

Summary of the PhD Thesis as a Thank You for the GTFCh Travel Fund for Presenting at the 2011 SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco

Entwicklung von forensisch-toxikologischen Untersuchungsverfahren für die Materialanalytik von ‚Spice‘-Produkten, Arznei- und Dopingmitteln

Christoph Härtel

Kriminaltechnisches Institut, Fachbereich KT 34 – Toxikologie, Bundeskriminalamt, Äppelallee 45, 65203 Wiesbaden

1. Einleitung

Im Bereich der Forensik haben Schnelluntersuchungstechniken einen hohen Stellenwert, da vor Ort, z.B. bei der Tatortarbeit in illegalen Laboratorien, oftmals schnelle und belastbare Untersuchungsergebnisse für Entscheidungen benötigt werden. Für die Erlangung von gerichtsfesten Ergebnissen reichen einfache Untersuchungen mit den gängigen Schnelluntersuchungstechniken aber nicht aus, da bedeutende wissenschaftliche Dachverbände im Bereich der Kriminaltechnik, wie die Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG), empfehlen, sichergestellte Materialien oder Spuren mit mindestens zwei unterschiedlichen Methoden zu analysieren, wobei eine Methode mit hohem Identifizierungspotenzial verwendet werden soll [1]. Diese Methoden liefern zwar sehr verlässliche und aussagekräftige Ergebnisse, haben aber den Nachteil, dass häufig eine aufwendige Probenvorbereitung und eine lange Analysenzeit notwendig sind. Die im Jahr 2004 von *Graham Cooks* entwickelte, neuartige Ionisierungstechnik für die Massenspektrometrie, die *Desorptions-Elektrospray-Ionierungs-Massenspektrometrie (DESI-MS)* [2], besitzt hingegen ein hohes Potential für die direkte massenspektrometrische Untersuchung von forensisch relevanten Materialien [3-4], was die Nachteile der gängigen Kopplungen von Massenspektrometrie und chromatographischen Methoden (Probenvorbereitung und lange Analysezeiten) unter Beibehaltung des hohen Identifizierungspotenzials nivelliert.

Neben der Identifizierung von Substanzen spielt die Quantifizierung in der Kriminaltechnik eine wichtige Rolle. Die Information über die Konzentration bzw. den Gehalt einer Substanz wird unter anderem für die Festlegung des Strafmaßes benötigt. Ein weiterer Bereich, in dem quantitative Ergebnisse eine Rolle spielen ist das *Profiling* sichergestellter Rauschgiftproben. Dabei handelt es sich um einen Vergleich von ähnlichen Materialien, bei dem festgestellt werden soll, ob die Materialien aus der gleichen Quelle (z.B. Syntheseprozess) stammen, oder ob sonstige Bezüge zwischen den Materialien bestehen.

Neben klassischen Aufgabenbereichen in den kriminaltechnischen Fachgebieten ergeben sich auch immer neue analytische Fragestellungen durch neu auftretende Deliktphänomene. Dazu gehören zum Beispiel die Bereiche der Arzneimittelfälschungen und der sogenannten *Kräutermischungen* („Spice“-Phänomen), die beide erst durch das Internet ihre heutige Bedeutung erlangen konnten. Im Bereich der Schnelldetektion bereitet die Analyse von Kräutermischungen Probleme, da durch die Verwendung potenter Wirkstoffe in vergleichsweise geringer Konzentration in diesen Produkten eine Analyse mit Schnelltestkits nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Auch für den zunehmend Bedeutung erlangenden Bereich der Untersuchung von Arzneimittelfälschungen ist eine funktionierende Schnellanalytik notwendig, da hier häufig ein belastbares und dokumentiertes Untersuchungsergebnis innerhalb weniger

Tage vorliegen muss. Neue Aufgabenfelder werden der Kriminalpolizei und somit auch der Kriminaltechnik auch durch den Gesetzgeber zugeteilt. So wurden 2007 durch die Änderung des Arzneimittelgesetzes und die Einführung der Dopingmittelmengenverordnung (DmMV) Grenzwerte für den Besitz von Dopingsubstanzen festgelegt, wodurch eine quantitative Analyse von Dopingpräparaten notwendig wurde. Da im Breiten- und teilweise auch im Spitzensport Substanzen aus der Gruppe der androgenen anabolen Steroide am häufigsten zu Dopingzwecken missbraucht werden, ist es für die Kriminaltechnik wichtig, quantitative Informationen für diese Substanzklasse ermitteln zu können.

