

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Bestimmung von Amphetaminderivaten und verwandten Designer-
Drogen im Serum – Screening, Identifizierung und Quantifizierung
mittels Immunchemie und Gaschromatographie/Massenspektrometrie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
JON SCHÄFER
aus Berlin

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Kaatsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Maser

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Oktober 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel 7. Oktober 2009

gez.: Prof. Dr. Dr. Schünke
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Bestimmung von Amphetaminderivaten und verwandten Designer-Drogen im Serum – Screening, Identifizierung und Quantifizierung mittels Immunchemie und Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Gliederung

1. Einleitung	1
2. Methodik	4
2.1 Theoretische Grundlagen	4
2.1.1 Wirkung der untersuchten Substanzen auf den Organismus	4
2.1.2 Immunchemische Methoden	8
2.1.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	10
2.1.4 Prinzipien der Probenextraktion	13
2.1.4.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion	13
2.1.4.2 Festphasenextraktion (SPE)	14
2.1.5 Erstellung einer Spektrenbibliothek	15
2.1.6 Methodvalidierung – Eingesetzte statische Verfahren	20
2.2 Material und Geräte	23
2.2.1 Geräte zur Probenextraktion und -analyse	23
2.2.2 Verwendete Materialien	23
2.2.3 Verwendetes Probenmaterial	25
2.2.4 Verwendete Software	25
2.3 Praktische Durchführung	25
2.3.1 Immunchemische Messungen	25
2.3.2 Probenaufarbeitung und Analyse mittels GC/MS	27
2.3.2.1 Probenextraktion	27
2.3.2.2 Derivatisierungs- und Analysemethoden	28
2.3.3 Aufnahme neuer Amphetaminderivate in eine selbst erstellte Spektrenbibliothek	30

2.3.4	Validierungsschritte für einer Methode für die Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA im Serum	33
2.3.4.1	Ausschluss von Interferenzen	34
2.3.4.2	Linearität der Kalibration und Varianzenhomogenität	34
2.3.4.3	Genauigkeit	35
2.3.4.4	Grenzwerte	35
2.3.4.5	Wiederfindung	35
2.3.5	Bestimmung einiger ausgesuchter Amphetaminderivate	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten-Amphetamin- und Methamphetamin-Tests	37
3.1.1	Einsatz bei Proben, die nur Amphetamin enthalten	37
3.1.1.1	Anwendung der Amphetamin-Tests	37
3.1.1.2	Anwendung der Methamphetamin-Tests	38
3.1.2	Einsatz bei Proben, die nur „Ecstasy“ enthalten	39
3.1.2.1	Anwendung der Amphetamin-Tests	39
3.1.2.2	Anwendung der Methamphetamin-Tests	40
3.1.3	Einsatz bei Proben sowohl mit Amphetamin als auch „Ecstasy“ enthalten (Misch-Fälle)	40
3.1.3.1	Anwendung der Amphetamin-Tests	40
3.1.3.2	Anwendung der Methamphetamin-Tests	41
3.1.4	Kreuzreaktivitäten des Cozart-Amphetamin-Tests	42
3.2	Erstellung einer eigenen Massenspektren-Bibliothek verschiedener Amphetaminderivate als Basis zur Substanzidentifizierung	43
3.3	Validierung einer Methode zur Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDE im Serum mit GC/MS nach den Richtlinien der GTFCh	45
3.3.1	Ausschluss von Interferenzen	45
3.3.2	Linearität der Kalibration und Varianzenhomogenität	45
3.3.3	Genauigkeit	45
3.3.4	Grenzwerte	46

3.3.5 Wiederfindung	47
3.4 Quantifizierung seltener vorkommender Amphetaminderivate	47
3.4.1 Phentermin, Ephedrin, Cathin, Methylphenidat, BDB und MBDB	47
3.4.2 Norephedrin, Cathin und Cathinon	48
4. Diskussion	49
4.1 Immunchemische Tests	49
4.2 Massenspektren-Bibliothek verschiedener Amphetaminderivate zur Substanzidentifizierung	53
4.3 Validierung einer GC/MS-Methode	54
4.4 Quantifizierung ausgewählter Amphetaminderivate	55
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	60
7. Danksagung	
8. Lebenslauf	
9. Anhang	

Abkürzungverzeichnis

BDB	Benzodioxolbutamin
BG	Bestimmungsgrenze (engl. lower limits of quantification oder LLOQ)
DOB	4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin
DOM	4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GTfCh	Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie
NWG	Nachweisgrenze (engl. lower limits of detection oder LLOD)
MBDB	Methylbenzodioxolbutamin
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylendioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
MS	Massenspektrometrie
SPE	Festphasenextraktion (engl. solid phase extration)

1. Einleitung

Amphetamine und mit diesen verwandte Substanzen spielen in der heutigen Medizin vor allem in zwei Bereichen eine große Rolle: in der Sportmedizin als leistungssteigernde Substanzen (Doping) und in der Rechtsmedizin als Suchtmittel mit großer verkehrsmedizinischer Relevanz. Aber auch für den klinisch arbeitenden Arzt haben Amphetamine und verwandte Designer-Drogen eine erhebliche Bedeutung, da der in den letzten Jahren zunehmende Konsum von synthetischen Drogen, wie z.B. MDMA (Ecstasy), auch vermehrt zu Intoxikationen und Abhängigkeiten geführt hat [1,2]. Um eine spezifische Therapie im Falle einer Intoxikation einleiten oder einen Missbrauch nachweisen zu können, müssen die Substanzen sicher identifiziert und in vielen Fällen auch quantifiziert werden.

Für den Nachweis von Amphetaminen werden verschiedene Analyseverfahren eingesetzt: meist dienen immunchemische Verfahren als Vortest, aufwändigere Verfahren wie Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC) werden dann zur genauen Identifizierung und Quantifizierung benutzt, häufig in Kopplung mit Massenspektroskopie (MS) [3-18].

Im Jahr 2007 waren im chemisch-toxikologischen Labor der Rechtsmedizin in Kiel mehr als 1500 von der Polizei eingesandte Blutproben auf Amphetamine zu untersuchen. Zur effektiven Abarbeitung eines derartigen Probenaufkommens sind schnelle und wirtschaftliche Analyseverfahren notwendig, die andererseits aber auch die hohen Qualitätsstandards erfüllen, die bei forensischen Fragestellungen gefordert sind. Immerhin geht es bei verkehrsmedizinischen bzw. strafrechtlichen Verfahren in der Regel um Geldbußen, Fahrverbote und um Fragen der Schuldfähigkeit mit den daraus folgenden weitreichenden Konsequenzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die am Institut für Rechtsmedizin Kiel für die Amphetaminanalytik zur Verfügung stehenden Verfahren umfassend auszutesten und zu optimieren. Die Verfahren waren speziell dahingehend zu testen, ob sie für eine allgemeine Suchanalyse (Screening) auf Amphetamine und verwandte Substanzen geeignet sind oder ob sie nur ein eingeschränktes Spektrum an

amphetaminartigen Wirkstoffen erfassen. Gegebenenfalls sollten die Verfahren entsprechend modifiziert werden, um eine qualitative und quantitative Bestimmung möglichst vieler Wirkstoffe zu erlauben.

Zunächst sollten verschiedene Immunoassays auf ihre Einsetzbarkeit zur allgemeinen Suchanalyse geprüft werden, da eine stetig steigende Zahl an Blutproben auf Drogen untersucht werden muss und es ökonomisch nicht sinnvoll ist, alle Proben direkt der wesentlich aufwändigeren GC/MS-Untersuchung zuzuführen [19], die eine eindeutige Identifizierung und exakte Quantifizierung erlaubt. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die von der Grenzwertkommission¹ empfohlenen Grenzwerte von 25 ng/mL im Serum für Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA gelegt werden, da bei Überschreiten dieser Grenzwerte eine Ordnungswidrigkeit im Straßenverkehr gemäß § 24a StVG vorliegt. Der für diesen Einsatzbereich am besten geeignete Immunoassay sollte im Hinblick auf seine Kreuzreaktivität für seltener vorkommende Amphetaminabkömmlinge untersucht werden, um Aussagen darüber machen zu können, welche Substanzen der Test überhaupt erfasst.

In einem weiteren Abschnitt der Arbeit sollten neuere größtenteils noch nicht in kommerziellen Spektrenbibliotheken enthaltenen Amphetaminabkömmlinge mittels GC/MS untersucht werden. Zur leichteren Identifizierung der Substanzen und breiteren Anwendbarkeit einer neuen Bibliothek sollten die Substanzen mit verschiedenen Derivatisierungsmitteln umgesetzt und alle erhaltenen Derivate in eine eigene Bibliothek aufgenommen werden. Dies sollte die Basis für eine spätere Identifikation dieser Substanzen in realen Fällen darstellen.

Weiterhin sollte eine GC/MS-Methode für den Nachweis von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA nach den Richtlinien der GTFCh (Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie) validiert werden. Dazu sollten unter anderem die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die Linearität der Kalibration, die Präzision und Richtigkeit sowie die Wiederfindungsraten bestimmt

¹ Gremium aus Toxikologen, Rechts- und Verkehrsmedizinern, das das Bundesministerium für Verkehr, Bau und Städteentwicklung berät

werden. Weiterhin sollte bei ausgewählten weiteren Stoffen die Linearität der Kalibration unter Verwendung dieser Methode nachgewiesen werden.

Ziel war es auch, den Khat-Inhaltstoff Cathinon - ein weiteres Amphetaminderivat - einer Bestimmung im Serum zugänglich zu machen. Sollte dies mit der Routinemethode nicht gelingen, war eine geeignete Methode zu etablieren.

Insgesamt sollte diese Arbeit die Möglichkeiten und Grenzen der zur Verfügung stehenden Nachweismethoden für die Amphetaminanalytik im Serum aufzeigen, durch die Optimierung der Verfahren das Spektrum an nachweisbaren Amphetaminabkömmlingen erweitern und die Zuverlässigkeit eines routinemäßig eingesetzten quantitativen Verfahrens unter Beweis stellen. Damit besitzt die vorliegende Arbeit erhebliche praktische Relevanz für die Amphetaminanalytik in einem forensisch-toxikologischen Labor.

2. Methodik

2.1 Theoretischer Hintergrund

2.1.1 Wirkung der untersuchten Substanzen auf den Organismus

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen handelt es sich um Abkömmlinge von Amphetamin, Phenethylamin, Ephedrin und Tryptamin, die im Handel befindlichen Medikamente Methylphenidat (Ritalin™) und Phentermin sowie Fenetyllin, das im menschlichen Körper zu Amphetamin verstoffwechselt wird. Einige Amphetaminabkömmlinge sind in Deutschland zur Therapie von Narkolepsie, ADD (engl. Attention Deficit Disorders) und als Appetitzügler zugelassen.

Ecstasy (MDMA) gehört zu den Abkömmlingen des Amphetamins und ist als „Partydroge“ verbreitet. Es kann in den als „Ecstasy“ (XTC) gehandelten Tabletten mit anderen Methyldioxyamphetaminen wie MDA und MDEA und auch anderen Wirk- und Verschnittstoffen vermischt sein.

Amphetamine, Phenethylamine und Tryptamine besitzen eine sympathomimetische Wirkung, weshalb sie auch als sympathomimetische Amine bezeichnet werden. Im Detail unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf den menschlichen Körper jedoch etwas [20] und werden deshalb getrennt betrachtet. Allerdings sind nicht alle Substanzen so gut untersucht wie das Amphetamin, so dass sich zum Teil nur recht pauschale Aussagen treffen lassen.

Amphetamine

Für das Amphetamin ist eine euphorisierende, antriebssteigernde Wirkung bekannt; Schmerzempfindung sowie Hungergefühl und Müdigkeit werden herabgesetzt und es kommt zur Steigerung der Herzfrequenz und des Blutdrucks. Außerdem werden die Bronchien erweitert.

Manche Amphetaminabkömmlinge wie etwa DOM, DOB, TMA und PMA besitzen eine starke halluzinogene Wirkung, die aufputschende Wirkung des Amphetamins tritt bei diesen Verbindungen in den Hintergrund. Sie werden deshalb als Halluzinogene bezeichnet.

Die Gruppe der Methylendioxyamphetamine und Methylendioxybutamine (MDMA, MDA, MDEA, MBDB und BDB) hingegen weist keine bzw. eine (konzentrationsabhängig) nur geringe halluzinogene Potenz auf. Ihnen werden psychische Wirkungen wie Steigerung von Stimmung und Kommunikationsfähigkeit und die Auslösung eines Gefühls der Empathie zugeschrieben. Aus diesem Grund werden sie als Entactogene bezeichnet.

Häufige Nebenwirkungen der Amphetamine sind Mundtrockenheit, Muskelzuckungen, Kaumuskelkrämpfe, Hyperthermie, ein vorübergehend reduziertes Kurzzeitgedächtnis und Appetitmangel; seltener treten Schlafstörungen, Angstgefühle, paranoide Psychosen und Depersonalisations-Phänomene auf. Intoxikationen mit Amphetamin und anderen sympathomimetisch-wirksamen Substanzen führten in der Vergangenheit schon zu zahlreichen Todesfällen [21], insbesondere wurden in den letzten Jahren auch Todesfälle mit zuvor wenig bekannten Amphetaminabkömmlingen beschrieben [22]. Meist fand sich eine kardiale Ursache (Arrhythmie, akute Herzinsuffizienz) als Todesursache. Ähnlich wie für Kokain ist bei chronischem Abusus bereits für einige Amphetamine die Möglichkeit der Entstehung einer Herzhypertrophie nachgewiesen [23], darüber hinaus werden Schädigungen an Leber, Niere und Nervensystem angenommen. Zu akuten Todesfällen nach Ecstasy-Konsum kann eine fortschreitende Dehydrierung des Körpers mit einhergehender Hyperthermie führen.

Auch bei den weiterhin im Handel erhältlichen sympathomimetischen Aminen wie Methylphenidat (Ritalin™) sind Intoxikationen beschrieben; dies ist besonders bedenklich, da die Medikamente häufig bei Kindern eingesetzt werden.

Nach Ende der Amphetamin-Wirkung klagen Konsumenten häufig über Erschöpfung, depressive Verstimmung, Appetitmangel und Konzentrationsprobleme. Bei wiederholter Einnahme wird auch über eine Abschwächung der Wirkung (Toleranzentwicklung) berichtet. Gygi et al. [24] haben die molekularen Ursachen für diese Toleranzentwicklung für Methamphetamin untersucht. Sie fanden im Tierexperiment an Ratten heraus, dass bei den Ratten, denen über einen längeren Zeitraum Methamphetamin gegeben wurde, die Methamphetamin-Konzentration im Gehirn im Vergleich mit der Kontrollgruppe, denen einmalig Methamphetamin verabreicht wurde, niedriger lag. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die Toleranz gegenüber Methamphetamin nicht alleine an einem verbesserten Abbau und schnellerer renaler Ausscheidung des Stoffes liegt. Vielmehr fand sich auch eine

Verschiebung der Verteilung zwischen Plasma und ZNS zugunsten des Plasmas nach längerer Einnahme. Dies legt die Existenz eines aktiven Transports von Methamphetamin ins Gehirn nahe, der nach längerer Einnahme inhibiert wird.

Die körperlichen Wirkungen von Amphetaminen werden durch eine erhöhte Freisetzung von Katecholaminen (Nor- und Adrenalin) hervorgerufen. Die psychischen Wirkungen von Amphetamin und MDMA entstehen durch die Veränderung der Konzentration einiger körpereigener Neurotransmitter in bestimmten Regionen des ZNS (vor allem im limbischen System). Im Vordergrund steht die erhöhte Produktion und Ausschüttung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, kurz 5-HT) durch das präsynaptische Neuron, sowie die synergistisch wirkende Hemmung der Wiederaufnahme des Serotonin (Reuptake-Hemmung). Auch eine direkt stimulierende Wirkung über den 5-HT-2-Rezeptor des postsynaptischen Neurons wird für MDMA beschrieben. Im Tierexperiment an Affen wurde gezeigt, dass sich bei chronischem Abusus die Zahl der Serotonin produzierenden Zellen im ZNS verringert. Dieser Prozess ist auch durch Abstinenz nur teilweise wieder rückgängig zu machen [25].

Methamphetamin wird im Körper zu Amphetamin abgebaut. Ein Teil des Amphetamins wird in der Leber durch das Cytochrom P450 desaminiert bzw. hydroxyliert (s. Abb. 2.1). Durch diese Reaktionen entstehen zum Teil Metaboliten, die ebenfalls psychoaktiv wirksam sind und damit die Gesamtwirkung beeinflussen. Zu den aktiven Metaboliten gehören das 4-Hydroxyamphetamin, das 4-Hydroxynorephedrin und das Norephedrin. Ein anderer Teil des Methamphetamins wird unverändert über den Urin eliminiert. Dieser Anteil ist im Wesentlichen vom pH-Wert des Urins abhängig. Bei sauren pH-Werten (5,5-6,0) können bis zu 60% unverändert über die Nieren eliminiert werden, während bei alkalischem Urin (pH 7,5-8,0) die Desaminierung in der Leber dominiert und nur ca. 7% unverändert mit dem Urin ausgeschieden werden.

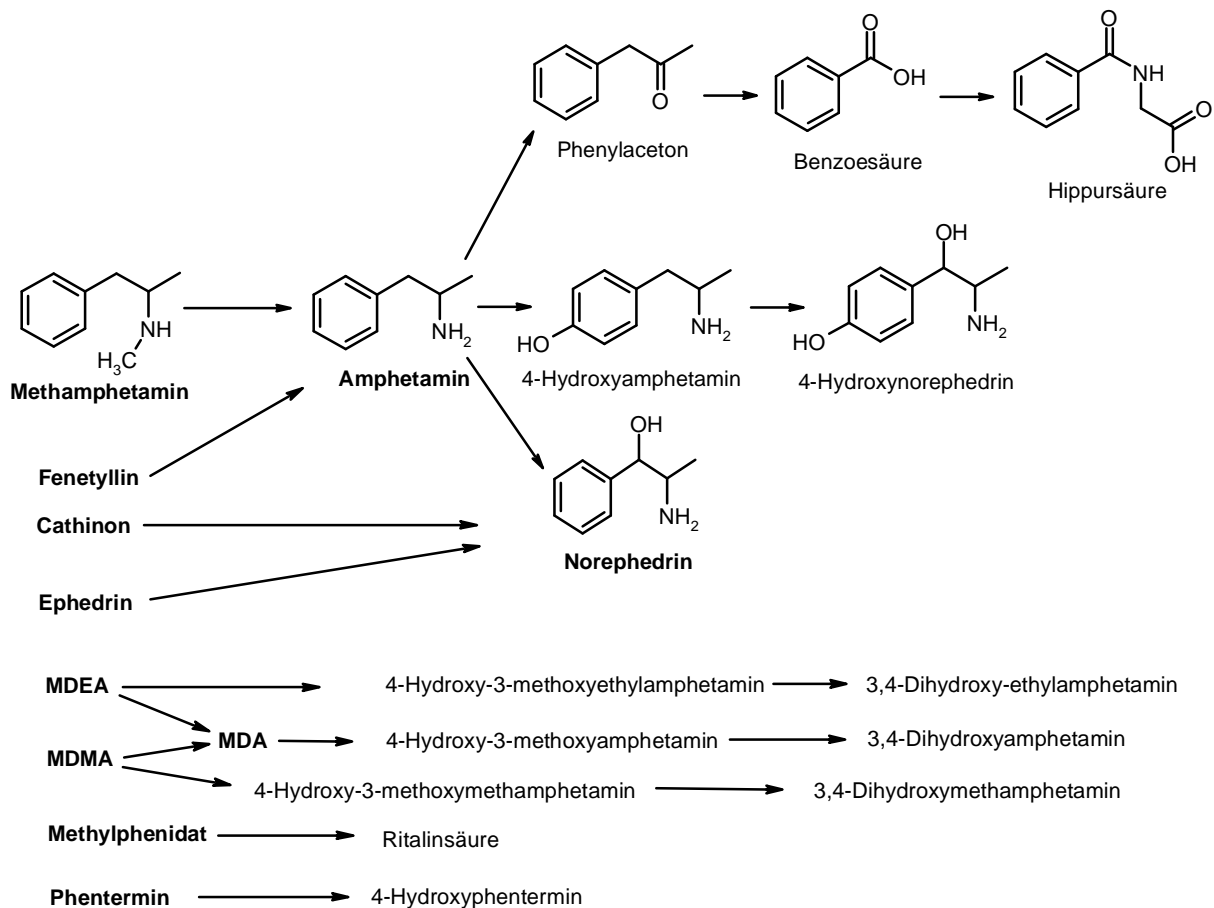


Abbildung 2.1 Abbauwege von sympathomimetischen Aminen im menschlichen Körper, insbesondere Amphetamin (verändert nach [26])

Phenethylamine

Die Stammsubstanz dieser Gruppe, das Phenethylamin selbst besitzt so gut wie keine sympathomimetische Wirkung, zur Gruppe der Phenethylamine gehören jedoch einige starke Halluzinogene wie das Mescaline, der Inhaltsstoff des Peyotlkaktus (lat. *Lophophora Williamsii*). Die halluzinogene Potenz wurde bei den synthetisch hergestellten Phenethylaminen durch die Einführung von Methoxy- und Halogensubstituenten noch deutlich verstärkt.

Tryptamine

Tryptamin ist als biogenes Amin eine körpereigene Substanz und eine Vorstufe des Serotonins. Wie oben beschrieben, ist Serotonin ein Neurotransmitter, der in bestimmten Zentren des ZNS zur Signalübertragung zwischen Nervenzellen dient. Es gibt einige klassische Rauschmittel, die die Grundstruktur der Tryptamine tragen, z.B. das Lysergsäureamid, von dem sich das LSD ableitet. Dementsprechend zeigen Tryptamine auch LSD-ähnliche Wirkungen: Wechsel zwischen Euphorie, Dysphorie

und Halluzinationen [20]. Zu den Tryptaminen gehören neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen Etryptamin, N,N-Diethyltryptamin und N,N-Dimethyltryptamin auch Psilocin (der Wirkstoff in Rauschpilzen, „Magic Mushrooms“) und Bufotenin (Inhaltsstoff in Krötensekret und einigen Pflanzen).

Cathinon

Cathinon ist im Khat (lat. *Catha edulis*), einer im nahen Osten und Ostafrika angebauten Pflanze, enthalten. Die Blätter der Pflanze werden vor allem im Jemen aufgrund ihrer euphorisierenden Wirkung gekaut.

Der Wirkung nach lässt sich das im Khat (lat. *Catha edulis*) enthaltene Cathinon wie auch seine Metaboliten Cathin (Norpseudoephedrin) und Norephedrin mit einem abgeschwächten Amphetamin vergleichen.

2.1.2 Immunchemische Methoden

Immunchemische Tests sind heute ein fester Bestandteil in jedem klinischen und forensisch-toxikologischen Labor. Sie ermöglichen ein einfaches Screening einer großen Anzahl von Proben auf eine gesuchte Substanz oder Substanzgruppe ohne eine aufwändige Probenvorbereitung. Es gibt Tests mit sehr spezifischen Antikörpern, die sich zur Suche und Quantifizierung von Einzelsubstanzen eignen. Die meisten Tests jedoch sprechen auf ganze Substanzgruppen an und liefern dann auch nur semiquantitative Aussagen beim Vorliegen einer Substanz der gesuchten Gruppe. Immunchemische Tests zeigen oberhalb eines vom Testhersteller festgelegten Grenzwerts positive Ergebnisse an. Die so positiv getesteten Proben müssen einer weiteren Analytik zugeführt werden, die eine sichere Identifizierung und gegebenenfalls eine Quantifizierung des vorliegenden Wirkstoffs erlaubt. Je spezifischer ein immunchemischer Vortest für die gesuchte Substanz ist, umso geringer ist die Anzahl an falsch positiven Proben, die einer weiteren Analyse zugeführt werden müssen. Tests mit einer hohen Spezifität besitzen eine geringe Kreuzreaktivität für andere Substanzen. „Kreuzreaktivität“ bedeutet, dass ein Test anspricht, obwohl nur eine dem gesuchten Stoff ähnliche Substanz enthalten ist. Ursache dafür ist eine strukturelle Ähnlichkeit in der antigenen Determinante der vorliegenden und der gesuchten Substanz. Die Kreuzreaktivität wird als Verhältnis

des Messwertes der vorliegenden Substanz zur Konzentration der Testsubstanz in Prozent angegeben.

Grundlage jeder immunchemischen Untersuchung ist die Antikörper-Antigen-Bindung. Antikörper, auch als Immunglobuline bezeichnet, sind die spezifische Antwort des menschlichen oder tierischen Körpers auf das Eindringen von potenziell schädlichen Substanzen, wie z.B. Krankheitserregern oder Fremdeiweißen. Sie werden von Immunzellen (Plasmazellen) gebildet, um mit den Fremdstoffen Komplexe zu bilden und sie so unschädlich zu machen oder weiteren Mechanismen der körpereigenen Abwehr zuzuführen. Antikörper werden jedoch erst bei einer Größe der eingedrungenen Substanz von mindestens ca. 10000 Dalton gebildet; solche Substanzen werden dann als Antigene bezeichnet. Antigene bestehen aus einem hochmolekularen Trägermolekül und einer für die Spezifität des Antikörpers verantwortlichen Determinante. Die vom Trägermolekül gelöste Determinante bezeichnet man als Hapten.

Antikörper sind auch außerhalb des Organismus' in der Lage, Antigene und Haptene spezifisch zu binden. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für ihre Verwendung in immunchemischen Tests. Um einen Antikörper gegen eine niedermolekulare Substanz, wie z.B. eine Droge oder ein Medikament zu bilden, werden diese, an große Eiweißmoleküle gebunden, in ein Versuchstier injiziert. Die von dem Tier gebildeten Antikörper können entnommen und gereinigt werden und reagieren nun auch gegen das Hapten allein.

Für alle immunchemischen Bestimmungen müssen an die Qualität der Antikörper hohe Anforderungen gestellt werden. Die Charakterisierung der Antikörper erfolgt über ihre Spezifität, Bindungsenergie und Arbeitsverdünnung.

Die Antikörper-Antigen-Komplexbildung ist eine Gleichgewichtsreaktion. Daher bindet sich, wenn wenig der gesuchten Substanz (Antigen) in der zu untersuchenden Probe enthalten ist, eine relativ große Menge an zugesetztem markierten Antigen an die Antikörper, während nur ein kleiner Teil des zugegebenen markierten Antigens frei in der Lösung verbleibt. Zur Auswertung des Tests kann nun entweder die gebundene oder die freie Menge markierter Antigene gemessen werden. Je nach Verfahren kann hierfür ein Trennschritt notwendig sein. Man spricht von einem heterogenen Immunoassay, wenn eine Trennung von gebundenem und freiem Antigen erfolgt. Ohne diesen Trennschritt spricht man von einem homogenen Immunoassay. Zur Markierung eines Antigens stehen verschiedene Verfahren zur

Verfügung und auch die eingesetzte Methodik ist sehr unterschiedlich. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Immunoassays handelt es sich um sogenannte ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay)-Platten. Dies sind Mikrotiterplatten mit zahlreichen durchnummerierten Testkammern. Die Wände der Testkammern sind mit Antikörpern versehen, um deren Bindung die gesuchte Substanz in der Probe und zusätzlich zugesetztes Enzymkonjugat konkurrieren. Das Enzymkonjugat besteht aus dem spezifischen Hapten, an das ein Enzym gebunden ist. Durch einen Waschschrift wird das ungebundene Enzymkonjugat entfernt. Das gebundene Enzymkonjugat führt nach Zugabe eines Substrats zu einem Farbumschlag, der mittels eines Photometers gemessen werden kann. Ist die Probe positiv auf die getestete Substanz, fällt der Farbumschlag gering aus, da relativ wenig Enzymkonjugat gebunden vorliegt, was eine semiquantitative Aussage über die enthaltene Menge der gesuchten Substanz ermöglicht.

Zur Auswertung werden vom Hersteller des Immunoassays gelieferte Kalibrierlösungen mit definierter Substanzmenge in jedem Test mitgeführt. Über die Extinktion dieser Kalibrierlösungen lässt sich dann eine Kalibrierkurve erstellen, an Hand derer sich die Substanzkonzentration in der Probe errechnen lässt. Dabei ist stets zu berücksichtigen, dass - wie oben beschrieben – Kreuzreaktivitäten vorliegen können und es sich damit nicht um ein beweissicheres Verfahren handelt.

2.1.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie eignet sich besonders zur empfindlichen Analyse von Verbindungen in komplexer Matrix. Die Verbindungen müssen hierbei unzersetzt in die Gasphase überführbar sein. Daher ist es bei vielen polaren Substanzen unerlässlich, sie vor der Injektion in den Gaschromatographen durch Derivatisierung in unpolare Verbindungen zu überführen.

Ein Gaschromatograph besteht aus einer druckkontrollierten Trägergasversorgung, dem Probeneinlass- und Verdampfungssystem (Injektor) und einer in einem Ofen befindlichen Trennsäule. Als mobile Phase dient ein Gas, als stationäre Phase wird ein Feststoff oder eine hochsiedende Flüssigkeit verwendet, die sich auf der Innenwand einer Trennsäule befindet. Aus dieser gelangen die aufgetrennten Verbindungen eines Gemisches direkt ins Massenspektrometer. Die Temperatur des Injektors, Ofens und des Detektors sind unabhängig voneinander regelbar.

In der chemisch-toxikologischen Analyse werden heute praktisch ausschließlich Kapillarsäulen verwendet, die wegen ihres geringeren Platzbedarfs viel länger als gepackte Säulen sind und damit eine weitaus größere Trennleistung aufweisen. Die Trennleistung verhält sich proportional zur Wurzel der Säulenlänge, so dass eine viermal so lange Säule eine doppelt so hohe Trennleistung erzielt. Kapillarsäulen bestehen aus amorph geschmolzenem Siliziumoxid und besitzen einen Innendurchmesser von 0,1 - 0,5 mm. Ihre Innenwand ist von einem 0,1 - 0,3 μm dicken Film einer hochsiedenden Flüssigkeit wie Polydimethylsiloxan oder Polyphenylmethylsiloxan überzogen. Durch ein Phasengleichgewicht zwischen dieser stationären Phase und der mobilen Gasphase kommt es zur Auftrennung der Substanzen. Bei der Trennung der Substanzen mit unterschiedlicher Affinität zur stationären Phase eluieren Verbindungen mit geringer Affinität schnell und in scharfen Peaks, während Verbindungen mit hoher Affinität länger auf der Säule bleiben und durch Diffusionsvorgänge in breiteren Peaks eluieren. Eine Peakverbreiterung ist infolge unempfindlicherer Detektion und Peaküberlappung unerwünscht. Dies gilt auch für eine lange Messzeit, die aufgrund der Gefahr von Zerfallsprozessen ebenfalls vermieden werden sollte. Es existieren unterschiedliche Techniken, um diese Probleme zu vermeiden und eine gaschromatographische Trennung zu verbessern. Die häufigste und hier verwendete Methode ist die kontinuierliche oder stufenweise Temperaturerhöhung. Sie ist sehr effektiv und apparativ leicht umzusetzen.

Der an der Säule angeschlossene Detektor hat die Aufgabe, die Analyten beim Austritt aus der Säule zu erfassen. Prinzipiell unterscheidet man zwischen selektiven und universellen Detektoren.

Die Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer (Gaschromatographie-Massenspektrometrie, GC/MS) ist in der forensischen Chemie eine der leistungsfähigsten und die derzeit am häufigsten eingesetzte Methode und wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

Beim Eintritt in das Massenspektrometer werden die aus der Säule austretenden Moleküle im Hochvakuum bei 10^{-7} Torr durch Elektronenbeschuss bei einer Energie von 70 eV ionisiert. Die hohe Überschussenergie führt zu einem Auseinanderbrechen der Moleküle und zu charakteristischen positiv geladenen Bruchstücken. Diese Ionen können dann nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) aufgetrennt in ihrer Intensität gemessen werden. Um die geladenen Bruchstücke nach ihrer

Masse zu trennen, werden sie durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung auf eine definierte Geschwindigkeit gebracht und dann mit Hilfe elektrostatischer Felder zu einem Strahl gebündelt. Als bewegte Teilchen lassen sich die Ionen nun auf verschiedene Weise trennen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Quadrupol-Massenspektrometer verwendet, bei dem an vier konzentrisch angeordnete Stabelektroden eine Gleichspannung angelegt wird, die von einer hochfrequenten Wechselspannung überlagert wird. In Abhängigkeit von der Amplitude der Wechselspannung können nur Ionen eines bestimmten Masse-Ladungsverhältnisses das Stabsystem in Längsrichtung passieren. Durch Variation der Wechselspannung ist das Stabsystem zu verschiedenen Zeiten für unterschiedliche Ionen durchgängig. Zur Registrierung der getrennten Ionen wird ein Elektronenmultiplier verwendet, auf den die Ionen nacheinander auftreffen und einen Strom auslösen. Die so erhaltenen Daten werden dann mittels eines Computers ausgewertet.

Für ein Quadrupol-Massenspektrometer sind verschiedene Betriebsmodi möglich. Wird es im Full-scan-Modus betrieben, so werden vorgegebene Massenbereiche innerhalb eines gewissen Zyklus' Masse für Masse registriert und die jeweiligen Intensitäten gemessen. Durch die Darstellung der Ionenintensitäten auf einer m/z -Achse erhält man die vollständigen Massenspektren. Im sensitiveren SIM (Selected Ion Monitoring) werden nur einzelne, für die Substanz charakteristische Ionen registriert. Hierbei wird die Empfindlichkeit der Messung auf Kosten eines Informationsverlustes erhöht.

Die Identifikation einer Verbindung erfolgt über das charakteristische Massenspektrum bzw. das charakteristische Ionenverhältnis bei SIM-Messungen, sowie zusätzlich über die Laufzeit auf der Trennsäule (Retentionszeit). Die Retentionszeit wird vor allem durch die Molekülgröße und die Polarität der Verbindung bestimmt. Kleine unpolare Substanzen bewegen sich schnell auf der polaren mobilen Phase der Säule und führen zu den gewünschten scharfen Peaks, während polare Substanzen breite Peaks zur Folge haben. Daher ist es bei vielen polaren Substanzen erforderlich, sie mit einem Derivatisierungsmittel in unpolare Verbindungen zu überführen. Ein zusätzlicher positiver Effekt sind die durch die höhere Molmasse bedingten selteneren und damit charakteristischeren Ionenmassen, die nach dem Elektronenbeschuss der Derivate entstehen [26].

Um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen, wird eine definierte Menge eines internen Standards in den Proben mitgeführt. Dabei sollte der interne Standard ähnliche chemische Eigenschaften wie die gesuchte Substanz haben, um ein möglichst gleichartiges Extraktions-, Trenn- und Fragmentierungsverhalten sicherzustellen. Daher werden heute zumeist deuterierte interne Standards verwendet, in denen einzelne oder mehrere Wasserstoffatome der nachzuweisenden Verbindung durch Deuterium ersetzt sind. Deuterium ist ein Isotop des Wasserstoffs, dessen Kern aus einem Proton und einem Neutron besteht (chemische Schreibweise ^2H , verbreitet ist aber der Einfachheit halber auch D). Deuterium ist doppelt so schwer wie Wasserstoff, dessen Kern nur aus einem Proton besteht. Der Standard besitzt daher eine höhere Molekülmasse bei sonst gleichen chemischen Eigenschaften wie die nachzuweisende Verbindung.

2.1.4 Prinzipien der Probenextraktion

In der toxikologischen Analytik kommt der Probenaufarbeitung eine entscheidende Bedeutung zu, da die in der biologischen Matrix in großen Mengen enthaltenen Bestandteile wie Fettsäuren und Eiweiße bei der chromatographischen Trennung stören und die spektroskopische Identifizierung der nachzuweisenden Substanzen erschweren können. Zudem liegen viele Substanzen in so geringen Konzentrationen in den Proben vor, dass sie vor ihrer Bestimmung angereichert werden müssen.

Neben neueren Extraktionsverfahren, wie beispielsweise der Solid Phase Micro Extraction (SPME), werden in der toxikologischen Analytik weiterhin Flüssig-Flüssig-Extraktionen angewendet, die mit wenigen Millilitern Flüssigkeit durchgeführt werden können. Für spezielle Fragestellungen werden jedoch zunehmend Festphasenextraktionen (SPE) eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren werden hier kurz näher beleuchtet.

2.1.4.1 Flüssig-Flüssig Extraktion

Das zugrunde liegende Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion ist, dass sich eine Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln verteilt. Die in den beiden Lösungsmitteln vorhandenen Anteile der gelösten Substanz stehen dabei entsprechend ihrer Löslichkeit in dem jeweiligen Lösungsmittel in einem

dynamischen Gleichgewicht. Zu den Flüssig-Flüssig-Extraktionen zählen zum Beispiel das Ausschütteln einer wässrigen Phase mit Ether in einem Schütteltrichter oder die Trennung mittels Extrelut®-Säulen.

2.1.4.2 Festphasenextraktion (SPE)

Bei der Fest-Flüssig- oder Festphasenextraktion findet eine Adsorption der Substanz an die poröse Oberfläche einer festen Phase statt. Als feste Phase dienen unterschiedlich derivatisierte Kieselgele. Neben polaren und unpolaren Phasen werden auch Ionenaustausch- und Mischphasen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden Säulen mit Mischphasen verwendet, deren Oberfläche einerseits unpolare Oktylketten und andererseits Alkyl-Phenyl-Sulfonsäure als kationische Komponente als Bindungsstellen enthalten. Über diese Bindungsstellen können Moleküle aus der flüssigen Phase pH-selektiv gebunden werden. Die Bindung an die feste Phase erfolgt einerseits über hydrophobe Wechselwirkungen (Oktylketten) bzw. über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Alkyl-Phenyl-Sulfonsäure. Es werden jedoch keine kovalenten Bindungen ausgebildet. Mit dieser Technik ist man in der Lage, unerwünschte Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen, entweder indem man die Verunreinigungen an die feste Phase bindet und die gesuchte Substanz eluiert oder indem man die gesuchte Substanz bindet, in einem ersten Schritt die Verunreinigungen und im zweiten Schritt die gesuchte Substanz eluiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die letztgenannte Möglichkeit verwendet, um die Extrakte von unerwünschten Substanzen zu befreien und die gesuchten Analyten anzureichern.

Bei der SPE werden zunächst die verwendeten Säulen konditioniert, um eine Benetzbarkeit zu gewährleisten. Nach Einstellung eines geeigneten pH-Wertes wird die Probe aufgetragen. Nach einem Waschschrift zum Entfernen von Verunreinigungen werden (im Idealfall) nur die Analyten eluiert. Zur Beschleunigung der einzelnen Schritte wird entweder ein Vakuum angelegt oder mit Überdruck gearbeitet.

2.1.5 Erstellung einer Spektrenbibliothek

Das Massenspektrum spiegelt die gesamte Struktur des Moleküls wider.

Aebi und Bernhard [27] wiesen auf die Wichtigkeit von umfangreichen Spektrenbibliotheken für die Identifizierung von Substanzen hin. Zur Identifizierung einer Substanz mittels GC/MS benötigt man das charakteristische Massenspektrum der Verbindung. Die Intensität der Fragmente wird im Wesentlichen durch die thermodynamische Stabilität bestimmt. Die Stärke der Bindungen spielt eher eine untergeordnete Rolle. Auch die Anwesenheit von Heteroatomen spielt für die Fragmentierung eine große Rolle (siehe α -Spaltung). Zusätzlich können die Retentionszeit oder der Kovats-Retentionsindex I zur Identifizierung herangezogen werden. Die Retentionszeit ist im Wesentlichen von der Größe und Polarität der Verbindung abhängig. Dabei haben in ihrem Aufbau ähnliche Moleküle auch ähnliche Retentionsindices, dies gilt speziell für Diastereomere. In dieser Arbeit wurden gesättigte, geradkettige Kohlenwasserstoffe mit 12 bis 36 Kohlenstoffatomen als Bezugsgröße für die Bestimmung des Kovats Retentionsindex herangezogen.

Die Formel zu Berechnung des Kovats-Index lautet:

$$I = 100 \left[\frac{\log X_i - \log X_z}{\log X_{z+1} - \log X_z} + z \right]$$

wobei X für die reduzierten Retentionsparameter (Elutionszeit abzüglich der Totzeit)

i für die zu bestimmende Substanz in der Probe steht,

z der Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, das vor der Substanz in der Probe eluiert, entspricht und

$z+1$ die Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, das nach der Substanz in der Probe eluiert, darstellt.

Eluiert z.B. eine Substanz gleichzeitig mit dem Kohlenwasserstoff mit 14 Kohlenstoffatomen von der Säule, so wird ihr nach Kovats ein Retentionsindex von 1400 zugeordnet.

Der Kovats-Index gilt in seiner ursprünglichen Form nur unter isothermischen Bedingungen. Für temperaturprogrammierte GC-Messungen kann ein ähnlicher Wert

berechnet werden, wobei dann die gemessenen Werte anstelle ihrer Logarithmen verwendet werden. Man bezeichnet dies als linearen Retentionsindex $I^{(T)}$

$$I^{(T)} = 100 \left[\frac{t_{R(i)}^{(T)} - t_{R(z)}^{(T)}}{t_{R(z+1)}^{(T)} - t_{R(z)}^{(T)}} + z \right]$$

wobei $t_R^{(T)}$ die jeweilige Retentionszeiten bezeichnet, die unter den Bedingungen des temperaturprogrammierten GC-Laufes gemessen werden.

Dadurch lässt sich - bei Verwendung einer bestimmten Trennsäule - eine von Säulenlänge und Temperaturprogramm weitgehend unabhängige Aussage über den Zeitpunkt der Detektion auch auf unterschiedlichen Geräten und unter verschiedenen Gerätebedingungen treffen.

Da in einer Spektrenbibliothek abgelegte Massenspektren einen schnellen Vergleich einer detektierten Substanz mit gespeicherten Substanzdaten ermöglichen, ist es nötig, umfangreiche Stoffdatenbanken aufzubauen. Leider enthalten auch die umfangreichsten, kommerziellen Datenbanken nicht alle Substanzen, die in der forensisch-toxikologischen Praxis auftauchen. Daher sind vorhandene Datenbanken ständig zu erweitern oder neue Datenbanken anzulegen. Zum Aufbau einer Spektrenbibliothek werden Massenspektren bekannter Verbindungen zusammen mit charakteristischen Substanzdaten in die Bibliothek aufgenommen, wobei zur Plausibilitätskontrolle neuer Substanzspektren vorher die möglichen Fragmentierungswege genau betrachtet werden müssen.

Fragmentierungsmechanismen

Durch den Elektronenstoß werden Elektronen aus der Elektronenhülle eines Atoms geschossen, so dass ein kationisches Radikal gebildet wird. Diese Ionisierung erfolgt bevorzugt an Atomen mit freien Elektronenpaaren wie zum Beispiel Stickstoff oder Sauerstoff oder an Doppelbindungen. Das zurückbleibende Radikalkation ist sehr reaktiv und führt zu einer Fülle von Fragmentierungsreaktionen. Die Fragmentierung kann hierbei durch das radikalische Ion oder durch die positive Ladung ausgelöst werden.

Die für die Arbeit wichtigsten Reaktionen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Entscheidend für die Intensität der entstehenden Bruchstücke ist deren thermodynamische Stabilität.

1. α -Spaltung

Bei der α -Spaltung stellt das Radikalkation sein Elektron dem Nachbaratom für eine Bindungsbildung zur Verfügung. Hierbei wird die vom Nachbaratom wegführende Bindung homolytisch aufgebrochen. Dieser Prozeß ist schematisch am Beispiel des Amphetamins in Abbildung 2.2 gezeigt.

