

**Neue Methodenkombination aus dynamischer
Festphasenextraktion, Gaschromatographie und
Massenspektrometrie für den Einsatz in der
forensisch-toxikologischen Haaranalytik**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dirk Lachenmeier

aus

Karlsruhe

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. B. Madea
2. Referent: Prof. Dr. K.-J. Steffens

Tag der Promotion: 20.5.2003

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methodenkombination aus dynamischer Festphasenextraktion (Headspace solid-phase dynamic extraction, HS-SPDE), Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS) oder Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) vorgestellt und ihre Leistungsfähigkeit für die forensisch-toxikologische Untersuchung von Betäubungsmitteln in Haarproben getestet. Mittels HS-SPDE erfolgt die Extraktion der Analyten sowie eine Aufkonzentrierung, Derivatisierung und die nachfolgende Injektion in ein GC/MS- oder GC/MS/MS-System für den selektiven und sensitiven Nachweis. Alle Einzelschritte, außer Waschen und Zerkleinern der Haarproben, d.h. auch der Probenaufschluß werden ohne manuelle Intervention auf einem Autosampler-Roboter ausgeführt.

HS-SPDE ist eine von der Festphasenmikroextraktion (Headspace solid-phase microextraction, HS-SPME) abgeleitete lösungsmittelfreie Extraktionstechnik. Der Headspace über der Probelösung wird mittels einer Spritze aktiv durch eine von innen mit Sorbens beschichtete Kapillare gespült (dynamische Extraktion). Die Desorption erfolgt durch Einführung der Kapillare in den heißen Injektor des GC-Systems.

Die HS-SPDE/GC/MS-Methode wurde an der Analyse von Methadon mit Hauptmetabolit, sowie den Trimethylsilylderivaten von Cannabinoiden und den Trifluoracetylderivaten von Amphetaminen und Designerdrogen erprobt. Mit diesen Substanzklassen wird der Bereich der halbflüchtigen (Amphetamine) bis schwerflüchtigen (Cannabinoide) Substanzen abgedeckt, für den eine Headspace-Mikroextraktion besonders interessant ist, weil diese Substanzen mit konventionellen Headspace-Methoden nicht erfaßt werden können.

Mit GC/MS wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,03 und 0,19 ng/mg Haarmatrix und Präzisionen zwischen 1,4 und 14,6 % erzielt. Linearität wurde von 0,1-20 ng/mg mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,995 und 0,999 nachgewiesen.

Darüberhinaus konnte mit Tandem-Massenspektrometrie die Empfindlichkeit gegenüber herkömmlicher Massenspektrometrie um Faktoren von 8 bis 35 je nach Substanz erhöht werden. Signifikant niedrigere Nachweisgrenzen zwischen 0,006 und 0,052 ng/mg und verbesserte Präzisionen zwischen 0,4 und 7,8 % wurden erzielt.

Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch die Analyse authentischer Haarproben von Drogenkonsumenten unter Beweis gestellt und mit Probenmaterial aus externen Ringversuchen abgesichert. Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, daß die HS-SPDE-Technik eine empfindliche und robuste Alternative für die Analyse komplexer Matrices darstellt. Erstmals wurden mit dieser Technik Routineverfahren entwickelt und validiert. Ein besonderer Vorzug des vollständig automatisierten SPDE-Verfahrens ist die Zeitersparnis im Vergleich zu traditionellen Verfahren der Probenvorbereitung wie Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Madea, Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, für wohlwollende Begleitung und wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens, Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn, danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitbetreuungsverhältnisses.

Herrn Dr. F. Mußhoff, Toxikologische Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin, bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung der Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. L. Kröner, Toxikologische Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin, für die Initiierung der Kooperation mit der Firma Chromtech und die Unterstützung mit Rat und Tat, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau H. Junker, bis Juli 2001 Doktorandin am Institut für Rechtsmedizin, danke ich für die Einarbeitung in das Gebiet der Festphasenmikroextraktion sowie die hervorragenden Vorarbeiten, auf denen meine Arbeit aufbaut.

Für die freundliche Integration in die Abteilung, vielseitige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Toxikologie am Bonner Institut für Rechtsmedizin danken.

Weiterhin danke ich der Firma Chromtech (Idstein, Deutschland) für technische und finanzielle Unterstützung. Herrn Dr. van den Berg und Herrn Hardi von Chromtech danke ich für die Mitarbeit bei den Workshops der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) 2001 und der Society of Hair Testing (SOHT) 2002. Herrn B. Schilling von BGB Analytik (Anwil, Schweiz) bin ich für seine Informationen zur SPDE-Technik sehr dankbar.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und Großeltern danken, die durch jahrelange Unterstützung Studium und Promotion erst möglich gemacht haben. Meiner Mutter danke ich speziell für das geduldige Korrigieren meist fremdsprachiger Texte, meinem Vater für die fachliche Beratung und Diskussion der physikochemischen Grundlagen meiner Arbeit, sowie die Anfertigung der Haarabbildungen für Kapitel 2.5, meiner Schwester Katrin für die Lenkung meines Interesses auf die Rechtsmedizin.

Publikationen

D.W. Lachenmeier, L. Kroener, F. Musshoff, B. Madea, Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 472-478.

F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, B. Madea, Methadone substitution: medicolegal problems in Germany. *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 118-124.

F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 32-38.

F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. *J. Chromatogr. A.* 958 (2002) 231-238.

T. van den Berg, M. Bergmann, L. Kroener, D.W. Lachenmeier, F. Musshoff, Haarige Drogenanalytik. *Laborpraxis.* 26 (2002) 70-73.

F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 359-364.

F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 554-560.

Inhalt

Zusammenfassung	I
Danksagung	II
Publikationen	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Stand der Technik und Grundlagen	3
2.1 SPDE - Technik	3
2.2 SPDE - Prinzip und Aufbau	5
2.3 SPDE - Theoretische Grundlagen	8
2.4 Einflüsse von Parametern auf die Ausbeute der SPDE-Extraktion	9
2.4.1 Auswahl der stationären Phase	9
2.4.2 Aufschluß der Haarproben	10
2.4.3 Temperaturen	11
2.4.5 Extraktionsparameter	11
2.4.6 Desorptionsparameter	12
2.4.7 Agitation	13
2.4.8 Derivatisierung	14
2.5 Grundlagen der Haaranalytik	17
2.5.1 Aufbau der Haare	17
2.5.2 Einbau von Drogen in Haare	19
2.6 Grundlagen GC und MS und MS/MS	20
2.6.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	20
2.6.2 MS/MS-Kopplung	21
2.6.3 Meßmodi	21
3 Experimenteller Teil	24
3.1 SPDE-Geräte	24
3.2 Geräte der Probenvorbereitung	26
3.3 Chemikalien	27
3.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	27
3.5 Haarproben und Asservierung	30
3.6 Probenvorbereitung	30
3.7 SPDE-Extraktion und Derivatisierung	31
3.8 Methodenoptimierung	32
3.9 Kalibration und Validierung	34
3.10 SPME-Vergleichsmethoden	34
3.11 Auswertung und Statistik	35
4 Ergebnisse und Diskussion	36
4.1 Untersuchungen der SPDE-Prototypen	36
4.2 Einfluß physikochemischer Eigenschaften auf die SPDE-Extraktion	40
4.3 Agitationstechniken und Extraktionsausbeute	43
4.4 Extraktion	45
4.5 Derivatisierung	49
4.6 Desorption	50
4.7 Validierungsergebnisse mit konventioneller GC/MS	55
4.8 MS-MS	58
4.9 Validierungsergebnisse MS/MS	60
4.10 Vergleich GC/MS-SIM mit GC/MS/MS-MRM	61
4.11 Nachweis der Anwendbarkeit zur Bestimmung authentischer Haarproben	61
4.12 Methodenvergleich mit SPME	66
4.13 Möglichkeiten und Grenzen der HS-SPDE-Technik	68
6 Ausblick	70
7 Literaturverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

A	Amphetamin
AK	Aktivkohle
b	Achsenabschnitt der Regressionsgeraden
BDB	3,4-Methylendioxyphenyl-2-butanamin
BG	Bestimmungsgrenze
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
EDDP	2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin
GC	Gaschromatographie
HS	Headspace (Dampfraum)
ID	Innendurchmesser
ISTD	Interner Standard
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
m	Steigung der Regressionsgeraden
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MA	Methamphetamin
MBDB	N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoracetamid)
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylendioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
NG	Nachweisgrenze
p	Wahrscheinlichkeit statistischer Tests
PDMS	Polydimethylsiloxan
Q	Quadrupol
R	Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden
SIM	Selected ion monitoring (Selektive Ionendetektion)
SPDE	Solid-phase dynamic extraction (dynamische Festphasenextraktion)
SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SPME	Solid-phase microextraction (Festphasenmikroextraktion)
TFA	Trifluoracetyl-Derivat
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TIC	Total ion current, Totalionenstrom-Chromatogramm
TMS	Trimethylsilyl-Derivat

1 Einleitung

Während des letzten Jahrzehnts hat sich die Analyse von Haarproben auf Drogen als wichtige Ergänzung zu Blut- und Urinuntersuchungen etabliert [1]. Haare stellen einen Langzeitspeicher für die Einlagerung von Betäubungsmittelmolekülen beziehungsweise Metaboliten dieser Verbindungen dar. Dadurch lassen sich in Abhängigkeit von der Länge des untersuchten Haarschafts noch Zeiträume erfassen, die durch Urin- und Blutproben nicht mehr kontrollierbar sind. Zudem können qualitative Aussagen zu Konsumgewohnheiten getroffen werden. Die Haaranalytik ist das bisher einzige Verfahren, das Aussagen zum Konsumverhalten erlaubt und für die Rechtsprechung von großem Interesse ist, der damit eine Kontrollmöglichkeit für die Zuverlässigkeit von Zeugenaussagen an die Hand gegeben wird [2].

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) ist derzeit die Methode der Wahl für Analysen von Drogen in Haarproben [3-6]. Die meisten publizierten Methoden beruhen auf Quadrupol-Massenspektrometrie im Selected Ion Monitoring (SIM) Modus [7-17]. Seit einigen Jahren werden zunehmend die empfindlicheren Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) mit Triple-Quadrupol [18-20] oder Ion-Trap Technik [21] in forensisch-toxikologischen Laboratorien für die Haaranalyse eingesetzt.

Während in der Vergangenheit eine deutliche Leistungssteigerung der instrumentellen Analytik erreicht wurde, basieren die Methoden zur Probenvorbereitung und Probenaufreinigung der Haare noch überwiegend auf traditionellen Verfahren wie Flüssig-Flüssig-Extraktion [8-14, 21] oder Festphasenextraktion (SPE) [15-17, 20]. Diese Methoden sind arbeitsintensiv und zeitaufwendig und erfordern große Mengen von Probenmaterial und Lösungsmitteln. Zur Automatisierung sind Zusatzgeräte erforderlich.

Eine Alternative zu diesen etablierten Methoden stellen Headspace-Festphasenmikroextraktionstechniken (headspace solid-phase microextraction, HS-SPME) dar, die sich seit ihrer Einführung vor 10 Jahren zuerst im Bereich der Wasseranalytik und danach auch im Bereich der forensisch-toxikologischen Analytik etablieren konnten. Seit 1998 wurden erste Ergebnisse der Anwendung auf Haaranalysen publiziert [22].

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals eine neu entwickelte Variante dieser Headspace-Festphasenmikroextraktionstechniken, die dynamische Festphasenextraktion (solid-phase dynamic extraction, SPDE), vorgestellt und ihre Leistungsfähigkeit bei der Bestimmung von Betäubungsmitteln in Haaren gezeigt.

Aufbauend auf den ausführlich erläuterten theoretischen Grundlagen der eingesetzten Untersuchungsmethoden und Meßtechniken werden die Methodenentwicklung und Anwendung der HS-SPDE-Technik auf zwei Gruppen von Analyten vorgestellt.

Zur Erprobung der Analysentechnik wurden Amphetamine und Amphetaminderivate (Designerdrogen, Ecstasy), Methadon (Heroinsubstitutionsmedikament) und dessen Metabolit 2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP) und die Cannabinoide Cannabidiol (CBD), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabinol (CBN) (Inhaltsstoffe von Haschisch und Marihuana) ausgewählt. In den letzten Jahren war ein starker Anstieg des Konsums von Amphetaminderivaten und Cannabis zu beobachten [23], die Zahl methadonsubstituierter Patienten ist erheblich gewachsen [24]. Der Nachweis dieser Substanzklassen in Haaren bei klinischen und forensischen Fragestellungen, sowie Fahrtauglichkeitsprüfungen ist daher zunehmend wichtig geworden.

Die Ergebnisse der Messungen auf einem GC/MS und einem Triple-Quadrupol GC/MS/MS-System wurden verglichen. Der experimentelle Teil dieser Arbeit schließt mit der Anwendung der entwickelten HS-SPDE-Methoden auf authentische Haarproben von Betäubungsmittel-abhängigen.

2 Stand der Technik und Grundlagen

2.1 SPDE - Technik

Die dynamische Festphasenextraktion (Solid-phase dynamic extraction, SPDE) ist eine Weiterentwicklung der Festphasenmikroextraktion (solid-phase microextraction, SPME), die 1990 von Pawliszyn und Mitarbeitern entwickelt wurde [25, 26].

SPME integriert Probenahme, Extraktion, Konzentration und Probenaufgabe in einem einzigen Verfahren mittels einer nur 1 cm langen Glasfaser, die auf der Oberfläche mit einem Sorbens als stationäre Phase überzogen ist. Durch Exposition der SPME-Faser in der Probelösung oder im Headspace über der Probe werden die Analyten im Sorbens absorbiert und angereichert, die Desorption erfolgt thermisch im Injektor des Gaschromatographen. Einige Applikationen für SPME/GC/MS sind in den letzten Jahren z.T. zeitgleich zu den hier vorgestellten Untersuchungen vorgestellt worden [27-32], darunter die Analyse von Amphetaminen und deren Methylenedioxyderivaten [22, 33-35], Cannabinoiden [36, 37], sowie Methadon und dessen Metabolit EDDP [38, 39] in Haaren. SPME besitzt für diese Applikationen große Vorteile gegenüber herkömmlichen Extraktionsmethoden, wie Einfachheit, Schnelligkeit und geringen Lösungsmittelverbrauch. Nachteile liegen jedoch in der niedrigen Kapazität und der Zerbrechlichkeit der im Handel erhältlichen Glasfasern [40] mit der nach dem Ausfahren aus der Spritzennadel ungeschützten stationären Phase auf der Oberfläche der Glasfaser.

Mehrere Arbeitsgruppen versuchten, die Nachteile der SPME zu überwinden, indem die stationäre Phase auf die Innenseite einer Nadel oder Kapillaren aufgebracht wird:

- 1997 wurde eine „inside needle capillary adsorption trap“ (INCAT) Technik von Gesser et al. entwickelt [41]. Bei dieser Technik wird entweder ein Stück GC-Säule in eine hohle Nadel eingebracht oder die Nadel von innen direkt mit Aktivkohle (AK) beschichtet. Die Analyse komplexer Mischungen flüchtiger organischer Verbindungen [42], sowie Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol [43] wurde beschrieben.
- Ein SPME-LC System, das als „In-Tube SPME“ bezeichnet wird, wurde 1997 durch Eisert und Pawliszyn [40] entwickelt. In-Tube SPME verwendet eine GC Kapillarsäule als Extraktionsmedium. Einige Anwendungen wurden beschrieben [40, 44-60].

- Die Besonderheit der 2002 von Berezkin et al. [61] zur Analyse von aromatischen Kohlenwasserstoffen vorgeschlagenen „in-needle microtrap“ Technik besteht darin, daß nicht die Innenseite einer Nadel beschichtet, sondern die Kapillare mit einem Sorbens gefüllt wird (entsprechend einer gepackten GC-Säule).
- 1996 ließ sich Murphy von Agilent Technologies (vorm. Hewlett-Packard Co., Palo Alto, USA) eine vereinfachte Methode der Festphasenextraktion patentieren [62]. Die Analyten werden aus der Probe durch Einsaugen in eine Spritze extrahiert, bei der die innere Oberfläche der Kanüle oder Nadel zumindest teilweise mit einer stationären Phase beschichtet ist.

Basierend auf diesem Patent, wurde diese Technik von Chromtech als Vertriebspartner von Agilent Technologies zur Marktreife weiterentwickelt und an den universellen Autosampler CombiPAL von CTC angepaßt. In Anlehnung an SPME wurde die Technik SPDE (Solid-phase dynamic extraction, dynamische Festphasenextraktion) genannt. Die Probe wird mehrmals durch eine beschichtete Kanüle gepumpt. Dieser Prozeß wird als „dynamic extraction“ bezeichnet. In Tabelle 1 sind SPME und SPDE vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 1. Vergleich von SPME und SPDE.

	SPME	SPDE
Aufbau	Zerbrechliche Glasfaser mit ungeschützter Beschichtung	Stabile Edelstahl-Nadel
Prinzip	Faser mit Außenbeschichtung	Hohl-Nadel mit innerer Beschichtung
Beschichtung	100 µm PDMS (1 cm)	50 µm PDMS (8 cm)
Kapazität (Volumen des Sorbens)	0.94 mm ³	5.99 mm ³

2.2 SPDE - Prinzip und Aufbau

SPDE besteht aus Edelstahl-Kapillaren, die von innen mit einem Film aus 50 μm Polydimethylsiloxan (PDMS) als Sorbens beschichtet sind und an einer gasdichten Spritze (Headspace (HS)-Spritze) angebracht werden. Schemata der SPDE- und SPME-Technik sind in Abbildung 1 gegenübergestellt. Der Querschnitt durch eine SPDE Kapillare ist in Abbildung 2 dargestellt. Weiterführende Informationen über die SPDE-Geräte enthält Abschnitt 3.1.

Der Headspace über der Probe wird mittels des Spritzenkolbens mehrfach durch die mit Sorbens beschichtete Kapillare gezogen, um eine möglichst große Anreicherung des Analyten im Sorbens (Gleichgewicht) zu erreichen.

Für die vollautomatische Durchführung der Analysen wird ein CTC CombiPAL Autosampler eingesetzt, der als Zubehör zu fast allen gängigen GC Systemen erhältlich ist. Der Autosampler bietet die Möglichkeit, die Proben im sog. Agitator zu schütteln und zu temperieren, als Option steht ein Magnetrührer zur Verfügung (Abbildung 3). Für die Desorption der Analyten mit Stickstoff wird eine sog. SPDE-Gasstation eingesetzt, ein injektorähnliches Gerät, aus dem mit der SPDE-Spritze Stickstoff aufgezogen werden kann. Dieser Autosampler ist neben SPDE auch für Flüssig-, SPME- und Headspace-Injektionen geeignet.

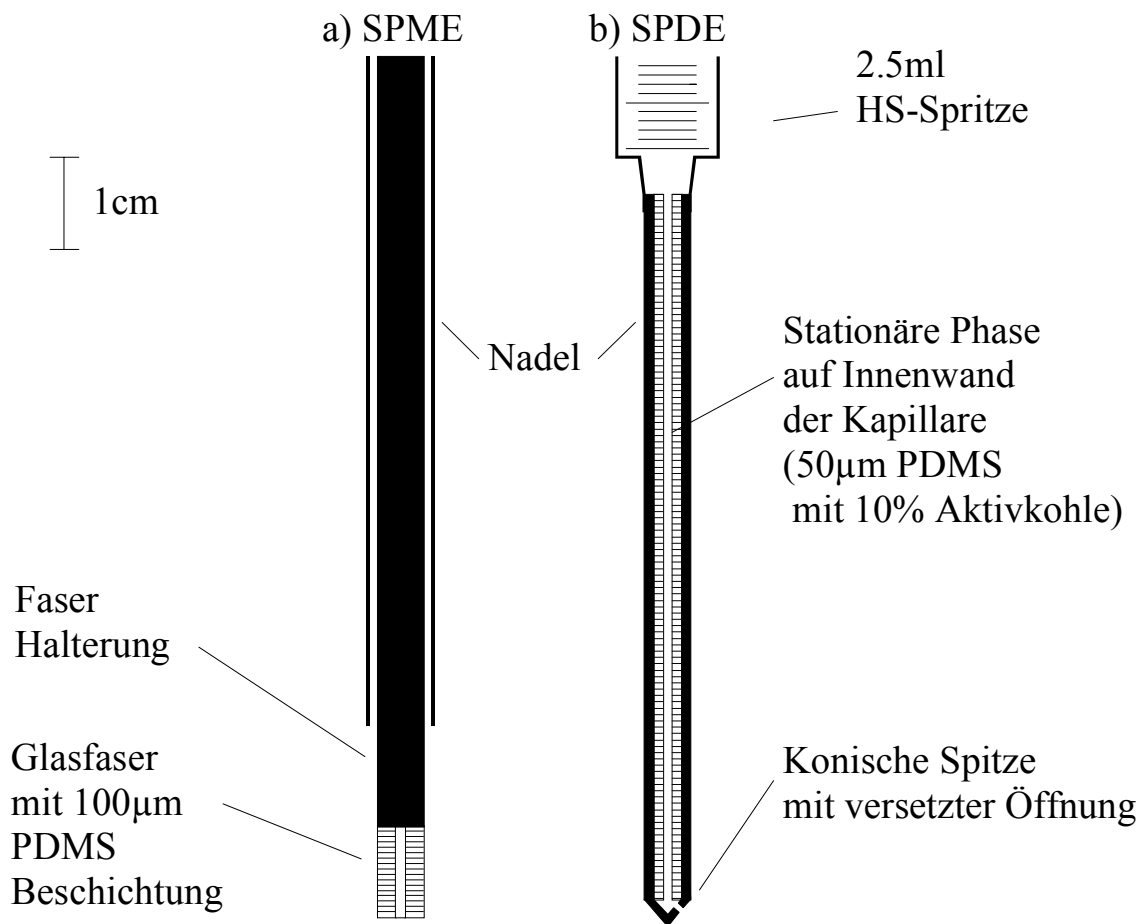


Abbildung 1. Schematischer Vergleich von SPME- und SPDE-Geräten.

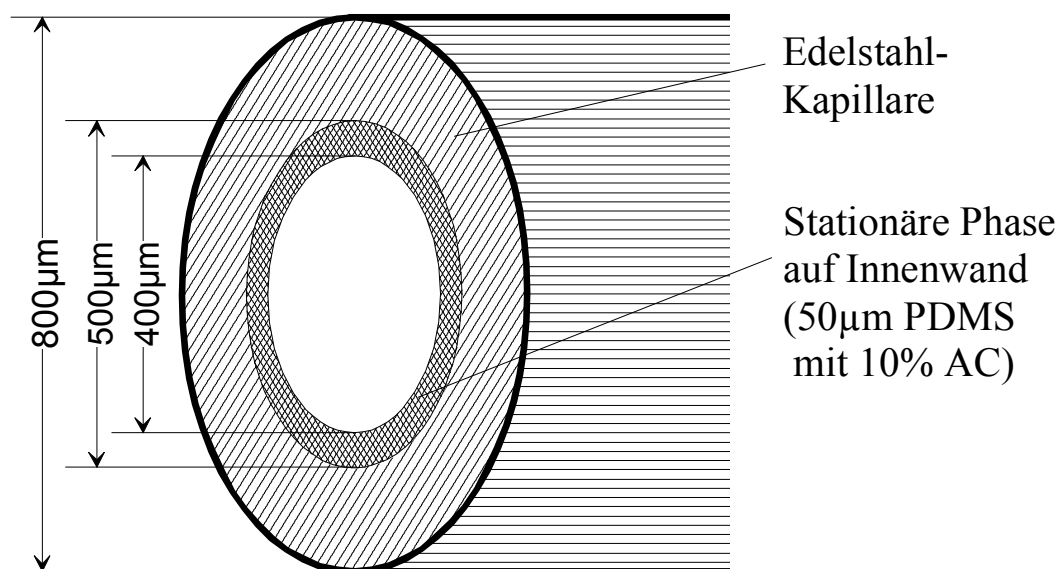


Abbildung 2. Schematische Darstellung des Querschnitts durch die SPDE-Kapillare.



Abbildung 3. CTC CombiPAL Autosampler mit Agitator und SPDE-Gasstation (A), sowie mit zusätzlichem Magnetrührer (B).

2.3 SPDE - Theoretische Grundlagen

Das Prinzip der Extraktion mit HS-SPDE entspricht dem der HS-SPME und basiert auf einem 3-Phasen-Gleichgewicht zwischen wässriger Probenlösung, dem Headspace darüber und der stationären Phase in der SPDE-Kapillare. Die bei der Headspace-Technik im Dreiphasengleichgewicht extrahierte Stoffmenge (n) ist von der Konzentration der Analyten in der wässrigen Lösung (c), den Volumina von stationärer Phase der SPDE-Kapillare (V_1), wässriger Lösung (V_2) sowie Headspace (V_3), und den Phasenübergangskoeffizienten K_1 (Headspace-stationäre Phase) und K_2 (Wasser-Headspace) in folgender Form abhängig [63, 64]:

$$n = \frac{cV_1V_2K_1K_2}{K_1K_2V_1 + K_2V_3 + V_2} \quad (1)$$

Da für die meisten Analyten K_2 sehr klein ist und das Volumen der wässrigen Lösung (V_2) sehr groß ist, kann Gleichung 1 vereinfacht werden zu:

$$n = cV_1K_1K_2 \quad (2)$$

Die absorbierte Stoffmenge hängt also wesentlich von der Konzentration der Analyten und dem Volumen der stationären Phase (V_1) ab, welches sich für SPDE wie folgt berechnen lässt [64]:

$$V_1 = \pi h (2rf - f^2) \quad (3)$$

Dabei ist h die Länge der SPDE-Kapillare, $2r$ der innere Durchmesser und f die Filmdicke der stationären Phase. Für die vorliegenden 8 cm langen Nadeln mit einem inneren Durchmesser von 0,4 mm und einem 50 μm PDMS-Film errechnet sich ein Volumen von 4,40 mm^3 .

Zum Vergleich lässt sich das Volumen einer SPME-Faser mit folgender Formel berechnen:

$$V_1 = \pi h (2rf + f^2) \quad (4)$$

Die 1 cm lange 100 μm PDMS Faser mit einem inneren Durchmesser von 0,2 mm hat danach ein Volumen von 0,94 mm^3 .

Theoretisch kann mit der SPDE-Technik eine um mehr als den Faktor 4 erhöhte Stoffmenge gegenüber SPME aus der Probelösung extrahiert werden.

Der Phasenübergangskoeffizient K_2 ist als Quotient der Gleichgewichtskonzentration zwischen Headspace (c_3) und wäßriger Lösung (c_2) definiert:

$$K_2 = \frac{c_3}{c_2} \quad (5)$$

Aufgrund der geringen Flüchtigkeit der in der wäßrigen Phase gelösten Analyten sind die K_2 -Werte relativ klein ($\ll 1$, [63]). Wie auch bei SPME und in-tube SPME ist das 3-Phasen-Gleichgewicht zugunsten der wäßrigen Lösung ausgeprägt, so daß abhängig von der Flüchtigkeit der Analyten absolute Extraktionsausbeuten im unteren Prozentbereich zu erwartet sind. Im Gegensatz zur passiven SPME-Extraktion ist SPDE ein aktiver Prozeß, wobei mit der Spritze der Headspace wiederholt durch die beschichtete Kapillare gezogen wird. Durch diesen dynamischen Prozeß wird das Gleichgewicht schneller erreicht. Die Gleichgewichtseinstellung wird durch Rühren der Probelösung während des Extraktionsvorgangs beschleunigt, weil der Stofftransport innerhalb der wäßrigen Phase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Für Analyten mit sehr niedriger Flüchtigkeit (z.B. Cannabinoide) ist das Rühren der Probelösung notwendig. Für eine Derivatisierung direkt auf der stationären Phase („On-coating Derivatisierung“) wird der Headspace über einem Derivatisierungsreagenz durch die Kapillare gepumpt. Anschließend werden die extrahierten Analyten thermisch mittels eines Stickstoffflusses im GC-Injektor von der Kapillare desorbiert. Die theoretischen Grundlagen und eine erste Anwendung von SPDE (Pestizide in Wasserproben) wurden von Lipinski [64] publiziert, die HS-SPDE Analyse flüchtiger Substanzen (t-Butylmethylether, Benzol, Toluol, o-Xylol, und Trimethylbenzol) wurde von Schilling vorgestellt [65].

2.4 Einflüsse von Parametern auf die Ausbeute der SPDE-Extraktion

2.4.1 Auswahl der stationären Phase

Die Auswahl des Sorbens, mit dem die Kapillare beschichtet ist, erfolgt anhand der Polarität und Flüchtigkeit der Analyten. In der Mehrzahl der Arbeiten zu SPME-Extraktionen von Drogen aus Haaren wurden 100%-PDMS-Fasern verwendet [22, 31, 33, 35-38, 66-68]. PDMS ist die universellste SPME-Beschichtung, sie ist mechanisch und chemisch sehr robust und für Temperaturen bis über 300 °C im GC-Injektor geeignet. Als unpolare, hochviskose Phase absorbiert sie unpolare Analyten in einem sehr großen linearen Bereich [69]. Für die

SPDE-Experimente wurde außer PDMS auch mit Aktivkohle dotiertes PDMS als stationäre Phase eingesetzt. Dieses zeigte in Vorversuchen die besten Extraktionsausbeuten und wurde deshalb für alle weiteren Versuche verwendet (siehe Abschnitt 4.4).

2.4.2 Aufschluß der Haarproben

In Blut- und Urinproben liegen die Analyten gelöst vor und können direkt extrahiert werden. Im Haar sind die Moleküle in einer festen Keratinmatrix eingeschlossen (siehe Abschnitt 2.5). Vor einer Headspace-Extraktion ist ein effizienter Aufschluß der Probenmatrix erforderlich, mit dem Ziel eine maximale Analytenkonzentration im Headspace zu erreichen. Die Keratinmatrix läßt sich chemisch (mit starken Säuren oder Basen) oder enzymatisch (mit proteinlösenden Enzymen) aufschließen. Alternativ können die Analyten mit organischen Lösungsmitteln aus der Matrix extrahiert werden [70].

