

Analytische Chemie

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

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Christoph Härtel**

aus Düsseldorf

- 2013 -

---

Dekan: Prof. Dr. Bart Jan Ravoo.....

Erster Gutachter: Prof. Dr. Uwe Karst.....

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Carolin Huhn.....

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2013.....

Tag der Promotion: 04.12.2013.....

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Stand der Technik .....	4
3	Theorie .....	7
3.1	Rauschdrogen .....	7
3.1.1	Klassische Rauschdrogen .....	7
3.1.2	Biogene Drogen .....	8
3.1.3	Designer-Drogen .....	9
3.1.4	Cannabinoide .....	13
3.1.4.1	Klassische Cannabinoide .....	13
3.1.4.2	Nicht-klassische Cannabinoide .....	14
3.1.4.3	Endocannabinoide .....	14
3.1.4.4	Cannabimimetika (Aminoalkylindole) .....	15
3.1.4.5	Cannabinoidrezeptoren CB <sub>1</sub> und CB <sub>2</sub> .....	17
3.2	Doping/Arzneimittel .....	18
3.2.1	Anabole androgene Steroide .....	19
3.2.2	Rechtslage in Deutschland .....	21
3.2.3	Arzneimittelfälschungen .....	22
3.3	Grundlagen der Massenspektrometrie .....	23
3.3.1	Ionenquellen .....	23
3.3.1.1	Elektrosprayionisierung (ESI) .....	24
3.3.1.2	Desorptions-Elektrospray-Ionisierung (DESI) .....	25
3.3.2	Analysator .....	27
3.3.3	Detektor .....	33
3.4	Chromatographie .....	33

3.4.1	Allgemeine Grundlagen.....	34
3.4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	36
3.4.3	Säulentypen.....	39
3.5	Statistik in der analytischen Qualitätssicherung (Grundlagen).....	41
3.5.1	Mittelwert und Standardabweichung.....	41
3.5.2	Normalverteilung .....	42
3.5.3	Statistische Prüfverfahren (Tests) .....	43
3.5.4	Kalibrierung .....	43
3.5.4.1	Regression.....	44
3.5.4.2	Residuen.....	44
3.5.4.3	Vertrauensbereich .....	45
3.5.4.4	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze .....	46
3.5.5	Validierung .....	48
4	Experimenteller Teil.....	50
4.1	Verwendete Lösemittel.....	50
4.2	Technische Informationen zu den verwendeten Geräten.....	50
4.3	Synthetische Cannabimimetika.....	51
4.3.1	Chemikalien und Wirkstoffe.....	51
4.3.2	UHPLC-DAD Parameter .....	52
4.3.2.1	Probenvorbereitung für die qualitative Analyse .....	53
4.3.2.2	Probenvorbereitung für die Analyse der Wirkstoffverteilung.....	53
4.3.2.3	Probenvorbereitung für die quantitative Analyse .....	54
4.3.3	UHPLC-DAD/MS Kopplung .....	54
4.3.4	DESI-MS .....	55
4.3.5	Direkte Analyse von Kräutermischungen.....	55
4.3.6	DC-DESI-MS zum Nachweis von synthetischen Cannabimimetika .....	55

4.4	Dopingsubstanzen und Arzneimittel .....	56
4.4.1	Chemikalien und Wirkstoffe .....	56
4.4.2	UHPLC-DAD Parameter .....	58
4.4.2.1	Klassisch gepackte Trennsäulen.....	58
4.4.2.1.1	Probenvorbereitung mittels flüssig/flüssig Extraktion.....	59
4.4.2.1.2	Probenvorbereitung mittels SPE-Phase .....	59
4.4.2.2	Monolithische-Trennsäule .....	60
4.4.3	UHPLC-DAD/MS Kopplung .....	61
4.4.4	GC-MS.....	61
4.4.5	DESI-MS .....	61
4.4.6	Direkte Analyse von öligen Zubereitungen .....	62
4.5	Software .....	62
4.6	APCI (Direct Probe) Messungen .....	62
4.7	DESI-MS an unterschiedlichen Massenspektrometern.....	63
5	Ergebnisse und Diskussion .....	65
5.1	Synthetische Cannabimimetika .....	65
5.1.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	65
5.1.1.1	Untersuchung der Wirkstoffverteilung.....	70
5.1.1.2	Untersuchungen zu der Probenvorbereitung.....	74
5.1.1.3	Analyse von Realproben .....	75
5.1.2	LC-MS Kopplung .....	77
5.1.3	DESI-MS .....	83
5.1.3.1	Direkte Analyse von Kräutermischungen .....	83
5.1.3.2	DC-DESI-MS Verfahren für synthetische Cannabimimetika .....	90
5.1.3.2.1	Vergleich von unterschiedlichen DC-Platten.....	92
5.1.4	Diskussion.....	98

5.2	Dopingsubstanzen .....	100
5.2.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	100
5.2.1.1	Probenvorbereitung.....	105
5.2.1.2	Messung von Realproben .....	113
5.2.1.3	Monolithische-Säule .....	117
5.2.2	Unterscheidung verschiedener Pflanzenöle .....	124
5.2.3	LC-MS Kopplung .....	127
5.2.4	DESI-MS .....	131
5.2.5	Diskussion.....	134
5.3	Arzneimittel.....	135
5.3.1	DESI-MS .....	135
5.3.1.1	Tabletten .....	135
5.3.1.2	Steckkapseln.....	143
5.3.2	Diskussion.....	145
5.4	Vergleich verschiedener Massenspektrometer .....	146
5.5	Vergleich von DESI und APCI (Direct Probe) .....	156
6	Zusammenfassung .....	163
7	Literaturverzeichnis .....	165
8	Anhang .....	170
9	Danksagung.....	185
10	Lebenslauf.....	187

# 1 Einleitung

Als Forensik wird die Wissenschaft von der interdisziplinären Anwendung sowie Weiterentwicklung naturwissenschaftlicher und/oder technischer Erkenntnisse und Methoden bei der Aufklärung und Verhütung von Verbrechen bezeichnet<sup>1</sup>. Die Forensik, auch als Kriminaltechnik bezeichnet, wird dabei in verschiedene Fachgebiete, wie z.B. Ballistik, Schriftanalyse und Toxikologie unterteilt<sup>2</sup>.

Im Bereich der Forensik haben Schnelluntersuchungstechniken einen hohen Stellenwert, da vor Ort, z.B. bei der Tatortarbeit in illegalen Arbeiten, oftmals schnelle und belastbare Untersuchungsergebnisse für Entscheidungen benötigt werden. Im Bereich der Vor-Ort-Analytik von Rauschgiftproben bei Sicherstellungen wird hauptsächlich auf Schnelltestkits zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um Reagenzgemische, die nach Zugabe des Untersuchungsmaterials Farbveränderungen auf Grund chemischer Reaktionen zeigen. Über die Veränderung der Farbe und entsprechende Farbskalen kann eine Aussage über die in den Untersuchungsmaterialien vorkommenden Substanzklassen getroffen werden. Weitere gebräuchliche, mobil einsetzbare Schnelluntersuchungstechniken sind die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR), die es ermöglicht, über den Vergleich mit Referenzspektren Substanzen zu identifizieren<sup>3</sup> und die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS), mit der Rauschdrogen<sup>4</sup> und Explosivstoffe<sup>5</sup> im Spurenbereich detektiert werden können.

Für die Erlangung von gerichtsfesten Ergebnissen reichen einfache Untersuchungen mit den gängigen Schnelluntersuchungstechniken nicht aus, da bedeutende wissenschaftliche Dachverbände im Bereich der Kriminaltechnik, wie die SWGDRUG (Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs), empfehlen, sichergestellte Materialien oder Spuren mit mindestens zwei unterschiedlichen Methoden zu analysieren, wobei eine Methode mit hohem Identifizierungspotenzial verwendet werden soll<sup>6</sup>. Dazu gehören unter anderem die Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie (GC-MS), die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR). Diese Methoden liefern zwar sehr verlässliche und aussagekräftige Ergebnisse, haben aber den Nachteil, dass eine aufwendige Probenvorbereitung und eine lange Analysenzeit notwendig sind. Die im Jahr 2004 von *Graham Cooks* entwickelte, neuartige Ionisierungstechnik für die Massenspektrometrie, *Desorptions-Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (DESI-MS)*<sup>7</sup>, besitzt hingegen ein hohes Potential für die direkte massenspektrometrische Untersuchung von forensisch relevanten Materialien<sup>8,9</sup>, was die Nachteile der gängigen Kopplungen von

der Massenspektrometrie und chromatographischen Methoden (Probenvorbereitung und lange Analysezeiten) unter Beibehaltung des hohen Identifizierungspotenzials, nivelliert. In den nachfolgenden Jahren sind weitere direkt-massenspektrometrische Techniken (z.B. DART, EASI) entwickelt worden, so dass heute eine Vielzahl solcher Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen.

Neben der Identifizierung von Substanzen spielt die Quantifizierung in der Kriminaltechnik eine wichtige Rolle. Die Information über die Konzentration bzw. den Gehalt einer Substanz wird unter anderem für die Festlegung des Strafmaßes benötigt. Ein weiterer Bereich, in dem quantitative Ergebnisse eine Rolle spielen ist das *Profiling* sichergestellter Rauschgiftproben. Dabei handelt es sich um einen Vergleich von ähnlichen Materialien, bei dem festgestellt werden soll, ob die Materialien aus der gleichen Quelle (z.B. Syntheseprozess) stammen, oder ob sonstige Bezüge zwischen den Materialien bestehen. Um diese Bezüge zwischen unterschiedlichen Materialien herstellen zu können, ist es notwendig, die einzelnen Materialien möglichst genau zu charakterisieren, wozu die Quantifizierung von Einzelbestandteilen (z.B. Spurenverunreinigungen) der Materialien unerlässlich ist. Für die Gewinnung von quantitativen Informationen werden in der Kriminaltechnik am häufigsten die Gaschromatographie und die Flüssigkeitschromatographie eingesetzt, aber auch die NMR-Technik findet in diesem Bereich zunehmend Anwendung<sup>10</sup>.

Neben klassischen Aufgabenbereichen in den kriminaltechnischen Fachgebieten, wie z.B. der Schusswaffenidentifizierung in der Ballistik und der Quantifizierung von klassischen Rauschgiften wie z.B. Cocain in der Toxikologie, ergeben sich auch immer neue analytische Fragestellungen durch neu auftretende Deliktphänomene. Dazu gehören zum Beispiel die Bereiche der Arzneimittelfälschungen und der sogenannten *Kräutermischungen* („Spice“-Phänomen), die beide erst durch das Internet ihre heutige Bedeutung erlangen konnten. Bei „Spice“ handelt es sich um Kräutermischungen, die als harmlose Räucherware deklariert sind, denen aber vollsynthetische Wirkstoffe zugesetzt wurden, die bei Konsum eine cannabisähnliche Wirkung im menschlichen Körper hervorrufen. Erstmals wurde dieses Phänomen in Deutschland im Jahre 2008 beobachtet und von einer Medienhype begleitet<sup>11</sup>. Bis Ende 2012 wurden seitdem in Europa 236 neuauftretende synthetische Wirkstoffe aus unterschiedlichen Substanzklassen (z.B. Cathinone, Piperazine und synthetische Cannabimimetika) gemeldet (14 bis Ende 2005)<sup>12</sup>, von denen allein im Jahr 2012 dreißig in Kräutermischungen nachgewiesen wurden<sup>13</sup>. Durch diese hohe Anzahl an vorkommenden Substanzen und durch



das Auftauchen von immer neuen, unbekannten Substanzen wird die forensisch-toxikologische Analytik vor große Herausforderungen gestellt. Gerade im Bereich der Schnelldetektion bereitet die Analyse von Kräutermischungen Probleme, da durch die Verwendung potenter Wirkstoffe in vergleichsweise geringer Konzentration in diesen Produkten eine Analyse mit Schnelltestkits nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. In einer vorherigen Arbeit<sup>8</sup> konnten erste Lösungsansätze für die schnelle und sichere Identifizierung von Wirkstoffen in Kräutermischungen erarbeitet werden, allerdings wurde nicht vollständig auf eine Probenvorbereitung verzichtet. Auch für den zunehmend Bedeutung erlangenden Bereich der Untersuchung von Arzneimittelfälschungen ist eine funktionierende Schnellanalytik notwendig, da hier häufig ein belastbares und dokumentiertes Untersuchungsergebnis innerhalb weniger Tage vorliegen muss (insbesondere bei sichergestellten Waren im Transit, z.B. auf Flughäfen), da ansonsten Schadenersatzforderungen entstehen können.

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

## 2 Stand der Technik

Die Analyse von androgenen anabolen Steroiden ist für die Kriminaltechnik eine Herausforderung, da die am weitesten verbreitete Applikationsform aus in Speiseölen gelösten Steroiden besteht (Depotzubereitungen für die intramuskuläre Injektion). Dennoch existieren bereits seit 1966 erste Verfahren für die Identifizierung und Quantifizierung von anabolen Steroiden in öligen Zubereitungen. Dabei handelte es sich um quantitative *Dünnschichtchromatographie* (DC)-Verfahren, bei denen die erhaltenen DC-Flecken ausgekratzt und nach weiterer Aufarbeitung in einem Spektrometer quantifiziert wurden<sup>14,15</sup>. Der Vorteil dieser Verfahren ist die Abtrennung der öligen Matrix auf der DC-Platte, da diese nach der Analyse entsorgt wird und somit keine Kontaminationsgefahr des Trennsystems besteht. Erst in den 90er Jahren wurden weitere Untersuchungsverfahren zum Quantifizieren von anabolen Steroiden in öligen Zubereitungen veröffentlicht. Statt DC-Verfahren wurden *Mizellarelektrokinetische-Kapillarchromatographie* (MEKC)- und *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie* (HPLC)-Verfahren verwendet<sup>16,17</sup>. Allerdings wurden die Verfahren vor allem für die Analyse von Tabletten und Lösungen entwickelt. Für die Analyse von öligen Zubereitungen empfehlen Meyers et al. die einmalige Extraktion mit 100 mL Methanol, für die sie Wiederfindungsraten von größer als 95% angeben. Walters et al. weisen darauf hin, dass mittels wiederholter Extraktion der öligen Zubereitungen mit Methanol Wiederfindungsraten von 100% erreicht werden können. In einer Monographie „Testosterone and Esters“ der SWGDRUG wurde 2005 eine letzte aktualisierte Version für die Vorgehensweise bei der Analytik von Testosteron und Testosteronestern veröffentlicht, die zwar quantitative Analysenverfahren beschreibt aber einschränkt, dass diese nicht mit öligen Zubereitungen getestet wurden<sup>18</sup>. In Abgrenzung zu diesen bisher durchgeführten Arbeiten sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation Verfahren entwickelt werden, um die quantitativen Informationen über jede einzelne Esterform in öligen Matrices zu erhalten. Zu diesem Zweck werden Möglichkeiten untersucht, die ölige Matrix vollständig zu entfernen um somit neben der Quantifizierung der Esterformen (Gewinnung von Profilinginformationen) auch die Kopplung der Trenntechniken mit einem Massenspektrometer zu ermöglichen. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf das benötigte Lösemittelvolumen gelegt, da eine Extraktion einer Untersuchungsprobe mit 100 mL Methanol zu einem nicht tolerierbaren Verbrauch an Lösemittel führen würde. Alternativ wird die Verwendung einer monolithischen Säule ohne vorherige Abtrennung der öligen Matrix getestet.

Für die massenspektrometrische Analyse von Arzneimitteln war es, bis zur Entwicklung von Techniken zur direkten Massenspektrometrie, immer notwendig, diese in eine gelöste Form zu überführen. Mit der Etablierung der direkten Massenspektrometrie wurden vereinzelte Untersuchungen zur Eignung der DESI-MS für die Analyse von unterschiedlichen Arzneimitelformen durchgeführt. So wurden 2006 von Leuthold et al. verschiedene Ecstasytabletten mittels DESI-MS untersucht<sup>19</sup>. Cooks und Mitarbeiter beschrieben 2005 und 2007 ebenfalls die Anwendung der DESI-Technik für die Untersuchung von Tabletten, wobei als Untersuchungsobjekte originale Arzneimittel verwendet und im positiven wie auch im negativen Ionenmodus analysiert wurden<sup>20,21</sup>. Ebenfalls im Jahr 2007 wurden von Ratcliffe et al. DESI-MS Messungen an beschichteten Tabletten durchgeführt, allerdings wurde die Beschichtung vor den Analysen mit einem Skalpell entfernt<sup>22</sup>. Für die Analyse von Arzneimitteln in Pulverform wurde im Jahr 2009 eine Vorgehensweise von Kauppila und Mitarbeitern vorgestellt. Diese beschränkte sich allerdings nur darauf, die pulvrigen Proben in Lösung zu überführen und diese nach Eintrocknung mittels DESI-MS zu untersuchen<sup>23</sup>. Anhand dieser Arbeiten ist zu erkennen, dass zwar vereinzelt DESI-MS Experimente an Tabletten durchgeführt wurden, bisher aber keine Untersuchungen zu der Eignung der DESI-MS zur Direktanalytik beschichteter Tabletten und Steckkapseln vorhanden sind. Für die Analyse von pulvrigen Arzneimitteln wurde zwar eine Vorgehensweise veröffentlicht, allerdings kommt diese nicht ohne eine Probenvorbereitung aus. Aus diesen genannten Gründen werden in dieser Arbeit Verfahren entwickelt, um Steckkapseln, Pulver und beschichtete Tabletten direkt mittels DESI-MS zu analysieren.

Im Bereich der synthetischen Cannabimimetika wurden seit dem Auftauchen dieser Substanzen in ‚Spice-Produkten‘ viele Forschungsarbeiten durchgeführt. Diese konzentrierten sich vor allem auf den Konsumnachweis in Körperflüssigkeiten und Haaren, weswegen neben der Erarbeitung von Analysenverfahren die Aufklärung des Metabolismus von synthetischen Cannabimimetika im Vordergrund stand. Heutzutage existieren deshalb quantitative Analysenverfahren für die Bestimmung von synthetischen Cannabimimetika und deren Metaboliten in menschlichem Plasma<sup>24,25,26</sup>. In dem für die Kriminaltechnik wichtigen Bereich der Materialanalytik wurden jedoch keine Forschungsarbeiten durchgeführt. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit ein schnelles und flexibles quantitatives UHPLC-DAD-MS Verfahren für die Untersuchung von synthetischen Cannabimimetika in ‚Spice‘-Produkten entwickelt werden. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der notwendigen Probenvorbereitung und auf der

Anwendung des Analysenverfahrens für die Untersuchung der Wirkstoffverteilung, um so Vergleiche zwischen unterschiedlichen Kräutermischungen zu ermöglichen und um Hinweise auf den Herstellungsprozess von Kräutermischungen erhalten zu können. Für die schnelle und eindeutige Identifizierung der synthetischen Cannabimimetika in ‚Spice‘-Produkten sollte ein direkt-massenspektrometrisches Verfahren für die Untersuchung von Kräutermischungen entwickelt werden.

Die DESI-Technik ist, aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur ESI-Technik, vor allem für die Ionisierung von polaren Substanzen geeignet<sup>27</sup>. Im Bereich der forensisch-toxikologischen Materialanalytik kommen aber auch unpolare Substanzen als Untersuchungsgegenstand vor (z.B. verschiedene Steroide). Eine Technik, die sich für die Ionisierung von unpolaren Substanzen eignet ist die *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI)-Technik<sup>27</sup>. Aus diesem Grund sollte die Direct Probe-Technik als direkt-massenspektrometrische Technik, die auf der APCI-Technik beruht, mit der DESI-Technik verglichen werden. In diesem Zusammenhang wird weiterhin untersucht, welcher Einfluss auf DESI-MS-Analysenergebnisse durch die Verwendung von unterschiedlichen Massenspektrometern besteht.

## 3 Theorie

### 3.1 Rauschdrogen

Unter dem Begriff Rauschdrogen wird eine Vielzahl von Stoffen und Verbindungen zusammengefasst, weswegen eine genaue Definition des Begriffes schwierig ist. Eine Möglichkeit besteht in der folgenden: Rauschdrogen enthalten Wirkstoffe, die im menschlichen Körper eine psychotrope Wirkung hervorrufen.

Im Allgemeinen werden Rauschdrogen in die Gruppen der klassischen, der biogenen und der Designer-Drogen eingeteilt, wobei jede dieser Gruppen in weitere Untergruppen eingeteilt wird.

#### 3.1.1 Klassische Rauschdrogen

Zu der Gruppe der klassischen Rauschdrogen gehören die Substanzen, die den Großteil (ca. 90%) des Rauschgiftmarkts ausmachen. Dies sind: Opiate (insbesondere Heroin), Cocain, Cannabisprodukte (Marihuana, Haschisch) und synthetische Drogen, wie Substanzen des Amfetamintyps (ATS, amphetamine-type stimulant) die unter anderem in Ecstasytabletten vorkommen.

Der Handel und der Besitz dieser klassischen Rauschgifte sind durch das Betäubungsmittelgesetz (BtMG) weitgehend eingeschränkt, da es sich um Betäubungsmittel der Anlage I bzw. Anlage III des BtMG handelt. Allgemein zählen alle Wirkstoffe, die in den Anlagen des BtMG aufgeführt sind, als Betäubungsmittel und unterliegen besonderen Auflagen, welche sich nach der unterschiedlichen Anlage, in der ein Wirkstoff aufgeführt ist, richten.

- In Anlage III sind die *verkehrs-fähigen und verschreibungsfähigen* Betäubungsmittel gelistet. Darunter zählen Wirkstoffe wie z.B. Morphin.
- In Anlage II sind die *verkehrs-fähigen, aber nicht verschreibungsfähigen* Betäubungsmittel gelistet. In diese Kategorie fallen z.B. Designer-Drogen (JHW-018, JWH-210 etc.) und Vorläufersubstanzen, die für die Synthese von Arzneimitteln benötigt werden.
- In Anlage I sind die *nicht verkehrs-fähigen* Betäubungsmittel aufgeführt. Dies sind Substanzen, die keinem anderen Zweck, außer illegal als Rauschgift konsumiert zu werden, dienen.

Im BtMG §29 Absatz 1 Satz 1 Nr. 3 heißt es: „Mit Freiheitsstrafen bis zu 5 Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft wer Betäubungsmittel besitzt, ohne zugleich im Besitz einer schriftlichen Erlaubnis für den Erwerb zu sein“, dadurch liegt für Betäubungsmittel eine Besitzstrafbarkeit vor. Eine Genehmigung für den Erwerb erfolgt durch die Bundesopiumstelle (BOPST) des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), das zum Geschäftsbereich des Bundesgesundheitsministeriums (BMG) zugeordnet ist. Zu diesen Genehmigungen gehören unter anderem Betäubungsmittelrezepte für Substanzen aus der Anlage III sowie Umgangsgenehmigungen für Forschungseinrichtungen und Laboratorien (es können für Substanzen aus allen drei Anlagen Umgangsgenehmigungen erteilt werden). Im BtMG §29 Absatz 3 ist die besondere Schwere eines Verstoßes gegen das BtMG definiert. Unter anderem zählt dazu der gewerbsmäßige illegale Handel mit Betäubungsmitteln. Als Unterscheidungskriterium zwischen Eigenkonsum und illegalem gewerbsmäßigem Handel wird die sogenannte „Nicht geringe Menge“ verwendet. Dabei handelt es sich um Schwellenwerte die vom Bundesgerichtshof (BGH) in Musterstrafverfahren festgelegt werden. Übersteigt die bei einem Verdächtigen gefundene Menge die Nicht geringe Menge wird davon ausgegangen, dass dieser mit der Substanz gewerbsmäßigen Handel treibt, wodurch ein höheres Strafmaß angelegt wird. Dadurch, dass die Nicht geringe Menge nicht im BtMG erfasst ist, ist sie für Richter nicht bindend. Gerade bei einer nur knappen Überschreitung wird nicht zwangsläufig die besondere Schwere des Verstoßes festgestellt. Bei x-facher Überschreitung wird das resultierende Strafmaß aber unter anderem an dem Faktor X festgemacht.

#### **3.1.2 Biogene Drogen**

Biogene Drogen sind Substanzen oder Produkte, die primär aus Pflanzen oder Tieren gewonnen wurden. Einfache chemische oder physikalische Veränderungs- und Umwandlungsprozesse (z.B. Trocknung und Filterung) dürfen dabei vorgenommen werden. Es findet jedoch keine komplexe Umwandlung oder chemische Vollsynthese statt. Bekannte biogene Drogen sind Khat (*Catha edulis*) und sogenannte Zauberpilze (magic mushrooms), z.B. *Stropharia cubensis*. Bei biogenen Drogen ist im Gegensatz zu anderen Rauschdrogen keine Besitzstrafbarkeit vorhanden, da neben dem Besitz eine Missbrauchabsicht erkennbar sein muss. Aus diesem Grund ist es für Kakteenzüchter erlaubt einen Peyotekaktus (*Lophophora williamsii*)

zu besitzen, obwohl dieser das Betäubungsmittel *Mescaline* enthält, welches der Anlage I des BtMG unterstellt ist.

#### 3.1.3 Designer-Drogen

Designer-Drogen sind Substanzen, die durch eine Veränderung der Molekularstruktur einerseits optimiert (psychotrop) wirken sollen, andererseits mit dem expliziten Ziel der Umgehung des Betäubungsmittelgesetzes hergestellt werden. Erst mit der gesetzlichen Erfassung im BtMG werden (dann vormalige Designe- Drogen) zu Betäubungsmitteln (z.B. MDMA). Zu diesem Zweck werden unter anderem die Verpackungen und auch die Darreichungsform der Designer-Drogen auf die entsprechende Zielgruppe abgestimmt.

So existieren Gelatinekapseln, die von ihrer Aufmachung den Eindruck erwecken es handele sich um biogene Drogen und auch als *Herbal Ecstasy* verkauft werden, die allerdings vollsynthetische Wirkstoffe (die oft/zunächst nicht dem BtMG unterliegen) enthalten. Durch die Verwendung von Steckkapseln wird den Konsumenten die orale Aufnahme nahegelegt. Die Möglichkeit der Aufnahme des *Herbal Ecstasy* durch oralen Konsum ist wichtig, da mit diesen Produkten klassische Ecstasy-Tabletten ersetzt werden sollen, die ebenfalls oral konsumiert werden. Innerhalb der Steckkapseln befindet sich meist gemahlenes Kräutermaterial, dass mit synthetischen Wirkstoffen vermischt wurde. In Abbildung 1 sind exemplarisch zwei *Herbal Ecstasy* Produkte abgebildet.



Abbildung 1: Verpackung und in der Packung enthaltene Steckkapseln der Herbal Ecstasy Produkte *x4 Ecstasy* (oben) und *Speedos* (unten).

In den ersten *Herbal Ecstasy* Produkten kamen als Wirkstoffe Ephedra und Coffein vor. Diese Wirkstoffkombination sollte der Wirkung für die Konsumenten, die durch den in Ecstasy-Tabletten verwendeten Wirkstoff MDMA hervorgerufen wird, entsprechen. MDMA zählt dabei zu der Gruppe der Entactoene. Dabei handelt es sich um Substanzen unter deren Einfluss die eigenen Emotionen intensiver wahrgenommen werden. Heute kommen hauptsächlich Substanzen aus der Gruppe der Piperazine als Wirkstoffe in *Herbal Ecstasy* Produkten vor, die ursprünglich nicht den Anlagen des BtMG unterstellt waren. Für den Gesetzgeber besteht zwar die Möglichkeit über Eilverordnungen Wirkstoffe in das BtMG aufzunehmen, allerdings tauchen meistens direkt nach der Aufnahme in die Anlagen des BtMG neue, nicht unterstellte Piperazine auf. Eilverordnungen sind nur ein Jahr gültig und innerhalb dieses Zeitraums muss eine Regelunterstellung erfolgen, da die Substanzen ansonsten nach Ablauf des Jahres automatisch nicht mehr als Betäubungsmittel gelten.

Wirkstoffe die nicht durch das BtMG erfasst werden, aber eine Veränderung im menschlichen Körper hervorrufen benötigen laut § 2 des Arzneimittelgesetz (AMG) einer Genehmigung. Weiterhin ist der Handel mit bedenklichen Arzneimitteln nach § 5 des AMG verboten. Als bedenklich werden dabei Arzneimittel eingestuft, die eine schädliche Wirkung auf den menschlichen Körper haben, die über ein vertretbares Maß hinausgeht. Nach diesen Definitionen ist der Handel von Designer-Drogen, die Wirkstoffe enthalten, die nicht dem BtMG unterstellt sind, verboten. Das Verbot richtet sich dabei aber ausschließlich auf den Handel und nicht auf den Besitz. Aus diesem Grund wird für Designer-Drogen auch häufig der Begriff *Legal High* verwendet, der die suggerierte Legalität dieser Produkte widerspiegeln soll.

Neben den *Herbal Ecstasy* Produkten, die als Ersatz von Ecstasy-Tabletten designt wurden, sind in den letzten Jahren vermehrt sogenannte als *Badesalze* deklarierte Produkte aufgetaucht. Diese werden als weißes Pulver, das meistens aus einer Zuckerkomponente, Coffein und den Wirkstoffen besteht, in Ziplock-Tüten verkauft. Auf der Verpackung werden keine Wirkstoffe angegeben, sondern nur darauf verwiesen, dass das Produkt nicht zum Konsum geeignet ist. Dennoch sind in den Produkten psychoaktive Substanzen vorhanden. Allerdings handelt es sich dabei meistens nicht um Piperazin-Derivate, wie bei den *Herbal Ecstasy*, sondern um Cathinon-Derivate. Durch die Wahl der Darreichungsform (pulvriges Material) und den zugesetzten Wirkstoffen (Cathinon-Derivate zählen wie Amfetamin zu den Stimulanzien) wurden Badesalze als Ersatz des klassischen Amfetamin designt, bei dem die Aufnahme



durch Schnupfen erfolgt. In Abbildung 2 sind exemplarisch zwei typische Badesalze und deren Verpackung dargestellt.



Abbildung 2: Verpackung und Ziplock-Tüte des Badesalzes *mojo* (oben) und *Charge+* (unten).

Designer-Drogen mit dem höchsten Verbreitungsgrad sind aber sogenannte Kräutermischungen, die als vermeintlich harmlose Räucherware über das Internet und in Headshops vertrieben werden. Diese Produkte werden gezielt als Cannabisersatz designet. Auf den Verpackungen wird dabei nur angegeben, dass es sich um Räucherware handelt, die zur Raumluftverbesserung dient. In Internetforen wird jedoch berichtet, dass beim Rauchen der Kräutermischungen cannabisähnliche Effekte auftreten. Beim ersten Auftauchen dieser *Legal Highs* bestand auf Seiten der forensischen Analytik zunächst Unklarheit darüber, ob die berausende Wirkung beim Konsum auf einzelne der enthaltenen weitgehend unbekanntenen Kräuter, auf synergetische Wirkeffekte oder auf zugesetzte synthetische Substanzen zurückzuführen ist, da auf der Verpackung verschiedene Pflanzen als Bestandteil der Kräutermischung deklariert waren. Die Verwendung einzelner Pflanzen wie z.B. die als *Wild Dagga* oder *Lion's Tail* deklarierte *Leonotis leonorus*, die nach einschlägiger Literatur (z.B. Christian Ratsch<sup>28</sup>) oder Open Source Informationen als Marihuana-Substitut bekannt sind, ließ es zumindest grundsätzlich denkbar erscheinen, dass die beschriebene cannabisähnliche Wirkung der Kräutermischungen auf pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe dieser Pflanzen zurückzuführen ist<sup>29</sup>. In Abbildung 3 ist eine der als zuerst aufgetauchten Kräutermischungstüten abgebildet.



Abbildung 3: Verpackung und Inhalt einer Kräutermischungstüte *Spice Diamond*.

Ende 2008 wurde dahingehend von einem Frankfurter Pharmaunternehmen eine Studie veröffentlicht, in der das vollsynthetische Aminoalkylindol JWH-018 in verschiedenen Kräutermischungen, unter anderem *Arctic Synergy*, nachgewiesen wurde. Nur einen Monat später wurde in einer gemeinsamen Studie des rechtsmedizinischen Instituts des Universitätsklinikums Freiburg und des Kriminaltechnischen Instituts des Bundeskriminalamtes das höhere Homologe CP47,497-C<sub>8</sub> des synthetischen, nicht-klassischen Cannabinoids CP47,497 in *Spice* und ähnlichen Produkten als Hauptwirkstoff nachgewiesen<sup>30</sup>. Durch diese beiden Studien konnte bewiesen werden, dass die cannabisähnliche Wirkung der Kräutermischungen aufgrund absichtlich zugesetzter und nicht auf den Verpackungen deklarierten vollsynthetischer Zusätze erzielt wurde. Als Kräutermatrix für die Herstellung von Kräutermischungen wird fast ausschließlich das dem Tabak ähnliche Kraut *Damiana (Tumera diffusa)*<sup>31</sup> verwendet. Die Art und Weise, wie die vollsynthetischen Wirkstoffe der Kräutermatrix zugesetzt werden wurde bisher jedoch noch nicht aufgeklärt.

Aufgrund der vollsynthetischen Zusätze, bei denen es sich um Substanzen handelt, die noch nie am Menschen getestet wurden, und der Gefahr die gerade für die Zielgruppe der Jugendlichen von diesen Produkten ausging, wurden am 19.01.09 durch die *Zweiundzwanzigste Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften* (22. BtMÄndV) die Substanzen JWH-018 und CP47,497-C<sub>8</sub> einschließlich dreier Homologe gem. §1 Abs. 3 des Betäubungsmittelgesetz (BtMG) per Eilverordnung in die Anlage II (verkehrsfähige, aber nicht verschreibungsfähige Betäubungsmittel) aufgenommen (Die Regelunterstellung erfolgte mit der 24. BtMÄndV).

Seit dem im Jahr 2009 intensiv über das Phänomen der sogenannten *Legal Highs* in den Medien berichtet wurde stieg die Zahl von neuen Designer-Drogen sprunghaft an. Durch diese Entwicklung konnte schnell festgestellt werden, dass die bisherige Praxis der Aufnahme von

genau definierten Substanzen in Anlage II des BtMG nicht ziel führend ist, da nach jeder Unterstellung neue nicht unterstellte Substanzen auftauchen. Diese Problematik beschränkt sich nicht nur auf Deutschland sondern ist ein weltweites Problem. Mittlerweile haben einige europäische Länder auf die Situation reagiert und Gesetzesänderungen erlassen. So wurde in Österreich<sup>32</sup> ein eigenes Gesetz und in England<sup>33</sup> eine Erweiterung des dortigen Betäubungsmittelgesetzes für Designerdrogen erlassen. Beide Länder definieren in diesen Gesetzen keine Einzelsubstanzen sondern Substanzgruppen. In Polen wurde sogar ein Gesetz erlassen, dass alle Stoffe, die als Ersatz für eine Droge in Umlauf gebracht werden verbietet<sup>34</sup>. In Deutschland wird derzeit über den Umgang mit diesem neuen Phänomen der Designer-Drogen diskutiert. Bis zu einer Entscheidung werden weiterhin Einzelsubstanzen dem BtMG unterstellt. Seit 2009 gab es bis dato fünf weitere BtMÄndV (Nr. 23-27) in denen insgesamt 56 neue Designer-Substanzen unterstellt wurden.

Da die unterstellten Substanzen teilweise zu der Gruppe der Cannabinoide gehören und diese für die vorliegende Doktorarbeit von großer Bedeutung sind, wird im Folgenden eine Übersicht dieser Substanzklasse gegeben.

#### **3.1.4 Cannabinoide**

Unter dem Begriff Cannabinoide wird eine Vielzahl von strukturell teils sehr unterschiedlichen Verbindungen zusammengefasst. Diese lassen sich in vier Substanzklassen gliedern: In die klassischen, die nicht-klassischen und die Endo-Cannabinoide, sowie die Amminoalkylindole, bei denen es sich streng genommen nicht um Cannabinoide handelt, da bei diesen ein anderes Grundgerüst vorliegt. Alle Wirkstoffe aus diesen vier Substanzklassen zeigen Bindungsaffinitäten zu den Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 (CNR1 und CNR2, meistens als CB<sub>1</sub> und CB<sub>2</sub> bezeichnet)<sup>35</sup>, welche ein Teil des Endocannabinoid-Systems sind. Im Folgenden werden die vier Unterarten sowie die beiden Cannabinoid-Rezeptoren näher erläutert.

##### **3.1.4.1 Klassische Cannabinoide**

Diese Klasse umfasst Substanzen, die sich strukturell unmittelbar von (-)- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ((-)- $\Delta^9$ -THC), welches der Hauptwirkstoff in *Cannabis sativa* ist, ableiten lassen. Weiterhin gehören die ebenfalls in *Cannabis sativa* vorkommenden Substanzen Cannabinol und Cannabidiol, sowie synthetische Analoga wie  $\Delta^{6a,10a}$ -THC und HU-210 dazu (siehe Abbildung 4).

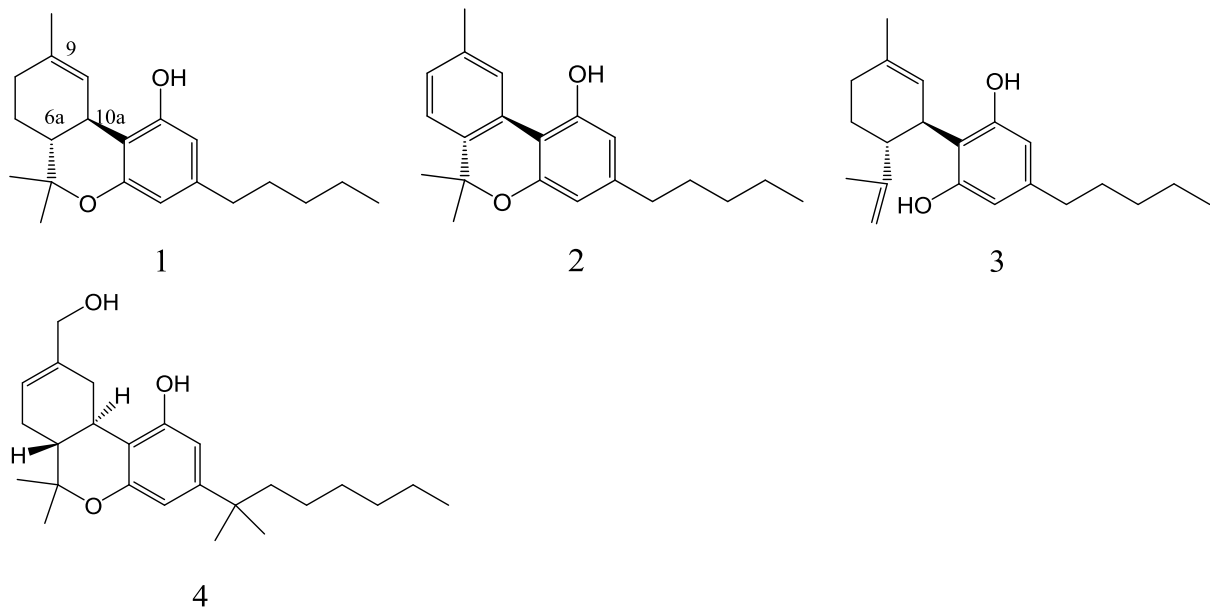


Abbildung 4: Strukturen der Klassischen Cannabinoide: (-)- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol **1**, Cannabinol **2**, Cannabidiol **3** und HU-210 **4**.

### 3.1.4.2 Nicht-klassische Cannabinoide

Die nicht-klassischen Cannabinoide, die in einigen der Kräutermischungen als Hauptwirkstoff identifiziert werden konnten, wurden nahezu vollständig in einem Forschungsprogramm, dem *cannabinoid project*, von dem Pharmaunternehmen *Pfizer* entwickelt und sind den Klassischen Cannabinoiden strukturell nahe verwandt. Einer dieser Wirkstoffe ist das 5-(1,1-Dimethyloctyl)-2-[(1R,3S)-3-hydroxycyclohexyl]-phenol (siehe Abbildung 5), das durch die Verwendung als vollsynthetischer Wirkstoff in Kräutermischungen wie z.B. *Spice*, heutzutage besser unter der Bezeichnung CP47,497-C<sub>8</sub> bekannt ist.

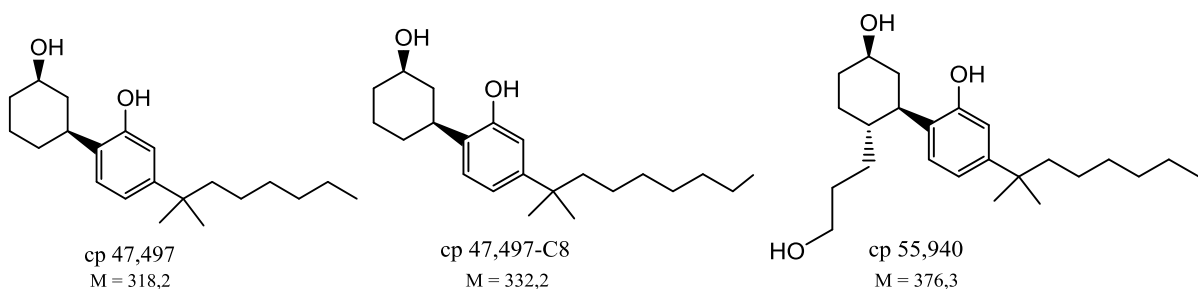


Abbildung 5: Strukturen von drei verschiedenen nicht-klassischen Cannabinoiden.

### 3.1.4.3 Endocannabinoide

Endocannabinoide sind körpereigene Substanzen, die auf die CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren wirken. Das erste Endocannabinoid *Anandamid* (siehe Abbildung 6) wurde von *Mechoulam* aus Schweinehirn isoliert<sup>36</sup>. Als gemeinsame Strukturmerkmale weisen die Endocannabinoide ein ungesättigtes Fettsäureamid auf. Die Cannabinoid-Rezeptoren, zusammen mit den darauf

wirksamen Agonisten und Antagonisten, den Endocannabinoiden, werden als Endocannabinoid-System bezeichnet. Die Endocannabinoid-Systeme sind außerdem die eigentlichen, vom menschlichen Körper entwickelten, Agonisten der Cannabinoid-Rezeptoren.

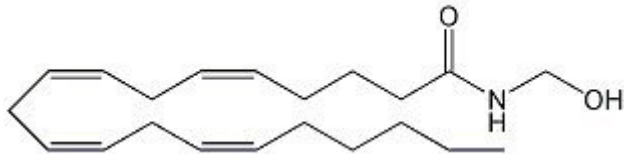


Abbildung 6: Struktur des ersten isolierten Endocannabinoids *Anandamid*.

#### **3.1.4.4 Cannabimimetika (Aminoalkylindole)**

Einige Wirkstoffe aus der Substanzklasse der Aminoalkylindole sind cannabimimetische Verbindungen. Im Gegensatz zu den nicht-klassischen Cannabinoiden weisen die Aminoalkylindole keine rein strukturellen Ähnlichkeiten zu den klassischen Cannabinoiden, oder zu den Endocannabinoiden auf, besitzen aber dennoch teilweise eine hohe Affinität zu den Cannabinoid-Rezeptoren. Aus diesem Grund werden bei der Herstellung von Kräutermischungen zumeist hochpotente Aminoalkylindole als psychoaktive Substanzen verwendet.

Die meisten derzeit bekannten Verbindungen wurden erstmals im Rahmen von Studien synthetisiert. Die Namen der jeweiligen Substanzen sind dabei häufig mit dem Studienleiter verknüpft. So wurden die JWH-Verbindungen (z.B. JWH-018, 1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indol) von einer Forschungsgruppe um *John W. Huffman* an der *Clemson Universität* und die AM-Verbindungen (z.B. AM-2201, 1-(5-fluoropentyl)-3-(1-naphthoyl)indol) von einer Forschungsgruppe um *A. Makriyannis* an der *Universität von Connecticut* synthetisiert. Weitere Verbindungsklassen wurden in Wirkstoffstudien von Pharmaunternehmen hergestellt. Dazu zählen unter anderem die ORG-Verbindungen (z.B. ORG-27569) von der Firma *Organon International* und die ULR-Verbindungen (z.B. ULR-144) von der Firma *Abott Laboratories*. Neben den Aminoalkylindolen, die in der Literatur bekannt sind, sind in den letzten Jahren auch vermehrt nicht literaturbekannte Verbindungen in Kräutermischungen nachgewiesen worden. Dazu zählt unter anderem das als APINACA bzw. AKB48 bezeichnete N-(1-adamantyl)-1-pentyl-1H-indazol-3-carboxamid, das erstmals 2012 in Japan in einer Kräutermischung nachgewiesen wurde. In Abbildung 7 sind die Strukturen der zuvor genannten Substanzen dargestellt. Hier ist auch deutlich zu erkennen, dass das namensgebende Indolsystem in allen Substanzen, teilweise in etwas modifizierter Form, auftaucht.

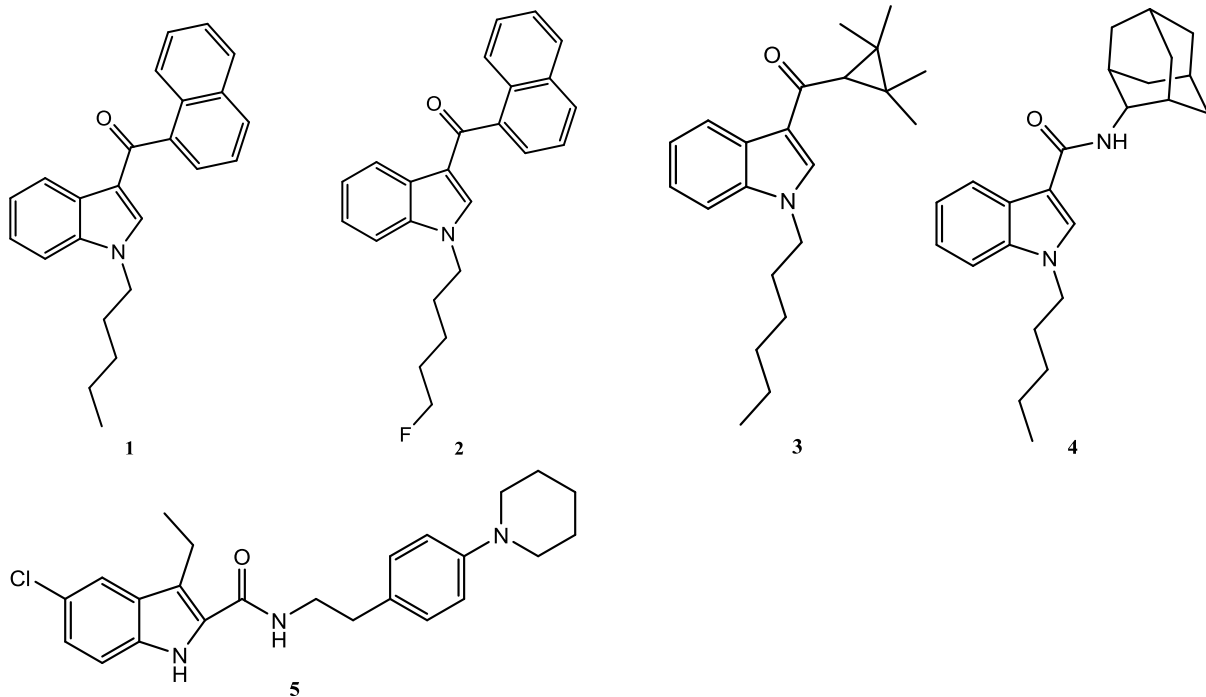


Abbildung 7: Strukturen unterschiedlicher Aminoalkylindole: **1** JWH-018, **2** AM-2201, **3** ULR-144, **4** APINACA, **5** ORG-27569.

Wie bereits erwähnt besitzen die synthetischen Cannabimimetika sehr unterschiedliche Affinitäten zu den Cannabinoid-Rezeptoren. Um die Affinitäten der unterschiedlichen Cannabimimetika zum  $CB_1$ -Rezeptor unterscheiden zu können werden die Affinitäts-Konstanten  $K_i$  verwendet. Diese werden bestimmt, indem die Fähigkeit der zu untersuchenden Substanz, radioaktiv markiertes WIN-55,212-2 ( $[^3H]$ WIN-55,212-2) von dessen Bindungsstelle in präparierten Membranen zu verdrängen, untersucht wird<sup>37</sup>. Über die Kenntnis der  $K_i$ -Werte ist es möglich eine Einschätzung zu der wahrscheinlichen Wirkpotenz von Cannabinoiden im Verhältnis zu  $\Delta^9$ -THC, was einen  $K_i$ -Wert von 10,2 aufweist, zu treffen. In dem ACMD (Advisory Council on the Misuse of Drugs) Bericht „Consideration of the major cannabinoid agonists“ listet der Autor *David Nutt* für eine Vielzahl von Cannabinoiden und Aminoalkylindolen die zugehörigen  $K_i$ -Werte auf. In Tabelle 1 ist für eine Auswahl an synthetischen Cannabimimetika der zugehörige  $K_i$ -Wert aufgeführt. Wie zu erkennen ist, weist JWH-081 mit einem  $K_i$ -Wert von 1,2 eine ungefähr neunmal höhere Affinität zu dem  $CB_1$ -Rezeptor als  $\Delta^9$ -THC auf.

Tabelle 1: Auflistung der  $K_i$ -Werte von ausgewählten Cannabimimetika<sup>38</sup>.

Substanz	$K_i$ -Wert
JWH-018	2,90
JWH-073	8,90
JWH-081	1,20

Substanz	$K_i$ -Wert
JWH-122	0,69
JWH-210	0,46
JWH-250	11,0
CP47,497	9,54
HU-210	0,06
$\Delta^9$ -THC	10,2

#### 3.1.4.5 Cannabinoidrezeptoren $CB_1$ und $CB_2$

Die vier zuvor beschriebenen Substanzklassen der Cannabinoide wechselwirken alle auf die eine oder andere Weise mit den Cannbinoid-Rezeptoren. 1988 beschrieben *Devane et al.* als Erste die Existenz eines G-Protein gekoppelten Cannabinoid-Rezeptors<sup>39</sup>. 1993 wurde ein zweiter G-Protein gekoppelter Cannabinoid-Rezeptor in Immunzellen gefunden<sup>40</sup>. Daraufhin wurde der Rezeptor, welcher im Zentralnervensystem angesiedelt ist, als  $CB_1$ -Rezeptor und der periphere Rezeptor als  $CB_2$ -Rezeptor bezeichnet. Es konnte ebenfalls geklärt werden, dass die psychotrope Wirkung der Cannabinoide überwiegend auf die Wechselwirkung mit dem  $CB_1$ -Rezeptor zurück zu führen ist, was an Mäusen getestet wurde, denen  $CB_1$  fehlt<sup>41</sup>. Die schmerzstillende Wirkung der Cannabinoide kommt hingegen durch Wechselwirkungen mit dem peripheren  $CB_2$ -Rezeptor zustande<sup>42</sup>.

Wie bereits erwähnt, existieren große Unterschiede in der Struktur der einzelnen Cannabinoide. Somit können die Wechselwirkungen zwischen den Wirkstoffen und den Rezeptoren nicht für alle Cannabinoide dieselben sein<sup>43,44</sup>. So kommt die Wechselwirkung zwischen den Aminoalkylindolen und den Cannabinoid-Rezeptoren durch *aromatic stacking* (Wechselwirkung zwischen den  $\pi$ -Systemen von Aromaten) zustande<sup>45</sup>. Bei den klassischen und den nichtklassischen Cannabinoiden sind hingegen drei Bindungspunkte relevant<sup>46,47,48,49</sup>. Und zwar:

- die Alkylseitenkette, eine zu lange oder zu kurze Seitenkette führt zu drastischen Einbrüchen in der Rezeptoraffinität
- die phenolische Hydroxylgruppe
- eine Bindungsstelle am zweiten Kohlenstoffring

Der Pyranring hingegen ist für die Wechselwirkungen nicht von Bedeutung, weswegen bei den nicht-klassischen Cannabinoiden auf diesen verzichtet werden konnte ohne Einbußen in der Rezeptoraffinität hin.

## 3.2 Doping/Arzneimittel

Der Begriff Doping wird heutzutage für eine Vielzahl von unterschiedlichen Gebieten verwendet. So wurde in einem Werbespot der Firma *Alpecin* die Verwendung eines Shampoos als „Doping für die Haare“ bezeichnet. Unter Verwendung dieser Tatsache könnte der Begriff Doping wie folgt definiert werden: Unter Doping wird die Einnahme von Substanzen oder die Verwendung von Methoden, die die Leistungsfähigkeit erhöhen, verstanden. Somit umschreibt der Begriff Doping nicht nur den Bereich der sportlichen Leistungssteigerung sondern auch die Leistungssteigerung in anderen Gebieten, wie zum Beispiel im mentalen Bereich. Bei Verwendung der obigen Definition würde die Einnahme von Kaffee auch als Doping zählen, da durch das aufgenommene Coffein eine Leistungssteigerung erreicht wird. Am häufigsten wird jedoch durch die Verwendung des Begriffes Doping eine nicht erlaubte Leistungssteigerung zum Ausdruck gebracht und ist vor allem mit dem sportlichen Wettkampf verknüpft. So definiert der Europarat in seinem Übereinkommen gegen Doping aus dem Jahre 1989 in Artikel 2: „Im Sinne dieses Übereinkommens bedeutet „Doping im Sport“ die Verabreichung pharmakologischer Gruppen von Dopingwirkstoffen oder Dopingmethoden an Sportler und Sportlerinnen oder die Anwendung solcher Wirkstoffe oder Methoden durch diese Personen“. Der Europarat versteht unter dem Begriff Doping somit nur eine Leistungssteigerung die sich auf den sportlichen Bereich bezieht und nicht erlaubt ist. Die *World Anti Doping Agency* (WADA) definiert Doping in Artikel 1 ihrer Richtlinien von 2004 „als Vorliegen eines oder mehrerer der nachfolgend in Artikel 2.1 bis Artikel 2.8 festgelegten Verstöße gegen Anti-Doping-Bestimmungen“. In den Artikeln 2.1 bis 2.8 ist unter anderem das Vorhandensein eines verbotenen Wirkstoffes, seiner Metabolite oder Marker in den Körpergewebs- oder Körperflüssigkeitsproben eines Athleten als Verstoß gegen Anti-Doping-Bestimmungen definiert. Wirkstoffe deren Verwendung die WADA als Doping definiert sind in der Verbotsliste der WADA aufgeführt. In dieser Liste sind die Substanzen entsprechend ihrer Wirkung in Gruppen zusammengefasst. Unter anderem handelt es sich dabei um Hormone, Wachstumsfaktoren, Beta-2 Agonisten, Diuretika und vor allem anabole androgene Steroide (AAS, anabolic androgenic steroids).



#### 3.2.1 Anabole androgene Steroide

Statt der korrekten Bezeichnung „anabole androgene Steroide“ wird häufig nur von „anabolen Steroiden“ gesprochen. Damit wird gleichzeitig auch dem Wunsch Ausdruck verliehen die anabole Wirkung von der androgenen abzukoppeln. Bis heute ist es bei allen Neuentwicklungen im Bereich der anabolen androgenen Steroide jedoch nicht gelungen eine rein anabole Wirkung zu erzielen. Es konnten allerdings Substanzen entwickelt werden, die vorwiegend anabole Eigenschaften mit nur geringer androgener Komponente aufweisen (z.B. Nandrolonundecanoat, Oxandrolon, Methandrostenolon etc.)<sup>50</sup>. Unter der anabolen Wirkung versteht man den Einfluss von z.B. Testosteron auf den Eiweißstoffwechsel im menschlichen Körper, durch den unter anderem der Aufbau der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin in der Muskulatur gesteigert wird. Dieser Effekt wird durch gleichzeitiges, intensives Muskeltraining noch verstärkt und ist der von Sportlern gewünschte Effekt, da dadurch eine Querschnittsvergrößerung der Myofibrillen und somit der Muskelfasern erreicht wird, was zu einer Erhöhung der Maximalkraft des Muskels führt. Unter der androgenen Wirkung versteht man vor allem den Einfluss auf die inneren und äußeren Geschlechtsmerkmale sowie auf den körpereigenen Hormonhaushalt. Häufig auftretende Nebenwirkungen bei der Einnahme von AAS sind deswegen Gynecomastie, Hodenatrophie, Cardiomyopathie und Thrombose.

In den letzten Jahrzehnten wurden vor allem Substanzen aus der Gruppe der anabolen Steroide zu Dopingzwecken verwendet. So zeigten verschiedene Studien in Europa, dass 15-20% aller Fitness-Studio-Besucher anabole Steroide konsumieren<sup>51,51b</sup>. Das entspricht in Deutschland einer Zahl von ungefähr einer Millionen<sup>52</sup> Konsumenten.

Anabole Steroide werden von den Konsumenten über drei verschiedene Hauptrouten bezogen.

- illegale Verschreibung oder Weitergabe/Abgabe von legalen Arzneimitteln von Medizinern und Apothekern
- Bezug über das Internet
- Schwarzmarkt

Der Bezugsweg über Mediziner und Apotheker ist nicht, wie zu erwarten, zu vernachlässigen sondern hat einen erheblichen Anteil an der Dopingmittelversorgung der Konsumenten. So zeigten Studien von Laure und Peters, dass in Großbritannien 61% der Studienteilnehmer an

gaben Dopingmittel von ihren Ärzten verschrieben bekommen zu haben<sup>53,54</sup>. In Deutschland liegt der Anteil laut einer Studie von Striegel bei 25%<sup>51b</sup>. Über das Internet besteht ein einfacher und diskreter Zugang zu Dopingmitteln weswegen vielfältige professionelle Webseiten betrieben werden auf denen verschiedenste Dopingmittel vertrieben werden. Gerade diesem Vertriebsweg ist polizeilich schwer entgegenzuwirken da die Server meist im Ausland angesiedelt sind und die Dopingmittel als Postsendungen im normalen Warenverkehr nur schwer zu identifizieren sind. Als Schwarzmarkt ist vor allem der Vertrieb von Dealern in Fitnessstudios anzusehen. Auf diesem so wie auch im Internet werden neben original Arzneimitteln auch Fälschungen sowie selbstgemachte Produkte vertrieben.

Testosteron kann als eine der am häufigsten verwendeten Dopingsubstanz angesehen werden. So wurden allein im Zeitraum 2003-2005 mehr als 900 positive Dopingtests an die WADA gemeldet<sup>55</sup>. Allerdings ist Testosteron bei oralem Konsum kaum wirksam, da es zu einem hohen Grad in der Leber metabolisiert (hoher first-pass-effekt) und ausgeschieden wird. Aus diesem Grund wird Testosteron häufig in Form von transdermalen Pflastern und Gelen verabreicht. Durch diese Applikationsform von Testosteron als Dopingsubstanz wird jedoch nur ein kurzfristiger Effekt erzielt, weswegen eine häufige Aufnahme von Testosteron, über einen längeren Zeitraum, erforderlich ist. Aus diesem Grund wird Testosteron meistens in einer esterfizierten Form aufgenommen. Die Testosteronester wirken dabei als ein Depot, da sie selbst keine anabole Wirkung besitzen, aber durch Metabolismus in anabol wirksames Testosteron umgewandelt werden. Die Depotwirkung nimmt dabei mit steigender Alkylseitenkettenlänge zu. Testosteron- und andere anabole Steroidester werden für die Humanapplikation in Öl (z.B. Rapsöl, Erdnussöl) gelöst und als intramuskuläre Injektion verabreicht, wodurch sich besondere Anforderungen an die Analytik ergeben (siehe unten).

Eine weitere Möglichkeit den Abbau von Testosteron in der Leber zu umgehen ist die chemische Modifikation (Designersteroid). Dabei findet eine gezielte Erhöhung der Metabolismusstabilität statt<sup>50</sup>. Diese kann unter anderem durch eine Methylierung in 17 $\alpha$ -Position erzielt werden, wodurch aus Testosteron Methyltestosteron und aus Boldenon Metandienon erzeugt wird. Diese Substanzen weisen jedoch eine sehr hohe Lebertoxizität auf<sup>56</sup>, weswegen in Deutschland kein Medikament mit diesen Substanzen zugelassen ist. Auf dem Schwarzmarkt sind jedoch eine Vielzahl von Produkten mit 17 $\alpha$ -methylierten Substanzen verfügbar<sup>57</sup>.

