

# Umfassende „Target Compound Analyse“ durch eine Kombination von Ion Trap – GC-MS und HP(T)LC UV-Spektrometrie nach einer ‚bipolaren‘ Flüssig-Flüssig-Extraktion<sup>1</sup>

---

Ulrich Demme, Christina Arndt, Edelgard Rabe und Rolf Werner

---

*Institut für Rechtsmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fürstengraben 23, D-07740 Jena  
E-Mail: ulrich.demme@med.uni-jena.de*

## Abstract

We were looking for a simple preparation of biological samples that extracts a large number of drugs and also provides sufficiently clean extracts for a successful analysis by ion trap-GC-MS. For non-volatile drugs this procedure should be combined with another method, e.g. two-dimensional HPTLC (or HPLC) with UV-detection (UV- spectra).

The extraction of biological material was performed “polarly” using ethylacetate at pH = 9. The polarity was reduced drastically by extensive evaporation of the ethylacetate and by addition of n-hexan, and the effectivity of the following acid re-extraction (necessary for the cleaning of the extract) will therefore be greatly enhanced. After alkalisation of the re-extract, a polar extraction was performed again and this second extract is evaporated; the residue is divided for GC-MS and HPTLC. The detection of the drugs after GC-separation was performed automatically using retention times and FULL SCAN mass spectra: in the case of HPTLC by the two rf-values and the wavelength of the maximum of absorption ( $\lambda_{\max}$ ). Simple software will be shown which calculates the FIT-values from the two rf's and  $\lambda_{\max}$  and which connects these FIT-values with GC-MS-results.

Approx. 150 drugs (parent substances) are included up to now; in the GC-MS program several hundred metabolites are included additionally. Other than detection, a simultaneously quantitative or semi-quantitative determination is possible in many cases. Some examples (GC-MS and HPTLC) will be demonstrated.

By means of the “bipolar” extraction besides basic drugs, also neutral and even weak acid drugs can be extracted by only one simple procedure, which provides additionally quite clean residues. The high separation and identification power of capillary-GC- ion trap MS is connected with a second chromatographic method, which permits the detection of non-sufficient volatile drugs.

## 1. Einleitung:

Für die Systematische Toxikologische Analyse (STA), d.h. die „chemisch-analytische Suche nach einem unbekanntem Gift in biologischem oder anderem Probenmaterial“ sind chromatographische Trennverfahren mit spektrometrischer Detektion – unterstützt von immunchemischen Gruppentesten – die Methoden der Wahl. Die Probenvorbereitung erfolgt meist durch Festphasen- (SPE) oder Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) oder Proteinfällung (letztere auch in Kombination mit den beiden anderen Verfahren).

In der vorliegenden Arbeit wird eine einfache Probenvorbereitung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) vorgestellt, mit der einerseits eine große Zahl toxikologisch relevanter Wirkstoffe extrahierbar ist und die andererseits genügend reine Extrakte für einen Nachweis mittels Ion Trap – Massenspektrometrie (nach gaschromatographischer Trennung) liefert. Die Polarität der Lösungsmittel bei Extraktion und Re-Extraktion wurde so gewählt, dass neben basischen Verbindungen (die den Hauptteil der toxikologisch relevanten Verbindungen darstellen) auch sehr schwach basische sowie eine Reihe neutraler und sogar schwach saurer Wirkstoffe erfassbar sind.

Für den Nachweis der Wirkstoffe wird die Gaschromatographie – Ion Trap-Massenspektrometrie eingesetzt, die eine Wirkstoffidentifizierung mittels FULL SCAN-Massenspektren und

---

<sup>1</sup> Dieser Beitrag wurde auf dem XV. GTFCh-Symposium am 21. April 2007 in Mosbach vorgetragen und durch ein Versehen nicht in den Tagungsband aufgenommen.

Retentionszeit gestattet. Da zahlreiche Substanzen nicht ausreichend flüchtig oder zu polar für eine gaschromatographische Analyse sind, wird die GC-Ion Trap-MS mit einer zweiten Methode kombiniert. Hierzu wird in dieser Arbeit statt der weitverbreiteten HPLC-DAD-Analyse die UV-spektrometrische Detektion nach chromatographischer Trennung mittels zweidimensionaler HPTLC eingesetzt. Beispiele für die Anwendung dieser Verfahrenskombination in der (ungerichteten) qualitativen und der quantitativen toxikologischen Analyse werden gezeigt, ihre Leistungsfähigkeit mit Hilfe der Discriminating Power eingeschätzt und mit den Angaben in der Massenspektren-Bibliothek von PFLEGER/MAURER/WEBER [1] verglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion:

Die Extraktion des biologischen Materials (Serum, Blut, Mageninhalt o.ä.) erfolgt polar mit Ethylacetat (5ml) bei einem pH-Wert von 9. Die Polarität der organischen Phase wird drastisch verringert durch weitgehendes Eindampfen des Ethylacetats (bis auf 1ml) und Zugabe von 4ml n-Hexan. Die zur Reinigung erforderliche saure Re-Extraktion erfolgt mit 1 N Schwefelsäure (2ml). Nach Umstellung des pH-Wertes wieder auf 9 wird erneut polar (2 ml Chloroform) extrahiert und diese organische Phase bei 40°C im Stickstoff-Strom soeben zur Trockne gebracht. In Tab. 1 ist der Arbeitsablauf dargestellt.

