
BACHELORARBEIT

Frau
Angelina Reimann

**Entwicklung einer
forensisch-analytischen Methode
zur Bestimmung von
Ethylglucuronid im Haar**

2018

Fakultät **Angewandte Computer- und
Biowissenschaften**

BACHELORARBEIT

Entwicklung einer forensisch-analytischen Methode zur Bestimmung von Ethylglucuronid im Haar

Autorin:

Angelina Reimann

Studiengang:

Allgemeine und Digitale Forensik

Seminargruppe:

FO15w1-B

Matrikelnummer:

40291

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Zweitprüfer:

Dr. rer. nat Marc Bartel

Heidelberg, 2018

Bibliografische Angaben

Reimann, Angelina: Entwicklung einer forensisch-analytischen Methode zur Bestimmung von Ethylglucuronid im Haar, 55 Seiten, 27 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Bachelorarbeit, 2018

Durchgeführt am Universitätsklinikum Heidelberg - Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin - *Fachbereich Forensische Toxikologie*

Referat

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von EtG im Haar. Mit dieser Methode können durch den EtG-Gehalt, Aussagen bezüglich des Alkoholkonsums getroffen werden. Das Ziel ist es eine stabile Methode zu entwickeln, um reproduzierbare Messungen in diesem Bereich zu erzielen.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Danksagung	V
1 Einleitung	1
1.1 Alkohol	1
1.2 Alkoholbiomarker	4
1.2.1 Ethylglucuronid	5
1.3 Haaranalytik	6
1.4 Angewandte Analytik	8
1.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	8
1.4.2 Tandem-Massenspektrometer	10
1.5 Leichentoxikologie	14
1.6 Validierung in der Toxikologie	16
2 Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Verbrauchsmaterial	21
3.1.2 Geräte	21
3.1.3 Chemikalien	22
3.1.4 Laufmittel	22
3.1.5 Probennahme	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Probenvorbereitung	23
3.2.2 Extraktion	23
3.2.3 Bestimmung von Ethylglucuronid mittels HPLC-MS/MS	26
3.2.4 Messung von Realproben	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Extraktion	29
4.2 Bestimmung von Ethylglucuronid mittels HPLC-MS/MS	35
4.3 Messungen von Realproben	38
5 Diskussion	43
5.1 Extraktion	43

5.2	Bestimmung von Ethylglucuronid mittels HPLC-MS/MS	45
5.3	Messungen von Realproben	47
6	Fazit	49
A	Regressionsgerade	51
	Literaturverzeichnis	53

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Entstehung von Ethanol	1
Abb. 1.2:	Abbau von Ethanol	4
Abb. 1.3:	Strukturformel Ethylglucuronid	5
Abb. 1.4:	Haaraufbau	6
Abb. 1.5:	Aufbau einer HPLC (modifiziert nach [5])	8
Abb. 1.6:	Mögliche Peakformen [18]	9
Abb. 1.7:	Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers (modifiziert nach [12])	10
Abb. 1.8:	Ablauf einer Elektrospray Ionisation [18]	10
Abb. 1.9:	Funktionsweise der Ionentrennung im Quadrupol [21]	11
Abb. 1.10:	Scan Modi im MS/MS [14]	12
Abb. 4.1:	Chromatogramm der Extraktion mit 100% Wasser bei 50 pg/mg	30
Abb. 4.2:	Chromatogramme der Extraktion mit 0,1 % (A), 0,5 % (B) und 1 % Ameisen- säure + Wasser (C) bei 50 pg/mg	30
Abb. 4.3:	Chromatogramme der Extraktion mit verschiedenen Verhältnissen Wasser + Methanol 50/50 (D), 70/30 (E) und 30/70 (F) bei 50 pg/mg	31
Abb. 4.4:	Chromatogramm nach einstündiger Ultraschallbehandlung bei 50 pg/mg	31
Abb. 4.5:	Chromatogramm nach Verwendung von Headspaceflaschen bei 50 pg/mg	32
Abb. 4.6:	Chromatogramm bei 2,5 pg/mg nach Erhöhung des Standardvolumens bei kleinen Konzentrationen	32
Abb. 4.7:	Chromatogramm bei 50 pg/mg ohne eintägiger Inkubation	33
Abb. 4.8:	Chromatogramme nach Verringerung des Volumens beim Rücklösen: ohne Inkubation (A), Standard (Tubes) (B), erhöhtes Volumen bei kleinen Konzentrationen (C) bei 50 pg/mg	33
Abb. 4.9:	Chromatogramme unterschiedlicher Haarmengen 25 mg (A), 50 mg (B), 75 mg (C) bei 50 pg/mg	34
Abb. 4.10:	Chromatogramme vor dem Tuning (A) und nach dem Tuning (B)	35
Abb. 4.11:	Chromatogramme der verschiedenen Injektionsvolumina 10 μ l (A), 15 μ l (B), 20 μ l (C) bei 50 pg/mg	36

Abb. 4.12: Chromatogramme mit Isopropanolpumpe; ohne Isopropanol (A), 100 μ l Isopropanol (B), 200 μ l Isopropanol (C) bei 50 pg/mg	37
Abb. 4.13: Regressionsgeraden des 85 -Überganges	38
Abb. 4.14: Chromatogramm der Probe A im 85 - Übergang	39
Abb. 4.15: Chromatogramm der Probe B im 85 - Übergang	40
Abb. 4.16: Chromatogramm der Probe C im 85 - Übergang	41
Abb. 5.1: Gegenüberstellung der verschiedenen Flussraten der Isopropanolpumpe - 85 Übergang	46

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Wirkung von Alkohol	2
Tab. 1.2:	Differenzierung von Alkoholkonsum [9,10]	3
Tab. 1.3:	Nachweisenfenster von EtG in Abhängigkeit der Konsummenge [1,13,24]	5
Tab. 1.4:	Grenzwerte für EtG-Konzentrationen im Haar [7]	6
Tab. 1.5:	Rechtliche Eignung [9]	7
Tab. 1.6:	Auszug einiger spezifischer Hinweise auf eine Intoxikation bei einer Obduktion	14
Tab. 3.1:	Verbrauchsmaterial	21
Tab. 3.2:	Geräte	21
Tab. 3.3:	Software	22
Tab. 3.4:	Verwendete Chemikalien	22
Tab. 3.5:	Verwendete Laufmittel	22
Tab. 3.6:	Kalibration von EtG in Haaren	23
Tab. 3.7:	Volumenänderung der kleinen Kalibrationspunkte	24
Tab. 3.8:	Volumenänderung bei geringerer Haarmenge	25
Tab. 3.9:	Gradient der Säule Luna Omega	26
Tab. 3.10:	Einstellungen des Massenspektrometers für EtG	26
Tab. 3.11:	Einstellungen des Massenspektrometers für EtG-d ₅	26
Tab. 3.12:	Feinjustierung einiger Parameter des Massenspektrometers	27
Tab. 3.13:	Verwendete Proben für Testmessungen	28
Tab. 3.14:	Kalibration	28
Tab. 4.1:	Ergebnisse der verschiedenen Vorgehensweisen bei der Extraktion	29
Tab. 4.2:	Optimale Einstellungen der Methodenparameter	35
Tab. 4.3:	Gegebene Werte für Probe A	39
Tab. 4.4:	Gegebene Werte für Probe B	40
Tab. 4.5:	Gegebene Werte für Probe C	41
Tab. A.1:	Area Ratio für Regressionsgerade	51

IV. Abkürzungsverzeichnis

μ l	Mikroliter
BAK	Blutalkoholkonzentration
BtM	Betäubungsmittel
CAD	Collision Activated Dissociation
CE	Collision Energy
cps	counts per second
CUR	Curtain Gas
CXP	Collision Cell Exit Potential
DP	Declustering Potential
EP	Entrance Potential
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtG	Ethylglucuronid
EtG - d ₅	5-fach deuteriertes Ethylglucuronid
EtOH	Ethanol
FAEE	Fettsäureethylester
g	Gramm
ggf.	gegebenfalls
GS1	Gas 1/Nebulizergas
GS2	Gas 2/Heatergas
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ihe	Interface Heater
IS	Ion Spray Voltage
ISTD	Interner Standard
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer
msec	Millisekunden
ng	Nanogramm

NLS	Neutral Loss Scan
PEth	Phosphatidylethanol
pg	Pikogramm
PreIS	Precursor Ion Scan
ProIS	Product Ion Scan
PS	positive surface
Q1	Quadrupol 1/Massenanalysator 1
Q2	Quadrupol 2/Kollisionszelle
Q3	Quadrupol 3/Massenanalysator 2
rpm	Rounds per minute
SIM	Selected Ion Monitoring
STD	Standard
Std.	Stunde
TEM	Temperatur

V. Danksagung

Herrn Dr. Marc Bartel möchte ich danken für die fachliche Betreuung, das interessante Thema und für die Möglichkeit, die Bachelorarbeit im Fachbereich der Toxikologie absolvieren zu dürfen.

Bei Vanessa Hofmann (M.Sc.) bedanke ich mich für die gute Einarbeitung und angenehme Zusammenarbeit sowie die tolle Unterstützung in der kompletten Zeit.

Allgemein möchte ich mich bei dem gesamten Team bedanken für die schöne Zeit am Institut und das mir bei Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die Hilfe und die Unterstützung in meinem gesamten Studium.

1 Einleitung

1.1 Alkohol

Alkohol ist das Suchtmittel, das gesellschaftlich am meisten akzeptiert wird. Dass Alkohol ebenso wie andere Suchtmittel abhängig machen kann, ist zwar bekannt, nur alle weiteren damit verbundenen Folgen sind für viele eher unklar. Durch die Wirkung von Alkohol wird die Stimmung angeregt und durch die gesunkene Hemmschwelle scheinen viele Bedenken nicht mehr vorhanden zu sein. Deshalb ist Alkohol auch so hoch angesehen. Die ansteigende Stimmung kann jedoch rasch in Aggressivität umschwenken [10].

Chemische Fakten und Wirkung im Körper

Alkohol entsteht aus der Gärung von Zucker (Abb. 1.1) und ist auch als Ethanol (EtOH) bekannt. Ethanol ist sehr gut wasser- und fettlöslich, welches eine Aufnahme in den Körper vereinfacht. Er ist aber unter anderem ein Zellgift, da Alkoholkonsum für viele verschiedene Krankheiten und Schäden im Körper verantwortlich ist. [11].

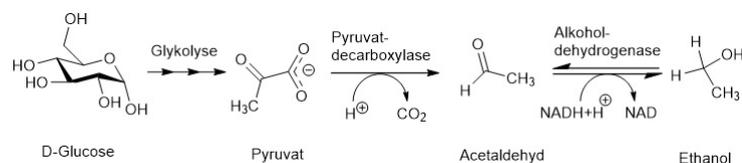


Abb. 1.1: Entstehung von Ethanol

Kennzeichnungspflichtig sind nur Getränke, die mehr als 1,2 Vol.% Alkohol enthalten. Als "alkoholfrei" dürfen nur Getränke bezeichnet werden, die weniger als 0,5 Vol.% aufweisen. [10]. Das bedeutet, selbst alkoholfreie Getränke können eine geringe Mengen an Alkohol besitzen.

Der reine Alkoholgehalt eines Getränks in Gramm wird mit einer einfachen Formel (Formel 1.1) berechnet [10]. Das spezifische Alkoholgewicht liegt bei 0,8.

$$\text{Volumen des Getränks [mL]} \cdot \frac{\text{Vol.} - \%}{100} \cdot \text{Dichte von Alkohol [g/mL]} \quad (1.1)$$

Die Wirkung (Tab. 1.1) ist bei jedem unterschiedlich und zusätzlich abhängig von der aufgenommenen Menge. Demnach hat beispielsweise ein Mann meist weniger Promille als eine Frau, auch wenn die gleiche Menge an Alkohol konsumiert wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Frauen einen höheren Fettgehalt und eine geringere Wasserverteilung besitzen. Die Formel zur Berechnung der Alkoholkonzentration wird

dementsprechend nur unter normalen Bedingungen (gesund, ausreichend gegessen, keine Medikamenteneinnahme) angewendet. Die Wirkung kann durch andere Einflussfaktoren erheblich verändert werden, zum Beispiel wird durch das Trinken auf nüchternen Magen der Eintritt der Wirkung erheblich beschleunigt [10]. Durch einen regelmäßigen Konsum kann sich der Körper auch an den Alkohol gewöhnen, was zur Folge hat, dass die Blutalkoholkonzentration (BAK) (Formel 1.2) nicht immer Aufschluss über den aktuellen Rausch gibt [11]. Der Reduktionsfaktor beträgt bei Männern 0,7 und bei Frauen 0,6 [10].

$$\text{Blutalkoholkonzentration (BAK)} = \frac{\text{aufgenommene Menge Alkohol [g]}}{\text{Körpergewicht [kg]} \cdot \text{Reduktionsfaktor}} \quad (1.2)$$

Die Aufnahme des Alkohols in den Blutkreislauf beginnt schon beim Trinken über die Schleimhäute im Mund und Rachenraum. Wenn dieser in der Blutbahn ist, wird er gleichmäßig im gesamten Körper verteilt [10]. Abgebaut wird der größte Teil in der Leber. Ein geringer Teil wird über die Haut, Urin, Atem oder auch Stuhl ausgeschieden [11]. Selbst ein gelegentlicher Alkoholkonsum kann zu gesundheitlichen Problemen führen. Die Leber wird hier als Stoffwechselorgan Nummer 1 zuallererst in Mitleidenschaft gezogen. Frauen sind, hormonell bedingt, anfälliger für Schäden durch Alkohol, da er langsamer abgebaut wird.

Tab. 1.1: Wirkung von Alkohol

Promille	Wirkung
ca. 0,2 Promille BAK	zwanglos und frei; Beeinträchtigung der Seh-, Konzentrations- und Bewegungsfähigkeit
ca. 1 Promille BAK	heiter oder depressiv; Gleichgewichts-/Sprachstörungen
ca. 2 Promille BAK	betäubend; Gedächtnisstörungen und fehlende Orientierung
über 3 Promille BAK	schwere Alkoholvergiftung

Das Gehirn ist ebenso gefährdet, denn ein Rausch zerstört viele Gehirnzellen, was sich bei exzessiven Alkoholkonsum schneller bemerkbar macht. Für alle anderen Organe ist der Konsum ebenso schädlich. Die gesundheitlichen Folgen des Alkohols sind gravierend: Jährlich sterben in Deutschland knapp 74.000 Menschen durch Alkohol oder die Kombination von Alkohol und Tabak [10].

Generell kann der Konsum von Suchtmitteln (Tab. 1.2) in verschiedene Bereiche eingeteilt werden. Hierbei wird unter einmaligem Konsum, gelegentlichem Konsum, regelmäßigem Konsum, sowie Gefährdung, Abhängigkeit und Missbrauch differenziert [9].

Tab. 1.2: Differenzierung von Alkoholkonsum [9,10]

Konsumart	Bedeutung	Statistik
		Altersgruppe 18 - 64 Jahre
einmalig	Testversuch/max. einmal im Monat	
gelegentlich	mehrmals im Monat	
regelmäßig	2 - 3 mal pro Woche	
Gefährdung	regelmäßiger Konsum und Suche nach der Wirkung von Alkohol	
Abhängigkeit	Zwang zum Konsum trotz gesundheitlicher Probleme inkl. Entzugserscheinungen	2012: ♂ 1,23 Mio. ♀ 328.000
Missbrauch	jeder Konsum der zu körperlichen/seelischen und/oder sozialen Schäden führt	2012: ♂ 1,25 Mio. ♀ 519.000

Alkoholkonsum in Deutschland

Alkohol kann als Einstiegsdroge bezeichnet werden. Die Mehrheit der Menschen über 15 Jahren in Deutschland trinkt Alkohol, das sind im Jahr 2018 pro Kopf rund 10,7 Liter reiner Alkohol [10]. Das kann wenig sein, zum Beispiel ein Glas Sekt bei einem Fest oder ein täglicher Konsum als "Ritual". Grundsätzlich macht die Industrie den Alkohol jeden Tag durch ständige Werbung schmackhaft. Hierbei werden die Risiken ignoriert, denn auf keinem alkoholischen Produkt wird ausdrücklich darauf hingewiesen. Dies führt dazu, dass bei den Konsumenten, insbesondere bei den jüngeren Personen, Alkohol als harmlos dargestellt wird und der Konsum schon im Alter von ca. 14 Jahren beginnt [11]. Es gibt keine einheitlichen Regelungen bezüglich der Alkoholwerbung. Jedes Land hat unterschiedliche Einschränkungen. Deutschland gehört zu den Ländern, die kaum Verbote für Alkoholwerbung besitzen. Somit kann im Kino, Fernsehen, Radio oder auch in Zeitschriften und Plakaten Werbung für Alkohol gemacht werden.