#### **3.2.2 Rechtslage in Deutschland**

Aufgrund der hohen Kosten die dem Gesundheitssystem durch die Verwendung von illegalen Arzneimitteln und dem Missbrauch von Dopingsubstanzen entstehen und um die Volksgesundheit zu schützen wurde im Jahr 2007 das Arzneimittelgesetz (AMG) novelliert und erheblich erweitert. Unter anderem wurde ein Tatbestand der besonderen Schwere eingeführt, verbunden mit der Anhebung der Höchstfreiheitsstrafe auf 10 Jahre. Durch die Erhöhung des Strafmaßes können die Strafverfolgungsbehörden auf erweiterte Ermittlungskompetenzen zugreifen. Im Zuge dieser Novellierung wurde dem Bundeskriminalamt die nationale Ermittlungszuständigkeit für Fälle des illegalen, internationalen und organisierten Handels mit Arzneimitteln zugeordnet. Weiterhin wurde am 22.11.2007 die „Verordnung zur Festlegung der nicht geringen Menge von Dopingmitteln“ (DmMV) durch das Innenministerium (BMI) und das Gesundheitsministerium (BMG) in Kraft gesetzt. Diese Verordnung ist angelehnt an die nicht geringe Menge aus dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG), deren Überschreitung (bei Besitz) ein erhöhtes Strafmaß zur Folge hat (siehe 3.1.1), da nicht mehr von Eigenkonsum sondern davon ausgegangen wird, dass mit den Substanzen gewerblicher Handel betrieben wird. Bei der Festlegung der nicht geringen Menge wurde auch die Toxizität der Substanzen berücksichtigt. So liegt die nicht geringe Menge von Boldenon bei 1500 mg und die von Metandienon bei nur 150 mg. Weiterhin wird zwischen freiem Testosteron (1500 mg) und Testosteron in Depotzubereitungen (632 mg, bezogen auf freies Testosteron) unterschieden. Durch das Einbringen der Steroidester in eine Ölmatrix wird die forensische Analytik dieser Dopingmittel vor Herausforderungen gestellt, da die klassischen quantitativen Methoden wie GC-MS und NMR nur in der Lage sind das freie anabole Steroid zu quantifizieren. Solange nur eine Esterform in der Ölmatrix vorhanden ist, ist das auch ausreichend. Wenn aber mehrere Esterformen ein und desselben anabolen Steroids vorhanden sind liefern diese Verfahren nur einen Summenparameter für das freie Steroid (z.B. Testosteron) und keine Einzelwerte für die jeweilige Esterform. Für die Straffestlegung ist die Art des Esters auch unerheblich, da die Nicht geringe Menge von Esterformen sich immer auf die Masse an freiem anabolem Steroid bezieht. Für die Strafverfolgung ist ein Vergleich von verschiedenen Sicherstellungen aber oft sehr wichtig, wozu die genaue Konzentration der jeweiligen Esterform bekannt sein muss, da nur dann eine Verknüpfung zwischen unterschiedlichen Fallkomplexen möglich ist („Profiling“).

#### **3.2.3 Arzneimittelfälschungen**

Durch die Verbreitung des Internets ist es heutzutage möglich zu jeder Tageszeit in Onlinemärkten verschiedenste Produkte zu erwerben. Dazu zählen unter anderem auch Arzneimittel. Die Vorteile dieser Onlineapotheken liegen vor allem in niedrigeren Preisen (Wegfall von Ladenmiete, Beratungspersonal) aber auch die Lieferung ins Haus und die Anonymität bei der Bestellung werden von vielen Kunden geschätzt. Neben seriösen und legal agierenden Onlineapotheken existiert heute auch eine Vielzahl von illegalen Webseiten, auf denen die unterschiedlichsten Arzneimittel auch ohne ein eigentlich benötigtes Rezept gekauft werden können. Über solche Webseiten werden aber fast ausschließlich Arzneimittelfälschungen vertrieben.

In Deutschland werden unterschiedliche Formen von Präparaten als Arzneimittelfälschungen unterschieden. Unter anderem werden Reimporte aus nicht EU Ländern als Arzneimittelfälschung eingestuft und entsprechend juristisch verfolgt (bei Reimporten handelt es sich um Präparate, die von der patentinhabenden Firma für ein anderes Land produziert wurden und nachträglich nach Deutschland bzw. in die EU importiert wurden). Weiterhin gelten alle Produkte als Arzneimittelfälschungen in denen Wirkstoffe enthalten sind, die durch ein Patent geschützt sind, und nicht von der patentinhabenden Firma produziert wurden. Aber auch Produkte, die einem bestehenden Medikament nachempfunden sind und andere oder keine Wirkstoffe (als die, die in den original Produkten vorhanden sind) enthalten zählen zu den Arzneimittelfälschungen.

Neben dem ökonomischen Schaden, den die patentinhabenden Firmen erleiden, gehen von Arzneimittelfälschungen auch enorme gesundheitliche Risiken aus. Dazu zählt unter anderem eine Über- oder Unterdosierung (bis zum Nichtvorhandensein) des in dem Präparat vorhandenen Wirkstoffs, aber auch die Verwendung von Substanzen und/oder Wirkstoffen, die zusätzlich in den Präparaten vorhanden sind.

Für die Identifizierung von Arzneimittelfälschungen ist immer ein Vergleich mit dem Original des gefälschten Produkts notwendig. Dabei wird neben äußerlichen Merkmalen, wie zum Beispiel Form, Größe, Gewicht und Verpackung, auch die Zusammensetzung des Präparats überprüft. Für die Analyse des Wirkstoffes und der weiteren in den Präparaten vorhandenen Substanzen existiert bereits eine Vielzahl von Verfahren und Methoden, die aufgrund der unterschiedlichen Probenmatrices aber sehr unterschiedlich sind und teilweise einen hohen Arbeitsaufwand und lange Analysenzeiten erfordern.

### 3.3 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie gilt heute als unverzichtbares analytisches Werkzeug in allen naturwissenschaftlichen Fachgebieten. Mit ihrer Hilfe ist es möglich Moleküle und auch Atome zu „wiegen“ und somit mehr Informationen über ihren Aufbau und ihre Zusammensetzung zu erhalten. Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus drei Teilen, der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor. In der Ionenquelle werdend dabei die zu untersuchenden Moleküle in Ionen umgewandelt. Der Analysator trennt die erzeugten Ionen nach ihren Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  und der Detektor detektiert ankommende Ionen und wandelt diese in elektrische Signale um.

#### 3.3.1 Ionenquellen

Um Moleküle/Atome analysieren zu können müssen diese ionisiert werden. Im Laufe der Jahre wurde eine Reihe von Ionenquellen entwickelt. Bei den entwickelten Methoden wird heutzutage grundsätzlich zwischen harten und weichen Ionisierungsmethoden unterschieden. Weiche Ionisierungsmethoden fragmentieren, im Gegensatz zu den harten, die zu untersuchenden Moleküle nicht oder nur in geringem Maße. Zu den harten Ionisierungsmethoden gehört unter anderem die *Elektronenstoßionisierung* (EI), die vor allem in der Kopplung mit der *Gaschromatographie* (GC) eingesetzt wird. Zu den weichen Ionisierungsmethoden gehören die *chemische Ionisierung* (CI), die *matrix assisted laser desorption* (MALDI), die *Felddesorption* (FD), das *Thermospray* (TSP), die *atmospheric pressure chemical ionisation* (APCI), die *fast atomic bombardment* (FAB) und die *Elektrospray-Ionisierung* (ESI). Durch diese weichen Ionisierungsarten werden vor allem Quasimolekülionen wie z.B.  $[M - H]^-$ ,  $[M + H]^+$  und  $[M + Na]^+$  erzeugt, wodurch eine Molmassenbestimmung der Molekülionen möglich ist. Dies wird erreicht indem die Masse der Ionen, die zusammen mit dem Molekül das Quasimolekülion bilden, aus der bestimmten Masse des Quasimolekülions heraus gerechnet wird.

Alle diese Techniken setzen allerdings voraus, dass der Analyt zur Ionisierung entweder in co-kristallisierter oder in gelöster Form oder direkt unter Hochvakuumbedingungen vorliegt. Im letzten Jahrzehnt wurden dagegen Ionisierungstechniken entwickelt die nicht mehr diesen Einschränkungen unterliegen, sondern in der Lage sind Ionen direkt von Oberflächen zu erzeugen. Die erste derartige Technik war die *Desorptions-Elektrospray-Ionisierung* (DESI), welche im Jahr 2004 von G. Cooks<sup>7</sup> entwickelt wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorwiegend die ESI- und die dazu nahe verwandte DESI-Technik verwendet, weswegen im Folgenden näher auf diese eingegangen wird.

#### **3.3.1.1 Elektrosprayionisierung (ESI)**

Die ESI-Technik wurde 1984 durch *Fenn* etabliert, der im Jahre 2002 den Chemie-Nobelpreis für seine Entwicklung bekam. Durch die Verleihung des Nobelpreises wird deutlich, welchen enormen Stellenwert diese Technik einnimmt. Die Elektrosprayionisierung ist, wie erwähnt, ein weiches Ionisierungsverfahren, welches unter Atmosphärendruck aus einer Flüssigkeit erfolgt. Darin liegt auch einer der Gründe, warum diese Technik so wichtig ist. Durch die Elektrosprayionisierung ist es möglich geworden, Flüssigkeitschromatographie, oder auch eine andere Flüssigtrennmethode, mit der Massenspektrometrie zu koppeln. Es ist aber auch gleichzeitig eines der schonendsten Ionisierungsverfahren und wird deswegen vor allem für die Analyse von Biomolekülen eingesetzt, da fragile Verbindungen, wie z.B. Proteine, nicht fragmentiert werden<sup>58</sup>.

Bei der Elektrosprayionisierung wird eine Flüssigkeit durch eine Edelstahl-nadel in eine Kammer gesprüht. Zwischen der Spitze der Nadel und einer plattenförmigen Gegenelektrode am Einlass des Massenspektrometers wird eine Potentialdifferenz von 2-5 kV angelegt. Die Polarität des erzeugten Feldes wird dabei in Abhängigkeit der Analyte auf positiv oder negativ eingestellt. Durch die angelegte Spannung kommt es an der Spitze der Nadel zu einer Ladungstrennung<sup>59</sup>, die dem angelegten Feld entgegen wirkt, wodurch sich eine geladene Flüssigkeitsschicht ausbildet. Wenn die Abstoßungskräfte zwischen den Ionen in der entstandenen Ladungsschicht größer als die Oberflächenspannung werden, wird die Oberfläche vergrößert und es bildet sich der so genannte *Taylor-Kegel*. An dessen Spitze tritt die Flüssigkeit als ein feines Aerosol aus, wobei jeder Tropfen dabei einen Ladungsüberschuss an der Oberfläche besitzt. Dem so erzeugten Spray ist ein Trockengasstrom (Stickstoff, 250-350 °C) entgegen gerichtet, der dafür sorgt, dass das in den Tropfen befindliche Lösungsmittel verdampft. Weiterhin wird, durch die so erzeugte Inertgasmatrix, die Analytzerersetzung verringert. Die Tropfen, in denen sich außer Lösungsmittel noch Elektrolytionen (je nach Trennsystem) und Analytionen befinden, werden dadurch immer kleiner. Die Abnahme des Tropfenradius bei gleichbleibender Ladungszahl führt zu einer Erhöhung des elektrischen Feldes an der Tropfenoberfläche. Wenn die Feldstärke eine kritische Grenze, das *Raylight-Limit*, erreicht, führen die Abstoßungskräfte zwischen den gleich geladenen Ionen zur *Coulomb-Explosion*, wodurch der Tropfen in viele kleinere Tropfen aufgeteilt wird. Diese entstandenen

Tropfen durchlaufen den gleichen Prozess. Für die endgültige Überführung der Ionen in die Gasphase existieren zwei Modelle:

Das *charge residue model* (CRM, dt. *Restladungsmodell*) von *Dole* und *Schmelzeisen-Redeker*, das davon ausgeht, dass die kleinsten Tropfen nur ein Analyt-Ion enthalten, welches durch vollständige Verdampfung des Lösungsmittels in die Gasphase überführt wird<sup>58</sup>. Dieses Modell ist besonders auf Makromoleküle wie z.B. Proteine anwendbar.

Das zweite Modell, das *ion evaporation model* (IEM, dt. *Ionenverdampfungsmodell*) von *Irbarne* und *Thomson* besagt, dass, bevor das eigentliche *Rayleigh Limit* erreicht ist, Analyt-Ionen von der Tropfenoberfläche emittiert werden und somit die *Coulombexplosion* vermieden wird<sup>60</sup>. Dieses Modell ist besonders auf kleine Moleküle anwendbar.

Die entstandenen kleinen Tropfen und die Ionen bewegen sich, wegen des angelegten Feldes und wegen des Vorpumpenvakuums, durch eine metallbedampfte Glas-Transferkapillare (Innendurchmesser ca. 0,5 mm) in den Analysatorvorraum, wo das Vorpumpenvakuum von etwa 5 mbar anliegt. Von dort gelangen sie durch ein Skimmersystem in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers, wo ein elektrostatisches Linsensystem für Fokussierung sorgt und die eigentliche Detektion stattfindet.

#### **3.3.1.2 Desorptions-Elektrospray-Ionisierung (DESI)**

Wie zu Beginn des Kapitels bereits erwähnt wurde im Laufe des letzten Jahrzehnts Ionisierungstechniken entwickelt, die in der Lage sind Ionen direkt von Oberflächen zu erzeugen. So wurde kurz nach der Entwicklung der DESI-Technik im Jahr 2005 von *Durst* die *Direct Analysis in Real Time* (DART)<sup>61</sup> Technik vorgestellt. Da schnell zu erkennen war welches Potential in diesen Techniken liegt wurden in kürzester Zeit Modifikationen entwickelt um das Anwendungsspektrum zu erweitern. Mittlerweile existieren Variationen wie *Easy Sonic Spray Ionization* (EASI)<sup>62</sup>, *extractive electrospray ionization* (EESI)<sup>63</sup>, *desorption atmospheric pressure chemical ionization* (DAPCI)<sup>64</sup> und *desorption atmospheric pressure photoionization* (DAPPI)<sup>65</sup>. Das wichtigste Merkmal all dieser Techniken ist dabei, dass sie aus einer offen an der Atmosphäre gehandhabten Probenoberfläche Analyt-Ionen abtragen und diese durch ein Standardinterface in den Analysator überführen, wodurch die Möglichkeit entsteht Oberflächen ohne vorherige Probenvorbereitung direkt-massenspektrometrisch zu untersuchen. Da im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die DESI-Technik verwendet wurde wird deren Funktionsweise im Folgenden näher beschrieben.

Die DESI-Technik ist nahe verwandt mit der ESI-Technik, was nicht nur an der Namenswahl zu erkennen ist. So ist eine DESI-Quelle im Prinzip nichts anderes als eine pneumatisch unterstützte ESI-Quelle, die sich oberhalb einer zu untersuchenden Oberfläche befindet. Im Gegensatz zur ESI-Technik ist jedoch keine Gegenelektrode vorhanden, weswegen die Ionisierung nur über die Potentialdifferenz zwischen dem Sprühkopf und dem MS-Einlass erfolgt, wobei der Kontakt über das Spray hergestellt wird. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass immer ein gewisser Wasseranteil im Lösungsmittelgemisch vorliegt. Bedingt durch diesen Unterschied wird, im Gegensatz zur ESI-Technik, nicht das gesamte Spray ionisiert. Daraus ergibt sich, dass die Intensitäten bei DESI-Messungen geringer sind, als bei ESI-Messungen. Die DESI-Technik ermöglicht es, massenspektroskopische Direktuntersuchungen unter Atmosphärendruck vorzunehmen und, im Gegensatz zur ESI-Technik, feste Proben unter nahezu ESI-Bedingungen zu untersuchen<sup>66</sup>.

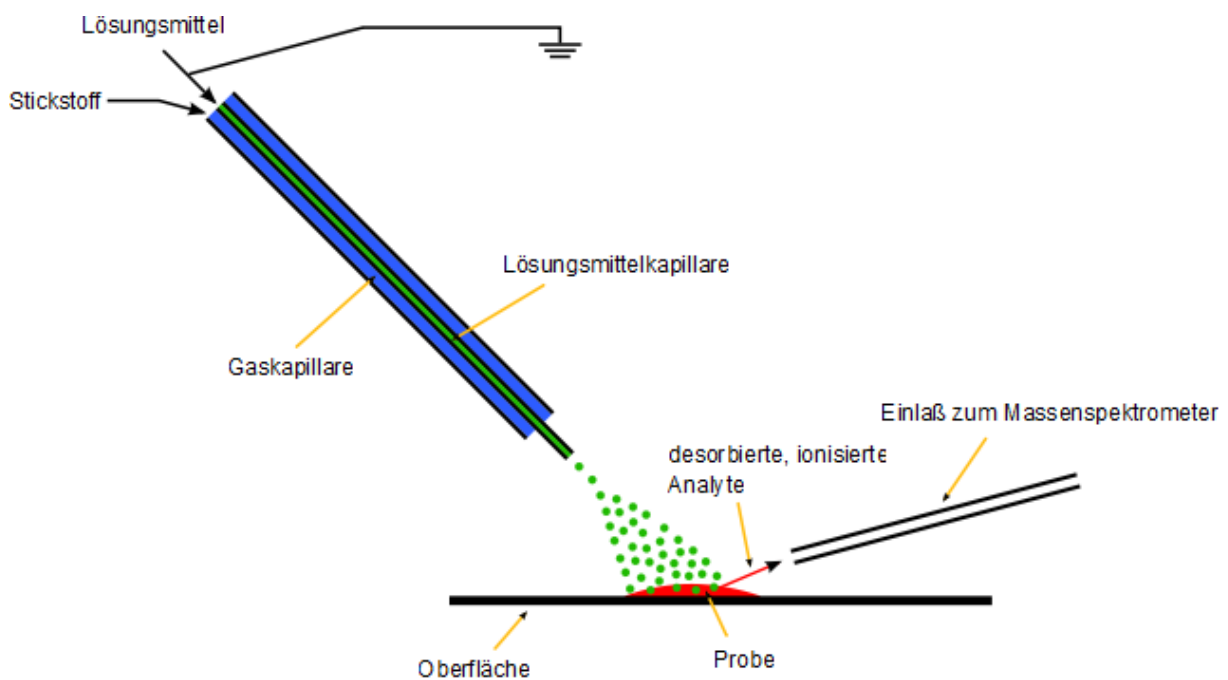


Abbildung 8: Schematische Darstellung der DESI-Quelle.

Der Aufbau einer DESI-Quelle ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Der wichtigste Teil der Quelle ist der Sprühkopf. Dieser besteht aus einer Kapillare, durch die Flüssigkeit gepumpt wird, die ihrerseits in einer Kapillare angeordnet ist, durch die Stickstoff gepresst wird. An den Einlass des Massenspektrometers wird eine Hochspannung (ca. 4 kV) angelegt. Durch den *Venturi-Effekt* entsteht an der Kapillarspitze ein gerichtetes Hochgeschwindigkeitsspray, bestehend aus geladenen Lösungsmitteltropfen. An dem Ort, wo das Spray auf-



trifft, werden Moleküle aus der Oberfläche in Lösemitteltröpfchen überführt, die durch das Vakuum ins Massenspektrometer gelangen.

Die Größe und die Form der Probenregion, die mittels des Sprays untersucht werden kann, hängt direkt von den geometrischen Begebenheiten der DESI-Quelle ab. So ist der Winkel, in dem das Spray auf die Oberfläche auftrifft, verantwortlich für die Form der Desorptionsregion, die meistens eine verzerrte Ellipse ist<sup>67</sup>. Durch den Abstand des Sprühkopfes von der Oberfläche und durch die Geschwindigkeit des Stickstoff- und des Lösungsmittelflusses, wird die Flächenabmessung der beprobten Region verändert. Diese Parameter, sowie die relative Anordnung zum MS-Einlass, beeinflussen die Ionisierungseffizienz und müssen für optimale Nachweisbedingungen für jede Substanzklasse optimiert werden. Es ist aber möglich, mit Standardeinstellungen zu arbeiten, mit denen der Großteil der Analyte mit akzeptabler Empfindlichkeit untersucht werden kann.

Die Prozesse der Überführung von Analytmolekülen aus der Probenoberfläche in die Gasphase und deren Ionisierung sind noch nicht genau bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass die geladenen Lösungsmitteltröpfchen teilweise Analyte aus der Oberfläche lösen. Weiterhin entstehen durch die mechanische Kraft der auftreffenden Tröpfchen oder durch elektrostatische Effekte geladene Lösungsmitteltröpfchen, die die Analyten enthalten. Die so entstandenen analythaltigen Lösemitteltröpfchen gelangen wegen des Vakuums ins Massenspektrometer<sup>67</sup>. Wenn die Analyte sich in den geladenen Lösungsmitteltröpfchen befinden, entsprechen die weiteren Mechanismen denen, die auch beim ESI auftreten (vgl. 3.3.1.1). Aus diesem Grund weisen die Massenspektren, die durch DESI- und ESI-Quellen erzeugt werden, große Ähnlichkeiten auf. In der Literatur wird der Desorptions-Mechanismus, der bei der DESI auftritt, auch als *droplet pick-up* bezeichnet<sup>68</sup>.

Wie bei der ESI-Technik ist es auch bei der DESI-Technik möglich, durch Zusätze im Lösungsmittel, Einfluss auf die Ionisierung bestimmter Substanzklassen zu nehmen, oder durch Zugabe von verschiedenen Substanzen chemische Reaktionen mit den Analyten zu ermöglichen, wie z.B. die Bildung von Enzym-Substrat-Komplexen<sup>7</sup>. Bei Verwendung solcher Zusätze wird in der Regel nicht mehr von DESI sondern von *reactive DESI* gesprochen.

#### 3.3.2 Analysator

Für die eigentliche massenspektrometrische Analyse, die Auftrennung der erzeugten Ionen nach Masse/Ladungsverhältnis werden verschiedene Systeme verwendet. Dabei werden

diese nach ihren unterschiedlichen Analysatorprinzipien (Quadrupole, Sektorfeldgeräte, Flugzeitmassenspektrometer (Time of flight), Ionenfallen (Ion trap), etc.) aber auch nach ihrer möglichen Massenauflösung  $R$  unterschieden. Die Massenauflösung ist definiert, als der kleinste Unterschied in dem  $m/z$ -Verhältnis, der bei einem bestimmten  $m/z$ -Wert aufgetrennt werden kann. Somit gilt:

$$R = \frac{m/z}{\Delta m/z} = \frac{m}{\Delta m} \quad (2.1)$$

Als getrennt gelten die Signale, wenn die Peakbreite bei 5% relativer Peakhöhe der Massendifferenz der beiden Signale entspricht. Eine hohe Massenauflösung ist dann wichtig, wenn aus den gemessenen Massen eine Summenformel bestimmt werden soll. Diese Möglichkeit besteht, da durch den Massendefekt die exakte Masse eines Atomkerns nicht der Summe aus den Massen der Protonen und Neutronen entspricht, sondern kleiner als diese ist, da ein Teil der Masse in Bindungsenergie umgewandelt wird. Das bedeutet, dass Verbindungen mit derselben Summe von Protonen und Neutronen, z.B. das Kohlenstoff  $^{14}\text{C}$ -Isotop (6 Protonen, 8 Neutronen) und Stickstoff (7 Protonen, 7 Neutronen), nicht dieselbe exakte Masse aufweisen. Wenn nun die Masse eines Moleküls hinreichend genau bestimmt werden kann, kann durch Kombination unterschiedlicher Elemente eine Summenformel bestimmt werden, die dieser exakten Masse entspricht. Diese Möglichkeit ist vor allem für die Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen unverzichtbar. Als weitere wichtige Größe wird für die Ermittlung von Summenformeln die absolute Massengenauigkeit  $\Delta m/z$  mit der Einheit  $u$  benötigt, die wie folgt definiert ist:

$$\Delta m/z = m/z_{\text{experimentell}} - m/z_{\text{berechnet}} \quad (2.2)$$

Allerdings wird in der Praxis häufiger die relative Massengenauigkeit  $\sigma m/m$ , als Quotient aus der absoluten Massengenauigkeit und der Masse für die diese bestimmt wurde, verwendet.

$$\delta m/m = \frac{\Delta m/z}{m/z} \quad (2.3)$$

Bei der relativen Massengenauigkeit handelt es sich um eine dimensionslose Größe die meistens in *parts per million* (ppm) angegeben wird. Für die Ermittlung von Summenformeln für Moleküle mit einem kleinem Molekulargewicht ( $\leq 1000$  da) wird in der Praxis meistens eine relative Massengenauigkeit von  $\leq 4$  ppm vorausgesetzt, da ansonsten zu viele verschiedene Summenformeln in Betracht gezogen werden müssen.

Wie bereits erwähnt werden Ionen in dem Analysator nur nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis getrennt was bedeutet, dass zwei Teilchen  $[M]^+$  und  $[2M]^{2+}$  beim gleichen  $m/z$ -

Wert registriert werden. Da in dieser Arbeit hauptsächlich Ionenfallen verwendet wurden, wird im Folgenden näher auf deren Funktionsweise eingegangen.

Jeweils zwei gegenüberliegende Stäbe sind an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen, wobei die Polarität zwischen den einzelnen Paaren immer wechselt. Über die Gleichspannung wird eine modulierbare Wechselfrequenz gelagert, wodurch die Ionen auf Wellenbahnen gezwungen werden. Je nachdem, wie die Spannungen an den Stäben eingestellt werden, ist nur eine Wellenbahn über die Länge des Oktupols stabil, was dazu führt, dass nur jenes Masse/Ladungs-Verhältnis, das sich auf dieser Wellenbahn bewegt, durch den Oktupol gelangen kann<sup>69</sup>, weswegen auch von einem Ionenfilter gesprochen wird. In dem in dieser Arbeit verwendeten Ionenfallen-Massenspektrometer *HCT+* (high capacity trap) der Firma *Bruker* wird der zum Transport und zur Fokussierung der in der Ionenquelle erzeugten Ionen ein Oktupol eingesetzt. Ein Oktupol ist eine Modifikation des Quadrupol und besteht aus acht, statt vier konzentrischen, parallel zueinander angeordneten Stabelektroden (Länge ca. 15 cm, Durchmesser ca. 6 mm). Anders als ein Quadrupol wird er nicht dazu verwendet nur einem  $m/z$ -Verhältnis, sondern  $m/z$ -Bereiche den Durchtritt zu ermöglichen. In der weiterentwickelten Ionenfalle *Amazon speed* der Firma *Bruker* wird kein Oktupol mehr verwendet. Die Fokussierung und der Transport der Ionen wird dort durch einen *dual ion funnel* (siehe Abbildung 9) ermöglicht, der gleichzeitig die Funktion eines Skimmers übernimmt.

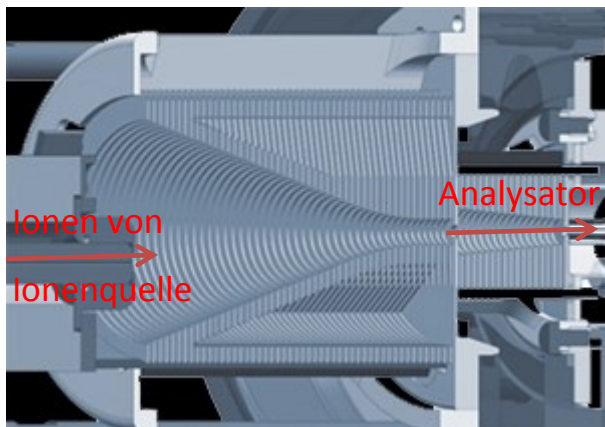


Abbildung 9: Querschnitt eines *dual ion funnel* (Verwendung mit freundlicher Genehmigung der Firma *Bruker*).

Die dreidimensionale Ionenfalle beruht auf einer Weiterentwicklung des Quadrupols, für die im Jahr 1989 *Paul* und *Dehmelt* den Nobelpreis bekommen haben. Eine Ionenfalle ist so aufgebaut, dass Ionen, die in die Falle gelangen, dort auf stabilen Trajektorien gefangen werden und unter optimalen Bedingungen so über mehrere Tage gespeichert werden können. In

der analytischen Massenspektrometrie werden üblicherweise Dreielektrodenzellen in zylindrischer Form verwendet<sup>69</sup>.

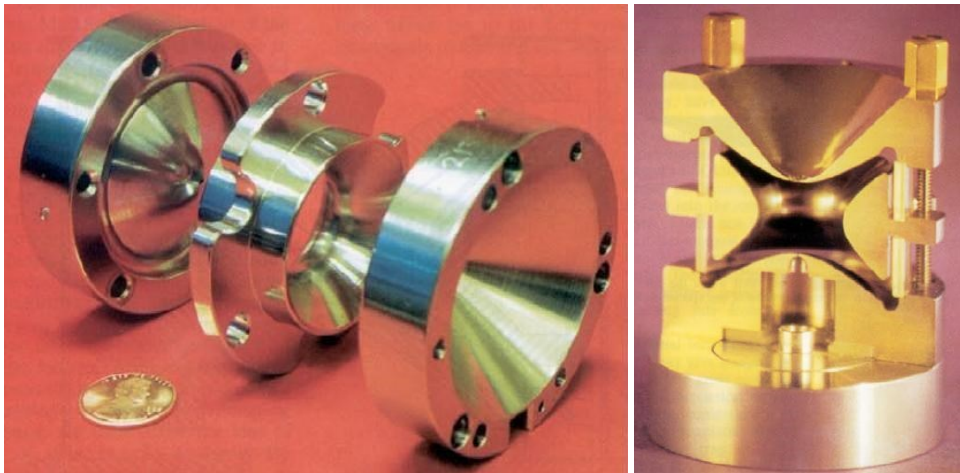


Abbildung 10: Links: Drei Elektroden einer Ionenfalle; Rechts: Querschnitt einer Ionenfalle<sup>70</sup>. Copyright © 1997 John Wiley & Sons, Ltd.

Die Endkappen sind dabei elektronisch miteinander verbunden, und zwischen Ringelektrode (jeweils die mittlere Elektrode in Abbildung 10) und Endkappen liegen Gleichstrom- und Wechselstrompotentiale an. Durch eine Öffnung in der oberen Endkappe, die durch ein Schaltgitter geöffnet oder geschlossen werden kann, treten die Ionen in die Falle ein, wo diese dann auf stabile Trajektorien gelenkt werden. Das Prinzip der Ionenfalle beruht darauf, dass Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Werts oder  $m/z$ -Bereichs auf stabilen Trajektorien gehalten werden, während unerwünschte Ionen entweder mit den Wänden stoßen gelassen werden oder aus der Ionenfalle entfernt und zum Detektor geleitet werden. Eine schematische Darstellung einer Ionenfalle ist in Abbildung 11 abgebildet.

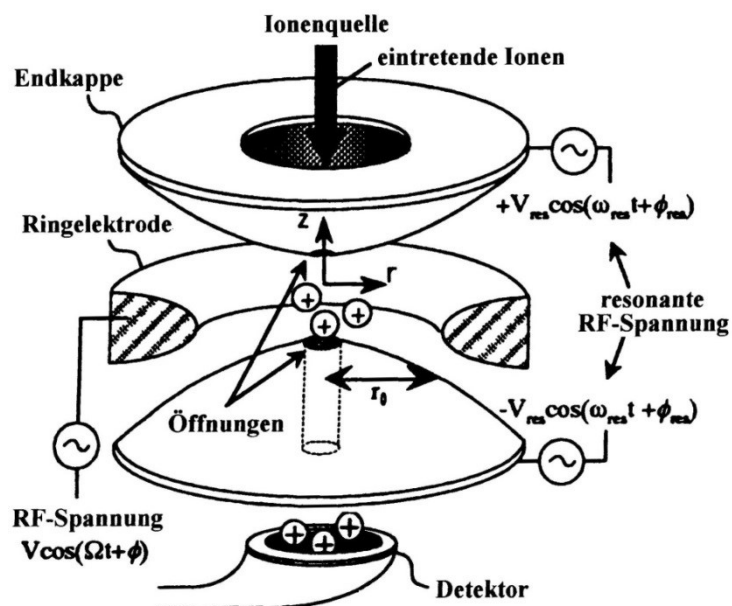


Abbildung 11: Querschnitt einer Ionenfalle<sup>71</sup>. Copyright © 2000 John Wiley & Sons, Ltd.

Wie sich die Ionen mithilfe eines dreidimensionalen Quadrupolfeld in einem bestimmten Volumen speichern lassen können kann wie folgt erklärt werden. Das dreidimensionale Feld wird sich als einen Sattel vorgestellt, auf dem eine Kugel, die für ein  $m/z$ -Verhältnis steht, liegt. Diese wird immer zu einer der steil abfallenden Sattelflanken hinunter rollen, es sei denn der Sattel wird so gedreht, dass die Kugel immer wieder in die Mitte des Sattels zurückrollt (siehe Abbildung 12).

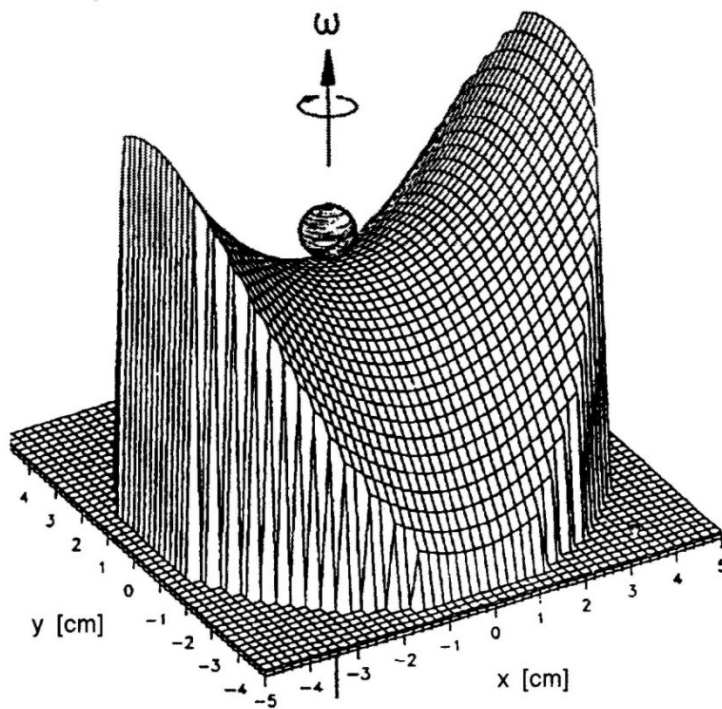


Abbildung 12: Darstellung der Ionenbewegung in einer Ionenfalle<sup>72</sup> © The Nobel Foundation 1989.

Wenn die Ionen eines festgelegten  $m/z$ -Bereich einmal in der Falle gespeichert sind bieten sich verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können alle  $m/z$ -Werte nacheinander aus der Ionenfalle entfernt und zum Detektor geleitet werden, was einem Fullscan-Massenspektrum entspricht. Zum anderen können durch hervorgerufene Stöße aller Ionen, außer eines bestimmten  $m/z$ -Werts, eine Ionensorte mit definiertem  $m/z$ -Wert isoliert werden.

Durch die Zufuhr eines Kühlgases (Helium) bei einem Druck von etwa  $10^{-5}$  Pa können die in der Ionenfalle vorhandenen Ionen ihre kinetische Energie reduzieren<sup>73</sup>. Dadurch können sich die Energien der Ionen der einzelnen  $m/z$ -Verhältnisse angleichen, wodurch eine bessere Fokussierung der  $m/z$ -Verhältnisse erreicht wird. Durch die bessere Fokussierung der  $m/z$ -Verhältnisse können diese exakter voneinander getrennt werden, was zu einer Erhöhung des Auflösungsvermögens führt.

Ionenfallen-Massenspektrometer sind in der Lage, von Ionen eines Masse/Ladungs-Verhältnisses (*Mutterion*, engl. *precursor ion*), mehrere Generationen von Fragmentionen ( $MS^n$ -Spektren) zu erzeugen, was für die Strukturaufklärung von großer Bedeutung ist<sup>74</sup>. Dabei werden durch die Ionenfalle Ionen eines bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis isoliert (siehe oben). Die Ionen in der Falle führen mit zugeführtem Helium (Stoßgas), bei einem Druck von etwa  $10^{-2}$  Pa<sup>75</sup>, reaktive Stöße aus und fragmentieren in Tochterionen, welche mittels eines Massenscan ( $MS^2$ -Spektrum) nachgewiesen werden können, alternativ kann auch ein bestimmtes Tochterion isoliert werden, welches wieder mit Heliumatomen stößt und somit eigene Tochterionen bildet ( $MS^3$ -Spektrum). Allgemein kann durch diese Technik ein ESI- $MS^n$ -Spektrum aufgenommen werden. Dieser Vorgang wird auch als multidimensionale Massenspektrometrie bezeichnet.

Im Unterschied zu den Ionenfallenmassenspektrometern wird in einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS) der  $m/z$ -Wert nicht mittels eines Scans des Massenbereichs, sondern durch die Messung der Flugzeit der erzeugten Ionen bestimmt. Zu diesem Zweck werden Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend die Zeit gemessen, die die Ionen benötigen eine definierte Strecke zurückzulegen. Durch die Beschleunigung im elektrischen Feld erhalten die Ionen die Energie  $E_{Ion} = q \cdot U$ , wobei  $q$  der Ladung der Ionen und  $U$  der Spannung des elektrischen Felds entspricht. Die aufgenommene Energie wird in kinetische Energie umgewandelt. Durch das Ultrahochvakuum ist die mittlere freie Weglänge der Ionen sehr groß ist, was dazu führt, dass die aufgenommene Energie nicht durch Stöße wieder abgegeben wird. Somit gilt:

$$q \cdot U = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2.4)$$

Über die Geschwindigkeit  $v$  und der Flugstrecke lässt sich der Zusammenhang zwischen Flugzeit  $t_{Flug}$  und Masse/Ladung der Ionen wie folgt definieren:

$$t_{Flug} \propto \sqrt{\frac{m}{q}} \quad (2.5)$$

Ein Vorteil der TOF-MS ist somit, dass keine Abrasterung eines definierten Massenbereichs stattfinden muss, sondern, dass alle auftretenden Ionen simultan gemessen werden können. Ein Nachteil ist jedoch, dass für die Zeitmessung ein exakt definierter Startzeitpunkt gewährleistet sein muss, weswegen aus den erzeugten Ionen immer nur einzelne Abschnitte auf die Flugstrecke transferiert werden.

### 3.3.3 Detektor

Der dritte Teil eines Massenspektrometers ist der Detektor. Mit diesem werden die Ionen, die in der Ionenquelle erzeugt und in dem Analysator nach ihren Masse/Ladungsverhältnis getrennt wurden, detektiert. Der Detektor kann dabei nicht zwischen unterschiedlichen Ionen unterscheiden, sondern detektiert nur ob und wenn ja wie viele Ionen zu einem Zeitpunkt bei ihm ankommen. Somit liefert nur die Kombination aus Analysator, der bestimmt zu welchem Zeitpunkt welches Masse/Ladungsverhältnis zum Detektor gelangt und die am Detektor registrierte Intensität ein verwertbares Massenspektrum. Als Detektoren kommen unter anderem Sekundärelektronenvervielfacher, Mikrokanalplatten und Channeltrons zum Einsatz.

Für die Darstellung des Detektorsignals über die Zeit existieren unterschiedliche Darstellungsmodi. Beim *Total Ion Chromatogram* (TIC) sind die addierten Intensitäten aller  $m/z$ -Werte gegen die Zeit aufgetragen. Im *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) wird die Intensität eines ausgewählten  $m/z$ -Wertes gegen die Zeit aufgetragen und im *Base Peak Chromatogram* (BPC) wird der die Intensität des  $m/z$ -Wert mit der höchsten Intensität gegen die Zeit aufgetragen.

## 3.4 Chromatographie

Chromatographie im Allgemeinen ist eine physikalisch-chemische Trennmethode, die auf einer wiederholten Verteilung des Analyten zwischen einer mobilen und einer stationären Phase beruht. Wechselwirkt der Analyt mit der stationären Phase, wird er retardiert, in der mobilen Phase wird der Analyt entlang der Bewegungsrichtung der mobilen Phase transportiert. Chromatographische Methoden können nach den Aggregatzuständen der mobilen und der stationären Phase, sowie nach der Beschaffenheit der stationären Phase eingeteilt werden. In Abbildung 13 ist ein Versuch unternommen worden eine Übersicht über die möglichen Kombinationen von stationärer (fest, flüssig) und mobiler Phase (flüssig, überkritisches Fluid, gasförmig) und die daraus jeweiligen resultierenden chromatographischen Methoden zu geben.

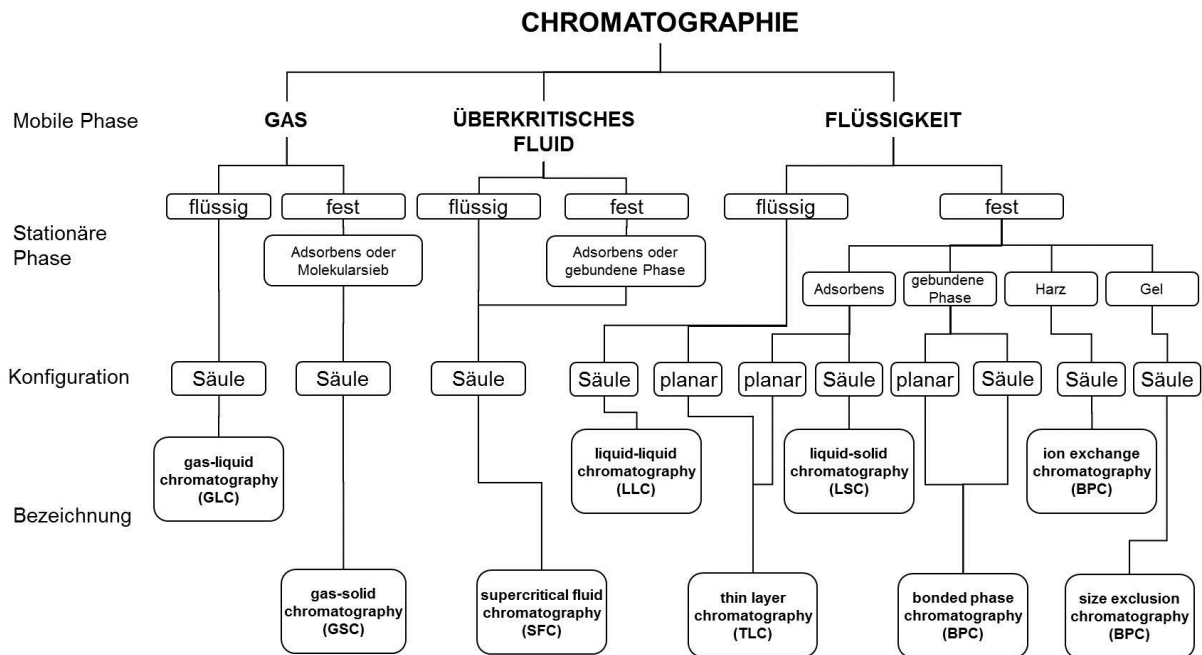


Abbildung 13: Klassifizierung der verschiedenen chromatographischen Verfahren<sup>69</sup>, with kind permission of Springer Science+Business Media.

Wie zu erkennen ist, gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Kombinationen. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Kombinationen gasförmige mobile Phase, flüssige stationäre Phase (GLC) und flüssige mobile Phase, feste stationäre Phase (LSC, TLC) verwendet.

### 3.4.1 Allgemeine Grundlagen

Die mobile Phase (bei der Säulenflüssigkeitschromatographie als Eluent bezeichnet) transportiert die einzelnen Komponenten des zu trennenden Substanzgemischs, während sie durch die bzw. entlang der stationären Phase fließt. Die einzelnen Komponenten unterliegen dabei mehreren reversiblen Gleichgewichtseinstellungen zwischen der stationären und der mobilen Phase. Der Zeitraum, während dessen sich die unterschiedlichen Analyte an oder in der stationären Phase aufhalten, ist dabei abhängig von den Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären Phase. Der Zeitraum, in dem sich die Analyte in der mobilen Phase aufhalten, ist jedoch für alle Analyte gleich, unabhängig von ihren Eigenschaften. Entscheidend für die Trennwirkung ist somit die unterschiedliche Retention, die die Analyte durch die wiederholten Gleichgewichtseinstellungen zwischen stationärer und mobiler Phase erfahren. Chromatographische Trennmethode lassen sich anhand der unterschiedlichen Retentionsmechanismen voneinander unterscheiden. Die wichtigsten sind dabei der Verteilungs- und der Adsorptionsmechanismus. Es existieren noch weitere Verfahren, die allerdings nur eingeschränkt angewendet werden, sie sollen hier nur kurz dargestellt werden:



- Die Größenausschlusschromatographie (vergleichbar mit der Wirkung eines Filters), wo das Trennprinzip auf dem Ausschluss der Analyte vom Inneren der porösen stationären Phase beruht.
- Die Ionenaustauschchromatographie, hierbei werden die unterschiedlichen Austauschaffinitäten einzelner Ionen zu Ionenaustauscherharzen verwendet.
- Und die Affinitätschromatographie, bei der die Retention durch hoch selektive Ligand- Rezeptor-Wechselwirkungen (Schlüssel-Schloss-Prinzip) erfolgt.

In der Verteilungschromatographie spielen die Verteilungsgleichgewichte der einzelnen Analyte zwischen der mobilen und der stationären Phase die entscheidende Rolle. Sie lassen sich wie folgt definieren



wobei  $A_M$  der Analyt in der mobilen und  $A_S$  der Analyt in der stationären Phase ist. Der *Nernst'sche Verteilungssatz* besagt, dass das Verhältnis der Konzentrationen eines Stoffes in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen bei einer gegebenen Temperatur eine Konstante ist, welche meist als Verteilungskoeffizient  $K_C$  bezeichnet wird.

$$K_C = \frac{c_S}{c_M} \quad (2.7)$$

Wenn die Verteilungskoeffizienten der Analyte hinreichend unterschiedlich sind, ist es möglich die Analyte voneinander zu separieren.

Bei der Adsorptionschromatographie finden polare Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und der in der mobilen Phase gelösten Analyte statt. Diese Wechselwirkungen können unterschiedlicher Natur sein, z.B.: Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken oder auch  $\pi$ -Komplexe. Auch hierbei handelt es sich aber um dynamische Gleichgewichte. Der Gleichgewichtszustand der Grenzflächenreaktion wird mittels der Adsorptionsisothermen beschrieben. Wenn somit die Analyte ein hinreichend unterschiedliches Adsorptionsverhalten zu der stationären Phase aufweisen, werden sie aufgetrennt. Bei realen chromatographischen Trennverfahren spielen allerdings fast immer mindestens zwei der Retentionsmechanismen eine Rolle (z.B. Zusätzlich zu dem Verteilungs- auch der Größenausschlussmechanismus), was die theoretische Betrachtung verkompliziert.

### 3.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der HPLC wird die Trennung der Substanzen, auf einer festen stationären Phase, welche sich in komprimierter Form in einer Trennsäule befindet, und in Verbindung mit einer flüssigen mobilen Phase (Eluent) erreicht. Der grundsätzliche Aufbau eines HPLC-Systems ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt. Die Funktionsweise besteht darin, dass die Eluenten mittels einer oder mehrerer Pumpen miteinander gemischt und über Kapillaren durch eine temperierte Trennsäule gepumpt werden. Bevor die mobile Phase durch die Trennsäule fließt, wird die zu trennende Probe injiziert. Um die Trennsäule vor Verunreinigungen zu schützen wird dieser meistens eine Vorsäule vorgeschaltet, die Matrixbestandteile der Probe zurück halten soll. Nach der Trennsäule gelangt die mobile Phase mit den getrennten Substanzen zu dem Detektor, in dem die Substanzen durch spezifische Mechanismen detektiert werden. Als Ergebnis einer HPLC-Analyse wird ein Chromatogramm erhalten, indem die Retentionszeit der Substanzen gegen die Intensität der korrespondierenden Detektorsignale aufgezeichnet ist.

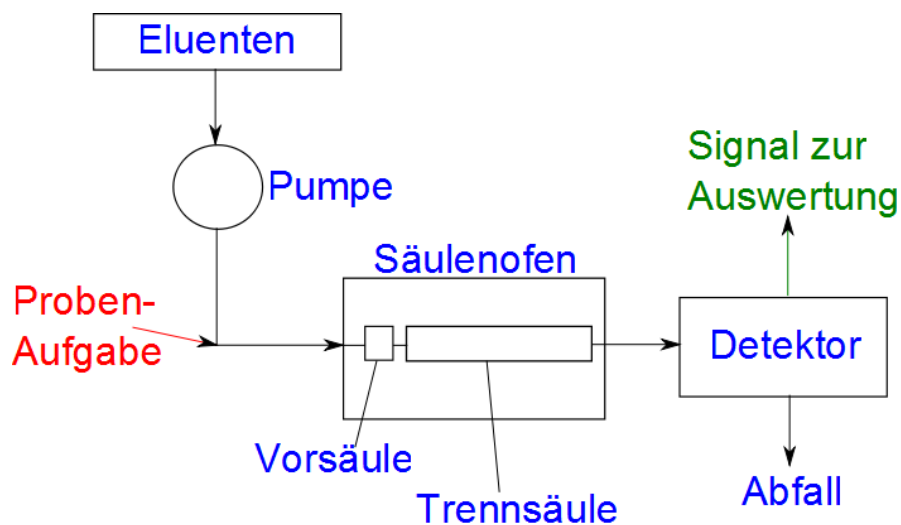


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer HPLC.

Das Herzstück bei der HPLC ist die Trennsäule, mit der enthaltenen stationären Phase. Da eine Vielzahl von stationären Phasen und unterschiedlicher Säulenmaterialien existieren, werden Kriterien benötigt, um eine Säule zu charakterisieren. Diese gelten nicht nur für Trennsäulen der HPLC sondern für Trennsäulen im Allgemeinen.

Die wichtigste Eigenschaft der Trennsäulen ist dabei die Trennleistung. Eine theoretische Betrachtungsweise der Trennleistung einer Säule ist das *Konzept der theoretischen Böden*, welches die Trennstrecke in eine diskrete Anzahl von Böden unterteilt. Weiterhin stellt sich zwischen jedem Boden und der mobilen Phase ein Gleichgewicht der Analytverteilung ein,

was zur Folge hat, dass ein Trennsystem umso effektiver ist, je mehr theoretische Böden vorhanden sind. Wichtige Parameter, die sich aus diesem Modell ergeben, sind die theoretische Bodenanzahl  $N$  und die theoretische Bodenhöhe  $H$ . Diese Werte sind über den folgenden Zusammenhang mit einander verknüpft, wobei  $L$  die Länge der Säule ist.

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.8)$$

Dieses Modell erklärt aber nicht alle Punkte einer chromatographischen Trennung, wie zum Beispiel die Peakverbreiterung die in Chromatogrammen beobachtet werden kann. Um diese Aspekte erklären zu können wurde die *dynamische Theorie* eingeführt.

Die *dynamische Theorie* erweitert das *Konzept der theoretischen Böden* um einige wichtige Aspekte. Demnach erfolgt die Gleichgewichtseinstellung zwischen der mobilen und der stationären Phase nicht mehr spontan, sondern der Massentransfer unterliegt gewissen Verzögerungen und es werden Diffusionseffekte mit berücksichtigt. Diese Diffusionseffekte führen zu einer Peakverbreiterung, was dazu führt, dass Substanzen, die länger auf der Trennsäule verbleiben, als immer breiterer Bande von dieser eluieren. Das Konzept, dass die Trennstrecke in einzelne Böden mit einer diskreten Höhe unterteilt wird, bleibt dabei erhalten. Aus diesen zusätzlichen Betrachtungen folgt, dass die Effizienz eines Trennsystems von der Lineargeschwindigkeit  $u$  der mobilen Phase abhängig ist. Die theoretische Bodenhöhe  $H$  wird nun in Abhängigkeit der Lineargeschwindigkeit über die *van-Deemter-Gleichung* (2.9) beschrieben:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (2.9)$$

wobei der C-Term in  $C = C_s u + C_m u$  (mit  $C_s$  und  $C_m$  als Massentransferkoeffizienten für stationäre und mobile Phase) aufgetrennt wird. Dabei handelt es sich allerdings um eine vereinfachte Schreibweise der *van-Deemter Gleichung*. Die ausführliche Schreibweise ist in Gleichung (1.5) aufgeführt.

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{8}{\pi^2} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_l} u \quad (2.10)$$

1983 wurde die *van-Deemter-Gleichung* von *J.Hawkes*<sup>76</sup> modifiziert um aktuelle Forschungsergebnisse besser theoretisch beschreiben zu können. Die modifizierte Form (2.10) ermöglicht es, wie auch die original Gleichung (2.9), Zusammenhänge zwischen der Bodenhöhe  $H$  und Eigenschaften der Säule (z.B. Durchmesser, Partikelgröße) herzustellen. Hawkes diskutiert in seiner Arbeit auch ausführlich die Eddydiffusion, die er auch als *multipath effect* bezeichnet. Seiner Ansicht nach ist dieser Effekt nicht unabhängig von der Lineargeschwindigkeit.

keit und sollte somit nicht als eigener Term sondern mit in dem  $C_m u$ -Term diskutiert werden.

$$H = \frac{B}{u} + C_s u + C_m u = \frac{2\gamma D_m}{u} + q \frac{k}{(k+1)^2} \frac{d_f^2}{D_l} u + \frac{fn(d_p^2, d_c^2, end, u)}{D_m} u \quad (2.11)$$

#### Verwendete Symbole

A = Eddydiffusion

$\lambda$  = Proportionalitätsfaktor  $\frac{A}{2d_p}$

B = Longitudinaldiffusionskoeffizient

$\gamma$  = Blockierungsfaktor

C = Massentransferkoeffizient

k = Säulenkapazitätsverhältnis  $\frac{t_s}{t_m} = \frac{K u_s}{u_m}$

u = Lineargeschwindigkeit

K = Verteilungskoeffizient  $\frac{c_s}{c_m}$

d = Durchmesser

t = Retentionszeit

D = molarer Diffusionskoeffizient

q = Faktor, beschreibt die Form der fl. Phase

end = Endeffekte

H = Bodenhöhe

#### Verwendete Indices

c = Säule

f = Flüssigkeitsfilm

l = Stationäre flüssige Phase

m = mobile Phase

p = Partikel

s = Stationäre Phase

Die vereinfachte Form der *van-Deemter-Gleichung* wird heutzutage in allen gängigen Lehrbüchern verwendet. Die einzelnen Terme werden dabei wie folgt beschrieben:

Der A-Term beschreibt die *Eddy-Diffusion*. Die darauf basiert, dass die Teilchen in einer Säule unterschiedliche Wege zurücklegen können. Diese unterscheiden sich in der Wegstrecke und somit auch im erforderlichen Zeitaufwand. Dadurch kommt eine Peakverbreiterung zustande, die unabhängig von der Lineargeschwindigkeit ist. *Hawkes* führt dahingegen in seiner Arbeit aus, dass bei einer unendlich langsamen Lineargeschwindigkeit jedes Analytmolekül, aufgrund von Diffusion, sich auf jedem möglichen Weg durch die Trennsäule befunden hat und somit kein Unterschied in der Retentionszeit der Analytmolekülen auftritt. Wohingegen bei unendlich hoher Lineargeschwindigkeit die Diffusion von einem möglichen Weg durch die Trennsäule zu einem anderen nicht möglich ist und dadurch sehr wohl Unterschiede in der Retentionszeit der einzelnen Analytmoleküle auftreten.

Der B-Term kommt durch die Longitudinaldiffusion zustande. Eine Diffusion parallel zur Fließrichtung bedeutet, dass Teilchen von einer konzentrierten Zone in eine weniger konzentrierte Zone, die vor oder hinter der konzentrierten Zone liegt, diffundieren können. Durch diesen Prozess wird ebenfalls eine Peakverbreiterung verursacht. Allerdings ist es leicht zu verstehen, dass bei einer höheren Fließgeschwindigkeit der B-Term kleiner wird.

Der C-Term beschreibt die Massentransport-Effekte. Die Massentransferkoeffizienten müssen eingeführt werden um der Tatsache gerecht zu werden, dass die Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase langsam ist und somit eine chromatographische Säule immer unter Nichtgleichgewichtsbedingungen arbeitet. Somit werden Teilchen die sich in der mobilen Phase befinden weiter nach vorne gespült. Und Teilchen die sich in der stationären Phase befinden haben Probleme in die schnell fließende mobile Phase zu gelangen. Hier bedeutet eine Zunahme der Fließgeschwindigkeit eine Verstärkung dieses Prozesses. Deswegen kann erwartet werden, dass es eine ausgezeichnete Fließgeschwindigkeit geben wird wo alle drei Effekte möglichst klein sind. Dies ist dann die Fließgeschwindigkeit bei der die Trennleistung optimal ist.

#### **3.4.3 Säulentypen**

Heutzutage existiert eine Vielzahl von chromatographischen Säulen für die Flüssigchromatographie. Diese können in zwei Untergruppen, in mit Partikeln gepackte und in monolithische Säulen, unterteilt werden.

Bei den gepackten Säulen haben sich seit den Anfängen der Säulenchromatographie die Parameter der verwendeten Säulen teils dramatisch verändert. Um diese Änderung zu verstehen muss die modifizierte van-Deemter-Gleichung betrachtet werden. Dort ist zu erkennen, dass die Bodenhöhe  $H$  unter anderem mit dem Quadrat des Partikeldurchmessers und des Säulendurchmessers ansteigt. Diese Zusammenhänge haben dazu geführt, dass neue Säulen mit immer kleinerem Durchmesser und kleinerem Partikeldurchmesser entwickelt wurden. Ein daraus resultierendes Problem war der hohe Rückdruck der neuen Säulen. Die damals geläufigen HPLC-Anlagen waren nur für Maximaldrücke von etwa 250 bar ausgelegt. Neue Herstellungsverfahren erlaubten Partikel mit Durchmessern von bis zu  $1.7 \mu\text{m}$  herzustellen. Eine mit solchen Partikeln gepackte Säule ( $2,1 \text{ mm} \times 100\text{mm}$ ) erzeugt jedoch Rückdrücke von bis zu 1000 bar. Aus diesem Grund wurden HPLC-Geräte entwickelt die mit diesen hohen Drücken arbeiten können. Ein einheitliche Bezeichnung für diesen Gerätetyp ist noch nicht vorhanden, allerdings wird meistens der Begriff der UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) verwendet. Doch nicht nur der Partikeldurchmesser sondern auch die Gleichmäßigkeit der hergestellten Partikel hat einen Einfluss auf die Bodenhöhe  $H$ , weswegen bei der Herstellung von modernen Chromatographiesäulen ein hohes Augenmerk auf diese gelegt wird.

Neben der Güte der hergestellten Partikel ist die Modifizierung der Partikel entscheidend für die Trenneigenschaft einer Säule. Grundsätzlich werden zwei Partikel voneinander unterschieden. Zu einem die Normalphase, bei der polare stationäre Phasen, wie z.B. Kieselgel oder Aluminiumoxid, verwendet werden. Und zum anderen sogenannte Umkehrphasen, wo unpolare stationäre Phasen, z.B. modifiziertes Kieselgel (Kieselgel auf dessen Oberfläche Moleküle, z.B. langkettige Alkane, befestigt wurden) verwendet werden. Durch die Verwendung von modifiziertem Kieselgel entsteht eine breite Variation an möglichen stationären Phasen. So wird Kieselgel neben Alkanen z.B. auch mit Aromatischen- und weiteren Gruppen modifiziert, wodurch jeweils andere Trenneigenschaften erzeugt werden.

Monolithische-Säulen bestehen im Gegensatz zu den gepackten Säulen nicht aus Partikeln. Bei Ihnen wird ein Säulenkörper aus einem Stück porösem Silica, welches je nach Trennproblem unterschiedlich modifiziert wurde, verwendet. Die erste dokumentierte Trennung mit einer monolithischen Säule erfolgte 1996 durch Tanaka et al<sup>77</sup>. Seit dem ist die Verwendung von monolithischen Säulen enorm gestiegen. Dadurch, dass der Säulenkörper aus einem Stück besteht ist er weniger Anfällig für Alterungsprozesse und meistens auch toleranter gegenüber von komplizierten Matrices in Untersuchungsproben. Ein weiterer Vorteil ist, dass mit modernen monolithischen Säulen theoretische Bodenzahlen wie bei der Verwendung von gepackten Säulen erreicht werden, allerdings ohne den Nachteil des hohen Rückdruckes. Nachteilig wirkt sich zurzeit vor allem der niedrige Grad an unterschiedlicher Modifizierung der monolithischen Säulen aus. Ein weiterer Nachteil von monolithischen Säulen besteht in der Signalform der Peaks (idealerweise entspricht diese einer Gaußform). Bei monolithischen Säulen kann jedoch sehr oft ein zu Anfang weniger steil ansteigender Peak beobachtet werden (was als *fronting* bezeichnet wird). Schuld an diesem Phänomen ist die Ummantelung der monolithischen Säulenkörper<sup>78</sup> da sich zwischen dem Gehäuse und dem Säulenkörper Hohlräume befinden, durch die der Eluent schneller durch die Säule gelangen kann, als wenn er durch die Poren des Säulenkörpers fließen würde (dieser Vorgang wird auch als *channeling* bezeichnet).