Gleiches Extraktionsprinzip (3-Phasen-Gleichgewicht) und gleiche Sorbentien von SPME und SPDE erlauben, die für SPME-Methoden beschriebene Probenvorbereitung auf SPDE zu übertragen.

In zahlreichen Veröffentlichungen wurde die alkalische Hydrolyse als optimale Aufschlußmethode für den Nachweis organischer Substanzen aus Haaren mittels SPME beschrieben [22, 31, 33-37]. Für die vorliegende Arbeit wurde auf die von Musshoff et al. [35, 37] entwickelte Probenvorbereitung zurückgegriffen: nach Waschen der Haare mit Wasser, Petrolether und Dichlormethan werden diese mit Natronlauge aufgeschlossen. Es zeigte sich, daß aufgrund der unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Analyten keine simultane Bestimmung aller Substanzen möglich ist. Cannabinoide erfordern aufgrund der möglichen Phenolatbildung, die einen Übergang der Analyten in den Headspace verhindern würde, eine niedrigere Natriumhydroxid-Konzentration für den Aufschluß (1 mol/l), sowie einen Zusatz von Natriumcarbonat zur Ausnutzung des Aussalzeffektes [37]. Die basischen Amphetamine und Designerdrogen erfordern eine höhere Natriumhydroxid-Konzentration (10 mol/l) für optimale Ausbeute; durch Salzzusatz kann hier keine Verbesserung erzielt werden [35]. Andere Probenvorbereitungsparameter, die vom Extraktionsverfahren unabhängig sind, wie Hydrolysezeit und Rührgeschwindigkeiten, wurden ebenfalls den Arbeiten von Musshoff et al. [35, 37] entnommen und sind in Abschnitt 3.6 aufgeführt.

2.4.3 Temperaturen

Ebenso wie Agitator und Magnetrührer, deren Temperaturen sich wie - von SPME-Methoden bekannt - über den Autosampler computerkontrolliert einstellen lassen, läßt sich bei der SPDE auch der Spritzenkörper thermostatisieren: der Spritzenadapter, mit dem die SPDE-Spritze am Autosampler befestigt wird, ist beheizbar (Abbildung 4). Eine Kondensation der Analyten im Spritzenkörper wird hierdurch verhindert.

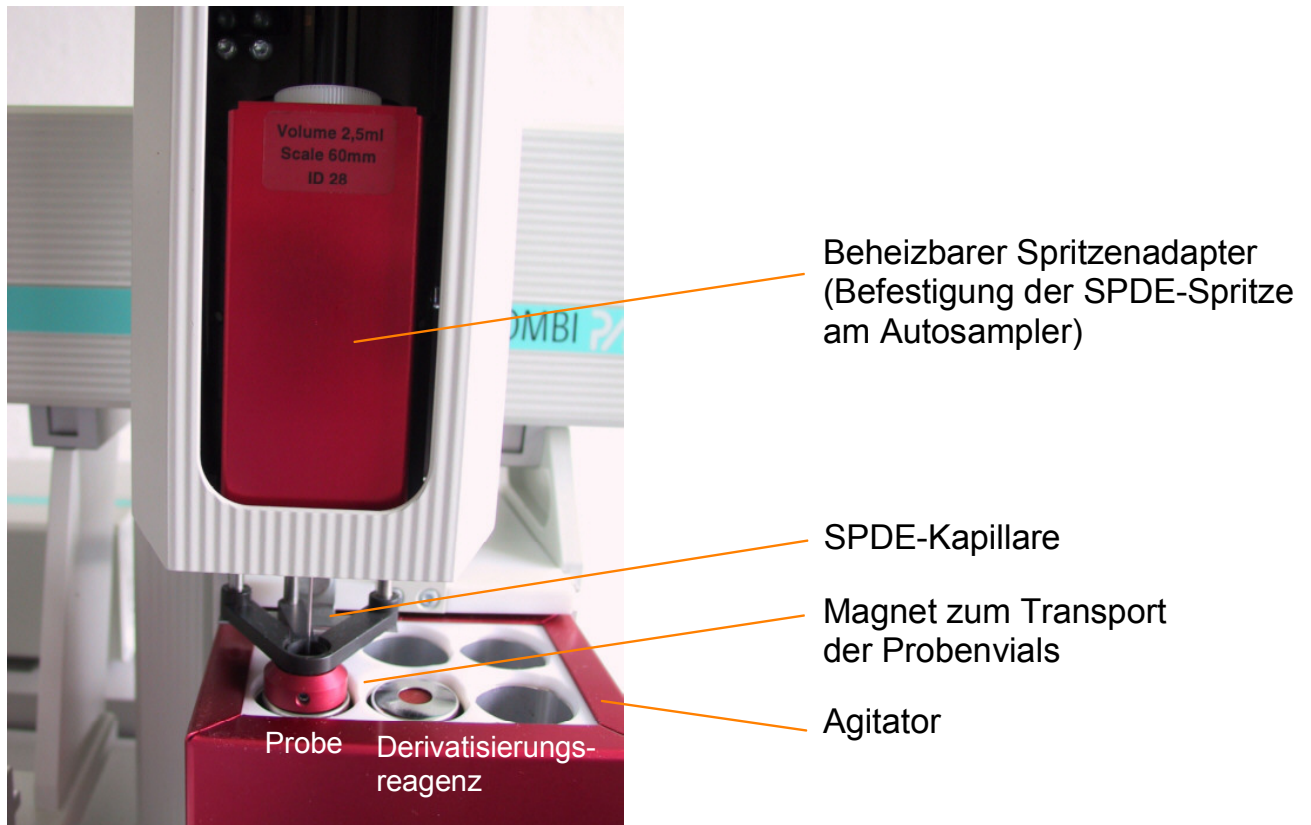


Abbildung 4. SPDE-Spritze in beheiztem Spritzenadapter beim Extraktionsvorgang.

2.4.5 Extraktionsparameter

Durch den dynamischen Extraktionsprozeß hängt die Gleichgewichtseinstellung nicht nur von der Extraktionszeit ab, wie dies bei der statischen SPME der Fall ist. Eine Vielzahl von Parametern läßt sich variieren und durch die Computersteuerung leicht optimieren.

Der Extraktionsprozeß hängt von einer Kombination folgender Parameter ab:

- Volumen (V), das bei jedem Zyklus durch die Kapillare gezogen wird (einstellbar zwischen 500 und 2500 µl)

- Volumenstrom ($\dot{V}$), mit dem der Headspace durch die Kapillare gepumpt wird (einstellbar zwischen 10 und 500 $\mu\text{l/sec}$)
- Anzahl der Zyklen (n), d.h. Bewegungen des Spritzenkolbens, mit denen der Headspace durch die Kapillare gesaugt und wieder zurückgepumpt wird

Aus der Kombination dieser Parameter errechnet sich dann die Extraktionszeit (t_E):

$$t_E = \frac{V \cdot 2 \cdot n}{\dot{V} \cdot 60} [\text{min}] \quad (6)$$

2.4.6 Desorptionsparameter

Standard Split-Splitless-Injektoren von Gaschromatographen sind mit großvolumigen Inlet-Linern ausgestattet, um Flüssiginjektionen zu ermöglichen, bei denen große Dampfvolumina entstehen. Liner mit geringerem Durchmesser, die für herkömmliche Headspace-Injektionen entwickelt wurden, sind auch für SPDE gut geeignet. Sie ermöglichen einen effizienten und schnellen Transport auf die GC-Säule.

Bei der Desorption lassen sich folgende Parameter über den Autosampler steuern:

- Stickstoffvolumen, das vor der Desorption aus der Gasstation aufgezogen wird (einstellbar zwischen 500 und 2500 μl)
- Equilibrierungszeit im heißen Injektor, nach der die Desorption durch den Stickstoffstrom durch Herunterdrücken des Spritzenkolbens gestartet wird (Predesorptionszeit)
- Volumenstrom ($\dot{V}$), mit dem der Stickstoff durch die Kapillare bewegt wird (einstellbar zwischen 10 und 500 $\mu\text{l/sec}$)

Für die Desorptionszeit t_D gilt:

$$t_D = \frac{V}{\dot{V} \cdot 60} [\text{min}] \quad (7)$$

Da die Desorption im Vergleich zu Flüssiginjektionen sehr lange dauert, muß der GC-Ofen während der Desorption isotherm gehalten werden. Die GC-Starttemperatur sollte zur

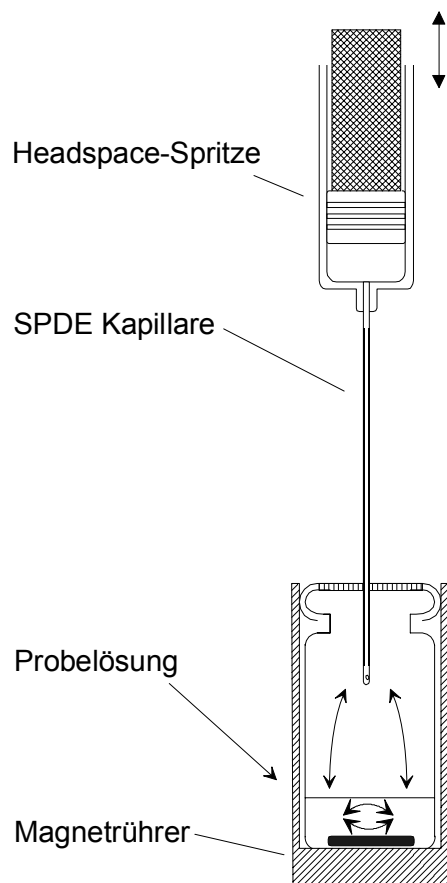
Fokussierung der Analyten niedriger gewählt werden als bei vergleichbaren Flüssiginjektionen.

2.4.7 Agitation

Der Übergang der Analyten von der wässrigen Lösung in den Headspace ist der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt bei Headspace-Mikroextraktionsverfahren. Die Diffusion im Headspace und die Absorption der Analyten auf die stationäre Phase erfolgt im Vergleich hierzu sehr schnell. Um den Massetransport zwischen der Probelösung, dem Headspace und der Faser zu erleichtern, ist in der Regel ein Schütteln oder Rühren erforderlich [69]. Der Standardagitator des CombiPAL Autosamplers schüttelt die Proben durch exzentrische Rotation des gesamten Gerätes, wobei eine in die Probe eingestochene Nadel ebenfalls durch die Drehbewegungen gebogen wird (Abbildung 5b). Für die relativ dünnen und elastischen SPME-Nadeln ist diese Art der Agitation möglich, verkürzt aber auch die Lebensdauer der Fasern durch die periodische mechanische Belastung [71, 72].

Bei den SPDE-Edelstahlkapillaren mit wesentlich größerem Durchmesser kann nach Herstellerangaben eine Agitation unter Verbiegen der Nadeln nicht durchgeführt werden, d.h. ein Schütteln der Proben während der Extraktion ist mit dem Standard-Agitator nicht möglich. Für flüchtige und halbflüchtige Analyten ist dies kein Problem, weil das Gleichgewicht zwischen wässriger und gasförmiger Phase schon zu Beginn des Extraktionsprozesses vorliegt, die meisten Analyten befinden sich im Headspace [69]. Durch den Pump-Vorgang während der Extraktion wird zudem eine Durchmischung der Lösung durch den Headspacestrom erreicht. Falls dies bei schwerer flüchtigen Analyten nicht ausreichen sollte, kann auf einen Magnetrührer (sog. „Single Magnet Mixer“) als Zusatzgerät für den Autosampler zurückgegriffen werden, mit dem die Probe mittels eines Magnetrührfisches durchmischt wird. Ein Verbiegen der Kapillare wird so verhindert (Abbildung 5a) [71, 72].

a) Agitation der Probelösung
mittels Magnetrührer
(SPDE)



b) Agitation der Probelösung
durch exzentrische Drehbewegung
des Agitators (SPME)

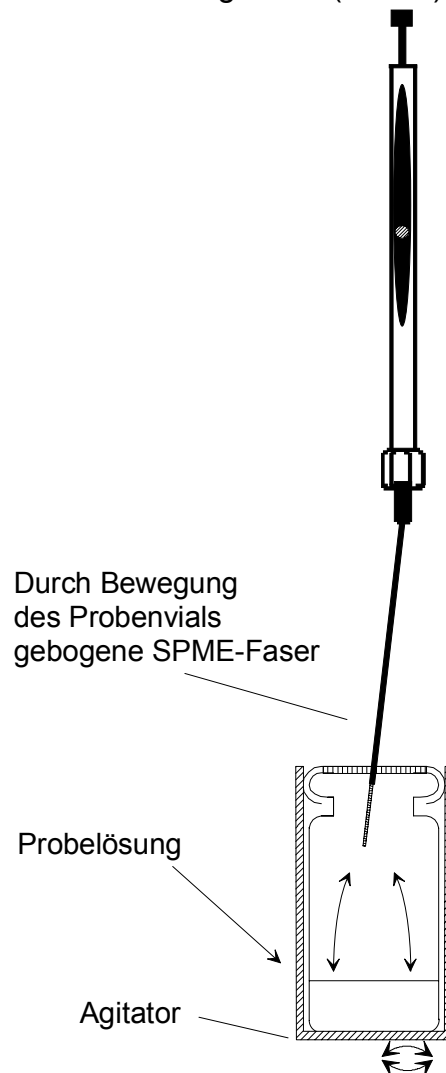


Abbildung 5. Agitationsmöglichkeiten mit Magnetrührer (a) oder Standardagitator (b).

2.4.8 Derivatisierung

Die nach der Extraktion direkt auf der stationären Phase der SPDE-Kapillare durchgeführte Derivatisierung (On-coating Derivatisierung, Abbildung 6) verbessert die chromatographischen Eigenschaften der Analyten für den nachfolgenden GC-Lauf. Als Derivatisierungsreagenzien haben sich N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) für Acylierungsreaktionen und N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) für Silylierungsreaktionen für SPME-Extraktionen bewährt, so daß auf diese auch für SPDE zurückgegriffen wurde (Abbildung 7). Vorteile dieser Reagenzien sind die stabilen Derivate und die schnell ablaufende Reaktion, die nur zu geringen Verlusten der zuvor extrahierten Analyten während des Derivatisierungsschritts führt. Trotzdem sollte für jede Probe ein

separates Vial (Probengefäß) mit Derivatisierungsreagenz verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden [33, 35, 37]. Die genannten Derivatisierungsmittel erwiesen sich als sehr milde und schädigten weder die stationären Phasen von SPME bzw. SPDE, noch die GC-Säule. Die Reaktionen liefen auch ohne Katalysator sehr schnell ab, die gebildeten Nebenprodukte zeichnen sich durch große Flüchtigkeit und kurze Retentionszeiten aus [73]. Durch die On-coating Derivatisierung gelangen nur geringste Mengen des Derivatisierungsmittels auf die GC-Säule.

In früheren Arbeiten wurde festgestellt, daß der Derivatisierungsprozeß vom Volumen des Derivatisierungsreagenz unabhängig ist. Schon bei der geringen Menge von 25 µl liegt eine Headspace-Konzentration vor, die eine vollständige On-Coating-Derivatisierung erlaubt. Höhere Volumina führen zu keiner Ausbeutenerhöhung [35, 37].

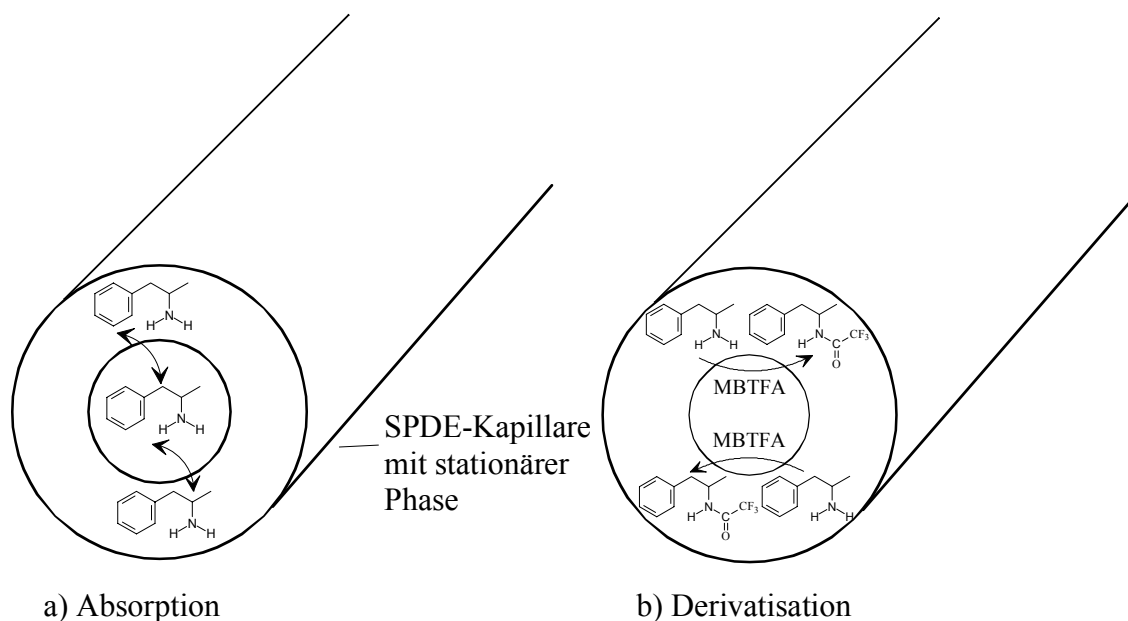


Abbildung 6. Darstellung von Absorption (a) und anschließender On-coating Derivatisierung (b) am Beispiel der Acylierung von Amphetamin mit MBTFA.

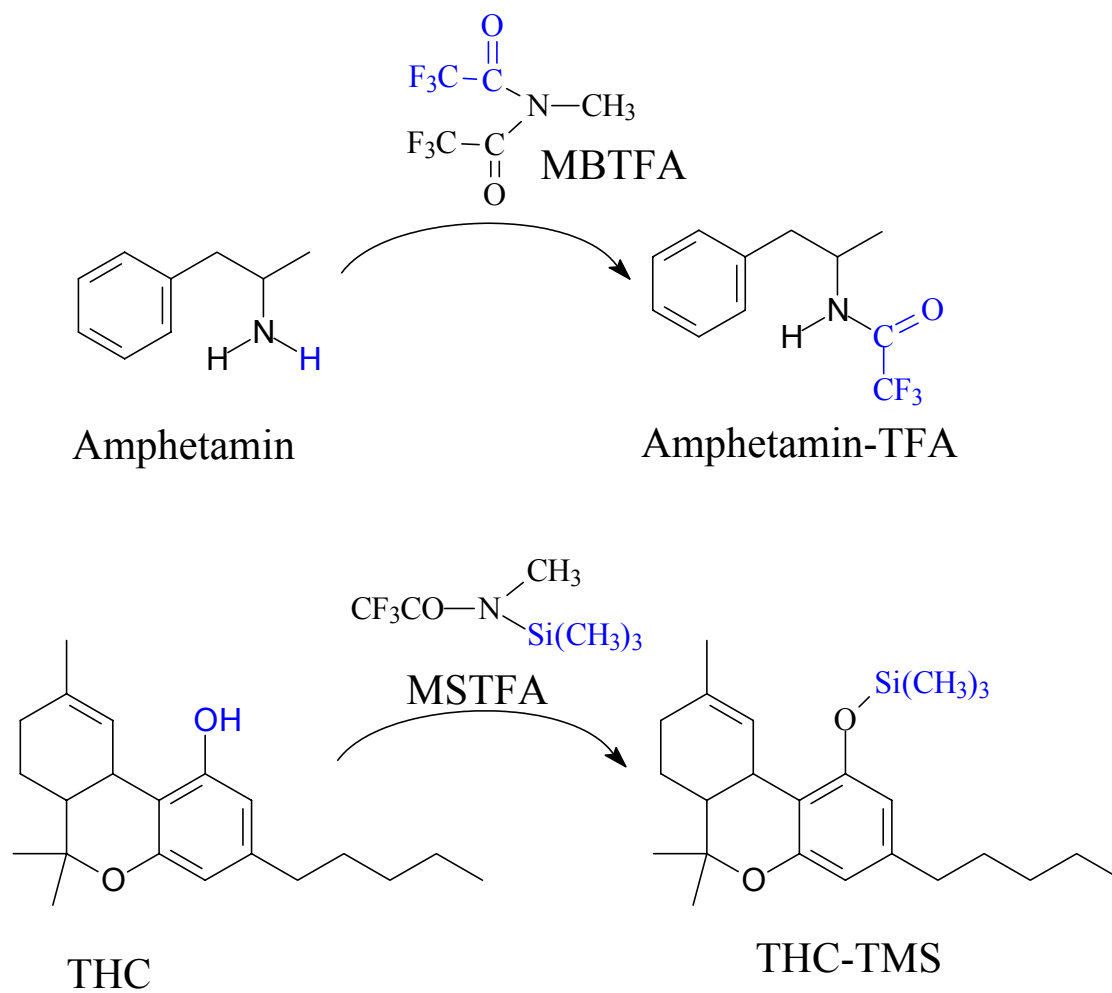


Abbildung 7. Derivatisierungsreaktionen mit MBTFA (geeignet für Amphetamine und synthetische Designerdrogen) und mit MSTFA (geeignet für Cannabinoide).

2.5 Grundlagen der Haaranalytik

2.5.1 Aufbau der Haare

Das Haar besteht aus frei aus der Haut herausragenden zylindrischen Strukturen oder Schäften (Durchmesser 15-120 μm). Sie bestehen aus stark zusammengedrängten Zellen, die in kleinen sackartigen Organen, den Follikeln, gebildet werden.

Die Haarfollikel sind in der Epidermis der Haut ca. 3-4 mm unterhalb der Oberfläche eingebettet. Sie sind als Funktionseinheit eng mit der Talgdrüse verbunden (Abbildung 8). Haare entstehen durch Zellteilung im Wachstumsbereich an der Basis des Follikels (Haarpapille). Die Zellen nehmen an Volumen zu und verlängern sich. In der Keratinisierungszone synthetisieren die Zellen Pigment (Melanin) und beginnen zu verhornen („keratinisieren“). Keratin ist ein schwefelreiches Protein, durch das die Zellen durch Austausch von Sulfhydryl-Gruppen durch S-S Bindungen sehr fest verbunden werden. Durch diese Bindung entstehen lange Fasern (sog. Fibrillen). In der Aushärtungszone sterben die Zellen unter Elimination des Zellkerns und Wasser ab (Abbildung 9). Das eigentliche Haar besteht aus einer kompakten Zusammenlagerung der abgestorbenen Zellen. Bevor das Haar die Hautoberfläche erreicht, wird es mit Sebum aus den Talgdrüsen benetzt.

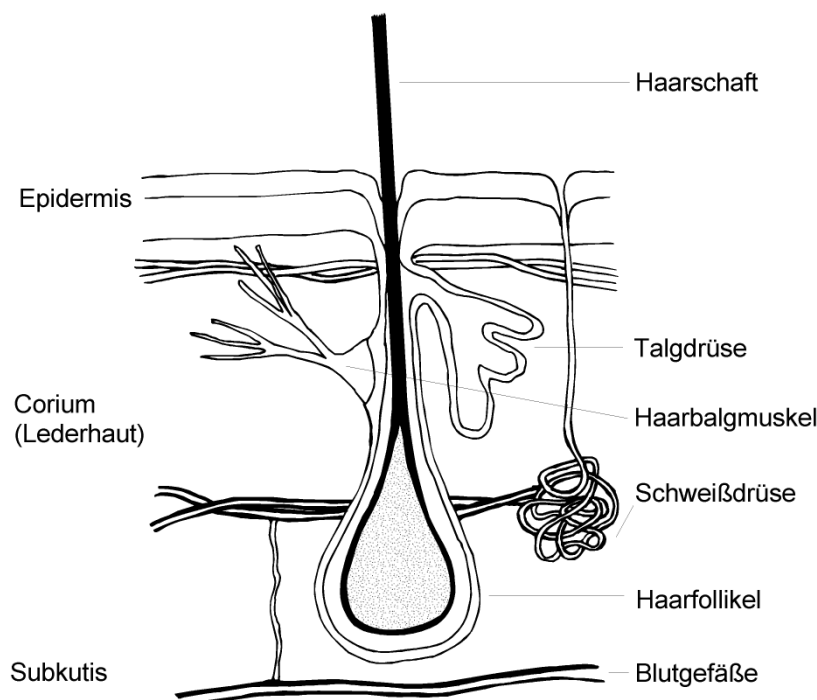


Abbildung 8. Schematischer Schnitt durch die Haut mit Haarfollikel, Haarschaft, Talg- und Schweißdrüsen.

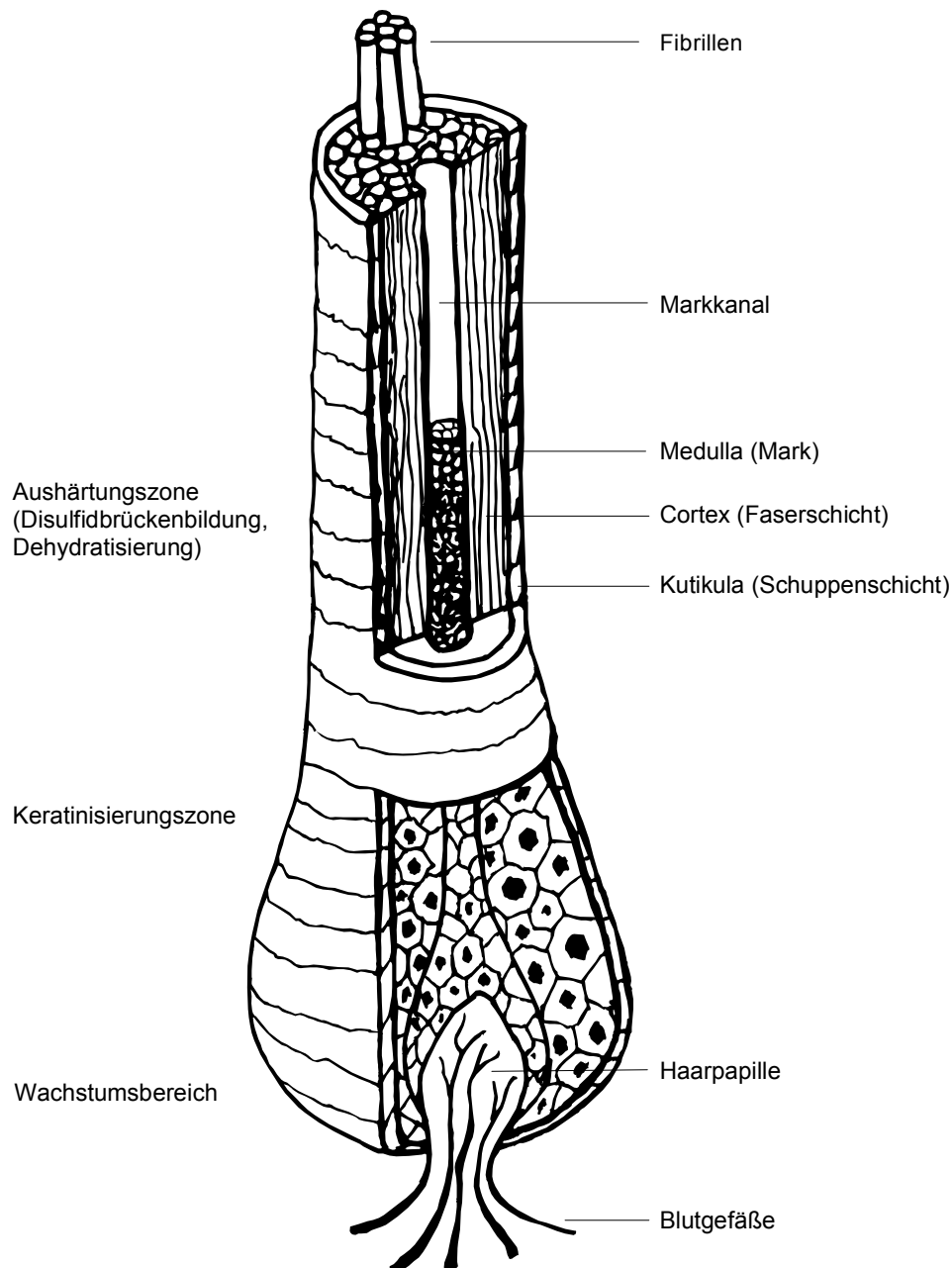


Abbildung 9. Schematische Darstellung des Aufbaus des Haares.

Der Schaft besteht aus einer äußeren Kutikula (Schuppenschicht), dem zentralen Kortex (Faserschicht) und einer inneren Medulla (Mark). Die Kutikula besteht aus abgeflachten, dachziegelartig überlappenden, verhornten Zellen und dient dem Schutz der innen liegenden Fasern. Der Kortex besteht aus langen keratinisierten Zellen, die zu langen Fasern (Fibrillen) von ca. 100 μm Länge angeordnet sind. In diesen kortikalen Zellen befinden sich auch die Pigmente, wie das Melanin. Die medullären Zellen im Inneren des Haares haben nur einen geringen Anteil an der Gesamtmasse, können auch komplett fehlen. Der Markstrang kann durch Lufteinschlüsse unterbrochen sein (Abbildung 9).

Insgesamt ist Haar als stark vernetztes, teil-kristallines polymeres Netzwerk aufzufassen, das eine Vielzahl von funktionellen Gruppen enthält (Säure, Base, Peptide), die kleine Moleküle binden können. Menschliches Haar besteht aus 65-95% Protein (90% Keratin), 15-35% Wasser (abhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit) und 1-9% Lipiden. Die Lipide (Sebum) werden von Talgdrüsen produziert.

Der Haarwachstumszyklus besteht aus 3 Stadien: nach einer langen Wachstumsphase (Anagenstadium, bis zu 6 Jahre), folgt ein kurzer Übergangszustand (Katagenstadium, 4-6 Wochen). Danach folgt eine Ruhephase (Telogenstadium), in der das Haarwachstum vollständig aufhört (10 Wochen). Ungefähr 15% der Haare befinden sich im Telogenstadium, 85% im Anagenstadium. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten muß bei der Interpretation von Haaranalysen berücksichtigt werden.

Als Faustformel gilt, daß Haare 1 cm/Monat wachsen. Es werden jedoch große interindividuelle Unterschiede berichtet (0,6 - 3,36 cm/Monat) [74-76].