1.2 Alkoholbiomarker

Der Abbau von Alkohol (Abb. 1.2) kann in zwei unterschiedliche Mechanismen unterteilt werden. Der *oxidative Mechanismus* ist der größte Teil, der ca. 90 bis 95 % des gesamten Stoffwechselprozesses ausmacht. Die restlichen 5 bis 10 % sind der sog. *Phase II Metabolismus*, hier entstehen durch bestimmte Enzyme Alkoholbiomarker. Alkoholbiomarker werden als Stoffwechselprodukte bezeichnet, die sich durch Alkoholaufnahme entweder spezifisch verändern oder erst dadurch neu bilden [16].

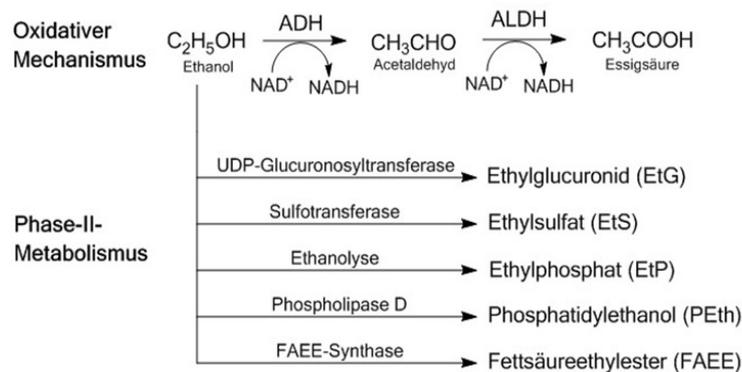


Abb. 1.2: Abbau von Ethanol

Hiervon gibt es zwei unterschiedliche Arten, die indirekten und die direkten Alkoholbiomarker. Geeignete Alkoholbiomarker sollten einige Kriterien erfüllen, das sind unter anderem die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit sowie eine günstige und einfache Nachweisbarkeit. Durch sie soll die in etwa konsumierte Menge an Alkohol festgestellt werden, sodass zwischen Abstinenz, normalem Konsum oder exzessiven Konsum (Tab. 1.2) unterschieden werden kann [2].

Indirekte Alkoholbiomarker

Diese zeigen die Auswirkungen des Alkohols auf den Körper an, beispielsweise die Leberwerte (GPT, GOT und GGT) [3]. Diese Werte werden auch durch andere Faktoren beeinflusst. Die Leber kann durch Krankheiten oder Medikamente geschädigt werden, sodass diese Werte ansteigen. Durch Alkoholkonsum werden die Werte erst verändert, wenn ein übermäßiger und langanhaltender Konsum vorliegt. Dazu zählt ein Konsum von mehr als 60 g Alkohol pro Tag [11]. Um es zu verdeutlichen: Ein Bier 0,3 l und 4,8 Vol.% enthält 11,5 g Alkohol (Gleichung 1.1).

Direkte Alkoholbiomarker

Diese Marker entstehen nur, wenn Alkohol konsumiert wurde. Schon eine geringe Menge Alkohol ist ausreichend, dass verschiedene direkte Marker durch bestimmte Enzyme im menschlichen Körper produziert werden, z.B.: Fettsäureethylester (FAEE), Phosphatidylethanol (PEth), Ethylglucuronid (EtG) oder Ethylsulfat (EtS) [16, 24].

Diese Alkoholmarker werden beispielsweise in Abstinenzprogrammen verwendet.

1.2.1 Ethylglucuronid

Ethylglucuronid (Abb. 1.3) ist ein extrem hydrophil und nicht flüchtiger stabiler Metabolit des Ethanols und besitzt eine molare Masse von 222 g/mol. EtG wird durch die Glucuronidierung von Ethanol gebildet und ist ein Nebenprodukt des Abbaus von Alkohol (Abb. 1.2) [9].

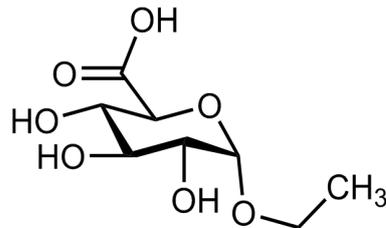


Abb. 1.3: Strukturformel Ethylglucuronid

Die Bildung von EtG aus Ethanol und Glucuronsäure ist seit 1901 durch Neubauer bekannt [9]. 1952 wurde es aus Kaninchenurin isoliert und 1967 konnte EtG im menschlichen Urin nachgewiesen werden. Eine Bestimmung des Analyten mittels quantitativer Bestimmung durch GC-MS ist erstmals 1995 Schmitt et al. gelungen. Daraufhin wurden stetig weitere Methoden für EtG entwickelt. Der Nachweis im Haar ist erstmals von Sachs 1993 beschrieben worden. Ab 1995 wurde dies von Aderjan, Skopp et al. erweitert [9].

EtG gehört zu den direkten Alkoholkonsummarker, da dieser Ethanolmetabolit schon nach einmaligem Konsum von Alkohol nachzuweisen ist [16]. EtG kann in verschiedenen Matrices nachgewiesen werden (Blut, Serum, Urin und Haaren) [1]. Durch die Vielzahl des unterschiedlichen Probenmaterials können große dosisabhängige Zeitfenster abgedeckt werden (Tab. 1.3).

Tab. 1.3: Nachweisfenster von EtG in Abhängigkeit der Konsummenge [1, 13, 24]

Material	Zeitfenster
Blut/Serum	36 Stunden bis 48 Stunden
Urin	80 h bis 7 Tage
Haare	Mehrere Monate

Da EtG auch wasserlöslich ist, kann natürlich nicht genau gesagt werden, wie viel sich durch die routinemäßige Haarwäsche aus den Haaren löst.

Um eine Klassifizierung der gemessenen EtG-Werte zu erhalten, sind in der Literatur einige Grenzwerte festgelegt worden [7].

Tab. 1.4: Grenzwerte für EtG-Konzentrationen im Haar [7]

Grenzwerte	Klassifizierung
EtG < 7 pg/mg	Abstinenz
7 pg/mg < EtG < 30 pg/mg	normaler Konsum
EtG > 30 pg/mg	übermäßiger Konsum

1.3 Haaranalytik

Der ganze Körper eines Menschen ist mit Haaren bedeckt. Das sind einerseits kleine, dünne schwach pigmentierte Haare, die kaum sichtbar sind (sog. Körperhaar) oder andererseits dicke lange stark pigmentierte Haare (Kopf-, Bart-, Scham- und Achselhaare) [17]. Jedes Haar entsteht in der Epidermis und wird als Haarfollikel bezeichnet. Im Großen und Ganzen sind Haare verhornte Produkte der Haut und in der Literatur als trockene Hautanhangsgebilde beschrieben. Durch Abbildung 1.4 wird der vereinfachte Aufbau eines Haares verdeutlicht [17].

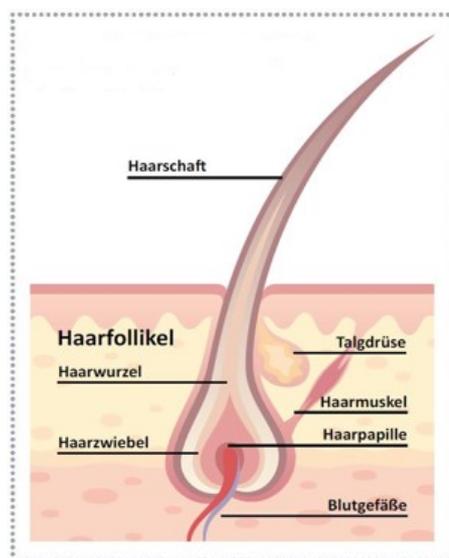


Abb. 1.4: Haaraufbau

Die Einlagerung von Substanzen in das Haar kann unter anderem auf die gute Blutversorgung der Kopfhaut oder auf den Flüssigkeitshaushalt zurückzuführen sein, obwohl auch durch äußere Einflüsse verschiedene Substanzen im Haar eingelagert werden können. Ethylglucuronid beispielsweise durch alkoholhaltige Haarpflegeprodukte. In der Regel kann davon ausgegangen werden, dass Fremdstoffe nach ca. 9 - 14 Tagen die Kopfhautoberfläche erreichen [20]. Das Nachweisfenster und die Einlagerung in das Haar ist auch von der Menge des getrunkenen Alkohols abhängig.

Haare haben für die Analytik einen sehr großen Vorteil, da die Substanzen über ein langes Zeitfenster nachweisbar sind. Denn im Durchschnitt wächst ein Kopfhaar ca. 1 cm pro Monat. Bei der Beurteilung von Ergebnissen der Haaranalytik müssen dennoch viele Faktoren berücksichtigt werden.

Beurteilung von Haarproben und rechtliche Eignung

Durch die dauerhafte Einlagerung von Substanzen in die Haarmatrix, in Abhängigkeit von Konsum und Haarlänge, ist ein retrospektiver Nachweis von Drogen/Alkohol möglich. Dabei wird entweder eine Abstinenz festgestellt oder ein rückwirkender Konsum bzw. regelmäßige Aufnahme nachgewiesen (Tab. 1.4) [20].

Da ein Nachweisfenster von mehreren Monaten abgedeckt ist, kann eine grobe Einschätzung des Trinkverhaltens (Tab. 1.2) interpretiert werden [20].

Die Haarfarbe, Haarstruktur und das Färben von Haaren ist für die Beurteilung von Ergebnissen der Haaranalysen von großer Bedeutung, da durch diese Faktoren die Einlagerung von Drogen verändert werden kann. Durch kosmetische Behandlungen, wie Färben und Bleichen der Haare, können die Stoffe im Haar zerstört, verändert oder ausgewaschen werden [20]. Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Sonneneinstrahlung, zählen zu den unsicheren Faktoren und können nicht sicher in die Analyse mit eingerechnet werden. In Tabelle 1.5 ist ein kleiner Überblick aufgelistet, für welche Fragestellungen die Haaranalyse geeignet ist.

Falls kein Kopfhaar vorhanden ist, können als Ersatz auch andere Körperhaare verwendet werden. Jedoch ist hierbei eine Interpretation über das Zeitfenster schwer einzuschätzen. Hier kann somit nur der eigentliche Konsum festgestellt werden. Diese Haare haben im Gegensatz zu den Kopfhaaren eine wesentlich längeres und unterschiedliches Wachstum [20].

Tab. 1.5: Rechtliche Eignung [9]

betroffener Bereich	Eignung
Fahreignung	geeignet
Beruf	geeignet
Schule	geeignet
Schuldfähigkeitsbeurteilung	geeignet
Bewährungsüberwachung	geeignet
Vergiftungsnachweis	geeignet
Doping	geeignet
Fahrsicherheit	ungeeignet
Strafbarkeit	ungeeignet

1.4 Angewandte Analytik

1.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Chromatographie bedeutet in der Analytik die Trennung von Gemischen durch physikalische und chemische Wechselwirkungen. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) stellt eines der effizientesten Verfahren dar und ist als sensitive Analytik weitverbreitet [18].

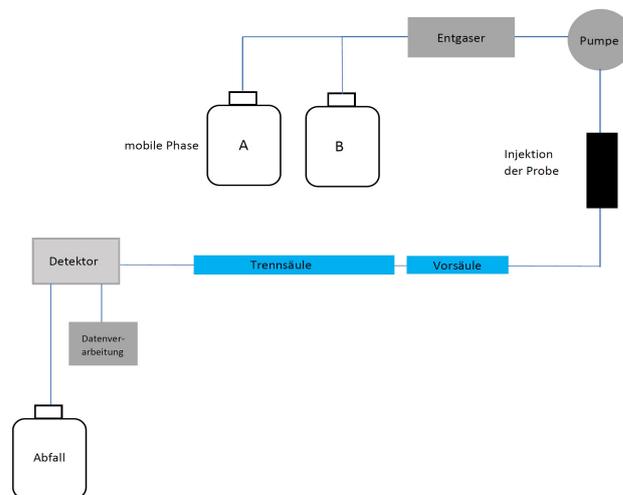


Abb. 1.5: Aufbau einer HPLC (modifiziert nach [5])

Die Funktionsweise einer HPLC kann anhand der Abbildung 1.5 gut nachvollzogen werden. Die chromatographische Trennung eines Probengemisches besteht aus zwei verschiedenen Phasen [18]. Die mobile Phase, das sog. Laufmittel und die stationäre Phase, eine individuelle Trennsäule. Das wässrige Laufmittel (A) und das organische Laufmittel (B) werden mit Hilfe einer Pumpe, nach dem angegebenen Verhältnis gemischt. Verfügt die HPLC nur über ein Laufmittel wird dies isokratisch genannt. In dieser Arbeit kommt jedoch ein Gradient zum Einsatz, d.h. das Mischungsverhältnis zwischen Laufmittel A und Laufmittel B verändert sich über die Zeit der Messung. Über eine Injektionsnadel wird nach und nach dem Laufmittelgemisch die zu analysierende Probe hinzugefügt, sodass alles zusammen zur Trennsäule weitergeleitet wird und es zur eigentlichen Trennung kommt.

Auf der Säule reagieren die verschiedenen Substanzen des Gemisches unterschiedlich stark mit der Trennsäule. Je größer die Wechselwirkungen sind, desto länger verweilt der Analyt auf der Säule. Diese Zeit wird auch Retentionszeit genannt, das ist der Zeitpunkt, an dem der Analyt von der Trennsäule gespült wurde. Durch den Gradient kann gewährleistet werden, dass alle polaren und unpolaren Bestandteile der Probe von der Säule gespült werden. Nach der Trennung auf der Säule wird das Laufmittel inklusive Probenbestandteile weitergeleitet, um am Detektor analysiert zu werden.

Als Trennsäule wird eine *Luna Omega PS C18* der Firma Phenomenex (Tab. 3.2) benutzt. Diese gehört zu den Säulen, die eine Umkehrphase (Reversed Phase (RP)) besitzt. Hier wird als mobile Phase ein polares Lösungsmittel eingesetzt [21].

Die stationäre Phase in dieser Säule besitzt einen sog. Mischmodus. Dies ist für die Methodenentwicklung sehr nützlich, da die Selektivität eine bessere Trennung zwischen Verbindungen mit variierenden funktionellen Gruppen ermöglicht [6]. Diese Säule besitzt eine positiv geladene Oberfläche (PS), welche die Retention von Verbindungen durch ionische Wechselwirkungen unterstützt, während der C18 Ligand die allgemeine Retention begünstigt. Aufgrund der positiv geladenen Oberfläche werden stark basische Substanzen abgestoßen, wodurch Tailing vermieden werden kann.

Chromatogramme und ihre Interpretation

Durch ein Chromatogramm können qualitative und quantitative Aussagen über die gemessene Probe gemacht werden.

Ein Peak im Chromatogramm wird als Signal einer Substanz bezeichnet, der unterschiedliche Formen aufweisen kann (Abb. 1.6).

Qualitativ: Die Retentionszeit des Analyten ist bei den gleichen Bedingungen immer identisch [18].

Quantitativ: Die Peakfläche und die Peakhöhe sollten proportional zu der eingesetzten Konzentration sein, sodass hiermit aus unbekanntem Proben die Analytkonzentration ermittelt werden kann [18].

Ein Peak sollte in den idealen Fällen eine symmetrische Gauß - Form aufweisen. Das Signal kann zwei weitere Formen aufweisen, das sog. Tailing und Fronting (Abb. 1.6).

