

**NACHWEIS VON XENOBIOTIKA IN ALTERNATIVEN MATRICES MITTELS  
FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE-MASSENSPEKTROMETRIE**

**METHODENENTWICKLUNG UND NEUE EINSATZMÖGLICHKEITEN IN DER  
FORENSISCHEN TOXIKOLOGIE UND KLINISCHEN CHEMIE**



**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

**Jürgen Kempf**

aus Zell a. H.

2015



Die praktischen Arbeiten zur Erstellung der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Januar 2009 bis September 2014 am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Prof. Dr. Stefan Weber

Referent:

Prof. Dr. Rolf Schubert

Betreuer der Arbeit und Korreferent:

Prof. Dr. Wolfgang Weinmann

Datum der Promotion:

02.02.2015



## Danksagung

Laut Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Fakultät für Chemie und Pharmazie dient die Promotion „...dem Nachweis der Befähigung zu selbständiger vertiefter wissenschaftlicher Arbeit“. Bei der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich zwar um eine, gemäß Promotionsordnung, selbständig angefertigte vertiefte wissenschaftlich Arbeit, diese wäre jedoch ohne die Hilfe und Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen:

Herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Wolfgang Weinmann für die Bereitstellung eines interessanten und vielseitigen Promotionsthemas, seine Unterstützung und seinen fachlichen Rat bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Freiheit, viele Ideen und Projekte nach eigenem Ermessen durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Auwärter möchte ich an dieser Stelle dafür danken, die Arbeit nach dem Ruf von Herrn Prof. Weinmann nach Bern unter gleichbleibenden Bedingungen in der Abteilung Forensische Toxikologie am Institut für Rechtsmedizin beenden zu können.

Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert danke ich herzlich für die Betreuung dieser Dissertation seitens der Fakultät für Chemie und Pharmazie, sein stets offenes Ohr und seinen besonnenen Umgang mit den anfänglichen formalen Problemen der Promotionsberechtigung eines Master-Abschlusses.

Frau Prof. Dr. Regine Süss möchte ich danken, dass sie sich als Dritt-Prüferin für die Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Großer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Stefan Pollak für sein Einverständnis die Promotionsarbeit am Institut für Rechtsmedizin durchführen zu können sowie die großzügige finanzielle Unterstützung zahlreicher nationaler und internationaler Tagungsteilnahmen und Fortbildungen.

Die vorliegende Arbeit bot Gelegenheit mit mehreren Kooperationspartnern aus anderen Instituten bzw. Kliniken sowie der Industrie zusammen zu arbeiten und so interessante Einblicke in andere Forschungs- und Arbeitsbereiche zu erhalten:

Herrn Thomas Wuske von der Drägerwerk AG Lübeck, der mit seiner Anfrage zur Stabilität von Benzodiazepinen in Speichel den Stein ins Rollen brachte, sei für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Realproben gedankt.

Herrn Prof. Dr. Christian Fleischhaker und Herrn PD Dr. Hans-Willi Clement der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik im Kindes- und Jugendalter des Universitätsklinikums Freiburg danke ich für ihre Bereitschaft, das Studienprotokoll ihrer arbeitsreichen Probandenstudie um eine Speichelnahme zu erweitern und die Möglichkeit, unter kontrollierten Bedingungen erhaltenen Realproben analysieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg-Elard Otten und Frau Dr. Yvonne Schüssel aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Freiburg möchte ich an dieser Stelle dafür danken, dass ich durch ihre Fragestellung über den Tellerrand der reinen forensischen Analytik blicken und erste praktische Erfahrungen mit der Analyse von humaner Zahnhartsubstanz sammeln konnte.

Herrn Prof. Dr. Markus Altenburger und Frau Dr. Hanna Ernst aus der Klinik für Zahnerhaltungskunde u. Parodontologie des Universitätsklinikums Freiburg danke ich für die gelungene Zusammenarbeit und die Ausdauer die nötig war, um das gemeinsame Projekt zum Thema Einlagerung von Drogen in humaner Zahnhartsubstanz erfolgreich auf den Weg zu bringen.

Petra Decker, Sebastian Götz, Markus Meyer, und Birgit Schneider von der Firma Bruker Daltonik GmbH danke ich recht herzlich für die mehrjährige Kooperation auf dem Gebiet der Applikationsentwicklung, die vielen Blicke hinter die Kulissen eines Geräteherstellers und dessen „ganz normalen Wahnsinn“ sowie die vielen (außer-) fachlichen Diskussionen. Die Vier seien stellvertretend für die zahlreichen Bruker-Mitarbeiter aus Entwicklung und Service genannt, die gemeinsam den besten technischen Support den man sich für sein Projekt wünschen kann, realisiert haben.

Neben den Kooperationspartnern gebührt mein Dank allen Kollegen und Mitarbeitern am Institut für Rechtsmedizin Freiburg:

„Meinen“ Praktikantinnen Rebecca Kuhn, Bettina Kaiser, Anna Sandhaas und Bettina Saar sowie „meinen“ Bachelorstudenten Markus Stieglat und Laura M. Huppertz möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für das unglaubliche Engagement im Rahmen ihrer jeweiligen Projektarbeiten danken. Ohne euren Einsatz wären einige der Studien und Versuche nicht in diesem Umfang möglich gewesen.

Großen Dank schulde ich Susanne Vogt, deren Türe jederzeit offen stand und die auch für die verwickeltesten Fragen immer ein offenes Ohr hatte. Ihre umsichtigen Antworten, Ratschläge und Ideen halfen mehr als einmal die richtige Entscheidung zu treffen. Danke, Susanne.

Stefan Kneisel danke ich für zahlreiche Diskussionen sowie die unkomplizierte und konstruktive Zusammenarbeit beim Projekt „Nachweis synthetischer Cannabinoide in Speichel“.

Annette Thierauf-Emberger möchte ich für die gemeinsame Projektarbeit, ihre Hilfe bei zahlreichen medizinischen Fragestellungen und mehreren, teils spontaner und umfangreicher Blutentnahme-Aktionen sowie ihre (nahezu) immerwährende gute Laune danken.

Den Präparatoren Gaby Herzog, Thomas Rost und Wolfgang Schmidt danke ich für ihre Unterstützung bei der Entnahme von post-mortalen Proben und die jederzeit freundliche Aufnahme in ihrer Abteilung.

Großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Forensische Toxikologie, insbesondere Lisa Fischer, Florian Geyler, Raija „Böse Frau“ Hammer, Laura M. Huppertz, Jens Klingele, Björn Moosmann, Renate Oßwald, Christa Pelz, Kathrin Riedy, Nadine „Cookie“ Schiesel, Sabrina Schwabe, Christine „Alberich“ Stronczek, Jessica Traber und Katrin Weber, für viele wertvolle Anregungen, stete Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

---

---

*"So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat."*

*Johann Wolfgang von Goethe*

---

---

## Publikationsliste

### ORIGINALBEITRÄGE

*J. Kempf, Th. Wuske, R. Schubert, W. Weinmann*

**Pre-analytical stability of selected benzodiazepines on a polymeric oral fluid sampling device**

Forensic Science International 2009 Apr 15;186(1-3):81-5.

*A. Thierauf, J. Kempf, M. Perdekamp, V. Auwärter, H. Gnann, A. Wohlfarth, W. Weinmann*

**Ethylsulphate and ethylglucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death**

Forensic Science International 2011 Jul 15; 210(1-3):63-8.

*A. Thierauf, J. Kempf, J. Eschbach, V. Auwärter, W. Weinmann, H. Gnann*

**A case of a distinct difference between the measured blood ethanol concentration and the concentration estimated by Widmark's equation.**

Medicine, Science, and the Law. 2013 Apr;53(2):96-9.

*C. Schneider, A. Thierauf, J. Kempf, V. Auwärter*

**Ethanol concentration in breastmilk after the consumption of non-alcoholic beer**

Breastfeeding Medicine 2013 Jun;8(3):291-3

*S. Kneisel, V. Auwärter, J. Kempf*

**Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.**

Drug Testing and Analysis 2013 Aug; 5(8):657-69.

*S. Vogt, J. Kempf, J. Buttler, V. Auwärter, W. Weinmann*

**Desalkylflurazepam found in patients' samples after high-dose midazolam treatment**

Drug Testing and Analysis 2013 Sep; 5(9-10):745-7.

*Y. Schüssl, K. Pelz, J. Kempf, J.-E. Otten*

**Concentrations of amoxicillin and clindamycin in teeth following a single dose of oral medication**

Clinical Oral Investigation 2014 Jan;18(1):35-40

*L.M. Huppertz, S. Kneisel, V. Auwärter, J. Kempf*

**A Comprehensive Library-Based, Automated Screening Procedure for 46 Synthetic Cannabinoids in Serum Employing Liquid Chromatography-Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry with High-Temperature Electrospray Ionization**

Journal of Mass Spectrometry 2014, 49, 117-127

*J. Kempf, J. Traber, V. Auwärter, L.M. Huppertz*

**'Psychotropics caught in a trap' – Adopting a screening approach to specific needs**

Forensic Science International 2014 May 6,243C:84-89

*J. Spinner, M. Klima, **J. Kempf**, L.M. Huppertz, V. Auwärter, M.J. Altenburger; M.A. Neukamm*  
**Determination of drugs of abuse in bovine dentin using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry**

Journal of Mass Spectrometry 2014 Dec,49(12): 1306-13

*T. Alderliesten, L.M.A Favie, R.W. Neijzen, V. Auwärter, C.H.A. Nijboer, R.E.J. Marges, **J. Kempf**, F. van Bel, F. Groenendaal*

**Neuroprotection by argon ventilation after perinatal asphyxia: a safety study in newborn piglets**

PLOS ONE 9(12):e113575. Doi:101371/journal.pone.0113575

## SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

***J. Kempf**, R. Kuhn, C. Fleischhaker, K. Schneider-Momm, W. Weinmann*

**Detection of Methylphenidate in Serum and Oral Fluid of Children and Adolescents Under Medical Treatment with a Single Dose of 20 mg**

Tagungsband zum XVI. GTfCH-Symposium, Toxikologie psychisch aktiver Substanzen, S. 99-104, ISBN: 978-3-00-029404-4

*L.M. Huppertz, S. Kneisel, V. Auwärter, **J. Kempf***

**Trapping 'Spice': a comprehensive, automated LC-ion trap-MS screening approach for the detection of currently 38 synthetic cannabinoids in serum**

Tagungsband zum XVIII. GTfCH-Symposium, Neue Methoden und neue Wirkstoffe – Auswirkungen auf die Forensische Chemie und Toxikologie, S. 293-298, ISBN 978-3-00-043163-0

*L.M. Huppertz, S. Vogt, **J. Kempf***

**Ein automatisiertes MSn-basiertes Screening Verfahren für die klinische und forensische Toxikologie**

Tagungsband zum XVIII. GTfCH-Symposium, Neue Methoden und neue Wirkstoffe – Auswirkungen auf die Forensische Chemie und Toxikologie, S. 299-303, ISBN 978-3-00-043163-0

***J. Kempf**, L.M. Huppertz, S. Vogt, M. Meyer, S. Götz, B. Schneider*

**Toxtyper™ – a Comprehensive LC-MS<sup>n</sup> Application for Clinical Research and Forensic Toxicology**

Bruker Daltonik Application Note LCMS-91

***J. Kempf**, L.M. Huppertz, S. Vogt, M. Meyer, S. Götz, B. Schneider*

**Interlaboratory Tests Demonstrate the Robustness and Transferability of the Toxtyper™ Workflow**

Bruker Daltonik Application Note LCMS-92

***J. Kempf**, L.M. Huppertz, M. Meyer*

**Adopting Forensic Analyses to Specific Lab Needs – Identifying Psychotropics in Serum Using the Toxtyper Open Library Concept**

Bruker Daltonik Application Note LCMS-96

---

## *Wissenschaftliche Auszeichnungen*

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin für die beste Präsentation auf dem Gebiet der Forensischen Toxikologie mit dem Titel:

**A method transferability study: Adapting a QTOF-MS pesticide screening method to the application of forensic screening using enhanced confirmation strategies**

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 17. - 21.09.2013 Saarbrücken

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

[M+H] <sup>+</sup>	protoniertes Molekülion
[M-H] <sup>-</sup>	deprotoniertes Molekülion
amu	atomare Masseneinheit / atomic mass unit
ANOVA	Varianzanalyse
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
API	Atmospheric Pressure Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization
ASMS	American Society for Mass Spectrometry
BAK	Blutalkoholkonzentration
BDAL	Bruker Daltonik
BE	Benzoylgonin
CAD	Collision Activated Dissociation
CCF	Cross-Correlation Function
CE	Kollisionsenergie / Collision Energy
CEP	Collision Entrance Potential
CES	Collision Energy Spread
CID	Collision Induced Dissociation
CRM	Charge Residue Model
CUR	Curtain Gas
CXP	Cell Exit Potential
DAD	Dioden-Array-Detection
DBS	Dynamic Background Substraction
DC	Dünnschichtchromatographie
DFA	Drug Facilitated Assault
DP	Declustering Potential
DRUID	Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines
DUI	Driving under the influence
EC	End Cap
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin
EDTA	Ethylendiamintetraaceta
EI	Elektronenstoßionisation / electron impact
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm / Extracted Ion Chromatogramm
EPI	Enhanced Product Ion
EPI	Entrance Potential
ESI	Electrospray Ionization

EtG	Ethylglucuronid
EtS	Ethylsulfat
FIA	Fließinjektionsanalyse / flow injection analysis
GC	Gaschromatographie / Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS-GC-FID	Headspace-Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor
HUG	Hôpitaux Universitaire de Genève
IB	ionBooster
ICC	Intelligent Charge Control
IDA	Information Dependent Acquisition
IED	Ion Desorption Model
IEM	Ion Evaporation Model
IKC	Institut für klinische Chemie
IRM	Institut für Rechtsmedizin
IS	Interner Standard
ISO	Internationale Organisation für Normung
k.A.	keine Angabe
KHN	KNOOP Hardness Number
Konz.	Konzentration
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LLE	Flüssig-flüssig Extraktion
LM	Laufmittel
LOD	Nachweisgrenze / limit of detection
LOQ	Bestimmungsgrenze / limit of quantification
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylendioxy-N-ethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin
ME	Matrixeffekte
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MTS	Multi-Target-Screening

---

NPS	Neue psychoaktive Substanzen
OF	oral fluid
OF/Se	Speichel/Serum Koeffizient
p.A.	pro analysi / zur Analyse
PE	Prozesseffektivität
Q	Quadrupol
QqQ	Triple-Quadrupol
RE	Ringelektrode
RE	Wiederfindungsrate / Recovery
ROSITA	Roadside Testing Assessment
RSD	Standardabweichung
RV	Ringversuch
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis
S/P	Speichel/Plasma Koeffizient
Se	Serum
SIM	Single Ion Monitoring
SPL	Scheduled Precursor List
SPS	Smart Parameter Settings
SST	System Suitability Test
THC	Tetrahydrocannabinol
THC-COOH	Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure
TIAFT	The International Association of Forensic Toxicologists
TIC	Totalionenchromatogramm / Total Ion Chromatogram
TOF	Flugzeitmassenspektrometrie / Time of Flight
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TT	Toxytyper
UAK	Urinalkoholkonzentration
UK	Bruker Daltonik UK
VHAK	Glaskörperalkoholkonzentration
ZDA	Zero-Delay Alternating

---

---

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Alternative Matrices .....	2
1.1.1 Speichel.....	2
1.1.2 Zähne .....	10
1.1.3 Glaskörper.....	13
1.2 Instrumentelle Grundlagen.....	15
1.2.1 LC-MS Kopplung.....	16
1.2.2 Ionen Transfer.....	21
1.2.3 Ionenfallen Massenspektrometer .....	22
1.2.4 Screening-Verfahren mit LC-MS bzw. LC-MS/MS.....	28
1.3 Ziele der Arbeit.....	31
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>33</b>
2.1 Materialien.....	33
2.1.1 Chemikalien und Standardsubstanzen .....	33
2.1.2 Reagenzien und Lösungen .....	35
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	41
2.2 Analysensystem .....	42
2.3 Methodenentwicklung.....	43
2.3.1 Methodenentwicklung für Triple-Quadrupol-MS-Systeme.....	43
2.3.2 Methodenentwicklung Toxytyper .....	44
2.4 Verwendete Analysenmethoden .....	46
2.4.1 Nachweis von Benzodiazepinen in humanem Speichel .....	46
2.4.2 Nachweis von Methylphenidat in humanem Speichel und Serum .....	48
2.4.3 Nachweis synthetischer Cannabinoide in humanem Speichel.....	49
2.4.4 Nachweis von Antibiotika in humaner Zahnhartsubstanz.....	53
2.4.5 Nachweis von Drogen in Zahnhartsubstanz .....	55
2.4.6 Nachweis von EtG und EtS in humaner Glaskörperflüssigkeit .....	61
2.4.7 Drogen- und Medikamentenscreening mittels 3D Ionenfalle.....	62
<b>3. EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>67</b>
3.1 Untersuchungen zur Stabilität von Benzodiazepinen auf einem kommerziellen Speichelsammler .....	67
3.1.1 Fragestellung.....	67
3.1.2 Studiendesign .....	67

3.2	Nachweis von Methylphenidat in humanem Speichel nach kontrollierter Medikation.....	68
3.2.1	Fragestellung .....	68
3.2.2	Studiendesign und Ablauf der klinischen Prüfung .....	69
3.3	Nachweis von synthetischen Cannabinoiden in humanem Speichel .....	70
3.3.1	Fragestellung .....	70
3.3.2	Methodenentwicklung .....	70
3.4	Nachweis von Antibiotika in humaner Zahnhartsubstanz.....	73
3.4.1	Fragestellung .....	73
3.4.2	Studiendesign .....	74
3.4.3	Methodenentwicklung .....	74
3.5	Untersuchungen zur Einlagerung von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in die Zahnhartsubstanz .....	75
3.5.1	Fragestellung .....	75
3.5.2	Studiendesign .....	76
3.6	Nachweis von EtG und EtS in humaner Glaskörperflüssigkeit .....	80
3.6.1	Fragestellung .....	80
3.6.2	Studiendesign .....	81
3.7	Entwicklung eines Drogen- und Medikamenten-Screenings mittels 3D Ionenfalle .....	81
3.7.1	Fragestellung .....	81
3.7.2	Toxyper-Methodenentwicklung und Evaluierung .....	82
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>87</b>
4.1	Untersuchungen zur Stabilität von Benzodiazepinen auf einem kommerziellen Speichelsammler.....	87
4.1.1	Validierungsparameter .....	87
4.1.2	Wiederfindungsrate bei Elution mit Methanol .....	88
4.1.3	Ergebnisse der Lagerstudie.....	88
4.1.4	Schlussfolgerungen der Lagerstudie.....	90
4.2	Nachweis von Methylphenidat in humanem Speichel nach kontrollierter Medikation.....	91
4.2.1	Ergebnisse der Methodvalidierung .....	91
4.2.2	Ergebnisse der Probandenstudie .....	92
4.2.3	Schlussfolgerungen der Probandenstudie .....	95
4.3	Nachweis von synthetischen Cannabinoiden in humanem Speichel .....	96
4.3.1	Ergebnisse der Methodvalidierung .....	96

---

4.3.2	Ergebnisse der Lagerstudie .....	101
4.3.3	Analyse von Realproben .....	103
4.3.4	Schlussfolgerungen .....	106
4.4	Nachweis von Antibiotika in humaner Zahnhartsubstanz .....	106
4.4.1	Amoxicillin in der Zahnhartsubstanz .....	106
4.4.2	Clindamycin in der Zahnhartsubstanz .....	108
4.4.3	Schlussfolgerungen der Studie .....	109
4.5	Untersuchungen zur Einlagerung von Drogen- und Medikamenten- wirkstoffen in die Zahnhartsubstanz .....	111
4.5.1	Ergebnisse und Diskussion der Versuche 1 - 4 .....	111
4.5.2	Ergebnisse und Diskussion der untersuchten humanen Zahnproben	118
4.5.3	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen humaner Zahnhartsubstanz .....	128
4.6	Nachweis von Ethylglucuronid und Ethylsulfat in humaner Glaskörperflüssigkeit.....	130
4.6.1	Ethylglucuronid und Ethylsulfat in Glaskörper-flüssigkeit.....	130
4.6.2	Ethanolkonzentration in Blut, Urin und Glaskörperflüssigkeit.....	132
4.6.3	Diskussion der Fall-Ergebnisse.....	132
4.7	Entwicklung eines Drogen- und Medikamenten-Screenings mittels 3D Ionenfalle .....	134
4.7.1	Auswahl von Säule und Laufmitteln .....	134
4.7.2	Aufbau einer Spektrenbibliothek.....	137
4.7.3	Toxyper Screening: Proof-of-concept.....	137
4.7.4	Toxyper Screening: Evaluierung der Methode für Serum.....	141
4.7.5	Toxyper Screening: Vergleich Toxyper und MTS (Serum).....	149
4.7.6	Toxyper Screening: Evaluierung der Methode in Urinproben .....	150
4.7.7	Toxyper Screening: Interlaborvergleich .....	160
4.7.8	Toxyper Screening: Analyse von Glaskörperflüssigkeit .....	166
4.7.9	Schlussfolgerungen aus der Toxyper-Entwicklung.....	178
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>183</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>191</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>193</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>195</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>203</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>271</b>

---

---

## 1. Einleitung

Blut und Urin sind die klassischen Routine-Matrices in der klinischen und forensischen Toxikologie. Der Begriff „Alternative Matrices“ summiert weitgefasst alle anderen biologischen Matrices, die für analytische Verfahren zum Nachweis körperfremder oder auch körpereigener Stoffe in Frage kommen. Die Definition, welche Untersuchungsmatrix Routine ist und welche als alternativ angesehen wird, ist äußerst subjektiv und unterscheidet sich je nach Art der Anwendung oder mitunter auch von Land zu Land.

Im Bereich der forensischen Toxikologie ist es für den Versuch einer Definition sinnvoll, zwischen prä- und post-mortal asservierbarem Probenmaterial zu unterscheiden. Bei einer lebenden Person kommen neben Blut und Urin noch Haare, Atemluft, Speichel, Schweiß, Mekonium, Sputum und Nägel als Untersuchungsmatrix in Frage. Während die Haaranalytik, z.B. im Rahmen der Abstinenzkontrolle oder die Atemalkoholkontrolle im Straßenverkehr, bereits zu den Routineverfahren gehören, ist z.B. die Analyse von Nägeln auf körperfremde Substanzen bisher auf einzelne, spezielle Fragestellungen begrenzt.

Im Rahmen der forensisch-toxikologischen Untersuchung von Todesfällen werden neben Blut und Urin routinemäßig Haare, Mageninhalt, Muskel und z.T. verschiedene Organasservate (z.B. Leber, Galle) untersucht. Als weitere Untersuchungsmaterialien kommen u.a. Glaskörper, Gehirn, Liquor, Nägel, Zähne und Knochenmark in Frage. Diese Liste alternativer Matrices lässt sich nahezu beliebig erweitern. Der Glaskörper befindet sich beispielsweise im Graubereich zwischen alternativer Matrix und Routine-Untersuchungsmaterial. Am hiesigen Institut für Rechtsmedizin wird Glaskörper routinemäßig lediglich für die Alkoholbestimmung verwendet. Im Department of Forensic Medicine des Hjelt Instituts der Universität von Helsinki hingegen wird Glaskörper seit Jahren als Matrix für die systematische toxikologische Analyse bei Todesfällen eingesetzt.

Die Gründe alternative Matrices zum Nachweis körperfremder Stoffe zu verwenden sind vielfältig. Eine bessere Compliance, einfachere Probennahme oder prä-analytische Handhabung, ein der jeweiligen Fragestellung angepasstes Nachweisfenster oder schlichtweg da die klassischen Asservate Blut und Urin nicht gewinnbar sind.

Das Wissen über die physiologischen und physikalisch-chemischen Hintergründe des Stofftransports in die jeweiligen Organe oder Gewebe ist in der Regel schon lange Zeit bekannt. Die enormen Fortschritte in der Entwicklung immer sensitiverer

analytischer Verfahren während der letzten Jahrzehnte ermöglichten den sensitiven und spezifischen Nachweis von Substanzen in immer kleiner werdenden Konzentrationen bzw. in immer weniger Probenmaterial. In dieser Arbeit wurden die alternativen Matrices Speichel, Zahnhartsubstanz und Glaskörper als Probenmaterial verwendet. In diesem Kapitel wird daher, soweit für die durchgeführten Versuche notwendig, näher auf deren physiologischen Eigenschaften, Besonderheiten und Limitierungen eingegangen. Zudem werden die physikalischen Prinzipien und Besonderheiten der in dieser Arbeit eingesetzten massenspektrometrischen Verfahren genauer erläutert.

## 1.1 *Alternative Matrices*

### 1.1.1 **Speichel**

Die Sekretion von Speichel (lat. *saliva*) dient in erster Linie der Anfeuchtung von Mundschleimhaut und Mundhöhle. Speichel macht die aufgenommene Nahrung schlüpfrig und leitet die Verdauung ein, er wirkt bakterizid, dient somit der immunologischen Abwehr in der Mundhöhle, und es werden Iod und Kalium über den Speichel ausgeschieden<sup>[1]</sup>.

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Methodenentwicklung zum Nachweis körperfremder Substanzen liegt, soll an dieser Stelle nicht näher auf die vielseitige Verwendung von Biomarkern im Speichel bei der Diagnose von Erkrankungen der Mundhöhle, Infektionen oder anderen systemischen Erkrankungen eingegangen werden. Für weitere Hintergrundinformationen sei auf die Reviews zur diagnostischen Anwendung von Speichel von Farnaud et al.<sup>[2]</sup> und Kaufmann et al.<sup>[3]</sup> verwiesen, in denen die verschiedenen klinischen Biomarker ausführlich beschrieben sind.

#### 1.1.1.1 *Bildung und physiologische Zusammensetzung von Speichel*

Als Speichel wird streng genommen das Sekret der verschiedenen im Mundraum vorhandenen Speicheldrüsen bezeichnet. Es besteht zu ca. 99% aus Wasser und verschiedenen Elektrolyten ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ). Weitere organische Bestandteile sind Mucin, Verdauungsenzyme ( $\alpha$ -Amylase), Immunglobulin IgA, Ascorbinsäure, Serumalbumin, mehrere Aminosäuren und einige Hormone (z.B. Cortisol und Testosteron)<sup>[4]</sup>. Im allgemeinen Sprachgebrauch ist mit Speichel jedoch der Mundspeichel gemeint, der neben dem eigentlichen Sekret auch Zellbruchstücke, Hämozyten, Bakterien und deren Stoffwechselprodukte sowie Essensreste enthält. Im Englischen hat sich daher auch der Begriff „oral fluid“ an Stelle von „saliva“

durchgesetzt. Dieser bringt besser zum Ausdruck, dass es sich bei Speichel nicht um eine homogene Flüssigkeit handelt, sondern um ein Gemisch, dessen Zusammensetzung und Konsistenz von vielerlei Faktoren abhängig ist.

Der Großteil des produzierten Speichels (0,5 - 1,6 l/d<sup>[5]</sup>) wird durch die drei großen Mundspeicheldrüsen (*Glandulae salivariae majores*) sezerniert. Zusätzlich finden sich nahezu überall in der Submucosa der Mundschleimhaut verteilt schätzungsweise 450 - 750 kleine Speicheldrüsen (*Glandulae salivariae minores*)<sup>[6]</sup>. Die drei großen Mundspeicheldrüsen, die *Glandula parotidea* (Ohrspeicheldrüse), die *Glandula submandibularis* (Unterkieferspeicheldrüse) und die *Glandula sublingualis* (Unterzungspeicheldrüse), zählen neben der Leber und der Bauchspeicheldrüse zu den großen Anhangsdrüsen des Verdauungstraktes. Es handelt sich um jeweils paarweise angelegte, von einer Bindegewebskapsel begrenzte Organe, die im Innern aus Drüsenendstücken und einem Ausführungsgangsystem aufgebaut sind. Der Aufbau ist drüsenpezifisch, jedoch bestehen die Endstücke immer aus sezernierenden Zellen, während sich das Ausführungsgangsystem aus sog. Schalt- und Streifenstücken zusammensetzt (s. Abb. 1).

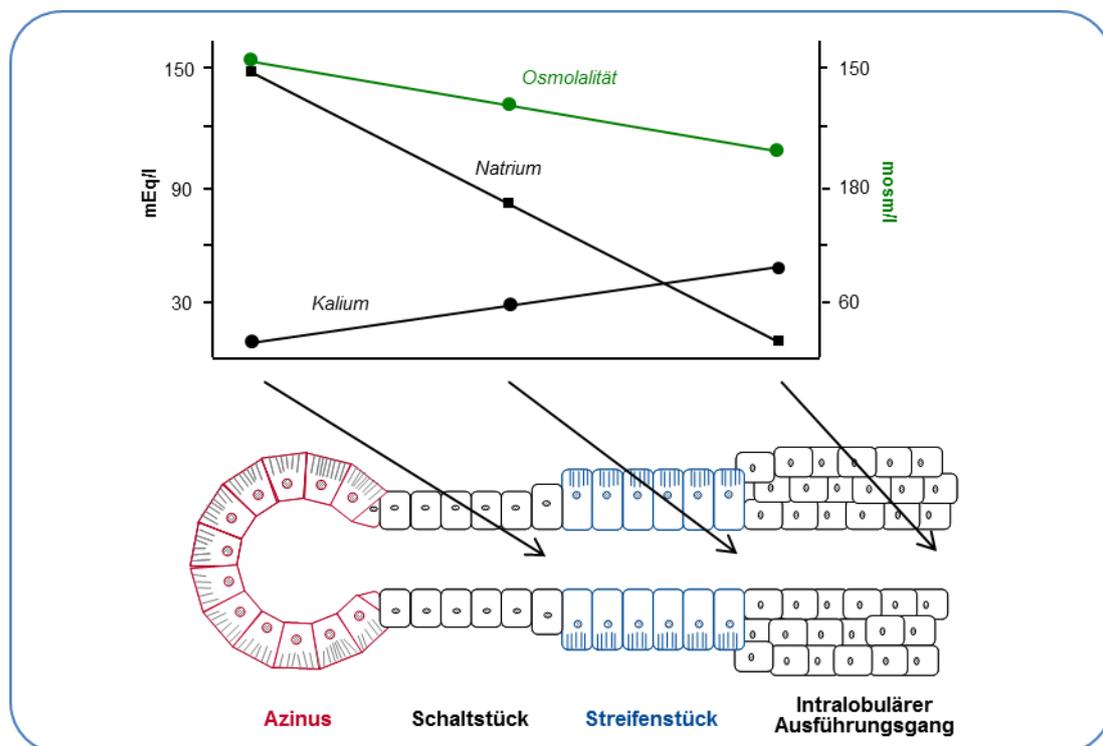


Abb. 1: Veränderung der Elektrolytkonzentration des Speichels im Streifenstück<sup>[7]</sup>

Die Ohrspeicheldrüse (*Parotis*) ist eine azinöse Drüse mit hoher Amylase-Aktivität, deren Endstücke ausschließlich aus serösen Drüsenzellen bestehen. Die im

Bindegewebe vorkommenden Plasmazellen bilden Immunglobulin IgA, das zusammen mit den in großer Zahl in den Drüsenzellen gebildeten Proteinen in den Speichel gelangt und an der Abwehr von Pathogenen in der Mundhöhle beteiligt ist. Bei der Unterkieferspeicheldrüse handelt es sich um eine turboloazinöse Drüse mit serösen (ca. 80% des Drüsenvolumen) und mukösen Drüsenzellen. Neben einer nur schwachen Amylase-Aktivität enthält das Sekret Lysozym, welches durch Spaltung der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminresten die Zellwand von Bakterien hydrolysieren kann.

Die Endstücke der Unterzungspeicheldrüse bestehen zu 60 % aus mukösen und zu 30 % aus serösen Zellen, die Schalt- und Streifenstücke des Ausführungssystems fehlen fast vollständig<sup>[7]</sup>.

Je nach Aufbau der Endstücke wird in den jeweiligen Drüsen dünnflüssiger, protein- und enzymreicher (serös) oder schleimiger enzymarmer (mukös) Primärspeichel gebildet. Die Elektrolytzusammensetzung entspricht der des Blutes. Beim Abtransport durch die Ausführungsgänge wird  $\text{Cl}^-$  durch einen  $\text{Na}^+ / 2 \text{Cl}^- / \text{K}^+$ -Co-transporter in die Zellen der Speicheldrüsen aufgenommen und wieder über einen  $\text{Cl}^-$ -Kanal in den oberen Teil des Drüsen-Ausführungsgangs sezerniert.  $\text{Na}^+$  und Wasser folgen passiv auf parazellulärem Weg<sup>[7]</sup>.

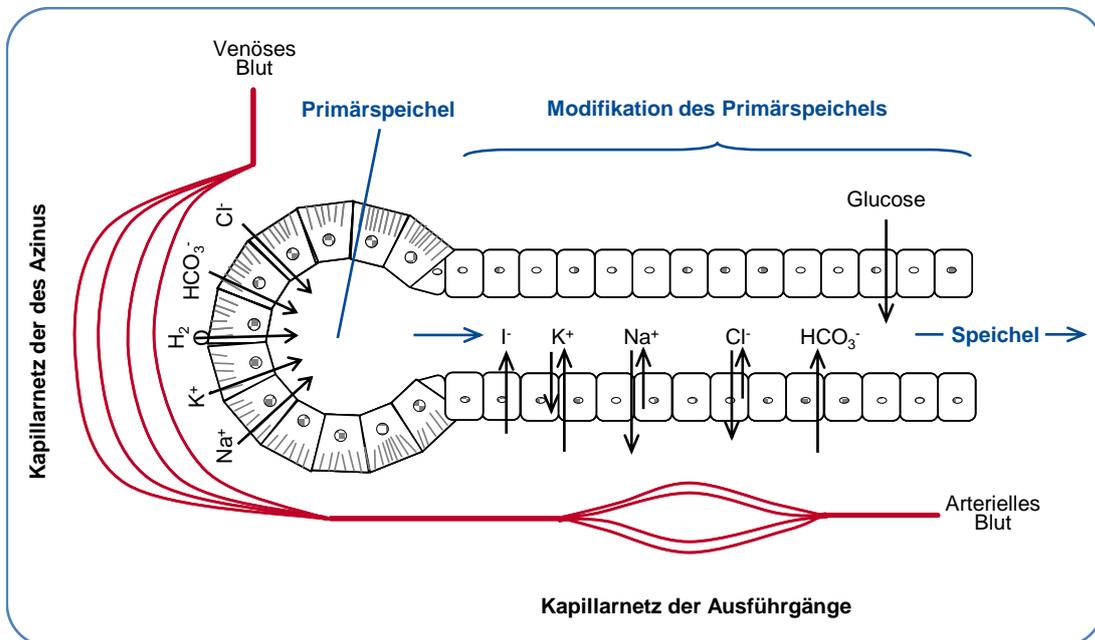


Abb. 2: Modifizierung des Primärspeichels in den Ausführungsgängen<sup>[7]</sup>

Während der Passage des Ausführungsganges, der im mittleren Teil relativ wasserundurchlässig ist, werden  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  aus dem Lumen resorbiert, wodurch die Osmolalität sekretionsabhängig sinkt (s. Abb. 2). Zusätzlich werden kleine

Mengen  $K^+$  und Hydrogencarbonat sezerniert, wodurch der entstehende Speichel zunehmend hypoton wird. Der pH-Wert des Speichels liegt im Ruhezustand zwischen 5,5 und 6,5 und kann nach Stimulation bis auf einen pH-Wert von 7,8 ansteigen<sup>[6]</sup>.

Mit gesteigertem Speichelfluss ändert sich auch die Elektrolytzusammensetzung des Speichels, da die Resorptions- und Sezernierungszeiten verkürzt, bzw. die Transportmechanismen gesättigt sind. Dies führt zu einem Anstieg der  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Konzentration und dadurch zu einer Erhöhung der Osmolalität. Die beschriebene Abgabe und Aufnahme von Stoffen in und aus dem Speichel geschieht über das doppelte Kapillarsystem der umgebenden Blutbahnen im Bereich der Ausführungsgänge (Gegenstromprinzip) und Endstücke<sup>[7]</sup>.

### *1.1.1.2 Regulation und Einflüsse auf die Speichelbildung*

Die Zusammensetzung des Speichels und dessen Flussrate werden von der Aktivität des autonomen Nervensystems bestimmt. Die serösen Teile der Speicheldrüsen unterliegenden dabei der Kontrolle des Sympathikus. Die mukösen Teile der Kontrolle von Parasympathikus und Sympathikus. Sympathische Stimulation der Sekretion führt zu einem verminderten, kalium- und proteinreichen Speichelfluss. Stimulation über den Parasympathikus führt zu erhöhtem Speichelfluss mit verminderter Konzentration an organischen und anorganischen Bestandteilen. Olfaktorische Reize können ebenso den Speichelfluss erhöhen. Mechanische Reize der Mundschleimhaut bei der Nahrungsaufnahme führen ebenfalls zu einer Erhöhung der Proteinsekretion (Verdauungsenzyme)<sup>[8]</sup>. Die Einnahme von Wirkstoffen, die Sympathikus bzw. Parasympathikus beeinflussen, kann somit auch Einfluss auf die Speichelflussrate haben.

### *1.1.1.3 Übergang körperfremder Stoffe in den Speichel*

Erste systematische Studien über den Stofftransport von organischen Makromolekülen durch die Membranen der Speicheldrüsen stammen bereits aus dem Jahre 1932<sup>[9, 10]</sup>. Damit körperfremde Stoffe, die in der Blutbahn zirkulieren, im Speichel nachweisbar werden, müssen sie im Zuge der Sekretion entweder auf intra- oder extrazellulärem Weg in den Speicheldrüsen in das Lumen abgegeben werden. Prinzipiell kommen dafür mehrere Wege in Frage:

- Passive Diffusion von lipophilen Stoffen durch die Zellmembran
- Aktive Transportprozesse
- (Ultra-)Filtration von Stoffen mit einem Molekulargewicht  $< 1900$  Da durch sog. Gap Junctions

Welcher der Prozesse für den einzelnen Stoff in Frage kommt, hängt im Wesentlichen von der Molekülgröße ab. Kleine Moleküle wie Ethanol gelangen durch Ultrafiltration aus dem Parazellularraum in den Speichel. Für Ionen (z.B. Lithium, Thiocyanat) und große Moleküle, darunter auch einige Arzneistoffe (z.B. Penicillin, Metoprolol und Methotrexat), sind aktive Transportmechanismen beschrieben<sup>[11-14]</sup>. Die meisten niedermolekularen Verbindungen gelangen durch einfache Diffusionsprozesse durch die Phospholipid-Doppelschicht der Azinus-Zellen in den Speichel. Bei diesem Vorgang spielen Lipophilie und der pKa-Wert eine wichtige Rolle. Auf die einzelnen Parameter, die Einfluss auf die den Übergang und damit auf den Speichel/Plasma-Koeffizienten (S/P) haben, soll an dieser Stelle noch genauer eingegangen werden.

### **Molekulargewicht**

Das Molekulargewicht spielt neben dem oben beschriebenen Einfluss auf den Transport weg eine eher geringe Rolle. Als vereinfachte Faustregel lässt sich sagen, je kleiner das Molekül, desto schneller die Übergangsrate. Für stark wasserlösliche Stoffe wird ein Molekulargewicht von 100 Da als kritische Größe angesehen<sup>[15, 16]</sup>.

### **Löslichkeit**

Den größten Einfluss auf die freie Diffusion zwischen Blut und Speichel hat die Wasser- bzw. Lipid-Löslichkeit eines Stoffes. Lipophile Substanzen diffundieren leichter durch Zellmembrane als hydrophile. Die Clearance durch Diffusion durch die Membranen der Speicheldrüsenzellen wird hauptsächlich durch den Oktanol/Wasser-Koeffizient bestimmt<sup>[16]</sup>.

### **pK<sub>a</sub>- und pH-Wert**

Für saure und basische Wirkstoffe hängt die Speichel-Konzentration vom Ionisierungsgrad und somit vom pK<sub>a</sub>-Wert der Substanz und dem pH-Wert der jeweiligen Lösung ab. Da humaner Speichel in der Regel saurer ist als das Blut, ist der Speichel/Plasma-Koeffizient für ungebundene, saure Substanzen gleich oder kleiner und für ungebundene, basische Substanzen gleich oder größer als eins. Dies lässt sich basierend auf der Henderson-Hasselbach-Gleichung für schwache Basen und Säuren wie folgt ermitteln<sup>[17]</sup>:

$$\text{Für schwache Basen gilt: } S/P = \frac{c(\text{Speichel})}{c(\text{Plasma})} = \frac{1+10^{(pK_a-pH_s)}}{1+10^{(pK_a-pH_p)}} * \frac{F(P)}{F(S)}$$

Für schwache Säuren gilt: 
$$S/P = \frac{c(\text{Speichel})}{c(\text{Plasma})} = \frac{1+10^{(pH_s-pK_a)}}{1+10^{(pH_p-pK_a)}} * \frac{F(P)}{F(S)}$$

$pK_a$	<i>pKa-Wert der Substanz</i>
$pH_s$	<i>pH-Wert des Speichels</i>
$pH_p$	<i>pH-Wert des Speichels</i>
$F_s$	<i>freie Konzentration im Speichel</i>
$F_p$	<i>freie Konzentration im Plasma</i>

Die freie Konzentration im Speichel  $F_s$  kann, anders als im Blut, gleich der Gesamtkonzentration gesetzt werden, da die Proteinbindung im Speichel auf Grund des geringen Proteingehalts vernachlässigbar ist.

Wie in Kapitel 1.1.1.1 beschrieben variiert der pH-Wert des Speichels abhängig vom Speichelfluss und der damit einhergehenden unterschiedlichen Hyrogencarbonat-Sezernierung. Zusätzlich erhöht sich der pH-Wert des Speichels beim Kontakt mit Luftsauerstoff in der Mundhöhle und dem damit einhergehenden Verlust von  $CO_2$ . Eine pH-Wert-Bestimmung des Mundspeichels spiegelt den für die Diffusion ausschlaggebenden pH-Wert des Primärspeichels im Innern der Endstücke also nur begrenzt wieder. Drogen und Medikamente können auf Grund ihres Ionisierungsgrades im Speichel in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen neutrale Substanzen, schwache Basen mit einem  $pK_A$  unter 5,5 oder schwache Säuren mit  $pK_A$  größer 8,5, die unter physiologischen Bedingungen größtenteils ungeladen vorliegen. Die Speichelkonzentration dieser Substanzen ist weitgehend unabhängig vom vorliegenden pH-Wert, wird also nur wenig bis gar nicht vom Speichelfluss (Stimulation, äußere Einflüsse usw.) beeinflusst. Zum anderen Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen zum größten Teil ionisiert vorliegen und deren Speichelkonzentration stärker den äußeren Einflüssen auf die Speichelsekretion unterliegt<sup>[15]</sup>.

### Speichelflussrate

Die Speichelflussrate kann, wie gerade schon erläutert, durch ihre Auswirkungen auf den pH-Wert die Speichelkonzentration einer Substanz beeinflussen. Zusätzlich beeinflusst die Flussrate die Membran-Durchlässigkeit<sup>[15]</sup>. Dazu existieren zwei mathematische Modelle. Kann aktiver Transport ausgeschlossen werden, so gilt für den Speichel/Plasma-Koeffizient auch folgender Zusammenhang<sup>[16, 18, 19]</sup>:

$$S/P = \frac{a_p * CL_D}{FL + a_s * CL_D}$$

$a_p$	<i>freier, nicht ionisierter Anteil im Plasma</i>
$a_s$	<i>freier, nicht ionisierter Anteil im Speichel</i>
$CL_D$	<i>Speichel-Clearance durch Diffusion</i>
$FL$	<i>Speichelfluss</i>

Aus obiger Gleichung wird deutlich, dass für Substanzen mit kleiner Speichel-Clearance der Speichel/Plasma-Koeffizient direkt vom Speichelfluss abhängt. Bei einer hohen passiven Clearance hingegen ist S/P unabhängig vom Speichelfluss.

Ein zweites Modell beschreibt den Übergang in den Speichel als Mischung aus Ultrafiltration ( $R_{UF}$ ) im Rahmen der Wassersekretion im Azinus und passiver Diffusion ( $CL_D$ )<sup>[20]</sup>:

$$S / P = R_{UF} + \left( \frac{a_S}{a_P} \right) * (1 - e^{-CL_D / FL})$$

$a_P$	<i>freier, nicht ionisierter Anteil im Plasma</i>
$a_S$	<i>freier, nicht ionisierter Anteil im Speichel</i>
$CL_D$	<i>Speichel-Clearance durch Diffusion</i>
$FL$	<i>Speichelfluss</i>

Dies bedeutet, bei vernachlässigbarer Ultrafiltration, dass bei hoher passiver Clearance  $CL_D$  oder geringem Speichelfluss  $FL$  der Speichel/Plasma-Koeffizient dem Verhältnis der freien, nicht ionisierten Anteile in Speichel und Plasma entspricht. Die Speichelkonzentration von Substanzen mit einer hohen Speichel-Clearance ist demnach weniger von Änderungen des Speichelflusses beeinflusst als die Konzentration von Substanzen mit geringem  $CL_D$ . Letztere können bei gesteigertem Speichelfluss (z.B. nach Stimulation) den Gleichgewichtszustand zwischen Plasma und Speichel nicht schnell genug wieder herstellen, was zu einer Verminderung der Speichelkonzentration führt.

### Proteinbindung

Die Speichelkonzentration bildet im optimalen Fall die freie Wirkstoffkonzentration im Blut ab<sup>[21]</sup>. Daher hat der Grad der Proteinbindung, und damit auch sämtliche physiologischen und pathologischen Effekte auf die Proteinbindung (z.B. Änderung der Albumin-Konzentration, kompetitive Bindung von Bilirubin, Fettsäuren etc.), Einfluss auf den Speichel/Plasma-Koeffizienten.

Viele Arzneistoffe und ein Großteil der illegalen Drogen sind entweder schwache Basen oder schwache Säuren. Für deren Übergang in den Speichel ist somit der pH-Wert des Primärspeichels bzw. die Differenz zwischen Plasma- und Speichel pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Für eine Reihe von Arzneistoffen wurden Speichel/Plasma-Koeffizienten berechnet<sup>[22]</sup>, die sich jedoch zum Teil stark von den bei in-vivo-Untersuchungen ermittelten Werten unterschieden. Dies lässt sich auf interindividuelle und je nach Tageszeit unterschiedlicher Zusammensetzung des (stimulierten) Speichels und den damit verbundenen Änderungen des pH-Werts zurückführen.

#### 1.1.1.4 Nachweis körperfremder Stoffe in Speichel

Mandel beschreibt in seinem Review aus dem Jahre 1990<sup>[23]</sup>, dass Speichel trotz seines fehlenden Charismas - „*It lacks the drama of blood, the sincerity of sweat and the emotional appeal of tears*“ - und entgegen der landläufigen Meinung „...*which suggest that in the view of most people saliva was created for licking stamps*“<sup>[24]</sup> eine auf einfache, nicht-invasive Art zu gewinnende Probenmatrix für zahlreiche diagnostische und forensische Fragenstellungen darstellt. Die Vorteile, die für die Verwendung von Speichel als Untersuchungsmatrix für diagnostische und forensische Zwecke sprechen, sind seither die Gleichen geblieben. Als größter Vorteil gegenüber Blut gilt die nicht-invasive Probennahme, die kein besonders ausgebildetes Personal benötigt. Dies trifft besonders auf Anwendungsbereiche mit „Vor-Ort-Probennahme“ zu, bei denen keine speziellen Räumlichkeiten zur Verfügung stehen (z.B. „Workplace-Drugtesting“, Straßenverkehrsproben) und im klinischen Bereich in Situationen, bei denen mehrere Probennahmen pro Tag notwendig oder kostengünstig große Probandenkollektive zu untersuchen sind<sup>[3, 25]</sup>. Zudem fehlt in bestimmten Fällen die rechtliche Grundlage für eine Blutentnahme. Eine nicht-invasive Probennahme (Urin, Speichel, Haare) zum Nachweis der Konsumfreiheit wird jedoch als verhältnismäßiges Mittel angesehen. Speichel stellt bei Kindern und alten Menschen sowie bei Drogenkonsumenten, bei denen zugängliche Venen oftmals durch Langzeitkonsum vernarbt sind, eine probate Alternative zur Blutentnahme dar<sup>[3]</sup>. Dabei ist das Infektionsrisiko bei einer Speichelentnahme deutlich geringer als bei einer Blutentnahme<sup>[26]</sup>. Eine Speichelabgabe unter Sichtkontrolle empfindet die Mehrheit der Probanden und des Aufsichtspersonals angenehmer als eine Urinabgabe<sup>[27, 28]</sup>. Zudem ist es nahezu ausgeschlossen eine unter Sichtkontrolle abgegebene Speichelprobe zu verfälschen<sup>[25]</sup>.

Crouch beschreibt die zahlreichen möglichen Einflüsse der verschiedenen auf dem Markt erhältlichen Probennahmesysteme auf die im Speichel gemessenen Werte<sup>[29]</sup>, was dazu führt, dass nicht nur die analytische Methode, sondern das komplette Verfahren inklusive Probennahme und Lagerung, sorgfältig zu evaluieren sind<sup>[30]</sup>. Da Speichel die frei im Blut vorliegenden Wirkstoff-Konzentrationen besser wiedergibt als Urin, sind zudem Rückschlüsse auf eine akute Beeinflussung möglich. Trotz der von Crouch beschriebenen Einflüsse haben sich international, z.B. im Rahmen der ROSITA-<sup>[31, 32]</sup> und DRUID-Studie<sup>[33]</sup>, Cut-Off-Werte für die Verwendung von Speichel im Rahmen von Verkehrskontrollen oder in den USA Cut-Off-Werte für das Workplace-Drugtesting<sup>[34]</sup> etabliert. Des Weiteren existieren bereits Arbeiten zur

Interpretation von Speichelkonzentrationen<sup>[35]</sup> und zur Pharmakokinetik illegaler Drogen im Speichel<sup>[36]</sup>.

Als weiterer Nachteil wird das auf Grund physiologischer Ursachen oder durch Drogen- oder Medikamenteneinnahme verursachte geringe Speichelvolumen („trockener Mund“) aufgeführt<sup>[30, 37]</sup>. Durch den Einsatz immer sensitiver werdender Analysensysteme rückte dieser Nachteil jedoch immer mehr in den Hintergrund.

Die ROSITA-Studien haben gezeigt, dass Speichel die optimale Untersuchungsmatrix für die Straßenverkehrsüberwachung darstellt. Frankreich, Belgien und der Staat Victoria in Australien haben die hier in Deutschland noch üblichen Urintests bereits durch Speicheltest ersetzt. Ähnliches gilt für den Einsatz im Rahmen des Workplace-Drugtesting. Zum Einsatz als Untersuchungsmatrix für das Therapeutic Drug Monitoring sind neben einer schnellen und validen Analytik konstante Speichel/Serum-Koeffizienten notwendig. Dies trifft nicht auf alle Medikamente zu, jedoch gelten zahlreiche häufig analysierte Substanzen als aussichtsreiche Kandidaten, um die klassische Untersuchungsmatrix Blut durch Speichel zu ersetzen<sup>[38, 39]</sup>. Speichel hat sich in allen drei genannten Anwendungsgebieten von sehr hohem Nutzen für den qualitativen Nachweis körperfremder Substanzen erwiesen. Quantitative Werte bedürfen je nach Substanz besonderer Interpretation bzw. weiterer Untersuchungen<sup>[3]</sup>.

Für den „on-site“ Einsatz stehen zahlreiche kommerzielle Probennahmesysteme<sup>[40]</sup>, teilweise mit dazugehörigem Analysegerät, zur Verfügung. Für Vororttests werden in der Regel antikörperbasierte Nachweisverfahren verwendet. In den Laboren kommen für den qualitativen und quantitativen Nachweis körperfremder Substanzen im Speichel GC-MS- und hauptsächlich LC-MS/MS-Systeme zum Einsatz. Einen Überblick über den technischen Stand der Analytik zu Beginn dieser Arbeit geben die von verschiedenen Autoren verfassten Übersichtsartikel<sup>[25, 39-42]</sup>.

## 1.1.2 Zähne

### 1.1.1.2 Histologischer Aufbau des Zahnes

Der menschliche Zahn ist aus drei verschiedenen stark mineralisierten Substanzen aufgebaut. Den Hauptbestandteil bildet das Dentin (Zahnbein). Dieses wird beim intakten Zahn im Bereich der Zahnkrone vom Zahnschmelz und im Bereich der Zahnwurzel vom Wurzelzement bedeckt.

Ausgereifter Zahnschmelz gilt als die härteste Substanz im menschlichen Körper (250-390 KHN<sup>[43]</sup>, Mohshärte 5<sup>[44]</sup>). Der Schmelz besteht hauptsächlich aus Calcium- und Phosphor-Hydroxylapatitkristallen, die durch Reifung der von den

Ameloblasten gebildeten Schmelzmatrix entstehen. Nach Abschluss der Schmelzreifung verlieren diese Zellen ihre Teilungsfähigkeit, differenzieren sich zu Epithelzellen um und werden schließlich abgestoßen. Fertig gereifter Zahnschmelz unterliegt daher keinerlei zellulärer Reparaturmechanismen<sup>[43]</sup>. Die Zusammensetzung des Schmelzes wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst (z.B. Ernährung, Alter). Neben den zahlreichen Spurenelementen kommen ca. 1 % organische Bestandteile (Proteine, Kohlenhydrate und Lipide) und ca. 4 % Wasser, als Kristallwasser oder an organische Materie gebunden, vor<sup>[45]</sup>. Das lose vorliegende Wasser kann bei Erwärmung verdampfen, bei Flüssigkeitszufuhr kann jedoch auch wieder Wasser aufgenommen werden. Dabei können mit dem Flüssigkeitsstrom Ionen in den Zahnschmelz hinein bzw. aus dem Zahnschmelz hinaus gelangen<sup>[43]</sup>.

Das zum Zahnhalteapparat zählende Wurzelzement setzt sich aus Zellen und interzellulärer Substanz zusammen. Es bedeckt die Wurzeloberfläche und dient als Kontaktfläche für die Parodontalfasern, welche den Zahn im Zahnfach halten. Das Wurzelzement ähnelt in Zusammensetzung, Struktur und Härte dem menschlichen Knochen und ist die am wenigsten mineralisierte Zahnhartsubstanz. Der Mineralgehalt von ca. 65 Gewichtsprozenten setzt sich hauptsächlich aus Calcium- und Phosphor-Hydroxylapatitkristallen zusammen. Der organische Anteil besteht hauptsächlich aus Kollagen<sup>[1, 46]</sup>.

Bei Dentin handelt es um „lebendes“ Gewebe, das zeitlebens von den Odontoblasten in der äußeren Region der Pulpa gebildet wird. Generell wird von einer funktionellen Einheit von Pulpa und Dentin ausgegangen<sup>[45]</sup>. Bei den für diese Arbeit durchgeführten verwendeten Zähnen wurde die Pulpa mit ihren Blut- und Lymphgefäßen mechanisch komplett entfernt, weshalb an dieser Stelle nicht weiter auf sie eingegangen wird. Dentin besteht zu 70 % aus anorganischen (Phosphat und Calcium) und 20 % aus organischen (Kollagen) Materialien. Die restlichen 10 % sind Wasser. Es ist sehr „porös“, hochelastisch und verformbar und hat daher eine wesentlich höhere Permeabilität als Zahnschmelz<sup>[43]</sup>. Das Dentin ist von einem Netzwerk kleiner Kanälchen durchzogen, in welche die Zellfortsätze der Odontoblasten hineinreichen<sup>[47]</sup>.

### *1.1.2.2 Demineralisation und Remineralisation*

Die Mundhöhle und die Zähne unterliegen einem ständigen pH-Wechsel. Ursachen hierfür sind, neben den in Getränken und Nahrungsmitteln vorhandenen Säuren, die Stoffwechselprodukte der in der Mundhöhle vorkommenden Mikroorganismen<sup>[44, 48]</sup>. Je nach pH-Wert an der Zahnoberfläche kommt es dort zu einer

Demineralisation oder einer Remineralisation der Zahnhartsubstanz<sup>[49]</sup>. Als kritische pH-Werte, bei denen eine Demineralisation beginnt, werden für Schmelz 5,2 - 5,7 und für Dentin 6,2 - 6,7 angegeben<sup>[43, 48]</sup>. Nach einem Säureangriff in der Mundhöhle steigt der pH-Wert durch die in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Puffereigenschaften des Speichels wieder langsam an. Durch das im Speichel vorliegende Calcium und Phosphat wird nun die Remineralisation, d.h. der Einbau von Mineralien in die Zahnoberfläche, begünstigt. Wird dieses Gleichgewicht über längere Zeit in Richtung Demineralisation verschoben, so bildet sich durch den Mineralverlust und die damit einhergehenden Vergrößerung der interprismatischen Räume eine initiale Kariesläsion<sup>[49, 50]</sup>. In den für diese Arbeit in der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Freiburg durchgeführten Laborversuchen wurde dieses Gleichgewicht in-vitro nachgestellt.

#### *1.1.2.3 Wege zur Aufnahme körperfremder Substanzen in die Zahnhartsubstanz*

Theoretisch ergeben sich für die Einlagerung von körperfremden Substanzen in den Zahn zwei verschiedene Einlagerungswege: Die Einlagerung von „außen“, d.h. aus der Mundhöhle in den Schmelz und ggf. bis in das darunterliegende Dentin oder von „innen“, d.h. aus der gut durchbluteten Pulpa in das sie umgebende Dentin.

Bei ersterem Weg werden Substanzen aus dem den Zahn umgebenden Speichel während des Remineralisations-Prozesses in die Zahnhartsubstanz eingebaut. Substanzen können auf den in Kapitel 1.1.1 ausführlich beschrieben Wegen aus dem Blut oder bei Substanzen, die nasal, oral oder inhalativ aufgenommen werden, durch Mundhöhlenkontamination in den Speichel gelangen. Bei letzteren zeigen sich besonders kurz nach der Applikation hohe Wirkstoffkonzentrationen in der Mundhöhle<sup>[51]</sup>, was eine Einlagerung im Rahmen der Remineralisation begünstigen würde.

#### *1.1.2.4 Nachweis körperfremder Stoffe in der Zahnhartsubstanz*

Es existieren zahlreiche Arbeiten in denen die Einlagerung von Schwermetallen wie z.B. Blei, Kupfer, Quecksilber in den menschlichen Zahn nachgewiesen wurden<sup>[52-57]</sup>. Dies wird im Allgemeinen als Indikator für eine verstärkte Exposition angesehen und findet u.a. auch Verwendung bei der Untersuchung von archäologischem Zahnmaterial<sup>[58]</sup>. Hierzu eignen sich besonders Milchzähne, während deren Entwicklung Metalle in die Zahnhartsubstanz eingelagert werden und dort auch verbleiben<sup>[59]</sup>.

Auf dem Gebiet der Zahnheilkunde existieren Arbeiten im Rahmen von Untersuchungen zur Zahnverfärbung. So können z.B. Blutbestandteile nach einem Trauma oder Nekrose der Pulpa in die Zahnhartsubstanz diffundieren<sup>[60]</sup>.

Über die Einlagerung von Drogen- und Medikamentenwirkstoffe existieren nur wenige Arbeiten. Cattaneo et al.<sup>[61]</sup> konnten post-mortal Morphin und Codein in Zahnmaterial nachweisen. Pellegrini et al. konnten mittels GC-MS ebenfalls Opiate und Cocain in menschlichen Zähnen nachweisen<sup>[62]</sup>. Beide vermuteten eine Einlagerung der Substanz aus den Blutgefäßen der Pulpa. Da in beiden Arbeiten ganze Zähne, z.T. ohne Entfernung der Pulpa verwendet wurden, erlauben diese Daten keine weiteren Rückschlüsse auf die Einlagerungswege.

Gracia-Algar et al. konnten Nicotin in Milchzähnen nachweisen und fanden dabei signifikante Unterschiede zwischen Kindern aus Raucher- bzw. Nichtraucherfamilien<sup>[63]</sup>. Haustein et al. konnten in Laborversuchen zeigen, dass sich verschiedene Alkohole, Zucker und Carbonsäuren in Hartsubstanzproben einlagern. Für Saccharose konnte gezeigt werden, dass die Diffusion in kariöses Material stärker ist als in gesunde Zahnhartsubstanz<sup>[64]</sup>. Schultz<sup>[65]</sup> konnte in ihrer Arbeit Penicillin G nach einer Einmalgabe in der Zahnhartsubstanz nachweisen und erst kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der der Alkoholkonsummarker Ethylglucuronid (EtG) in menschlicher Zahnhartsubstanz nachgewiesen wurde<sup>[66]</sup>.

### 1.1.3 Glaskörper

#### 1.1.3.1 Physiologie und Besonderheiten als analytische Matrix

Der Glaskörper (*Corpus vitreum*) besteht einem durchsichtigen Gel aus Wasser (98 %), Hyaluronsäure und kollagenhaltigen Fibrillen<sup>[7]</sup>. Er nimmt ca. 2/3 des Augapfelvolumens ein und wird nach vorne von der Linse, in den übrigen Abschnitten von der Retina begrenzt. Ausgehend von einem mittleren Augapfel-Durchmessers von 23 mm ergeben sich daraus theoretisch ca. 4 ml Glaskörperflüssigkeit pro Auge<sup>[1]</sup>. Es ist bekannt, dass neben Elektrolyten auch Drogen- und Medikamentenwirkstoffe durch Diffusion durch die Blut-Retina-Schranke von den Blutgefäßen des Augapfels in den Glaskörper gelangen<sup>[67, 68]</sup>. Die geschützte Lage des Auges in der knöchernen Augenhöhle und die deutliche, mehrschichtige Abgrenzung des Augapfels zum umliegenden Gewebe durch die Leder-, Ader- und Netzhaut führen zu einer, im Vergleich zu anderen Geweben, langsamen Diffusion von Fremdstoffen in den Glaskörper. Dies führt dazu, dass auch bei langen postmortalen Intervallen nur wenig bakterielle Zersetzung oder Kontamination bzw. postmortale Umverteilung beobachtet wird<sup>[69, 70]</sup>. Im

Untersuchungsgut des hiesigen Instituts kann in mehr als 80 % der Fälle Glaskörper asserviert werden. Problematisch wird eine Asservierung in der Regel bei Leichen mit ausgeprägten späten Leichenerscheinungen (Fäulnis, Skelettierung) oder bei Fällen mit massiver Zerstörung des Gesichtsschädels. Bei intaktem Auge lässt sich die klare Glaskörperflüssigkeit einfach durch Punktion des Augapfels mit Hilfe einer herkömmlichen Einwegspritze entnehmen.

Die wenig proteinhaltige Zusammensetzung und die einfache Probengewinnung machen Glaskörper daher zu einer idealen Matrix für postmortale forensisch-toxikologische Untersuchungen<sup>[36]</sup>.

### *1.1.3.2 Verwendung von Glaskörperflüssigkeit in der Forensik*

Die älteste forensische Verwendung des Glaskörpers sind biochemische Untersuchungen zur Bestimmungen der Todeszeit. Seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts existiert bereits die Idee, sich regelhafte chemische Veränderungen zur Bestimmung der Todeszeit zu Nutze zu machen<sup>[71-76]</sup>. Hierbei gerieten insbesondere Elektrolytveränderungen in den wissenschaftlichen Fokus. Nach dem Tod kommt es zu einem Ausgleich der zu Lebzeiten unterschiedlichen intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen. Der Ausgleich verläuft nach dem 1. Fickschen Gesetz, in das u.a. die Diffusionstrecke, die Diffusionsfläche und die Konzentrationsunterschiede einfließen. Auf Grund der großen Diffusionsflächen laufen diese Konzentrationsausgleiche im Blut sehr schnell ab. In der Cerebrospinalflüssigkeit wurde ein langsamerer Konzentrationsausgleich beobachtet, jedoch kann es hier schon zu Lebzeiten durch Erkrankungen oder Verletzungen zu Konzentrationsveränderungen kommen und eine kontaminationsfreie, postmortale Asservierung gestaltet sich schwierig. Glaskörper hingegen ist einfach zu asservieren und die Zusammensetzung, wie auch die relativ geringe Austauschfläche, führen zu einer langsamen Diffusion. In Folge der Untersuchungen zu Elektrolytkonzentration in Abhängigkeit von der Leichenliegezeit wurde das Untersuchungsspektrum auf weitere Substanzen wie Kalium, Calcium; Magnesium, Phosphat, Kreatinin und Harnstoff erweitert. Auf Grund hoher Unterschiede ist die Interpretation dieser postmortalen Werte bis heute nicht unumstritten und noch immer Gegenstand von Untersuchungen<sup>[77]</sup>. Eingang in die forensische Routine hat bisher allerdings nur der quantitative Nachweis von Glucose und Laktat zu Bestätigung einer Hyperglykämie gefunden. Zusätzlich zu den beschriebenen biochemischen Untersuchungen wird Glaskörper zum postmortalen Nachweis von Fremdsubstanzen eingesetzt. Am weitesten verbreitet ist hierbei der Nachweis von Ethanol im Glaskörper<sup>[78]</sup>. Darüber hinaus

existieren mehrere Arbeiten zum Nachweis einzelner Wirkstoffe<sup>[68, 79]</sup> oder Wirkstoffgruppen, darunter die gängigen basischen Drogen<sup>[80-83]</sup>, Benzodiazepine<sup>[84]</sup>, Cannabinoide<sup>[85]</sup> und LSD<sup>[86]</sup>. Der Einsatz von immunchemischen Verfahren wurde ebenfalls untersucht<sup>[87-89]</sup>. Glaskörper eignet sich auf Grund der beschriebenen Eigenschaften ebenfalls für postmortale Screening-Untersuchungen im Rahmen der systematischen toxikologischen Analyse. Da Wirkstoffe, ähnlich wie bei Speichel, durch aktive oder passive Diffusion direkt aus dem Blutstrom in den Glaskörper gelangen, entspricht das Nachweisfenster des Glaskörpers eher dem von Blut als z.B. Urin<sup>[78]</sup>.

## **1.2 Instrumentelle Grundlagen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die klassischen Analysemethoden der Forensischen Toxikologie wie Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) mit den jeweiligen gerätespezifischen Messmodi verwendet. Die GC-MS ist seit über 20 Jahren etabliertes Verfahren für den qualitativen (Fullscan) und quantitativen (Single Ion Monitoring, SIM) Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in verschiedensten biologischen Matrices. Die Kopplung von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern (QqQ) und Flüssigkeitschromatographie mittels Electrospray Ionisation (ESI) oder Chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) hat sich in den letzten Jahren ebenfalls als Routineanwendung in diesem Gebiet etabliert. Die Quantifizierung erfolgt dabei in der Regel im sensitivsten Messmodus, dem Multiple Reaction Monitoring (MRM). Für den qualitativen Nachweis von körperfremden Substanzen werden an Triple Quadrupol Geräten mit linearer Ionenfalle (QTRAP<sup>TM</sup>-Systeme der Firma AB Sciex) zwei unterschiedliche Messmodi kombiniert. Die Identifizierung von Analyten erfolgt hierbei anhand von kommerziell erhältlichen oder selbst generierten Spektrenbibliotheken. Die gerade in Kürze skizzierten chromatographischen Trennverfahren und Detektionstechniken sind bereits in zahlreichen Publikationen ausführlich beschrieben. An dieser Stelle soll daher nur auf die technischen Möglichkeiten von 3D Ionenfallen näher eingegangen werden, deren spezielle Vor- und Nachteile sowie technischen Unterschiede zu den weit verbreiteten Quadrupol-Geräten beim Erstellen der hier entwickelten Screening-Methode großen Einfluss hatten. Zusätzlich sollen zum besseren Verständnis der in Kapitel 3.7 beschriebenen Methodenvergleiche auch die theoretischen Hintergründe des in der Arbeitsgruppe bereits etablierten LC-MS/MS basierten Multi-Target-Screenings (MTS)<sup>[90]</sup> kurz erläutert werden.

### 1.2.1 LC-MS Kopplung

Während bei der GC-MS bereits verdampfte Analyten über ein Trägergas in das Massenspektrometer eingebracht werden, müssen bei der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie Analyten aus einem Lösungsmittelstrom ionisiert und in das Hochvakuum überführt werden. Die Verdampfung und Ionisierung von größeren polaren Molekülen aus einem Flüssigkeitsstrom und der anschließende Transfer ins Hochvakuum als intaktes Molekül waren erst Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts technisch realisierbar. Dole et al. gelang es 1968 Polystyrolmoleküle mit durchschnittlichen Massen von 51.000 amu bzw. 411.000 amu mit Hilfe einer unter Hochspannung stehenden Kapillare in eine mit Stickstoff befüllte Kammer zu versprühen<sup>[91]</sup>. Die dabei entstehenden Makro-Ionen detektierte er mit einem Faradaybecher und bewies somit, dass es möglich ist, Makromoleküle in die Gasphase zu überführen und zu ionisieren, ohne dass diese zerfallen. Diese Arbeit legte den Grundstein für die Entwicklung der verschiedenen Atmosphärendruck-Ionisierungstechniken (API) wie zum Beispiel Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI) und Electrospray Ionisation (ESI). Seit der Einführung dieser Ionisierungstechniken hat sich die LC-MS über die Jahre zu einer spezifischen, empfindlichen und effektiven Analysenmethode entwickelt, mit der die Analyse von polaren, thermolabilen und hochmolekularen Verbindungen möglich wurde.

Für die in dieser Arbeit entwickelten Methoden wurden neben Electrospray Ionisation u.a. die neue ionBooster<sup>TM</sup> Ionenquelle der Firma Bruker Daltonik GmbH verwendet. Kapitel 1.2.1.1 und Kapitel 1.2.1.2 geben einen kurzen Überblick über die herkömmliche ESI und diese neuartige Ionenquelle.

#### 1.2.1.1 Electrospray Ionisation (ESI)

*“ESI is great, it can be used to gently transfer just about anything, except perhaps small animals, into the gas phase”*. Dieses Zitat stammt aus einer Publikation von Hamdy et al.<sup>[92]</sup> und beschreibt eindrücklich die breit gefächerten Einsatzmöglichkeiten dieser Ionisierungstechnik. ESI ist eine sanfte Art der Ionisierung (soft ionization) und eignet sich für Analyten mit mittlerer bis hoher Polarität<sup>[93, 94]</sup>. Der in der Regel sehr geringe Grad an in-source Fragmentierung führt zu einer hohen Ausbeute an Molekülionen. Der Umstand, dass mittels ESI mehrfach geladene Ionen erzeugt werden können, ermöglicht es, Makro-Moleküle wie z.B. Proteine mit einem Molekulargewicht oberhalb des Massenbereichs des jeweiligen Massenspektrometers nachzuweisen<sup>[95]</sup>.

Abb. 3 zeigt den schematischen Aufbau einer ESI am Beispiel der Bruker Apollo™ Ionenquelle. Das Fließmittel der HPLC wird mit Hilfe von Stickstoff (Nebulizer Gas) durch eine Metallkapillare in ein elektrisches Feld, welches in der Quelle zwischen der Spitze der Kapillare und der Gegenelektrode am Einlass in das MS anliegt, versprüht. Es bilden sich kleine Lösungsmittel-Tropfen, die abhängig von der Polarität der Kapillarspitze positive oder negative Ladungen tragen. Bei positiver Ionisierung ist die Kapillare positiv geladen und im Überschuss vorliegende Kationen, wie z.B. protonierte Amine, werden in Richtung der negativen Gegenelektrode beschleunigt. Bei negativer Ionisierung ist das elektrische Feld umgekehrt gepolt. Anionen werden in Richtung der positiv geladenen Gegenelektrode beschleunigt und gelangen durch eine kleine Öffnung (Orifice) in die erste Vakuumstufe.

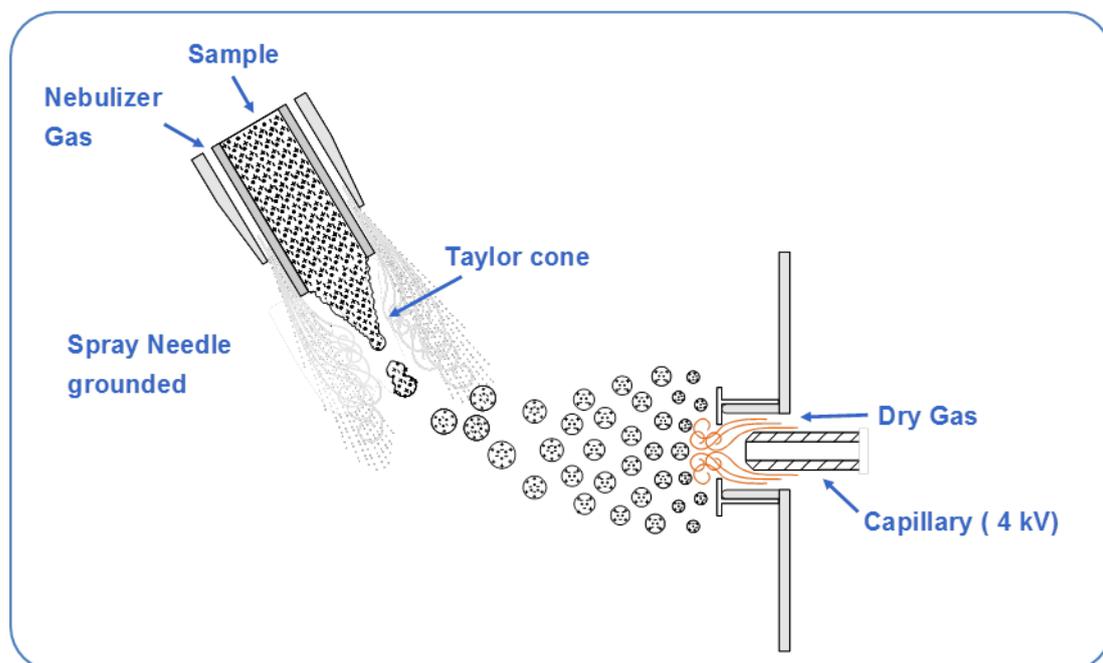


Abb. 3: Schematische Darstellung der Electro Spray Ionisation<sup>[96]</sup>

Im Gegensatz zur Elektronenstoß-Ionisation (EI) oder Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) werden bei ESI streng genommen keine Ionen generiert sondern vielmehr Protonen transferiert<sup>[97]</sup>. Dieser Vorgang wird als Electrophoretic Charging Mechanismus bezeichnet<sup>[98]</sup>. Die Electro spray-Ionisation stellt einen Austausch (Konversion) von Ionen und Elektronen dar und kann als Sonderfall einer elektrolytischen Zelle betrachtet werden<sup>[99]</sup>. Für die ESI ist es daher unumgänglich, dass bereits Ionen, z.B. in Form von dissoziierten Lösungsmittel-Elektrolyten, vorhanden sind, deren Ladung auf den Analyten übertragen werden

kann. Alternativ kann natürlich auch der Analyt selbst schon als Ion in der Lösung vorliegen. Die mit Unterstützung des Nebulizer Sprays gebildeten Lösungsmittel-Tröpfchen bestehen damit aus Ionen des Lösungsmittels und neutralen Molekülen, die durch Prozesse wie Feldionisation gebildet werden.

Schon vor der eigentlichen Tröpfchenbildung an der Kapillarspitze erfolgt, auf Grund des angelegten elektrischen Feldes, eine Separation der vorhandenen Ladungen. Dies führt an der Spitze der Kapillare, je nach Polarität, zu einem Überschuss einer Ladung an der Flüssigkeits-Oberfläche, was zu Bildung des sog. Taylor Cone (s. Abb. 3) führt<sup>[100]</sup>. An der Spitze dieses Kegels, wo die Ladungsdichte am höchsten ist, bildet sich, sobald die elektrostatische Kraft des Feldes die Oberflächenspannung der Flüssigkeit übersteigt, ein Flüssigkeitsstrahl in Richtung der Gegenelektrode. Auf Grund der hohen Ladungsdichte und der stärker werdenden elektrischen Kraft wird dieser Strahl instabil und löst sich in Folge in kleine Tröpfchen auf (s. Abb. 4).

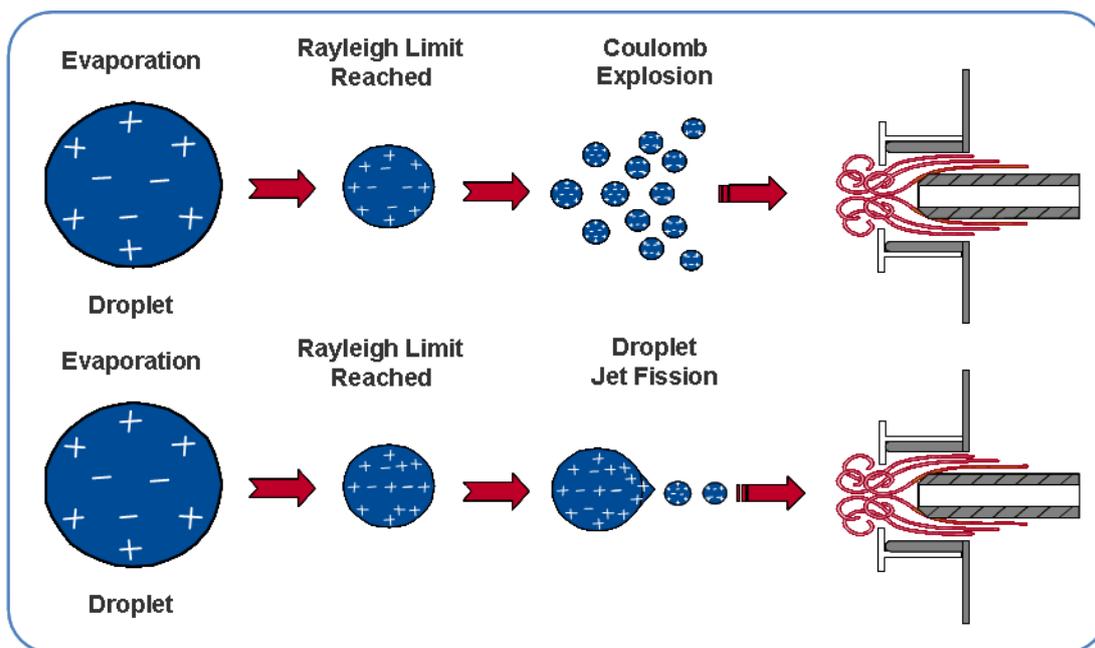


Abb. 4: Schematische Darstellung der Tröpfchenbildung in der ESI durch Coulomb-Explosion (oben) beziehungsweise Droplet Jet Fission (unten)<sup>[96]</sup>

Durch das Verdampfen des Lösungsmittels in der geheizten Quelle erhöht sich die Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen. Bei Erreichen des sog. Rayleigh Limit<sup>[101]</sup>, an diesem Punkt ist die elektrostatische Abstoßung größer als die Oberflächenspannung, bilden sich wiederum kleinere Tröpfchen. Dies geschieht entweder durch sog. Coulomb Explosion, d.h. der ursprüngliche Tropfen "explodiert" in viele kleinere Tröpfchen, oder wie neuere Arbeiten zeigen, durch

sog. Droplet Jet Fission<sup>[102-104]</sup>. Dabei werden an dem durch elektrostatische Kräfte zu einem Konus geformten Ende des ursprünglichen Tropfens laufend einzelne kleine Tröpfchen ausgestoßen (s. Abb. 4). Der Prozess der Tröpfchenverkleinerung durch Verdampfung lässt sich, wie schon oben beschrieben, durch einen heißen Stickstoffstrom (z.B. Turbolonspray<sup>TM</sup>) unterstützen, was letztendlich die split-lose Kopplung von HPLC und MS auch bei größeren Flussraten (bis 1 ml/min) ermöglicht. Bei den heute verwendeten Electrospray Ionenquellen wird der Sprühvorgang an der Metallkapillare durch ein Inertgas (in der Regel N<sub>2</sub>) unterstützt (Nebulizer Assisted ESI auch Ionspray genannt), wodurch ein konstantes Spray erzielt wird. Die Bildung einzelner Ionen in der Gasphase lässt sich jedoch mit den gerade beschriebenen Theorien nicht vollständig erklären.

Für den Mechanismus wie Ionen von der Flüssig- in die Gasphase gelangen werden zwei Theorien diskutiert. Dole postuliert in seinem Charge-Residue Model (CRM) eine nahezu komplette Verdampfung des Lösungsmittels, was zu kleinsten Tröpfchen führt, die lediglich ein einziges Molekül und die übrig bleibenden Ladungen enthalten<sup>[91, 105]</sup>.

Thomson und Iribane hingegen postulieren mit ihrem „Ion Evaporation“ oder auch „Ion Desorption Model“ (IEM oder IDM), dass Tröpfchen durch mehrere Zyklen von Lösungsmittelverdampfung und Coulomb-Explosionen so klein werden, dass bei den herrschenden Feldstärken einzelne Ionen aus den Tröpfchen desorbiert werden können. Der Grad dieser Ionenemission ist proportional zur angelegten Feldstärke und umgekehrt proportional zur Solvatisierungsenergie der Ionen<sup>[106]</sup>.

Es wird angenommen, dass das Modell von Thomson und Iribane die Bildung kleiner Ionen zutreffender beschreibt<sup>[102, 107]</sup>, wohingegen das CRM die Bildung von Makromolekül-Ionen z.B. von Proteinen besser erklärt<sup>[108]</sup>.

Ungeachtet davon welche Theorie genau zutrifft, werden mittels ESI einzelne einfach- oder mehrfach geladenen Molekül-Ionen ( $[M+(H^+)_n]$  /  $[M-(H)_n]^{-n}$ ) generiert, die in der Folge ins Massenspektrometer überführt werden. Neben dieser einfachen Protonierung bzw. De-Protonierung kann es jedoch auch zu Ionisierung durch Addukt-Bildung kommen. Am häufigsten werden bei positiver ESI Natrium-, Kalium- und Ammonium-Addukte beobachtet. Bei negativer Ionisierung treten hauptsächlich Formiat-, Acetat- und Chlorid-Addukte auf. Der Grad der Addukt-Bildung hängt im Wesentlichen von den physiko-chemischen Eigenschaften des Analyten und der Lösungsmittelzusammensetzung (Puffer, Verunreinigungen, etc.) ab.

Je nach Hersteller und Quellengeometrie wird ein zusätzlicher Stickstoffstrom (Curtain Gas) rechtwinklig zur Flugrichtung der Ionen verwendet (AB Sciex), um sog. Cluster aus Ionen und angelagerten Neutralteilchen aus dem Lösungsmittel aufzulösen. Bei Quellen ohne Curtain Gas (z.B. Bruker Daltonik) wird zusätzlich Dry Gas (s. Abb. 3) entgegen der Flugbahn der Ionen zum Auflösen von Clustern versprüht. Die unterschiedlichen Quellengeometrien, Sprühwinkel, Gasflüsse und Quellentemperaturen der verschiedenen Hersteller führen zu unterschiedlich starker Addukt-Bildung und in-source-Fragmentierung und haben daher großen Einfluss auf die Ionenausbeute.

### 1.2.1.2 IonBooster™ (IB)

Bei der ionBooster Quelle (Bruker Daltonik GmbH) handelt es sich um eine neue Hochtemperatur-ESI Ionenquelle, die vor allem im Bereich „small molecules“ der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der forensischen Analytik zu einer Steigerung der Sensitivität führt<sup>[109]</sup>. Der Aufbau der Quelle ist in Abbildung 5 gezeigt. Er entspricht, bis auf der zusätzlichen Verwendung von Stickstoff als Sheath Gas, der zusätzlichen Charging Voltage und dem beheizten Verdampfer, grundsätzlich dem Aufbau der konventionellen Bruker ESI Quelle.

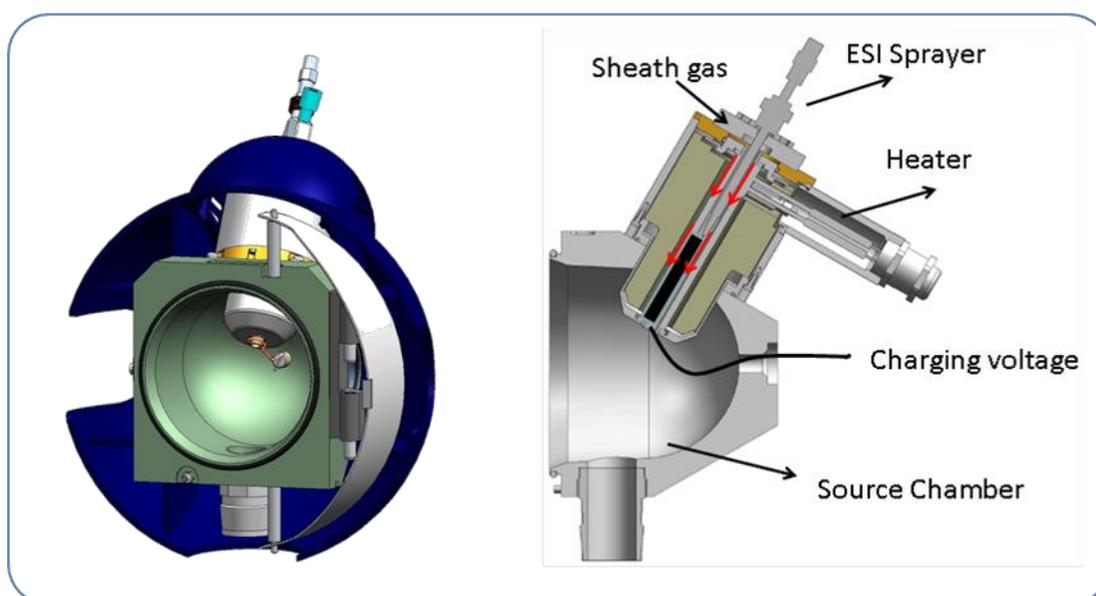


Abb. 5: Schematischer Aufbau der neuen ionBooster Ionenquelle [Bruker Daltonik GmbH]

Die Erhöhung der Signalintensitäten und Verbesserung der Desolvatisierung wird durch das zusätzlich geheizte Verdampfen des Fließmittels im ionBooster erreicht. Das Sheath Gas (Stickstoff) dient dabei zum einen zur Kühlung der Analyten und umhüllt zusätzlich das Spray und fokussiert dieses stärker Richtung MS Einlass.

Zusätzlich zieht das elektrische Feld durch Potentialgefälle zwischen Charge HV Tube, dem End Plate Offset und der Transferkapillarenspitze die Ionen in die Vakuumvorstufe.

Die erreichte Sensitivitätssteigerung hängt sehr stark von den chemisch-physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Substanzen ab. Viele Substanzen zeigen eine der ESI ähnliche Intensität, besonders temperaturlabile Analyten verlieren an Intensität. Der tatsächliche Intensitätsgewinn durch den ionBooster muss daher für jede Substanz evaluiert werden. Für die Alkoholkonsummarker Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS)<sup>[110]</sup>, das Antibiotikum Chloramphenicol<sup>[111]</sup> und für Substanzen aus der Gruppe der synthetischen Cannabinoide<sup>[112]</sup> konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des ionBooster zu erheblichen Intensitätssteigerungen führt. Für Methoden mit mehreren Analyten gilt es daher, die Quellenparameter (Sheath Gas Fluss, Dry Gas Temperatur) je nach Fragestellung so anzupassen, dass möglichst alle Substanzen von der neuartigen Ionisierungstechnik profitieren.

### 1.2.2 Ionen Transfer

Nachdem die Ionen in der Ionenquelle bei Atmosphärenruck gebildet wurden, müssen sie in das Hochvakuum des MS überführt werden. Dies geschieht in der Regel „schrittweise“ durch mehrere Bereiche mit stetig sinkendem Druck. Der Transfer der Ionen geschieht dabei entweder durch einen – oder mehrere – Skimmer- und Linsensysteme, die den Ionenstrahl fokussieren oder mittels sog. Funnel (s. Abb. 6), welche Ionen mit hoher Effektivität fokussieren und durchleiten. Ein Funnel besteht aus zahlreichen Ringelektroden mit immer kleiner werdenden Innendurchmessern, stellt also einen großen Satz an in Reihe geschalteter Linsen dar. Zwischen benachbarten Ringelektroden wird durch Anlegen einer Wechselspannung mit gleicher Amplitude, jedoch entgegen gesetzter Phase ein elektrisches Feld aufgebaut. Durch die immer kleiner werdenden Innendurchmesser der Elektroden werden die Ionen entlang der Mittelachse des Funnel fokussiert und in die nächste Vakuumstufe des MS geleitet. Vom elektrischen Feld nicht beeinflusste Neutralteilchen wie z.B. Fragmente, Lösungsmittel oder nicht ionisierte Matrix erhalten keine stabile Flugbahn entlang der Mittelachse des Funnel und werden durch die Vakuumpumpe entfernt<sup>[113-116]</sup>.

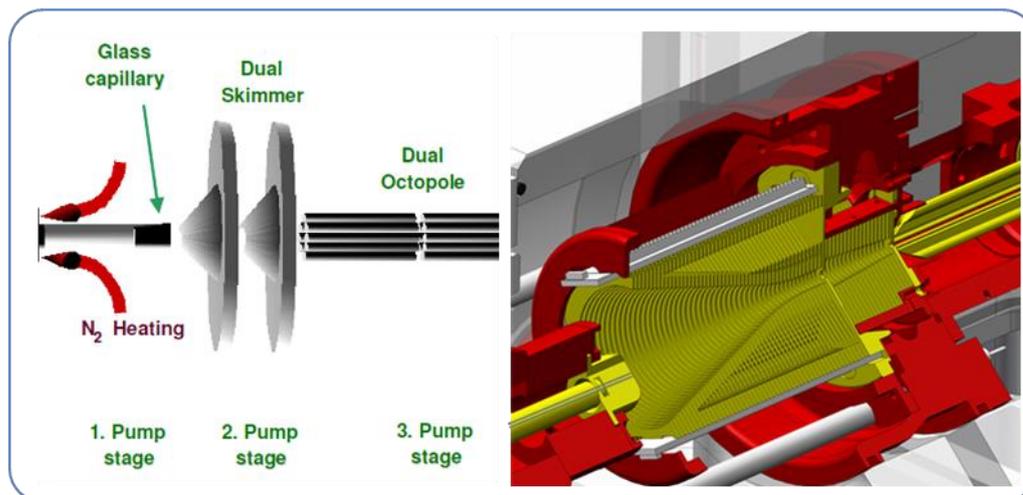


Abb. 6: Skizze eines linsen-basierten Ionenstrahltransfers (Skimmer, links) und eines Dual Funnel Transfersystems<sup>[96]</sup>

Bei Transfersystemen mit Skimmer wird das zwischen Einlass (Orifice Plate) und geerdeten Skimmer anliegende Declustering Potential (DP) zusätzlich genutzt, um noch an Ionen angelagerte Lösungsmittelmoleküle abzulösen. Je größer dieses Potential ist, desto schneller werden angelagerten Lösemittelmoleküle abgelöst und durch das Vakuumsystem entfernt. Stellt man das DP ausreichend hoch ein, nehmen Ionen Energie auf, die zur Spaltung von kovalenten Bindungen führt und Fragmente erzeugt - man spricht von in-source Fragmentierung.

Für die Weiterleitung des Ionenstrahls durch eine weitere Vakuumstufe zum eigentlichen Massenanalysator werden Quadrupole oder Multipole eingesetzt, die den Ionenstrahl weiter fokussieren.

### 1.2.3 Ionenfallen Massenspektrometer

Die Entwicklung der Quadrupol Ionenfalle geht zurück auf die Theorie von Wolfgang Paul aus dem Jahre 1953, Ionen in elektrischen, oszillierenden Quadrupolfeld zu speichern<sup>[117]</sup>. Die Methode wurde von Stafford so erweitert, dass nun die Speicherung aller  $m/z$ -Verhältnisse und eine selektive Entnahme möglich wurden. 1983 brachte die Finnigan Corp. die erste kommerzielle Ionenfalle als Detektor eines Gaschromatographen auf den Markt<sup>[117]</sup>. In Kombination mit der Entwicklung der Electrospray-Ionisation von Fenn et al. gelang dieser Technik damit der Durchbruch in der analytischen Chemie.

Eine Quadrupol Ionenfalle besteht aus zwei baugleichen, hyperbolischen Elektroden, den sogenannten End-Caps und einer ebenfalls hyperbolischen Ringelektrode. In den beiden End-Caps befinden sich jeweils in der Mitte ein oder mehrere Löcher, durch die auf der einen Seite Ionen in die Falle gelangen, und auf der anderen Ionen die Falle in Richtung des Detektors verlassen können. Die

Ringelektrode ist mittig zwischen den beiden *End-Caps* angeordnet. Abb. 7 zeigt einen Schnitt durch die Quadrupol-Ionenfalle einer HCT der Firma Bruker Daltonik.

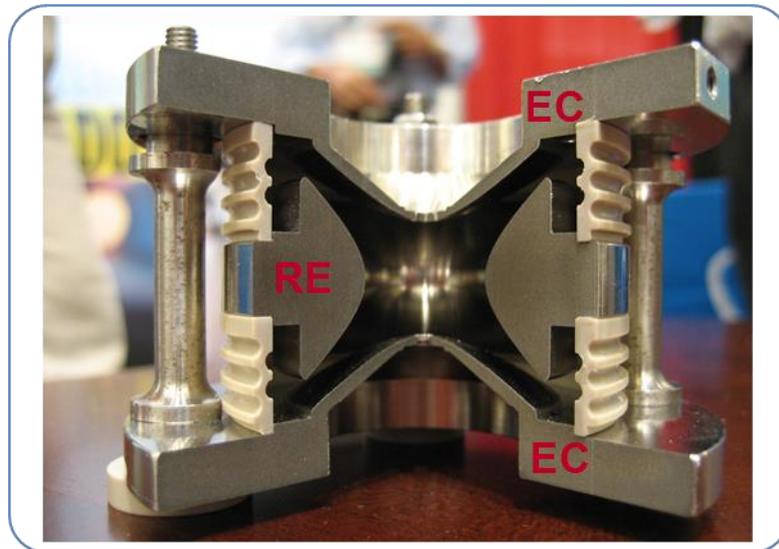


Abb. 7: Schnitt durch eine Ionenfalle der Firma Bruker Daltonik (EC: End-Caps; RE: Ringelektrode)

Abb. 8 zeigt den Aufbau schematisch. In einer idealen theoretischen Quadrupol Ionenfalle verlaufen die jeweiligen Äste der beiden End-Caps und der Ringelektrode bis ins Unendliche. Die Geometrie der Elektroden wird so gewählt, dass aus dem Asymptotenwinkel bei Anlegen von Gleich- und Wechselspannungen zwischen End-Caps und Ringelektrode bei endlichen Abmessungen ein optimales dreidimensionales elektrisches Feld zum Speichern der Ionen resultiert.