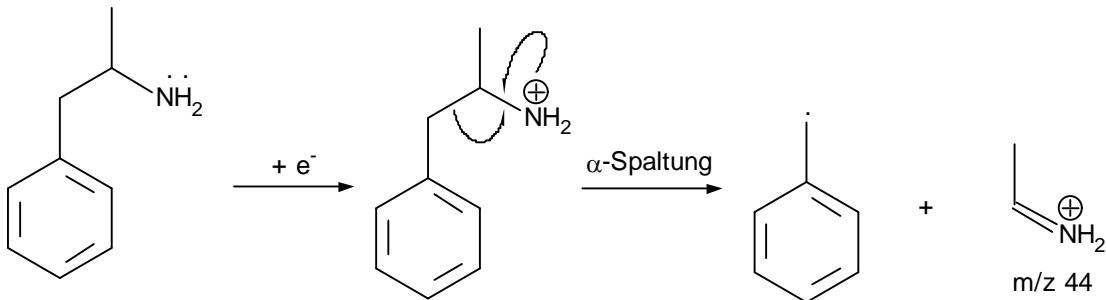


Abbildung 2.2 Reaktionsablauf der α -Spaltung (Anmerkung: Das bei dieser Reaktion entstehende Immoniumion (hier mit m/z 44) bildet bei Amphetaminen und Phenethylaminen oft das stärkste Ion im Massenspektrum (Basepeak))

2. Benzylspaltung

Die Benzylspaltung ist eine spezielle α -Spaltung nach Ionisierung im aromatischen Ring. Bei unsubstituierten Ringen entsteht ein Tropyliumkation mit der Masse m/z 91.

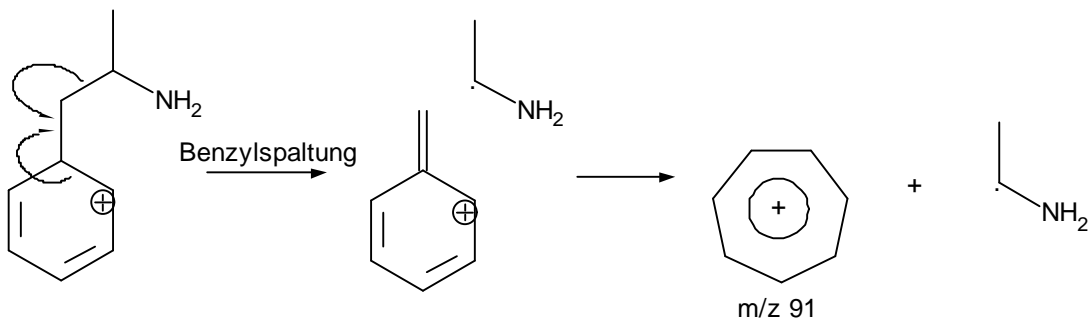


Abbildung 2.3 Reaktionsablauf der Benzylspaltung

3. Induktive Bindungsspaltung

Bei der induktiven Bindungsspaltung wird das dem Radikalkation benachbarte Bindungselektron vollständig auf das Radikalkation übertragen. Dabei bildet sich ein

Kation und ein neutrales Aminoradikal (z.B. das Homobenzylkation m/z 119 für Amphetamin).

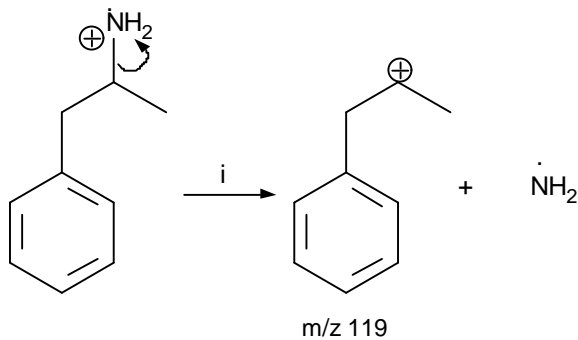


Abbildung 2.4 Reaktionsablauf der induktiven Bindungsspaltung

4. Unspezifische Umlagerungen (Rearrangements)

Innerhalb eines Moleküls kommt es häufig zu Verlagerungen eines Wasserstoffatoms. Der Mechanismus führt über 5- oder 6-ringartige Anordnungsmöglichkeiten des Molekülgerüsts zur radikalisch induzierten Umlagerung eines Wasserstoffatoms und ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt. Im gezeigten Amphetamin kommt es zu einer α -Spaltung unter Bildung eines protonierten Benzylradikals mit der Masse m/z 92.

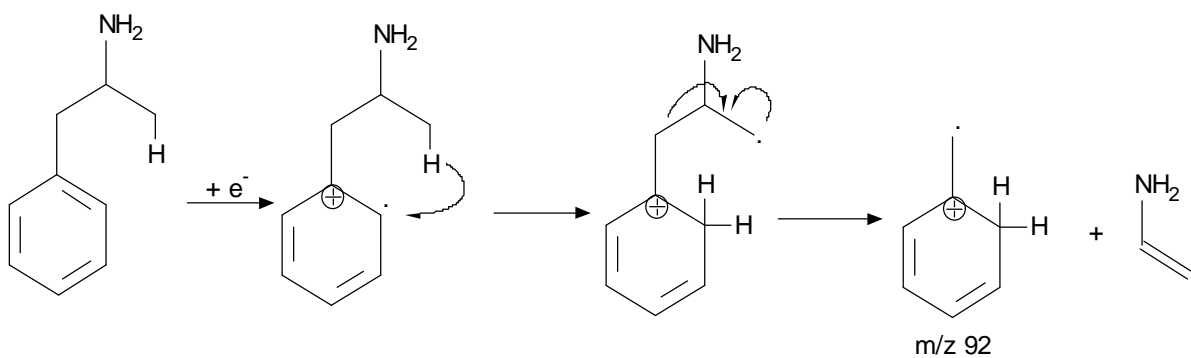


Abbildung 2.5 Mechanismus der Wasserstoffumlagerung am Beispiel des Amphetamins

5. MacLafferty-Umlagerung

MacLafferty entdeckte in den Massenspektren langkettiger (mehr als fünf Kohlenstoffatome) aliphatischer Methylester immer den gleichen Basispeak mit dem m/z -Wert von 74. Dies ist ungewöhnlich, da einfache Bindungsbrüche in Verbindungen ohne Stickstoffatome nur zu ungeradzahigen Fragmenten führen können; zudem erwartet man bei längeren Kohlenstoffketten eher einen Basispeak, der um einen m/z -Wert von 14 pro zusätzlichem Kohlenstoffatom höher liegt. Dies

erklärte MacLafferty mit einer spezifischen, zweistufigen Umlagerung, die an die Existenz eines ungesättigten Heteroatoms und eines γ -ständigen Wasserstoffatoms gebunden ist. Prinzipiell existieren zwei Wege des Reaktionsablaufs mit unterschiedlichen Ergebnissen, ein radikalisch-induzierter und ein induktiv-induzierter Weg. In Abbildung 2.6 sind beide Wege am Beispiel der acetylierten Form des PMA dargestellt, obgleich der radikalische Weg bei Aminen äußerst selten ist.

Der erste Schritt ist beiden Wegen gemeinsam und besteht aus einer radikalischen Wasserstoffumlagerung. Im zweiten Schritt des radikalischen Wegs kommt es zu einer α -Spaltung, während die Spaltung des induktiven Wegs von der Verschiebung eines Elektronenpaares ausgeht. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Ladung auf die Endprodukte der verschiedenen Umlagerungswege wird beim induktiv induzierten Weg der Alkylrest am Stickstoffatom und beim radikalisch induzierten Weg die Aminogruppe mit der Carbonylgruppe als geladenes Fragment massenspektrometrisch gemessen. Die Kenntnis der möglichen Fragmentierungsmechanismen ist bei der Interpretation und eindeutigen Zuordnung von Massenspektren unverzichtbar.

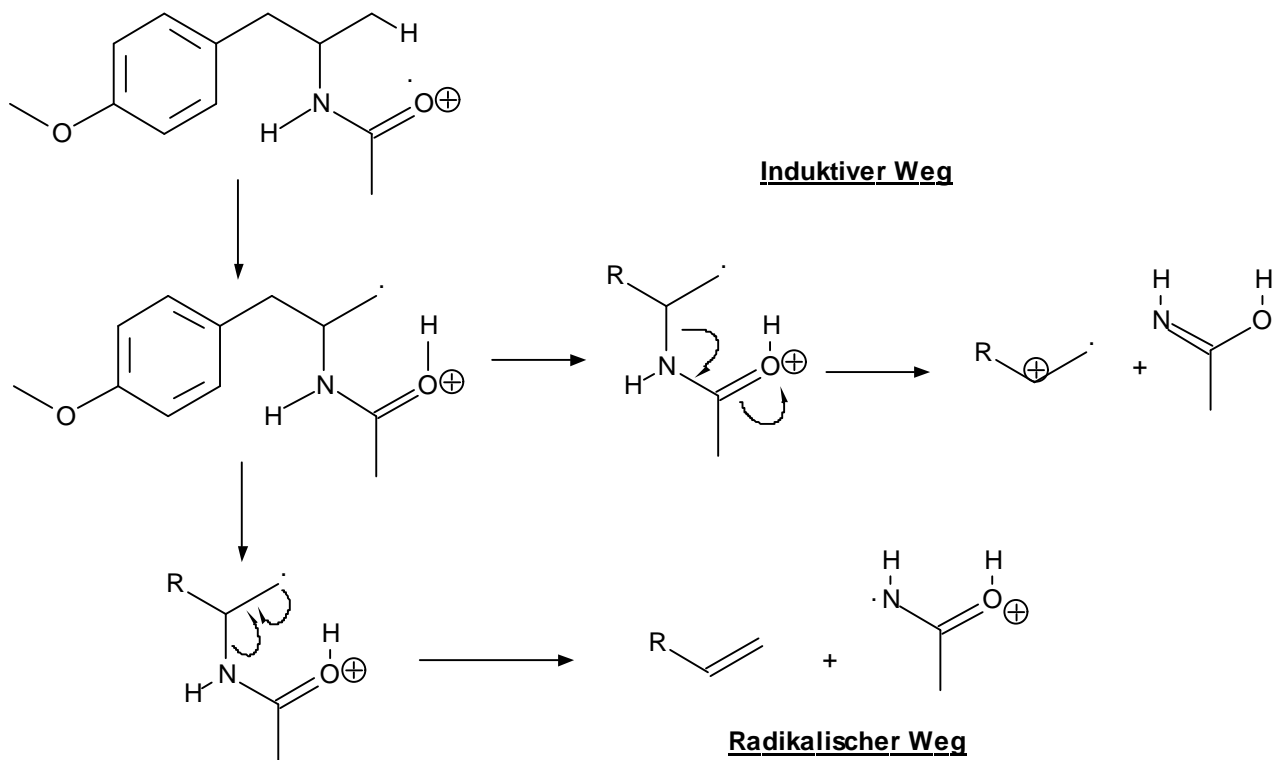


Abbildung 2.6 MacLafferty-Umlagerung am Beispiel von acetyliertem 4-Methoxy-Amphetamin (PMA)

2.1.6 Methodenvalidierung – Eingesetzte statistische Verfahren

Es gehört zur Aufgabe eines jeden analytischen Labors, die Qualität der eingesetzten Analyseverfahren zu kontrollieren und zu dokumentieren. Erst dann kann von einem zuverlässigen Analyseverfahren gesprochen werden. Die Validierung der Methoden gehört damit zu den wichtigsten Aufgaben eines Labors. Dabei werden an ein forensisch-toxikologisches Labor wegen der Tragweite der Ergebnisse besonders hohe Ansprüche gestellt.

Allgemein versteht man nach der ISO 8402 unter Validierung sowohl den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode als auch die Bestätigung, dass eine Analysemethode die besonderen Forderungen für einen speziellen, vorgesehenen Gebrauch erfüllt. In der Regel werden hierfür a priori Akzeptanzgrenzen für bestimmte Parameter festgelegt, deren Erfüllung dann durch ein entsprechendes Versuchsprogramm überprüft wird. Die Validierung einer Methode entspricht somit einem Nachweis der Eignung einer Analysemethode für einen bestimmten Zweck. Zu Beginn der Validierung müssen einige Fakten bekannt sein.

Diese sind:

- die Anforderungen an die ermittelten Ergebnisse
- die erforderlichen Leistungsmerkmale
- das anzuwendende und dokumentierte Analyseverfahren

Grundsätzlich müssen nach der ISO 17025 alle nicht genormten, selbst entwickelten Verfahren, genormte Verfahren, die außerhalb ihres geplanten Einsatzgebietes eingesetzt werden, sowie Erweiterungen von genormten Verfahren validiert werden.

Die Ziele der Validierung sind:

- zu bestätigen, dass die Verfahren für den beabsichtigten Gebrauch geeignet sind
- aufzuzeigen, dass der Bereich und die Genauigkeit der mit dem validierten Verfahren erreichten Werte den Erfordernissen entsprechen

- die Validierung in dem Umfang durchzuführen, der zur Erfüllung der Erfordernisse der beabsichtigten Anwendung oder des betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist.

Für die statistische Auswertung der während der Validierung erhaltenen Daten wurde die unten beschriebene Computer-Software Valistat verwendet. Aus diesem Grund wird hier nur kurz auf die verwendeten Verfahren eingegangen.

Grubbs-Test auf Ausreißer

Ein gemessener Wert darf unter bestimmten Umständen vernachlässigt werden, wenn er unter statistischen Gesichtspunkten ein Ausreißer ist. Der Grubbs-Test ist eine Möglichkeit, Ausreißer zu identifizieren.

Dabei wird zunächst der Wert (x') mit der größten Abweichung vom Mittelwert (\bar{x}) bestimmt, die Differenz dieser beiden Werte zum Betrag genommen und durch die Standardabweichung (s) geteilt. Dieses Ergebnis (Prüfgröße oder PG genannt) wird mit in einer Tabelle aufgelisteten $r_m(P)$ -Werte verglichen, die vom Signifikanzniveau P und der Anzahl der Messwerte abhängen. P beschreibt dabei die statistische Sicherheit mit der der Ausreißer als solcher erkannt werden soll. Im verwendeten Verfahren war $P=99\%$. Ist die Prüfgröße größer als der korrespondierende $r_m(P)$ -Wert, handelt es sich um einen Ausreißer.

$$PG = \frac{|x' - \bar{x}|}{s}$$

F-Test

Mit diesem Test wird überprüft, ob zwei Varianzen, s_1 und s_2 , die auf Basis von zwei Merkmalsergebnisreihen, die z.B. unter Vergleichsbedingungen ermittelt wurden, einer Grundgesamtheit entstammen. Sie werden also auf Gleichheit oder Homogenität getestet.

Überschreitet die Prüfgröße (PG), wobei

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2} ,$$

den F-Wert, entstammen die Varianzen verschiedenen Grundgesamtheiten, d.h. die Hypothese auf Gleichheit bzw. Homogenität muss verworfen werden.

Der theoretische F-Wert kann unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade der Verteilung und einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit α in einer F-Wert-Tabelle nachgeschlagen werden.

Linearitätstest nach Mandel (Mandel-F-Test)

Dieser Test hat gegenüber dem einfachen F-Test den Vorteil, dass die Prüfgröße nicht durch die Anzahl an Freiheitsgraden beeinflusst wird, was bei einer niedrigen Anzahl an Kalibrierdaten stark ins Gewicht fallen würde. Er kann aber nur bei gegebener Varianzhomogenität angewendet werden.

Test auf systematische Fehler (Bias)

Unter Bias versteht man in der Statistik den Unterschied zwischen Erwartungswert eines Schätzers und dem wahren Wert, den der Schätzer approximiert (oder einfacher ausgedrückt, die Differenz zwischen Messergebnis und Sollwert).

Der Bias errechnet sich aus dem Mittelwert aller Bestimmungen und dem Sollwert bei jedem Messpunkt nach folgender Formel:

$$Bias[\%] = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \cdot 100$$

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

μ Sollwert

Bias-Werte innerhalb eines Intervalls von +/- 15% wurden als akzeptabel betrachtet.

2.2 Material und Geräte

Es wurden in dieser Arbeit neben der üblichen Laborausstattung einige spezielle Geräte verwendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

2.2.1 Geräte zur Probenextraktion und -analyse

- Zentrifuge (Megafuge 10, Firma Heraeus, Hanau)
- Rüttler (Combi-Mixer, CM-9, Firma Desaga GmbH Sarstedt-Gruppe)
- Waage (MC1, Analytic AC 210 S, Firma Sartorius)
- Regelbarer Heizblock
- Druckluftbetriebene Abblasvorrichtung
- Gaschromatograph/Massenspektrometer:
 - für perfluorierte Verbindungen (PFO): GC Agilent 6890, MS Agilent 5973 (Böblingen), ausgestattet mit einem MultiPurposeSampler MPS2 (Probengeber) der Fa. Gerstel (Mühlheim an der Ruhr)
 - für die Ephedrin-Reihe: GC Agilent 6890N, MS Agilent 5973, ausgestattet mit Probengeber Agilent 7683B (Böblingen)
 - für silylierte Verbindungen (TMS): GC HP 5890, MS HP 5970 (Firma Hewlett Packard)
 - für underivatisierte und acetylierte (AC) Verbindungen: GC HP 5890, MS HP 5971A (Firma Hewlett Packard)
- Photometer (Microplate Reader 550, Serien-Nr. 12545, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Immunoassay-Probenanalysegerät (Biochem Immunosystems Bio Lab 200, Firma Mahsan Diagnostika, Reinbek)

2.2.2 Verwendete Materialien

ELISA-Kits:

- Inspec-Amp-EIA (Kat.-Nr. 1103EA, Ch.-Nr. 29642 sowie 47500, von Cozart Biosciences Limited, vertrieben von Mahsan Diagnostika, Reinbek)
- Inspec-Met-EIA (Kat.-Nr. 1104EA, Ch.-Nr. 29658, von Cozart Biosciences Limited, vertrieben von Mahsan Diagnostika, Reinbek)

- OTI Amphetamine-Specific Micro-Plate EIA (Item No. 1103E, Ch.-Nr. 1002702, OraSure Technologies Inc., Vertrieb durch BioRad)
- OTI Methamphetamine Micro-Plate EIA (Item No. 1104E, Ch.-Nr. 0902718, OraSure Technologies Inc., Vertrieb durch BioRad)

Extraktionssäulen:

- Mischphasensäulen (Bond Elut Certify LRC, 130 mg Packungsmaterial, 6 mL Volumen, Firma Varian)

GC-Säulen:

- für silylierte und perfluorierte Verbindungen (PFO): Factor Four Capillary Column (CP-Sil 5 CB, 30 m x 250 µm i.d., 0,33 µm Filmdicke, Varian, Darmstadt)
- für underivatisierte und acetylierte (AC) Verbindungen: Factor Four Capillary Column (VF-5ms, 15 m x 250 µm i.d., 0,33 µm Filmdicke, Varian, Darmstadt)
- für die Ephedrin-Reihe: Agilent Columns (HP-5ms, 30 m x 250 µm i.d., 0,25 µm Filmdicke, Fa. Agilent, Böblingen)

Verwendete Reinsubstanzen und Chemikalien

Bei den untersuchten Substanzen handelte es sich um Derivate von Amphetamin bzw. in ihrer Wirkung ähnliche Substanzen wie Tryptamin-, Phenethylamin- oder Ephedrinabkömmlinge, sowie Phentermin, Methylphenidat (Ritalin™) und Fenetyllin. Diese Substanzen stammten aus Beständen der Rechtsmedizin Kiel und des Landeskriminalamtes Schleswig-Holstein bzw. wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Radian/Promochem (Wesel) und Mallinckrodt-Baker (Griesheim) bezogen. Die asservierten Substanzen wurden identifiziert und auf Verunreinigungen getestet.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Reinheit pro-analyse (p.a.) verwendet, die über die Firma Merck (Darmstadt) bezogen wurden.

2.2.3. Verwendetes Probenmaterial

Zur Austestung der ELISA-Kits wurden 80 anonymisierte Blutproben der täglichen Routineanalytik verwendet. Es handelt sich dabei um Proben, die auf polizeiliche Anordnung bei Straßenverkehrsdelikten entnommen wurden.

2.2.4 Verwendete Software

Zur Testung des Amphetamin-Immunoassays von Cozart auf Kreuzreaktivitäten wurde das o.g. Probenanalysegerät mit der Software Biochem WorkBench Processor in der Version 2.2 gesteuert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls durch diese Software. Die Aufnahme der MS-Spektren und die Erstellung der Bibliothek erfolgte mit MSChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn) in der Version C.03.00. Für die Analyse der Linearität bei Ephedrin wurde MSChemstation in der Version D.01.02.16 genutzt. Die statistische Auswertung der Daten der Validierung wurde mit dem Programm Valistat 1.0 (Arvecon GmbH, Walldorf) durchgeführt.

Die Darstellung der Massenspektren und Fragmentierungsmechanismen erfolgte mit der Software Chemograph Plus in der Version 6.4 (DigiLab Software, Scharnhagen).

2.3 Praktische Durchführung

2.3.1 Immunchemische Messungen

Die Amphetamin-Tests zweier Firmen, der MTP-AMP-Enzymimmunoassay von Cozart Biosciences Limited (Arlington, England) vertrieben von Mahsan und der MTP-Immunoassay auf Amphetamin von OraSure Technologies Inc. (Bethlehem, Pennsylvania, USA) vertrieben von Bio-Rad und die entsprechenden Methamphetamin-Tests lagen zur Überprüfung vor. Die zu vergleichenden Mikrotiterplatten unterschieden sich in der Testdurchführung praktisch nicht, wenn man davon absieht, dass die Proben bei den von Cozart gelieferten Tests zunächst im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt, durchmischt und zentrifugiert werden sollten, was bei den Tests von OraSure Technologies Inc. (OTI) nicht nötig war. Als Probenmaterial wurde Serum verwendet. 25 µL Serum bzw. 25 µL des verdünnten Serums wurden jeweils in die Testkammer gegeben, je 100 µL Enzymkonjugat hinzugefügt und anschließend wurde für 30 Minuten inkubiert. Dann wurden die

Testkammern sechsmal mit 350 µL Waschpuffer ausgespült. Nach Zugabe von 100 µL Substratlösung wurde erneut 30 Minuten inkubiert, bevor 100 µl Stopplösung die Umsetzung beendeten und die Platten im Photometer gemessen wurden. Hierbei unterschieden sich die Tests der beiden Firmen noch einmal: Während die optische Dichte der Tests von Cozart nur bei 450 nm bestimmt wurde, erfolgte bei den OTI-Tests eine gleichzeitige Messung bei 450 und 630 nm.

Auf allen Mikrotiterplatten wurden 4 Proben mit bekannter Konzentration mitgeführt, die die Grundlage für eine Kalibrierkurve bildeten. Nun wurden die ermittelten Konzentrationen auf der Kalibrierkurve eingetragen, und es ließ sich so die jeweils in der Probe enthaltene ungefähre Stoffmenge ablesen.

Prüfung des Cozart-Amphetamin-Tests auf Kreuzreaktivitäten

Zur Prüfung des Cozart-Amphetamin-Tests auf Kreuzreaktivitäten wurde das o.g. Probenanalysegerät verwendet, das alle notwendigen Schritte nach entsprechender Programmierung selbstständig durchführt, allerdings wurde dabei auf eine Verdünnung der Proben und des Kalibrierstandards verzichtet, da sich diese in der Praxis als unnötig erwiesen hatte.

Zur Untersuchung wurden Leerseren mit den entsprechenden Substanzen aufgestockt. Die zunächst untersuchten Konzentrationen lagen bei 10 µg/mL. Alle Stoffe, die einen Amphetamin-Äquivalentwert von 20 ng/mL ergaben, wurden als positiv gewertet. Bei Ergebnissen über 100 ng/mL konnte kein Zahlenwert abgelesen werden und die Proben wurden im Verhältnis 1:10 weiter verdünnt, so dass in vielen Fällen zusätzliche Konzentrationen von 1 µg/mL, 100 ng/mL und 10 ng/mL gemessen wurden. Die Kreuzreaktivität (KR) ließ sich aus der gemessenen Konzentration der Substanz (c_m) im Verhältnis zur vorliegenden Konzentration (c) berechnen, wobei der Leerwert einer frischen Serumprobe (c_0) vom Messwert abgezogen wurde.

$$\text{Kreuzreaktivität[\%]} = \frac{c_m - c_0}{c} * 100$$

2.3.2 Probenaufarbeitung und Analyse mittels GC/MS

Zur Analyse im verwendeten GC/MS mussten die Proben in flüssiger Form vorliegen. Es war daher erforderlich, Feststoffe zu lösen, um sie in das Gerät einspritzen zu können. Dazu wurden entsprechende Lösungen der Reinsubstanzen angesetzt, die eine Konzentration zwischen 100 und 600 µg/mL aufwiesen.

2.3.2.1 Probenextraktion

Flüssig-Flüssig-Extraktion im Alkalischen mit Cyclohexan

Blutproben wurden zunächst zentrifugiert und das überstehende Serum entnommen. 250 µL Serum oder eine entsprechende Menge Reinsubstanzlösung wurden in einem Pyrex-Glas mit 250 µL interner Standardlösung versetzt. Nach Zugabe von 500 µL 5%iger Natronlauge wurde zu der alkalischen Lösung 2 mL Cyclohexan hinzugefügt und die Lösung 10 Minuten auf einem Rüttler geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 4000 UPM zentrifugiert, woraufhin die überstehende Cyclohexanphase in ein neues verschließbares Probenglas abpipetiert wurde.

Die in den einzelnen Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit als interne Standards verwendeten Substanzen und deren Konzentrationen sind den Kapiteln 2.3.4 und 2.3.5 zu entnehmen.

Festphasenextraktion (SPE)

Für die Analyse von Proben, die Cathinon enthielten, konnte die o.g. Probenaufarbeitung nicht verwendet werden. Daher wurde nach in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Nachweis von Cathinon gesucht [28] und schließlich eine von Sporkert et al. [29] für die Analyse von Khat in Haaren entwickelte Nachweismethode für die Untersuchung von Serumproben angepasst. Hier kam die Festphasenextraktion zum Einsatz. 250 µL Serum wurden mit 250 µL interner Standardlösung (vgl. Kapitel 2.3.5) versetzt und mit 2 mL Phosphat-Puffer (pH 2) angesäuert. Beim Test von aufgestockten Proben wurde dem Leerserum noch eine definierte Menge der Reinsubstanz zugesetzt. Nach Konditionierung der Festphasensäule mit 3 mL Methanol und 3 mL Phosphat-Puffer wurde die Probe aufgegeben. Anschließend wurde die Säule mit 2 mL Phosphat-Puffer und 3 mL Methanol gewaschen und dann für 5 Minuten bei Zimmertemperatur im

Vakuumlufstrom getrocknet. Die Elution der Probe erfolgte mittels einer alkalischen Lösung (80 Teile Dichlormethan, 20 Teile Isopropanol und 2 Teile 32%ige Ammoniak-Lösung) in ein Pyrex-Glas. Nach Einengen des Extraktes im Luftstrom wurde der Rückstand in 1 mL Cyclohexan aufgenommen und dem gewünschten Derivatisierungsprozess zugeführt.

2.3.2.2 Derivatisierungs- und Analysemethoden

Als Derivatisierungsreaktionen wurden die sehr verbreiteten Methoden der Acetylierung und der Silylierung, sowie die durch Gjerde et al. [30] in die Amphetamin-Analytik eingeführte und in der Rechtsmedizin Kiel erprobte Derivatisierung mit PFOC (s.o.) eingesetzt.

Underivatisierte Proben

Die Cyclohexanphase wurde hierbei bei 30°C im Luftstrom vorsichtig eingedampft und der verbleibende Rückstand in 30 µL Isopropanol aufgenommen. Die Lösung wurde in ein GC/MS-Probengläschen überführt und davon wurden 1 µL in das GC/MS injiziert. Für underivatisierte Proben wurde die Methode „schue2.m“ verwendet. Der gemessene Massenbereich lag zwischen 50 und 550 amu.

Erstellung von acetylierten Derivaten (AC)

Der Cyclohexanphase wurden unter dem Abzug 30 µl Pyridin und 20 µL Essigsäureanhydrid zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 60°C für 20 Minuten in einem geschlossenen Glas derivatisiert. Anschließend wurde die Cyclohexanphase eingedampft und der Rückstand in 15 µL Isopropanol aufgenommen, um dann in einem GC/MS-Gläschen der Analyse zugeführt zu werden. 1 µL wurde dazu in das GC/MS-Gerät injiziert. Die verwendete Methode hieß „ac2.m“. Diese Methode detektierte Massen im Bereich von 50 bis 550 amu.

Erstellung von Trimethylsilyl-Derivaten (TMS)

Nach Eindampfen der Cyclohexanphase im Luftstrom wurden dem Rückstand 40 µL MSTFA (2,2,2-Trifluoro-N-methyl-N-(trimethylsilyl)acetamid) zugesetzt. Diese Lösung wurde bei 60°C für 30 Minuten im verschlossenen Pyrex-Glas erhitzt. 1 µL dieser Phase wurde direkt ins GC/MS injiziert. Ein Großteil der Umsetzung erfolgte dabei

erst online im heißen Injektor bei 250 °C. Die eingesetzte Methode war „schaefer.m“, sie detektierte Massen von 40 bis 650 amu.

Erstellung von Pentadecafluorooctanoyl-Derivaten (PFO)

Zur Derivatisierung wurde der Cyclohexanphase unter dem Abzug 50 µL PFOC (Pentadecafluorooctanoylchlorid) hinzugefügt. Im geschlossenen Glas verblieb die Lösung für 30 Minuten bei 70°C im Heizblock, bevor sie im Luftstrom eingedampft und der Rückstand in 15 µL getrocknetem Essigsäureethylester (Ethylacetat) aufgenommen wurde. Die Analyse von 1 µL Extrakt erfolgte im GC/MS unter Verwendung der Methode „schae80.m“ mit einem Messbereich von 50 bis 650 amu zur Spektrenaufnahme. Für quantitative Messungen im Rahmen der Validierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA wurde das Programm „schtd3k.m“ (vgl. auch Kapitel 2.3.4, Tab. 2.2) verwendet. Für die Messreihe zur Quantifizierung von Phentermin, Ephedrin, Cathin, BDB und MBDB wurde die Messmethode „schtd3ka.m“ benutzt. Die zusätzliche Ephedrin-Quantifizierung unter Verwendung von d3-Ephedrin als internen Standard wurde mit dem Programm „schtd3ka.m“ durchgeführt. Cathinon wurde quantitativ mit dem Programm „schacath.m“ bestimmt.

Die Einstellungen, die bei allen GC/MS-Methoden übereinstimmten, finden sich in Tab. 2.1. Die Methoden unterschieden sich in der Temperatursteuerung des GC-Ofens und der daraus folgenden Gesamtzeit einer Messung (Die Temperaturprogramme finden sich im Anhang). Die für die Erstellung der Bibliothek gesammelten Spektren wurden im SCAN-Modus aufgenommen. Die Proben, die einer quantitativen Untersuchung unterzogen wurden, wurden im SIM-Modus gemessen.

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte ebenfalls mit der Analysesoftware Chemstation (s.o.).

Tabelle 2.1 Allen verwendeten Methoden gemeinsame Einstellung der GC/MS-Geräte

Trägergas	Helium
Flussgeschwindigkeit des Gases	1,0 mL/min
Injektionsvolumen der Probe	1 µL
Arbeitsweise des Injektors	Splitless
Injektor-Temperatur	250 °C
Temperatur der Verbindung zum GC-MS	280 °C
Ionisationsenergie	70 eV
Verweildauer im MS (Dwell time)	10 ms

2.3.3 Aufnahme neuer Amphetaminderivate in eine selbst erstellte Spektrenbibliothek

Zur Erstellung einer Bibliothek für Derivate und Verwandte des Amphetamins wurden 23 Reinsubstanzen ausgewählt, die gar nicht oder nur unzureichend in den für die forensisch-toxikologische Analytik üblicherweise verwendeten Bibliotheken enthalten waren. Hinzu kamen die bekannten Amphetamine, die auch in der Validierung untersucht wurden, da bei diesen Substanzen auch nicht alle hier durchgeführten Derivatisierungsmethoden von kommerziell erhältlichen Substanzbibliotheken abgedeckt wurden.

Des Weiteren wurden auch die Spektren von 7 deuterierten Amphetaminderivaten, die in der vorliegenden Arbeit als interne Standards zur Anwendung kamen, aufgezeichnet, allerdings nur in Form ihrer PFO-Derivate. Insgesamt ergab sich so eine Summe von 35 verschiedenen Reinsubstanzen, von denen insgesamt 102 Spektren in die Bibliothek aufgenommen wurden. Bei der Aufnahme in die Spektrenbibliothek war zu beachten, dass sich im Chromatogramm innerhalb eines Peaks die Intensitäten der Fragmente zueinander geringfügig änderten, deshalb wurde ein über den Peak gemittelttes Spektrum aufgenommen. Zusätzlich wurde der Untergrund unmittelbar vor dem Peak vom Spektrum abgezogen, um das störende Untergrundrauschen zu minimieren. Außerdem wurde das Spektrum oberhalb des Molions der Substanz abgeschnitten, da größere Fragmente nur aus dem Untergrund herrühren können. Das erhaltene Spektrum wurde dann mit Hilfe der

Software zusammen mit den Kenndaten der Substanz (Name, Retentionsindex auf 5 auf- oder abgerundet, Summenformel, Molmasse) in der Bibliothek gespeichert.

Im Folgenden wird der Prozess der Substanzidentifizierung exemplarisch anhand von DOM (4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin) dargestellt.

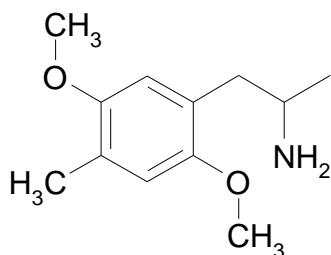


Abbildung 2.7 Strukturformel von DOM (4-Methyl-2,5-dimethoxy-amphetamin)

Die gesuchte Substanz wurde, wie oben beschrieben, gelöst und in das GC/MS injiziert. Die im Chromatogramm erhaltenen Peaks wurden nun einzeln analysiert. In diesem Fall wurden nur 2 Peaks, einer bei 6,56 min und einer bei 6,64 min (s. Abb. 2.8)

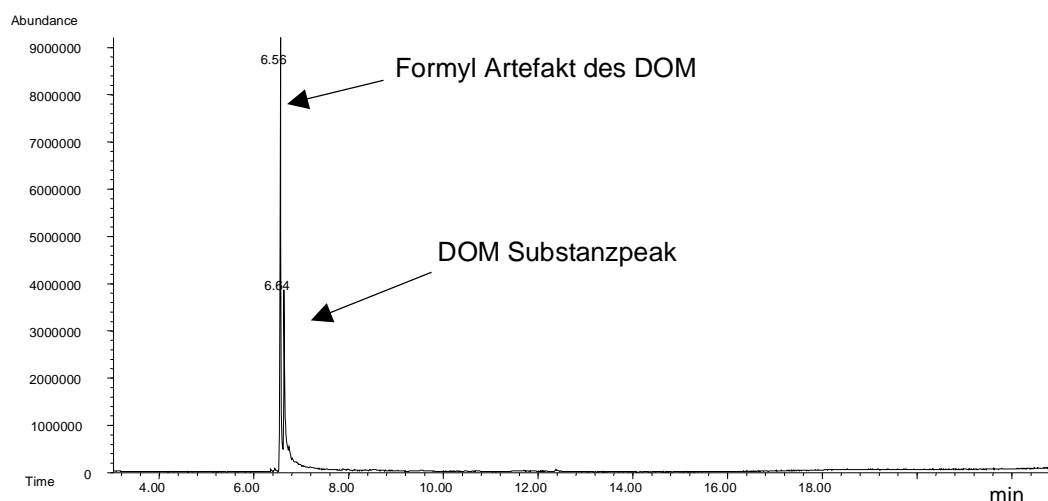


Abbildung 2.8 GC-Peaks im Extrakt, der DOM enthält (Total Ion Chromatogram – TIC)

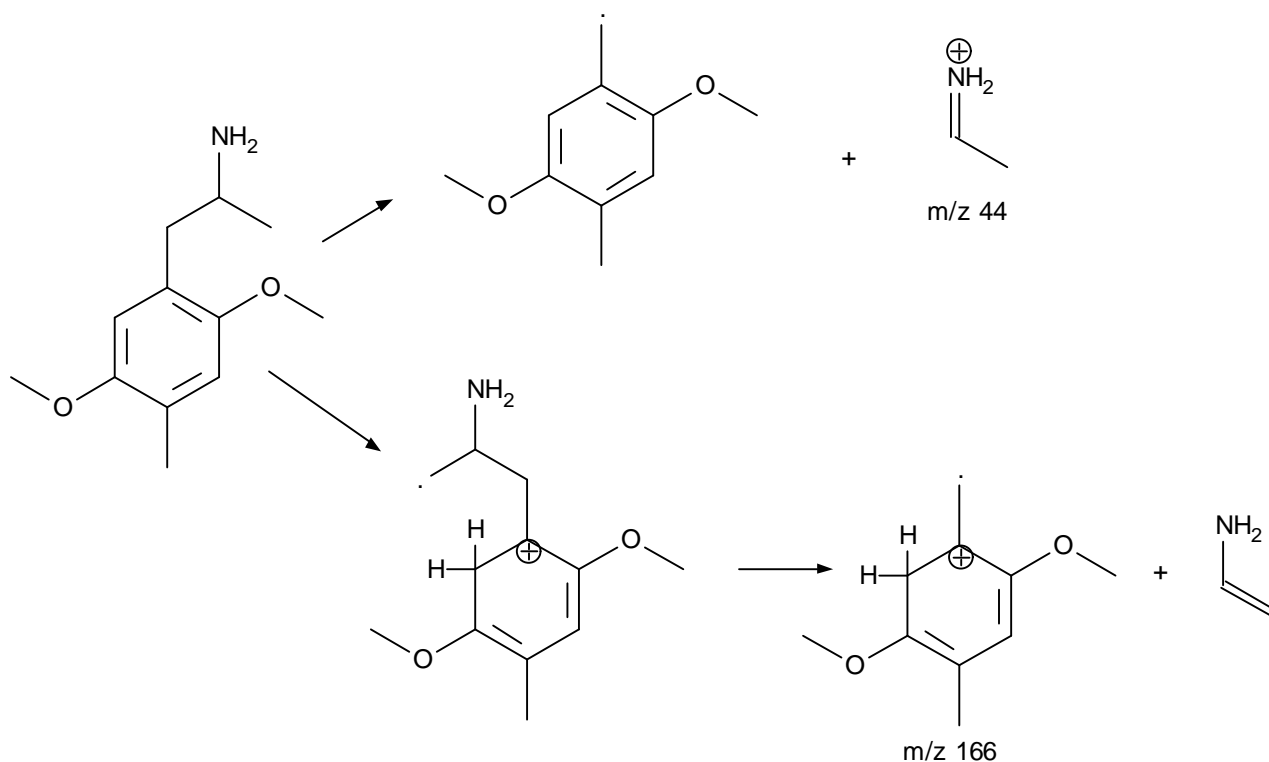


Abbildung 2.9 Zerfallsschemata von DOM

Die wichtigsten Bruchstücke des DOM ließen sich mit den oben beschriebenen Fragmentierungsmechanismen erklären: Das für die Identifizierung und Strukturaufklärung einer Verbindung wichtige Molekülion (für DOM m/z 209) fand sich im Peak bei 6.64 min. Das Massenspektrum an dieser Stelle zeigte als intensivstes Ion m/z 44 (siehe Abbildung 2.10). Es handelt sich dabei um das Iminiumion, das sich aufgrund einer α -Spaltung bildet (siehe Abbildung 2.9). Das zweitgrößte Fragment bei m/z 166 lässt sich folgendermaßen erklären: Hier kam es zunächst zu einer Wasserstoff-Umlagerung und dann zu einer Benzylspaltung, also einer speziellen Form der α -Spaltung. Auch die zusätzlichen Fragmente bei m/z 91, 135 und 151 waren auf α -Spaltungen innerhalb des DOM-Moleküls zurückzuführen, so dass DOM sicher identifiziert wurde.

DOM

4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin

MW:209,28840

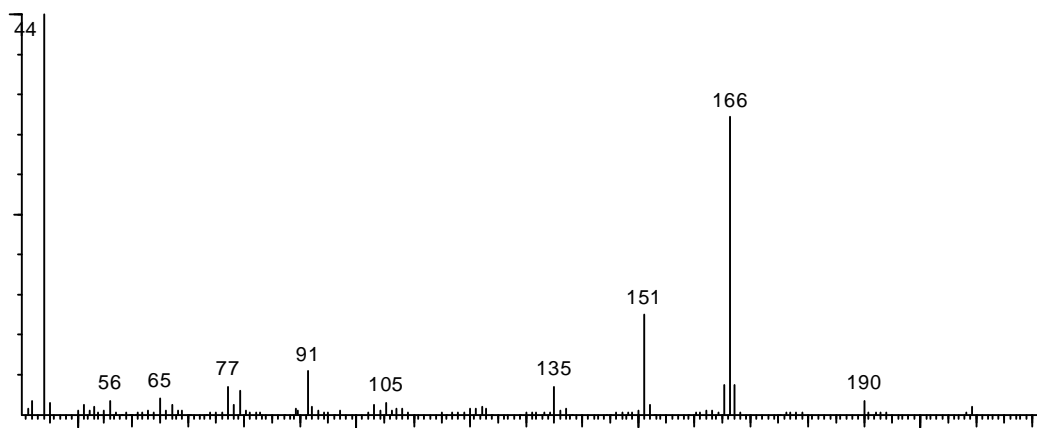
MM:209,14158

 $C_{12}H_{19}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

**Abbildung 2.10** GC/MS-Spektrum von DOM

Der Peak bei 6.56 min konnte dem Formyl-Artifakt von DOM zugeordnet und ebenfalls in die Bibliothek aufgenommen werden.

2.3.4 Validierungsschritte für eine Methode zur Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA im Serum

Es wurde die in der Rechtsmedizin Kiel verwendete Nachweismethode für die häufigsten Amphetaminderivate (Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA, MDE) nach den Richtlinien der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) validiert. Diese Methode wurde ursprünglich von Gjerde et al. [30] entwickelt und wurde nach entsprechender Optimierung und Anpassung an die vorhandenen Geräte seit mehreren Jahren im Institut für Rechtsmedizin Kiel beim Nachweis aus Serumproben angewendet. Hierbei wurden die Proben nach einer Flüssig-Flüssig-Aufarbeitung mit PFOC derivatisiert und im GC/MS analysiert.

Zunächst wurden die Stammlösungen zur Aufstockung der Seren und die die internen Standards enthaltende Lösung angesetzt. Es wurden wässrige Stammlösungen mit Konzentrationen von 1 µg/mL, 100 ng/mL und 10 ng/mL von jeder einzelnen Substanz hergestellt.

Die gekauften methanolischen Lösungen der internen Standards wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL geliefert und dann mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µg/mL verdünnt. Von diesen Lösungen wurde eine

Arbeitslösung der internen Standards mit Konzentrationen von 100 ng/mL Methamphetamin-d8, MDA-d5 und MDMA-d5, sowie von 200 ng/mL Amphetamin-d3 und MDEA-d6 hergestellt. Die unterschiedlichen zur Validierung notwendigen Messungen wurden unter den in Kapitel 2.3.2.2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt, wobei die als charakteristisch ausgewählten Ionen (siehe Tab. 2.2) aufgezeichnet wurden.

