

Dissertation zur Forensischen Toxikologie

Anwendungen der Headspace-Festphasenmikroextraktion in der forensischen Analytik unter besonderer Berücksichtigung der Haaranalyse

Frank Sporkert

*Institut für Rechtsmedizin der Humboldt-Universität zu Berlin, Hannoversche Straße 6, D-10115 Berlin
Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität Berlin, 2001
Referent: Prof. Dr. F. Pragst*

Die Analysenmethoden im forensisch-toxikologischen Labor haben sich in den letzten Jahrzehnten vom 100 Gramm-Maßstab um Größenordnungen auf wenige Milligramm bis 1 Gramm reduziert. Dieser Fortschritt wurde einerseits durch die steigende Trennleistung und Empfindlichkeit der instrumentellen Methoden ermöglicht, andererseits wurden auch immer vorteilhaftere Materialien für die Probenvorbereitung erschlossen. Ein solches neues Verfahren ist die Festphasenmikroextraktion (Solid-Phase Microextraction, SPME) mit polymerbeschichteten Fasern, die vor allem in Kombination mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie in jüngster Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welchem Maße sich die Vorteile der Headspace-Variante dieses Verfahrens (HS-SPME), d. h. lösungsmittelfreie Probenaufbereitung, gute Automatisierbarkeit, wenig matrixbedingte Störungen, auch in der forensischen Toxikologie, insbesondere aber in der Haaranalyse, anwenden lassen.

Theoretische Grundlagen und Stand der Literatur

Die in der Arbeit dargestellten theoretischen Grundlagen konzentrieren sich somit naturgemäß auf die SPME und die Haaranalyse und streifen die etablierte Kapillargaschromatographie und die Massenspektrometrie nur sehr kurz. Ausgehend von den thermodynamischen Gleichgewichten zwischen den beteiligten Phasen und den Diffusionsgesetzen bei Nichterreichen von Gleichgewichtszuständen werden als Basis für die Methodenoptimierung und für die Diskussion der eigenen Ergebnisse die wesentlichen Einflussgrößen auf die Effektivität der HS-SPME dargestellt. Die Grundlagen der Haaranalytik umfassen andererseits den anatomischen Aufbau des Haares und die Physiologie des Haarwachstums, Wege der Einlagerung von Drogen ins Haar sowie bisher benutzte Verfahren der Probenaufbereitung und Analytik von Drogen und Medikamentenwirkstoffen aus dem Haar. In einer Literaturübersicht (insgesamt 247 Zitate) werden alle wesentlichen Arbeiten zur Anwendung der HS-SPME in der toxikologischen Analytik von Drogen, Medikamenten und anderen Giften aus Blut, Urin und Organproben sowie die wenigen Arbeiten zur Haaranalytik unter Verwendung der SPME zusammengestellt. Dabei fällt auf, dass der überwiegende Teil dieser Publikationen erst in den letzten Jahren erschienen ist, was die Aktualität der vorliegenden Promotionsarbeit unterstreicht.

Untersuchte Substanzen und Analysebedingungen

Insgesamt wurden 41 Substanzen durch HS-SPME mit der Methode analysiert, davon 38 im Haar. Die konkreten Bedingungen für den Haaraufschluss oder die Haarextraktion, die SPME-Faser, die Adsorptionszeit und –temperatur, der jeweilig verwendete interne Standard und gegebenenfalls die Derivatisierungsbedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Analyse erfolgte generell mit GC-MS-SIM unter Verwendung einer HP 5-MS Kapillarsäule mit den ebenfalls in Tabelle 1 angegebenen Temperaturprogrammen. Der überwiegende Teil der Messungen wurde mit einem automatischen Probengeber durchgeführt, was die Reproduzierbarkeit der Messungen in hohem Maße begünstigt hat.

Tabelle 1: Probenvorbereitung und SPME-Bedingungen für die untersuchten Substanzen