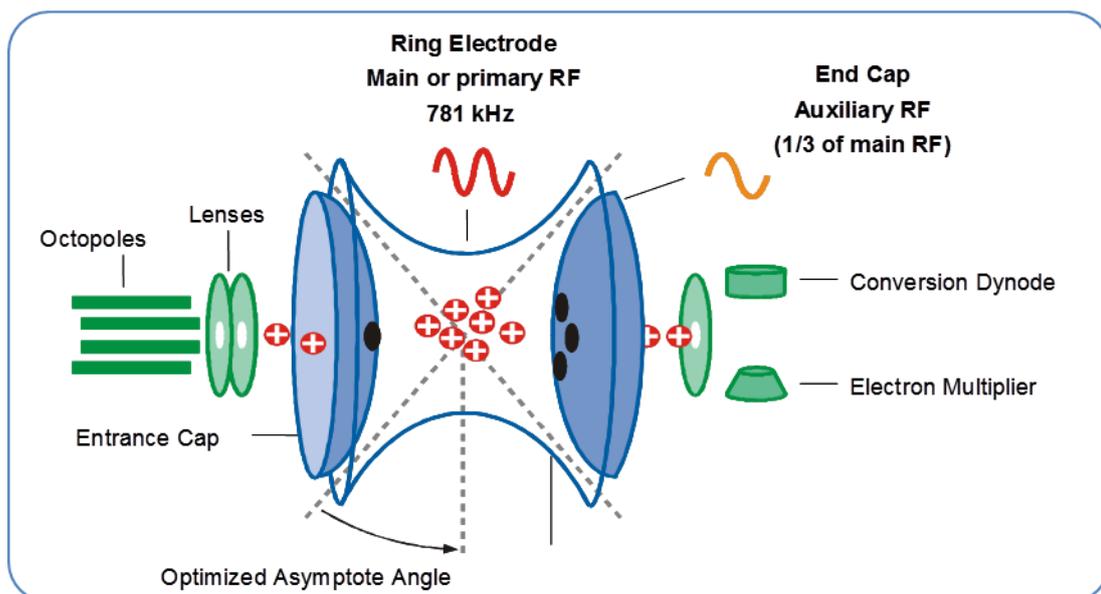


Abb. 8: Schematischer Aufbau einer 3D Ionenfalle<sup>[96]</sup>

Das Quadrupol Feld übt, abhängig von der angelegten Wechselspannung an der Ringelektrode (Main RF) und den End-Caps (Auxiliary RF), auf Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses oder eines definierten  $m/z$ -Bereichs eine periodisch wirkende Kraft aus. Die Fokussierung erfolgt dabei phasenabhängig abwechselnd in  $x$ - $y$ - bzw.  $z$ -Richtung. Je größer der Abstand einer Ladung zum Mittelpunkt ist, desto stärker ist die speichernde Kraft. Die hohe Frequenz der Wechselspannung führt zu einer berührungslosen Speicherung der Ionen. Die Bewegung eines geladenen Teilchens um den Schnittpunkt der Asymptoten-Achsen (s. Abb. 8) kann mit Hilfe der Mathieuschen Differentialgleichungen beschrieben werden<sup>[117]</sup>.

Paul selbst beschrieb den Vorgang des Speicherns anschaulich mit Hilfe eines Balls, der von einer ruhenden Sattelfläche rollt. Rotiert die Sattelfläche jedoch um eine senkrechte Achse, so wird die Lage des Balls im Zentrum stabilisiert<sup>[118]</sup>. Auch hier gilt, je weiter die Kugel vom Zentrum entfernt ist, desto steiler die Fläche also desto größer die rücktreibende Kraft bei Rotation.

Gespeicherte Ionen in einer Ionenfalle können daher als Teilchen angesehen werden, die in der durch Wechselspannung verursachten Senke eines Potentialgefälles „gefangen“ sind (s. Abb. 9). Die an den End-Caps angelegte Wechselspannung (Auxiliary RF) zwingt die Ionen zusätzlich in die Mitte und verstärkt dadurch den Speichereffekt der Falle.

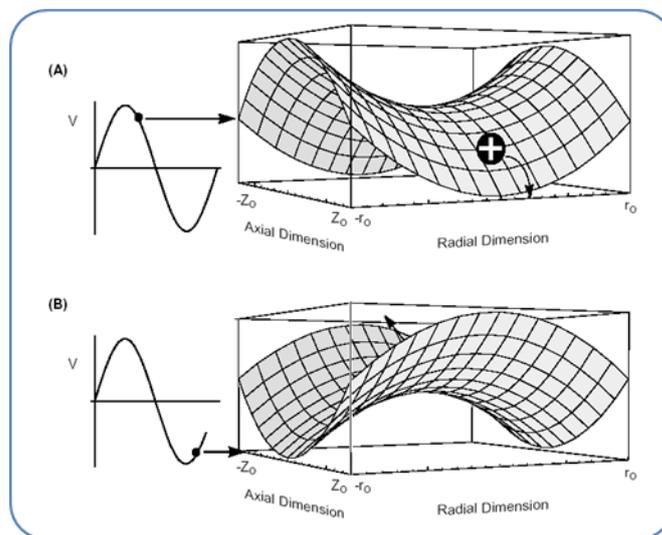


Abb. 9: Durch Wechselspannung an der Ringelektrode entstehender Potentialtopf<sup>[96]</sup>

Die Ionen gelangen mit einer gewissen Anfangsgeschwindigkeit aus dem Transfersystem (Hexapol) in die Ionenfalle. Durch diese kinetische Energie weichen ihre Flugbahnen von den in den Mathieuschen Gleichungen beschriebenen Bahnen ab. Um diesem Effekt entgegen zu wirken ist die Falle mit Helium gefüllt ( $\Delta p =$

$1,5 \cdot 10^6$  mbar). Durch Kollision mit den Heliummolekülen verlieren die Ionen Energie und bleiben auf den stabilen Bahnen um das Zentrum der Falle<sup>[119]</sup>.

Auf Grund der endlichen Abmessungen der Ionenfalle ist die Summe der speicherbaren Ionen begrenzt. Grund dafür sind sog. Raumladungseffekte oder „space-charge effects“. Zum einen führt eine steigende Ionendichte vermehrt zu Kollision zwischen zwei einzelnen Teilchen, die daraufhin ihre Flugbahn verlassen. Zum anderen beeinflusst eine hohe Raumladungsdichte die an den Elektroden angelegten Potentiale, was zu Verschiebungen der Grenzen im Stabilitätsdiagramm führt. Diese Überladung der Falle resultiert in einer verminderten Auflösung und Massengenauigkeit<sup>[120]</sup>. Um solche Überladungseffekte zu vermeiden, wird bei modernen Ionenfallen die Füllzeit softwaregestützt überwacht und gesteuert. Diese Intelligent Charge Control (ICC) regelt die Füllzeit der Falle in Abhängigkeit des eintretenden Ionenstroms (Abb. 10).

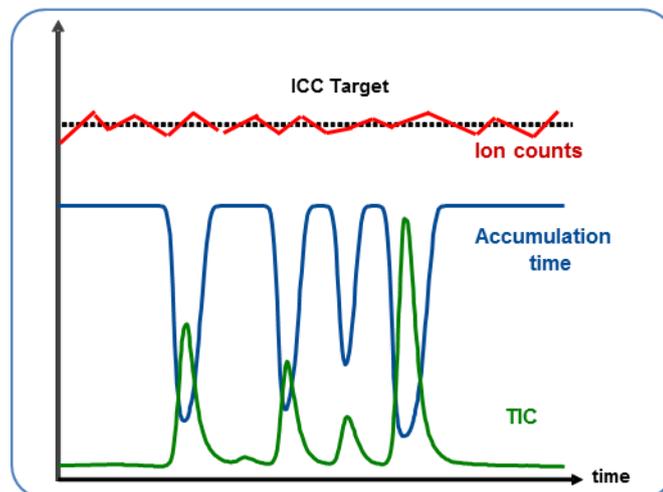


Abb. 10: Schematische Darstellung der ICC-Regelung<sup>[96]</sup>

Die Intensität des Totalionenstroms (TIC) wird später unter Berücksichtigung der jeweiligen Füllzeit berechnet.

Die Aufnahme von Massenspektren ist theoretisch über zwei verschiedene Mess-Modi möglich<sup>[119, 121]</sup>:

#### Mass-Selective-Stability Modus:

Ionen aller  $m/z$ -Verhältnisse werden in die Falle geleitet, es wird jedoch immer nur ein  $m/z$ -Verhältnis gespeichert und anschließend detektiert. Fullscan-Spektren werden, ähnlich wie bei einem Quadrupol, durch Aufsummieren mehrerer hunderter Einzelmessungen erstellt. Auf Grund dieser, für ein einzelnes Spektrum

benötigten hohen Zykluszeit und den damit einhergehenden Verlust an Ionen, wird hauptsächlich der Mass-Selective-Instability Modus verwendet.

**Mass-Selective-Instability Modus:**

Hier werden zunächst alle Ionen des ausgewählten  $m/z$ -Bereich in der Falle gespeichert. Eine Kombination aus geerdeten End-Caps und steigender Wechselfspannung an der Ringelektrode führt zu einem kontrollierten,  $m/z$ -weisen Ausstoß der Ionen in Richtung Detektor (s. Abb. 11). Der Ausstoß der Ionen erfolgt über das Prinzip der Resonant Ejection durch Anlegen der Hochfrequenz an den End-Caps. Die Bewegung jedes Ions im Quadrupolfeld hat eine axiale und eine radiale Komponente. Diese beiden Vektoren sind unabhängig voneinander. Die Oszillationsfrequenz eines Ions hat daher ebenfalls eine axiale und eine radiale Komponente.

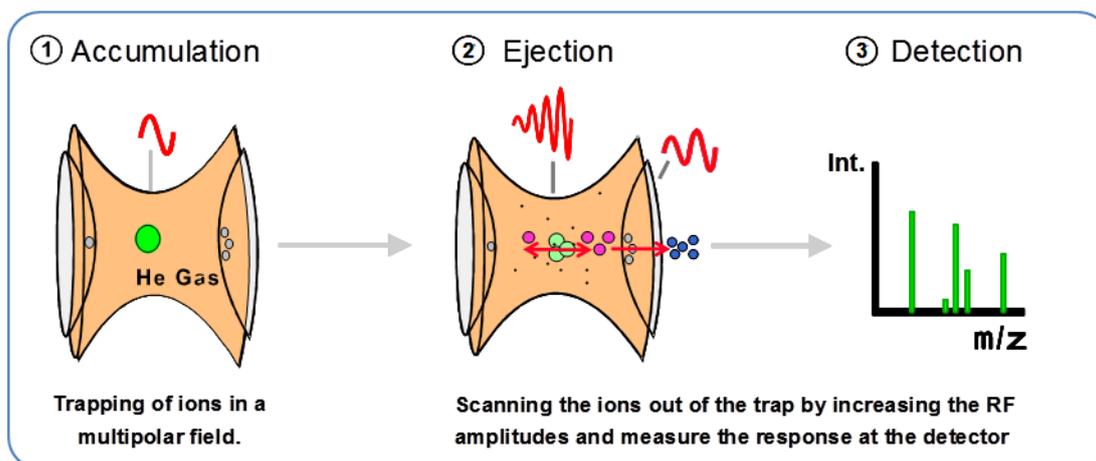


Abb. 11: Spektrenaufnahme mit Hilfe des Mass-Selective-Instability Modus<sup>[96]</sup>

Sobald die Amplituden der Auxiliary RF und der axiale Oszillationsfrequenz eines Ions übereinstimmen, wird dieses Ion axial in Richtung *End-Caps* beschleunigt. Zum Leeren der Falle werden also Primary und Auxiliary RF kontinuierlich erhöht und Ionen mit steigendem  $m/z$ -Verhältnis nacheinander ausgestoßen<sup>[119, 121, 122]</sup>. Der gesamte Ablauf von Akkumulation, Isolation und Fragmentierung bei MS/MS-Experimenten und Leeren der Falle wird als Duty Cycle bezeichnet (s. Abb. 12). Die Füllzeit der Falle ist abhängig von der Menge an Ionen, die Zeit für das Leeren der Falle hängt von der gewählten Auflösung und dem zu messenden Massenbereich ab. Die Zeiten für Isolierung und Fragmentierung sind von Zyklus zu Zyklus gleich.

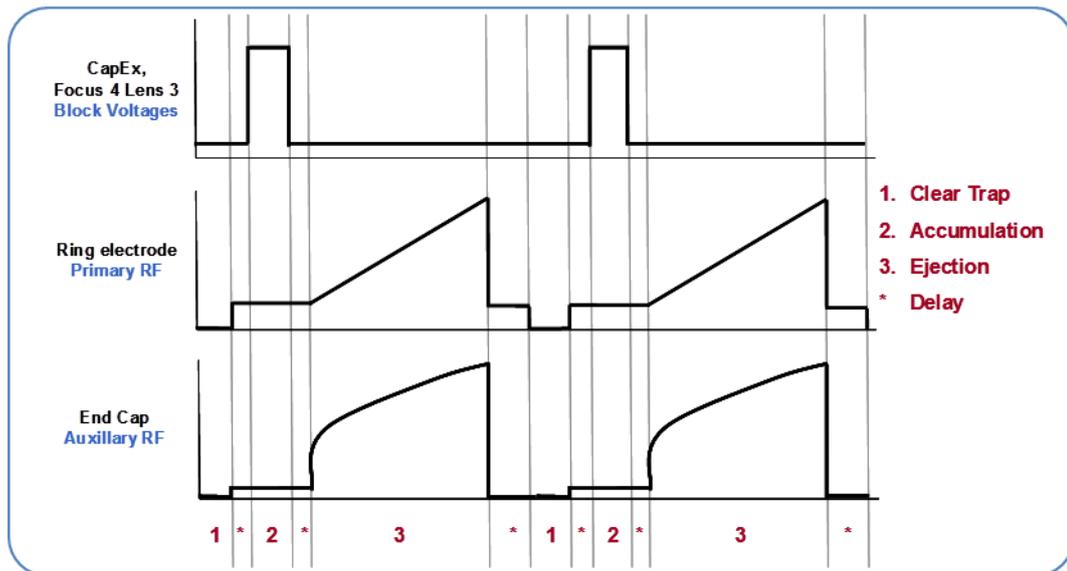


Abb. 12: Verlauf der Wechselspannungen während eines MS Scans<sup>[96]</sup>

### Tademmassenspektrometrie mit einer Ionenfalle („MS/MS in time“)

Bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern finden die notwendigen Schritte zur Bildung von MS/MS-Spektren - Isolierung eines Precursor-Ions, Fragmentierung und Nachweis der Fragmente - nacheinander an verschiedenen „Orten“ im Massenspektrometer (Q1, Kollisionszelle und Q3) statt („MS/MS in space“). Da bei einer Ionenfalle diese Schritte nacheinander am selben Ort ablaufen, spricht man von „MS/MS in time“ (Abb. 13).

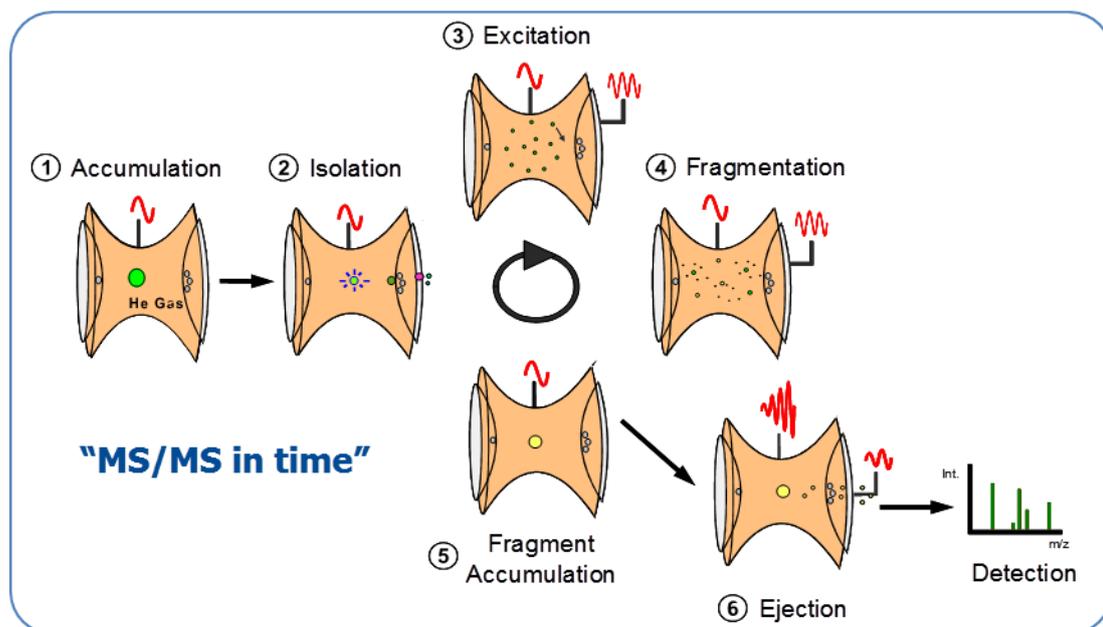


Abb. 13: Aufnahme von MS<sup>n</sup>-Spektren „MS/MS in time“<sup>[96]</sup>

Zur Aufnahme von MS<sup>2</sup>-Spektren werden dem bisher beschriebenen Messzyklus vier weitere Schritte hinzugefügt. Aus der bereits gespeicherten Menge an Ionen wird ein bestimmtes m/z-Verhältnis (Precursor-Ion) isoliert (2). Diese Ionen werden über die Auxiliary RF angeregt und so auf ihren Bahnen beschleunigt (3). Die Zunahme an kinetischer Energie führt zu einer verstärkten Kollision mit Helium-Molekülen und schließlich zur Fragmentierung (4) (s. Abb. 13). Die m/z-Verhältnisse der entstehenden Fragmente unterscheiden sich von dem des Precursors, d.h. sie erfahren keine weitere Anregung durch die angelegte Auxiliary RF und fragmentieren daher nicht weiter. Im Vergleich zu Triple-Quadrupol-Geräten, in denen Ionen durch eine Kollisionszelle hindurch beschleunigt und durch Kollision mit Stickstoff einfach oder mehrfach fragmentieren, erhält man über diese Art der Anregung „echte“ MS<sup>2</sup>-Spektren. Die entstehenden Fragmente werden erneut gesammelt (5) und dann, wie bereits oben beschrieben, in Richtung Detektor aus der Falle ausgestoßen (6). Der Nachteil bei dieser Art der Fragmentierung ist der sog. „Low Mass Cut-Off“. Fragmente mit einem m/z-Wert kleiner als 1/3 des m/z-Werts des Precursors können auf Grund ihrer hohen kinetischen Energie, bei den zur Isolierung und Fragmentierung notwendigen Einstellungen, nicht in der Falle gespeichert werden<sup>[119, 123]</sup>. Dies lässt sich anschaulich mit einem Golfball, der nach einem zu starken Schlag das Loch wieder verlässt, vergleichen. Der hier beschriebene Zyklus kann zur Aufnahme von MS<sup>n</sup>-Spektren mehrfach durchlaufen werden.

#### **1.2.4 Screening-Verfahren mit LC-MS bzw. LC-MS/MS**

In diesem Kapitel soll kurz auf die Grundlagen und methodenspezifischen Besonderheiten der in dieser Arbeit verwendeten LC-Screening-Verfahren (Toxtyper<sup>TM</sup> und Multi-Target-Screening) eingegangen werden. Beide Methoden verwenden eine definiert Liste von Analyten sowie eine datenabhängige Kombination zweier Mess-Modi (Information Dependent Acquisition, IDA)). Die Informationen aus der Übersichtsanalyse (Survey Scan) steuern die Aufnahme von MS<sup>n</sup>-Spektren (Dependent Scan). Die Identifizierung eines Analyten erfolgt software-gestützt über Retentionszeit und Spektrenvergleich mit den Einträgen einer Spektrenbibliothek.

Unterschiede beim Nachweis eines in beiden Methoden enthaltenen Analyten können demnach durch unterschiedliche Empfindlichkeit der Geräte sowie durch die Verwendung verschiedener Algorithmen beim Spektrenvergleich auftreten. Ein allgemeiner Vergleich der Empfindlichkeit gestaltet sich schwierig, da das MTS einen empfindlicheren Survey Scan als der Toxtyper verwendet, die Ionenfalle des

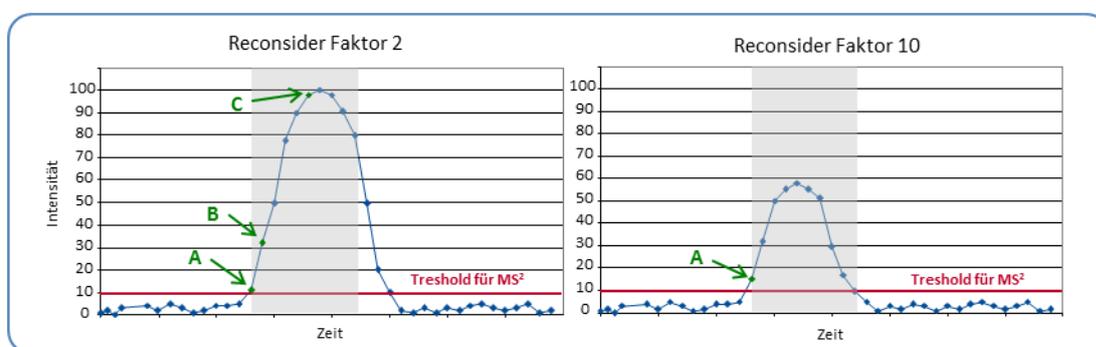
Toxtypers jedoch bei geringerer Precursor-Intensität noch verwertbare  $MS^2$ -Spektren generieren kann.

#### 1.2.4.1 Theoretische Grundlagen Toxtyper™

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Toxtyper Workflow<sup>[124]</sup> nutzt zum Nachweis und zur Identifizierung von Substanzen eine datenabhängige Aufnahme von  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektren mit Hilfe des AutoMSn Modus und anschließendem Bibliotheksspektrenabgleich. Die genauen Methodenparameter sind in Kapitel 2.4.7 beschrieben. Kernstück der datenabhängigen Spektrenaufnahme ist eine Scheduled Precursor List (SPL), in der die Precursor-Massen für  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektren sowie ein Retentionszeitfenster (Retentionszeit  $\pm x$  Sekunden) für alle mit der Methode erfassbaren Substanzen hinterlegt sind. Im ersten Schritt, dem sogenannten Survey Scan, wird ein MS-Spektrum im Massenbereich von 70 - 800 amu aufgenommen. Die Informationen des Spektrums werden mit den Einträgen der SPL verglichen. Findet sich eines, der dort zur aktuellen Retentionszeit hinterlegten Precursor-Ionen in ausreichender Intensität im aufgenommenen Spektrum, so wird dieses Ion isoliert, fragmentiert und das  $MS^2$ -Spektrum aufgenommen. Das  $MS^2$ -Spektrum wird nun in einem weiteren Schritt auf das in der SPL beim aktuellen Eintrag vorhandene Precursor-Ion für  $MS^3$  überprüft. Ist das hinterlegte Precursor-Ion für die Aufnahme von  $MS^3$ -Spektren in ausreichender Intensität vorhanden wird es isoliert, fragmentiert und das  $MS^3$ -Spektrum aufgenommen. Um eine wiederholte Aufnahme der gleichen Spektren zu vermeiden wird der für diesen Zyklus ursprünglich verwendete  $MS^2$ -Precursor nun für eine definierte Zeit auf eine sog. Exclusion List gesetzt. Der Precursor wird nun in den folgenden Survey Scans beim Abgleich mit der SPL ignoriert. Ein Flussdiagramm des gesamten Prozesses findet sich in Anhang A-1.

Um qualitativ hochwertige Spektren für einen späteren Bibliotheksvergleich zu erhalten, wäre es optimal die  $MS^n$ -Experimente im Peak-Maximum der Substanz anzustoßen. Dies lässt sich jedoch über die hier verwendete Schwellenwertgesteuerten Aufnahme von Spektren nicht zufriedenstellend realisieren. Ein hoher Schwellenwert (Threshold), der eine Aufnahme von Spektren in der Nähe des Peak-Maximums auslösen würde, würde automatisch die Sensitivität der Methode negativ beeinflussen. Ein zu niedrig gewählter Threshold führt zu einer hohen Anzahl von  $MS^n$ -Zyklen mit möglicherweise nur mangelhaften Spektren und damit zu einer hohen Zahl falsch positiver oder, bei schlechter Spektrenqualität, falsch negativer Treffer. Eine Möglichkeit dies zu umgehen ist eine Modifizierung des Exclusion-Algorithmus. Ein bereits gemessenes Precursor-Ion wird wie beschrieben

auf die *Exclusion List* gesetzt, seine Intensität in den darauffolgenden Survey Scans jedoch weiter überwacht. Steigt die Intensität um einen definierten Faktor (Reconsider Factor) an, so wird das entsprechende Ion von der Exclusion List gelöscht und die Aufnahme von  $MS^2$ -Spektrum und  $MS^3$ -Spektren gestartet. Anschließend wird das Ion analog zur ersten Messung wieder auf die Exclusion List gesetzt. Auf diese Weise lässt sich die Aufnahme qualitativ hochwertige  $MS^n$ -Spektren bei relativ geringen Threshold realisieren. Ein brauchbarer Reconsider Factor muss durch Testmessungen ermittelt werden. Wird der Wert zu hoch gewählt, so wird kein weiteres Spektrum mehr aufgenommen, da die Intensität nicht mehr um den geforderten Faktor ansteigt. Ein zu niedriger Faktor führt zu einer wiederholten Aufnahme von  $MS^n$ -Spektren aus der ansteigenden Flanke des Peaks. Die beiden Beispiele sind in Abb. 14 nochmals graphisch zusammengefasst.



**Abb. 14:** Auswirkungen verschiedener Reconsider-Faktoren. Die graue Fläche zeigt die gewählte *Exclusion Time*:

Links: A: Aufnahme des ersten  $MS^2$ -Spektrums; B, C: Aufnahme weiterer  $MS^2$ -Spektren bei einem *Reconsider Factor* von 2

Rechts: Keine erneute Spektren-Aufnahme bei einem *Reconsider Factor* von 10

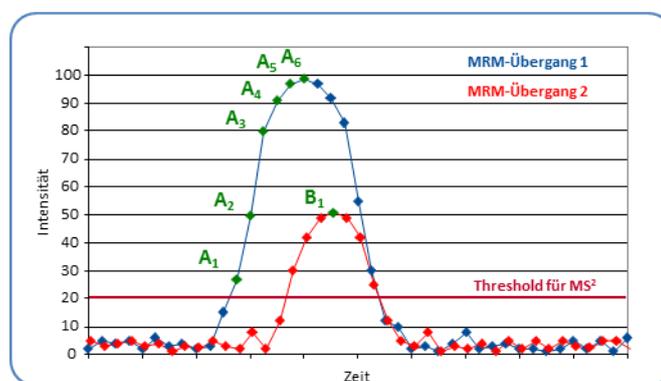
#### 1.2.4.2 Theoretische Grundlagen Multi Target Screening (MTS) mit QTRAP™

Das hier im Labor etablierte LC-MS/MS-Screening Verfahren mit einem Tandem-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (QTRAP™) verwendet eine, an die technischen Gegebenheiten angepasste, Variante der oben beschriebenen datenabhängigen Spektrenaufnahme<sup>[90]</sup>.

Als Survey Scan dient hier der empfindlichste Messmodus eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers, der Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) Modus. Für jede von der Methode erfassbare Substanz ist ein spezifischer MRM-Übergang, in der Regel der Übergang von Molekül-Ion auf das intensivste Fragment, und ein Retentionszeit-Fenster hinterlegt. Übersteigt das MRM-Signal einen gegebenen Threshold, so wird automatisch ein  $MS^2$ -Spektrum des entsprechenden Molekül-Ions aufgenommen. Zur Unterscheidung eines Peaks vom Grundrauschen wird vor

der Threshold-Prüfung die über die vorherigen Datenpunkte ermittelte Intensität des Rauschens von der gemessenen Intensität des MRM-Übergangs subtrahiert. (Dynamic Background Subtraction, DBS). Eine Basislinie, die im gegebenen Retentionszeitfenster permanent oberhalb des gegebenen Threshold liegt, wird somit als Rauschen erkannt und nur einmal zur Aufnahme eines  $MS^2$ -Spektrums führen.

Die Fragmentierung erfolgt mit Hilfe einer ansteigenden Kollisionsenergie (Collision Energy Spread, CES). Die Fragmente werden in der linearen Ionenfalle (Q3) für eine gegebene Füllzeit gesammelt und anschließend detektiert. Danach erfolgt der nächste Survey-MRM. Für den nächsten Datenpunkt des soeben gemessenen Übergangs wird in Folge neben der beschriebenen Threshold-Prüfung zusätzlich geprüft, ob die Intensität im Vergleich zum letzten Datenpunkt angestiegen ist. Ist dies der Fall wird erneut ein  $MS^2$ -Spektrum aufgenommen. Hat die Intensität abgenommen wird der MRM-Übergang für einen definierten Zeitraum (Exclusion Time) von der Liste der Survey-MRM-Übergänge ausgenommen. Dies ermöglicht in günstigen Fällen die Detektion von zwei koeluiierenden Substanzen unterschiedlicher Intensität (s. Abb. 15). Die erhaltenen  $MS^2$ -Spektren werden anschließend ebenfalls softwaregestützt mit den Referenzspektren einer hinterlegten Spektrenbibliothek verglichen.



**Abb. 15:** IDA gesteuerte Spektrenaufnahme beim MTS:  $A_x$ : Aufnahme von  $MS^2$ -Spektren mit Precursor MRM-Übergang 1  $B_1$ : Aufnahme von  $MS^2$ -Spektrum mit Precursor MRM-Übergang 2

### 1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von körperfremden Substanzen in Speichel, Zähnen und Glaskörperflüssigkeit. Neben der reinen technischen Nachweisbarkeit sind vor dem Einsatz solcher alternativer Matrices bei forensischen Fragestellungen umfangreiche Untersuchungen und Evaluierungen von der Probennahme über die Lagerung bis

hin zum analytischen Nachweis und der Interpretation der (quantitativen) Ergebnisse notwendig. Da insbesondere in der Forensik, je nach Matrix und zu untersuchenden Analyten, kontrollierte Humanstudien nicht möglich sind, bzw. bei asservierten Proben keine gesicherten Informationen über Zeitpunkt und Menge der Einnahme vorhanden sind, sollten insbesondere für die grundlegenden Untersuchungen von Zahnhartsubstanz passende Modelle entwickelt und angewendet werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines robusten LC-MSn-basierenden Screeningverfahrens zum Nachweis körperfremder Substanzen in verschiedenen biologischen Matrices. Hierbei sollte vor allem Wert auf eine schnelle und einfache Methodik mit hoher Selektivität gelegt werden, die auf Grund einer anwenderfreundlichen automatisierten Datenauswertung, insbesondere für den Routine-Einsatz in klinischen und forensischen Laboren geeignet ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Standardsubstanzen

**Tab. 1:** Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Reinheit	Hersteller / Lieferant
Aceton	p.a.	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Acetonitril	LC-MS grade	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Acetonitril	HPLC Far UV / Gadient Grade	J.T. Baker Deventer, Niederlande
Acetonitril	LC-MS grade	Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	98 %	Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Ammoniaklösung	25 %	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ammoniumformiat	> 99,995 %	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Ammoniumformiat Lösung, 10 M	-	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Amphetamin, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Benzoyllecgonin, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Borsäure	k. A.	J.T. Baker Deventer, Niederlande
1-Chlorbutan	≥ 99,8 %	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Clindamycinhydrochlorid	-	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Cocain, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Codein, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Deionisiertes Wasser	-	Hauseigene Anlage
ESI - L Tuning Mix	k. A.	Agilent Technologies Waldbronn, Deutschland
Essigsäure	100 %	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Ethylglucuronid, 1 mg/ml	-	Medichem Steinenbronn, Deutschland
Ethylglucuronid-D5, 1 mg/ml	-	Medichem Steinenbronn, Deutschland

## Material und Methoden

Chemikalien / Reagenzien	Reinheit	Hersteller / Lieferant
Ethylsulfat-D5	≥ 99,9 %	In-House-Synthese <sup>[125]</sup>
n-Hexan	p. A.	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	≥ 99,5 %	Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	≥ 85 %	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
MDE, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
MDEA-D5, 100 µg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
MDMA, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Methamphetamin, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Methanol	Gradient grade	J.T. Baker Deventer, Niederlande
Methanol	LC-MS grade	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Methylphenidat, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Morphin, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Natriumcarbonat	≥ 99,9 %	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Natrium-Ethylsulfat	-	ABCR Karlsruhe, Deutschland
n-Hexan	Gradient grade	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
2,2,3,3,3-Pentafluorpropanol	97 %	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
2-Propanol	Gradient grade	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Petrolether 40-60 °C	p.a.	Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
THC, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
THC-COOH, 1 mg/ml	-	LGC Standards GmbH Wesel, Deutschland
Trifluoressigsäureanhydrid	ReagentPlus®, ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland

Weitere Drogen- und Medikamentenwirkstoffe sowie deuterierte Analoga zur Erstellung von Referenzspektren und Kalibratoren wurden - soweit in Tabelle 1 nicht

gelistet - von LGC Standards GmbH (Promochem), Wesel, Deutschland und Lipomed GmbH, Weil am Rhein, Deutschland bezogen. Der Erstbezug der für diese Arbeit verwendeten synthetischen Cannabinoiden erfolgte als Feststoff, als sog. „Research Chemical“ oder nach Sicherstellung durch verschiedene Behörden (Bundeskriminalamt, Landeskriminalämter, Zoll). Identität und Reinheit wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC), Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) bestätigt. Die deuterierten Analoga wurden von Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) und Chiron AS (Trondheim, Norwegen) bezogen.

Drogenfreies Blut und Leerspeichel für die Methodenentwicklung bzw. zu Validierungs-Zwecken stammte von Freiwilligen aus dem Institut für Rechtsmedizin. Blut- und Speichelproben wurden nach der Entnahme zentrifugiert und das erhaltene Serum bzw. der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Glasröhrchen gelagert.

Bovines Frontzahnmaterial sowie Augäpfel von Rindern und Schweinen wurden vom Schlachthof Freiburg Betriebsgesellschaft d.b.R. bezogen.

## 2.1.2 Reagenzien und Lösungen

### 2.1.2.1 Puffer und Reagenzien

#### **Boratpuffer pH 9**

Lösung A: Es wurden 61,8 g Borsäure und 74,6 g Kaliumchlorid in einen 1 l Messkolben eingewogen und bis zur Eichmarke mit dest. Wasser gefüllt.

Lösung B: Es wurden 106 g Dinatriumhydrogencarbonat in einen 1 l Messkolben eingewogen und bis zur Eichmarke mit dest. Wasser aufgefüllt.

Der Puffer wurde durch Mischen von 630 ml Lösung A und 370 ml Lösung B hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Lösung B eingestellt.

#### **Phosphatpuffer pH 6**

Es wurden 13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat in ca. 900 ml dest. Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 M KOH-Lösung auf pH 6 eingestellt und anschließend mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

#### **Phosphatpuffer pH 7,4 (nach Sörensen)**

Lösung A: 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in einen 1 l Messkolben eingewogen und bis zur Eichmarke mit dest. Wasser aufgefüllt.

Lösung B: 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat wurden in einen 1 l

Messkolben eingewogen und bis zur Eichmarke mit dest. Wasser aufgefüllt.

Es wurden 818 ml Lösung B in einen 1 l Messkolben gegeben und mit Lösung A bis zur Eichmarke gefüllt.

#### **Phosphatpuffer pH 8,5**

Es wurden 6,8 g Kaliumdihydrogenphosphat in ca. 900 ml dest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit 5 M KOH-Lösung eingestellt.

#### **Carbonatpuffer pH 10**

Lösung A: 10,6 g Dinatriumcarbonat wurden in einen 1 l Messkolben eingewogen und bis zur Eichmarke mit dest. Wasser aufgefüllt.

Lösung B: 8,4 g Natriumhydrogencarbonat wurden in einen 1 l Messkolben eingewogen und bis zur Eichmarke mit dest. Wasser aufgefüllt.

Der Carbonatpuffer wurde durch Mischen von 534 ml Natriumcarbonat-Lösung (A, 0,1 M) und 466 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (B, 0,1 M) hergestellt.

#### **10 M Kaliumhydroxydlösung**

112,22 g Kaliumhydroxid Plätzchen werden in ein Becherglas abgewogen und in ca. 150 ml dest. Wasser gelöst. Die Lösung wird in einen 200 ml Messkolben überführt und mit dest. Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung ist bei Raumtemperatur in einer Braunglasflasche mit Plastikstopfen aufzubewahren.

#### **Ammoniumformiat-Stammlösung (c = 20 mM)**

Es wurden 1,2612 g Ammoniumformiat in einen 1 l Messkolben eingewogen und mit dest. Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur in einer Braunglasflasche mit Schraubdeckel aufbewahrt.

#### **Ammoniumformiat-Stammlösung (c = 200 mM)**

Zur Herstellung der Stammlösung wurde eine kommerzielle 10 M Formiatlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 1:50 mit dest. Wasser verdünnt.

#### **Extraktionsgemisch JWH:**

Für das Extraktionsgemisch werden n-Hexan und Ethylacetat im Verhältnis 99:1 (v/v) gemischt.

#### **Demineralisations-Lösung für pH-Cycling<sup>[126]</sup>**

Zur Herstellung der Demineralisations-Lösung wurden 0,32 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 6,005 g Essigsäure (50 mM) in einen 2 l Messkolben gefüllt und dieser bis zur Eichmarke mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gefüllt.

**Remineralisations-Lösung für pH-Cycling<sup>[126]</sup>**

Lösung A: Es wurden 0,32 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 19,38 g KCl und 9,52 g HEPES in einen 1 l Messkolben eingewogen und dieser bis zur Eichmarke mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gefüllt.

Lösung B: Je 2 ml Referenzstandard (1 mg/ml) der Modellsubstanzen Amphetamin, Benzoyllecgonin, Cocain, Codein, MDE, MDMA, Methamphetamin und Morphin wurden in einen 1 l Messkolben pipettiert und dieser bis zur Eichmarke mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gefüllt.

Zur Herstellung der Remineralisations-Lösung wurden die beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt.

**2.1.2.2 LC-Fließmittel****Fließmittel zum Nachweis von Benzodiazepinen, Methylphenidat und Antibiotika**

Fließmittel A: 949 ml dest. Wasser, 1 ml Ameisensäure, 50 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 20$  mM)

Fließmittel B: 949 ml Acetonitril, 1 ml Ameisensäure, 50 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 20$  mM)

**Fließmittel zum Nachweis synthetischer Cannabinoide**

Fließmittel A: 988 ml dest. Wasser, 2 ml Ameisensäure, 10 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 200$  mM)

Fließmittel B: Methanol

**Fließmittel zum Nachweis von Drogen in der Zahnhartsubstanz**

Fließmittel A: 949 ml dest. Wasser, 1 ml Ameisensäure, 50 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 20$  mM)

Fließmittel B: 949 ml Methanol, 1 ml Ameisensäure, 50 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 20$  mM)

**Fließmittel zum Nachweis von EtG und EtS**

Fließmittel A: 999 ml dest. Wasser, 1 ml Ameisensäure

Fließmittel B: Methanol

**Fließmittel für Toxyper**

Fließmittel A: 979 ml dest. Wasser, 1 ml Ameisensäure, 10 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 200$  mM), 10 ml Acetonitril

Fließmittel B: 989 ml Acetonitril, 1 ml Ameisensäure, 10 ml Formiat-Stammlösung ( $c = 10$  M)

### 2.1.2.3 Standardgemische

#### **11er BenzoMix**

Der Mix zum Dotieren von Proben, Kalibratoren und Kontrollen wurde aus methanolischen Lösungen von Bromazepam, Chlordiazepoxid, Clonazepam, Diazepam, Flurazepam, Flunitrazepam, Lorazepam, Midazolam, Nordazepam, Oxazepam, Temazepam (LGC Standards GmbH (Promochem), Wesel, Deutschland) hergestellt. Hierzu wurden je 9 µl einer 1 mg/ml Lösung in einem 4 ml Braunglas-Vial gemischt und mit Methanol auf 3 ml abs. aufgefüllt (Endkonzentration: 3 µg/ml). Die Lagerung der Lösung erfolgt bei -20 °C.

#### **8er Dx-BenzoMix**

Der Mix besteht aus methanolischer Lösung der stabilisotopen-markierten Benzodiazepinen D4-Clonazepam, D4-Lorazepam, D4-Midazolam, D5-Diazepam, D5-Nordazepam, D5-Oxazepam, D7-Aminoflunitrazepam, D7-Flunitrazepam (LGC Standards GmbH (Promochem), Wesel, Deutschland). Es wurden je 2 µg pro Substanz bzw. je 200 ng für D7-Flunitrazepam und D7-Aminoflunitrazepam mit Methanol auf 1 ml abs. aufgefüllt. Die Lagerung der Lösung erfolgt bei -20 °C.

#### **Methylphenidat-Standard**

Zum Dotieren von Kalibratoren und Kontrollen wurde eine methanolische Arbeitslösung mit 1 µg/ml bzw. 100 ng/ml Methylphenidat verwendet. Diese wurden aus einer 1 mg/ml Methylphenidat-Lösung (LGC Standards GmbH (Promochem), Wesel, Deutschland) hergestellt.

#### **D5-MDEA Standard**

Als interner Standard (IS) für die quantitative Bestimmung von Methylphenidat wurde eine D5-MDEA-Lösung ( $c = 2 \mu\text{g/ml}$ ) verwendet. Diese Arbeitslösung wurde durch Verdünnen einer 100 µg/ml Lösung (LGC Standards GmbH (Promochem), Wesel, Deutschland) hergestellt.

#### **JWH Standard**

Von allen Analyten wurden ethanolische Stammlösungen von jeweils 1 mg/ml hergestellt. Zum dotieren von Kalibratoren und Qualitätskontrollen wurde eine ethanolische Stammlösung, die die synthetischen Cannabinoide JWH-007, JWH-015, JWH-018, JWH-019, JWH-020, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-122 5-Fluoropentyl-Derivat, JWH-200, JWH-203, JWH-210, JWH-250, JWH-251, JWH-412, AM-694, AM-1220, AM-2201, AM-2233, RCS-4, RCS-4 ortho-Isomer, RCS-8, WIN 48,098 und WIN 55,212-2 in einer Konzentration von je 1 µg/ml enthält hergestellt. JWH-018 Adamantylderivat und JWH-387 wurden mit je 20 µg/ml,

JWH-398 und Methanandamid mit je 5 µg/ml und CRA-13 mit 40 µg/ml zugegeben. Aus dieser Stammlösung wurden 3 ethanolische Arbeitslösungen durch Verdünnen hergestellt: Arbeitslösung 1 wurde durch Verdünnen der Stammlösung (1:10, v/v) hergestellt. Arbeitslösung 2 durch Verdünnen von Arbeitslösung 1 (1:10, v/v) und Arbeitslösung 3 durch Verdünnen von Arbeitslösung 2 (1:10, v/v).

#### **Dx-Mix JWH**

Als interner Standard wurde eine Mischung hergestellt, welche die deuterierten synthetischen Cannabinoide D7-JWH-015 and D9-JWH-073 (je 25 ng/ml), D9-JWH-007, D11-JWH-018, D9-JWH-081, D5-JWH-250 (50 ng/ml), D9-JWH-122 (75 ng/ml), D5-JWH-200 (100 ng/ml) und D9-JWH-210 (200 ng/ml) in Ethanol enthält. Dies erfolgte durch Verdünnung entsprechender Stammlösungen.

#### **Ampicillin Standard (IS)**

Es wurden 10,62 mg Ampicillin Natriumsalz in einen 10 ml Messkolben eingewogen und in ca. 5 ml Methanol für 5 min im Ultraschallbad gelöst. Danach wurde der Kolben bis zur Eichmarke mit Methanol gefüllt.

#### **Clindamycin-Standard**

Es wurden 10,85 mg Clindamycinhydrochlorid in einen 10 ml Messkolben eingewogen und in ca. 5 ml Methanol für 5 min im Ultraschallbad gelöst. Danach wurde der Kolben bis zur Eichmarke mit Methanol gefüllt.

#### **Amoxicillin-Standard**

Es wurden 10 mg Amoxicillin in einen 100 ml Messkolben eingewogen und in ca. 50 ml Methanol für 5 min im Ultraschallbad gelöst. Danach wurde der Kolben bis zur Eichmarke mit Methanol gefüllt. Daraus wurde durch Verdünnen eine 1 µg/ml Arbeitslösung hergestellt.

#### **8er Mix basische Drogen**

Zum Dotieren von Kalibratoren und Kontrollen wurde zunächst aus kommerziellen Referenzstandards (LGC Standards GmbH) eine methanolische Stammlösung mit je 10 µg/ml Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDEA, Cocain, Benzoylecgonin, Morphin und Codein hergestellt. Als Arbeitslösung wurde eine Verdünnung mit je 100 ng/ml pro Analyt verwendet.

#### **BD-IS-Mix**

Als IS wurde das für die Routineanalytik auf basische Drogen eingesetzte Standardgemisch 1:10 verdünnt verwendet<sup>[127]</sup>. Zur Herstellung der Arbeitslösung

wurden kommerzielle Stammlösungen (LGC Standards GmbH) der einzelnen Substanzen ( $c = 100 \mu\text{g/ml}$ ) wie folgt gemischt: Je  $250 \mu\text{l}$  D5-Amphetamin, D5-Methamphetamin, D5-MDA, D5-MDMA, D5-MDEA, D9-Methadon, D3-EDDP, D3-Cocain, D3-BE, D3-EME, D3-Tramadol, D6-O-Desmethyltramadol, D3-Nortilidin, D3-Morphin, D3-Codein und D6-Dihydrocodein sowie je  $50 \mu\text{l}$  D3-Oxymorphon, D3-Oxycodon, D3-Cocaethylen und D3-Hydromorphon wurden in einen  $25 \text{ ml}$  Messkolben gegeben und dieser bis zur Eichmarke mit Methanol gefüllt.

#### **Hexamix**

Aus methanolischen Stammlösungen ( $1 \text{ mg/ml}$ ) von Coffein, Doxepin, Diazepam, Morphin, Codein, Amiodaron wurde eine Mischung mit einer Konzentration von jeweils  $10 \mu\text{g/ml}$  hergestellt. Die Stammlösungen wurden entweder als fertige Lösung bezogen (LGC Standards GmbH (Promochem) oder Lipomed GmbH) oder durch Einwaage von Feststoff selbst hergestellt.

#### **Decamix**

Aus methanolischen Stammlösungen ( $1 \text{ mg/ml}$ ) von Paracetamol, Coffein, Doxepin, Diazepam, Morphin, Codein, Buprenorphin, Amiodaron, Phenprocoumon und Glafenin wurde eine Mischung mit einer Konzentration von jeweils  $10 \mu\text{g/ml}$  hergestellt. Die Stammlösungen wurden entweder als fertige Lösung bezogen (LGC Standards GmbH (Promochem) oder Lipomed GmbH) oder durch Einwaage von Feststoff selbst hergestellt.

#### **BenzoMix 1**

Aus methanolischen Stammlösungen ( $1 \text{ mg/ml}$  bzw.  $100 \mu\text{g/ml}$ ) von alpha-OH-Midazolam, Zolpidem, Chlordiazepoxid, Zopiclon, Lorazepam, Bromazepam, Diazepam, Clonazepam, Temazepam, Midazolam, Oxazepam und Nordazepam wurde eine Mischung mit einer Konzentration von jeweils  $10 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $1 \mu\text{g/ml}$  für Flunitrazepam, 7-Aminoflunitrazepam und Desalkylflunitrazepam hergestellt. Die Stammlösungen wurden entweder als fertige Lösung bezogen (LGC Standards GmbH (Promochem) oder Lipomed GmbH) oder durch Einwaage von Feststoff selbst hergestellt.

#### **BenzoMix 2**

Aus methanolischen Stammlösungen ( $1 \text{ mg/ml}$  bzw.  $100 \mu\text{g/ml}$ ) von Alprazolam, Camazepam, Chlordiazepoxid, Clobazam, Flurazepam, Lorazepam, Medazepam, Nitrazepam, Prazepam, Tetrazepam und Triazolam wurde eine Mischung mit einer Konzentration von jeweils  $10 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $1 \mu\text{g/ml}$  für Lormetazepam, 7-Aminoclonazepam, alpha-OH-Alprazolam und 2-OH-Ethyl-Flurazepam hergestellt.

Die Stammlösungen wurden entweder als fertige Lösung bezogen (LGC Standards GmbH (Promochem) oder Lipomed GmbH) oder durch Einwaage von Feststoff selbst hergestellt.

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2:** Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Dräger DCD 5000 Speichelsammler	Drägerwerk AG & Co. KGaA (Lübeck, Deutschland)
Salivette® ohne Präparierung	SARSTEDT AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
SPE-Säulen Oasis® HLB 60 mg, 3 ml	Waters GmbH (Eschborn, Deutschland)
SPE-Säulen Isolute® HXC-5 130 mg, 3 ml	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
Chromabond Drug 200 mg, 3 ml	Machery Nagel (Düren, Deutschland)
Synergi™ 4 µm Polar-RP 80 Å LC Column 150 x 2 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Synergi™ 4 µm Polar-RP 80 Å LC Column 250 x 2 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Luna® 3 µm PFP(2) 100 Å LC Column 150 x 3 mm	SARSTEDT AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Luna® 5 µm PFP(2) 100 Å LC Column 150 x 2 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Luna® 5 µm Phenyl-Hexyl 100 Å LC Column 50 x 2 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
SecurityGuard Cartridges PFP 4 x 2,0 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
SecurityGuard Cartridges Polar-RP 4 x 2,0 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
SecurityGuard Cartridges Phenyl-Hexyl 4 x 2,0 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Acclaim® RSLC 120 C18 2,2 m120Å 2,1 x 100 mm	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
Acclaim® RSLC 120 C18 2,2 m120Å 2,1 x 50 mm	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
Kinetex™ 1,7 µm PFP 100 Å LC Column 100 x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Kinetex™ 2,6 µm PFP 100 Å LC Column 100 x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Kinetex™ 1,7 µm C18 100 Å LC Column 100x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Kinetex™ 2,6 µm C18 100 Å LC Column 100x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
HP-5MS UI 30 m x 0.250 mm x 0.25 µm	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

## 2.2 Analysensystem

Tab. 3: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Analysen-Systeme

Gerät	Komponenten	Hersteller
QTRAP 2000 LC-MS/MS	1100 Series G1313A Autosampler	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
	1200 Series G1316A Säulenofen	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
	1100 Series G1312A Binäre Pumpe	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
	1100 Series G1310A Isokratische Pumpe	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
	1100 Series G1379A micro-Degasser	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
	QTRAP 2000 QqQ mit ESI Ionenquelle	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)
	Analyst Software (Version 1.4.1)	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)
QTRAP 4000 LC-MS/MS	SIL-20AC <i>prominence</i> Autosampler	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	CBM-20A Systemsteuerung	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	CTO-20AC <i>prominence</i> Säulenofen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	DGM-20A3 <i>prominence</i> Degasser	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	2 LC-20AD SP <i>prominence</i> LC-Pumpen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	QTRAP 4000 QqQ mit ESI Ionenquelle	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)
	Analyst Software (Version 1.5.1)	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)
API 5000 LC-MS/MS	HTC PAL Autosampler	CTC Analytics (Zwingen, Schweiz)
	SCL-10A Systemsteuerung	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	CTO-10AC Säulenofen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	3 LC-10AD VP HPLC - Pumpen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)
	ERC 3415α Degasser	ERC GmbH (Riemerling, Deutschland)
	API 500 Triple-Quadrupol-MS mit TurbolonSpray Ionenquelle	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)
	Analyst Software (Version 1.5.1)	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 3: Fortsetzung

Gerät	Komponenten	Hersteller
amazon Speed LC-MS	WPS-3200TRS Autosampler	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
	HPG-3200TRS Binäre Pumpe	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
	SRD-3200 2 Chanel Degasser	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
	TCC-3000RS Column Compartment	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
	amaZon Speed Ionenfalle mit Elektrospray-Ionenquelle bzw. ionBooster	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
	DataAnalysis (Version 4.1 Build 342)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
	TrapControl (Version 7.1 Build 95.0)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
	HyStar (Version 3.2 Build 44)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
	DCMS Link (Version 2.8)	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
	Agilent GC-MS	7683 B Series Injector
6890 N Network GC-System		Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
5973 Network MSD		Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Agilent Chemstation (Version D.03.00.61)		Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

## 2.3 Methodenentwicklung

### 2.3.1 Methodenentwicklung für Triple-Quadrupol-MS-Systeme

Für die Entwicklung von LC-MS/MS Methoden an den in Kapitel 2.2 aufgeführten Triple-Quadrupol-Systemen wurden zunächst für den jeweiligen Analyten passende MRM-Übergänge gewählt. Diese wurden entweder anhand der ESI MS/MS-Spektren einer vorhandenen Bibliothek<sup>[128]</sup> oder nach Aufnahme von Produktionen-Spektren der jeweiligen Reinsubstanz gewählt. Die chromatographische Trennung wurde ausgehend von in der Arbeitsgruppe etablierten Methoden entwickelt und für die jeweilige Fragestellung optimiert. Die Optimierung der MRM-Parameter erfolgte dann durch Fließinjektion (FIA) des jeweiligen Analyten in den LC-Gradienten. Die Zusammensetzung des Fließmittels für den jeweiligen Analyten orientierte sich an der Zusammensetzung der Gradientenmischung bei der entsprechenden Retentionszeit. Die Methoden wurden je nach Fragestellung nach Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert bzw. teil-

validiert. Die für die jeweiligen Analysen verwendeten Methodenparameter sind in Kapitel 2.4 beschrieben.

## 2.3.2 Methodenentwicklung Toxyper

### 2.3.2.1 LC-Methode

Ausgangspunkt der Methodenentwicklung war eine bestehende LC-Methode zur Analyse unterschiedlicher Drogen- und Medikamentenwirkstoffe, die an den in der Arbeitsgruppe vorhandenen Triple-Quadrupol-MS-Systemen verwendet wurde<sup>[129]</sup>. Zur Überprüfung des Analysensystems (Trennleistung der Säule und Empfindlichkeit des MS) wurde ein Testmix (Hexamix) aus sechs positiv ionisierenden Analyten, die die komplette Laufzeit und den analysierten Massenbereich (50 - 800 amu) abdecken verwendet. Da die hier verwendete Ionenfalle ohne Zeitverlust zwischen negativer und positiver Polarität wechseln kann (Zero-Delay Alternating, ZDA™), wurde der vorhandene Testmix um die zwei negativ ionisierbaren Analyten Phenprocoumon und Glafenin erweitert. Zudem wurde zur engeren Abdeckung des Massen- und Retentionszeitbereichs die Substanzen Paracetamol (151,16 amu) und Buprenorphin (467,64 amu) hinzugefügt. Dieser Decamix (s. Kapitel 2.1.2.3) wurde zum Testen verschiedener Säulen (s. Tab. 4) und Fließmittel verwendet.

Tab. 4: Im Laufe der Methodenentwicklung getestete Säulen

Säule	Hersteller / Lieferant
Synergi™ 4 µm Polar-RP 80 Å LC Column 150 x 2 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Acclaim® RSLC 120 C18 2,2 m120Å 2,1 x 100 mm	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
Acclaim® RSLC 120 C18 2,2 m120Å 2,1 x 50 mm	Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland)
Kinetex™ 1,7 µm PFP 100 Å LC Column 100 x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Kinetex™ 2,6 µm PFP 100 Å LC Column 100 x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Kinetex™ 1,7 µm C18 100 Å LC Column 100x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
Kinetex™ 2,6 µm C18 100 Å LC Column 100x 2,1 mm	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)

Als Fließmittel wurden als organische Phasen Aceton und Methanol verschiedener Hersteller, als wässrige Phase 0,1 %ige Ameisensäure mit unterschiedlichen Mengen an Ammoniumformiat getestet. Die Zusammensetzung der letztendlich für das

Screening verwendeten Fließmittel findet sich in Kapitel 2.1.2.2 „Fließmittel für Toxyper“. Die Analysendaten wurden hinsichtlich Peakform, Intensität und Reproduzierbarkeit der Retentionszeit bei zehn aufeinander folgenden Injektionen ausgewertet.

### 2.3.2.2 *Spektrenbibliothek*

Für das Screening-Verfahren wurden umfangreiche Spektrenbibliotheken mit MS, MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup> Spektren erzeugt. Hierzu wurde von jedem Analyten eine 1 µg/ml Lösung in Fließmittel (A:B, 50:50, v/v) hergestellt und jeweils 1 µl injiziert. Die Spektrenaufnahme erfolgte mittels auto-MSn (n = 3) im UltraScan mode mit positiver und falls möglich negativer Electrospray-Ionisierung in einem jeweils eigenen Lauf. Der UltraScan mode wurde auf Grund seiner hohen Scan-Geschwindigkeit (32500 Da/s) und dem kleinsten detektierbaren m/z von 70 gewählt. Da ca. 70 % aller relevanten Substanzen ein Molekulargewicht zwischen 200 und 400 Da aufweisen, wurden keine MS<sup>n</sup>-Spektren mit n > 3 aufgenommen. Mittels DataAnalysis wurde die Ionenspur des protonierten bzw. de-protonierten Molekül-Ions extrahiert (EIC). MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren wurden über die „Find AutoMS(n)“-Funktion generiert. Das jeweils beste Spektrum wurde ausgewählt, automatisch dekonvuliert und in ein Linienspektrum umgewandelt. Alle Spektren wurden bevor sie in die Bibliothek aufgenommen wurden anhand folgender Parameter überprüft:

- Massenunterschied zwischen MS<sup>1</sup>-Precursor- und theoretischer mono-isotopischer Masse ≤ 0,25 amu
- Gemessenes Isotopen-Muster des MS<sup>1</sup>-Precursors stimmt mit dem theoretischen Isotopen-Muster überein.
- Intensität des Base-Peaks im MS<sup>2</sup> ≥ 10<sup>5</sup> counts
- Intensität des Base-Peaks im MS<sup>3</sup> ≥ 10<sup>4</sup> counts

Nachträglich wurden Summen- und Strukturformeln sowie weitere Meta-Daten wie Substanzklasse und CAS-Nummer den Einträgen hinzugefügt.

Die ausführlichen LC- und MS-Methodenparameter zur Spektrenaufnahme sind in Kapitel 2.4.7.2 hinterlegt.

### 2.3.2.3 *Toxyper-Screening*

Für das Toxyper-Screening wurde die Polarität der zur Spektren-Aufnahme verwendeten Methode zunächst auf „alternating“ gesetzt. Aus der erstellten Bibliothek wurde eine Scheduled Precursor List (SPL) mit der jeweiligen Precursor-Masse, Retentionszeit, und Polarität generiert. Zusätzlich wurde - abhängig vom

Informationsgehalt des MS<sup>2</sup>-Spektrums - für jeden Analyten angegeben, ob die Aufnahme eines MS<sup>3</sup>-Spektrums angestoßen werden sollte oder nicht.

Als proof-of-concept wurde die Methode zu Beginn des Projektes anhand einer SPL mit 37 Benzodiazepinen, einer Spektrenbibliothek mit 600 Einträgen und der Analyse von mit Benzodiazepinen dotierten Serumproben bzw. Ringversuchsproben getestet.

## 2.4 *Verwendete Analysemethoden*

### 2.4.1 **Nachweis von Benzodiazepinen in humanem Speichel**

#### 2.4.1.1 *Probenaufarbeitung für Speichel*

In Methanol gelagerte Speichelsammler (Dräger DCD 5000) wurden ohne weitere Behandlung verwendet. Zur Extraktion ‚nativ‘ gelagerter Speichelsammler wurden 950 µl Methanol zugegeben. Nach 10 min im Ultraschallbad wurden Speichelsammler und Flüssigkeit in eine Salivette® (ohne Watte-Pad) überführt und zentrifugiert (10 min, 4000 U/min). Das Zentrifugat wurde in ein Serumröhrchen überführt und nach Zugabe von 10 µl Internem Standard bei 40 °C unter Stickstoff eingengt. Die Extraktion der Benzodiazepine aus dem eingengten Rückstand erfolgte mittels basischer Chlorbutanextraktion. Hierzu wurden 1,5 ml Chlorbutan und 0,5 ml Boratpuffer (pH 9) hinzugegeben und vier Minuten auf einem Überkopfschüttler durchmischt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4000 U/min). Die organische Phase wurde in ein LC-Vial überführt und bis zur Trockene eingedampft (40 °C, N<sub>2</sub>). Der Rückstand wurde in 100 µl Fließmittel A:B, 80:20 (v/v) rekonstituiert.

#### 2.4.1.2 *Quantitativer Nachweis von Benzodiazepinen mit LC-MS/MS*

Für den quantitativen Nachweis von Benzodiazepinen in Speichel wurde ein QTRAP 2000 Triple-Quadrupol-MS System verwendet (s. Tab. 3). Die verwendeten MRM-Übergänge wurden anhand einer hauseigenen Spektrenbibliothek gewählt<sup>[128]</sup>. Die jeweiligen MS-Parameter wurden durch Fließ-Injektions-Analyse (FIA) methanolischer Standards in den LC-Fluss optimiert. Die Methodenparameter sind in Tabelle 5 und 6 hinterlegt.

Tab. 5: LC-Parameter zur Quantifizierung von Benzodiazepinen

Säule:	Synergi™ 4 µm Polar-RP 80 Å LC Column 150 x 2 mm
Vorsäule:	Synergi™ Polar-RP 4 x 2,0 mm
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,4 ml/min
Fließmittel A:	0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Fließmittel B:	Acetonitril : 0,1 % Ameisensäure, 95:5 (v/v), 1 mM Ammoniumformiat
Gradient:	0,0 - 1,0 min: 20 % B 1,0 - 10,0 min: linear von 20 % auf 95 % B 10,0 - 11,0 min: 95 % B 11,0 - 12,0 min: linear von 95 % auf 20 % B 12,0 - 15,0 min: 20 % B
Post Column:	-

Tab. 6: MS-Parameter zur Quantifizierung von Benzodiazepinen

<b>Acquisition Method:</b>	Benzos Oral Fluid 21042008.dam						
<b>Acquisition Duration:</b>	15 min 0 sec	<b>CUR:</b>	20				
<b>Acquisition Type:</b>	MRM	<b>IS:</b>	5400 V				
<b>Polarity:</b>	Positive	<b>TEM:</b>	400 °C				
<b>Ion Source:</b>	Turbo Spray	<b>GS1:</b>	60				
<b>Scans in Period:</b>	557	<b>GS2:</b>	70				
<b>Resolution Q1:</b>	Unit	<b>CAD:</b>	5,00				
<b>Resolution Q2:</b>	Low	<b>EP:</b>	10 V				
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>t<sub>R</sub> min</b>
Bromazepam	316,1	182,2	55	12	41	3,0	4,97
	316,1	209,2	55	12	34	3,0	
Chlordiazepoxid	300,2	293,2	30	9	35	4,0	4,35
	300,2	227,2	30	9	32	4,0	
Clonazepam	316,1	270,2	55	10	32	4,0	6,42
	316,1	214,2	55	10	52	4,0	
Diazepam	285,2	193,2	50	12	35	4,0	7,25
	285,2	154,2	50	12	33	4,0	
Flurazepam	388,2	315,2	37	12	20	4,0	5,44
	388,2	288,2	37	12	33	4,0	
Flunitrazepam	314,2	268,2	48	11	33	4,0	6,94
	314,2	239,2	48	11	46	4,0	

Tab. 6: Fortsetzung

Analyt	Precursor m/z	Fragment m/z	DP V	CEP V	CE eV	CXP V	tR min
Lorazepam	321,1	303,1	40	11	20	4,0	5,95
	321,1	275,1	40	11	27	4,0	
Midazolam	326,1	291,2	55	32	40	4,0	5,23
	326,1	249,2	55	32	50	4,0	
Nordazepam	271,1	165,1	50	10	39	3,0	6,22
	271,1	140,1	50	10	39	3,0	
Oxazepam	287,2	269,2	38	9	20	4,0	5,80
	287,2	241,2	38	9	28	4,0	
Temazepam	301,1	283,2	45	11	15	4,0	6,61
	301,1	255,2	45	11	28	4,0	
D4-Clonazepam	320,0	274,1	40	10	35	3,5	6,37
D4-Lorazepam	324,9	279,0	40	11	27	4,0	5,93
D4-Midazolam	330,0	295,1	55	32	40	4,0	5,20
D5-Diazepam	290,0	198,2	50	12	35	5,0	7,20
D5-Nordazepam	276,1	140,1	50	13	39	5,0	6,18
D5-Oxazepam	292,0	246,0	38	14	28	5,0	5,76
D5-Temazepam	30,6	260,0	45	14	28	4,0	6,28
D7-Flunitrazepam	321,2	275,2	48	9	33	4,0	5,94

## 2.4.2 Nachweis von Methylphenidat in humanem Speichel und Serum

### 2.4.2.1 Probenaufarbeitung für Speichel und Serum

Zur Speichel-Entnahme wurden Sarstedt Salivetten® verwendet und sofort nach der Probennahme zentrifugiert. Speichel- und Serumproben wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Es wurden je 0,5 ml Serum bzw. Speichel nach Zugabe von 20 ng D5-MDEA als internen Standard mittels basischer Chlorbutanextraktion (s. Kapitel 2.4.1.1) extrahiert. Der Rückstand wurde in 100 µl Fließmittel A:B, 80:20 (v/v) rekonstituiert.

### 2.4.1.2 Quantitativer Nachweis von Methylphenidat mit LC-MS/MS

Für den quantitativen Nachweis von Methylphenidat in Speichel und Serum wurde ein QTRAP 2000 Triple-Quadrupol-MS System verwendet (s. Tab. 3). Die jeweiligen MS-Parameter wurden durch Fließ-Injektions-Analyse (FIA) methanolischer Standards in den LC-Fluss optimiert. Die Methodenparameter sind in Tab. 7 und Tab. 8 hinterlegt.

**Tab. 7:** LC-Parameter zur Quantifizierung von Methylphenidat

Säule:	Synergi™ 4 µm Polar-RP 80 Å LC Column 150 x 2 mm
Vorsäule:	Synergi™ Polar-RP 4 x 2,0 mm
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,4 ml/min
Fließmittel A:	0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Fließmittel B:	Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Gradient:	0,0 - 6,0 min: linear von 20 % auf 50 % B 6,0 - 7,0 min: linear von 50 % auf 95 % B 7,0 - 8,0 min: 95 % B 8,0 - 8,5 min: linear von 95 % auf 20 % B 8,5 - 1,0 min: 20 % B
Post Column:	-

**Tab. 8:** MS-Parameter zur Quantifizierung von Methylphenidat

<b>Acquisition Method:</b>	MRM - Ritalin 5-opti.dam						
<b>Acquisition Duration:</b>	11 min 2 sec	<b>CUR:</b>	20				
<b>Acquisition Type:</b>	MRM	<b>IS:</b>	5400 V				
<b>Polarity:</b>	Positive	<b>TEM:</b>	400°C				
<b>Ion Source:</b>	Turbo Spray	<b>GS1:</b>	60				
<b>Scans in Period:</b>	807	<b>GS2:</b>	70				
<b>Resolution Q1:</b>	Unit	<b>CAD:</b>	5,0				
<b>Resolution Q2:</b>	Low	<b>EP:</b>	9,0				
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>t<sub>R</sub> min</b>
Methylphenidat	234,1	84,1	36	8	32	3,5	3,84
	234,1	234,1	36	8	15	3,5	
D5-MDEA	213,0	163,2	50	12	20	4,0	3,06

## 2.4.3 Nachweis synthetischer Cannabinoide in humanem Speichel

### 2.4.3.1 Probenaufarbeitung für Speichel

Der Speichelsammler (Dräger DCD 5000) wurde in eine Salivette® (ohne Watte-Pad) überführt und zentrifugiert (5 min, 4000 U/min). Anschließend wurden 1 ml Ethanol und 10 µl Dx-Mix JWH als interner Standard hinzugegeben und erneut zentrifugiert (5 min, 4000 U/min). Der Überstand wurde in ein Glasröhrchen überführt und

mittels Vakuumzentrifuge eingedampft (1,5 h, 50 °C). Der Rückstand wurde in 0,5 ml Carbonat-Puffer (pH 10) und 1,5 ml Extraktionsgemisch (n-Hexan : Ethylacetat 99 : 1 (v/v/)) rekonstituiert und 5 min durchmischt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (20 min, 4000 U/min). Die organische Phase wurde in ein LC-Vial überführt und bis zur Trockene eingedampft (40 °C, N<sub>2</sub>). Der Rückstand wurde in 100 µl Fließmittel A:B, 50:50 (v/v) rekonstituiert<sup>[130]</sup>.

#### 2.4.3.2 Quantitativer Nachweis synthetischer Cannabinoide mit LC-MS/MS

Für den quantitativen Nachweis von Benzodiazepinen in Speichel wurde ein QTRAP 4000 Triple-Quadrupol-MS System verwendet (s. Tab. 3). Die verwendeten MRM-Übergänge wurden einer von der Arbeitsgruppe kürzlich publizierten Methode zum Nachweis synthetischer Cannabinoide im Serum entnommen<sup>[131]</sup>. Die Methodenparameter sind in Tab. 9 und Tab. 10 hinterlegt.

**Tab. 9:** LC-Parameter zur Quantifizierung synthetischer Cannabinoide

Säule:	Luna® 5 µm Phenyl-Hexyl 100 Å LC Column 50 x 2 mm
Vorsäule:	Phenyl-Hexyl 4 x 2,0 mm
Säulentemperatur:	50°C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,4 ml/min
Fließmittel A:	0,2 % Ameisensäure, 2 mM Ammoniumformiat
Fließmittel B:	Methanol
Gradient:	0,0 - 7,0 min: linear von 50 % auf 90 % B 7,0 - 8,5 min: 90 % B 8,5 - 9,0 min: linear von 90 % auf 50 % B 9,0 - 12,0 min: 50 % B
Post Column:	Isopropanol, 0,2 ml/min

Tab. 10: MS-Parameter zur Quantifizierung synthetischer Cannabinoide

<b>Acquisition Method:</b>	synth_cann_of2.dam						
<b>Acquisition Duration:</b>	12 min 0 sec	<b>CUR:</b>	30				
<b>Acquisition Type:</b>	MRM	<b>IS:</b>	2500 V				
<b>Polarity:</b>	Positive	<b>TEM:</b>	600 °C				
<b>Ion Source:</b>	Turbo Spray	<b>GS1:</b>	40				
<b>Scans in Period:</b>	600	<b>GS2:</b>	50				
<b>Resolution Q1:</b>	Unit	<b>CAD:</b>	6,00				
<b>Resolution Q2:</b>	Low	<b>EP:</b>	5 V				
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>t<sub>R</sub> min</b>
JWH-007	356,2	155,2	85	-	36	12	6,8
	356,2	127,2	85	-	70	9	
JWH-015	328,2	155,1	85	-	34	11	5,8
	328,2	127,1	85	-	60	8	
JWH-018	342,2	155,1	90	-	35	7	6,8
	342,2	127,1	90	-	61	8	
AB-001	350,5	135,2	70	-	41	10	7,2
	350,5	107,1	70	-	60	7	
JWH-019	356,2	155,1	90	-	36	11	7,2
	356,2	127,1	90	-	71	9	
JWH-020	370,3	155,1	100	-	36	10	7,5
	370,3	127,1	100	-	65	8	
JWH-073	328,2	155,1	90	-	32	11	6,3
	328,2	127,1	90	-	65	8	
JWH-081	372,2	185,1	80	-	35	12	7,0
	372,2	214,2	80	-	35	10	
JWH-122	356,2	169,1	94	-	36	12	7,2
	356,2	141,1	94	-	66	9	
MAM-2201	374,4	169,2	70	-	37	13	6,5
	374,4	141,1	70	-	61	10	
JWH-200	385,2	155,1	80	-	33	11	2,6
	385,2	114,1	80	-	37	8	
JWH-203	340,1	125,0	80	-	36	8	6,3
	340,1	188,2	80	-	28	13	
JWH-210	370,2	183,1	80	-	35	8	7,5
	370,2	214,2	80	-	35	10	
JWH-250	336,3	121,1	75	-	30	8	6,1
	336,3	91,1	75	-	63	5	

Analyt	Precursor m/z	Fragment m/z	DP V	CEP V	CE eV	CXP V	t <sub>R</sub> min
JWH-251	320,2	105,1	80	-	34	6	6,2
	320,2	214,1	80	-	34	9	
JWH-307	386,2	155,1	60	-	30	11	7,0
	386,2	127,0	60	-	72	9	
JWH-387	420,1	233,0	80	-	38	5	7,6
	420,1	205,0	80	-	62	15	
JWH-398	376,2	189,2	85	-	37	14	7,4
	376,2	161,2	85	-	62	12	
JWH-412	360,4	173,2	70	-	36	13	6,9
	360,4	145,1	70	-	66	10	
AM-694	436,3	231,0	80	-	40	16	5,5
	436,3	203,0	80	-	67	8	
AM-1220	383,5	98,1	78	-	56	6	1,4
	383,5	155,1	78	-	38	11	
AM-2201	360,2	155,0	85	-	36	11	6,1
	360,2	127,1	85	-	64	8	
AM-2233	459,1	98,1	65	-	53	6	1,0
	459,1	112,1	65	-	31	8	
CRA-13	369,3	155,1	72	-	35	7	7,9
	369,3	171,1	72	-	40	11	
Methanandamid	362,2	76,2	51	-	33	4	6,7
	362,2	91,2	51	-	66	5	
RCS-4	322,2	135,1	80	-	34	10	5,9
	322,2	77,1	80	-	77	4	
RCS-4 ortho isomer	322,2	135,1	80	-	32	10	5,7
	322,2	77,1	80	-	74	4	
RCS-8	376,2	121,1	60	-	34	8	7,1
	376,2	91,1	60	-	74	5	
WIN 48,098	379,2	135,0	70	-	30	9	1,7
	379,2	114,1	70	-	41	8	
WIN 55,212-2	427,2	155,1	80	-	36	11	5,6
	427,2	127,1	80	-	76	8	
D9-JWH-007	365,2	155,1	90	-	36	11	6,8
D7-JWH-015	335,2	155,1	85	-	34	11	5,7
D11-JWH-018	353,3	155,1	90	-	35	7	6,7
D9-JWH-073	337,3	155,1	90	-	32	11	6,2
D9-JWH-081	381,2	185,2	80	-	35	12	7,0
D9-JWH-122	365,2	169,2	94	-	36	12	7,2
D5-JWH-200	390,2	155,1	80	-	33	11	2,5
D9-JWH-210	379,2	183,2	80	-	35	8	7,5
D5-JWH-250	341,2	121,1	75	-	30	8	6,0

## 2.4.4 Nachweis von Antibiotika in humaner Zahnhartsubstanz

### 2.4.4.1 Probenaufarbeitung für humane Zähne und Serumproben

Die extrahierten Zähne wurden gereinigt, Krone von Wurzel getrennt und mit einer Kugelmühle unter Stickstoff-Kühlung gemahlen. Das Pulver wurde bis zur Analyse bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse wurden für den Nachweis von Clindamycin je 100 mg Zahnpulver, für den Nachweis von Amoxicillin je 200 mg Zahnpulver in ein Eppendorf-Cup eingewogen und nach Zugabe von 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4 für 60 min in einem gekühlten Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 U/min) wurde der Überstand in ein Serumröhrchen überführt und mit 2 ml Puffer (pH 8,5) und internem Standard (50  $\mu\text{l}$  Ampicillin,  $c = 1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) versetzt. Es folgte eine automatisierte Festphasenextraktion mit Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg, 3 ml (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) SPE-Kartuschen. Die Kartuschen wurden dazu mit jeweils 2 ml Methanol und 2 ml dest. Wasser gewaschen und mit 2 ml Puffer (pH 8,5) konditioniert. Nach Aufgabe der Probe wurde die Kartusche mit 3 ml Puffer (pH 8,5) und 1 ml dest. Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 ml Acetonitril/dest. Wasser 1:1 (v/v). Das Eluat wurde anschließend mittels Vakuumzentrifuge eingedampft und der Rückstand in 100  $\mu\text{l}$  Fließmittel A:B, 80:20 (v/v) rekonstituiert.

Für den Nachweis von Amoxicillin und Clindamycin im Serum wurden 50  $\mu\text{l}$  (Amoxicillin) bzw. 25  $\mu\text{l}$  Serum (Clindamycin) eingesetzt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  IS (Ampicillin,  $c = 1\text{ }\mu\text{g/ml}$  in Methanol) wurde jeweils mit Phosphatpuffer (pH 7,4) auf 1 ml aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend mit 2 ml Puffer (pH 8,5) verdünnt und analog zum Zahnmaterial mittels Festphasenextraktion extrahiert.

### 2.4.4.2 Quantitativer Nachweis von Amoxicillin und Clindamycin mit LC-MS/MS

Für den quantitativen Nachweis von Amoxicillin und Clindamycin in Speichel und Serum wurde ein QTRAP 2000 Triple-Quadrupol-MS System verwendet (s. Tab. 3). Die jeweiligen MS-Parameter wurden durch Fließ-Injektions-Analyse (FIA) methanolischer Standards in den LC-Fluss optimiert. Die Methodenparameter sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 hinterlegt.

**Tab. 11:** LC-Parameter zur Quantifizierung von Amoxicillin und Clindamycin

Säule:	Luna® 3 µm PFP(2) 100 Å LC Column 150 x 3 mm
Vorsäule:	PFP 4 x 2,0 mm
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	10 µl bzw. 30 µl
Flussrate:	0,25 ml/min
Fließmittel A:	0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Fließmittel B:	Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Gradient:	0,0 - 3,0 min: linear von 20 % auf 40 % B 3,0 - 11,0 min: linear von 40 % auf 75 % B 11,0 - 12,0 min: linear von 75 % auf 95 % B 12,0 - 16 min: 95 % B 16,0 - 16,5 min: linear von 95 % auf 20 % B 16,5 - 20,0 min: 20 % B
Post Column:	-

**Tab. 12:** MS-Parameter zur Quantifizierung von Amoxicillin und Clindamycin

<b>Acquisition Method:</b>	MRM - Antibiotika 13.dam						
<b>Acquisition Duration:</b>	20 min 03 sec	<b>CUR:</b>	20				
<b>Acquisition Type:</b>	MRM	<b>IS:</b>	1500 V				
<b>Polarity:</b>	Positive	<b>TEM:</b>	400°C				
<b>Ion Source:</b>	Turbo Spray	<b>GS1:</b>	60				
<b>Scans in Period:</b>	1636	<b>GS2:</b>	70				
<b>Resolution Q1:</b>	Unit	<b>CAD:</b>	5,0				
<b>Resolution Q2:</b>	Unit	<b>EP:</b>	10,0				
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>t<sub>R</sub> min</b>
Amoxicillin	366,0	134,0	20	13	47	3,0	
	366,0	114,0	20	13	27	3,0	
	366,0	349,0	20	39	19	3,0	
Clindamycin	425,1	425,1	45	13	11	4,0	
	425,1	126,1	45	13	45	4,0	10,84
	425,1	377,1	45	13	25	4,0	
Ampicillin	350,0	106,0	27	20	30	3,0	8,06

## 2.4.5 Nachweis von Drogen in Zahnhartsubstanz

### 2.4.5.1 Probenaufarbeitung für Zahnproben für LC-MS/MS

Dentin-, Schmelzproben und humane Zähne wurden mit Hilfe einer Kugelmühle unter Stickstoff-Kühlung gemahlen. Anschließend wurden - sofern verfügbar - je 50 mg Pulver in ein Eppendorf-Cup eingewogen und nach Zugabe von 500 µl Methanol für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Proben wurden für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand in ein LC-MS Vial überführt. Der Rückstand wurde nochmals mit 100 µl Methanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 13000 U/min) und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Nach Zugabe von 2 µl internen Standards (BD-IS-Mix) wurde der Extrakt bei 40°C unter Stickstoff vorsichtig bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 µl Fließmittel A:B, 95:5 (v/v) rekonstituiert.

### 2.4.5.2 Probenaufarbeitung für Vorversuche mit GC-MS

#### **Methanolische Extraktion**

250 mg bzw. 100 mg Zahnpulver wurden nach Zugabe von 1 ml MeOH und 25 µl deuterierten Standard (BD-IS-Mix) in einem Eppendorf-Cup 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde in ein Serumröhrchen überführt und unter Stickstoff bei 40 °C getrocknet. Der Rückstand wurde mit 100 µl Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und bei 60°C für 30 min inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 70 µl 2,2,3,3,3-Pentafluorpropanol zugegeben und bei 60°C für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe vorsichtig im Heizblock bei 40°C unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 25 µl wasserfreiem, über Molekularsieb gelagertem Essigsäureethylester aufgenommen.

#### **Festphasenextraktion**

250 mg Zahnpulver wurden nach Zugabe von 1 ml MeOH und 25 µl deuterierten Standard (BD-IS-Mix) in einem Eppendorf-Cup 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde in ein Serumröhrchen überführt und unter Stickstoffstrom bei 40 °C bis fast zur Trockne eingengt. Es wurden 200 µl Kälberserum und 800 µl Phosphatpuffer pH 6 zugegeben. Die Probe wurde anschließend analog zur Routinemethode zur Extraktion basischer Drogen aus Serum nach folgendem Schema mit Chromabond Drug, 3 ml, 200 mg, Festphasenextraktionssäulen extrahiert (s. Tab. 13).

**Tab. 13:** Schritte der Festphasenextraktion zur Extraktion basischer Drogen aus Serum

Schritt	Material	Volumen bzw. Zeit
Konditionierung	Methanol	2,0 ml
Konditionierung	Phosphatpuffer pH 6,0	2,0 ml
Langsam Beladen	Probe	3,0 ml
Waschen	Deionisiertes Wasser	2,0 ml
Waschen	0,1 M Essigsäure	1.0 ml
Waschen	Methanol	2,0 ml
Trocknen	Vakuum	10 min
Eluieren	DIA 25%	1,5 ml

Das Eluat der Festphasenextraktion wurde in ein GC-Vial überführt und unter Stickstoffstrom bei 40 °C getrocknet. Der Rückstand mit 100 µl Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und bei 60°C für 30 min inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 70 µl 2,2,3,3,3-Pentafluorpropanol zugegeben und bei 60°C für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe vorsichtig im Heizblock bei 40°C unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 25 µl wasserfreiem, über Molekularsieb gelagertem Essigsäureethylester aufgenommen.

#### 2.4.5.3 Nachweis basischer Drogen in Rinderzähnen mit LC-MS/MS

Für den Nachweis von acht basischen Drogen in Zahnhartsubstanz wurde ein API 5000 LC-MS/MS System verwendet (s. Tab. 3).

**Tab. 14:** LC-Parameter zum Nachweis basischer Drogen

Säule:	Luna® 5 µm PFP(2) 100 Å LC Column 150 x 2 mm
Vorsäule:	PFP 4 x 2,0 mm
Säulentemperatur:	50 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,4 ml/min
Fließmittel A:	0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Fließmittel B:	Methanol, 0,1 % Ameisensäure, 1 mM Ammoniumformiat
Gradient:	0,0 - 1,0 min: 5 % B 1,0 - 10,0 min: linear von 5 % auf 98 % B 10,0 - 12,0 min: 98 % B 12,0 - 13,0 min: linear von 98 % auf 98 % B 13,0 - 18,0 min: 5 % B
Post Column:	Isopropanol, 0,1 ml/min

Die verwendeten MRM-Übergänge wurden anhand einer hauseigenen Spektrenbibliothek gewählt<sup>[128]</sup>. Die MS-Parameter wurden durch Fließ-Injektions-Analyse (FIA) methanolischer Standards in den LC-Fluss optimiert. Die Methodenparameter sind in Tab. 14 und Tab. 15 hinterlegt.

**Tab. 15:** MS-Parameter zum Nachweis basischer Drogen

<b>Acquisition Method:</b>	Bas Drogen Zaehne opti.dam						
<b>Acquisition Duration:</b>	18 min 0 sec	<b>CUR:</b>	20				
<b>Acquisition Type:</b>	MRM	<b>IS:</b>	1500 V				
<b>Polarity:</b>	Positive	<b>TEM:</b>	500 °C				
<b>Ion Source:</b>	Turbo Spray	<b>GS1:</b>	60				
<b>Scans in Period:</b>	1800	<b>GS2:</b>	70				
<b>Resolution Q1:</b>	Unit	<b>CAD:</b>	9,00				
<b>Resolution Q2:</b>	Low	<b>EP:</b>	5 V				
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>t<sub>R</sub> min</b>
Amphetamin	136,1	91,0	53	-	26	3,0	4,16
	136,1	119,1	53	-	11	3,5	
Methamphetamin	150,1	91,0	57	-	30	3,5	4,28
	150,1	119	57	-	13	4,0	
MDMA	194,1	163,1	60	-	14	4,5	4,41
	194,1	105,1	60	-	30	3,0	
MDEA	208,1	163,1	55	-	16	4,0	4,58
	208,1	105,1	55	-	34	3,5	
Cocain	304,2	182,1	65	-	26	3,5	4,95
	304,2	77,0	65	-	26	3,5	
Benzoylecgonin	290,2	168,2	65	-	25	4,0	5,30
	290,2	77,0	65	-	75	3,0	
Morphin	286,2	153,1	90	-	57	4,0	2,50
	286,2	128,1	90	-	80	4,0	
Codein	300,2	215,2	85	-	33	5,0	3,98
	300,2	165,1	85	-	58	4,0	
D5-Amphetamin	141,1	93,0	53	-	26	3,0	4,14
D5-Methamphetamin	155,1	92,0	57	-	30	3,5	4,26
D5-MDMA	199,1	165,1	60	-	14,0	4,5	4,40
D5-MDEA	213,1	163,1	55	-	26	4,0	4,57
D3-Cocain	307,2	185,1	65	-	26	3,5	4,96
D3-Benzoylecgonin	293,2	171,1	65	-	25	4,0	5,29
D3-Morphin	289,2	152,1	90	-	57	4,0	2,48
D3-Codein	303,2	165,1	85	-	58	4,0	3,97

#### 2.4.5.4 Nachweis von Drogen in humanen Zähnen mit LC-MS/MS

Bei den vorliegenden Leichenzähnen wurde in der Zahnklinik gesundes und kariöses Material getrennt. Die Probenaufarbeitung erfolgte analog der in Kapitel 2.4.5.1 beschriebenen Verfahrensweise. Für die Analyse der Proben wurde der MS-Teil der in Kapitel 2.4.5.3 beschriebenen LC-MS/MS-Methode um die Übergänge der in der toxikologischen Routine-Untersuchung der Leichenasservate nachgewiesenen Substanzen erweitert (s. Tab. 16 und Tab. 17). Die jeweiligen MRM-Übergänge und Parameter wurden anhand einer hauseigenen Spektrenbibliothek gewählt<sup>[128]</sup>.

**Tab. 16:** Zusätzliche MRM-Übergänge zum Nachweis ausgewählter Drogen in humanen Zähnen I

<b>Acquisition Method:</b> Bas Drogen Zaehne real1.dam							
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>t<sub>R</sub> min</b>
Doxepin	280,0	107,0	80	-	35	4,0	5,81
	280,0	84,0	80	-	35	4,0	
Nordoxepin	266,0	107,0	80	-	35	4,0	5,82
	266,0	235,0	80	-	20	4,0	
Coffein	195,0	138,1	80	-	35	4,0	5,38
	195,0	122,9	80	-	50	4,0	
Nicotin	163,0	130,0	80	-	50	4,0	1,91
	163,0	117,0	80	-	35	4,0	
EDDP	278,0	234,2	80	-	35	4,0	5,57
	278,0	186,2	80	-	50	4,0	
Methadon	310,0	265,0	80	-	20	4,0	7,10
	310,0	105,0	80	-	35	4,0	
Paracetamol	152,0	110,0	80	-	35	4,0	4,56
	152,0	65,0	80	-	50	4,0	
Diazepam	285,0	154,0	80	-	35	4,0	8,42
	285,0	193,0	80	-	50	4,0	
Nordazepam	271,0	140,0	80	-	35	4,0	7,16
	271,0	208,0	80	-	35	4,0	
Temazepam	301,0	255,2	80	-	28	4,0	7,16
	301,0	283,2	80	-	20	4,0	
Oxazepam	287,0	241,0	80	-	30	4,0	6,90
	287,0	269,0	80	-	20	4,0	
D5-Diazepam	290,0	154,0	80	-	35	4,0	8,41
D3-Doxepin	283,0	107,0	80	-	35	4,0	5,79

Tab. 17: Zusätzliche MRM- zum Nachweis ausgewählter Drogen in humanen Zähnen II

Acquisition Method: Bas Drogen Zaehne real2.dam							
Analyt	Precursor m/z	Fragment m/z	DP V	CEP V	CE eV	CXP V	t <sub>R</sub> min
Doxepin	280,0	107,0	80	-	35	4,0	5,81
	280,0	84,0	80	-	35	4,0	
Nordoxepin	266,0	107,0	80	-	35	4,0	5,82
	266,0	235,0	80	-	20	4,0	
Coffein	195,0	138,1	80	-	35	4,0	5,38
	195,0	122,9	80	-	50	4,0	
Nicotin	163,0	130,0	80	-	50	4,0	1,91
	163,0	117,0	80	-	35	4,0	
EDDP	278,0	234,2	80	-	35	4,0	5,57
	278,0	186,2	80	-	50	4,0	
Methadon	310,0	265,0	80	-	20	4,0	7,10
	310,0	105,0	80	-	35	4,0	
Paracetamol	152,0	110,0	80	-	35	4,0	4,56
	152,0	65,0	80	-	50	4,0	
Diazepam	285,0	154,0	80	-	35	4,0	8,42
	285,0	193,0	80	-	50	4,0	
Nordazepam	271,0	140,0	80	-	35	4,0	7,16
	271,0	208,0	80	-	35	4,0	
Temazepam	301,0	255,2	80	-	28	4,0	7,16
	301,0	283,2	80	-	20	4,0	
Oxazepam	287,0	241,0	80	-	30	4,0	6,90
	287,0	269,0	80	-	20	4,0	
Trimipramin	295,0	100,0	80	-	20	4,0	6,23
	295,0	58,0	80	-	20	4,0	
Imipramin	281,0	86,0	80	-	20	4,0	6,15
	281,0	58,0	80	-	50	4,0	
Tramadol	264,0	264,0	80	-	20	4,0	4,87
	264,0	58,0	80	-	50	4,0	
N-Desmethyltramadol	250,2	121,2	80	-	35	4,0	4,94
	250,2	189,1	80	-	20	4,0	
Opipramol	364,0	171,0	80	-	35	4,0	5,96
	364,0	143,0	80	-	35	4,0	
Fentanyl	337,0	188,0	80	-	30	4,0	5,56
	337,0	80	80	-	50	4,0	
D5-Diazepam	290,0	154,0	80	-	35	4,0	8,41
D3-Doxepin	283,0	107,0	80	-	35	4,0	5,79

### 2.4.5.5 Nachweis basischer Drogen in Rinderzähnen mit GC-MS

Für einen Teil der Vorversuche mit humanen Rinderzähnen wurde GC-MS-Analytik verwendet. Die Parameter der Methode sind in Tab. 18 aufgelistet.

**Tab. 18:** Methodenparameter der GC-MS-Methode zum Nachweis basischer Drogen

Back Inlet split/splitless	Mode	Splitless	Total Flow	18,7 ml/min
	Initial temp	270 °C	Gas Saver	Off
	Purge Flow	15 ml/min	Gas type	Off
	Purge Time	1,5 min	Pressure	8,81 psi
GC-Säule	HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane, Agilent 19091S-433			
	Nominal length	30,0 m	Mode	constant flow
	Nominal diameter	250 µm	Initial flow	1,0 ml/min
	Film thickness	0,25 µm	Outlet	MSD
Temperaturgradient	0 - 2 min, 80°C; 2 - 8 min, linear von 80°C auf 200°C; 8 - 16 min, linear von 220°C auf 240°C; 16 - 19 min, linear von 240°C auf 300°C; 19 - 24 min, 300°C			
MS Information	MS Quad Temp	150 °C	MS Source Temp	230 °C
	Solvent delay	6,00 min	Resolution	Low
<b>Substanz</b>	<b>Start Time</b>		<b>m/z</b>	
Amphetamin	6,00 min	91,00	118,00	140,00
D5-Amphetamin	6,00 min	92,00	122,00	144,00
Methamphetamin	6,70 min	110,00	118,00	154,00
D5-Methamphetamin	6,70 min	113,00	120,00	158,00
Ecgoninmethylester	7,15 min	182,00	264,00	295,00
D3-Ecgoninmethylester	7,15 min	185,00	267,00	298,00
MDA	8,20 min	135,00	162,00	275,00
D5-MDA	8,20 min	136,00	167,00	280,00
MDMA	9,00 min	113,00	154,00	289,00
D5-MDMA	9,00 min	110,00	158,00	294,00
MDEA	9,35 min	140,00	168,00	303,00
D5-MDEA	9,35 min	141,00	173,00	308,00
EDDP	11,70 min	262,00	276,00	277,00
D3-EDDP	11,70 min	265,00	279,00	280,00
Benzoylecgonin	12,20 min	82,00	300,00	421,00
D3-Benzoylecgonin	12,20 min	85,00	303,00	424,00
Methadon	12,85 min	72,00	223,00	294,00
D9-Methadon	12,85 min	78,00	226,00	303,00
Cocain	13,60 min	82,00	182,00	303,00
D3-Cocain	13,60 min	85,00	185,00	306,00

Substanz	Start Time		m/z	
Morphin	14,10 min	311,00	364,00	477,00
D3-Morphin	14,10 min	314,00	367,00	480,00
Codein	14,90 min	-	282,00	395,00
D3-Codein	14,90 min	-	285,00	398,00
6-Monoacetylmorphin	15,60 min	311,00	364,00	423,00
D3-6-Monoacetylmorphin	15,60 min	314,00	367,00	426,00

## 2.4.6 Nachweis von EtG und EtS in humaner Glaskörperflüssigkeit

### 2.4.6.1 Probenaufarbeitung für Glaskörperflüssigkeit, Serum und Urin

Zu 100 µl Probenmaterial wurden je 100 ng D5-EtG und D5-EtS als interner Standard hinzugegeben. Als Probenaufarbeitung wurde eine Proteinfällung verwendet. Glaskörperflüssigkeit und Urin wurden mit je 250 µl Methanol, Serum mit 250 µl Acetonitril gefällt. Die Proben wurden für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, 270 µl des Überstandes abgenommen und mittels Vakuumzentrifuge eingedampft. Der Rückstand wurde in 140 µl 0,1 % Ameisensäure rekonstituiert.