Tabelle 2.2 Ausgewählte Ionen der im Rahmen der Validierung untersuchten Substanzen und der dazugehörigen internen Standards (Target-Ion fett und schwächstes Qualifier-Ion kursiv gedruckt)

Substanz	Ionen m/z	Interner Standard	Ionen m/z
Amphetamin	440 – 118 – <i>441</i>	d3-Ampehtamin	443 – 121 – <i>444</i>
Methamphetamin	454 – 118 – <i>410</i>	d8-Methamphetamin	461 – 121 – <i>413</i>
MDA	440 – 162 – <i>575</i>	d5-MDA	444 – 167 – <i>580</i>
MDMA	454 – 410 – <i>589</i>	d5-MDMA	458 – 413 – <i>594</i>
MDEA	468 – 162 – <i>440</i>	d6-MDEA	474 – 165 – <i>444</i>

2.3.4.1 Ausschluss von Interferenzen

Zum Ausschluss von Interferenzen der Matrix mit den gesuchten Ionen wurden zunächst zehn Leerseren analysiert sowie drei Seren, denen eine Lösung mit internem Standard zugesetzt wurde (Nullproben). Die erhaltenen Chromatogramme wurden auf das Vorhandensein von Störungen der gesuchten Ionen bei den erwarteten Retentionszeiten geprüft.

2.3.4.2 Linearität der Kalibration und Varianzenhomogenität

In dieser Phase der Validierung sollte die Linearität der Nachweismethode für alle untersuchten Analyten in einem gewählten Bereich gezeigt werden. Dazu wurden sechs Probenserien durchgeführt. Innerhalb jeder Serie wurden 14 aufgestockte Proben mit aufsteigender Konzentration von 0-1000 ng/mL analysiert und quantifiziert. Zur Quantifizierung wurde die Fläche unter der Kurve eines Ionenpeaks mit der Fläche des korrespondierenden Ions des internen Standards ins Verhältnis gesetzt. Zur statistischen Analyse wurde Valistat 1.0 verwendet. Ausreißer wurden durch die Software mit dem Grubbs-Test ermittelt und dann eliminiert, wenn sie auf

dem 99%-Niveau signifikant waren. Die Homogenität wurde mit dem F-Test ermittelt und die Linearität wurde mit dem Mandel-F-Test überprüft.

2.3.4.3 Genauigkeit

Im Anschluss wurde die Genauigkeit im unteren und oberen Arbeitsbereich durch Doppelbestimmungen zweier Proben an acht aufeinanderfolgenden Tagen getestet. Dabei wurde die Richtigkeit, Wiederholpräzision und die Laborpräzision überprüft. Die Richtigkeit wurde in Form des systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt. Die Formel für die Berechnung der Wiederhol- und Laborpräzision finden sich im Anhang. Abweichungen von unter 15% galten jeweils als akzeptabel.

2.3.4.4 Grenzwerte

Im nächsten Schritt wurden die Grenzwerte bestimmt. Die Richtlinien der GFTCh sehen dafür Kalibrationskonzentrationen von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/mL vor. Die Nachweisgrenze (NWG oder engl. LLOD) wurde mit Hilfe des schwächsten Qualifier-Ions und die Bestimmungsgrenze (BG oder engl. LLOQ) mit dem Target-Ion bestimmt. Die Nachweisgrenze stellt den kleinsten Analytengehalt dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Leerwert unterscheidbar ist. Laut Richtlinien der GTFCh soll für die NWG eine Signifikanz von 90% angenommen werden.

Die Bestimmungsgrenze ist der kleinste Gehalt, der mit einer vorgegebenen Ergebnisunsicherheit (laut GTFCh 33% bei einer Signifikanz 99%) bestimmt werden kann.

2.3.4.5 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden Leerseren mit zwei mittleren Konzentrationen der Substanzen versetzt (20 ng/mL und 80 ng/mL). Da die Analyse mit 250 µL Serum durchgeführt wurde, wurden 5 ng bzw. 20 ng jeder Substanz zugesetzt. Abhängig von der Trennung der Phasen an der Grenze zwischen wässriger und Cyclohexan-Phase wurden zwischen 1,5 bis 1,8 mL der organischen Phase abpipettiert. Diese wurde zur eingedampften Mischung der internen Standards hinzugefügt und der Derivatisierung zugeführt.

Zur Kontrolle wurden Proben untersucht, denen die internen Standards bereits vor der Extraktion beigemischt worden waren. Die Ergebnisse von sechs Wiederfindungsmessungen wurden gemittelt.

2.3.5 Bestimmung einiger ausgesuchter Amphetaminderivate

Zur Untersuchung wurden aus der in dieser Arbeit angelegten Bibliothek sieben Substanzen ausgewählt, die mit einiger Regelmäßigkeit in Blutproben zur forensisch-toxikologischen Aufarbeitung enthalten sind.

Zunächst erfolgte die Untersuchung von Phentermin, Ephedrin, Cathin (Norpseudoephedrin), Methylphenidat, BDB und MBDB. Als interne Standards dienten deuteriertes Amphetamin (d3-Amphetamin) sowie deuteriertes MBDB (d5-MBDB). Ephedrin wurde mit deuteriertem Ephedrin (d3-Ephedrin) als internem Standard untersucht. Aus organisatorischen Gründen mussten diese Messungen auf einem anderen GC/MS-Gerät (s.o.) durchgeführt werden.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden zusätzlich die Inhaltsstoffe der Khat-Pflanze (lat. *Catha edulis*), Cathinon und seine Abbauprodukte Norephedrin (Phenylpropanolamin) und Cathin (Norpseudoephedrin) untersucht. Die Pflanzeninhaltsstoffe verursachen den Amphetaminen ähnliche Erregungszustände und sind in den letzten Jahren auch in Deutschland vermehrt nachgewiesen worden. Da sich Cathinon mit der sonst eingesetzten Flüssig-Flüssig-Extraktion nicht aus den Proben extrahieren ließ, wurden die Proben mit der oben beschriebenen Festphasenextraktion untersucht. Als interne Standards wurden undeuteriertes Aminoacetophenon und deuteriertes Ephedrin verwendet. Die bei den GC/MS-Messungen im SIM-Modus aufgezeichneten Ionen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Bei beiden Untersuchungsreihen wurden 11 Konzentrationen (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200 ng/mL) verwendet. Die Linearität der Kalibrierung wurde, wie in Abschnitt 2.3.4.2 beschrieben, überprüft.

Tabelle 2.4 Ausgewählte Ionen der zusätzlich untersuchten Substanzen und der dazugehörigen internen Standards (Target-Ion fett und schwächstes Qualifier-Ion kursiv gedruckt)

Substanz	Ionen m/z	Interner Standard	Ionen m/z
Phentermin	414 – 454 – 530	d3-Ampehtamin	443 – 121 – 444
Cathin	440 – 475 – 530	d3-Ampehtamin	443 – 121 – 444
Ephedrin	440 – 162 – 575	d3-Ephedrin	444 – 167 – 580
Methylphenidat	480 – 461 – 570	d3-Ampehtamin	443 – 121 – 444
BDB	589 – 135 – 454	d5-MBDB	472 – 444 – 608
MBDB	468 – 440 – 603	d5-MBDB	472 – 444 – 608
Cathinon	77 – 105 – 440	Aminoacetophenon	77 – 105 – 426

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten-Amphetamin- und Methamphetamin-Tests

Die Amphetamin- und Methamphetamintests von Cozart Biosciences Limited (kurz Cozart) und OraSure Technologies Inc. (kurz OTI) wurden auf 80 Blutproben angewandt, bei denen Verdacht auf die Einnahme von Amphetamin und seiner Derivate bestand. Als Referenzmethode diente die Aufarbeitung und Analyse der Proben mittels GC/MS.

Zur Analyse der Daten wurden die 68 positiven Fälle in drei Gruppen aufgeteilt:

- reine Amphetamin-Fälle (15)
- reine „Ecstasy“-Fälle (22)
- Mischfälle mit Amphetamin und Ecstasy (31)

Hinzu kamen 12 Negativproben, in denen keine der gesuchten Substanzen gefunden wurde. Diese Fälle wurden in die Betrachtung sowohl der reinen Amphetamin- also auch der reinen „Ecstasy“-Fälle mit einbezogen. Im untersuchten Kollektiv fanden sich keine Proben, bei denen nur Methamphetamin oder MDE enthalten war.

3.1.1 Einsatz bei Proben, die nur Amphetamin enthalten

3.1.1.1 Anwendung der Amphetamin-Tests

Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, waren beide Amphetamin-Tests bei einem Cut-off-Wert von 25 ng/mL in der Lage, alle positiven Proben zu identifizieren. Bei einem Fall, der im GC/MS unter der Grenze von 25 ng/ml lag, befand sich der Wert im Cozart-Test ebenfalls knapp unterhalb des Cut-Off-Wertes, der OTI-Test verlief deutlich negativ (Proben-Nr. 13, Pfeil in Abb. 3.1). Während der Cozart-Test in allen Fällen korrekte Ergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode lieferte, erbrachte der OTI-Amphetamin-Test ein falsch positives Ergebnis (Proben-Nr. 9, gestrichelter Pfeil in Abb. 3.1).

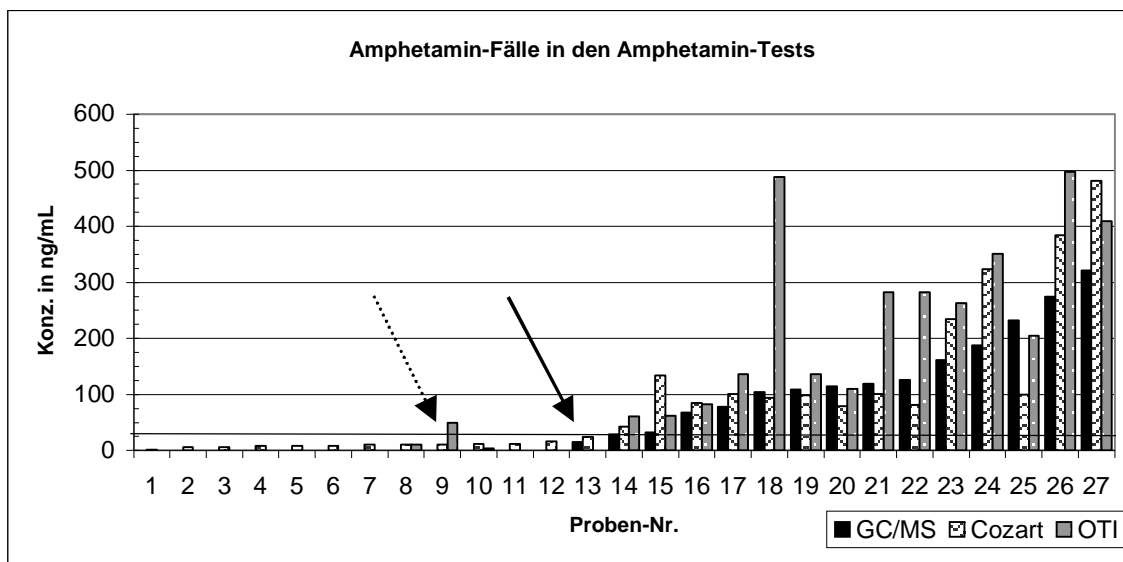


Abbildung 3.1 Fälle nur mit Amphetamin: Quantitative Bestimmung mittels GC/MS den Ergebnissen des Cozart- und OTI-Tests auf Amphetamin gegenübergestellt, eingezeichnet ist der von den Herstellern empfohlene Cut-Off-Wert von 25 ng/mL

3.1.1.2 Anwendung der Methamphetamin-Tests

Die Methamphetamin-Tests beider Hersteller sind bei den Amphetamin-Fällen nicht in der Lage, die positiven Proben zu identifizieren (s. Abb. 3.2). Der Cozart-Methamphetamin-Test lieferte einen falsch positiven Befund (Proben-Nr. 8).

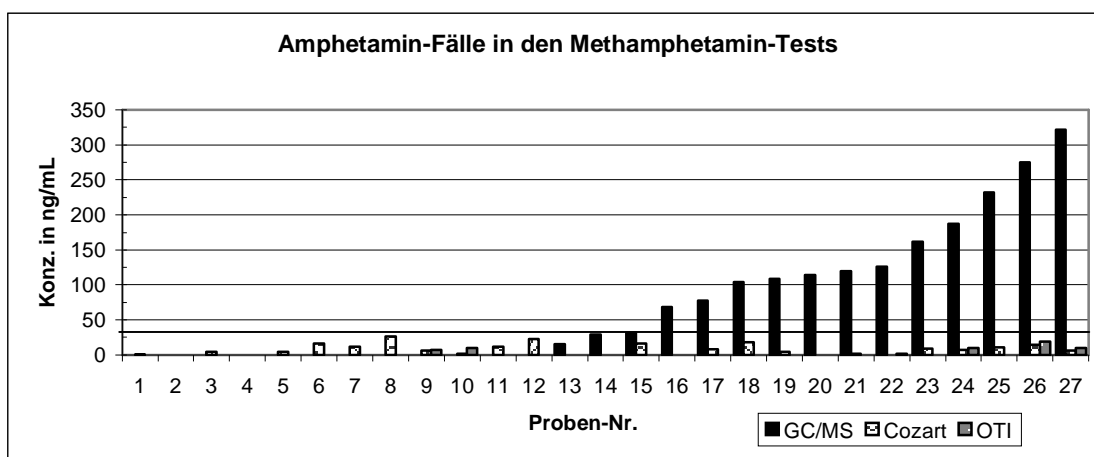


Abbildung 3.2 Fälle nur mit Amphetamin: Quantitative Bestimmung mittels GC/MS den Ergebnissen des Cozart- und OTI-Tests auf Methamphetamin gegenübergestellt, eingezeichnet ist der von den Herstellern empfohlene Cut-Off-Wert von 25 ng/mL

3.1.2 Einsatz bei Proben, die nur „Ecstasy“ enthalten

Bei den meisten „Ecstasy“-Blutproben wurde neben dem eigentlichen Wirkstoff MDMA noch ein stets kleinerer Anteil des Metaboliten MDA nachgewiesen. Teilweise lagen noch geringe Mengen von MDEA als Verunreinigung vor. Die Proben in dieser Gruppe enthielten alle kein Amphetamin.

3.1.2.1 Anwendung der Amphetamin-Tests

Der Cozart-Test auf Amphetamin war in der Lage, die meisten positiven Proben herauszufiltern, 19 von 21 positiven Proben wurden richtig erkannt. Bei zwei Proben lieferte er ein Ergebnis knapp unterhalb des Cut-Off-Wertes des Herstellers (Proben-Nr. 13 und 15, s. Pfeil in Abb. 3.3).

Der OTI-Test auf Amphetamin konnte 15 von 21 positiven Proben erkennen, sechs positive Proben lagen im OTI-Test unterhalb des Cut-Off-Wertes. Es wurden nur die Proben mit einer sehr hohen Konzentration von „Ecstasy“ richtig erkannt, wobei die gemessenen Werte keine Linearität zur in der Probe enthaltenen Substanzmenge aufwiesen.

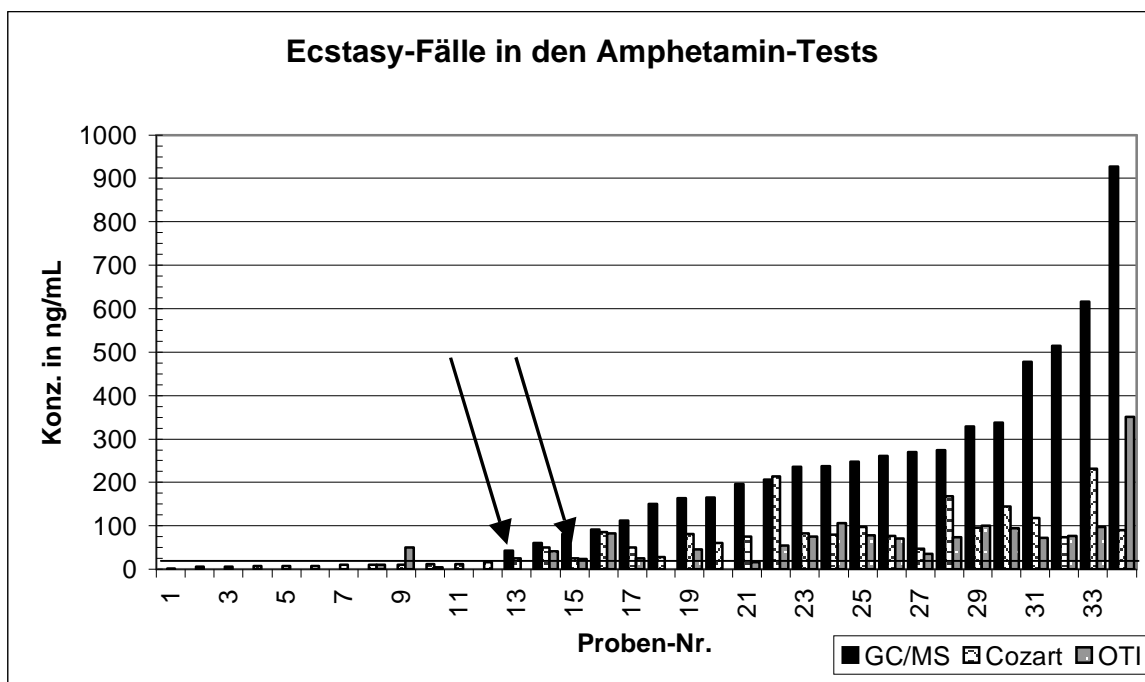


Abbildung 3.3 Fälle nur mit Ecstasy: Quantitative Bestimmung mittels GC/MS (nur MDMA) den Ergebnissen des Cozart- und OTI-Tests auf Amphetamin gegenübergestellt, eingezeichnet ist der von den Herstellern empfohlene Cut-Off-Wert von 25 ng/mL

3.1.2.2 Anwendung der Methamphetamin-Tests

Der Cozart-Test auf Methamphetamin erkannte nur die Probe mit der niedrigsten Konzentration nicht (s. Pfeil in Abb. 3.4), alle anderen positiven Proben wurden richtig identifiziert. Der OTI-Test auf Methamphetamin erfasste alle positiven Proben richtig. Es bestand in keinem der Tests eine Proportionalität der Ergebnisse im Vergleich zu den GC/MS-Ergebnissen.

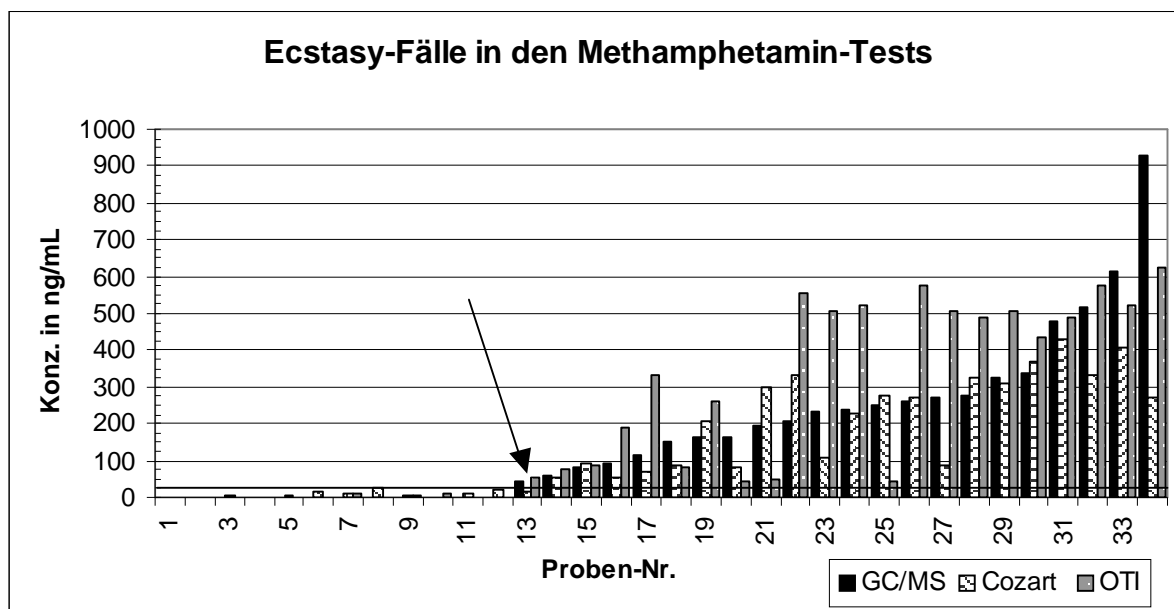


Abbildung 3.4 Fälle nur mit „Ecstasy“: Quantitative Bestimmung mittels GC/MS (nur MDMA) den Ergebnissen des Cozart- und OTI-Tests auf Methamphetamin gegenübergestellt, eingezeichnet ist der von den Herstellern empfohlene Cut-Off-Wert von 25 ng/mL

3.1.3 Einsatz bei Proben, die sowohl Amphetamin als auch „Ecstasy“ enthalten

31 Proben, die neben Amphetamin auch „Ecstasy“ enthielten, wurden getrennt in der Gruppe der „Mischfälle“ betrachtet. In den Diagrammen wurden die im GC/MS gemessenen Konzentrationen von Amphetamin und MDMA addiert: der Amphetamin-Anteil findet sich als unterer Teil des Balkens und der MDMA-Teil entspricht dem oberen Teil.

3.1.3.1 Anwendung der Amphetamin-Tests

Nur die Probe mit der niedrigsten Gesamtkonzentration von Amphetamin und MDMA wurde von beiden Amphetamin-Tests als negativ ausgewiesen (s. Pfeil in Abb. 3.5). Hier lag der Wert des Cozart-Tests gering unterhalb des Cut-Off-Wertes, der Wert des OTI-Tests lag deutlich darunter. Alle anderen Proben wurden in beiden Amphetamin-Tests richtig erkannt.

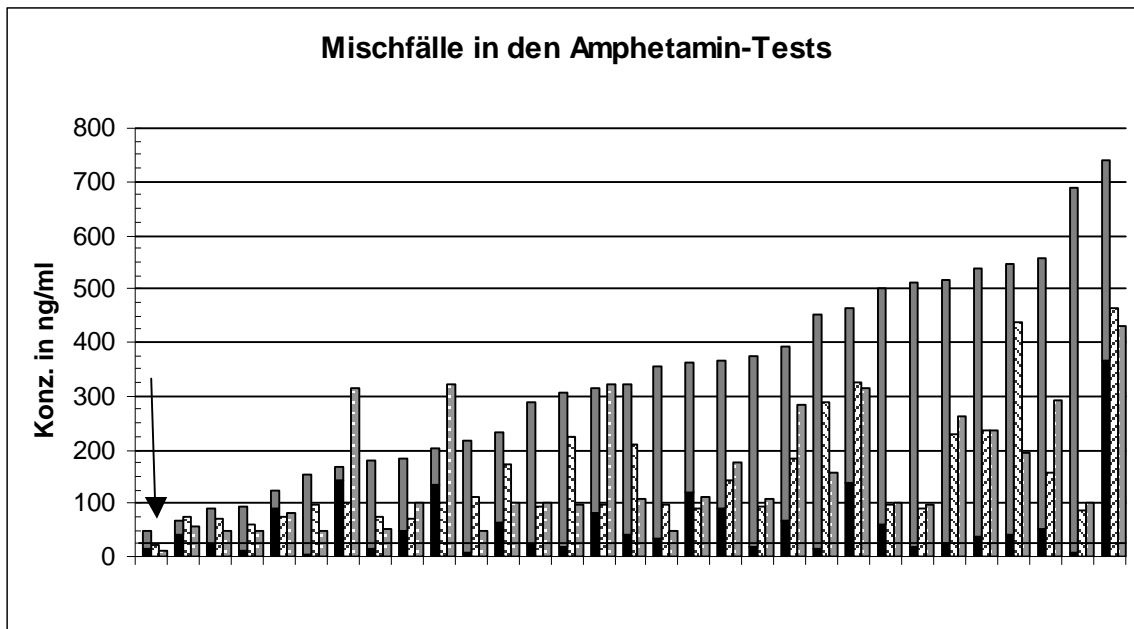


Abbildung 3.5 Fälle mit Amphetamin und „Ecstasy“: Quantitative Bestimmung mittels GC/MS (Amphetamin plus MDMA) den Ergebnissen des Cozart- und OTI-Tests auf Amphetamin gegenübergestellt, eingezeichnet ist der von den Herstellern empfohlene Cut-Off-Wert von 25 ng/mL. Bei den Dreiergruppen entspricht die linke Säule dem summierten GC/MS-Ergebnis, die mittlere Säule dem Cozart- und die rechte Säule dem OTI-Amphetamin-Test.

3.1.3.2 Anwendung der Methamphetamin-Tests

Der Cozart-Methamphetamin-Test konnte vier von einunddreißig positiven Proben nicht erkennen, obwohl bei allen diesen Proben allein die Konzentration von MDMA oberhalb des Grenzwertes von 25 ng/ml lag (siehe Pfeile in Abb. 3.6).

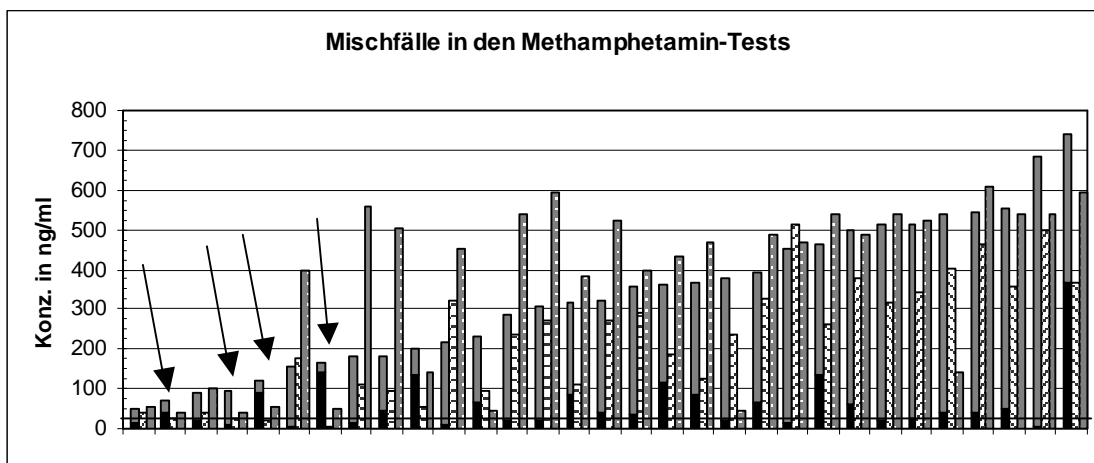


Abbildung 3.6 Fälle mit Amphetamin und „Ecstasy“: Quantitative Bestimmung mittels GC/MS (Amphetamin plus MDMA) den Ergebnissen des Cozart- und OTI-Tests auf Methamphetamin gegenübergestellt, eingezeichnet ist der von den Herstellern empfohlene Cut-Off-Wert von 25 ng/mL. Bei den Dreiergruppen entspricht die linke Säule dem summierten GC/MS-Ergebnis, die mittlere Säule dem Cozart- und die rechte Säule dem OTI-Methamphetamin-Test.

Der OTI-Test auf Methamphetamin war hingegen in der Lage, alle positiven Proben richtig herauszufiltern.

3.1.4 Kreuzreaktivitäten des Cozart-Amphetamin-Tests

Lediglich das Norephedrin der von uns untersuchten Substanzen zeigte im Cozart-Amphetamin-Test keine Kreuzreaktivität bei 10 µg/mL. Für alle anderen Analyten fand sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte Kreuzreaktivität in diesem Test. Bei zwei Substanzen lag die Kreuzreaktivität zum Teil deutlich über 100%, das bedeutet, dass der Test stärker auf diese Substanz reagiert als auf Amphetamin. Bei diesen Substanzen handelt es sich um PMA und MDA, zwei weitere Substanzen lagen um 100% BDB und Phentermin. Die einzelnen Ergebnisse sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1 Kreuzreaktivitäten untersuchter Amphetaminabkömmlinge im Cozart Amphetamin-Test, in Klammern sind die zur Ermittlung eingesetzten Konzentrationen angegeben. Die kursiv gedruckten Messwerte lagen bei der gemessenen Konzentration im Bereich des Cut-Offs von 20-25 ng/mL Amphetamin-Äquivalenten.

Substanz	Kreuzreaktivität in %
4-Methoxyamphetamin (PMA)	544,4 (10 ng/mL)
3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA)	326,1 (10 ng/mL)
Amphetamin	127,1 (10 ng/mL)
Benzodioxolbutamin (BDB)	71,8 (100 ng/mL)
Phentermin	39,3 (100 ng/mL)
Etryptamin (Ethyltryptamin)	14,2 (100 ng/mL)
3,4-Methylendioxymethamphetamin (MDMA)	7,9 (1 µg/mL)
Methamphetamin	5,4 (1 µg/mL)
2,5-Dimethoxyphenethylamin (BDMPEA intermediate 2)	5,2 (1 µg/mL)
4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin (DOB)	4,2 (1 µg/mL)
3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA)	4,1 (1 µg/mL)
Norpseudoephedrin (Cathin)	3,9 (1 µg/mL)
N-Methyl-4-methoxyamphetamin	3,7 (1 µg/mL)
Methylbenzodioxolbutamin (MBDB)	1,8 (1 µg/mL)
2,4,5-Trimethoxyamphetamin	1,2 (1 µg/mL)
N,N-Dimethyl-3,4-methylendioxyamphetamin	0,8 (10 µg/mL)
2,4,6-Trimethoxyamphetamin	0,6 (10 µg/mL)
4-Brom-2,5-dimethoxyphenethylamin (BDMPEA)	0,5 (10 µg/mL)
N,N-Diethyltryptamin	0,4 (10 µg/mL)
N,N-Dimethyltryptamin	0,4 (10 µg/mL)
Cathinon	0,3 (10 µg/mL)
4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin (DOM)	0,2 (10 µg/mL)
2,5-Dimethoxy-4-methylphenethylamin	0,1 (10 µg/mL)
Methylphenidat	0,1 (10 µg/mL)
Fenetyllin	0,1 (10 µg/mL)
Ephedrin	0,1 (10 µg/mL)
Norephedrin	Negativ (10 µg/mL)

3.2 Erstellung einer eigenen Massenspektren-Bibliothek verschiedener Amphetaminderivate als Basis zur Substanzidentifizierung

Von den 23 untersuchten Substanzen besaßen mit Ausnahme von N,N-Dimethyl-3,4-methylendioxy-amphetamin alle eine freie Hydroxy- und/oder freie Aminogruppe, die mit den verwendeten Derivatisierungsmitteln umgesetzt werden konnten. Daher wurde angestrebt, von allen diesen Substanzen Spektren in underivatisierter, acetylierter und silylierter Form sowie als PFO-Derivat in die Bibliothek aufzunehmen. Von N,N-Diethyltryptamin und N,N-Dimethyltryptamin waren nur underivatisierte und silylierte Spektren zugänglich. Von Norephedrin und Cathinon konnten nur derivatisierte Spektren erhalten werden. Die bereits hinreichend untersuchten Substanzen wie Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA wurden ausschließlich als PFO-Derivate in die Bibliothek aufgenommen, dasselbe gilt für die deuterierten Standards.

Bei einigen Stoffen bildeten sich sogenannte Formyl-Artifakte, die im Chromatogramm vor der gesuchten Verbindung erschienen. Dieses Phänomen zeigte sich im underivatisierten Zustand bei BDB, DOB, DOM und PMA.

Ephedrin, Norephedrin und Norpseudoephedrin nahmen bei der Acetylierung und der Silylierung zwei Moleküle des Derivatisierungsmittels auf, Etryptamin wurde bei der Silylierung an zwei Stellen derivatisiert.

Durch die Derivatisierungsreaktion erhöhte sich das Molgewicht um das Gewicht des Derivatisierungsmittels, minus das Gewicht eines in der Derivatisierungsreaktion abgespaltenen Moleküls, wie beispielsweise H_2O . Die Nettoänderung betrug bei der Acetylierung +42, +72 bei der Silylierung und +396 bei der Derivatisierung mit PFOC. In Tab. 3.2 findet sich eine Aufstellung aller untersuchten Substanzen mit den erzielten Derivaten. Die insgesamt 102 Massenspektren finden sich im Anhang und wurden in einer computergestützten Datenbank hinterlegt, die wiederum Eingang in eine kommerzielle Spektrenbibliothek fand [31].

Tabelle 3.2 Erhaltene Massenspektren der untersuchten Amphetaminabkömmlinge (☑ Spektrum erhalten und in die Bibliothek aufgenommen, ☒ Spektrum nicht erhalten, ∅ Derivatisierung nicht möglich)

Substanz	Underivatisiert	AC	TMS	PFO
Benzodioxolbutamin (BDB)	☑	☑	☑	☑
Methylbenzodioxolbutamin (MBDB)	☑	☑	☑	☑
4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin (DOM)	☑	☑	☑	☑
4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin (DOB)	☑	☑	☑	☑
4-Methyl-2,5-dimethoxyphenethylamin	☑	☑	☑	☑
4-Methoxy-amphetamin (PMA)	☑	☑	☑	☑
2,5-Dimethoxyphenethylamin (BDMPEA intermediate 2)	☑	☑	☑	☑
2,4,5-Trimethoxyamphetamin	☑	☑	☑	☑
2,4,6-Trimethoxyamphetamin	☑	☑	☑	☑
N-Methyl-4-methoxyamphetamin	☑	☑	☑	☑
4-Brom-2,5-dimethoxyphenethylamin (BDMPEA)	☑	☑	☑	☑
N,N-Diethyltryptamin	☑	∅	☑	∅
Methylphenidat	☑	☑	☑	☑
Phentermin	☑	☑	☑	☑
N,N-Dimethyl-3,4-methylendioxyamphetamin	☑	∅	∅	∅
Fenethylin	☑	☑	☑	☑
Etryptamin	☑	☑	☑	☑
N,N-Dimethyltryptamin	☑	∅	☑	∅
Ephedrin	☑	☑	☑	☑
Norephedrin (Phenylpropanolamin)	☒	☑	☑	☑
Norpseudoephedrin (Cathin)	☑	☑	☑	☑
Cathinon	☒	☑	☑	☑
Amphetamin	☒	☑	☒	☑
Methamphetamin	☒	☑	☒	☑
3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA)	☒	☑	☒	☑
3,4-Methylendioxymethamphetamin (MDMA)	☒	☑	☒	☑
3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA)	☒	☑	☒	☑
Amphetamin-D3	☒	☒	☒	☑
Methamphetamin-D8	☒	☒	☒	☑
MDA-D5	☒	☒	☒	☑
MDMA-D5	☒	☒	☒	☑
MDE-D5	☒	☒	☒	☑
MBDB-D5	☒	☑	☒	☑
ω-Aminoacetophenon (als interner Standard verwendet)	☒	☒	☒	☑
Ephedrin-D3	☒	☒	☒	☑
BDB formyl artifact	☑	∅	∅	∅
DOM formyl artifact	☑	∅	∅	∅
DOB formyl artifact	☑	∅	∅	∅
PMA formyl artifact	☑	∅	∅	∅

3.3 Validierung einer Methode zur Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA im Serum mit GC/MS nach den Richtlinien der GTFCh

Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit der zur Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA verwendeten Methode wurden die von der GTFCh vorgeschriebenen Validierungsschritte durchgeführt.

3.3.1 Ausschluss von Interferenzen

Durch die Analyse der Leerseren sowie der Nullproben (Serum plus internem Standard) wurde gezeigt, dass sich im Serum keine Substanzen befanden, die bei der verwendeten Aufarbeitung die Detektion der Substanzen stören. Es fanden sich bei den erwarteten Retentionszeiten keine der zur Identifizierung und Quantifizierung verwendeten Ionen.

3.3.2 Linearität der Kalibration und Varianzenhomogenität

Es wurde für alle fünf untersuchten Amphetaminderivate die Linearität innerhalb eines Bereiches von 0-800 ng/mL gezeigt. Dies wurde mittels des Mandel-F-Tests mit einer Signifikanz von 99% getestet. Die sechs durchgeführten Serien waren bezüglich ihrer Mittelwerte mit einer Signifikanz von 99% homogen. Die Varianzenhomogenität wurde mit dem F-Test überprüft. Es fanden sich mit Hilfe des Grubbs-Tests keine Ausreißer.

3.3.3 Genauigkeit

Die relative Standardabweichung für Wiederholpräzision und Laborpräzision bzw. der Bias für die Richtigkeit lagen für die verschiedenen Analyten bei jeweils zwei Konzentrationen (20 ng/mL und 80 ng/mL) deutlich unter 15%. Somit wurden die an eine quantitative Bestimmungsmethode gestellten Akzeptanzkriterien erfüllt (siehe Tab. 3.3).

Tabelle 3.3 Wiederhol-, Laborpräzision und Bias

	Wiederholpräzision (n=8) (% RSD)		Laborpräzision (n=8) (% RSD)		Bias (n=8) (%)	
	20 ng/mL	80 ng/mL	20 ng/mL	80 ng/mL	20 ng/mL	80 ng/mL
Amphetamin	2.2	3.1	5.7	4.3	2.1	1.1
Methamphetamin	6.3	1.6	7.1	3.5	6.2	1.3
MDA	6.3	1.6	10.0	4.5	7.6	0.8
MDMA	3.3	1.7	7.0	3.8	5.5	1.6
MDEA	4.8	2.3	7.6	3.0	0.1	0.1

3.3.4 Grenzwerte

Die Richtlinien der GTFCh sehen für die Ermittlung der Nachweisgrenze (NWG oder engl. LLOD) ein Signifikanzniveau von 90% und für die Bestimmungsgrenze (BG oder engl. LLOQ) ein Signifikanzniveau von 99% vor. Dabei ergaben sich die in Tab. 3.4 aufgeführten Grenzwerte.

Tabelle 3.4 Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen

	NWG in ng/mL	BG in ng/mL
Amphetamin	3,5	11,6
Methamphetamin	2,4	16,0
MDA	2,5	24,1
MDMA	4,3	13,1
MDE	1,4	13,2

3.3.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsraten der einzelnen Analyten für die Lösungen mit 20 ng/mL und 80 ng/mL finden sich in Tab. 3.5.

Tabelle 3.5 Gemittelte Wiederfindungsraten (n=6) bei Substanzkonzentrationen von 20 und 80 ng/mL (Werte in Klammern geben die jeweils minimale Wiederfindungsrate an)

Substanz	20 ng/mL	80 ng/mL
Amphetamin	88% (78%)	80% (65%)
Methamphetamin	92% (80%)	79% (73%)
MDA	86% (76%)	75% (62%)
MDMA	98% (89%)	84% (72%)
MDEA	90% (77%)	81% (69%)

3.4 Quantifizierung seltener vorkommender Amphetaminderivate

Für Substanzen, die nicht routinemäßig quantitativ bestimmt werden, muss nicht zwingend eine komplette Basisvalidierung durchgeführt werden, da normalerweise bei jeder Quantifizierungsserie eine eigene Kalibration mit aufgezeichnet wird. Für derartige Substanzen muss lediglich die prinzipielle Eignung eines Verfahrens und dessen Arbeitsbereich festgelegt werden.

3.4.1 Phentermin, Ephedrin, Cathin, Methylphenidat, BDB und MBDB

Für alle mit der beschriebenen Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeiteten Substanzen konnte ein proportionaler Anstieg bei steigender Konzentration nachgewiesen werden. Die genauen Ergebnisse befinden sich in Tab. 3.6.

Dabei wurde für Phentermin, Cathin und Methylphenidat d3-Amphetamin als interner Standard verwendet, für BDB und MBDB d5-MBDB und für Ephedrin d3-Ephedrin.

Tabelle 3.6 Linearität der Kalibration der untersuchten Substanzen

	Phentermin	Ephedrin	Cathin	Methylphenidat	BDB	MBDB
r^2	0,974	0,999	0,910	0,923	0,982	0,995

3.4.2 Norephedrin, Cathin und Cathinon

Mit Hilfe der Festphasenextraktion ließ sich auch für Cathin und Cathinon ein linearer Verlauf bei Konzentrationen von 0-200 ng/ml nachweisen. Norephedrin fand sich in den mittels Festphasenextraktion aufgearbeiteten Proben nicht wieder. Als interner Standard wurden für Cathinon Aminoacetophenon und für Cathin d3-Ephedrin verwendet. Für Cathin wurde so eine Linearität von $r^2=0,960$ und für Cathinon $r^2=0,911$ erhalten.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Immunochemische Tests

Beim Nachweis von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA oder MDEA im Blut eines Kraftfahrers liegt oberhalb eines Grenzwertes von 25 ng/mL eine Ordnungswidrigkeit im Straßenverkehr nach §24a StVG vor. Daher ist es Ziel immunochemischer Vortests diese Konzentrationen in Blutproben sicher zu erkennen. Methamphetamin und MDA wurden erst im Juli 2007 in die Anlage des §24a StVG aufgenommen, da MDA fast ausschließlich als Metabolit in den Proben vorkommt und Methamphetamin nur in wenigen Regionen von Bedeutung ist.

Beim Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten-Amphetamin- und Methamphetamin Tests wurden die 80 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Blutproben hinsichtlich ihres Gehaltes an Amphetamin, „Ecstasy“ (MDMA) oder einer Kombination beider Stoffe analysiert, da dies die häufigsten derzeit konsumierten Amphetamine sind. Methamphetamin und MDEA spielten im Untersuchungsgut keine Rolle.

Reine Amphetamin-Fälle

Bei Betrachtung der nur Amphetamin enthaltenden Proben konnten die ELISA-Amphetamin-Tests von Cozart und OraSure Technologies Inc. (OTI) alle Proben mit Konzentrationen oberhalb des Grenzwertes erkennen. Bei einem Fall, der im GC/MS unter der Grenze von 25 ng/ml lag, befand sich der Wert im Cozart-Test ebenfalls knapp unterhalb des Cut-Off-Wertes, der OTI-Test verlief deutlich negativ. Während der Cozart-Test in allen Fällen korrekte Ergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode lieferte, erbrachte der OTI-Amphetamin-Test ein falsch positives Ergebnis. Die Methamphetamin-Tests beider Hersteller erkannten Amphetamin unabhängig von der Konzentration in keiner Probe. Der Cozart-Methamphetamin-Test ergab ein falsch positives Ergebnis knapp oberhalb des Cutoff-Wertes.

Diese Ergebnisse überraschen nicht, wurden die Amphetamin-Tests doch zum Nachweis von Amphetamin entwickelt und optimiert, wohingegen die Methamphetamin-Tests laut Herstellerangaben nur geringe Kreuzreaktivitäten für Amphetamin besitzen. Die (wenigen) falsch positiven Ergebnisse könnten möglicherweise in der Anwesenheit von Fäulnisaminen begründet sein, die bei der

Probenlagerung unter anderem in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur in unterschiedlichem Ausmaß entstehen.

Reine „Ecstasy“-Fälle

Bei den meisten „Ecstasy“-Blutproben wurde mit GC/MS neben dem eigentlichen Wirkstoff MDMA noch ein stets kleinerer Anteil des Metaboliten MDA nachgewiesen. Teilweise lagen noch geringe Mengen von MDEA als Verunreinigung vor.

Der Cozart-Test auf Amphetamin war in der Lage, die meisten positiven Proben zu erkennen, 19 von 21 positiven Proben wurden richtig bestimmt. Bei zwei Proben lieferte der Test ein Ergebnis knapp unterhalb des Cut-Off-Wertes des Herstellers.

Der OTI-Test auf Amphetamin konnte 15 von 21 positiven Proben herausfiltern, sechs positive Proben lagen im OTI-Test unterhalb des Cut-Off-Wertes. Es wurden von diesem Amphetamin-Test nur die Proben mit einer sehr hohen Konzentration von „Ecstasy“ richtig erkannt, wobei die gemessenen Werte jedoch keine Linearität zur in der Probe enthaltenen Substanzmenge aufwiesen.

Der Cozart-Test auf Methamphetamin erkannte alle positiven „Ecstasy“-Proben mit Ausnahme der Probe mit der niedrigsten Konzentration. Der OTI-Test auf Methamphetamin erfasste alle positiven Proben richtig. Es bestand allerdings in keinem der beiden Methamphetamin-Tests eine Proportionalität der Ergebnisse im Vergleich zu den GC/MS-Ergebnissen.