2.5.2 Einbau von Drogen in Haare

Aktiv durch Injektion, Inhalation oder Ingestion konsumierte Suchtstoffe gelangen primär über den Blutweg in die Haarwurzel und werden durch den beschriebenen Haarbildungsprozeß in den keratinisierten Zellen eingelagert. Die Haarfollikel sind von einem dichten Netz von Blutkapillaren umgeben, die Papille der Haarwurzel wird über eine separate Kapillare versorgt (Abbildung 8). Eine weitere Möglichkeit der Herkunft körperfremder Substanzen ist die direkte Aufnahme in das keratinisierte Haar über den Kontakt mit drogenhaltigem Emulsionsfilm (Schweiß, Sebum) auf der Hautoberfläche oder über den Kontakt mit drogenhaltigen Stäuben oder Gasen (passive Aufnahme) [77].

Drei Hauptfaktoren beeinflussen die Drogenaufnahme und -retention in Haaren: Melaninaffinität, Lipophilie und Basizität der eingenommenen Substanz [78]. Die geringere Durchlässigkeit von Biomembranen für polare Substanzen ist der Grund dafür, daß die lipophileren Muttersubstanzen oft in höheren Konzentrationen gefunden werden als ihre hydrophileren Metaboliten [77, 79].

2.6 Grundlagen GC und MS und MS/MS

2.6.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Kapillar-Gaschromatographie in Verbindung mit Quadrupol-Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahrzehnten als Routinemethode in allen Bereichen der analytischen Chemie verbreitet und wird für forensisch-toxikologische Untersuchungen am häufigsten eingesetzt. Die Konstruktion kompakter und preisgünstiger GC/MS-Systeme war ein wichtiger Faktor für die Verbreitung dieser Methodik.

Bei der Gaschromatographie wird die gasförmige oder flüssige Probe in einen Strom einer inerten gasförmigen mobilen Phase (Trägergas, z.B. Helium) eingespritzt. Die Probe wird durch eine Kapillarsäule transportiert, in der sich die Komponenten zwischen mobiler und stationärer Phase auftrennen. Durch die Kapillartechnik mit ihren geringen Trägergasflußraten ist eine direkte Kopplung des gaschromatographischen Trennsystems an das Massenspektrometer möglich.

Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf einer Ionisierung der Analytmoleküle mit energiereichen Elektronen (Elektronenionisation, EI) in der sog. Ionenquelle. Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt, im Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt und ihre elektrischen Ladungen mit einem Elektronenvervielfacher in einen meßbaren Strom verstärkt. Der Massenanalysator besteht beim Quadrupol-Massenspektrometer aus 4 parallelen Stäben, an die ein elektromagnetisches Feld, bestehend aus einem Gleichspannungs- und Wechselspannungsanteil, angelegt wird. Dieses bewirkt, daß nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis bei einem gegebenen Gleich-/Wechselspannungsverhältnis den Analysator passieren können [80]. Bei dem für diese Arbeit benutzten Massenselektiven Detektor (MSD) handelte es sich um ein Agilent 5973N.

2.6.2 MS/MS-Kopplung

Triple-Quadrupol MS/MS-Systeme bestehen aus einer Kombination von zwei Quadrupol-Massenfiltern (Quad 1 / Quad 3), zwischen denen sich ein weiteres Quadrupol als Kollisionszelle befindet (Quad 2). In dieser Zelle wird ein erhöhter Druck eines Edelgases aufgebaut, dessen Atome durch das Quadrupolfeld in einen energiereichen Zustand überführt werden. Durch Kollision mit den Fragmentionen des Analyten kommt es zu stoßinduzierten Zerfällen. Die gebildeten Fragmente (Produkt-Ionen) werden in das zweite Massenfilter überführt und dort getrennt [80].

Für die vorliegende Arbeit wurde als Triple-Quadrupol-Massenspektrometer das Kodiak 1200 System von Bear Instruments eingesetzt, ein sehr kostengünstiges und raumsparendes Tischgerät mit einem besondere Konstruktionsprinzip: Die Quadrupole sind nicht in Reihe hintereinander angeordnet und die Kollisionszelle ist um 180° gebogen, so daß die beiden Massenfilter parallel zueinander angeordnet werden können. Der Elektronvervielfacher liegt damit nicht in der Achse der Ionenquelle. Störende, während der Fragmentierung entstehende Neutralteilchen erreichen den Detektor nicht, so daß ein geringer Rauschpegel erreicht wird (Abbildung 10) [81].

2.6.3 Meßmodi

Das Single-Quadrupol-Massenspektrometer unterstützt folgende Meßmodi:

- *Fullscan*. Beim Fullscan-Modus werden alle Ionen eines gewählten Bereiches (z.B. m/z 50-550) fortlaufend aufgenommen. Anschließend bietet sich die Möglichkeit der Suche in einer Spektrenbibliothek. Nachteil ist die geringe Empfindlichkeit des Fullscan-Modus, so daß er für Spurenanalysen ungeeignet ist.
- *SIM* (Selected ion monitoring). Bei SIM-Experimenten werden nur wenige ausgewählte Ionen als Funktion der Zeit detektiert. Durch die längere Meßzeit pro Ion erniedrigt sich die Nachweisgrenze gegenüber dem Fullscan-Modus um den Faktor 10-100 [80]. Zur sicheren Identifizierung der Analyten wird die Retentionszeit und das Intensitätsverhältnis zwischen den ausgewählten SIM-Ionen herangezogen.

Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ermöglicht zusätzlich zum Fullscan- und SIM-Modus (hier auf beiden Massenfiltern möglich) folgende Modi:

- *Produkt-Ionen-Scan*. Ein MS/MS-Lauf, bei dem alle Produkt-Ionen, die aus einem einzelnen Ausgangsion im zweiten Quadrupol gebildet werden, aufgenommen werden (entsprechend Quad 1 SIM/Quad 3 Scan).
- *Multiple reaction monitoring* (MRM). Im Quad 1 werden ausgewählte Ionen detektiert und im Quad 3 deren ausgewählte Fragmentionen, so daß spezifische Fragmentierungsreaktionen detektiert werden (entsprechend SIM/SIM). Da die Wahrscheinlichkeit, daß Störsubstanzen die gleiche Reaktion eingehen, minimal ist, wird der störende Hintergrund erheblich erniedrigt und die Selektivität des Nachweises erhöht. Obwohl die Ionenausbeute durch den zweiten und dritten Quadrupol erniedrig wird, verbessert sich nach Herstellerangaben das Signal-Rausch-Verhältnis und die Nachweisgrenzen sinken [82].

Agilent 6890+
Gaschromatograph
mit CTC CombiPAL
Autosampler



Kodiak 1200
MS/MS

Quadrupol 1

Ionenquelle



Quadrupol 2
(180° Kollisionszelle)

Quadrupol 3

Elektronen-
vervielfacher

Abbildung 10. GC/MS/MS System (oberes Bild). Das untere Bild zeigt die Komponenten des Kodiak 1200 Triple-Quadrupol Massenspektrometers (Ansicht von oben in das geöffnete Gerät).

3 Experimenteller Teil

3.1 SPDE-Geräte

Die SPDE-Geräte (Spritzen mit angebrachten SPDE-Kapillaren, SPDE-Gasstation und Magnetrührer) wurden von Chromtech (Idstein, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Abbildung 11). Bei der Evaluierung der SPDE-Technik, begleitend zur Entwicklung zur Marktreife durch die Firma Chromtech, wurden zunächst Prototypen der Kombination aus SPDE-Kapillaren und Headspace-Spritzen untersucht, die sich in 5 Entwicklungsstadien einteilen lassen (Abbildung 12, Tabelle 2). Im Frühjahr 2001 hatte die Technik die Marktreife erreicht. Die daran anschließenden Untersuchungen (Methodenoptimierung und Validierung) wurden mit den kommerziell erhältlichen SPDE-Kapillaren (70 mm x 0,8 mm, ID 0,4 mm, konische Spitze mit seitlicher Öffnung) durchgeführt.

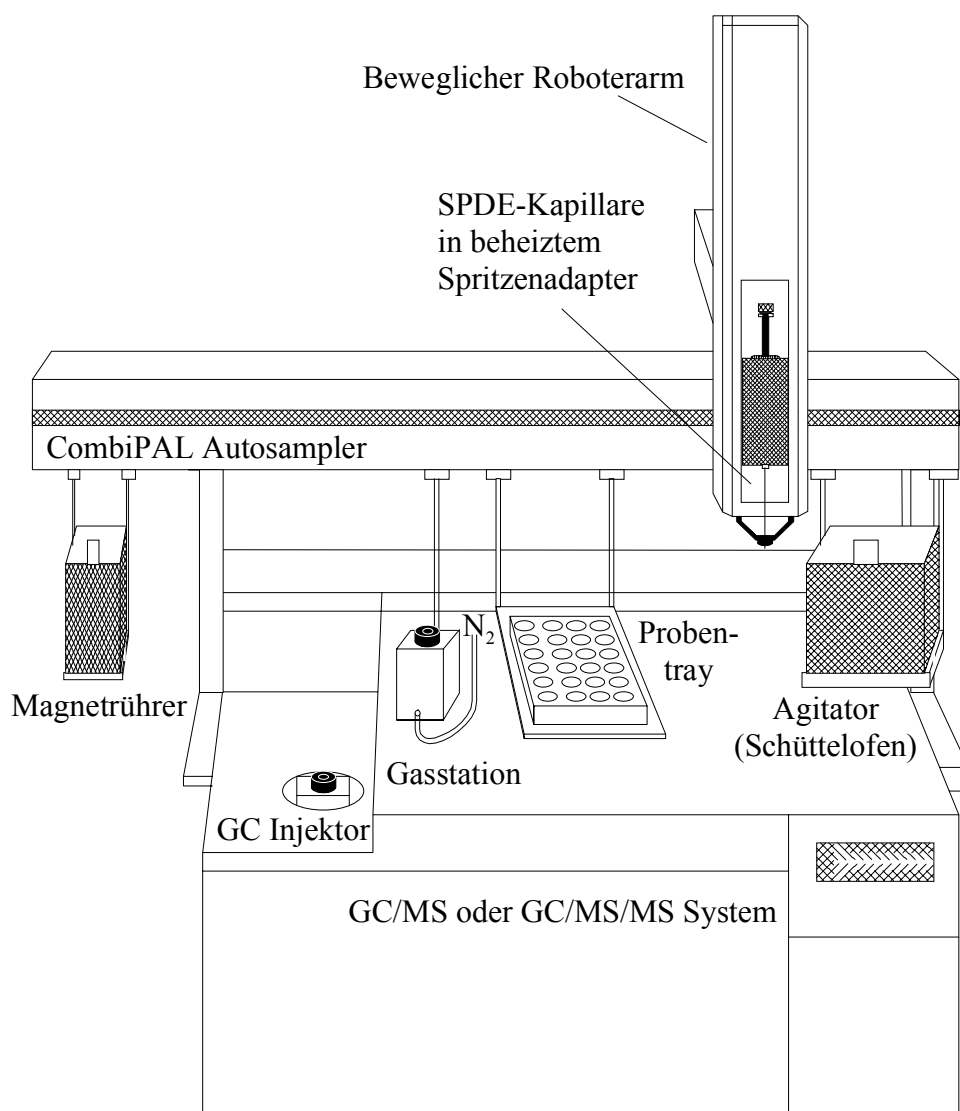


Abbildung 11. Schematische Darstellung der Bestandteile des SPDE-Systems. Zusätzlich zu den Standardkomponenten des CTC CombiPAL Autosamplers sind die Gasstation und ggf. der Magnetrührer erforderlich.

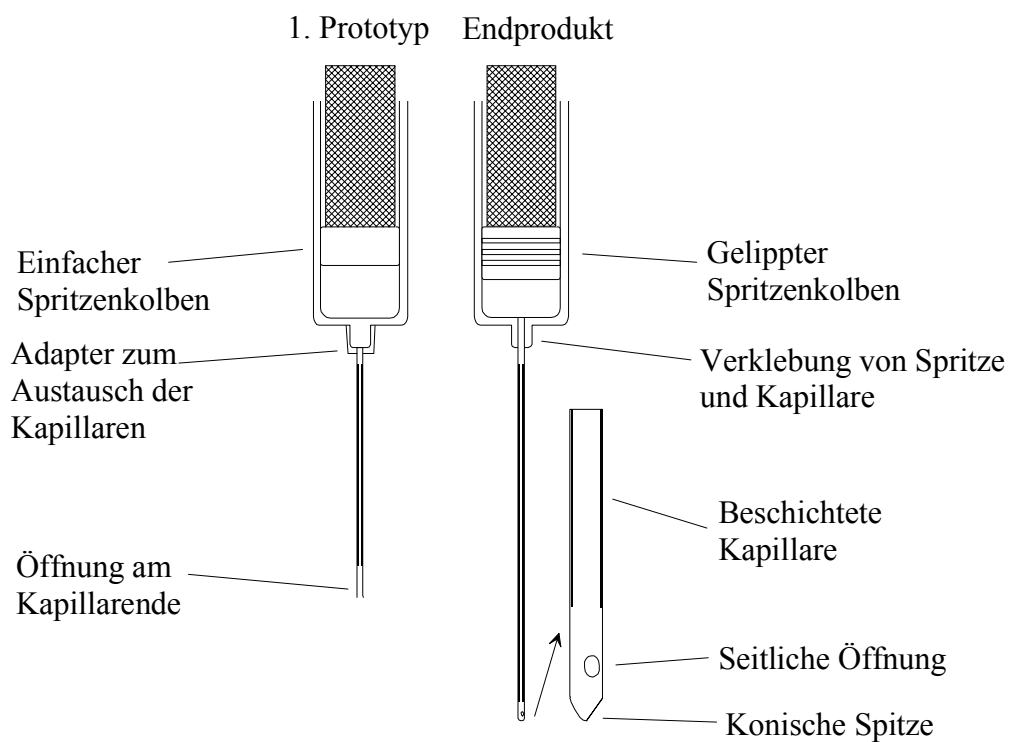


Abbildung 12. Vergleich des ersten (linkes Bild) und letzten Entwicklungsstadiums (rechtes Bild) der SPDE-Gerätekomination aus Headspace-Spritze und beschichteter Kapillare.

Tabelle 2. Vergleich der SPDE Prototypen.

Stadium	Headspace-Spritze		SPDE-Kapillare	
	Befestigung der Kapillaren	Spritzenkolben	Länge/Außendurchmesser	Position der Öffnung
1	Austauschbar, Plastikkonus zum Stecken	Einfach	5 cm/0,5 mm (0,25 mm ID)	Kapillarende
2	Fest verklebt	Einfach	5 cm/0,5 mm (0,25 mm ID)	Kapillarende
3	Fest verklebt	Mehrfach gelippt	5 cm/0,5 mm (0,25 mm ID)	Kapillarende
4	Fest verklebt	Mehrfach gelippt	7 cm/0,8 mm (0,53 mm ID)	Seitlich (1 mm von konischer Spitze entfernt)
5 (Marktreife)	Fest verklebt	Mehrfach gelippt	7 cm/0,8 mm (0,40 mm ID)	Seitlich (3 mm von konischer Spitze entfernt)

Die Herstellung und Beschichtung der Kapillaren mit der stationären Phase erfolgte im Auftrag von Chromtech durch BGB Analytik (Anwil, Schweiz) mit 50 µm reinem Polydimethylsiloxan (PDMS) oder mit 50 µm PDMS, das 10% Aktivkohle (AK) enthält. Laut Herstellerangabe handelt es sich um ein hochpolymerisiertes PDMS. Die Polymerisierung erfolgt über Vinylgruppen unter Dicumylperoxidzusatz bei 160 °C. Durch den Polymerisierungsprozeß wird das PDMS unlöslich in Lösungsmitteln, ebenso wie in Wasser. Die Kapillaren wurden durch den Hersteller an 2,5 ml gasdichten Spritzen durch Verkleben angebracht.

Die Temperatur des beheizten Spritzenadapters, mit dem die Spritze am Autosampler befestigt wird, wurde auf 90 °C (Cannabinoide) oder 50 °C (Amphetamine) eingestellt. Die Gasstation wurde mit einem Stickstoffgenerator mit hohem Reinheitsgrad (99,99%) verbunden (Peak Scientific, Inchinnan, Schottland). Mit der Gasstation wurde eine definierte Menge Stickstoff vor der Desorption in die gasdichte Spritze eingebracht. Der Magnetrührer wurde als weiteres Zusatzgerät zum Autosampler CombiPAL eingesetzt; Temperatur und Rotationsgeschwindigkeit sind durch Software gesteuert. Der Standardagitator des Autosamplers wurde weiterhin für die Erhitzung des Derivatisierungsmittels verwendet.

Die zum Methodenvergleich benutzten SPME-Geräte (Faserhalter für Autosampler mit einer austauschbaren 100 µm PDMS-Faser) stammten von Supelco (Deisenhofen, Deutschland).

3.2 Geräte der Probenvorbereitung

Für das Schütteln beim Waschvorgang der Haarproben wurde ein Vortex Genie 2 Mixer (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) verwendet und zum Abdampfen der Lösungsmittel beim Dotieren der Haarproben ein TCS-Metallblock-Thermostat Typ VapoTherm mobil I (Labor Technik Barkey, Leopoldshöhe, Deutschland) eingesetzt. Die Zerkleinerung der Haare erfolgte mit handelsüblichen Laborscheren. Headspace Rollrandflaschen (Vials) 22,5x46 mm, 10 ml Inhalt, sowie magnetische Bördelkappen (Öffnung 8 mm Durchmesser) mit 3 mm Silikon/Teflon-Septum wurden von Chromtech (Idstein, Deutschland) bezogen.

3.3 Chemikalien

Folgende Substanzen wurden von Promochem (Wesel, Deutschland) bezogen: DL-Amphetamin, DL-Amphetamin-d₅, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN), DL-2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolinium Perchlorat (EDDP Perchlorat), DL-2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolinium-d₃ Perchlorat (EDDP-d₃ Perchlorat), DL-Methadon, DL-Methadon-d₉, DL-Methamphetamin, DL-Methamphetamin-d₁₁, DL-3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), DL-3,4-Methylendioxyamphetamin-d₅ (MDA-D₅), DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA), DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin-d₅ (MDEA-d₅), DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin (MDMA), DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin-d₅ (MDMA-d₅), DL-3,4-Methylendioxyphenyl-2-butanamin (BDB), DL-N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin (MBDB), DL-1,2-Dideutero-N-trideuteromethyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin (MBDB-d₅), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-d₃ (THC-d₃).

Ferner wurden die nachfolgend genannten Substanzen von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen: N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) und N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA).

Weitere Chemikalien (Natriumhydroxid, Natriumcarbonat, Methanol) wurden von Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen.

3.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für die Messungen standen zwei Systeme mit folgenden Konfigurationen zur Verfügung:

- GC/MS-System: Agilent 6890 Series plus Gaschromatograph in Verbindung mit einem Agilent 5973 N MSD Massenspektrometer, gesteuert von der Agilent Chemstation Software G1701CA Version C.00.01 (Chromtech, Idstein, Deutschland).
- GC/MS/MS System: Agilent 6890 Series plus Gaschromatograph in Verbindung mit einem Bear Instruments Kodiak 1200 MS/MS Triple Quadrupol Massenspektrometer, gesteuert durch die Kodiak Software 2.1. Der Argon-Gasdruck in der Kollisionszelle betrug 1,3 mTorr (Chromtech, Idstein, Deutschland).

Beide Systeme waren mit einem CTC-CombiPAL-Autosampler ausgestattet. Alle Schritte der SPDE-Methoden sind vollautomatisiert, gesteuert durch die CTC-CombiPAL Software (CTC-Cycle Composer 1.5.2) mit selbst erstellten Makros. Die chromatographische Trennung erfolgte jeweils an einer 30 m langen Kapillarsäule vom Typ DB-5MS mit einem

Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Beschichtung von 0,25 µm (J&W Scientific, Köln, Deutschland). Als Trägergas diente Helium mit einem Volumenstrom von 1 ml/min. Die Injektionen erfolgten im Split/Splitless-Modus für 5 min bei geschlossenem Split. Das Probeneinlaßsystem des Gaschromatographen wurde durch Aufbohren der Inlet-Nuß modifiziert, um eine Injektion mit den SPDE-Kapillaren mit dem vergrößerten Außendurchmesser von 0,8 mm zu ermöglichen. Für den Probeneinlaß wurden 1.5 mm ID Headspace Liner und vorgebohrte Thermogreen LB2-Septen von Supelco (Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

Die Temperatureinstellungen für die Gaschromatographen und Massenspektrometer sind in Tabelle 3, die GC-Ofenprogramme in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 3. Temperatureinstellungen der analytischen Systeme.

	GC/MS	GC/MS/MS
Injektor	250 °C	260 °C
Interface	280 °C	280 °C
Ionenquelle	230 °C	220 °C
Quadrupol	150 °C	-

Tabelle 4. GC-Ofenprogramme.

	GC/MS	GC/MS/MS
Amphetamine, synthetische Designerdrogen	90 °C für 1 min, 8 °C/min bis 210 °C, gehalten für 2 min, 30 °C/min bis 280 °C, gehalten für 5 min	90 °C für 1 min, 8 °C/min bis 210 °C, gehalten für 2 min, 30 °C/min bis 260 °C, gehalten für 1 min
Cannabinoide, Methadon, EDDP	90 °C für 5 min, 30 °C/min bis 190 °C, gehalten für 10 min, 5 °C/min bis 250 °C, gehalten für 3 min, 30 °C/min bis 300 °C, gehalten für 2 min	90 °C für 5 min, 20 °C/min bis 300 °C, gehalten für 5 min

Für beide Systeme wurde eine Elektronenenergie von –70 eV für die Ionisierung (EI-Modus) gewählt. Zur Bestimmung der charakteristischen Massenfragmente wurden die Primärmassenspektren für jeden Analyten im Full-Scan Modus (m/z 50-550) aufgenommen. Drei charakteristische und intensive Ionen wurden für das Selected Ion Monitoring (SIM-Modus), das auf beiden Systemen möglich ist, ausgewählt. Auf dem GC/MS/MS Gerät wurden danach zusätzlich die Produkt-Ionenmassenspektren aufgenommen, um charakteristische Fragmen-

tierungsreaktionen für den Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus zu bestimmen. Die SIM-Ionen und MRM-Reaktionen mit der benutzten Kollisionsenergie sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5. Detektierte Ionen und MRM-Reaktionen der nachgewiesenen Substanzen und der korrespondierenden deuterierten internen Standards (fett markierte Ionen zur Quantifizierung).

Substanz	SIM Ionen (m/z)		MS/MS MRM-Reaktionen Quad1>Quad3 (m/z)		
	Analyt	ISTD	Analyt	ISTD	Kollisions- energie [eV]
Methadon	223 294 295	226 297	294>223	297>226	-13
EDDP	262 276 277	265 279 280	277>262	280>265	-10
CBD-di-TMS	301 337 390	-	390>301	-	-10
THC-TMS	303 371 386	315 374 389	386>371	374>306	-10
CBN-TMS	367 368 382	-	367>310	-	-10
Amphetamin-TFA	91 118 140	92 123 144	140>93	144>96	-15
MA-TFA	110 118 154	113 126 160	154>110	160>113	-15
MDA-TFA	135 162 275	136 167 280	135>79	136>80	-15
MDMA-TFA	110 135 154	113 136 158	154>110	158>113	-12
MDEA-TFA	140 168 303	141 173 308	168>140	173>141	-15
BDB-TFA	135 176 289	-	135>79	-	-15
MBDB-TFA	168 176 303	172 178 308	168>110	172>113	-15

Für die Quantifizierung wurden die Massenspuren der in Tabelle 5 durch Fettdruck hervorgehobenen SIM-Ionen bzw. MRM-Reaktionen zur Flächenberechnung herangezogen.

Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und der im charakteristischen Peakflächenverhältnis vorliegenden Massenspuren (SIM-Modus) bzw. der charakteristischen Zerfallsreaktion (MRM-Modus). Für die Flächenberechnung wurden die o.g. Standardsoftwareprogramme der Gerätehersteller verwendet. Sämtliche Peakintegrationen wurden nachträglich kontrolliert und bei fehlerhafter Peakerkennung manuell nachintegriert. Zur Auswertung wurde dann das Flächenverhältnis zwischen Analyten und deuteriertem internem Standard als Funktion der Konzentration herangezogen (Kalibrierfunktion). Für einige Substanzen waren keine deuterierten Analoga erhältlich, so daß CBD und CBN mit THC-d₃ quantifiziert wurden, MDA-d₅ wurde für BDB verwendet.

3.5 Haarproben und Asservierung

Die Haarproben wurden Patienten während einer Drogenentgiftungsbehandlung in den Rheinischen Kliniken Bonn entnommen. Drogenkonsumangaben der Patienten wurden bei der Haarentnahme erfragt. Diese Untersuchungen wurden von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt (Nr. 117/02).

Negative Kontrollproben wurden Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn entnommen. Sämtliche Proben wurden innerhalb von 2 bis 4 Wochen analysiert.

Die Haare wurden von der Rückseite des Kopfes so nahe wie möglich zur Kopfhaut mit einer Schere abgeschnitten, mit einer Schnur fixiert, mit Klebestreifen auf einem Blatt Papier befestigt und am kopfnahen Ende gekennzeichnet. Die Proben wurden bei Raumtemperatur trocken gelagert.

3.6 Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Haarproben wurde in früheren Untersuchungen [35, 37] - angelehnt an ein Verfahren von Kauert [10] - für HS-SPME-Bestimmungen hinsichtlich des Ausschlusses von externen Kontaminationen optimiert. Die für die Amphetamine und Cannabinoide erforderlichen Hydrolysebedingungen, die wegen der unterschiedlichen Eigenschaften der Substanzklassen eine Durchführung in zwei getrennten Ansätzen erfordern, sind in Abschnitt 2.4.2 dargestellt. Unterschiede beider Methoden zeigt Tabelle 6.

Die Proben wurden jeweils 5 min mit Aqua dest., Petrolether und Dichlormethan unter Zuhilfenahme eines Vortex-Mischers gewaschen und anschließend getrocknet. Bei längerem Haar wurden die Proben dann in jeweils 3 cm lange Segmente geteilt, wobei nur die ersten 3 kopfnahen Segmente untersucht wurden. Danach wurden die Segmente in kleine Stücke von

ungefähr 1 mm geschnitten. 10 mg Haare, 1 ml NaOH-Lösung (Konzentration siehe Tabelle 6) und 80 µl interner Standard-Mix (250 ng der deuterierten Analyte/ml) wurden in ein 10 ml Headspace-Vial gegeben und sofort mit einem Silikon/Teflon-Septum und einer magnetischen Bördelekappe verschlossen.

Tabelle 6. Methodenparameter SPDE.

	Amphetamine und Designerdrogen	Cannabinoide, Methadon und EDDP
Einwaage	10 mg	10 mg
Salzzusatz (Aussalzeffekt)	-	0.5 g Na ₂ CO ₃
Hydrolyse	10 M NaOH	1 M NaOH
Equilibrierung	Schütteln für 5 min bei 50 °C im Agitator (600 U/min, 5 s an, 2 s aus)	Magnet. Rühren für 5 min bei 90 °C (200 U/min, 60 s an, 2 s aus)
Extraktion	50 SPDE Zyklen: 1 ml mit 200 µl/s, 9 min (50 °C)	30 SPDE Zyklen: 2 ml mit 50 µl/s unter weiterem Rühren, 20 min (90 °C)
Derivatisierung	25 µl MBTFA, 6 SPDE Zyklen (50 °C)	25 µl MSTFA, 6 SPDE Zyklen (90 °C)
Desorption	2,5 ml Stickstoff mit 10 µl/s bei 260 °C	1,0 ml Stickstoff mit 10 µl/s bei 260 °C

3.7 SPDE-Extraktion und Derivatisierung

Methadon und EDDP können ohne Derivatisierung im gleichen GC-Lauf wie die silylierten Cannabinoide analysiert werden. Die Gruppe der Amphetamine und synthetischen Designerdrogen erfordert eine Acylierung mit geänderten SPDE-Bedingungen (Tabelle 6). Prinzipiell wurde die SPDE Extraktion in der gleichen Weise für beide Methoden durchgeführt: Zuerst wurden die Vials mit Probe und Derivatisierungsreagenz im Autosampler 5 min geschüttelt bzw. gerührt (Abbildung 13a). Nach dem Einstich der SPDE-Kapillare durch das Septum des Vials, wurde jeweils ein Headspacevolumen von 1 ml aus der Probe aufgezogen und wieder zurückgedrückt (dynamische Extraktion). Um die Ausbeute zu verbessern, wurde dieser Vorgang mehrmals wiederholt (Abbildung 13 I.b. Zahl der Zyklen und Geschwindigkeiten siehe Tabelle 6). Bei den Cannabinoiden wurde das Haarhydrolysat während des Extraktionsvorganges zusätzlich mittels eines Magnetrührers gerührt (Abbildung 13 II.b). Für die Derivatisierung auf der Festphase wurde die SPDE-Kapillare in ein zweites Vial mit Derivatisierungsreagenz gestochen und der Spritzenkolben wurde wieder auf und ab bewegt (Abbildung 13c). Nach dem letzten Zyklus wurde die Spritze geleert, zur Gasstation bewegt und dort eine definierte Menge Stickstoff aufgezogen (Abbildung 13d). Für die

Desorption der Analyten wurde die Kapillare vollständig in den heißen Injektor des Gaschromatographen eingeführt und dort für 15 s thermisch equilibriert (Predesorptionszeit). Der Spritzenkolben wurde dann langsam nach unten bewegt, und die Analyten wurden durch den Stickstoffstrom auf die GC-Säule transportiert, simultan dazu startete das GC-Programm (Abbildung 13e).

Nach Entfernung der SPDE-Kapillare aus dem Injektor, wurden Spritze und Kapillare durch erneute Spülung mit 1 ml Stickstoff aus der Gasstation in den Injektor bei nun geöffnetem Split-Ventil gesäubert. Danach folgte ein Blank-Lauf, um Verschleppungen, die allerdings nie beobachtet wurden, auszuschließen.

