



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Entwicklung und Optimierung einer Trennmethode
für ein Multi-Target-Screening“

verfasst von

Kristina Mitterhauser

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an dieser Stelle all denjenigen aussprechen, die mir direkt oder indirekt bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen und mich tatkräftig sowie mental unterstützt haben.

In erster Linie darf ich mich bei Frau a.o. Univ.-Prof. Liselotte KRENN für die Betreuung der Arbeit und der Betreuergruppe des Departments PHARMAKOGNOSIE der UNIVERSITÄT WIEN für die wertvollen Inputs und die hochgeschätzte Kritik bedanken.

Weiters ein großes Dankeschön Herrn a.o. Univ.-Prof. Dr. Rainer SCHMID, Leiter der TOXIKOLOGIE UND MEDIKAMENTENANALYTIK des KLINISCHEN INSTITUTS FÜR LABORMEDIZIN der MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT WIEN, der mich durch sein Wissen und seine lebenswürdige Betreuung beim Praktischen Arbeiten unterstützt hat.

Ebenso möchte ich Ass.-Prof. Dr. Thomas STIMPFL und dem Team des Departments für GERICHTSMEDIZIN der MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT WIEN, sowie den Teams der ROUTINEANALYTIK, der PROTEOMICS und CHECKIT! im KLINISCHEN INSTITUT FÜR LABORMEDIZIN des AKH WIEN für deren liebevolle Aufnahme in deren Gemeinschaft und für die aktive Hilfe bedanken, an die ich mich mit jeder Frage wenden und auf die ich mich immer verlassen konnte.

Weiters gilt mein Dank meiner Familie, meinen Eltern Ingeborg und Dr. Josef MITTERHAUSER, sowie meinen Geschwistern Markus, Eva und Josef, für ihre lebenslange Unterstützung, sowie ihr Fordern und Fördern.

Schließlich darf ich mich noch bei meinem Partner Mag. pharm. Andreas BERGER für alles bedanken, was er für mich während des Studiums und davor getan hat, der mir immer mit Aufmerksamkeit und Verständnis zur Seite gestanden und immer für mich da ist

Abkürzungsverzeichnis

ACE:	Angiotensin Converting Enzyme
CAN:	Cannabinoide
COX:	Cyclooxygenase
GHB:	Gamma-Hydroxybuttersäure
KILM:	Klinisches Institut für Labormedizin
NSAR:	Nichtsteroidales Antirheumaticum
NSRI:	Non-selective (monoamine) reuptake inhibitor
OPS:	Opioide
SPE:	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
THC:	Tetrahydrocannabinol
Z-Drugs:	Zopiclon, Zaleplon, Zolpidem

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Forensische Toxikologie	1
1.2. HPLC in der forensischen Analytik	2
1.3. Gegenüberstellung von General Unknown Screening und Multi Target Screening in der Systematisch-toxikologischen Analyse	2
2. Allgemeiner Teil	4
2.1. Intoxikationen und Todesfälle	4
2.2. Grundlagen der HPLC	11
2.2.1. Säulen-Trennmaterialien	12
2.2.2. Puffersystem	13
2.2.3. Flussrate	14
2.3. Detektion mittels Massenspektrometrie	15
2.4. Bedeutung dieser Arbeit	16
3. Spezieller Teil	17
3.1. Verwendete Geräte und Materialien	17
3.1.1. Säuleneigenschaften laut Herstellerangaben	18
3.1.2. Substanzen des Testmixes	19
3.1.3. Ausgewählte Einzelsubstanzen	31
3.2. Ausgangspunkt der Methodenoptimierung	32
3.3. Experimente und Workflow	33
3.3.1. Trennung an einer Phenomenex Kinetex-Säule	33
3.3.2. Trennung an einer ThermoFisher Accucore	38
3.3.3. Trennung an einer Phenomenex Luna	41
4. Ergebnisse	46
4.1. Optimales Fließmittel	46
4.2. Optimale Säule	46
4.3. Optimale Fließmittelgeschwindigkeit	48
4.4. Temperaturoptimum	48
4.5. Korrektur der Ionenstärke	49
4.6. Abschließende Bemerkung	49
5. Diskussion	50
Zusammenfassung der Methoden aus der verwendeten Literatur	55
Literatur	73
Repräsentative Chromatogramme der benutzten Säulen	76
Kurzfassung	85
Abstract	87
Curriculum Vitae	89

1. Einleitung

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes zur Methodenoptimierung zur Entwicklung eines Multi-Target-Screenings für forensisches oder auch klinisches Material mittels HPLC-MS, die in einer vorangegangenen Diplomarbeit über die Detektion mittels LC-Massenspektrometer ergänzt wird¹. Ein weiterer Teil wäre Optimierung von Trennungen biologischer Proben (z.B.: gespiktes Hirn oder Blut) mittels LC-MS und die Auswahl einer geeigneten Ionisierungstechnik für das Arbeiten mit LC-MS.

1.1. Forensische Toxikologie

Der Hintergrund forensisch-toxikologischer Untersuchungen ist die Aufklärung und Bestätigung der Todesursache bei Vermutung auf Fremdeinwirkung, Gewaltverbrechen, Drogen- und Medikamentenmissbrauch, Suizid, Ingestion oder Inhalation von Giften wie Insektizide, chemische Industrie-reiniger, Waschmittel etc. Das bedeutet, sie finden immer dann statt, wenn kein fassbarer Befund besteht, kein morphologisches Korrelat und kein plötzlicher Tod natürlicher Ursache diagnostiziert wurde².

Nach einer oft aufwändigen Aufarbeitung der Proben (Blut, Kleinhirn, Medulla oblongata, Mageninhalt, Urin, Leber, Nasenscheidewandabstrich, Glaskörperflüssigkeit) wird eine Trennmethode zur Auftrennung des Stoffgemisches angewandt, im Anschluss kann detektiert und identifiziert werden.

Neben der SPE und der Gaschromatographie findet die Flüssigchromatographie, insbesondere Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Ultra-hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC bzw. UPLC), Verwendung. Der Vorteil hiervon ist, dass die Proben nicht flüchtig gemacht werden müssen, bzw. nicht flüchtige Substanzen ohne Derivatisierung getrennt und detektiert werden können, was einerseits Zeit spart, und andererseits thermolabile Substanzen nicht zerstört.

1.2. HPLC in der forensischen Analytik

Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist heute die Standardmethode, um Substanzmischungen aufzutrennen, die Einzelkomponenten anschließend zu identifizieren und eventuell quantitative Aussagen treffen zu können.

Von der Vielzahl an Methoden sind die wichtigsten die Normalphasen-HPLC, die jedoch kaum mehr angewandt wird, da sie für die meisten Fragestellungen aufgrund der Polarität der Analyten wenig geeignet ist, und die Umkehrphasen-HPLC („reversed phase“), die ein sehr breites Spektrum an Möglichkeiten betreffend Fließmittel, Gradientenelution, Säulentyp und –dimension und weiteren variierbaren Parametern bietet. In diesem Projekt wurde mit ebendieser Technik gearbeitet.

Um die getrennten Komponenten zu detektieren, gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, die auf unterschiedliche Prinzipien beruhen; optische Detektoren (wie UV/Vis, Diode-Array, Fluoreszenzdetektoren) benötigen eine chromophore Komponente in den vorhandenen Substanzen oder fluoreszenzfähige Teilstrukturen. In der Massenspektrometrie hingegen muss man darauf achten, dass die verwendeten Fließmittel und Gradienten, Puffersystem und Fließgeschwindigkeit für eine Koppelung mit einem MS-Gerät kompatibel sind.

1.3. Gegenüberstellung von General Unknown Screening und Multi Target Screening in der Systematisch-toxikologischen Analyse

In der Untersuchung von Probenmaterial in der klinischen und forensischen Toxikologie finden zwei Varianten Anwendung: das General Unknown Screening eignet sich besonders bei Proben, bei denen die Intoxikationskomponenten nicht bekannt sind und die neue Substanzen, oder solche, die nicht häufig als Drogen konsumiert werden, aufdecken kann. Das Multi Target Screening birgt den Vorteil, dass die Detektion derjenigen Komponenten, mit denen die Methode entwickelt wurde, gesichert ist. Andererseits könnten etwaige andere, nicht bekannte Stoffe in der Analyse

eventuell nicht erfasst werden. Ein Ziel dieses Projektes war, eine Methode für diejenigen Substanzen zu entwickeln und zu verfeinern, die bekanntermaßen häufig bzw. zumindest sporadisch für schwere und auch tödliche Intoxikationen verantwortlich sind. Dementsprechend war die Zusammensetzung des Testmixes, der polare und apolare, sowie saure und basische Komponenten beinhaltet, um einen möglichst breiten Bereich der häufig konsumierten Substanzen abdecken zu können.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Intoxikationen und Todesfälle

Vergiftungen treten infolge falscher Anwendung von Medikamenten oder auch durch beabsichtigte oder unbeabsichtigte Ingestion von Haushaltschemikalien oder anderen Giftstoffen auf.

Intoxikationen durch Arzneimittel oder Suchtmittel können unterschiedlich geartet sein: Vergiftung aufgrund von Überdosierung (auch metabolische Überdosierung via Hemmung der abbauenden Enzyme durch Nahrung oder andere Arzneimittel), unerwünschten anderen Wirkungen, pharmakodynamischen Wechselwirkungen mit Nahrung oder anderen Xenobiotika und Suizid.

Symptome sind, je nach Venenum, u.a. Nausea, Emesis, Vertigo, Impetigo, Urticaria oder Diurese.

In weiterer Folge können Organschäden und Atemdepression akut oder in latenter Form zum Tode führen.

Die nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die Häufigkeit der Todesfälle, bei denen die jeweiligen Xenobiotika vorgekommen sind; es kann daraus kein Schluss über die jeweilige Todesursache gezogen werden, da häufig mehrere Substanzen gefunden werden. Diese Polytoxikomanie erschwert die Aufklärung von Todesfällen deutlich:

Tab. 1: Beteiligung verschiedener Arznei- und Giftstoffe bei Todesfällen in Wien seit 1.1.2005, Eigenrecherche aus dem GMT-Archiv der Forensischen Toxikologie in Wien

Substanz	Stoffgruppe	Häufigkeit
2-(Methylthio)benzothiazol	Benzothiazole	1 sehr selten
4-Methylethcathinon	Research Chemicals	1 sehr selten
Allobarbital	Barbiturate	1 sehr selten
Amantadin	Virustaticum/Antiparkinsonmittel	1 sehr selten
Ascorbinsäure	wasserlsl. Vitamine/org. Säuren	1 sehr selten

Substanz	Stoffgruppe	Häufigkeit
Barbital	Barbiturate	1 sehr selten
Bornaprin	Anticholinergica	1 sehr selten
Carbofuran	Carbamate/Insecticida	1 sehr selten
Cilazapril	ACE-Inhibitoren	1 sehr selten
Clindamycin	Lincosamid-Antibiotica	1 sehr selten
Clobazam	Benzodiazepine	1 sehr selten
Clomethiazol	Sedativa	1 sehr selten
Clopentixol	Antipsychotica	1 sehr selten
Clotrimazol	Antimycotica	1 sehr selten
Cyclamat	Süßstoffe	1 sehr selten
Cyclobarbital	Barbiturate	1 sehr selten
Decamethrin	Insecticida	1 sehr selten
S-Methyldemeton	Insecticida	1 sehr selten
Imipramin	Dibenzazepine	1 sehr selten
Dixyrazin	Neuroleptica	1 sehr selten
Dopamin	Schocktherapeutica	1 sehr selten
Doxylamin	Antihistaminica	1 sehr selten
Esmolol	Antiarrhythmica	1 sehr selten
Etilefrin	Sympathomimetica	1 sehr selten
Fenofibrat	Fibrate	1 sehr selten
Gliclacid	Antidiabetica	1 sehr selten
Haloperidol	Neuroleptica	1 sehr selten
Heroin	Opioide/Opiate	1 sehr selten
Iminostilben	Dibenzazepine	1 sehr selten
Indometacin	Nicht-opioide Analgetica	1 sehr selten
Isofluran	Narcotica	1 sehr selten
Isopropanol	Lösungsmittel	1 sehr selten
Kebuzon	Nicht-opioide Analgetica	1 sehr selten
Levorphanol	Opioide/Opiate	1 sehr selten
Linezolid	Oxazolidinon-Antibiotica	1 sehr selten
Lisofyllin	PDE-Hemmer	1 sehr selten
Mecloxacamin	Antibiotica	1 sehr selten
Memantin	Antidementiva	1 sehr selten
Mepivacain	Localanaesthetica	1 sehr selten
Mezcalin	Halluzinogene	1 sehr selten

Substanz	Stoffgruppe	Häufigkeit
Methylen-bis-(methyl-tert-butyl)phenol	Design Drugs	1 sehr selten
Methylphenidat	Psychostimulantia	1 sehr selten
Naloxon	Opiat-Antagonisten/Antidota	1 sehr selten
Nifedipin	Ca-Antagonisten	1 sehr selten
Oxycodon	Opioide/Opiate	1 sehr selten
Papaverin	Opioide/Opiate	1 sehr selten
Parathion	Insecticida	1 sehr selten
Penfluridol	Neuroleptica	1 sehr selten
Pentoxifyllin	Vasodilatoren	1 sehr selten
Phenprocoumon	Anticoagulantia	1 sehr selten
Phentermin	Sympathomimetica	1 sehr selten
Phenyltoloxamin	Antihistaminica	1 sehr selten
Piracetam	Nootropica	1 sehr selten
Piritramid	Opioide/Opiate	1 sehr selten
Prednisolon	Glucocorticoide	1 sehr selten
Pregabalin	Antiepileptica	1 sehr selten
Ramipril	ACE-Inhibitoren	1 sehr selten
Risperidon	Neuroleptica	1 sehr selten
Scopolamin	Tropane	1 sehr selten
Sertindol	Neuroleptica	1 sehr selten
Tamoxifen	Antiestrogene	1 sehr selten
Tetrazepam	Benzodiazepine	1 sehr selten
Ticlopidin	Thrombozytenaggregationshemmer	1 sehr selten
Valproinsäure	Antiepileptica	1 sehr selten
Zotepin	Neuroleptica	1 sehr selten
Cyanide	Synthesereagentia	1 sehr selten
Alimemazin	Antihistaminica	2 sehr selten
Baclofen	Muskelrelaxantia	2 sehr selten
Buprenorphin	Opioide/Opiate	2 sehr selten
Chlorocresol	Antiseptica	2 sehr selten
Clomipramin	Dibenzazepine	2 sehr selten
Clonazepam	Benzodiazepine	2 sehr selten
Dihydroergotamin	Migränetherapeutica	2 sehr selten
Donepezil	Antidementiva	2 sehr selten
Duloxetin	Andidepressiva	2 sehr selten
Ephedrin	Sympathomimetica	2 sehr selten
Ethylenglycol	Synthesereagentia	2 sehr selten
Fluconazol	Antimycotica/Antiandrogene	2 sehr selten
Mephesisin	Muskelrelaxantia	2 sehr selten

Substanz	Stoffgruppe	Häufigkeit
Milnacipran	Antidepressiva	2 sehr selten
Nitrazepam	Benzodiazepine	2 sehr selten
Orphenadrin	Anticholinergica	2 sehr selten
Phenazon	Nicht-opioide Analgetica	2 sehr selten
Pheniramin	Antihistaminica	2 sehr selten
Phloroglucindimethylether	Synthesereagentia	2 sehr selten
Physostigmin	Parasympathomimetica	2 sehr selten
Propranolol	Antiarrhythmica	2 sehr selten
Thiopental	Barbiturate	2 sehr selten
Tizanidin	Muskelrelaxantia	2 sehr selten
Tropisetron	Antiemetica	2 sehr selten
Verapamil	Antiarrhythmica	2 sehr selten
Zuclopenthixol	Neuroleptica	2 sehr selten
Clopidogrel	Thrombozytenaggregationshemmer	3 sehr selten
Furosemid	Schleifendiuretica	3 sehr selten
Maprotilin	Dibenzazepine	3 sehr selten
Moclobemid	MAO-Inhibitoren	3 sehr selten
Paroxetin	Antidepressiva	3 sehr selten
Atracurium	Muskelrelaxantia	4 sehr selten
Buflomedil	Vasodilatatoren	4 sehr selten
Bupropion	Antidepressiva	4 sehr selten
Chloroquin	Antiprotozoica	4 sehr selten
Diltiazem	Antiarrhythmica	4 sehr selten
Fentanyl	Opioide/Opiate	4 sehr selten
Guaifenesin	Expectorantia	4 sehr selten
Mianserin	α_2 -R-Antagonisten	4 sehr selten
Noscapin	Opioide/Opiate	4 sehr selten
Topiramat	Antiepileptica	4 sehr selten
Amlodipin	Antiarrhythmica	5 selten
Chinin	Antiprotozoica	5 selten
Dobutamin	Sympathomimetica	5 selten
Gabapentin	Antiepileptica	5 selten
Methamphetamin	Psychostimulantia	5 selten
Methorphan	Opioide/Opiate	5 selten
Pentobarbital	Barbiturate	5 selten
Primidon	Barbiturate	5 selten

Substanz	Stoffgruppe	Häufigkeit
Trometamol	Acidose-therapeutica	5 selten
Alprazolam	Benzodiazepine	6 selten
Atenolol	Antiarrhythmica	6 selten
Metronidazol	Nitroimidazol-Antibiotica	6 selten
Oxcarbazepin	Dibenzazepine	6 selten
Phenytoin	Antiepileptica/Antiarrhythmica	6 selten
Tiaprid	Neuroleptica	6 selten
Amisulprid	Neuroleptica	7 selten
Dosulepin	Dibenzazepine	7 selten
Hydroxyzin	Antihistaminica	7 selten
Olanzapin	Neuroleptica	7 selten
Etomidat	Narcotica	8 selten
Levetiracetam	Antiepileptica	8 selten
Lorazepam	Benzodiazepine	8 selten
Propyphenazon	Nicht-opioide Analgetica	8 selten
Chlorprothixen	Neuroleptica	9 selten
Doxepin	Dibenzazepine	9 selten
Trimethoprim	Antibiotica	9 selten
Phenacetin	Nicht-opioide Analgetica	10 sporadisch
Phenobarbital	Barbiturate	10 sporadisch
Levomepromazin	Neuroleptica	11 sporadisch
Naproxen	Nicht-opioide Analgetica	11 sporadisch
Temazepam	Benzodiazepine	11 sporadisch
Bromazepam	Benzodiazepine	12 sporadisch
Diclofenac	Nicht-opioide Analgetica	12 sporadisch
Meprobamat	Anxiolytica	12 sporadisch
Zolpidem	Tranquilizer	13 sporadisch
Clozapin	Neuroleptica	15 sporadisch
Fluoxetin	Antidepressiva	16 sporadisch
Ecstasy	Design Drugs	18 sporadisch
Metoprolol	Antiarrhythmica	20 sporadisch
Lamotrigin	Antiepileptica	21 sporadisch
Metamizol	Nicht-opioide Analgetica	21 sporadisch
THC	Cannabinoide	23 sporadisch
Venlafaxin	Antidepressiva	23 sporadisch
Amphetamin	Sympathomimetica	25 sporadisch
Metoclopramid	Antiemetica	26 sporadisch
Diphenhydramin	Antihistaminica	27 sporadisch
Sertralin	Antidepressiva	31 sporadisch
Ketamin	Narcotica	34 sporadisch

Substanz	Stoffgruppe	Häufigkeit
Mefenaminsäure	Nicht-opioide Analgetica	34 sporadisch
Ibuprofen	Nicht-opioide Analgetica	36 sporadisch
Amitriptylin	Dibenzazepine	38 sporadisch
Quetiapin	Neuroleptica	44 sporadisch
Trazodon	Antidepressiva	47 sporadisch
Atropin	Parasympatholytica	49 sporadisch
Carbamazepin	Antiepileptica	49 sporadisch
Methadon	Opioide/Opiate	58 häufig
Prothipendyl	Neuroleptica	59 häufig
Codein	Opiate	61 häufig
Midazolam	Benzodiazepine	62 häufig
Flunitrazepam	Benzodiazepine	70 häufig
Mirtazapin	α_2 -Rezeptor-Antagonisten	72 häufig
Tramadol	Opioide/Opiate	72 häufig
Lidocain	Localanaesthetica/Antiarrhythmica	87 häufig
Diazepam	Benzodiazepine	91 häufig
Paracetamol	Nicht-opioide Analgetica	92 häufig
Citalopram	Antidepressiva	100 sehr häufig
Cocain	Tropane/Lokalanaesthetica	122 sehr häufig
Oxazepam	Benzodiazepine	159 sehr häufig
Morphin	Opioide/Opiate	472 extrem häufig

Dass diese Aufstellung die reale Situation widerspiegelt, zeigt ein Vergleich mit den Aufzeichnungen diverser Organisationen.

Es konnte eine partielle Korrelation mit den Angaben der Krankenkassen und Suchtgiftexperten festgestellt werden, die in einem Vortrag der Österreichischen Apothekerkammer vom 31.5.2012 präsentiert wurden:

Derzeit gäbe es laut Statistiken etwa 10-12.000 Opiatabhängige in Wien.

2011 waren 8660 davon in Substitutionsbehandlung mit Kosten von etwa € 17 Mio/Jahr; 3600 von ihnen beziehen Benzodiazepine als Beikonsum, was weitere Kosten von ungefähr € 1 Mio/Jahr verursacht.

Seit Jahren bleibe die Zahl der Patienten konstant, aber die Kosten

steigen, inadäquate Dosiserhöhung oder Verschreiben kleinerer Packungen sei der Grund.