2. Zielsetzung

Im Bereich der synthetischen Cannabimimetika wurden seit dem Auftauchen dieser Substanzen in ‚Spice‘-Produkten viele Forschungsarbeiten durchgeführt. Diese konzentrierten sich aber vor allem auf den Konsumnachweis in Körperflüssigkeiten und Haaren, weswegen neben der Erarbeitung von Analysenverfahren die Aufklärung des Metabolismus von synthetischen Cannabimimetika im Vordergrund stand [5-7]. In dem für die Kriminaltechnik wichtigen Bereich der Materialanalytik wurden jedoch kaum Forschungsarbeiten durchgeführt. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit ein schnelles und flexibles quantitatives UHPLC-DAD-MS Verfahren für die Untersuchung von synthetischen Cannabimimetika in ‚Spice‘-Produkten entwickelt werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der notwendigen Probenvorbereitung. Weiterhin sollte für die schnelle und eindeutige Identifizierung der synthetischen Cannabimimetika in ‚Spice‘-Produkten ein direkt-massenspektrometrisches Verfahren für die Untersuchung von Kräutermischungen entwickelt werden.

Für die massenspektrometrische Analyse von Arzneimitteln war es, bis zur Entwicklung von Techniken zur direkten Massenspektrometrie, immer notwendig, diese in eine gelöste Form zu überführen. Mit der Etablierung der direkten Massenspektrometrie wurden vereinzelte Untersuchungen zur Eignung der DESI-MS für die Analyse von unterschiedlichen Arzneimittelformen durchgeführt [8-9]. In diesen Arbeiten wurden zwar DESI-MS Experimente an Tabletten durchgeführt, aber keine Untersuchungen zu der Eignung der DESI-MS zur Direktanalytik beschichteter Tabletten und Stechkapseln. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit Verfahren entwickelt, um Stechkapseln, Pulver und beschichtete Tabletten direkt mittels der DESI-MS zu analysieren.

Die Analyse von androgenen anabolen Steroiden ist für die Kriminaltechnik eine Herausforderung, da die am weitesten verbreitete Applikationsform aus in Speiseölen gelösten Steroiden besteht (Depotzubereitungen für die intramuskuläre Injektion). Die bisherigen Analyseverfahren sind jedoch vor allem für die Untersuchung von Tabletten und Lösungen entwickelt worden [10-11]. 2005 wurde in einer Monographie „Testosterone and Esters“ der SWGDRUG eine letzte aktualisierte Version für die Vorgehensweise bei der Analytik von Testosteron und Testosteronestern veröffentlicht, die zwar quantitative Analyseverfahren beschreibt aber einschränkt, dass diese nicht mit öligen Zubereitungen getestet wurden [12]. In Abgrenzung zu diesen bisher durchgeführten Arbeiten sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation Verfahren entwickelt werden, um die quantitativen Informationen über jede einzelne Esterform in öligen Matrices zu erhalten (Gewinnung von Profilinginformationen). Dabei sollte zusätzlich eine Kopplung mit einem Massenspektrometer ermöglicht werden um unbekannte Substanzen identifizieren zu können.

Als Ergänzung zur DESI-Technik, die vor allem für die Ionisierung von polaren Substanzen geeignet ist [13], wurde die Direct Probe-Technik, die auf der APCI-Technik beruht, für die Untersuchung von unpolaren Substanzen verwendet. In diesem Zusammenhang wird weiter-

hin untersucht, welchen Einfluss die Verwendung unterschiedlicher Massenspektrometer auf die DESI-MS-Analysenergebnisse hat.

3. Ergebnisse

Für die quantitative Analytik von synthetischen Cannabimimetika in ‚Spice‘-Produkten wurde ein UHPLC-DAD-MS Verfahren entwickelt und validiert. Es wurden systematische Untersuchungen zu der Wirkstoffverteilung in Kräutermischungen durchgeführt. Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede in den Wirkstoffgehalten unterschiedlicher Materialproben verschiedener Produktgenerationen. Weiterhin wurden verschiedene Probenvorbereitungsvarianten für die qualitative und quantitative Analyse untersucht. Anhand der Ergebnisse konnte eine flexible Untersuchungsstrategie für die kriminaltechnische Materialuntersuchung von Kräutermischungen erarbeitet werden. Diese beinhaltet neben der Quantifizierung und Identifizierung auch eine Schnelluntersuchung mittels einer DESI-MS Methode zur direkten Untersuchung von Kräutermaterial. In diesem Zusammenhang wurden DESI/ESI-MSⁿ-Spektren von neuen synthetischen Cannabimimetika aufgenommen und die Fragmentierungswege (bis MS⁴) aufgeklärt. Die erarbeitete Vorgehensweise wurde durch die Teilnahme an Ringversuchen validiert und in die Fallarbeit überführt.