### 2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

Es wurde ein Gaschromatograph 3400 (VARIAN), gekoppelt mit einem Ion Trap Massenspektrometer SATURN 2000 bzw. SATURN II (VARIAN), verwendet.

Tab. 1: Aufarbeitung des biologischen Materials für die GC-MS + HPTLC - Analyse

Probe (z.B. 1ml Serum, Blut, Urin, Mageninhalt (0,2 ml)) + 25 ng int.St. (z.B. Trimipramin-d3, Etoloxamin o. Cyproheptadin)
+ 1ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH=6, 2 h US-Bad bei 45°C, anschließend pH → 9 (NaHCO <sub>3</sub> )
Extraktion mit 5 ml n-Hexan/Ethylacetat (7:3)
Org. Phase reex + 2 ml 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , wässrige Phase pH → 9 (0,1ml 8N NaOH + NaHCO <sub>3</sub> )
Extraktion der wässr. Phase + 2ml CHCl <sub>3</sub>
Org. Phase evp., Rs + 25 µl Ethylacetat, 2 µl injizieren (GC-MS), Rest → HPTLC

**GC-Bedingungen:** 15 m Kapillarsäule (0,25mm iD, 25µm Schichtdicke (RESTEK OV-1), T-Programm: 60° (1min) – 10°/min – 300° (5min), Split-Öffnung nach 1min, Gesamtzeit: 30 min

**MS-Bedingungen:** EI-Modus (Emissionsstrom: 10-15µA), m/z: 50-450, background-Masse: 49, automatische Verstärkungskontrolle (AGC), Scan-Zeit: 1sec, Trap-Temperatur: 220°C

Die Substanzidentifizierung erfolgte automatisch (Software: Varian workstations: Versionen 4.51 – 6.6 (+DOS-Version 1.4 ‚AUTOQUAN‘)) durch Vergleich der FULL SCAN-Massenspektren und der Retentionszeiten mit den in selbst erstellten Datenbanken gespeicherten Massenspektren und Retentionszeiten der in die Untersuchung einbezogenen Wirkstoffe (FIT-Threshold ≤ 700, Retentionszeitfenster: 20 – 40 sec)

Zur Bestätigung der Nachweise und zur Identifizierung unbekannter Substanzpeaks standen die Spektrenbibliothek von PFLEGER/MAURER/WEBER [1] und die NIST-Bibliothek zur Verfügung.

### 2.3 Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie:

Der nach der GC-MS-Analyse verbleibende Rückstand (oder ein Aliquot bei Extrakten aus Mageninhalt (0,2ml erwiesen sich als ausreichend)) wurde manuell oder mittels des Auftragegerätes TLS 100 (Fa- BARON) in der in Abb. 1 schematisch dargestellten Weise auf eine 10x10 cm HPTLC-Platte (Fa. MERCK) aufgetragen (4 Extrakte pro Platte)

Die Entwicklung der Chromatogramme (1. Dimension: Dichlormethan/Methanol 9:1; 2. Dimension: Ethylacetat/Methanol/Ammoniak 8,5:1:0,5) ist ebenfalls in Abb. 1 gezeigt und erfordert für die vier Chromatogramme nur ca. 20 min. Die Chromatogramme werden mit Hilfe des Densitometers CD-60 (Fa. DESAGA) bei einer Wellenlänge (220nm, evtl. zusätzlich 280nm) gescant (Software: „ProQuant“).

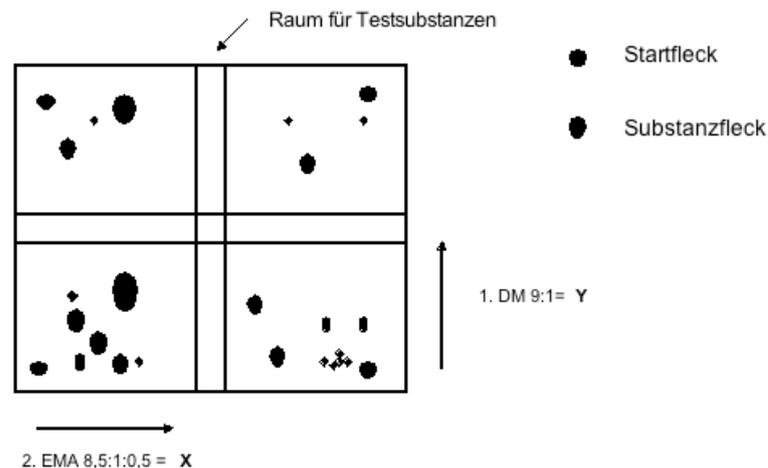


Abb.1: Schema der zweidimensionalen Entwicklung einer HPTLC-Platte

Das Registrieren erfolgt in DM-Richtung (geringere Peakbreiten) – im Abstand von 1mm können maximal 30 Bahnen aufgezeichnet werden; dies entspricht exakt der Substanzverteilung in X (EMA)-Richtung (z.B. X = 11-40mm), als Y (DM)-Bereich empfiehlt sich meist eine Spanne von 8 bis 40 mm. Von den gefundenen Peaks werden die Remissionspektren registriert. Die beiden Laufhöhen und das Absorptionsmaximum können in eine Datenbank eingegeben werden, die aus diesen 3 Größen einen FIT-Wert berechnet.