Der Beikonsum fokussiere sich meist auf Flunitrazepam (Somnubene®), Rohypnol®) und/oder Oxazepam (Praxiten forte)®, Anxiolit (forte)®), aufgrund deren günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften. Es sind sog. „kurze Benzodiazepine“: mit kurzer Anflutungszeit (das bedeutet, sie bereiten dem Konsumenten einen willkommene „Flash“), aber auch kurzer Halbwertszeit. Weiters würden andere Benzodiazepine wie Bromazepam (Lexotanil®), Clonazepam (Rivatriol®), Diazepam (Valium®) und Alprazolam (Xanor®) eingenommen und am Schwarzmarkt weitergegeben, wie aus gesammelten Erfahrungsberichten über Rezeptfälschungen hervorgeht. Gefälschte Rezepte betreffen demnach außer Benzodiazepinen auch ähnlich wirkende Tranquilizer wie Zolpidem (Ivadal®).

Die Krankenkasse, die laut Vortragenden die meisten Fälschungen zu verbuchen hat, ist die Oberösterreichische Gebietskrankenkasse. Als Substanzen werden meist Substitol® ret. Kapseln vor Codidol und magistral verarbeitetem Methadon eingesetzt. Originalpräparate aus dem Psychopharmakabereich, die ebenfalls häufig auf gefälschten Rezepten aufscheinen, sind Xanor® (Alprazolam), Psychopax® (Diazepam) oder Alprazolam Genericon® (Alprazolam).

Laut Suchtgiftverordnung gilt ein Suchtgiftrezept als gefälscht, wenn das vorliegende Rezept nicht den Vorschriften entspricht, etwa auch bei falscher Handhabung der Suchtgiftvignette. Der Apotheker darf auf ein nicht sachgemäß ausgeführtes Suchtgiftrezept kein Suchtmittel abgeben. Auch wenn er die Fälschung nicht erkennt, trägt er dafür die Verantwortung. Bei erkannter Fälschung besteht eine umgehende Meldepflicht.

Neben der Suchtmittelverordnung gibt es die Psychotropenverordnung; diese Rezepte sind einfacher zu fälschen und die Präparate unterliegen nicht einer so strengen Buchführung.

2.2. Grundlagen der HPLC

Die High-Performance Liquid Chromatography ist eine Variante der instrumentellen Analytik und eine Weiterentwicklung der früheren High Pressure LC, die nicht nur zur qualitativen und quantitativen Analyse, sondern auch präparativ genutzt werden kann.

Die Grundlage ist die Verteilung der Komponenten zwischen einer stationären und der mobilen Phase aufgrund der Polaritäten der Phasen und der jeweiligen Affinität der Substanzen zu diesen Phasen.

Für die „Normalphasen-HPLC“ ist die stationäre Phase polar (Kieselgel) und apolare Lösungsmittel wie beispielsweise Alkane, Esther oder Ether sind die mobile Phase. In der apolaren mobilen Phase führen auch geringe Mengen an Wasser zu unstabilen Verteilungsverhältnissen.

Bei der „Reversed-Phase-HPLC“ (RP-HPLC) besteht die stationäre Phase aus meist mit Alkylketten modifiziertem Kieselgel und ist somit apolar. Die mobile Phase besteht aus dem polaren wässrigen Fließmittelanteil „A“ und einem organischen Anteil „B“. A und B können in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt sein, man kann auch optional ein Puffersystem verwenden. Das Mischungsverhältnis von A und B kann bei der RP-Chromatographie konstant sein (isokratische Elution) oder während eines Laufes linear bzw. stufenweise geändert werden (Gradientenelution). Das Trennergebnis wird von vielen Parametern beeinflusst, darunter Temperatur, Art und Zusammensetzung der Laufmittel (Polarität! Elutionskraft gemäß der elotropen Reihe) oder Art der Oberflächenmodifikation.



Abb. 1: Eluotrope Reihe mit relativer Polarität zur Verwendung bei der RP-HPLC

(http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/mob_phase/beisp/elureihem63ht0900.vscml.html; Stand: 13.10.2012)

Zur Detektion werden in der HPLC verschiedene spektroskopische Detektionsprinzipien eingesetzt. Eine Detektion mit UV-Detektor (wie in dieser Arbeit) oder Diodenarraydetektor erfordert bessere Trennungen, da co-eluierende Substanzen voneinander nicht zu unterscheiden sind. Außerdem müssen chromophore Strukturen vorhanden sein.

Mit einem nachgeschaltetem Massenspektrometer, für den die vorliegenden Methoden optimiert wurden, kann mit weniger guten Trennungen gearbeitet werden, da die überlagernden Analyten durch ihre Massenfragmente charakterisiert sind und so selektiv identifiziert werden können.

2.2.1. Säulen-Trennmaterialien

Nicht nur das verwendete Material, sondern auch die Packung und die Korngröße sowie die Homogenität der Partikel haben Einfluss auf das Trennergebnis.

Neben den klassischen und häufig für die RP-HPLC verwendeten, gut dokumentierten C18 bzw. C8-modifizierten Silica Materialien finden sich eine Vielzahl an Oberflächenmodifikationen, die als stationäre Phase verwendet werden können. Hierbei werden die meisten freien Silanolgruppen mit unterschiedlichen apolaren Molekülen derivatisiert, z.B. mit Alkylhalogenen wie Fluoralkanen, bzw. kommen auch aromatische Gruppen und Aalkyl-Modifikationen, wie PhenylHexyl, in Frage.

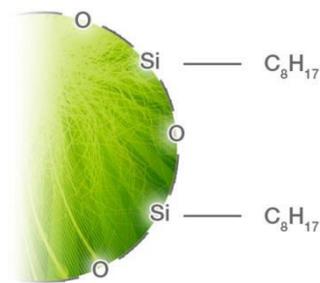


Abb. 2: Modifikation von Kieselgel mit PhenylHexyl-Gruppen am Beispiel vom Luna-Material von Phenomenex (www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/PhenylHexyl; Stand: 17.10.2012)

Jedes oberflächenmodifizierte Trenn-Material zeigt verschiedene Vor- und Nachteile, wie u.a. Veränderung der Selektivität, Polarität und auch pH-Bereich.

Beim Core-Shell-Material bestehen die einzelnen Partikeln aus einem soliden Kern, der von einer porösen Hülle umgeben ist. Das soll den Vorteil der verminderten Diffusion durch Verringerung der porösen Schicht, in der sich die für die Diffusion verantwortlichen Kapillaren befinden, bringen.

2.2.2. Puffersystem

Da die auszuarbeitende Methode für eine Koppelung an einen Massen-

spektrometer optimiert wurde, musste darauf Rücksicht genommen werden, dass für diese Detektion nicht alle Puffersysteme als mobile Phase geeignet sind. Die gewählte Kombination von Ameisensäure und Ammoniumformiat deckt einen pH-Bereich ab, der gute Trennbedingungen für die Analyten in der klinischen und forensischen toxikologischen Untersuchung ermöglicht und ist gleichzeitig für eine MS-Koppelung kompatibel.

2.2.3. Flussrate

Die optimale Flussrate in der HPLC ergibt sich aus der Zahl der zu erreichenden theoretischen Trennstufen (Van-Deemter-Kurve). Diese ist umso größer, je geringer die Trennstufenhöhe ist. Die Zahl der Trennstufen konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Auswertung der Chromatogramme mit dem verwendeten Chromeleon-Integrations-Programm ermittelt werden, auf deren Basis Van-Deemter-Kurven erstellt werden konnten. Diese zeigen graphisch den Verlauf der nichtlinearen Veränderung der Zahl an theoretischen Böden und lässt die zu bevorzugende Fließgeschwindigkeit ablesen (Abb. 3).

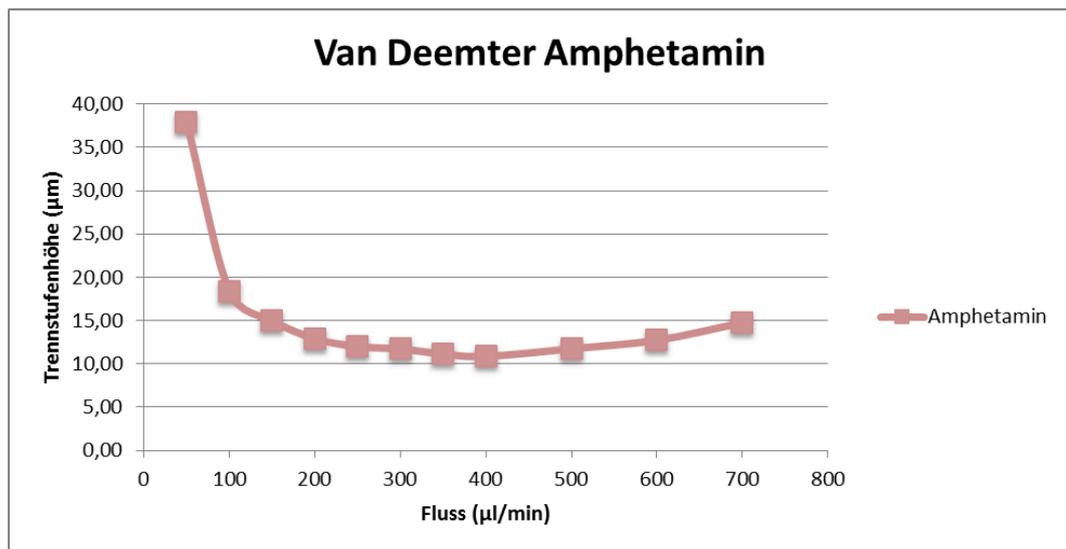


Abb. 3: Ermittelte Van-Deemter-Kurve für Amphetamin unter Verwendung einer Phenomenex PhenylHexyl-Säule

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Trenn-Parameter wie Temperatur, Fließgeschwindigkeit, Ionenstärke der wässrigen Phase und Variation der organischen Phase einzeln und unabhängig voneinander unter **Beibehaltung der restlichen Bedingungen** geändert. Nicht variiert wurden pH-Wert und das Puffersystem.

2.3. Detektion mittels Massenspektrometrie

In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde die massenspektrometrische Detektion für die Analyse der im Testmix vorhandenen Substanzen bereits abgedeckt₁.

Grundsätzliches Prinzip der Massenspektrometrie ist das Ionisieren und Fragmentieren von Molekülen zu charakteristischen Bruchstücken, aus denen nach Massenanalyse rechnerisch die abgespaltenen funktionellen Gruppen ermittelt werden können. Je nach Ionisationstechnik entsteht ein Mutterionenpeak, mit Massenzahl +1 oder -1 der Molekülmassenzahl. In den aufgenommenen Massenspektren werden beobachtete Masse gegen die Ladung aufgezeichnet.

Für diese Art selektiver Detektion sind auch weniger gute Trennung der Einzelkomponenten ausreichend, da durch die charakteristischen Fragmente zwei sich überlagernde Peaks unterschieden und identifiziert werden können.

2.4. Bedeutung dieser Arbeit

Für die HPLC toxischer Verbindungsklassen in der klinischen und forensischen Toxikologie gibt es noch immer zu wenig etablierte und erprobte Methoden für die Auftrennung einer Vielzahl von Substanzen.

Daher wurde in dieser Arbeit eine Trennmethode für ein Modellgemisch von Substanzen etabliert, das ein möglichst breites Spektrum chemischer Charakteristika von vorhandenen Analyten abdeckt. Die Methodenentwicklung durchlief die Testung verschiedener stationärer Phasen und Parameter, die die Trennung beeinflussen, wie Temperatur, Ionenstärke, Flussrate und organische Phase.

3. Spezieller Teil

3.1. Verwendete Geräte und Materialien

Als HPLC-System wurde ein Dionex UltiMate 3000 mit Ultimate 3000 RS Pumpe, Ultimate 3000 RS Autosampler WPS 3000 RS, Ultimate 3000 RS Column Compartment TCC 3000 RS mit eingebautem Degasser verwendet und zur Detektion wurde ein Dionex UVD170U UV-Detektor eingesetzt.

Der Testmix stammt aus den Beständen des Departments für Gerichtsmedizin der Medizinischen Universität Wien, Bereich Forensische Toxikologie, ebenso alle anderen untersuchten Substanzen, mit Ausnahme von GHB und Cocain, die vom Team CheckIt! bereitgestellt wurden.

Der Testmix enthielt folgende Komponenten: Benzoylecgonin, Amphetamin, Cocain, Codein, Diazepam, Morphin, Doxepin, Metoprolol, Methadon, THC, THC-Carbonsäure, Paracetamol, Phenobarbital, Salicylsäure und Ibuprofen.

Da dieser Mix nicht frisch zubereitet wurde, sondern bereits einige Zeit unter Kühlung gelagert worden war, hatte sich Cocain bereits teilweise in Benzoylecgonin umgewandelt und konnte in der ursprünglichen Form bei der Methodenentwicklung nicht berücksichtigt werden. Beim nachträglich mit Cocain gespickten Mix konnten jedoch befriedigende Ergebnisse erzielt werden.

Die Lösungsmittel stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Acetonitril, Ch # SZBC121SV und Isopropanol, Ch # SZBC858AV) sowie Merck (Methanol, Ch # I653907); der Puffer wurde mit Salz der Firma Sigma-Aldrich (Ammoniumformiat, Ch # 50H0207) hergestellt.

Die ersten Tests des Systems und der Methode wurden mit einer bereits verwendeten TF Hypersil Gold PFP Säule, 10x3mm, 3µm durchgeführt, die aufgrund der schlechten Performance allerdings nicht zur Optimierung der Methode verwendet werden konnte.

Die folgenden Experimente wurden daher mit einer Phenomenex Ki-

netex PFP 50 x 3 mm, 2,6 µm durchgeführt, als weitere Säule wurde eine TF Accucore PFP 100 x 2,1 mm, 2,6 µm herangezogen.

Schließlich wurde auch eine Phenomenex Luna PhenylHexyl 150 x 3 mm, 3 µm (**kein** Core-Shell-Material!) getestet.

3.1.1. Säuleneigenschaften laut Herstellerangaben

Phenomenex bezeichnet seine Kinetex-Serie als Meilenstein unter den Innovationen im Bereich der HPLC-Säulenteknik. Sie wird beworben mit erhöhter Produktivität, verbesserten chromatographischen Ergebnissen und deutlicher Kostenersparnis durch verringerten Fließmittelverbrauch. Ebenso soll der Methodentransfer auf diese Säulen unkompliziert sein, wobei die relativen Porengrößen berücksichtigt wurden. Die Säule mit 2,6 µm Porengröße wird insbesondere als vielseitig einsetzbare Verbesserung für HPLC als auch für UPLC bezeichnet, die eine vergleichbare Performance wie eine 2 µm Säule mit porösen Kernen liefern soll, doppelte Performance einer 3 µm und dreifache einer 5 µm Säule porösen Materials, bei gleicher Methode, kürzeren Säulen, weniger Fließmittelverbrauch und einem Ergebnis, das dem einer UPLC vergleichbar sein soll. Der Rückdruck soll geringer sein, die Analyse schneller und der Durchsatz höher³.

Thermo Fisher hingegen verspricht bei Anwendung der Accucore PFP-Säule eine schnelle Trennung bei guter Auflösung und Sensitivität, geringeren Rückdruck, sodass eine UPLC-Pumpe nicht nötig sei, eine Alternative zum C18-Material in Selektivität, einheitliche Selektivität für nicht halogenierte polare und extra Retention für halogenierte Komponenten⁴.

Luna von Phenomenex wird als eines der führenden Säulenmaterialien weltweit beworben. Mit einem breiten Spektrum an skalierbarer Selektivität soll sie auch gut für präparative Aufreinigung geeignet sein. Der weitgefächerte pH-Bereich soll ausschlaggebend für lange Lebensdauer und Methodenflexibilität sein. Von schneller LC bis hin zu Präparation und Massenaufreinigung könne diese Säule verwendet werden.

3.1.2. Substanzen des Testmixes

3.1.2.1. Amphetamin

Amphetamin wirkt indirekt sympathomimetisch als Analogon des Phenethylamins über eine Vermehrung der Dopamin- und Noradrenalinausschüttung und so zentral stimulierend. In der ausgearbeiteten Statistik scheint es als sporadisch vorkommendes Gift auf. Es wird in der Drogenszene vor allem als ‚Speed‘, oder auch als ‚Pep‘ gehandelt.

Chromatographisch relevante Eigenschaften: basisch und lipophil

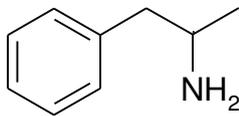


Abb. 4: Amphetamin

3.1.2.2. Benzoylecgonin

Als Abbauprodukt des Cocains spielt Benzoylecgonin eine bedeutende Rolle, da es nicht nur im Körper, sondern auch durch Lagerung aus Cocain durch Esterspaltung entsteht. Deswegen wurde es in der Statistik unter Cocain zusammengefasst und als sehr häufig eingestuft.

Die chromatographischen Eigenschaften sind basisch und hydrophob.

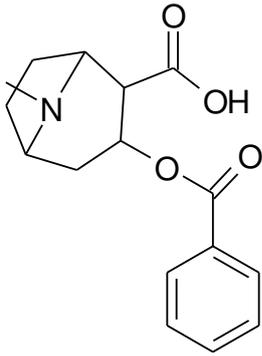


Abb. 5: Benzoylecgonin

3.1.2.3. Cocain

Cocain gehört zu den Tropanalkaloiden. Die Wirkung ist stimulierend auf das zentrale Nervensystem, euphorisierend und lokalanästhetisch. In der Drogenszene wird es intranasal oder parenteral angewendet oder als „Crack“ geraucht, das man erhält, wenn man die freie Cocainbase mit Backtreibmittel verkocht.

Als Methyl ester ist es noch etwas hydrophober als Benzoylecgonin und ebenfalls basisch und hydrophob

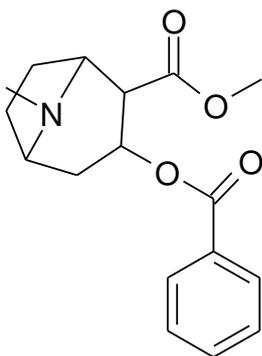


Abb. 6: Cocain

3.1.2.4. Codein

Ein häufig bei forensischen Untersuchungen vorkommendes Opiat, das vorrangig als zentraler Hustendämpfer verkauft wird, aber in hohen Dosen auch in Morphin metabolisiert wird und als solches seine gewünschte Wirkung entfaltet. Daher gibt es auch einen Schwarzmarkt für Codein. In Russland wird es als Ausgangsstoff für die synthetische Droge „Krokodil“ verwendet, aus dem Hydromorphon hergestellt wird, das in Österreich durch den liberalen Zugang zur Substitutionstherapie keine Rolle spielt. Verunreinigtes Hydromorphon verursacht im Körper schwerste Abbau- und Zerstörungsprozesse von Muskeln und anderen Geweben, was in Russland bei einer hohen Anhängigkeitsrate ein sehr großes Problem darstellt und dem Gesundheitssystem hohe Kosten verursacht.

Codein kann die zentral hustendämpfende Wirkung bei etwa zwei Prozent der Menschen nicht entfalten, da es nicht verstoffwechselt wird. Wegen der starken Lipophilie, die beim Verarbeiten von Codein ungünstig ist, ist als Reinsubstanz das Hydrochlorid oder das Phosphat gängig. Neben der Reinsubstanz, die in Apotheken vor allem Hustensäften beigemischt wird, war Codein lange als Teilkomponente in OTC-Schmerzmitteln zu finden. Heute ist das nicht mehr zulässig.

Auch Codein ist wieder eine lipophile Base.

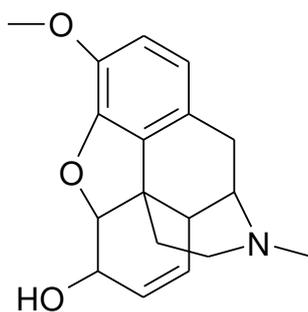


Abb. 7: Codein

3.1.2.5. Diazepam

Dieses Benzodiazepin und sein Metabolit Oxazepam, der selbst als Arzneispezialität im Handel ist, sind beide in der Statistik als häufig bzw. sehr häufig verzeichnet. Es gehört zu den langwirksamen Benzodiazepinen und wirkt, wie alle Psychopharmaka dieser Klasse, anxiolytisch, sedierend, zentral muskelrelaxierend und antikonvulsiv. Früher als nur allzu bekannte Spezialität Valium®, das das vorherige „schwarzmarktführende“ Mozambin® abgelöst hatte, wurde es in den letzten Jahren von Drogenszeneangehörigen weniger verwendet, da das kurzwirksame Flunitrazepam leicht zugänglich war. Seit dem 15. Dezember 2012 wird Flunitrazepam nur mehr auf Rezepte mit Suchtgiftvignette verschrieben und abgegeben. Diazepam sowie Oxazepam und andere langwirksame Benzodiazepine sollen so auf Wunsch der Verantwortlichen des Gesundheitssystems wieder in den Vordergrund rücken, was aus toxikologischer Sicht durch Gefahr der Kumulation wenig Sinn macht, aber eventuell das Craving reduzieren kann. Trotzdem ist auch bei diesen Vertretern der Substanzklasse die Gefahr der Tachyphylaxie und der Abhängigkeit gegeben.

Oxazepam und Diazepam sind vorwiegend als Tabletten im Handel, aber auch als Ampullen. Diazepam ist auch in Zäpfchen- oder Tropfenform verfügbar.

Es ist stark lipophil und hat saure Eigenschaften.

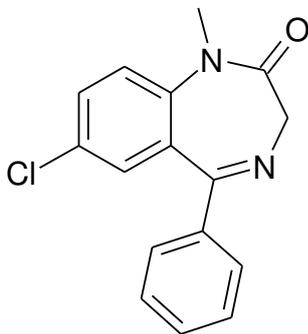


Abb. 8: Diazepam

3.1.2.6. Doxepin

Aus der Gruppe der Dibenzazepine wurde Doxepin für den Testmix gewählt. Es kommt bei den toxikologischen Untersuchungen selten vor. Es gehört zu den Trizyklischen Antidepressiva und ist ein NSRI. Die sedierende Wirkung ist vor allem zur Unterdrückung der Craving-Symptome bei Suchtkranken erwünscht und wird auch in diesem Rahmen verschrieben. Oft wird es auch in der Schmerztherapie eingesetzt. In Österreich gibt es einige Monopräparate, die allerdings nicht sehr häufig verkauft werden. Die Verbindung ist stark apolar und basisch.