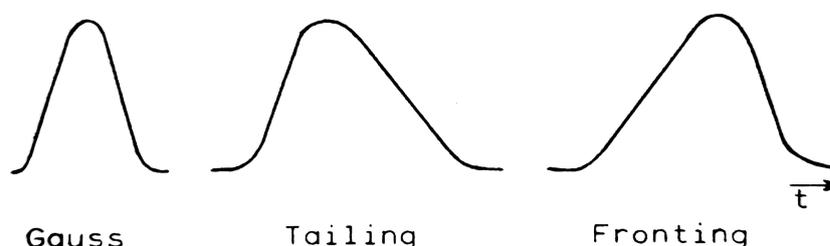


Abb. 1.6: Mögliche Peakformen [18]

In dieser Arbeit kommt eine massenspektrometrische Detektion zum Einsatz.

1.4.2 Tandem-Massenspektrometer

Das Prinzip der Massenspektrometrie ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen Ionen zu erzeugen. Diese werden nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt und mittels Detektor qualitativ und quantitativ bestimmt [14].

Für die Detektion von Ethylglucuronid wird hier ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) mit Triple-Quadrupolen zur Ionentrennung und Selektion verwendet. Ein MS/MS besteht aus zwei hintereinander geschalteten Massenanalysatoren. Diese Analytik wird meist verwendet, um seltene Analyten zu identifizieren und quantifizieren zu können. Der Aufbau eines MS/MS wird in Abbildung 1.7 vereinfacht dargestellt. Es setzt sich aus einer Ionenquelle, Massenanalysator 1 (Q1), Kollisionszelle (Q2) und Massenanalysator 2 (Q3) zusammen [12]. Im Quadrupol 0 (Q0) werden die erzeugten Ionen fokussiert. Im Massenanalysator 1 (Q1) werden die Ionen ausgewählt (je nach Scan-Modi unterschiedlich) und in der Kollisionszelle (Q2) durch Beschuss mit einem neutralen Gas (Stickstoff) spezifisch fragmentiert. Die Fragmente werden zum Massenanalysator 2 (Q3) weitergeleitet und detektiert [5].

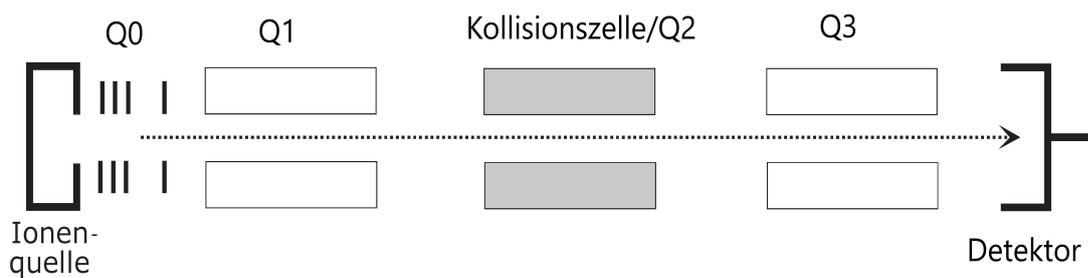


Abb. 1.7: Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers (modifiziert nach [12])

Ionenquelle

Die Ionen werden durch eine Elektronenspray-Ionisation (ESI) (Abb. 1.8) erzeugt, welche am häufigsten genutzt wird [14]. Sie zählt unter den Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden zu den beliebtesten und bekanntesten Verfahren. Als Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden werden Verfahren bezeichnet, bei denen ein kontinuierlicher Fluss aus dem Umgebungsdruck in das Vakuum eines Massenanalysators vorhanden ist [14].

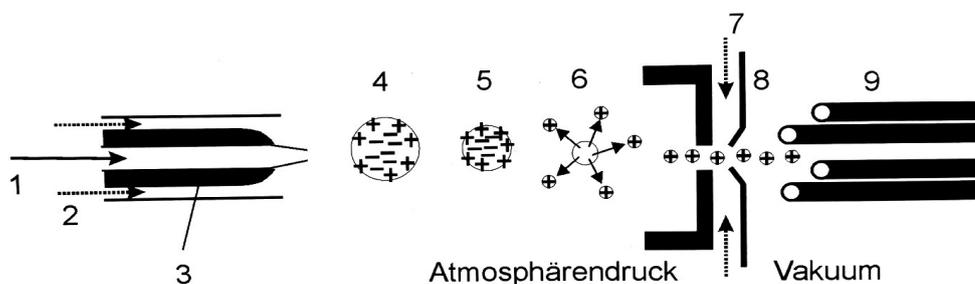


Abb. 1.8: Ablauf einer Elektrospray Ionisation [18]

1. Die verdünnte Probe aus der HPLC [18].
2. Die Zerstäubergase (GS1 und GS2) helfen bei der Tröpfchenbildung und bei der Verdampfung des Lösungsmittels.
3. Die angelegte Ionenspray Spannung (IS) ionisiert die Probe an der Spitze der Kapillare.
4. An der Spitze der Kapillare bildet sich ein Überschuss gleich geladener Ionen. Diese stoßen sich gegenseitig ab.
5. Die Verdampfung wird durch das Nebulizergas (GS1) weiter begünstigt.
6. Durch die zunehmende elektrische Ladung an der Tröpfchenoberfläche wird der Radius der Tröpfchen kleiner als die maximale Anzahl aufnehmbarer, gleicher Ladung. Somit zerfallen die Tröpfchen wegen der Abstoßung gleichartiger Ladungen. Dieser Effekt wird auch Coulomb Explosion genannt.
7. Das Abschirmgas (CUR) dient als Barriere, um nicht ionisierte Stoffe aus dem Gerät fernzuhalten.
8. Über den Skimmer wird die Probe ins Vakuum überführt.
9. Beginn der massepektrometrischen Detektion durch Quadrupole (Q1 und Q3).

Prinzip der Triple Quadrupole

Nach der Ionisierung (Abb. 1.8) werden die vorläufigen Ionen zum Triple-Quadrupol weitergeleitet. Triple-Quadrupole sind drei nacheinander stehende Analysatoren (Abb. 1.7), die jeweils aus vier parallel angeordneten Metallstäben bestehen (Abb. 1.9). Die gegenüberliegenden Stäbe besitzen eine um 180° phasenverschobene Hochspannung in Form einer Gleichspannung [25].

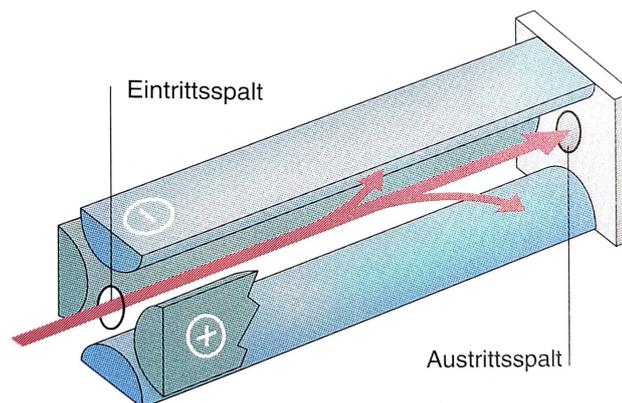


Abb. 1.9: Funktionsweise der Ionentrennung im Quadrupol [21]

Die Quadrupole sind dafür zuständig, die Ionen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) zu trennen. Durch die anliegende Spannung werden die erzeugten Ionen auf eine spiralförmige Bahn gedrängt [25]. Anhand des Verhältnisses zwischen der anliegenden Gleichspannung und Wechselfspannung können nur Ionen komplett durch die Quadrupole gelangen, wenn diese eine spezielle Masse aufweisen. Sobald Ionen ein anderes

Masse-Ladungsverhältnis besitzen, kommen sie von der Bahn ab und werden durch die Berührung mit den Metallstäben zerstört.

Verschiedene Scan-Modi

Im Tandem-Massenspektrometer können verschiedene Scan-Modi angewendet werden. In Abbildung 1.10 werden die jeweiligen Scan-Modi visuell dargestellt.

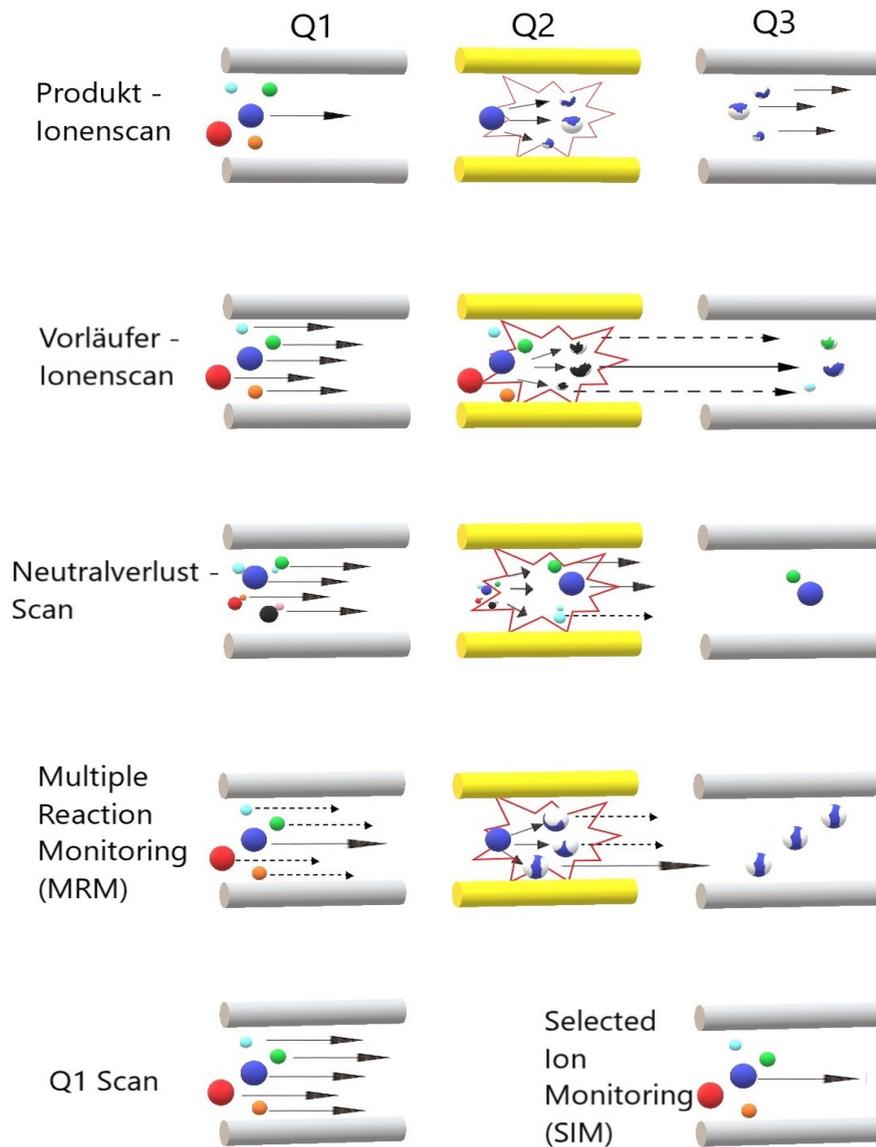


Abb. 1.10: Scan Modi im MS/MS [14]

Beim *Produkt-Ionen-Scan (ProIS)* werden alle Fragmentionen aus einem bestimmten Vorläuferion im Q3 getrennt und anschließend detektiert [25]. Dies dient zur Identifizierung von Substanzen, die mit Hilfe des Q1-Scans nicht eindeutig festgestellt wurden.

Im *Vorläufer-Ionen-Scan (PreIS)* werden durch den Quadrupol 1 (Q1) mithilfe der Angabe eines bestimmten Massenbereichs Ionen gescannt. Die Fragmentierung erfolgt im Quadrupol 2 durch ein Kollisionsgas. Im Q3 wird eine weitere Selektion eines Fragmentions einer bestimmten Masse durchgeführt. Nach der Detektion wird dieses Fragment durch seine spezifische Masse einem bestimmten Vorläuferion zugeordnet [25].

Durch den *Neutralverlust-Scan (NIS)* kann eine Massendifferenz festgestellt werden. Indem in den beiden Quadrupolen 1 und 3 zwei unterschiedliche Bereiche der Massen festgelegt werden, können hier Ionenpaare selektiert werden bei dem sich die beiden Ionen durch eine bestimmte Masse unterscheiden.

Das *Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)* ist neben der Selected Ion Monitoring (SIM) sehr beliebt in der Anwendung in einem Triple-Quadrupol MS/MS. Hierbei werden im Massenfilter 1 bestimmte Analytionen selektiert, in der Kollisionszelle fragmentiert und im zweiten Massenanalysator wird ein bestimmtes Fragment zum Detektor weitergeleitet. Der MRM Modus kommt bei bekannten Substanzen meistens zum Einsatz, wenn Matrixeffekte vorhanden sind, sodass ein einfacher SIM Modus nicht ausreicht.

Die Modi *Q1 Scan (Full Scan)* und *Selected Ion Monitoring (SIM)* werden in einfachen Massenspektrometern verwendet [25]. Im Full-Scan werden alle Ionen gemessen, dies dient dazu unbekannte Substanzen zu identifizieren. Der Selected Ion Monitoring Modus ist zur Quantifizierung von bekannten Analyten gedacht.

Weitere Parameter, die einen Einfluss auf die Detektion oder die Fragmentierung haben:

- Temperatur (TEM): schnellere Verdampfung des Lösungsmittels
- Stossaktivität (CAD): zuständig für den Vorgang der Kollision der Vorläuferionen von Quadrupol 1 mit dem neutralen Gas (Stickstoff)
- Eingangspotential (EP): Fokussierung der Ionen vor dem Eintritt in Q1
- Kollisionsenergie (CE): die Energie, die die Ionen aufbringen sollen, um aus dem Quadrupol 1 in den Quadrupol 2 zu beschleunigen
- Collision Cell Exit (CXP): die Energie der Ionen bei Austritt von Quadrupol 2 und Eintritt in Quadrupol 3
- Declustering Potential (DP): die Energie zwischen Ionisierung und Q0, die die Ionen unterstützt sich nicht zusammen zu lagern

1.5 Leichentoxikologie

Das Ziel der *Leichentoxikologie* ist es, durch forensisch-toxikologische Analysen an Sektionsproben zu überprüfen, ob der Tod durch Fremdstoffen (Alkohol, Betäubungsmittel (BtM), Medikamente oder andere fremde Substanzen) eingetreten ist, dadurch begünstigt wurde oder zu Handlungsunfähigkeit geführt hat [22].

In der Fachsprache wird von einer *Intoxikation* gesprochen, welche in zwei Arten, die akute und die chronische Intoxikation [23], eingeteilt werden kann. Als akut wird eine Vergiftung bezeichnet, bei der die Giftwirkung sehr schnell nach einer einmaligen oder kurzfristig wiederholten Einnahme eintritt. Bei der chronische hingegen, werden Vergiftungserscheinungen durch kontinuierliche Einnahmen geringer, nicht tödlicher Mengen Gift herbeigeführt. Eine Intoxikation kann anhand zahlreicher spezifischer Symptome (Tab. 1.6) bei einer äußeren Leichenschau und der Obduktion erkannt werden.

Tab. 1.6: Auszug einiger spezifischer Hinweise auf eine Intoxikation bei einer Obduktion

Wirkstoff	mögliche Symptome
Ätzspuren	Säuren
Dunkler Zahnfleischsaum	Blei oder Quecksilber
Geruch	Alkohol (aromatisch), Zyanid (Bittermandel)
Injektionsstellen	evtl. Betäubungsmittel oder Insulin
Totenflecken	Hellrot (Kohlenmonoxid), graurot (Zyanide), aschgrau (Methanol)

Jedoch sind viele Hinweise bei Verstorbenen meistens nicht vorhanden [19]. Deshalb sollten am Tatort alle Spuren gesichert werden, um gegebenenfalls schneller auf eine Intoxikation und den potenziellen Giftstoff schließen zu können.

