

Aus dem  
Institut für Rechtsmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

# **Toxikologische Analyse von Blutspuren**

Inauguraldissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. biol. hum.)  
an der  
medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Julia Krüger

aus München

-2018-

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Mußhoff  
Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Betreuer: Dr. rer. biol. hum. Gabriele Roider  
Dr. rer. nat. Hans Sachs

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2018

Herrn Dr. rer. nat. Hans Sachs †

Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen

Von ihm lernte man ... fürs Leben

# Inhaltsverzeichnis

I-IV

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Aufgabenstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Allgemeiner Teil .....</b>	<b>3</b>
3.1. Analysen in forensisch-toxikologischen Laboratorien .....	3
3.2. Validierung und Qualitätskontrolle.....	3
3.3. Präanalytik .....	4
3.4. Analytik .....	5
3.5. Drogen und Arzneistoffe .....	8
3.6. Analytik von Blutspuren.....	16
3.6.1. DNS-Analytik.....	16
3.6.2. Blutspurenmusterverteilungsanalyse .....	17
3.6.3. Dried Blood Spots (DBS) .....	17
3.6.4. DBS und Blutspuren in der forensischen Toxikologie .....	19
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
4.1. Geräte .....	24
4.2. Softwares .....	24
4.3. Verbrauchsmaterial .....	25
4.4. Chemikalien und Reagenzien .....	25
4.5. Standardmaterial.....	27
4.6. Untersuchungsmaterial .....	28
4.7. Qualitätskontrollproben .....	29
4.8. Untergrundmaterialien.....	30
4.9. Lagerungsbedingungen .....	30
4.10. Aufarbeitungsmethode .....	31
4.11. LC-MS/MS-Methode.....	31
4.12. Validierung .....	32
<b>5. Experimenteller Teil.....</b>	<b>37</b>
5.1. Vorversuche .....	37
5.1.1. Trocknungsverlust von Blut unter verschiedenen Bedingungen .....	37
5.1.2. Asservierung der Trockenblutproben .....	39
5.1.3. „Rekonstituieren“ des Trockenblutes zur Analyse.....	41

5.1.4. Wiederfindung von Arznei- bzw. Suchtstoffen in post-mortem Trockenblutproben im Vergleich zu Vollblut .....	42
5.1.5. Verwendung von DBS zur Messung von Ethylglucuronid (EtG) aus getrocknetem Kapillarblut im Vergleich zu venösem Blut.....	45
5.1.6. Kurzzeit-Lagerungsstudie über sieben Wochen.....	48
5.1.7. Ergebnisse Vorversuche .....	52
5.2. Langzeitstudie über sechs Monate.....	58
<b>6. Ergebnisse</b> .....	64
6.1. Auswertung der Qualitätskontrollen .....	64
6.2. Langzeitstudie .....	66
<b>7. Diskussion</b> .....	100
7.1. Asservierung am Tatort.....	100
7.2. Aufarbeitung im Labor.....	102
7.3. Langzeitstudie und Kurzzeit-Lagerungsstudie zur Stabilität von Arznei- bzw. Suchtstoffen .....	109
<b>8. Spurenanalytik an Realproben mit forensischer Fragestellung</b> .....	120
8.1. Blutfleck auf Teppich.....	120
8.2. Infusionslösung auf Teppich .....	121
8.3. Watteabriebe vom Gesicht eines Verstorbenen .....	123
8.4. Rückstände an einer Verbandsschere .....	124
8.5. Getrocknetes Blut auf Textilien .....	126
8.6. Urin auf Bettlaken.....	128
<b>9. Zusammenfassung</b> .....	133
<b>10. Ausblick</b> .....	135
<b>11. Anhang</b> .....	136
<b>12. Literatur</b> .....	162
<b>13. Danksagung</b> .....	167
<b>14. Lebenslauf</b> .....	169

## **Abkürzungsverzeichnis**

6-MAM	6-Monoacetylmorphin
ACE	Angiotensin converting enzyme (Angiotensin-konversierendes Enzym)
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization, chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
BG	Bestimmungsgrenze
BtM	Betäubungsmittel
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
CE	Collision energy (Kollisionsenergie)
DBS	Dried blood spots
DNS	Desoxyribonukleinsäure (auch DNA aus dem englischen deoxyribonucleic acid)
DP	Declustering potential
EDDP	2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (Stoffwechselprodukt von Methadon)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektronsprayionisation
EtG	Ethylglucuronid
FTC	Forensisch Toxikologisches Centrum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GTFCh	Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie
HIV	Humanes Immunschwächevirus
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IS	Interner Standard
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie
LLE	Liquid/liquid-extraction (Flüssig/Flüssig-Extraktion)
MDMA	Methylendioxymethamphetamin
MeOH	Methanol
MPPH	5-(4-methylphenyl)-5-phenylhydantoin
MS	Massenspektrometrie

NSMRI	Non-selective monoamin reuptake inhibitor (Nicht-selektiver Monoamin-Wiederaufnahmehemmer)
NWG	Nachweisgrenze
QC	Quality control (Qualitätskontrolle)
S/N	Signal to noise ratio (Signal/Rausch-Verhältnis)
SOP	Standard operating procedure (Standardarbeitsanweisung)
SPE	Solid phase extraction, Festphasenextraktion
SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitor (Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer)
StVG	Straßenverkehrsgesetz
TDM	Therapeutic drug monitoring (Therapeutisches drug monitoring)
TOF-MS	Time of flight Massenspektrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
TTS	Transdermales therapeutisches System
U/min	Umdrehungen pro Minute



## **1. Einleitung**

Die Vielfalt der forensisch relevanten Fälle führt in der toxikologischen Analyse humaner Proben teilweise zu ungewöhnlichen Fragestellungen, die eine spezielle Betrachtung und Bearbeitung erfordern.

Ein solcher Fall ereignete sich im Jahr 2011 in der Nähe von München. In einer Wohnung kam es zu einer körperlichen Auseinandersetzung zwischen zwei Personen, in deren weiterem Verlauf eine der beiden in Folge einer Blutaspiration starb. Als Folge der Schlägerei wurden in der Wohnung, auch auf dem Teppich, mehrere Blutspuren aufgefunden. Darüber hinaus wurden typische Drogenutensilien sichergestellt. Das Institut für Rechtsmedizin wurde mit der Obduktion und Durchführung einer toxikologischen Analyse beauftragt. Im Oberschenkelvenenblut des Verstorbenen wurden Morphin und Codein in einem für Straßenheroin typischen Verhältnis sowie 6-Monoacetylmorphin nachgewiesen. Dieses zeitnah entstehende Stoffwechselprodukt des Heroins belegt einen vorangegangenen Heroinkonsum. Von Seiten der Ermittler wurde die Frage an das Institut herangetragen, ob der Verstorbene Heroin bereits vor der körperlichen Auseinandersetzung oder erst danach aufgenommen hatte.

Zur Abklärung wurde seitens des Instituts für Rechtsmedizin vorgeschlagen, die auf dem Teppich getrockneten Blutspuren auf das Vorhandensein typischer Stoffwechselprodukte von Heroin zu untersuchen um festzustellen, ob der Verstorbene zum Zeitpunkt der Schlägerei bereits Heroin konsumiert hatte. Hierfür wurde mehr als 6 Monate nach der Tat ein blutbeflecktes Teppichstück zur Analyse übergeben. Dies war der erste Fall, bei dem im Institut für Rechtsmedizin München getrocknete Blutspuren von einem Tatort toxikologisch analysiert wurden. Daher stellten Extraktion und Quantifizierung eine Herausforderung für das toxikologische Labor dar.



## **2. Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Der geschilderte Fall war Ausgangspunkt und Anlass für die Untersuchungen in dieser Arbeit. Es soll insbesondere überprüft werden, ob und über welchen Zeitraum eine Analyse getrockneten Blutes von verschiedenen Oberflächen sinnvoll ist bzw. ob man aus getrockneten Blutspuren, die bereits längere Zeit auf einer Oberfläche haften (wie im gegenständlichen Fall 6 Monate) noch toxikologisch relevante Informationen erhalten kann.

In verschiedenen Vorversuchen soll zunächst geprüft werden, ob die in flüssigem Blut nachweisbaren Analyten auch in getrocknetem Blut noch detektierbar sind. Darüber hinaus soll eine geeignete Asservierungsmethode entwickelt werden, um getrocknete Blutproben von unterschiedlichen Materialien einer Aufarbeitung und toxikologischen Analyse einfach zugänglich zu machen.

Als nächster Punkt soll die Korrelation der dabei erhaltenen Werte mit denen aus flüssigem Blut überprüft werden. Ziel ist es hier, aus den erhaltenen Ergebnissen einen Konzentrationsbereich der betreffenden Substanz in flüssigem Blut zum Zeitpunkt der Trocknung abschätzen zu können.

Zur Klärung dieser Fragen schien es sinnvoll zu sein, zuerst eine kurze Lagerungsstudie mit verschiedenen, für die Praxis relevanten Analyten über 7 Wochen anzusetzen, um diese Parameter überprüfen und optimieren zu können.

In einer sich anschließenden Langzeitstudie über 6 Monate werden, basierend auf den in den Vorversuchen erzielten Ergebnissen, Tropfen eines Blutpools mit ausgewählten Arznei- und Suchtstoffen auf verschiedenen Untergrundmaterialien angesetzt und über 6 Monate bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Teile dieser Proben werden in jeweils unterschiedlichen Abständen mit den entwickelten Verfahren und Methoden auf die ausgewählten Analyten untersucht. Damit soll die Langzeitstabilität der Analyten in getrocknetem Blut auf verschiedenen Materialien untersucht sowie insbesondere auch die Praktikabilität der Asservierungs- und Aufarbeitungsmethode und die Reproduzierbarkeit der erhaltenen quantitativen Ergebnisse überprüft werden.

Ziel ist die Entwicklung einer Methode, um forensisch relevante, auf verschiedenen, nicht standardisierten Materialien getrocknete Spuren auf Drogen und Arzneistoffe zu untersuchen sowie eine einheitliche praktikable Vorgehensweise zur Asservierung und toxikologischen Analyse von Blutspuren vom Tatort zu entwickeln.



### **3. Allgemeiner Teil**

#### **3.1. Analysen in forensisch-toxikologischen Laboratorien**

Forensisch-toxikologische Analysen werden mit unterschiedlichen Fragestellungen und daraus resultierend auch aus verschiedenen Materialien durchgeführt.

Blutproben werden häufig zur Überprüfung der Fahrsicherheit bei vermutetem Führen eines Fahrzeuges unter dem Einfluss von Alkohol oder "anderen berauschenden Mitteln" (und damit Drogen, aber auch Arzneistoffen mit Wirkung auf das zentrale Nervensystem) sowie zur Überprüfung der Einsichts- und Steuerungsfähigkeit und damit der "Schuldfähigkeit" bei Straftaten wie z.B. Raub, Körperverletzung oder Handel mit Betäubungsmitteln untersucht. Die Nachweisbarkeit von Arznei- oder Suchtstoffen im Blut ist von verschiedenen Faktoren wie z.B. konsumierte Menge oder Halbwertszeit der Substanz abhängig und in der Regel auf wenige Tage nach dem Konsum begrenzt.

Im Urin sind Substanzen durch die physiologische Aufkonzentrierung über die Niere deutlich länger nachweisbar, daher werden beispielsweise Abstinenzkontrollen häufig an Urin als Untersuchungsmatrix durchgeführt.

Da sich Arznei- und Suchtstoffe auch in die wachsenden Haare einlagern, sind sie dort – in Abhängigkeit von der Haarlänge – Monate bis Jahre nachweisbar und können so auch einen lange zurückliegenden Konsum belegen.

In der post-mortem-Analytik Verstorbener können – in Abhängigkeit von der Fragestellung – auch völlig andere Materialien wie Mageninhalt oder Organteile analysiert werden.

#### **3.2. Validierung und Qualitätskontrolle**

Im Bereich der forensisch-toxikologischen Analytik ist das Arbeiten nach einheitlichen Vorschriften und Richtlinien von essentieller Bedeutung, um eine Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse unabhängig vom untersuchenden Labor zu gewährleisten. Dies beginnt bereits mit der Probenentnahme und reicht über den Versand, die Aufbewahrung der biologischen Untersuchungsmaterialien, die Probenvorbereitung (Präanalytik) und die Messung an verschiedenen Analysengeräten (Analytik) bis zur Interpretation durch die oder den Gutachter/Sachverständigen. Solche einheitlichen Richtlinien erarbeitet und veröffentlicht in Deutschland die Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh).

Für eine Gerichtsverwertbarkeit der Analysen sind eine Validierung der Methoden und eine ständige Qualitätskontrolle unabdingbar. Eine Validierung der Methode belegt, dass die Analysenmethode für die zu untersuchende Substanz geeignet ist und reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Für die Validierung von Analysemethoden gibt es Vorgaben der GTFCh, welche Parameter zu überprüfen sind [50].

### **3.3. Präanalytik**

Die Blutentnahme bei lebenden Personen erfolgt häufig in Arztpraxen bzw. Krankenhäusern, manchmal jedoch auch vor Ort, beispielsweise auf einem Polizeirevier. Bis der diensthabende Arzt, der diese durchführt, dort eintrifft, kann unter Umständen eine längere Zeit vergehen, während der bereits ein Teil der möglicherweise im Blut vorhandenen Drogen oder Arzneistoffe verstoffwechselt wird. Eine zeitnahe Probenahme ist daher sehr wichtig. Für sehr empfindliche Substanzen wie z.B. Cocain wird der Blutprobe bzw. der Entnahmevenüle ein Esterasehemmer wie Natriumfluorid zugesetzt, um den enzymatischen Abbau des Wirkstoffes in der Venüle zu hemmen [42]. Die Probe wird, sollte die Blutentnahme nicht bereits im untersuchenden Institut erfolgen, in der Regel anschließend an ein Untersuchungslabor bzw. rechtsmedizinisches Institut versandt. Hier ist ein ungekühlter Postversand die Regel, es können somit Bedingungen vorliegen, die einen weiteren Substanzabbau fördern.

Nach Eingang im Labor wird die Blutprobe registriert, anschließend zentrifugiert, das überstehende Serum/Plasma abgenommen und tiefgefroren gelagert, um einen Abbau von Arznei-/Suchtstoffen zu verhindern bzw. zu minimieren.

Vor der Messung an einem der unten genannten Geräte (Analytik) muss eine adäquate Probenvorbereitung, z.B. eine Proteinfällung (Enteiweißung) des Blutes bzw. Serums/Plasmas erfolgen. Immunchemische Methoden benötigen keine Probenvorbereitung, sind jedoch häufig lediglich qualitativ auswertbar, da sie in den meisten Fällen nicht substanz- sondern gruppenspezifisch reagieren. Das bedeutet, dass beispielsweise ein positiver Immunoassay auf Opiate ein Hinweis für den Konsum der illegalen Droge Heroin sein kann, es kann jedoch ebenso das legale Hustenmittel Codein therapeutisch aufgenommen worden sein. Des Weiteren kann es zu sogenannten Kreuzreaktivitäten kommen. Hierbei handelt es sich um falsch-positive Reaktionen des Gerätes aufgrund struktureller Ähnlichkeiten eines in der Probe vorhandenen Moleküls zu den nachzuweisenden Analyten. Daher müssen immunchemische

Tests in der Regel anschließend mittels beweissicherer, chromatographischer Methoden bestätigt werden.

Für die Aufbereitung biologischer Probenmatrices für eine chromatographische Messung gibt es verschiedene Möglichkeiten wie beispielsweise die Festphasenextraktion (SPE = Solid Phase Extraction), wobei eine Aufreinigung über eine feste stationäre Phase erfolgt, von der die gewünschten Analyten mit einer geeigneten mobilen Phase wieder heruntergelöst werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE = Liquid Liquid Extraction), ein Verfahren zur Trennung eines Gemisches aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der jeweiligen Analyten in verschiedenen organischen bzw. wässrigen Lösungsmitteln [51]. Eine einfache und in dieser Arbeit verwendete Methode ist die oben erwähnte Probenvorbereitung durch Proteinfällung mit einem organischen Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol, bei der die störenden Proteine aus dem Untersuchungsmaterial ausgefällt und anschließend abzentrifugiert werden. Die Zugabe von Lösungsmitteln führt zu einem Verlust des Wassermantels der Proteine, diese agglomerieren dadurch und fallen aus [27].

### **3.4. Analytik**

Neben den meist für Vortests angewandten Immunoassays werden für die Analyse von Blutproben in vielen forensisch-toxikologischen Laboratorien hochleistungsfähige Analysengeräte eingesetzt, wie gaschromatographische (GC) bzw. hochdruckflüssigkeitschromatographische Methoden (HPLC = High Pressure Liquid Chromatography), jeweils gekoppelt mit einem geeigneten Detektor. Als Detektor finden beispielsweise der Dioden-Array-Detektor, UV-Detektoren oder Massenspektrometer (MS) Verwendung.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein LC-MS/MS-System, also eine HPLC, gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) als Detektor, verwendet. Bei dieser Analysenmethode erfolgt zunächst die Auftrennung eines Stoffgemisches über die HPLC. Der zu messende (z.B. aus Blut/Plasma durch Proteinfällung erhaltene) Extrakt wird in das System injiziert und mit Hilfe eines Fließmittels über eine Trennsäule geführt. Die Trennsäule besteht aus hydrophobem oder hydrophilem Material mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Dadurch kommt es zwischen den Analyten aus dem zu analysierenden Extrakt und dem Säulenmaterial zu Wechselwirkungen, welche eine Auftrennung der Analyten bewirken [51]. Das Fließmittel dient

dem Transport der Substanzen über das Säulenmaterial. Zumeist wird ein sogenannter Fließmittelgradient verwendet, bestehend aus zwei unterschiedlich polaren Lösungsmitteln, deren prozentuale Anteile im Fließmittel im Laufe der Messung verändert werden. Dadurch ändern sich die chemischen Eigenschaften des Fließmittels und die im Extrakt enthaltenen Analyten werden nach ihren unterschiedlichen Affinitäten zu Säule bzw. Fließmittel zeitlich getrennt von der Säule eluiert.

Im Interface, also dem Übertritt von der Kapillare aus der HPLC-Anlage in das Massenspektrometer werden die ankommenden Analyten positiv oder negativ ionisiert und zum Massenanalysator weitergeleitet. Es gibt verschiedene Arten der Ionisation, wie Elektronenstoßionisation, Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) oder die sogenannte sanfte Ionisationstechnik der Elektrosprayionisation (ESI). Bei letzterer, in der vorliegenden Arbeit angewandter Technik wird die Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung anliegt. Durch dieses elektrische Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode werden die Teilchen ionisiert und bilden einen sogenannten Taylor-Kegel in dem sie dann zur Gegenelektrode, also dem Einlass in den Analysator (Orifice) beschleunigt werden. Um eine Vernebelung des Sprays zu optimieren, wird das neutrale Gas Stickstoff hinzugeleitet. Da nach und nach das Lösungsmittel verdampft, vergrößert sich die elektrische Abstoßung der einzelnen, gleich geladenen Teilchen in den Tröpfchen, bis bei Unterschreitung des sogenannten Raleigh-Limits die Tröpfchen in einer Coulomb-Explosion zerfallen. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis schließlich – in der Theorie – nur noch einzelne geladene Moleküle verbleiben. Diese Einzelmoleküle werden dann an den Analysator (in diesem Fall das Tandem-Massenspektrometer) weitergeleitet [15].

Als massenspektrometrische Analysatoren werden beispielsweise Ionenfallen-, Time-of-Flight- oder Tandem-Massenspektrometer verwendet.

Mit einer Ionenfalle (Q-Trap) lassen sich insbesondere gering konzentrierte Analyten selektiver und sensitiver bestimmen, da die Ionen über einen bestimmten Zeitraum im Massenspektrometer gehalten und somit aufkonzentriert werden können. Beim Time-of-Flight-Massenspektrometer (TOF-MS) findet eine Identifizierung der Substanzen unter anderem über die exakte Molekülmasse und die Flugzeit der Analyten im Analysator statt. Die Flugzeit ist vor allem von dem Verhältnis der Masse zur Ladung abhängig und sehr substanzspezifisch.

In dieser Arbeit wurde ein Tandem-Massenspektrometer als Analysator verwendet. Dieser Analysator besteht aus drei hintereinander angeordneten Quadrupolen. Jeder

Quadrupol besteht aus vier Metallstäben. An diesen Stäben liegt ein Wechselstrom an, der sich in einer zuvor für jeden Analyten festgelegten Frequenz ändert. Dies bewirkt, dass lediglich die gewünschten geladenen Analyten - die sogenannten "Mutterionen" - an den zweiten Quadrupol weitergeleitet werden, Ionen anderer Masse werden "aussortiert". Im zweiten Quadrupol, der sogenannten Kollisionszelle findet die Fragmentierung dieser ausgewählten Moleküle durch Kollision mit Stickstoff statt. Durch die Kollision bilden sich charakteristische Fragmente, die als "Tochterionen" bezeichnet und zum dritten Quadrupol weitergeleitet werden. Dort erfolgt die Detektion mit Hilfe eines Elektronenmultipliers. Charakteristisch und für die Auswertung maßgeblich sind die für jede Substanz spezifischen Massenübergänge, d.h. von Mutterionen zu den diversen Tochterionen. Für eine valide Auswertung der erhaltenen Ergebnisse ist es notwendig, dass für jede Substanz mindestens zwei spezifische Übergänge ausgewählt werden. In der Regel wird das Tochterion mit der höchsten Intensität als "Target" oder auch als "Quantifier" bezeichnet und zur Ermittlung der Konzentration herangezogen. Die weniger häufig und damit mit geringerer Intensität entstehenden Tochterionen werden "Qualifier" genannt und dienen der qualitativen Bestätigung des Analyten sowie zur Bestätigung der quantitativ erhaltenen Werte. Die Identifizierung der Analyten - also der zu untersuchenden Substanzen - erfolgt somit aus einer Kombination von Retentionszeit (Zeit, nach der ein Analyt von der Trennsäule eluiert), genauer Masse des Mutterions, der Masse der Tochterionen sowie deren Verhältnisse zueinander.

Mit dieser Methode kann eine Vielzahl von Substanzen selektiv und spezifisch im Untersuchungsmaterial bestimmt werden. Um möglichst sensitiv viele Analyten zu erfassen, werden Zeitfenster um die jeweilige Retentionszeit des Analyten eingesetzt, in denen dann die Übergänge Mutterion zu Tochterionen aufgezeichnet werden. Zur Quantifizierung wird ein interner Standard verwendet, d.h. eine Substanz, die in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften dem Analyten möglichst ähnlich ist. Optimal sind hier die jeweiligen deuterierten Analoga der nachzuweisenden Substanzen, in denen mehrere Wasserstoff-Atome durch das schwerere Deuterium substituiert worden sind. Der interne Standard dient auch dazu, aufarbeitungs- und messtechnische Schwankungen auszugleichen bzw. zu erkennen. Zur Quantifizierung werden Kalibratoren in identischem Untersuchungsmaterial (z.B. Serum, Urin) in bekannten Konzentrationen gemessen. Für die Quantifizierung wird das Peakflächenverhältnis

von Analyt zu internem Standard herangezogen und mit dem jeweiligen Verhältnis der Kalibrierung verglichen.

### **3.5. Drogen und Arzneistoffe**

Die für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Arznei- bzw. Suchtstoffe wurden aus unterschiedlichen Wirkstoff- aber auch Strukturklassen ausgewählt und werden nachfolgend vorgestellt.

#### *- Stimulanzen*

Cocain ist der aktive Wirkstoff des Cocastrauches (*Erythroxylum coca*, *Erythroxylaceae*), eine in Südamerika, vor allem in den Bergregionen Kolumbiens und Peru heimischen Pflanze. Die (getrockneten) Blätter enthalten bis zu 2,5 % eines Alkaloidgemisches, dessen Hauptkomponente Cocain ist [65]. Cocain wirkt stark euphorisierend und stimulierend, da es die Wiederaufnahme der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin hemmt. Als Nebenwirkungen können unter anderem erhöhter Blutdruck sowie erhöhte Herzfrequenz auftreten, die bei hoher Dosierung auch lebensbedrohlich werden können. Bis heute gilt Cocain als die Droge, mit der man (zumindest zeitlich begrenzt) leistungsfähiger und produktiver sein kann. Insbesondere nach häufigerem und/oder hochdosiertem Konsum kann es bei nachlassender Wirkung zur Umkehr der Wirkung und damit zu depressionsartigen Zuständen, dem sogenannten "Crash" kommen. Bei dem im Körper, jedoch auch artefaktisch nach Abnahme der Blutprobe *in vitro* durch Demethylierung entstehenden Benzoyllecgonin handelt es sich um einen inaktiven Metaboliten von Cocain, welcher als Marker für einen Cocainkonsum als Analyt in diese Doktorarbeit aufgenommen wurde. Cocain untersteht dem Betäubungsmittelgesetz Anlage III (verkehrs- und verschreibungsfähige Betäubungsmittel) und ist damit (z.B. zur Lokalanästhesie bei Eingriffen am Auge) verschreibungsfähig.

Aus der Gruppe der illegalen Stimulanzen wurde darüber hinaus Methamphetamin ausgewählt. Methamphetamin ist eine stark stimulierend wirkende Substanz aus der Gruppe der Amphetamin-Derivate, die insbesondere in den grenznah zu Tschechien gelegenen Gebieten häufig missbräuchlich verwendet wird. In Europa nimmt die Menge der Sicherstellungen seit Jahren kontinuierlich zu [16]. Das synthetische Methamphetamin kann beispielsweise aus Ephedrin bzw. Pseudoephedrin (und damit

aus Arzneistoffen, die häufig in nicht verschreibungspflichtigen Erkältungsmitteln enthalten sind) oder aus Phenylaceton hergestellt werden [16]. In der Szene wird es als "Crystal" oder "Meth" bezeichnet. Methamphetamin wirkt als indirektes Sympathomimetikum, indem es den Neurotransmitter Noradrenalin aus seinem Speichervesikeln freisetzt und so zu einer (vorübergehenden) Leistungssteigerung sowie einem verringerten Angstgefühl führt. Aus diesem Grund fand es im zweiten Weltkrieg unter anderem als sogenannte "Panzerschokolade" weite Verbreitung [16]. Obwohl Methamphetamin rasch zur Abhängigkeit führen kann, versterben im Vergleich zu anderen Drogen wie Heroin weniger Menschen an den unmittelbaren Folgen des Konsums.

#### - *Opiate/Opioide*

Im Gegensatz zu den oben genannten Stimulanzien wirken Opiate/Opioide zentral dämpfend. In der Natur kommen die beiden Opiate Morphin und Codein in *Papaver somniferum* (Papaveraceae), dem Schlafmohn vor [65], welcher derzeit insbesondere in Afghanistan angebaut wird. Zur Gewinnung von Morphin werden die unreifen Samenkapseln angeritzt und der austretende Milchsaft nach Eintrocknung gesammelt. In diesem sogenannten Rohopium befinden sich neben ca. 10 % Morphin weitere Alkaloide wie Codein, Papaverin und Noscapin. Diese natürlich vorkommenden Alkaloide werden als "Opiate" bezeichnet, während halbsynthetisch oder synthetisch gewonnene Abkömmlinge "Opioide" genannt werden. Medizinisch wird Morphin als starkes Schmerzmittel vor allem in der Behandlung von Tumorpatienten eingesetzt.

Codein wird aufgrund seiner antitussiven (= den Hustenreiz unterdrückenden) Eigenschaft als Arzneistoff bei starkem Reizhusten verwendet. Im Körper wird es in der Regel zu ca. 10 bis 15 % zu Morphin verstoffwechselt, dem ein Großteil der ebenfalls vorhandenen schmerzlindernden Wirkung des Codeins zugeschrieben wird [43]. Sowohl Morphin als auch (in deutlich geringerem Umfang) Codein werden in der Substitutionstherapie Opiatabhängiger als Alternative zu den meist verordneten Opioiden Methadon oder Buprenorphin eingesetzt.

Als Ausgangsstoff für die Synthese von Heroin kommt Morphin auf dem illegalen Markt eine große Bedeutung zu. Durch zweifache Acetylierung der Hydroxylgruppen im Morphinmolekül enthält man das aufgrund seiner Lipophilie deutlich schneller im zentralen Nervensystem anflutende Heroin. Dieses wird im Körper rasch zu

Monoacetylmorphin und weiter zu Morphin verstoffwechselt. Die schnelle Konzentrationsänderung im zentralen Nervensystem, insbesondere bei intravenösem Konsum, führt zum sogenannten "Kick", einer rasch einsetzenden, extrem starken Euphorie [1]. Auch Heroin wird inzwischen unter seinem chemischen Namen "Diamorphin" bei schwerst opiatabhängigen Patienten als Substitutionsmittel verwendet.

Die Opiate/Opioide wirken im Körper an den sogenannten Opiat-/Opioid-Rezeptoren. Eine gravierende unerwünschte Wirkung ist die Atemdepression, die bei stationärer Behandlung aufgrund möglicher Vorsichts- bzw. gegebenenfalls Gegenmaßnahmen (Intubation, Beatmung) in der Regel ohne Folgen bleibt, jedoch bei illegalem Konsum von Morphin oder Morphin-Derivaten wie Heroin häufig tödliche Folgen hat. Da Straßenheroin in der Regel mit günstig zu erwerbenden Substanzen wie Coffein oder Paracetamol "gestreckt" ist [7], ist dem Konsumenten die Reinheit des gekauften Heroins nicht bekannt. In der Notfallmedizin wird bei Opiat-Intoxikationen neben symptomatischer Behandlung (Intubation, Beatmung) der Opiat-Antagonist Naloxon eingesetzt, der mit hoher Affinität, aber ohne Wirkung an den Opiat-/Opioid-Rezeptoren bindet und somit die Wirkungen der Opiate/Opioide wie Heroin aufhebt [43]. Eine Behandlung mit Naloxon kann jedoch zu einer plötzlich einsetzenden Entzugssymptomatik führen [1]. Darüber hinaus ist zu beachten, dass Naloxon eine deutlich kürzere Halbwertszeit als Morphin aufweist und sich somit nach Abklingen der Wirkung des Naloxons wieder eine Opiat-Intoxikation ausbilden kann.

Bei Methadon handelt es sich ebenfalls um ein starkes Schmerzmittel aus der Gruppe der Opioide. Methadon hat etwa die doppelte bis vierfache Wirkstärke von Morphin und unterliegt dem Betäubungsmittelgesetz. Es wird (in deutlich höherer Dosierung) in Deutschland häufig zur Substitutionsbehandlung Opiat-/Opioidabhängiger, typischerweise in Form von oral angewandten und hierdurch nur langsam anflutenden Darreichungsformen wie viskoser Lösung oder Tabletten eingesetzt. Aufgrund der bei oraler Aufnahme nur langsamen Anflutung, auch im zentralen Nervensystem, fehlt der sogenannte "Kick", der bei Heroinaufnahme die gewünschte starke Euphorie erzeugt.

Auch bei Tramadol handelt es sich um ein vollsynthetisch hergestelltes Schmerzmittel aus der Gruppe der Opioide. Es hat etwa 10 % der Wirkstärke von Morphin. Tramadol agiert vermutlich neben seiner opioid-agonistischen Wirkung auch als Serotonin- sowie Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer [1]. Dieser Wirkmechanismus sorgt für einen zusätzlichen schmerzmodulierenden Effekt. Tramadol unterliegt nicht dem

Betäubungsmittelgesetz, es ist lediglich rezeptpflichtig und daher vergleichsweise einfach erhältlich. Daher wird es häufig auch missbräuchlich verwendet.

Fentanyl ist als stärkstes der in dieser Arbeit untersuchten Opioide etwa 100-mal so stark wirksam wie Morphin [6]. Fentanyl wird vollsynthetisch hergestellt und unterliegt dem Betäubungsmittelgesetz. Eine insbesondere für chronische Schmerzpatienten häufig verordnete Darreichungsform sind die sogenannten transdermalen therapeutischen Systeme (TTS, "Pflaster"), die über eine Dauer von bis zu drei Tagen auf der Haut verweilen und in dieser Zeit den Wirkstoff kontinuierlich abgeben.

Fentanyl wird, insbesondere im süddeutschen Raum, von Drogenabhängigen häufig missbräuchlich verwendet. Hierzu werden die Pflaster gekaut, gelutscht oder häufig auch ausgekocht und der Extrakt intravenös injiziert [52]. Um eine konstante Wirkstofffreisetzung zu erreichen, enthalten Fentanyl-Pflaster in der Regel sehr viel mehr Wirkstoff als sie während ihrer Anwendungsdauer freisetzen. Daher enthalten selbst gebrauchte Pflaster noch Wirkstoff und wurden früher häufig aus Abfällen von Krankenhäusern oder Pflegeheimen gestohlen. Da die Dosierung bei ausgekochten Pflastern aufgrund der unbekannt erhaltenen Menge von Fentanyl schwierig ist, kommt es zumindest in Bayern zu vielen (wohl versehentlichen) tödlichen Überdosierungen.

#### - *Benzodiazepine*

Die zentral dämpfend wirkenden Benzodiazepine sind eine große Gruppe von Arzneistoffen mit hauptsächlich sedierender und anxiolytischer Wirkung. Als Grundgerüst enthalten alle Benzodiazepine den sogenannten Diazepinring (siebengliedriger Ring mit zwei Stickstoffatomen). Die in dieser Arbeit untersuchten Benzodiazepine unterliegen in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz, sind jedoch in bestimmten Darreichungsformen und Höchstmengen sogenannte "ausgenommene Zubereitungen" und müssen dann nicht auf einem Betäubungsmittelrezept verordnet werden. Im Fall von Lorazepam sind dies beispielsweise 2,5 mg Wirkstoff pro Tablette.

Alle Benzodiazepine binden an den sogenannten GABA-Rezeptoren. Der Neurotransmitter GABA (= Gamma-Aminobuttersäure) vermittelt eine inhibierende (= hemmende) Wirkung im zentralen Nervensystem. Die Hauptwirkungen sind damit angstlösend, zentral muskelrelaxierend (= muskelentspannend), sedierend (= beruhigend) und hypnotisch (= schlaffördernd). Einige Benzodiazepine wie Diazepam werden auch als

Antiepileptika und somit als Arzneistoffe zur Vorbeugung und Behandlung von Krampfanfällen eingesetzt. Als Antidot bei Überdosierungen mit Benzodiazepinen wird Flumazenil eingesetzt, welches ebenfalls an den GABA-Rezeptor bindet, als kompetitiver Antagonist jedoch keine Wirkung auslöst, so dass bei länger wirksamen Benzodiazepinen die Gefahr der wieder einsetzenden Wirkung nach Verstoffwechslung von Flumazenil besteht [1].

Bei 7-Aminoflunitrazepam handelt es sich um ein pharmakologisch inaktives Stoffwechselprodukt des unter dem Handelsnamen Rohypnol® bekannten Wirkstoffes Flunitrazepam, welcher als stark wirksames Schlafmittel Verwendung findet. Vor der Aufnahme in das Betäubungsmittelgesetz im Jahre 2011 war Flunitrazepam unter dem Szenenamen "Roofies" in der Drogenszene weit verbreitet, darüber hinaus wurde es, häufig in Verbindung mit Alkohol, als "K.O.-Mittel" eingesetzt.

Benzodiazepine wie Diazepam und Lorazepam werden von Opiat-/Opioid-Konsumenten häufig missbräuchlich als Ausweich- bzw. Ersatzmittel verwendet [3]. Der Mischkonsum von Benzodiazepinen und Heroin erhöht das Mortalitätsrisiko [12], da sich nicht nur die euphorisierenden, sondern auch die sedierenden und atemdepressiven Wirkungen verstärken [1].

Unter alleiniger Einnahme von Benzodiazepinen kommt es aufgrund ihrer großen therapeutischen Breite – zumindest bei gesunden Erwachsenen – auch bei massiver Überdosierung nicht zu einer direkten letalen Intoxikation. Alle Benzodiazepine haben ein hohes Abhängigkeitspotential. Bei Abhängigkeit von hohen Dosierungen können als Entzugserscheinung unter anderem epileptische Anfälle auftreten.

Diazepam und sein Metabolit Nordazepam sind Benzodiazepine mit einer sehr langen Halbwertszeit von 20 bis 40 bzw. 30 bis 90 Stunden und werden daher vorwiegend als auch tagsüber wirksame Anxiolytika und Tranquilizer eingesetzt [1]. Nordazepam selbst ist auf dem deutschen Markt nicht mehr erhältlich, sein hingegen auch hier erhältliches Prodrug Clorazepat wird noch im sauren Milieu des Magensaftes vollständig zu Nordazepam verstoffwechselt.

In der Langzeitstudie wurde anstatt von Diazepam Lorazepam als mittellang wirksames und häufig verordnetes Benzodiazepin ausgewählt. Therapeutisch findet es Anwendung in der Behandlung von Angst- und Panikstörungen, aber auch, wie

Diazepam, zur Behandlung der Epilepsie. Missbräuchlich wird Lorazepam insbesondere in Form der leicht löslichen und damit leicht beibringbaren Schmelztablette Tavor Expidet® auch als K.O.-Mittel angewandt.

- *Hypnotika*

Als Alternative zu den Benzodiazepinen wurde 1991 in Deutschland mit Zopiclon ein neuer Arzneistoff aus der Gruppe der sogenannten Z-Substanzen als Schlafmittel eingeführt. Auch das ebenfalls im Jahr 1991 auf den Markt gekommene Zolpidem gehört in diese Gruppe und ist in Deutschland ein häufig verschriebenes Schlafmittel [30]. Zopiclon und Zolpidem wirken am gleichen Ionenkanal wie die Benzodiazepine, dem sogenannten GABA-Rezeptor, greifen jedoch an einer anderen Bindungsstelle an. Das Wirkungsspektrum ähnelt dem der Benzodiazepine mit sedierenden und muskelrelaxierenden Eigenschaften. Aufgrund kürzerer Halbwertszeit führen Zopiclon und Zolpidem weniger zu "Hangover-Effekten", d.h. Nachwirkungen am Morgen nach einer abendlichen Einnahme. Von Ärzten wurde angenommen, dass auch das Abhängigkeitspotenzial geringer sei und die natürlichen Schlafphasen nicht beeinträchtigt würden. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass auch Zolpidem und Zopiclon zu Toleranz und Abhängigkeit führen können [23].

Bei Diphenhydramin handelt es sich um ein 1958 auf dem deutschen Markt eingeführtes Antihistaminikum, d.h. einen Arzneistoff zur Behandlung von Allergien. Da es als Nebenwirkung zu deutlicher Müdigkeit führt wird Diphenhydramin inzwischen nicht mehr als Antiallergikum verwendet. Die zunächst unerwünschte Arzneimittelwirkung der Müdigkeit macht man sich heute zunutze. Diphenhydramin ist inzwischen als leichtes Schlafmittel zur kurzfristigen Behandlung von Schlafstörungen zugelassen und in Form einer Vielzahl nicht rezeptpflichtiger Schlafmittel erhältlich.

- *Psychopharmaka*

Amitriptylin ist strukturell gesehen ein trizyklisches Antidepressivum. Nortriptylin ist ein aktiver Metabolit des Amitriptylins, ist jedoch auch als eigener Arzneistoff auf dem Markt erhältlich. Beide Arzneistoffe wirken als sogenannte nicht-selektive Monoaminwiederaufnahmehemmer (englische Abkürzung NSMRI Non Selective Monoamine Reuptake Inhibitors), da sie zu einer (nicht-selektiven) Hemmung der Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt in die Zelle führen und

so die Konzentration der freien Neurotransmitter erhöhen. Dies führt zu einer höheren Verfügbarkeit von Serotonin und Noradrenalin und so zu einer Milderung depressiver Symptome, deren Ursache auf der Monoaminmangelhypothese beruht [1]. Amitriptylin wird auch als sogenanntes "Co-Analgetikum" insbesondere bei neuropathischen Schmerzen erfolgreich eingesetzt [43].

Doxepin gehört ebenfalls zu den trizyklischen Antidepressiva, das Wirkprinzip ist wie bei Amitriptylin die unselektive Wiederaufnahmehemmung und dadurch erhöhte Verfügbarkeit von Serotonin und Noradrenalin im synaptischen Spalt. Doxepin wirkt stark zentral dämpfend und wird daher von Drogenabhängigen häufig missbräuchlich verwendet. Therapeutisch wird es neben seiner Anwendung als Antidepressivum auch unterstützend im Entzug Alkohol- und Drogenabhängiger verordnet [1].

Der Wirkmechanismus von Citalopram ist die selektive Wiederaufnahmehemmung von Serotonin in die Zelle, dies führt zu einer höheren Konzentration des Neurotransmitters Serotonin im synaptischen Spalt, der die antidepressive Wirkung von Citalopram erklärt. Diesen Wirkmechanismus bezeichnet man als SSRI (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor).

Citalopram ist sowohl in Form eines Racemates (1:1 Gemisch der Stereoisomere) als auch in Form des reinen S-Enantiomers erhältlich und wird dann als Escitalopram bezeichnet.

Quetiapin ist in die große Gruppe der Antipsychotika einzuordnen. Dort gehört es zur neueren Generation der atypischen Antipsychotika und wird bei Schizophrenie, bipolaren Erkrankungen sowie schweren Depressionen ärztlich verordnet. Quetiapin greift an unterschiedlichen Rezeptoren (Adrenozeptoren, Histaminrezeptoren, Dopaminrezeptoren und Serotoninrezeptoren) an [43]. Da man bei den meisten psychischen Erkrankungen von einem Ungleichgewicht der unterschiedlichen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ausgeht, werden Substanzen wie Quetiapin bei verschiedensten psychischen Störungen angewandt; Quetiapin war 2015 das Psycholeptikum mit der höchsten definierten Tagesdosis [24].

Als tetrazyklisches Antidepressivum findet Mirtazapin Anwendung bei depressiven Erkrankungen. Dies ist derzeit das einzige Indikationsgebiet, für das dieser Wirkstoff

in Deutschland zugelassen ist. Die Wirkung wird über eine Steigerung der Noradrenalin- und Serotoninfreisetzung erreicht. Da Mirtazapin eine stark sedierende Wirkung aufweist, wird es in der Regel zur abendlichen Einnahme verordnet.

- *Weitere Arzneistoffe*

Darüber hinaus wurden in die Langzeitstudie die Arzneistoffe Bisoprolol, Ramipril und Metformin aufgenommen, da sie als häufig verordnete Wirkstoffe bei Bluthochdruck bzw. Diabetes Hinweise auf eventuelle Erkrankungen der betreffenden Person und bei unbekanntem Personen somit auch auf die Person selbst geben können.

Bisoprolol ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der sogenannten Betarezeptorenblocker, deren Wirkung auf einer Blockade der Betarezeptoren insbesondere am Herzen und an den Gefäßen beruht. Bisoprolol war nach Metoprolol 2015 die Substanz aus dieser Gruppe mit dem höchsten Verbrauch in Deutschland [24]. Betablocker hemmen somit die Wirkungen des Adrenalins und werden aufgrund der daraus resultierenden blutdrucksenkenden und herzentlastenden Eigenschaften zur Behandlung von Hypertonie (Bluthochdruck), Angina Pectoris und chronischer Herzinsuffizienz angewandt.

Ramipril führt ebenfalls zu einer Blutdrucksenkung, es weist jedoch einen anderen Wirkmechanismus auf, als die Betarezeptorenblocker. Es handelt sich hierbei um einen sogenannten ACE-Hemmer, d.h. die Blutdrucksenkung wird durch eine Blockade des Angiotensin Converting Enzymes erreicht. Dadurch wird letzten Endes vermindert Angiotensin II freigesetzt, was wiederum über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eine Erniedrigung des Blutdrucks zur Folge hat. Des Weiteren wird über diesen Mechanismus weniger Aldosteron ausgeschüttet, welches in der Nebenniere gebildet wird und zu einer Retention von Natrium und Wasser in der Niere führt. Daher wirken ACE-Hemmer gleichzeitig leicht diuretisch, d.h. harntreibend. Bei Ramipril handelt es sich um ein sogenanntes Prodrug, erst im Organismus wird durch Abspaltung einer Ethanolgruppe durch Esterasen in der Leber aktives Ramiprilat erzeugt. Ramipril war 2014 eines der Antihypertonika mit dem höchsten Verbrauch in Deutschland [24].

Bei Metformin handelt es sich um ein orales Antidiabetikum, d.h. einen Arzneistoff zur Behandlung von nicht-insulinpflichtigem Typ2-Diabetes ("Zuckerkrankheit"). Metformin war 2015 das orale Antidiabetikum mit dem höchsten Verbrauch in Deutschland [24].

Strukturell gesehen ist es ein sogenanntes Biguanid, dessen Wirkprinzip noch nicht vollständig geklärt ist. Es hemmt die intestinale Glucoseresorption sowie die Gluconeogenese (Neubildung von Glucose) in der Leber. Es wirkt daher nur, solange noch eine - wenn auch geringe - körpereigene Produktion von Insulin stattfindet.

Bei Metformin besteht im Gegensatz zu vielen anderen oralen Antidiabetika nicht die Gefahr einer Hypoglykämie ("Unterzucker"), da es keine direkte insulinsekretionssteigernde Wirkung hat [1]. Als schwere Nebenwirkung kann es in seltenen Fällen zur sogenannten Lactatazidose kommen, d.h. einer Anhäufung von Milchsäure bzw. Lactat im Blut und daraus resultierend zu einer Azidose (= zu niedriger pH-Wert des Blutes), die auch tödlich verlaufen kann. Da Metformin zu einem großen Anteil über die Niere ausgeschieden wird, besteht die Gefahr einer Lactatazidose insbesondere bei niereninsuffizienten Patienten, daher ist Metformin bei schwerer Niereninsuffizienz kontraindiziert.

### **3.6. Analytik von Blutspuren**

In vielen Bereichen der Medizin ist die Analyse kleinster Spuren menschlichen Ursprungs und der Vergleich bzw. die Zuordnung solcher Spuren bereits etabliert, beispielsweise bei der DNS-Analytik. Eine toxikologische Analyse solcher verschiedener Spuren ist jedoch im Bereich der forensischen Toxikologie noch eine Seltenheit.

#### **3.6.1. DNS-Analytik**

Im Jahre 1987 gelang der Durchbruch im Bereich der DNS-Analyse an getrockneten menschlichen Spuren. Der sogenannten „Pitchfork-Fall“, benannt nach dem letztlich überführten Täter Colin Pitchfork, konnte mithilfe des von Alec Jeffreys 1984 im Zusammenhang mit seiner Forschung am menschlichen Genom entschlüsselten genetischen Fingerabdrucks [33] und des dadurch möglichen DNS-Vergleiches aufgeklärt werden [17].

Innerhalb von drei Jahren wurden in der Nähe von Leicester zwei 15-jährige Mädchen umgebracht. Als der zweite Mord geschah, stellte man fest, dass derselbe Täter am Werk gewesen sein musste. Ein vermutlich Schuldiger war gefunden, lediglich der Vater des Beschuldigten glaubte an seine Unschuld. Nun wurden mit dem von Jeffreys neu entwickelten Verfahren die Spermaspuren von der Kleidung der beiden Opfer mit dem Blut des Verdächtigen verglichen, wodurch dieser entlastet werden konnte. Durch einen groß angelegten DNS-Vergleich von etwa 5000 Männern konnte letztendlich der

Täter überführt werden [17]. Seit dieser Zeit hat sich die DNS-Analyse aus Körperflüssigkeiten und getrockneten menschlichen Spuren in der forensischen Analytik etabliert. Für die Durchführung eines genetischen Abgleichs genügen bereits Spuren von menschlichem Probenmaterial wie beispielsweise Spermaspuren, Hautschuppen oder Haare (mit Wurzel). Diese können dann mit Vergleichsproben verglichen und meistens eindeutig zugeordnet werden.

### **3.6.2. Blutspurenmusterverteilungsanalyse**

Bei der Blutspurenmusterverteilungsanalyse nutzt man getrocknete Blutropfen und Blutspritzer, um ein Tatgeschehen zu rekonstruieren, oder ggf. ein postuliertes Geschehen zu bestätigen oder zu widerlegen [53]. Hierbei werden Größe, Form und Ort der Spuren analysiert, um diese beispielsweise einer Tatwaffe und/oder einer Position von Opfer bzw. Täter zuzuordnen.

Bei einer Schusswaffe entstehen durch die hohe Beschleunigung sehr feine Spritzmuster des Blutes, die mit Entfernung der Schusswaffe zum Opfer immer größer werden und so eine ungefähre Zuordnung des Abstandes von Opfer zu Täter ermöglichen. Exakte Geschehensabläufe können so zwar nicht rekonstruiert werden, allerdings können angegebene Handlungsabläufe und Zeugenaussagen bestätigt oder ggf. auch widerlegt werden.

### **3.6.3. Dried Blood Spots (DBS)**

Auch für klinische und toxikologische Analysen werden Blutspuren verwendet. Bereits vor etwa einem Jahrhundert befasste sich der Schwede Ivar Christian Bang mit der Bestimmung der Blutglucosekonzentration. Da hierfür zum damaligen Zeitpunkt eine große Menge Blut benötigt wurde, suchte er mit seinen Schülern eine patientenschonende Methode, um den Blutzuckerspiegel, zunächst im Tierversuch an Kaninchen, zu bestimmen [4]. Hierfür verwendete Bang nur etwa zwei bis drei Tropfen Blut aus der Ohrvene der Kaninchen und brachte diese auf ein Filterpapier auf. Anschließend konnte er mithilfe einer Titration mit Jodlösung die Glucosekonzentration im Blut der Kaninchen mit einer für diese Zeit erstaunlichen Genauigkeit bestimmen.

Etwa 50 Jahre später, in den 1950er Jahren wurde die Analyse von auf Filterkarten getrocknetem Blut zur Verwendung in der klinischen Chemie weiterentwickelt. Eine Arbeitsgruppe um den Mikrobiologen Robert Guthrie entwickelte den nach ihm benannten Guthrie-Test für das Massenscreening von Neugeborenen auf Phenyl-

ketonurie, einen Stoffwechseldefekt, der unbehandelt zu schweren geistigen Schäden führt [22]. In der Regel findet das Screening bereits am dritten Lebenstag des Neugeborenen statt. Bei der von Guthrie entwickelten, minimal invasiven Methode wird Kapillarblut aus der Ferse des Säuglings entnommen, direkt auf ein Filterpapier aufgetragen und getrocknet. Dieses Filterpapier mit getrocknetem Blut wird anschließend auf eine mit einem *Bacillus subtilis* Stamm bebrütete Nährplatte aufgebracht. Die Bakterien sind auf dieser Platte durch den Stoff Thienylalanin in ihrem Wachstum gehemmt, dessen Wirkung durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen Phenylalanin aufgehoben wird. Dies resultiert letztlich in einem deutlichen Wachstum des Bakterienstammes. Dies war für Guthrie ein eindeutiger Beleg auf das Vorliegen der Krankheit. So konnte bereits frühzeitig mit einer spezifischen Behandlung bzw. einer phenylalaninarmen Diät begonnen werden und Spätfolgen wie geistige Schäden verhindert bzw. minimiert werden. Das Massenscreening für Neugeborene ist auch heute noch weit verbreitet und im Laufe der Jahre auf verschiedenste angeborene Stoffwechseldefekte wie Hypothyreose, Galactosämie und die sogenannte Ahornsirupkrankheit erweitert worden.

Ab Mitte der 1980er Jahre wurde diese Methode auch zur Bestimmung der Konzentration von Arzneistoffen beim therapeutic drug monitoring (TDM) in der klinischen Chemie angewandt. Insbesondere für Arzneistoffe, die langfristig eingenommen werden müssen und deren Blutspiegel regelmäßig kontrolliert werden muss, bietet sich diese Methode an, da die Betroffenen nicht regelmäßig zum Arzt fahren müssen. Ziel ist es, dem Patienten die Möglichkeit zu geben, zu Hause mithilfe einer Lanzette aus der Fingerbeere selbst eine Blutprobe zu entnehmen und diese nach Trocknung auf einer Filterkarte für die Analyse an ein Labor einzusenden. Vor allem Kinder können, bei guter Compliance der Eltern, von dieser einfachen Blutentnahmemethode profitieren. Beispielsweise Antiepileptika [56], [10], Antiretrovirale Arzneistoffe [45] und Immunsuppressiva [25], [18], [14] sind in den letzten Jahren untersucht und die DBS-Analytik in diesem Bereich routinemäßig angewandt worden.

Darüber hinaus werden toxikokinetische und pharmakokinetische Studien, metabolic profiling, Doping- und Umweltanalysen sowie mikrobiologische und epidemiologische Überwachungen bezüglich Infektionen mit verschiedenen Viren (hier wurden z.B. auch Resistenzen des HI-Virus gegenüber Medikamenten untersucht [41]), Bakterien, aber auch Parasiten wie Plasmodien [54] an DBS durchgeführt [13]. Beispielsweise wurde

eine epidemiologische Studie zum Missbrauch von Cocain in der Schwangerschaft mithilfe der Bestimmung von Benzoylconin aus DBS durchgeführt [61]. Des Weiteren gibt es Studien, die eine Verwendung von DBS für Dopingkontrollen im Sport, beispielsweise zum missbräuchlichen Gebrauch von Wachstumsfaktoren [11] oder anabolen Steroiden [64] untersuchen. Auch die Untersuchung von Blutproben aus schwer zugänglichen Gebieten (beispielsweise Krisen- bzw. Kriegsgebieten) kann mittels DBS realisiert werden. John et al entwickelten eine Methode, eine Senfgasexposition über ein in vivo entstehendes Reaktionsprodukt mithilfe der DBS-Technik zu untersuchen, da die Blutproben getrocknet problemlos nach Deutschland versandt werden konnten [34].

#### **3.6.4. DBS und Blutspuren in der forensischen Toxikologie**

Im Rahmen der täglichen Routinearbeit in der forensischen Toxikologie wird die Analyse von dried blood spots bisher noch nicht, bzw. lediglich in sehr geringem Umfang eingesetzt und es existieren nur vergleichsweise wenige Publikationen zur Anwendung und Möglichkeiten der Analyse von DBS in der forensischen Toxikologie.

Ricarda Jantos beispielsweise untersuchte die Stabilität des Schlafmittels Zopiclon in getrockneten gegenüber flüssigen Blutproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen [32]. Da Zopiclon in flüssigen, im Kühlschrank gelagerten Blutproben sehr instabil ist [44], wurde von Jantos (Arbeitskreis Skopp) überprüft, ob Zopiclon auch in getrockneten Blutproben als DBS auf Filterkarten instabil ist oder ob sich hier ggf. eine Möglichkeit zur Langzeitlagerung darstellt. In der Studie lag die Wiederfindung von Zopiclon in den angefertigten DBS nach 30 Tagen bei Lagerung bei 20 °C noch bei 81 % gegenüber 26 % bei nur achttägiger Lagerung in flüssigen, gespiketen Blutproben. Bei einer Lagerung bei 40 °C ist dieser Unterschied noch deutlicher, da in den flüssigen Blutproben nach 8 Tagen bereits kein Zopiclon mehr nachweisbar war, in den DBS nach einem Lagerungszeitraum von 30 Tagen jedoch noch 66 % verbleibendes Zopiclon nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt eine deutliche verbesserte Stabilität des Zopiclons in Trockenblutproben gegenüber flüssigem Blut.

Bei der Analyse getrockneter Blutproben ergeben sich jedoch auch Schwierigkeiten im Vergleich zur Aufarbeitung flüssiger Blutproben. Zunächst muss das getrocknete Blut wieder gelöst und so für eine Aufarbeitung zugänglich gemacht werden. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich derzeit mit Verfahren, die das Lösen und Aufbereiten des Trockenblutes von einer normierten Filterkarte erleichtern sollen, beispielsweise

mit einer direkten on-line-Festphasenextraktion der Spots [47], oder einer direkten Paper-Spray-Massenspektrometrie [40].

Ein weiterer Punkt, der eine Analyse von Trockenblutproben erschwert, besteht darin, zu rekonstruieren, welcher Menge flüssigen Blutes der DBS entspricht, da diese Information essentiell ist, um den Blutspiegel einer Substanz bestimmen zu können. Es gibt allerdings bereits Versuche, die Menge des in einem DBS auf einer normierten Filterkarte enthaltenen Blutes zu evaluieren [35].

Aber auch bei Verwendung von vorgefertigten Filterkarten und Verwendung von normierten „Punches“, also einem definierten, ausgestanzten Teil des DBS, ist eine weitere unbekannt Variable der Hämatokritwert. Der Hämatokrit wird in Prozent angegeben und bezeichnet den Anteil der Erythrozyten im Blut. Dieser beeinflusst die Größe des DBS, aber auch durch Chromatographieeffekte die Verteilung der Arzneistoffe, da er die Viskosität des Blutes maßgeblich mitbestimmt [67]. Daher sind ausgestanzte Areale verschiedener Blutproben bei gleicher Größe nicht immer von gleicher Masse bzw. liegen in verschiedenen Arealen eines DBS nicht immer dieselben Konzentrationen an Analyten vor (beispielsweise von Holub et al am Beispiel von Aminosäuren und Acylcarnitinen gezeigt [26]). Auch hier gibt es Forschungsarbeiten zur Lösung dieses Problems (beispielsweise durch Ausschneiden des kompletten DBS [36] bzw. alternative Probennahmestrategien wie Systeme zur Entnahme einer definierten minimalen Menge Kapillarblut [39] oder das sogenannte VAMS (volumetric absorptive microsampling, deutsch: volumetrische absorptive Mikroprobennahme) [37] oder durch Berechnung des ursprünglichen Vollblutvolumens über einen leicht zugänglichen Faktor, wie die Kaliumkonzentration [8].

Des Weiteren fehlen derzeit noch weiterführende Studien zur Vergleichbarkeit von Analysen aus Vollblut und entsprechend zugehörigem, für DBS in der Regel verwendetem Kapillarblut. Forschungsarbeiten zu diesem Thema fokussieren sich zumeist auf einen bestimmten Analyten (Gammahydroxybuttersäure (GHB) [58], Paracetamol [63] oder 25-Hydroxy-Vitamin D [38]) und die Übertragbarkeit auf andere Arzneistoffe ist fraglich.

Diese Forschungsarbeiten und auch die bereits etablierte Routineanalytik aus DBS beschränken sich auf die Analyse von auf normierten Filterkarten getrocknetem Blut. Zur Spurenanalyse von getrocknetem Blut auf anderen Materialien gibt es sehr wenige Forschungsarbeiten.

Doch auch im Bereich der Blutspurenanalyse auf anderen Untergrundmaterialien als den standardisierten Filterkarten gibt es einige wenige Studien, die die Schwierigkeiten, die sich aus der Heterogenität der unterschiedlichen Materialien ergeben, aufzeigen. Eine Veröffentlichung aus dem Ulmer Institut für Rechtsmedizin befasst sich mit der Analyse von Ethylglucuronid, einem Stoffwechselprodukt des Ethanols, auf verschiedenen Untergrundmaterialien [66]. Als solche Materialien wurden hier Teppich, Tapete, Asphalt, ein Autositzbezug, unbehandeltes Leder und Wattetupfer untersucht. Es wurden im Rahmen eines kontrollierten Trinkversuches jeweils 4 mL Blut von sieben Versuchspersonen auf die verschiedenen Untergrundmaterialien aufgetragen. Lediglich auf die Wattetupfer wurden aus Platzgründen nur 100 µL Blut aufgetragen. Nach 24-stündiger Trocknung erfolgte eine Analyse der Proben auf Ethylglucuronid. Die Extraktion der Blutropfen von den verschiedenen Untergrundmaterialien erfolgte durch Zerschneiden des Teppichs, Sitzbezugs und Leders; Asphalt und Glas wurden mit Wasser abgespült und die Wattetupfer mit Wasser extrahiert. Allen Proben wurde eine große Menge Wasser (3 mal 100 mL) zugefügt und die Extraktion erfolgte im Ultraschallbad. Anschließend wurden die erhaltenen Überstände gefriergetrocknet. Der Vergleich zwischen Vollblut und den getrockneten Blutproben zeigt eine gute Reproduzierbarkeit unabhängig vom Material. Zu erwähnen ist allerdings, dass hier mit einem definierten Blutvolumen gearbeitet wurde, in der Praxis ist dies nicht bekannt und schwer zu rekonstruieren.

Eine Arbeitsgruppe um Schütz analysierte Blutspuren aus einem Unfallauto [60]. Der nach einem Verkehrsunfall flüchtige Verursacher wurde von der Polizei zu einem späteren Zeitpunkt in seiner Wohnung angetroffen, eine Analyse seines 8 Stunden nach dem Vorfall entnommenen Blutes verlief positiv auf Benzoyllecgonin, ein Stoffwechsel- und Abbauprodukt des Cocains. Der Beschuldigte gab an, erst nach dem Unfall Cocain konsumiert zu haben. Eine wohl im Verlauf des Verkehrsunfalls entstandene Blutspur in seinem Auto wurde daraufhin auf das Vorliegen von Benzoyllecgonin untersucht. In der Blutspur wurde eindeutig Benzoyllecgonin nachgewiesen. Dies zeigt, dass die Person zu der die Blutspur gehörte (ob hier ein DNS-Abgleich stattfand, ist dem Artikel nicht zu entnehmen), vor dem Entstehen des Blutflecks im Auto Cocain konsumiert hatte und möglicherweise hierdurch der Unfall mit verursacht wurde. Hier liegt jedoch lediglich ein qualitativer Nachweis von Benzoyllecgonin vor, da die Menge des Blutes auf dem Lenkrad nicht bekannt war.

Aus dieser Arbeitsgruppe um Harald Schütz (s.o.) überprüfte Jan Gotta 2004 im Rahmen seiner Dissertation die Nachweisbarkeit und Stabilität verschiedener, strafrechtlich relevanter Analyten aus den Gruppen der Cannabinoide, Amphetamine, Opiate und Cocain in - auf unterschiedlichen Materialien (Glas, Stoff, Metall, Holz, Fliesen) - getrockneten Blutproben [19]. Hierfür entwickelte er geeignete Verfahren, um die Blutspuren von den verschiedenen Untergrundmaterialien zu lösen und einer Aufarbeitung mittels automatisierter Festphasenextraktion und anschließender GC-MS-Analyse zugänglich zu machen. Er konnte nach einer Lagerungszeit von 64 Tagen noch alle Analyten qualitativ nachweisen. Durch Verwendung eines definierten Blutvolumens konnte auch eine Quantifizierung vorgenommen werden. Die quantitativen Resultate unterlagen jedoch teils größeren Schwankungen. Diese Schwankungen sind zum einen sicherlich dem geschuldet, dass hier im Bereich der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze der Methode gearbeitet wurde, zum anderen liegen sicher auch durch Aufarbeitung und Extraktion bedingte Schwankungen vor.

Auch Carole Jamey aus Straßbourg untersuchte die Nachweisbarkeit verschiedener Arzneistoffe in getrockneten Blutproben. Sie konnte die Stabilität der von ihr ausgewählten Analyten Bromazepam, Diazepam, Cyamemazin (ein in Deutschland nicht erhältliches Antipsychotikum), Methadon, Tramadol und Zolpidem auf den Untergrundmaterialien Glas, Kachel, Tapete und Stoff über ein Jahr beweisen. Es wurden zwei verschiedene Lagerungsbedingungen (Tageslicht und Dunkelheit) und zwei verschiedene Asservierungsmethoden (Abnahme mit Tupfern bei den glatten Materialien Glas und Kachel bzw. Ausschneiden der Spots bei Stoff; für die Trockenblutproben auf Tapete wurden beide Verfahren getestet) überprüft [28]. Alle Arzneistoffe waren innerhalb des untersuchten Zeitraums nachweisbar.

In einer weiteren Studie untersuchte Carole Jamey die Stabilität von sieben Benzodiazepinen, Methadon und Zolpidem in getrockneten Blutproben über einen Zeitraum von einem Monat [29]. Hierbei wurde als Untergrundmaterial nur Glas verwendet, von dem die Blutropfen mit einem Skalpell abgekratzt bzw. als vergleichendes Asservierungsverfahren mithilfe eines Tupfers abgenommen wurden. In dieser Studie sollte der Einfluss verschiedener äußerer Faktoren wie Lagerungstemperatur und Lichtexposition überprüft werden. Dabei konnte die Stabilität der untersuchten Analyten über einen Monat nachgewiesen werden, einzige Ausnahme bildete Clonazepam, welches sich bei Lagerung im Freien bzw. bei -20 °C instabil zeigte. Auch in dieser Studie wurde

mit einem definierten Blutvolumen gearbeitet, wobei sich zeigt, dass eine Quantifizierung der Arzneistoffe aus Blutspuren eines definierten Volumens durchaus möglich ist.

Zusammenfassend werden die Vorteile der Analyse von DBS bzw. getrockneten Blutproben im Folgenden dargestellt:

Einige Arznei- bzw. Suchtstoffe sind in flüssigen Blutproben instabil, wie beispielsweise das oben erwähnte Zopiclon, vorrangig aufgrund enzymatischer Hydrolyse. Durch Anfertigung von DBS wird diese durch den Wasserentzug beim Trocknen des Blutflecks gestoppt, wodurch eine verbesserte Stabilität resultiert [32]. Die Proben lassen sich dann problemlos und ohne Kühlung per Post verschicken, ohne dass ein signifikanter Abbau entsprechender Analyten stattfindet.

Durch den Wasserentzug beim Trocknen der DBS wird nicht nur die chemische Degradation von Substanzen gestoppt. Auch Viren und Bakterien können dann größtenteils nicht mehr überleben bzw. überdauern, somit liegt ein zusätzlicher Vorteil im Handling getrockneter Blutproben in der gegenüber flüssigen Blutproben häufig deutlich geringeren Infektiosität. Beispielsweise werden Human Immunschwächeviren (HIV) bei Trocknung irreversibel inaktiviert, wohingegen Hepatitisviren weiterhin über einen längeren Zeitraum (mindestens sieben Tage) infektiös bleiben können [48].

Ein weiterer Vorteil von DBS ist die Probennahme, die gegenüber einer venösen Blutentnahme deutlich vereinfacht ist und auch durch den Probanden selbst oder anderes, nicht-medizinisches Personal (z.B. Polizei) erfolgen kann. Dadurch kann die Probe zeitnah zum Geschehen entnommen werden, sodass das Ergebnis der Analyse die Konzentration des zu bestimmenden Analyten zum Tat- oder Geschehenszeitpunkt besser wiedergibt.



## 4. Material und Methoden

Die Geräte, die für Aufarbeitung, Auswertung und Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden, wurden vom Forensisch-toxikologischen Centrum (FTC) zur Verfügung gestellt. Das Labor ist nach ISO 17025 für Forensische Zwecke akkreditiert

### 4.1. Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Firma
Hochdruckflüssigkeitschromatograph	Agilent
Tandemmassenspektrometer API 4000 bzw. API 5000	AB Sciex
Vortexmischer	Scientific Industries
Zentrifugen	Hettich
Reacti-Therm Heizblock	Thermo Scientific
Reacti-Vap Abdampfvorrichtung	Thermo Scientific
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Multipette	Gilson
Dispenser	Hirschmann

### 4.2. Softwares

Für die Auswertungen der Daten wurden die unten aufgelisteten Softwares in ihrer jeweils genannten Version verwendet.

Tabelle 2: Softwares

Bezeichnung und Version	Herausgeber
Analyst® 1.6.2	AB Sciex GmbH
Office 2013	Microsoft®
Valistat 2.0	Arvecon GmbH

### 4.3. Verbrauchsmaterial

Die jeweiligen Verbrauchsmaterialien wurden ebenfalls vom FTC bereitgestellt.