Substanz	ISTD	Matrix	Probenvorbereitung	Faser	SPME-Bedingungen *	Derivatisierung	Temp.-Progr.**
Amantadin	Memantin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C	MBTFA	III
Amfepramon	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Amitriptylin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine	III
Amphetamin	D ₅ -Amphetamin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA PDMS	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C Ads.: 30 min, 100°C	MBTFA BCF	III III
Benzfetamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Chlorphenamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Clomethiazol	Diethylanilin	Haar	Extraktion mit Phosphatpuffer pH 6,0	PDMS/DVB	Ads.: 15 min, 60°C	keine	I
Clomipramin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine	IV
Diphenhydramin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine	II
Doxepin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine	IV
Doxylamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
EDDP	D ₃ -EDDP	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine	III
EMDP	D ₃ -EDDP	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine	III
Ethylmyristat	D ₅ -Ethylmyristat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine	II
Ethyloleat	D ₅ -Ethyloleat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine	II
Ethylpalmitat	D ₅ -Ethylpalmitat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine	II
Ethylstearat	D ₅ -Ethylstearat	Haar	Lösungsmittlextraktion mit DMSO/n-Hexan	PDMS/DVB	Ads.: 30 min, 100°C	keine	II
Fluoxetin	D ₃ -Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF	II
Imipramin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Ketamin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Lidocain	Etidocain	Haar	Alkalische Hydrolyse	Carbowax/DVB	Ads.: 20 min, 80°C	keine	II
Metamphetamin (MA)	D ₅ -MA	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA PDMS	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C Ads.: 30 min, 100°C	MBTFA BCF	II II
Maprotilin	D ₃ -Maprotilin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	keine	IV
MDA	D ₅ -MDA	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA PDMS	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C Ads.: 30 min, 100°C	MBTFA BCF	II II
MDEA	D ₆ -MDEA	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA PDMS	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C Ads.: 30 min, 100°C	MBTFA BCF	II
MDMA	D ₅ -MDMA	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA PDMS	Ads.: 30 min, 80°C Deriv.: 25 min, 80°C Ads.: 30 min, 100°C	MBTFA BCF	II
Metamfepramon	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V

Fortsetzung Tabelle 1

Substanz	ISTD*	Matrix	Probenvorbereitung	Faser	SPME-Bedingungen	Derivatisierung	Temp.-Progr.
Methaqualon	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Monofluoressigsäure	D ₃ -Essigsäure	Blut	1 M H ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄	PDMS/DVB/Carboxen	Ads.: 30 min, 90°C	PDAM	III
Nicotin	N,N-Diethylanilin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Norclomipramin	D3-Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF	IV
Nordiphenhydramin	Fluoxetin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF	II
Nordoxepin	D3-Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF	IV
Nortriptylin	D3-Nortriptylin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PDMS	Ads.: 30 min, 100°C	MCF	IV
Phencyclidin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Phendimetacin	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Promethazin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Tramadol	Ethylbenzhydramin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Trichlorethanol	Valproinsäure	Blut, Urin	Phosphatpuffer pH 2,3, Na ₂ SO ₄	PDMS/DVB	Ads.: 15 min, 60°C	keine	I
Trimipramin	Dimetacrin	Haar	Alkalische Hydrolyse	PA	Ads.: 15 min 70°C	keine	V
Valproinsäure	Trichlorethanol	Blut, Urin	Phosphatpuffer pH 2,3, Na ₂ SO ₄	PDMS/DVB	Ads.: 15 min, 60°C	keine	I

*Ads. = Adsorptionsbedingungen, Deriv. = Derivatisierungsbedingungen, ISTD = interner Standard

** GC-Temperaturprogramme:

I Initialtemperatur 50°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 250°C, gehalten für 5 min

II Initialtemperatur 70°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 300°C, gehalten für 5 min

III Initialtemperatur 100°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 300°C, gehalten für 2 min

IV Initialtemperatur 150°C für 2 min, Heizrate 20°C/min bis 300°C, gehalten für 2 min

V Initialtemperatur 100°C für 2 min, Heizrate 30°C/min bis 205°C, dann mit 2,5°C/min bis 240°C und weiter mit 30°C bis 290°C

Kombination von HS-SPME und alkalischer Haarhydrolyse

An einer Reihe von Testsubstanzen wurden die Möglichkeiten und Grenzen der HS-SPME als Einstufenmethode in Kombination mit der alkalischen Haarhydrolyse in Abhängigkeit von strukturellen Eigenschaften wie Flüchtigkeit und Lipophilie untersucht. Erstaunlicherweise ließen sich dabei relativ schwerflüchtige Substanzen wie die tri- und tetracyclischen Antidepressiva aus wässrigen Phasen mit vergleichsweise hohen Extraktionsausbeuten abtrennen. Der dabei festgestellte Matrixeffekt auf die Extraktionsausbeute wurde sinnvoll interpretiert und sollte generell für die HS-SPME-Analyse aus biologischen Proben gelten. Mit zunehmender Probenmenge führt das biologische Material zu einer erhöhten Löslichkeit der Verbindungen in der wässrigen Phase (z. T. tensidartiger Effekt) und vermindert die Extraktionsausbeute. Demnach sollte die Probenmenge möglichst klein und konstant gehalten werden.