Ein weiteres Gebiet indem Säulenmaterial verwendet wird ist die Probenvorbereitung bzw. Probenaufarbeitung. Hier wird es vor allem bei der Festphasenextraktion (SPE, *solid phase extraction*) eingesetzt. Für die SPE werden Glas- oder Kunststoffkartuschen eingesetzt, die zwischen zwei Fritten ein Adsorbens enthalten. Als Adsorbens werden Materialien verwendet, die auch in gepackten Chromatographiesäulen Einsatz finden (siehe oben). Durch die

Wahl des richtigen Adsorbens können somit gelöste Substanzen auf der SPE-Phase adsorbiert und aus der Lösung extrahiert werden. Die adsorbierten Substanzen werden im Anschluss mit geeigneten Lösemitteln von der SPE-Phase eluiert.

## 3.5 Statistik in der analytischen Qualitätssicherung - (Grundlagen)

Für die Auswertung von analytischen Messergebnissen ist es notwendig verschiedene statistische Methoden zu verwenden. In diesem Abschnitt der Arbeit wird auf einige der in dieser Arbeit verwendeten statistischen Methoden eingegangen.

### 3.5.1 Mittelwert und Standardabweichung

Unter dem Begriff Mittelwert können sich zwei verschiedene Begriffe verbergen. Zu einem, und am häufigsten, ist bei der Verwendung des Begriffes Mittelwert das arithmetische Mittel gemeint. Dabei handelt es sich um den Wert, der sich ergibt, wenn alle Einzelmesswerte  $x$  addiert und durch die Anzahl der Messwerte  $N$  dividiert wird (siehe Formel 2.12).

$$\mu = \frac{\sum_i x_i}{N} \quad (2.12)$$

Eine andere seltener verwendete Größe ist der Median. Der Median ist bei einem Datenkollektiv mit ungerader Anzahl von Einzelwerten der mittlere Einzelwert, nachdem alle Einzelwerte nach der Größe sortiert wurden. Bei einer geraden Anzahl von Einzelwerten wird das arithmetische Mittel aus den beiden mittleren Einzelwerten gebildet.

In dieser Arbeit wird im Folgenden der Begriff Mittelwert gleichbedeutend zu dem arithmetischen Mittel verwendet.

Als Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert wird die Standardabweichung  $\sigma$  verwendet (siehe Formel 2.13).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \mu)^2}{N}} \quad (2.13)$$

Als weiterer wichtiger Wert ist die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient)  $s_{rel}$  zu nennen. Diese ist ein Maß für die mittlere Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert (siehe Formel 2.14).

$$s_{rel} = \frac{\sigma}{\mu} \quad (2.14)$$

In dieser Arbeit wird die relative Standardabweichung immer in Prozent angegeben um eine bessere Veranschaulichung zu ermöglichen.

### 3.5.2 Normalverteilung

Bei statistischen Untersuchungen großer Datenmengen wird meist eine Häufigkeitsverteilung von Merkmalswerten in Form einer symmetrischen Glockenkurve erhalten. Diese wird durch die Gauß'sche Normalverteilungsfunktion beschrieben. Die Lage des Maximalwerts wird dabei durch den Mittelwert und die Verteilungsbreite durch die Standardabweichung beschrieben. Eine grundlegende Eigenschaft dieser Funktion besteht darin, dass bei der Verwendung der Beziehung  $\mu \pm n\sigma$  (mit  $n = 1 - 3$ ) ein bestimmter Prozentwert aller Einzelwerte in dem definierten Bereich liegt (siehe Abbildung 15).

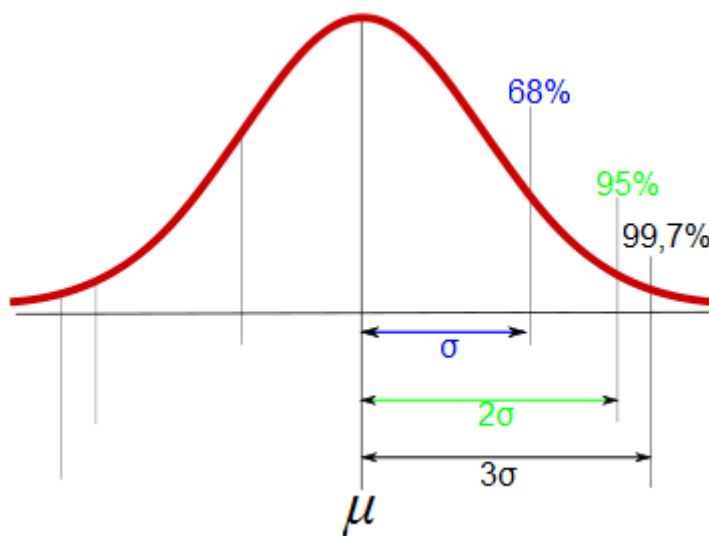


Abbildung 15: Graphische Darstellung der 1-3  $\sigma$  Grenzen.

Die Gauß'sche Normalverteilungsfunktion gilt streng genommen erst bei einer unendlichen Anzahl von Datenpunkten. Davor kommt eigentlich die Student t-Verteilung zur Anwendung. Diese trägt dem Umstand Rechnung, dass bei einer kleinen Gesamtanzahl von Messwerten die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Daten in der Nähe des Mittelwerts etwas geringer und in den entfernteren Bereichen etwas höher ist. Das führt dazu, dass die Verteilungsfunktion in Abhängigkeit der Zahl der Freiheitsgrade flacher und breiter wird. Der Grad der Korrektur der Normalverteilungskurve wird dabei durch den Freiheitsgrad der Student t-Verteilung beeinflusst. Bei eindimensionalen Datensätzen mit  $N$  Wiederholmessungen ist der Freiheitsgrad  $f = N - 1$ . Weiterhin gilt, dass ab einem Freiheitsgrad von ungefähr 30 die Gauß'sche Normalverteilung anwendbar ist.



### 3.5.3 Statistische Prüfverfahren (Tests)

Beim Auswerten von Messdaten stellt sich immer wieder die Frage, ob ein bestimmter Einzelwert noch zum Datenkollektiv gezählt werden kann, oder ob es sich um einen Ausreißer handelt. Um diese Frage beantworten zu können wird häufig der Grubb'sch Ausreißertest angewendet. Dabei wird, wie für alle statistischen Tests üblich, eine Prüfgröße mit einer Vergleichsgröße verglichen. Die Berechnung der Prüfgröße für den Grubb'schen Ausreißertest ( $PG_{Grubs}$ ) erfolgt dabei mittels Formel 2.15, wobei  $x^*$  der ausreißerverdächtige Wert ist.

$$PG_{Grubs} = \frac{|x^* - \mu|}{\sigma} \quad (2.15)$$

Die Vergleichsgröße muss aus einer dem Test zugeordneten Verteilungstabelle (hier  $r_m$ -Tabelle) entnommen werden. In dieser sind die Vergleichsgrößen nach Gesamtanzahl der Einzelwerte und verschiedener Signifikanzniveaus aufgelistet. In Tabelle 2 ist ein Auszug aus der  $r_m$ -Tabelle zur Veranschaulichung dargestellt. In dieser Arbeit wird ein Signifikanzniveau von 95% verwendet.

Tabelle 2: Auszug aus der Verteilungstabelle nach Grubbs

N	Signifikanzniveau	
	90%	95%
3	1,148	1,153
4	1,425	1,463
5	1,602	1,672
6	1,729	1,822
...	...	...

In der statistischen Auswertung von analytischen Daten werden weiterhin der F-Test und der t-Test benötigt. Der F-Test ermöglicht dabei den Vergleich von zwei Varianzen und der t-Test die Beurteilung der Lage eines Mittelwerts zu einem Richtwert.

### 3.5.4 Kalibrierung

In der analytischen Chemie werden häufig zweidimensionale Datensätze erfasst, bei denen eine Beziehung zwischen dem Messsignal (Informationswert) und einer Probeneigenschaft (Konzentration) besteht. Dieser Zusammenhang ermöglicht es Proben mit unbekanntem Konzentrationen zu analysieren und zu quantifizieren, wenn zuvor der mathematische Zusammenhang mittels Messungen von bekannten Konzentrationen ermittelt wurde. Dieser Vorgang wird als externe Kalibrierung bezeichnet.

#### 3.5.4.1 Regression

In der Regel ist es nicht möglich die theoretischen Zusammenhänge aller beeinflussender Größen messtechnisch zu erfassen. Aus diesem Grund werden die oben beschriebenen Vergleichsmessungen mit bekannter Konzentration durchgeführt. Im Anschluss wird analysiert mit welcher mathematischen Funktion der Zusammenhang beschrieben werden kann (Regressionsanalyse). Der einfachste, und in der Analytik am häufigsten vorkommende, ist der lineare Zusammenhang  $y = b * x + a$ , wobei  $y$  der Informationswert  $x$  und die Konzentration ist. Die Regressionsparameter  $a$  und  $b$  werden dabei so gewählt, dass die Summe der quadratischen Abstände zwischen den jeweiligen Einzelwerten und der Ausgleichgeraden ein Minimum ergibt (siehe Formel 2.16).

$$b = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2} \text{ und } a = \bar{y} - b * \bar{x} \quad (2.16)$$

Als Maß dafür, wie gut das eingesetzte Regressionsmodell den Zusammenhang zwischen Informationswert und Konzentration beschreibt, dient der Korrelationskoeffizient  $r$  (siehe Formel 2.17).

$$r = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i(x_i - \bar{x})^2 * \sum_i(y_i - \bar{y})^2}} \quad (2.17)$$

Er kann Werte im Bereich  $-1 \leq r \leq 1$  annehmen, wobei  $r = 1$  bestmögliche und  $r = 0$  gar keine Übereinstimmung zwischen den Messdaten und dem gewählten Regressionsmodell darstellt. Für die Beurteilung der Linearität ist  $r$  jedoch nicht zu verwenden (siehe unten), er ist bestenfalls ein Hinweis auf nichtlineares Verhalten.

#### 3.5.4.2 Residuen

Die ermittelte Ausgleichsfunktion liefert an den jeweiligen Konzentrationsstellen zu den Messwerten  $y_i$  die theoretischen Werte  $\hat{y}_i$ . Die Differenz zwischen diesen beiden Werten wird als Residuen bezeichnet und dient zur Beschreibung und Beurteilung der Regression. Für die Beschreibung von eindimensionalen Messdaten (Wiederholdaten) wurden oben bereits der Mittelwert und die Standardabweichung eingeführt. Analog dazu dienen zur Beurteilung von zweidimensionalen Messdaten die Ausgleichsfunktion und das Streuverhalten der Einzelwerte um diese. Dieses Streuverhalten wird durch die Varianz der Residuen beschrieben und wird als Reststandardabweichung  $s_{yx}$  (siehe Formel 2.18) bezeichnet.

$$s_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_i(y_i - \hat{y})^2}{N-2}} \quad (2.18)$$

Mit der Reststandardabweichung kann zum Beispiel beurteilt werden ob ein Wertepaar in der Kalibration einen Ausreißer darstellt. Dazu wird die Reststandardabweichung mit und ohne dem verdächtigten Wertepaar ermittelt und die beiden Werte mittels F-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Weiterhin wird mit der Reststandardabweichung die Linearitätsprüfung durchgeführt. Hierzu darf  $s_{yx}$  für ein nicht lineares Regressionsmodell nicht signifikant besser sein als  $s_{yx}$  des linearen Regressionsmodells (Auch hier wird ein F-Test durchgeführt).

### 3.5.4.3 Vertrauensbereich

Messunsicherheiten im Kalibrierexperiment führen zwangsläufig zu Fehlern in den Regressionskoeffizienten, womit für eine Ausgleichsgerade Unsicherheiten in deren Steigung  $b$  und y-Achsenabschnitt  $a$  resultieren. Die aufgrund dieser Unsicherheiten resultierende Gesamtheit an möglichen Ausgleichsgeraden beschreibt einen Bereich um die Ausgleichsgerade, der im Arbeitsbereichsmittelpunkt am stärksten eingeschnürt ist und dessen Enden sich trompetenförmig öffnen. Dieser Bereich wird als Vertrauensbereich bezeichnet, der durch die Vertrauensbänder (VB) eingegrenzt wird. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 16 eine graphische Darstellung der Unsicherheiten in den Regressionskoeffizienten sowie der sich bei Kombination dieser Unsicherheiten ergebende Vertrauensbereich dargestellt.

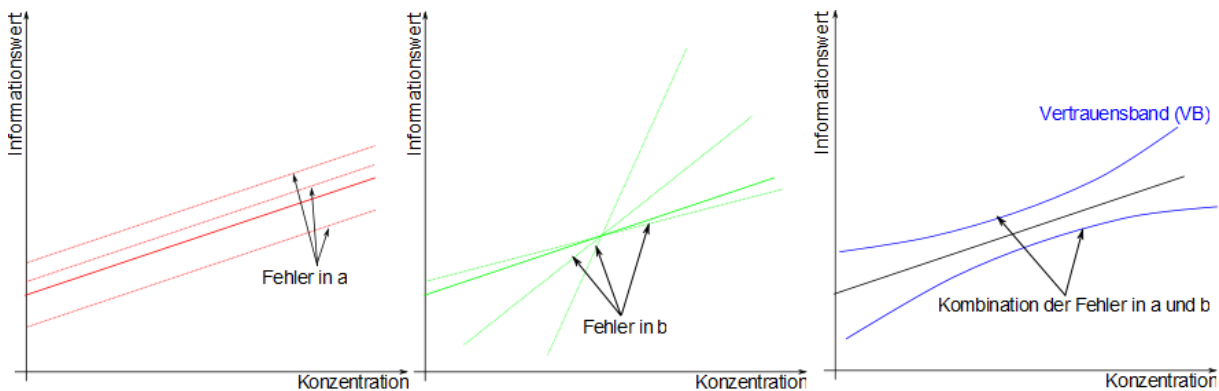


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Fehler im y-Achsenabschnitt  $a$  und in der Steigung  $b$ , sowie die Kombination der beiden Fehler.

Mathematisch wird der Vertrauensbereich durch  $s_{yx}$  und durch den t-Faktor, in den der Freiheitsgrad ( $f = N - 2$ ) und die statistische Sicherheit  $P$  eingehen, beschrieben. Weiterhin wird die Anzahl der Kalibrierpunkte  $N$  sowie die Anzahl derer Wiederholungsmessungen  $M$  mit einbezogen. Formel 2.19 zeigt die vollständige Beziehung.

$$VB_y(x) = s_{yx} * t(P, f) * \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.19)$$

### 3.5.4.4 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens kann auf verschiedene Weise definiert werden. Bei der sogenannten Leerwertmethode wird eine Leerprobe (reine Probenmatrix ohne Analyt) mehrmals analysiert. Dadurch kann von einer gaussförmigen Verteilung der Messwerte ausgegangen werden. Per Definition wurde die Nachweisgrenze (NWG) als der Wert angesetzt, der dem Mittelwert der Leerprobe plus dreimal Sigma entspricht. Diese Festlegung führt dazu, dass 50% aller Messungen, die an der Konzentration der Nachweisgrenze durchgeführt werden, nicht als Analyt identifiziert werden ( $\beta$ -Fehler, oder auch Fehler 2. Art) und, dass in 5% aller Messungen der Leerprobe Analyt identifiziert wird ( $\alpha$ -Fehler, oder auch Fehler 1. Art). Die Erfassungsgrenze (EG) wurde weiterhin als Mittelwert der Leerprobe plus sechsmal Sigma definiert, da dort die Größe des  $\alpha$ -Fehlers und  $\beta$ -Fehlers gleich ist. In Abbildung 17 ist die Ermittlung der Nachweisgrenze mittels Leerwertmethode sowie der daraus resultierende  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fehler graphisch dargestellt.

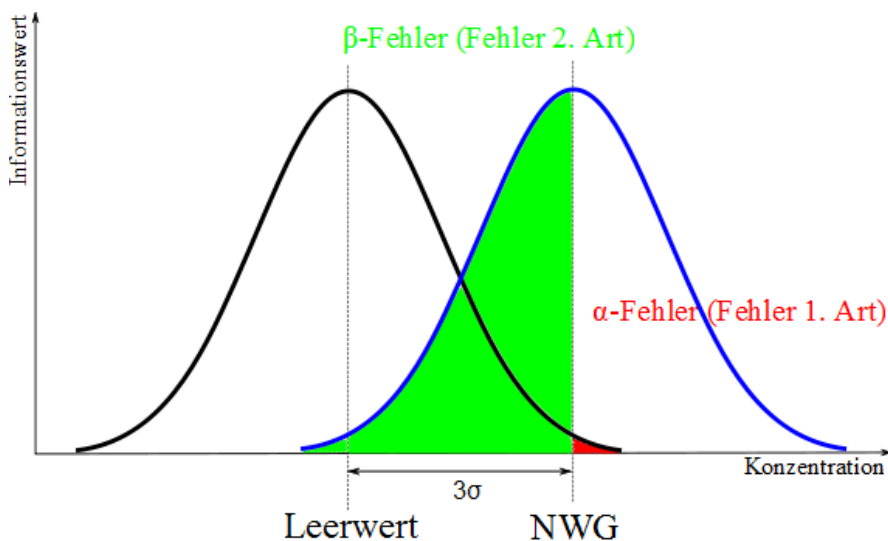


Abbildung 17: Bestimmung der NWG mittels Leerwertverfahren.

Ein großes Problem bei Verwendung der Leerwertmethode ist, dass das Analysensystem nie dem eigentlichen Analyten ausgesetzt war, was gerade bei chromatographischen Verfahren zu erheblichen Unstimmigkeiten führen kann. Aus diesem Grund wird zur Ermittlung der Nachweisgrenze häufig auf das sogenannte Kalibrierkurvenverfahren zurückgegriffen. Dabei werden die NWG und die EG mittels der erstellten Kalibrierung ermittelt.

Wenn die Regressionsgerade der Kalibrierdaten bis zur Ordinatenachse extrapoliert wird, gibt der Schnittpunkt zwischen Ordinate und Regressionsgraden den Informationswert wieder, der gemessen wird, wenn kein Analyt in der Probe vorhanden ist. Es handelt sich somit

um einen theoretisch ermittelten Leerwert. Die Breite des Vertrauensbereichs an einer Konzentrationsstelle gibt die zulässige Streuung des zugehörigen Informationswertes, ohne dass eine signifikante Auswirkung auf die Regressionskoeffizienten vorliegt, wieder. Somit beschreibt der Bereich zwischen den Schnittpunkten des oberen und des unteren Vertrauensbands mit der Ordinate den statistischen Verteilungsbereich des theoretischen Leerwerts. Der Schnittpunkt des oberen Vertrauensbands mit der Ordinate wird als kritischer Wert der Messgröße  $y_k$  bezeichnet. Wenn nun das Maximum einer Gausskurve mit  $y_k$  zentriert wird, ergeben sich folgende Bedingungen: 50% aller Messungen werden nicht mehr dem Leerwert zugeordnet und nur 5% aller Messungen des Leerwerts werden diesem nicht mehr zugeordnet. Der Wert, der diese Bedingungen erfüllt, wurde bereits bei Verwendung der Leerwertmethode als die NWG definiert. Um die diesem Informationswert zugehörige Konzentration zu ermitteln wird eine Parallele zur Abszisse durch  $y_k$  gelegt. Deren Schnittpunkt mit der Regressionsgeraden gibt dann die Konzentration an der Nachweisgrenze wieder. Die Erfassungsgrenze ist der x-Wert des Schnittpunktes von derselben Parallele mit dem unteren Vertrauensband. In Abbildung 18 ist die Ermittlung der NWG und der EG mittels Kalibriergradientenverfahren graphisch dargestellt.

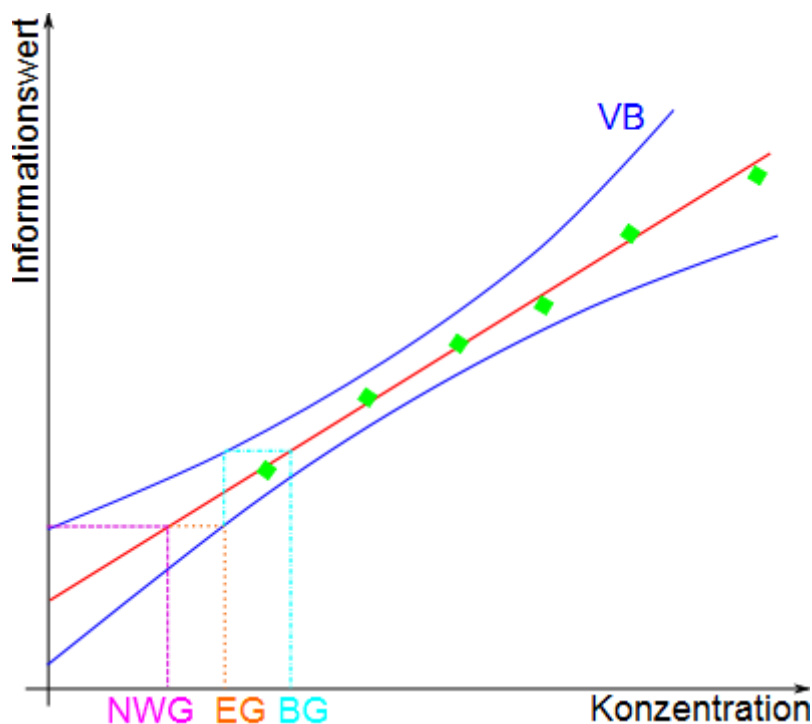


Abbildung 18: Ermittlung der Nachweisgrenze (NWG), der Erfassungsgrenze (EG) und der Bestimmungsgrenze (BG) mittels Kalibrierkurvenverfahren.

Für die Ermittlung der NWG und der EG ist bei dem Kalibriermethodenverfahren somit die Reststreuung der Kalibrierdaten die entscheidende Größe. Das führt dazu, dass mit diesem Verfahren realistischere Werte für die NWG und EG ermittelt werden können.

Da das Ergebnis für die NWG und die EG entscheidend von der Kalibrierpräzision abhängt können zwei kritische Situationen auftreten.

- 1) Bei geringer Präzision vergrößern sich die Werte für die NWG und die EG. Dadurch kann es vorkommen, dass der unterste Kalibrierpunkt unterhalb der EG bzw. der NWG liegt. Wenn dies der Fall ist, muss der Kalibrierbereich entsprechend verschoben werden.
- 2) Bei sehr hoher Präzision kann die EG sehr viel niedriger als der unterste Kalibrierpunkt liegen. In diesem Fall ist es nicht zulässig quantitative Aussagen in dem Bereich zwischen EG und unterstem Kalibrierpunkt zu treffen. Es muss zuerst ein Kalibrierpunkt in der unmittelbaren Nähe der EG analysiert und mit in die Berechnung aufgenommen werden.

Durch das Verändern des Kalibrierbereichs, durch Hinzufügen oder Streichen von Kalibrierpunkten ändert sich in der Regel auch die Reststandardabweichung und damit die Werte der Vertrauensbänder. Aus diesem Grund wird das Kalibriergradenverfahren auch als dynamisch gegenüber der statistischen Festlegung der Kenngrößen in der direkten Leerwertmethode betrachtet.

Eine weitere wichtige Größe in der statistischen Auswertung ist die Bestimmungsgrenze. Dabei handelt es sich um einen Konzentrationswert, der größer oder gleich der Erfassungsgrenze ist, ab dem eine vorgegebene, relative Ergebnisunsicherheit gegeben ist. Bei der Ergebnisunsicherheit handelt es sich dabei um den statistischen Schwankungsbereich eines Messwertes, der sich aus der Umrechnung eines Informationswertes über eine Kalibrierfunktion ergibt. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze ist es notwendig eine akzeptierte relative Ergebnisunsicherheit vorzugeben. Dies wird in diesem Fall durch einen k-Faktor festgelegt. Ein k-Faktor von drei entspricht dabei einer relativen Ergebnisunsicherheit von  $\pm 33\%$ . Mit zunehmendem k-Faktor verringert sich somit die zulässige relative Ergebnisunsicherheit und die Bestimmungsgrenze verschiebt sich zu höheren Konzentrationen. Die graphische Ermittlung der Bestimmungsgrenze ist in Abbildung 18 dargestellt.

#### **3.5.5 Validierung**

Unter dem Begriff Validierung werden der Nachweis und die Dokumentation der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen unter definierten Bedingungen verstanden. In der analytischen Qualitätssicherung nimmt die Validierung einen hohen Stellenwert ein, da durch valide Verfahren sichergestellt wird, dass diese für ihren Einsatzzweck geeignet sind und reproduzier-

bare und richtige Ergebnisse liefern. Unter anderem werden im Rahmen von Akkreditierungen (z.B. in Deutschland durch die DAkks) valide Prüfverfahren für die Erteilung einer Akkreditierungsurkunde gefordert.

Durch eine Akkreditierung kann das akkreditierte Labor belegen, dass es bestimmte Anforderungen (Qualität, technisches Niveau, Richtlinien, Gesetze usw.) hinsichtlich des akkreditierten Verfahrens erfüllt und somit die Kompetenz besitzt diese anzuwenden. In der DIN EN ISO/IEC 17011 ist deshalb der Begriff Akkreditierung wie folgt definiert: "Akkreditierung ist die Bestätigung durch eine dritte Stelle, die formal darlegt, dass eine Konformitätsbewertungsstelle die Kompetenz besitzt, bestimmte Konformitätsbewertungsaufgaben durchzuführen".

Um ein Verfahren als valide nach DIN ISO 17025 anzusehen müssen folgende Aspekte untersucht werden:

- Richtigkeit. Unter der Richtigkeit wird die Möglichkeit einer Methode verstanden nicht nur präzise sondern auch wahre Messergebnisse zu liefern.
- Robustheit. Ein System gilt als Robust, wenn es trotz leichter Veränderung in der Verfahrensweise (Änderung im Eluentensystem) reproduzierbare Ergebnisse liefert.
- Spezifität. Hierunter wird die Möglichkeit einer Methode verschiedene Analyte voneinander zu unterscheiden verstanden.
- Linearität. Darunter wird der Bereich verstanden, indem ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Informationswert besteht.
- Wiederholpräzision. Die Eigenschaft einer Methode bei mehrmaligem Wiederholen einer Messung unter gleichen Umständen nahezu identische Messergebnisse zu liefern.
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Grenzen die für die qualitative bzw. quantitative Analyse benötigt werden.
- Arbeitsbereich. Der Konzentrationsbereich, indem mit der vorliegenden Methode valide Messergebnisse erhalten werden können.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Verwendete Lösemittel

In Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien und Lösemittel mit CAS-Nummer und Hersteller zusammengefasst. Entionisiertes Wasser wurde mit einer Milli-Q Synthesis A10 Anlage (*Millipore*, Schwalbach, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Lösemittel.

Chemikalie	Hersteller	CAS-Nr.
Chloroform	Merck	67-66-3
Dichlormethan	Fluka	75-09-2
Methanol	Merck	67-56-1
Acetonitril	Merck	75-05-8
n-Hexan	Merck	110-54-3
Ameisensäure	Fluka	64-18-6
Diethylether	Merck	60-29-7
n-Pentan	Merck	109-66-0
Isopropanol	Fluka	67-63-0
Benzylalkohol	Riedel-deHaën	202-859-9
Benzylbenzoat	Sigma-Aldrich	120-51-4
Pyridin	Sigma-Aldrich	110-86-1
MSTFA	Macherey-Nagel	24589-78-4

### 4.2 Technische Informationen zu den verwendeten Geräten

Als Massenspektrometer wurden zwei Ionenfallenmassenspektrometer, HCT plus (*Bruker Daltonics*, Bremen, Deutschland) und Amazon Speed (*Bruker Daltonics*, Bremen, Deutschland) und ein Flugzeitmassenspektrometer micro-TOF-q (*Bruker Daltonics*, Bremen, Deutschland) verwendet. Die DESI-Messungen wurden mit einer *Omni Spray Ion Source OS-4001* (*Prosolia*, Indianapolis, IN, USA) durchgeführt. Die Direct Probe Messungen wurden mit einer APCI II-Quelle mit Direct Probe-Aufsatz (*Bruker Daltonics*, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Die flüssigkeitschromatographischen Untersuchungen wurden auf einer UFLC-Anlage (*Shimadzu*, Duisburg, Deutschland) durchgeführt (siehe Tabelle 4).



Tabelle 4: Technische Daten der verwendeten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Anlage.

Gerät	Typ	Hersteller
Degaser	DGU-20A <sub>5</sub>	Shimadzu
Pumpe	LC-20AD <sub>XR</sub>	Shimadzu
Pumpe	LC-20AD <sub>XR</sub>	Shimadzu
Autosampler	SIL-20AC <sub>XR</sub>	Shimadzu
Säulenofen	CTO-20AC	Shimadzu
Diodenarraydetektor	SPD-M20A	Shimadzu
Verbindungsmodul	CBM-20A	Shimadzu

Die GC-Messungen wurden auf einem *GC 7890A* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) mit integriertem FID-Detektor und einem angekoppelten *MSD 5975C inert XL* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) Massenspektrometer durchgeführt. Als Autosampler wurde ein *MPS 2XL+HS* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) verwendet.

### 4.3 Synthetische Cannabimimetika

#### 4.3.1 Chemikalien und Wirkstoffe

In Tabelle 5 sind die verwendeten synthetischen Cannabimimetika aufgelistet. Bei Verwendung der Bezeichnung „China“ unter dem Begriff Hersteller wurde die Substanz von chinesischen Herstellern über verdeckte Testkäufe bezogen und mittels NMR verifiziert. Die Bezeichnung „Extraktion“ bedeutet, dass die Substanz aus sichergestellten Kräutermischungsprodukten extrahiert, isoliert und mittels NMR verifiziert wurde.

Tabelle 5: Verwendete synthetische Cannabimimetika.

Chemikalie	Hersteller	CAS-Nr.
JWH-007	China	155471-10-6
JWH-015	LGC-standards	155471-08-2
JWH-072	China	209414-06-2
JWH-073	Chiron AS	208987-48-8
JWH-018	LGC-standards	209414-07-3
JWH-018 d11	Chiron AS	
JWH-019	THC-pharm	209414-08-4
JWH-081	China	210179-46-7
JWH-122	THC-pharm	619294-47-2
JWH-200	THC-pharm	103610-04-4
JWH-210	China	824959-81-1
JWH-250	THC-pharm	864445-43-2
RCS-4	China	1345966-78-0
CP47,497-C8 (1S/3S)	Extraktion	
CP47,497-C8 (1S/3R)	Extraktion	70434-92-3

Chemikalie	Hersteller	CAS-Nr.
CP47,497	China	70434-82-1
AM-694	China	335161-03-0
AM-2201	China	335161-24-5
AM-2233	China	444912-75-8
ORG-27569	China	868273-06-7
ORG-29647	China	868273-11-4
ORG-27759	China	868273-09-0

### 4.3.2 UHPLC-DAD Parameter

Das verwendete Eluentensystem besteht aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure. Die genaue Zusammensetzung der organischen und der wässrigen Phase ist in Tabelle 6 dargestellt (um die korrekte Zusammensetzung der Eluenten sicherzustellen wurden diese in Messkolben hergestellt).

Tabelle 6: Zusammensetzung des salzfreien Eluentensystems.

	Wässrige Phase A	Organische Phase B
Wasser	94,9%	4,9%
Acetonitril	5,0%	95,0%
Ameisensäure	0,1%	0,1%

In Tabelle 7 sind die entwickelten Verfahrensparameter zur chromatographischen Trennung beschrieben und in Tabelle 8 und Tabelle 9 die dabei verwendeten Trennsäulen.

Tabelle 7: UHPLC-Verfahren für synthetische Cannabimimetika.

Säule	Acquity UPLC BEH Phenyl	
Gradient	0 - 12,5 min	41% B
	12,5 - 20,0 min	50% B
	20,0 - 23,0 min	60% B
	23,0 - 27,5 min	41% B
Fließgeschwindigkeit		0,4 mL/min
Druck		max. 512 bar
Temperatur		30 °C
Laufzeit		27,5 min
Basispeakbreite	JWH-200	18 s
	JWH-250	30 s
	JWH-210	24 s

## 4 Experimenteller Teil

Tabelle 8: Technische Daten verwendeten Säule: Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 u.

Eigenschaft	Ausführung
Matrix	Ethylene bridged hybrid (BEH), 130 Å
Aktive Gruppe	Trifunktionale C <sub>6</sub> -Phenyl Phase
Säulendimension	100 x 2,1 mm
Partikelgröße	1,7 µm
pH-Bereich	2-8
Hersteller	Waters

Tabelle 9: Technische Daten der verwendeten Säule: Kinetex 1,7 u PFP 100 Å.

Eigenschaft	Ausführung
Matrix	Core Shell Silica
Aktive Gruppe	Pentafluorophenyl, TMS endcapping
Säulendimension	100 x 2,1 mm
Partikelgröße	1,7 µm
pH-Bereich	1,5 – 8,0
Hersteller	Phenomenex

### 4.3.2.1 *Probenvorbereitung für die qualitative Analyse*

Für qualitative Untersuchungen werden etwa 100 Milligramm der Kräutermischung mit einem Milliliter Methanol versetzt und für 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die Methanolphase wird über einen Spritzenfilter (0,2 µm) gereinigt und mit dem in Tabelle 7 beschriebenen Verfahren analysiert.

### 4.3.2.2 *Probenvorbereitung für die Analyse der Wirkstoffverteilung*

Für die Untersuchung der Wirkstoffverteilung werden aus jeder der zehn Tüten an drei unterschiedlichen Stellen jeweils ungefähr 100 mg Material als Einzelprobe entnommen. Weiterhin wird aus jeder der zehn Tüten an verschiedenen Stellen (mindestens 8) ungefähr 200 mg Material für eine Mischprobe entnommen. Das restliche Material wird für die Durchschnittsprobe, im Folgenden auch als Restprobe bezeichnet, verwendet.

Die Einzelproben werden nach dem Schema Tüte.Probe (Bsp. 1.3, 4.2), die Restproben nach dem Schema TüteRH.Probe (Bsp. 1RH.2, 4RH.1) beschriftet. Die Mischproben werden als Misch.1 und Misch.2 bezeichnet.

Die Einzelproben werden dreimal jeweils mit einem Milliliter Methanol versetzt und 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die vereinigten Methanolphasen werden über einen Spritzenfilter (0,2 µm) gereinigt. Von dem Filtrat werden 30 µL mit 900 µL Methanol versetzt und mittels des entwickelten Prüfverfahrens analysiert.

Das Mischprobenmaterial aus den 10 Tüten wird vereinigt und im Weiteren als eine Probe bearbeitet. Die Mischprobe und die zehn Restproben werden in einer Kugelmühle unter flüssigem Stickstoff gemahlen. Von dem gemahlene Material werden jeweils zwei Proben á circa 200 mg entnommen. Diese werden separat jeweils dreimal mit zwei Milliliter Methanol versetzt, 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und drei Minuten bei  $3500 \text{ U}^{-1}$  zentrifugiert. Die jeweils vereinigten Methanolphasen werden über einen Spritzenfilter ( $0,2 \mu\text{m}$ ) gereinigt. Von dem Filtrat werden  $30 \mu\text{L}$  mit  $900 \mu\text{L}$  Methanol versetzt und mittels des entwickelten Verfahrens analysiert.

### **4.3.2.3 Probenvorbereitung für die quantitative Analyse**

Der Inhalt der Kräutermischungstüte wird in einer Kugelmühle unter flüssigem Stickstoff gemahlen. Von dem gemahlene Material werden zwei Proben á jeweils circa 200 mg entnommen, zweimal mit je zwei Milliliter Methanol versetzt, 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und drei Minuten bei  $3500 \text{ U}^{-1}$  zentrifugiert. Die Methanolphasen der jeweiligen Probe werden vereinigt und über einen Spritzenfilter ( $0,2 \mu\text{m}$ ) gereinigt. Von dem Filtrat werden  $50 \mu\text{L}$  in einen 2 mL Messkolben überführt, mit Methanol aufgefüllt und mit dem in Tabelle 7 beschriebenen Prüfverfahren analysiert.

### **4.3.3 UHPLC-DAD/MS Kopplung**

Für die Kopplung der UHPLC mit dem Massenspektrometer HCT+ wurde eine Edelstahl-Kapillare mit  $0,1 \text{ mm}$  Innendurchmesser verwendet. Als Ionenquelle wurde eine ESI-Quelle mit eingebautem LC-Sprayer verwendet. Die gewählten Systemparameter des Massenspektrometers sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Einstellungen am Massenspektrometer für die Ankopplung an die UHPLC.

Dry Gas	9 L/min
Nebulizer	40 Psi
Dry Temperature	350 °C
Polarity	positive/negativ
Target Mass	350
Scan-Bereich	50 – 600 m/z
Smart Target	100000
Max Accu Time	200 ms
Averages	5

### 4.3.4 DESI-MS

In Tabelle 11 sind die verwendeten, optimierten geometrischen Parameter der DESI-Quelle aufgeführt. In Tabelle 12 sind die standardmäßig verwendeten Parameter für das HCT+ Massenspektrometer angegeben. Flüssige Proben werden auf eine Glastüpfelplatte, deren Auftragungssports aus Teflon bestehen, aufgetragen, und nach dem Verdunsten des Lösemittels mittels DESI-MS analysiert.

Tabelle 11: Einstellungen an der DESI-Quelle.

Abstand des MS-Einlass zur Oberfläche	0,3 cm
Abstand der Spitze des Sprühkopfes zur Oberfläche	2,4 cm
Abstand der Spitze des Sprühkopfes zum MS-Einlass	6,0 cm
Sprühwinkel	55°
Fließrate	3 µL/min
Stickstoffdruck	8 bar

Tabelle 12: Einstellungen am Massenspektrometer HCT+ für DESI-MS Messungen.

Dry Gas	5 L/min
Dry Temperature	250 °C
Polarity	positive/negative
Target Mass	350
Scan-Bereich	50 – 600 m/z
Smart Target	100000
Max Accu Time	200 ms
Averages	5

### 4.3.5 Direkte Analyse von Kräutermischungen

Für die direkte DESI-MS Analyse von Kräutermischungen werden ca. 50 mg der Kräutermischung auf einen Teflonfilter gegeben, mit einem zweiten Teflonfilter abgedeckt und zusammengepresst. Einer der beiden Teflonfilter wird im Anschluss mit Druckluft gereinigt und direkt mittels DESI-MS untersucht.

### 4.3.6 DC-DESI-MS zum Nachweis von synthetischen Cannabimimetika

In eine Doppeltrogkammer (BxHxT, 13 x 13,5 x 5,5 cm) werden 20 ml eines Gemisches aus n-Hexan und Diethylether (1:9) gegeben. Anschließend wird ein passendes Filterpapier in die Kammer eingestellt. Nach 30 Minuten Sättigungszeit wird die zu untersuchende DC-Platte in die Kammer gestellt. Wenn die Laufmittelfront ca. 1 cm vor dem Plattenende ist wird die

Platte entnommen und im Kaltluftstrom getrocknet. Für die Sichtbarmachung wird UV-Licht der Wellenlänge 254 nm verwendet.

Für die DESI-MS Messungen wird die DC-Platte in 5x5 cm Stücke gebrochen. Zuerst wird auf der unteren Hälfte der DC-Platte das DESI-Spray unterhalb eines der DC-Auftragungsspotps gerichtet. Nach ungefähr 30 Sekunden wird ein vertikaler Scan der DC-Platte durchgeführt. Dies wird mit Hilfe des manuell verstellbaren Probenhalters realisiert. Von vorhandenen Substanzen (als Peak im TIC zu erkennen) werden nach dem erfolgten Scan MS<sup>n</sup>-Spektren aufgenommen. Im Anschluss wird die Vorgehensweise auf der oberen Hälfte der DC-Platte wiederholt. Durch die Verwendung einer rein manuell verstellbaren DESI-Quelle kann keine gleichbleibende Scangeschwindigkeit erreicht werden, weswegen eine Umwandlung der Zeit- in eine Längen-Domäne nicht möglich ist.

## 4.4 Dopingsubstanzen und Arzneimittel

### 4.4.1 Chemikalien und Wirkstoffe

In Tabelle 13 sind die verwendeten anabolen Steroide und in Tabelle 14 die Original-Arzneimittel mit Hersteller, Wirkstoff und Darreichungsform aufgeführt. In Tabelle 15 sind Detailangaben zu einem sichergestellten Dopingpräparat aufgelistet. Weitere untersuchte, sichergestellte Präparate werden im Kapitel 5.2.1.2 beschrieben.

Tabelle 13: Verwendete anabole Steroide.

Chemikalie	Hersteller	CAS-Nr.
Boldenon	Sigma-Aldrich	846-48-0
Danazol	Sigma-Aldrich	17230-88-5
Metandienon	Sigma-Aldrich	72-63-9
Methyltestosteron	Sigma-Aldrich	58-18-4
Nortestosteron	Sigma-Aldrich	434-22-0
Testosteron	Sigma-Aldrich	58-22-0
Trenbolon	Sigma-Aldrich	10161-33-8
Testosteron-Acetat	Sigma-Aldrich	1045-69-8
Testosteron-Propionat	Sigma-Aldrich	57-85-2
Testosteron-Enantat	Sigma-Aldrich	315-37-7
Testosteron-Isocaproat	Sigma-Aldrich	15262-86-9
Testosteron-Phenylpropionat	Fluka	1255-49-8
Testosteron-Decanoat	Sigma-Aldrich	5721-91-5
Testosteron-Undecanoat	LGC-Standards	5947-44-0
Testosteron-Cypionat	Sigma-Aldrich	58-20-8
Trenbolon-Acetat	Fountain Limited	10161-34-9
Trenbolon-Enantat	Fountain Limited	

#### 4 Experimenteller Teil

Tabelle 14: Übersicht über die verwendeten originalen Arzneimittel.

Arzneimittel	Hersteller	Wirkstoff	Darreichungsform
Andriol	Essex Pharma	Testosteron Undecanoat	Hartkapsel
Intrinsa	Warner Chilcott	Testosteron	Pflaster
Nebido	Bayer Vital	Testosteron Undecanoat	Injektion
Testogel	Jenapharm	Testosteron	Gel
Testosteron Depot	Jenapharm	Testosteron Enantat	Injektion
Testosteron Depot	Eifelfango	Testosteron Enantat	Injektion
Testosteron Depot Galen	Galenpharma	Testosteron Enantat	Injektion
Testoviron Depot 250	Bayer	Testosteron Enantat	Injektion
Testoviron Depot 250	Rotexmedica	Testosteron Enantat	Injektion
Tramadol 50tabs	1A Pharma	Tramadol	Tabletten
Tramadol AL 50	Auid Pharma	Tramadol	Brausetabletten
Tramadol-ratiopharm	Ratiopharm	Tramadol	Hartkapseln
Tramadolor 100 ID	Hexal	Tramadol	Retardtabletten
Tramadol Zäpfchen	Sandoz	Tramadol	Zäpfchen
Tramundin	Mundipharma	Tramadol	Filmtabletten
Tramadolor	Hexal	Tramadol	Retardtabletten
Tramadol AbZ	AbZ-Pharma	Tramadol	Retardkapseln
Tramadol AL	Aluid Pharma	Tramadol	Retardtabletten
Tramadolor tabs	Hexal	Tramadol	Tabletten
Valoron N retard	Pfizer	Tilidin/Naloxon	Retardtabletten
Valoron N	Pfizer	Tilidin/Naloxon	Tropfen
Tilidin-ratiopharm	Ratiopharm	Tilidin/Naloxon	Retardtabletten
Champix	Pfizer	Vareniclin	Filmtabletten
Diazepam AbZ	AbZ-Pharma	Diazepam	Tabletten
Amoxi	1A Pharma	Amoxicillin	Tabletten
Finasterid-ratiopharm	Ratiopharm	Finasterid	Tabletten
Subutex	Essex Pharma	Buprenorphin	Sublingualtabletten
Furosemid AbZ	AbZ-Pharma	Furosemid	Retardkapseln
Fluconazol-ratiopharm	Ratiopharm	Fluconazol	Hartkapseln
Clomifen-ratiopharm	Ratiopharm	Clomifen	Tabletten
Azithromycin-ratiopharm	Ratiopharm	Azithromycin	Tabletten

Tabelle 15: Übersicht über sichergestellte Dopingpräparate.

Bezeichnung	Wirkstoff	Darreichungsform
Sustanon 250	Testosteron-Propionat	ölige Injektionslösung
	Testosteron-Isocaproat	
	Testosteron-Phenylpropionat	
	Testosteron-Decanoat	

### 4.4.2 UHPLC-DAD Parameter

Das Eluentensystem besteht aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure und die genaue Zusammensetzung der organischen und der wässrigen Phase ist im Kapitel 4.3.2 beschrieben.

#### 4.4.2.1 Klassisch gepackte Trennsäulen

In Tabelle 16 ist das entwickelte Verfahren zur chromatographischen Trennung unter Verwendung von gepackten Trennsäulen (siehe Tabelle 17 und Tabelle 18) beschrieben.

Tabelle 16: UHPLC-Verfahren für anabole Steroide mit Probenvorbereitung.

Säule	Acquity UPLC HSS T3	
Gradient	0 - 3 min	38% B
	3 - 4 min	90% B
	4 - 13 min	98% B
	13 - 14 min	auf 38% B
	14 - 17,5 min	38% B
Fließgeschwindigkeit	0,5 mL/min	
Druck	max. 560 bar	
Temperatur	30 °C	
Laufzeit	17,5 min	
Basispeakbreite	Trenbolon	18 s
	Testosteron	18 s
	T.-Isocaproat	15 s
	T.-Undecanoat	30 s

Tabelle 17: Technische Daten der verwendeten Säule: Acquity UPLC® HSS T3 1,8 u.

Eigenschaft	Ausführung
Matrix	high strength silica (HSS) Partikel
Aktive Gruppe	Trifunktionale Octadecyl-Phase
Säulendimension	100 x 2,1 mm
Partikelgröße	1,8 µm
pH-Bereich	2-8
Hersteller	Waters

Tabelle 18: Technische Daten der verwendeten Säule: Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> 100 Å.

Eigenschaft	Ausführung
Matrix	Core Shell Silica
Aktive Gruppe	Octadecyl, TMS endcapping
Säulendimension	100 x 2,1 mm
Partikelgröße	2,6 µm
pH-Bereich	1,5 – 10,0
Hersteller	Phenomenex



## 4 Experimenteller Teil

---

### 4.4.2.1.1 Probenvorbereitung mittels flüssig/flüssig Extraktion

Zu circa 200 mg des zu untersuchenden Öls werden 10 µL des Steroid-Esters (gelöst in Benzylalkohol) gegeben und 5 min geschüttelt. Anschließend werden 5 mL eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (9:1) dazu gegeben und 5 min geschüttelt und das Gefäß für 5 min vertikal um 180 ° gedreht. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wird 10 min bei 4000 RPM zentrifugiert. Falls die Phasentrennung nicht vollständig ist, werden einige Tropfen einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung zugesetzt. Ein Teil der oberen Phase wird direkt mittels des entwickelten Verfahrens (siehe Tabelle 16) analysiert.

### 4.4.2.1.2 Probenvorbereitung mittels SPE-Phase

Für die Extraktion der öligen Zubereitungen wurden die in den in Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21 beschriebenen SPE-Phasen verwendet.

Tabelle 19: Technische Daten der verwendeten SPE-Phase: LiChrolut EN.

Eigenschaft	Ausführung
Adsorbens	Ethyl vinyl benzene divinyl benzene polymer
Max. Aufgabevolumen	6 mL
Kapazität	500 mg
Hersteller	Merck

Tabelle 20: Technische Daten der verwendeten SPE-Phase: LiChrolut RP 18 E.

Eigenschaft	Ausführung
Adsorbens	keine Angaben
Max. Aufgabevolumen	3 mL
Kapazität	500 mg
Hersteller	Merck

Tabelle 21: Technische Daten der verwendeten SPE-Phase: Discovery DSC-18.

Eigenschaft	Ausführung
Adsorbens	Polymerically bonded octadecyl
Max. Aufgabevolumen	6 mL
Kapazität	500 mg
Hersteller	Supelco

Für die Probenvorbereitung werden etwa 100 mg Speiseöl in ein 1,5 mL Eppendorf-Cap gefüllt, mit 15 µL des als internen Standard verwendeten Steroid-Esters (200 mg gelöst in 450 mg Benzylalkohol) versetzt und 10 min geschüttelt. Von der öligen Zubereitung werden etwa 80 mg direkt auf die Discovery DSC-18 (500 mg) SPE-Phase von Supelco gegeben. Die

SPE-Phase wird anschließend mit 5 mL Methanol gewaschen. Die Methanolphase wird mit dem in Tabelle 16 angegebenen Verfahren analysiert.

### 4.4.2.2 Monolithische-Trennsäule

In Tabelle 22 ist das entwickelte Verfahren zur chromatographischen Trennung unter Verwendung einer monolithischen Trennsäule (siehe Tabelle 23) beschrieben.

Tabelle 22: UHPLC-Verfahren für anabole Steroide ohne Probenvorbereitung unter Verwendung einer monolithischen Säule.

Säule	Chromolith Performance	
Gradient	0 - 3 min	38% B
	3 - 4 min	90% B
	4 - 13 min	98% B
	13 - 14 min	auf 38% B
	14 - 17,5 min	38% B
Fließgeschwindigkeit	1,0 mL/min	
Druck	max. 48 bar	
Temperatur	30 °C	
Laufzeit	17,5 min	
Basispeakbreite	Trenbolon	4,5 s
	Testosteron	6,0 s
	T.-Isocaproat	4,5 s
	T.-Undecanoat	18,0 s

Tabelle 23: Technische Daten der verwendeten Säule: Chromolith Performance RP-18e.

Eigenschaft	Ausführung
Matrix	Monolithic silica
Aktive Gruppe	Octadecylsilan, full endcapping
Säulendimension	100 x 4,6 mm
Partikelgröße	2 µm Macropore, 180 Å Mesopore
pH-Bereich	2 – 7,5
Hersteller	Merck

Für die Probenvorbereitung werden circa 10 mg der öligen Zubereitung in ein Glasvial (2 mL) eingewogen. Dazu wird 1 mL Chloroform mittels einer Pipette *Rainin AutoRep E* (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) gegeben. Nach vollständiger Auflösung werden 20 µL der Lösung mittels Direktverdränger (*Eppendorf*, Wesseling-Berzdorf) in ein LC-Vial überführt, mit 1 mL Methanol versetzt und mit dem in Tabelle 22 aufgeführten Verfahren untersucht.

### 4.4.3 UHPLC-DAD/MS Kopplung

Für die Kopplung der UHPLC mit dem Massenspektrometer HCT+ wurden dieselben Bedingungen wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben verwendet.

### 4.4.4 GC-MS

Für die GC-MS-Messungen werden die Öl-Proben silyliert. Dazu werden je 5 µL der Probe mit 65 µL MSTFA und 10 µL Pyridin versetzt und für 30 min bei 70 °C sowie weiteren 10 min bei 75 °C in einem Heizblock erwärmt. Anschließend werden die Proben für weitere 20 min in dem ausgeschalteten Heizblock belassen. Die so erhaltenen Lösungen werden mit dem in Tabelle 24 beschriebenen GC-MS Verfahren untersucht.

Tabelle 24: GC-MS Verfahren für ölige Zubereitungen.

---

Säule	5% Phenyl Methyl Silox 25 m x 200 µm x 0,11 µm
Helium-Fluss	1 mL/min
Temperatur Programm	Start 60 °C Steigerung 10 °C/min Ende 320 °C
Laufzeit	42 min
Split	1:10
Split Fluss	10 mL/min
Injektor Temperatur	250 °C
Solvent delay	4 min
Massenbereich	40 – 650
MS Quellen Temperatur	230 °C
MS Quadrupol Temperatur	150 °C

---

### 4.4.5 DESI-MS

In Tabelle 25 sind die verwendeten geometrischen Parameter der DESI-Quelle und in Tabelle 26 die für die DESI-MS standardmäßig verwendeten Parameter für das HCT+ Massenspektrometer angegeben.

Tabelle 25: Einstellungen an der DESI-Quelle.

---

Abstand des MS-Einlass zur Oberfläche	0,3 cm
Abstand der Spitze des Sprühkopfes zur Oberfläche	2,4 cm
Abstand der Spitze des Sprühkopfes zum MS-Einlass	6,0 cm
Sprühwinkel	55°
Fließrate	3 µL/min
Stickstoff Druck	8 bar

---

Tabelle 26: Einstellungen am Massenspektrometer HCT+ für DESI-MS Messungen.

Dry Gas	5 L/min
Dry Temperature	250 °C
Polarity	positive/negative
Target Mass	350
Scan-Bereich	50 – 800 m/z
Smart Target	100000
Max Accu Time	200 ms
Averages	5

### 4.4.6 Direkte Analyse von öligen Zubereitungen

Für die direkte DESI-MS Analyse von öligen Zubereitungen werden 0,7 µL der Zubereitung auf eine Glastüpfelplatte aufgetragen. Im Anschluss wird die ölige Zubereitung mit einem saugfähigem Tuch abgetupft. Dabei ist es wichtig darauf zu achten, dass die Probe nicht verrieben wird, da ansonsten eine Kontamination der restlichen Tüpfelspots nicht ausgeschlossen werden kann. Die so präparierte Tüpfelplatte wird anschließend direkt mittels DESI-MS untersucht.

## 4.5 Software

Zur statistischen Auswertung der Messdaten wurde das Programm *SQS2000* verwendet. Dabei handelt es sich um eine kommerzielle Software, die auf dem Programm *Excel* der Firma *Microsoft* aufbaut. Mit diesem Programm wurden die in dieser Arbeit angegebenen statistischen Kenngrößen für die Kalibrierung berechnet. Dazu zählen: Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Reststandardabweichung, Linearitätsprüfung, Korrelation und lineare Regressionsparameter. Andere statistische Werte (z.B. Mittelwert, Standardabweichung) wurden mit dem Programm *Excel 2010* der Firma *Microsoft* berechnet.

## 4.6 APCI (Direct Probe) Messungen

Für die Durchführung von Direct Probe Messungen wird eine Schmelzpunktkapillare an der Außenseite mit dem zu untersuchendem Feststoff in Kontakt gebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst wenig Material an der Innen- und Außenseite der Kapillare haften bleibt. Noch sichtbares Material wird im Anschluss mit einem fusselfreien Tuch entfernt. Das so präparierte Glasrohr wird in die Direct Probe-Quelle montiert und in die Messposition bewegt, wodurch automatisch die Messung startet. In Tabelle 27 sind die Standardbe-

dingungen für die Einstellungen an dem Amazon Massenspektrometer für Direct Probe Messungen aufgeführt.

Tabelle 27: Einstellungen am Massenspektrometer Amazon für Direct Probe Messungen.

Dry Gas	4 L/min
Dry Temperature	220 °C
Nebulizer	29 psi
Vaporizer Temperature	450 °C
Polarity	positive/negative
Target Mass	350
Scan-Bereich	50 – 600 m/z
Smart Target	100000
Max Accu Time	200 ms
Averages	10

### 4.7 DESI-MS an unterschiedlichen Massenspektrometern

In der Tabelle 28 sind die verwendeten geometrischen Parameter der DESI-Quelle aufgeführt. In Tabelle 29 sind die standardmäßig verwendeten Parameter für das HCT+ Massenspektrometer, in Tabelle 30 für das Amazon Massenspektrometer und in Tabelle 31 für das micro-TOF-q Massenspektrometer angegeben.

Tabelle 28: Einstellungen an der DESI-Quelle.

Abstand des MS-Einlass zur Oberfläche	0,3 cm
Abstand der Spitze des Sprühkopfes zur Oberfläche	2,4 cm
Abstand der Spitze des Sprühkopfes zum MS-Einlass	6,0 cm
Sprühwinkel	55°
Fließrate	3 µL/min
Stickstoff Druck	8 bar

Tabelle 29: Einstellungen am Massenspektrometer HCT+ für DESI-MS Messungen.

Dry Gas	5 L/min
Dry Temperature	250 °C
Polarity	positive/negative
Target Mass	350
Scan-Bereich	50 – 600 m/z
Smart Target	100000
Max Accu Time	200 ms
Averages	5

## 4 Experimenteller Teil

---

Tabelle 30: Einstellungen am Massenspektrometer Amazon für DESI-MS Messungen.

Dry Gas	4 L/min
Dry Temperature	250 °C
Polarity	positive/negative
Target Mass	350
Scan-Bereich	50 – 600 m/z
Smart Target	100000
Max Accu Time	200 ms
Averages	10

Tabelle 31: Einstellungen am Massenspektrometer micro-TOF-q für DESI-MS Messungen.

Dry Gas	4 L/min
Dry Temperature	170 °C
Polarity	positive/negative
Quadrupol Collision energy	7 eV
Target Mass	350
Scan-Bereich	100 – 800 m/z
Averages	10

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Synthetische Cannabimimetika

#### 5.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Verfahren für den quantitativen Nachweis von cannabimimetischen Substanzen in Kräutermischungen entwickelt. Da sich die zu untersuchenden Substanzen strukturell oft nur wenig voneinander unterscheiden, sollten als Detektoren ein *Dioden-Array-Detektor* (DAD) und ein Massenspektrometer verwendet werden. Aus diesem Grund wurde ein salzfreies Eluentensystem, bestehend aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure, gewählt. Für die Verfahrensentwicklung und die anschließende Validierung wurde jedoch auf die Verwendung eines Massenspektrometers verzichtet, da für quantitative MS-Experimente unter Verwendung einer ESI-Quelle deuterierte Standards benötigt werden. Da die Quantifizierung mittels DAD erfolgen sollte musste für eine Basislinientrennung der Analyte gesorgt werden.

Folgende Säulen wurden bei der Methodenentwicklung untersucht:

- HSS T3 Water (siehe Tabelle 17)
- Waters Phenyl (siehe Tabelle 8)
- Kinetex PFP 1,7 (siehe Tabelle 9)

Zum Test der Leistungsfähigkeit und Eignung der unterschiedlichen Trennsäulen wurde jeweils versucht eine Basislinientrennung von einem Gemisch aus 16 synthetischen Cannabimimetika (JWH-007, JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-200, JWH-203, JWH-210, JWH-250, JWH-251, AM-694, AM-1220, RCS-4, CP47,497, (1S,3R)-CP47,497-C8), im weiteren Verlauf als SynMix bezeichnet, zu erreichen. Da sich die zu untersuchenden Substanzen teilweise deutlich in ihrer Polarität unterscheiden konnte für die Trennung kein isokratisches Verfahren verwendet werden, weswegen die unterschiedlichen Säulen mit einem mehrstufigen Gradienten getestet wurden. Zusätzlich wurden die Säulentemperatur in einem Bereich von 25 bis 40 °C und der Fluss in einem Bereich von 0,2 - 0,6 mL/min variiert.

Bei vorherigen Experimenten<sup>8</sup> wurde für die Trennung von verschiedenen Aminoalkylindolen eine C18-Phase verwendet. Allerdings konnten unter Verwendung einer C18-Phase und unter Verwendung des geringsten organischen Phasenanteils des Eluenten (1%) und eines

niedrigen Flusses (0,2 mL/min) die Substanzen JWH-200 und AM-1220 nicht aus der Totzeit der Retentionszeit entfernt werden. Bei diesen beiden Substanzen ist im Gegensatz zu den anderen synthetischen Cannabinoiden am Indolstickstoff keine Alkylkette sondern ein Ring-system vorhanden (siehe

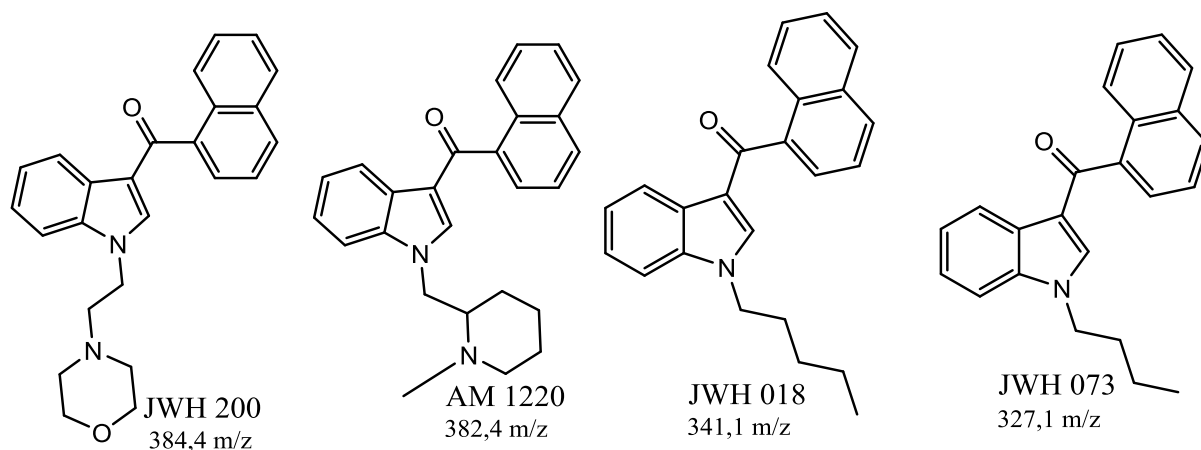


Abbildung 19).