### 2.4 Quantitative Analyse:

Die Anwendung eines internen Standards bei jeder GC-MS-Analyse (100ng Etoloxamin oder Cyproheptadin bzw. Trimipramin-d3) gestattet in vielen Fällen neben der Substanzidentifizierung auch eine quantitative oder zumindest halbquantitative Bestimmung der Konzentration, da durch die Software bei jeder Analyse auch die Peakfläche jedes gefundenen Substanzpeaks bestimmt wird. Aus dem Flächenverhältnis zum internen Standard wird mit Hilfe entsprechend erstellter (gespeicherter) Kalibrationskurven automatisch die Konzentration berechnet. Überraschenderweise reicht auch die Reproduzierbarkeit der Peakflächenbestimmung bei der zweidimensionalen HPTLC für eine quantitative (oder halbquantitative) Bestimmung mittels

internem Standard (100 ng Cyproheptadin bzw. Benperidol) aus. Nach der Registrierung der Remissionsspektren wird die Peakfläche bei der für die zu bestimmende Substanz charakteristischen Wellenlänge und den Koordinaten bestimmt, bei denen die Absorption ein Maximum aufweist. Deren Ermittlung ist durch die Software Proquant mit geringem Aufwand möglich. Auch bei der HPTLC wird aus dem Flächenverhältnis zum internen Standard die Konzentration berechnet, die bei der Densitometrie naturgemäß nicht linearen Kalibrationskurven sind in diesem Fall extern (MS-Excel) gespeichert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

In den GC-MS-Datenbanken sind bisher über 530 Wirkstoffe (Reinsubstanzen und Metaboliten sowie GC-MS-Artifakte) enthalten, die alle mit dem beschriebenen Verfahren nachweisbar sind und nach Extraktion aus biologischem Material in die Datenbanken aufgenommen wurden. Ein Beispiel für die sichere Identifikation mittels FULL SCAN-Spektrum und Retentionszeit zeigt Tab. 2; in einer Ringversuchsprobe war Propoxyphen enthalten und naturgemäß wurden von der Software eine Reihe von Substanzen mit ähnlichen Massenspektren (dominierende Masse  $m/z=58$ ) und Retentionszeiten vorgeschlagen.

Tab.2: Substanzvorschläge beim Vorhandensein von Propoxyphen

Substanz	m/z	Fläche	(RI)	RT	FIT	FIT-PMW
Doxepin	58+165+280	957299	2240	15,96	907	867
Diphenhydramin-MbI	58+153+165	956620	-	15,61	815	-
Diphenhydramin-MbII	58+152+213	950773	-	15,91	828	-
Imipramin	58+234+245	945889	2215	15,84	632	<780
Dimetinden	58+218+292	946325	2290	16,36	849	<780
Propoxyphen	58+91+193	1046827	2205	15,75	983	948
Orphenadrin-MbI	58+181+197	951078	-	15,96	801	-
Orphenadrin-MbII	58+165+227	955525	-	16,36	809	-

Die Unterschiede in den FIT-Werten aber auch in den Peakflächen (für deren Berechnung nicht nur die Hauptmasse sondern eine Summe von drei charakteristischen Massen verwendet wurde) und auch der Retentionszeiten gestatten aber eine eindeutige Identifizierung des Propoxyphens. Die Bedeutung der Einbeziehung der Retentionszeiten besteht vor allem darin, dass ohne ihre Berücksichtigung eine wesentlich größere Zahl von Wirkstoffen mit der – sehr häufigen – Hauptmasse 58 vorgeschlagen würde. Wenn zwischen Verbindungen mit derart ähnlichen Massenspektren so eindeutig differenziert werden kann, ist davon auszugehen, dass die Discriminating Power für die Gaschromatographie – Ion Trap-Massenspektrometrie sich dem Idealwert ‚1‘ zumindest annähert! Dies gilt insbesondere, da der Suchalgorithmus auch bei vollständiger Peaküberlappung eine Identifizierung zweier Substanzen gestattet, was bei sich überlappenden UV-Spektren nur in Ausnahmefällen möglich ist.

#### 3.2 Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie:

Die Trennleistung der HPTLC wird - wie Tab.3 - zeigt durch die zweidimensionale Durchführung entscheidend verbessert und kann mit anderen chromatographischen Verfahren mindestens mithalten.