Solche Beurteilungen sind immer fallspezifisch zu betrachten, denn die jeweiligen Einflussfaktoren, wie zum Beispiel die Liegezeit einer Leiche, könnte das Probenmaterial beeinträchtigen. Denn zwischen Todeseintritt und Obduktion kann eine bestimmte Zeit vergehen, die Auswirkungen auf den Körper hat und dementsprechend auch auf das evtl. benötigte Probenmaterial [4]. Das können unter anderem Wärme, Feuchtigkeit, Insektenbefall, Bakterien oder Hefe sein, die den automatischen Prozess der Fäulnis begünstigen. Außerdem ist auch mit Konzentrationsänderungen zu rechnen, beispielsweise sind im Herzblut höhere Wirkstoffkonzentrationen vorhanden als im peripheren Blut.

Grundsätzlich ist eine Intoxikation in Betracht zu ziehen, bei [4]:

- Drogenabhängigkeit
- Verdacht auf Suizid mit psychischer Vorerkrankung
- plötzlicher Tod von Kindern oder Jugendlichen ohne Vorerkrankung
- Gleichzeitige Erkrankung oder Tod mehrerer Personen auf die gleiche Art und Weise
- spezielle Vorteile durch Tod der Person (Vermögen, Feinde,...)
- Beteiligung von Personen mit Zugriff zu Gift- oder Betäubungsmittel

Bei einem großen Intoxikationsverdacht kann sogar eine Exhumierung von Erdbestattungen in Betracht gezogen werden [4].

Asservierung des forensisch-toxikologischen Probenmaterials

Um geeignete Proben zu erlangen, müssen diese sachgerecht entnommen werden. Das Entnehmen von Leichenteilen ist deshalb gesetzlich festgelegt.

"Nr. 35 Entnahme von Leichenteilen

(1)¹ Der Staatsanwalt hat darauf hinzuwirken, daß bei der Leichenöffnung Blut- und Harnproben, Mageninhalt oder Leichenteile entnommen werden, falls es möglich ist, daß der Sachverhalt durch deren eingehende Untersuchung weiter aufgeklärt werden kann. ² Manchmal, z.B. bei mutmaßlichem Vergiftungstod, wird es sich empfehlen, einen besonderen Sachverständigen zuzuziehen, der diese Bestandteile bezeichnet. (2) ¹ Werden Leichenteile zur weiteren Begutachtung versandt, so ist eine Abschrift der Niederschrift über die Leichenöffnung beizufügen. ² Die Ermittlungsakten sind grundsätzlich nicht zu übersenden (vgl. Nr. 12). (3) Sind anlässlich der Leichenöffnung Körperteile, Organe oder sonstige wesentliche Körperteile abgetrennt oder entnommen und aufbewahrt worden, trägt der Staatsanwalt regelmäßig dafür Sorge, dass ein Totensorgeberechtigter hierüber in geeigneter Weise spätestens bei der Freigabe der Leiche zur Bestattung (§159 Abs. 2 StPO) unterrichtet und auf die weitere Verfahrensweise, insbesondere die Möglichkeit einer Nachbestattung, hingewiesen wird." ¹

"§ 91 StPO Untersuchung der Leiche bei Verdacht einer Vergiftung

(1) Liegt der Verdacht einer Vergiftung vor, so ist die Untersuchung der in der Leiche oder sonst gefundenen verdächtigen Stoffe durch einen Chemiker oder durch eine für solche Untersuchungen bestehende Fachbehörde vorzunehmen. (2) Es kann angeordnet werden, daß diese Untersuchung unter Mitwirkung oder Leitung eines Arztes stattzufinden hat." ²

¹ Richtlinien für das Strafverfahren und das Bußgeldverfahren (RiStBV) Abschnitt I, Nr.35

² Strafprozessordnung (StPO)

Ein zeitliches Intervall für die Aufbewahrung gibt es gesetzlich nicht. Der jeweilige Arzt ist dafür verantwortlich wie lange ein biologisches Material aufbewahrt wird [22].

Welche Materialien und wieviel für forensisch-toxikologische Untersuchungen mindestens abgenommen werden sollten, sind in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin aufgeführt [22]. Dennoch können durch fallspezifische Umstände (Ausblutung, fortgeschrittenes Fäulnis, o.a.) die erforderlichen Untersuchungsmaterialien nicht asserviert werden, sodass Alternativen entnommen werden müssen (z.B. Muskel anstatt Blut) [22]. Die Proben sind in geeigneten Behältnissen abzufüllen und mit dem jeweiligen Namen und der Sektionsnummer eindeutig zu beschriften. Alle Informationen der Asservate zu der jeweiligen Sektion sind im Obduktionsbericht und im zugehörigen Asservierungsprotokoll zu finden [22]. Grundsätzlich sollte eine forensisch-toxikologische Untersuchung umfangreicher sein als eine klinisch-toxikologische.

Die Analysen der "postmortalen Asservate" werden in zwei Schritten durchgeführt. Im 1. Schritt wird eine qualitative Analyse durchgeführt, ob eine Substanz überhaupt vorhanden ist. Im 2. Schritt muss der Verdacht/Hinweis zusätzlich mit Hilfe von chromatographischen Verfahren bestätigt werden. Das sind unter anderem Gaschromatographie (GC) und/oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Detektion durch ein Massenspektrometer (MS) [22].

1.6 Validierung in der Toxikologie

Die Validierung von analytischen Methoden ist in der Toxikologie nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) genau festgelegt und dient als wichtige Voraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit von Messergebnissen. Außerdem ist eine Akkreditierung des Labors notwendig. Die Ergebnisse von validierten Methoden sind beispielsweise vor Gericht verlässlich interpretierbar und können dadurch nur schwer in Frage gestellt werden [15].

Die Forderungen für die Validierung von Methoden, die in der Routine verwendet werden, umfasst mehrere Punkte:

Selektivität und Spezifität

Als *Selektivität* wird das Potential einer Methode bezeichnet, in der verschiedene bestimmende Analyte ohne gegenseitige Behinderung oder Einschränkung durch andere Produkte bestimmt und eindeutig benannt werden [15].

Die *Spezifität* bezeichnet das Potential einer Methode, einen Analyten ohne Verfälschung durch andere Substanzen im Probengemisch zu bestimmen und eindeutig festzulegen [15].

Linearität der Kalibration

Wenn eine Methode *Linearität* aufweisen soll, sollte diese innerhalb eines gegebenen Bereiches Ergebnisse liefern, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind. Der Kalibrationsbereich ist ein Intervall zwischen einer hohen und niedrigen Konzentration des Analyten im Probengemisch. Dieser Bereich sollte aus mind. 5 Kalibrationspunkten bestehen und jeder dieser Punkte 6 mal wiederholt gemessen werden [15].

Genauigkeit

Als *Genauigkeit* wird die Abweichung von jedem Messergebnis zum Sollwert genannt. Diese Abweichungen kommen meist durch systematische Fehler (Bias) und zufällige Fehler zustande [15].

Präzision

Die *Präzision* einer Methode ist die Streuung der einzelnen Messwerte um den Mittelwert. Dieser Wert ist ein Maß für die zufälligen Fehler eines Analyseverfahrens [15]. Hier gibt es drei unterschiedliche Werte, die Wiederholpräzision, die Laborpräzision und die Vergleichspräzision. Bei der Wiederholpräzision geht es vor allem darum, dass unabhängige Messergebnisse mit Hilfe der identischen Methode, Probenmaterial, Labor und Person innerhalb eines kurzen Intervalls (6 Tage) erzielt werden. Die Laborpräzision hingegen ist die Bestimmung der identischen Probe im gleichen Labor unter bewusster Veränderung eines Parameters. Die Vergleichspräzision ist ein Wert, bei dem die Messergebnisse durch die selbe Methode mit identischen Proben und Material nur in verschiedenen Laboratorien, Personen und Geräten bestimmt wird.

Stabilität

Die *Stabilität* eines Analyten sollte in einer gegebenen Matrix über einen bestimmten Zeitraum gegeben sein [15]. Das Zeitfenster ist meistens ab Probennahme bis zur beendeten Analyse. Außerdem schließt es das Verhalten bei mehrmaligen Einfrieren und Auftauen und derivatisierten Proben ggf. mit ein.

Analytische Grenzen

Die analytischen Grenzen werden bei einer Validierung immer berechnet.

Nachweisgrenze (Limit of Detection (LOD))

Die Nachweisgrenze ist die geringste Konzentration eines Analyten, bei dem die Identifizierungsvoraussetzungen erfüllt sind [15].

Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification (LOQ))

Die Bestimmungsgrenze wird definiert als die geringste Konzentration eines Analyten in einer Probe, bei der folgende Kriterien gegeben sein sollten:

- Systematischer Fehler $\pm 20 \%$
- Präzision $\leq 20 \%$
- Ergebnisunsicherheit 33 % mit einer Signifikanz von 99 %

Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute

Wiederfindungsrate

Die Wiederfindung ist die komplette Abtrennung des zu untersuchenden Analyten von der Probenmatrix in der vorhandenen Lösung [15].

Extraktionsausbeute

Die *Extraktionsausbeute* ist der Wert, der die Menge des Analyten aus dem Probenmaterial in die verwendete Extraktionsflüssigkeit zeigt [15].

Matrixeffekte

Matrixeffekte sind Veränderungen des Signals aufgrund anderer Substanzen in der Probe [15].

Robustheit

Von *Robustheit* wird in einer analytischen Methode gesprochen, wenn die Analytik die Fähigkeit besitzt, durch wenige jedoch gewollte Parameteränderungen keine sichtbaren Änderungen aufzuweisen [15]. Somit ist die Methode verlässlich.

In der Haaranalytik ist eine sog. Basisvalidierung [8] ausreichend bei der folgende Punkte von Bedeutung sind:

- *Linearität der Kalibration*: Kalibration aus 4 Konzentrationen und die Wiederholungen pro Kalibrator auf 5 verringern
- *Wiederholungspräzision und Laborpräzision*: Anzahl der Tage bei der Präzision kann auf 5 reduziert werden
- *Stabilität*: Überprüfung der Analyten und der verwendeten internen Standards

2 Zielsetzung

Alkohol ist in unserer Gesellschaft ein großes Thema. Es gibt Konsumenten aller Altersklassen, wobei der Konsum schon bei ca. 14 Jahren beginnt. Auch wenn 14 Jahre ein sehr junges Alter zum Konsumieren von Alkohol ist, steigt die Zahl der Jugendlichen weiter an.

Durch die hohe Präsenz von Alkohol in der Gesellschaft, wird es immer wichtiger neue Methoden zum Nachweis von Alkoholkonsum zu entwickeln.

Hier hat der Alkoholbiomarker Ethylglucuronid eine extrem hohe Anerkennung verdient, da er den speziellen Vorteil aufweist, dass er nur gebildet wird, wenn direkt Alkohol konsumiert wurde und zudem schon bei einmaligen Trinken nachgewiesen werden kann. In einigen Matrices, wie Blut (Serum), Urin ist die Aufbereitung schnell und zeitsparend möglich. Bei diesen Materialien ist jedoch das Nachweisfenster gering. Um einen größeren Zeitraum abzudecken, wird auf Haare (Kopf-/Körperhaar) zurück gegriffen. Die Vorgehensweise wurde 2000 von Sachs erstmals beschrieben [9].

Seitdem wurde ständig an neuen Methoden gearbeitet. Die komplizierte Haarmatrix führt jedoch dazu, dass noch immer keine zuverlässige Methode zur Bestimmung von EtG im Haar existiert.

Das Ziel dieser Bachelorarbeit ist es, eine Methode zur Bestimmung von EtG in Haaren mittels HPLC-MS/MS zu entwickeln, sodass robuste und reproduzierbare sowie spezifische Messungen möglich sind. Dies beinhaltet eine ausgiebige Betrachtung der Extraktion und den Methodenparametern an der HPLC und dem Tandem-Massenspektrometer.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Tab. 3.1: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Headspace-Flaschen	WICOM Germany, Heppenheim
20 mm Alu Crimp Kappen mit 10 mm Loch ohne Septum	WICOM Germany, Heppenheim
20 mm Butylgummi-Stopfen für 20 mL Headspace-Flaschen (grau)	WICOM Germany, Heppenheim
Micro insert, 250 μ l Inhalt, L = 30 mm, 6 mm AD, 15 mm Spitz	WICOM Germany, Heppenheim
11 mm Alu Crimp Caps (Alu Boerdelkappen) mit Septum aus Gummi/PTFE	WICOM Germany, Heppenheim
2 mL Autosampler Vials (klar) mit 11 mm Rollrand in DAB-10 Qualität	WICOM Germany, Heppenheim
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG Deutschland, Hamburg
Micro-Spin-Filter Tubes	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

3.1.2 Geräte

Tab. 3.2: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agilent 1100 Series	Agilent Technologies, Waldbronn
Luna Omega PS C18; 150 x 2,1 mm, Partikelgröße 5 μ m	Phenomenex, Aschaffenburg
API 4000 Tandem-Massenspektrometer Turbo Ion Spray Interface (ESI)	Applied Biosystems Siex, Darmstadt
Schwingmühle MM 200	Retsch GmbH, Haan
Dri - Block [®] DB-3	Techne, Staffordshire, United Kingdom
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
11 mm Electronic Crimper/Decrapper	Agilent Technologies, Waldbronn
20 mm Electronic Crimper/Decrapper	Macherey-Nagel, Düren
Sonorex Super RK 510 Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
MC 1 Waage Analytik AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Software

Tab. 3.3: Software

Bezeichnung	Hersteller
Analyst Software 1.4	Applied Biosystems Siex, Darmstadt
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond (Washington)

3.1.3 Chemikalien

Tab. 3.4: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
Ampuwa (dest. Wasser)		Kabi Fresenius, Bad Homburg
Ameisensäure		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acetonitril	HPLC Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumformiat		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dichlormethan		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylglucuronid (1,0 mg/mL Methanol)		Lipomed GmbH, Herne
Ethylglucuronid - d5 (1,0 mg/mL Methanol)		Lipomed GmbH, Herne
Referenzhaar		Arvecon, Walldorf
Qualitätskontrollen		ACQ Science GmbH, Rottenburg

3.1.4 Laufmittel

Tab. 3.5: Verwendete Laufmittel

Laufmittel A	Laufmittel B
5 mM Ammoniumformiat, pH = 3,3	Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure

3.1.5 Probennahme

Die Probennahme der Leichenhaare wird jeweils bei der Sektion vorgenommen. Die Haare werden in kleine Plastiktüten überführt, fest verschlossen und mit der jeweiligen Laboridentifikationsnummer gekennzeichnet. Die Haarproben der Freiwilligen werden nach Anweisungen des Instituts abgenommen. Eine bleistiftdicke Strähne wird mit einer geeigneten Schnur kopfhautnah am Hinterhauptshöcker abgebunden und abgeschnitten. Die Proben sollten vor Licht und Feuchtigkeit geschützt gelagert werden. Bei allen Proben handelt es sich um Kopfhare.

3.2 Methoden

3.2.1 Probenvorbereitung

Das Leerhaar für die Kalibration ist im Institut schon gemahlen angekommen. Alle weiteren Proben werden mit 5 ml Dichlormethan und 5 ml Methanol jeweils 5 Minuten unter ständigem Schütteln gewaschen. Die Haare sind bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer Schwingmühle mit einer Edelstahlkugel mit einem Durchmesser von 0,5 cm für 3 Minuten 40 Sekunden bei höchster Geschwindigkeit gemahlen worden. Die gemahlene Haare werden in Headspacegläschen abgefüllt, mit einem Gummideckel verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.2 Extraktion

Für die Extraktion werden jeweils 75 mg der gemahlene Haare in Tubes abgewogen. Die Kalibration besteht aus 7 Punkten und wird, wie in Tabelle 3.6 angesetzt.