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterial**

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Pipettenspitzen mit/ohne Filter, verschiedene Größen	Eppendorf
Plastikröhrchen 5 & 10 mL	Sarstedt
Reagiergefäße Plastik bis 2 mL Inhalt („micro tubes“)	Sarstedt
EDTA-Blutentnahmeröhrchen (1,8 mg/mL)	Sarstedt
HPLC-Vials bis 0,2 mL Inhalt	Chromatographiehandel Müller
Glasvials bis 1,5 mL Inhalt	Agilent
Bechergläser verschiedene Größen	Schott Duran
Zellstofftupfer	Hartmann
Schwammtupfer	Fitzco
Einmalskalpelle	Braun
Filterkarten (collection card 705™)	Fitzco

### 4.4. Chemikalien und Reagenzien

Auch die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden vom FTC zur Verfügung gestellt und jeweils innerhalb ihrer vorgegebenen Haltbarkeit verwendet.

**Tabelle 4: Lösungsmittel**

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Bezug</b>
Methanol HPLC grade	Sigma Aldrich
Acetonitril HPLC grade	Sigma Aldrich
Bidestilliertes Wasser	ELGA-Anlage im Haus

**Tabelle 5: Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezug</b>
Ameisensäure 98 %	Sigma Aldrich
Ammoniumformiatlösung 10 mM	Sigma Aldrich
Ammoniumacetat HPLC	Sigma Aldrich (Hersteller FLUKA)
Beta-Glucuronidase-Arylsulfatase aus Helix Pomatia	Sigma Aldrich

Die Herstellung der benötigten Reagenzien, Pufferlösungen und mobilen Phasen für die HPLC erfolgte nach unten stehenden Schemata.

**Tabelle 6: Puffer und Reagenzien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Rekonstitutionspuffer R1	0,5 mL 10 mM Ammoniumformiatlösung, 150 mL Methanol auf 850 mL bidestilliertes Wasser
Rekonstitutionspuffer A1/A2	1 mL 2 mM Ammoniumacetatlösung, 50 mL Acetonitril auf 950 mL bidestilliertes Wasser
Mobile Phase A1	0,5 mL 10 mM Ammoniumformiatlösung, 1 mL Ameisensäure 98% auf 1 L bidestilliertes Wasser
Mobile Phase A2	1 mL 2 mM Ammoniumacetatlösung, 0,2 mL Ameisensäure 98 %, 50 mL Acetonitril auf 950 mL bidestilliertes Wasser
Mobile Phase B1	1 mL 2 mM Ammoniumacetatlösung, 50 mL bidestilliertes Wasser in 950 mL Acetonitril
Mobile Phase B2	0,5 mL 10 mM Ammoniumformiatlösung, 0,1 mL Ameisensäure 98% auf 1 L Methanol
Ammoniumacetatlösung 2 mM	38,5 g Ammoniumacetat auf 250 mL bidestilliertes Wasser

#### 4.5. Standardmaterial

Alle verwendeten Standardlösungen wurden innerhalb ihrer Haltbarkeit verwendet und nach dem Öffnen einer Originalampulle jeweils in beschrifteten, lichtgeschützten Glasvials bis zur erneuten Verwendung im Tiefkühlfach bei (-20 °C) aufbewahrt.

Tabelle 7: Standardlösungen

Stammlösung	Konzentration (der freien Base)	Hersteller
7-Aminoflunitrazepam	1,0 mg/mL in Acetonitril	LGC Standards
Amitriptylin	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Benzoyllecgonin	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Bisoprolol Fumarate	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Citalopram HBr	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Codein	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Diazepam	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Diphenhydramin HCl	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Doxepin HCl	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Ethylglucuronid	Reinsubstanz Pulver	Medichem
Fentanyl	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Lorazepam	1,0 mg/mL in Acetonitril	LGC Standards
Metformin HCl	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
(+/-)-Methadon	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
(+/-)-Methamphetamin	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Mirtazapin	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Morphin	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Nordiazepam	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Nortriptylin HCl	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Quetiapin Hemifumarat	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Ramipril	Reinsubstanz Pulver	LGC Standards
cis-Tramadol HCL	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards
Zolpidemtartrat	1,0 mg/mL in Methanol	LGC Standards

Von den Reinsubstanzen in Pulverform wurden jeweils Stammlösungen hergestellt. Ethylglucuronid wurde in einer Konzentration von 2 mg/mL in bidestilliertem Wasser hergestellt, Ramipril in einer Konzentration von 1 mg/mL in Methanol.

**Tabelle 8: interne Standards**

<b>Stammlösung</b>	<b>Konzentration (der freien Base)</b>	<b>Hersteller</b>
Alprazolam-D5	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Amphetamin-D5	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Benzoylecgonin - D3	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Buprenorphin-D4	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Clonazepam-D4	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Cocain - D3	100 µg/mL in Acetonitril	LGC Standards
Codein-D3	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Dihydrocodein-D6	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Diazepam - D5	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Nordazepam-D5	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
EDDP-D3	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Fentanyl-D5	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
7-Aminoflunitrazepam-D7	100 µg/mL in Acetonitril	LGC Standards
Methadon-D3	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Methamphetamin - D14	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
(+/-)-Methylendioxyamphetamin - D5 (MDMA-D5)	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Morphin - D3	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Oxazepam-D5	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Tramadol-13C-D3	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
Zolpidem-D6	100 µg/mL in Methanol	LGC Standards
5-(4-methylphenyl)-5-phenylhydantoin MPPH)	Reinsubstanz Pulver	Sigma Aldrich

Da MPPH in Pulverform vorliegt wurde eine Stammlösung mit 1 mg/mL in Methanol hergestellt.

#### **4.6. Untersuchungsmaterial**

Sowohl die Vortests als auch die Langzeitstudie wurden mit Eigenvollblut durchgeführt. Dieses - im Sinne der Studie - wirkstofffreie Blut wurde durch Punktion der Ellenbeugvene gewonnen und in mit EDTA imprägnierte Röhrchen entnommen.

Für die Herstellung der Probenpools wurde jeweils eine definierte Menge dieses Blutes (106 g für die Kurzzeit-Lagerungsstudie bzw. 74,2 g für die Langzeitstudie) in ein 300 mL fassendes Becherglas (mit zugegebenem Rührfisch) unter Berücksichtigung der Dichte des Blutes von 1,06 g/mL eingewogen und auf einen Magnetrührer gestellt.

Unter Rühren wurden nun bei Raumtemperatur die Analytlösungen in entsprechender Menge und Konzentration zupipettiert (siehe Tabelle 15 für die Kurzzeit-Lagerungsstudie bzw. Tabelle 16 für die Langzeitstudie im Anhang).

Im Anschluss wurde das Becherglas mit Parafilm dicht verschlossen und inklusive Magnetrührer in den Kühlschrank bei 4 °C verbracht und dort 2,5 h gerührt. Anschließend wurde der Pool bei Raumtemperatur weitere 30 min gerührt. Zuletzt wurde der fertige Pool auf seine Homogenität geprüft. Hierzu wurde an acht verschiedenen Stellen im Becherglas jeweils 100 µL Blut entnommen und in acht verschiedene, beschriftete „micro tubes“ überführt. Diese Proben wurden anschließend wie für die Aufarbeitung der Kalibratoren beschrieben aufgearbeitet und gegen eine tagesaktuelle Kalibration gemessen. Aus allen acht Bestimmungen je Pool wurde für jeden Analyten der Mittelwert der Messungen berechnet und als Zielwert für die Qualitätskontrolle verwendet.

#### **4.7. Qualitätskontrollproben**

Zur Kontrolle der Richtigkeit der Messungen wurden sowohl externe, kommerziell erworbene, als auch interne, selbst hergestellte Qualitätskontrollproben verwendet. Als interne Qualitätskontrolle wurde der für die Studie hergestellte Blutpool verwendet. Dazu wurden 30 Aliquote zu je 100 µL aus dem Pool in beschriftete „micro tubes“ abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20 °C tiefgefroren. Für die Validierung wurden eine hohe und eine niedrige Kontrolle – relativ zum Kalibrationsbereich – mit allen in der Methode enthaltenen Analyten in Kälberserum angesetzt. Hierfür wurden separat Mischungen der Analyten analog der Kalibriermixe (siehe Tabelle 17 im Anhang) hergestellt und von diesen je 200 µL des Mixes „low“ auf 10 mL Serum bzw. 600 µL des Mixes „high“ auf 10 mL Serum pipettiert. Diese Qualitätskontrollpools wurden gemischt, wie oben angegeben, auf ihre Homogenität geprüft und anschließend ebenfalls in beschrifteten „micro tubes“ zu je 100 µL aliquotiert bis zur Aufarbeitung bei -20 °C tiefgefroren. Alle externen Qualitätskontrollproben waren lyophilisierte Serumproben mit dotierten Sollkonzentrationen der aufgeführten Analyten. Sie müssen vor Verwendung mit bidestilliertem Wasser nach Herstellervorschrift gelöst werden. Zur Zusammensetzung der externen Qualitätskontrollproben siehe Tabelle 18 im Anhang.

Die aliquotierten internen sowie externen Qualitätskontrollproben wurden mit jeder Analysenserie analog zu den Kalibratoren mit aufgearbeitet und anschließend in mit-

hilfe von Excel erstellte Kontrollkarten eingepflegt. In diesen waren die erlaubten Grenzen von +/- 30 % hinterlegt, sodass direkt erkennbar war, ob bei einem Analyten zu hohe oder zu niedrige Werte gemessen werden.

#### **4.8. Untergrundmaterialien**

Als Untergrundmaterialien für die Blutspuren wurden verwendet:

- Küchenkacheln, matt, weiß mit den Maßen 4,8 cm x 4,8 cm
- Bettlaken, weiß, 100% Baumwolle ohne elastische Fasern
- Raufasertapete, weiß, tapeziert auf Pressspanplatten
- Parkett, Esche weiß, geölt, nicht imprägniert
- Teppichfliesen mit Gummiuntergrund, braun, Maße 50 cm x 50 cm

#### **4.9. Lagerungsbedingungen**

Um eine unterschiedliche Beeinflussung durch äußere Faktoren zu simulieren, wurden für die vorliegende Arbeit drei verschiedene Umgebungsbedingungen gewählt.

Ein Kühlschrank mit einer eingestellten Soll-Temperatur von 4 °C wurde zur Simulation eines kalten Tages gewählt. In diesem nicht kontaminierten Kühlschrank sind äußere Einflussfaktoren, wie UV-Einstrahlung minimiert. Dennoch kommt es durch das Öffnen des Kühlschranks zu Temperaturschwankungen innerhalb eines Bereiches von 2 bis 8 °C. Einmal pro Woche wurde die Temperatur am Kühlschrank abgelesen und maximaler und minimaler Wert in diesem Zeitraum notiert.

Die Lagerung der Proben bei Raumtemperatur erfolgte unter Lichtausschluss in einem Schrank bzw. bei den Vorversuchen in einem Abzug (leer, BtM-frei). Die Temperaturen und auch die Luftfeuchte unterlagen den in einem Labor üblichen Schwankungen, wobei die Temperatur im Labor an einigen Tagen auf bis zu 35 °C anstieg. Hier sollten Realbedingungen simuliert werden, bei denen ebenfalls eine erhebliche Schwankungsbreite von Temperatur und Luftfeuchte vorliegen kann.

Um einen sehr heißen Tag mit etwas konstanteren Bedingungen zu simulieren, wurde ein Trockenschrank gewählt. Dieser war auf 35 °C eingestellt, diese Temperatur war konstant, abgesehen von den Zeitpunkten, an denen der Trockenschrank zur Probenentnahme geöffnet werden musste. Äußere Einflussfaktoren wie UV-Strahlung und Luftfeuchte spielten in diesem abgeschlossenen Raum keine große Rolle.

#### **4.10. Aufarbeitungsmethode**

Die Methode für die Aufarbeitung von Trockenblut wurde aus der derzeit am FTC etablierten Methode zur Aufarbeitung von flüssigen Blutproben für ein Wirkstoff-screening entwickelt. Zur Aufarbeitung der Kalibratoren und Qualitätskontrollen in flüssigem Blut wurde die unten stehende Methodik angewandt.

Bei dieser Methode wird die Blutprobe mit einer Proteinfällung mittels Acetonitril aufgereinigt. Hierfür werden 100 µL Probe - für die sieben Kalibrationspunkte nach Zugabe von jeweiligen Mengen Standardmix low bzw. high (siehe Tabelle 19 im Anhang) - in einem „micro tube“ mit je 2 µL internem Standardmix (Anhang Tabelle 20) versehen und anschließend mit je 1 mL Acetonitril versetzt. Die Proben werden sofort auf den Vortexmischer gestellt und dort eine Minute gemischt. Anschließend werden sie sechs Minuten bei 14000 U/min in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert und der Überstand in neue „micro tubes“ dekantiert. Es werden je 2 µL Ameisensäure 98 % zugesetzt, um empfindliche Analyten durch Ansäuern des Milieus zu schützen, bevor die Proben unter Stickstoffstrom im Heizblock bei 37 °C zur Trockne eingedampft werden. Der erhaltene Rückstand wird in 150 µL Rekonstitutionspuffer R1 aufgenommen, kurz angerüttelt, fünf Minuten stehen gelassen und nach nochmaligem kurzem Mischen auf dem Vortexmischer in HPLC-Vials überführt und zur Messung in den Autosampler des Gerätes gestellt.

#### **4.11. LC-MS/MS-Methode**

Die Messmethode am LC-MS/MS-Gerät wurde aus der Routine übernommen. Das verwendete MS-Gerät ist ein API 4000 Tandemmassenspektrometer von AB Sciex. Die HPLC-Anlage besteht aus einer Binärpumpe (Agilent), dem Säulenofen (Agilent), einem automatischen Probengeber (Agilent) und einem Säulenschaltventil (Valco). Die Fließmittel werden unmittelbar in der Pumpe entgast. Als Säule für die HPLC wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C8 (5 micron 3 mm x 150 mm) der Firma Agilent mit Vorsäule verwendet.

Die hier verwendete Methode ist ein Multianalytpanel mit 62 Analyten, einer Gesamtlaufzeit von 18,5 Minuten pro Probe und eine Equilibrierungszeit von 1,5 Minuten. Von der Probe werden pro Lauf jeweils 4 µL injiziert und mit einem Gradienten über die HPLC-Säule getrennt (siehe Anhang Tabelle 21). Die cycle time, also die Zeit, in der einmal alle in diesem Zeitraum zu messenden Analyten gemessen werden, liegt bei 1,1 s. Insgesamt laufen über die Messzeit von 18,5 min 1009 Zyklen. Für jeden Analyten liegt das Messzeitfenster, in dem seine Übergänge gemessen werden, bei

110 s, jeweils 55 s vor und nach der jeweils zu erwartenden Retentionszeit. Pro Analyt werden zwei charakteristische Übergänge von Mutter- zu Tochterion betrachtet. Die Kollisionsenergien (CE) und Declustering-Potentiale (DP) für die in der Studie untersuchten Analyten sind zusammen mit den Massenübergängen in Tabelle 22 im Anhang dargestellt.

Mithilfe des Programms Analyst® wurde mit einer für die Routine erstellten Methode der Lauf ausgewertet. Hierbei wurden die Peaks von der Software integriert und teilweise - wo erforderlich - manuell nachintegriert. Für die Ermittlung der Konzentration wurde eine im etwa zweiwöchigen Rhythmus frisch aufgearbeitete Kalibrierung herangezogen. Berechnet wurden die Konzentrationen der Analyten in den Proben mithilfe der Peakflächenverhältnisse von Analyt zu internem Standard und im Abgleich mit der Kalibrationsgeraden. Diese wurde von der Software automatisch linear durch alle sieben Kalibratoren gelegt, mit einem Wichtungsfaktor von  $1/x$ . Die jeweils pro Lauf mitgemessenen verschiedenen Qualitätskontrollen wurden mithilfe von in Excel angelegten Kontrollkarten auf ihre Richtigkeit hin überprüft, wobei eine Abweichung der Werte vom Sollwert von bis zu  $\pm 30\%$  zugelassen war.

#### **4.12. Validierung**

Die Validierung der Methode erfolgte nach den Richtlinien der GTFCh für die „Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden“ in forensisch-toxikologischen Laboratorien.

##### *- Linearität der Kalibrierung*

Die Kalibration einer Methode erfüllt dann die Kriterien zur Linearität, wenn innerhalb des vorgegebenen Messbereiches Ergebnisse erhalten werden, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind. Für die praktische Durchführung wird eine Kalibration mit mindestens fünf von Null verschiedenen, gleichmäßig über den Bereich der Kalibrierung verteilten Konzentrationen nach Methodenvorschrift angesetzt, aufgearbeitet und gemessen. Die Kriterien sind erfüllt, wenn maximal zwei Ausreißer vorliegen und diese nicht auf demselben Kalibrationsniveau liegen. Des Weiteren wird die Varianzhomogenität zwischen dem niedrigsten und höchsten Kalibrator mittels F-Test bestimmt, liegt diese über 99 % und ergibt ein anschließend durchgeführter Linearitätstest nach Mandel über 99%, so kann eine lineare Regression

verwendet werden. Falls keine Varianzhomogenität gegeben ist, muss eine gewichtete Regression verwendet werden.

- *Analytische Grenzen*

Die Nachweisgrenze (niedrigste qualitativ nachweisbare Konzentration) und die Bestimmungsgrenze (niedrigste quantitativ bestimmbare Konzentration) eines Analyten können auf zwei verschiedene Methoden überprüft werden. Entweder wird hier nach DIN 32645 [50] verfahren, wobei die Bestimmung beider Parameter über eine Kalibriergerade im unteren Konzentrationsbereich und eine lineare Regression derselben erfolgt. Die zweite Möglichkeit ist eine Bestimmung der Nachweisgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N), welches für die Nachweisgrenze mindestens ein Verhältnis von 3:1 betragen muss. Die Bestimmungsgrenze wird bei dieser alternativen Methode durch fünffache Messung einer Qualitätskontrollprobe, die in ihrer Konzentration dem niedrigsten Kalibrator entspricht, festgelegt und kann angenommen werden, wenn der BIAS sowie die Wiederholpräzision um maximal 20 % abweichen.

- *Genauigkeit und Präzision*

Die Genauigkeit bezeichnet die Abweichung der einzelnen erhaltenen Werte von den jeweiligen Sollwerten, die Präzision beschreibt den Grad der durch zufällige Fehler ausgelösten Streuung um den Mittelwert. Zur Überprüfung werden zwei Qualitätskontrollpools, jeweils einer im niedrigen und einer im hohen Bereich relativ zur Kalibration in Serum angesetzt. An acht verschiedenen Tagen muss jeweils in Doppelbestimmung die Konzentration der einzelnen Analyten in den (aliquotiert eingefrorenen) Proben bestimmt werden. Der jeweilige Bias, also der Fehler der einzelnen Parameter darf maximal 15 %, im Bereich der Nachweisgrenze 20 % betragen.

- *Stabilität*

Unter diesem Punkt soll die chemische Stabilität der einzelnen Analyten in einer gegebenen Matrix und unter bestimmten Bedingungen untersucht werden. Zum einen wird hier die Einfrier-Auftau-Stabilität untersucht, des Weiteren die Langzeitstabilität und die Probentellerstabilität aufgearbeiteter Proben. Die Probentellerstabilität ergibt sich in der durchgeführten Studie durch Messung von Qualitätskontrollproben über den

gesamten Messzeitraum und insbesondere am Ende einer Analysenserie. Bei Verwendung deuterierter interner Standards dürfen die absoluten Peakflächen der Analyten maximal 25 % abweichen, sonst lediglich um 15 % bzw. 20 % nahe der Bestimmungsgrenze. Für die Einfrier-Auftau-Stabilität werden jeweils sechs Qualitätskontrollproben drei Einfrier-Auftauzyklen unterzogen, anschließend nach Arbeitsanweisung aufgearbeitet und gemessen. Die gemittelten Ergebnisse dürfen nicht mehr als 10 % vom Sollwert abweichen. Für die Langzeitstabilität wurden die jeweils mitgemessenen QC-Proben aus jeder Serie verwendet, da diese zu Beginn der Studie hergestellt, aliquotiert eingefroren und über den gesamten Untersuchungszeitraum verwendet wurden. Auch hier gilt eine Höchstgrenze für die Abweichung vom Sollwert von maximal 10 %.

- *Matrixeffekte und Wiederfindungsrate*

Matrixeffekte beschreiben den Einfluss von in der Probe vorhandenen Substanzen auf das Messsignal des zu untersuchenden Analyten. Hierbei kann es zur Verstärkung (enhancement) oder Abschwächung (suppression) des Messsignals kommen. Für die Bestimmung der Matrixeffekte müssen je mindestens fünf Reinsubstanzlösungen, fünf aufgestockte Matrixproben aus verschiedenen Leermatrices und fünf aufgearbeitete, im Nachhinein aufgestockte Leermatrixextrakte vergleichend analysiert werden. Die Wiederfindungsrate (gemäß Richtlinien soll sie mindestens bei 50 % liegen) berechnet sich bei diesen Versuchen aus den jeweiligen Peakflächenverhältnissen der aufgestockten Matrixproben zu denen der entsprechenden aufgestockten Leermatrixextrakte, die Matrixeffekte aus den Peakflächenverhältnissen der aufgestockten Leermatrixextrakte zu denen der jeweiligen Reinsubstanzlösungen. Zugelassene Abweichung ist im Falle der Verwendung eines deuterierten internen Standards 25 %, in anderen Fällen 15 % bzw. 20 % nahe der Bestimmungsgrenze.

- *Eigene Methodvalidierung*

Die neue Methode wurde gemäß den Richtlinien der GTFCh validiert.

Die Kriterien der GTFCh für die Linearität der Analyten über den zu messenden Kalibrierbereich war für alle Analyten, sowohl im Vollblut, als auch in Serum erfüllt.

Zur Ermittlung der Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden beide, nach GTFCh-Richtlinien akzeptierten Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Teilweise wurde die alternative Methode der Festlegung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N, Variante 2) herangezogen.

**Tabelle 9: Nachweisgrenzen (NWG) bzw. Bestimmungsgrenzen (BG) und jeweilig verwendete Methode der Analyten der Langzeitstudie**

Analyt	NWG [ng/mL]	BG [ng/mL]	Methode
Benzoylcegonin	5	10	S/N
Methamphetamin	2,23	7,54	DIN
Morphin	1,54	5,15	DIN
Codein	2,57	8,3	DIN
Methadon	5,4	18,1	DIN
Fentanyl	0,66	2,2	DIN
Nordazepam	6,79	22,6	DIN
Lorazepam	2,34	7,90	DIN
Zolpidem	6,89	22,0	DIN
Citalopram	5	10	S/N
Diphenhydramin	5,01	16,3	DIN
Doxepin	4,76	15,5	DIN
Mirtazapin	4,26	14,0	DIN
Quetiapin	5	10	S/N
Bisoprolol	5	10	S/N
Metformin	3,93	13,3	DIN
Ramipril	0,49	1,61	DIN

Die Messung der Genauigkeit erfolgte an acht verschiedenen Tagen, an denen jeweils zwei der aliquotiert eingefrorenen Kontrollen (low und high) nach o.g. Methode aufgearbeitet wurden. Im hohen Konzentrationsbereich erfüllten einige Analyten das 95 %-Intervall nicht, da die Abweichungen vom dotierten Sollwert zu groß waren. Dies fiel vor allem bei Analyten auf, für die zur Quantifizierung kein eigener deuterierter interner Standard zur Verfügung stand. Die Genauigkeit im niedrigen und damit für die Spurenanalytik und die hier verwendete Methodik wichtigeren Bereich war für alle untersuchten Analyten erfüllt.

Sowohl Probenstabilität, als auch Langzeitstabilität waren für die in der Langzeitstudie verwendeten Analyten erfüllt. Die Probenstabilität wurde bei jeder Analysenserie mittels zu Beginn und am Ende der Serie gemessenen Qualitätskontroll-

proben überprüft. Die Langzeitstabilität war gegeben, da in den aliquotiert eingefrorenen Qualitätskontrollproben nach sechsmonatiger aliquotierter Lagerung bei -20 °C das Kriterium einer maximalen Abweichung von 10 % vom Sollwert erfüllt war. Die Einfrier-Auftau-Stabilität konnte für fast alle Analyten belegt werden. Lediglich Quetiapin zeigt über den untersuchten Zeitraum von den nach GTFCh-Richtlinien geforderten drei Einfrier- und Auftauzyklen (siehe Methodenteil) eine ansteigende Tendenz, die über das erlaubte Niveau von 25 % anstieg. Diese Tendenz zeigte sich für alle in der Studie verwendeten Psychopharmaka (Citalopram, Doxepin, Mirtazapin sowie für Diphenhydramin). Bei diesen lagen jedoch die Werte innerhalb der erlaubten Abweichungen.

Bei einer Methode mit einer kurzen Probenvorbereitung mittels einfacher Proteinfällung, die so viele Analyten erfasst, sind Matrixeffekte ein zu erwartendes Phänomen, da sich viele Substanzen gegenseitig beeinflussen. Des Weiteren ist die Aufarbeitungsmethode mittels Acetonitrilfällung eine schnelle Methode, die allerdings nicht alle störenden Matrixeffekte beseitigen kann. Von den hier untersuchten Analyten unterlag lediglich Nordazepam ausgeprägten Matrixeffekten. Obwohl hier ein deutlicher interner Standard verwendet wurde, lagen die Matrixeffekte bei der niedrigen Qualitätskontrolle bei 65,6 % im Serum bzw. 66,1 % im Vollblut und bei der hohen Qualitätskontrolle bei 71,7 % im Serum bzw. 76,8 % im Vollblut.

Die Wiederfindungsrate lag bei allen Analyten oberhalb der geforderten 50 %.



## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Vorversuche

Im Rahmen von Vorversuchen wurden zunächst wesentliche Parameter bei der Asservierung von Blutspuren überprüft und verschiedene Methoden getestet.

#### 5.1.1. Trocknungsverlust von Blut unter verschiedenen Bedingungen

Zunächst wurde der aus einer bestimmten Menge flüssigem Vollblut resultierende Anteil an Trockenmasse bestimmt, da bei einer unbekanntem Blutspur nur über diesen Parameter eine Einordnung der Konzentration eines Analyten möglich ist. Für die erste Abschätzung des Trockenanteiles von Blut wurden „micro tubes“ aufsteigend durchnummeriert und gewogen. Für die Bestimmung des resultierenden Trockenblutanteils wurde ein festes Volumen von 100  $\mu\text{L}$  gewählt. Je 100  $\mu\text{L}$  von 142 verschiedenen postmortalen Blutproben wurden jeweils in Dreifachbestimmung in die beschrifteten „micro tubes“ pipettiert und bei Raumtemperatur drei Tage unter einem anderweitig nicht genutzten Abzug offen getrocknet. Zur Ermittlung des Trockenblutanteiles wurden die „micro tubes“ erneut gewogen und das Leergewicht des Gefäßes abgezogen. In Abbildung 1 ist deutlich ersichtlich, dass die resultierenden Trockenblutanteile in einem engen Bereich (Extremwerte zwischen 13,0 % [m/V] und 33,2 % [m/V]) um einen Mittelwert von 23,7 % [m/V] streuen (Standardabweichung 4,63).

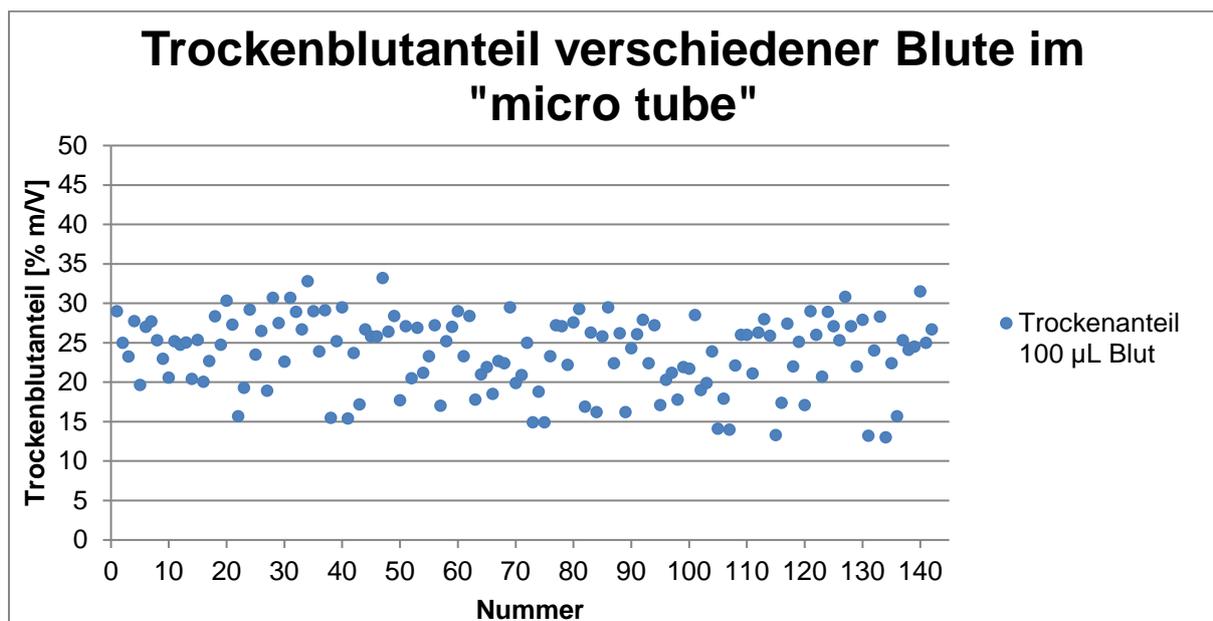


Abbildung 1: Trockenblutanteil von 142 verschiedenen, postmortalen Blutproben

Um auch äußere Einflüsse auf die Trockenmasse auf anderen Materialien zu überprüfen, wurden Blutropfen auf Bettlaken angesetzt und getrocknet. Hierfür wurde ein weißes Bettlaken aus 100 % Baumwolle in ca. 5 cm x 5 cm große Stücke zurechtgeschnitten. Diese Stücke wurden nummeriert und bei Raumtemperatur gewogen. Anschließend wurde jeweils auf zwei verschiedene Stück Laken je 100 µL postmortale Blutproben verschiedener Personen aufgetragen. Von diesen Laken wurden je Blutprobe ein Stück bei Raumtemperatur und eines bei 35 °C getrocknet. Nach einer Trocknungszeit von je 18 Stunden wurden die tarierten Bettlakenstücke erneut gewogen. Die Massendifferenz ist in Abbildung 2 als prozentualer Trockenanteil des Vollblutes auf der y-Achse zu sehen. Die jeweils zusammengehörigen Blutproben sind an je einem Messpunkt der x-Achse aufgetragen.

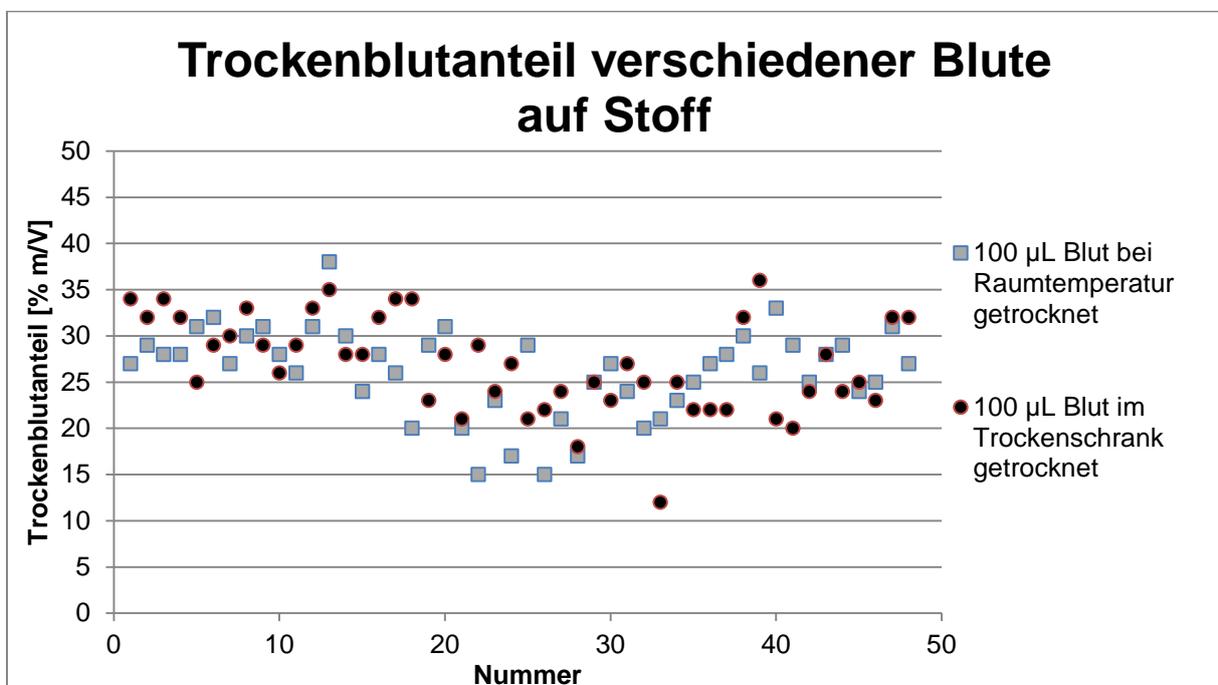


Abbildung 2: Trockenblutanteil von 48 verschiedenen Blutproben zu je 100 µL, getrocknet auf Stoff bei jeweils zwei verschiedenen Temperaturen

Der Mittelwert der Trockenblutanteile auf Stoff liegt mit 26,5 % [m/V] höher als der aus den in den „micro tubes“ getrockneten Blutproben ermittelte Wert. Die Streuung der einzelnen Werte liegt in engem Bereich (Extremwerte zwischen 12,0 % [m/V] und 38,0 % [m/V]) um den berechneten Mittelwert (Standardabweichung 4,96). Bei den hier untersuchten Proben zeigte sich kein Einfluss der Lagerungstemperatur auf die resultierende Trockenblutmasse, die Mittelwerte lagen bei 26,2 % [m/V] Trockenblutanteil nach Trocknung bei Raumtemperatur und bei 26,9 % [m/V] Trockenblutanteil nach Lagerung im Trockenschrank bei 35 °C.

### 5.1.2. Asservierung der Trockenblutproben

Nach Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde die Asservierung der Blutspuren auf verschiedenen Untergrundmaterialien überprüft. Einige Materialien lassen sich gut transportieren und können somit ins Labor gebracht werden, um dort die Blutspuren vom Untergrund zu lösen. Ein Beispiel hierfür ist der zuvor im Rahmen des Trocknungsverlustes geprüfte Stoff, der in Form von Laken oder Kleidungsstücken leicht transportabel ist und von dem somit eine Extraktion des Blutfleckes im Labor möglich ist. Von anderen Materialien, wie beispielsweise Bodenbelägen, Putz bzw. Tapeten müssen Spuren direkt vor Ort durch die Polizeibeamten asserviert werden, da sie meistens nicht transportabel sind. Hierfür ist eine einfach durchführbare und praktikable Lösung essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Asservierungsverfahren für unterschiedliche Untergründe getestet.

Zunächst wurde die Asservierung von Kacheln als einem häufig in Wohnungen und an öffentlichen Plätzen vorhandenen Untergrund getestet. Auf matt weiße Küchenkacheln wurden verschiedene Volumina eines Blutes (20, 50, 100  $\mu\text{L}$ ) getropft und bei einem Teil der Kacheln durch Verwischen zusätzlich verteilt. Anschließend wurde mittels unterschiedlicher Verfahren die Vollständigkeit und Praktikabilität der Asservierungen und Extraktionen überprüft.

Da von den Beamten der Spurensicherung verschiedenste Spuren zur DNS-Analytik asserviert werden, sind am Tatort in der Regel Wattetupfer zum Abrieb solcher menschlicher Spuren verfügbar. Diese können auch zur Asservierung von Blutspuren für eine toxikologische Analyse verwendet werden und wurden deshalb dahingehend überprüft. Um die Menge des abgeriebenen Blutes bestimmen zu können, wurden die Wattetupfer zunächst durchnummeriert (dies war nötig, da die Tupfer sich in ihren Massen zwar nur wenig unterscheiden, dies aber in Bezug auf die sehr geringe aufgenommene Blutmenge erhebliche Auswirkungen hat) und in trockenem Zustand gewogen. Die tarierten Tupfer wurden mit bidestilliertem Wasser angefeuchtet. Hierdurch wurde das Blut auf dem Untergrund durch das Wasser an den Tupfern angelöst und dadurch abnehmbar. Für einen getrockneten Tropfen nicht verwischten Blutes war meist ein Tupfer ausreichend, da sich das Blut größtenteils als Ganzes vom Untergrund ablösen ließ. Um das verwischte und anschließend getrocknete Blut vollständig von der Kachel abzunehmen, waren bei 100  $\mu\text{L}$  ursprünglichen Vollblutvolumens bis zu drei Wattetupfer nötig. Die Tupfer wurden anschließend aufrecht in je

einem Sarstedtröhrchen pro Blutfleck drei Tage bei Raumtemperatur vollständig getrocknet und nochmals gewogen.

Als alternative Abriebmaterialien wurden zum einen Zellstofftupfer der Firma Hartmann und zum anderen Schwammtupfer der Firma Fitzco getestet, die vor Verwendung leer gewogen wurden. Beide Tupferarten waren saugfähiger und größer als die Wattetupfer von Sarstedt, daher war nur ein Tupfer zum Abnehmen von 100 µL Blut von den Kacheln nötig. Auch diese Tupfer wurden zunächst angefeuchtet, allerdings war hier aufgrund der stärkeren Saugfähigkeit der Zellstoff- und Schwammtupfer eine deutlich größere Menge an bidestilliertem Wasser zum Anfeuchten nötig, als bei den Wattetupfern. Anschließend wurde der Blutfleck vollständig von der Kachel abgenommen. Die Tupfer wurden analog den Wattetupfern drei Tage vollständig getrocknet und anschließend erneut gewogen.

Beim Bewegen und Arbeiten mit den Kacheln zeigte sich, dass das getrocknete Blut bereits bei kleinen Erschütterungen und Berührungen splitterte und sich vom Untergrund löste. Daher wurde als alternative Asservierungshilfe ein Skalpell getestet. Das getrocknete Blut wurde mithilfe eines zuvor mit Methanol gereinigten Einmalskalpells vorsichtig von der Kachel abgekratzt und die so entstandenen, teils sehr feinen Trockenblutsplitter in „micro tubes“ überführt. Das Skalpell wurde nach jeder Probe mit Methanol gründlich gereinigt und getrocknet. Bei einer Spurensicherung vor Ort muss, vor allem bei sehr geringem Probenmaterial die starke Splitterung des Blutes bei Berührungen beachtet werden, da erhebliche Teile der Spur verloren gehen bzw. verstreut werden könnten (siehe Abbildung 3). Vor allem, wenn das Blut nicht in einem Tropfen, sondern eher verwischt auf dem Untergrund getrocknet ist, ist es wichtig, das Trockenblut sehr vorsichtig abzukratzen, da die Splitter dann sehr fein sind.



**Abbildung 3: Abkratzen des Blutes mithilfe eines Einmalskalpells**

### **5.1.3. „Rekonstituieren“ des Trockenblutes zur Analyse**

Um das asservierte getrocknete Blut einer Aufarbeitung wie sie in der Routine für Blut- und Serumproben durchgeführt wird, zugänglich zu machen, wurde zunächst überprüft, welches Lösungsmittel geeignet ist, um das asservierte Blut von den Wattetupfern herunter zu lösen, das von glatten Oberflächen wie Kacheln abgekratzte, trockene Blut anzulösen bzw. die auf Stoff getrockneten Blutproben in Lösung zu bringen. Zunächst wurde bidestilliertes Wasser zum Lösen der Blutproben verwendet, da das Blut in seiner Trocknungsphase vorrangig an Wasser verliert und dieses Verfahren somit den ursprünglichen Zustand des Blutes am ehesten wieder herstellen soll. Hierfür wurde zu den getrockneten Splittern jeweils 100  $\mu\text{L}$  Wasser bzw. bei Stoffproben und den Wattetupfern jeweils 1 mL Wasser zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten auf das Rüttelbrett bei 370 Schwingungen pro Minute verbracht. Die Blutsplitter lösten sich im Wasser nur zu einem Teil auf, das Wasser färbte sich leicht rötlich. Auch beim „Rekonstituieren“ des auf den Stoffproben getrockneten Blutes ließ sich eine leichte Rotfärbung des zugegebenen Wassers beobachten.

Als Alternative wurden Versuche mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (80 % Methanol, 20 % bidestilliertes Wasser) durchgeführt, da viele Arznei- und Suchtstoffe leicht in organischen Flüssigkeiten löslich sind. Organische Lösungsmittel wie Methanol haben jedoch proteindenaturierende Eigenschaften, die man sich zwar bei Aufarbeitungen zunutze macht (Proteinfällung als Aufreinigungsschritt), die jedoch zum Lösen getrockneten Blutes hinderlich sind. Es bildeten sich bereits auf dem jeweiligen Untergrundmaterial Klumpen bzw. das getrocknete und abgekratzte Blut von den Kacheln ließ sich mit diesem Lösungsmittelgemisch ( $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ) nicht auflösen, sondern blieb

als ein Gebilde im Lösungsmittel schwimmen. Eine Färbung der Lösung war hier nicht zu beobachten. Bei der Auswertung der an der LC-MS/MS-Anlage gemessenen Extrakte dieser Proben vergleichend mit Extrakten der nur mit H<sub>2</sub>O angelösten Proben zeigte sich, dass der bei der Aufarbeitung der Proben zugesetzte interne Standard Morphin-D3 bei Verwendung des Lösungsmittelgemisches eine deutlich geringere Intensität zeigte, als bei reinem Wasser und somit die Proben mit dem MeOH/H<sub>2</sub>O-Gemisch schlechter lösbar bzw. extrahierbar waren, als mit reinem H<sub>2</sub>O. Daher wurde für das Anlösen des Blutes weiterhin Wasser verwendet.

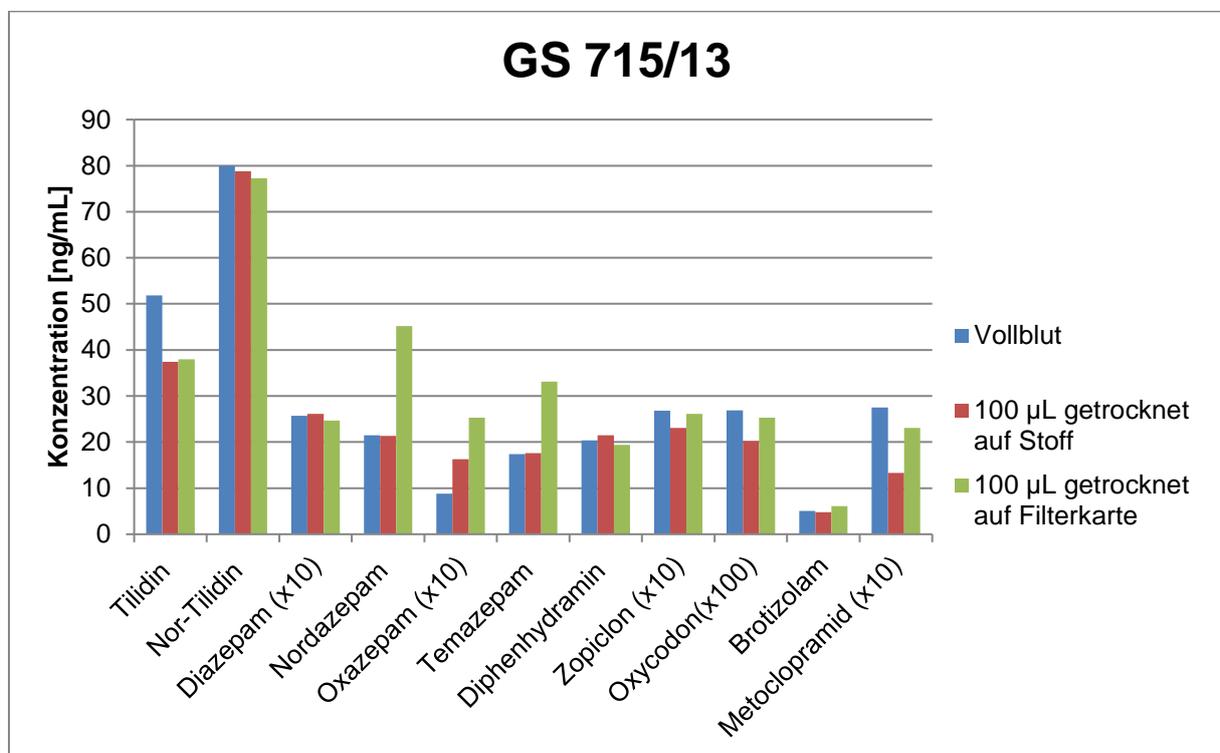
Zusätzlich wurde die Extraktion der Analyten aus den Trockenblutproben mithilfe eines Ultraschallbades überprüft. Hierfür wurden vergleichend Tupfer mit je 100 µL aufgetragenem Blut jeweils in Dreifachbestimmung wie oben beschrieben auf den Rüttler, bzw. für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Bei der Extraktion zeigten sich kaum Unterschiede, sodass die Verfahrensweise mittels Rüttelbrett beibehalten wurde, da die Proben hier nicht einer zusätzlichen thermischen Belastung ausgesetzt werden.

#### **5.1.4. Wiederfindung von Arznei- bzw. Suchtstoffen in post-mortem Trockenblutproben im Vergleich zu Vollblut**

Zur Überprüfung der Wiederfindung verschiedener Analyten in getrockneten Blutproben im Vergleich zu (flüssigem) Vollblut müssen die Proben zunächst aufgearbeitet werden. Dafür wurde eine Verfahrensweise, angelehnt an die Routinemethode zur Aufarbeitung von flüssigen Blutproben vom FTC verwendet, um selektiv und sensitiv möglichst viele verschiedene Arznei- und Suchtstoffe in der Probe nachweisen zu können.

Hierfür wurden 28 verschiedene, für Forschungszwecke asservierte post-mortem Blutproben, die in der Routineanalytik positiv auf mindestens drei verschiedene Arznei- bzw. Suchtstoffe getestet worden waren, ausgewählt. Von diesen Proben wurde jeweils eine aktuelle Routineanalyse aus flüssigem Vollblut angesetzt (analog der Aufarbeitung der Kalibratoren wie im Methodenteil beschrieben), zusätzlich wurden je 100 µL Vollblut auf Stoff (Bettlaken) bzw. eine Fitzco Filterkarte aufgetragen und drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurden die getrockneten Blutflecke aus dem Stoff bzw. der Filterkarte ausgeschnitten. Die Filterkarten wurden zusätzlich in kleine Stücke geschnitten, um die Oberfläche zu vergrößern. Von beiden Materialien wurde jeweils der ganze Fleck aufgearbeitet, da die aufgetragene Menge

Blut (100 µL) genau der Menge entspricht, die für Routineaufarbeitungen verwendet wurde, um die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen direkt vergleichbar zu machen. Anschließend wurden zur Rekonstitution, wie im vorigen Versuch beschrieben, jeweils 1 mL bidestilliertes Wasser und eine Mischung interner Standards zugegeben und die Röhrcchen für 20 Minuten bei 370 Schwingungen/min auf den Rüttler gestellt. Es folgte die routinemäßige weitere Aufarbeitung mit einer Proteinfällung, hier allerdings mit je 3 mL Acetonitril aufgrund des höheren Probenvolumens. Der Überstand wurde nach Zentrifugation abgenommen, mit Ameisensäure 98% versetzt und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde mit Pufferlösung aufgenommen und anschließend an einer LC-MS/MS-Anlage mit einer Routinemethode des FTC vermessen.



**Abbildung 4: Konzentrationen verschiedener Arznei- bzw. Suchtstoffe aus auf Filterkarte bzw. Stoff getrocknetem Blut im Vergleich zum Vollblut**

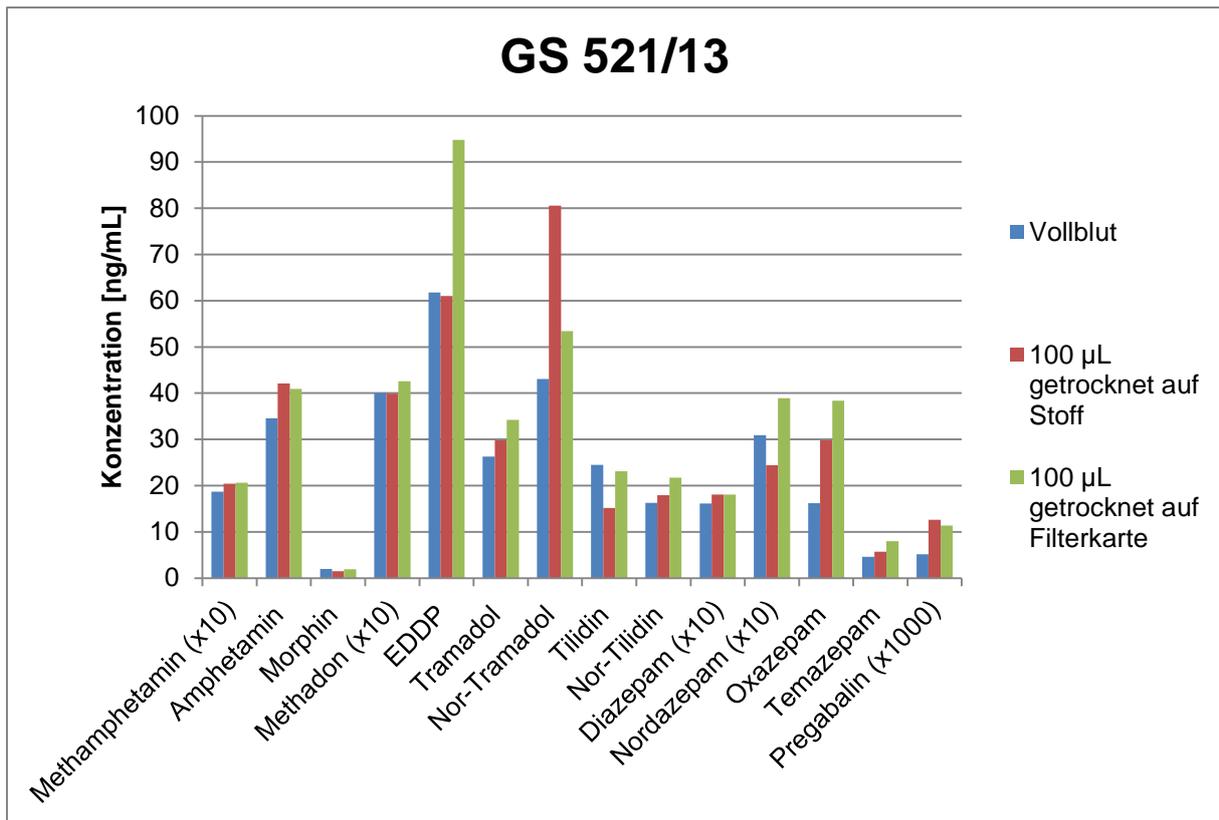


Abbildung 5: Konzentrationen verschiedener Arznei- bzw. Suchtstoffe aus auf Filterkarte bzw. Stoff getrocknetem Blut im Vergleich zum Vollblut

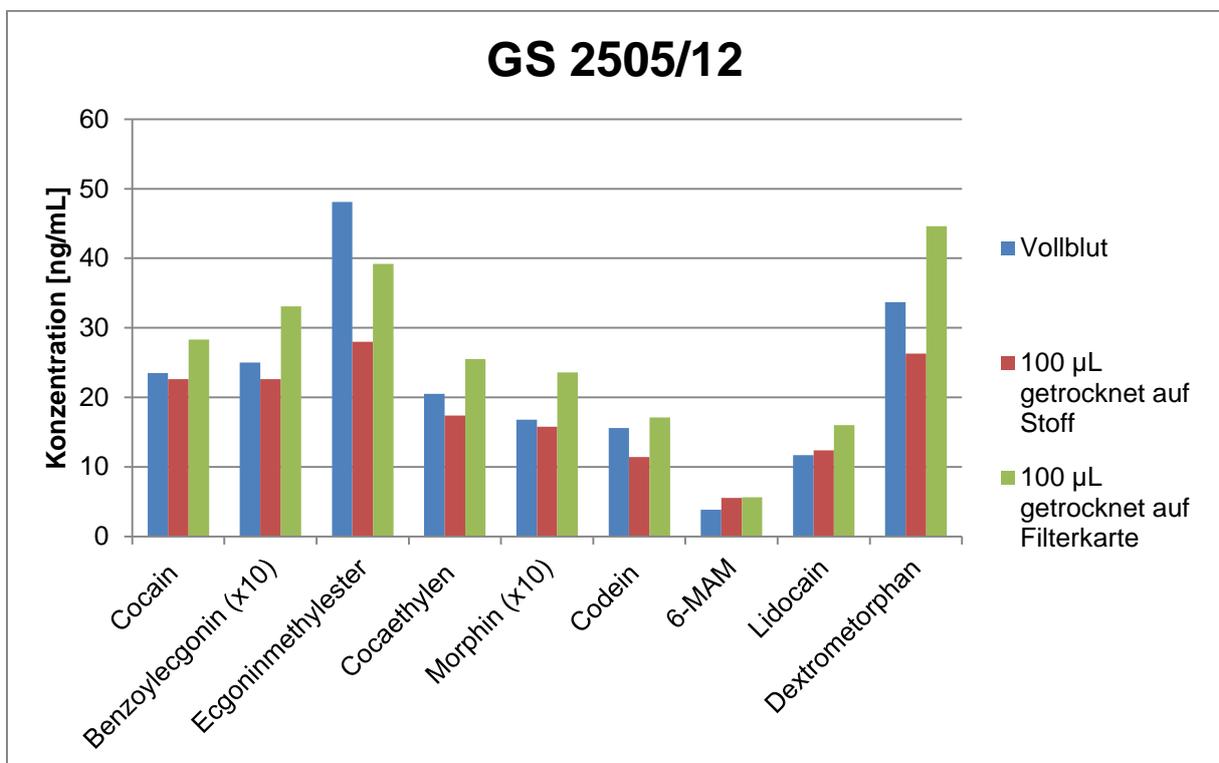


Abbildung 6: Konzentrationen verschiedener Arznei- bzw. Suchtstoffe aus auf Filterkarte bzw. Stoff getrocknetem Blut im Vergleich zum Vollblut

An den beispielhaft aufgeführten Diagrammen (Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6) ist ersichtlich, dass sich alle in Vollblut nachgewiesenen Arznei- bzw.

Suchtstoffe sowohl in auf Stoff als auch auf Filterkarte getrocknetem Blut qualitativ nachweisen ließen. Darüber hinaus konnte eine quantitative Bestimmung der Werte vorgenommen werden, da das aufgetropfte Vollblutvolumen mit 100 µL genau dem entsprach, welches auch in der Routinemethode für die Aufarbeitung flüssiger Blutproben verwendet wird. Hierbei zeigte sich meist eine sehr gute Übereinstimmung der quantitativen Messwerte von Trockenblut sowohl auf Stoff als auch auf Filterkarte im Vergleich zu flüssigem Vollblut.

Am Beispiel des Diazepam in Abbildung 4, des Methamphetamins in Abbildung 5 bzw. des Cocains in Abbildung 6, die alle drei mithilfe eigener deuterierter interner Standards, die den Proben jeweils nach dem Anlösen mit Wasser zugegeben wurden, quantifiziert werden, lässt sich die gute Reproduzierbarkeit der Analysen von 100 µL getrocknetem Blut gegenüber 100 µL Vollblut erkennen. Trotz einer Trocknungszeit von drei Tagen ließ sich das sonst instabile Cocain noch in gleicher Menge in den trockenen wie in der flüssigen Blutprobe nachweisen. Die Analyten, für die zur Quantifizierung kein eigener deuterierter interner Standard zur Verfügung stand, wiesen eine größere Schwankungsbreite auf (siehe beispielsweise Nordazepam in Abbildung 4 und Nortramadol bzw. EDDP (2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin, Metabolit von Methadon) in Abbildung 5). Da bei Auswertung der Chromatogramme die internen Standards der Blutproben von Filterkarte bzw. Stoff geringere Intensitäten zeigten, als bei der Aufarbeitung von Vollblut, sind die Schwankungen in den Konzentrationen der Analyten, die ggf. andere physikochemische Eigenschaften in Bezug auf Untergrundmaterial und Extraktionsflüssigkeit aufweisen, erklärbar.

Zur Verbesserung der Übersicht wurden einige der in hohen Konzentrationen vorliegenden Arzneistoffe als Bruchteil ihres Wertes angegeben und mit einem Faktor gekennzeichnet (beispielsweise bei Oxycodon in Abbildung 4 entspricht der Balken nur einem Hundertstel der tatsächlichen Konzentration, hier wurde der Faktor x100 ergänzt).

#### **5.1.5. Verwendung von DBS zur Messung von Ethylglucuronid (EtG) aus getrocknetem Kapillarblut im Vergleich zu venösem Blut**

Auch eine Vergleichbarkeit der quantitativen Analyse von getrocknetem Kapillarblut zu flüssigem, venös entnommenem Blut kann, wie bereits im allgemeinen Teil ausgeführt,

aufgrund einer Vereinfachung der Probennahme von Bedeutung sein. Im Falle von Ethylglucuronid (EtG) wurde die Praktikabilität der Analyse von auf verschiedenen Untergrundmaterialien getrockneten Blutproben bereits bewiesen [66]. Daher wurde überprüft, ob eine Verwendung von einfach zugänglichem Kapillarblut aus der Fingerbeere eine alternative Probennahme darstellt, da sie zeitnäher zum Vorfall auch durch nicht medizinisches Personal durchgeführt werden kann.

Zur Überprüfung dieser alternativen Probennahme wurden im Rahmen eines kontrollierten Trinkversuches mit venösen Blutentnahmen auch zeitgleich DBS aus Kapillarblut auf Filterkarten angesetzt. Der Trinkversuch wurde zur Überprüfung der Plausibilität von Angaben zu Trinkmenge und Getränkeart im Hinblick auf die resultierende EtG-Konzentration, aber auch der möglichen Korrelation nachgewiesener Konzentrationen von EtG zur Blutalkoholkonzentration durchgeführt. Parallel sollte nun die Vergleichbarkeit einer Analyse von EtG aus auf Filterkarten getrocknetem Kapillarblut zu einer Routineanalyse aus venösem Vollblut überprüft werden. Der für diese Arbeit relevante Anteil der erhaltenen Ergebnisse soll im Folgenden dargestellt werden.

An jeweils zwei Abenden wurde über einen Zeitraum von vier bis sechs Stunden Alkohol nach Belieben konsumiert. Menge und Art der Getränke wurden genau dokumentiert. Eine Liste der Alkoholgehalte der unterschiedlichen Getränke lag vor.

Insgesamt wurden im Rahmen des Trinkversuches pro Person zu neun verschiedenen Zeitpunkten Blutproben in mit EDTA imprägnierte Blutentnahmeröhrchen entnommen. Eine venöse Blutprobe wurde als EtG-Nullwert vor Beginn der Versuchsreihe entnommen, um festzustellen, ob die Versuchspersonen auf EtG negativ waren, oder ob, gegebenenfalls durch Genuss von Früchten oder alkoholhaltigen Speisen und Getränken, bereits vor Beginn der Studie EtG im Blut nachzuweisen war. Jeweils zeitgleich mit vier der neun Blutentnahmen, nämlich jeweils abends nach Trinkende und am nächsten Morgen, wurden zusätzlich zur venösen Blutentnahme auch Kapillarblutproben abgenommen. Diese wurden aus der Fingerbeere mithilfe einer Lanzette und einer mit Eichstrichen bei je 50 und 100  $\mu\text{L}$  versehenen Kapillare entnommen, direkt auf eine Filterkarte aufgetragen und trocknen gelassen. Die venösen Blutproben wurden sofort kühl gelagert, die Filterkarten mit den Kapillarblutproben bei Raumtemperatur frei stehend trocknen gelassen und anschließend in eine Kiste mit Silicagel als Trockenmittel verpackt.

Im Labor wurden von den venösen Blutproben nach kurzem, leichtem Mischen auf dem Vortexmischer jeweils zweimal 100 µL Vollblut in „micro tubes“ pipettiert.

Die Probenaufbereitung der flüssigen venösen Blutproben und der Kalibratoren erfolgte nach der im FTC gültigen vorläufigen Arbeitsanweisung zur Analyse von EtG in Blut wie folgt: Jeweils 100 µL Blutprobe wurden mit internem Standard EtG-D5 versehen und mit einer Proteinfällung 1 mL Acetonitril unterzogen. Die „micro tubes“ wurden sofort auf den Vortexmischer gestellt und eine Minute intensiv gemischt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand in ein neues „micro tube“ dekantiert und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µL Puffer A1/A2 aufgenommen und eine halbe Minute auf dem Vortexmischer gerüttelt. Diese Probe wurde dann mit A1/A2-Puffer 1:10 verdünnt indem 10 µL Probe zu 90 µL Puffer in ein HPLC-Vial pipettiert wurden. Dieses wurde nochmals auf dem Vortexmischer gemischt und anschließend an ein API 5000 LC-MS/MS-System zur Messung mittels Routinemethode für EtG gestellt.

Eine Kalibration mit zertifiziertem EtG-Standard wurde im Vollblut mit neun Punkten im Konzentrationsbereich von 10 ng/mL bis 5000 ng/mL angesetzt. Eine externe Kontrolle in Serum und jeweils zwei intern hergestellte Kontrollen in Vollblut wurden mit aufgearbeitet. Die Kontrollproben wurden jeweils auch als DBS zu je 100 µL auf Filterkarten angesetzt.

Die Trockenblutproben auf den Filterkarten wurden komplett ausgeschnitten, klein geschnitten und mit 500 µL bidestilliertem Wasser und dem internem Standard EtG-D5 in einer Konzentration von 200 ng/mL versetzt und 20 Minuten auf das Rüttelbrett gestellt. Die Proteinfällung erfolgte mit 1,5 mL Acetonitril, die weitere Aufarbeitung wie bereits beschrieben.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 10 gegenübergestellt. Ersichtlich ist die sehr gute Korrelation der Werte zwischen flüssigem venösem Blut und DBS. Da die DBS teilweise nur mit 50 µL Probenmaterial angefertigt werden konnten, mussten diese Werte noch hochgerechnet werden. Da es sich um Vorversuche handelt, wurde auf eine weiterführende statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet.

**Tabelle 10: Für diese Arbeit relevanter Anteil der Ergebnisse des Trinkversuches (Vergleich der Konzentrationen in Vollblut und DBS)**

<b>Nr. Versuchsperson (VP) und Nr. Blutprobe (BP)</b>	<b>EtG Vollblut [ng/mL]</b>	<b>EtG blood spot [ng/mL], ggf. berechnet auf 100 µL Vollblut</b>
VP1 BP2	503	744
VP1 BP3	367	422
VP2 BP2	586	771
VP3 BP3	159	179
VP4 BP2	131	116
VP7 BP2	209	260
VP7 BP3	112	118
VP8 BP2	554	576
VP8 BP3	466	484
VP11 BP3	270	333
VP12 BP3	796	828

Zusammenfassend lässt sich durch diese kleine Studie zum Vergleich von EtG in flüssigem venösem Blut und DBS aus Kapillarblut ausführen, dass die in venösem Blut gemessenen Konzentrationen in guter Korrelation zu den aus Kapillarblut angefertigten DBS nachgewiesenen Konzentrationen stehen.

#### **5.1.6. Kurzzeit-Lagerungsstudie über sieben Wochen**

Um die Stabilität verschiedener Arznei- bzw. Suchtstoffe in getrocknetem Blut zunächst orientierend zu überprüfen, wurde eine kurze Versuchsreihe über eine Dauer von sieben Wochen angesetzt (Aufbau siehe Tabelle 11). Die Auswahl der Analyten sollte einen möglichst großen Bereich verschiedener zentral wirksamer Drogen und Medikamentenwirkstoffe abdecken. Die Wirkung der einzelnen Arznei- bzw. Suchtstoffe ist im allgemeinen Teil beschrieben. Auf zwei im Alltag häufige Materialien, nämlich Kachel und Stoff (Bettlaken) wurden insgesamt 250 Proben zu je 100 µL Vollblut aufgetragen. Jeweils ein Drittel der Proben wurde bei Raumtemperatur, im Kühlschrank bei 4 °C bzw. im Trockenschrank bei 35 °C gelagert.

**Tabelle 11: Plan zur Durchführung der Lagerungsstudie**

Lagerungs- studie	Materia- lien	Aufarbeitungs- tage [Tag nach Auftragen der Proben]		
		Analyten	Temperaturen	
Ansatz der Proben je- weils in 5- fach Bestim- mung	Kachel	Tag 1	Benzoyllecgonin	Kühlschrank
	Stoff	Tag 3	Morphin	Raumtemperatur
		Tag 8	Codein	Trockenschrank
		Tag 15	Methadon	
		Tag 22	Tramadol	
		Tag 36	Fentanyl	
		Tag 50	Diazepam	
			Nordazepam	
			Amitriptylin	
			Nortriptylin	
			Doxepin	
			Citalopram	
			Quetiapin	
			Zolpidem	
			7-Amoniflunitrazepam	

Zur Durchführung der Studie wurde zunächst der Probenpool mit den in Tabelle 11 aufgeführten Arznei- bzw. Suchtstoffen, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, angesetzt. Die an sechs verschiedenen Stellen im Pool entnommenen Proben wurden anschließend aufgearbeitet und am LC-MS/MS gegen eine tagesaktuelle Kalibrierung vermessen. Der aus dieser Sechsfachbestimmung errechnete Mittelwert wurde als Zielwert für die weiteren Analysen verwendet (Anhang Tabelle 15).

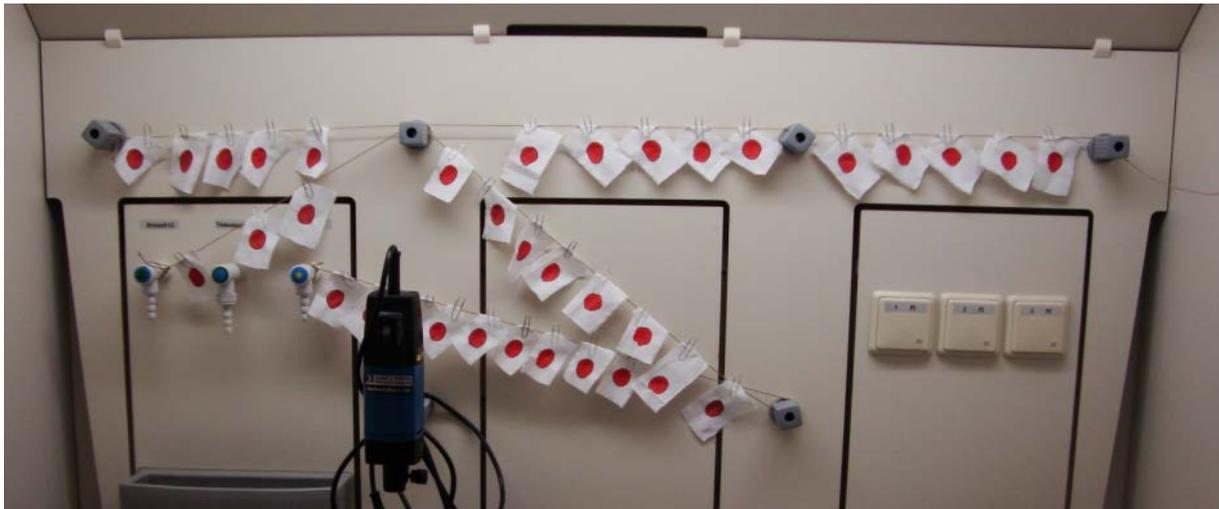
Pro Kachel wurden jeweils 100 µL Blut in einem Tropfen aufgetragen, das Blut wurde nicht verwischt. Die Kacheln wurden dann bei den entsprechenden Temperaturen getrocknet (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Kacheln mit je 100  $\mu$ L Blut, zum Trocknen in Kartons gelagert**

Für die Blutropfen auf Stoff wurden aus dem Bettlaken etwa 5 cm x 5 cm große Stücke ausgeschnitten, gewogen und von dem Pool je 100  $\mu$ L Blut pro Stoffstück aufgetragen. Die Stoffstücke wurden im Kühlraum bei 4 °C auf gespannten Leinen aufgehängt, ebenso für die Lagerung bei Raumtemperatur unter einem anderweitig nicht genutzten Abzug (siehe Abbildung 8).