Bei der direkt-massenspektrometrischen Untersuchung von Arzneimitteln konnte gezeigt werden, dass sogar beschichtete Tabletten ohne weitere Probenvorbereitung mittels DESI-MS analysiert werden können, da die Beschichtung mittels DESI-Spray entfernt werden kann (siehe Abbildung 1). Weiterhin war die Wirkstoffidentifizierung in anderen Arzneiformen (Pflaster, Gele und Tropfen) durch DESI-MS Messungen möglich.



Abb.1. Fläche auf der die Beschichtung einer Viagra-Tablette in Abhängigkeit des Lösemittelflusses des DESI-Sprays entfernt wurde.

Für die Analytik von anabolen Steroiden in öligen Zubereitungen wurden zwei UHPLC-DAD-Verfahren (siehe Abbildung 2) entwickelt und validiert, die es ermöglichen, neben unterschiedlichen Wirkstoffen auch die jeweilige Esterform ein und derselben Substanz zu quantifizieren, wodurch Proben aus verschiedenen Sicherstellungen miteinander verglichen werden können (Gewinn von Profilinginformationen).

Für das erste Verfahren wurde durch Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion die Ölmatrix entfernt und so eine Kopplung mit einem Massenspektrometer ermöglicht. Für das zweite Verfahren wurde eine monolithische Trennsäule eingesetzt, weswegen hier auf eine Probenvorbereitung verzichtet werden konnte. Beide Verfahren wurden in die kriminaltechnische Fallarbeit überführt und anhand von Ringversuchsproben verifiziert. Für die direkt-massenspektrometrische Analyse von öligen Zubereitungen wurde ein DESI-MS Verfahren entwickelt, was zu einer erheblichen Zeitersparnis unter Aufrechterhaltung des hohen Identifizierungspotentials der Massenspektrometrie führte.

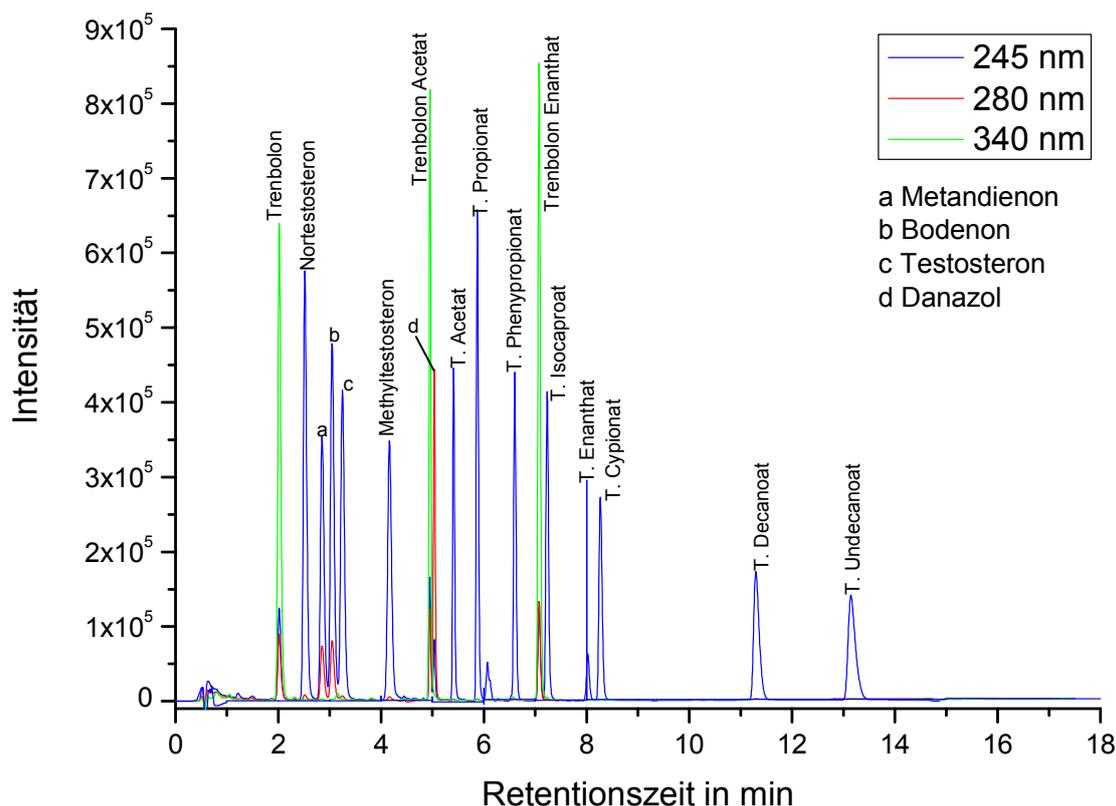


Abb. 2. Hintergrund korrigiertes Chromatogramm einer UHPLC-DAD Messung eines Gemisches von 17 Steroiden und Steroidestern.