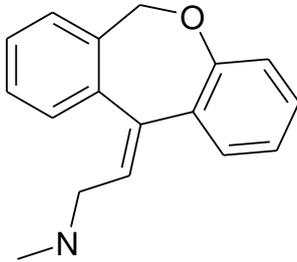


Abb. 9: Doxepin

3.1.2.7. Ibuprofen

Ein sporadisch bei Todesfällen gefundenes Nicht-Steroidales Antirheumatikum ist Ibuprofen. Durch unselektive COX-Hemmung entfaltet es die typische Dreifachwirkung Analgesie, Fiebersenkung und Entzündungshemmung, sowie auch die typischen Nebenwirkungen wie Blutungen im Magen-Darm-Trakt, die durch das Fehlen der gefäßprotektiven Prostaglandine verursacht werden. In Österreich wird Ibuprofen oft verkauft und gegen jegliche Art von Schmerzen eingenommen.

Die kindgerechten Darreichungsformen wie Säfte und Zäpfchen steigern die Konkurrenz zu Paracetamolpräparaten, die in der Pädiatrie Anwendung finden. Generell wird es gut vertragen.

Die COX-bedingten Nebenwirkungen treten im Regelfall schwächer und seltener auf als bei anderen unselektiven COX-Hemmern.

Ibuprofen ist sauer und apolar.

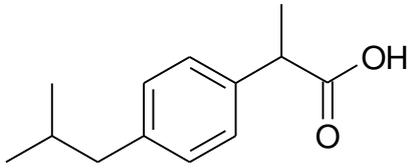


Abb. 10: Ibuprofen

3.1.2.8. Methadon

Methadon ist ein synthetisches Opioid und kommt bei Vergiftungsfällen häufig vor. Es wird zur Drogensubstitution in Apotheken abgegeben. Da für jeden Abhängigen die Dosis individuell eingestellt wird, nahm man lange an, dass das trinkbare Methadon-Zuckersirup-Wasser-Gemisch am Schwarzmarkt unattraktiv sei, weil außerdem das so genannte Kicking-in fehlt, doch Daten der Krankenkassen zeigen das Gegenteil. Das Suchtpotential von Methadon ist sogar etwas höher als das von Heroin, weshalb die Entwöhnung aus dem Ersatzprogramm eine neuerliche Hürde ins normale Leben für ehemalige Heroinabhängige darstellt. Eine Sondervariante stellt das Levomethadon, auch L-Polamidon genannt, dar. In Deutschland seit jeher anstelle von racemischem Methadon angewendet, findet es seit einigen Jahren auch in Österreich Verwendung. Der Vorteil ist, dass man nur mehr die halbe Dosis, verglichen mit dem Racemat, benötigt.

Methadon ist eine lipophile Base.

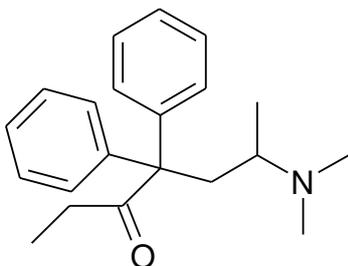


Abb. 11: Methadon

3.1.2.9. Metoprolol

Die breit angewandte Gruppe der β -Blocker wird im Testmix durch Metoprolol vertreten. Es taucht bei forensisch untersuchten Todesfällen sporadisch und meistens bei älteren Personen auf. Wie allen selektiven β_1 -Adrenozep-torblockern kommt Metoprolol eine große Bedeutung zu, da es neben der Hypertensions- und Antiarrhythmicabehandlung auch zur Therapie der Herzinsuffizienz und der koronaren Herzkrankheit und zur Prophylaxe der Migräne eingesetzt wird. Vor allem bei eingeschränkter Nierenfunktion ist Metoprolol anderen β -Blockern wie z.B. Atenolol vorzuziehen, da es hepatisch eliminiert wird.

Es ist lipophil und basisch.

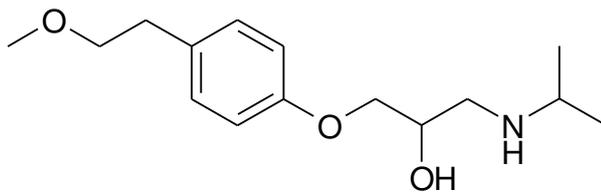


Abb. 12: Metoprolol

3.1.2.10. Morphin

Die forensisch wohl wichtigste Komponente im Testmix stellt Morphin dar. Das Opiat ist die meistvertetene Substanz in der erstellten Statistik und mit 472 Fällen extrem häufig.

Es ist ein Alkaloid aus dem Presssaft des Schlafmohns und wurde schon in der Antike gegen Schmerzen eingesetzt. Abseits der schmerzstillenden Wirkung ist Morphin vor allem für die durch Bindung am μ -Opioidrezeptor verursachte Euphorie beliebt.

Das Hauptproblem am Drogenschwarzmarkt stellen die retardierten Morphine dar, die als Substitutionstherapie ursprünglich als zweite Wahl nach Methadon z.B. bei einer Unverträglichkeit, gedacht waren, gegenwärtig aber den Status als wichtigstes und beliebtestes Ersatzmittel

genießen, das auch häufig als Wochenbedarf den Suchtpatienten mitgegeben wird. Nicht selten werden die erhaltenen Kapseln verkauft, um mit dem Erlös Heroin erstehen zu können.

Bedenklich ist die Methode der intravenösen Verwendung der Kapseln: die Hilfsstoffe der Retardpellets stellen ein tödliches Risiko bei parenteralen Verabreichung durch mögliches Verstopfen der Blutwege dar. Eine andere, häufige, aber weniger gefährliche Art der Einnahme ist Aufkochen in Flüssigkeit und anschließendes Trinken.

In Verbindung mit Todesfällen tritt Morphin mittlerweile wesentlich häufiger auf als Heroin bzw. dessen Metabolit 6-Monoacetylmorphin.

Eine weitere Wirkung von Morphin und dessen Derivaten ist Obstipation, daher erfolgt eine Anwendung bei unspezifischen Durchfällen jeglicher Genese, wobei hierfür vor allem das synthetische Derivat Loperamid verwendet wird, das keine zentrale Wirkung als Opioid hat und motilitätshemmend wirkt.

Die Morphinbase ist eher hydrophil als lipophil, dennoch schwerlöslich in Wasser.

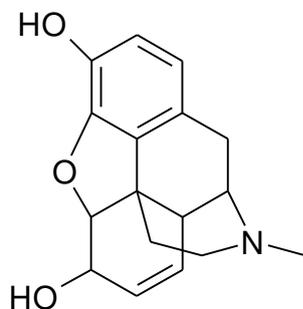


Abb. 13: Morphin

3.1.2.11. Paracetamol

Als eines der meistverkauften und bedeutendsten Schmerzmittel aus der Gruppe der Nicht-opioiden Analgetica ist Paracetamol, auch Acetaminophen genannt, im Testmix unumgänglich. Es ist kein Nicht-steroidales Antirheumatikum und hat somit auch keine Dreifachwirkung, sondern wirkt

nur analgetisch und antipyretisch. Obwohl es schwach sauer ist, reichert es sich nicht im entzündeten Gewebe an und hat keine antiphlogistische oder antiinflammatorischen Eigenschaften. Durch die relative COX-2-Selektivität treten für NSAR übliche gastrointestinale Beschwerden nicht auf und es ist gut verträglich. Die bevorzugte Anwendung vor allem auch in der Pädiatrie birgt allerdings einige Risiken.

Die Hepatotoxizität wird häufig unterschätzt und durch Überdosierung kann es schnell zu Leberzellschädigung und akutem Leberversagen kommen. Auch im Erwachsenenalter ist der Umgang mit Paracetamol oft fahrlässig, vor allem in Verbindung mit Alkoholkonsum. In den USA tritt ein Großteil der Vergiftungen durch falschen oder übermäßigen Konsum von Acetaminophen auf. Die breite Palette an nicht parenteralen Darreichungsformen reicht von Zäpfchen und Suspensionen für Säuglinge, Kleinkinder und Schulkinder über Tabletten und Filmtabletten, bis hin zu Sachets mit Sublingualpellets mit fast sofortigem Wirkungseintritt. Paracetamol ist das Standardpräparat bei leichten Schüben der rheumatoiden Arthritis, Migräneattacken mit und ohne Aura und vor allem bei unspezifischen fiebrigen Infekten mit Schmerzzuständen.

Das schwach saure Acetaminophen ist lipophil und am besten in absolutem Ethanol löslich.

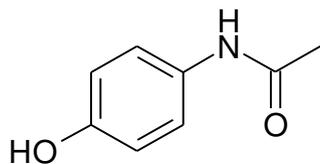


Abb. 14: Paracetamol

3.1.2.12. Phenobarbital

Sporadisch findet man bei Todesfällen noch Barbiturate, im Testmix durch Phenobarbital vertreten, die Tendenz ist sinkend. „Zu Beginn des Jahrtausends hat man am Karlsplatz noch die abgelaufenen Barbiturate bekommen“, so ein Szeneangehöriger. Heute sind die Barbitursäurederi-

vate als Arzneispezialitäten obsolet und durch Benzodiazepine ersetzt worden, vorallem wegen des hohen Suchtpotentials. Unter manchen dubiosen Internetadressen sind sie allerdings noch zu bekommen, vorallem als Suiziddroge, alleine oder als Unterstützung gegen die körpereigenen Fluchreflexe und Krampfanfälle bei anderen Todesarten, wie etwa Ertrinken oder Ersticken.

Phenobarbital ist eine schwache Säure und eher hydrophil.

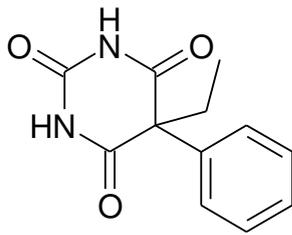


Abb. 15: Phenobarbital

3.1.2.13. Salicylsäure

Nur mehr vorwiegend äußerlich wird die entzündungshemmende, schmerzstillende und fiebersenkende sowie keratolytisch auf die Haut wirkende Salicylsäure angewendet, teilweise wird sie illegal oder im Ausland auch erlaubt als Konservierungsstoff eingesetzt. Salicylsäure selbst wurde früher aus Weidenrinde (*Salix*) gewonnen und gegen jegliche Art von Schmerz, auch innerlich, eingesetzt. Wegen der erheblichen Nebenwirkungen, vor allem auf die Magen-Darm-Schleimhäute durch einerseits Hemmung der Prostaglandinsynthese und des gewebeschützenden Prostacyclins und andererseits durch die magenreizende eigene Wirkung wird sie als solche nicht mehr eingesetzt, sondern vor allem in Form ihrer Pro-Drug, der Acetylsalicylsäure, oder in Form von Weidenrindentee, wo die nativen Inhaltsstoffe als Glykoside vorkommen und erst im Darm gespalten werden.

Salicylsäure zählt zu den Nicht-steroidalen Antiphlogistika und wird sowohl gegen Schmerzen, Fieber und Entzündungen als auch zur Vermeidung der Thrombozytenaggregation angewendet.

Die oben genannte Acetylsalicylsäure wird im Körper binnen kürzester Zeit zur Salicylsäure metabolisiert und zählt zu den meistverkauften Wirkstoffen, das Originalpräparat Aspirin® wurde bereits gesetzlich 1899 geschützt.

Das Molekül ist sauer und polar.

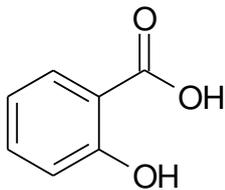


Abb. 16: Salicylsäure

3.1.2.14. Tetrahydrocannabinol (THC)

Der stimmungsaufhellende, halluzinogene Inhaltsstoff der Cannabispflanze wird sporadisch bei Todesfällen nachgewiesen. Δ^9 -THC, auch als Dronabinol bekannt, findet sich nicht oder nur in geringen Mengen im Faserhanf.

THC bindet an die Cannabinoidrezeptoren und löst so Euphorie und Analgesie via Transmitterfreisetzung aus. Viel mehr ist über den Wirkmechanismus des THC noch nicht bekannt.

Dronabinol wird in Einzelfällen bei Krebspatienten als analgetischer Arzneistoff eingesetzt.

Die Apotheke erhält nach Vorweisen des Rezeptes ein Kit, in dem sich der Wirkstoff, ein Abgabegefäß nebst genauer Beschriftung und Überkarton befindet, bereits vorbereitet zum Verarbeiten in einer magistralen Rezeptur.

Allgemein wird Cannabis oder Haschisch in Österreich illegal geraucht, in Form eines Joints oder in einer Wasserpfeife, in Backwaren verarbeitet

und selten injiziert, da das lipophile THC bei parenteraler Verabreichung nur schlecht resorbiert wird.

Die Abhängigkeit ist psychischer Natur, doch können bei Langzeitanwendern auch körperliche Symptome auftreten.

THC ist lipophil und sauer.

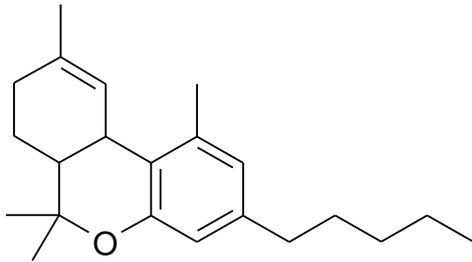


Abb. 17: Tetrahydrocannabinol

3.1.2.15. Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure (THCA)

Die THC-Carbonsäure ist ein Abbauprodukt des Dronabinols und bleibt im Körper bis zu 40 Tage nachweisbar. In der Statistik ist es unter THC als sporadisch verzeichnet.

Sie ist hydrophiler als der Ausgangsstoff, und ebenfalls sauer.

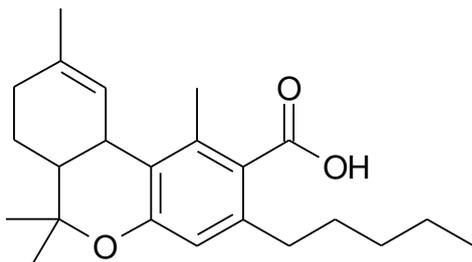


Abb. 18: Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure

3.1.3. Ausgewählte Einzelsubstanzen

3.1.3.1. Amitriptylin

Sporadisch findet man das zu den tricyclischen Antidepressiva gehörende NSRI Amitriptylin bei Todesfällen. Die Substanz wird auch zur Migräneprophylaxe oder gegen chronische rheumatische Beschwerden eingesetzt. Diese Substanz wurde ausgewählt, um eine analytische Erfassung zu testen, weil das Wirkprofil denen der Komponenten in der Mischung ähnlich ist.

Ein hydrophobes, basisches Molekül.

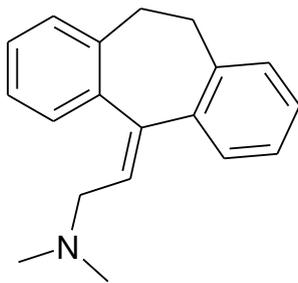


Abb. 19: Amitriptylin

3.1.3.2. γ -Hydroxybuttersäure (GHB)

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit im Körper (knapp zwölf Stunden) und der geringen Größe sowie der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Gamma-Hydroxybuttersäure gibt es keine Aufzeichnungen über die Häufigkeit dieser Substanz bei Todesfällen. Sie wird sowohl als „Liquid Ecstasy“ als Upper angewendet, als auch als Vergewaltigungsdroge in Verbindung mit Alkohol eingesetzt, wobei die schnelle Elimination aus dem Körper des Opfers den Tätern in die Hände spielt. Noch vor einigen Jahren hat man zu diesem Zweck Flunitrazepam eingesetzt, das, ähnlich GHB, das Opfer willen- und wehrlos machen sollte, doch ist das durch Zusatz

von Patentblau V in den Filmtabletten von Rohypnol® und Somnubene® nun nicht mehr möglich, ohne eine grünlichblaue Farbe im Basisgetränk zu erhalten.

Für die forensische Analytik GHB sehr interessant, da mit konventionellen Methoden ein Nachweis kaum möglich ist. Einerseits ist es aufgrund der geringen Größe und Polarität analytisch schwer fassbar, andererseits müsste die Probennahme relativ kurz nach Anwendung erfolgen. GHB hat auch keine analytisch erfassbaren Metaboliten, da es rasch und vollständig abgebaut wird.

Über den Wirkmechanismus ist man sich noch nicht ganz im Klaren, sicher ist allerdings die Wirkung auf einen GABA-Kanal.

Die Wirkungen und Nebenwirkungen sind ähnlich denen der Benzodiazepine, bei Überdosierung kann zu Atemdepression und folglich zum Tode führen.

Die Substanz wird als Alcover® als Entwöhnungsmedikament bei Alkoholismus eingesetzt und als Lösung verabreicht.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte GHB nicht detektiert werden. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), das hätte aber den Umfang dieser Arbeit überstiegen.

Das kleine Molekül ist hydrophil und sauer.

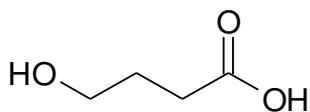


Abb. 20: γ -Hydroxybuttersäure

3.2. Ausgangspunkt der Methodenoptimierung

Aufgrund Herstellerangaben der ersten verwendeten Säule (Hypersil PFP von ThermoFisher) wurden folgenden Bedingungen gewählt:

Wässrige Phase: 0,1 % Ameisensäure, 10 mM Ammoniumformiat (A)

Organische Phase: Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure (B)

Zu Beginn wurde ein linearer Gradient getestet: 10 % B – 95 % B mit einer Äquilibrierungszeit am Ende von 1,5 Minuten und einer Anstiegszeit von 12 Minuten.

Es wurde mit einer Flussrate von 0,4 ml/min bei Säulendurchmesser von 3 mm gestartet.

3.3. Experimente und Workflow

Zur Auswertung der Experimente wurde der Retentionsfaktor berechnet; Bezugspunkt war der „Injektionspeak“, der erste sichtbare Peak im Chromatogramm. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$k = (t_R - t_0)/t_0$$

k = Retentionsfaktor

t_r = Retentionszeit einer Substanz

t_0 = Retentionszeit des Injektionspeaks

3.3.1. Trennung an einer Phenomenex Kinetex-Säule

Von den unter Punkt 3.2. (Seite 32) beschriebenen Bedingungen ausgehend wurde nun immer **ein Parameter** geändert, um ein möglichst stabiles System zu gewährleisten.

Es wurde getestet, welche Auswirkungen eine Änderung der Flussgeschwindigkeit, der Ionenstärke, der Temperatur und des Fließmittels bei der eingesetzten Säule hat.

Die Standardbedingungen waren 10 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser und Isopropanol mit 0,1 % Ameisensäure als mobile Phase, einer Flussrate von 400 μ l/min und 40°C im Säulenofen.

3.3.1.1. Änderung der Ionenstärke

Im ersten Schritt erfolgte eine experimentelle Ermittlung, wie sehr und

in welcher Form sich die Trennung und die Peak Performance bei Ionenstärken von 5, 10, 30, 50 und 100 mM verändert. Interessant war auch, ob und wie stark der pH-Wert bei der jeweiligen Ionenstärke variiert. Das pH-Messgerät zeigte eine geringe Variation von maximal $\pm 0,1$. Da aber keine Tendenz zu erkennen war (z.B. höhere Ionenstärke – höherer pH oder umgekehrt), kann von einer Geräteungenauigkeit ausgegangen werden.

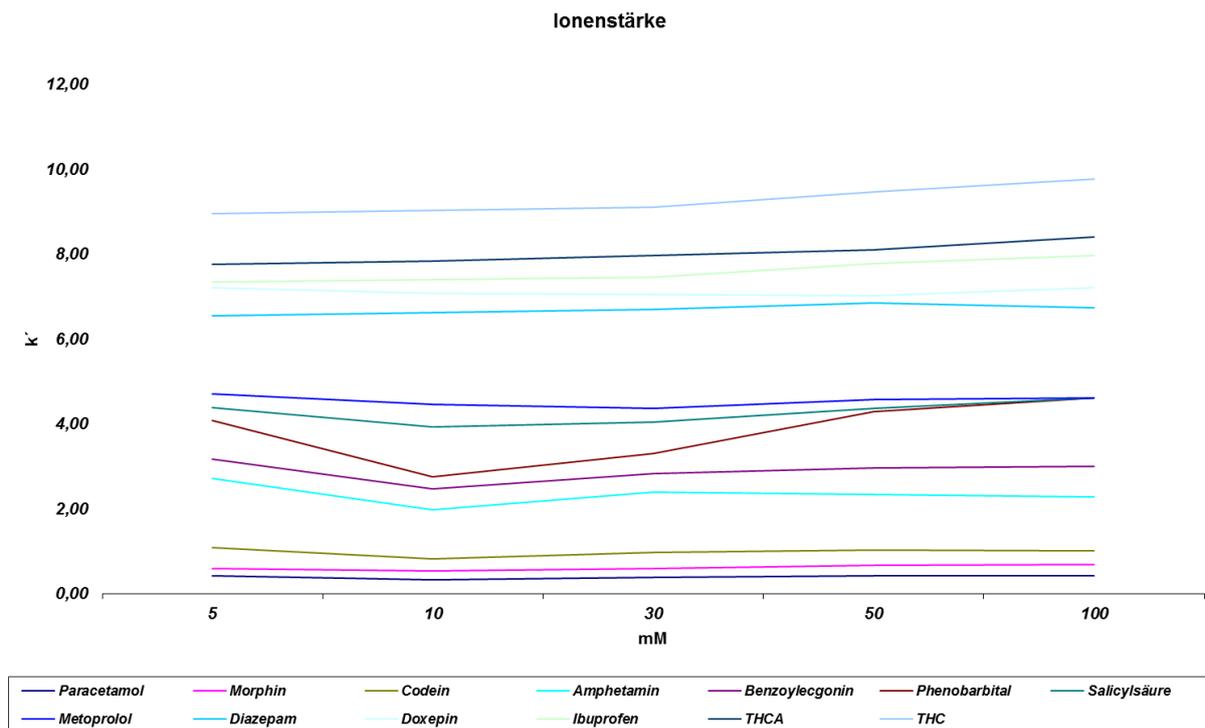


Diagramm 1: Abhängigkeit der k' -Werte von der Ionenstärke der wässrigen Phase A auf der Kinetex-Säule mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Isopropanol mit 0,1 % Ameisensäure (B), 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate und 40°C im Säulenofen.