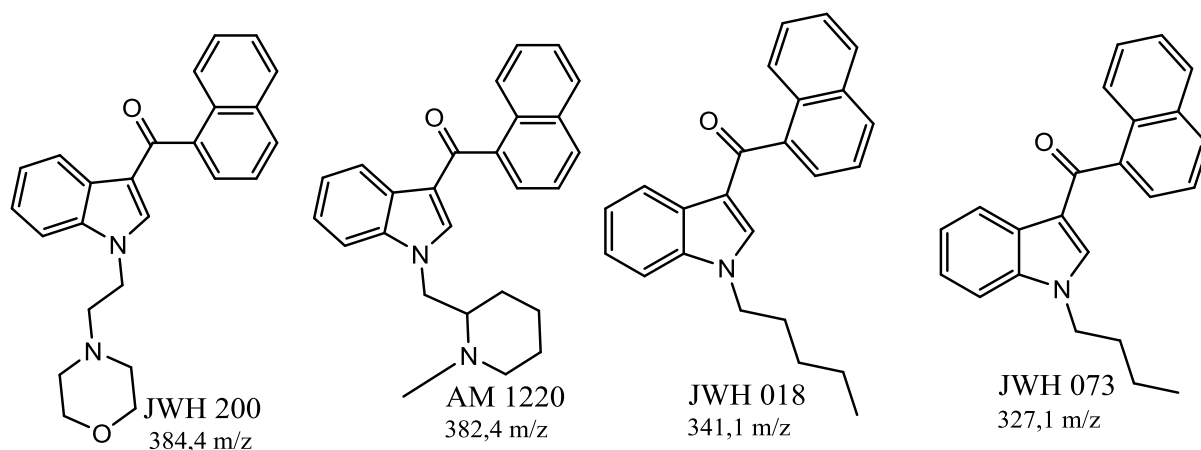


Abbildung 19: Strukturen der Aminoalkylindole JWH-200, AM-1220, JWH-018 und JWH-073.

Aus diesem Grund wurden zwei weitere Säulen, eine mit einer PFP-Phase (siehe Tabelle 9) und eine mit einer Phenylphase (siehe Tabelle 8), getestet. Die experimentelle Gegenüberstellung der unterschiedlichen Säulen zeigten, dass unter 4.3.2 beschriebene Verfahren unter Verwendung der Acquity UPLC® BEH Phenyl (1,7  $\mu$ m Partikeldurchmesser) (siehe Tabelle 8 am besten für die Trennung der synthetischen Cannabimimetika geeignet ist. Ein Beispiel-Chromatogramm der Trennung ist in Abbildung 20 zu sehen und in Tabelle 32 sind die Retentionszeiten und die für die Quantifizierung ausgewählten Wellenlänge dargestellt.



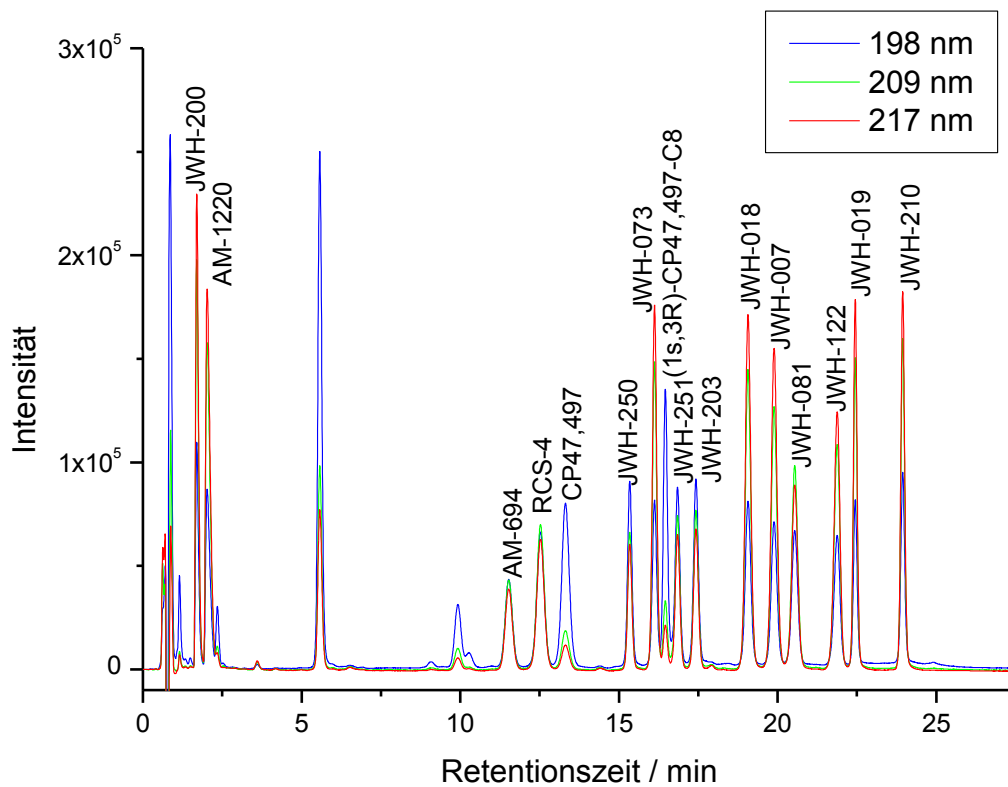


Abbildung 20: Chromatogramm einer UHPLC-DAD Trennung der Testlösung der synthetischen Cannabimimetika „SynMix“ mit dem entwickelten Verfahren.

Tabelle 32: Retentionszeit der einzelnen cannabimimetischen Wirkstoffe bei angegebener Wellenlänge.

Name	Retentionszeit / min	Wellenlänge / nm
JWH-200	1,916	217
AM-1220	2,333	217
AM-694	11,836	209
RCS-4	12,844	209
CP47,497	13,670	198
JWH-250	15,503	209
JWH-073	16,278	217
(1S,3R)-CP47,497-C8	16,613	198
JWH-251	17,003	209
JWH-203	17,582	209
JWH-018	19,200	217
JWH-007	20,006	217
JWH-081	20,640	209
JWH-122	21,948	217
JWH-019	22,483	217
JWH-210	23,946	217

Das entwickelte Verfahren wurde im Anschluss validiert. Zu diesem Zweck wurde die Wiederholpräzision innerhalb eines Tages an Hand von elf aufeinander folgenden Messungen ermittelt. Die erzielten relativen Standardabweichungen ( $\sigma_{rel}$ ) für die Retentionszeit und die Peakfläche sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Tabelle 33: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision von elf aufeinander folgenden Messungen des SynMix.

Substanz	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
CP47,497	0,60	0,65
CP47,497-C8	0,23	0,32
JWH-200	0,50	0,22
AM-1220	0,57	0,21
JWH-073	0,22	0,32
JWH-018	0,29	0,32
JWH-007	0,31	0,34
JWH-122	0,36	0,54
JWH-019	0,19	0,64
JWH-210	0,20	0,43
AM-694	0,61	0,68
RCS-4	0,57	0,56
JWH-250	0,23	0,46
JWH-251	0,24	0,41
JWH-203	0,25	0,34
JWH-081	0,32	0,37

Sowohl die relativen Standardabweichungen der Retentionszeit als auch die der Peakflächen liegen durchweg deutlich unterhalb von 1% weshalb sich das Verfahren hervorragend für die quantitative Analyse eignet.

Als weitere wichtige Validierungsgröße wurde die Wiederholpräzision über einen mehrtägigen Zeitraum ermittelt. Dazu wurden 12 Analysen des SynMix an sieben unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Bei Mehrfachmessungen an einem Tag wurde eine Messung morgens und eine Messung nachmittags durchgeführt. Die erhaltenen relativen Standardabweichungen für die Retentionszeit und die Signalfläche sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision von zwölf Messungen des SynMix an sieben unterschiedlichen Tagen.

Substanz	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
CP47,497	1,13	3,05
CP47,497-C8	0,40	2,98
JWH-200	1,76	2,52

Substanz	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
AM-1220	2,06	1,98
JWH-073	0,40	2,89
JWH-018	0,39	3,12
JWH-007	0,39	2,59
JWH-122	0,35	2,47
JWH-019	0,20	2,91
JWH-210	0,20	2,91
AM-694	1,12	2,14
RCS-4	1,07	1,93
JWH-250	0,43	3,01
JWH-251	0,40	2,50
JWH-203	0,40	2,51
JWH-081	0,39	2,61

Die relative Standardabweichung der Retentionszeit liegt im Bereich von 0,4 – 2% und die der Peakfläche im Bereich von 1,9 – 3,1%.

Die erhaltenen relativen Standardabweichungen der Wiederholpräzisionen zeigen, dass das entwickelte Verfahren sehr gut für die quantitative Analytik geeignet ist, da die Schwankungen zwischen einzelnen Messungen unter 5% liegen.

Nicht für alle der 16 Substanzen, für die Wiederholpräzisionen ermittelt wurden, wurde im Rahmen der Validierung eine Kalibration durchgeführt. Von den 16 Substanzen wurden nur die neun Substanzen ausgewählt, von denen eine ausreichende Menge an Reinsubstanz vorhanden war. Diese Substanzen entsprechen denen, die zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit am häufigsten in Kräutermischungen auftraten. Auf Grund der geringen Menge an Reinsubstanz wurde für die Herstellung der einzelnen Kalibrierlösungen eine Stammlösung der Substanz in Messkolben (mindestens 2 mL) mit Methanol verdünnt.

Für die Kalibrierung wurden jeweils zwischen fünf und sieben Lösungen der jeweiligen Substanz hergestellt. Die erhaltenen Messdaten wurden mit dem Programm SQS2000 ausgewertet (siehe Kapitel 4.5). Für die Überprüfung des Arbeitsbereichs wurden Mehrfachbestimmungen von zwei Kontrollproben, eine im unteren und eine im oberen Arbeitsbereich, durchgeführt. In Abbildung 21 ist exemplarisch eine Darstellung der bei der Kalibrierung von AM-694 erhaltenen Residuen und der resultierenden Regression mit zugehörigen Vertrauensbändern dargestellt. Die ausführlichen Ergebnisse der Kalibrierung sind im Anhang in den Tabellen 83 - 91 aufgeführt.

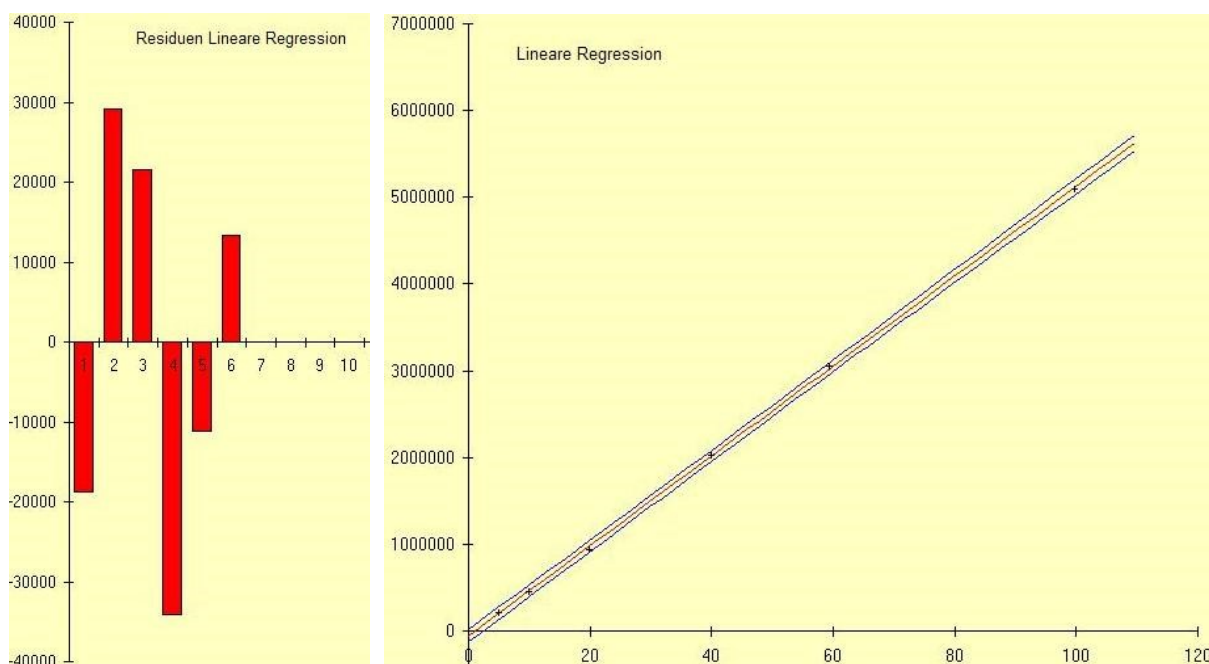


Abbildung 21: Darstellung der Residuenverteilung (links) und der linearen Regression mit zugehörigen Vertrauensbändern (rechts) der Kalibration von AM-694.

Für alle Kalibrierungen sind die Korrelationsfaktoren der Kalibriergeraden  $\geq 0,999$ . Die Nachweisgrenzen bei einem Vertrauensbereich von 95% und der jeweiligen Arbeitsbereiche sind in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35: Auflistung der Nachweisgrenzen und des Arbeitsbereichs für die in die Kalibrierung eingeschlossenen synthetischen Cannabimimetika.

Substanz	Nachweisgrenze in $\mu\text{g/mL}$	Arbeitsbereich in $\mu\text{g/mL}$
JWH-018	4,16	11-100
JWH-019	1,94	6-100
JWH-073	2,57	7-100
JWH-081	1,01	3-100
JWH-122	1,04	3-100
JWH-200	0,44	2-60
JWH-210	0,17	1-60
AM-694	1,09	5-100
CP47,497-C8	2,37	7-100

### 5.1.1.1 Untersuchung der Wirkstoffverteilung

Um grundlegende Informationen über den Herstellungsprozess und über geeignete Proben-  
vorbereitungen zu erlangen, wurde mit dem entwickelten Verfahren die Wirkstoffverteilung  
innerhalb von Kräutermischungen untersucht. Zu diesem Zweck wurde aus einer Großsicher-  
stellung von „Spice Diamond“ 10 Tüten zufällig als Untersuchungsobjekt ausgewählt und der

Gehalt an (1S,3R)-CP47,497-C8 analog zu Kapitel 4.3.2.2 bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Übersicht der Mittelwerte (M) und relativen Standardabweichungen ( $\sigma_{\text{rel}}$ ) der Wirkstoffgehalte der Einzelproben (Einzel) und Resthomogenisate (Rest) der einzelnen Tüten der Kräutermischung „Spice Diamond“.

Tüte	M (Einzel) / $\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}$	$\sigma_{\text{rel}}$ (Einzel)	M (Rest) / $\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}$	$\sigma_{\text{rel}}$ (Rest)	Abweichung M (Rest) / M (Einzel)
1	15,19	3,07%	14,27	1,21%	-6,50%
2	15,65	1,28%	14,23	0,71%	-9,97%
3	15,40	6,50%	13,94	0,26%	-10,50%
4	18,55	23,74%	14,45	0,46%	-28,36%
5	14,90	4,48%	14,72	0,63%	-1,27%
6	15,28	2,28%	14,05	0,61%	-8,72%
7	15,80	3,78%	13,88	1,03%	-13,83%
8	15,84	3,46%	13,79	1,56%	-14,88%
9	16,24	2,10%	12,46	1,47%	-30,35%
10	15,92	5,94%	14,56	0,40%	-9,35%

Die Einzelproben wiesen Wirkstoffgehalte zwischen 14,11  $\mu\text{g}/\text{mg}$  und 16,63  $\mu\text{g}/\text{mg}$  auf (lediglich ein Wert lag bei 24,75  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Die Durchschnittsproben wiesen mit Wirkstoffgehalten zwischen 12,28  $\mu\text{g}/\text{mg}$  und 14,62  $\mu\text{g}/\text{mg}$  im Mittel deutlich niedrigere Werte auf. Der Mittelwert der Mischprobe (Material aller 10 Tüten) lag mit einer Wirkstoffkonzentration von 14,70  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ( $\sigma_{\text{rel}}$  1,43%) über den Wirkstoffgehalten der Durchschnittsproben. Der Mittelwert der Durchschnittsproben lag bei 14,04 und die relative Standardabweichung zwischen den 10 Tüten bei 4,36%. Diese Werte zeigen, dass der Mittelwert der Durchschnittsproben als Konzentrationswert für eine Kräutermischungstüte und somit für die Berechnung der Gesamtmenge an Wirkstoff in allen sichergestellten Kräutermischungstüten verwendet werden kann, weshalb eine repräsentative Beprobung von einer großen Anzahl an Kräutermischungstüten möglich ist.

Da die Wirkstoffgehalte der drei Einzelproben einer Kräutermischungstüte maximal um 5% schwankten, der Mittelwert der Durchschnittsproben aber bis zu 30% unter dem Mittelwert der Einzelproben lag wurde in weiteren Experimenten getestet ob bei der Homogenisierung mittels Kugelmühle Wirkstoff verloren geht (z.B. durch Anhaftungen an den Gefäßwänden). Zu diesem Zweck wurden aus drei weiteren Kräutermischungstüten „Spice Diamond“ jeweils dreimal circa 100 mg entnommen und analog zu den Einzelproben (siehe Kapitel 4.3.2.2) analysiert. Die restliche Probe (circa 2,7 g) wurde, ohne vorherige Homogenisierung, analog zu den Einzelproben dreimal mit jeweils 27 mL Methanol extrahiert und mit dem entwickel-

ten Verfahren analysiert. Durch die in diesem Fall identische Probenvorbereitung der Einzel- und der Restproben wurde sichergestellt, dass auftretende Konzentrationsunterschiede nicht auf die Probenvorbereitung zurückgeführt werden können. Die erhaltenen Messdaten sind in Tabelle 37 aufgeführt.

Tabelle 37: Übersicht der Mittelwerte (M) und relativen Standardabweichungen ( $\sigma_{rel}$ ) der Wirkstoffgehalte der Einzelproben (Einzel) und der Restprobe (Rest) der drei Tüten der Kräutermischung „Spice Diamond“.

Tüte	M (Einzel) / $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\sigma_{rel}$ (Einzel)	M (Rest) / $\mu\text{g}/\text{mg}$	Abweichung M (Rest) / M (Einzel)
1	14,63	5,54%	12,48	-17,22%
2	15,21	2,75%	14,35	-5,98%
3	14,59	4,41%	13,33	-9,44%

Der Mittelwert der Wirkstoffgehalte der Einzelproben liegt mit  $14,81 \mu\text{g}/\text{mg}$  rund 10,5% über dem Mittelwert der Restprobe ( $13,39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Da auch nach der gleichen Probenvorbereitung der Gehalt an Wirkstoff in der Restprobe deutlich unterhalb des Gehalts der Einzelproben liegt konnte gezeigt werden, dass bei der Probenvorbereitung mittels Kugelmühle kein Wirkstoff verloren geht.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Probenahme und die Probenvorbereitung einen entscheidenden Einfluss auf die quantitativen Analysen von Kräutermischungen haben. Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine einfache Entnahme und Analyse von Kräutermatrix aus einer Kräutermischungstüte die Wirkstoffkonzentration dieser Tüte nicht in geeigneter Weise widerspiegeln kann. Somit ist auch für die Erstellung einer Mischprobe darauf zu achten an mindestens acht verschiedenen Stellen Material aus einer Kräutermischungstüte zu entnehmen. Die besten Ergebnisse können erzielt werden, wenn der gesamte Inhalt der Kräutermischungstüte mittels Kugelmühle homogenisiert wird. Bei der Untersuchung von Sicherstellungen sollte somit eine gewisse Anzahl (je nach Gesamtanzahl) an Kräutermischungstüten vollständig homogenisiert und analysiert werden.

Im Rahmen der Untersuchungen der Wirkstoffverteilung in Kräutermischungen sollte weiterhin untersucht werden inwieweit die Partikelgröße der Kräutermatrixbestandteile mit der Wirkstoffkonzentration korreliert, da durch diese Information eine Aussage über den Herstellungsprozess der Kräutermischungen möglich ist. Zu diesem Zweck wurde der Inhalt der Tüte einer Kräutermischung „Spice Diamond“ über vier Siebstufen gesiebt (siehe Abbildung

22) und jede erhaltene Fraktion einzeln extrahiert (dreifach Extraktion mit Methanol) und quantifiziert. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 38 zusammengefasst.



Abbildung 22: Resultierende Siebfraktionen des Inhalts einer Tüte der Kräutermischung „Spice Diamond“.

Tabelle 38: Ergebnisse der Siebung einer Tüte der Kräutermischung „Spice Diamond“.

Siebfraktion	Gewicht / g	Wirkstoffgehalt / mg	$\beta$ (Wirkstoff) / mg/g
> 2,0 mm	1,2276	17,68	14,40
1,4 mm – 2,0 mm	0,7272	10,65	14,64
1,0 mm – 1,4 mm	0,4434	6,62	14,92
0,71 mm – 1,0 mm	0,2314	4,05	17,51
< 0,71 mm	0,1918	3,44	17,91

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkstoffkonzentrationen in den Siebfraktionen > 1 mm ungefähr gleich sind. Die Wirkstoffkonzentrationen in den Siebfraktionen < 1 mm sind untereinander ebenfalls nahezu identisch allerdings liegen diese ungefähr 20% höher als die der größeren Siebfraktionen. Dies zeigt, dass bei der Herstellung der Kräutermischungen an kleineren Matrixbestandteilen im Mittel mehr Wirkstoff haften bleibt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass bei dem Herstellungsprozess in Lösemittel gelöster Wirkstoff auf die Kräutermatrix aufgesprüht wird und nicht die Kräutermatrix in das Lösemittel getaucht wird. Wenn die Kräutermatrix in das Lösemittel getaucht worden wäre, müsste der Wirkstoffgehalt von den größeren Matrixbestandteilen höher als der Wirkstoffgehalt der kleinen Matrixbestandteile sein, da mehr Masse für die Adsorption von Wirkstoff zur Verfügung steht. Der höhere Wirkstoffgehalt der kleinen Matrixbestandteile erklärt sich beim Aufsprühen der Wirkstoffe dadurch, dass das Verhältnis zwischen Volumen und Oberfläche der kleinen Matrixbestandteile größer ist als das von größeren Matrixbestandteilen, wodurch eine größere Adsorptionsfläche für die Wirkstoffaufnahme über die Oberfläche besteht.

Ende 2012 konnte in mehreren illegalen Laboratorien zur Herstellung von Kräutermischungen Mischtrommeln und Sprühflaschen sichergestellt werden, wodurch die Erkenntnisse aus den obigen Experimenten bestätigt werden konnten.

### 5.1.1.2 Untersuchungen zu der Probenvorbereitung

Für die quantitative Analyse von Kräutermischungen ist es wichtig den zugesetzten Wirkstoff vollständig aus der Kräutermatrix zu extrahieren. Weiterhin ist jedoch bei jeder Probenvorbereitung darauf zu achten, dass diese möglichst einfach und schnell zu erledigen ist, um somit tauglich für die kriminaltechnische Fallarbeit zu sein.

Zum Test, ob eine einmalige Extraktion der homogenisierten Kräutermatrix ausreichend ist wurden jeweils 100 Milligramm der Proben *1RH*, *5RH*, *10RH* und *Misch* (siehe Kapitel 4.3.2.2) dreimal mit jeweils 1 mL Methanol für 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde die Lösung jeweils über einen 0,2 µm Filter filtriert und der Wirkstoffgehalt an (1S,3R)-CP47,497-C8 mit dem beschriebenen Verfahren quantifiziert. Die Resultate sind in der Tabelle 39 aufgeführt.

Tabelle 39: Resultate des Tests der durchgeführten Mehrfachextraktionen von Kräutermatrix.

Probe	Messung	β (Wirkstoff) in µg/mg
1RH	1	12,77
	2	1,81
	3	0,00
5RH	1	13,17
	2	1,52
	3	0,00
10RH	1	13,19
	2	1,67
	3	0,00
Misch.1	1	12,99
	2	1,60
	3	0,00

Wie an Hand der Daten deutlich zu erkennen ist reicht eine zweifache Extraktion der homogenisierten Kräutermatrix für eine vollständige Extraktion des Wirkstoffes aus.

In einem weiteren Versuch sollte getestet werden, ob eine einfache Extraktion der Kräutermatrix, mit dem doppelten Lösungsmittelvolumen, ebenfalls für eine vollständige Extraktion sorgt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 100 Milligramm der Proben *1RH* und *Misch* mit 2 mL Methanol für 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert, über einen 0,2 µm Filter filtriert und anschließend analysiert. Dabei zeigte es sich (siehe Tabelle 40), dass die ermittelten Massenkonzentrationen ca. 10% unterhalb der summierten Massenkonzentrationen aus Tabelle 39 liegen.



Tabelle 40: Ergebnisse der einmaligen Extraktion von Kräutermischungen

Probe	Messung	$\beta$ (Wirkstoff) / $\mu\text{g}/\text{mg}$	Summenkonzentration / $\mu\text{g}/\text{mg}$
1RH	1	12,45	14,58
Misch	1	13,52	14,59

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine einfache Extraktion mit erhöhtem Lösemittelvolumen zu keiner vollständigen Extraktion der Wirkstoffe aus der Kräutermatrix führt. Aus diesem Grund wurde die in Kapitel 4.3.2.3 beschriebene Probenvorbereitung für die quantitative Analyse von Kräutermischungen als Effizienteste ermittelt.

In zwei wissenschaftlichen Publikationen aus dem Jahr 2012 wurden zwei Verfahren für die Quantifizierung von synthetischen Cannabimimetika in Kräutermischungen veröffentlicht. Allerdings wurde die Probenvorbereitung dort nur oberflächlich untersucht. So empfiehlt Logan et al. ein Zermahlen der Kräutermischung zwischen Schmiergelpapier und eine anschließende einmalige Extraktion mittels Methanol<sup>79</sup> und Merola et al. ein zermörsern des gesamten Kräutermaterials und eine anschließende einmalige Extraktion mittels Methanol<sup>80</sup>. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen somit deutlich, dass die Vorgehensweise in diesen beiden wissenschaftlichen Arbeiten nicht ausreichend für die Gewinnung von quantitativen Wirkstoffkonzentrationen ist.

### **5.1.1.3 Analyse von Realproben**

Im Rahmen der Untersuchungen zu der Wirkstoffverteilung in Kräutermischungen sollten 17 verschiedene Kräutermischungen auf das zugesetzte synthetische Cannabimimetikum hin untersucht und quantifiziert werden. Dabei sollte vor allem analysiert werden inwiefern die Wirksamkeit der einzelnen Cannabimimetika mit dem Wirkstoffgehalt in Kräutermischungen korreliert und wie der Wirkstoffgehalt in Produkten unterschiedlicher Herstellungs. Für diese Untersuchungen wurden die einzelnen Kräutermischungen analog zu 4.3.2.3 homogenisiert, extrahiert und analysiert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 41 dargestellt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Synthetische Cannabimimetika

Tabelle 41: Übersicht der Wirkstoffkonzentrationen von JWH-210, JWH-122 und JWH-018 in verschiedenen Kräutermischungsprodukten.

Name	$\beta$ (JWH-210) in $\mu\text{g}/\text{mg}$	Name	$\beta$ (JWH-122) in $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\beta$ (JWH-018) in $\mu\text{g}/\text{mg}$
 Push	199,9	 69	-	20,1
 DJ	197,1	 Jamaican Gold	-	43,8
 Love	186,5	 BLAZE	-	93,2
 Vegas	61,0	 Monkees Go banana	61,2	
 Jamaican Gold Extreme	162,7	 OMG	69,5	
 Boom	179,4			
 Welcome Vegas	135,7			
 Maya	211,5			
 Lips	182,8			
 BONZAI Citrus	165,9			
 Remix	183,6			
 Silber ohne Aufschrift	195,3			

Die Ergebnisse zeigen, dass die größte Anzahl der untersuchten Kräutermischungen das synthetische Cannabinoid JWH-210 enthalten. Die Wirkstoffkonzentration in der jeweiligen Kräutermischung schwankt dabei zwischen 6% und 21%. Besonders fallen dabei stark schwankende Wirkstoffgehalte desselben synthetischen Cannabimimetikum in unterschiedlichen Kräutermischungen auf. So ist in der Kräutermischung *Blaze* ungefähr fünfmal mehr JWH-018 enthalten als in der Kräutermischung *69* und in der Kräutermischung *Vegas* ist ungefähr dreimal weniger JWH-210 enthalten als z.B. in der Kräutermischung *Maya*. Die Untersuchung der Kräutermischungen *Jamaican Gold* und *Jamaican Gold Extreme*, bei dem es sich um ein nachfolgendes Produkt handelt, zeigt, dass die Produzenten ihre Produkte der aktuellen Gesetzgebung anpassen. In diesem Fall wurde die Kräutermischung *Jamaican Gold* zu einem Zeitpunkt sichergestellt wo JWH-018 noch nicht dem BtMG unterstellt war. Nach der Unterstellung wurde dann das Nachfolgerprodukt *Jamaican Gold Extreme* mit einem anderen Wirkstoff (JWH-210) sichergestellt.

### 5.1.2 LC-MS Kopplung

Wie zu Beginn des Kapitels 5.1.1 erwähnt sollte bei der Entwicklung des Verfahrens nicht nur eine photometrische Detektion sondern zusätzlich auch eine massenspektrometrische Detektion, für die eindeutige Identifizierung, erfolgen. Die Bedingungen, die im Kapitel 4.4.3 beschrieben sind, sind am besten für die Kopplung der UHPLC-DAD mit einem Massenspektrometer geeignet.

Mit den dort beschriebenen Parametern konnte das entwickelte UHPLC-DAD Verfahren ohne weitere Adaption für die Kopplung mit einem Massenspektrometer verwendet werden. In Tabelle 42 sind die Retentionszeiten sowie die m/z-Werte, bei denen die 16 Cannabinoide im Massenspektrometer detektiert werden, zusammengefasst.

Tabelle 42: Retentionszeiten und m/z-Werte bei denen die massenspektrometrische Detektion der 16 untersuchten Cannabinoide erfolgte.

Name	Retentionszeit in min	m/z
JWH-200	2,122	385,4
AM-1220	2,429	383,4
AM-694	12,144	436,1
RCS-4	13,162	322,2
CP47,497	13,977	301,3
JWH-250	15,883	336,3
JWH-073	16,660	328,3
(1S,3R)-CP47,497-C8	17,009	315,3

Name	Retentionszeit in min	m/z
JWH-251	17,364	320,3
JWH-203	17,941	340,3
JWH-018	19,580	342,2
JWH-007	20,397	356,2
JWH-081	21,046	372,2
JWH-122	22,367	356,2
JWH-019	22,937	356,2
JWH-210	24,425	370,2

In der folgenden Abbildung sind alle relevanten EIC's, der Trennung des Cannabinoidgemisches, in einem Chromatogramm zusammengefasst.

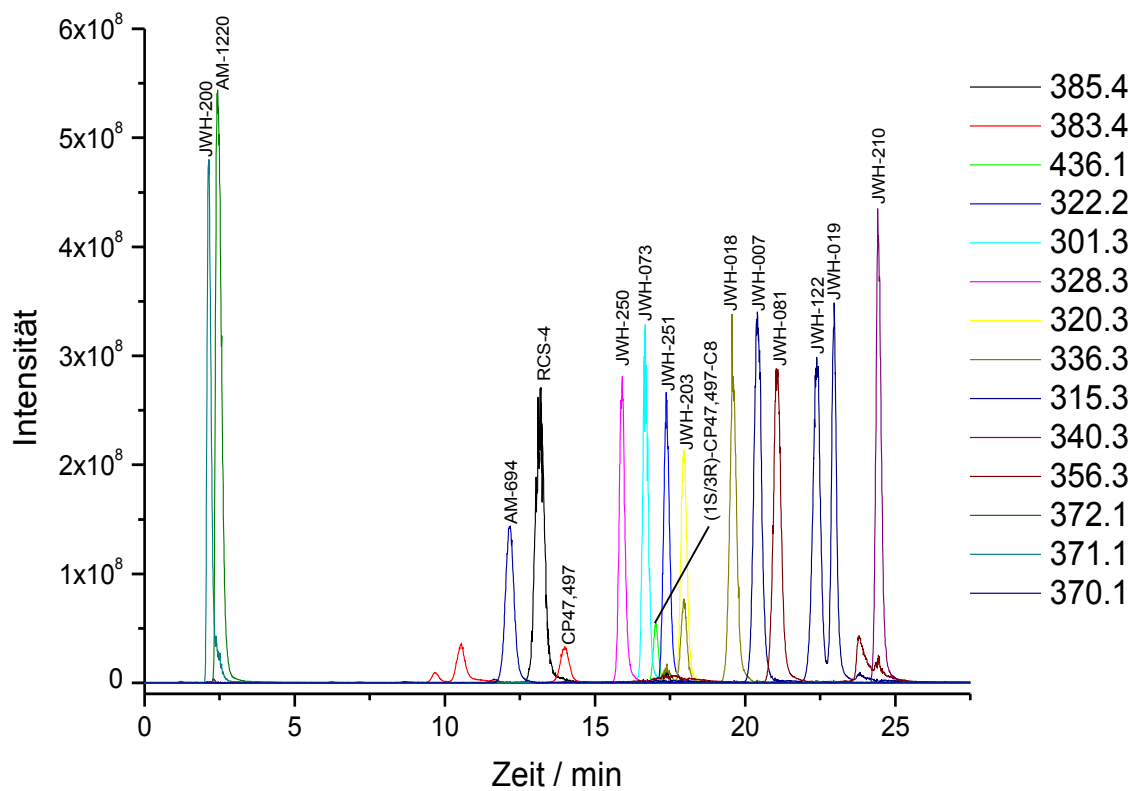


Abbildung 23: Darstellung aller relevanten EIC's der Trennung des Cannabinoidgemisches.

In Abbildung 24 ist beispielhaft ein Massenspektrum der Substanz JWH-018 und die dazugehörigen MS<sup>n</sup>-Spektren dargestellt.

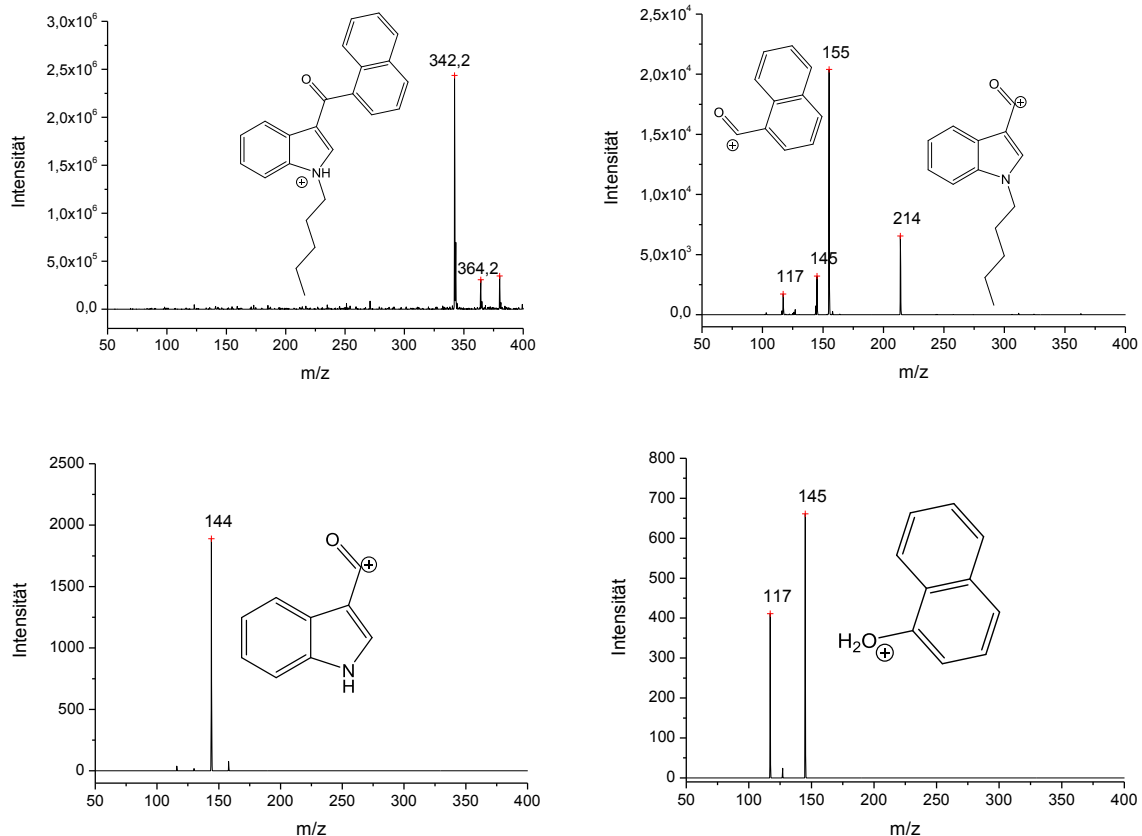


Abbildung 24: Links oben, Fullscan Spektrum der Substanz JWH-018. Rechts oben,  $MS^2$ -Spektrum des  $m/z$ -Wert 342; Links unten,  $MS^3$ -Spektrum des  $m/z$ -Wert 214; Rechts unten  $MS^3$ -Spektrum des  $m/z$ -Wert 155.

Anhand von diesen Massenspektren können die am häufigsten auftretenden Fragmentierungen erklärt werden. So zeigen Massenspektren der Aminoalkylindole neben einem Signal das dem protonierten Molekül (JWH-018,  $m/z = 342$ ) entspricht auch ein Signal, welches dem Natriumaddukt der Substanz (JWH-018,  $m/z = 364$ ) entspricht. Die Fragmentierung der Aminoalkylindole findet, wie in Abbildung 24 zu sehen ist, normalerweise an der Keto-Gruppe statt, wobei diese jeweils an dem Molekülfragment, welches im Spektrum zu sehen ist, verbleibt. Bei JWH-018 entspricht dies einem Naphtyl-oxo-methylium-Ion ( $m/z = 155$ ) und einem Oxo(1-pentyl-1H-indol-3yl)methylium-Ion ( $m/z = 214$ ). Bei der Interpretation der  $MS^3$ -Spektren der Aminoalkylindole fällt häufig ein Massenverlust von  $m/z = 10$  auf. Dabei handelt es sich um einen Verlust von Kohlenmonoxid mit gleichzeitig erfolgender Anlagerung von Wasser, was in der Summe einen Verlust von zehn Masseneinheiten entspricht. In Abbildung 24 ist dies beispielhaft für die Substanz JWH-018 dargestellt.

Eine weitere Besonderheit in der Fragmentierung weisen die Substanzen JWH-203 und JWH-251 auf. Bei diesen beiden Substanzen ist das Indolsystem nicht direkt über die Keto-

Gruppe mit dem aromatischen System verknüpft, sondern es befindet sich noch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe dazwischen (siehe Abbildung 25).

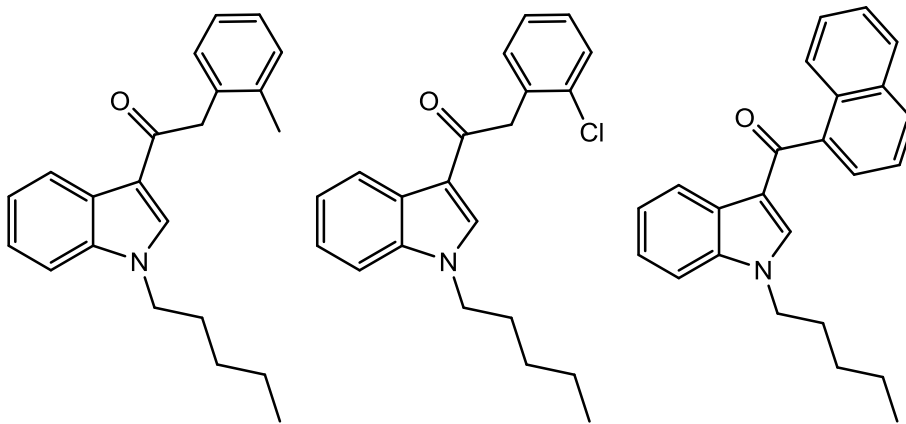


Abbildung 25: Strukturen von Aminoalkylindolen. JWH-251 (links), JWH-203 (mitte), JWH-018 (rechts).

So zeigt das Fragmentspektrum der Substanz JWH-251, anders als z.B. das der Substanz JWH-018, einen Massenverlust von  $m/z = 28$  (siehe Abbildung 26).

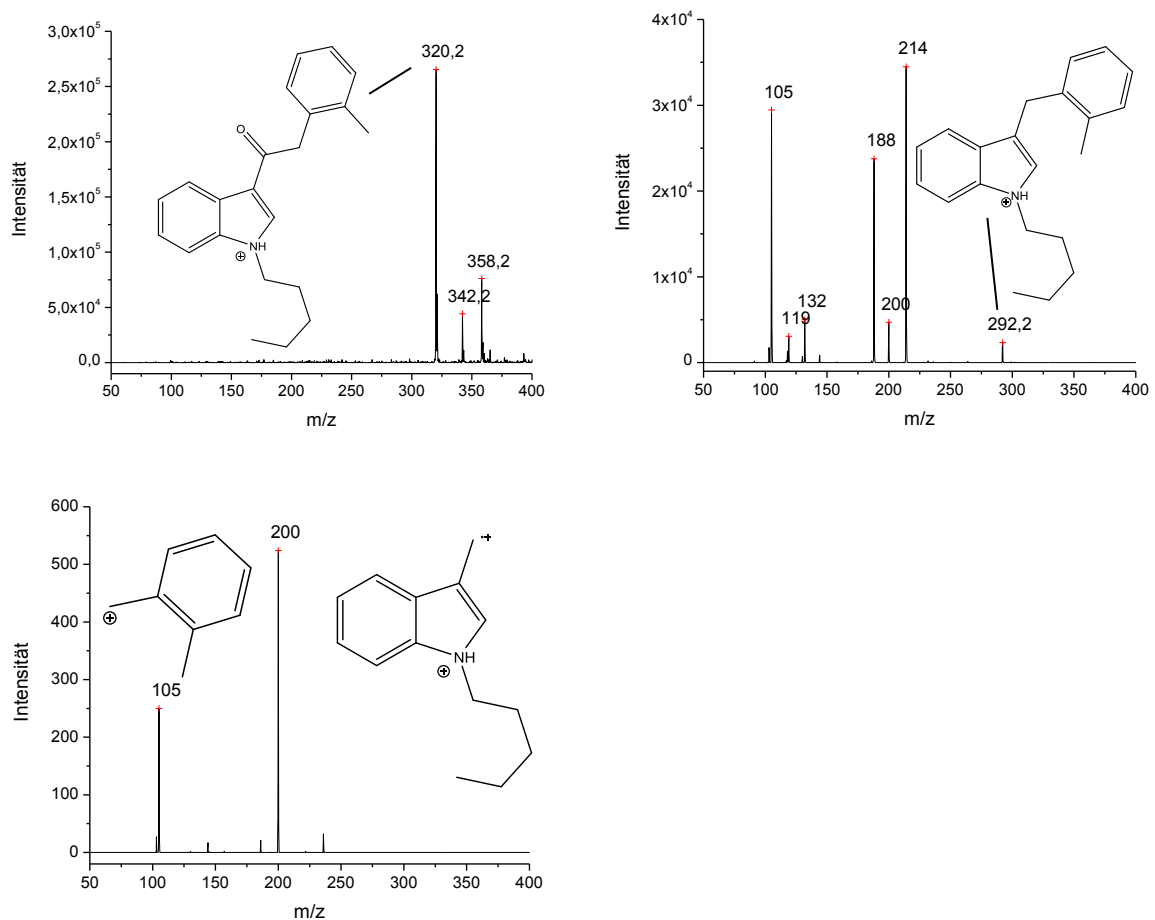


Abbildung 26: Links oben, Fullscan Spektrum der Substanz JWH-251. Rechts oben, MS<sup>2</sup>-Spektrum des  $m/z$ -Wert 320; Links unten, MS<sup>3</sup>-Spektrum des  $m/z$ -Wert 292.

Dieser konnte mittels Messungen an einem hochauflösenden Massenspektrometer (Orbitrap) als Verlust von Kohlenmonoxid identifiziert werden. Auch die weiteren MS<sup>n</sup>-Spektren von JWH-251 unterscheiden sich deutlich von denen anderer Aminoalkylindole. In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass die Verbindung JWH-203 ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster zu JWH-251 aufweist.

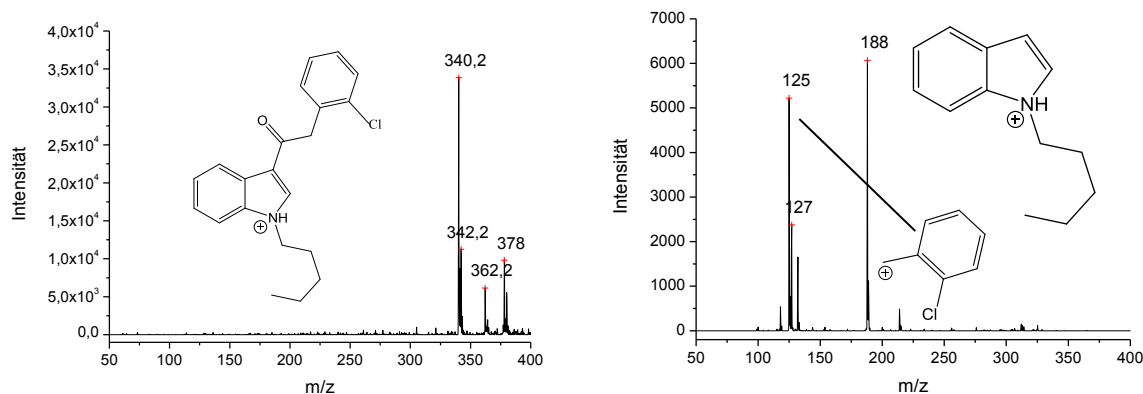


Abbildung 27: Links, Fullscan Spektrum der Substanz JWH-203. Rechts, MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 340.

Der Tabelle 42 ist weiterhin zu entnehmen, dass viele Cannabimimetika dieselbe Molekülmasse und teilweise auch die selbe Summenformel aufweisen und somit bei demselben m/z-Wert gemessen werden. Eine Unterscheidung dieser Verbindungen (z.B. JWH-007, JWH-019) ist somit nur über die Fragmentspektren möglich.

Im Anhang in Tabelle 111 sind die Hauptfragmente der Cannabimimetika, die im SynMix vorhanden sind, aufgelistet. Wie zu erkennen ist, können alle untersuchten Cannabinoide, auch die mit gleicher Summenformel, anhand ihrer Fragmentspektren eindeutig voneinander unterschieden werden.

Für die UHPLC-DAD-MS Kopplung sollte an Hand von 10 aufeinanderfolgenden Messungen des SynMix die Wiederholpräzision bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision (massenspektrometrische Detektion) von zehn aufeinander folgenden Messungen des SynMix.

Name	$\sigma_{rel}$ in %	
	Retentionszeit	Fläche
JWH-200	0,91	0,28
AM-1220	0,75	1,02
AM-694	0,12	3,39
RCS-4	0,12	2,86

Name	$\sigma_{rel}$ in %	
	Retentionszeit	Fläche
CP47,497	0,10	0,65
JWH-250	0,08	1,63
JWH-073	0,05	3,65
(1S/3R)-CP47,497-C8	0,07	2,54
JWH-251	0,07	2,94
JWH-203	0,06	2,72
JWH-018	0,06	0,85
JWH-007	0,06	1,05
JWH-081	0,06	2,08
JWH-122	0,06	1,14
JWH-019	0,07	1,54
JWH-210	0,05	2,88

Wenn die relativen Standardabweichungen der Wiederholpräzisionen der massenspektrometrischen Detektion (siehe Tabelle 43) mit denen der photometrischen Detektion (siehe Tabelle 33) verglichen werden ist festzustellen, dass die Fläche der Signale bei der massenspektrometrischen Detektion signifikant stärker schwankt als bei der photometrischen Detektion. Aufgrund dieser Schwankungen ist eine externe Kalibrierung der ESI/MS nicht ohne weiteres möglich. Stattdessen wurde getestet, ob eine Quantifizierung mittels deuterierter Standards möglich ist. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung mit einer bekannten Konzentration an JWH-018 (50 ppb) mit drei verschiedenen Mengen an JWH-018 d11 (25, 50 und 100 ppb) versetzt und analysiert. Über das Verhältnis der Flächen der Peaks der EIC's 342 und 353 sowie die bekannte Konzentration an JWH-018 d11 wurde die Konzentration an JWH-018 in jeder Probe bestimmt und mit der realen Konzentration (50 ppb) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 dargestellt.

Tabelle 44: Konzentration des zugesetzten Standards JWH-018 d11 und die daraus berechnete Konzentration an JWH-018 sowie die prozentuale Abweichung zwischen der realen und der berechneten Konzentration (50 ppb).

c (JWH-018 d11)	c (JWH-018) berechnet	Abweichung
25 ppb	40,1 ppb	-19,8%
50 ppb	50,7 ppb	1,4%
100 ppb	27,6 ppb	-44,8%

Die Messergebnisse zeigen, dass sowohl bei einer Addition von 25 ppb und 100 ppb JWH-018 d11 eine geringere Konzentration an JWH-018 als eigentlich vorhanden gemessen. Bei einer Zugabe von 100 ppb JWH-018 d11 kann die geringere Intensität des JWH-018 Sig-



nals eventuell auf Ionsuppression zurückgeführt werden. Anhand der Messdaten ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe an deuteriertem Standard möglichst genau der Menge entsprechen sollte, in der auch der Analyt vorhanden ist. Das bedeutet, dass für die Quantifizierung mittels deuterierter Standards immer mindestens zwei Messungen durchgeführt werden müssen. In der ersten Messung muss eine Abschätzung des Analytgehalts vorgenommen werden und erst in der zweiten Messung kann die eigentliche Quantifizierung durchgeführt werden. Ein weiterer Nachteil der Quantifizierung mittels deuterierter Standards ist der hohe Preis der deuterierten Reagenzien sowie deren eingeschränkte Verfügbarkeit. Dies führt dazu, dass Analyte nur selten mit den entsprechenden deuterierten Analyten quantifiziert werden können. Stattdessen müssen strukturell ähnliche deuterierte Verbindungen verwendet werden, was wiederum die Fehleranfälligkeit erhöht und die Verlässlichkeit der Quantifizierung reduziert.

Aus diesen Gründen wurde, wie am Anfang des Kapitels erwähnt, auf die Quantifizierung der Cannabinoide mittels ESI/MS verzichtet, zumal mittels der UHPLC-DAD sehr gute Ergebnisse erzielt wurden.

Messungen von Kräutermischungen mit synthetischen Cannabimimetika, die nicht in der Methodvalidierung vertreten waren zeigten, dass mittels ESI/MS<sup>n</sup> die Identifizierung der Cannabimimetika einfach möglich war. Allerdings konnten die Cannabimimetika nicht mehr in die Validierung integriert werden, da bei der photometrischen Detektion Überlagerungen von Signalen auftraten.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Kopplung UHPLC/DAD-ESI/MS<sup>n</sup> hervorragend geeignet ist quantitative Informationen für eine diskrete Anzahl von Substanzen zu erhalten und weiterhin in der Lage ist weitere, auch unbekannte cannabimimetische Substanzen zu identifizieren.

### **5.1.3 DESI-MS**

#### ***5.1.3.1 Direkte Analyse von Kräutermischungen***

In diesem Abschnitt wird das Ergebnis einer Untersuchungsserie beschrieben ob Kräutermischungen ohne vorherige Probenvorbereitung (Extraktion mit Lösemittel) mittels DESI-MS analysiert werden können. Das Problem bei diesen Untersuchungen ist neben dem Vakuum des Massenspektrometers, das einzelne Kräuterbestandteile in das Massenspektrometer

saugen kann, auch das DESI-Spray, das Bestandteile von der Oberfläche pusten kann. Aus diesem Grund ist es bei der Untersuchung von Kräutermatrix wichtig diese Gefahren zu unterbinden.

Als erstes wurde versucht die Kräutermischung auf einem Klebefilm zu befestigen (siehe Abbildung 28 a). Bei den DESI-MS Untersuchungen wurden auch keine festen Bestandteile der Kräutermatrix in das Massenspektrometer eingetragen. Allerdings wurden bei den Analysen nur Massenspektren des Klebefilms generiert (siehe Abbildung 28 b).

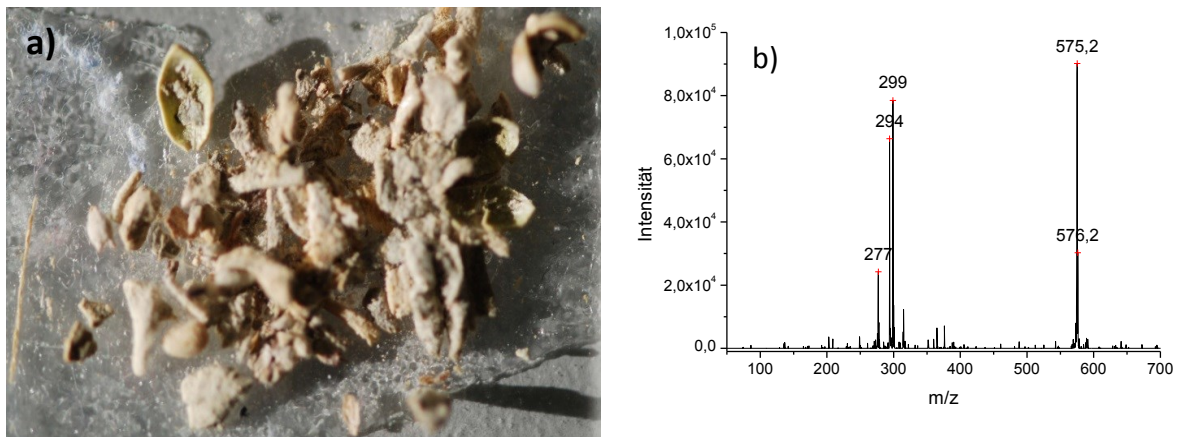


Abbildung 28: a) Kräutermischung „Monkees go Bananas“ mittels Klebefilm auf einem Glasträger befestigt. b) erhaltenes DESI-MS Spektrum bei der Beprobung der auf einem Klebefilm befestigten Kräutermischung „Monkees go Bananas“.

Durch die Anordnung der Pflanzenpartikel auf dem Klebefilm bleiben immer kleine Lücken zwischen den einzelnen Matrixbestandteilen, durch die das DESI-Spray auf den Klebefilm trifft. Da eine lückenlose Anordnung der Matrixbestandteile nicht möglich ist, wurde dieser Ansatz als direkte Untersuchungsmöglichkeit verworfen.

Im zweiten Ansatz wurde die Kräutermischung zwischen zwei Teflonfiltern zusammengepresst (siehe Kapitel 4.3.5) und anschließend der partikelfreie Teflonfilter, sichtbar anhaftende Partikel wurden mit Druckluft entfernt, mittels DESI-MS untersucht (siehe Abbildung 29). Durch die beschriebenen Arbeitsschritte konnte eine Kontamination des Massenspektrometers durch feste Bestandteile der Kräutermischungen ausgeschlossen werden.



Abbildung 29: links: Kräutermischung auf Teflonfilter; mitte: Kräutermischung zwischen zwei Teflonfiltern gepresst; rechts: gesäuberter Teflonfilter auf Objekträger für DESI-Messungen befestigt.

Analysen zeigten, dass der synthetische Wirkstoff aus einer Kräutermischung auf dem Teflonfilter einwandfrei nachgewiesen werden konnte. Als Test der Leistungsfähigkeit dieser Messmethode wurden unterschiedliche Spice-Produkte mit dem obigen Verfahren, sowie zum Vergleich mittels GC-MS analysiert. Dabei wurden auch Kräutermischungen mit mehr als einem synthetischen Wirkstoff untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 45 zusammengefasst.

Tabelle 45: Vergleich der direkten DESI-MS und der GC-MS Ergebnisse von den untersuchten Kräutermischungen.

Kräutermischung	DESI-MS Ergebnisse	GC-MS Ergebnisse
Monkees go Bananas	JWH-122	JWH-122
Jamaican Gold EXTREME	JWH-210	JWH-210
New Jamaican Gold	JWH-081	JWH-081
Blaze It (Grape)	JWH-019, JWH-200	JWH-019, JWH-200
Bulk	JWH-203	JWH-203
Unbeschriftete Silbertüte	AM-694, WIN 48,098	AM-694, WIN 48,098
Bloom! <sup>TM</sup>	JWH-250	JWH-250
Spicy Inka	RCS-4	RCS-4
Leerer Teflonfilter	-	

Die Messergebnisse zeigen, dass alle mittels GC-MS in den Kräutermischungen nachgewiesene synthetische Cannabimimetika ebenfalls mit der obigen Methode analysiert werden können. Die Methode ist auch in der Lage mehrere synthetische Cannabimimetika neben einander einwandfrei zu identifizieren.

Mit der oben beschriebenen Methode wurde auch eine Fragestellung im Zusammenhang mit einer Realprobe aus einer Sicherstellung bearbeitet. Bei der sichergestellten Kräutermischung handelte es sich um das Produkt TAI HIGH. Vorausgegangene GC-MS Untersuchungen einer anderen Untersuchungsstelle zeigten einen enthaltenen Wirkstoff, der dieselbe Molekülmasse aber eine unterschiedliche Retentionszeit im Vergleich zu RCS-4 aufwies. Aus diesem Grund wurde dort zunächst eine Struktur für diese Substanz postuliert, die statt einer Methoxy-Gruppe eine Methylenhydroxy-Gruppe in para-Position enthält (siehe Abbildung 30).

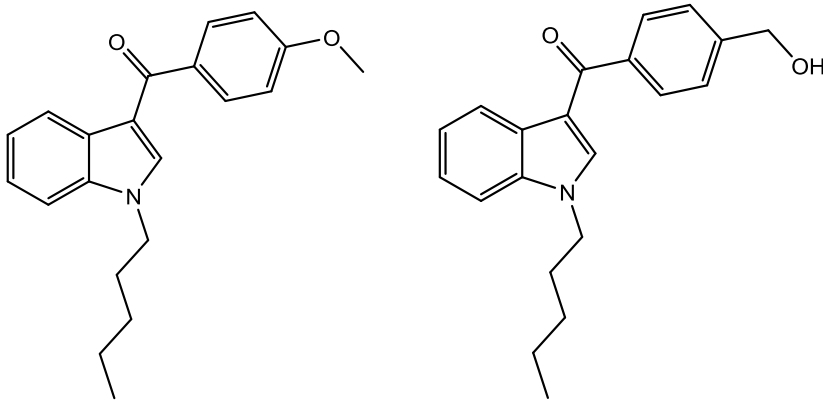


Abbildung 30: Struktur von RCS-4 (links) und der postulierten Substanz mit einer Methylenehydroxy-Gruppe in para-Position (rechts).

Ein Teil dieser Probe und RCS-4 als Referenzsubstanz wurden mittels DESI-MS analysiert. Die erhaltenen Massenspektren sind in Abbildung 31 dargestellt.

