störungen (Diazepam, Carbamazepin) und Medikamentenwirkstoffe zur Schmerztherapie (Metamizol, Morphin, Diclofenac).

Insgesamt wurden 114 Wirkstoffe, die in den Fallgeschichten erwähnt wurden und / oder aus der Analyse von Blut oder Urin bekannt waren, nicht in den Haarproben nachgewiesen. Die Gründe hierfür können darin liegen, dass keine oder nur eine gelegentliche Einnahme erfolgte, eine niedrige Dosierung mit entsprechender niedriger Blutkonzentration vorlag, eine geringe Inkorporation vom Blut ins Haar erfolgte, eine unzureichende Stabilität im Haar gegeben war, eine geringe Wiederfindung bedingt durch die Probenvorbereitung erreicht wurde, oder eine unzureichende Ionisierung mittels ESI im positiven Modus bei der spektrometrischen Messung vorlag.

Bei einigen der nicht nachgewiesenen Arzneimittel handelte es sich um solche, die für eine langfristige medizinische Behandlung typisch sind und bei denen von einer regelmäßigen Einnahme ausgegangen werden kann. In diesen Fällen treffen eine oder mehrere der oben genannten Gründe für das Fehlen im Haar zu. Nach den grundlegenden Arbeiten von Nakahara et al. [150, 151] lagern sich lipophile und basische Substanzen im Allgemeinen gut ins Haar ein. Dahingegen werden saure und hydrophile Substanzen weniger effizient ins Haar aufgenommen. Der analytische Nachweis von Therapeutika im Haar wurde in Literaturübersichten durch Pragst [152] und Chèze et al. [153] zusammengefasst. Saure Drogen wie Salizylsäure (ein Key-Metabolit der Acetylsalicylsäure), Valproinsäure, Furosemid, Pravastatin oder Ibuprofen wurden im Haar bis dato nicht beschrieben. Der Grund liegt hierbei in der geringen Einbaurrate ins Haar. In dieser Promotionsarbeit konnten sie aber auch deshalb nicht nachgewiesen werden, da sie nicht im positiven ESI-Modus ionisiert werden. Dies ist ebenfalls der Grund dafür, dass Phenobarbital nicht gefunden wurde, obwohl bekannt ist, dass es ins Haar mit hohen Konzentrationen eingelagert wird [154].

**Tabelle 4.15:** Häufigkeit der 50 am stärksten vertretenen Medikamentenwirkstoffe oder Key-Metabolite aus den Fallgeschichten und / oder Analyseergebnissen von Blut, Urin und Mageninhalt von 90 Todesfällen im Vergleich zur Häufigkeit mit der sie in Haarproben mittels LC-QTOF-MS detektiert wurden.

Medikamentenwirkstoff oder Key-Metabolit	Häufigkeit				Medikamentenwirkstoff oder Key-Metabolit	Häufigkeit			
	Fallgeschichte	Blut und Urin	Fallgeschichte und / oder Blut und Urin	Detektiert im Haar		Fallgeschichte	Blut und Urin	Fallgeschichte und / oder Blut und Urin	Detektiert im Haar
Metamizol	6	15	16	14	Fentanyl	2	4	5	1
Acetylsalicylsäure	12	2	14	0	Ofloxacin	2	5	5	1
Pantoprazol	11	5	14	1	Trimipramin	2	5	5	3
Metoprolol	8	5	11	8	Clozapin	1	4	4	2
Diazepam	4	10	10	7	Codein	2	3	4	2
Ibuprofen	7	4	9	1	Doxepin	1	4	4	4
Lidocain	1	9	9	6	Doxylamin	2	3	4	3
Omeprazol	7	5	9	3	Insulin	4	0*	4	0
Phenprocoumon	7	2	8	0	Morphin	4	4	4	4
Torasemid	7	1	8	0	Tilidin	2	2	4	2
Amitriptylin	2	7	7	4	Phenobarbital	1	3	4	0
Citalopram	4	7	7	5	Verapamil	4	4	4	4
Diphenhydramin	3	7	7	5	Allopurinol	2	1	3	0
Furosemid	6	4	7	0	Amiodaron	0	3	3	1
Mirtazapin	4	6	7	4	Amisulprid	3	3	3	3
Quetiapin	4	4	7	4	Clemastin	1	2	3	1
Carbamazepin	3	6	6	5	Enoxaparin	3	0	3	0
Diclofenac	4	2	6	3	Flunitrazepam	2	1	3	1
Metoclopramid	4	6	6	6	Lorazepam	3	3	3	0
Midazolam	1	6	6	3	L-Thyroxin	3	0	3	0
Paracetamol	2	5	6	5	Metronidazol	3	1	3	2
Promethazin	4	3	6	3	Naloxon	3	0	3	0
Simvastatin	6	0	6	0	Salbutamol	3	0	3	0
Tramadol	3	6	6	6	Tetrazepam	2	1	3	1
Amlodipin	4	4	5	0	Zopiclon	2	2	3	3

\*Insulin wurde nicht bestimmt, da eine andere Todesursache vorlag.

Diese beiden Gründe – geringe Einlagerung ins Haar und niedrige ESI-Ausbeute – müssen auch für neutrale Substanzen wie Phenprocoumon, Simvastatin oder Spironolacton angenommen werden. In der Literatur wurden keine Daten zu diesen drei Medikamentenwirkstoffen in Haaren gefunden. Von Deveaux et al. wurden Konzentrationen von 3,6 bis 11,4 pg/mg an Digoxin im Haar nach chronischer Behandlung beschrieben [155]. In dieser Studie wurden Digoxin und Digitoxin jeweils in zwei Fallgeschichten beschrieben, jedoch nicht im Haar nachgewiesen. Weitere Beispiele für chronisch angewandte Medikamentenwirkstoffe mit geringen Konzentrationen im Blut, die in dieser Studie nicht im Haar gefunden wurden, sind das orale Antidiabetikum Glimperid und der Anti-Hypothyreose-Wirkstoff L-Thyroxin. Orale Antidiabetika wurden häufig bei Straftaten missbraucht, jedoch wurde bislang nur Glibenclamid im

Haar mit Konzentrationen von 0,65 ng/mg nach einer 20 mg/Tag Dosis und 5 pg/mg nach einer einmaligen Dosis von 5 mg beschrieben [156]. Organische Nitrate wie Isosorbiddinitrat, welche als koronare Vasodilatoren verwendet werden, sind nicht ausreichend stabil im Blut, sodass eine Einlagerung ins Haar nicht erfolgt. Die analytische Methode ist nicht geeignet für Medikamentenwirkstoffe mit Peptidstruktur wie zum Beispiel Insulin oder Metallionen wie zum Beispiel Lithium. Auch Antibiotika wie Sulfonamide und Penicillin-Derivate wurden häufig nicht in den Haaren gefunden. Dies liegt daran, dass sie typischerweise nur kurzzeitig angewendet werden und darüber hinaus in vielen Fällen eine geringe Einlagerung ins Haar aufgrund ihrer hydrophilen oder sauren Struktur aufweisen.

Diese oben beschriebenen Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die Systematische Toxikologische Analyse im Haar mittels LC-QTOF-MS einen erheblichen Fortschritt in der retrospektiven Aufklärung einer chronischen Einnahme von Medikamentenwirkstoffen darstellt. Allerdings sind die Informationen, die erhalten werden können, bei weitem nicht vollständig, und es gibt noch viele Lücken. Die große Variabilität von Wirkstoffen bezüglich ihrer Struktur und der Konzentration kann nicht durch eine einzige Methode erfasst werden. Auch kann die Systematische Toxikologische Analyse nicht die gezielte Analyse auf bestimmte Wirkstoffe nach einer einmaligen Anwendung, wie zum Beispiel der Beibringung von KO-Mitteln bei sexuellen Übergriffen, ersetzen.

#### **4.4 Nachweis von Metaboliten in der STA [157]**

Durch den Körper aufgenommene Fremdstoffe (Drogen, Medikamente, Pflanzenschutzmittel, etc.) werden allgemein in der Leber, aber auch anderen Organen der Biotransformation (Metabolisierung) unterzogen. Nicht nur die Chromatogramme von Urinproben, sondern auch die von Blutproben werden bei Vergiftungen oft von Metabolitenpeaks beherrscht. Häufige Metabolisierungsreaktionen und die dabei auftretenden Massenänderungen sind in Tabelle 4.16 aufgelistet. Diese lassen sich in zwei Kategorien einordnen, die Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierung) und die Phase-II-Reaktionen (Konjugation). Im Blut sind überwiegend die Ausgangsstoffe und die Phase-I-Metabolite, im Urin hingegen bereits Phase-II-Metabolite zu finden. Diese enzymatischen Reaktionen folgen einer begrenzten Anzahl von Mechanismen. Die wichtigste Phase-I-Reaktion stellt die Oxidation dar, bei der ein Sauerstoffatom durch Cytochromoxidasen (CYP) in das Substrat eingeführt wird. Dabei handelt es

sich um eine Monooxygenierung, bei der nur eines der beiden Atome des Sauerstoffmoleküls auf das Substrat übertragen wird, wodurch es zur Bildung von Hydroxylierungsprodukten kommt. Ebenso weist die metabolische N- und O-Desalkylierung als erste Stufe eine Sauerstoffübertragung auf das  $\alpha$ -C-Atom der Alkylgruppe auf [158-160]. Die gemeinsame Eigenschaft von Phase-I-Enzymen besteht in der Fähigkeit zur Einführung von polaren funktionellen Gruppen in Moleküle mit grundsätzlich unpolarem Charakter, wie zum Beispiel gesättigten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen. Dies stellt eine entscheidende Voraussetzung für eine weitere Metabolisierung von lipophilen Verbindungen ohne geeignete funktionelle Gruppe für Konjugationsreaktionen dar.

**Tabelle 4.16:** Häufige Phase-I- und Phase-II-Metabolisierungsreaktionen und die durch sie bedingten Änderungen in der Summenformel sowie der exakten Masse.

Reaktionstyp	Diff. Summenformel	Diff. Masse	Phase
Hydroxylierung / N-Oxidation / S-Oxidation	+O	+15,9949	I
Dihydroxylierung	+2O	+31,9898	I
Dehydrierung	-H <sub>2</sub>	-2,0156	I
Demethylierung	-CH <sub>2</sub>	-14,0156	I
Desethylierung oder zweifache Demethylierung	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-28,0312	I
Depropylierung	-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	-42,0468	I
Oxidative Desaminierung	-NH <sub>3</sub> +O	-1,0316	I
Oxidative Dechlorierung	-Cl +OH	-17,9662	I
Oxidative Defluorierung	-F +OH	-1,9957	I
Hydratisierung	+H <sub>2</sub> O	+18,0105	I
Methyl → Carbonsäure	-H <sub>2</sub> +O <sub>2</sub>	+29,9742	I
Glucuronidierung	+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	+176,0321	II
Sulfatbildung	+SO <sub>3</sub>	+79,9568	II
Glutathion-Konjugation	+C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	+305,0681	II
	+C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	+307,0837	II
Cystein-glycin-Konjugation	+C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	+178,0410	II
Cystein-Konjugation	+C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	+121,0196	II
N-Acetyl-cystein-Konjugation	+C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> S	+163,0301	II

Durch Phase-I-Reaktionen entstandene Produkte können entweder pharmakologisch aktiv oder inaktiv sein. Sie stellen in der Regel Substrate für Phase-II-Enzyme. Bei Phase-II-Biotransformationen erfolgt eine Konjugation von Wirkstoffen oder deren Metaboliten typischerweise mit hydrophilen endogenen Molekülen wie zum Beispiel Glucuronsäure, Sulfat und Glutathion. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme wie zum Beispiel die Cytochromoxidasen oder die Glucuronosyltransferase unterliegen dabei einem genetischen Polymorphismus, wodurch der Umfang und die Art erzeugter Metabolite variieren kann [161, 162]. Bei den meisten Konjugationsreaktionen erfolgt ein Austausch des Wasserstoffatoms in einer Hydroxyl-, Amino- oder Carboxyl-Gruppe durch ein endogenes Molekül. In der Regel haben die durch eine

Konjugation entstandenen Metabolite keine pharmakologische Aktivität, weisen eine sehr gute Wasserlöslichkeit auf und werden leicht im Urin ausgeschieden. Phase-II-Reaktionen sind in der Regel detoxifizierend. Als wichtigste Phase-II-Reaktionen sind die Glucuronidierung, Sulfatierung, Acetylierung, und Konjugation mit Glutathion oder Aminosäuren zu nennen [163-165].

Die Identifizierung von Metaboliten spielt eine wesentliche Rolle in der STA. Da die Anzahl kommerziell erhältlicher Standards limitiert ist und viele Metabolite nicht in Reinform zugänglich sind bzw. deren Synthese aufwendig und teuer ist, wurden verschiedene Ansätze zum Nachweis von Metaboliten ohne Referenzverbindungen gemacht. Mit Hilfe von Softwareprogrammen lassen sich im Datenfile einer Probe auch Substanzen nachweisen, die nicht in der Datenbank oder Bibliothek vorhanden sind bzw. deren Existenz bis dato nicht bekannt war. Kommerziell erhältliche Software für die Suche und Identifizierung von Metaboliten wie zum Beispiel Metabolyx der Firma Waters und MassHunter Metabolite ID der Firma Agilent wurde für die automatisierte Auswertung von massenspektrometrischen Chromatogrammen und Spektren entwickelt und angewendet [166-168]. Die Software Metabolite ID benötigt jedoch für die Metabolitensuche ein Referenzdatenfile mit dem Ausgangsstoff um in einem weiteren Datenfile nach Metaboliten zu suchen. Diese Anwendung ist sehr geeignet für pharmakologische Untersuchungen zum Beispiel in der Wirkstoffentwicklung und -testung. Bei der STA hingegen existiert nicht für jede identifizierte Substanz eine Referenzmessung unter den gleichen chromatographischen Bedingungen, was die Anwendung dieser Software für diesen Zweck stark einschränkt.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Tool zur Suche nach Metaboliten geschaffen, mit dessen Hilfe die Lücke zwischen den durch die Bibliothek identifizierbaren Substanzen und deren in der Bibliothek und Datenbank nicht erfassten bzw. noch unbekanntem Metaboliten geschlossen werden soll. Dabei ist der Nachweis von Metaboliten nicht nur in Abwesenheit der Muttersubstanz bedeutsam, sondern auch zur zusätzlichen Bestätigung der Wirkstoffaufnahme oder zur Klärung unbekannter chromatographischer Peaks.

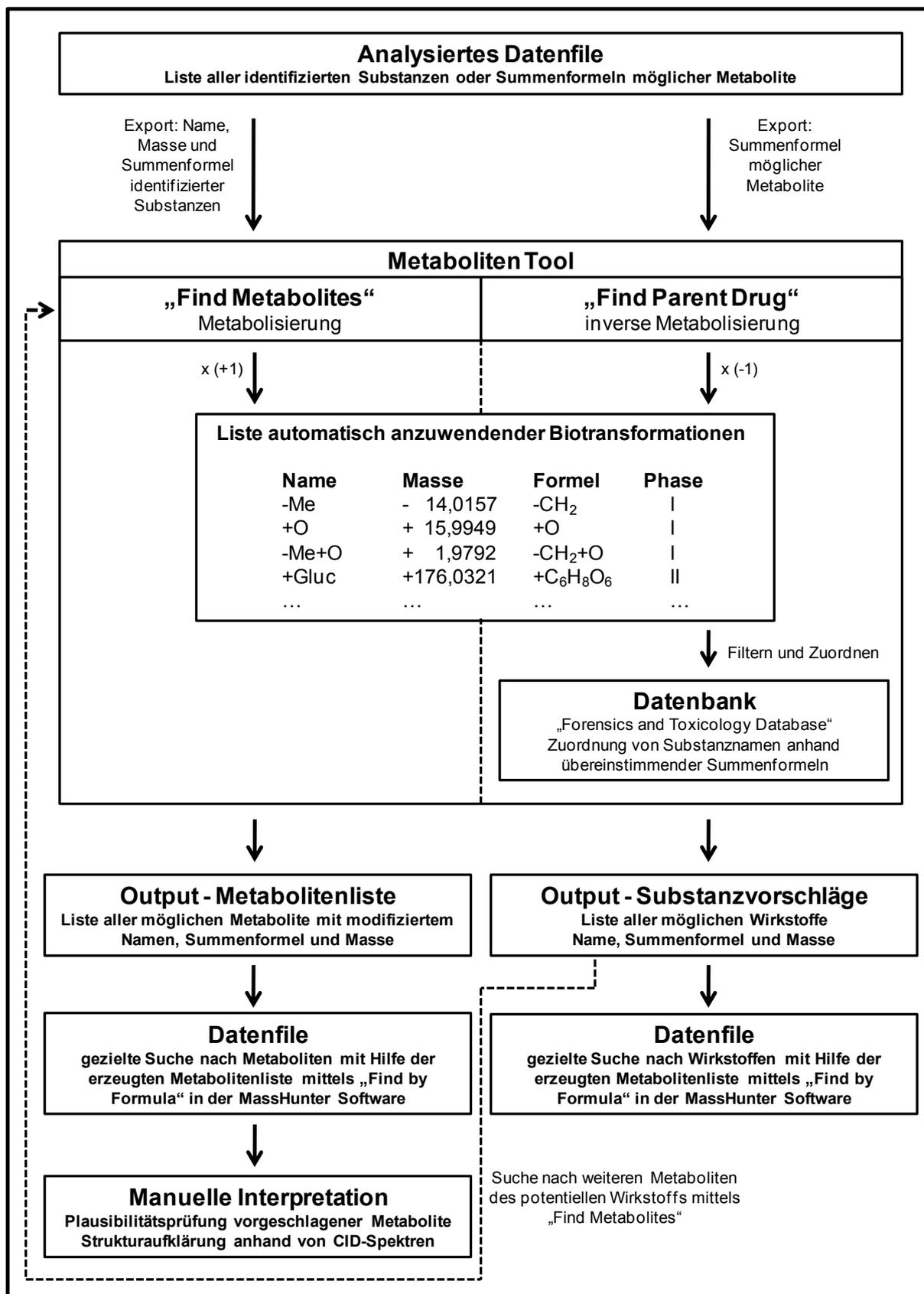
### 4.4.1 Aufbau und Funktionsweise des Metaboliten-Tools

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Metaboliten-Tool stellt eine Schnittstelle zwischen identifizierten Substanzen (Bibliotheksabgleich), vorgeschlagenen Substanzen (Datenbankabgleich) und Summenformeln ohne konkreten Substanzbezug dar. Mit Hilfe dieses Tools können zusätzliche Informationen zum untersuchten Fall erhalten werden. So kann zum Beispiel die Identität eines Wirkstoffes durch vorgeschlagene Metabolite bestätigt werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn das Signal des Wirkstoffs durch koeluiierende Peaks gestört oder ohnehin sehr gering und nicht eindeutig identifizierbar ist. Weiterhin kann eine Substanz anhand ihrer Metabolite nachgewiesen werden, wenn diese bereits komplett metabolisiert und nicht mehr detektierbar ist. In der Haaranalyse besteht die wichtigste Anwendung des Tools in der Unterscheidung zwischen einer Kontamination der Probe und einem stattgefundenen Konsum. Letzterer kann nach eindeutiger Substanzidentifikation durch eine gezielte Suche nach nichthydrolytischen Metaboliten erfolgen.

Des Weiteren können auch Informationen bzgl. der Applikation wie zum Beispiel der oralen oder parenteralen Aufnahme durch die Metaboliten-Wirkstoff-Verhältnisse geliefert werden. Durch Anwendung des Tools sind auch pharmakogenetische Untersuchungen möglich [169]. So lassen sich zum Beispiel schnelle und langsame Acetylierer anhand der aufzufindenden Metabolitenmuster unterscheiden.

Das Schema des entwickelten Tools ist in Abbildung 4.29 dargestellt und beinhaltet zwei grundlegende Algorithmen. Zum einen können aus einer Liste identifizierter bzw. vorgeschlagener Substanzen mögliche Metabolite automatisch generiert werden. Zum anderen kann ein vermeintlicher Metaboliten-Peak über dessen Summenformel, welche durch die akkurate Masse und das Isotopenmuster zugänglich ist, einer inversen Metabolisierung unterzogen und mit der Datenbank abgeglichen werden, wodurch potentielle Muttersubstanzen vorgeschlagen werden. Dieses Tool operiert unabhängig von der verwendeten Auswertesoftware, sodass eine Anwendung universell gegeben ist.

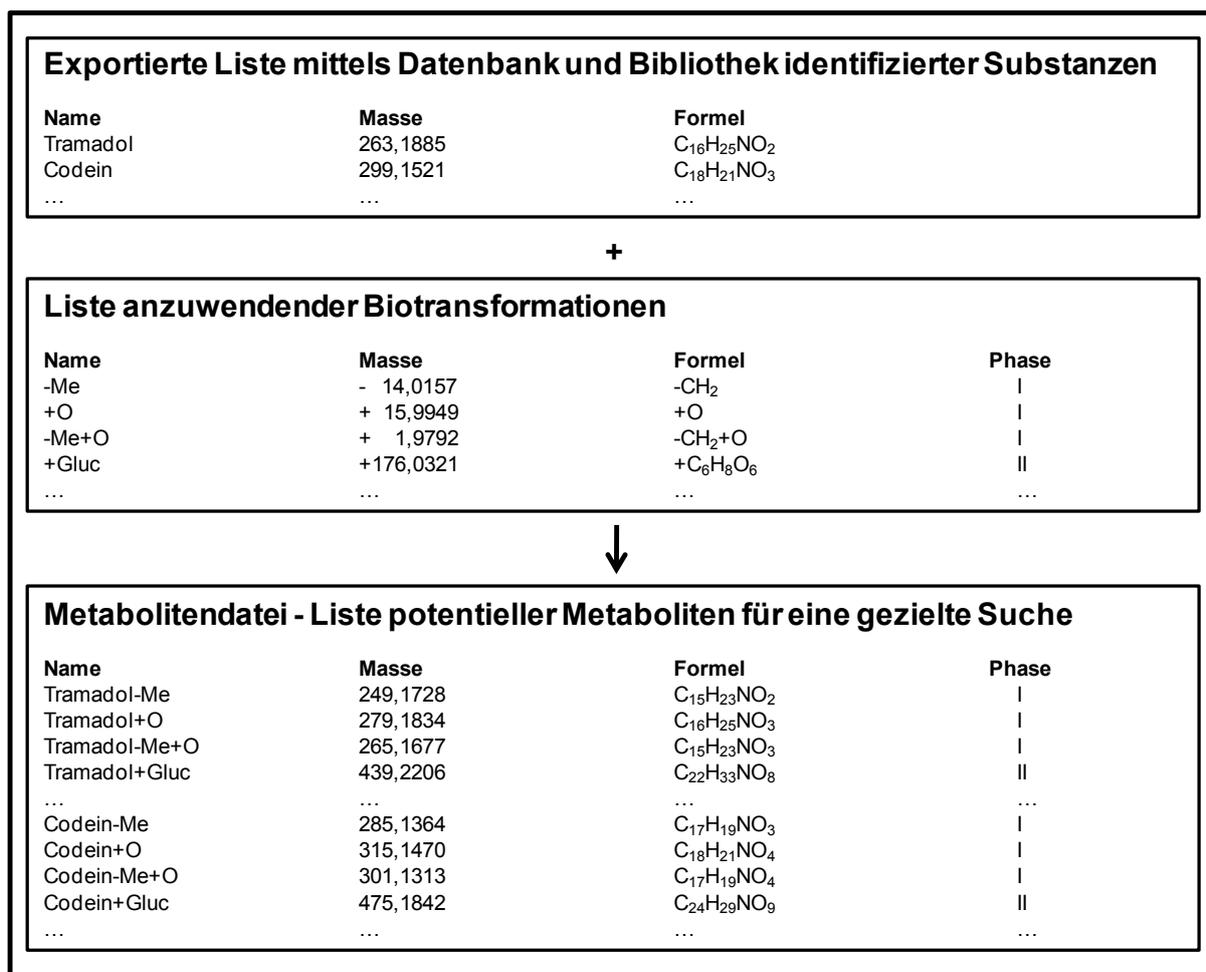
Die beiden Algorithmen sollen im Folgenden näher erläutert werden.