Für die Lagerung im Trockenschrank wurden die Stoffstücke aus Platzgründen in offene 10 mL Sarstedt-Röhrchen verbracht und dort getrocknet.



**Abbildung 8: Stoffstücke mit je 100 µL Blut, aufgehängt zum Trocknen im Abzug**

Zu Beginn der Studie wurde in kürzeren Abständen aufgearbeitet, um einen eventuell erfolgten Abbau der Arznei- bzw. Suchtstoffe zu erfassen. Gegen Ende wurden die Abstände länger gewählt, da zu erwarten war, dass Substanzen, die über einen gewissen Zeitraum stabil sind und keine Tendenzen für einen Abbau zeigen, auch im späteren Verlauf nicht innerhalb kürzester Zeit abgebaut sein würden.

Zum Aufarbeiten der Proben wurden die Trockenblutproben mithilfe eines Skalpell von der Kachel abgekratzt, vorsichtig in tarierte „micro tubes“ überführt und gewogen, um den Trocknungsverlust zu bestimmen. Anschließend wurden je 100 µL bidestilliertes Wasser zugegeben, um das getrocknete Blut zu rekonstituieren.

Die Stoffstücke wurden gewogen, anschließend wurde der komplette Blutfleck ausgeschnitten, in ein 10 mL Sarstedt-Röhrchen überführt und mit 1 mL bidestilliertem Wasser rekonstituiert.

Zu allen Proben wurde nun 1 µL interne Standardlösung (siehe Tabelle 23 im Anhang) zugegeben und diese Mischung 20 Minuten auf dem Rüttler bei 370/min geschüttelt. Anschließend wurde eine Proteinfällung mit 1 mL (für Kachel) bzw. 3 mL (für Stoff wegen der größeren verwendeten Wassermenge) Acetonitril durchgeführt. Die Proben wurden sofort nach Zugabe des Acetonitril auf dem Vortexmischer für 1 Minute gemischt und anschließend bei 14500 U/min bzw. die Stoffproben aufgrund der größeren Probenröhrchen in einer anderen Zentrifuge bei nur 3500 U/min zentrifugiert und der jeweilige Überstand in beschriftete 2 „micro tubes“ bzw. für Stoff in 5 mL Sarstedt-Röhrchen abgenommen. Anschließend wurde Ameisensäure zugegeben (2 µL bei den Proben von Kachel und 6 µL bei den Proben von Stoff aufgrund des

höheren Volumens) und die Proben weiter aufgearbeitet wie für die Aufarbeitung der Kalibratoren beschrieben. Die Extrakte wurden an der LC-MS/MS mit der am FTC gültigen Routinemethode für Blutanalytik gemessen.

### 5.1.7. Ergebnisse Vorversuche

Der prozentuale Trockenblutanteil der Proben an den jeweiligen Aufarbeitungstagen über den gesamten Studienzeitraum ist in Abbildung 9 ersichtlich. Am ersten Tag der Aufarbeitung waren die im Kühlraum getrockneten Proben noch feucht, sodass sich die Blutropfen nur schwer von der Kachel abkratzen ließen, dafür war keine Splitterung des Blutes zu beobachten. Die Stoffstücke wiesen insgesamt, mit Ausnahme der im Trockenschrank gelagerten Proben - ggf. durch eine höhere Luftfeuchtigkeit und dadurch eine unvollständige Trocknung - eine deutlich höhere Trockenmasse auf, als die auf Kacheln gelagerten Blutproben. Dennoch lässt sich auch bei den Stoffproben erkennen, dass die erhaltenen Trockenblutanteile mit Ausnahme des letzten Tages (evtl. bedingt durch einen zufälligen Fehler) geringe Schwankungen aufweisen.

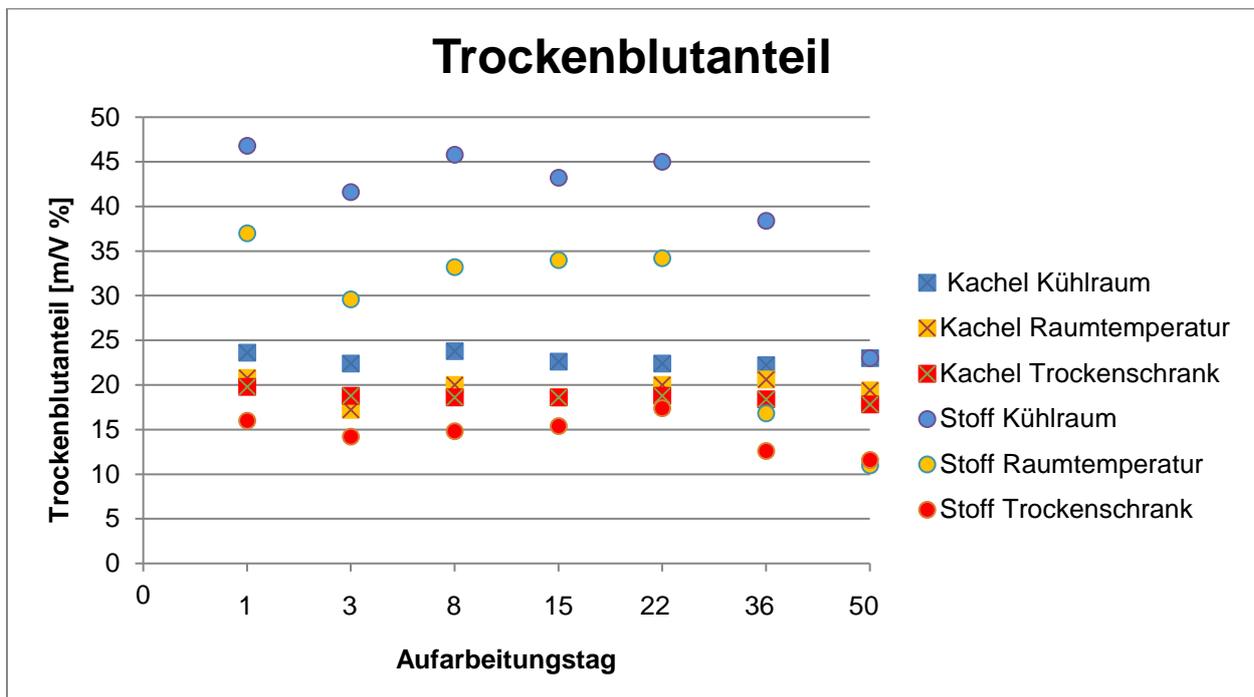


Abbildung 9: Trockenblutanteil des Poolblutes über den gesamten Untersuchungszeitraum

Das Abnehmen des getrockneten Blutes von den Kacheln erwies sich als schwierig, da das Blut beim Abkratzen teilweise stark splitterte. Gerade die getrockneten Blutropfen der im Trockenschrank gelagerten Kacheln waren extrem spröde und zersplitterten in kleine und kleinste Partikel, was ein vollständiges Überführen in die „micro tubes“ deutlich erschwerte. Die vor Auftragen des Blutes tarierten Stoffproben waren

hier deutlich besser zu handhaben, da sie nach dem Trocknen komplett gewogen wurden.

Die quantitative Auswertung der Kurzzeit-Lagerungsstudie erfolgte halbautomatisch mithilfe der Software Analyst<sup>®</sup>. Einige Peaks mussten manuell nachintegriert werden. Eine quantitative Berechnung der Konzentrationen konnte erfolgen, da das auf beide Materialien applizierte Volumen Vollblut von 100 µL bekannt war. Bei den Analyten, deren Konzentrationen mithilfe eines eigenen deuterierten internen Standards berechnet wurde, zeigten sich teilweise Schwankungen, die z.B. durch Verluste bei der Abnahme von den Kacheln, bzw. bei Stoff durch Störmatrix bedingt sein könnten. Diese Resultate lassen sich zumindest semiquantitativ interpretieren. Bei den Analyten, bei denen nur ein allgemeiner interner Standard vorlag, können die Ergebnisse lediglich qualitativ gewertet werden, da sich bei den Messungen, auch abhängig vom Untergrundmaterial, deutliche Schwankungen in der Konzentration des internen Standards im Extrakt zeigten.

Als Stoffwechsel- und Abbauprodukt des Cocains ist Benzoyllecgonin ein wesentlicher Marker für einen erfolgten Cocain-Konsum (siehe allgemeiner Teil). Die für die Versuche gewählte Konzentration von 90 ng/mL liegt im niedrigen Bereich einer Größenordnung, wie sie typischerweise nach „Freizeitkonsum“ aufgefunden wird [5]. Benzoyllecgonin wird mithilfe eines eigenen deuterierten Standards, Benzoyllecgonin-D3, quantifiziert. Wie in Abbildung 10 und Abbildung 11 deutlich ersichtlich, ist Benzoyllecgonin über den gesamten untersuchten Zeitraum, unabhängig von der Lagerungstemperatur, stabil. Die am Tag 36 nach Auftragen der Proben erkennbaren, leichten Einbußen in der Konzentration auf Kachel bzw. die am Tag 15 auf Stoff deutlich zu hohen Werte an Benzoyllecgonin dürften am ehesten auf systematische Fehler (ggf. bei der Aufarbeitung der Proben) zurückzuführen sein. In der Gesamtschau war Benzoyllecgonin nach sieben Wochen Lagerung bei Raumtemperatur, im Kühlraum bzw. im Trockenschrank und auf zwei verschiedenen Materialien in den getrockneten Blutproben im Bereich des Sollwertes nachweisbar.

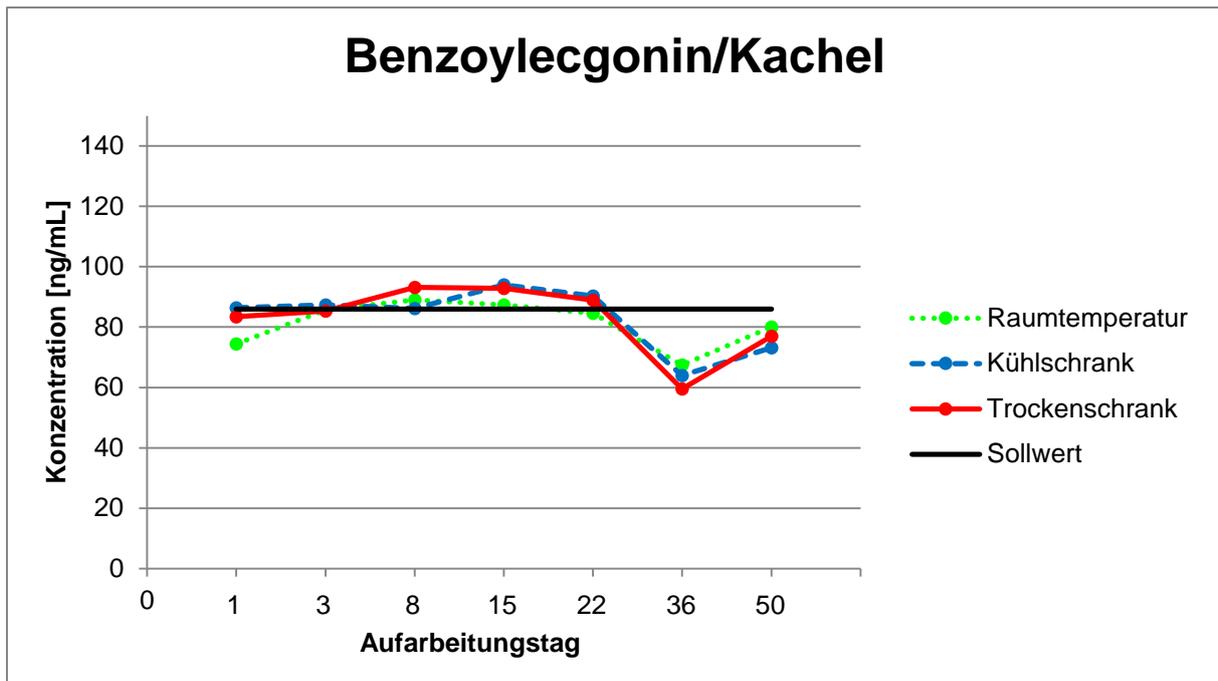


Abbildung 10: Konzentration von Benzoylecgonin auf Kachel in der Kurzzeit-Lagerungsstudie

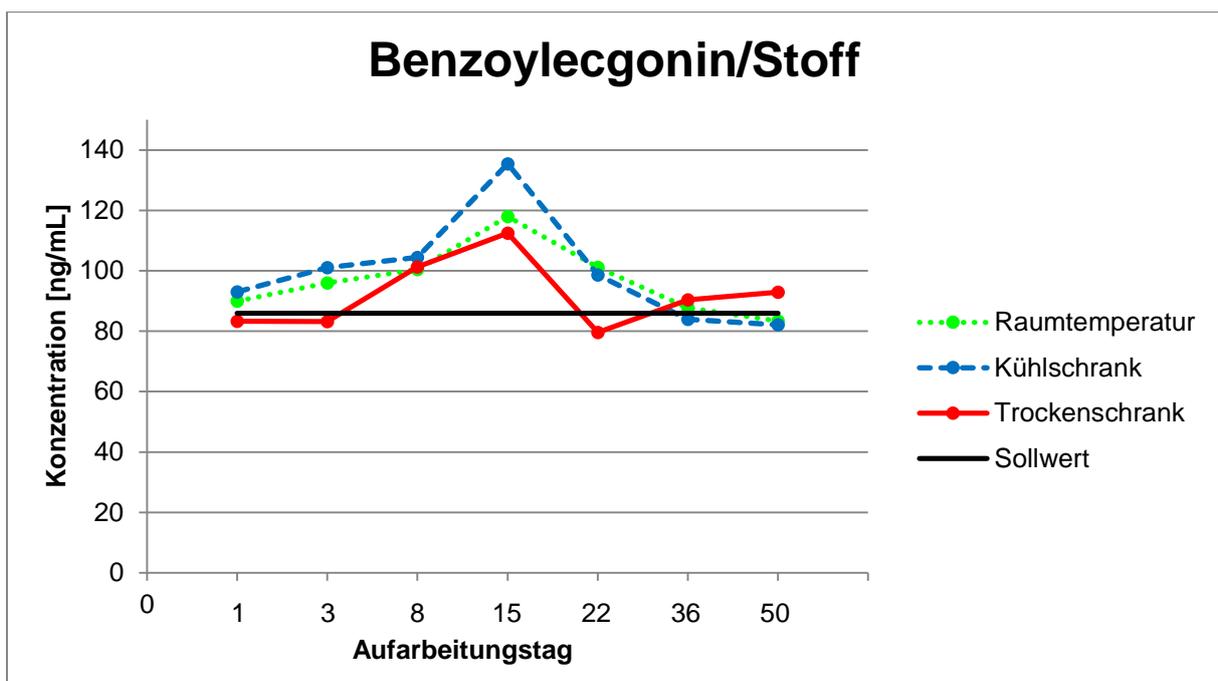


Abbildung 11: Konzentration von Benzoylecgonin auf Stoff in der Kurzzeit-Lagerungsstudie

Auch Morphin wird bei der hier verwendeten Methode über einen eigenen deuterierten Standard, Morphin-D3 quantifiziert. Hier sind die Schwankungsbreiten der nachgewiesenen Konzentrationen in den getrockneten Blutproben ähnlich gering wie bei Benzoylecgonin (Diagramme siehe Anhang). Am zweiten Aufarbeitungstag waren die Messungen auf Kachel möglicherweise aufgrund eines nicht näher zuordenbaren zufälligen Fehlers bei der Aufarbeitung nicht auswertbar. Insgesamt ist Morphin noch

nach sieben Wochen Lagerung bei verschiedenen Temperaturen stabil und eindeutig in getrockneten Blutproben nachweisbar.

Für Codein liegt in der für die Lagerungsstudie verwendeten Methode kein eigener interner Standard vor. Daher wurde das strukturähnliche Morphin-D3 als interner Standard für die Quantifizierung verwendet. Es zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse hierbei nicht reproduzierbar waren, daher wurde als Alternative Cocain-D3 als interner Standard für eine semiquantitative Bestimmung des Codeins verwendet. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich Codein nach sieben Wochen Lagerung unabhängig von Temperatur und Material noch eindeutig im Trockenblut nachweisen lässt.

Methadon ist ein in der gewählten Methode in flüssigem Blut sehr gut (mit hoher Intensität) nachweisbarer Analyt. Auch in den getrockneten Blutproben ließ sich Methadon gut nachweisen. Die Schwankungen sind bei beiden Materialien nicht nur zwischen den verschiedenen Aufarbeitungstagen, sondern auch zwischen den einzelnen Lagerungstemperaturen deutlich ausgeprägter, als beispielsweise bei Benzoyllecgonin. Als interner Standard für die Quantifizierung wurde MPPH gewählt, da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein deuteriertes Methadon in der Routinemethode integriert war. Auch der interne Standard unterliegt bei den Messungen (teils erheblichen) Schwankungen. Es gibt keine eindeutig erkennbaren Tendenzen bezüglich Temperatur- oder Materialabhängigkeit, jedoch konnte Methadon nach siebenwöchiger Lagerung eindeutig in den getrockneten Proben nachgewiesen werden.

Auch Tramadol wird bei der Auswertung durch Verwendung des internen Standards MPPH quantifiziert. Die von den Blutropfen auf Kachel ermittelten Werte streuen über einen sehr großen Bereich und sind als quantitative Werte nicht zu verwenden. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Tagen sind unabhängig von der Temperatur sehr hoch, es wurden teils deutlich geringere, teils sogar höhere Werte an Tramadol gemessen, als die zu Beginn der Studie ermittelte Konzentration an Tramadol im Poolblut (siehe Tabelle 15 Anhang). Doch auch nach siebenwöchiger Lagerungsfrist ist Tramadol in getrockneten Blutproben qualitativ gut nachweisbar.

Fentanyl liegt im Pool in einer geringen, dem therapeutischen Bereich angepassten Konzentration vor [5]. Zur Quantifizierung von Fentanyl in den Trockenblutproben wurde ebenfalls MPPH als interner Standard verwendet. Auch Fentanyl unterliegt den bereits bei Tramadol erkennbaren, starken Schwankungen bezüglich der berechneten

Konzentrationen. In der Gesamtschau ließ sich auch Fentanyl nach Ablauf der 7 Wochen in den letzten analysierten Proben unabhängig von Material und Temperatur noch nachweisen, ist also in getrockneten Blutproben über mindestens 7 Wochen stabil.

Zur Quantifizierung des Wirkstoffes Diazepam stand der direkte deuterierte interne Standard Diazepam-D5 zur Verfügung, sodass hier bei beiden Untergrundmaterialien deutlich konstantere und reproduzierbarere Werte erhalten wurden, als beispielsweise bei den Opioiden Tramadol und Fentanyl, die über MPPH quantifiziert wurden (Diagramme siehe Anhang). Es konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum bei allen untersuchten Temperaturen kein Abbau des Diazepams festgestellt werden.

Analog zu Diazepam wurde zur Quantifizierung von Nordazepam der strukturell sehr ähnliche interne Standard Diazepam-D5 herangezogen. Deutlich wird der Unterschied zwischen Diazepam und Nordazepam in größeren Schwankungen bei den quantitativen Werten für Nordazepam auf beiden Untergrundmaterialien. Auch Nordazepam ist nach siebenwöchiger Lagerung bei allen untersuchten Temperaturen stabil und ohne erkennbare Verluste nachweisbar.

Wie für alle Benzodiazepine wurde auch für 7-Aminoflunitrazepam Diazepam-D5 als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Analog zu Fentanyl wurde die Konzentration an 7-Aminoflunitrazepam im Pool den zu erwartenden Konzentrationen im menschlichen Körper nach einer therapeutischen Gabe von Flunitrazepam angepasst. Bei den Auswertungen war die Intensität von 7-Aminoflunitrazepams am Messgerät, bedingt durch die Analysenparameter in der verwendeten Methode, deutlich niedriger als vergleichsweise die von Fentanyl, welches in einem ähnlichem Konzentrationsbereich liegt. In Abbildung 12 und Abbildung 13 fällt auf, dass dieser Analyt nicht über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil war.

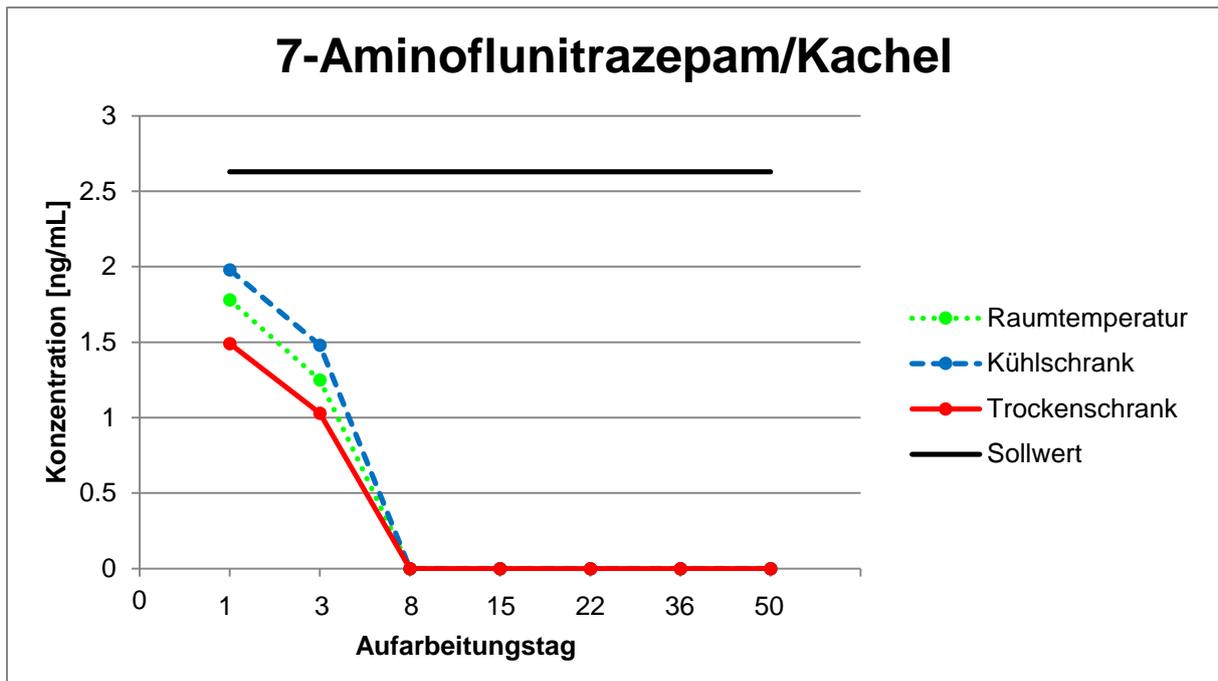


Abbildung 12: Konzentration von 7-Aminoflunitrazepam auf Kachel in der Kurzzeit-Lagerungsstudie

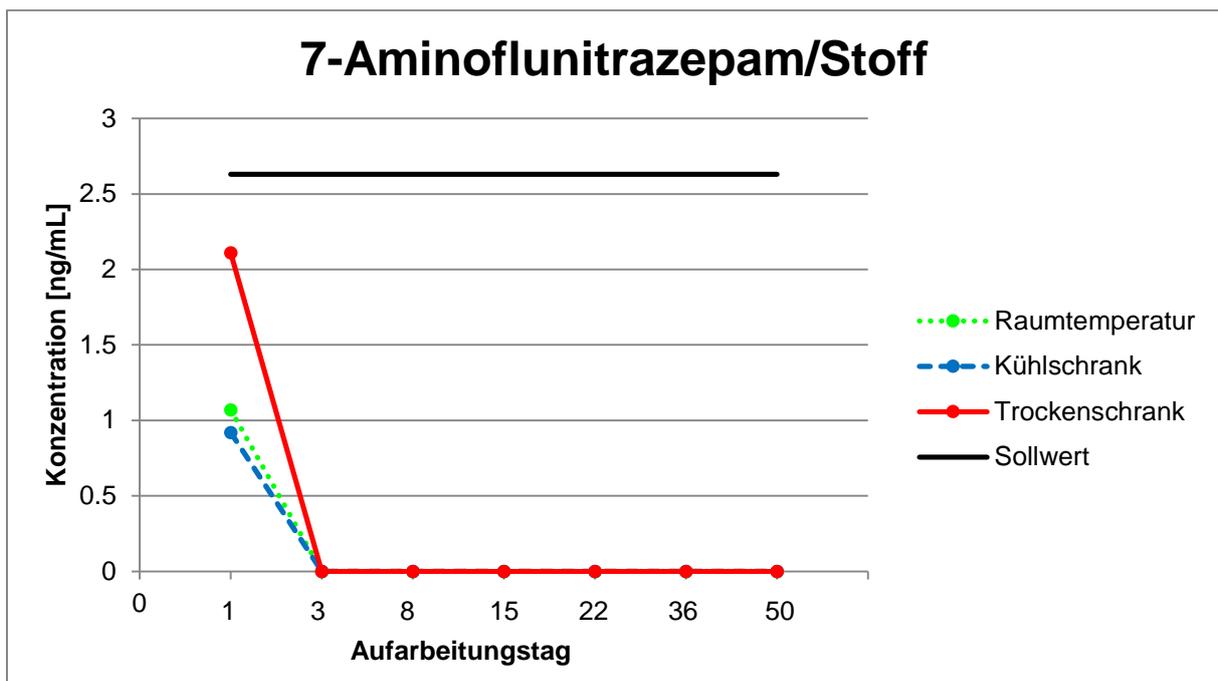


Abbildung 13: Konzentration von 7-Aminoflunitrazepam auf Stoff in der Kurzzeit-Lagerungsstudie

Bei den Versuchen auf dem Untergrundmaterial Kachel (Abbildung 12) konnte an den ersten beiden Untersuchungstagen, also Tag 1 und Tag 3 nach Auftragen der Proben noch 7-Aminoflunitrazepam nachgewiesen werden. Bereits am Tag 8 nach Auftragen konnte kein eindeutiger Peak mehr vom Untergrundrauschen abgegrenzt werden, auch die weiteren Untersuchungen an den nachfolgenden Tagen verliefen negativ. Aus Abbildung 13 des getrockneten Blutes auf Stoff ist ersichtlich, dass schon ab

Tag 3 nach Auftragen der Proben kein 7-Aminoflunitrazepam mehr nachweisbar war. Eine Instabilität von 7-Aminoflunitrazepam in flüssigen Blutproben ist in der Literatur beschrieben [57]. Aus der Kurzzeit-Lagerungsstudie lässt sich folgern, dass 7-Aminoflunitrazepam auch in getrockneten Blutproben instabil ist, da es bereits nach kurzer Lagerungszeit zumindest bei der hier untersuchten therapeutischen Konzentration von 2,6 ng/mL vollständig abgebaut ist.

Wie alle Psychopharmaka außer den Benzodiazepinen wurden Amitriptylin, sein aktiver, auch als eigenständiges Arzneimittel vermarkteter Metabolit Nortriptylin sowie Doxepin, Citalopram, Quetiapin und Zolpidem mithilfe von MPPH als internem Standard quantifiziert. Den jeweiligen Diagrammen sind deutliche Schwankungsbreiten der ermittelten Konzentrationen der Analyten zu entnehmen (siehe Diagramme im Anhang). Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass alle vorgenannten Analyten innerhalb des siebenwöchigen Studienzeitraums stabil waren und sich auch am Ende der Studie bei allen untersuchten Temperaturen zumindest qualitativ nachweisen ließen.

Zusammenfassend resultiert aus der Kurzzeit-Lagerungsstudie über sieben Wochen, dass lediglich ein Analyt (7-Aminoflunitrazepam) der untersuchten 15 verschiedenen Drogen- und Medikamentenwirkstoffe nicht über die gesamte Lagerungsdauer stabil war. Alle anderen ließen sich jeweils bei allen Temperaturen noch sicher am letzten Analysentag nachweisen. Für die Substanzen, für die eigene deuterierte interne Standards zur Quantifizierung vorlagen, konnten valide quantitative Werte berechnet werden. Für die Analyten, für die kein eigener deuterierter interner Standard zur Verfügung stand, waren die Schwankungsbreiten meist größer und eine valide Quantifizierung nicht möglich. Ein qualitativer Nachweis gelang (mit Ausnahme von 7-Aminoflunitrazepam) jedoch über die gesamte Untersuchungsdauer bei allen Temperaturen.

## **5.2. Langzeitstudie über sechs Monate**

Die aus den Vorversuchen erhaltenen Ergebnisse bezüglich Probennahme, Aufarbeitung der Proben und Analytik wurden zur Optimierung der Langzeitstudie genutzt. Ziel der Langzeitstudie ist, die Stabilität ausgewählter Arznei- und Suchtstoffe in getrocknetem Blut auf verschiedenen Untergrundmaterialien über einen Zeitraum von sechs Monaten zu bestimmen. In Tabelle 12 ist die Versuchsreihe mit den Parametern

ersichtlich. Zu Beginn der Studie wurden enge Zeitabstände für die Aufarbeitung und Analyse der Proben gewählt, zum Ende der Studie hingegen wurde nur noch einmal monatlich aufgearbeitet. Falls einer der gewählten Arznei- und Suchtstoffe sich als nicht stabil erweisen sollte, ist davon auszugehen, dass dies in den ersten Tagen bzw. Wochen nach dem Auftragen der Proben bemerkbar sein würde. Substanzen, die über einen Zeitraum von vier Monaten keine erkennbaren Anzeichen für einen Substanzmengenverlust aufzeigen, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch nach fünf Monaten noch nachweisbar.

**Tabelle 12: Plan zur Durchführung der Langzeitstudie**

Langzeitstudie	Materialien	Aufarbeitungstage	Analyten	Temperaturen
3-fach Bestimmung	Kachel	Tag 1 (1. Tag nach dem Auftragen der Proben)	Benzoylcgonin	Kühlschrank (4 °C)
	Stoff	Tag 3	Methamphetamin	Raumtemperatur
	Parkett	Tag 8	Morphin	
	Tapete	Tag 15	Codein	
	Teppich	Tag 22	Methadon	
		Tag 29	Fentanyl	
		Tag 43	Nordazepam	
		Tag 57	Lorazepam	
		Tag 71	Zolpidem	
		Tag 85	Diphenhydramin	
		Tag 113	Citalopram	
		Tag 141	Doxepin	
		Tag 169	Mirtazapin	
		Tag 197	Quetiapin	
			Bisoprolol	
			Metformin	
			Ramipril	

Da in den Vorversuchen bei keinem der untersuchten Analyten eine Temperaturabhängigkeit der Stabilität zu erkennen war, wurden in der Langzeitstudie nur zwei Temperaturen überprüft (Kühlschrank (ca. 4 °C) und Raumtemperatur). Um die Stabilität der Analyten sowie die Reproduzierbarkeit der Probennahme und Aufarbeitung auch auf schwierigeren Untergründen zu testen wurden weitere, häufig an Tatorten vorhandene Untergrundmaterialien, nämlich Parkett, Tapete und Teppich als Untergrundmaterial ergänzt.

Aufgrund der Erfahrungen durch die Lagerungsstudie wurde Tramadol wegen seiner schlechten Reproduzierbarkeit in der Langzeitstudie ausgeschlossen. Des Weiteren wurde Diazepam aufgrund der Wahl zweier weiterer Benzodiazepine und der limitierten Anzahl möglicher Substanzen, Amitriptylin und Nortriptylin wegen der größeren Relevanz der weiteren in der Studie untersuchten Psychopharmaka und 7-Aminoflunitrazepam aufgrund seiner in der Kurzzeit-Lagerungsstudie bewiesenen, deutlichen Instabilität auch in gelagerten getrockneten Blutproben nicht in die Langzeitstudie aufgenommen. Mit Bisoprolol, Metformin und Ramipril wurden drei häufig verordnete Arzneistoffe in die Langzeitstudie aufgenommen, die in Realproben nicht bekannter Personen einen Hinweis auf ggf. vorhandene Grunderkrankungen der Person, von der die Blutspur stammt, geben können. Zusätzlich wurden Methamphetamin als Stimulans, Lorazepam als Benzodiazepin, Diphenhydramin als nicht rezeptpflichtiges Schlafmittel sowie Mirtazapin als tetrazyklisches Antidepressivum aufgenommen.

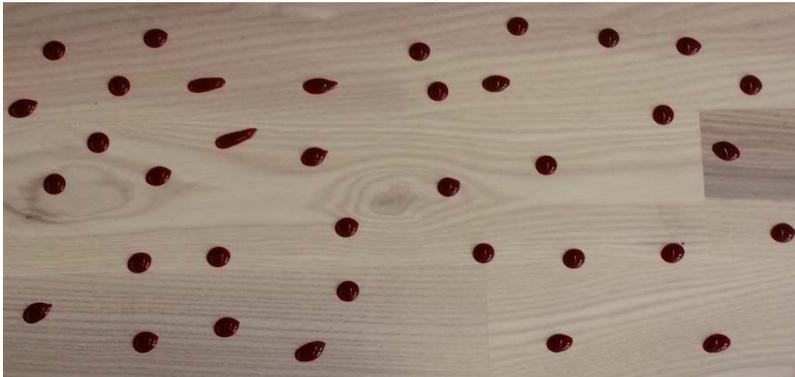
Zur Quantifizierung wurden weitere deuterierte interne Standards in die Methode integriert und die Konzentrationen teilweise angepasst (siehe Tabelle 20 im Anhang), da aus den Ergebnissen der Kurzzeit-Lagerungsstudie und weiterer Vorversuche ersichtlich wurde, dass Analyten, die über einen deuterierten internen Standard quantifiziert wurden, reproduzierbarere Ergebnisse lieferten als diejenigen mit einem allgemeinen internen Standard.

Für die Langzeitstudie wurde analog zur Kurzzeit-Lagerungsstudie ein Blutpool mit den unten aufgeführten Arznei- bzw. Suchtstoffen angesetzt (zur Durchführung siehe Materialteil). Eine Prüfung der Homogenität ergab die in Tabelle 16 im Anhang aufgeführten Ergebnisse.

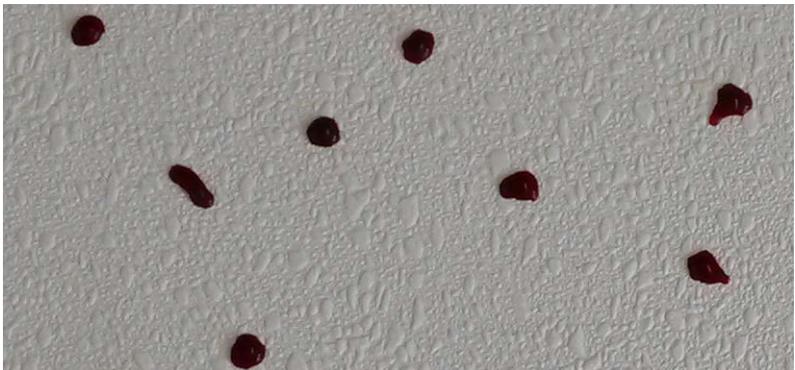
Insgesamt wurden aus diesem Pool 500 Blutropfen zu je 100 µL angesetzt. Je Untergrundmaterial (Kachel, Parkett, Tapete, Stoff, Teppich) wurden also 100 Tropfen zu je 100 µL Blut mithilfe einer Pipette in genügend großem Abstand - um ein Ineinanderlaufen der Tropfen zu verhindern - aufgetropft. Die Proben wurden jeweils als ein Spot auf die verschiedenen Untergrundmaterialien aufgetragen. Stoff als Material ist durchlässig und es musste darauf geachtet werden, dass kein Blut durch den Stoff sickerte und abtropfte. Die Stoffproben wurden hängend gelagert (Abbildung 17), Kacheln (Abbildung 14), Parkett (Abbildung 15), Tapete (Abbildung 16) und Teppich (Abbildung 18) wurden bei Raumtemperatur sowie im Kühlschrank (4 °C) liegend ausgebreitet.



**Abbildung 14: Auf Kachel aufgebrachte Blutropfen**



**Abbildung 15: Auf Parkett aufgebrachte Blutropfen**



**Abbildung 16: Auf Tapete aufgebrachte Blutropfen**



**Abbildung 17: Auf Stoff aufgebrachte Blutropfen**



**Abbildung 18: Auf Teppich aufgebrachte Blutropfen**

Das Lösen und Aufarbeiten der getrockneten Blutropfen von den fünf ausgewählten Untergrundmaterialien wird im Folgenden beschrieben:

#### *Kachel*

Die getrockneten Blutropfen wurden mithilfe eines Skalpells vorsichtig von der Kachel abgekratzt und die so entstandenen Splitter in beschriftete micro tubes überführt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  bidestilliertes Wasser zugegeben, um das getrocknete Blut wieder in Lösung zu bringen. Des Weiteren wurden 2  $\mu\text{L}$  interne Standardmischung (siehe Tabelle 20 im Anhang) zugegeben und die „micro tubes“ für 20 Minuten auf dem Rüttler bei 370/min geschüttelt. Die so erhaltene Lösung wies Schwebteilchen auf, die vermutlich von ungelösten Blutbestandteilen stammten. Anschließend wurde eine Proteinfällung mit je 1 mL Acetonitril durchgeführt, der erhaltene Überstand unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und der dabei entstehende Rückstand in je 150  $\mu\text{L}$  Rekonstitutionspuffer R1 aufgenommen.

#### *Parkett*

Für das Auftragen und Extrahieren der Blutropfen von Parkett wurde die gleiche Methode gewählt, wie für Kacheln beschrieben, da sich die Blutropfen, wie bei den Kacheln auch, leicht mithilfe eines Skalpells abkratzen ließen.

#### *Tapete*

Von der zur Simulation eines festen Untergrundes auf eine Pressspanplatte aufgeklebten Tapete wurden die getrockneten Blutropfen mithilfe eines mit bidestilliertem Wasser angefeuchteten Wattetupfers abgenommen. Hierzu wurde der Wattetupfer mit Wasser kurz angefeuchtet und das Blut von der Tapete abgerieben. Auch auf diesem Untergrund splitterte das Blut bzw. ließ sich teilweise als komplettes Gebilde entfernen

und lediglich kleinere Rückstände mussten durch Reiben des Wattetupfers am Untergrund aufgenommen werden. Somit war zum Abnehmen lediglich jeweils ein Tupfer pro Probe nötig. Die Spitze des Wattetupfers wurde abgeschnitten und mit den Splintern in ein 10 mL-Sarstedt-Röhrchen gegeben. Es wurden nun je 0,5 mL bidestilliertes Wasser zum Lösen des Blutes und 2 µL interne Standardmischung zugesetzt und die Röhrchen für 20 Minuten auf dem Rüttler (s.o.) geschüttelt. Die so erhaltenen Suspensionen, die Schwebeteilchen sowohl des Untergrundes als auch ungelöster Blutbestandteile enthält, wurden dann mit je 1 mL Acetonitril gefällt und bei 3500 U/min 5 min. lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in ein neues, beschriftetes 5 mL Sarstedt-Röhrchen überführt. Zu diesem wurden je 2 µL Ameisensäure zupipettiert und die Probe bei 37 °C unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Es wurde weiter verfahren wie bei der Aufarbeitung der Kacheln beschrieben.

#### *Stoff*

Nach dem Trocknen wurden aus dem Stoff die kompletten Blutflecke ausgeschnitten, in ein 10 mL Sarstedt-Röhrchen überführt und aufgrund der großen Saugfähigkeit des Stoffes mit je 1 mL bidestilliertem Wasser angelöst. Nach Zugabe von interner Standardmischung erfolgte die weitere Probenvorbereitung analog der Aufarbeitung der Proben von Tapete (s.o.).

#### *Teppich*

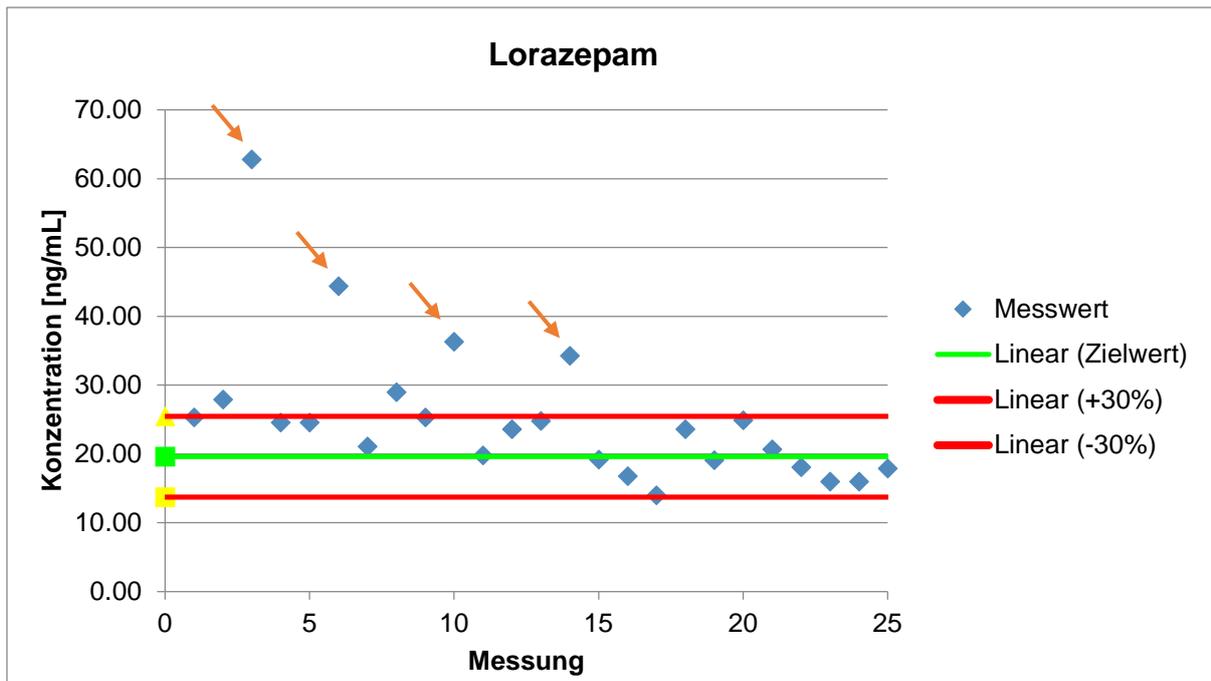
Auch hier wurde für die Aufarbeitung jeweils der komplette Fleck ausgeschnitten und in ein 10 mL Sarstedt-Röhrchen überführt. Zum Anlösen des Blutes wurden hier allerdings 2 mL bidestilliertes Wasser verwendet, da es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Teppich im Vergleich zu Stoff um noch deutlich saugfähigeres Material handelt. Nach Zugabe von interner Standardmischung wurden die Proben 20 Minuten auf dem Rüttelbrett (s.o.) geschüttelt. Aufgrund der größeren Wassermenge für die Extraktion des Blutes aus dem Teppich wurde entsprechend auch mehr Acetonitril (2 mL) für die Proteinfällung verwendet. Die Proben wurden nach dem Mischen auf dem Vortexmischer für 5 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues beschriftetes 5 mL Sarstedt-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 µL Ameisensäure (Volumen angepasst an das höhere Wasser- und Acetonitrilvolumen) wurde die Probe bei 37 °C unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und weiter verfahren wie bei der Aufarbeitung der Proben von den Kacheln beschrieben.



## 6. Ergebnisse

### 6.1. Auswertung der Qualitätskontrollen

Bei jedem Messlauf wurden nach Herstelleranweisung vorbereitete externe Qualitätskontrollen zur Überprüfung der Kalibration analog den Kalibratoren aufgearbeitet und gemessen (zur Zusammensetzung der Qualitätskontrollen: siehe Tabelle 18 im Anhang). Zusammenfassend lässt sich für die Qualitätskontrollen feststellen, dass sie mit wenigen Ausnahmen im Rahmen der laborintern festgelegten  $\pm 30\%$  um den Sollwert schwankten. Auffällig waren lediglich die teilweise stark erhöhten Konzentrationen einiger Analyten bei Qualitätskontrollproben, die direkt nach Injektion eines vergleichsweise unreinen Extraktes (wie beispielsweise den Blutproben von Teppich) injiziert wurden (siehe Abbildung 19; Beispiel Lorazepam: große Ausreißer nach oben sind bei Qualitätskontrollen erkennbar, die unmittelbar nach einem solchen Extrakt gemessen worden sind). Durch einen solchen gefärbten Extrakt mit Schwebeteilchen kann die Trennsäule der HPLC verschmutzt werden. Dies kann dazu führen, dass Reste davon in der verschmutzten Säule hängen bleiben, in der nachfolgenden Probe Suppressioneffekte auftreten und manche Analyten eine schlechtere Intensität aufweisen. In diesem Fall betrifft dies den internen Standard Diazepam-D5, der bei den mit einem Pfeil markierten Ausreißern des Lorazepams in der Qualitätskontrollprobe mit einer geringeren Intensität am Massenspektrometer gemessen wird, als in den Kalibratorproben. Dies führt dazu, dass vom System höhere Konzentrationen an Lorazepam berechnet werden, als tatsächlich enthalten, da sich die Quantifizierung auf den internen Standard bezieht.



**Abbildung 19: Konzentration von Lorazepam in der Qualitätskontrolle Bz-A je Messung**

Die Auswertung der Proben erfolgte zeitnah über eine tagesaktuelle bzw. die zuletzt gemessene Kalibrierung. Bei jedem Messlauf wurden vier verschiedene externe Qualitätskontrollen und eine Probe des aliquotiert eingefrorenen internen QC-Pools mit aufgearbeitet und gemessen um die Richtigkeit der Messung zu überprüfen. Um dies auch innerhalb bzw. nach einer längeren Serie zu gewährleisten, wurden diese Qualitätskontrollproben in regelmäßigen Abständen verteilt über den Lauf gemessen. Bei den Trockenblutproben mussten Peaks teilweise aufgrund geringer Intensität bzw. schlechter, vom System nicht erkannter Peakform manuell nachintegriert werden, vor allem bei den vom Untergrundmaterial Teppich extrahierten Proben. Von der Dreifachbestimmung pro Material, Temperatur und Analysentag wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Arznei- bzw. Suchtstoffe aus der Langzeitstudie in je einem Diagramm pro Untergrundmaterial dargestellt, in denen beide Lagerungstemperaturen enthalten sind. Auf der Y-Achse ist jeweils die zugehörige Konzentration zu den auf der X-Achse aufgetragenen Messtagen zu sehen. Die rote Linie stellt jeweils den zu Beginn der Studie im Pool ermittelten Ausgangswert (siehe Tabelle 16 im Anhang), also die „Ist-Konzentration“ dar.



## 6.2. Langzeitstudie

### - Benzoylecgonin

Benzoylecgonin wurde in der verwendeten Methode mithilfe eines deuterierten Standards (Benzoylecgonin-D3) quantifiziert. Die so erhaltenen Werte der einzelnen Untersuchungstage schwanken in einem geringen Ausmaß (zwischen minimal 73 % bis maximal 132 % vom zu Beginn im Pool bestimmten Sollwert). Die Diagramme der unterschiedlichen Materialien zeigen einen ähnlichen Verlauf, lediglich bei den vom Untergrundmaterial Teppich entnommenen Proben zeigen sich etwas größere Schwankungen zwischen den einzelnen Analysentagen. Zusammenfassend lässt sich Benzoylecgonin in der dotierten Konzentration während der gesamten 6-monatigen Lagerung bei beiden Temperaturen und auf allen fünf Materialien nachweisen.

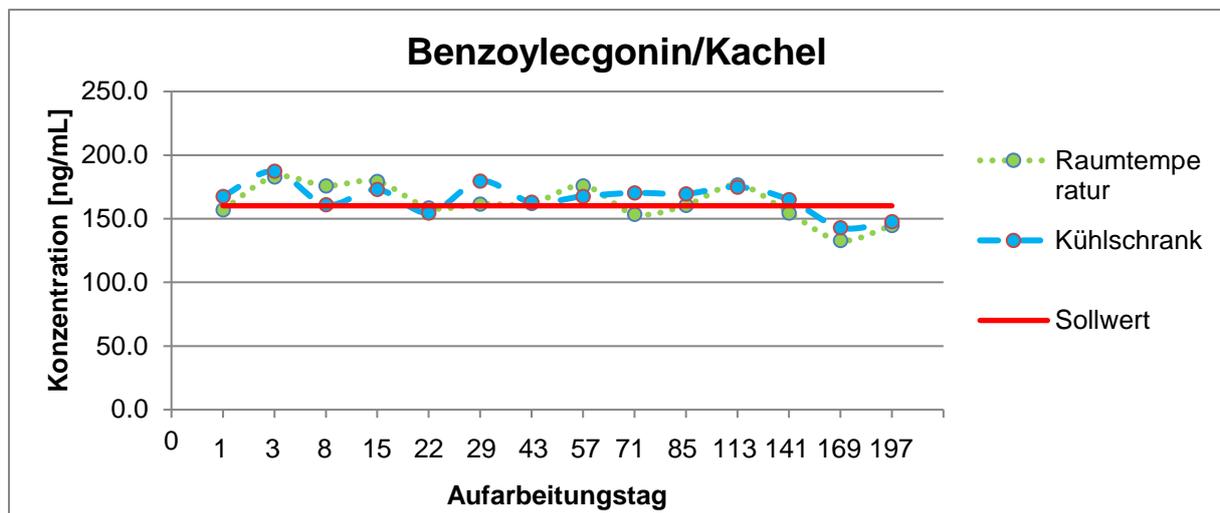


Abbildung 20: Konzentration von Benzoylecgonin auf Kachel über 6 Monate

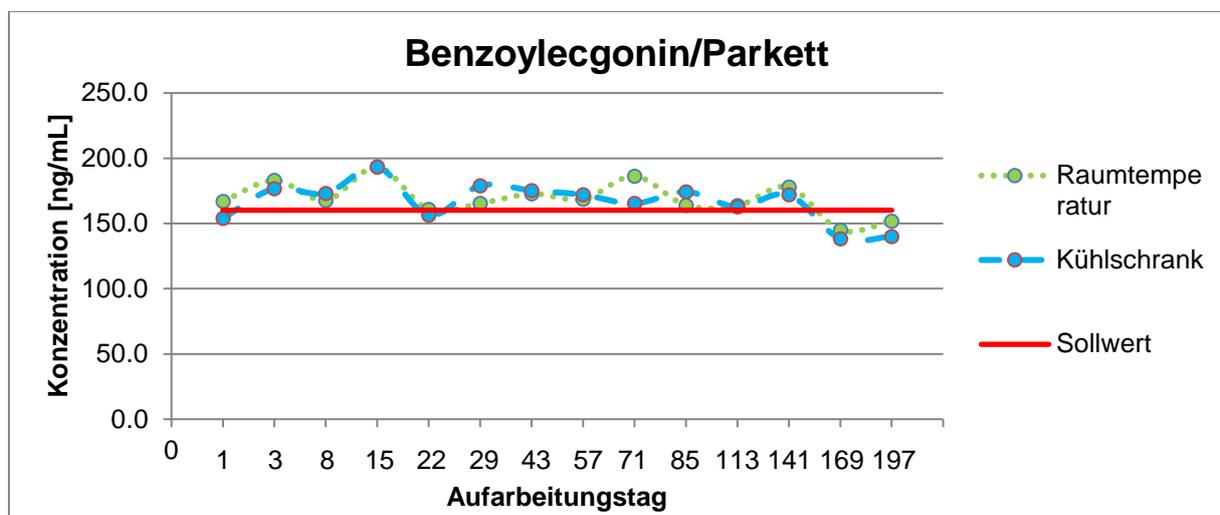


Abbildung 21: Konzentration von Benzoylecgonin auf Parkett über 6 Monate

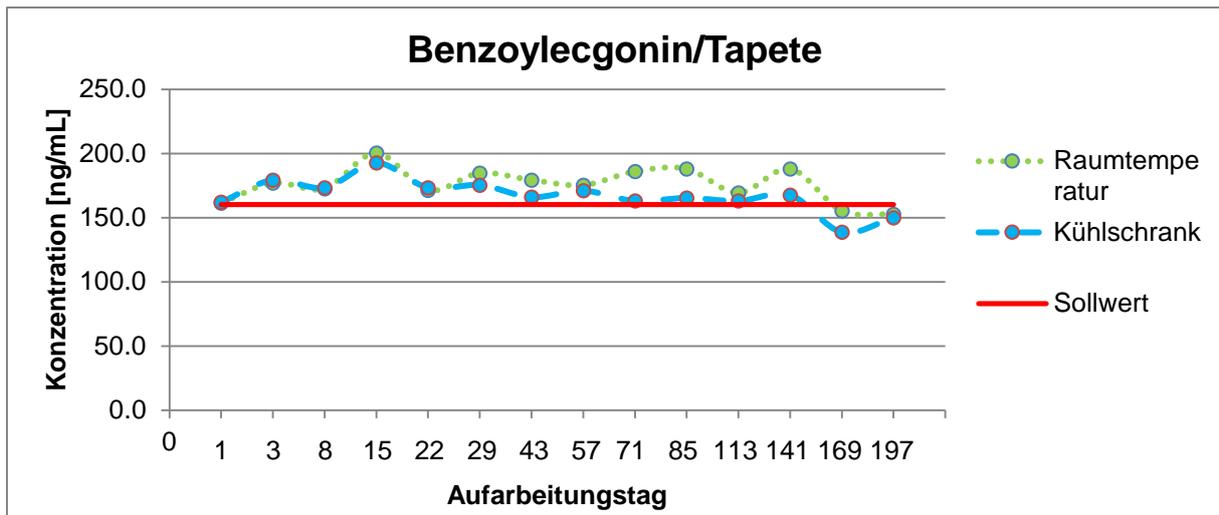


Abbildung 22: Konzentration von Benzoylecgonin auf Tapete über 6 Monate

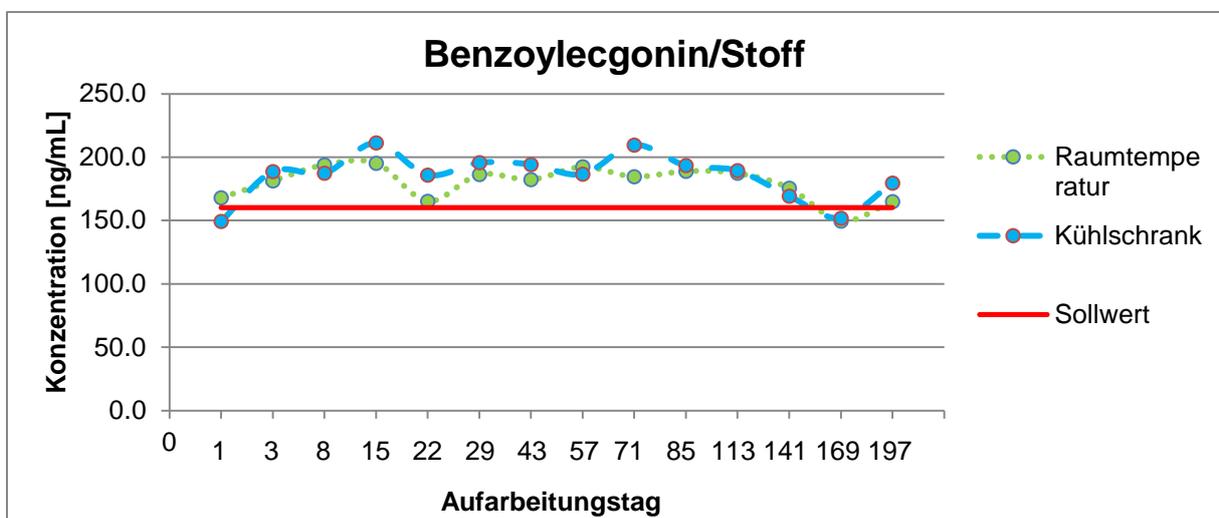


Abbildung 23: Konzentration von Benzoylecgonin auf Stoff über 6 Monate

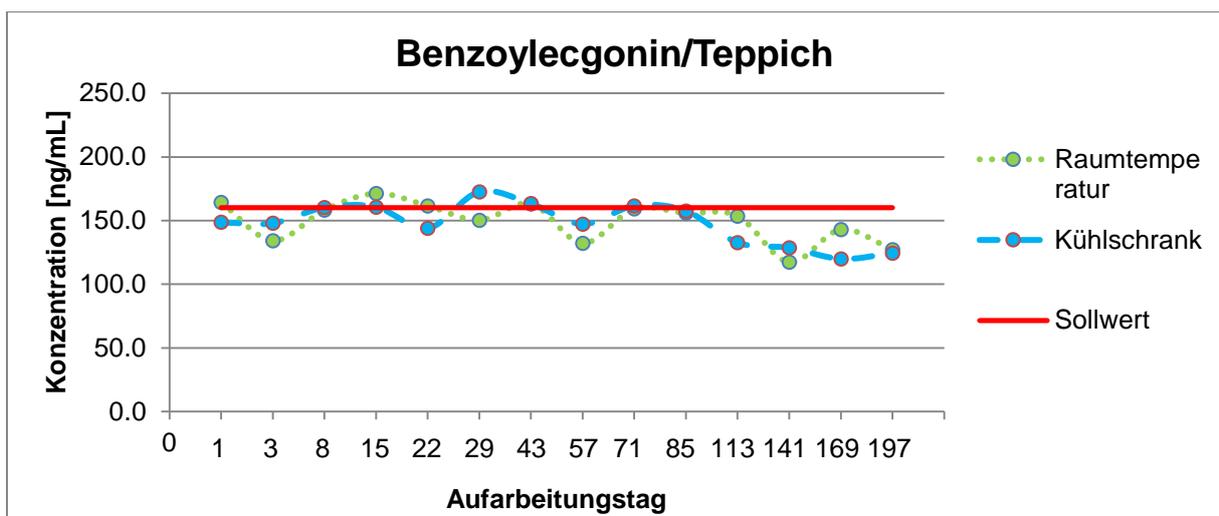


Abbildung 24: Konzentration von Benzoylecgonin auf Teppich über 6 Monate

- Methamphetamin

Für die quantitative Bestimmung von Methamphetamin steht mit Methamphetamin-D14 ebenfalls ein deuterierter interner Standard zur Verfügung. In den Diagrammen zeigen sich nur geringe Schwankungen um den Sollwert. Lediglich die vom Untergrundmaterial Teppich extrahierten Proben bilden hier eine Ausnahme. Die ermittelten Konzentrationen von Methamphetamin betragen hier unabhängig von der Lagerungstemperatur bereits zu Beginn der Studie etwa das Dreifache des bestimmten Sollwertes. Eindeutig ersichtlich ist aber auch hier, dass Methamphetamin über eine Lagerungszeit von sechs Monaten bei verschiedenen Temperaturen und auf allen fünf unterschiedlichen Untergrundmaterialien nachweisbar ist, bei vier davon in sehr guter Übereinstimmung mit dem dotierten Wert.

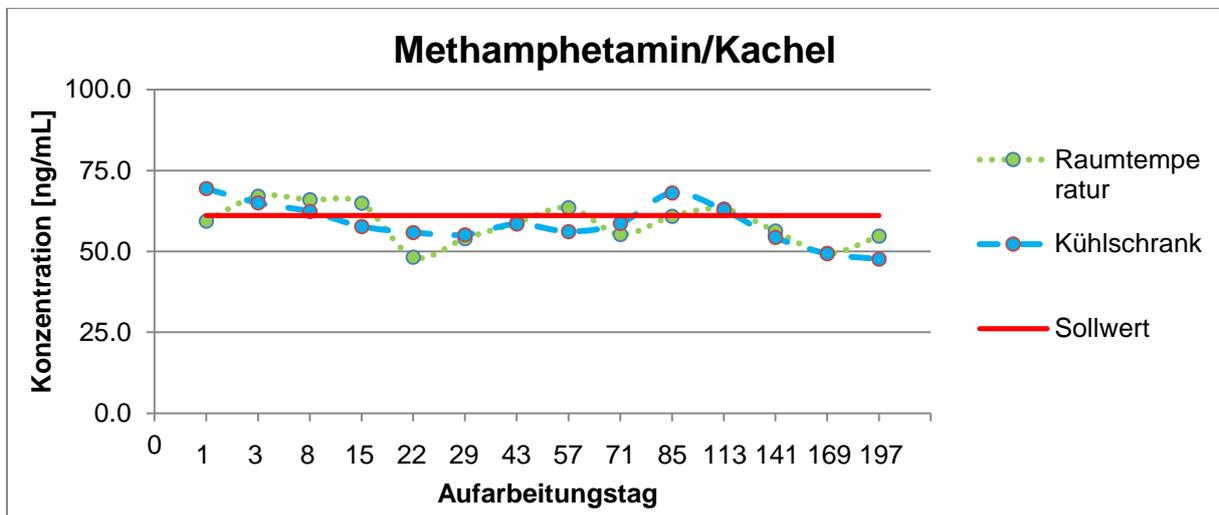


Abbildung 25: Konzentration von Methamphetamin auf Kachel über 6 Monate

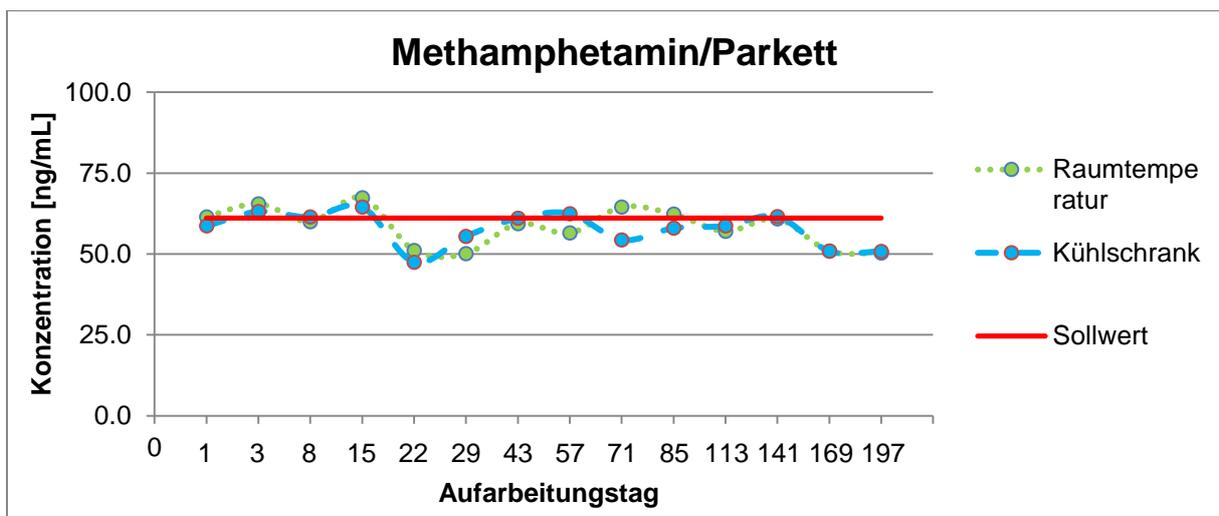


Abbildung 26: Konzentration von Methamphetamin auf Parkett über 6 Monate

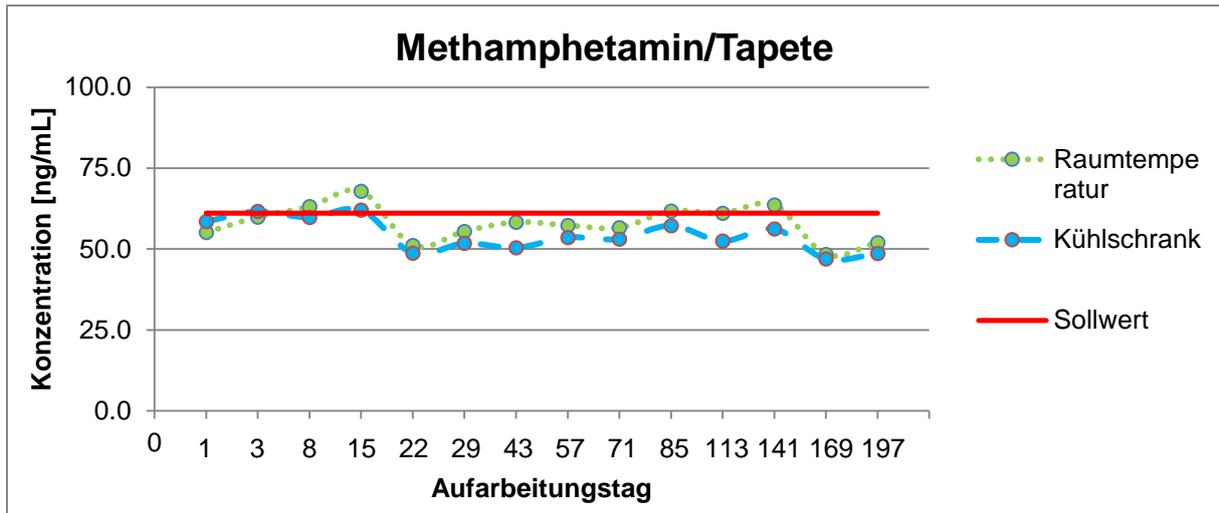


Abbildung 27: Konzentration von Methamphetamin auf Tapete über 6 Monate

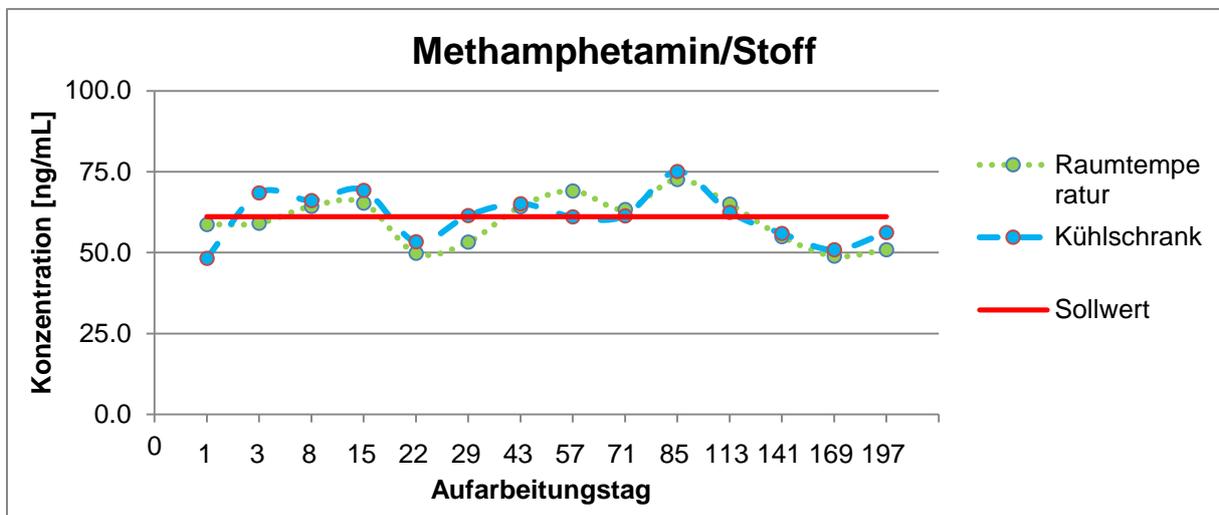


Abbildung 28: Konzentration von Methamphetamin auf Stoff über 6 Monate

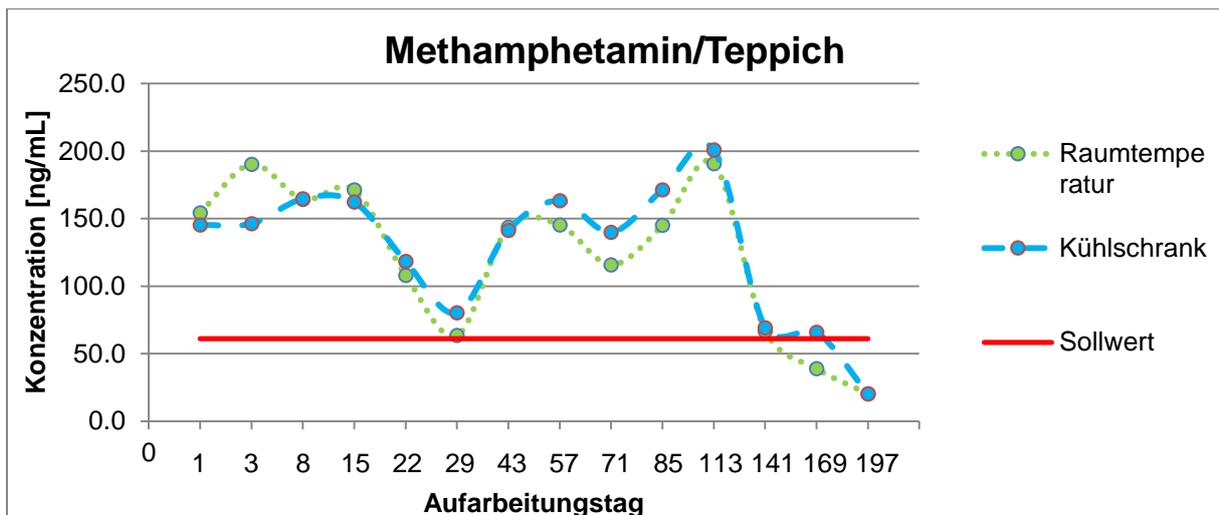


Abbildung 29: Konzentration von Methamphetamin auf Teppich über 6 Monate

- Morphin

Die quantitativen Werte für Morphin in der Langzeitstudie wurden durch Verwendung von Morphin-D3 zur Quantifizierung erhalten. Die so erhaltenen Werte der einzelnen Untersuchungstage schwanken in einem geringen Ausmaß (Extremwerte bei den vom Untergrundmaterial Stoff erhaltenen Ergebnissen zwischen 65 % bis 134 % des zu Beginn im Pool bestimmten Sollwerts). Wie aus den Diagrammen ersichtlich, war Morphin über den gesamten untersuchten Zeitraum auf allen Materialien bei beiden Temperaturen in der dotierten Größenordnung nachweisbar.