Beim Vergleich der DESI-Quelle mit einer APCI (Direct Probe)-Quelle zeigte es sich, dass die Ionisierung bei der DESI-Technik ähnlich zu der ESI-Technik und bei der Direct Probe-Technik ähnlich zu der EI-Technik erfolgt. Insgesamt ist die DESI-Technik der Direct Probe-Technik vorzuziehen, da aufgrund von einer möglichen längeren Beprobungszeit MS^n -Spektren aufgenommen werden können und die Kontaminationsgefahr des Massenspektrometers und der APCI-Quelle bei Verwendung der Direct Probe-Technik zu groß ist.

Ein weiterer Aspekt bestand in einer Gegenüberstellung der Kopplung der DESI-Quelle an unterschiedliche Massenspektrometer. Dabei stellte sich heraus, dass die Verwendung eines Ionenfallenmassenspektrometers (IT-MS) der eines Flugzeitmassenspektrometers (TOF-MS) vorzuziehen ist, da die zusätzliche Information der exakten Masse nicht den Verlust der Fragmentierungsinformation ausgleicht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass mittels DESI-IT- MS^n eine Unterscheidung von Regioisomeren möglich ist, die mittels DESI-TOF-MS nicht getroffen werden konnte.

4. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer Prof. Dr. Uwe Karst für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit anzufertigen. Die Entfernung zwischen Wiesbaden und Münster tat der guten Betreuung keinen Abbruch und Prof. Karst hatte immer hilfreiche Ratschläge für das Lösen von Problemen und für das Überwinden von Hindernissen.

Besonderen Dank schulde ich auch meinem Betreuer beim Bundeskriminalamt Dipl. Chem. Michael Pütz, der es mir ermöglicht hat, meine Forschung an einem spannenden Teilgebiet der Forensik durchzuführen.

Schlussendlich bedanke ich mich bei der GTFCH für die finanzielle Unterstützung der Reise zum 49. Jahrestreffen der TIAFT in San Francisco 2011.

5. References

- [1] Recommendations of the scientific working group for the analysis of seized drugs (SWGDRUG). 4th edition.
- [2] Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass Spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 2004;306:471-473.
- [3] Härtel C. Direkte forensisch-toxikologische Materialanalytik mittels Desorptions-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (DESI-MS). Diplomarbeit. Phillips-Universität Marburg 2010.
- [4] Rodriguez-Cruz SE. Rapid screening of seized drug exhibits using desorption ionisation mass spectrometry (DESI-MS). *Microgram Journal* 2008;6:10-25.
- [5] Coulter C, Garnier M, Moore C. Synthetic cannabinoids in oral fluid. *J Anal Toxicol* 2011;35:424-430.
- [6] Dresen S, Kneisel S, Weinmann W, Zimmermann R, Auwärter V. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *J Mass Spectrom* 2011;46:163-171.
- [7] Kneisel S, Auwärter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *J Mass Spectrom* 2012;47:825-835.
- [8] Leuthold LA, Mandscheff JF, Fathi M, Giroud C, Augsburg M, Varesio E, Hopfgartner G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit ecstasy tablets. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:103-110.
- [9] Chen H, Talaty NN, Takáts Z, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceuticals samples in the ambient environment. *Analytical Chemistry* 2005;77:6915-6927.
- [10] Cavina G, Moretti G. Quantitative separation of steroids in oily solutions by mean of thin-layer chromatography. *J Chromatog A* 1966;22:41-51.
- [11] Lurie IS, Sperling AR, Meyers RP. The determination of anabolic steroids by MECC, gradient HPLC, and capillary GC. *J Forensic Sci* 1994;39:74-85.
- [12] Monograph "Testosterone and Esters". SWGFRUG 2005.
- [13] Rosenberg E. The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionization) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *J Chromatog A* 2003;1000:841-889.

Die vollständige Dissertation ist veröffentlicht unter http://repositorium.uni-muenster.de/document/miami/1ae8b53e-70fc-4ad3-b24c-b799c60cdeb8/diss_haertel.pdf