Das gute Ansprechen beider Amphetamin-Tests auf Proben, die nur „Ecstasy“ (MDMA) enthalten, dürfte vorwiegend durch den Metaboliten MDA erklärbar sein, das aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Amphetamin (freie Aminogruppe in der Seitenkette) eine erhöhte Kreuzreaktivität in den Amphetamin-Tests zeigt. Dass auch in beiden Amphetamin-Tests zwei Proben, in denen mittels GC/MS kein MDA nachweisbar war, erkannt wurden, könnte von der relativ hohen MDMA-Konzentrationen in diesen Proben herrühren; die Kreuzreaktivität von MDMA im Cozart-Amphetamin-Test wurde in der vorliegenden Arbeit zu 7,9 % bestimmt, für den entsprechenden OTI-Test gibt der Hersteller eine Kreuzreaktivität von <1% an.

Das gute Abschneiden der Methamphetamin-Tests der Hersteller bei den Ecstasy-Proben ist auf die hohe Kreuzreaktivität zu MDMA zurückzuführen (Cozart-Methamphetamin-Test 43-49% und OTI Methamphetamin-Test 151,3%).

Mischfälle mit Amphetamin und „Ecstasy“

31 Proben, die neben Amphetamin auch „Ecstasy“ enthielten, wurden getrennt in der Gruppe der „Mischfälle“ betrachtet. Nur die Probe mit der niedrigsten Gesamtkonzentration von Amphetamin (15,7 ng/mL) und MDMA (32,2 ng/mL) wurde von beiden Amphetamin-Tests als negativ ausgewiesen. Hierbei lag der Wert des Cozart-Tests gering unterhalb des Cut-Off-Wertes (23,8 ng/mL), der Wert des OTI-Tests (12,5 ng/mL) lag deutlich darunter. Alle anderen Proben wurden in beiden Amphetamin-Tests richtig erkannt.

Bei den Proben, die sowohl Amphetamin als auch Ecstasy enthielten, profitierten die Amphetamin-Tests offensichtlich auch von der guten Kreuzreaktivität zu MDA, so dass auch Proben, die weniger als 25 ng/mL Amphetamin enthielten, richtig erkannt wurden. Hier zeigte der Cozart-Amphetamin-Test eine deutlichere Korrelation der gemessenen Werte zu den per GC/MS ermittelten Ergebnissen.

Der Cozart-Methamphetamin-Test konnte vier von einunddreißig positiven Proben nicht erkennen, obwohl bei allen diesen Proben allein die Konzentration von MDMA oberhalb des Grenzwertes von 25 ng/mL lag. Damit schnitt er in diesem Untersuchungskollektiv schlechter ab als bei den reinen „Ecstasy“-Fällen.

Der OTI-Test auf Methamphetamin hingegen erfasste alle positiven Proben des Kollektivs der „Mischfälle“ wie er auch alle reinen „Ecstasy“-Fälle erkannt hatte.

Bei der Gesamtauswertung aller drei Untersuchungskollektive zeigte sich, dass die jeweiligen Tests von OTI verlässliche Ergebnisse lieferten und - in Kombination angewendet - die Kriterien für einen Amphetamin- und „Ecstasy“-Suchtest unter besonderer Berücksichtigung der im Zusammenhang mit § 24a StVG empfohlenen Grenzwerte erfüllten.

Der Cozart-Amphetamin-Test allein lieferte bei allen untersuchten Proben (n=80) nur drei falsch negative Ergebnisse. Dabei lagen die gemessenen Werte jeweils nur geringfügig unter dem vom Hersteller vorgegebenen Cutoff von 25 ng/mL, sodass eine Absenkung des Cutoff-Wertes auf 23 ng/mL alle positiven Proben im Untersuchungsgut herausfilterte. Zwar wird prinzipiell der Cutoff vom Hersteller so gewählt, dass sowohl die Anzahl der falsch negativen wie die Anzahl der falsch positiven Proben minimiert werden [32], jedoch können durch Absenken des Cutoffs

niedrige Konzentrationen besser erkannt und die Proben einer weiterführenden spezifischen Analytik zugeführt werden. Dass dadurch vermehrt immunchemisch falsch positive Proben entstehen und mittels GC/MS zusätzlich untersucht werden müssen, ist eine hinzunehmende Konsequenz der hohen Sensitivität.

Die Kombination des Cozart-Amphetamin-Tests mit dem entsprechenden Methamphetamin-Test steigerte auch für „Ecstasy“ enthaltende Proben nicht die Empfindlichkeit, sodass sich für das vorliegende Untersuchungsgut keinerlei Vorteile offenbarten.

Die alleinige Anwendung des Cozart-Amphetamin-Tests reduziert im Vergleich zur kombinierten Anwendung beider Tests von OTI den zeitlichen Aufwand, die Kosten für die Testmaterialien und die Menge des benötigten Serums deutlich.

Kreuzreaktivitäten des Cozart-Amphetamin-Tests

Vor der Einführung des Cozart-Amphetamin-Tests in die Routineanalytik sollte auch das Ansprechen gegenüber nicht im § 24a StVG genannten Amphetaminabkömmlingen überprüft werden. Dazu wurden die Kreuzreaktivitäten von 27 verschiedenen uns zugänglichen Amphetaminderivaten bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Dabei zeigte der Test Kreuzreaktivitäten gegenüber einigen anderen verwandten Amphetaminen und erwies sich somit als weniger spezifisch, was für ein Screeningverfahren von Vorteil ist. Besonders hohe Kreuzreaktivitäten ließen sich bei Substanzen mit einer freien Aminogruppe in der Seitenkette nachweisen (PMA 544,4%, MDA 326,1%, BDB 71,8%, Phentermin 39,3% und eingeschränkt auch Ethyltryptamin 14,2%). Im Vergleich dazu ließ sich für Amphetamin im vorliegenden Test bei einer Konzentration von 10 ng/mL eine Reaktivität von 127,1% messen.

Andererseits zeigten die vorliegenden Messungen, dass die Spezifität des Cozart-Amphetamin-Tests ausreichend hoch war, um nicht zu viele falsch positive Proben bestätigen zu müssen, so dass der Test aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit mit abgesenktem Cutoff-Wert Eingang in die Routineanalytik des Kieler Instituts für Rechtsmedizin fand.

4.2 Massenspektren-Bibliothek verschiedener Amphetaminderivate zur Substanzidentifizierung

Für die Aufnahme der Massenspektren in die Bibliothek war es wichtig, die Substanzen in der richtigen Konzentration zu messen. Da die Messungen im SCAN-Modus vorgenommen wurden, durfte die Konzentration nicht zu gering sein, da bei der Registrierung von mindestens 500 Ionen die Empfindlichkeit deutlich niedriger ist als im SIM-Modus. Wurde allerdings eine zu hohe Konzentration eingesetzt, konnte es vorkommen, dass der Peak überladen war, das heißt, es kam zu keinen scharfen, zeitlich eng begrenzten Peaks mit gleichartigem steilen Auf- und Abstieg. Bei zu niedriger Konzentration war die Störung durch den Untergrund überproportional groß, während es bei überladenen Peaks zu Verschiebungen der Ionenverhältnisse kam. Da für die spätere Suche und Wiederfindung einer Substanz in der Bibliothek sowohl hohes Untergrundrauschen als auch Verschiebungen zwischen den Ionenverhältnissen sehr störend sein können, wurden nur Messungen verwendet, die keine derartigen Messfehler aufwiesen. Norephedrin und Cathinon konnten nur in den derivatisierten Formen in die Bibliothek aufgenommen werden.

Formyl-Artefakte ließen sich bei vier der untersuchten Substanzen in nennenswerten Mengen nachweisen, die auf die Anwesenheit von Formaldehyd in den Proben oder als Rückstand auf der Säule zurückzuführen sind, das durch Oxidation aus Methanol entsteht. Bei der Vermeidung von Methanol als Lösungsmittel ließen sich diese Artefakte deutlich reduzieren.

Die für die anderen Substanzen erfolgreich eingesetzte Flüssig-Flüssig-Extraktion im Alkalischen lieferte für Cathinon extrem schlechte Ausbeuten; aus den Extrakten konnte kein Spektrum gewonnen werden. Dies gelang erst mittels SPE auf einer Mischphase in Anlehnung an eine von Sporkert et al. [29] für Haare entwickelte Methode, bei der die Probe im sauren Milieu (pH 2,0) auf die Säule gegeben wurde.

Mit der massenspektrometrischen Messung vieler seltener vorkommender Amphetamine und ihre Derivate konnte die Bandbreite verfügbarer Spektrenbibliotheken erfolgreich erweitert werden und es ist nun ohne großen Aufwand möglich, diese Substanzen mit verschiedenen Derivatisierungstechniken eindeutig zu identifizieren und nachzuweisen.

4.3 Validierung einer GC/MS-Methode

Durch die in der vorliegenden Arbeit nach strengen Richtlinien überprüfte Methode können Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA verlässlich und vergleichsweise schnell nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Validierungsdaten zeigten, dass die Methode sehr gute, reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die von der GTFCh für eine zu validierende Methode gestellten Anforderungen Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden ($\geq 0,98$), der Nachweisgrenze ($\leq 15 \text{ ng/mL}$), der Bestimmungsgrenze ($\leq 25 \text{ ng/mL}$), die Wiederholpräzision ($\leq 15\%$), die Laborpräzision ($\leq 15\%$) und das Bias ($\leq 15\%$) wurden alle eingehalten und zum Teil deutlich unterschritten. So fanden sich durchweg Korrelationskoeffizienten $\geq 0,99$, die Nachweisgrenze lag für alle Substanzen bei $\leq 4,3 \text{ ng/mL}$ und die Bestimmungsgrenzen für alle Substanzen außer MDA ($24,1 \text{ ng/mL}$) bei $\leq 20,0 \text{ ng/mL}$. Wiederholpräzision ($\leq 6,3\%$), Laborpräzision ($\leq 10,0\%$) und Bias ($\leq 7,6\%$) übertrafen die Forderungen ebenfalls. Darüber hinaus wurden die empfohlenen Wiederfindungsraten ($\geq 50\%$) mit $\geq 75\%$ für alle Substanzen erfüllt. Lediglich der Bereich der Linearität entsprach mit $0\text{-}800 \text{ ng/mL}$ nicht den Empfehlungen, laut denen ein linearer Bereich bis 1000 ng/mL anzustreben ist.

Die Derivatisierung ohne vorhergehendes Eindampfen ist zeitsparend und verhindert den Verlust von flüchtigen, underivatisierten Amphetaminen. Die sehr guten Wiederfindungsraten - insbesondere bei niedrigen Konzentrationen - ermöglichen kurze Extraktionszeiten. Die etwas niedrigeren Wiederfindungsraten bei höheren Konzentrationen weisen jedoch darauf hin, dass sich das Gleichgewicht während dieser Zeit noch nicht vollständig ausgebildet hat, was bei der Verwendung der entsprechenden deuterierten internen Standards keinen negativen Effekt auf das Ergebnis der Quantifizierung hat. Das zügige Arbeiten verhindert zusätzlich die Bildung von Emulsionen und erlaubt einen großen Probendurchsatz, was mit niedrigen Personalkosten verbunden ist.

Die Methode kann ohne größeren Aufwand von einem GC/MS-Gerät auf ein anderes übertragen werden, wobei jedoch der Bereich der Linearität der Kalibrierung überprüft werden sollte.

In der Praxis erwies sich die validierte Methode darüber hinaus als sehr robust, da äußere Faktoren wie unterschiedliche Zustände der GC-Säule und des

Massenspektrometers keinen Einfluss auf die erzielten quantitativen Ergebnisse nahmen.

4.4 Quantifizierung ausgewählter Amphetaminderivate

Um herauszufinden, ob sich die validierte Methode ohne größeren Aufwand auf andere, häufiger vorkommende Amphetaminderivate erweitern lässt, wurden Proben mit Phentermin, Ephedrin, Cathin, Methylphenidat, BDB und MBDB versetzt und die Linearität der Kalibrierkurven bestimmt. Die ursprünglich ins Auge gefasste zusätzliche Erweiterung der Methode auf Cathinon und sein Abbauprodukt Norephedrin gelang unter den gegebenen Bedingungen nicht, da - wie oben beschrieben - Cathinon sich nicht extrahieren ließ und Norephedrin sich unter den eingesetzten Bedingungen chromatographisch nur unzureichend von seinem Isomer Cathin (Norpseudoephedrin) trennte.

Lediglich für MBDB stand uns gleich zu Anfang mit d5-MBDB ein entsprechender deuterierter Standard zur Verfügung, was zu einer sehr guten, linearen Kalibration ($r^2=0,995$) führte. Für alle anderen untersuchten Analyten musste auf strukturell verwandte, zum Teil undeuterte Substanzen zurückgegriffen werden, die etwas andere Extraktionsraten im Vergleich zu den Analyten besaßen. Erste Versuche mit Amphetamin-d3 als internem Standard für Ephedrin und BDB scheiterten an der Linearität der Kalibration (Ephedrin $r^2=0,233$; BDB $r^2=0,477$), die Strukturähnlichkeit war offensichtlich nicht ausreichend. Für BDB lieferte der deuterierte Standard von MBDB gute Ergebnisse ($r^2=0,982$). Später wurde für Ephedrin erfolgreich der deuterierte Standard d3-Ephedrin verwendet ($r^2=0,999$). Phentermin, Cathin und Methylphenidat wurden über d3-Amphetamin ausgewertet und zeigten mit $r^2=0,974$, $r^2=0,910$ und $r^2=0,923$ recht gute Proportionalitäten.

Für die Analyse von Proben nach Khat-Konsum auf Cathinon, Cathin und Norephedrin wurde zusätzlich die verwendete Festphasenextraktion (Probenaufgabe bei pH 2) hinsichtlich ihrer Eignung zur Quantifizierung untersucht, wobei als interner Standard für Cathinon Aminoacetophenon und für Norephedrin und Cathin d3-Ephedrin verwendet wurden. Für Cathin wurden mit einer Linearität von $r^2=0,960$ und für Cathinon mit $r^2=0,911$ zufriedenstellende Kalibrierkurven erhalten, Norephedrin

konnte mit der PFOC-Derivatisierung wegen unzureichender Trennung von Cathin auch hier nicht erfasst werden. Sporkert et al. [29] fanden in Abhängigkeit vom pH-Wert stark schwankende Ausbeuten für Cathinon, seine Abbauprodukte und die verwendeten internen Standards, die den hier verwendeten entsprachen. Unter den von Sporkert et al. gewählten Bedingungen ließ sich allerdings Norephedrin nicht nachweisen; dies dürfte auf die abweichende Derivatisierung zurückzuführen sein. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Methoden zur Khat-Bestimmung noch nicht sehr robust sind und weiter optimiert werden können.

Anhand der Ergebnisse lässt sich sehr genau die Bedeutung des deuterierten Standards erkennen. Während die Linearität der Kalibrierung bei den Verbindungen, für die deuterierte Standards verfügbar waren, sehr hoch war, zeigten die Substanzen, die lediglich mit ähnlichen Stoffen als Standard quantifiziert wurden, eine deutlich geringer ausgeprägte Proportionalität. Als Fazit kann festgehalten werden, dass für die GC/MS – falls verfügbar – immer die entsprechenden deuterierten Standards eingesetzt werden sollten.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen von forensischen Fragestellungen im Zusammenhang mit Ordnungswidrigkeiten und Straftaten sind häufig Blutproben auf Amphetamin oder strukturell ähnliche Wirkstoffe zu untersuchen. Bei ständig wachsendem Probenaufkommen ist unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten eine ständige Optimierung der verwendeten Analyseverfahren in Bezug auf die Ergebnisqualität und die Wirtschaftlichkeit erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst überprüft, inwieweit die am Institut für Rechtsmedizin Kiel verfügbaren immunchemischen und chromatographischen Analyseverfahren geeignet waren, Amphetamine und verwandte Substanzen im Rahmen einer allgemeinen Suchanalyse (Screening) im Serum zu erkennen.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene ELISA-Tests auf Amphetamin beziehungsweise Tests auf Methamphetamin bezüglich ihrer Einsetzbarkeit als Screeningverfahren für die in der Praxis derzeit am häufigsten vorkommenden Amphetamine, Amphetamin und MDMA (Ecstasy) verglichen. Sowohl die von OraSure Technologies Inc. als auch die von Cozart hergestellten Immunoassays zeigten bei Anwendung beider Tests in Kombination ihre Eignung als Screeningmethoden zur Vorauswahl potenziell positiver Serumproben. Der Cozart-Amphetamin-Test allein konnte darüber hinaus - im Gegensatz zum Test von OraSure Technologies Inc. - sowohl Amphetamin als auch „Ecstasy“ in relevanten Konzentrationen in den Proben erkennen, wenn der Test durch geringfügige Absenkung des Cutoff-Wertes für diesen Zweck optimiert wurde. Diese Fähigkeit erklärt sich durch die Anwesenheit gewisser Mengen des Metaboliten MDA nach „Ecstasy“-Aufnahme und die geringere Spezifität des Cozart-Amphetamin-Tests, die diesen Test zum Nachweis eines größeren Spektrums von Amphetaminabkömmlingen prädestiniert. Daher wurden die Kreuzreaktivitäten von 27 verschiedenen uns zugänglichen Amphetaminderivaten in der vorliegenden Arbeit mit diesem Test bestimmt. Hohe Kreuzreaktivitäten wiesen neben MDA insbesondere PMA, BDB, Phentermin und Etryptamin auf. Aber auch einige andere verwandte Substanzen zeigten eine ausreichende Kreuzreaktivität, um in hohen Konzentrationen, wie sie bei Intoxikationen auftreten, Hinweise auf ihre Anwesenheit geben zu können. Somit kann die Notwendigkeit einer weiterführenden

chromatographischen Untersuchung allein durch die Anwendung eines ELISA-Tests erkannt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine spezielle GC/MS-Spektrenbibliothek für Amphetamine mit mehr als hundert Einträgen erstellt, die auch andere für die jeweilige Substanz charakteristische Parameter, wie Molgewicht, Summenformel und Retentionsindex, enthält. Diese Bibliothek enthält die Spektren von Reinsubstanzen und bei der Aufarbeitung entstehende Artefakte, Acetyl- (AC), Trimethylsilyl- (TMS) sowie Pentadecafluorooctanoyl-Derivaten (PFO), soweit bei der Umsetzung erhältlich. Alle aufgenommenen Substanzspektren wurden anhand von Fragmentierungsschemata auf ihre Plausibilität geprüft. Diese Spektrenbibliothek eignet sich zur Identifizierung von Amphetaminen in Stoffproben und biologischem Material. Zu diesem Zweck wurde sie zwischenzeitlich in eine kommerzielle Datenbank integriert [31].

Weiterhin wurde eine quantitative GC/MS-Methode für den Nachweis und die Konzentrationsbestimmung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDMA und MDEA im Serum nach den Richtlinien der für die forensische Toxikologie maßgeblichen Fachgesellschaft (GTFCh) validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verwendete GC/MS-Methode sehr verlässliche und gut reproduzierbare Ergebnisse bei niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lieferte, die die Forderungen der GTFCh an eine routinemäßig eingesetzte quantitative Untersuchungsmethode erfüllt.

Für weitere ausgewählte Substanzen (Phentermin, Ephedrin, Cathin, Methylphenidat, BDB und MBDB) wurde die Linearität der Kalibration mit derselben Methode gezeigt, wobei zum Teil nicht auf die analogen deuterierten Standards zurückgegriffen werden konnte. Die Linearität war bei allen Substanzen ausreichend, jedoch zeigten die Untersuchungen den bedeutenden Vorteil von entsprechenden deuterierten Standards.

Der Hauptinhaltsstoff des Khat, das Cathinon, ließ sich mit der Standardmethode (Flüssig-Flüssig-Extraktion im Alkalischen) nicht extrahieren und wurde daher mit Hilfe einer Festphasenextraktion über eine Mischphase angereichert. Mittels dieser Extraktion und Derivatisierung mit PFOC ließ sich auch für Cathinon und seinen

Metaboliten Cathin eine zufriedenstellende Linearität der Kalibrierkurven erreichen. Allerdings gelang auch mit dieser Methode der gleichzeitige Nachweis von Norephedrin nicht, sodass hier weitere Untersuchungen wünschenswert wären.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Drogen- und Suchtbericht der Drogenbeauftragten der Bundesregierung, Bundesministerium für Gesundheit, Berlin (Mai 2005)
- [2] Grass H, Käferstein H, Sticht G
Konsum von Amphetamin, Methylenedioxyamphetaminen und Beigebrauch anderer Drogen (Köln 1991-1996)
Rechtsmedizin (1998): 51-54
- [3] Käferstein H, Sticht G
Vergleich der MTP-Immunoassays mit EMIT beim Screening von Blut auf Drogen
In: Pragst F, Anderjan R (Hrsg.): GTFCh-Symposium, Seite 165-172, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim (1999)
- [4] Kupiec T, DeCicco L, Spiehler V, Sneed G, Kemp Ph
Choice of an Elisa Assay for Screening Postmortem Blood for Amphetamine and/or Methamphetamine
J Anal Toxicol, 26 (2002): 513-518
- [5] Zhao H, Brenneisen R, Scholer A, McNally AJ, ElSohly MA, Murphy TP, Salamone SJ
Profiles of Urine Samples taken from Ecstasy Users at Rave Parties: Analysis by Immunoassays, HPLC and GC/MS
J Anal Toxicol, 25 (2001): 258-269
- [6] Spiehler VR, Collison IB, Sedgewick PR, Perez SL, Le SD, Farnin DA
Validation of an Automated Microplate Enzyme Immunoassay for Screening of Postmortem Blood for Drugs of Abuse
J Anal Toxicol, 22 (1998): 573-579

- [7] Logan BK
Amphetamines: An update on forensic issues
J Anal Toxicol, 25 (2001): 400-404
- [8] Helmlin H-J, Bracher K, Bourquin D, Vonlanthen D, Brenneisen R
Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS.
J Anal Toxicol 20 (1996): 517-520
- [9] Bogusz MJ, Kala M, Maier RD
Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC-APCI-MS or DAD.
J Anal Toxicol 21 (1997): 59-69
- [10] Sadeghipour F, Veuthey J-L
Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection.
J Chromatography A 787 (1997): 137-143
- [11] Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, De Letter EA, Van Calenbergh S, Lambert WE, De Leenheer AP
Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor and urine.
Clin Chemistry 46(12) (2000): 1968-1977
- [12] Al-Dirbashi OY, Kuroda N, Wada M, Takahashi M, Nakashima K
Quantification of methamphetamine, amphetamine and enantiomers by semi-micro column HPLC with fluorescence detection; applications on abusers' single hair analyses.
Biomed Chromatogr 14(5) (2000): 293-300

- [13] Weinmann W
Fast screening for drugs of abuse by solid-phase extraction combined with flow-injection ionspray-tandem mass spectrometry.
J Anal Toxicol 22 (1998): 319-328
- [14] Garofano L, Santoro M, Patri P, Guidugli F, Bollani T, Favretto D, Traldi P
Ion trap mass spectrometry for the characterisation of N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine and N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine, two widely distributed street drugs.
Rapid Commun Mass Spectrom 12 (1998): 779-782
- [15] Hensley D, Cody JT
Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS.
J Anal Toxicol 23 (1999): 518-523
- [16] Stout PR, Horn CK, Klette KL
Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in urine by solid-phase extraction and GC-MS: A method optimised for high-volume laboratories.
J Anal Toxicol 26 (2002): 253-261
- [17] Gentili S, Torresi A, Marsili R, Chiarotti M, Macchia T
Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B 780(1) (2002): 183-192
- [18] Kronstrand R, Ahlner J, Dizdar N, Larson G
Quantitative analysis of desmethylselegiline, methamphetamine, and amphetamine in hair and plasma from parkinson patients on long-term selegiline medication. J Anal Toxicol 27(3) (2003): 135-141

- [19] Käferstein H, Sticht G
Immunchemische und gaschromatographisch-massenspektrometrische Befunde im Blut bei Verdacht auf Drogenkonsum
Z. Rechtsmed (1998): 173-177
- [20] Forstehäuser D
Synthetische Drogen
Kriminalistik 8-9 (1993): 533-558
- [21] Logan BK, Fligner CL, Haddix T.
Cause and manner in death of fatalities involving methamphetamine
J Forensic Sci 43 (1998): 457-464
- [22] Tarbah F, Zweipfenning P, Pier S, Temme O, Daldrup T
Fatal intoxication with the amphetamine designer drug 4-MTA
Kongresshandbuch GFTCh Symposium April 2001: 143-148
- [23] Patal MM, Belson MG, Wright D, Lu H, Heninger M, Miller MA
Methylendioxyamphetamine (ecstasy)-related myocardial hypertrophy: an autopsy study
Resuscitation, Vol. 66: 197-202
- [24] Gygi MP, Gygi SP, Johnson M, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR.
Mechanism for tolerance to methamphetamine effects
Neuropharmacology 35 (1996): 751-757
- [25] Hatzidimitriou G, McCann UD, Ricaurte GA
Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with MDMA seven years previously: Factors influencing abnormal recovery.
J Neurosci 19 (1999): 5096-5107.

- [26] Valentine JL, Middleton R
GC-MS Identification of sympathomimetic amine
drugs in urine: rapid methodology applicable for emergency clinical
toxicology.
J Anal Toxicol, 24, April 2000: 211-220
- [27] Aebi B, Bernhard W.
Advances in the use of mass spectral libraries for forensic toxicology
J Anal Toxicol, 26 (2002): 149-156
- [28] Toennes SW, Kauert GF
Excretion and detection of cathinone, cathine and
phenylpropanolamine in urine after khat chewing
Clin Chem 48 (2002): 1715-1719
- [29] Sporkert F, Pragst F, Bachus R, Masuhr F, Harms L
Determination of cathinone, cathine and norephedrine in hair of Yemenite
khat chewers
Forensic Sci Int 133 (2003): 39-46
- [30] Gjerde H, Hasvold I, Pettersen G, Christophersen AS
Determination of Amphetamine and Methamphetamine in blood by
derivatization with perfluorooctanoyl chloride and gas
chromatography/mass spectrometry
J Anal Toxicol, 17 (1993): 65-68
- [31] Rösner P, Westphal F, Fritschi G, Junge Th
Mass spectra of designer drugs
Wiley-VCH, Weinheim 2007
- [32] Collison IB, Spiehler VR, Guluzian St, Sedgewick PR
Setting Cutoff Concentrations for immunoassays screening of postmortem
blood
J Forensic Sci, 43 (1998): 390-394

Für die sehr gute fachliche Unterstützung und die Geduld möchte ich mich bei Dr. G. Rochholz und Dr. F. Westphal, sowie Dr.H.W. Schütz und Prof. H.-J. Kaatsch bedanken. Besonderer Dank für die Unterstützung und Beratung bezüglich massenspektrometrischer Grundlagen geht an Dr. P. Rösner.

Für die Geduld und moralische Unterstützung danke ich meinen Eltern und Julia Friedlbinder.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Jon Schäfer,
geb. am 7.Juni 1974 in Berlin, ledig

Eltern: Jürgen Schäfer, geb. am 09.04.1948, selbst. Steuerberater
Gertrud Schäfer, geb. Klein, geb. am 24.11.1949, Kfm.-Angestellte

Schulbildung

Aug. 1980 - Juni 1984 Walter-Rathenau-Grundschule in Düsseldorf

Sept. 1984 - Juni 1993 Städt. Lessing-Gymnasium in Düsseldorf,
Abitur

Ersatzdienst

Aug. 1993 - Okt. 1994 Ersatzdienst im Neurologischen Therapie Zentrum
in Düsseldorf

Hochschulbildung

Okt. 1994 - Feb. 1998 Studium im Fach Informatik an der RWTH Aachen
mit der Ausrichtung Medizininformatik, Bewerbung bei der
ZVS um einen Studienplatz der Humanmedizin, Erwerb
von Scheinen der Humanmedizin

April 1998 - Okt. 2004 Studium der Humanmedizin an der Christian Albrecht
Universität Kiel

Okt. 2004 Abschluss des Studiums mit dem bestandenen
3. Staatsexamen und der ärztlichen Approbation

Berufserfahrung

Jan. 2005 - Nov. 2005 Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung der OsteMed
Klinik Bremervörde

Seit März 2006 Assitenzarzt der orthopädischen Abteilung III der
Ostseeklinik Damp

Fortbildungen

Juni 2005/2006	Fortbildung Strahlenschutz in der Röntgendiagnostik
November 2006	Kurs Rettungsmedizin
April/Mai 2007	Elastisches Taping
November 2007	Manuelle Medizin Kurs I
Februar 2008	Manuelle Medizin Kurs II

Veröffentlichungen

Rochholz G, Schäfer J, Westphal F, Franzelius C (2006)
Kreuzreaktivitäten des Cozart-Amphetamin-Mikrotiterplatten-Tests für
Amphetaminderivate und verwandte Substanzen und ihre Bedeutung für die
Praxis.
Rechtsmedizin 16(4): 272

Westphal F, Franzelius C, Schäfer J, Schütz HW, Rochholz G
Development of a validated method for the simultaneous determination of
amphetamine, methamphetamine and methylenedioxyamphetamines (MDA,
MDMA, MDEA) in serum by GC-MS after derivatisation with perfluorooctanyl
chloride
Accred Qual Assur 12: 335-342

Kiel, 22. Oktober 2009

Anhang

A. Immunoassays

Ergebnisse Amphetamin-Fälle in ng/mL

GC/MS Amph.	Amphetamin-Tests		Methamphetamin-Tests	
	Cozart	OTI	Cozart	OTI
0	1,1	0	0,5	0
0	5,6	0	0	0
0	6,6	0	3,88	0
0	8,05	0	0	0
0	8,05	0	4,63	0
0	8,25	0	15,88	0
0	10,7	0	11,63	0
0	10,85	11	26,25	0
0	11,2	50	5,75	6,83
0	11,8	4	1,5	10,17
0	12,25		11,75	
0	16,7	0	22,88	0
15,3	24,45	0	0	0
28,55	42,33	60,5	0	0
32,14	134,21	62	16,13	0
68,08	85,33	83	0	0
77,91	101	136,59	7,63	0
103,87	94,33	487,8	18,25	0
109,04	98,67	136,59	4,25	0
114,31	79	110,5	0	0
119,52	101	282,93	1,88	0
126,01	81,33	282,93	0	1,33
162,08	234,21	263,41	9,25	0
187,43	323,68	351,22	7,13	9,67
232,03	100	204,88	11	0
274,59	384,21	497,56	13,88	18,5
321,3	481,58	409,76	5,63	9,5

Ergebnisse "Ecstasy"-Fälle in ng/mL

Amphetamin-Tests Methamphetamin-Tests

GC/MS MDMA	Cozart	OTI	Cozart	OTI
0	1,1	0	0,5	0
0	5,6	0	0	0
0	6,6	0	3,88	0
0	8,05	0	0	0,67
0	8,05	0	4,63	2,67
0	8,25	0	15,88	0
0	10,7	0	11,63	12,5
0	10,85	11	26,25	0
0	11,2	50	5,75	6,83
0	11,8	4	1,5	10,17
0	12,25		11,75	
0	16,7	0	22,88	0
42,45	24,6	0	17,25	54,17
60,98	50,67	41	52,25	76,09
81,12	24,95	24,5	94,75	86,96
91,7	85	83	53	191,3
112,35	50,33	24,75	71	330,43
150,43	28,33	0	88	82,61
163,75	81,67	45,5	206,17	260,87
164,68	60,67	0	79	42,33
196,09	76	15,75	297,34	47,83
206,22	213,16	54,5	329,59	556,52
235,77	83,33	75,5	109,4	504,35
237,88	80,33	107	230,01	521,74
248,04	97	78	274,89	45
261,16	77	71	272,09	573,91
270,13	47,67	36,25	89,25	504,35
274,92	168,42	73,5	328,19	486,96
328,38	96,33	100,5	309,96	504,35
337,78	144,74	94	371,67	434,78
477,3	118,42	73	427,77	486,96
514,3	73,67	76,5	332,4	573,91
616,74	231,16	98	405,33	521,74
927,3	90	351,22	272,09	626,09

Ergebnisse Mischfälle in ng/mL

GC/MS		Amphetamin-Tests		Methamphetamin-Tests	
GC/MS Amph.	GC/MS MDMA	Cozart Amp.	OTI Amph.	Cozart Met.	OTI Meth.
0	0	1,1	0	0,5	0
0	0	5,6	0	0	0
0	0	6,6	0	3,88	0
0	0	8,05	0	-3,5	0,67
0	0	8,05	0	4,63	2,67
0	0	8,25	0	15,88	0
0	0	10,7	0	11,63	12,5
0	0	10,85	11	26,25	0
0	0	11,2	50	5,75	6,83
0	0	11,8	4	1,5	10,17
0	0	12,25		11,75	
0	0	16,7	0	22,88	0
15,69	32,23	23,8	12,5	41	55
40,12	28,14	75	55,25	24,5	42,67
21,65	67,16	72,33	50,25	40,5	100
10,9	83,2	61	48	23,5	42,67
89,28	33,72	74	80,5	17,88	55,17
5	149,7	96,67	49,5	175,32	400
141,38	26,46	101	312,2	4,38	52,33
15,07	165,78	74,67	53,25	111,57	556,52
47,23	134,32	71	100,5	97	504,35
135,86	66,7	99,33	321,95	56,75	139,13
9,3	206,7	113,16	48,25	319,78	452,17
64,22	167,38	173,68	99,5	97,25	46
21,32	267,78	94,33	102,5	238,43	539,13
19	287,41	223,68	95,5	270,69	591,3
83,18	232,25	97	321,95	112,5	382,61
39,7	281,9	210,53	110	270,69	521,74
35,03	321,6	98	49,25	291,73	400
118,05	242,77	89,33	111	185,13	434,78
87,93	278,77	142,11	175,61	123,42	469,57
18,54	356,39	91,67	107,32	235,62	47,33
67,1	326,4	181,58	282,93	326,79	486,96
14,56	438,88	289,47	156,1	513,32	469,57
137,77	326,56	323,68	312,2	260,87	539,13
59,74	439,52	95,33	102	377,28	486,96
20,24	492,66	90,33	98	318,37	539,13
25,82	489,15	226,32	263,41	343,62	521,74
38,32	500,88	236,84	234,15	402,52	139,13
41,8	503,02	436,84	195,12	461,43	608,7
51,05	504,66	155,26	292,68	359,05	539,13
7,1	678,9	85	100	497,9	539,13
366,62	373,18	463,16	429,27	367,46	591,3

B. GC-MS

Temperaturprogramme

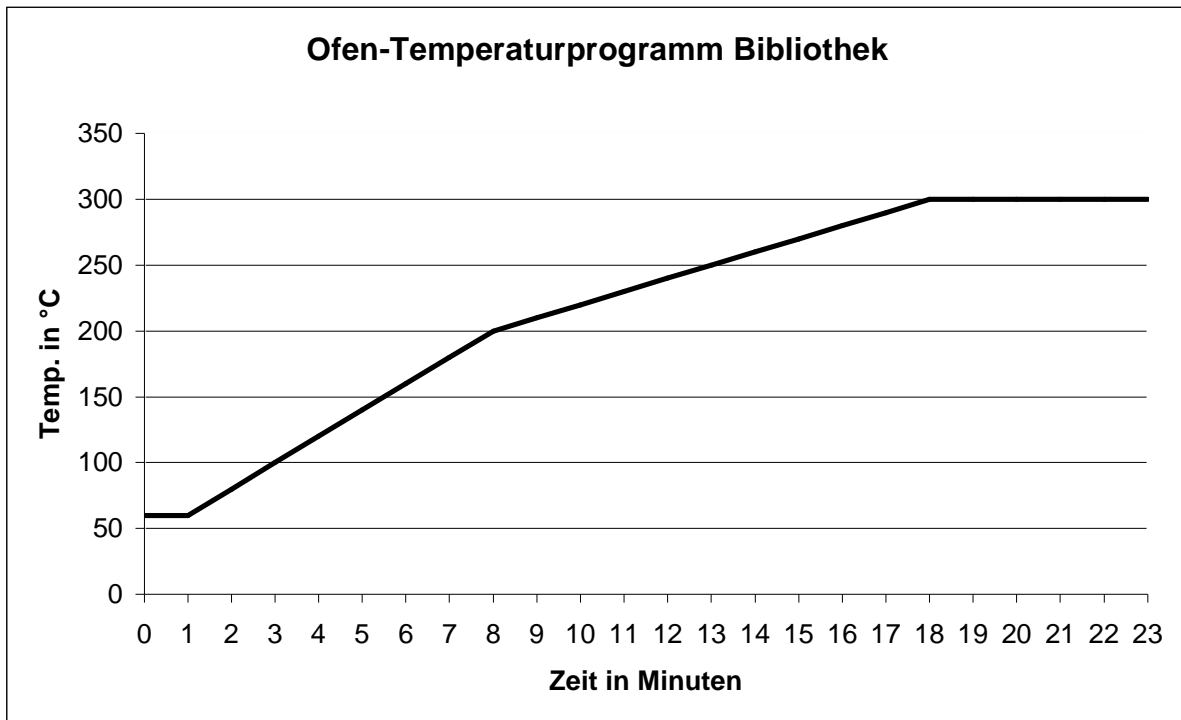


Abbildung 1 Temperatursteuerung des GC-Ofens für die Spektrenbibliothek (Methoden: schue2.m, ac2.m, schaefer.m, schaefer80.m)

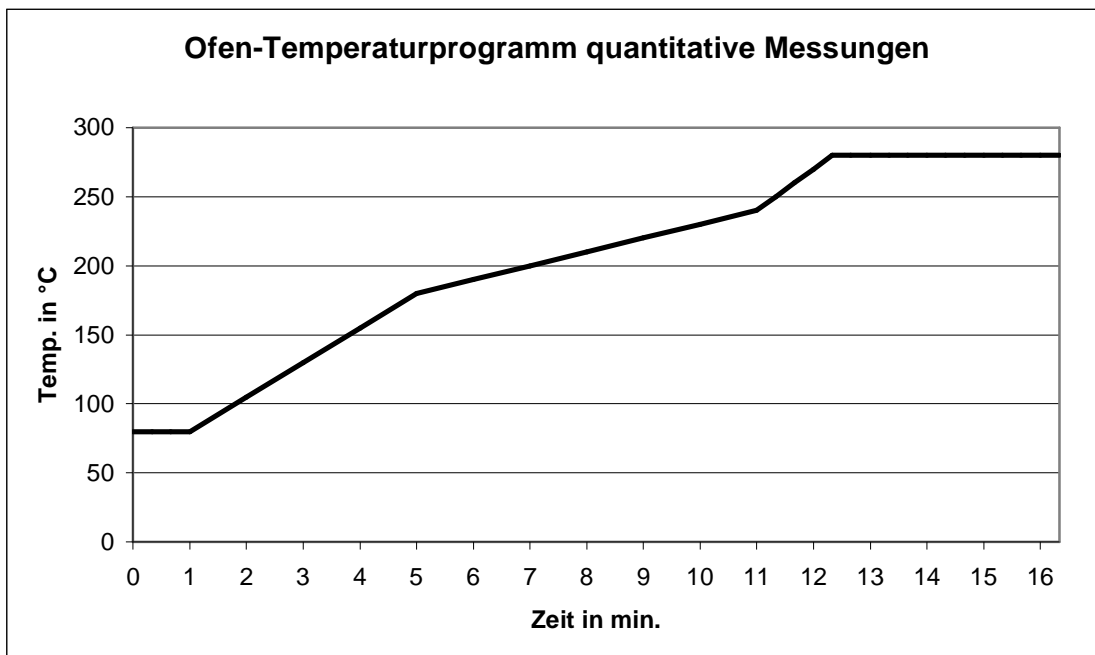


Abbildung 2 Temperatursteuerung des GC-Ofens für quantitative Bestimmungen (Methoden: schtd3k.m, schacath.m, schtd3ka.)

