

## **Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen<sup>1</sup>**

### **Anhang A: Anforderung an einzelne Analysemethoden**

#### **1. Analysen mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation**

---

*Erstellt unter der Mitarbeit von:*

Aderjan R., Heidelberg; Babel B., Würzburg; Briellmann T., Basel; Daldrup T., Düsseldorf; Demme U., Jena; Hallbach J., München; Hartung M., Homburg/Saar; Harzer K., Stuttgart; Herbold M., Heidelberg; von Meyer L., München; Möller M., Homburg/Saar; Mußhoff F., Bonn; Schmitt G., Heidelberg; Weinmann W., Freiburg i.B.

---

Die heute gängigste Methode zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Betäubungsmitteln, Medikamentenwirkstoffen, Giften und deren Abbauprodukten in Körperflüssigkeiten und sonstigen Proben ist die Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Die hohe Trennleistung der Kapillar-Gaschromatographie ist zur Trennung von chemisch sehr ähnlichen Vertretern einer Substanzklasse bzw. Metaboliten erforderlich. Durch die Registrierung von Massenspektren wird eine hohe Spezifität der Detektion erreicht. Die Elektronenstoßionisation ist die am häufigsten verwendete Ionisationstechnik zum Nachweis von Betäubungsmitteln in Blut und Serum.

#### **Gerätekontrolle**

Als massenspektrometrische Analysatoren für die GC/MS werden in der Regel Quadrupolgeräte verwendet. Weiterhin werden Ionenfallen („Ion Trap“) und vereinzelt Sektorfeldanalysatoren eingesetzt.

Zur Qualitätssicherung bei der GC/MS-Analyse ist es erforderlich, daß die Anwenderin/der Anwender sich der Grenzen und Möglichkeiten der Analysemethoden und des Gerätes bewußt ist und dieses ordnungsgemäß bedient. Dies beinhaltet das regelmäßige Einstellen und Überprüfen der Geräte-Parameter („Tuning“) z.B. mit Hilfe einer schwerflüchtigen Substanz (Perfluortributylamin o.ä.), die regelmäßige Kalibrierung der Massenchse, die Herstellung der erforderlichen massenspektrometrischen Auflösung und die Kontrolle der massenspektrometrischen Empfindlichkeit. Die massenspektrometrische Auflösung muß bei Quadrupol- und Iontrap-Geräten zum Nachweis von Betäubungsmitteln im relevanten Massenbereich mindestens der Einheitsauflösung (1 bei 10 %-Tal) entsprechen.

Ebenso ist eine regelmäßige Wartung des Gaschromatographen und die Überprüfung der gaschromatographischen Trennung durchzuführen. Dazu wird ein Standardgemisch aus Betäubungsmitteln und Medikamenten empfohlen, welches bei regelmäßiger Injektion eine Lokalisierung von Fehlerquellen (Injektor oder Trennsäule) ermöglicht. Die Maßnahmen zur Wartung, Pflege und Überprüfung des Gerätes sind in einem entsprechenden Gerätehandbuch zu archivieren.

#### **Extraktion**

Für den quantitativen Nachweis von Betäubungsmitteln u.ä. mit GC/MS im ppb- oder ppm-Bereich (z.B. Betäubungsmittel im Blut oder Serum) müssen diese aus dem biologischen Material z.B. durch Flüssig-flüssig- oder Festphasenextraktion isoliert werden. Die Extraktion soll reproduzierbar und mit hohen Wiederfindungsraten, möglichst größer als 50 %, erfolgen. Für quantitative Untersuchungen sollen interne Standards, möglichst deuterierte Analoga

---

<sup>1</sup> Toxicchem + Krimtech 65(1): 18-24 (1998)

jeder zu quantifizierenden Komponente, mitgeführt werden, die in ausreichender, aber nicht zu hoher Konzentration zur Probe gegeben werden. Die Wiederfindungsrate der Extraktion ist dann aus den Signalverhältnissen einer gleich zugesetzten Menge aus deuterierten Standards einer extrahierten Serumprobe zu einer nicht extrahierten Originallösung zu bestimmen. Es muß gewährleistet sein, daß deuterierte Substanzen keinen die Bestimmung verfälschenden nicht-deuterierten Anteil enthalten. Unter dieser Voraussetzung sollte die Menge nicht über  $C_{\max}/2$  (Konzentration des höchsten Kalibrationsstandards) liegen. Aufgrund ihrer Polarität schlecht gaschromatographisch trennbare Substanzen sollen durch geeignete chemische Umsetzung derivatisiert werden. Das gleiche gilt für Substanzen, die Massenspektren mit nur wenig spezifischen Fragmentationen liefern.