Tab. 3.6: Kalibration von EtG in Haaren

Kalibration und Leerwert	STD [μ l] (125 ng/mL)	ISTD [μ l] (125 ng/mL)
Kal Ø	0	0
Kal 0	0	20
Kal 1 (2,5 pg)	1,5	20
Kal 2 (5 pg)	3	20
Kal 3 (10 pg)	6	20
Kal 4 (25 pg)	15	20
Kal 5 (50 pg)	30	20

Zusätzlich wird jeder Probe 1 mL Extraktionslösung (Wasser) zugegeben und kurz gevortext. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag werden die Ansätze nochmals kurz gemischt und anschließend bei 14800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Um die restlichen Haarfragmente aus der wässrigen Phase zu entfernen, werden die Proben in Micro-Spin-Filter Tubes überführt und nochmals für 3 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in Vials abgefüllt und eingedampft, um die Rückstände in 50 μ l Laufmittel A wieder zurück zu lösen. Jede Probe wird jeweils 1 Minute gevortext, um danach das Extrakt in Mikroeinsätze zu füllen und die Vials mit Bördekkappen zu verschließen.

Neben der standardmäßigen Extraktionslösung werden noch weitere Gemische und Vorgehensweisen (a - g und 3 + 4) getestet. Für alle folgenden Parameter sind jeweils 3 Kalibrationspunkte (niedrig (2,5 pg), mittel (10 pg) und hoch (50 pg)) angesetzt, um diese mit den optimierten Parametern 3 mal zu messen.

a) **Extraktionslösung**

- Wasser + 0,1 % Ameisensäure
- Wasser + 0,5 % Ameisensäure
- Wasser + 1 % Ameisensäure
- Wasser 50 % + Methanol 50 %
- Wasser 70 % + Methanol 30 %
- Wasser 30 % + Methanol 70 %

b) **Behandlung im Ultraschallbad**

Die vorbereiteten Proben werden nach Zugabe der Extraktionslösung für 1 Std. in das Ultraschallbad gestellt und wie in Kapitel 3.2.2 weiterverarbeitet.

c) **Verwendung von Headspaceflaschen**

Die Kalibrationspunkte werden in Headspaceflaschen anstatt in Eppendorf Tubes (Tab. 3.6) angesetzt. Die weitere Aufbereitung ist identisch, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, jedoch kommt für die Flaschen eine große Zentrifuge zum Einsatz. Die Proben werden bei 4300 g für 10 Minuten zentrifugiert.

d) **Volumen für Standard erhöhen**

Der EtG-Standard bei kleineren Konzentrationen wird 10-fach verdünnt, um ein größeres Volumen pipettieren zu können (Tab. 3.7). Der interne Standard bleibt davon unberührt.

Tab. 3.7: Volumenänderung der kleinen Kalibrationspunkte

Kalibrationspunkte	STD [μl] (125 ng/mL)	ISTD [μl] (125 ng/mL)
Kal niedrig (2,5 pg)	15 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	20
Kal mittel (10 pg)	60 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	20
Kal hoch (50 pg)	30	20

e) **Keine eintägige Inkubationszeit**

Die Proben werden direkt nach der einstündigen Ultraschallbadbehandlung, wie in Kapitel 3.2.2 weiterverarbeitet.

f) Volumen zum Rücklösen verringern

Nachdem das Probengemisch im Vial abgepusht wurde, werden die Proben in 30 μ l Laufmittel A rückgelöst anstatt in 50 μ l. Diese Vorgehensweise wird mit allen vorherigen Tests (a - e) durchgeführt.

g) Haarmenge verringern

Neben der ursprünglichen Menge (75 mg) (Tab. 3.6) an gemahlene Haaren, werden auch 2 geringere Mengen (25 mg und 50 mg) angesetzt. Durch die niedrigere Menge an Haaren muss der Standard und der interne Standard angepasst werden (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Volumenänderung bei geringerer Haarmenge

Haarmenge	Kalibrationspunkte	STD [μ l] (125 ng/mL)	ISTD [μ l] (125 ng/mL)
25 mg	Kal niedrig (2,5 pg)	5 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	7
	Kal mittel (10 pg)	20 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	7
	Kal hoch (50 pg)	10	7
50 mg	Kal niedrig (2,5 pg)	10 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	13
	Kal mittel (10 pg)	40 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	13
	Kal hoch (50 pg)	20	13

3.2.3 Bestimmung von Ethylglucuronid mittels HPLC-MS/MS

1. Einstellungen der HPLC

- Säule: Phenomenex Luna Omega PS C18; 150 x 2,1 mm, 5 μ m
- Laufmittel: 5 mM Ammoniumformiat, pH = 3,3; Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure
- Fluss: 200 μ l/Minute
- Injektionsvolumen: 10 μ l
- Laufzeit: 8 Minuten

Tab. 3.9: Gradient der Säule Luna Omega

Dauer [min]	Laufmittel A	Laufmittel B
0	100 %	0 %
3	10 %	90 %
3,1	100 %	0 %
5	100 %	0 %
8	100 %	0 %

2. Methodenparameter des Massenspektrometers

Durch das Massenspektrometer werden die Methodenparameter für den Analyten EtG und den internen Standard EtG-d₅ automatisch bestimmt, siehe Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11.

Tab. 3.10: Einstellungen des Massenspektrometers für EtG

	Q1	Q3	Zeit [msec]	DP	CE	CXP	EP
EtG	221.026	75.008	70	-50.0	-20.0	-1.0	-10
EtG	221.026	85.059	70	-50.0	-24.0	-13.0	-10
EtG	221.026	113.061	70	-50.0	-22.0	-5.0	-10

CAD: 8 IS: -4500
 CUR: 25 TEM: 350
 GS1: 25 GS2: 27

Tab. 3.11: Einstellungen des Massenspektrometers für EtG-d₅

	Q1	Q3	Zeit [msec]	DP	CE	CXP	EP
EtG - d5	225.962	75.050	70	-65.0	-26.0	-1.0	-10
EtG - d5	225.962	85.054	70	-65.0	-26.0	-3.0	-10
EtG - d5	225.962	113.093	70	-65.0	-22.0	-5.0	-10

CAD: 12 IS: -4500
 CUR: 25 TEM: 300
 GS1: 21 GS2: 12

Um die Einstellungen für den gesuchten Analyten EtG bestmöglich einzustellen, werden die Methodenparameter auch manuell nachjustiert. Hier sind im weiteren Verlauf folgenden Parameter verändert worden (Tab. 3.12). Eine Probe aus Reinsubstanz mit der Konzentration 25 ng/mL wird nach jeder einzelnen Parameteränderung erneut gemessen.

Tab. 3.12: Feinjustierung einiger Parameter des Massenspektrometers

	Parameter	veränderter Wert
1)	dwell time	100
2)	Temperatur	250
3)	Temperatur	450
4)	Temperatur	550
5)	Temperatur	650
6)	CXP	-11
7)	CXP	-5,5
8)	EP	-7
9)	EP	-5
10)	CUR	10
11)	CUR	15
12)	CUR	20
13)	GS1	1
14)	GS1	15
15)	GS1	35
16)	GS2	1
17)	GS2	15
18)	GS2	35

3. Änderungen des Injektionsvolumens

Bei der HPLC werden im weiteren Verlauf unterschiedliche Injektionsvolumina (10 μ l, 15 μ l und 20 μ l) getestet.

4. Einsatz einer Isopropanolpumpe

Zusätzlich zu dem eingesetzten Gradienten aus Tabelle 3.9 wird eine weitere isokratische Pumpe post-column mit Isopropanol und einer Flussrate von 100 μ l/min dazu geschaltet.

Eine Flussrate von 200 μ l/min wird ebenfalls betrachtet.

3.2.4 Messung von Realproben

Für die Testmessungen stehen drei verschiedene Proben (Tab. 3.13) zur Verfügung.

Tab. 3.13: Verwendete Proben für Testmessungen

Bezeichnung	Probe
A	Leichenhaar
B	Leichenhaar
C	Freiwilliger

Alle drei Proben werden mit jeweils 5 mL Dichlormethan und danach mit 5 mL Methanol unter ständigen Schütteln 5 Minuten gewaschen. Danach sind sie über Nacht bei Raumtemperatur geschützt getrocknet. Nachdem alle Haare getrocknet sind, wird jede Probe einzeln in die Schwingmühle überführt, um diese bei höchster Geschwindigkeit mit Hilfe der Edelstahlkugel für 3 Minuten 40 Sekunden zu pulverisieren. Um eine geeignete Lagerung zu garantieren, werden die gemahlten Proben in beschriftete Headspaceflaschen überführt und verschlossen.

Durch die Tests in der Extraktion werden hier die optimalen Parametern angewendet. Von jeder Probe werden 50 mg in Eppendorf - Tubes abgewogen. Um die Konzentration in den Proben zu ermitteln, läuft immer eine Kalibration (Tab. 3.14) mit.

Tab. 3.14: Kalibration

Kalibration und Leerwert	STD [μ l] (125 ng/mL)	ISTD [μ l] (125 ng/mL)
Kal \emptyset	0	0
Kal 0	0	13
Kal 1 (2,5 pg)	10 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	13
Kal 2 (5 pg)	20 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	13
Kal 3 (10 pg)	40 (verdünnt \rightarrow 12,5 ng/mL)	13
Kal 4 (25 pg)	10	13
Kal 5 (50 pg)	20	13
Probe A	0	13
Probe B	0	13
Probe C	0	13

Nach Hinzufügen des internen Standards und der Extraktionslösung von 1 mL 70/30 Wasser + Methanol, werden die Proben inkl. Kalibration für 1 Stunde in ein Ultraschallbad gestellt. Danach bei Raumtemperatur für einen Tag inkubiert. Nach der eintägigen Inkubationszeit werden die Haare weiterverarbeitet, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

Für die Messung an der HPLC-MS/MS werden die optimierten Methodenparameter und Einstellungen (Tab. 4.2; 3.10; 3.11) verwendet.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen näher erläutert. Hier sind jeweils Beispielchromatogramme des 85 - Übergangs eingefügt worden. Dieser Übergang wird als Quantifier und der 75 - Übergang als Qualifier betrachtet.

Der *Quantifier* ist dafür zuständig den Analyten quantitativ zu bestimmen.

Der *Qualifier* ist eine zusätzliche Bestätigung, dass es sich um den gesuchten Analyten handelt.

4.1 Extraktion

a) Extraktionslösung

Tab. 4.1: Ergebnisse der verschiedenen Vorgehensweisen bei der Extraktion

	Extraktionslösungen	Änderung	Bemerkungen
	Wasser (Standard)	→	Intensität gering
	Wasser + 0,1 % Ameisensäure	↘	kleine Konzentrationen nicht auswertbar
	Wasser + 0,5 % Ameisensäure	↘	kleine Konzentrationen nicht auswertbar
a)	Wasser + 1 % Ameisensäure	↘	kleine Konzentrationen nicht auswertbar
	Wasser 50 % + Methanol 50 %	↘	schlechte chromatographische Abtrennung
	Wasser 70 % + Methanol 30 %	↗	
	Wasser 30 % + Methanol 70 %	↘	schlechte chromatographische Abtrennung + Doppelpeaks

Legende: ↘ Verschlechterung
→ keine Veränderung
↗ Verbesserung

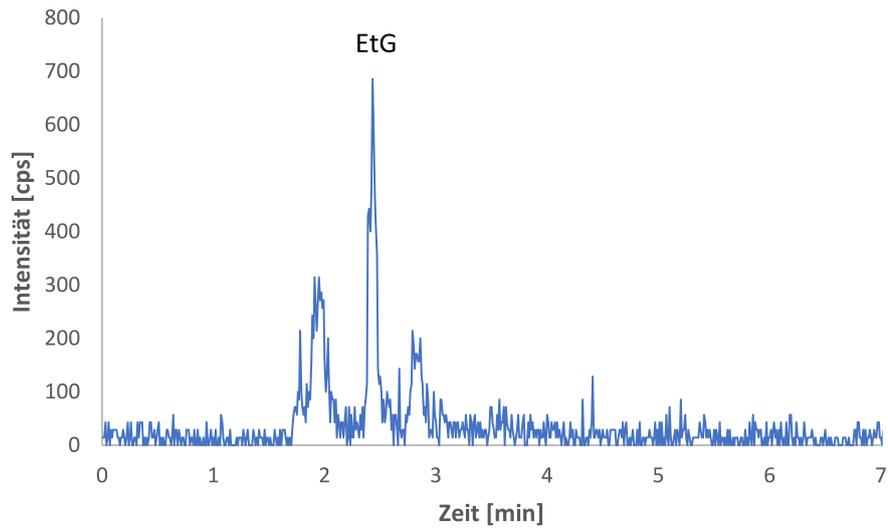


Abb. 4.1: Chromatogramm der Extraktion mit 100% Wasser bei 50 pg/mg

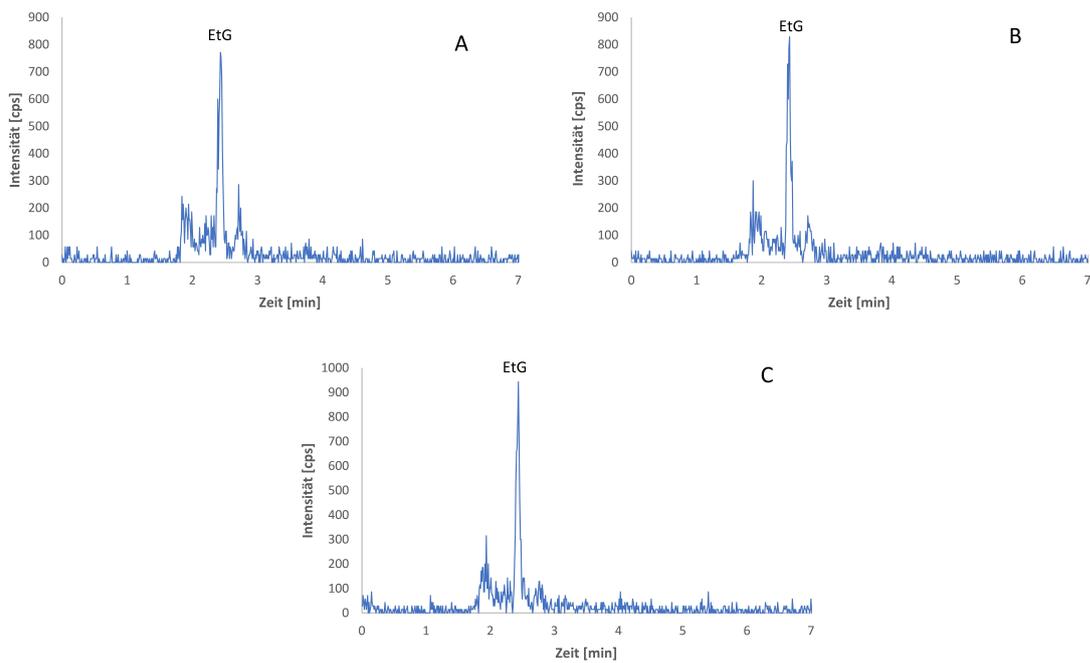


Abb. 4.2: Chromatogramme der Extraktion mit 0,1 % (A), 0,5 % (B) und 1 % Ameisensäure + Wasser (C) bei 50 pg/mg

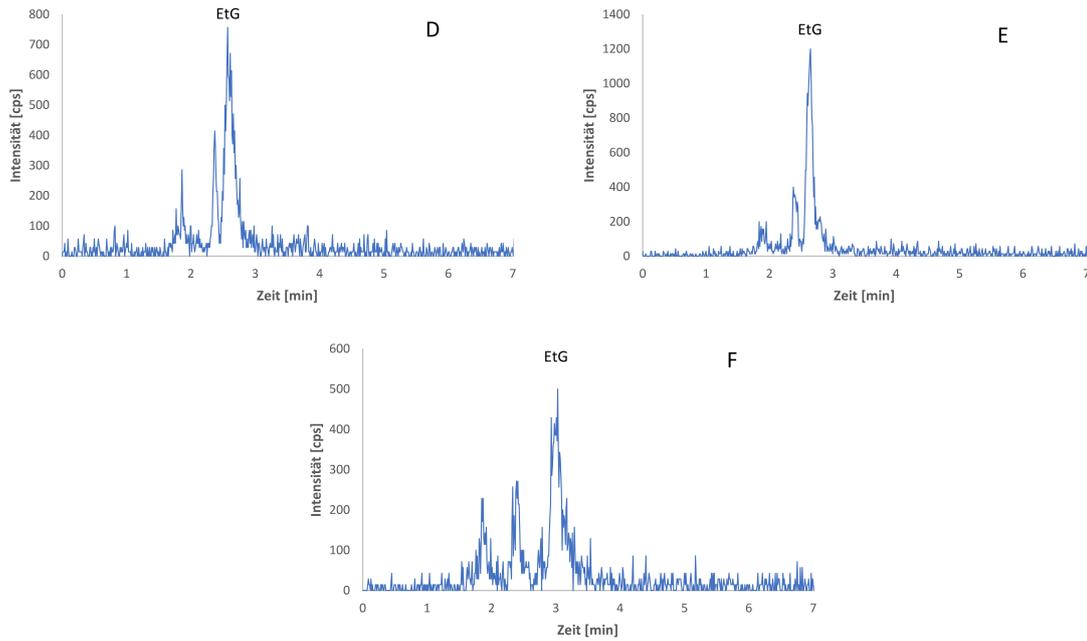


Abb. 4.3: Chromatogramme der Extraktion mit verschiedenen Verhältnissen Wasser + Methanol 50/50 (D), 70/30 (E) und 30/70 (F) bei 50 pg/mg

b) Ultraschallbad

Durch die einstündige Behandlung im Ultraschallbad hat sich die Peakfläche des EtG-Peaks verdoppelt. Bei einer EtG - Konzentration von 50 pg beträgt die Peakfläche bei dem Leerhaar $1,58 \cdot 10^3$ counts und nach der einstündigen Ultraschallbehandlung $3,33 \cdot 10^3$ counts.