Validierung

Formeln

Wiederholpräzision

- Berechnung der Wiederholvarianz

$$s_r^2 = MS_{wg}$$

s_r^2 Wiederholvarianz

MS_{wg} Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppe

- Berechnung der Wiederholpräzision aus der Wiederholvarianz

$$RSD_r [\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100 = \frac{\sqrt{MS_{wg}}}{\bar{x}} \cdot 100$$

RSD_r Wiederholpräzision

s_r^2 Wiederholvarianz

\bar{x} Mittelwert aller Bestimmungen

MS_{wg} Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppe

Tagesverschiedene Laborpräzision

- Berechnung der Varianz zwischen den Tagen

$$s_t^2 = \frac{MS_{bg} - MS_{wg}}{n}$$

s_t^2 Varianz zwischen den Tagen

MS_{bg} Mittleres Abweichungsquadrat zwischen den Gruppen

MS_{wg} Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen

n Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag

- Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision

$$RSD_{(t)}[\%] = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100$$

$RSD_{(t)}$ tagesverschiedene Varianz

s_t^2 Varianz zwischen den Tagen

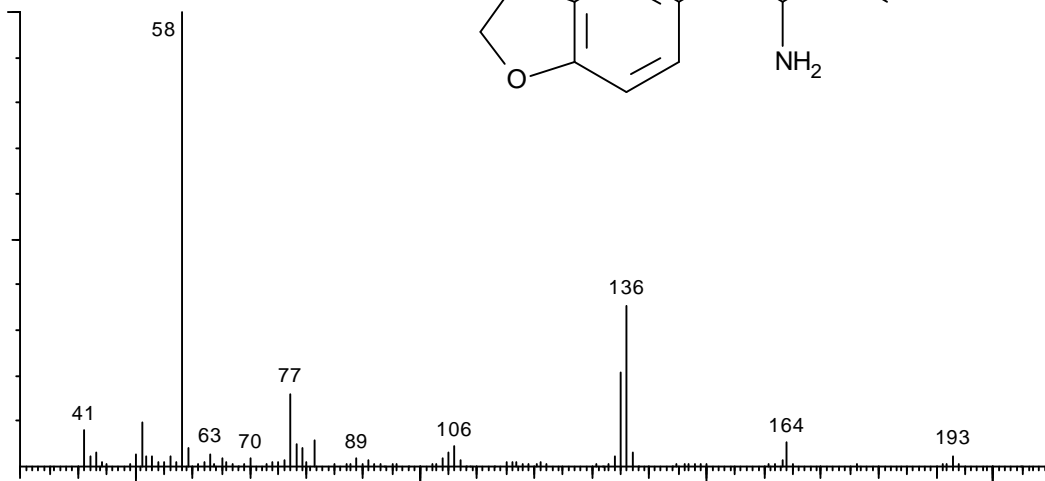
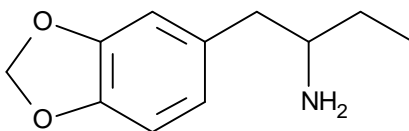
s_r^2 Wiederholvarianz

\bar{x} Mittelwert aller Bestimmungen

Underivatisierte Spektren

BDB

Benzodioxolbutamin



MW:193,24564

MM:193,11028

$C_{11}H_{15}NO_2$

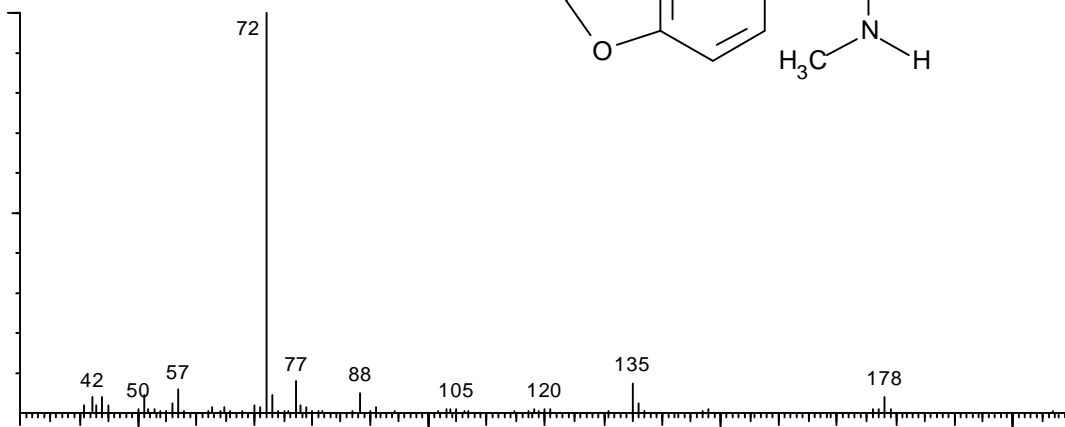
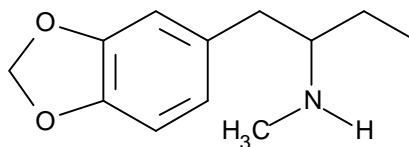
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

MBDB

Methyl-benzodioxolbutamin



MW:207,27252

MM:207,12593

$C_{12}H_{17}NO_2$

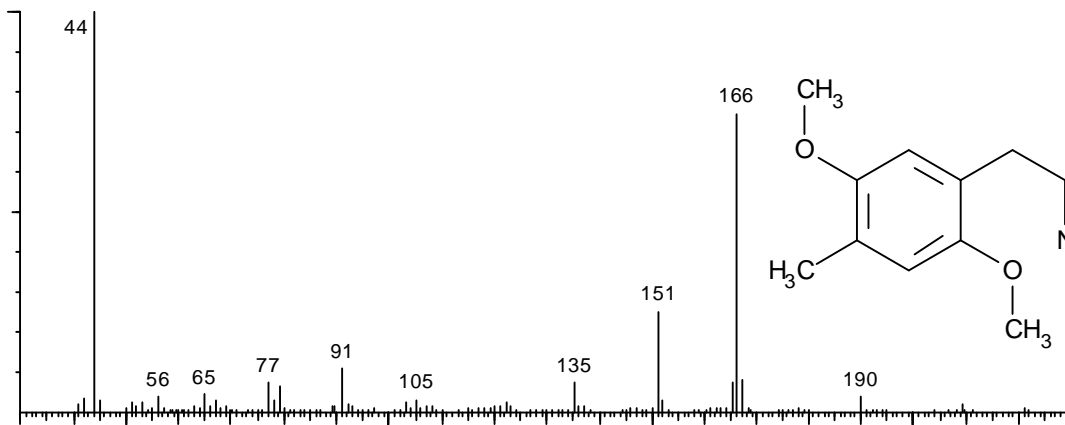
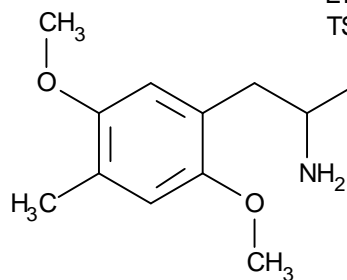
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOM

4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin



MW:209,28840

MM:209,14158

$C_{12}H_{19}NO_2$

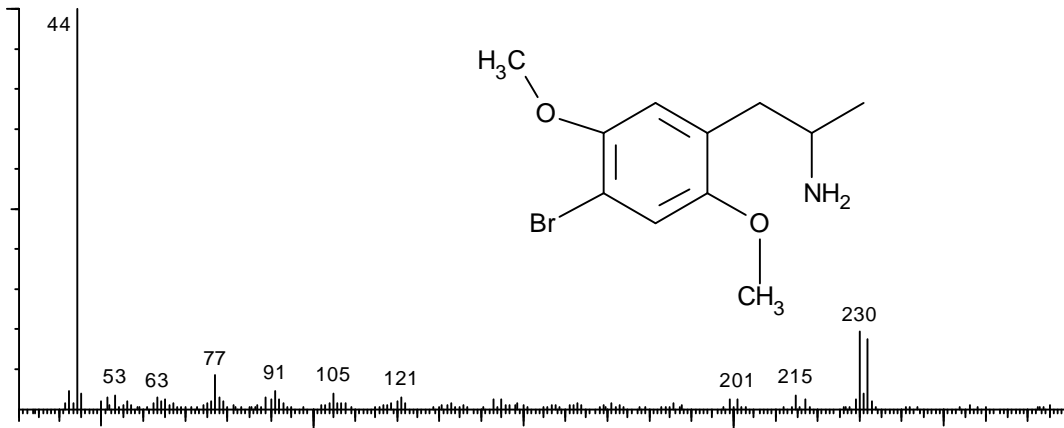
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOB

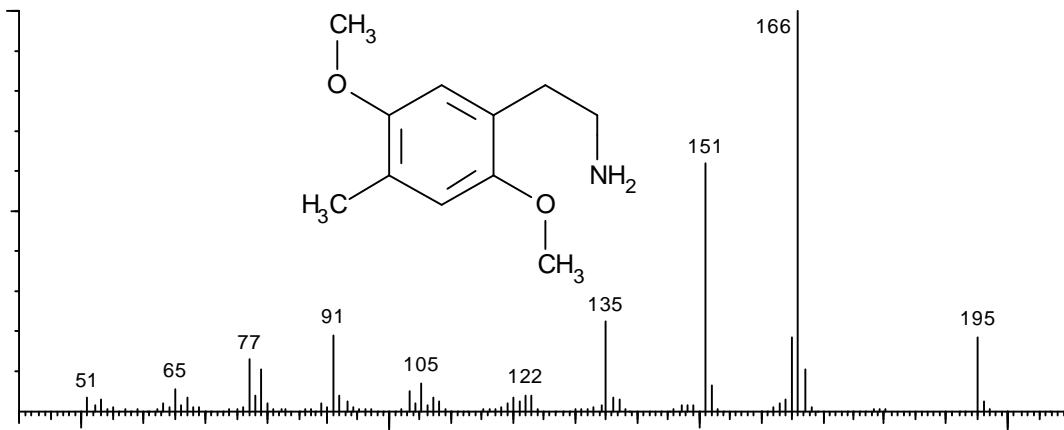
4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin



MW:274,15758
MM:273,03644
C₁₁H₁₆BrNO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

2,5-Dimethoxy-4methylphenethylamin

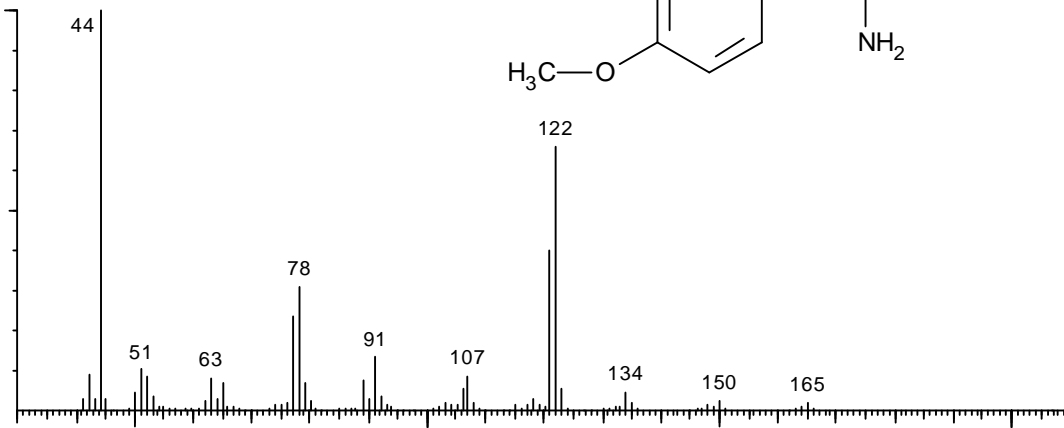


MW:195,26152
MM:195,12593
C₁₁H₁₇NO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

PMA

4-Methoxyamphetamin



MW:165,23524
MM:165,11536
C₁₀H₁₅NO

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

BDMPEA intermediate 2

2,5-Dimethoxyphenethylamin

MW:181,23464

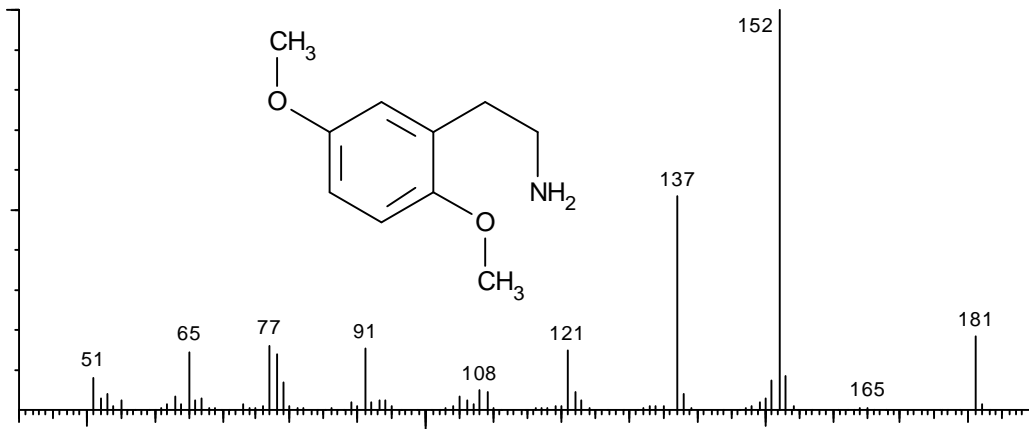
MM:181,11028

$C_{10}H_{15}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



2,4,5-Trimethoxyamphetamin

MW:225,28780

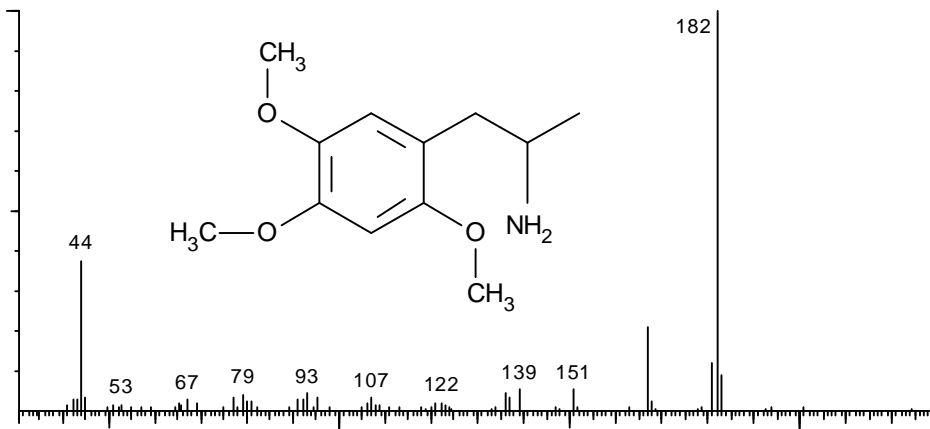
MM:225,13649

$C_{12}H_{19}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



2,4,6-Trimethoxyamphetamin

MW:225,28780

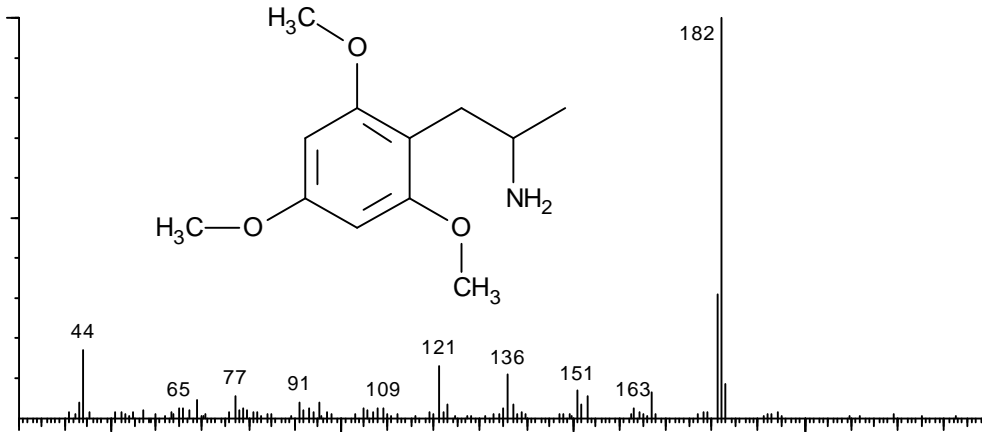
MM:225,13649

$C_{12}H_{19}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



N-Methyl-4-methoxyamphetamin

MW:179,26212

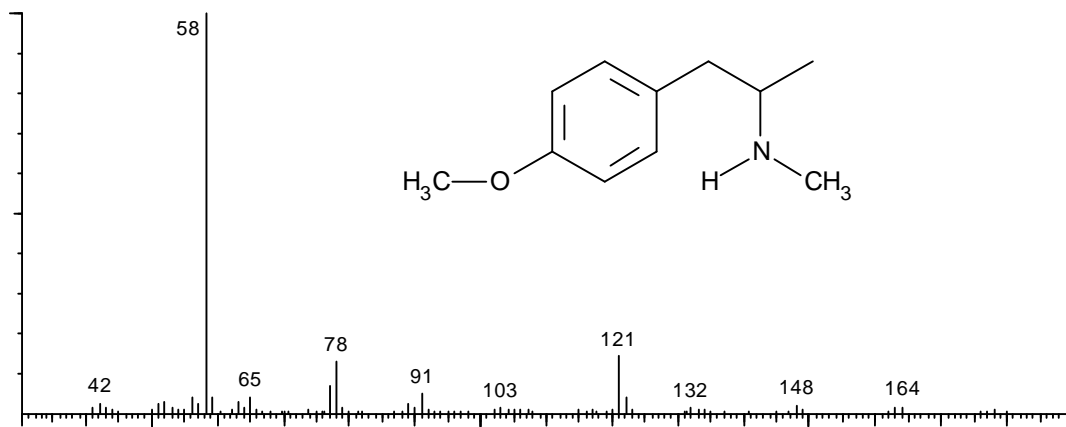
MM:179,13101

C₁₁H₁₇NO

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



BDMPEA

2,5-Dimethoxy-4-bromphenethylamin

MW:260,13070

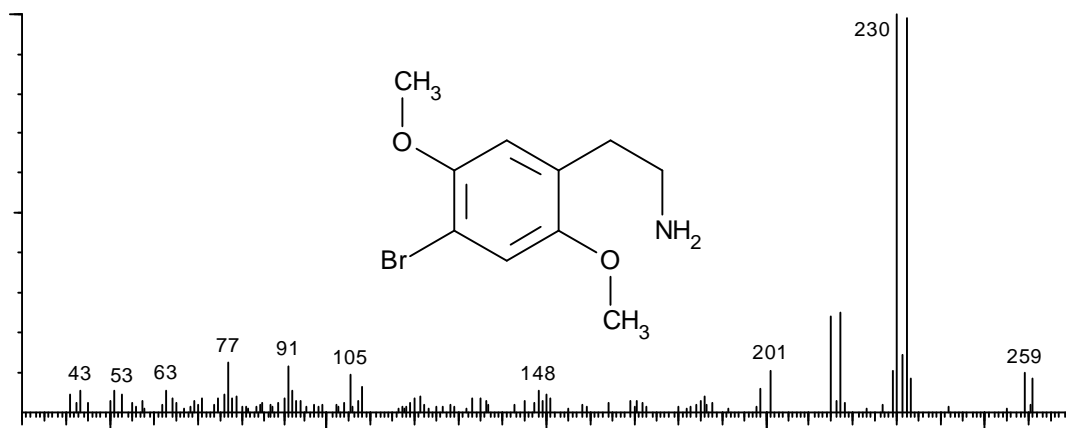
MM:259,02079

C₁₀H₁₄BrNO₂

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



N,N-Diethyltryptamin

MW:216,32628

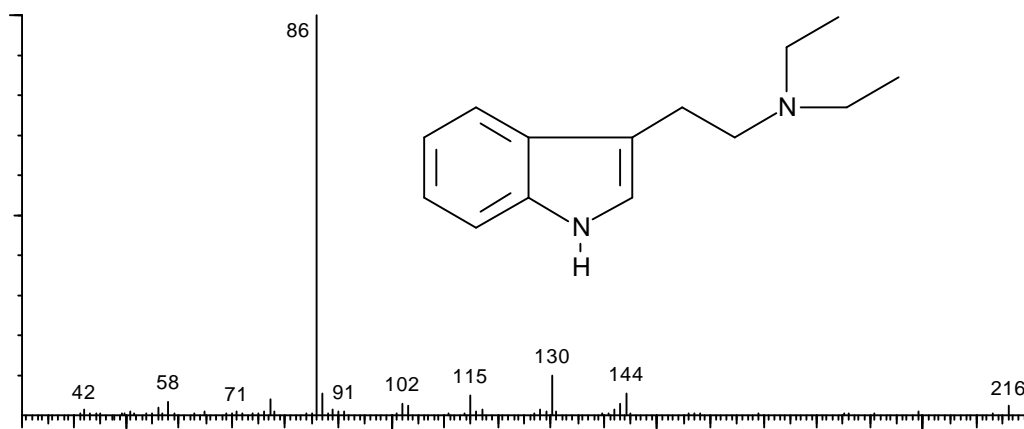
MM:216,16265

C₁₄H₂₀N₂

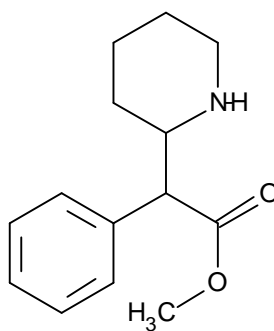
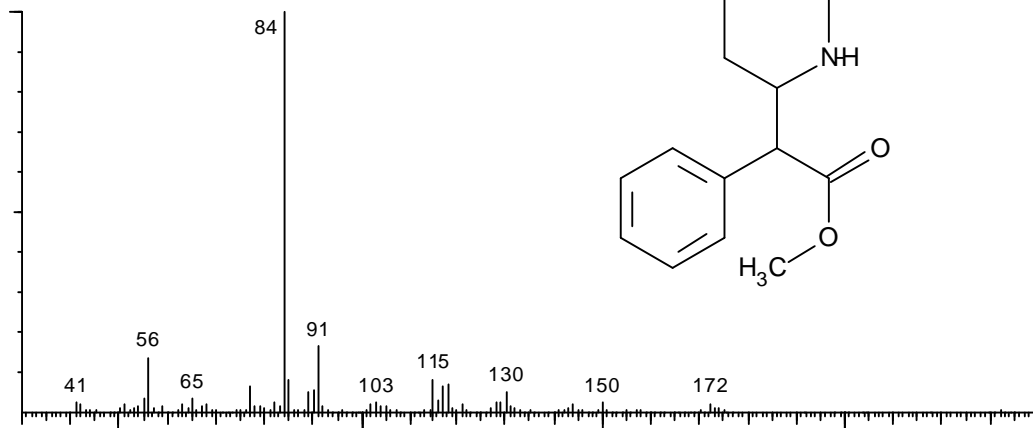
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



Methylphenidat



MW:233,31040

MM:233,14158

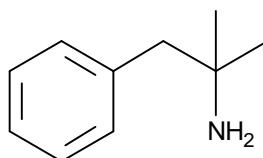
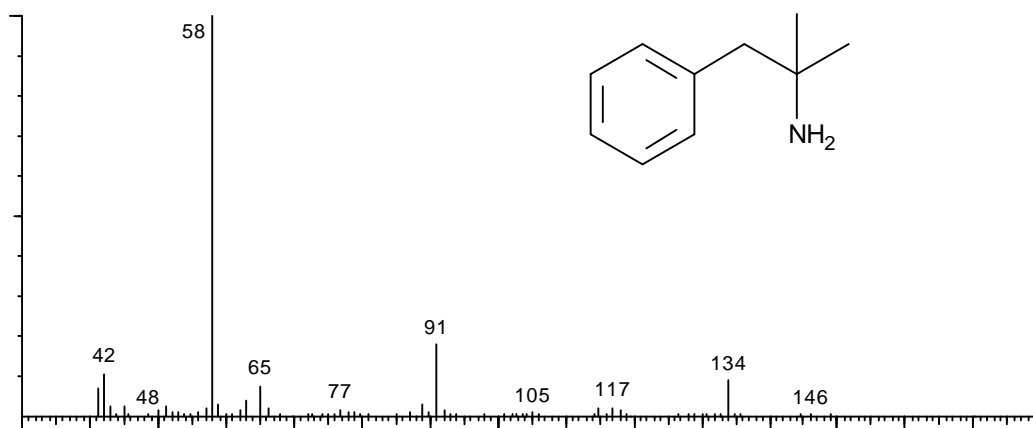
$C_{14}H_{19}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Phentermin



MW:149,23584

MM:149,12045

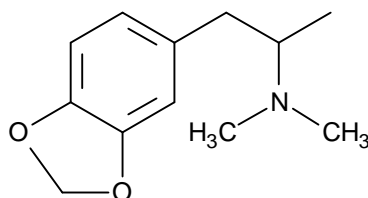
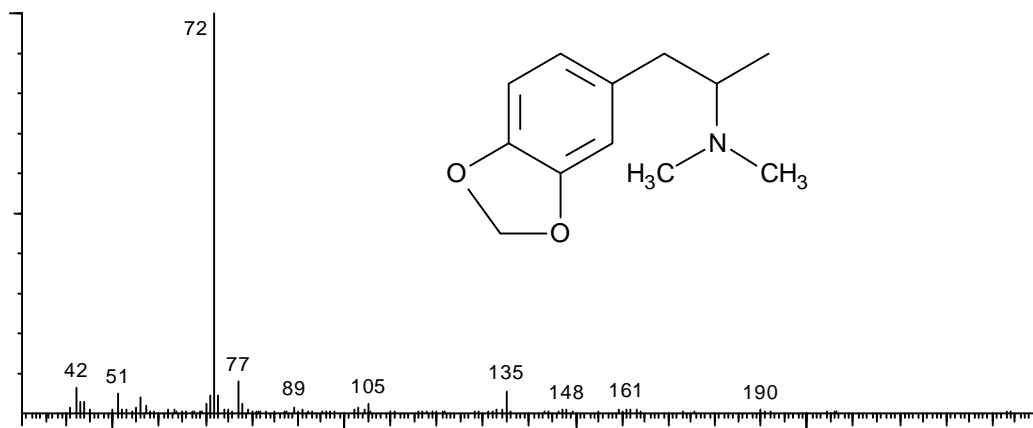
$C_{10}H_{15}N$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

N,N-Dimethyl-3,4-methylenedioxy-amphetamin



MW:207,27252

MM:207,12593

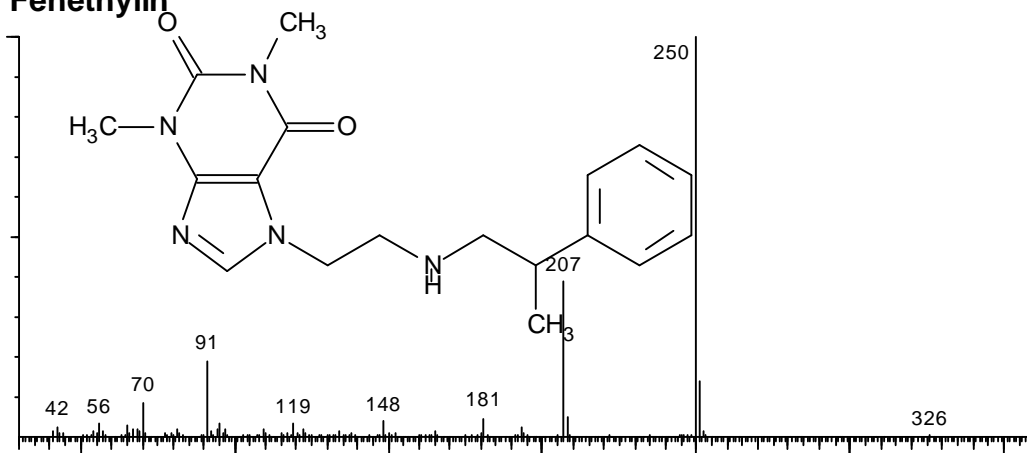
$C_{12}H_{17}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Fenethylin



MW:341,41312

MM:341,18518

$C_{18}H_{23}N_5O_2$

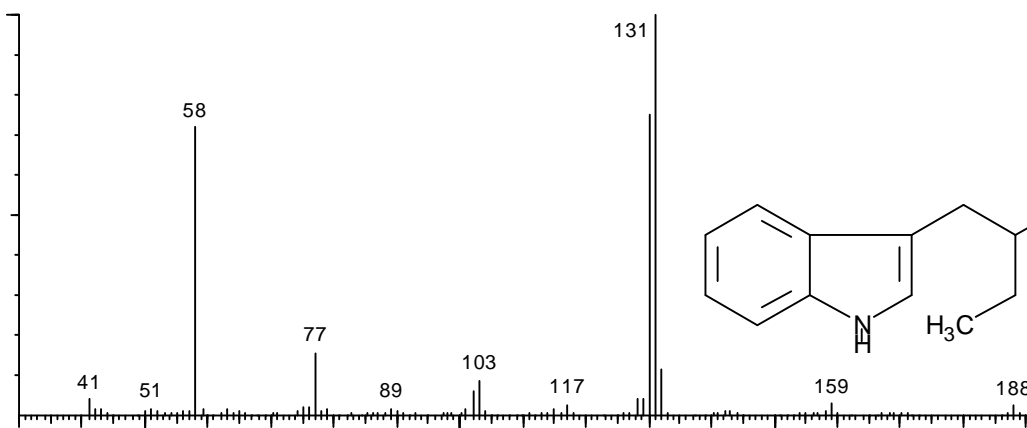
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Etryptamin

Ethyltryptamin



MW:188,27252

MM:188,13135

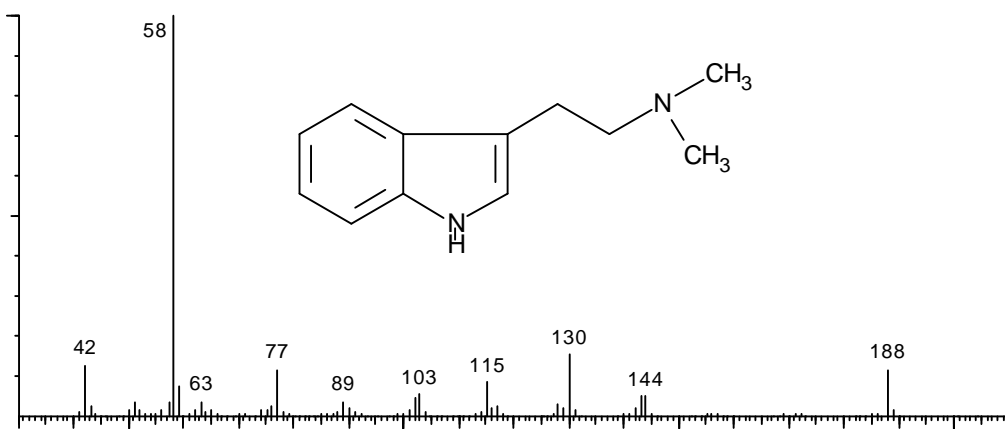
$C_{12}H_{16}N_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

N,N-Dimethyltryptamin



MW:188,27252

MM:188,13135

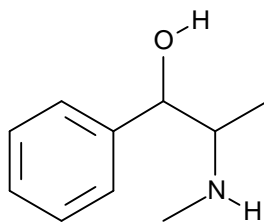
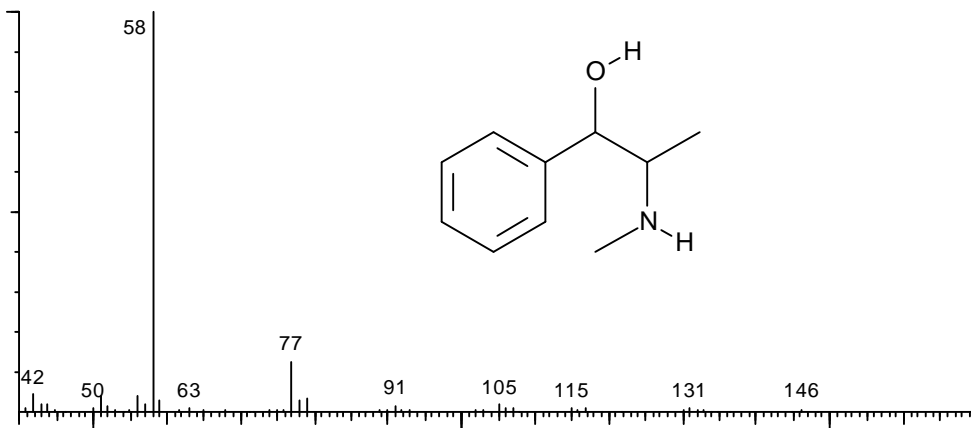
$C_{12}H_{16}N_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Ephedrin



MW:165,23524

MM:165,11536

C₁₀H₁₅NO

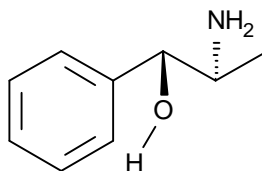
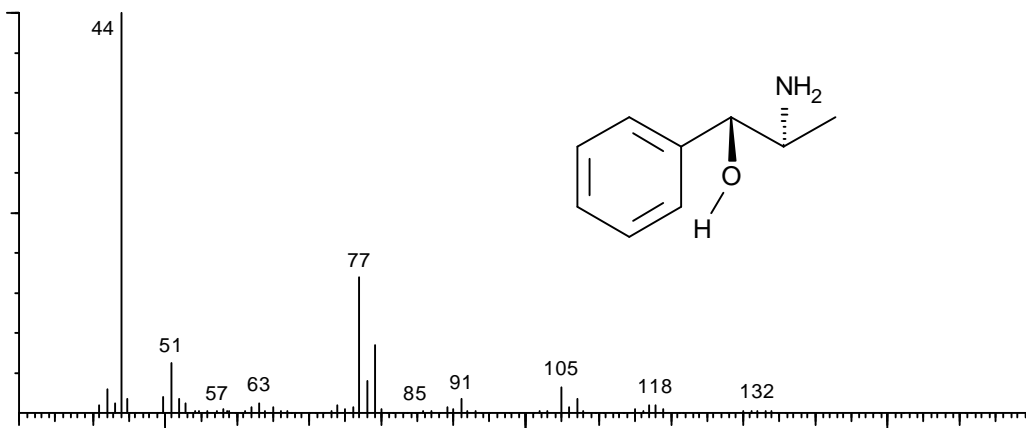
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Cathin

Norpseudoephedrin



MW:149,19248

MM:149,08406

C₉H₁₁NO

GC/MS

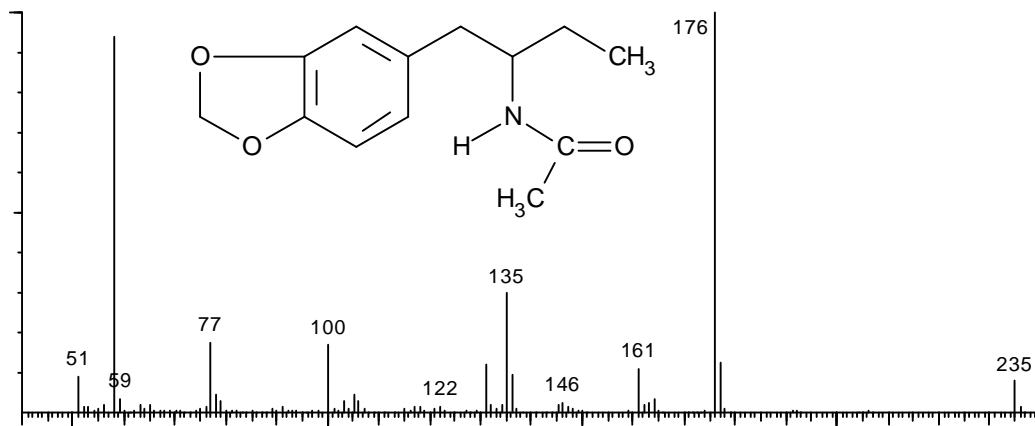
EI 70 eV

TSQ 70

Acetylierte Spektren

BDB AC

Benzodioxolbutamin acetyliert



MW:235,28292

MM:235,12084

C₁₃H₁₇NO₃

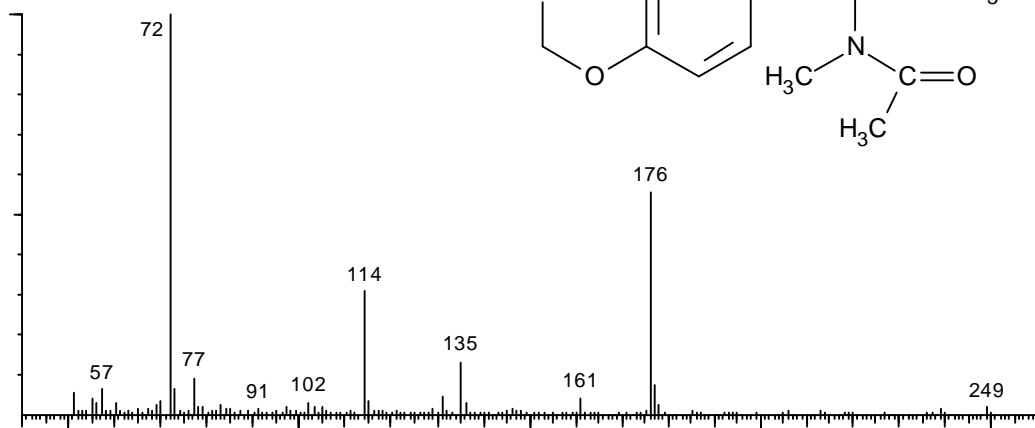
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

MBDB AC

Methyl-benzodioxolbutamin acetyliert



MW:249,30980

MM:249,13649

C₁₄H₁₉NO₃

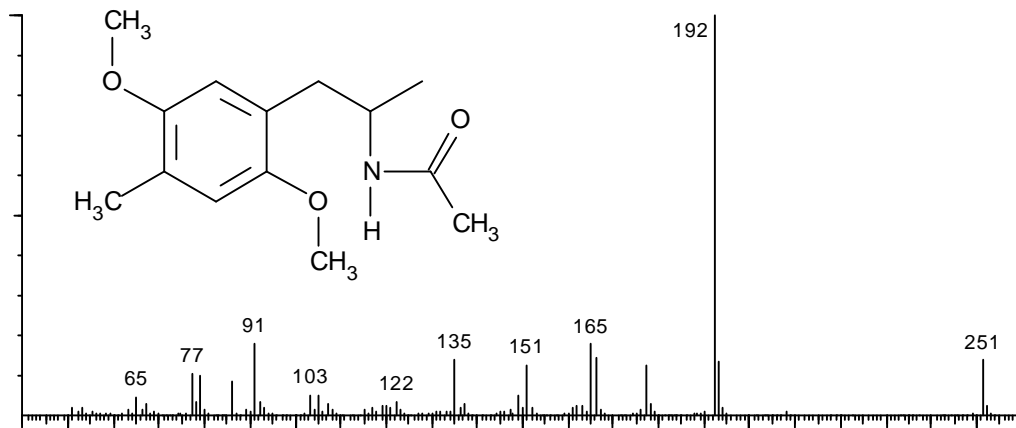
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOM AC

4-Methyl-2,5-methoxyamphetamin acetyliert



MW:251,32568

MM:251,15214

C₁₄H₂₁NO₃

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOB AC

4-Brom-2,5-dimethoxyamphetamin

MW:316,19486

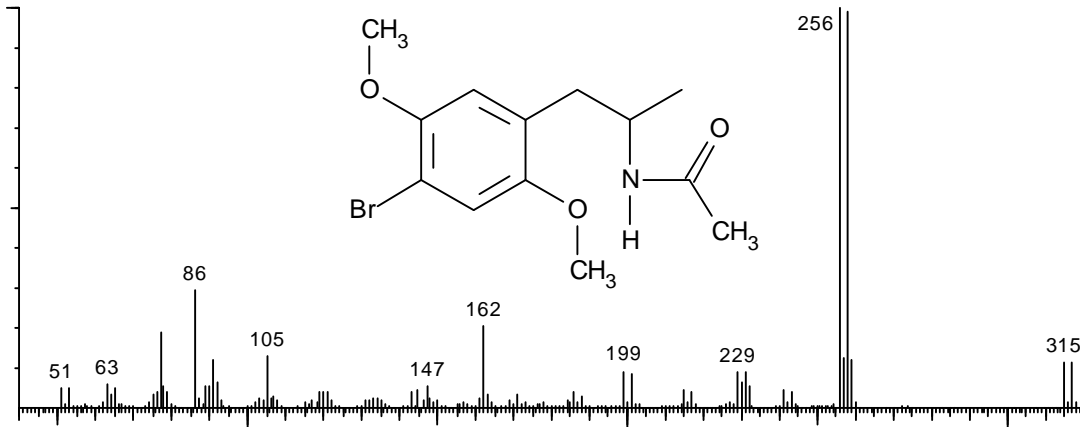
MM:315,04700

$C_{13}H_{18}BrNO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



4-Methyl-2,5-dimethoxyphenethylamin AC

MW:237,29880

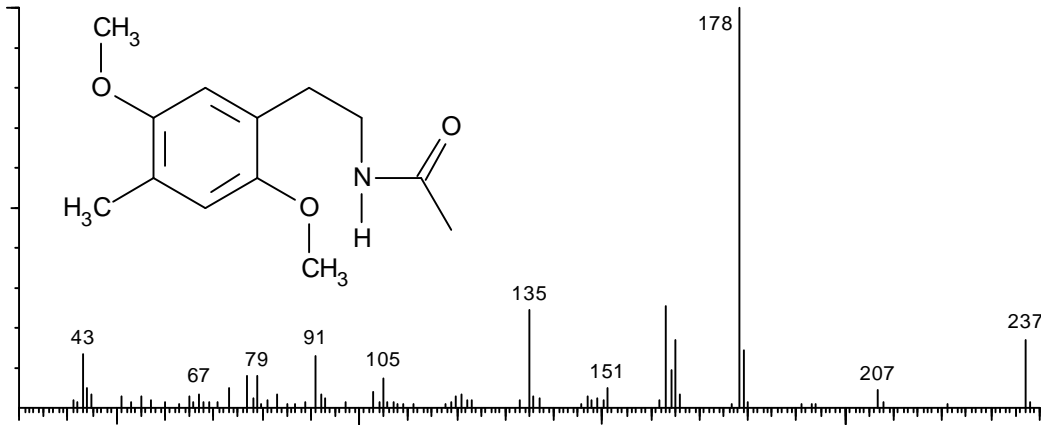
MM:237,13649

$C_{13}H_{19}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



PMA AC

4-Methoxyamphetamin acetyliert

MW:207,27252

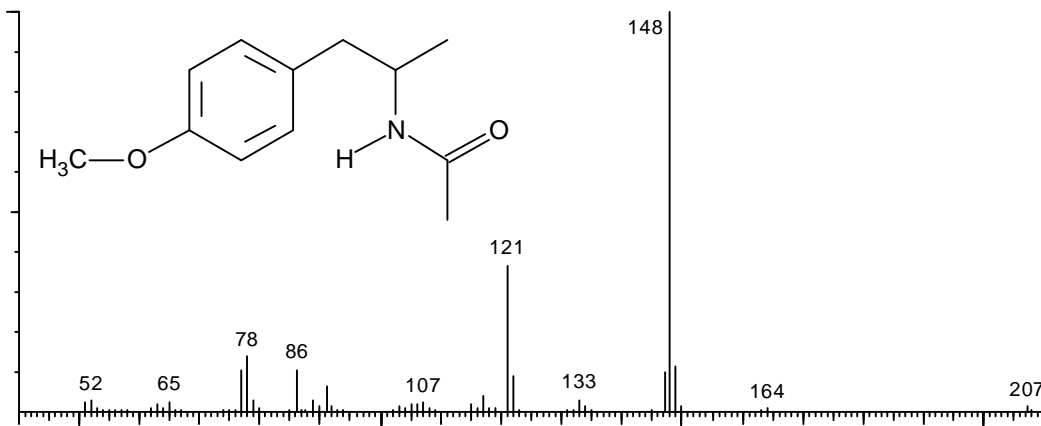
MM:207,12593

$C_{12}H_{17}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



2,5-Dimethoxyphenethylamin AC

MW:223,27192

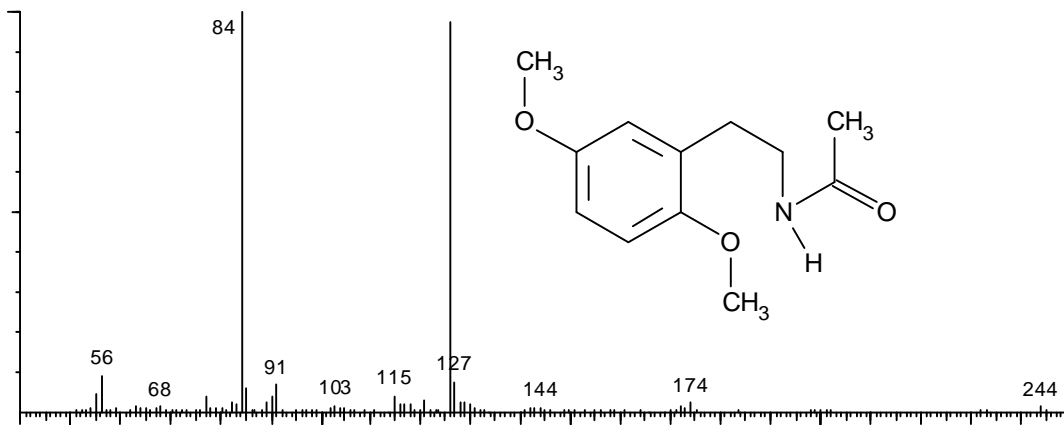
MM:223,12084

$C_{12}H_{17}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



2,4,5-Trimethoxyamphetamin AC

MW:267,32508

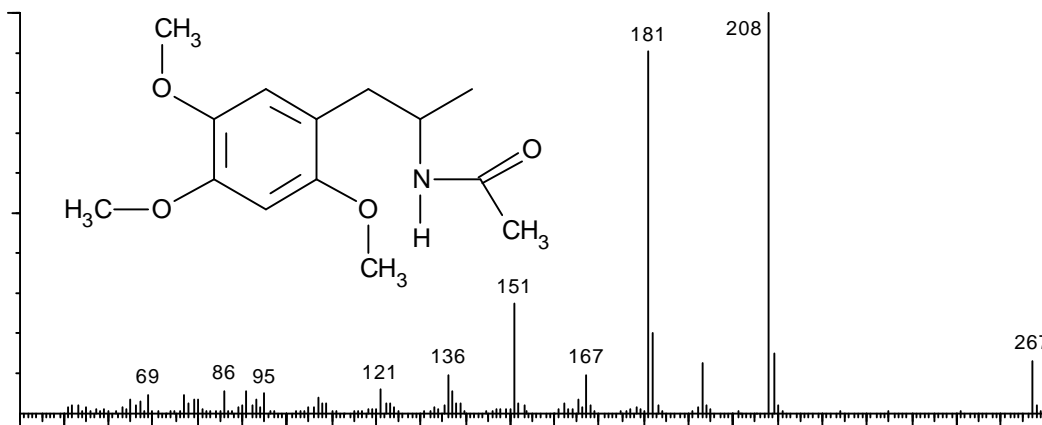
MM:267,14706

$C_{14}H_{21}NO_4$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



2,4,6-Trimethoxyamphetamin AC

MW:267,32508

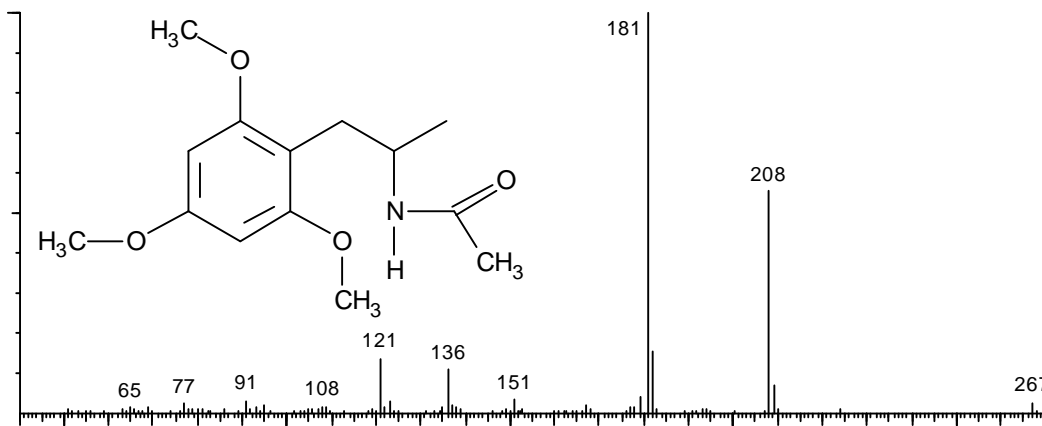
MM:267,14706

$C_{14}H_{21}NO_4$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



N-Methyl-4-methoxyamphetamin AC

MW:221,29940

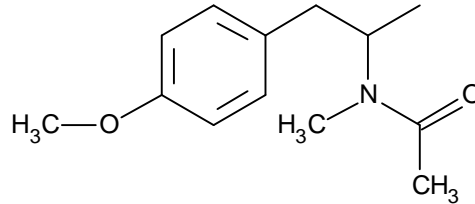
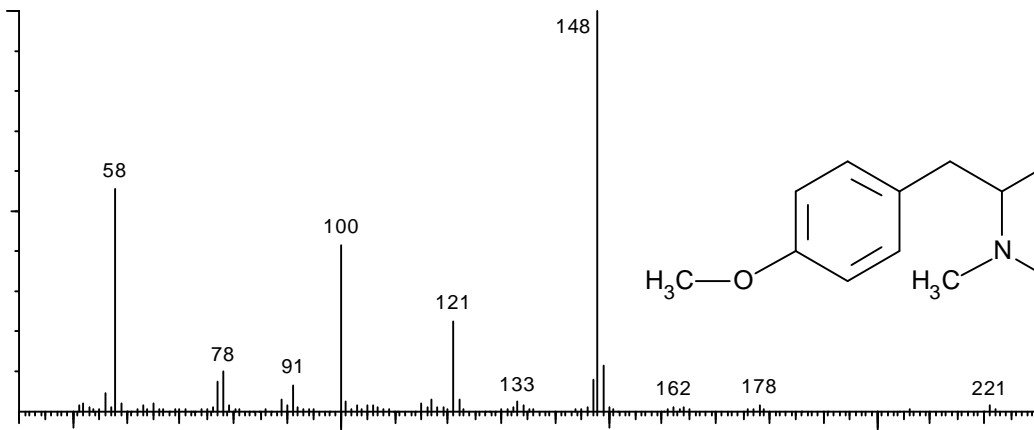
MM:221,14158