Tab.3: Schematische Berechnung der Trennleistung aus Trennstrecke und Peakbreite

Methode	Trennstrecke „T“	Halbwertsbreite „b“	„T/b“
GC - MS	25 min = 1500sec	3sec	500
		5sec	300
HPLC	25 min = 1500sec	5 sec	300
		10 sec	150
HPTLC	40 mm	2 mm	20
HPTLC 2-dim	40 x 40 =1600 mm <sup>2</sup>	2x2 = 4 mm <sup>2</sup>	400

In die HPTLC-Datenbank (MS Excel), die als Ergänzung zur GC-MS gedacht ist, wurden bisher 110 Verbindungen (fast ausnahmslos die eigentlichen Wirkstoffe) einbezogen. Alle Wirkstoffe wurden auch im Fall der HPTLC aus biologischem Material extrahiert (aus authentischen oder gespickten Proben). Die Registrierung der zweidimensionalen Chromatogramme wird bei einer Wellenlänge von 220 nm durchgeführt, da die Summe der relativen Intensitäten (bezogen auf das Absorptionsmaximum der jeweiligen Substanz) bei dieser Wellenlänge ein Maximum aufweist. Für die nicht ‚GC-gängigen‘ Stoffe empfiehlt sich zusätzlich eine zweite Registrierung bei 280 nm. Die Koordinaten der gefundenen Peakmaxima (auch Schultern oder Peakflanken sind möglich) müssen zur Aufnahme der Remissionspektren (Wellenlängenbereich von 200 bis 330 nm) manuell eingegeben werden. Abb.2. zeigt als Beispiel das Spektrum des Amiodarons.

In Tab. 4. ist die nach der Substanzsuche mittels der HPTLC-Datenbank erhaltene ‚Hit-Liste‘ dargestellt. Eingegeben werden (fettgedruckt) die beiden Laufhöhen des Amiodarons und die Wellenlänge des längstwelligen charakteristischen Absorptionsmaximums (38mm, 25mm und 233 nm). Die Spalten 3-5 enthalten die in der Datenbank gespeicherten Werte für die jeweiligen Wirkstoffe, aus den Differenzen zur Eingabe werden die FIT-Werte (DC, UV bzw. ihr Produkt (DCxUV)) berechnet. Die Eindeutigkeit der Suche kann wesentlich gesteigert werden, wenn das Ergebnis der – aussagekräftigeren – GC-MS mit einbezogen wird: Alle mittels GC-MS nicht oder schlecht nachweisbaren Stoffe erhalten als ‚Default-Wert‘ eine „1“, umgekehrt die gut nachweisbaren eine „0“ (s. Spalte 1).

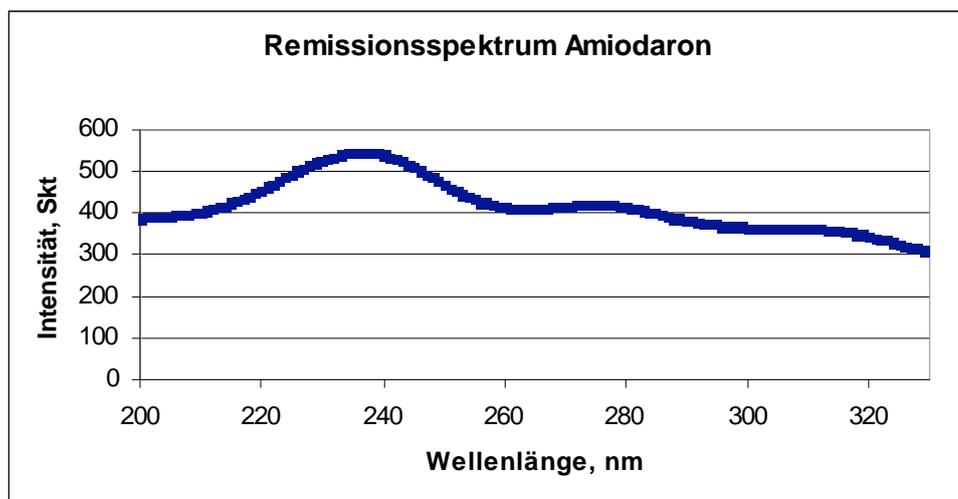


Abb. 2: Remissionsspektrum des Amiodarons

Tab. 4: Identifizierung von Amiodaron mittels zweier Laufhöhen und einer Wellenlänge (+GC)

GC	Wirkstoff	y- EMA	y- DM	$\lambda$	FIT DC	FIT UV	FIT DCxUV	FIT DCxUVxGC
	Eingabe:	38	25	233				
1	Amiodaron	38	25	233	1,00	1,00	1,00	1,00
0	Bromazepam	33	25	231	0,93	0,99	0,91	0,00
0	Diltiazem	34	23	228	0,91	0,96	0,88	0,00
0	Moclobemid	30	25	235	0,89	0,99	0,87	0,00
0	Flurazepam	35	22	224	0,91	0,93	0,85	0,00
0	Amitriptylin	32	21	231	0,86	0,99	0,84	0,00
1	<i>Citalopram</i>	32	20	230	0,84	0,98	0,82	0,82
0	Dosulepin	35	22	220	0,91	0,90	0,82	0,00
0	Clobazam	36	32	223	0,87	0,92	0,80	0,00

Werden nun bei einer konkreten Analyse die mittels GC-MS gefundenen Substanzen ebenfalls mit dem Wert „1“ versehen (im konkreten Fall wurde *Citalopram* (*kursiv*) nachgewiesen), so beschränkt sich die nachfolgende Suche nur auf diese und die prinzipiell nicht ‚GC-gängigen‘ Stoffe, was den in Frage kommenden Substanzkreis entscheidend verkleinert. Aus dem Produkt ‚FIT-DCxUVxGC‘ ergibt sich im konkreten Fall eine eindeutige Identifizierung des Amiodarons (letzte Spalte).