### 2.4.6.2 Quantitativer Nachweis von EtG und EtS mit LC-MS/MS

Für den quantitativen Nachweis von EtG und EtS in den verschiedenen Körperflüssigkeiten wurde ein QTRAP 2000 Triple-Quadrupol-MS verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels einer Agilent 1100 Anlage (s. Tab. 3). Die Methodenparameter sind in Tab. 19 und Tab. 20 hinterlegt.

**Tab. 19:** LC-Parameter zur Quantifizierung von EtG und EtS<sup>[132]</sup>

Säule:	Synergi™ 4 µm Polar-RP 80 Å LC Column 250 x 2 mm
Vorsäule:	Synergi™ Polar-RP 4 x 2,0mm
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,2 ml/min
Fließmittel A:	0,1 % Ameisensäure
Fließmittel B:	Methanol
Gradient:	0,0 - 6,0 min: 0 % B
	6,0 - 6,5 min: linear von 0 % B auf 100 % B
	6,5 - 7,5 min: 100 % B
	7,5 - 8,0 min: linear von 100 % B auf 0 % B
	8,0 - 12,0 min: 0 % B
Post Column:	Isopropanol, 0,2 ml/min

Tab. 20: MS-Parameter zur Quantifizierung von EtG und EtS

<b>Acquisition Method:</b>	110302 EtG-EtS 20 µL IS 1500						
<b>Acquisition Duration:</b>	12 min 0 sec	<b>CUR:</b>	30				
<b>Acquisition Type:</b>	MRM	<b>IS:</b>	-1500 V				
<b>Polarity:</b>	Negative	<b>TEM:</b>	400 °C				
<b>Ion Source:</b>	Turbo Spray	<b>GS1:</b>	60				
<b>Scans in Period:</b>	500	<b>GS2:</b>	70				
<b>Resolution Q1:</b>	Unit	<b>CAD:</b>	5,00				
<b>Resolution Q2:</b>	Low	<b>EP:</b>	-10 V				
<b>Analyt</b>	<b>Precursor m/z</b>	<b>Fragment m/z</b>	<b>DP V</b>	<b>CEP V</b>	<b>CE eV</b>	<b>CXP V</b>	<b>tR min</b>
EtG	221,1	75,0	-40	-10	-25	-2,0	5,03
	221,1	85,0	-40	-10	-25	-2,0	
	221,1	113,0	-40	-10	-20	-2,0	
EtS	125,0	97,0	-40	-10	-30	-2,0	4,21
	125,0	80,0	-40	-10	-30	-2,0	
	125,0	125,0	-40	-10	-30	-2,0	
D5-EtG	226,1	75,0	-40	-10	-24	-2,0	4,98
D5-EtS	130,0	98,0	-40	-10	-30	-2,0	4,17

## 2.4.7 Drogen- und Medikamentenscreening mittels 3D Ionenfalle (Toxyper)

### 2.4.7.1 Probenaufarbeitung

Abhängig von Matrix und Fragestellung wurden unterschiedliche Extraktionsmethoden verwendet.

#### Serum

Serumproben (1 ml) wurden nach Zugabe von 10 µl D5-Diazepam ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) als interner Standard mittels basischer Chlorbutan-Extraktion extrahiert (s. Kapitel 2.4.1.1). Der eingedampfte Rückstand wurde in 25 µl Fließmittel A:B, 50:50 (v/v) rekonstituiert.

#### Urin

Urinproben wurden analog zu Serumproben extrahiert oder mit Acetonitril gefällt<sup>[133]</sup>. 0,1 ml Urin, 10 µl D5-Diazepam ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) als Interner Standard und 0,5 ml Acetonitril wurden in ein Eppendorf-Cup gegeben, für 2 min durchmischt und anschließend zentrifugiert (3 min, 10000 U/min). 500 µl des Überstandes wurden in ein LC-Vial Überführt und bei 40 °C unter Stickstoffstrom

bis zur Trockne eingedampft. Der eingedampfte Rückstand wurde in 25  $\mu$ l Fließmittel A:B, 50:50 (v/v) rekonstituiert.

### Zähne

Es wurden ca. 50 mg Dentinpulver in 500  $\mu$ l Methanol eingewogen und nach Zugabe von 20  $\mu$ l Dx-Mix (BD-IS-Mix) für 1 h im Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 U/min) wurde der Überstand abgenommen und in ein LC-Vial überführt. Der Rückstand wurde nochmals mit 100  $\mu$ l Methanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 13000 U/min) und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. und bei 40 C unter Stickstoff bis zur Trockne eingedampft. Der Extrakt wurde bei 40°C unter Stickstoff vorsichtig bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100  $\mu$ l Fließmittel A:B, 95:5 (v/v) rekonstituiert.

### Glaskörperflüssigkeit

Glaskörperflüssigkeit wurde mittels Festphasenextraktion nach einer Methode von Pelander et al.<sup>[78]</sup> extrahiert. 1 ml Glaskörper wurde mit 50  $\mu$ l IS (D5-Diazepam/D3-Doxepin) und 2 ml Phosphatpuffer pH 6 versetzt und anschließend mit Isolute® HCX 5, 130 mg, 3 ml Festphasen-Extraktionssäulen und der folgenden Extraktionsmethode (s. Tab. 21) extrahiert:

**Tab. 21:** Schritte der Festphasenextraktion zur Extraktion von Glaskörperflüssigkeit

Schritt	Material	Volumen bzw. Zeit
Konditionierung	Methanol	2,0 ml
Konditionierung	Deionisiertes Wasser	
Konditionierung	Phosphatpuffer pH 6,0	3,0 ml
Langsam Beladen	Probe	3,0 ml
Waschen	Phosphatpuffer pH 6,0	1,0 ml
Trocknen	Vakuum	5 min
Waschen	1 M Essigsäure	1,0 ml
Trocknen	Vakuum	5 min
Eluieren (sauer/neutral)	EE / Hexan, 25 / 75 (v/v)	3,0 ml
Trocknen	Vakuum	2 min
Waschen	Methanol	1,0 ml
Trocknen	Vakuum	2 min
Eluieren (basisch)	EE / Ammoniak, 98 / 2 (v/v)	3,0 ml

Beide Eluate der Festphasenextraktion werden vereinigt und unter Stickstoff bei 40 °C getrocknet. Der Rückstand wird in 25  $\mu$ l Fließmittel A:B, 95:5 (v/v) rekonstituiert.

## Haare

Haarproben wurden nacheinander mit dest. Wasser, Aceton und Petrolether gewaschen und anschließend auf Papierfilter luftgetrocknet. Es werden ca. 50 mg Haare eingewogen und mit einer Schere in ca. 1-2 mm lange Segmente unterteilt. Die zerkleinerten Haare wurden in ein Schraubvial überführt und mit 1 ml Methanol für 4 h im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde das Methanol in ein LC-Vial überführt und bei 40 °C unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Der eingedampfte Rückstand wurde in 25 µl Fließmittel A:B, 50:50 (v/v) rekonstituiert.

### 2.4.7.2 Nachweis von Drogen und Medikamenten mit LC-MS<sup>n</sup>

Für den qualitativen Nachweis von Drogen und Medikamenten wurde eine amaZon speed Ionenfalle im AutoMS<sup>n</sup>-Modus verwendet (s. Tab. 3). Die Auswahl der jeweiligen Precursor-Massen für einen MS<sup>n</sup>-Zyklus erfolgte über eine Scheduled Precursor List (SPL). Die SPL umfasst Precursor-Masse und Retentionszeit von 830 toxikologisch relevanten Analyten. Die Auswertung der Screening-Daten sowie die Report-Erstellung erfolgt automatisch mittels eines speziell für diese Anwendung erstellten Scripts. Dieses kann entweder nach Öffnen der Rohdaten in DataAnalysis (DA) manuell angestoßen werden oder über HyStar bzw. Compass OpenAccess in die Analysenmethode integriert werden. Die jeweiligen Methodenparameter sind in den Tab. 22, 23 und 24 aufgeführt.

**Tab. 22:** LC-Parameter für Toxytyper

Säule:	Acclaim® RSLC 120 C18 2,2 µm 120A 2.1x100 mm
Vorsäule:	-
Säulentemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	2 µl
Flussrate:	0,5 ml/min
Fließmittel A:	0,1 % Ameisensäure, 2 mM Ammoniumformiat, 1 % Fließmittel B
Fließmittel B:	Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure, 2 mM Ammoniumformiat
Gradient:	0,0 - 1,0 min: 1 % B 1,0 - 8,0 min: linear von 1 % B auf 95 % B 8,0 - 9,0 min: 95 % B 9,0 - 9,1 min: linear vor 95 % B auf 1 % B 9,1 - 11,0 min: 1 % B
Post Column:	-

Tab. 23: MS-Parameter für die Aufnahme von Bibliotheksspektren

<b>Mode</b>		<b>Tune SPS</b>	
Mass Range Mode	UltraScan	Target Mass	300 m/z
Ion Polarity	pos or neg	Compound Stability	50 %
Ion Source Type	ESI	Trap Drive Level	100 %
Alternating Ion Polarity	off	Smart Parameter Setting	active
<b>Tune Source</b>		<b>Trap</b>	
Trap Drive	42.8	Rolling	off
Capillary Exit	140.0 V	Scan Begin	70 m/z
Dry Temp (Set)	320°C	Scan End	800 m/z
Nebulizer (Set)	30.00 psi	Averages	2 Spectra
Dry Gas (Set)	10 l/min	Max. Accu Time	10 ms
HV Capillary	-4500 V	(Smart) ICC Target	200000
HV End Plate Offset	-500 V	ICC	On
<b>MS/MS Automatic</b>			
MS(n) Averages (CID)	2 Spectra	Abs. Threshold Auto MS(3)	2500
Depth AutoMS (>2)	3	Rel. Threshold Auto MS(3)	2.0 %
Auto MS/MS	On	Active Exclusion	off
Group length	5 lines	SPS	on
Abs. Threshold Auto MS(2)	25000	Precursor Ions Auto MS(2)	1
Rel. Threshold Auto MS(2)	5.0 %	Precursor Ions Auto MS(3)	1

Tab. 24: MS-Parameter für Toxyper-Screening

<b>Mode</b>		<b>Tune SPS</b>	
Mass Range Mode	UltraScan	Target Mass	300 m/z
Ion Polarity	alternating	Compound Stability	50 %
Ion Source Type	ESI	Trap Drive Level	100 %
Alternating Ion Polarity	on	Smart Parameter Setting	active
<b>Tune Source</b>		<b>Trap</b>	
Capillary	4500 V	Rolling	off
End Plate Offset	500 V	Scan Begin	70 m/z
Nebulizer	30.0 psi	Scan End	800 m/z
Dry Gas	10 l/min	Averages	1 Spectrum
Dry Temperature	320 °C	Max. Accu Time	10.00 ms
ICC	On	(Smart) ICC Target	200000

Tab. 24: Fortsetzung

<b>MS/MS Automatic</b>			
MS(n) Averages (CID)	1 Spectrum	Abs. Threshold Auto MS(3)	2500
Depth AutoMS (>2)	3	Rel. Threshold Auto MS(3)	60 %
Auto MS/MS	On	Active Exclusion	on
Group length	5 lines	Release after	0.1 min
Abs. Threshold Auto MS(2)	10000	Reconsider Factor (RCF)	5.0
Rel. Threshold Auto MS(2)	0 %	Precursor Ions Auto MS (2)	1
SPS	on	Precursor Ions Auto MS(3)	1

## 3. Experimenteller Teil

### 3.1 *Untersuchungen zur Stabilität von Benzodiazepinen auf einem kommerziellen Speichelsammler*

#### 3.1.1 Fragestellung

Ziel der durchgeführten Studie war die Klärung der prä-analytischen Stabilität von Benzodiazepinen auf einem kommerziellen Speichelsammler. Der Speichelsammler der Firma Dräger (Dräger DCD 5000) wurde speziell für den Nachweis von Drogen- und Medikamenten in Kombination mit einem transportablen Analysengerät (Dräger DrugTest 5000) entwickelt. Das Testprinzip beruht auf einem immunchemischen Verfahren mit automatischer Funktionskontrolle und Ergebnisausgabe. Ein robustes Verfahren und einfache Handhabung sind Grundvoraussetzungen für mobile Testsysteme, gleichzeitig muss das Nachweißverfahren analytischen und forensischen Standards genügen. Darunter fällt u.a. die Möglichkeit einer unabhängigen Bestätigungsanalyse mit einem identifizierenden Verfahren. Hierzu wird eine parallel gewonnene Speichelprobe in ein Labor zur weiteren Untersuchung versandt. In der Regel erfolgt der Versand solcher Proben ungekühlt per Post. Ausgehend von einem mittleren Postweg von bis zu drei Tagen - in Extremfällen, z.B. bei grenzüberschreitendem Versand von bis zu sieben Tagen - muss die Stabilität der Analyten auf dem Probennehmer zumindest für diesen Zeitraum gesichert sein.

#### 3.1.2 Studiendesign

Im Vorfeld der Studie zur prä-analytischen Stabilität während der Lagerung wurde Leerspeichel von fünf freiwilligen Labormitarbeitern (3 Frauen, 2 Männer) gesammelt und zu einem Leerspeichel-Pool vereinigt. Ein Aliquot dieses Leerspeichels wurde anschließend mit einer Auswahl der am häufigsten verschriebenen und missbräuchlich verwendeten Benzodiazepinen dotiert. Im Einzelnen waren dies: Bromazepam, Chlordiazepoxid, Clonazepam, Flurazepam, Flunitrazepam, Lorazepam, Midazolam, Nordazepam, Oxazepam Temazepam (je 15 ng/ml) und Diazepam (30 ng/ml). Aus Leerspeichel, dotierten Speichel-Pool und der verwendeten methanolischen Lösung (11er BenzoMix, s. Kapitel 2.1.2.3) wurden sechs verschiedene Proben (A - F) hergestellt (s. Tab. 25).

Für die Proben E und F wurden jeweils 450 µl dotierter Speichel auf einen Speichelsammler gegeben und dieser in einem Eppendorf-Cup platziert. Die Proben F wurden ohne weitere Behandlung gelagert („native“ Lagerung), zu den

Proben E wurden jeweils 950 µl Methanol hinzugegeben (methanolische Lagerung). Als Negativ-Kontrolle wurden Speichelsammler mit je 450 µl Leerspeichel beladen und ebenfalls ‚nativ‘ (Proben C) und methanolisch (Proben D) in einem Eppendorf-Cup gelagert. Zusätzlich wurden eine methanolische Lösung der Benzodiazepine (Proben B) sowie dotierter Speichel (Proben A) analog zu den Speichelsammlern gelagert. Von jeder der Proben wurden für jede Lagerungsdauer zwei Aliquots vorbereitet.

Zur Simulation eines ungekühlten Postversands wurden die Proben im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 - 14 Tage gelagert. Die jeweilige Lagerungsdauer der einzelnen Proben ist in Tabelle 25 notiert.

**Tab. 25:** Probenbeschreibung und Lagerdauer der Lagerstudie

Proben ID	Matrix	Benzodiazepin-Konzentration	Art der Lagerung	Lagerzeit
A	Speichel	15 ng/ml pro Analyt (Diazepam 30 ng/ml)	-	5 min / 14 d
B	Methanol	15 ng/ml pro Analyt (Diazepam 30 ng/ml)	-	5 min / 7 d / 14 d
C	Speichel auf DCD 5000	0 ng/ml	‚nativ‘	5 min / 1 d / 3 d / 7 d / 10 d / 14 d
D	Speichel auf DCD 5000	0 ng/ml	methanolisch	5 min / 1 d / 3 d / 7 d / 10 d / 14 d
E	Speichel auf DCD 5000	15 ng/ml pro Analyt (Diazepam 30 ng/ml)	‚nativ‘	5 min / 1 d / 3 d / 7 d / 10 d / 14 d
F	Speichel auf DCD 5000	15 ng/ml pro Analyt (Diazepam 30 ng/ml)	methanolisch	5 min / 1 d / 3 d / 7 d / 10 d / 14 d

Nach Ende der jeweiligen Lagerzeit wurden die Proben wie in Kapitel 2.4.1.1 beschrieben bis zur Einengung unter Stickstoff aufgearbeitet. Das Konzentrat wurde bis zum vollständigen Abschluss der Lagerungsstudie bei -20 °C gelagert und sämtliche Probenkonzentrate dann mittels Flüssig-flüssig-Extraktion extrahiert und mit LC-MS/MS analysiert (Kapitel 2.4.1)

## 3.2 Nachweis von Methylphenidat in humanem Speichel nach kontrollierter Medikation

### 3.2.1 Fragestellung

Methylphenidat (Ritalin®) wird hauptsächlich zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

angewandt. Zusätzlich wird von einem Missbrauchspotential als leistungssteigerndes Mittel - insbesondere unter Studenten - berichtet<sup>[134, 135]</sup>. Auf Grund der hohen interindividuellen Unterschiede in der Bioverfügbarkeit und der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Methylphenidat ist eine individuelle Dosierung notwendig<sup>[136]</sup>. Marchei et al. postulierten nach ersten Studien, dass Speichelanalysen auf Methylphenidat zum Nachweis der Medikamenteneinnahme und zur Dosis-Titration als nicht-invasive Alternative zur Serumanalytik eingesetzt werden könnten<sup>[137, 138]</sup>. Ziel dieses Projektes war die Ermittlung von Speichelkonzentrationen von ADHS-Patienten (Kinder und Jugendliche) nach kontrollierter Einnahme von 20 mg Methylphenidat und genauere Informationen über die interindividuellen Unterschiede des Speichel/Serum-Koeffizienten in einem größeren Kollektiv an Probanden zu erhalten.

### **3.2.2 Studiendesign und Ablauf der klinischen Prüfung**

Serum- und Speichelproben wurden im Rahmen einer monozentrischen, einfach-blinden, randomisierten cross-over Studie bei präpubertären Jungen mit einem ADHS zur Untersuchung der Wirksamkeit und Bioequivalenz von Ritalin LA (20 mg/Tag) im Vergleich zu Medikinet retard (20 mg/Tag) bei einer jeweiligen Behandlungsdauer von 7 Tagen (CRIT124DDE03; EudraCT-Nummer: 2008-000227-25) erhoben. Die parallel zur Blutentnahme stattfindende Asservierung von Speichel mit Hilfe einer Sarstedt Salivette® und Analyse wurde als Anhang des Studienprotokolls dokumentiert und von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA), dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (Bfarm) sowie der Ethikkommission des Universitätsklinikums Freiburg genehmigt (EK-Nr 79/08, 06.10.2008). Eltern und Probanden wurden über die Durchführung der Speichel-Entnahme und die damit geplanten Analysen im Rahmen der Probandenaufklärung separat informiert.

Die an der Studie teilnehmenden 24 Kinder wurden jeweils über eine Woche mit 20 mg Medikinet® retard und eine Woche mit 20 mg Ritalin LA® behandelt. Die Reihenfolge der Behandlungen wurde nach einem Zufallsverfahren festgelegt. Nach Ablauf der Woche wurden die Probanden an einem Samstag für einen kompletten Tag in die Klinik einbestellt. Dort wurden während eines simulierten Schultages die Aufmerksamkeit und das Verhalten der Kinder in verschiedenen Lern- und Spielsituationen untersucht. Im Tagesverlauf wurden von jedem Teilnehmer jeweils paarweise 10 Blut- und Speichelproben asserviert. Bei der morgendlichen Aufnahme wurde je eine Nullprobe erhoben zur Überprüfung, ob die Dosis des Vortages komplett ausgeschieden war. Die Medikamenten-Gabe erfolgte 75 min

nach der Aufnahme. Von da an wurden zu den Zeitpunkten 0,5 h, 1,25 h, 2,25 h, 3,25 h, 4,25 h, 4,83 h, 5,5 h, 6,25 h und 8,00 h je paarweise Blut- Speichelproben entnommen. Die Blutentnahme erfolgte über einen peripheren Venenverweilkatheter, Speichelproben wurden durch leichtes Kauen für 1 - 2 Minuten auf einem Watte-Pad (Salivette®) gewonnen. Blut und Salivetten wurden sofort nach der Probennahme zentrifugiert und das so gewonnene Serum bzw. die komplette Salivette® bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### **3.3 *Nachweis von synthetischen Cannabinoiden in humanem Speichel***

#### **3.3.1 Fragestellung**

Während der letzten drei Jahre hat der Nachweis synthetischer Cannabinoide in forensischen und klinischen Proben enorm an Bedeutung gewonnen. Die Entwicklung von umfassenden Nachweis-Methoden stellt auf Grund der hohen möglichen Anzahl an struktur-ähnlichen Substanzen eine große Herausforderung dar. Dabei sind besonders die Identifikation und der Nachweis der Metaboliten arbeits- und zeitaufwendig. Ein metaboliten-basiertes Screening kann daher kaum den Anforderungen des schnell fluktuierenden Marktes gerecht werden. Der Nachweis der jeweiligen Muttersubstanzen in Serum bzw. Blut deckt die größtmögliche Anzahl an Analyten ab, und ist daher auch für Abstinenznachweise noch immer die Methode der Wahl. Wann immer aus medizinischen oder rechtlichen Gründen keine Blutentnahme möglich ist, stellt sich die Frage nach alternativen Matrices zum Nachweis oder Ausschluss eines möglichen Konsums synthetischer Cannabinoide.

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung einer Nachweismethode für synthetische Cannabinoide in humanem Speichel als nicht-invasive Alternative zur Serumanalytik für Psychiatrische und Forensische Kliniken. Die Arbeiten zu diesem Projekt wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Stefan Kneisel, ebenfalls Doktorand am hiesigen Institut, im Rahmen des EU-Projektes „Spice and synthetic cannabinoids“ (JUST/2009/DPIP/AG/0948) durchgeführt.

#### **3.3.2 Methodenentwicklung**

##### **3.3.2.1 *Probennahme mittels Dräger DCD 5000 Speichelsammler:***

Zur Probennahme streicht der Proband mit dem Probenehmer eine bis vier Minuten lang zwischen Wange und Zahnfleisch hin und her. Das Ende der Probennahme wird

durch Blau-Färbung eines im Mundstück befindlichen Indikators angezeigt. Der komplette Probennehmer wird anschließend im beiliegenden Transportröhrchen zur Analyse an das Labor geschickt. Die spezielle Beschaffenheit des Probennehmers ermöglicht zudem die zeitgleiche Gewinnung einer Parallel-Probe mit Hilfe zweier zusammengesteckter Probennehmer. Die weitere Probenvorbereitung der Realproben ist im Kapitel 2.4.3.1 erläutert.

### *3.3.2.2 Methodvalidierung*

Zur Bestimmung der Speichelmenge, die für Methodenentwicklung und -validierung verwendet wurde, wurden Speichelproben von 10 Freiwilligen mittels eines DCD 5000 Speichelsammlers gesammelt und das Mundstück direkt nach der Probennahme zentrifugiert. Das mittlere Speichelvolumen betrug 330 µl, woraufhin für alle weiteren Messungen im Rahmen der Methodenentwicklung und -Validierung ein Probenvolumen von 333 µl verwendet wurde. 333 µl Leerspeichel wurden mit entsprechenden Volumina JWH Standard dotiert und nach Zugabe von 1 ml Ethanol und 10 ml Dx-Mix JWH für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die weitere Probenaufarbeitung verlief analog zur Aufarbeitung der Realproben wie in Kapitel 3.4.3.1 beschrieben.

Die Validierung zum quantitativen Nachweis von 30 synthetischen Cannabinoiden in Speichel wurde nach den Richtlinien der Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie (GTFCh)<sup>[139]</sup> durchgeführt. Dazu wurden Selektivität, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, Genauigkeit und Impräzision, Matrix-Effekte, Wiederfindung und Prozesseffektivität, Autosampler Stabilität und Carry-over-Effekte untersucht. Da für eine Analyse jeweils das komplette Probenvolumen verwendet wurde, wurde auf eine Untersuchung der Gefrier-Auftau-Stabilität sowie der Langzeitstabilität verzichtet.

#### **Selektivität**

Zum Ausschluss von Interferenzen und Störpeaks durch endogene Substanzen, Reagenzien oder durch Materialien der Probenaufarbeitung wurde die Selektivität an sechs verschiedenen Leer-Speichelproben untersucht. Zwei der Leer-Speichelproben wurden zudem zusätzlich mit Dx-Mix JWH dotiert und analysiert, um Störsignal durch die isotopenmarkierten Standards auszuschließen.

#### **Linearität**

Zum Nachweis der Linearität des Verfahrens wurden sechs Kalibrationskurven mit je acht Kalibrationspunkten hergestellt und analysiert. Die jeweiligen Kalibratoren wurden durch dotieren von Leerspeichel mit 20, 30 und 40 µl Arbeitslösung 3, 20,

30 und 50 µl Arbeitslösung 2 bzw. 10 und 20 µl Arbeitslösung 1 hergestellt (s. 2.1.2.3 JWH Standard). Es wurde eine lineare Regression mit Wichtung 1/x angewendet. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Valistat 2.0 durchgeführt.

#### **Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD / LOQ)**

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645 ermittelt. Dazu wurden zehn äquidistante Kalibratoren kurz über der erwarteten Nachweisgrenze analysiert. LOD und LLOQ für die einzelnen Analyten wurden ebenfalls mit Valistat 2.0 berechnet. Für Analyten, die nur qualitativ ermittelt werden konnten, wurde der LOD anhand der Signal/Rausch-Verhältnisse in fünf verschiedenen, mit der entsprechenden LOD-Konzentration dotierten Leer-Speichelproben, ermittelt.

#### **Richtigkeit und Impräzision**

Zur Ermittlung von Richtigkeit und Impräzision wurden Qualitätskontrollproben mit 40 µl Arbeitslösung 3 bzw. 10 µl Arbeitslösung 1 dotiert und analysiert. Es wurden je zwei Aliquots an acht aufeinander folgenden Tagen gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit einer arbeitstäglichen Kalibration. Bias, Interday- und Intradayimpräzision wurden mit Valistat 2.0 ermittelt.

#### **Matrixeffekte, Wiederfindung und Prozess-Effektivität**

Matrixeffekte, Wiederfindung und Prozess-Effektivität wurden mit Speichelkonzentrationen der niedrigen und hohen Qualitätskontrolle nach Matuszewski et al.<sup>[140]</sup> untersucht. Dazu wurden drei Sets an Proben hergestellt: Für Set 1 wurden Analyten und Interne Standards und Laufmittel analysiert. Für Set 2 wurde der organische Überstand von Leerspeichel-Extrakten mit den in Set 1 verwendeten Mengen an Analyten und Internen Standards versehen, das organische Lösungsmittel eingedampft, der Rückstand in Laufmittel rekonstituiert und anschließend analysiert (Post-extraction Analysis). Für Set 3 wurde Leerspeichel mit den in Set 1 verwendeten Mengen an Analyten und Internen Standards versehen, wie oben beschrieben, extrahiert und analysiert (Pre-extraction Analysis). Von jedem Set wurden fünf Aliquots analysiert, der für die Sets 2 und 3 verwendete Leerspeichel stammte jeweils von den gleichen 5 Individuen.

Matrixeffekte wurden durch Vergleich der entsprechenden Peakflächen aus Set 2 und Set 1 errechnet. Wiederfindung wurde anhand der absoluten Peakflächen der Sets 3 und 2 ermittelt. Die Prozess-Effektivität wurde durch Vergleich der Peakflächen aus Set 3 und Set 1 bestimmt.

**Autosampler-Stabilität**

Zur Untersuchung der Stabilität der Analyten und deuterierten Analoga während einer langen Analysenserie wurden je acht niedrige und hohe Qualitätskontrollen dotiert und aufgearbeitet. Die Extrakte wurden kurz vor der Analyse vereint, gut gemischt und wieder in acht Aliquots aufgeteilt und jede Stunde ein Aliquot pro Konzentration analysiert. Die Autosampler-Stabilität wurde durch Vergleich der jeweiligen absoluten Peakflächen mit denen der ersten Injektion berechnet.

**Carry-Over**

Um Verschleppungen ausschließen zu können, wurde Leerspeichel mit der 50-fachen Analyt-Menge des höchsten Kalibrators dotiert, extrahiert und analysiert. Direkt darauf wurden drei Leerspeichelproben gemessen und auf Signale der entsprechenden Analyten untersucht.

**Wiederfindung Speichelsammler DCD 5000**

Zur Untersuchung der Wiederfindung / Extraktionsausbeute nach Lagerung des Speichelsammlers wurden drei verschiedene Sets an Proben vorbereitet. Für jedes Set wurden je drei Speichelsammler in 400 µL Leerspeichel, der zuvor mit 10 µl Arbeitslösung 1 dotiert wurde, gegeben. Fünf Minuten nach Ende der „Probennahme“ wurden die Speichelproben aus Set 1, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und analysiert. Die Speichelsammler aus Set 2 wurden im dazugehörigen Transport-Röhrchen, die Speichelsammler des Sets 3 in einem Eppendorf-Cup mit 1 ml Ethanol platziert. Diese Speichelsammler wurden anschließend unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur (22 bis 27°C) für drei Tage gelagert. Diese Lagerbedingungen sollten einen ungekühlten Inlandversand per Post simulieren. Nach drei Tagen wurden die Proben wie in Kapitel 2.4.3.1 aufgearbeitet und analysiert.

### **3.4 *Nachweis von Antibiotika in humaner Zahnhartsubstanz***

#### **3.4.1 Fragestellung**

Die folgenden Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Dr. J.-E. Otten (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Freiburg) im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. med. dent. Yvonne Schüssl<sup>[141]</sup> durchgeführt. Fragestellung dieser Arbeit war u.a., ob und in welchen Konzentrationen die beiden Antibiotika Amoxicillin und

Clindamycin nach einmaliger oraler Aufnahme in der Zahnhartsubstanz (Wurzel und Krone) nachweisbar sind.

Aufgabenstellung im Rahmen dieser Dissertation war die Entwicklung einer geeigneten quantitativen Nachweismethode für Amoxicillin und Clindamycin sowie die gesamte analytische Laborarbeit. Patienten-Aquirierung und -Aufklärung, Probennahme und Reinigung der extrahierten Zähne sowie die Trennung von Wurzel und Krone wurde von Frau Schüssl teilweise schon vor Beginn der Kooperation durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemeinsam im Journal of Clinical Oral Investigation veröffentlicht<sup>[142]</sup>.

### 3.4.2 Studiendesign

Bei der durchgeführten Studie handelt es sich um eine prospektiv offene, nicht randomisierte und nicht verblindete Studie, in die insgesamt 25 Patienten mit nichterhaltungswürdigen Zähnen eingeschlossen wurden<sup>[141]</sup>. Im Rahmen des Eingriffes benötigten 22 dieser Patienten eine Antibiotika-Prophylaxe, 3 Patienten ohne medizinisch indizierte Antibiotikagabe dienten als Kontrollgruppe (Negativ-Kontrolle). Die Patienten erhielten mind. 60 min vor dem Eingriff eine einmalige orale Gabe von 2 g Amoxicillin bzw. 600 mg Clindamycin. Direkt nach der Zahnextraktion wurde - wenn möglich - mittels Insulinspritze mindestens 1 ml Alveolarblut aus der Extraktionsalveole entnommen. Die Alveole wurde zuvor mit einem Speichelsauger abgesaugt, um eine Kontamination mit Speichel zu vermeiden. Aus den Blutproben wurde direkt nach dem Eingriff Serum gewonnen und dieses bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die extrahierten Zähne wurden mit Hilfe von sterilen Tupfern und Instrumenten gereinigt, bis sie optisch frei von Blut, Desmodont, Zahnstein und anderen Fremdkörpern waren. Die Zahnkrone wurde am Zahnhals von der Wurzel abgetrennt und Krone und Wurzel getrennt gewogen. Anschließend wurde mit Exkavatoren und endodontischen Feilen die Pulpa entfernt und die Wurzelkanäle gereinigt. Insgesamt wurden so 31 Zahn- und 28 Alveolarblutproben asserviert.

Die Studie wurde mit Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Freiburg (EK 55/09 vom 20.02.2009) durchgeführt.

### 3.4.3 Methodenentwicklung

Für die Extraktion der beiden Antibiotika aus Zahnhartsubstanz und Serum wurde nach verschiedenen Vorversuchen (u.a. Festphasenextraktion nach De Baere et al.<sup>[143]</sup>) eine Festphasenextraktion mit einer Oasis HLB (60 mg, 3ml Kartusche) verwendet. Die HPLC-Trennung wurde mit einer Standard-Gradientenmethode

durchgeführt. Mangels deuterierte Analoga wurde das Antibiotikum Ampicillin als interner Standard verwendet. Die Entwicklung der MS-Methode erfolgte wie in Kapitel 2.3.1. beschrieben. Das komplette Verfahren ist in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte anhand arbeitstäglicher Kalibrationen. Für den quantitativen Nachweis in Serum wurde Kälberserum mit je 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 25 µg/ml dotiert. Für die Quantifizierung in Zahnmaterial wurden mangels genügend Leermaterial Kalibratoren und Kontrollen in Puffer (pH 7,4) hergestellt und analog zu den Realproben aufgearbeitet. Für Amoxicillin wurden Kalibratoren mit 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, und 100 ng/ml, für Clindamycin Kalibratoren mit 0, 0,5, 1, 5, 10, 20, 25 und 50 ng/ml hergestellt. Als LOQ wurde der jeweils kleinste Kalibrator angenommen. Die Signal/Rausch-Verhältnisse (S/N) für Clindamycin und Amoxicillin lagen dabei jeweils deutlich über 10.

### ***3.5 Untersuchungen zur Einlagerung von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in die Zahnhartsubstanz***

#### **3.5.1 Fragestellung**

Die „alternative Matrix“ Zahn zum Nachweis körperfremder Substanzen findet derzeit kaum Verwendung, obwohl die Ergebnisse in Kombination mit anderen „alternativen Matrices“ wie Haare, Knochen und Nägel von großem Nutzen für die Erhebung postmortalen Befunde sein können. Es existieren vereinzelt Veröffentlichungen, die die Einlagerung bestimmter Substanzen in die Zahnhartsubstanz beschreiben<sup>[61-63]</sup>. Der Transport von Substanzen durch den Schmelz in das darunterliegende Dentin wurde von Haustein et al. 1994 gezeigt<sup>[64]</sup>. Es existieren jedoch bisher keine Arbeiten, die sich mit dem Transport aus der Pulpa in das Dentin, bzw. mit einer differenzierten Betrachtung der Einlagerung in Dentin und Schmelz, beschäftigen. Ebenso gibt es keine Veröffentlichungen mit vergleichenden Analysenergebnissen aus Blut, Urin, Haaren oder Nägeln. Ziel dieses Projektes war die Untersuchung der Aufnahme von Medikamenten- und Drogenwirkstoffen in das Zahnmaterial unter besonderer Berücksichtigung der Einlagerungswege sowie erste Versuche zur Verwendungsmöglichkeit der Analyse von Zahnmaterial bei Verstorbenen mit bekannten/vermutetem Drogen- oder Medikamenten-Konsum in der forensischen Praxis.

Die Arbeiten zu diesem Thema wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. M. Altenburger (Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Freiburg) im Rahmen der

Dissertation von Frau Dr. med. dent. Hanna Ernst durchgeführt. Die Zahnextraktionen, Reinigung und Präparation der Zähne sowie die Versuche mit Rinderzähnen und gewählten Modell-Substanzen wurden von Frau Ernst durchgeführt. Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung und Durchführung der verschiedenen analytischen Methoden sowie die Auswertung der Daten.

### 3.5.2 Studiendesign

#### 3.5.2.1 Versuche mit Rinderzähnen

Für die Versuche zur Einlagerung von Substanzen in die Zahnhartsubstanz wurden Rinderzähne (Frontzähne) verwendet. Diese werden in der Zahnmedizin oft als Modell für humane Zähne benutzt<sup>[144, 145]</sup>. Sie sind ausreichend groß, um größere Mengen Dentin und Schmelz relativ einfach voneinander trennen zu können, und frei von den verwendeten Modellsubstanzen. Die in den folgenden Versuchen verwendeten Dentin- und Schmelzproben wurden mit Hilfe eines Trepanbohrers entnommen (siehe

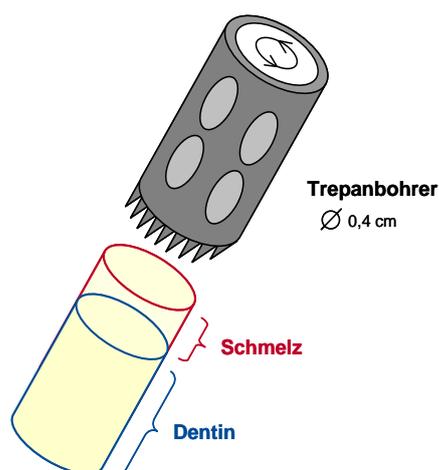


Abb. 16: Gewinnung von Zahn-Pellets mit Hilfe eines Trepanbohrers

Abb. 16), Dentinproben im Bereich der Wurzel, Schmelzproben aus der Labialfläche der Kronen. Die so erhaltenen Zahn-Pellets wurden zur besseren weiteren Bearbeitung in Kunststoffchips eingebettet. Je nach gewünschtem Probenmaterial wurde entweder Schmelz oder Dentin bis zur Dentin-Schmelze heruntergeschliffen. Zur Standardisierung der Oberflächen wurden diese mit Nassschleifpapier poliert. Als Modellsubstanzen für die Versuche wurden die folgenden Drogen, die häufig konsumiert und im Sektionsgut des Instituts regelmäßig nachgewiesen werden, verwendet: Amphetamin, Benzoylcegonin, Cocain, Codein, 3,4-Methylenedioxy-N-ethylamphetamin (MDE), 3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin (MDMA), Methamphetamin, Morphin, Tetrahydrocannabinol (THC) sowie dessen Metabolit THC-COOH. Insgesamt wurden während dieser Arbeit vier Versuche mit Rinderzahnmaterial durchgeführt.

#### Versuch 1 (GC-MS)

Der erste Versuch sollte zeigen, ob sich die gewählten Substanzen nach einmaliger Demineralisation nach Buskes et al.<sup>[146]</sup> in die Zahnhartsubstanz einlagern. Dazu wurden die präparierten Dentin- und Schmelz-Pellets in einer wässrigen Lösung

(2 µg/ml) der Modellsubstanzen bei 37°C für 15 min, 1 h, 5 h, 10 h, 24 h, 3 d, und 7 d inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Pellets kurz mit Leitungswasser gewaschen, im Trockenschrank getrocknet und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Für die Analyse der Proben aus diesen ersten Versuchen wurde neben einer einfachen methanolischen Extraktion, die in der Routineanalytik zur Extraktion von basischen Drogen aus Serum eingesetzte Festphasenextraktionsmethode (siehe Kapitel 2.4.5.2) und GC-MS-Analytik verwendet.

### **Versuch 2 (GC-MS)**

In Versuch 2 sollte geklärt werden, ob die Oberflächenbearbeitung einen Einfluss auf die Einlagerung der Substanzen hat. Dazu wurden von sechs Zähnen die Krone entfernt und je zwei Wurzeln drei verschiedenen Oberflächenbehandlungen unterzogen. Bei allen sechs Wurzeln wurde die Pulpa mittels Herdström-Feile (ISO Gr. 25) entfernt und der Wurzelkanal jeweils mit ca. 5 ml H<sub>2</sub>O dest. gespült (Bezeichnung: Vite). Bei den Wurzeln 3-6 wurden die Kanäle zusätzlich mit Herdström-Feilen und Spülung mit H<sub>2</sub>O dest. bis ISO Gr. 80-100 präpariert (Bezeichnung: WK). Die Wurzelkanäle 5 und 6 wurden anschließend noch mit je 5 ml EDTA gespült (Bezeichnung: WK-EDTA). Die daraus hergestellten Dentin-Pellets wurden anschließend analog zu Versuch 1 für zehn Tage bei 37°C inkubiert. Die Analyse erfolgte ebenfalls mit GC-MS (s. Kapitel 2.4.5.5).

### **Versuch 3 (LC-MS/MS)**

Da im Mund Demineralisation und Remineralisation der Zahnhartsubstanz in Zyklen abläuft, wurde in Versuch 3 erstmalig auch eine Remineralisation durchgeführt. Dazu wurden je zehn Dentin- und Schmelzproben mit Nassschleifpapier (Körnung 220) geschliffen und anschließend analog zu Versuch 1 für sieben Tage in einer Lösung nach Buskes<sup>[146]</sup> demineralisiert. Anschließend wurden sie in mit den Modellsubstanzen (je 2 µg/ml) versetzten künstlichem Speichel<sup>[147]</sup> für sechs Tage remineralisiert. Die Pellets wurden anschließend mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült, im Trockenschrank getrocknet und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

### **Versuch 4 (LC-MS/MS)**

In diesem Versuch wurde zur Simulation des natürlichen pH-Wert Zyklus in der Mundhöhle ein sog. pH-Cycling mit einer die Modellsubstanzen (je 1 µg/ml) enthaltenden Remineralisations-Lösung durchgeführt. Dazu wurden je 20 Schmelz- und 20 Dentinproben zur Standardisierung der Oberflächen mit Nassschleifpapier geschliffen und getrennt voneinander für sieben Tage in je

10 ml Demineralisations-Lösung inkubiert. Die Proben wurden anschließend 20 h im Wärmeschrank getrocknet.

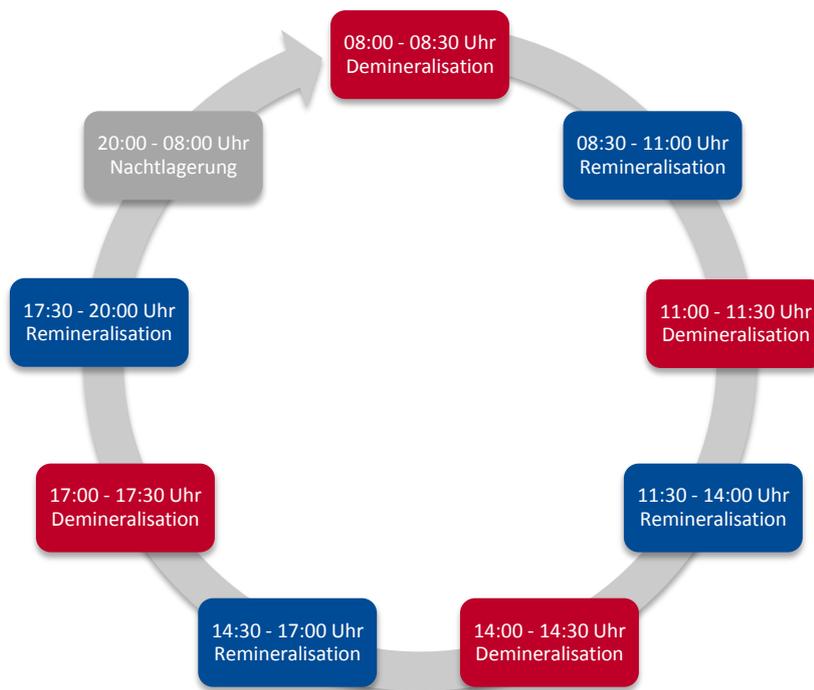


Abb. 17: Ablauf des 9-tägigen pH-cyclings<sup>[126]</sup>

Das eigentliche pH-Cycling (s. Abb. 17) wurde neun Tage lang mit je vier Zyklen pro Tag durchgeführt. Vor dem Umsetzen in die jeweils andere Lösung wurden die Proben kurz mit H<sub>2</sub>O dest. gespült. Die Lagerung über Nacht erfolgte in Remineralisations-Lösung.

Nach Abschluss des Cyclings wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O dest. gespült und für 20 h im Trockenschrank getrocknet. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 3.5.2.2 Versuche mit humanem Zahnmateriäl

Im Rahmen dieses Projektes konnten zudem Zahnproben von drei Verstorbenen untersucht werden, bei denen Drogen- und/oder Medikamentenüberkonsum als Todesursache festgestellt worden war. Die Zähne wurden am Institut für Rechtsmedizin im Rahmen der Obduktion sichergestellt. Sie wurden in der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde gereinigt und von jedem Zahn wurden, soweit möglich, eine kariöse und eine nicht-kariöse Probe entnommen. Weiche kariöse Anteile und teilweise remineralisierte kariöse Stellen wurden mittels Bohrer und Exkavator entfernt und in Eppendorf-Cups bei -20°C gelagert. Zur Asservierung von kariesfreien Proben wurde je eine Wurzel abgesetzt und die Pulpa entfernt. Die

Wurzelhaut wurde mittels Diamantfinierer entfernt. Die Wurzelkanäle unter Wasserspülung bis ISO Größe 35 geschliffen. Die Proben wurden ebenfalls bei -20°C in Eppendorf-Cups gelagert.

In den drei Fällen lag zum Zeitpunkt der Analyse der Zahnproben das komplette forensisch-toxikologische Gutachten vor. Die Auswahl der untersuchten Substanzen erfolgte retrospektiv an Hand der Ergebnisse der Untersuchungen der sonstigen Leichenasservaten (Blut, Urin, Organmaterial). Zur Analyse wurde die in Kapitel 2.4.5.4 beschriebene LC-MS/MS Methode verwendet.

#### Fall 1:

Im ersten Fall handelt es sich um eine im Alter von 41 Jahren an einer, durch eine Überdosis Doxepin verstorbene, männliche Person. Zum Zeitpunkt der Obduktion war bekannt, dass der Mann seit längerem mit Methadon substituiert worden war. Es wurde je ein molarer und ein prämolares Zahn des Oberkiefers asserviert.



Abb. 18: Prämolares (links) und molares Oberkieferzahn (rechts) Fall 1

#### Fall 2:

Im zweiten Fall handelt es sich um eine männliche Person im Alter von 26 Jahren, die nach einer Überdosis Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB, „Liquid Ecstasy“) verstarb. In der forensisch-toxikologischen Routine-Untersuchung der Leichenasservate konnten zudem Amphetamin, THC, Opipramol und Benzodiazepine im Blut nachgewiesen werden. Es wurden zwei molare Zähne des Oberkiefers asserviert.



Abb. 19: 2 molare Zähne des Oberkiefers Fall 2

### Fall 3:

Person 3 verstarb im Alter von 24 Jahren an einer Überdosis Methadon. In der forensisch-toxikologischen Routine-Untersuchung der Leichenasservate konnten zudem Amphetamin, Doxepin, Coffein und Nicotin im Blut nachgewiesen werden. Es wurden ein molarer Zahn des Unterkiefers und ein Weisheitszahn asserviert.



Abb. 20: Weisheitszahn (links) und molarer Zahn des Unterkiefers Fall 3

## 3.6 *Nachweis von Ethylglucuronid und Ethylsulfat in humaner Glaskörper-flüssigkeit*

### 3.6.1 Fragestellung

Der Nachweis oder Ausschluss einer Alkoholisierung zum Todeszeitpunkt liefert wichtige Informationen, die zur Klärung der genauen Todesumstände beitragen können. Die Analyse von post-mortem Proben ist je nach Zustand des Probenmaterials eine Herausforderung und die erhaltenen Ethanol-Konzentrationen bedürfen besonderer Interpretation. Besonders bei Ethanol sind post-mortale Umverteilung, Bildung und/oder Abbau durch Fäulnis und/oder Autolyse-Prozesse zu berücksichtigen<sup>[148-152]</sup>. Die direkten Alkoholkonsum-marker EtG und EtS können unter anderem zur Unterscheidung zwischen Alkoholkonsum kurz vor dem Tod und post-mortal gebildetem Alkohol („Fäulnis-Alkohol“) herangezogen werden<sup>[153]</sup>. Da das Auge einen relativ geschützten und abgegrenzten Bereich bildet, ist die Glaskörperflüssigkeit von postmortaler Umverteilung und postmortaler Veränderung in der Regel wenig, bis gar nicht betroffen.

Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Ethanol-, EtG- und EtS-Konzentration in humaner Glaskörperflüssigkeit sowie der Vergleich mit den im Verlauf der routinemäßigen forensisch-toxikologischen Untersuchung erhaltenen Ethanol-Konzentrationen in Blut und Urin.

### 3.6.2 Studiendesign

Von 26 Verstorbenen, mit vermutetem Alkoholkonsum kurz vor dem Tod, wurden Urin, Femoralvenen-Blut und Glaskörperflüssigkeit asserviert und auf Ethanol, EtG und EtS untersucht. Diese Matrices werden, soweit vorhanden, routinemäßig bei der Obduktion asserviert. Urin wurde direkt aus der Blase, Oberschenkelvenenblut nach Freipräparation des Gefäßes mit einer Spritze entnommen. Glaskörperflüssigkeit wurde durch Punktion des Augapfels mit einer Nadel (20 Gauge) und einer Spritze entnommen. Das Probenmaterial wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Aliquots für die Ethanolbestimmung wurden bis zur Analyse bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die routinemäßig durchgeführte Bestimmung von Ethanol in Blut, Urin und Glaskörper erfolgte am Tag der Obduktion mittels Headspace-Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (HS-GC-FID) und DRI Alkohol-Dehydrogenase Assay (ThermoFisher Scientific, Dreieich) nach Richtlinien der GTFCh. Creatinin wurde mittels Jaffé-Reaktion (DRI Creatinin-Detect® Test, Microgenics, Passau) bestimmt. Die Quantifizierung von EtG und EtS erfolgte mittels LC-MS/MS<sup>[132]</sup>.

## 3.7 *Entwicklung eines Drogen- und Medikamenten-Screenings mittels 3D Ionenfalle*

### 3.7.1 Fragestellung

Im Bereich der klinischen und forensischen Toxikologie hat die Verwendung von Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) zum Nachweis körperfremder Substanzen in Körperflüssigkeiten in den letzten Jahren stark zugenommen und es wurde eine große Zahl verschiedener Screening-Verfahren publiziert<sup>[78, 90, 133, 154]</sup>.

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung und Evaluierung eines Spektrenbibliothek-gestützten Screening-Verfahrens basierend auf einer neuartigen 3D-Ionenfalle für den Einsatz in der forensischen und klinischen Toxikologie. Für diesen Zweck stand ein Analysensystem bestehend aus einem UltiMate 3000 LC-System (Dionex) und einer amaZon speed<sup>TM</sup> Ionenfalle (Bruker Daltonik) zur Verfügung. (s. Tab. 3). Angesichts des geplanten Einsatzes dieser Screening-Lösung in der klinischen Notfallanalytik waren besonders die Robustheit sowie die einfache Bedienbarkeit des kompletten Verfahrens ein Schwerpunkt während der Entwicklung. Die Arbeiten zu diesem Projekt wurden in Kooperation mit der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen) durchgeführt.

### 3.7.2 Toxyter-Methodenentwicklung und Evaluierung

Die Grundzüge der eigentlichen Methodenentwicklung wurden bereits in Kapitel 2.3.2 erläutert. In diesem Kapitel sind nun die weiterführenden Versuche zur Optimierung und Evaluierung des Verfahrens in verschiedenen Matrices beschrieben.

#### 3.7.2.1 Untersuchungen an dotierten Serumproben

Zur Evaluierung der Möglichkeiten und Grenzen des Verfahrens wurden zunächst verschiedene Versuche mit dotierten Humanserum-Proben durchgeführt.

##### **Serum-Mixe**

Zunächst wurde Leerserum mit unterschiedlichen Mischungen an Drogen- und Medikamentenwirkstoffen im niedrigen, mittleren und hohen therapeutischen Bereich dotiert. Insgesamt wurden 21 verschiedene Mischungen mit 156 verschiedenen Analyten als methanolische Lösungen hergestellt. Die therapeutischen Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe wurden aus der "TIAFT therapeutic and toxic drug concentrations" Liste<sup>[155]</sup> entnommen. Die Auswertung der Analyseergebnisse und die Befunderstellung erfolgten automatisiert mit der Software SmileMS<sup>TM</sup> (GeneBio, Genf, Schweiz).

##### **Vergleich amaZon 3D Ionenfalle (Toxyter) und QTRAP 3200 (MTS)**

Um das Verfahren mit einem bereits etablierten LC-MS/MS Multi-Target-Screening (MTS) unter identischen Bedingungen vergleichen zu können, wurden zwei Aliquots dieser Seren extrahiert und die Extrakte an das Hôpital Universitaire de Genève geschickt. Das dortige klinische Labor verfügt über zwei amaZon Ionenfallen und ein Triplequadrupol-MS mit linearer Ionenfalle (QTRAP 3200). Die Auswertung der Daten aller drei Systeme und die Reporterstellung erfolgen dort routinemäßig automatisiert per SmileMS. Für diesen Vergleich wurde die Hardware der beiden amaZon LC-Systeme dem Hardware-Setting in Freiburg angeglichen und die entwickelte Methode auf beiden Geräten installiert. Die Analyse mittels Multi-Target-Screening (MTS) erfolgte entsprechend der in Genf etablierten Laborroutine.

##### **Toxyter Ringversuch**

Als letzter Schritt der Evaluierung mit dotierten Serumproben wurde ein Ringversuch mit insgesamt sieben Analysensystemen in fünf verschiedenen Laboren durchgeführt. Die in den teilnehmenden Laboren vorhandenen Analysensysteme (Dionex UltiMate; Bruker amaZon) wurden falls nötig dem in Freiburg verwendeten Hardware-Setting angepasst. Für den Ringversuch wurden

vier Leer-Seren mit Drogen und/oder Medikamenten unterschiedlicher Konzentration dotiert. Die Zusammenstellung der Substanzen erfolgte angelehnt an in der Routine vorkommende Wirkstoffkombinationen (s. Tab. 26). Jeder Teilnehmer erhielt Teilmengen der jeweiligen vier Extrakte, eine standardisierte Arbeitsanweisung wie die Proben zu analysieren sind sowie die dafür notwendige Software, Methoden und Bibliotheken. Die Zusammensetzung der Proben und die jeweiligen Konzentrationen wurden nicht mitgeteilt.

**Tab. 26:** Zusammensetzung und Wirkstoff-Konzentrationen (ng/ml) der Ringversuchsproben (subtherapeutisch, therapeutisch, toxisch)

RV Serum 1	RV Serum 2	RV Serum 3	RV Serum 4
Methadone (250)	Trimipramin (100)	Duloxetin (600)	-
EDDP (50)	Amitriptylin (100)	Nordoxepin (300)	-
Diazepam (100)	Zolpidem (500)	Mirtazapin (50)	-
Nordazepam (500)	Midazolam (150)	Metoprolol (200)	-
Oxazepam (200)	$\alpha$ -OH-Midazolam (50)	-	-
Temazepam (100)	Fentanyl (3)	-	-
-	Lidocain (200)	-	-

### 3.7.2.2 Untersuchungen an realen Urinproben

Parallel zu den obigen Untersuchungen wurde im Rahmen der Evaluierung 119 Patienten-Urinproben analysiert. Die Urinproben stammen aus einem Projekt zur Untersuchung von Medikamenten-Beikonsum während eines Alkohol-Entzuges. Mit diesen Proben wurden insgesamt drei verschiedene Experimente durchgeführt. Zur besseren Übersicht sind die im Folgenden erklärten Analysemethoden in Tab. 27 stichwortartig zusammengefasst.

#### Nachweis von Benzodiazepinen

Alle Proben des Projektes wurden mit einem Triple-Quadrupol-LC-MS (QTRAP 4000, s. Tab. 3) quantitativ auf Benzodiazepine untersucht (Methode 2, Tab. 27)<sup>[156]</sup>. Zur Probenaufarbeitung wurde 1 ml Urin nach enzymatischer Spaltung der Glucuronide mittels Chlorbutanextraktion extrahiert. Für das QTRAP 4000 wurden die Proben in 100  $\mu$ l, für die Ionenfalle in nur 25  $\mu$ l Fließmittelgemisch (A:B, 50:50 (v/v)) rekonstituiert.

#### Vergleich amaZon 3D Ionenfalle (Toxytyper) und QTRAP 4000 (MTS)

Die Toxytyper Ergebnisse (Methode 1) wurden mit den Screening-Ergebnissen des hier im Labor etablierten LC-MS Screening-Verfahrens (Methode 3, Tab. 27) verglichen. Das MTS wurde an einem QTRAP 4000 Triple-Quadrupole MS

durchgeführt. Diese Methode verwendet den MRM-Modus als Survey Scan und den Enhanced Product Ion Spectra Modus (EPI) als Dependant Scan. Als Probenvorbereitung dient hierbei eine einfache Fällung und Verdünnung der Probe („dilute and shoot“) mit Wasser. Ergebnis-Berichte wurden mit der Auswerte-Software Cliquid™ (AB Sciex) halb-automatisch generiert.

### Vergleich zweier Probenaufarbeitungen

Mit der bisher verwendeten Flüssig-flüssig-Extraktion mit Chlorbutan kann ein großer Teil der relevanten Drogen- und Medikamentenwirkstoffe extrahiert werden. Es gibt jedoch auch Analyten die von dieser Extraktionsmethode nicht oder nur schlecht erfasst werden. Deshalb wurde in diesem Schritt der Evaluierung eine weitere, universellere Extraktionsmethode für Urinproben getestet und mit der bisherigen Methode verglichen.

Tab. 27: Analytische Methoden zur Urinanalyse

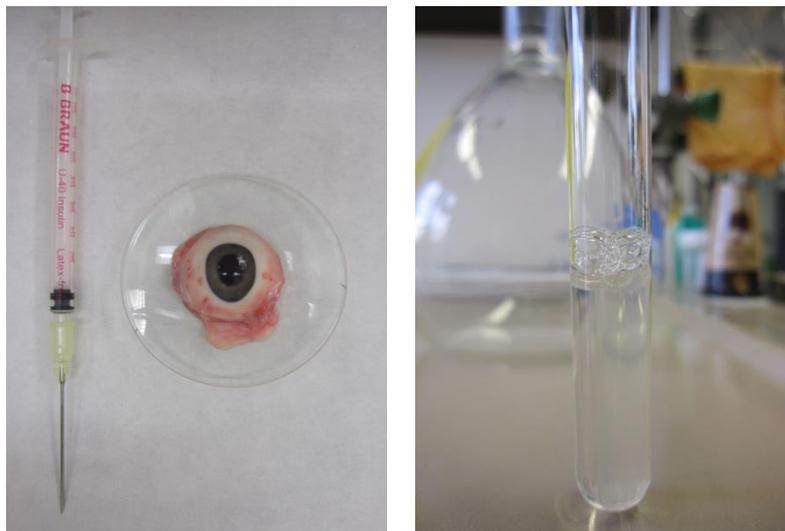
	Proben Volumen	Probenaufarbeitung	Analysenmethode
1	1 ml	Enzymatische Spaltung der Glucuronide LLE (pH 9) mit 1-Chlorobutan Aufnahme in 25 µl Fließmittel	amaZon X Toxtyper SmileMS™ Bibliothekssuche
2	1 ml	Enzymatische Spaltung der Glucuronide LLE (pH 9) mit 1-Chlorobutan Aufnahme in 100 µl Fließmittel	QTRAP 4000 MRM Methode (Quantitative Analyse)
3	50 µl	Fällung mit Methanol Verdünnung in 1 ml Wasser	QTRAP 4000 Multi-Target-Screening (MTS) MRM und EPI mit Cliquid™ Bibliothekssuche
4	100 µl	Enzymatische Spaltung der Glucuronide Fällung mit Acetonitril Aufnahme in 25 µl Fließmittel	amaZon X Toxtyper SmileMS™ Bibliothekssuche

100 µl Urin wurden nach enzymatischer Hydrolyse mit 500 µl Acetonitril versetzt. Hierbei fallen nicht lösliche Bestandteile aus. Nach Zentrifugation wurden 500 µl der organischen Phase abgenommen, bei 40°C unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 25 µl Fließmittel A:B, 50:50 (v/v) rekonstituiert (siehe Methode 4, Tab. 27). Die Ergebnisse wurden anschließend mit den Ergebnissen der ursprünglichen Extraktionsmethode verglichen.

#### 3.7.2.3 Nachweis körperfremder Substanzen in Glaskörperflüssigkeit

Nach der Evaluierung in Serum und Urin wurde damit begonnen, das entwickelte Verfahren für den Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in

Glaskörperflüssigkeit zu testen. Grundsätzlich ergibt sich dabei das Problem, dass keine größeren Mengen an humanem wirkstofffreiem Untersuchungsmaterial zur Verfügung stehen, um z.B. Nachweisgrenzen analog dem Vorgehen wie es in Kapitel 3.7.2.1 für Serum beschrieben wurde zu bestimmen. Als Alternative wurde hierzu auf Glaskörperflüssigkeit von Rindern bzw. Schweinen zurückgegriffen, deren Augen schlachtfrisch aus dem freiburger Schlachthof bezogen wurden. Die Entnahme der Glaskörperflüssigkeit erfolgte durch Punktion des Augapfels mit einer Spritze. Aliquots der getrennt nach Spezies vereinigten Proben wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 21:** Schweineauge vor der Punktion (links) und entnommene Glaskörperflüssigkeit (rechts)

Die Analyse und automatisierte Datenauswertung aller in diesem Kapitel beschriebenen Proben erfolgte bereits mit dem Toxyper Version 1.1, einer Weiterentwicklung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Screening-Verfahrens. In dieser Version wurde besonders der Algorithmus der automatischen Ergebnisbericht-Erstellung weiter verbessert sowie die Spektrenbibliothek um weitere 70 Analyten erweitert.

#### **Analyse dotierter boviner Glaskörperflüssigkeit**

Glaskörperflüssigkeit wurde mit sechs unterschiedlichen Mischungen mit insgesamt 57 Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in drei verschiedenen Konzentrationen dotiert. Die Auswahl der Substanzen und der verwendeten Konzentrationen erfolgte anhand der Publikation von Pelander et al.<sup>[78]</sup>, die zur systematischen toxikologischen Untersuchung von Glaskörper jedoch ein LC-QTOF-System verwenden. Die Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion erfolgte nach dem in Kapitel 2.4.7.1 Protokoll.

### **Analyse humaner Glaskörperflüssigkeit**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Glaskörperflüssigkeiten entstammen dem Sektionsgut des Freiburger Instituts für Rechtsmedizin. Glaskörperflüssigkeit wird hier im Rahmen der gerichtlichen Sektion asserviert, jedoch wird routinemäßig lediglich die Ethanolkonzentration bestimmt. Probenaufarbeitung, Analyse und Datenauswertung erfolgte analog zu den dotierten Proben. Die Analysenergebnisse der Glaskörperflüssigkeit wurden mit den Untersuchungsergebnissen der jeweiligen Urinprobe - falls vorhanden - und den Ergebnissen der chemisch-toxikologischen Routine-Untersuchung verglichen.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zur Stabilität von Benzodiazepinen auf einem kommerziellen Speichelsammler

#### 4.1.1 Validierungsparameter

Die Quantifizierung erfolgte mittels Ein-Punkt-Kalibration, wobei das durchschnittliche Peakflächenverhältnis der beiden methanolischen Benzodiazepin-Lösungen (Probe B, 5 min) als 100 % gesetzt wurde. Für die Benzodiazepine Bromazepam, Chlordiazepoxid und Flurazepam, für die kein deuteriertes Analogon zur Verfügung stand, wurde D5-Diazepam als interner Standard verwendet.

Die sechsmalige Messung von Kalibrationsgeraden (10 Kalibrationspunkte pro Analyt) zeigte für alle untersuchten Analyten, dass die verwendete LC-MS/MS-Methode (s. Kapitel 2.4.1) in einem Konzentrationsbereich von 3 - 120 ng/ml linear ist ( $R^2 > 0,99$ ). Die Nachweisgrenze wurde für alle Substanzen auf 3 ng/ml ( $S/N > 3$ ), die Bestimmungsgrenze auf 9 ng/ml ( $S/N > 10$ ) gesetzt. Die relative Standardabweichung (RSD) bei mit 9 ng/ml dotierten Speichel ( $n = 10$ ) lag jeweils unter 10 % (s. Tab. 28).

**Tab. 28:** Standardabweichung (RSD) und Matrixeffekte (ME) der einzelnen Benzodiazepine in Speichel

Analyt	RSD [%] bei 9 ng/ml (n = 10)	ME [%] bei 15 ng/ml (n = 5)	ME [%] bei 60 ng/ml (n = 5)
Bromazepam	7,8	175	169
Chlordiazepoxid	5,0	127	138
Clonazepam	8,2	146	141
Diazepam	5,4	153	147
Flunitrazepam	8,9	138	128
Flurazepam	4,9	143	138
Lorazepam	5,4	152	145
Midazolam	4,0	148	140
Nordazepam	7,2	158	146
Oxazepam	3,3	154	147
Temazepam	4,5	164	160

Die Bestimmung der Matrixeffekte (ME) erfolgte nach Matuszewski<sup>[140]</sup> an Hand von fünf verschiedenen Leerspeicheln, die mit 15 bzw. 60 ng/ml der untersuchten Analyten dotiert wurden. Zum Vergleich wurden 100 µl Laufmittel mit identischen Konzentrationen an Benzodiazepinen dotiert und analysiert. Bei beiden

Konzentrationen konnte bei allen Analyten eine Signalverstärkung (Ion Enhancement) beobachtet werden. Die detaillierten Ergebnisse der Matrixeffekte finden sich in Tab. 28.

#### 4.1.2 Wiederfindungsrate bei Elution mit Methanol

Zur Bestimmung der generellen Wiederfindungsraten nach nur kurzzeitigem Kontakt mit dem Probennehmer ( $t = 5$  min) wurde mit je  $c = 15$  ng/ml pro Analyt dotierter Leerspeichel verwendet. Zusätzlich wurden Eluate von mit Leerspeichel dotierten Probennehmer vor dem Aufkonzentrierungsschritt mit der entsprechenden Menge an Benzodiazepinen aufdotiert. Es folgte eine Doppelbestimmung anhand einer 5-Punkt-Kalibration (3 - 21 ng/ml). Der Mittelwert der nach dem Zentrifugationsschritt dotierten Leerspeichelproben wurde als 100 % gesetzt. Die Wiederfindungsraten der einzelnen Analyten sind in Abbildung 22 zusammengefasst.

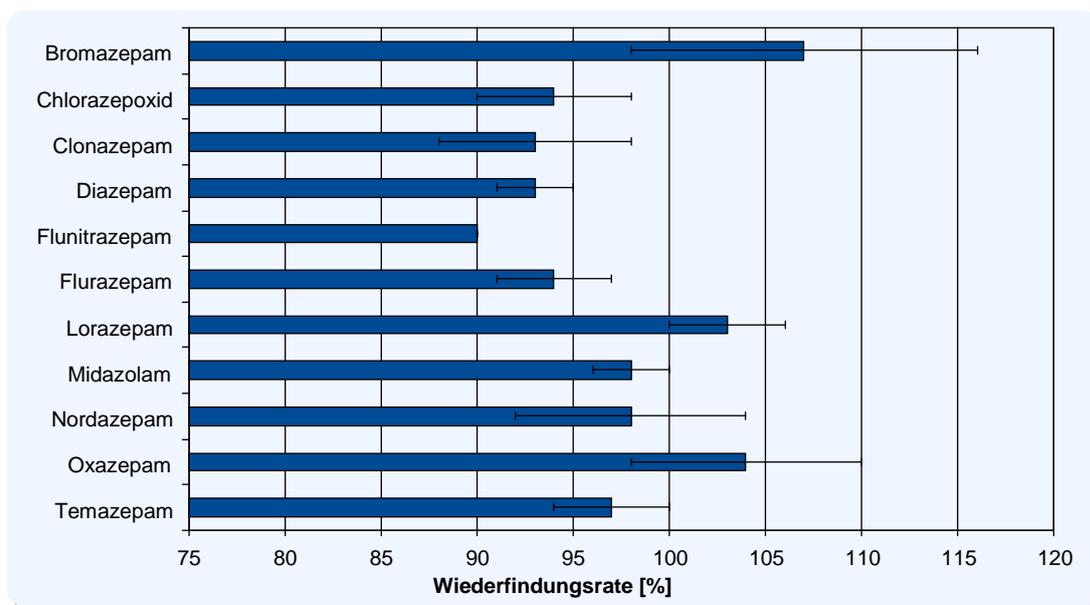


Abb. 22: Wiederfindungsraten nach Kurzzeit-Lagerung ( $t = 5$  min)

#### 4.1.3 Ergebnisse der Lagerstudie

Die Raumtemperatur während der 14-tägigen Lagerung bewegte sich zwischen 19 und 26 °C, was die Temperaturen bei einem ungekühlten Postversand innerhalb Mitteleuropas sehr gut abbildet. Die einzelnen Proben wurden nach Ende der jeweiligen Lagerzeit bis zum Aufkonzentrationsschritt aufgearbeitet und die eingedampften Rückstände bis zum Abschluss der Studie bei -20 °C gelagert. Die weitere Flüssig-flüssig-Extraktion sowie die LC-MS/MS Analysen wurden für alle

Proben an einem Tag durchgeführt. In der Literatur werden für die Stabilität von Wirkstoffen in Plasma Wiederfindungsraten von 88 bis 115 % im Vergleich zu einer Referenzprobe als akzeptabel angesehen<sup>[157]</sup>.

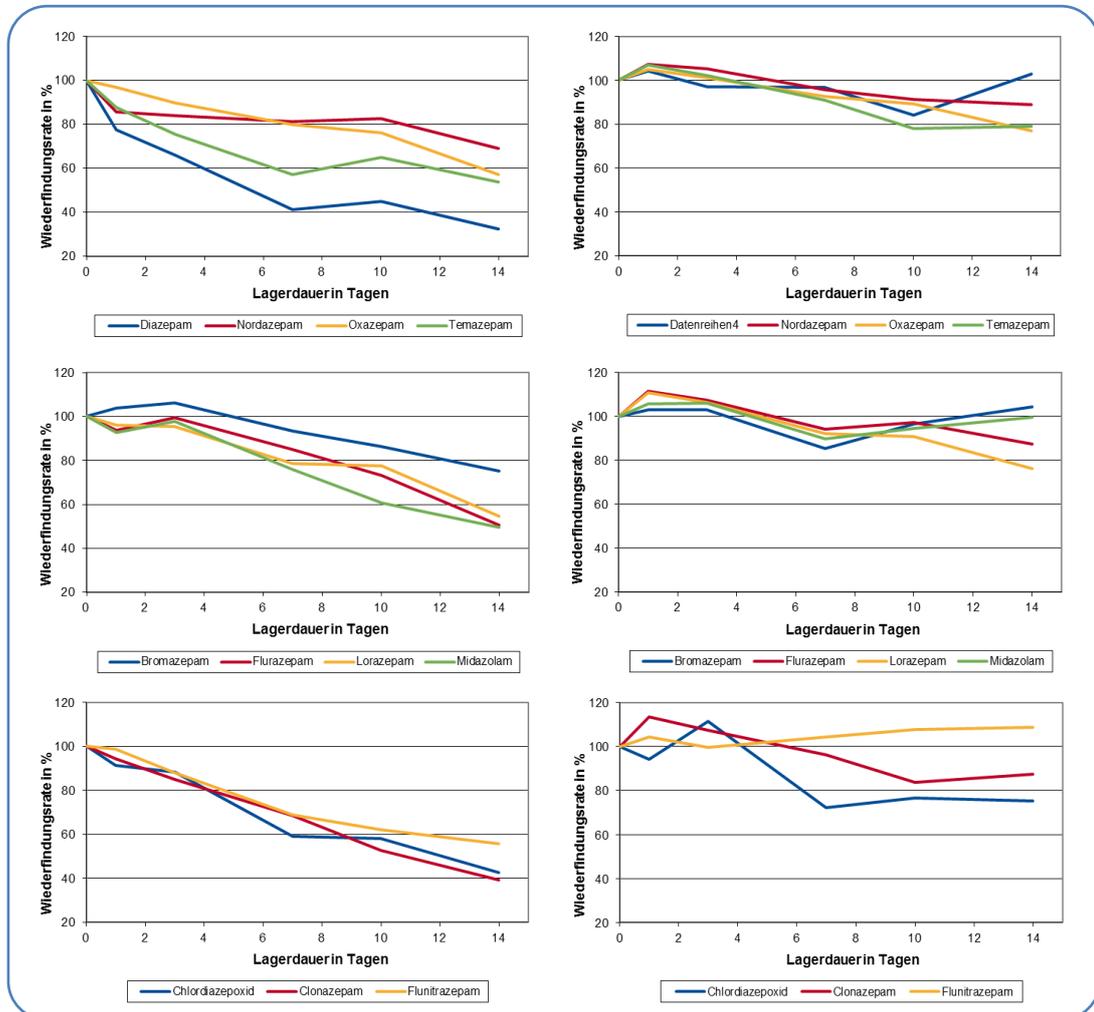


Abb. 23: Konzentrationsverlauf bei ‚nativer‘ (links) und methanolischer Lagerung (rechts)

Die durchgeführte Studie zeigte bei nativer Lagerung (Proben E) bei allen Benzodiazepinen massive Verluste. Ein Abfall der Konzentrationen war bereits nach zwei Tagen zu beobachten. Nach 7 Tagen lag die Wiederfindungsrate für einige Analyten (z.B. Diazepam) bereits unter 60 %. Bei methanolischer Lagerung der Probennehmer (Proben F) konnten auch nach 14-tägiger Lagerung nur geringe Analyt-Verluste von 10 bis 20 % festgestellt werden. Die Konzentrationsverläufe bei ‚nativer‘ und methanolischer Lagerung sind in Abb. 23 dargestellt.

Im dotierten Leerspeichel (Proben A) zeigten sich für einen Großteil der Benzodiazepine nahezu konstante Konzentrationen (s. Abb. 24). Lediglich Chlordiazepoxid und die beiden Benzodiazepine mit einer Nitro-Gruppe

Flunitrazepam und Clonazepam waren im Speichel nicht stabil und konnten nach 7-tägiger Lagerung nicht mehr nachgewiesen werden.

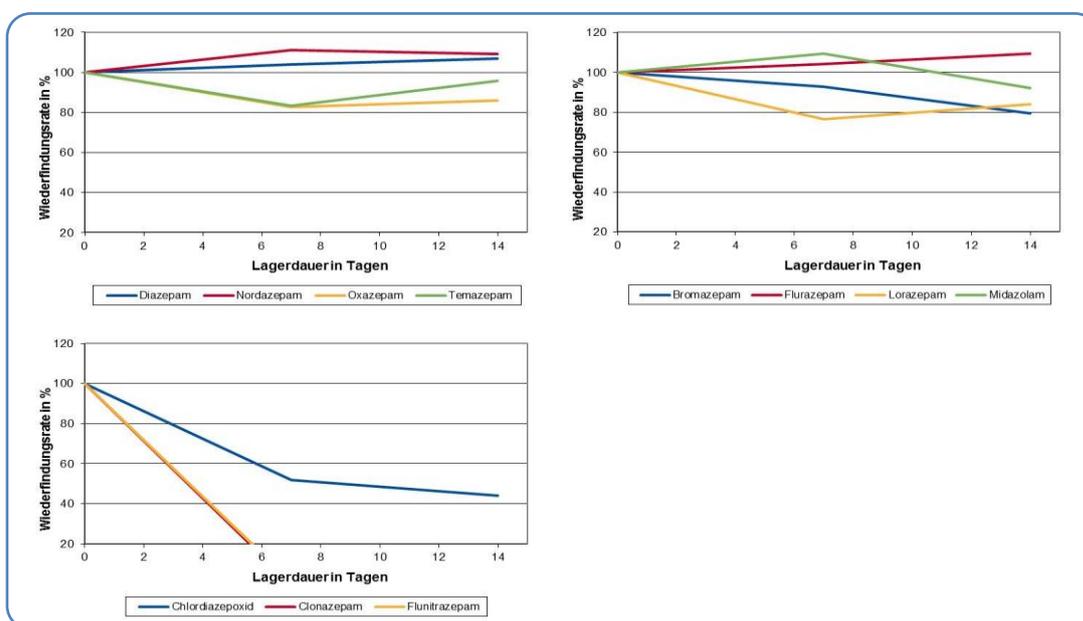


Abb. 24: Konzentrationsverlauf im dotierten Speichelpool (Proben A)

#### 4.1.4 Schlussfolgerungen der Lagerstudie

Der verwendete Probennehmer (Dräger DCD 5000) wurde unter anderem für die Bestätigungsanalyse von Ergebnissen des mobilen Dräger DrugTest 5000 entwickelt. Das Studiendesign simuliert den ungekühlten Postversand wie er oft von der Polizei und für Workplace-Drugtesting Proben verwendet wird. Es konnten, abhängig von der Art der Lagerung, für die verschiedenen Benzodiazepine unterschiedliche Wiederfindungsraten ermittelt werden. Die höchsten Wiederfindungsraten ergaben sich bei Zugabe von 950 µl Methanol auf den Probengeber. Die in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Wiederfindungsraten nach kurzer Verweildauer auf dem Probengeber, lassen darauf schließen, dass die bei nativer Lagerung der Probennehmer aufgetretenen Analytverluste hauptsächlich auf irreversible Adsorption der Analyte am Polymer des Mundstückes zurückzuführen sind. Adsorptionseffekte wurden bereits für andere Wirkstoffe, insbesondere für Cannabis<sup>[158]</sup>, beschrieben und sollten immer berücksichtigt werden, sobald Probenbehälter aus Plastik verwendet werden. Zentrifugation der Probengeber mit anschließendem ungekühltem Versand des Eluats resultiert in Verlusten bei nitrogruppenhaltigen Benzodiazepinen (z.B. Flunitrazepam, Clonazepam) sowie bei Chlordiazepoxid.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie lassen sich folgende Hinweise für den ungekühlten Versand von mittels Dräger DCD 5000 asservierten Speichelproben geben: Um die größtmögliche Wiederfindung sicherzustellen, sollten die Probennehmer mit Methanol stabilisiert und zeitnah noch vor dem Versand zentrifugiert und das Eluat vom Probengeber getrennt gelagert werden. Sollte die Zugabe von Methanol und/oder die Zentrifugation nicht möglich sein, so sollte die kürzeste Versandart gewählt werden (1 - 2 Tage) und die Probennehmer nach Ankunft im Labor umgehend mit Methanol behandelt und abzentrifugiert werden.

## **4.2 Nachweis von Methylphenidat in humanem Speichel nach kontrollierter Medikation**

### **4.2.1 Ergebnisse der Methodvalidierung**

Zum Nachweis von Selektivität, Linearität sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde Serum und Speichel von sechs Freiwilligen verwendet. In den jeweiligen Leermatrices konnten keine Signale oder Störungen im Retentionszeitfenster des Analyten bzw. des internen Standards beobachtet werden. Die Zugabe von D5-MDEA als IS ergab ebenfalls keine Störung der MRM-Signale von Methylphenidat. Die Linearität der Methode in beiden Matrices wurde anhand von je sechs Kalibrationsgeraden ( $R^2 > 0,99$ ) mit je zwölf Kalibrationspunkten von 1,0 bis 100 ng/ml nachgewiesen. Als Bestimmungsgrenze wurde jeweils der kleinste Kalibrator mit einem Signal-Rausch-Verhältnis größer 10 gewählt und mittels Mehrfachbestimmung in verschiedenen dotierten Matrices ( $n = 7$ ) bestätigt. Auf diese Art wurde für Methylphenidat in Serum und Speichel eine Bestimmungsgrenze von 1 ng/ml ermittelt. Die relative Standardabweichung von sieben mit je 1 ng/ml dotierten Serum- und Speichelproben betrug im Serum 7,3 % und im Speichel 8,4 %. Als Nachweisgrenze wurde in beiden Matrices  $c = 0,2$  ng/ml als die kleinste, mit einem Qualifier Signal-Rauschverhältnis größer 3 detektierbare Konzentration als LOD gewählt.

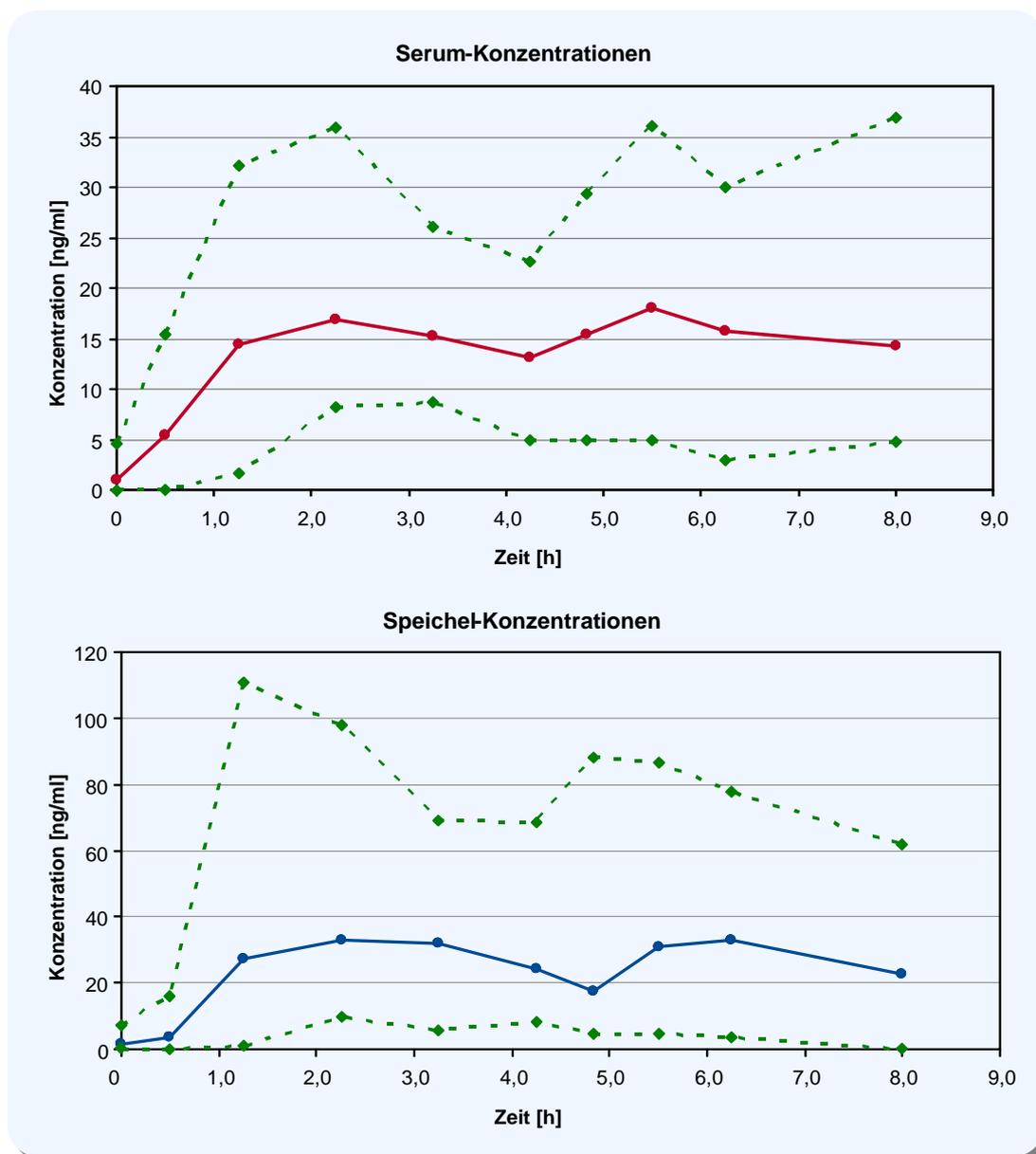
Die Genauigkeit der Methode wurde durch mehrfache Analyse von drei Qualitätskontrollen (Low: 3 ng/ml, Medium: 20 ng/ml, High: 50 ng/ml) an verschiedenen Tagen bestimmt. Die relative Standardabweichung lag dabei jeweils unter 15 %. Matrixeffekte in Serum ( $ME_{\text{Serum}} = 89,2\%$ ) und Speichel ( $ME_{\text{OF}} = 101,6\%$ ) wurden nach Matuszewski et al.<sup>[140]</sup> bestimmt.

Es erfolgte eine arbeitstägliche Kalibration in gepooltem Leerspeichel bzw. Leerserum von fünf verschiedenen Spendern. In jeder Messreihe wurden die oben

beschriebenen Qualitätskontrollen (QC) mitgeführt und mindestens nach jeder zwanzigsten Probe eine QC-Probe analysiert.

### 4.2.2 Ergebnisse der Probandenstudie

Aus den Proben der 24 teilnehmenden Kinder konnten insgesamt 19 komplette kinetische Profile (Serum und Speichel) erstellt werden.



**Abb. 25:** Durchschnittliche Konzentrationsverläufe (n = 19) in Serum und Speichel nach Gabe von 20 mg Ritalin (Extended-Release Formulierung). In grün sind die zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Maximal- und Minimal-Konzentrationen bis 8 Stunden nach Einnahme dargestellt.

Bei fünf Kindern war es nicht möglich, alle im Studienprotokoll vorgesehenen Blut- und oder Speichelproben zu gewinnen. Diese Probanden wurden daher von der

weiteren Auswertung ausgeschlossen. Abbildung 25 zeigt die über 8 h nachgewiesenen durchschnittlichen Serum- und Speichelkonzentration sowie die jeweiligen Maximal- und Minimal-Konzentration in Serum und Speichel.

Zwischen 1,25 und 8 h nach der Gabe von 20 mg Methylphenidat konnten Serumwerte zwischen 1 und 36 ng/ml nachgewiesen werden. Die Speichelkonzentrationen lagen in diesem Zeitraum zwischen 1 und 110 ng/ml. Serum- und Speichelprofile zeigen jeweils zwei Maxima bei 2,25 h bzw. 5,5 h nach Medikamentengabe. In über 80 % der Probanden konnten bereits 0,5 h nach Ritalingabe Methylphenidat-Spiegel oberhalb des LODs (LOD = 0,2 ng/ml) im Speichel nachgewiesen werden.

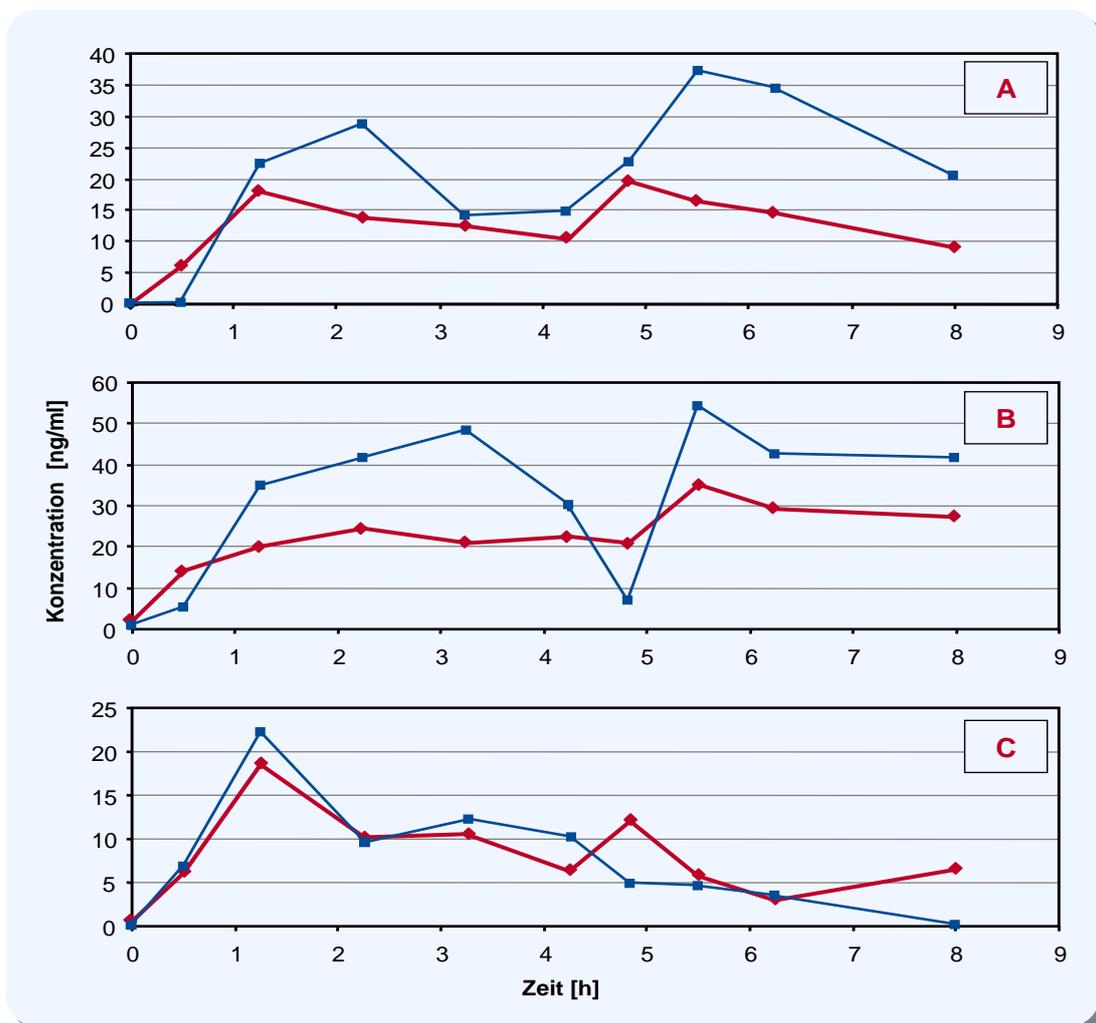


Abb. 26: Serum- und Speichelkinetik von drei Probanden über acht Stunden.

Abbildung 26 zeigt die Kinetiken von drei Probanden, die jeweils einen von drei verschiedenen beobachteten Konzentrationsverläufen (A, B und C) zeigen. Die Konzentrationsverläufe aller Probanden finden sich in Anhang A-2.

In ca. 50 % der Fälle überschritt die Methylphenidat-Konzentration im Speichel eine Stunde nach Einnahme die Konzentration im Serum und blieb über die restlichen 7 h des Beobachtungszeitraumes höher. Es konnten - wie bei einer zweiphasigen Extended-Release Formulierung erwartet - in beiden Matrices jeweils zwei deutliche Maxima bei  $t = 2$  h und  $t = 5$  h bzw.  $t = 5,5$  h beobachtet werden (Abb. 25 Gruppe A). Der Speichel-Serum-Koeffizient (OF/Se-Koeffizient) bei Probanden dieser Gruppe lag im beobachteten Zeitraum zwischen 1,1 und 4,8.

Ca. 30 % der Probanden zeigten Konzentrationsverläufe ähnlich denen von Proband B (Abb. 25). Erneut konnten in beiden Matrices zwei jeweils deutliche Maxima bei  $t = 3$  h und  $t = 5,5$  h beobachtet werden. Die Speichelkonzentration lag dabei bei den meisten Probanden für  $t > 1$  h, bis auf einen auffälligen Abfall bei  $t = 5$  h, ebenfalls oberhalb der Serumkonzentration. In Gruppe B konnten OF/Se-Koeffizienten zwischen 0,3 und 3,0 ermittelt werden.

Bei Probanden der Gruppe C waren die Speichel- und Serumkonzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu gleich hoch. Die Konzentrationsverläufe zeigen nur ein Maximum und es konnten OF/Se-Koeffizienten zwischen 0,4 und 1,8 errechnet werden. Abbildung 27 zeigt die Verläufe der OF/Se-Koeffizienten aller 19 Probanden.