Die Auswertung des Diagramms zeigt, dass die vorgeschlagene Ionenstärke von 10mM für eine Trennung nahezu optimal ist. Eine etwas bessere Trennung der Einzelkomponenten könnte eine Ionenstärke von 8mM bringen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde bei Verwendung der ThermoFisher Accucore-Säule eine 8mM wässrige Phase eingesetzt.

3.3.1.2. Variation der Fließgeschwindigkeit

Bei Säulen mit 2 mm I.D. wurde von 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ ausgehend nun die Flussrate in 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ -Schritten erhöht, bis hin zum maximal möglichen Druck für die Säule (Voreinstellung durch die Chromeleon®-Software: 600 bar.)

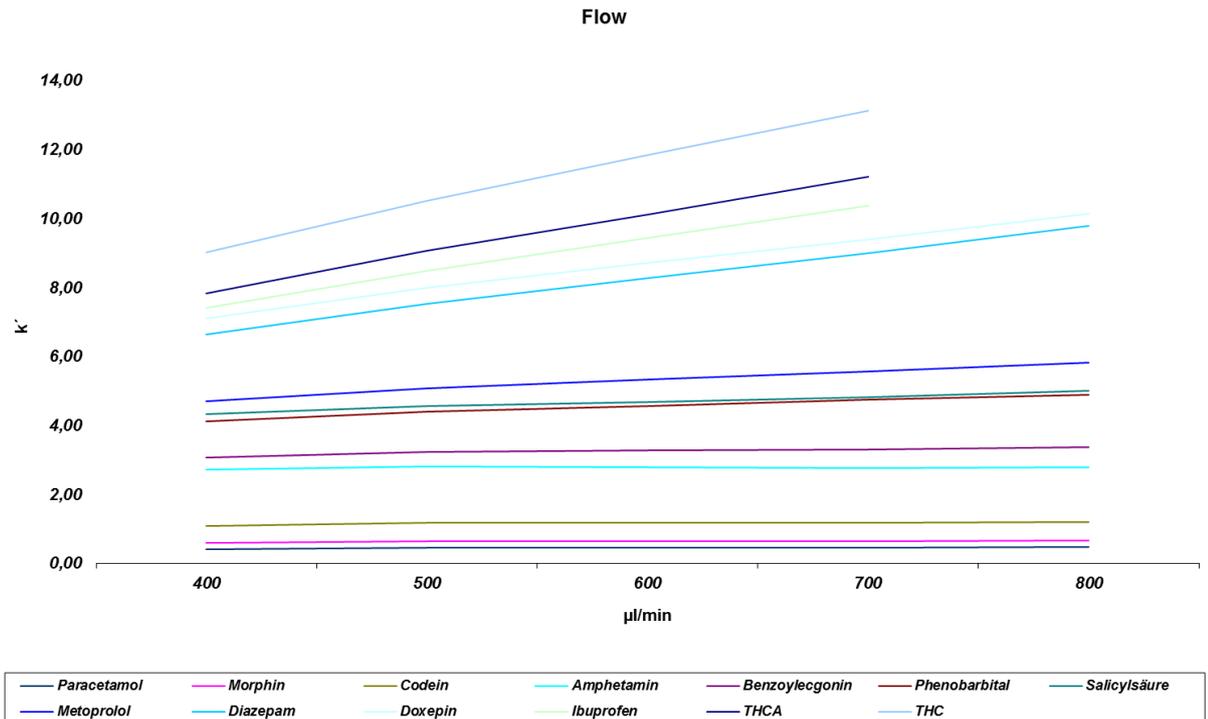


Diagramm 2: Veränderung der k' -Werte bei Änderung der Fließgeschwindigkeit auf der Kinetex-Säule mit 10 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Isopropanol mit 0,1 % Ameisensäure (B) und 40°C im Säulenofen.

Eine Erhöhung des Fließmittelstroms erbrachte keine Vorteile, wie etwa kürzere Laufzeiten. Außerdem zeigten die Peaks bei höherer Fließgeschwindigkeit stärkeres Tailing. Das Fehlen der später eluierenden Substanzen in der Auswertung ist durch den Gradienten erklärbar: durch die Erhöhung des Isopropanol-Anteils stieg der Druck im System stark an, da die Viskosität höher ist als von Wasser. Das vollautomatische HPLC System stoppte den Batch bei Überschreitung der Voreinstellungen (s.o.), weswegen nur Komponenten, die mit hohem Wasseranteil eluiert wurden, noch ausgewertet werden konnten.

3.3.1.3. Änderung der Temperatur

Gestartet wurde bei 30°C, da dies einer realistischen Arbeitstemperatur ohne aktive Kühlung entspricht. Experimente wurde mit dieser Säule bis 80°C durchgeführt, da bei höheren Temperaturen die Stabilität der Säule nicht mehr garantiert ist.

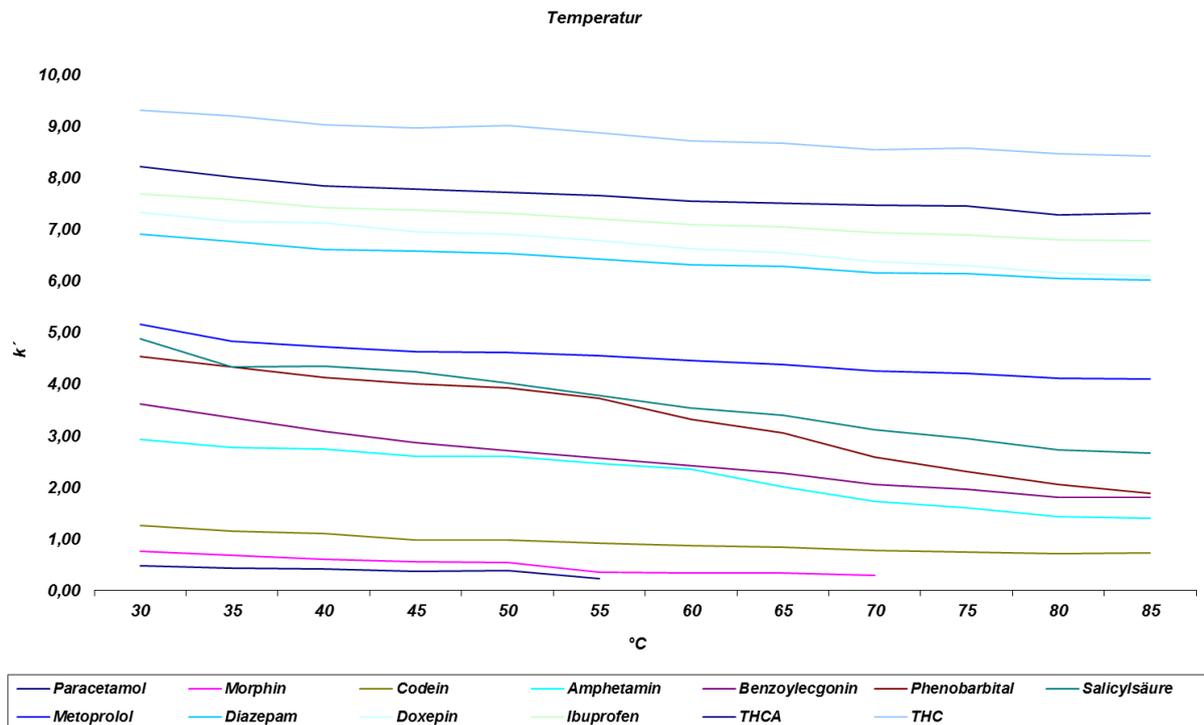


Diagramm 3: Abhängigkeit der Retentionsfaktoren von der Temperatur auf der Kinetex-Säule mit 10 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Isopropanol mit 0,1 % Ameisensäure (B) und 400 µl/min Flussrate.

Wie das Diagramm erkennen lässt, sind die Verläufe der Linien nicht parallel. Dieses Ergebnis ist vermutlich durch Auswirkungen von pH-Effekten begründet, die auch das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Komponenten im Temperatur-Verlauf erklären.

Nach dem Resultat des Tests wurde bei einer Temperatur um 40°C das beste Trennvermögen beobachtet.

3.3.1.4. Fließmittelvergleich

Obwohl mit Isopropanol in den ersten Experimenten gute Trennungen erzielt wurden, ist es als Lösungsmittel nicht ideal. Der starke Druckanstieg bei verhältnismäßig flachen Gradienten als auch der absolute hohe Druck ist ein Negativum.

Möglicherweise könnte eine Mischung von Acetonitril und Isopropanol, beispielsweise im Verhältnis 3:1, den hohen Druck vermeiden. Allerdings wurde dies in diesen Experimenten nicht getestet. Nach den Ergebnissen dieses Versuchs wurde im Weiteren nur mehr mit Acetonitril gearbeitet.

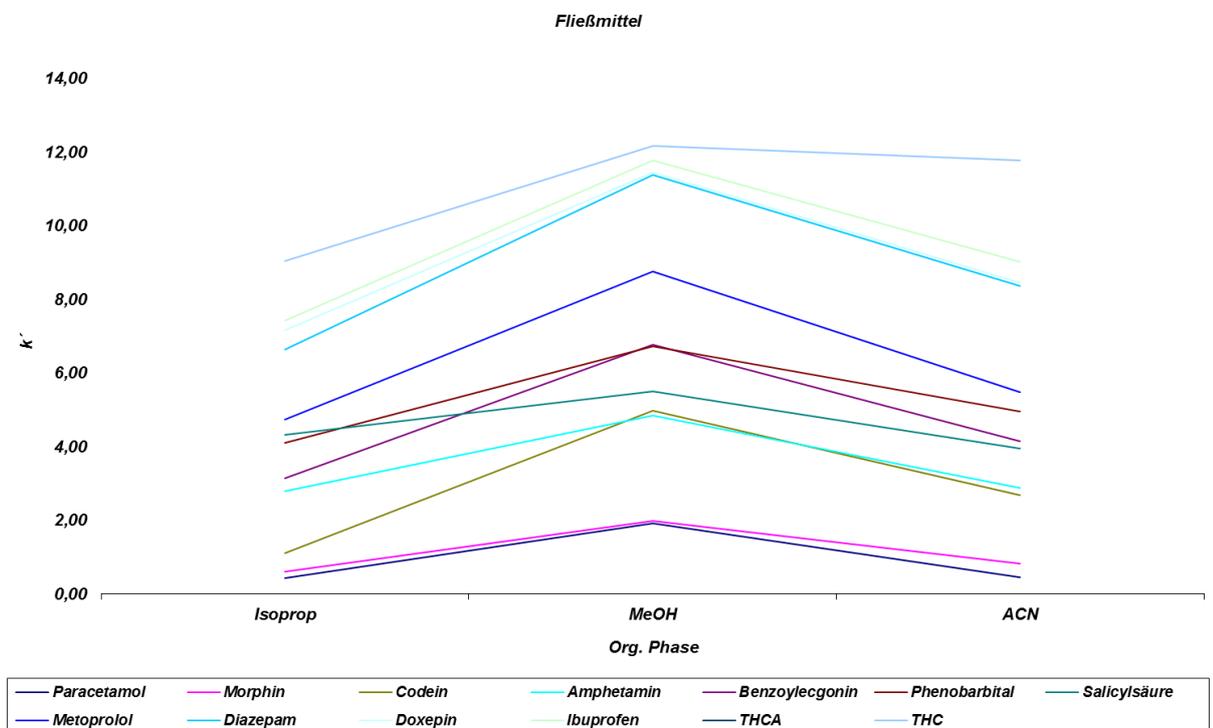


Diagramm 4: Retentionsfaktoren bei den angeführten organischen Laufmitteln (B) mit 0,1% Ameisensäure auf der Kinetex-Säule mit 10 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), 400 µl/min Flussrate und 40°C im Säulenofen.

Methanol konnte keine überzeugende Trennleistung zeigen und der Retentionsfaktor jeder Komponente war mit Methanol deutlich höher ist als bei den beiden anderen Laufmitteln.

3.3.2. Trennung an einer ThermoFisher Accucore-Säule

Generell muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass diese Säule für diese Anwendung als am besten geeignet schien. Allerdings war in den Experimenten geringe Peak-Performance, schlechte Reproduzierbarkeit und starkes Tailing der Peaks zu beobachten.

Die Standardbedingungen waren 8 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B), 270 µl/min Flussrate und 40°C im Säulenofen.

Da mit der Kinetex-Säule eine nahezu optimale Ionenstärke von 8 mM ermittelt wurde, erfolgte kein Versuch zur Variation der Ionenstärke. Es wurden alle Experimente mit 8 mM wässriger Phase und Acetonitril durchgeführt.

3.3.2.1. Variation der Fließgeschwindigkeit

Da der Säulendurchmesser mit 2,1 mm kleiner war als bei der Kinetex-Säule, wurde auch die Flussrate verringert, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Beginnend mit 270 µl/min wurde die Flussrate bis 390 µl/min, in Schritten von 30 µl/min, erhöht, um den Optimalbereich einzugrenzen.

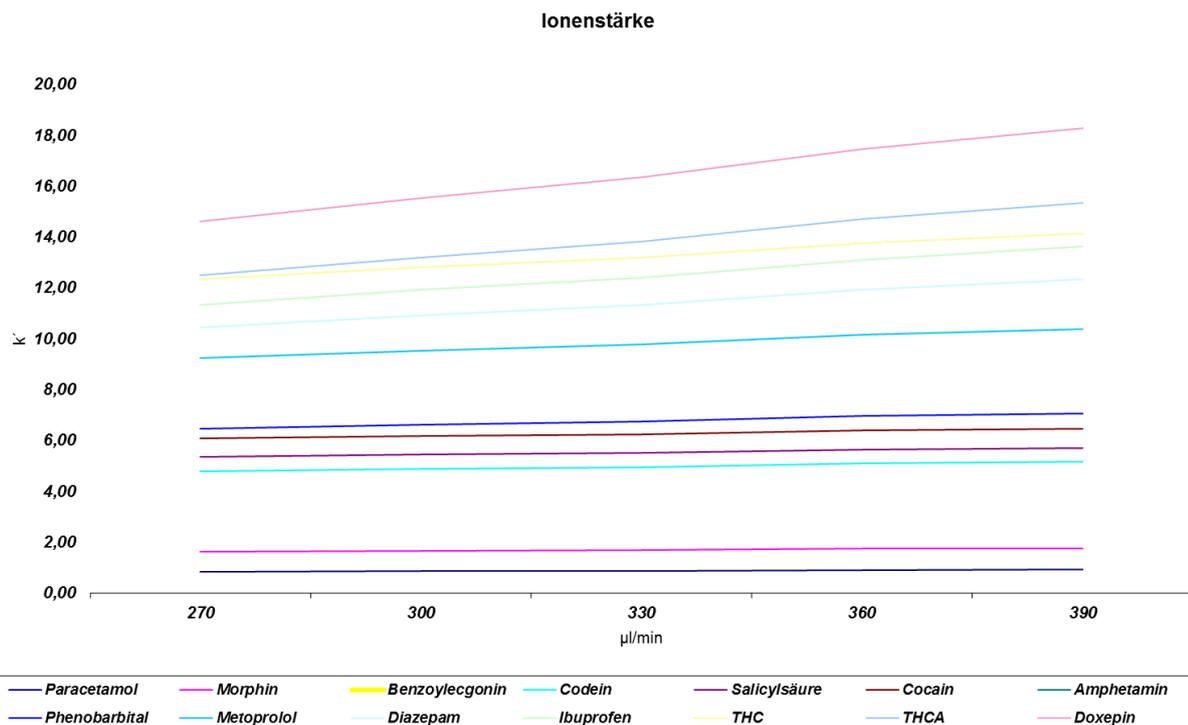


Diagramm 5: Entwicklung des Retentionsfaktors bei Erhöhung der Fließmittelgeschwindigkeit auf der Accucore-Säule mit 8 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B) und 40°C im Säulenofen.

Wie das Diagramm zeigt, war auch hier kein Vorteil aus einer höheren Flussrate zu erzielen, ohne dass man den Gradienten oder andere Bedingungen ändert. Es bestanden keine großen Unterschiede in der Trennselektivität innerhalb dieses Bereiches.

3.3.2.2. Änderung der Temperatur

Etwas abgeändert wurde das Temperaturexperiment wie oben (3.3.1.3., Seite 35) beschrieben durchgeführt, um ideale Arbeitsbedingungen zu ermitteln. Da bei der Kinetex-Säule der Bereich zwischen 40°C und 50°C für die Trennung am geeignetsten schien, wurden die Temperaturen 43°C, 46°C, 49°C, 52°C und 55°C getestet.

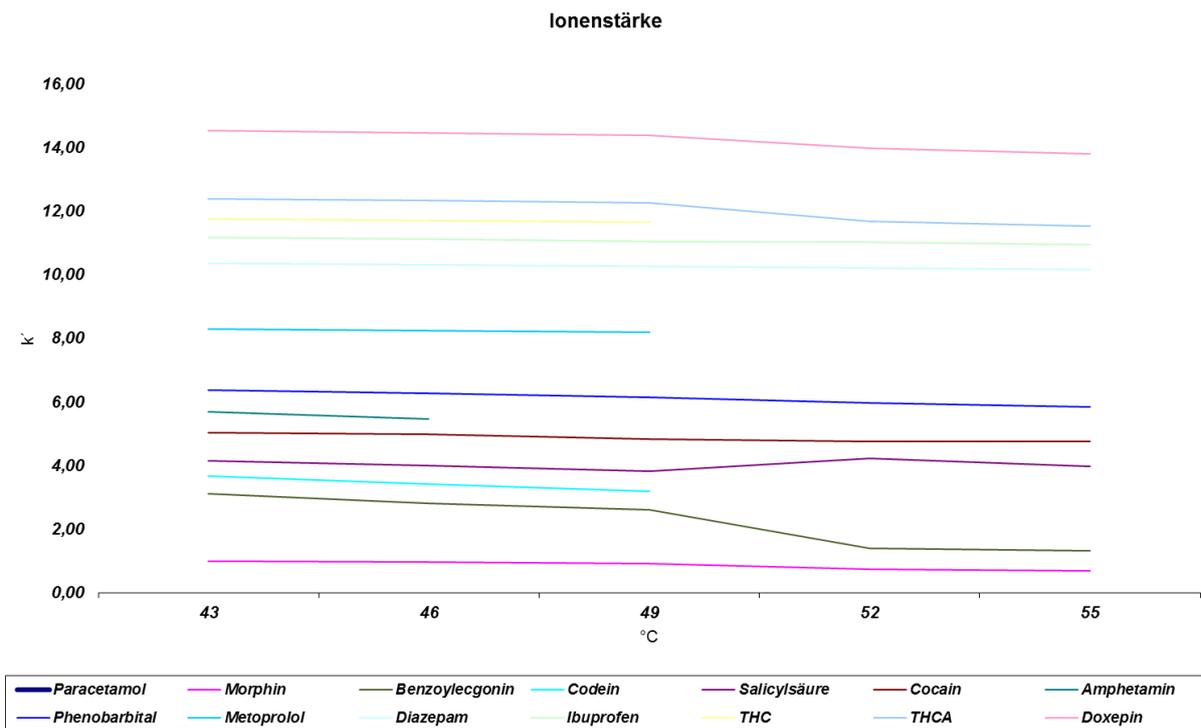


Diagramm 6: Veränderung des k' bei Änderung der Temperatur auf der Accucore-Säule mit 8 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B) und 270 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate.

Die unvollständigen Linien zeigen wieder, dass manche Komponenten in einigen Chromatogrammen nicht auswertbar waren, da die Peaks zu starkes Tailing zeigten oder überlappten. Bei 52°C kam es bei allen Komponenten bis auf Salicylsäure zu einer Erniedrigung des Retentionsfaktors. Trotzdem änderte sich die Trennleistung kaum. Da aber die Performance der Peaks bei den höheren Temperaturen schlechter wurde, ist eine Temperatur von 40-43°C optimal.

Da die Accucore-Säule ein PFP-Core-Shell-Material ist, wurde auch der Fließmittelvergleich weggelassen, da nicht zu erwarten war, dass sich das Verhalten bei vergleichbarem Material zur ersten Säule stark ändern würde, bzw. da Acetonitril am geeignetsten war, wurde mit diesem optimiert.

3.3.3. Trennung an einer Phenomenex Luna

Diese PhenylHexyl-Säule wurde bereits seit einiger Zeit im Labor durch das Team CheckIt! eingesetzt, in einer HPLC-Anwendung, die dieser Methode nicht unähnlich ist. Die Säule wurde auf Anfrage des Teams mit derselben Testmischung getestet, mit dem Unterschied, dass das organische Standardfließmittel in diesem Fall Acetonitril und nicht Isopropanol war. Die hohe Hydrophobizität des Materials ließ eine wünschenswerte Selektivität versprechen.

Da es sich hierbei **nicht** um eine Core-Shell-Säule handelt, wurden wieder alle Experimente wie zu Beginn bei der Kinetex-Säule durchgeführt, um einen direkten Vergleich der Trennqualität erhalten zu können.

Die Standardbedingungen waren 10 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B), 400 µl/min Flussrate und 40°C im Säulenofen.

3.3.3.1. Änderung der Ionenstärke

Es wurde wieder wässriges Fließmittel mit Ionen-Stärken von 5, 10, 30 und 50 mM hergestellt und der Testmix injiziert.