Durch die polare Extraktion kann es zu einer Substanzanhäufung polarer Stoffe kommen, die in DM nicht transportiert werden (Chromatogramm rechts unten in Abb.1). Hier kann eine nochmalige hochpolare Entwicklung (Methanol/Ammoniak 10:0,1) Abhilfe schaffen. Die Leistungsfähigkeit dieser dann ‚dreidimensionalen‘ HPTLC wird für die nicht gaschromatographierbaren Wirkstoffe mit Hilfe der Discriminating Power (DP) berechnet, wobei die potentiellen ‚Matches‘ experimentell bestimmt wurden.

Von den 110 (=N<sub>ges</sub>) in die HPTLC-Untersuchungen einbezogenen Verbindungen sind 42 (=N<sub>HPTLC</sub>) einer GC-MS-Analyse nicht zugänglich. Bei der Berechnung der Discriminating Power für diese 42 Verbindungen müssen alle 110 Verbindungen als mögliche Störung (Peak-Überlappung, ‚Match‘) berücksichtigt werden.

$$DP = 1 - \frac{M}{N_{HPTLC} \times (N_{ges} - 1)} \quad \text{bzw.} \quad D = 1 - \frac{M}{42 \times 109}$$

Die Laufhöhen aller sich potentiell überlappenden Substanzen wurden auf einer Platte und somit unter gleichen Entwicklungsbedingungen gemessen. War die Differenz zwischen den Laufhöhen zweier Wirkstoffe  $\leq 3$ mm, dann wurde dieses Substanzpaar durch Zusatz zu biologischem Material getestet, d.h. es erfolgte eine experimentelle Bestimmung der verbleibenden ‚Matches‘ (M). Tab. 5 zeigt die Substanzpaare, die sich mittels der angewandten Methodenkombination (GC-MS + HPTLC) nicht zweifelsfrei trennen ließen. Kursiv sind die Substanzen gedruckt, die sich selbst eindeutig nachweisen lassen, aber den Nachweis der entsprechenden - nicht kursiven - Substanz stören können. Mit der Gesamtzahl von M = 15 ergibt sich ein DP-Wert von 0,9967!

### 3.3 Leistungsfähigkeit der vorgestellten Verfahrenskombination:

In Tab. 6 sind die durch die beschriebene Methodenkombination in biologischem Material nachgewiesenen Wirkstoffe (meist bei therapeutischer Dosierung, z.T. jedoch nur bei Überdosierungen (z.B. Clonidin, Pholedrin, LSD)) aufgeführt. Vergleicht man diese Subs-

tanzübersicht mit anderen entsprechenden Datensammlungen, z.B. mit der Spektrenbibliothek von Pfleger/Maurer/Weber [1], so ergeben sich folgende Zahlen:

Tab. 5: Experimentell bestimmte ‚Matches‘ bei der HPTLC-Analyse

Wirkstoff 1	Gegenseitige Störung	Wirkstoff 2	Matches, ‚M‘
Canrenon	← nein, nur 1 durch 2	<i>Flunitrazepam</i>	<b>1</b>
Canrenon	← nein, nur 1 durch 2	<i>Clobazam</i>	<b>1</b>
Clonazepam	← nein, nur 1 durch 2	<i>Nitrazepam</i>	<b>1</b>
Bisoprolol	↔ ja	Metoprolol	<b>2</b>
Dipyridamol	↔ ja	Metronidazol	<b>2</b>
Dipyridamol	↔ ja	Urapidil	<b>2</b>
Fluvoxamin	↔ ja	Propafenon	<b>2</b>
Lorazepam	↔ ja	Oxazepam	<b>2</b>
Metoprolol	← nein, nur 1 durch 2	<i>Propranolol</i>	<b>1</b>
Paroxetin	← nein, nur 1 durch 2	<i>Amisulprid</i>	<b>1</b>

In [1] wurden 775 verschiedene Verbindungen (direkt oder nach der routinemäßig durchgeführten Acetylierung) in biologischen Materialien (Urin, Blut und/oder Mageninhalt) nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit umfasst nur 264 (Tab. 6) verschiedene Wirkstoffe (=34%), jedoch sind davon 46 (=17%) in [1] nicht enthalten bzw. nicht in biologischem Material nachgewiesen.

Beschränkt man sich auf in der ‚Roten Liste 2005‘ enthaltene Wirkstoffe (dadurch werden Pflanzenschutzmittel aber auch sehr viele nicht mehr im Handel befindliche Arzneistoffe ausgeschlossen), verändern sich die Zahlen auf 362 bzw. 207 (=57%) und 36 (=17%).

In Tab. 6 sind die ‚quantitativ‘ bestimmbaren durch Fettdruck, ‚halbquantitativ‘ bestimmbare durch kursiven Fettdruck hervorgehoben. Insgesamt ließen sich mittels GC-MS 45 Substanzen gut quantifizieren, für 54 ist eine Abschätzung der Konzentration (‚halbquantitativ‘) möglich. Voraussetzung für die Quantifizierung ist die Erstellung entsprechender Kalibrationskurven, die sich für einige Substanzen (z.B. Methylphenidat, Abb. 3) als überraschend stabil (über mehrere Jahre und bei wechselnden chromatographischen Bedingungen (z.B. unterschiedliche Trennsäulen)) erwiesen. Andere Substanzen (z.B. Clozapin) zeigten allenfalls eine halbquantitative Korrelation zwischen Response und Konzentration – insbesondere bei höheren Konzentrationen („CI-Effekt“).