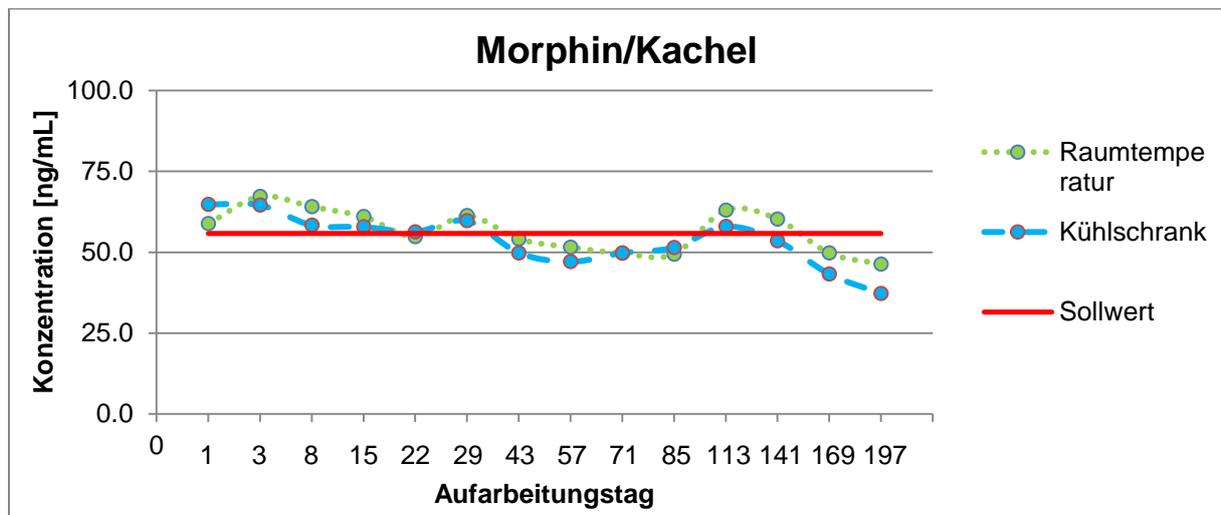


Abbildung 30: Konzentration von Morphin auf Kachel über 6 Monate

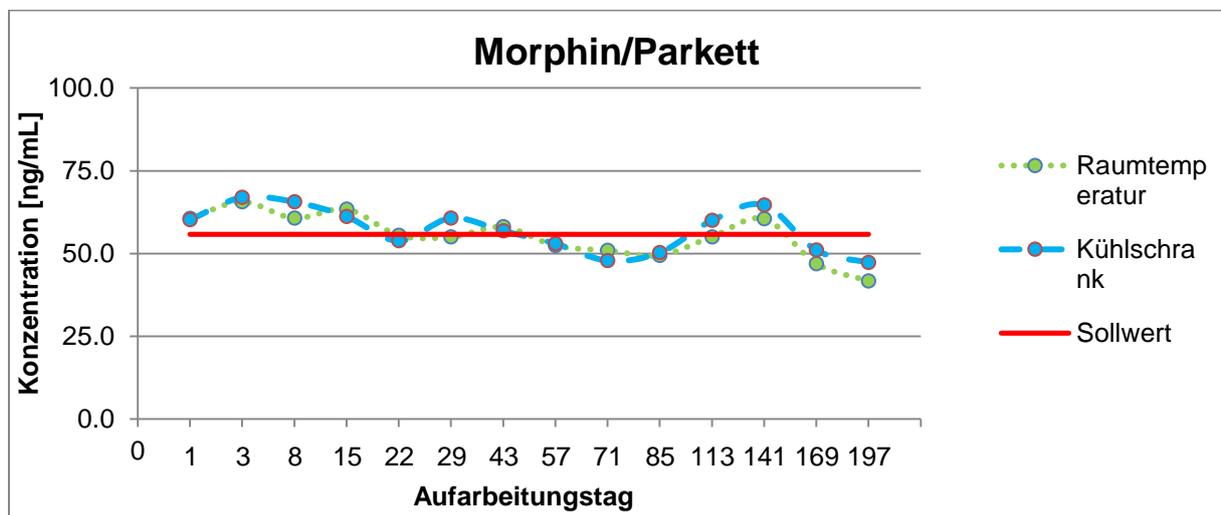


Abbildung 31: Konzentration von Morphin auf Parkett über 6 Monate

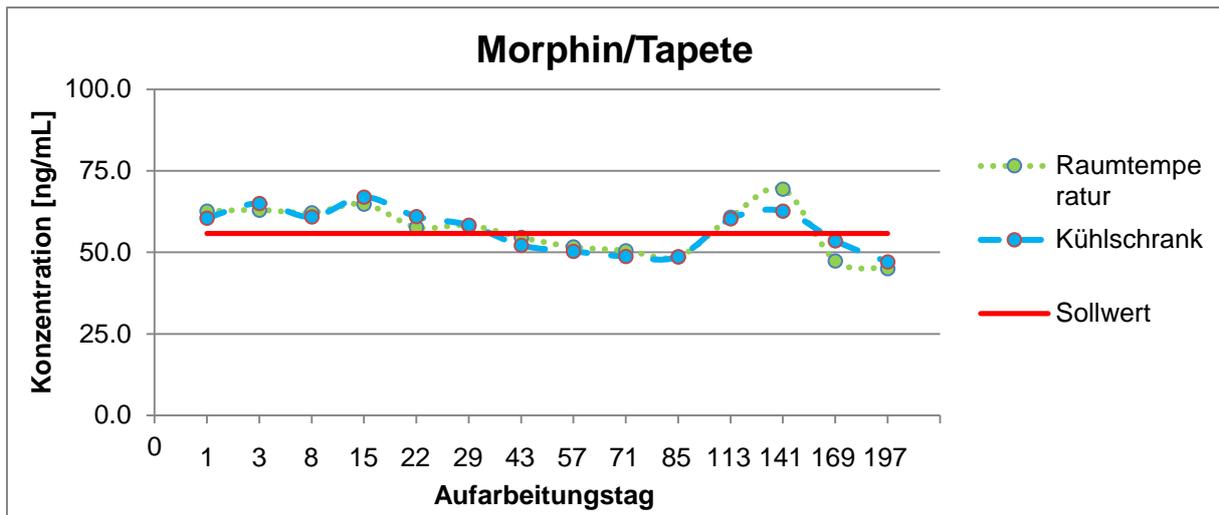


Abbildung 32: Konzentration von Morphin auf Tapete über 6 Monate

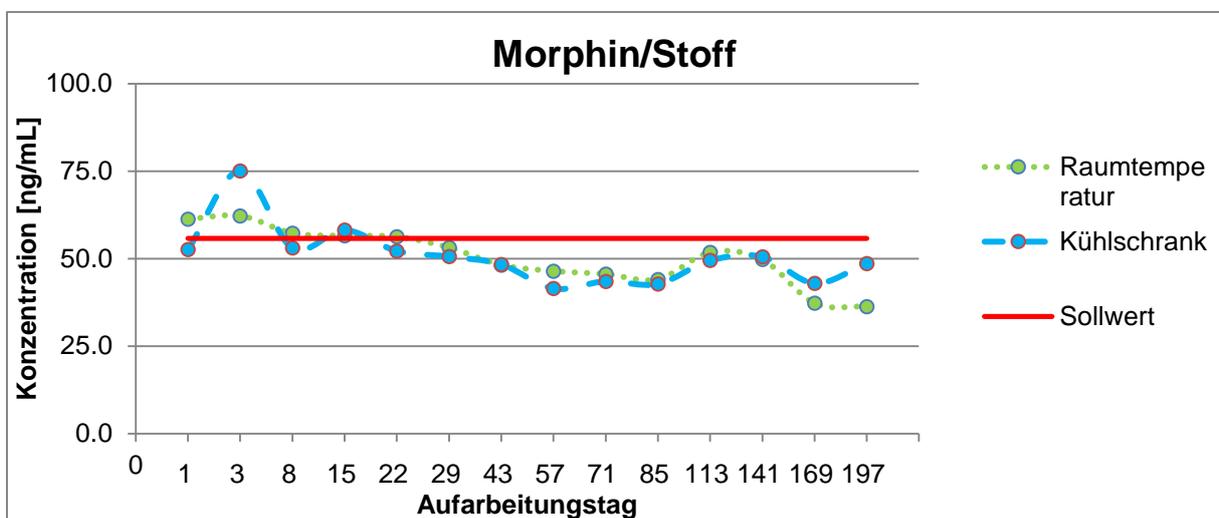


Abbildung 33: Konzentration von Morphin auf Stoff über 6 Monate

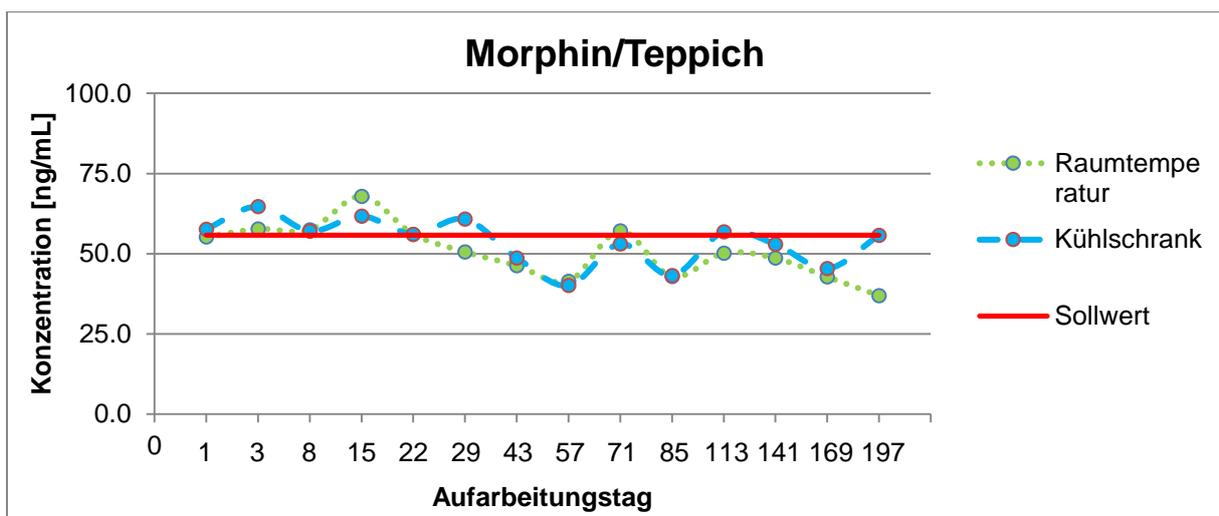


Abbildung 34: Konzentration von Morphin auf Teppich über 6 Monate

- Codein

Auch für Codein stand in der Langzeitstudie deuteriertes Codein-D3 zur Verfügung, über welches die quantitativen Werte bestimmt wurden. Die Diagramme (ausgenommen Teppich) zeigen eine sehr geringe Streuung um den Sollwert mit Maximalabweichungen zwischen 76,4 % (auf Stoff) und 121 % (auf Kachel). Lediglich die Ergebnisse der auf Teppich getrockneten Blutproben zeigen einen leicht abfallenden Kurvenverlauf (Minimalwert 51,8 % vom Sollwert). Auf allen hier untersuchten Untergrundmaterialien ist Codein innerhalb der sechsmonatigen Lagerung bei beiden Temperaturen in der zugesetzten Größenordnung nachweisbar.

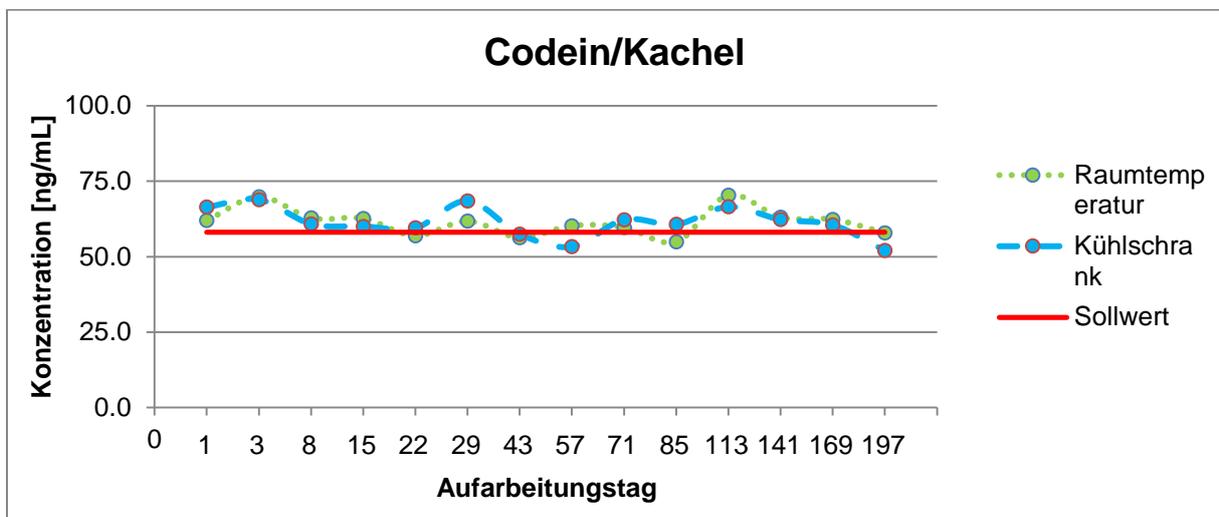


Abbildung 35: Konzentration von Codein auf Kachel über 6 Monate

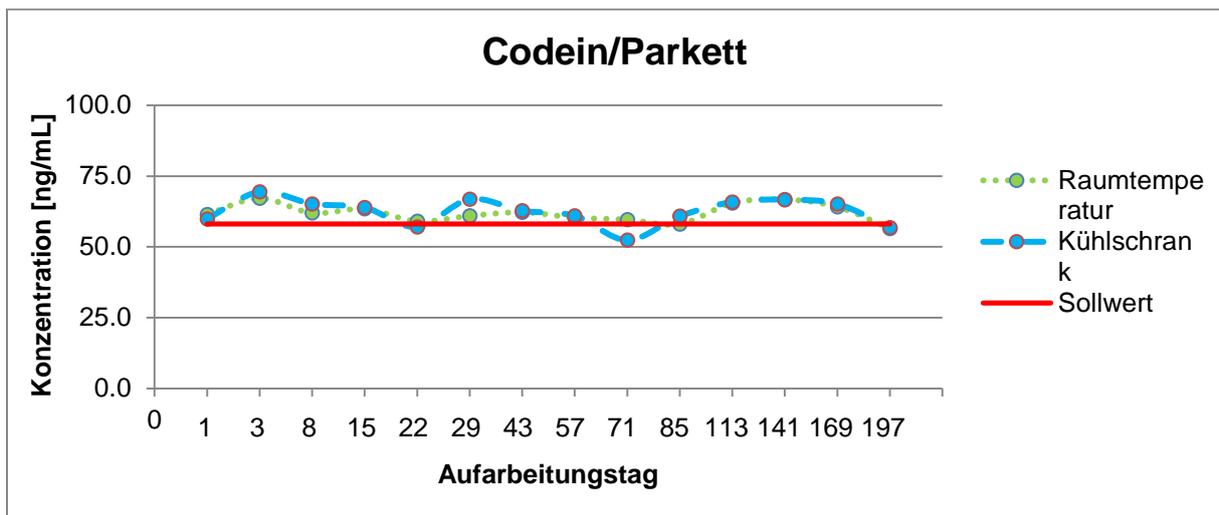


Abbildung 36: Konzentration von Codein auf Parkett über 6 Monate

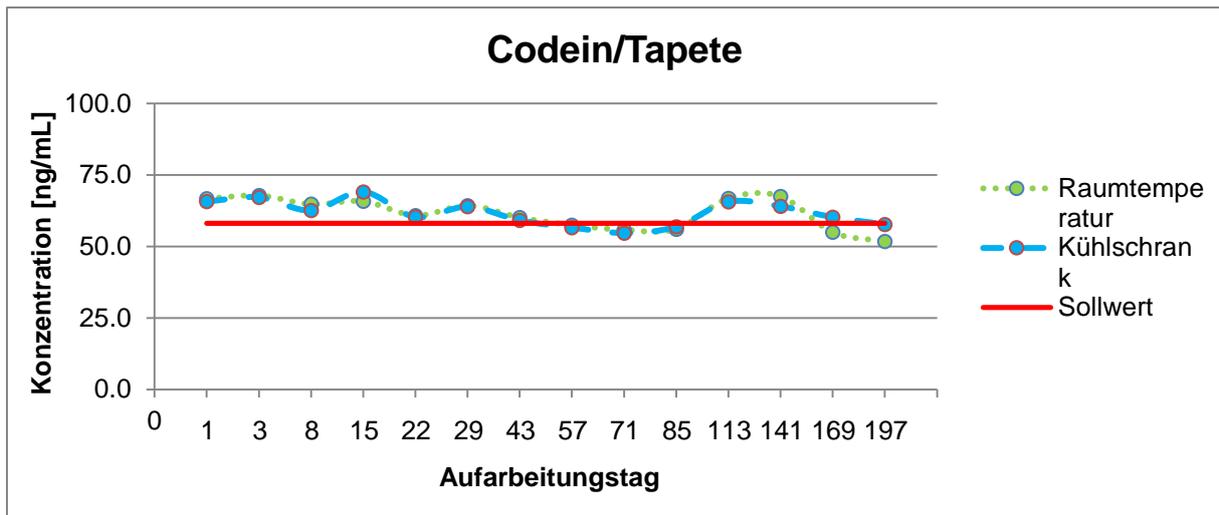


Abbildung 37: Konzentration von Codein auf Tapete über 6 Monate

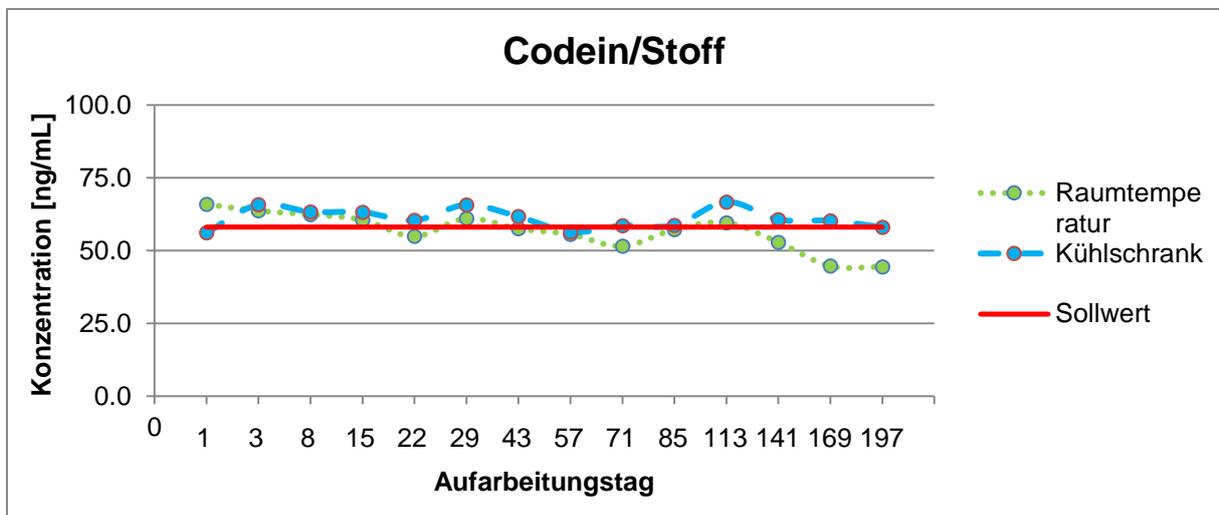


Abbildung 38: Konzentration von Codein auf Stoff über 6 Monate

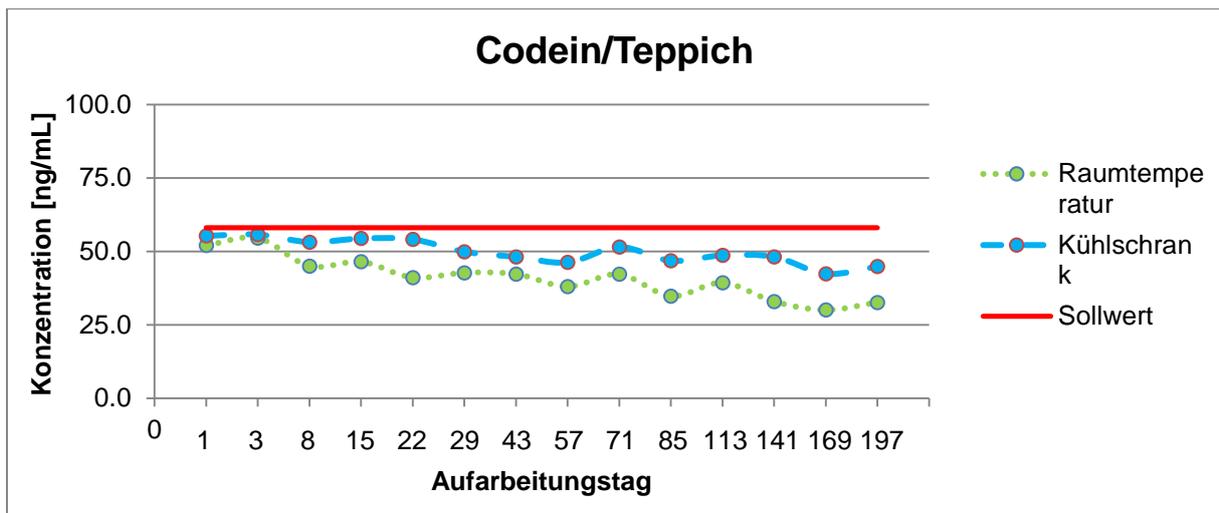


Abbildung 39: Konzentration von Codein auf Teppich über 6 Monate

- Methodon

Bei Methadon wurde ebenfalls ein deuterierter interner Standard (Methadon-D3) für die Quantifizierung verwendet. Bei den Untergrundmaterialien Tapete und Teppich sind die gemessenen Konzentrationen jeweils deutlich unterhalb des dotierten Sollwertes (bis zu einem Messwert auf Teppich der lediglich 38,4 % vom Sollwert betrug). Die Schwankungen der anderen Untergrundmaterialien zwischen den Aufarbeitungstagen sind gering (zwischen 57,4 % (Stoff) und 122 % (Kachel) vom Sollwert). Auch Methadon war über den Zeitraum von sechs Monaten stabil und ließ sich am Ende der Studie auf allen hier untersuchten Untergrundmaterialien bei beiden untersuchten Temperaturen nachweisen.

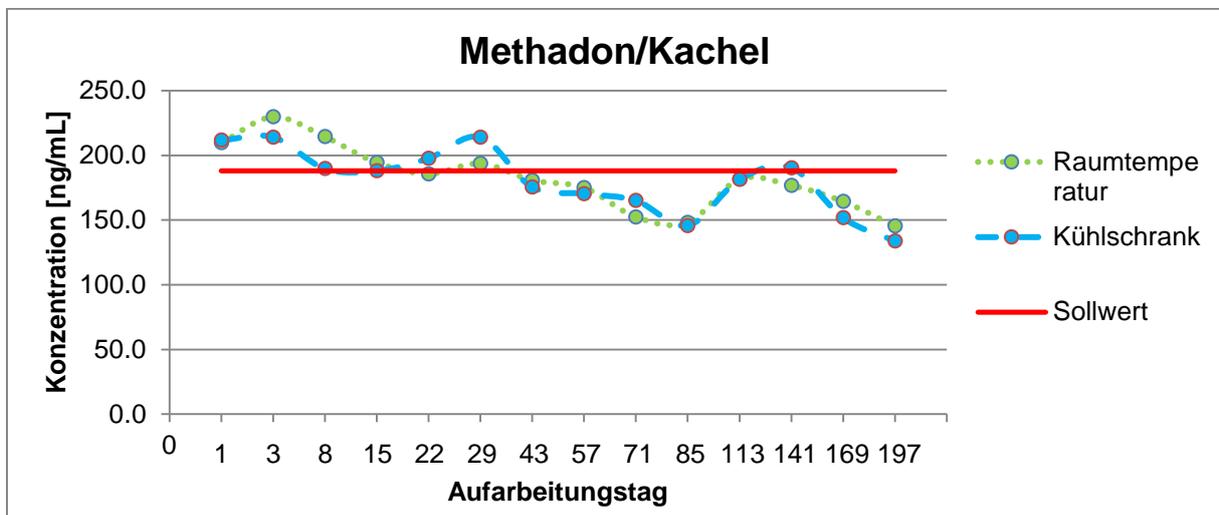


Abbildung 40: Konzentration von Methadon auf Kachel über 6 Monate

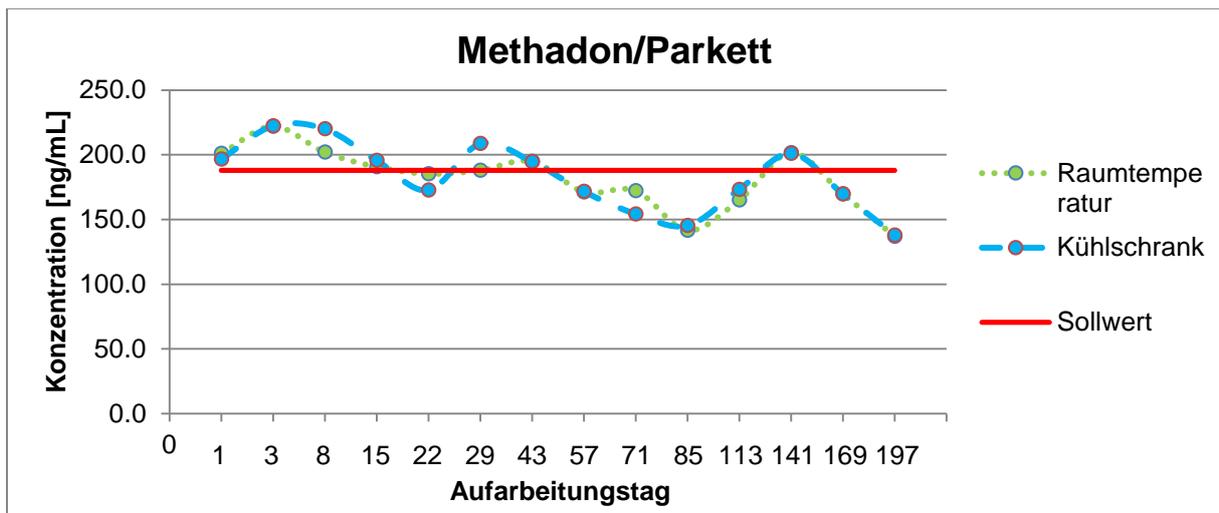


Abbildung 41: Konzentration von Methadon auf Parkett über 6 Monate

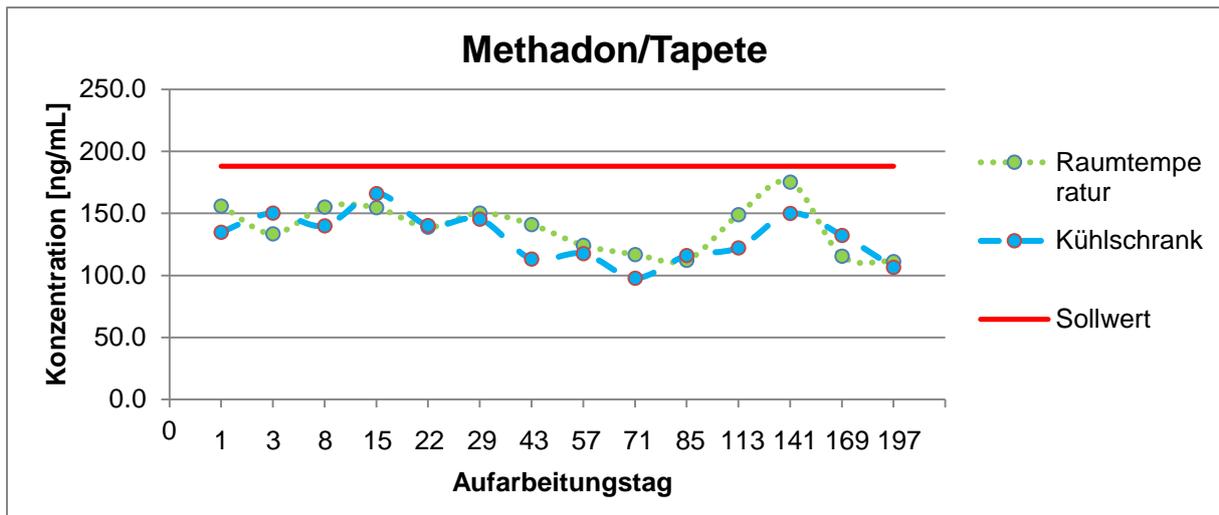


Abbildung 42: Konzentration von Methadon auf Tapete über 6 Monate

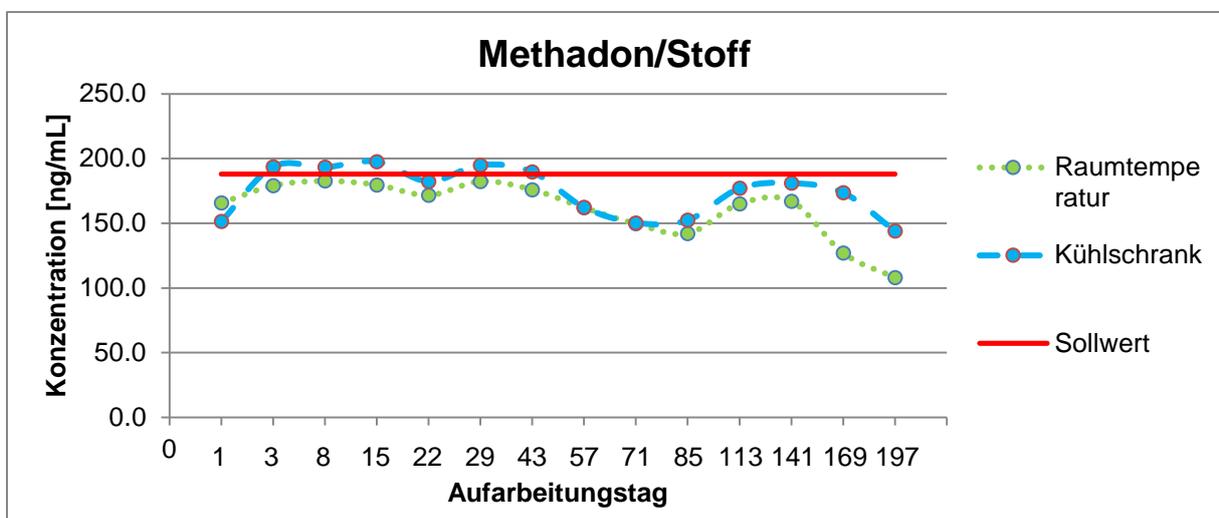


Abbildung 43: Konzentration von Methadon auf Stoff über 6 Monate

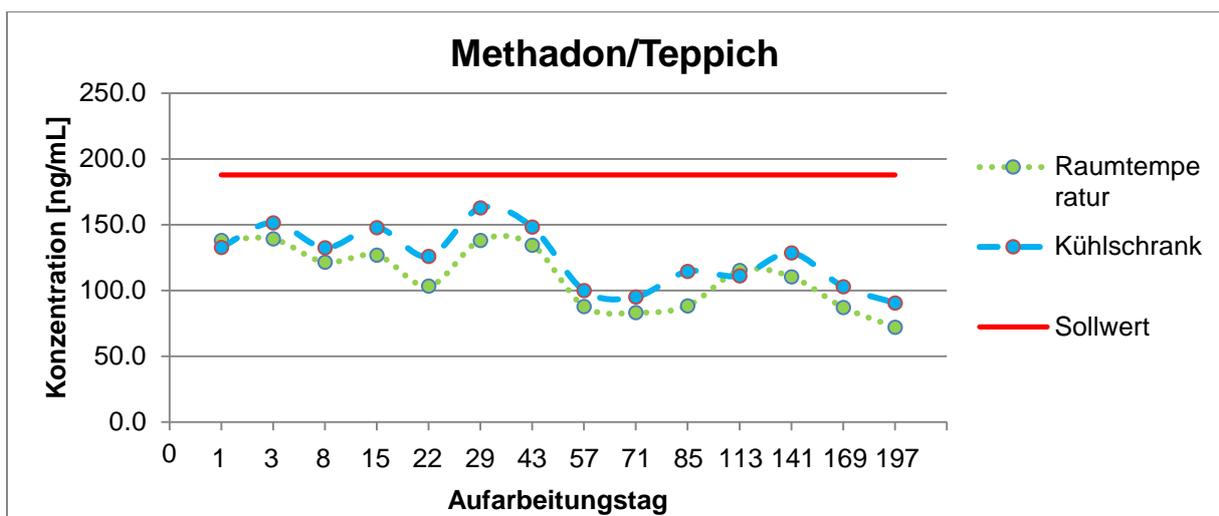


Abbildung 44: Konzentration von Methadon auf Teppich über 6 Monate

- Fentanyl

Auch das Opioid Fentanyl wurde mit einem eigenen deuterierten internen Standard quantifiziert (Fentanyl-D5). Die Diagramme (ausgenommen Teppich) zeigen geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Aufarbeitungstagen (Extremwerte zwischen 52,2 % (Parkett) und 112 % (Kachel) vom Sollwert), die berechneten Werte für das Untergrundmaterial Teppich sind, bezogen auf den Sollwert konstant zu niedrig (zwischen 54,3 % und 74,3 % vom Sollwert). Insgesamt ließ sich Fentanyl über den Zeitraum von sechs Monaten auf allen Untergrundmaterialien bei beiden Temperaturen in relativ konstanter Konzentration nachweisen.

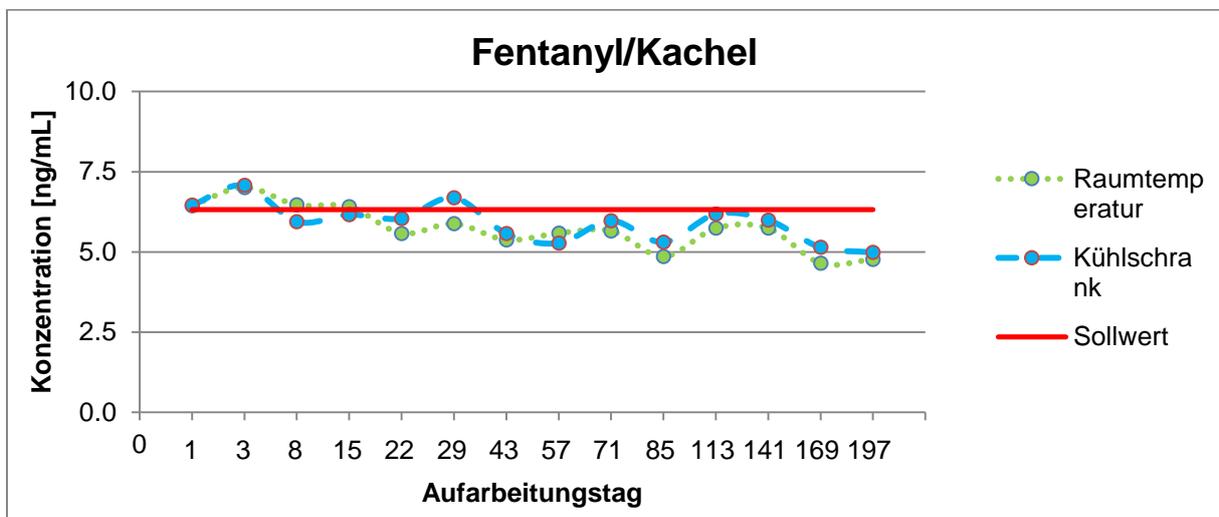


Abbildung 45: Konzentration von Fentanyl auf Kachel über 6 Monate

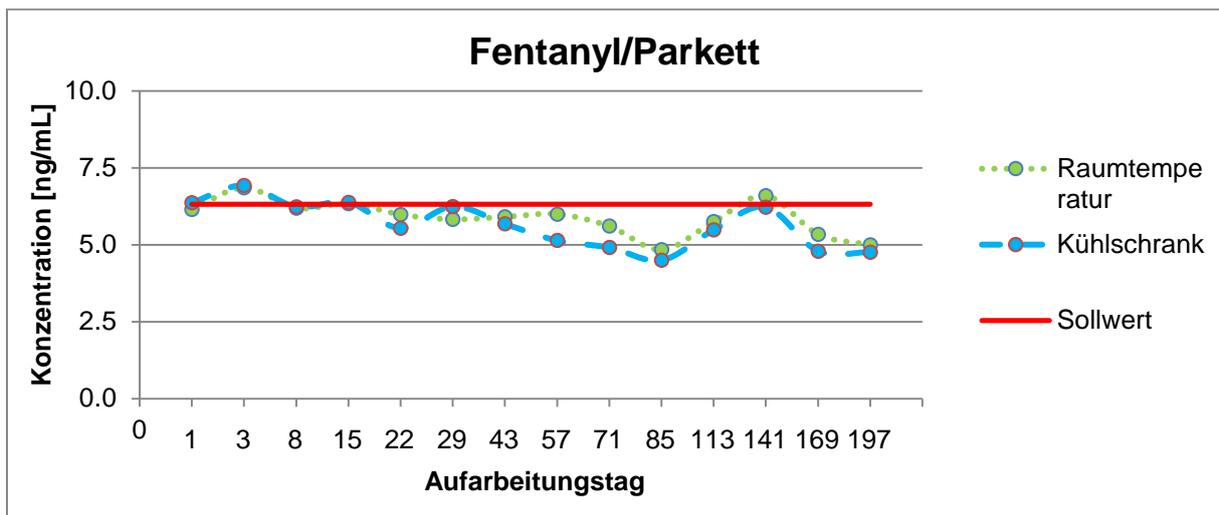


Abbildung 46: Konzentration von Fentanyl auf Parkett über 6 Monate

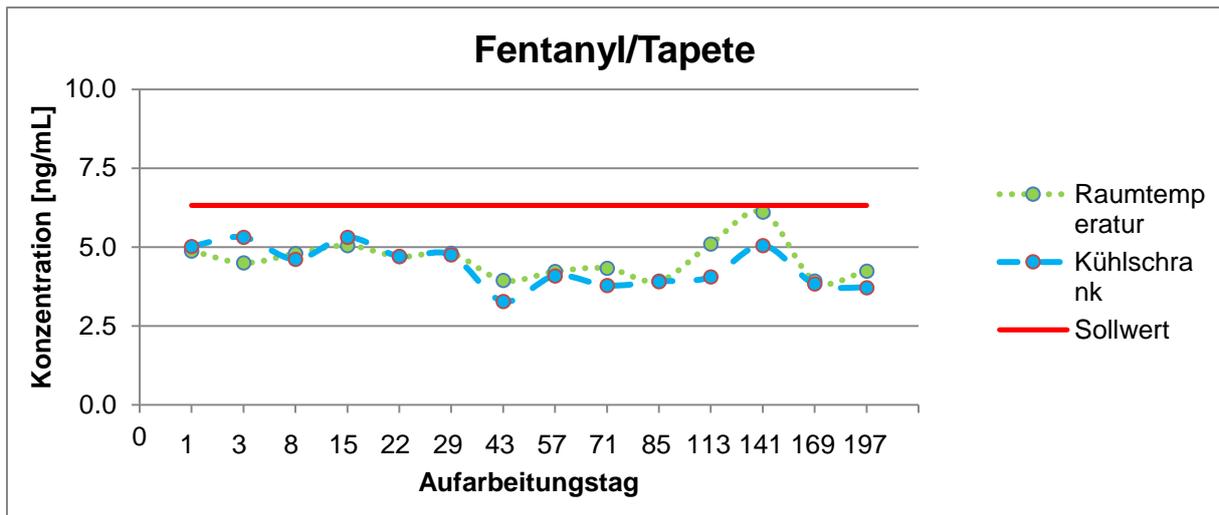


Abbildung 47: Konzentration von Fentanyl auf Tapete über 6 Monate

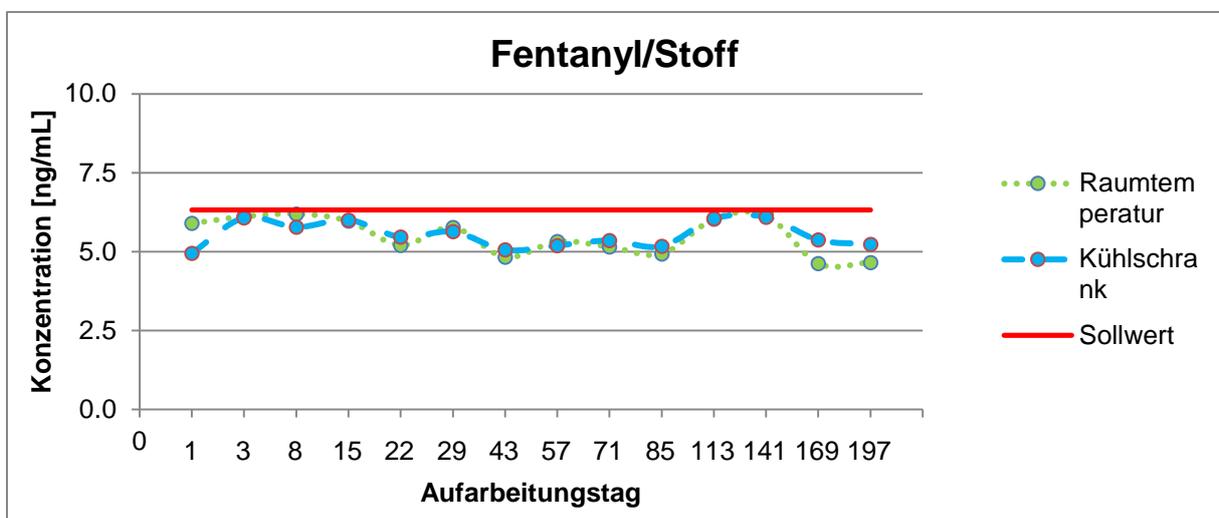


Abbildung 48: Konzentration von Fentanyl auf Stoff über 6 Monate

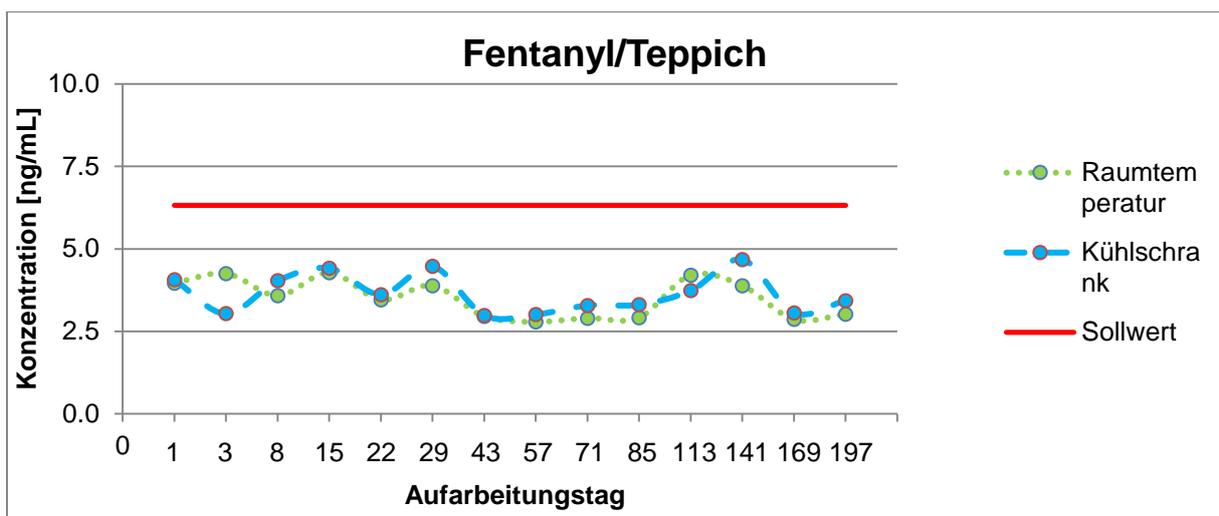


Abbildung 49: Konzentration von Fentanyl auf Teppich über 6 Monate

- Nordazepam

Für Nordazepam lag zur Quantifizierung in der Studie mit Nordazepam-D5 ein eigener interner Standard vor. Die Werte schwanken gering um den Sollwert (Extremwerte vom Untergrundmaterial Teppich zwischen 64,2 % und 127 % vom Sollwert). Auch Nordazepam ließ sich über den Zeitraum von sechs Monaten auf allen untersuchten Untergrundmaterialien und bei beiden Temperaturen sicher nachweisen.

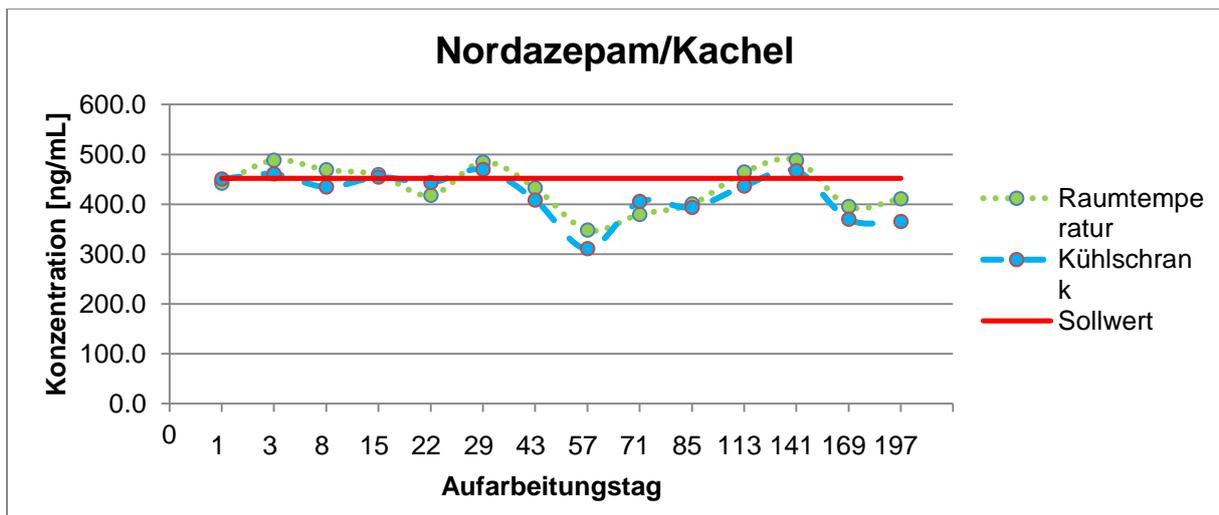


Abbildung 50: Konzentration von Nordazepam auf Kachel über 6 Monate

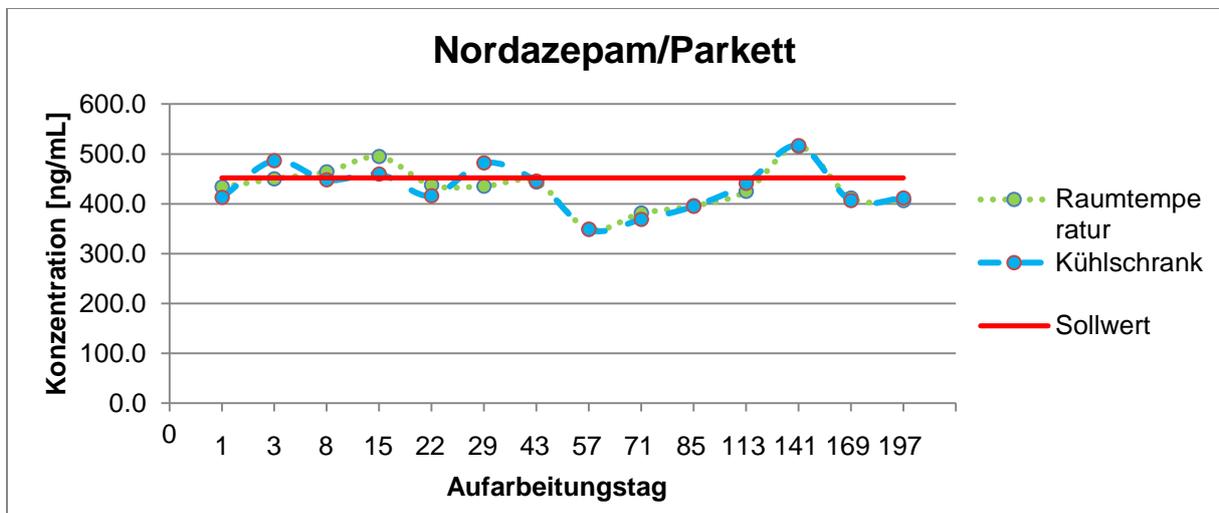


Abbildung 51: Konzentration von Nordazepam auf Parkett über 6 Monate

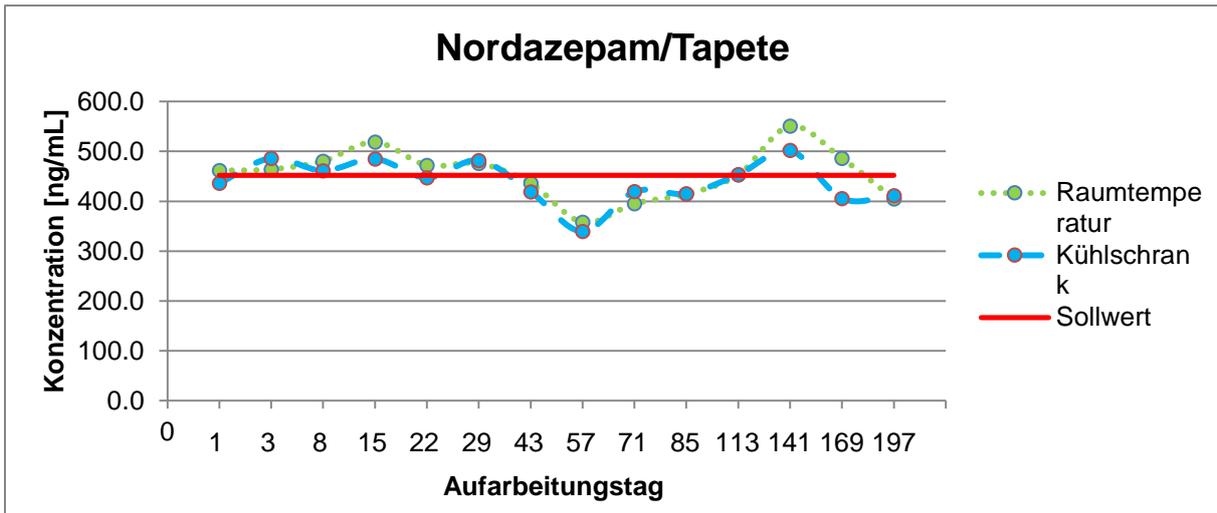


Abbildung 52 Konzentration von Nordazepam auf Tapete über 6 Monate

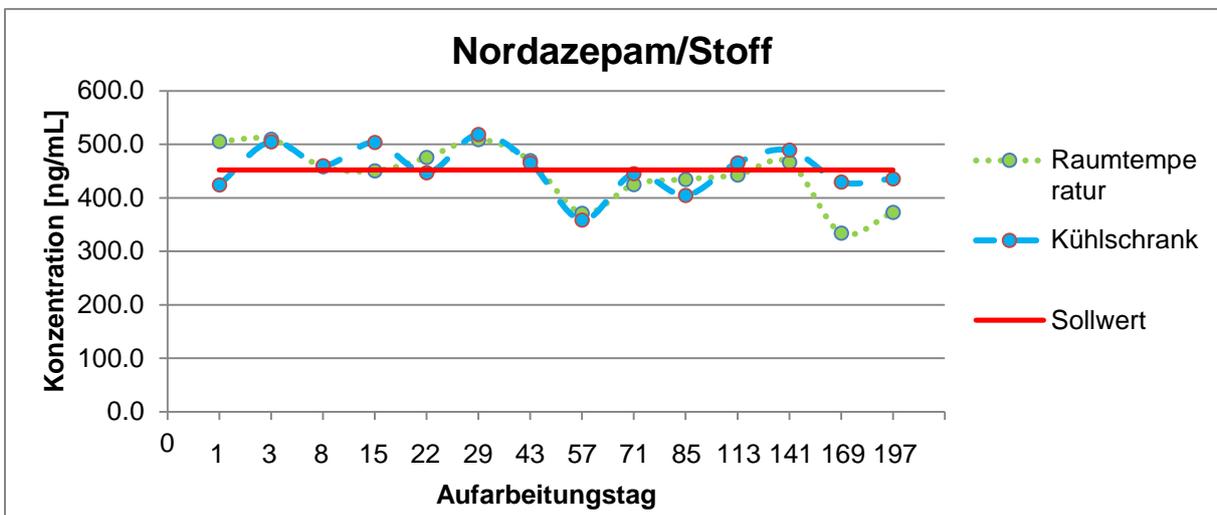


Abbildung 53: Konzentration von Nordazepam auf Stoff über 6 Monate

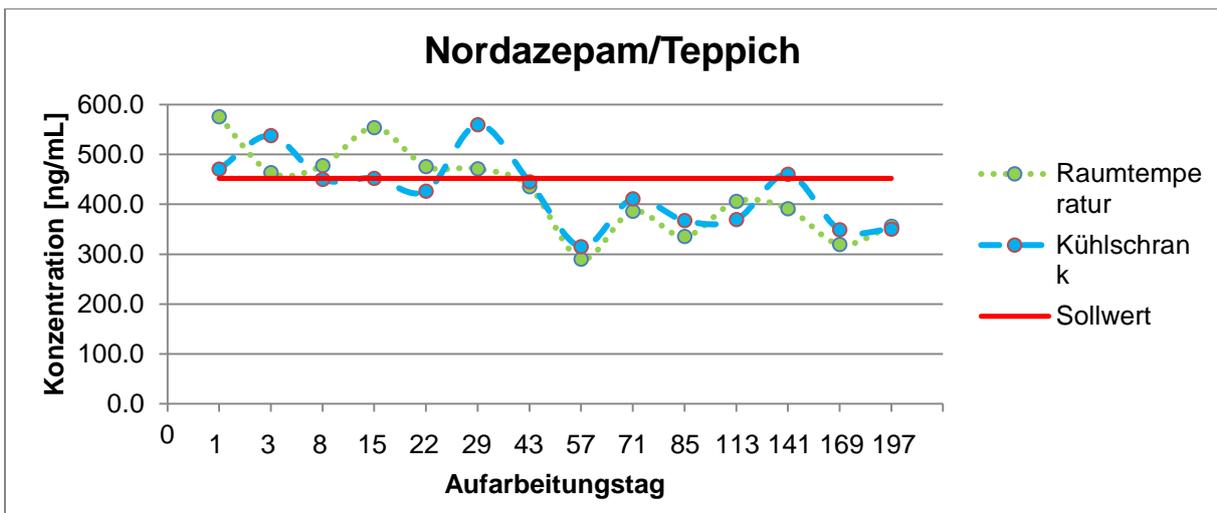


Abbildung 54: Konzentration von Nordazepam auf Teppich über 6 Monate

- Lorazepam

Lorazepam ist der erste hier aufgeführte Analyt aus der Langzeitstudie, der nicht mit einem eigenen internen Standard quantifiziert wurde, sondern über das strukturähnliche Diazepam-D5. Die Schwankungen innerhalb der einzelnen Untergrundmaterialien sind deutlich größer als bei den bisher vorgestellten Analyten. Auch die Abweichung der Werte vom Sollwert ist teilweise sehr groß (vor allem bei den Proben vom Untergrundmaterial Teppich ersichtlich mit maximalen Werten zwischen 68,4 % und 1120 % vom Sollwert). Unabhängig davon ist Lorazepam nach sechsmonatiger Lagerung auf allen untersuchten Materialien bei beiden Temperaturen stabil und nachweisbar.

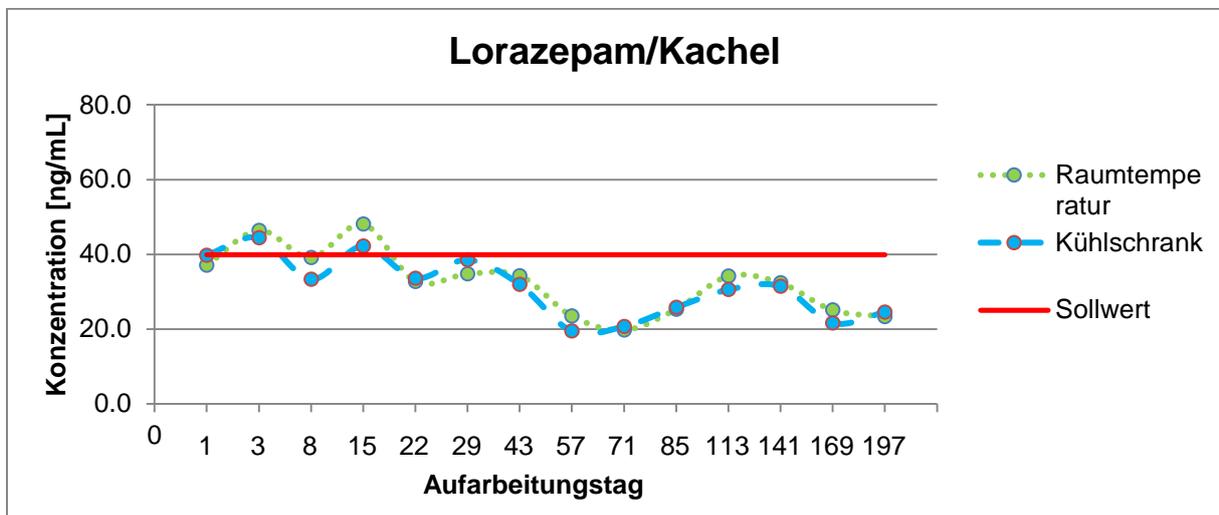


Abbildung 55: Konzentration von Lorazepam auf Kachel über 6 Monate

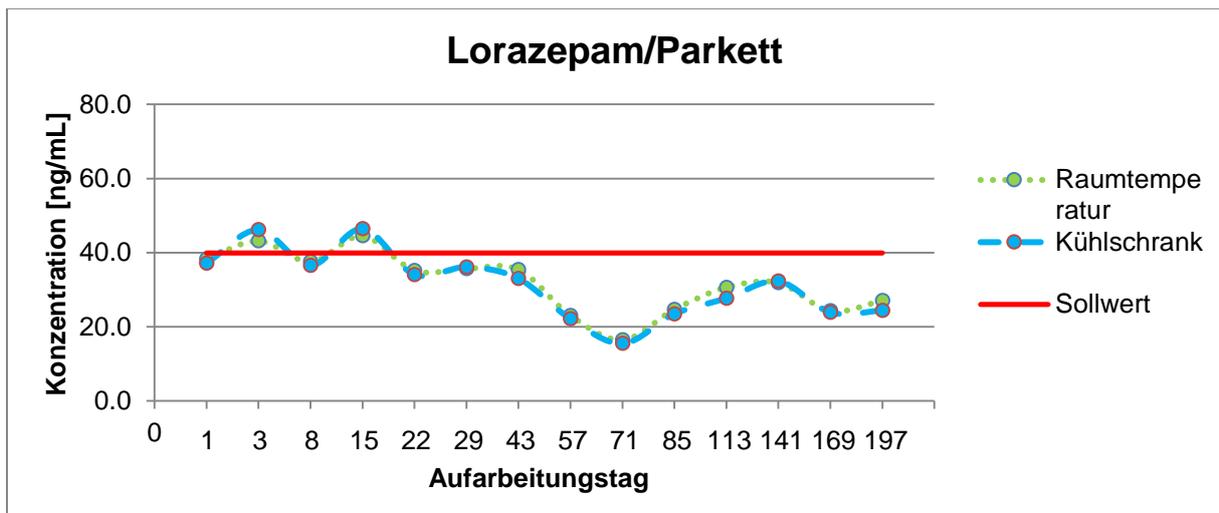


Abbildung 56: Konzentration von Lorazepam auf Parkett über 6 Monate

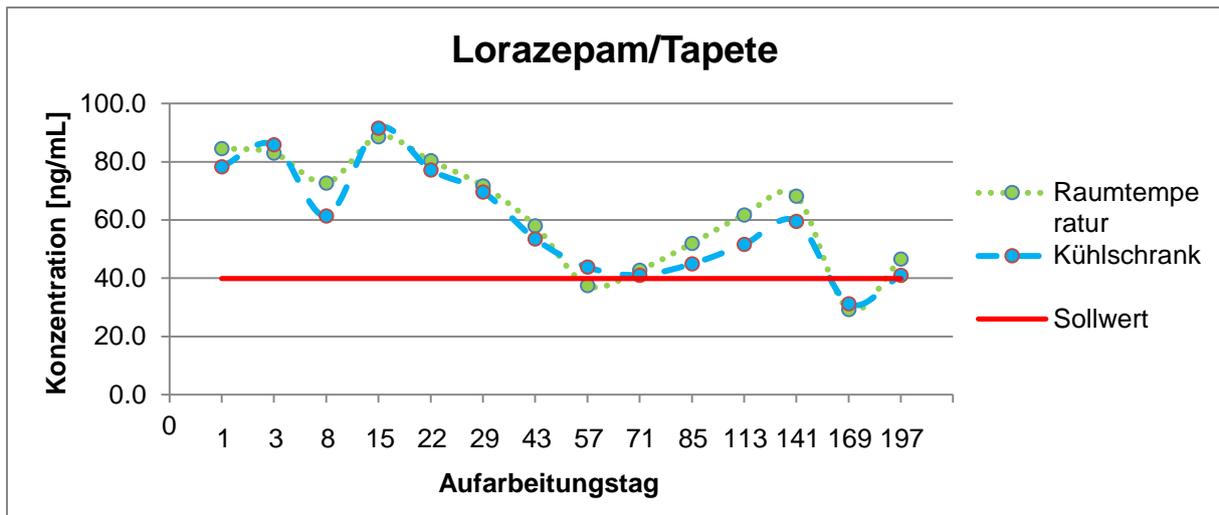


Abbildung 57: Konzentration von Lorazepam auf Tapete über 6 Monate

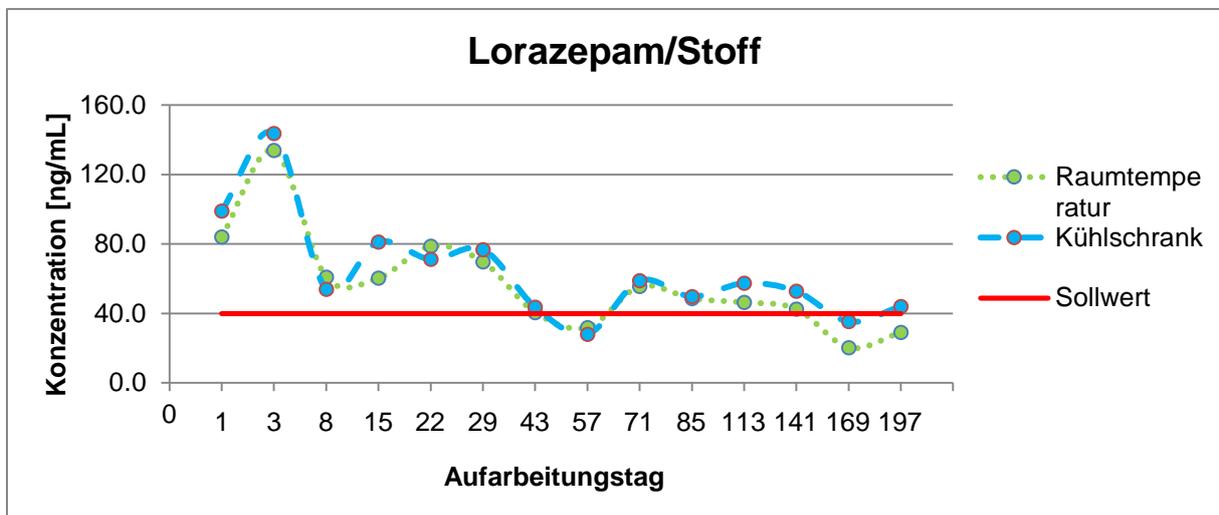


Abbildung 58: Konzentration von Lorazepam auf Stoff über 6 Monate

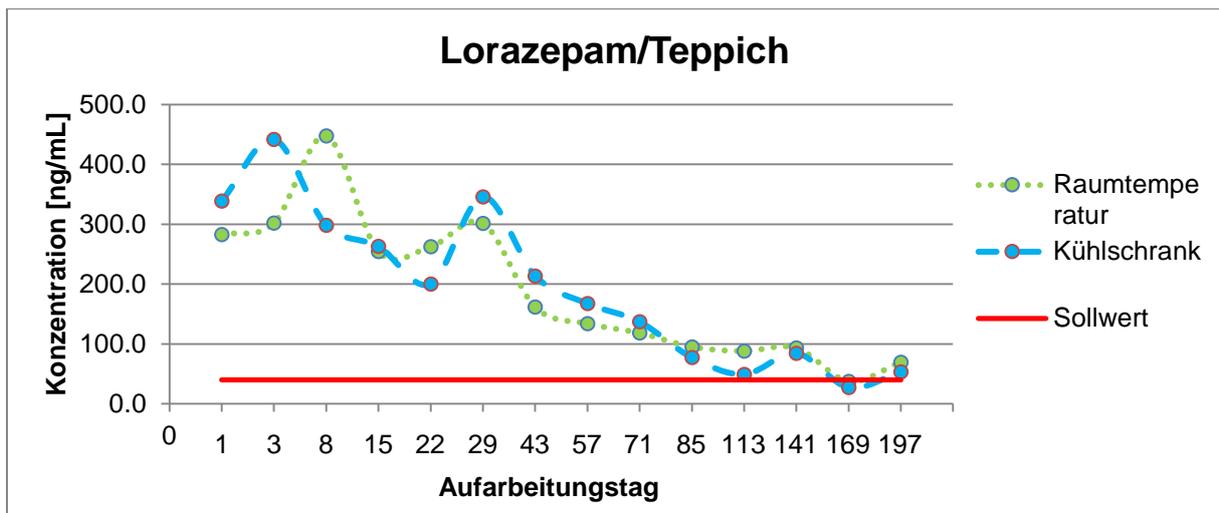


Abbildung 59: Konzentration von Lorazepam auf Teppich über 6 Monate

- Zolpidem

Für die Quantifizierung von Zolpidem lag mit Zolpidem-D6 ein deuterierter interner Standard vor. Die Werte streuen bei allen Materialien über den untersuchten Zeitraum jedoch - insbesondere in ihren negativen Tendenzen - deutlicher um den Sollwert (Extremwerte auf dem Untergrundmaterial Teppich zwischen 38,0 % und 120 % vom Sollwert), als beispielsweise bei Benzoyllecgonin oder Morphin. Während der sechsmonatigen Lagerung bei zwei verschiedenen Temperaturen ist Zolpidem in getrockneten Blutproben auf allen fünf Materialien nachweisbar.