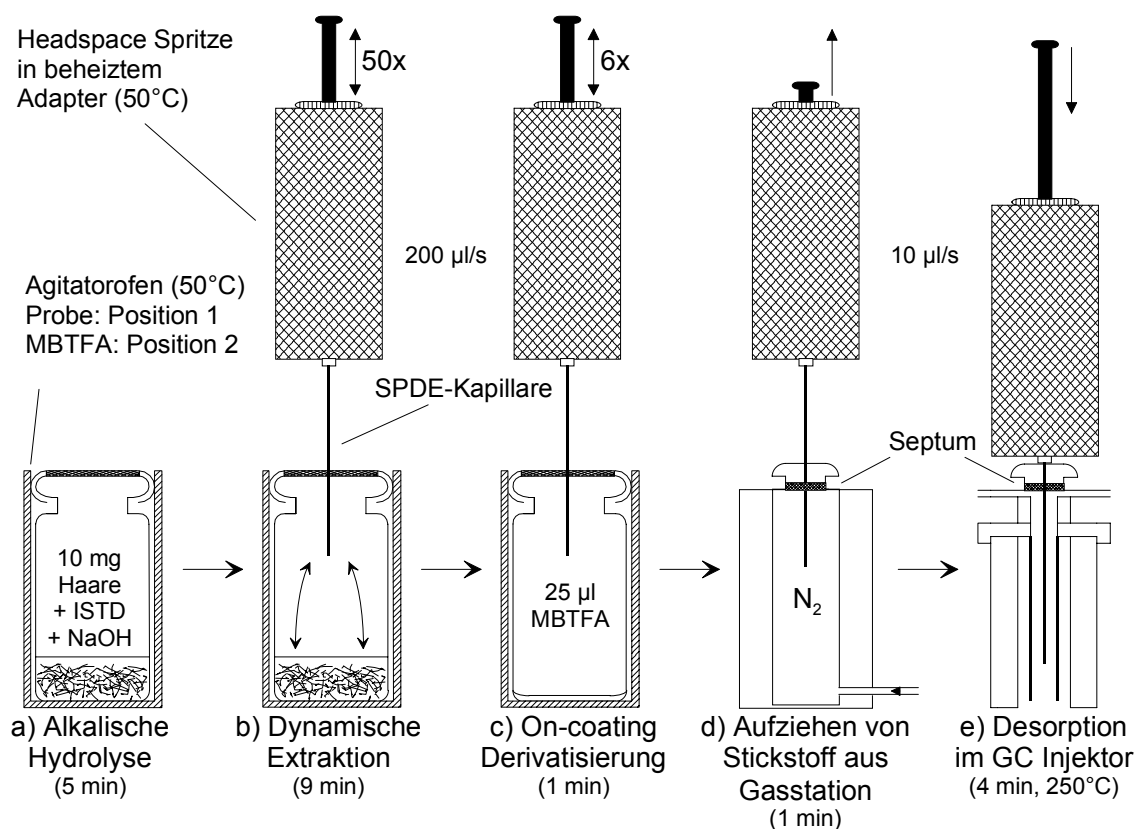
3.8 Methodenoptimierung

Vom Extraktionsmodus (SPDE oder SPME) unabhängige Parameter, wie z.B. alkalische Hydrolyse, Agitatorgeschwindigkeit, Salzzugabe (nicht notwendig für Amphetamine) und Menge des Derivatisierungsreagenz, wurden im Zusammenhang mit der Entwicklung von HS-SPME-Methoden in früheren Untersuchungen [35, 37] ermittelt und auch in dieser Arbeit gewählt (siehe Tabelle 6).

Die folgenden SPDE-spezifischen Parameter wurden in experimentellen Untersuchungen mit dem Ziel der Ausbeutenmaximierung sukzessive optimiert, indem jeweils 3 aufgestockte Haarproben (2 ng/mg) bei jeder Temperatur bzw. bei jedem Punkt vermessen wurden:

- Art der Probendurchmischung (Agitator oder Magnetrührer)
- Art der stationären Phase auf der SPDE-Kapillare (PDMS oder PDMS/AK)
- Art des GC-Glasliners (1,5 mm ID und 4,0 mm ID)
- Temperatur des Agitators und der Headspace-spritze (30-90 °C)
- Zahl der Spritzenzyklen für Extraktion (10-500) und Derivatisierung (1-10)
- Volumenstrom für Extraktion (50-250 µl/s) und Desorption (10-200 µl/s)
- Stickstoffvolumen für Desorption (250-2500 µl)
- Predesorptionzeit im GC-Injektor (1-45 s)
- Desorptionstemperatur (230-280 °C).

I. Amphetamine und Synthetische Designerdrogen



II. Cannabinoide, EDDP und Methadon

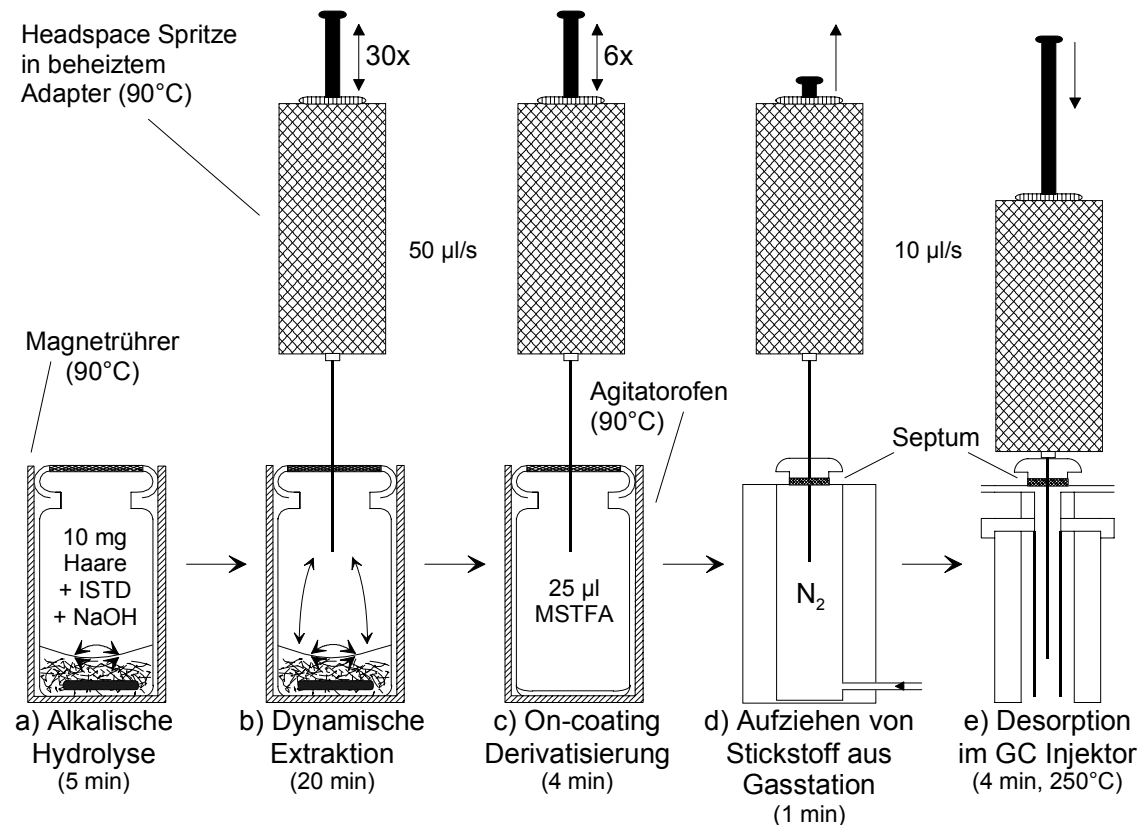


Abbildung 13. Schematische Darstellung der Verfahrensschritte der vollautomatischen Analyse von Amphetaminen und synthetischen Designerdrogen (I.) und Cannabinoiden, EDDP und Methadon (II.) in Haarproben mittels HS-SPDE und GC/MS oder GC/MS/MS.

3.9 Kalibration und Validierung

Für die Kalibrierfunktionen wurden mindestens fünf Meßpunkte herangezogen. Dabei wurden die Kalibrationsproben wie reale Proben behandelt: Negative Kontrollproben wurden mit verschiedenen Mengen des Analyten-Standardgemisches und gleichbleibender Menge des internen Standardgemisches dotiert und dann wie die Realproben aufgearbeitet und gemessen. Für die Methodenvalidierung wurden aufgestockte Proben wie oben beschrieben vorbereitet und analysiert. Peak-Reinheit und Selektivität, sowie Intra- und Interday Präzision bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (2 und 20 ng/mg) wurden bestimmt. Die Linearität der Eichkurven wurde zwischen 0,05 und 20 ng/mg ausgewertet. Für die Ermittlung der Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) wurde nach DIN 32645 eine separate Eichkurve im Bereich der NG (0,005-1 ng/mg) hergestellt [83, 84]. Für die Ermittlung der absoluten Wiederfindung wurden Haarproben (10 mg) dotiert mit 20 ng jedes Analyten mit dem HS-SPDE Verfahren analysiert und die Ergebnisse mit der Flüssig-Injektion einer Methanol-Lösung verglichen (20 ng/2 µl).

3.10 SPME-Vergleichsmethoden

Die gemäß Abschnitt 3.6 vorbereiteten Proben wurden im Agitator des Autosamplers 5 min geschüttelt. Die SPME-Faser wurde zuerst im Headspace der Probe und danach im Headspace des Derivatisierungsreagenz exponiert. Die derivatisierten Analyten wurden im GC-Injektor desorbiert. Die Methodenparameter sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Einzelheiten können den Publikationen von Musshoff und Junker et al. [35, 37] entnommen werden.

Tabelle 7. Methodenparameter SPME.

	Amphetamine und Designerdrogen [35]	Cannabinoide, Methadon und EDDP [37]
Einwaage	10 mg	10 mg
Salzzusatz (Aussalzeffekt)	-	0.5 g Na ₂ CO ₃
Hydrolyse	10 M NaOH	1 M NaOH
Equilibrierung	Schütteln für 5 min bei 50 °C im Agitator (600 U/min, 5 s an, 2 s aus)	Schütteln für 5 min bei 90 °C im Agitator (600 U/min, 5 s an, 2 s aus)
Extraktion (Exposition der SPME Faser)	10 min unter weiterem Schütteln (50 °C)	25 min unter weiterem Schütteln (90 °C)
Derivatisierung	25 µl MBTFA, 2 min (50 °C)	25 µl MSTFA, 8 min (90 °C)
Desorption	4 min (52 mm Eintauchtiefe)	5 min (52 mm Eintauchtiefe)

3.11 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurden die Analysenergebnisse (Flächenwerte) aus der Agilent Chemstation Software mit der Custom-Reports-Funktion zu Microsoft Excel (Version 9.0) exportiert (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland). Peak-Asymmetrie Faktoren (A_S) wurden von der Agilent Chemstation Software als Quotient der Breite der zweiten Peakhälfte (b) und der Breite der ersten Peakhälfte (a), gemessen bei 10% der Peakhöhe, berechnet. Es gilt: $A_S = b/a$.

Die Methodenpräzision (relative Standardabweichung) wurde direkt in Excel nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Präzision} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \cdot 100 [\%]$$

Die Linearität der Eichkurven wurde mit dem Pearson-Korrelationstest auf lineare Abhängigkeit überprüft (WinSTAT für Microsoft Excel, Version 2001.1, R.Fitch Software, Staufen, Deutschland). Eine statistische Signifikanz wurde unterhalb des 0,05 Wahrscheinlichkeitsniveaus angenommen. Der Zusammenhang der Meßergebnisse beim Methodenvergleich zwischen SPME und SPDE wurde ebenfalls mit dem Pearson-Test auf Linearität überprüft.

Die Auswertung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 erfolgte mit B.E.N. Version 1.0 für Microsoft Excel (Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin, Heidelberg).

Die absoluten Wiederfindungen wurden mit Excel wie folgt berechnet:

$$\text{Absolute Wiederfindung} = \frac{\text{Peakfläche SPDE}}{\text{Peakfläche Flüssig-Injektion}} \cdot 100 [\%]$$

Die graphische Datenauswertung erfolgte mit dem Softwarepaket Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen der SPDE-Prototypen

Die Erprobung und Weiterentwicklung der SPDE-Meßtechnik wurde in enger Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma durchgeführt. Am Anfang der Arbeiten standen Prototypen der SPDE-Kapillaren zur Verfügung, die in Länge und Außendurchmesser mit Standard-Kanülen von Headspace-Spritzen übereinstimmten, um die SPDE-Extraktion ohne Modifikation des Autosamplers zu ermöglichen (Tabelle 2, Stadium 1).

Die SPDE-Kapillaren waren zunächst mit einem konischen Befestigungselement am Glaskörper der Spritze befestigt. Sie konnten so durch den Hersteller leicht umgetauscht werden, und zudem war ein schneller Wechsel durch den Anwender möglich. Undichtigkeiten, die am Verbindungselement zwischen SPDE-Kapillare und Spritze nachgewiesen wurden, waren jedoch nicht zu beseitigen.

Daher wurden die SPDE-Kapillaren fest mit dem Glaskörper der Headspace-Spritze verklebt (Tabelle 2, Stadium 2), wobei der Nachteil, zum Wechsel der Kapillaren die ganze Spritze an den Hersteller einzuschicken, in Kauf genommen werden muß. Weiterhin führte eine Undichtigkeit des Spritzenkolbens zum Entweichen der Analyten bei der Desorption. Zur Behebung dieses Problems wurde ein Spritzenkolben mit mehrfacher Lippung eingesetzt (Tabelle 2, Stadium 3), mit dem keine Undichtigkeiten mehr beobachtet wurden. Signale für die Amphetamine, EDDP und Methadon wurden bei einer Konzentration von jeweils 2 ng/mg erzielt, im Vergleich zu SPME allerdings mit geringer Ausbeute (5-10% der SPME-Ausbeute). Cannbinoide zeigten selbst bei 5 ng/mg keine Signale.

Zur Erhöhung des Sorbens-Volumens wurden die Kapillaren deshalb um 0,3 mm im Außendurchmesser (0,8 mm statt 0,5 mm) und um 2 cm in der Länge vergrößert (7 cm statt 5 cm) (Tabelle 2, Stadium 4). Das Volumen des Polydimethylsiloxan-Sorbens erhöhte sich so von $1,5 \text{ mm}^3$ auf $5,99 \text{ mm}^3$ (Formel 4, S. 8). Das Kapillarende wurde durch Zusammenpressen geschlossen und durch Schleifen abgerundet, so daß eine konische Spitze entstand. Die Öffnung wurde seitlich versetzt gebohrt (Abbildung 14). Durch diese Konstruktion wurde eine Beschädigung des Septums am GC-Injektor verhindert. Für diese längeren Kapillaren mußte die Spritzenführung des Autosamplers um 2 cm verstellt werden, und die Koordinaten der Autosamplerobjekte sind anzupassen. Mit diesen Kapillaren konnten sämtliche Analyten extrahiert und detektiert werden. Ein Rückschlag der Entwicklung ergab sich dadurch, daß sich nach 20-30 Extraktionen das Sorbens von der Stahlkapillare ablöste und in den Glaskörper

der Spritze hineingezogen wurde. In Abbildung 15 ist eine mikroskopische Aufnahme der herausgelösten Beschichtung abgebildet. Die Schlauchform ist gut zu erkennen. Offensichtlich liegt die Ursache des Versagens in einer mangelhaften Bindung zwischen PDMS und Stahlkapillare.

Der Herstellungsprozeß der SPDE-Kapillaren wurde daraufhin geändert. Durch eine Vorbehandlung der Stahloberfläche konnte eine festere Bindung zwischen Stahl und Polydimethylsiloxan erreicht werden. Darüberhinaus wurde der Innendurchmesser der Kapillaren auf 0,4 mm verkleinert, so daß sich ein Sorbens-Volumen von 4,40 mm³ ergibt (Tabelle 2, Stadium 5). Mit diesen SPDE-Kapillaren, die mittlerweile kommerziell erhältlich sind, traten die beschriebenen Probleme nicht mehr auf. Sie wurden für alle im folgenden beschriebenen Experimente eingesetzt.

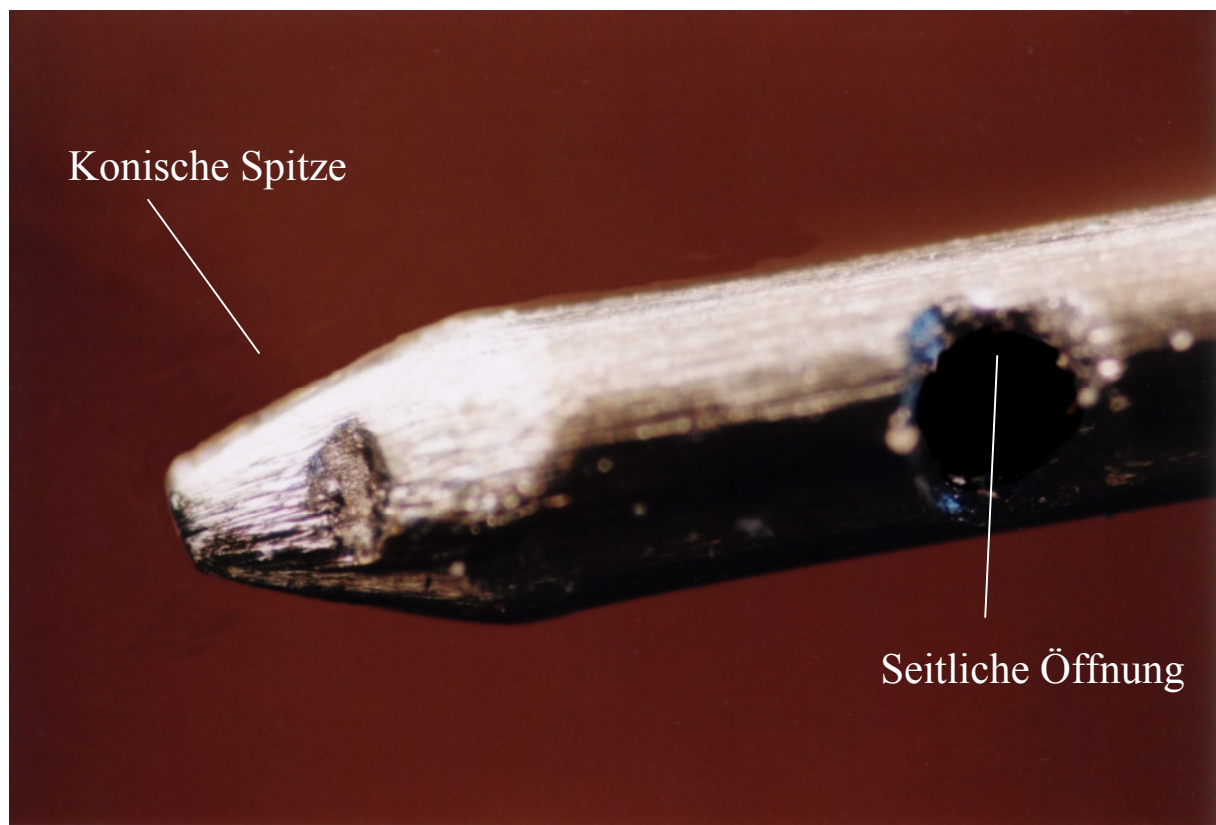


Abbildung 14. Mikroskopische Aufnahme der Spitze der SPDE-Kapillare (Vergr. 1:40).

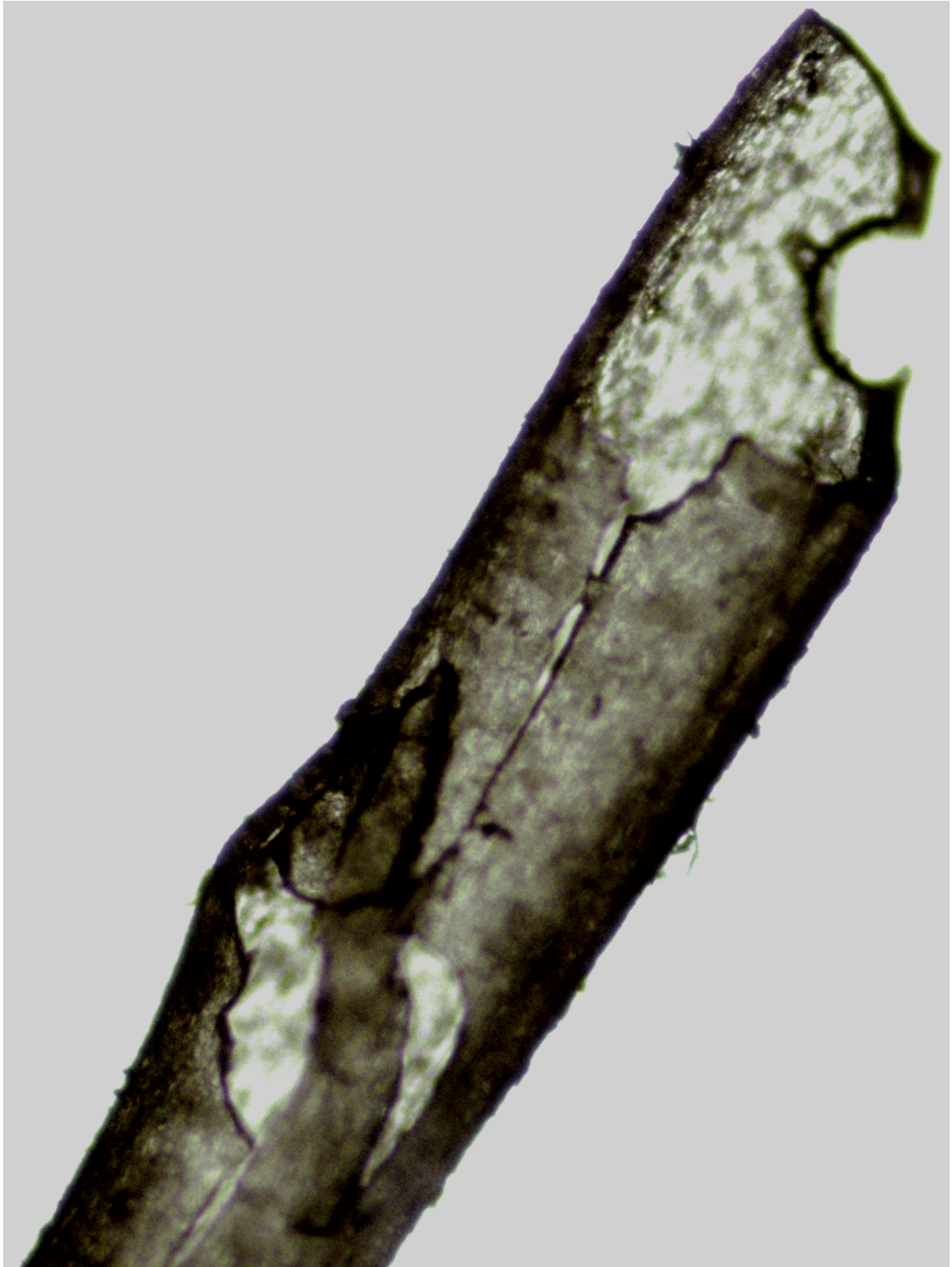
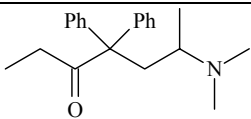
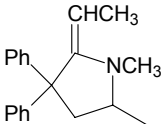
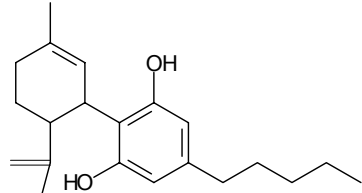
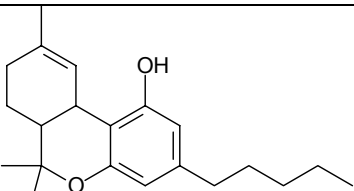
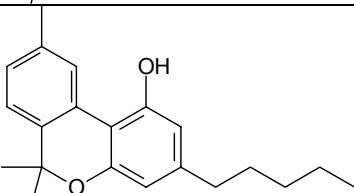
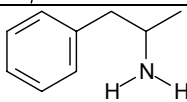
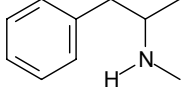
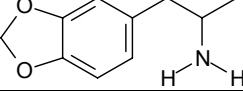
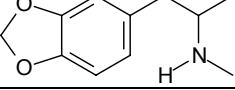
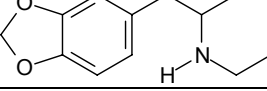
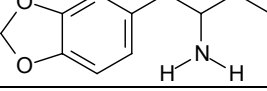
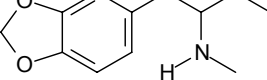


Abbildung 15. Mikroskopische Aufnahme des schlauchförmigen PDMS-Sorbens, das sich aus der Kapillare gelöst hat (Vergr. 1:100).

Tabelle 8. Strukturformeln und physiko-chemische Daten der Analyten.

Substanz	Struktur	Octanol-Wasser- Verteilungskoeffizient log p (Octanol-Wasser)	Siedetemperatur (760 Torr) [°C]
Methadon		3,93 ^a	392 ^d
EDDP		3,63 ^d	369 ^{bc}
CBD		8,01 ^a	381-385 ^{bc}
THC		7,60 ^a	420-424 ^{bc}
CBN		7,23 ^a	422 ^d
Amphetamin		1,76 ^a	203 ^a
MA		2,07 ^a	208 ^b
MDA		1,64 ^a	278 ^{bc}
MDMA		1,92 ^d	279 ^{bc}
MDEA		2,26 ^d	301 ^d
BDB		1,94 ^d	299 ^d
MBDB		2,39 ^d	310 ^{bc}

^a Daten aus SRC PhysProp Datenbank [85]^b Daten aus Beilstein Datenbank [86]^c Siedepunkte aus Datenbank normalisiert auf 760 Torr^d Für die jeweilige Strukturformel mit Chemdraw Chemical Properties Pro [87] berechnete Werte

4.2 Einfluß physikochemischer Eigenschaften der Analytmoleküle auf die SPDE-Extraktion

Als Maßzahl für die Absorption von Molekülen im lipophilen PDMS dient der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient. Zur weiteren Charakterisierung der organischen Analyte wird die Siedetemperatur herangezogen. Diese Größen sind auch deshalb von Interesse, weil sie Einfluß auf den Übergang der Moleküle in den Headspace haben. Die Stoffgrößen der Analyten sind in Tabelle 8 aufgelistet, die sich wesentlich in diesen Eigenschaften unterscheiden:

Amphetamine und Designeramphetamine weisen deutlich niedrigere Siedepunkte (203-310 °C) und eine geringere Affinität zu lipophilen Phasen auf ($\log p$ 1,64-2,39), als die anderen Analyten (Methadon, EDDP und Cannabinoide. Siedebereich 369-422 °C, $\log p$ 3,63-8,01).

Die über der Extraktionstemperatur aufgetragenen Peakflächen ergeben charakteristische Profile. Die Temperaturprofile von Amphetamin und Methamphetamin zeigen ein ausgeprägtes Maximum bei 50 °C (Abbildung 16). Dieses Maximum ist das Temperaturoptimum, d.h. die Temperatur mit der größten Extraktionsausbeute bzw. den größten Peakflächen im Chromatogramm. Für die Designerdrogen (MDA, MDMA, MDEA, BDB und MBDB) liegt das Temperaturoptimum zwischen 50 °C und 70 °C (Abbildung 17), das Maximum der Temperaturprofile ist breiter und nicht so ausgeprägt wie bei Amphetamin und Methamphetamin. EDDP und Methadon weisen ein Temperaturoptimum bei 70 °C auf (Abbildung 18). Das Temperaturprofil der Cannabinoide (CBD, THC und CBN) zeigt hingegen kein Maximum, die Peakfläche erhöht sich weiter mit ansteigender Temperatur (Abbildung 19).

Diese experimentellen Befunde lassen sich mit den physiko-chemischen Eigenschaften der Moleküle korrelieren. Mit steigenden Siedepunkten in der Reihenfolge Amphetamine, Designeramphetamine, EDDP und Methadon steigen auch die Temperaturoptima der SPDE-Extraktion an. Gegenläufige Desorptionseffekte bei höheren Temperaturen führen danach zu einer Abnahme der Ausbeute, so daß eine Kurvenform mit Maximum resultiert. Der kleinere Oktanol-Wasser-Koeffizient und damit die geringere Affinität zum Sorbens begünstigt diesen Desorptionseffekt. CBD, THC und CBN mit den höchsten Siedepunkten der untersuchten Substanzen zeigen erwartungsgemäß auch die höchsten Temperaturoptima (90-120 °C). Aufgrund der hohen Affinität zum Sorbens ($\log p$ 7,6) kommt es für THC zu keiner

Ausbildung eines Maximums und die Ausbeute bleibt ab 100 °C konstant. Desorptionseffekte sind hier nicht zu beobachten. Eine Steigerung der Temperatur über 100 °C hinaus, die für CBN und CBD zu einer weiteren Steigerung der Extraktionsausbeute führt, ist hier nicht möglich, weil die Siedetemperatur der verwendeten Salzlösung überschritten wird und an der Einstichstelle des Vial-Septums kondensierender Wasserdampf die Kapillare benetzt.

Aus diesen Befunden ist ersichtlich, daß nicht alle Analyten mit einer Methode erfaßt werden können (vgl. auch Abschnitt 3.6). Die Temperaturoptima von Amphetaminen und Cannabinoiden liegen zu weit auseinander. Bei der Wahl einer Temperatur als Kompromiß (z.B. 70 °C) werden beide Substanzklassen mit weniger als 10% der maximalen Ausbeute erfaßt.

Als Extraktionstemperatur für die Amphetamine und Designerdrogen wurde 50 °C gewählt. Die simultane Bestimmung von EDDP, Methadon und den Cannabinoiden wurde bei 90 °C als Kompromiß zwischen den Optima der Einzelsubstanzen durchgeführt. Bei dieser Temperatur wird Wasserdampfkondensation vermieden.

Die optimale Temperatur für die SPDE-Extraktion gleicht der für die SPME-Extraktion ermittelten [35, 37], so daß bei Portierung von SPME zu SPDE-Methoden der zeitraubende Vorgang der Temperaturoptimierung des Systems unterbleiben kann.