### **Einzelionendetektionen**

Bei der Anwendung von Quadrupolmassenspektrometern ist aufgrund der höheren Empfindlichkeit und besseren statistischen Sicherheit die Einzelionendetektion („Selected Ion Monitoring, SIM“) der Analyse über einen großen Massenbereich („Full-Scan“) vorzuziehen. Aus Gründen der Nachweissicherheit sollen bei der Anwendung des SIM-Verfahrens mindestens drei charakteristische Ionen je Analyt registriert werden. Die Signale jedes Ionenchromatogramms müssen die gleiche Retentionszeit besitzen und sollen gaschromatographisch von anderen Substanzen oder Matrixbestandteilen abgetrennt sein.

### **Ion-Trap**

Im Fall von Ion-Trap-Massenspektrometern sind der SIM-Analytik mit Quadrupol-Massenspektrometern vergleichbare Qualitätskriterien bezüglich Zahl der Kalibratoren, Leer- und Kontrollproben, massenspektrometrische Auflösung sowie relative Ionenintensitäten zur Identifizierung einer Komponente etc., anzusetzen. Durch Registrierung von Full-Scan-Spektren kann eine zusätzliche Identifizierung von Substanzen durch Vergleich mit Referenzspektren (z.B. Spektrenbibliothek) erfolgen.

### **Kalibrierung**

Bei Zugabe von deuterierten Substanzen als interne Standards soll eine Kalibrierung mit einer Nullprobe mit internem Standard und fünf Kalibrationsstandards mit Konzentrationen in einem für die eigentliche Analyse relevanten Arbeitsbereich erstellt werden. Der Korrelationskoeffizient  $r$  der Eichung muß im Arbeitsbereich größer oder gleich 0,98 sein.

### **Fragment-Ionenverhältnisse**

Bei beiden Verfahren soll Wert auf hohe chromatographische Auflösung und geringe Signalbreiten ohne Tailing gelegt werden. Außerdem ist auf die richtige Wahl der deuterierten, als interne Standards verwendeten Substanzen zu achten. Die Anzahl und Position der durch Deuterium ersetzten Wasserstoffatome am Molekül sollen zu Massenfragmenten führen, die eindeutig von denen der undeuterierten Verbindung zu unterscheiden sind. Die für die Quantifizierung herangezogenen Ionensignale dürfen weder durch Fremdsubstanzen, noch durch die jeweils analogen Verbindungen (deuteriert/undeuteriert) gestört sein (Isotopenverteilung beachten!). Die Fragment-Ionenverhältnisse einer Referenzsubstanz müssen unter den gleichen Analysenbedingungen unabhängig von der eigentlichen Analyse bestimmt werden. Die Fragment-Ionenverhältnisse des Analyten in der Probe dürfen nicht mehr als 20% von denen der Referenzsubstanz abweichen. Bei größeren Abweichungen ist die Analyse zu wiederholen bzw. darzulegen, weshalb eine höhere Abweichung toleriert werden kann. Bleibt der Nachweis zweifelhaft, so ist eine weitere Plausibilitätskontrolle durchzuführen, z.B. aufgrund der Anwesenheit von Metaboliten oder der Ergebnisse anderer Analysenverfahren.

## Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wird von den drei charakteristischen Massenfragmenten das Ion mit der geringsten relativen Intensität ausgewählt. Die Nachweisgrenze wird nach DIN 32645 bestimmt, bei einer relativen Ergebnisunsicherheit von  $k=3$ .