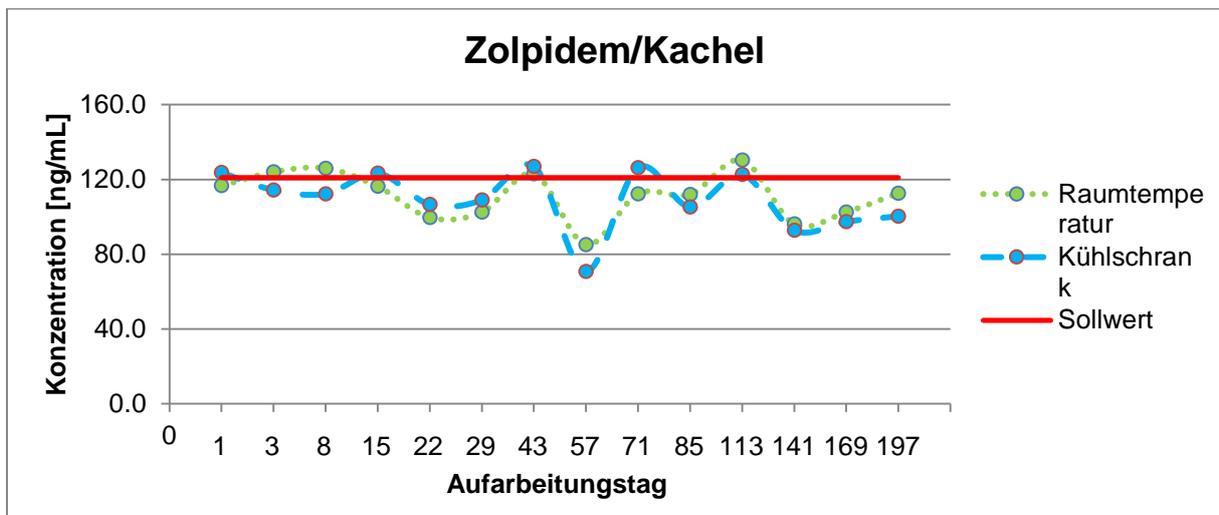


Abbildung 60: Konzentration von Zolpidem auf Kachel über 6 Monate

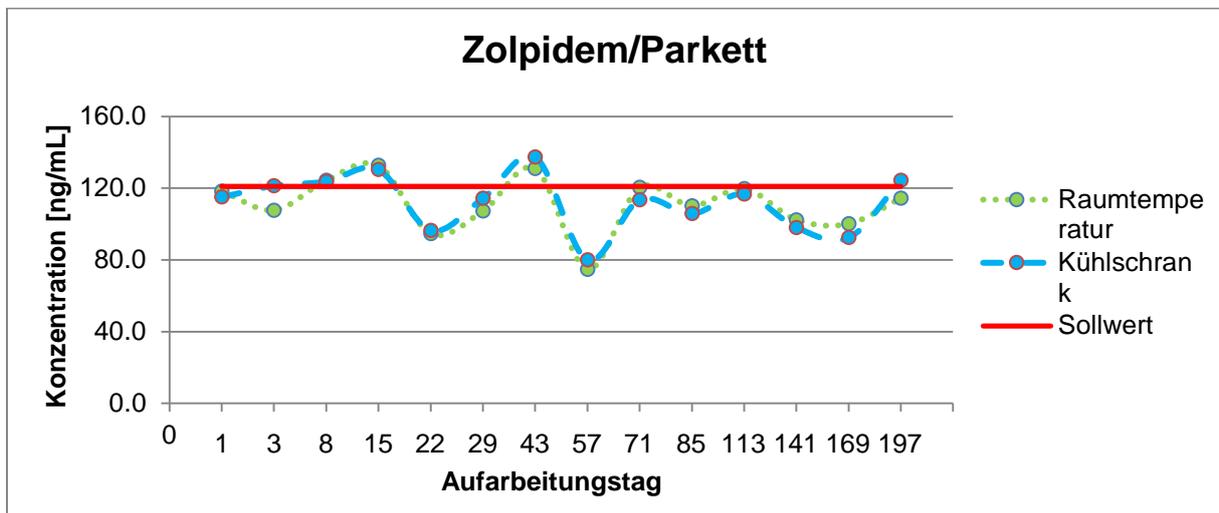


Abbildung 61: Konzentration von Zolpidem auf Parkett über 6 Monate

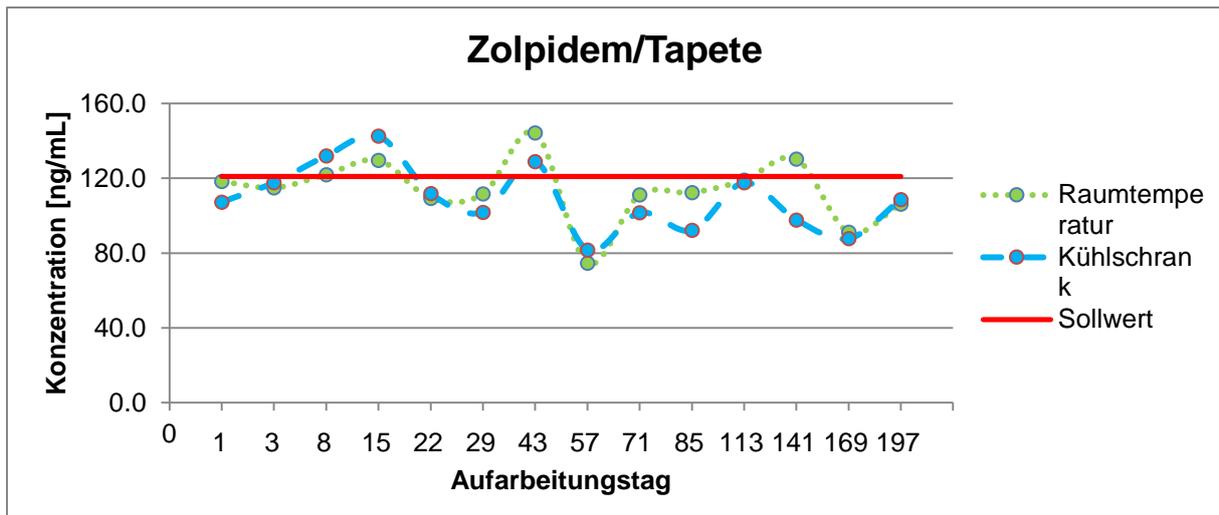


Abbildung 62: Konzentration von Zolpidem auf Tapete über 6 Monate

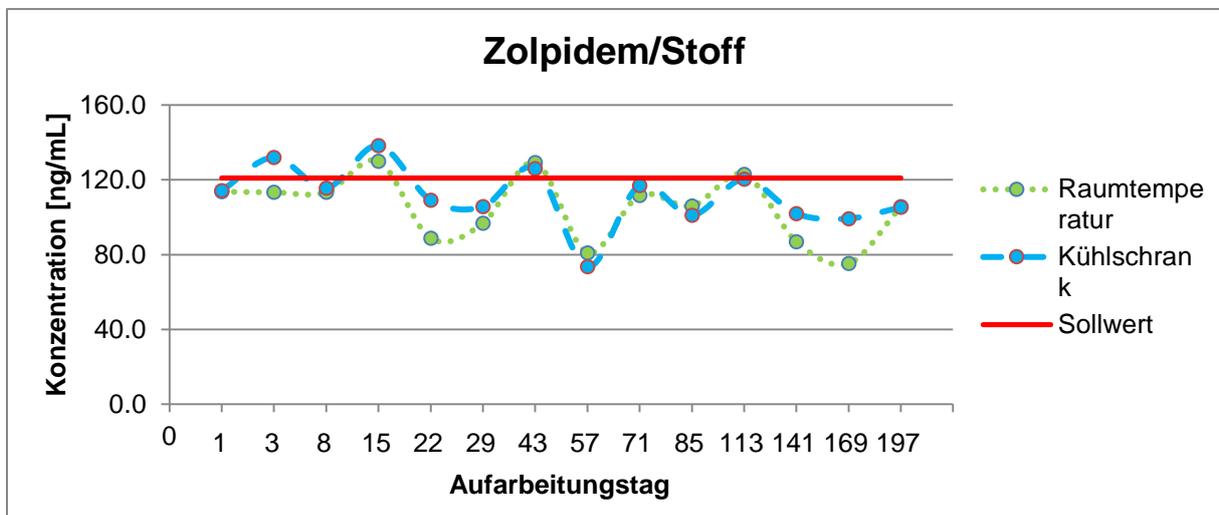


Abbildung 63: Konzentration von Zolpidem auf Stoff über 6 Monate

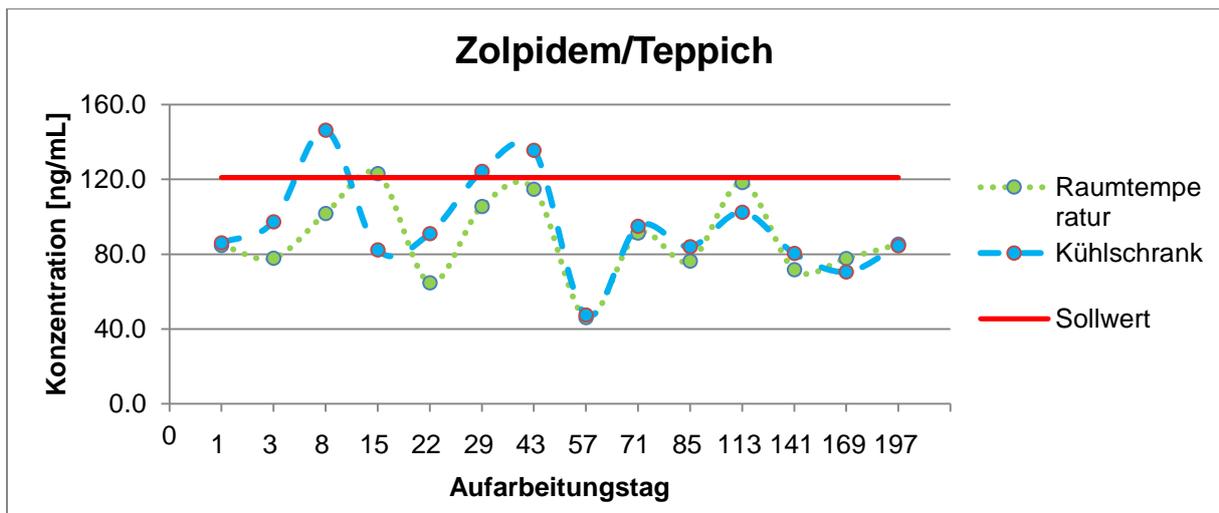


Abbildung 64: Konzentration von Zolpidem auf Teppich über 6 Monate

- Diphenhydramin

Diphenhydramin ist der erste der hier aufgeführten Analyten, der mithilfe von MPPH als internem Standard quantifiziert wird. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Untersuchungstagen zeigen bei beiden Temperaturen pro Untergrundmaterial gleiche Tendenzen. Die erhaltenen Werte liegen bereits zu Beginn der Studie bei einigen Materialien (Tapete, Stoff, Teppich) oberhalb des dotierten Sollwertes (bis zu maximal 571 % vom Sollwert auf Stoff). Unabhängig davon war Diphenhydramin über den untersuchten Zeitraum von sechs Monaten auf allen fünf hier untersuchten Untergrundmaterialien bei beiden Temperaturen nachweisbar.

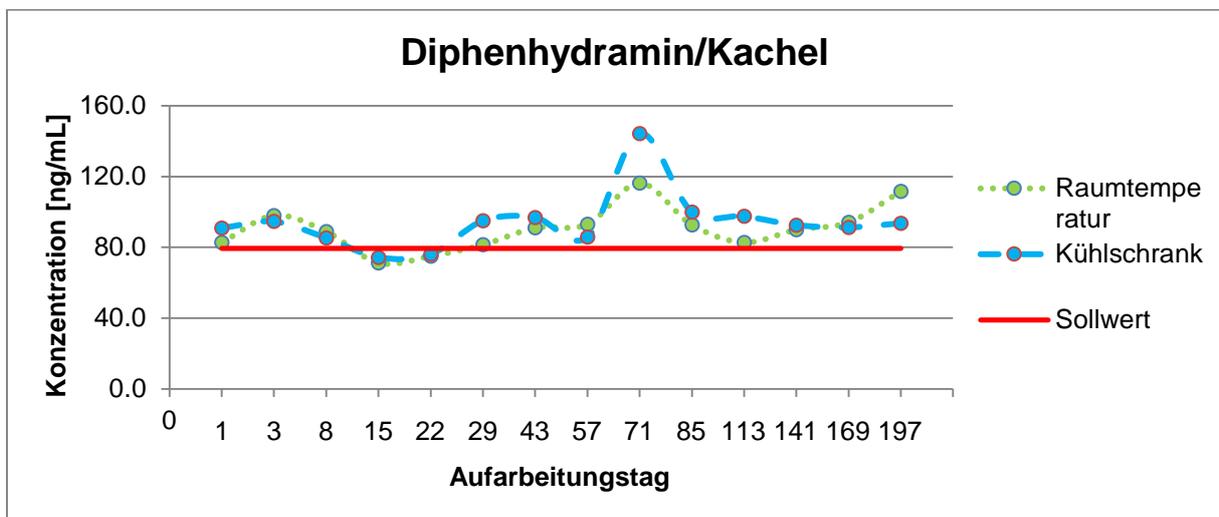


Abbildung 65: Konzentration von Diphenhydramin auf Kachel über 6 Monate

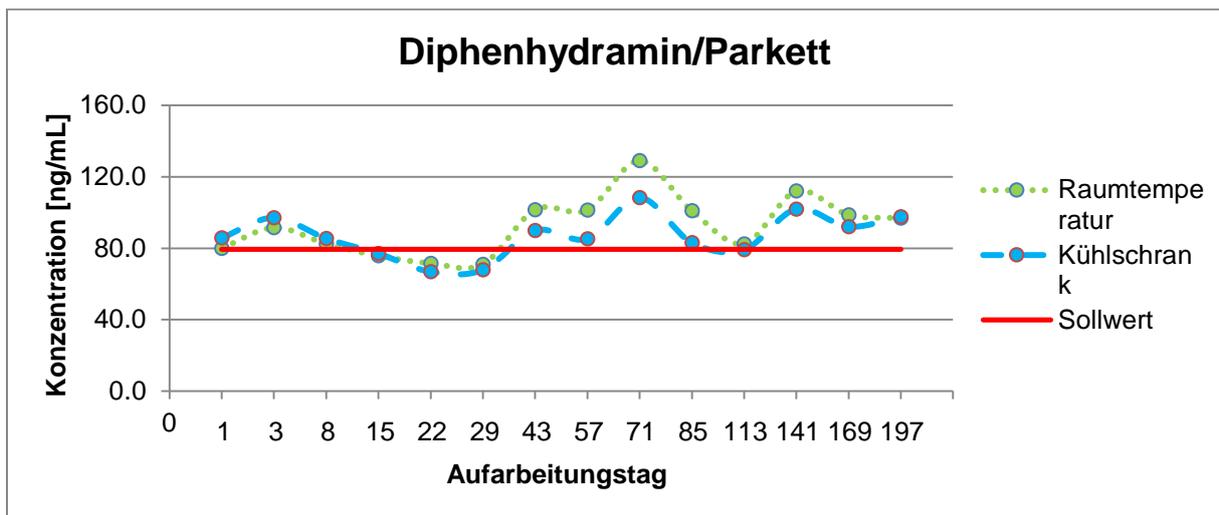


Abbildung 66: Konzentration von Diphenhydramin auf Parkett über 6 Monate

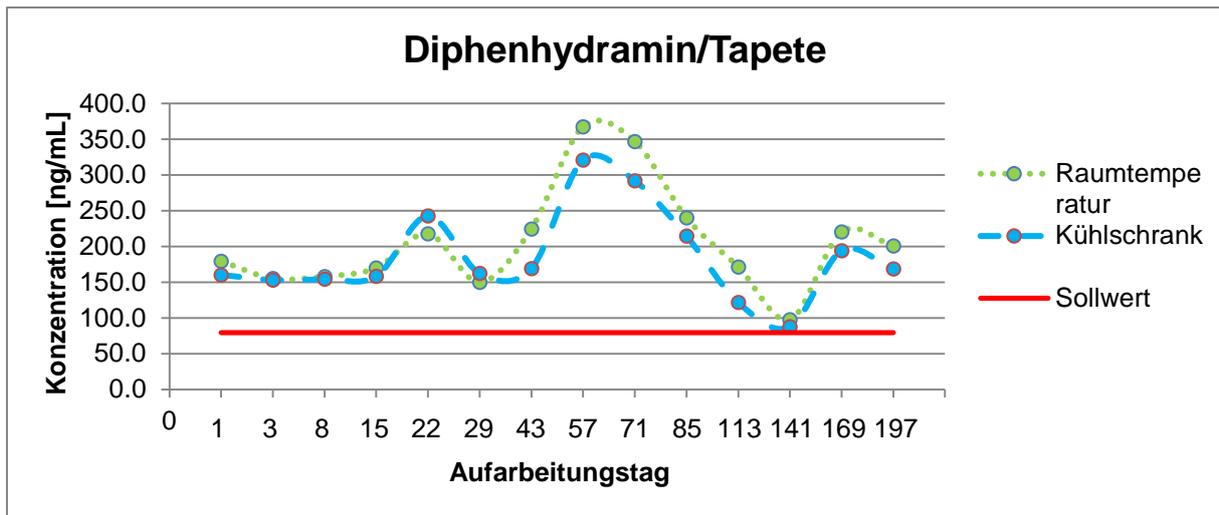


Abbildung 67: Konzentration von Diphenhydramin auf Tapete über 6 Monate

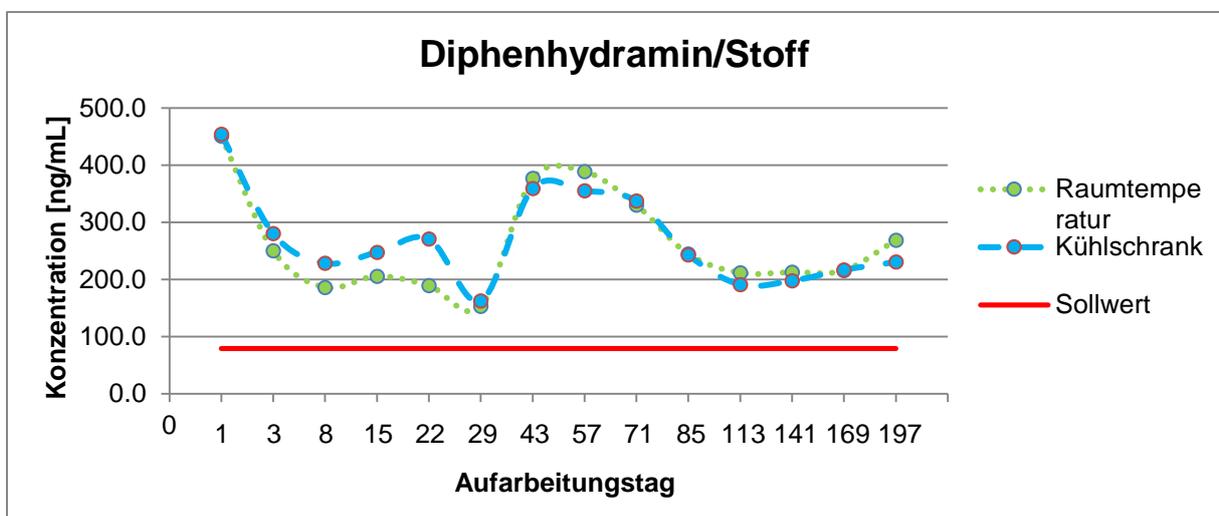


Abbildung 68: Konzentration von Diphenhydramin auf Stoff über 6 Monate

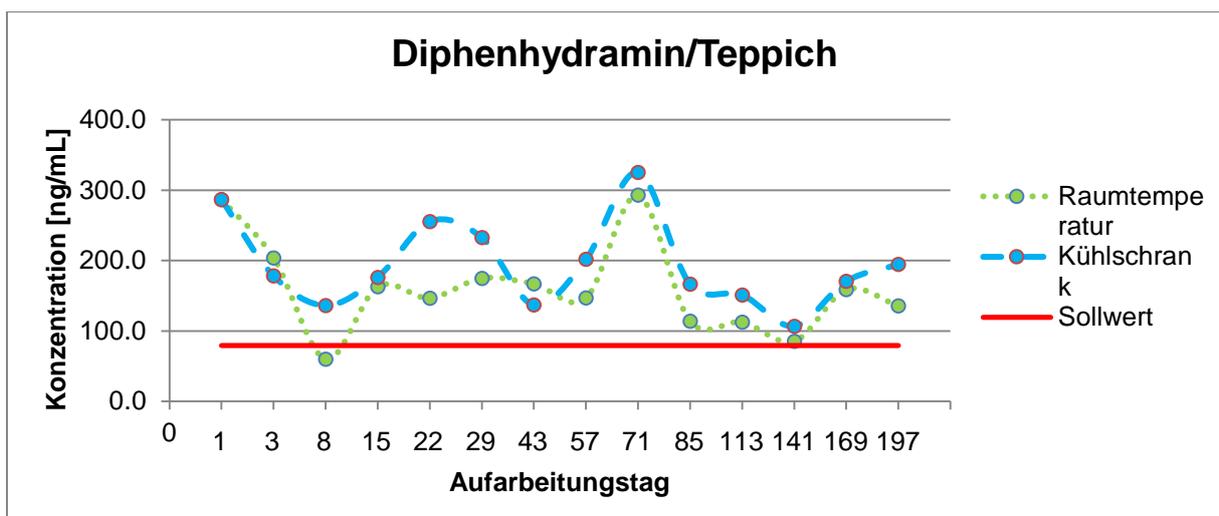


Abbildung 69: Konzentration von Diphenhydramin auf Teppich über 6 Monate

- Citalopram

Auch Citalopram wird mithilfe von MPPH als internem Standard quantifiziert. Deutlich ersichtlich sind höhere Schwankungen zwischen den einzelnen Werten, die allerdings für beide hier untersuchten Temperaturen jeweils die gleichen Tendenzen zeigen. Wie bereits bei Diphenhydramin ersichtlich, liegen die erhaltenen Werte insbesondere auf Stoff und Tapete schon zu Beginn der Studie zum Teil oberhalb des dotierten Sollwerts (bis zu maximal 480 % vom Sollwert beim Untergrundmaterial Stoff). Innerhalb der sechsmonatigen Lagerung ließ sich Citalopram in auf allen fünf verschiedenen Untergrundmaterialien getrockneten Blutropfen bei beiden untersuchten Temperaturen nachweisen.

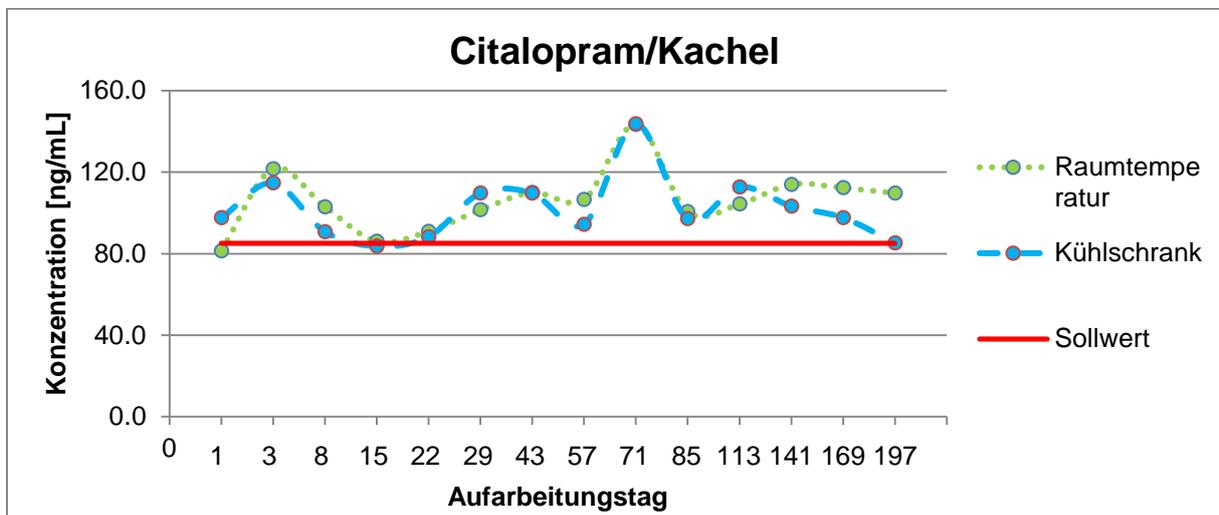


Abbildung 70: Konzentration von Citalopram auf Kachel über 6 Monate

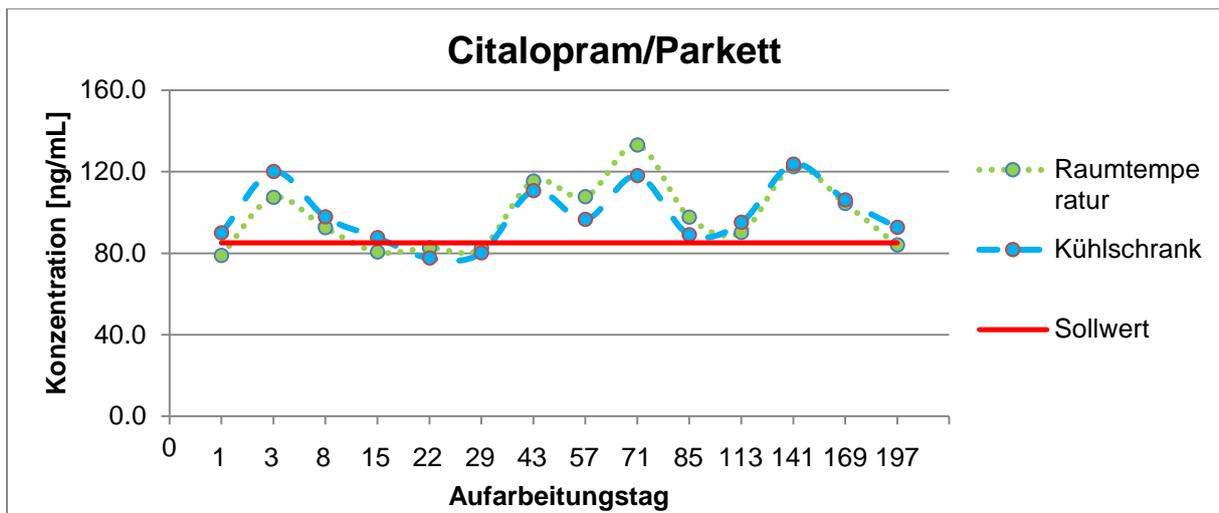


Abbildung 71: Konzentration von Citalopram auf Parkett über 6 Monate

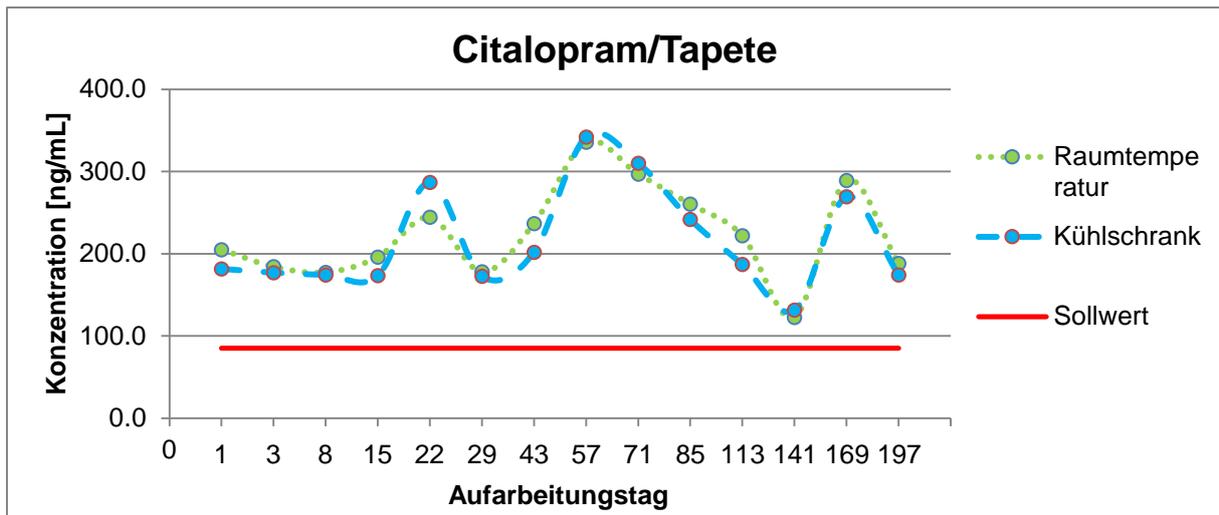


Abbildung 72: Konzentration von Citalopram auf Tapete über 6 Monate

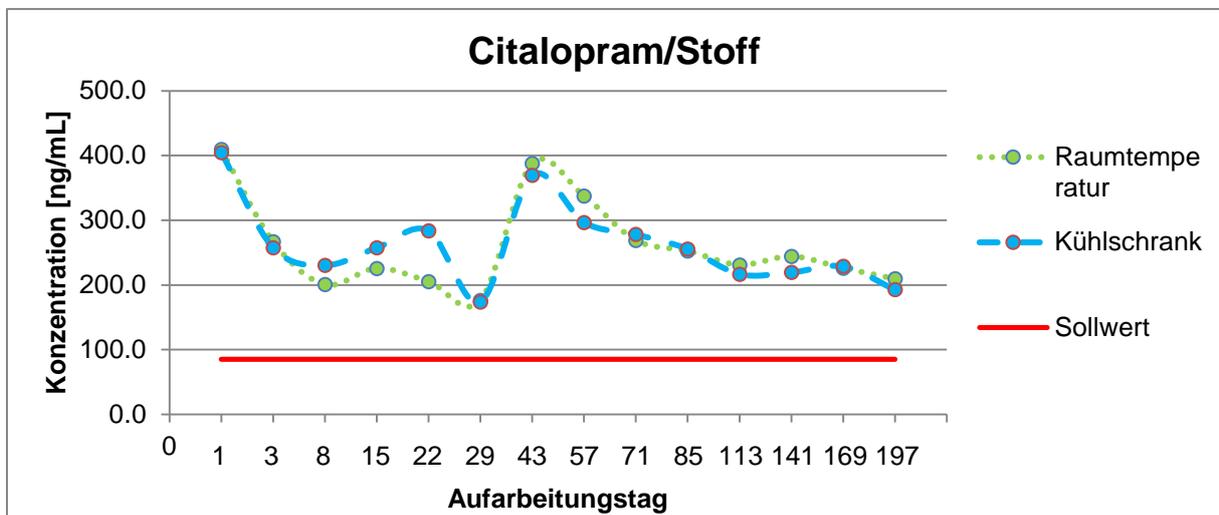


Abbildung 73: Konzentration von Citalopram auf Stoff über 6 Monate

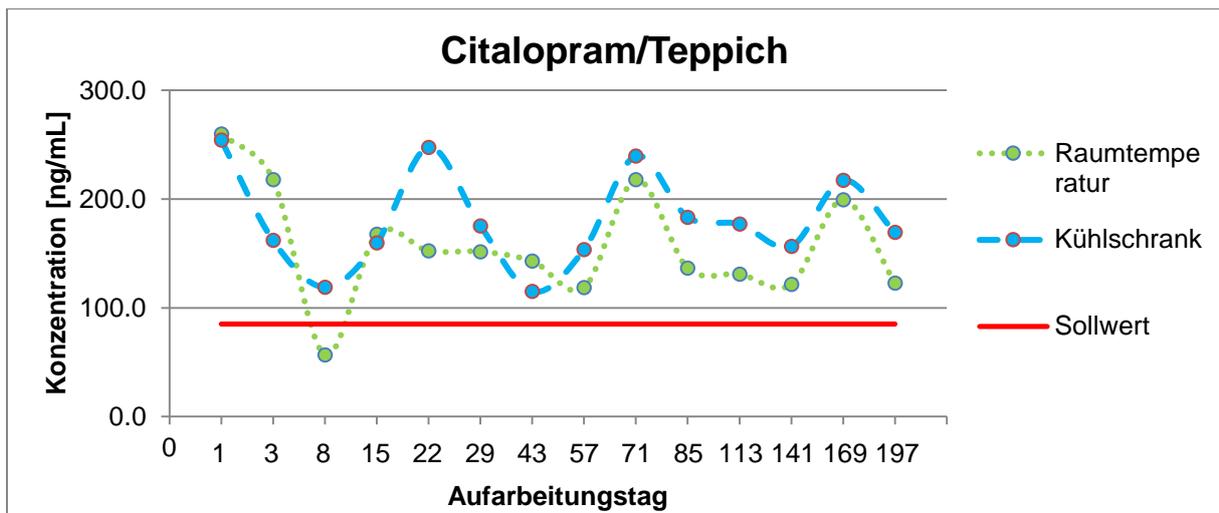


Abbildung 74: Konzentration von Citalopram auf Teppich über 6 Monate

- Doxepin

Das ebenfalls mithilfe von MPPH als internem Standard quantifizierte Doxepin zeigt einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie Diphenhydramin, die Schwankungen zwischen den einzelnen Werten und auch die Abweichung vom Sollwert sind jedoch geringer und betragen zwischen maximal 64,6 % (Teppich) und 491 % vom Sollwert auf dem Untergrundmaterial Stoff. Auch Doxepin lässt sich über die gesamte sechsmonatige Lagerung auf den untersuchten Untergrundmaterialien bei beiden Temperaturen nachweisen.

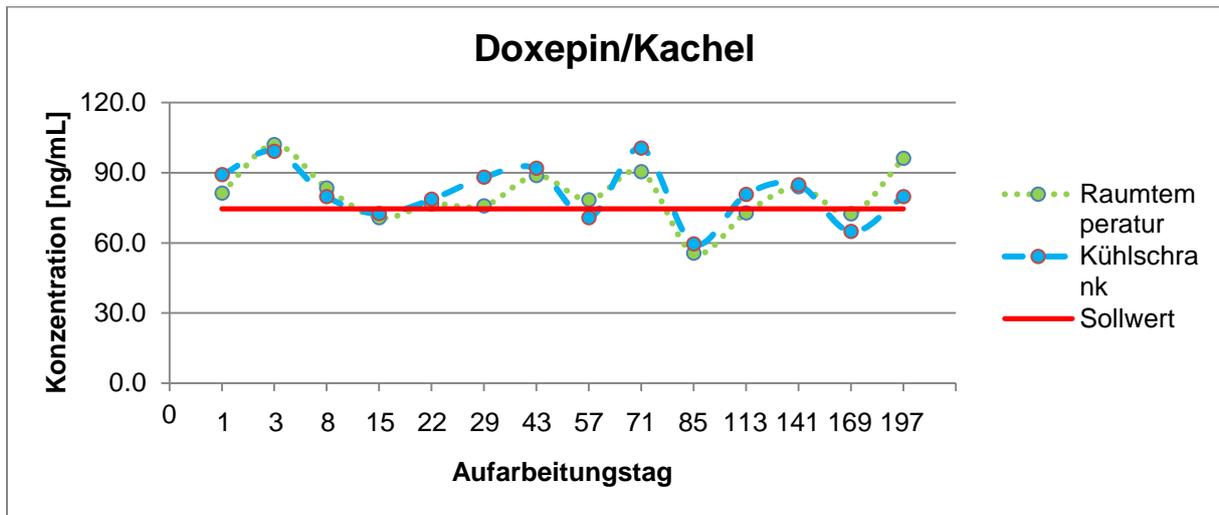


Abbildung 75: Konzentration von Doxepin auf Kachel über 6 Monate

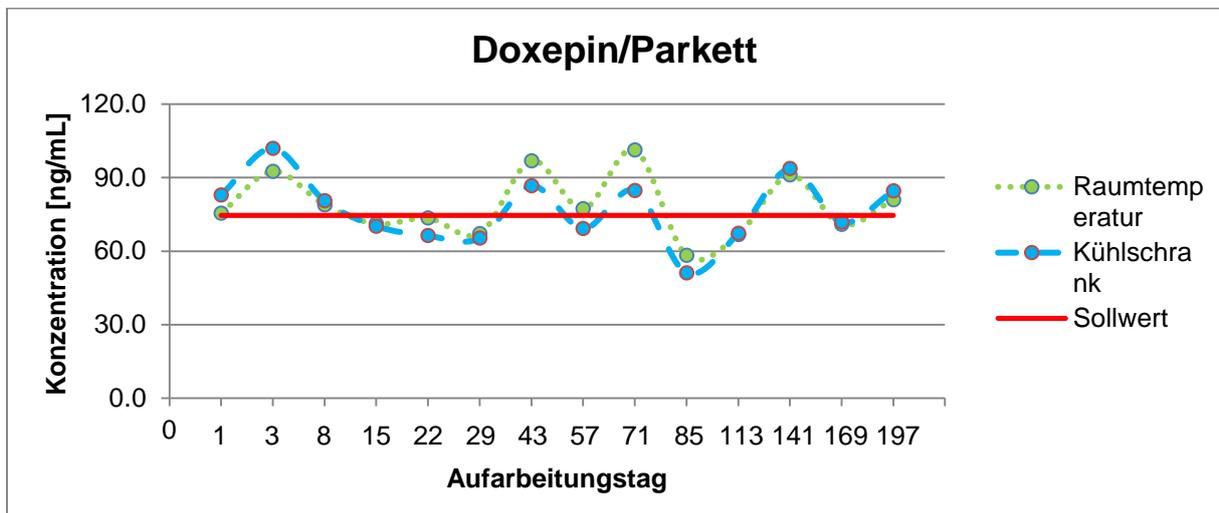


Abbildung 76: Konzentration von Doxepin auf Parkett über 6 Monate

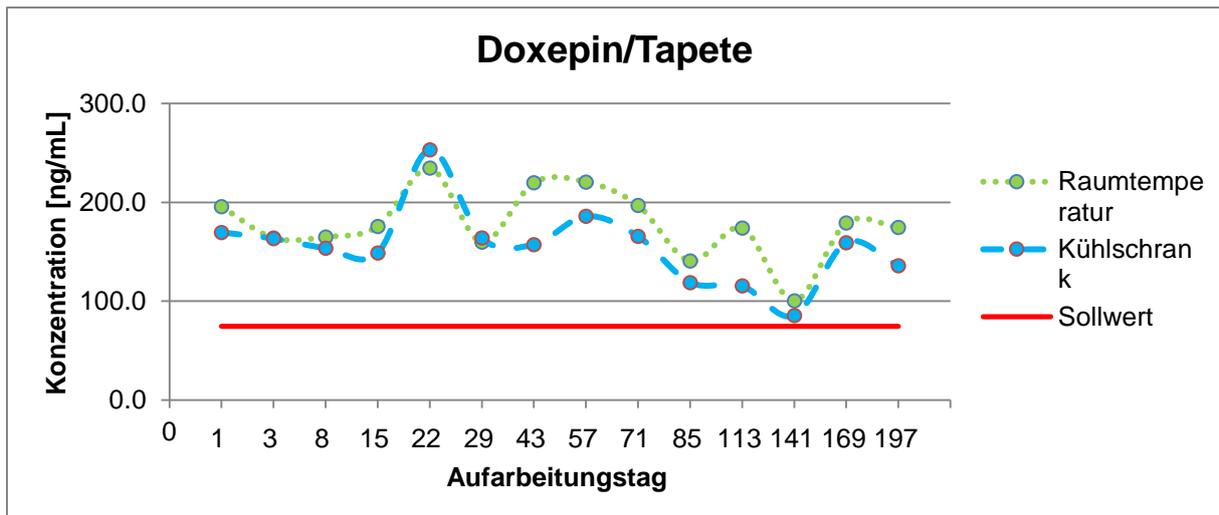


Abbildung 77: Konzentration von Doxepin auf Tapete über 6 Monate

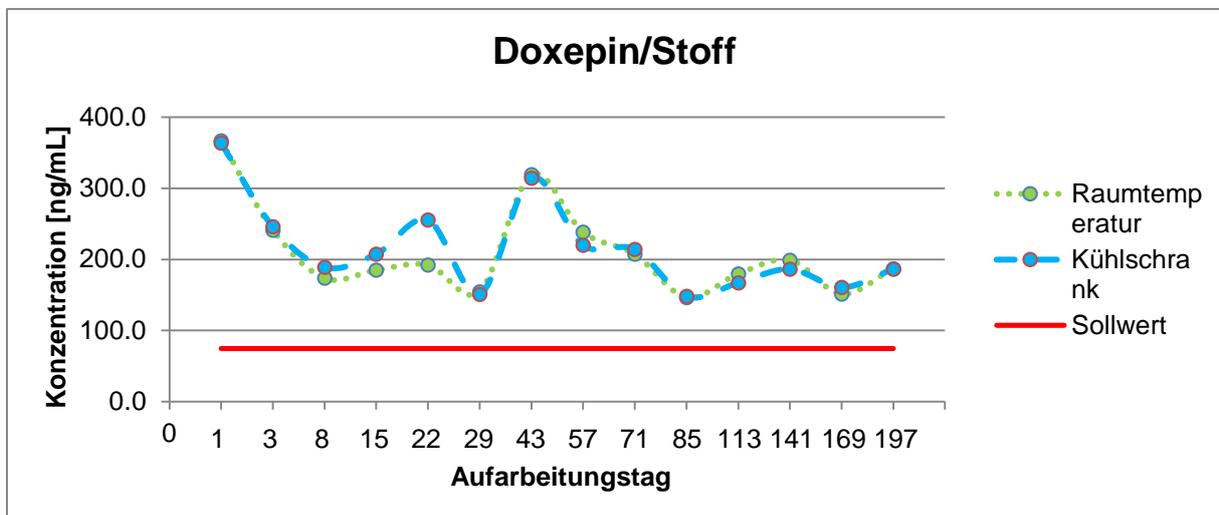


Abbildung 78: Konzentration von Doxepin auf Stoff über 6 Monate

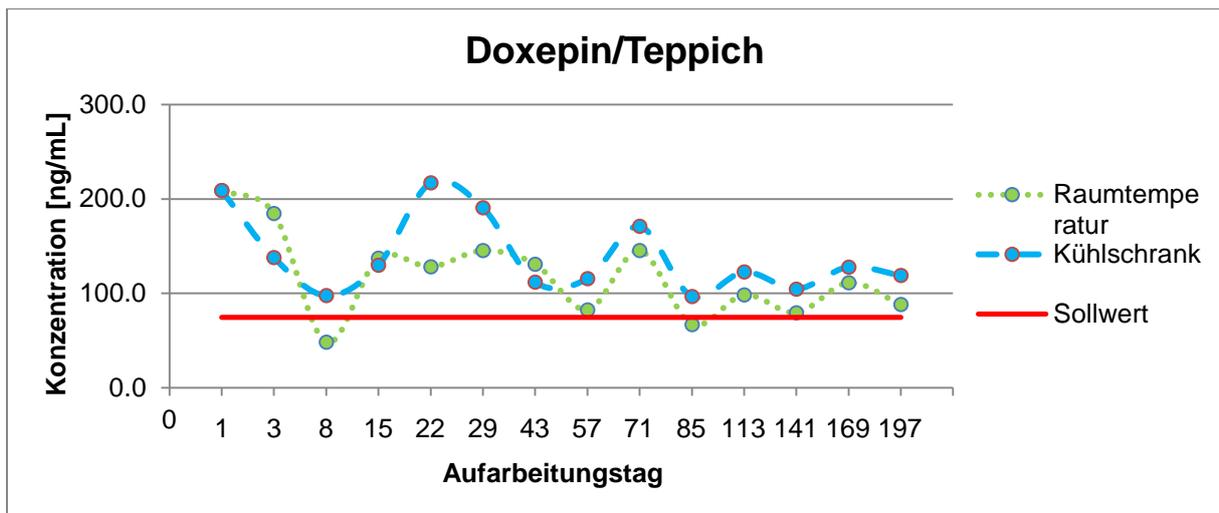


Abbildung 79: Konzentration von Doxepin auf Teppich über 6 Monate

- Mirtazapin

Mirtazapin wurde in der Studie ebenfalls mithilfe von MPPH als internem Standard quantifiziert. Die Diagramme ähneln in ihren Verläufen auch hier den für Diphenhydramin erhaltenen. Im Gegensatz zu den bisherigen, mithilfe von MPPH quantifizierten Analyten liegen die vom Untergrundmaterial Teppich erhaltenen Konzentrationen nicht deutlich oberhalb des Sollwertes, sondern mit einer Ausnahme (Tag 29, Kühlschrank) darunter (bis zu minimal 16,0 % vom Sollwert). Auch Mirtazapin lässt sich innerhalb der sechsmonatigen Lagerung auf den fünf Untergrundmaterialien bei beiden Temperaturen nachweisen.

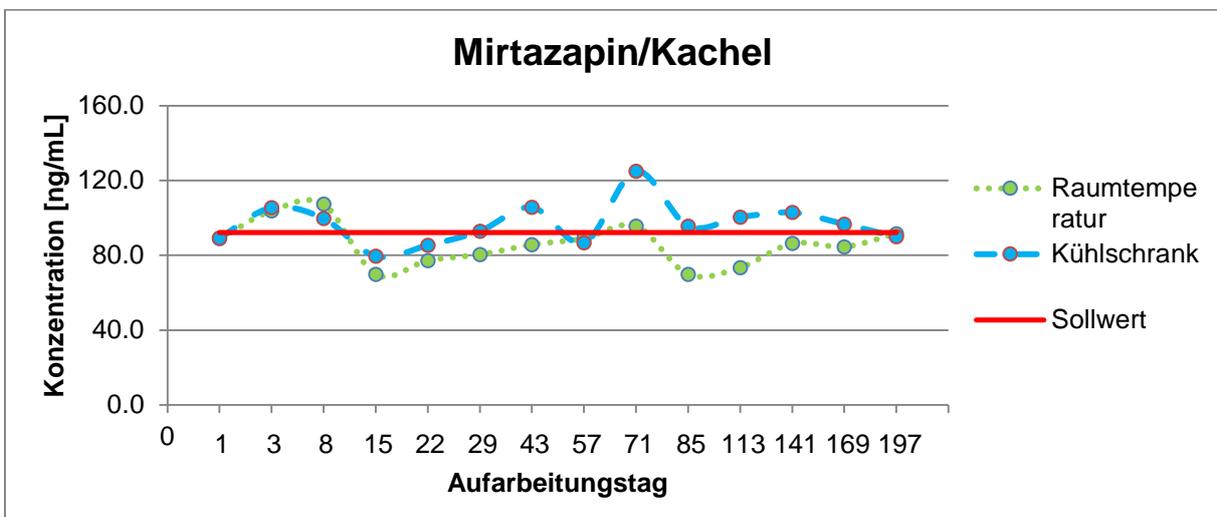


Abbildung 80: Konzentration von Mirtazapin auf Kachel über 6 Monate

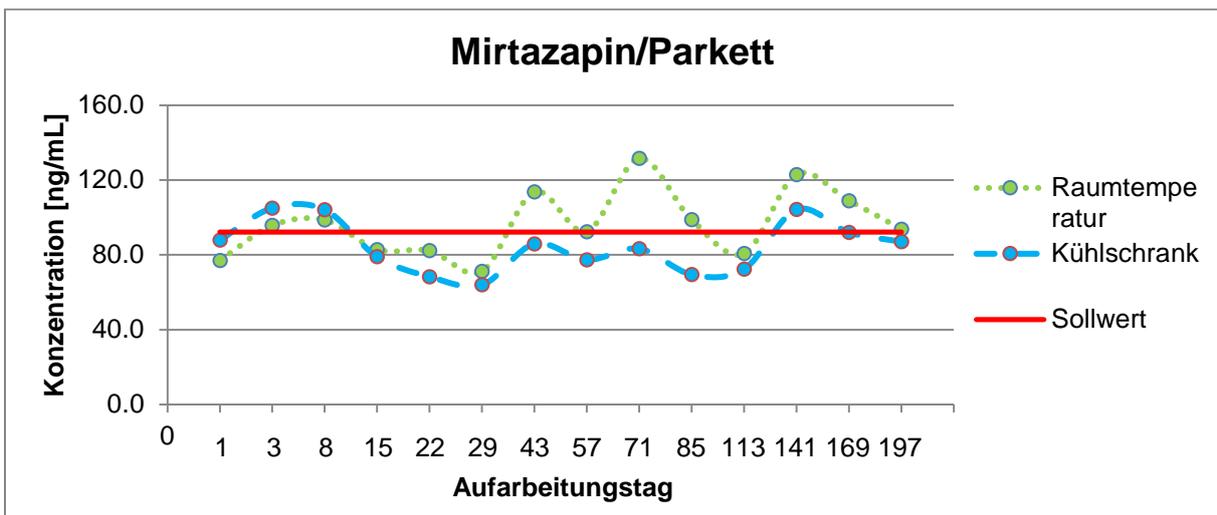


Abbildung 81: Konzentration von Mirtazapin auf Parkett über 6 Monate

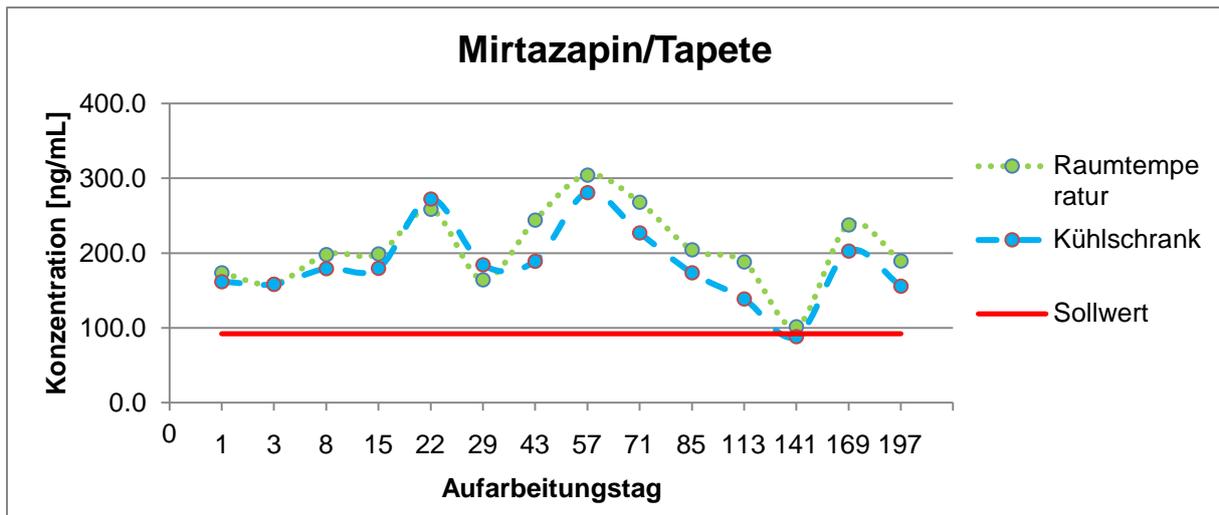


Abbildung 82: Konzentration von Mirtazapin auf Tapete über 6 Monate

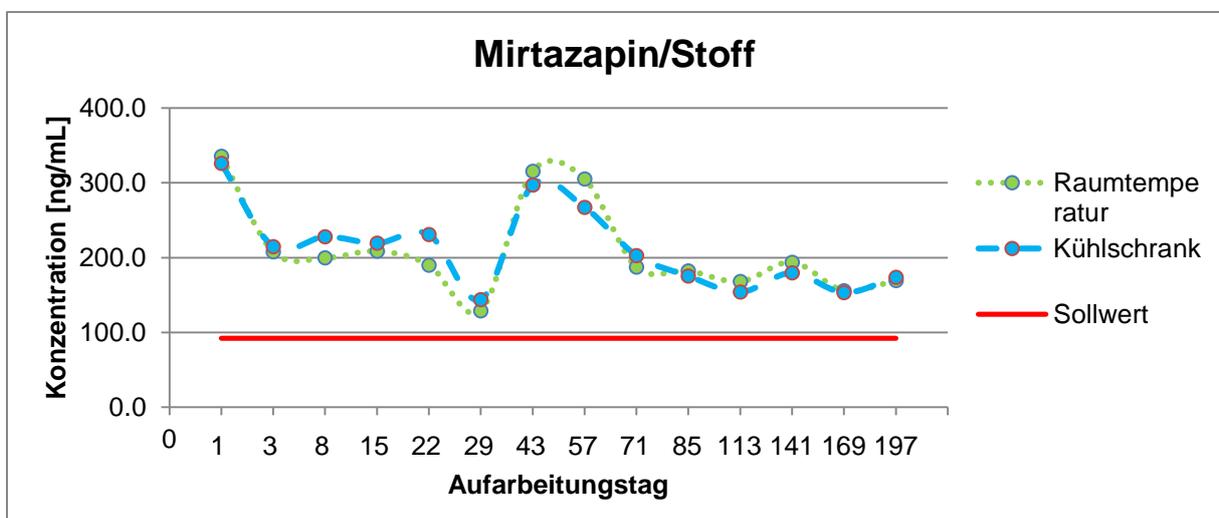


Abbildung 83: Konzentration von Mirtazapin auf Stoff über 6 Monate

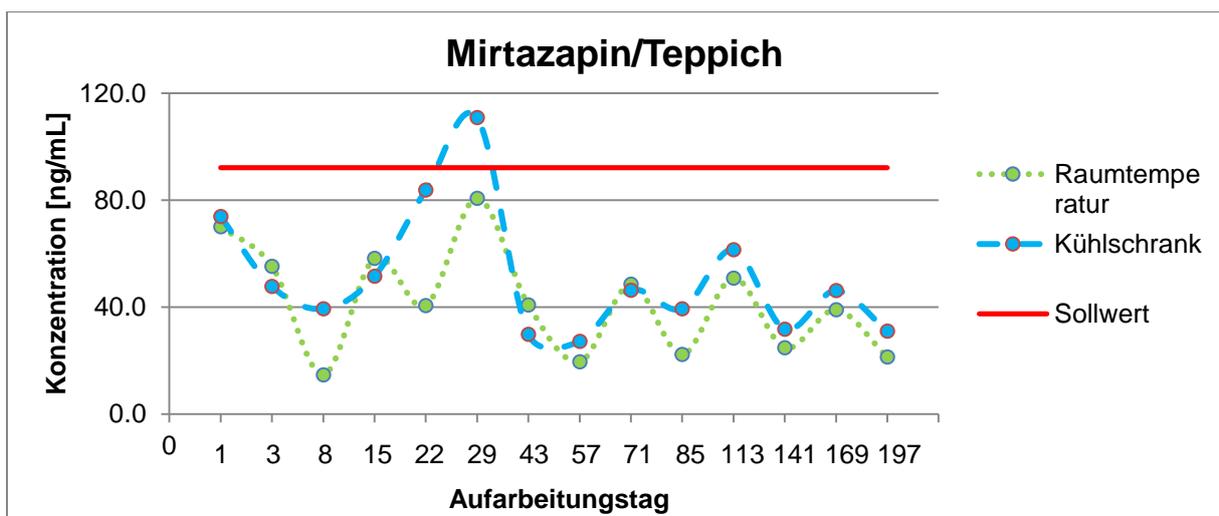


Abbildung 84: Konzentration von Mirtazapin auf Teppich über 6 Monate

- Quetiapin

Quetiapin wurde ebenfalls mittels MPPH quantifiziert. Die von den Trockenblutproben auf Kachel und Parkett erhaltenen Werte schwanken in geringem Ausmaß um den ermittelten Sollwert (Extremwerte zwischen 87,1 % und 167 % vom Sollwert), die anderen Materialien zeigen deutlichere Schwankungen, zudem liegen die Werte auch hier oberhalb des Sollwertes (mit Extremwerten von bis zu 832 % vom Sollwert für das Untergrundmaterial Teppich). Die Kurven der jeweiligen Temperaturen verlaufen nahezu parallel zueinander. Insgesamt war Quetiapin innerhalb von und nach sechs Monaten in Trockenblutproben auf allen untersuchten Materialien bei beiden Temperaturen stabil.

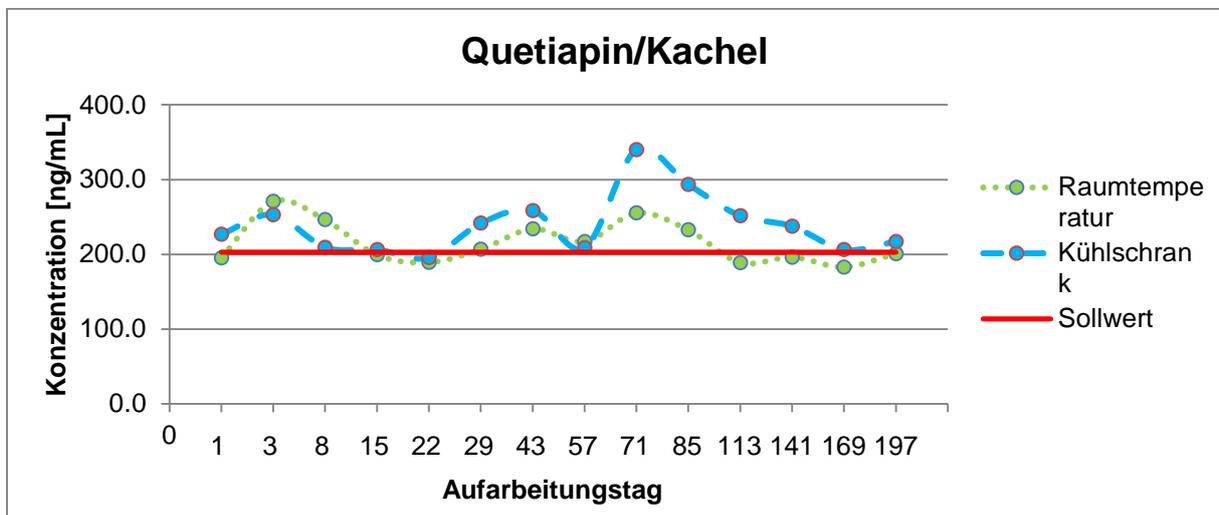


Abbildung 85: Konzentration von Quetiapin auf Kachel über 6 Monate

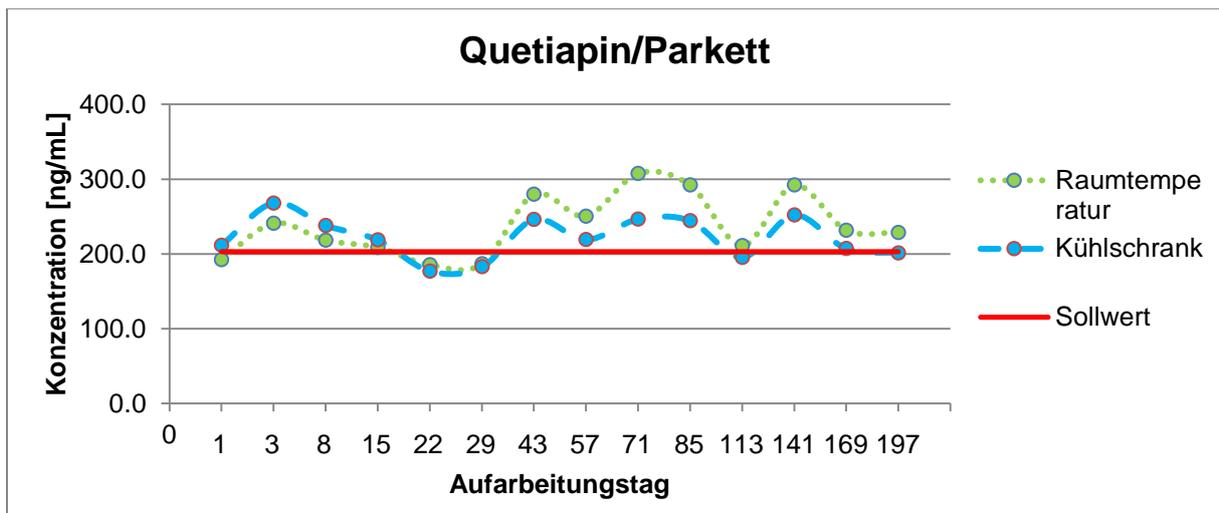


Abbildung 86: Konzentration von Quetiapin auf Parkett über 6 Monate

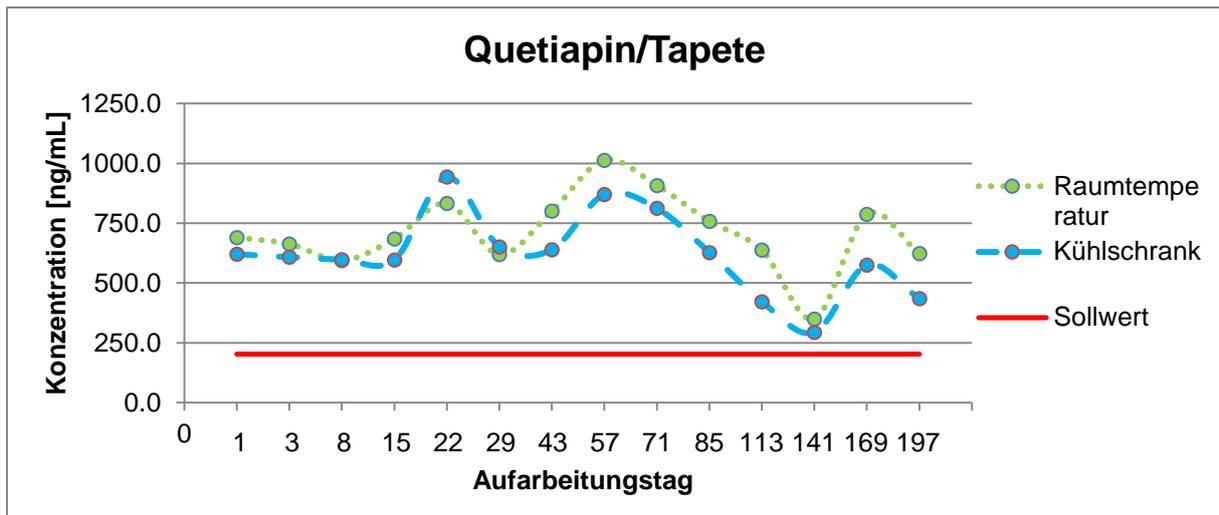


Abbildung 87: Konzentration von Quetiapin auf Tapete über 6 Monate

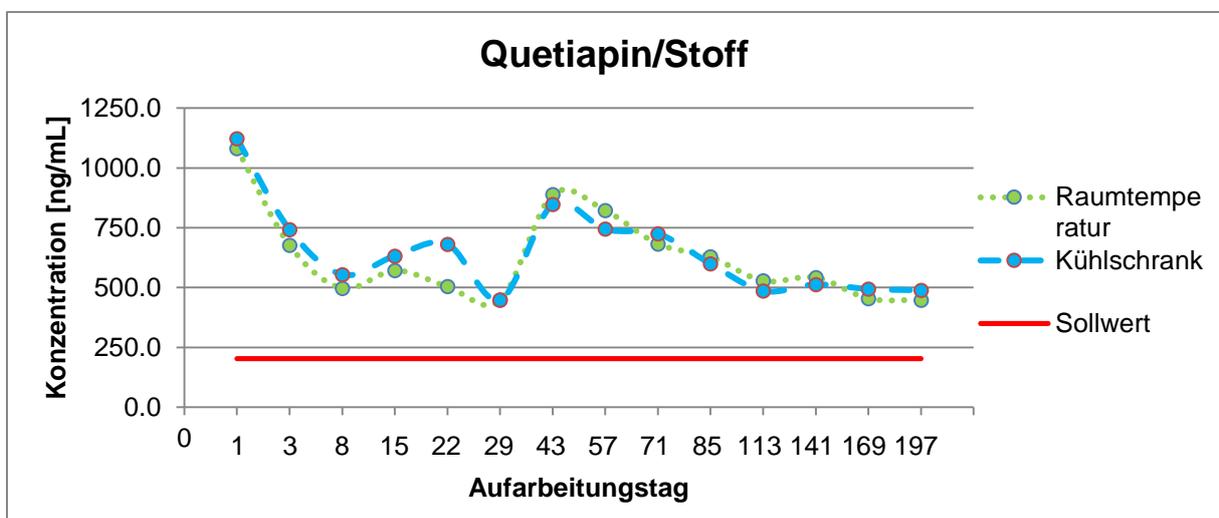


Abbildung 88: Konzentration von Quetiapin auf Stoff über 6 Monate

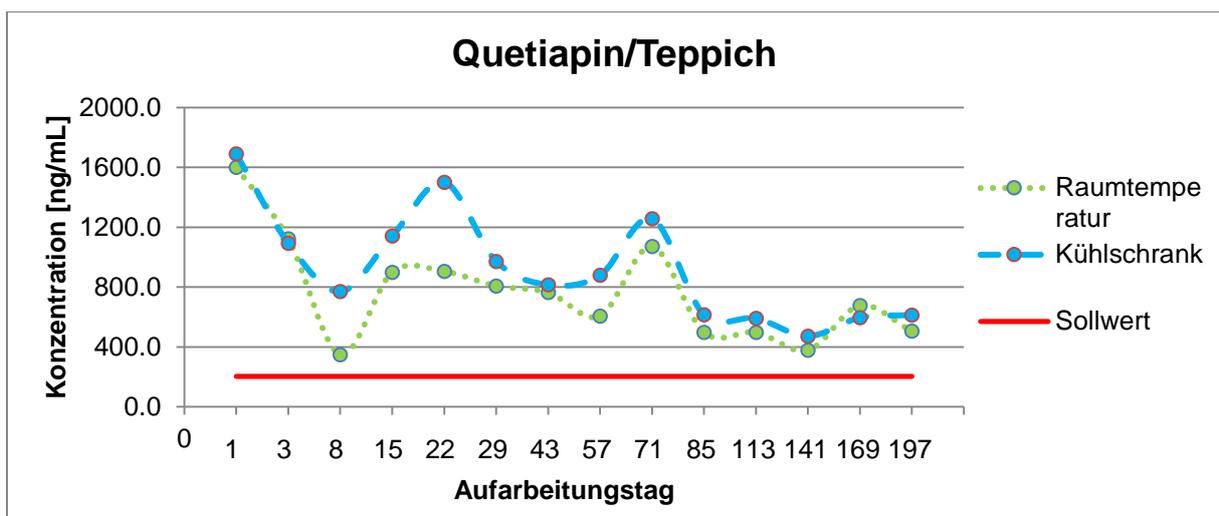


Abbildung 89: Konzentration von Quetiapin auf Teppich über 6 Monate

- Bisoprolol

Für Bisoprolol wurde Methamphetamin-D14 als interner Standard verwendet, da die chemischen Eigenschaften und insbesondere die Retentionszeiten der beiden Substanzen ähnlicher sind als die von Bisoprolol und dem für die vorher genannten Stoffe verwendeten internen Standard MPPH. Die von Kachel und Parkett extrahierten Proben zeigen nur geringe Schwankungen um den dotierten Sollwert (zwischen 82,5 % und 123 % vom Sollwert). Die auf den anderen Untergrundmaterialien ermittelten Konzentrationen liegen jedoch (zum Teil deutlich) oberhalb des ermittelten Sollwertes (bis zu maximal 1408 % vom Sollwert auf Teppich) und weisen größere Schwankungen auf. Insgesamt ließ sich auch Bisoprolol innerhalb der sechsmonatigen Lagerung auf allen fünf untersuchten Untergrundmaterialien bei beiden Temperaturen nachweisen.