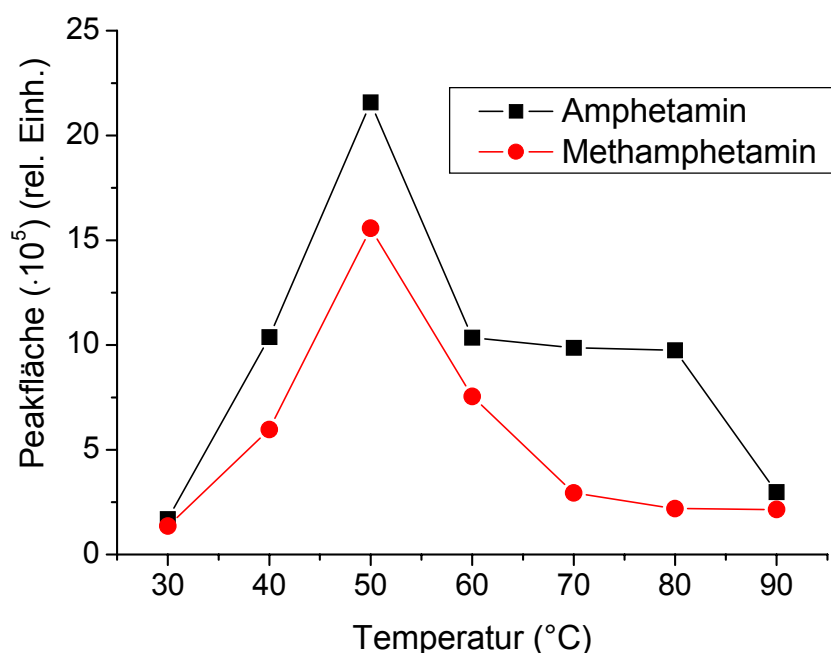


Abbildung 16. Abhängigkeit der Peakfläche von der Temperatur (Amphetamin und Methamphetamin).

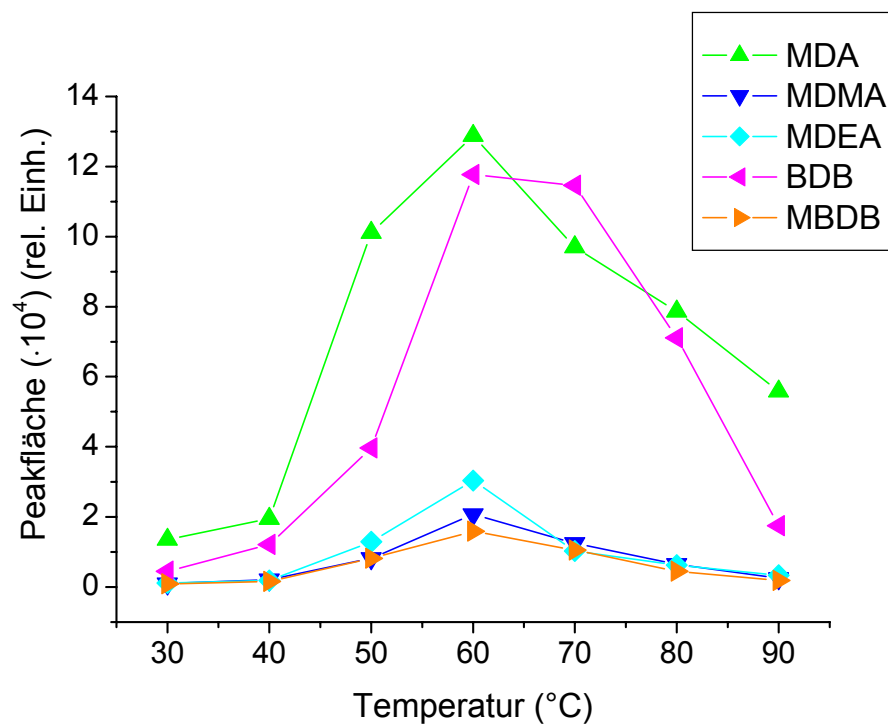


Abbildung 17. Abhängigkeit der Peakfläche von der Temperatur (Designerdrogen).

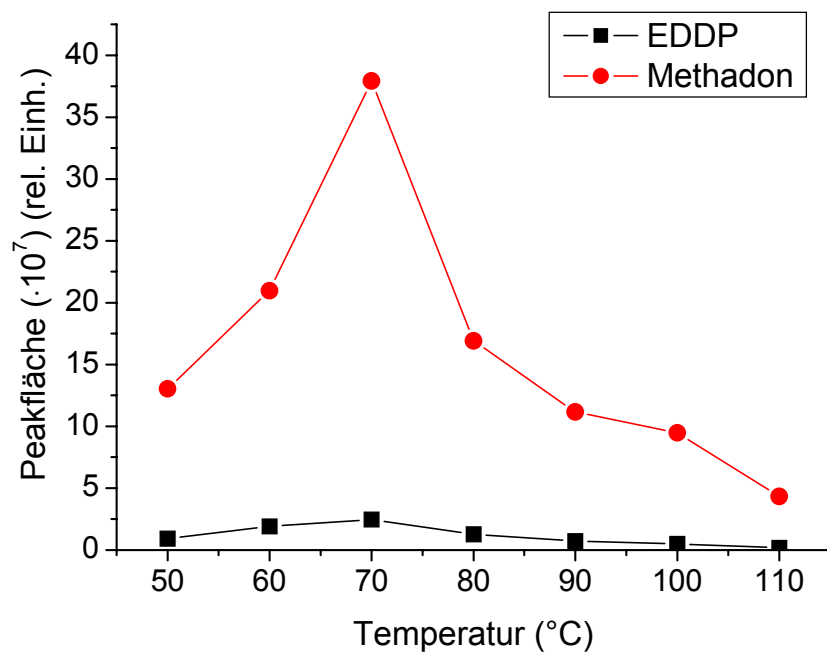


Abbildung 18. Abhängigkeit der Peakfläche von der Temperatur (EDDP und Methadon).

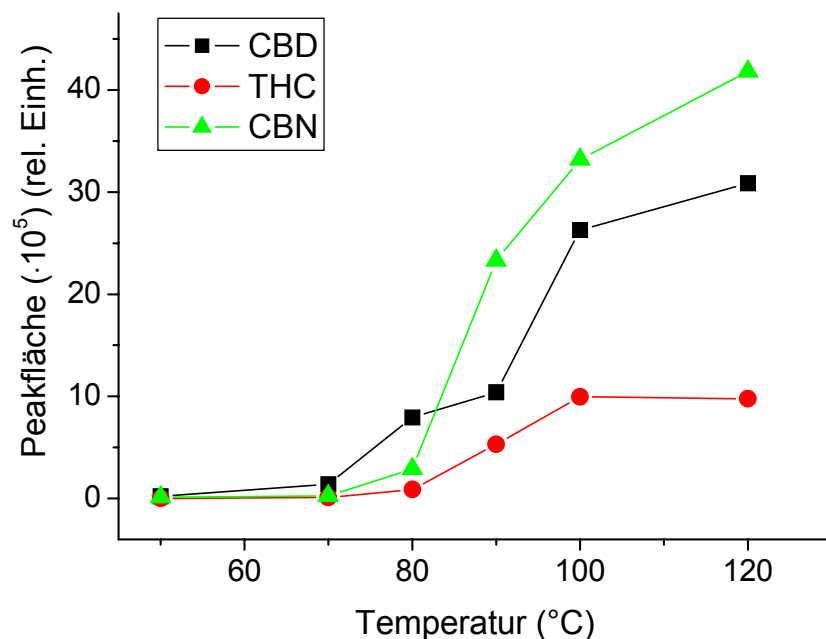


Abbildung 19. Abhängigkeit der Peakfläche von der Temperatur (Cannabinoide).

4.3 Agitationstechniken und Extraktionsausbeute

Wie in Abschnitt 2.4.7 beschrieben, kann der Standardagitator des Autosamplers nicht zum Schütteln der Probelösung während des SPDE-Extraktionsprozesses verwendet werden. Durch den Pumpvorgang während der Extraktion erfolgt aber eine gewisse Durchmischung der Lösung. Bei der Analyse der leichter flüchtigen Analyten mit niedrigen Siedpunkten (Amphetamine und Designerdrogen) konnten so auch ohne Agitation höhere absolute Extraktionsausbeuten erzielt werden als bei vergleichbaren SPME-Extraktionen (Tabelle 9). Das Gleichgewicht zwischen wässriger und gasförmiger Phase liegt für diese Analyten schon zu Beginn des Extraktionsprozesses vor. Die höheren Ausbeuten bei der SPDE sind durch die beschriebene höhere Kapazität des Sorbens zu erklären.

Bei den Cannabinoiden wird das Gleichgewicht ohne Agitation nur langsam erreicht. Mit Magnetrührer kann die Gleichgewichtseinstellung wesentlich verkürzt werden. Bei gleicher Extraktionszeit konnten ohne Rühren nur geringe Ausbeuten erzielt werden (0,1-2%). Unter Rühren konnten auch für diese Analyten Extraktionsausbeuten erzielt werden (0,6-12,9%), die vergleichbaren SPME-Extraktionen entsprechen (Tabelle 10). Bei einer Extraktionszeit von 20 min und effektiver Durchmischung wurde im Vergleich zur nicht durchmischten Probe die 4 bis 16-fache Menge an Substanz angereichert. Der Massentransport erfolgt durch die

Agitation in der wässrigen Phase viel schneller als in den zwei anderen Phasen [63] und ist somit nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Diffusionsprozesses. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Popp et al. [88], bei denen für hochsiedende Komponenten ohne Rühren praktisch keine Gleichgewichtseinstellung erreicht wurde.

Tabelle 9. Extraktionsausbeuten der Amphetamine und Designeramphetamine.

Extraktionsausbeute [%]	A	MA	MDA	MDMA	MDEA	BDB	MBDB
SPDE ohne Agitation	12,9	10,2	15,0	16,7	14,7	12,7	11,6
SPME mit Agitation [35]	10,2	8,0	11,4	12,6	11,1	10,3	9,2

Tabelle 10. Extraktionsausbeuten von EDDP, Methadon und Cannabinoiden.

Extraktionsausbeute [%]	EDDP	Methadon	CBD	THC	CBN
SPDE ohne Agitation	0,5	1,2	0,3	2,0	0,1
SPDE mit Agitation (Rühren)	8,1	12,9	1,7	8,4	0,6
SPME mit Agitation (Schütteln) [37]	6,4	9,5	1,9	7,5	0,3

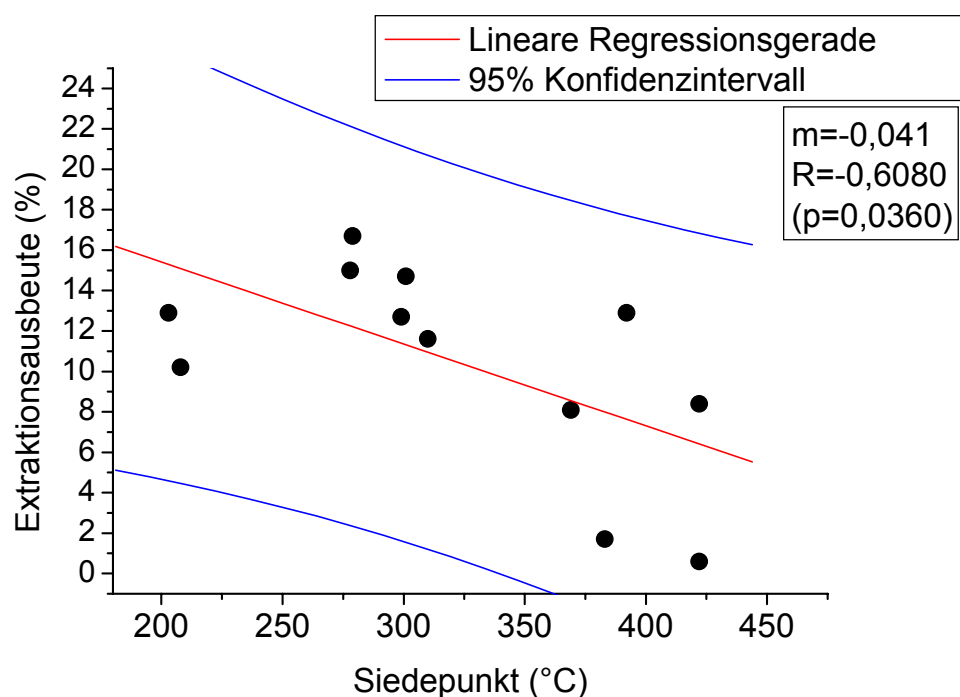


Abbildung 20. Abhängigkeit der Extraktionsausbeute vom Siedepunkt.

Für die semivolatilen Analyten liegen die experimentell bestimmten absoluten Extraktionsausbeuten wie erwartet im Bereich von 0,6 bis 16,7% (siehe Abschnitt 2.3). Wie für eine Headspace-Extraktionstechnik zu erwarten ist, nimmt mit steigenden Siedetemperaturen der Analyten die Extraktionsausbeute ab (Abbildung 20). Trotzdem reichen die ermittelten Ausbeuten auch für die hochsiedenden Analyten (Cannabinoide) für eine valide Analyse aus. Im Gegensatz zu einer Flüssig-Injektion, wird bei der SPDE die Gesamtmenge der extrahierten Analyten auf die GC-Säule überführt, bei einer Flüssig-Injektion nach herkömmlicher Probenvorbereitung (Flüssig-Flüssig-Extraktion oder SPE) wird aber nur ein Bruchteil des Extraktes eingespritzt (z.B. 2 µl von 200 µl, entsprechend 1%). In diesem Bereich liegt auch die SPDE-Extraktionsausbeute von CBN (0,6%).

Gegenüber SPME konnte mit der SPDE bei gleicher Extraktionszeit eine Steigerung der Extraktionsausbeuten um den Faktor 1,3 (Mittelwert) erreicht werden, ein Ergebnis, das weit unterhalb der theoretisch möglichen Steigerung um den Faktor 4 liegt, der sich aus dem gegenüber SPME erhöhten Volumen des Sorbens ergibt. Während bei der SPME allerdings für die in Tabellen 9 und 10 angegebenen Extraktionsausbeuten schon der Gleichgewichtszustand herrschte, wurde bei der SPDE – wie im nächsten Abschnitt beschrieben wird - aus Gründen der Analysendauer nicht der Gleichgewichtszustand abgewartet. Durch Steigerung der Extraktionszyklen läßt sich die Extraktionsausbeute weiter steigern, was bei SPME nicht möglich ist.

4.4 Extraktion

Extraktionen mit PDMS, das 10% Aktivkohle (AK) enthält, führten bei allen Analyten zu größeren Extraktionsausbeuten als mit reinem PDMS-Sorbens (Abbildung 21). Laut Angabe des Herstellers wird durch den Kohlenstoffzusatz die Polarität der Beschichtung erhöht und die Oberfläche vergrößert, so daß die Analyten, die auch polare Gruppen besitzen (Tabelle 8), besser absorbiert werden als in reinem, apolaren PDMS. PDMS-AK-Sorbentien wurden für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet.

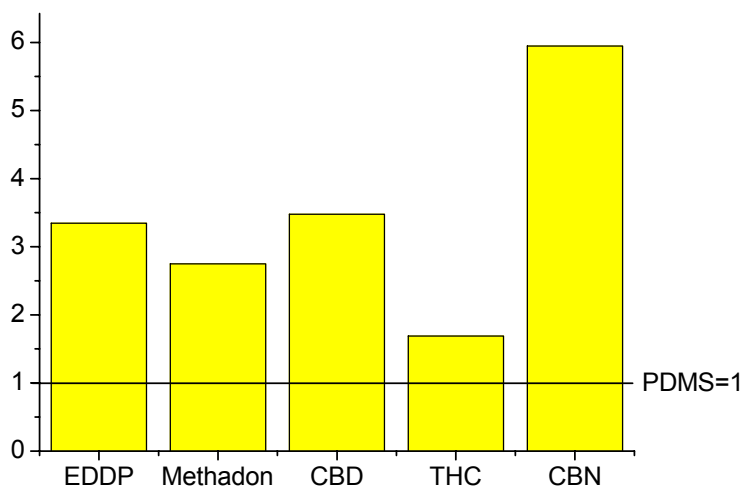


Abbildung 21. Vergleich der Extraktionsausbeuten mit PDMS-Aktivkohle-Sorbens gegenüber PDMS-Sorbens (PDMS=1).

Die Extraktionszeit und die Extraktionsausbeute hängen vom Volumen, Volumenstrom und der Anzahl der SPDE-Zyklen ab (siehe Abschnitt 2.4.5). Um eine routinetaugliche, effiziente Methode zu entwickeln, sollte die Probenvorbereitung im Autosampler (Hydrolyse, Extraktion, Derivatisierung) nur so lange dauern wie die nachfolgende Chromatographie. Es ist dann möglich, bereits während der Trennung und Detektion einer Probe im GC/MS System, die nächste mit dem Autosampler vorzubereiten. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, dauert die Einstellung des Gleichgewichtes bei der SPDE länger als bei SPME. Die Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung überschreitet die Dauer des GC-Programms bei weitem, so daß ein Kompromiß für die SPDE-Extraktion eingegangen werden muß. Die Analyse außerhalb des Gleichgewichtszustandes des 3-Phasen-Gleichgewichtes ist möglich, da die Extraktion vom Autosampler reproduzierbar kontrolliert wird und interne Standards benutzt werden [63].

Für die Amphetamine und Designerdrogen stellen 50 Zyklen einen guten Kompromiß hinsichtlich der Analysenzeit und der Empfindlichkeit dar (Abbildung 22). Der optimale Volumenstrom betrug 200 µl/s (Abbildung 23). Die besten Resultate wurden mit einem Volumen von 1000 µl erzielt. Mit Gleichung 6 (S. 8) errechnet sich eine Extraktionszeit von 8,3 min.

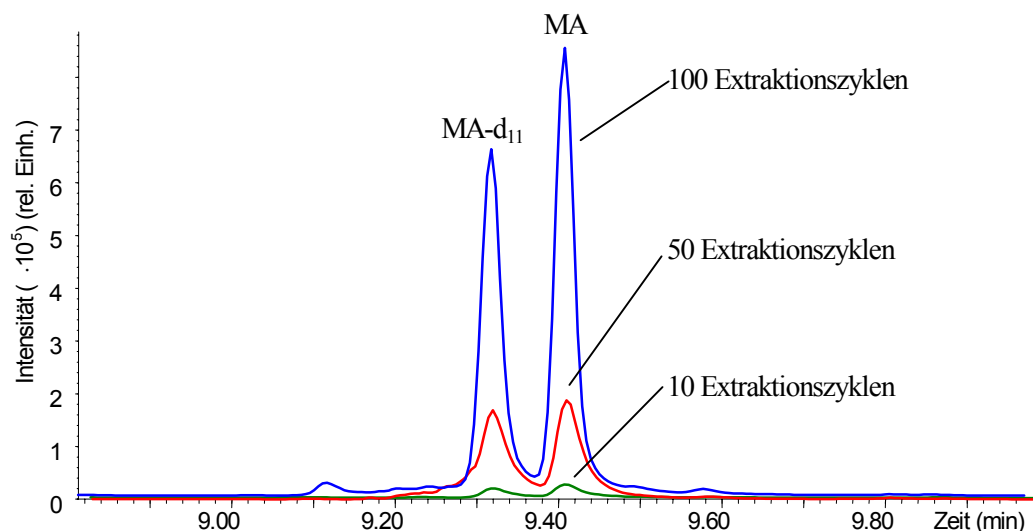


Abbildung 22. HS-SPDE/GC/MS TIC Chromatogramme von Methamphetamin (MA) (2 ng/mg), gemessen mit unterschiedlichen Extraktionszyklen.

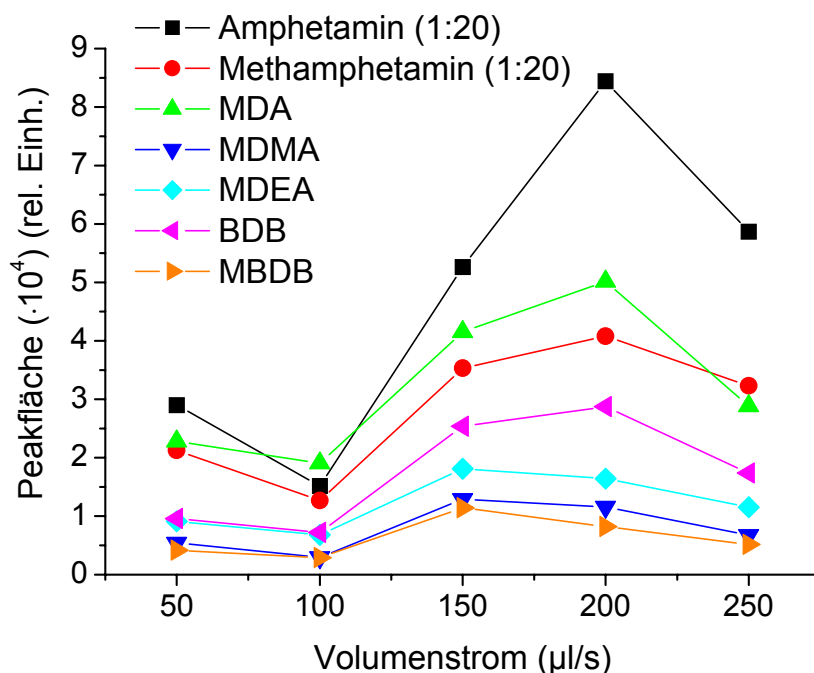


Abbildung 23. Extraktionsprofile von Amphetaminen und Designerdrogen (2 ng/mg).

Für die Cannabinoide liegt der optimale Volumenstrom bei 50 $\mu\text{l/s}$ (bei einem Volumen von 1000 μl). Bei größeren Volumenströmen nimmt die Extraktionsausbeute ab (Abbildung 24). Mit dem gewählten Volumenstrom (50 $\mu\text{l/s}$) dauert allerdings ein Extraktionszyklus viermal so lange wie bei den Amphetaminen (200 $\mu\text{l/s}$). Als Kompromiß zwischen Analysenzeit und Empfindlichkeit wurden in diesem Fall 30 Zyklen gewählt (Extraktionszeit: 20 min nach Gleichung 6, S. 8), obwohl auch hier das Gleichgewicht noch nicht erreicht wurde. Aus Abbildung 25 ist zu entnehmen, daß zunächst ein linearer Zusammenhang zwischen

Extraktionszyklen und Extraktionsausbeute besteht. Ab 100 Extraktionszyklen kommt es für THC und CBN zu einer Abnahme der Ausbeute. Aufgrund der langen Zeit für die Erhitzung der Probe von über 1 h können oxidative oder pyrolytische Effekte, wie sie von Spronck et al. [89] und Tjeerdema [90] beschrieben wurden, die Cannabinoide angreifen. CBN erwies sich als stabilste Komponente, ein Gleichgewichtszustand stellt sich ab 200 Extraktionszyklen ein.

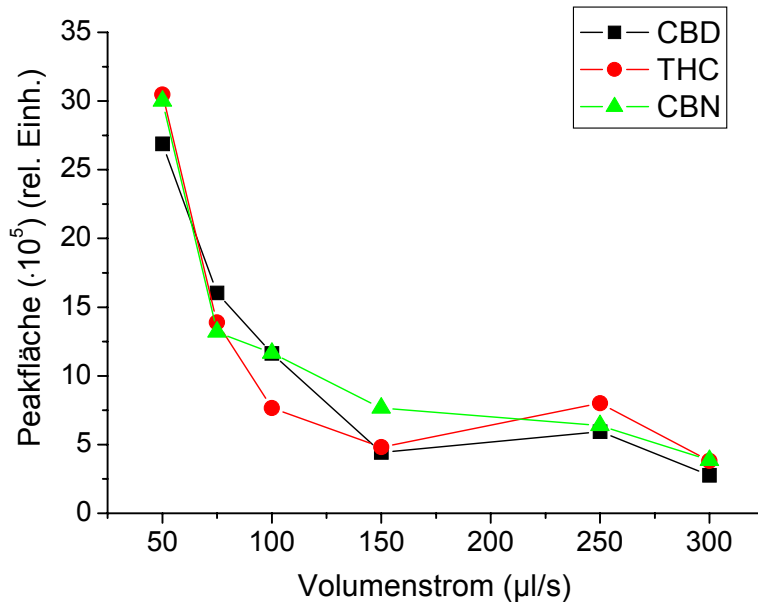


Abbildung 24. Extraktionsprofile von Cannabinoiden (2 ng/mg).

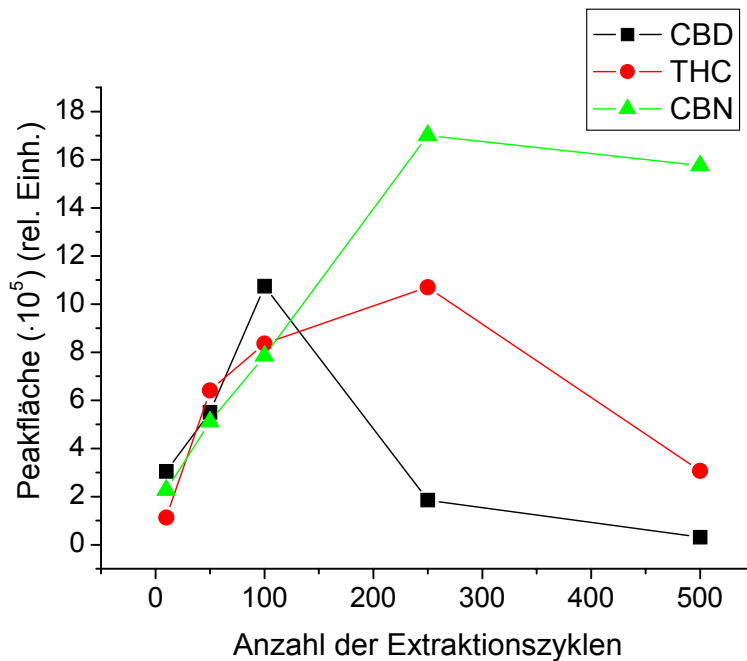


Abbildung 25. Abhängigkeit der Peakfläche von der Anzahl der SPDE-Zyklen (Cannabinoide).

4.5 Derivatisierung

Die Derivatisierungsreagenzien haben im Vergleich zu den Analyten niedrige Siedetemperaturen (MBTFA: 123-124 °C, MSTFA: 131,5 °C, jeweils bei 760 Torr nach [86]). Bei den vorliegenden Bedingungen liegen die Derivatisierungsreagenzien komplett gasförmig vor (25 µl MBTFA oder MSTFA sind im Derivatisierungsvial nach Erreichen der Temperatur verdampft). Auf Rühren oder Schütteln des Reagenz während der Derivatisierung kann daher verzichtet werden.

Für die Amphetamine startet die Derivatisierungsreaktion mit MBTFA sehr langsam (1-4 Zyklen). In dieser Zeit erfolgt die Diffusion von MBTFA in das Sorbens bis zur Gleichgewichtseinstellung. Ein Grund für diese lange Initialphase ist die geringe Temperatur von 50 °C (der Hersteller empfiehlt für MBTFA 120 °C [73]). Nach 5 Zyklen kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Peakflächen, die Reaktion ist nach 6 Zyklen beendet (Abbildung 26).

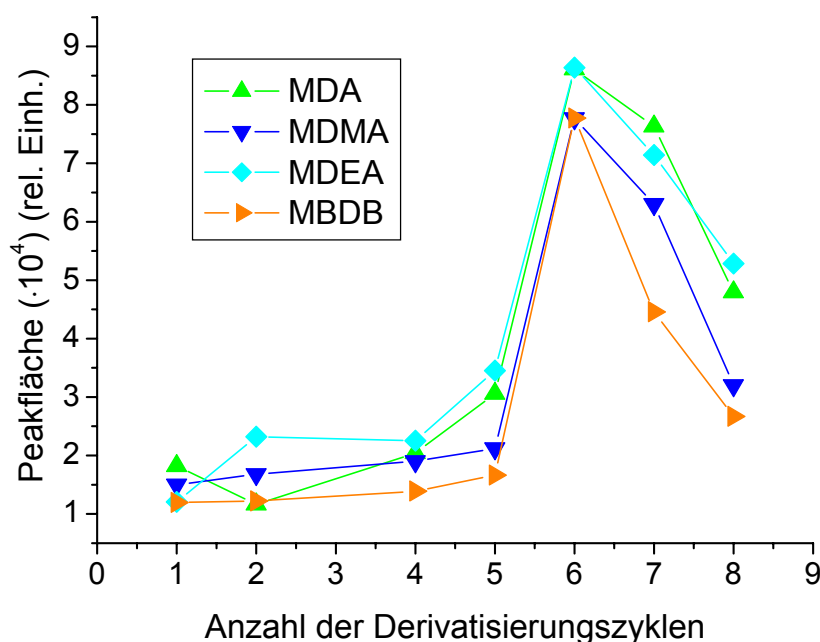


Abbildung 26. Derivatisierungszeit-Profile mit MBTFA (2 ng/mg).

Für die Cannabinoide sind dagegen schon nach dem ersten SPDE-Zyklus signifikante Mengen der silylierten Produkte nachweisbar. Die Reaktion verläuft aufgrund der höheren Temperatur (90 °C) schneller. MSTFA ist reaktiver als MBTFA, der Hersteller empfiehlt hier nur Temperaturen von 60-80 °C. Auch für die Cannabinoide ist die Reaktion nach 6 Zyklen beendet (Abbildung 27).