Für die Wahrscheinlichkeit des Fehlers 1. Art ( $\alpha$ -Fehler) wird ein Wert von maximal 10 % eingesetzt [siehe hierzu: M. Herbold, G. Schmitt: Qualitätsansprüche an die quantitative MS-Untersuchung, *Toxichem+Krimtech.*(1998) 65 (3) 87-96]. Dieses Signifikanzniveau von 90 % wird als ausreichend erachtet, weil die Identifizierung einer Substanz auf den zusätzlichen, obengenannten Kriterien beruht.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze ( $k=3$ ) wird das charakteristische Ion mit der höchsten relativen Intensität eingesetzt. Die Bestimmungsgrenze darf die Nachweisgrenze nicht unterschreiten. Für den Fall, daß die so ermittelte Bestimmungsgrenze die Nachweisgrenze unterschreitet, muß die Nachweisgrenze auch als Bestimmungsgrenze gesetzt werden. Folgende Formeln sind zugrunde zu legen:

### Formeln zur Berechnung (nach DIN 32645)

Nachweisgrenze

$$X_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f,a} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}}$$

Erfassungsgrenze

$$X_{EG} = X_{NG} + s_{x_0} \cdot t_{f,b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}}$$

Bestimmungsgrenze

$$X_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,a} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

$s_{x_0}$  = Verfahrensstandardabweichung  
 $n$  = Anzahl der Kalibrationsniveaus  
 $m$  = Anzahl der Messungen

$Q_x$  = Summe der Abweichungsquadrate  
 $t$  = Quantil der t-Verteilung  
 $X$  = Gehaltsgröße

$k$  = relative Ergebnisunsicherheit  
 $\alpha$  = Signifikanzniveau (Fehler 1.Art)  
 $\beta$  = Wahrscheinlichkeit (Fehler 2.Art)

Ein entsprechendes Auswerteprogramm (B.E.N.) ist bei den Autoren (Herbold und Schmitt, Insitut für Rechtsmedizin der Universität Heidelberg) erhältlich.

Um die Ausschlußgrenze (Nachweisgrenze bei Realproben, die ein negatives Ergebnis aufweisen) zu ermitteln, wird die Höhe des Rauschbandes des Fragment-Ions mit der für den Analyten höchsten relativen Intensität zur erwarteten relativen Retentionszeit  $\pm$  der Peakbasisbreite des höchsten Kalibrators ausgemessen. Der dreifache Wert des halben Rauschbandes wird als Meßwert gewertet und die hieraus ermittelte Konzentration als individuelle Ausschlußgrenze des Analyten in der jeweiligen Realprobe bezeichnet. Weitere Einzelheiten sind in den Qualitätsstandards für die einzelnen Analyten geregelt.

## Meßreihen

Bei der GC/MS-Analyse müssen Verschleppungen eines Analyten von einer Probeninjektion zur nächsten ausgeschlossen werden, was in der Regel durch eine Injektion von reinem Lösungsmittel vor jeder GC/MS-Analyse einer Realprobe zu erreichen ist. Nach Herstellung und Kontrolle der Analysenbereitschaft des GC/MS-Gerätes (siehe oben) wird für die Erstellung einer Meßreihe folgendes Vorgehen vorgeschlagen:

- a) Injektion von Referenzstandards zur Bestimmung von Retentionszeiten und der Fragment-Ionenverhältnisse (nicht bei jeder Probensequenz erforderlich).
- b) Bestimmung der Empfindlichkeit der GC/MS-Analyse durch Injektion eines Standards mit einer Konzentration im Bereich der Bestimmungsgrenze,
- c) Richtigkeitskontrollen mit bekannter Konzentration (z.B. Kontrollserum der GTFCh oder ein mit bekannter Konzentration des Analyten versetztes Leerserum)
- d) Abwechselnd Realproben und reines Lösungsmittel

Bei großer Probenzahl sind weitere Analysen von Richtigkeitskontrollen erforderlich. Die zulässige Variationsbreite der Richtigkeits- und Präzisionskontrolle richtet sich nach gängigen Kriterien der Methodvalidierung.

### **Inkrafttreten**

Diese Anlage wurde gemäß Beschluß des Vorstandes der GTFCh vom 28.03.2000 genehmigt und in Kraft gesetzt.