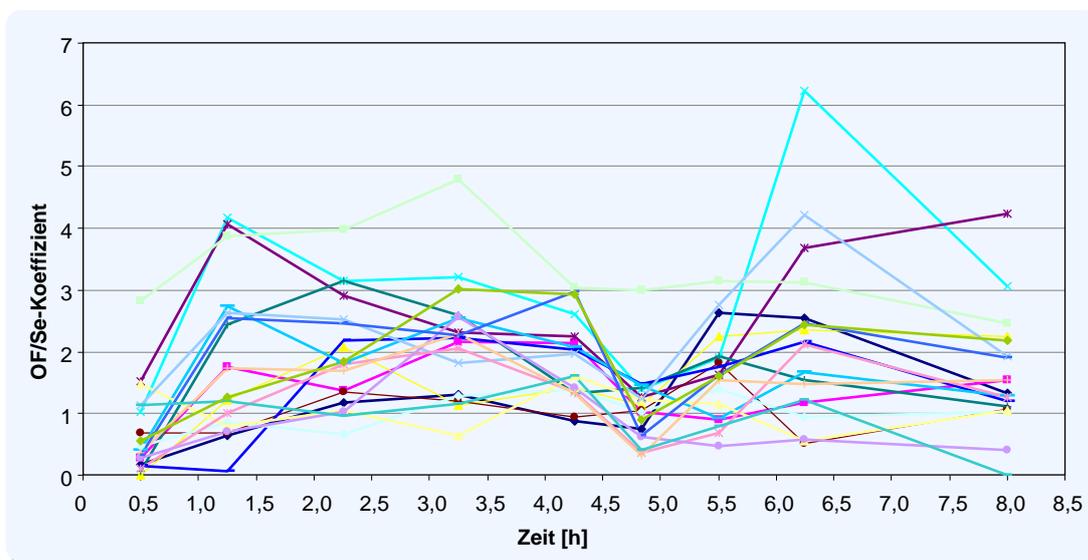


Abb. 27: OF/Se-Koeffizienten aller 19 Probanden über einen Zeitraum von acht Stunden

Gemäß der aus der Henderson-Hasselbalchschen Gleichung abgeleiteten Rasmussen-Gleichung besteht unter Berücksichtigung der Proteinbindung und Ionisation ein linearer Zusammenhang zwischen dem OF/Se-Koeffizienten und dem pH-Wert des Speichels<sup>[159]</sup>.

$$\begin{array}{cc}
 \text{Saurer Speichel} & \text{Basischer Speichel} \\
 OF / Se = \frac{1 + 10^{(pH_{OF} - pKa)}}{1 + 10^{(pH_{Se} - pKa)}} * \frac{f_{OF}}{f_{Se}} & OF / Se = \frac{1 + 10^{(pKa - pH_{OF})}}{1 + 10^{(pH_{Se} - pKa)}} * \frac{f_{OF}}{f_{Se}}
 \end{array}$$

$pH_{OF}$  pH-Wert Speichel  
 $pH_{Se}$  pH-Wert Serum, pKa: pKa-Wert des Substanz  
 $f_{OF}$  nicht proteingebundener Anteil im Speichel  
 $f_{Se}$  nicht proteingebundener Anteil im Serum

Während der Probandenstudie wurde keine pH-Messung des Speichels durchgeführt. Der gemessene pH-Wert der Speichelprobe spiegelt jedoch nur bedingt den durch Sekretion von Hydrogencarbonat und Kontakt mit Luftsauerstoff veränderten pH-Wert des im Azinus gebildeten Primärspeichels wieder, welcher die Diffusionsrate von Methylphenidat bestimmt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass sich der pH-Wert des Speichels im Tagesverlauf ändert (s. Kapitel 1.1.1), insbesondere während bzw. nach der Aufnahme von Nahrung, so dass inter-individuelle und zeitabhängige Unterschiede der OF/SE-Koeffizienten zu erwarten sind. Dies erklärt möglicherweise den deutlichen Abfall der OF/SE-Koeffizienten zum Zeitpunkt  $t = 4,8$  h, der ersten Probennahme nach dem gemeinsamen Mittagessen der Probanden.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden auf der 47. Jahrestagung der International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) in Genf (Schweiz) und dem 16. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) in Mosbach (Baden) vorgestellt.

### 4.2.3 Schlussfolgerungen der Probandenstudie

Methylphenidat ist mit einem Molekulargewicht von 233,3 Da und einem pKa-Wert von 8,9 eine kleine, basische Substanz und reichert sich daher im humanen Speichel, welcher unter normalen physiologischen Bedingungen einen geringeren pH-Wert als Blut hat, an. Es ist bekannt, dass nach Gabe von Ritalin hohe interindividuelle Unterschiede in der Methylphenidat-Konzentration auftreten und unterschiedliche Dosis-Wirkbeziehungen beobachtet werden. Die von Ernährung, Tageszeit, Dauer und Art der Stimulation, Gesundheitsstatus etc. abhängigen interindividuellen Unterschiede in der Speichelsekretion führen dazu, dass sich die interindividuellen Methylphenidat-Konzentrationen im Speichel nach Gabe einer definierten Dosis noch mehr unterscheiden als die Serum-Konzentrationen. Die Umstände der Speichelnahme, insbesondere die Aufnahme von Nahrung und Getränken, müssen daher zwingend bei der Interpretation von Speichelkonzentrationen berücksichtigt werden.

Nach der Gabe von 20 mg Methylphenidat in einer Extended-Release Formulierung an sechs bis vierzehn Jahre alten Kindern und Jugendlichen konnte im Speichel der Probanden Methylphenidat über einen Zeitraum von 0,5 bis 7 h nach der Gabe in Konzentrationen größer 0,2 ng/ml nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass - abgesehen von den Herausforderungen bei der Interpretation quantitativer Ergebnisse - Speichel als nicht-invasive Alternative zu Blut zur Überwachung der Compliance bzw. zum Nachweis eines kurzzeitig zurückliegenden Missbrauches von Ritalin verwendet werden kann.

Die hier vorgestellte Methode wurde erfolgreich zum Nachweis einer nicht vom behandelnden Arzt verordneten Aufnahme von Ritalin durch einen Jugendlichen während der ambulanten Behandlung in der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik im Kindes- und Jugendalter des Universitätsklinikums Freiburg eingesetzt.

### **4.3 Nachweis von synthetischen Cannabinoiden in humanem Speichel**

#### **4.3.1 Ergebnisse der Methodvalidierung**

Die Analyse von sechs verschiedenen Leerspeichelproben und zweier, lediglich mit internen Standards versetzten Leerspeichelproben ergab keine Störungen der MRM-Signale der internen Standards und/oder Analyten.

Die Linearität der Methode wurde anhand von sechs Kalibrationsgeraden mit acht, über den jeweiligen Substanz-spezifischen Konzentrationsbereich (s. Tab. 29) verteilten, Kalibrationspunkten nachgewiesen. Ein nach  $1/x$  gewichtetes Regressionsmodell führte für alle Analyten außer CRA-13 und JWH-307 zu einem ausreichend linearen Zusammenhang von Konzentration und Peakflächenverhältnis ( $R > 0,992$  ( $n=6$ )). CRA-13 und JWH-307 können mit diesem Verfahren daher nur qualitativ nachgewiesen werden.

Für lineare Analyten wurden die Nachweisgrenzen (LOD) statistisch nach DIN 32645 ermittelt. Wurden dabei rechnerisch Konzentrationen ermittelt, bei denen die Identifizierungskriterien nicht erfüllt waren, so wurde der nächst höhere Kalibrator mit einem Qualifier Signal-Rauschverhältnis größer 3 als LOD gewählt. Dieses Verfahren wurde ebenfalls zur Ermittlung der LODs von CRA-13 und JWH-307 angewendet. Die Berechnung der Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 führte bei allen quantitativ bestimmbaren Analyten zu LLOQs unterhalb des kleinsten Kalibrators. Für alle diese Analyten wurde daher der kleinste Kalibrator als

Bestimmungsgrenze festgelegt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen synthetischen Cannabinoide sind in Tab. 29 zusammengefasst.

**Tab. 29:** Kalibrationsbereich und Nachweisgrenze (LOD) der einzelnen synthetischen Cannabinoide

Analyt	LOD [ng/ml]	Kalibrationsbereich [ng/ml]	Interner Standard
AM-694	0,015	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
AM-1220	0,030	0,15 - 6,0	D5-JWH-200
AM-2201	0,015	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
AM-2233	0,015	0,15 - 6,0	D5-JWH-200
CRA-13	0,600	-	-
JWH-007	0,015	0,15 - 6,0	D9-JWH-007
JWH-015	0,015	0,15 - 6,0	D7-JWH-015
JWH-018	0,015	0,15 - 6,0	D11-JWH-018
AB-001	0,900	3,0 - 60	D9-JWH-210
JWH-019	0,030	0,15 - 6,0	D9-JWH-210
JWH-020	0,030	0,15 - 6,0	D9-JWH-210
JWH-073	0,015	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
JWH-081	0,015	0,15 - 6,0	D9-JWH-081
JWH-122	0,030	0,15 - 6,0	D9-JWH-122
MAM-2201	0,030	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
JWH-200	0,015	0,15 - 6,0	D5-JWH-200
JWH203	0,045	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
JWH-210	0,045	0,15 - 6,0	D9-JWH-210
JWH-250	0,030	0,15 - 6,0	D5-JWH-250
JWH-251	0,016	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
JWH-307	0,030	0,15 - 6,0	-
JWH-387	0,300	3,0 - 120	D9-JWH-210
JWH-398	0,150	0,75 - 30	D9-JWH-210
JWH-412	0,045	0,15 - 6,0	D9-JWH-081
Methanandamid	0,200	0,75 - 30	D9-JWH-007
RCS-4	0,033	0,15 - 6,0	D9-JWH-073
RCS-4 ortho isomer	0,015	0,15 - 3,0	D9-JWH-073
RCS-8	0,030	0,15 - 6,0	D9-JWH-122
WIN 48,098	0,030	0,15 - 6,0	D5-JWH-200
WIN 55,212-2	0,020	0,15 - 6,0	D9-JWH-073

Die Genauigkeit sowie die Intra- und Interday-Impräzision der Methode wurde anhand einer jeweiligen Doppelbestimmung der niedrigen und hohen QC-Probe an acht aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt. Die Genauigkeit wurde als Bias

errechnet und war für alle Analyten bei beiden Konzentrationen geringer als  $\pm 7,5$  %. Die Intra- und Interday-Impräzision lag für alle Analyten bei beiden QC-Proben unterhalb von 8,0 %. Damit erfüllten alle quantitativ erfassbaren Analyten die in den Validierungsrichtlinien geforderten Kriterien für die Genauigkeit (Bias  $\leq \pm 15$  %) und Impräzision ( $\leq 15$  % RSD).

Die Signale aller von der Methode erfassten synthetischen Cannabinoide wurden teilweise stark durch koeluierende Matrixkomponenten supprimiert (ME 87 bis 31 %). Dabei zeigten die eher lipophilen Analyte wie z.B. JWH-020, JWH-387, JWH-398 und CRA-13 die stärkste Ionensuppression. Die Wiederfindungsraten nach Flüssig-flüssig-Extraktion lagen zwischen 86 und 14 %, die Prozesseffektivität zwischen 68 und 4,4 %. Alle nach Matuszewski et al.<sup>[140]</sup> ermittelten Werte für Matrixeffekte (ME), Wiederfindungsraten (RE) sowie die Prozesseffektivität (PE) sind in Tab. 30 und Tab. 31 zusammengestellt.

Die Autosamplerstabilität bei 10 °C wurde durch stündliche Injektion eines Aliquots einer aufgearbeiteten dotierten Leerspeichelprobe über sieben Stunden überprüft. Die Wiederfindungsraten für die einzelnen Analyten lagen dabei zwischen 89 und 105 %. Zur Untersuchung möglicher Carry-Over-Effekte im Autosampler oder der Ionenquelle wurde Leerspeichel, der mit der 50-fachen Konzentration des jeweiligen höchsten Kalibrators dotierter war, analysiert und die in der Messreihe folgenden Leerspeichelproben ausgewertet. Auf diese Weise konnte ein Carry-Over aus hochkonzentrierten Proben in die darauffolgende Analysen ausgeschlossen werden.

**Tab. 30:** Matrixeffekte (ME), Wiederfindungsrate (RE) und Prozesseffektivität (PE) nach Flüssig-flüssig-Extraktion der niedrigen QC-Probe.

Analyt	Konz. [ng/ml]	ME [%]	RSD [%] (n = 5)	RE [%]	RSD [%] (n = 5)	PE [%]	RSD [%] (n = 5)
AM-694	0,3	76,7	4,9	81,3	13,0	62,2	9,5
AM-1220	0,3	75,1	2,3	80,3	11,6	60,3	10,9
AM-2201	0,3	72,8	4,4	76,9	12,1	56,0	13,6
AM-2233	0,3	73,0	3,5	80,3	11,0	58,5	9,9
CRA-13	12	30,9	10,3	14,2	18,6	4,4	18,9
JWH-007	0,3	59,8	5,0	58,6	11,3	35,0	10,2
JWH-015	0,3	72,4	6,2	77,5	10,9	55,9	9,1
JWH-018	0,3	83,1	6,6	62,4	14,4	51,7	12,7
AB-001	6,0	55,0	4,2	43,5	16,5	23,8	13,5
JWH-019	0,3	68,2	5,2	48,6	13,5	32,9	9,2
JWH-020	0,3	57,9	6,9	36,1	18,1	20,7	13,3
JWH-073	0,3	71,5	3,4	72,1	10,6	51,5	9,3
JWH-081	0,3	71,5	5,1	58,9	12,5	41,9	9,4
JWH-122	0,3	66,6	2,9	52,9	10,6	35,2	11,1
MAM-2201	0,3	63,9	6,4	73,2	13,5	46,5	8,5
JWH-200	0,3	77,2	4,2	78,3	10,2	60,3	8,5
JWH203	0,3	75,0	4,1	68,8	11,2	51,2	9,8
JWH-210	0,3	60,8	8,1	40,8	16,5	24,7	15,8
JWH-250	0,3	68,8	5,1	78,0	12,1	53,5	8,7
JWH-251	0,3	68,1	4,1	74,0	10,1	50,4	10,6
JWH-307	0,3	82,2	8,0	43,5	12,5	35,6	8,7
JWH-387	6,0	60,3	6,5	35,0	18,1	21,0	15,4
JWH-398	1,5	59,6	4,7	38,4	16,4	22,8	15,7
JWH-412	0,3	63,4	4,2	53,8	16,8	33,9	13,8
Methanandamid	1,5	71,2	5,9	68,8	15,4	48,8	12,6
RCS-4	0,3	71,8	5,7	76,8	11,4	55,0	9,7
RCS-4 ortho isomer	0,3	71,8	4,2	79,3	12,0	56,8	10,2
RCS-8	0,3	73,0	9,1	56,6	10,9	41,1	7,2
WIN 48,098	0,3	72,1	5,9	77,6	10,5	56,1	14,7
WIN 55,212-2	0,3	71,2	5,5	79,2	10,2	56,3	9,4

**Tab. 31:** Matrixeffekte (ME), Wiederfindungsrate (RE) und Prozesseffektivität (PE) nach Flüssig-flüssig-Extraktion der hohen QC-Probe.

Analyt	Konz. [ng/ml]	ME [%]	RSD [%] (n = 5)	RE [%]	RSD [%] (n = 5)	PE [%]	RSD [%] (n = 5)
AM-694	3,0	80,2	6,3	84,2	11,0	67,3	7,7
AM-1220	3,0	77,0	4,7	81,2	7,9	62,4	6,7
AM-2201	3,0	78,0	6,9	81,4	11,8	63,3	8,8
AM-2233	3,0	77,1	5,0	83,4	7,7	64,2	4,3
CRA-13	120	35,2	7,8	18,5	15,7	6,5	11,9
JWH-007	3,0	67,9	3,6	60,4	16,1	41,,9	15,0
JWH-015	3,0	77,1	6,9	81,1	11,7	62,9	5,9
JWH-018	3,0	87,3	9,9	67,7	16,8	58,7	15,7
AB-001	60	71,5	6,1	56,9	16,8	40,6	14,5
JWH-019	3,0	71,8	9,9	53,8	19,0	38,4	18,2
JWH-020	3,0	65,3	9,5	38,6	20,4	25,1	19,4
JWH-073	3,0	75,7	6,4	75,2	14,4	56,7	11,5
JWH-081	3,0	81,0	14,3	60,8	17,9	83,4	10,7
JWH-122	3,0	74,1	9,9	56,8	13,2	42,1	15,4
MAM-2201	3,0	74,0	7,7	74,3	16,3	54,6	12,5
JWH-200	3,0	79,0	7,4	82,3	8,4	64,8	5,8
JWH203	3,0	79,4	8,5	73,0	14,0	57,6	10,9
JWH-210	3,0	70,6	10,0	41,5	18,9	29,3	20,6
JWH-250	3,0	75,5	5,9	80,5	7,8	60,7	6,8
JWH-251	3,0	73,5	6,69	76,4	11,6	55,9	9,2
JWH-307	3,0	84,7	13,1	48,0	16,3	40,2	13,3
JWH-387	60	66,8	837	40,8	19,2	27,1	18,1
JWH-398	15	67,5	5,7	43,3	19,5	29,2	20,1
JWH-412	3,0	69,2	7,1	57,9	17,0	39,8	14,0
Methanandamid	15	76,2	7,2	71,5	9,1	54,2	5,8
RCS-4	3,0	76,5	7,9	82,9	11,3	62,1	8,8
RCS-4 ortho isomer	3,0	79,0	3,9	85,7	8,6	67,6	7,3
RCS-8	3,0	79,7	9,9	63,5	14,2	50,2	11,0
WIN 48,098	3,0	75,0	9,7	81,5	8,3	60,7	2,0
WIN 55,212-2	3,0	75,6	8,3	81,7	11,1	61,6	8,9

### 4.3.2 Ergebnisse der Lagerstudie

Studien der Firma Dräger sowie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass für eine Vielzahl von Analyten (darunter THC, Cocain, Amphetamin, Morphin und Benzodiazepinen) die Wiederfindungsrate durch Stabilisierung der Probennehmer mit Methanol deutlich erhöht werden kann. Die beladenen Probennehmer wurden in dieser Studie daher analog zu den Versuchen in Kapitel 4.1 jeweils ‚nativ‘ und stabilisiert mit 1 ml Ethanol, worin alle hier untersuchten synthetischen Cannabinoide gut löslich sind, gelagert. Bereits nach 5 Minuten Lagerung konnte ein zum Teil massiver Verlust durch Adsorption an der Oberfläche des Probennehmers (DCD 5000) beobachtet werden. Die Wiederfindungsraten lagen nach 5 min zwischen 77 und 14 % (RSD: 5,1 bis 18,5 %). Bei ‚nativer‘ Lagerung konnten nach drei Tagen bei einem Großteil der Analyten lediglich 5 % der ursprünglich dotierten Menge oder weniger nachgewiesen werden (s. Abb. 28). Die höchsten Wiederfindungsraten von 6 bis 36 % zeigten dabei Analyten mit einer hydrophilen funktionellen Gruppe (z.B. WIN 48,098, WIN 55,212-2 und JWH-200). Die Stabilisierung der Probennehmer mit Ethanol führte zu einer deutlichen Erhöhung der Wiederfindungsrate. So konnte durch die Zugabe von Ethanol und die damit verbundene Verminderung der Adsorptionseffekte eine Wiederfindungsrate von mindestens 43 % erreicht werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Ergebnissen von Coulter et al.<sup>[160]</sup>, die den Quantisal Probennehmer für ihre Methode zum Nachweis von sechs synthetischen Cannabinoiden in Speichel verwendeten und ebenfalls unter nativen Bedingungen geringe Wiederfindung hatten, die sich durch Zugabe von 2-Propanol verbesserte.

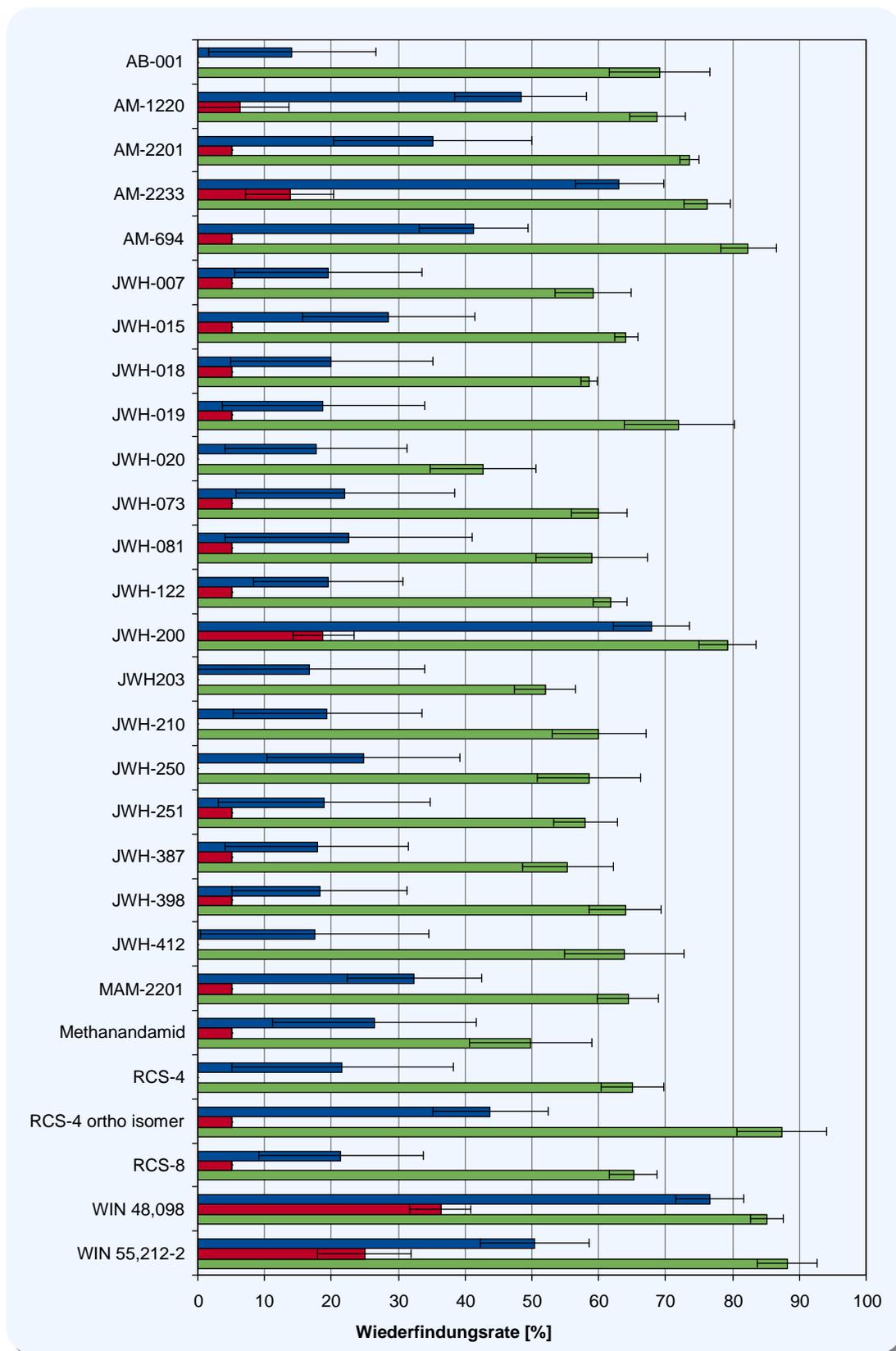
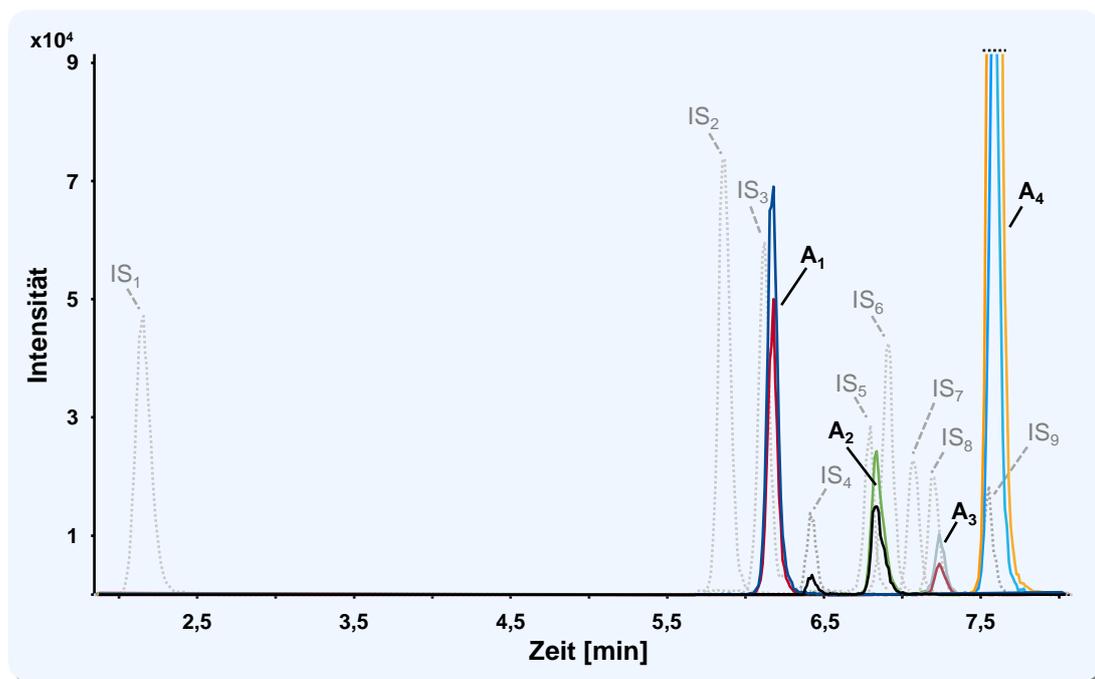


Abb. 28: Wiederfindungsraten (RSD in %, n = 3) nach 5 minütiger, 3-tägiger ‚nativer‘ und 3-tägiger stabilisierter Lagerung

### 4.3.3 Analyse von Realproben

Mit der hier beschriebenen LC-MS/MS Methode wurden bis dato 264 Speichelproben, die zwischen Dezember 2010 und Januar 2012 an unser Labor gesendet wurden, analysiert. Abbildung 29 zeigt das TIC einer Speichelprobe in der die synthetischen Cannabinoide AM-2201, JWH-018, JWH-122 und JWH-210 nachgewiesen wurden.



**Abb. 29:** Totalionenchromatogramm (TIC) einer realen Speichelprobe in der die synthetischen Cannabinoide AM-2201 (A<sub>1</sub>: c = 0,33 ng/ml), JWH-018 (A<sub>2</sub>: c = 0,30 ng/ml), JWH-122 (A<sub>3</sub>: c < 0,15 ng/ml) und JWH-210 (A<sub>4</sub>: c = 12 ng/ml) nachgewiesen wurden (IS<sub>1</sub> - IS<sub>9</sub>: Interne Standards)<sup>[130]</sup>

Die Proben stammten zum größten Teil aus forensisch-psychiatrischen Kliniken (82 %) oder aus Entzugskliniken (16 %). Das Alter der nahezu ausschließlich männlichen Probanden (98 %) lag zwischen 16 und 75 Jahren. Obwohl die Einsender auf den möglichen Verlust von Analyten bei ‚nativem‘ Versand hingewiesen wurden, erreichten der Großteil der Proben das Labor ohne Zugabe von Ethanol. Die Proben wurden nach Probeneingang bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Insgesamt konnten in 31 Proben (12 %) eines oder mehrere der folgenden 12 synthetischen Cannabinoide nachgewiesen werden: JWH-210 (68 %), JWH-122 (55 %), JWH-081 (26 %), AM-2201 (20 %), JWH-019 (7 %), JWH-203 (7 %), RCS-4 (7 %), AM-694 (3 %), JWH-250 (3 %), JWH-307 (3 %) und MAM-2201 (3 %). In Abbildung 4.8 ist beispielhaft das TIC einer realen Speichelprobe, in der JWH-018 (c = 0,30 ng/ml), JWH-122 (c < 0,15 ng/ml), JWH-210 (c = 12 ng/ml) und AM-2201 (c = 0,33 ng/ml) detektiert wurden, abgebildet.

Bei 134 der eingesandten Speichelproben lag eine zeitgleich abgenommenen Blutprobe bei. Für die Analyse der daraus gewonnenen Serumproben wurde eine von Kneisel et al. publizierte LC-MS/MS-Methode verwendet<sup>[131]</sup>. Bei 24 von insgesamt 26 positiven Serumproben konnten in der dazugehörigen Speichelprobe ebenfalls synthetische Cannabinoide nachgewiesen werden (s. Tab. 32). Diese Übereinstimmung war angesichts der hohen Anzahl an nicht stabilisierten Speichelproben und dem damit verbundenen Verlust an Analyt sehr erstaunlich. Die teilweise sehr hohen Speichelkonzentrationen, z.B. in den Fällen 13, 18, 20 und 21, lassen darauf schließen, dass die Oberfläche des Probennehmers gesättigt werden kann und die beschriebenen Adsorptionseffekte somit bei hohen Speichelkonzentrationen nicht so ausschlaggebend sind. Ungeachtet der hohen Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse in Serum und Speichel ist eine Stabilisierung der DCD 5000 Probengeber mit Ethanol vor dem Versand dringend empfohlen.

**Tab. 32:** Ergebnisse der 26 Speichelproben für die zeitgleich abgenommene Serumproben zur Verfügung standen. <sup>ST</sup>Probennehmer mit Ethanol stabilisiert. \*Konzentration lag oberhalb des höchsten Kalibrators und wurde extrapoliert. (Konzentrationsangaben in ng/ml, Se = Serum, OF = Speichel)

ID	Probe	AM-694	AM-2201	JWH-018	JWH-019	JWH-081	JWH-122	JWH-203	JWH-210	JWH-250	MAM-2201	RCS-4
1	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,41	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,28	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,40	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,25	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
5	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,47	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
6	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,82	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,90	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,65	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,3	n.n.	n.n.	n.n.
8	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,10	0,67	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,16	< 0,15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,12	n.n.	n.n.	0,10	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,36	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	n.n.	n.n.
10	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,27	n.n.	n.n.	0,11	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,66	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	n.n.	n.n.

ID	Probe	AM-694	AM-2201	JWH-018	JWH-019	JWH-081	JWH-122	JWH-203	JWH-210	JWH-250	MAM-2201	RCS-4
11	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,13	n.n.	n.n.	< 0,10	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,17	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	n.n.	n.n.
12	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,27	n.n.	< 0,10	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	0,96	n.n.	n.n.	n.n.
13	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,22	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,2*	n.n.	269*	n.n.	n.n.	n.n.
14	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,35	n.n.	n.n.	n.n.
	OF <sup>ST</sup>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	1,80	n.n.	n.n.	n.n.
15	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,26	n.n.	1,0	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,1	n.n.	n.n.	n.n.
16	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,10	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,30	n.n.	n.n.	< 0,15
17	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,8*	n.n.	n.n.	0,68
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,20	n.n.	4,8	n.n.	n.n.	5,3
18	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,10	< 0,15	n.n.	1,4	n.n.	n.n.	0,10
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,1	n.n.	n.n.	54*	n.n.	n.n.	5,0
19	Se	n.n.	0,18	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF <sup>ST</sup>	n.n.	8,6*	0,41	n.n.	n.n.	0,22	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
20	Se	n.n.	0,22	n.n.	n.n.	n.n.	< 0,15	n.n.	1,6	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	0,43	0,48	1,2	n.n.	n.n.	0,23	n.n.	457*	n.n.	n.n.	n.n.
21	Se	n.n.	1,9	n.n.	n.n.	n.n.	4,4*	n.n.	8,3*	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	22*	0,53	< 0,15	n.n.	37*	n.n.	52*	n.n.	n.n.	n.n.
22	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,92	n.n.	n.n.	n.n.
	OF <sup>ST</sup>	n.n.	1,2	< 0,15	n.n.	n.n.	3,5	0,51	154*	n.n.	n.n.	n.n.
23	Se	n.n.	0,33	0,23	n.n.	n.n.	0,37	n.n.	2,0	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	0,33	0,30	n.n.	n.n.	< 0,15	< 0,15	12*	n.n.	n.n.	n.n.
24	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	11*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF <sup>ST</sup>	n.n.	0,44	1,2	0,61	n.n.	381*	n.n.	15*	n.n.	0,41	n.n.
25	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,22	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
26	Se	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,7*	n.n.	n.n.	0,43	0,2	n.n.	n.n.
	OF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Die hohe Anzahl an verschiedenen synthetischen Cannabinoiden in diesem vergleichsweise kleinen Probenkollektiv zeigt, dass bei Analysen zur Abstinenzkontrolle umfangreiche Methoden, die die höchstmögliche Anzahl an synthetischen Cannabinoiden beinhalten, notwendig sind. Angesichts der hohen und ständig wechselnden Anzahl an synthetischen Cannabinoiden, die bereits in

Kräutermischungen oder als sog. „Research Chemicals“ identifiziert wurden, ist es zudem zwingend notwendig, die verwendeten Methoden ständig zu erweitern und den Änderungen des Marktes anzupassen.

#### **4.3.4 Schlussfolgerungen**

Die entwickelte LC-MS/MS-Methode ermöglicht den Nachweis von 30 synthetischen Cannabinoide im Speichel mit Nachweisgrenzen zwischen 0,015 und 0,9 ng/ml und Bestimmungsgrenzen zwischen 0,15 und 3,0 ng/ml. Als Probennehmer wurde der Dräger DCD 5000 verwendet. Die durchgeführte Lagerstudie über 3 Tage zur Simulierung eines ungekühlten Postversandes zeigte, dass es bei nicht stabilisierten Probennehmern bereits nach kurzer Zeit zu irreversiblen Adsorptionseffekten kommt, was mit einem massiven Verlust an Analyt einhergeht. Durch Stabilisierung der Probennehmer mit Ethanol konnten nach drei Tagen Lagerung Wiederfindungsraten größer 43 % erreicht werden.

In 264 untersuchten Speichelproben von Probanden aus Entzugskliniken und forensisch-psychiatrischen Einrichtungen konnten insgesamt 12 verschiedene synthetische Cannabinoide nachgewiesen werden. Bei 26 Speichelproben lagen zusätzlich zeitgleich entnommene Blutproben vor. Obwohl ein Großteil der Probennehmer ohne ethanolische Stabilisierung versandt worden war, stimmten die Ergebnisse der Speichelproben qualitativ zum größten Teil mit den Ergebnissen der zeitgleich entnommenen Blutproben überein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Fällen, in denen keine Blutprobe erhoben werden kann, Speichel als geeignete alternative Matrix zum Nachweis des Konsums synthetischer Cannabinoide herangezogen werden kann und mit dem DCD 5000 - bei stabilisiertem Versand - ein dafür geeigneter Probennehmer für eine einfache und schnelle Probennahme zur Verfügung steht.

### **4.4 Nachweis von Antibiotika in humaner Zahnhartsubstanz**

Bei den drei Patienten der Kontrollgruppe, die keines der beiden Antibiotika eingenommen hatten, konnte weder in der Zahnwurzel/Zahnkrone noch im Alveolarserum Clindamycin bzw. Amoxicillin nachgewiesen werden.

#### **4.4.1 Amoxicillin in der Zahnhartsubstanz**

Nach Gabe von 2 g Amoxicillin zwischen 87 und 145 min ( $96,7 \pm 19,9$  min) vor der Zahnextraktion konnten in allen untersuchten Zahnkronen zwischen 23 und 473 ng/g und in der Zahnwurzel zwischen 21 und 945 ng/g Amoxicillin nachgewiesen werden (siehe Abb. 30). Die mittlere Amoxicillin-Konzentration in der

Wurzel ( $0,5020 \pm 0,29549$ ) war signifikant höher als die mittlere Amoxicillin-Konzentration in der Krone ( $0,1713 \pm 0,15105$ ) (Einfache ANOVA, 5 % Signifikanzniveau,  $p = 0,001$ ).

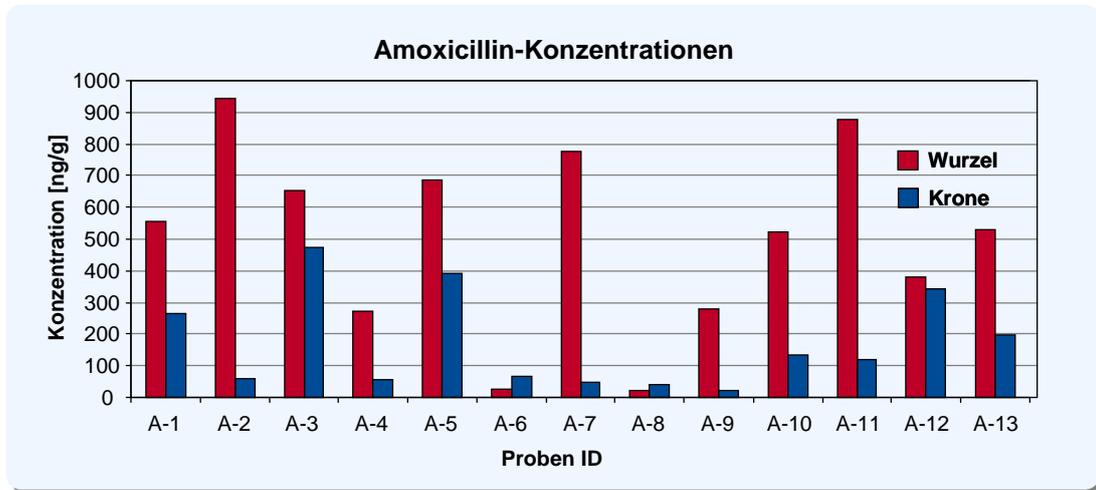


Abb. 30: Amoxicillin-Konzentrationen in Zahnkrone und -Wurzel nach Gabe von 2 g Amoxicillin

Von den 13 Patienten mit Amoxicillin-Gabe konnte bei 11 Patienten direkt nach der Zahnextraktion Blut aus der Alveole asserviert werden. Die im daraus gewonnenen Serum nachgewiesenen Amoxicillin-Konzentrationen sowie die Zeit zwischen Medikamentengabe und Zahnextraktion sind in Tab. 33 aufgelistet. Die Amoxicillin-Konzentration lag zwischen 2,5 und 32,5  $\mu\text{g/ml}$  ( $18,2 \pm 10,4 \mu\text{g/ml}$ ).

Tab. 33: Amoxicillin-Konzentrationen in Zahnkrone, -Wurzel und Alveolarserum nach Gabe von 2 g Amoxicillin sowie der Zeitraum zwischen Amoxicillin-Gabe und Zahnextraktion ( $t_{\text{Gabe}}$ )

Proben ID	Konz. Krone [ng/g]	Konz. Wurzel [ng/g]	Konz. Serum [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$t_{\text{Gabe}}$ [min]
A-1	264	556	-	95
A-2	60	945	27	90
A-3	473	654	10,9	100
A-4	55	272	11,1	87
A-5	393	686	26,2	97
A-6	67	27	2,5	100
A-7	50	777	25,8	95
A-8	42	21	3,1	67
A-9	23	279	32,5	75
A-10	136	522	20,8	102
A-11	120	877	26,9	122
A-12	345	381	-	82
A-13	199	529	13,4	145

Aus den Ergebnissen einiger Proben könnte man auf eine Abhängigkeit der Konzentrationen vom Körpergewicht des Probanden schließen. So war die Serum- und Zahnwurzelkonzentrationen bei den Patienten A-9 und A-3 (Körpergewicht 56 bzw. 86 kg) bei ähnlicher Dauer zwischen Amoxicillin-Gabe und Zahnextraktion höher als bei Patienten mit höherem Körpergewicht (A-8, 109 kg; A-4, 105 kg). Um eine sichere Aussage über diesen Zusammenhang treffen zu können, wäre jedoch ein größeres Patientenkollektiv notwendig.

#### 4.4.2 Clindamycin in der Zahnhartsubstanz

Nach Gabe von 600 mg Clindamycin zwischen 69 und 145 min ( $98,4 \pm 21,9$  min) vor der Zahnextraktion konnten in allen untersuchten Zahnkronen zwischen 31 und 140 ng/g und in der Zahnwurzel zwischen 11 und 837 ng/g Clindamycin nachgewiesen werden (siehe Abb. 31).

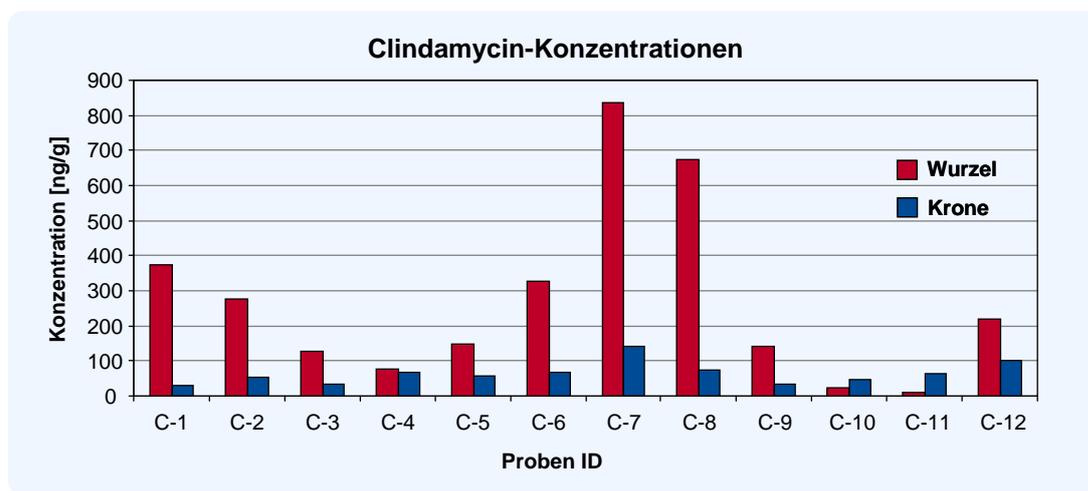


Abb. 31: Clindamycin-Konzentrationen in Krone und Wurzel nach Gabe von 600 mg Clindamycin

Die mittlere Clindamycin-Konzentration in der Wurzel ( $269,67 \pm 255,21$  ng/mg) war signifikant höher als die mittlere Clindamycin-Konzentration in der Krone ( $63,92 \pm 31,25$  ng/mg) (Einfache ANOVA, 5 % Signifikanzniveau,  $p = 0,01$ ).

Von den 12 Patienten mit Clindamycin-Gabe konnte bei 10 Patienten direkt nach der Zahnextraktion Blut aus der Alveolare asserviert werden. Die im daraus gewonnen Serum nachgewiesenen Clindamycin-Konzentrationen sowie die Zeit zwischen Medikamentengabe und Zahnextraktion sind in Tab. 34 aufgelistet. Die Clindamycin-Konzentrationen lagen zwischen 5,1 und 16,3  $\mu\text{g/ml}$  ( $9,53 \pm 3,75$   $\mu\text{g/ml}$ ). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration und der seit Einnahme verstrichenen Zeit ( $t_{\text{Gabe}}$ ) bzw. zwischen Konzentration und Körpergewicht festgestellt werden.

**Tab. 34:** Clindamycin-Konzentrationen in Zahnkrone, -Wurzel und Alveolarserum nach Gabe von 600 mg Clindamycin sowie der Zeitraum zwischen Clindamycin-Gabe und Zahnextraktion ( $t_{\text{Gabe}}$ )

Proben ID	Konz. Krone [ng/g]	Konz. Wurzel [ng/g]	Konz. Serum [µg/ml]	$t_{\text{Gabe}}$ [min]
C-1	31	373	-	77
C-2	52	277	10,0	87
C-3	32	128	-	80
C-4	67	76	6,4	92
C-5	58	150	-	72
C-6	67	326	12,0	69
C-7	140	837	12,6	118
C-8	73	673	10,7	145
C-9	35	142	5,1	95
C-10	47	24	6,5	85
C-11	63	11	6,2	73
C-12	102	219	16,3	80

#### 4.4.3 Schlussfolgerungen der Studie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Amoxicillin und Clindamycin in Zahnkronen und -Wurzeln von Patienten nachgewiesen, die vor einer Zahnextraktion die im jeweiligen Fall indizierte Menge an Amoxicillin (2 g) bzw. Clindamycin (600 mg) peroral aufgenommen hatten. Mit der hier vorgestellten Methode konnten in allen untersuchten Zahnproben ( $n = 25$ ) Amoxicillin bzw. Clindamycin nachgewiesen werden.

In der Literatur wird bereits die Einlagerung von Amoxicillin<sup>[161-163]</sup> und Clindamycin<sup>[164-166]</sup> in den Knochen beschrieben. Die Diffusion von Antibiotika in ein Gewebe wird vom Grad der Durchblutung des Gewebes beeinflusst<sup>[167]</sup>. Knochen wird demnach als wenig durchblutet, die Zahnhartsubstanz als sehr wenig durchblutet klassifiziert. Ebenso wurde bereits von Otten et al. Penicillin G nach einmaliger IV-Gabe (5 Millionen bzw. 10 Millionen IU) im Unterkieferknochen nachgewiesen<sup>[168]</sup>. Die Penicillin G Konzentrationen im Knochen betragen dabei 3,9 % (nach Gabe von 5 Millionen IU) bzw. 4,8 % (nach Gabe von 10 Millionen IU) der jeweiligen Serum-Konzentrationen. Dabei ist die Verteilung von Penicillin G in die Zahnhartsubstanz ungefähr vergleichbar mit der Verteilung in den kortikalen Knochen<sup>[168]</sup>. In dieser Studie konnten für Amoxicillin und Clindamycin mit jeweils 2,8 % der jeweiligen Alveolarserum-Konzentration ähnliche Konzentrations-Verhältnisse zwischen Zahnwurzel und Alveolarserum ermittelt werden.

Wie in Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 gezeigt, war die mittlere Amoxicillin- und Clindamycin-Konzentration in der Zahnwurzel signifikant höher als in der Zahnkrone. Dies lässt sich vermutlich durch die unterschiedlich starke Durchblutung und den unterschiedlichen histologischen Aufbau von Zahnkrone- und -wurzel erklären (s. Kapitel 1.1.2). So verfügt der Zahnschmelz weder über eine direkte Versorgung durch Blutgefäße noch über die im Dentin vorkommenden flüssigkeitsgefüllten Kanälchen und ist somit weniger permeabel als das Dentin.

Neben der Diffusion aus der Pulpa bzw. dem umliegenden peridontalen Gewebe besteht zudem die Möglichkeit, dass Antibiotika aus dem die Zahnkrone umgebenden Speichel bzw. der zervikalen Sulkusflüssigkeit, die in den Zahnfleischtaschen sezerniert wird, in die Zahnhartsubstanz eingelagert werden. Einen Hinweis darauf, dass dieser Einlagerungsweg für die hier untersuchten Antibiotika wenn überhaupt nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt, ergibt sich aus den Analyseergebnissen der Probe C-2 (s. Tab. 34). Bei dieser Probe handelt es sich um den einzigen Zahn der Studie, der das Zahnfleisch noch nicht durchbrochen hatte. Somit waren sowohl Wurzel als auch Krone komplett von Zahnfleisch umgeben und die Krone hatte keinen Kontakt mit Speichel bzw. Sulkusflüssigkeit. Dennoch konnten in Krone und Wurzel ähnliche Clindamycin-Verhältnisse wie in den übrigen Proben ermittelt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Diffusion aus der Pulpa bzw. dem umliegende Gewebe den Haupteinlagerungsweg von Clindamycin und Amoxicillin in die Zahnhartsubstanz darstellt. Wang et al. kommen bei ihrer Untersuchung von Ampicillin in den Zahnwurzelkanälen von Hunden unter Berücksichtigung der Existenz einer nicht-permeablen Barriere zwischen Dentin und Zahnzement zur gleichen Schlussfolgerung<sup>[169]</sup>.

Für die erfolgreiche Prophylaxe einer bakteriellen Entzündung der Herzklappen bzw. anderer Gewebe ist eine ausreichend hohe Serumkonzentration von Amoxicillin bzw. Clindamycin notwendig. Die Wirkung der hier festgestellten Antibiotika-Konzentrationen direkt im Zahn ist bisher unbekannt. Eine erste Abschätzung möglicher bakteriostatischer Effekte kann durch Vergleich der jeweiligen Antibiotika-Konzentration mit der für bestimmte Keime der Mundflora bekannten minimalen Hemmkonzentration (MHK 90) durchgeführt werden. Die in der Zahnwurzel nachgewiesenen Amoxicillin-Konzentrationen bzw. die mittlere Clindamycin-Konzentration lagen über der jeweiligen MHK90 von *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum* und *Streptococcus mutans*<sup>[141, 142]</sup>. Da Bakterien an Zähnen einen Biofilm bilden, sind für einen therapeutischen Effekt sicherlich lokale Antibiotika-Konzentrationen deutlich

oberhalb der MHK notwendig. Diese notwendigen Konzentrationen in der Zahnhartsubstanz konnten in dieser Studie nicht erreicht werden. Zum Nachweis eines positiven Effektes der hier nachgewiesenen Amoxicillin- und Clindamycin-Konzentrationen sind weitere systematische Untersuchungen, eventuell unter Einbeziehung von in-vitro Versuchen mit Modelorgansimen, erforderlich.

## ***4.5 Untersuchungen zur Einlagerung von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in die Zahnhartsubstanz***

### **4.5.1 Ergebnisse und Diskussion der Versuche 1 - 4**

#### **Versuch 1**

Nach einmaliger Demineralisation nach Buskes et al.<sup>[146]</sup> konnten weder im Zahnschmelz noch im Dentin mit keiner der hier angewendeten Extraktionsmethoden (einfache methanolische Extraktion bzw. methanolische Extraktion kombiniert mit Festphasenextraktion) Spuren der Modellsubstanzen nachgewiesen werden.

In diesem ersten Versuch zur Einlagerung von Drogen in Schmelz und Dentin wurde ein einfacher Versuchsaufbau mit nur einem Demineralisations-Schritt verwendet, um festzustellen, ob sich durch einfache Diffusion aus der wässrigen Lösung überhaupt Substanzen in die Zahnhartsubstanz einlagern. Nach siebentägiger Lagerung der Pellets in der wässrigen Drogenlösung konnte jedoch keine der Modellsubstanzen mittels GC-MS nachgewiesen werden. Eine Einlagerung in die Zahnhartsubstanz über simple Diffusion findet daher – falls überhaupt – nur in sehr geringem Ausmaß statt.

#### **Versuch 2**

Zur Klärung ob die Oberflächenstruktur der verwendeten Dentinpellets Einfluss auf die Einlagerung von Analyten in die Zahnhartsubstanz hat, wurden im zweiten Versuch Wurzelproben nach drei verschiedenen, definierten Oberflächenbehandlungen verwendet. Es wurden je zwei Proben mit der Bezeichnung Vite, WK und WK-EDTA hergestellt (s. Kapitel 3.5.2.1). Die Analyse erfolgte mittels GC-MS, die semi-quantitative Auswertung anhand matrixfreier Kalibratoren.

Es konnten unabhängig von der Art der Oberflächenbehandlung in allen Proben Spuren an MDMA, Morphin, Codein und Benzoylcegonin nachgewiesen werden.

Die nach Rückrechnung auf die verwendete Einwaage-Menge ermittelten Konzentrationen sind in Tab. 35 zusammengefasst.

Mit der hier verwendeten Methode konnten in Dentin keine oberflächenabhängigen Konzentrationsunterschiede nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich nach Behandlung des Wurzelkanals mit einer Herdström-Feile (ISO Gr. 25) nach 10 Tagen Lagerung in wässriger Drogenlösung einzelne der verwendeten Modellsbstanz in die Zahnhartsubstanz einlagern.

**Tab. 35:** Semi-quantitative Ergebnisse der einzelnen Dentin-Proben nach unterschiedlicher Oberflächenbehandlung. (n.n.: nicht nachweisbar)

<b>Analyt</b>	<b>Vite 1</b> [pg/mg]	<b>Vite 2</b> [pg/mg]	<b>WK 1</b> [pg/mg]	<b>WK 2</b> [pg/mg]	<b>WK-EDTA 1</b> [pg/mg]	<b>WK-EDTA 2</b> [pg/mg]
Amphetamin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Methamphetamin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	27	27	24	28	31	30
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Morphin	23	23	20	20	29	25
Codein	19	25	n.n.	17	25	18
Cocain	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	50	58	43	45	56	50

Zum Nachweis von THC und THC-Carbonsäure ist auf Grund ihrer Lipophilie und anderer physiko-chemischen Eigenschaften eine zweite Analysenmethode, d.h. zusätzliches Probenmaterial, notwendig. Nach den negativen Ergebnissen der GC-MS Analysen des ersten Versuchs wurde von einer weiteren Analyse der Proben auf THC abgesehen und das gesamte Probenmaterial für die Untersuchung der Einlagerung der basischen Modellsbstanz verwendet. Diese Gruppe umfasst eine größere Anzahl an Substanzen, deren Missbrauch - im Gegensatz zu THC-Konsum - bei Todesfällen von Drogenkonsumenten öfters als todesursächlich angesehen wird.

Nach den negativen Ergebnissen des ersten Versuches sollten in diesem Versuch die Einflüsse verschiedener Zahnbehandlungen auf die Einlagerung untersucht werden. Die durchgeführten Bearbeitungsschritte entsprechen vereinfacht der Durchführung einer Wurzelkanalbehandlung während derer u.a. das Pulpengewebe aus dem Wurzelkanal entfernt wird. EDTA wird dabei zur Entfernung der bei der Bearbeitung des Wurzelkanals entstehenden Schmierschicht verwendet und öffnet somit die vom Wurzelkanal abgehenden

Dentinkanälchen<sup>[43]</sup>. In diesem Versuch konnten nun erstmalig MDMA, Morphin, Codein und Benzoyllecgonin im Dentin nachgewiesen werden. Die nach den drei verschiedenen Bearbeitungsschritten ermittelten Konzentrationen können jedoch bestenfalls als semiquantitative Werte betrachtet werden. Die Hypothese, dass nach Entfernung aller Gewebereste (Proben WK1 und WK2) durch die dabei entstehende Schmierschicht weniger Analyt in das Dentin diffundiert, kann durch die leicht höheren Konzentrationen nach der EDTA-Behandlung (Proben WK-EDTA 1 und WK-EDTA 2) nicht sicher bestätigt werden. Trotzdem wurden bei der Herstellung aller zukünftigen Pellets sämtliche Gewebereste aus dem Wurzelkanal entfernt und der Zahn mit EDTA gespült.

Dieser Versuch zeigt deutlich die Grenzen der hier verwendeten GC-MS-Analytik so dass für alle weiteren Untersuchungen eine sensitivere LC-MS/MS Methode entwickelt wurde.

### **Versuch 3**

Die Dentin- und Schmelzpellets wurden in diesem Versuch erstmalig nach der Demineralisierung für 6 Tage in einer die Modellschubstanzen enthaltenden Remineralisationslösung inkubiert.

Zur Untersuchung ob die Temperatur während des Mahlvorgangs in der Kugelmühle Einfluss auf die Analytkonzentration in der Zahnhartsubstanz hat, wurde ein Teil der vorbereiteten Pellets bei Raumtemperatur, ein anderer bei Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemahlen. Die Analyse der Extrakte erfolgte mittels LC-MS/MS, eine Konzentrationsabschätzung wurde anhand der Peakfläche des jeweiligen deuterierten Standards durchgeführt.

Die semi-quantitativen Ergebnisse in Tabelle 36 zeigen, dass bei den nachweisbaren Modellschubstanzen der Energieeintrag bei einem nicht gekühltem Mahlvorgang in der Kugelmühle zu einem Verlust von Analyten führt. Zudem ergeben sich in diesem Versuch erste Hinweise darauf, dass auf Grund des jeweiligen physiko-chemischen Aufbaus in den Schmelz weniger Analyten eingelagert werden als in das Dentin.

**Tab. 36:** Semi-quantitative Ergebnisse der Schmelz- und Dentin-Proben nach Remineralisierung und unterschiedlichen Temperaturen beim Mahlen (n.n.: nicht nachweisbar)

Analyt	Dentin	Dentin	Schmelz	Schmelz
	Raumtemperatur [pg/mg]	N <sub>2</sub> -Kühlung [pg/mg]	Raumtemperatur [pg/mg]	N <sub>2</sub> -Kühlung [pg/mg]
Amphetamin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Methamphetamin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	8	28	5	6
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Morphin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	1	3	n.n.	n.n.
Cocain	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	6	27	n.n.	n.n.

In diesem Versuch wurde der Versuchsaufbau des ersten Versuchs um einen Remineralisationsschritt erweitert und die Zahn-Pellets (Dentin und Schmelz) für sechs Tage in einer wirkstoffhaltigen Remineralisationslösung gelagert. Mit LC-MS/MS konnte im Dentin MDMA, Codein und Benzoylcegonin, im Schmelz lediglich MDMA nachgewiesen werden. Dieser Versuch liefert die ersten Hinweise, dass auf Grund des jeweiligen physiko-chemischen Aufbaus in den Schmelz weniger Analyten eingelagert werden als in das Dentin.

In diesem Versuch wurde zudem die Auswirkung der Temperatur beim Mahlvorgang in der Kugelmühle untersucht. Die Kühlung der Kugelmühle mit flüssigem Stickstoff erwies sich bei den nachweisbaren Substanzen als vorteilhaft und wurde daher bei allen weiteren Versuchen angewandt.

#### Versuch 4: pH-Cycling und Extraktionsversuche

In diesem Versuch wurde zur Simulation der natürlichen De- und Remineralisationsphasen in der Mundhöhle ein pH-Cycling über neun Tage durchgeführt (s. Kapitel 3.5.2.1). Ausgehend von den Ergebnissen aus Versuch 3 wurden alle Pellets unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemahlen. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS/MS.

Da die Einlagerung von Analyten in die Zahnhartsubstanz nicht quantitativ stattfindet, ist die Bestimmung der Extraktionsausbeute auf herkömmliche Art nicht möglich. Zur Abschätzung der Extraktionsausbeute wurden Dentin- und Schmelzpellets unter Stickstoff-Kühlung gemahlen, das Pulver viermal hintereinander (LE 1 bis LE 4) mit 500 µl Methanol für 30 min extrahiert (s. Kapitel 2.4.5.1) und die Extrakte jeweils mit LC-MS/MS analysiert und die in jedem Extraktionsschritt extrahiert Menge quantifiziert. Zu Vergleichszwecken wurde die

extrahierte Menge der Extraktion LE 1 einer Extraktionsausbeute von 100 % gleichgesetzt. Für die beiden Matrices ergaben sich die in Abb. 32 und Abb. 33 dargestellten Extraktionsausbeuten.

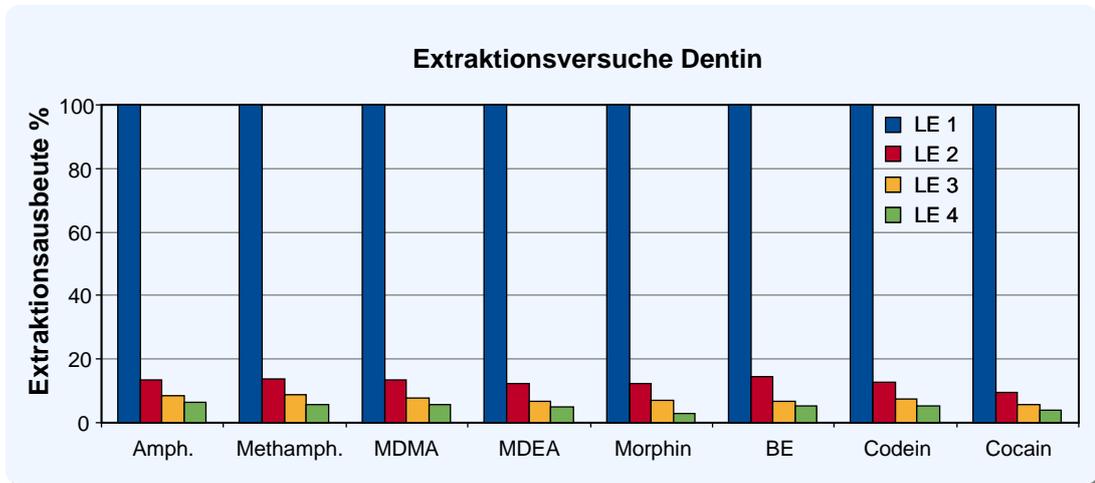


Abb. 32: Extraktionsausbeute im Dentin bei vier aufeinanderfolgenden Extraktionen LE 1 bis LE4

Wie in Abbildung 32 gezeigt, konnten nach einmaliger methanolischer Extraktion alle Modellsubstanzen im Dentin nachgewiesen werden. Die hier jeweils nachgewiesene Menge wurde zum Vergleich mit den weiteren Extraktionsschritten als 100 % Extraktionsausbeute gesetzt (LE 1 = 100 %). Im zweiten Extraktionsschritt konnten nochmals zwischen 10 und 15 % der bei LE 1 extrahierten Analytmenge extrahiert werden. Bei den darauffolgenden Extraktionsschritten LE 3 und LE 4 lag die Extraktionsmenge jeweils unter 10 %. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die methanolische Extraktion des Zahnpulver in zwei Schritten mit 500 µl bzw. 100 µl Methanol durchgeführt und die beiden Überstände zur weiteren Probenaufarbeitung vereint (s. Kapitel 2.4.5.1).

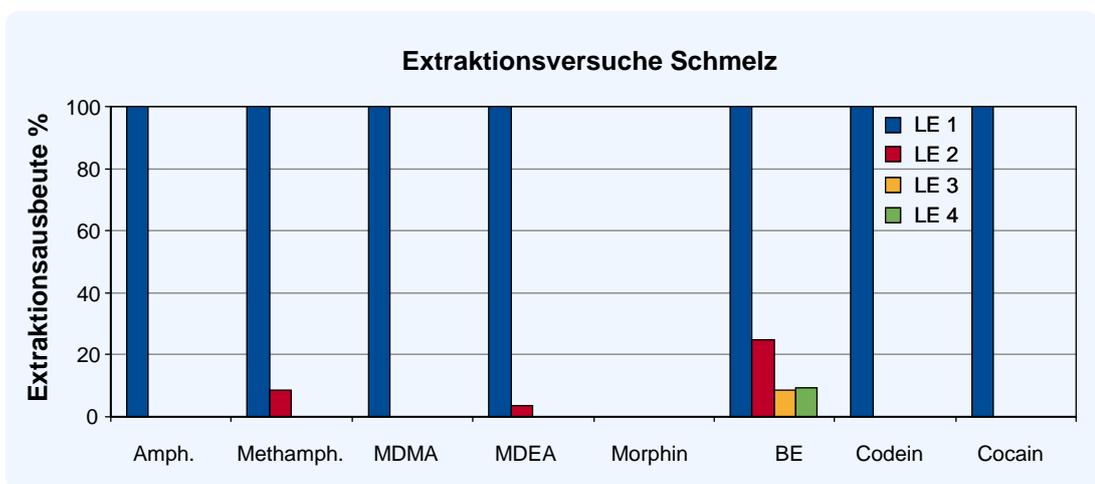


Abb. 33: Extraktionsausbeute im Schmelz bei vier aufeinanderfolgenden Extraktionen LE 1 bis LE4

Im Schmelz konnten nach pH-cycling bis auf Morphin alle Modellschubstanzen nachgewiesen werden. Abb. 33 zeigt, dass sich bis auf Benzoylcegonin alle in den Schmelz eingelagerten Modellschubstanzen durch eine einmalige Extraktion (500 µl Methanol, 30 min) nahezu vollständig extrahieren lassen. In den Proben der Extraktion LE 2 konnten neben Benzoylcegonin lediglich geringe Mengen Methamphetamin und MDEA nachgewiesen werden. Die für die Dentinpellets angewandte zweistufige Extraktion (500 µl Methanol, 30 min; 100 µl Methanol, 10 min) ist demnach auch für Schmelzproben ausreichend. Die semi-quantitative Auswertung erfolgte mittels matrixfreier Kalibratoren (s. Tab. 37 ).

**Tab. 37:** Ergebnisse der Schmelz- und Dentin-Proben nach 9-tägigem pH-Cycling. (n.n.: nicht nachweisbar)

<b>Analyt</b>	<b>Dentin</b> [ng absolut]	<b>Schmelz</b> [ng absolut]
Amphetamin	2,8	0,2
Methamphetamin	2,5	0,2
MDMA	2,6	0,2
MDEA	1,5	0,1
Morphin	2,2	n.n.
Codein	1,3	0,1
Cocain	2,2	0,05
Benzoylcegonin	0,6	Spur < 0,025

Dazu wurden sieben Kalibratoren (0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,5 ng) analog zu den Proben unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand in 100 µl Laufmittel aufgenommen. Der kleinste Kalibrator 0,025 ng konnte bei allen acht Analyten mit einem Signal-Rausch-Verhältnis  $S/N > 3$  nachgewiesen werden.

Umgerechnet auf die eingesetzte Menge (Dentin: 52,10 mg; Schmelz: 49,98 mg) ergeben sich daraus die in Abb. 34 dargestellten Konzentration in der Zahnmatrix. Mittels LC-MS/MS konnten in Dentin und Schmelz unterschiedliche Mengen der Modellschubstanzen nachgewiesen werden. Die Schmelz-Konzentration ist dabei bei allen Analyten um ca. Faktor 10 geringer als im Dentin. Morphin konnte im Schmelz überhaupt nicht nachgewiesen werden. Keine der gemessenen Dentin- und Schmelz-Leerproben bzw. -Nullproben zeigten eine Störung der Selektivität durch Matrixbestandteile. Durch die Art der Zahnentnahme und der Präparation der Zahnhartsubstanz-Pellets konnte zum Zeitpunkt der Analyse jedoch nicht mehr ermittelt werden, von wie vielen verschiedenen Tieren oder Zähnen die verwendeten Pellets stammten.

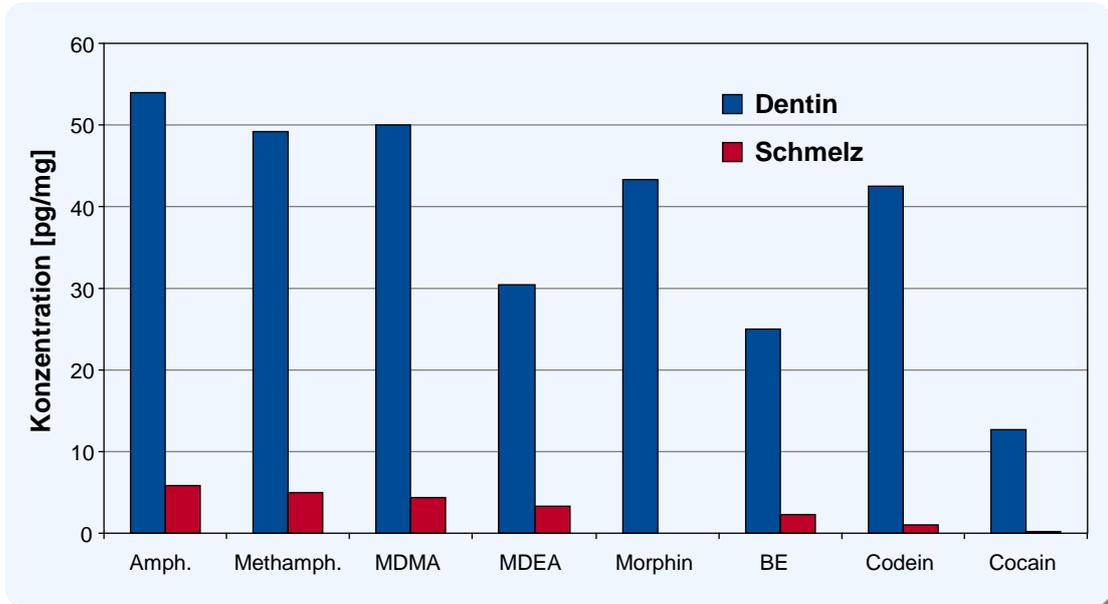


Abb. 34: Analyt-Konzentrationen in Dentin (blau) und Schmelz (rot) nach 9 tägigem pH-Cycling

Das in diesem Versuch durchgeführte pH-Cycling simuliert den durch von Mikroorganismen produzierten Säuren, der Pufferwirkung des Speichels, sowie durch die Aufnahme von Speisen und Getränken beeinflussten Wechsel des pH-Werte in der Mundhöhle. Für die Demineralisation, d.h. das Herauslösen von Mineralien aus der Zahnhartsubstanz wird für Schmelz ein pH von 5,2 - 5,7 und für Dentin von 6,2 - 6,7 angegeben<sup>[43, 48]</sup>. Die gewählten De- und Remineralisationszyklen sind dabei dem Tagesablauf des Menschen nachempfunden und ermöglichen daher eine realistischere Einlagerung der Analyten als die bisherigen Versuche. Da die Modellsubstanzen nicht quantitativ in die jeweilige Zahnhartsubstanz eingelagert werden können, war die Bestimmung der Extraktionsausbeute analog zur Bestimmung der Extraktionsausbeute aus Körperflüssigkeiten nicht möglich. Zur Abschätzung der Effektivität der verwendeten methanolischen Extraktion wurde daher eine Mehrfach-Extraktion durchgeführt und die jeweilige Ausbeute mit derjenigen der ersten Extraktion verglichen. Die Versuche mit einem Teil der Proben des pH-Cycling-Experiments zeigten, dass mit einer zweistufigen methanolischen Extraktion der Proben, ca. 90 % der eingelagerten Substanzen aus Dentin extrahiert werden konnten. Bei Schmelzproben konnten - außer bei Methamphetamin, MDEA und Benzoyllecgonin - bereits beim 2ten Extraktionsschritt keine nachweisbaren Analytmengen mehr extrahiert werden. Eine 2-stufige methanolische Extraktion wurde daher für die hier bearbeitete Fragestellung als zweckmäßig erachtet.

Die Ergebnisse des pH-Cycling-Experiments bestätigen die Hypothese, dass sich auf Grund der physiko-chemischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes, die Modellsubstanzen deutlich besser in das Dentin einlagern als in den Zahnschmelz. Bei Schmelz handelt es sich um ein kristallines Gefüge, während Dentin ein organisches, eher poröses Gewebe ist. Daher erscheint es durchaus plausibel, dass die im Dentin nachgewiesenen Konzentrationen im Schnitt um den Faktor 10 höher lagen als im Schmelz.

Dies entspricht den Ergebnissen von Marin et al., die bei Untersuchungen der Einlagerung von Blutpigmenten in die Zahnhartsubstanz im Dentin deutlich mehr Pigmente nachweisen konnten als im Schmelz<sup>[60]</sup>. Kwon et al.<sup>[170]</sup> beobachteten die Ausbreitung von Farbstoffen in den Zähnen entlang der Dentinkanälchen und entlang der interprismatischen Substanz im Schmelz.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch die hier verwendeten Modellsubstanzen sich entlang dieser Strukturen in der Zahnhartsubstanz verteilen. Diese würde sowohl die höheren Dentin-Konzentrationen aller Modellsubstanzen als auch deren schlechtere Extrahierbarkeit aus Dentin erklären, da sich die Substanzen anhand der weitläufigen Dentinkanälchen besser im porösen Dentin verteilen.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen lassen keine Rückschlüsse zu, warum Morphin im Schmelz nicht nachgewiesen werden konnte. Der positive Nachweis in Dentin, die Verwendung eines deuterierten Analogons als internen Standard sowie der positive Nachweis in dotierten Leerzahnproben, schließen einen analytischen Fehler aus. Die hier vorgestellte LC-MS/MS-Methode ist generell geeignet, die für diesen Pilotversuch verwendeten Substanzen im Pikogramm-Bereich zu detektieren und quantifizieren. Daraus folgt, dass Morphin - eventuell auf Grund seines amphoteren Charakters - entweder nicht dauerhaft in den Zahnschmelz eingelagert wird, oder sich mit der hier verwendeten Extraktionsmethode nicht aus dem Schmelz extrahieren lässt.

#### **4.5.2 Ergebnisse und Diskussion der untersuchten humanen Zahnproben**

Für die Analyse der Zahnproben wurde für jeden der drei Fälle eine separate Methode erstellt, die jeweils um die in der toxikologischen Routine-Untersuchung von Blut, Urin und Mageninhalt gefundenen Analyten erweitert wurde.

Weiterhin wurden - falls vorhanden - Haarproben des Verstorbenen mittels GC-MS auf basische Drogen untersucht. Diese quantitative Routine-Methode deckt die im Versuch verwendeten acht Modellschmelzsubstanzen sowie Methadon und EDDP ab.

Zusätzlich wurden die Haarproben mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Toxyper-Screening auf weitere Drogen und Medikamente untersucht.

Von den Zähnen wurden jeweils kariöse (C) und nicht-kariöse Proben im Bereich der Zahnwurzel (W) gewonnen (s. Kapitel 3.5.2.2) und beide Proben mit der in Kapitel 2.4.5.4 beschriebenen Methode analysiert.

#### *4.5.2.1 Fall 1*

Im ersten Fall (GS 314-10) wurden je ein molarer und ein prämolares Zahn des Oberkiefers asserviert. Als Todesursache wurde eine Intoxikation mit Doxepin festgestellt. Zudem war bekannt, dass der Mann seit längerer Zeit mit Methadon substituiert wurde.

In allen vier Zahnproben konnten Doxepin und sein Metabolit Nordoxepin, Methadon, EDDP, Paracetamol, Coffein, Nicotin und in drei Proben (1W, 2W und 2C) Paracetamol nachgewiesen werden. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen der forensisch-toxikologischen Untersuchungen im Rahmen der Todesfall-ermittlungen.

In der Zahnhartsubstanz konnte zudem Diazepam, sein Metabolit Nordazepam und Methamphetamin nachgewiesen werden. In Probe GS 3140-2C konnte kein Nordazepam und kein Methamphetamin detektiert werden. Dies könnte auf die geringe Probenmenge von lediglich 4 mg kariösem Material zurückzuführen sein. In den Routineuntersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf die Einnahme dieser Stoffe in engem zeitlichem Zusammenhang mit der Probennahme.

Da in diesem Fall kein Kopfhaar zur Analyse zur Verfügung stand, können keine Aussagen über einen weiter zurückliegenden Konsum von Methamphetamin oder Diazepam gemacht werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Analysenergebnisse der Zahnhartsubstanzproben mit den Ergebnissen der Routineuntersuchungen übereinstimmen und zu dem Gesamtbild des Falles passen. Die Ergebnisse der einzelnen Analysen sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

**Tab. 38:** Ergebnisse der Zahnuntersuchungen sowie der forensisch-toxikologischen Routineanalytik im Fall GS 314-10 (C: kariöse Proben, W: nicht-kariöse Proben)

Analyt	GS314-1W (50,2 mg)	GS314-2W (49,8 mg)	GS314-1C (61,6 mg)	GS314-2C (4,0 mg)	Routine- Untersuchung
Amphetamin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Methamphetamin	pos	pos	pos	n.n.	n.n.
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Morphin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Doxepin	pos	pos	pos	pos	pos
Nordoxepin	pos	pos	pos	pos	pos
Diazepam	pos	pos	pos	pos	n.n.
Nordazepam	pos	pos	pos	n.n.	n.n.
Oxazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Temazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Methadon	pos	pos	pos	pos	pos
EDDP	pos	pos	pos	pos	pos
Coffein	pos	pos	pos	pos	pos
Nicotin	pos	pos	pos	pos	pos
Paracetamol	pos	pos	Spur	pos	pos

#### 4.5.2.2 Fall 2

Bei diesem Fall (GS 348-10) konnten in der forensisch-toxikologischen Routine-Untersuchung der Leichenasservate Amphetamin, THC, Opipramol, GHB und Benzodiazepine (Diazepam und Metaboliten) im Blut nachgewiesen werden. Der Tod wurde im vorliegenden Fall als Folge der in toxisch-letalener Konzentration nachgewiesenen Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) erklärt. Die zusätzliche Aufnahme erheblicher Mengen Alkohol und die Überdosierung mit dem Antidepressivum Opipramol haben den Todeseintritt begünstigt. Es wurden zwei molare Zähne des Oberkiefers asserviert und jeweils kariöse und karies-freie Proben daraus gewonnen.

**Tab. 39:** Ergebnisse der Zahnuntersuchungen sowie der forensisch-toxikologischen Routineanalytik im Fall GS 348-10 (C: kariöse Proben, W: nicht-kariöse Proben)

Analyt	GS348-2W (53,2 mg)	GS348-3W (51,5 mg)	GS348-2C (5,5 mg)	GS348-3C (1,6 mg)	Routine- Untersuchung
Amphetamin	pos	Spur	n.n.	n.n.	pos
Methamphetamin	pos	pos	n.n.	n.n.	n.n.
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Morphin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	pos	pos	pos ?	pos	n.n.
Doxepin	pos	n.n.	pos	pos	n.n.
Nordoxepin	pos	n.n.	pos	pos	n.n.
Diazepam	pos	pos	pos	pos	pos
Nordazepam	pos	pos	pos	pos	pos
Oxazepam	pos	n.n.	pos	pos	pos
Temazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	pos
Methadon	pos	n.n.	pos	pos	n.n.
EDDP	n.n.	n.n.	pos	pos	n.n.
Coffein	pos	pos	pos	pos	pos
Nicotin	pos	pos	n.n.	n.n.	pos
Tramadol	n.n.	n.n.	pos	pos	pos
Nor-Tramadol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	pos
Opipramol	pos	pos	pos	pos	pos
Fentanyl	n.n.	n.n.	pos	pos	pos
Trimipramin	pos	Spur	pos	pos	pos
Nor-Trimipramin	pos	pos	pos	n.n.	pos

In den karies-freien Proben konnten Amphetamin, Methamphetamin, Cocain, Doxepin und Nordoxepin, Diazepam und die Metaboliten Nordazepam und Oxazepam, Coffein, Nicotin, Opipramol, Trimipramin und Nor-Trimipramin nachgewiesen werden. Im kariösen Material konnten zusätzlich Methadon, EDDP und Tramadol detektiert werden (Tab. 39). Die negativen Befunde im kariösen Material bei positiven Befunden im nicht-kariösen Material lassen sich vermutlich auf die geringe Menge an kariösem Probenmaterial (5,5 mg bzw. 1,6 mg) zurückführen. Trotz dieser geringen Probenmenge konnten im kariösen Material jedoch Methadon, EDDP, Fentanyl und Tramadol nachgewiesen werden.

Die Aufnahme von Amphetamin, Diazepam, Coffein, Nicotin, Opipramol, Trimipramin und Fentanyl konnte durch die Ergebnisse der toxikologischen Routine-

Untersuchungen (Blut, Urin, Mageninhalt) bestätigt werden. Auffällig waren die positiven Zahnbefunde für Cocain, Methadon, EDDP, Doxepin und Methamphetamin, welche nicht durch die Serum- oder Urinanalytik bestätigt werden konnten. Aus diesem Grund wurden die bei diesem Fall vorhandenen Kopfhare mittels GC-MS auf basische Drogen untersucht und der methanolische Extrakt der Haare (s. Kapitel 2.4.7.1) zusätzlich versuchsweise mit dem Toxyper analysiert (s. Tab. 40).

**Tab. 40:** Zusammenfassung der Zahnergebnisse und Haaranalysen (ca. 4,5 cm Kopfhare) zum Fall GS 348-10

Analyt	kariesfreie Proben	kariöse Proben	Routine-Untersuchung	Haare GC-MS	Haare Toxyper
Amphetamin	pos	n.n.	pos	2,7 ng/mg	pos
Methamphetamin	pos	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	n.n.	n.n.	n.n.	0,1 ng/mg	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	0,1 ng/mg	pos
Morphin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	n.n.	n.n.	n.n.	0,1 ng/mg	n.n.
Cocain	pos	pos ?	n.n.	0,37 ng/mg	pos
Doxepin	pos	pos	n.n.	-	n.n.
Nordoxepin	pos	pos	n.n.	-	n.n.
Diazepam	pos	pos	pos	-	pos
Nordazepam	pos	pos	pos	-	n.n.
Oxazepam	pos	pos	pos	-	pos
Temazepam	n.n.	n.n.	pos	-	n.n.
Methadon	pos	pos	n.n.	0,2 ng/mg	n.n.
EDDP	n.n.	pos	n.n.	0,02 ng/mg	n.n.
Coffein	pos	pos	pos	-	pos
Nicotin	pos	n.n.	pos	-	pos
Paracetamol	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.
Tramadol	n.n.	pos	pos	-	n.n.
Nor-Tramadol	n.n.	n.n.	pos	-	n.n.
Opi Pramol	pos	pos	pos	-	pos
Fentanyl	n.n.	pos	pos	-	n.n.
Trimipramin	pos	pos	pos	-	n.n.
Nor-Trimipramin	pos	pos	pos	-	n.n.

Da für die Analyse von Haarproben mit dem Toxyper zurzeit keine Nachweisgrenzen vorliegen, können über negative Analyseergebnisse keine weiteren Aussagen getroffen werden. Bei positiven Zahnbefunden und negativem

Haarbefund kann demnach zum einen die im Haar eingebaute Analytmenge unterhalb des noch zu ermittelnden LODs der Methode liegen, zum anderen deckt die analysierte Haarlänge (ca. 4,5 cm) nicht zwingend den Zeitraum der Substanzaufnahme ab. Positive Haarbefunde können jedoch als Nachweis einer Aufnahme der jeweiligen Substanz und damit somit als Bestätigung der Ergebnisse der Zahnanalysen gewertet werden.

Nach Berücksichtigung aller Analysenergebnisse können über die einzelnen nachgewiesenen Wirkstoffe folgende Aussagen getroffen werden:

### **Amphetamin**

Amphetamin konnte in beiden karies-freien Zahnhartsubstanzproben, den Körperflüssigkeiten der forensisch-toxikologischen Routineuntersuchungen sowie in der untersuchten Haarprobe (qualitativ: Toxyper, quantitativ: GC-MS) nachgewiesen werden. Dies beweist einen gelegentlichen bis regelmäßigen Konsum von Amphetamin in den Tagen (Serum und Urin) bzw. Monaten (Haare) vor dem Tod. Die negativen Analysenergebnisse im kariösen Material lassen sich durch die geringe Probenmenge erklären.

### **Methamphetamin**

Der positive Methamphetamin-Befund der nicht-kariösen Zahnhartsubstanz konnte weder in den Körperflüssigkeiten noch in den Haaren bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen an humanen Zähnen von Verstorbenen ohne Drogenvorgeschichte könnten Aufschluss darüber geben, ob Matrixbestandteile in humanem Dentin zu falsch-positiven Methamphetamin-Nachweisen führen (Vergleiche Befunde Kapitel 4.5.2.1).

### **Cocain, Benzoylcegonin**

In allen vier untersuchten Zahnhartsubstanzproben konnte Cocain detektiert werden. In der forensisch-toxikologischen Routineuntersuchung konnte jedoch in den Körperflüssigkeiten weder Cocain noch der Metabolit Benzoylcegonin nachgewiesen werden. Die qualitativen (Toxyper) und quantitativen Ergebnisse (GC-MS) der Haaranalyse beweisen jedoch einen zumindest gelegentlichen Konsum von Cocain innerhalb der letzten 0,5 bis 6 Monaten vor dem Tod (Cocain: 0,37 ng/mg; BE: 0,1 ng/mg).

### **Doxepin und Nordoxepin**

Doxepin und sein Metabolit Nordoxepin konnten in der kariösen und nicht-kariösen Zahnhartsubstanz nachgewiesen werden. Die Befunde konnten weder im Rahmen der Routineuntersuchungen noch durch einen positiven Haarbefund

bestätigt werden. Da jedoch sowohl Wirkstoff als auch Metabolit in der Zahnhartsubstanz nachgewiesen wurden, erscheint eine Doxepin-Einnahme in einem Zeitraum, der nicht durch die untersuchte Haarlänge abgedeckt wird sehr wahrscheinlich.

### **Diazepam und Metaboliten**

Diazepam und seine Metaboliten Nordazepam und Oxazepam konnten sowohl in den Zahnhartsubstanz-Proben als auch in den Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Mit dem Toxyper konnten zudem Diazepam und Oxazepam im methanolischen Extrakt der Haare qualitativ nachgewiesen werden. Die Befunde lassen darauf schließen, dass sowohl kurz vor Zeitpunkt des Todes als auch in den Monaten davor das Benzodiazepin Diazepam eingenommen wurde.

Der fehlende Nachweis von Temazepam in der Zahnhartsubstanz kann durch die im Vergleich zu den anderen beiden Metaboliten geringen Serumkonzentrationen erklärt werden. Diazepam wird hauptsächlich zu Nordazepam ( $t_{1/2} = 40 - 80 \text{ h}$ ) und anschließend Oxazepam ( $t_{1/2} = 6 - 12 \text{ h}$ ) metabolisiert. Der Abbau von Diazepam zu Temazepam hingegen findet nur in geringem Ausmaß statt.

### **Methadon und EDDP**

Für Methadon und seinen Metaboliten EDDP konnten Befunde ähnlich den oben bereits beschriebenen Cocain-Ergebnissen erhoben werden. Methadon bzw. EDDP konnten in allen vier Zahnhartsubstanzproben, nicht jedoch in den Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Mittels GC-MS konnten in den Haaren jedoch Spuren von Methadon und EDDP nachgewiesen werden (Methadon: 0,2 ng/mg; EDDP: 0,02 ng/mg), was zumindest eine gelegentliche Einnahme von Methadon innerhalb des letzten halben Jahres beweist

### **Opipramol**

Das Trizyklische Antidepressivum Opipramol konnte in allen vier Zahnhartsubstanz-Proben, den Körperflüssigkeiten der forensisch-toxikologischen Routine-untersuchungen sowie qualitativ in der untersuchten Haarprobe (Toxyper) nachgewiesen werden. Dies beweist einen gelegentlichen bis regelmäßigen Konsum von Opipramol in den Tagen (Serum und Urin) bzw. Monaten (Haare) vor dem Tod.

**Fentanyl**

Das synthetische Opioid Fentanyl konnte im Rahmen der forensisch-toxikologischen Routineuntersuchungen und in den kariösen Proben 2C und 3C nachgewiesen werden.

Fentanyl wird in der Notfallmedizin oder Anästhesie intravenös verabreicht oder zur Behandlung chronischer Schmerzen bzw. Durchbruchschmerzen über ein transdermales oder trans-mukosales System verabreicht. Seit 2009 ist zudem europaweit ein fentanyl-haltiges Nasenspray (Instanyl®) erhältlich. Da Fentanyl sowohl im Oberschenkelvenenblut als auch im Urin nachgewiesen wurde, erscheint es möglich, dass Fentanyl nicht im Rahmen einer notärztlichen Behandlung sondern vom Verstorbenen selbst appliziert wurde. Eine trans-mukosale oder nasale Einnahme könnte den Nachweis von Fentanyl in der mit der Mundhöhle in Kontakt stehenden kariösen Zahnhartsubstanz bei negativem Wurzelbefund (Proben 2W und 3W) erklären.

**Trimipramin und Metabolit**

Das Trizyklische Antidepressivum Trimipramin wurde in allen Zahnhartsubstanz-Proben nachgewiesen. Der Metabolit Nor-Trimipramin in den Proben 2W, 3W und 2C. Der negative Befund in Zahnhartsubstanz-Probe 3C lässt sich vermutlich auf die geringe Probenmenge (1,6 mg) zurückführen.

Die Einnahme von Trimipramin konnte durch die Befunde der forensisch-toxikologischen Routineuntersuchungen bestätigt werden.

In den Haaren konnte mit dem Toxyper weder Trimipramin noch Nortrimipramin nachgewiesen werden. Eine weitere möglicherweise empfindlichere Methode zum Nachweis von Trimipramin in Haaren stand hier im Labor zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zur Verfügung, so dass eine weiter zurückliegende Einnahme von Trimipramin weder bestätigt noch sicher ausgeschlossen werden kann.

**Coffein und Nicotin**

Coffein konnte in allen untersuchten Proben (Körperflüssigkeiten, Zahnhartsubstanz-Proben, Haare), Nicotin in den karies-freien Zahnhartsubstanz-Proben sowie den Körperflüssigkeiten und Haaren nachgewiesen werden. Die negativen Nicotin-Befunde im kariösen Material lassen sich vermutlich auf die zu geringe Probenmenge zurückführen.

### 4.5.2.3 Fall 3

Im Fall GS 447-10 konnten in der forensisch-toxikologischen Routine-Untersuchung der Leichenasservate Amphetamin, Doxepin, Methadon, Paracetamol, Coffein und Nicotin im Blut nachgewiesen werden. Todesursächlich war eine Überdosis Methadon. Es wurden ein molarer Zahn des Unterkiefers und ein Weisheitszahn asserviert.

Amphetamin, Doxepin und der Metabolit Nordoxepin, Methadon und der Metabolit EDDP, Coffein und Nicotin konnten ebenfalls in allen vier Zahnhartsubstanz-Proben nachgewiesen werden (s. Tab. 41). Paracetamol konnte in der Zahnhartsubstanz nicht detektiert werden. Jedoch ergaben sich durch die Zahnanalyse Hinweise auf den Konsum von Cocain (Proben 2W, 1C und 2C), Ecstasy (Proben 1W, 1C und 2C), MDMA (Proben 1W und 2C) und Methamphetamin (1W, 1C und 2C).

**Tab. 41:** Ergebnisse der Zahnuntersuchungen sowie der forensisch-toxikologischen Routineanalytik im Fall GS 447-10 (C: kariöse Proben, W: nicht-kariöse Proben)

Analyt	GS447-1W	GS447-2W	GS447-1C	GS447-2C	Routine-Untersuchung	
	(54,2 mg)	(53,2 mg)	(13,1 mg)	(18,5 mg)	Blut	Urin
Amphetamin	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Methamph.	pos	n.n.	pos	pos	n.n.	n.n.
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	pos	n.n.	n.n.	pos	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Morphin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	n.n.	pos	pos	pos	n.n.	n.n.
Doxepin	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Nordoxepin	pos	pos	pos	pos	n.n.	pos
Diazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Nordazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Oxazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Temazepam	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Methadon	pos	pos	pos	pos	pos	pos
EDDP	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Coffein	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Nicotin	pos	n.n.	pos	pos	pos	pos
Paracetamol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	pos

Auch in diesem Fall wurden die vorhandenen Kopfhaare (ca. 3 cm) mit GC-MS und LC-MS<sup>n</sup> (Toxytyper) analysiert, um eine Bestätigung der positiven Zahnbefunde zu erhalten (s. Tab. 42). Die Haaranalyse mittels GC-MS bestätigte einen länger

zurückliegenden Konsum von Cocain (Cocain: 0,16 ng/mg; Benzoylecgonin: 0,06 ng/mg) und Ecstasy (MDMA: 0,31 ng/mg). Zusätzlich konnte sowohl mit GC-MS als auch mit LC-MS<sup>n</sup>-Screening der Konsum von Amphetamin sowie die Einnahme von Methadon innerhalb der letzten 3 bis 6 Monate vor dem Tod nachgewiesen werden.

Erneut konnte in keiner der zusätzlich untersuchten Matrices eine Bestätigung des positiven Methamphetamin-Befundes in den Proben 1W, 1C und 2C gefunden werden. Auch in diesem Fall könnte argumentiert werden, dass der Konsum von Methamphetamin bei Verstorbenen mit Drogenvergangenheit (hier: Amphetamin, Ecstasy und Cocain) durchaus im Bereich des Möglichen. Trotz dessen erscheinen weitere Untersuchungen an drogenfreier, humaner Zahnhartschubstanz notwendig, um falsch positive Methamphetamin-Befunde durch Matrixstörungen definitiv ausschließen zu können.

**Tab. 42:** Zusammenfassung der Zahnergebnisse und Haaranalysen (ca. 3 cm Kopfhaar) zum Fall GS 447-10

Analyt	kariesfreie Proben	kariöse Proben	Routine-Untersuchung	Haar-Analytik GC-MS	Haar-Screening Toxytyper
Amphetamin	pos	pos	pos	1,46 ng/mg	pos
Methamphetamin	pos	pos	n.n.	n.n.	n.n.
MDEA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
MDMA	pos	pos	n.n.	0,31 ng/mg	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	0,06 ng/mg	n.n.
Morphin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	pos	pos	n.n.	0,16 ng/mg	n.n.
Doxepin	pos	pos	pos	-	n.n.
Nordoxepin	pos	pos	pos	-	n.n.
Diazepam	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.
Nordazepam	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.
Oxazepam	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.
Temazepam	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.
Methadon	pos	pos	pos	0,23 ng/mg	pos
EDDP	pos	pos	pos	n.n.	n.n.
Coffein	pos	pos	pos	-	pos
Nicotin	pos	n.n.	pos	-	pos
Paracetamol	n.n.	n.n.	pos	-	n.n.

### 4.5.3 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen humaner Zahnhartsubstanz

Die Ergebnisse der hier untersuchten humanen Zähne zeigen, dass sich Drogen- und Medikamentenwirkstoffe nach deren Konsum bzw. Einnahme in die Zahnhartsubstanz einlagern und dort - ähnlich dem Haar - für einen längeren Zeitraum gespeichert werden.

Bei forensischen Proben stehen in der Regel keine gesicherten Angaben über Konsum, Dosierung und Zeitpunkt der Einnahme zur Verfügung, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. In dieser Arbeit wurden daher die Ergebnisse mehrere Untersuchungsmatrices zur Bestätigung der Zahnbefunde herangezogen: Die Ergebnisse forensisch-toxikologischer Routine-Untersuchungen, die in der Regel in Blut, Urin und Mageninhalt durchgeführt werden und somit ein Zeitfenster von wenigen Stunden bis Tage vor dem Tod abdecken und die Ergebnisse der Analyse von Kopfhaar, das, ausgehend von einem mittleren Haarwachstum von 0,8 bis 1,3 cm pro Monat, in erster Näherung einen Zeitraum von einem Monat pro cm Länge abdeckt. Zu beachten ist hierbei, dass zwischen Bildung des Haares in der Haarwurzel und Austritt an der Kopfoberfläche im Mittel zwei Wochen vergehen. Eine ein bis zwei Wochen zurückliegende Einnahme lässt sich daher in der Regel im Haar nicht nachweisen. Die Zähne decken dabei von allen untersuchten Matrices das längste Nachweisfenster ab. Theoretisch könnten einmal eingelagerte Substanzen unbegrenzt in der Zahnhartsubstanz gespeichert werden. Da die Zähne, insbesondere das Dentin, keinen Umwelteinflüssen unterliegen, erscheint ein „Auswasch-Effekt“, wie er z.B. bei Haaren durch Haarbehandlung (z.B. Bleichen, Färben...) oder UV-Strahlung entsteht, unwahrscheinlich. Die Frage, ob die Zahnhartsubstanz als ein „tieferes Kompartiment“, aus dem eine Rückresorption in die Blutbahn stattfindet, angesehen werden kann, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Auf Grund der unterschiedlichen Nachweisfenster der drei Untersuchungsmatrices (Körperflüssigkeiten, Haare, Zahnhartsubstanz) und den nicht vorhandenen Angaben über Konsum, Konsumzeitpunkt, -Häufigkeit und -Menge bleibt derzeit bei fehlender Bestätigung positiver Zahnbefunde in einer weiteren Matrix eine Restunsicherheit, ob eine weiter zurückliegende Aufnahme stattgefunden hat. Da kontrollierte Humanstudien bei dieser Art Fragestellung aus praktischen und ethischen Gründen nicht durchführbar sind, erscheinen weiterführende Untersuchungen von Zahnproben und die Interpretation der

Befunde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Haaranalyse und forensisch-toxikologischer Routineuntersuchung an einem größeren Kollektiv von post-mortem Proben am besten geeignet, weitere Informationen über die Einlagerung körperfremder Substanzen und deren Nachweisbarkeitsdauer in humaner Zahnhartsubstanz zu erhalten.