Im Fall der zweidimensionalen HPTLC lauten die entsprechenden Zahlen 27 und 33. Trotz der Anwendung eines neuen Trennsystems für jede Analyse (HPTLC-Platte) weisen natürlich auch die HPTLC- Kalibrationskurven z.T. beträchtliche Schwankungen auf, die u.a. durch nicht ganz konstante Entwicklungsbedingungen, unterschiedliche (auch vom biologischen Material abhängige) Größen der Substanzflecken und durch die Diffusion in der Trennschicht bedingt sein können. Abb. 4 zeigt beispielhaft die Kalibrationskurven für Risperidon.

Insgesamt lassen sich somit 127 (=48%) von den bei dieser ‚Target-Compound-Analyse‘ nachweisbaren 264 Wirkstoffen zumindest auch halbquantitativ bestimmen.

Tab. 6: Nachweisbare Verbindungen (Ion Trap-GC-MS + zweidimensionale HPTLC-UV-Det.)

Acepromazin	Cotinin	<i>Maprotilin</i>	Pholcodin
Acetylcodein	Cyamemazin	MBDB	Pholedrin
Acetylsalicylsäure	Cyproheptadin	MDA	Physostigmin
<i>Alfentanil</i>	Dehydroabietic acid	MDEA	<b>Pipamperon</b>
Alimemazin	<i>Demelverin</i>	MDMA	<i>Piritramid</i>
<i>Alprazolam</i>	<b>Desipramin</b>	Meconin	Prednisolon
Alprenolol	Detajmium (Artifact)	<b>Medazepam</b>	<b>Prilocain</b>
Amantadin	<i>Dextrometorphan</i>	<b>Melperon</b>	Primidon
<i>Ambroxol</i>	Dextropropoxyphen	<i>Memantin</i>	<b>Promazin</b>
<i>Amiodaron</i>	<b>Diazepam</b>	Mephentermin	<b>Promethazin</b>
<b>Amisulprid</b>	Dibenzepin	<b>Mepivacain</b>	<b>Propafenon</b>
<b>Amitriptylin</b>	Diclofenac	Meprobamat	Propiverin
Amitriptylinoxid	Diethazin	Metamizol	<i>Propofol</i>
Amlodipin-Mb	<i>Dihydrocodein</i>	<b>Methadon</b>	Propoxyphen
Amphetamin	<i>Diltiazem</i>	Methamphetamin	<i>Propranolol</i>
<b>Aripiprazol</b>	Dimethoat	Methaqualon	Propyphenazon-M
Articain	<b>Dimetinden</b>	Methylephedrine	<i>Prothipendyl</i>
Atenolol	<b>Diphenhydramin</b>	<b>Methylphenidat</b>	Pyrazinamid
Atomoxetin	Dipyridamol	Methylprednisolon	Pyrimethamin
<i>Atropin</i>	Disopyramid	<i>Metoclopramid</i>	<b>Quetiapin</b>
BDB	Diuron-Art. (Intox)	<i>Metoprolol</i>	Ranitidin
Benperidol	Dobutamin-Mb	Metorphan	Reboxetin
Benzylpiperazin	Dosulepin	<i>Metronidazol</i>	<b>Risperidon</b>
<b>Biperiden</b>	<b>Doxepin</b>	<i>Mianserin</i>	<b>Rivastigmin</b>
Bisacodyl	<b>Doxylamin</b>	<b>Midazolam</b>	<i>Ropivacain</i>
<i>Bisoprolol</i>	<b>Duloxetin</b>	<b>Mirtazapin</b>	Scopolamin
<i>Bromazepam</i>	EDDP	<b>Moclobemid</b>	<i>Sertralin</i>
Bromhexin	Enalapril – H <sub>2</sub> O	<i>Modafinil</i>	Sotalol
Bromperidol	Ephedrin	<i>Mono-Acetylmorphin</i>	Strychnin
<i>Brotizolam</i>	Erythromycin	Morphin	<b>Sulpirid</b>
<b>Budipin</b>	Estazolam	Moxonidin	Sultiam
<b>Bupivacain</b>	Ethosuximid	Naftidrofuryl	<b>Talinolol</b>
Bupranolol	Etoloxamin	Naloxone	Tamoxifen
<b>Buprenorphin</b>	<b>Etomidate</b>	Nebivolol	Telmisartan-Mb
Buspirone	<i>Etoricoxib</i>	Nevirapin	<i>Temazepam (Ac)</i>
Cafedrin – H <sub>2</sub> O	Felbamat	<i>Nicotin</i>	<b>Tetrazepam</b>
Canrenon	<b>Fentanyl</b>	Nicotinamid	Theobromin
<i>Carbamazepin</i>	<b>Flecainid</b>	Nifedipin	<i>Theophyllin</i>
Carvedilol	Fluconazol	Nimodipin-Mb	Thiopental
Celiprolol	Fludiazepam	<b>Nitrazepam</b>	<b>Thioridazin</b>
Chavicin	<b>Flunitrazepam</b>	Nitrendipin	<i>Tiaprid</i>
<i>Chinidin</i>	<i>Fluoxetin</i>	<b>Nordazepam</b>	Ticlopidine
<i>Chinin</i>	<b>Flupirtin</b>	<b>Nortriptylin</b>	<b>Tilidin</b>
Chlorazepate-Art	<i>Flurazepam</i>	Noscapin	Tocopherol
<i>Chlordiazepoxid</i>	<i>Fluvoxamin</i>	<b>Olanzapin</b>	Tolperison
<i>Chlormezanon</i>	Granisetron	<b>Opipramol</b>	Topiramate
<i>Chloroquin</i>	<b>Haloperidol</b>	Orphenadrin	<b>Tramadol</b>
<i>Chlorphenamin</i>	Heroin	<i>Oxazepam</i>	Tranylcypromin
<i>Chlorpromazin</i>	Hydrocodone	<i>Oxcarbazepin</i>	<i>Trapidil</i>
<b>Chlorprothixen</b>	Hydromorphon	<b>Oxycodon</b>	Trazodon
<i>Cinnarizin</i>	Hydroxycarbazepin	Papaverin	<b>Trihexyphenidyl</b>
<b>Citalopram</b>	<i>Hydroxyzin</i>	Paracetamol	<i>Trimethoprim</i>
Clindamycin	Ibuprofen	<i>Paroxetin</i>	<b>Trimipramin</b>