$C_{13}H_{19}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



BDMPEA AC

2,5-Dimethoxy-4-bromphenethylamin acetyliert

MW:302,16798

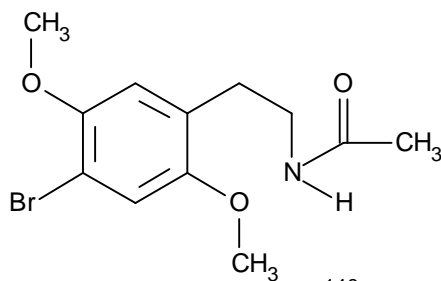
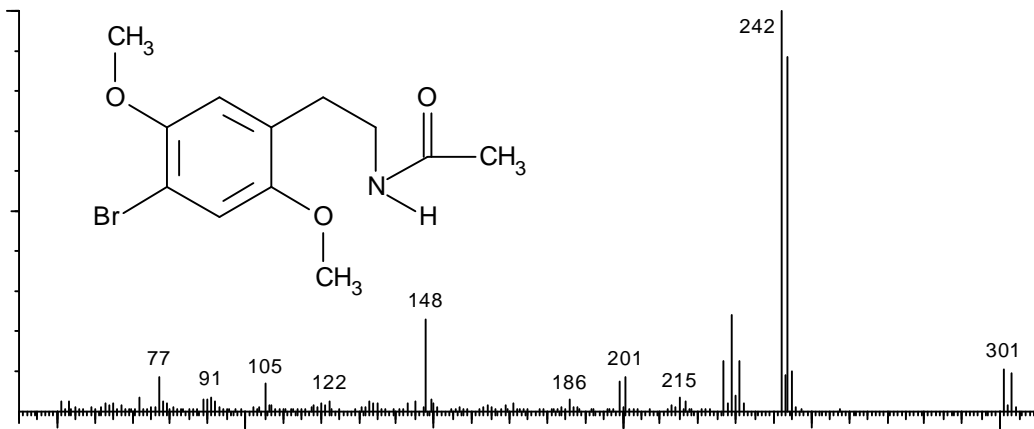
MM:301,03135

$C_{12}H_{16}BrNO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



Methylphenidat AC

MW:275,34768

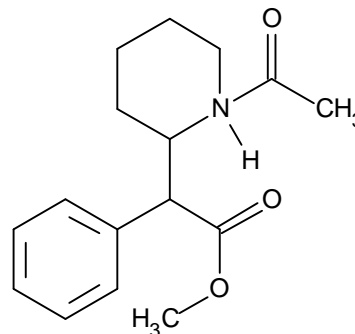
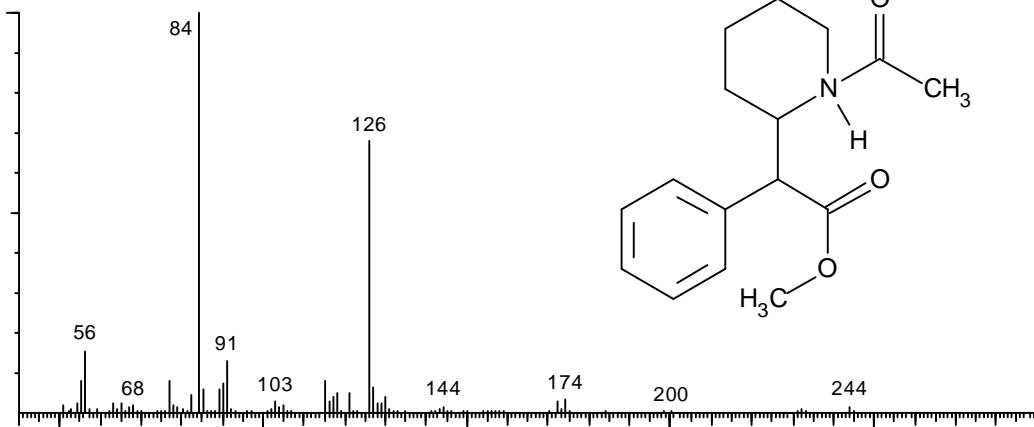
MM:275,15214

$C_{16}H_{21}NO_3$

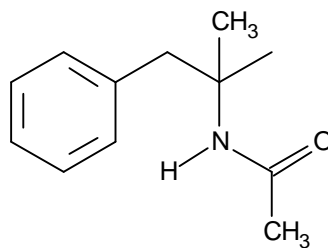
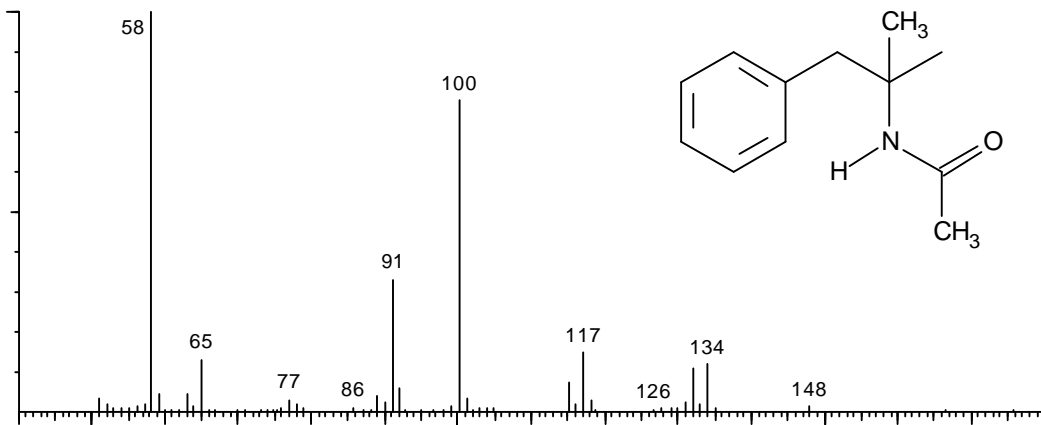
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



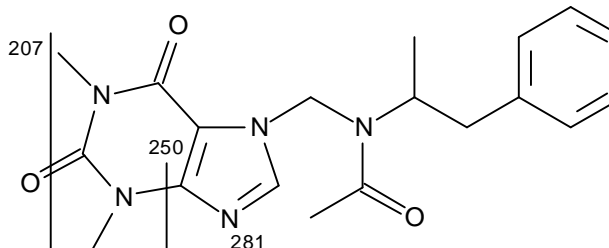
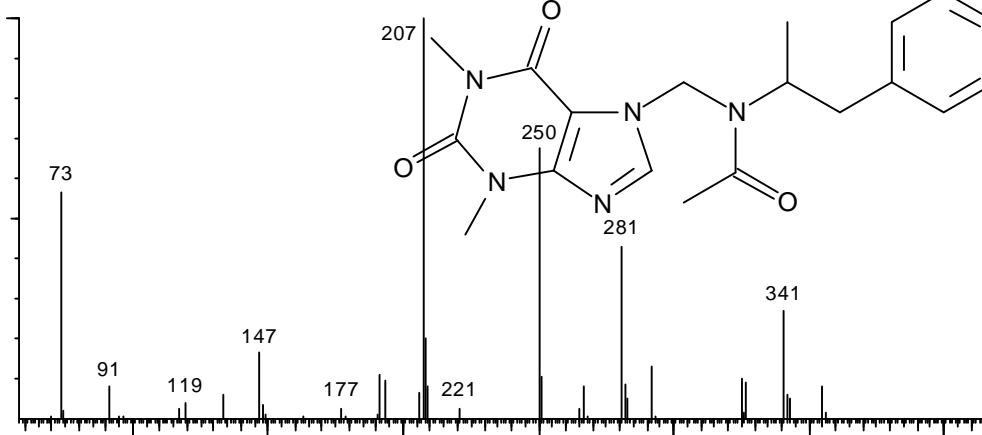
Phentermin AC



MW:191,27312
MM:191,13101
C₁₂H₁₇NO

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Fenethylin AC

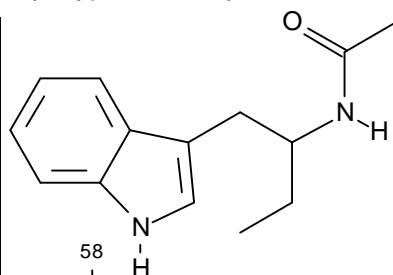
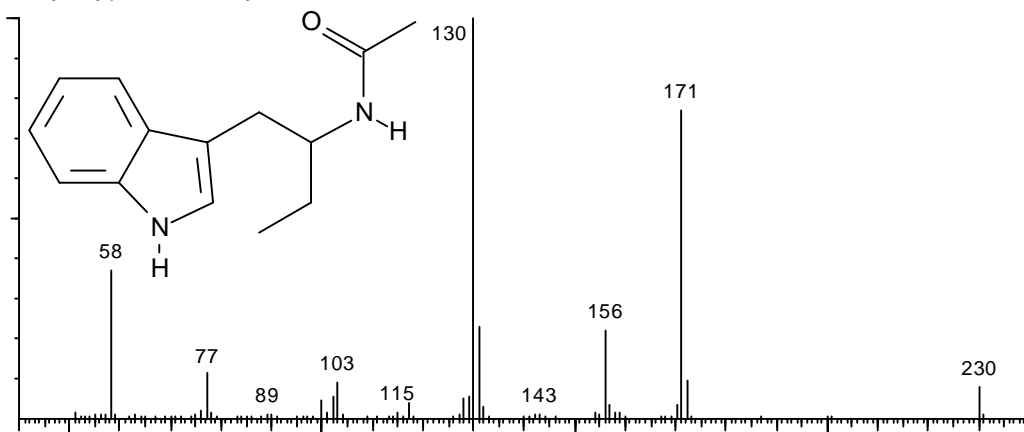


MW:383,45040
MM:383,19574
C₂₀H₂₅N₅O₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Etryptamin AC

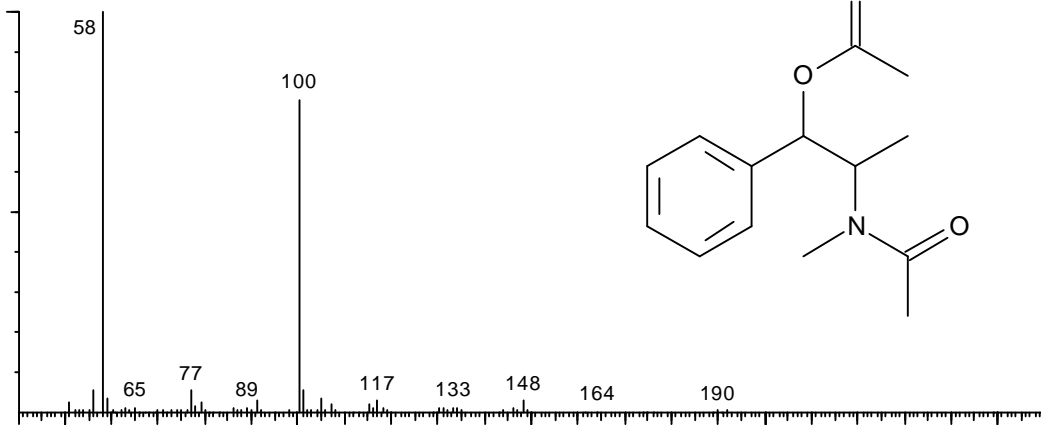
Ethyl-tryptamin acetyliert



MW:232,30246
MM:232,13375
C₁₄H₁₈NO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

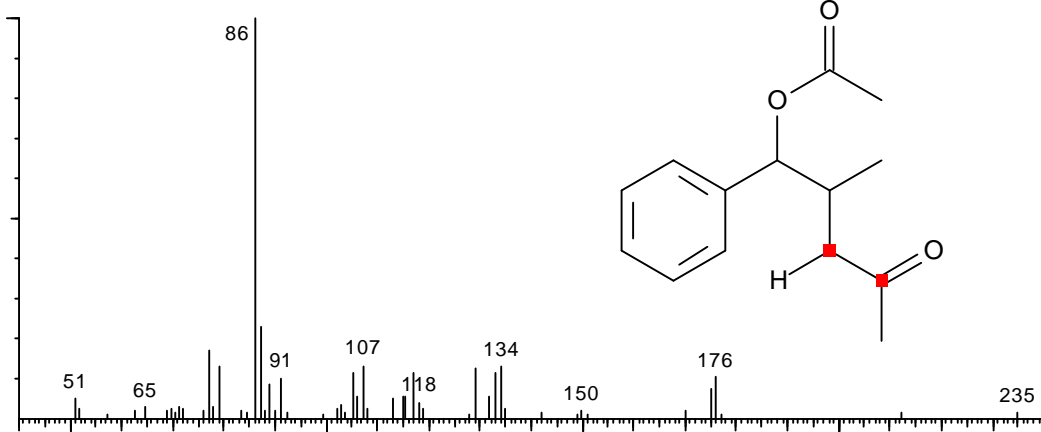
Ephedrine 2AC



MW:249,30980
MM:249,13649
C₁₄H₁₉NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Norephedrine 2AC

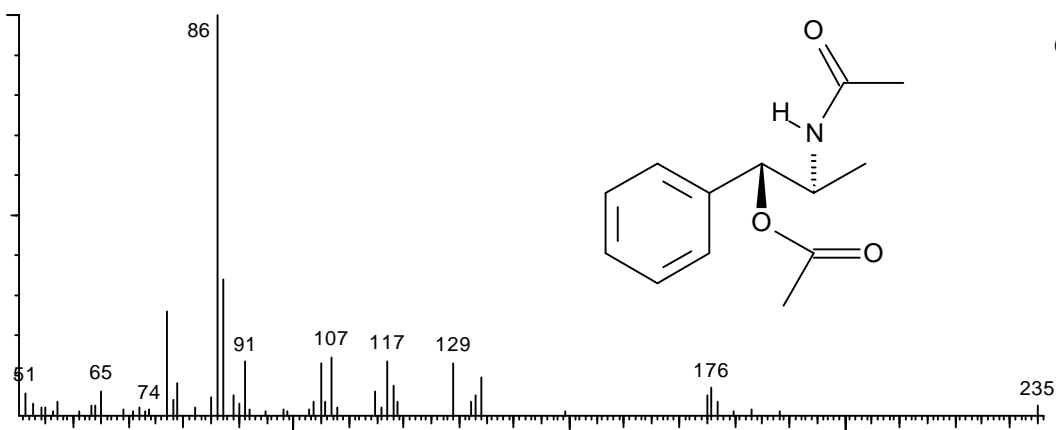


MW:235,28292
MM:235,12084
C₁₃H₁₇NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Cathin 2AC

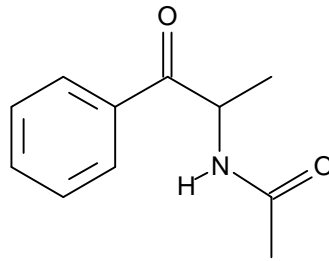
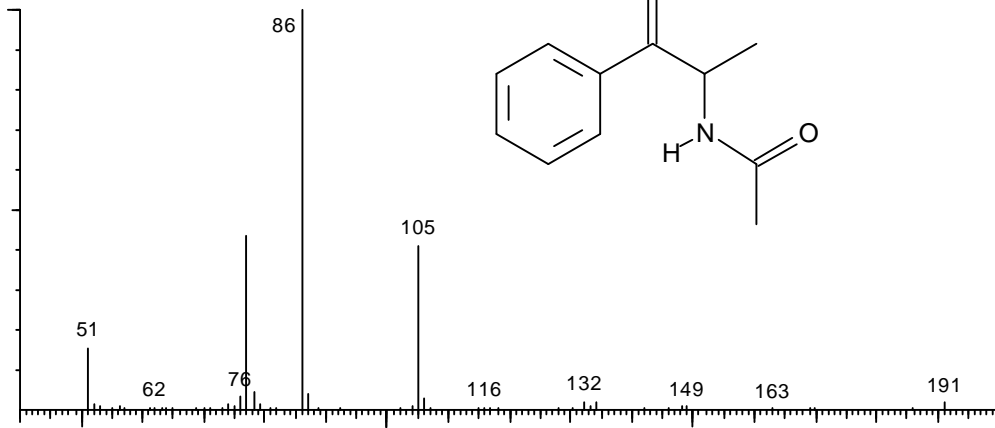
Norpseudoephedrin 2-fach acetyliert



MW:235,28292
MM:235,12084
C₁₃H₁₇NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Cathinon AC



MW:191,22976

MM:191,09463

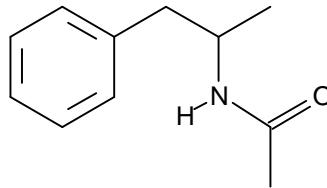
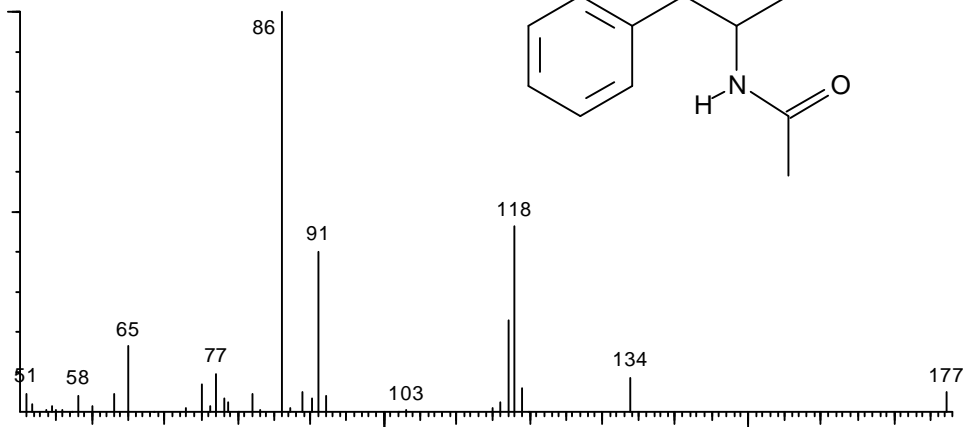
C₁₁H₁₃NO₂

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Amphetamin AC



MW:177,24624

MM:177,11536

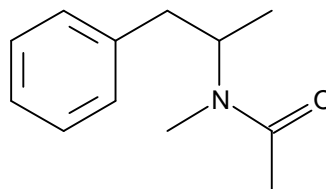
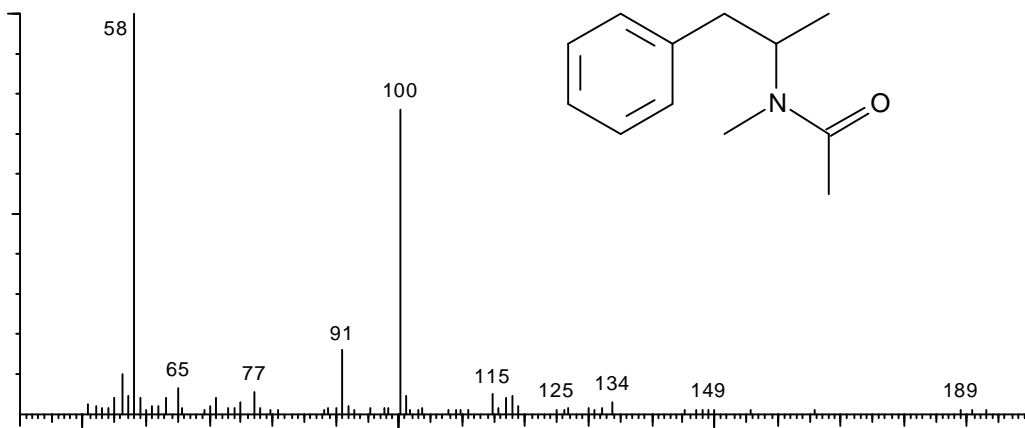
C₁₁H₁₅NO

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Methamphetamin AC



MW:191,27312

MM:191,13101

C₁₂H₁₇NO

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

MDA AC

3,4-Methylenedioxy-amphetamin

MW:221,25604

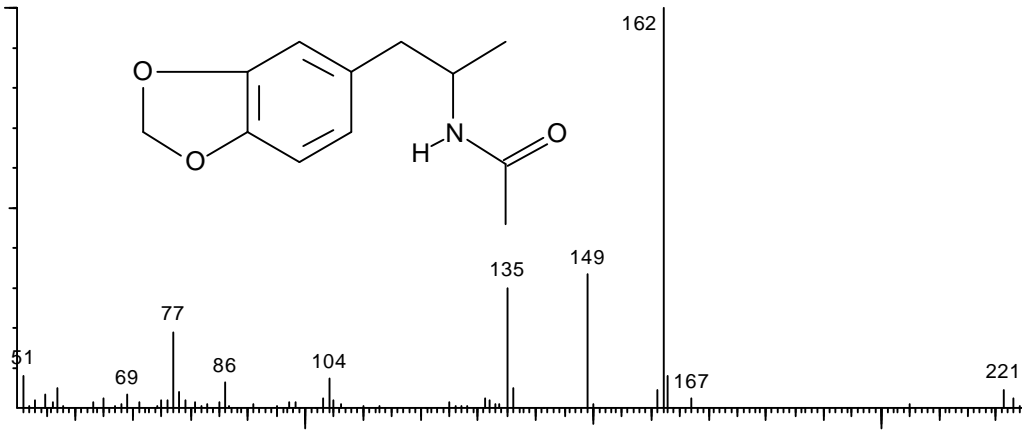
MM:221,10519

$C_{12}H_{15}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



MDMA AC

3,4-Methylenedioxy-methamphetamin acetyliert

MW:235,28292

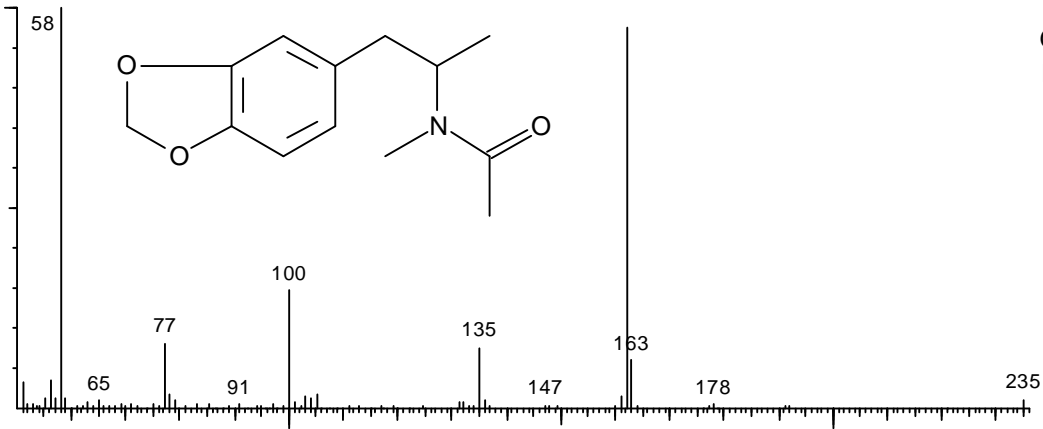
MM:235,12084

$C_{13}H_{17}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



MDEA AC

3,4-Methylenedioxy-ethylamphetamin acetyliert

MW:249,30980

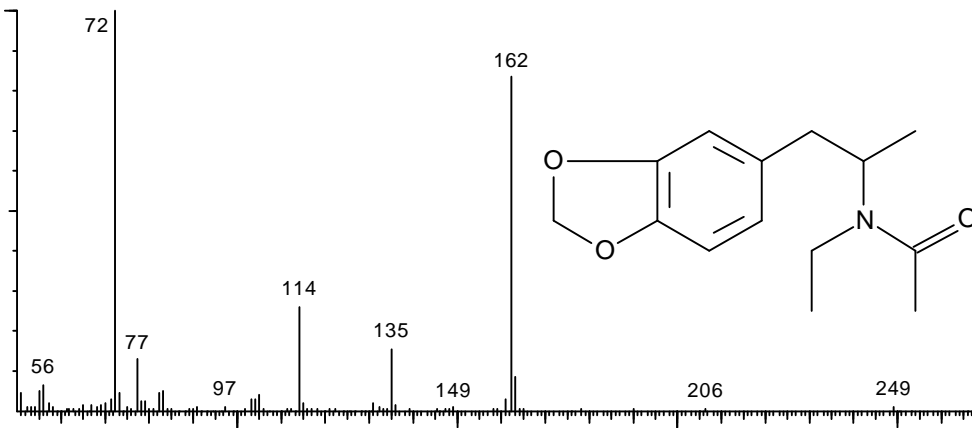
MM:249,13649

$C_{14}H_{19}NO_3$

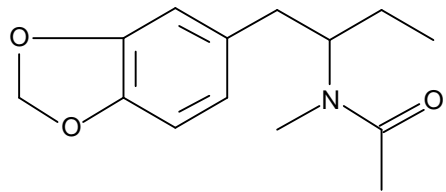
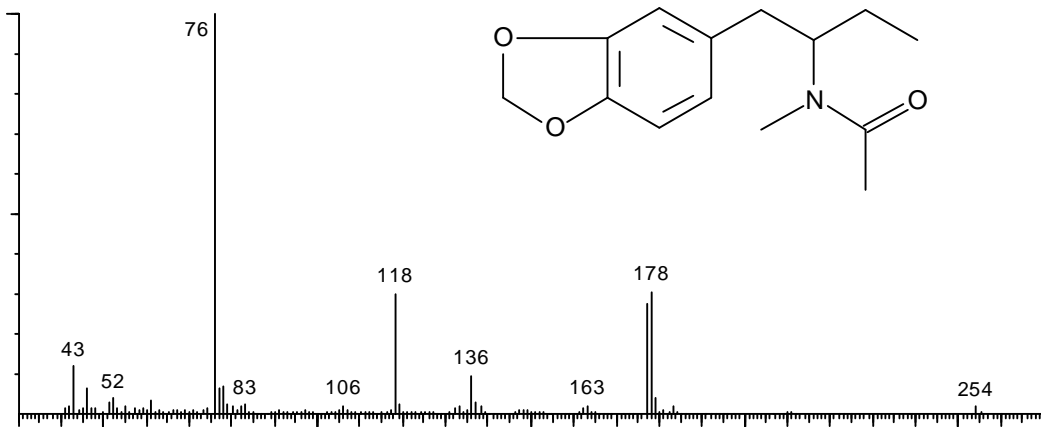
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



d5-MBDB AC

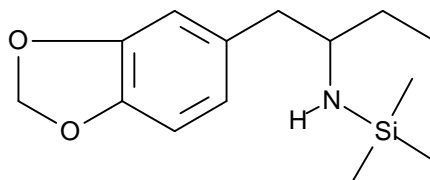
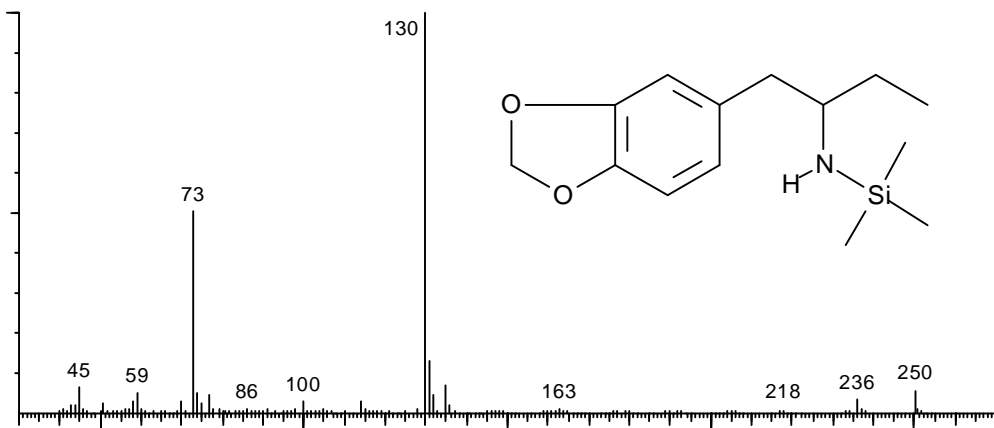


MW:254,30980
MM:254,16737
 $C_{14}H_{14}D_5NO_3$
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

TMS-derivatisierte Spektren

BDB TMS

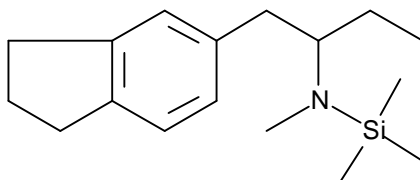
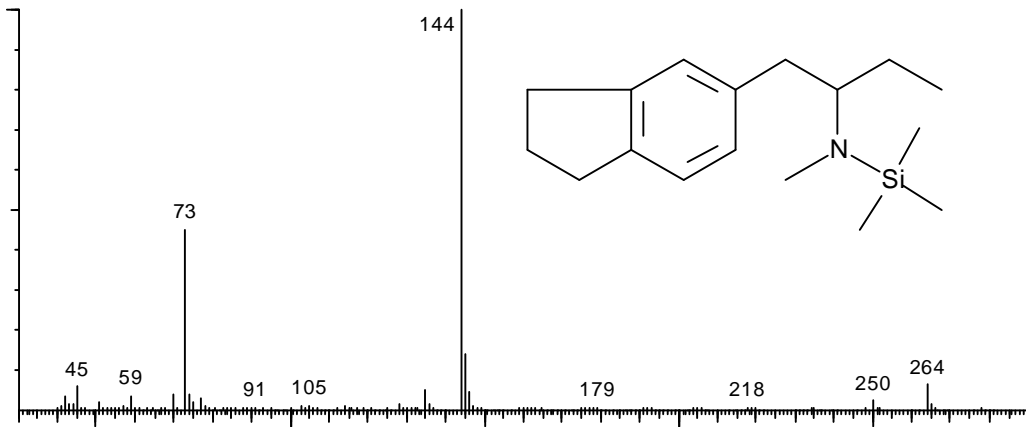
Benzodioxolbutamin silyliert



MW:265,42766
MM:265,14981
 $C_{14}H_{23}SiNO_2$
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

MBDB TMS

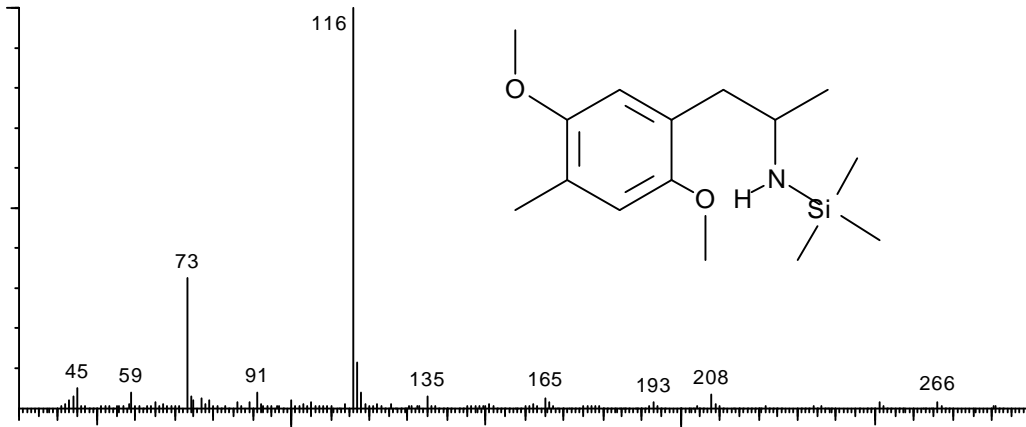
Methyl-benzodioxolbutamin silyliert



MW:279,45454
MM:279,16546
 $C_{15}H_{25}SiNO_2$
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

DOM TMS

4-Methyl-2,5-dimethoxyamphetamin silyliert



MW:281,47042

MM:281,18111

$C_{15}H_{27}SiNO_2$

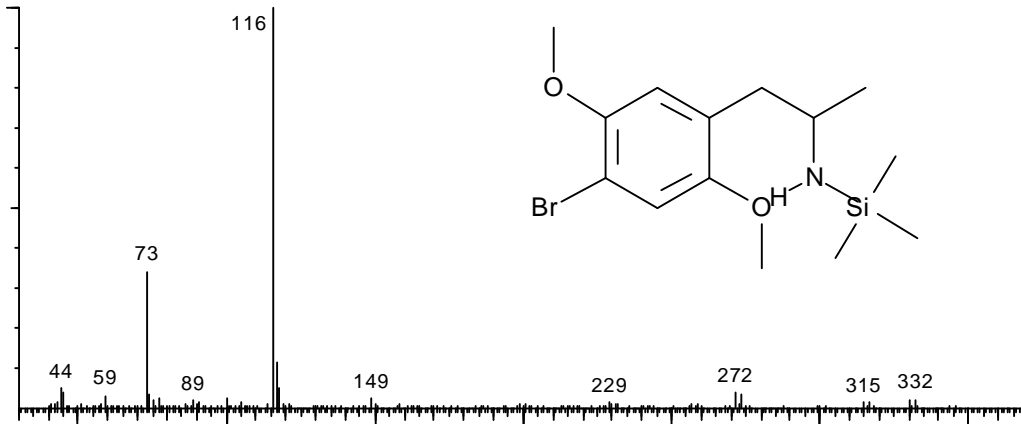
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOB TMS

4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin silyliert



MW:346,33960

MM:345,07597

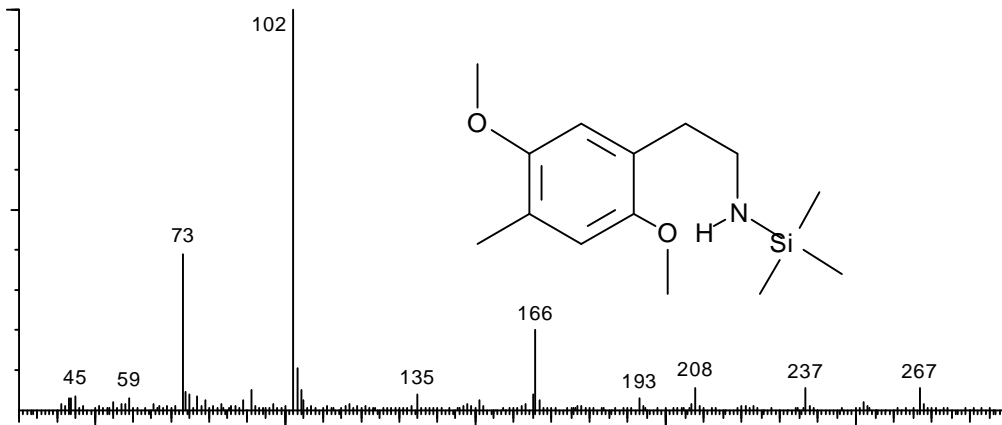
$C_{14}H_{24}BrSiNO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

4-Methyl-2,5-dimethoxyphenethylamin TMS



MW:267,44354

MM:267,16546

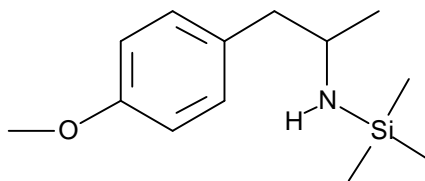
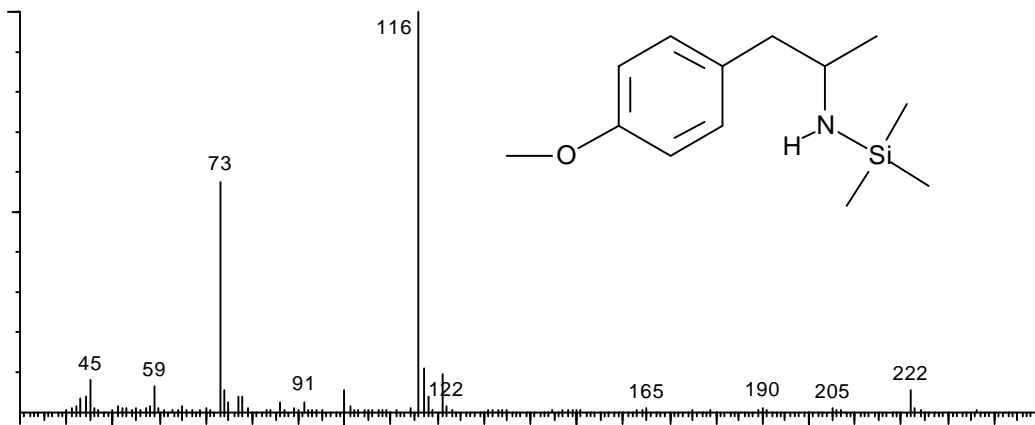
$C_{14}H_{25}SiNO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

4-Methoxyamphetamin TMS



MW:237,41726

MM:237,15489

$C_{13}H_{23}SiNO$

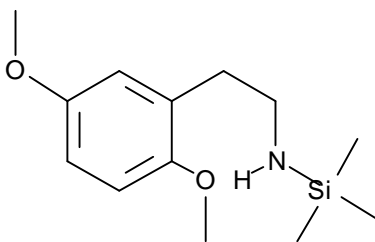
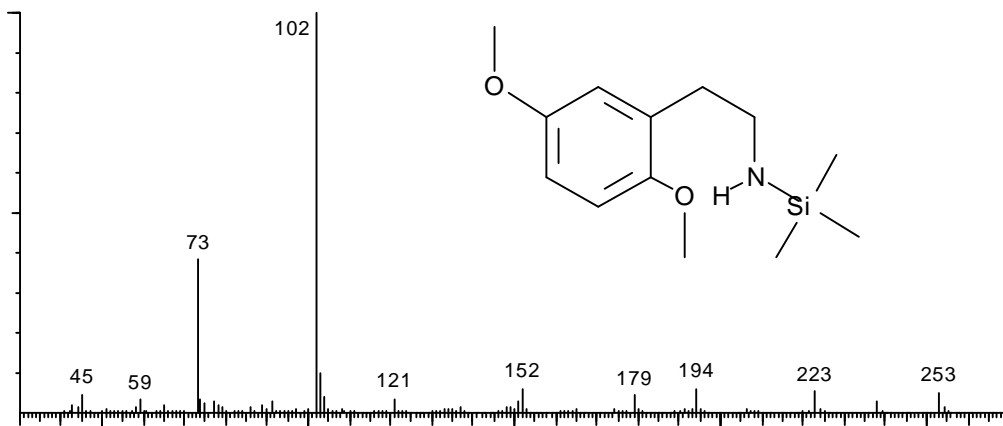
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

BDMPEA intermediate-2 TMS

2,5-Dimethoxyphenethylamin silyliert



MW:253,41666

MM:253,14981

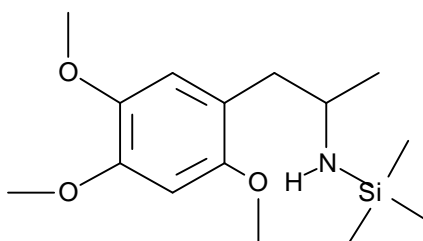
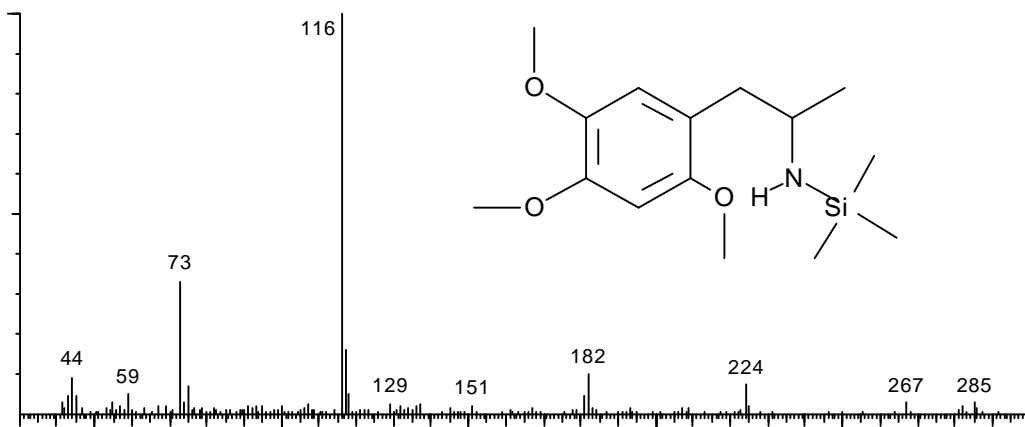
$C_{13}H_{23}SiNO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