Weiterer Untersuchungsbedarf besteht zur Frage, ob kariöses Material auf Grund seiner Struktur Drogen- und Medikamentenwirkstoffe besser aufnehmen kann als intaktes Dentin. Hinweise darauf geben die positiven Analyseergebnisse im kariösen Material, obwohl im Vergleich zum intakten Dentin deutlich geringere Mengen an kariösem Material asserviert und analysiert werden konnten. Durch den Kontakt zur Mundhöhle erscheint es plausibel, dass insbesondere intranasal (z.B. Cocain), oral-transmukosal (z.B. Fentanyl- oder Buprenorphin-Sublingualtabletten oder Kauen von Fentanylpflastern) und durch Rauchen aufgenommene Substanzen (z.B. Cannabis), bei denen hohe Kontaminationen der Mundhöhle bekannt sind<sup>[29, 171]</sup> besonders gut in kariösen Läsionen nachweisbar sind.

Über die Auswirkungen des von Bakterien auf und in solchen Läsionen gebildeten Biofilms auf die Einlagerung und die Stabilität körperfremder Substanzen kann bisher ebenfalls keine Aussage getroffen werden. Denkbar wäre, je nach Zusammensetzung des Biofilms, z.B. eine verminderte Aufnahme von Analyten durch die zusätzliche Diffusionsstrecke oder ein mikrobieller oder enzymatischer Abbau der Analyten im Biofilm. Zur Klärung dieser Fragen sind weiterführende Untersuchungen an standardisierten Modell-Systemen und umfangreiche quantitative Analysen an humanen Zahnproben notwendig.

## 4.6 Nachweis von Ethylglucuronid und Ethylsulfat in humaner Glaskörperflüssigkeit

Für diese Studie wurden Oberschenkelvenenblut, Urin und Glaskörperflüssigkeit von 26 Verstorbenen - 23 Männer und 3 Frauen - im Alter von 27 bis 73 Jahren quantitativ auf Ethylglucuronid (EtG), Ethylsulfat (EtS) und Ethanol untersucht. Personen mit Augenerkrankungen, bekanntem Diabetes oder anderen Stoffwechselerkrankungen wurden von der Studie ausgeschlossen. Der Zeitraum zwischen Todeszeitpunkt und Obduktion (post-mortales Intervall (PMI)) betrug zwischen 1 und 9 Tagen. Aufgrund der gekühlten Lagerung der Verstorbenen, zeigte keine der Leichen nennenswerte Fäulnis-Veränderungen. In keinem der Fälle lagen belastbare Informationen zum Trinkverhalten bzw. Angaben über den Zeitraum zwischen letzter Alkoholaufnahme und Todeszeitpunkt vor.

### 4.6.1 Ethylglucuronid und Ethylsulfat in Glaskörper-flüssigkeit

Ethylglucuronid konnte in 24 von 26 Fällen in Konzentrationen zwischen 0,1 und 9,4 mg/l und EtS in 23 Fällen in Konzentrationen zwischen 0,13 und 4,1 mg/l nachgewiesen werden (s. Abb. 35).

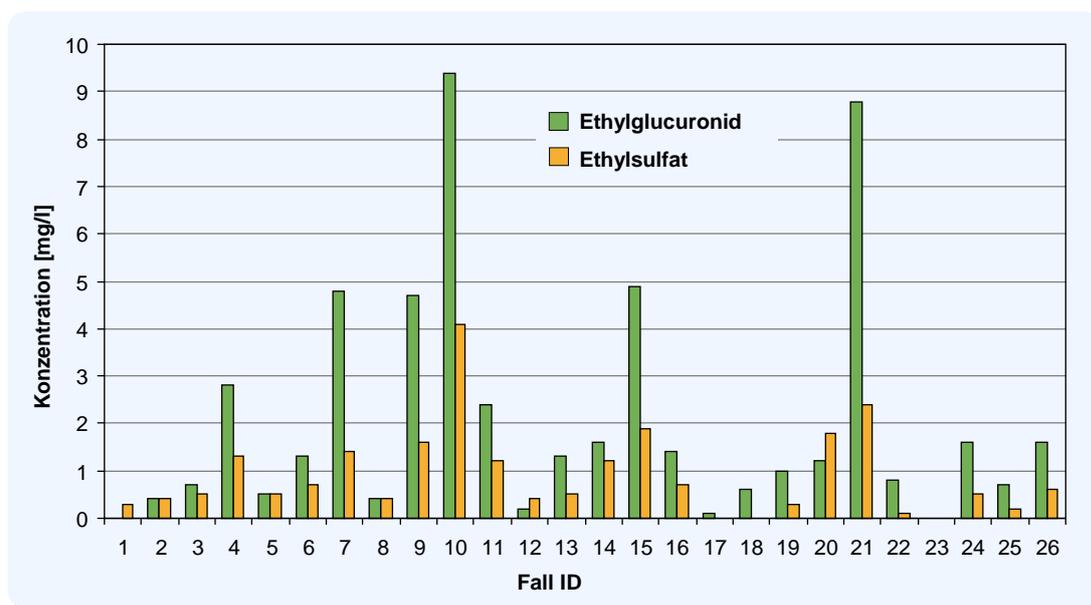


Abb. 35: EtG- und EtS-Konzentrationen im Glaskörper in mg/l

Das Verhältnis EtG zu EtS lag im Glaskörper zwischen 0,50 und 6,23 ( $2,21 \pm 0,96$ ,  $n = 21$ ). Zu Vergleichszwecken wurden auch in den Routine-Asservaten Blut und Urin EtG und EtS quantitativ bestimmt. EtG konnte im Blut bei 25 Fällen in Konzentrationen zwischen 0,35 bis 19,3 mg/l, EtS in 24 Fällen in Konzentrationen zwischen 0,13 und 4,1 mg/l nachgewiesen werden. Die jeweiligen

Blutkonzentrationen (s. Abb. 36) waren, verglichen mit den Glaskörperkonzentrationen für beide Analyten signifikant höher (Zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test:  $\alpha = 0,1$ : EtG n = 25, R- = 56; EtS n = 23, R- = 3).

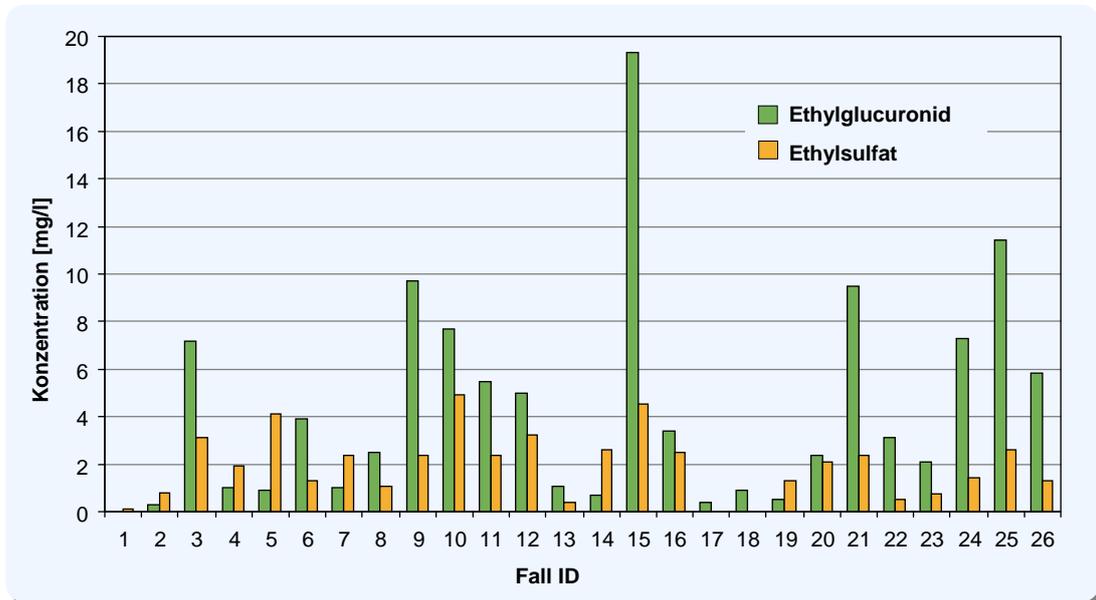


Abb. 36: EtG- und EtS-Konzentrationen im Serum (Oberschenkelvenenblut)

Die höchsten EtG- und EtS-Konzentrationen (0,06 - 150 mg/l bzw. 2,58 - 280 mg/l) wurden im Urin nachgewiesen. Lediglich in einer Urinprobe konnte weder EtG noch EtS nachgewiesen werden (s. Abb. 37).

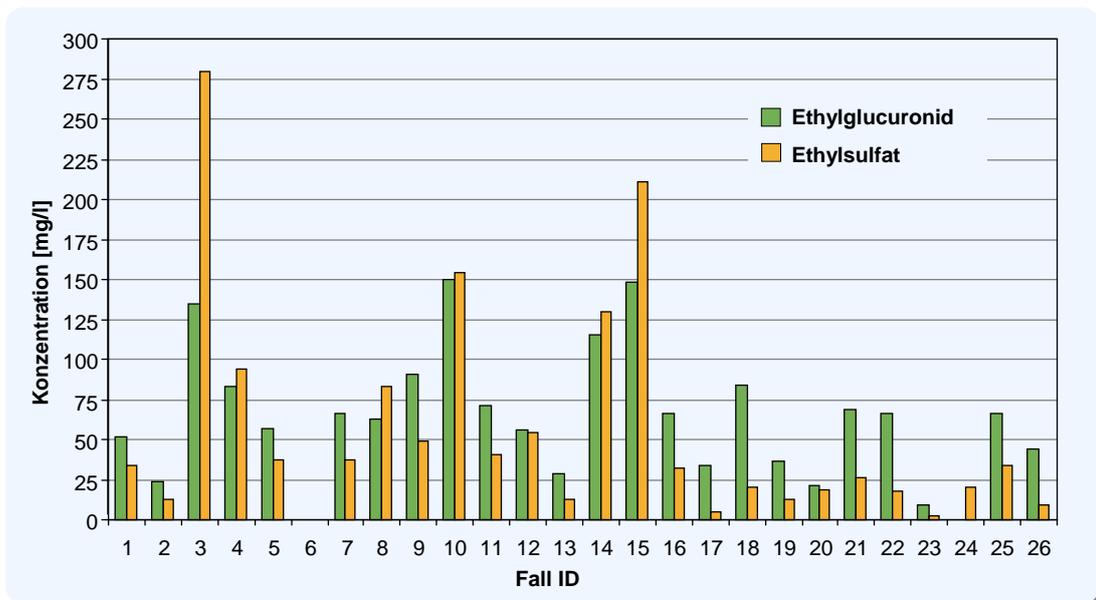


Abb. 37: EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin

#### 4.6.2 Ethanolkonzentration in Blut, Urin und Glaskörperflüssigkeit

Die Ergebnisse des in allen drei Asservaten im Rahmen der Obduktion routinemäßig durchgeführten quantitativen Nachweises von Ethanol sind in Abb. 38 zusammengestellt.

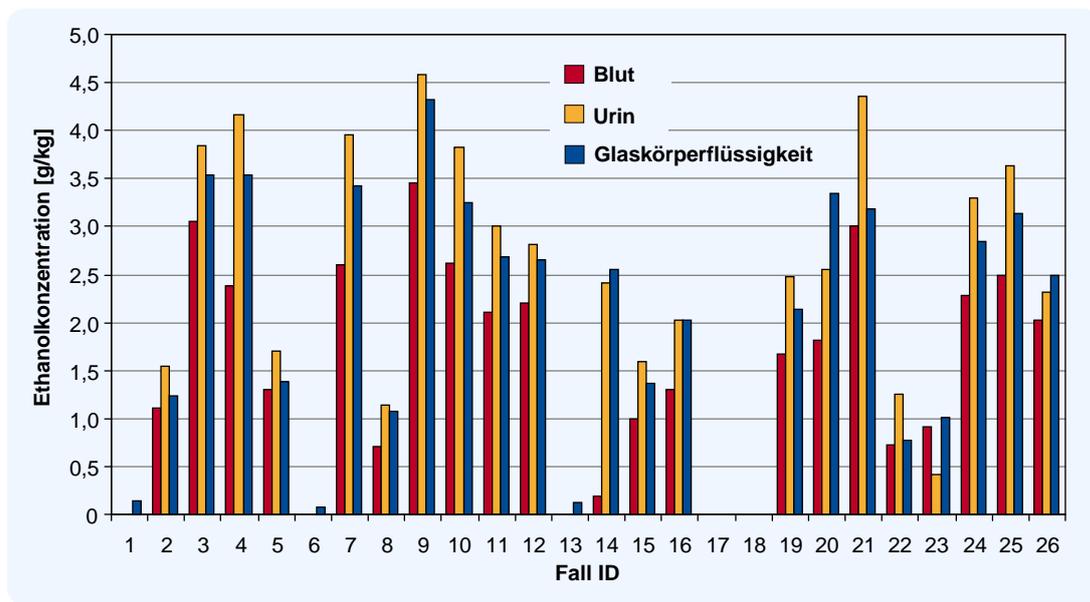


Abb. 38: Ethanolkonzentrationen in Blut, Urin und Glaskörperflüssigkeit in g/kg

In 21 von 26 Fällen konnte eine Blutalkoholkonzentration (BAK) zwischen 0,7 und 3,46 g/kg festgestellt werden. Ebenso konnte in 21 Urinproben und 24 Glaskörperflüssigkeiten Ethanol in Konzentrationen von 0,42 bis 4,59 g/kg (UAK) bzw. 0,1 - 4,32 g/kg (VHAK) nachgewiesen werden.

Die Ethanolkonzentrationen in Blut, Urin und Glaskörperflüssigkeit zeigten untereinander eine gute Korrelation (Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten-Test): Korrelation Urin / Blut:  $r_s = 0,978$ , Korrelation Urin / Glaskörperflüssigkeit:  $r_s = 0,968$  und Korrelation Blut / Glaskörperflüssigkeit  $r_s = 0,953$ . Das Verhältnis von Blutalkoholkonzentration (BAK) und Glaskörperalkoholkonzentration lag, die fünf Proben in denen keine BAK nachweisbar war ausgeschlossen, zwischen 0,64 und 0,94 ( $0,76 \pm 0,12$ ).

#### 4.6.3 Diskussion der Fall-Ergebnisse

Alles in allem waren die beiden Alkoholkonsummarker EtG und EtS sowie Ethanol selbst in allen drei untersuchten Matrices gut nachweisbar. Selbst nach Leichenliegezeiten von 9 Tagen wie bei Fall Nr. 21 konnten neben Ethanol auch EtG und EtS in allen drei Matrices eindeutig nachgewiesen werden, so dass in Fällen in denen lediglich Glaskörperflüssigkeit zur Verfügung steht neben einer

Alkoholbestimmung auch die Quantifizierung von EtG und EtS in Betracht gezogen werden sollte.

In den Fällen mit den Nummern 1, 6 und 13 konnte Ethanol lediglich im Glaskörper nachgewiesen werden. Im Fall Nr. 6 konnten die Alkoholkonsummarker EtG und EtS nur in Blut und Glaskörper nachgewiesen werden, nicht jedoch im Urin. Obwohl in den vorhandenen Fallakten keine Hinweise auf eine bestehende Nierenerkrankung zu finden waren, lassen sich diese Ergebnisse am ehesten durch eine verminderte Ausscheidungsrate über die Nieren erklären. Mikrobieller Abbau von EtG in humanem Urin wurde bereits beschrieben<sup>[172]</sup> und könnte den negativen EtG-Befund ebenfalls erklären. Es wurde bis heute jedoch noch kein mikrobieller Abbau von EtS in Körperflüssigkeiten beschrieben. Halter et al. fanden lediglich, dass die komplexe Mischung aus Bakterien, Pilzen und Protozoen des Belebtschlammes in der biologischen Stufe einer Modellkläranlage in der Lage ist, Ethylsulfat abzubauen<sup>[173]</sup>. In den Fällen 14, 20, 23 und 26 war die Ethanolkonzentration im Glaskörper am höchsten. Der Nachweis von Ethanol im Glaskörper kann durch zwei Mechanismen erklärt werden: durch post-mortale Bildung im Glaskörper oder durch verlangsamte Diffusion aus dieser Matrix nach Eintritt des Todes. Die teilweise hohen EtG- und EtS-Konzentrationen sprechen jedoch gegen eine postmortale Bildung von Ethanol sondern geben vielmehr Hinweise auf wiederholten Alkoholkonsum vor dem Tod. Von den drei untersuchten Matrices scheinen im Glaskörper diffusive Eliminationsprozesse am langsamsten abzulaufen.

Von einigen Ausnahmen abgesehen waren die EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin am höchsten und teilweise um das über hundertfache höher als in Blut und Glaskörperflüssigkeit (z.B. Fall Nr. 3:  $\text{EtG}_{\text{Urin}}/\text{EtG}_{\text{VH}} = 175,3$ ;  $\text{EtS}_{\text{Urin}}/\text{EtS}_{\text{VH}} = 474,6$ ).

Die Konzentrationsverhältnisse von Ethanol in Urin und Blut waren deutlich geringer (z.B. Fall Nr. 4:  $\text{UAK}/\text{BAK} = 1,75$ ), was sich zum Teil durch den geringeren Wasseranteil im Blut (ca. 80 %) und durch die Wiederaufnahme von Wasser in den Nieren erklären lässt. Laut Jones et al.<sup>[151]</sup> deutet ein Konzentrationsverhältnis  $\text{UAK}/\text{BAK} > 1,25$  auf eine zum Todeszeitpunkt vollständig abgeschlossene Resorption und Verteilung des Ethanols im Körper hin. Demnach waren bei 85 % der hier untersuchten Fälle die Alkohol-Resorption und -Verteilung zum Todeszeitpunkt bereits abgeschlossen. Im Fall Nr. 24 lässt das Konzentrationsverhältnis  $\text{UAK}/\text{BAK} = 0,46$  auf eine kurz vor dem Todeszeitpunkt stattgefundenen Alkoholkonsum schließen. EtG und EtS konnten in Blut und Urin nachgewiesen werden, nicht jedoch im Glaskörper, was diese These zusätzlich erhärtet. Die EtG-

und EtS-Konzentration im Urin lässt sich durch weiter zurückliegenden Alkoholkonsum erklären.

Wie bereits in zurückliegenden Publikationen<sup>[174-176]</sup> beschrieben, lies sich auch bei dieser Untersuchung keine Relation zwischen den Ethanol-, EtG- und EtS-Konzentrationen feststellen. Dies liegt zum einen an den interindividuell unterschiedlichen Bildungs- und Eliminationskinetiken der Analyten, zum anderen an unterschiedlichen post-mortalen Veränderungen sowie unterschiedlichem Alkoholkonsumverhalten (Menge, Häufigkeit, Konsumzeitpunkt etc.) vor dem Tod. Im Gegensatz dazu, zeigte die Ethanolkonzentration in Blut, Urin und Glaskörperflüssigkeit eine gute Korrelation (s. Abb. 38), so dass sich aus den Ethanolkonzentrationen in den verschiedenen Matrices und den Markerkonzentrationen wertvolle Hinweise über die Zeitspanne zwischen Trinkende und Todeszeitpunkt ergeben.

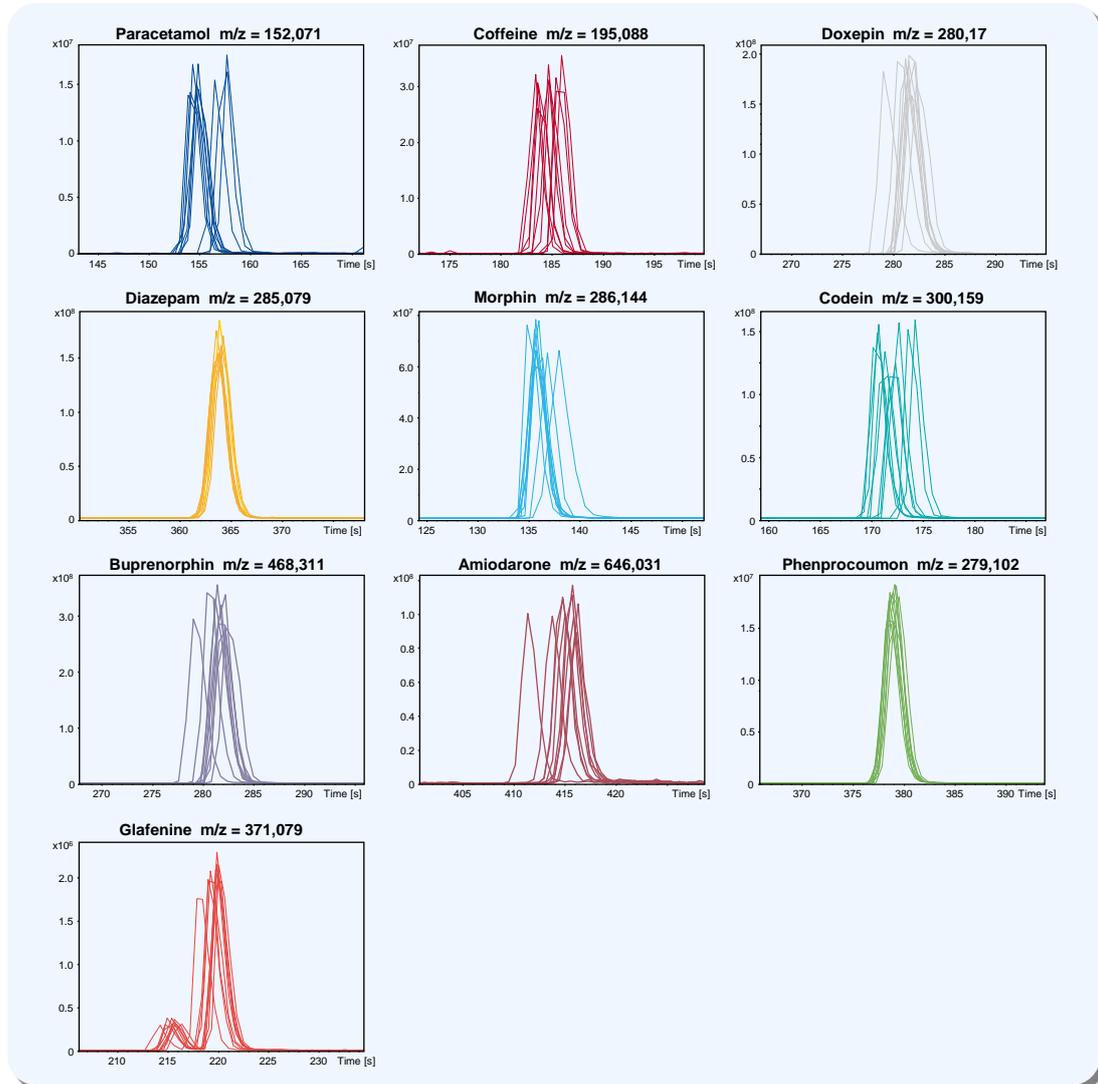
## ***4.7 Entwicklung eines Drogen- und Medikamenten-Screenings mittels 3D Ionenfalle***

### **4.7.1 Auswahl von Säule und Laufmittel**

Beginnend mit der bereits im Labor verwendeten Synergi<sup>TM</sup> Polar RP Säule und dem routinemäßig verwendeten Fließmittel (A: 0,1 %ige Ameisensäure, 2 mM Formiat; B: Methanol, 2 mM Formiat) wurde die sieben in Tab. 4 gelisteten Säulen getestet. Um eine möglichst kurze Messzeit zu erreichen, wurde der Gradient der Ausgangsmethode von 28 min auf 11 min gekürzt.

Unter den getesteten Säulen zeigte die Dionex Acclaim RSLC C18 2.2 µm (2.1x100 mm und 2.1x50 mm) alles in allem die besten Trenneigenschaften, Retention und Peakform. Von dieser Säule waren zudem von der Firma Bruker umfangreiche Untersuchungen zur Retentionszeitstabilität und Batch-zu-Batch-Vergleiche verfügbar.

Für die organische Phase wurden Acetonitril und Methanol von drei verschiedenen Lieferanten (Fluka®, Carl Roth®, J.T. Baker®) auf Grundrauschen und Verunreinigungen bei Verwendung von Gradientenelution in Kombination mit der oben erwähnten Säule überprüft. Mit den Lösungsmitteln von Fluka® konnten die besten Ergebnisse erzielt werden.

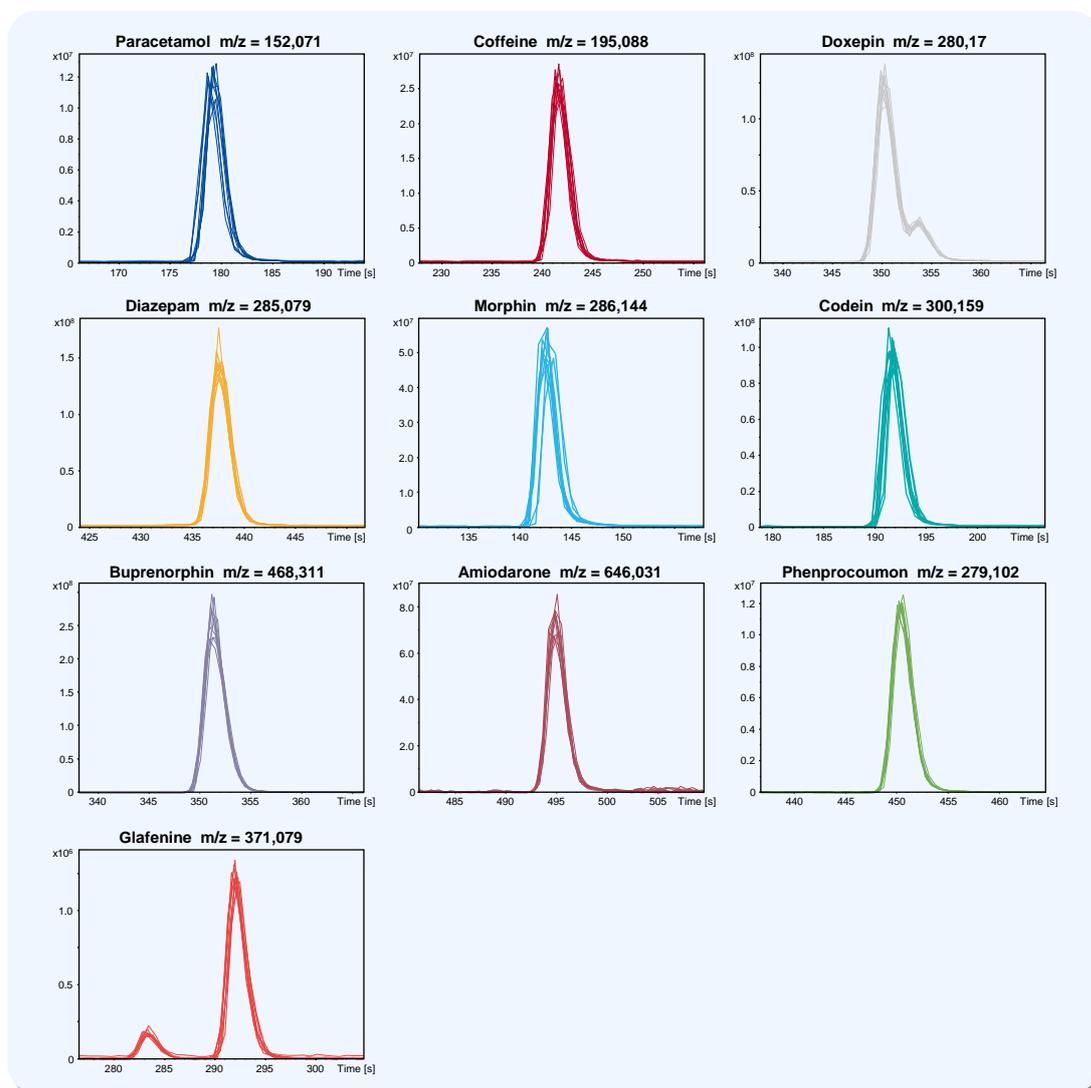


**Abb. 39:** EICs der 10-fach Injektion des Decamixes (Serumextrakt) mit Acetonitril und 5 mM Ammoniumformiat als organischem Laufmittel

Obwohl mit dem preisgünstigeren Methanol geringere Retentionszeit-Schwankungen beobachtet wurden (s. Abb. 39 und Abb. 40), wurde auf Grund der höheren Elutionskraft und des geringeren Gegendrucks entschieden, Acetonitril als organische Phase zu verwenden.

Besonderes Augenmerk wurde zudem auf den Formiatpuffer-Gehalt der Fließmittel gelegt. Formiat wirkt sich positiv auf die Ionenausbeute im positiven Electrospray-Modus und die Retentionszeitstabilität aus. Hohe Formiat-Konzentrationen vermindern jedoch die schon geringere Ionenausbeute im negativen ESI noch zusätzlich. Es wurden Formiat-Konzentrationen von 0, 2 und 5 mM im wässrigen und organischen Fließmittel getestet. Hierzu wurden Fließmittel und Leerserumextrakte mit Decamix dotiert und im UltraScan mode mit alternierender

Polarität gemessen (10-fach Injektion) und die Daten hinsichtlich Peakform, Retentionszeitstabilität und Signalintensität ausgewertet.



**Abb. 40:** EICs der 10-fach Injektion des Decamixes (Serumextrakt) mit Methanol und 5 mM Ammoniumformiat als organischem Laufmittel.

Es konnten bei allen Formiat-Konzentrationen insbesondere bei den früh eluierenden Substanzen wie Paracetamol oder Codein geringfügige Retentionszeitschwankungen von 2 - 4 s festgestellt werden. Mit der Zugabe von 0,1 % Ameisensäure und 2 mM Ammoniumformiat zu beiden Fließmitteln konnten für die positiv und negativ ionisierten Analyten insgesamt die besten Resultate erzielt werden.

### 4.7.2 Aufbau einer Spektrenbibliothek

Zum Projekt-Ende enthielt die erstellte Spektrenbibliothek die MS-, MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren sowie Strukturformel und Metadaten wie Substanzklasse und CAS-Nummer von 839 Substanzen (s. Abb. 41).

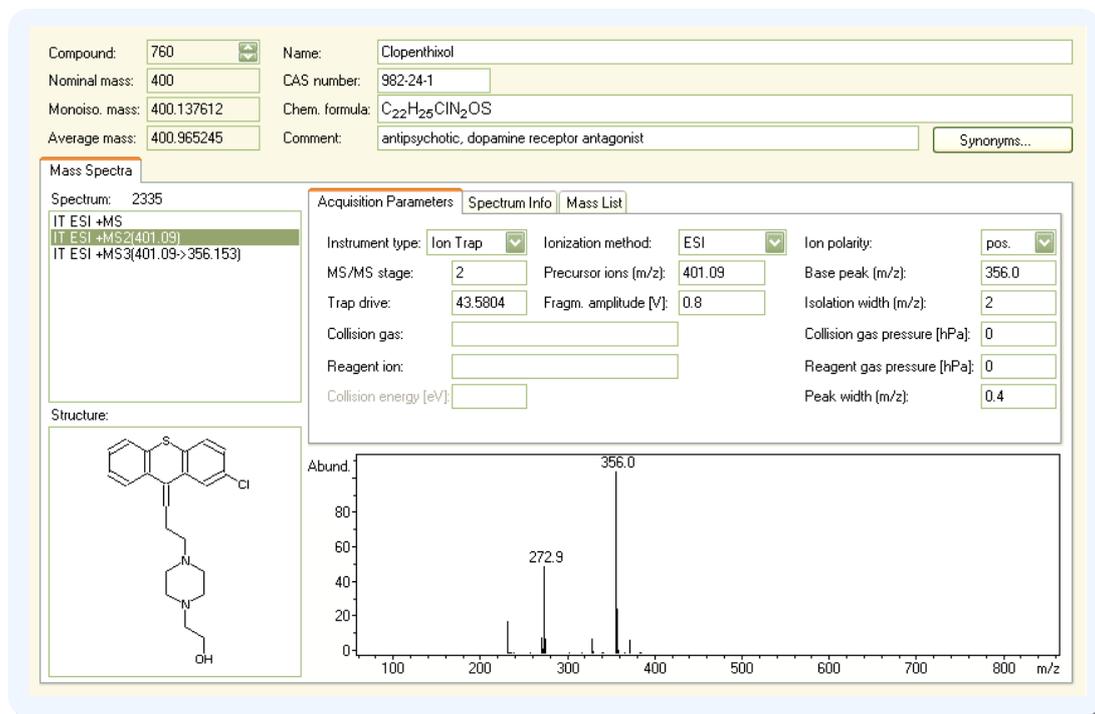


Abb. 41: Bibliothekseintrag (Bruker Daltonik LibraryEditor) von Clopenthixol (MS<sup>2</sup>-Spektrum)

Da manche Substanzen sowohl positiv als auch negativ ionisierbar sind, wurden insgesamt 2600 Spektren hinterlegt<sup>[177]</sup>. Substanzen, die hauptsächlich als Addukte (in der Regel Natrium-Addukte), Dimere oder zweifach geladene Spezies vorliegen, wurden mit dem jeweils im Fullscan intensivsten Ion als Precursor in die Bibliothek aufgenommen. Bei halogenhaltigen Analyten, bei denen im Fullscan die Intensität des Isotopenpeaks (m/z +2) die gleiche Intensität wie die der monoisotopische Spezies erreichen kann, wurden von beiden Isotopen MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren hinterlegt. Anhang A-3 enthält eine Liste mit allen in der Spektrenbibliothek (Toxtyper 1.0) enthaltenen Substanzen.

### 4.7.3 Toxtyper Screening: Proof-of-concept

Es wurden zunächst Human- und Kälberserum mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen von Benzodiazepinen dotiert (s. Kapitel 2.1.2.3 BenzoMix 1 und BenzoMix 2) und nach Zugabe von je 50 ng D5-Diazepam als internem Standard mittels basischer Chlorbutanextraktion extrahiert. Für die informationsabhängige Spektrenaufnahme wurde für diesen Methodentest eine Scheduled Precursor

List (SPL) mit 37 Benzodiazepinen und Metaboliten erstellt (s. Tab. 43). Zur Identifikation der Substanzen wurde die zum Zeitpunkt des Versuches aktuelle Version der Toxyper-Spektrenbibliothek mit damals 600 Einträgen verwendet. Alle weiteren LC- und MS-Parameter finden sich in Kapitel 2.4.7.2.

**Tab. 43:** Liste der in der SPL hinterlegten Benzodiazepine und deuterierten Analoga.

Name	t <sub>R</sub> in s	[M+H] <sup>+</sup>	Name	t <sub>R</sub> in s	[M+H] <sup>+</sup>
2-Hydroxyethylflurazepam	312	333,08	D7-7-Aminoflunitrazepam	231	291,16
4-Hydroxynordiazepam	232	287,06	D7-Flunitrazepam	325	321,14
7-Aminoclonazepam	215	286,07	Desalkyl-Flurazepam	324	289,05
7-Aminoflunitrazepam	232	284,12	Diazepam	354	285,08
7-Aminonitrazepam	173	252,11	Estazolam	305	295,07
alpha-Hydroxyalprazolam	296	325,09	Flumazenil	260	304,11
alpha-Hydroxymidazolam	259	342,08	Flunitrazepam	327	314,09
alpha-Hydroxytriazolam	296	359,05	Flurazepam	261	388,16
Alprazolam	311	309,09	Ketazolam	369	369,1
Bromazepam	274	316,01	Lorazepam	310	321,02
Brotizolam	325	392,96	Lormetazepam	338	335,03
Chlordiazepoxide	243	300,09	Medazepam	261	271,1
Clobazam	334	301,07	Midazolam	258	326,09
Clonazepam	312	316,05	N-Desmethylflunitr.	302	300,08
Clotiazepam	357	319,07	Nitrazepam	304	282,09
D4-7-Aminoclonazepam	213	290,1	Nordiazepam	323	271,06
D4-Clonazepam	311	320,07	Oxazepam	305	287,06
D4-Lorazepam	309	325,04	Prazepam	400	325,11
D4-N-Desmethylflunitrazepam	301	277,15	Temazepam	330	301,07
D5-Diazepam	352	290,11	Tetrazepam	349	289,11
D5-Nordiazepam	320	276,09	Triazolam	316	343,05
D5-Oxazepam	304	292,09	Zaleplon	293	306,13
D5-Temazepam	329	306,11	Zolazepam	199	287,13
D6-Zolpidem	229	314,21	Zolpidem	231	308,18

Die Ergebnisse (Score-Werte) der mit Benzodiazepinen dotierten Humansen sind in Tab. 44 und Tab. 45 zusammengefasst.

**Tab. 44:** Zusammenfassung der SmileMS-Ergebnisse von mit verschiedenen Benzodiazepinen (Benzo-Mix 1) dotiertem Humanserum.

Name	Score 10 ng/ml	Score 50 ng/ml	Score 100 ng/ml	therapeutische Spiegel
Bromazepam	0,90	0,90	0,91	80 - 170 ng/ml
Chlordiazepoxid	0,91	0,91	0,91	400 - 4000 ng/ml
Clonazepam	0,91	0,91	0,91	20 - 70 ng/ml
Diazepam	0,70	0,90	0,91	125 - 500 ng/ml
Flunitrazepam	0,90	0,91	0,91	5 - 15 ng/ml
7-Aminoflunitrazepam	0,90	0,90	0,91	-
Desalkylflunitrazepam	n.n.	0,91	0,91	-
Lorazepam	n.n.	0,86	0,88	20 - 250 ng/ml
Midazolam	0,91	0,91	0,91	80 - 250 ng/ml
Alpha-OH-Midazolam	0,91	0,91	0,91	-
Nordazepam	0,91	0,81	0,91	200 - 800 ng/ml
Oxazepam	n.n.	n.n.	n.n.	150 - 200 ng/ml
Temazepam	0,89	0,89	0,91	300 - 900 ng/ml
Zolpidem	0,80	0,84	0,86	80 - 300 ng/ml
Zopiclon	0,89	0,88	0,85	10 - 50 ng/ml

**Tab. 45:** Zusammenfassung der SmileMS-Ergebnisse von mit verschiedenen Benzodiazepinen (Benzo-Mix 2) dotiertem Humanserum.

Name	Score 10 ng/ml	Score 50 ng/ml	Score 100 ng/ml	therapeutische Spiegel
Alprazolam	0,91	0,91	0,91	20 - 40 ng/ml
Alpha-OH-Alprazolam	n.n.	0,71	0,75	-
Camazepam		<i>nicht in SPL</i>		100 - 600 ng/ml
Chlordiazepoxid	0,91	0,91	0,91	400 - 4000 ng/ml
Clobazam	0,91	0,91	0,91	100 - 400 ng/ml
Flurazepam	0,91	0,91	0,91	0,5 - 30 ng/ml
2-OH-Ethyl-Flurazepam	n.n.	0,91	0,91	
Lorazepam	n.n.	0,56	0,85	20 - 250 ng/ml
Lormetazepam	n.n.	n.n.	n.n.	1 - 20 ng/ml
Medazepam	0,91	0,91	0,91	10 - 150 ng/ml
Nitrazepam	0,90	0,91	0,91	30 - 120 ng/ml
Prazepam	0,91	0,91	0,91	10 - 40 ng/ml
Tetrazepam	0,91	0,91	0,91	50 - 600 ng/ml
Triazolam	0,91	0,91	0,91	2 - 20 ng/ml
7-Aminoclonazepam	n.n.	0,37	n.n.	-

Die automatisierte Datenauswertung und Reporterstellung erfolgte zu diesem Zeitpunkt noch mit Hilfe von SmileMS™ (GeneBio SA, Genf, Schweiz), einer gerätetyp-unabhängigen Software zur Auswertung von Massenspektren. Für den Spektrenvergleich verwendet SmileMS den sog. X-Rank Algorithmus der Firma GeneBio<sup>[178, 179]</sup>, der basierend auf Wahrscheinlichkeits-berechnungen zwischen den nach Intensitäten geordneten m/z-Verhältnissen zweier Massenspektren, deren Übereinstimmung in einem Zahlenwert zwischen -10 und 30 wiedergibt. Dieser Wert wird für die Darstellung der Ergebnisse in den sogenannten Score-Wert umgerechnet. Dieser liegt in einem Bereich zwischen 0,30 und 0,91. Score-Werte von 0,85 bis 0,91 sprechen für eine Übereinstimmung der Spektren und somit sichere Identifizierung der entsprechenden Substanz. Werte zwischen 0,5 bzw. 0,65 und 0,85 deuten auf eine wahrscheinliche Übereinstimmung hin. Bei Substanzen mit einem Score-Wert unterhalb von 0,5 kann nicht von einer Übereinstimmung/Identifikation ausgegangen werden. Der X-Rank Algorithmus berücksichtigt dabei im Gegensatz zu Skalarprodukt-basierten Algorithmen<sup>[180, 181]</sup> weder absolute noch relative Intensitäten der einzelnen Fragmente. Ein Nachteil der Auswertung mit SmileMS besteht darin, dass lediglich die Übereinstimmung zweier Massenspektren miteinander errechnet wird. Hierbei werden MS<sup>2</sup>-Spektren sowohl gegen MS<sup>2</sup>- als auch gegen MS<sup>3</sup>-Spektren der Bibliothek abgeglichen. Das Gleiche gilt für MS<sup>3</sup>-Spektren. Die Information der MS<sup>1</sup>-Spektren wird dabei komplett ignoriert.

Da SmileMS ursprünglich für den Vergleich von Quadrupol-Spektren entwickelt wurde, geht die Information, ob für eine gefundene Substanz das MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektrum mit denen des Bibliothekseintrags übereinstimmen, nicht in die Berechnung des Score-Wertes mit ein. Dies hat sich besonders bei informationsarmen Spektren als Nachteil erwiesen. Ein Beispiel dafür ist Oxazepam, das im MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektrum jeweils nur ein Fragment (m/z 269 bzw. m/z 241) zeigt und in allen drei dotierten Konzentrationen nicht identifiziert werden konnte (s. Tabelle 44). Die Durchsicht der entsprechenden Rohdaten zeigte, dass die vorhandene Analyt-Menge in allen 3 Proben ausreichte, um die Aufnahme eines MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektrums auszulösen. Grund für die nicht korrekte Identifizierung war der mangelnde Einzelscore der jeweiligen (informationsarmen) Spektren. Die Kombination und Berücksichtigung aller vorhandenen Informationen hingegen, d.h. korrekte Retentionszeit, Identifikation in MS<sup>1</sup>, Identifikation in MS<sup>2</sup> und Identifikation in MS<sup>3</sup> hätte zu einer positiven Identifizierung geführt.

Zusätzlich zu den dotierten Serumproben wurde mit der gleichen Methode die Serumprobe des Benzodiazepin-Ringversuchs BZF 2/09 (ARVECON GmbH) analysiert. Es konnten in beiden Ringversuchsproben bis auf Zopiclon, das zu diesem Zeitpunkt noch nicht in die SPL aufgenommen war, alle dotierten Substanzen mit hohen Score-Werten nachgewiesen werden (s. Tab. 46).

**Tab. 46:** Dotierte Substanzen der Ringversuchsproben BZF 2/09 A und BZF 2/09 B und die entsprechenden Score Werte des SmileMS Bibliotheksspektrenvergleichs. (\*Zopiclon war zu diesem Zeitpunkt nicht in der SPL notiert und wurde daher nicht identifiziert)

Probe	Substanz	Konzentration [ng/ml]	SmileMS Score
BZF 2/09 A	Diazepam	616,5	0,91
BZF 2/09 A	Nordazepam	412,8	0,91
BZF 2/09 A	Bromazepam	151,4	0,88
BZF 2/09 A	Clonazepam	62,4	0,91
BZF 2/09 A	Temazepam	227,2	0,90
BZF 2/09 A	Zolpidem	59,0	0,78
BZF 2/09 B	Flunitrazepam	29,1	0,91
BZF 2/09 B	Norflunitrazepam	22,5	0,91
BZF 2/09 B	7-Aminoflunitrazepam	41,1	0,91
BZF 2/09 B	Oxazepam	351,2	0,52
BZF 2/09 B	Midazolam	102,9	0,91
BZF 2/09 B	Zopiclon	41,8	n.d.*

Beide Vorversuche zeigen, dass der entwickelte LC-MS<sup>n</sup> Workflow grundsätzlich geeignet ist, Benzodiazepine in therapeutischen und z.T. auch sub-therapeutischen Konzentrationen zu detektieren und identifizieren. Die kurze Laufzeit und die automatische Auswertung und Report-Generierung entsprechen den Anforderungen klinischer und forensischer Labore und ermöglichen die effektive Bearbeitung großer Probenzahlen.

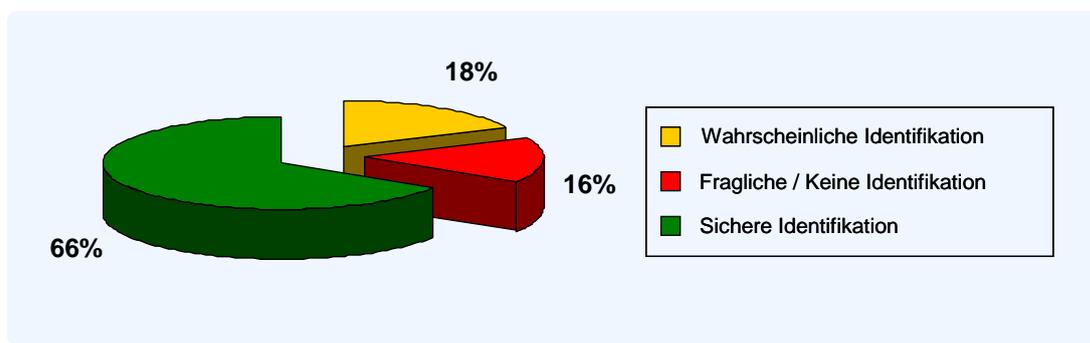
Die Ergebnisse dieses Vorversuchs wurden auf der 48. Jahrestagung der International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2010 in Bonn vorgestellt.

#### 4.7.4 Toxyper Screening: Evaluierung der Methode für Serum

Bei diesem Versuch wurde Humanserum mit unterschiedlichen Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in je drei Konzentrationen („Low“, „Medium“ und „High“) dotiert und analysiert (s. Kapitel 3.7.2.1). Die insgesamt 156 untersuchten Analyten umfassen forensisch relevante Substanzen verschiedener Wirkstoffklassen (z.B. Benzodiazepine, Neuroleptika, Psychopharmaka, Opiate, Amphetamine). Es wurden bis zu 10 Substanzen mit ähnlichen therapeutischen Spiegeln in einem Mix

zusammengefasst. Für Substanzen, für die in der TIAFT-Liste kein therapeutischer Bereich hinterlegt war, wurden Konzentrationen von 50, 250 und 500 ng/ml verwendet. Die Auflistung der einzelnen Serumproben mit Wirkstoffkonzentrationen und der jeweiligen SmileMS Score-Werte sind in Anhang A-4 aufgelistet.

Die automatische Auswertung der Daten erfolgte mit SmileMS. Ein Score-Wert  $\geq 0,85$  wurde als sichere Identifikation, Score-Werte zwischen 0,65 und 0,84 als wahrscheinliche Identifikation definiert. Ergebnisse mit Score-Werten unter 0,65 wurde als fragliche Identifikationen gewertet. Nach dieser Einstufung konnten 103 Substanzen (66 %) in allen drei Konzentrationen nachgewiesen und sicher identifiziert werden. 28 Substanzen (18 %) wurden mit einem Score-Wert zwischen 0,65 und 0,84 identifiziert während 25 Substanzen (16 %) nur fraglich bzw. gar nicht identifiziert werden konnten (s. Abb. 42).



**Abb. 42:** Analysenergebnisse der dotierten Serumproben sortiert nach Qualität der Identifikation. (Score-Wert  $\geq 0,85$ : Sichere Identifikation;  $0,84 \geq \text{Score-Wert} \geq 0,65$ : Wahrscheinliche Identifikation; Score-Wert  $< 0,65$ : Fragliche bzw. keine Identifikation)

Bei allen fraglichen und wahrscheinlichen Identifikationen wurde anhand des von SmileMS durchgeführten Spektrenvergleichs bzw. mit Hilfe der entsprechenden Rohdaten versucht, Gründe für die nur unzureichende Identifizierung zu finden. Die Hauptursachen für schlechte bzw. fehlende Identifikation sind demnach: fragmentarme Spektren (47 %), mangelnde Sensitivität (20 %), unterschiedliche Intensitäten-Reihenfolge der Fragmente (13 %), Co-Elution anderer Substanzen (11 %) und/oder unterschiedliche Fragmentierung (9 %). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich in Tabelle 47. Anhang A-5 enthält eine Aufstellung aller untersuchten Substanzen.

Tab. 47: Ursachen für unzureichende bzw. fehlende Identifizierung

Ursache	Score-Wert < 0.65	Score-Wert 0.65 - 0.84	
Sensitivität	7	4	4 Substanzen konnten in keiner der 3 Konzentrationen detektiert werden. Für 4 Substanzen zeigte lediglich die niedrigste Konzentration einen Score < 0.85
Nur 1 Fragment	7	5	Informationsarme Spektren
Nur 2 Fragmente	2	10	Informationsarme Spektren
Co-Elution	4	2	Bei 4 Substanzen wurden gemischte Fragmentspektren beobachtet. Bei 2 Substanzen wurde daher das Molekül-Ion nicht als Precursor gewählt.
Intensitäts-Reihenfolge der Fragmente	3	4	Fragmente mit ähnlichen Intensitäten
Unterschiedliche Fragmentierung	2	3	Schlechte Reproduzierbarkeit bzw. falsches Bibliotheksspektrum?
Summe	25	28	

Darüber hinaus wurden falsch-positive Identifikationen anhand der verwendeten Spektren und der vorhandenen Rohdaten auf Plausibilität überprüft. Dabei konnten folgende falsch-positive Identifikationen gefunden werden:

#### Identifikation trotz komplett unterschiedlicher Spektren

Insgesamt wurden 11 Substanzen trotz deutlicher Unterschiede in den Fragment-Intensitäten bzw. der Intensitätsreihenfolge der Fragmente mit Score-Werten zwischen 0,49 und 0,72 identifiziert. Dabei unterschied sich das Hauptfragment der experimentellen Daten von dem im zugeordneten Bibliotheksspektrum. Bei 9 der 11 Fälle handelte es sich bei dem zugeordneten Bibliotheksspektrum um ein informationsarmes Spektrum mit nur einem Fragment. In Abb. 43 sind zwei Beispiele für diese am häufigsten vorkommende Art von falsch-positivem Match abgebildet.

Die Aufnahme eines MS<sup>3</sup>-Spektrums wurde in diesen Fällen nicht angestoßen, da der im jeweiligen Referenzspektrum vorhandene Peak im experimentellen Spektrum nur in Intensitäten unterhalb von 5 % des Basepeaks vorhanden war und diese Intensität unterhalb des Schwellenwertes zum Auslösen eines MS<sup>3</sup>-Spektrums liegt. Bei visueller Kontrolle des Ergebnisberichts kann diese Art von falsch-positiven Treffern leicht als nicht zutreffend erkannt werden. Hier zeigen sich deutlich die Schwächen des von SmileMS verwendeten Algorithmus bei der Berechnung von Score-Werten fragmentarmer Spektren.

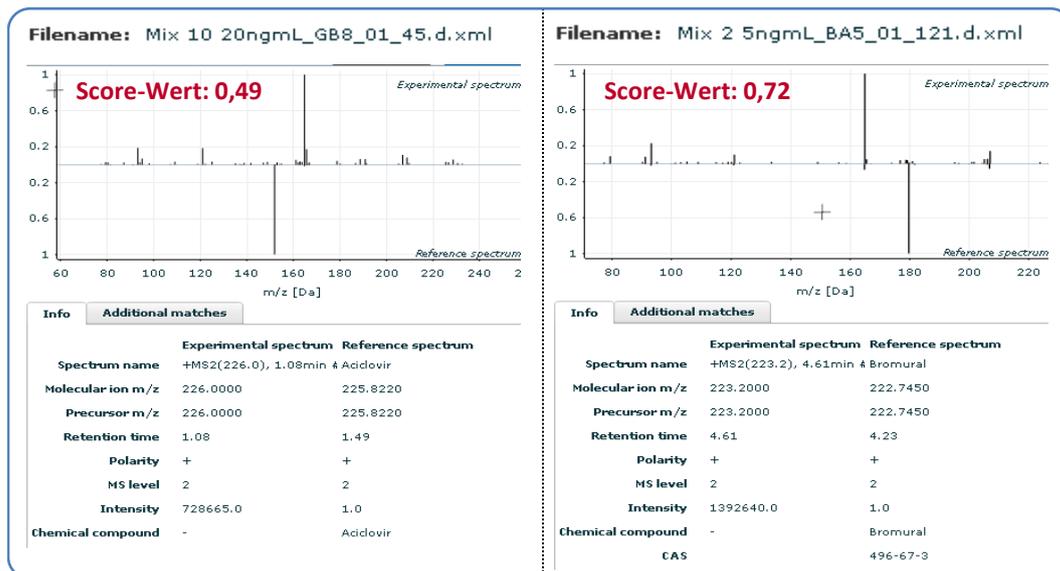


Abb. 43: Beispiele für falsch-positive Identifikation auf Grund der Zuordnung von informationsarmen Spektren.

### Identifikation bei geringen Intensitäten

In drei Fällen wurden Spektren mit sehr geringen Intensitäten mit der Spektrenbibliothek verglichen. Ähnlich wie bei den obigen Treffern wurde jeweils ein informationsarmes Bibliotheksspektrum mit Score-Werten zwischen 0,56 und 0,68 zugeordnet (s. Abb. 44).

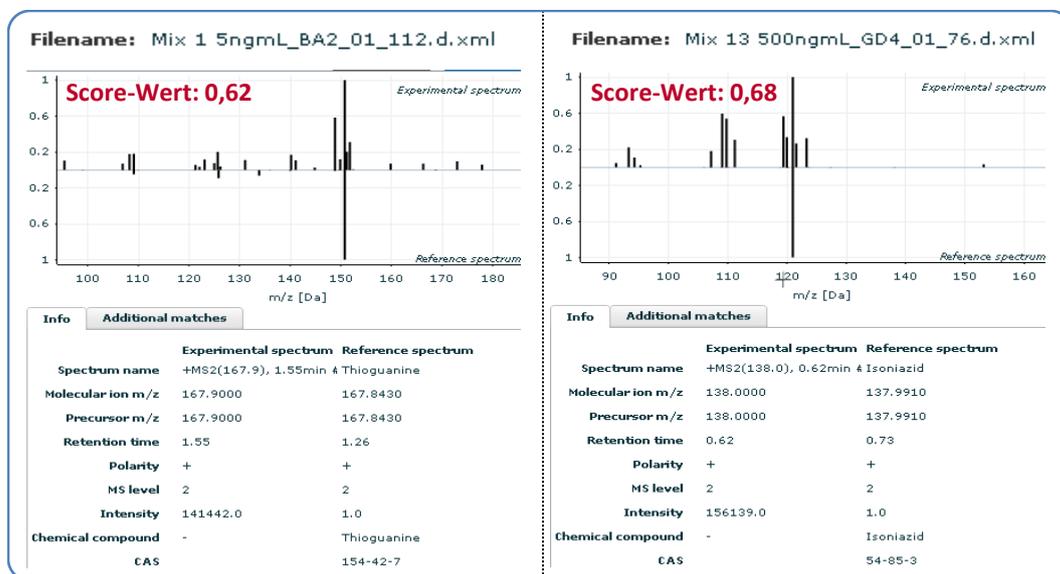


Abb. 44: Beispiele für falsch-positive Identifikation bei geringen Intensitäten

In diesen Fällen wurde entweder auf Grund der geringen MS<sup>2</sup>-Intensitäten kein MS<sup>3</sup>-Spektrum aufgenommen bzw. das aufgenommene MS<sup>3</sup>-Spektrum unterscheidet sich so stark vom hinterlegten MS<sup>3</sup>-Spektrum der vermeidlichen

Substanz, dass es von SmileMS nicht berücksichtigt wurde. Erneut können diese Treffer bei visueller Kontrolle der Spektren einfach erkannt und ausgeschlossen werden.

### Identifikation nur über das MS<sup>3</sup>-Spektrum

In zwei Fällen wurde eine Substanz (Methadon bzw. Clozapin, s. Abb. 45) lediglich anhand des MS<sup>3</sup>-Spektrums mit Score-Werten von 0,56 bzw. 0,81 identifiziert. Bei Durchsicht der entsprechenden Rohdaten wurde jedoch festgestellt, dass das jeweilige MS<sup>2</sup>-Spektrum nicht zur angegebenen Substanz passt.

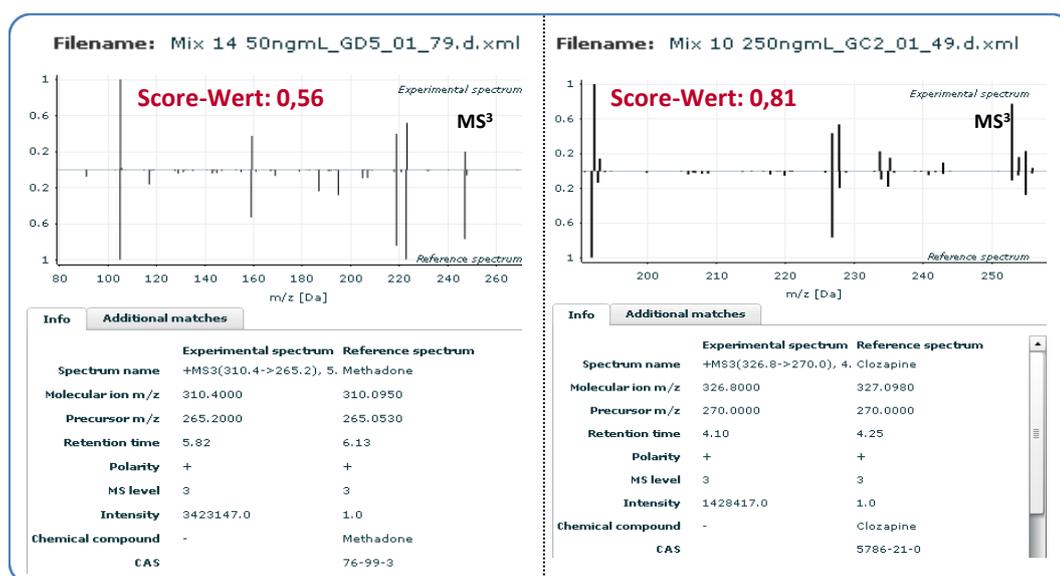


Abb. 45: Beispiele für falsch-positive Identifikation bei Übereinstimmung der MS<sup>3</sup>-spektren ohne zugehörigen MS<sup>2</sup>-Treffer

Da SmileMS lediglich zwei Spektren miteinander vergleicht, geht die Information des unpassenden MS<sup>2</sup>-Spektrums nicht negativ in die Score-Wert Berechnung mit ein. Treffer, die bei fehlendem MS<sup>2</sup>-Spektrum lediglich auf Übereinstimmung der MS<sup>3</sup>-Spektren beruhen, sind daher bei manueller Durchsicht der Ergebnisse als falsch-positiv auszuschließen.

### Zusätzliche Identifizierung von Struktur-Isomeren

In zwei Fällen wurde zusätzlich zu einer dotierten Substanz ein Struktur-Isomer identifiziert. So wird beispielsweise Clopenthixol auch als Zuclopentixol identifiziert und umgekehrt.

### Identifikation von Serum-Bestandteilen

In mehreren Fällen wurden nicht dotierte, jedoch endogen vorhandene Substanzen (z.B. verschiedene Hormone der Nebennierenrinde) bzw. von den

Spendern des Serums aufgenommene Substanzen oder deren Metaboliten (z.B. Coffein, Nicotin, Theobromin...) identifiziert (s. Abb. 46).

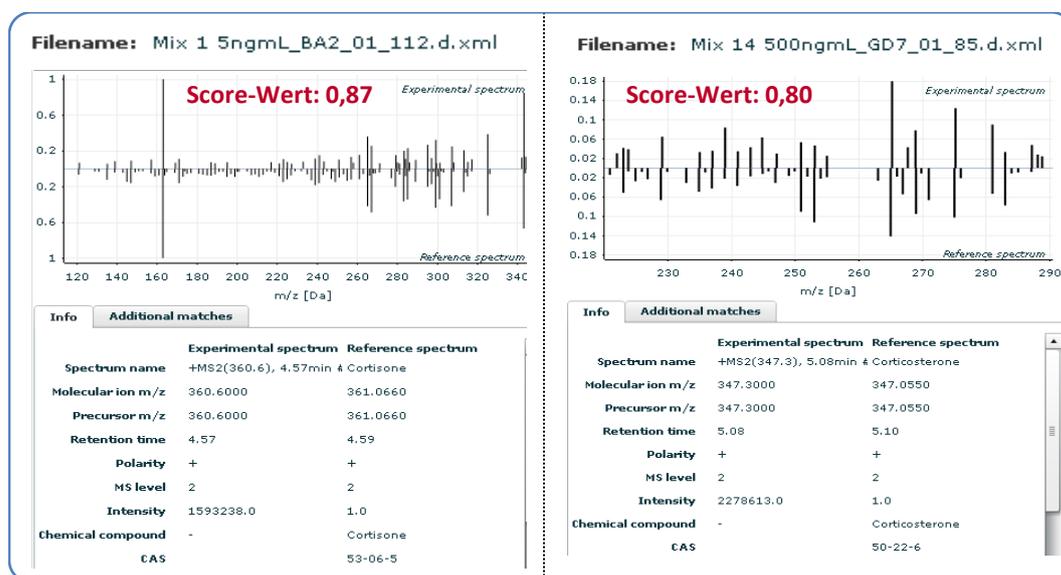


Abb. 46: Korrekte Identifikation von im Serum vorhandener Hormone

Hierbei handelt es sich somit nicht um falsch-positive Treffer sondern um korrekte Identifikationen.

### Identifikation von Abbauprodukten

In sieben Fällen wurden Substanzen identifiziert, die theoretisch als Abbauprodukt eines im entsprechenden Mix dotierten Wirkstoffes entstanden sein könnten. In Mix 10 wurden neben dotierten Cocain auch dessen Abbauprodukte Ecgoninmethylester (Score-Werte zwischen 0,36 und 0,89) und Benzoyllecgonin (Score-Wert 0,91) identifiziert. Diese Cocain-Abbauprodukte konnten weder in den anderen Mixen noch in den verschiedenen analysierten Leerseren identifiziert werden.

Des Weiteren wurden in mehreren Fällen desalkylierte Abbauprodukte von dotierten Substanzen identifiziert. Ein Beispiel dafür ist die Identifikation von Naloxon in allen drei Konzentrationen von Mix 9, welches durch Desalkylierung des in Mix 9 vorhandenen Nalbuphin entstanden sein könnte.

### Identifikation nicht-dotierter Substanzen mit z.T. hohen Score-Werten

Bei dieser Gruppe handelt es sich um echte falsch-positive Treffer. Es wurden insgesamt sechs nicht dotierte Substanzen mit z.T. hohen Score-Werten und bei visueller Kontrolle gut übereinstimmenden Spektren identifiziert. Als Beispiel dafür ist der immer wiederkehrende Treffer für Benzododecinium in Abb. 47 dargestellt.

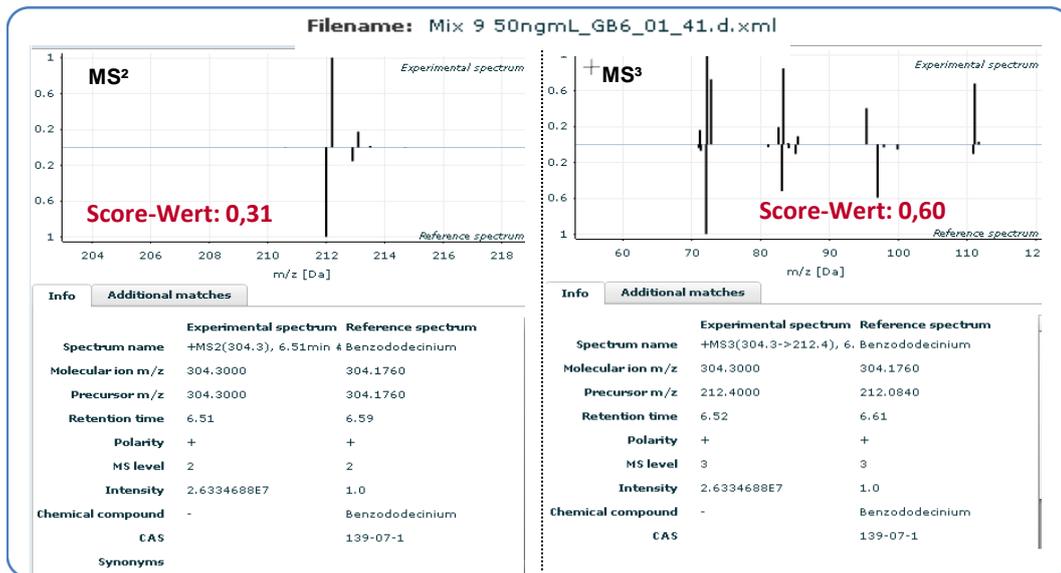
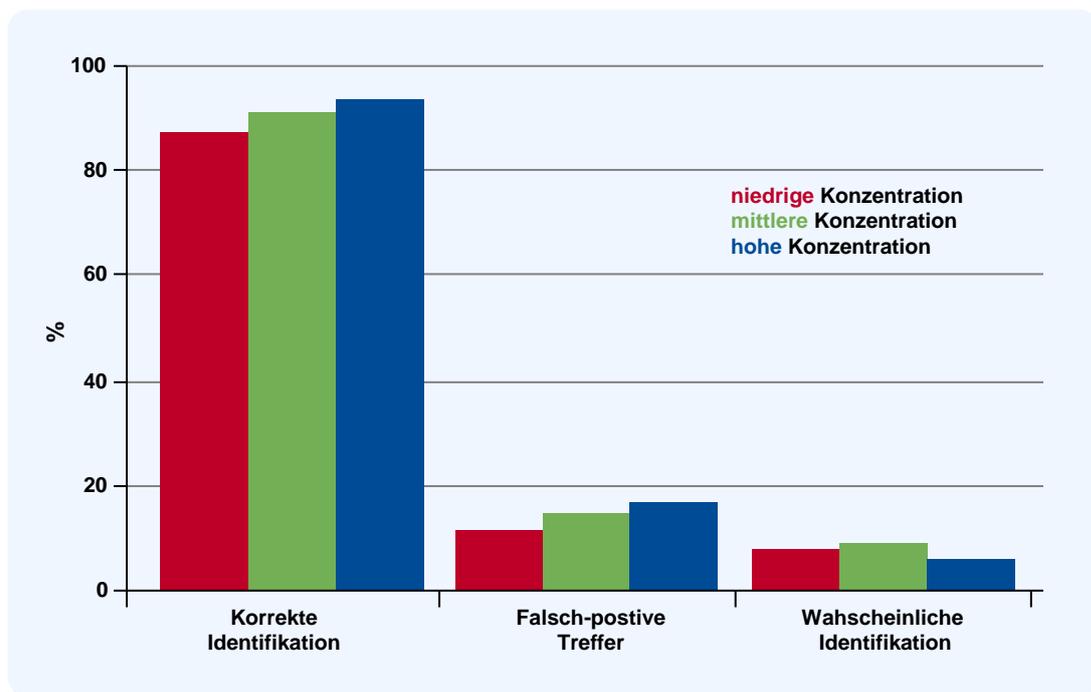


Abb. 47: Beispiel für falsch-positive Identifikation von Benzododecinium in MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>

Die Ursache dieser wiederkehrenden falsch positiven Treffer bzw. die Quelle möglicher Störsubstanzen konnte nicht zufriedenstellend ermittelt werden. Eine mögliche Quelle könnten Stoffe, die chargenabhängig in unterschiedlich hoher Konzentration in den verwendeten Lösungsmitteln oder der Trennsäule vorkommen. Bei der manuellen Kontrolle der automatischen Ergebnisse durch geschultes Personal lassen sich diese wiederkehrenden Treffer jedoch nahezu komplett ausschließen.

Die Messungen wurden nach Fertigstellung der in DataAnalysis (DA) implementierten Auswerte-Routinen mit der finalen Toxtyper-Methode erneut analysiert und prozessiert. Auf Grund nicht mehr vorrätiger Referenzsubstanzen wurden dieses Mal nur 144 Substanzen dotiert. Die Ergebnisse dieser mit der finalen Toxtyper-Methode ausgewerteten Analysen sind in Abb. 48 zusammengefasst.



**Abb. 48:** Ergebnisse der mit der finalen Toxyper Methode analysierten Serum-Mixe aufgeschlüsselt in die 3 Konzentrations-Stufen. Treffer mit einem Purity-Wert zwischen 700 und 800 wurden als „wahrscheinliche Identifikation“ definiert.

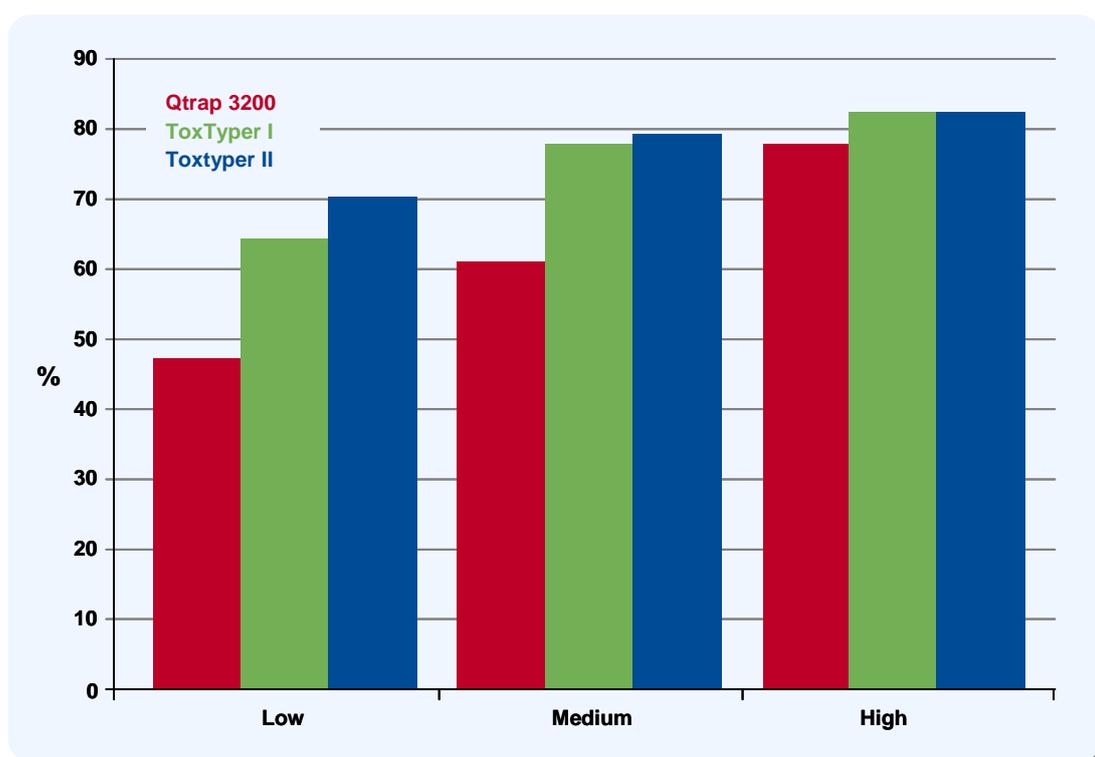
Der von Bruker Daltonik entwickelte Algorithmus gibt die Güte der Identifikation in Form des sogenannten Purity-Wertes an. Dieser liegt 0 und 1000, wobei für diese Arbeit Werte größer 800 als sichere Identifikation und Purity-Werte zwischen 700 und 800 als wahrscheinliche Identifikation definiert wurden. Treffer mit Purity-Werten kleiner 700 werden nicht im automatischen Ergebnis-Report gelistet. Im Gegensatz zum Score-Wert von SmileMS gehen die relativen Ionen-Intensitäten der Fragmente in die Berechnung des Purity-Wertes mit ein. Zusätzlich werden die Informationen von  $MS^1$ -,  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektrum miteinander verknüpft, d.h. für einen hohen Purity-Wert müssen die Spektren aller Fragmentierungsstufen übereinstimmen.

Der Vergleich der beiden Auswerteprogramme zeigt, dass sich der Algorithmus von SmileMS bei der hier verwendeten Methode nur bedingt zur Ermittlung einer Substanz-Identifizierung eignet (vergleiche Abb. 42 und Abb. 48). Die im Vergleich zu QqQ-Spektren eher fragmentarmen  $MS^2$ -Spektren der Ionenfalle führen zu einer hohen Zahl falsch positiver Treffer. Die fehlende Verknüpfung von  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Information führt zu einer erhöhten Zahl falsch negativer Ergebnisse, obwohl alle notwendigen Daten in ausreichender Qualität vorhanden waren.

Die Ergebnisse dieser Evaluierung wurden auf dem nationalen Treffen der Association for Clinical Biochemistry (Focus) in Harrogate (UK) und der 59. ASMS Konferenz in Denver, Colorado (USA) vorgestellt.

#### 4.7.5 Toxtyper Screening: Vergleich Toxtyper und MTS (Serum)

Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit der neuen Methode mit dem bisher verwendeten Multi-Target-Screenings (MTS) mittels QTRAP wurden ebenfalls die in Kapitel 4.7.4 verwendeten dotierten Serumproben verwendet (s. Kapitel 3.7.2.1). Insgesamt gingen 121 mit beiden Methoden erfassbare Analyten in die Auswertung ein. Eine Zusammenfassung der SmileMS-Ergebnisse ist in Abb. 49 dargestellt.



**Abb. 49:** Ergebnisse des Methodenvergleichs Toxtyper/MTS. Insgesamt gingen 121 mit beiden Methoden erfassbare Substanzen in die Auswertung ein. Treffer mit einem Score-Wert  $\geq 0,7$  wurden als Identifizierung gewertet (SmileMS).

Die beiden Toxtyper Systeme zeigten bei mittleren und hohen Konzentrationen nahezu identische Ergebnisse. Bei Proben mit niedrigen Konzentrationen konnte mit dem Toxtyper System II eine geringfügig höhere Identifizierungsrate erzielt werden. (Toxtyper I: 64 %, Toxtyper II: 70 %). Nach Rücksprache mit dem die Analysen durchführenden Labors konnte dies auf den aktuellen Zustand der jeweiligen Analysensysteme zurückgeführt werden. Toxtyper System I war bereits längere Zeit im täglichen Routinebetrieb, während System II erst wenige Wochen vor den Analysen in Betrieb genommen wurde.

Mit dem MTS (QTRAP 3200) konnten bei hohen Konzentrationen eine nahezu identische Anzahl korrekter Identifikationen erzielt werden (QTRAP: 77 %, Toxtyper I und II je 82 %). Mit abnehmender Konzentration verschlechterte sich die Identifizierungsrate jedoch deutlich, so dass in Serumproben mit geringen therapeutischen Konzentrationen lediglich 47 % der dotierten Analyten korrekt identifiziert wurde. Ursache hierfür ist vermutlich nicht der Mangel an Sensitivität sondern mangelnde Spektrenqualität bei geringen Analyt-Konzentrationen. Betrachtet man die Empfindlichkeit des jeweiligen Survey-Scans der beiden Methoden, so ist der Survey-Scan des MTS (MRM-Modus) verglichen mit dem Fullscan Survey-Scan des Toxtypers der empfindlichere Messmodus. Die 3D-Ionenfalle des amaZons benötigt jedoch für die Aufnahme qualitativ hochwertiger MS-Spektren weniger Precursor-Intensität bzw. kann mittels ICC eine geringe Ionen-Intensität besser kompensieren als die lineare Falle des QTRAP 3200 (Q3, Hybrid aus Quadrupol und Ionenfalle). Obwohl der SmileMS-Algorithmus, wie in Kapitel 4.7.4 gezeigt, für den Vergleich von Quadrupole-MS-Spektren besser geeignet ist, resultieren die Vorzüge und Nachteile der jeweiligen Methode insgesamt in einer höheren Identifizierungsrate der ToxTyper-Systeme.

#### 4.7.6 Toxtyper Screening: Evaluierung der Methode in Urinproben

Für die Methodenevaluierung stand ein Kontingent von 119 realen Urinproben zur Verfügung, mit denen vier verschiedene Experimente durchgeführt wurden:

- 1.) Toxtyper Screening (amaZon, SmileMS)
- 2.) Quantitative Bestimmung von Benzodiazepinen (QTRAP 4000, Analyst 1.5)
- 3.) MTS (QTRAP 4000, Cliquid 3.0™)
- 4.) Vergleich zweier Probenaufarbeitungen (amaZon, SmileMS)

Detaillierte Informationen zu den einzelnen Experimenten finden sich in Kapitel 3.7.2.2. Die Auswertung aller Screening Analysen erfolgte zu diesem Zeitpunkt der Arbeit mangels Alternative noch mit SmileMS.

#### **Nachweis von Benzodiazepinen in Urin (Experiment 1 und 2)**

Insgesamt konnten in 57 der untersuchten 119 Urinproben mit mindestens einer der beiden Methoden ein Wirkstoff aus der Gruppe der Benzodiazepine nachgewiesen werden. Angelehnt an die Evaluierungsergebnisse in Serum wurde für die Auswertung SmileMS-Ergebnisse mit einem Score-Wert  $\geq 0,65$  als sichere Identifizierung gewertet. Mit dieser Einschränkung wurden mit dem Toxtyper in 37 Proben insgesamt 46 Benzodiazepine oder Metaboliten nachgewiesen (s. Tab. 48).

**Tab. 48:** Ergebnisse des Nachweises von Benzodiazepinen im Urin. Methodenvergleich Toxyper (Score-Werte) und quantitative LC-MS/MS-Methode (Konzentration in ng/ml). Grün: Korrekte Identifizierung TT; Blau: Falsch-positive Identifizierung TT; Rot: falsch-negative Identifizierung TT.

ID	Toxyper (amaZon, Score-Wert)	LC-MS/MS (QTRAP 4000, [ng/mL])
MD 1	7-Aminoflunitrazepam (0.90)	7-Aminoflunitrazepam (71) Flunitrazepam (< 2.5)
MD 2	-	Nordiazepam (< 10)
MD 3	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.85)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (992)
MD 4	7-Aminoflunitrazepam (0.91)	7-Aminoflunitrazepam (105) Flunitrazepam (< 2.5)
MD 5 H1	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.90)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (51)
MD 11 H1	-	Lorazepam (125)
MD 17	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.86)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (2420)
MD 18	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.88)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (1050)
MD 21	Lorazepam (0.84)	Lorazepam (152)
MD 22	Oxazepam (0.73)	Oxazepam (30000)
MD 23 H2	-	Oxazepam (53)
MD 24	7-Aminoflunitrazepam (0.89)	7-Aminoflunitrazepam (41) $\alpha$ -Hydroxytriazolam (2230)
MD 25	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.88) Nordiazepam (0.87) Oxazepam (0.71)	Nordiazepam (303) Oxazepam (15000) Temazepam (492) Diazepam (25)
MD 27 H2	Oxazepam (0.70)	Oxazepam (167)
MD 36 H3	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.88)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (< 25)
MD 37 H3	-	Oxazepam (< 10)
MD 38 H3	Lorazepam (0.66)	Lorazepam (27) Diazepam (< 10) Nordiazepam (< 10) Oxazepam (31) Temazepam (< 10)
MD 42 H4	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.83)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (29)
MD 45 H4	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.86)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (< 25)
MD 47 H4	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.90)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (31)
MD 48 H4	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.84)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (< 25)
MD 51 H5	-	Nordiazepam (< 10) Oxazepam (21)
MD 52 H5	Nordiazepam (0.85)	Nordiazepam (159) Temazepam (166) Oxazepam (173) Diazepam (< 10)
MD 55 H5	Desmethyloclobazam (0.77)	-
MD 62 H6	Alprazolam (0.91) $\alpha$ -Hydroxyalprazolam (0.82) $\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.83)	Alprazolam (50) $\alpha$ -Hydroxyalprazolam (positiv) $\alpha$ -Hydroxytriazolam (30)
MD 66 H6	-	Oxazepam (< 10)

ID	Toxtyper (amaZon, Score-Wert)	LC-MS/MS (QTRAP 4000, [ng/mL])
MD 67 H6	-	Nordiazepam (< 10)
MD 70 H6	7-Aminoflunitrazepam (0.91)	7-Aminoflunitrazepam (61) Flunitrazepam (< 2.5)
MD 72 H6	7-Aminoflunitrazepam (0.89) $\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.87)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (40) Triazolam (< 10)
MD 91 H7	Zolpidem (0.84)	Zolpidem (< 10) Nordiazepam (< 10) Oxazepam (25)
MD 92 H7	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.86)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (58)
MD 95 H7	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.86)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (28) Triazolam (< 10)
MD 101 H8	Lorazepam (0.78)	Lorazepam (50) Zopiclon (< 10)
MD 102 H9	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.88)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (41)
MD 104 H9	Nordiazepam (0.86) Oxazepam (0.73)	Nordiazepam (298) Oxazepam (429) Temazepam (336) Diazepam (< 10)
IK 1	7-Aminoflunitrazepam (0.90) 7-Aminodesmethyflunitrazepam (0.91)	7-Aminoflunitrazepam (166) Flunitrazepam (< 2,5)
IK 2	-	Lorazepam (232) Nordiazepam < 10 Oxazepam (< 10)
IK 4	Zolpidem (0.79)	Zolpidem (< 10)
IK 5	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.84)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (2840)
IK10	7-Aminoflunitrazepam (0.90)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (35)
IK 12	7-Aminoflunitrazepam (0.91)	7-Aminoflunitrazepam (25)
IK 16 H3	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.88) Temazepam (0.77)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (204) Temazepam (224) Nordiazepam (109) Oxazepam (425) Diazepam (< 10) Triazolam (< 10)
IK 17 H3	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (0.90)	$\alpha$ -Hydroxytriazolam (29) Triazolam (< 10)
IK 25 H3	-	Flunitrazepam (< 1,0)
IK 34	-	Flunitrazepam (< 1,0) 7-Aminoflunitrazepam 113 Norflunitrazepam (< 2,5)
IK 35	Lorazepam (0.87)	Lorazepam (43)

ID	Toxyper (amaZon, Score-Wert)	LC-MS/MS (QTRAP 4000, [ng/mL])
IK 39	Alprazolam (0.90) Oxazepam (0.71)	Alprazolam (16) Oxazepam (62) $\alpha$ -Hydroxyalprazolam (positiv) Nordiazepam (26) Diazepam (< 10) Temazepam (< 10)
507 TS	-	Zolpidem (< 10)
510 TS	-	Zopiclon (< 10)
516 BGL	-	Bromazepam (28)

Davon konnten vier Treffer (MD 51 H5, MD 72 H6, IK 1 und IK 10) nicht mit der quantitativen LC-MS/MS Methode bestätigt werden. Zur Klärung dieser falsch-positiven Treffer wurden die SmileMS-Daten sowie die Rohdaten der jeweiligen Messungen manuell ausgewertet. Nach Durchsicht der Daten konnte für alle Fälle eine plausible Erklärung für die teilweise falsche Identifikation mit hohem Score-Wert gefunden werden.

**Probe IK 1, 7-Aminodesmethylflunitrazepam (Score 0,91):** Der Flunitrazepam-Metabolit 7-Aminodesmethylflunitrazepam wird von der quantitativen MRM-Methode nicht erfasst. Da in der Proben jedoch sowohl die Muttersubstanz Flunitrazepam ( $c < 2,5$  ng/ml) als auch der Hauptmetabolit 7-Aminoflunitrazepam (Score 0,90,  $c = 166$  ng/ml) nachgewiesen wurden, kann der Treffer für 7-Aminodesmethylflunitrazepam als korrekte Identifizierung gewertet werden.

**Probe MD 55 H5, Desmethyloclobazam (Score 0,77):** Manuelle Überprüfung der zur Identifizierung verglichenen Spektren zeigte keinerlei Übereinstimmung. Das experimentelle MS<sup>2</sup>-Spektrum bestand aus nur einem Fragment, was darauf schließen lässt, dass das hier isolierte Precursor-Ion in Wahrheit ein Matrixbestandteil ist. Diese Theorie wird durch einen Störpeak in einem der für Desmethyloclobazam hinterlegten MRM-Übergänge (QTRAP 4000) gestützt. Die Problematik der Score-Wert Berechnung bei fragmentarmen Spektren wurde bereits in Kapitel 4.7.4 ausführlich diskutiert.

**Probe MD 72 H6 und IK 10, 7-Aminoflunitrazepam (Score 0,89 und 0,90):** Mittels LC-MS/MS konnte in keiner der beiden Proben Flunitrazepam oder 7-Aminoflunitrazepam nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde jedoch in der zuvor analysierten Probe (MD 70 H6 bzw. IK 1) 7-Aminoflunitrazepam nachgewiesen. Bei Auswertung der jeweiligen, zwischen jeder Messung analysierten Fließmittelinjektion, konnten in beiden Fließmitteln 7-

Aminoflunitrazepam mit Score-Werten  $> 0,65$  identifiziert werden. Die falsch-positiven Treffer für 7-Aminoflunitrazepam lassen sich demnach auf Memoryeffekte im Autosampler zurückführen.

Mittels quantitativer LC-MS/MS konnten in 49 Urinproben insgesamt 90 Benzodiazepine und/oder Metaboliten nachgewiesen werden. Davon konnten lediglich 43 Substanzen vom Toxyper mit Score-Werten  $\geq 0,65$  bestätigt werden. Die Rohdaten aller Fälle in denen eine Substanz nicht identifiziert werden konnten (siehe rote Einträge Tab. 48). wurden ebenfalls manuell überprüft um Gründe für die falsch-negativen Ergebnisse zu finden.

**Flunitrazepam (Spur  $< 2.5$  ng/ml bzw. Spur  $< 1.0$  ng/ml):** Insgesamt wurde mittels LC-MS/MS in sechs Fällen Spuren von Flunitrazepam nachgewiesen. Diese geringen Konzentrationen konnten mit dem Toxyper auf Grund mangelnder Sensitivität nicht nachgewiesen werden. Manuelle Durchsicht der Rohdaten mit Extraktion des Flunitrazepam-Precursors m/z 314 ergab in keinem der Fälle eine verwertbare Intensität oberhalb des Thresholds.

In vier der Fälle konnte die Einnahme von Flunitrazepam jedoch durch Nachweis des Metaboliten 7-Aminoflunitrazepam mit Score-Werten  $> 0,85$  nachgewiesen werden.

**Triazolam (Spur  $< 10$  ng/ml):** Aufgrund mangelnder Empfindlichkeit konnten diese geringen Triazolamkonzentrationen mit der Ionenfalle nicht detektiert werden. Ähnlich wie schon zuvor bei Flunitrazepam konnte die Einnahme von Triazolam in drei Fällen nur durch Nachweis des Metaboliten  $\alpha$ -Hydroxytriazolam nachgewiesen werden.

**Diazepam (Spur  $< 0,25$  ng/ml):** In sechs Proben konnten geringen Konzentrationen Diazepam nachgewiesen werden. In diesen Fällen war eine positive Identifizierung mittels Toxyper nicht möglich.

**Nordazepam, Temazepam und Oxazepam (Spur  $< 25$ ng/ml):** Analog zu Diazepam konnten diese aktiven Diazepam-metaboliten in diesen geringen Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Im Fullscan fanden sich keine Peaks in den EICs der jeweiligen Precursor-Ionen.

**Zolpidem und Zopiclon (Spur  $< 10$  ng/ml):** In drei Proben konnten diese zwei benzodiazepin-ähnlichen Substanzen in dieser geringen Konzentration nicht identifiziert werden. Die übereinstimmenden Ergebnisse in Probe MD 91 H7

(Zolpidem < 10 ng/ml) zeigen jedoch das der Nachweis von geringen Zolpidem-Konzentrationen von Fall zu Fall möglich ist.

**Bromazepam (c = 28 ng/ml):** Bei Durchsicht der Rohdaten konnten für den Bromazepam-Precursor m/z 316 bzw. sein Isotop m/z 318 nach Extraktion der entsprechenden Ionenspur keine Peaks gefunden werden.

Die Ergebnisse der Serum-Evaluierung zeigen jedoch, dass im Serum therapeutische Konzentrationen von Bromazepam (80 - 170 ng/ml) sicher identifiziert werden können.

**Oxazepam und Temazepam (c > 50 ng/ml):** In allen Fällen konnten in den Rohdaten Peaks in den EICs der entsprechenden Precursor-Ionen gefunden werden und es wurde in allen Fällen den Informationen der SPL entsprechende MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren aufgenommen. Bei beiden Substanzen handelt es sich um Analyten mit fragmentarmen Spektren (lediglich 1 oder 2 Fragmente). Dies reicht nicht in der Regel nicht aus, um mit SmileMS vernünftige Score-Werte zu berechnen. Bei manueller Durchsicht der Daten und Vergleich der jeweiligen MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren sowie der Retentionszeit kann von einer korrekten Identifizierung der beiden Substanzen ausgegangen werden.

**Lorazepam (Probe IK 2 und MD 11 H1):** In den beiden Proben konnten mittels quantitativer LC-MS/MS 232 ng/ml bzw. 125 ng/ml Lorazepam nachgewiesen werden. Die automatische Auswertung ergab Score-Werte von 0,56 bzw. 0,60. da im Rahmen dieser Untersuchung bereits Lorazepam-Konzentrationen unterhalb von 75 ng/ml mit guten Score-Werten identifiziert wurden (z.B. Proben MS 101 H8 und IK 35) handelt es sich hier nicht um ein generelles Empfindlichkeitsproblem. Die manuelle Auswertung in DataAnalysis zeigte eine gute Übereinstimmung der beiden von SmileMS zur Identifizierung verwendeten Spektrenpaare. Dies wurde durch manuelle Berechnung der Übereinstimmung mit Hilfe eines anderen Algorithmus (Cross-Correlation-Function, CCF) bestätigt (fit-factor von 98,34 % bzw. 97,71 %). Im Vergleich zu den anderen aufgelisteten Beispielen handelt es sich hierbei um ein Problem der Auswerteroutine von SmileMS (X-Rank) und nicht um einen analytisches Problem.

Vom verschreibenden Arzt bzw. der Pflegeeinrichtung konnten für 18 Probanden Aussagen über die Medikation mit Benzodiazepinen erhalten werden. Dabei handelt es sich um 22 Verschreibungen, von denen 18 Einnahmen mit beiden Analysenmethoden durch Nachweis des jeweiligen Wirkstoffes und/oder dessen Metaboliten bestätigt werden konnten.

Es war nicht möglich, die Lorazepam- bzw. Diazepam-Einnahme von Proband IK 2 mittels Toxyper zu bestätigen. Letzteres lässt sich durch die im Urin nur noch in Spuren vorhandenen Diazepam-Metaboliten Nordazepam und Oxazepam erklären. Diazepam selbst war auch mittels empfindlicher LC-MS/MS nicht mehr detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass die letzte Diazepam-Einnahme mehrere Tage vor der Urin-Kontrolle stattgefunden haben muss. Die Einnahme von Diazepam durch Proband MD 47 H4 sowie die Einnahme von Bromazepam durch Proband IK 12 konnten mit beiden Verfahren nicht bestätigt werden.

### **Vergleich amaZon (Toxyper) und QTRAP 4000 (MTS) (Experiment 1 und 3)**

Im nächsten Schritt wurden die automatischen SmileMS Ergebnisse des Toxypers mit den Ergebnissen Multi-Target-Screenings (MTS, QTRAP 4000) verglichen (s. Kapitel 3.7.2.2). Ausgehend von der jeweiligen Probenvorbereitung (MTS: Fällung, „Dilute-and-shoot“; Toxyper: alkalische LLE) kann davon ausgegangen werden, dass basische Substanzen besser mit dem Toxyper, saure und gut wasserlösliche Substanzen besser mittels MTS nachgewiesen werden können.

Der von der Auswerte-Software Cliquid verwendete Algorithmus gibt die Übereinstimmung von gemessenem Spektrum und Bibliotheksspektrum mit Hilfe eines Prozentwertes wieder. Die Einführung eines Cut-Off-Wertes zur Unterscheidung von „sicherer Identifikation“ und „wahrscheinlicher Identifikation“ wie bei der SmileMS-Auswertung hat sich in der Praxis jedoch als nicht zielführend erwiesen. Deshalb wurden alle MTS-Treffer des automatischen Cliquid-Reports manuell überprüft und in die oben genannten Kategorien eingeteilt.

Für die Toxyper-Auswertung wurde erneut der automatische Ergebnis-Report mit einem Score-Cut-off von 0,65 (SmileMS) zugrunde gelegt. Eine detaillierte Auflistung aller Ergebnisse findet sich in Anhang A-6.

In die folgende Auswertung der Ergebnisse (s. Tab. 49) wurden lediglich Substanzen einbezogen, die mit beiden analytischen Methoden erfassbar sind. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurden die jeweiligen internen Standards, die bekannten häufig auftretenden falsch-positiven Ergebnisse Chlorambucil, Primidone und Triallate (MTS) und Isosorbidmononitrat (Toxyper) und ubiquitär vorkommenden Matrixkomponenten Coffein, Nicotin und deren Metaboliten. Diese nicht in die Auswertung aufgenommenen Substanzen sind ebenfalls in Anhang A-6 aufgeführt.