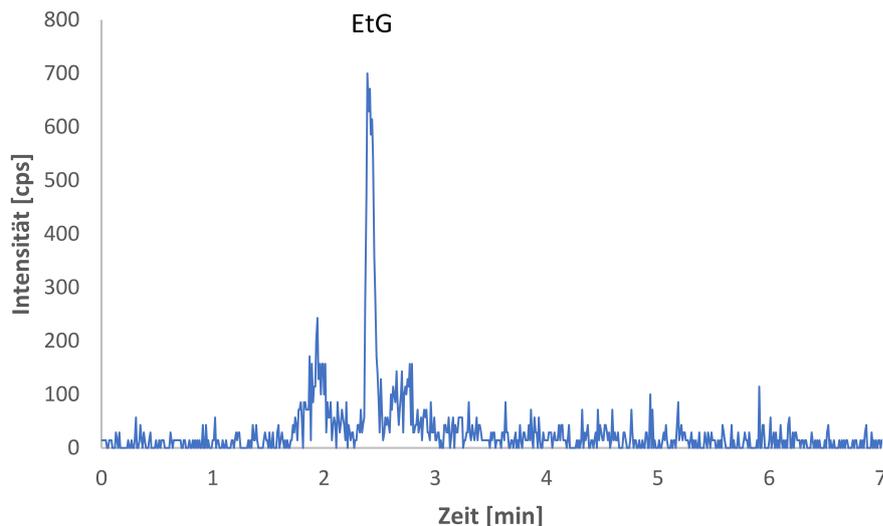


Abb. 4.4: Chromatogramm nach einstündiger Ultraschallbehandlung bei 50 pg/mg

c) Headspaceflaschen

Die Verwendung von Headspaceflaschen anstatt Eppendorf Tubes hat keine Intensitätssteigerung ergeben und es sind Doppelpeaks (Abb. 4.5) entstanden.

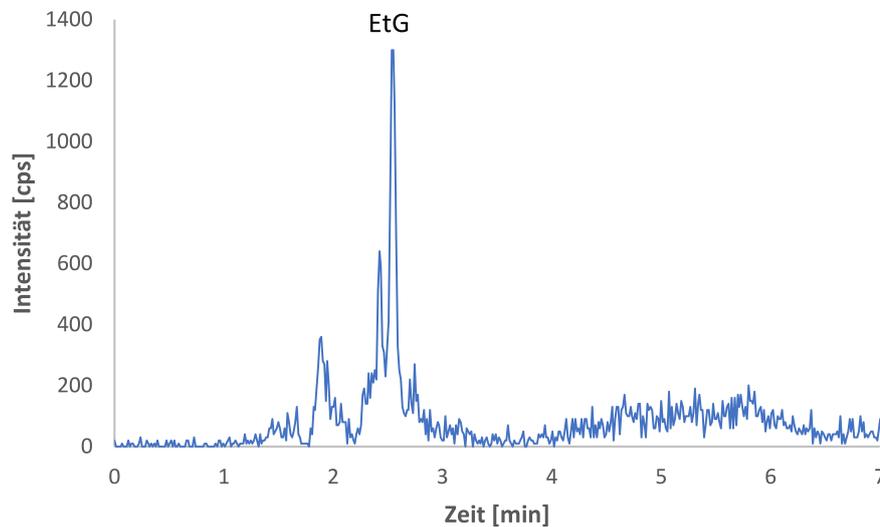


Abb. 4.5: Chromatogramm nach Verwendung von Headspaceflaschen bei 50 pg/mg

d) Volumen für Standard erhöhen

Durch das erhöhte Volumen für den EtG-Standard konnten bei den kleinen Konzentrationen die EtG-Peaks eindeutiger (Abb. 4.6) ausgewertet werden.

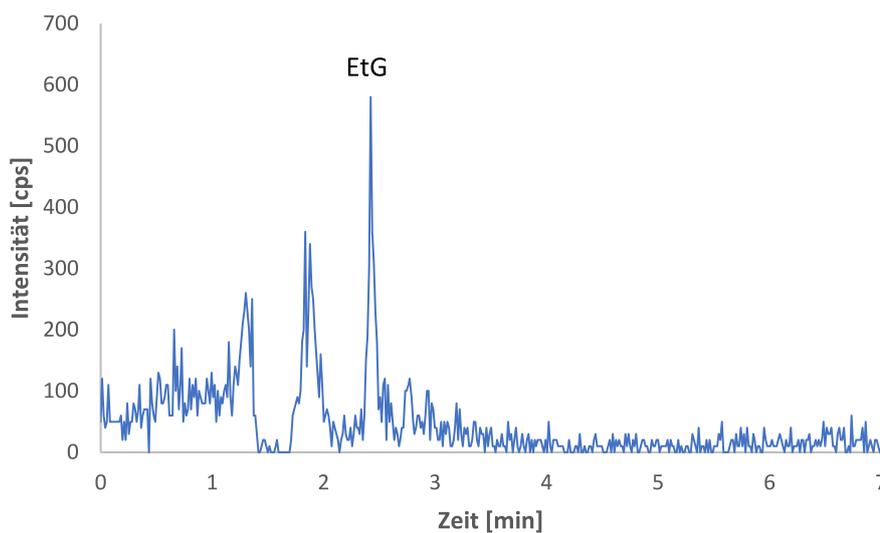


Abb. 4.6: Chromatogramm bei 2,5 pg/mg nach Erhöhung des Standardvolumens bei kleinen Konzentrationen

e) Keine eintägige Inkubationszeit

Das Weglassen der eintägigen Inkubationszeit hat zwar eine sichtbare Besserung der Intensität ergeben, jedoch sind hier Doppelpeaks entstanden (Abb. 4.7).

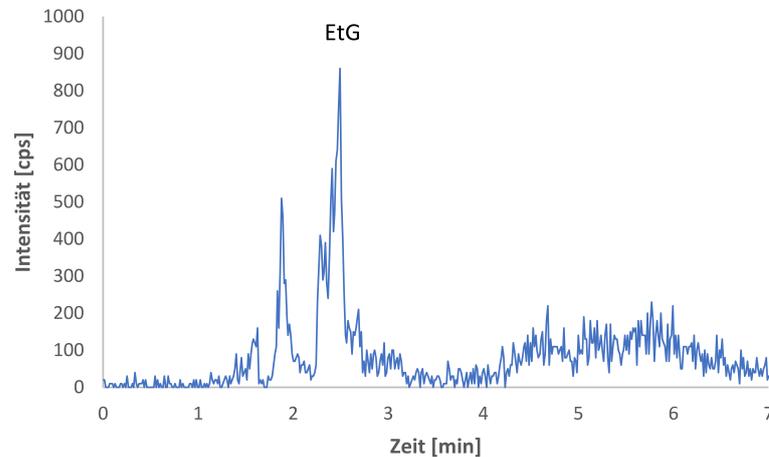


Abb. 4.7: Chromatogramm bei 50 pg/mg ohne eintägiger Inkubation

f) Volumen zum Rücklösen verringern

Auch das Verringern des Volumens beim Rücklösen, hat Doppelpeaks oder zu breite Peaks (Abb. 4.8) ergeben.

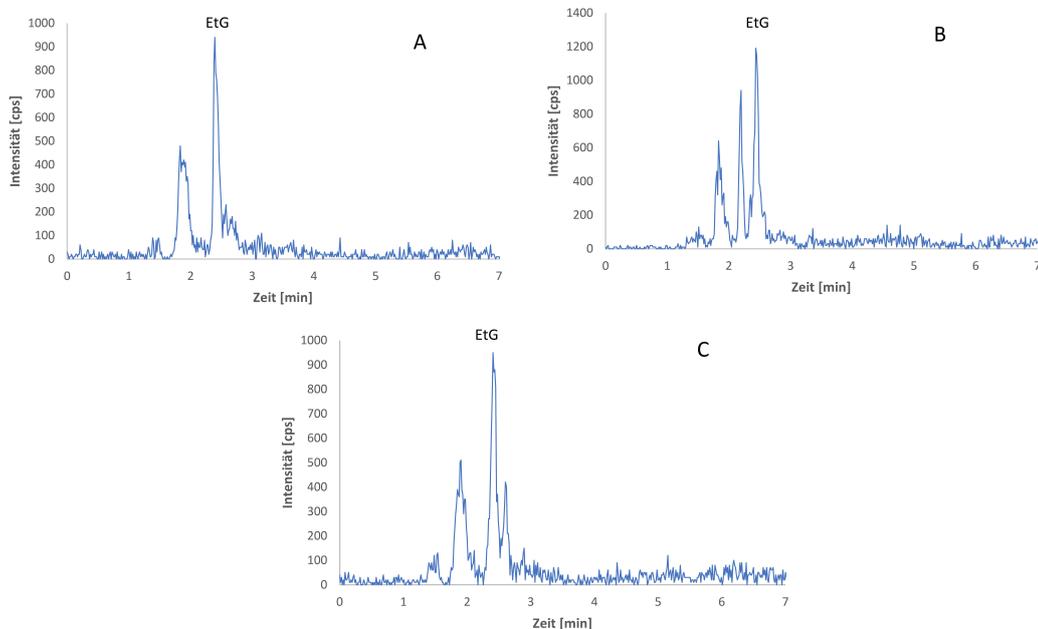


Abb. 4.8: Chromatogramme nach Verringerung des Volumens beim Rücklösen: ohne Inkubation (A), Standard (Tubes) (B), erhöhtes Volumen bei kleinen Konzentrationen (C) bei 50 pg/mg

g) Haarmenge verringern

Die Chromatogramme zeigen deutlich wie sich die Menge der Haare auf das Ergebnis auswirkt. Alle drei Mengen bringen zufriedenstellende Ergebnisse, denn die Abtrennung von der Matrix ist überall vorhanden. Der EtG-Peak bei 25 mg weist eine geringere Intensität auf, bei 50 mg ist er schmal und intensiv und bei 75 mg ist er ebenfalls intensiv, wird jedoch breiter (Abb. 4.9).

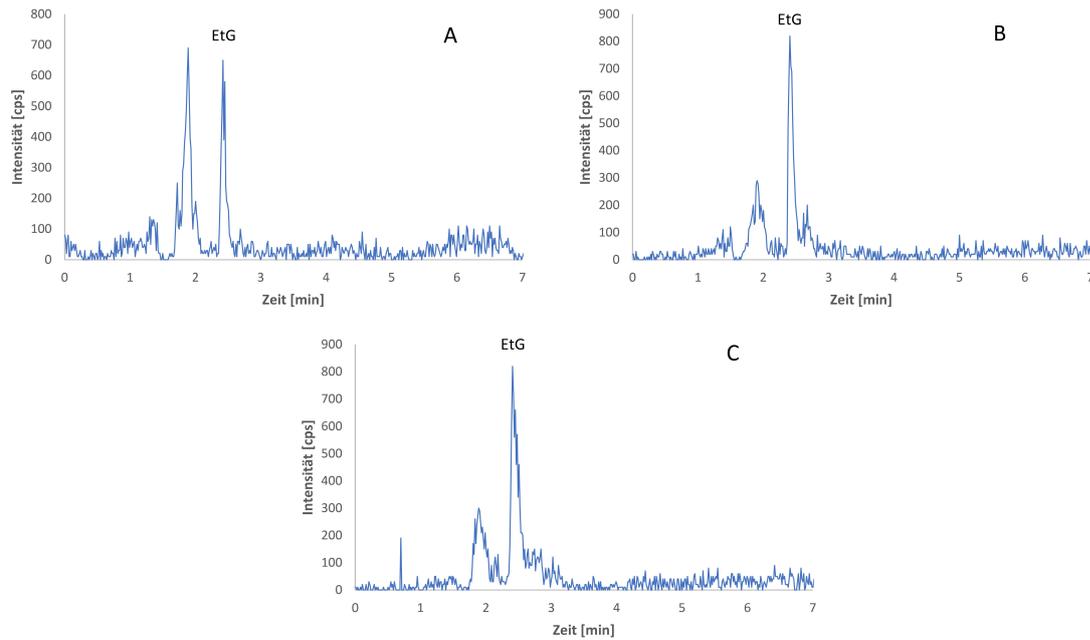


Abb. 4.9: Chromatogramme unterschiedlicher Haarmengen 25 mg (A), 50 mg (B), 75 mg (C) bei 50 pg/mg

4.2 Bestimmung von Ethylglucuronid mittels HPLC-MS/MS

1. Einstellungen der HPLC

Die Einstellungen der HPLC konnten wie in Kapitel 3.2.3 Punkt 1 beibehalten werden.

2. Methodenparameter des Massenspektrometers

Als Referenz wird das Beispielchromatogramm in Abbildung 4.1 des genutzten Leerhaares verwendet.

Durch eine Kombination der besten Parameter konnte eine eindeutig erhöhte Intensität (Abb. 4.10) erzielt werden:

Tab. 4.2: Optimale Einstellungen der Methodenparameter

Methodenparameter	besten Wert
dwell time	100
CXP	-11
EP	-10
TEM	550
CUR	25
GS1	35
GS2	35
IS	-4000

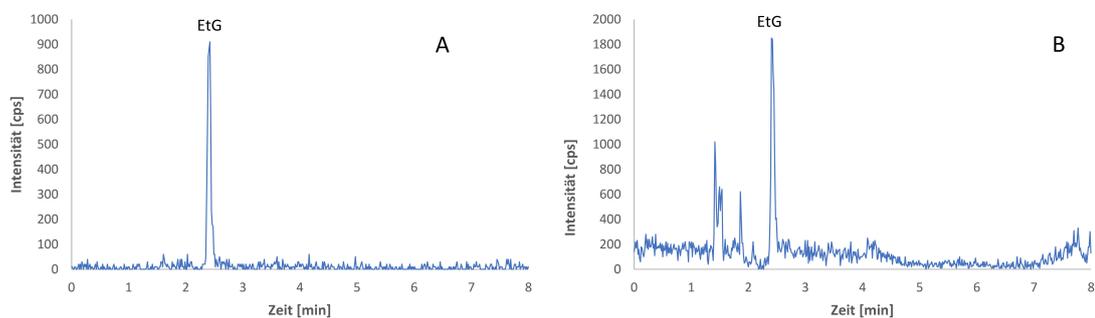


Abb. 4.10: Chromatogramme vor dem Tuning (A) und nach dem Tuning (B)

3. Änderungen des Injektionsvolumen

Es wurde unter anderem auch das Injektionsvolumen (10 μl , 15 μl und 20 μl) getestet.