Praktische Anwendungen dieser Methode wurden an einer Reihe toxikologisch relevanter Wirkstoffe mit sehr guten Nachweisgrenzen demonstriert, wobei Lidocain und Methadon mit seinen Metaboliten methodisch umfassend optimiert und in den Haaren von Drogenopfern besonders gründlich untersucht und forensisch interpretiert wurden. Abb. 1 zeigt die Chromatogramme zum Nachweis von Methadon, EDDP und EMDP bei zwei Drogentodesfällen. Mit Nachweisgrenzen bis herab zu 0,03 ng/mg ließen sich mit diesem Verfahren aber auch Tramadol, Diphenhydramin, Amitriptylin, Doxepin, Trimipramin oder Nicotin in konkreten Fällen bestimmen.

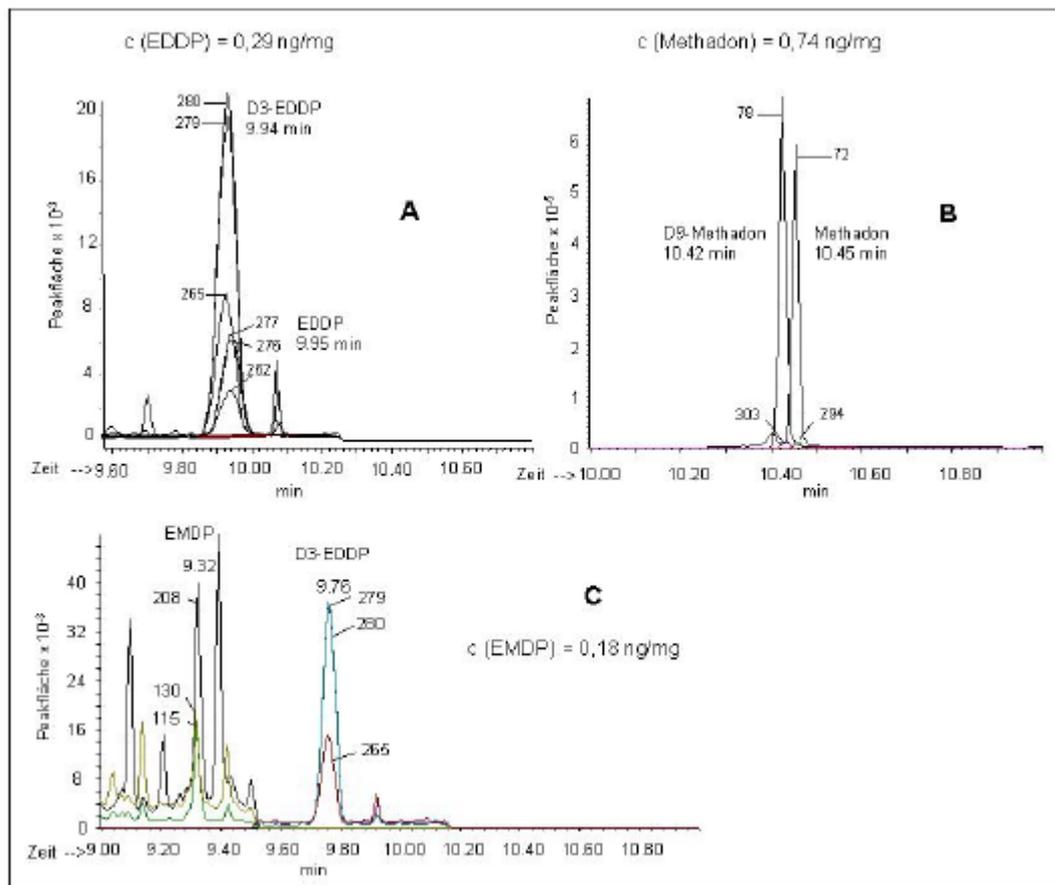
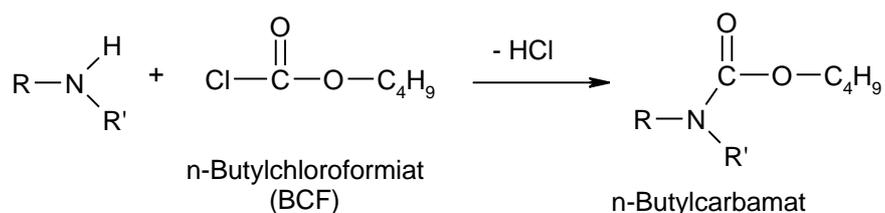


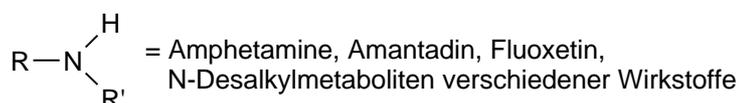
Abb. 1: Massenspektren der GC-MS-SIM-Chromatogramme für EDDP (A) und Methadon (B) der Haarprobe 164/98 (10 mg) sowie für EMDP (C) der Haarprobe 037/98 (10 mg) mit je 10 ng der deuterierten Standards. Die Retentionszeit für D₃-EDDP ist im Fall C wegen des Kürzens der Kapillarsäule geringer im Vergleich zu A.