Fortsetzung Tab. 6: Nachweisbare Verbindungen

<i>Clobazam</i>	<b>Imipramin</b>	Penbutolol	Tripelennamine
<i>Clobutinol</i>	<b>Ketamin</b>	Pentobarbital	Triprolidol
<i>Clomethiazol</i>	<b>Lamotrigin</b>	<i>Pentoxifyllin</i>	<b>Tyramin</b>
<b>Clomipramin</b>	<b>Laudanosin</b>	<i>Perazin</i>	<b>Urapidil</b>
<i>Clonazepam</i>	Levetiracetam	<b>Pethidin</b>	<b>Venlafaxin</b>
Clonidin-INTOX	<b>Levomepromazin</b>	Phenacetin	<b>Verapamil</b>
Clopendithiol	Levorphanol	Phenazon	Viloxazine
Clopidogrel	<b>Lidocain</b>	Phencyclidin	Voriconazol
<b>Clozapin</b>	Lincomycin-Mb	<b>Phenobarbital</b>	Zaleplon
Cocaethylen	Loratadine	Phenothiazine	<b>Ziprasidon</b>
<b>Cocain</b>	Lorazepam	Phenoxyethanol	<b>Zolpidem</b>
<i>Codein</i>	Loxapin	Phentermin	<b>Zopiclon</b>
<b>Coffein</b>	LSD (Intox)	Phenytoin	<b>Zotepin</b>

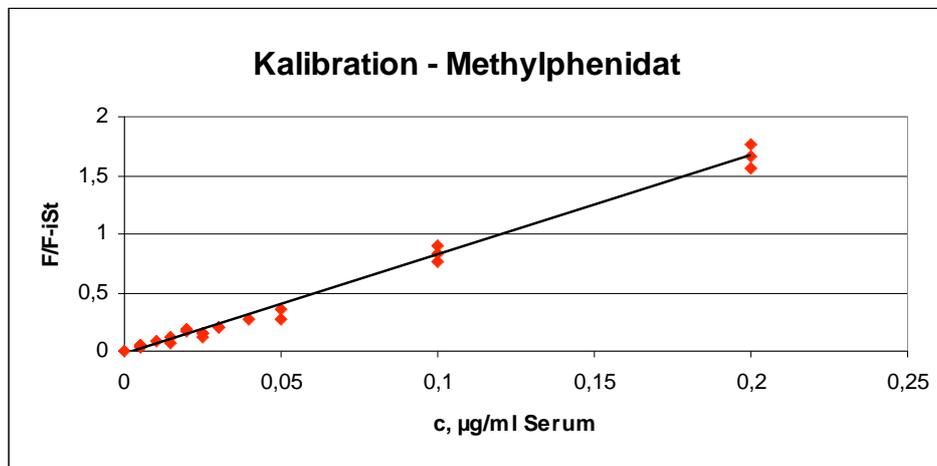


Abb. 3: Kalibrationskurve für Methylphenidat (GC-MS, 100 ng Etoloxamin = int.St.)