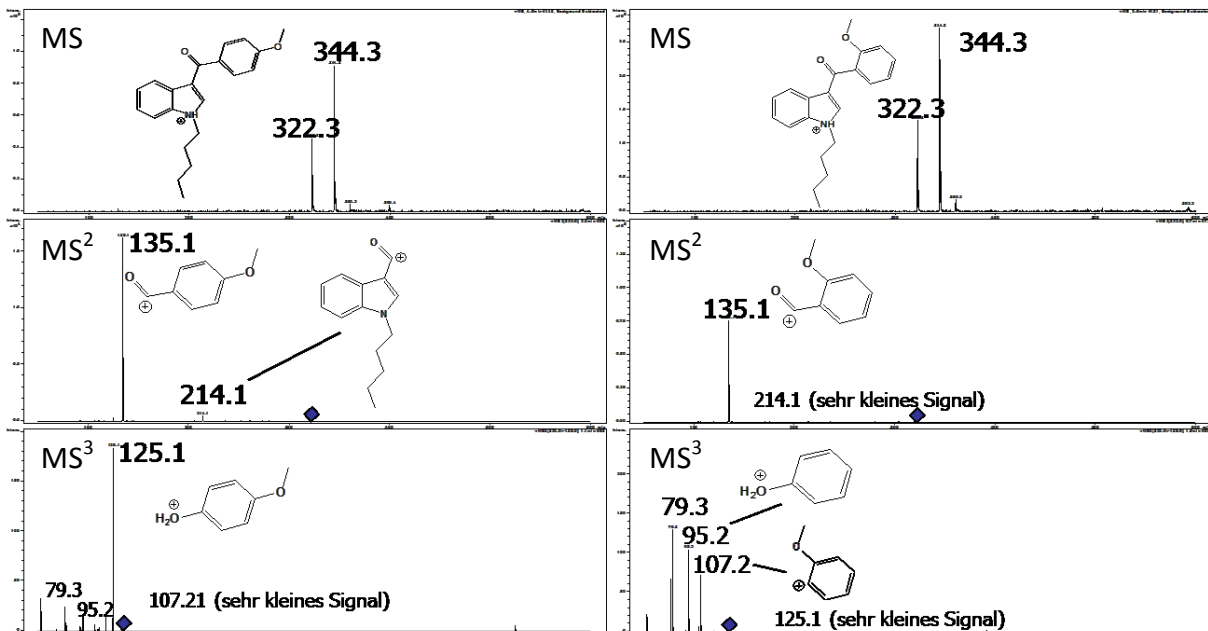


Abbildung 31: DESI-MS Spektren der RCS-4 Reinsubstanz (links) und der unbekannt Substanz in *Tai High* (rechts).

Dabei zeigte es sich, dass im MS<sup>2</sup>-Spektrum der unbekannt Substanz keine Abspaltung von Wasser auftrat, was gegen die postulierte Struktur sprach. Weiterhin ist zu erkennen, dass die MS<sup>2</sup>-Spektren der unbekannt Substanz und von RCS-4 untereinander sehr ähnlich sind. Auch in den MS<sup>3</sup>-Spektren stimmt die Signalverteilung überein, allerdings mit deutlichen Unterschieden in der Intensität der einzelnen Signale. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei der unbekannt Substanz um ein Positionsisomer von RCS-4 handelt. Mittels DESI-MS konnte jedoch nicht zwischen den beiden möglichen Isomeren meta-RCS-4 und ortho-RCS-4 unterschieden werden. Nachfolgende NMR-Messungen bestätigten das

Postulat, dass es sich um ein Positionsisomer handelt, und identifizierten die Substanz als ortho-RCS-4 (siehe Abbildung 32).

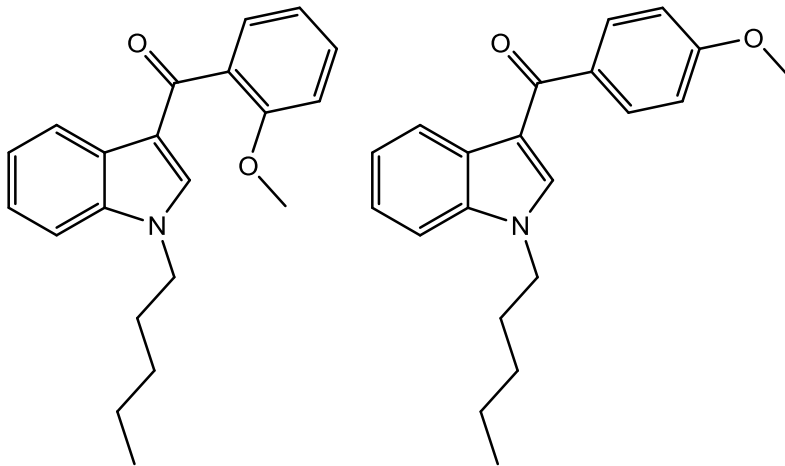


Abbildung 32: Struktur von ortho-RCS-4 (links) und RCS-4 (rechts).

Die Fähigkeit der Ionenfalle  $MS^1$ -Spektren zu erzeugen ist auch wichtig um die Aminoalkylin-dole JWH-007, JWH-019 und JWH-122 voneinander zu unterscheiden. Alle drei Substanzen weisen mit der Summenformel  $C_{25}H_{25}NO$  eine Masse von 355,2 auf und werden somit als  $m/z$ -Wert von 356 als  $[M+H]^+$  detektiert was bedeutet, dass eine Unterscheidung anhand des  $MS$ -Spektrums nicht möglich ist. Die Unterscheidung zwischen JWH-122 und JWH-019 bzw. JWH-007 ist durch das  $MS^2$ -Spektrum möglich, eine Unterscheidung zwischen JWH-019 und JWH-007 aber erst mit dem  $MS^3$ -Spektrum (siehe Tabelle 111). Auch in diesem Fall ermöglicht erst die Kopplung der DESI-Quelle mit einem Ionenfallenmassenspektrometer die Unterscheidung der drei Regioisomere.

Ein weiteres Beispiel für die Leistungsfähigkeit der Kopplung DESI-IT-MS demonstriert die Untersuchung von sichergestellten Papiertrips (siehe Abbildung 33). Diese werden von den Konsumenten in den Mund genommen, wo der vorhandene Wirkstoff herausgelöst und über die Schleimhäute aufgenommen wird. Am häufigsten wird in dieser Applikationsform LSD (Lysergsäurediethylamid) konsumiert. Allerdings können auch andere Substanzen in dieser Form konsumiert werden.

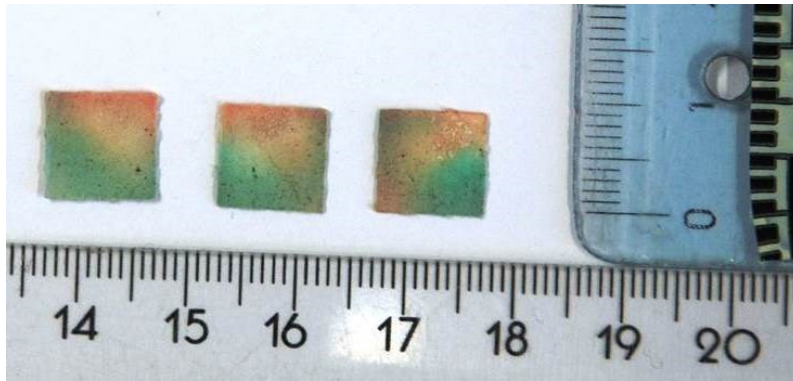


Abbildung 33: Abbildung von sichergestellten Papiertrips.

Eine DESI-MS Messung ergab das in Abbildung 34 dargestellte Massenspektrum mit den dazugehörigen  $MS^n$ -Spektren. Anhand dieser Daten konnte schnell geklärt werden, dass es sich nicht um LSD sondern um TMA (Trimethoxyamfetamin) handelte.

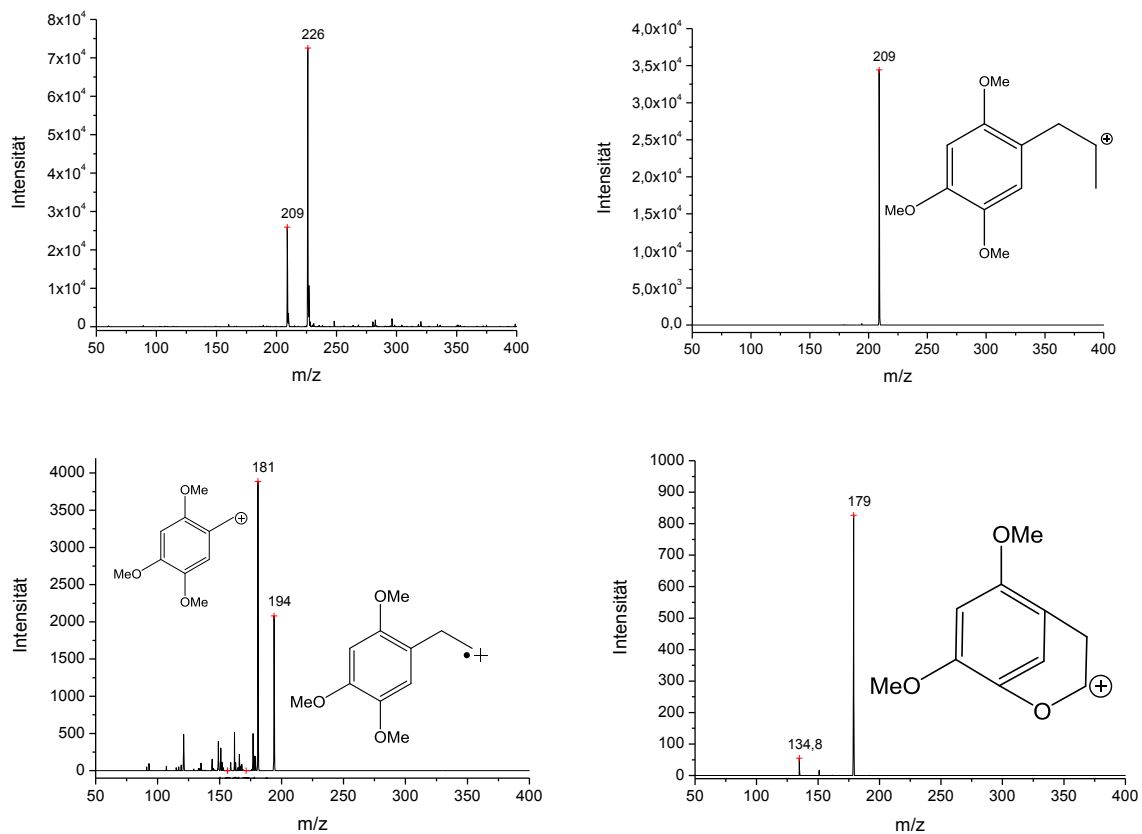


Abbildung 34: Links oben, Fullscan Spektrum einer Untersuchung der Papiertrips mittels DESI-MS. Rechts oben,  $MS^2$ -Spektrum des m/z-Wert 226; Links unten,  $MS^3$ -Spektrum des m/z-Wert 209; Rechts unten  $MS^4$ -Spektrum des m/z-Wert 194.

Von dieser Substanz existieren jedoch sechs unterschiedliche Positionsisomere, wobei drei Isomere (3,4,5-TMA; 2,4,5-TMA; 2,4,6-TMA) in der Rauschgiftszene einschlägig bekannt sind (die Strukturen sind in Abbildung 35 abgebildet).

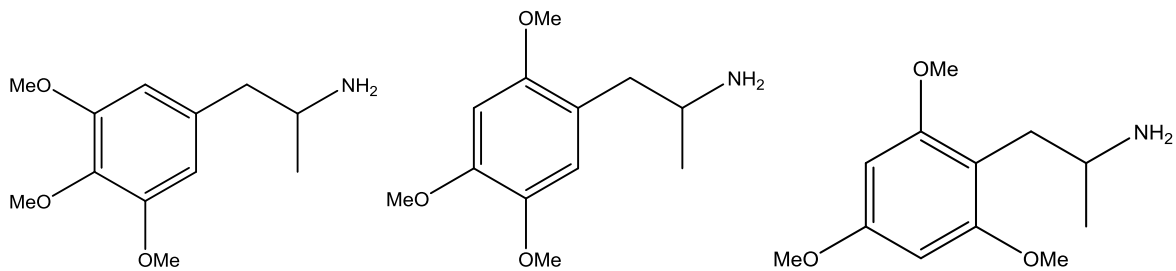


Abbildung 35: Strukturen der Verbindungen 3,4,5-TMA (links), 2,4,5-TMA (Mitte) und 2,4,6-TMA (rechts).

Mit Hilfe von DESI-MS Messungen von Referenzsubstanzen dieser drei Positionsisomere war es möglich die Substanz auf den Papiertrips als 2,4,5-TMA zu identifizieren. Die eindeutige Identifizierung gelang allerdings erst durch den Vergleich der  $MS^4$ -Spektren (siehe Abbildung 36), da die  $MS^-$ ,  $MS^2$ - und  $MS^3$ -Spektren von 2,4,5-TMA und 3,4,5-TMA ununterscheidbar sind. Die Abgrenzung zu 2,4,6-TMA gelang hingegen bereits bei dem Vergleich des  $MS^3$ -Spektrum (siehe Abbildung 36).

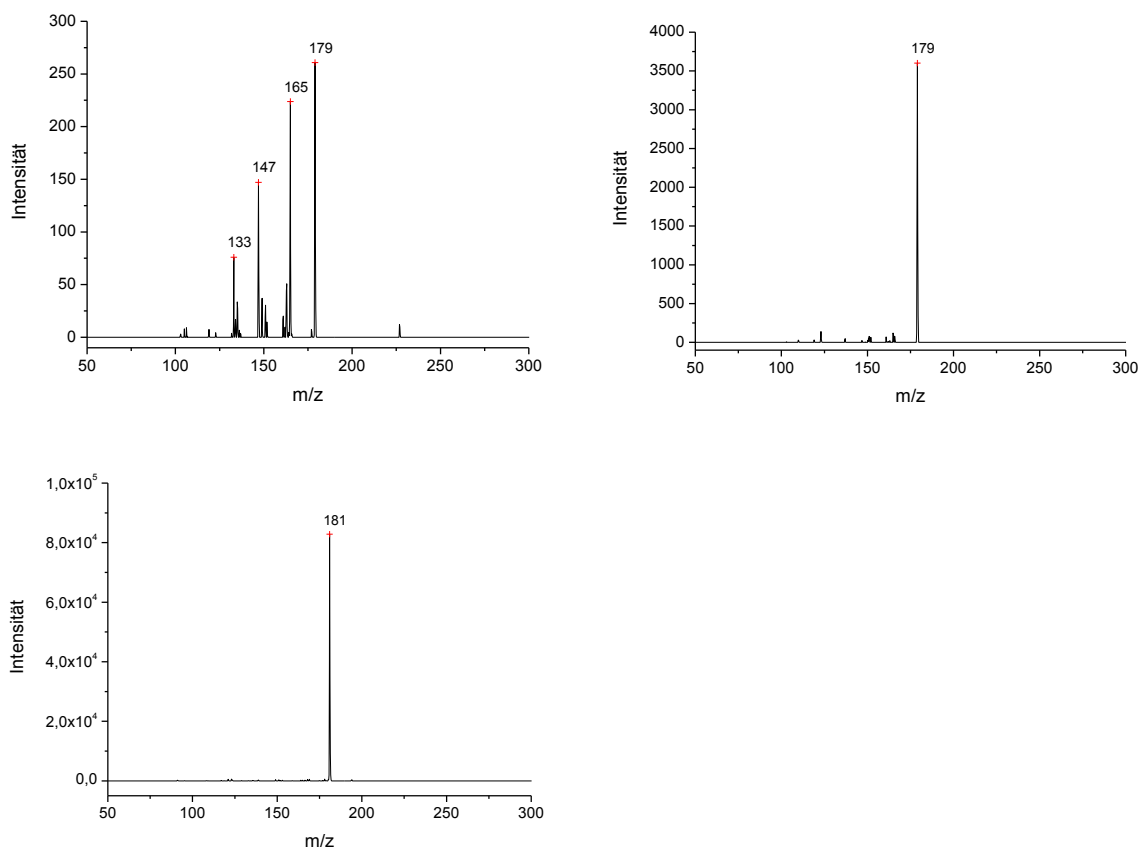


Abbildung 36:  $MS^4$ -Spektren der Substanzen 3,4,5-TMA (oben links) und 2,4,5-TMA (oben rechts).  $MS^3$ -Spektrum der Substanz 2,4,6-TMA (unten links). Alle Spektren wurden mittels DESI-MS aufgenommen.

Mit der oben beschriebenen Methode, zur extraktionsfreien Untersuchung von Kräutermischungen ohne Probenvorbereitung, wurden ebenfalls Testmessungen mit sogenannten Badesalzen und *Herbal Ecstasy* durchgeführt. Diese Proben liegen in Pulverform vor (siehe

Kapitel 3.1.3) und können deswegen ebenfalls nicht ohne Kontaminationsgefahr direkt mittels DESI-MS untersucht werden. Die Messungen zeigten dabei, dass der Nachweis der synthetischen Wirkstoffe ebenfalls möglich ist. Allerdings konnten in manchen Proben nicht alle mittels GC-MS identifizierten Wirkstoffe nachgewiesen werden (die nicht identifizierten Wirkstoffe waren jeweils nur NebenkompONENTEN und konnten aufgrund von Quenching-Prozessen nicht identifiziert werden).

Mit dem in diesem Abschnitt vorgestellten Verfahren können Kräutermischungen und Pulver direkt mittels DESI-MS untersucht werden, obwohl auf den analysierten Teflonfiltern kein sichtbares Probenmaterial verbleibt. Das ist dadurch zu erklären, dass bei dem Pressen der Untersuchungsmaterialien kleinste Partikel in das Gewebe des Teflonfilters eingebaut werden, die mittels mechanischer Krafteinwirkung (Druckluft) nicht entfernt werden können. Aus diesen Partikeln werden jedoch durch das Lösemittel des DESI-Sprays die enthaltenen Wirkstoffe herausgelöst und können somit massenspektrometrisch analysiert werden. Ein ähnlicher Effekt tritt bei der Kontamination von Geldscheinen mit Cocain auf<sup>81</sup>.

Eine weitere Möglichkeit zur direkten massenspektrometrischen Untersuchung von Kräutermischungen ist die DART Technik, die im Jahr 2012 von Shepard et al. für die Identifizierung von synthetischen Cannabimimetika in Kräutermaterial verwendet wurde<sup>82</sup>.

### ***5.1.3.2 DC-DESI-MS Verfahren für synthetische Cannabimimetika***

In der Diplomarbeit des Autors<sup>8</sup> wurde ein Verfahren (Kopplung von Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie mittels DESI) für den Nachweis von synthetischen Cannabimimetika in Kräutermischungen entwickelt. In dieser Arbeit wurden neu in ‚Spice-Produkten‘ auftauchende synthetische Cannabimimetika kontinuierlich in das DC-DESI-MS Verfahren aufgenommen. Durch die Vielzahl der neuen Verbindungen kam es hierbei zu Spot-Überlagerungen bei der Dünnschichtchromatographie (gleiche  $R_f$ -Werte von unterschiedlichen Substanzen). Aus diesem Grund musste geklärt werden in wie weit mittels DESI-MS die Möglichkeit besteht in Co-eluierenden Spots von zwei synthetischen Cannabinoiden beide Substanzen eindeutig zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Mischungen von JWH-122/JWH-210 und JWH-250/JWH-081 hergestellt (siehe Tabelle 46).



Tabelle 46: Mischungsverhältnisse der hergestellten Poolproben.

Mischungsverhältnis JWH-122 : JWH-210	Mischungsverhältnis JWH-250 : JWH-081
1 : 10 (Pool 1)	1 : 10 (Pool 5)
1 : 20 (Pool 2)	1 : 20 (Pool 6)
1 : 50 (Pool 3)	1 : 50 (Pool 7)
1 : 100 (Pool 4)	1 : 100 (Pool 8)

Die hergestellten Poolproben wurden einerseits auf eine Glastüpfelplatte aufgebracht und ohne vorherige Trennung mittels DESI-MS untersucht. Andererseits wurden die Poolproben mit dem DC-Verfahren (siehe Kapitel 4.3.6) getrennt und die Spots der DC-Platte anschließend mittels DESI-MS analysiert.

Für die DESI-MS-Analyse der mittels DC getrennten Poolproben wurde die Trennstrecke auf der DC-Platte manuell abgerastert (siehe Kapitel 4.3.6). Bei diesen Untersuchungen fällt auf, dass die Substanzen JWH-081 und JWH-250 nicht exakt co-eluieren, sondern eine Antrennung vorhanden ist. Diese Antrennung konnte durch eine rein visuelle Auswertung über die Fluoreszenzlöschung nicht erkannt werden (siehe Abbildung 37).

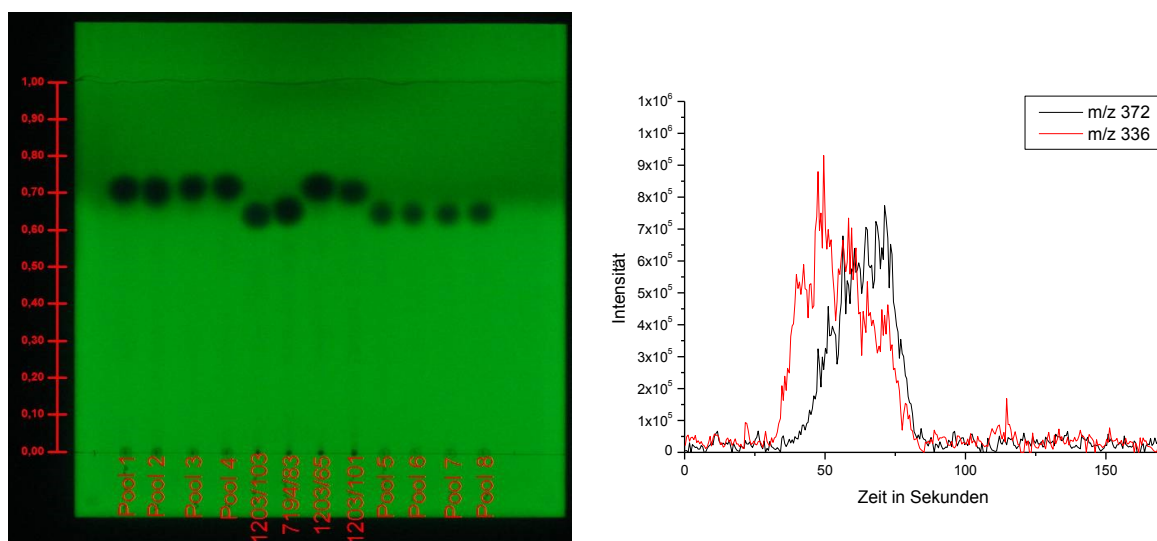


Abbildung 37: links: Entwickelte DC-Platte unter UV-Licht (254 nm); rechts: extracted ion chromatograms (EIC) der m/z 336 und 372, ermittelt bei der Abrasterung der Trennstrecke der Pool-Probe JWH-081/JWH-250 (1:50)

Bei den weiteren Analysen der Poolproben zeigte es sich, dass JWH-122 in der Probe 1:20 neben JWH-210 noch nachgewiesen werden kann (in der Probe 1:50 konnte nur noch JWH-210 nachgewiesen werden). Dabei machte es keinen Unterschied ob die Probe nach einer DC-Trennung oder direkt auf der Glastüpfelplatte analysiert wurde.

Bei den Direktmessungen der JWH-081/JWH-250 Proben konnte in der 1:50 Probe das JWH-250 noch neben dem JWH-081 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39). Mit einer vorgeschalteten DC-Trennung konnte sogar noch in der Probe 1:100 das JWH-250 eindeutig festgestellt werden.

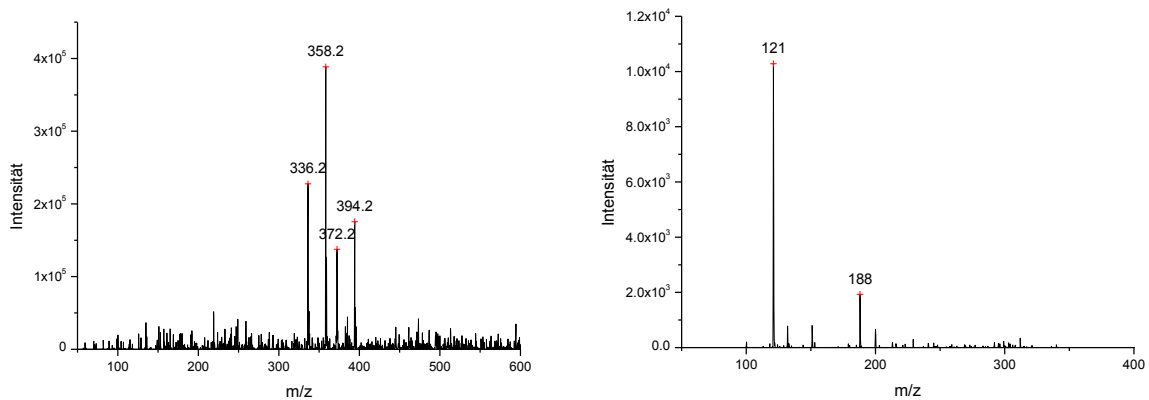


Abbildung 38: Probe Pool 7, DESI-MS Spektrum von JWH-250.

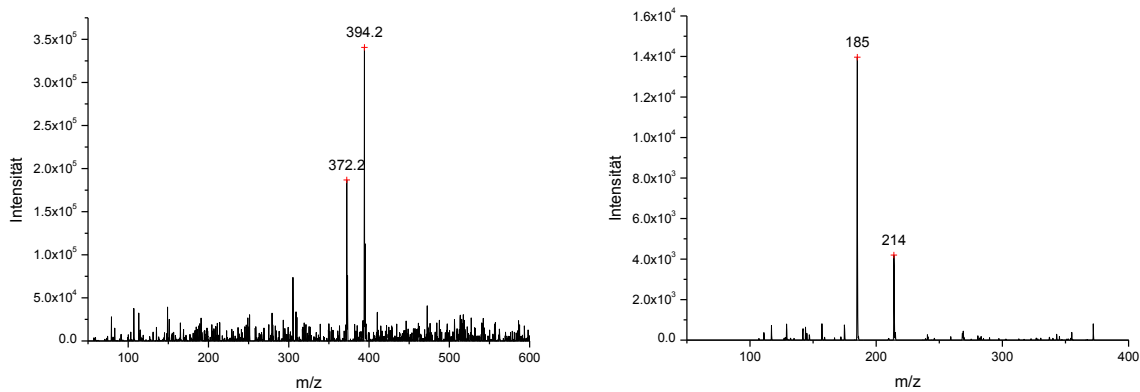


Abbildung 39: Poolprobe 7, DESI-MS Spektrum von JWH-081.

Abschließend ist zu sagen, dass die Identifizierung der Einzelkomponenten in Mischproben mehrerer synthetischer Cannabimimetika auch dann möglich ist, wenn eines der beiden nur in geringen Konzentrationen vorliegt. Somit ist sichergestellt, dass durch DESI-MS Untersuchungen von DC-Platten, auf denen synthetische Cannabinoide nicht mehr getrennt werden konnten, die Identifizierung der nicht getrennten Substanzen möglich ist.

### 5.1.3.2.1 Vergleich von unterschiedlichen DC-Platten

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) ergab sich die Möglichkeit sechs unterschiedliche Typen von DC-Platten, die speziell für die Analyse mittels Massenspektrometer entwickelt wurden, auf ihre Eignung für die Trennung von synthetischen Cannabimimetika und ihre anschließende Untersuchung

mittels DESI-MS zu testen. Für diese Vergleichsstudie wurden folgende DC-Platten der Firma *Merck* verwendet:

1. Standard HPTLC, Si60, F254
2. Standard HPTLC, Si60, F254, 3x mit jeweils frischem Methanol entwickelt
3. HPTLC, Si60, F254, reinst (OB447651)
4. HPTLC, Si60, F254, extra thin (HX077701)
5. HPTLC, Si60, WRF254s, extra thin (OB469309)
6. ProteoChrom HPTLC, Si60, F254s (HX605148)

Dabei wurde neben einer Standard DC-Platte auch eine dreimal mit Methanol gewaschene DC-Platte verwendet, da dies laut Herstellerangaben eine Reduzierung des Hintergrundsignals bei MS-Messungen bewirken soll.

In Abbildung 40 ist der optisch sichtbare Unterschied zwischen der normalen HPTLC Platte und der dreimal mit Methanol gewaschenen HPTLC Platte visualisiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Platte nach dem Waschen mit Methanol sauberer ist und sich am oberen Ende eine Schmutzzone gebildet hat.

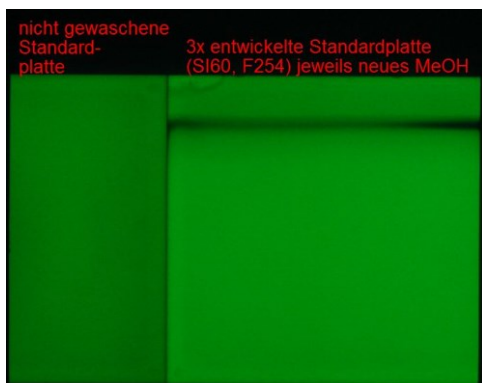


Abbildung 40: Vergleich einer dreimal mit Methanol gewaschenen und einer ungewaschenen Standard HPTLC-Platte.

Für die Vergleichsuntersuchungen wurden jeweils die folgenden 11 Einzelsubstanzen bzw. Mischungen von Aminoalkylindolen auf der DC-Platte aufgetragen: JWH-018, JWH-081, JWH-122, JWH-250, JWH-210, JWH-203, ORG-27569, AM-1220, RCS-4, Pool 2 (JWH-210 zu JWH-122 im Verhältnis 1:20), Pool 5 (JWH-250 zu JWH-081 im Verhältnis 1:10) und im Anschluss mit der unter 4.3.6 beschriebenen Methode entwickelt. In den Abbildungen 41 - 43 sind die unterschiedlichen DC-Platten nach erfolgter Entwicklung dargestellt.

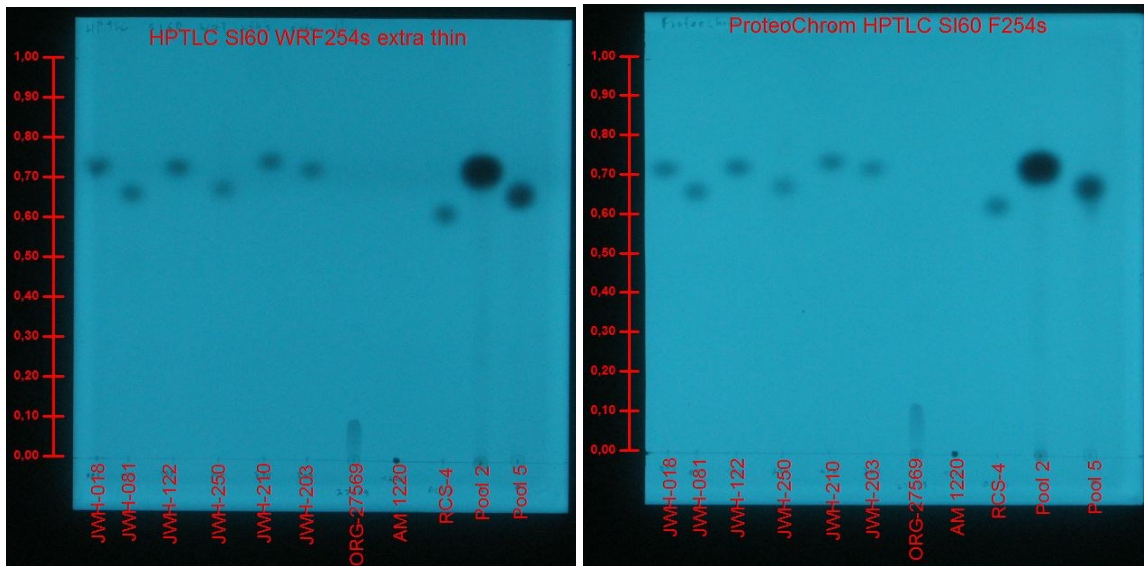


Abbildung 41: Entwickelte HPTLC Si60 WRF254s (links) und ProteoChrom HPTLC Si60 F254s (rechts) unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

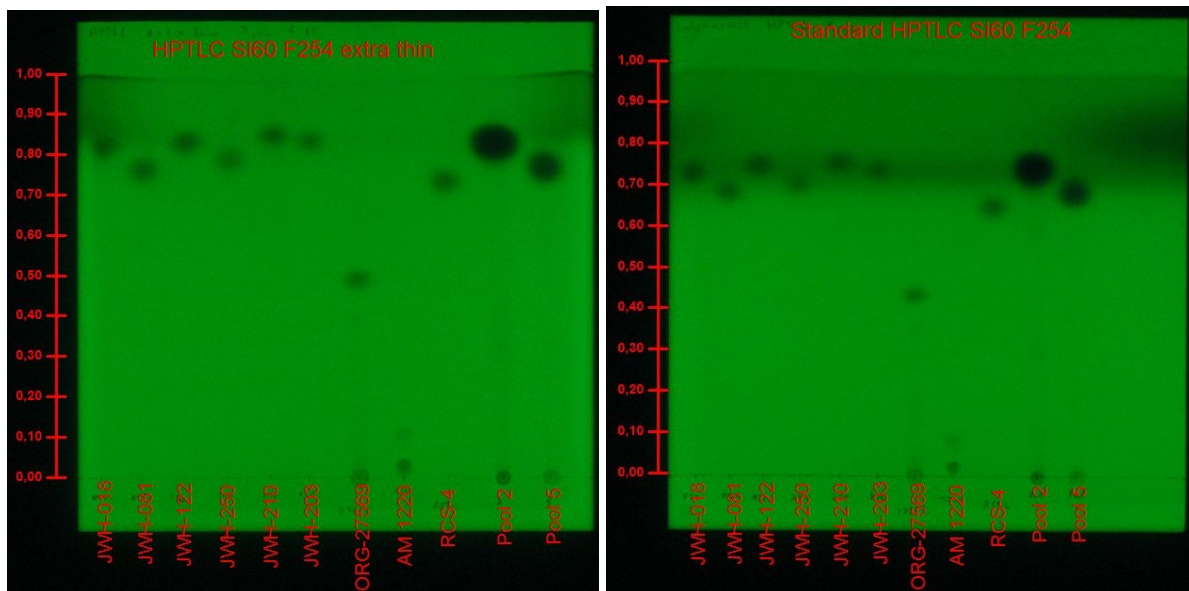


Abbildung 42: Entwickelte HPTLC F254 extra thin (links) und Standard HPTLC Si60 F254 (rechts) unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

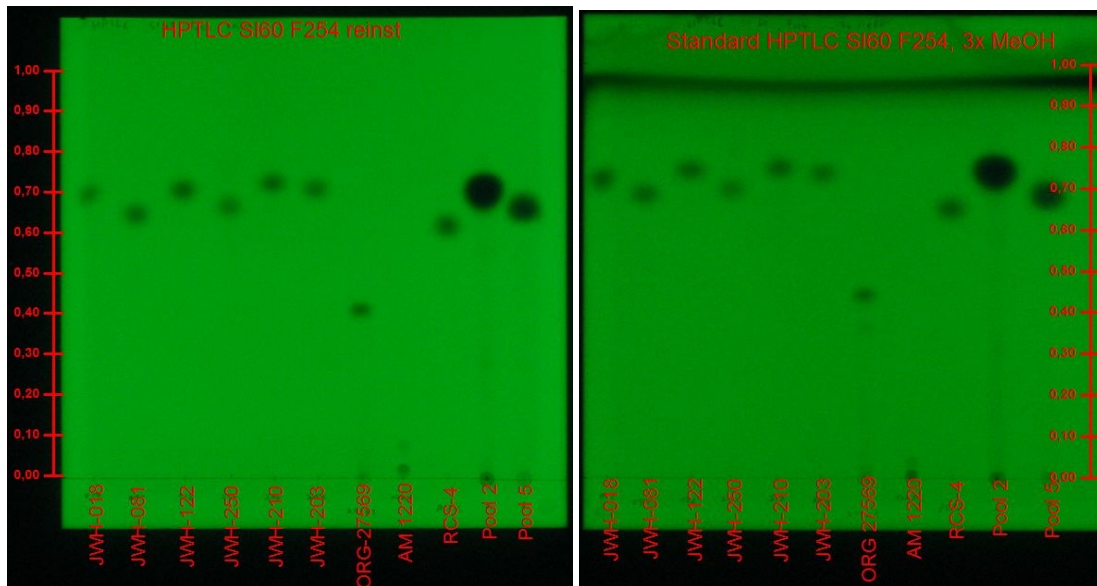


Abbildung 43: Entwickelte HPTLC F254 reinst (links) und dreimal mit Methanol gewaschene Standard HPTLC Si60 F254 (rechts) unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

Unterschiede in der Trennung sind vornehmlich an den Substanzen AM-1220 und ORG-27569 fest zu machen. Auf den beiden DC-Platten, die einen anderen Fluoreszenzmarker (F254s) verwenden, wird das ORG-27569 entweder nicht getrennt oder es ist unter diesen Bedingungen nicht zu erkennen. Das AM-1220 ist auf allen verwendeten DC-Platten nur leicht abgetrennt. Von den sechs DC-Platten liefert die „HPTLC Platte reinst“ für anschließende UV-Untersuchungen das optisch beste Bild bei einer gleichzeitig guten Auftrennung der Substanzen.

Für die Vergleichsuntersuchungen mittels DESI-MS wurden die Substanzen JWH-250, JWH-210 und JWH-081 sowie das Hintergrundsignal der DC-Platten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Fließraten ( $3 \mu\text{L}/\text{min}$  und  $7 \mu\text{L}/\text{min}$ ) verwendet. Die geometrischen Parameter der DESI-Quelle wurden analog zu Kapitel 4.6 gewählt und bei den Untersuchungen der unterschiedlichen DC-Platten nicht verändert. Die bei den Untersuchungen erzielten Intensitäten für den  $[M+H]^+$ -Peak sowie für den  $[M+Na]^+$ -Peak der drei Aminoalkylindole wurden als Vergleichswert verwendet. Für die Ermittlung der summierten Hintergrundintensität wurde der Wert des TIC (total ion chromatogram) herangezogen. Die Ergebnisse für den Vergleich der Hintergrundintensität ist in Abbildung 44 zu sehen.

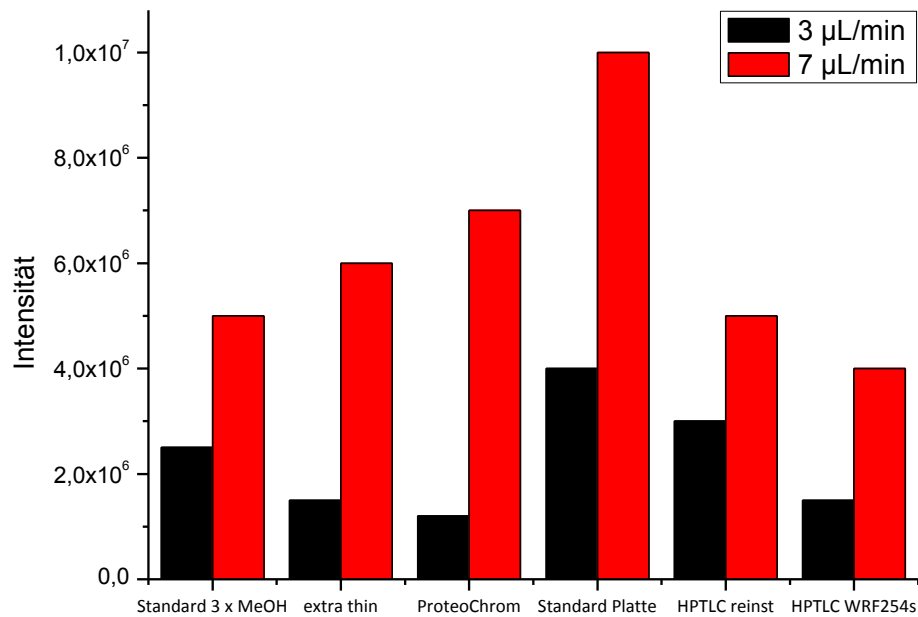


Abbildung 44: Vergleich der summierten Hintergrundintensität des DESI-MS Signals der sechs unterschiedlichen DC-Platten.

Beim Vergleich der Hintergrundsignale (siehe Abbildung 44) ist zu erkennen, dass die Standard DC-Platte den höchsten Hintergrund liefert. Hier ist auch deutlich der Effekt des Waschens zu erkennen, da der Hintergrund auf der gewaschenen DC-Platte niedriger ist und ungefähr dem der „DC-Platte reinst“ entspricht. Der niedrigste Hintergrund wird auf der „HPTLC WRF“ DC-Platte erreicht.

Beim Vergleich der beiden Fließraten ist zu erkennen, dass die Intensitäten bei einer Fließrate von 7 µL/min (siehe Abbildung 46) im Unterschied zu einer Fließrate von 3 µL/min (siehe Abbildung 45) deutlich erhöht sind. Dieser Zusammenhang zwischen Fließrate und Signalintensität auf einer DC-Platte konnte bereits in der Diplomarbeit des Autors<sup>8</sup> gezeigt werden. Das wichtigste Ergebnis ist jedoch, dass die Natriumaddukte auf den DC-Platten mit dem Fluoreszenzmarker F254s „Proteochrom“ und „HPTLC WRF“ kaum gebildet werden und somit die Signalintensität des Wasserstoffaddukts deutlich erhöht ist. Dies ist insbesondere für Fragmentierungsexperimente hilfreich, da die Natriumaddukte nicht fragmentiert werden können und somit eine geringere Anzahl von Ionen für Fragmentierungsexperimente zur Verfügung steht.

Für die DESI-MS Untersuchungen ist insofern die DC-Platte „Proteochrom“ am besten geeignet.

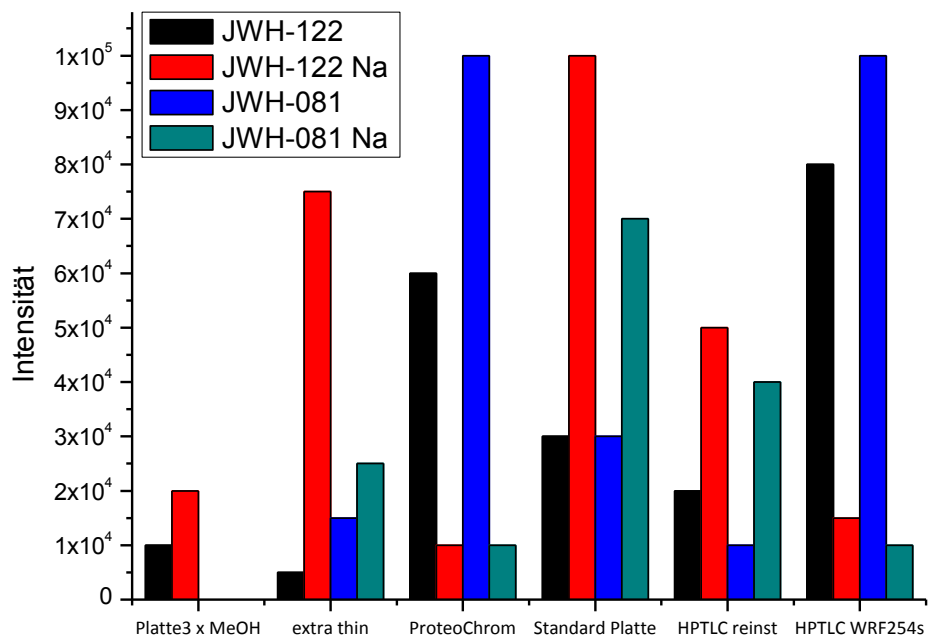


Abbildung 45: Vergleich der Intensitäten des DESI-MS Signal für JWH-122 ( $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ ) und für JWH-081 ( $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ ) bei einer Fließrate von 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

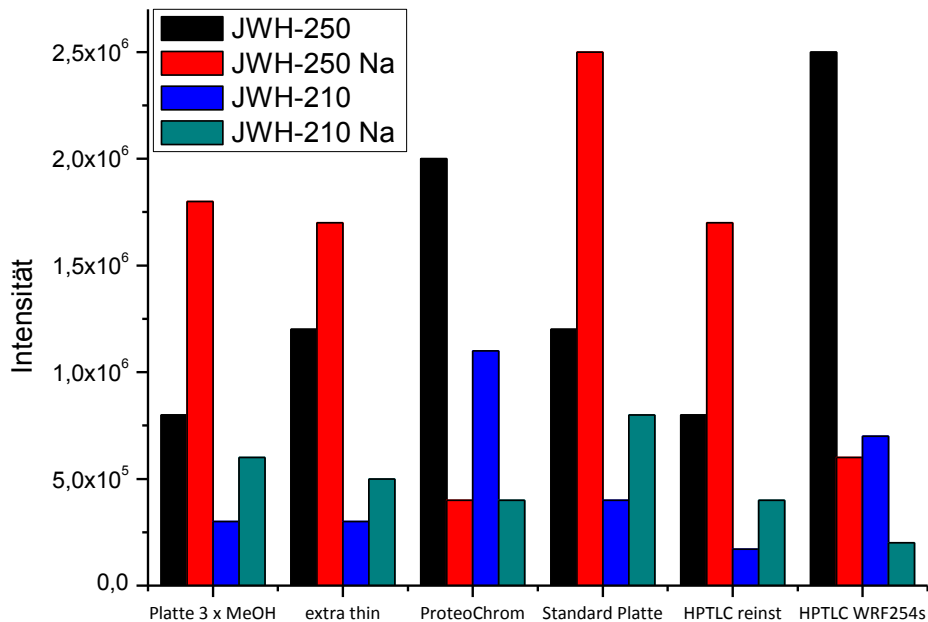


Abbildung 46: Vergleich der Intensitäten des DESI-MS Signal für JWH-250 ( $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ ) und für JWH-210 ( $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ ) bei einer Fließrate von 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Die Vergleichsuntersuchungen haben gezeigt, dass keine der untersuchten Platten sowohl für die DC-Untersuchung als wie auch für die DESI-MS Untersuchungen am besten geeignet

ist. Es ist somit gegeben falls notwendig für besonders gute DC und DESI-MS Ergebnisse unterschiedliche DC-Platten zu verwenden.

### 5.1.4 Diskussion

Im Gegensatz zu den *Klassischen Rauschgiften*, die typischerweise nicht in derart kleine Untereinheiten verpackt werden, liegen Kräutermischungen in bunten, undurchsichtigen Tüten à ein, zwei oder drei Gramm vor. Ein einfacher visueller Vergleich der Materialien ist somit nicht möglich und auch die Probenahme kann nicht ohne weiteres erfolgen. Weiterhin haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass für die Quantifizierung von Kräutermischungen jeweils der gesamte Inhalt von einer Tüte homogenisiert werden muss.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich somit folgende Empfehlung einer Untersuchungsstrategie:

1. Circa 30% der Kräutermischungstüten werden geöffnet und visuell in Augenschein genommen (bei sehr großer Anzahl gleichartiger Produkte reichen auch 10% aus).
2. Neben der visuellen Überprüfung der Materialien muss mit Analyseverfahren das Vorhandensein der synthetischen Cannabimimetika bestätigt werden. Hierfür eignet sich am besten die in dieser Arbeit entwickelte DESI-MS Methode zur direkten Untersuchung von Kräutermischungen. Diese hat den Vorteil gegenüber anderen Schnelldetektionstechniken, wie Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) und Infrarotspektroskopie (FT-IR) nicht nur Hinweise auf die mögliche in den Kräutermischungen vorhandene Substanz zu liefern, sondern diese auch eindeutig zu identifizieren (die eindeutige Identifizierung ist zwar auch über GC-MS beziehungsweise LC-MS möglich, allerdings nur mit einem sehr viel höheren Zeitaufwand).
3. Für eine Quantifizierung sollten weitere ca. 10% der Kräutermischungstüten homogenisiert und im Anschluss mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode quantifiziert werden, um mit dem erhaltenen Mittelwert der Konzentration an synthetischem Cannabimimetikum die Hochrechnung auf die Gesamtanzahl der Kräutermischungstüten durch führen zu können.

Die quantitative Analyse der Realproben verdeutlicht, warum der Konsum von Kräutermischungen mit hohen Risiken behaftet ist. Der Konsument hat keinerlei Informationen über die in der Mischung enthaltenen Stoffe und/oder deren Konzentration. Weiterhin weisen die den Kräutermischungen zugesetzten synthetischen Cannabimimetika alle eine unterschiedliche Affinität gegenüber dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor auf (siehe Kapitel 3.1.4.5), was bedeutet, dass die Wirkstoffkonzentration immer in Verbindung mit der Rezeptoraffinität bewertet werden muss. Da dem Konsument all diese Informationen nicht zur Verfügung stehen, ist die Gefahr einer Überdosierung extrem hoch. Dies ist leider durch zahlreiche Intoxikationen, nach dem Konsum von Kräutermischungen, belegt<sup>83,84,85</sup>. Weiterhin konnte anhand der Analyseergeb-



nisse der Realproben gezeigt werden, dass der Konsument nicht nur der Gefahr der Überdosierung ausgesetzt ist sondern, dass er weiterhin keine Möglichkeit besitzt die strafrechtlichen Konsequenzen einzuschätzen. Einige der analysierten Kräutermischungen mit dem Cannabimimetikum JWH-018 wurden zu einem Zeitpunkt beschlagnahmt, wo dieses bereits als Betäubungsmittel unterstellt war, JWH-210 und JWH-122 jedoch noch nicht. Besitzer/Händler der Kräutermischungen mit JWH-018 begingen somit ein Verstoß gegen das BtMG, wohingegen bei Besitzern/Händlern der Kräutermischungen mit JWH-210 oder JWH-122 keine Straftat nach dem BtMG vorlag.

## 5.2 Dopingsubstanzen

### 5.2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein quantitatives Analysenverfahren für anabole Steroide in öligen Zubereitungen entwickelt werden. Dabei sollte es vor allem ermöglicht werden verschiedene Esterformen von ein und demselben Ausgangsteroid (z.B. Testosteron-Acetat und Testosteron-Propionat) einzeln zu quantifizieren um somit Profiling-Informationen gewinnen zu können (siehe Kapitel 3.2.2). Aus diesem Grund wurde bei der Methodenentwicklung ein besonderes Augenmerk auf die Probenvorbereitung gelegt.

Wie auch bei dem Verfahren zur Quantifizierung von synthetischen Cannabimimetika in Spice-Produkten (siehe Kapitel 5.1.1) sollten als Detektoren sowohl ein PDA als auch ein Massenspektrometer verwendet werden. Aus diesem Grund wurde dasselbe salzfreie Eluentensystem, bestehend aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure, gewählt. Da die Quantifizierung mittels PDA erfolgen sollte, war eine Basislinientrennung aller Analyte anzustreben.

Als Trennsäulen wurden zwei Säulen, Kinetex 2,6 $\mu$  C18 (siehe Tabelle 18) und HSS T3 Waters (siehe Tabelle 17), mit einer C<sub>18</sub>-Phase getestet. Zum Test der Leistungsfähigkeit der beiden Trennsäulen wurde jeweils versucht eine Basislinientrennung eines Gemischs aus 17 anabolen Steroiden bzw. Steroidestern (Boldenon, Danazol, Metandienon, Methyltestosteron, Nortestosteron, Testosteron (T.), T. Acetat, T. Propionat, T. Enanthat, T. Isocaproat, T. Decanoat, T. Undecanoat, T. Cypionat, T. Phenylpropionat, Trenbolon, Trenbolon Acetat, Trenbolon Enanthat), im weiteren Verlauf als „DopMix“ bezeichnet, zu erreichen. Da sich die zu untersuchenden Substanzen teilweise deutlich in ihrer Polarität unterscheiden, konnte für die Trennung kein isokratisches Verfahren verwendet werden, weswegen die unterschiedlichen Säulen mit einem mehrstufigen Gradienten getestet wurden. Zusätzlich wurden die Säulentemperatur in einem Bereich von 25 bis 40 °C und der Fluss in einem Bereich von 0,2 – 0,6 mL/min variiert.

Die Versuche zeigten, dass das unter 4.4.2.1.2 beschriebene Verfahren unter Verwendung der Kinetex Säule mit C18 Material (2,6  $\mu$ m Partikeldurchmesser) am besten für die Trennung der anabolen Steroide geeignet ist. Ein Chromatogramm der Trennung des DopMix ist in Abbildung 47 dargestellt und die Retentionszeiten mit zugehöriger Detektionswellenlänge sind in Tabelle 47 aufgeführt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

Tabelle 47: Retentionszeit und Detektionswellenlänge der 17 Steroide des DopMix.

Steroid	Retentionszeit in min	Detektionswellenlänge
Trenbolon	2,035	340 nm
Nortestosteron	2,541	245 nm
Metandienon	2,877	245 nm
Boldenon	3,072	245 nm
Testosteron	3,273	245 nm
Methyltestosteron	4,192	245 nm
Trenbolon acetat	4,949	340 nm
Danazol	5,033	280 nm
Testosteron acetat	4,409	245 nm
Testosteron propionat	5,870	245 nm
Testosteron phenylpropionat	6,597	245 nm
Trenbolon enanthat	7,071	340 nm
Testosteron isocaproat	7,227	245 nm
Testosteron enanthat	7,981	245 nm
Testosteron cypionat	8,263	245 nm
Testosteron decanoat	11,292	245 nm
Testosteron undecanoat	13,140	245 nm

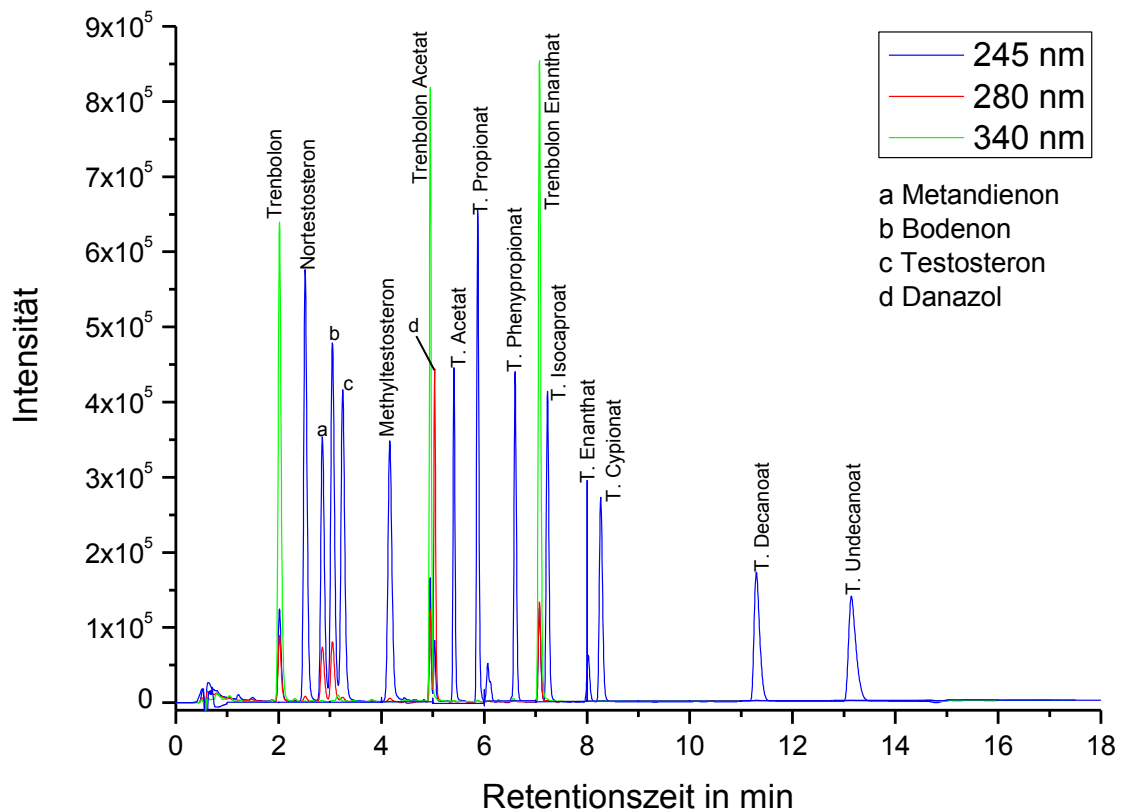


Abbildung 47: Chromatogramm einer UHPLC-DAD Messung des DopMix.

Das entwickelte Verfahren sollte im Anschluss validiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Wiederholpräzision an einem Tag an Hand von acht aufeinander folgender Messungen ermittelt. Die erzielten relativen Standardabweichungen ( $\sigma_{rel}$ ) für die Retentionszeit und die Signalfläche sind in Tabelle 48 aufgeführt.

Tabelle 48: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision von acht aufeinander folgender Messungen des DopMix.

Steroid	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
Trenbolon	1,10	0,23
Nortestosteron	1,10	0,57
Metandienon	1,06	0,61
Boldenon	0,97	0,82
Testosteron	0,96	0,75
Methyltestosteron	0,83	0,84
Trenbolon acetat	0,12	0,12
Danazol	0,11	0,29
Testosteron acetat	0,10	0,36
Testosteron propionat	0,10	0,19
Testosteron phenylpropionat	0,10	0,18
Trenbolon enanthat	0,10	0,35
Testosteron isocaproat	0,10	0,14
Testosteron enanthat	0,10	0,30
Testosteron cypionat	0,08	0,14
Testosteron decanoat	0,05	0,09
Testosteron undecanoat	0,05	0,18

Als weitere wichtige Validierungsgröße wurde die Wiederholpräzision von Messungen an verschiedenen Tagen ermittelt. Dazu wurden elf Analysen des DopMix an sieben unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Bei Mehrfachmessungen an einem Tag wurde eine Messung morgens und eine Messung nachmittags durchgeführt. Die erhaltenen relativen Standardabweichungen für die Retentionszeit und die Signalfläche sind in Tabelle 49 aufgeführt.

Tabelle 49: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision von elf Messungen des DopMix an sieben unterschiedlichen Tagen.

Steroid	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
Trenbolon	1,38	5,67
Nortestosteron	1,44	5,65
Metandienon	1,48	5,64
Boldenon	1,40	5,39
Testosteron	1,43	5,66
Methyltestosteron	1,24	10,07

Steroid	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{\text{rel}}$ in %	$\sigma_{\text{rel}}$ in %
Trenbolon acetate	0,36	5,54
Danazol	0,36	5,34
Testosteron acetat	0,33	5,56
Testosteron propionat	0,27	5,22
Testosteron phenylpropionat	0,24	4,70
Trenbolon enanthat	0,24	4,25
Testosteron isocaproat	0,25	4,59
Testosteron enanthat	0,24	4,20
Testosteron cypionat	0,27	5,46
Testosteron decanoat	0,36	7,77
Testosteron undecanoat	0,41	9,45

Nicht für alle der 17 anabolen Steroide, für die Wiederholpräzisionen ermittelt wurden, wurde im Rahmen der Validierung eine Kalibration durchgeführt. Von den 17 Substanzen wurden nur die sechs Substanzen ausgewählt, für die eine ausreichende Menge an Reinsubstanz vorlag. Diese Substanzen sind ebenfalls die, die am häufigsten in öligen Zubereitungen auftreten.

Für die Kalibrierung wurden jeweils zwischen zehn und vierzehn Lösungen der jeweiligen Substanz hergestellt. Für die Herstellung der einzelnen Lösungen wurde eine bestimmte Menge der Substanz in einem Aluminiumschälchen eingewogen und in einem Messkolben (mindestens 5 mL) mit Methanol gelöst. Die erhaltenen Messdaten wurden mit dem Programm SQS2000 ausgewertet (siehe Kapitel 4.5). Für die Überprüfung des Arbeitsbereichs wurden Mehrfachbestimmungen von zwei Kontrollproben, eine im unteren und eine im oberen Arbeitsbereich, durchgeführt. In Abbildung 48 ist exemplarisch eine Darstellung der bei der Kalibrierung von Testosteron Decanoat erhaltenen Residuen dargestellt. Die ausführlichen Ergebnisse der Kalibrierung sind im Anhang in den Tabellen 92 – 97 aufgeführt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

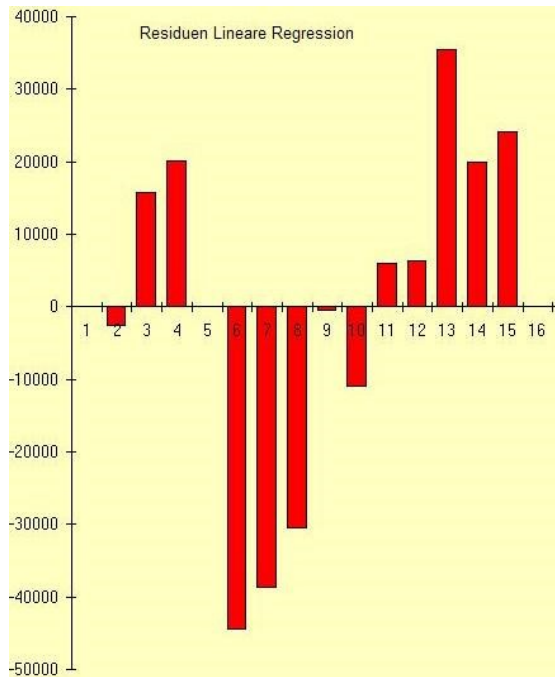


Abbildung 48: Darstellung der Residuenverteilung der Kalibration von Testosteron-Decanoat.