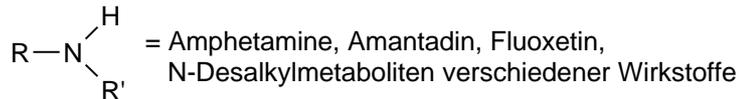
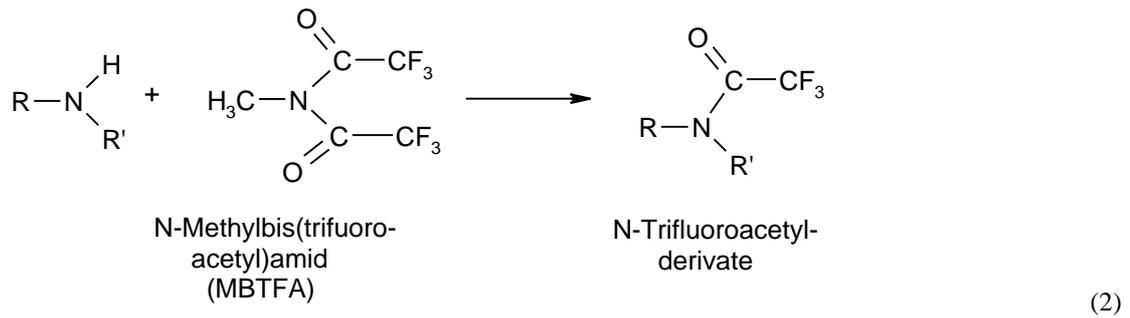
Kombination der alkalischen Haarhydrolyse mit Derivatisierung und HS-SPME

Ebenfalls erfolgreich waren Versuche, dieses Verfahren am Beispiel von Amphetaminen und Ecstasy-Wirkstoffen sowie anderen Substanzen oder Metaboliten mit primären oder sekundären Aminogruppen wie Nortriptylin, Nordoxepin, Desipramin, Norclomipramin, Maprotilin, Fluoxetin und Nordiphenhydramin mit der Derivatisierung zu koppeln, wobei sowohl die *in-sample* Derivatisierung mit Alkylchloroformiaten (Gl. 1) als auch die *on-fiber* Derivatisierung mit N-Methyl-bis-trifluoracetamid (Gl. 2) optimiert und auf reale Proben angewendet wurden. Auch hier ließen sich die Verfahren für die routinemäßige Anwendung gut auf dem Probengeber zum GC-MS-Gerät automatisieren.



(1)



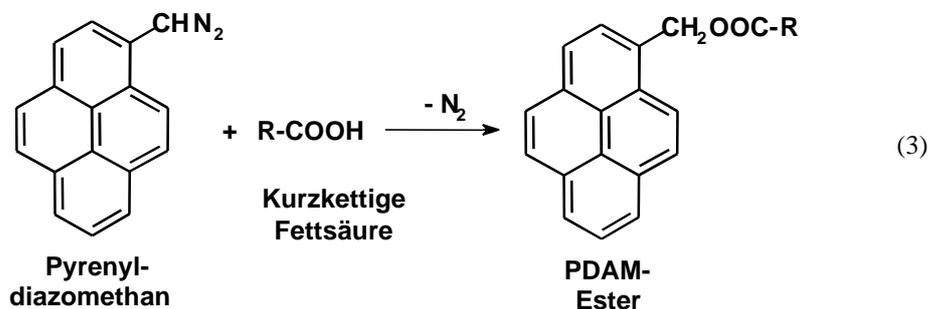


Kombination der Lösungsmittlextraktion von Haaren mit der HS-SPME

Für baseninstabile Substanzen wurden als drittem Schwerpunkt Kombinationen der HS-SPME mit einer vorangehenden Lösungsmittlextraktion erarbeitet. Als wichtigste Anwendung wurden hier erste Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung von Fettsäureethylestern im Haar als Marker für exzessiven Alkoholkonsum entwickelt. Versuche mit anderen Methoden waren zuvor gescheitert, so dass hier die großen Vorteile der Abtrennung und Anreicherung über den Dampfraum offensichtlich wurden. Weiterhin gehört hierzu aber auch die Bestimmung von Clomethiazol, das in basischer Lösung ebenfalls hydrolysiert wird.