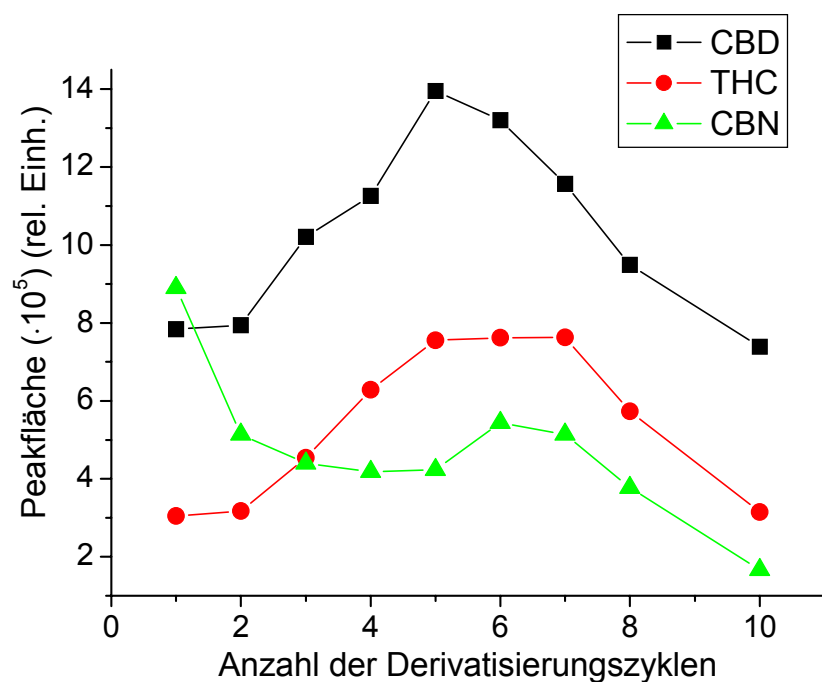


Abbildung 27. Derivatisierungszeit-Profile mit MSTFA (2 ng/mg).

Für sämtliche untersuchten Analyten führen weitere Derivatisierungszyklen wieder zu einer Abnahme der Reaktionsausbeute durch Desorptionseffekte. Das relativ kleine Zeitfenster mit maximaler Ausbeute kann mit dem Autosampler reproduzierbar eingestellt werden und hatte keinen Einfluß auf die Methodenpräzision (siehe Abschnitte 4.7 und 4.9).

Es ist wichtig, für jede Probe ein separates Vial mit Derivatisierungsreagenz zu verwenden, weil sonst eine Verschleppung wegen des Desorptionseffektes erfolgen würde.

4.6 Desorption

Mit den großvolumigen Standard-Inlet-Linern (4 mm ID) des Split-Splitless-Injektors des Gaschromatographen konnten nur unzureichende Ergebnisse erzielt werden. Ein starkes Tailing mit Peak-Asymmetrie Faktoren $\geq 2,71$ wurde am Beispiel von EDDP und Methadon ermittelt (Abbildung 28). Mit für Headspace-Injektionen entwickelten Linern (1,5 mm ID) wurden schärfer fokussierte Peaks mit Peak-Asymmetrie Faktoren $\leq 2,25$ erhalten. Der lineare Volumenstrom im Liner wird durch die Verkleinerung des Volumens gesteigert und die Desorptionskinetik verbessert, so daß die Analyten schneller und in schmalen Banden auf die chromatographische Säule transportiert werden. Schon für die SPME-Desorption hatten

sich Liner mit kleinem Durchmesser bewährt [69]. Alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit dem 1,5 mm ID Liner durchgeführt.

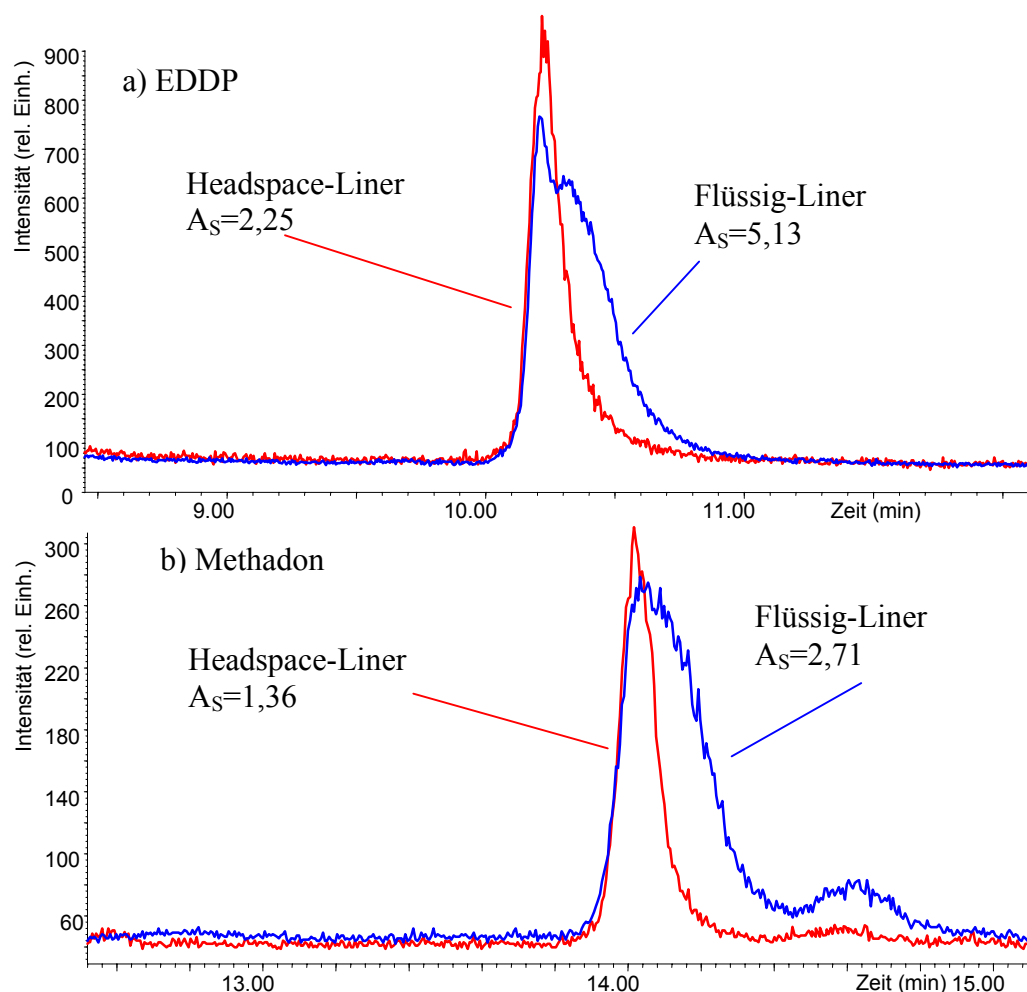


Abbildung 28. Vergleich der HS-SPDE/GC/MS SIM Chromatogramme von EDDP (a) und Methadon (b) (jeweils 1 ng/mg) mit unterschiedlichen GC-Inlet-Linern (A_S =Peak-Asymmetrie Faktor).

Einen weiteren Einfluß auf die Peaksymmetrie besitzt die Predesorptionszeit. Die thermische Equilibrierung im GC-Injektor sollte nicht länger als 15 s dauern, weil bei längeren Predesorptionszeiten ein Peak-Tailing zu beobachten ist, das zu verringerter Empfindlichkeit führt, obwohl die breiteren Peaks eine größere Fläche haben (Abbildung 29 und 30). In diesen 15 s wird thermisches Gleichgewicht erreicht, damit die Analyten danach durch den Stickstoffstrom vollständig desorbiert werden.

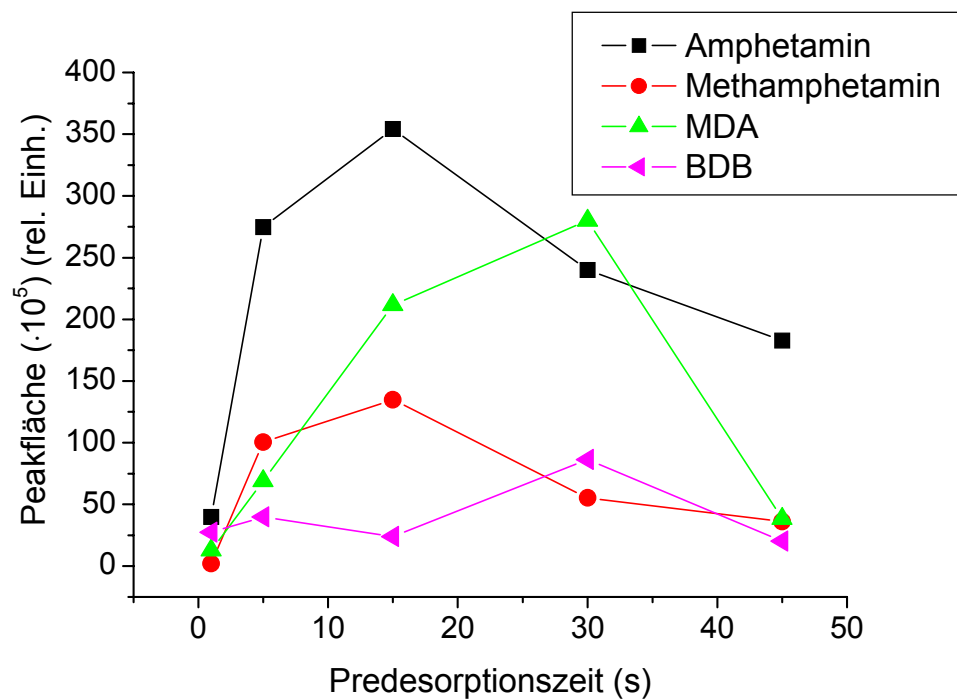


Abbildung 29. Einfluß der Predesorptionszeit auf die Extraktionsausbeute.

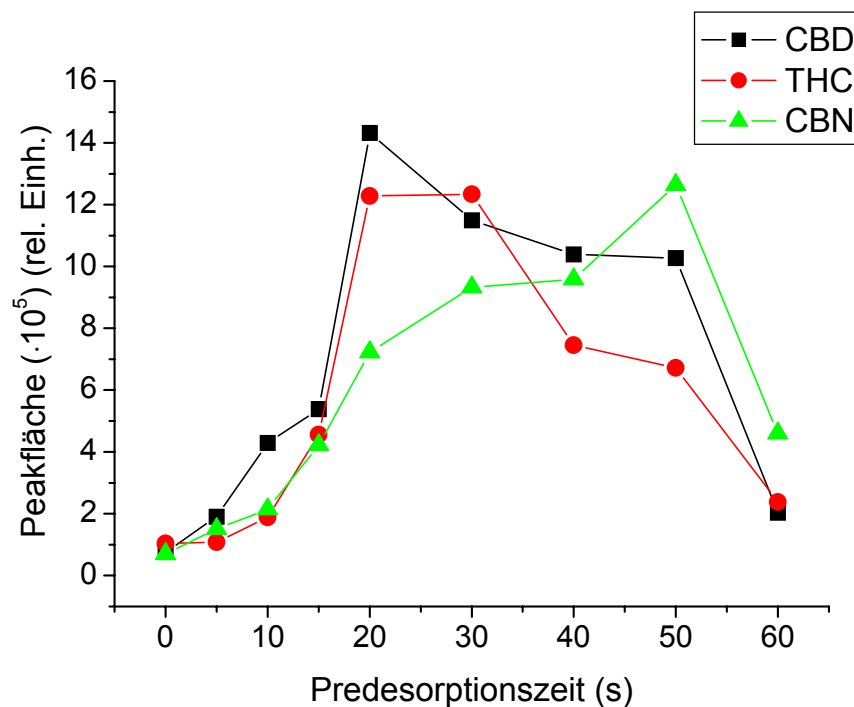


Abbildung 30. Einfluß der Predesorptionszeit auf die Extraktionsausbeute.

Die Kondensation der Analyten im Spritzenkörper wird durch den vor der Desorption aus der Gasstation aufgezogenen Stickstoff verhindert. In den Blank-Läufen wurde keine Verschleppung beobachtet. Eine Reaktion der Analyten mit der Metalloberfläche der Nadel, die zu einem Verlust der Analyten führen oder Geisterpeaks im Chromatogramm erzeugen würde, wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Das Desorptionsvolumen und der Volumenstrom haben einen bedeutenden Einfluß auf den Desorptionsprozeß. Für die Amphetamine und Designerdrogen erhöhte sich die chromatographische Ausbeute mit steigendem Desorptionsvolumen. Das größte Spritzenvolumen betrug 2,5 ml. Bei Volumenströmen $\geq 50 \mu\text{l/s}$ wurde der Druck im Injektor zu hoch, so daß das GC-System eine Fehlermeldung zeigte. Zusätzlich war der Diffusionsprozeß aus dem Sorbens bei diesen größeren Volumenströmen kinetisch begrenzt, so daß eine Abnahme der chromatographischen Ausbeute und ein Peak-Tailing beobachtet wurde. Die größten Peakflächen wurden mit dem kleinsten justierbaren Volumenstrom von $10 \mu\text{l/s}$ und einem Stickstoffvolumen von 2,5 ml erreicht (Abbildung 31). Für die Cannabinoide wurden die größten Peakflächen bei einem Volumenstrom von $10 \mu\text{l/s}$ und einem Stickstoffvolumen von nur 1 ml erzielt (Abbildung 32).

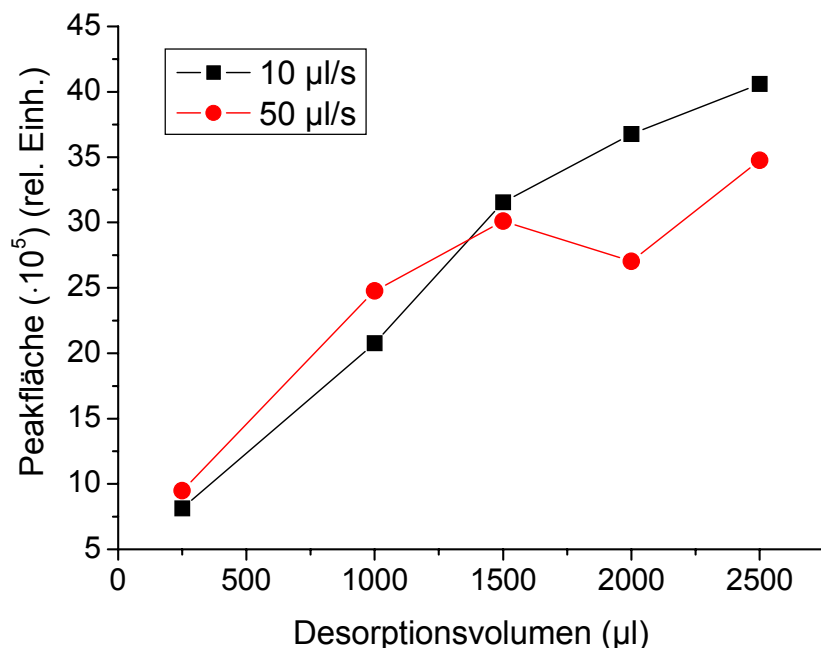


Abbildung 31. Einfluß von Volumenstrom und Desorptionsvolumen auf die Extraktionsausbeute (Amphetamin, 2 ng/mg).

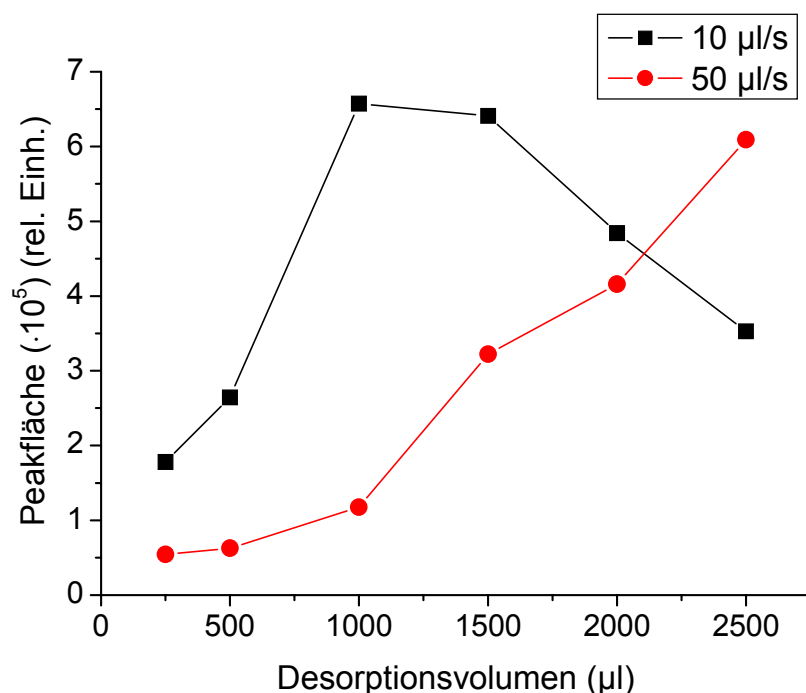


Abbildung 32. Einfluß von Volumenstrom und Desorptionsvolumen auf die Extraktionsausbeute (CBN, 2 ng/mg).

Wegen der langen Desorptionszeit im Vergleich zu Flüssiginjektionen wurde die GC-Säule zu Beginn des Ofenprogramms bei 90 °C gehalten, um die Analyten besser zu fokussieren (bei Flüssiginjektionen starten die GC-Programme bei 110 °C (Amphetamine) bzw. 160 °C (Cannabinoide)). Bei höheren Ofenstarttemperaturen wurde Peak-Tailing beobachtet (Peak-Asymmetrie Faktoren >1,3; Tabelle 11). Bei 90 °C lagen die Peak-Asymmetrie Faktoren bei 0,93-1,30. Die Peaks weisen eine sehr gute Symmetrie und gute Integrierbarkeit auf. Niedrigere Temperaturen (30-70 °C) verbessern die chromatographische Trennung nicht (Asymmetrie Faktor 0,78-1,15).

Tabelle 11. Peakflächen und Peak-Asymmetrie Faktoren (A_S) bei verschiedenen Ofen-Starttemperaturen.

	40 °C		90 °C		160 °C	
	Fläche	A_S	Fläche	A_S	Fläche	A_S
THC	48.764	1,10	53.448	1,04	25.937	1,79
THC-d ₃	38.239	0,82	43.827	0,93	24.696	1,33
CBD	11.621	0,78	26.485	1,09	8.837	1,33
CBN	28.570	1,15	56.911	1,30	54.620	1,67

4.7 Validierungsergebnisse mit konventioneller GC/MS

In Abbildungen 33 bis 35 sind Chromatogramme von dotierten und undotierten Haarproben dargestellt. Während routinemäßiger Analysen von 10 authentischen Proben von Personen ohne Drogenkonsum wurden keine interferierenden Peaks der Haarmatrix beobachtet. Peakreinheit und Selektivität sind damit sichergestellt.

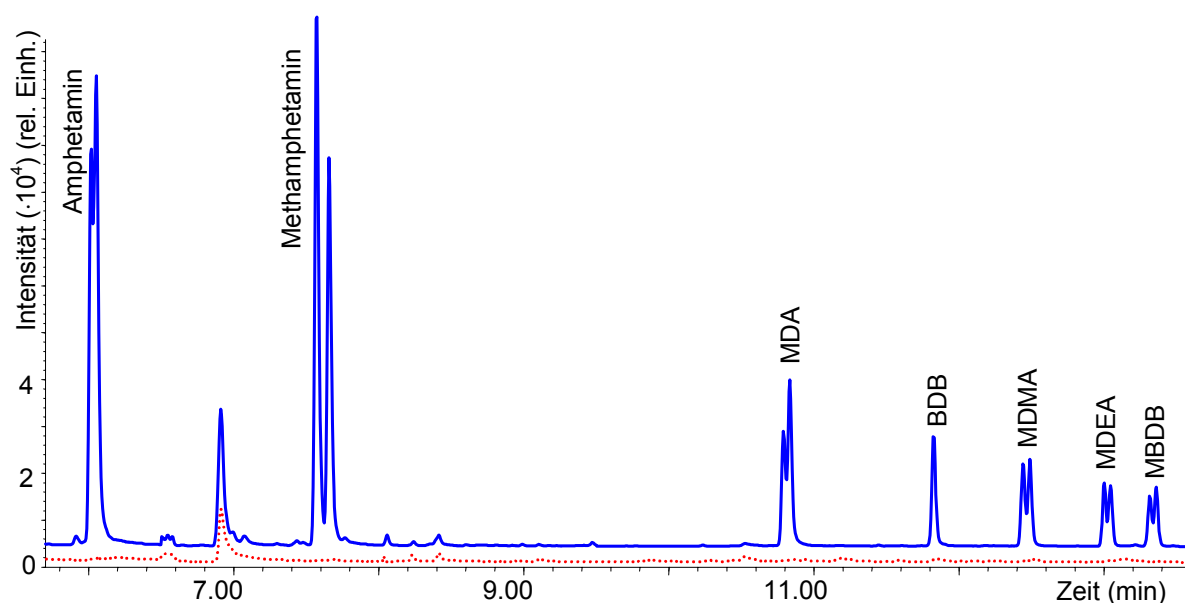


Abbildung 33. HS-SPDE/GC/MS TIC Chromatogramm einer dotierten Haarprobe mit Analyten und deuterierten internen Standards (Amphetamin und Methamphetamin: 1 ng/mg, MDA, BDB, MDMA, MDEA und MBDB: 2,5 ng/mg) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (gestrichelte Linie).

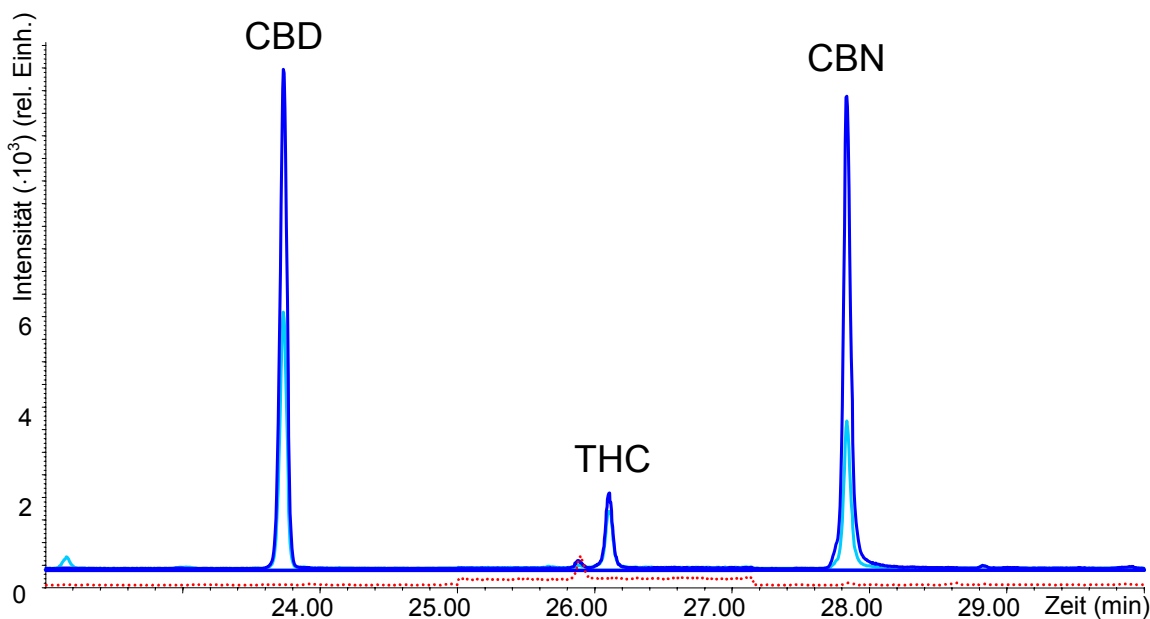


Abbildung 34. HS-SPDE/GC/MS SIM Chromatogramm einer dotierten Haarprobe (CBD, THC, CBN, je 2 ng/mg) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (gestrichelte Linie).

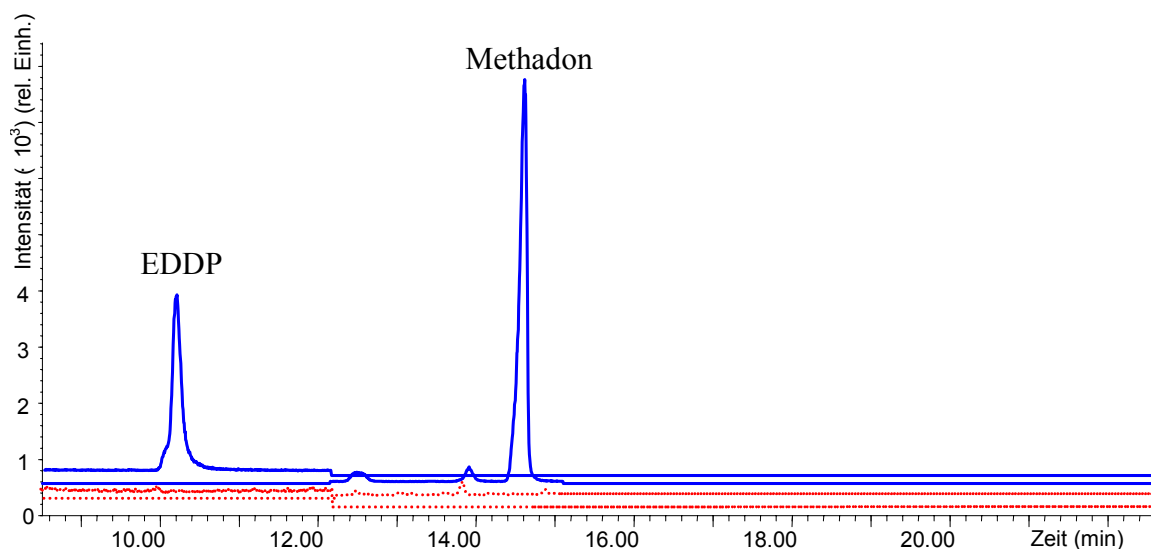


Abbildung 35. HS-SPDE/GC/MS SIM Chromatogramm einer dotierten Haarprobe (EDDP und Methadon, 2 ng/mg) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (gestrichelte Linie).

Die Stabilität der Analyten in gleichzeitig vorbereiteten Proben wurde durch Vergleich der Resultate der Proben am Anfang und am Ende einer Analysensequenz mit 32 Proben im Autosampler überprüft. Zusätzlich wurde die Stabilität der vorbereiteten Proben unter Lagerbedingungen (8 °C, 7 Tage) untersucht. Unter diesen Bedingungen wurden keine signifikanten Verluste von Analyten beobachtet ($p < 0.05$). Die absoluten Extraktionsausbeuten sind in Tabellen 9 und 10 angegeben und in Abschnitt 4.3 diskutiert. Die Validierungsergebnisse sind in Tabelle 12 angegeben. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,03 und 0,19 ng/mg. Die Methodenpräzision beträgt 1,4 bis 4,1% (Intraday) und 4,2 bis 14,6% (Interday). Diese Präzisionsdaten erfüllen die Vorgaben aus der Literatur für bioanalytische Methodenvalidierung (Präzision $< 15\%$, im Bereich der Nachweisgrenze $< 20\%$ [91]), sowie die Vorgaben des Journal of Chromatography (Präzision $< 10\%$ für hohe Konzentration, Präzision $< 20\%$ für niedrige Konzentration [92]). Für BDB wurde im Vergleich zu den anderen Analyten eine schlechte Präzision von 14,4-14,6% (Interday) ermittelt. Dies lässt sich mit dem fehlenden analogen deuterierten internen Standard erklären. Die Kalibrierfunktionen zeigten für alle Analyten einen linearen Zusammenhang (Pearson-Linearitätstest, $p < 0.05$). Die Proportionalität zwischen extrahierter Stoffmenge und Konzentration (Gleichung 2, S. 8) konnte experimentell belegt werden.

Material von 2 dotierten Haarproben, das aus früheren Laborvergleichsuntersuchungen (Ringversuchen) der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCH) noch verfügbar war, wurde mit HS-SPDE/GC/MS untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13

dargestellt und liegen innerhalb des von anderen Laboratorien ermittelten gültigen Meßbereichs. Allein die Bestimmung von Methamphetamin im Ringversuch 1/2002 liegt außerhalb des gültigen Bereichs. Gegenüber dem Sollwert wurden mit der SPDE-Methode zumeist höhere Werte erzielt (insbesondere bei den Amphetaminen). Dies kann dadurch erklärt werden, daß der Großteil der am Ringversuch beteiligten Laboratorien die Haare mit Ultraschall behandelte und die Proben nicht vollständig hydrolysiert wurden, was zu signifikant niedrigeren Meßwerten führt [93].

Die Validierungsdaten beweisen die Empfindlichkeit, Selektivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Die Analyse von Haarproben von Drogenabhängigen zeigte die praktische Anwendbarkeit der entwickelten Methoden.

Tabelle 12. Validierungsergebnisse GC/MS SIM.

	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]	Präzision Intraday		Präzision Interday		Regressionsgerade			
			2 ng/mg [%]	20 ng/mg [%]	2 ng/mg [%]	20 ng/mg [%]	Linearität [ng/mg]	m	b	R
Methadone	0,05	0,34	5,3	5,1	6,2	7,9	0,1-20	0,302	0,014	0,997
EDPP	0,03	0,17	3,1	4,6	5,2	4,5	0,1-20	0,253	0,021	0,996
CBD	0,09	0,44	5,1	3,6	7,6	5,0	0,1-20	2,212	0,012	0,998
THC	0,14	0,45	5,3	3,4	5,7	3,7	0,2-20	0,719	-0,020	0,999
CBN	0,12	0,44	6,0	2,3	6,1	3,3	0,1-20	0,967	0,009	0,998
A	0,04	0,14	1,6	1,4	4,6	4,2	0,05-20	0,603	0,016	0,999
MA	0,05	0,21	3,4	2,6	5,9	4,3	0,05-20	0,594	0,013	0,998
MDA	0,03	0,11	2,4	2,3	7,8	4,2	0,05-20	0,604	0,005	0,998
MDMA	0,13	0,70	3,0	2,4	7,3	4,5	0,1-20	0,528	0,026	0,995
MDEA	0,19	1,94	4,1	3,5	9,5	4,4	0,2-20	1,227	-0,017	0,992
BDB	0,07	0,40	3,7	3,1	14,6	14,4	0,1-20	0,231	0,016	0,992
MBDB	0,18	1,37	3,6	2,6	10,2	8,8	0,2-20	0,455	0,019	0,999

Tabelle 13. Ergebnisse der Messungen von zwei Proben aus Ringversuchen.