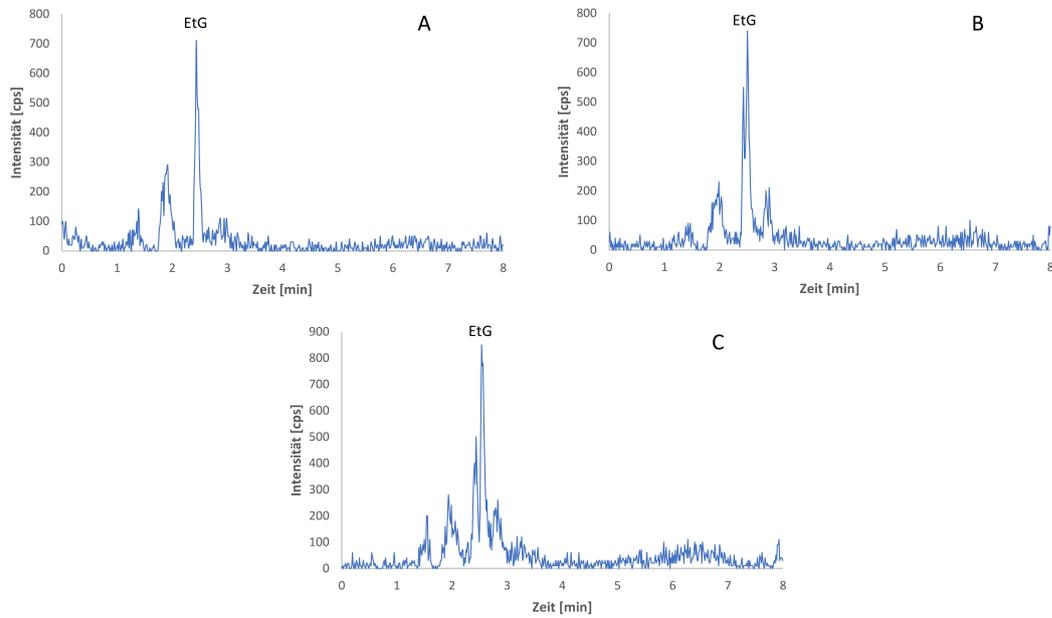


Abb. 4.11: Chromatogramme der verschiedenen Injektionsvolumina 10 μl (A), 15 μl (B), 20 μl (C) bei 50 pg/mg

4. Einsatz einer Isopropanolpumpe

Der Einsatz einer zusätzlichen isokratischen Pumpe, nach der Trennung mit Isopropanol, hat bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ eine Besserung gezeigt. Bei der Flussrate von $200 \mu\text{l}/\text{min}$ eine deutliche Verschlechterung der Peakform und Intensität (Abb. 4.12).

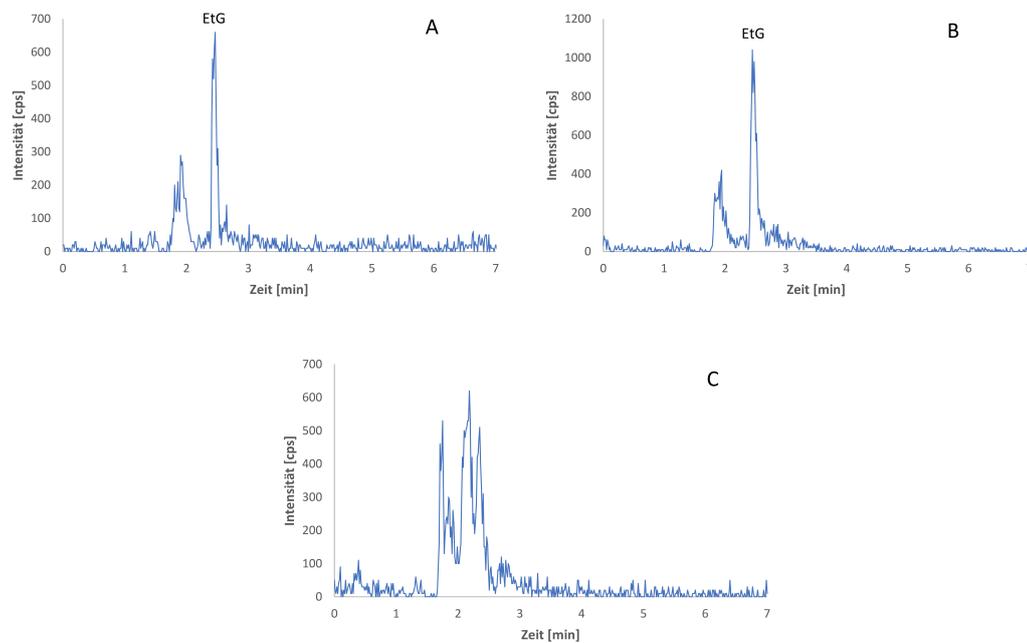


Abb. 4.12: Chromatogramme mit Isopropanolpumpe; ohne Isopropanol (A), $100 \mu\text{l}$ Isopropanol (B), $200 \mu\text{l}$ Isopropanol (C) bei $50 \text{ pg}/\text{mg}$

4.3 Messungen von Realproben

Kalibration

Um die Konzentrationen in den Proben zu berechnen, wird aus den Kalibrationspunkten und der Peakfläche (Tab. A.1) mit Hilfe des Programmes Excel eine lineare Regressionsgerade gebildet. Um die Ergebnisse bestätigen zu können, wurde ebenfalls der 75 - Übergang betrachtet.

Die Gleichung der linearen Regression hat folgenden Aufbau : $y = m \cdot x + n$

$$y = \text{Area Ratio}^3$$

m = Steigung der Regressionsgeraden

x = unbekannte EtG - Konzentration

n = Schnittpunkt mit der y-Achse

$$85 - \text{Übergang: } y = 0,0258x + 1,4828$$

Der Korrelationskoeffizient R^2 stellt den Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und dem Signal dar. Je mehr dieser Wert gegen 1 geht, desto näher befindet sich die Regressionsgerade (Abb. 4.13) am eigentlichen Signal. Damit eine genauere Auswertung möglich ist wird deshalb ein hoher Wert angestrebt.

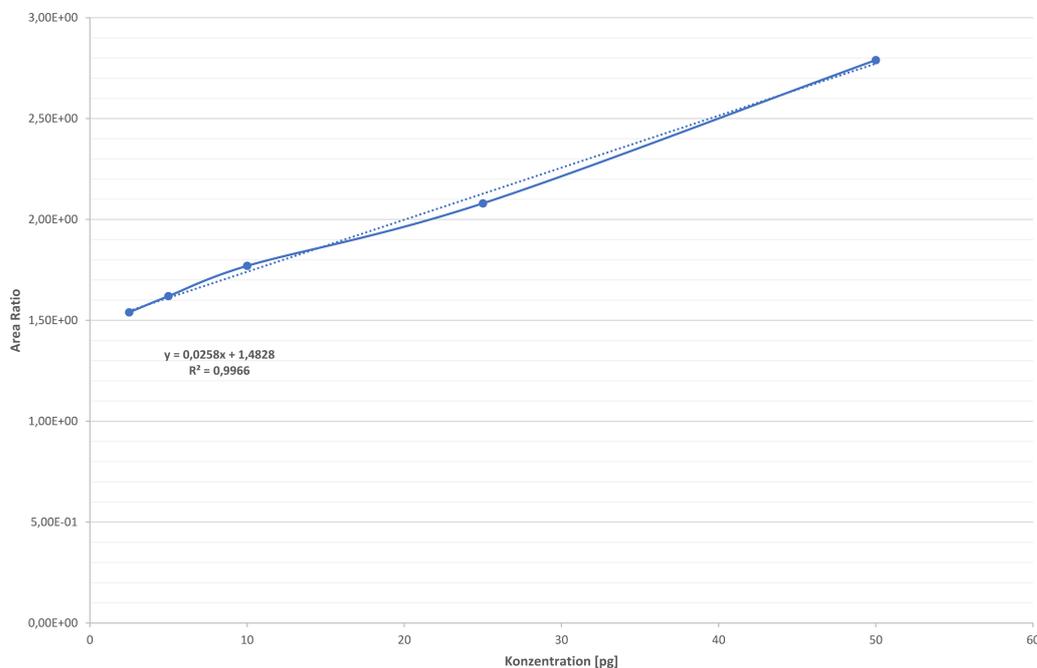
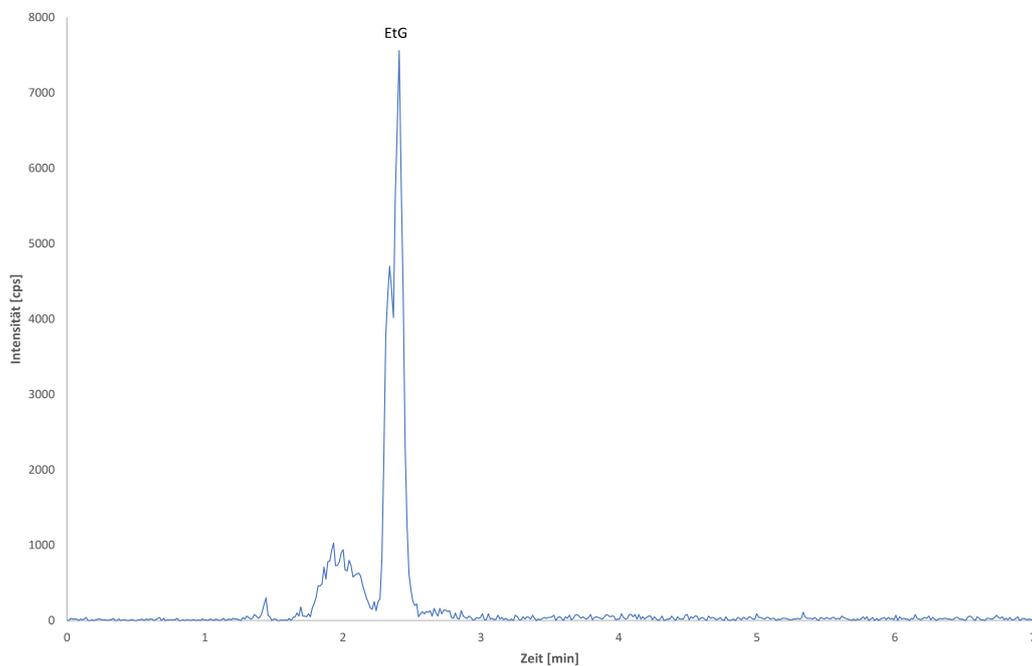


Abb. 4.13: Regressionsgeraden des 85 -Übergänges

³ Verhältnis zwischen Peakfläche und internen Standard

Probe A**Abb. 4.14:** Chromatogramm der Probe A im 85 - Übergang**Tab. 4.3:** Gegebene Werte für Probe A

85 - Übergang	
Area Ratio	9,26

Die EtG-Konzentration in der Probe wird wie folgt berechnet:

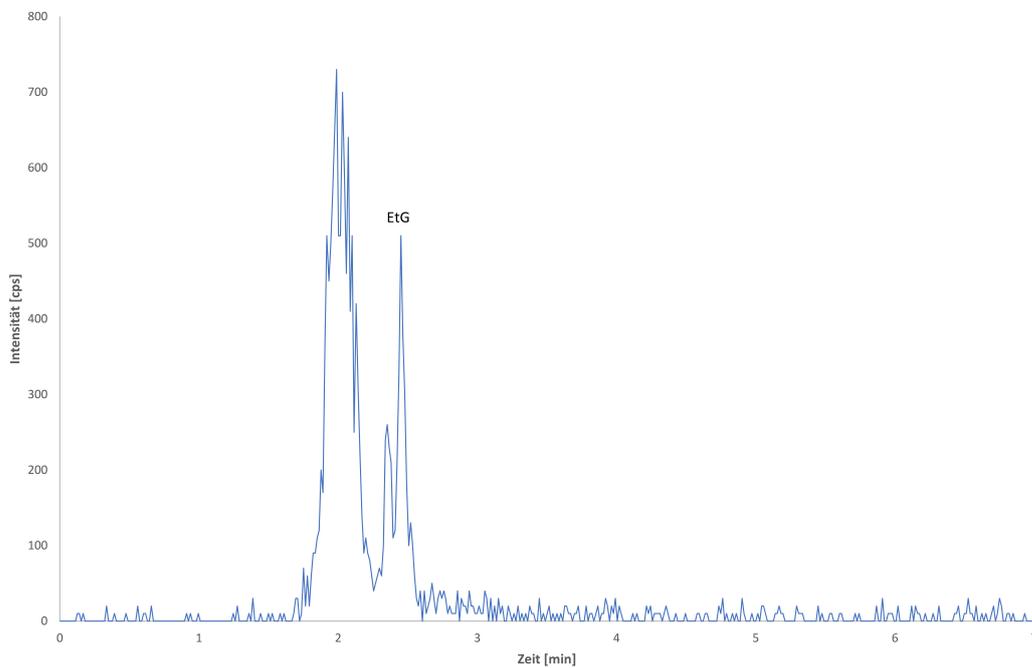
85 - Übergang:

$$y = m \cdot x + n \quad | \text{umstellen nach } x$$

$$x = \frac{y - n}{m} \quad | \text{gegebene Werte aus Regressionsgleichung einsetzen}$$

$$x = \frac{9,26 - 1,4828}{0,0258}$$

$$x = \underline{\underline{301 \text{ pg EtG}}}$$

Probe B**Abb. 4.15:** Chromatogramm der Probe B im 85 - Übergang**Tab. 4.4:** Gegebene Werte für Probe B

85 - Übergang	
Area Ratio	4,31

Die EtG-Konzentration in der Probe wird wie folgt berechnet:

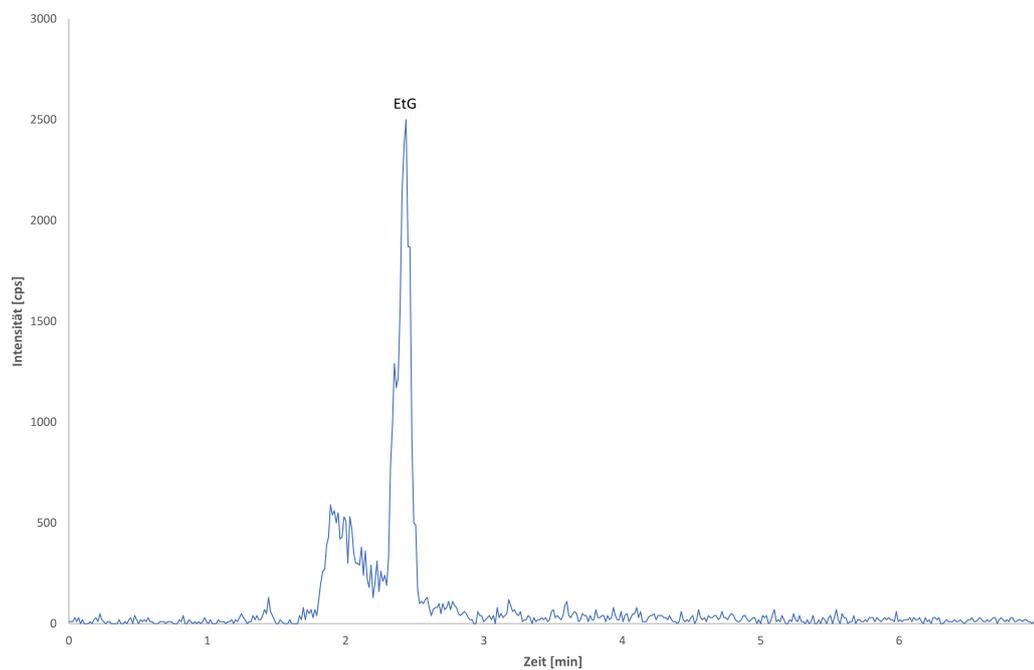
85 - Übergang:

$$y = m \cdot x + n \quad | \text{umstellen nach } x$$

$$x = \frac{y - n}{m} \quad | \text{gegebene Werte aus Regressionsgleichung einsetzen}$$

$$x = \frac{4,31 - 1,4828}{0,0258}$$

$$x = \underline{\underline{110 \text{ pg EtG}}}$$

Probe C**Abb. 4.16:** Chromatogramm der Probe C im 85 - Übergang**Tab. 4.5:** Gegebene Werte für Probe C