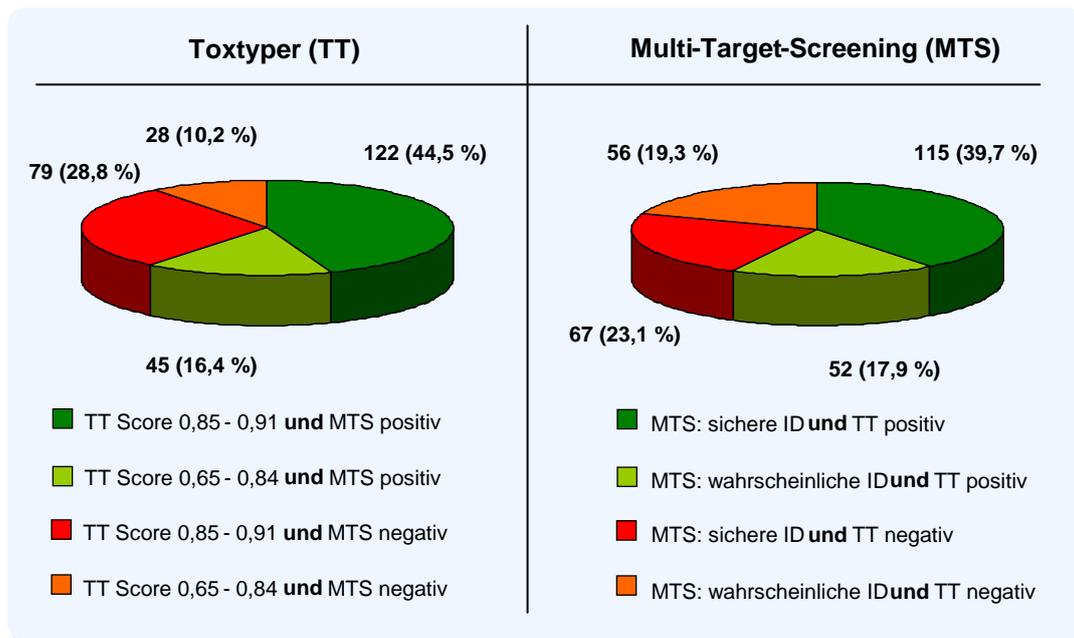
Tab. 49: Zusammenfassung der Toxyper- und MTS Screening-Ergebnisse

	amaZon X™	QTRAP 4000™
<b>Analysierte Proben</b>	119	119
<b>nachgewiesene Substanzen</b>	297 (100 %)	347 (100 %)
<b>Score-Wert <math>\geq 0,85</math> (TT) "sichere Identifikation" (MTS)</b>	213 (71,7 %)	198 (57,1 %)
<b>Score-Wert 0,65 - 0,85 (TT) "wahrscheinliche Identifikation" (MTS)</b>	84 (28,3 %)	149 (42,9 %)
<b>Substanzen in der jeweilig anderen Methode nicht enthalten</b>	23	57
<b>Substanzen für Methodenvergleich mit beiden Methoden identifiziert</b>	167	167
<b>Score-Werte <math>\geq 0,85</math> (TT) "sichere Identification" (MTS)</b>	122 (44,5 %)	115 (39,7 %)
<b>Score-Wert 0,65 - 0,85 (TT) "wahrscheinliche Identifikation" (MTS)</b>	45 (16,4 %)	52 (17,9 %)
<b>mit alternativer Methode <u>nicht</u> identifiziert</b>	107	123
<b>Score-Wert <math>\geq 0,85</math> (TT) "sichere Identification" (MTS)</b>	79 (28,8 %)	67 (23,1 %)
<b>Score-Wert 0,65 - 0,85 (TT) "wahrscheinliche Identifikation" (MTS)</b>	28 (10,2 %)	56 (19,3 %)

**Toxyper Screening (TT):** Insgesamt wurden in den 119 Urinproben 297 Substanzen mit einem Score-Wert  $\geq 0,65$  identifiziert. Aus diesen Treffern wurden 23 Substanzen von der Auswertung ausgeschlossen, da sie nicht in der Spektrenbibliothek des MTS hinterlegt sind. Von den verbleibenden 274 Substanzen konnten 167 auch im MTS gefunden werden (Score-Wert  $> 0,85$ : 122; Score-Wert zw. 0,65 und 0,84: 45).

107 Toxyper Treffer konnten nicht mittels MTS bestätigt werden. Davon lagen  $n = 79$  im Bereich sicherer (Score-Wert 0,85 - 0,91) und  $n = 28$  im Bereich wahrscheinlicher Identifikation (Score-Wert 0,65 - 0,84)

**Multi-Target-Screening (MTS):** Mit dem im Labor routinemäßig verwendeten MTS konnten insgesamt 347 Substanzen nachgewiesen werden. Davon waren 57 Substanzen nicht in der Toxyper Bibliothek hinterlegt, so dass diese von der weiteren Wertung ausgeschlossen wurden. Es konnten 167 Substanzen mit beiden Analysenmethoden nachgewiesen werden. 123 MTS-Treffer (67 sichere Identifizierung, 56 wahrscheinliche Identifizierung) konnten nicht mit dem Toxyper bestätigt werden (s. Abb. 50).



**Abb. 50:** Screening-Ergebnisse Toxytyper (TT) bezogen auf den Nachweis bzw. Nicht-Nachweis mittels Multi-Target-Screening (MTS) (links) und Screening-Ergebnisse MTS bezogen auf den Nachweis bzw. Nicht-Nachweis mittels TT (rechts).

#### Vergleich zweier Probenaufarbeitungsschritte (Experiment 4)

Mit dieser Untersuchung sollte evaluiert werden, ob der Toxytyper auch nach einer universelleren Probenaufarbeitung (Fällung mit Acetonitril s. Kapitel 2.4.7.1), die ein breiteres Spektrum an Substanzen erfasst, jedoch nur einen theoretischen Aufkonzentrierungsschritt um Faktor 4 beinhaltet, valide Ergebnisse liefert. Die beiden hier durchgeführten Messungen unterscheiden sich demnach lediglich in der Probenaufarbeitung (s. Tab. 27). Die Zusammenfassung der Analysenergebnisse der 119 untersuchten Urinproben findet sich in Tab. 50. Die ausführliche Zusammenstellung aller Ergebnisse findet sich in Anhang A-7. In grün hinterlegte Einträge wurden nach beiden Aufarbeitungen gefunden.

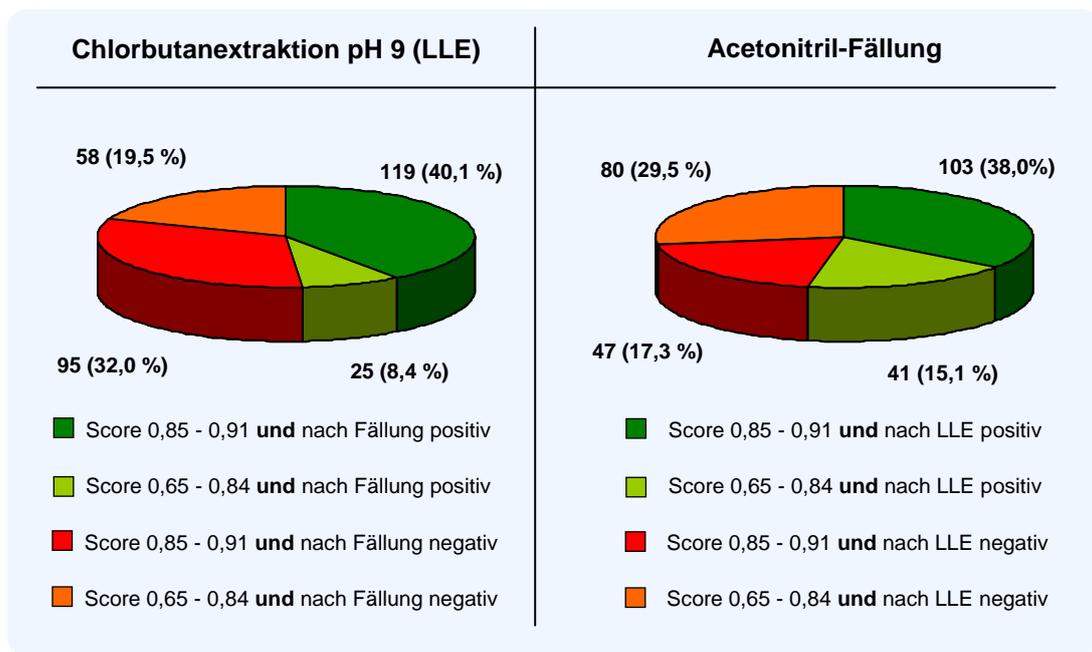
In die Auswertung mit einbezogen wurden Treffer mit einem Score-Wert  $\geq 0,65$ . Wie schon zuvor wurden der Interne Standard (D5-Diazepam), bekannte falsch-positive Treffer (z.B. Isosorbidmononitrat, Bromural, Benzododecinium) und Substanzen die aus coffein- oder nicotinhaltigen Lebens- oder Genussmitteln stammen (z.B. Coffein, Nicotin, Theobromin) von der Auswertung ausgeschlossen. Diese nicht in die Auswertung aufgenommenen Substanzen sind ebenfalls in Anhang A-7 aufgeführt.

Tab. 50: Zusammenfassung der Analyseergebnisse nach Chlorbutan-Extraktion (LLE) bzw. Acetonitril-Fällung

	LLE	Fällung
<b>Analysierte Proben</b>	119	119
<b>Nachgewiesene Substanzen</b>	297 (100 %)	271 (100 %)
<b>Score-Wert <math>\geq 0,85</math> (TT)</b>	214 (72,1 %)	150 (55,4 %)
<b>Score-Wert 0,65 - 0,85 (TT)</b>	83 (27,9 %)	121 (44,6 %)
<b>Substanzen für Methodenvergleich</b>	297 (100 %)	271 (100 %)
<b>Nach beiden Aufarbeitungsmethoden identifiziert</b>	144	144
<b>Score-Wert <math>\geq 0,85</math> (TT)</b>	119 (40,1 %)	103 (38,0 %)
<b>Score-Wert 0,65 - 0,85 (TT)</b>	25 (8,4 %)	41 (15,1 %)
<b>Nach alternativer Aufarbeitungsmethode nicht identifiziert</b>	153	127
<b>Score-Wert <math>\geq 0,85</math> (TT)</b>	95 (32,0 %)	47 (17,3 %)
<b>Score-Wert 0,65 - 0,85 (TT)</b>	58 (19,5 %)	80 (29,5 %)

**Chlorbutan-Extraktion pH 9 (LLE):** In dem untersuchten Probenkollektiv konnten nach Chlorbutan-Extraktion insgesamt 297 Substanzen mit einem Score-Wert  $\geq 0,65$  nachgewiesen werden. 144 dieser Substanzen konnten auch nach Acetonitril-Fällung mit ausreichend hohem Score-Wert nachgewiesen werden. Davon wiesen nach LLE  $n = 119$  Substanzen Score-Werte zwischen 0,85 und 0,91 und  $n = 25$  Substanzen Score-Werte zwischen 0,65 und 0,84 auf. 153 der insgesamt 297 nach Chlorbutan-Extraktion nachgewiesenen Substanzen konnten nach Acetonitril-Fällung nicht nachgewiesen werden. Von diesen nicht gefundenen Substanzen lagen  $n = 95$  im Bereich sicherer und  $n = 58$  im Bereich wahrscheinlicher Identifizierung (s. Abb. 51).

**Acetonitril-Fällung:** Nach Fällung konnten insgesamt 271 Substanzen mit Score-Werten  $\geq 0,65$  werden, wobei 144 Substanzen auch nach LLE gefunden wurden. Hiervon lagen nach Acetonitril-Fällung 103 im Score-Werte-Bereich  $\geq 0,85$  und  $n = 41$  im Bereich zwischen 0,65 und 0,84. Insgesamt konnten  $n = 127$  der nach Acetonitril-Fällung gefunden Substanzen nach Chlorbutan-Extraktion nicht identifiziert werden. Hiervon lagen  $n = 47$  im Bereich sicherer und  $n = 80$  im Bereich wahrscheinlicher Identifizierung (s. Abb. 51).



**Abb. 51:** Analysenergebnisse nach Chlorbutan-Extraktion (LLE), bezogen auf den Nachweis bzw. Nicht-Nachweis nach Acetonitril-Fällung (links) und Analysenergebnisse nach Acetonitril-Extraktion, bezogen auf den Nachweis bzw. Nicht-Nachweis nach LLE (rechts)

#### 4.7.7 Toxytyper Screening: Interlaborvergleich

Am ersten Toxytyper Interlaborvergleich nahmen fünf verschiedene Labore mit insgesamt sieben Analysensystemen teil. Unter den Teilnehmern waren neben dem Freiburger Institut für Rechtsmedizin (IRM) zwei klinische Routine-Labore und zwei Labore für Applikationsentwicklung. Die Teilnehmer im Einzelnen:

- Hôpitaux Universitaire de Genève, Laboratoire de Toxicologie, Genf, Schweiz (HUG 1 und HUG 2)
- Institut für klinische Chemie, Universitätsmedizin Mannheim (IKC)
- Bruker Daltonik, Bremen (BDal 1 und BDal 2)
- Bruker Daltonik UK, Coventry, United Kingdom (UK)
- Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Freiburg (IRM)

Alle automatisch generierten Reports, die vom jeweiligen Anwender überprüft und letztendlich freigegebenen Ergebnisse und die Rohdaten aller Messungen wurden an unser Labor zur Auswertung übersandt. Die Deckblätter aller Reports und die von den Laboren mitgeteilten Ergebnistabellen finden sich in Anhang A-8. Die dortigen Ergebnisse sind in den Tabellen Tab. 51 zusammengefasst.

**Tab. 51:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Serumproben RV Se 1 bis RV Se 4 des Interlaborvergleichs. Dotierte Substanzen sind unterstrichen dargestellt. J: positive Identifizierung; N: keine Identifizierung; x / x: Automatisches Ergebnis / manuell überprüftes Ergebnis.

RV Se 1 - Substanz	BDal 1	BDal 2	IKC	HUG 1	HUG 2	IRM	UK
Coffein	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>D5-Diazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Diazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>EDDP</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Methadon</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Nordazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Oxazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Temazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
Theobromin	N/N	J/J	N/N	J/N	J/N	J/J	N/N
Benzododecinium					J/N	J/N	J/N
Isosorbid mononitrat				J/N	J/N	J/N	
Lidocain							J/J
Lonazolac			J/N				
Midazolam							J/J
Minoxidil					J/N		
Nifenazon							J/N
Pindolol							J/N
Prajmalium	J/N						
Propafenon		J/N					
Quinin							J/N
Terfenadin							J/N
Zolpidem							J/J

RV Se 2 - Substanz	BDal 1	BDal 2	IKC	HUG 1	HUG 2	IRM	UK
<u>Amitriptylin</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Alpha-OH-midazolam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
Coffein	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>D5-Diazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Fentanyl</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Lidocain</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Midazolam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
Theobromin	N/N	J/J	N/N	J/N	J/N	J/J	N/N
<u>Trimipramin</u>	J/J	J/J	J/J	N/N	J/J	J/J	N/N
<u>Zolpidem</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
Benzododecinium				J/J	J/N	J/N	J/N

RV Se 2 - Substanz	BDal 1	BDal 2	IKC	HUG 1	HUG 2	IRM	UK
2 C-B				J/N			
Desmethyl- chlordiazepoxid					J/N		
Fendilin							J/N
Isosorbide mononitrat				J/N	J/N	J/N	
Nifenazon							J/N
Oxymorphon							J/N
Penfluridol					J/N		
Primaquin				J/N			
Quinin							J/N
Terfenadin							J/N
Timolol							J/J

RV Se 3 - Substanz	BDal 1	BDal 2	IKC	HUG 1	HUG 2	IRM	UK
Coffein	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>D5-Diazepam</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Duloxetin</u>	J/J	J/J	N/N	J/J	J/J	N/N	N/N
<u>Metoprolol</u>	J/J	J/J	J/J	N/N	N/N	J/J	J/J
<u>Mirtazapin</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
<u>Nordoxepin</u>	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
Theobromin	N/N	N/N	N/N	J/N	J/N	J/J	N/N
Benzododecinium				J/N	J/N	J/N	J/N
Doxepin				J/J	J/J		
Desmethylvenlafaxin				J/N			
Flupentixol					J/N		J/J
Isosorbid mononitrat				J/N	J/N	J/N	
N, N-Diethyl-m- toluamide				J/N			
D3-EME							J/J
Methadon			J/J				
Nifenazon							J/N
Pindolol							J/N
Quinine							J/N
Terfenadin							J/N

RV Se 4 - Substanz	BDal 1	BDal 2	IKC	HUG 1	HUG 2	IRM	UK
Coffein	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
D5-Diazepam	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J	J/J
Theobromin	N/N	J/J	N/N	N/N	J/N	J/J	N/N
Benzododecinium				J/N	J/N	J/N	J/N
Isosorbid mononitrat				J/N	J/N	J/N	
Mescaline					J/N		
Methadon			J/J	J/J			
Nifenazon							J/N
Pindolol							J/N
Quinin							J/N
Terfenadin							J/N

Die Ergebnisse dieses Ringversuchs zeigen, dass sich die Methode sehr gut auf baugleiche Analysensysteme übertragen lässt. So konnten auf den sieben verschiedenen Systemen sowohl gleichbleibend reproduzierbare Fragmentierungsmuster als auch übereinstimmend konstante Retentionszeiten beobachtet werden. Auch bei leicht unterschiedlicher Hardwarekonfiguration - das Labor in Großbritannien nutzte eine quaternäre LC-Pumpe während alle anderen Labore eine binäre LC-Pumpe verwendeten - konnten trotz unterschiedlicher Totvolumina ausreichend vergleichbare Retentionszeiten erzielt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Toxyper auch im Routineeinsatz in einem klinischen Labor und nicht nur in der Entwicklungsumgebung valide Ergebnisse liefert.

Das Probenmaterial in klinischen und forensisch-toxikologischen Laboren enthält zumeist eine zunächst unbekannt Anzahl verschiedenster Analyten in unbekannt Konzentrationen. Dadurch besteht - insbesondere bei Screening-Analysen - die Gefahr von Memoryeffekten bzw. Kontamination des Analysensystems durch hochkonzentrierte Analyten. Während der Auswertung der Daten wurde daher ein besonderes Augenmerk auf die Substanzen gelegt, die identifiziert wurden, obwohl sie nicht aufdotiert worden waren. Zusätzlich wurden bei falsch-negativen Ergebnissen die Rohdaten der entsprechenden Messungen manuell ausgewertet und nach Gründen für die nicht korrekte Identifizierung gesucht.

### Korrekte Identifikation

Die teilnehmenden Labore konnten bis auf Trimipramin (Probe RV Se 2) und Metoprolol (RV Se 3) alle dotierten Substanzen korrekt identifizieren. Da der

Spender des für den Ringversuch verwendeten Blutes coffeinhaltige Lebensmittel zu sich genommen hat, sind im analysierten Serum sowohl Coffein als auch dessen Metabolit Theobromin in unbekannter Konzentration vorhanden. Die Identifizierung dieser beiden Substanzen wurde daher als korrekte Identifizierung gewertet. Während Coffein von allen Teilnehmern sicher identifiziert werden konnte, wurde der Metabolit Theobromin lediglich von zwei Analysensystemen (BDal 2 und IRM) sicher nachgewiesen. Grund dafür könnte der allgemeine Zustand des Analysensystems (Sensitivität, Alter der Säule...) zum Zeitpunkt der Messung gewesen sein. Für diesen Systemvergleich wurden die Teilnehmer aufgefordert, die zu untersuchenden Proben in die jeweilige Messroutine aufzunehmen. Die Beurteilung der Einsatzfähigkeit der jeweiligen Analysensysteme unterlag somit dem jeweiligen Anwender, so dass über den Zustand der Systeme bei Messung der Proben keine Informationen vorliegen. Dieser Umstand zeigte, dass neben den Qualitätssicherungsmaßnahmen der jeweiligen Anwender eine unabhängige Möglichkeit zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Analysensystems hilfreich wäre. In Folge wurde ein System Suitability Test (SST) mit frei erhältlichen Analyten, die sowohl den gesamten Massen- und Retentionsbereich als auch beide Polaritäten abdecken, entwickelt.

#### **Falsch-positive Identifikation**

Wie in Tab. 51 gezeigt und bereits aus den Ergebnissen der bisherigen Evaluationsversuche bekannt kann ein Großteil der falsch-positiven Treffer bei Durchsicht des pdf-Reports ausgeschlossen werden. Die Kombination aus automatisch generiertem Report und manueller Durchsicht der Ergebnisse erhöht die Rate korrekter Identifizierungen. Da ein solches Screening-Verfahren lediglich als hinweisgebendes Verfahren anzusehen ist, sind nach forensischen Richtlinien positive und fragliche Treffer mit einer zweiten Analysenmethode zu bestätigen.

Isosorbitmononitrat ( $m/z$  192) wird über das gesamte Retentionszeitfenster von  $\pm 0,5$  min ohne erkennbaren Peak detektiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Treffer, trotz gut übereinstimmender Spektren, um Analysenartefekt handelt.

Bei Benzododecinium handelt es sich um ein weit verbreitetes Desinfektionsmittel. Die häufigen, möglicherweise falsch-positiven Treffer in mehreren Serumproben könnten daher auf die Benutzung von Benzododecinium-haltigen Hautdesinfektionsmitteln bei der Blutentnahme zurückzuführen sein. Da der Precursor für Benzododecinium jedoch ubiquitär über den gesamten

Retentionszeitbereich detektiert wird, scheint es wahrscheinlicher, dass es sich ähnlich wie schon zuvor für Isosorbitmononitrat diskutiert um ein Analysenartefakt handelt.

In Serumproben die mit einer methanolischen Lösung von Nordoxepin dotiert wurden (RV Se 3) können nach Re-Methylierung geringe Mengen Doxepin vorhanden sein und detektiert werden (HUG 1 und HUG 2).

Bei dem in den Proben RV Se 4 (HUG 1, IKC) und RV SE 3 (IKC) nachgewiesenen Methadon handelt es sich höchstwahrscheinlich um Verschleppungseffekte. Es wurde ebenso in den Fließmittel-Blanks zwischen den eigentlichen Proben nachgewiesen. Im Probengut solcher klinischen Laboratorien sind Proben mit hohen Methadon-Konzentrationen keine Seltenheit (z.B. Therapeutic Drug Monitoring) und Methadon ist eine Analyt mit bekannter Memoryproblematik. Zur Verminderung dieser Problematik können unterschiedliche Zusammensetzungen des zwischen den Proben injizierten Lösungsmittel- oder Fließmittelblanks getestet werden.

Bei dem von UK in RV Se 1 nachgewiesenen Lidocain, Zolpidem und Midazolam handelt es sich um Memoryeffekte, da diese Substanzen in der zuvor analysierten Probe RV Se 2 dotiert und nachgewiesen und auch im zwischen den beiden Proben injizierten Fließmittel identifiziert wurden.

Nifenazon, Oximorphon, Pindolol, Quinin und Terfenadin wurden in allen im Labor UK analysierten Proben nachgewiesen. Da zumindest die drei zuletzt genannten Substanzen in Konzentrationen von zwischen 10 und 200 ng/ml als Test-Mix zur Überprüfung des LC-MS-Systems verwendet werden, handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich um Memoryeffekte aus dem LC-System.

### **Falsch-negative Identifikation**

Häufigster Grund für ein falsch-negatives Analysenergebnis waren Software-Fehler, informationsarme MS<sup>2</sup>- bzw. MS<sup>3</sup>-Spektren, Co-Elution und fehlerhafte Informationen in der SPL (z.B. falsche Precursor-Masse). Bei mehr als 800 Analyten in einem LC-Lauf lässt sich Co-Elution - insbesondere bei der hier durchgeführten Betrachtung mehrerer LC-Systeme - nicht vermeiden.

Die Systeme HUG 1 und UK konnten Trimipramin in Probe 2 nicht identifizieren. Durchsicht der Messdaten und der Bibliothekseinträge für Trimipramin zeigten, dass auf Grund des informationsarmen MS<sup>2</sup>-Spektrums die Aufnahme des MS<sup>3</sup>-Spektrums für die sichere Identifikation von Trimipramin notwendig ist.

Duloxetine (Probe 3) konnte von den Systemen IRM und IKC nicht identifiziert werden. Manuelle Auswertung der Rohdaten (DataAnalysis) zeigte, dass für Duloxetine entsprechend der SPL Spektren aufgezeichnet wurden, die hinterlegten Bibliotheksspektren jedoch von nur unzureichender Qualität waren. Nach erneuter Aufnahme und Austausch der für Duloxetine hinterlegten Bibliotheksspektren wurden die Ringversuchsdaten erneut automatisch prozessiert und Duloxetine von allen Teilnehmern korrekt identifiziert.

Metoprolol wurde auf Grund von Co-Elution von Mirtazapin mit den beiden HUG-Systemen nicht korrekt nachgewiesen. Grund dafür waren die durch Co-Elution verursachten gemischte MS<sup>2</sup>-Spektren, für die beim Bibliotheksabgleich ein Score-Wert kleiner 700 berechnet und der Treffer daher nicht im Ergebnisreport erfasst wurde. Mirtazapin wurde korrekt identifiziert, da hier entsprechend der SPL zusätzlich ein MS<sup>3</sup>-Spektrum zur Identifizierung der Substanz zur Verfügung stand. Für Metoprolol war auf Grund des fragment-reichen MS<sup>2</sup>-Spektrums bis dahin die Aufnahme eines MS<sup>3</sup>-Spektrums nicht vorgesehen.

Nach Abschluss der Evaluierung der Ringversuchsergebnisse wurden alle Rohdaten nochmals mit einem optimierten Auswerte-Algorithmus und einer überarbeiteten Spektrenbibliothek prozessiert. Hier wurden alle dotierten Substanzen von allen sieben Systemen korrekt identifiziert und die Anzahl falsch-positiver Treffer verringert. Die Ergebnisse dieser Datenauswertung wurden mit besonderem Augenmerk auf die jeweiligen individuellen Probleme allen Teilnehmern zusammen mit der überarbeiteten Software-Version zur Verbesserung der Analysensysteme und Laborabläufe zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse des Ringversuchs wurden auf der 91. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) in Freiburg, dem 18. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) in Mosbach (Baden), der 60. ASMS Konferenz in Minneapolis, Minnesota (USA) und der 51. Jahrestagung der International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) in Funchal - Madeira (Portugal) vorgestellt.

#### **4.7.8 Toxytyper Screening: Analyse von Glaskörperflüssigkeit**

##### **Analyse dotierter boviner Glaskörperflüssigkeit**

Von den 70 von Pelander et al. angegebenen Substanzen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 57 Substanzen am Institut vorrätig bzw. in der Toxytyper 1.1 Spektrenbibliothek vorhanden. Diese Substanzen wurden anhand ähnlicher Cut-Off Konzentrationen in sechs Mixe gruppiert. Insgesamt konnten 46 Substanzen in

allen jeweiligen drei Konzentrationen korrekt identifiziert werden (Doppelbestimmung). Bei fünf Substanzen (Mirtazapin, Methamphetamin, Trimipramin, Olanzapin und Tramadol) konnten die niedrigen Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Amlodipin, Clonidin, Clomipramin und LSD konnten überhaupt nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 52).

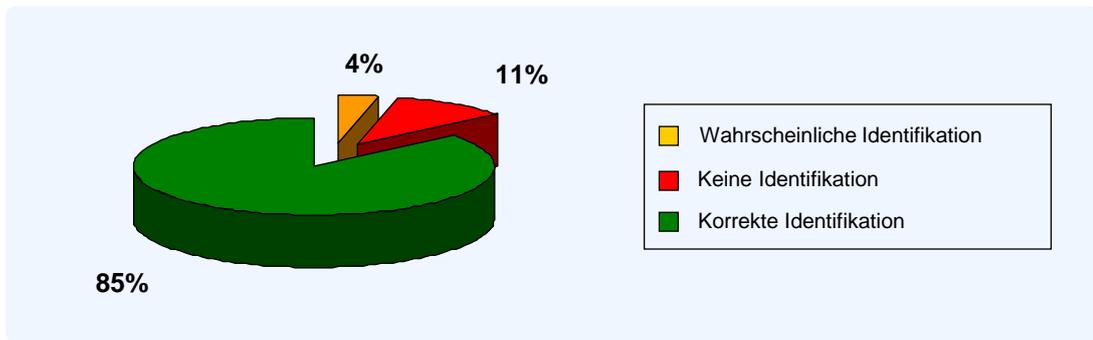


Abb. 52: Zusammenfassung der Analyseergebnisse der dotierten Glaskörper-Proben sortiert nach Qualität der Identifikation (Toxtyper 1.1)

Die ausführlichen Ergebnisse aller dotierten Substanzen sind in den Tabellen in Anhang A-9 hinterlegt. Abbildung 53 zeigt eine Zusammenfassung aller in den automatischen Ergebnisberichten gelisteten Substanzen. Sortiert nach korrekter Identifikation, wahrscheinlicher Identifikation und falsch-positiven Treffern.

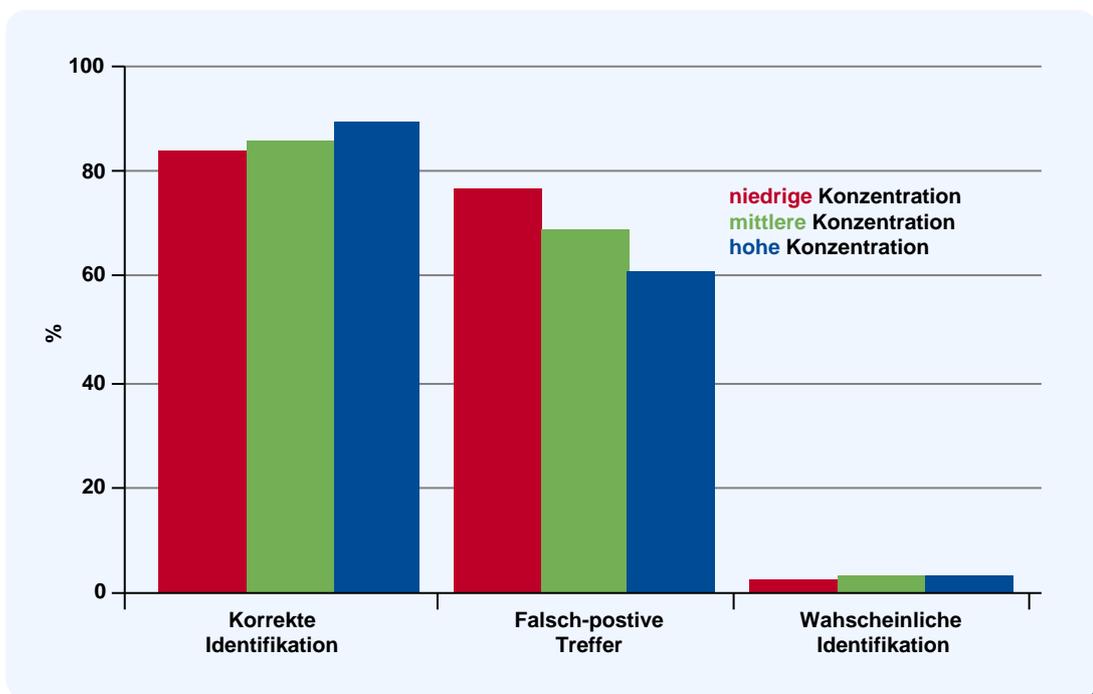


Abb. 53: Gruppierung der auf den automatischen reports gelisteten Treffer nach korrekter Identifikation, wahrscheinlicher Identifikation und falsch-positiven Treffern

In die Gruppe „wahrscheinliche Treffer“ wurden hierbei lediglich dotierte Substanzen die im Report als tentative markiert waren aufgenommen. Alle nicht-dotierten Substanzen wurden, unabhängig der Qualität der Übereinstimmung, zunächst als falsch-positive Treffer eingestuft. Hier fielen zunächst die geringe Anzahl wahrscheinlicher Identifikationen und die augenscheinlich hohe Anzahl falsch-positiver Treffer auf. Ersteres spricht für die Leistungsfähigkeit des beim Toxyper 1.1 verwendeten Identifikations-Algorithmus. Bei manueller Durchsicht der automatischen Reports wurde demnach besonderes Augenmerk auf die falsch-positiven Treffer gelegt. Die Identifikation von endogen im Körper vorkommenden Substanzen wie z.B. Adenin, Adenosin und Nicotinamid ist nicht als falsch-positive Identifikation zu werten. Eliminiert man die endogenen Substanzen aus der Liste der falsch-positiven Treffer, so erhält man die in Abbildung 54 dargestellte Zusammenfassung.

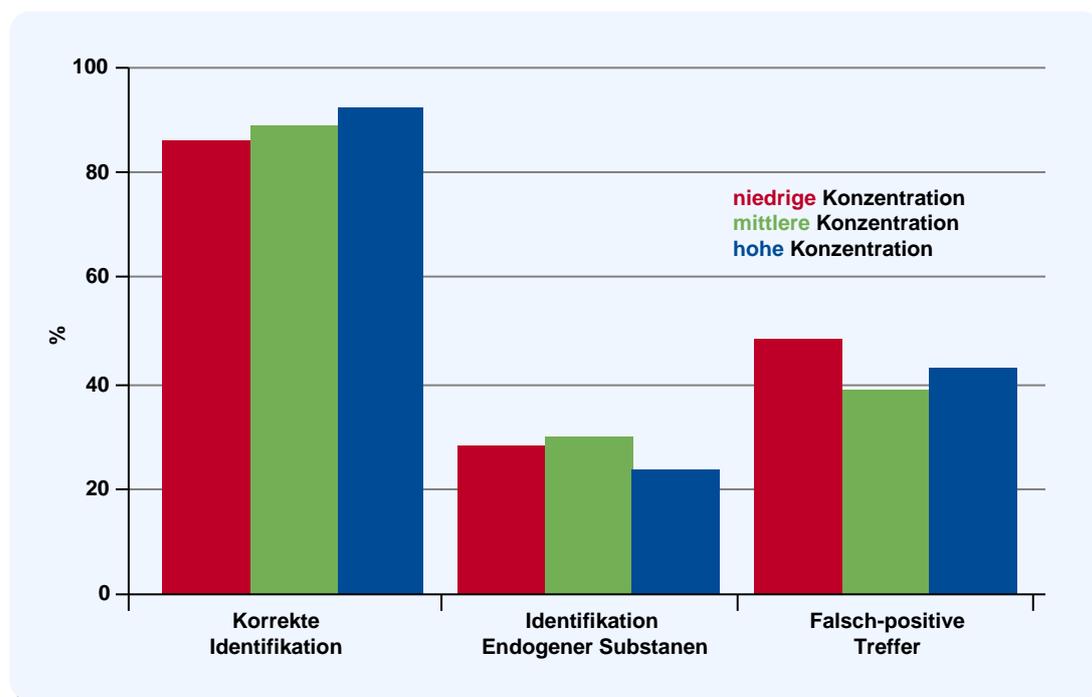


Abb. 54: Gruppierung der Ergebnisse nach manueller Durchsicht der automatisch generierten Reports

Die in den 36 Analysen (Doppelbestimmung von sechs Mixen à drei Konzentrationen) gefundenen falsch-positiven Treffer setzten sich wie in der folgenden Tabelle gezeigt zusammen (s. Tab. 52).

**Tab. 52:** Falsch-positive Treffer in den mit sechs Mixen dotierten Glaskörperproben (Doppelbestimmung)

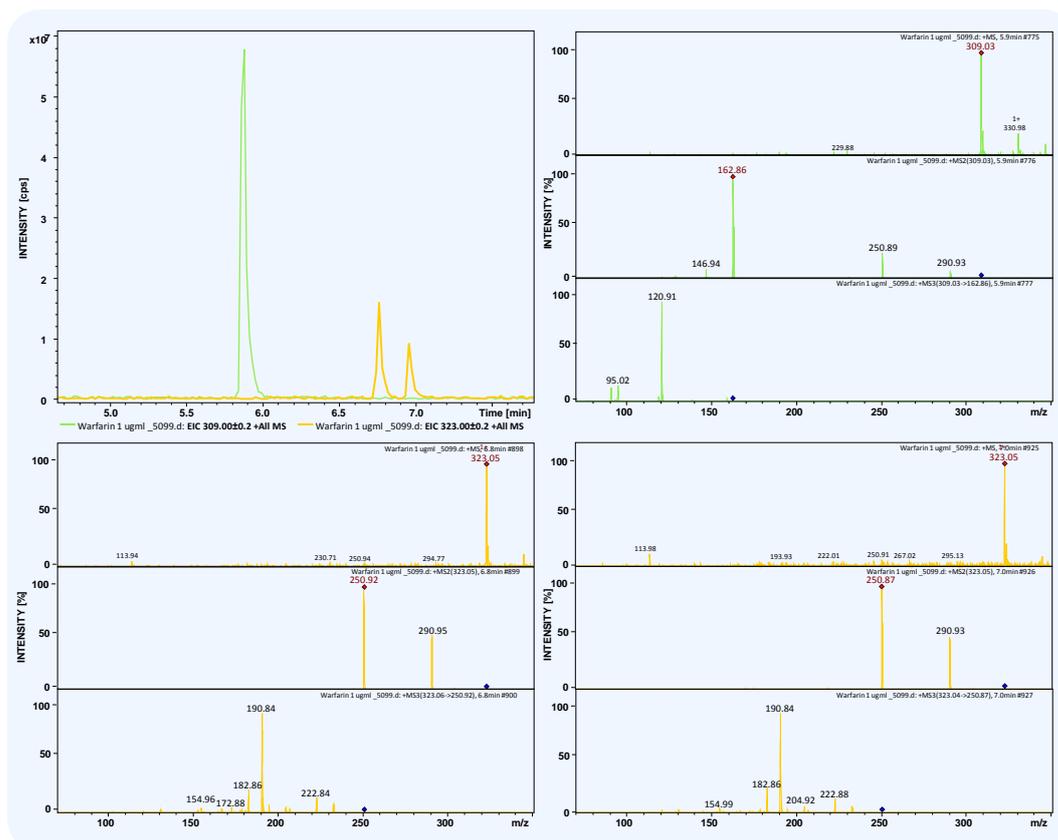
Analyt	Anzahl	Analyt	Anzahl
D <sub>3</sub> -Oxycodon	32	Meclofenamic Acid	2
JWH-307	26	3,4-Dimethoxyphenethylamin	1
JWH-210	25	4-Acetylaminoantipyrin	1
JWH-122	22	Bamethan	1
MDDMA	6	Coffein	1
Pyranocumarin	6	Flecainid	1
Sildenafil	5	JWH-081	1
Lorazepam	4	JWH-310	1
Norcodein	4	Tetrazepam	1
Cocain	3	Venlafaxin	1
D <sub>5</sub> -Temazepam	2	Vincamine	1

D<sub>3</sub>-Oxycodon, JWH-307, JWH-210 und JWH-122 wurden auch in nicht-dotierter Glaskörperflüssigkeit detektiert und identifiziert. D<sub>3</sub>-Oxycodon wurde zum Zeitpunkt der Analyse regelmäßig in Proben und Fliesmittel-Blanks detektiert. Zusammen mit dem relativ großen, positiven Retentionzeit-Unterschied von 0,24 bis 0,28 Minuten zum Referenz-Spektrum lässt sich daraus schließen, dass es sich hierbei um Memory-Effekte handelt. Da per SPL für alle deuterierten Standards lediglich die Aufnahme eines MS<sup>2</sup>-Spektrums angestoßen wird, ist in diesem Falle eine weitere Differenzierung über das MS<sup>3</sup>-Spektrum nicht möglich.

Das Designeramphetamin MDDMA wurde in allen drei Konzentrationen von Mix 3, der das Amphetaminderivat MDEA enthielt, als alternative Identifikation von MDEA angegeben. Bei MDDMA und MDEA handelt es sich um isobare Substanzen, die sich weder im MS<sup>2</sup>- noch im MS<sup>3</sup>-Spektrum unterscheiden und die bei der verwendeten Chromatographie lediglich einen Retentionszeit-Unterschied von 0,08 min haben. Daher ist eine Differenzierung, ob es sich um das N-Ethyl- (MDEA) oder N-Dimethyl-Derivat (MDDMA) handelt, mit diesem Screening-Verfahren nicht möglich.

Das Cumarinderivat Pyranocumarin wurde in allen drei Konzentrationen des Mixes 2 identifiziert. Mix 2 enthielt u.a. Warfarin ebenfalls ein Cumarinderivat. Beide werden als Antikoagulantien in Fertig-Giftködern gegen Ratten und andere Nagetiere eingesetzt. Pyranocumarin hat das gleiche Molekulargewicht wie methyliertes Warfarin (M = 322,35 g/mol), daher ergab sich die Vermutung, dass es sich bei dem vermeintlichen Pyranocumarin-Treffer um methyliertes Warfarin handelt. Zur Bestätigung dieses Verdachts wurde der zum Dotieren der Proben

verwendete methanolische Warfarin-Standard mit der zur Spektren-Aufzeichnung verwendeten LC-MS<sup>n</sup>-Methode (s. Kapitel 2.4.7.2) analysiert. Dabei ergaben sich neben dem erwarteten Warfarin-Peak ( $m/z = 309$ ;  $t_R = 5,9$  min) auch zwei Peaks mit dem Molekulargewicht von methyliertem Warfarin ( $m/z = 323$ ;  $t_{R1} = 6,8$  min;  $t_{R2} = 7,0$  min). Abbildung 55 zeigt die extrahierten Ionenspuren der genannten Mass/Ladungs-Verhältnisse und dazugehörigen MS-Spektren.



**Abb. 55:** Extrahierte Ionenspuren der  $m/z$ -Verhältnisse 309 (Warfarin, grün) und 323 (methyliertes Warfarin, gelb) und die jeweiligen MS-Spektren

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich bereits in der methanolischen Warfarin-Lösung zwei methylierte Warfarin-Derivate enthalten sind, die chromatographisch getrennt sind, sich massenspektrometrisch mit den aufgenommenen MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren nicht unterscheiden lassen. Eines dieser Derivate eluiert im Retentionszeitfenster von Pyranocumarin ( $t_R = 6,79 \pm 0,2$  min) und führt zu dem entsprechenden Treffer.

Sildenafil wurde in den Mixen 1, 4 und 5 insgesamt fünf Mal als falsch positiver Treffer mit Score-Werte größer 800 identifiziert. Auch bei Kontrolle der jeweiligen Ergebnisse zeigte sich eine gute Übereinstimmung der MS<sup>2</sup>-Spektren. Auf Grund des fragmentreichen MS<sup>2</sup>-Spektrums, wird für Sildenafil kein zusätzliches MS<sup>3</sup>-

Spektrum aufgenommen. Das zur Ermittlung des Treffers verwendete aufgenommene Spektrum stimmt auch bei manueller Kontrolle sehr gut mit dem Bibliotheksspektrum von Sildenafil überein. Eine reale Probe mit einem derartigen Ergebnis würde zur Bestätigung mit einem weiteren, in der Regel quantitativem Verfahren erneut auf Sildenafil untersucht werden. Es handelt sich hierbei also um einen echten falsch-positive Treffer.

Das für die Identifikation von Lorazepam verwendete MS<sup>2</sup>-Spektrum zeigte im Vergleich zum entsprechenden Bibliotheksspektrum ein zusätzliches Fragment m/z 246,9. Das MS<sup>3</sup>-Spektrum mit dem Fragment m/z 302,96 als *precursor ion* stimmt mit dem MS<sup>3</sup>-Bibliotheksspektrum von Lorazepam überein. Im Rahmen einer forensisch-toxikologischen Untersuchung von realen Proben, wäre hier ebenfalls eine Bestätigungsanalyse auf Benzodiazepine angezeigt.

Norcodein wurde insgesamt in vier Proben identifiziert. In keine dieser Proben war Codein zugegeben worden. Die Überprüfung der entsprechenden Spektren im automatischen Report ergab, dass das gemessene MS<sup>2</sup>-Spektrum, abgesehen vom intensivsten Masse/Ladungs-Verhältnis, nicht mit dem Bibliotheksspektrum vom Norcodein übereinstimmte.

Cocain wurde in drei der mit Benzoylcegonin dotierten Proben nachgewiesen. Dies lässt sich analog zum falsch-positiven nachweis von Pyranocumarin erklären. Cocain und methyliertes Benzoylcegonin haben identische Nominalmassen. Auf Grund der unterschiedlichen Retentionszeit kann eine Methylierung in der Ionenquelle ausgeschlossen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass methanolisch gelagertes Benzoylcegonin zu einem geringen Anteil methyliert wird. Am wahrscheinlicheren erscheint dabei die Reaktion an der OH-Gruppe, was zu Cocain führen würde. Unabhängig vom Ort der Methylierung, kann bei dem Cocain ähnlichem Retentionverhalten, durch jede methylierte Form des Benzoylcegonins die Aufnahme eines (vermeintlichen) Cocain-Spektrums angestoßen werden. Findet die Methylierung an einer der neutralen Abgangsgruppen statt, folgt daraus ein dem Cocain-Spektrum identisches MS<sup>2</sup>-Spektrum.

Da es sich bei D5-Temazepam um einen deuterierten Standard handelt, wurde hier, wie schon weiter oben für D3-Oxycodon erleutert, lediglich ein MS<sup>2</sup>-Spektrum aufgenommen. Da es sich auf keinen Fall um das deuterierte Temazepam-Analogon handeln kann, handelt es sich hierbei um einen falsch-

positiven treffer, der jedoch bei der Analyse von Realproben einfach als solcher erkannt werden würde.

Bei Meclofenamic Acid handelt es sich um einen nicht-steroidalen Entzündungshemmer, der u.a. auch in der Veterinärmedizin eingesetzt wird. Die beiden Treffer wurden als „tentative“ angegeben, da es sich bei dem entsprechenden MS<sup>2</sup>-Spektrum um ein unspezifisches Spektrum mit nur einem Peak handelt und das MS<sup>3</sup>-Spektrum auf Grund der geringen Intensität nicht zum Vergleich mit dem hinterlegten Bibliotheksspektrum herangezogen wurde.

Für alle weiteren in Tabelle 52 gelisteten falsch-positiven Treffern konnte keine mögliche Erklärung gefunden werden.

Insgesamt konnten vier der dotierten Substanzen überhaupt nicht nachgewiesen werden. Bei LSD lässt sich dies vermutlich auf seine Lichtempfindlichkeit zurückführen, da die komplette Probenaufarbeitung nicht lichtgeschützt durchgeführt wurde. Amlodipin fehlt in der Toxtyper 1.1 Spektrenbibliothek, so dass die Substanz nicht identifiziert werden konnte. Clonidin und Clomipramin wurden auf Grund eines Software-Fehlers nicht identifiziert bzw. es wurde trotz ausreichender Intensität des jeweiligen Molekülions keine Spektren-Aufnahme angestoßen. Für Clomipramin wurde in einer Probe sowohl ein MS<sup>2</sup>- als auch ein MS<sup>3</sup>-Spektrum aufgenommen, welche bei manueller Kontrolle sehr gut mit den hinterlegten Bibliotheksspektren übereinstimmen, jedoch nicht als Treffer im Report gelistet wurden. Die hier aufgezeichneten Daten werden zur Kontrolle und weiteren Optimierung der Algorithmen zur Auswahl von Precursor-Ionen nochmals genauer durch die zuständigen Software-Entwickler analysiert.

### **Analyse humaner Glaskörperflüssigkeit**

Insgesamt wurden bisher 24 humane Glaskörper-Proben untersucht. Bei neun älteren Fällen, war kein weiteres Probenmaterial für vergleichende Untersuchungen mehr vorhanden. Bei diesen Fällen kann zur Auswertung lediglich auf das jeweilige forensich-toxikologische Gutachten zurückgegriffen werden. Bei den restlichen Fällen aus den Jahren 2012 und 2013 wurde zusätzlich zur Glaskörperflüssigkeit auch Urin mit dem Toxtyper analysiert. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Analyse der Glaskörperflüssigkeit sowie die qualitativen Ergebnisse der jeweiligen chemisch-toxikologischen Routineuntersuchung bzw. der parallel untersuchten Urinproben (s Tab. 53).

**Tab. 53:** Ergebnisse der Untersuchung von Glaskörperflüssigkeit und Urin (Toxyper 1.1) und Ergebnisse der forensisch-toxikologischen Routine-Untersuchung (Serum, Urin)

Fall ID	Glaskörperflüssigkeit (Toxyper 1.1)	Urin (Routine-Analytik)	Herzblut / Femoralblut (Routine-Analytik)
GS 54-10	Diazepam	Diazepam	Diazepam
	Nordazepam	Oxazepam	Oxazepam
	Temazepam	Temazepam	Temazepam
	Amitriptylinoxid	Amitriptylin- Metabolit	Amitriptylin
GS 85-10	Noscapine	Morphin	Morphin
		Codein	Codein
		6-MAM	
		Ibuprofen Paracetamol	
GS 196-11	Midazolam		Midazolam
	Lidocain	Lidocain	Lidocain
	Sildenafil		
	Metronidazol Flecainide		
GS 275-10	Oxycodon	Oxycodon	Oxycodon
	Diazepam	Oxazepam	Diazepam
	Nordazepam		Nordazepam
		Morphin	Morphin
GS 387-10	Trimipramin	Trimipramin	Trimipramin
		Trimipramin- Metabolite	Nortrimipramin
GS 446-10	Ambroxol	Ambroxol	
		Ibuprofen Salicylate (IA)	
GS 454-11	Midazolam	Midazolam	Midazolam
	Ketamin	Ketamin	Ketamin
	Norketamin	Norketamin	Norketamin
		Atropin	Atropin
		Amiodaron	Amiodaron Paracetamol
GS 457-10	Citalopram	Citalopram	Citalopram
	Nordoxepin	Doxepin	Doxepin
	Nordazepam	Ibuprofen	Nordazepam
	Lidocain	Acetylsalicylsäure Chlorprothixen	Lidocain Chlorprothixen
GS 458-10	-	Olanzapin und Metabolite	Olanzapin

Tab. 53: Fortsetzung

Fall ID	Glaskörperflüssigkeit (Toxyter 1.1)	Urin (Toxyter 1.1)	Routine-Analytik (Serum / Urin)
GS 165-12	Diazepam	Ethylglucuronid	Diazepam
	Nordazepam		Nordazepam
	Temazepam	Temazepam	Temazepam
	Sertralin	Sertralin	Sertralin
	Lorazepam		Lorazepam Oxazepam Bubrenorphin THC
GS 244-12	Citalopram	Citalopram	Citalopram
	Methadon	Methadon	Methadon
	EDDP	EDDP	EDDP
	Paracetamol	Paracetamol	THC-Metabolite GHB
GS 523-12	Metoclopramid	Metoclopramid	Metoclopramid
	Diazepam	Diazepam	Diazepam
	Nordazepam	Nordazepam	Nordazepam
	Temazepam	Temazepam	Temazepam
	Noscapin	Noscapin	Noscapin
	Morphin		Morphin
	Codein		Codein
	Bromazepam und Metabloit	Paracetamol	Pregabalin
GS 18-13	Methadon	Methadon	Methadon
	EDDP	EDDP	EDDP
	Diazepam	Temazepam	Diazepam Nordazepam
GS 56-13	-	Ethylglucuronid THC-COOH	Alkohol THC
GS 57-13	Trimipramin	Trimipramin	Trimipramin
	Zopiclon	Zopiclon	Zopiclon
	Quetiapin		Quetiapin
	7-Aminoflunitrazepam	7-Aminoflunitrazepam	7-Aminoflunitrazepam
	Oxazepam	Oxazepam	Oxazepam
	Olanzapin	Olanzapin	Olanzapin
	Desmethylvenlafaxin	Desmethylvenlafaxin Venlafaxin	Desmethylvenlafaxin Venlafaxin Promethazin
GS 267-13	Quetiapin	Quetiapin	Quetiapin
	Metamizol-Metaboliten	Metamizol-Metaboliten	Metamizol-Metaboliten
	Metoclopramid		Metoclopramid Olanzapin

Tab. 53: Fortsetzung

Fall ID	Glaskörperflüssigkeit (Toxyper 1.1)	Urin (Toxyper 1.1)	Routine-Analytik (Serum / Urin)
GS 132-13	Flecainide	Flecainide	Flecainide
	Bromazepam	Bromazepam	Bromazepam
	3-OH-Bromazepam	Ethylglucuronid	Alkohol
		Aminosalicylsäure	Ibuprofen Clomethiazol Aprenolol
GS 136-13	Morphin	Morphin	Morphin
	Codein	Codein	Codein
	Amphetamin	Amphetamin	Amphetamin
	Paracetamol	Paracetamol	Paracetamol
	9-Hydroxyrisperidon	9-Hydroxyrisperidon	Risperidon und Metabolit
	Noscapin	6-MAM	6-MAM
GS 161-13	Amitriptylin und Metabolite	Amitriptylin und Metabolite	Amitriptylin und Metabolite
	Tilidin und Nortilidin	Tilidin und Nortilidin	Tilidin und Nortilidin
	Doxepin und Nordoxepin	Doxepin und Nordoxepin	Doxepin und Nordoxepin
	Amphetamin	Amphetamin	Amphetamin
	Metoclopramid	Metoclopramid	Metoclopramid
	Ibuprofen	Ibuprofen	Ibuprofen
	O-Desmethyltramadol	Tramadol und Metabolit	Tramadol und Metabolit
	THC-COOH	THC-COOH	THC und Metabolite
Zopiclon	THC-COOH-A-Gluc		
GS 217-13	Methadon	Methadon	Methadon
	EDDP	EDDP	EDDP
	Doxepin und Nordoxepin	Doxepin und Nordoxepin	Doxepin und Nordoxepin
	Opipramol	Opipramol	Opipramol
	Oxazepam	Oxazepam	Diazepam und Metabolite
	Norbuprenorphin		Buprenorphin
		Paracetamol	Promethazin Lorazepam Carbamazepin und Metabolite THC-Metabolite
GS 238-13	Methadon	Methadon	Methadon
	EDDP	EDDP	EDDP
	Amphetamin	Amphetamin	Amphetamin
	Diazepam	Diazepam	Diazepam
	Nordazepam	Nordazepam	Nordazepam
	Temazepam	Temazepam	Temazepam

Tab. 53: Fortsetzung

Fall ID	Glaskörperflüssigkeit (Toxyper 1.1)	Urin (Toxyper 1.1)	Routine-Analytik (Serum / Urin)
GS 253-13	Diazepam		Diazepam
	Nordazepam	Nordazepam	Nordazepam
	Temazepam	Temazepam	Temazepam
	Oxazepam		Oxazepam
	Methadon	Methadon	Methadon
	EDDP	EDDP	EDDP
	Mirtazapin und Metabolit	Mirtazapin und Metabolit	Mirtazapin und Metabolit
	Bisoprolol	Bisoprolol	Bisoprolol
	Fentanyl	Fentanyl	Fentanyl
	THC-COOH	THC-COOH	THC und Metabolite
	Norbuprenorphin		Buprenorphin und Metabolit
Naloxon		Naloxon	
		Ramirpil	Ramipril und Metabolite
GS 335-13	Lamotrigin	Lamotrigin	Lamotrigin
	Bisoprolol	Bisoprolol	Bisoprolol
	Clozapin und Metabolit	Clozapin und Metabolit	Clozapin und Metabolit
	Nordazepam	Nordazepam	Nordazepam
	Pirenzepin	Pirenzepin	Pirenzepin
	Diazepam		Diazepam
	Oxazepam		Oxazepam
	Atropin		Atropin
	Amisulprid		Haloperidol
GS 516-13	Oxycodon und Metabolit	Oxycodon und Metabolit	Oxycodon und Metabolit
	Lorazepam	Lorazepam	Lorazepam
	Metoclopramid	Metoclopramid	Metoclopramid
	Metamizol-Metabolite	Metamizol-Metabolite	Metamizol-Metabolite
		Paracetamol	Paracetamol

Die Analysen-Ergebnisse der untersuchten humanen Glaskörperflüssigkeiten stimmen in großen Teilen mit den Ergebnissen der forensisch-toxikologischen Routine-Untersuchungen überein. In den 24 untersuchten Glaskörperproben konnten 76 % der von den Verstorbenen aufgenommenen Substanzen nachgewiesen werden. Nahezu ubiquitär vorkommende Substanzen wie Coffein, Nikotin und deren Metaboliten sowie Alkohol und dessen Metabolit Ethylglucuronid wurden bei dieser Auswertung nicht berücksichtigt. In sechs Fällen stimmten die Screening-Ergebnisse der Glaskörperflüssigkeit komplett mit den Ergebnissen der forensisch-toxikologischen Untersuchung überein. In drei Fällen (GS85-10, GS446-10, GS516-13) konnten lediglich Ibuprofen bzw. Paracetamol nicht im Glaskörper nachgewiesen werden. Substanzen mit hoher Polarität (z.B.

Paracetamol oder Oxazepam) und/oder einer hohen Plasmabindungsrate (z.B. Ibuprofen) können die Blut-Retina-Schranke nur schlecht passieren, sind daher - falls überhaupt - nur in geringer Konzentration im Auge vorhanden, so dass sie nicht zwingend mit einem allgemeinen Screening-Verfahren nachgewiesen werden können.

Olanzapin war die einzige Substanz, die in den Fällen GS458-10 und GS267-13 nicht in der Glaskörperflüssigkeit identifiziert werden konnte. Im Serum des Oberschenkelvenenblutes konnte in diesen Fällen 94 ng/ml bzw. 190 ng/ml Olanzapin nachgewiesen werden. Die Toxyper-Ergebnisse im Fall GS 57-13 zeigen jedoch, das Olanzapin prinzipiell die Blut-Retina-Schranke passiert und nach Aufnahme im Glaskörper nachgewiesen werden kann. Um weitere Aussagen treffen zu können, ist hier eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Olanzapin in Glaskörperflüssigkeit notwendig.

Promethazin konnte ebenfalls nicht im Glaskörper nachgewiesen werden. Laut forensisch-toxikologischem Gutachten lag die Serumkonzentration zum Zeitpunkt des Todes unter 10 ng/ml. Norbuprenorphin und THC-COOH konnten mit dem Toxyper zwar in wenigen Fällen erfolgreich in der Glaskörperflüssigkeit detektiert werden, jedoch scheinen für den Nachweis solcher niedrig dosierten Wirkstoffe (GS165-12  $c_{\text{Serum}} = 0,8 \text{ ng/ml}$ ) und spezieller Drogenwirkstoffe wie z.B. THC und GHB gezielte LC-MS Methoden notwendig.

Fälle wie GS 253-13 und GS161-13 zeigen, dass auch die Einnahme mehrerer Drogen und Medikamente einfach durch Analyse der Glaskörperflüssigkeit nachgewiesen werden kann.

In einigen Fällen konnte die Aufnahme eines Wirkstoffes weder durch die Befunde der forensisch-toxikologischen Untersuchung noch an Hand der Fallgeschichte bestätigt werden. Im Fall GS196-11 handelt es sich um einen, nach Herzinfarkt im Klinikum verstorbenen, 21-jährigen Mann. Die Fallgeschichte erklärt den Nachweis des, im Rahmen einer ärztlichen Erstversorgung, oft verabreichten Benzodiazepins Midazolam, des Lokalanästhetikums Lidocain und des Antiarrhythmikums Flecainid. Es ergaben sich jedoch keine Hinweise auf die Einnahme von Sildenafil vor der Einlieferung in die Notaufnahme.

Im Fall GS161-13 konnte, neben zahlreichen anderen Wirkstoffen, abweichend von den Befunden der forensisch-toxikologischen Routine-Analytik zusätzlich Zopiclon in der Glaskörperflüssigkeit nachgewiesen werden. Laut polizeilichem Untersuchungsbericht befand sich der Verstorbene in Behandlung und unter Selbstmedikation mit mehreren, namentlich nicht erwähnten, Schmerz- und

Betäubungsmitteln. In diesem Fall stand zum Zeitpunkt dieser Untersuchung kein weiteres Probenmaterial, wie z.B. Kopfhaar, für eine weitere Bestätigungsanalyse zur Verfügung.

Die im Rahmen der Toxyper-Evaluierung durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass mit dem entwickelten Screening-Verfahren der Nachweis von Xenobiotika in humaner Glaskörperflüssigkeit möglich ist. Die, verglichen mit der Aufarbeitung von Gewebe, einfache Probenhandhabung und -aufarbeitung und die automatisierte Auswertung der Messdaten des Toxypers ist eine zeit- und kostensparende Screening-Alternative für die Untersuchung von Leichenfällen, in denen kein oder nur eine geringe Menge Urin bzw. Blut asserviert werden kann. Die erreichten Nachweisgrenzen decken sich weitgehend mit den von Pelander et al.<sup>[78]</sup> publizierten Werten. Abgesehen von den bekannten physiologischen Limitierungen der Matrix (Passage der Blut-Retina-Schranke), ist der Toxyper somit auch prinzipiell für den Nachweis von körperfremden Substanzen im Glaskörper im Rahmen der Leichentoxikologie geeignet.

Für die weitere Evaluierung der Methode ist eine Bestätigungsanalyse zur quantitativen Bestimmung der Wirkstoff-Konzentration in der Glaskörperflüssigkeit unumgänglich. Hierzu würde es sich anbieten, auf eine gezielte und damit sensitive LC-MS/MS-Methode zurückzugreifen. Da humane Glaskörperflüssigkeit, ähnlich wie schon beim Nachweis körperfremder Substanzen in der Zahnhartsubstanz diskutiert, nicht unter kontrollierten Bedingungen asservierbar ist, bleibt die Analyse von dotierter boviner Glaskörperflüssigkeit sowie der systematische Vergleich von Urin-, Blut und Glaskörperkonzentration bei Realfällen die einzige Möglichkeit, mehr über die Verteilung forensisch relevanter Wirkstoffe in das Auge in Erfahrung zu bringen.

#### **4.7.9 Schlussfolgerungen aus der Toxyper-Entwicklung**

Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie ist im Vergleich zu den weit verbreiteten immunologischen Screening-Methoden das spezifischere Nachweisverfahren und liefert in der Regel mehr Informationen als dies mit Flüssigkeitschromatographie-Dioden-Array-Detektion (LC-DAD) möglich wäre. Verglichen mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie, dem Goldstandard der letzten zwei Jahrzehnte auf dem Gebiet der Detektion von Xenobiotika in Körperflüssigkeiten, deckt die LC-MS einen erweiterten und - in gewisser Hinsicht - komplementären Bereich detektierbarer Substanzen ab. Zusammen mit den rasanten technischen Entwicklungen der letzten Jahre auf diesem Gebiet führte dies

zur schnellen Verbreitung von LC-MS-Systemen in der forensischen Toxikologie. Dabei handelte es sich in den vergangenen Jahre hauptsächlich um Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, die mit ihrer hohen Spezifität und Sensitivität auch in hochkomplexen Matrices wie Blut und Urin den quantitativen Nachweis von Wirkstoffen - teilweise im Pikogramm-Bereich - ermöglichen. Für das Screening mittels Triple-Quadrupol-MS werden unterschiedliche Messmodi bzw. software-unterstützte Kombinationen verschiedener Messmodi verwendet. Exemplarisch für die unterschiedlichen methodischen Ansätze des Screenings mittels Triple-Quadrupol-MS seien hier die Arbeiten von Nordgren et al.<sup>[182]</sup>, Wolfarth et al.<sup>[183]</sup>, Mazzorino et al.<sup>[184]</sup>, Dresen et al.<sup>[90]</sup> und Sauvage et al.<sup>[185]</sup> aufgeführt. Mit der zunehmenden Verfügbarkeit hochauflösender Benchtop Geräte innerhalb der letzten 3 - 5 Jahre wurden zudem unterschiedliche methodische Ansätze zum Nachweis körperfremder Substanzen in Körperflüssigkeiten oder Geweben unter Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie (Flugzeitmassenspektrometer (TOF) oder Orbitrap) publiziert<sup>[186-190]</sup>.

Im Gegensatz zu den soeben erwähnten Triple-Quadrupol- oder Flugzeit-Massenspektrometern sind Ionenfallen vergleichsweise alte Systeme und schon seit über 30 Jahren kommerziell erhältlich. Obwohl die technischen Limitationen und Probleme dieser ersten Geräte längst behoben sind, hat sich die Ionenfalle als Analysensystem in den forensischen Laboren trotz der hohen Scan-Geschwindigkeiten von bis zu 52 000 amu/s (amaZon speed, Bruker Daltonik) - zum Vergleich: das neueste QqQ-System QTRAP 5500 der Firma AB Sciex hat eine maximale Scan-Geschwindigkeit von 20 000 amu/s - bis jetzt nicht etablieren können. Lediglich Liu et al.<sup>[191]</sup> und Wissenbach et al.<sup>[133]</sup> haben 2010 auf unterschiedlichen Plattformen einen Screening Ansatz vorgestellt. Auf dem Gebiet der Proteomics sind Ionenfallen zur Untersuchung komplexer Peptidgemische hingegen weit verbreitet. Da die analytische Fragestellung in diesen beiden Gebieten, nämlich die Identifizierung möglichst vieler Analyten in einer komplexen Matrix, in Grundzügen die Gleiche ist, liegt es nahe, die technischen Möglichkeiten eines solchen Systems auch für den Nachweis kleiner Moleküle einzusetzen.

Der in dieser Arbeit entwickelte Toxyper-Workflow ist eine schnelle und robuste Screening-Lösung für den Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in biologischen Matrices. Die Kombination von Retentionszeit und MS<sup>2</sup>-/MS<sup>3</sup>-Spektren erfüllt die Kriterien zur Identifikation von Analyten mit chromatographisch-massenspektrometrischen Verfahren<sup>[192]</sup>. Durch Verwendung des Zero Delay Polarity Switching besteht die Möglichkeit, positiv und negativ ionisierende

Substanzen (s. Anhang A-3) in einer Messung zu detektieren. Die Ergebnisse der im Rahmen der Evaluierung durchgeführten Messungen dotierter Proben mit bekannten Konzentrationen und die Analyse von Realproben parallel zu etablierten Analysenverfahren bestätigen die Leistungsfähigkeit des Systems. Die Methode eignet sich demnach sowohl für die Untersuchung klinischer als auch forensischer Proben. Bei Fragestellungen, bei denen der Nachweis geringster Spuren von Bedeutung ist (z.B. Beibringung von Medikamenten oder Drogen), sollte auf Grund der höheren Empfindlichkeit jedoch auf eine angepasste QqQ-Methode zurückgegriffen werden.

Die Daten des Interlaborvergleichs an sieben unabhängigen Analysensystemen in fünf verschiedenen Routine- und Forschungslaboren zeigen die Übertragbarkeit und Effizienz der Methode auch außerhalb der kontrollierten Entwicklungsumgebung. Die Erfahrungen mit unterschiedlich matrixbelasteten Systemen in Routine- und Forschungslaboren führten zur Entwicklung eines mittlerweile kommerziell verfügbaren System Suitability Test (SST), der dem Anwender helfen soll, den aktuellen Zustand des Systems besser beurteilen zu können. Weiterhin wurde zur Verringerung von Verschleppungseffekten eine Methode etabliert, mit der das LC-System bei Bedarf, auch innerhalb von Probensequenzen, gespült werden kann.

Durch den hohen Automatisierungsgrad eignet sich die Methode für den Einsatz in Routine-Laboratorien mit hohem Probenaufkommen. Trotz der automatischen Auswertung und Reporterstellung ist eine manuelle Kontrolle der Ergebnisse durch geschulte Mitarbeiter weiterhin unabdingbar. Die Zusammenstellung der Analysenlisten und Auswahl der Methoden über die web-basierte Benutzeroberfläche (Compass OpenAccess) erfordert für die Durchführung der Analysen vom Benutzer keine tiefgehenden MS-Kenntnisse, so dass jeder Labormitarbeiter bereits nach kurzer Einarbeitungszeit die Analyse selbständig durchführen kann. Mit der Compass Software besteht, z.B. für spezielle Fragestellungen, Forschungsprojekte und Methodenentwicklung, jedoch nach wie vor Zugriff auf die volle MS<sup>n</sup> Funktionalität sowie alle weiteren Geräteparameter. Diese Kombination ermöglicht neben dem Einsatz im Routinelabor auch die Bearbeitung komplexer Fragestellungen auf dem Gebiet der Strukturaufklärung.

Trotz dieser Vorteile kann auch diese Analysenmethode nicht den Anspruch erheben, ein alles umfassendes Screening zu bieten. Mehrere forensisch relevante Substanzen und Substanzklassen können mit diesem Verfahren aktuell nicht oder nur schlecht nachgewiesen werden. Zu den ersteren gehören z.B. Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) bzw. Gamma-Butyrolacton (GBL) und 1,4-Butandiol von

denen auf Grund ihrer geringen Molekularmasse (unter 105 g/mol) und dem unteren Massen-Cut-off von 70 Da keine verwertbaren MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-Spektren aufgenommen werden können.

Die Methode wurde hauptsächlich zur Analyse von Serumproben entwickelt, so dass lediglich eine geringe Anzahl an Phase-I- und Phase-II-Metaboliten enthalten sind. Für ein umfassendes Urin-Screening sei hierfür auf die von Maurer, Wissenbach und Weber veröffentlichte Sammlung an MSn-Spektren verwiesen<sup>[193]</sup>.

Auf Grund der gegenüber aktuellen Triple-Quadrupol- und Flugzeit-Massenspektrometern geringeren Empfindlichkeit, sollte für den Nachweis der großen Gruppe an neuen psychoaktiven Substanzen (NPS) auf Grund deren - in der Regel - geringen Serumkonzentrationen auf eine gezielte Methodik d.h. eine QqQ-Methode oder zumindest eine Methode mit eingeschränkter Anzahl an Analyten zurückgegriffen werden. Auf Grund der schnellen Chromatographie erreicht die Methode mit mittlerweile 900 Analyten (Toxytyper 1.1) nahezu die Grenze, an der die Verwendung einer retentionszeit-gesteuerte Spektrenaufnahme auf Grund zu vieler Überlappender Retentionszeitfenster noch sinnvoll ist. Ein weiterer Ausbau der Methode ist daher nur über einen Verzicht auf die SPL zugunsten einer reinen AutoMSn-Spektrenaufnahme, bei der jeweils das intensivste bzw. die intensivsten Ionen als Precursor für MSn-Experimente ausgewählt werden, möglich.

Der Toxytyper wird u.a. am Institut für Rechtsmedizin Freiburg seit Mitte 2013 als Routine-Methode zum Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in Serum und Urin eingesetzt. Das Bundeskriminalamt (Fachbereich KT 34 Toxikologie) verwendet das System aktuell zur schnellen Analyse beschlagnahmter Festsubstanzen, „Research Chemicals“, Kräutermischungen und Tabletten. Weiterführende Arbeiten haben gezeigt, dass sich der Toxytyper-Ansatz und das verwendete LC-MS System neben dem hier vorgestellten Screening auch für weitere Fragestellungen erfolgreich einsetzen lassen. Im Routinebetrieb eines klinischen oder forensischen Labors stellt sich oft die Frage des Nachweises einer bestimmten Gruppe von Substanzen, beispielsweise bei fraglicher Beibringung von Hypnotika (drug-facilitated assault, DFA) oder Psychopharmaka / Benzodiazepinen in Proben aus Straßenverkehrsfällen (DUI). Das von Bruker verwendete Open Library Concept ermöglicht die einfache Erstellung von Screening-Methoden, die speziell auf bestimmte Fragestellungen zugeschnitten werden können. Dies konnte für eine Gruppe von 105 Psychopharmaka gezeigt werden. Hierzu wurden Spektren von gewünschten Substanzen aus der Toxytyper Bibliothek zusammen mit neu aufgenommen Spektren weiterer Analyten in einer neuen Spektrenbibliothek

hinterlegt. Zusammen mit der daraus erstellten SPL konnte somit innerhalb kürzester Zeit eine Screening-Methode mit automatischer Auswertung und Reporterstellung zum Nachweis dieser Psychopharmaka erstellt werden. Durch die Einschränkung der Methode auf bestimmte Analyten und die Verwendung einer sog. Heated ESI-Quelle (ionBooster™, Bruker Daltonik GmbH) konnten mit der entwickelten Methode im Vergleich zum Toxyper niedrigere Nachweisgrenzen und ein höherer Prozentsatz korrekter Identifizierungen erreicht werden<sup>[194]</sup>.

Neben der Analyse von Blut und Urin konnte zudem gezeigt werden, dass sie die Methode auch für die Analyse von Glaskörperflüssigkeit eignet. Die relativ einfache Probenaufarbeitung in Kombination mit der schnellen Analytik und automatischen Auswertung des Toxypers stellen, verglichen mit der GC-MS Analyse von post-mortalem Gewebe, eine zeit- und kostensparende Screening-Alternative für Leichenfälle, in denen kein bzw. nur wenig Urin und/oder Blut asserviert werden kann, dar.

Huppertz et al. entwickelten unter Verwendung einer Kinetex® Säule (Phenomenex Ltd., Aschaffenburg) und einer speziell für diese Fragestellung neu erstellten Bibliothek ein Verfahren zum Nachweis synthetischer Cannabinoide<sup>[112]</sup>. In Serum konnten für einen Großteil der 48 Substanzen Nachweisgrenzen zwischen 0,1 und 0,5 ng/ml erreicht werden. Diese relativ niedrigen Konzentrationen entsprechen ungefähr den Bestimmungsgrenzen aktueller, auf Triple-Quadrupol-MS basierender Nachweismethoden für synthetische Cannabinoide<sup>[131]</sup>. Die kurze Laufzeit von 12 Minuten und die vom Toxyper übernommene automatische Auswertung ermöglichen somit einen einfachen und schnellen Nachweis synthetischer Cannabinoide in einem Konzentrationsbereich wie er nach dem Konsum von Räuchermischungen im Blut vorliegt.

Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten wird die Erweiterung des Methodenspektrums um quantitative bzw. semi-quantitative Bestimmungen forensisch relevanter Substanzen bzw. Substanzklassen sein.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in verschiedenen alternativen Matrices. Blut und Urin gehören sowohl in der forensischen, wie auch klinischen Toxikologie zu den klassischen Untersuchungsmaterialien. Zudem hat sich in den letzten Jahren die Analyse von Haaren - hauptsächlich Kopfhaar - als Routinemethode etabliert. Im Bereich der Forensik wird zudem bei der Untersuchung von Todesfällen klassischer Weise auch Mageninhalt analysiert. Die Bezeichnung „alternative Matrix“ kann somit alle weiteren Körperflüssigkeiten und Gewebe zusammenfassen, die in der alltäglichen Laborroutine nicht zum Nachweis körperfremder Substanzen verwendet werden. Dies führt dazu, dass die Frage ob ein Untersuchungsmaterial nun „alternativ“ sei oder nicht, je nach Aufgabengebiet oder analytischer Fragestellung, aber auch von Land zu Land, im Extremfall sogar von Labor zu Labor, unterschiedlich beantwortet wird.

Ein Beispiel für eine Matrix, die zu Beginn dieser Arbeit an der Schwelle zum Routine-Einsatz stand, ist der Speichel. Wie bei vielen anderen Matrices auch ist das theoretische Wissen über den Stofftransport aus dem Blut in den Speichel seit langem bekannt und der Nachweis von Biomarkern bzw. einzelner Wirkstoffe im Bereich des klinischen Monitorings erprobt. Auf Grund der einfachen, nicht-invasiven Probennahme wurde die Verwendung von Speichel zur Durchführung von Drogenschnelltests im Rahmen von Verkehrskontrollen als Alternative zu den bisher verwendeten Urintests in zwei EU-weiten Studien untersucht. Neben der eigentlichen Analyse vor Ort, für die mittlerweile von mehreren Herstellern immunchemische Komplett-Systeme erhältlich sind, stellt sich im forensischen Kontext unter anderem die Frage nach der Möglichkeit einer identifizierenden Bestätigungsanalyse in einem Labor und damit auch nach Versandt- und Lagermöglichkeit von Proben und der Stabilität der nachzuweisenden Substanzen im Speichel oder auf bzw. in dem entsprechenden Probennahme System. Um dieser Frage nachzugehen wurden die Einflüsse des ungekühlten Versands von mittels Dräger DCD 5000 asservierten Speichelproben auf die Stabilität von Benzodiazepinen untersucht. Mit Hilfe einer für diese Fragestellung entwickelten LC-MS/MS-Methode konnten für die unterschiedlichen Modellsubstanzen, je nach Lagerung des Probennehmers, unterschiedliche Wiederfindungsraten ermittelt werden. Die besten Ergebnisse wurden nach Zugabe von 950 µl Methanol auf den

Probengeber erzielt, was zu der allgemeinen Empfehlung an die Anwender vor Ort die Probennehmer Methanol-stabilisiert zu versenden bzw. nach Möglichkeit den Probennehmer zeitnah zu zentrifugieren und das Eluat vom Mundstück getrennt zu lagern, führte.

Auch wenn positive Speichel- oder Urinbefunde die Aufnahme einer Substanz beweisen können, ist der Nachweis einer akuten Beeinflussung nur durch quantitative Untersuchung einer Blutprobe möglich. Da die Zusammenhänge zwischen Plasma- und Speichelkonzentration eines Wirkstoffes theoretisch bekannt sind, stellt sich oft die Frage, ob durch quantitative Analyse einer Speichelprobe Rückschlüsse auf die Plasmakonzentration gezogen werden können. Als Beispiel hierfür wird oft das Therapeutic Drug Monitoring genannt, das bei probandenreichen Studien, aber auch im klinischen Alltag schon mittels Speichelanalytik durchgeführt wird. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass bei dieser Art des Monitorings lediglich die Compliance des Patienten überwacht und verhindert werden soll, dass es langfristig zu Über- oder Unterdosierung des Wirkstoffes kommt. Im Bereich der Forensik existieren jedoch bei nicht wenigen Fragestellungen definierte Grenzwerte (Blut- bzw. Serumkonzentrationen) seitens des Gesetzgebers, bei deren Überschreiten ein ordnungswidriges oder strafrechtliches Vergehen vorliegt. Abgesehen von der rechtlichen Problematik müsste zur Beurteilung einer Beeinflussung anhand einer Speichelprobe ein konstanter Speichel/Serum-Koeffizient für diese Substanz vorliegen. Dies wurde in der Literatur anhand eines Einzelfalles für Methylphenidat postuliert. Daher wurde das Studienprotokoll einer klinischen Studie, in deren Rahmen 24 Probanden unter kontrollierten Bedingungen Ritalin verabreicht wurde, um eine zeitgleich zu den bereits geplanten Blutentnahmen durchgeführte Speichelprobennahme, erweitert. Die über den Tagesverlauf erhaltenen Methylphenidat-Kinetiken in Serum und Speichel zeigten große interindividuelle und zircadiane Unterschiede. Insbesondere die Menge und damit verbundene Zusammensetzung des sezernierten Speichels, z.B. nach dem Essen, hatte großen Einfluss auf die im Speichel nachweisbare Methylphenidat-Konzentration. Dies führte zu Speichel/Serum-Koeffizienten von 0,3 bis 4,8 innerhalb der ersten acht Stunden nach der Einnahme. Die in dieser Studie erhaltenen Daten zeigen, dass sich die Analyse von Speichel auf Grund der einfachen, nicht-invasiven Probennahme durchaus zum Nachweis oder Ausschluss einer Methylphenidat-Aufnahme eignet, ein Rückschluss auf die vorliegenden Serum-Konzentration und damit eine Aussage über die Beeinflussung zum Zeitpunkt der Probennahme jedoch nicht möglich ist.

Als letztes Projekt zum Thema Speichelanalytik wurde die Nachweisbarkeit von synthetischen Cannabinoiden untersucht. Diese Fragestellung war vor allem für forensische Kliniken von Interesse, da zu Beginn dieses Projektes auf Grund fehlender Informationen über den Metabolismus dieser Substanzen noch keine Nachweismethoden für Urin vorhanden waren und viele dieser Einrichtungen nicht über die Möglichkeit verfügen, eine Blutprobe erheben zu können. Die Entnahme und Handhabung einer Speichelprobe läuft hingegen einfacher ab als die weitverbreitete kontrollierte Abnahme von Urinproben. Hierzu wurde erneut auf den DCD 5000 Speichelsammler der Firma Dräger zurückgegriffen und ebenfalls Stabilitäts- und Lagerversuche mit dotierten Speichelproben durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die untersuchten synthetischen Cannabinoide bereits nach kurzer Zeit irreversible an dem Polymer des Probennehmers haften, was zu einem starken Verlust an Analyt in den Eluat nach der Zentrifugation führte. Diese Verluste konnten wie schon zuvor durch Stabilisierung der Probennehmer mit Ethanol kompensiert werden, so dass nach drei Tagen Lagerung, was ungefähr einem innerdeutschen Postversand entspricht, noch Wiederfindungsraten größer 43 % erreicht werden konnten. Obwohl ein Großteil der hier untersuchten Realproben entgegen der Empfehlung unstabilisiert verschickt wurde, stimmten die Ergebnisse der Speichelproben qualitativ zum größten Teil mit den Ergebnissen der zeitgleich entnommenen Blutproben überein. Dies zeigt, dass Speichel in Fällen in denen keine Blutprobe erhoben werden kann, eine geeignete alternative Matrix zum Nachweis des Konsums synthetischer Cannabinoide darstellt und mit dem DCD 5000 trotz Einbußen bei der Wiederfindungsrate ein geeigneter Probennehmer für die einfache und schnelle Probennahme zur Verfügung steht.

Als weitere Matrix zum Nachweis körperfremder Substanzen wurde humane Zahnhartsubstanz untersucht. Es existieren bereits vereinzelte Publikationen über den Nachweis von Schwermetallen und anderen Substanzen in menschlichen und tierischen Zähnen, systematische Studien über die Einlagerungswege existieren jedoch nicht. Obwohl die Zahnhartsubstanz zu den härtesten und damit am längsten überdauernden Geweben zählt, spielt sie in der forensischen Routine im Rahmen der forensisch-toxikologischen Analytik keine Rolle, was sie zu einer wirklichen „alternativen“ Matrix macht. In diese Arbeit konnten erstmalig nach peroraler Einmalgabe Amoxicillin und Clindamycin in humanen Zahnkronen und Zahnwurzeln nachgewiesen werden. Die hierbei durchgeführte Trennung, der den Einwirkungen des Mundraums ausgesetzten Krone von der in der Regel komplett vom Zahnfleisch umschlossenen Wurzel, lässt dabei Rückschlüsse auf den

Einlagerungsweg zu. In der besser durchbluteten Zahnwurzel konnten höhere Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden als in der Krone. Dies lässt darauf schließen, dass der Großteil der nachgewiesenen Antibiotikamenge über die Blutgefäße der Pulpa in den Zahn gelangt ist. Eine Einlagerung über den im Mundraum vorhandenen Speichel in die Zahnkrone erscheint, wenn überhaupt, nur in geringem Umfang stattzufinden, da selbst Zähne die das Zahnfleisch noch nicht durchbrochen und daher keinen Kontakt zur Mundhöhle hatten, ähnliche Wirkstoffverteilungen zwischen Zahnkrone und -Wurzel aufweisen. Zum Nachweis einer antimikrobiellen Wirkung der hier nachgewiesenen Amoxicillin- und Clindamycin-Konzentrationen auf Mikroorganismen am Zahn sind weitere systematische Untersuchungen, eventuell unter Einbeziehung von in-vitro Versuchen mit Modelorganismen, erforderlich.

Über den Einlagerungsweg von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in die Zähne sind bisher nur wenige Arbeiten publiziert. Diese befassen sich hauptsächlich mit dem generellen Nachweis eines Wirkstoffes, differenzieren dabei jedoch nicht zwischen Dentin und Schmelz. In dieser Arbeit wurde ein in der Zahnmedizin etabliertes Modell (pH-Cycling) zur Simulation der im Mund stattfindenden De- und Remineralisationszyklen verwendet um die Einlagerung von acht Modellschubstanzen aus dem Mundspeichel in den Zahn nachzustellen. Hierbei wurde aus Rinderzähnen gewonnenes Dentin und Schmelz getrennt voneinander untersucht. Vorversuche haben gezeigt, dass aus beiden Matrices mittels einer zweistufigen methanolischen Extraktion ca. 90 % der eingelagerten Substanzen extrahiert werden können. Die quantitative Analyse mittels LC-MS/MS zeigte, dass bei den acht untersuchten Modellschubstanzen, die im Dentin nachgewiesenen Konzentrationen im Schnitt um den Faktor 10 höher lagen als im Schmelz. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass sich auf Grund der physiko-chemischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes, die Modellschubstanzen deutlich besser in das Dentin einlagern als in den Zahnschmelz. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Wirkstoffe entlang feiner, im Dentin vorhandener Kanälchen in der Zahnhartsubstanz verteilen. Dies würde sowohl die höheren Dentinkonzentrationen aller Modellschubstanzen als auch deren schlechtere Extrahierbarkeit aus Dentin erklären.

Die Ergebnisse der im Rahmen einer Pilotstudie untersuchten Zähne dreier Verstorbener mit bekanntem Drogenkonsum zeigen, dass sich Drogen- und Medikamentenwirkstoffe nach deren Konsum bzw. Einnahme in die Zahnhartsubstanz einlagern und dort - ähnlich dem Haar - für einen längeren

Zeitraum gespeichert werden. Die qualitativen Ergebnisse lassen sich weitgehend mit den Befunden der forensisch-toxikologischen Routineanalysen bestätigen. Auf Grund der unterschiedlichen Nachweisfenster der drei Untersuchungsmatrizes (Körperflüssigkeiten, Haare und Zahnhartsubstanz) und den nicht vorhandenen Angaben über Konsum, Konsumzeitpunkt, -häufigkeit und -menge ist bei fehlender Bestätigung in einer weiteren Matrix keine gesicherte Interpretation positiver Zahnbefunde möglich. Da Zähne, insbesondere das Dentin, keinen Umwelteinflüssen unterliegen, erscheint ein „Auswasch-Effekt“, wie er z.B. bei Haaren durch Haarbehandlung oder UV-Strahlung entsteht, unwahrscheinlich. Theoretisch könnten einmal eingelagerte Substanzen unbegrenzt in der Zahnhartsubstanz gespeichert werden. Dies macht sie zu einer wertvollen Matrix zur Erhebung postmortaler forensisch-toxikologischer Befunde, insbesondere bei stark fäulnisveränderten oder bereits komplett skelettierten Leichen.

Für die Zukunft scheinen weiterführende Untersuchungen von Zahnproben und die Interpretation der Befunde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Haaranalyse und forensisch-toxikologischer Routineuntersuchung an einem größeren Kollektiv von post-mortem Proben zusammen mit weiteren in-vitro Studien am besten geeignet, weitere Informationen über die Einlagerung körperfremder Substanzen und deren Nachweisbarkeitsdauer in humaner Zahnhartsubstanz zu erhalten.

Als weitere alternative Matrix für die post-mortale Analytik wurde Glaskörperflüssigkeit auf Alkohol und die zwei direkten Alkoholkonsummarker Ethylglucuronid und Ethylsulfat untersucht. Bei Alkohol handelt es sich, besonders in Europa, um die am meisten konsumierte Droge und der Nachweis einer zum Todeszeitpunkt vorliegenden Alkoholisierung kann wichtige Erkenntnisse zur Ermittlung der Todesumstände liefern. Die beiden Alkoholkonsummarker EtG und EtS waren mittels LC-MS/MS, das Ethanol selbst mit GC-FID in Blut, Urin und Glaskörperflüssigkeit gut nachweisbar. Von einigen Ausnahmen abgesehen waren die EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin am höchsten und teilweise um das über hundertfache höher als in Blut und Glaskörperflüssigkeit. Jedoch lässt sich keine Relation zwischen den Ethanol-, EtG- und EtS-Konzentrationen feststellen. Dies liegt zum einen an den interindividuell unterschiedlichen Bildungs- und Eliminationskinetiken der Analyten, zum anderen an unterschiedlichen post-mortalen Veränderungen sowie unterschiedlichem Alkoholkonsumverhalten vor dem Tod. Erschwerend kommt hinzu, dass durch post-mortale Prozesse Alkohol und EtG sowohl gebildet, als auch abgebaut werden kann, was die Interpretation der Ergebnisse weiter erschwert. Bis heute wurde jedoch noch kein post-mortaler

Abbau bzw. keine postmortale Bildung von EtS beschrieben, daher kann durch den Nachweis dieses Markers eine Alkoholaufnahme vor dem Tod sicher nachgewiesen werden. Die Kombination aus den Ethanol-Konzentrationen und den Marker-Konzentrationen in den verschiedenen Matrices kann daher wertvolle Hinweise über die Zeitspanne zwischen Trinkende und Todeszeitpunkt ergeben.

Für den Nachweis von, teilweise im Pikogramm-Bereich vorliegenden Wirkstoff-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten oder Geweben, sind hoch sensitive und hoch spezifische Analysensysteme und Methoden notwendig. Der Nachweis von Xenobiotika in biologischen Matrices wird heute hauptsächlich mittels massenspektrometrischer Verfahren durchgeführt. Hierbei hat sich, auch auf Grund der rasanten technischen Entwicklungen der letzten Jahre auf diesem Gebiet, die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie durchgesetzt. Für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen werden in der forensischen Analytik hauptsächlich Triple-Quadrupol-Massenspektrometer unter Verwendung unterschiedlicher Messmodi bzw. software-unterstützter Kombination verschiedener Messmodi eingesetzt.

Neben der reinen Empfindlichkeit und Spezifität eines Analysensystems sind für den Einsatz in der Routineanalytik jedoch auch dessen Robustheit, die Kosten und die einfache Bedienbarkeit ausschlaggebend. Besonders klinische Labore sind hier durch die hoch automatisierten immunchemischen Analyser eine einfache und benutzerfreundliche Bedienung und automatische Auswertung der Analyseergebnisse gewohnt. Der in dieser Arbeit entwickelte Toxyper-Workflow ist eine schnelle und robuste Screening-Lösung für den Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in biologischen Matrices. Durch den hohen Automatisierungsgrad eignet sich die Methode für den Einsatz in Routine-Laboratorien mit hohem Probenaufkommen. Dabei erfordert die Durchführung der Analysen auf Grund der web-basierten Benutzeroberfläche vom Anwender keine tiefergehenden MS-Kenntnisse, so dass jeder Labormitarbeiter bereits nach kurzer Einarbeitungszeit die Analyse selbständig durchführen kann. Trotz der automatischen Auswertung und Reporterstellung ist eine manuelle Kontrolle der Ergebnisse durch geschulte Mitarbeiter weiterhin unabdingbar. Die verwendete Kombination von Retentionszeit und  $MS^2$ -/ $MS^3$ -Spektren erfüllt die Kriterien zur Identifikation von Analyten mit chromatographisch-massenspektrometrischen Verfahren. Mit der Compass Software besteht für spezielle Fragestellungen, Forschungsprojekte und Methodenentwicklung nach wie vor Zugriff auf die volle

MSn Funktionalität der Ionenfalle. Diese Kombination ermöglicht neben dem Einsatz im Routinelabor auch die Bearbeitung komplexer Fragestellungen auf dem Gebiet der Strukturaufklärung. Somit eignet sich dieses Analysensystem besonders für den Einsatz in forensischen Laboren, die - auf Grund der schnellen Entwicklungen auf dem Drogenmarkt - auf die Möglichkeit unbekannte Wirkstoffe identifizieren und schnell entsprechende Nachweismethoden entwickeln zu können, angewiesen sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methoden-Evaluierungen, Ermittlung von Nachweisgrenzen und Vergleiche mit etablierten LC-MS-Verfahren sowie der Interlabor-Vergleich zeigen, dass der entwickelte Workflow, unabhängig von der untersuchten Matrix, den Anforderungen an ein Screeningverfahren zur Analyse von Körperflüssigkeiten entspricht. Die Methode ist robuster und die automatisierte Datenauswertung für den Routineeinsatz anwenderfreundlicher als dies momentan bei den aktuell verfügbaren hochauflösenden Massenspektrometern wie TOF-MS und Orbitrap der Fall ist. Der Toxyper liefert spezifischere Informationen als die weit verbreiteten immunologischen Assays, ist universeller einsetzbar als auf Diodenarray-Detektion basierte Systeme und deckt im Vergleich zur GC-MS - insbesondere bei der Analyse von Urinproben - eine komplementäre Anzahl von Analyten ab.

Die Verwendung von Speichel im Rahmen von Verkehrskontrollen hat sich in Deutschland nicht durchgesetzt, so dass es aktuell im Bereich der Routine-Analytik keine Nachfrage nach Bestätigungsanalysen im Speichel gibt. Die anfängliche Problematik mit dem Nachweis synthetischer Cannabinoide bzw. deren Metaboliten in Urin hat jedoch gezeigt, dass es hilfreich sein kann, auch alternative Matrices analytisch abzudecken, um - bei passender Fragestellung - zeitnah zumindest den qualitativen Nachweis oder Ausschluss eines Konsums führen zu können. Bei dem derzeit schnell wachsenden Angebot an neuen Designerdrogen kann es jederzeit wieder vorkommen, dass Substanzen, die vollständig als noch unbekannte Metaboliten im Urin ausgeschieden werden, auf den Markt kommen. In diesem Falle wäre der Nachweis der Muttersubstanz im Speichel bis zur Aufklärung des Metabolismus und der Entwicklung entsprechender Nachweismethoden, seien es Immunoassays oder LC-MS-Methoden, eine adäquate Alternative zur invasiven Blutentnahme.

Die im Rahmen diese Arbeit entwickelten Verfahren zum Nachweis von Drogen- und Medikamentenwirkstoffen in Glaskörperflüssigkeit und Zahnhartsubstanz bilden den Grundstock für weitere Forschungsprojekte auf diesem Gebiet. Für beide

Matrices ist es nicht möglich, nach kontrollierter Einnahme erhaltene humane Realproben zu asservieren. Daher wird man auch in Zukunft zur Methodenentwicklung bzw. zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf dotiertes tierisches Material zurückgreifen müssen. Neben dem hier entwickelten rein qualitativen Nachweis ist der nächste Schritt, die Entwicklung von gezielten LC-MS/MS-Verfahren zum quantitativen Nachweis der im Rahmen der forensisch-toxikologischen Routine-Analytik nachgewiesenen Substanzen im Glaskörper. Durch den systematischen Vergleich von Blut-, Urin- und Glaskörper-Konzentrationen lassen sich eventuell wertvolle Hinweise für die Interpretation von Leichenfällen, in denen lediglich Glaskörperflüssigkeit asserviert werden konnte, gewinnen.

## Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: VERÄNDERUNG DER ELEKTROLYTKONZENTRATION DES SPEICHEL IM STREIFENSTÜCK.....	3
ABB. 2: MODIFIZIERUNG DES PRIMÄRSPEICHEL IN DEN AUSFÜHRGÄNGEN .....	4
ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ELECTROSPRAY IONISATION .....	17
ABB. 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TRÖPFCHENBILDUNG IN DER ESI DURCH COULOMB-EXPLOSION BEZIEHUNGSWEISE DROPLET JET FISSION .....	18
ABB. 5: SCHEMATISCHER AUFBAU DER NEUEN IONBOOSTER IONENQUELLE .....	20
ABB. 6: SKIZZE EINES LINSEN-BASIERTEN IONENTRANSFERS UND EINES DUAL FUNNEL TRANSFERSYSTEMS .....	22
ABB. 7: SCHNITT DURCH EINE IONENFALLE DER FIRMA BRUKER DALTONIK .....	23
ABB. 8: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER 3D IONENFALLE .....	23
ABB. 9: DURCH WECHSELSPANNUNG AN DER RINGELEKTRODE ENTSTEHENDER POTENTIALTOPF .....	24
ABB. 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ICC-REGELUNG .....	25
ABB. 11: SPEKTRENAUFNAHME MIT HILFE DES MASS-SELECTIVE-INSTABILITY MODUS.....	26
ABB. 12: VERLAUF DER WECHSELSPANNUNGEN WÄHREND EINES MS SCANS .....	27
ABB. 13: AUFNAHME VON MS <sup>N</sup> -SPEKTREN „MS/MS IN TIME“ .....	27
ABB. 14: AUSWIRKUNGEN VERSCHIEDENER RECONSIDER-FAKTOREN .....	30
ABB. 15: IDA GESTEUERTE SPEKTRENAUFNAHME BEIM MTS.....	31
ABB. 16: GEWINNUNG VON ZAHN-PELLETS MIT HILFE EINES TREPANBOHRERS .....	76
ABB. 17: ABLAUF DES 9-TÄGIGEN PH-CYCLINGS <sup>[126]</sup> .....	78
ABB. 18: PRÄMOLARER (LINKS) UND MOLARER OBERKIEFERZAHN (RECHTS) FALL 1 .....	79
ABB. 19: 2 MOLARE ZÄHNE DES OBERKIEFERS FALL 2 .....	79
ABB. 20: WEISHEITZAHN (LINKS) UND MOLARER ZAHN DES UNTERKIEFERS FALL 3.....	80
ABB. 21: SCHWEINEAUGE VOR DER PUNKTION (LINKS) UND ENTNOMMENE GLASKÖRPERFLÜSSIGKEIT (RECHTS).....	85
ABB. 22: WIEDERFINDUNGSRATEN NACH KURZZEIT-LAGERUNG (T = 5 MIN).....	88
ABB. 23: KONZENTRATIONSVERLAUF BEI ‚NATIVER‘ (LINKS) UND METHANOLISCHER LAGERUNG (RECHTS) .....	89
ABB. 24: KONZENTRATIONSVERLAUF IM DOTIERTEN SPEICHELPOOL (PROBEN A) .....	90
ABB. 25: DURCHSCHNITTLLICHE KONZENTRATIONSVERLÄUFE (N = 19) IN SERUM UND SPEICHEL NACH GABE VON 20 MG RITALIN .....	92
ABB. 26: SERUM- UND SPEICHELKINETIK VON DREI PROBANDEN ÜBER ACHT STUNDEN.....	93
ABB. 27: OF/SE-KOEFFIZIENTEN ALLER 19 PROBANDEN ÜBER EINEN ZEITRAUM VON ACHT STUNDEN .....	94
ABB. 28: WIEDERFINDUNGSRATEN (RSD IN %, N = 3) NACH 5 MINÜTIGER, 3-TÄGIGER ‚NATIVER‘ UND 3-TÄGIGER STABILISierter LAGERUNG .....	102
ABB. 29: TOTALIONENCHROMATOGRAMM (TIC) EINER REALEN SPEICHELPROBE IN DER DIE SYNTHETISCHEN CANNABINOIDE AM-2201, JWH-018, JWH-122 UND JWH-210 NACHGEWIESEN WURDEN.....	103
ABB. 30: AMOXICILLIN-KONZENTRATIONEN IN ZAHNKRONE UND -WURZEL NACH GABE VON 2 G AMOXICILLIN .....	107
ABB. 31: CLINDAMYCIN-KONZENTRATIONEN IN KRONE UND WURZEL NACH GABE VON 600 MG CLINDAMYCIN .....	108
ABB. 32: EXTRAKTIONS-AUSBEUTE IM DENTIN BEI VIER AUF EINANDERFOLGENDEN EXTRAKTIONEN LE 1 BIS LE4 .....	115
ABB. 33: EXTRAKTIONS-AUSBEUTE IM SCHMELZ BEI VIER AUF EINANDERFOLGENDEN EXTRAKTIONEN LE 1 BIS LE4 .....	115
ABB. 34: ANALYT-KONZENTRATIONEN IN DENTIN (BLAU) UND SCHMELZ (ROT) NACH 9 TÄGIGEM PH-CYCLING .....	117
ABB. 35: ETG- UND ETS-KONZENTRATIONEN IM GLASKÖRPER IN MG/L.....	130
ABB. 36: ETG- UND ETS-KONZENTRATIONEN IM SERUM (OBERSCHENKELVENENBLUT).....	131
ABB. 37: ETG- UND ETS-KONZENTRATIONEN IM URIN .....	131

ABB. 38: ETHANOLKONZENTRATIONEN IN BLUT, URIN UND GLASKÖRPERFLÜSSIGKEIT IN G/KG .....	132
ABB. 39: EICs DER 10-FACH INJEKTION DES DECAMIXES (SERUMEXTRAKT) MIT ACETONITRIL UND 5 MM AMMONIUMFORMIAT ALS ORGANISCHEM LAUFMITTEL .....	135
ABB. 40: EICs DER 10-FACH INJEKTION DES DECAMIXES MIT METHANOL UND 5 MM AMMONIUMFORMIAT ALS ORGANISCHEM LAUFMITTEL .....	136
ABB. 41: BIBLIOTHEKSEINTRAG VON CLOPENTHIXOL ( $MS^2$ -SPEKTRUM).....	137
ABB. 42: ANALYSENERGEBNISSE DER DOTIERTEN SERUMPROBEN SORTIERT NACH QUALITÄT DER IDENTIFIKATION .....	142
ABB. 43: BEISPIELE FÜR FALSCH-POSITIVE IDENTIFIKATION AUF GRUND DER ZUORDNUNG VON INFORMATIONSPARMEN SPEKTREN.....	144
ABB. 44: BEISPIELE FÜR FALSCH-POSITIVE IDENTIFIKATION BEI GERINGEN INTENSITÄTEN.....	144
ABB. 45: BEISPIELE FÜR FALSCH-POSITIVE IDENTIFIKATION BEI ÜBEREINSTIMMUNG DER $MS^3$ -SPEKTREN OHNE ZUGEHÖRIGEN $MS^2$ -TREFFER .....	145
ABB. 46: KORREKTE IDENTIFIKATION VON IM SERUM VORHANDENER HORMONE.....	146
ABB. 47: BEISPIEL FÜR FALSCH-POSITIVE IDENTIFIKATION VON BENZODODECINIUM IN $MS^2$ UND $MS^3$ .....	147
ABB. 48: ERGEBNISSE DER MIT DER FINALEN TOXTYPER METHODE ANALYSIERTEN SERUM-MIXE AUFGESCHLÜSSELT IN DIE 3 KONZENTRATIONS-STUFEN .....	148
ABB. 49: ERGEBNISSE DES METHODENVERGLEICHS TOXTYPER/MTS.....	149
ABB. 50: SCREENING-ERGEBNISSE TOXTYPER (TT) BEZOGEN AUF DEN NACHWEIS BZW. NICHT-NACHWEIS MITTELS MULTI-TARGET-SCREENING (MTS) UND SCREENING-ERGEBNISSE MTS BEZOGEN AUF DEN NACHWEIS BZW. NICHT-NACHWEIS MITTELS TT. ....	158
ABB. 51: ANALYSENERGEBNISSE NACH CHLORBUTAN-EXTRAKTION (LLE), BEZOGEN AUF DEN NACHWEIS BZW. NICHT- NACHWEIS NACH ACETONITRIL-FÄLLUNG UND ANALYSENERGEBNISSE NACH ACETONITRIL-EXTRAKTION, BEZOGEN AUF DEN NACHWEIS BZW. NICHT-NACHWEIS NACH LLE .....	160
ABB. 52: ZUSAMMENFASSUNG DER ANALYSENERGEBNISSE DER DOTIERTEN GLASKÖRPER-PROBEN SORTIERT NACH QUALITÄT DER IDENTIFIKATION (TOXTYPER 1.1) .....	167
ABB. 53: GRUPPIERUNG DER AUF DEN AUTOMATISCHEN REPORTS GELISTETEN TREFFER NACH KORREKTER IDENTIFIKATION, WAHRSCHEINLICHER IDENTIFIKATION UND FALSCH-POSITIVEN TREFFERN .....	167
ABB. 54: GRUPPIERUNG DER ERGEBNISSE NACH MANUELLER DURCHSICHT DER AUTOMATISCH GENERIERTEN REPORTS	168
ABB. 55: EXTRAHIERTE IONENSPUREN DER M/Z-VERHÄLTNISSE 309 UND 323 UND DIE JEWELIEGEN $MS$ -SPEKTREN .	170

## Tabellenverzeichnis

TAB. 1: AUFLISTUNG DER IM RAHMEN DIESER ARBEIT VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	33
TAB. 2: AUFLISTUNG DER IM RAHMEN DIESER ARBEIT VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	41
TAB. 3: AUFLISTUNG DER IM RAHMEN DIESER ARBEIT VERWENDETEN ANALYSEN-SYSTEME.....	42
TAB. 4: IM LAUFE DER METHODENENTWICKLUNG GETESTETE SÄULEN .....	44
TAB. 5: LC-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON BENZODIAZEPINEN.....	47
TAB. 6: MS-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON BENZODIAZEPINEN .....	47
TAB. 7: LC-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON METHYLPHENIDAT .....	49
TAB. 8: MS-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON METHYLPHENIDAT.....	49
TAB. 9: LC-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG SYNTHETISCHER CANNABINOIDE .....	50
TAB. 10: MS-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG SYNTHETISCHER CANNABINOIDE .....	51
TAB. 11: LC-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON AMOXICILLIN UND CLINDAMYCIN.....	54
TAB. 12: MS-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON AMOXICILLIN UND CLINDAMYCIN .....	54
TAB. 13: SCHRITTE DER FESTPHASENEXTRAKTION ZUR EXTRAKTION BASISCHER DROGEN AUS SERUM.....	56
TAB. 14: LC-PARAMETER ZUM NACHWEIS BASISCHER DROGEN.....	56
TAB. 15: MS-PARAMETER ZUM NACHWEIS BASISCHER DROGEN .....	57
TAB. 16: ZUSÄTZLICHE MRM-ÜBERGÄNGE ZUM NACHWEIS AUSGEWÄHLTER DROGEN IN HUMANEN ZÄHNEN I .....	58
TAB. 17: ZUSÄTZLICHE MRM- ZUM NACHWEIS AUSGEWÄHLTER DROGEN IN HUMANEN ZÄHNEN II .....	59
TAB. 18: METHODENPARAMETER DER GC-MS-METHODE ZUM NACHWEIS BASISCHER DROGEN .....	60
TAB. 19: LC-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON ETG UND ETS <sup>[132]</sup> .....	61
TAB. 20: MS-PARAMETER ZUR QUANTIFIZIERUNG VON ETG UND ETS .....	62
TAB. 21: SCHRITTE DER FESTPHASENEXTRAKTION ZUR EXTRAKTION VON GLASKÖRPERFLÜSSIGKEIT .....	63
TAB. 22: LC-PARAMETER FÜR TOXTYPER .....	64
TAB. 23: MS-PARAMETER FÜR DIE AUFNAHME VON BIBLIOTHEKSSPEKTREN .....	65
TAB. 24: MS-PARAMETER FÜR TOXTYPER-SCREENING .....	65
TAB. 25: PROBENBESCHREIBUNG UND LAGERDAUER DER LAGERSTUDIE .....	68
TAB. 26: ZUSAMMENSETZUNG UND WIRKSTOFF-KONZENTRATIONEN (NG/ML) DER RINGVERSUCHSPROBEN .....	83
TAB. 27: ANALYTISCHE METHODEN ZUR URINANALYSE.....	84
TAB. 28: STANDARDABWEICHUNG UND MATRIXEFFEKTE DER DER EINZELNEN BENZODIAZEPINE IN SPEICHEL .....	87
TAB. 29: KALIBRATIONSBEREICH UND NACHWEISGRENZE DER EINZELNEN SYNTHETISCHEN CANNABINOIDE.....	97
TAB. 30: MATRIXEFFEKTE, WIEDERFINDUNGSRATE UND PROZESSEFFEKTIVITÄT NACH FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION DER NIEDRIGEN QC-PROBE. ....	99
TAB. 31: MATRIXEFFEKTE, WIEDERFINDUNGSRATE UND PROZESSEFFEKTIVITÄT NACH FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION DER HOHEN QC-PROBE. ....	100
TAB. 32: ERGEBNISSE DER 26 SPEICHELPROBEN FÜR DIE ZEITGLEICH ABGENOMMENE SERUMPROBEN ZUR VERFÜGUNG STANDEN .....	104
TAB. 33: AMOXICILLIN-KONZENTRATIONEN IN ZAHNKRONE, -WURZEL UND ALVEOLARSERUM NACH GABE VON 2 G AMOXICILLIN SOWIE DER ZEITRAUM ZWISCHEN AMOXICILLIN-GABE UND ZAHNEXTRAKTION (T <sub>GABE</sub> ) .....	107
TAB. 34: CLINDAMYCIN-KONZENTRATIONEN IN ZAHNKRONE, -WURZEL UND ALVEOLARSERUM NACH GABE VON 600 MG CLINDAMYCIN SOWIE DER ZEITRAUM ZWISCHEN CLINDAMYCIN-GABE UND ZAHNEXTRAKTION (T <sub>GABE</sub> ) .....	109
TAB. 35: SEMI-QUANTITATIVE ERGEBNISSE DER EINZELNEN DENTIN-PROBEN NACH UNTERSCHIEDLICHER OBERFLÄCHEN-BEHANDLUNG .....	112

TAB. 36: SEMI-QUANTITATIVE ERGEBNISSE DER SCHMELZ- UND DENTIN-PROBEN NACH REMINERALISIERUNG UND UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN BEIM MAHLEN.....	114
TAB. 37: ERGEBNISSE DER SCHMELZ- UND DENTIN-PROBEN NACH 9-TÄGIGEM PH-CYCLING .....	116
TAB. 38: ERGEBNISSE DER ZAHNUNTERSUCHUNGEN SOWIE DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN ROUTINEANALYTIK IM FALL GS 314-10.....	120
TAB. 39: ERGEBNISSE DER ZAHNUNTERSUCHUNGEN SOWIE DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN ROUTINEANALYTIK IM FALL GS 348-10.....	121
TAB. 40: ZUSAMMENFASSUNG DER ZAHNERGEBNISSE UND HAARANALYSEN ZUM FALL GS 348-10 .....	122
TAB. 41: ERGEBNISSE DER ZAHNUNTERSUCHUNGEN SOWIE DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN ROUTINEANALYTIK IM FALL GS 447-10.....	126
TAB. 42: ZUSAMMENFASSUNG DER ZAHNERGEBNISSE UND HAARANALYSEN ZUM FALL GS 447-10.....	127
TAB. 43: LISTE DER IN DER SPL HINTERLEGTE BENZODIAZEPINE UND DEUTERIERTEN ANALOGA.....	138
TAB. 44: ZUSAMMENFASSUNG DER SMILEMS-ERGEBNISSE VON MIT VERSCHIEDENEN BENZODIAZEPINEN (BENZO-MIX 1) DOTIERTEM HUMANSERUM. ....	139
TAB. 45: ZUSAMMENFASSUNG DER SMILEMS-ERGEBNISSE VON MIT VERSCHIEDENEN BENZODIAZEPINEN (BENZO-MIX 2) DOTIERTEM HUMANSERUM. ....	139
TAB. 46: DOTIERTE SUBSTANZEN DER RINGVERSUCHSPROBEN BZF 2/09 A UND BZF 2/09 B UND DIE ENTSPRECHENDEN SCORE WERTE DES SMILEMS BIBLIOTHEKSSPEKTRENVERGLEICHS .....	141
TAB. 47: URSACHEN FÜR UNZUREICHENDE BZW. FEHLENDE IDENTIFIZIERUNG .....	143
TAB. 48: ERGEBNISSE DES NACHWEISES VON BENZODIAZEPINEN IM URIN. METHODENVERGLEICH TOXTYPER UND QUANTITATIVE LC-MS/MS-METHODE.....	151
TAB. 49: ZUSAMMENFASSUNG DER TOXTYPER- UND MTS SCREENING-ERGEBNISSE.....	157
TAB. 50: ZUSAMMENFASSUNG DER ANALYSENERGEBNISSE NACH CHLORBUTAN-EXTRAKTION BZW. ACETONITRIL-FÄLLUNG.....	159
TAB. 51: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER SERUMPROBEN RV Se 1 BIS RV Se 4 DES INTERLABORVERGLEICHS. DOTIERTE SUBSTANZEN SIND UNTERSTRICHEN DARGESTELLT.....	161
TAB. 52: FALSCH-POSITIVE TREFFER IN DEN MIT SECHS MIXEN DOTIERTEN GLASKÖRPERPROBEN .....	169
TAB. 53: ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG VON GLASKÖRPERFLÜSSIGKEIT UND URIN (TOXTYPER 1.1) UND ERGEBNISSE DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG.....	173

---

## Literaturverzeichnis

- [1] T. Schiebler, et al., *Anatomie, 7. Auflage*, 1997, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [2] S.J. Farnaud, et al., Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease, *TheScientificWorldJournal* 10 (2010) 434.
- [3] E. Kaufman, et al., The diagnostic applications of saliva--a review, *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (2002) 197.
- [4] J.L. Chicharro, et al., Saliva composition and exercise, *Sports Med* 26 (1998) 17.
- [5] S. Chiappin, et al., Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation, *Clin Chim Acta* 383 (2007) 30.
- [6] J.K. Aps, et al., Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva, *Forensic Sci Int* 150 (2005) 119.
- [7] L. Junqueira, et al., *Histologie 4. Auflage*, 1996, Springer-Verlag berlin Heidelberg New York,
- [8] B. Messenger, et al., Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity in saliva following sham-fed and swallowed meals, *J Endocrinol* 177 (2003) 407.
- [9] W. Amberson, et al., The permeability of mammalian salivary glands for organic non-electrolytes, *Journal of Comparative Physiology* 2 (1932) 201.
- [10] P. Linde, der Übergang des Aethylalkohols in den Parotidenspeichel beim Menschen, *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 167 (1932) 285.
- [11] K.R. Spring, et al., Salivary excretion of lithium. II. Functional analysis, *J Dent Res* 48 (1969) 550.
- [12] K.R. Spring, et al., Salivary excretion of lithium. I. Human parotid and submaxillary secretions, *J Dent Res* 48 (1969) 546.
- [13] U. Groth, et al., Estimation of pharmacokinetic parameters of lithium from saliva and urine, *Clin Pharmacol Ther* 16 (1974) 490.
- [14] M.J. Gardner, et al., Relationship of serum thiocyanate concentrations to smoking characteristics, *J Toxicol Environ Health* 14 (1984) 393.
- [15] R. Haeckel, Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs, *Ann N Y Acad Sci* 694 (1993) 128.
- [16] W.J. Jusko, et al., Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva, *Ann N Y Acad Sci* 694 (1993) 36.
- [17] S.B. Matin, et al., Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva, *Clin Pharmacol Ther* 16 (1974) 1052.
- [18] J. Zuidema, et al., Clearance concept in salivary drug excretion. Part II: Experiments, *Pharm Acta Helv* 58 (1983) 136.
- [19] J. Zuidema, et al., Clearance concept in salivary drug excretion. Part I: theory, *Pharm Acta Helv* 58 (1983) 88.
- [20] E.M. Renkin, Effects of blood flow on diffusion kinetics in isolated, perfused hindlegs of cats; a double circulation hypothesis, *Am J Physiol* 183 (1955) 125.
- [21] I.A. Siegel, (Ed.: L.M. Sreebny), CRC Press. Boca Raton, Florida, 1987, pp. 157.
- [22] I. Siegel, The role of saliva in Drug Monitoring, *Annals of the New York Academy of Sciences* 694 (1993) 86.
- [23] I.D. Mandel, The diagnostic uses of saliva, *J Oral Pathol Med* 19 (1990) 119.
- [24] I.D. Mandel, Salivary diagnosis: promises, promises, *Ann N Y Acad Sci* 694 (1993) 1.
- [25] W.M. Bosker, et al., Oral fluid testing for drugs of abuse, *Clin Chem* 55 (2009) 1910.
- [26] K. Langel, et al., Drug testing in oral fluid--evaluation of sample collection devices, *J Anal Toxicol* 32 (2008) 393.
- [27] G.J. Yacoubian, et al., A comparison between the Intercept Oral LFluid Collection device and urine analysis among Baltimore City probationers, *Journal of Criminal Justice* 34 (2006) 413.

- [28] C. Maccall, et al., Oral fluid testing as an alternative to urine testing for drugs of abuse in inpatient forensic settings: giving patients choice, *Scott Med J* 58 (2012) 99.
- [29] D.J. Crouch, Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing, *Forensic Sci Int* 150 (2005) 165.
- [30] A.G. Verstraete, Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges, *Forensic Sci Int* 150 (2005) 143.
- [31] A.G. Verstraete, ROSITA: Roadside Testing Assessment (ROSITA Contract No. DPVII PL 98-3032), Ghent University, Ghent (2000)
- [32] M. López-Rivadulla, et al., In: Verstraete AG, Raes E, ROSITA 2 Project, Final Report, Ghent University, Ghent (2006)
- [33] DRUID [http://www.druid-project.eu/Druid/EN/Dissemination/downloads\\_and\\_links/Final\\_Report.html?nn=613800](http://www.druid-project.eu/Druid/EN/Dissemination/downloads_and_links/Final_Report.html?nn=613800)
- [34] SAMSHA 2004 Federal register 69, Proposed revisions to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs, 19673,
- [35] E.J. Cone, et al., Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse, *Ann N Y Acad Sci* 1098 (2007) 51.
- [36] O.H. Drummer, Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid, *Forensic Sci Int* 150 (2005) 133.
- [37] E.J. Cone, et al., Prevalence and disposition of drugs of abuse and opioid treatment drugs in oral fluid, *J Anal Toxicol* 31 (2007) 424.
- [38] R.E. Choo, et al., Oral fluid as a diagnostic tool, *Clin Chem Lab Med* 42 (2004) 1273.
- [39] E. Gallardo, et al., Current technologies and considerations for drug bioanalysis in oral fluid, *Bioanalysis* 1 (2009) 637.
- [40] P. Lillsunde, Analytical techniques for drug detection in oral fluid, *Ther Drug Monit* 30 (2008) 181.
- [41] C.K. Yeh, et al., Current development of saliva/oral fluid-based diagnostics, *Tex Dent J* 127 (2010) 651.
- [42] R. Mullangi, et al., Measurement of xenobiotics in saliva: is saliva an attractive alternative matrix? Case studies and analytical perspectives, *Biomed Chromatogr* 23 (2009) 3.
- [43] E. Hellwig, et al., *Einführung in die Zahnerhaltung, 2te Auflage*, 1999, Urban & Fischer München-Jena
- [44] K.M. Lehmann, et al., *Zahnärztliche Propädeutik, 11. Auflage* 2012, Deutscher Zahnärztereverein, Köln
- [45] T. Weber, *memorix Zahnmedizin, 2. Auflage*, 2003, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [46] R. Strub, et al., *Curriculum Prothetik Band 1, 3. auflage*, 2005, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin
- [47] W. Gühring, et al., *Anatomie: Spezielle Biologie des Kausystems, 4. Auflage*, 1992, Verlag Neuer merkus GmbH, München
- [48] P. Axelsson, *Diagnosis and Risk Prediction of Dental Caries, 1. Edition*, 2000, Quintessence Publishing Co. Inc,
- [49] O. Fejerskov, et al., *Textbook of Cariology, 1. Edition*, 1986, Munksgaard, Kopenhagen
- [50] O. Fejerskov, et al., *Dental Caries, the Disease and its Clinical Management, 2. edition*, 2008, Blackwell Munksgaard Ltd., , Oxford
- [51] E.J. Cone, Saliva testing for drugs of abuse, *Ann N Y Acad Sci* 694 (1993) 91.
- [52] A. Alomary, et al., Lead and cadmium in human teeth from Jordan by atomic absorption spectrometry: Some factors influencing their concentrations, *Sci Total Environ* 369 (2006) 69.
- [53] J.D. Arruda-Neto, et al., Study of environmental burden of lead in children using teeth as bioindicator, *Environ Int* 35 (2009) 614.
- [54] P. Malara, et al., [Effect of cigarette smoking on coexistence of cadmium and zinc in retained wisdom teeth], *Przegl Lek* 62 (2005) 1072.
- [55] P. Malara, et al., Do the levels of selected metals differ significantly between the roots of carious and non-carious teeth?, *Sci Total Environ* 369 (2006) 59.

- [56] M. Poczatek, et al., A comparative analysis of occupational risk in industry employees based on concentrations of some elements in teeth and body fluids, *Ann Acad Med Stetin* 50 (2004) 107.
- [57] H.M. Tvinnereim, et al., Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations, *Sci Total Environ* 255 (2000) 21.
- [58] P. Bud, et al., Human tooth enamel as a record of the comparative lead exposure of prehistoric and modern people, *Sci Total Environ* 263 (2000) 1.
- [59] H.J. Barton, Advantages of the use of deciduous teeth, hair, and blood analysis for lead and cadmium bio-monitoring in children. A study of 6-year-old children from Krakow (Poland), *Biol Trace Elem Res* 143 (2011) 637.
- [60] P.D. Marin, et al., Tooth discoloration by blood: an in vitro histochemical study, *Endod Dent Traumatol* 13 (1997) 132.
- [61] C. Cattaneo, et al., The detection of morphine and codeine in human teeth: an aid in the identification and study of human skeletal remains, *J Forensic Odontostomatol* 21 (2003) 1.
- [62] M. Pellegrini, et al., Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth, *J Pharm Biomed Anal* 40 (2006) 662.
- [63] O. Garcia-Algar, et al., Nicotine concentrations in deciduous teeth and cumulative exposure to tobacco smoke during childhood, *JAMA* 290 (2003) 196.
- [64] K. Haustein, et al., Transport of various substances through human enamel and dentine, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 32 (1994) 483.
- [65] H. Schultz, Nachweis von Penicillin G nach intravenöser Einmalgabe in der Zahnhartsubstanz., Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), 2009.
- [66] C. Zeren, et al., Demonstration of ethyl glucuronide in dental tissue samples by liquid chromatography/electro-spray tandem mass spectrometry, *J Forensic Leg Med* 20 (2013) 706.
- [67] K.R. Ziminski, et al., Comparative study of postmortem barbiturates, methadone, and morphine in vitreous humor, blood, and tissue, *J Forensic Sci* 29 (1984) 903.
- [68] D. Cox, et al., Distribution of phencyclidine into vitreous humor, *J Anal Toxicol* 31 (2007) 537.
- [69] D.R. Harper, A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination, *Forensic Sci Int* 43 (1989) 37.
- [70] A. Keten, et al., Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci Int* 193 (2009) 101.
- [71] W.Q. Sturner, et al., Postmortem Vitreous Glucose Determinations, *J Forensic Sci* 9 (1964) 485.
- [72] W.Q. Sturner, et al., The Postmortem Interval. A Study of Potassium in the Vitreous Humor, *Am J Clin Pathol* 42 (1964) 137.
- [73] L. Adelson, et al., Vitreous Potassium Concentration as an Indicator of the Postmortem Interval, *J Forensic Sci* 8 (1963) 503.
- [74] L. Hansson, et al., Potassium content of the vitreous body as an aid in determining the time of death, *J Forensic Sci* 11 (1966) 390.
- [75] B. Madea, et al., References for determining the time of death by potassium in vitreous humor, *Forensic Sci Int* 40 (1989) 231.
- [76] B. Madea, et al., Precision of estimating the time since death by vitreous potassium--comparison of two different equations, *Forensic Sci Int* 46 (1990) 277.
- [77] A. Thierauf, et al., Post-mortem biochemical investigations of vitreous humor, *Forensic Sci Int* 192 (2009) 78.
- [78] A. Pelander, et al., Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J Anal Toxicol* 34 (2010) 312.
- [79] P. Kintz, et al., GHB in postmortem toxicology. Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens, *Forensic Sci Int* 143 (2004) 177.

- [80] K.M. Clauwaert, et al., Determination of the designer drugs 3, 4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin Chem* 46 (2000) 1968.
- [81] S. Mackey-Bojack, et al., Cocaine, cocaine metabolite, and ethanol concentrations in postmortem blood and vitreous humor, *J Anal Toxicol* 24 (2000) 59.
- [82] W.C. Duer, et al., Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine, *J Forensic Sci* 51 (2006) 421.
- [83] H.M. Antonides, et al., Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood, *J Anal Toxicol* 31 (2007) 469.
- [84] K.S. Scott, et al., The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodiazepines, *J Forensic Sci* 46 (2001) 694.
- [85] A.J. Jenkins, et al., Phencyclidine and cannabinoids in vitreous humor, *Leg Med (Tokyo)* 10 (2008) 201.
- [86] D. Favretto, et al., LC-ESI-MS/MS on an ion trap for the determination of LSD, iso-LSD, nor-LSD and 2-oxo-3-hydroxy-LSD in blood, urine and vitreous humor, *Int J Legal Med* 121 (2007) 259.
- [87] I. Ojanpera, et al., Screening for barbiturates in vitreous humor by the EMIT-st serum enzyme immunoassay, *J Forensic Sci* 31 (1986) 707.
- [88] N. Fucci, et al., An evaluation of the Cozart RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor, *Forensic Sci Int* 156 (2006) 102.
- [89] C.W. Chronister, et al., Rapid detection of opioids in vitreous humor by enzyme immunoassay, *J Anal Toxicol* 32 (2008) 601.
- [90] S. Dresen, et al., Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching, *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 2425.
- [91] M. Dole, et al., Molecular Beams of Macroions *Journal of Chemical Physics* 49 (1968) 10.
- [92] O.M. Hamdy, et al., Reflections on charge state distributions, protein structure, and the mystical mechanism of electrospray ionization, *J Am Soc Mass Spectrom* 23 (2012) 1.
- [93] J. Fenn, et al., Electrospray ionization—principles and practice, *Mass Spectrometry Reviews* 9 (1990)
- [94] J.B. Fenn, Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture), *Angew Chem Int Ed Engl* 42 (2003) 3871.
- [95] R.D. Smith, et al., New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization, *Anal Chem* 62 (1990) 882.
- [96] Bruker Daltonik GmbH, Training Documents amaZon X, (2010)
- [97] J. Gross, *Mass Spectrometry - A Textbook 2nd Edition*, 2011, Springer-Verlag, Berlin
- [98] C. Hendricks, et al., Parametric studies of electrohydrodynamic spraying, *AiAA Journal* 6 (1968)
- [99] A. Blades, et al., Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell, *Analytical Chemistry* 63 (1991)
- [100] G. Taylor, Disintegration of Water Drops in an Electric Field, *Proceeding of the Royal Society A* 280 (1964)
- [101] L. Raylight, On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged with Electricity, *The London and Edinburgh Philosophical Magazine and Journal of Science* 14 (1882)
- [102] R. Cole, Some Tenants Pertaining to Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 35 (2000)
- [103] A. Gomez, et al., Charge and Fission of Droplets in Electrostatic Sprays, *Physics of Fluids* 6 (1994) 11.
- [104] D. Duft, et al., Coulomb fission: Rayleigh jets from levitated microdroplets, *Nature* 421 (2003) 128.
- [105] L. Mack, et al., Molecular Beams of Macroions II, *Journal of Chemical Physics* 52 (1970)

- [106] B. Thomson, et al., Field Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric Pressure, *Journal of Chemical Physics* 71 (1979)
- [107] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J Mass Spectrom* 35 (2000) 804.
- [108] N. Felitsyn, et al., Origin and Number of Charges Observed on Multiply-Protonated Native Proteins Produced by ESI, *International Journal of Mass Spectrometry* 219 (2002)
- [109] B.D. GmbH, Bruker Introduces ionBooster™ Next-Generation High Sensitivity Ion Source at Pittcon *Pittcon Annual Conference and Exposition*, 2012, Orlando, FL
- [110] K. Wendt, et al., Application Note # ET-28: Enhanced Determination of Alcohol Biomarkers Using Mass Spectrometry with the New IonBooster™ Source, Bruker Daltonik Application Notes (2012)
- [111] G. McLeod, et al., Application Note # ET-27: Sensitive Detection of Chloramphenicol in Food Using the New IonBooster™ Source with maXis impact Bruker Daltonik Application Notes (2012)
- [112] L.M. Huppertz, et al., A comprehensive library-based, automated screening procedure for 46 synthetic cannabinoids in serum employing liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry with high-temperature electrospray ionization, *J Mass Spectrom* 49 (2014) 117.
- [113] R.T. Kelly, et al., The ion funnel: theory, implementations, and applications, *Mass Spectrom Rev* 29 (2010) 294.
- [114] J.S. Page, et al., Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface, *J Am Soc Mass Spectrom* 18 (2007) 1582.
- [115] S.A. Shaffer, et al., An ion funnel interface for improved ion focusing and sensitivity using electrospray ionization mass spectrometry, *Anal Chem* 70 (1998) 4111.
- [116] S.A. Shaffer, et al., Characterization of an improved electrodynamic ion funnel interface for electrospray ionization mass spectrometry, *Anal Chem* 71 (1999) 2957.
- [117] R.E. March, Quadrupole ion traps, *Mass Spectrom Rev* 28 (2009) 961.
- [118] W. Paul, Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie* 29 (1990)
- [119] R.E. March, et al., *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*, 2005, John Wiley & Sons,
- [120] J. Mathurin, et al., Investigation of Space Charge Interactions Which Arise During Simultaneous Confinement of Positive and Negative Ions in an Ion Trap Mass Spectrometer, *Journal of Mass Spectrometry* 32 (1997) 829.
- [121] J. Fulford, et al., Radio-frequency mass selective excitation and resonant ejection of ions in a 3-dimensional quadrupole ion trap, *Journal of Vacuum Science & Technology* 17 (1980)
- [122] F. Vedel, et al., New Schemes for Resonant Ejection in RF Quadrupolar Ion Traps, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 99 (1990) 125.
- [123] F. McLafferty, *Tandem Mass Spectrometry*, 1983, John Wiley, New York, NY
- [124] L. Huppertz, et al., An automated MS-based screening procedure for clinical and forensic toxicology, *91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, 2012, Freiburg
- [125] S. Dresen, et al., Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate - a new marker for alcohol consumption - by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom* 15 (2004) 1644.
- [126] H. Ernst, *Der Nachweis von Drogen in der Zahnhartsubstanz*, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), 2013.
- [127] Institut für Rechtsmedizin Freiburg, *Verfahrensanweisung IRM\_T\_Va230\_ Basische Drogen und Opiate in Urin mit LCMSMS*, Version 3, (2012)
- [128] S. Dresen, et al., Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification, *Forensic Sci Int* 161 (2006) 86.
- [129] C. Müller, *Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS*, Alber-Ludwigs-Universität (Freiburg), 2004.
- [130] S. Kneisel, et al., Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Drug Test Anal* (2012)

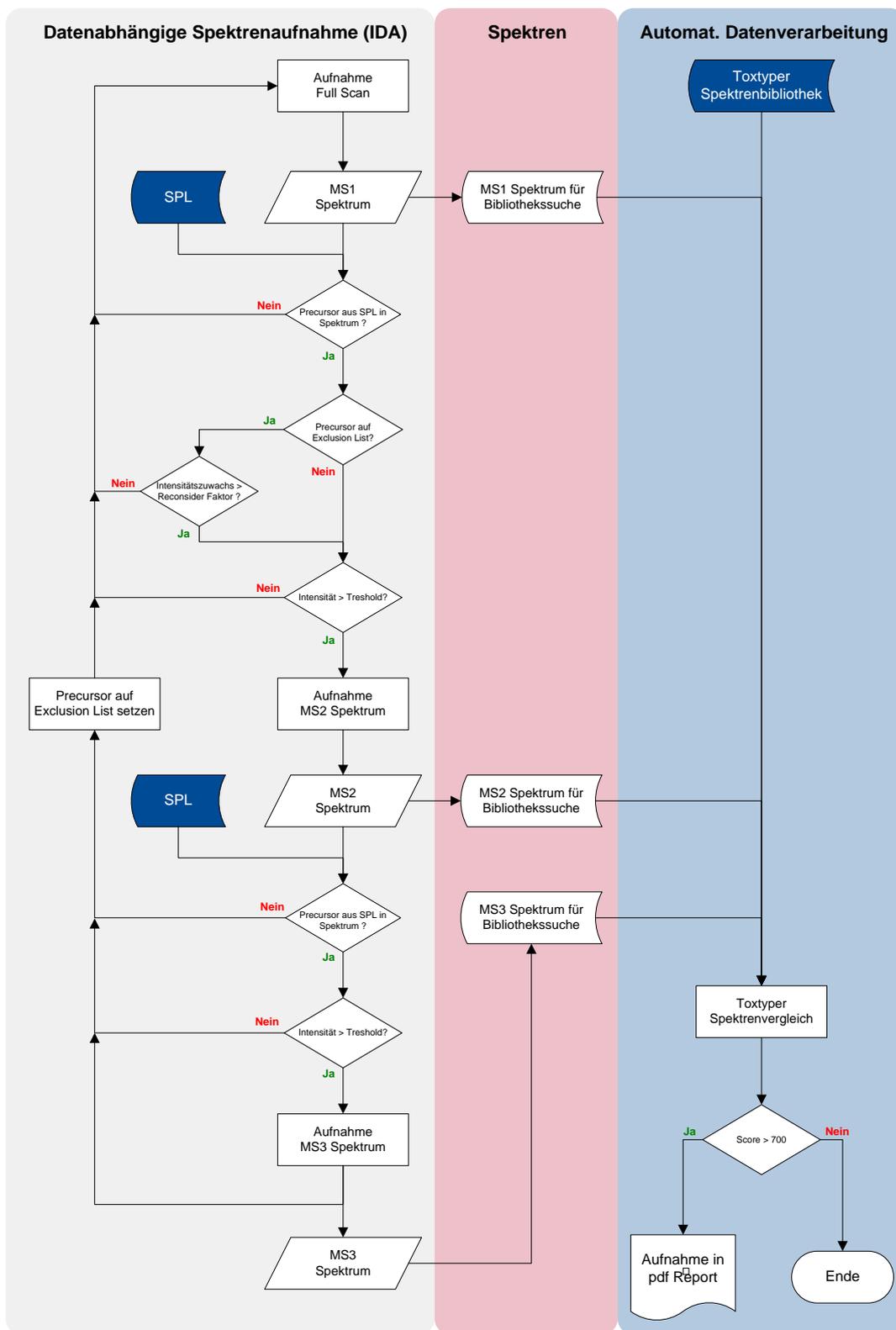
- [131] S. Kneisel, et al., Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction, *J Mass Spectrom* 47 (2012) 825.
- [132] W. Weinmann, et al., Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines, *J Am Soc Mass Spectrom* 15 (2004) 188.
- [133] D.K. Wissenbach, et al., Development of the first metabolite-based LC-MS(n) urine drug screening procedure-exemplified for antidepressants, *Anal Bioanal Chem* 400 (2010) 79.
- [134] A.D. DeSantis, et al., "Adderall is definitely not a drug": justifications for the illegal use of ADHD stimulants, *Subst Use Misuse* 45 (2010) 31.
- [135] Q. Babcock, et al., Student perceptions of methylphenidate abuse at a public liberal arts college, *J Am Coll Health* 49 (2000) 143.
- [136] H.C. Kimko, et al., Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate, *Clin Pharmacokinet* 37 (1999) 457.
- [137] E. Marchei, et al., Pharmacokinetics of methylphenidate in oral fluid and sweat of a pediatric subject, *Forensic Sci Int* 196 (2010) 59.
- [138] E. Marchei, et al., Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry determination of methylphenidate and ritalinic acid in conventional and non-conventional biological matrices, *J Pharm Biomed Anal* 49 (2009) 434.
- [139] F. Peters, et al., Anhang B zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen; Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden, *Toxichem. Krimtech.* 76 (2009) 185ff.
- [140] B.K. Matuszewski, et al., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal Chem* 75 (2003) 3019.
- [141] Y. Schüssl, Amoxicillin- und Clindamycinkonzentrationen in der Zahnhartsubstanz nach oraler Einmalgabe, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), 2010.
- [142] Y. Schussl, et al., Concentrations of amoxicillin and clindamycin in teeth following a single dose of oral medication, *Clin Oral Investig* (2013)
- [143] S. DeBeare, et al., Quantitative analysis of amoxycillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal Chem* 74 (2002) 1393.
- [144] F. Feagin, et al., The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material, *Arch Oral Biol* 14 (1969) 1407.
- [145] J.D. Featherstone, et al., Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel, *Caries Res* 15 (1981) 109.
- [146] J.A. Buskes, et al., Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications, *Caries Res* 19 (1985) 490.
- [147] W.A. Gerrard, et al., Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro, *Caries Res* 20 (1986) 209.
- [148] I. Audrlicky, Die Abhängigkeit des Alkoholspiegels im Leichenblut vom verschiedenen Wassergehalt im untersuchten Material, *Blutalkohol* 3 (1965) 169.
- [149] J.E. Corry, A review. Possible sources of ethanol ante- and post-mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition, *J Appl Bacteriol* 44 (1978) 1.
- [150] A.W. Jones, Urine as a biological specimen for forensic analysis of alcohol and variability in the urine-to-blood relationship, *Toxicol Rev* 25 (2006) 15.
- [151] A.W. Jones, et al., Urine/blood ratios of ethanol in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism, *Forensic Sci Int* 135 (2003) 206.
- [152] W. Huckenbeck, et al., *Handbuch gerichtliche Medizin* 2, 2003, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [153] G. Hoiseth, et al., A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol, *Forensic Sci Int* 165 (2007) 41.

- [154] D.K. Wissenbach, et al., Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSn screening concept, *Anal Bioanal Chem* 400 (2011) 3481.
- [155] Reference blood level list of therapeutic and toxic substances [www.tiaft.org](http://www.tiaft.org)
- [156] J. Kempf, et al., Comparison of Multi-Target-Screening and Multi-Reaction-Monitoring with an LC - Triple Quadrupole / Linear Iontrap (QTrap) for the detection of benzodiazepines in serum, *XIV. GTFCh-Symposium, 2005, Mosbach, Baden*
- [157] D. Dadgar, et al., Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability, *J Pharm Biomed Anal* 14 (1995) 23.
- [158] K.D. Roth, et al., Investigation of the effects of solution composition and container material type on the loss of 11-nor-delta 9-THC-9-carboxylic acid, *J Anal Toxicol* 20 (1996) 291.
- [159] D.A. Kidwell, et al., Testing for drugs of abuse in saliva and sweat, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 713 (1998) 111.
- [160] C. Coulter, et al., Synthetic cannabinoids in oral fluid, *J Anal Toxicol* 35 (2011) 424.
- [161] K. Weismeier, et al., Penetration of amoxicillin/clavulanate into human bone, *J Antimicrob Chemother* 24 Suppl B (1989) 93.
- [162] Y. Akimoto, et al., Amoxicillin concentrations in serum, jaw cyst, and jawbone following a single oral administration, *J Oral Maxillofac Surg* 40 (1982) 287.
- [163] C.B. Landersdorfer, et al., Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations, *Clin Pharmacokinet* 48 (2009) 89.
- [164] H. Bystedt, et al., Concentrations of azidocillin, erythromycin, doxycycline and clindamycin in human mandibular bone, *Int J Oral Surg* 7 (1978) 442.
- [165] P. Nicholas, et al., Concentration of clindamycin in human bone, *Antimicrob Agents Chemother* 8 (1975) 220.
- [166] S.C. Mueller, et al., Perioperative antibiotic prophylaxis in maxillofacial surgery: penetration of clindamycin into various tissues, *J Craniomaxillofac Surg* 27 (1999) 172.
- [167] M. Neumann, *Antibiotika Kompendium*, 1981, Hans Huber Verlag, Bern, Stuttgart, Wien
- [168] J.E. Otten, et al., Penicillin concentration in the compact bone of the mandible, *Int J Oral Maxillofac Surg* 20 (1991) 310.
- [169] M.M. Wang, et al., Presence of systemic ampicillin in pulp-extirpated root canals, *J Endod* 14 (1988) 502.
- [170] S.R. Kwon, et al., Penetration pattern of rhodamine dyes into enamel and dentin: confocal laser microscopy observation, *Int J Cosmet Sci* 34 (2012) 97.
- [171] M. Fabritius, et al., Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after smoking a cannabis joint, *Anal Bioanal Chem* 405 (2013) 9791.
- [172] S. Baranowski, et al., In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate, *Int J Legal Med* 122 (2008) 389.
- [173] C.C. Halter, et al., Assessment of the stability of the ethanol metabolite ethyl sulfate in standardised degradation tests, *Forensic Sci Int* 186 (2009) 52.
- [174] C.C. Halter, et al., Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake, *Int J Legal Med* 122 (2008) 123.
- [175] A. Thierauf, et al., Urine tested positive for ethyl glucuronide after trace amounts of ethanol, *Addiction* 104 (2009) 2007.
- [176] G. Hoiseth, et al., A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology, *Forensic Sci Int* 172 (2007) 119.
- [177] J. Kempf, et al., Application Note # LCMS-91: Toxtyper™ – a Comprehensive LC-MSn application for Clinical Research and Forensic Toxicology, Bruker Daltonik Application Notes (2014)
- [178] R. Mylonas, LC-MSMS identification of small molecules; X-Rank, a robust library search algorithm., Thèse de doctorat thesis, University of Geneva (Geneva), 2010.
- [179] R. Mylonas, et al., X-Rank: a robust algorithm for small molecule identification using tandem mass spectrometry, *Anal Chem* 81 (2009) 7604.

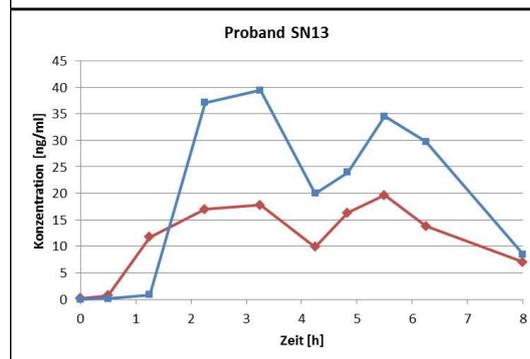
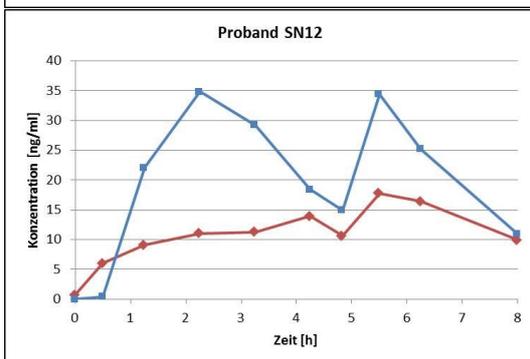
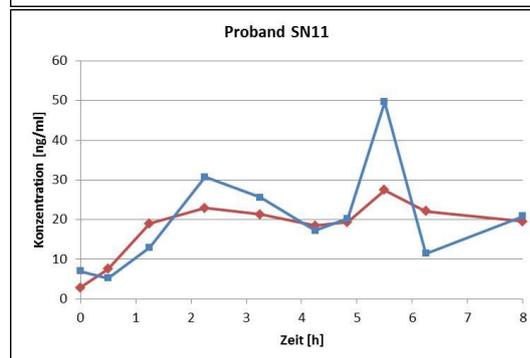
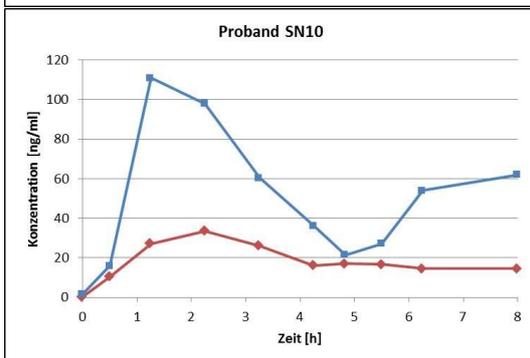
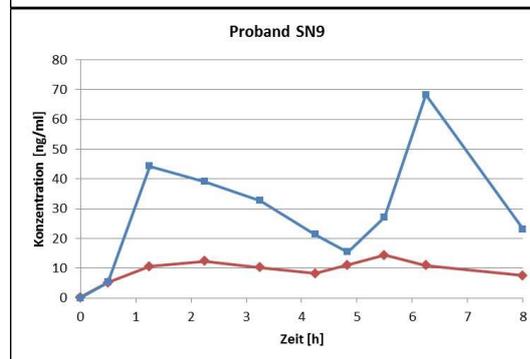
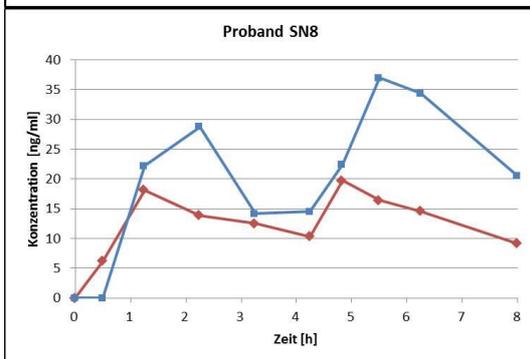
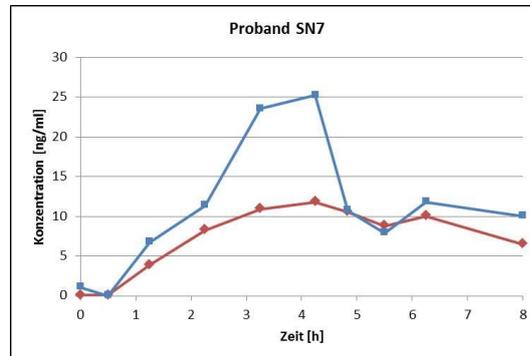
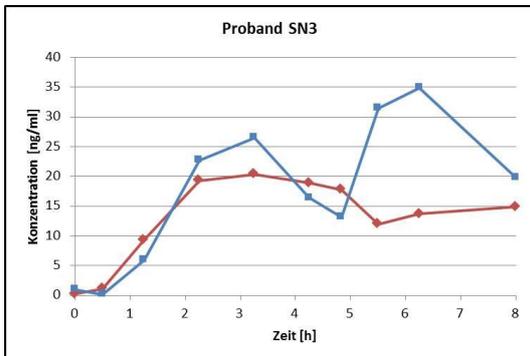
- [180] H. Lam, et al., Development and validation of a spectral library searching method for peptide identification from MS/MS, *Proteomics* 7 (2007) 655.
- [181] F. Gan, et al., Library search of mass spectra with a new matching algorithm based on substructure similarity, *Anal Sci* 17 (2001) 635.
- [182] H.K. Nordgren, et al., Multicomponent screening for drugs of abuse: direct analysis of urine by LC-MS-MS, *Ther Drug Monit* 26 (2004) 90.
- [183] A. Wohlfarth, et al., LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum, *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 2403.
- [184] M. Mazzarino, et al., A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS, *Anal Bioanal Chem* 392 (2008) 681.
- [185] F.L. Sauvage, et al., Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry, *Clin Chem* 52 (2006) 1735.
- [186] G. Hopfgartner, et al., High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices, *Anal Bioanal Chem* 402 (2012) 2587.
- [187] A. Roemmelt, et al., Evaluation of a new data independent acquisition approach (MS/MSall with SWATH) for future simultaneous qual/quant screening using LC-HRMS, *TIAFT 51st International Meeting, 2013, Funchal - Madeira, Portugal*
- [188] S. Broecker, et al., General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS), *Forensic Sci Int* 218 (2012) 68.
- [189] I. Ojanpera, et al., Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control, *Anal Bioanal Chem* 403 (2012) 1203.
- [190] P. Decker, et al., Transferring a Pesticide Screening Solution to the Application of Forensic Screening: Feasibility Study Including The Application of Enhanced Confirmation Strategies, *TIAFT 51st International Meeting, 2013, Funchal - Madeira, Portugal*
- [191] H.C. Liu, et al., Rapid screening and confirmation of drugs and toxic compounds in biological specimens using liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry and automated library search, *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (2010) 75.
- [192] *Entscheidung zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen,*
- [193] H.H. Maurer, et al., Maurer/Wissenbach/Weber LC-MSn Library of Drugs, Poisons and their Metabolites, (2014)
- [194] J. Kempf, et al., 'Psychotropics caught in a trap' - Adopting a screening approach to specific needs, *Forensic Sci Int* 243C (2014) 84.

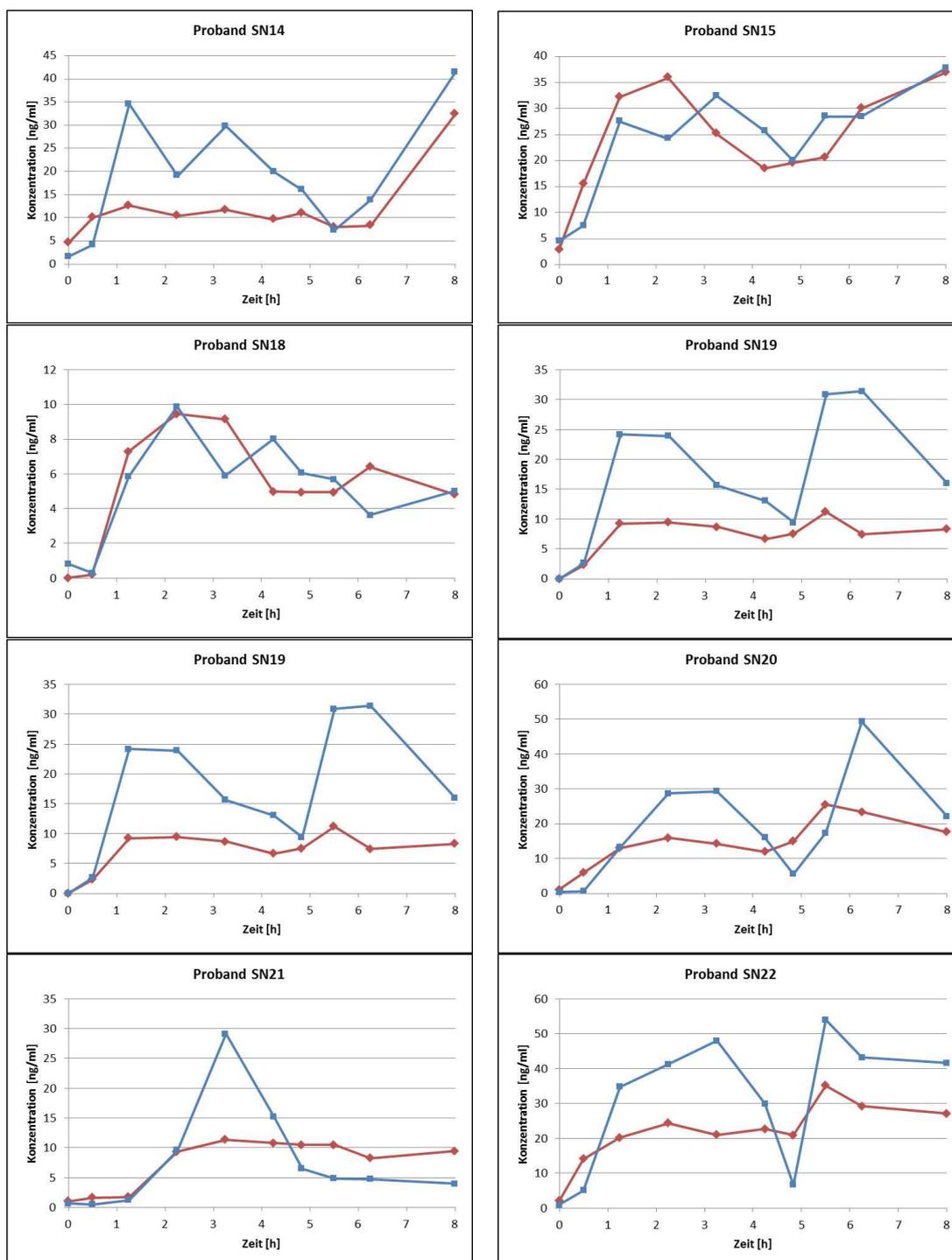
# Anhang

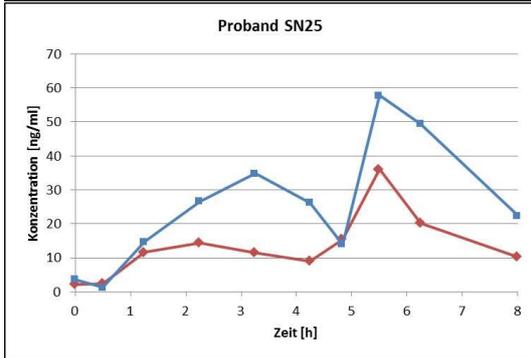
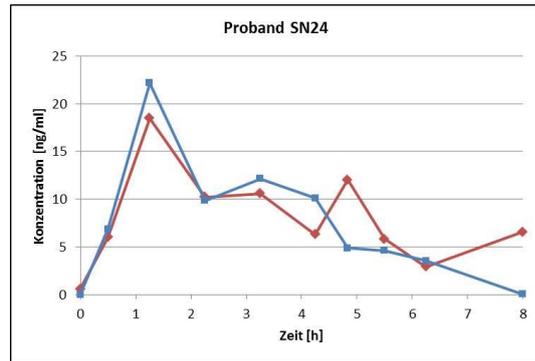
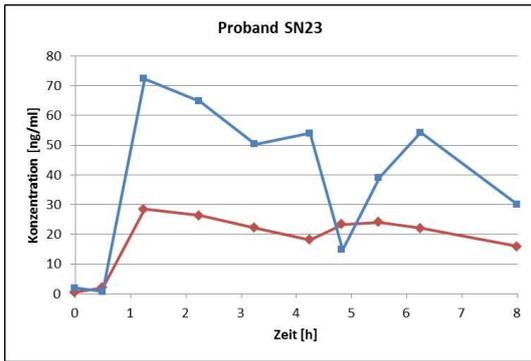
## A-1: Toxtyper Workflow



**A-2: Konzentrationsverläufe von Ritalin in Speichel und Serum aller 19 Probanden (Serumkonzentration / Speichelkonzentration in ng/ml)**







### A-3: Substanzliste Spektrenbibliothek Toxyper Version 1.0

Die unten stehende Tabelle enthält alle in der Toxyper Spektrenbibliothek (Version 1.0) enthaltenen Substanzen, sowie die Information mit welcher Polarität (ESI + bzw. ESI -) die enthaltenen Spektren aufgenommen wurden.

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
11-Nor-Delta9-THC9-carboxylic acid gluc.	0	1	Adrenalone	1	0
17-Alpha-methyltestosterone	1	0	Ajmaline	1	0
2 C-B	1	0	Alachlor	1	0
2 C-B-BZP	1	0	Alfentanil	1	0
2 C-D	1	0	Alimemazine	1	0
2 C-H	1	0	Alizapride	1	0
2 C-I	1	0	Almitrine	1	0
2 C-P	1	0	Alpha-hydroxyalprazolam	1	0
2,5-DMA	1	0	Alpha-hydroxymidazolam	1	0
2-Amino-5-chlorobenzophenone	1	0	Alpha-hydroxytriazolam	1	0
2-Amino-5-nitrobenzophenone	1	0	Alprazolam	1	0
2-Benzyltetronic acid	1	0	Alprenolol	1	0
2-Hydroxyethylflurazepam	1	0	Altretamine	1	0
2-Oxo-3-OH-LSD	1	0	Alypin	1	0
3,4-Dimethoxyphenethylamine	1	0	AM-1220	1	0
3,5-Diidotyrosine	1	0	AM-2233	1	0
3-Methylfentanyl	1	0	AM-694	1	0
4-Benzamidosalicylic acid	1	0	Amantadine	1	0
4'-Hydroxynordazepam	1	0	Ambroxol	1	0
5-Aminosalicylic acid	1	0	Ametryn	1	0
5-Carboxybupranolol	1	0	Amfepramone	1	0
5-MeO-DMT	1	0	Amidopyrine	1	0
6-Chlorothymolsulfonic acid	0	1	Aminodantrolene	1	0
6-Mercaptourine	1	0	Aminoglutethimide	1	0
6-O-Acetylmorphine	1	0	Aminopromazine	1	0
7-Aminoclonazepam	1	0	Aminorex	1	0
7-Aminodesmethylflunitrazepam	1	0	Amiodarone	1	0
7-Aminoflunitrazepam	1	0	Amisulpride	1	0
7-Aminonitrazepam	1	0	Amitriptyline	1	0
9-Hydroxyrisperidone	1	0	Amitriptylinoxide	1	0
Acebutolol	1	0	Amobarbital	1	1
Aceclidine	1	0	Amorolfine	1	0
Acemetacin	1	0	Amoxapine	1	0
Acepromazine	1	0	Amphetamine	1	0
Aceprometazine	1	0	Amrinone	1	0
Acetaminodantrolene	1	0	Antazoline	1	0
Acetiamin	1	0	Apomorphine	1	0
Acetylsalicylic acid	0	1	Apophedrin	1	0
Aciclovir	1	0	Apraclonidin	1	0
Aconitine	1	0	Aprindine	1	0
Actinoquinol	1	0	Arecoline	1	0
Adenine	1	0	Aripiprazole	1	0
Adenosine	1	0	Atenolol	1	0

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Atorvastatin	1	0	Cannabinol	0	1
Atracurium	1	0	Canrenone	1	0
Atraton	1	0	Caproylresorcinol	1	0
Atrazine	1	0	Captopril	1	0
Atrazine-desethyl	1	0	Carazolol	1	0
Atropine	1	0	Carbachol	1	0
Axeen isomere 1	1	0	Carbamazepine	1	0
Azatadine	1	0	Carbamazepine 10,11-epoxide	1	0
Azelastine	1	0	Carbutamide	1	0
Azithromycin	1	0	Carbuterol	1	0
Baclofen	1	0	Carteolol	1	0
Bambuterol	1	0	Carticaine	1	0
Bamifylline	1	0	Carvedilol	1	0
Bamipine	1	0	Cathinone	1	0
Barverin	1	0	Celiprolol	1	0
BDB	1	0	Cerivastatin	1	0
Beclamide	1	0	Chlorazanyl	1	0
Befunolol	1	0	Chlorbenzoxamine	1	0
Bendamustine	1	0	Chlordiazepoxide	1	0
Bendroflumethiazide	0	1	Chlorfluazuron	1	0
Benodanil	1	0	Chloridazon	1	0
Benperidol	1	0	Chlormezanone	1	0
Benproperine	1	0	Chloroquine	1	0
Bensultap	1	0	Chlorphenethiazine	1	0
Benzatropine	1	0	Chlorpromazine	1	0
Benzethonium	1	0	Chlorprothixene	1	0
Benzocaine	1	0	Chlortalidone	0	1
Benzocetamine	1	0	Cimetidine	1	0
Benzoxonium	1	0	Cinchocaine	1	0
Benzoyllecgonine	1	0	Cinnarizine	1	0
Benzthiazide	1	0	Cinoxacin	1	0
Benzthiazuron	1	0	Ciprofloxacin	1	0
Betaxolol	1	0	Cisapride	1	0
Bethanidine	1	0	Citalopram	1	0
Bezafibrate	1	0	Clemastine	1	0
Bicalutamide	1	0	Clenbuterol	1	0
Biotin	1	0	Clibucaine	1	0
Biperiden	1	0	Climbazol	1	0
Bisoprolol	1	0	Clobazam	1	0
Bopranolol	1	0	Clobenzepam	1	0
Bornaprine	1	0	Clobutasone butyrat	1	0
Brallobarbital	0	1	Clobutinol	1	0
Brodifacoum	1	0	Clomethiazole	1	0
Bromazepam	1	0	Clomipramine	1	0
Bromperidol	1	0	Clonazepam	1	0
Bromural	1	0	Clonidine	1	0
Brotizolam	1	0	Clopamide	1	0
Bucetin	1	0	Clopenthiol	1	0
Budipine	1	0	Clopidogrel	1	0
Bufexamac	1	0	Clotiapine	1	0
Bulbocapnine	1	0	Clotiazepam	1	0
Bumetanide	1	0	Clozapine	1	0
Bunitrolol	1	0	Cocaethylene	1	0
Bupivacaine	1	0	Cocaine	1	0
Buprenorphine	1	0	Codeine	1	0
Buprofezin	1	0	Codeine-6-beta-D-glucuronide	1	0
Bupropion	1	0	Colchicine	1	0
Buspirone	1	0	Corticosterone	1	0

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Butizide	1	0	Cortisone	1	0
Butoxycaine	1	0	Cotinine	1	0
BZP	1	0	Coumatetralyl	1	0
Cafaminol	1	0	Croconazole	1	0
Caffeine	1	0	Cyamemazine	1	0
Calteridol	1	0	Cyclamic acid	0	1
Cannabidiol	1	1	Cyclizine	1	0
Cyclobenzaprine	1	0	Desmethylenlafaxine	1	0
Cyclovalone	1	0	Desoxycortone 21-(3-phenylpropionate)	1	0
Cyproheptadine	1	0	Desoxycortone enantate	1	0
D3-6-O-Acetylmorphine	1	0	Detajmium	1	0
D3-Atropin	1	0	Dexamethasone	1	0
D3-Benzoylcegonine	1	0	Dexfenfluramine	1	0
D3-Chlorpromazine	1	0	Dextromethorphan	1	0
D3-Clomipramine	1	0	Diaveridine	1	0
D3-Cocaethylene	1	0	Diazepam	1	0
D3-Cocaine	1	0	Dibenzepin	1	0
D3-Codeine	1	0	Diclofenac	1	0
D3-Cotinine	1	0	Dicycloverine	1	0
D3-Doxepine	1	0	Dienogest	1	0
D3-Ecgoninemethylester	1	0	Diethazine	1	0
D3-EDDP	1	0	Diethylcarbamazine	1	0
D3-Fenetylline	1	0	Difenoconazole	1	0
D3-Hydromorphone	1	0	Difenoxuron	1	0
D3-Imipramine	1	0	Difenzoquat	1	0
D3-LSD	1	0	Dihydrocodeine	1	0
D3-Morphine	1	0	Dihydroergocristine	1	0
D3-Morphine-3-beta-D-glucuronide	1	0	Diltiazem	1	0
D3-Morphine-6-beta-D-glucuronide	1	0	Dimefuron	1	0
D3-Nortilidine	1	0	Dimethachlor	1	0
D3-Oxycodone	1	0	Dimethomorph	1	0
D3-THC	1	1	Dimetindene	1	0
D3-THC-COOH	1	1	Dimetotiazine	1	0
D3-THC-OH	1	1	Dimetridazole	1	0
D3-Trimipramine	1	0	Dioxethedrin	1	0
D4-7-Aminoclonazepam	1	0	Diphenamid	1	0
D4-Clonazepam	1	0	Diphenhydramine	1	0
D4-Haloperidol	1	0	Diponium	1	0
D4-Lorazepam	1	0	Diprophylline	1	0
D4-Meperidine	1	0	Dipyridamole	1	0
D4-Midazolam	1	0	Disopyramide	1	0
D4-N-Desmethylflunitrazepam	1	0	Dixyrazine	1	0
D4-Nicotine	1	0	Dobutamine	1	0
D4-Norketamine	1	0	DOM	1	0
D5-Diazepam	1	0	Dopexamine	1	0
D5-MBDB	1	0	Dorzolamide	1	0
D5-MDEA	1	0	Dosulepine	1	0
D5-MDMA	1	0	Doxapram	1	0
D5-Nordiazepam	1	0	Doxepin	1	0
D5-Oxazepam	1	0	Doxylamine	1	0
D5-Temazepam	1	0	Drazoloxon	1	0
D6-Dihydrocodeine	1	0	Drofenine	1	0
D6-Fluoxetine	1	0	Duloxetine	1	0
D6-Zolpidem	1	0	Ecgoninemethylester	1	0
D7-7-Aminoflunitrazepam	1	0	EDDP	1	0
D7-Flunitrazepam	1	0	Embutramide	1	0
D9-Heroin	1	0	Enalapril	1	0
D9-Methadone	1	0	Enoximon	1	0

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Dapiprazole	1	0	Entacapone	1	0
Debrisoquine	1	0	Ephedrine	1	0
Deflazacort	1	0	Eprosartan	1	0
Delorazepam	1	0	Esculin	1	0
Demeclocycline	1	0	Esmolol	1	0
Demeton-S-methylsulfone	1	0	Esomeprazole	1	0
Denaverine	1	0	Estazolam	1	0
Desalkylflurazepam	1	0	Ethambutol	1	0
Desipramine	1	0	Ethenzamide	1	0
Desmethyl-chlordiazepoxide	1	0	Etilefrine	1	0
Desmethyl-Citalopram	1	0	Etofylline	1	0
Desmethylclobazam	1	0	Famotidine	1	0
Desmethylclomipramine	1	0	Fedrilate	1	0
Desmethylclozapine	1	0	Fenarimol	1	0
Desmethyl-Mirtazapine	1	0	Fendiline	1	0
Fenethylline	1	0	Indoramin	1	0
Fenfuram	1	0	Iopodic acid	1	0
Fenofibrate	1	0	Ipratropium	1	0
Fenoterol	1	0	Irbesartan	1	0
Fenpipramide	1	0	Isoaminile	1	0
Fenpiprane	1	0	Isoconazole	1	0
Fentanyl	1	0	Iso-LSD	1	0
Fenticonazole	1	0	Isoniazid	1	0
Fexofenadine	1	0	Isoprotruron	1	0
Flecainide	1	0	Isothipendyl	1	0
Flocoumafen	1	0	Isoxsuprine	1	0
Floctafenine	1	0	JWH-007	1	0
Fluanisone	1	0	JWH-015	1	0
Fluconazol	1	0	JWH-018	1	0
Fludrocortisone	1	0	JWH-019	1	0
Flumazenil	1	0	JWH-020	1	0
Flunitrazepam	1	0	JWH-072	1	0
Fluoxetine	1	0	JWH-073	1	0
Flupentixol	1	0	JWH-081	1	0
Fluphenazine	1	0	JWH-122	1	0
Flupirtine	1	0	JWH-122-5-fluoropentyl-derivate	1	0
Flurazepam	1	0	JWH-200	1	0
Flurochloridone	1	0	JWH-210	1	0
Fluspirilen	1	0	JWH-250	1	0
Fluvastatin	1	0	JWH-307	1	0
Fluvoxamine	1	0	JWH-387	1	0
Fuberidazole	1	0	JWH-398	1	0
Furalaxyl	1	0	JWH-412	1	0
Furazolidone	1	0	Kavain	1	0
Gabapentin	1	0	Ketamin	1	0
Galantamine	1	0	Ketazolam	1	0
Gallopamil	1	0	Ketoprofen	1	0
Glafenin	1	1	Ketorolac	1	0
Glibenclamide	1	1	Ketotifen	1	0
Glibornuride	1	0	Labetalol	1	0
Glimepiride	1	1	Lamotrigine	1	0
Glipizide	1	1	L-Ascorbic acid	0	1
Griseofulvin	1	0	Laudanosine	1	0
Guanabenz	1	0	Lercanidipine	1	0
Guanethidine	1	0	Levobunolol	1	0
Guanoxan	1	0	Levocabastine	1	0
Halcinonide	1	0	Levomepromazine	1	0
Haloperidol	1	0	Levopropylhexedrine	1	0

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Haloxyfop ethoxyethyl ester	1	0	Lidocaine	1	0
Heroin	1	0	Lisinopril	1	0
Hexazinone	1	0	Lisuride	1	0
Hexobendine	1	0	Lonazolac	1	0
Histamine	1	0	Loperamide	1	0
Histapyrrodine	1	0	Loratadine	1	0
Histidine	1	0	Lorazepam	1	0
Homatropine	1	0	Lormetazepam	1	0
Holdenine	1	0	Losartan	1	0
Hydralazine	1	0	Loxapine	1	0
Hydrochlorothiazide	0	1	LSD	1	0
Hydrocodone	1	0	Maprotiline	1	0
Hydrocortisone	1	0	Mazindol	1	0
Hydrocortisone 21-acetate	1	0	MBDB	1	0
Hydromorphone	1	0	MCPP	1	0
Hydroxychloroquine	1	0	MDA	1	0
Hydroxyzine	1	0	MDBP	1	0
Ibuprofen	1	0	MDDMA	1	0
Imipramine	1	0	MDEA	1	0
Indanazoline	1	0	MDMA	1	0
Indapamine	1	0	Mebeverine	1	0
Indinavir	1	0	Meclofenamic acid	1	0
Indometacin	1	0	Meclozine	1	0
Medazepam	1	0	Nadolol	1	0
Mefenamic acid	1	1	Naftidrofuryl	1	0
Mefenorex	1	0	Naftifine	1	0
Mefexamide	1	0	Nalbuphine	1	0
Mefloquine	1	0	Nalidixic acid	1	0
Mefruside	1	0	Nalorphine	1	0
Melitracen	1	0	Naloxone	1	0
Meloxicam	1	0	Naltrexon	1	0
Melperone	1	0	Nandrolone	1	0
Melphalan	1	0	Nandrolone phenylpropionate	1	0
Mepacrine	1	0	Naphazoline	1	0
Mephedrone	1	0	Napropamide	1	0
Mepindolol	1	0	Naproxen	1	0
Meptazinol	1	0	N-Desmethylflunitrazepam	1	0
Mequitazine	1	0	N-Desmethylpropafenone	1	0
Mescaline	1	0	Nebivolol	1	0
Mesoridazine	1	0	Nefazodone	1	0
Metamfetramone	1	0	Nefopam	1	0
Metamitron	1	0	N-Ethyl-Amphetamine	1	0
Metenolone acetate	1	0	Nicardipine	1	0
Metformin	1	0	Nicotinamide	1	0
Methabenzthiazuron	1	0	Nicotine	1	0
Methadone	1	0	Nifedipine	1	0
Methamphetamine	1	0	Nifenazone	1	0
Methanandamide	1	0	Niflumic acid	1	0
Methanthelinium	1	0	Nilvadipine	1	0
Methaphenilene	1	0	Nimorazole	1	0
Methaqualone	1	0	Nisodipine	1	0
Methazolamide	1	0	N-Isopropylsalicylamide	1	0
Methcathinone	1	0	Nitrazepam	1	0
Methfuroxam	1	0	Nizatidin	1	0
Methocarbamol	1	0	Nomifensine	1	0
Methohexital	1	0	Norcocaine	1	0
Methoprottryne	1	0	Norcodeine	1	0
Methotrexate	1	0	Nordazepam	1	0

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Methylephedrine	1	0	Nordoxepine	1	0
Methylphenidate	1	0	Norethisterone	1	0
Methylscopolamine	1	0	Norethisterone acetate	1	0
Methysergide	1	0	Norfloxacin	1	0
Metipranolol	1	0	Norketamin	1	0
Metixene	1	0	Nor-LSD	1	0
Metoclopramide	1	0	Normorphine	1	0
Metoprolol	1	0	Nortilidine	1	0
Metronidazol	1	0	Nortriptyline	1	0
Metsulfuron-methyl	1	0	Noscapine	1	0
Metyrapone	1	0	Nuarimol	1	0
Mexiletine	1	0	Obidoxime	1	0
Mianserin	1	0	O-Desmethyltramadol	1	0
Miconazole	1	0	Ofloxacin	1	0
Midazolam	1	0	Olanzapine	1	0
Minocycline	1	0	Olsalazine	0	1
Minoxidil	1	0	Ondansetron	1	0
Mirtazapine	1	0	Opipramol	1	0
Mizolastine	1	0	Ornidazole	1	0
Moclobemide	1	0	Oxatomide	1	0
Monolinuron	1	0	Oxazepam	1	0
Moperone	1	0	Oxcarbazepine	1	0
Morphin-3-beta-D-glucuronide	1	0	Oxeladin	1	0
Morphine	1	0	Oxetacaine	1	0
Morphine-6-beta-D-glucuronide	1	0	Oxitropium	1	0
Moxaverine	1	0	Oxomemazine	1	0
Moxislyte	1	0	Oxprenolol	1	0
Moxonidine	1	0	Oxybuprocaine	1	0
MPPH	1	0	Oxybutynin	1	0
N,N-Diethyl-m-toluamide	1	0	Oxycodone	1	0
Nabumetone	1	0	Oxyfedrine	1	0
Oxymetazoline	1	0	Propranolol	1	0
Oxymorphone	1	0	Propyphenazone	1	0
Oxypendyl	1	0	Prothipendyl	1	0
Oxypertine	1	0	Protionamide	1	0
Oxytetracycline	1	0	Protriptyline	1	0
Papaverin	1	0	Pseudoephedrine	1	0
Paracetamol	1	0	Pyranocoumarin	1	0
Paraoxon	1	0	Pyribenzamine	1	0
Paraoxon-methyl	1	0	Pyrilamine	1	0
Paroxetine	1	0	Pyrimethamine	1	0
Penbutolol	1	0	Pyritinol	1	0
Penfluridol	1	0	Pyrvinium	1	0
Pentoxifylline	1	0	Quetiapine	1	0
Pentoxiverine	1	0	Quinapril	1	0
Perazine	1	0	Quinine	1	0
Pergolide	1	0	Ramifenazone	1	0
Periciazine	1	0	Ramipril	1	0
Perindopril	1	0	Ranitidine	1	0
Perphenazine	1	0	Raubasine	1	0
Pethidine	1	0	RCS-4 ortho-isomer	1	0
Phenazetin	1	0	Reboxetine	1	0
Phenazone	1	0	Remifentanil	1	0
Phenazopyridine	1	0	Repaglinide	1	0
Phenelzine	1	0	Reproterol	1	0
Phenethylamine	1	0	Reserpine	1	0
Pheniramine	1	0	Riluzole	1	0
Phenprocoumon	1	1	Risperidone	1	0

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Phenylbutazone	1	0	Rizatriptan	1	0
Phenyltoloxamine	1	0	Rocuronium	1	0
Phenytoin	1	0	Ropinirole	1	0
Pholedrine	1	0	Ropivacaine	1	0
Phthalylsulfathiazole	1	0	Rosiglitazone	1	0
Physostigmine	1	0	Salicylamide	1	0
Pimozide	1	0	Salicylic acid	0	1
Pindolol	1	0	Scopolamine	1	0
Pipamperone	1	0	Sebuthylazine	1	0
Piprozolin	1	0	Selegilin	1	0
Pirenzepine	1	0	Sertindole	1	0
Piretanide	1	0	Sertraline	1	0
Piritramide	1	0	Sibutramin	1	0
Piroxicam	1	0	Sildenafil	1	0
Pizotifen	1	0	Simazine	1	0
PMMA	1	0	Sotalol	1	0
Practolol	1	0	Spirapril	1	0
Prajmalium	1	0	Stanozolol	1	0
Pramipexol	1	0	Sufentanil	1	0
Prazepam	1	0	Sulfabenzamide	1	0
Prazosin	1	0	Sulfaclomide	1	0
Prednisone	1	0	Sulfadiazine	1	0
Prenylamine	1	0	Sulfadoxine	1	0
Primaquine	1	0	Sulfaethidole	1	0
Primidone	1	0	Sulfaguanidin	1	0
Procainamide	1	0	Sulfalene	1	0
Procaine	1	0	Sulfamerazine	1	0
Prochlorperazin	1	0	Sulfamethizole	1	0
Procyclidine	1	0	Sulfamethoxazole	1	0
Progesterone	1	0	Sulfamethoxypyridazine	1	0
Promazine	1	0	Sulfapyridine	1	0
Promethazine	1	0	Sulfaquinoxaline	1	0
Prometryn	1	0	Sulfasalazine	1	0
Propafenone	1	0	Sulfathiazole	1	0
Propallylonal	0	1	Sulfinpyrazon	1	0
Propiconazole	1	0	Sulindac	1	0
Propionylpromazine	1	0	Sulpiride	1	0
Propipocaine	1	0	Sultiame	0	1
Propiverine	1	0	Sumatriptan	1	0
Suxibuzone	1	0	Trimipramine	1	0
Tacrine	1	0	Triperiden isomere 2	1	0
Tadalafil	1	0	Tripolidine	1	0
Talinolol	1	0	Tritoqualine	1	0
Tamoxifen	1	0	Tromantadine	1	0
Telmisartan	1	0	Tropisetron	1	0
Temazepam	1	0	Trospium	1	0
Terazosin	1	0	Tryptamine	1	0
Terbinafine	1	0	Tulobuterol	1	0
Terbutylazine	1	0	Valacyclovir	1	0
Terbutryn	1	0	Valdecoxib	1	0
Terconazole	1	0	Vardenafil	1	0
Terfenadine	1	0	Venlafaxine	1	0
Tertalolol	1	0	Verapamil	1	0
Testosterone benzoate	1	0	Vincamine	1	0
Tetracaine	1	0	Warfarin	1	0
Tetramethrin	1	0	WIN 55,212-2	1	0
Tetrazepam	1	0	Xipamide	1	0
Tetroxoprim	1	0	Xylometazoline	1	0

---

Name	ESI +	ESI -	Name	ESI +	ESI -
Tetryzolin	1	0	Tolnaftate	1	0
TFMPP	1	0	Tolpropamine	1	0
THC	1	1	Tolycaine	1	0
THC-COOH	1	1	Topotecan	1	0
THC-OH	1	1	Torasemide	1	0
Thebacon	1	0	Tramadol	1	0
Theobromine	1	0	Tranexamic acid	1	0
Theophylline	1	0	Trapidil	1	0
Thiethylperazine	1	0	Trazodone	1	0
Thioguanine	1	0	Triadimefon	1	0
Thiopropazate	1	0	Triamcinolone	1	0
Thiopropoperazine	1	0	Triamterene	1	0
Thioridazine	1	0	Triasulfuron	1	0
Thymopentin	0	1	Triazolam	1	0
Tiapride	1	0	Trifluoperazine	1	0
Ticlopidine	1	0	Trifluoperidol	1	0
Tiemonium	1	0	Triflupromazine	1	0
Tilidine	1	0	Trihexyphenidyl	1	0
Timolol	1	0	Trimethobenzamid	1	0
Tinidazole	1	0	Trimethoprim	1	0
Tiocarlide	1	0	Yohimbin	1	0
Tizanidine	1	0	Zaleplon	1	0
Tolazamide	1	0	Ziprasidone	1	0
Tolazoline	1	0	Zolazepam	1	0
Tolbutamide	1	0	Zolpidem	1	0
Toliprolol	1	0	Zopiclone	1	0
Tolmetin	1	0	Zuclopenthixol	1	0

#### A-4: Zusammensetzung der für die Toxyper-Evaluierung verwendeten dotierten Serumproben

<b>Mix 1</b>		<b>5 ng/ml</b>	<b>10 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>
1	Flupentixol	0.91	0.90	0.91
2	Fluphenazine	0.89	0.91	0.91
3	LSD	-	-	-
4	Buspiron	0.91	0.90	0.87
5	Fentanyl	0.91	0.91	0.91
6	Perphenazine	0.87	0.90	0.91
7	Flurazepam	0.90	0.90	0.91

<b>Mix 2</b>		<b>5 ng/ml</b>	<b>10 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>
1	Bromperidol	0.89	0.88	0.90
2	Brotizolam	0.91	0.91	0.91
3	Lormetazepam	0.54	0.63	0.76
4	Pimozide	0.91	0.91	0.91
5	Benperidol	0.86	0.90	0.90
6	Clopenthixol	0.91	0.91	0.91
7	Triazolam	0.91	0.91	0.91
8	Atropine	0.86	0.87	0.87
9	Risperidon	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 3</b>		<b>5 ng/ml</b>	<b>10 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>
1	Flunitrazepam	0.90	0.91	0.90
2	Haloperidol	0.91	0.86	0.91
3	Methylphenidate	-	0.39	0.34
4	Zuclopenthixol	0.90	0.91	0.91
5	Biperidene	0.90	0.91	0.89
6	Fluspirilen	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 4</b>		<b>5 ng/ml</b>	<b>10 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>
1	Loxapine	0.90	0.89	0.90
2	Prazepam	0.89	0.89	0.91
3	Codeine	0.91	0.91	0.90
4	Dimetindene	0.90	0.91	0.91
5	Methamphetamine	-	-	0.65
6	Prochlorperazin	0.90	0.91	0.89
7	Zopiclon	-	-	-
8	Bisoprolol	0.32	0.31	0.35
9	Mianserine	0.91	0.91	0.91
10	Nefopam	0.89	0.91	0.91

<b>Mix 5</b>		<b>5 ng/ml</b>	<b>10 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>
1	Zotepine		Not in library	
2	Medazepam	0.91	0.91	0.91
3	Tramadol	-	-	-
4	Nefazodon	0.84	0.70	0.82
5	Promazine	0.47	0.65	0.73
6	Melitracen	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 6</b>		<b>20 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>
1	Oxypertin	0.91	0.91	0.91
2	Alprazolam	0.91	0.90	0.91
3	Oxycodone	0.90	0.91	0.90
4	Nomifensin	0.91	0.90	0.91
5	Risperidon-9-Hydroxy	0.87	0.87	0.91
6	Clonazepam	-	0.90	0.90
7	Duloxetine	-	-	0.77
8	Olanzapin	0.91	0.91	0.91
9	Mirtazapine	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 7</b>		<b>20 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>
1	Dosulepine	0.91	0.91	0.91
2	Levomepromazine	0.76	0.86	0.88
3	Temazepam	0.89	0.90	0.86
4	Chloroquine		not in library	
5	Chlorprothixene	0.91	0.91	0.91
6	Lorazepam	0.79	0.75	0.90
7	Triflupromazine	0.67	0.56	0.61
8	Nitrazepam	0.89	0.91	0.91

<b>Mix 8</b>		<b>20 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>
1	Metoprolol	0.91	0.91	0.91
2	Perazine	0.89	0.89	0.91
3	Dibenzepine	0.89	0.90	0.91
4	Nicotine	0.82	-	0.87
5	Trifluoperidol	0.90	0.91	0.90
6	Dihydrocodeine	0.91	0.91	0.91
7	Chlorpromazine	0.88	0.87	0.90
8	Chlorprothixen	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 9</b>		<b>20 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>
1	Alfentanil	0.91	0.91	0.91
2	Nalbuphine	0.91	0.91	0.91
3	Metoclopramide	0.78	0.80	0.80
4	Sulpirid	0.79	0.42	0.76
5	Imipramine	0.84	0.85	0.84
6	Tilidine	0.80	0.87	0.89
7	Ziprasidon	0.91	0.90	0.89
8	Amphetamine	-	0.36	-
9	Propranolol	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 10</b>		<b>20 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>
1	Amitriptyline	0.91	0.91	0.91
2	Citalopram	0.91	0.91	0.91
3	Doxylamine	0.61	-	0.34
4	Opipramol	0.91	0.90	0.91
5	Prothipendyl	0.86	0.85	0.86
6	Trihexyphenidyl	0.68	0.84	0.88
7	Fluvoxamine	0.91	0.90	0.91
8	Sertraline	0.89	0.91	0.90
9	Cocaine	0.91	0.91	0.91

<b>Mix 11</b>		<b>20 ng/ml</b>	<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>
1	Tranlycypromine		not in library	
2	Reboxetine	0.89	0.90	0.90
3	Doxepine	0.91	0.91	0.91
4	Verapamil	0.91	0.91	0.91
5	Alimemazine	0.71	0.84	0.81
6	Cyamemazin	0.60	0.66	0.81
7	Diltiazem	0.91	0.91	0.91
8	MDA	-	0.79	0.78
9	Methadone	-	-	0.46
10	Sildenafil	0.87	0.91	0.90

<b>Mix 12</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	Paroxetin	0.91	0.91	0.91
2	Protriptylin	0.91	0.91	0.91
3	Desipramine	0.83	0.88	0.65
4	Maprotiline	0.91	0.91	0.91
5	Nortriptyline	0.87	0.90	0.89
6	Bromazepam	0.78	0.81	0.77
7	Midazolam	0.91	0.90	0.91
8	Clomipramine	0.90	0.88	0.90
9	Trimipramine	0.64	0.86	0.67

<b>Mix 13</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	MDMA	0.81	0.81	0.85
2	Quetiapine	0.91	0.91	0.91
3	Zolpidem	0.85	0.84	0.84
4	Amisulprid	0.84	0.87	0.91
5	Promethazine	0.84	0.79	0.43
6	Fluoxetine	-	-	-
7	Pipamperone	0.91	0.91	0.91

---

<b>Mix 14</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	Desmethylozapin	0.91	0.91	0.91
2	Pethidine	0.91	0.91	0.91
3	Diphenhydramine	0.86	0.85	0.84
4	Clomethiazol	-	-	-
5	Diazepam	0.91	0.91	0.91
6	Venlafaxine	-	-	-
7	Nordazepam	0.91	0.91	0.91

---

<b>Mix 15</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	Ajmaline	0.81	0.84	0.79
2	Thioridazine	0.91	0.91	0.90
3	MDEA	0.81	0.89	0.90
4	Nortilidin	0.91	0.91	0.91
5	Bupivacaine	0.86	0.86	0.84
6	O-Desmethylvenlafaxin	0.90	0.90	0.91
7	Amantadine	0.91	0.91	0.91
8	Clozapine	0.91	0.91	0.91
9	Dixyracin	0.91	0.91	0.91

---

<b>Mix 16</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	Trazodone	0.88	0.88	0.87
2	Moclobemide	0.31	0.37	0.34
3	Propafenon	0.91	0.91	0.91
4	Chlordiazepoxide	0.91	0.91	0.91
5	Methaqualone	0.91	0.91	0.91
6	Flecainide	0.91	0.91	0.91
7	Flupirtine	0.84	0.86	0.85
8	Amiodarone	-	0.66	0.50
9	Mexiletine	0.80	0.84	0.80

---

<b>Mix 17</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	Methohexital	0.80	0.91	0.91
2	Quinine	0.91	0.91	0.91
3	Tiaprid	0.91	0.91	0.90
4	Ticlopidine	0.91	0.91	0.91
5	Lidocaine	0.50	0.60	0.43
6	Disopyramide	0.80	0.80	0.69
7	Lamotrigin	0.91	0.90	0.90

---

<b>Mix 18</b>		<b>50 ng/ml</b>	<b>250 ng/ml</b>	<b>500 ng/ml</b>
1	Chlormezanone	0.91	0.91	0.91
2	Propyphenazone	0.91	0.91	0.91
3	Carbamazepine	0.91	0.91	0.91
4	Phenazon	0.91	0.90	0.91
5	Phenytoin	-	-	-
6	Oxcarbazepine	0.78	0.73	0.84

---

Mix 19		50 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
1	EDDP	0.91	0.91	0.91
2	Budipine	0.90	0.91	0.91
3	Chlorphenethiazine	0.44	0.83	-
4	Clobutinol	0.72	0.38	0.72
5	Detajmium	0.91	0.91	0.91

Mix 20		50 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
1	Fenethyliline	0.90	0.91	0.90
2	Fluanison	0.73	0.82	0.83
3	MBDB	0.53	0.81	0.75
4	Mefenorex	0.61	0.73	0.62
5	Moperon	0.91	0.81	0.80
6	Noscapine	0.91	0.91	0.91
7	Pentoxyverine	0.85	0.86	0.91

Mix 21		50 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
1	Remifentanil	0.91	0.91	0.91
2	Sertindol	0.88	0.85	0.83
3	Thiopropazat	0.91	0.91	0.91
4	Zaleplon	0.89	0.91	0.90

### A-5: Detaillierte Analyseergebnisse der 21 dotieren Serumproben

Nein: Score-Werte  $\geq 0,85$  in allen 3 Konzentrationen (103 Substanzen)

≈ Score-Werte zwischen 0,65 und 0,84 (28 Substanzen)

Ja: Score-Wert  $< 0,65$  (25 Substanzen)

Fünf der dotierten Substanzen waren zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht in der Bibliothek eingepflegt.