	Ringversuch DHF 1/2001			Ringversuch DHF 1/2002		
	Sollwert	Gültiger Bereich	SPDE	Sollwert	Gültiger Bereich	SPDE
THC	0,17	0,09-0,25	0,20	1,36	0,94-1,78	1,16
Amphetamin	9,70	7,30-12,10	8,83	2,90	2,10-3,70	3,34
Methamphetamin	5,50	4,10-6,90	6,38	1,96	1,38-2,54	2,63
MDMA	9,30	7,10-11,50	9,24	5,23	3,91-6,55	5,67
MDA	10,30	7,90-12,70	12,37	1,89	1,33-2,45	3,03
MDEA	8,50	6,50-10,50	9,95	1,09	0,73-1,45	1,25
Methadon	2,10	1,30-2,90	1,98	-	-	-

4.8 MS/MS

Zur Optimierung der MS/MS-Methode wurden Produkt-Ionen-Scans durchgeführt. Als Ausgangsionen wurden jeweils die drei intensivsten Ionen (SIM-Ionen) aus dem Fullscan-Spektrum des ersten Quadrupols gewählt. Die Fragmentierung der Ausgangsionen erfolgt im zweiten Quadrupol durch stoßinduzierte Zerfälle mit Argonmolekülen, die durch eine zusätzliche Energie angeregt wurden. Die Produktspektren wurden im Quadrupol 3 Fullscan-Modus aufgenommen, um das intensivste Produkt-Ion festzustellen. Als Beispiel für die erzielte spektrale Qualität sind Produkt-Ionenmassenspektren von MDMA-TFA und THC-TMS mit ihren entsprechenden deuterierten internen Standards in Abbildung 36 dargestellt. Danach wurde die Fragmentierungsreaktion des gewählten Ausgangs-/Produkt-Ionenpaars durch Variation der Kollisionsenergie zwischen -5 und -20 eV optimiert. Die optimalen Fragmentierungsreaktionen und die Kollisionsenergien für alle Analyten sind in Tabelle 5 angegeben.

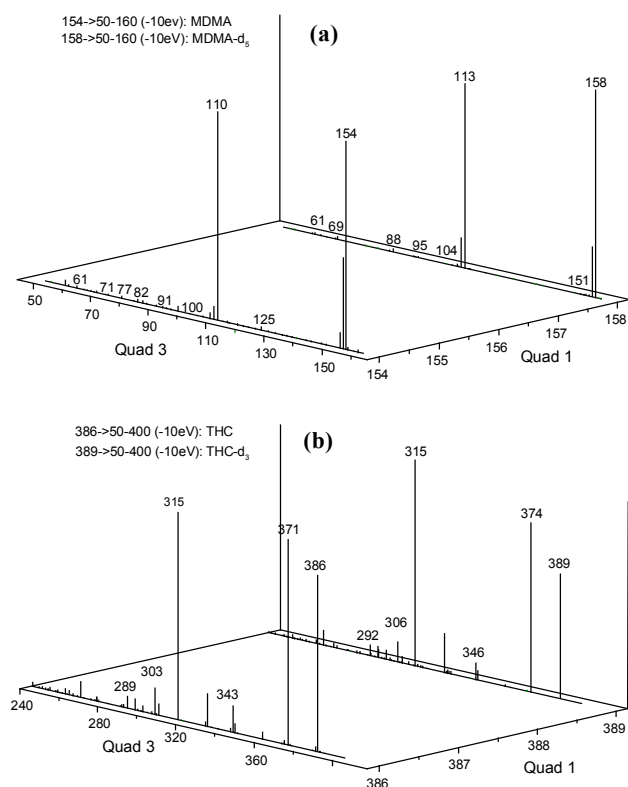


Abbildung 36. MS/MS Produkt-Ionen Massenspektren in 3D-Ansicht des Analyten und des co-eluierenden deutertierten Standards: (a) m/z 154 MDMA and m/z 158 MDMA- d_5 , (b) m/z 386 THC and m/z 389 THC- d_3 .

Zum Vergleich wurden dotierte Haarproben nach HS-SPDE-Extraktion mit dem GC/MS SIM-Modus sowie dem GC/MS/MS MRM Modus analysiert. Abbildung 37 (a) und (b)

zeigen im SIM-Modus gemessene Chromatogramme. Die Peaks sind in Matrixpeaks eingebettet (deutlich erkennbar um die Peaks der synthetischen Designerdrogen MDA bis MBDB, Abbildung 37 (a)). In Abbildung 37 (c) und (d) sind MRM-Chromatogramme für die gleichen Mengen der Analyten in identischen Haarproben gezeigt. Ausgeprägte Peaks erscheinen für alle Analyten. Peaks von Verunreinigungen sind nicht mehr zu erkennen. In Tabelle 14 sind die Signal-Rausch-Verhältnisse (Signal-to-noise-ratios; S/N) bei einer Konzentration von 1 ng/mg für die Chromatogramme aus Abbildung 37 angegeben. Mit MRM wurden 8-35mal höhere S/N-Verhältnisse erzielt. Offensichtlich erreichte MRM für die Bestimmung der Drogen in Haarproben eine höhere Empfindlichkeit und Selektivität als der SIM-Modus. Die Herstellerangabe, wonach sich im MRM-Modus trotz der geringeren Ionenausbeute das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, kann mit diesen Befunden bestätigt werden. Folglich wurde der MRM-Modus für alle weiteren MS/MS Experimente verwendet.

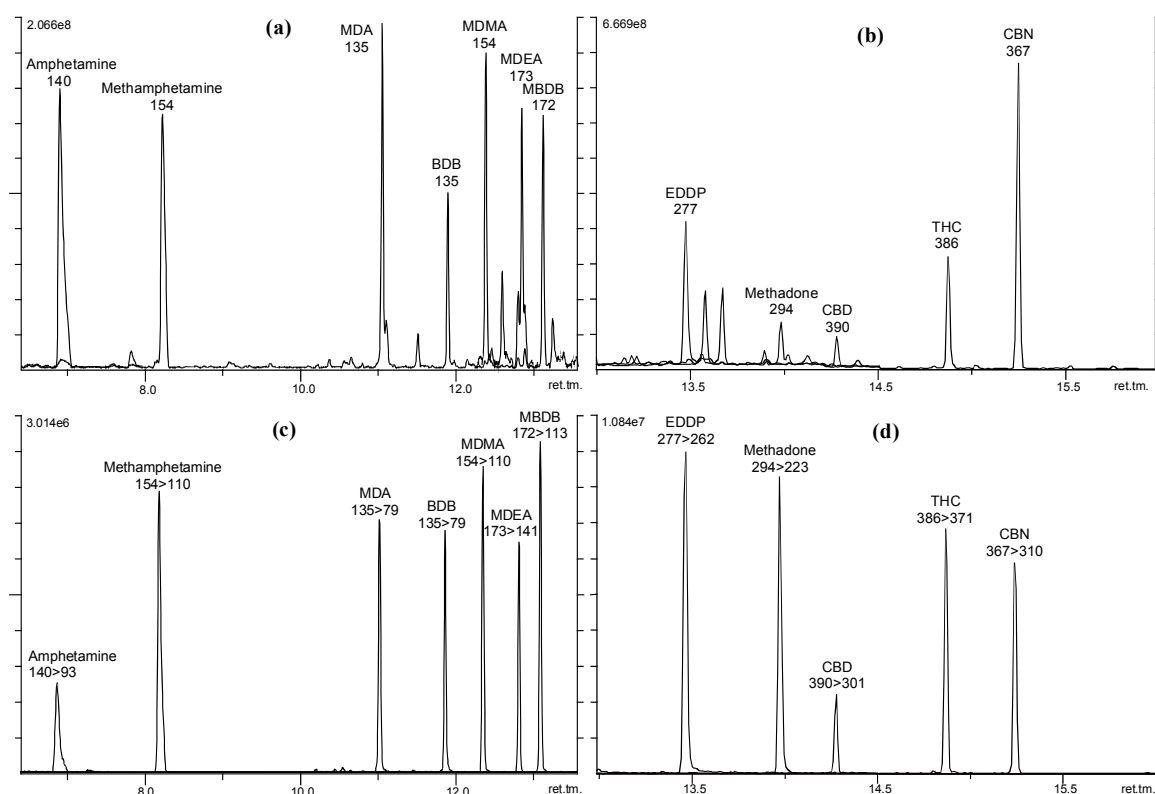


Abbildung 37. HS-SPDE/GC/MS SIM Chromatogramme (a,b) im Vergleich zu den korrespondierenden HS-SPDE/GC/MS/MS MRM Chromatogrammen (c,d) identischer dotierter Haarproben (1 ng/mg aller Analyten).

Tabelle 14. Signal-Rausch-Verhältnisse dotierter Haarproben (1 ng/mg), gemessen im SIM oder MRM Modus. Korrespondierende Chromatogramme siehe Abbildung 37.

	Signal-Rausch-Verhältnis (S/N)		
	SIM Modus	MRM Modus	MRM/SIM Quotient
Methadon	236	3679	16
EDPP	268	9339	35
CBD	319	4556	14
THC	232	6036	26
CBN	323	2557	8
Amphetamin	1020	25846	25
MA	1042	29551	28
MDA	468	7153	15
MDMA	498	6631	13
MDEA	336	7585	23
BDB	680	7286	11
MBDB	219	7585	35

4.9 Validierungsergebnisse MS/MS

Die Methodenvalidierungsdaten für den MS/MS MRM-Modus sind in Tabelle 15 zusammengefaßt. Alle 12 Drogen zeigten gute Linearitäten der Regressionsgeraden mit Korrelationskoeffizienten größer als 0,99. Die erreichten Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,006 und 0,052 ng/mg. Durch Benutzung von deuterierten internen Standards und der verringerten manuellen Probenvorbereitung überstiegen die Präzisionen nie 7,8%.

Table 15. Validierungsergebnisse GC/MS/MS MRM.

	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]	Präzision Intraday		Präzision Interday		Regressionsgerade			
			2 ng/mg [%]	20 ng/mg [%]	2 ng/mg [%]	20 ng/mg [%]	Linearität [ng/mg]	m	b	R
Methadon	0,009	0,034	4,2	1,8	6,1	4,0	0,02-20	3,848	2,767	0,995
EDPP	0,006	0,025	2,9	0,5	3,1	2,3	0,02-20	0,292	0,051	0,999
CBD	0,052	0,187	5,0	0,4	7,8	7,6	0,10-20	3,715	-0,019	0,998
THC	0,040	0,137	2,7	2,3	5,4	3,1	0,05-20	0,692	-0,030	0,998
CBN	0,051	0,216	4,8	0,6	6,2	4,4	0,05-20	5,618	3,177	0,998
A	0,033	0,122	3,5	3,3	4,9	4,5	0,05-20	0,109	0,048	0,999
MA	0,029	0,107	4,5	3,7	7,6	6,0	0,05-20	0,343	0,391	0,999
MDA	0,014	0,044	3,0	2,9	6,1	2,5	0,05-20	0,803	-0,092	0,996
MDMA	0,036	0,100	1,4	1,1	3,7	1,2	0,05-20	0,510	0,181	0,999
MDEA	0,039	0,331	2,6	2,0	6,2	2,4	0,10-20	0,518	0,193	0,999
BDB	0,020	0,078	5,3	4,7	6,5	6,3	0,05-20	0,824	-0,016	0,998
MBDB	0,030	0,114	1,9	1,2	3,6	2,2	0,05-20	0,553	0,213	0,998

4.10 Vergleich GC/MS-SIM mit GC/MS/MS-MRM

Der Vergleich der mit GC/MS auf dem Agilent-System und der mit GC/MS/MS auf dem Kodiak-System erzielten Validierungsergebnisse ergibt, daß sowohl Nachweis- und Bestimmungsgrenzen durch MS/MS gesenkt, als auch die Intra- und Interday Präzisionen verbessert werden konnten. Mit MS/MS liegt die relative Standardabweichung der Meßergebnisse (Präzision) für alle Analyten unterhalb 7.8%. Insbesondere die Interday-Präzision von BDB, die bei GC/MS-SIM sehr groß war (14,4-14,6%), konnte durch MS/MS auf 6,5-6,3% verbessert werden. Trotz der bereits sehr selektiven SPDE-Extraktion konnten die Ergebnisse durch Anwendung der selektiven MS/MS Technik nochmals verbessert werden. Die MS/MS-Technik mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometern hat sich als ebenso robust erwiesen wie die SIM-Technik auf herkömmlichen Massenspektrometern. Die auf dem Agilent GC/MS-System entwickelten SPDE-Methoden konnten jeweils innerhalb eines Tages auf das Kodiak MS/MS System übertragen werden und praktisch auf Workshops der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) im Oktober 2001 in Mainz und der Society of Hair Testing (SOHT) im Mai 2002 in Berlin demonstriert werden.

4.11 Nachweis der Anwendbarkeit zur Bestimmung authentischer Haarproben

HS-SPDE Chromatogramme von authentischen Haarprobe sind in Abbildungen 38-42 gezeigt.

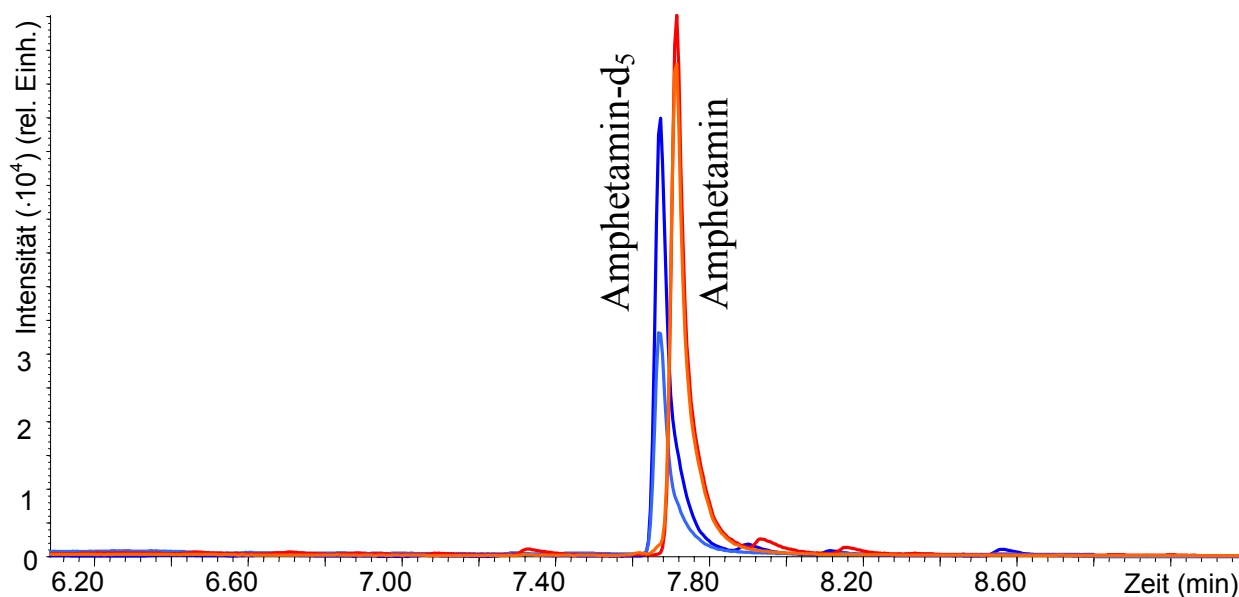


Abbildung 38. HS-SPDE/GC/MS SIM-Chromatogramm: Authentische Haarprobe mit Amphetamin (1,46 ng/mg).

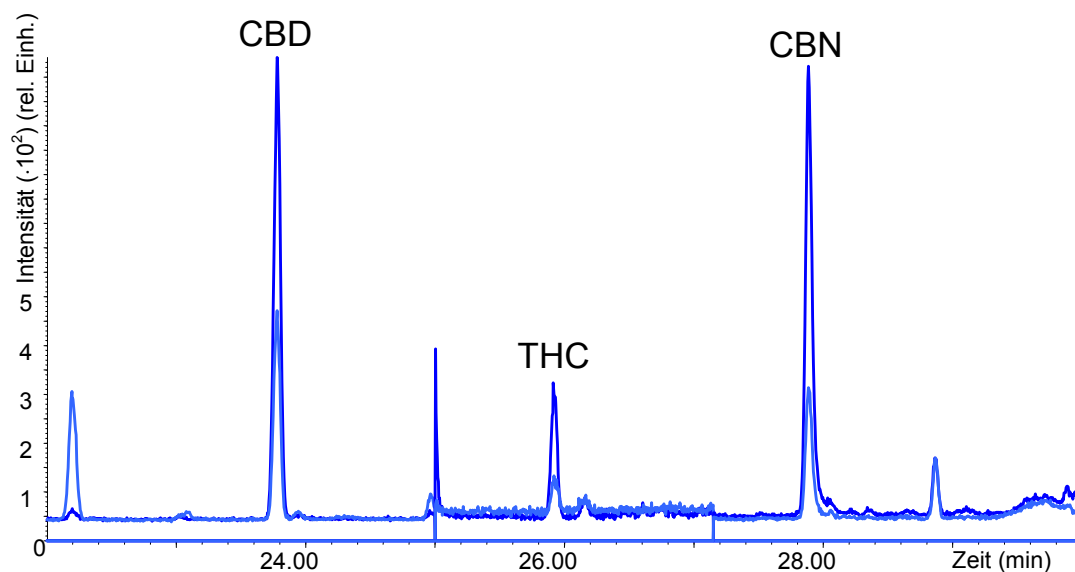


Abbildung 39. HS-SPDE/GC/MS SIM Chromatogramm einer authentischen Haarprobe (1,25 ng/mg CBD, 0,44 ng/mg CBN. Die Konzentration von THC ist unter der Bestimmungsgrenze (ca. 0,25 ng/mg).

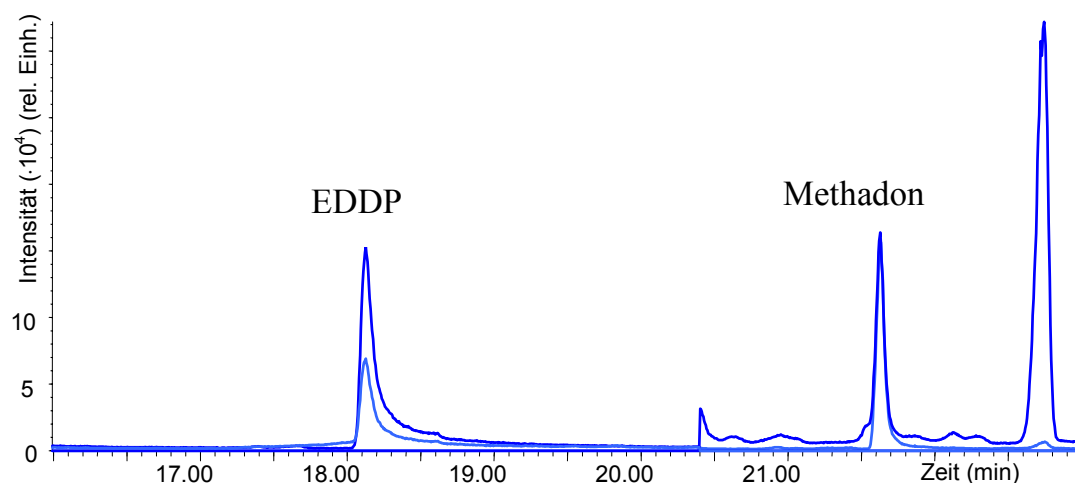


Abbildung 40. HS-SPDE/GC/MS SIM Chromatogramm einer authentischen Haarprobe (1,47 ng/mg EDDP, 1,98 ng/mg Methadon).

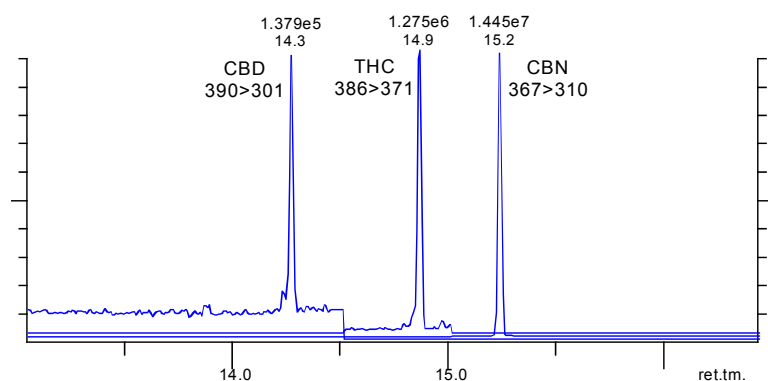


Abbildung 41. HS-SPDE/GC/MS/MS MRM Chromatogramm einer authentischen Haarprobe eines Cannabis-Abhängigen (0,50 ng/mg CBD, 0,95 ng/mg THC und 1,93 ng/mg CBN).

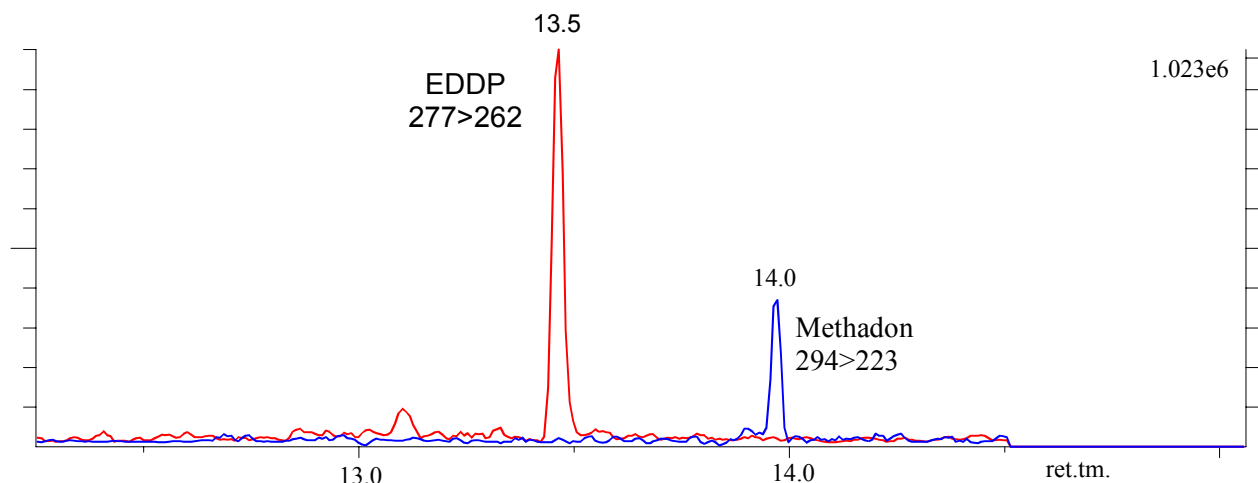


Abbildung 42. HS-SPDE/GC/MS/MS MRM Chromatogramm einer authentischen Haarprobe eines Methadon-substituierten Patienten (0,93 ng/mg EDDP, 1,30 ng/mg Methadon).

Amphetamin, MDMA, EDDP, Methadon, THC, CBD und CBN konnten in Haaren von Drogenkonsumenten nachgewiesen werden, die Befunde sind Tabellen 16 und 17 jeweils für die gleichen Patienten zu entnehmen. Methamphetamin und die weniger gebräuchlichen Designerdrogen MDA, MDEA, BDB und MBDB konnten in keiner der untersuchten Haarproben nachgewiesen werden.

Der Konzentrationsbereich der Amphetamine und Designerdrogen in den untersuchten Proben lag mit 0,06-1,46 ng/mg unterhalb des in früheren Untersuchungen bestimmten Bereichs (0,1-26,4 ng/mg [35]). Dieser Effekt kann damit erklärt werden, daß das untersuchte Patientenkollektiv aus ehemaligen Konsumenten harter Drogen (Heroin, Cocain) bestand, ein wahrscheinlich nur gelegentlicher Konsum von Amphetaminen wurde in keinem Fall zugegeben.

Methadon und dessen Metabolit EDDP konnte in den Haaren aller Patienten nachgewiesen werden, die eine Einnahme dieses Substitutionsmedikaments zugegeben hatten, sowie in einem zusätzlichen Fall (P5). Die Konzentration der lipophileren Muttersubstanz Methadon (log p 3,93) war in allen Fällen höher als die des Methadon-Metaboliten EDDP (log p 3,63). Dieses Verhältnis steht im Einklang mit dem Einbauweg der Drogen in Haare über Biomembranen, der lipophilere Substanzen bevorzugt (siehe Abschnitt 2.5.2), sowie Literaturangaben über Konzentrationen von Methadon und EDDP in Haaren [38, 39].

Die Konzentrationen von THC und CBN lagen im allgemeinen zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze. In allen Proben war – wie aufgrund des Einbaus von Drogen in Haare erwartet (siehe Abschnitt 2.5.2) – das lipophilste Cannabinoid CBD (log p 8,01) der Analyt mit der höchsten Konzentration. In der Mehrzahl der Untersuchungen über Cannabinoide in

Haaren wurden ebenfalls CBD und CBN als Hauptanalyten bestimmt [11, 36, 37]. Lediglich in der Publikation von Baptista et al. [94] wurden geringere Konzentrationen von CBD als von THC und CBN beschrieben.

Die Interpretation von Haaranalysen sei an den folgenden drei Fällen aus den Tabellen 16 und 17 beispielhaft dargestellt:

- Der signifikante Einfluß der Haarschaftlänge wird aus dem Ergebnis der Analyse von Probe P1 deutlich. Hier ändert sich die CBD-Konzentration von 1,36 ng/mg (Segment 0-3 cm) über 4,04 ng/mg (Segment 3-6 cm) auf 3,79 ng/mg (Segment 6-9 cm). Die Amphetaminkonzentration ändert sich dagegen von 1,54 ng/mg im kopfnahen Segment auf die sehr geringe Konzentrationen von 0,06 bis 0,08 ng/mg in den beiden anderen untersuchten Segmenten. Im untersuchten Zeitraum (ca. 9 Monate bei einer angenommenen Haarwachstumsrate von 1 cm/Monat, siehe Abschnitt 2.5.1) hat sich der Cannabiskonsum des Patienten offensichtlich in den letzten Monaten verringert (geringere Konzentration im kopfnahen Segment). Zusätzlich muß er in den letzten Monaten vor Haarentnahme Amphetamin und Designerdrogen konsumiert haben. Die bereits seit einem Jahr erfolgte Methadonsubstitutionsbehandlung konnte durch signifikante Mengen an Methadon und dessen Metabolit EDDP in allen Haarsegmenten belegt werden.
- In der Probe P11 wurde Amphetamin in geringen Konzentrationen in den Schamhaaren des Patienten nachgewiesen. Das Kopfhaar war jedoch negativ. Bei Cannabis und Opiaten wurden regelmäßig höhere Konzentrationen in Schamhaaren als in Kopfhaaren beobachtet [8, 95, 96]. Für Amphetamine liegen noch keine Erkenntnisse vor, in welchem Haartyp höhere Konzentrationen auftreten. Der vorliegende Befund zeigt jedoch die Wichtigkeit von Schamhaaruntersuchungen auf. Eine Abnahme der Konzentration im Kopfhaar bis unter die Nachweisgrenze kann auch durch kosmetische Behandlung der Haare [97] oder UV-Einflüsse [98] erklärt werden.
- Beim Vergleich der Patienten P3 und P7 zeigt sich, daß keine Beziehung zwischen der aufgenommenen Konzentration eines Betäubungsmittels und der in den Haaren ermittelten Konzentration gefunden werden kann. Patient 3 nimmt seit 1,5 Jahren täglich 5 ml Methadon ein, Patient 7 dagegen seit einem halben Jahr täglich 11 ml (jeweils 1%ig). Jedoch wurde bei dem Patient mit der höheren Dosis keine höhere Haarkonzentration nachgewiesen. Im Gegenteil hat Patient 3 eine um über den

Faktor 10 höhere Methadonkonzentration in den Haaren. Wie in der Literatur dargestellt ist [99, 100] bedarf die Interpretation von Haaranalysen großer Vorsicht und sollte möglichst Ergebnisse aus Blut- oder Urinuntersuchungen mit einbeziehen.

Tabelle 16. Ergebnisse der Untersuchung authentischer Haarproben auf Amphetamine und Designerdrogen (Positive Befunde aus einem Kollektiv mit Verdacht auf Drogenabhängigkeit, n=20).

Probe	Haartyp	Segment	SPME [ng/mg]		SPDE [ng/mg]	
			A	MDMA	A	MDMA
P1	Kopfhaar (blond), 30 cm	0-3 cm	1,54	0	1,46	0
		3-6 cm	0,06	0	0,25	0
		6-9 cm	0,08	0	0,25	0
P2	Kopfhaar (blond), 12 cm	0-3 cm	0,14	0	0,21	0
		3-6 cm	0,06	0	0,05*	0
		6-12 cm	0	0	0	0
P5	Kopfhaar (braun), 35 cm	0-3 cm	0	0	0	0
		3-6 cm	0,24	0	0,15	0
		6-9 cm	0,08	0	0,06*	0
P11	Kopfhaar (blond), 3 cm	0-3 cm	0	0	0	0
	Schamhaar		0,24	0	0,24	0
P18	Kopfhaar (braun), 7 cm	3-7 cm	0,26	0,55	0,23	0,63

Tabelle 17. Ergebnisse der Untersuchung authentischer Haarproben auf Methadon und Cannabinoide (Positive Befunde aus einem Kollektiv mit Verdacht auf Drogenabhängigkeit, n=11).