**Abbildung 4.29:** Schema des Metaboliten-Tools. „Find Metabolites“: Erzeugung einer Liste möglicher Metabolite unter Verwendung einer Liste von Biotransformationen sowie einer Ergebnisliste identifizierter oder vorgeschlagener Substanzen. „Find Parent Drug“: Inverse Metabolisierung einer Summenformel und Suche nach möglichen Ausgangssubstanzen in einer Datenbank.

*Algorithmus „Find Metabolites“*

In Abbildung 4.30 ist der Algorithmus „Find Metabolites“ mit dem Metaboliten-Tool dargestellt. Ausgangspunkt ist die Liste der in dem Analysefile durch die Bibliothek identifizierten oder über die Datenbank vorgeschlagenen Wirkstoffe. Diese Ergebnisse werden zunächst in eine Datei („Ergebnisse.csv“) exportiert. Das Format, welches den Aufbau dieser Textdatei beschreibt, ist comma-separated values (csv) und ist geeignet zur Speicherung und zum Austausch von Daten. Diese Datei beinhaltet mindestens die Spalten „Name“, „Masse“ und „Formel“. Da das Metaboliten-Tool so konzipiert wurde, dass die benötigten Informationen über den Header der zu verwendenden Spalte ermittelt werden, dürfen auch zusätzliche Angaben in der Datei enthalten sein. Die Funktionalität des Tools wird dadurch nicht beeinträchtigt. Es können auch manuell weitere Einträge wie z. B. schnell metabolisierende Wirkstoffe hinzugefügt werden. Diese Einträge empfehlen sich bei einem gerichteten Verdacht.



**Abbildung 4.30:** Verwendete Dateien für den Algorithmus „Find Metabolites“ des Metaboliten-Tools am Beispiel von Tramadol: Die aus MassHunter exportierte Ergebnisliste wird unter Verwendung einer Metabolisierungsdatei in eine Liste von möglichen Metaboliten überführt.

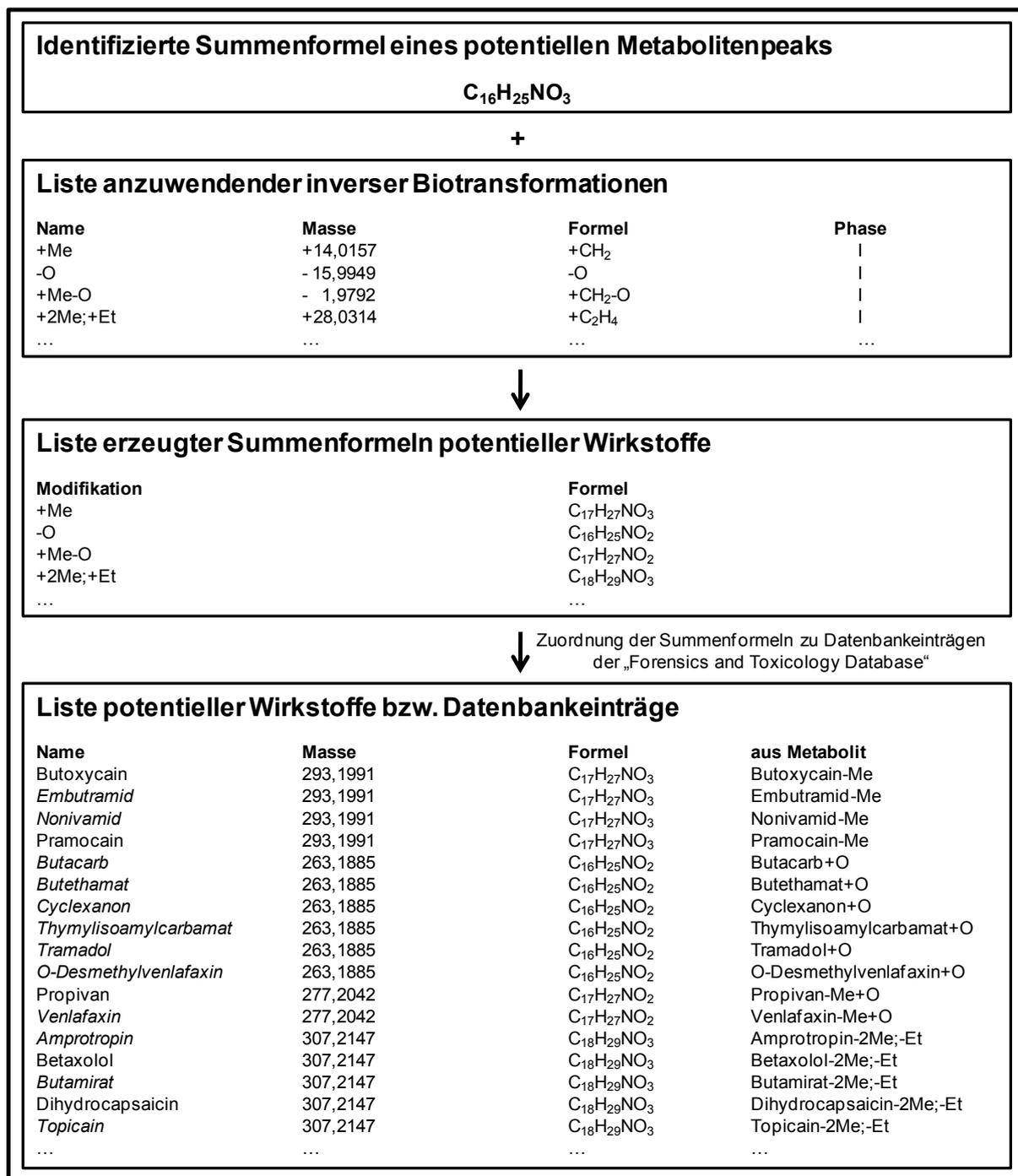
Für die Berechnung möglicher Biotransformationsprodukte wird eine zweite csv-Datei („Metabolisierung.csv“) mit Biotransformationsreaktionen verwendet. Diese enthält vier Header: „Name“, „Masse“, „Formel“ und „Phase“ der entsprechenden Biotransformationen. In dieser Datei sind alle zu verwendenden Modifikationen eingetragen. Diese können beliebig reduziert oder ergänzt werden. Mit dem Befehl „Find Metabolites“ werden alle Metabolisierungsreaktionen der Datei „Metabolisierung.csv“ auf die Einträge der Datei „Ergebnisse.csv“ angewendet. Begonnen wird bei dem ersten Eintrag der Datei „Ergebnisse.csv“. Es werden alle Metabolisierungen, die als Phase-I in der Datei „Metabolisierung.csv“ eingetragen sind, auf den Namen, die Masse und die Summenformel der Substanz angewendet. Anschließend erfolgt die Phase-II-Metabolisierung aller so erhaltenen Produkte sowie der Ausgangssubstanz. Dieser Algorithmus wird für alle weiteren Einträge der Datei „Ergebnisse.csv“ durchgeführt und alle neu erhaltenen transformierten Ergebnisse in eine neue Datei, welche ebenfalls die Header „Name“, „Masse“, „Formel“ und „Phase“ beinhaltet, eingetragen. Mit Hilfe dieser Automatisierung erfolgt innerhalb einer Sekunde die Erzeugung einer Liste mit bis zu mehreren hundert möglichen Metaboliten für eine einzelne Substanz. Diese postulierten Metabolite sind lediglich berechnet und können auf Grund ihrer Struktur unrealistisch sein. Diese erzeugte Datenbank wird für eine erneute, gerichtete Suche mit dem Algorithmus „Find by Formula“ in der MassHunter Qualitative Software verwendet. Hierbei werden die nicht identifizierten Peaks der extrahierten Ionenchromatogramme anhand der akkuraten Masse sowie des Isotopenmusters mit der berechneten postulierten Metabolitensummenformel abgeglichen. Bei Übereinstimmung erfolgen eine Plausibilitätsprüfung sowie eine Strukturaufklärung anhand von CID-Spektren.

### *Algorithmus „Find Parent Drug“*

Der dem Befehl „Find Parent Drug“ zugrundeliegende Algorithmus stellt eine gezielte Suche nach einem Wirkstoff ausgehend von einem vermeintlichen Metaboliten dar. Diese Suche ist besonders wertvoll bei Wirkstoffen, die schnell metabolisiert werden und deren Metabolite intensive Peaks im Chromatogramm liefern. Es kann grundlegend jeder als Metabolit betrachtete Peak verwendet werden. Auf Grund der Vielzahl an Peaks in einem Datenfile ist diese Methode jedoch nur für nicht identifizierte, sehr intensive Peaks praktikabel. Mit Hilfe der akkuraten Masse und des Isotopenmusters ist es möglich, die Summenformel des vermeintlichen Metabolitenpeaks zu ermitteln. Diese wird in das Metaboliten-Tool eingetragen. Ausgehend von der Summenformel

kann dann eine Liste ausgewählter Metabolisierungsreaktionen verwendet werden, die invers angewendet wird. Die somit erhaltenen Summenformeln möglicher Wirkstoffe werden dann automatisch mit der Datenbank abgeglichen. Dabei werden häufig zu einer Summenformel mehrere Wirkstoffnamen isomerer Substanzen angegeben. Daher sollte die erhaltene Liste möglicher Wirkstoffe manuell auf Plausibilität überprüft werden. In Abbildung 4.31 ist am Beispiel der identifizierten Summenformel  $C_{16}H_{25}NO_3$  der Algorithmus „Find Parent Drug“ dargestellt. Entsprechend der vorgegebenen inversen Metabolisierungsreaktionen werden zunächst Summenformeln potentieller Muttersubstanzen erzeugt. Diese werden dann in der Datenbank „Forensics and Toxicology Database“ gesucht und übereinstimmenden Einträgen zugeordnet. In diesem Beispiel kommen von den 17 in der Datenbank gefundenen Substanzen nur 12 auf Grund ihrer Struktur und damit verbundenen Metabolisierungsreaktion in Frage. Botoxycain ist eine der fünf Substanzen, die ausgeschlossen werden kann, da dessen Demethylierung zur Bildung des potentiellen Metaboliten auf Grund der fehlenden Methylgruppe in der Ausgangssubstanz nicht möglich ist.

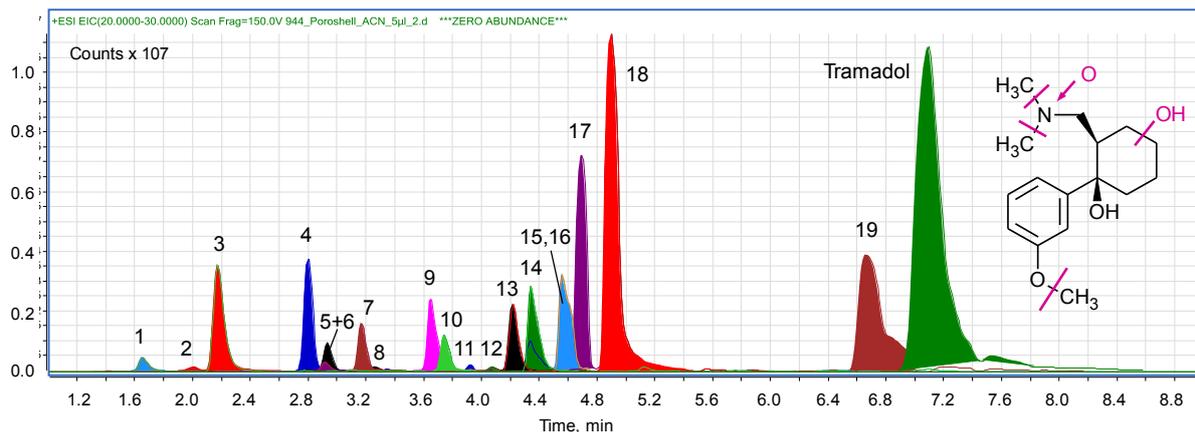
Diese potentiellen Ausgangssubstanzen können zum einen direkt für eine gezielte Suche oder zum anderen für eine Suche nach weiteren Metaboliten mit dem Befehl „Find Metabolites“ verwendet werden. So kann der Nachweis eines Wirkstoffs entweder direkt erfolgen, insbesondere wenn die Substanz in sehr niedriger Konzentration vorhanden ist und nur durch eine gezielte Suche identifiziert werden kann, oder durch den Nachweis weiterer, den Befund ergänzender Metabolite.



**Abbildung 4.31:** Verwendete Dateien für den Algorithmus „Find Parent Drug“ des Metaboliten-Tools: Die identifizierte Summenformel  $C_{16}H_{25}NO_3$  lieferte unter Anwendung einer Metabolisierungsdatei 17 Einträge aus der Datenbank. Von denen kommen nur die 12 kursiv dargestellten Substanzen auf Grund ihrer Struktur in Frage.

#### Anwendung des Metaboliten-Tools anhand einer Blutprobe

Anhand des identifizierten Tramadols (RT = 7,1 min) in Abbildung 4.32 soll die Anwendung des Metaboliten-Tools demonstriert werden. Insgesamt wurden 19 Metabolite aus Demethylierungs-, Hydroxylierungs-, N-Oxid-Bildungs- und Glucuronidierungs-Biotransformationen gefunden und mittels CID-Spektren bestätigt.



**Abbildung 4.32:** Fallbeispiel 09/994, Proteinfällung einer Venenblutprobe. Anwendung des Tools mit dem Algorithmus „Find Metabolites“ auf den Peak bei 7,089 min, welcher durch die Bibliothekssuche als Tramadol (T) identifiziert wurde. Insgesamt wurden 19 Metabolite, die durch Demethylierung, Didemethylierung, Tridemethylierung, Hydroxylierung oder unter Bildung des N-Oxids, deren Kombinationen und Kombination der Glucuronidierung, gefunden. Durch Abgleich der akkuraten Masse und des Isotopenmusters wurde folgende Peakidentifikation vorgeschlagen: 17 = O-Demethyl-T (ebenfalls über die Bibliothekssuche identifiziert); 19 = N-Demethyl-T, 11 = N,O-Didemethyl-T, Unterscheidung zu 16 durch die Retentionszeit; 16 = N,N-Didemethyl-T; 15 = Tridemethyl-T, 13,18 = Hydroxy-T und T-N-Oxid; 1,3,10,14 = isomere Hydroxydemethyl-T; 2,12 = isomere Hydroxydidemethyl-T; 4 = Glucuronid des Demethyl-T; 5,7 = Glucuronid des Didemethyl-T; 6 = Glucuronid des Hydroxydemethyl-T; 8 = Glucuronid des Hydroxydidemethyl-T; 9 = Glucuronid des Hydroxy-T.

Dabei handelte es sich um O-Demethyltramadol (RT = 4,7 min), N-Demethyltramadol (RT = 6,7 min), N,O-Didemethyltramadol (RT = 3,9 min), N,N-Didemethyltramadol (RT = 4,6 min), Tridemethyltramadol (RT = 4,6 min), Hydroxytramadol und Tramadol-N-Oxid (RT = 4,2 min und 4,9 min), Isomere des Hydroxydemethyltramadols (RT = 1,7 min, 2,2 min, 3,8 min und 4,3 min), Isomere des Hydroxydidemethyltramadols (RT = 2,0 min und 4,1 min), Glucuronid des Demethyltramadols (RT = 2,8 min), Glucuronid des Didemethyltramadols (RT = 2,9 min und 3,2 min), Glucuronid des Hydroxydemethyltramadols (RT = 2,9 min), Glucuronid des Hydroxydidemethyltramadols (RT = 3,3 min) und Glucuronid des Hydroxytramadols (RT = 3,6 min). Die Unterscheidung von N,O-Didemethyltramadol und N,N-Didemethyltramadol kann anhand der Polaritäten beider Substanzen erfolgen, wobei das hydrophilere N,O-Didemethyltramadol bei der RP-Chromatographie die kürzere Retentionszeit aufweist. Eine eindeutige Identifizierung war nur für den Metaboliten O-Demethyltramadol möglich, da dieser als einziger in der Bibliothek enthalten war. Eine Unterscheidung zwischen den zwei oder mehr gebildeten isomeren Metaboliten ist ohne zusätzliche Informationen nicht möglich. Dennoch zeigt dieses Beispiel, dass das Metaboliten-Tool sehr nützlich zur Bestätigung des identifizierten Wirkstoffs ist und darüber hinaus eine Erklärung für die intensivsten Peaks im Chromatogramm lieferte.

### 4.4.2 Anwendung des Metaboliten-Tools in der Haaranalyse

Der Nachweis von Metaboliten ermöglicht in der Haaranalyse häufig eine zusätzliche Bestätigung eines Wirkstoffs und spielt eine Schlüsselrolle bei der Unterscheidung zwischen externer Kontamination und systemischer Inkorporation ins Haar. Alleine die eindeutige Identifizierung einer Substanz stellt noch keinen Beweis für einen Konsum dar. Eine durch die Umwelt von außen ins Haar eingetragene Substanz wie zum Beispiel Cocainstaub oder Marihuanarauch, resultierend aus Fremdkonsum, stellt eine Kontamination dar und kann zu einem positiven Befund führen. Dieser Eintrag kann auch durch die in der Probenvorbereitung üblichen Dekontaminationsschritte nicht völlig entfernt werden. Zur Unterscheidung zwischen einer Kontamination und einer systemischen Aufnahme des Wirkstoffs ist es daher nötig, weitere auf den Wirkstoff zurückzuführende Substanzen nachzuweisen. Diese sollten ausschließlich im Organismus durch die dort stattfindende Biotransformation wie Hydroxylierung, Desalkylierung oder Phase-II-Konjugationen entstehen und keinen anderen Ursprungsort haben. Hydrolytische Metabolite stellen keinen eindeutigen Beweis für einen Konsum dar, da sie auch außerhalb eines Organismus ohne Metabolisierungsreaktionen entstehen können. Beispiele hydrolytischer Metabolite sind durch Esterspaltung aus Cocain entstandenes Benzoylecgonin oder aus Heroin durch Desacetylierung entstandenes Acetylmorphin und Morphin, während Norcocain oder Normorphin nicht-hydrolytische Metabolite des Cocains oder Heroins darstellen.

Mit Hilfe des Nachweises von Metaboliten kann auch dann noch ein Konsum von Drogen oder Medikamenten belegt werden, wenn die Muttersubstanz eine kurze Halbwertszeit im Blut hat, nicht oder nur schlecht ins Haar eingelagert wird oder instabil im Haar ist. Auch instabile Metabolite, welche eine hohe Inkorporationsrate ins Haar aufweisen, können im Haar nachgewiesen werden. Des Weiteren sind pharmakogenetische Studien zu CYP Polymorphismen anhand von Metaboliten-Wirkstoff-Konzentrationsverhältnissen möglich [169]. Analog zu anderen Matrices sind Informationen zur Art der Einnahme wie zum Beispiel oral oder parenteral über das Metaboliten-Wirkstoff-Verhältnis zugänglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Haarproben aus Todesfällen mit bekanntem Drogenmissbrauch oder therapeutischer Medikamenteneinnahme mit dem selbstentwickelten Metaboliten-Tool systematisch auf die Anwesenheit von Metaboliten untersucht. Durch die Anwendung des Algorithmus „Find Metabolites“ auf die identifizier-

ten Wirkstoffe wurden automatisch die Summenformeln möglicher Metabolite berechnet. Die daraus resultierende Liste wurde in der MassHunter Software unter Verwendung des Algorithmus „Find by Formula“ verwendet, um im Datenfile nach Summenformeln potentieller Metabolite zu suchen. Zur Bestätigung eines vorgeschlagenen Metaboliten wurde auf Plausibilität überprüft und die CID-Spektren wurden zur Strukturaufklärung herangezogen.

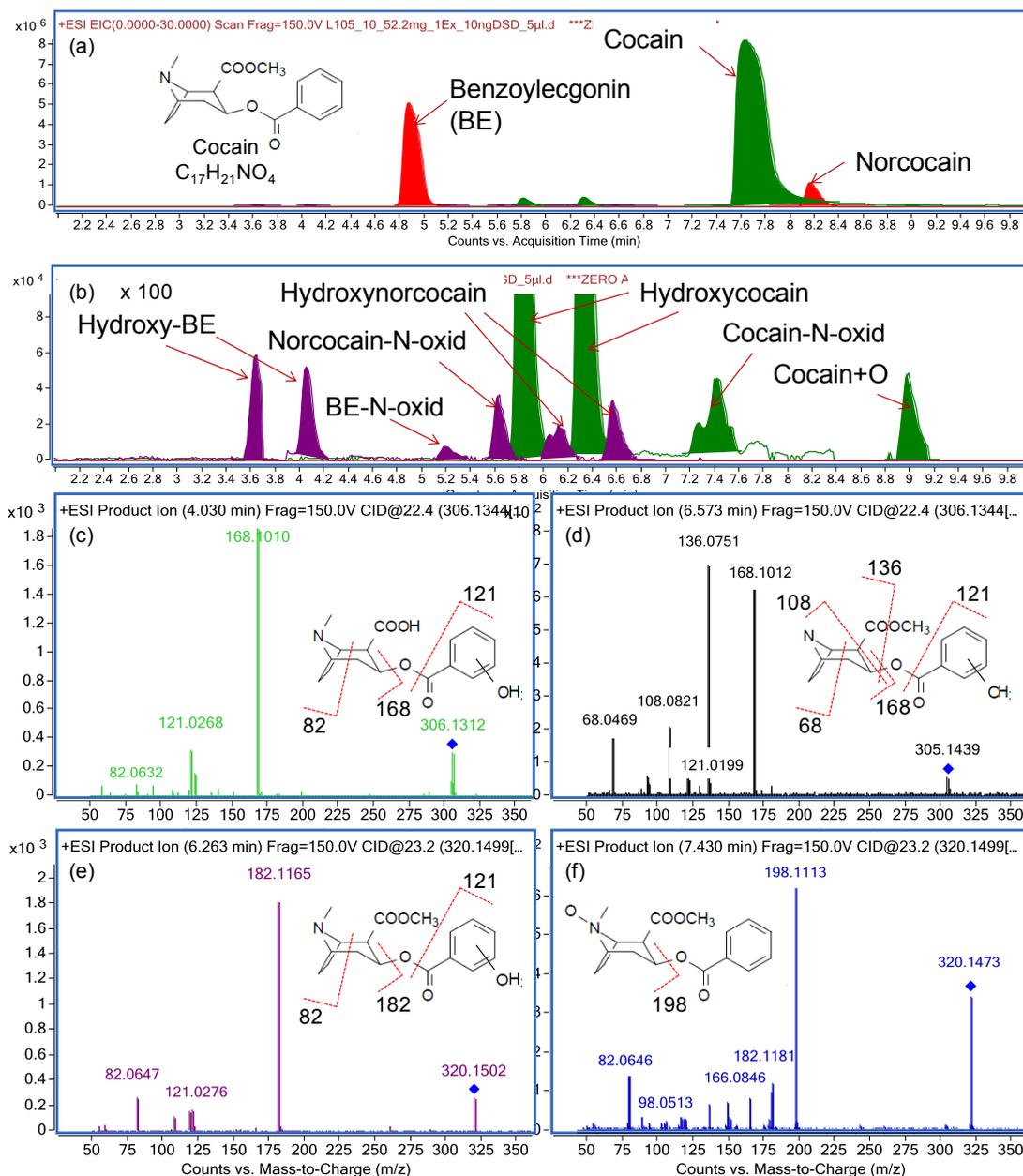
Anhand einiger ausgewählter Beispiele soll die Anwendung des Metaboliten-Tools demonstriert werden.

### *Beispiel für Cocain-Metabolite im Haar*

Von den 30 insgesamt in dieser Arbeit untersuchten Haarproben von Drogenkonsumenten wurde in 20 Cocain nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.3.3. und Tabelle 4.13). Der Fall 10/105, in dem neben Cocain auch zwei seiner Metabolite Benzoylecgonin und Norcocain mittels Bibliothekssuche eindeutig identifiziert wurden, ist in Abbildung 4.33 (a) dargestellt.