Fluoressigsäure in Blut und Urin

Von den im Rahmen dieser Dissertation für Blut- Urin und Gewebeproben erarbeiteten Verfahren ist besonders die Methode zur routinemäßigen automatischen Bestimmung von Fluor-essigsäure hervorzuheben, die auf der on-fiber Derivatisierung mit 1-Pyrenyldiazomethan beruht und eine sehr vorteilhafte und bequeme Methode zur Prüfung auf dieses heimtückische Gift im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren darstellt. In Abb. 2 ist das Chromatogramm einer dotierten Serumprobe dargestellt.



Resümee

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues Analysenprinzip erfolgreich für den Bereich der forensischen Toxikologie weiterentwickelt und insbesondere auf die Bestimmung von Drogen und Medikamentwirkstoffen im Haar angewendet. Die wesentlichen

Ergebnisse wurden in einer Reihe von Publikationen veröffentlicht [1-6]. Die gesamte Dissertation kann im Internet unter der Adresse

<http://dohost.rz.hu-berlin.de/dissertationen/sporkert-frank-2001-12-07/>
eingesehen werden.

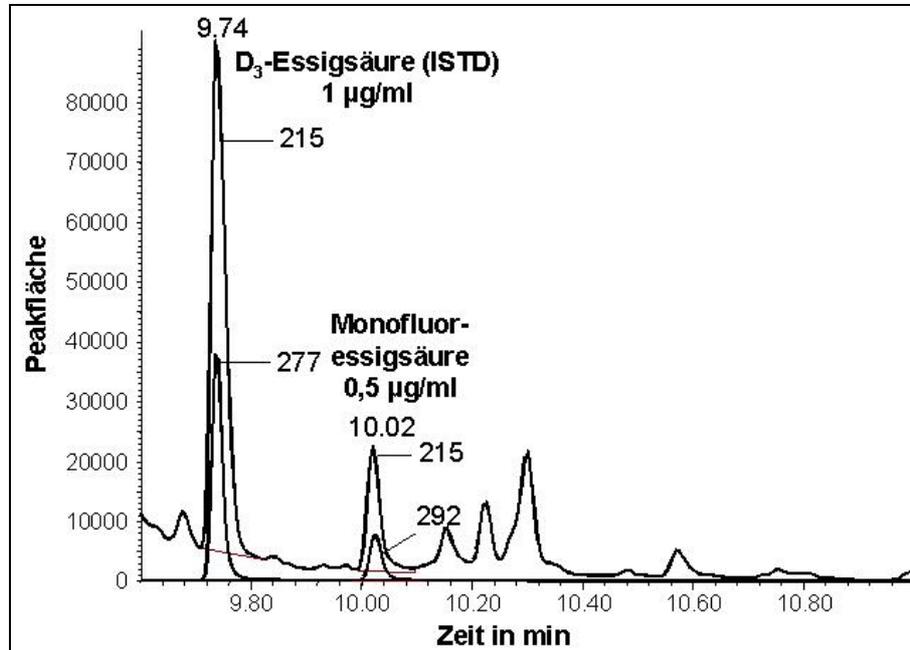


Abb. 2: Ionensuren aus dem SIM-Chromatogramm einer mit 0,5 µg/ml Fluoroessigsäure dotierten Serumprobe. Eingesetztes Volumen: 200 µl, HS-SPME: 15 min Eintauchzeit in PDAM-Lösung, 30 min bei 90°C Adsorption

Literatur

- [1] F. Sporkert, F. Pragst: Use of Headspace Solid Phase Microextraction in Hair Analysis for Organic Compounds. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 129-148.
- [2] F. Pragst, K. Spiegel, F. Sporkert, M. Bohnenkamp: Are there Possibilities for the Detection of Chronically Elevated Alcohol Consumption by Hair Analysis? A Report about the State of Investigation. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 201-223.
- [3] F. Sporkert, F. Pragst: Determination of Lidocaine in Hair of Drug Fatalities by Headspace Solid Phase Microextraction. *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 316-322.
- [4] F. Sporkert and F. Pragst: Determination of methadone and its metabolite EDDP in human hair by headspace solid phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 746 (2000) 255-264.
- [5] F. Pragst, V. Auwaerter, F. Sporkert, K. Spiegel: Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci. Int.* 121 (2001) 76-88.
- [6] F. Sporkert, F. Pragst, S. Hübner, G. Mills: Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane on-fibre derivatization for analysis of fluoroacetic acid in biological samples. *J. Chromatogr. B* (2002), im Druck.