Für alle Kalibrierungen ist die Korrelation der Kalibriergeraden  $\geq 0,999$ . Die Nachweisgrenzen bei einem Vertrauensbereich von 95% und der Arbeitsbereich sind in Tabelle 50 aufgelistet.

Tabelle 50: Auflistung der Nachweisgrenzen und des Arbeitsbereichs für die in der Kalibrierung, eingeschlossenen anabolen Steroide.

Substanz	Nachweisgrenze in $\mu\text{g/mL}$	Arbeitsbereich in $\mu\text{g/mL}$
T. Acetat	5,00	60-400
T. Propionat	11,57	60-400
T. Enanthat	4,25	60-400
T. Decanoat	2,76	60-400
T. Undecanoat	4,88	80-800
T. Cypionat	4,67	60-400

Zum Testen, ob die entwickelte Methode robust ist, wurde die Zusammensetzung der Eluenten leicht verändert und der Einfluss auf die Retentionszeit analysiert. Für diese Untersuchung wurden die in Tabelle 51 angegebenen Lösemittelzusammensetzungen verwendet.

Tabelle 51: Eluentzusammensetzung der vier Experimente zur Ermittlung der Robustheit der Methode zur Quantifizierung anaboler Steroide.

Experiment	wässriger Eluent	organischer Eluent
1	94,9% H <sub>2</sub> O, 5% ACN, 0,1% HFA	4,9% H <sub>2</sub> O, 95% ACN, 0,1% HFA
2	93,9% H <sub>2</sub> O, 6% ACN, 0,1% HFA	4,9% H <sub>2</sub> O, 95% ACN, 0,1% HFA
3	93,9% H <sub>2</sub> O, 6% ACN, 0,1% HFA	5,9% H <sub>2</sub> O, 94% ACN, 0,1% HFA
4	94,9% H <sub>2</sub> O, 5% ACN, 0,1% HFA	5,9% H <sub>2</sub> O, 94% ACN, 0,1% HFA

Mit den angegebenen Eluentzusammensetzungen wurde jeweils dreimal ein Gemisch aus 16 anabolen Steroiden analysiert und ausgewertet. In Tabelle 52 sind die Mittelwerte der Retentionszeiten sowie die Abweichungen zu den unter Normalbedingungen ermittelten Retentionszeiten aufgelistet.

Tabelle 52: Auflistung der bei den Experimenten zur Robustheit erhaltenen mittleren Retentionszeiten  $\bar{x}$  der einzelnen anabolen Steroide sowie deren Abweichung  $\Delta$  zu den Retentionszeiten unter Normalbedingungen.

Steroid	Experiment							
	1		2		3		4	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\Delta$ in %	$\bar{x}$	$\Delta$ in %	$\bar{x}$	$\Delta$ in %	
Nortestosteron	2,55	2,42	-5,02	2,51	-1,36	2,58	1,46	
Metandienon	2,89	2,73	-5,42	2,84	-1,48	2,93	1,56	
Boldion	3,08	2,91	-5,33	3,03	-1,45	3,12	1,46	
Testosteron	3,28	3,10	-5,61	3,23	-1,54	3,33	1,49	
Methyltestosteron	4,21	3,97	-5,77	4,14	-1,65	4,26	1,27	
T.Acetat	5,40	5,37	-0,63	5,41	0,17	5,42	0,36	
T.Propionat	5,86	5,83	-0,50	5,89	0,42	5,89	0,58	
T.Phenylpropionat	6,58	6,56	-0,36	6,64	0,95	6,65	1,11	
T.Isocaproat	7,20	7,18	-0,35	7,30	1,30	7,31	1,47	
T.Cypionat	8,23	8,20	-0,31	8,39	2,06	8,41	2,25	
T.Decanoat	11,18	11,16	-0,23	11,69	4,58	11,72	4,79	
T.Undecanoat	12,97	12,95	-0,21	13,74	5,90	13,77	6,12	
Danazol	5,02	4,99	-0,70	5,03	0,02	5,04	0,22	
Trenbolon	2,04	1,95	-4,51	2,02	-1,23	2,07	1,32	
Tren.Acetat	4,94	4,90	-0,79	4,94	-0,06	4,95	0,19	
Tren.Enantat	7,05	7,03	-0,36	7,14	1,20	7,15	1,37	

Im Anhang in den Tabellen 106 - 109 sind die jeweiligen Retentionszeiten der einzelnen Experimente aufgeführt. Dort ist auch gekennzeichnet, welche Signale gar nicht oder falsch zu geordnet wurden. Signale die gar nicht zugeordnet werden führen zu falsch negativen Ergebnissen. Signale die falsch zugeordnet werden führen zu falschen Ergebnissen.

Eine Analyse der Messdaten zeigt, dass die Abweichungen in der Retentionszeit und damit einhergehend die falsche bzw. gar nicht mehr Zuordnung der Signale, am höchsten bei Variation des organischen Eluenten ist. Bei diesen Bedingungen wurden bei jeder der drei Messungen bis zu drei Signale falsch zugeordnet.

Die Experimente zur Ermittlung der Robustheit zeigen, dass das Verfahren empfindlich auf die Variation der Eluentzusammensetzung reagiert, weswegen ein besonderes Augenmerk auf die Sorgfalt bei der Herstellung gelegt werden muss.

### 5.2.1.1 Probenvorbereitung

Für die Extraktion der Steroid-Ester aus der Ölmatrix wird ein interner Standard benötigt, um die genaue Extraktionseffizienz bestimmen zu können. Dafür wurden Gallensäure und

7-Dehydrocholesterol, als in ihrer Struktur ähnlich zu Testosteronestern (siehe Abbildung 49), auf ihre Eignung als interner Standard hin untersucht.

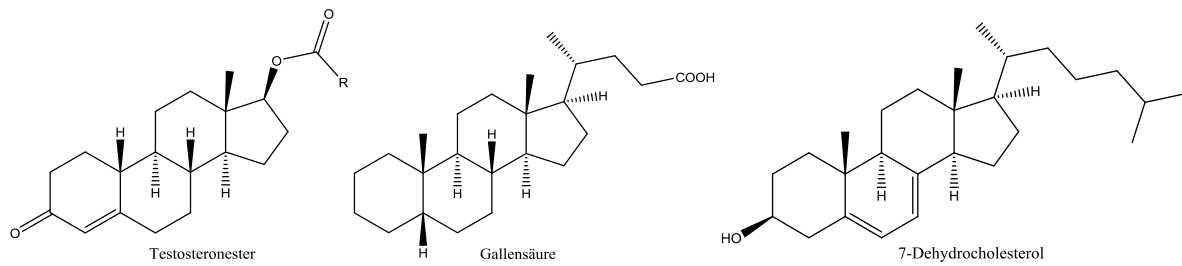


Abbildung 49: links: Struktur von Testosteronestern; mitte: Struktur von Gallensäure; rechts: Struktur von 7-Dehydrocholesterol.

Bei der Analyse von Gallensäure zeigte es sich, dass diese mit dem entwickelten Verfahren kein Signal im Messbereich liefert. Auch 7-Dehydrocholesterol konnte nicht als interner Standard verwendet werden, da das Messsignal ein starkes Tailing aufwies und mit einer Retentionszeit von 16 Minuten im hinteren Messbereich lag. Aus diesem Grund wurde beschlossen als internen Standard eines der 17 untersuchten anabolen Steroide zu wählen, welches jeweils nicht in der zu untersuchenden Probe vorkommt.

Für die Zugabe des internen Standards zu der Ölprobe wird dieser in Benzylalkohol gelöst und mittels einer 10  $\mu\text{L}$  Glasspritze zu dosiert, da eine Dosierung mittels Eppendorf-Pipette nicht exakt genug ist. Aus diesem Grund ist es auch notwendig den Benzylalkoholgehalt für den internen Standard gravimetrisch zu bestimmen.

Für die Abtrennung der anabolen Steroide aus der Ölmatrix wurde eine flüssig/flüssig Extraktion auf ihre Eignung getestet.

Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von unterschiedlichen Extraktionsmitteln auf die Extraktion untersucht. Als Extraktionsmittel wurden Acetonitril, Methanol, Acetonitril/Wasser (v/v 9:1) und Methanol/Wasser (v/v 9:1) verwendet. Für die Durchführung wurden 30  $\mu\text{L}$  Sustanon 250 mit jeweils 750  $\mu\text{L}$  des Extraktionsmittels versetzt. Für die Durchmischung wurden die Proben fünf Minuten geschüttelt und fünf Minuten über Kopf gedreht. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 5000 U/min). Zur Unterscheidung der Extraktionseffizienz wurden die Peakflächen der vier, in der Probe vorkommender, Steroide verwendet (siehe Tabelle 53). Wie anhand der Daten zu erkennen ist, ist das Lösemittelgemisch Acetonitril/Wasser (v/v 9:1) am besten für die Extraktion geeignet.



Tabelle 53: Fläche der in Sustanon 250 enthaltenen Steroide in Abhängigkeit des Extraktionsmittels.

Steroid	ACN	MeOH	ACN/H <sub>2</sub> O (9:1)	MeOH/H <sub>2</sub> O (9:1)
T. Propionat	4,88*10 <sup>4</sup>	4,85*10 <sup>4</sup>	5,50*10 <sup>4</sup>	4,81*10 <sup>4</sup>
T. Phenylpropionat	7,57*10 <sup>4</sup>	7,49*10 <sup>4</sup>	8,39*10 <sup>4</sup>	7,13*10 <sup>4</sup>
T. Isocaproat	8,05*10 <sup>4</sup>	7,92*10 <sup>4</sup>	9,10*10 <sup>4</sup>	7,76*10 <sup>4</sup>
T. Decanoat	1,23*10 <sup>5</sup>	1,11*10 <sup>5</sup>	1,43*10 <sup>5</sup>	1,02*10 <sup>5</sup>

Zur weiteren Einschätzung sollten die vier Testosteronester in der jeweiligen extrahierten Ölphase analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden GC-MS Messungen der extrahierten Ölphasen, von Sesamöl und von nicht extrahiertem Sustanon 250 (siehe Tabelle 15) durchgeführt. Die Vorgehensweise sowie die Messbedingungen sind unter 4.4.4 beschrieben.

In Abbildung 50 ist ein Chromatogramm einer GC-MS Messung von Sustanon 250 und von der Ölphase, die mit dem Gemisch aus Acetonitril/Wasser (v/v 9:1) extrahiert wurde, dargestellt.

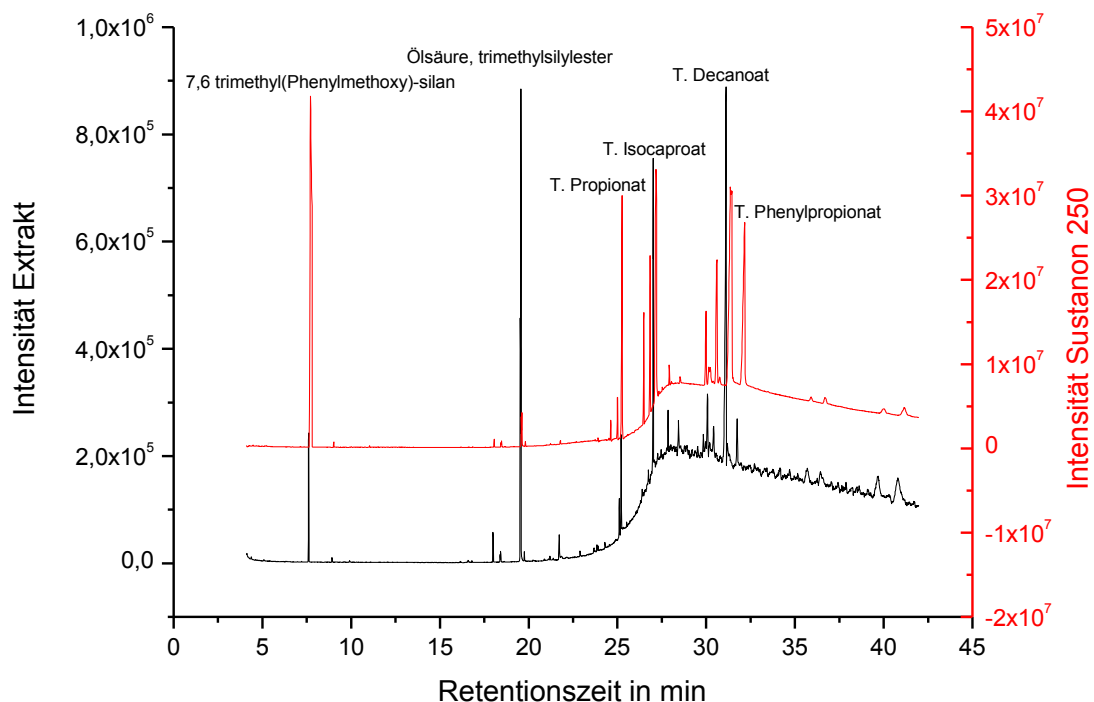


Abbildung 50: Chromatogramm der GC-MS Analyse der Probe Sustanon 250 (rot) und der mit Acetonitril/Wasser (v/v 9:1) extrahierten Sustanon 250 Probe (schwarz).

Es zeigt sich dabei deutlich, dass die Wirkstoffe des Sustanon 250 (Testosteron-Propionat, Testosteron-Phenylpropionat, Testosteron-Isocaproat, Testosteron-Decanoat) extrahiert wer-

den konnten. Allerdings konnte eine Mitextraktion des Benzylalkohols nicht vermieden werden. In Tabelle 54 sind die Verhältnisse der Flächen der jeweiligen Testosteronester der extrahierten Sustanon 250 Proben zu der nicht extrahierten Probe dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Extraktion mit nahezu 100% erfolgt.

Tabelle 54: Verhältnis der Flächen der untersuchten Testosteronester der extrahierten zu der nicht extrahierten Sustanon 250 Probe.

Substanz	ACN	MeOH	ACN/H <sub>2</sub> O (9:1)	MeOH/H <sub>2</sub> O (9:1)
silylierter Benzylalkohol	0,3%	2,6%	0,1%	0,2%
T.Propionat	0,8%	3,7%	0,3%	0,4%
T.-Phenylpropionat	2,0%	8,9%	1,5%	1,4%
T.-Isocaprat	4,4%	7,9%	1,1%	4,1%
T.-Decanoat	1,2%	3,1%	0,2%	1,4%

Nach den durchgeführten GC-MS-Messungen konnten keine MS-Daten mehr aufgezeichnet werden, eine Fehleranalyse ergab eine starke Kontamination der EI-Quelle. Nach einer Säuberung wurde deswegen davon abgesehen weitere ölige Zubereitungen mit dem GC-MS-Verfahren zu untersuchen. Stattdessen sollte untersucht werden, ob ein GC-FID Verfahren in der Lage ist verschiedene Öle voneinander zu unterscheiden (siehe Kapitel 5.2.2).

Um zu testen, ob die flüssig/flüssig Extraktion mittels Acetonitril/Wasser (v/v 9:1) reproduzierbar ist, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt (in Klammern ist die Probenbezeichnung angegeben):

- 5 Extraktionen von jeweils 20 µL Sustanon 250 mit 500 µL Lösemittelgemisch (**Öl**)
- 5 Extraktionen von jeweils 20 µL Sustanon 250, denen Testosteron-Propionat zugesetzt wurde, mit 500 µL Lösemittelgemisch (**Öl + X**)
- 5 Extraktionen von 20 µL Sesamöl, denen Testosteron-Propionat zugesetzt wurden, mit 500 µL Lösemittelgemisch (**Sesam**)

Die ermittelten relativen Standardabweichungen der Wiederholpräzisionen für die jeweiligen Signalfächen für Testosteron-Propionat, Decanoat und Enanthat sind in Tabelle 55 aufgelistet.

Tabelle 55: relative Standardabweichung der Wiederholpräzisionen für die Signalfächen von Testosteron-Propionat, Enanthat und Decanoat bei durchgeführter flüssig/flüssig Extraktion.

	T. Propionat	T. Enanthat	T. Decanoat
Sesam	4,00 %	-	-
Öl	4,08%	3,60%	3,64%
Öl + X	2,71%	1,19%	1,11%

Anhand der Daten ist zu erkennen, dass bei der flüssig/flüssig Extraktion wiederholbare Ergebnisse erzielt werden können.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen zu den unterschiedlichen Extraktionsmitteln zeigen, dass mit dem Lösemittelgemisch Acetonitril/Wasser (v/v 9:1) die beste und eine wiederholbare Extraktion erzielt werden kann. Weitere Experimente zeigten, dass das Verhältnis von Probe zu Extraktionsmittel 1:25 betragen sollte.

Zur weiteren Untersuchung der Eignung der flüssig/flüssig Extraktion sollten die Wiederfindungsraten verschiedener Testosteron-Ester in unterschiedlichen Speiseölen (Erdnuss-, Oliven-, Raps-, Lein-, ALBA- und Sesamöl) bestimmt werden. Die genaue Durchführung der Probenvorbereitung ist unter 4.4.2.1.1 beschrieben.

Tabelle 56: Wiederfindungsrate der Testosteronester nach flüssig/flüssig Extraktion aus unterschiedlichen Speiseölen.

Steroid	Sesam-Öl	Raps-Öl	Erdnuss-Öl	Lein-Öl	Oliven-Öl	ALBA-Öl	Leer
T. Cypionat	80,7%	80,7%	80,5%	-	-	-	99,3%
T. Undecanoat	-	-	-	59,5%	63,1%	60,7%	100,6%
T. Enanthat	-	72,6%	71,1%	68,1%	-	-	96%
T. Decanoat	-	-	-	61,0%	69,5%	66,7%	99,1%
T. Acetat	-	-	-	95,0%	95,4%	95,2%	97,7%
T. Propionat	-	-	-	94,5%	96,0%	94,8%	100,3%

Die Daten aus Tabelle 56 zeigen, dass unterschiedliche Speiseöle keinen Einfluss auf die Extraktionseffizienz besitzen. Beim Vergleich der Extraktionseffizienzen der unterschiedlichen Testosteronester fällt jedoch auf, dass diese mit zunehmender Länge der Alkylkette des Esters abnimmt (siehe auch Abbildung 51).

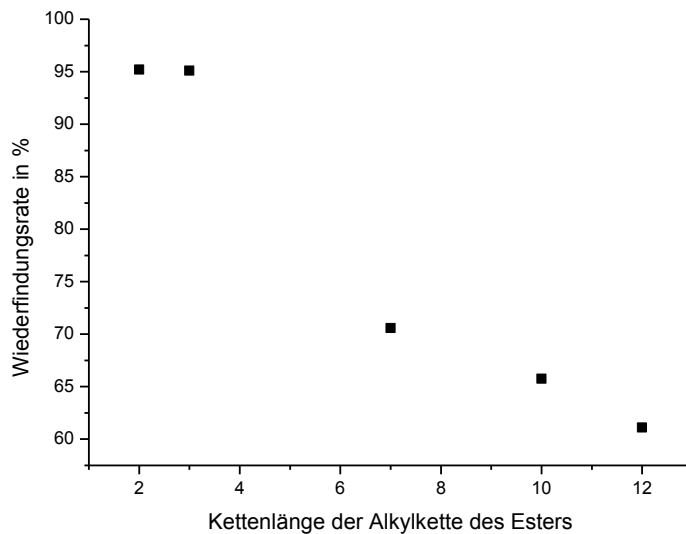


Abbildung 51: Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von der Länge der Alkylkette des Esters

Bedingt durch die Abhängigkeit der Extraktionseffizienz von der Kettenlänge des Esters wurde die flüssig/flüssig Extraktion nicht weiter entwickelt, da es nicht möglich ist eine einheitliche Verfahrensvorschrift für alle Steroid-Ester zu entwickeln.

Da die flüssig/flüssig Extraktion nicht für die Isolierung der Steroid-Ester aus einer Ölmatrix geeignet ist wurde eine Extraktion mittels Festphase (*solid phase extraction*, SPE) getestet.

Zuerst sollte getestet werden, ob es möglich ist die ölige Zubereitung vollständig zu lösen und die Testosteronester dann selektiv auf einer SPE-Phase zurück zu halten. Zu diesem Zweck wurden zu circa 200 mg Erdnussöl 10 µL Testosteron-Decanoat (gelöst in Benzylalkohol) gegeben und 5 min geschüttelt. Anschließend wurde die ölige Zubereitung in 1 mL n-Hexan gelöst und auf eine Adsorbex RP-18 (400 mg) SPE-Phase der Firma Merck gegeben. Das Reagenzglas, in dem die ölige Zubereitung bereitet wurde, wurde mit 1 mL n-Hexan ausgespült und die Lösung ebenfalls auf die SPE-Phase gegeben. Die Lösung wurde mittels Vakuum durch die SPE-Phase gespült. Im Anschluss wurde die SPE-Phase mit 2 mL Methanol gewaschen. Die n-Hexan Phase wurde eingedampft und die Methanol-Phase mit dem entwickelten LC-Verfahren analysiert.

In der Methanol-Phase konnten nur 9% des eingebrachten Testosteron-Decanoats wieder gefunden werden und beim Eindampfen der n-Hexan Phase blieb nahezu die vollständige Menge an eingesetztem Öl zurück. Das bedeutet, dass die SPE-Phase nicht genutzt werden konnte um den Testosteronester selektiv zurück zu halten.

Als nächstes sollte getestet werden die Ölmatrix selektiv auf der SPE-Phase zu adsorbieren. Zu diesem Zweck wurden etwa 300 mg Öl in ein kleines Eppendorf-Cap gefüllt, mit 15 µL des Steroid-Esters (gelöst in Benzylalkohol) versetzt und 10 min gevortext. Von der öligen Zubereitung wurden etwa 200 mg direkt auf die Adsorbex SPE-Phase gegeben. Im Anschluss wurde die SPE-Phase mit 1 mL Methanol eluiert. Ein Teil der Methanol-Phase wurde mit dem LC-Verfahren analysiert und der Rest wurde eingedampft. Ein erster Versuch mit Erdnussöl und Testosteron-Decanoat führte zu einer Wiederfindungsrate von 67% und nach dem Eindampfen der Methanolphase konnten keine Ölrückstände gefunden werden. Aus diesem Grund wurden weitere Analysen mit der oben beschriebenen Vorgehensweisen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 57 zusammengefasst.

Tabelle 57: Übersicht über die Wiederfindungsraten *W* verschiedener Steroide in unterschiedlichen Ölen nach der Probenvorbereitung mittels SPE-Phase.

Speiseöl	Steroid	m (Zubereitung)	Spüllösung	W
0,2469 g Erdnussöl	10 µL T. Decanoat	188,4 mg	1 mL MeOH	61,5 %
0,2826 g Erdnussöl	10 µL T. Decanoat	189,3 mg	2 x 1 mL MeOH	107,2 %
0,2889 g Sesamöl	10 µL T. Decanoat	171,9 mg	1 mL MeOH	53,2%
0,2929 g Erdnussöl	10 µL T. Decanoat	176,3 mg	1 mL MeOH	52,9%
0,2088 g Leinöl	15 µL T. Acetat	87,3 mg	2 x 1 mL MeOH	97,3%
0,2057 g Leinöl	15 µL T. Acetat	86,3 mg	3 x 1 mL MeOH	103,1%
0,1964 g Leinöl	15 µL T. Decanoat	89,5 mg	2 x 1 mL MeOH	76,8%
0,2040 g Leinöl	15 µL T. Decanoat	92,8 mg	3 x 1 mL MeOH	93,3%
0,1950 g Leinöl	20 µL T. Decanoat	78,3 mg	3 x 1 mL MeOH	89,3%
0,2004 g Leinöl	20 µL T. Decanoat	81,1 mg	4 x 1 mL MeOH	98,6%
0,1979 g Erdnussöl	20 µL T. Undecanoat	89,6 mg	4 x 1 mL MeOH	95,3%
0,2059 g Erdnussöl	20 µL T. Undecanoat	86,0 mg	4 x 1 mL MeOH	92,6%
0,1997 g Erdnussöl	15 µL T. Undecanoat	86,3 mg	4 x 1 mL MeOH	91,1%
	15 µL T. Acetat			99,9%
0,2107 g Erdnussöl	15 µL T. Undecanoat	95,8 mg	4 x 1 mL MeOH	90,6%
	15 µL T. Acetat			100,0%
0,2047 g Erdnussöl	20 µL T. Decanoat	89,8 mg	4 x 1 mL MeOH	97,1%
0,2038 g Erdnussöl	20 µL T. Decanoat	90,5 mg	4 x 1 mL MeOH	96,4%
0,1968 g Erdnussöl	15 µL T. Decanoat	92,4 mg	4 x 1 mL MeOH	91,1%
	15 µL T. Acetat			100,9%
0,1949 g Erdnussöl	15 µL T. Decanoat	87,5 mg	4 x 1 mL MeOH	95,2%
	15 µL T. Acetat			102,9%
0,2011 g Erdnussöl	20 µL T. Acetat	81,4 mg	4 x 1 mL MeOH	102,4%

Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Aufgabe von nur etwa 80 mg öliger Zubereitung auf die SPE-Phase und viermaligem waschen der SPE-Phase mit jeweils 1 mL Methanol, die Wiederfindungsrate für alle Steroid-Ester bei nahezu 100% liegt.

Da die bisherigen Extraktionen auf einer SPE-Phase durchgeführt wurden, die käuflich nicht mehr erwerbbar ist, wurden drei weitere SPE-Phasen (siehe 4.4.2.1.2) auf ihre Eignung zur Probenvorbereitung untersucht. Zu diesem Zweck wurden 100 mg des Medikaments *Testosteron Depot Jenapharm* in ein kleines Eppendorf-Cap gefüllt, mit 10 µL Testosteron-Acetat (gelöst in Benzylalkohol) versetzt und 10 min geschüttelt. Von der öligen Zubereitung wurden etwa 50 mg direkt auf die unterschiedlichen SPE-Phasen gegeben. Im Anschluss wurde die SPE-Phase fünfmal mit 1 mL Methanol eluiert. Die sich dabei ergebenden Wiederfindungsraten sind in Tabelle 58 aufgeführt.

Tabelle 58: Wiederfindungsraten von T. Acetat bei Verwendung verschiedener SPE-Phasen.

SPE-Phase	Int. Standard	W
LiChrolut EN	10 µL T. Acetat	13,7%
LiChrolut EN	10 µL T. Acetat	0%
LiChrolut RP-18 E	10 µL T. Acetat	108,2%
LiChrolut RP-18 E	10 µL T. Acetat	110,0%
Discovery DSC-18	10 µL T. Acetat	116,0%
Discovery DSC-18	10 µL T. Acetat	178,0%

An Hand der Werte ist zu erkennen, dass die SPE-Phase LiChrolut EN nicht für die Extraktion geeignet ist. Die Wiederfindungsraten über 100% machten weitergehende Untersuchungen notwendig. Dabei wurde getestet, ob eine zusätzliche Durchmischung der öligen Zubereitung durch langsames Drehen des Vials um 360°, zu realistischen Werten führt. Weiterhin wurde das Volumen an Extraktionsmittel auf bis zu 10 Milliliter erhöht, wobei das Lösemittel nach der Extraktion eingedampft und für die Analyse mit einem geringeren Volumen an Methanol wiederaufgenommen wurde. Dabei zeigt sich, dass bei der Verwendung eines zu hohen Volumens an Extraktionsmittel (> 6 mL) Öl von der SPE-Phase abgewaschen wird. Weiterhin ergab sich, dass die Extraktion mit einmal fünf Milliliter Methanol die besten Ergebnisse liefert. Aus diesem Grund wurde die SPE-Phase Discovery DSC-18 als am besten geeignete Extraktions-Phase ausgewählt. Da hier das maximale Aufgabevolumen an Flüssigkeit bei sechs Milliliter, und bei der ebenfalls zur Extraktion geeigneten LiChrolut RP-18 E Phase nur bei drei Milliliter liegt.

Durch die durchgeführten Extraktionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die unter 4.4.2.1.2 beschriebene Methode am besten zur Probenvorbereitung von quantitativen Analysen von öligen Zubereitungen geeignet ist. Mit dieser Methode wurden sieben original

Medikamente auf ihren Gehalt an anabolem Steroid untersucht (siehe Tabelle 59), wobei als interner Standard jeweils ein nicht in dem Medikament enthaltener Testosteronester zugesetzt wurde.

Tabelle 59: Übersicht über die Wiederfindungsrate des Wirkstoffes und des zugesetzten internen Standards von unterschiedlichen original Medikamenten.

Medikament	Wirkstoff	Int. Standard	Wiederfindungsrate in %	
			Wirkstoff	Int. Standard
T. Depot Jenapharm	T. Enanthat	T. Decanoat	98	96
Testoviron	T. Enanthat	T. Decanoat	111	103
T. Depot Galen	T. Enanthat	T. Decanoat	94	90
T. Depot Rotexmedica	T. Enanthat	T. Decanoat	104	105
T. Depot Eifelfango	T. Enanthat	T. Decanoat	83	85
Nebido	T. Undecanoat	T. Decanoat	99	104
Andriol Testocaps	T. Undecanoat	T. Decanoat	96	100

Anhand der Messdaten ist zu erkennen, dass, außer bei dem Präparat Testoviron, eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Wiederfindungsrate des int. Standards und der des Wirkstoffs gefunden wurde, obwohl sich die Präparate in der Zusammensetzung stark voneinander unterscheiden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das entwickelte Extraktionsverfahren für alle öligen Zubereitungen eingesetzt werden kann.

Im Rahmen der Extraktionskontrolle wurden ebenfalls Versuche zu der Bestimmung des Nettogewichts der Medikamente in Glasampullen durchgeführt. Zur Bestimmung des Nettogewichts wurde mittels Spritze das Öl aus der Ampulle entfernt und über die Differenz des Gewichts der Glasampulle das Nettogewicht an Öl bestimmt. Bei Untersuchungen zeigte es sich, dass bei dieser Ermittlung des Nettogewichts ein Fehler von etwa 4% auftritt, da mit der Spritze nicht das gesamte Öl aus der Ampulle entfernt werden konnte (Adsorption an den Glaswänden). Um das tatsächliche Nettogewicht zu erhalten ist es notwendig die geleerte Glasampulle mit n-Hexan auszuwaschen und im Anschluss das Leergewicht zu bestimmen.

### **5.2.1.2 Messung von Realproben**

Mit der oben beschriebenen Methode sollten sieben sichergestellte Präparate untersucht werden. Dabei handelte es sich jeweils um eine ölige Zubereitung, in der mittels GC-MS Messungen anabole Steroide nachgewiesen werden konnten (siehe Tabelle 110 im Anhang). Die Beschreibung sowie Bilder der untersuchten Präparate sind in Tabelle 60 aufgeführt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

Tabelle 60: Bezeichnungen und Bilder der sichergestellten anabolen Steroid Präparate.

Name	sonstige Beschriftung	Bild
Testoplex E	Testoplex E Testosterone Enanthate 300 mg/mL Pharmaceuticals	
Sustanon 250 (Präp 1)	Sustanon 250	
Sustanon 250 (Präp 2)	Identisch mit obigem	
Sustanon 4-Blend	Elite of Qualities Sustanon 4-Blend 10 mL a 300 mg High Quality Body Supplier	
Sustanon	1 mL Sustanon Inj. 250 mg	
Testosteron Depot Galenika	250 mg/mL Testosteron Depot Galenika	
Testosteron Propionat	Testosteron Propionat 10 mL sterile multi-dose vial 100 mg/mL for intramuscular injection Elite of Qualities	

Bei den untersuchten Präparaten handelt es sich um Einfach- und Mehrfach-Injektionsampullen. Die Aufmachung und Beschriftung der Präparate ist sehr unterschiedlich und reicht von einem professionellen Design (Präparat *Testosteron Propionat*) zu eher schlichter Aufmachung (Präparat *Testosteron Depot Galenika*). Auf allen Präparaten außer auf *Sustanon 4-Blend* wird in der Beschriftung eine Angabe zu den Inhaltsstoffen getätigt.



## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

Für die Untersuchung der Präparate wurden diese analog zu der Vorschrift in 4.4.2.1.2 behandelt und analysiert. Als interner Standard wurde dabei jeweils Testosteron-Decanoat verwendet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 61 aufgeführt.

Tabelle 61: Analyseergebnisse der quantitativen Analysen der anabolen Steroid-Präparate.

Name	Wirkstoff	$\beta$ in $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\Sigma$ freies Testosteron in $\mu\text{g}/\text{mg}$
Testoplex E	T. Propionat	23,36	178,55
	T. Enanthat	220,82	
Sustanon 250 (Präp 1)	T. Propionat	28,04	166,28
	T. Phenylpropionat	51,40	
	T. Isocaproat	51,13	
	T. Decanoat	106,51	
Sustanon 250 (Präp 2)	T. Propionat	24,43	141,26
	T. Phenylpropionat	45,84	
	T. Isocaproat	23,40	
	unbekannt	110,37	
Sustanon 4-Blend	T. Decanoat	110,37	208,66
	unbekannt	74,66	
Sustanon	T. Propionat	25,53	161,70
	T. Enanthat	202,99	
	T. Propionat	25,53	
	T. Phenylpropionat	46,88	
	T. Isocaproat	47,26	
Testosteron Depot Galenika	T. Decanoat	111,92	150,29
	T. Enanthat	208,74	
Testosteron Propionat	unbekannt		130,01
	T. Propionat	146,41	
	T. Enanthat	10,32	

Wie zu erkennen ist, sind in drei der untersuchten Präparate Substanzen vorhanden, die mittels DAD-Detektor nicht identifiziert werden konnten. Bei der unbekannt Substanz in den Proben *Testosteron Propionat* und *Sustanon 4-Blend* handelt es sich jeweils um die gleiche. Anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums (siehe Abbildung 52) konnte jedoch keine Aussage über diese getätigt werden.

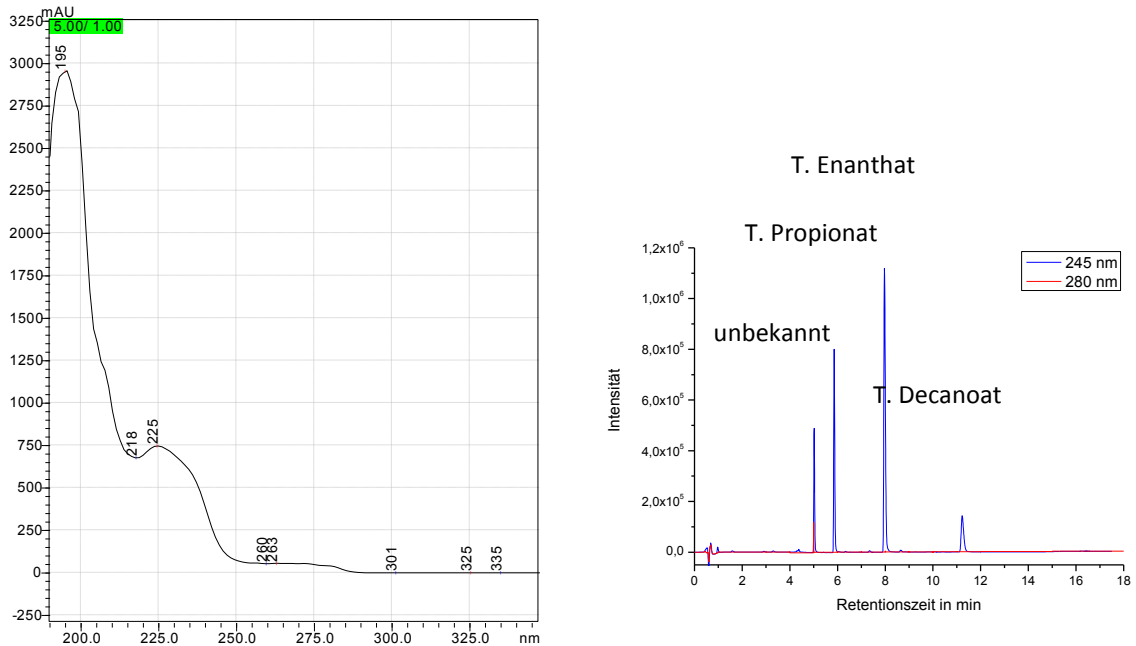


Abbildung 52: UV-Spektrum der unbekannten Substanz in den Realproben *Testosteron Propionat* und *Sustanon 4-Blend* (links). Ausgewählte Wellenlängen (245 nm und 280 nm) des DAD-Signals einer Analyse des Präparates *Sustanon 4-Blend* (rechts).

Die unbekannte Substanz im Präparat *Sustanon 250 (Präp 2)* liegt hingegen von der Retentionszeit in einem Bereich wo esterfizierte Steroide nachgewiesen werden (siehe Abbildung 53). Da auch das UV-Spektrum der Substanz dem von Testosteronestern ähnelt (siehe Abbildung 54), handelt es sich bei dieser Substanz vermutlich um einen unbekanntes Testosteronester.

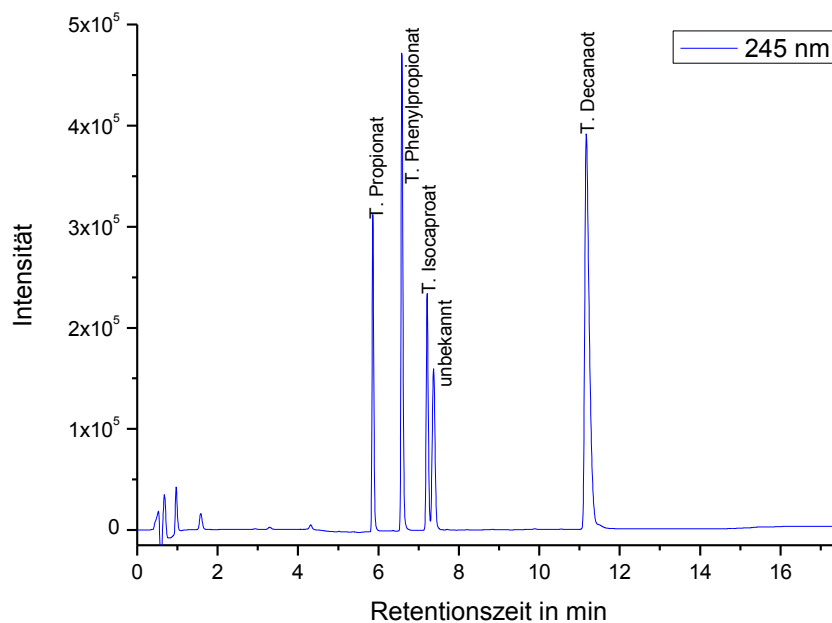


Abbildung 53: Ausgewählte Wellenlänge (245 nm) des DAD-Signals einer Analyse des Präparates *Sustanon 250 (Präp 2)*.

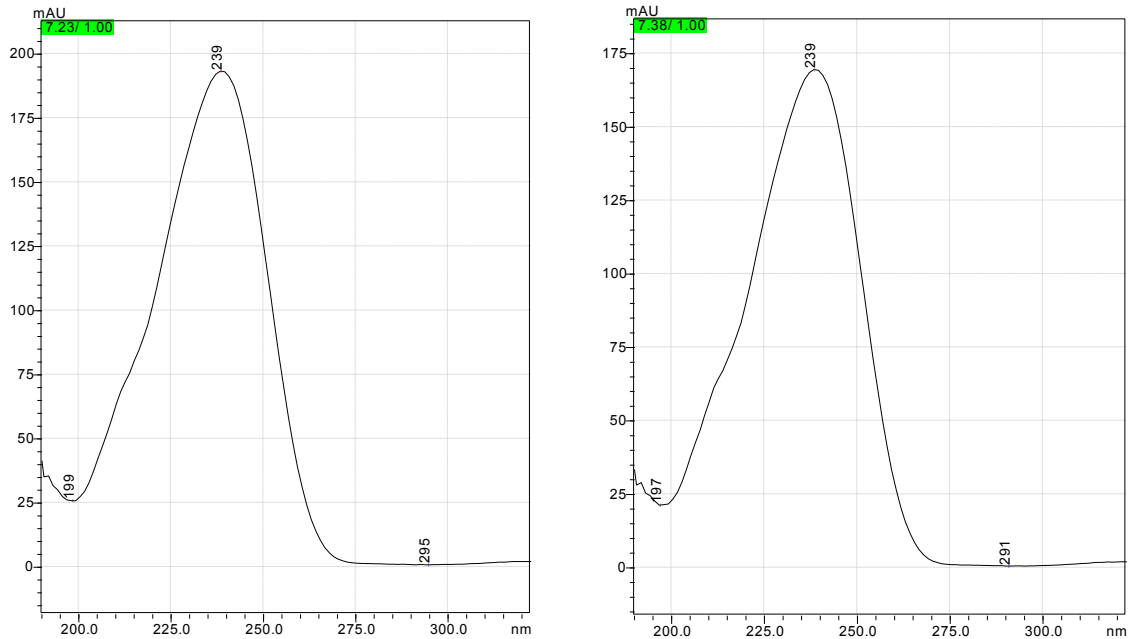


Abbildung 54: UV-Spektrum der Substanz Testosteron-Isocaproat (links) und der unbekannten Substanz aus der Probe *Sustanon 250* (Präp 2) (rechts).

Bei der Analyse der Untersuchungsergebnisse fällt weiterhin auf, dass in Präparaten, die von außen nicht unterscheidbar sind (*Sustanon 250* Präp 1 und Präp 2), unterschiedliche Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten sein können. Weiterhin ist bei dem Vergleich der angegebenen Inhaltsstoffe und den tatsächlich vorhandenen festzustellen, dass außer bei dem Präparat *Sustanon* keine vollständige Auflistung der enthaltenen anabolen Steroide stattgefunden hat.

Diese Begebenheiten, unterschiedliche Zusammensetzung von außen nicht unterscheidbarer Präparate und das Vorhandensein nicht deklarerter Steroide, machen einen Teil der Gefahren von Schwarzmarkt-Präparaten aus. Eine weitere Gefahrenquelle liegt in der Herstellung der Präparate da bei dieser meist auf keinerlei Hygiene geachtet wird.

### 5.2.1.3 Monolithische-Säule

Da die Probenaufarbeitung der in 4.4.2.1.2 erarbeiteten Methode zur quantitativen Bestimmung von anabolen Steroiden sehr aufwendig ist, sollte versucht werden ob die Verwendung einer monolithischen Säule eine Vereinfachung des Verfahrens ermöglicht. Zu Testzwecken wurde das Steroidgemisch auf einer monolithischen Säule der Firma Merck (siehe Tabelle 23) analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass nach einer Erhöhung des Flusses von 0,5 mL/min auf 1 mL/min die unter 4.4.2.1.2 angegebene Methode eins zu eins auf die monolithische Säule übertragen werden kann. In Abbildung 55 ist ein Chromatogramm der

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

Trennung des Steroidgemisches unter Verwendung der monolithischen Säule dargestellt und in Tabelle 62 sind die Retentionszeiten aufgeführt.

Tabelle 62: Retentionszeiten und Wellenlängen bei denen die photometrische Detektion der 17 untersuchten anabolen Steroide, unter Verwendung der monolithischen Säule, erfolgte.

Steroid	Retentionszeit	Wellenlänge
Trenbolon	2.035	340 nm
Metandienon	2.541	245 nm
Nortestosteron	2.877	245 nm
Boldenon	3.072	245 nm
Testosteron	3.273	245 nm
Methyltestosteron	4.192	245 nm
Trenbolon-Acetat	4.949	340 nm
Danazol	5.033	280 nm
T. Acetat	5.409	245 nm
T. Propionat	5.870	245 nm
T. Phenylpropionat	6.597	245 nm
Trenbolon-Enanthat	7.071	340 nm
T. Isocaproat	7.227	245 nm
T. Enanthat	8.152	245 nm
T. Cypionat	8.381	245 nm
T. Decanoat	11.292	245 nm
T. Undecanoat	13.140	245 nm

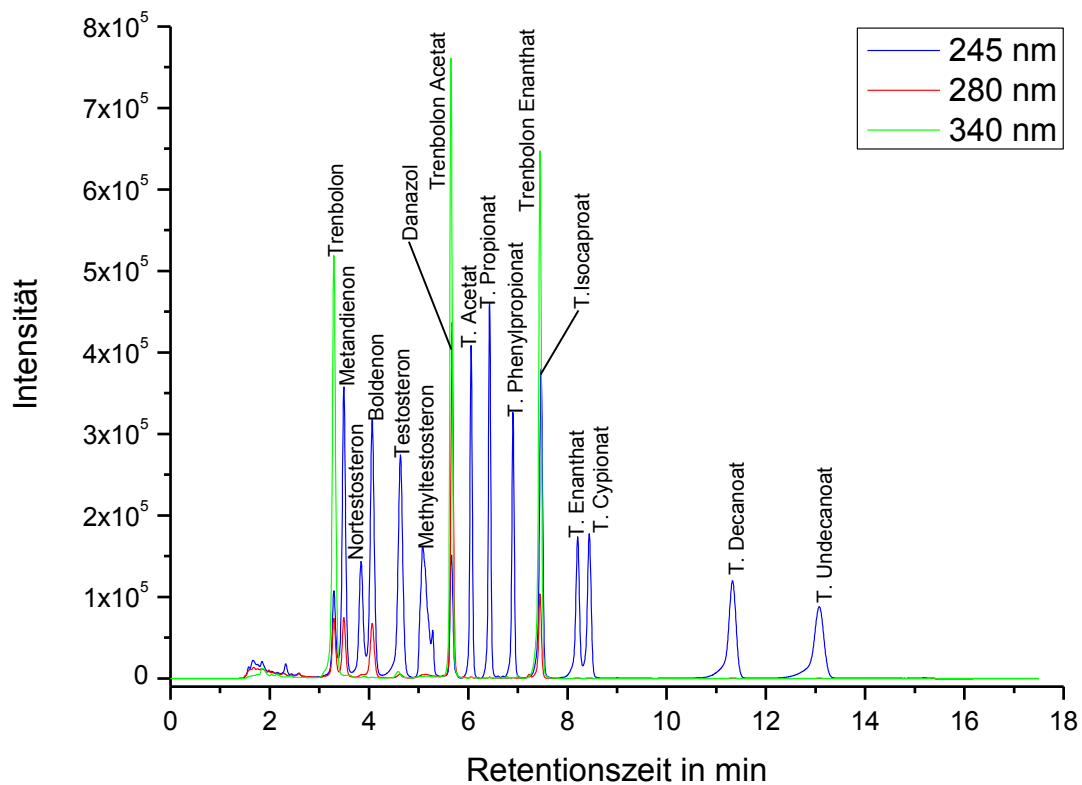


Abbildung 55: Chromatogramm des Mix aus 17 verschiedenen Steroiden, analysiert mit der Methode zur quantitativen Analyse von anabolen Steroiden unter Verwendung der monolithischen Säule.

Es ist zu erkennen, dass die Retentionsreihenfolge sowie die Retentionszeiten nicht exakt mit denen der entwickelten Methode unter Verwendung der RP-18-Säule übereinstimmen (siehe Tabelle 47). Zum weiteren Test der monolithischen Säule wurde eine Realprobe mehrfach hintereinander analysiert werden, umso eventuelle Akkumulationseffekte nachweisen zu können. Zu diesem Zweck musste die ölige Zubereitung in eine injizierbare Form überführt werden. Zu Testzwecken wurde deswegen etwas des Originalpräparats *Testosteron Depot Eifelfango* in n-Pentan gelöst, mit dem organischen Eluenten verdünnt und direkt auf die Säule aufgegeben. Bei dieser Messung wurde für Testosteron-Enanthat jedoch ein Doppelpeak erhalten. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt Chloroform statt n-Pentan zum Lösen der öligen Zubereitung verwendet. Das dabei erhaltene Signal konnte ohne Probleme dem Steroid Testosteron-Enanthat zugeordnet werden. Bei weiteren Messungen (*Testosteron Depot Jenapharm, Sustanon 250*) konnten die Signale ebenfalls den zugehörigen Steroiden zugeordnet werden. Somit kann folgende Vorgehensweise zur Lösung der öligen Zubereitungen als geeignet angesehen werden:

Eine kleine Menge der öligen Zubereitung (ca. 15 mg) wird in 1 mL Chloroform gelöst und anschließend mit Methanol verdünnt.

Mit dieser Probenvorbereitung wurde eine Probe des Präparats Sustanon 250 20mal hintereinander mit der entwickelten Methode unter Verwendung der monolithischen Säule analysiert. Die dabei auftretenden relativen Standardabweichungen der Wiederholpräzisionen der Fläche und der Retentionszeit, für die vier im Präparat enthaltenen Steroide, sind in Tabelle 63 aufgeführt.

Tabelle 63: relative Standardabweichung der Wiederholpräzisionen der Fläche und der Retentionszeit von im Präparat Sustanon 250 vorkommenden Steroiden nach 20facher Analyse unter Verwendung der monolithischen Säule.

Steroid	$\sigma_{\text{rel}}$ (Fläche)	$\sigma_{\text{rel}}$ (Retentionszeit)
Testosteron-Propionat	0,16%	0,05%
Testosteron-Phenylpropionat	0,08%	0,05%
Testosteron-Isocaproat	0,08%	0,05%
Testosteron-Decanoat	0,22%	0,05%

Anhand der erhaltenen Wiederholpräzisionen wurde entschieden, dass das direkte Injizieren von öligen Proben auf die monolithische Säule möglich ist und zu keiner Kontamination führt (bis zu diesem Zeitpunkt wurden 65 ölhaltige Proben auf der Säule untersucht und es konnten keine Beeinträchtigungen festgestellt werden).

Für die Quantifizierung der ölhaltigen Proben war es notwendig ein Verfahren zu erarbeiten, dass reproduzierbare und exakte Messwerte liefert. Die Einwaage der Proben in ein Vial stellt in dieser Beziehung kein Problem dar. Die Zugabe von 1 mL Chloroform sowie die Entnahme von 20 µL Chloroform für die Verdünnung gestaltet sich jedoch als schwierig. Wegen des hohen Dampfdrucks kann Chloroform nicht mit den normalen Kolbenhubpipetten abgemessen werden. Stattdessen müssen Direktverdränger verwendet werden. Aus diesem Grund wurde für die Zugabe von 1 mL Chloroform eine AutoRep E Pipette der Firma *Rainin* (unter Verwendung der 1,25 mL Einsätze) und für die Überführung der 20 µL eine nicht veränderbare 20 µL Direktverdränger-Pipette der Firma *Eppendorf* verwendet.

Um eine Aussage zu der Möglichkeit der Quantifizierung treffen zu können wurde zu Testzwecken eine Dreipunktkalibrierung für Testosteron-Enanthat und Testosteron-Undecanoat erstellt. Mittels dieser Kalibrierung wurden verschiedene Originalmedikamente quantifiziert und mit den Angaben des Herstellers verglichen. Die dabei auftretenden Abweichungen sind in Tabelle 64 aufgeführt.

Tabelle 64: Ermittelte Abweichungen des Wirkstoffgehalts nach qualitativer Analyse unter Verwendung der monolithischen Säule und der Angaben der Hersteller.

Präparat	Messung	Abweichung	
		T. Undecanoat	T. Enanthat
Andriol Caps	1	-7,26%	-
	2	-6,40%	-
Nebidol	1	-3,94%	-
	2	-4,07%	-
Rotexmedica	1	-	- 5,71%
Eifelfango	1	-	-10,97%
Jenapharm	1	-	- 6,30%

An den erzielten Abweichungen ist zu erkennen, dass eine Quantifizierung unter Verwendung der monolithischen Säule möglich ist. Die Höhe der ermittelten Abweichungen lassen sich mit der einfachen und schnellen Kalibrierung erklären.

Die durchgeführten Tests zur Verwendung der monolithischen Säule zeigten, dass diese für die quantitative Analyse von anabolen Steroiden in öligen Zubereitungen, ohne aufwendige Probenvorbereitung, eingesetzt werden kann. Aus diesem Grund wurde eine Validierung der unter 4.4.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt.

Als erster wichtiger Validierungsparameter wurde die Wiederholpräzision an einem Tag bestimmt. Dafür wurden zehn aufeinanderfolgende Messungen des DopMix durchgeführt. Die dabei erzielten relativen Standardabweichungen der Wiederholpräzisionen sind in Tabelle 65 aufgeführt.

Tabelle 65: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision der Retentionszeit und der Fläche von zehn aufeinander folgenden Messungen des Steroidgemisches, unter Verwendung der monolithischen Säule.

Steroid	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
Metandienom	0.097	0.160
Nortestosteron	0.418	0.172
Boldeon	0.169	0.175
Testosteron	0.138	0.179
Methyltestosteron	0.701	0.074
T. Acetat	0.198	0.060
T. Propionat	0.133	0.057
T. Phenylpropionat	0.105	0.055
T. Isocaproat	0.131	0.053
T. Enantat	0.324	0.051
T. Cypionat	0.235	0.050
T. Decanoat	0.175	0.065
T. Undecanoat	0.337	0.083
Danazol	0.114	0.062
Trenbolon	0.120	0.157
Trenbolon-Acetat	0.131	0.062
Trenbolon-Enantat	0.541	0.053

Als weitere wichtige Validierungsgröße wurde die Wiederholpräzision zwischen verschiedenen Tagen ermittelt. Dazu wurden vierzehn Analysen des DopMix an vierzehn unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die erhaltenen relativen Standardabweichungen für die Retentionszeit und die Signalfläche sind in Tabelle 66 aufgeführt.

Tabelle 66: relative Standardabweichung ( $\sigma_{rel}$ ) der Wiederholpräzision der Retentionszeit und der Fläche von vierzehn Messungen des Steroidgemisches an vierzehn unterschiedlichen Tagen, unter Verwendung der monolithischen Säule.

Name	Retentionszeit	Fläche
	$\sigma_{rel}$ in %	$\sigma_{rel}$ in %
Metandienom	1.189	0.233
Nortestosteron	0.545	0.273
Boldeon	1.405	0.263
Testosteron	1.148	0.312

Name	Retentionszeit $\sigma_{rel}$ in %	Fläche $\sigma_{rel}$ in %
Methyltestosteron	5.543	0.246
T. Acetat	0.831	0.124
T. Propionat	0.679	0.135
T. Phenylpropionat	0.686	0.167
T. Isocaproat	0.338	0.209
T. Enantat	1.109	0.264
T. Cypionat	0.452	0.276
T. Decanoat	0.273	0.453
T. Undecanoat	0.212	0.536
Danazol	1.711	0.090
Trenbolon	1.230	0.240
Trenbolon-Acetat	1.111	0.090
Trenbolon-Enantat	0.616	0.207

Nicht für alle der 17 anabolen Steroide, für die Wiederholpräzisionen ermittelt wurden, wurde im Rahmen der Validierung eine Kalibration durchgeführt. Von den 17 Substanzen wurden nur die acht Substanzen ausgewählt, für die eine ausreichende Menge an Reinsubstanz vorlag. Diese Substanzen sind ebenfalls die, die am häufigsten in öligen Zubereitungen auftreten.

Für die Kalibrierung wurden jeweils zwischen sieben und neun Lösungen der jeweiligen Substanz hergestellt. Für die Herstellung der einzelnen Lösungen wurde eine bestimmte Menge der Substanz in einem Aluminiumschälchen eingewogen und in einem Messkolben (mindestens 5 mL) mit Methanol gelöst. Die erhaltenen Messdaten wurden mit dem Programm SQS2000 ausgewertet (siehe Kapitel 4.5). Für die Überprüfung des Arbeitsbereichs wurden Mehrfachbestimmungen von zwei Kontrollproben, eine im unteren und eine im oberen Arbeitsbereich, durchgeführt. In Abbildung 56 ist exemplarisch eine Darstellung der bei der Kalibration von Testosteron-Decanoat erhaltenen Residuen dargestellt. Die ausführlichen Ergebnisse der Kalibrierung sind im Anhang in den Tabellen 98 – 105 aufgeführt.



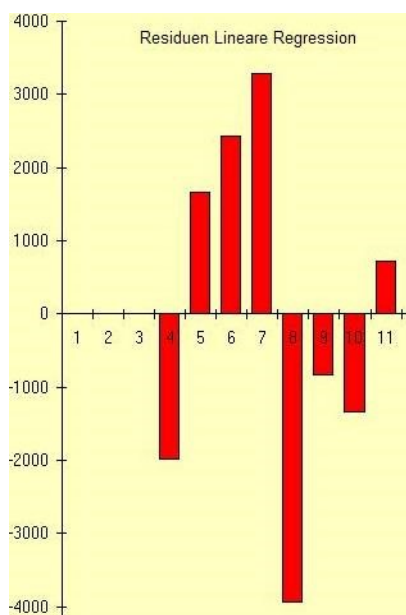


Abbildung 56: Darstellung der Residuenverteilung der Kalibration von Testosteron-Decanoat unter Verwendung der monolithischen Säule.

Für alle Kalibrierungen ist die Korrelation der Kalibriergeraden  $\geq 0,999$ . Die Nachweisgrenzen bei einem Vertrauensbereich von 95% und der Arbeitsbereich sind in Tabelle 67 aufgeführt.

Tabelle 67: Auflistung der Nachweisgrenzen und des Arbeitsbereichs für die in der Kalibrierung, unter Verwendung der monolithischen Säule, eingeschlossenen anabolen Steroide.

Substanz	Nachweisgrenze in $\mu\text{g/mL}$	Arbeitsbereich in $\mu\text{g/mL}$
T. Acetat	3,69	10-450
T. Propionat	2,48	7-400
T. Enanthat	6,86	18-1000
T. Undecanoat	1,57	4-700
T. Cypionat	0,42	2-400
Danazol	1,79	5-500
Nortestosteron	1,29	4-750
Trenbolon	2,24	6-350

Mit der entwickelten Methode wurden im Anschluss acht der original anabolen Steroid-Präparate untersucht. Dabei zeigte es sich, dass das Präparat *Tostran Gel* mit der beschriebenen Methode nicht analysiert werden konnte. Dies lag daran, dass sich das Gel nicht im Chloroform lösen lies, weswegen in diesem Fall Methanol als Lösungsmittel verwendet wurde. Mit dieser einen Abänderung konnte für alle Präparate eine sehr gute Wiederfindungsrate  $W$  ermittelt werden (siehe Tabelle 68).

Tabelle 68: Wiederfindungsraten der in den Präparaten enthaltenen Wirkstoffe unter Verwendung der entwickelten Methode.

Medikament	W in %	W <sub>korrigiert</sub> in %
T. Depot Jenapharm	95	99
Testoviron	106	111
T. Depot Galen	96	100
T. Depot Rotexmedica	94	99
T. Depot Eifelfango	94	98
Nebido	93	97
Andriol Testocaps	93	
Tostran Gel	100	

Bei den korrigierten Werten (Faktor 1,043) wurde berücksichtigt, dass in einer, mit einer Pipette oder Spritze geleerten, Injektionsampulle noch ölige Zubereitung verbleibt, so dass die Gesamtmenge an ölicher Zubereitung zu gering ist (siehe Kapitel 5.2.1.1, Seite 113).

Es ist zu erkennen, dass, außer bei dem Präparat Testoviron, eine sehr gute Wiederfindungsrate des Wirkstoffs erreicht wird, obwohl sich die Präparate in der Zusammensetzung stark voneinander unterscheiden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die entwickelte Methode für ölige Zubereitungen im Allgemeinen eingesetzt werden kann.

### 5.2.2 Unterscheidung verschiedener Pflanzenöle

GC-MS Messungen von öligen Zubereitungen führten trotz Sillylierung zu einer starken Kontamination der EI-Quelle (siehe 5.2.1.1). Deswegen sollte untersucht werden inwieweit GC-FID Messungen für die Analyse von öligen Zubereitungen geeignet sind.

Zu diesem Zweck wurden acht verschiedene Öle und eine Blindprobe mit der unter 4.4.4 beschriebenen Vorgehensweise sillyliert und im Anschluss mit dem in Tabelle 24 beschriebenen Verfahren analysiert, wobei statt des Massenspektrometers ein FID-Detektor mit einem Split von 1:100 verwendet wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Signalverteilung in dem Retentionszeitfenster von 29 – 42 Minuten in allen untersuchten Ölproben identisch ist (siehe Abbildung 58). Da diese Signalverteilung in der Blindprobe nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 57), ist dieser Bereich geeignet um das Vorhandensein eines Speiseöles anzuzeigen.