2,4,5-Trimethoxyamphetamin TMS



MW:297,46982

MM:297,17602

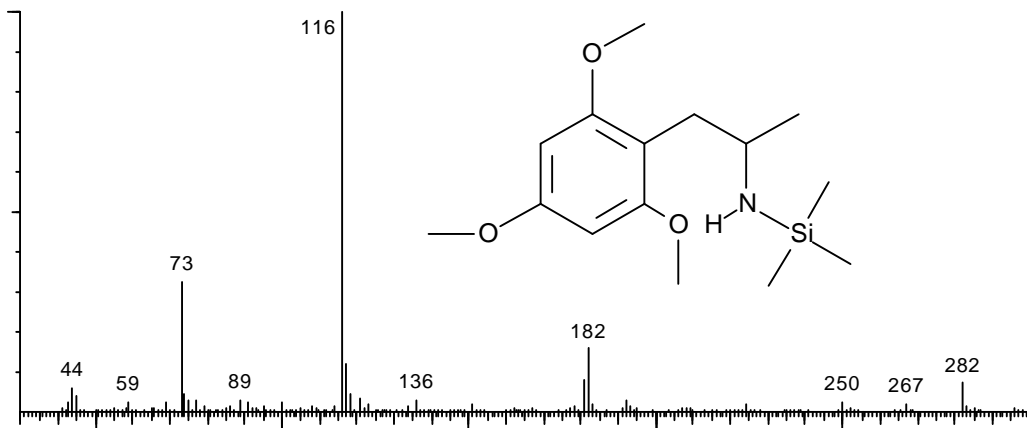
$C_{15}H_{27}SiNO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

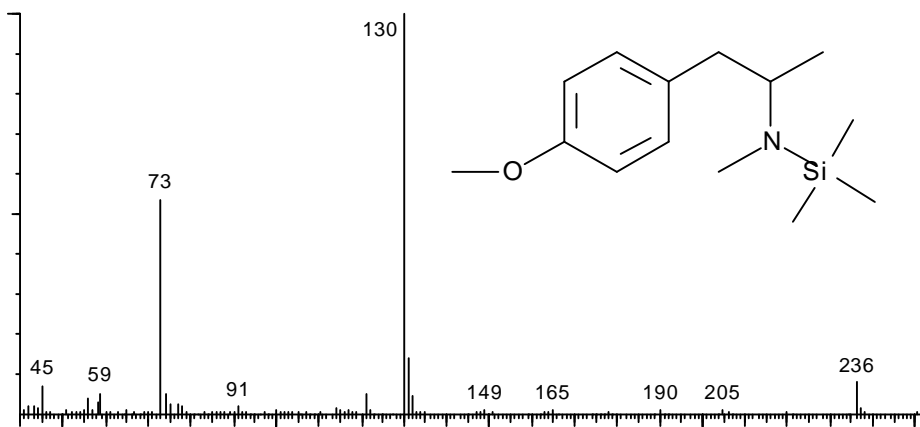
2,4,6-Trimethoxyamphetamin TMS



MW:297,46982
MM:297,17602
C₁₅H₂₇SiNO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

N-Methyl-4-methoxyamphetamin TMS

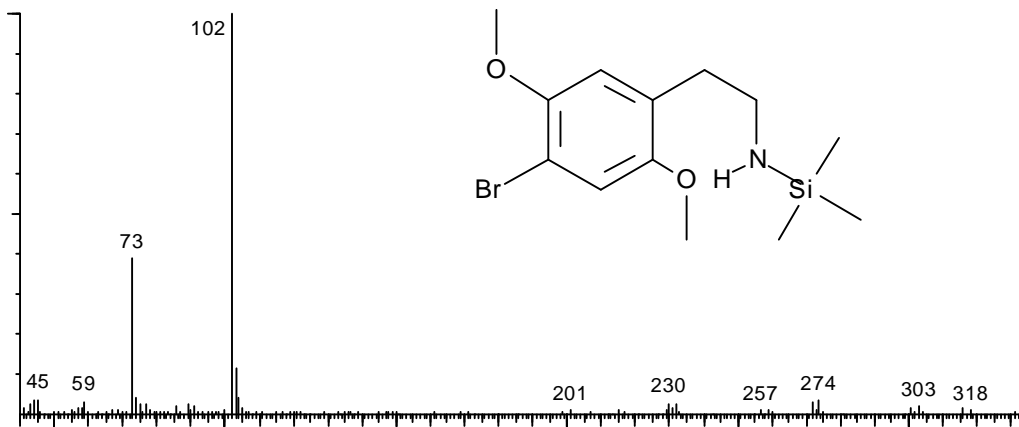


MW:251,44414
MM:251,17054
C₁₄H₂₅SiNO

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

BDMPEA TMS

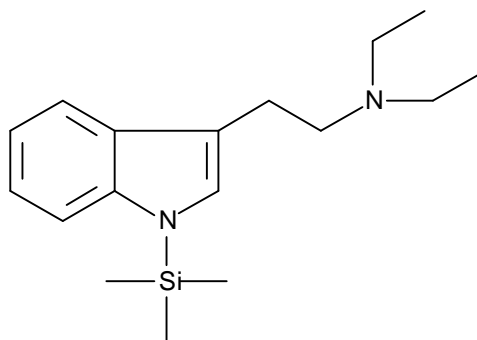
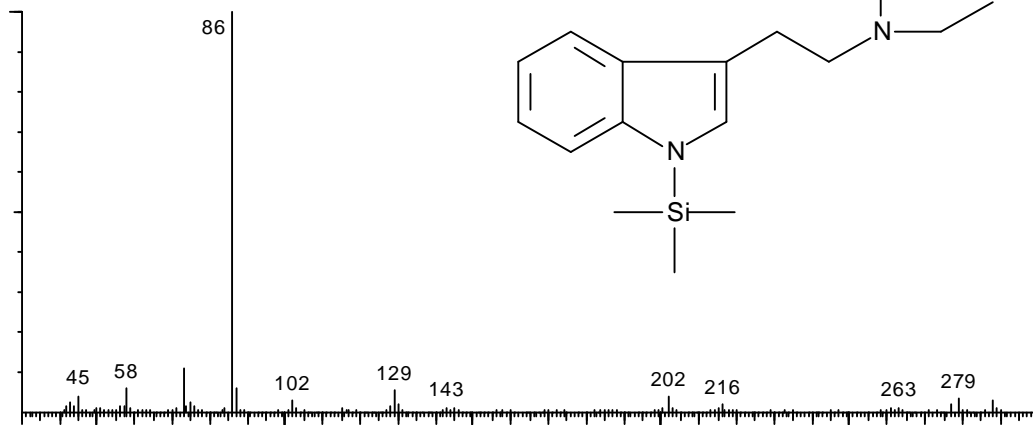
4-Brom-2,5-dimethoxyphenethylamin



MW:332,31272
MM:331,06032
C₁₃H₂₂BrSiNO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

N,N-Diethyltryptamin TMS



MW:288,50830

MM:288,20218

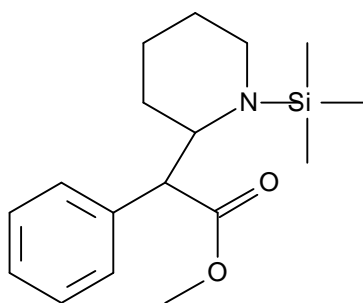
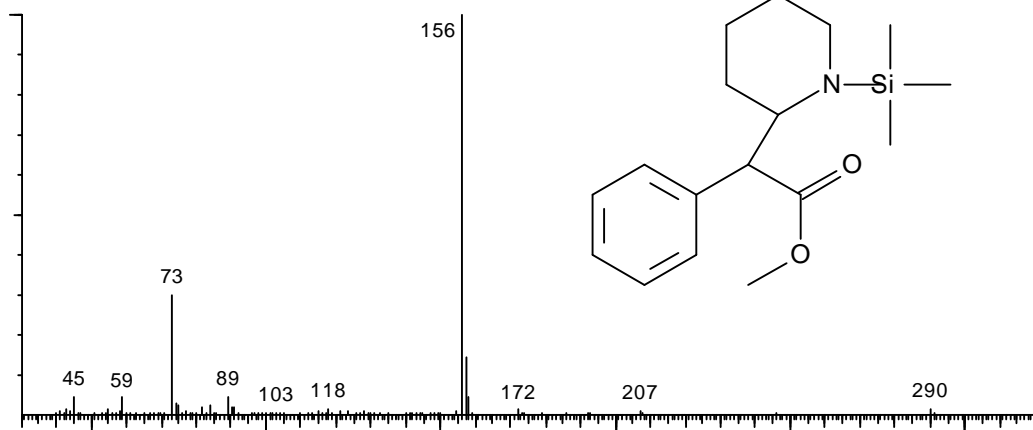
$C_{17}H_{28}SiN_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Methylphenidat TMS



MW:305,49242

MM:305,18111

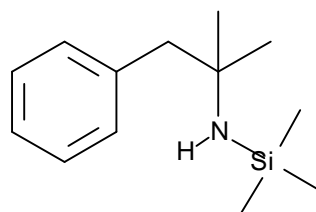
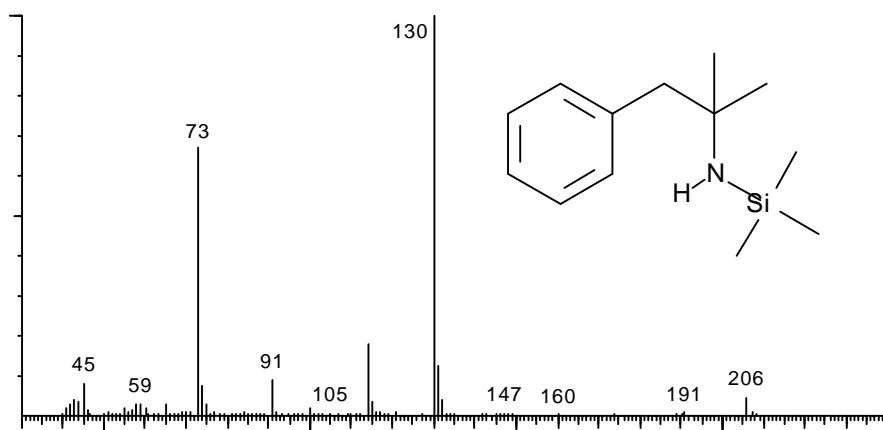
$C_{17}H_{27}SiNO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

Phentermin TMS



MW:221,41786

MM:221,15998

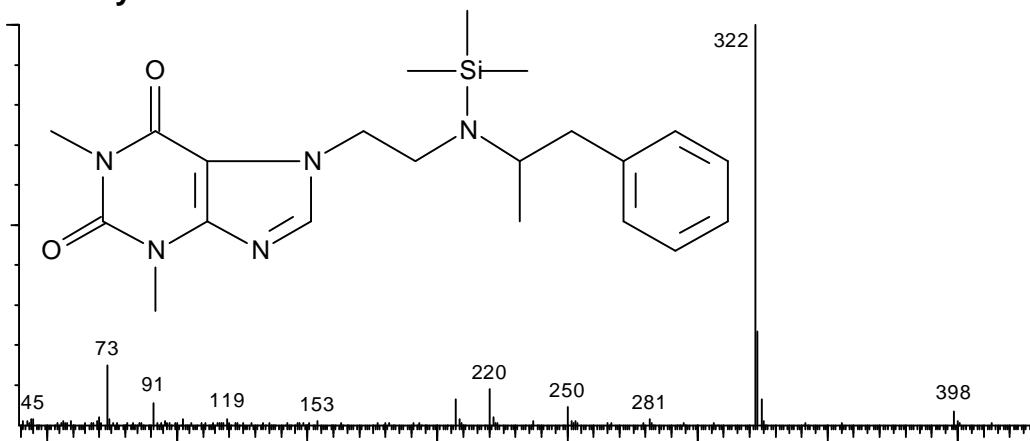
$C_{13}H_{23}SiN$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

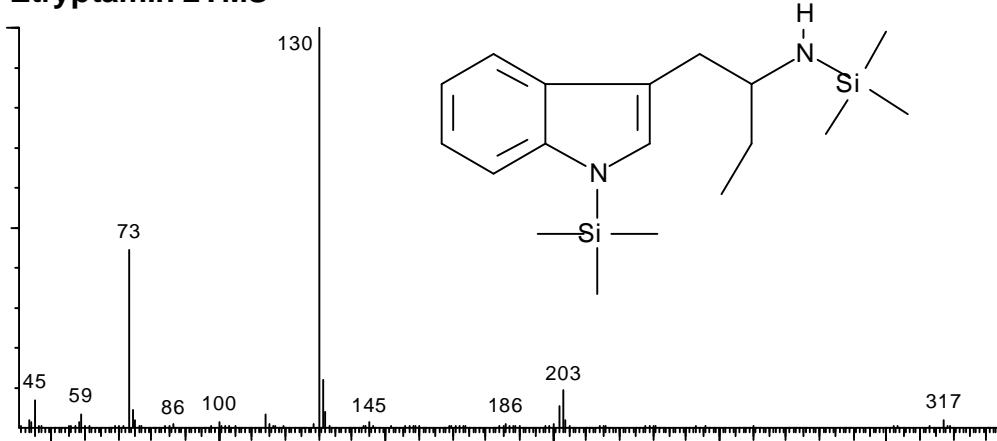
Fenethylin TMS



MW:413,59514
MM:413,22470
 $C_{21}H_{31}SiN_5O_2$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

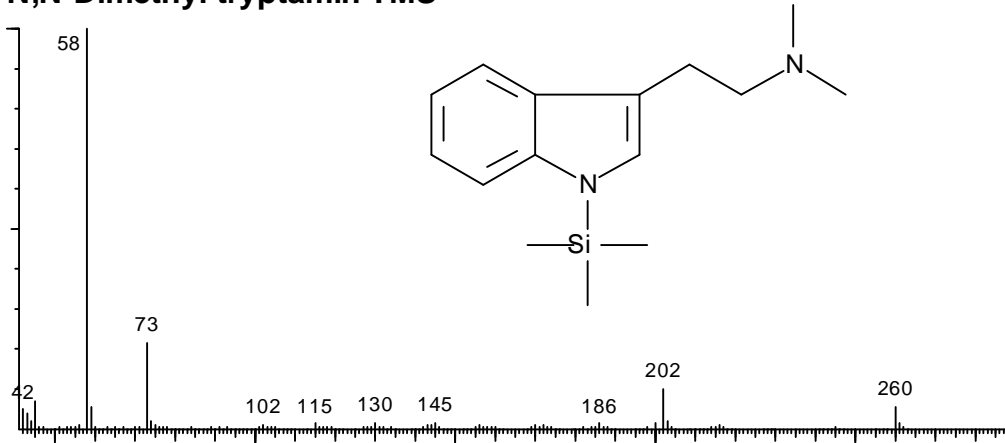
Etryptamin 2TMS



MW:332,63656
MM:332,21040
 $C_{18}H_{32}Si_2N_2$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

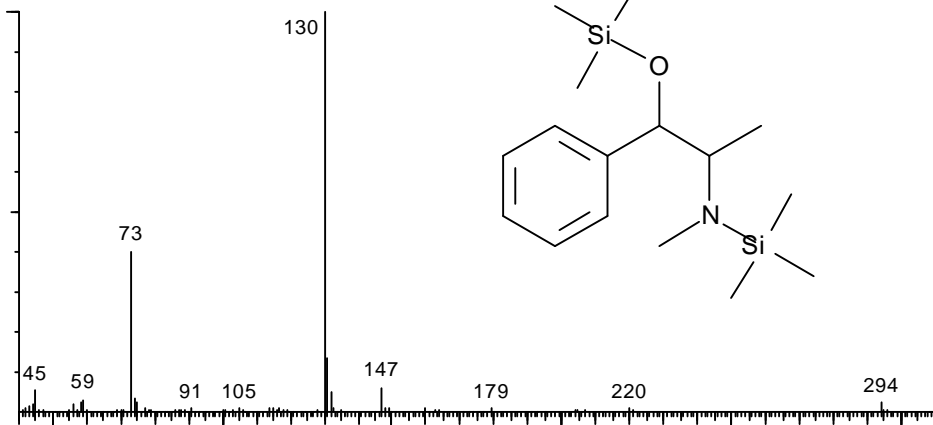
N,N-Dimethyl-tryptamin TMS



MW:261,46248
MM:261,17870
 $C_{15}H_{25}SiN_2$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Ephedrin 2TMS



MW:309,59928

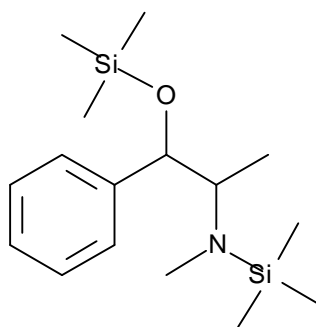
MM:309,19442

$C_{16}H_{31}Si_2NO$

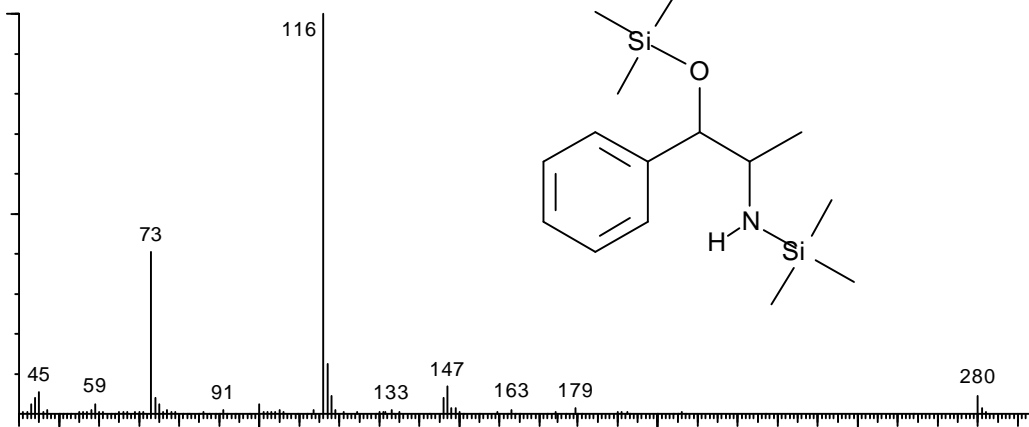
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



Norephedrin 2TMS



MW:295,57240

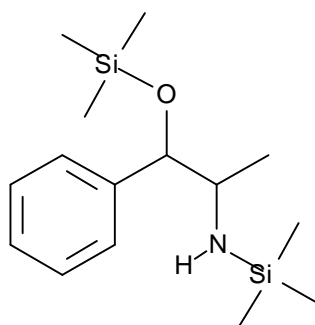
MM:295,17877

$C_{15}H_{29}Si_2NO$

GC/MS

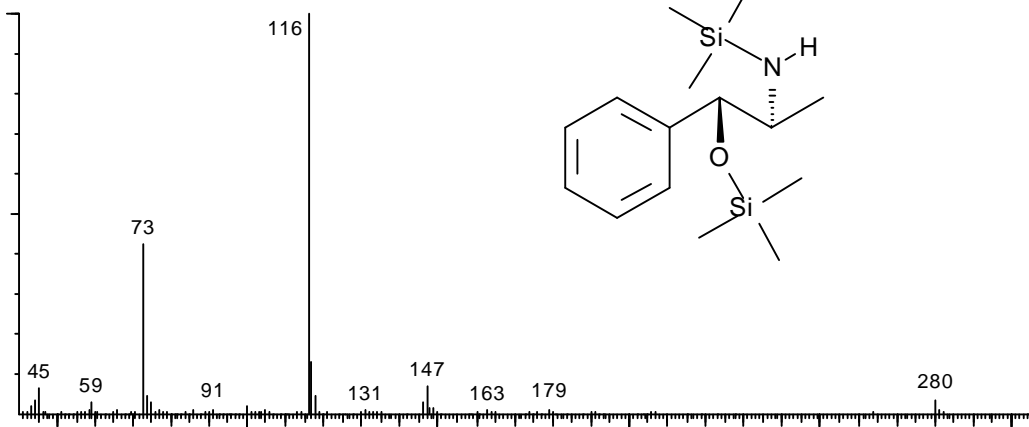
EI 70 eV

TSQ 70



Cathin 2TMS

Norpseudoephedrin 2-fach silyliert



MW:295.57240

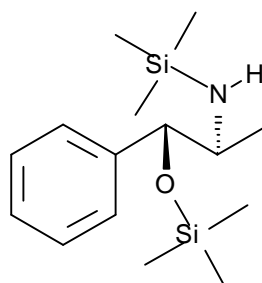
MM:295.17877

$C_{15}H_{29}Si_2NO$

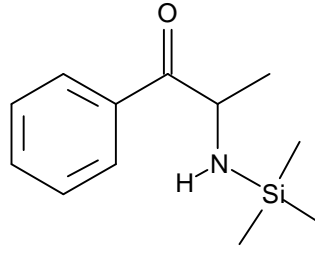
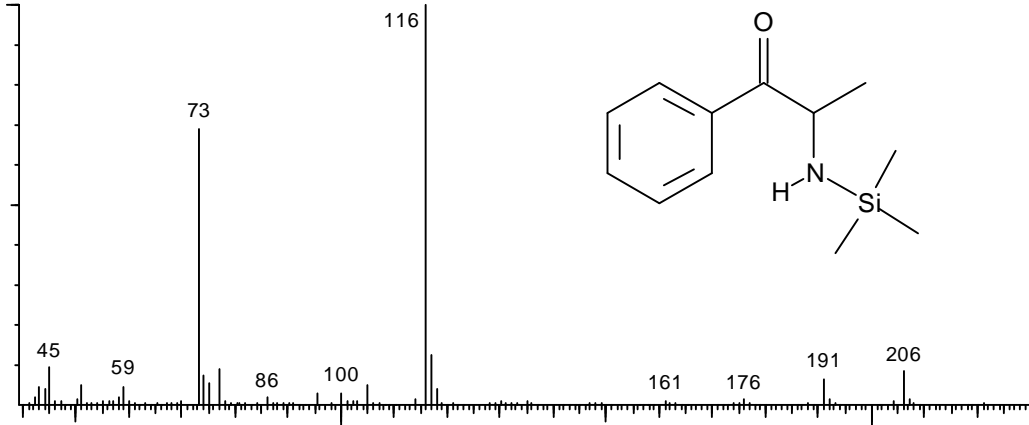
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



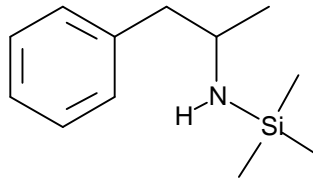
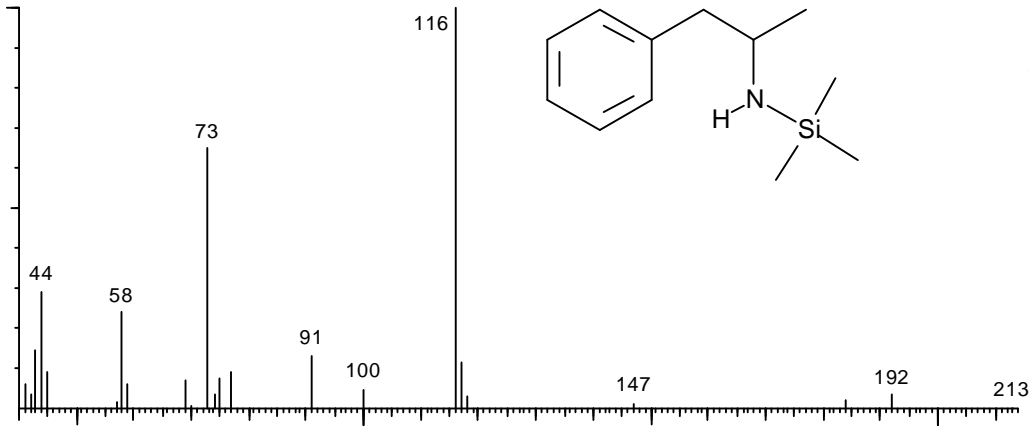
Cathinon TMS



MW:221,37450
MM:221,12359
C₁₂H₁₉SiNO

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Amphetamin TMS

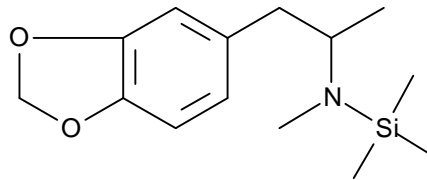
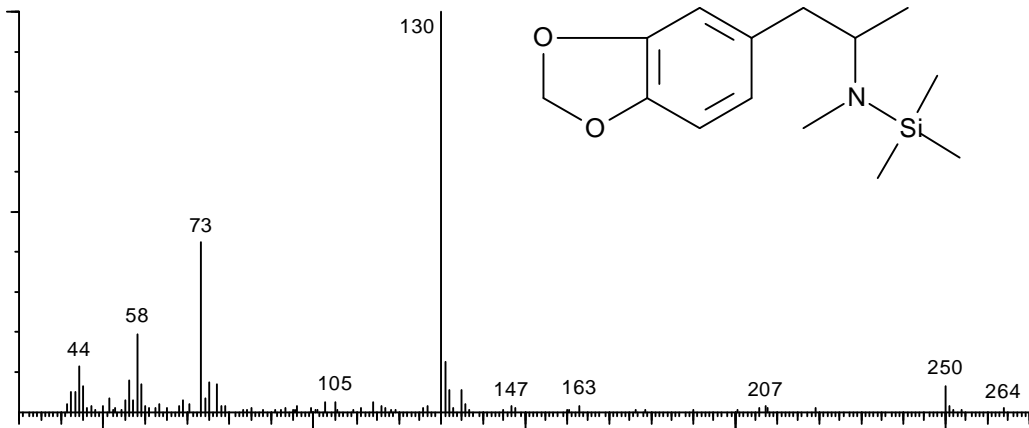


MW:207,39098
MM:207,14433
C₁₂H₂₁SiN

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

MDMA TMS

3,4-Methylendioxy-methamphetamin silyliert

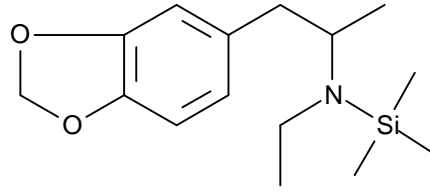
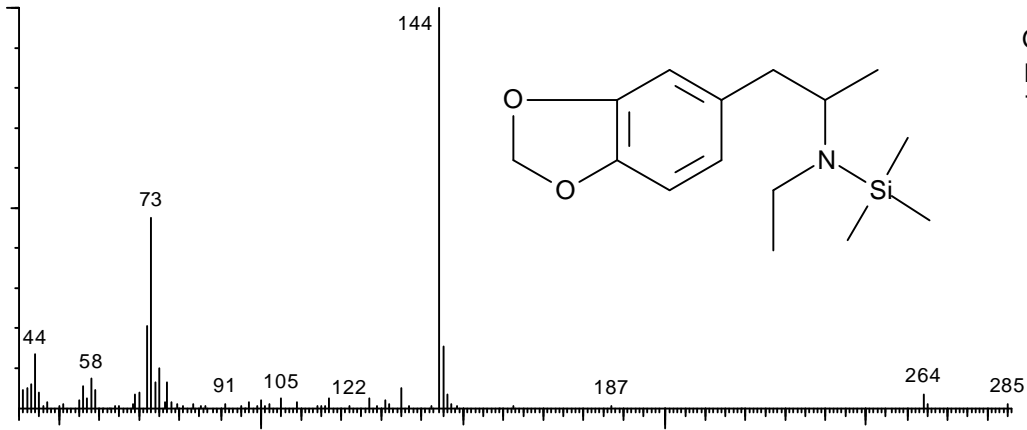


MW:265.42766
MM:265.14981
C₁₄H₂₃SiNO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

MDEA TMS

3,4-Methylenedioxy-ethylamphetamin silyliert



MW:267.44354

MM:267.16546

$C_{14}H_{25}SiNO_2$

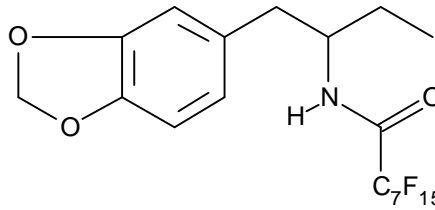
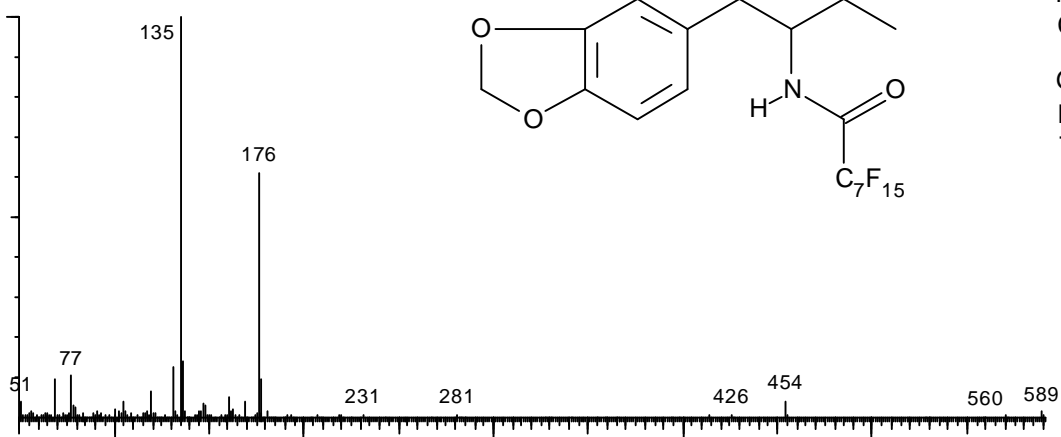
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

PFO-derivatisierte Spektren

BDB PFO



MW:589,30115

MM:589,07342

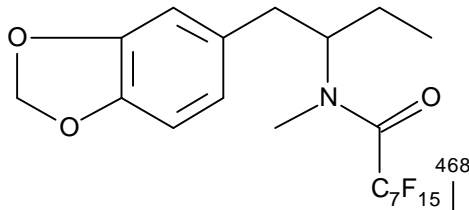
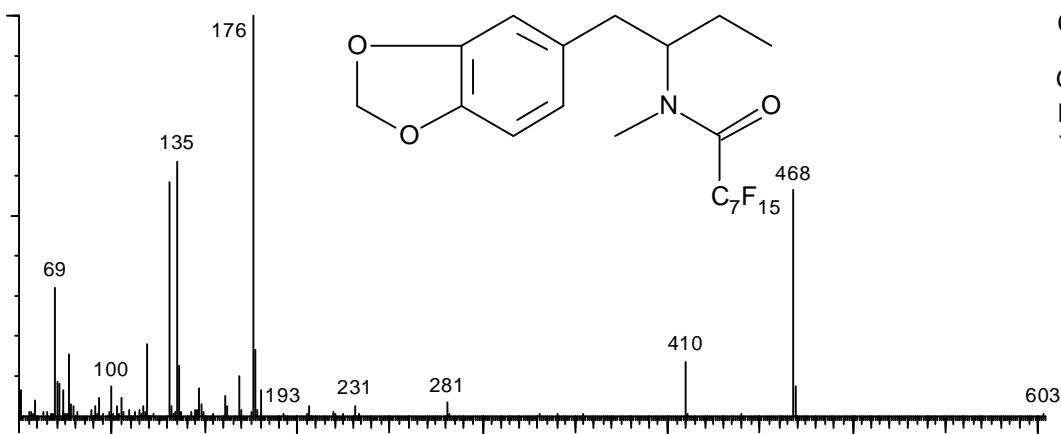
$C_{19}H_{14}F_{15}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

MBDB PFO



MW:603,32803

MM:603,08907

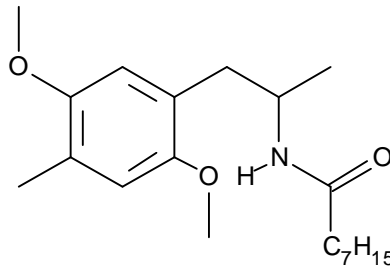
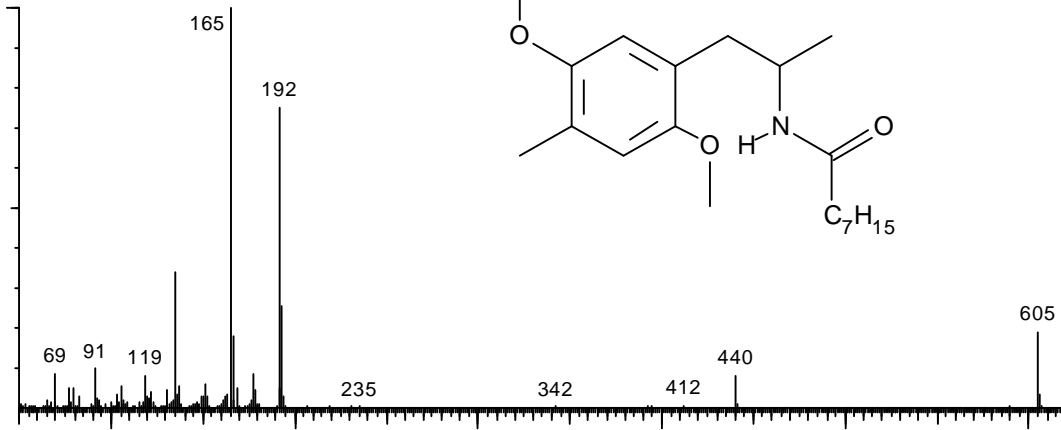
$C_{20}H_{16}F_{15}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

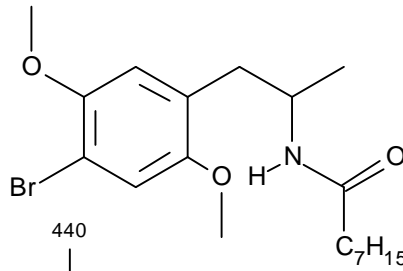
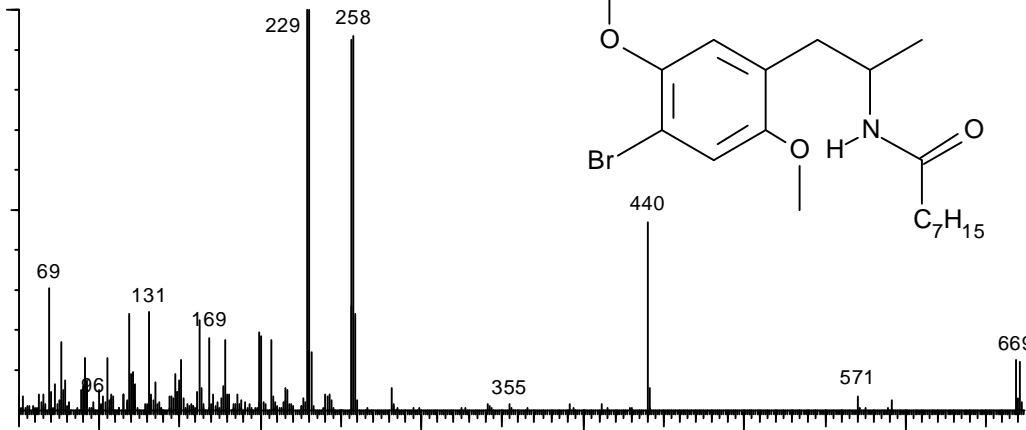
DOM PFO



MW:605,34391
MM:605,10472
C₂₀H₁₈F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

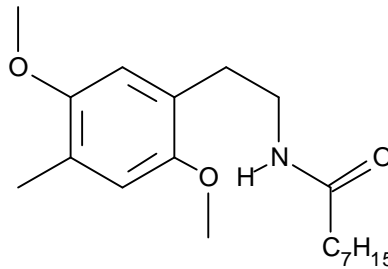
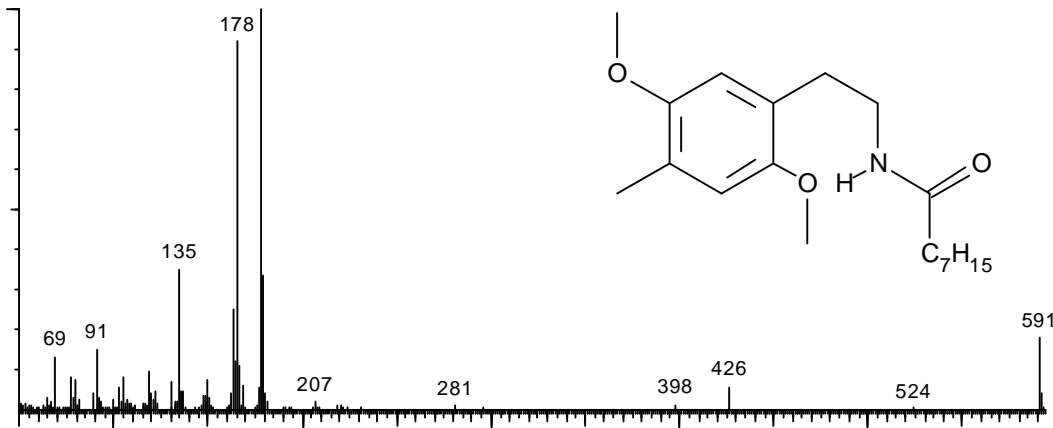
DOB PFO



MW:670,21309
MM:668,99958
C₁₉H₁₅F₁₅BrNO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

4-Methyl-2,5-dimethoxyphenethylamin PFO

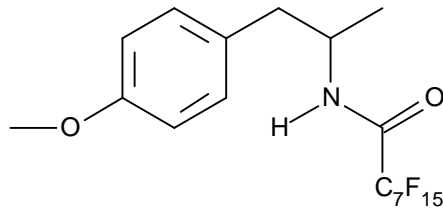
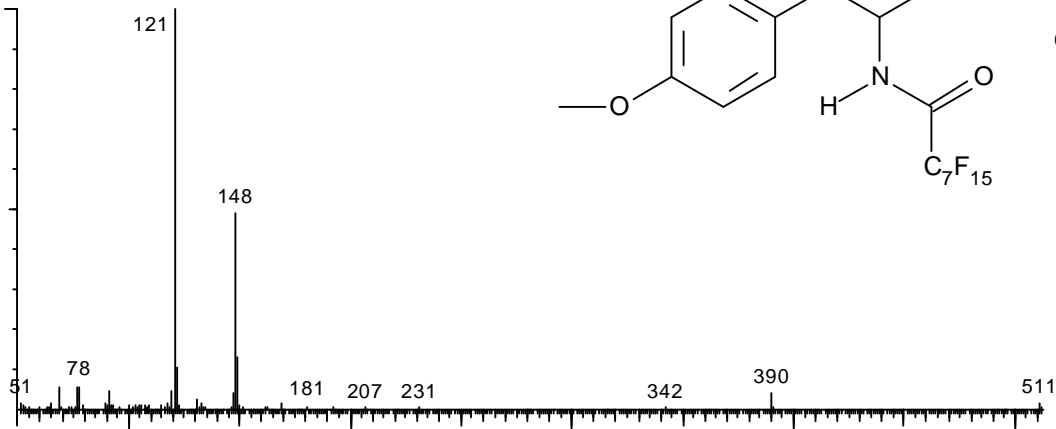


MW:591,31703
MM:591,08907
C₁₉H₁₆F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

PMA PFO

4-Methoxyamphetamin PFO



MW:561,29075

MM:561,07850

$C_{18}H_{14}F_{15}NO_2$

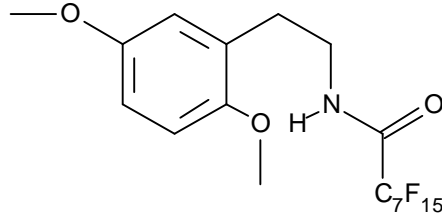
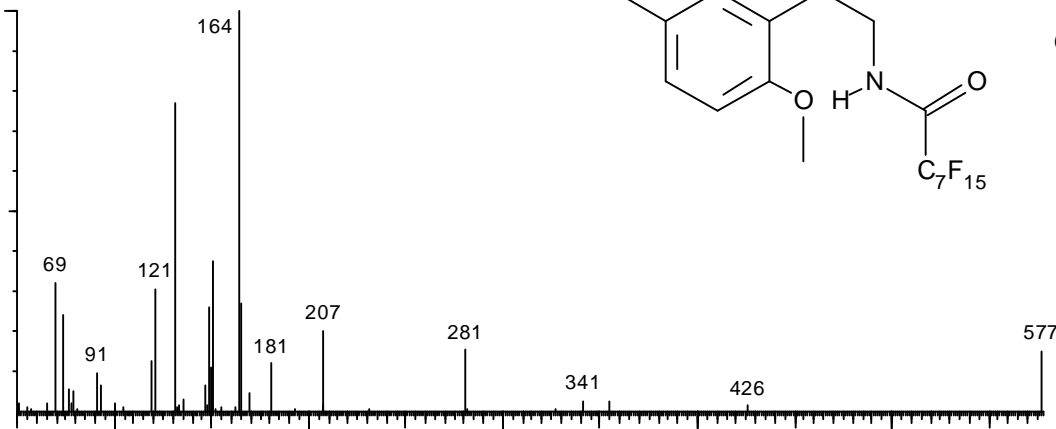
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

BDMPEA intermediate-2 PFO

2,5-Dimethoxyphenethylamin PFO



MW:577,29015

MM:577,07342

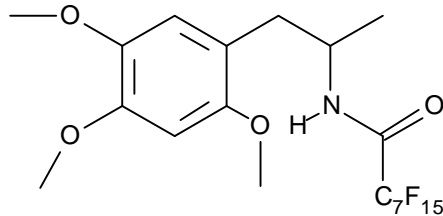
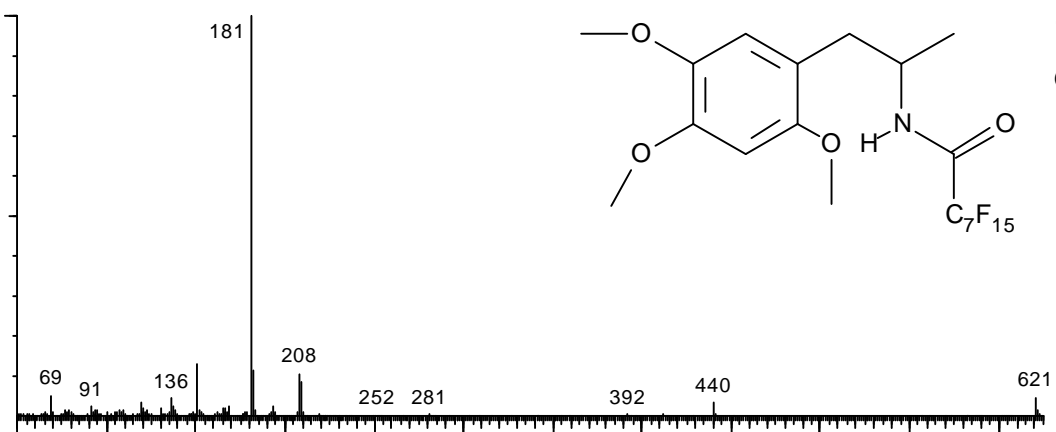
$C_{18}H_{14}F_{15}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

2,4,5-Trimethoxyamphetamin PFO



MW:621,34331

MM:621,09963

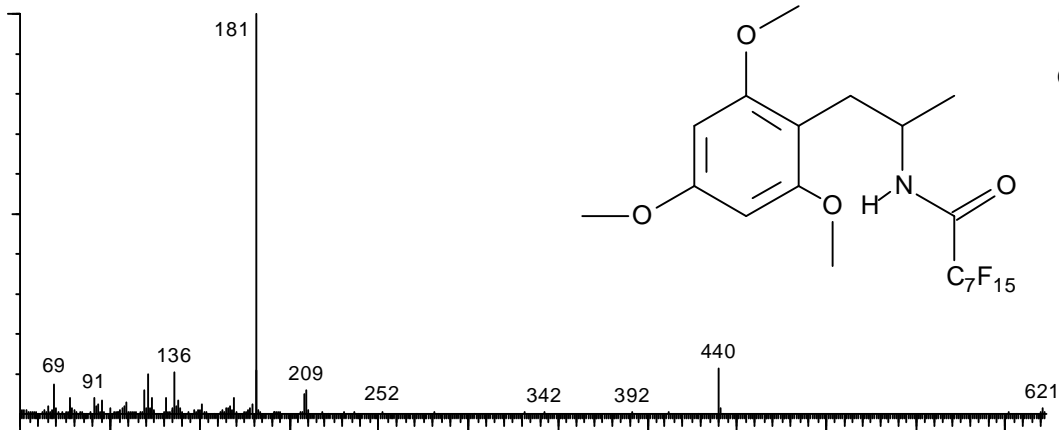
$C_{20}H_{18}F_{15}NO_4$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