Der Nachweis von Benzoylecgonin, einem hydrolytischen Metaboliten des Cocains, liefert noch keinen Beweis für einen erfolgten Konsum von Cocain. Dahingegen belegt der nicht-hydrolytische Metabolit Norcocain dessen Konsum. Durch die Anwendung des Metaboliten-Tools wurden neben Norcocain weitere nicht-hydrolytische Metabolite vorgeschlagen (siehe Abbildung 4.33 (b)). Dabei handelt es sich um vier bis fünf hydroxylierte oder oxidierte und sechs bis sieben demethylierte und hydroxylierte oder oxidierte Cocainmetabolite. Die chromatographischen Peaks basieren auf einem Vergleich des Isotopenmusters und der akkuraten Masse der vorgeschlagenen Metabolite. Die Biotransformationsprodukte des Cocain-Me+O ließen sich als m-Hydroxybenzoylecgonin und p-Hydroxybenzoylecgonin (RT = 3,6 min und 4,1 min), Benzoylecgonin-N-oxid (RT = 5,2 min), Norcocain-N-oxid (RT = 5,6 min), m-Hydroxynorcocain und p-Hydroxynorcocain (RT = 6,1 min und 6,6 min) identifizieren.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.33:** Haarprobe des Falls 10/105: (a) EICs des mittels Bibliothek identifizierten Cocains, Benzoyllecgonins und Norcocains, (b) 100fache Vergrößerung der EICs des mittels Metaboliten-Tools nachgewiesenen Hydroxycocains bzw. Cocain-N-oxids sowie deren Demethylierungsprodukte, (c) CID-Spektrum von Hydroxybenzoyllecgonin bei 4,1 min, (d) CID-Spektrum von Hydroxynorcocain bei 6,6 min, (e) CID-Spektrum von Hydroxycocain bei 5,8 min, (f) CID-Spektrum von Cocain-N-oxid bei 7,4 min.

Aus der Metabolisierung des Cocains durch eine Monooxygenierung wurden m-Hydroxycocain und p-Hydroxycocain (RT = 5,8 min und 6,3 min), Cocain-N-oxid (RT = 7,4 min) und Cocain+O (RT = 9,0 min) identifiziert. Zur Unterscheidung der Isomere wurden deren CID-Spektren herangezogen. Das charakteristische Fragmentation 121 m/z (Hydroxybenzaldehyd) ist nur bei einer metabolisch erfolgten Hydroxylierung am Aromaten zu finden (siehe Abbildung 4.33 (c)-(e)). Dahingegen wird bei einer metabolischen N-Oxidierung ein um die Masse des Sauerstoffs größeres



### *Beispiele für Amphetamin-Metabolite im Haar*

Zwei der untersuchten Haarproben wiesen hohe Konzentrationen an Amphetamin auf. Anhand dieser beiden Haarproben wurde eine systematische Suche nach Metaboliten vorgenommen.

Im ersten Fall 09/768 wurden Methamphetamin (0,048 ng/mg) und Amphetamin (30 ng/mg) mittels Bibliothekssuche identifiziert. Amphetamin stellt bereits einen möglichen Metaboliten des Methamphetamins dar. Aus dem Konzentrationsverhältnis ist aber anzunehmen, dass es in dieser Probe nur zu geringem Teil aus der Metabolisierung hervorging und im Wesentlichen als Wirkstoff eingenommen wurde. Bei der Suche nach Methamphetaminmetaboliten konnte der im Metabolismusschema in Abbildung 4.35 dargestellte Hydroxymetabolit des Methamphetamins nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurden das bereits identifizierte Amphetamin, sowie zwei Hydroxyamphetaminmetabolite gefunden (siehe Abbildung 4.36). Das Signalverhältnis der Hydroxymetabolite zu Amphetamin ist ca. 1:20. Mit Hilfe der CID-Spektren wurde der Peak bei RT = 2,7 min in Abbildung 4.35 als Norephedrin, der zweite bei RT = 3,4 min als p-Hydroxyamphetamin identifiziert. Eine Unterscheidung beider Isomere konnte alleine schon anhand der Wasserabspaltung, welche nur beim Norephedrin ablaufen kann und zu einer Verlängerung des  $\pi$ -Elektronensystems führt, erfolgen (siehe Abbildung 4.36 (b)). Aus der Literatur ist bekannt (siehe Abbildung 4.35), dass sich aus beiden Metaboliten das p-Hydroxynorephedrin bildet [173]. Dieses konnte jedoch nicht in den untersuchten Haarproben nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass es auf Grund seiner sehr hydrophilen Eigenschaften nur schlecht oder gar nicht ins Haar eingelagert wird. Ein weiterer im Metabolismusschema in Abbildung 4.35 dargestellter Metabolit Phenylaceton konnte ebenfalls nicht gefunden werden. Bei einer Überprüfung der Detektierbarkeit dieser Substanz mittels ESI zeigte sich, dass diese Substanz unter diesen Bedingungen nicht ionisierbar ist. Unter Verwendung der negativen Ionisation wurde die Anwesenheit von Benzoesäure überprüft, welche jedoch ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte.

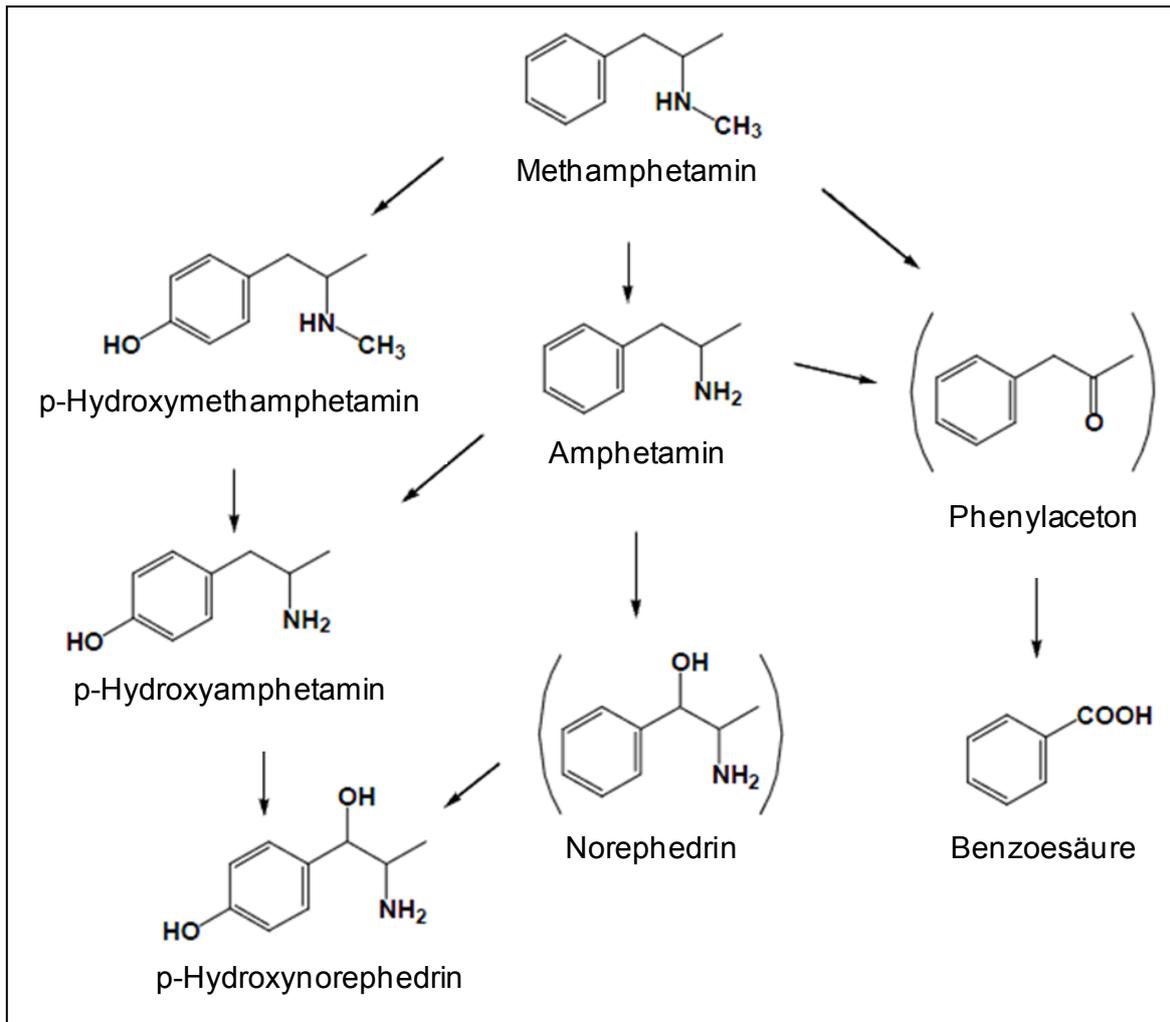


Abbildung 4.35: Metabolismusschema von Methamphetamine [173].

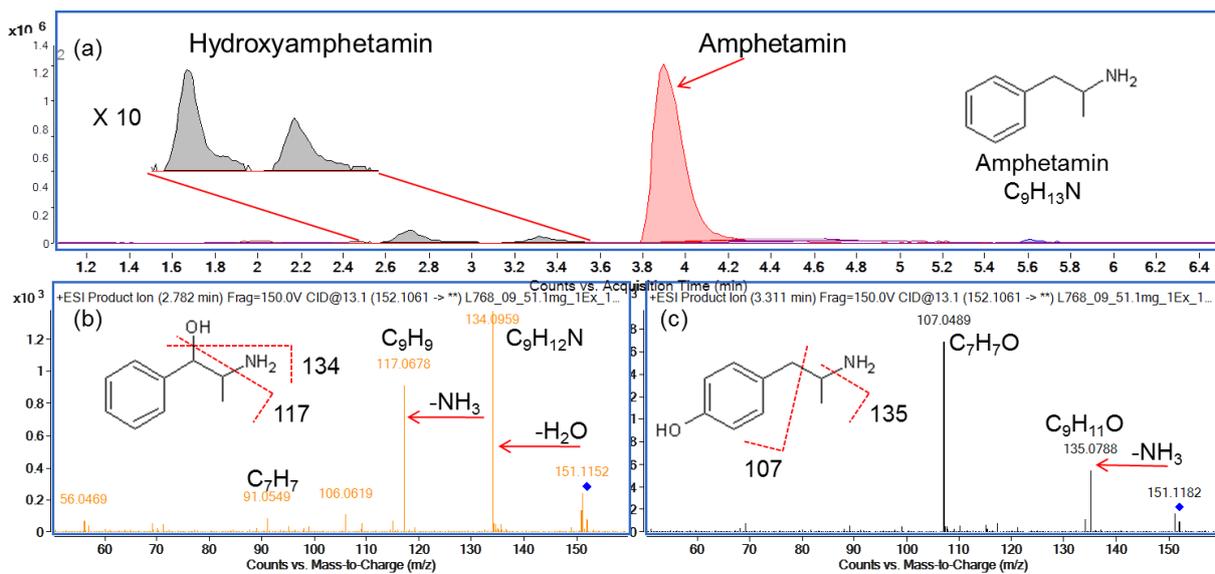
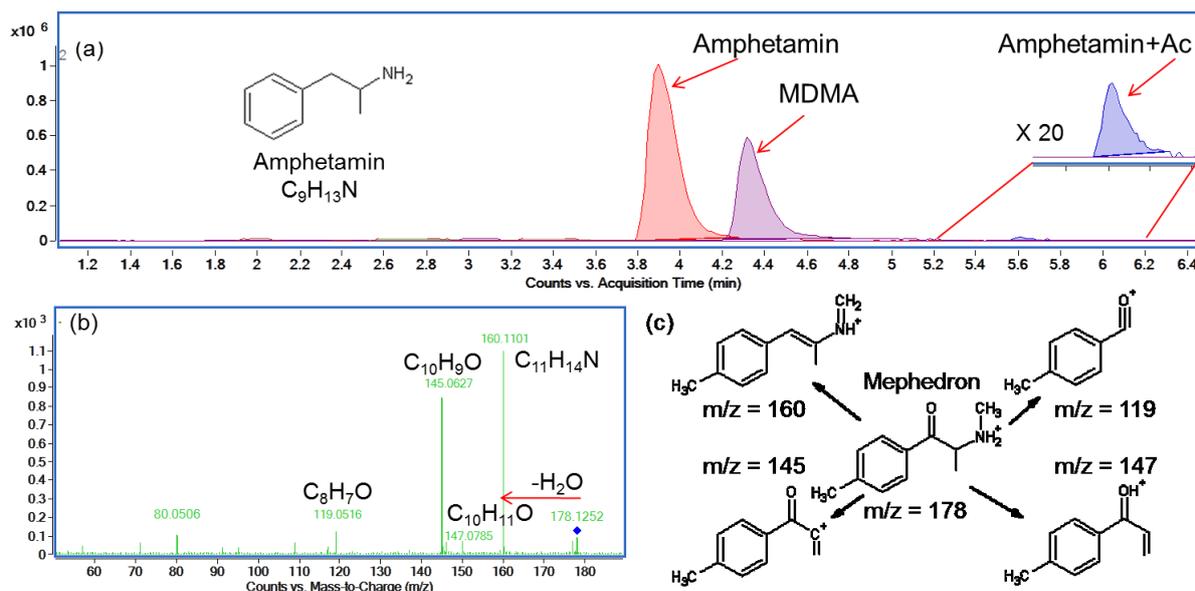


Abbildung 4.36: Haarprobe des Falls 09/768: (a) EICs des mittels Bibliothek identifizierten Amphetamins und der mittels Metaboliten-Tools nachgewiesenen Monohydroxyamphetaminmetabolite, (b) CID-Spektrum von Norephedrin bei 2,7 min, (c) CID-Spektrum von p-Hydroxyamphetamin bei 3,4 min.

Im zweiten Fall 10/079 wurden mittels Bibliothekssuche Amphetamin (6,2 ng/mg) und Ecstasy (MDMA) (0,90 ng/mg) identifiziert. Die systematische Suche nach Ecstasy-Metaboliten lieferte keine potentiellen Metabolitenpeaks. Bei der Suche nach Amphetaminmetaboliten zeigte sich entgegen den im vorigen Beispiel gemachten Beobachtungen, dass die beiden Hydroxymetabolite des Amphetamins nicht nachgewiesen werden konnten. Anstelle dessen wurde N-Acetylamphetamin (RT = 5,6 min) als ein möglicher Metabolit vorgeschlagen (siehe Abbildung 4.37 (a)).



**Abbildung 4.37:** Haarprobe des Falls 10/079: (a) EICs des mittels Bibliothek identifizierten Amphetamins und MDMA und mittels Metaboliten-Tools vorgeschlagenen N-Acetylamphetamins, (b) CID-Spektrum des vorgeschlagenen N-Acetylamphetamins bei 5,6 min, (c) Fragmentierungsschema von Mephedron [174].

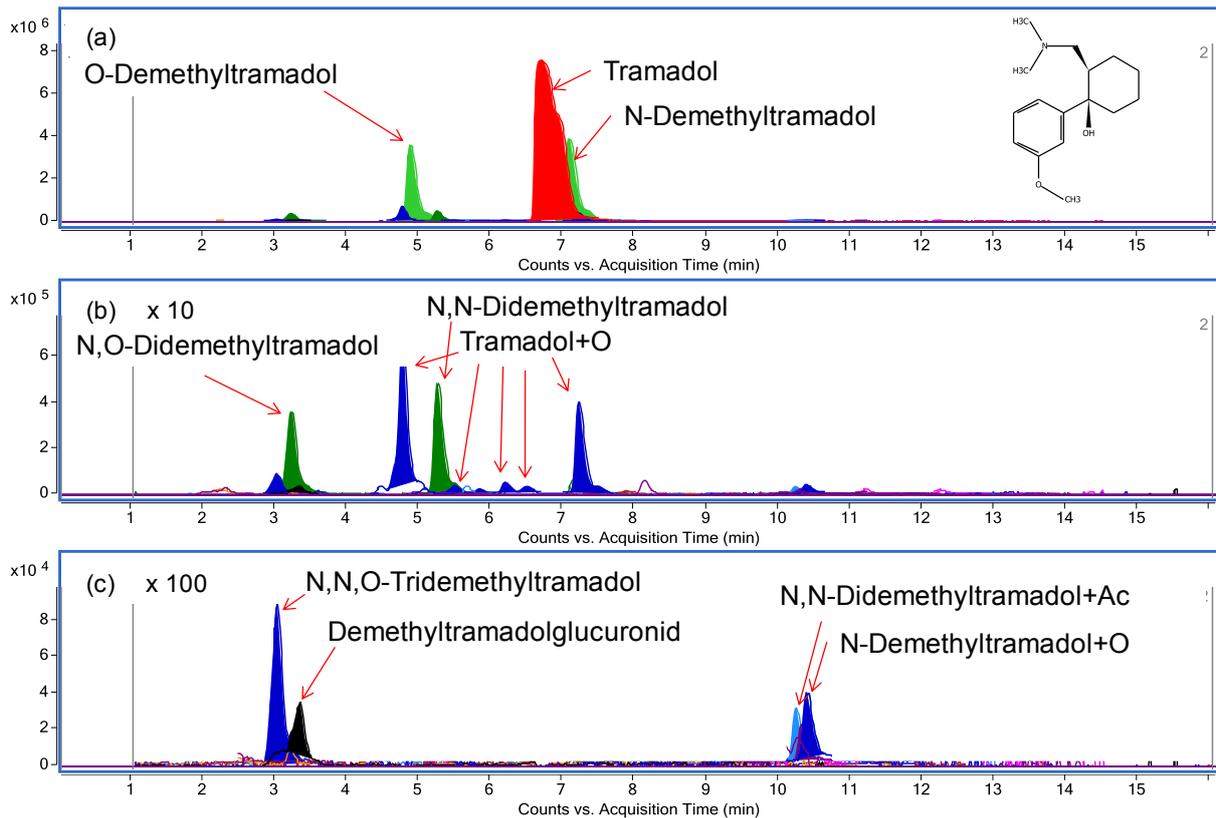
Bei der Interpretation des CID-Spektrums stellte sich jedoch heraus, dass es sich hierbei nicht um N-Acetylamphetamin handeln kann. Insbesondere das intensive Signal des Neutralverlusts von Wasser spricht gegen den vorgeschlagenen Metaboliten (siehe Abbildung 4.37 (b)), obwohl eine Wasserabspaltung im geringeren Maße auch für dieses Molekül nicht auszuschließen ist. Bei der manuellen Interpretation des CID-Spektrums und dem Vergleich mit in der Literatur gefundenen CID-Spektren von Cathinonen stellte sich heraus, dass es sich bei der Verbindung mit hoher Wahrscheinlichkeit um Mephedron handelt (siehe Abbildung 4.37 (c)) [174]. Jedoch war auf Grund der niedrigen Signalintensität und Matrixinterferenzen für einige erwartete Fragmentationen die Massenabweichung zu groß. Da dieser Wirkstoff noch nicht in der Datenbank und daher auch nicht in der Bibliothek erfasst ist, war dessen eindeutige Identifizierung nicht möglich. Weitere, den Befund bestätigende Metabolite des Mephedrons wurden nicht gefunden. Eine eindeutige

Aussage über das Vorhandensein von Mephedron in dieser Haarprobe ließ sich daher nicht abschließend klären und kann erst durch die Messung der Referenzsubstanz erfolgen. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Anwendung des Metaboliten-Tools lediglich Vorschläge auf der Basis der akkuraten Masse und des Isotopenmusters liefert und eine Unterscheidung isomerer Verbindungen anhand von CID-Spektren erforderlich ist.

### *Beispiel für Tramadol-Metabolite im Haar*

Der Medikamentenwirkstoff Tramadol wurde in dieser Arbeit mit einer hohen Häufigkeit in Haarproben nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.3.3. Tabelle 4.14). Ein Fall mit einer besonders hohen Konzentration im Haar war 09/801. Anhand dieses Fallbeispiels soll der Umfang an nachweisbaren Tramadolmetaboliten in der Haaranalyse dargestellt werden. Tramadol (RT = 6,8 min) sowie sein Metabolit O-Demethyltramadol (RT = 5,0 min) konnten mittels Bibliothekssuche eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 4.38 (a)). Durch die Anwendung des Metaboliten-Tools und der Suche nach weiteren Metaboliten konnten Signale für N-Demethyltramadol (RT = 7,1 min), N,N-Didemethyltramadol (RT = 5,2 min), N,O-Didemethyltramadol (RT = 3,2 min), fünf Isomere des Hydroxytramadols bzw. Tramadol-N-oxids (RT = 4,8 min, 5,6 min, 6,2 min, 6,5 min und 7,2 min), N,N,O-Tridemethyltramadol (RT = 3,0 min), Demethyltramadolglucuronid (RT = 3,2 min), sowie acetyliertes N,N-Didemethyltramadol (RT = 10,3 min) und N-Demethyltramadol-N-oxid oder Hydroxy-N-demethyltramadol (RT = 10,4 min) erhalten werden (siehe Abbildung 4.38). Einschränkend muss bemerkt werden, dass es sich zunächst nur um Vorschläge handelt, die jedoch durch das Fragmentierungsverhalten gestützt werden und sich durch ihre Anwesenheit gegenseitig bestätigen.

## Ergebnisse und Diskussion



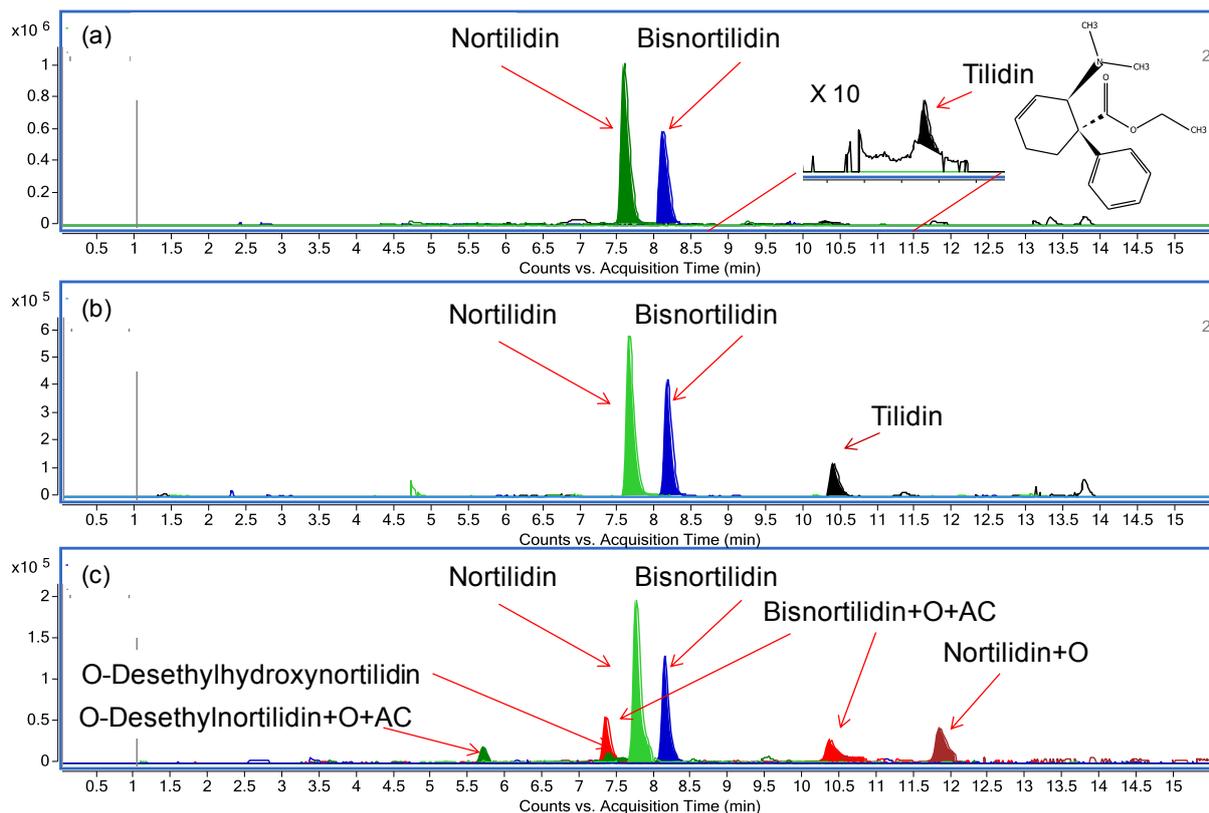
**Abbildung 4.38:** Haarprobe 09/801: (a) EICs der mittels Bibliothek identifizierte Substanzen Tramadol und O-Demethyltramadol sowie das mittels Metaboliten-Tools nachgewiesene N-Demethyltramadol, (b) 10fache Vergrößerung der EICs, der mittels Metaboliten-Tools nachgewiesenen Metabolite N,O-Didemethyltramadol, N,N-Didemethyltramadol und fünf Isomere des Hydroxytramadols bzw. Tramadol-N-oxids, (c) 100fache Vergrößerung der EICs, der mittels Metaboliten-Tools nachgewiesenen Metabolite N,N,O-Tridemethyltramadol, Demethyltramadolglucuronid, acetyliertes N,N-Didemethyltramadol und N-Demethyltramadol-N-oxid oder Hydroxy-N-demethyltramadol.