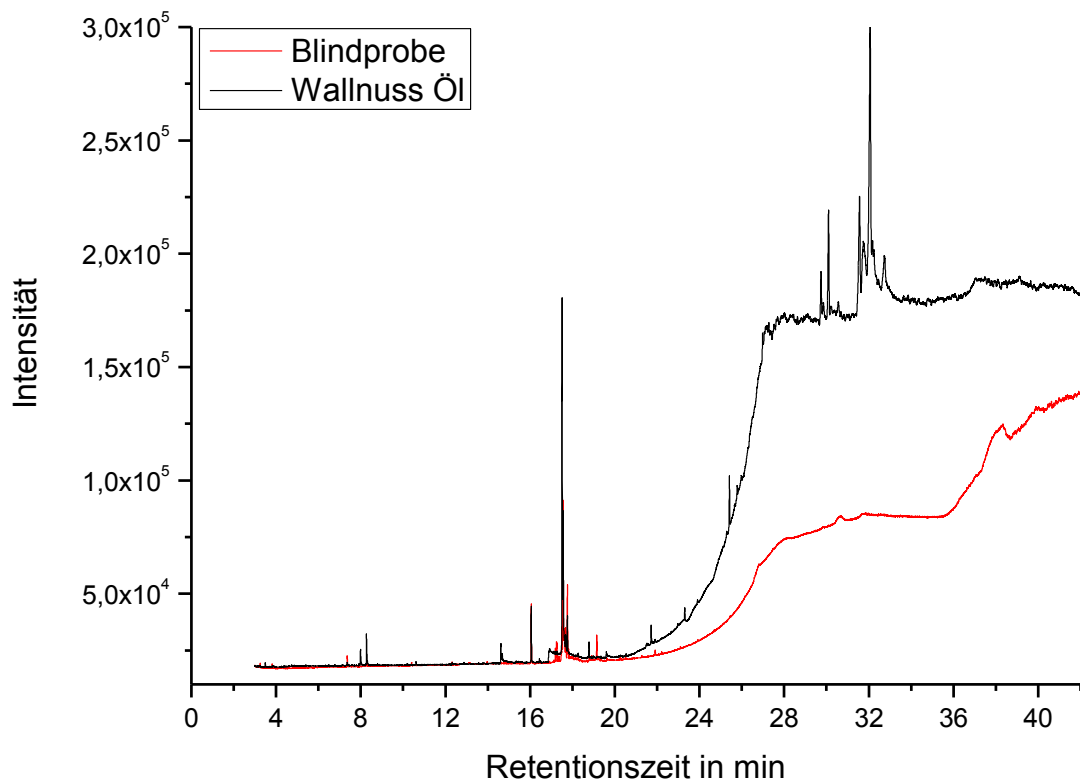


Abbildung 57: Chromatogramm der GC-FID Analyse der Blindprobe (rot) und des Wallnussöl (schwarz).

Weiterhin können im Bereich 3 – 29 Minuten deutliche Unterschiede in der Signalverteilung erkannt werden (siehe Tabelle 69, Abbildung 58). Dieser Bereich kann somit zur Unterscheidung von verschiedenen Speiseölen verwendet werden. Das Signal bei 17.549 Minuten kann nicht als spezifische für Speiseöl gewertet werden, da es auch in der Blindprobe das intensivste Signal ist.

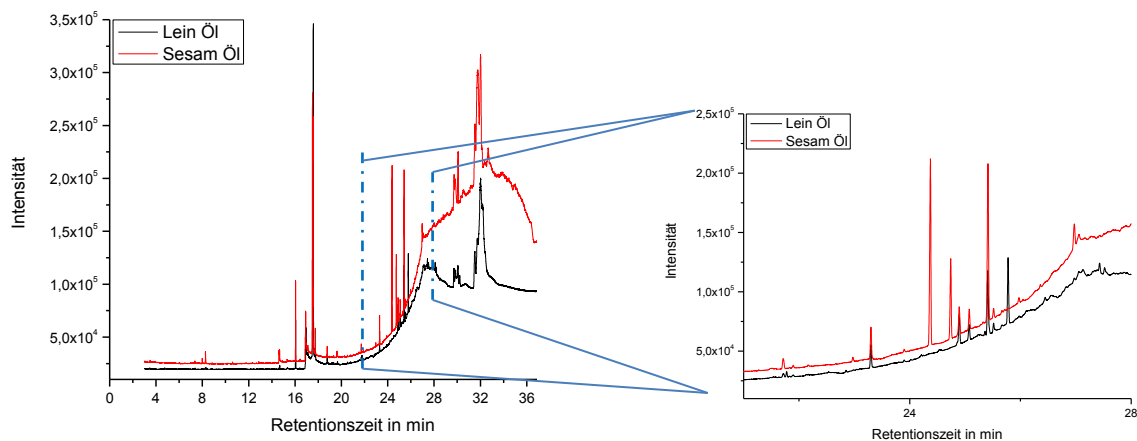


Abbildung 58: links, Chromatogramm der GC-FID Analyse des Sesamöl (rot) und des Leinöl (schwarz); rechts, Vergrößerung des Retentionsbereich 22 – 26 Minuten.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

Tabelle 69: Auflistung der jeweils fünf intensivsten Peaks im Retentionsfenster 3 - 29 Minuten der mittels GC-FID untersuchten Ölproben.

	Blindprobe	Lein-	Kürbiskern-	Wallnuss-	Oliven-	Raps-	Sesam-	ALBA-	Trauben-
1	17.549	17.577	17.512	17.511	14.673	17.548	17.507	17.548	17.507
2	16.053	17.550	17.551	17.549	22.135	25.417	17.545	25.417	29.116
3	17.680	17.506	27.076	26.989	26.967	17.508	24.374	17.508	26.983
4	17.636	16.947	22.137	17.574	17.545	14.676	25.413	14.676	14.672
5	17.509	27.430	16.055	16.055	26.810	24.903	16.920	24.903	17.545

Die Messdaten zeigen deutlich, dass eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Ölen möglich ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Signalverteilung des untersuchten Raps- bzw. ALBA-Öls identisch ist (siehe auch Abbildung 59).

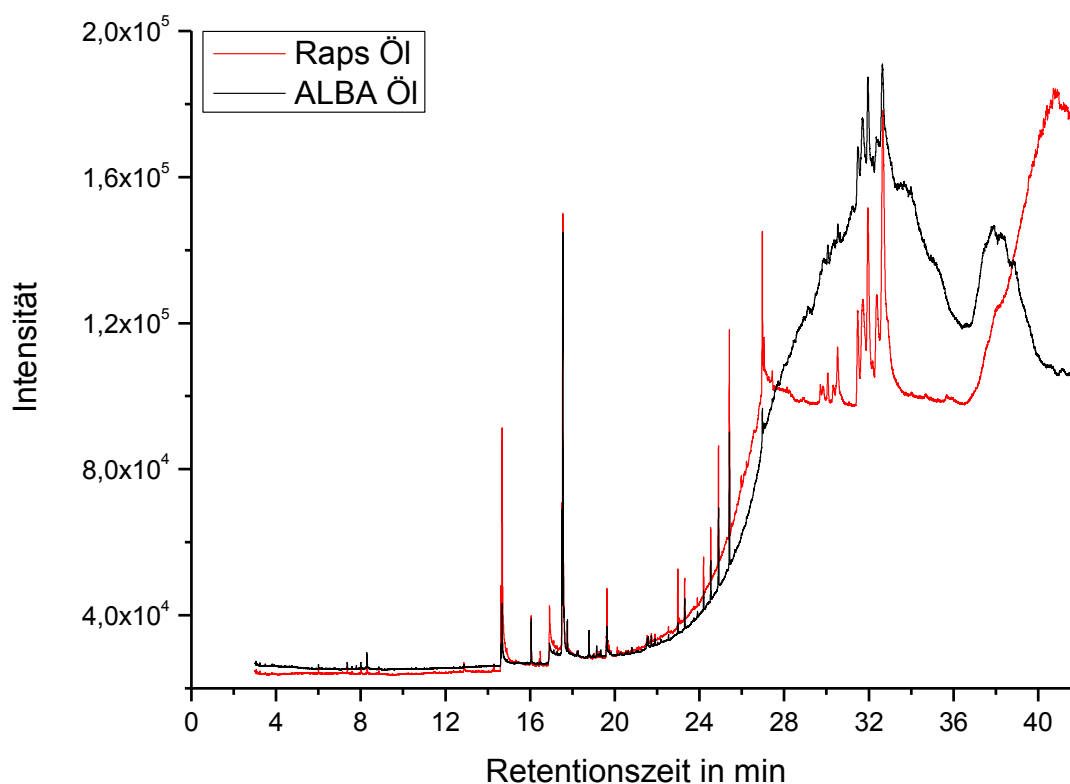


Abbildung 59: Chromatogramm der GC-FID Analyse des Rapsöl (rot) und des ALBA-Öl (schwarz).

Diese Übereinstimmung ist dadurch zu erklären, dass es sich bei dem ALBA-Öl um ein Rapsöl handelt, das laut Etikett eine besonders hohe Qualität aufweisen soll.

Es wurde somit gezeigt, dass Speiseöle derselben Art aber von unterschiedlichen Herstellern ähnliche Signalverteilungen im Retentionsfenster von  $3 - 29$  Minuten aufweisen. Diese durchgeführten Messungen führten dazu, dass weiterführende Untersuchungen zu der Unterscheidungsmöglichkeit von Speiseölen durchgeführt werden sollten. Diese Untersuchun-

gen wurden von *Marion Schäffer* mittels GCxGC Analysen im Rahmen eines internen Forschungsprojekts des Bundeskriminalamtes durchgeführt.

### 5.2.3 LC-MS Kopplung

Wie in Kapitel 5.2.1 erwähnt sollte bei der Entwicklung der Methode nicht nur eine photometrische Detektion sondern zusätzlich auch eine massenspektrometrische Detektion erfolgen. Zu diesem Zweck ist eine Abtrennung der öligen Matrix erforderlich da ansonsten die Gefahr der Kontamination des Massenspektrometers zu groß ist. Aus diesem Grund kann die Methode unter Verwendung der monolithischen Säule (siehe 5.2.1.3), nicht durchgeführt werden. Stattdessen muss für diese Kopplung auf die aufwendigere Probenvorbereitung aus Kapitel 4.4.2.1.2 zurückgegriffen werden. Unter Verwendung der dort beschriebenen Methode und mit den unter 4.4.3 beschriebenen Parametern konnte eine Kopplung der UHPLC mit einem Massenspektrometer erreicht werden. Die Retentionszeiten sowie die  $m/z$ -Werte, bei denen die 17 anabolen Steroide des DopMix im Massenspektrometer detektiert werden, sind in Tabelle 70 zusammengefasst und in Abbildung 60 ist eine in einem Chromatogramm zusammengefasste Darstellung aller relevanten EIC's der Trennung des Steroidgemisches aufgezeigt.

Tabelle 70: Retentionszeiten und  $m/z$ -Werte bei denen die massenspektrometrische Detektion der 17 untersuchten Cannabinoide erfolgte.

Steroid	[M+H] <sup>+</sup>	Retentionszeit in min
Trenbolon	271	2,402
Nortestosteron	275	2,923
Metandienon	301	3,259
Boldenon	285	3,477
Testosteron	289	3,663
Methyltestosteron	303	4,579
Trenbolon-Acetat	313	5,294
Danazol	338	5,370
Testosteron-Acetat	331	5,741
Testosteron-Propionat	345	6,202
Testosteron-Phenylpropionat	421	6,918
Trenbolon-Enanthat	383	7,380
Testosteron-Isocaproat	387	7,531
Testosteron-Enanthat	401	8,306
Testosteron-Cypionat	413	8,567
Testosteron-Decanoat	443	11,488
Testosteron-Undecanoat	457	13,298

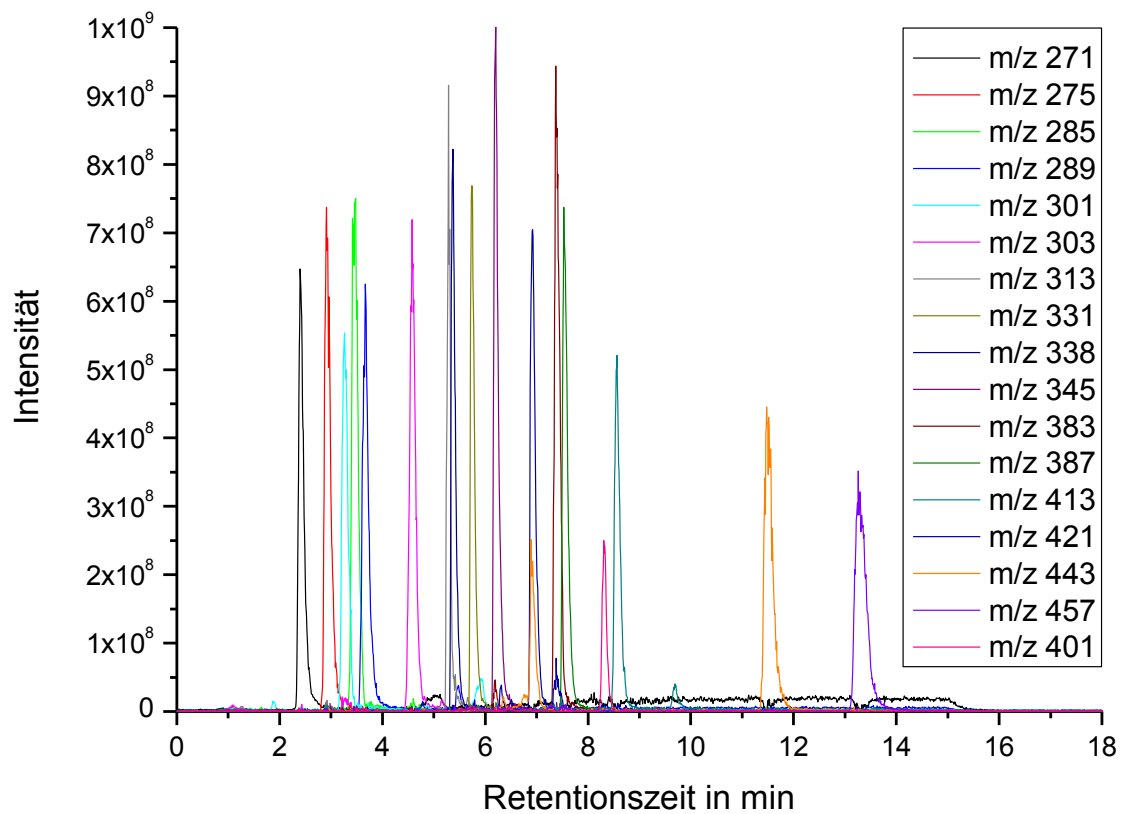


Abbildung 60: Darstellung aller relevanten EIC's der Trennung des Steroidgemisches.

Mit der ermöglichten SPE-UHPLC-DAD-MS Kopplung wurden die unter 5.2.1.2 beschriebenen Realproben erneut analysiert. Dabei sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob mit Hilfe des massenselektiven Detektors neue Erkenntnisse über die unbekannte Substanz in dem Präparat *Sustanon 250 (Präp 2)* erlangt werden können. In Abbildung 61 sind die EIC's der Analyse des Präparates *Sustanon 250 (Präp 2)* dargestellt. Wie dort zu erkennen ist, weist der unbekannte Peak dasselbe m/z-Verhältnis wie Testosteron-Isocaproat auf.

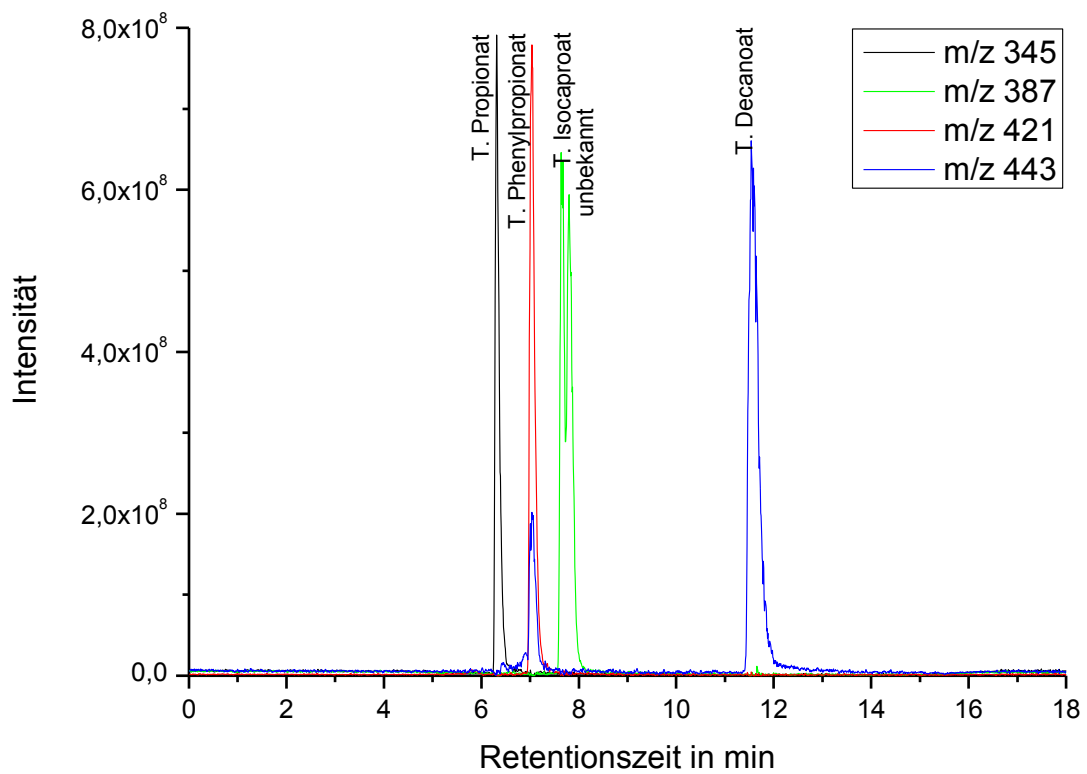


Abbildung 61: Darstellung der vier relevanten EIC's der massenspektrometrischen Detektion der Trennung des Präparates Sustanon 250 (Präp 2).

Die Fullscan-Massenspektren von Testosteron-Isocaproat und der unbekanntem Substanz sind in Abbildung 62 dargestellt.

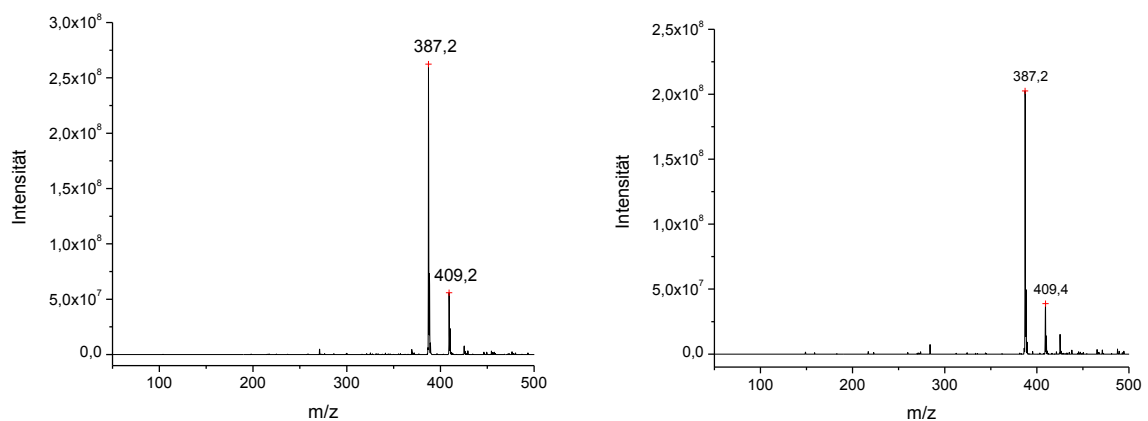


Abbildung 62: Fullscan Spektrum von Testosteron-Isocaproat (links) und der unbekanntem Substanz aus der Probe Sustanon 250 (Präp 2).

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Dopingsubstanzen

Zusätzlich zu den Fullscan-Massenspektren wurden MS<sup>3</sup>-Spektren des m/z-Verhältnis 387 aufgenommen (siehe Abbildung 63). Dort zeigte es sich, dass die unbekannte Substanz die gleiche Fragmentierung wie Testosteron-Isocaproat aufweist.

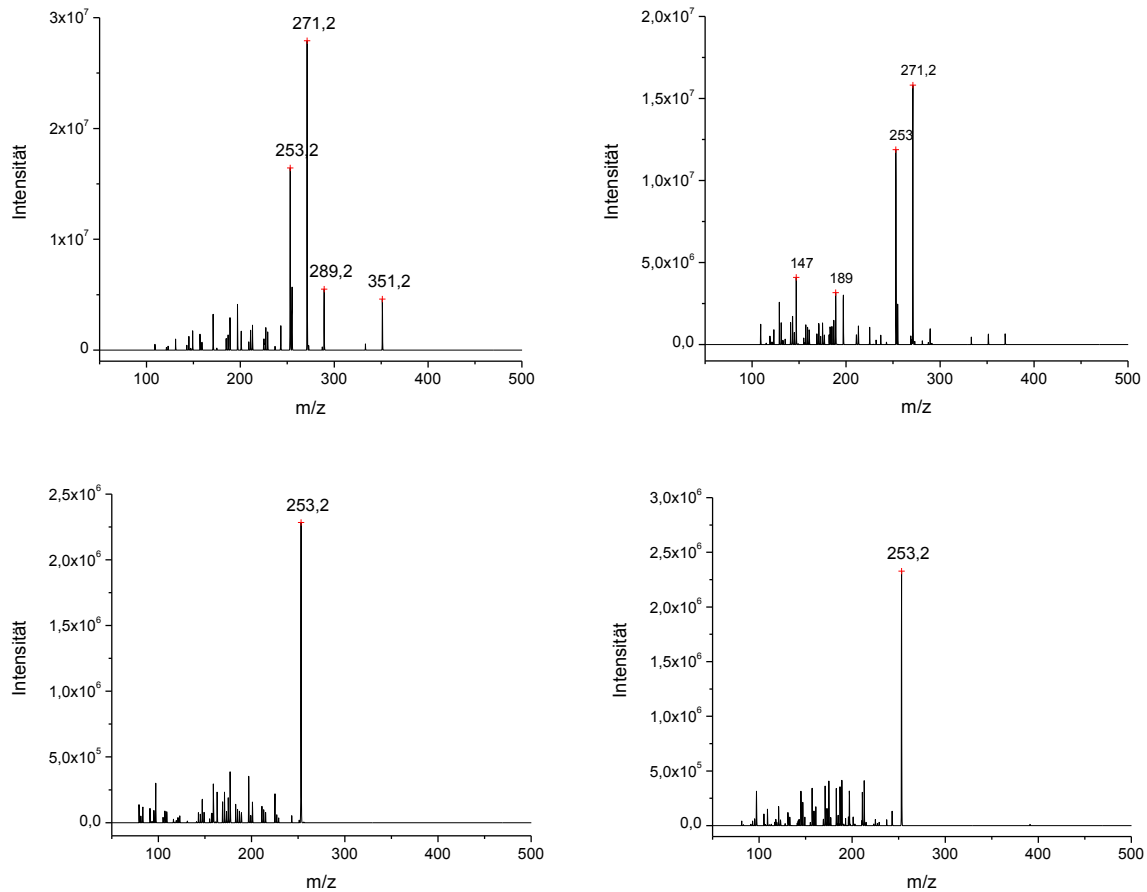


Abbildung 63: MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 387 von Testosteron-Isocaproat (links oben) und der unbekannt Substanz aus der Probe Sustanon 250 (Präp 2) (rechts oben); MS<sup>3</sup>-Spektrum des m/z-Wert 271 von Testosteron-Isocaproat (links unten) und der unbekannt Substanz (rechts unten).

Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass es sich bei der unbekannt Substanz um einen Testosteronester mit ebenfalls sechs Kohlenstoffatomen in der Alkylkette handelt. Eine Recherche in einschlägigen Foren führte zu dem Schluss, dass es sich bei der unbekannt Substanz sehr wahrscheinlich um Testosteron-Hexanoat (Testosteron-Caproat) handelt. Zu der zweiten unbekannt Substanz konnte auch mit Hilfe der MS-Messungen keine Aussage getroffen werden. Für eine Aufklärung sind weiterführende Messungen, unter anderem mittels hochauflösender Massenspektrometrie, notwendig.



### 5.2.4 DESI-MS

Im Bereich der Arzneimittel und illegaler Zubereitungen werden Wirkstoffe häufig in öligen Matrices verarbeitet. Besonders oft tritt diese Art der Zubereitung im Zusammenhang mit anabolen Steroiden auf. Die Ölmatrix bereitet für viele analytische Methoden Probleme, da sie Trennsäulen kontaminieren können. Um Kontaminationen von z.B. GC- oder HPLC-Säulen zu vermeiden sollte eine Methode zur direkten massenspektrometrischen Analyse entwickelt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob weitere gängige Zubereitungsformen von anabolen Steroiden (Pflaster, Gele) mittels DESI-MS analysiert werden können.

Als erstes wurde versucht die öligen Proben auf Glastüpfelplatten aufzubringen und mittels DESI-MS zu analysieren. Da das Öl, im Gegensatz zu Lösemitteln, nicht verdampft, wurde mit dem DESI-Spray der Öltropfen quasi zerteilt. Bei dieser Vorgehensweise konnten zwar Massenspektren erhalten werden allerdings wurde die Ölmatrix auf der Glastüpfelplatte verteilt, wodurch diese kontaminiert wurde und somit für weitere Messungen nicht mehr verwendbar war. Weiterhin traten Probleme bei den MS<sup>n</sup>-Analysen auf und eine Kontamination des MS-Einlasses konnte nicht komplett verhindert werden. Aus diesem Grund wurde die aufgetragene ölige Probe vor der Messung abgetupft (siehe Kapitel 4.4.6).

Mit dieser Vorgehensweise konnte eine Kontamination der Glastüpfelplatte sowie des MS-Einlasses vollständig verhindert werden. Als Test der Leistungsfähigkeit dieser Messmethode wurden unterschiedliche ölige Zubereitungen mit dem obigen Verfahren, sowie zum Vergleich mittels LC-MS (siehe Kapitel 5.2.1.2) analysiert. Dabei wurden auch Zubereitungen mit mehr als einem Wirkstoff untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 71 zusammengefasst.

Tabelle 71: Vergleich der direkten DESI-MS und der LC-MS Ergebnisse von den untersuchten öligen Zubereitungen.

<b>Präparat</b>	<b>DESI-MS Ergebnis</b>	<b>Referenzergebnis</b>
Testosteron-Depot Galen	Testosteron-Enanthat	Testosteron-Enanthat
Nebido	Testosteron-Undecanoat	Testosteron-Undecanoat
Testosteron Gel	Testosteron	Testosteron
Sustanon 250	Testosteron-Propionat	Testosteron-Propionat
	Testosteron-Isocaproat	Testosteron-Isocaproat
	Testosteron-Phenylpropionat	Testosteron-Phenylpropionat
	Testosteron-Decanoat	Testosteron-Decano
Valeron N	Tilidin	Tilidin
Diazepam Abz Tropfen	Diazepam	Diazepam

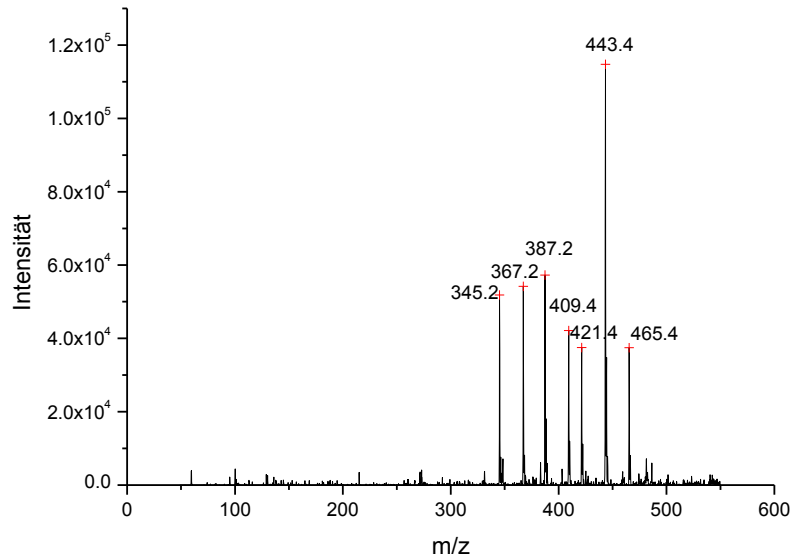


Abbildung 64: direkte DESI-MS Messung von Sustanon 250.

In Abbildung 64 ist das Massenspektrum der Probe Sustanon 250 dargestellt. Es sind 7 Peaks zu erkennen von denen der mit dem  $m/z$ -Verhältnis 443,4 ungefähr doppelt so hoch ist wie die anderen. Das liegt daran, dass unter dem  $m/z$ -Verhältnis 443,4 das  $[M + H]^+$ -Signal von Testosteron-Decanoat sowie das  $[M + Na]^+$ -Signal von Testosteron-Phenylpropionat liegt. Die Zuordnung der  $m/z$ -Werte zu den entsprechenden Substanzen ist in Tabelle 72 aufgeführt.

Tabelle 72: Zuordnung der  $m/z$ -Werte zu den Wirkstoffen in der Probe Sustanon 250.

$m/z$ -Wert	Substanz
345,2	$[M + H]^+$ von T. Propionat
367,2	$[M + Na]^+$ von T. Propionat
387,2	$[M + H]^+$ von T. Isocaproat
409,4	$[M + Na]^+$ von T. Isocaproat
421,4	$[M + H]^+$ von T. Phenylpropionat
443,4	$[M + H]^+$ von T. Decanoat und $[M + Na]^+$ von T. Phenylpropionat
465,4	$[M + Na]^+$ von T. Decanoat

Die Messergebnisse zeigen, dass alle mittels LC-MS in den öligen Zubereitungen und in dem Gel nachgewiesene Wirkstoffe ebenfalls mit dem obigen Verfahren analysiert werden können. Das Verfahren ermöglicht ebenfalls mehrere Wirkstoffe neben einander einwandfrei zu

identifizieren (siehe Abbildung 64) und ist somit für die direkte Untersuchung von öligen Zubereitungen und Gelen geeignet.

Für die Untersuchung von Pflastern zeigte es sich, dass keine weitere Probenvorbereitung notwendig war. Es war ausreichend ein Stück der Pflaster auf einem Objektträger zu fixieren (siehe Abbildung 65 b) und dieses mittels DESI-MS zu analysieren. Ein bei der Analyse von dem Pflaster *Intrinsa* der Firma *Procter und Gamble* erhaltenes Massenspektrum ist in Abbildung 65 a zu sehen. Dabei konnte der vorhandene Wirkstoff Testosteron eindeutig nachgewiesen werden.

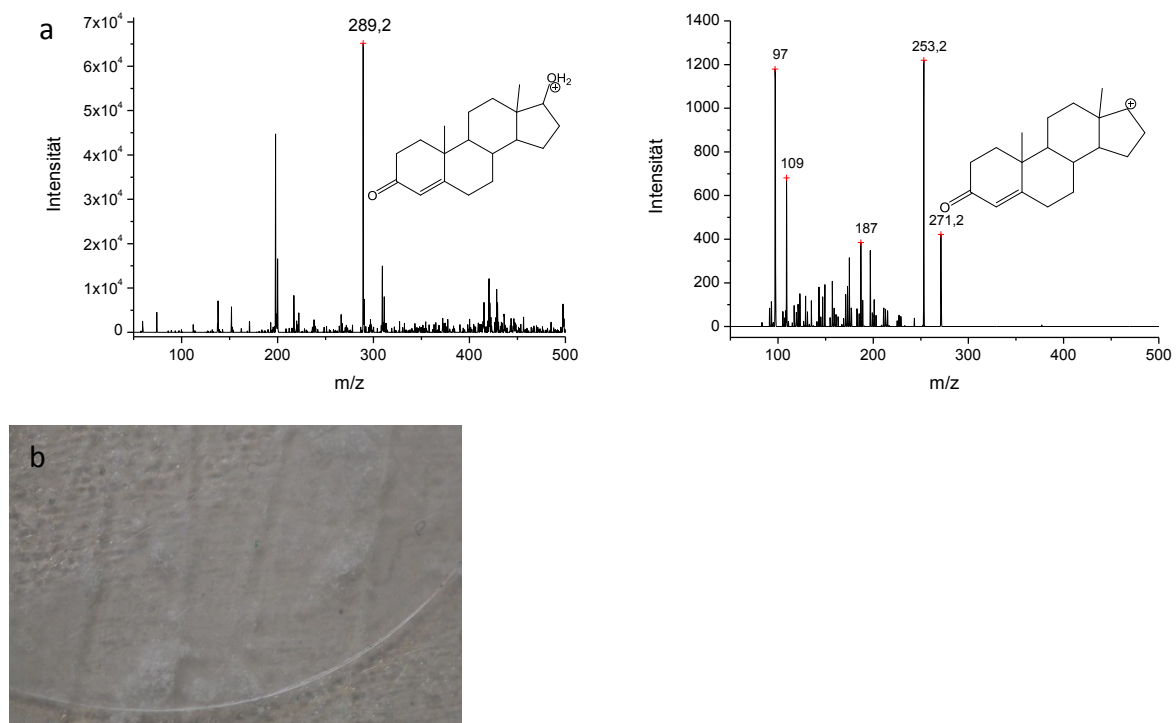


Abbildung 65: a) DESI-MS Spektrum eines Testosteronpflasters (links) und das dazugehörige MS<sup>2</sup>-Spektrum (rechts). b) Ein Teil eines Testosteronpflaster *Intrinsa* fixiert auf einem Objektträger.

Bei der Untersuchung der Hartkapsel *Andriol Testocap* der Firma *Essex Pharma* mittels DESI-MS konnte wie unter 5.3.1.2 beschrieben weder die Kapsel mit dem DESI-Spray durchdrungen noch der Wirkstoff an der Außenseite nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Kapsel geöffnet und die darin enthaltene ölige Zubereitung analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise analysiert. Dabei konnte das in Abbildung 66 zu sehende Massenspektrum erhalten werden. Und somit der in der Kapsel enthaltene Wirkstoff Testosteron-Undecanoat bestätigt werden.

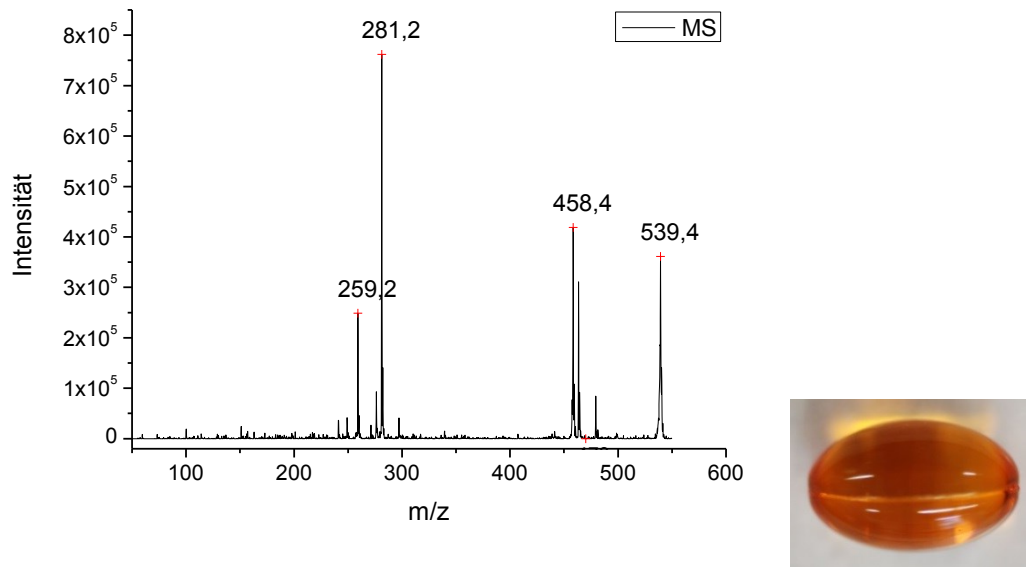


Abbildung 66: Abbildung einer Kapsel *Andriol Testocap* (rechts); Massenspektrum der öligen Zubereitung, die aus der Kapsel *Andriol Testocap* entfernt wurde (links).

### 5.2.5 Diskussion

Wie in der Einleitung und in der Theorie bereits erwähnt, war es bisher nicht möglich mehrere in einer Probe vorkommende unterschiedliche Esterformen eines anabolen Steroids jeweils einzeln zu quantifizieren. Stattdessen wurde ein Summenparameter bezogen auf das nicht veresterte anabole Steroid angegeben, da von diesem auch die gewünschte Wirkung im menschlichen Körper ausgeht. In dieser Arbeit wurden zwei Verfahren zur Quantifizierung der jeweiligen Esterform des anabolen Steroids entwickelt. Bei einem Verfahren wurde eine aufwendige Probenvorbereitung verwendet, um die ölhaltige Matrix der Proben abzutrennen. Bei dem anderen Verfahren kann aufgrund der Verwendung einer monolithischen Säule auf eine Probenvorbereitung verzichtet werden. Allerdings kann dieses Verfahren nicht an ein Massenspektrometer gekoppelt werden, da durch die ölhaltige Matrix eine Kontaminationsgefahr besteht. Die Kopplung an ein Massenspektrometer ermöglichte aber die Aufklärung von bis dato nicht identifizierten Substanzen, was ein Vorteil des Verfahrens mit vorgeschalteter Abtrennung der öligen Matrix ist. Weiterhin wurde ein Verfahren entwickelt, ölige Zubereitungen direkt mittels DESI-MS zu analysieren, was zu einer erheblichen Zeitersparnis, unter Aufrechterhaltung der Aussagekraft, führt. Anhand von GC-FID-Messungen konnten verschiedene Speiseöle unterschieden werden, was weitere Profilnginformationen für den Materialvergleich von öligen Zubereitungen liefert.

## 5.3 Arzneimittel

### 5.3.1 DESI-MS

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht ob DESI-MS Messungen geeignet sind Arzneimittelfälschungen zu analysieren. Aus diesem Grund sollte ein Verfahren entwickelt werden, dass es ermöglicht unterschiedliche Arzneimittelformen mittels DESI-MS direkt-massenspektrometrisch zu untersuchen. Dabei ist vor allem die Frage zu klären ob Filmtabletten und Steckkapseln ohne vorherige Probenvorbereitung analysiert werden können.

#### 5.3.1.1 Tabletten

Bei der Untersuchung von Tabletten konnte schnell festgestellt werden, dass es keine Möglichkeit gibt genau definierte geometrische Parameter der verwendeten DESI-Quelle für die Analyse festzulegen, was vor allem an den existierenden sich stark unterscheidenden Tablettenformen liegt. Diese Unterschiede betreffen vor allem:

- Den Tablettendurchmesser
- Die Tablettenhöhe
- Die unterschiedliche Oberflächenform (konvex, flach)
- Die unterschiedliche Tablettenform (rund, oval, eckig)
- Die Prägungen auf der Oberfläche (Bruchrille, Firmenname, Produktname, usw.)

Es zeigt sich jedoch ebenfalls, dass sich als Ausgangswerte die folgenden geometrischen Parameter für die DESI-Quelle verwenden lassen:

- |   |        |
|---|--------|
| - Abstand des MS-Einlass zur Oberfläche             | 0,2 cm |
| - Abstand der Spitze des Sprühkopfes zur Oberfläche | 2,4 cm |
| - Abstand der Spitze des Sprühkopfes zum MS-Einlass | 6,0 cm |
| - Sprühwinkel                                       | 55°    |

Für die Messung wird die Tablette auf einem Glasträger mittels Klebefilm befestigt und der Abstand zwischen Tablettenoberfläche und MS-Einlass eingestellt. Dann wird die Tablette mittels des Probentisches so unter dem Sprühkopf positioniert, dass das Spray auf der Oberfläche auftrifft. Für eine Signalmaximierung ist es notwendig die geometrischen Parameter an die jeweiligen Tabletten anzupassen.

Der Einfluss der Lösemittelzusammensetzung auf das MS-Signal wurde ebenfalls untersucht. Dabei wurden folgende Lösungsmittelgemische analysiert:

- Tetrahydrofuran / Wasser (75:25)
- DMSO / Wasser (75:25)
- Aceton / Wasser (75:25)

- Acetonitril / Wasser (75:25)
- Methanol/Wasser (50:50)

Mit diesen fünf Lösemittelgemischen wurden die drei bekannten PDE-5 Hemmer (Potenzmittel), Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil als Reinsubstanzen und in Form von Tabletten analysiert und dabei die Signalintensität und das Signal zu Rauschverhältnis ermittelt.

Mit dem Lösemittelgemisch Methanol/Wasser konnte keine der drei Substanzen nachgewiesen werden. Das Gemisch DMSO/Wasser führte zu einer starken Benetzung der zu untersuchenden Oberfläche. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich auf den hohen Siedepunkt von DMSO zurück zu führen, weswegen dieses langsamer als die anderen untersuchten Lösemittel von der Oberfläche verdampfen kann. Aus diesen Gründen wurden diese beiden Lösemittelgemische nicht für die weiteren Untersuchungen berücksichtigt. Die Daten für die restlichen Lösemittelgemische sind in Tabelle 73 zusammengefasst.

Tabelle 73: Übersicht über die Intensitäten der DESI-MS Signale und des Rauschens von Messungen der Reinsubstanzen und der Tabletten von drei PDE-5 Hemmern, unter Verwendung unterschiedlicher Lösemittelgemische. In Schwarz sind die Messungen im positiv und in Rot die Messungen im negativ Ionenmodus dargestellt. Der erste Wert ist die Intensität des Messsignals und der zweite Wert die Intensität des Rauschens.

Gemisch	Sildenafil		Vardenafil		Tadalafil	
	Substanz	Tablette	Substanz	Tablette	Substanz	Tablette
THF/H <sub>2</sub> O	7,8x10 <sup>6</sup> /6800	44500/1700	5,5x10 <sup>5</sup> /15800	27600/9600	-/1,8x10 <sup>5</sup>	-/1,9x10 <sup>5</sup>
Aceton/H <sub>2</sub> O	3,6x10 <sup>6</sup> /27000	8800/500	8,5x10 <sup>6</sup> /75000	5400/2000	-/2,0x10 <sup>5</sup>	-/9000
ACN/H <sub>2</sub> O	1,5x10 <sup>6</sup> /5000	17100/1200	2,2x10 <sup>6</sup> /85000	14200/1300	23100/3500	-/14300
THF/H <sub>2</sub> O	1,4x10 <sup>5</sup> /1300	560/110	46000/620	412/82	6600/1300	-/3800
Aceton/H <sub>2</sub> O	27000/1800	400/100	46000/2400	240/40	6500/3500	-/3700
ACN/H <sub>2</sub> O	2200/500	600/220	8500/340	320/40	740/130	-/2000

Die Daten zeigen, dass Sildenafil und Vardenafil im positiven Ionenmodus mit allen drei Lösemittelgemischen analysiert werden können. Das Fragmentierungsmuster ist dabei unabhängig von dem verwendeten Lösemittelgemisch. Tadalafil hingegen kann nur mit dem Lösemittelgemisch Acetonitril/Wasser detektiert werden und dabei auch nahezu ausschließlich als Natrium-Addukt.

Im negativen Ionenmodus können alle drei Substanzen mit allen untersuchten Lösemittelgemischen detektiert werden. Allerdings ist das Signal/Rausch-Verhältnis bei der Verwendung von Aceton/Wasser deutlich schlechter als bei den anderen beiden Lösemittelgemischen. Detektiert werden die Substanzen als M-H- und Vardenafil zusätzlich als Chlor-

Addukt. Das Fragmentierungsmuster ist auch hier unabhängig von dem verwendeten Lösemittelgemisch. Das Gegenion Citrat ist mit dem Lösemittelgemisch Aceton/Wasser nicht detektierbar.

Die Untersuchung der Cialis-Tabletten zeigte, dass mit keinem verwendeten Lösemittelgemisch eine Identifizierung des enthaltenen Tadalafilis möglich ist. Ein Nachweis war auch nach Entfernung der Beschichtung und mit Verwendung weiterer Lösemittelgemische nicht mehr möglich. Die Substanzen Sildenafil (Viagra-Tablette) und Vardenafil (Levitra-Tablette) konnten mit allen untersuchten Lösemittelgemischen, sowohl im positiven wie auch im negativen Ionenmodus, in Tabletten nachgewiesen werden.

Das Lösemittelgemisch Tetrahydrofuran/Wasser liefert sowohl im positiv wie auch im negativ Ionenmodus sehr ausgeprägte Störmassen. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass das Lösemittelgemisch Acetonitril/Wasser (75:25) am besten für die Analyse von unbekanntem Tabletten geeignet ist.

Ein weiterer Parameter, der Einfluss auf die Signalintensität der DESI-Messung besitzt, ist die Fließrate des Lösemittels. Grundsätzlich führt ein höherer Lösemittelfluss zu einer erhöhten Signalintensität. Allerdings nimmt bei Fließraten größer drei Mikroliter pro Minute die Benetzung der Oberfläche stark zu. Dadurch kommt es zu großen Verformungen auf der Tablettenoberfläche, da das überschüssige Lösemittel von der Beprobungsstelle in alle Richtungen abfließt und dabei die Oberfläche verändert. Aus diesen Gründen wurde für die Analyse von Tabletten eine Fließrate von 3 Mikroliter pro Minute gewählt.

Ein wichtiger Aspekt der DESI-MS Untersuchungen ist die Möglichkeit auf jegliche Probenvorbereitung verzichten zu können. Aus diesem Grund sollte getestet werden ob diese Bedingung auch bei der Analyse von beschichteten Tabletten erfüllt wird. Bei der Untersuchung von beschichteten Tabletten zeigte es sich, dass die Beschichtung mittels des DESI-Sprays entfernt werden kann und somit eine Analyse der Inhaltsstoffe der Tablette möglich ist. In Tabelle 74 ist die Abhängigkeit zwischen dem Lösemittelfluss, der resultierenden Signalintensität und der benötigten Zeit zur Entfernung der Beschichtung zusammen gefasst.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Arzneimittel

Tabelle 74: Einfluss des Lösemittelflusses auf die Signalintensität und die Zeit zur Entfernung der Beschichtung einer Viagra- und einer Levitra-Tablette.

Fluss	Viagra-Tablette		Levitra-Tablette	
	Zeit	Intensität	Zeit	Intensität
1 $\mu\text{L}/\text{min}$	Abbruch nach 13 min		Abbruch nach 14 min	
2 $\mu\text{L}/\text{min}$	2,5 min	$3 \times 10^4$	4,5 min	$3 \times 10^4$
3 $\mu\text{L}/\text{min}$	1,1 min	$1 \times 10^5$	2,6 min	$1 \times 10^5$
4 $\mu\text{L}/\text{min}$	1,0 min	$1 \times 10^5$	1,2 min	$8 \times 10^5$

Weiterhin ist in Abbildung 67 der Zusammenhang zwischen dem Lösemittelfluss und der resultierenden Untersuchungsfläche auf der Tablettenoberfläche dargestellt.

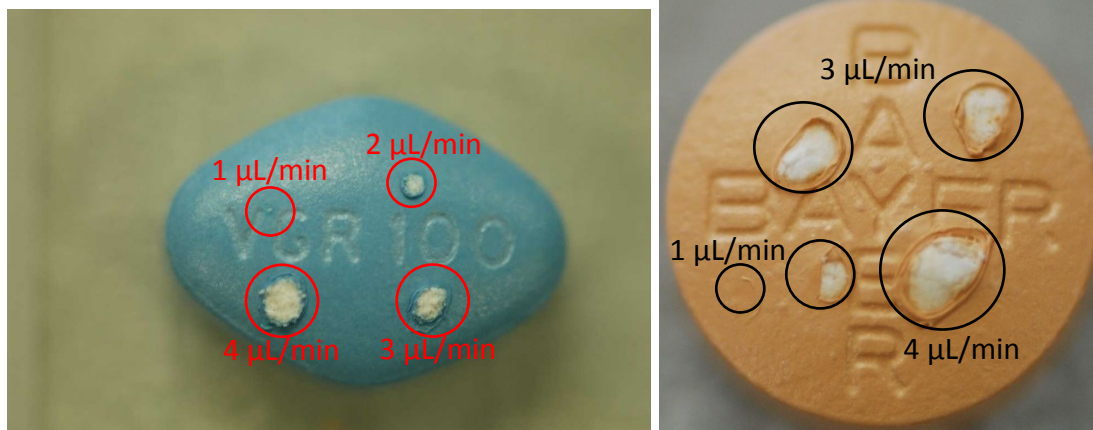


Abbildung 67: Fläche auf der die Beschichtung einer Viagra-Tablette (links) und einer Levitra-Tablette (rechts) entfernt wurde, in Abhängigkeit des Lösemittelflusses.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Untersuchung von beschichteten Tabletten am besten ein Lösemittelfluss von 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  geeignet ist. Bei diesem Fluss wird die Beschichtung innerhalb akzeptabler Wartezeit entfernt und die resultierende Beprobungsfläche auf der Tablette bewegt sich in einem noch akzeptablen Größenbereich. Die Massenspektren die unter diesen Bedingungen mittels DESI-MS erzeugt werden konnten sind in Abbildung 101 und Abbildung 102 zu sehen.

Im Rahmen der Untersuchungen von Arzneimittel-Tabletten wurden ebenfalls Tabletten einer Testserie untersucht. Die Testserie wurde im Rahmen des BmBF-Projektes „MIME“ (Multimodales Mustererkennungssystem zum Schutz der Bevölkerung vor organisierter Arzneimittelkriminalität und zur Bekämpfung des internationalen Drogenhandels) hergestellt. Innerhalb der Testserie wurden unterschiedliche Matrices mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen mit variierenden Pressdrücken zu Tabletten (rund, bikonvex, 9 mm Durchmesser) verarbeitet. Die DESI-MS Messungen sollten zeigen, ob eine Unterscheidung der



unterschiedlichen Pressdrücke anhand des Messsignals möglich ist. Zu diesem Zweck wurden runde Tabletten mit den in Tabelle 76 angegebenen Parametern untersucht. Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Matrices der Mischungen sind in Tabelle 75 angegeben.

Tabelle 75: Zusammensetzung der Tablettenmatrix der unterschiedlichen Mischungen.

Mischung	Rohstoff	Gehalt
A	Lactose Monohydrat	68,50%
	Kollidon VA 64	5,00%
	Magnesiumstearat	0,50%
	Aerosil	0,50%
	Maisstärke	10,00%
	Talkum	4,50%
B	Selbe wie Mischung A, nur unzureichend durchmischt	
C	Ludipress	73,91%
	Kollidon VA 64	4,59%
	Avicel PH 101	10,00%
	Magnesiumstearat	0,50%
D	Selbe wie Mischung A	

Tabelle 76: Auflistung der Tabletten der Testserie aus dem MIME-Projekt, die mittels DESI-MS analysiert wurden.

Bezeichnung	Mischung	Pressdruck
	Wirkstoffgehalt	
A	10% Coffein, 1% Chinin	Gering, Optimal, Hoch
B	10% Coffein, 1% Chinin	Sehr gering, Gering, Optimal, Hoch
C	10% Coffein, 1% Chinin	Gering, Optimal, Hoch
D	7% Coffein, 3% Chinin	Gering, Optimal, Hoch

Bei den Untersuchungen wurden immer dieselben geometrischen Parameter der DESI-Quelle verwendet (siehe 4.6). Die Untersuchungen der Tabletten zeigten, dass jeweils nur der Wirkstoff Chinin nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 68).



Abbildung 68: Full-Scan DESI-MS Spektrum (links) der Tablette mit der Mischung A und optimalen Pressdruck. Struktur von Chinin (rechts).

Weiterhin konnten die Tabletten, die mit dem sehr geringen Pressdruck gefertigt wurden, nicht analysiert werden, da diese bei der Befestigung auf dem Objektträger bzw. durch das DESI-Spray zerstört wurden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 77 zusammengefasst.

Tabelle 77: DESI-MS Signalintensitäten des m/z-Werts 325 ( $[M+H]^+$  Signal des Wirkstoffs Chinin) von Tabletten mit unterschiedlicher Zusammensetzung und variierendem Pressdruck.

Mischung	Pressdruck		
	gering	optimal	hoch
A	270	519	99
B	1107	325	399
C	154	681	405
D	4848	2050	723

Die Daten zeigen, dass anhand der Intensität des DESI-MS Signal keine Aussage über den bei der Herstellung der Tablette verwendeten Pressdruck getätigt werden kann. Die unterschiedliche Wirkstoffkonzentration in den Tabletten konnte mittels DESI-MS jedoch nachgewiesen werden. Allerdings ist keine quantitative Aussage sondern nur eine qualitative Aussage möglich.

Anhand von Arzneimitteln in Tablettenform sollte weiterhin untersucht werden, in wieweit Tabletten mit einem geringen Wirkstoffgehalt mittels DESI-MS untersucht werden können. Zu diesem Zweck wurden die original Arzneimittel Subutex, Diazepam-AbZ, Finasterid-

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Arzneimittel

ratiopharm und Zolpidem AL mittels DESI-MS analysiert. Die Daten und Abbildungen der Arzneimittel sind in Tabelle 78 aufgeführt.

Tabelle 78: Angaben des Wirkstoff und des Wirkstoffgehalts sowie Abbildungen von vier original Arzneimitteln.

Arzneimittel	Wirkstoff	Wirkstoffgehalt
Subutex	Buprenorphin	0,4 mg
Diazepam-AbZ	Diazepam	5,0 mg
Finasterid-ratiopharm	Finasterid	5,0 mg
Zolpidem AL	Zolpidem	5,0 mg

Die Untersuchungen zeigten, dass in allen Tabletten der Wirkstoff mittels DESI-MS Messungen nachgewiesen werden konnte. Allerdings stieß die Methode teilweise an ihre Grenzen, wie das Massenspektrum des Medikaments Finasterid-ratiopharm (siehe Abbildung 69) zeigt, da das Substanzsignal ( $[M+H]^+ = 373$ ) fast im Untergrund verschwunden ist. Aber dennoch war die Identifizierung des Wirkstoff Finasterid über das  $MS^2$ -Spektrum möglich<sup>86</sup>.

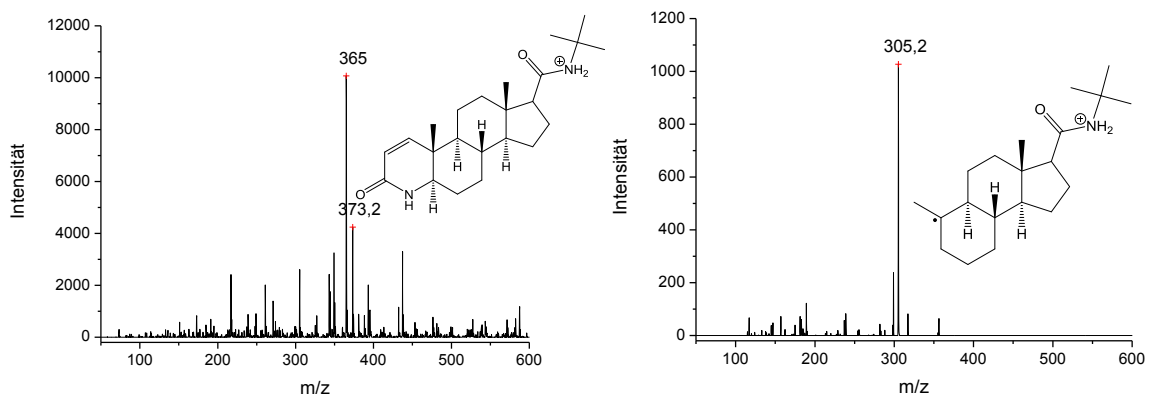


Abbildung 69: DESI-MS Fullscan Spektrum einer Tablette Finasterid-ratiopharm (links) und des zugehörigen  $MS^2$ -Spektrum (rechts).

Die Massenspektren der anderen untersuchten Tabletten sind im Anhang in der Abbildung 98, Abbildung 99 und Abbildung 100 aufgeführt. Bei diesen Messungen erzeugte der Wirkstoff bereits im Fullscan-Spektrum das höchste Signal. Diese Messungen von Tabletten mit

geringer Wirkstoffkonzentration zeigen, dass die direkte DESI-MS Untersuchung von Tabletten möglich ist, da auch niedrig konzentrierte Wirkstoffe nachgewiesen werden können.

Dieses Wissen wurde sich bei einer sichergestellten weißen Tablette (siehe Abbildung 70), ohne weitere Identifikationsmerkmale, zu nutzen gemacht.



Abbildung 70: Abbildung der sichergestellten weißen Tablette ohne weitere Identifikationsmerkmale.

Im Voraus durchgeführte NMR- und GC-MS Messungen konnten keinen Wirkstoff in der Tablette identifizieren. DESI-MS Messungen zeigten das in Abbildung 71 dargestellte Massenspektrum mit den dazu gehörigen  $MS^n$ -Spektren.

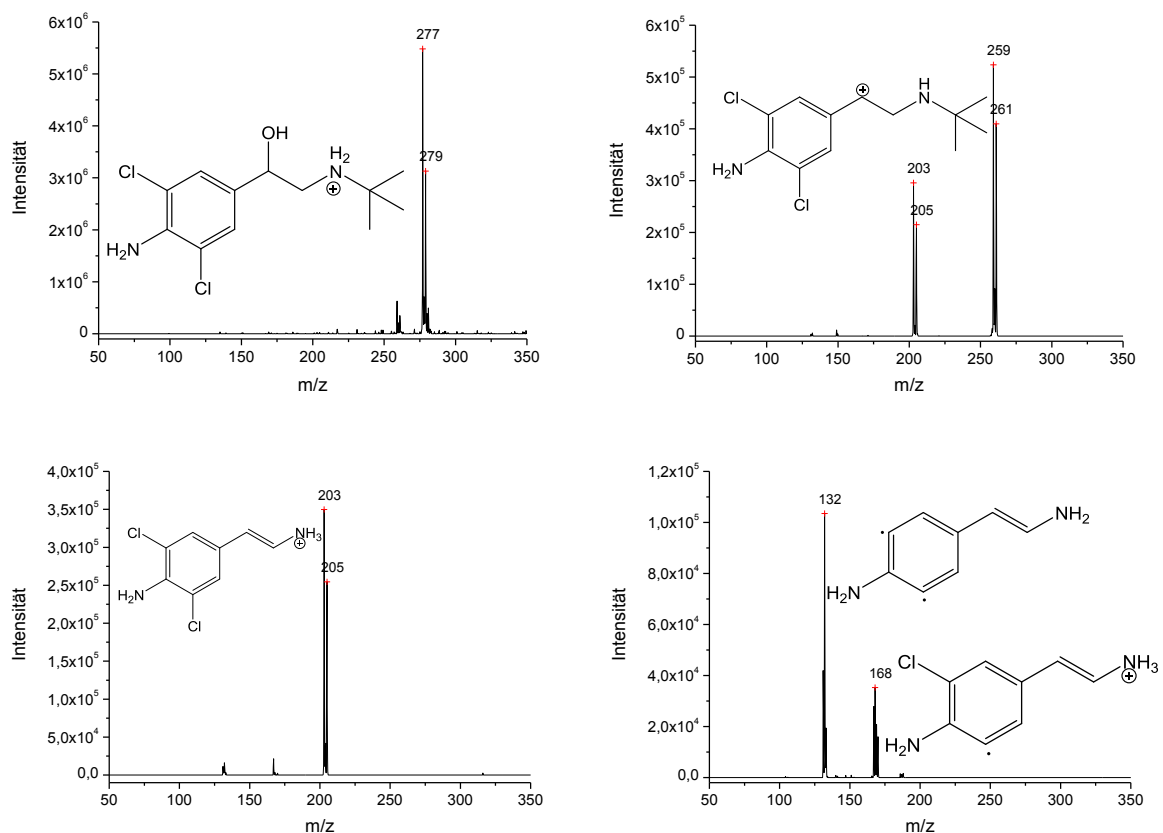


Abbildung 71: Links oben, Fullscan Spektrum einer Untersuchung der sichergestellten weißen Tablette mittels DESI-MS. Rechts oben,  $MS^2$ -Spektrum des  $m/z$ -Bereich 277-279; Links unten,  $MS^3$ -Spektrum des  $m/z$ -Bereich 203-205; Rechts unten  $MS^4$ -Spektrum des  $m/z$ -Bereich 203-205.