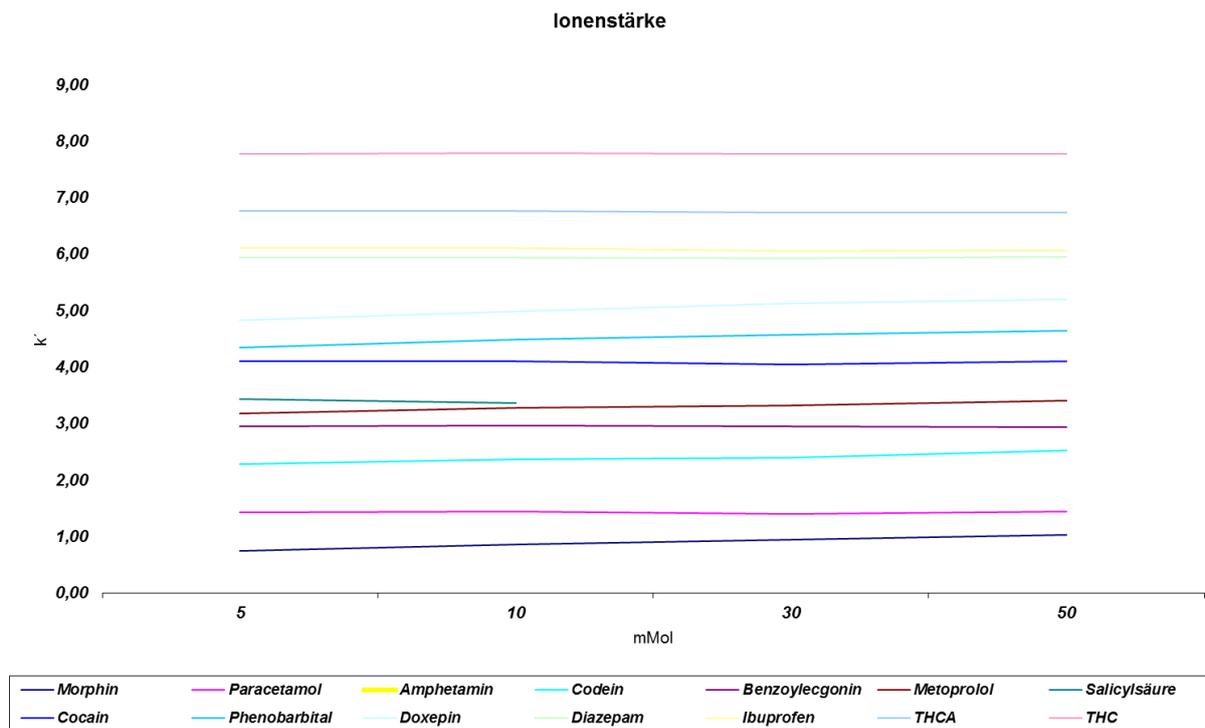


Diagramm 7: Abhängigkeit der k' -Werte von der Ionenstärke der wässrigen Phase A auf der PhenylHexyl-Säule bei 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B), 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate und 40°C im Säulenofen.

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen mit anderen Trennmaterialien waren hier erstaunlich wenige Selektivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Ionenstärken zu erkennen. Dennoch zeigte sich die beste Trennleistung im Bereich zwischen 5 und 10 mM.

3.3.3.2. Variation der Fließgeschwindigkeit

Die PhenylHexyl-Säule hatte den gleichen Durchmesser (3 mm) wie die Kinetex-Säule. Demnach wurde die Flussrate mit der erwarteten größten Zahl an theoretischen Böden mit etwa 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ berechnet.

In diesem Versuch wurde mit 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ begonnen und in 100 μl -Schritten bis 900 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesteigert. Das bei der ersten Säule aufgetretene Problem mit zu hohem Druck war nicht zu erwarten, da in diesen Experimenten Acetonitril anstelle von Isopropanol eingesetzt wurde.

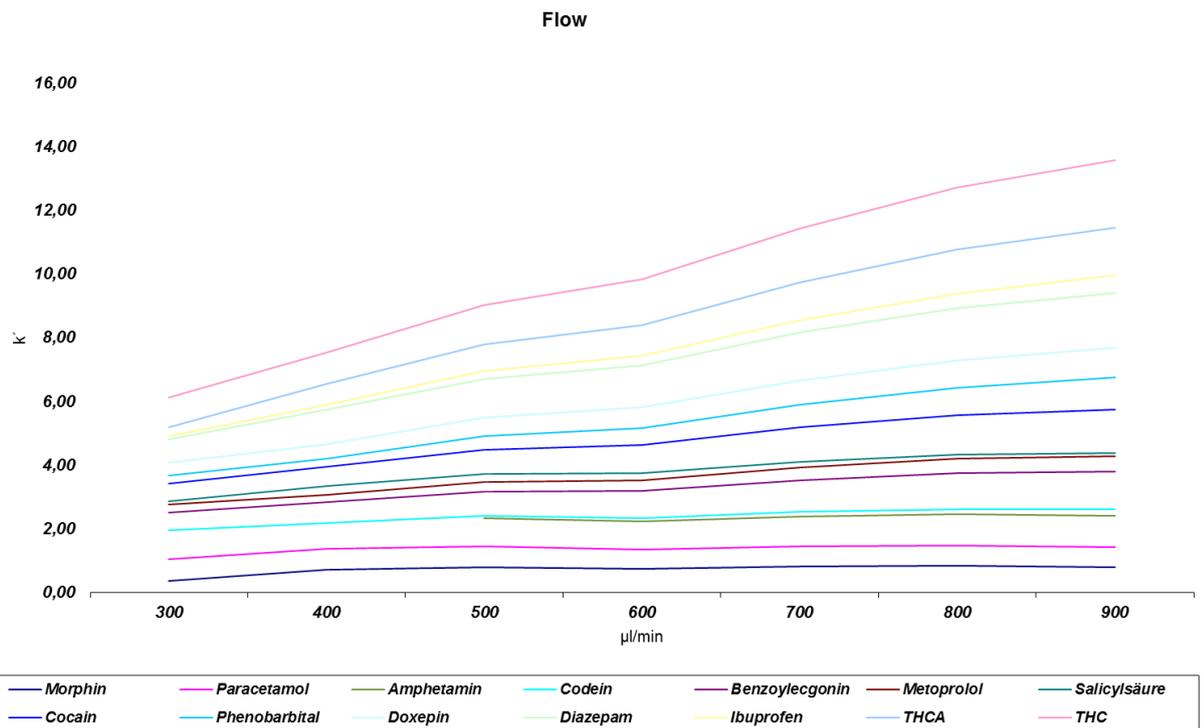


Diagramm 8: Entwicklung des Retentionsfaktors bei Erhöhung der Fließmittelgeschwindigkeit auf der PhenylHexyl-Säule mit 10 mM Ammoniumformiat, 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B) und 40°C im Säulenofen.

Hier ist gut zu erkennen, dass die Steigerung der Retentionsfaktoren fast parallel verlaufen; die bessere Trennung des Amphetamin-Peaks von Codein wäre ein Argument für eine höhere Flussrate, die sich zwischen 600 und 700 $\mu\text{l}/\text{min}$ bewegen sollte. Bei noch höheren Raten muss man auf das Zusammenrücken der Peaks von Metoprolol und Salicylsäure achten.

3.3.3.3. Änderung der Temperatur

Da die Säule bis maximal etwa 70°C stabil ist, wurden die Versuche nur bis 60°C durchgeführt. Es wurde eine Temperatur von 25°C als Startpunkt gewählt und in jedem Lauf um 5°C erhöht.

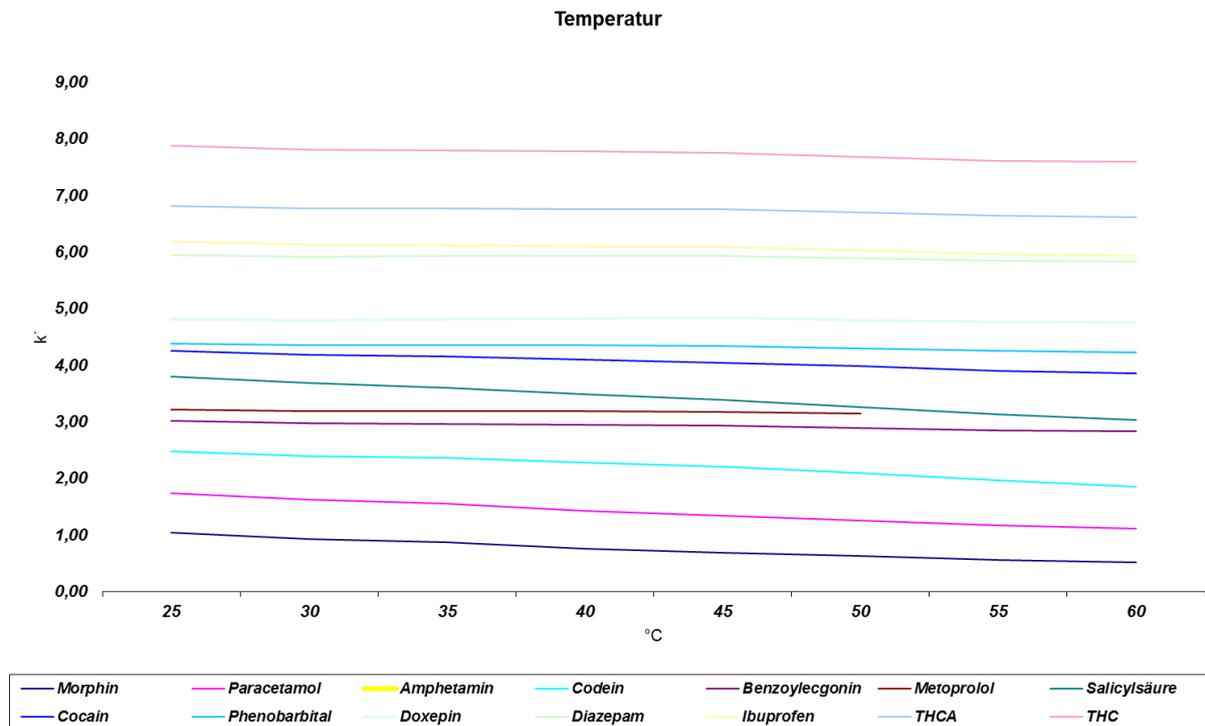


Diagramm 9: Veränderung des k' bei Änderung der Temperatur auf der PhenylHexyl-Säule mit 10 mM Ammoniumformiat, 0,1% Ameisensäure in Wasser (A), Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (B) und 400 μ l/min Flussrate.

Die optimale Temperatur bei dieser Säule lag zwischen 40 und 50°C, da hier die bestmögliche Trennleistung aller im Testmix befindlichen Komponenten erhalten wurde.

3.3.3.4. Fließmittelvergleich

Obwohl bei allen Experimenten an diese Säule Acetonitril verwendet worden war, wurden auch Methanol und Isopropanol als Laufmittel getestet. Die übrigen Bedingungen blieben gleich.

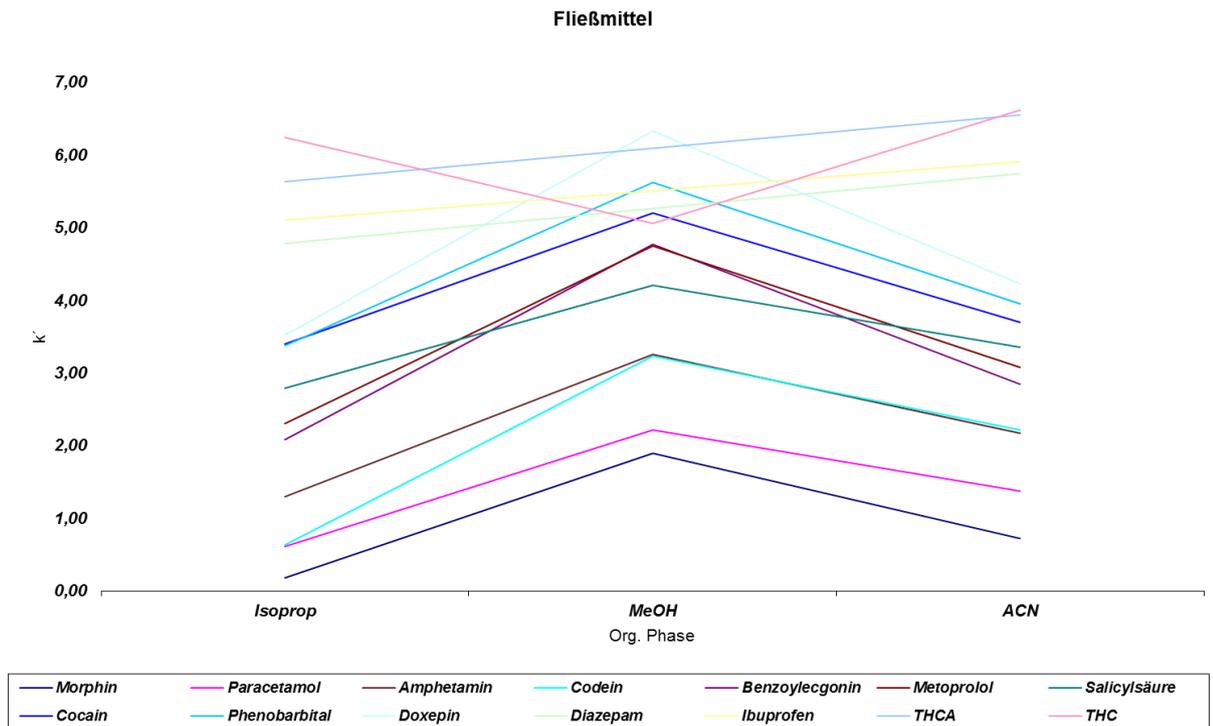


Diagramm 10: Retentionsfaktoren bei den angeführten organischen Laufmitteln (B) mit 0,1% Ameisensäure auf der Phenylhexyl-Säule mit 10 mM Ammoniumformiat, 0,1% Ameisensäure in Wasser (A), 400 µl/min Flussrate und 40°C im Säulenofen.

Eine unerwartete Entwicklung zeigte der Retentionsfaktor von THC bei Verwendung von Methanol. Entgegen dem Trend aller anderen Substanzen, bei denen der Retentionsfaktor unter Methanol größer ist, ist er bei THC deutlich niedriger.

4. Ergebnisse

4.1. Optimales Fließmittel

Die Selektivität von Isopropanol war zufriedenstellend und mit dem Gradienten 10-95 konnten alle Komponenten getrennt werden. Der Druckanstieg war für das verwendete System (der UltiMate 3000 ist auch als UPLC verwendbar) und die eingesetzten Säulen vertretbar.

Bei der Kinetex-Säule stellte sich im Vergleich allerdings Acetonitril als ein geeigneteres Fließmittel heraus. Methanol bot bei keinem der Experimente Vorteile gegenüber den anderen Lösungsmitteln.

Das verwendete Puffersystem Ammoniumformiat-Ameisensäure ist für die MS-Detektion gut einsetzbar und hat sich bereits für ähnliche Fragestellungen bewährt^{6,11,13,18,20}.

4.2. Optimale Säule

Alle verwendeten Säulen waren von hoher analytischer Qualität und für diese Fragestellung State Of The Art.

Von den getesteten Säulen konnte mit der Kinetex PFP-Säule von Phenomenex keine zufriedenstellende Trennung erzielt werden konnte, da in jedem Chromatogramm ein starkes Tailing der Peaks auftrat.

Die Accucore-Säule zeigte, verglichen mit der Kinetex-Säule, eine geringere Asymmetrie der Peaks (Durchschnitt 1,33 gegenüber 1,72), die PhenylHexyl-Säule hatte mit einem Durchschnittswert von 1,2 die geringste Asymmetrie.

Die Asymmetrie, berechnet nach der Formel

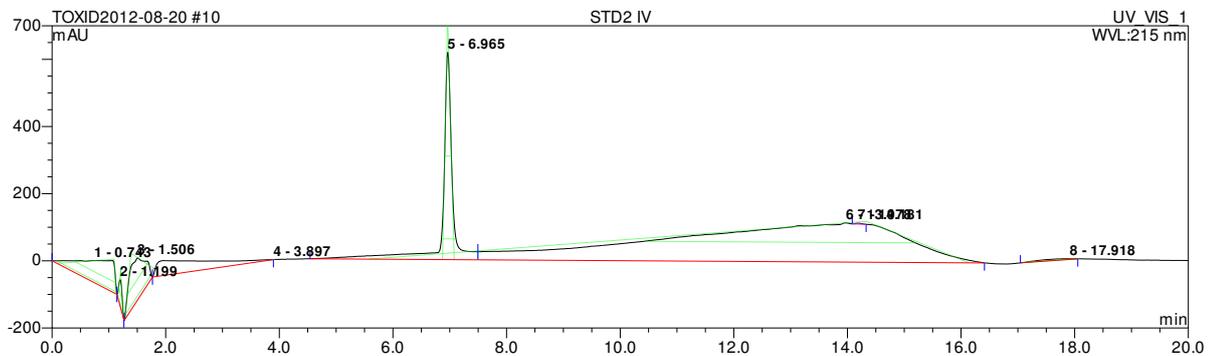
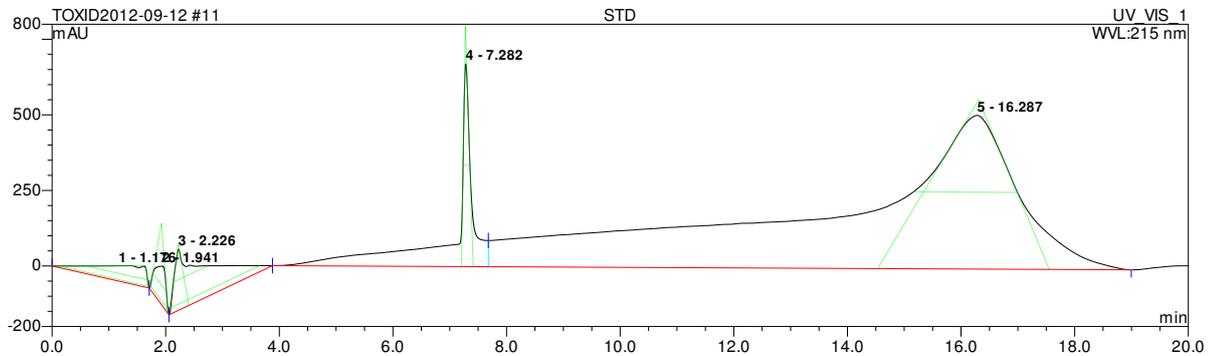
$$A = (RW_{5\%} + LW_{5\%}) / 2 * LW_{5\%}$$

A: Asymmetrie

RW_{5%}: rechte Peakbreite vom Maximum bei 5% Peakhöhe

LW_{5%}: linke Peakbreite vom Maximum bei 5% Peakhöhe

gemäß dem Europäischen und US-Amerikanischen Arzneibuch, ist eine dimensionslose Zahl, die in der Peakanalyse einen Vergleich der Tailing-Tendenz möglich macht soll.



Chromatogramme 1 und 2: Vergleich von Amphetamin auf der PhenylHexyl-Säule (oben) und der AccucorePFP-Säule (unten).

Auch bei der Reproduzierbarkeit (Tag zu Tag Vergleich) war die Phenyl-Hexyl-Säule überzeugender. Bei der Accucore-Säule gab es sowohl an verschiedenen Tagen ohne weitere Veränderung, als auch nach Herstellung eines neuen Puffers oder der Neuabfüllung des Standard-Testmixes Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit, die sich vor allem in leichter Variation der Retentionszeiten zeigten.

Das Auftreten von Systempeaks machte allerdings beim Auswerten der Chromatogramme aus Analysen an der PhenylHexyl-Säule einige Schwierigkeiten, da sie teilweise mit Substanzpeaks zusammenfielen bzw. bei Austestung der Fließmittelgeschwindigkeit an für Substanzen zu erwartenden Retentionszeiten auftraten und so eine Komponente vortäuschten.

Da für ähnliche Fragestellungen diese Säule regelmäßig in Gebrauch ist, lag eine Optimierung einer Methode für diese stationäre Phase nahe.

4.3. Optimale Fließmittelgeschwindigkeit

Bei dieser Optimierung wurde die vorgeschlagene Flussrate der ersten verwendeten Säule als Ausgangspunkt gewählt und bei jeder neuen Säule berechnet.

Die experimentell ermittelten Optimalflüsse stimmten mit der Van-Deemter-Kurve überein und mussten nicht variiert werden, da eine Veränderung ohne Variation des Gradienten keine Vorteile brachte.

Ein steilerer Anstieg des Gradienten würde eine Beschleunigung der Trennung ermöglichen, jedoch handelte es sich hier maximal um ein oder zwei Minuten, da der Gradient im Anfangsstadium der Methodenoptimierung in einigen Analysen ausgetestet worden war, um etwaige unbekannte Substanzen in einer Realsituation ebenso auftrennen zu können.

Ebenso muss man bei Erhöhung der Fließmittelgeschwindigkeit immer an einen Druckanstieg und an die Grenzen der Säule und des nachgeschalteten Detektors denken, daher ist eine Variation dieses Parameters mit der vorliegenden Methode nicht zu empfehlen.

4.4. Temperaturoptimum

Die Temperaturvariation von 25 bis 80 Grad hat gezeigt, dass die für die beschriebene Art von Substanzen am besten geeignete Temperatur um die 40 Grad liegt. Einige Gründe, warum sich eine Temperaturänderung derart auswirkt, sind die entstehenden pH-Effekte, die Veränderung des Löslichkeitsprodukts einiger Komponenten und die Verminderung der Viskosität der verwendeten mobilen Phase.

In vielen Labors wird weniger die Temperatur als der pH-Wert variiert, was bei dieser Arbeit aufgrund der Verwendung eines für eine MS-Koppelung geeigneten Puffers unterlassen wurde.

Eine Einhaltung von 40°C bringt keine Probleme, wie sie etwa beim Abkühlen auf unter Raumtemperatur auftreten könnten. Das Aufheizen dauert nur sehr kurz, und das Säulenmaterial sowie die Analyten bleiben geschont. Ebenso ist bei dieser Temperatur MS-Detektion problemlos durchführbar.