Nr.	Substanz	Problem	Art des Problems
1	Flupentixol	Nein	
2	Fluphenazine	Nein	
3	LSD	Ja	Sensitivität: Kein Signal im MS <sup>1</sup> (Stabilität?)
4	Buspiron	Nein	
5	Fentanyl	Nein	
6	Perphenazine	Nein	
7	Flurazepam	Nein	
8	Bromperidol	Nein	
9	Brotizolam	Nein	
10	Lormetazepam	Ja	Co-Elution: Gemischtes Spektrum
11	Pimozide	Nein	
12	Benperidol	Nein	
13	Clopenthixol	Nein	
14	Triazolam	Nein	
15	Atropine	Nein	
16	Risperidon	Nein	
17	Flunitrazepam	Nein	

Nr.	Substanz	Problem	Art des Problems
18	Haloperidol	Nein	
19	Methylphenidate	Ja	Fragmentarme Spektren: 1 Fragment (m/z 84); Kein MS <sup>3</sup>
20	Zuclopenthixol	Nein	
21	Biperidene	Nein	
22	Fluspirilen	Nein	
23	Loxapine	Nein	
24	Prazepam	Nein	
25	Codeine	Nein	
26	Dimetindene	Nein	
27	Methamphetamine	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 2 Fragmente (m/z 91,119); MS <sup>3</sup> : 1 Fragment (m/z 91)
28	Prochlorperazin	Nein	
29	Zopiclon	(Ja)	Substanz nicht in Bibliothek
30	Bisoprolol	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 2 Fragmente (m/z 116,222); MS <sup>3</sup> : 1 Fragment (m/z 72)
31	Mianserine	Nein	
32	Nefopam	Nein	
33	Zotepine	(Ja)	Substanz nicht in Bibliothek
34	Medazepam	Nein	
35	Tramadol	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 1 Fragment (m/z 246); Kein MS <sup>3</sup>
36	Nefazodon	~	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 2 Fragmente (m/z 274,246); Score zw. 0.70 und 0.84
37	Promazine	Ja	Unterschiedliche Intensitäts-Reihenfolge
38	Melitracen	Nein	
39	Oxypertin	Nein	
40	Alprazolam	Nein	
41	Oxycodone	Nein	
42	Neinmifensin	Nein	
43	Risperidon-9-Hydroxy	Nein	
44	Clonazepam	Ja	Coelution mit Alprazolam.
45	Duloxetine	Ja	Sensitivität: Bei Low und Medium Konzentration kein MS/MS ausgelöst
46	Olanzapin	Nein	
47	Mirtazapine	Nein	
48	Dosulepine	Nein	
49	Levomepromazine	~	Sore-Wert 0.76 für niedrigste Konzentration
50	Temazepam	Nein	
51	Chloroquine	(Ja)	Substanz nicht in Bibliothek
52	Chlorprothixene	Nein	
53	Lorazepam	~	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 2 Fragmente (m/z 275,303); MS <sup>3</sup> : 1 Fragment (m/z 275)
54	Triflupromazine	Ja	Unterschiedliche Intensitäts-Reihenfolge
55	Nitrazepam	Nein	
56	Metoprolol	Nein	
57	Perazine	Nein	
58	Dibenzepine	Nein	
59	Nicotine	Ja	Sensitivität: Bei Low und Medium Konzentration kein MS/MS ausgelöst
60	Trifluoperidol	Nein	

Nr.	Substanz	Problem	Art des Problems
61	Dihydrocodeine	Nein	
62	Chlorpromazine	Nein	
63	Chlorprothixen	Nein	
64	Alfentanil	Nein	
65	Nalbuphine	Nein	
66	Metoclopramide	≈	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : (m/z 227); Identifiziert über MS <sup>3</sup> : Scores zw. 0.78 und 0.80
67	Sulpirid	Ja	Co-Elution: Gemischtes Spektrum
68	Imipramine	≈	MS <sup>2</sup> schlechte Reproduzierbarkeit; MS <sup>3</sup> OK jedoch nicht in SPL
69	Tilidine	≈	2 Hauptfragmente; Score-Wert niedrigste Konzentration: 0,80
70	Ziprasidon	Nein	
71	Amphetamine	Ja	Sensitivität: Bei Low und Medium Konzentration kein MS/MS ausgelöst
72	Propranolol	Nein	
73	Amitriptyline	Nein	
74	Citalopram	Nein	
75	Doxylamine	≈	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 2 Fragmente (m/z182 ,90); MS <sup>3</sup> : 1 Fragment (m/z 167)
76	Opipramol	Nein	
77	Prothipendyl	Nein	
78	Trihexyphenidyl	≈	Nur über MS <sup>3</sup> identifiziert; Score-Werte L: 0.68, M: 0.84, H: 0.88)
79	Fluvoxamine	Nein	
80	Sertraline	Nein	
81	Cocaine	Nein	
82	Tranlycypromine	(Ja)	Substanz nicht in Bibliothek
83	Reboxetine	Nein	
84	Doxepin	Nein	
85	Verapamil	Nein	
86	Alimemazine	≈	Score-Werte: L: 0.71, M: 0.84, H: 0.81) (Intensitäts-Reihenfolge)
87	Cyamemazin	Ja	Intensitäts-Reihenfolge; Score-Werte: L: 0.60, M: 0.66, H: 0.81)
88	Diltiazem	Nein	
89	MDA	Ja	Bei niedrigster Konzentration MS/MS von Fragment satt Molekül-Ion
90	Methadone	(Ja)	Falsche Retentionszeit in Bibliothek
91	Sildenafil	Nein	
92	Paroxetin	Nein	
93	Protriptylin	Nein	
94	Desipramine	≈	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : 1 Fragment (m/z 227)
95	Maprotiline	Nein	
96	Neinrtiptyline	Nein	
97	Bromazepam	≈	Unterschiedliche Isotopenmuster --> Bibliothekseintrag überprüfen.
98	Midazolam	Nein	
99	Clomipramine	Nein	
100	Trimipramine	Ja/≈	Fragmentarme Spektren; Score-Werte: L: 0.64, M: 0.86, H: 0,67)
101	MDMA	≈	Fragmentarme Spektren: Score-Werte zw. 0.81 und 0.85

Nr.	Substanz	Problem	Art des Problems
102	Quetiapine	Nein	
103	Zolpidem	≈	Score-Werte zw. 0.84 und 0.85; 2 Fragmente mit Isotopen
104	Amisulprid	≈	Geringste Konzentration Score-Wert 0.84
105	Promethazine	Ja	3% and 5 % Fragmente aus Bibliothek nicht reproduzierbar
106	Fluoxetine	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : Nur 1 Fragment; kein MS <sup>3</sup>
107	Pipamperone	Nein	
108	Desmethylclozapin	Nein	
109	Pethidine	Nein	
110	Diphenhydramine	≈	Score-Werte höchste Konz. 0.84; MS <sup>3</sup> : 2 Fragmente ohne Isotope
111	Clomethiazol	Ja	Sensitivität: Kein EIC
112	Diazepam	Nein	
113	Venlafaxine	Ja	Sensitivität: Kein EIC
114	Nordazepam	Nein	
115	Ajmaline	≈	Score-Werte zw. 0.79 und 0.84; Mehr als 20 Fragmente --> Problem der Intensitäts-Reihenfolge
116	Thioridazine	Nein	
117	MDEA	≈	Score-Wert 0.81; Nur MS <sup>3</sup> identifiziert
118	Nortilidin	Nein	
119	Bupivacaine	≈	Score-Werte zw. 0.84 und 0.86; Nur MS <sup>3</sup> identifiziert
120	O-Desmethylvenlafaxin	Nein	
121	Amantadine	Nein	
122	Clozapine	Nein	
123	Dixyracin	Nein	
124	Trazodone	Nein	
125	Moclobemide	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> und MS <sup>3</sup> jeweils nur 1 Fragment
126	Propafenon	Nein	
127	Chlordiazepoxide	Nein	
128	Methaqualone	Nein	
129	Flecainide	Nein	
130	Flupirtine	≈	Score: 0.84 - 0.86; 2 Fragmente gleicher Intensität (ca. 16%)
131	Amiodarone	Ja	Hauptfragment unterhalb des Massen Cut-offs
132	Mexiletine	≈	Unterschiedliche Intensitätsreihenfolge: Score 0.80 - 0.84
133	Methohexital	Nein	
134	Quinine	Nein	
135	Tiaprid	Nein	
136	Ticlopidine	Nein	
137	Lidocaine	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> : nur 1 Fragment; Kein MS <sup>3</sup>
138	Disopyramide	≈	Fragmentarme Spektren: Score-Werte zw. 0.69 und 0.80
139	Lamotrigin	Nein	
140	Chlormezanone	Nein	
141	Propyphenazone	Nein	
142	Carbamazepine	Nein	
143	Phenazon	Nein	
144	Phenytoin	Ja	Sensitivität: Kein MS/MS angestoßen
145	Oxcarbazepine	≈	Fragmentarme Spektren: Score-Werte zw. 0.73 und 0.84
146	EDDP	Nein	
147	Budipine	Nein	
148	Chlorphenethiazine	Ja	Fragmentarme Spektren: nicht reproduzierbar

Nr.	Substanz	Problem	Art des Problems
149	Clobutinol	Ja	Fragmentarme Spektren: MS <sup>2</sup> nur 1 fragment; MS <sup>3</sup> nicht reproduzierbar
150	Detajmium	Nein	
151	Fenethylline	Nein	
152	Fluanison	≈	Co-Elution mit Moperon bei m/z-Different von 1; Gemischte Spektren
153	MBDB	≈	Spektren ohne Isotopenpeaks in Bibliothek. Score-Werte zw. 0.53 und 0.81
154	Mefenorex	≈	Spektren ohne Isotopenpeaks in Bibliothek. Score-Werte zw. 0.61 und 0.73
155	Moperon	≈	Co-Elution mit Fluanison bei m/z-Different von 1; Gemischte Spektren
156	Noscapine	Nein	
157	Pentoxverine	Nein	
158	Remifentanil	Nein	
159	Sertindol	≈	niedrigster Score bei höchster Konzentration (0.83)
160	Thiopropazat	Nein	
161	Zaleplon	Nein	

## A-6: Vergleich der Analyseergebnisse von Toxyper und MTS (Urin)

Übereinstimmende Ergebnisse sind in grün hinterlegt.

normale Schrift: Sichere Identifizierung;

*kursive Schrift*: wahrscheinliche Identifizierung;

\* Substanz nicht in Toxyper-Bibliothek;

\*\* Substanz nicht in MTS-Bibliothek.

Nicht in der Toxyper Ergebnissen aufgeführt: D5-Diazepam (IS), Coffein, Theophyllin, Theobromine, Nicotin, Cotinin (Matrixbestandteile aus Lebens- oder Genussmitteln), Thioguanine, Benzododecinium, Isosorbidmononitrat, 2 C-P, Bromural, Primidone (bekannte falsch-positive Treffer), Cortisone (Hormon)

Nicht in den MTS Ergebnissen aufgeführt: D5-Diazepam, D3-Doxepin (IS), Coffein, Theophyllin, Theobromine, Nicotin, Cotinin (Matrixbestandteile aus Lebens- oder Genussmitteln), Chlorambucil, Benzododecinium, Triallate, Primidone, Methylthiouracil, Selegilin (bekannte falsch-positive Treffer).

Proband	Toxyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
MD 1	7-Aminoflunitrazepam 0.9	7-Aminoflunitrazepam 61.8
	Mirtazapine 0.89	Mirtazapine 66.8
		Amitrole 91.7*
MD 2	Risperidone 0.91	Risperidone 79.5
	9-Hydroxyrisperidone 0.91	9-Hydroxyrisperidone 82.2
	Levomepromazine 0.78	Levomepromazine 77.6

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
MD 3	Prothiopendyl 0.85	Pyridoxin 72 (Vitamin B6)
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.85	Thiamine 80* (Vitamin B1)
MD 4	Sertraline 0.91	Sertaline 84.2
	7-Aminoflunitrazepam 0.91	7-Aminoflunitrazepam 61.2
	Prothiopendyl 0.88	Prothiopendyl 79.1
		Famotidine 71.1
		Pyridoxin 62.2 (Vitamin B6)
		Mefenamic Acid 80.6*
MD 5 H1	Carvedilol 0.9	Torasemide 73.4
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.9	
MD 6 H1	Galantamine 0.9	Galantamine 74.1
		Pholedrine 90.1
MD 8 H1	Citalopram 0.91	Citalopram 59.9
	Ranitidine 0.9	Ranitidine 73.9
		Pholedrine 76.3
		Amitrole 73.3*
		Urapidil 60*
MD 9 H1	-	-
MD 10 H1	Galantamine 0.89	Galantamine 62.7
		Tryptamine 68.7
		Hordenine 42.7
MD 11 H1	Mirtazapine 0.91	Mirtazapine 69.5
	Citalopram 0.91	Citalopram 64.9
	Phenazone 0.87	Phenazone 71.5
	Bisoprolol 0.86	Bisoprolol 78
MD 12 H1	Galantamine 0.87	Galantamine 73.2
	Citalopram 0.91	Enalapril 88.8
	Carvedilol 0.89	Metformin 78.2
MD 14 H1	Citalopram 0.91	Citalopram 66.3
	Trazodone 0.8	Trazodone 92.3
	Clopidogrel 0.7	Clopidogrel 92.1
	Prothiopendyl 0.77	Prothiopendyl 79.9
	Carvedilol 0.9	
MD 15 H1	MCPD 0.87**	
MD 17	Nebivolol 0.86	-
	Phenazone 0.86	
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.86	
	Metoclopramide 0.87**	
MD 18	Ranitidine 0.91	Ranitidine 74.8
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.88	Metformin 68.6
		Pholedrine 65.7
MD 19 H2	Citalopram 0.91	Enalapril 74.5
		Metformin 75.9
MD 20 H2	9-Hydroxyrisperidone 0.91	9-Hydroxyrisperidone 84.4
	Risperidone 0.9	Risperidone 66.3
		Amitrole 91.7*
		8-Hydroxyquinoline 53.7*

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
MD 21	Lorazepam 0.84	Lorazepam 52.3
	Loperamide 0.89	Loperamide 65.6
		Clonidine 83.6
		Pholedrine 71.7
		Mefenamic Acid 63.3*
MD 22	Oxazepam 0.73	Oxazepam 85.1
	Carvedilol 0.89	Metformin 74.8
	Prothiopyridyl 0.84	
MD 23 H2	Pheniramine 0.91	Pheniramine 82.2
	Paroxetine 0.9	Paroxetine 44
		Amitrole 91.7*
		Lisinopril 56.9
MD 24	Metoprolol 0.9	Metoprolol 70.2
	Diphenhydramin 0.86	Diphenhydramine 88.8
	7-Aminoflunitrazepam 0.89	7-Aminoflunitrazepam 46.5
		Lisinopril 70.5
		Pyridoxin 66.8 (Vitamin B6)
MD 25	Quetiapine 0.91	Quetiapine 83.2
	Citalopram 0.91	Citalopram 62
	Paracetamol 0.86	Paracetamol 81.5
	Oxazepam 0.71	Oxazepam 62.7
	Mirtazapine 0.88	Diphenhydramine 71
	Nordiazepam 0.87	Tramadol 76
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.88	Metformin 94.3
		Phenazone 63.2
		8-Hydroxyquinoline 75.4*
		Candesartan 64.1*
	Amlodipine 56.5*	
MD 27 H2	Citalopram 0.91	Citalopram 47.4
	Mirtazapine 0.91	Mirtazapine 60.6
	Oxazepam 0.70	Tramadol 77.6
	Quetiapine 0.91	Metformin 72.1
		Paracetamol 52.9
MD 29 H2	Ambroxol 0.91	Ambroxol 80.6
	Gabapentin 0.91	Gabapentin 87
	Metoprolol 0.9	Metoprolol 63.4
	Metformin 0.67	Metformin 93.9
	Toliprolol 0.7	Histamine 68.7
		Amlodipine 74.7*
		Valsartan 59.3*
		Salbutamol 55.8*
	Levodopa 32.3*	
MD 30	Phenazone 0.9	Phenazone 73
	Ambroxol 0.87	Ambroxol 81.4
	Metoprolol 0.89	Metoprolol 78.5
		Metformin 80.5
		Lisinopril 74.7
		Gabapentin 70.5
MD 33 H2	-	Metformin 79.2
MD 34 H3	Trazodone 0.76	Trazodone 69.2
	Carvedilol 0.89	
	MCPD 0.81**	

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
MD 36 H3	Citalopram 0.91	Citalopram 66.1
	Metoprolol 0.9	Metoprolol 75.6
	Hydromorphone 0.9	<i>Morphine-3-β-D-glucuronide 69.9</i>
	α-Hydroxytriazolam 0.88	
	Phenazone 0.71	
MD 37 H3	Sertraline 0.91	<i>Sertraline 80.5</i>
MD 38 H3	Mirtazapine 0.91	<i>Mirtazapine 68.5</i>
	Timolol 0.79	
	Lorazepam 0.66	
MD 41 H3	Phenazone 0.91	Phenazone 81.1
	Prothiopyndyl 0.84	Prothiopyndyl 84.1
	Trazodone 0.72	Trazodone 87.6
	MCPD 0.85**	
MD 42 H4	Diphenhydramin 0.78	Diphenhydramine 86.9
	Bisoprolol 0.81	<i>Bisoprolol 72.6</i>
	α-Hydroxytriazolam 0.83	<i>Candesartan 42.4*</i>
		<i>Norfentanyl 38.5*</i>
MD 44 H4	Citalopram 0.91	Citalopram 61.5
	Metoclopramide 0.87**	
MD 45 H4	Timolol 0.86	Timolol 70.2
	Repaglinide 0.89	<i>Repaglinide 60.2</i>
	Bisoprolol 0.84	<i>Bisoprolol 59.4</i>
	α-Hydroxytriazolam 0.86	<i>Cilazapril 64.4*</i>
	Dimetindene 0.91	
MD 46 H4	Paracetamol 0.9	Paracetamol 71.1
	9-Hydroxyrisperidone 0.89	
	Haloperidol 0.91	
MD 47 H4	Citalopram 0.9	Citalopram 51.7
	Carvedilol 0.91	<i>Losartan 64.8</i>
	α-Hydroxytriazolam 0.9	
MD 48 H4	Hydromorphone 0.9	<i>Hydromorphone 61.6</i>
	Trazodone 0.82	Trazodone 87.3
	α-Hydroxytriazolam 0.84	<i>Amitrole 70*</i>
	Carvedilol 0.8	
	MCPD 0.81**	
MD 50 H5	Citalopram 0.91	Citalopram 67.6
	Hydromorphone 0.89	<i>Hydromorphone 68.8</i>
	Phenazone 0.91	<i>Phenazone 67.4</i>
	Trazodone 0.85	Trazodone 86
	Nebivolol 0.89	Gabapentin 77
	MCPD 0.89**	<i>Morphine-3-β-D-glucuronide 78.7</i>
MD 51 H5		Thiamine 71.6* (Vitamin B1)
	Hydromorphone 0.82	<i>Hydromorphone 69.8</i>
	Bisoprolol 0.78	<i>Bisoprolol 69.1</i>
	Metoclopramide 0.87**	Lisinopril 81.3
		Torasemide 74.1

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
MD 52 H5	Amitriptylin 0.91	Amitriptyline 85
	Nortriptyline 0.84	Nortriptyline 78
	Mirtazapine 0.91	Mirtazapine 61.7
	Hydromorphone 0.9	Hydromorphone 67.5
	Bisoprolol 0.8	Bisoprolol 59.9
	Amitriptylinoxid 0.88	Protriptyline 75.8
	Nordiazepam 0.85	Gabapentin 77.6
	Dosulepin 0.91	Lisinopril 27.5
	5-Aminosalicylic Acid 0.69**	Morphin-3- $\beta$ -D-glucuronide 75.9
	Metoclopramide 0.81**	Thiamine 81* (Vitamin B1)
MD 53 H5	-	Amlodipine 50.4*
	-	Metformin 60.4
MD 55 H5	Desmethyloclobazam 0.77	8-Hydroxyquinoline 61.1*
		Pyridoxin 63.8 (Vitamin B6)
MD 60 H6	Metoprolol 0.91	Thiamine 91.2* (Vitamin B1)
	Hydromorphone 0.91	Metoprolol 62.5
MD 62 H6	Corticosterone 0.68	Hordenine 93.9
	Alprazolam 0.91	Methotrexate 82.2
	$\alpha$ -Hydroxyalprazolam 0.82	
	Fentanyl 0.91	
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.83	
MCPP 0.9**	Norfentanyl 84.7*	
MD 63 H6	Paroxetine 0.91	Paroxetine 64.6
	Mirtazapine 0.8	Mirtazapine 60.1
	-	Tramadol 80.2
MD 65 H6	-	Etilefrine 59.3
	Gabapentin 0.91	Gabapentin 70.8
	Fentanyl 0.91	Fentanyl 86.4
	Pyridoxin 0.79 (Vitamin B6)	Pyridoxin 67.3 (Vitamin B6)
	Trazodone 0.71	Trazodone 86.6
MD 66 H6	-	Thiamine 82.2* (Vitamin B1)
	Metoprolol 0.91	Metoprolol 78
	Dimetindene 0.91	Metformin 76.6
	Citalopram 0.87	Gabapentin 52.9
MD 67 H6	-	Allopurinol 88.1*
	Melperone 0.78	Melperone 92.7
	Prothiopyndyl 0.9	Prothiopyndyl 76.1
	Bisoprolol 0.78	Bisoprolol 73.3
MD 69 H6	Codeine 0.81	-
MD 70 H6	-	-
	Citalopram 0.91	Citalopram 48.2
	7-Aminoflunitrazepam 0.91	Lisinopril 49.6
MD 72 H6	-	Amlodipine 50.5*
	7-Aminoflunitrazepam 0.89	-
MD 73 H6	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0.87	-
	Metoprolol 0.91	Metoprolol 77.7
	Telmisartan 0.91	Telmisartan 77.4
	Trazodone 0.83	Trazodone 84.6
MD 90 H7	-	Metformin 32.5
	Timolol 0.79	Timolol 38
	Pentoxifylline 0.9	Oxitropium 94.3
		Diclofenac 67.1

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
MD 91 H7	Zolpidem 0.84	Zolpidem 74.5
	Hydromorphone 0.9	Hydromorphone 55.4
	Venlafaxine 0.89	Venlafaxine 27.4
	Desmethylvenlafaxine 0.89	Trospium 53.7
MD 92 H7	Melperone 0.81	Melperone 86.2
	Fentanyl 0.91	Norfentanyl 76.3*
	α-Hydroxytriazolam 0.86	
	Bendroflumethiazide 0.7	
MD 93 H7	Quetiapine 0.91	Quetiapine 71.1
	9-Hydroxyrisperidone 0.91	9-Hydroxyrisperidone 79.4
	Risperidone 0.86	Risperidone 73.1
	Desmethyl-Clozapine 0.68**	
MD 94 H7	Olanzapine 0.91	Bisoprolol 70.1
	Nebivolol 0.86	Trospium 83.7
	Phenazone 0.86	Quetiapine 79.9
		Metformin 75.3
MD 95 H7	Sertraline 0.91	Sertraline 80.5
	Quetiapine 0.91	Trospium 85.5
	α-Hydroxytriazolam 0.86	Gabapentin 42.8
	Loperamide 0.78	Thiamine 59* (Vitamin B1)
MD 101 H8	Sertraline 0.9	Sertraline 80.5
	Lorazepam 0.78	Trospium 85.5
	Amitriptylin 0.77	Gabapentin 42.8
		Thiamine 59* (Vitamin B1)
MD 102 H9	Citalopram 0.91	Citalopram 65.9
	Nebivolol 0.89	Norfentanyl 80*
	α-Hydroxytriazolam 0.88	
	Phenazone 0.76	
MD 103 H9	Fentanyl 0.9	Fentanyl 88
	Ambroxol 0.9	Ambroxol 79.9
	Sertraline 0.91	Norfentanyl 86.2*
		8-Hydroxyquinoline 70.9*
MD 104 H9	Sertraline 0.89	Sertraline 86.9
	Codeine 0.88	Codeine 49.5
	Hydrocodone 0.89	Ecgoninemethylester 78.2
	Dosulepin 0.91	Phenazone 58.2
MD 105 H9	Nordiazepam 0.86	Thiamine 75.7* (Vitamin B1)
		Milrinone 66*
		Tryptamine 44.2
MD 106 H9		Thiamine 56.6* (Vitamin B1)
	Quetiapine 0.91	Quetiapine 63.7
	Trimethoprim 0.91	Trimethoprim 84.8
IK 1	Sertraline 0.91	Sertraline 74.8
	7-Aminodesmethyl-flunitrazepam 0.91	7-Aminodesmethyl-flunitrazepam 72.7
	7-Aminoflunitrazepam 0.9	7-Aminoflunitrazepam 51.1
		Lisinopril 71.1
		Diclofenac 89.1
	Tramadol 87	
	Sulpiride 74.3	

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
IK 2	Paracetamol 0.67	Paracetamol 82.1
	Hydromorphone 0.91	Hydromorphone 81.8
IK 3	-	Tranexamic Acid 58.6
	-	<i>Morphin-3-β-D-glucuronide 78.4</i>
IK 4	Citalopram 0.91	Enalapril 77.3
	Levomepromazine 0.7	<i>Amitrole 91.7*</i>
IK 5	Zolpidem 0.79	Citalopram 70.5
	Paroxetine 0.91	Levomepromazine 70.2
IK 6	Paracetamol 0.84	<i>Pholedrine 76.3</i>
	Verapamil 0.91	Paroxetine 77.6
IK 7	Citalopram 0.89	Paracetamol 89.2
	α-Hydroxytriazolam 0.84	Verapamil 82
IK 8	Sertraline 0.79	<i>Hydralazine 76.4</i>
	Metoprolol 0.91	Metoprolol 67.2
IK 9	Citalopram 0.91	Citalopram 70.4
	Melperone 0.86	Melperone 93.3
IK 10	-	Trospium 83.4
	-	Metformin 82.6
IK 11	-	<i>Isoprenaline 49.7*</i>
	-	<i>Tranexamic Acid 59.8</i>
IK 12	Carvedilol 0.9	Enalapril 91.2
	-	Pholedrine 86.8
IK 13	-	Pyridoxin 69.2 (Vitamin B6)
	-	<i>Thiamine 82.6* (Vitamin B1)</i>
IK 14	Citalopram 0.91	Citalopram 60.5
	-	<i>Tranexamic Acid 61.3</i>
IK 15	7-Aminoflunitrazepam 0.89	-
	Prothiopyridin 0.85	-
IK 16	Phenazone 0.81	Phenazone 76
	-	<i>Pholedrine 82.1</i>
IK 17	Prothiopyridin 0.89	Prothiopyridin 75.3
	Quetiapine 0.91	-
IK 18	7-Aminoflunitrazepam 0.91	-
	Hydromorphone 0.9	-
IK 19	Pramipexol 0.91	-
	Diphenhydramin 0.76	Diphenhydramine 90.9
IK 20	Hydromorphone 0.9	<i>Hydromorphone 73</i>
	Verapamil 0.91	Verapamil 80.9
IK 21	Paroxetine 0.86	<i>Paroxetine 56.3</i>
	α-Hydroxytriazolam 0.88	Metoprolol 69.2
IK 22	Temazepam 0.77	Tramadol 69.1
	Metoclopramide 0.87**	<i>Morphin-3-β-D-Glucuronide 62.1</i>
IK 23	-	<i>Chlormequat 60.7*</i>
	α-Hydroxytriazolam 0.9	-
IK 24	Tizanidine 0.8	-
	Trazodone 0.85	Trazodone 91
IK 25	MCPD 0.87**	Enalapril 76.2
	-	<i>Xipamide 45.2</i>

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
IK 19	-	Histamine 83.2 Tryptamine 56.6 Tranexamic Acid 69.2 Canrenoic Acid 63.5*
IK 20	Sertraline 0.9	Pholedrine 89.7
IK 22	Bisoprolol 0.86	Bisoprolol 76.6 Pholedrine 76.4
IK 23	Nebivolol 0.84	Metformin 69.4
IK 24 H3	Citalopram 0.91	Citalopram 66.5 Pyridoxin 67 (Vitamin B6)
IK 25 H3	Prothiopyndyl 0.85 Metoclopramide 0.87**	Prothiopyndyl 85
IK 26 H3	Trazodone 0.83 Fentanyl 0.9 MCP 0.87**	Trazodone 91.9 Fentanyl 57.8 Phenazone 50 Norfentanyl 90.5* 8-Hydroxyquinoline 49*
IK 27 H3	Atenolol 0.91	Atenolol 58.5 Pholedrine 89.2 Ephedrine 65 Amphetamine 94 Metamphetamine 78.5 Tryptamine 61.3 Metoprolol 34.8
IK 30	Citalopram 0.91 Hydromorphone 0.85 Verapamil 0.91 Paracetamol 0.88 Prothiopyndyl 0.83 3.4-Dimethoxyphenethylamine 0.85	Citalopram 66.7 Hydromorphone 76.6 Verapamil 72.9 Paracetamol 84.7 Prothiopyndyl 82.8 Morphin-3- $\beta$ -D-Glucuronide 39.2 Milrinone 66*
IK 31	Quetiapine 0.91 Sertraline 0.91	Quetiapine 81.4 Sertraline 80.5 Metformin 89.9 Pyridoxin 61.8 (Vitamin B6)
IK 34	Paracetamol 0.87 Fentanyl 0.91 Bisoprolol 0.72 9-Hydroxyrisperidone 0.72 MCP 0.84** Metoclopramide 0.86**	Paracetamol 72.7 Fentanyl 73.1 Bisoprolol 58.2 Trazodone 86.9 7-Aminoflunitrazepam 54 Phenazone 62 Norfentanyl 89.7*
IK 35	Lorazepam 0.87	Torasemide 71.7
IK 37	Venlafaxine 0.9 Risperidone 0.91 9-Hydroxyrisperidone 0.91 Metformin 0.67 Phenazone 0.88 Biperiden 0.9 Desmethylvenlafaxine 0.88	Venlafaxine 60.8 Risperidone 88 9-Hydroxyrisperidone 76.1 Metformin 81.4 Phenazone 63.4 Triperiden 69.7*
IK 39	Alprazolam 0.9	Tramadol 67.8

Proband	Toxytyper (Score-Wert)	MTS (Fit %)
501 TS	Bisoprolol 0.88 Phenazone 0.9	Bisoprolol 70.2 Phenazone 70.1 Torasemide 74.7
502 TS – 18	Citalopram 0.91 Carbamazepine 10.11-epoxide 0.89 Carbamazepine 0.89	Citalopram 68.2 Carbamazepine 10.11-epoxide 77.4 Carbamazepine 77.8 Amphetamine 94 Torasemide 59.1
503 TS	Flecainide 0.91	Torasemide 74.3
504 TS	Bisoprolol 0.86 Flecainide 0.88 Prothiopyridyl 0.74	Bisoprolol 71.5 Histamine 78.2
507 TS	Bisoprolol 0.68	Bisoprolol 61.4 Tryptamine 75.7 Amitrole 91.7*
508 TS - 19	-	-
509 TS - 9	-	-
510 TS	Chinine 0.91	-
513 BGL	-	-
514	Metoprolol 0.91 Terbinafine 0.89	Metoprolol 63.2 Minoxidil 67.3
515	Metoprolol 0.91 Ambroxol 0.84	Metoprolol 65.8 Gabapentin 77.1
516 BGL	Citalopram 0.91 Paracetamol 0.76	Citalopram 65.5 Paracetamol 86.6 Metformin 86.7
550 TS	-	Thiamine 30.8* (Vitamin B1)
552 TS	Nebivolol 0.85 BDB 0.68**	Allopurinol 67.1*
556 TS	-	-
557 TS	-	Amiloride 79.2*
558 TS	-	-
612 TC	Vardenafil 0.9 5-Aminosalicylic Acid 0.55**	-
BGL 518	Diltiazem 0.91 Triamterene 0.79 Phenazone 0.89	Diltiazem 82.6 Triamterene 83.5
BGL 519	Bisoprolol 0.87 Hydrochlorothiazide 0.65**	Bisoprolol 47.5 Allopurinol 58.3*
BGL 520	-	Ciprofloxacin 75.9
BGL 521	Lisinopril 0.7 Bisoprolol 0.82 Hydrochlorothiazide 0.76** Naftidrofuryl 0.91	Lisinopril 95.2 Bisoprolol 75.9
BGL 522	Hydrochlorothiazide 0.72**	Enalapril 95.6
TS 516	Dextromethorphan 0.9 Bisoprolol 0.81 Chinine 0.91	Dextromethorphan 90 Bisoprolol 69.4 Amitrole 87.9* Thiamine 80* (Vitamin B1)

Proband	Toxyter (Score-Wert)	MTS (Fit %)
TS 517	Bisoprolol 0.82	Bisoprolol 72.6
	Timolol 0.8	Timolol 72.3
	Telmisartan 0.91	Torasemide 79
		Tryptamine 50.1
		Pilocarpine 67.8*

### A-7: Vergleich zweier Probenaufarbeitungen für Urinproben (basische Chlorbutan-Extraktion und Fällung mit Acetonitril)

Übereinstimmende Ergebnisse sind in grün hinterlegt.

Nicht in der Toxyter Ergebnissen aufgeführt: D5-Diazepam (Interner Standard), Coffein, Theophyllin, Theobromine, Nicotin, Cotinin (üblichen Lebens- oder Genussmittel), Thioguanine, Benzododecinium, Isosorbidmononitrat, 2 C-P, Bromural, Primidone (häufige falsch-positive Treffer), Cortisone (Nebennierenrinden-Hormon)

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
MD 1	7-Aminoflunitrazepam 0,90	7-Aminoflunitrazepam 0,91
	Mirtazapine 0,89	Mirtazapine 0,91
MD 2	Risperidone 0,91	Risperidone 0,91
	9-Hydroxyrisperidone 0,91	9-Hydroxyrisperidone 0,89
	Levomepromazine 0,78	Hordeine 0,85
MD 3	Prothiopyridin 0,85	Pyridoxin 0,72 (Vitamin B6)
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,85	
MD 4	Sertraline 0,91	Sertraline 0,89
	7-Aminoflunitrazepam 0,91	Pyridoxin 0,83 (Vitamin B6)
	Prothiopyridin 0,88	Famotidine 0,79
MD 5 H1	Carvedilol 0,90	Carvedilol 0,90
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,90	Torasemide 0,91
MD 6 H1	Galantamine 0,90	Galantamine 0,89
		Desmethylclobazam 0,69
MD 8 H1	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
	Ranitidine 0,90	Ranitidine 0,91
		Hordeine 0,65
MD 9 H1	-	Hydrochlorothiazide 0,78
MD 10 H1	Galantamine 0,89	Galantamine 0,81
	Mirtazapine 0,91	Mirtazapine 0,85
MD 11 H1	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
	Phenazone 0,87	Phenazone 0,90
	Bisoprolol 0,86	Bisoprolol 0,79

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
MD 12 H1	Citalopram 0,91 Carvedilol 0,89 Galantamine 0,87	Citalopram 0,74 Carvedilol 0,89 Galantamine 0,88 Enalapril 0,91 Hydrochlorothiazide 0,65
MD 14 H1	Citalopram 0,91 Carvedilol 0,9 Trazodone 0,8 Clopidogrel 0,7 Prothiopyridyl 0,77 MCPD 0,87	Citalopram 0,91 Carvedilol 0,89 Trazodone 0,75
MD 15 H1	-	Hydrochlorothiazide 0,72
MD 17	Nebivolol 0,86 Phenazone 0,86 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,86 Metoclopramide 0,87	Nebivolol 0,76
MD 18	Ranitidine 0,91 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,88	Ranitidine 0,90 Hordenine 0,66 Enalapril 0,91 Metformin 0,85 5-Aminosalicylic Acid 0,71 Hydrochlorothiazide 0,65
MD 19 H2	Citalopram 0,91	9-Hydroxyrisperidone 0,91 Histidine 0,67
MD 20 H2	9-Hydroxyrisperidone 0,91 Risperidone 0,90	9-Hydroxyrisperidone 0,91 Histidine 0,67
MD 21	Lorazepam 0,84 Loperamide 0,89	Lorazepam 0,76
MD 22	Oxazepam 0,73 Carvedilol 0,89 Prothiopyridyl 0,84	Ipratropium 0,66
MD 23 H2	Paroxetine 0,90 Pheniramine 0,91	Paroxetine 0,74 Lisinopril 0,90 Hydrochlorothiazide 0,67
MD 24	Metoprolol 0,90 Diphenhydramin 0,86 7-Aminoflunitrazepam 0,89	Metoprolol 0,91 Diphenhydramin 0,82 Lisinopril 0,91 Pyridoxin 0,68 (Vitamin B6) Hydrochlorothiazide 0,66 Hordenine 0,65
MD 25	Quetiapine 0,91 Citalopram 0,91 Mirtazapine 0,88 Paracetamol 0,86 Oxazepam 0,71 Nordiazepam 0,87 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,88	Quetiapine 0,91 Citalopram 0,9 Mirtazapine 0,83 Histidine 0,74 Hordenine 0,7
MD 27 H2	Citalopram 0,91 Mirtazapine 0,91 Oxazepam 0,70 Quetiapine 0,91	-

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
MD 29 H2	Gabapentin 0,91 Metoprolol 0,9 Ambroxol 0,91 Metformin 0,67 Toliprolol 0,70	Gabapentin 0,91 Metoprolol 0,90 Ambroxol 0,90 Apophedrin 0,79
MD 30	Metoprolol 0,89 Phenazone 0,9 Ambroxol 0,87	Metoprolol 0,89 Lisinopril 0,91 Gabapentin 0,91
MD 33 H2	-	Hordenine 0,72 Metformin 0,69
MD 34 H3	Trazodone 0,76 Carvedilol 0,89 MCPD 0,81	Trazodone 0,66 Hordenine 0,68
MD 36 H3	Citalopram 0,91 Metoprolol 0,90 Hydromorphone 0,90 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,88 Phenazone 0,71	Citalopram 0,91 Metoprolol 0,91 Hydromorphone 0,90
MD 37 H3	Sertraline 0,91	Sertraline 0,88 Hordenine 0,67
MD 38 H3	Mirtazapine 0,91 Timolol 0,79 Lorazepam 0,66	Mirtazapine 0,73
MD 41 H3	Phenazone 0,91 Prothiopyridin 0,84 Trazodone 0,72 MCPD 0,85	Phenazone 0,86 Prothiopyridin 0,88
MD 42 H4	Bisoprolol 0,81 Diphenhydramin 0,78 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,83	Bisoprolol 0,73
MD 44 H4	Citalopram 0,91 Metoclopramide 0,87	Citalopram 0,91 Metoclopramide 0,81 Hordenine 0,73 Desmethylclobazam 0,69 Apophedrin 0,68
MD 45 H4	Repaglinide 0,89 Timolol 0,86 Bisoprolol 0,84 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,86 Dimetindene 0,91	Repaglinide 0,75 Timolol 0,77 Bisoprolol 0,76 Hydrochlorothiazide 0,66
MD 46 H4	Paracetamol 0,90 9-Hydroxyrisperidone 0,89 Haloperidol 0,91	Paracetamol 0,90
MD 47 H4	Citalopram 0,90 Carvedilol 0,91 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,9	Citalopram 0,91 Carvedilol 0,88 Losartan 0,85
MD 48 H4	Hydromorphone 0,90 Trazodone 0,82 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,84 Carvedilol 0,8 MCPD 0,81	Hydromorphone 0,83 Hordenine 0,66

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
MD 50 H5	Citalopram 0,91 Phenazone 0,91 Hydromorphone 0,89 MCPD 0,89 Trazodone 0,85 Nebivolol 0,89	Citalopram 0,91 Phenazone 0,87 Hydromorphone 0,91 MCPD 0,64 Gabapentin 0,91
MD 51 H5	Hydromorphone 0,82 Bisoprolol 0,78 Metoclopramide 0,87	Metoclopramide 0,81 Bisoprolol 0,81 Lisinopril 0,91 Torasemide 0,91
MD 52 H5	Dosulepin 0,91 Amitriptylin 0,91 Hydromorphone 0,90 Amitriptylinoxid 0,88 Metoclopramide 0,81 Bisoprolol 0,80 Nordiazepam 0,85 Mirtazapine 0,91 Nortriptyline 0,84 5-Aminosalicylic Acid 0,69	Dosulepin 0,91 Amitriptylin 0,9 Hydromorphone 0,87 Amitriptylinoxid 0,9 Metoclopramide 0,86 Gabapentin 0,91 Lisinopril 0,87 Hordenine 0,74
MD 53 H5	-	Lisinopril 0,91 Hydrochlorothiazide 0,67
MD 55 H5	Desmethylclobazam 0,77	Histidine 0,85 Pyridoxin 0,79 (Vitamin B6)
MD 60 H6	Metoprolol 0,91 Hydromorphone 0,91 Corticosterone 0,68	Metoprolol 0,91 Hordenine 0,71
MD 62 H6	Alprazolam 0,91 $\alpha$ -Hydroxyalprazolam 0,82 Fentanyl 0,91 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,83 MCPD 0,90	Alprazolam 0,85 Losartan 0,85 Methotrexate 0,81 Hydrochlorothiazide 0,75
MD 63 H6	Paroxetine 0,91 Mirtazapine 0,80	Paroxetine 0,65
MD 65 H6	Gabapentin 0,91 Pyridoxin 0,79 (Vitamin B6) Trazodone 0,71 Fentanyl 0,91	Gabapentin 0,91 Pyridoxin 0,74 (Vitamin B6) Trazodone 0,67
MD 66 H6	Metoprolol 0,91 Dimetindene 0,91 Citalopram 0,87	Metoprolol 0,9 Histidine 0,77 Hordenine 0,71 Metformin 0,65
MD 67 H6	Prothiopyridyl 0,9 Melperone 0,78 Bisoprolol 0,78 Codeine 0,81	Prothiopyridyl 0,89 Melperone 0,69 Bisoprolol 0,85 Morphine 0,84
MD 69 H6	-	-
MD 70 H6	7-Aminoflunitrazepam 0,91 Citalopram 0,91	7-Aminoflunitrazepam 0,91 Citalopram 0,91 Lisinopril 0,91 Hydrochlorothiazide 0,76
MD 72 H6	7-Aminoflunitrazepam 0,89 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,87	-

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
MD 73 H6	Metoprolol 0,91 Telmisartan 0,91 Trazodone 0,83	Metoprolol 0,91 Telmisartan 0,90 Paracetamol 0,86 Hordenine 0,65
MD 90 H7	Timolol 0,79 Pentoxifylline 0,90	Ipratropium 0,89 Hordenine 0,75
MD 91 H7	Hydromorphone 0,90 Venlafaxine 0,89 Desmethylvenlafaxine 0,89 Zolpidem 0,84	Hydromorphone 0,91 Venlafaxine 0,86 Desmethylvenlafaxine 0,89 Ipratropium 0,88
MD 92 H7	Melperone 0,81 Fentanyl 0,91 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,86 Bendroflumethiazide 0,7	-
MD 93 H7	Quetiapine 0,91 9-Hydroxyrisperidone 0,91 Risperidone 0,86 Desmethyl-Clozapine 0,68	Quetiapine 0,91 9-Hydroxyrisperidone 0,91 Hordenine 0,66
MD 94 H7	Olanzapine 0,91 Nebivolol 0,86 Phenazone 0,86	Quetiapine 0,91 Sertraline 0,89 Metformin 0,65
MD 95 H7	Sertraline 0,91 Quetiapine 0,91 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,86 Loperamide 0,78	Olanzapine 0,90
MD 101 H8	Sertraline 0,9 Lorazepam 0,78 Amitriptylin 0,77	Sertraline 0,89 Gabapentin 0,9
MD 102 H9	Citalopram 0,91 Nebivolol 0,89 $\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,88 Phenazone 0,76	Citalopram 0,91
MD 103 H9	Sertraline 0,91 Ambroxol 0,90 Fentanyl 0,9	Sertraline 0,89 Ambroxol 0,89 Morphine 0,86
MD 104 H9	Dosulepin 0,91 Sertraline 0,89 Codeine 0,88 Hydrocodone 0,89 Nordiazepam 0,86	Dosulepin 0,85 Sertraline 0,89 Codeine 0,84 Codeine-6- $\beta$ -D-glucuronide 0,89 Morphine 0,86 Hydrochlorothiazide 0,67
MD 105 H9	-	-
MD 106 H9	Quetiapine 0,91 Trimethoprim 0,91 Sertraline 0,91	-
IK 1	7-Aminodesmethyl-flunitrazepam 0,91 7-Aminoflunitrazepam 0,90	Lisinopril 0,9 Sulpiride 0,80
IK 2	Hydromorphone 0,91 Paracetamol 0,67	Hydromorphone 0,91 Paracetamol 0,88 Histidine 0,86
IK 3	-	Enalapril 0,91

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
IK 4	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
	Levomepromazine 0,7 Zolpidem 0,79	
IK 5	Paroxetine 0,91	Paroxetine 0,86
	Paracetamol 0,84	Paracetamol 0,75
	Verapamil 0,91	
	Citalopram 0,89	
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,84 Sertraline 0,79	
IK 6	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
	Metoprolol 0,91	Metoprolol 0,91
	Melperone 0,86	Melperone 0,80 Histidine 0,77
IK 7	-	-
IK 8	Carvedilol 0,9	Enalapril 0,91 Pyridoxin 0,76 (Vitamin B6)
IK 9	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
IK10	7-Aminoflunitrazepam 0,89	Enalapril 0,9
	Prothiopyridin 0,85	
IK 11	Phenazone 0,81	Phenazone 0,88 Histidine 0,81
IK 12	Quetiapine 0,91	Quetiapine 0,91
	Prothiopyridin 0,89	
	7-Aminoflunitrazepam 0,91	
IK 15	Hydromorphone 0,9	Hydromorphone 0,85
	Pramipexol 0,91	Hydrochlorothiazide 0,73
IK 16 H3	Verapamil 0,91	Verapamil 0,86
	Hydromorphone 0,90	Hydromorphone 0,89
	Metoclopramide 0,87	Metoclopramide 0,84
	Paroxetine 0,86	Paroxetine 0,74
	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,88	Metoprolol 0,88
	Diphenhydramin 0,76	Morphin-3- $\beta$ -D-Glucuronide 0,67
	Temazepam 0,77	
IK 17 H3	$\alpha$ -Hydroxytriazolam 0,90	-
	Tizanidine 0,80	
IK 18	Trazodone 0,85	Enalapril 0,91 Xipamide 0,88
	MCPD 0,87	
IK 19	-	Hordenine 0,68
IK 20	Sertraline 0,90	Histidine 0,74 Apophedrin 0,71
IK 22	Bisoprolol 0,86	Bisoprolol 0,85
IK 23	Nebivolol 0,84	Histidine 0,82
IK 24 H3	Citalopram 0,91	Citalopram 0,9
		Pyridoxin 0,72 (Vitamin B6)
IK 25 H3	Prothiopyridin 0,85	Prothiopyridin 0,89
	Metoclopramide 0,87	Metoclopramide 0,87
		Hordenine 0,69
IK 26 H3	Trazodone 0,83	Histidine 0,85
	Fentanyl 0,90	Hordenine 0,77
	MCPD 0,87	
IK 27 H3	Atenolol 0,91	Atenolol 0,91

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
IK 30	Citalopram 0,91	Citalopram 0,89
	Verapamil 0,91	Verapamil 0,86
	Paracetamol 0,88	Paracetamol 0,86
	Hydromorphone 0,85	Hydromorphone 0,88
	Prothiopyridyl 0,83	
	3,4-Dimethoxyphenethylamine 0,85	
IK 31	Quetiapine 0,91	Quetiapine 0,91
	Sertraline 0,91	Sertraline 0,90
		Hydrochlorothiazide 0,75
		Pyridoxin 0,66 (Vitamin B6)
	Metformin 0,65	
IK 34	Paracetamol 0,87	Paracetamol 0,75
	Metoclopramide 0,86	Metoclopramide 0,8
	Bisoprolol 0,72	Bisoprolol 0,69
	Fentanyl 0,91	Hordenine 0,87
	9-Hydroxyrisperidone 0,72	
	MCPD 0,84	
IK 35	Lorazepam 0,87	Torasemide 0,91
IK 37	9-Hydroxyrisperidone 0,91	9-Hydroxyrisperidone 0,89
	Risperidone 0,91	Risperidone 0,9
	Venlafaxine 0,9	Venlafaxine 0,9
	Desmethylvenlafaxine 0,88	Desmethylvenlafaxine 0,88
	Metformin 0,67	
	Phenazone 0,88	
	Biperiden 0,9	
IK 39	Alprazolam 0,9	-
501 TS	Phenazone 0,90	Phenazone 0,89
	Bisoprolol 0,88	Bisoprolol 0,75
		Torasemide 0,91
502 TS - 18	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
	Carbamazepine 10,11-epoxide 0,89	Carbamazepine 10,11-epoxide 0,86
	Carbamazepine 0,89	Carbamazepine 0,86
		Torasemide 0,91
		Oxcarbazepine 0,71
503 TS	Flecainide 0,91	Flecainide 0,91
		Torasemide 0,91
504 TS	Bisoprolol 0,86	Bisoprolol 0,69
	Flecainide 0,88	Hydrochlorothiazide 0,78
	Prothiopyridyl 0,74	
507 TS	Bisoprolol 0,68	Bisoprolol 0,69
508 TS - 19	-	Hordenine 0,69
509 TS - 9	-	Histidine 0,82
		Hordenine 0,68
510 TS	Chinine 0,91	-
513 BGL	-	-
514	Metoprolol 0,91	Metoprolol 0,91
	Terbinafine 0,89	Hordenine 0,67
		Enalapril 0,90
515	Metoprolol 0,91	Metoprolol 0,91
	Ambroxol 0,84	Gabapentin 0,91
516 BGL	Citalopram 0,91	Citalopram 0,91
	Paracetamol 0,76	Paracetamol 0,84

Proband	Chlorbutan-Extraktion	Acetonitril-Fällung
550 TS	-	Lisinopril 0,90
552 TS	Nebivolol 0,85 BDB 0,68	Prothiopendyl 0,74
556 TS	-	Hordenine 0,8
557 TS	-	Hordenine 0,84 Hydrochlorothiazide 0,65
558 TS	-	-
612 TC	Vardenafil 0,90	5-Aminosalicylic acid 0,74 Hordenine 0,66
BGL 518	Diltiazem 0,91 Triamterene 0,79 Phenazone 0,89	Diltiazem 0,91
BGL 519	Bisoprolol 0,87 Hydrochlorothiazide 0,65	Bisoprolol 0,74
BGL 520	-	Hordenine 0,8 THC-OH 0,65
BGL 521	Lisinopril 0,7 Hydrochlorothiazide 0,76 Bisoprolol 0,82 Naftidrofuryl 0,91	Lisinopril 0,9 Hydrochlorothiazide 0,72 Bisoprolol 0,84 Hordenine 0,69
BGL 522	Hydrochlorothiazide 0,72	Hydrochlorothiazide 0,8 Enalapril 0,91
TS 516	Bisoprolol 0,81 Dextromethorphan 0,90 Chinine 0,91	Bisoprolol 0,73
TS 517	Telmisartan 0,91 Bisoprolol 0,82 Timolol 0,80	Telmisartan 0,91 Bisoprolol 0,89 Apophedrin 0,69 Hordenine 0,68

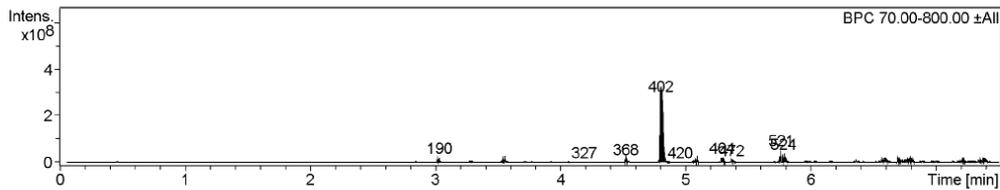
## A-8: Original Ergebnisberichte aller Ringversuchsteilnehmer

### a) Deckblätter ToxTyper-Reports

#### ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV SE 1 Station AmaZon RF3  
 Submitter Birgit Schneider Supervisor System Administrator  
 Analysis Name RV SE 1\_109\_RB4\_01\_4972.d Acquisition Date 6/6/2012 1:12:21 PM  
 Sample Description

#### Base Peak Chromatogram



#### Library Search Results

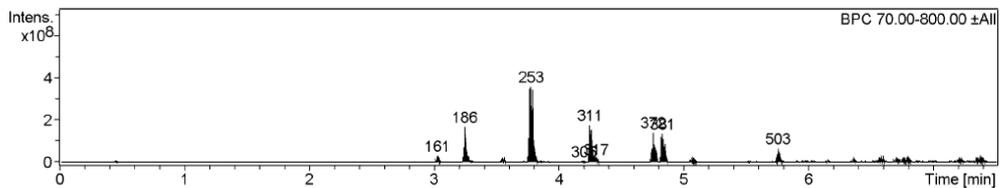
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	190	Caffeine	996	-0.06	-0.05	2.2E7
2	327	Prajamalium	779	-0.32	-0.96	1.8E5
3	368	EDDP	976	-0.12	0.02	1.6E7
4	402	Methadone	985	0.02	0.01	3.2E8
5	420	Oxazepam	970	-0.12	0.01	1.4E6
6	464	Nordazepam	873	-0.09	-0.00	2.4E7
7	472	Temazepam	818	-0.14	-0.00	2.8E6
8	521	D5-Diazepam	834	-0.13	-0.01	5.3E7
9	524	Diazepam	935	-0.15	0.00	4.1E7

#### BDal 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

#### ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV SE 2 Station AmaZon RF3  
 Submitter Birgit Schneider Supervisor System Administrator  
 Analysis Name RV SE 2\_107\_RB2\_01\_4970.d Acquisition Date 6/6/2012 12:46:34 PM  
 Sample Description

#### Base Peak Chromatogram



#### Library Search Results

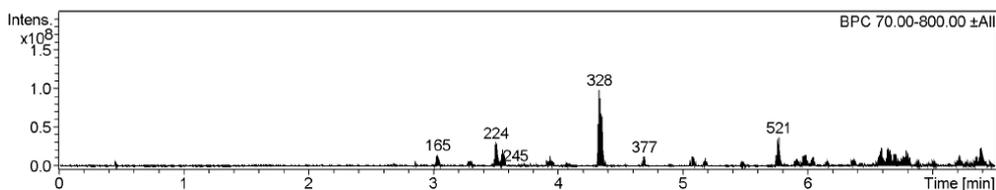
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	161	Caffeine	992	-0.06	-0.05	3.3E7
2	186	Lidocaine	999	-0.03	-0.04	1.7E8
3	253	Zolpidem	979	-0.10	0.02	4.0E8
4	306	Fentanyl	981	-0.08	0.05	6.2E6
5	311	Midazolam	984	-0.11	0.01	2.0E8
6	317	Alpha-hydroxymidazolam	975	-0.07	0.03	1.8E7
7	372	Amitriptyline	976	-0.05	0.01	1.5E8
8	381	Trimipramine	884	-0.14	-0.01	1.6E8
9	503	D5-Diazepam	969	-0.14	-0.01	2.1E7

#### BDal 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV SE 3	Station AmaZon RF3
Submitter Birgit Schneider	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV SE 3_105_RA8_01_4968.d	Acquisition Date 6/6/2012 12:20:48 PM
Sample Description	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

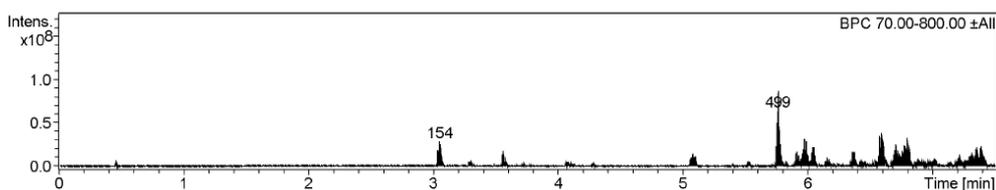
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	165	Caffeine	998	-0.05	-0.06	1.5E7
2	245	Mirtazapine	961	0.11	-0.01	2.0E6
3	224	Metoprolol	817	-0.08	0.02	3.0E7
4	328	Nordoxepine	988	-0.04	-0.03	1.1E8
5	377	Duloxetine	707	-0.08	-0.04	1.5E7
6	521	D5-Diazepam	943	-0.12	-0.02	4.0E7

### BDal 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV SE 4	Station AmaZon RF3
Submitter Birgit Schneider	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV SE 4_103_RA6_01_4966.d	Acquisition Date 6/6/2012 11:55:04 AM
Sample Description	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

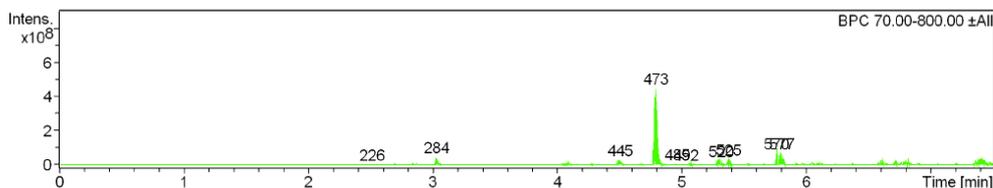
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	154	Caffeine	996	-0.04	-0.05	3.0E7
2	499	D5-Diazepam	928	-0.13	-0.01	6.7E7

### BDal 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 4

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Serum 1 Station amaZon Speed 1  
 Submitter Zoltan Czenthnar Supervisor System Administrator  
 Analysis Name RV Serum 1\_1279\_RB5\_01\_1000.D Acquisition Date 7/3/2012 10:24:05 AM  
 Sample Description

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

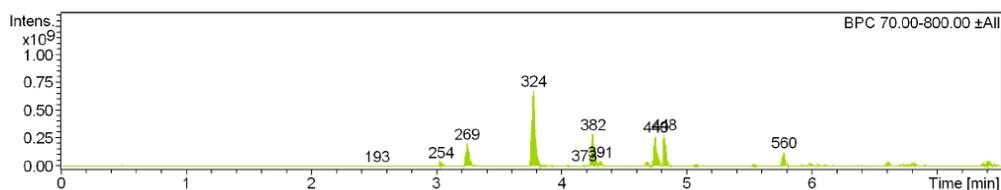
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	226	Theobromine	835	-0.07	-0.13	8.2E5
2	284	Caffeine	995	-0.06	-0.18	4.5E7
3	445	EDDP	968	-0.13	-0.09	2.9E7
4	473	Methadone	978	0.01	-0.05	4.4E8
5	485	Oxazepam	991	-0.11	-0.08	5.9E6
6	492	Propafenone	944	0.22	-0.18	2.0E6
7	520	Nordazepam	969	-0.06	-0.08	3.0E7
8	525	Temazepam	989	-0.13	-0.10	6.6E6
9	570	D5-Diazepam	979	-0.13	-0.08	1.9E7
10	577	Diazepam	976	-0.12	-0.07	1.5E7

### BDal 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Serum 2 Station amaZon Speed 1  
 Submitter Zoltan Czenthnar Supervisor System Administrator  
 Analysis Name RV Serum 2\_1280\_RB6\_01\_1001.D Acquisition Date 7/3/2012 10:36:53 AM  
 Sample Description

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

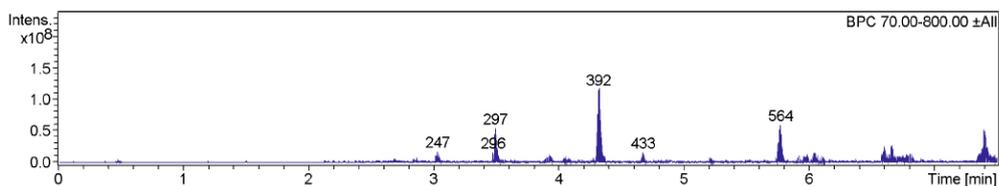
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	193	Theobromine	849	-0.06	-0.14	1.1E6
2	254	Caffeine	994	-0.05	-0.16	4.1E7
3	269	Lidocaine	995	-0.03	-0.15	2.1E8
4	324	Zolpidem	984	-0.10	-0.06	7.0E8
5	382	Midazolam	893	-0.11	-0.07	5.9E7
6	373	Fentanyl	998	-0.10	-0.06	1.3E7
7	391	Alpha-hydroxymidazolam	891	-0.05	-0.01	4.6E7
8	440	Amitriptyline	980	-0.05	-0.09	2.7E8
9	448	Trimipramine	974	-0.14	-0.08	2.9E8
10	560	D5-Diazepam	978	-0.12	-0.09	2.5E7

### BDal 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Serum 3	Station amaZon Speed 1
Submitter Zoltan Czentnar	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Serum 3_1281_RB7_01_1002.d	Acquisition Date 03-Jul-12 10:49:42
Sample Description	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

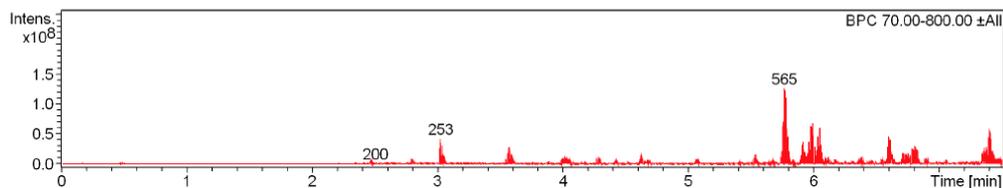
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	247	Caffeine	995	-0.06	-0.18	1.8E7
2	296	Mirtazapine	984	-0.07	-0.08	3.7E6
3	297	Metoprolol	958	-0.09	-0.09	5.4E7
4	392	Nordoxepine	995	-0.05	-0.11	1.2E8
5	433	Duloxetine	957	-0.07	-0.13	1.6E7
6	564	D5-Diazepam	979	-0.12	-0.08	6.0E7

### BDal 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Serum 4	Station amaZon Speed 1
Submitter Zoltan Czentnar	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Serum 4_1282_RB8_01_999.D	Acquisition Date 7/3/2012 10:11:17 AM
Sample Description	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

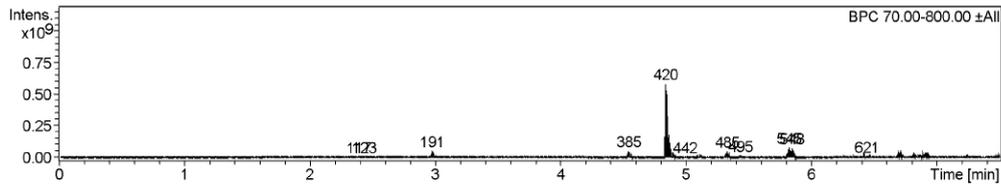
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	200	Theobromine	884	-0.08	-0.15	1.6E6
2	253	Caffeine	995	-0.06	-0.18	4.2E7
3	565	D5-Diazepam	984	-0.13	-0.08	2.7E7

### BDal 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 4

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 1	Station amaZon1
Submitter Laura Huppertz	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 1_112_3007.D	Acquisition Date 6/6/2012 5:43:41 PM
Sample Description LLE pH 9	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

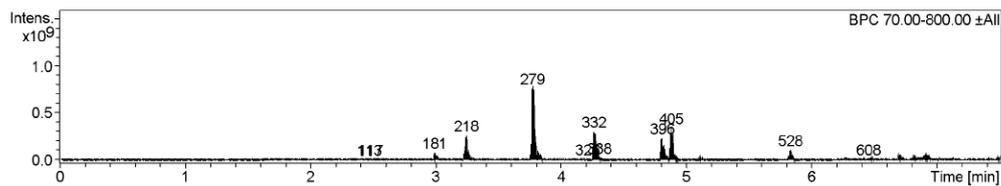
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	117	Isosorbidmononitrat	995	-0.06	-0.07	7.9E6
2	123	Theobromine	897	-0.15	-0.15	7.6E5
3	191	Caffeine	989	-0.11	-0.21	5.5E7
4	385	EDDP	979	-0.09	-0.12	5.7E7
5	420	Methadone	984	0.06	-0.10	6.3E8
6	442	Oxazepam	990	-0.08	-0.16	2.5E6
7	485	Nordazepam	945	-0.04	-0.14	5.3E7
8	495	Temazepam	989	-0.08	-0.05	1.7E7
9	545	D5-Diazepam	979	-0.07	-0.12	7.8E7
10	548	Diazepam	986	-0.08	-0.14	7.9E7
11	621	Benzododecinium	783	-0.16	-1.07	1.2E7

IRM: Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 2	Station amaZon1
Submitter Laura Huppertz	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 2_110_3005.D	Acquisition Date 6/6/2012 5:15:51 PM
Sample Description LLE pH 9	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	117	Isosorbidmononitrat	995	0.04	-0.11	6.7E6
2	113	Theobromine	925	-0.11	-0.22	1.0E6
3	181	Caffeine	995	-0.10	-0.23	8.3E7
4	218	Lidocaine	998	-0.03	-0.17	2.9E8
5	279	Zolpidem	990	-0.11	-0.14	8.5E8
6	326	Fentanyl	995	-0.07	-0.08	1.2E7
7	332	Midazolam	992	-0.09	-0.05	4.0E8
8	338	Alpha-hydroxymidazolam	985	-0.06	-0.06	2.4E7
9	396	Amitriptyline	980	0.01	-0.15	2.5E8
10	405	Trimipramine	981	-0.09	-0.13	3.6E8
11	528	D5-Diazepam	962	-0.06	-0.12	1.1E8
12	608	Benzododecinium	997	-0.14	-1.08	1.2E7

IRM: Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

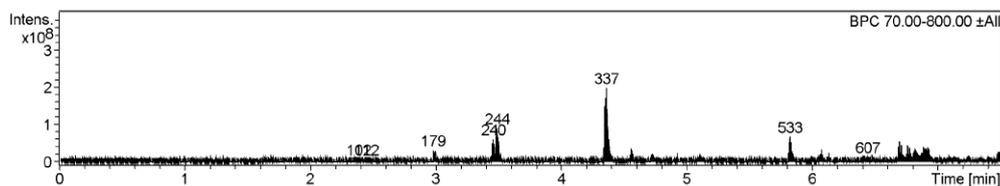
---

**ToxTyper Analysis Report**

---

Sample-ID RV Se 3 Station amaZon1  
Submitter Laura Huppertz Supervisor System Administrator  
Analysis Name RV Se 3\_108\_3003.D Acquisition Date 6/6/2012 4:48:02 PM  
Sample Description LLE pH 9

---

**Base Peak Chromatogram****Library Search Results**

No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	102	Isosorbidmononitrat	995	-0.06	-0.13	5.8E6
2	112	Theobromine	932	-0.14	-0.16	6.5E5
3	179	Caffeine	995	-0.11	-0.23	3.5E7
4	240	Mirtazapine	989	-0.08	-0.15	6.3E7
5	244	Metoprolol	962	-0.10	-0.15	1.0E8
6	337	Nordoxepine	991	-0.01	-0.13	2.1E8
7	533	D5-Diazepam	866	-0.07	-0.14	6.8E7
8	607	Benzododecinium	712	-0.16	-1.08	1.4E7

---

IRM: Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

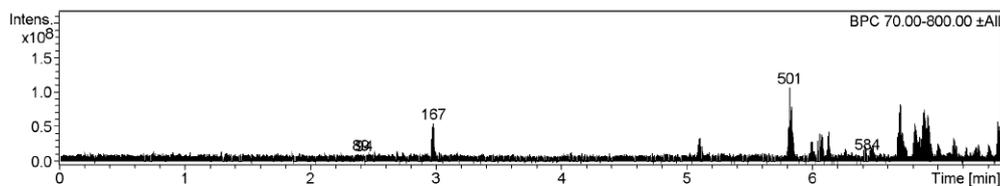
---

**ToxTyper Analysis Report**

---

Sample-ID RV Se 4 Station amaZon1  
Submitter Laura Huppertz Supervisor System Administrator  
Analysis Name RV Se 4\_106\_3001.D Acquisition Date 6/6/2012 4:20:11 PM  
Sample Description LLE pH 9

---

**Base Peak Chromatogram****Library Search Results**

No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	89	Isosorbidmononitrat	995	-0.05	-0.14	5.5E6
2	94	Theobromine	894	-0.16	-0.15	1.0E6
3	167	Caffeine	995	-0.11	-0.22	5.7E7
4	501	D5-Diazepam	907	-0.07	-0.13	1.1E8
5	584	Benzododecinium	794	-0.17	-1.07	1.3E7

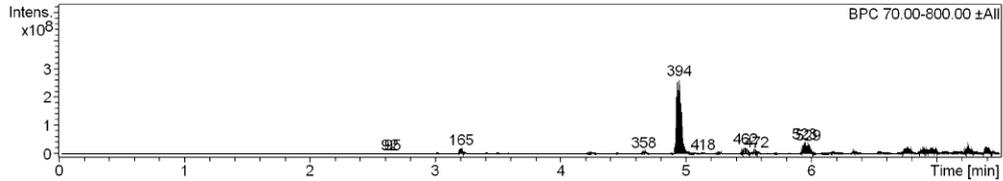
---

IRM: Deckblatt ToxTyper Report Serum 4

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 1	Station Amazon
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 1_8354_RB2_01_7574.D	Acquisition Date 6/15/2012 4:58:48 PM
Sample Description RV Se 1	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

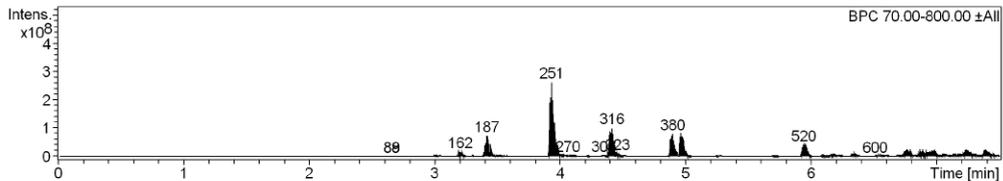
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	92	Isosorbidmonitrat	996	0.19	-0.09	1.1E5
2	95	Theobromine	847	0.08	-0.09	2.3E5
3	165	Caffeine	997	0.12	-0.11	1.9E7
4	358	EDDP	896	0.02	-0.04	9.8E6
5	394	Methadone	857	0.16	-0.06	2.6E8
6	418	Oxazepam	857	0.06	-0.04	2.8E6
7	462	Nordazepam	886	0.10	-0.07	6.3E6
8	472	Temazepam	886	0.05	-0.03	3.2E6
9	523	D5-Diazepam	886	0.05	-0.05	4.2E7
10	529	Diazepam	876	0.04	-0.03	3.9E7

### HUG 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 2	Station Amazon
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 2_8352_RA8_01_7572.D	Acquisition Date 6/15/2012 4:32:03 PM
Sample Description RV Se 2	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

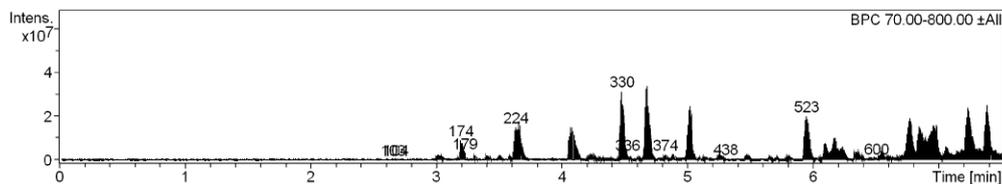
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	88	Isosorbidmonitrat	996	0.21	-0.02	1.2E5
2	89	Theobromine	781	0.07	-0.06	2.0E5
3	162	Caffeine	995	0.12	-0.11	1.7E7
4	187	Lidocaine	999	0.14	-0.06	8.1E7
5	251	Zolpidem	896	0.05	-0.05	2.8E8
6	270	Primaquine	805	0.00	0.32	1.3E5
7	270	2 C-B	768	0.33	0.47	1.3E5
8	306	Fentanyl	898	0.07	-0.02	4.3E6
9	316	Midazolam	975	0.05	-0.02	1.0E8
10	323	Alpha-hydroxymidazolam	862	0.09	-0.05	1.5E7
11	380	Amitriptyline	895	0.09	-0.05	8.1E7
12	520	D5-Diazepam	887	0.05	-0.08	1.0E7
13	600	Benzododecinium	835	-0.09	-0.96	7.5E5

### HUG 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 3	Station Amazon
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 3_8350_RA6_01_7570.D	Acquisition Date 6/15/2012 4:05:19 PM
Sample Description RV Se 3	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

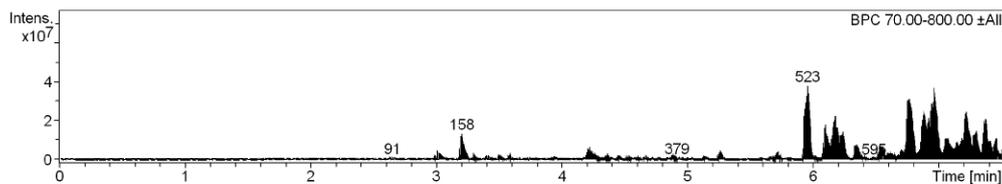
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	103	Isosorbidmononitrat	995	0.21	-0.01	1.1E5
2	104	Theobromine	855	0.09	-0.05	1.2E5
3	174	Caffeine	996	0.11	-0.10	9.1E6
4	179	Desmethylenlafaxine	900	-0.14	-0.08	1.0E5
5	224	Mirtazapine	897	0.09	-0.06	1.6E7
6	330	Nordoxepine	988	0.11	-0.06	3.4E7
7	336	Doxepin	756	0.06	-0.03	2.3E5
8	374	Duloxetine	723	0.06	-0.03	2.6E6
9	438	Temazepam	724	-0.20	-0.82	1.1E5
10	523	D5-Diazepam	887	0.05	-0.04	5.1E6
11	600	Benzododecinium	886	-0.10	-0.98	7.2E5

### HUG 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 4	Station Amazon
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 4_8348_RA4_01_7568.D	Acquisition Date 6/15/2012 3:38:33 PM
Sample Description RV Se 4	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

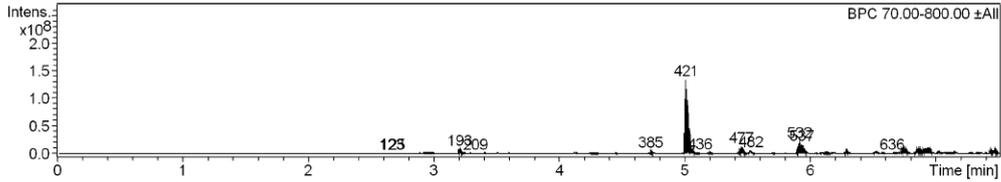
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	91	Isosorbidmononitrat	990	0.20	0.02	1.3E5
2	158	Caffeine	994	0.11	-0.12	1.4E7
3	379	Methadone	829	0.14	-0.03	1.9E5
4	523	D5-Diazepam	878	0.06	-0.05	3.9E7
5	595	Benzododecinium	842	-0.12	-0.99	6.9E5

### HUG 1: Deckblatt ToxTyper Report Serum 4

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 1	Station amaZon 2
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 1_1582_RE1_01_2029.D	Acquisition Date 6/18/2012 12:38:21 PM
Sample Description RV Se 1	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

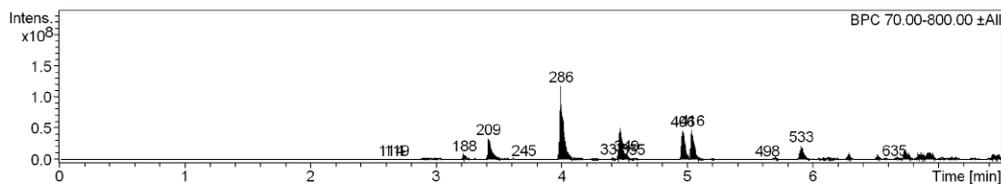
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	123	Isosorbidmonitrat	960	0.22	-0.25	6.0E5
2	125	Theobromine	851	0.09	-0.31	1.4E5
3	193	Caffeine	996	0.12	-0.36	8.4E6
4	209	Minoxidil	890	0.05	-0.30	2.3E4
5	385	EDDP	992	0.09	-0.20	5.7E6
6	421	Methadone	914	0.23	-0.19	1.5E8
7	436	Oxazepam	989	0.05	-0.13	1.3E6
8	477	Nordazepam	987	0.08	-0.22	1.7E7
9	482	Temazepam	913	0.02	-0.09	7.2E6
10	532	D5-Diazepam	921	0.02	-0.21	2.4E7
11	537	Diazepam	977	0.00	-0.19	4.7E6
12	636	Benzododecinium	986	0.06	-0.99	5.3E5

### HUG 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 2	Station amaZon 2
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 2_1580_RD7_01_2027.D	Acquisition Date 6/18/2012 12:11:33 PM
Sample Description RV Se 2	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

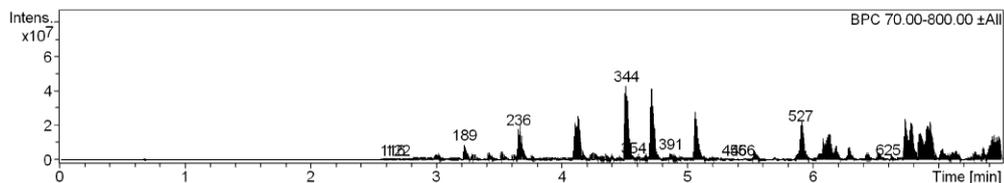
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	114	Isosorbidmonitrat	996	0.20	-0.25	5.5E5
2	119	Theobromine	793	0.10	-0.30	1.8E5
3	188	Caffeine	996	0.14	-0.34	8.0E6
4	209	Lidocaine	999	0.14	-0.31	3.7E7
5	245	Desmethyl-chlordiazepoxide	900	-0.21	0.02	3.9E4
6	286	Zolpidem	979	0.12	-0.21	1.4E8
7	337	Fentanyl	997	0.13	-0.12	2.7E6
8	349	Alpha-hydroxymidazolam	799	0.15	-0.19	7.1E6
9	355	Midazolam	748	0.21	-0.12	4.8E5
10	406	Amitriptyline	993	0.16	-0.25	5.0E7
11	416	Trimipramine	989	0.08	-0.23	5.2E7
12	498	Penfluridol	935	-0.29	0.20	7.4E4
13	533	D5-Diazepam	939	0.01	-0.21	2.5E7
14	635	Benzododecinium	975	0.05	-1.01	5.9E5

### HUG 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 3	Station amaZon 2
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 3_1584_RE3_01_2031.D	Acquisition Date 6/18/2012 1:30:22 PM
Sample Description RV Se 3	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

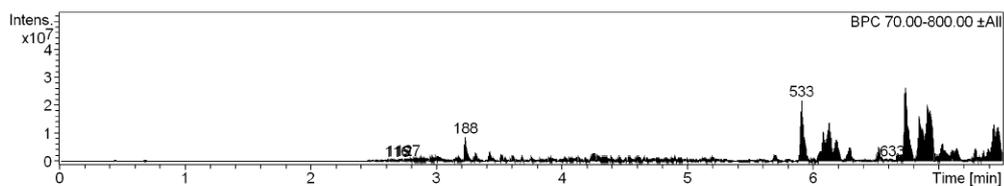
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	116	Isosorbidmononitrat	994	0.20	-0.21	5.8E5
2	122	Theobromine	855	0.11	-0.34	2.1E5
3	189	Caffeine	996	0.14	-0.33	9.1E6
4	236	Mirtazapine	999	0.11	-0.20	2.0E7
5	344	Nordoxepine	986	0.15	-0.28	4.5E7
6	354	Doxepin	909	0.11	-0.15	2.0E5
7	391	Duloxetine	974	0.10	-0.14	5.3E6
8	455	Flupentixol	807	-0.00	-0.01	3.8E5
9	466	N,N-Diethyl-m-toluamide	841	0.02	-0.09	1.1E5
10	527	D5-Diazepam	979	0.01	-0.18	2.5E7
11	625	Benzododecinium	981	0.00	-0.67	4.5E5

### HUG 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 4	Station amaZon 2
Submitter abderrahim karmime	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 4_1575_RD3_01_2023.D	Acquisition Date 6/18/2012 10:54:43 AM
Sample Description RV Se 4	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

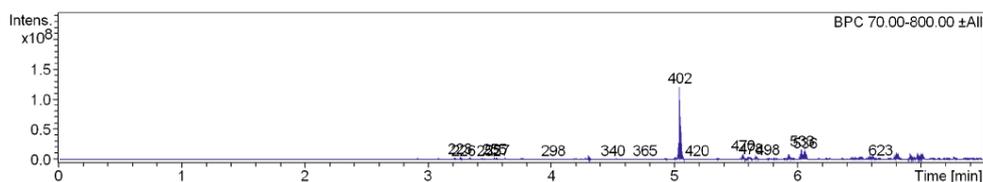
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	119	Isosorbidmononitrat	928	0.25	-0.24	5.8E5
2	116	Theobromine	854	0.10	-0.30	1.9E5
3	127	Mescaline	999	-0.09	-0.32	2.0E4
4	188	Caffeine	997	0.15	-0.35	8.7E6
5	533	D5-Diazepam	914	0.02	-0.20	2.3E7
6	633	Benzododecinium	995	0.03	-0.74	4.1E5

### HUG 2: Deckblatt ToxTyper Report Serum 4

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 1	Station amaZon Speed
Submitter George McLeod	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 1_162_RD7_01_273.D	Acquisition Date 7/11/2012 6:11:55 PM
Sample Description Ring Test Sample	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

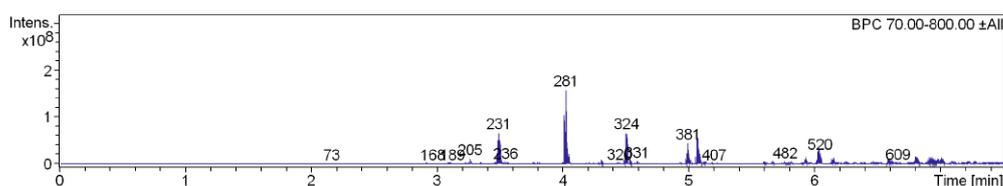
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	257	Nifenazone	1000	0.27	-0.08	2.0E5
2	223	Caffeine	993	0.17	-0.18	3.9E6
3	226	Pindolol	981	0.14	-0.12	6.6E5
4	252	Lidocaine	999	0.22	-0.15	1.5E5
5	255	Quinine	966	0.21	-0.05	2.5E6
6	298	Zolpidem	975	0.14	-0.08	4.1E5
7	340	Midazolam	857	0.14	0.01	1.9E5
8	365	EDDP	925	0.12	-0.11	3.3E5
9	402	Methadone	976	0.26	-0.07	1.3E8
10	420	Oxazepam	995	0.11	-0.06	4.5E5
11	478	Temazepam	965	0.11	-0.03	3.5E6
12	470	Nordazepam	976	0.18	-0.11	1.9E6
13	498	Terfenadine	920	0.08	0.04	2.2E6
14	533	D5-Diazepam	956	0.14	-0.09	2.0E7
15	536	Diazepam	969	0.13	-0.10	3.5E6
16	623	Benzododecinium	964	0.08	-1.03	1.3E6

### UK: Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 2	Station amaZon Speed
Submitter George McLeod	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 2_160_RD5_01_271.D	Acquisition Date 7/11/2012 5:46:23 PM
Sample Description Ring Test Sample	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

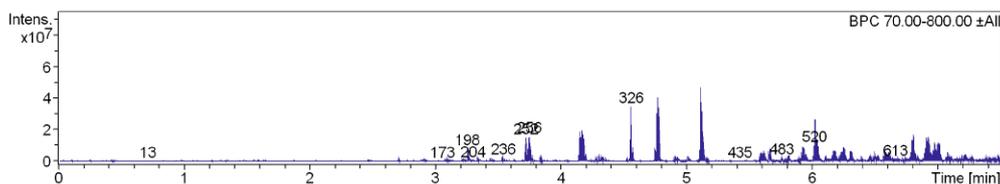
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	73	Oxymorphone	960	-0.22	0.02	1.0E5
2	168	Nifenazone	913	-0.32	-0.54	1.3E5
3	189	Timolol	731	-0.33	-0.06	2.0E5
4	205	Caffeine	991	0.18	-0.18	1.3E7
5	231	Lidocaine	986	0.21	-0.15	6.8E7
6	236	Quinine	955	0.21	-0.03	3.3E6
7	281	Zolpidem	999	0.14	-0.07	1.7E8
8	320	Fentanyl	987	0.17	-0.02	1.9E6
9	324	Midazolam	887	0.15	-0.07	1.9E7
10	331	Alpha-hydroxymidazolam	825	0.22	-0.01	1.7E6
11	381	Amitriptyline	980	0.19	-0.09	4.6E7
12	407	Fendiline	985	0.03	-0.03	8.6E4
13	482	Terfenadine	825	0.08	0.03	4.2E6
14	520	D5-Diazepam	946	0.15	-0.09	7.3E6
15	609	Benzododecinium	965	0.07	-1.07	1.3E6

### UK: Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 3	Station amaZon Speed
Submitter George McLeod	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 3_158_RD3_01_269.D	Acquisition Date 7/11/2012 5:20:50 PM
Sample Description Ring Test Sample	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

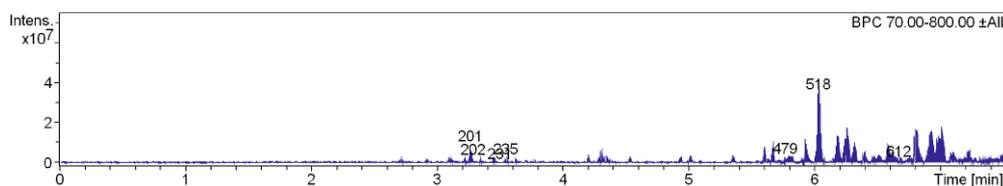
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	13	D3-Ecgoninemethylester	997	0.06	-0.16	5.0E4
2	173	Nifenazone	938	-0.23	-0.02	9.4E4
3	198	Caffeine	994	0.17	-0.18	8.7E6
4	204	Pindolol	932	0.15	-0.12	4.6E5
5	236	Quinine	958	0.21	-0.04	2.5E6
6	252	Metoprolol	983	0.13	-0.10	1.6E7
7	256	Mirtazapine	995	0.21	-0.11	2.0E7
8	326	Nordoxepine	985	0.19	-0.13	3.6E7
9	435	Flupentixol	827	0.05	-0.02	1.6E5
10	483	Terfenadine	837	0.07	0.01	2.5E6
11	520	D5-Diazepam	960	0.12	0.40	1.2E7
12	613	Benzododecinium	977	0.07	-1.06	1.5E6

UK: Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID RV Se 4	Station amaZon Speed
Submitter George McLeod	Supervisor System Administrator
Analysis Name RV Se 4_156_RD1_01_267.D	Acquisition Date 7/11/2012 4:55:16 PM
Sample Description Ring Test Sample	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

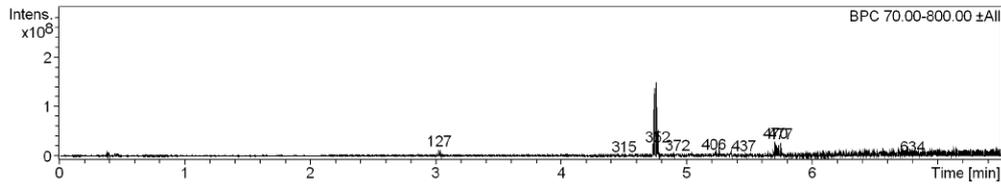
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	231	Nifenazone	1000	0.21	-0.01	1.1E5
2	201	Caffeine	995	0.17	-0.13	9.7E6
3	202	Pindolol	978	0.13	-0.11	6.6E5
4	235	Quinine	941	0.21	-0.04	2.4E6
5	479	Terfenadine	865	0.08	-0.00	3.0E6
6	518	D5-Diazepam	974	0.14	-0.08	6.3E6
7	612	Benzododecinium	983	0.07	-1.08	1.5E6

UK: Deckblatt ToxTyper Report Serum 4

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID 120724_RV SE 1	Station ZINI
Submitter Evelyn Jaeger	Supervisor System Administrator
Analysis Name 120724_RV SE 1_667_BE1_01_10665.d	Acquisition Date 7/24/2012 11:48:05
Sample Description	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

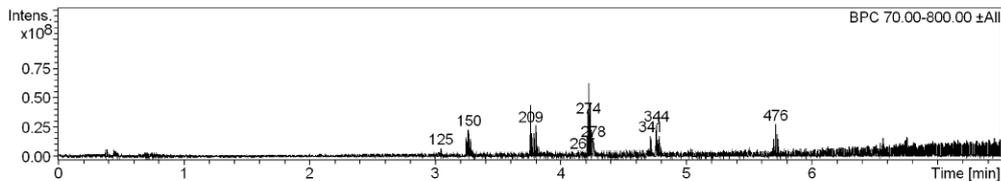
No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	127	Caffeine	994	-0.06	-0.17	1.4E7
2	315	EDDP	995	-0.14	-0.09	1.2E6
3	352	Methadone	815	-0.01	0.36	3.2E7
4	372	Oxazepam	993	-0.15	-0.07	4.7E6
5	406	Nordazepam	805	-0.16	0.03	6.5E6
6	437	Temazepam	984	-0.06	-0.01	4.8E5
7	470	D5-Diazepam	934	-0.19	-0.03	2.8E7
8	477	Diazepam	953	-0.18	-0.07	3.1E7
9	634	Lonazolac	915	0.30	-0.66	1.3E5

**IKC:** Deckblatt ToxTyper Report Serum 1

## ToxTyper Analysis Report

Sample-ID 120724_RV SE 2	Station ZINI
Submitter Evelyn Jaeger	Supervisor System Administrator
Analysis Name 120724_RV SE 2_665_BD7_01_10663.d	Acquisition Date 7/24/2012 11:22:30
Sample Description	

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	125	Caffeine	996	-0.04	-0.18	7.2E6
2	150	Lidocaine	999	-0.01	-0.07	2.4E7
3	209	Zolpidem	996	-0.12	0.03	3.9E7
4	274	Midazolam	967	-0.14	0.00	4.4E7
5	267	Fentanyl	995	-0.11	-0.03	3.9E6
6	278	Alpha-hydroxymidazolam	953	-0.11	-0.05	1.4E7
7	341	Amitriptyline	989	-0.09	0.02	3.5E7
8	344	Trimipramine	900	-0.20	0.00	4.1E7
9	476	D5-Diazepam	982	-0.18	-0.07	5.5E6

**IKC:** Deckblatt ToxTyper Report Serum 2

---

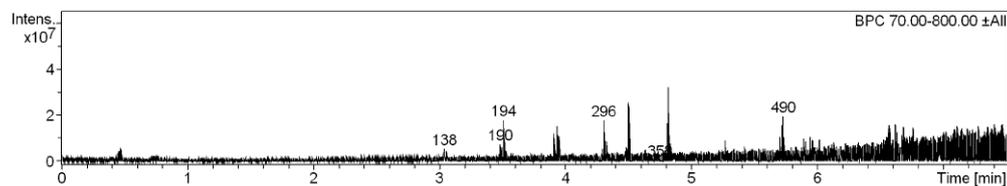
## ToxTyper Analysis Report

---

Sample-ID 120724_RV SE 3	Station ZINI
Submitter Evelyn Jaeger	Supervisor System Administrator
Analysis Name 120724_RV SE 3_663_BD5_01_10661.d	Acquisition Date 7/24/2012 10:56:53
Sample Description	

---

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	138	Caffeine	996	-0.05	-0.17	5.6E6
2	190	Mirtazapine	996	-0.06	-0.07	8.3E6
3	194	Metoprolol	960	-0.08	-0.06	2.3E7
4	296	Nordoxepine	980	-0.06	-0.09	2.0E7
5	358	Methadone	720	-0.03	-0.11	1.7E5
6	490	D5-Diazepam	976	-0.17	-0.08	3.7E6

---

**IKC:** Deckblatt ToxTyper Report Serum 3

---

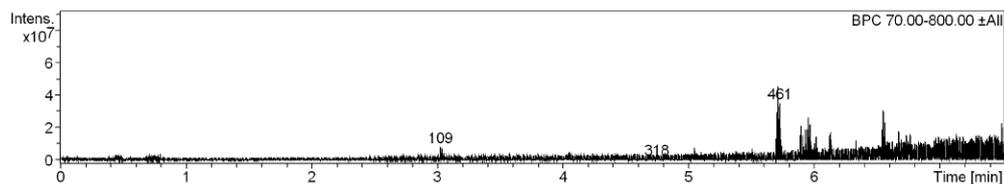
## ToxTyper Analysis Report

---

Sample-ID 120724_RV SE 4	Station ZINI
Submitter Evelyn Jaeger	Supervisor System Administrator
Analysis Name 120724_RV SE 4_661_BD3_01_10659.d	Acquisition Date 7/24/2012 10:31:16
Sample Description	

---

### Base Peak Chromatogram



### Library Search Results

No.	cmp #	Cmp Name	Purity'	d RT [min]	d m/z [Da]	Intensity
1	109	Caffeine	988	-0.06	-0.16	9.1E6
2	318	Methadone	913	-0.04	-0.06	2.0E5
3	461	D5-Diazepam	978	-0.17	-0.07	9.8E6

---

**IKC:** Deckblatt ToxTyper Report Serum 4





























**A-9: Toxytper-Ergebnisse der dotierten Glaskörperproben (Mix 1 - Mix 6)**

Doppelbestimmung (n.n.: nicht nachgewiesen; pos: korrekt identifiziert)

Mix 1	Cut-Off TOF [ng/ml] <sup>[78]</sup>	5,0 ng/ml	5,0 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml
Venlafaxin	7	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Phenazon	7,5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Propranolol	8	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Tramadol	8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	pos	pos
Carbamazepin	9	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Buprenorphin	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Cocain	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Diazepam	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Melperon	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Methadon	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Metoprolol	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Mirtazapin	10	n.n.	n.n.	pos	pos	pos	pos
Zolpidem	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Mix 2	Cut-Off TOF [ng/ml] <sup>[78]</sup>	10 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	40 ng/ml	40 ng/ml
Bisoprolol	15	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Clonidin	15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Codein	15	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Mianserin	15	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Moclobemid	15	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Phencyclidin	15	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Sulpirid	15	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Acebutolol	20	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Amitriptylin	20	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Fentanyl	20	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Flunitrazepam	20	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Methamphetamin	20	n.n.	pos	pos	pos	pos	pos
Trimipramin	20	n.n.	pos	pos	pos	pos	pos
Warfarin	20	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Mix 3	Cut-Off TOF [ng/ml] <sup>[78]</sup>	12,5 ng/ml	12,5 ng/ml	25 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml
Midazolam	25	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Morphin	25	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Oxycodon	25	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Diltiazem	30	pos	pos	pos	pos	pos	pos
MDE	30	pos	pos	pos	pos	pos	pos
MDMA	30	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Nortriptylin	30	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Clozapin	35	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Atenolol	40	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6-MAM	40	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Mix 4	Cut-Off TOF [ng/ml] <sup>[78]</sup>	25 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
Amphetamin	50	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Clomipramin	50	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Fluoxetin	50	pos	pos	n.n.	pos	pos	pos
Fluoxamin	50	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Olanzapin	50	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	pos	pos
Risperidon	50	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Sotalol	60	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Mix 5	Cut-Off TOF [ng/ml] <sup>[78]</sup>	50 ng/ml	50 ng/ml	75 ng/ml	75 ng/ml	150 ng/ml	150 ng/ml
Paroxetin	70	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Zopiclon	70	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Verapamil	80	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Carvediolol	90	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Chloroquin	100	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Citalopram	130	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Doxepin	150	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Mix 6	Cut-Off TOF [ng/ml] <sup>[78]</sup>	150 ng/ml	150 ng/ml	200 ng/ml	200 ng/ml	300 ng/ml	300 ng/ml
Dixyrzin	200	pos	pos	pos	pos	pos	pos
BE	250	pos	pos	pos	pos	pos	pos
LSD	250	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Phenytoin	250	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Sildenafil	350	pos	pos	pos	pos	pos	n.n.
Amlodipine	500	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

---

## Lebenslauf

Die Seite 271 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.