In diesem wie auch anderen Fällen zeigte sich, dass Tramadol den intensivsten Peak darstellte und dass dessen Metabolite in niedriger Konzentration vorhanden waren. Mit zunehmender Hydrophilie der detektierten Metabolite zeigte sich eine Signalabnahme, was mit einer verminderten Einlagerung ins Haar erklärbar ist. Das hier nachgewiesene Glucuronid des Tramadols stellte eine Ausnahme der sonst nachgewiesenen Metabolite dar und wurde nur in dieser Probe detektiert.

### *Beispiele für Tilidin-Metabolite im Haar*

Das Opioid Tilidin wurde nur sehr selten in der Systematischen Toxikologischen Analyse in Haarproben identifiziert. In Abbildung 4.39 sind drei Fälle 09/994, 09/973 und 09/915 dargestellt, in denen es direkt oder dessen Einnahme indirekt nachgewiesen werden konnte. Lediglich im Fall 09/973 wurde es auf Grund der ausreichenden Signalintensität direkt bei der STA mit einer Bibliothekssuche identifiziert. Im Fall 09/994 konnte es nur nach gezielter Suche nachgewiesen werden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.39:** EICs von Tilidin und seinen Metaboliten nach Anwendung des Metaboliten-Tools: (a) Haarprobe des Falls 09/994, (b) Haarprobe des Falls 09/973, (c) Haarprobe des Falls 09/915.

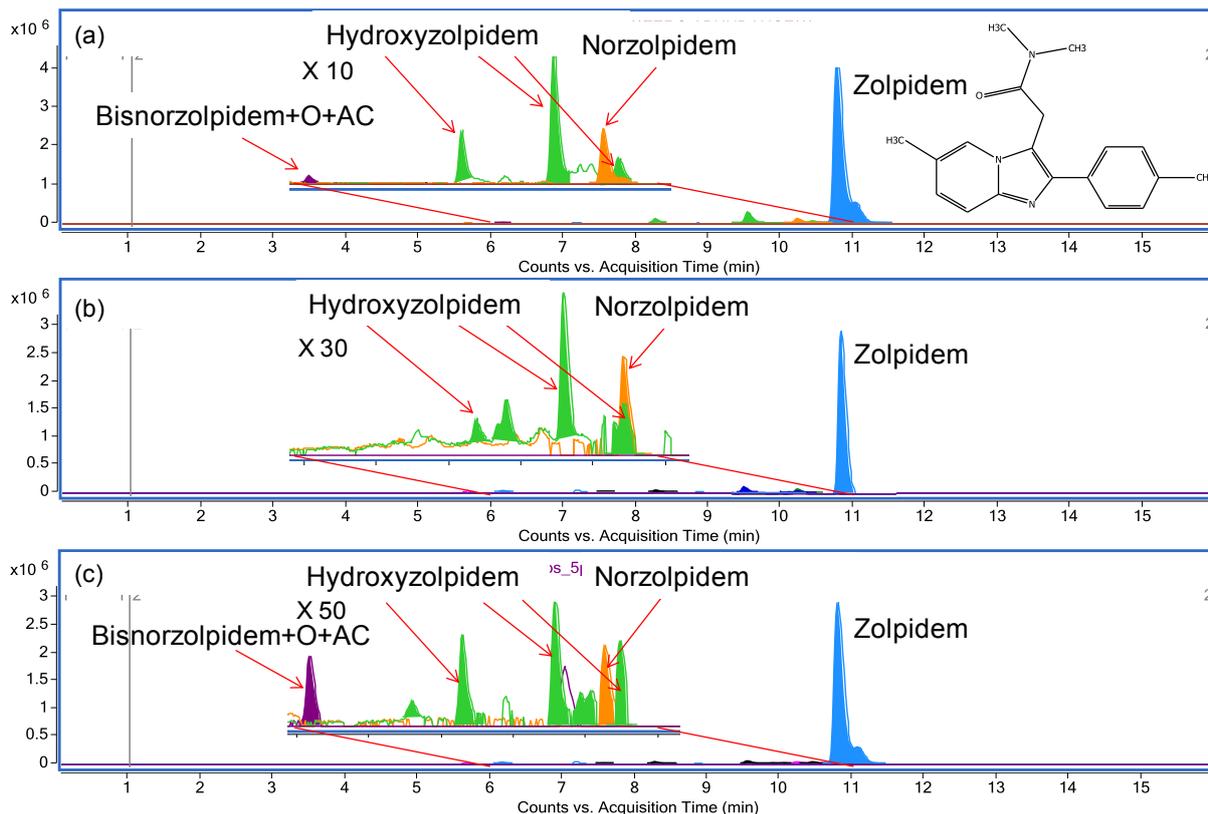
Durch die Anwendung des Metaboliten-Tools auf einige der intensiveren Peaks des Chromatogramms mit dem Algorithmus „Find Parent Drug“ und anschließender Suche nach den vorgeschlagenen Wirkstoffen, sowie der Anwendung des Algorithmus „Find Metabolites“ auf die potentiellen Wirkstoffe konnte im Fall 09/994 Tilidin als Muttersubstanz nachgewiesen werden. Im Fall 09/915 konnte die Muttersubstanz Tilidin nicht bestätigt werden. Dafür konnten jedoch mehrere seiner Metabolite gefunden werden, wobei es sich neben den in allen Tilidinfällen identifizierten Metaboliten Nortilidin (RT = 7,6 min) und Bisnortilidin (RT = 8,2 min) um acetyliertes, hydroxyliertes oder N-oxidiertes O-Desethylnortilidin (RT = 5,8 min), O-Desethylhydroxynortilidin (RT = 7,4 min), acetyliertes, hydroxyliertes oder N-oxidiertes Bisnortilidin (RT = 10,4 min) und hydroxyliertes oder N-oxidiertes Nortilidin (RT = 11,9 min) handelte. Die im Fall 09/915 nachgewiesenen acetylierten Metabolite zeigen, dass es sich hierbei um ein Individuum mit besonderem Metabolismus handelt. Das Auftreten acetylierter Metabolite wurde nur in wenigen Fällen beobachtet. Dies kann auf den Polymorphismus der an der Biotransformation beteiligten N-Acetyltransferasen (NAT) zurückgeführt werden. Bei „schnellen Acetylierern“ kommt es bei Konkurrenzreaktionen zwischen CYP-Enzymen, welche eine Mono-

oxigenierung herbeiführen, und NAT-Enzymen, welche eine Acetylierung bewerkstelligen, zu einer durch die Kinetik bedingten schnelleren Substratumsetzung durch NAT zugunsten acetylierter Metabolite.

Entgegen der Regel und den zuvor in den anderen Fällen gemachten Beobachtungen, dass die Muttersubstanz das intensivste Signal bei Haaranalysen liefert, wiesen die Metabolite Nortilidin und Bisnortilidin eine deutlich höhere Signalintensität/Konzentration als die Muttersubstanz auf. Im Fall 09/994 lagen sie ca. um den Faktor 50 höher als Tilidin. Diese beiden nicht-hydrolytischen Metabolite eignen sich nicht nur zum Nachweis einer systemischen Aufnahme von Tilidin, sondern liefern auch die Möglichkeit einen Konsum empfindlicher, anhand der Metabolite und nicht der Muttersubstanz, nachzuweisen. Daher sollte bei einer gezielten Suche nach Tilidin immer auch nach Nortilidin und Bisnortilidin gesucht werden. Diese drei Beispiele für das Tilidin zeigen, dass nicht immer die Muttersubstanz in hoher Konzentration ins Haar eingelagert wird, sondern dass diese teilweise nicht oder nur in sehr geringem Umfang eingetragen wird. Hier kann der Nachweis anhand von Metaboliten sinnvoll sein, wenn sie besser ins Haar inkorporiert werden und daher in höheren Konzentrationen vorliegen.

### *Beispiel für Zolpidem-Metabolite im Haar*

In drei der in dieser Promotionsarbeit untersuchten Haarproben wurde mit der Bibliotheksuche Zolpidem (RT = 10,9 min) identifiziert (siehe Abbildung 4.40). Die Anwendung des Metaboliten-Tools zur Suche nach Metaboliten zeigte, dass in allen drei Proben Norzolpidem (RT = 10,3 min) und drei isomere Hydroxyzolpideme (RT = 8,2 min, 9,8 min und 10,5 min) nachgewiesen werden konnten. In zwei Fällen konnte darüber hinaus sogar acetyliertes, hydroxyliertes oder oxidiertes Bisnorzolpidem (RT = 6,2 min) nachgewiesen werden. Alle diese Metabolite stellen nicht-hydrolytische Metabolite dar und beweisen zweifelsfrei, dass es sich bei diesen Fällen um einen Konsum des Zolpidems gehandelt hat.



**Abbildung 4.40:** EICs von Zolpidem und seinen Metaboliten nach Anwendung des Metaboliten-Tools: (a) Haarprobe des Falls 09/865, (b) Haarprobe des Falls 09/859, (c) Haarprobe des Falls 09/801.

Insgesamt zeigen diese Beispiele, dass die Aussagekraft der Systematischen Toxikologischen Analyse im Haar durch das Metaboliten-Tool erheblich erweitert werden kann.

### 4.5 Semiquantitative Konzentrationsbestimmung in der STA [175]

Die Systematische Toxikologische Analyse hat nicht nur die Identifizierung von Giften zum Ziel, sondern auch Angaben über deren Konzentrationen. Schon Paracelsus brachte im Jahr 1589 die Bedeutung der Dosis-Wirkungs-Beziehung durch die Feststellung „All Ding' sind Gift und nichts ohn' Gift; allein die Dosis macht, das ein Ding kein Gift ist.“ [176] passend zum Ausdruck. Daher ist bei der toxikologischen Interpretation im klinischen wie auch forensischen Bereich zumindest eine Konzentrationsabschätzung unbedingt erforderlich. Hierbei genügt oftmals schon die Einordnung in die Bereiche der nicht wirksamen, der therapeutischen, der toxischen oder der letalen Konzentration. Insbesondere in der Notfalldiagnostik muss eine schnelle und einfache Konzentrationserfassung ermöglicht werden, wenn die Ergebnisse für die Therapie wirksam werden sollen.

Im Gegensatz zu speziellen Methoden (Targeted-Analysen), die nur ausgewählte Substanzen oder Substanzgruppen erfassen, besteht in der STA die Herausforderung, eine Vielzahl chemisch und physikalisch unterschiedlicher Stoffe erst zu identifizieren und dann so weit als möglich zu quantifizieren. Da die Referenzsubstanzen bei der Durchführung der STA nicht immer in vollem Umfang zugänglich sind, und darüber hinaus Standards nicht unbegrenzt haltbar sind, sollte die Methode so konzipiert werden, dass eine näherungsweise Quantifizierung auch ohne die Anwesenheit der Reinstoffe möglich ist. Idealerweise sollten qualitative wie auch quantitative Daten und Informationen zu allen in Frage kommenden Substanzen so erfasst sein, dass sie von einem Softwaretool verwendet werden können. In dieser Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, eine Datenbank toxikologisch relevanter Substanzen und ein Softwaretool zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung zu entwickeln. Als vereinfachte Annahme wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Messsignal (Peakfläche) und der Konzentration vorausgesetzt (Einpunktkalibrierung).

Die Quantifizierung mittels Massenspektrometer bringt eine Vielzahl an Herausforderungen mit sich. Im Gegensatz zur UV-Spektrometrie weisen Massenspektrometer eine Reihe von Parametern auf, die einen direkten Einfluss auf das Messsignal haben. So werden die Signale maßgeblich durch das verwendete Instrument und dessen Ausstattung bestimmt. Die Ionenquelle, wie auch die im Instrument enthaltene Ionenoptik, Massenfilter und der Detektor unterscheiden sich je nach Hersteller, Geräte-Typ, -Serie und -Modell untereinander. Auch ein und dasselbe Massenspektrometer kann unter Umständen durch verschiedene Tune-Files unterschiedliche Messsignale bei derselben Konzentration eines Analyten aufweisen. Die Wahl der Methodenparameter spielt ebenfalls eine Rolle. So muss unter Verwendung einer flüssigchromatographischen Trennung die mobile Phase, deren pH-Wert, die Fließgeschwindigkeit und auch der Gradient berücksichtigt werden. Beim Massenspektrometer müssen Potentiale, Temperaturen, Gasflüsse, Vakuumwerte, Kollisionsgas, etc. betrachtet werden. Darüber hinaus haben die Probenvorbereitung sowie die Art der Probe einen wesentlichen Einfluss auf das Verhältnis des Messsignals zur Konzentration. Insbesondere unter Verwendung einer Elektrosprayionisations-Quelle spielen Matrixeffekte wie die Ionensuppression oder die Ionenverstärkung eine wesentliche Rolle [177-179]. Um diese Effekte zu kompensieren werden in einer gerichteten Analyse optimalerweise isotope (meist deuterierte) interne Standards

verwendet. In der STA können bei der großen Zahl möglicher Analyte, und da die wirklich zu quantifizierenden Substanzen von vornherein nicht bekannt sind, nicht für alle Analyte deuterierte Standards verwendet werden. Nähere Gründe sind häufig das Fehlen deuterierter Analoga und entsprechend hohe Kosten. Daher muss hier der Einsatz einer begrenzten Zahl interner Standards, von denen für jeden Analyten mindestens einer anwendbar ist, erfolgen. Optimalerweise sollten sie daher chemisch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen und über den Retentionszeitbereich des gesamten Chromatogramms verteilt sein. Abbildung 4.41 (siehe Abschnitt 4.5.1.) zeigt, dass dieses für die vorliegende Studie gewährleistet ist.

Auf Grund der dargelegten Problematik ist es essentiell, standardisierte Bedingungen seitens der LC- und auch der MS-Methode festzulegen. Die als optimal für diesen Zweck erachteten Parameter sind unter den LC- und MS-Bedingungen (II) im experimentellen Teil (Abschnitt 3.7.2. und 3.7.4.) beschrieben.

### **4.5.1 Aufbau der LC-TOF-QUANT-Datenbank**

Über die „Broecker, Herre & Pragst Personal Compound Database and Library“ hinaus wurde zum Zweck der Quantifizierung eine weitere Datenbank „LC-TOF-QUANT“ aufgebaut. Erstere wurde bereits in den Abschnitten 4.1.1.-4.1.3. vorgestellt und das Verfahren zur Retentionszeiterfassung unter den standardisierten LC-Bedingungen (II) beschrieben. Die für mehr als 2130 Substanzen ermittelten Retentionszeiten (siehe Abschnitt 4.1.3.) sollten für die LC-TOF-QUANT-Datenbank ebenfalls gelten. Daher wurden unter den LC- und MS-Bedingungen (II) auch die Standardpeakflächen für diese Substanzen ermittelt.

Von den mehr als 2130 Substanzen wurden – in Gruppen zu je 50 – Mischlösungen mit einer Konzentration von je 10 ng/µl in Methanol hergestellt. Diese wurden unter Zugabe einer Mischlösung, die die 32 deuterierten Standards enthielten, zu einer Endkonzentration von je 100 pg/µl mit Methanol verdünnt.

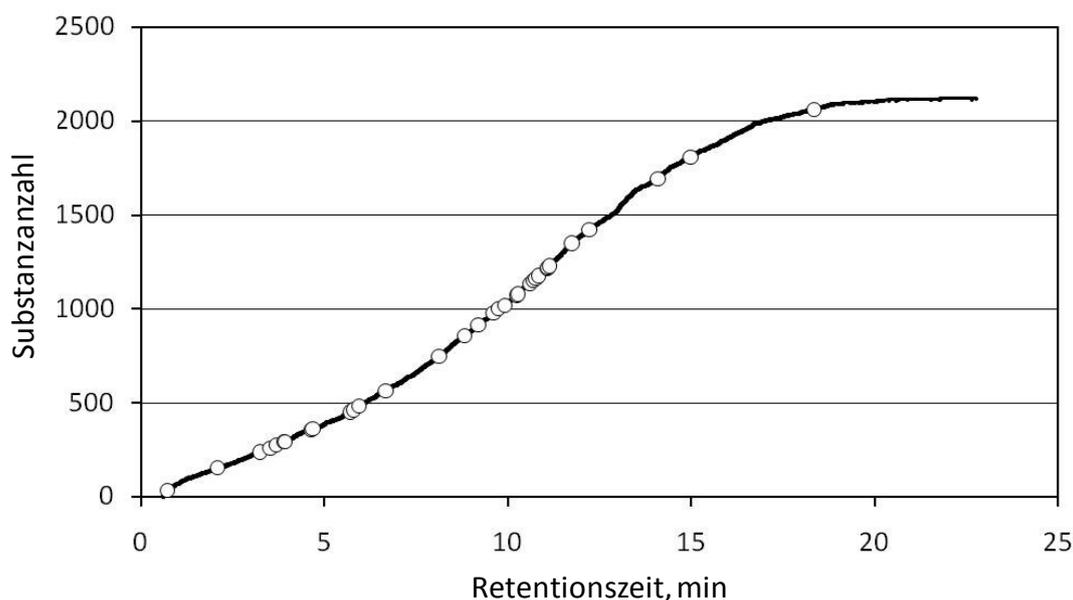
Anschließend erfolgte in dreifacher Wiederholung die Messung im MS-Modus. Injiziert wurden jeweils 100 pg jedes Standards (1 µl des Mischstandards), um den Effekt der Ionensuppression koeluierender Standards zu reduzieren. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte anhand derer Retentionszeiten sowie derer Isotopenmuster. Die monoisotopische Masse der einzelnen Ionenspezies ( $M^+$ ,  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ) sowie die Summe aus drei ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ) und vier ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ) Spezies wurde mit

einem Massenfenster von 60 ppm extrahiert und integriert. Aus den erhaltenen Werten wurde das arithmetische Mittel aller drei Messungen gebildet und in die LC-TOF-QUANT-Datenbank importiert. Zur Qualitätsprüfung wurde die empirisch erhaltene Summe aller Ionenspezies mit den berechneten Summen der einzelnen empirisch erhaltenen Peakflächen verglichen. Hierbei wurde eine Abweichung von bis zu 5 % akzeptiert. Im Falle größerer Abweichungen wurde eine Nachintegration vorgenommen. Die Standardabweichung der Wiederholungsmessungen war i.d.R. kleiner als 1 %. Die verwendeten 32 deuterierten Standards, sowie deren Retentionszeiten und die Peakflächen einiger Ionenspezies sind in Tabelle 4.17 wiedergegeben.

**Tabelle 4.17:** Übersicht über die 32 verwendeten deuterierten Standards in der LC-TOF-QUANT-Datenbank. Dargestellt sind hier nur die Retentionszeit (RT) sowie die Peakflächen von 100 pg der Addukte mit  $H^+$  und  $Na^+$  und der Subtraktion von  $H^+$ .

Substanzname	RT, Min	Peakfläche von 100 pg, Counts		
		$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$
Ecgoninmethylester-D3	0,73	4887258		
Morphin-D3	3,25	3757518	41739	
Amphetamin-D5	3,52	998745		
MDA-D5	3,69	1322183		
Methamphetamin-D5	3,90	2833799		
MDMA-D5	3,93	3374961		
MDEA-D6	4,64	3814717		
Benzoylecgonin-D3	4,68	4269419	489433	
7-Aminoclonazepam-D4	5,71	3565385	359001	
6-Acetylmorphin-D3	5,79	3537540	80644	
Codein-D3	5,95	3852608	262915	
7-Aminoflunitrazepam-D7	6,67	4463845	265926	
Cocain-D3	8,13	6223774		
EDDP-D3	8,82	4859965		
Cocaethylen-D3	9,19	6442952		
Nitrazepam-D5	9,60	398899		246741
Clonazepam-D4	9,74	221233		302000
Flunitrazepam-D7	9,91	162389		
$\alpha$ -Hydroxyalprazolam-D5	10,24	755497	943045	5811
Estazolam-D5	10,27	2402247	1119243	
Oxazepam-D5	10,61	164398	1248818	28547
Lorazepam-D4	10,70	125158	1198542	34924
2-Hydroxyethylflurazepam-D4	10,77	1955113	1388469	
Triazolam-D4	10,83	3341780	721999	
Desalkylflurazepam-D4	11,07	1121140	155204	6225
Temazepam-D5	11,09	1095839	2221736	
Methadon-D9	11,13	6225882		
Nordiazepam-D5	11,75	1869580	140182	8450
Diazepam-D5	12,22	4334230	343488	
Prazepam-D5	14,08	4197983	475731	
Buprenorphin-D4	18,34	5323782	93366	
$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol-D3	18,40	708605		

Die Retentionszeitverteilung der über 2100 Analyte und 32 verwendeten deuterierten Standards aus der LC-TOF-QUANT-Datenbank ist in Abbildung 4.41 dargestellt.



**Abbildung 4.41:** Chromatographische Verteilung von mehr als 2130 Substanzen, welche unter den LC-Bedingungen (II) gemessen wurden. Die verwendeten 32 deuterierten Standards sind als Punkte dargestellt.

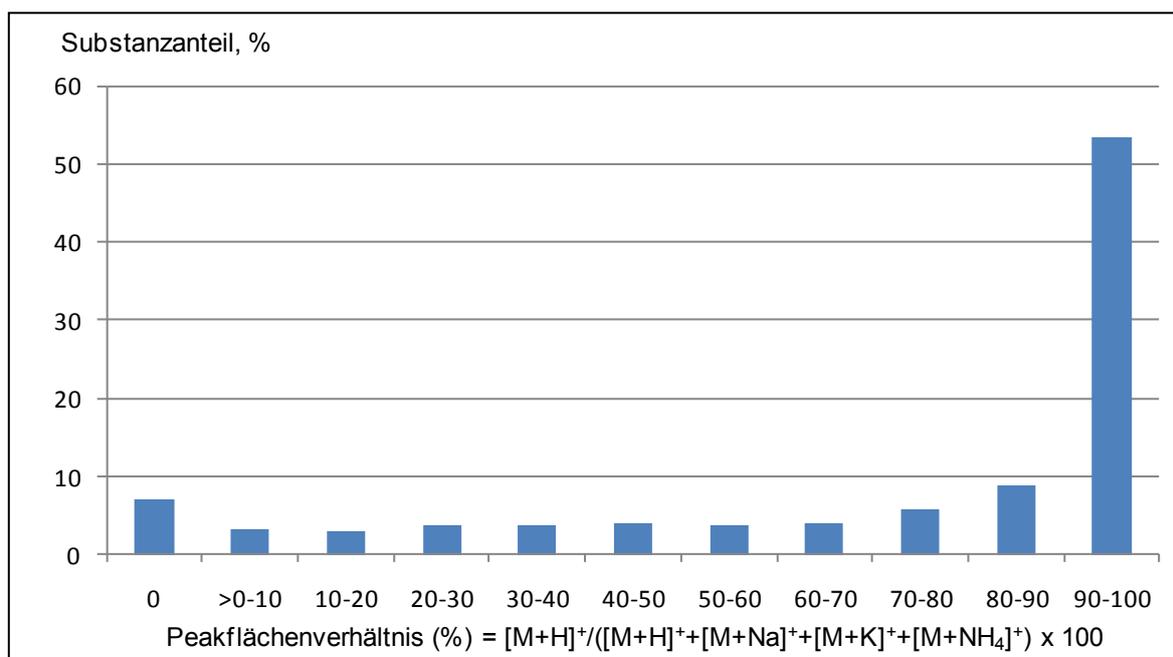
Die erhaltene LC-TOF-QUANT-Datenbank (Ausschnitt siehe Tabelle 4.18) enthält neben dem Substanznamen die Retentionszeit und die Peakflächen aller detektierten Ionenspezies.