4.5. Korrektur der Ionenstärke

Die vorgeschlagenen 10 mM des Ammoniumformiatsalzes wurden nach den Experimenten auf 8 mM reduziert. Mit dieser Konzentration wurde dann bei der Accucore-Säule weiteroptimiert. Bei Verwendung eines anderen Puffers wäre dieser Parameter neu auszutesten.

4.6. Abschließende Bemerkung

Da sich die PhenylHexyl-Säule am geeignetsten herausstellte, könnte man bei dieser mit weiteren, tiefergehenden Experimenten fortsetzen. In Kombination mit MS-Detektion₁ könnte die Methode in weiterführenden Experimenten für die Untersuchung von biologischem Material, das mit den Analyten des Testmixes gespikt ist, herangezogen werden.

5. Diskussion

Teilweise basierend auf Literaturdaten⁶ wurde in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk für die stationäre Phase auf Core-Shell-Säulen gelegt (Kinetex PFP von Phenomenex, Accucore PFP von TF).

Die Entscheidung, mit diesem Material zu arbeiten, basiert auf der hohen Selektivität und der geringen Diffusionsrate, die bei dieser Art von Packungsmaterialien durch die einheitliche Korngröße gegeben ist. Außerdem wurde die vorliegende Anwendung mit diesem relativ neuen Material noch wenig getestet bzw. dokumentiert, und es bestand großes Interesse an dem Vergleich vor allem der beiden Core-Shell-Säulen untereinander.

Die meistverwendeten Lösungsmittel im Laufmittel bei einer Aufgabenstellung dieser Art sind Acetonitril oder Methanol. Durch die Anwendung von Isopropanol konnte eine Alternative zu dem häufig verwendeten Acetonitril gezeigt werden, vorausgesetzt, das vorhandene HPLC-System ist für einen starken Druckanstieg auf über 300 bar geeignet. Die Auswahl der mobilen Phase basierte auf Herstellerangaben.

Ein Arbeiten unter Raumtemperatur (theoretisch 20°C, praktisch deutlich darüber bei etwa 25°C) wäre bei einer Fragestellung wie dieser aufgrund der Problematik einer konstanten Kühlung schwierig, darum wurde bei einer konstanten Temperatur von 40°C gearbeitet.

Der ideale Fluss von 270 µl/min für die Accucore-Säule ergab sich sowohl durch Berechnung als auch experimentell durch Erstellung der Van-Deemter-Kurve.

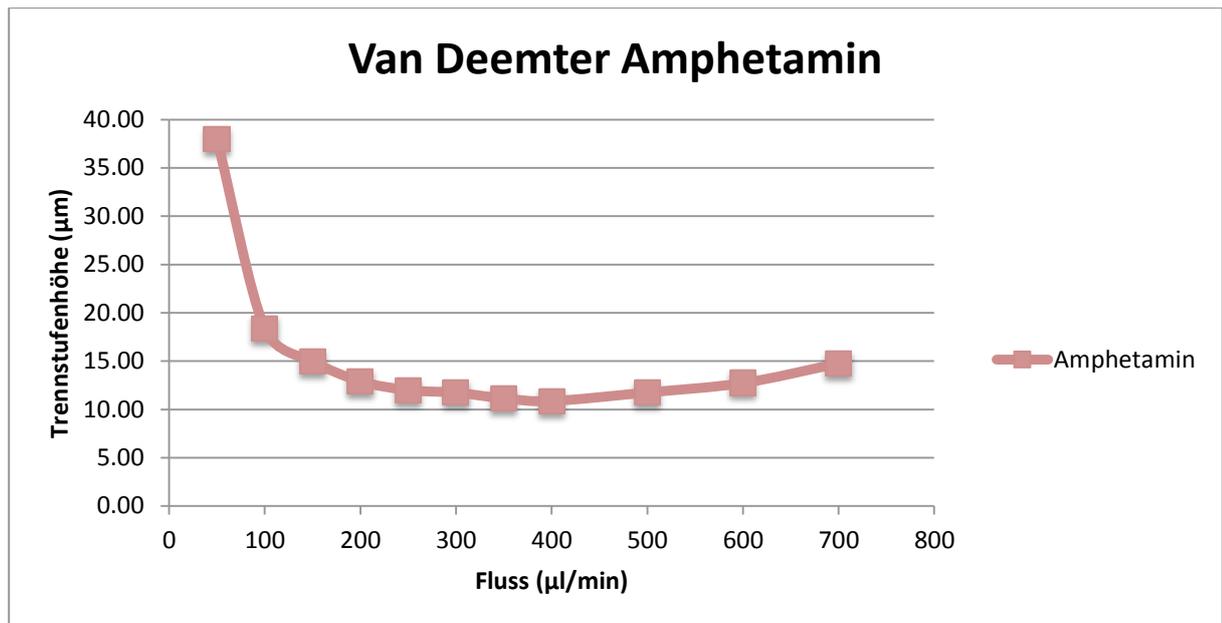


Abb. 21: Van Deemter-Kurve für Amphetamin auf der Accucore-Säule

Der lineare Gradient und die Steilheit des Anstiegs haben sich aus den Experimenten der Kinetex-Säule ergeben. Die ursprüngliche Laufzeit von 20 Minuten kann so auf eventuell 15-18 Minuten verkürzt werden, wenn man die maximale Konzentration an organischem Anteil in der mobilen Phase auf 75% herabsetzt, was für die Trennung der Komponenten im Testmix völlig ausreichend ist. Jedoch stellt sich die Frage, ob diese Methode dann auch für andere, stärker apolare Substanzen geeignet ist.

Die experimentell ermittelte, ideale Salzkonzentration von 8 mM wurde bisher in der Literatur noch nicht erwähnt.

Das Puffersystem Ameisensäure/Ammoniumformiat wurde aufgrund des pH-Bereichs (~4) gewählt. Auf ein Experiment mit Änderung des pH-Werts um dessen Einfluss auf Trennschärfe und Peak Performance zu zeigen, wurde verzichtet. Es hätte eine Destabilisierung des Puffersystems oder aber eine Änderung des Puffersalzes (z.B. Essigsäure/Acetat-System, o.ä.) erfordert. Die Veränderung von mehr als einem Parameter zieht einen Stabilitätsverlust des Systems und in weiterer Folge einen Verlust an Reproduzierbarkeit nach sich, was für eine Methodenentwicklung

oder –optimierung nicht wünschenswert war. Ebenso muss man bei einer Kopplung mit einem Massenspektrometer auf die begrenzte Auswahl an kompatiblen, flüchtigen Puffersystemen achten.

Die Säule „Accucore PFP (TF)“-Säule wurde als „State Of The Art“ Core-Shell-Material beworben. An ihr wurde die Methode verfeinert und die Experimente nicht mehr im vollen Ausmaß durchgeführt, da schon zu erwarten war, dass Acetonitril-Puffer bei einer Temperatur von etwa 40°C und ca. 8mM Ammoniumformiat mit Pentafluorphenyl Propyl modifiziertem Kieselgel die weitaus besten Trennergebnisse liefern würde. Der Temperatur-Test wurde in einem enger begrenzten Bereich noch einmal durchgeführt, um die optimale Temperatur rund um 40°C zu finden. (siehe **Diagramm 6**, Seite 40).

Es stand auch eine PhenylHexyl-Säule zur Verfügung, die in vollem Umfang getestet wurde, da sie für ähnliche Fragestellungen in Gebrauch ist und sich die Möglichkeit bot, einen direkten Vergleich zu häufiger angewandten Materialien zu erhalten.

Möglicherweise könnte man durch Änderung auf einen steileren Gradienten die Laufzeit noch verkürzen, z.B. bei Anschluss an einen selektiveren Detektor wie MS. Jedoch bei unselektiver UV/Vis Detektion könnte man eine eindeutige Trennung der Komponenten und somit eine Identifikation nicht garantieren. Andererseits lagen 20 Minuten Trennzeit, verglichen mit Literaturdaten^{7,10,11,16,20}, ohnehin im Durchschnittsbereich, und eine schnellere Trennung muss hier nicht zwingend angestrebt werden.

Weiterführende Experimente könnten noch in diese Richtung gemacht werden, wenn die Möglichkeit der Koppelung mit einem Massenspektrometer angestrebt wird.

Grundsätzlich könnten auch noch weitere Substanzen getestet werden, um sicherzustellen, ob sie auch mit dieser Methode detektierbar wären bzw. in einer Mehrkomponentenmischung aufgetrennt würden.

Als Test wurde mit dieser Methode eine Amitriptylinlösung analysiert, deren Retentionszeit ebenso innerhalb der Laufzeit lag und die in einem Reinsubstanzengemisch aufgetrennt würde.

Die entwickelte Methode wurde für Reinsubstanzen optimiert. Da sie für den Routinebereich in der klinischen und/oder forensischen Toxikologie eingesetzt werden soll, wäre eine Weiterentwicklung mit aufgearbeiteten gespikten Körperflüssigkeiten (Schweineblut, -hirn, -urin, ...) unter Verwendung von Vorsäulen interessant, um die Abtrennung von Störfaktoren zu überprüfen. In diesem Falle wäre eine Kopplung mit MS schon bei der Entwicklung empfehlenswert, um auch die Ionisierungstechniken für biologische Materialien zu erproben und eine optimale Detektion zu erreichen.

Die zufriedenstellende Trennung des Testmixes durch die beschriebene Methode mit den verwendeten Säulen stellt einen guten Ausgangspunkt für weiteres Arbeiten mit biologischen Materialien zur Optimierung für eine praktische Anwendung in klinischen und forensischen Toxikologielabors dar und kann mit der Methode zur MS-Detektion₁ kombiniert werden.

Zusammenfassung der Methoden aus der verwendeten Literatur

Lit.	Column	Column Type	Column Dimensions	Duration (Mins.)	System	Mobile Phase	Ratio/Time	Compounds	Temp °C Column oven	Flow Rate mL/min
6	Allure guard column (Restek GmbH, Bad Homburg, Germany)	PFP Propyl	50x2.1mm; 5µm Guard: 10x2.1mm; 5µm	15	LC-20 AD Prominence HPLC system (Shimadzu Europa)	0.1% Formic acid + 1 mM ammonium formate (water) (A) and 0.1% formic acid + 1 mM) + Ammonium formate (acetonitrile) (B)	0min=10% B 6min=90% B 6min-8.5min=90% B 9min=10% B 10.1min=10% B till end of run	amphetamines, benzodiazepines, dibenzazepines, cocaine, lysergic acid diethylamide, opioids, phencyclidine, tricyclic antidepressants, Z-drugs	40	0.75

7	Kromasil (MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany) + guard column C18 bonded silica	C18	250x4.6mm; 4µm Guard: 3x1.0mm; 10µm	70	LCP 5020 gradient pump (INGOS, Czech Republic)	40mM Phosphate buffer, pH 3 + H ₃ PO ₄ (A) and CH ₃ OH (B)	0-25=35-80% B	GHB	Ambient temperature	1.3
8	Acquity UPLC BEH (Waters, Milford, MA)	C18	100x2.1mm; 1.7µm	5.5	ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA)	0.1% aqueous ammonia (25%) + water (A) and 0.1% aqueous ammonia (25%) + methanol (B)	0min=60% A 0.2min=60% A 4min=25% A 4.5min=5% A 5min=60% A	benzodiazepines + related compounds, Z-drugs	65	0.4

9	<p>-Luna 3 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) + guard cartridge Polar-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) [Cannabinoids]</p> <p>-Synergi column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) + Polar-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) [Opioids]</p>	<p>-PhenylHexyl</p> <p>-Hydro-RP</p>	<p>-50x2mm; 3µm</p> <p>Guard: 4x2mm</p> <p>-</p> <p>150x2mm; 3µm</p> <p>Guard: 4x2mm</p>	<p>-11 (Can)</p> <p>-23 (Ops)</p>	<p>-Series 200 LC Plus system (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) (Can)</p> <p>-2 HPLC PUMPS: Shimadzu-LC-10AD VP and controller SCL 10Avp (Shimadzu, Duisburg, Germany) (Ops)</p>	<p>-5mM ammonium acetate (pH 6.5) (A) and Acetonitrile (B) (Can)</p> <p>-4mM ammonium acetate (pH 4.6) (A) and Acetonitrile (B) (Ops)</p>	<p>-0-0.4min=30% B</p> <p>0.4-7.8min=lin. from 30% to 90% B</p> <p>7.8-8.2min=90% B</p> <p>8.2-8.5min=lin. from 90% to 30% B</p> <p>8.5-11min=30% B (Can)</p> <p>-0-1min=0% B</p> <p>1-13min=lin. from 0% to 60% B</p> <p>13-15min=60% B</p> <p>15-17min=lin. from 60% to 0% B</p> <p>17-23min=0% B (Ops)</p>	<p>-cannabinoids</p> <p>-opioids</p>	<p>-40 (Can)</p> <p>-40 (Ops)</p>	<p>-0.25 (Can)</p> <p>-0.25 (Ops)</p>
---	---	--------------------------------------	--	-----------------------------------	--	---	---	--------------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------------

10	Varian Pursuit 3 column (manufacturer not shown)	C18	100x3mm; 3µm	35	Agilent 1100 series high performance LC system (binary pump, autosampler, thermostated column compartment) (Agilent, Palo Alto, CA, USA)	2 mM ammonium formate buffer + 8% acetonitrile pH 5.3 (A) and methanol (B)	0-3min=3% B 3-7min=3-20% B 7-11min=20% B 11-17min=20-30% B 17-30min=30-90% B	amphetamine, methylenedioxyamphetamine, methylenedioxyethylamphetamine, methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, cocaine, benzoylecgonine, morphine, 6-acetylmorphine, codeine, methadone, buprenorphine, norbuprenorphine, ketobemidone, tramadol, O-desmethyltramadol, Z-drugs	35	0.3
----	--	-----	--------------	----	--	--	--	---	----	-----

11	Hypersil GOLD column (TF)	Phenyl	100x2.1mm; 1.9µm	26	TF Accela UHPLC system (Degasser, Quaternary Pump, Autosampler) (manufacturer not shown)	10 mM aqueous ammonium formate + 0.1% formic acid pH 3.4 (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B)	0–0.2min=2% B 0.2–0.8min=15% B 0.8–3min=20% B 3–4min=25% B 4–7.5min hold 7.5–10min=30% B hold till 11.5min t11.5–13min=35% B 13–14.5min=50%B 14.5–16 min hold 16–18min=100% B	amitriptyline amitriptylinoxide amoxapine atomoxetine bupropion citalopram clomipramine cyclobenzaprine desipramine dosulepin doxepin fluoxetine fluvoxamine hydroxybupropion imipramine maprotiline mianserin milnacipran mirtazapine moclobemide norclomipramine nordoxepin norfluoxetine nortriptyline O-demethylvenlafaxine opipramol paroxetine reboxetine sertraline	not shown	0.5
----	---------------------------	--------	------------------	----	--	--	---	--	-----------	-----

								tianeptine trazodone trimipramine venlafaxine viloxazine		
13	Synergi column + guard column (Pheno- menex, Aschaff- enburg, Germany)	Polar RP	150x2mm; 4µm Guard: 4x2mm	10	3 Shimad- zu AD 10 VP pumps (Degasser (ERC- 3415α), Column oven (Shimad- zu CTO-10 AC), CTC PAL Auto- sampler, Control- led by a Shimadzu SCL- 10A VP (Shimad- zu, Duis- burg, Germany)	1 mM ammoni- um for- mate + 0.1% formic acid (A) and methanol + 0.1% formic acid (B)	0-10min=10- 100% B	designer amphetamines, tryptamines, piperazines	40	0.25

14	Thermo Electron-Hypersil Gold ultra column (CPS analitica, Milan, Italy)	Pure Silica	150x4.6m m; 5µm	15	Agilent 1100 series HPLC system (G1312A binary pump, G1322A degasser, ALS G1329A autosampler (Agilent Technologies, Palo Alto, CA))	10mM ammonium bicarbonate pH 7.3 (A) and acetonitrile (B)	0-3min=20% B 3-8min=50% B 8-9min=20% B	designer amphetamines	27	1
----	--	-------------	-----------------	----	---	---	--	-----------------------	----	---

16	Alltima (Alltech, Deerfeld, IL, USA)	C18	250x4.6m m; 5µm	38	HPLC/Auto sampler (100-µL loop)/Vac uum Degasser System (Series 200, Per- kinElmer, Norwalk, CT, USA)	Acetoni- trile (A) and 5mM Formic acid in water (B)	0-2min=90% B 2-18=75% B 18-18.1min=65% B 18.1-30min=0% B	morphine, amphetamine, 6- monoacetylmorphine, methylenedioxyampheta- mine, methamphetamine, methylenedioxy-me- thamphetamine, benzoylecgonine, ketamine, methylenedioxy-N- ethylamphetamine, cocaine, phencyclidine, carboxyTHC, THC	22	1
----	---	-----	--------------------	----	--	--	--	--	----	---

17	Chromolith Speed ROD (VWR/Merck, Darmstadt, Germany)	C18	50x4.6mm; 5µm	8	1100 Series Binary pump (Agilent, Waldbronn, Germany) HTC-PAL Auto-sampler (CTC-Analytcs, Zwingen, Switzerland)	Methanol (A) and 5mM acetic acid, pH 3.9 + ammonia solution (B)	0-4min=20% A lin. to 70% A 4-5min=70% A 5-8min=lin. to 20% A	amisulpride, amitriptyline, aripiprazole, benperidol, chlorpromazine, chlorprothixene, citalopram, clomipramine, clozapine, desipramine, doxepin, fluoxetine, flupentixol, fluphenazine, fluvoxamine, haloperidol, hydroxyrisperidone, imipramine, levomepromazine, maprotiline, mianserine, mirtazapine, moclobemide, norclomipramine, nordoxepin, norfluoxetine, nortriptyline, O-desmethylvenlafaxine, olanzapine, opipramol, paroxetine, perazine, perphenazine, pimoziide, pipamperone,	Ambient temperature	1
----	--	-----	---------------	---	---	---	--	--	---------------------	---

								quetiapine, reboxetine, risperidone, sertraline, sulpiride, thioridazine, trazodone, trimipramine, venlafaxine, viloxazine, ziprasidone, zotepine, zuclopenthixol		
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

18	L-Column ODS2 column 150mm×1.5mm 5µm (Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan) + CAPCELL PAK Phenyl semimicro column (Shiseido, Tokyo, Japan) [LC-MS]	Semi-micro + Phenyl Semi-micro	150x1.5m m; 5µm + 150x1.5m m; 5µm	~20 [LC-MS]	not shown [LC-MS]	10 mM ammonium formate buffer (pH 3.5, Formic acid)(A) and Methanol (25%–50%, v/v) (B)	not shown	designer amphetamines	40	0.15
18	CAPCELL PAK column (Shiseido, Tokyo, Japan) [LC-MSMS]	Phenyl Semi-micro	150x1.5m m; 5µm	~20 [LC-MSMS]	Prominence Series LC pump (Shimadzu) [LC-MSMS]	10 mM ammonium formate buffer (pH 3.5, Formic acid) (A) and Meth-	not shown	designer amphetamines	40	0.15

						anol (25%– 50%, v/v) (B)				
--	--	--	--	--	--	--------------------------------	--	--	--	--

19	Acquity UPLC HSS T3 (Waters, Milford, MA)	C18	100x2.1mm; 1.8µm	15	ACQUITY UPLC system (Waters Corporation)	2 mmol/L ammonium acetate, pH 6.2 (A) and methanol (B)	0min=2% B 4min=25% B 5.8min=38% B 7.3min=45% B 8.6min=55% B 9.6min=65% B 11min=68% B 11.1min=85% B 16.1min=85% 16.2min=2% B	morphine, amphetamine, MDA, benzoylecgonine, MDMA, methamphetamine, MDEA, 6-acetylmorphine, codeine, 7-aminonitrazepam, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, tramadol, cocaine, bromazepam, zopiclone, clonazepam, flunitrazepam, nitrazepam, alprazolam, oxazepam, chlordiazepoxide, lorazepam, zolpidem, nordiazepam, diazepam, methadone, buprenorphine	35	0.4
----	---	-----	------------------	----	--	--	--	--	----	-----

20	Hypersil GOLD Phenyl column (100×2.1 mm, 1.9 μm) (TF)	Phenyl	100x2.1; 1.9μm	26	TF Accela UHPLC	10 mM aqueous ammonium formate + 0.1% formic acid, pH 3.4 (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B)	0–0.2min=<2% B 0.2–0.8min=<15% B 0.8–3min=<20% B 3–4min=<25% B 4–7.5min=hold 7.5–10min=<30% B 10–11.5=hold 11.5–13min=<35% B 13–14.5min=<50% B 14.5–16min=hold 16–18min=<100% B	9-OH-risperidone, amisulpride, aripiprazole, benperidol, bromperidol, chlorpromazine, chlorprothixene, clopenthixol, clozapine, clozapine-N-oxide, droperidol, flupentixol, fluphenazine, fluspirilene, haloperidol, levomepromazine, melperone, norclozapine, perazine, perphenazine, pimozide, pipamperone, promazine, promethazine, prothipendyl, quetiapine, risperidone, sulpiride, thioridazine, ziprasidone, zotepine, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, brotizolam,	not shown	0.5
----	---	--------	----------------	----	-----------------	---	---	---	-----------	-----

								camazepam, chlordiazepoxide, clobazam, clonazepam, desalkylflurazepam, diazepam, flumazenil, flunitrazepam, flurazepam, lorazepam, lormetazepam, medazepam, metaclozepam, midazolam, nitrazepam, nordazepam, oxazepam, prazepam, temazepam, tetrazepam, triazolam, zaleplone, zolpidem, zopiclone		
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Kristina Mitterhauser	Kinetex PFP (Phenomenex)	PFP	100x3.0; 2.6µm	20	Dionex UltiMate 3000 UHPLC	10 mM aqueous ammonium formate + 0.1% formic acid, pH 3.4 (A) and isopropanol + 0.1% formic acid (B)	0-0.3min=10% B 0.3-12.5min=to 95% 12.5-15min=to10% 15-20min=hold (equilibration)	amphetamine, benzoylecgonine, cocaine, codeine, diazepam, doxepin, ibuprofene, methadone, metoprolol, morphine, paracetamol, phenobarbital, THC, THC-CA	40	0.4
	Accucore PFP (TF)	PFP	100x 2.1mm; 2.6µm	20	Dionex UltiMate 3000 UHPLC	8 mM aqueous ammonium formate + 0.1% formic acid, pH 3.4 (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B)	0-0.3min=10% B 0.3-12.5min=to 95% 12.5-15min=to10% 15-20min=hold (equilibration)	amphetamine, benzoylecgonine, cocaine, codeine, diazepam, doxepin, ibuprofene, methadone, metoprolol, morphine, paracetamol, phenobarbital, THC, THC-CA	40	0.27
	Pheno-	PhenylHexyl	150x3mm;	20	Dionex	10 mM	0-0.3min=10% B	amphetamine, benzoylecgonine,	40	0.6 -

	menex Luna 3		3 μm		UltiMate 3000 UHPLC	aqueous ammonium formate + 0.1% formic acid, pH 3.4 (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B)	0.3-12.5min=to 95% 12.5-15min=to10% 15-20min=hold (equilibration)	cocaine, codeine, diazepam, doxepin, ibuprofene, methadone, metoprolol, morphine, paracetamol, phenobarbital, THC, THC-CA		0.7
--	-----------------	--	------	--	---------------------------	---	---	---	--	-----