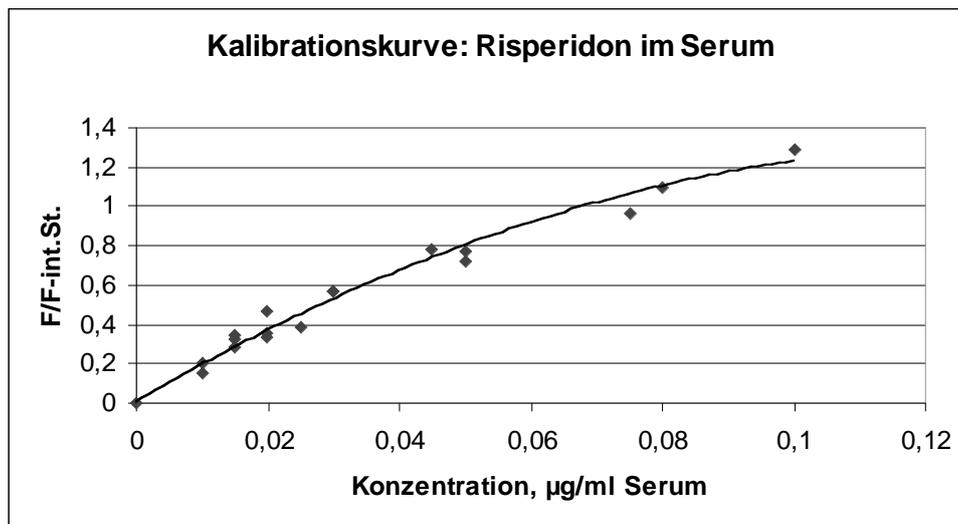


Abb. 4: Kalibrationskurve für Risperidon (HPTLC, 100 ng Benperidol = int.St.)

#### 4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen:

Die hier vorgestellte basische ‚bipolare‘ FFE (Extraktion mit polaren Lösungsmitteln, saure Re-Extraktion aus unpolarem Lösungsmittel) hat den Vorteil, dass eine große Zahl von Verbindungen extrahiert und relativ saubere Extrakte erhalten werden. Außerdem ist die Trennung ‚sauer/basisch‘ nicht so scharf wie bei der SPE, so dass neutrale (z.B. Diazepam oder Dimethoat) und sogar schwach saure Verbindungen (z.B. Phenobarbital oder Theophyllin) zusammen mit polaren (z.B.  $\beta$ -Blocker) und zahlreichen weniger polaren basischen Wirkstoffen in einem einzigen Extraktionsrückstand enthalten sind.

Als grundlegendes Nachweisverfahren wird die Gaschromatographie – Ion Trap-Massenspektrometrie eingesetzt, die einen schnellen automatischen Substanznachweis durch Vergleich von FULL SCAN-Spektren und Retentionszeiten mit entsprechenden Datenbanken ermöglicht und in nahezu allen Fällen eine eindeutige Identifizierung (auch bei überlagerten Substanzpeaks) ermöglicht. Die Gaschromatographie reicht jedoch als Trennverfahren allein nicht aus, da ein beträchtlicher Teil der toxikologisch relevanten Stoffe für eine gaschromatographische Analyse nicht ausreichend flüchtig ist – ein Umstand, der sich auch durch Derivatisierung nur teilweise ausgleichen lässt.

Auf Grund dessen wurde – statt der verbreiteteren HPLC – die HPTLC mit UV-spektrometrischer Detektion als zweites Analysenverfahren eingesetzt, die bei zweidimensionaler Ausführung eine ausreichend hohe Trennleistung besitzt. Für die Verbindungen, die sich nur mittels HPTLC (nicht bzw. schlechter mit GC-MS nachweisbar) nachweisen ließen, wurde für die Discriminating Power ein relativ hoher Wert von  $DP = 0,9967$  experimentell ermittelt.

Ein Vergleich mit der Datenbank von PFLEGER/MAURER/WEBER [1] zeigte, dass der Umfang der durchgeführten Untersuchungen (die Substanzzahl) für eine Systematische Toxikologische Analyse noch nicht ausreichend ist, sondern dass es sich eher um eine (umfassende) ‚Target-Compound-Analyse‘ handelt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich mit der vorgestellten ‚bipolaren‘ FFE prinzipiell eine wesentlich größere Zahl toxikologisch relevanter Verbindungen aus biologischem Material isolieren lässt. Andererseits zeigte der Vergleich mit [1] aber, dass die Anwendung eines zweiten Analysenverfahrens – neben der GC-MS – in jedem Fall erforderlich ist, da schon 17% der in diese Untersuchung einbezogenen toxikologisch relevanten Substanzen in [1] nicht enthalten sind.

Die Bezeichnung ‚Target-Compound-Analyse‘ für die vorgestellte Verfahrensweise ist auch deshalb gerechtfertigt, weil – bei Verwendung von internen Standards – sowohl die GC – Ion Trap-MS als auch die zweidimensionale HPTLC neben dem Nachweis bei vielen Verbindungen (48%) auch quantitative oder halbquantitative Aussage gestatten. Auch die Zahl der bestimmbareren Wirkstoffe (z.Zt. 48% von 264) ließe sich durch systematische Erstellung von Kalibrationskurven mit Sicherheit weiter erhöhen.

Es liegt auf der Hand, das spektrometrische Detektionsverfahren mit der höchsten Aussagekraft (MS) mit einer chromatographischen Trennung zu koppeln, die eine größere Zahl von Verbindungen zu trennen vermag als die GC. Möglicherweise ist das ‚Endziel‘ der ungerichteten toxikologischen Analyse – die qualitative und quantitative STA – durch die Methodenkombination HPLC – MS (MS/MS) zu erreichen.

#### Literaturverzeichnis

- [1] Pflieger K, Maurer HH, Weber A (2000) Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites Second, revised and enlarged edition Part 4, WILEY VCH Weinheim 2000