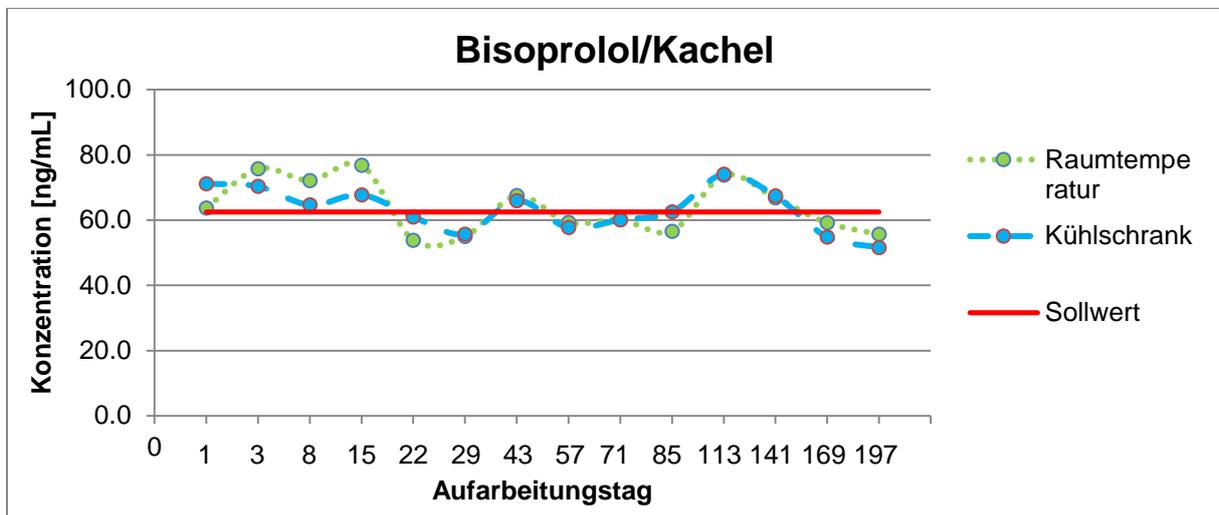


Abbildung 90: Konzentration von Bisoprolol auf Kachel über 6 Monate

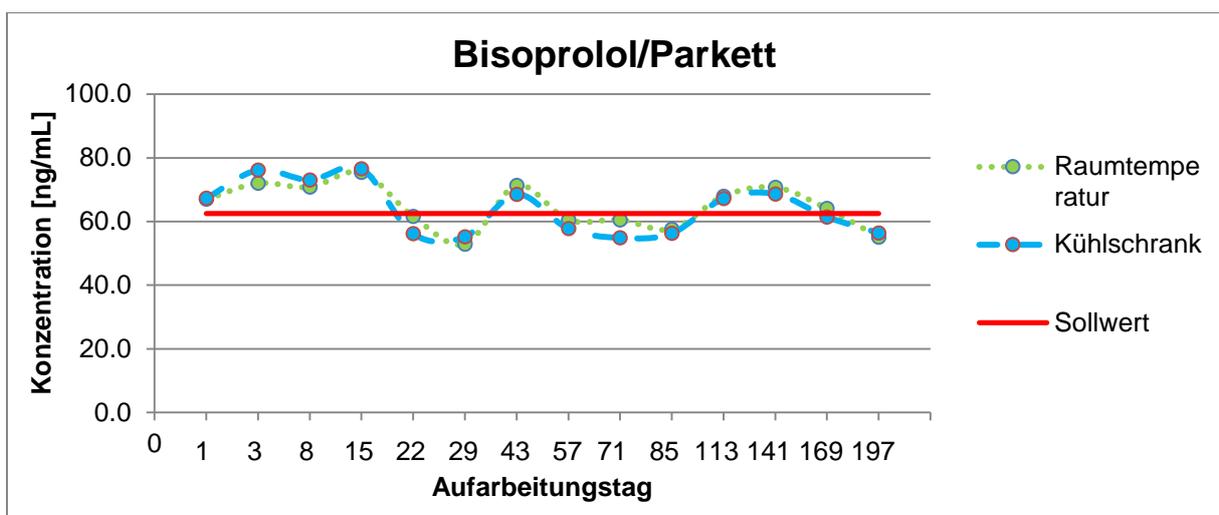


Abbildung 91: Konzentration von Bisoprolol auf Parkett über 6 Monate

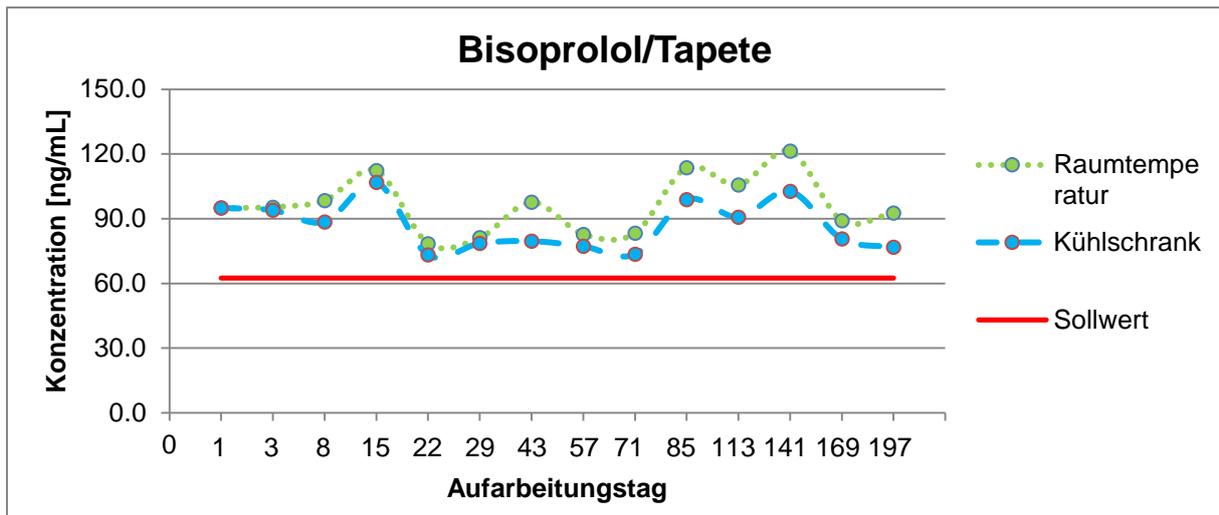


Abbildung 92: Konzentration von Bisoprolol auf Tapete über 6 Monate

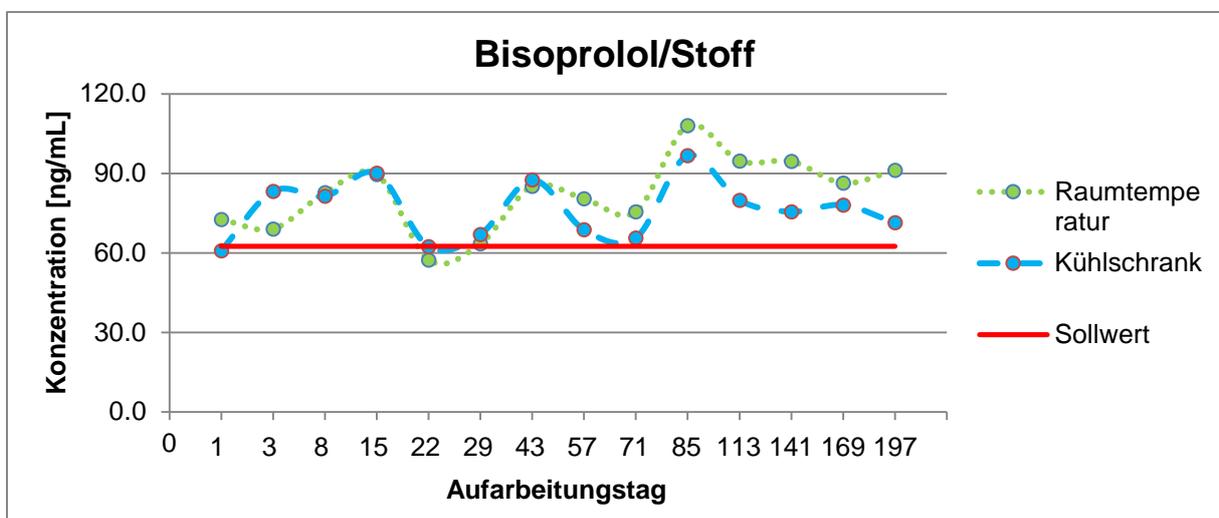


Abbildung 93: Konzentration von Bisoprolol auf Stoff über 6 Monate

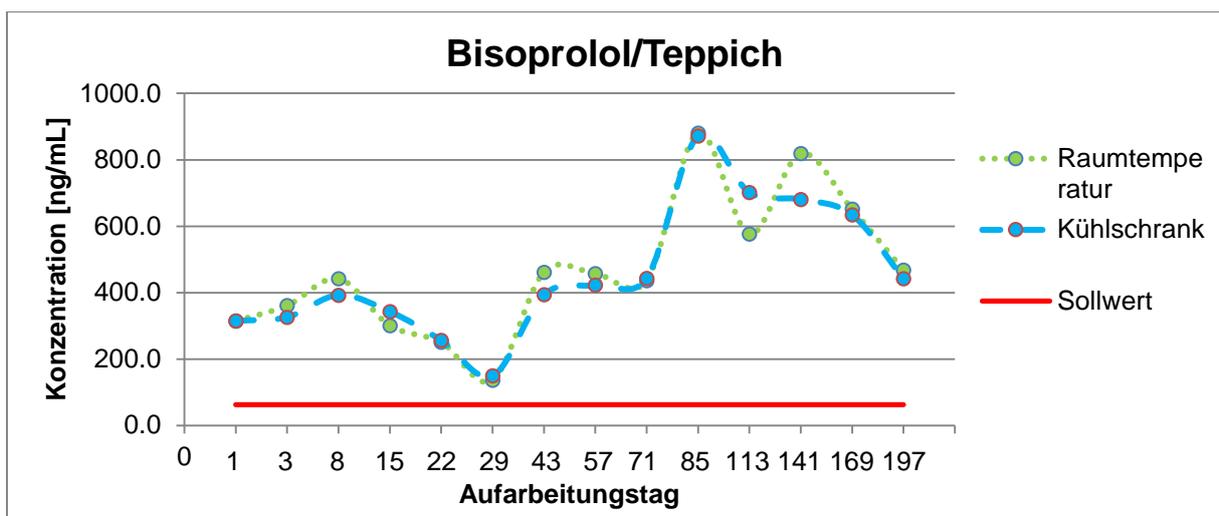


Abbildung 94: Konzentration von Bisoprolol auf Teppich über 6 Monate

- Metformin

Metformin wurde in dieser Studie mittels Morphin-D3 als internem Standard quantifiziert, da auch hier die sehr frühe Retentionszeit von Metformin und damit die chemischen Eigenschaften eher mit dem ebenfalls früh eluierenden Morphin-D3 korrelieren, als mit MPPH. Die Proben, die von Kachel bzw. Parkett extrahiert wurden, zeigen wenig Streuung in engem Rahmen zwischen maximal 91,8 % und 143 % vom Sollwert. Die Diagramme der restlichen Untergrundmaterialien zeigen ebenfalls wenig Schwankungen, allerdings einen stetig ansteigenden Kurvenverlauf bis zum Ende der Studie hin, wobei die ersten erhaltenen Werte unterhalb und die letzten oberhalb des im Pool ermittelten Sollwertes liegen (bis zu maximal 161 % vom Sollwert für das Untergrundmaterial Teppich). Insgesamt war Metformin auf allen untersuchten Materialien über den Zeitraum von sechs Monaten bei beiden Temperaturen stabil nachweisbar.

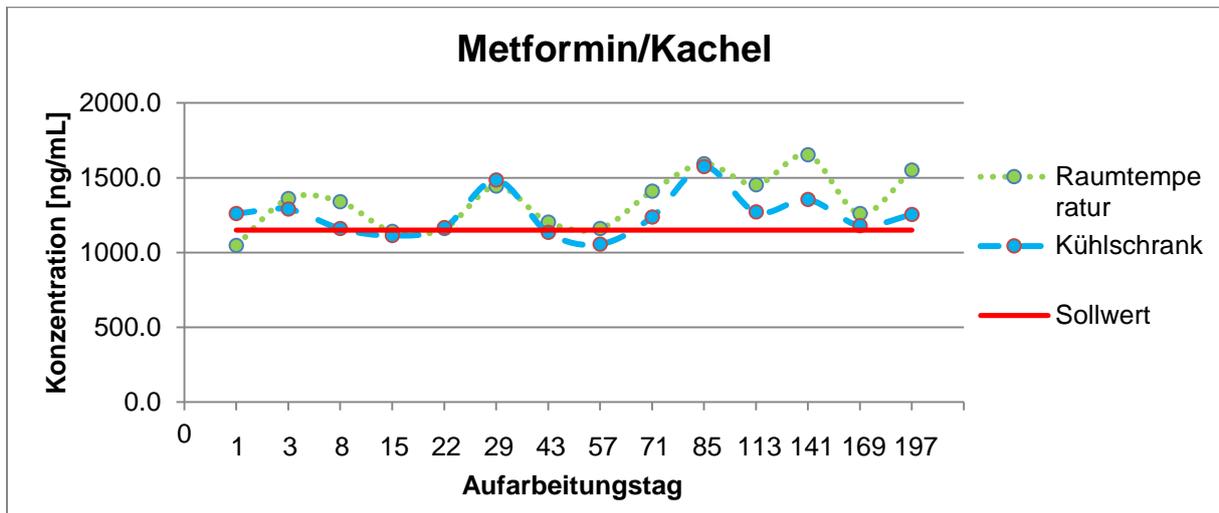


Abbildung 95: Konzentration von Metformin auf Kachel über 6 Monate

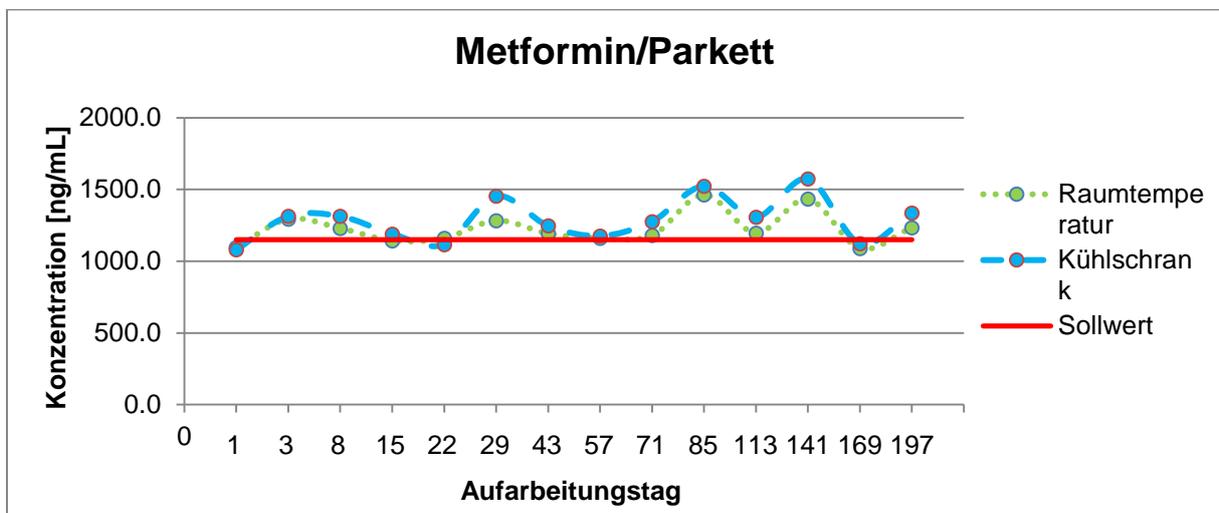


Abbildung 96: Konzentration von Metformin auf Parkett über 6 Monate

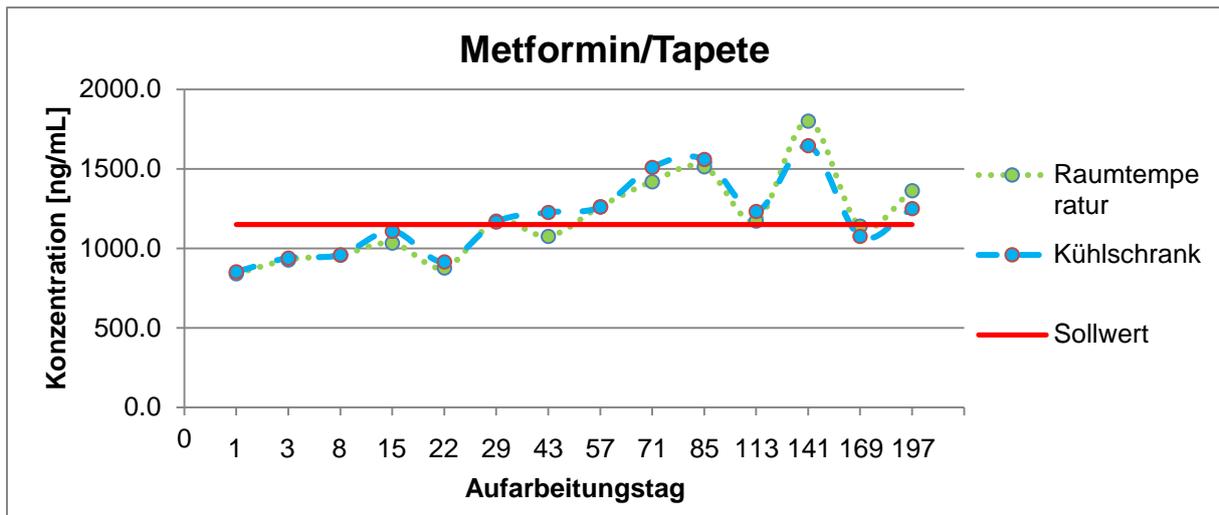


Abbildung 97: Konzentration von Metformin auf Tapete über 6 Monate

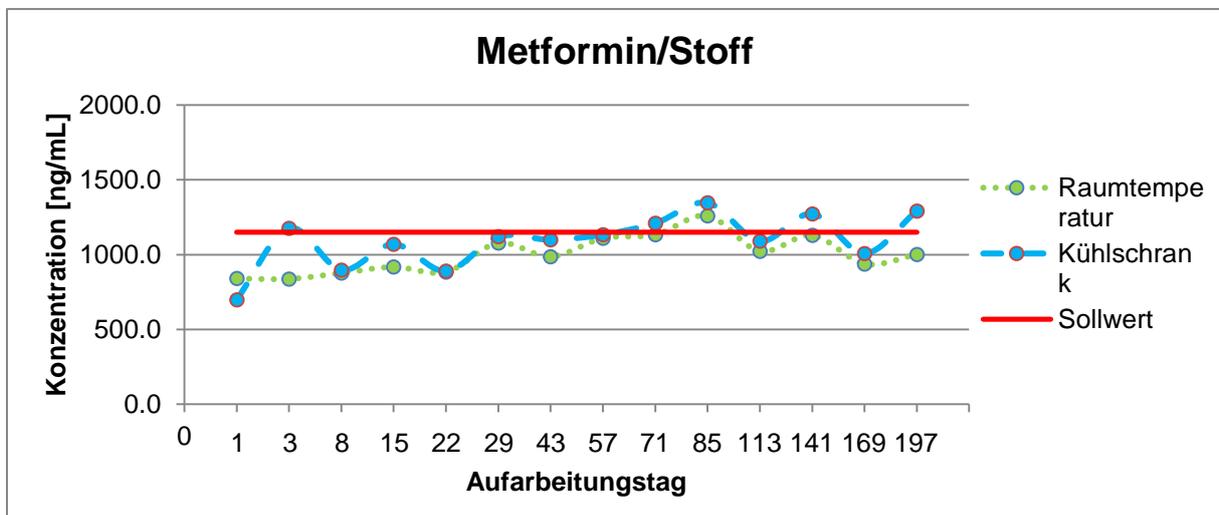


Abbildung 98: Konzentration von Metformin auf Stoff über 6 Monate

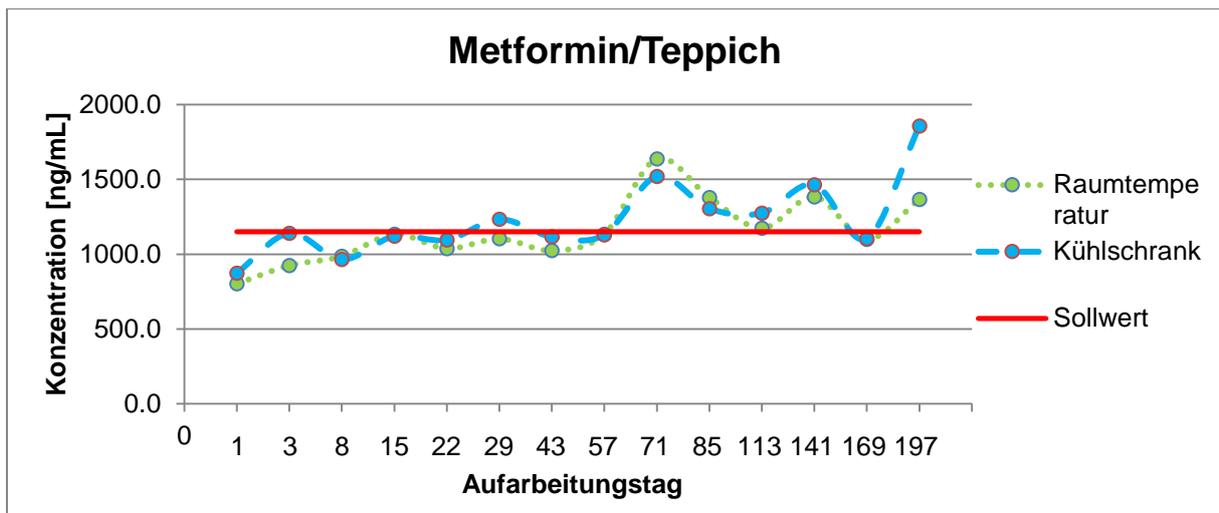


Abbildung 99: Konzentration von Metformin auf Teppich über 6 Monate

- Ramipril

Ramipril wurde analog zu den Psychopharmaka über MPPH als internem Standard quantifiziert. Die von allen fünf Untergrundmaterialien extrahierten Trockenblutproben zeigen fast ausnahmslos Werte, die oberhalb des ermittelten Sollwertes liegen (bis zu Extremwerten von 488 % vom Sollwert für das Untergrundmaterial Tapete). Allen Kurven gemeinsam sind ein deutlicher Anstieg der Konzentration am letzten Aufarbeitungstag und die Parallelität der beiden jeweiligen Temperaturkurven. Auch hier erweist sich – in diesem Fall neben Tapete als Untergrundmaterial - Teppich als eines der am wenigsten reproduzierbaren Untergrundmaterialien. Auch Ramipril war in der Studie über einen Zeitraum von sechs Monaten in getrockneten Blutproben auf fünf unterschiedlichen Untergrundmaterialien bei beiden Temperaturen stabil.

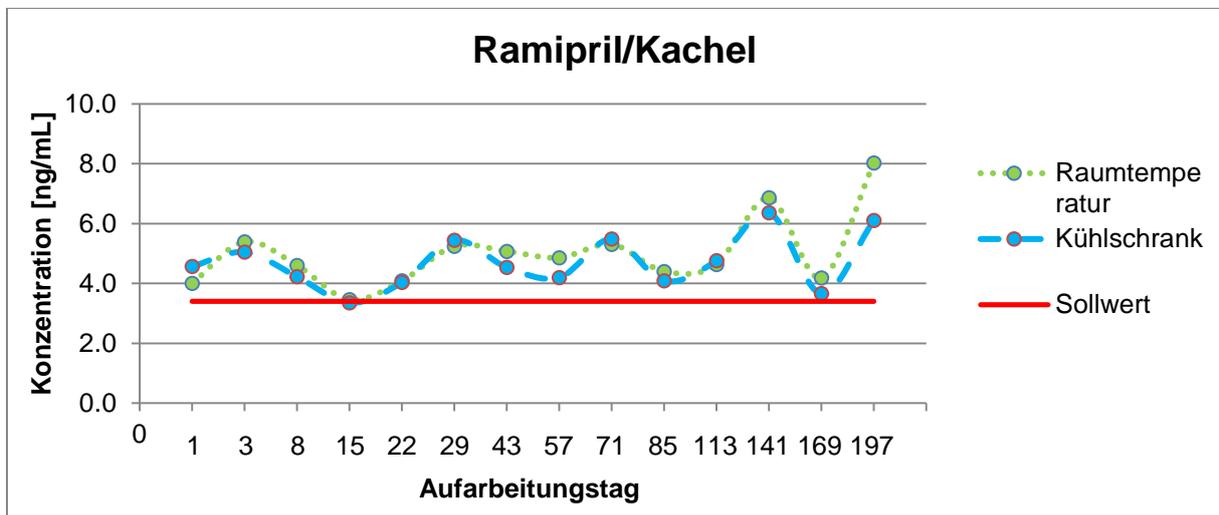


Abbildung 100: Konzentration von Ramipril auf Kachel über 6 Monate

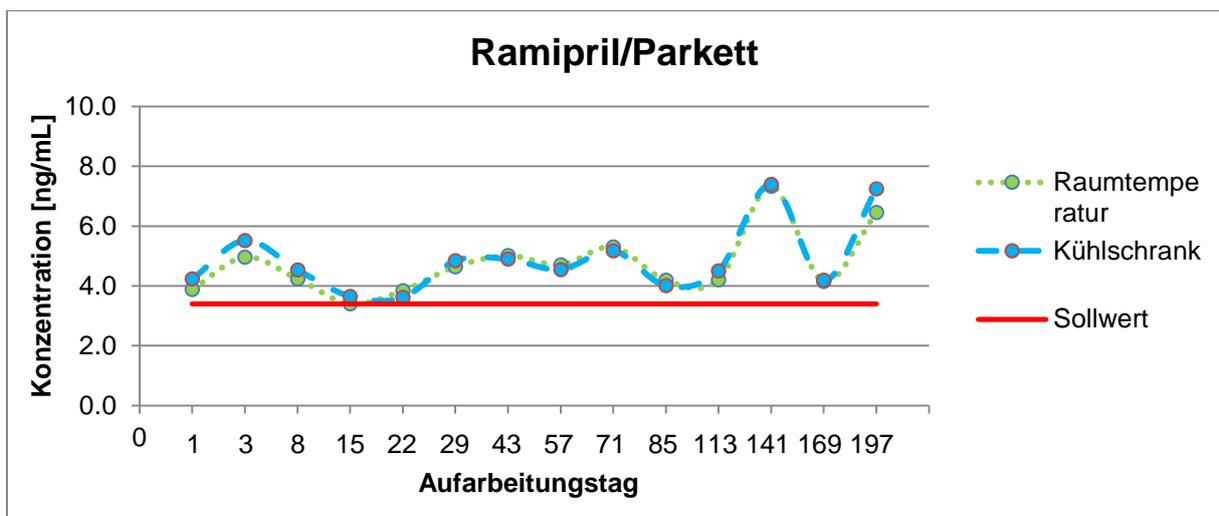


Abbildung 101: Konzentration von Ramipril auf Parkett über 6 Monate

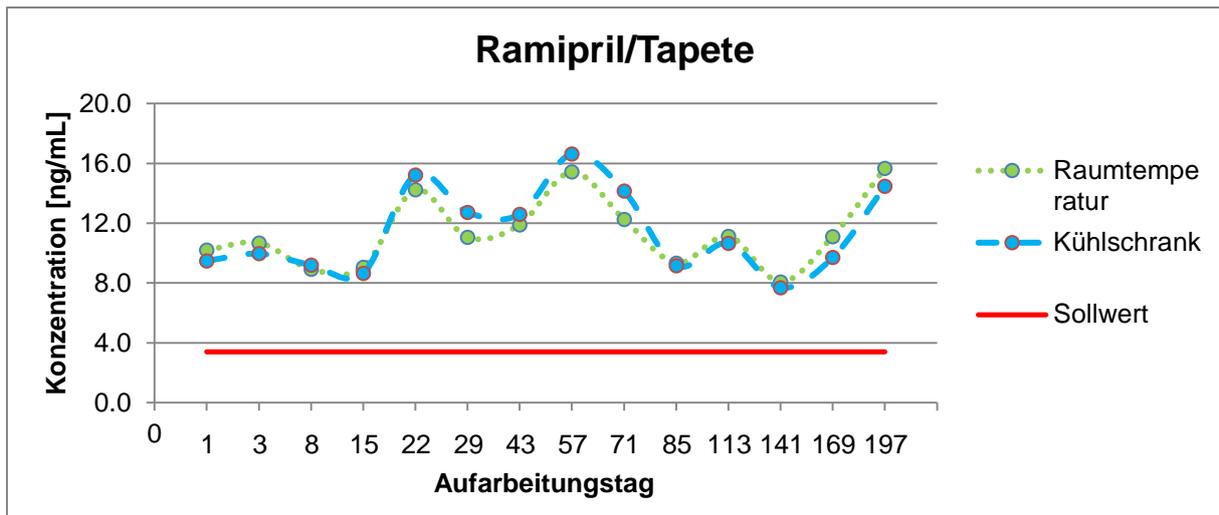


Abbildung 102: Konzentration von Ramipril auf Tapete über 6 Monate

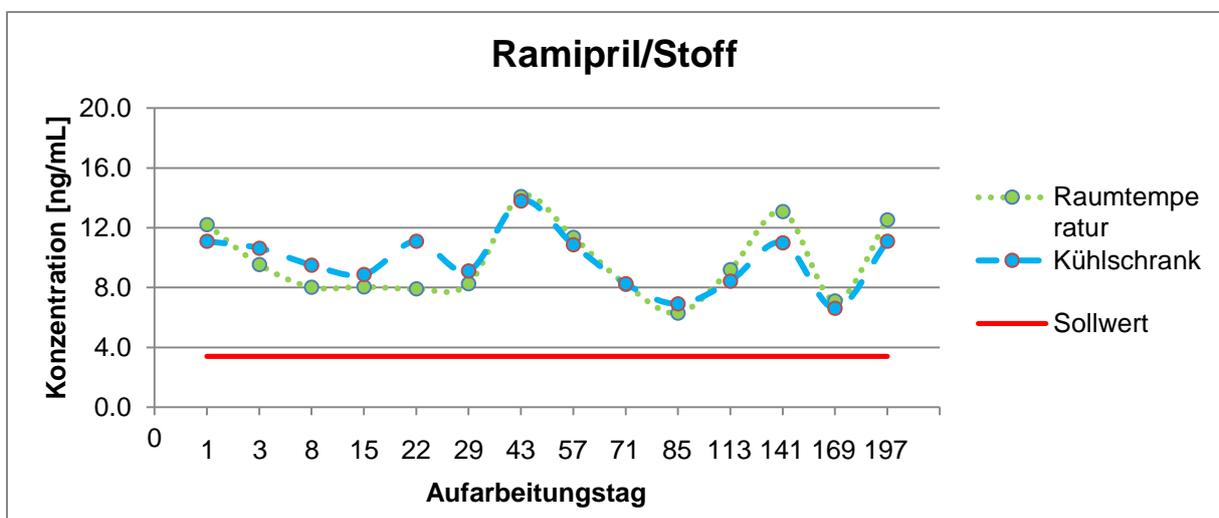


Abbildung 103: Konzentration von Ramipril auf Stoff über 6 Monate

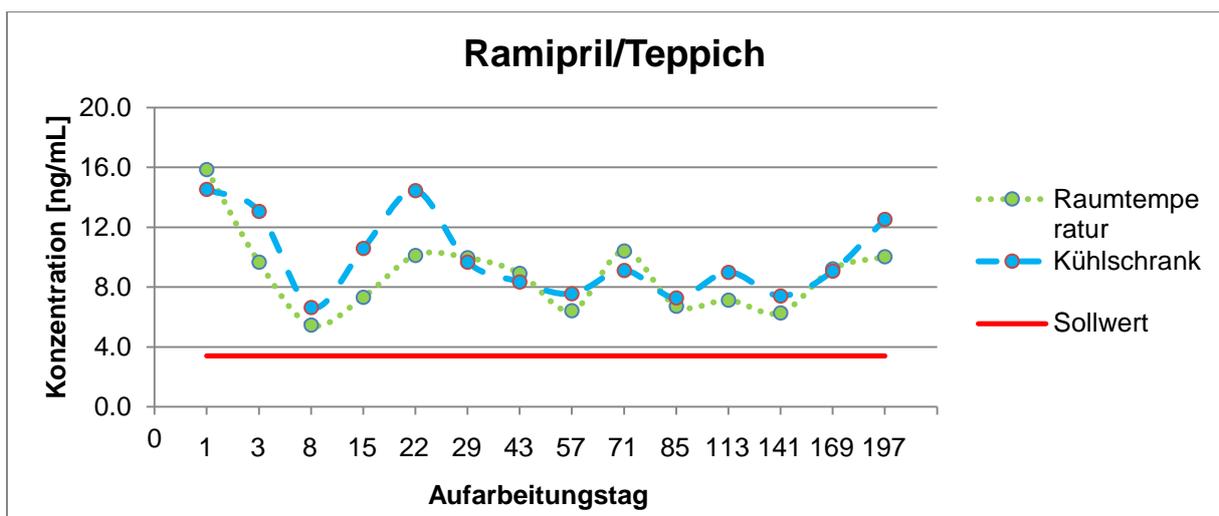


Abbildung 104: Konzentration von Ramipril auf Teppich über 6 Monate



## 7. Diskussion

Die Untersuchung von getrockneten Blutproben ist in der klinischen Chemie beim TDM (Therapeutisches Drug Monitoring) am weitesten verbreitet. Hier werden „dried blood spots“ (DBS) auf normierten Filterkarten und definierte Volumina bzw. „Punches“ (ausgestanzte Areale) verwendet, um die Arzneistoffkonzentration im Blut eines Patienten bestimmen zu können. Der große Nutzen dieser alternativen Matrix besteht in seiner einfachen Handhabbarkeit für Patienten und klinisches Personal, sowohl bei der Probennahme als auch bei Versand und Asservierung der DBS-Karten sowie einer geringeren Infektiosität [46]. Die meisten aktuellen Studien zur Analytik von DBS kommen daher aus dem Bereich des TDM. In der vorliegenden Arbeit sollten insbesondere die im Hinblick auf forensisch-toxikologische Untersuchungen relevanten Fragen einer Asservierung und Analytik von am Tatort getrockneten Blutproben – und damit nicht unter Verwendung normierter Filterkarten – und die Stabilität der untersuchten Analyten untersucht werden. Zunächst sollen hier die bei den durchgeführten Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse diskutiert und im Anschluss mit der wenigen vorhandenen Literatur verglichen werden.

### 7.1. Asservierung am Tatort

Zunächst wurde in Vorversuchen ein geeignetes Verfahren zur Asservierung der Blutspuren am Tatort entwickelt.

Bei glatten, nicht transportablen Untergrundmaterialien, wie beispielsweise **Kacheln**, **Parkettboden** oder zum Teil auch **Tapete**, hat sich die Asservierung durch Abkratzen mithilfe eines Skalpells bewährt. Allerdings splitterte das Blut bei dieser Form der Asservierung stark und lud sich zudem elektrostatisch auf, sodass ein Überführen in Asservierungsbehälter erschwert wurde.

Deshalb wurden zusätzlich Versuche mit verschiedenen Tupfern (Wattetupfer bzw. Schwammtupfer aus Polyurethanschaum) durchgeführt. Die verwendeten Wattetupfer finden sich in Spurensicherungskoffern der Polizei und sind somit vor Ort leicht zugänglich, allerdings wird zum Anfeuchten der Tupfer zusätzlich Wasser benötigt. Dieses Wasser muss selbstverständlich frei von Drogen oder Medikamentenrückständen sowie schnell verfügbar sein. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Wattetupfern zur Asservierung der Blutspuren ist die bei bereits 100 µL verteiltem Blut nötige Menge von drei bis vier Wattetupfern, um das getrocknete Blut vollständig aufzunehmen. Bei Verwendung der Schwammtupfer genügte aufgrund der größeren

Oberfläche bereits ein Tupfer. Wenn der Blutfleck als tropfenartiges Gebilde vorlag, wie beispielsweise bei genau senkrechtem Auftropfen aus geringer Höhe (wie es für die vorliegende Arbeit praktiziert wurde), ließ sich der Tropfen meist in seiner Gesamtheit vom Untergrund lösen, daher war hier auch nur ein Wattetupfer notwendig.

Die beste Asservierungsmethode bei glatten Oberflächen wie Kacheln und Parkett ist das Abkratzen mithilfe eines Einmalskalpells.

Bei Tapete als Untergrundmaterial stellt die Asservierung der Blutspuren mit Hilfe von Wattetupfern - in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Tapete und des zu sichernden Blutflecks - gegebenenfalls eine Alternative zum Abkratzen mit einem Einmalskalpell dar. Bei Vorliegen eines Blutflecks, der sich als Ganzes von der Tapete lösen lässt, ist eine Verwendung von Wattetupfern sinnvoll, da diese lediglich als Hilfsmittel dienen, um den Tropfen in ein Asservierungsgefäß zu überführen. Mit einem Skalpell würden gegebenenfalls Faserbestandteile der Tapete mit asserviert werden, die später zu Störeffekten bei der Aufarbeitung führen könnten. Ein Abkratzen des Blutflecks mit einem Skalpell bietet sich an, wenn der Blutfleck verwischt ist, da hier sonst eine Verwendung von mehreren Tupfern notwendig wäre.

Liegt eine sehr kleine bzw. fein verspritzte Blutantragung vor, so ist es sinnvoll, mit angefeuchteten Wattetupfern zu asservieren, um möglichst viel der geringen Blutmenge zu erfassen.

**Stoff** bzw. (ausgeschnittener) **Teppich** sind Untergrundmaterialien, welche sich zumeist verhältnismäßig einfach transportieren lassen. Allerdings muss auch in diesen Fällen auf eine korrekte Asservierung geachtet werden. Die heutigen Analysemethoden sind derart empfindlich, dass auch durch Kontakt übertragene Spuren von Arznei- bzw. Suchtstoffen erfasst werden. Die Spurenträger dürfen nicht mit anderen Vergleichsproben (z.B. zusätzlich asservierten, nicht blutbehafteten) zusammen in einer Verpackung aufbewahrt werden, da es hier sonst zur Übertragung derartiger Spuren kommen kann.

Eine weitere Schwierigkeit stellt sich bei der Asservierung von Blutspuren von stark gemusterten bzw. dunklen, insbesondere hochflorigen Teppichen, da hier der eingesickerte Blutfleck nach Trocknung nur noch schwer abgrenzbar ist. Somit sollte eine großzügige Asservierung des betroffenen Stückes erfolgen. Diese ist auch von Vorteil, da berücksichtigt werden muss, dass gegebenenfalls bei verschiedenen Textilien als Untergrundmaterial Chromatografie-Effekte auftreten können und die Verteilung der zu analysierenden Substanzen im Teppich bzw. Stoff möglicherweise nicht homogen

ist [67]. Solche Effekte sind in der Literatur auch für Filterkarten durchaus beschrieben. Ren et al untersuchten mittels drei verschiedenen, mit  $^{14}\text{C}$  radioaktiv markierten Komponenten die Verteilung derer in getrockneten Blutproben auf Filterkarten und konnten Verteilungseffekte aufzeigen (geringere Konzentrationen am Rand des Flecks, den „volcano-effect“ in der Mitte des spots und das „gesprenkelte“ Zentrum) [55].

Durch unterschiedliche Hämatokritwerte verschiedener Personen ändert sich auch das Verhältnis von Größe zu Volumen der Spots und somit auch bei gleicher Stanzgröße die gemessene Konzentration eines Analyten. Dies konnten Holub et al anhand einer Untersuchung verschiedener Aminosäuren und Acylcarnitine in DBS zeigen [26].

Diese Effekte wurden in der vorliegenden Studie nicht weiter untersucht, da die Antragungen auf den textilen Untergrundmaterialien als Ganzes extrahiert wurden.

Falls eine Asservierung des betroffenen Textils und ein Transport in das untersuchende Labor nicht möglich sind, können als Alternative angefeuchtete Wattetupfer zum Abreiben der Blutspur Anwendung finden.

Um eine mikrobielle Belastung der Proben möglichst gering zu halten, sollte den Asservaten ein Päckchen mit Trocknungsmittel beigelegt werden.

Insgesamt lässt sich ausführen, dass getrocknete Blutspritzer oder Blutflecken von unterschiedlichen Materialien mit so wenig Fremdmatrix wie möglich asserviert werden sollen. Daher eignet sich ein Skalpell oder ein ähnlich scharfer Gegenstand am besten, um an glatten Oberflächen getrocknete Blutspuren abzukratzen. Bei kleinen Spuren kann es durchaus sinnvoll sein, mit angefeuchteten Wattetupfern zu arbeiten, da hier eine möglichst vollständige Asservierung der Minimalspuren erfolgen sollte. Bei saugfähigen, transportablen Materialien, in die das Blut einsickern kann empfiehlt sich eine komplette Asservierung des Untergrundmaterials mitsamt dem Blutfleck.

## **7.2. Aufarbeitung im Labor**

Für die Extraktion der Blutproben von den fünf verschiedenen, in der vorgestellten Langzeitstudie verwendeten Untergrundmaterialien Kachel, Parkett, Tapete, Stoff und Teppich wurden unterschiedliche Verfahren getestet.

Zunächst wurde in Vorversuchen die Asservierung des getrockneten Blutes mithilfe von Watte- und Schwammtupfern überprüft. Allerdings waren bei den Wattetupfern insbesondere bei verwischten Blutspuren, bei denen sich das getrocknete Blut nicht als ganzes Gebilde vom Untergrund abnehmen ließ, bis zu vier Tupfer notwendig, um

die getrocknete Blutspur vollständig abzunehmen. Die Aufarbeitung einer größeren Menge an Wattetupfern führte wiederum bei der Analyse zu größeren Störeffekten aufgrund der höheren Belastung durch Matrixbestandteile wie Watterfasern, welche als Schwebeteilchen im zu injizierenden Extrakt gegebenenfalls sogar zu einem Verstopfen der Injektionsnadel des LC-MS/MS-Gerätes führen können.

Insbesondere bei den mittels Schwammtupfer asservierten, aufgearbeiteten Proben resultierten jedoch niedrigere Intensitäten der zu bestimmenden Arznei- bzw. Suchstoffe bei der Messung und daraus resultierenden schlechteren Nachweisgrenzen der einzelnen Analyten. Zum einen ist dies gegebenenfalls durch eine chemische Affinität der Substanzen zum Tupfermaterial bedingt, wodurch sich die Analyten nicht vollständig vom Tupfer extrahieren ließen. Zum anderen liegt insbesondere bei den Schwammtupfern eine hohe Saugfähigkeit vor, die bereits rein physikalisch eine vollständige Wiedergewinnung der zur Extraktion verwendeten Flüssigkeit und damit auch der darin gelösten Analyten erschwert.

Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung der beiden Tupfer war die höhere notwendige Menge an Wasser zum Ablösen des Blutes von den Tupfern im Vergleich zum Rekonstituieren des abgekratzten Blutes. Dies führte zu deutlich längeren Abdampfzeiten im Heizblock und kann dadurch möglicherweise, insbesondere bei temperaturlabilen Analyten durch die längere thermische Belastung eine Degradation bewirken. Bei der Asservierungsmethode durch Abkratzen der Blutproben mithilfe eines Einmalskalpells liegt ein großer Vorteil in der geringen, zum Anlösen der Blutproben nötigen Menge Wasser, und somit resultierenden geringeren Zeiten einer thermischen Belastung beim Abdampfen. Des Weiteren werden bei dieser Aufarbeitung keine Fremdmatrixbestandteile mit extrahiert, wie es bei der Aufarbeitung der mittels Tupfer asservierten Blutproben der Fall ist. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass das Gewicht des abgenommenen Blutes mittels Wiegen exakt bestimmt werden konnte und somit eine ungefähre Rückrechnung auf das ursprünglich vorhanden gewesene Blutvolumen möglich war.

Bei den glatten Untergrundmaterialien, wie **Kacheln** bzw. **Parkett** hat sich die Asservierung durch Abkratzen mithilfe eines Skalpells als beste Methode erwiesen und wurde für die Langzeitstudie verwendet.

Für das uneinheitliche Untergrundmaterial **Tapete** sind, wie bereits oben ausgeführt, je nach Beschaffenheit verschiedene Methoden der Asservierung sinnvoll. Für die Langzeitstudie wurden die getrockneten Blutropfen von Tapete mithilfe von mit

bidestilliertem Wasser angefeuchteten Wattetupfern asserviert, da diese sich als ganzes Gebilde vom Untergrund lösen ließen und somit lediglich ein Tupfer notwendig war. Die verwendeten Tupfer sind deutlich weniger saugfähig, als die alternativ getesteten Schwammtupfer, mit dem Vorteil, dass weniger Wasser zum Ablösen bzw. Rekonstituieren des Blutes benötigt wird. Falls der Blutropfen sich als komplettes Gebilde von der Tapete löst, lässt sich die erhaltene Trockenblutmasse einfach mittels Wiegen, gegebenenfalls nach vorheriger Trocknung, bestimmen. Werden allerdings verwischte Spuren aufgenommen, die sich im Tupfermaterial verteilen, ist ein komplettes Ablösen des Blutes vom Tupfer und damit die Wägung des Trockenblutes nicht möglich. Ein Gewichtsvergleich mit einem nicht benutzten Tupfer wäre theoretisch möglich, ist aber praktisch kaum durchführbar, da die Tupfer sich in ihren Massen in einem für diese Studie relevanten Bereich unterscheiden. Ein Wiegen der Tupfer vor ihrer Verwendung ist aus praktischen Gründen nicht durchführbar, zusätzlich kann es gegebenenfalls auch beim Asservieren einer Blutspur zum Verlust von Fasern aus dem Tupfermaterial und so zu Gewichtsunterschieden in einem für die Spurenanalytik relevanten Bereich kommen.

Bei **Stoff** und **Teppich** ist eine Bestimmung der enthaltenen Trockenblutmenge durch Wägung und somit eine mögliche Abschätzung des Vollblutvolumens aufgrund des Einsickerns in die Fasern nicht möglich, da das Blut nicht fleckförmig, sondern gebunden auf einem Untergrundmaterial vorliegt.

Eine Alternative für die Abschätzung des Gewichtes von auf Stoff getrockneten Blutproben wäre, von einem nicht kontaminierten Stück desselben Stoffes ein gleich großes Stück wie das zu untersuchende Stück mit Blutfleck auszuschneiden, beide gleichermaßen zu trocknen und anschließend mittels Wägung die Gewichtsunterschiede zu bestimmen. Allerdings liegen hier, wie auch bei den Tupfern beschrieben, Massenschwankungen in einem Bereich vor, der diese Methode für die Praxis ungeeignet macht.

Bei Teppich als verhältnismäßig dickem und saugfähigem Material könnten für eine grobe Abschätzung der Masse des getrockneten Blutes, wie später im Fallbeispiel 1 beschrieben, Vergleichsteppichstücke mit unterschiedlichen aufgetragenen Blutvolumina angesetzt werden und nach Trocknung und Lösung des Blutes die Farben der erhaltenen Extraktionsflüssigkeiten verglichen werden. Dies ist jedoch eine aufgrund der Farbwahrnehmung subjektive Methode, des Weiteren kann die Menge des

Blutes hier nur sehr grob (im Milliliterbereich) abgeschätzt werden. Die ist für die hier durchgeführte Spurenanalytik jedoch deutlich zu ungenau.

Als Extraktionsmittel für auf den transportablen Untergrundmaterialien Stoff bzw. Teppich getrocknete, im Ganzen asservierte Blutspuren hat sich in dieser Studie Wasser bewährt. Es wurden zunächst Vorversuche mit einem Methanol/Wasser-Gemisch durchgeführt. Ein Vorteil dieser Methode wäre eine vereinfachte Probenvorbereitung, da Methanol als organisches Lösungsmittel wesentlich kürzere Abdampfzeiten aufweist, als Wasser. Da Methanol aber Proteine denaturiert, wurde bei diesem Verfahren sichtbar weniger Blut vom Untergrundmaterial in Lösung gebracht. Dies zeigte sich bereits anhand der Farbe der erhaltenen Lösungen, die im Vergleich zu den mit reinem Wasser extrahierten Proben deutlich weniger gefärbt waren und damit weniger roten Blutfarbstoff enthielten. Dies lässt sich damit erklären, dass die Proteine aus dem Blut offensichtlich direkt auf dem Stoff denaturiert wurden und sich daher einige Bestandteile nicht mehr in Lösung bringen ließen. Darüber hinaus war die Extraktionsausbeute der zu analysierenden Arznei- bzw. Suchtstoffe in einigen Fällen geringer, als bei den mit Wasser rekonstituierten Proben. Dies lässt sich damit begründen, dass diese Analyten zumindest teilweise zusammen mit den denaturierten Proteinen auf dem Stoff fixiert wurden. Aufgrund der oben genannten Nachteile bei der Verwendung eines Methanol/Wasser-Gemisches wurden die getrockneten Blutproben von Stoff und Teppich für die Langzeitstudie mit bidestilliertem Wasser vom jeweiligen Untergrund extrahiert. Bei Verwendung von 1 mL Wasser als Extraktionsmittel für die Proben von Stoff bzw. 2 mL für die Extraktion von Teppich (da nach Zugabe von 1 mL analog zu den Stoffproben keine überstehende Flüssigkeit vorhanden war, sondern das Wasser komplett in die Fasern des Teppichs aufgesaugt wurde) ergab sich eine deutlich längere Abdampfzeit als bei den Proben von Parkett, Kachel und Tapete, bei denen mit weniger Wasser gearbeitet wurde. Dies kann für thermisch instabile Analyten problematisch sein. Auch waren in den zum Schluss erhaltenen Extrakten mehr sichtbare Verunreinigungen durch Schwebteilchen aus dem Untergrundmaterial enthalten, als in den Extrakten, aus den von Kachel und Parkett abgekratzten Blutproben. Durch Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes konnte, insbesondere bei den Proben von Stoff, zumindest ein Teil der Verunreinigungen vor der Messung am LC-Gerät eliminiert werden.

**Teppich** als Untergrundmaterial stellte sich als in der Extraktion der getrockneten Blutropfen schwierigstes, in dieser Studie untersuchtes Material dar. Insbesondere bei hochflorigen Teppichen dringen die Blutropfen weit in das Material ein und können bei gewebten Teppichen ohne gummierten Untergrund auch bis auf den darunter liegenden Boden durchsickern. Darüber hinaus kann eine Lokalisation des Blutfleckes auf stark gemusterten, insbesondere rötlich oder braun gefärbten Teppichen wie beispielsweise Perserteppichen, erhebliche Schwierigkeiten bereiten. Die Areale mit den getrockneten Blutflecken sollten daher großzügig um den Fleck herum ausgeschnitten werden, um die Blutantragung vollständig zu erfassen.

Die erhaltenen Extrakte von den auf Teppich getrockneten Blutproben wiesen deutlich mehr Verunreinigungen auf, als die Extrakte der von glatten Materialien, aber auch der von Stoff extrahierten Proben, da hier offensichtlich eine Mitextraktion von Staub und anderen Kleinstpartikeln aus dem Teppich stattgefunden hat. Hier ließ sich auch durch Zentrifugieren und Abpipettieren der Extrakte nur ein Teil der Verunreinigungen entfernen.

Diese Schwierigkeiten ließen sich in den erhaltenen Chromatogrammen deutlich an einem höheren Untergrundsignal und einer geringeren Intensität der zu untersuchenden Analyten im Vergleich zu den anderen verwendeten Untergrundmaterialien erkennen.

Eine zu diskutierende Alternative für die Probenvorbereitung der auf Teppich getrockneten Blutspuren wäre eine Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion. Nachteile liegen hier in dem deutlich höheren Aufwand und eventuellen Substanzverlusten bei der Aufreinigung.

#### - *Literaturvergleich*

Die breiteste Anwendung in der Analytik kleinerer Moleküle finden dried blood spots (DBS) im Bereich des therapeutic drug monitoring (TDM). Der Hauptgrund hierfür ist eine vereinfachte, patientenschonende Entnahmemethode und damit eine Entlastung von sowohl Krankenhaus-/Praxispersonal als auch eine Erleichterung für den Patienten selbst. Hier werden vor allem Arzneistoffe untersucht, bei denen häufige Blutspiegelkontrollen erforderlich sind wie Immunsuppressiva, Antiepileptika und antivirale Medikamente. Auch werden neue Entwicklungen aus dem Bereich der Probennahme und automatisierten Analytik vorgestellt wie beispielsweise modifizierte Filterkarten,

die dried plasma spots erzeugen sollen [62] oder Extraktionsmethoden für dried blood spots auf Filterkarten ([20], [21], [47]).

Von Pedersen et al liegt eine Studie zur Untersuchung von verschiedenen Elementen in DBS vor. Hier wurden die Konzentrationen von u.a. Kupfer, Zink und Eisen im Blut untersucht [49].

Im Bereich der illegalen Drogenwirkstoffe finden sich einige Publikationen, die sich mit der Analyse von DBS auf Filterkarten beschäftigten. Hier ist ebenfalls ein Hauptgrund die vereinfachte Probennahme, aber auch der unproblematische Versand und die teilweise verbesserte Stabilität einiger Substanzen. Alfazil et al beispielsweise untersuchten die Stabilität von Cocain und sechs Benzodiazepinen (Flunitrazepam, Temazepam, Lorazepam, Oxazepam, Nitrazepam und Diazepam) in DBS über einen Monat bei drei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C) [2]. Auch wurden in dieser Studie die Wiederfindungsraten in DBS bezüglich flüssigem Blut untersucht. Die Untersuchungen zeigen durchweg gute Wiederfindungsraten und eine sehr gute Stabilität der untersuchten Substanzen, insbesondere gegenüber einer Lagerung in flüssigem Blut. Allerdings wurde hier mit sehr hohen Ausgangskonzentrationen der einzelnen Analyten von jeweils 1000 ng/mL gearbeitet, daher fallen geringere Schwankungen nach der Lagerungsdauer von einem Monat möglicherweise nicht auf. Bei einigen Analyten sind Konzentrationsabfälle von bis zu 19,9 % (Cocain) bei Lagerung bei Raumtemperatur zu beobachten gewesen. Bei Lagerung im Gefrierschrank waren die berechneten Abweichungen für alle Analyten geringer als 10 %.

Von dried blood spots auf Filterkarten abgesehen, finden sich in der Literatur nur wenig Artikel zu einer forensisch toxikologischen Analyse aus getrockneten Blutspuren.

Saussereau et al entwickelten eine Methode zur Untersuchung von DBS auf die straßenverkehrsrelevanten Suchtstoffgruppen Cocain, Opiate und Amphetamine [59]. Es wurden auch Metaboliten der jeweiligen Substanzen mit untersucht. Die Filterkarten mit den DBS wurden sechs Monate bei zwei verschiedenen Temperaturen (4 °C und -20 °C) gelagert. Nach sechs Monaten waren in den bei -20 °C gelagerten Proben alle untersuchten Analyten ohne signifikanten Substanzabbau detektierbar (81,5 % bis 100 % vom Ursprungswert). Bei 4 °C lagen insbesondere bei Cocain, Ecgoninmethylester und Methamphetamin deutlich niedrigere Konzentrationen vor, als zu Beginn der Studie.

Chepyala et al untersuchten Wiederfindung und Stabilität von 57 verschiedenen Drogen bzw. deren Metaboliten in auf Filterkarten getrocknetem Blut bei zwei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur und  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [9]. Die Wiederfindung der Analyten lag bei allen Analyten bei mindestens 67 %. Einige Analyten, wie beispielsweise Methylphenidat zeigten allerdings nach Lagerung über sechs Monate sowohl bei Raumtemperatur als auch bei den bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben eine um mehr als 50 % verringerte Konzentration des Analyten und somit eine deutliche Instabilität.

Zur Asservierung von getrockneten Blutspuren von verschiedenen Untergrundmaterialien am Tatort gibt es bis dato wenige Studien, in denen entsprechende Untersuchungen veröffentlicht sind.

Winkler et. al untersuchten die Asservierung und Untersuchung von auf verschiedenen Untergrundmaterialien (Teppich, Tapete, Asphalt, Autositzbezug, unbehandeltem Kalbsleder, Wattetupfern und Glas) getrockneten Blutproben auf Ethylglucuronid als Alkoholkonsummarker [66]. Die auf Textilien bzw. Leder getrockneten Blutproben (zu je 4 mL) wurden ausgeschnitten, in kleine Stücke geteilt und anschließend extrahiert. In dieser Studie wurde mit großen Mengen bidestillierten Wassers (300 mL) als Extraktionsmittel gearbeitet, welches im weiteren Verlauf der Aufarbeitung durch Gefriertrocknung wieder entzogen wurde. Von dem erhaltenen Rückstand wurde ein Teil wieder mit Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS gemessen. Auf den in der Aufarbeitung unkomplizierten, glatten Untergrundmaterialien wurden in der Studie von Winkler et. al. ähnliche Erfahrungen gemacht, wie auch in der in dieser Arbeit vorgestellten Langzeitstudie. Die weiteren Untergrundmaterialien - insbesondere das in unserer Studie schwierige Material Teppich - zeigen bei der von Winkler et. al. verwendeten Methode deutlich bessere Ergebnisse. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass es sich bei dem Analyten Ethylglucuronid um eine sehr gut wasserlösliche Substanz handelt und die bei Winkler et. al. beschriebene Extraktion mit einer großen Menge Wasser durchgeführt wurde. Des Weiteren wurde in der Methode eine aufwändigere Aufreinigung durchgeführt, während in unserer Studie eine kurze, möglichst einfach durchzuführende Aufarbeitungsmethode gewählt wurde. Zusätzlich wurde in der Studie von Winkler et. al. eine große Menge Blut (je 4 mL) auf die verschiedenen Untergrundmaterialien aufgebracht, sodass eine hohe Konzentration des zu messenden Analyten Ethylglucuronid im mg/L-Bereich vorlag, während in der von uns durchgeführten Studie die Substanzen teilweise im niedrigen µg/L-Bereich

und somit um ca. einen Faktor 10 bis 300 geringer konzentriert vorlagen. Damit fielen die Abweichungen vom Sollwert in unserer Studie deutlicher ins Gewicht als in der von Winkler et. al. durchgeführten Studie (hier betrug die maximale Abweichung der EtG-Konzentration bei einer Versuchsperson - 11,3 % für Proben von Leder und Tapete bezogen auf einen auf die Trockenblutmasse berechneten Wert der EtG-Konzentration im Vollblut).

### 7.3. Langzeitstudie und Kurzzeit-Lagerungsstudie zur Stabilität von Arznei- bzw. Suchtstoffen

In den beiden durchgeführten Studien wurde die Stabilität von insgesamt 22 verschiedenen Analyten in - auf diversen Untergrundmaterialien (Kachel und Stoff, in der Langzeitstudie zusätzlich Parkett, Tapete und Teppich) getrocknetem - Blut über einen Zeitraum von sechs Monaten bzw. sieben Wochen untersucht. Es wurden verschiedene Drogenwirkstoffe und Medikamente mit forensischer Relevanz ausgewählt.

#### - Stimulanzien (Benzoyllecgonin, Methamphetamin)

Aus der Gruppe der Stimulanzien wurden Benzoyllecgonin als inaktives Stoffwechsel- bzw. Abbauprodukt des Cocains und Methamphetamin untersucht. Für beide Substanzen lagen zur Quantifizierung in den verwendeten Methoden deuterierte interne Standards vor. Sowohl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie als auch in der Langzeitstudie schwankten die für die jeweiligen Analyten errechneten Konzentrationen mit einer Ausnahme in einem engen Bereich um die jeweiligen Sollwerte.

Die für Methamphetamin auf dem Untergrundmaterial Teppich berechneten Konzentrationen waren meist deutlich zu hoch und stark schwankend, sodass zwar über die gesamte sechsmonatige Lagerung ein qualitativer Nachweis des Analyten möglich war, nicht jedoch eine Quantifizierung. Alle anderen Untergrundmaterialien konnten sowohl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie als auch in der Langzeitstudie bei allen untersuchten Temperaturen quantitativ ausgewertet werden. Es lassen sich in den Diagrammen keinerlei Hinweise für eine Degradation der beiden untersuchten Stimulanzien in getrockneten Blutproben erkennen. Vielmehr weisen die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass beide Analyten sehr wahrscheinlich auch über einen deutlich längeren Zeitraum zumindest qualitativ nachweisbar sein sollten.

#### - Opiate/Opioide

##### o *Morphin*

Morphin wurde sowohl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie als auch in der Langzeitstudie mit deuteriertem internem Standard bestimmt. In beiden Studien zeigte sich eine gute Korrelation mit nur geringen Schwankungen zum Sollwert. In der

Kurzzeit-Lagerungsstudie zeigten sich insbesondere auf Stoff größere Schwankungen, die in der Langzeitstudie nicht erkennbar waren. Dies lässt sich möglicherweise mit der für die Langzeitstudie modifizierten Aufarbeitung der Proben mit einer geringeren Menge an bidestilliertem Wasser erklären.

- *Codein, Methadon, Fentanyl, Tramadol*

In den Diagrammen der Kurzzeit-Lagerungsstudie sieht man für die o.a. Opioide deutliche Schwankungen der errechneten Konzentrationen, da für diese Substanzen keine deuterierten internen Standards zur Quantifizierung verwendet wurden. Eine valide Quantifizierung ist hier nicht möglich. Tramadol wurde aufgrund einer gegenüber den anderen Opioiden geringeren Relevanz nicht in die Langzeitstudie aufgenommen. In der Langzeitstudie hat die Verwendung von Codein-D3, Methadon-D3 bzw. Fentanyl-D5 zur Quantifizierung für die entsprechenden Analyten zu sehr stabilen, im Bereich des Sollwertes liegenden und damit quantitativ auswertbaren Ergebnissen geführt. Während Codein und Fentanyl auf allen untersuchten Materialien stabile, wenn auch für Teppich – und Fentanyl auch für Tapete - im Vergleich zum Sollwert zu niedrige Ergebnisse zeigten, wies Methadon auf allen hier untersuchten Materialien eine abnehmende Tendenz auf, die bei Teppich besonders ausgeprägt war (bis zu einer Konzentration, die nur noch 38,4 % des Sollwertes betrug).

Die in beiden Studien untersuchten Opiate/Opioide ließen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum temperatur- und materialunabhängig zumindest qualitativ nachweisen, in der Langzeitstudie war darüber hinaus – mit Ausnahme von Teppich als Untergrundmaterial – eine valide Quantifizierung möglich.

- *Benzodiazepine*

- *7-Aminoflunitrazepam*

7-Aminoflunitrazepam liegt nach therapeutischer Aufnahme von Flunitrazepam als Metabolit in einem niedrigen Konzentrationsbereich von durchschnittlich 2 ng/mL im Serum vor [5]. In der Kurzzeit-Lagerungsstudie wurde zur Quantifizierung von 7-Aminoflunitrazepam Diazepam-D5 verwendet. Bereits nach - für Proben von Kachel - achttägiger bzw. - für Proben von Stoff - dreitägiger Lagerung war in keiner der Proben mehr 7-Aminoflunitrazepam nachweisbar. Die Instabilität von Nitrobenzodiazepinen wie Flunitrazepam in flüssigen Blutproben ist bereits hinreichend bekannt

[57]. Auch deren 7-Amino-Metabolite unterliegen einer temperaturabhängigen Degradation [57]. In dieser Studie sollte überprüft werden, ob sich die Stabilität mit dem Trocknen von Blutproben verbessern lässt. Da es sich jedoch auch in getrockneten Blutproben bereits nach sehr kurzer Lagerungszeit als instabil erwiesen hat, wurde 7-Aminoflunitrazepam als Analyt nicht in die Langzeitstudie aufgenommen.

- *Diazepam*

Diazepam wurde nur in der Kurzzeit-Lagerungsstudie untersucht und in dieser mit einem eigenen deuterierten internen Standard quantifiziert. Die erhaltenen Werte schwankten bei den beiden untersuchten Untergrundmaterialien Kachel und Stoff in engem Bereich um den Sollwert, wobei die auf Stoff getrockneten Proben eine geringfügig größere Abweichung zu gegenüber dem Sollwert höheren Konzentrationen aufwiesen (bis zu 129 % des Sollwerts). In der Langzeitstudie wurde Diazepam nicht untersucht, da mit seinem Metaboliten Nordazepam eine sehr strukturähnliche Substanz vorlag und darüber hinaus Lorazepam als weiteres Benzodiazepin ausgewählt wurde.