**Tabelle 4.18:** Ausschnitt aus der Datenbank „LC-TOF-QUANT“.

Substanzname	RT min	Peakfläche von 100 pg, Counts							
		M <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	Sum 1 <sup>1</sup>	Sum 2 <sup>1</sup>	[M-H]
Acetazolamid	1,40	---	19094	98807	15850	---	118733	134684	---
Acetylamino-nitropropoxybenzen	9,33	---	2910232	317561	---	109212	3334814	3392164	---
Acriflavinium	5,65	1202478	---	---	---	---	---	---	---
Ajmalin	7,00	---	51880897	---	---	---	5279504	5261400	---
Allobarbital	5,82	---	---	---	---	---	---	---	5481
Aminoquinurid	10,82	---	---	40637	---	---	40637	40637	---
Aminophenazon	7,32	---	4502281	222378	15240	---	4722476	4742589	---
Amiodaron	20,11	---	5073641	---	---	---	5089228	5088671	---
Amitriptylin	13,11	---	4587099	---	---	---	4587099	4587099	---
Amobarbital	9,52	---	---	---	---	---	---	---	13646
Amrinon	2,75	---	206583	---	---	---	209156	209156	---
Atrazin	10,16	---	2693485	---	---	---	2685126	2684544	---
Atropin	5,01	---	3691602	24966	---	---	3725074	3737983	---
Acebutolol	6,36	---	4201908	42504	---	---	4245109	4265149	5362
Azidamfenicol	4,25	---	---	157687	154033	---	157687	312600	302263
Acetanilid	4,21	---	589364	---	---	---	589364	589364	---
Alprazolam	10,87	---	4833592	1118202	---	---	5951459	6030845	---
Alprenolol	9,23	---	7268153	59076	---	---	7347363	7249966	---
Amantadin	5,29	---	3062036	---	---	---	3057832	3057460	---

<sup>1</sup> Sum 1 = [M+H]<sup>+</sup> + [M+Na]<sup>+</sup> + [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>; Sum 2 = [M+H]<sup>+</sup> + [M+Na]<sup>+</sup> + [M+K]<sup>+</sup> + [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

Da nur protonierte Substanzen mit der Bibliothek identifiziert werden können, wurde das Verhältnis der protonierten Spezies zu allen auftretenden Ionen für alle Substanzen berechnet und die Häufigkeitsverteilung in Abbildung 4.42 dargestellt. Es zeigt sich, dass für 10 % der in der LC-TOF-QUANT-Datenbank enthaltenen Substanzen die protonierte Ionenspezies 10 % oder weniger ausmacht. Für ca. 140 Substanzen (6,6 %) existierte keine protonierte Spezies. Dabei waren in den meisten Fällen Natrium- und Kalium-Addukte vertreten. Der Anteil an Natrium-Addukten war dabei in der Regel höher als der von Kalium. Azidamfenicol,  $\alpha$ -Acetyldigoxin, Bromadiolon, Digitoxin, Felbamat, Monensin und Tacrolimus sind hierbei Beispiel für Substanzen ohne detektierte protonierte Ionenspezies. Der Anteil an Substanzen, die überwiegend (>90 %) oder ausschließlich als protonierte Ionenspezies vorlagen, betrug ca. 54 %.

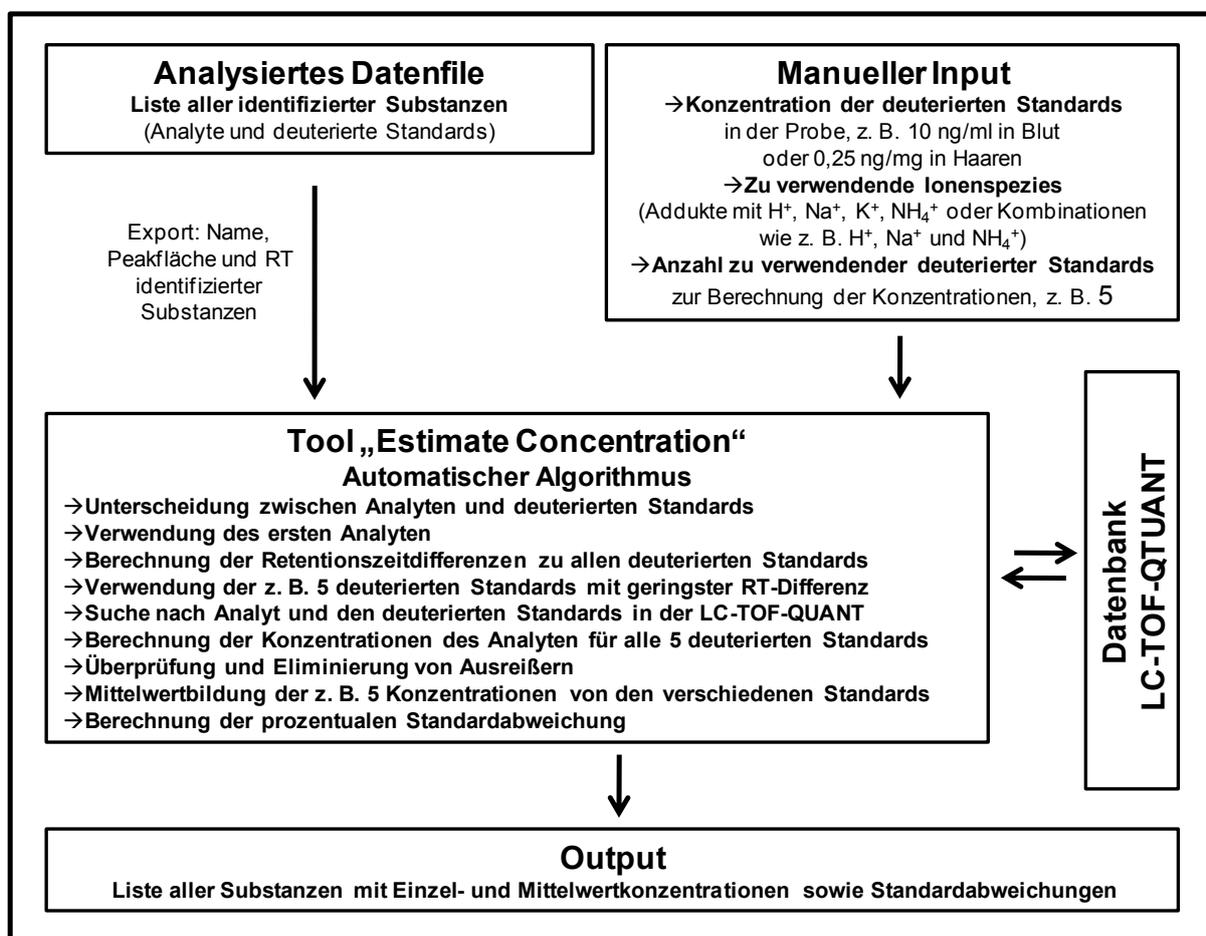


**Abbildung 4.42:** Prozentuale Verteilung des Verhältnisses der Peakfläche der protonierten Spezies zu der Summe aus den Addukten mit  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $NH_4^+$  von 2130 Substanzen.

#### 4.5.2 Funktionsweise des Tools „Estimate Concentration“

Die umfangreiche LC-TOF-QUANT-Datenbank liefert die Grundlage für eine semi-quantitative Konzentrationsbestimmung von Analyten in einer gemessenen Probe unter Verwendung von deuterierten Standards. Um eine manuelle Berechnung, die sehr zeitaufwendig und darüber hinaus fehlerbehaftet sein kann, zu ersparen, wurde das Softwaretool „Estimate Concentration“ entwickelt.

Die Funktionsweise dieses Tools ist in Abbildung 4.43 dargestellt. Nach erfolgter Peakidentifizierung mittels Spektrenbibliothek und Datenbank werden die Ergebnisse visuell auf ihre Qualität überprüft. Im Falle interferierender Peaks muss eine manuelle Integration erfolgen oder bei unzureichender Signalintensität (im Bereich der LODs) der entsprechende Peak aussortiert werden. Für die Bestimmung der Peakflächen kann jede beliebige Ionenspezies oder Kombinationen mehrerer Ionenspezies verwendet werden. Die aus dem Datenfile erhaltene Liste identifizierter Wirkstoffe wird exportiert und enthält mindestens die Information des Namens, der Retentionszeit und der Peakfläche aller Substanzen.



**Abbildung 4.43:** Funktionsweise des Softwaretools „Estimate Concentration“.

Das Tool „Estimate Concentration“ berechnet automatisch die Konzentrationen aller in der exportierten Liste enthaltenen Substanzen einer Probe. Dazu erfolgt zunächst die Eingabeaufforderung der Konzentration der deuterierten Standards in der Probe. Diese geht aus der Probenvorbereitung hervor und kann zum Beispiel mit 10 ng/ml im Blut oder 0,25 ng/mg im Haar angegeben werden. Danach wird die Angabe der für die Integrale verwendeten Ionenspezies benötigt. Diese kann zum Beispiel als

Addukt mit  $H^+$  oder als Summe der Addukte mit  $H^+$ ,  $Na^+$  und  $NH_4^+$  erfolgen. Als dritte Eingabe muss die Anzahl maximal zu verwendender deuterierter Standards für die folgende Berechnung angegeben werden. Diese sollte so gewählt werden, dass im Falle des Vorhandenseins von Ausreißern und deren Elimination noch eine genügende Anzahl für die Konzentrationsberechnung gegeben sind. Es sollten jedoch auch nicht zu viele verwendet werden, da diese dann hinsichtlich der Retentionszeit zu weit vom identifizierten Peak entfernt sind und abweichenden Matrixeinflüssen unterliegen. Eine Auswahl von zum Beispiel 5 erwies sich i. d. R. als sehr geeignet.

Unter Verwendung der drei Eingaben sowie der exportierten Ergebnisliste und der LC-TOF-QUANT-Datenbank erfolgen alle weiteren Schritte vollständig automatisch. Zunächst wird die Ergebnisliste in zwei Gruppen unterteilt. Hierbei bildet die eine das Kollektiv an Analyten und die andere die der deuterierten Standards. Nacheinander werden die Retentionszeitdifferenzen jedes Analyten zu allen deuterierten Standards berechnet. Daraus werden zum Beispiel die fünf deuterierten Standards mit den geringsten RT-Differenzen für jeden Analyten ausgewählt. Aus dieser Zuordnung von Analyt und benachbarten deuterierten Standards werden die zugehörigen Standardpeakflächen aus der LC-TOF-QUANT-Datenbank herausgezogen. Die Berechnung der Konzentration jedes Analyten erfolgt zunächst separat für jeden der zum Beispiel verwendeten fünf deuterierten Standards nach Gleichung (5).

$$c_{Analyt} = c_{deut.Stand.in\ Probe} \times \frac{Fläche_{Analyt\ in\ Probe} \times Fläche_{deut.Stand.in\ Datenbank}}{Fläche_{deut.Stand.in\ Probe} \times Fläche_{Analyt\ in\ Datenbank}} \quad (5)$$

Für die einzelnen anhand verschiedener verwendeter deuterierter Standards berechneten Konzentrationen eines Analyten wird anschließend ein Ausreißertest durchgeführt. Sollten dabei Ausreißer festgestellt werden, so werden diese eliminiert. Aus den verbleibenden Werten wird dann das arithmetische Mittel gebildet und die prozentuale Standardabweichung berechnet.

Nach Ablauf des Algorithmus erfolgt die Ausgabe der ursprünglichen Liste, welche um die Konzentrationsangaben erweitert wurde. Neben dem Mittelwert und der prozentualen Standardabweichung sind auch für jeden Analyten die jeweilig verwendeten deuterierten Standards und die mit ihrer Hilfe berechneten Konzentrationen angegeben. In Tabelle 4.19 ist als Beispiel eines solchen Eintrags die Konzentrationsabschätzung von Codein aus einer mit 25 ng/ml dotierten Blutprobe gegeben.

**Tabelle 4.19:** Konzentrationsabschätzung von Codein in einer Blutprobe mit dem Tool „Estimate Concentration“ und der Datenbank LC-TOF-QUANT. Dotierte Konzentration 25 ng/ml, Ionenspezies  $[M+H]^+$ , Anzahl zu verwendender deuterierter Standards: 5.

Nr.	Deuterierter Standard	Konzentration Analyt, ng/ml	Ausreißer
1	Codein-D3	25	Nein
2	7-Aminoflunitrazepam-D7	24	Nein
3	6-Acetylmorphin-D3	23	Nein
4	7-Aminoclonazepam-D4	24	Nein
5	MDEA-D6	101	Ja
	Mittelwertkonzentration	Gesamt: 40 ng/ml Ohne Ausreißer: <b>24 ng/ml</b>	
	Standardabweichung	Gesamt: 88 % Ohne Ausreißer: <b>2,9 %</b>	

Man erkennt, dass für vier der internen Standards gut übereinstimmende Konzentrationen gefunden werden, während der mit MDEA-D6 ermittelte Wert offensichtlich wegen starker Ionensuppression des deuterierten Standards in dieser Probe einen weit erhöhten Wert liefert. Die Elimination dieses Wertes als Ausreißer führt zu einem sehr guten Ergebnis mit einer Standardabweichung von 2,9 %.

#### 4.5.3 Praktische Erprobung des Tools „Estimate Concentration“

Zur Überprüfung der Datenbank „LC-TOF-QUANT“ und der Anwendung des Tools „Estimate Concentration“ wurden jeweils fünf verschiedene mit 31 toxikologisch relevanten Substanzen dotierte Blut- und Haarproben bei vier unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Richtigkeit sind in Tabelle 4.20 für jeweils eine Blut- und eine Haarprobe dargestellt. Als maximale prozentuale Standardabweichung wurden 30 % zugelassen. Lediglich bei der Blutprobe trat bei der Berechnung der Konzentrationen der Amphetamine (MDMA, MDA und MDEA) sowie bei Codein und Oxycodon ein Ausreißer (MDEA-D6) auf (siehe auch in Abschnitt 4.5.2 Tabelle 4.19). Dieser wurde automatisch eliminiert. Die für diese Analyte resultierenden Konzentrationen und Standardabweichungen resultieren daher nur auf vier anstatt auf fünf deuterierter Standards. Für die Richtigkeit wurde unter dem Gesichtspunkt der angestrebten „Konzentrationsabschätzung“ eine Abweichung von bis zu -33 % und bis zu +50 % für die Zielstellung einer Abschätzung als eine akzeptable Übereinstimmung definiert. Die nicht in diesem Bereich erhaltenen Werte sind in den Tabellen 4.20 kursiv dargestellt.

**Tabelle 4.20:** Anwendung des Tools „Estimate Concentration“ auf eine mit 31 Wirkstoffen dotierte Blut- und Haarprobe.

Analyt	Blut								Haare							
	Konzentration [ng/mg] Standardabweichung [%]				Richtigkeit [%]				Konzentration [ng/mg] Standardabweichung [%]				Richtigkeit [%]			
	5,0 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	5,0 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	0,050 ng/ml	0,25 ng/ml	1,0 ng/ml	5,0 ng/mg	0,050 ng/ml	0,25 ng/ml	1,0 ng/ml	5,0 ng/mg
Alprazolam	4,5 (13)	18 (8,4)	117 (6,5)	480 (6,2)	90	72	117	96	0,052 (5,7)	0,26 (5,0)	1,1 (5,8)	5,2 (4,1)	105	105	109	103
Amitriptylin	3,8 (18)	20 (24)	79 (15)	425 (9,8)	76	80	79	85	0,036 (4,7)	0,25 (2,9)	1,0 (5,3)	5,4 (2,9)	72	101	102	108
Carbamazepin	5,0 (20)	21 (19)	108 (21)	387 (12)	101	84	108	77	0,052 (10)	0,25 (14)	1,1 (12)	5,2 (12)	105	98	107	105
Citalopram	5,6 (20)	21 (19)	118 (21)	496 (12)	112	84	118	99	0,034 (10)	0,22 (14)	1,0 (10)	5,4 (11)	68	89	100	108
Clonazepam	3,7 (20)	21 (19)	128 (21)	439 (12)	74	83	128	88	0,055 (10)	0,26 (14)	1,1 (12)	5,2 (10)	109	105	109	103
Clozapin	3,9 (18)	16 (24)	82 (15)	431 (9,8)	78	63	82	86	0,043 (8,3)	0,23 (2,9)	1,0 (5,3)	5,2 (2,9)	85	92	100	103
Cocain	5,2 (20)	22 (19)	141 (20)	508 (10)	104	87	141	102	0,052 (10)	0,27 (14)	1,1 (11)	5,6 (12)	105	108	109	112
Codein	5,2 (20)	23 (26)	123 (21)	558 (18)	105	94	123	112	0,035 (2,7)	0,22 (2,6)	1,1 (2,6)	5,3 (3,8)	71	86	109	106
Diazepam	4,2 (11)	23 (11)	111 (11)	481 (8,3)	85	93	111	96	0,053 (8,9)	0,25 (4,6)	1,0 (6,2)	4,8 (2,3)	106	98	100	95
Flunitrazepam	6,2 (20)	18 (23)	108 (21)	404 (12)	124	72	108	81	0,052 (9,1)	0,25 (4,6)	1,0 (12)	5,0 (11)	103	98	105	101
Hydrocodon	5,2 (18)	28 (25)	148 (20)	473 (13)	105	114	148	95	0,050 (2,7)	0,27 (2,6)	1,1 (4,8)	5,3 (3,8)	100	106	108	106

Fortsetzung Tabelle 4.20: Anwendung des Tools „Estimate Concentration“ auf eine mit 31 Wirkstoffen dotierte Blut- und Haarprobe.

Analyt	Blut								Haare							
	Konzentration [ng/mg] Standardabweichung [%]				Richtigkeit [%]				Konzentration [ng/mg] Standardabweichung [%]				Richtigkeit [%]			
	5,0 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	5,0 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	0,050 ng/ml	0,25 ng/ml	1,0 ng/ml	5,0 ng/mg	0,050 ng/ml	0,25 ng/ml	1,0 ng/ml	5,0 ng/mg
Ketamin	3,2 (20)	17 (23)	90 (21)	429 (12)	63	66	90	86	0,047 (9,1)	0,23 (14)	1,0 (12)	4,8 (11)	94	92	100	96
Lorazepam	2,4 (10)	20 (8,4)	125 (6,5)	459 (6,2)	48	78	125	92	---	0,26 (4,6)	1,1 (4,3)	5,3 (4,1)	---	105	109	106
MDA	4,8 (26)	23 (25)	99 (18)	499 (20)	96	92	99	100	0,050 (9,9)	0,26 (7,8)	1,0 (5,0)	4,8 (4,8)	99	105	100	97
MDEA	4,5 (23)	24 (20)	92 (16)	426 (22)	90	96	92	85	0,050 (4,0)	0,25 (4,7)	1,0 (8,3)	5,5 (6,7)	100	102	100	111
MDMA	4,8 (26)	22 (25)	91 (18)	472 (20)	96	88	91	94	0,048 (4,7)	0,25 (6,0)	1,0 (8,3)	5,4 (4,6)	95	102	100	108
Methadon	3,6 (14)	19 (26)	97 (11)	463 (8,3)	71	76	97	93	0,030 (8,9)	0,22 (3,8)	1,1 (6,2)	5,0 (2,3)	60	86	109	100
Methamphetamin	5,1 (26)	24 (25)	93 (18)	479 (20)	102	96	93	96	0,052 (4,0)	0,26 (4,7)	1,0 (4,3)	5,1 (4,6)	104	104	102	102
Metoprolol	4,8 (18)	21 (25)	123 (20)	489 (13)	97	84	123	98	0,048 (4,6)	0,26 (3,7)	1,1 (4,8)	5,2 (0,8)	95	105	109	103
Nitrazepam	6,0 (20)	26 (29)	148 (21)	514 (12)	119	105	148	103	0,052 (10)	0,28 (14)	1,2 (12)	5,0 (12)	103	114	115	100
Oxazepam	4,0 (13)	16 (8,6)	119 (6,5)	495 (5,3)	79	62	119	99	0,053 (6,3)	0,24 (6,5)	1,1 (5,8)	5,5 (3,2)	106	95	109	110
Oxycodon	5,2 (21)	23 (29)	139 (24)	575 (17)	104	93	139	115	0,025 (2,7)	0,27 (2,6)	1,0 (2,6)	5,5 (3,8)	50	107	101	109

**Fortsetzung Tabelle 4.20:** Anwendung des Tools „Estimate Concentration“ auf eine mit 31 Wirkstoffen dotierte Blut- und Haarprobe.

Analyt	Blut								Haare							
	Konzentration [ng/mg] Standardabweichung [%]				Richtigkeit [%]				Konzentration [ng/mg] Standardabweichung [%]				Richtigkeit [%]			
	5,0 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	5,0 ng/ml	25 ng/ml	100 ng/ml	500 ng/ml	0,050 ng/ml	0,25 ng/ml	1,0 ng/ml	5,0 ng/mg	0,050 ng/ml	0,25 ng/ml	1,0 ng/ml	5,0 ng/mg
Pethidin	3,7 (20)	18 (19)	86 (20)	453 (10)	74	72	86	91	0,049 (10)	0,24 (14)	1,1 (11)	5,5 (12)	97	95	109	111
Phencyclidin	3,2 (20)	22 (29)	117 (21)	625 (12)	64	88	117	125	0,043 (10)	0,26 (14)	1,1 (12)	5,2 (12)	85	103	109	103
Proadifen	3,9 (18)	22 (16)	86 (14)	414 (9,8)	78	88	86	83	0,032 (4,3)	0,23 (2,9)	1,1 (5,3)	4,8 (4,6)	63	94	109	97
Strychnin	3,2 (18)	21 (13)	93 (20)	437 (13)	64	84	93	87	0,015 (7,6)	0,17 (3,7)	1,3 (4,8)	5,4 (0,8)	30	69	127	108
Temazepam	3,8 (11)	19 (8,6)	121 (11)	517 (6,2)	76	75	121	103	0,057 (4,3)	0,27 (5,0)	1,1 (5,6)	5,2 (4,1)	114	108	109	103
Tramadol	3,5 (18)	19 (13)	96 (20)	446 (13)	70	78	96	89	0,036 (4,6)	0,22 (3,7)	1,0 (4,8)	5,0 (0,8)	71	89	100	100
Trazodon	4,9 (18)	21 (24)	128 (15)	507 (9,8)	97	85	128	101	0,044 (8,3)	0,28 (2,9)	1,2 (5,3)	5,5 (2,9)	88	111	118	109
Verapamil	5,1 (18)	21 (24)	132 (15)	510 (9,8)	102	83	132	102	0,026 (8,3)	0,23 (2,9)	1,1 (5,3)	5,2 (2,9)	52	93	109	104
Zolpidem	4,9 (13)	19 (8,4)	113 (6,5)	487 (6,2)	98	76	113	97	0,047 (5,7)	0,25 (5,0)	1,1 (5,8)	5,3 (4,1)	94	102	108	106

Sowohl bei den Blutproben wie auch bei den Haarproben ergab sich eine gute Richtigkeit, mit der die Konzentrationen bestimmt worden sind. Beim Vergleich der prozentualen Standardabweichungen in den beiden Matrices zeigte sich, dass die Streuung bei den Blutproben in der Regel höher war als bei den Haarproben. Unter Berücksichtigung, dass bei beiden Probenmaterialien die gleiche absolute Menge an deuterierten Standards (50 pg) injiziert wurde, lässt sich dieser Unterschied nur auf die unterschiedliche Matrix zurückführen. Die Blutmatrix weist eine stärker schwankende Beeinflussung der Signale der einzelnen deuterierten Standards im Vergleich zur Haarmatrix auf.