Literatur

- 1: Hinterberger, B. „Development of a LC-MS Screening Procedure for the Application in Analytical Toxicology” Universität Wien (2012)
- 2: Hochmeister, M./Grassberger, M./Stimpfl, T., „Forensische Medizin für Studium und Praxis”, 2 (2007), Wien: Maudrich
- 3: <http://www.phenomenex.com/kinetex/index>; Stand: 1.9.2012
- 4: <http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/newsdetail?storeId=11152&contentId=54908&ca=accucore>; Stand: 1.9.2012
- 5: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/Phenyl-Hexyl?returnURL=/Products/Search/HPLC>; Stand: 1.9.2012
- 6: Bassan, David M. et al. „Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS” *Analytical Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 43–50
- 7: Zacharis, Constantinos K. et al. „A new method for the HPLC determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) following derivatization with a coumarin analogue and fluorescence detection Application in the analysis of biological fluids” *Talanta* 75 (2008) 356–361
- 8: Wiese Simonsen, Kirsten et al. „A Validated Method for Simultaneous Screening and Quantification of Twenty-Three Benzodiazepines and Metabolites Plus Zopiclone and Zaleplone in Whole Blood by Liquid–Liquid Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry“ *Journal of Analytical Toxicology* 34 (2010) 332–341
- 9: Maralikova, Barbora et al. „Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification” *Journal of Chromatography B* 811 (2004) 21–30

- 10: Kjærsgaard Bjørk, Marie et al. „Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry“ *Analytical Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 2393–2401
- 11: Remane, Daniela et al. „Full validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric procedure for target screening and quantification of 34 antidepressants in human blood plasma as part of a comprehensive multi-analyte approach“ *Analytical Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 2093–2107
- 12: Kintz, Pascal et al. „GHB in postmortem toxicology Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens“ *Forensic Science International* 143 (2004) 177–181
- 13: Wohlfarth, Ariane et al. „LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum“ *Analytical Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 2403–2414
- 14: Pichini, Simona et al. „Liquid chromatography–atmospheric pressure ionization electrospray mass spectrometry determination of “hallucinogenic designer drugs” in urine of consumers“ *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47 (2008) 335–342
- 15: Maurer, Hans H. „Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology“ *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 310– 318
- 16: Sergi, M. et al. „Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS“ *Analytical Bioanalytical Chemistry* 393 (2009):709–718
- 17: Kirchherr, H., Kühn-Velten, W. N. „Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach“ *Journal of Chromatography B*,

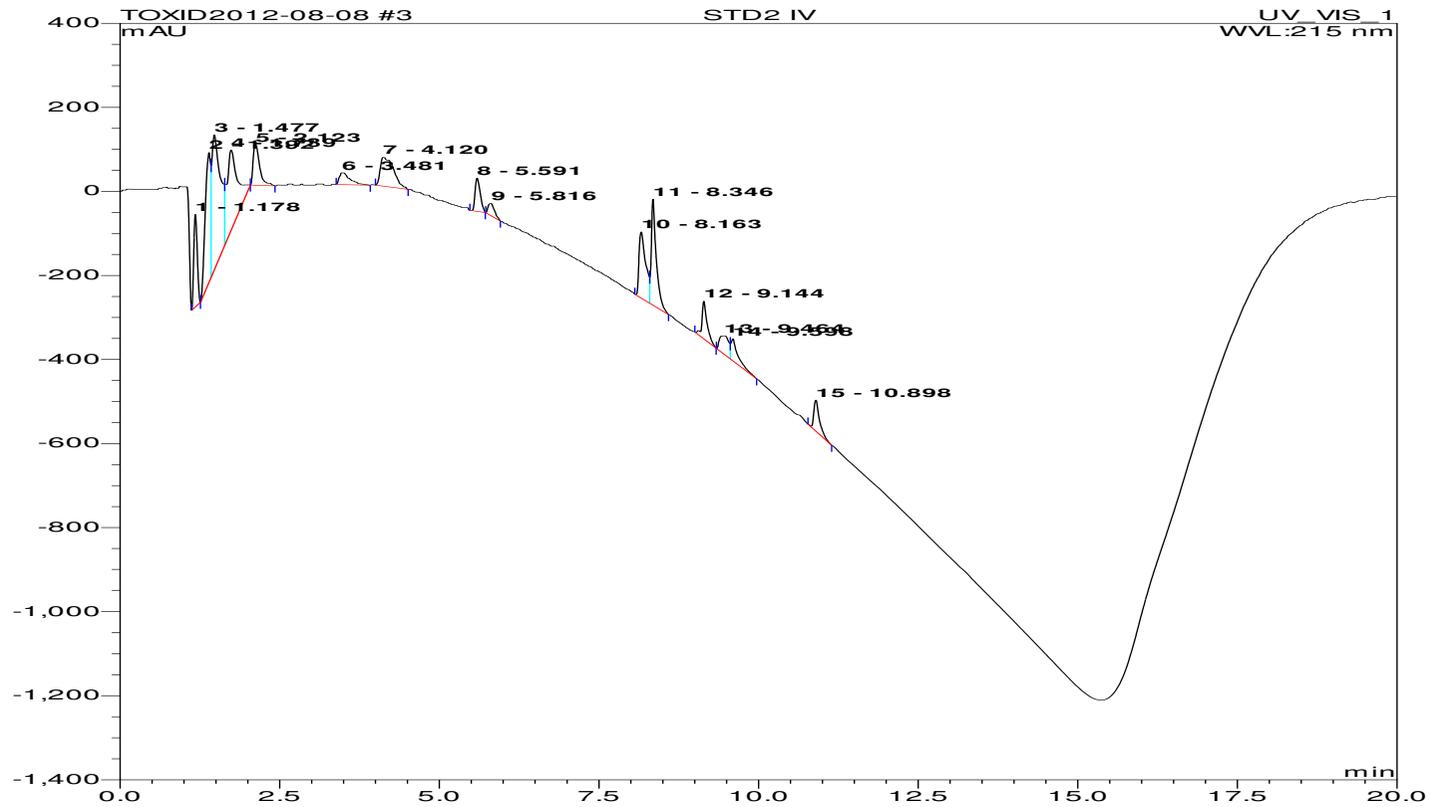
843 (2006) 100–113

- 18: Zaitsev, Kei et al. „Simultaneous analysis of six novel hallucinogenic (tetrahydrobenzodifuranyl)aminoalkanes (FLYs) and (benzodifuranyl)aminoalkanes (DragonFLYs) by GC-MS, LC-MS, and LC-MS-MS“ *Forensic Toxicol* 28 (2010) 9–18
- 19: Badawi, Nora et al. „Simultaneous Screening and Quantification of 29 Drugs of Abuse in Oral Fluid by Solid-Phase Extraction and Ultraperformance LC-MS/MS“ *Clinical Chemistry* 55:11 (2009) 2004–2018
- 20: Remane, Daniela et al. „Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 neuroleptics, 28 benzodiazepines, and Z-drugs“ *Analytical Bioanalytical Chemistry* 401 (2011) 1341–1352

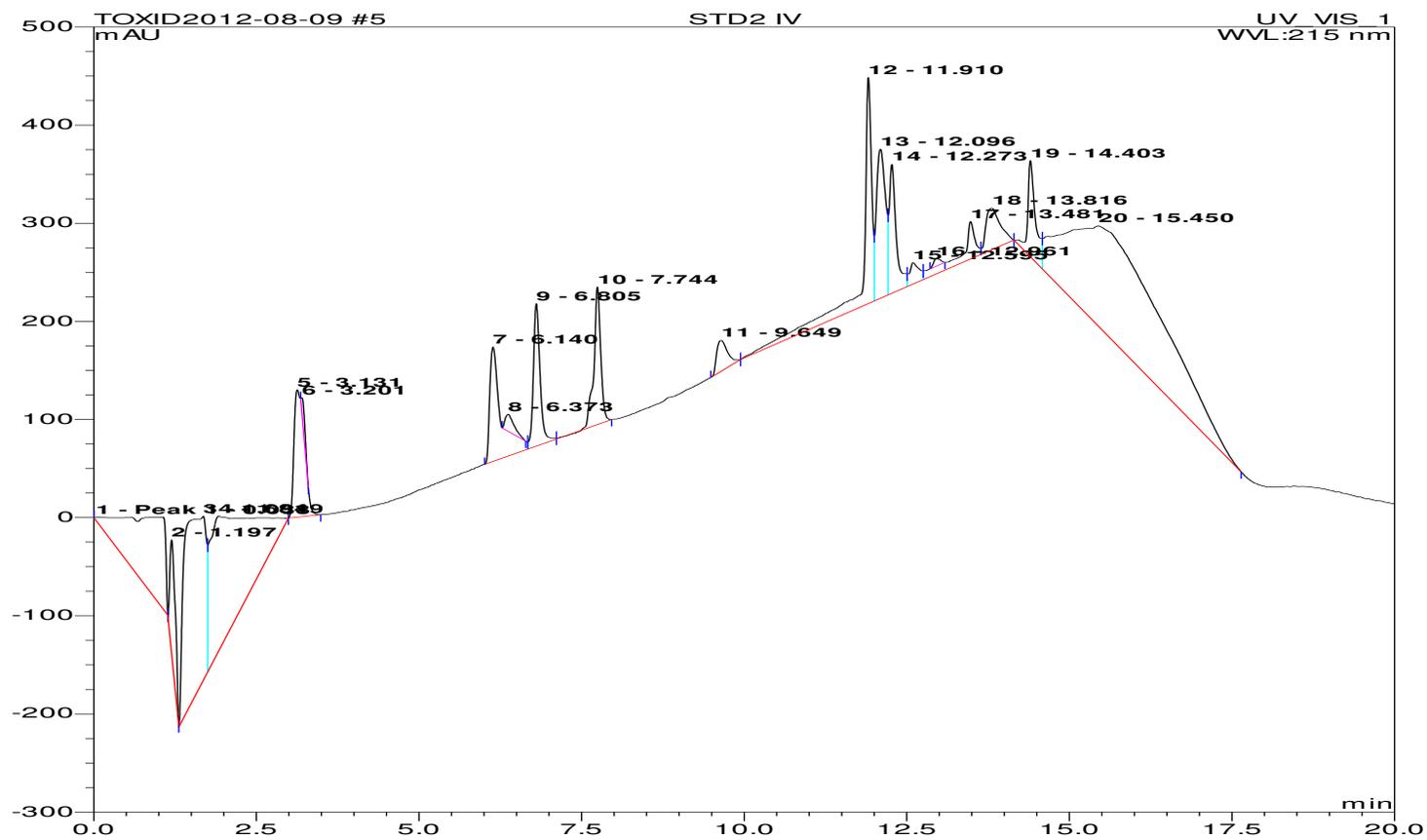
Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Repräsentative Chromatogramme der benutzten Säulen

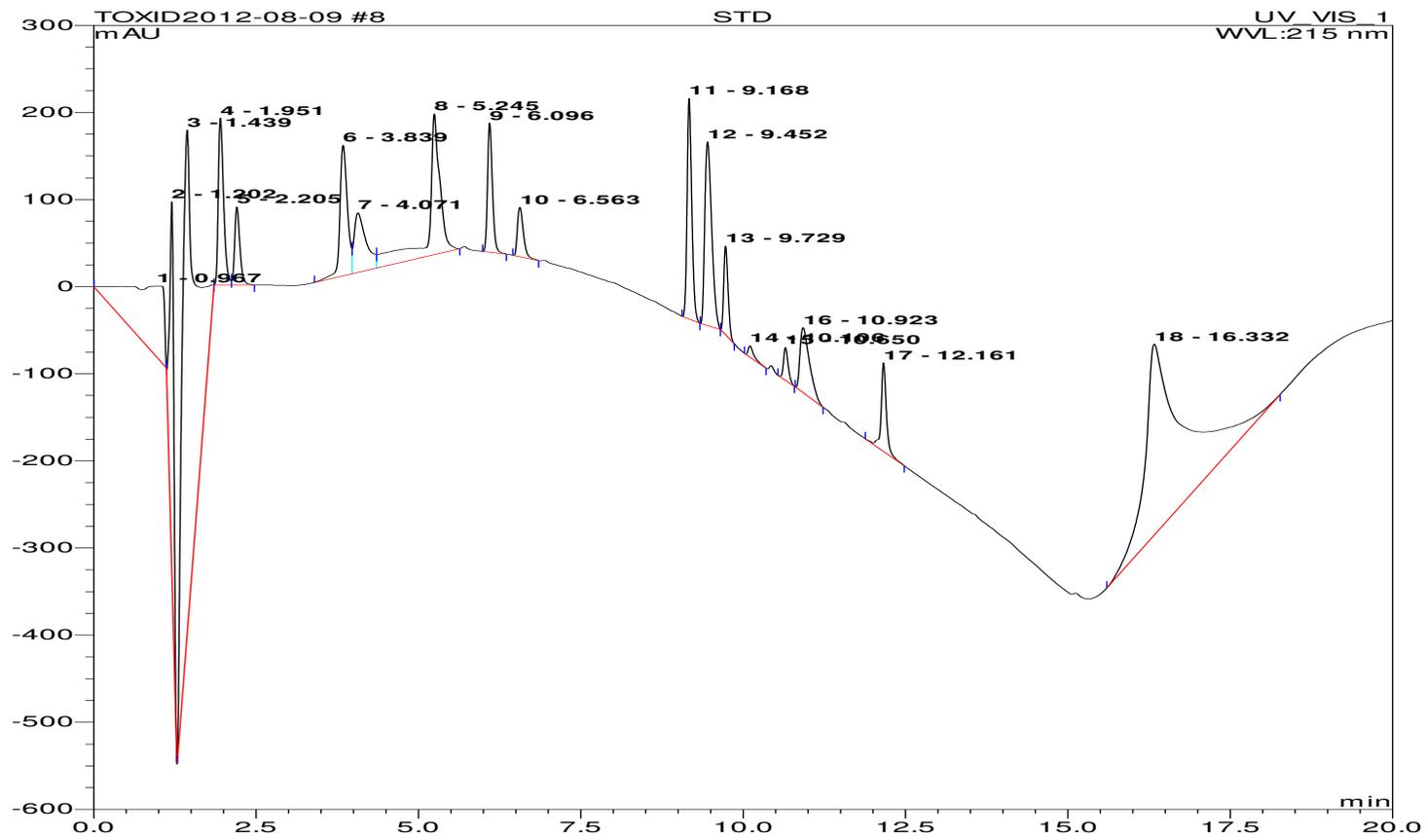
Phenomenex Kinetex: Isopropanol 0,1 % Ameisensäure (B)/50 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 40°C im Säulenofen, 400 µL/min
Flussrate



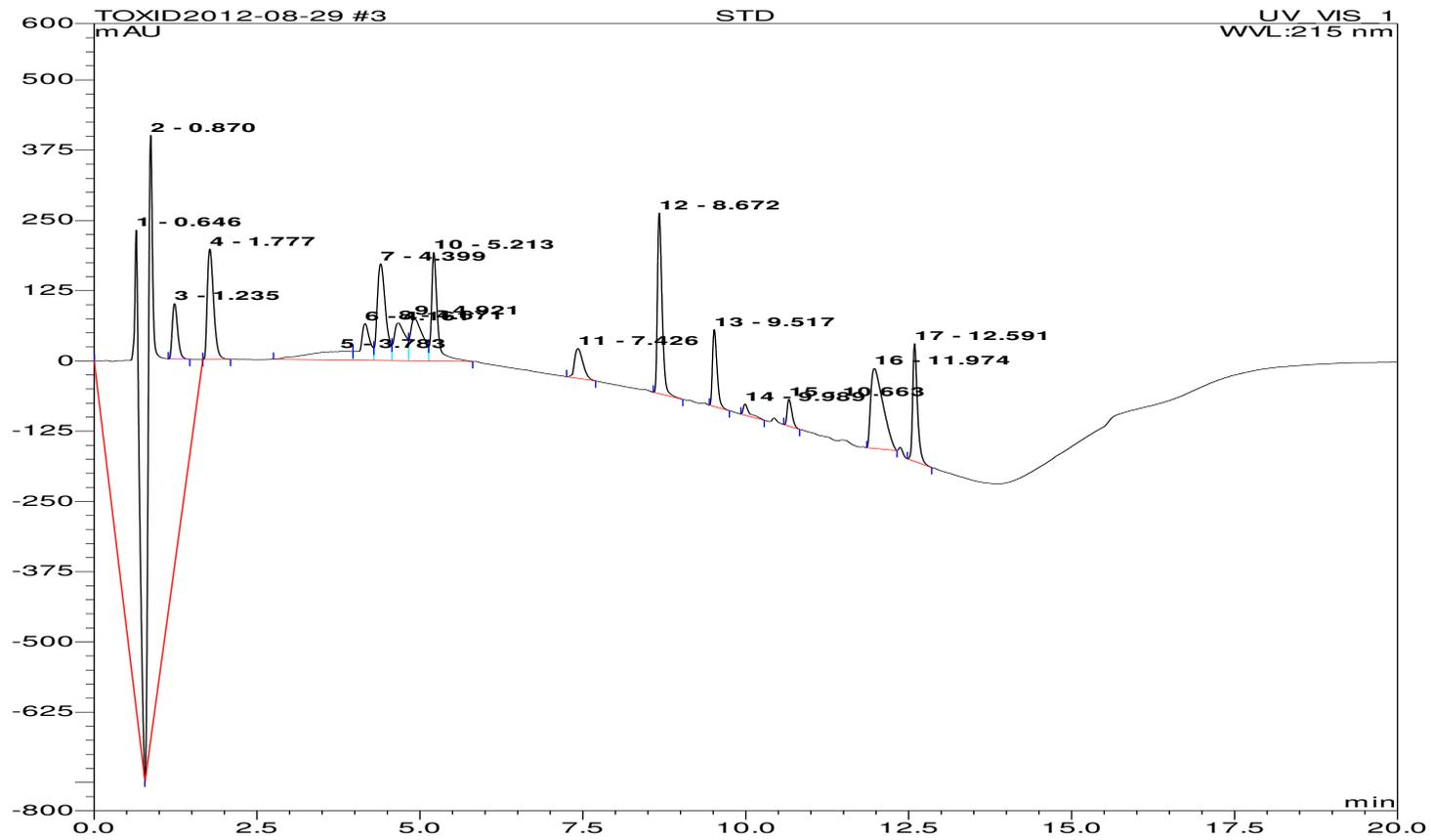
Phenomenex Kinetex: Methanol 0,1 % Ameisensäure (B)/10 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 40°C im Säulenofen, 400 µL/min Flussrate