- *Nordazepam*

Nordazepam wurde sowohl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie, als auch – modifiziert durch Verwendung eines deuterierten internen Standards – in der Langzeitstudie untersucht. In der Kurzzeit-Lagerungsstudie schwankten die Werte temperaturunabhängig deutlich, wobei sie bei den auf Stoff getrockneten Proben oberhalb des Sollwertes und bei den auf Kachel getrockneten Proben unterhalb des Sollwertes lagen. Eine mögliche Erklärung liegt im unterschiedlichen Extraktionsverhalten von Nordazepam bezogen auf den zur Quantifizierung in der Kurzzeit-Lagerungsstudie verwendeten internen Standard Diazepam-D5. Dieser ließ sich anscheinend von Stoff schlechter in Lösung bringen als Nordazepam selbst, wodurch die erhaltenen Konzentrationen für Nordazepam zu hoch lagen. Für die auf Kachel getrockneten Proben liegt eine mögliche Erklärung der nahezu durchweg zu niedrig gemessenen Konzentrationen in einer verminderten Extraktionsausbeute des Analyten aus den getrockneten Blutsplittern.

In der Langzeitstudie schwankten die Werte – auf den in beiden Studien untersuchten Untergrundmaterialien Kachel und Stoff - in deutlich geringerem Umfang um den Sollwert, als in der Kurzzeit-Lagerungsstudie. Dies lässt sich mit der Verwendung eines

eigenen deuterierten internen Standards zur Quantifizierung erklären. Auch auf den übrigen, in der Langzeitstudie untersuchten Untergrundmaterialien Parkett, Tapete und Teppich bewegten sich die erhaltenen Konzentrationen für Nordazepam in geringem Umfang um den Sollwert. Lediglich die auf Teppich getrockneten Blutproben zeigen deutlichere Schwankungen.

- *Lorazepam*

Lorazepam wurde in der Langzeitstudie als Alternative zum – in der Kurzzeit-Lagerungsstudie ebenso wie Nordazepam stabilen - Diazepam als weiteres, häufig verordnetes Benzodiazepin untersucht. Zur Quantifizierung stand kein deuteriertes Lorazepam zur Verfügung. Auf allen untersuchten Materialien fielen die gemessenen Lorazepamkonzentrationen im untersuchten Zeitraum leicht ab mit minimalen Konzentrationen von 41,1 % vom Sollwert auf Parkett. Während die Werte auf Kachel und Parkett nur geringfügig vom Sollwert abwichen, waren die Schwankungen auf den weiteren – in der Extraktion der Blutproben aufwändigeren - untersuchten Untergrundmaterialien deutlicher, die Werte lagen zum Teil erheblich oberhalb des Sollwertes. Dies lässt sich mit dem unterschiedlichen Extraktionsverhalten von Lorazepam und dem zur Quantifizierung verwendeten Diazepam-D5 erklären.

Aus der Gruppe der Benzodiazepine waren – mit Ausnahme des 7-Aminoflunitrazepams – alle hier untersuchten Arzneistoffe über den jeweiligen Lagerungszeitraum in getrockneten Blutproben stabil und qualitativ nachweisbar. Die größten Schwankungen der erhaltenen Konzentrationen zeigten sich auf dem schwierig zu extrahierenden Untergrundmaterial Teppich. Eine Quantifizierung war für Nordazepam und Diazepam unter Verwendung eigener deuterierter interner Standards auf allen jeweils untersuchten Untergrundmaterialien temperaturunabhängig möglich. Die für den Analyten Lorazepam ermittelten Konzentrationen fielen über den untersuchten Zeitraum von sechs Monaten auf allen Materialien temperaturunabhängig leicht ab, dies könnte auf einen beginnenden Abbau des Arzneistoffes hinweisen. Auf den in ihrer Extraktion unkomplizierten Materialien Kachel und Parkett konnte eine Quantifizierung des Lorazepams erfolgen, auf den übrigen Materialien Tapete, Stoff und Teppich war dies nicht möglich.

- Weitere Hypnotika

o *Zolpidem*

Zolpidem wurde in beiden Studien untersucht. Da sich in der Kurzzeit-Lagerungsstudie große Schwankungen der erhaltenen Werte zeigten, wurde in der Langzeitstudie ein eigener deuterierter interner Standard zur Quantifizierung in die Methode integriert. Hieraus resultierte eine deutliche Verbesserung. Auf allen in der Langzeitstudie untersuchten Materialien konnte Zolpidem temperaturunabhängig über sechs Monate qualitativ nachgewiesen und auch quantifiziert werden. Das Untergrundmaterial Teppich zeigte auch hier die größten Schwankungen der erhaltenen Konzentrationen um den Sollwert.

o *Diphenhydramin*

Diphenhydramin ist ein zusätzlich in der Langzeitstudie untersuchtes Hypnotikum. Für die Quantifizierung dieses Arzneistoffes lag kein deuterierter interner Standard vor. Die von den leicht zu extrahierenden Untergrundmaterialien Kachel und Parkett erhaltenen Ergebnisse wiesen nur geringe Schwankungen auf und der Arzneistoff ließ sich quantitativ bestimmen. Die Konzentrationen der Proben von Tapete, Stoff und Teppich und damit den in der Extraktion aufwändigeren Untergrundmaterialien lagen bereits zu Beginn deutlich oberhalb des Sollwertes und unterlagen erheblichen Schwankungen. Dies lässt sich auf das unterschiedliche physikochemische Verhalten von Diphenhydramin und des zur Quantifizierung verwendeten internen Standards MPPH zurückführen. Analog zu Nordazepam in der Kurzzeitlagerungsstudie lag wohl auch hier auf den Untergrundmaterialien Tapete, Stoff und Teppich eine schlechtere Extraktionsausbeute des internen Standards verglichen mit dem Analyten Diphenhydramin vor, sodass dessen Werte zu hoch berechnet wurden.

Beide hier untersuchten Hypnotika ließen sich über einen Zeitraum von sechs Monaten in getrockneten Blutproben zumindest qualitativ nachweisen. Es bestand keine Abhängigkeit der Stabilität von Lagerungstemperatur oder Untergrundmaterial. Auf den – in ihrer Bearbeitung unkomplizierten – Materialien Kachel und Parkett betrug die maximale Abweichung zwischen 84,1 % und 181 % vom ermittelten Sollwert.

- Psychopharmaka

o *Amitriptylin und Nortriptylin*

Amitriptylin und sein Metabolit Nortriptylin wurden lediglich in der Kurzzeit-Lagerungsstudie untersucht. Beide wurden nicht über einen deuterierten internen Standard quantifiziert und unterlagen insbesondere gegen Ende der Studie und auf dem Untergrundmaterial Stoff deutlichen, augenscheinlich zufälligen Schwankungen um den Sollwert (siehe Diagramme im Anhang). In die Langzeitstudie wurde aufgrund größerer Relevanz (deutlich häufiger verordnet) der Arzneistoff Mirtazapin anstelle von Amitriptylin und Nortriptylin aufgenommen. Zumindest qualitativ waren sowohl Amitriptylin als auch Nortriptylin auf allen in der Kurzzeit-Lagerungsstudie untersuchten Materialien über sieben Wochen temperaturunabhängig nachweisbar.

o *Doxepin, Citalopram, Quetiapin*

Die drei Psychopharmaka Citalopram, Doxepin und Quetiapin wurden sowohl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie, als auch in der Langzeitstudie untersucht. In beiden Studien wurde zur Quantifizierung jeweils kein deuterierter interner Standard verwendet. Die in der Kurzzeit-Lagerungsstudie erhaltenen Ergebnisse schwankten temperatur- und materialunabhängig deutlich um den Sollwert und ließen sich nicht quantifizieren. Analog zu den bei Diphenhydramin erhaltenen Ergebnissen ließen sich die drei Psychopharmaka Doxepin, Citalopram und Quetiapin über sechs Monate qualitativ nachweisen. Darüber hinaus war auf den einfach zu extrahierenden Untergrundmaterialien Kachel und Parkett eine Quantifizierung mit geringen Schwankungen um den Sollwert möglich, wohingegen sich die Resultate der schwierig zu extrahierenden Materialien Tapete, Stoff und Teppich deutlich oberhalb des Sollwertes befanden (mit Extremwerten von bis zu 832 % des Sollwertes bei Quetiapin) und sich nicht quantifizieren ließen.

o *Mirtazapin*

Zur Quantifizierung von Mirtazapin wurde kein deuterierter interner Standard verwendet. Die auf Kachel und Parkett getrockneten Blutproben zeigten, ähnlich wie Diphenhydramin, nur geringe Schwankungen um den Sollwert und ließen sich valide quantitativ auswerten. Die Resultate der Proben der – in ihrer Extraktion aufwändigeren – Untergrundmaterialien Tapete, Stoff und Teppich schwankten deutlicher und lagen für

Stoff und Tapete, analog zu Diphenhydramin, mit Extremwerten bis zu 363 % des Sollwertes deutlich zu hoch. Das Untergrundmaterial Teppich unterschied sich sichtbar von den bei Diphenhydramin erhaltenen Ergebnissen, so lagen die Werte - mit Ausnahme eines Ausreißers – weit unterhalb des Sollwertes (bis zu nur noch 16 % des ursprünglichen Sollwertes). Eine mögliche Erklärung liegt in einem unterschiedlichen Verhalten des tetrazyklischen Antidepressivums Mirtazapin gegenüber dem zur Quantifizierung verwendeten internen Standard MPPH auf Teppich im Vergleich zu Tapete und Stoff.

Die in beiden Studien untersuchten Psychopharmaka waren über den jeweils untersuchten Zeitraum in getrockneten Blutproben unabhängig von gewählter Lagerungstemperatur und Untergrundmaterial stabil und nach dieser Zeit qualitativ nachweisbar. Eine Quantifizierung wäre durch die Verwendung eines deuterierten internen Standards für den jeweiligen Arzneistoff auch auf den schwierig zu extrahierenden Materialien Tapete, Stoff und Teppich möglich.

- Weitere Arzneistoffe

o *Bisoprolol*

Bisoprolol wurde als weiterer Arzneistoff in die Langzeitstudie aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde aufgrund der ähnlichen Retentionszeit Methamphetamin-D14 als interner Standard verwendet. Über den Zeitraum von sechs Monaten war Bisoprolol auf allen untersuchten Materialien temperaturunabhängig zumindest qualitativ nachweisbar. Wie die Psychopharmaka ließ sich Bisoprolol auf den einfach zu extrahierenden Untergrundmaterialien Kachel und Parkett mit nur geringen Schwankungen vom Sollwert temperaturunabhängig quantitativ bestimmen. Auf den in ihrer Extraktion aufwändigeren Materialien Tapete, Stoff und Teppich lagen deutlich größere Schwankungen vor (auf Teppich wurden Extremwerte der Konzentration von bis zu 1408 % des ermittelten Sollwertes erhalten), sodass eine Quantifizierung nicht sinnvoll erscheint.

o *Ramipril*

Auch Ramipril wurde als häufig verordnetes Antihypertonikum in der Langzeitstudie untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit MPPH als internem Standard. Über den untersuchten Zeitraum von sechs Monaten war Ramipril auf allen fünf untersuchten

Materialien temperaturunabhängig stabil und qualitativ nachweisbar. Aufgrund der geringen – an den therapeutischen Bereich angepassten - Konzentration von Ramipril in den aufgetragenen Blutproben waren die Schwankungen um den Sollwert deutlich und somit eine Quantifizierung – auch aus den von Kachel und Parkett (auch hier Abweichungen vom Sollwert bis zu + 135 %) extrahierten Blutproben- nicht valide möglich.

- *Metformin*

Metformin wurde als Antidiabetikum in die Langzeitstudie aufgenommen. Eine Quantifizierung erfolgte aufgrund der ähnlich frühen Retentionszeiten mittels Morphin-D3. Ein qualitativer Nachweis war über sechs Monate auf allen untersuchten Materialien temperaturunabhängig möglich. Darüber hinaus war auf allen untersuchten Materialien aufgrund vergleichsweise geringer Schwankungen zwischen minimal 91,8 % und maximal 161 % des Sollwerts auch eine Quantifizierung möglich. Für die leicht ansteigenden Konzentrationen auf den in ihrer Extraktion aufwändigeren Untergrundmaterialien Tapete, Stoff und Teppich ist eine durch die Lagerungsdauer gegebenenfalls verbesserte Extrahierbarkeit des Metformins aus dem getrockneten Blut zu diskutieren.

- *Vergleich mit Literaturangaben*

Aktuelle Studien aus dem Bereich der forensischen Toxikologie liegen im Vergleich zu den zahlreichen Untersuchungen aus dem Bereich des TDM nur in geringem Umfang vor, beispielsweise für Benzodiazepine und Cocain [2] oder Zopiclon [32]. Ziel dieser Untersuchungen war es insbesondere, die Stabilität dieser in flüssigem Blut teilweise instabilen Analyten in getrocknetem Blut zu überprüfen. Schon das Versenden flüssiger Blutproben auf dem Postweg kann in Bezug auf die Stabilität solcher Analyten eine Fehlerquelle aufgrund Degradation darstellen, da die Proben teilweise mehrere Tage bei unbekanntem äußeren Bedingungen unterwegs sein können. In diesen Fällen kann die Anfertigung von DBS auf normierten Filterkarten eine sinnvolle Alternative beim Versand von Blutproben darstellen.

Es gibt auch einige wenige Untersuchungen zur Vergleichbarkeit einer Analyse von Vollblut und DBS. Beispielsweise für MDMA ("Ecstasy") konnte von Jantos et al eine gute Übereinstimmung (Verhältnis Blut/DBS 0,99) gezeigt werden [31].

Für eine – über die normierten Filterkarten hinausgehende - Analyse von getrockneten Blutproben auf verschiedenen Untergrundmaterialien, wie sie potenziell auch an Tatorten vorkommen können, gibt es wenig Literatur.

J. Gotta (2004) beschäftigte sich in seiner Doktorarbeit mit der Analyse häufig missbräuchlich verwendeter Arznei- bzw. Suchtstoffe aus den Gruppen Opiate, Amphetamine, Cocain und Cannabinoide (unter anderem auch die in der von uns durchgeführten Langzeitstudie verwendeten Substanzen Morphin, Codein, Methamphetamin und Benzoyllecgonin) [19]. Er untersuchte die Stabilität dieser Analyten in - auf verschiedenen Untergrundmaterialien (u.a. auch die in dieser Studie verwendeten Materialien Stoff und Fliesen) - getrockneten Blutproben über einen Zeitraum von rund zwei Monaten. Das Volumen der aufgetragene Blutropfen lag in seiner Studie bei 50 µL. Extraktionsversuche wurden von Gotta nicht durchgeführt, die auf Kachel getrockneten Blutflecken wurden mit einem Spatel abgekratzt, die auf Stoff getrockneten Flecken wurden komplett ausgeschnitten, anschließend wurden alle Proben jeweils mit Pufferlösung extrahiert und über Festphasenextraktion aufgereinigt. Die Messung erfolgte mittels GC-MS nach entsprechender Derivatisierung.

Morphin und Benzoyllecgonin konnten in der von Gotta durchgeführten Studie auf dem Untergrundmaterial Stoff in Übereinstimmung mit unseren Untersuchungsergebnissen

mit geringen Schwankungen über den gesamten Zeitraum quantitativ bestimmt werden. Bei Codein und Methamphetamin lagen deutlichere Schwankungen vor, als dies in unserer Studie der Fall war, ein qualitativer Nachweis war aber auch in der Studie von Gotta zumindest über den Zeitraum von zwei Monaten möglich. Im Gegensatz zu der von uns durchgeführten Studie zeigen die von Kacheln/Fliesen extrahierten Proben bei Gotta deutlichere Schwankungen, als die von Stoff extrahierten. Dies gilt insbesondere für Morphin und Benzoylcegonin, lediglich Methamphetamin zeigt einen weniger schwankenden Verlauf. Zusammenfassend lässt sich ausführen, dass Gotta in seiner Studie alle von ihm untersuchten Substanzen über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten in getrocknetem Blut auf verschiedenen Untergrundmaterialien qualitativ nachweisen konnte.

C. Jamey (2014) untersuchte in einer einmonatigen Studie die Stabilität von sieben verschiedenen Benzodiazepinen (u.a. Diazepam), Methadon und Zolpidem in auf Glas getrocknetem Blut [29]. Auch das in dieser Studie aufgetragene Blutvolumen betrug jeweils 50 µL pro Spot. Die Proben wurden mithilfe eines Skalpell abgenommen, mit Pufferlösung rekonstituiert und mittels LC-MS/MS analysiert.

Verglichen mit den aus der Langzeitstudie erhaltenen Ergebnissen für das vergleichbare, ebenfalls glatte Untergrundmaterial Kachel, sind die von Jamey aufgeführten Resultate in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der von uns durchgeführten Studien. In der Kurzzeit-Lagerungsstudie wurden die Proben bei drei verschiedenen Temperaturen gelagert. Bei allen Temperaturen war Diazepam über sieben Wochen stabil. Jamey untersuchte in ihrer Studie zusätzlich zu den von uns überprüften Temperaturen Raumtemperatur, 4 °C und 35 °C den Einfluss von Licht auf die Stabilität bei Raumtemperatur sowie die weiteren Lagerungsbedingungen – 20 °C und Lagerung im Freien. Auch unter diesen weiteren Bedingungen zeigte sich Diazepam über einen Monat in getrockneten Blutproben stabil.

Auch Methadon und Zolpidem waren – wieder in guter Übereinstimmung mit den von uns erhaltenen Resultaten – bei Jamey über den untersuchten Zeitraum unter Berücksichtigung aller Variablen stabil und zumindest qualitativ nachweisbar.

Die Ergebnisse der einzelnen in der gegenständlichen Langzeitstudie untersuchten Analyten sind in guter Übereinstimmung mit den wenigen aus der Literatur bisher veröffentlichten Daten zur Analyse getrockneter Blutproben auf verschiedenen Untergrundmaterialien am Tatort.

Zusammenfassend lässt sich ausführen, dass sowohl die in der Langzeitstudie als auch die in der Kurzzeit-Lagerungsstudie untersuchten Analyten in getrockneten Blutproben über einen Zeitraum von sechs Monaten bzw. sieben Wochen stabil waren. Die einzige Ausnahme stellte 7-Aminoflunitrazepam dar.

Ein qualitativer Nachweis war mit oben genannter Ausnahme für alle in den vorliegenden Studien untersuchten Arznei- bzw. Suchtstoffe über den jeweils untersuchten Zeitraum und bei den jeweiligen Lagerungstemperaturen möglich gewesen. Bei Verwendung von deuterierten Standards für die jeweiligen Substanzen war aufgrund des bekannten Blutvolumens auch eine Quantifizierung der nachgewiesenen Stoffe möglich.



## **8. Spurenanalytik an Realproben mit forensischer Fragestellung**

### **8.1. Blutfleck auf Teppich**

Der zu Beginn dieser Arbeit beschriebene Fall des getrockneten Blutes auf Teppich, welches zur Untersuchung auf Heroin-Abbauprodukte an das Institut für Rechtsmedizin geschickt wurde, gab Anlass für die Anfertigung dieser Arbeit. Hier konnte durch die Untersuchung des vorliegenden Blutflecks der Geschehensablauf rekonstruiert werden.

Nach einer körperlichen Auseinandersetzung war eine der beiden involvierten Personen verstorben. Durch eine post-mortem-Analyse des Oberschenkelvenenblutes konnte eine Aufnahme von Heroin belegt werden. Die weiterführende Fragestellung war, ob Heroin vor oder nach der Auseinandersetzung aufgenommen wurde. Dies sollte durch die Untersuchung des am Tatort befindlichen Teppichs, bzw. des auf ihm getrockneten Blutes des Opfers überprüft werden. Der Teppich war sechs Monate nach der Tat asserviert worden.

Um eine grobe Abschätzung des im Teppich enthaltenen Blutes vorzunehmen, wurden aus dem Teppich ein blutdurchtränktes Stück und mehrere gleich große Stücke von einer entfernten Stelle ohne Blutantragungen ausgeschnitten. Auf diese Vergleichsstücke wurden nun unterschiedliche Volumina Blut aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurde das Blut von den Teppichstücken mit jeweils gleichen Volumina Wasser gelöst und die resultierenden Farbtöne der Lösungen miteinander verglichen, um die enthaltene Menge Blut in dem betroffenen Teppichstück zumindest grob orientierend abschätzen zu können. Die geschätzte Menge Blut in dem Teppichstück (so groß wie eine zwei Euromünze) betrug 2 mL.

Für die anschließende Analytik wurde eine Kalibration auf Teppich mit dem oben ermittelten ungefähren Blutvolumen angesetzt. Die Teppichstücke wurden über Festphasenextraktion aufgereinigt und mittels GC-MS untersucht. Im vom Teppich extrahierten Blut wurden Morphin und Codein eindeutig nachgewiesen. Eine abschätzende Quantifizierung ergab ein für den Konsum von Heroin typischerweise auftretendes Konzentrationsverhältnis der beiden Analyten von 10:1. Auf zum Vergleich analysierten Proben von nicht blutgetränkten Stellen des Teppichs wurden weder Morphin noch Codein nachgewiesen. Damit lag der Schluss nahe, dass der Konsum des Heroins bereits vor der körperlichen Auseinandersetzung stattgefunden hatte.

Während der Anfertigung dieser Doktorarbeit wurden wir in manchen Fällen um toxikologische Untersuchung am Tatort gesicherter Spuren gebeten. Die folgenden, aus der Praxis untersuchten Beispiele zeigen, dass sich eine Analyse getrockneter Proben nicht immer auf Blut beschränken muss. Vielmehr sind verschiedene andere getrocknete Spuren von Körperflüssigkeiten und diversen Lösungen zur toxikologischen Analyse geeignet.

## **8.2. Infusionslösung auf Teppich**

Im Fall eines erweiterten Suizids sollte die Schlüssigkeit eines möglichen Ablaufes nachvollzogen werden. Bei den nachgewiesenen Analyten handelte es sich darüber hinaus um instabile Substanzen, deren Nachweisbarkeit in getrockneten Proben im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit überprüft werden sollte.

Ein siebenjähriges Mädchen erhielt von seiner Mutter eine Infusionslösung mit Medikamenten verabreicht und wurde anschließend stranguliert. Die Mutter suizidierte sich selbst mit einer Infusionslösung, der u.a. Atracurium, Propofol und Midazolam zugemischt waren. Diese Arzneistoffe konnten im Oberschenkelvenenblut der Mutter nachgewiesen werden. Im Blut der Tochter wurden Atracurium und Midazolam nachgewiesen, Midazolam jedoch nicht in einer hypnotisch wirksamen Konzentration. Propofol war nicht nachweisbar. Am Tatort konnten zwei Infusionsbeutel sichergestellt werden. Bei einem Infusionsbeutel war bei Auffindung der Stellmechanismus geschlossen und der Beutel enthielt noch ca. 100 mL Restinhalt. In dieser Infusionslösung wurden die auch bei dem Kind nachgewiesenen Arzneistoffe Atracurium und Midazolam aufgefunden. Der zweite Infusionsbeutel war komplett leer, lediglich im Schlauch waren Reste einer milchigen Lösung zu finden, der Stellmechanismus war geöffnet. In den Resten im Schlauch der Infusionslösung wurden neben Atracurium und Midazolam auch Propofol, welches das milchige Aussehen erklärt, aufgefunden. Diese Schläuche hingen auf den in der Wohnung liegenden Teppich, unterhalb der Nadeln war ein getrockneter weißlicher Fleck zu sehen, wo vermutlich Infusionslösung in den Teppich gesickert war (Abbildung 105).



**Abbildung 105: Schläuche und Venülen der beiden Infusionslösungen, lose hängend**

Von einem der Kriminalbeamten wurden drei Tage nach Auffindung der Leichen Abriebe des weißlichen Flecks auf dem Teppich gefertigt und zur Untersuchung auf die in den Infusionslösungen bzw. im Blut der Verstorbenen befindlichen Arzneistoffe an das Institut gesandt. Die Abriebe wurden von dem Beamten nach Anleitung mittels angefeuchteten Wattetupfern genommen. Zusätzlich wurden Vergleichsproben von einer anderen Stelle des Teppichs, die weit genug von den hängenden Infusionsschläuchen entfernt liegen sollte, entnommen.

Da Propofol im FTC mit einer anderen Methode aufgearbeitet wird, als Atracurium und Midazolam, wurden die Tupfer aufgeteilt.

Für die Analyse auf Midazolam und Atracurium wurde ein Tupfer am Holzstiel kurz unterhalb des Watteanteils abgeschnitten und in einem Sarstedtröhrchen mit 300  $\mu\text{L}$  Rekonstitutionspuffer R1 (siehe Materialteil) eingeweicht und 20 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Von der überstehenden Lösung wurde ein Aliquot von 150  $\mu\text{L}$  mit internem Standardmix versehen und mittels LC-MS/MS analysiert. Als Leerprobe diente einer der vom Polizeibeamten von einer entfernten Stelle des Teppichs entnommen Vergleichstupfer.

Da für die Analyse auf Propofol mittels LC-MS/MS eine Derivatisierung notwendig ist und die Methode eine geringere Sensitivität aufweist als die zur Analyse auf Atracurium und Midazolam verwendeten, wurden fünf Abriebtupfer zusammengefasst, um eine möglichst große Menge Propofol zu erhalten. Des Weiteren ist Propofol ein instabiler Arzneistoff, weshalb von einer Degradation auf dem getrockneten Teppich ausgegangen wurde. Die Tupfer wurden mit 2 mL Acetonitril für zehn Minuten auf dem Rüttelbrett geschüttelt. Die überstehende Lösung (etwa 1,2 mL) wurde mit 5  $\mu\text{L}$  internem Standard (Tertiär-Butylmethylphenol in einer Konzentration von 100 ng/mL) versehen und bis auf etwa 150  $\mu\text{L}$  eingengt, um die Substanz zu konzentrieren.

Von diesem Konzentrat wurden anschließend 20 µL gemäß Arbeitsanweisung mit 40 µL 2-fluoro-1-methylpyridinium p-toluenesulfonate und 10 µL Triethylamin derivatisiert und mittels LC-MS/MS vermessen. Als Vergleich wurde auch hier ein Tupfer von einer entfernten Stelle des Teppichs analog den Proben des Flecks mit aufgearbeitet. Atracurium, Midazolam und Propofol ließen sich in den Abriebtupfern von dem Fleck auf dem Teppich nachweisen. Die Vergleichsproben von einem Teppichstück ohne Fleck gaben keinen Hinweis auf die untersuchten Substanzen. Somit stammt der Fleck auf dem Teppich von der tödlich wirkenden Infusionslösung, die sich die Mutter infundiert hatte. Eine Erklärung für das Herausrutschen der Venüle aus dem Arm der Verstorbenen wären gegebenenfalls agonale Krämpfe der Mutter. Sowohl Propofol als auch Atracurium sind in Blutproben vergleichsweise instabile Analyten. Daher ist das Resultat der durchgeführten Untersuchungen an den getrockneten Proben, die bereits drei Tage den Umgebungsbedingungen in der Wohnung ausgesetzt waren und dann per Post an das Labor geschickt wurden, eine Bestätigung für die Anwendbarkeit der Analyse getrockneter Proben insbesondere auch auf sonst relativ instabile Analyten.

### **8.3. Watteabriebe vom Gesicht eines Verstorbenen**

In einer weiteren von der Staatsanwaltschaft in Auftrag gegebenen Untersuchung handelte es sich um Watteabriebe, die auf das Vorhandensein von „Pfefferspray“ geprüft werden sollten.

Mehrere Polizeibeamte wurden beauftragt, einen Mann festzunehmen. Dieser widersetzte sich jedoch der Festnahme und zog ein Messer, mit dem er, laut Aussage der Polizisten, die Beamten bedrohte. Trotz mehrmaliger Vorwarnung ließ sich der Mann angeblich nicht beruhigen. Daraufhin wurde von den Polizisten dreimal „Pfefferspray“ gegen den Mann eingesetzt, um diesen aufzuhalten. Da dieser sich aber dadurch laut Polizeiangaben nicht beeindruckt ließ und unvermittelt mit gezogenem Messer auf einen Beamten zuging, sah dieser sich gezwungen, Gebrauch von seiner Schusswaffe zu machen. Der angeschossene Mann verstarb trotz sofortiger Notarztalarmierung wenig später im Krankenhaus.

Die Staatsanwaltschaft stellte nun die Frage, ob sich überprüfen ließe, ob die Polizeibeamten vor der Schussabgabe „Pfefferspray“ eingesetzt hatten. Daher wurden noch während der Sektion mithilfe von Wattetupfern Abriebe vom Gesicht und aus der Nase des Verstorbenen genommen. Im Krankenhaus war das Gesicht des Verstorbenen bereits mit Wasser gereinigt worden, da er Blut und Mageninhalt erbrochen hatte. Die

bei der Sektion genommenen Abriebe sollten nun auf das Vorliegen von Capsaicin, dem aktiven Inhaltsstoff von „Pfefferspray“ untersucht werden. Die beiden Tupfer wurden in einem Sarstedtröhrchen mit je 0,5 mL Ethanol versetzt und fünf Minuten auf dem Vortexmischer gemischt. Ein Aliquot von je 150 µL wurde entnommen und mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie-time-of-flight-Massenspektrometrie vermessen. Hier fand sich in der vom Gesicht des Verstorbenen genommenen Probe lediglich ein Hinweis auf das Vorliegen von Capsaicin, der jedoch nicht eindeutig verifiziert werden konnte. Die Analyse der aus der Nase genommenen Probe verlief ohne Hinweis auf Capsaicin. Daher wurde die positive Probe mit dem wesentlich empfindlicheren Ionenfallenmassenspektrometer vermessen. Hier konnte eindeutig Capsaicin nachgewiesen werden. Da Capsaicin nicht wasserlöslich ist, wurde es bei der Reinigung des Gesichtes offensichtlich nicht bzw. nicht vollständig entfernt. Weitere Abriebe aus der Nase des Verstorbenen ergaben keinen Hinweis auf das Vorliegen von Capsaicin. Der Nachweis von Capsaicin führte hier zu einer Entlastung der Polizeibeamten, da es den angegebenen Gebrauch des „Pfeffersprays“ bestätigte.

#### **8.4. Rückstände an einer Verbandsschere**

Bei einem schwer kranken Patienten auf einer Intensivstation waren verschiedene Infusionslösungen über einen zentralen Venenkatheter an der rechten Halsseite angeschlossen, eine davon enthielt Metamizol und Flucloxacillin. Nach Alarm des Überwachungsgerätes fiel auf, dass zwei der drei Infusionsschläuche des zentralen Venenkatheters offensichtlich mit Schnitten durchtrennt/beschädigt waren.

Der zuständige Pfleger gab zu, mit einer Verbandsschere im Bereich des Zugangs hantiert zu haben um den Pflasterverband zu lösen. Wir erhielten die Verbandsschere mit der Bitte, zu überprüfen, ob darauf die über die beschädigten Infusionsschläuche verabreichten Arzneistoffe Metamizol und Flucloxacillin nachweisbar wären. Es sollte so überprüft werden, ob der Pfleger beim Lösen des Pflasters mit der Verbandsschere (siehe Abbildung 106) versehentlich die Infusionsschläuche durchtrennt oder beschädigt hatte.



**Abbildung 106: Verbandsschere, mit der die Schläuche zerschnitten worden sein sollen**

Dazu wurde die Schere in einem 30 mL Sarstedt-Röhrchen mit 15 mL bidestilliertem Wasser versetzt und zunächst innerhalb einer Einweichzeit von 45 Minuten etwa 30 mal geöffnet und wieder geschlossen, um kleinste kristalline Rückstände auch von den Innenseiten der Schnittflächen in Lösung zu bekommen. Anschließend wurde das Röhrchen für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde ein noch an der Schere haftender, kristalliner Rest mit einem Spatel abgekratzt, zur Lösung gegeben und diese nochmals eine Minute auf dem Vortexmischer gerüttelt. Von dieser Lösung wurden nun 7,5 mL mit internem Standardmix und 15  $\mu$ L Ameisensäure versetzt, zur Trockne eingedampft und anschließend in 150  $\mu$ L Rekonstitutionspuffer R1 aufgenommen und mittels LC-TOF-MS vermessen. Es fanden sich neben Spuren von Flucloxacillin und 4-Methylaminoantipyrin, einem Stoffwechsel- und Abbauprodukt von Metamizol, noch weitere Arzneistoffe wie Carbamazepin und Levetiracetam. Des Weiteren fanden sich Hinweise auf Pantoprazol, Sitagliptin, Nicotin, Lamotrigin, Koffein und Lidocain. Dieses Ergebnis lässt an eine Kontamination der Schere mit im Krankenhaus gängigen Medikamenten denken. Vor allem der Nachweis von Koffein und Nicotin weist darauf hin, dass mit der Schere verschiedene, auch nicht zweckbestimmte Dinge geschnitten wurden und die Schere im Anschluss daran nicht gereinigt worden war und/oder dass die Schere durch Kontakt mit Händen (ohne Handschuhe) kontaminiert war. Es gibt deutlich zu bedenken, dass eine Asservierung solcher Spurenräger äußerst sorgfältig erfolgen muss, um Kontaminationen zu verhindern. Der Nachweis von Flucloxacillin und 4-Methylaminoantipyrin erhärtete den Verdacht, dass durch diese Verbandsschere der die Medikamente zuführende Infusionsschlauch beschädigt bzw. versehentlich durchschnitten wurde.

## 8.5. Getrocknetes Blut auf Textilien

Im Rahmen einer Auseinandersetzung in einer Arbeiterunterkunft kam es zum Gebrauch verschiedener Stichwaffen. Der Niedergestochene überlebte den Angriff nach notärztlicher und intensivmedizinischer Behandlung. Während der Tat kam es zu großflächigen Blutantragungen auf das T-Shirt des Opfers, aber auch auf die Schuhe des Täters (siehe Abbildung 107 und Abbildung 108). Der Täter verletzte sich bei dem Angriff selbst an der Hand.



**Abbildung 107: T-Shirt des Niedergestochenen mit großen Blutflecken**



**Abbildung 108: Schuh des Täters mit reichlich Blutspuren**

Beide Personen waren deutlich alkoholisiert, sowohl beim Täter als auch beim Geschädigten war jeweils eine Blutalkoholkonzentration von 1,3 ‰ kurz nach der Tat nachweisbar. Im Blut des Täters waren keine weiteren Drogen oder Medikamente nachweisbar, im Blut des Geschädigten waren zusätzlich Arzneistoffe nachweisbar,

die sich mit der notärztlichen Behandlung erklären ließen (Lidocain, Midazolam, Piritramid, Propofol, Prilocain und Cephazolin).

Zur Untersuchung auf Arznei- bzw. Suchtstoffe und auch Ethylglucuronid (EtG) aus wissenschaftlichen Zwecken für diese Arbeit wurden von den Schuhen mithilfe von Wattetupfern Abriebe genommen. Dazu wurde jeweils ein Tupfer mit bidestilliertem Wasser angefeuchtet und Blut von verschiedenen Stellen abgerieben. Eine Probe wurde an der Sohle entnommen, hierbei ist aufgrund der Lokalisation davon auszugehen, dass es sich um Blut des Geschädigten handelt. Eine weitere Probe wurde von der Oberseite des Schuhs genommen, hierbei ist aufgrund der Tropfenform des abgeriebenen Blutflecks davon auszugehen, dass es sich um Blut des Täters handelt, der sich bei der Auseinandersetzung selbst verletzt hatte. Ein Vergleichsabrieb wurde von einer nicht blutbefleckten Stelle des Schuhs abgenommen.

Von dem blutdurchtränkten T-Shirt des Geschädigten wurde aus einem der Blutflecke ein Stück mit einem Stanzer (siehe Abbildung 109 unter Punkt 8.6) ausgestanzt. Als Vergleich wurde eine Stelle ohne Blutfleck gewählt und ein gleich großes Stück ausgestanzt. Die Tupfer wurden jeweils einzeln mit je 0,5 mL, die ausgestanzten T-Shirt-Stücke mit je 1 mL bidestilliertem Wasser und 2 µL interner Standardmischung versetzt. Die Lösungen wurden anschließend 20 Minuten auf den Rüttler bei 370 Schwingungen/min verbracht, anschließend wurden alle Proben mit jeweils 1 mL Acetonitril versetzt und sofort auf dem Vortexmischer für ca. 30 Sekunden gemischt. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen und nach Zugabe von je 2 µL Ameisensäure 98 % unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µL Puffer R1 aufgenommen und an einem API 6500 LC-MS/MS-System vermessen.

Für eine Analyse auf EtG wurde wie oben beschrieben verfahren, statt des internen Standardmixes wurde fünffach deuteriertes EtG vor dem Rütteln zugegeben, die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 100 µL Puffer A1/A2, anschließend wurde die so erhaltene Lösung 1:10 verdünnt, wie in der Arbeitsanweisung für die Aufarbeitung von Serumproben auf EtG am FTC vorgesehen (siehe auch 5.1.5). Diese Extrakte wurden an einem API 5000 LC-MS/MS-System vermessen.

EtG ließ sich in allen untersuchten Proben nachweisen. Die untersuchten Vergleichsproben von nicht blutbefleckten Stellen des T-Shirts bzw. der Schuhe waren unauffällig.

Zusätzlich zu der wie erwartet positiven Analyse der Proben auf EtG wurde ein allgemeines Medikamenten- und Drogenscreening durchgeführt. An der von der Schuhoberseite genommenen Probe, sowie auch an der Probe, die von einer nicht blutbefleckten Stelle des T-Shirts genommen wurde, ließen sich eindeutig Cocain und Spuren des Abbauproduktes Benzoyllecgonin nachweisen. Da keine weiteren Substanzen nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die betroffenen Kleidungsstücke mit Cocain in Kontakt gekommen waren. Die toxikologische Analyse der Blutproben der beiden Beteiligten verlief in Bezug auf Cocain und seine Abbau- bzw. Stoffwechselprodukte negativ.

### **8.6. Urin auf Bettlaken**

In einem Fall fraglicher Sterbehilfe bei einer älteren Dame in einem Pflegeheim wurde zunächst eine routinemäßige post-mortem-Analyse der anlässlich der Obduktion asservierten Materialien auf gängige Arzneistoffe durchgeführt. Die Analyse erbrachte hohe Konzentrationen von Lidocain, Mirtazapin, Zolpidem und Zopiclon im Oberschenkelvenenblut der Verstorbenen. Todesursächlich war die hohe Konzentration von Lidocain. Ob die Pflegerin aktiv oder passiv am Tod der älteren Dame mitgewirkt hatte, war unklar. Auf dem Nachttisch wurde ein Glas mit einem Flüssigkeitsrest aufgefunden, der nach dem Ergebnis der toxikologischen Analyse genau die im Oberschenkelvenenblut nachgewiesenen Arzneistoffe enthielt. Auf dem blassgelben Bettlaken, auf dem die Verstorbene gelegen hatte, fand sich ein größerer, gelblich abgegrenzter Fleck, lokalisiert in etwa auf Leistenhöhe eines darauf schlafenden Menschen. Laut Angaben des Pflegeheims waren der Dame außer einem Ginkgo-Präparat keine Arzneistoffe verordnet worden.

Die Fragestellung der Staatsanwaltschaft war, ob es sich bei dem Fleck auf dem Bettlaken um verschüttete Flüssigkeit aus dem Glas, eine andere Flüssigkeit oder um Urin handelt. Zur Beantwortung wurde zunächst untersucht, ob auf dem Fleck im Laken die gleichen Arzneistoffe nachgewiesen werden konnten, wie bei der Verstorbenen. Für die toxikologische Analyse wurden mithilfe eines einfachen Papierstanzers (Abbildung 109) gleichgroße Stücke (à ca. 4 cm<sup>2</sup>) von zwei verschiedenen Stellen des Lakens, einmal mit gelblichen Anhaftungen und einmal ohne, ausgestanzt. Im Anschluss wurden die Stücke des Bettlakens mit gelblichen Anhaftungen (Laken A

und B), sowie je ein Vergleichsstück des Bettlakens ohne Anhaftungen einmal mit und einmal ohne Glucuronidspaltung aufgearbeitet.



**Abbildung 109: Stanzer, der zum Ausstanzen des Urinfleckes auf dem Laken verwendet wurde**

Analog zum Vorgehen bei getrockneten Blutproben wurde zunächst zu jeder Probe 1 mL bidestilliertes Wasser (Laken B) bzw. 1 mL eines zur Aufarbeitung flüssigen Urins verwendeten Puffers (Laken A) zugegeben, um den Fleck und die darin möglicherweise enthaltenen Arzneistoffe zu rekonstituieren. Die so erhaltenen Lösungen wurden im Anschluss jeweils auf zwei verschiedene Arten behandelt, wobei je ein Stück mit Anhaftungen und eines ohne als Vergleich untersucht wurden. Bei Laken B wurden Probe und Vergleichsprobe nach Zugabe von interner Standardmischung einer Glucuronidspaltung mit beta-Glucuronidase-Arylsulfatase unterzogen und anschließend im Verhältnis 1:10 mit Puffer verdünnt, wie bei der Urinaufarbeitung üblich. Bei Laken A wurden Probe und Vergleichsprobe nach Zugabe von interner Standardmischung ohne Glucuronidspaltung je 1:10 mit Rekonstitutionspuffer verdünnt. Die so aufbereiteten Proben wurden anschließend einem umfassenden Medikamenten- und Drogenscreening unterzogen. Es fanden sich in den unterschiedlichen Stücken jeweils Lidocain, Mirtazapin, Zolpidem und Zopiclon in unterschiedlichen Konzentrationen, wobei in Tabelle 13 ersichtlich ist, dass in dem mit Glucuronidase behandelten Stück des Lakens mit Ausnahme von Zolpidem die höheren Arzneistoffkonzentrationen nachgewiesen werden konnten.

**Tabelle 13: Ergebnis des untersuchten Lakens mit (Laken B) und ohne vorherige Glucuronidspaltung (Laken A)**

<b>Probe</b>	<b>Mirtazapin</b>	<b>Zolpidem</b>	<b>Zopiclon</b>	<b>Lidocain</b>
Laken B mit Glucuronidspaltung	6,22 ng/4 cm <sup>2</sup>	1,57 ng/4 cm <sup>2</sup>	82,2 ng/4 cm <sup>2</sup>	2780 ng/4 cm <sup>2</sup>
Laken A ohne Glucuronidspaltung	2,59 ng/4 cm <sup>2</sup>	2,70 ng/4 cm <sup>2</sup>	29,1 ng/4 cm <sup>2</sup>	596 ng/4 cm <sup>2</sup>

Da viele Arzneistoffe glucuronidiert werden, bevor sie mit dem Urin ausgeschieden werden können, ist nachvollziehbar, dass mit vorheriger Glucuronidspaltung höhere Konzentrationen des freien – und damit durch die durchgeführte Analyse erfassten - Arzneistoffs vorliegen. Aufgrund der sehr niedrigen Konzentration von Zolpidem kann der höhere Wert des nicht behandelten Lakens auch durch Messunsicherheiten in diesem niedrigen Bereich erklärt werden.

Zur Abklärung der Frage, ob es sich bei dem sichtbaren Fleck um Urin oder eine andere Flüssigkeit handelte, wurden, wieder mithilfe des oben verwendeten Stanzers drei Stücke (à ca. 4 cm<sup>2</sup>) aus dem Laken mit Antragungen ausgestanzt und mit Wasser eingeweicht. Die so erhaltenen Lösungen wurden auf das Vorliegen von Harnstoff und Kreatinin als typischen Inhaltsstoffen von Urin untersucht. Als Vergleich wurden auf dem asservierten Laken an verschiedenen, von den Anhaftungen entfernten Stellen Leerurinproben von vier verschiedenen Personen, Schwarztee, Früchtetee, Wasser, Apfelsaft und Multivitaminsaft angesetzt, trocken gelassen und auf gleiche Art und Weise wie die von dem Fleck genommenen Proben untersucht. Wie in Tabelle 14 ersichtlich, waren lediglich bei den Urinproben abgrenzbare Kreatinin- und Harnstoffwerte messbar.

**Tabelle 14: Ergebnisse der Untersuchung verschiedener, auf Bettlaken getrockneter Flüssigkeiten auf Kreatinin und Harnstoff**

	Kreatinin Urin frisch (mg/dL)	Kreatinin im Fleck (mg/dL)	Harnstoff (mg/dL)
Laken ohne Fleck		< 0,2	< 5
Laken mit Fleck 1		7,46	39
Laken mit Fleck 2		7,54	39
Laken mit Fleck 3		6,19	44
Leerurin 1.1	111	5,8	84
Leerurin 1.2		4,55	67
Leerurin 2.1	35	1,74	34
Leerurin 2.2		1,31	28
Leerurin 3.1	35	1,31	20
Leerurin 3.2		1,02	16
Leerurin 4.1	16	0,27	12
Leerurin 4.2		0,38	13
Wasser 1		< 0,2	< 5
Wasser 2		< 0,2	< 5
Früchtetee 1		< 0,2	< 5
Früchtetee 2		< 0,2	< 5
Schwarzer Tee 1		< 0,2	< 5
Schwarzer Tee 2		< 0,2	< 5
Apfelsaft 1		0,57	< 5
Apfelsaft 2		0,70	< 5
Multivitaminsaft 1		< 0,2	< 5
Multivitaminsaft 2		< 0,2	< 5

Apfelsaft bildet hier eine Ausnahme, es wurden minimale Kreatininwerte gefunden, allerdings kein Harnstoff. Auch in den drei Proben, die von dem ursprünglichen Fleck auf dem Laken entnommen wurden, waren Harnstoff und Kreatinin in deutlich abgrenzbarer Konzentration nachweisbar, sodass es sich hier mit größter Wahrscheinlichkeit um Urin handelte.

Zur endgültigen Abklärung wurden die Extrakte, die für die LC-MS/MS aufbereitet wurden, mittels hochauflösender Time-of-flight Massenspektrometrie vermessen. Hier wurde insbesondere auf Metaboliten der aufgefundenen Substanzen geachtet, also vor allem hydroxylierte, carboxylierte, oxidierte und demethylierte Produkte. Es konn-

ten in dem Extrakt mittels akkurater Masse Zolpidem-Carbonsäure und Hydroxymirtazapin nachgewiesen werden. Diese Stoffe bilden sich im menschlichen Körper über Phase-I-Metabolisierungen aus den jeweiligen Arzneistoffen und werden dann mit dem Urin ausgeschieden. Die Ergebnisse belegen somit eine Körperpassage der auf dem Laken nachgewiesenen Arzneistoffe und bestätigen - zusammen mit den gemessenen Kreatinin- und Harnstoffwerten - Urin als Verursacher des Flecks. Somit konnte die Einlassung der Pflegerin vor Gericht, dass es sich bei dem eingetrockneten Fleck um Teile des Inhaltes aus dem Glas auf dem Nachttisch handelte, widerlegt werden.



## **9. Zusammenfassung:**

Anlass der vorliegenden Arbeit und erste diesbezügliche Auftragsstellung war ein realer Fall am Münchner Institut für Rechtsmedizin mit der Frage, ob die toxikologische Analyse eines auf Teppich getrockneten Blutflecks möglich wäre. Der erst sechs Monate nach dem Vorfall asservierte Teppich sollte auf das Vorliegen typischer Heroin-Stoffwechselprodukte untersucht werden, um zu überprüfen, ob die betroffene Person, deren Blut im Rahmen einer körperlichen Auseinandersetzung auf den Teppich gelangt war, bereits zuvor Heroin konsumiert hatte. Mithilfe aufwändiger Untersuchungen gelang es, eine Aufnahme von Heroin bereits vor dem Vorfall nachzuweisen.

Ziel dieser Arbeit war, geeignete, möglichst auch am Tatort einfach durchführbare Asservierungsmethoden für toxikologisch relevante Spuren (insbesondere Blut) sowie eine Probenvorbereitung im Labor in Anlehnung an bereits bestehende Routineverfahren zu entwickeln. Darüber hinaus sollte die Stabilität von Arznei- bzw. Suchtstoffen in getrockneten Blutproben, die auf fünf verschiedenen tatortrelevanten Untergrundmaterialien (Kachel, Stoff, Parkett, Tapete, Teppich) über einen Zeitraum von sechs Monaten bei zwei verschiedenen Temperaturen gelagert wurden, untersucht werden.

Zur Entwicklung einer geeigneten - idealerweise vor Ort durchführbaren - Asservierung sowie Aufarbeitung im Labor wurden verschiedene Methoden überprüft. Bei glatten Untergrundmaterialien wie Kachel und Parkett, von denen sich getrocknete Blutproben leicht entfernen lassen, hat sich das Abkratzen des Blutes mithilfe eines Skalpells bewährt. Die auf Tapete getrockneten Blutproben wurden mithilfe angefeuchteter Watteupfer asserviert, da so am wenigsten störendes Untergrundmaterial mit erfasst wurde. Bei Materialien, in die das Blut einsickern kann - wie Stoff oder Teppich- und die häufig schlecht transportabel sind, wurde der komplette Blutfleck ausgeschnitten und im Labor aufgearbeitet.

Für die anschließende Aufarbeitung der am Tatort asservierten Proben im Labor wurde eine an die Routinemethode angelehnte, einfache und schnelle Probenvorbereitung entwickelt. Die asservierten Blutproben wurden zunächst mit Wasser gelöst, anschlie-

ßend mit Acetonitril gefällt, die nach Eindampfen erhaltenen Rückstände in Pufferlösung aufgenommen und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert.

Zur Überprüfung der Stabilität von Arznei- und Suchtstoffen in getrockneten Blutproben wurde nach einer orientierenden Kurzzeit-Lagerungsstudie über sieben Wochen eine Langzeitstudie über sechs Monate durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Suchtstoffe sowie häufig verschriebene Arzneistoffe untersucht. Die aus der Kurzzeit-Lagerungsstudie erhaltenen Ergebnisse dienten zur Optimierung der Methodik für die Langzeitstudie. Bereits in der Kurzzeit-Lagerungsstudie erwies sich 7-Aminoflunitrazepam in getrockneten Blutproben als instabil, daher wurde diese Substanz nicht in die Langzeitstudie aufgenommen. In dieser wurde die Stabilität von 17 verschiedenen Arznei- und Suchtstoffen mit zumeist zentraler Wirkung in - auf den fünf oben genannten Untergrundmaterialien - getrockneten Blutproben bei zwei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, Kühlschrank) überprüft.

Alle 17 untersuchten Arznei- bzw. Suchtstoffe waren in den auf verschiedenen Untergrundmaterialien getrockneten Blutproben temperaturunabhängig stabil und nach sechs Monaten eindeutig nachweisbar. Für einige Substanzen stand zur Quantifizierung ein deuterierter interner Standard zur Verfügung, diese Arznei- bzw. Suchtstoffe ließen sich auch zu einem großen Teil valide quantitativ auswerten. Damit ist eine Aussage über die Konzentration eines Arznei- bzw. Suchtstoffes zum Zeitpunkt des Entstehens einer Blutspur möglich, welche für weitere Ermittlungen bzw. ein nachfolgendes Gerichtsverfahren relevant sein kann. Da die hier vorgestellte Untersuchung an verschiedensten Arznei- und Suchtstoffen durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass sich diese Methode auch auf andere Substanzen erweitern bzw. anwenden lässt.

## 10. Ausblick

Während der Durchführung dieser Doktorarbeit wurde das Münchner Institut für Rechtsmedizin um die toxikologische Analyse verschiedener am Tatort asservierter Spuren in mehreren realen Fällen gebeten. Die Fragestellungen und asservierten Materialien zeigen, wie vielfältig die Einsatzmöglichkeiten der in dieser Arbeit vorgestellten Methode sind. Durch Verwendung deuterierter interner Standards erscheint eine valide quantitative Bestimmung verschiedenster Arznei- und Suchtstoffe möglich und eine toxikologische Analyse getrockneter Spuren auch in Bezug auf eine fragliche therapeutische oder übertherapeutische Aufnahme der nachgewiesenen Substanzen interpretierbar.

Die hier vorgestellte Studie zeigt auch, dass manche Analyten (z.B. solche, die in ihrer Molekülstruktur eine Nitrogruppe beinhalten oder auch schwefelhaltige Arzneistoffe) in getrockneten Blutproben instabil sind. Dies muss bei einem Hinweis auf potentiell instabile Analyten bei der Bewertung berücksichtigt und deren Stabilität in getrockneten Spuren überprüft werden.

Die untersuchten Untergrundmaterialien (z.B. Bettlaken, Schere, Abriebe von der Gesichtshaut) waren ebenso verschieden wie die darauf befindlichen, zu analysierenden Matrices (z.B. Urin, Arzneistoffrückstände, "Pfefferspray") und zeigen, dass die toxikologische Analyse von tatortrelevanten Spuren nicht nur auf Blut beschränkt ist, sondern sich sehr variabel und praxisbezogen anwenden lässt.

Da die hier vorgestellte Methode keiner aufwändigen Probenvorbereitung bzw. -aufarbeitung bedarf, lässt sie sich in forensisch-toxikologischen Labors auch in der Praxis durchführen und bei Bedarf auch auf andere, für den jeweiligen Fall relevante Untergrundmaterialien und Arznei- bzw. Suchtstoffe anwenden.

Schwierigkeiten und damit Ausgangspunkte für weitere Forschung liegen in der Bestimmung der Blutmenge eines getrockneten Flecks, die für die quantitative Bestimmung der nachgewiesenen Analyten essentiell ist und die insbesondere bei saugfähigen Materialien wie Teppich einen schwer zu bestimmenden Faktor darstellt.



## 11. Anhang

- Tabellen 15 – 23

**Tabelle 15: Konzentrationen und zu pipettierende Volumina der für die Kurzzeit-Lagerungsstudie verwendeten Analyten**

<b>Analyt</b>	<b>Konzentration der Arbeitslösung [µg/mL]</b>	<b>Konzentration Soll im Pool [ng/mL]</b>	<b>zu pipettierendes Volumen der Arbeitslösung [µL]</b>	<b>Konzentration Ist (Mittelwertbestimmung im Pool) [ng/mL]</b>
Benzoylcegonin	100	90	90	86,0
Morphin	100	90	90	92,2
Codein	100	35	35	40,9
Methadon	100	90	90	79,1
Tramadol	100	90	90	68,2
Fentanyl	10	9	90	5,70
Diazepam	100	90	90	71,9
Nordazepam	100	90	90	75,3
Amitriptylin	100	90	90	61,2
Nortriptylin	100	90	90	61,0
Doxepin	100	90	90	65,0
Citalopram	100	90	90	102
Quetiapin	100	90	90	69,0
Zolpidem	100	90	90	62,0
7-Aminoflunitrazepam	10	3,5	35	2,63

**Tabelle 16: Konzentrationen und zu pipettierende Volumina der für die Langzeitstudie verwendeten Analyten**

<b>Analyt</b>	<b>Konzentration der Arbeitslösung [µg/mL]</b>	<b>Konzentration Soll im Pool [ng/mL]</b>	<b>Zu pipettierendes Volumen der Arbeitslösung [µL]</b>	<b>Konzentration Ist (Mittelwertbestimmung im Pool) [ng/mL]</b>
Benzoylecgonin	1000	150	10,5	160
Methamphetamin	1000	50	3,5	61,1
Morphin	1000	50	3,5	55,8
Codein	1000	50	3,5	58,1
Methadon	1000	150	10,5	188
Fentanyl	100	5	3,5	6,32
Nordazepam	1000	400	28	452
Lorazepam	1000	30	2,1	39,9
Zolpidem	1000	100	7	121
Diphenhydramin	1000	100	7	79,4
Citalopram	1000	100	7	85,1
Doxepin	1000	100	7	74,6
Mirtazapin	1000	100	7	92,2
Quetiapin	1000	250	17,5	203
Bisoprolol	1000	50	3,5	62,5
Metformin	1000	1500	105	1150
Ramipril	100	5	3,5	3,40

Tabelle 17: Herstellung des Kalibriermixes "high"

Substanz	Konzentration Standard [mg/mL]	angewandte Verdünnung	zu pipettierendes Volumen [µL] auf 222 µL MeOH	Endkonzentration Standard-Mix [µg/mL]
Cocain	1		5	5
Benzoylecgonin	1		10	10
Ecgoninmethylester	1		1	1
Cocaethylen	1		1	1
Amphetamin	1		10	10
Methamphetamin	1		10	10
MDE	1		10	10
MDA	1		10	10
MDMA	1		10	10
Morphin	1		5	5
Codein	1		5	5
Dihydrocodein	1		5	5
Fentanyl	0,1		20	2
- Nor-Fentanyl	1		2	2
Tramadol	1		10	10
- Nortramadol	1		10	10
-o-Desmethyl-Tramadol	1		10	10
Tilidin	1		10	10
- Nortilidin	1		10	10
Methadon	1		20	20
- EDDP	1		10	10
Alprazolam	1		2	2
- HO-Alprazolam	1		5	5
Bromazepam	1		10	10
- HO-Bromazepam	2	1:20	50	5
Clonazepam	1		5	5
- 7-Aminoclonazepam	1		2	2
Diazepam	1		20	20
Nordazepam	1		20	20
Oxazepam	1		10	10
Temazepam	1		5	5
Flunitrazepam	1		2	2
-7-Aminoflunitrazepam	1		2	2
- Norflunitrazepam	1		5	5
Lorazepam	1		10	10
Midazolam	1		10	10
- HO-Midazolam	0,1		100	10
Zaleplon	1		5	5
Zolpidem	1		10	10
Zopiclon	1		10	10

Amitriptylin	1		10	10
- Nortriptylin	1		10	10
Bisoprolol	1		10	10
Carbamazepin	1		10	10
Citalopram	0,1		100	10
Diphenhydramin	1		10	10
Doxepin	1		10	10
- Nor-Doxepin	1		10	10
Doxylamin	1		10	10
Fluoxetin	1		10	10
Ketamin	1		10	10
- Nor-Ketamin	1		10	10
LSD	1		1	1
Metformin	1		20	20
Mirtazapin	1		10	10
Moclobemid	1		10	10
Paroxetin	1		10	10
Quetiapin	1		10	10
Sertralin	1		10	10
Trazodon	1		10	10
Venlafaxin	1		10	10
- Nor-Venlafaxin	1		10	10

Erläuterung zur Herstellung der Kalibriermixe:

Zur Herstellung des Kalibriermixes „high“ werden 222 µL Methanol in einem braunen Glasvial vorgelegt. Anschließend werden die Analytlösungen jeweils in den der Tabelle zu entnehmenden Volumina und Verdünnungen hinzupipettiert, sodass das resultierende Gesamtvolumen 1 mL ergibt. Von diesem Mix werden dann 100 µL mit 900 µL Methanol verdünnt, um den Kalibriermix „low“ zu erhalten.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der verwendeten externen Qualitätskontrollen**

<b>Qualitätskontrolle</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Analyten</b>
BtMF 3/13 Betäubungsmittel im Serum	ACQ Science	Amphetamin, Methamphetamin, Methylenedioxyamphetamin, Methylenedioxyethylamphetamin, Methylenedioxymethylamphetamin, Cocain, Benzoylecgonin, Ecgoninmethylester, Morphin, Codein, Dihydrocodein
Bz-A Benzodiazepine im Serum	ACQ Science	Flunitrazepam, Norflunitrazepan, 7-Aminoflunitrazepam, Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Nordazepam, Oxazepam, Temazepam, Lorazepam, Midazolam, Zolpidem, Zopiclon
TDMA 2/13 A Neuroleptika im Serum	ACQ Science	Quetiapin
TDMA 2/13 D Neuroleptika im Serum	ACQ Science	Citalopram

**Tabelle 19: Pipettierschema für die Herstellung der Kalibratoren in der Langzeitstudie**

Je 100 µL Leer-Kälberserum	Analyt	Cal 0	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Cal 7
µl Standard-MIX „low“		0	1	2,5	5	12,5			
µl Standard-MIX „high“							2,5	5	10
Konzentrationen [ng/mL]									
	Cocain		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Benzoyllecgonin		10	25	50	125	250	500	1000
	Ecgoninmethylester		1	2,5	5	12,5	25	50	100
	Cocaethylen		1	2,5	5	12,5	25	50	100
	Amphetamin		10	25	50	125	250	500	1000
	Methamphetamin		10	25	50	125	250	500	1000
	Methylen-dioxyethylamphetamin		10	25	50	125	250	500	1000
	Methylendioxyamphetamin		10	25	50	125	250	500	1000
	Methylendioxymethamphetamin		10	25	50	125	250	500	1000
	Morphin		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Codein		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Dihydrocodein		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Fentanyl		2	5	10	25	50	100	200
	- Nor-Fentanyl		2	5	10	25	50	100	200
	Tramadol		10	25	50	125	250	500	1000
	- Nortramadol		10	25	50	125	250	500	1000
	-o-Desmethyl-Tramadol		10	25	50	125	250	500	1000
	Tilidin		10	25	50	125	250	500	1000
	- Nortilidin		10	25	50	125	250	500	1000
	Methadon		20	50	100	250	500	1000	2000
	EDDP		10	25	50	125	250	500	1000
	Alprazolam		2	5	10	25	50	100	200
	- HO-Alprazolam		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Bromazepam		10	25	50	125	250	500	1000
	- HO-Bromazepam		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Clonazepam		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	- 7-Aminoclonazepam		2	5	10	25	50	100	200
	Diazepam		20	50	100	250	500	1000	2000
	Nordazepam		20	50	100	250	500	1000	2000

	Oxazepam		10	25	50	125	250	500	1000
	Temazepam		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Flunitrazepam		2	5	10	25	50	100	200
	- 7-Aminoflu- nitrazepam		2	5	10	25	50	100	200
	- Norflunitra- zepam		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Lorazepam		10	25	50	125	250	500	1000
	Midazolam		10	25	50	125	250	500	1000
	- HO-Mida- zolam		10	25	50	125	250	500	1000
	Zaleplon		5	12,5	25	62,5	125	250	500
	Zolpidem		10	25	50	125	250	500	1000
	Zopiclon		10	25	50	125	250	500	1000
	Amitriptylin		10	25	50	125	250	500	1000
	- Nortriptylin		10	25	50	125	250	500	1000
	Bisoprolol		10	25	50	125	250	500	1000
	Carbamazepin		10	25	50	125	250	500	1000
	Citalopram		10	25	50	125	250	500	1000
	Diphenhydra- min		10	25	50	125	250	500	1000
	Doxepin		10	25	50	125	250	500	1000
	- Nor-Doxepin		10	25	50	125	250	500	1000
	Doxylamin		10	25	50	125	250	500	1000
	Fluoxetin		10	25	50	125	250	500	1000
	Ketamin		10	25	50	125	250	500	1000
	- Nor-Ketamin		10	25	50	125	250	500	1000
	LSD		1	2,5	5	12,5	25	50	100
	Metformin		20	50	100	250	500	1000	2000
	Mirtazapin		10	25	50	125	250	500	1000
	Moclobemid		10	25	50	125	250	500	1000
	Paroxetin		10	25	50	125	250	500	1000
	Quetiapin		10	25	50	125	250	500	1000
	Sertralin		10	25	50	125	250	500	1000
	Trazodon		10	25	50	125	250	500	1000
	Venlafaxin		10	25	50	125	250	500	1000
	- Nor- Venlafaxin		10	25	50	125	250	500	1000

**Tabelle 20: Herstellung des internen Standardmixes für die Langzeitstudie**

<b>Substanz</b>	<b>pipettiertes Volumen in <math>\mu\text{L}</math> bei 399 <math>\mu\text{L}</math> MeOH Vorlage</b>	<b>Endkonzentration Interner Standard-Mix [ng/mL]</b>	<b>Konzentration im Blut [ng/mL]</b>
Cocain-D3	50	2500	50
Benzoyllecgonin-D3	100	5000	100
Methylendioxy-methamphetamin-D5	50	2500	50
Amphetamin-D5	50	2500	50
Methamphetamin-D14	50	2500	50
Morphin-D3	100	5000	100
Codein-D3	100	5000	100
Dihydrocodein-D6	100	5000	100
Methadon-D3	100	5000	100
EDDP-D3	100	5000	100
Fentanyl-D5	50	2500	50
Alprazolam-D5	50	2500	50
7-Amino-Flunitrazepam-D7	50	2500	50
Diazepam-D5	100	5000	100
Nordiazepam-D5	100	5000	100
Oxazepam-D5	100	5000	100
Clonazepam-D4	100	5000	100
Zolpidem-D6	100	5000	100
MPPH (1mg/ml)	50	25000	500
Buprenorphin-D4	1	50	1
Tramadol-13C-D3	100	5000	100

**Tabelle 21: Fließmittelgradient der für die Langzeitstudie verwendeten LC-MS/MS-Methode**

<b>Laufzeit [min]</b>	<b>Flussrate [<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>]</b>	<b>A1 [%]</b>	<b>B2 [%]</b>
1,5	500	90	10
1	500	85	15
4,7	700	50	50
5	850	49	51
10	950	45	55
12	950	20	80
17	950	0	100
17,1	500	90	10
18,5	500	90	10

**Tabelle 22: Massenübergänge, DP und CE in der verwendeten Methode**

<b>Analyt</b>	<b>Precursorion m/z [Dalton]</b>	<b>Production m/z [Dalton]</b>	<b>CE [V]</b>	<b>DP [V]</b>
Benzoylcegonin 1	290	168	56	56
Benzoylcegonin 2	290	105	56	56
IS Benzoylcegonin-D3	293	171	61	61
Methamphetamin 1	150	119	51	51
Methamphetamin 2	150	91	51	25
IS Methamphetamin-D14	164	130	46	46
Morphin 1	286	165	101	101
Morphin 2	286	153	101	101
IS Morphin-D3	289	165	101	101
Codein 1	300	165,1	66	66
Codein 2	300	152	66	66
IS Codein-D3	303	215	86	86
Fentanyl 1	337	188	20	20
Fentanyl 2	337	105	20	20
IS Fentanyl-D5	342	188	76	76
Methadon 1	310	265	66	66
Methadon 2	310	105	66	66
IS Methadon-D3	313	268	66	66
IS Diazepam-D5	290	198	86	86
Nordazepam 1	271	208	86	86
Nordazepam 2	271	140	86	86
IS Nordazepam-D5	276	213	66	39
Lorazepam 1	321	275	21	21
Lorazepam 2	321	229	21	21
Zolpidem 1	308	235	101	101
Zolpidem 2	308	263	101	101
IS Zolpidem-D6	313	235	101	101
Bisoprolol 1	326	116	66	66
Bisoprolol 2	326	74	66	66
Citalopram 1	325	109	81	81
Citalopram 2	325	262	81	81
Diphenhydramin 1	256	167	41	41
Diphenhydramin 2	256	152	41	41
Doxepin 1	280	235	51	51
Doxepin 2	280	107	51	51
Metformin 1	130	71	56	56
Metformin 2	130	85	56	56
Mirtazapin 1	266	195	76	76
Mirtazapin 2	266	72	76	76