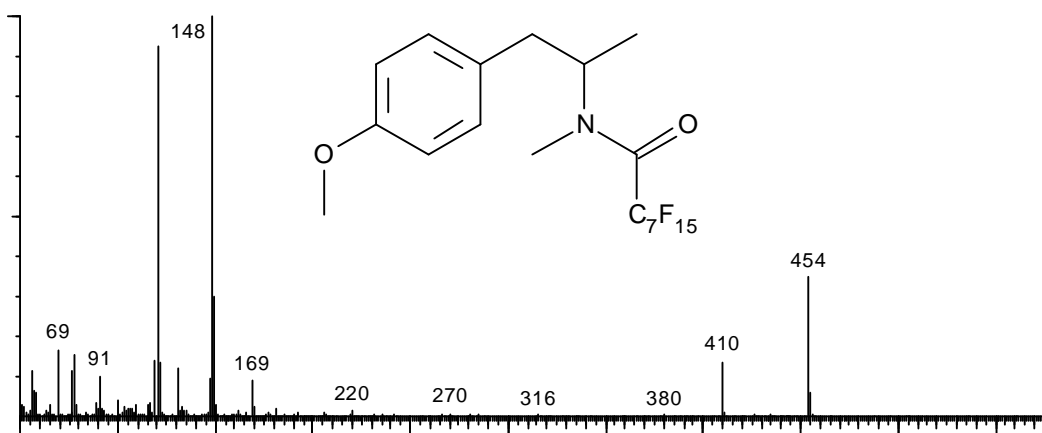
2,4,6-Trimethoxyamphetamin PFO



MW:621,34331
MM:621,09963
 $C_{20}H_{18}F_{15}NO_4$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

N-Methyl-4-methoxyamphetamin PFO

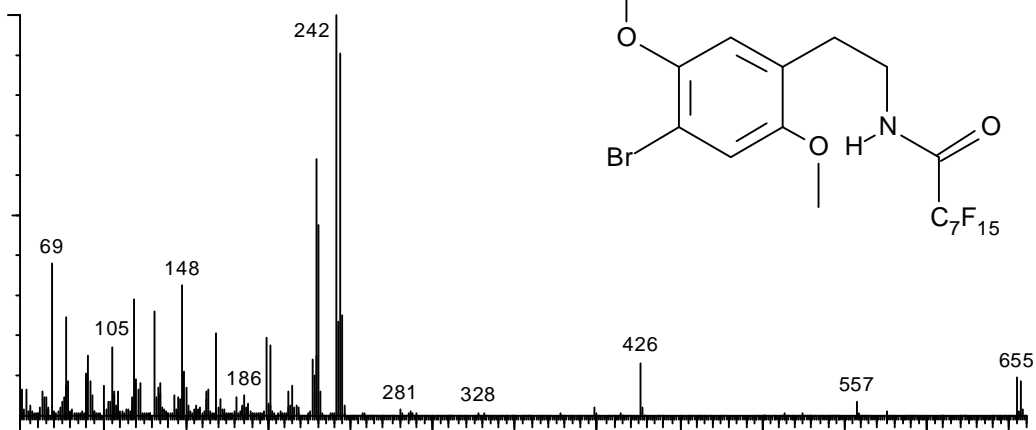


MW:574,30969
MM:574,08633
 $C_{19}H_{15}F_{15}NO_2$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

BDMPEA PFO

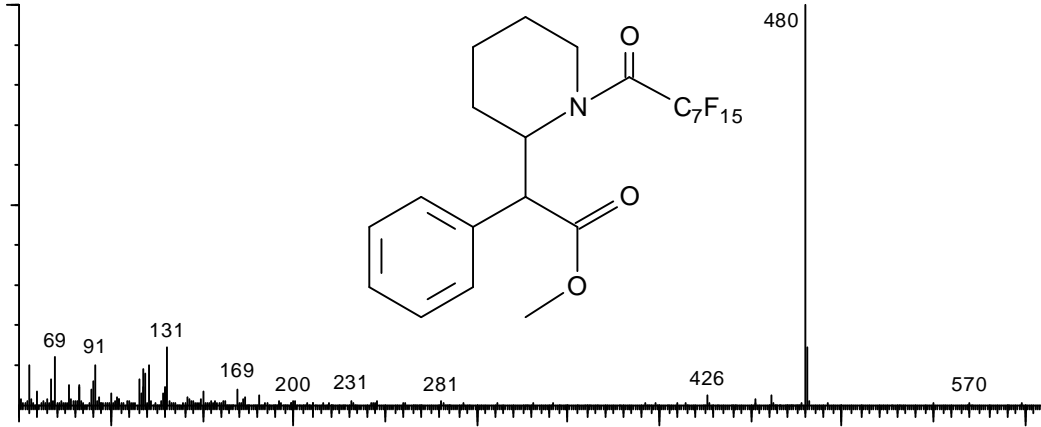
4-Brom-2,5-dimethoxyphenethylamin PFO



MW:656,18621
MM:654,98393
 $C_{18}H_{13}F_{15}BrNO_3$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

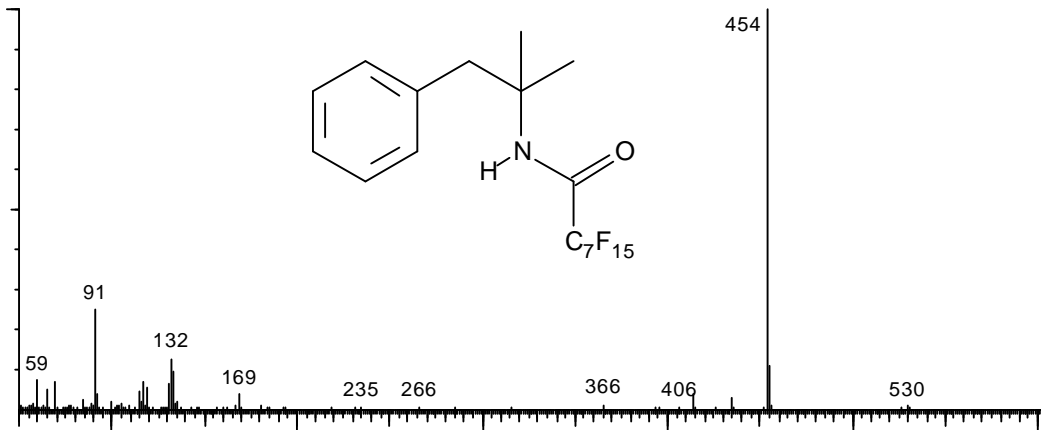
Methylphenidat PFO



MW:629,36591
MM:629,10472
 $C_{22}H_{18}F_{15}NO_3$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

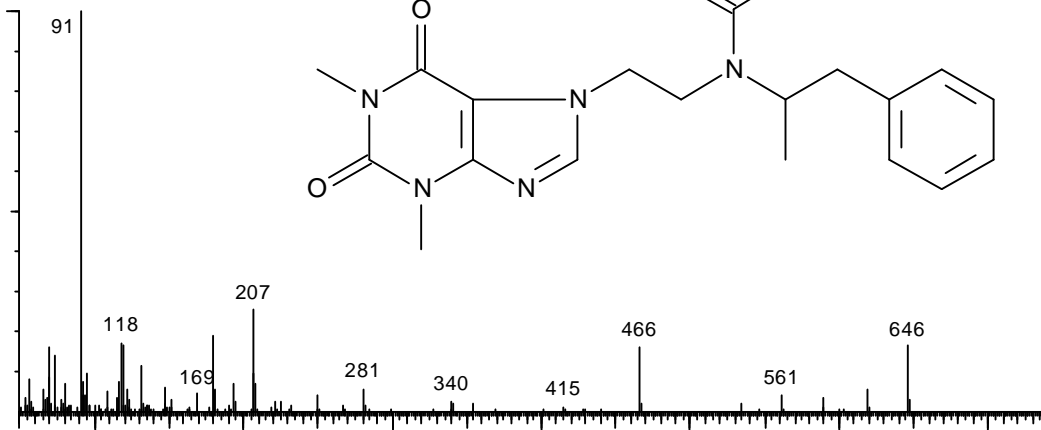
Phentermin PFO



MW:545,29135
MM:545,08359
 $C_{18}H_{14}F_{15}NO$

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

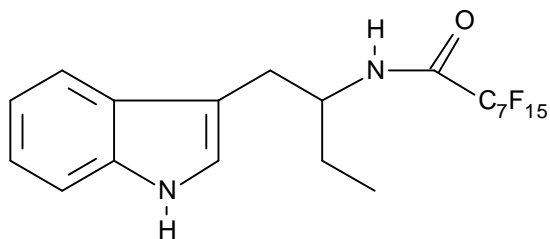
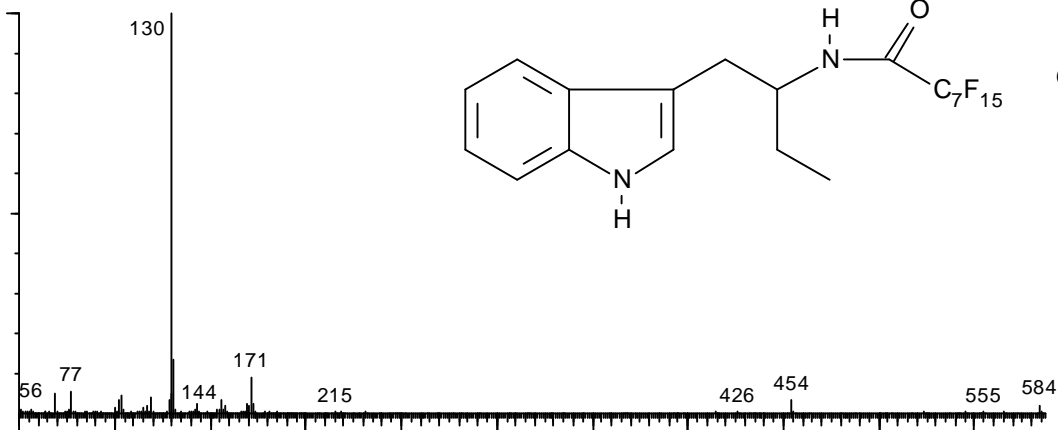
Fenethylin PFO



MW:663,44961
MM:663,14926
 $C_{26}H_{22}F_{15}N_2O$

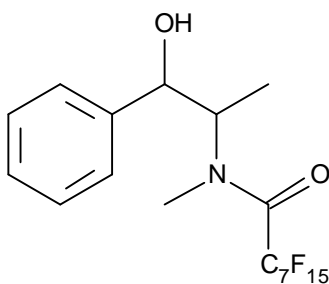
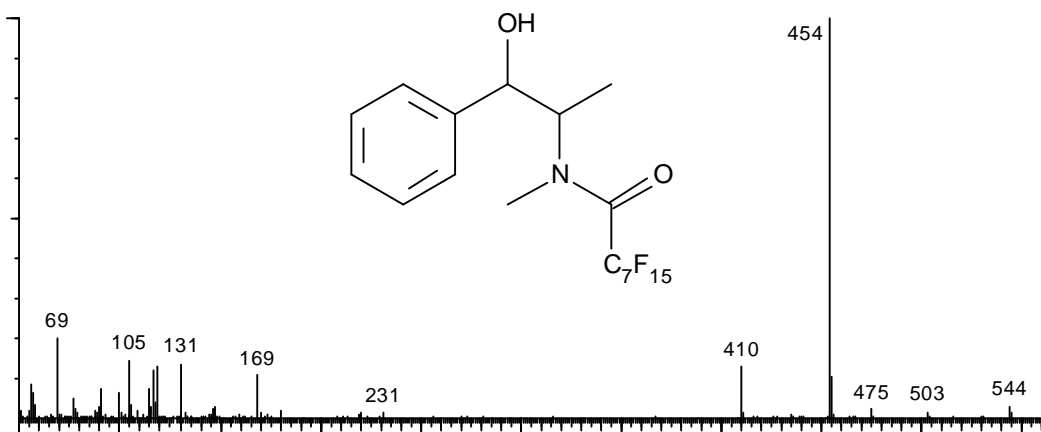
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Etryptamin PFO



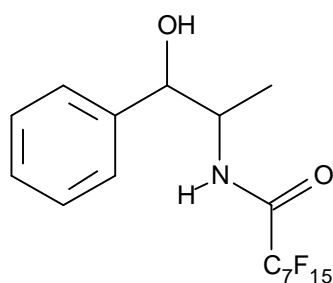
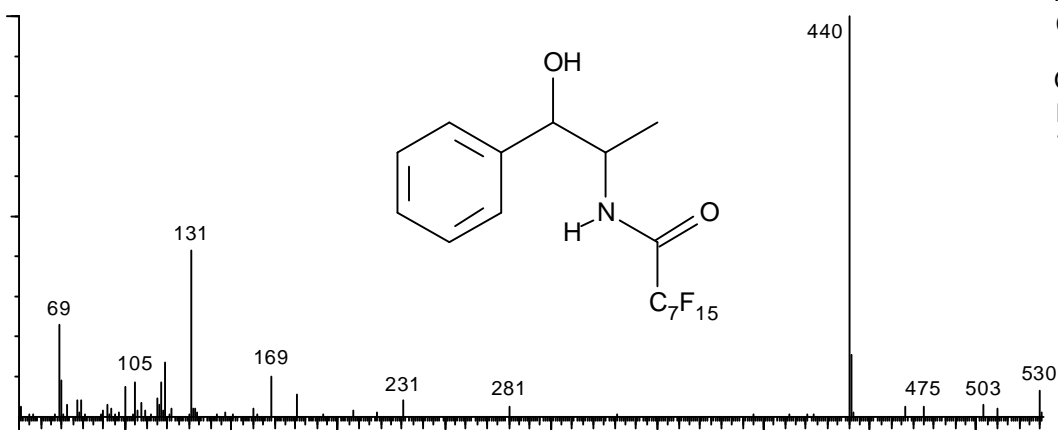
MW:584,32803
MM:584,09449
C₂₀H₁₅F₁₅N₂O
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Ephedrin PFO



MW:561,29075
MM:561,07850
C₁₈H₁₄F₁₅NO₂
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Norephedrin PFO

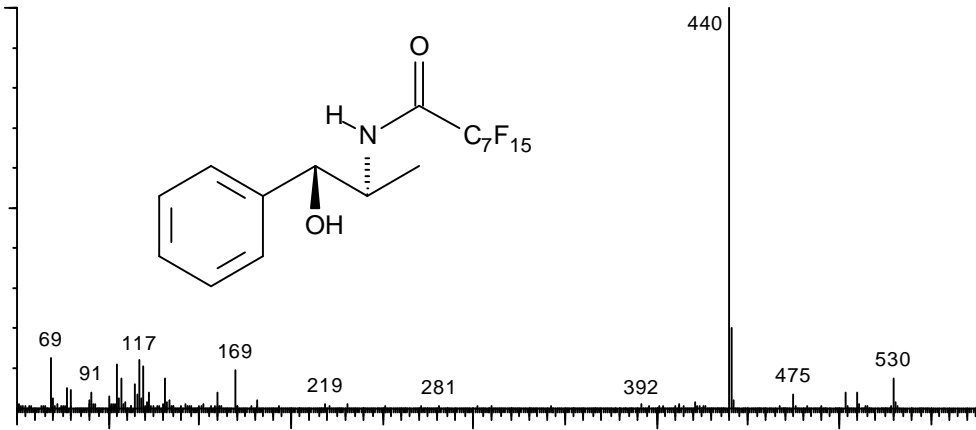


MW:547,26387
MM:547,06285
C₁₇H₁₂F₁₅NO₂
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Cathin PFO
Norpseudoephedrin PFO

MW:547,26387
MM:547,06285
 $C_{17}H_{12}F_{15}NO_2$

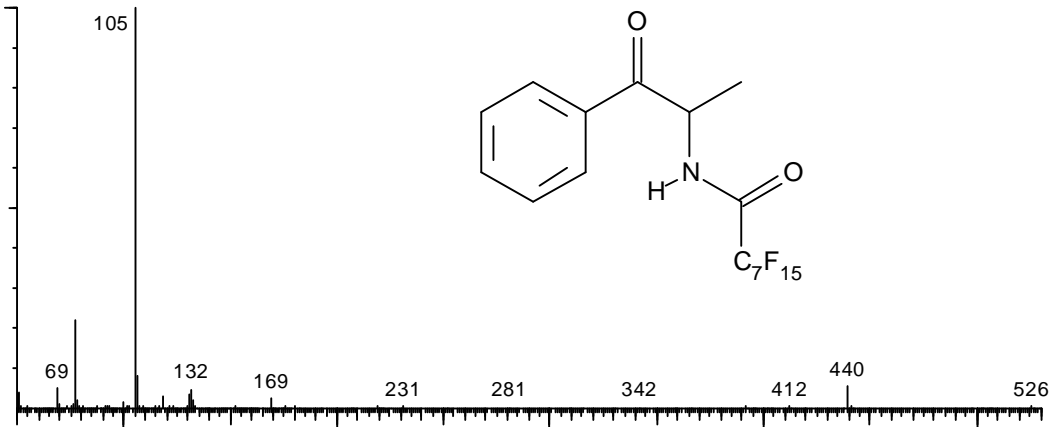
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70



Cathinon PFO

MW:545,24799
MM:545,04720
 $C_{17}H_{10}F_{15}NO_2$

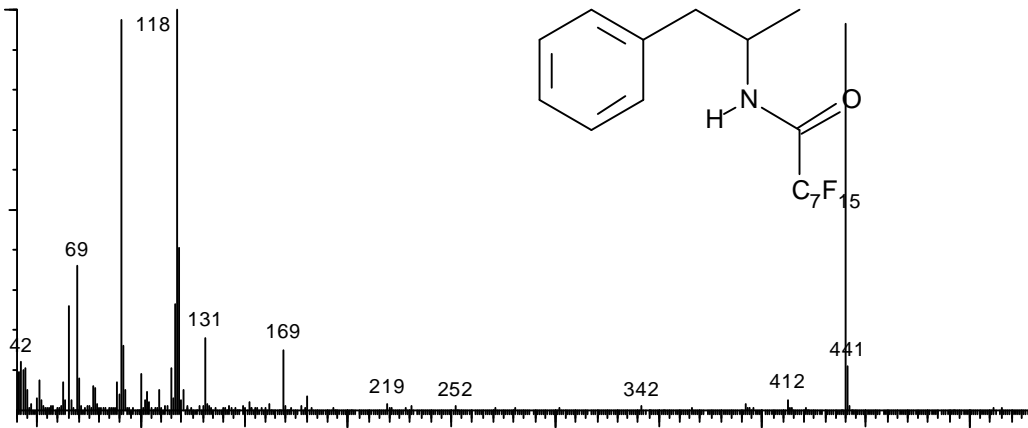
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70



Amphetamin PFO

MW:531,26447
MM:531,06794
 $C_{17}H_{12}F_{15}NO$

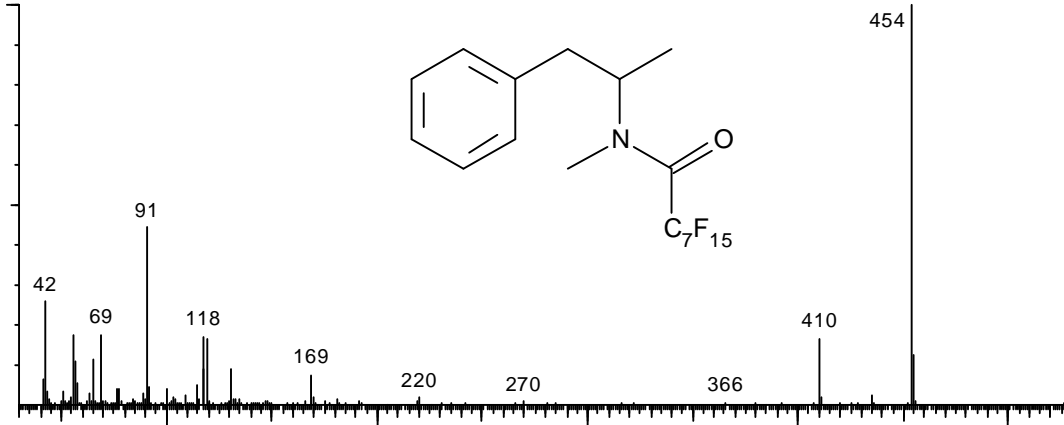
GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70



Methamphetamin PFO

MW:545,29135
MM:545,08359
C₁₈H₁₄F₁₅NO

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

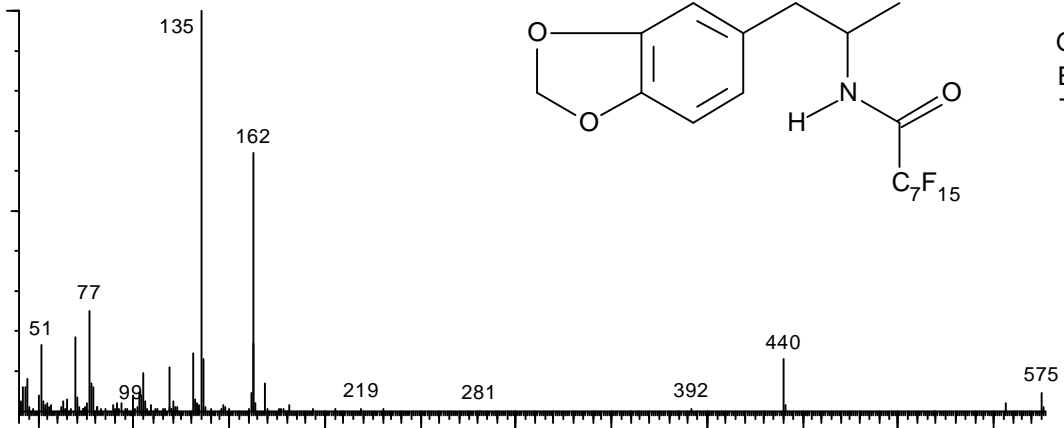


MDA PFO

3,4-Methylenedioxy-amphetamin PFO

MW:575,27427
MM:575,05777
C₁₈H₁₂F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

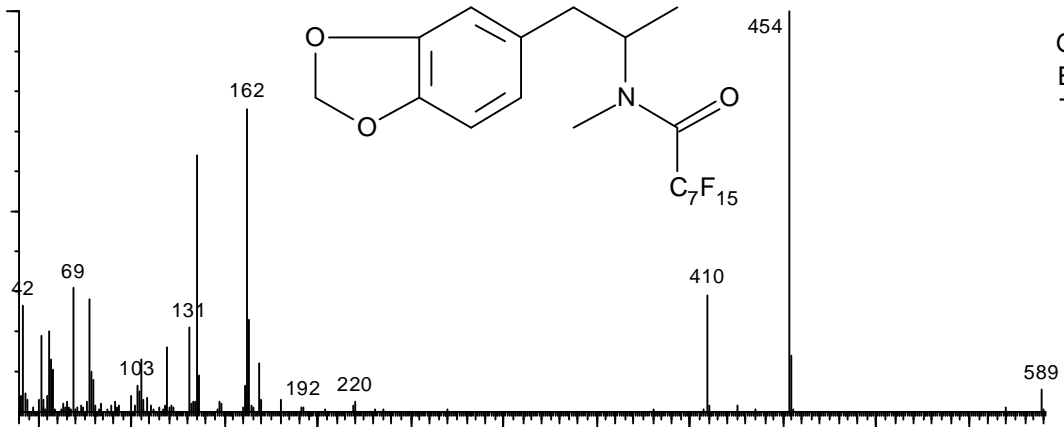


MDMA PFO

3,4-Methylenedioxy-methamphetamin PFO

MW:589,30115
MM:589,07342
C₁₉H₁₄F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70



MDEA PFO

3,4-Methylenedioxyethylamphetamin PFO

MW:603,32803

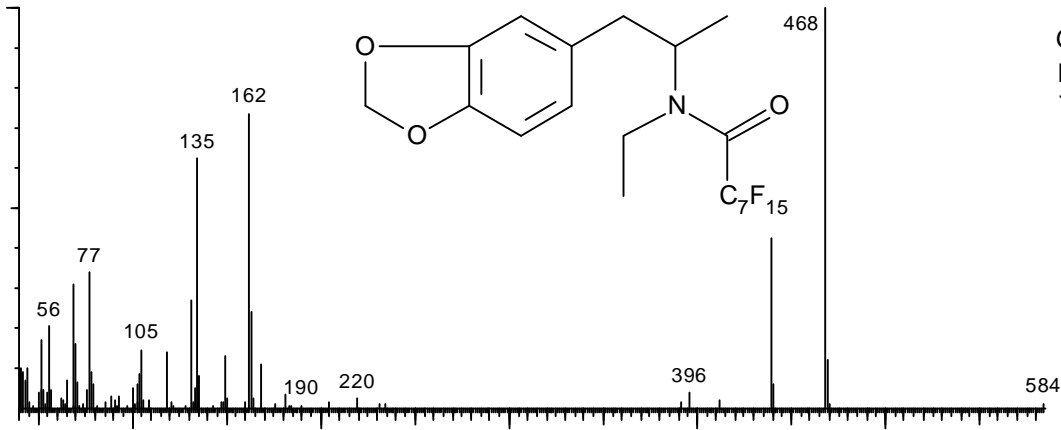
MM:603,08907

$C_{20}H_{16}F_{15}NO_3$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



d3-Amphetamin PFO

MW:534,26447

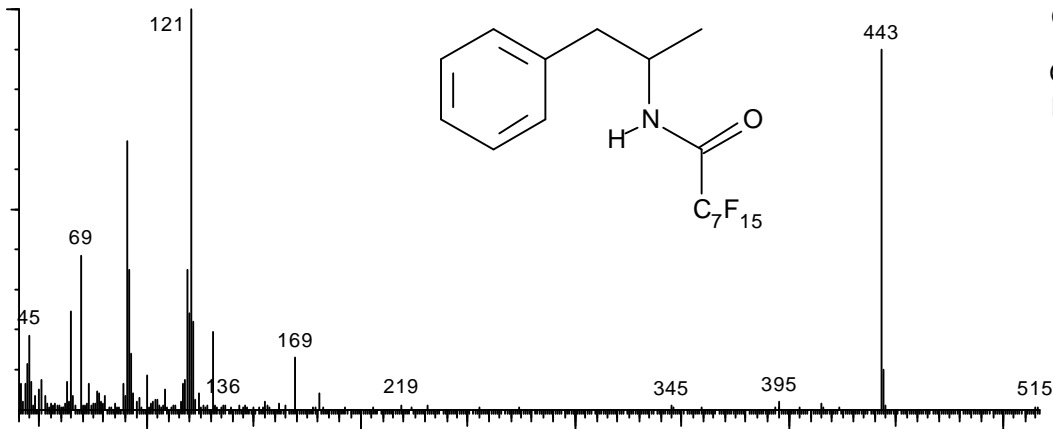
MM:534,08646

$C_{17}H_9D_3F_{15}NO$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



d8-Methamphetamin PFO

MW:551,27547

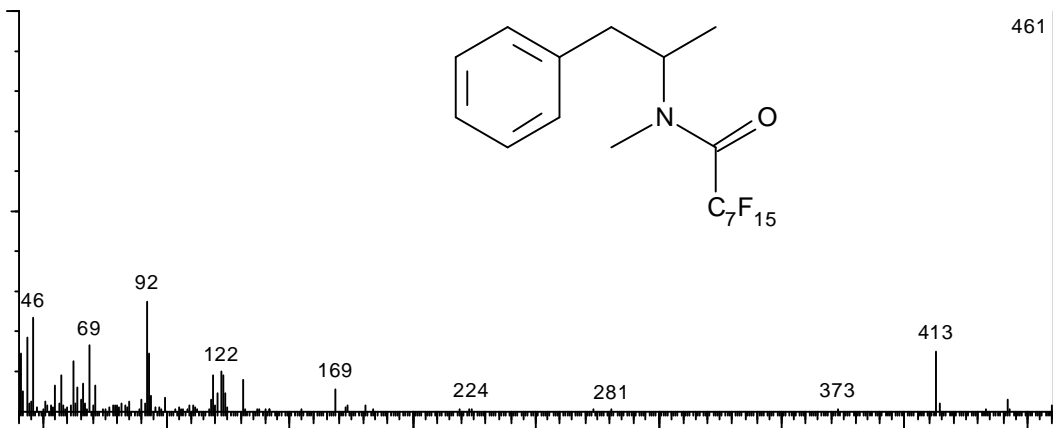
MM:551,11734

$C_{18}H_4D_8F_{15}NO$

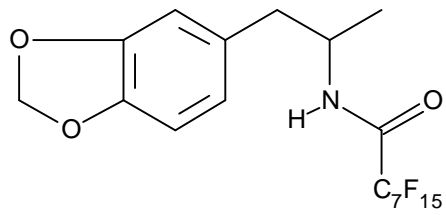
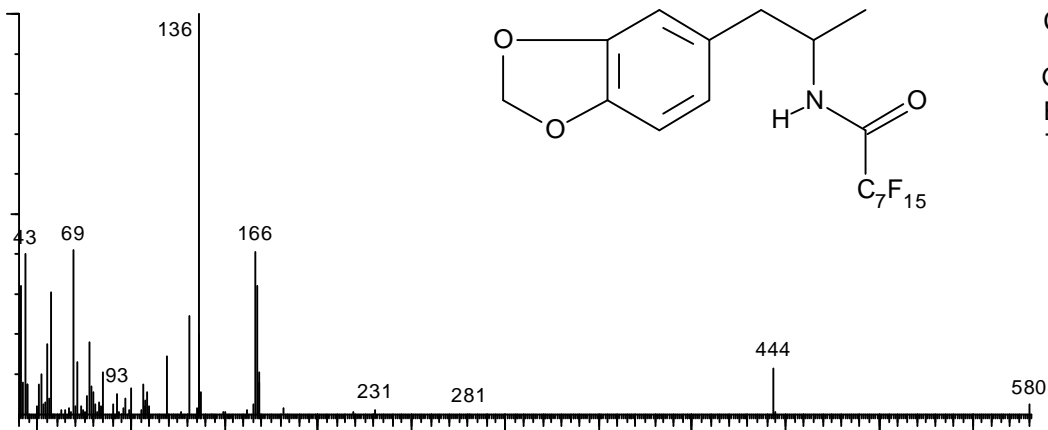
GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70



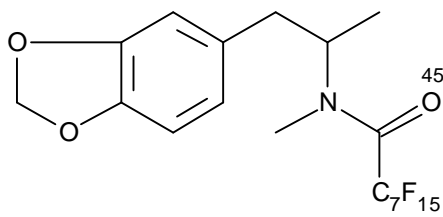
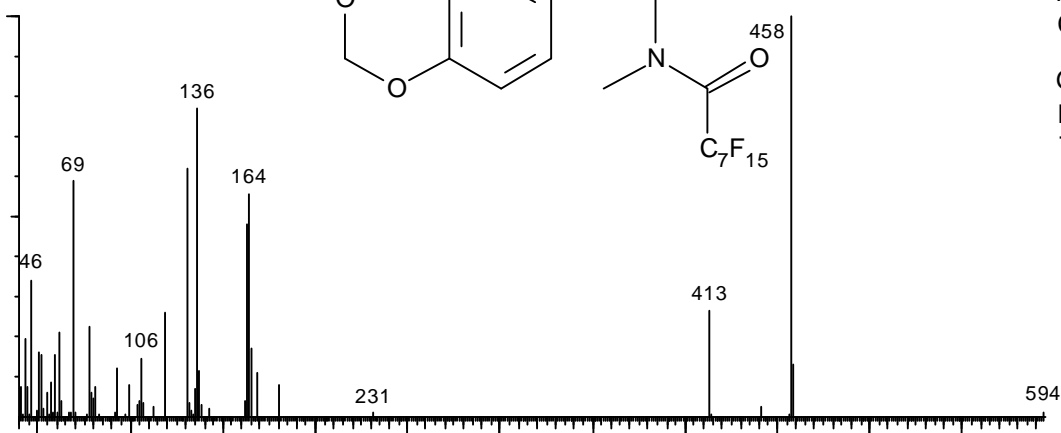
d5-MDA PFO



MW:580,27427
MM:580,08864
C₁₈H₇D₅F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

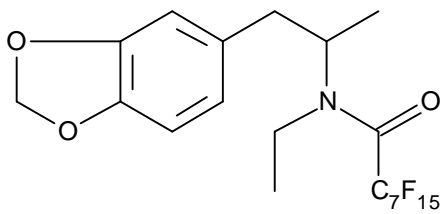
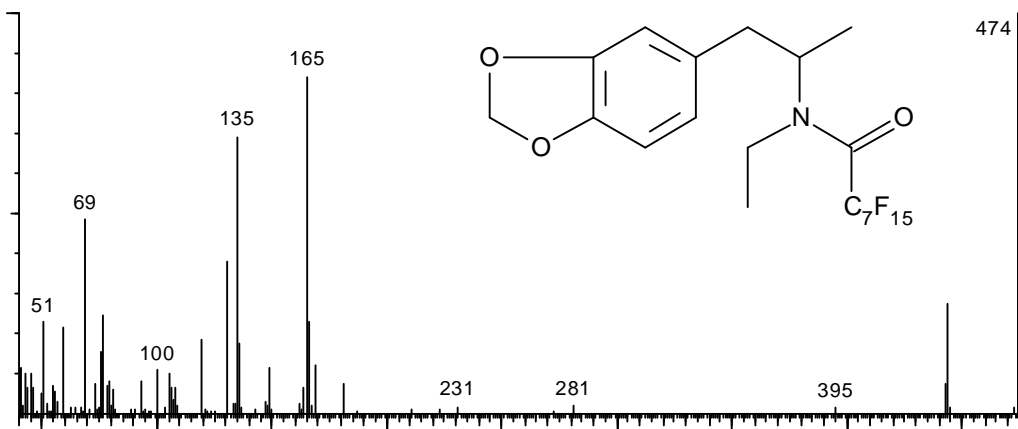
d5-MDMA PFO



MW:309,32510
MM:309,12824
C₁₉H₉D₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

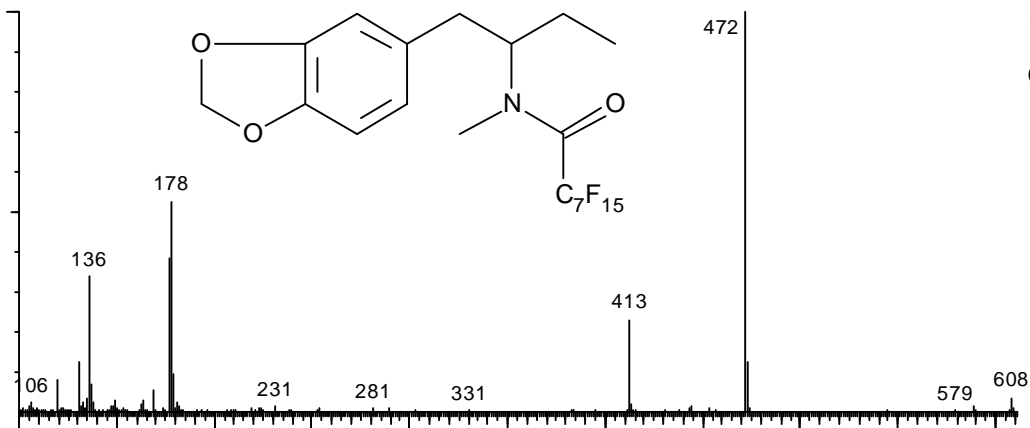
d6-MDE PFO



MW:609,32803
MM:609,12612
C₂₀H₁₀D₆F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

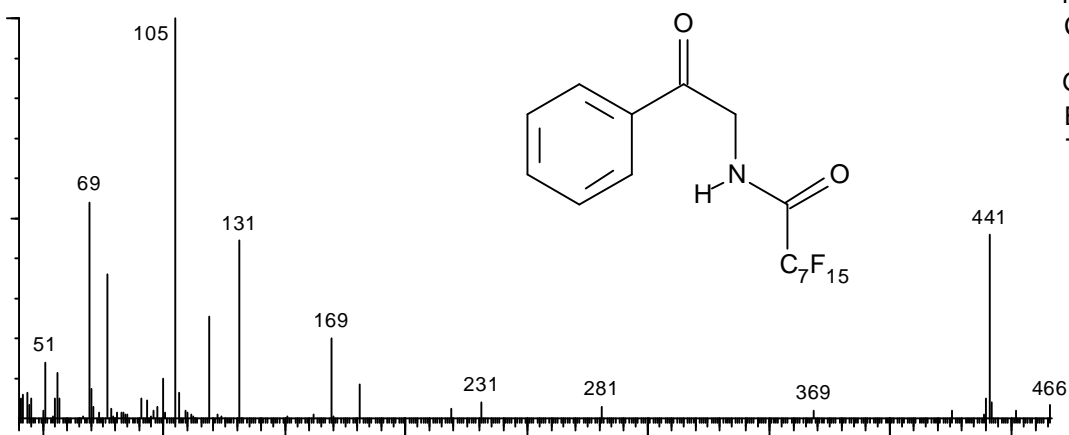
d5-MBDB PFO



MW:608,32803
MM:608,11994
C₂₀H₁₁D₅F₁₅NO₃

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

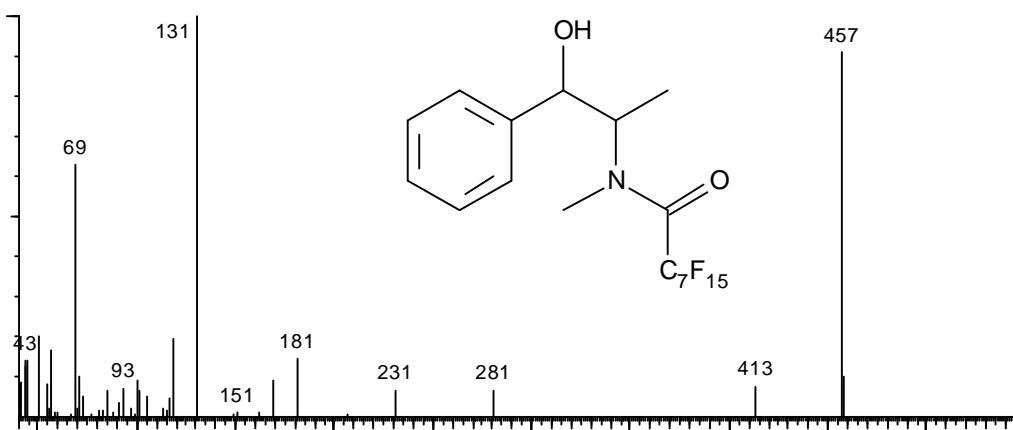
Aminoacetophenon PFO



MW:531,22111
MM:531,03155
C₁₆H₈F₁₅NO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

d3-Ephedrin PFO

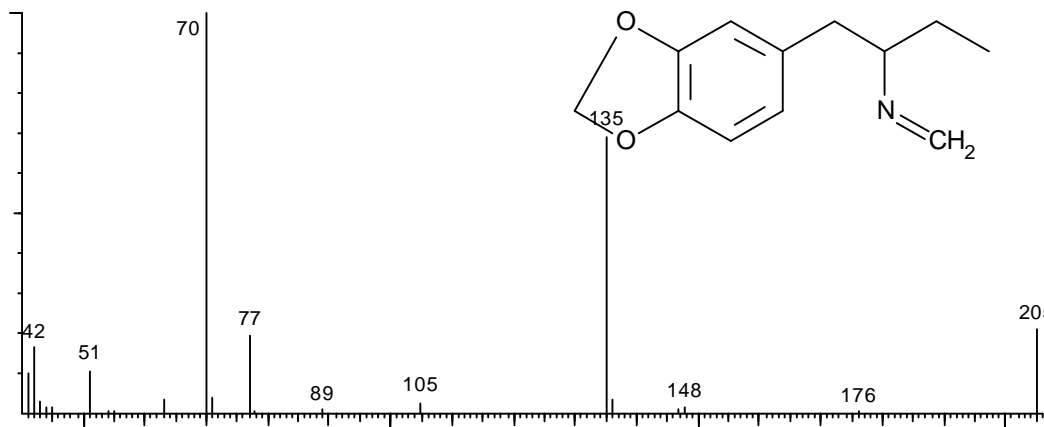


MW:564,29075
MM:564,09703
C₁₈H₁₁D₃F₁₅NO₂

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

Formyl Artefakte

BDB formyl artifact



MW:205,25664

MM:205,11028

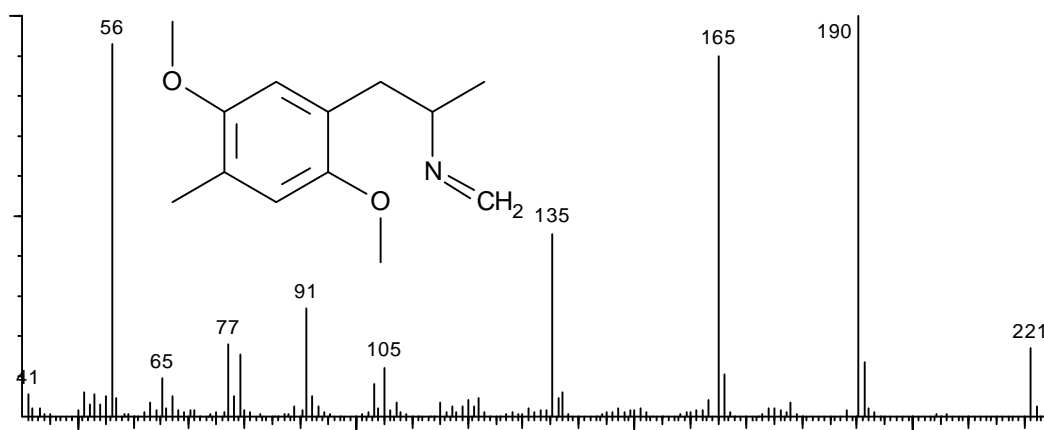
$C_{12}H_{15}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOM formyl artifact



MW:221,29940

MM:221,14158

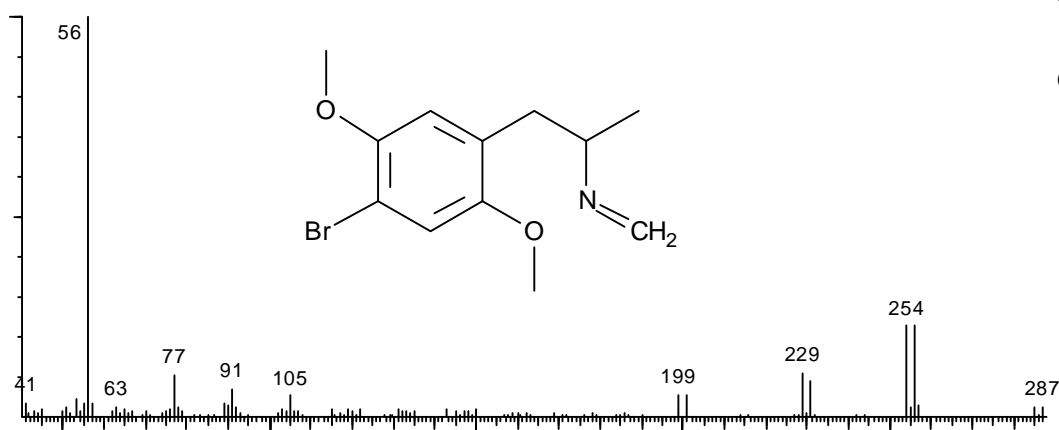
$C_{13}H_{19}NO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

DOB formyl artifact



MW:286,16858

MM:285,03644

$C_{12}H_{16}BrNO_2$

GC/MS

EI 70 eV

TSQ 70

PMA formyl artifact

MW:177,24624
MM:177,11536
C₁₁H₁₅NO

GC/MS
EI 70 eV
TSQ 70