85 - Übergang	
Area Ratio	2,09

Die EtG-Konzentration in der Probe wird wie folgt berechnet:

85 - Übergang:

$$y = m \cdot x + n \quad | \text{umstellen nach } x$$

$$x = \frac{y - n}{m} \quad | \text{gegebene Werte aus Regressionsgleichung einsetzen}$$

$$x = \frac{2,09 - 1,4828}{0,0258}$$

$$x = \underline{\underline{23,5 \text{ pg EtG}}}$$

5 Diskussion

5.1 Extraktion

a) Extraktionslösung

Die Recherche hat ergeben, dass sich EtG am besten in Wasser oder Gemischen aus Wasser und Methanol [9] extrahieren lässt. Durch die unterschiedlichen Extraktionslösungen, die getestet wurden, konnte beobachtet werden in welcher Lösung sich das EtG am besten extrahieren lässt. Auch Gemische aus Säure und Wasser wurden eingesetzt, um gegebenenfalls die Haarmatrix durch die Säure noch besser aufspalten zu können, sodass mehr EtG in Lösung tritt. Die Messungen haben jedoch ergeben, dass durch den Einsatz von Ameisensäure (Abb. 4.2) das EtG schlechter in die Lösung übergegangen ist. Die Gemische aus Methanol und Wasser haben bessere Ergebnisse gezeigt, sodass am Ende das Gemisch aus 70 % Wasser und 30 % Methanol (Abb. 4.3) für den weiteren Verlauf benutzt wurde.

b) Ultraschallbad

Die Verwendung von einem Ultraschallbad und der damit erhöhten Temperatur hat einen positiven Einfluss auf die Extraktion gezeigt (Abb. 4.4). Die Peakfläche hat sich dadurch verdoppelt.

c) Headspaceflaschen

Die Headspaceflaschen haben bei der Messung von EtG keine Besserungen der Intensität ergeben (Abb. 4.5). Die Konzentration von 10 pg wird jedoch von der Matrix komplett überlagert oder es entstand ein Doppelpeak. Die Probenaufbereitung in den Flaschen ist nicht zufriedenstellend gewesen, da die Zentrifugalkraft in der großen Zentrifuge für die Headspaceflaschen nicht ausreichend war, um die Haarfragmente optimal von der flüssigen Phase zu trennen. Aufgrund dessen konnte die wässrige Phase nur schlecht abpipetiert werden.

d) Volumen für Standard erhöhen

Das Verdünnen des EtG-Standards wurde getestet, da regulär eine sehr kleine Menge wie zum Beispiel 1,5 μ l oder 3 μ l bei den kleinen Kalibrationspunkten pipettiert wird. Hier hat ein einfacher Pipettierfehler schon große Auswirkungen auf die Ergebnisse. Durch das Verdünnen konnte somit das 10-fache an Volumen hinzugefügt werden. Wie das Chromatogramm (Abb. 4.6) zeigt, steigt die Intensität der kleinen Konzentrationspunkte an. Dadurch können diese besser interpretiert und sichergestellt werden, dass

es sich um den gesuchten Analyten handelt. Grundsätzlich sollte der Peak des Analyten mindestens 3 mal größer sein als das Grundrauschen im Chromatogramm.

e) **Keine eintägige Inkubationszeit**

Durch das Weglassen der Inkubationszeit sollte herausgefunden werden, ob dennoch zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Das wäre für die Aufbereitung sehr nützlich, da somit Proben schneller bearbeitet werden könnten. Im Chromatogramm (Abb. 4.7) wird sichtbar, dass sich zwar die Intensität erhöht, aber auch Doppelpeaks gebildet werden. Das zeigt, dass diese Vorgehensweise ungeeignet ist.

f) **Volumen zum Rücklösen verringern**

Das Ziel vom geringeren Volumen beim Rücklösen war, dass durch eine höhere Konzentration des Extraktes eine dementsprechend höhere Intensität im Chromatogramm (Abb. 4.8) erzielt wird. Hier war die Konzentration möglicherweise zu hoch, wodurch die Säule etwas überladen wurde, sodass Doppelpeaks oder zu breite Peaks entstanden sind.

g) **Haarmenge verringern**

Die Reduzierung der Haarmenge hat mehrere Vorteile, einerseits kann dadurch viel Verbrauchsmaterial gespart werden und andererseits ist die Matrix im Chromatogramm (Abb. 4.9) nicht so dominant. Bei beiden niedrigen Mengen sind zufriedenstellende Ergebnisse erzielt worden. Jedoch hat sich herausgestellt, dass 50 mg vergleichbare Ergebnisse, wie 75 mg aufweist und somit für weitere Versuche eingesetzt werden kann. Der EtG-Peak ist bei allen drei Konzentrationen gut von der Matrix abgetrennt und auch deutlich intensiver als die Haarmatrix.

5.2 Bestimmung von Ethylglucuronid mittels HPLC-MS/MS

1. Einstellungen der HPLC

Bei der Trennung von EtG mit Hilfe der Luna Omega Säule konnte bei jeder Messung ein konstante Retentionszeit und eine eindeutige Abtrennung von der Matrix beobachtet werden. Mit diesen Ergebnissen kann somit eine quantitative Bestimmung von EtG garantiert werden. Das Injektionsvolumen wurde standardmäßig auf 10 μl eingestellt. Auch der Gradient führt dazu, dass so gut wie alles von der Säule gespült wird. Somit sind die Parameter für den Analyten sehr gut geeignet.

2. Anpassung der Methodenparameter

Durch die Feineinstellungen der Parameter des Massenspektrometers konnte eine deutlich höhere Intensität erzielt werden (Abb. 4.10). Die meisten Änderungen wurden an der Ionenquelle vorgenommen, da diese Parameter am größten Auswirkungen auf die Messungen haben.

3. Änderung des Injektionsvolumen

Die Anpassung des Injektionsvolumen sollte Aufschluss geben, welches Volumen sich für EtG und der Trennsäule am besten eignet. Standardmäßig wird 10 μl verwendet. Durch das Chromatogramm (Abb. 4.11) wird deutlich, dass die Säule mit einem Volumen von 15 μl etwas überladen ist, welches der vorhandene Doppelpeak zeigt. Bei einem Injektionsvolumen von 20 μl wird der Doppelpeak noch weiter verstärkt, sodass eine Auswertung nicht möglich ist.

4. Einsatz einer Isopropanolpumpe

Die zusätzliche Pumpe wurde nach der Trennsäule dazugeschaltet. Bei EtG wurde Isopropanol getestet, da dies im Institut schon länger in Verbindung mit diesem Analyten verwendet wurde. Durch den post-column Einsatz beeinträchtigt das Isopropanol nur die nachfolgende Ionisierung der getrennten Substanzen. In den Chromatogrammen (Abb. 4.12) wird sichtbar, dass die Intensität durch diesen Zusatz begünstigt wird und das Grundrauschen nimmt im Allgemeinen etwas ab. Wie die Werte in einer Gegenüberstellung von Konzentration und Peakfläche aussehen, wird in Abbildung 5.1 deutlich. Die Peakfläche nimmt bei zusätzlichen 100 μl Isopropanol zu. Im Gegensatz zu der Verwendung der doppelten Menge, hier ist die zuverlässige Abtrennung von der Matrix nicht mehr gegeben.

In dieser Arbeit wurde dies jedoch nur mit 3 verschiedenen Kalibrationspunkten getestet. Für die endgültige Einschätzung, ob der Einsatz von Isopropanol weiterhin ver-

wendet wird, bedarf es noch einer umfangreichen Untersuchung und weiteren Messungen.

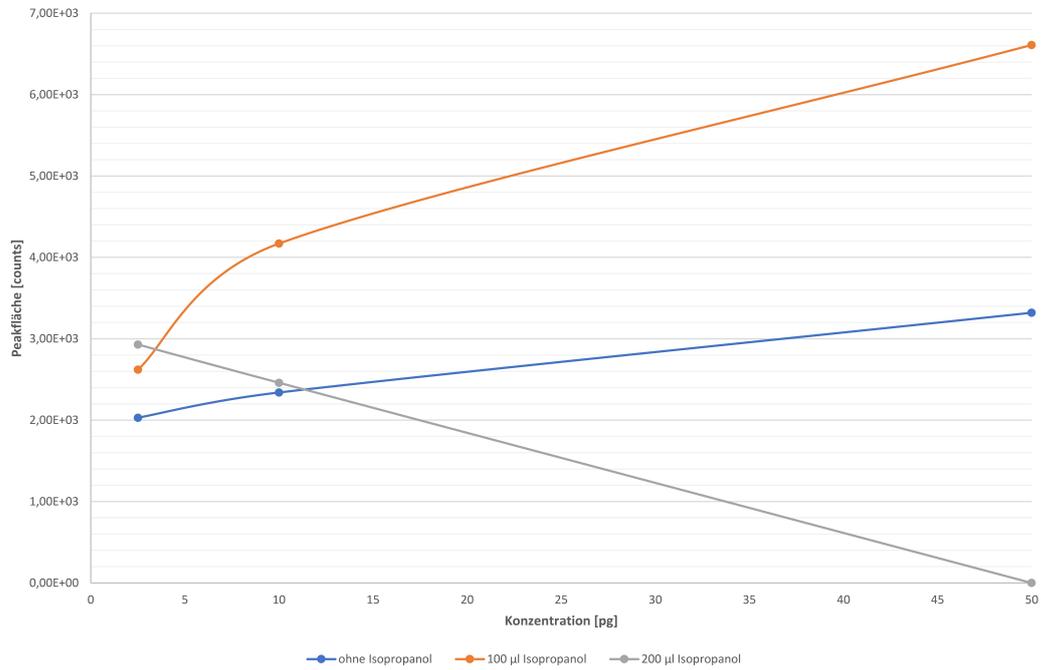


Abb. 5.1: Gegenüberstellung der verschiedenen Flussraten der Isopropanolpumpe - 85 Übergang

5.3 Messungen von Realproben

Durch die Auswertung beider Übergänge ist sicher gestellt das es sich um den gesuchten Analyten handelt. Da das Bestimmtheitsmaß R^2 sich sehr nah an 1 annähert, kann auch die Linearität zwischen Konzentrationen und Signal festgestellt werden.

Bei Verstorbenen liegt das Trinkverhalten meist nicht genau vor, deshalb kann nur eine Einschätzung abgegeben werden.

Probe A

Durch die Regressionsgleichung konnte im Leichenhaar eine EtG-Konzentrationen von 301 pg (85 - Übergang) ermittelt werden. Da deutlich erhöhte Werte gemessen werden konnte, deutet es daraufhin das die verstorbene Person in den letzten 3 Monaten ermutlich einen übermäßigen bis chronisch exzessiven Alkoholkonsum hatte.

Probe B

Das Leichenhaar aus Probe B hat Werte von 110 pg (85 - Übergang) ergeben. Diese Werte signalisieren durch die bekannten Grenzwerte einen übermäßigen Alkoholkonsum in den letzten 3 Monaten.

Probe C

Die Haarprobe der freiwilligen Person hat eine EtG-Konzentration von 23,5 pg EtG auf dem 85 - Übergang ergeben. Die Person hat angegeben das sie in den letzten 3 Monaten vor Haarabnahme einen Konsum von mehrmals pro Woche 1 bis 2 Bier und gelegentlich am Wochenende verschiedene Cocktails/Shots hatte, was jedoch nie zu Rauscherscheinungen geführt hat. Durch die gemessenen Werte kann der Alkoholkonsum als regelmäßig eingestuft werden.

6 Fazit

Die Forschung und der spezifische Nachweis von EtG im Haar stellt eine große Herausforderung dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen weiterführenden Beitrag für die Entwicklung einer robusten und sensitiven Messung von EtG.

Mit Hilfe der erzielten Ergebnisse konnte eine Methode unter der Verwendung neuer chromatographischer und massenspektrometrische Parameter entwickelt werden. Außerdem wurden die Extraktions- und Methodenparameter optimiert, sodass eine Bestimmung von EtG im Haar möglich ist.

Mittels dieser entwickelter Methode konnten drei Realproben (Kopfhaare) und deren Gehalt an EtG bestimmt werden. Die Forschung an der Bestimmung von EtG im Haar ist noch nicht abgeschlossen und weiterführende Untersuchungen sind noch notwendig.

Anhang A: Regressionsgerade

Tab. A.1: Area Ratio für Regressionsgerade

Konzentrationen [pg]	85 - Übergang
2,5	1,54
5	1,62
10	1,77
25	2,08
50	2,79

Literaturverzeichnis

- [1] Rolf Aderjan. *Marker missbräuchlichen Alkoholkonsums: Klinische und rechtliche Bedeutung*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2000.
- [2] Maria Elena Albermann. *Untersuchungen zu den Alkoholmarkern Ethylglucuronid und Ethylsulfat sowie zu Fettsäureethylestern in unterschiedlichen Matrices*. phd-thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Mathematische - Naturwissenschaftliche Fakultät, Bonn, 2012.
- [3] Romy Brauer. Ethylglucuronid als direkter Alkoholkonsummarker, 2014.
- [4] Reinhard Dettmeyer Burkhard Madea. *Basiswissen Rechtsmedizin*. Springer Verlag, 2007.
- [5] Karl Cammann. *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, 2001.
- [6] Phenomenex Ltd. Deutschland. *Luna HPLC Information*.
- [7] Dominic Ammann. *Ethylglucuronid in Haaren - Beiträge zur qualitätsgesicherten Spurenanalytik*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin - Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, 2017.
- [8] D. Thieme F. Mußhoff; G. Skopp; F. Pragst; H. Sachs. *Anhang C zu Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen - Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben*. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, 2009.
- [9] B.Madea; F.Mußhoff. *Haaranalytik*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 2004.
- [10] Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V. *Alkohol - Basisinformationen*. für Suchtfragen e.V., Deutsche Hauptstelle, 2017.
- [11] Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V. *Alkohol und gesundheitliche Risiken*. für Suchtfragen e.V., Deutsche Hauptstelle, 2017.
- [12] Manfred Gey. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer Verlag, Heidelberg, 3.Auflage edition, 2015.
- [13] Prof. Dr. W. N. Goebel, Dipl.-Ing. A. und Kühn-Velten. Ethylglucuronid im Haar–Ein neuer Marker des chronischen Ethanolkonsums. *Laborinformation*, 2014.

- [14] Jürgen H. Gross. *Massenspektrometrie*. Springer Spektrum, Heidelberg, 2013.
- [15] F.T. Peters; M. Hartung; M. Herbold; G. Schmitt; T. Daldrup; F. Mußhoff;. *Anhang B zu Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen - Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden*. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, 2009.
- [16] Universitätsklinikum Freiburg Institut für Rechtsmedizin Forensische Toxikologie. Ethylclucuronid und Alkoholkonsum, 2012.
- [17] Renate Lüllmann-Rauch. *Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.
- [18] Veronica R. Meyer. *Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KG, Weinheim, aktualisierte edition, 2004.
- [19] M. A. Verhoff R. B. Dettmeyer. *Rechtsmedizin*. Springer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [20] Volker Schubert, Wolfgang und Dittmann. *Urteilsbildung in der Fahreignungsbeurteilung - Beurteilungskriterien*. Kirschbaum Verlag, 2013.
- [21] Georg Schwedt. *Taschenatlas der Analytik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG, 2000.
- [22] Skopp G. Leichentoxikologie. *Rechtsmedizin*, 2008.
- [23] Karlheinz Lohs; Peter Elstner; Ursula Stephan. *Fachlexikon Toxikologie*. Springer-Verlag, 2009.
- [24] Natasha Thon, Wolfgang Weinmann, Michel Yegles, Ulrich Preuss, and Friedrich Martin Wurst. Was Ethanolmetabolite als Biomarker über Alkoholkonsum aussagen. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2013.
- [25] Jens Trafkowski. *Anwendung der HPLC Triple Quadrupol Massenspektrometrie in der forensischen und klinischen Toxikologie bei der Analytik von Opioiden*. phd-thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Mathematische - Naturwissenschaftliche Fakultät, Bonn, 2009.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Heidelberg, 1. September 2018

Angelina Reimann