Probe	Haartyp	Segment	SPME [ng/mg]					SPDE [ng/mg]					Zugegebener Konsum
			EDDP	Methadon	CBD	THC	CBN	EDDP	Methadon	CBD	THC	CBN	
P1	Kopfhaar (blond) 30 cm	0-3 cm	1,02	6,56	1,75	0,10*	0,14*	4,46	7,65	1,36	0,73	1,48	Seit 1 J. Methadon 0,5g THC/d inhal. (+ Heroin)
		3-6 cm	0,97	8,03	3,13	0,09*	0,12*	1,57	8,87	4,04	0,37*	1,75	
		6-9 cm	1,03	6,30	5,12	0,12*	0,14*	4,62	6,98	3,79	0,25*	0,67	
P3	Kopfhaar (schwarz) 27 cm	0-3 cm	10,15	118,54 ⁺	0	0	0	38,21 ⁺	147,19 ⁺	0	0	0	1,5 J. Methadon (5 ml/d) (+ Cocain)
		3-6 cm	11,95	211,57 ⁺	0	0	0	17,79	237,53 ⁺	0	0	0	
		6-9 cm	14,59	94,01 ⁺	0	0	0	32,02 ⁺	88,31 ⁺	0	0	0	
P4	Kopfhaar (braun) 3,5 cm	0-3,5 cm	1,28	6,94	0	0	0	7,98	4,45	0	0	0	Methadon 6,5 ml/d Selten THC (+ Heroin)
P5	Kopfhaar (braun) 35 cm	0-3 cm	1,50	6,36	0	0	0	2,90	11,36	0	0	0	(Heroin/Cocain)
		3-6 cm	1,29	4,69	0	0	0	0,08	0,00	0	0	0	
		6-9 cm	1,01	1,74	0	0	0	1,86	10,31	0	0	0	
P7	Kopfhaar (blond) 6 cm	0-3 cm	1,85	1,44	0	0	0	5,59	1,38	0	0	0	0,5 J. Methadon 11 ml/d, selten THC
		3-6 cm	2,83	13,24	0	0	0	2,25	10,28	0	0	0	
P8	Kopfhaar (blond) 6 cm	0-3 cm	0,87	8,04	0	0	0	0,08	0,00	0	0	0	Methadon 2,2 ml/d 1g THC/d
		3-6 cm	1,69	7,88	0	0	0	3,12	4,32	0	0	0	
P11	Kopfhaar (blond) 3 cm	0-3 cm	5,22	37,23 ⁺	0	0	0	6,28	39,05 ⁺	0	0	0	Seit 1998 Methadon 9 ml/d 3-4x THC/Woche (+Heroin, Cocain)
	Schamhaar		6,54	44,81 ⁺	0	0	0	5,51	45,07 ⁺	0	0	0	

* Ergebnis unterhalb der Bestimmungsgrenze (qualitativ positiv)

+ Ergebnis außerhalb des Eichbereiches (>20 ng/mg)

0 nicht nachweisbar

4.12 Methodenvergleich mit SPME

Um die Richtigkeit der SPDE-Ergebnisse zu überprüfen, wurden Haarproben von Patienten aus Drogenentgiftungsbehandlungen, die Angaben zu ihrem Konsum gemacht hatten, mittels HS-SPDE/GC/MS und HS-SPME/GC/MS untersucht. HS-SPME/GC/MS wird am Bonner Institut für Rechtsmedizin standardmäßig zur Bestimmung von Drogen in Haarproben eingesetzt. Ringversuche der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) wurden mit SPME erfolgreich durchgeführt.

Die Einzelergebnisse der SPDE und SPME Bestimmungen sind in den Tabellen 16 und 17 angegeben. In den Abbildungen 43-45 sind die Ergebnisse beider Methoden gegeneinander aufgetragen. Eine lineare Korrelation der Ergebnisse läßt sich feststellen (Pearson-Korrelationstest, $p < 0.05$). Die beste Korrelation zeigt die Gruppe der Amphetamine (Abbildung 43), bei denen mit einer Steigung der Regressionsgeraden von $0,909 \pm 0,069$ fast die ideale Winkelhalbierende für die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden erreicht wird. Auch die Ergebnisse für die anderen Analyten liegen dicht an der Winkelhalbierenden (Cannabinoide: $0,911 \pm 0,146$, Abbildung 44; Methadon, EDDP: $0,976 \pm 0,108$, Abbildung 45). Die Betrachtung der Standardabweichungen der Regressionsgeraden läßt keinen Trend für systematische Abweichungen der Ergebnisse beider Methoden erkennen. Auf dem 5%-Signifikanzniveau entsprechen sich die Ergebnisse beider Methoden.

Die Nachweisgrenzen sind vergleichbar mit denen von entsprechenden SPME-Methoden [36, 37], sowie Nachweisgrenzen, die mit herkömmlichen Extraktionen erzielt wurden [11, 94]. Wenn höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, z.B. für THC, das normalerweise in sehr niedrigen Konzentrationen gefunden wird, können die Nachweisgrenzen durch die Erhöhung der Zahl der Extraktionszyklen verringert werden. Unter den in Abschnitt 3.7 beschriebenen Bedingungen, die für möglichst kurze Analysenzeiten optimiert wurden, konnte THC in allen Fällen qualitativ bestimmt werden.

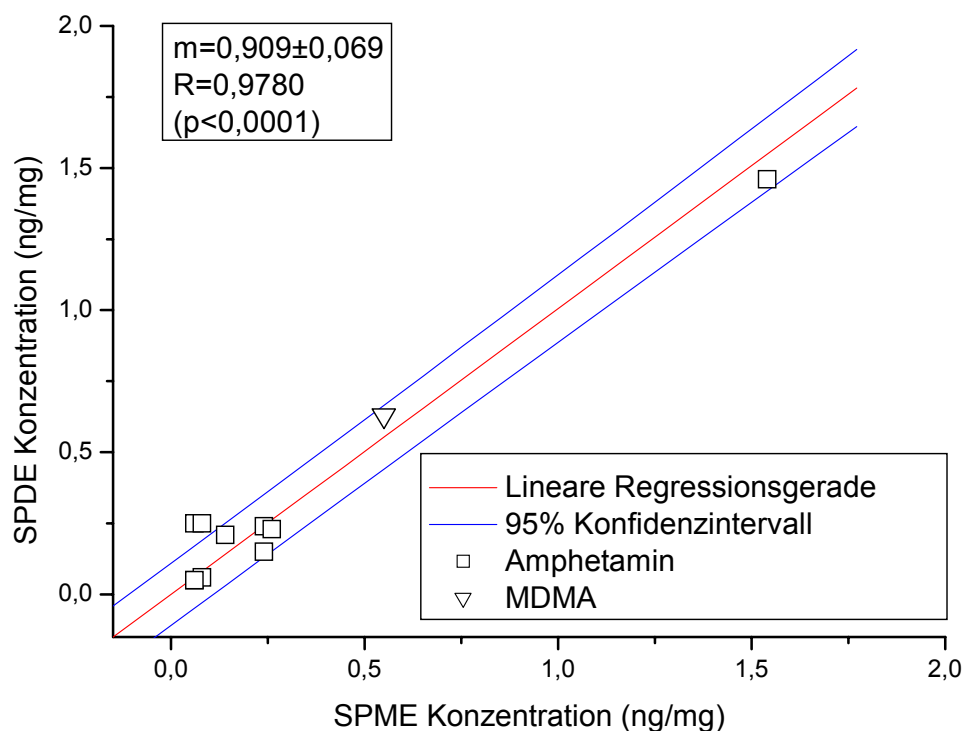


Abbildung 43. Methodenvergleich zwischen SPME und SPDE: Korrelation der Analyseergebnisse realer Haarproben für Amphetamin und MDMA. (Abkürzungen: m =Steigung der Regressionsgeraden, R =Korrelationskoeffizient, p =Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).

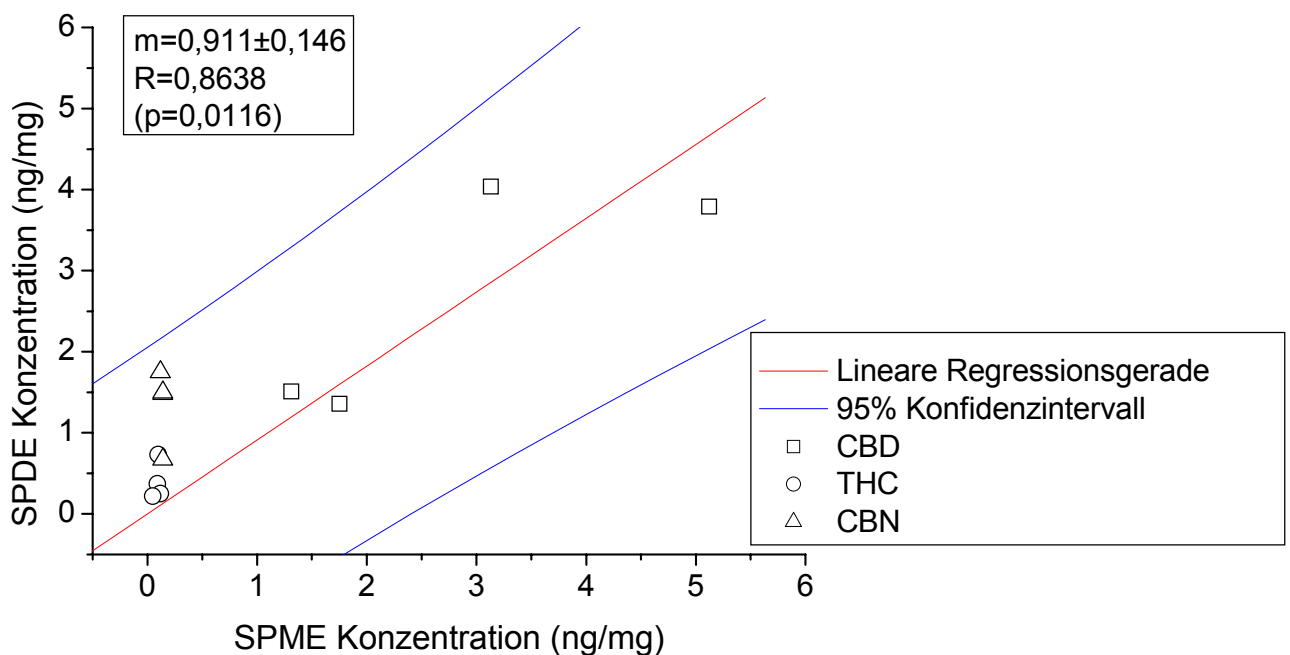


Abbildung 44. Methodenvergleich zwischen SPME und SPDE: Korrelation der Analyseergebnisse realer Haarproben für Cannabinoide (CBD, THC, CBN). (Abkürzungen siehe Abbildung 43).

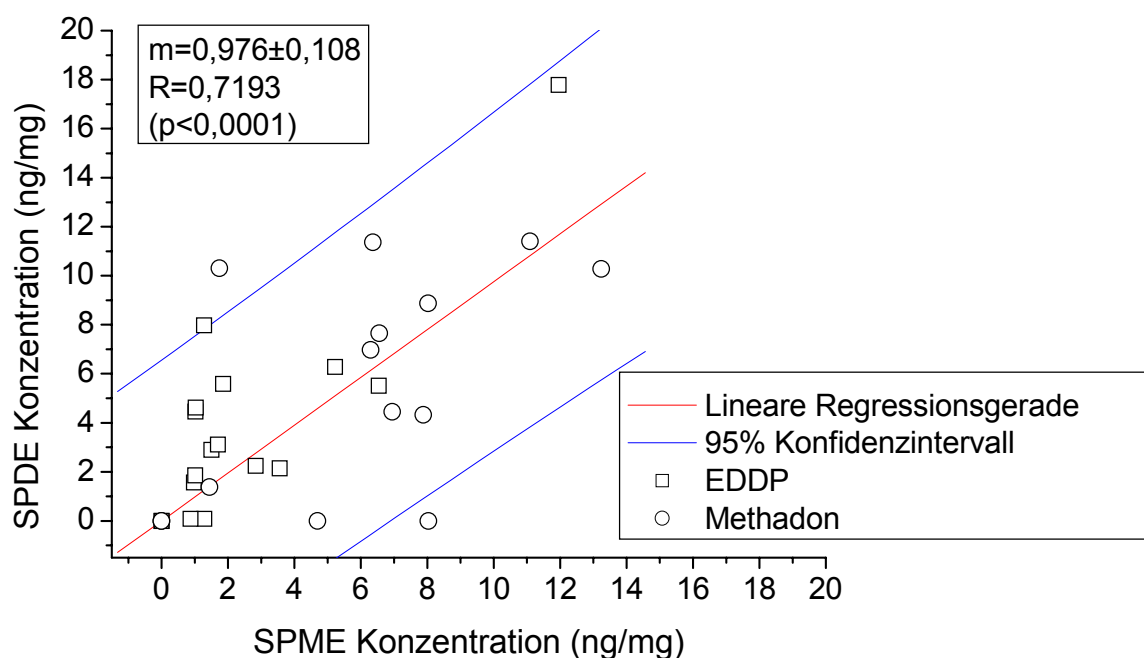


Abbildung 45. Methodenvergleich zwischen SPME und SPDE: Korrelation der Analyseergebnisse realer Haarproben für Methadon und EDDP. (Abkürzungen siehe Abbildung 43).

4.13 Möglichkeiten und Grenzen der HS-SPDE-Technik

Das gesteigerte Sorbens-Volumen der SPDE-Kapillaren gegenüber SPME-Fasern führte nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der Ausbeute bei vergleichbarer Extraktionszeit. Der Grund dafür liegt in der geringen Diffusionsgeschwindigkeit, die auch durch eine Steigerung der Dynamik des Extraktionsprozesses (Pumpen) nicht kompensiert werden konnte. Aus diesem Grund konnten die Nachweisgrenzen gegenüber SPME nicht signifikant gesenkt werden.

Insgesamt betrachtet ist das HS-SPDE Verfahren mit universellem Autosampler jedoch eine einfache, automatisierte Methode für die Analyse von Amphetaminen und synthetischen Designerdrogen in Haarproben. Alle Einzelschritte wie Erhitzen und Schütteln der Probe, alkalische Hydrolyse, Absorption, Derivatisierung und Desorption im Injektor des Gaschromatographen sind programmierbar und automatisch durchführbar. Damit wird die Zahl der Fehlmessungen deutlich verringert und eine sehr gute Reproduzierbarkeit erreicht.

Ein großer Vorteil der SPDE-Technik im Vergleich zu SPME ist die mechanische Robustheit der Kapillare.

Vorteile der Headspace-Technik gegenüber dem direkten Pumpen einer wässrigen Lösung durch die SPDE-Kapillare sind der bessere Schutz des Sorbens und der Ausschluß von Matrixeffekten, die die Chromatographieergebnisse beeinflussen würden. Die Effizienz der SPDE-Kapillare kann durch Überwachung der chromatographischen Ausbeute der internen Standards beurteilt werden. Verschmutzungen der stationären Phase können so zuverlässig festgestellt werden. Während der gesamten Methodenentwicklung, Validierung und Messung authentischer Proben wurden nur vier SPDE-Kapillaren verwendet. Die Headspaceanalyse von Haarproben mittels SPDE erlaubte über 200 Extraktionen mit der gleichen Kapillare, mehr als doppelt so viele Extraktionen wie mit SPME (90-100). Bei leicht verkürzter Extraktionszeit (vgl. Tabellen 6 und 7) waren die absoluten Extraktionsausbeuten mit SPDE höher als mit SPME-Faser.

Verglichen mit traditionellen Probenvorbereitungstechniken wie Flüssig-Flüssig-Extraktion oder SPE, bietet SPDE ähnliche oder bessere Leistung in Linearität, Nachweisgrenzen und Präzision. Eine drastische Verringerung der Gesamtanalysenzeit wurde erreicht (9-20 min Extraktion, statt 5 Std. methanolische Extraktion im Ultraschallbad), da keine zeitraubende Naßchemie erforderlich ist. Die Methode ist zudem sehr ökonomisch, weil auf organische Lösungsmittel verzichtet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die neue HS-SPDE-Technik vorgestellt und mit validierten Applikationen gezeigt, daß das Verfahren eine Alternative zu bewährten Mikroextraktionsmethoden wie SPME darstellt.

6 Ausblick

Die Geschwindigkeit des Extraktionsprozesses bis zur Gleichgewichtseinstellung ist durch die Diffusionskinetik innerhalb des PDMS-Sorbens begrenzt, wie durch die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig gezeigt wurde. Eine Möglichkeit zur Beschleunigung des Extraktionsvorganges ist die Vergrößerung der Oberfläche der Sorbens-Materials, wie es von Berezkin et al. [61] vorgeschlagen wurde. Die Kapillaren müßten hierzu mit einem geeigneten, thermisch stabilen Material gefüllt werden, das eine poröse Oberfläche besitzt, analog zu einer gepackten GC-Säule. Während die PDMS-Oberfläche der untersuchten SPDE-Kapillaren 88 mm^2 beträgt, besitzt eine mit 50 µg Tenax (Polymer auf Basis von 2,6-Di-phenyl-p-phenylenoxid) gefüllte Kapillare eine innere Oberfläche von ca. 1 m^2 . Die Geschwindigkeit des Prozesses wird dann von der Absorption an der Oberfläche des Sorbens und nicht mehr von der Diffusion im Film bestimmt. Gepackte SPDE-Kapillaren sind zur Zeit in Entwicklung.

Durch die Weiterentwicklung der Headspace-Mikroextraktionsgeräte mit dem Ziel einer weiteren deutlichen Vergrößerung der Oberfläche des Sorbens bestehen gute Aussichten, schwerer flüchtige Analyten wie Cocain und Morphin zu erfassen. Durch polarere Sorbentien könnten auch polarere Metaboliten wie Hydroxy-THC oder THC-Carbonsäure der Analyse zugänglich werden.

Im praktischen Einsatz hat es sich als nachteilig erwiesen, daß ein Austausch der Kapillaren durch den Anwender, der ursprünglich auch angestrebt war, nicht möglich ist. Beim Wechsel zwischen SPDE und Flüssig-Injektionen muß der Autosampler umgebaut und umprogrammiert werden (Zeitaufwand 30 min). Ein schneller Wechsel der Injektionstechniken, wie zwischen Flüssiginjektion und SPME durch alleinigen Austausch der Spritzenhalterung, ist nicht möglich. Auch in diesen Punkten ist weitere Entwicklungsarbeit notwendig.

7 Literatur

- [1] H. Sachs, History of hair analysis. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 7-16.
- [2] R. Denk, I. Raff, H. Sachs, Haaranalysen bei Betäubungsmittelkonsum. *Kriminalistik.* 4 (1992) 253-255.
- [3] M.R. Moeller, Drug detection in hair by chromatographic procedures. *J. Chromatogr.* 580 (1992) 125-134.
- [4] P. Kintz (Ed.), *Drug testing in hair*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.
- [5] H. Sachs, P. Kintz, Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 713 (1998) 147-161.
- [6] Y. Nakahara, Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 733 (1999) 161-180.
- [7] Y. Nakahara, Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 135-153.
- [8] V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 175-182.
- [9] C. Jurado, M.P. Gimenez, M. Menendez, M. Repetto, Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 165-174.
- [10] G. Kauert, J. Röhrich, Concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *Int. J. Legal Med.* 108 (1996) 294-299.
- [11] V. Cirimele, H. Sachs, P. Kintz, P. Mangin, Testing human hair for Cannabis. III. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol. *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 13-16.
- [12] J. Röhrich, G. Kauert, Determination of amphetamine and methylenedioxy-amphetamine-derivatives in hair. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 179-188.
- [13] R. Kronstrand, R. Grundin, J. Jonsson, Incidence of opiates, amphetamines, and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose. *Forensic Sci. Int.* 92 (1998) 29-38.
- [14] O. Quintela, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, S. Strano-Rossi, M. Chiarotti, A.C.S. Lucas, Evaluation of cocaine, amphetamines and cannabis use in university students through hair analysis: preliminary results. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 273-279.
- [15] M. Rothe, F. Pragst, K. Spiegel, T. Harrach, K. Fischer, J. Kunkel, Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. *Forensic Sci. Int.* 89 (1997) 111-128.

- [16] B.A. Goldberger, A.G. Darraj, Y.H. Caplan, E.J. Cone, Detection of methadone, methadone metabolites, and other illicit drugs of abuse in hair of methadone-treatment subjects. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 526-530.
- [17] L. Skender, V. Karacic, I. Brcic, A. Bagaric, Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 125 (2002) 120-126.
- [18] T. Mieczkowski, A research note: the outcome of GC/MS/MS confirmation of hair assays on 93 cannabinoid (+) cases. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 83-91.
- [19] M. Uhl, Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 281-294.
- [20] M. Uhl, Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 169-179.
- [21] M. Chiarotti, L. Costamagna, Analysis of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci. Int.* 114 (2000) 1-6.
- [22] I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka, Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 707 (1998) 99-104.
- [23] BKA, Rauschgiftjahresbericht Bundesrepublik Deutschland 2001, Bundeskriminalamt, Wiesbaden, Deutschland, 2002.
- [24] F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, B. Madea, Methadone substitution: medicolegal problems in Germany. *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 118-124.
- [25] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.
- [26] Z. Zhang, M.J. Yang, J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.* 66 (1994) 844A-853A.
- [27] L. Junting, C. Peng, O. Suzuki, Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Sci. Int.* 97 (1998) 93-100.
- [28] J. Pawliszyn, Applications of solid phase microextraction, RSC, Cambridge, UK, 1999.
- [29] G. Theodoridis, E.H. Koster, G.J. de Jong, Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745 (2000) 49-82.
- [30] N.H. Snow, Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 445-455.
- [31] F. Sporkert, F. Pragst, Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 129-148.

- [32] G.A. Mills, V. Walker, Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr. A.* 902 (2000) 267-287.
- [33] F. Sporkert, F. Pragst, *Proceedings of TIAFT International Meeting*, Tallinna Raamatutrükikoja, Helsinki, Finland, 2000, pp. 429-439.
- [34] J. Liu, K. Hara, S. Kashimura, M. Kashiwagi, M. Kageura, New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of amphetamines in hair. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 758 (2001) 95-101.
- [35] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 359-364.
- [36] S. Strano-Rossi, M. Chiarotti, Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 7-10.
- [37] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 554-560.
- [38] A.C. Lucas, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, P. Fernandez, S. Strano-Rossi, Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 225-232.
- [39] F. Sporkert, F. Pragst, Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 746 (2000) 255-264.
- [40] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140-3147.
- [41] M.E. McComb, R.D. Oleschuk, E. Giller, H.D. Gesser, Microextraction of volatile organic compounds using the inside needle capillary adsorption trap (INCAT) device. *Talanta.* 44 (1997) 2137-2143.
- [42] S. Shojania, M.E. McComb, R.D. Oleschuk, H. Perreault, H.D. Gesser, A. Chow, Qualitative analysis of complex mixtures of VOCs using the inside needle capillary adsorption trap. *Can. J. Chem.* 77 (1999) 1716-1727.
- [43] S. Shojania, R.D. Oleschuk, M.E. McComb, H.D. Gesser, A. Chow, The active and passive sampling of benzene, toluene, ethyl benzene and xylenes compounds using the inside needle capillary adsorption trap device. *Talanta.* 50 (1999) 193-205.
- [44] Y. Gou, J. Pawliszyn, In-tube solid-phase microextraction coupled to capillary LC for carbamate analysis in water samples. *Anal. Chem.* 72 (2000) 2774-2779.

- [45] Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. *J. Chromatogr. A.* 873 (2000) 137-147.
- [46] K. Jinno, M. Kawazoe, Y. Saito, T. Takeichi, M. Hayashida, Sample preparation with fiber-in-tube solid-phase microextraction for capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine. *Electrophoresis.* 22 (2001) 3785-3790.
- [47] H. Kataoka, Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application - a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 31-45.
- [48] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Simple and rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 257-265.
- [49] H. Kataoka, S. Narimatsu, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the determination of beta-blockers and metabolites in urine and serum samples. *Anal. Chem.* 71 (1999) 4237-4244.
- [50] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of ranitidine. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 731 (1999) 353-359.
- [51] Z. Mester, J. Pawliszyn, Electrospray mass spectrometry of trimethyllead and triethyllead with in-tube solid phase microextraction sample introduction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1999-2003.
- [52] W.M. Mullett, K. Levsen, J. Borlak, J. Wu, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC for the determination of N-nitrosamines in cell cultures. *Anal. Chem.* 74 (2002) 1695-1701.
- [53] W.M. Mullett, P. Martin, J. Pawliszyn, In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. *Anal. Chem.* 73 (2001) 2383-2389.
- [54] Y. Saito, Y. Nakao, M. Imaizumi, T. Takeichi, Y. Kiso, K. Jinno, Fiber-in-tube solid-phase microextraction: a fibrous rigid-rod heterocyclic polymer as the extraction medium. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 368 (2000) 641-643.
- [55] Y. Saito, M. Kawazoe, M. Hayashida, K. Jinno, Direct coupling of microcolumn liquid chromatography with in-tube solid-phase microextraction for the analysis of antidepressant drugs. *Analyst.* 125 (2000) 807-809.
- [56] Y. Saito, M. Imaizumi, T. Takeichi, K. Jinno, Miniaturized fiber-in-tube solid-phase extraction as the sample preconcentration method for microcolumn liquid-phase separations. *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 164-168.

- [57] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, Automated on-line in-tube solid-phase microextraction followed by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of chlorinated phenoxy acid herbicides in environmental waters. *Analyst*. 126 (2001) 602-608.
- [58] J. Wu, W. Xie, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid phase microextraction coupled with HPLC-ES-MS for the determination of catechins and caffeine in tea. *Analyst*. 125 (2000) 2216-2222.
- [59] J. Wu, J. Pawliszyn, Polypyrrole-coated capillary coupled to HPLC for in-tube solid-phase microextraction and analysis of aromatic compounds in aqueous samples. *Anal. Chem.* 73 (2001) 55-63.
- [60] H. Yuan, Z. Mester, H. Lord, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 718-725.
- [61] V.G. Berezkin, E.D. Makarov, B.V. Stolyarov, An in-needle trap and its use for determination of ecotoxics in aqueous and gaseous media. *Petroleum Chemistry*. 42 (2002) 209-214.
- [62] G.E. Murphy, United States Patent. 5,565,622 (1996).
- [63] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843-1852.
- [64] J. Lipinski, Automated solid phase dynamic extraction - extraction of organics using a wall coated syringe needle. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 369 (2001) 57-62.
- [65] B. Schilling, HS-SPDE (Head Space Solid Phase Dynamic Extraction) as an alternative to HS-SPME and SHS for the analysis of volatile compounds. Poster BGB Analytik AG, Adliswil, Schweiz. (2002)
- [66] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea, Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 29-34.
- [67] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea, Rapid analysis of halothane in biological samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry--a case of a double homicide. *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 372-376.
- [68] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea, Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Clin. Chem. Lab Med.* 37 (1999) 639-642.
- [69] J. Pawliszyn, Solid phase microextraction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 488 (2001) 73-87.
- [70] M. Chiarotti, S. Strano-Rossi, Preparation of Hair Samples for Drug Analysis. *Forensic Sci. Rev.* 8 (1996) 111-128.

- [71] Chromtech, Single Magnet Mixer, Tech Note 2. (2001)
- [72] Chromtech, Single Magnet Mixer, Tech Note 1. (2001)
- [73] Chromatographie 2000/2001, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 2000.
- [74] M.R. Harkey, Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 9-18.
- [75] P. Busch, D. Hollenberg, *Kosmetik*, 1995, pp. 46-57.
- [76] H. Fey, I. Otte, *Wörterbuch der Kosmetik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1991.
- [77] L. Pötsch, G. Skopp, M.R. Moeller, Zum Suchtmittelnachweis in Haaren VI. Mögliche Einflüsse der Hautfunktionen. *Rechtsmedizin*. 8 (1997) 2-6.
- [78] Y. Nakahara, R. Kikura, Hair analysis for drugs of abuse. XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Arch. Toxicol.* 70 (1996) 841-849.
- [79] P. Kintz, P. Mangin, What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 3-11.
- [80] M. Oehme, *Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen*, Hüthig, Heidelberg, 1996.
- [81] T. Van den Berg, M. Bergmann, L. Kroener, D.W. Lachenmeier, F. Musshoff, *Haarige Drogenanalytik. Laborpraxis*. 26 (2002) 70-73.
- [82] 1200 Quadrupole MS Operation Manual, Varian Inc., 2001.
- [83] DIN 32 645, *Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen. Begriffe, Verfahren, Auswertung*, Beuth Verlag, Berlin (Germany), 1994.
- [84] P.C. Meier, R.E. Zünd, *Statistical methods in analytical chemistry*, Wiley, New York, 2000.
- [85] The Physical Properties Database (PHYSPROP) <http://esc.syrres.com/interkow/physdemo.htm>, Syracuse Research Corporation, North Syracuse, USA, 2002.
- [86] Beilstein-Datenbank, Beilstein Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften, Frankfurt am Main, Deutschland, 2002.
- [87] *Chemical Properties Pro (Chemdraw Ultra Version 7.0.3)*, Cambridge Soft, Cambridge USA, 2002.
- [88] P. Popp, A. Kauert, K. Kalbitz, Festphasenmikroextraktion (SPME). *GIT*. 39 (1995) 325-331.
- [89] H.J. Spronck, C.A. Salemink, F. Alikaridis, D. Papadakis, Pyrolysis of cannabinoids: a model experiment in the study of cannabis smoking. *Bull. Narc.* 30 (1978) 55-59.

- [90] R.S. Tjeerdema, The pyrolysis of cannabinoids. *Rev. Environ. Contam Toxicol.* 99:61-81. (1987) 61-81.
- [91] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation - How, how much and why? A review. *Bull. TIAFT.* 32 (2002) 16-23.
- [92] W. Lindner, I.W. Wainer, Requirements for initial assay validation and publication in *J. Chromatography B. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 707 (1998) 1-2.
- [93] Ergebnisse Drogen im Haar DHF 1/2001, GTFCH-Ringversuche, Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin, Heidelberg, 2001.
- [94] M.J. Baptista, P.V. Monsanto, E.G. Pinho Marques, A. Bermejo, S. Avila, A.M. Castanheira, C. Margalho, M. Barroso, D.N. Vieira, Hair analysis for delta(9)-THC, delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 66-78.
- [95] P. Kintz, P. Mangin, Opiate concentrations in human head, axillary, and pubic hair. *J. Forensic Sci.* 38 (1993) 657-662.
- [96] C. Offidani, R.S. Strano, M. Chiarotti, Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 105-108.
- [97] C. Jurado, P. Kintz, M. Menendez, M. Repetto, Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int. J. Legal Med.* 110 (1997) 159-163.
- [98] G. Skopp, L. Potsch, M. Mauden, Stability of cannabinoids in hair samples exposed to sunlight. *Clin. Chem.* 46 (2000) 1846-1848.
- [99] A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin, Hair analysis: a worthless tool for therapeutic compliance monitoring. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 183-189.
- [100] H. Sachs, Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 53-61.