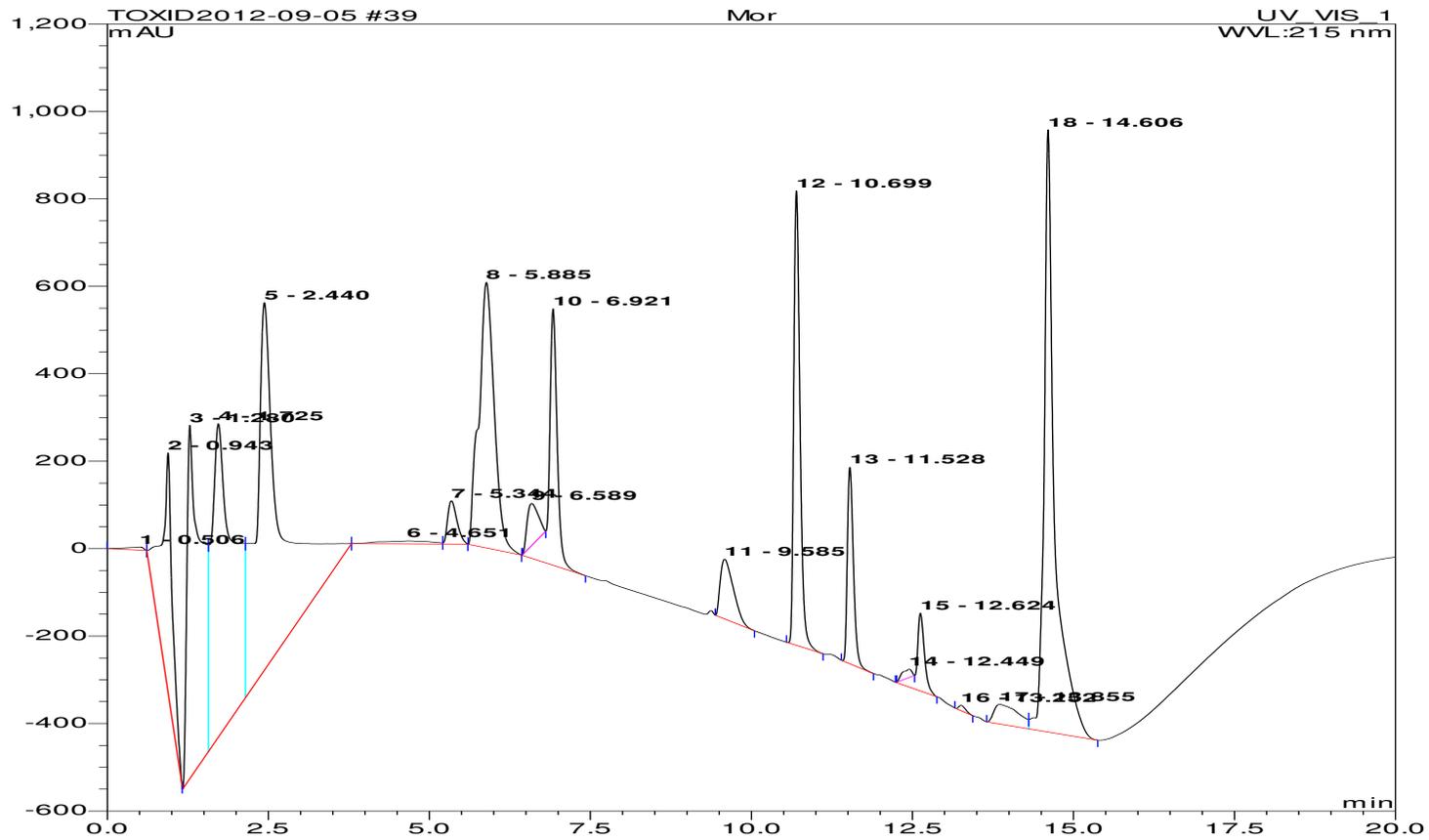
Phenomenex Kinetex: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/10 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 40°C im Säulenofen, 400 µL/min
Flussrate



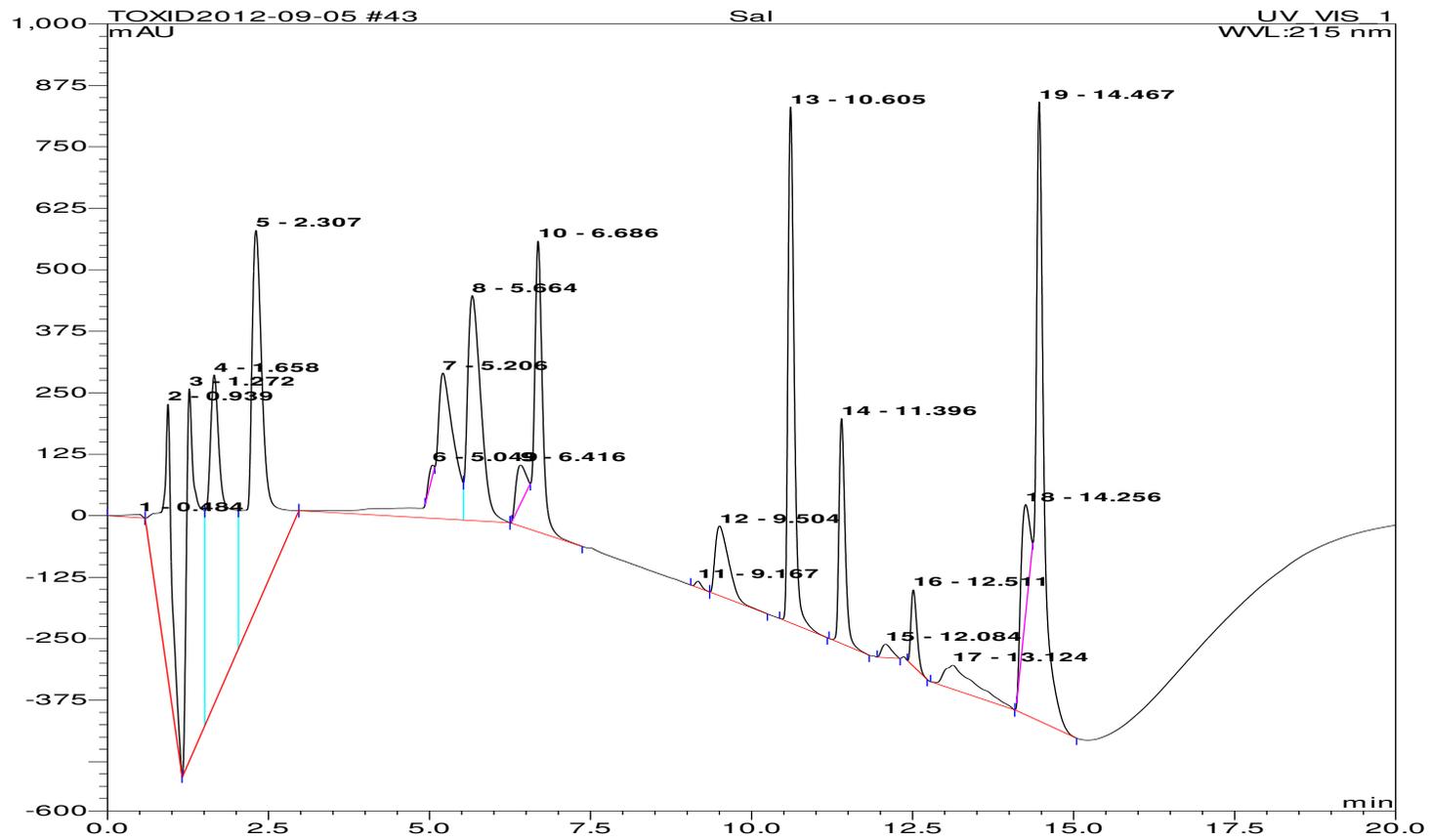
TF Accucore: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/8 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 40°C im Säulenofen, 270 µL/min Flussrate



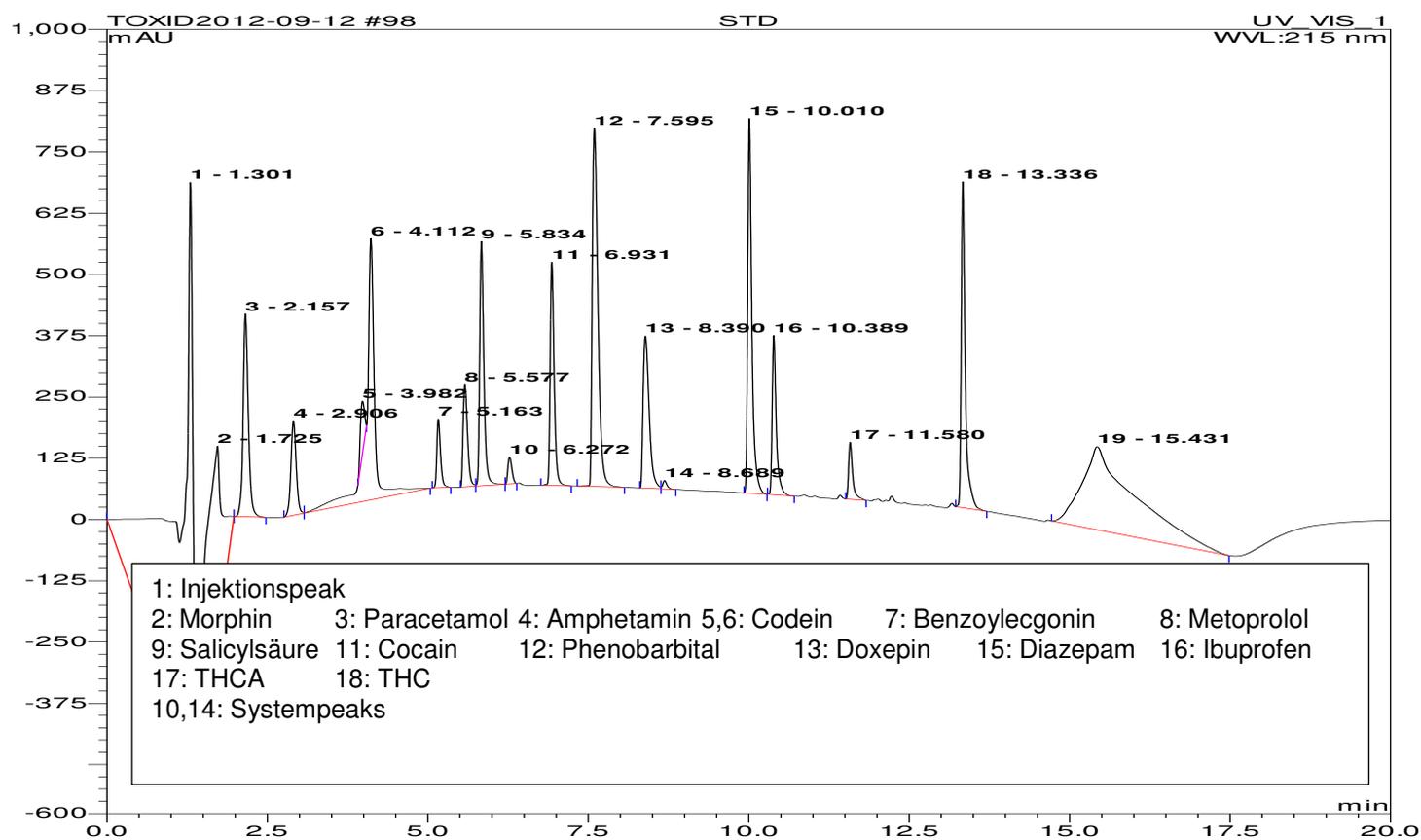
TF Accucore: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/8 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 43°C im Säulenofen, 270 µL/min Flussrate



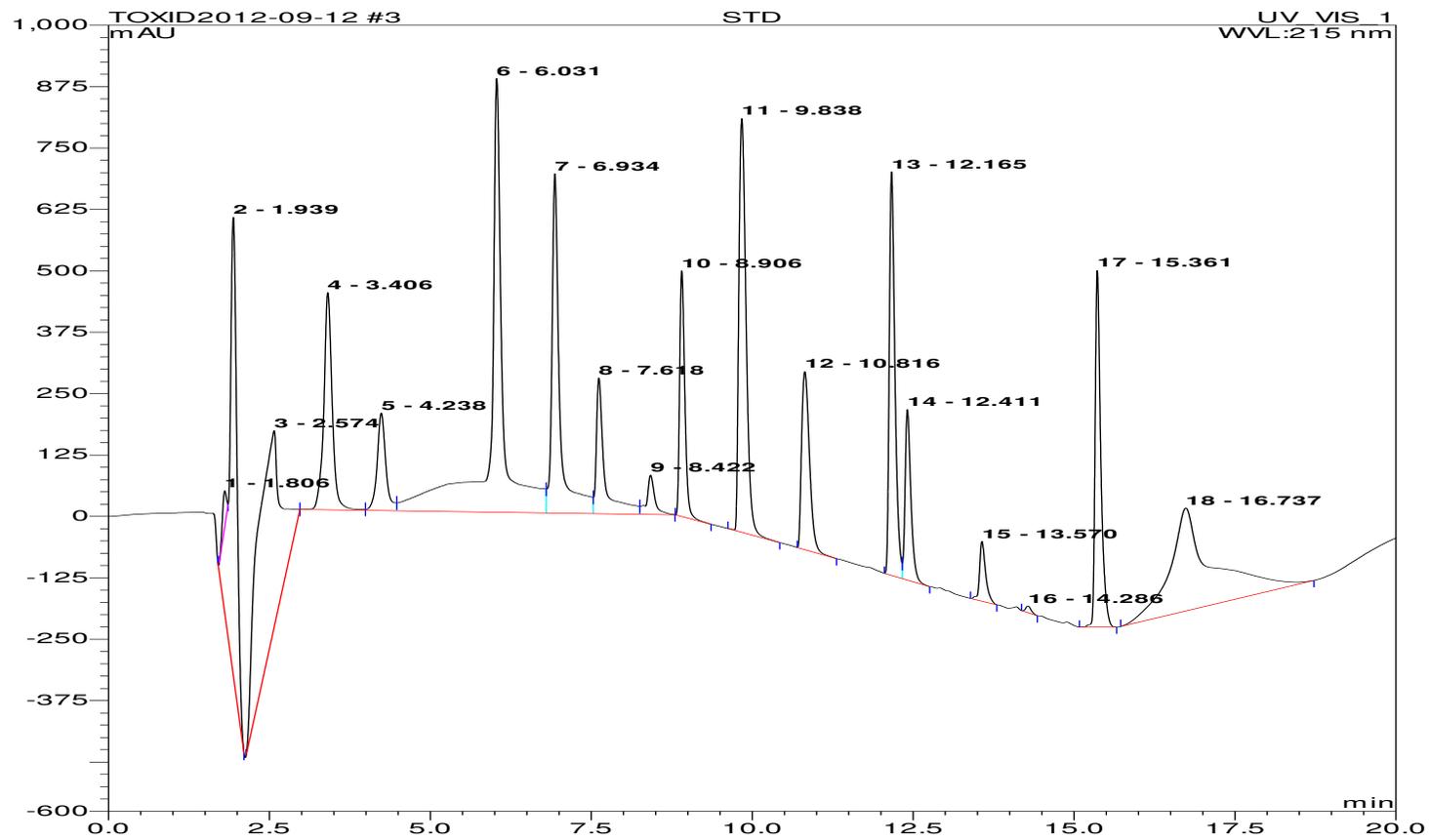
TF Accucore: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/8 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 49°C im Säulenofen, 270 µL/min Flussrat



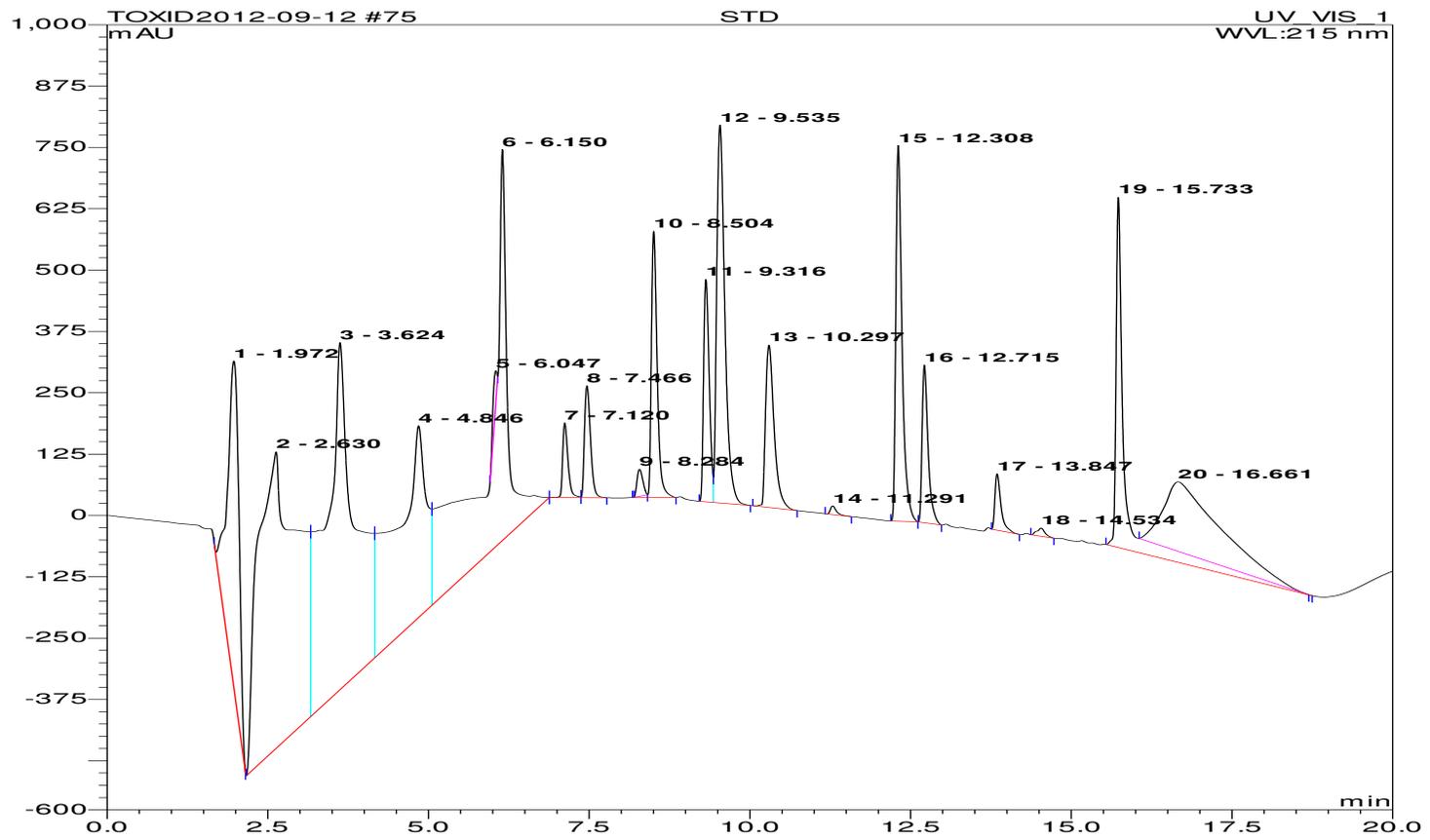
Phenomenex Luna: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/8 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 40°C im Säulenofen, 600 µL/min Flussrate



Phenomenex Luna: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/8 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 40°C im Säulenofen, 400 µL/min Flussrate



Phenomenex Luna: Acetonitril 0,1 % Ameisensäure (B)/8 mM Ammoniumformiat 0,1 % Ameisensäure (A), 25°C im Säulenofen, 400 µL/min Flussrate



Kurzfassung

Die HPLC-MS-Kopplung stellt in forensisch-toxikologischen Untersuchungen eine bewährte Methode dar.

Häufig finden sich Methoden eines „General Unknown Screenings“, die zwar einerseits eine gute Basis für Analysen darstellen, jedoch für eine zielführende Detektion vermuteter Substanzen weniger geeignet sind.

Daher wurde in dieser Arbeit eine Methodenentwicklung zu einem Multi-Target-Screening unter Verwendung eines 15-Komponenten-Mixes durchgeführt.

Neben zwei Core-Shell-Säulen wurde eine PhenylHexyl-Säule auf ihre Eignung zur Trennung des Testmixes getestet, alle verwendeten Säulen wiesen einen hohen analytischen Standard auf.

Es wurden die unterschiedlichen Effekte auf die Trennleistung durch Verwendung der Fließmittel Isopropanol, Methanol und Acetonitril getestet, sowie die Trennung durch Temperaturvariation, Änderung der Ionenstärke im Puffersystem (Ammoniumformiat-Ameisensäure) und Variation der Flussgeschwindigkeit optimiert.

Als am besten geeignete Methode stellte sich für die Trennung des Testgemisches eine PhenylHexyl-Säule mit Acetonitril 0,1% Ameisensäure (B) und Wasser 0,1% Ameisensäure/Ammoniumformiat als Puffer (A) als mobiler Phase bei einer Flussrate von 600-700 $\mu\text{L}/\text{min}$, einer Temperatur des Säulenofens von 40°C und einer Salzkonzentration von 8 mM Ammoniumformiat unter Gradientenelution heraus.

Die Core-Shell-Säulen konnten für diese Aufgabenstellung nicht überzeugen.

Abstract

HPLC-MS is a common method in forensic and clinical toxicology, and frequently used as a tool for a general unknown screening.

A good basis though, the general unknown screening is not the best method for the identification of a particular substance in the examined specimen.

Based on several publications, a method for a testmix of 15 substances was evolved, using different types of columns, organic part of the mobile phase, temperature, ionic strength and flow rate to assess the various effects on separation results.

In this paper, two core shell columns and a phenyl hexyl column were tested for their ability to separate the testmix. Effects on the separation by the use of different solvents, e.g. acetonitrile, methanol and isopropanol, ionic strength of the buffer system ammonium formiat-formic acid, temperature rising from ambient temperature to 80°C and increasing flow were examined.

Concerning the separation, the phenyl hexyl column was the best choice, in a method with acetonitrile 0.1% formic acid (B) and water 0.1% formic acid/ammonium formate as a buffer (A) as mobile phase, column oven temperature at 40°C, ionic strength of about 8 mM ammonium formate and a flow rate between 600 and 700 $\mu\text{L}/\text{min}$.

None of the core shell columns was convincing for this analytical problem.

Curriculum Vitae

Name: Kristina Mitterhauser



Schulbildung:

1994 – 1998 Volksschule in Kaltenleutgeben
1998 – 2006 Musikgymnasium, Wien 7

Sonstige Bildung:

1991 – 1993 Musikalische Früherziehung an der Musikschule Perchtoldsdorf
1993 – 1997 Violine Konzertfach an der Musikschule Perchtoldsdorf
1998 – 1999 Violine Konzertfach an der Musikschule Döbling
1999 – 2001 Violine Konzertfach am Privatkonservatorium „Gustav Mahler“
2005 – 2006 Trompete Konzertfach am Privatkonservatorium „Prayner“
2006 – 2013 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufserfahrung:

06/2008 – 09/2013

Angestellte (Teilzeit, mit Berufserfahrung)
Ameisapotheker, <http://www.ameisapotheker.at>
Branche: Arzneimittel, 1-10 Mitarbeiter

12/2007 – 07/2008

Angestellte (Teilzeit)
Neulerchenfelder-Apotheker, Wien Ottakring
Branche: Arzneimittel, 1-10 Mitarbeiter

07/2007 – 08/2007

Angestellte (Vollzeit, mit Berufserfahrung)
Brahms-Apotheker Hamburg-Pinneberg (Deutschland)
Branche: Arzneimittel, 1-10 Mitarbeiter

07/2005 – 08/2005

Praktikantin
Apotheker Alte Remise Wien Ottakring
Branche: Arzneimittel, 1-10 Mitarbeiter