Quetiapin 1	384	253	91	91
Quetiapin 2	384	210	91	91
IS MPPH	267	196	20	20

**Tabelle 23: Herstellung des internen Standardmixes für die Kurzzeit-Lagerungsstudie**

<b>Substanz</b>	<b>pipettiertes Volumen in <math>\mu\text{L}</math> bei 625 <math>\mu\text{L}</math> MeOH Vorlage</b>	<b>Endkonzentration Interner Standard-Mix [ng/mL]</b>	<b>Konzentration im Blut [ng/mL]</b>
Cocain-D3	4	400	4
Benzoyllecgonin-D3	100	10000	100
Methylendioxyamphetamin-D5	40	4000	40
Methamphetamin-D14	40	400	40
Morphin-D3	40	400	40
Diazepam-D5	100	10000	100
MPPH (1mg/ml)	50	50000	500
Buprenorphin-D4	1	100	1



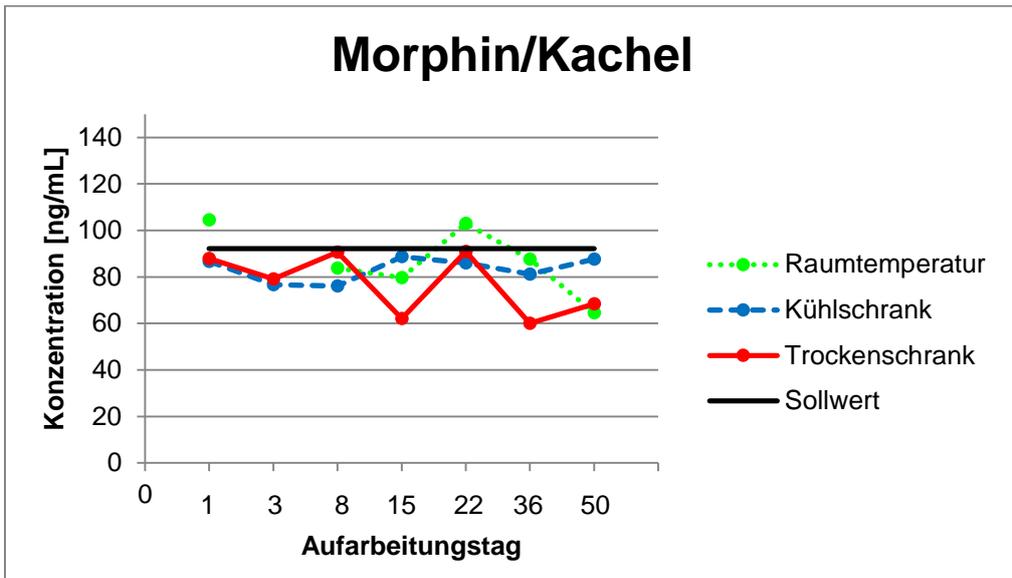


Abbildung 110: Stabilität von Morphin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

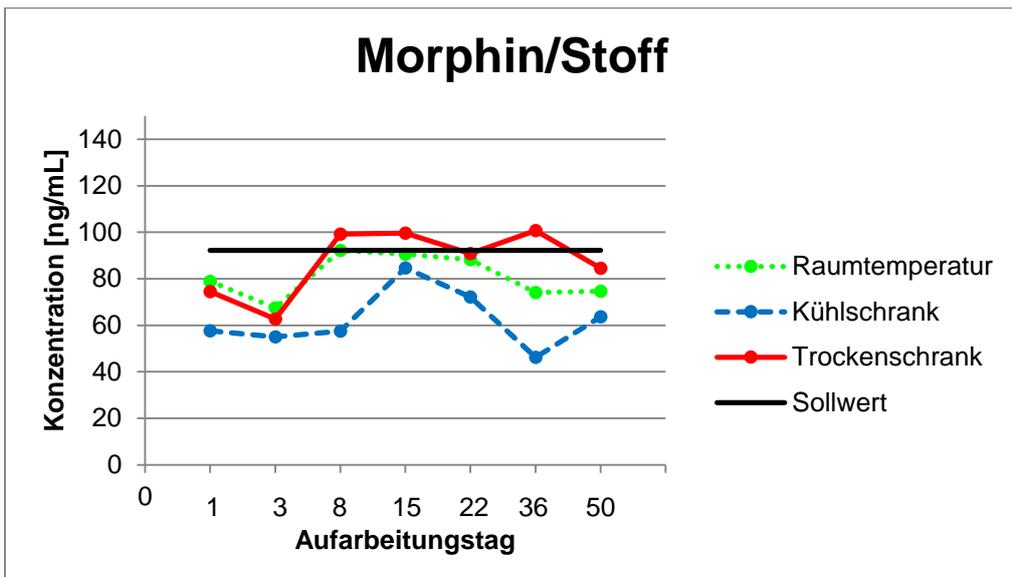


Abbildung 111: Stabilität von Morphin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

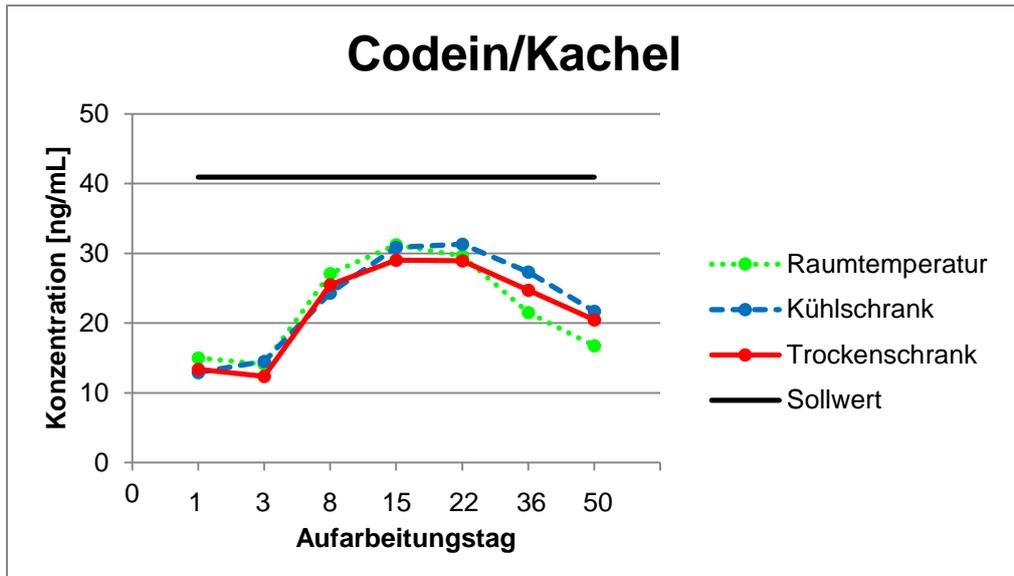


Abbildung 112: Stabilität von Codein in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

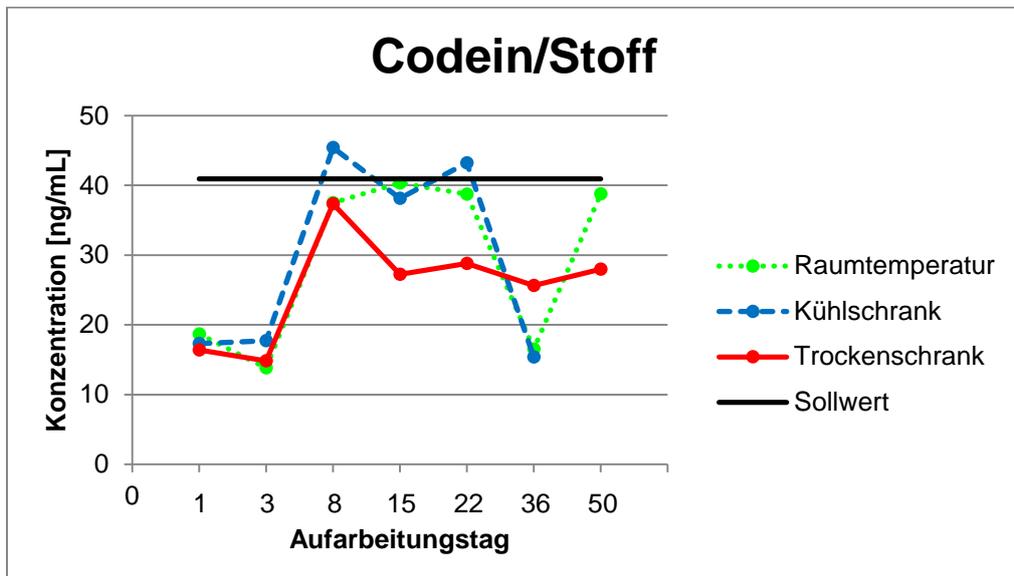


Abbildung 113: Stabilität von Codein in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

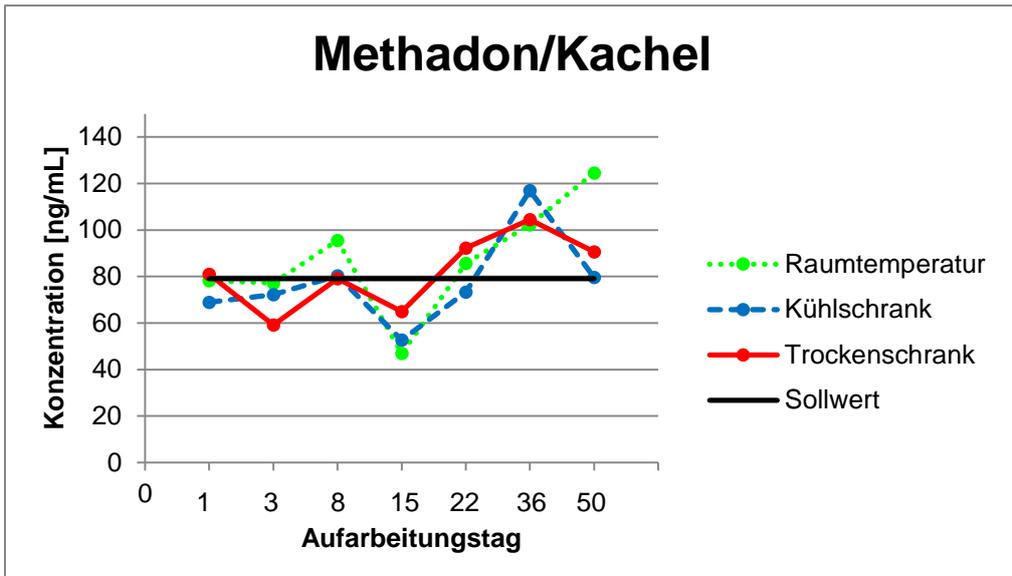


Abbildung 114: Stabilität von Methadon in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

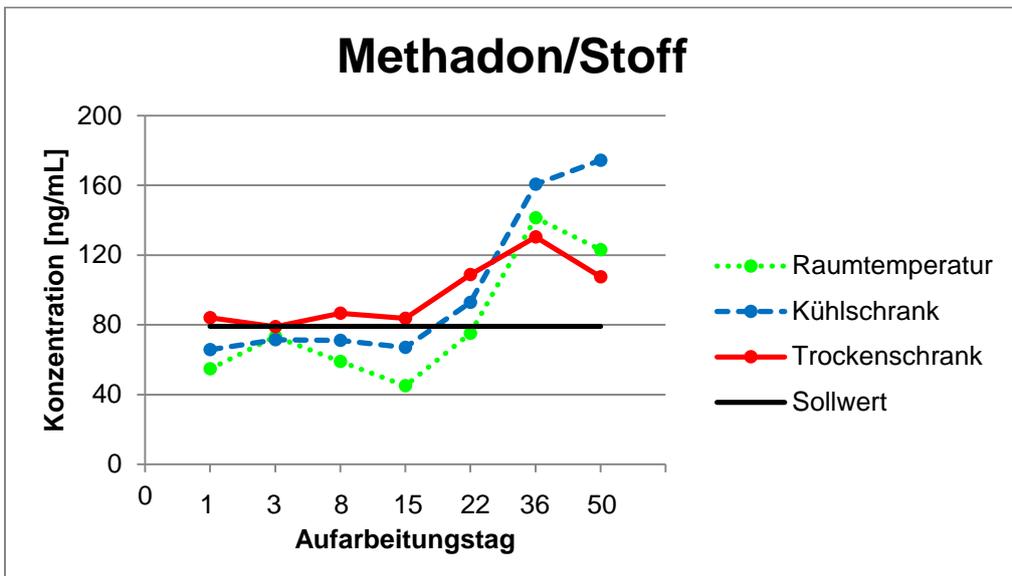


Abbildung 115: Stabilität von Methadon in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

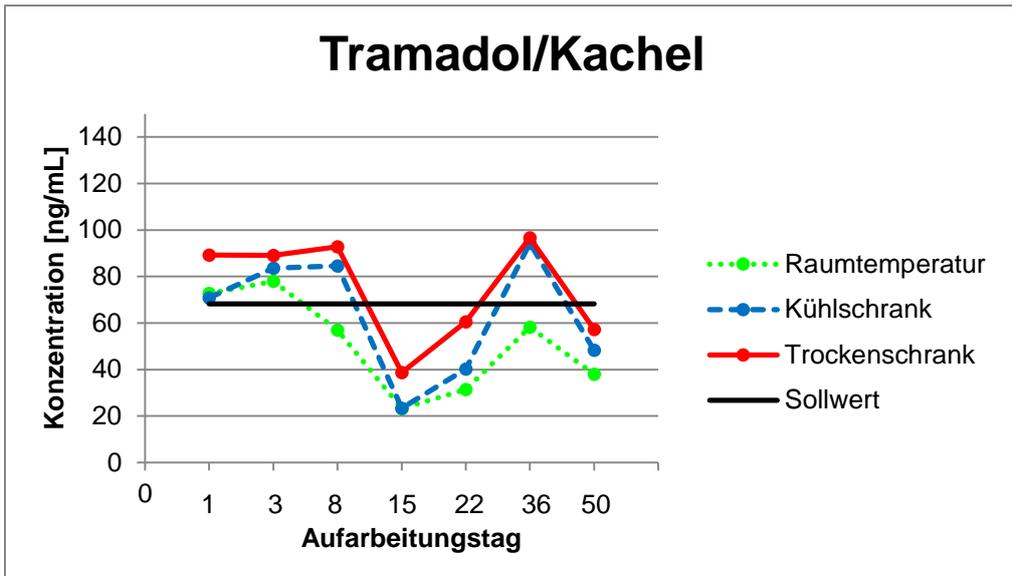


Abbildung 116: Stabilität von Tramadol in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

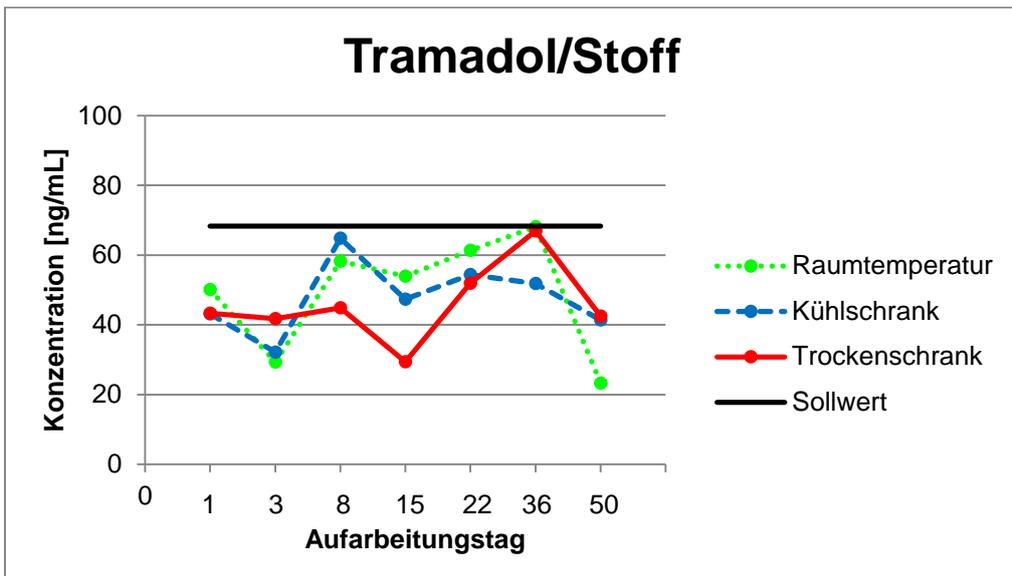


Abbildung 117: Stabilität von Tramadol in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

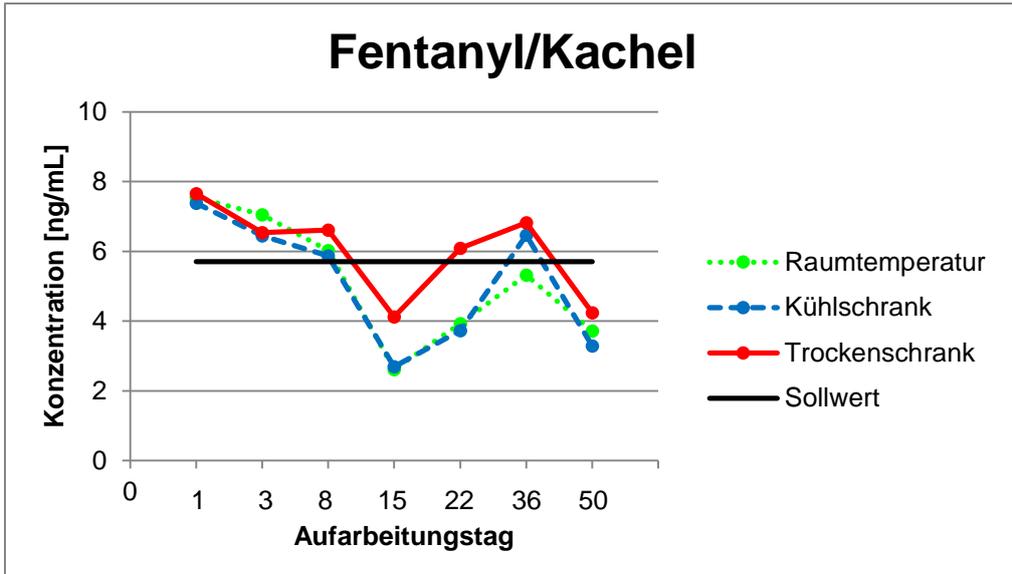


Abbildung 118: Stabilität von Fentanyl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

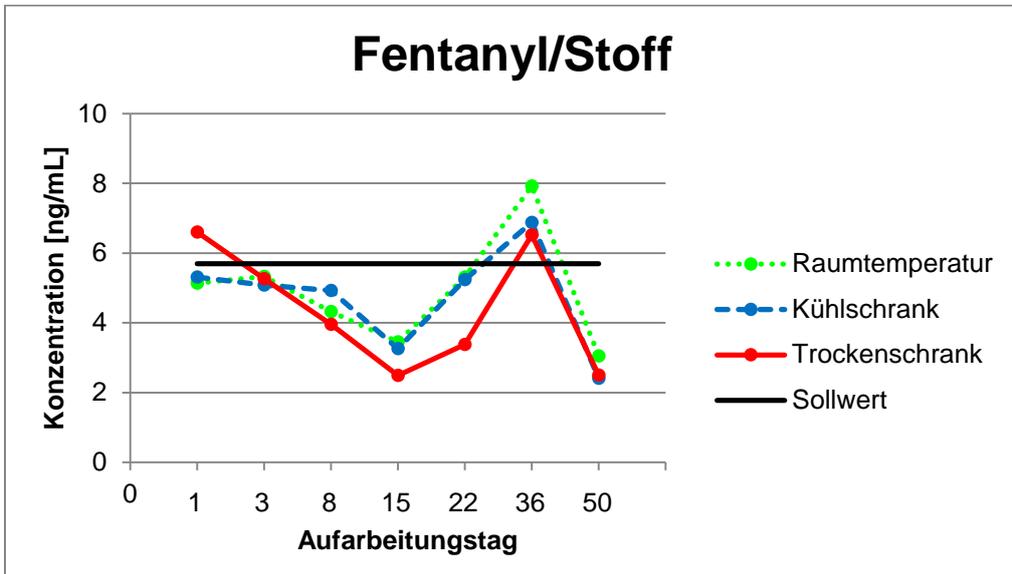


Abbildung 119: Stabilität von Fentanyl in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

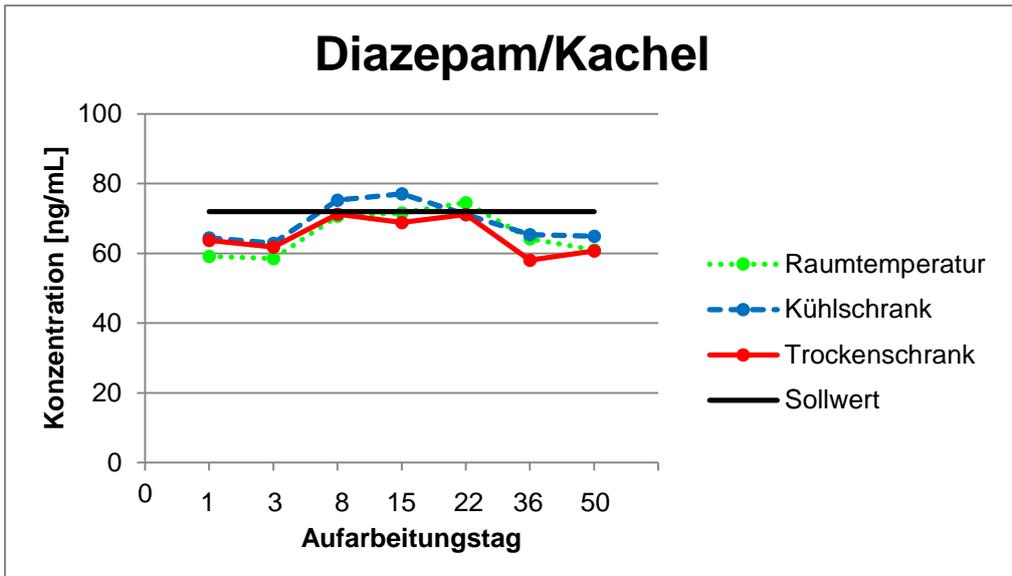


Abbildung 120: Stabilität von Diazepam in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

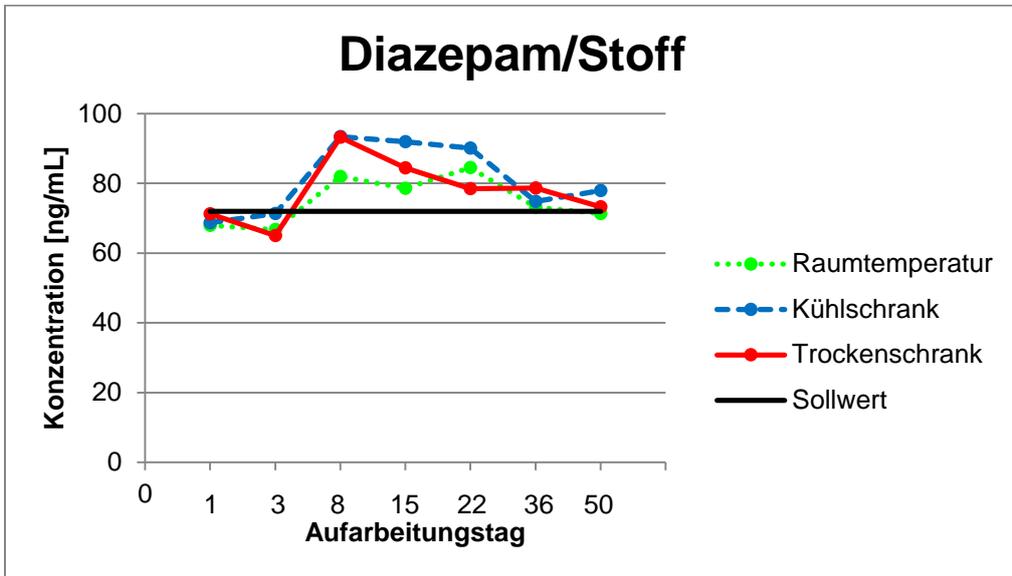


Abbildung 121: Stabilität von Diazepam in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

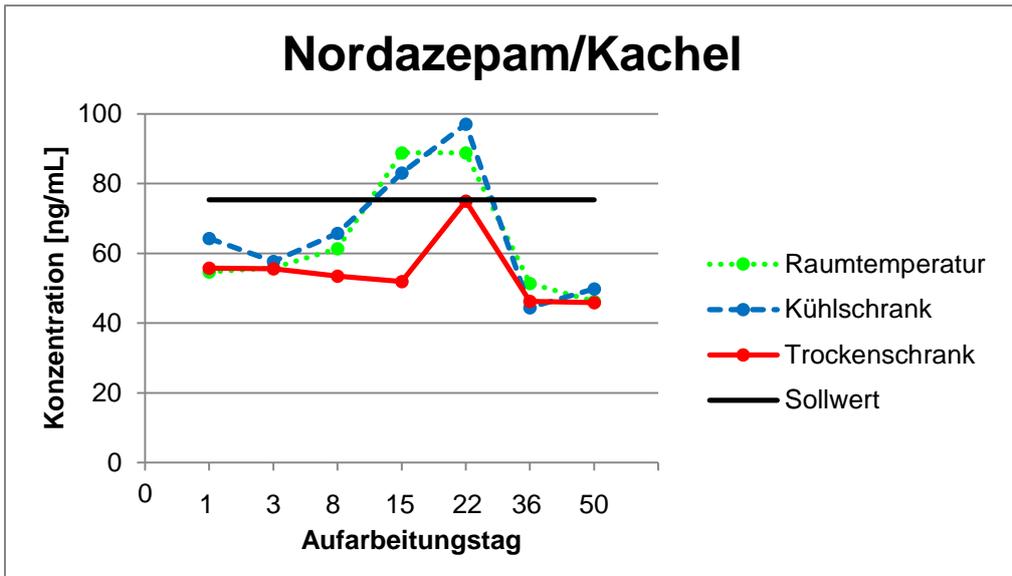


Abbildung 122: Stabilität von Nordazepam in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

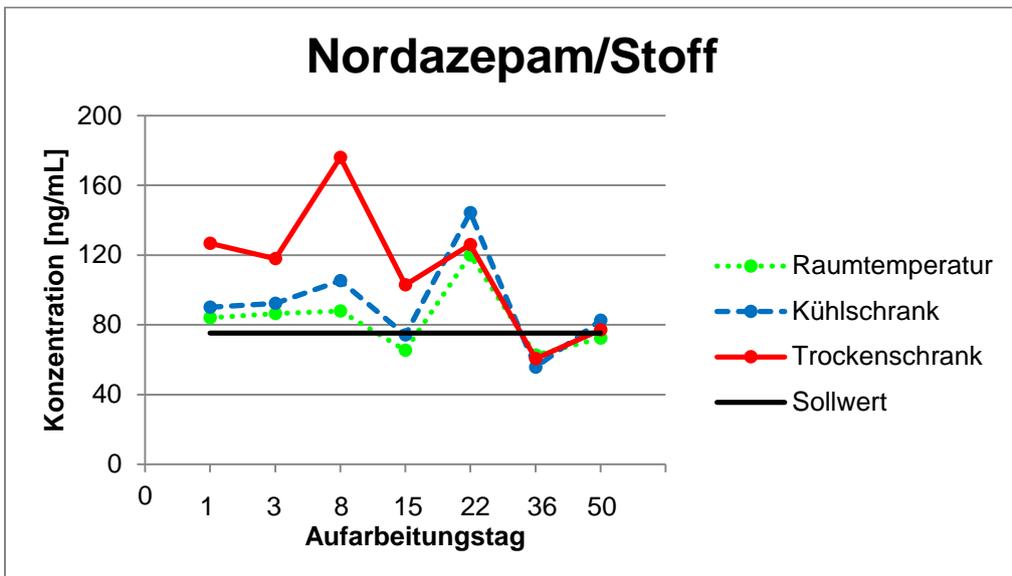


Abbildung 123: Stabilität von Nordazepam in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

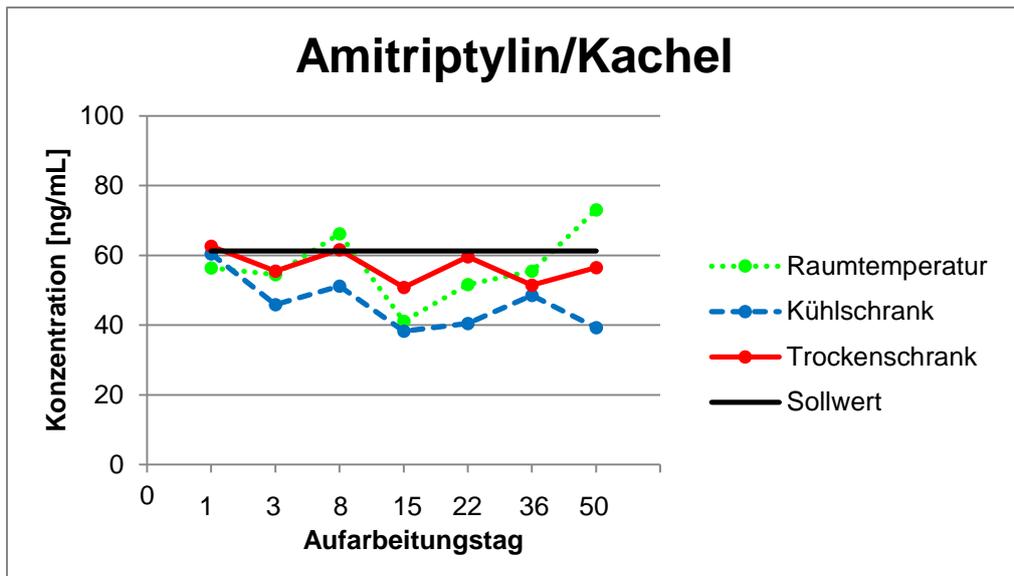


Abbildung 124: Stabilität von Amitriptylin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

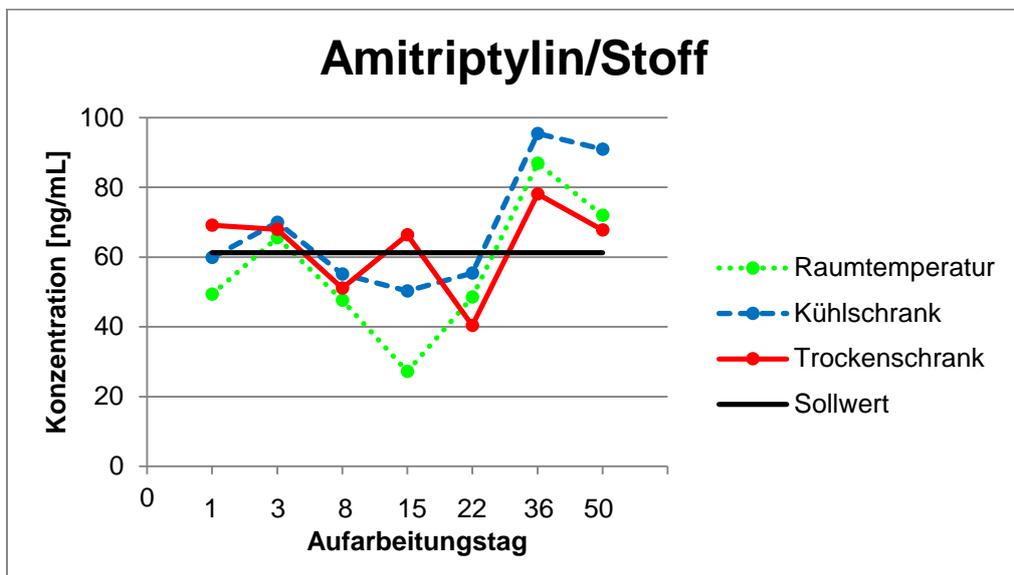


Abbildung 125: Stabilität von Amitriptylin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

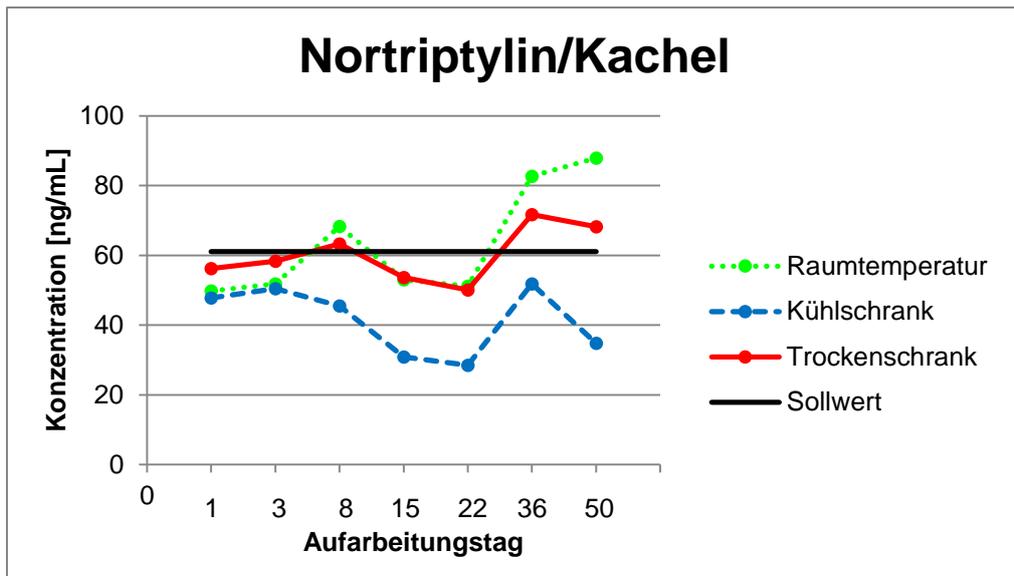


Abbildung 126: Stabilität von Nortriptylin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

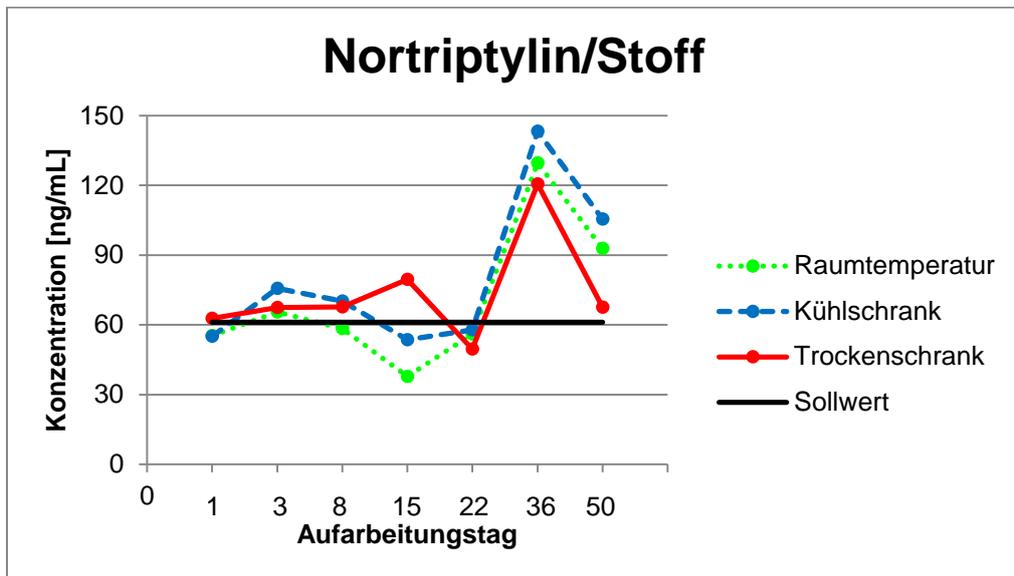


Abbildung 127: Stabilität von Nortriptylin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

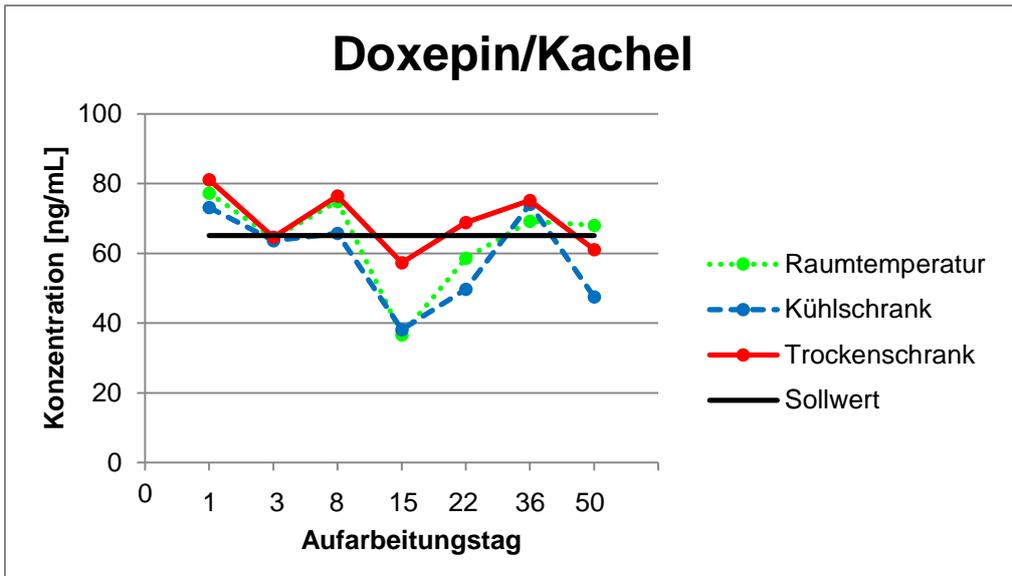


Abbildung 128: Stabilität von Doxepin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

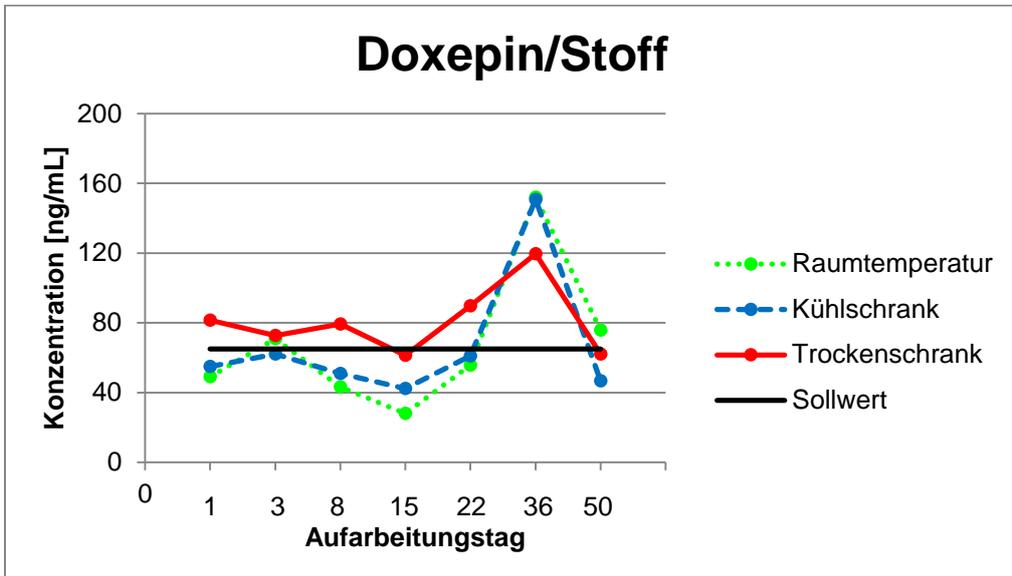


Abbildung 129: Stabilität von Doxepin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

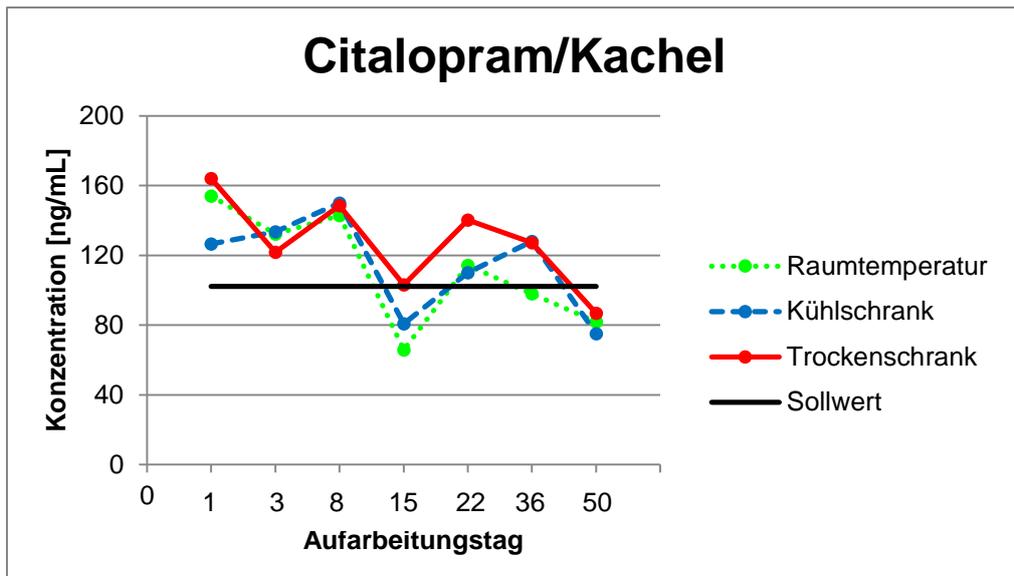


Abbildung 130: Stabilität von Citalopram in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

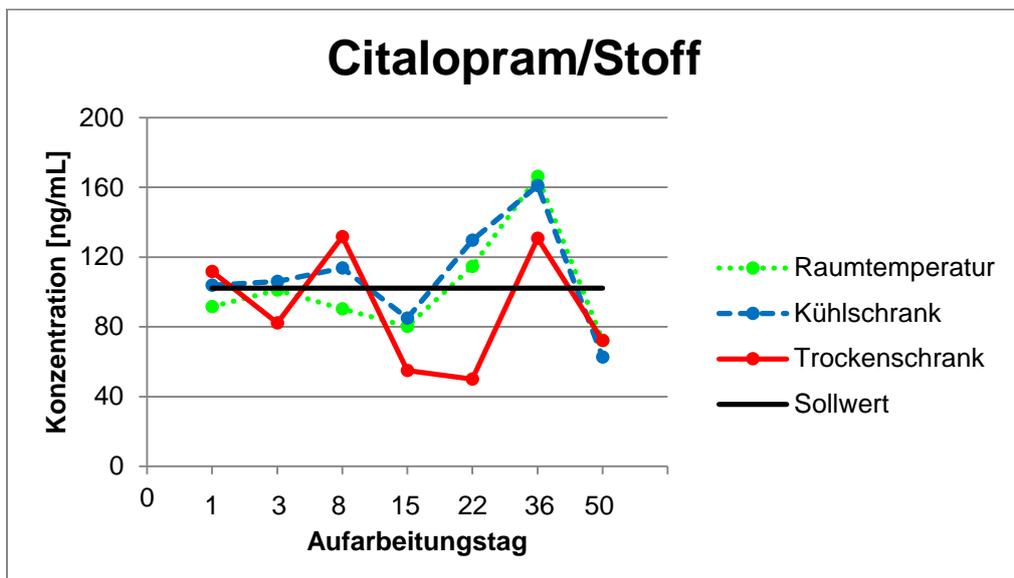


Abbildung 131: Stabilität von Citalopram in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

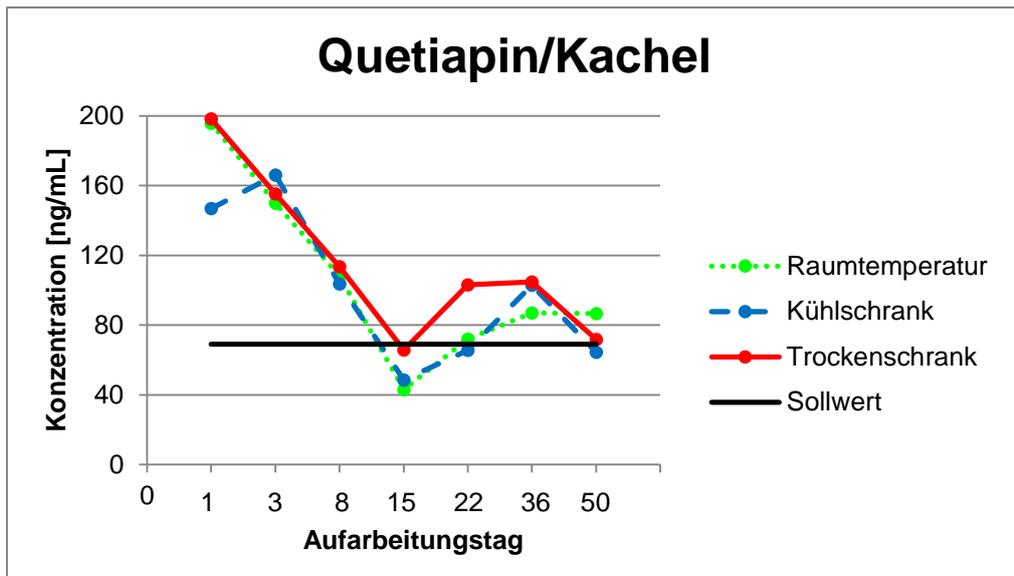


Abbildung 132: Stabilität von Quetiapin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

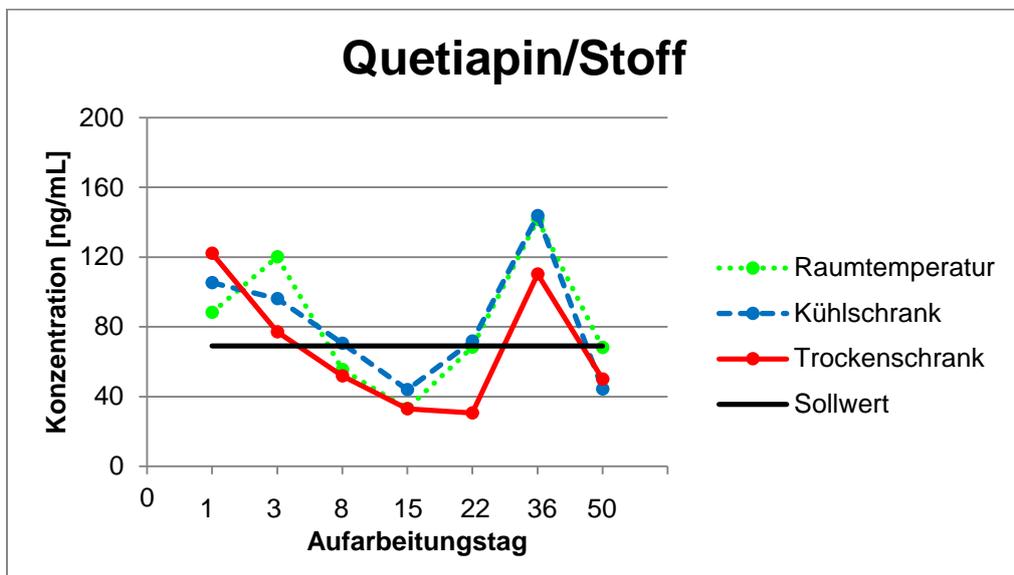


Abbildung 133: Stabilität von Quetiapin in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff

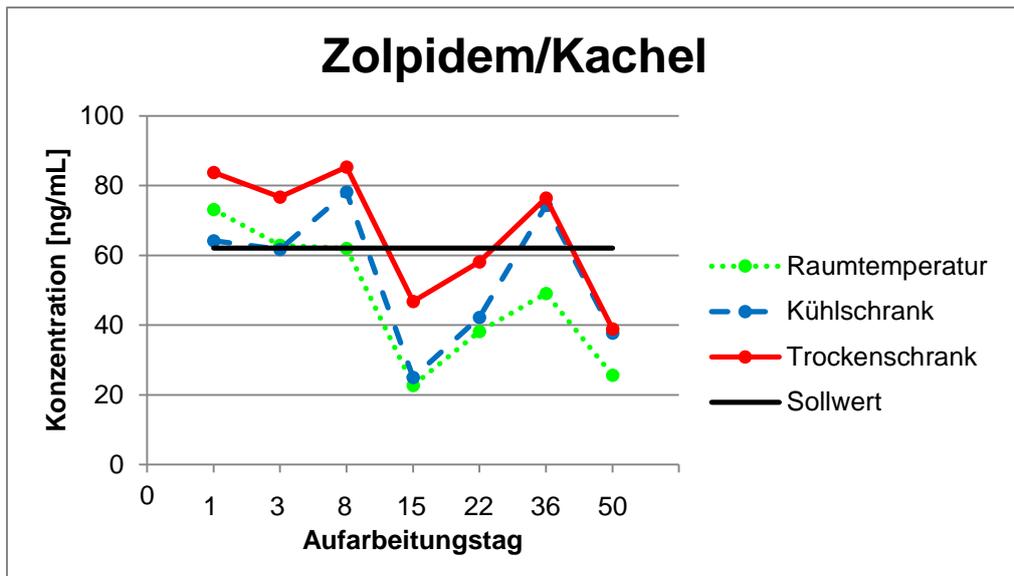


Abbildung 134: Stabilität von Zolpidem in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Kachel

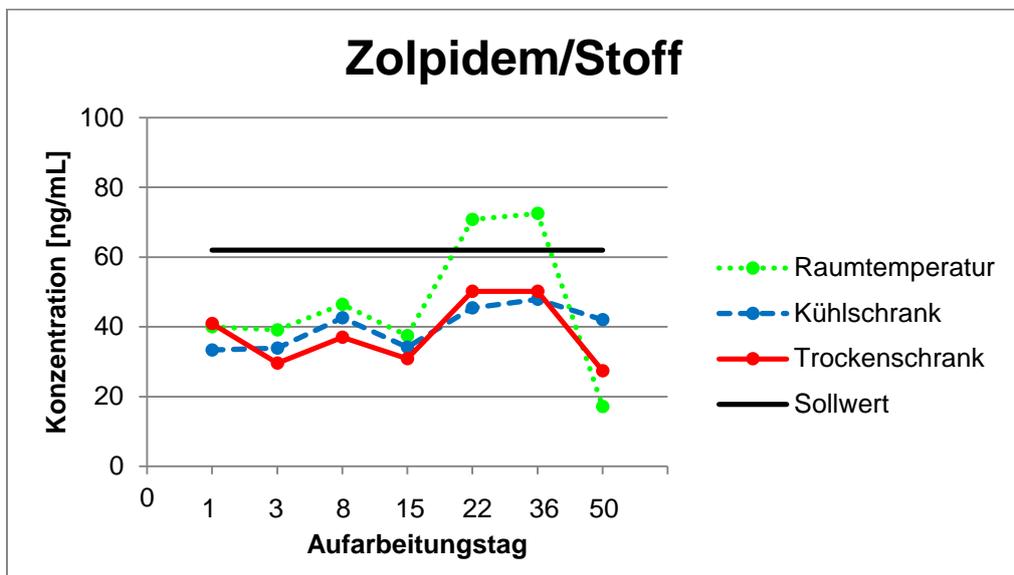


Abbildung 135: Stabilität von Zolpidem in der Kurzzeit-Lagerungsstudie über 7 Wochen auf Stoff



## 12. Literatur

- [1] Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., und Forth, W. 2008. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. *Elsevier Urban & Fischer*, München.
- [2] Alfazil, A. A. und Anderson, R. A. 2008. Stability of Benzodiazepines and Cocaine in Blood Spots Stored on Filter Paper. *Journal of Analytical Toxicology* 32, 7, 511–515.
- [3] Backmund, M., Meyer, K., Henkel, C., Soyka, M., Reimer, J., und Schutz, C. G. 2005. Co-consumption of benzodiazepines in heroin users, methadone-substituted and codeine-substituted patients. *Journal of addictive diseases* 24, 4, 17–29.
- [4] Bang, Ivar Christian, 1869-1918. Der Blutzucker.
- [5] Baselt, R. C. 2014. Disposition of toxic drugs und chemicals in man. *Biomedical Publ*, Seal Beach, Calif.
- [6] Beck, H., Boehrer, H., Allenberg, J. R., und Hempelmann, G., Eds. 2002. Schmerztherapie. 171 Tabellen. Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie Ains / Gesamthrg.: G. Hempelmann ; Bd. 4. *Thieme*, Stuttgart.
- [7] Broseus, J., Gentile, N., und Esseiva, P. 2016. The cutting of cocaine and heroin. A critical review. *Forensic science international* 262, 73–83.
- [8] Capiou, S., Stove, V. V., Lambert, W. E., und Stove, C. P. 2013. Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Analytical chemistry* 85, 1, 404–410.
- [9] Chepyala, D., Tsai, I.-L., Liao, H.-W., Chen, G.-Y., Chao, H.-C., und Kuo, C.-H. 2017. Sensitive screening of abused drugs in dried blood samples using ultra-high-performance liquid chromatography-ion booster-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* 1491, 57–66.
- [10] Coombes, E. J., Gamlen, T. R., Batstone, G. F., und Leigh, P. N. 1984. A phenytoin assay using dried blood spot samples suitable for domiciliary therapeutic drug monitoring. *Annals of clinical biochemistry* 21 (Pt 6), 519–522.
- [11] Cox, H. D., Rampton, J., und Eichner, D. 2013. Quantification of insulin-like growth factor-1 in dried blood spots for detection of growth hormone abuse in sport. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405, 6, 1949–1958.
- [12] Cropsey, K. L., Stevens, E. N., Valera, P., Brendan Clark, C., Bulls, H. W., Nair, P., und Lane, P. S. 2015. Risk factors for concurrent use of benzodiazepines and opioids among individuals under community corrections supervision. *Drug and alcohol dependence* 154, 152–157.
- [13] Demirev, P. A. 2013. Dried blood spots. Analysis and applications. *Analytical chemistry* 85, 2, 779–789.
- [14] den Burger, J. C. G., Wilhelm, A. J., Chahbouni, A., Vos, R. M., Sinjewel, A., und Swart, E. L. 2012. Analysis of cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404, 6-7, 1803–1811.
- [15] Desiderio, D. M., Ed. 1992. Mass spectrometry. Clinical and biomedical applications. Modern analytic chemistry. *Plenum Press*, New York.
- [16] EMCDDA. 2009. Methamphetamine. A European Union perspective in the global context. *Europol joint publications 1*. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction, Lisbon.
- [17] Evans, C. 1996. *The casebook of forensic detection. How science solved 100 of the world's most baffling crimes*. Wiley, New York NY u.a.

- [18] Ghareeb, M. und Akhlaghi, F. 2015. Alternative matrices for therapeutic drug monitoring of immunosuppressive agents using LC-MS/MS. *Bioanalysis* 7, 8, 1037–1058.
- [19] Gotta, J. 2004. Nachweis und Quantifizierung von Drogen und anderen Fremdstoffen in Blutspuren auf verschiedenen Trägermaterialien. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/1970/pdf/GottaJan-2004-12-16.PDF>. Accessed 17 May 2017.
- [20] Griffiths, R. L., Dexter, A., Creese, A. J., und Cooper, H. J. 2015. Liquid extraction surface analysis field asymmetric waveform ion mobility spectrometry mass spectrometry for the analysis of dried blood spots. *The Analyst* 140, 20, 6879–6885.
- [21] Gruner, N., Stambouli, O., and Ross, R. S. 2015. Dried blood spots--preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 97.
- [22] Guthrie, R. und Susi, A. 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32, 338–343.
- [23] Hajak, G., Muller, W. E., Wittchen, H. U., Pittrow, D., und Kirch, W. 2003. Abuse and dependence potential for the non-benzodiazepine hypnotics zolpidem and zopiclone. A review of case reports and epidemiological data. *Addiction (Abingdon, England)* 98, 10, 1371–1378.
- [24] Häussler, B., Höer, A., und Millas, C. de, Eds. 2016. Arzneimittel-Atlas 2016. Der Arzneimittelverbrauch in der GKV. *MWV Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Berlin.
- [25] Hawwa, A. F., Albawab, A., Rooney, M., Wedderburn, L. R., Beresford, M. W., und McElnay, J. C. 2014. A novel dried blood spot-LCMS method for the quantification of methotrexate polyglutamates as a potential marker for methotrexate use in children. *Public Library of Science one* 9, 2, e89908.
- [26] Holub, M., Tuschl, K., Ratschmann, R., Strnadova, K. A., Muhl, A., Heinze, G., Sperl, W., und Bodamer, O. A. 2006. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 373, 1-2, 27–31.
- [27] Hunnius, C. und Ammon, H. P. T. 2004. Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch. *de Gruyter*, Berlin.
- [28] Jamey, C. Stability of bloodstains on various supports. *TIAFT Meeting 2014*, Buenos Aires.
- [29] Jamey, C., Tracqui, A., Ludes, B., und Raul, J.-S. 2014. Étude de la stabilité de sept benzodiazépines, de la méthadone et du zolpidem dans des taches de sang. *Toxicologie Analytique et Clinique* 26, 1, 32–38.
- [30] Janhsen, K., Roser, P., und Hoffmann, K. 2015. The problems of long-term treatment with benzodiazepines and related substances. *Deutsches Ärzteblatt international* 112, 1-2, 1–7.
- [31] Jantos, R., Veldstra, J. L., Mattern, R., Brookhuis, K. A., und Skopp, G. 2011. Analysis of 3,4-methylenedioxymetamphetamine. Whole blood versus dried blood spots. *Journal of Analytical Toxicology* 35, 5, 269–273.
- [32] Jantos, R., Vermeeren, A., Sabljic, D., Ramaekers, J. G., und Skopp, G. 2013. Degradation of zopiclone during storage of spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *International journal of legal medicine* 127, 1, 69–76.
- [33] Jeffreys, A. J., Wilson, V., und Thein, S. L. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 6023, 76–79.
- [34] John, H., Willoh, S., Hörmann, P., Siegert, M., Vondran, A., und Thiermann, H. 2016. Procedures for Analysis of Dried Plasma Using Microsampling Devices to

- Detect Sulfur Mustard-Albumin Adducts for Verification of Poisoning. *Analytical chemistry* 88, 17, 8787–8794.
- [35] Kadjo, A. F., Stamos, B. N., Shelor, C. P., Berg, J. M., Blount, B. C., und Dasgupta, P. K. 2016. Evaluation of Amount of Blood in Dry Blood Spots. Ring-Disk Electrode Conductometry. *Analytical chemistry* 88, 12, 6531–6537.
- [36] Kesel, P. M. M. de, Capiou, S., Lambert, W. E., und Stove, C. P. 2014. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis* 6, 14, 1871–1874.
- [37] Kesel, P. M. M. de, Lambert, W. E., und Stove, C. P. 2015. Does volumetric absorptive microsampling eliminate the hematocrit bias for caffeine and paraxanthine in dried blood samples? A comparative study. *Analytica chimica acta* 881, 65–73.
- [38] Larkin, E. K., Gebretsadik, T., Koestner, N., Newman, M. S., Liu, Z., Carroll, K. N., Minton, P., Woodward, K., und Hartert, T. V. 2011. Agreement of blood spot card measurements of vitamin D levels with serum, whole blood specimen types and a dietary recall instrument. *Public Library of Science one* 6, 1, e16602.
- [39] Leuthold, L. A., Heudi, O., Deglon, J., Raccuglia, M., Augsburg, M., Picard, F., Kretz, O., und Thomas, A. 2015. New microfluidic-based sampling procedure for overcoming the hematocrit problem associated with dried blood spot analysis. *Analytical chemistry* 87, 4, 2068–2071.
- [40] Manicke, N. E., Abu-Rabie, P., Spooner, N., Ouyang, Z., und Cooks, R. G. 2011. Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry. An avenue to therapeutic drug monitoring. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22, 9, 1501–1507.
- [41] Monleau, M., Butel, C., Delaporte, E., Boillot, F., und Peeters, M. 2010. Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65, 8, 1562–1566.
- [42] Musshoff, F. and Madea, B. 2010. Cocaine und benzoyllecgonine concentrations in fluorinated plasma samples of drivers under suspicion of driving under influence. *Forensic science international* 200, 1-3, 67–72.
- [43] Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., und Schäfer-Korting, M., Eds. 2008. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart*.
- [44] Nilsson, G. H., Kugelberg, F. C., Kronstrand, R., und Ahlner, J. 2010. Stability tests of zopiclone in whole blood. *Forensic science international* 200, 1-3, 130–135.
- [45] Nirogi, R., Kandikere, V., Komarneni, P., Aleti, R., Padala, N., Kalaikadhiban, I., Bhyrapuneni, G., und Muddana, N. 2012. Exploring dried blood spot sampling technique for simultaneous quantification of antiretrovirals. Lamivudine, stavudine and nevirapine in a rodent pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography : BMC* 26, 12, 1472–1481.
- [46] Odoardi, S., Anzillotti, L., und Strano-Rossi, S. 2014. Simplifying sample pretreatment. Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic science international* 243, 61–67.
- [47] Oliveira, R. V., Henion, J., und Wickremsinhe, E. R. 2014. Automated direct extraction and analysis of dried blood spots employing on-line SPE high-resolution accurate mass bioanalysis. *Bioanalysis* 6, 15, 2027–2041.
- [48] Parker, S. P. und Cubitt, W. D. 1999. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal of Clinical Pathology* 52, 9, 633–639.
- [49] Pedersen, L., Andersen-Ranberg, K., Hollergaard, M., und Nybo, M. 2017. Quantification of multiple elements in dried blood spot samples. *Clinical biochemistry*.

- [50] Peters, F. T., Hartung M., Herbold M., Schmitt G., Daldrup T., und Mußhoff F. Aus dem Arbeitskreis „Qualitätskontrolle“ Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen 1.
- [51] Poletini, A., Ed. 2006. Applications of LC-MS in toxicology. *Pharmaceutical Pr*, London.
- [52] Prosser, J. M., Jones, B. E., und Nelson, L. 2010. Complications of oral exposure to fentanyl transdermal delivery system patches. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* 6, 4, 443–447.
- [53] Ramsthaler, F., Peschel, O., und Rothschild, M., Eds. 2015. Forensische Blutspurenmusteranalyse. *Rechtsmedizin*. Lehmanns, Berlin.
- [54] Rantala, A.-M., Taylor, S. M., Trottman, P. A., Luntamo, M., Mbewe, B., Maleta, K., Kulmala, T., Ashorn, P., und Meshnick, S. R. 2010. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malaria journal* 9, 269.
- [55] Ren, X., Paehler, T., Zimmer, M., Guo, Z., Zane, P., und Emmons, G. T. 2010. Impact of various factors on radioactivity distribution in different DBS papers. *Bioanalysis* 2, 8, 1469–1475.
- [56] Rhoden, L., Antunes, M. V., Hidalgo, P., Alvares da Silva, C., und Linden, R. 2014. Simple procedure for determination of valproic acid in dried blood spots by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 96, 207–212.
- [57] Robertson, M. D. und Drummer, O. H. 1998. Stability of nitrobenzodiazepines in postmortem blood. *Journal of Forensic Sciences* 43, 1, 5–8.
- [58] Sadones, N., Archer, J. R. H., Ingels, A.-S. M. E., Dargan, P. I., Wood, D. M., Wood, M., Neels, H., Lambert, W. E., und Stove, C. P. 2015. Do capillary dried blood spot concentrations of gamma-hydroxybutyric acid mirror those in venous blood? A comparative study. *Drug testing and analysis* 7, 4, 336–340.
- [59] Saussereau, E., Lacroix, C., Gaulier, J. M., und Gouille, J. P. 2012. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 885-886, 1–7.
- [60] Schütz, H., Gotta, J. C., Erdmann, F., Riße, M., und Weiler, G. 2002. Simultaneous screening and detection of drugs in small blood samples and bloodstains. *Forensic science international* 126, 3, 191–196.
- [61] Sosnoff, C. S., Ann, Q., Bernert, J. T., JR, Powell, M. K., Miller, B. B., Henderson, L. O., Hannon, W. H., Fernhoff, P., und Sampson, E. J. 1996. Analysis of benzoylecgonine in dried blood spots by liquid chromatography--atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 20, 3, 179–184.
- [62] Sturm, R., Henion, J., Abbott, R., und Wang, P. 2015. Novel membrane devices and their potential utility in blood sample collection prior to analysis of dried plasma spots. *Bioanalysis* 7, 16, 1987–2002.
- [63] Taylor, R. R., Hoffman, K. L., Schriedewind, B., Clavijo, C., Galinkin, J. L., und Christians, U. 2013. Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 83, 1–9.

- [64] Tretzel, L., Thomas, A., Geyer, H., Gmeiner, G., Forsdahl, G., Pop, V., Schanzer, W., und Thevis, M. 2014. Use of dried blood spots in doping control analysis of anabolic steroid esters. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 96, 21–30.
- [65] Wagner, H., Vollmar, A., Bechthold, A., und Hoffmeister, D. 2007. Biogene Arzneistoffe und Grundlagen von Gentechnik und Immunologie. 51 Tabellen. *Pharmazeutische Biologie 2*. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart.
- [66] Winkler, M., Kaufmann, E., Thoma, D., Thierauf, A., Weinmann, W., Skopp, G., und Alt, A. 2011. Detection of ethyl glucuronide in blood spotted on different surfaces. *Forensic science international* 210, 1-3, 243–246.
- [67] Zakaria, R., Allen, K. J., Koplín, J. J., Roche, P., und Greaves, R. F. 2016. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 27, 4, 288–317.



### **13. Danksagung**

Allen voran danken möchte ich meiner Betreuerin Dr. Gabriele Roider für das interessante Thema der Arbeit, für das in mich gesetzte Vertrauen und ihren Einsatz, der mir die praktische Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglichte.

Des Weiteren möchte ich in diesem Zusammenhang meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Graw für die Überlassung des interessanten Themas danken, ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

An Herrn Dr. Sachs geht ein ganz besonderer Dank, ihm verdanke ich meine Forschungsstelle am FTC, an dem ich meine praktischen Versuche an den verschiedenen Geräten durchführen konnte. Er gab mir außerdem die Möglichkeit, den Routinealltag in einem forensisch-toxikologischen Labor von Anfang bis Ende aktiv kennenzulernen. Er stand mir in meinen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite und hinterließ nach seinem Tod eine fachlich sowie menschlich sehr große Lücke.

Herrn Professor Mußhoff, der im Jahr 2013 zum FTC stieß möchte ich ebenfalls danken, auch er stand mir mit Rat und Tat zur Seite und förderte und forderte mich. Vor allem in der Endphase meiner Arbeit war er es, der mich unermüdlich zur Fertigstellung der Arbeit trieb.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern in der Toxikologie am Institut für Rechtsmedizin in München, die immer ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag parat hielten.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Birgit Övgüer danken, die mich zu Beginn meiner Studien tatkräftig unterstützte und sich mindestens genauso intensiv mit dem Thema beschäftigte wie ich selbst.

Auch den Mitarbeitern am FTC gilt ein ganz besonderer Dank. Hier habe ich mich von Anfang an wohl und aufgenommen gefühlt. Auch in die Routine wurde ich schnell eingebunden. Für Nachfragen gab es immer offene Ohren und gute Ratschläge. Hier möchte ich insbesondere Sabrina Mayet hervorheben, ohne die ich mit dem Gerät und den Methoden niemals so schnell zurechtgekommen wäre. Sie hat mir viel beigebracht und war immer bereit, eine extra Schicht für die Forschung einzulegen.

Susanna Fehn vom BLKA gilt ebenfalls ein besonderer Dank, sie hat sich lange und intensiv mit der Arbeit beschäftigt und mit guten Ideen und Vorschlägen zum Gedeihen dieses Werks beigetragen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung danken und insbesondere meinem Freund für seine unermüdlichen Anstöße, die Arbeit zu Ende zu bringen.

## Eidesstattliche Versicherung

Krüger, Julia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **„Toxikologische Analyse von Blutspuren“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.06.2018

---

Ort, Datum

Julia Krüger

---

Unterschrift Doktorand/Doktorandin