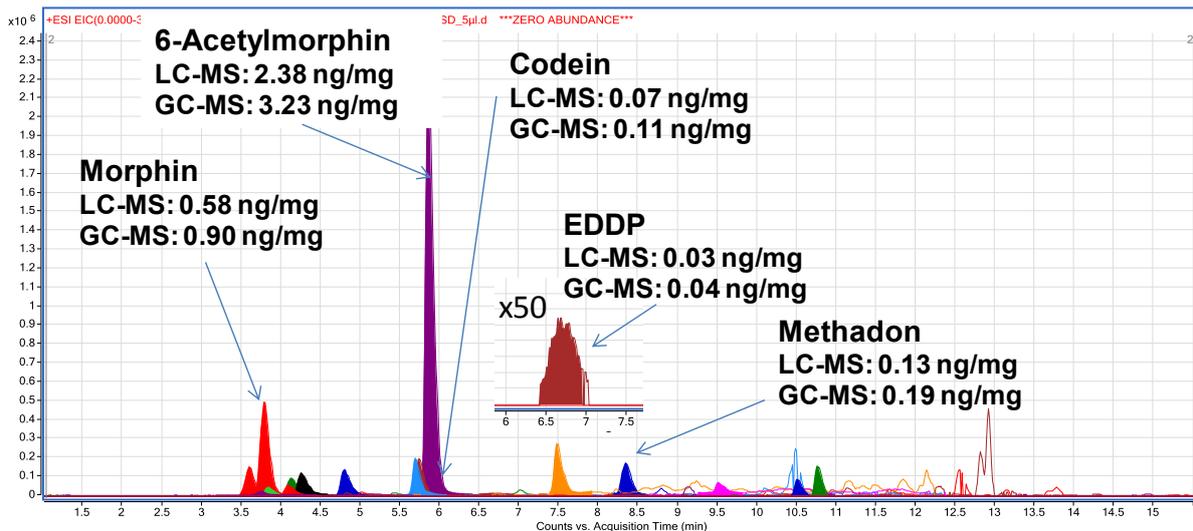
Zur Überprüfung der Methode wurden reale Blut- und Haarproben gemessen, welche vorher bereits mittels HPLC-DAD und GC-MS untersucht worden waren. Der Vergleich der ermittelten Konzentrationen aus Blutproben wurde zwischen den Instrumenten LC-QTOF-MS und HPLC-DAD vorgenommen. Hierbei wurden speziell Medikamentenwirkstoffe gegenübergestellt. Beim Vergleich der Haarergebnisse wurden die LC-QTOF-MS- und die GC-MS-Instrumente bezüglich der Betäubungsmittelbestimmung verglichen. In Tabelle 4.21 sind die Ergebnisse von acht Blut- und acht Haarproben wiedergegeben. Auch hier zeigt sich wie bereits bei den dotierten Proben, dass die prozentuale Standardabweichung bei Blutproben i. d. R. größer ist (häufig zwischen 20 und 30 %), wohingegen die Werte bei den Haarproben <20 % betragen (meistens zwischen 5 und 20 %). Auch hier wird der Einfluss der Matrix wiedergespiegelt. Der Vergleich der verschiedenen Methoden und der chemisch sehr unterschiedlichen Analyte, wie die der Opiate, Amphetamine, Benzodiazepine sowie des Methadons, zeigt in Bezug auf die Größenordnung eine sehr gute Übereinstimmung.

In Abbildung 4.44 sind die qualitativen und quantitativen bzw. semiquantitativen Ergebnisse einer untersuchten Haarprobe des Falls 10/243 dargestellt. Es handelte sich hierbei um einen Verstorbenen, der neben Heroin, nachgewiesen durch 6-Acetylmorphin, auch Methadon zu Lebzeiten eingenommen hat. Die mittels validierter GC-MS-Methode quantifizierten Opiode stimmen gut mit den mittels LC-QTOF-MS unter Anwendung des Tools „Estimate Concentration“ geschätzten Konzentrationen überein.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.21:** Vergleich der mit dem Tool „Estimate Concentration“ für die LC-QTOF-MS-Analyse bestimmten Konzentrationen mit vorliegenden HPLC-DAD- und GC-MS-Analyseergebnissen von acht Blut- und acht Haarproben.

Probe	Analyt	LC-MS [ng/ml oder ng/mg] (% Standardabweichung)	HPLC-DAD [ng/ml]	GC-MS [ng/mg]
10/812 Blut	Midazolam	22 (22)	20	---
10/828 Blut	Venlafloxin	25 (27)	<100	---
	Tramadol	39 (18)	<50	---
10/863 Blut	Diazepam	22 (29)	15	---
10/903 Blut	Methadon	465 (16)	470	---
10/904 Blut	Diazepam	46 (30)	30	---
	Nordiazepam	38 (33)	170	---
	Chlorprothixen	113 (30)	50	---
10/914 Blut	Doxepin	330 (27)	700	---
	Demethyldoxepin	214 (18)	190	---
10/926 Blut	Lorazepam	9,0 (28)	12	---
11/056 Blut	Lidocain	530 (7)	640	---
09/679 Haare	Codein	0,13 (8)	---	0,06
	Morphin	0,62 (6)	---	0,3
	BE	0,18 (6)	---	0,12
	Cocain	0,12 (8)	---	0,05
	6-AM	0,25 (8)	---	0,19
09/719 Haare	Morphin	0,24 (7)	---	0,21
	6-AM	0,51 (7)	---	0,23
	Codein	0,17 (7)	---	0,09
10/024 Haare	Morphin	5,5 (14)	---	4,0
	Codein	2,1 (10)	---	0,87
10/079 Haare	Amphetamin	6,3 (17)	---	7,6
	MDMA	1,1 (17)	---	0,69
	Cocain	0,68 (17)	---	0,38
	BE	0,10 (19)	---	0,05
10/241 Haare	Morphin	3,0 (5)	---	3,9
	6-AM	4,6 (8)	---	5,9
	Codein	0,80 (8)	---	0,86
	Methadon	4,5 (17)	---	3,2
	EDDP	0,44 (9)	---	0,47
10/243 Haare	Morphin	0,58 (5)	---	0,9
	6-AM	2,4 (9)	---	3,2
	Codein	0,07 (9)	---	0,11
	Methadon	0,13 (24)	---	0,19
	EDDP	0,03 (9)	---	0,04



**Abbildung 4.44:** Vergleich der mittels validierten GC-MS-Methode bestimmten Konzentrationen und durch LC-QTOF-MS gemessenen und abgeschätzten Konzentrationen mit dem Tool „Estimate Concentration“ der Haarprobe des Fallbeispiels 10/243.

Insgesamt lieferte das Tool zur semiquantitativen Konzentrationsabschätzung somit bisher für eine beschränkte Anzahl an Wirkstoffen vielversprechende Ergebnisse. Die Erprobung mit einer größeren Anzahl an Proben und einer breiteren Vielfalt an Wirkstoffen wird im Rahmen der laufenden Routine fortgeführt, wobei Vergleichsmessungen nach dem Standard-Additionsverfahren vorgenommen werden. Darüber hinaus sind eine Erweiterung auf neue und bislang nicht erfasste Wirkstoffe und die Überprüfung an anderen Geräten vorgesehen.

Neben der bereits genannten Bedeutung für die klinisch-toxikologische Notfalldiagnostik kann diese schnelle Konzentrationsabschätzung auch bei forensischen Fällen Bedeutung erlangen, um toxikologisch relevante von unbedeutenden Signalen zu unterscheiden und so den Aufwand für nachfolgende Quantifizierungen mit validierten Verfahren zu minimieren. Das Tool kann jedoch nicht die abgesicherte Quantifizierung ersetzen, wenn eine Interpretation auf der Basis von definierten Grenzwerten erfolgen soll.

### 5. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Anwendung der Flüssigchromatographie mit Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie (LC-QTOF-MS) für die Systematische Toxikologische Analyse unter Nutzung eines modernen Gerätes mit hoher Massenauflösung und -genauigkeit und effizienter Software umfassend erschlossen und unter Praxisbedingungen erprobt. Dazu wurden eine umfangreiche Datenbank mit mehr als 7360 toxikologisch relevanten Substanzen und eine CID-Spektrenbibliothek mit mehr als 2720 Substanzen aufgebaut, geeignete Probenvorbereitungen für Blut- und Haarproben entwickelt und Softwaretools geschaffen, die eine Identifizierung von Metaboliten und eine semiquantitative Konzentrationsabschätzung ermöglichen. Insgesamt können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die LC-QTOF-MS stellt zurzeit die am meisten fortgeschrittene Methode für die Systematische Toxikologische Analyse dar, da bei Anwendungen des „Data Dependent Acquisition“-Modus (Auto-MS/MS-Modus) alle mit der Probe injizierten Substanzen erfasst und durch akkurate MS- und CID-Spektren sehr spezifisch charakterisiert werden, ohne dass vorher eine Einschränkung auf bestimmte Analyte erfolgt. Daher kann ein Analysefile auch nachträglich und ohne Neumessung auf die Anwesenheit von bestimmten Giften überprüft werden, wenn sich ein Verdacht erst später ergeben sollte.
- Um diese Vorteile der LC-QTOF-MS voll ausschöpfen zu können, ist eine gute chromatographische Trennung in einem genügend langem Lauf vor der MS-Messung unbedingt erforderlich. Hierdurch werden sowohl Matrixeffekte durch Ionensuppression minimiert als auch genügend Zeit für die Erfassung aller Daten inklusive der CID-Spektren zur Verfügung gestellt. Die in diesem Zusammenhang vorgenommene Standardisierung der LC-Bedingungen ermöglichte die Nutzung der Retentionszeit als zusätzliches Identifizierungskriterium und den Aufbau eines Systems zur semiquantitativen Konzentrationsabschätzung.
- Einschränkungen der universellen Anwendung der Methodik ergeben sich, wenn die Substanzen bei der Probenvorbereitung nicht erfasst oder in der Ionenquelle nicht oder nicht ausreichend ionisiert werden. Neben der bevorzugt eingesetzten positiven Elektrosprayionisation (ESI) ist daher zusätzlich bei

sauren Substanzen die negative ESI erforderlich. Weitere Lücken können durch die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) geschlossen werden, die in der vorliegenden Arbeit noch nicht berücksichtigt werden konnte. Zusätzliche Einschränkungen ergaben sich dadurch, dass CID-Spektren nicht verfügbar sind, wenn die ESI überwiegend oder ausschließlich zu Komplexionen mit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{NH}_4^+$  führt.

- Die im Rahmen dieser Arbeit optimierten und angewendeten Probenvorbereitungen zur Analyse von Blut und Haaren wurde der Forderung nach einer breiten Erfassung von Substanzen mit unterschiedlicher Polarität und Lipophilie in hohem Maße gerecht. Dabei wird der Vorteil der universellen Erfassung durch Proteinfällung von Blutproben durch eine geringere Empfindlichkeit im Vergleich zu der mehr selektiven Dichlormethanextraktion erkaufte. Die optimierte Haarextraktion mit einer Mischung aus Methanol / Acetonitril / 2 mM Ammoniumformiat (pH 4,5) lieferte hohe Ausbeuten für eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen. Die zweimalige Inkubation für 18 Stunden ist bei hohem Probenaufkommen jedoch nachteilig. Vorteile könnte hier die Kombination von Mahlen und Extraktion in einer Kugelmühle („Bead assisted extraction“) bringen, die in Fortsetzung dieser Arbeit mit dem gleichen Extraktionsmittel eingeführt wird.
- Die unter diesen Bedingungen erreichten Nachweisgrenzen von 0,5 bis 5 ng/ml im Blut oder 3 bis 15 pg/mg im Haar werden den Anforderungen in der Praxis in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle gerecht. In speziellen Fällen kann eine Empfindlichkeitssteigerung durch Anreicherung und eine empfindlichere Messung von CID-Spektren im Targeted-MS/MS-Modus erreicht werden, allerdings auf Kosten der Anwendungsbreite.
- Die Bibliothek mit CID-Spektren bei drei verschiedenen Kollisionsenergien, die die exakten Massen der Vorläufer- und Fragmentationen von mehr als 2720 toxiologisch relevanten Substanzen umfasst, erwies sich als ein sehr effizientes Mittel zur Substanzidentifizierung durch Bibliothekssuche. Das gilt insbesondere auch für die Unterscheidung von Isomeren. Dabei wird die besondere Spezifität der Spektren vor allem durch die exakten Massen der Fragmente und erst in zweiter Linie durch deren relative Intensitäten gewährleistet. Dieses stellt auch eine wichtige Voraussetzung für die weitgehende Geräteunabhängigkeit der Spektrenbibliothek dar.

- Der durch die Auswertesoftware ermöglichte und im Rahmen der Arbeit optimierte Algorithmus zur Substanzidentifizierung gewährleistete im Zusammenspiel mit der Datenbank und Spektrenbibliothek eine schnelle und sichere Bearbeitung von Analysefiles. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Metaboliten-Tool stellt dabei eine wertvolle Ergänzung dar, mit dessen Hilfe systematisch nach Biotransformationsprodukten identifizierter Substanzen gesucht werden kann, das aber auch bei der Suche nach Muttersubstanzen möglicher Metabolitenpeaks hilfreich sein kann. In gleicher Weise wird die Auswertesoftware durch das selbstentwickelte Tool „Estimate Concentration“ ergänzt, das auf der Basis der zusätzlich erstellten Datenbank von Retentionszeiten und spezifischen Peakflächen von mehr als 2130 Substanzen eine schnelle Konzentrationsabschätzung identifizierter Peaks erlaubt.
- Im Ergebnis dieser Arbeit steht somit eine neue leistungsfähige und vollständige Methodik für die ungerichtete Suche nach toxischen Substanzen in Blut- und Haarproben, die von der Probenvorbereitung bis zur Substanzidentifizierung und Konzentrationsabschätzung alle Schritte des Analyseprozesses umfasst. Sie ist geprägt von einem hohen Maß an Automatisierung und Einbeziehung gespeicherter Substanzdaten. Die Funktionsfähigkeit wurde an postmortalen Blut- und Haarproben unter Beweis gestellt. Trotz der großen Vorteile muss vor einer schematischen und unkritischen Anwendung gewarnt werden, da das Verfahren nicht das kritische Herangehen des analytischen Toxikologen ersetzen soll, sondern umgekehrt dessen analytische und toxikologische Erfahrungen und Kenntnisse erfordert, um die vielfältigen Möglichkeiten der Methodik auszuschöpfen und falsche Ergebnisse mit Hilfe von Plausibilitätsbetrachtungen zu vermeiden.

### Zusammenfassung

Die Systematische Toxikologische Analyse stellt auf Grund der großen Vielfalt und der ständigen Zunahme an toxikologisch relevanten Substanzen eine der größten Herausforderungen in der chemischen Analyse dar. Zur Identifizierung von Giften und deren Metaboliten sowie deren semiquantitative Konzentrationsbestimmung wurde in dieser Dissertation unter Verwendung der Flüssigchromatographie gekoppelt mit einem Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (LC-QTOF-MS) eine Methode entwickelt und in der Routine erprobt.

Im Grundlagenteil dieser Arbeit wurde zunächst auf die Problematik der Systematischen Toxikologischen Analyse eingegangen. Die besonders günstigen Voraussetzungen von Flugzeitmassenspektrometern für diesen Zweck wurden erörtert und die Möglichkeit, weitere Kriterien der Substanzidentifizierung durch Verwendung von Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometern zu erhalten, wurde aufgezeigt. Schließlich wurden die Besonderheiten von Haaren für den Nachweis von chronischem Substanzmissbrauch oder Langzeiteinnahme von Medikamenten dargelegt.

Für die Substanzidentifizierung unter Verwendung des QTOF-MS 6530 Massenspektrometers von Agilent Technologies wurde eine Datenbank mit mehr als 7360 toxikologisch relevanten Substanzen erstellt. Diese beinhaltet textbasierende Einträge wie Name, Summenformel, exakte Masse und CAS-Nummer aller Substanzen. Für mehr als 2720 dieser Substanzen wurden CID-Spektren mittels Fließinjektion unter Verwendung von 5 mM wässrigem Ammoniumformiat + 0,01 % Ameisensäure und Methanol (50/50, v:v) als mobile Phase und Messung im Targeted-MS/MS-Modus bei Kollisionsenergien von 0, 10, 20 und 40 eV gemessen. Anschließend erfolgte deren Untergrundbereinigung, Überprüfung der Plausibilität und Korrektur durch Umrechnung auf die exakten Massen. Diese Datenbank und Spektrenbibliothek ist inzwischen unter der Bezeichnung „Broecker, Herre & Pragst Personal Database and Library“ kommerziell verfügbar.

Als Probenmaterial für die Methodenentwicklung und praktische Anwendung dienten in dieser Arbeit Blut und Haar. Während ersteres Aussagen zu einer akuten Beeinflussung oder Intoxikation zulässt, lassen sich aus letzterem Informationen zu einer länger zurückliegenden Einnahme, häufigem Konsum oder Missbrauch gewinnen. Bei Blutproben wurde eine Proteinfällung mit Acetonitril oder eine basische

Dichlormethanextraktion durchgeführt. Haarproben wurden durch zweimalige Inkubation mit einer Extraktionslösung aus Methanol, Acetonitril und 2 mM Ammoniumformiat (pH 4,5) für 18 Stunden aufgearbeitet. Diese Verfahren ermöglichten die gleichzeitige Detektion von sauren, neutralen, basischen, hydrophilen und lipophilen Substanzen.

Die chromatographische Trennung wurde mittels 20-minütiger Gradientenelution mit Fließmitteln aus 10 mM wässrigem Ammoniumacetat und Methanol an einer Poroshell C18 Säule durchgeführt. Die Messung erfolgte überwiegend im „Data Dependent Acquisition“-Modus (Auto-MS/MS-Modus). Hier wurden neben akkuraten Full-Scan-MS-Spektren akkurate Full-Scan-CID-Spektren aller relevanten Substanzen akquiriert.

Die Erprobung der Datenbank und Spektrenbibliothek erfolgte an dotierten Blutproben von freiwilligen Personen, die keine Drogen und Medikamente eingenommen hatten. Hierbei zeigte sich, dass die Analyse im Auto-MS/MS-Modus eine Substanzidentifizierung mittels CID-Spektren basischer Substanzen zwischen 0,5 und 2 ng/ml ermöglichte. Benzodiazepine wurden zwischen 2 und 20 ng/ml identifiziert. Der Nachweis in MS-Spektren mit Hilfe der Datenbank war in der Regel bei um 50 % niedrigeren Konzentrationen gegeben.

Zur weiteren Erhöhung der Aussagesicherheit wurde die LC-QTOF-MS durch Ventilschaltung mit der HPLC-DAD kombiniert, wobei beide Methoden unter ihren optimalen chromatographischen Bedingungen betrieben wurden. Die Analyse von 77 postmortalen Blutproben mit dieser Methodenkombination unter Verwendung der zugehörigen Datenbanken und Spektrenbibliotheken ergab im Wesentlichen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse, wobei durch die deutlich höhere Empfindlichkeit der LC-QTOF-MS-Analyse eine höhere Anzahl identifizierter Substanzen resultierte. Die HPLC-DAD-Messung hingegen hatte neben der schnellen semiquantitativen Konzentrationsabschätzung den Vorteil, basische und saure Substanzen in einer Messung simultan zu erfassen, wohingegen die Verwendung von LC-QTOF-MS zwei separate Messungen mit positiver und negativer Elektrosprayionisation erforderte. Mit beiden Verfahren ließen sich Metabolite identifizieren.

Die Eignung der LC-QTOF-MS zur Systematischen Toxikologischen Analyse von Haarproben wurde an 30 Drogentodesfällen und 60 Todesfällen mit bekannter chro-

nischer Medikamenteneinnahme zu Lebzeiten überprüft. Die Nachweisgrenzen der für 24 Wirkstoffe validierten Methode lagen bei 3 bis 15 pg/mg. In den Haarproben der Drogentoten konnte das Missbrauchspotential durch Opiate, Cocain, Amphetamin, deren Metabolite, natürliche Begleitstoffe und Streckmittel sehr gut charakterisiert werden. Cannabinoide konnten mit der Methode hingegen nicht detektiert werden. Insgesamt wurden in den Haarproben 212 Wirkstoffe und deren Metabolite mit einer Häufigkeit von 1 bis 40 nachgewiesen. In einzelnen Proben traten dabei bis zu 33 Wirkstoffe auf. Der Vergleich mit der aus den Ermittlungsakten oder aus der Untersuchung von Blut-, Urinproben und Mageninhalt bekannten Medikamenteneinnahme ergab jedoch nur eine Übereinstimmung von 36,8 %. Aus diesen Untersuchungen geht jedoch hervor, dass die STA in Haarproben mittels LC-QTOF-MS geeignet ist, ein umfassendes Bild über die zurückliegende Einnahme oder Applikation von Drogen und Medikamenten zu liefern, wobei deren Konzentration im Haar neben der Dosis auch von zahlreichen physiologischen und strukturellen Faktoren bestimmt wird.

Für die Identifizierung von Metaboliten wurde ein Metaboliten-Tool entwickelt und an Blut- und Haarproben erprobt. Dieses ermöglicht es, nach erfolgreichem Nachweis einer Substanz mittels Datenbank oder auch nach der eindeutigen Identifizierung durch die CID-Spektrenbibliothek systematisch nach zugehörigen Metaboliten zu suchen. Dabei werden Massendifferenzen und dazugehörige Isotopenmuster berechnet und mit unbekanntem chromatographischen Peaks abgeglichen. Im Falle einer Übereinstimmung werden die Vorschläge über CID-Spektren verifiziert. In der praktischen Anwendung auf die Analysefiles von Blut- und Haarproben erwies sich das Tool als wertvolles Hilfsmittel zur Identifizierung unbekannter Peaks und zur Bestätigung von Suchergebnissen in der Datenbank. Zum Beispiel wurden in einer Blutprobe, in der Tramadol identifiziert wurde, 19 Metabolite gefunden. In Haarproben konnte auf diesem Wege zwischen externer Kontamination und Konsum von Drogen oder Medikamenten durch den Nachweis nicht-hydrolytischer Metabolite unterschieden werden. So konnte zum Beispiel der Konsum von Cocain und Amphetaminen durch entsprechende Hydroxy- und Desalkyl-Metabolite bestätigt und eine externe Kontamination ausgeschlossen werden.

Da die Systematische Toxikologische Analyse nicht nur die Identifizierung beinhaltet, sondern zumindest auch eine Konzentrationsabschätzung liefern sollte, wurde ein

Tool „Estimate Concentration“ geschaffen. Dieses basiert auf einer weiteren Datenbank „LC-TOF-QUANT“, die für mehr als 2130 Substanzen inklusive 32 deuterierter Standards Substanznamen, monoisotopische Massen, Summenformeln, Retentionszeiten und Peakflächen für 100 pg unter definierten chromatographischen Bedingungen beinhaltet. Das Tool berechnet automatisch die Konzentration einer identifizierten Substanz aus dessen Peakfläche und die zum Beispiel fünf ähnlich retardierenden deuterierten Standards in der Probe und in der Datenbank. Eine Überprüfung anhand von Haar- und Blutproben, die über zwei Dekaden mit 31 Wirkstoffen dotiert waren, zeigte, dass das Tool für nahezu alle 31 Analyte die Konzentration mit einer Richtigkeit innerhalb der Grenzen von -33 % bis + 50 % vollkommen akzeptabel wiedergegeben hat. Die relativen Standardabweichungen unter Verwendung von fünf deuterierten Standards und der sich daraus ergebenden mittleren Konzentrationen waren bei Blutproben in der Regel höher (15-30 %) als bei Haarproben (5-20 %). Dies lässt sich durch entsprechend größere Matrixeffekte bei Blutproben gegenüber Haarproben erklären. Die Überprüfung des Verfahrens an realen Blut- und Haarproben durch Vergleich mit HPLC-DAD- und GC-MS-Ergebnissen zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Konzentrationen.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass die LC-QTOF-MS unter Verwendung des „Data Dependent Acquisition“-Modus (Auto-MS/MS-Modus) zurzeit die geeignetste Methode für die Systematische Toxikologische Analyse darstellt. Ohne Vorgabe oder Einschränkung der zu analysierenden Analyte vor der Messung werden alle ionisierten Substanzen der injizierten Probe erfasst. Akkurate MS- und CID-Spektren ermöglichen es, umfangreiche Datenbank- und Bibliothekssuchen zur Identifizierung von Giften vorzunehmen. Da immer alle Informationen erfasst werden, kann auch nachträglich und ohne eine erneute Messung auf die Anwesenheit von bestimmten Giften überprüft werden. Somit kann auch erst bei einem später aufkommenden Verdacht eine gezielte Suche in einem bereits gemessenen Analysefile durchgeführt werden.

## Abstract

Due to the large variety and the steady increase of toxicologically relevant substances, systematic toxicological analysis (STA) is one of the most difficult tasks in analytical chemistry and, therefore, a steady topic of research and methodical improvement. In this thesis, a method for identification of poisons, their metabolites, and for semi-quantitative determination of their concentrations was developed and tested in routine application by using liquid chromatography with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS).

In the general part of this work, the principles and problems of systematic toxicological analysis were discussed. The particularly favorable prerequisites of time-of-flight mass spectrometers for this purpose were shown and the advantage to obtain further criteria of substance identification by use of hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometers was demonstrated. Finally, the characteristics of hair for detection of chronic substance abuse or long-term use were outlined.

For substance identification by means of the 6530 QTOF-MS instrument from Agilent Technologies a database of more than 7360 toxicologically relevant substances was created. This included text-based entries, such as name, molecular formula, CAS number, and exact mass of all substances. For more than 2720 of these substances CID spectra were measured by flow injection using 5 mM aqueous ammonium formate + 0.01 % formic acid and methanol (50/50, v:v) as mobile phase in Targeted-MS/MS mode with collision energies of 0, 10, 20 and 40 eV. Subsequently, the spectra were cleaned by background subtraction, checked for plausibility, and corrected by conversion of the measured accurate fragment masses to their exact masses. This spectral library and database is commercially available under the name "Broecker, Herre & Pragst Personal Database and Library."

Method development and practical applications were performed with blood and hair samples. While blood allows statements about acute intoxication or impedance of mental and physical performance by a poison, information about chronic or previous exposure to a poison can be derived from hair. Blood samples were prepared by protein precipitation with acetonitrile; or a basic extraction with dichloromethane was performed. Hair samples were prepared by two-times incubation for 18 hours with a solvent mixture consisting of methanol, acetonitrile and ammonium formate (pH 4.5).

This method allowed the simultaneous detection of acidic, neutral and basic as well as hydrophilic and lipophilic substances.

The chromatographic separation was performed using a 20-minute gradient elution with a mobile phase of 10 mM aqueous ammonium acetate and methanol on a C18 Poroshell column. The measurement was carried out mainly in the "Data Dependent Acquisition" mode (Auto-MS/MS mode). Here, in addition to accurate full-scan MS spectra, accurate full-scan CID spectra of all relevant constituents in the sample extract were acquired.

The application of the database and the library spectra was evaluated on spiked blood samples from individuals who had not taken any drugs. It was found that the analysis in Auto-MS/MS mode allowed substance identification using CID spectra between 0.5 and 2 ng/ml for basic substances. Benzodiazepines were identified between 2 and 20 ng/ml. The detection of a substance from the MS spectra only with the database was usually possible at around 50 % lower concentrations.

To further increase the confidence level of systematic toxicological analysis, LC-QTOF-MS was combined with HPLC and a photodiode array detector (HPLC-DAD). A valve switching system enabled simultaneous operation of both methods under their respective optimal chromatographic conditions. The analysis of 77 post-mortem blood samples with this combination of methods using the associated databases and spectra libraries showed the advantages of mutual confirmation and completion. The significantly higher sensitivity of LC-QTOF-MS analysis provided a higher number of identified substances. Furthermore, co-eluting substances could be better identified due to the additional separation by accurate mass. However, in addition to the rapid estimation of semi-quantitative concentration, the HPLC-DAD measurements had the advantage of acquiring simultaneously basic and acidic substances in one measurement, whereas LC-QTOF-MS required two separate measurements with positive and negative electrospray ionization for this purpose. With both methods metabolites could be identified.

The suitability of LC-QTOF-MS for systematic toxicological analysis of hair samples was tested on samples from 30 drug-related deaths and from 60 deaths with known chronic medication. The detection limits of the validated method ranged from 3 to 15 pg/mg for 24 drugs. The hair samples from drug-related death cases proved

abuse of opiates, cocaine, and amphetamines and detection of their metabolites, natural impurities and adulterants. Cannabinoides could not be detected because of the insufficient sensitivity of the method for these substances. A total of 212 medical drugs and their metabolites were detected in all 90 hair samples with a frequency of 1 to 40. Up to 33 drugs were found in some samples. The comparison of the hair results with the data from police reports or from the analysis of blood, urine and gastric contents gave only an agreement of 36.8 %. Altogether, these studies showed that STA in hair samples by LC-QTOF-MS is suitable to provide a comprehensive picture of past administration or application of drugs, with their concentration in the hair depending on dose as well as on numerous physiological and structural factors.

For the identification of metabolites, a metabolite tool was developed and tested on blood and hair samples. This makes it possible to perform a systematic search for metabolites of substances which were detected by a database search or were identified by the CID spectra library search. This tool uses the exact mass differences occurring in typical metabolism reactions and calculates the exact mass and the isotope pattern of the metabolites which are used for searching the LC-QTOF-MS analysis file. In the case of a match the CID spectra of the proposed metabolites are evaluated for verification. In the practical application of data files from blood and hair samples, the tool proved to be very helpful for identification of unknown peaks and for confirmation of results obtained only from the database without CID spectra. For example, in a blood sample in which tramadol was identified, 19 metabolites were found. Furthermore, the detection of non-hydrolytic metabolites enabled to distinguish between external contamination and consumption. For example, the consumption of cocaine and amphetamines could be confirmed by corresponding hydroxy and desalkyl metabolites in hair and an external contamination could be excluded.

The systematic toxicological analysis includes not only the identification of a poison but should also provide an estimation of its concentration. For this purpose a tool "Estimate Concentration" was created. This is based on another database "LC-TOF-QUANT," which was measured in this work and which includes for more than 2130 substances and 32 deuterated standards substance names, monoisotopic masses, molecular formula, retention times, and peak areas for 100 pg of each substance under defined chromatographic conditions. The tool automatically calculates the concentration of an identified substance from its peak area and the peak areas of, for

example, five nearby eluting deuterated standards in the sample and in the database. By evaluation with hair and blood samples which were spiked with 31 drugs over two orders of magnitude, it was found that the tool had calculated the concentrations of almost all the 31 analytes within the limits of -33 % to + 50 % which is acceptable for a semi-quantitative estimation in order to decide whether the substance is in the sub-therapeutic, therapeutic, toxic or comatose-lethal range. The relative standard deviations using five deuterated standards and the resulting mean concentrations were in general higher in blood samples (15-30 %) than in hair samples (20-50 %). This can be explained by larger matrix effects in extracts from blood samples than from hair samples. The application of the method to real blood and hair samples and comparison of the concentrations with results from HPLC-DAD and GC-MS showed good agreement.

Overall, these investigations showed that the LC-QTOF-MS in "Data Dependent Acquisition" mode (Auto-MS/MS mode) is currently the best method for systematic toxicological analysis. Without defining or limiting the analytes before the measurement, accurate MS and MS/MS spectra of all ionized substances of the injected sample are recorded. These data enable an extensive database and library search for identification of toxic compounds. Because all information is captured, it can be checked for the presence of certain poisons, and even later without re-measurement. Automatic search for metabolites of identified substances and estimation of concentrations for a large number of substances complete the technique to provide powerful tool in forensic toxicological laboratories.

**Literaturverzeichnis**

- [1] H.H. Maurer, K. Pflieger, A.A. Weber, Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, (2007).
- [2] F. Pragst, M. Herzler, B.T. Erxleben, Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), Clin Chem Lab Med, 42 (2004) 1325-1340.
- [3] S.I. Services, Wiley Registry™ of Mass Spectral Data 2010, <http://www.sisweb.com/software/ms/wiley.htm>.
- [4] S.E. Stein, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program: (Data Version: NIST 08, Software Version 2.0f), <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>.
- [5] C.K. Meng, J. Zweigenbaum, P. Furst, E. Blanke, Finding and confirming nontargeted pesticides using GC/MS, LC/quadrupole-time-of-flight MS, and databases, J AOAC Int, 93 (2010) 703-711.
- [6] M.J. Gomez, M.M. Gomez-Ramos, A. Aguera, M. Mezcua, S. Herrera, A.R. Fernandez-Alba, A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters, J Chromatogr A, 1216 (2009) 4071-4082.
- [7] L. Mondello, A. Salvatore, P.Q. Tranchida, A. Casilli, P. Dugo, G. Dugo, Reliable identification of pesticides using linear retention indices as an active tool in gas chromatographic-mass spectrometric analysis, J Chromatogr A, 1186 (2008) 430-433.
- [8] L. Huber, K. Zech, Automated screening for drug metabolites with high-performance liquid chromatography UV-visible diode array detection and spectra library search, J Pharm Biomed Anal, 6 (1988) 1039-1043.
- [9] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T. Erxleben, M. Rothe, UV-Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons, Verlag Dieter Helm, Heppenheim 2001 (Suppl. Vol. 2007).
- [10] S. Dresen, J. Kempf, W. Weinmann, Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification, Forensic Sci Int, 161 (2006) 86-91.
- [11] S. Dresen, M. Gergov, L. Politi, C. Halter, W. Weinmann, ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology, Anal Bioanal Chem, 395 (2009) 2521-2526.
- [12] S. Dresen, N. Ferreiros, H. Gnann, R. Zimmermann, W. Weinmann, Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching, Anal Bioanal Chem, 396 (2010) 2425-2434.
- [13] C.A. Mueller, W. Weinmann, S. Dresen, A. Schreiber, M. Gergov, Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching, Rapid Commun Mass Spectrom, 19 (2005) 1332-1338.
- [14] H.C. Liu, R.H. Liu, H.O. Ho, D.L. Lin, Development of an information-rich LC-MS/MS database for the analysis of drugs in postmortem specimens, Anal Chem, 81 (2009) 9002-9011.
- [15] H.C. Liu, R.H. Liu, D.L. Lin, H.O. Ho, Rapid screening and confirmation of drugs and toxic compounds in biological specimens using liquid chromatography/ion trap tandem

- mass spectrometry and automated library search, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24 (2010) 75-84.
- [16] M. Pavlic, K. Libiseller, H. Oberacher, Combined use of ESI-QqTOF-MS and ESI-QqTOF-MS/MS with mass-spectral library search for qualitative analysis of drugs, *Anal Bioanal Chem*, 386 (2006) 69-82.
- [17] R. Diaz, M. Ibanez, J.V. Sancho, F. Hernandez, Building an empirical mass spectra library for screening of organic pollutants by ultra-high-pressure liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25 (2011) 355-369.
- [18] G. Hoizey, D. Lamiable, T. Trenque, A. Robinet, L. Binet, M.L. Kaltenbach, S. Havet, H. Millart, Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry and library searching, *Clin Chem*, 51 (2005) 1666-1672.
- [19] K. Pihlainen, E. Sippola, R. Kostainen, Rapid identification and quantitation of compounds with forensic interest using fast liquid chromatography-ion trap mass spectrometry and library searching, *J Chromatogr A*, 994 (2003) 93-102.
- [20] M. Gergov, B. Boucher, I. Ojanpera, E. Vuori, Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated target library search based on elemental formulas, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15 (2001) 521-526.
- [21] A. Pelander, I. Ojanpera, S. Laks, I. Rasanen, E. Vuori, Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chem*, 75 (2003) 5710-5718.
- [22] L. Ojanpera, A. Pelander, S. Laks, M. Gergov, E. Vuori, M. Witt, Application of accurate mass measurement to urine drug screening, *J Anal Toxicol*, 29 (2005) 34-40.
- [23] S. Ojanpera, A. Pelander, M. Pelzing, I. Krebs, E. Vuori, I. Ojanpera, Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20 (2006) 1161-1167.
- [24] M. Kolmonen, A. Leinonen, A. Pelander, I. Ojanpera, A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 585 (2007) 94-102.
- [25] A. Pelander, J. Ristimaa, I. Rasanen, E. Vuori, I. Ojanpera, Screening for basic drugs in hair of drug addicts by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Ther Drug Monit*, 30 (2008) 717-724.
- [26] A. Pelander, J. Ristimaa, I. Ojanpera, Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 34 (2010) 312-318.
- [27] E. Tyrkko, A. Pelander, I. Ojanpera, Differentiation of structural isomers in a target drug database by LC/Q-TOFMS using fragmentation prediction, *Drug Test Anal*, 2 (2010) 259-270.
- [28] J. Ristimaa, M. Gergov, A. Pelander, E. Halmesmaki, I. Ojanpera, Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 398 (2010) 925-935.
- [29] T.N. Decaestecker, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, W.E. Lambert, E.G. Van den Eeckhout, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenheer, Evaluation of automated single mass spectrometry to tandem mass spectrometry function switching for comprehensive

- drug profiling analysis using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14 (2000) 1787-1792.
- [30] T.N. Decaestecker, S.R. Vande Casteele, P.E. Wallemacq, C.H. Van Peteghem, D.L. Defore, J.F. Van Boclaer, Information-dependent acquisition-mediated LC-MS/MS screening procedure with semiquantitative potential, *Anal Chem*, 76 (2004) 6365-6373.
- [31] A. Poletti, R. Gottardo, J.P. Pascali, F. Tagliaro, Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chem*, 80 (2008) 3050-3057.
- [32] E. Liotta, R. Gottardo, A. Bertaso, A. Poletti, Screening for pharmaco-toxicologically relevant compounds in biosamples using high-resolution mass spectrometry: a 'metabolomic' approach to the discrimination between isomers, *J Mass Spectrom*, 45 (2010) 261-271.
- [33] H.K. Lee, C.S. Ho, Y.P. Lu, P.S. Lai, C.C. Shek, Y.C. Lo, H.B. Klink, M. Wood, Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 649 (2009) 80-90.
- [34] J.G. Stroh, C.J. Petucci, S.J. Brecker, L.M. Nogle, Sub-2 microm HPLC coupled with sub-ppm mass accuracy for analysis of pharmaceutical compound libraries, *J Sep Sci*, 31 (2008) 3698-3703.
- [35] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF): a novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine, *Anal Chim Acta*, 586 (2007) 13-21.
- [36] M.K. Nielsen, S.S. Johansen, P.W. Dalsgaard, K. Linnet, Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS, *Forensic Sci Int*, 196 (2010) 85-92.
- [37] <http://www.cas.org> (20. Juli 2011).
- [38] M. Schulz, A. Schmoltdt, Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie*, 58 (2003) 447-474.
- [39] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T. Erxleben, M. Rothe, UV-Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons, Verlag Dieter Helm, Heppenheim 2001 (Suppl. Vol. 2007) 1.
- [40] H.H. Maurer, Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology, *Clin Biochem*, 38 (2005) 310-318.
- [41] H.H. Maurer, Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Anal Bioanal Chem*, 388 (2007) 1315-1325.
- [42] M. Wood, M. Laloup, N. Samyn, M. del Mar Ramirez Fernandez, E.A. de Bruijn, R.A. Maes, G. De Boeck, Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science, *J Chromatogr A*, 1130 (2006) 3-15.
- [43] F.T. Peters, Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Clin Biochem*, 44 (2011) 54-65.
- [44] P. Marquet, Is LC-MS suitable for a comprehensive screening of drugs and poisons in clinical toxicology?, *Ther Drug Monit*, 24 (2002) 125-133.

- [45] N. Venisse, P. Marquet, E. Duchoslav, J.L. Dupuy, G. Lachatre, A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 27 (2003) 7-14.
- [46] P. Marquet, F. Saint-Marcoux, T.N. Gamble, J.C. Leblanc, Comparison of a preliminary procedure for the general unknown screening of drugs and toxic compounds using a quadrupole-linear ion-trap mass spectrometer with a liquid chromatography-mass spectrometry reference technique, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 789 (2003) 9-18.
- [47] R. Jansen, G. Lachatre, P. Marquet, LC-MS/MS systematic toxicological analysis: comparison of MS/MS spectra obtained with different instruments and settings, *Clin Biochem*, 38 (2005) 362-372.
- [48] F.L. Sauvage, F. Saint-Marcoux, B. Duretz, D. Deporte, G. Lachatre, P. Marquet, Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry, *Clin Chem*, 52 (2006) 1735-1742.
- [49] F.L. Sauvage, N. Picard, F. Saint-Marcoux, J.M. Gaulier, G. Lachatre, P. Marquet, General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and constraints, *J Sep Sci*, 32 (2009) 3074-3083.
- [50] W. Weinmann, A. Wiedemann, B. Eppinger, M. Renz, M. Svoboda, Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching, *J Am Soc Mass Spectrom*, 10 (1999) 1028-1037.
- [51] M. Gergov, I. Ojanpera, E. Vuori, Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 795 (2003) 41-53.
- [52] H. Horai, M. Arita, S. Kanaya, Y. Nihei, T. Ikeda, K. Suwa, Y. Ojima, K. Tanaka, S. Tanaka, K. Aoshima, Y. Oda, Y. Kakazu, M. Kusano, T. Tohge, F. Matsuda, Y. Sawada, M.Y. Hirai, H. Nakanishi, K. Ikeda, N. Akimoto, T. Maoka, H. Takahashi, T. Ara, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, S. Neumann, T. Iida, K. Funatsu, F. Matsuura, T. Soga, R. Taguchi, K. Saito, T. Nishioka, MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences, *J Mass Spectrom*, 45 (2010) 703-714.
- [53] M.J. Bogusz, R.D. Maier, K.D. Kruger, K.S. Webb, J. Romeril, M.L. Miller, Poor reproducibility of in-source collisional atmospheric pressure ionization mass spectra of toxicologically relevant drugs, *J Chromatogr A*, 844 (1999) 409-418.
- [54] C. Pistos, S. Karampela, I. Papoutsis, S. Athanaselis, C. Spiliopoulou, C. Maravelias, Investigation of the identification point system adaptation in cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester using a single quadrupole mass spectrometer, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23 (2009) 3772-3780.
- [55] A.G. Lips, W. Lameijer, R.H. Fokkens, N.M. Nibbering, Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 759 (2001) 191-207.
- [56] L. Humbert, F. Grisel, C. Richeval, M. Lhermitte, Screening of xenobiotics by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry using in-source fragmentation at increasing cone voltages: library constitution and an evaluation of spectral stability, *J Anal Toxicol*, 34 (2010) 571-580.
- [57] M. Gergov, W. Weinmann, J. Meriluoto, J. Uusitalo, I. Ojanpera, Comparison of product ion spectra obtained by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry for library search, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18 (2004) 1039-1046.

- [58] A.W. Bristow, K.S. Webb, A.T. Lubben, J. Halket, Reproducible product-ion tandem mass spectra on various liquid chromatography/mass spectrometry instruments for the development of spectral libraries, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18 (2004) 1447-1454.
- [59] C. Hopley, T. Bristow, A. Lubben, A. Simpson, E. Bull, K. Klagkou, J. Herniman, J. Langley, Towards a universal product ion mass spectral library - reproducibility of product ion spectra across eleven different mass spectrometers, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22 (2008) 1779-1786.
- [60] H. Oberacher, M. Pavlic, K. Libiseller, B. Schubert, M. Sulyok, R. Schuhmacher, E. Csaszar, H.C. Kofeler, On the inter-instrument and inter-laboratory transferability of a tandem mass spectral reference library: 1. Results of an Austrian multicenter study, *J Mass Spectrom*, 44 (2009) 485-493.
- [61] H. Oberacher, M. Pavlic, K. Libiseller, B. Schubert, M. Sulyok, R. Schuhmacher, E. Csaszar, H.C. Kofeler, On the inter-instrument and the inter-laboratory transferability of a tandem mass spectral reference library: 2. Optimization and characterization of the search algorithm, *J Mass Spectrom*, 44 (2009) 494-502.
- [62] T. Srikumar, S.M. Jeram, H. Lam, B. Raught, A ubiquitin and ubiquitin-like protein spectral library, *Proteomics*, 10 (2010) 337-342.
- [63] A. Panchaud, P. Singh, S.A. Shaffer, D.R. Goodlett, xComb: a cross-linked peptide database approach to protein-protein interaction analysis, *J Proteome Res*, 9 (2010) 2508-2515.
- [64] K.H. Gowd, K.K. Dewan, P. Iengar, K.S. Krishnan, P. Balaram, Probing peptide libraries from *Conus achatinus* using mass spectrometry and cDNA sequencing: identification of delta and omega-conotoxins, *J Mass Spectrom*, 43 (2008) 791-805.
- [65] P. Findeisen, T. Peccerella, S. Post, F. Wenz, M. Neumaier, Spiking of serum specimens with exogenous reporter peptides for mass spectrometry based protease profiling as diagnostic tool, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22 (2008) 1223-1229.
- [66] G. Alves, W.W. Wu, G. Wang, R.F. Shen, Y.K. Yu, Enhancing peptide identification confidence by combining search methods, *J Proteome Res*, 7 (2008) 3102-3113.
- [67] X. Wu, C.W. Tseng, N. Edwards, HMMatch: peptide identification by spectral matching of tandem mass spectra using hidden Markov models, *J Comput Biol*, 14 (2007) 1025-1043.
- [68] <http://www.chem.agilent.com>.
- [69] <http://www.molgen.de> (20. August 2010).
- [70] <http://www.chemspider.com> (20. August 2010).
- [71] H.H. Maurer, K. Pflieger, A.A. Weber, *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, (1992) 423-562.
- [72] M.A. ElSohly, W. Gul, T.P. Murphy, B. Avula, I.A. Khan, LC-(TOF) MS analysis of benzodiazepines in urine from alleged victims of drug-facilitated sexual assault, *J Anal Toxicol*, 31 (2007) 505-514.
- [73] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [74] M. Hayashida, M. Takino, M. Terada, E. Kurisaki, K. Kudo, Y. Ohno, Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) exact mass database for benzodiazepine screening, *Leg Med (Tokyo)*, 11 Suppl 1 (2009) S423-425.

- [75] S. Laks, A. Pelander, E. Vuori, E. Ali-Tolppa, E. Sippola, I. Ojanpera, Analysis of street drugs in seized material without primary reference standards, *Anal Chem*, 76 (2004) 7375-7379.
- [76] O. Quintela, D.M. Andrenyak, A.M. Hoggan, D.J. Crouch, A validated method for the detection of Delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Delta 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples by liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 31 (2007) 157-164.
- [77] R. Gottardo, A. Fanigliulo, F. Bortolotti, G. De Paoli, J.P. Pascali, F. Tagliaro, Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1159 (2007) 190-197.
- [78] F. Pragst, M. Rothe, K. Spiegel, F. Sporkert, Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments - a timetable of drug exposure?, *Forensic Sci. Rev.* 10, (1998) 81-111.
- [79] F. Pragst, M.A. Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin Chim Acta*, 370 (2006) 17-49.
- [80] M. Wada, R. Ikeda, N. Kuroda, K. Nakashima, Analytical methods for abused drugs in hair and their applications, *Anal Bioanal Chem*, 397 (2010) 1039-1067.
- [81] B. Madea und F. Mußhoff (Eds.), *Haaranalytik - Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, (2004).
- [82] P. Kintz (Ed.), *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006.
- [83] Y. Gaillard, G. Pepin, 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*, 762 (1997) 251-267.
- [84] H. Sachs, Screening strategies in hair analysis on drugs, in: P. Kintz (Ed.), *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, (2006) 187-200.
- [85] D. Thieme, H. Sachs, Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Chim Acta* 492, (2003) 171-186.
- [86] S. Vogliardi, D. Favretto, M. Tucci, G. Stocchero, S.D. Ferrara, Simultaneous LC-HRMS determination of 28 benzodiazepines and metabolites in hair, *Anal Bioanal Chem*, 400 (2011) 51-67.
- [87] A. Miki, M. Katagi, T. Kamata, K. Zaitso, M. Tatsuno, T. Nakanishi, H. Tsuchihashi, T. Takubo, K. Suzuki, MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair, *J Mass Spectrom*, 46 (2011) 411-416.
- [88] T. Porta, C. Grivet, T. Kraemer, E. Varesio, G. Hopfgartner, Single Hair Cocaine Consumption Monitoring by Mass Spectrometric Imaging, *Anal Chem*, 83 (2011) 4266-4272.
- [89] W. Schubert, R. Mattern, *Beurteilungskriterien – Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik*, second ed., Kirschbaum Verlag GmbH, Bonn, (2009).
- [90] D. Thieme, H. Sachs, Allgemeine analytische Methoden, in: B. Madea, F. Mußhoff (Eds.), *Haaranalytik – Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzte Verlag, Köln, (2004) 103-130.

- [91] G. Kauert, v.L. Meyer, I. Herle, Drogen- und Medikamentnachweis im Kopfhaar ohne Extraktion des Haaraufschlusses mittels GC–MS. *Zbl Rechtsmed*, 38 (1992).
- [92] G. Kauert, J. Rohrich, Concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers, *Int J Legal Med*, 108 (1996) 294-299.
- [93] F. Musshoff, K. Lachenmeier, J. Trafkowski, B. Madea, F. Nauck, U. Stamer, Determination of opioid analgesics in hair samples using liquid chromatography / tandem mass spectrometry and application to patients under palliative care, *Ther Drug Monit*, 29 (2007) 655-661.
- [94] M. Shen, P. Xiang, H. Wu, B. Shen, Z. Huang, Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in human hair, *Forensic Sci Int*, 126 (2002) 153-161.
- [95] S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal, S. Carman, Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC-MS, *J Anal Toxicol*, 25 (2001) 203-208.
- [96] M. Rothe, F. Pragst, Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples, *J Anal Toxicol*, 19 (1995) 236-240.
- [97] P. Kintz, P. Bundeli, R. Brenneisen, B. Ludes, Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program, *J Anal Toxicol*, 22 (1998) 231-236.
- [98] P. Kintz, V. Cirimele, A. Tracqui, P. Mangin, Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 670 (1995) 162-166.
- [99] M.R. Moeller, P. Fey, R. Wennig, 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*, 63 (1993) 185-206.
- [100] M. Villain, M. Concheiro, V. Cirimele, P. Kintz, Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 825 (2005) 72-78.
- [101] M. Cheze, G. Duffort, M. Deveaux, G. Pepin, Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris, *Forensic Sci Int*, 153 (2005) 3-10.
- [102] M. Yegles, Y. Marson, R. Wennig, Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair, *Forensic Sci Int*, 107 (2000) 87-92.
- [103] J. Klein, P. Blanchette, G. Koren, Assessing nicotine metabolism in pregnancy--a novel approach using hair analysis, *Forensic Sci Int*, 145 (2004) 191-194.
- [104] T. Chetiyankornkul, A. Toriba, R. Kizu, K. Kimura, K. Hayakawa, Hair analysis of nicotine and cotinine for evaluating tobacco smoke exposure by liquid chromatography-mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 18 (2004) 655-661.
- [105] M. Rothe, F. Pragst, K. Spiegel, T. Harrach, K. Fischer, J. Kunkel, Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users, *Forensic Sci Int*, 89 (1997) 111-128.
- [106] I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka, Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 707 (1998) 99-104.
- [107] J. Liu, K. Hara, S. Kashimura, M. Kashiwagi, M. Kageura, New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic-mass

- spectrometric analysis of amphetamines in hair, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 758 (2001) 95-101.
- [108] S. Gentili, A. Torresi, R. Marsili, M. Chiarotti, T. Macchia, Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 780 (2002) 183-192.
- [109] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr Sci*, 40 (2002) 359-364.
- [110] M. Cheze, M. Deveaux, C. Martin, M. Lhermitte, G. Pepin, Simultaneous analysis of six amphetamines and analogues in hair, blood and urine by LC-ESI-MS/MS. Application to the determination of MDMA after low ecstasy intake, *Forensic Sci Int*, 170 (2007) 100-104.
- [111] M. Uhl, H. Sachs, Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption, *Forensic Sci Int*, 145 (2004) 143-147.
- [112] C. Jurado, M.P. Gimenez, M. Menendez, M. Repetto, Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair, *Forensic Sci Int*, 70 (1995) 165-174.
- [113] C. Moore, F. Guzaldo, T. Donahue, The determination of 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair using negative ion gas chromatography-mass spectrometry and high-volume injection, *J Anal Toxicol*, 25 (2001) 555-558.
- [114] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 26 (2002) 554-560.
- [115] D. Wilkins, H. Haughey, E. Cone, M. Huestis, R. Foltz, D. Rollins, Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 19 (1995) 483-491.
- [116] V. Cirimele, H. Sachs, P. Kintz, P. Mangin, Testing human hair for Cannabis. III. rapid screening procedure for the simultaneous identification of delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol, *J Anal Toxicol*, 20 (1996) 13-16.
- [117] R. Sato, T. Uematsu, S. Yamaguchi, M. Nakashima, Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: prospective study, *Ther Drug Monit*, 11 (1989) 686-691.
- [118] F.J. Couper, I.M. McIntyre, O.H. Drummer, Extraction of psychotropic drugs from human scalp hair, *J Forensic Sci*, 40 (1995) 83-86.
- [119] F. Sporkert, F. Pragst, Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds, *Forensic Sci Int*, 107 (2000) 129-148.
- [120] A. Tracqui, P. Kreissig, P. Kintz, A. Pouliquen, P. Mangin, Determination of amitriptyline in the hair of psychiatric patients, *Hum Exp Toxicol*, 11 (1992) 363-367.
- [121] M. Josefsson, R. Kronstrand, J. Andersson, M. Roman, Evaluation of electrospray ionisation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rational determination of a number of neuroleptics and their major metabolites in human body fluids and tissues, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 789 (2003) 151-167.

- [122] R. Kronstrand, I. Nystrom, M. Josefsson, S. Hodgins, Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients, *J Anal Toxicol*, 26 (2002) 479-484.
- [123] C. Offidani, S. Strano Rossi, M. Chiarotti, Improved enzymatic hydrolysis of hair, *Forensic Sci Int*, 63 (1993) 171-174.
- [124] A.C. Lucas, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, P. Fernandez, S. Strano-Rossi, Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS, *Forensic Sci Int*, 107 (2000) 225-232.
- [125] Y. Nakahara, T. Ochiai, R. Kikura, 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*, 66 (1992) 446-449.
- [126] H. Sachs, M. Uhl, Opiatnachweis in Haarextrakten mit Hilfe von GC-MS-MS und Supercritical Fluid Extraction (SCF), *Toxichem Krimtech*, 59 (1992) 114-120.
- [127] P. Edder, C. Staub, J.L. Veuthey, I. Pierroz, W. Haerdi, Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 658 (1994) 75-86.
- [128] D.L. Allen, J.S. Oliver, The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair, *Forensic Sci Int*, 107 (2000) 191-199.
- [129] W.E. Brewer, R.C. Galipo, K.W. Sellers, S.L. Morgan, Analysis of cocaine, benzoylecgonine, codeine, and morphine in hair by supercritical fluid extraction with carbon dioxide modified with methanol, *Anal Chem*, 73 (2001) 2371-2376.
- [130] J.F. Morrison, S.N. Chesler, W.J. Yoo, C.M. Selavka, Matrix and modifier effects in the supercritical fluid extraction of cocaine and benzoylecgonine from human hair, *Anal Chem*, 70 (1998) 163-172.
- [131] A. Miki, M. Katagi, N. Shima, H. Tsuchihashi, Application of ORAL.screen saliva drug test for the screening of methamphetamine, MDMA, and MDEA incorporated in hair, *J Anal Toxicol*, 28 (2004) 132-134.
- [132] E. Ando, M. Hayashida, M. Nihira, T. Yamada, Y. Ohno, GC-MS analysis of methamphetamine and amphetamine in hair of Thai drug addicts, *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 39 (2004) 168-179.
- [133] E. Han, Y. Park, W. Yang, J. Lee, S. Lee, E. Kim, M. Lim, H. Chung, The study of metabolite-to-parent drug ratios of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine in hair, *Forensic Sci Int*, 161 (2006) 124-129.
- [134] S. Vogliardi, D. Favretto, G. Frison, S.D. Ferrara, R. Seraglia, P. Traldi, A fast screening MALDI method for the detection of cocaine and its metabolites in hair, *J Mass Spectrom*, 44 (2009) 18-24.
- [135] S. Vogliardi, D. Favretto, G. Frison, S. Maietti, G. Viel, R. Seraglia, P. Traldi, S.D. Ferrara, Validation of a fast screening method for the detection of cocaine in hair by MALDI-MS, *Anal Bioanal Chem*, 396 (2010) 2435-2440.
- [136] R. Kronstrand, I. Nystrom, J. Strandberg, H. Druid, Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS, *Forensic Sci Int*, 145 (2004) 183-190.
- [137] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci Int*, 165 (2007) 216-224.
- [138] G. Schmitt, M. Herbold, F. Peters, Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor. Auswertung von Validierungsdaten nach den Richtlinien der GTFCh mit VALISTAT, Arvecon, (2009).

- [139] P. Stone, J. Zweigenbaum, An Application Kit for the Screening of Samples for Analytes of Forensic and Toxicological Interest using TOF or Q-TOF LC/MS with a Personal Forensics/Toxicology Database., Agilent Application Note 5990-4252EN, Agilent Technologies, (2009).
- [140] S. Broecker, S. Herre, B. Wust, J. Zweigenbaum, F. Pragst, Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition, *Anal Bioanal Chem*, 400 (2011) 101-117.
- [141] S. Broecker, S. Herre, F. Pragst, F. Kuhlmann, B. Wüst, J. Zweigenbaum, Toxicological Screening with the Agilent LC/MS-QTOF and the Personal Compound Database and the Broecker, Herre and Pragst Accurate Mass Spectral Library, Agilent Application Note 5990-6419EN Agilent Technologies, Santa Clara, (2010).
- [142] S. Broecker, F. Pragst, A. Bakdash, S. Herre, M. Tsokos, Combined use of liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) in systematic toxicological analysis, *Forensic Sci Int*, 212 (2011) 215-226.
- [143] G.J. Muirhead, D.J. Rance, D.K. Walker, P. Wastall, Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil, *Br J Clin Pharmacol*, 53 Suppl 1 (2002) 13S-20S.
- [144] H. Zhang, P. Wang, M.G. Bartlett, J.T. Stewart, HPLC determination of cisatracurium besylate and propofol mixtures with LC-MS identification of degradation products, *J Pharm Biomed Anal*, 16 (1998) 1241-1249.
- [145] V. Vlahov, M. Badian, M. Verho, N. Bacracheva, Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium, *Eur J Clin Pharmacol*, 38 (1990) 61-65.
- [146] S. Broecker, S. Herre, F. Pragst, General unknown screening in hair by liquid chromatography – hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS), *Forensic Sci Int*, (2011) im Druck.
- [147] R. Coomber, The adulteration of drugs: what dealers do to illicit drugs, and what they think is done to them, *Addict. Res. Theory* 5, (1997) 297–306.
- [148] I. Evrard, S. Legleye, A. Cadet-Tairou, Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France, *Int J Drug Policy*, 21 (2010) 399-406.
- [149] A. Chang, J. Osterloh, J. Thomas, Levamisole: a dangerous new cocaine adulterant, *Clin Pharmacol Ther*, 88 (2010) 408-411.
- [150] Y. Nakahara, K. Takahashi, R. Kikura, Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair, *Biol Pharm Bull*, 18 (1995) 1223-1227.
- [151] Y. Nakahara, R. Hanajiri, Hair analysis for drugs of abuse XXI. Effect of para-substituents on benzene ring of methamphetamine on drug incorporation into rat hair, *Life Sci*, 66 (2000) 563-574.
- [152] F. Pragst, Medikamente, in: B. Madea, F. Mußhoff (Eds.), *Haaranalytik – Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzte Verlag, Köln, (2004) 215-261.
- [153] M. Chèze, M. Deveaux, G. Duffort, F. Billaut, G. Pépin, Pharmaceuticals in hair, in P. Kintz (Ed.), *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, (2006) 163-185.
- [154] J.P. Gouille, J. Noyon, A. Layet, N.F. Rapoport, Y. Vaschalde, Y. Pignier, D. Bouige, F. Jouen, Phenobarbital in hair and drug monitoring, *Forensic Sci Int*, 70 (1995) 191-202.

- [155] M. Deveaux, E. Revuelta, E. Mornay, V. Hedouin, D. Gosset, Immunoassay of digoxin in hair, *Forensic Sci Int*, 84 (1997) 219-223.
- [156] M. Villain, C. Tournoud, F. Flesch, V. Cirimele, P. Kintz, Hair to document exposure to glibenclamide, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 842 (2006) 111-115.
- [157] S. Broecker, M. Koch, F. Pragst, Detection of metabolites in the general unknown screening of hair by LC-QTOF-MS, *Ann. Tox. Anal.* 23, (2011) S1-12.
- [158] S. Mabic, K. Castagnoli, J.N. Castagnoli, Oxidative Metabolic Bioactivation of Xenobiotics, in: T.F. Woolf (Ed.), *Handbook of Drug Metabolism*, Marcel Dekker Inc, New York, (1999) 49-79.
- [159] G.G. Gibson, P. Skett, Enzymology and molecular mechanisms of drug metabolism reactions, *Introduction to Drug Metabolism*, Blackie Academic & Professional, An imprint of Chapman & Hall, London, (1994) 35-76.
- [160] G.G. Gibson, P. Skett, Pharmacological and toxicological aspects of drug metabolism, in: T.F. Woolf (Ed.), *Handbook of Drug Metabolism*, New York: Marcel Dekker Inc Introduction to Drug Metabolism, Blackie Academic&Professional, an imprint of Chapman & Hall, London, (1994) 157-179.
- [161] J.R. Gibbs, A. Singleton, Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond, *PLoS Genet*, 2 (2006) e150.
- [162] C. Ionescu, M.R. Cairra, Pathway of biotransformation – Phase II reactions, *Drug Metabolism Current Concepts*, Springer, Dordrecht NL, (2006) 129-130.
- [163] J.B. Taylor, P.D. Kennewell, Drug metabolism, in *Modern Medicinal Chemistry*, London: Ellis Harwood Ltd, (1993) 110.
- [164] G.L. Zubay, W.W. Parson, D.E. Vance, Principles of Biochemistry, Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers, (1995) 287-289, 301, 418.
- [165] B. Burchell, Transformation Reactions: Glucuronidation, in: T.F. Woolf (Ed.), *Handbook of Drug Metabolism*, Marcel Dekker Inc, New York, (1999) 53-173.
- [166] R. Xu, A fully automated system for metabolic stability and metabolite ID measurements, in: *Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Montreal, Canada, (2003).
- [167] A.G. Wilson, A.C. White, R.A. Mueller, Role of predictive metabolism and toxicity modeling in drug discovery--a summary of some recent advancements, *Curr Opin Drug Discov Devel*, 6 (2003) 123-128.
- [168] D.F. Lewis, Modelling human cytochromes P450 for evaluating drug metabolism: an update, *Drug Metabol Drug Interact*, 16 (2000) 307-324.
- [169] D. Thieme, B. Rolf, H. Sachs, D. Schmid, Correlation of inter-individual variations of amitriptyline metabolism examined in hairs with CYP2C19 and CYP2D6 polymorphisms, *Int J Legal Med*, 122 (2008) 149-155.
- [170] A.L. Misra, R.B. Pontani, N.L. Vadlamani, Metabolism of norcocaine, N-hydroxy norcocaine and cocaine-N-oxide in the rat, *Xenobiotica*, 9 (1979) 189-199.
- [171] E.J. Cone, A. Tsadik, J. Oyler, W.D. Darwin, Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration, *Ther Drug Monit*, 20 (1998) 556-560.
- [172] K. Srinivasan, P.P. Wang, A.T. Eley, C.A. White, M.G. Bartlett, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of cocaine and its metabolites from blood, amniotic fluid, placental and fetal tissues: study of the metabolism and distribution of cocaine in pregnant rats, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 745 (2000) 287-303.

- [173] T. Kanamori, K. Tsujikawa, Y. Ohmae, Y.T. Iwata, H. Inoue, T. Kishi, T. Nakahama, Y. Inouye, A study of the metabolism of methamphetamine and 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in isolated rat hepatocytes, *Forensic Sci Int*, 148 (2005) 131-137.
- [174] P. Jankovics, A. Varadi, L. Tolgyesi, S. Lohner, J. Nemeth-Palotas, H. Koszegi-Szalai, Identification and characterization of the new designer drug 4'-methylethcathinone (4-MEC) and elaboration of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) screening method for seven different methcathinone analogs, *Forensic Sci Int*, 210 (2011) 213-220.
- [175] S. Broecker, F. Pragst, G. Kopf, M. Koch, S. Wuttig, S. Herre, Semi-quantitative Determination of Concentrations in Systematic Toxicological Analysis by LC-QTOF-MS, *Toxichem Krimtech*, 78 (2011) 230-239.
- [176] Philippus Theophrastus Aureolus Bombast von Hohenheim, *Septem Defensiones*, Basel, (1589).
- [177] A. Krueve, K. Herodes, I. Leito, Electrospray ionization matrix effect as an uncertainty source in HPLC/ESI-MS pesticide residue analysis, *J AOAC Int*, 93 (2010) 306-314.
- [178] S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures, *J Chromatogr A*, 1058 (2004) 61-66.
- [179] J. Wu, X. Qian, Z. Yang, L. Zhang, Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1217 (2010) 1471-1475.

## Publikations- und Vortragsverzeichnis

### Publikationen:

- S. Broecker, S. Herre, F. Pragst, F. Kuhlmann, B. Wüst, J. Zweigenbaum, Toxicological Screening with the Agilent LC/MS-QTOF and the Personal Compound Database and the Broecker, Herre and Pragst Accurate Mass Spectral Library, Agilent Application Note 5990-6419EN, Agilent Technologies, Santa Clara, (2010).
- S. Broecker, S. Herre, B. Wust, J. Zweigenbaum, F. Pragst, Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition, *Anal Bioanal Chem*, 400 (2011) 101-117.
- S. Broecker, F. Pragst, A. Bakdash, S. Herre, M. Tsokos, Combined use of liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) in systematic toxicological analysis, *Forensic Sci Int*, 212 (2011) 215-226.
- S. Broecker, S. Herre, F. Pragst, General unknown screening in hair by liquid chromatography – hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS), *Forensic Sci Int*, (2011) im Druck.
- S. Broecker, M. Koch, F. Pragst, Detection of metabolites in the general unknown screening of hair by LC-QTOF-MS, *Ann. Tox. Anal.* 23, (2011) S1-12.
- S. Broecker, F. Pragst, G. Kopf, M. Koch, S. Wuttig, S. Herre, Semi-quantitative Determination of Concentrations in Systematic Toxicological Analysis by LC-QTOF-MS, *Toxichem Krimtech*, 78 (2011) 230-239.

### Vorträge:

Datum	Veranstaltung	Titel
08.12.2009	Agilent Anwendertreffen Massenspektrometrie 2009, Würzburg	F. Pragst und S. Broecker, Neue Wege in der Systematischen Toxikologischen Analyse: LC-QTOF-MS in Kombination mit HPLC-DAD
08.12.2009	Agilent Anwendertreffen Massenspektrometrie 2009, Würzburg	S. Broecker und F. Pragst, Aufbau einer neuen LC-QTOF-MS/MS-Bibliothek mit mehr als 1000 Substanzen und Anwendung in der toxikologischen Suchanalyse
10.03.2010	43. Jahrestagung der DGMS, Halle	S. Broecker und F. Pragst, Anwendung von LC-QTOF-MS in der Systematischen Toxikologischen Analyse
14.04.2010	4 <sup>th</sup> Conference of Pharmaceutical Sciences, Aleppo (Syrien)	F. Pragst, S. Broecker, A. Bakdash und S. Herre, Systematic toxicological analysis by liquid chromatography and combined use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and photodiode array detector (HPLC-DAD)
31.08.2010	48 <sup>th</sup> Annual Meeting of TIAFT, Bonn	S. Broecker und F. Pragst, Forensic/Toxicology Accurate-Mass Library solidifies LC/MS/MS Screening and Identification

## Publikations- und Vortragsverzeichnis

Datum	Veranstaltung	Titel
01.09.2010	48 <sup>th</sup> Annual Meeting of TIAFT, Bonn	F. Pragst, S. Broecker, A. Bakdash, S. Herre und M. Tsokos, Combined use of LC-QTOF-MS and HPLC-DAD in systematic toxicological analysis
02.09.2010	48 <sup>th</sup> Annual Meeting of TIAFT, Bonn	S. Broecker und F. Pragst, General unknown screening in hair by LC-QTOF-MS
29.10.2010	Minisymposium der Arbeitsgruppe Klinische Toxikologie der DGKL: UPDATE Klinische Toxikologie 2010 – Klinik und Labor, Bad Staffelstein - Kloster Banz	A. Bakdash, S. Broecker, A. von Meyer, J. Hallbach und F. Pragst, Anwendung von LC-TOF-MS und LC-QTOF-MS in der Metabolitenidentifizierung
28.02.2011	DGMS 2011, Dortmund	S. Broecker und F. Pragst, General Unknown Screening in der forensischen Toxikologie mittels LC-QTOF-MS
22.03.2011	SoHT annual meeting, Chamonix (Frankreich)	S. Broecker, M. Koch, F. Pragst, Detection of metabolites in general unknown screening of hair by LC-QTOF-MS
15.04.2011	XVII. Symposium der GTFCh, Mosbach	S. Broecker, F. Pragst, G. Kopf, M. Koch, S. Wuttig und S. Herre, Semiquantitative Determination of Concentrations in Systematic Toxicological Analysis by LC-QTOF-MS
27.05.2011	2. Wissenschaftliches Symposium Stiftung Europäische Gewebebanken in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin, Hamburg	S. Broecker, S. Hartwig, R. Meyer, Restmengenbestimmung von Antibiotika in kardiovaskulären Gewebesubstraten
04.06.2011	ASMS 2011, Denver (Colorado, USA)	S. Broecker, General Unknown Screening in the forensic toxicology by LC-QTOF-MS
18.06.2011	DGRM 20. Frühjahrstagung Region Nord, Münster/Westfalen	S. Broecker, F. Pragst, G. Kopf, M. Koch, S. Herre und M. Tsokos, Nachweis von Metaboliten in der Systematischen Toxikologischen Analyse von Haarproben durch LC-QTOF-MS
01.08.2011	FORENSIC AND CLINICAL TOXICOLOGY ASSOCIATION (FACTA), Melbourne (Australien)	S. Broecker und F. Pragst, General Unknown Screening in Forensic Toxicology using LC-QTOF-MS

### *Poster:*

Datum	Veranstaltung	Titel
29.08.- 02.09.2010	48 <sup>th</sup> Annual Meeting of TIAFT, Bonn	S. Broecker, S. Herre, F. Pragst und B. Wüst, Development and practical application of a CID mass spectra library of toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS

## **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, den 18. August 2011