Da die untersuchte Tablette im Bereich der Bodybuilding-Szene sichergestellt wurde, konnte die Substanz anhand ihrer Massenspektren und des Isotopenmusters als Clenbuterol identifiziert werden. Vergleichsmessungen mit der Referenzsubstanz konnten die Identifizierung bestätigen. Dieses Ergebnis zeigt, dass NMR-Experimente nicht geeignet sind niedrig konzentrierte Wirkstoffgehalte in Tabletten nach zu weisen. Weiterhin konnte durch diese Untersuchung ein Fehler in dem angewendeten GC-MS Verfahren identifiziert werden.

### 5.3.1.2 Steckkapseln

Bisher wurde gezeigt, dass für die Untersuchung von Tabletten mit oder ohne Beschichtung keine extra Probenvorbereitungen für die DESI-MS Messungen notwendig sind. In diesem Abschnitt sollte untersucht werden ob dies auch für die Analyse von Steckkapseln zutrifft.

Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Tramadol-Präparate, die jeweils in Steckkapseln vorliegen, mittels DESI-MS untersucht. Es zeigte sich, dass mit keinem der folgenden Lösemittelgemische ein Durchdringen der Steckkapsel möglich war.

- Tetrahydrofuran / Wasser (75:25)
- Isopropanol / Wasser (75:25)
- Aceton / Wasser (75:25)
- Acetonitril / Wasser (75:25)

Es konnte lediglich eine gewisse Verformung der Steckkapsel beobachtet werden (siehe Abbildung 72).

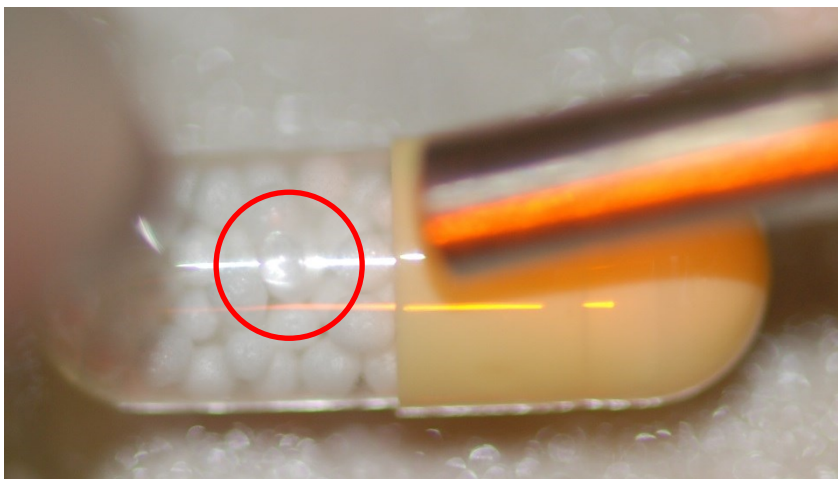


Abbildung 72: Tramadol Retardkapsel AbZ unter dem DESI-Spray. Im roten Kreis ist eine Verformung der Oberfläche erkennbar.

Bei den Versuchen die Steckkapsel mittels DESI-Spray zu durchdringen konnte bei der Steckkapsel von *Tramadol ratiopharm* der Wirkstoff auf der Außenseite der Steckkapsel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 73).

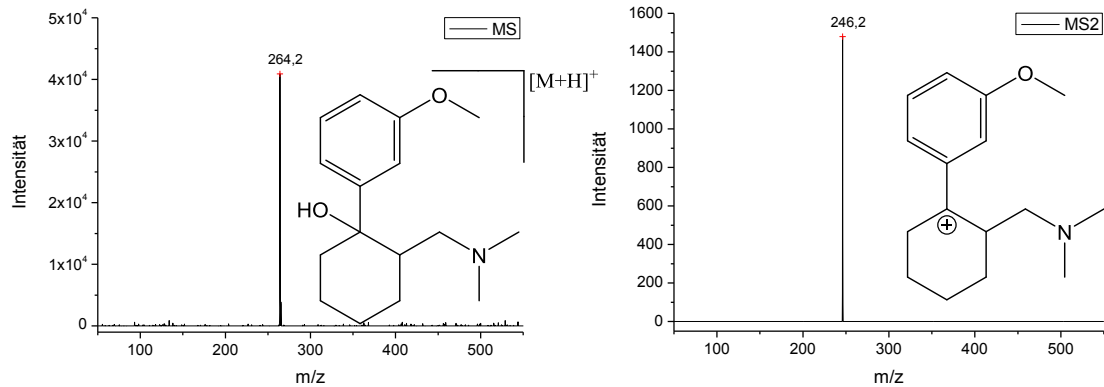


Abbildung 73: DESI-MS Spektren die auf der Außenseite der ungeöffneten Hartkapsel *Tramadol ratiopharm* gemessen wurden; Links, Fullscan-Spektrum; Rechts, MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 284,2.

Bei der Steckkapsel der Firma *AbZ* war dies nicht möglich. Ein öffnen der Kapseln zeigte, dass in der Steckkapsel von *AbZ* granuliertes Material vorhanden war und in der Steckkapsel von *ratiopharm* ein Pulver (siehe Abbildung 74).

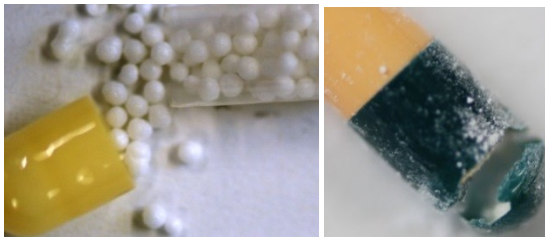


Abbildung 74: links geöffnete Tramadol Steckkapsel der Firma *AbZ*; rechts geöffnete Steckkapsel der Firma *ratiopharm*.

Das bedeutet, dass bei der Herstellung der Steckkapseln der Firma *ratiopharm* Wirkstoff, wahrscheinlich bei der Befüllung der Kapseln, an der Außenseite haften geblieben ist. Zur Überprüfung ob die Verwendung von Pulvern in Steckkapseln immer zu einer Kontamination an der Außenseite führt wurden weitere Steckkapseln untersucht. Dabei handelte es sich um folgende zwei Hartkapseln (siehe Abbildung 75): *Fluconazol-ratiopharm* (mit Pulver gefüllt) und *Furosemid AbZ Retardkapseln* (mit granuliertem Material gefüllt).



Abbildung 75: geöffnete Fluconazol-Hartkapsel der Firma *ratiopharm* (links); geöffnete Furosemid-Hartkapsel der Firma *AbZ* (rechts).

Bei beiden Steckkapseln konnte mittels DESI-MS Analyse kein Wirkstoff auf der Außenseite der Kapseln nachgewiesen werden. Nach dem Öffnen der Kapseln war eine Identifizierung der Wirkstoffe möglich (siehe Abbildung 76 und Abbildung 77).

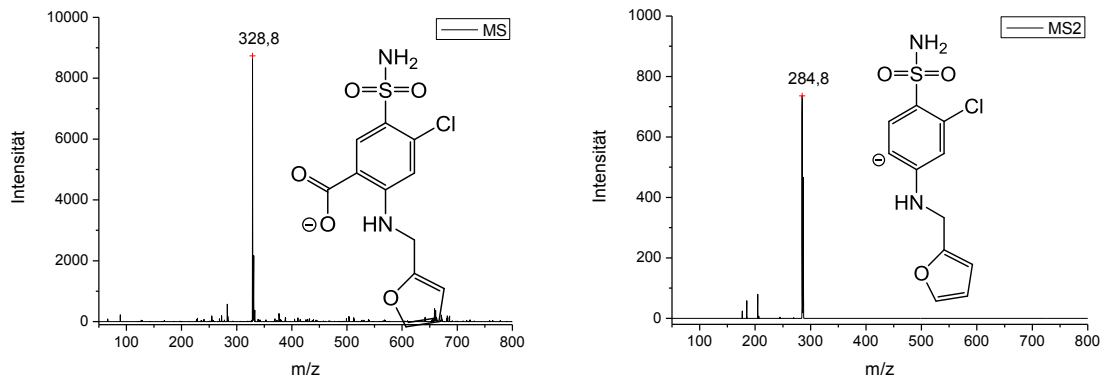


Abbildung 76: DESI-MS Spektren die nach Öffnen der Hartkapsel *Furosemid AbZ* gemessen wurden; Links, Fullscan-Spektrum; Rechts, MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 328,8.

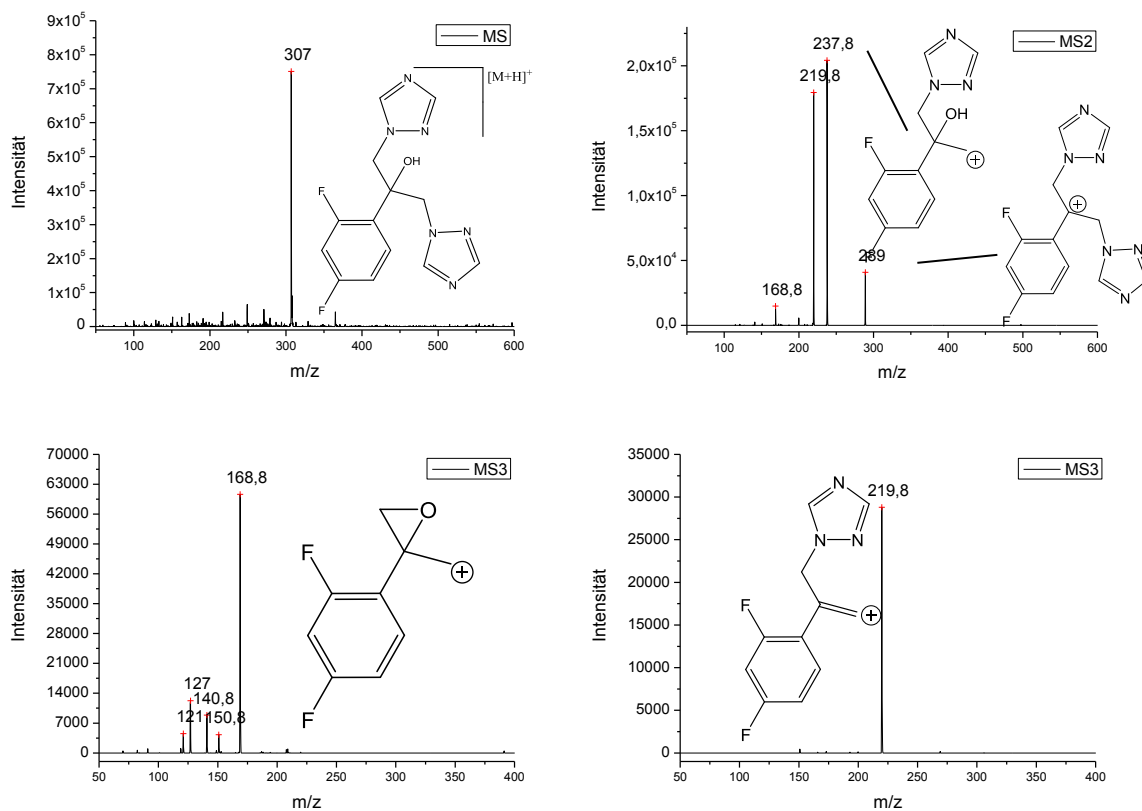


Abbildung 77: DESI-MS Spektren die nach Öffnen der Hartkapsel *Fluconazol-ratiopharm* gemessen wurden; Links oben, Fullscan-Spektrum; Rechts oben, MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 307; Links unten, MS<sup>3</sup>-Spektrum (307→238→); Rechts unten, MS<sup>3</sup>-Spektrum (307→289→).

### 5.3.2 Diskussion

Wie in der Einführung erwähnt sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern unterschiedliche Arzneimittelzubereitungen direkt mittels DESI-MS analysierbar sind. Die Untersuchungen zeigten, dass Tabletten ohne weitere Probenvorbereitung mittels DESI-MS analysiert werden können. Dabei spielte es keine Rolle ob eine Beschichtung vorhanden war

oder nicht, da diese mit dem DESI-Spray entfernt werden konnte. Die Untersuchung von Steckkapseln ergab, dass diese nicht mittels DESI-Spray durchdrungen werden konnten. Allerdings konnte bei der Analyse der Außenseite auf manchen Steckkapseln, die mit Pulver befüllt sind, der Wirkstoff nachgewiesen werden. Bei weiteren Darreichungsformen (Pflaster, Gele und Tropfen) war die Wirkstoffidentifizierung mittels DESI-MS ebenfalls möglich. Experimente mit Tabletten, die einen sehr geringen Wirkstoffgehalt aufweisen, zeigten, dass DESI-MS Messungen auch für den Nachweis im Spurenbereich verwendet werden können.

### **5.4 Vergleich verschiedener Massenspektrometer**

In diesem Kapitel soll untersucht werden, welchen Einfluss unterschiedliche Massenspektrometer auf DESI-MS Messungen von forensischen Materialien haben. Zu diesem Zweck wurde die DESI-Quelle der Firma *Prosolia* auf drei verschiedenen Massenspektrometern installiert und Vergleichsmessungen durchgeführt. Dabei handelt es sich um folgende Massenspektrometer:

1. HCT+ der Firma *Bruker*
2. AmaZon speed der Firma *Bruker*
3. micrOTOF-Q der Firma *Bruker*

Für die Installation der DESI-Quelle auf den Massenspektrometern 2 und 3 war ein Adapter notwendig, da das Einlasssystem dieser Massenspektrometer im Vergleich zum Massenspektrometer 1 verändert wurde. Eine Abbildung der Kopplung der DESI-Quelle an die drei Massenspektrometer ist in Abbildung 78 zu sehen.



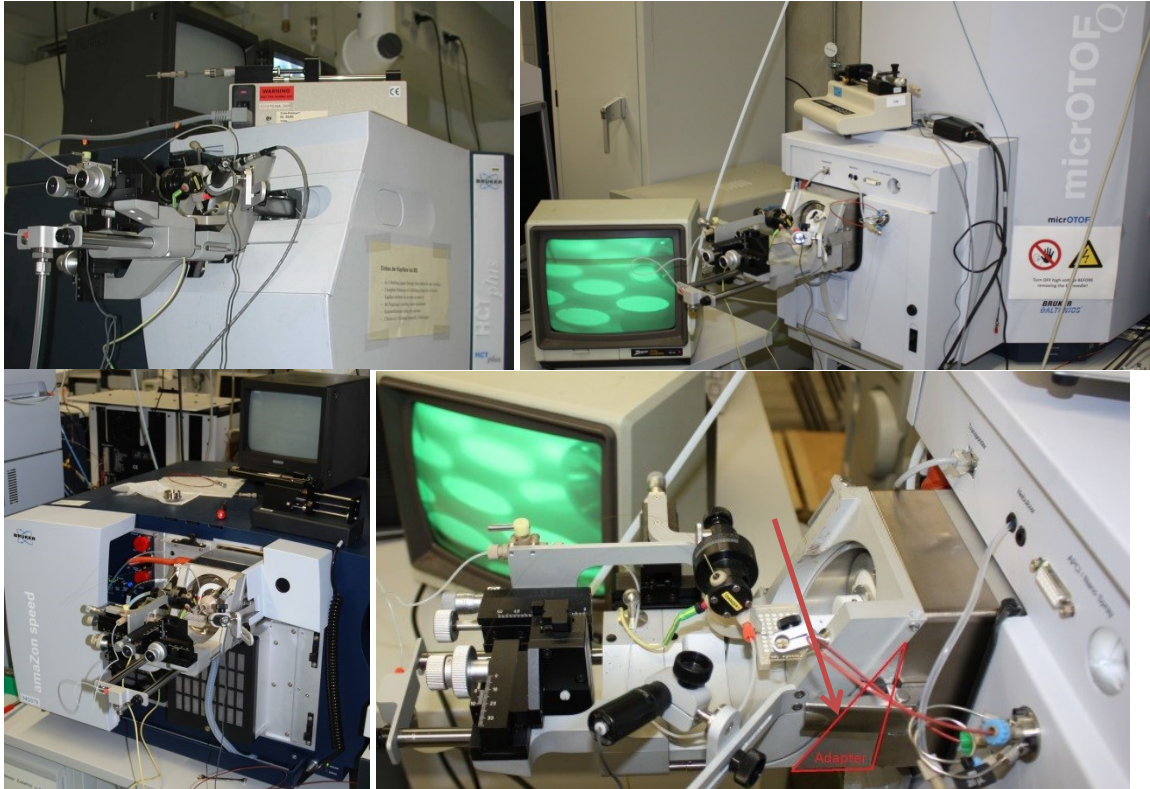


Abbildung 78: Abbildungen der DESI-MS Kopplungen. Oben links, Kopplung HCT+; Oben rechts, Kopplung microTOF-Q; Unten links, Kopplung Amazon; Unten rechts Vergrößerung der Kopplung microTOF-Q.

Bei den Massenspektren 1 und 2 handelt es sich jeweils um eine sphärische Ionenfalle. Das Massenspektrometer 3 ist ein Flugzeitmassenspektrometer und besitzt, im Gegensatz zu den Ionenfallen, eine genügend hohe Auflösung um Exaktmassen und aus diesen die Summenformeln zu ermitteln. Allerdings ist es bei dem Flugzeitmassenspektrometer nicht möglich multidimensionale Massenspektren zu generieren (siehe Kapitel 3.3.2).

Für die Vergleichbarkeit der Messungen wurden die geometrischen Parameter der DESI-Quelle jeweils konstant gehalten (siehe 4.6). Erste Messungen wurden jeweils mit den Standardeinstellungen des jeweiligen Massenspektrometers durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial wurden verschiedene Lösungen von Aminoalkylindolen, Kräutermischungen und ölige Zubereitungen verwendet.

Bei den Messungen mittels des Massenspektrometers *Amazon speed* zeigte es sich, dass im Gegensatz zu den Messungen mittels Massenspektrometer *HCT+*, bei Fragmentierungsexperimenten das Mutterion nicht vollständig fragmentiert werden konnte. Erst eine Erhöhung des Fragmentierungs-Amplifier (ein Wert, der beschreibt, ob die Standardfragmentierungsspannung erhöht oder erniedrigt wird) führte zu denselben Fragmentierungsmustern. Eine Identifizierung der Substanzen mittels der angelegten DESI/ESI-Spektren Datenbank war erst

danach möglich. In Abbildung 79 sind die unterschiedlichen Fragmentierungsmuster von JWH-007 dargestellt.

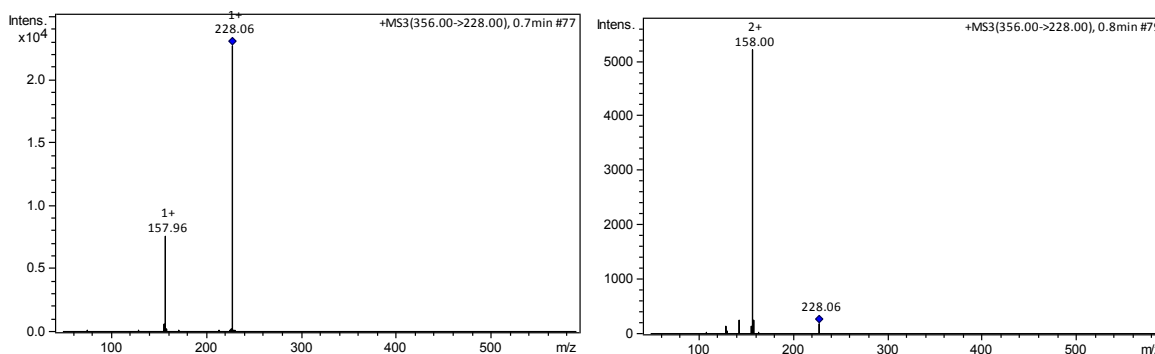


Abbildung 79: MS<sup>3</sup>-Spektren der Substanz JWH-007. Links mit Grundeinstellungen; Rechts mit manuellem erhöhtem Amplifier. Die Spektren wurden mit der an das Massenspektrometer 2 gekoppelten DESI-Quelle durchgeführt.

Bei Messungen im Auto-MS<sup>n</sup> Modus traten dieselben Schwierigkeiten auf. Hier war eine manuelle Anpassung der Fragmentierungsspannung über einen Amplifier nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Grundeinstellungen des Geräts verändert. Die Grundeinstellungen für Fragmentierungsexperimente am Massenspektrometer *Amazon speed* sind in Tabelle 79 angegeben. In derselben Tabelle sind auch die Grundeinstellungen des Massenspektrometers *HCT+* aufgeführt. Die Parameter bedeuten dabei Folgendes: Innerhalb der Fragmentierungsdauer wird die Fragmentierungsspannung in einem Bereich, der durch den Start- und Endwert des Amplifiers definiert ist, verändert und jeweils die Restintensität des Mutterion detektiert. Die Fragmentierungsspannung, bei der die Intensität des Mutterion am geringsten ist, wird für die Messung verwendet.

Tabelle 79: Grundwerte der Fragmentierungseinstellungen der Massenspektrometer 1 (HCT+) und 2 (Amazon speed), sowie die angepassten Parameter des Massenspektrometers 2.

Parameter	Amazon	HCT+	Amazon angepasst
Startwert Amplifier	80%	30%	40%
Endwert Amplifier	120%	200%	250%
Fragmentierungsdauer	20 ms	40 ms	40 ms
Fragmentierungsspannung	0,8 V	1,0 V	1,0 V

Mit den in Tabelle 79 angegebenen angepassten Fragmentierungseinstellungen konnte auch bei Verwendung des Auto-MS<sup>n</sup> Modus dieselben Fragmentierungsmuster wie bei dem Massenspektrometer *HCT+* erhalten werden (siehe Abbildung 80).

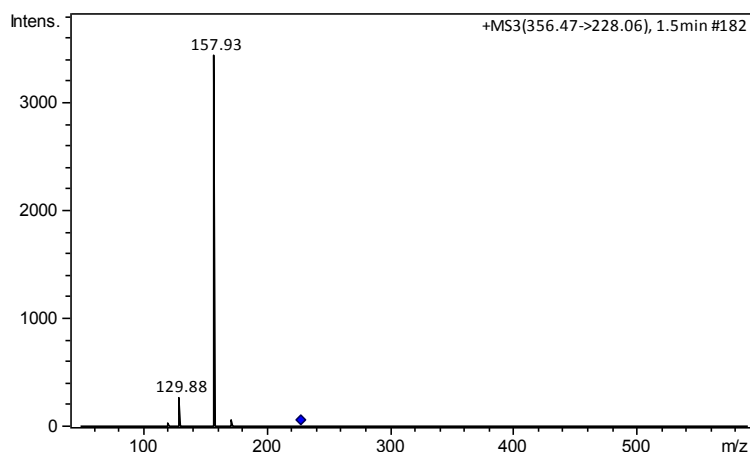


Abbildung 80: MS<sup>3</sup> Spektrum der Substanz JWH-007 gemessen im Auto-MS<sup>n</sup> Modus mit angepassten Fragmentierungseinstellungen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit der an das Massenspektrometer 2 gekoppelten DESI-Quelle.

Diese Übereinstimmung MS<sup>n</sup>-Spektren ist wichtig, damit die erstellte Spektren-Datenbank auf beiden Massenspektrometern genutzt und erweitert werden kann. Durch die Veränderung der Parameter geht allerdings ein Vorteil des Massenspektrometers *Amazon speed*, die schnellere Fragmentierung und somit mehr Messpunkte pro Zeit, verloren.

Die beschriebenen Unterschiede in der Fragmentierung traten jedoch nicht bei allen untersuchten Aminoalkylindolen auf. Unter anderem bei den Substanzen AM-2233 und AM-1220 wurden mit den Grundeinstellungen am Massenspektrometer *Amazon speed* dieselben Fragmentierungsmuster wie am Massenspektrometer *HCT+* erhalten. Das liegt vermutlich daran, dass die Struktur dieser beiden Substanzen anders (siehe Abbildung 81), als die der restlichen untersuchten Aminoalkylindole, ist und eine Fragmentierung somit leichter möglich ist.

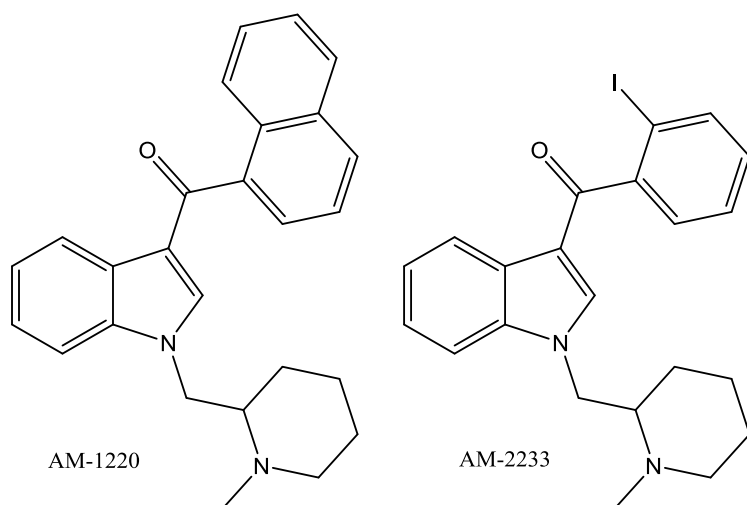


Abbildung 81: Struktur der Aminoalkylindole AM-1220 und AM-2233.

Bei der Untersuchung von in öligen Zubereitungen enthaltenen anabolen Steroiden und weiteren Arzneimitteln konnten keine Unterschiede in den Fragmentierungsmustern der beiden Massenspektrometer erhalten werden.

Für den weiteren Vergleich zwischen den Massenspektrometern *HCT+* und *Amazon speed* wurde die Nachweisgrenze für JWH-018 bei DESI-MS Messungen, einmal auf einer Glastüpfelplatte und einmal auf einer Standard-HPTLC-Platte, bestimmt. Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgte durch jeweils dreimaliges Messen einer Lösung einer definierten Konzentration an JWH-018. Die Konzentration, bei der bei allen drei Messungen das EIC von dem m/z-Wert 342 gerade noch einen eindeutigen Anstieg zwischen Leerprobe und Messprobe aufweist, und bei der MS<sup>2</sup>-Experimente eindeutig das Fragmentierungsmuster von JWH-018 liefern, wird als Nachweisgrenze definiert. In Tabelle 80 sind die so ermittelten Nachweisgrenzen aufgeführt.

Tabelle 80: Nachweisgrenzen für DESI-MS Untersuchungen von JWH-018 auf unterschiedlichen Oberflächen und mittels verschiedener Massenspektrometer.

Massenspektrometer	HPTLC-Platte	Glastüpfelplatte
HCT+	800 pg	24 pg
Amazon speed	24 pg	0,1 pg

In der Abbildung 82 ist das EIC der DESI-Amazon Messung an der Nachweisgrenze von JWH-018 auf einer Glastüpfelplatte gezeigt und in Abbildung 83 sind die dazugehörigen Massenspektren dargestellt. In dem linken Massenspektrometer kann deutlich der m/z-Wert 342 erkannt werden, der in dem Hintergrundspektrum (rechtes Spektrum) nicht zu erkennen ist.

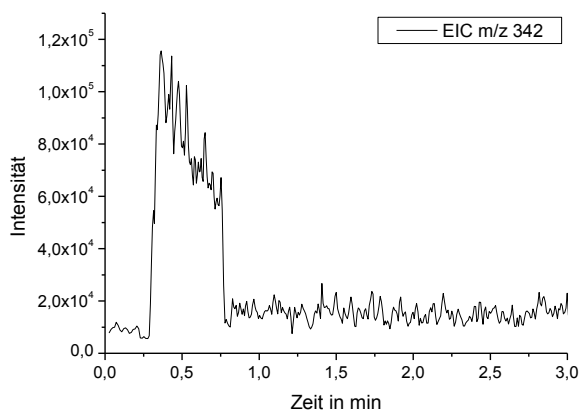


Abbildung 82: EIC des m/z-Wert 342 einer Probe JWH-018 auf einer Glastüpfelplatte, gemessen mit der an das Amazon gekoppelten DESI-Quelle.

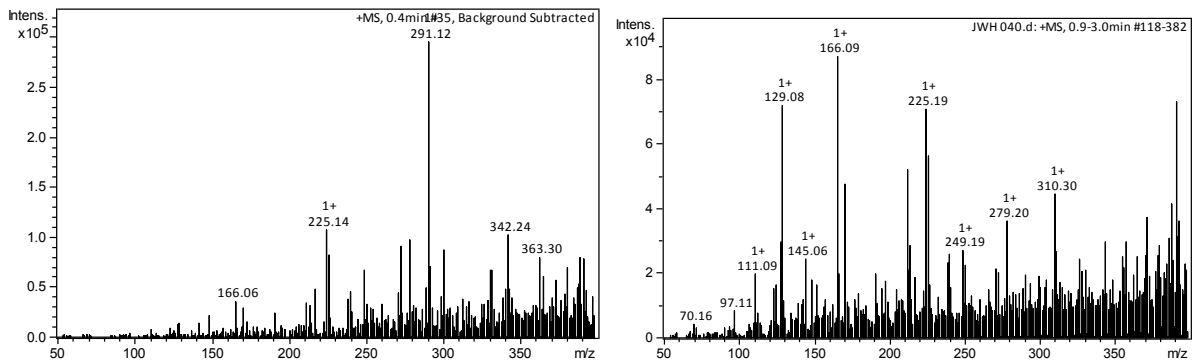


Abbildung 83: links, hintergrundkorrigiertes Massenspektrum bei 0,5 min des in Abbildung 82 zu sehenden EIC's; rechts, Summenmassenspektrum von 1,0 – 3,0 Minuten des in Abbildung 82 zu sehenden EIC's.

Wie den Nachweisgrenzen zu entnehmen ist, ist das Massenspektrometer *Amazon speed* ungefähr 100-mal sensitiver als das Massenspektrometer *HCT+*. Diese Steigerung der Empfindlichkeit ist laut Herstellerangaben auf den Verzicht eines Skimmers und Einführung des *dual ion funnel* zurück zu führen (siehe Kapitel 3.3.2).

Bei dem Massenspektrometer *micrOTOF-Q* handelt es sich wie bereits erwähnt um ein Gerät mit Flugzeitanalysator, das keine  $MS^n$ -Spektren aufnehmen (durch *insource CID* ist die Generation von Spektren ähnlich  $MS^2$ -Spektren möglich), dafür aber die Exaktmasse der untersuchten Substanzen anzeigen kann (siehe 3.3.2). Um die Messung der Exaktmasse zu gewährleisten muss aber eine Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgen. Diese erfolgt für den Massenbereich 50-1000 u mit Natrium-Formiat-Clustern. Da keine Möglichkeit gefunden wurde die Kalibrierung mittels DESI-TOF-MS Messungen durchzuführen wurde die Kalibrierung mittels ESI-TOF-MS Messungen durchgeführt und im Anschluss die DESI-TOF-MS Messungen durchgeführt.

In Abbildung 84 ist ein so erhaltenes Massenspektrum der Substanz Sildenafil dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die m/z-Werte, im Gegensatz zu den Massenspektren, die mit den Massenspektrometern *HCT+* und *Amazon speed* aufgenommen wurden, mit vier Nachkommastellen angegeben werden. Diese Genauigkeit in der Bestimmung des m/z-Werts erlaubt eine Berechnung der Summenformel (siehe 3.3.2). Für diese ist es jedoch notwendig, dass angegeben wird, welche Atome in dem Molekül vorhanden sein können. Bei allen folgenden Berechnungen der Summenformel wurden als mögliche Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel angegeben.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Vergleich verschiedener Massenspektrometer

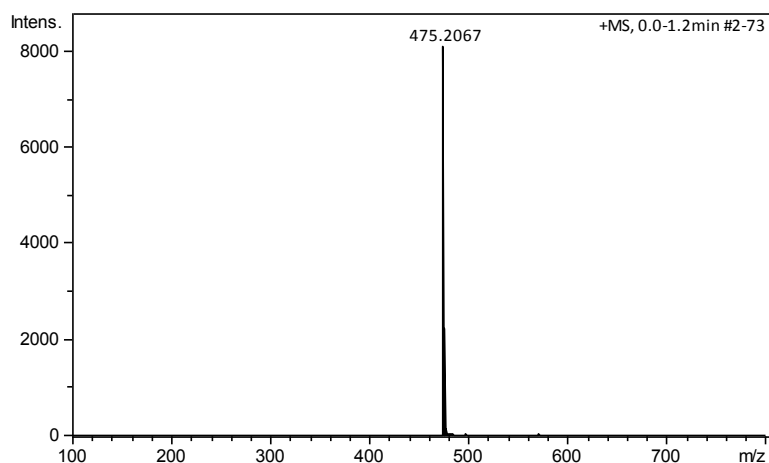


Abbildung 84: DESI-MS Spektrum der Substanz Sildenafil erzeugt an dem Massenspektrometer 3 (micro-TOF-q).

Für das in Abbildung 84 gezeigte  $m/z$ -Verhältnis wurde unter Einbeziehung einer möglichen relativen Massengenauigkeit von 20 ppm Summenformeln berechnet. Dabei ergab sich mit einer Abweichung von 11,5 ppm die Summenformel  $C_{22}H_{31}N_6O_4S$ . Diese Summenformel entspricht der Summenformel von einfach protoniertem Sildenafil. Allerdings wurden für das untersuchte  $m/z$ -Verhältnis noch weitere Summenformelvorschläge berechnet, die teilweise eine niedrigere Abweichung als die korrekte Summenformel aufwiesen. Um abzuschätzen, ob diese niedrige relative Massengenauigkeit normal ist, wurden weitere Substanzen mittels DESI-TOF-MS analysiert und die relativen Massengenauigkeiten bei der Berechnung der korrekten Summenformeln miteinander verglichen (siehe Tabelle 81).

Tabelle 81: Übersicht über die mit Hilfe des mittels DESI-TOF-MS gemessenen  $m/z$ -Wert berechnete Summenformel, sowie deren berechnetem  $m/z$ -wert und die sich ergebende relative Massengenauigkeit.

Substanz	$m/z_{\text{experimentell}}$	Summenformel	$m/z_{\text{berechnet}}$	$\frac{\delta m}{m}$ in ppm
Sildenafil	475,2067	$C_{22}H_{31}N_6O_4S$	475,2122	11,5
JWH-073	328,1642	$C_{23}H_{22}NO$	328,1696	13,5
Tramadol	264,1953	$C_{16}H_{26}NO_2$	264,1958	1,8
JWH-122	356,2009	$C_{25}H_{26}NO$	356,2009	0
JWH-081	372,1963	$C_{25}H_{26}NO_2$	372,1958	1,4
JWH-210	370,2175	$C_{26}H_{28}NO$	370,2165	0,9
JWH-019	356,2030	$C_{25}H_{26}NO$	356,2009	-6,0
Testosteron	289,2195	$C_{19}H_{29}O_2$	289,2162	11,5
T. Propionat	345,2445	$C_{22}H_{33}O_3$	345,2424	-6,1
T. Cypionat	413,3080	$C_{27}H_{41}O_3$	413,3050	-7,3
Methyltestosteron	303,2350	$C_{20}H_{31}O_2$	303,2319	-3,2

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Vergleich verschiedener Massenspektrometer

Substanz	$m/z_{\text{experimentell}}$	Summenformel	$m/z_{\text{berechnet}}$	$\frac{\delta m}{m}$ in ppm
Nortestosteron	275,2043	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	275,2006	-13,6
Vardenafil	489,2173	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	489,2279	21,6
CP47,497-C8	331,2592	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub>	331,2643	-14,1

Beim Vergleich der Massengenauigkeiten ist zu erkennen, dass eine Schwankung zwischen - 3 und +21 ppm auftritt, wobei neun Substanzen einen Wert  $\leq 10$  ppm aufweisen. Aus diesen Werten lässt sich schließen, dass die Kopplung einer DESI-Quelle an ein TOF-MS möglich ist und dass selbst dann belastbare Messwerte ermittelt werden können, wenn die Kalibrierung nicht mittels DESI-TOF-MS sondern ESI-TOF-MS erfolgt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Fehler in der Messung der  $m/z$ -Werte sich noch weiter verringern, wenn eine Möglichkeit gefunden wird das Massenspektrometer mittels DESI-TOF-MS Messungen zu kalibrieren. Eine Verbesserung der relativen Massengenauigkeit führt automatisch dazu, dass weniger möglich Summenformel, für eine experimentell bestimmte Masse, berechnet werden, was zu einer Vereinfachung der Auswertung führt.

Beim Vergleich der Ergebnisse in Tabelle 81 fällt weiterhin auf, dass für die Substanzen JWH-019 und JWH-122 dieselbe Summenformel berechnet wurde. Dies ist auch korrekt, da es sich bei den beiden Substanzen um Regioisomere handelt, die somit dieselbe Summenformel aufweisen. Wie oben bereits erwähnt können mittels TOF-MS keine  $MS^n$ -Spektren generiert werden, allerdings ist es über eine Erhöhung der *collision energy* im Quadrupol möglich Ionen zu fragmentieren (siehe Abbildung 85).

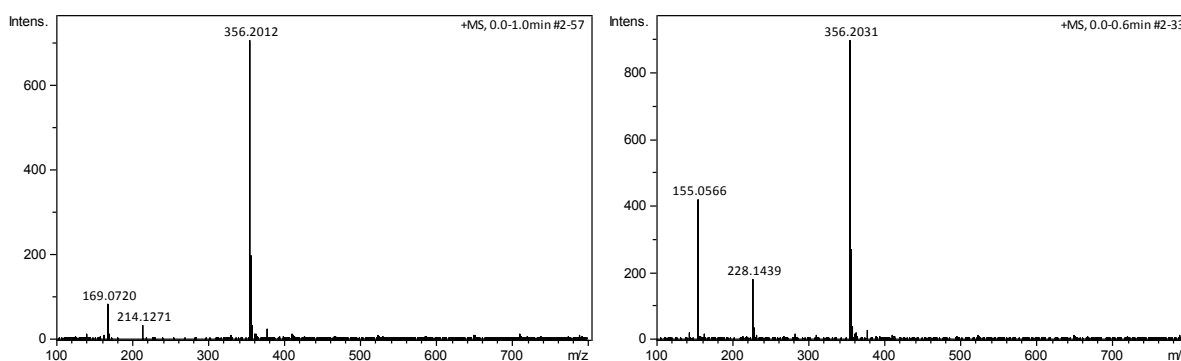


Abbildung 85: DESI-MS Spektren der Substanzen JWH-122 (links) und JWH-019 (rechts) aufgenommen mittels Massenspektrometer 3 bei einer *collision energy* von 40 eV.

Diese Fragmentation ist allerdings nicht vollständig und generiert auch nur Signale, die  $MS^2$ -Spektren entsprechen. Die Unterscheidung von JWH-019 und JWH-122 ist durch diese Mes-

sung aber möglich, da sich die  $MS^2$ -Fragmente unterscheiden (siehe Tabelle 111 und Abbildung 85). Eine Unterscheidung zwischen JWH-019 und JWH-007 wäre aber mittels DESI-TOF-MS Messungen nicht mehr möglich, da hier erst Unterschiede in den  $MS^3$ -Fragmenten auftreten. Aus demselben Grund war eine Unterscheidung der unterschiedlichen Trime-thoxyamfetamine, im Gegensatz zur DESI-IT-MS, mittels DESI-TOF-MS auch nicht möglich.

Bei der Untersuchung von Realproben konnte gezeigt werden, dass der Massenanalysator wie erwartet keine Auswirkungen auf die Untersuchbarkeit der Proben besitzt (die Untersuchbarkeit wird vor allem durch die Ionisierungsquelle bestimmt). So konnten Kräutermischungen direkt (siehe Abbildung 86 a), ölige Zubereitungen (siehe Abbildung 86 b) und Tabletten (siehe Abbildung 86 c) mittels DESI-TOF-MS analysiert werden.

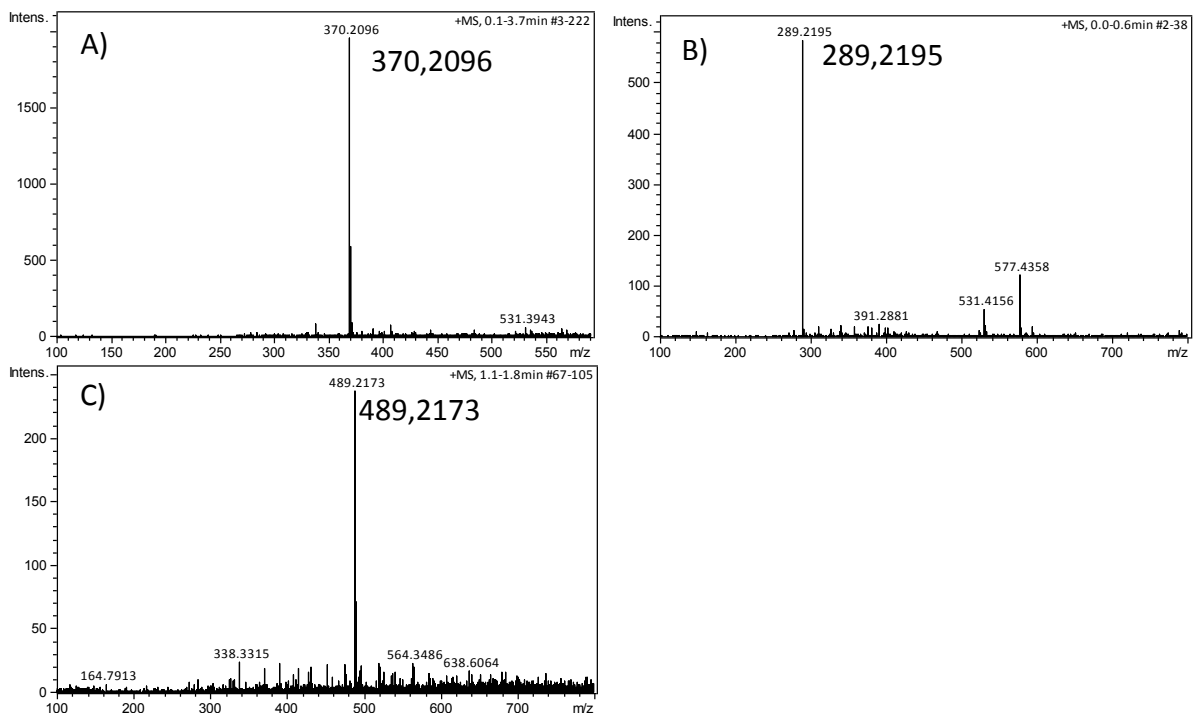


Abbildung 86: DESI-MS Spektren aufgenommen mittels des Massenspektrometers micrOTOF-Q. A) direkte Analyse (siehe Kapitel 5.1.3.1) der Kräutermischung *Welcome Las Vegas*; b) Analyse einer Probe Testogel der Firma *Jenapharm*; c) Analyse einer Levitra-Tablette.

Bei der Analyse der öligen Zubereitung Sustanon 250 zeigte sich, dass mit DESI-TOF-MS Messungen auch mehr als eine Substanz in einer Probe gemessen werden können (siehe Abbildung 87).



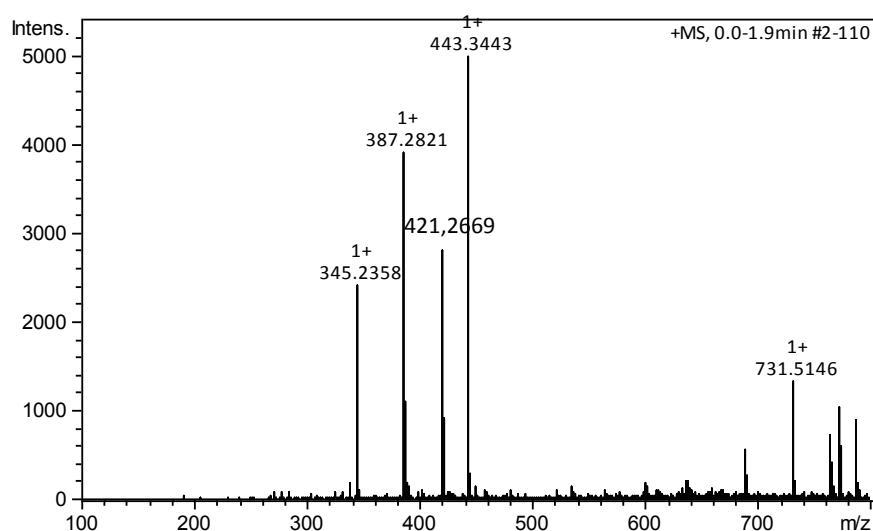


Abbildung 87: DESI-MS Spektrum der öligen Zubereitung Sustanon 250, gemessen mittels micro-TOF-q.

Eine Auswertung der  $m/z$ -Werte der Messung der Probe Sustanon 250 ergab die in Tabelle 82 aufgeführten Summenformeln und die dazu gehörigen Substanzen. Die Zuordnung der Substanzen ist jedoch nur möglich, da das Wissen vorhanden ist, dass es sich bei der untersuchten Probe um eine Sicherstellung aus der Bodybuilding-Szene handelt. Nur mit einer DESI-TOF-MS Analyse wäre die Identifizierung nicht eindeutig gewesen, da zu einer Summenformel unterschiedliche Strukturformeln gehören können.

Tabelle 82: Übersicht über die mit Hilfe des mittels DESI-TOF-MS gemessenen  $m/z$ -Wert berechnete Summenformel, sowie deren berechnetem  $m/z$ -wert und die sich ergebende relative Massengenauigkeit der Probe Sustanon 250.

Substanz	$m/z_{\text{experimentell}}$	Summenformel	$m/z_{\text{berechnet}}$	$\frac{\delta m}{m}$ in ppm
T. Propionat	345,2358	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>	345,2424	19,3
T. Isocaproat	387,2821	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> O <sub>3</sub>	387,2894	-18,7
T. Phenylpropionat	421,2669	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> O <sub>3</sub>	421,2737	16,2
T. Decanoat	443,3443	C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	443,3520	-17,3

An dieser Probe kann auch wieder gezeigt werden, warum  $MS^n$ -Spektren wichtig sind. Über die Erhöhung der Transferspannung kann zwar das Testosteronsignal im Spektrum identifiziert werden, es kann aber keine Zuordnung zu den vier in der Probe vorkommenden Substanzen getroffen werden. Wodurch keine Verknüpfung des Testosteronsignals mit einer oder mehrerer der vier in der Probe vorkommenden Substanzen möglich ist.

Abschließend lässt sich zum Vergleich der drei Massenspektrometer folgendes sagen. Die Unterschiede zwischen den beiden Ionenfallenmassenspektrometern liegen nur in der Nachweisgrenze. Alle wesentlichen Merkmale, wie die Fragmentierung und die Ionisierung sind identisch. Bei Verwendung des micro-TOF-q-Massenspektrometers können zwar exakte Massen und aus diesen Summenformeln berechnet werden, aber es gibt keine Substanzen oder Proben, die mittels DESI-TOF-MS nachgewiesen werden konnte, die nicht auch mittels DESI-IT-MS analysiert werden konnte. Im Gegenteil, mittels DESI-TOF-MS konnten einige Substanzen nicht identifiziert werden, da die Möglichkeit  $MS^n$ -Spektren zu erzeugen nicht gegeben ist. Aus diesen Gründen wird die Kopplung der DESI-Quelle an ein Ionenfallenmassenspektrometer für die Beantwortung von forensischen Fragestellungen bevorzugt, da die exakte Masse, bestimmt durch TOF-MS Messungen, keinen Zugewinn in der Identifizierung liefert. Anders wäre wahrscheinlich eine Kopplung der DESI-Quelle an ein Orbitrap- oder FT-ICR-Massenspektrometer zu beurteilen, da dort die Möglichkeit besteht die exakte Masse zu bestimmen und  $MS^n$ -Experimente durchzuführen.

### 5.5 Vergleich von DESI und APCI (Direct Probe)

Bei der Direct Probe Technik handelt es sich um ein patentiertes Verfahren der Firma *Bruker Daltonic* feste Substanzen direkt-massenspektrometrisch zu analysieren. Dabei werden nicht flüchtige Substanzen thermisch in eine *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) Quelle desorbiert und dort ionisiert. Die thermische Desorption erfolgt dabei mittels des in der API-Quelle integrierten Heizers bei Temperaturen von ungefähr 350 °C. Die Probenzufuhr erfolgt über eine Glaskapillare, die in die API-Quelle eingeführt wird. In Abbildung 88 ist die beschriebene API-Quelle mit Direct Probe-Aufsatz dargestellt.

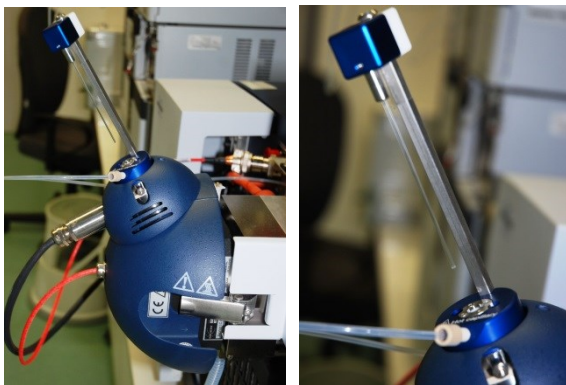


Abbildung 88: Auf dem Amazon MS montierte API-Quelle mit Direc Probe-Aufsatz (links). Vergrößerung des Direct Probe-Aufsatz (rechts).

Da mittels Direct Probe, wie bei der DESI, die Möglichkeit besteht Feststoffe direkt-massenspektrometrisch zu untersuchen, sollte ein Vergleich der beiden Techniken durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden Messungen mittels Direct Probe (Parameter und Durchführung siehe Kapitel 4.6) und mittels DESI, beide gekoppelt an das Amazon Massenspektrometer, durchgeführt. Bei den Direct Probe Messungen konnte immer ein sehr schneller starker Anstieg in dem MS-Signal beobachtet werden, der von einem ebenso schnellen Abfall gefolgt wurde (siehe Abbildung 89). Die dabei extrem hohen Signalintensitäten von teilweise  $1 \times 10^{10}$  führten des Öfteren zu einer Kontamination der APCI-Quelle und des Massenspektrometers. Der Versuch noch weniger Substanz auf die Glasstäbe aufzutragen, um dadurch die Überladung des Systems zu verhindern, war nicht erfolgreich, da eine exakte Probenahme mittels der Glasstäbe nicht möglich ist.

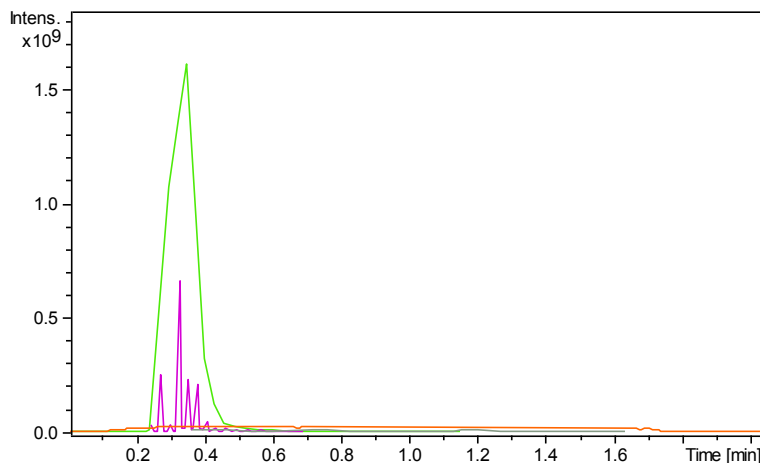


Abbildung 89: Zeitlicher Verlauf des BPC (grün) und des TIC-MS<sup>n</sup> (lila) einer Direct Probe Messung von Testosteron.

Bei den Untersuchungen konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Ionisierung der Ammonoalkylindole bei beiden Techniken unterschiedlich verläuft, da bei den Direct Probe Messungen die Substanzen nicht als  $[M+H]^+$  sondern als  $M^+$  detektiert wurden (siehe Abbildung 90). Durch die unterschiedliche Ionisierung erfolgte auch eine komplett unterschiedliche Fragmentierung (siehe Abbildung 90).

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Vergleich von DESI und APCI (Direct Probe)

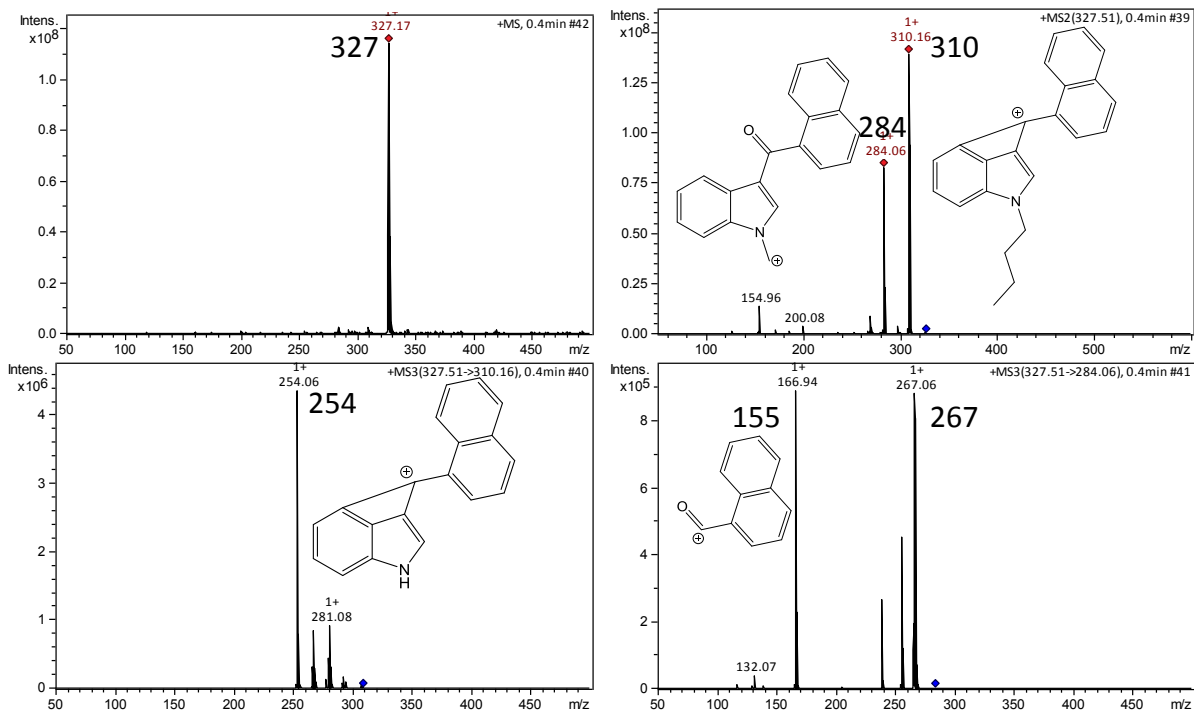


Abbildung 90: Direct Probe Massenspektren der Substanz JWH-073. Fullscan-Spektrum (links oben), MS<sup>2</sup>-Spektrum (rechts oben), MS<sup>3</sup>-Spektrum des m/z-Wert 310 (links unten), MS<sup>3</sup>-Spektrum des m/z-Wert 284 (rechts unten).

Die Massenspektren die mittels Direct Probe erhalten werden können somit nicht mittels der erstellten DESI/ESI Spektren-Datenbank identifiziert werden. Das erhaltenen Molekülion und die zugehörigen Fragmente können aber mit EI-Spektren der Substanzen verglichen werden (siehe Abbildung 83).

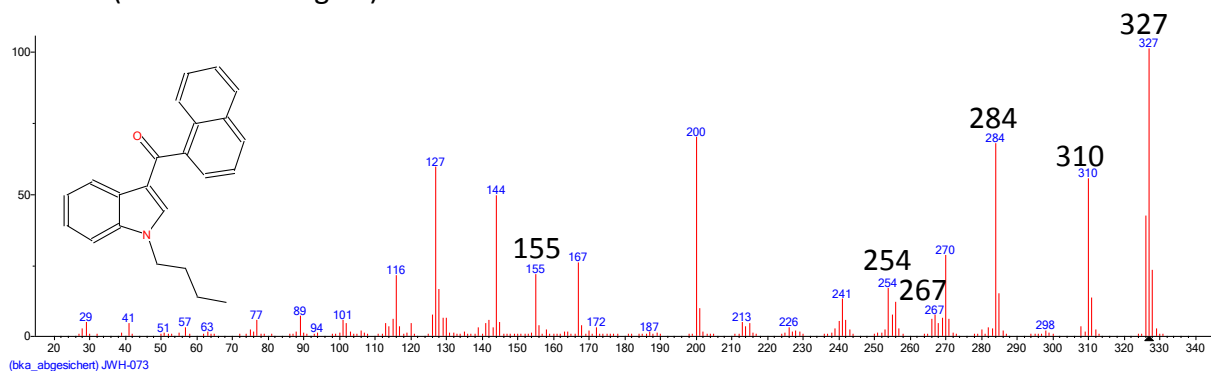


Abbildung 91: EI-Spektrum der Substanz JWH-073.

Bei der Interpretation der erhaltenen Direct Probe-Spektren von Aminoalkylindolen fällt auf, dass bei vielen der untersuchten Substanzen (z.B. JWH-073, JWH-210, JWH-122, JWH-081, JWH-072) aus dem Molekülion eine Abspaltung mit einer Massenzahl von 17 erfolgt. Diese kann durch eine Dehydroxylierung erklärt werden. Problematisch an dieser Erklärung ist, dass nicht geklärt werden kann, wo das Proton für die Protonierung des Keto-Sauerstoffs herkommt. Theoretisch denkbar wären dabei Protonen aus der Seitenkette des Indolstick-

stoffs, Protonen aus dem Aromaten des Indolsystems oder aus dem Aromaten des Naphtylsystems (siehe Abbildung 92).

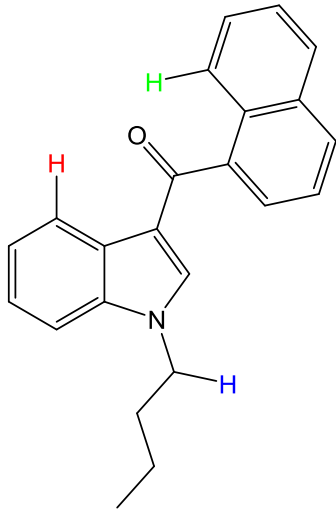


Abbildung 92: Struktur von JWH-073 mit den möglichen Protonen für den Transfer auf den Sauerstoff der Keto-Gruppe.

Mit der Auswertung von GC-MS Spektren von verschiedenen Derivaten von Aminoalkylindolen konnte der Protonentransfer aus der Seitenkette der Indolstickstoffes ausgeschlossen werden. Da Verbindungen, die keine Seitenkette aufweisen, dennoch eine Abspaltung der Hydroxylgruppe aufweisen (siehe Abbildung 93 und Abbildung 94).

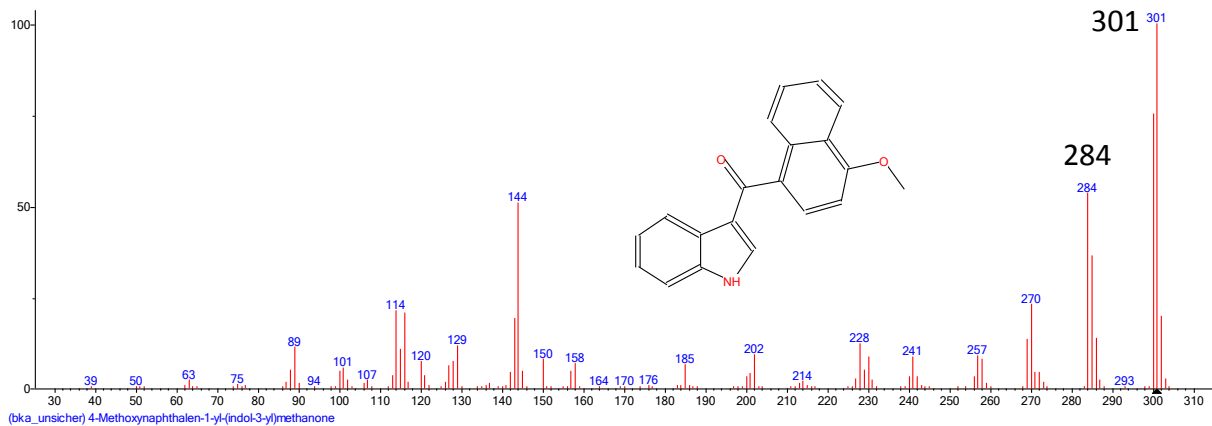


Abbildung 93: EI-Spektrum der in dem Spektrum dargestellten Modifikation der Substanz JWH-081.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Vergleich von DESI und APCI (Direct Probe)

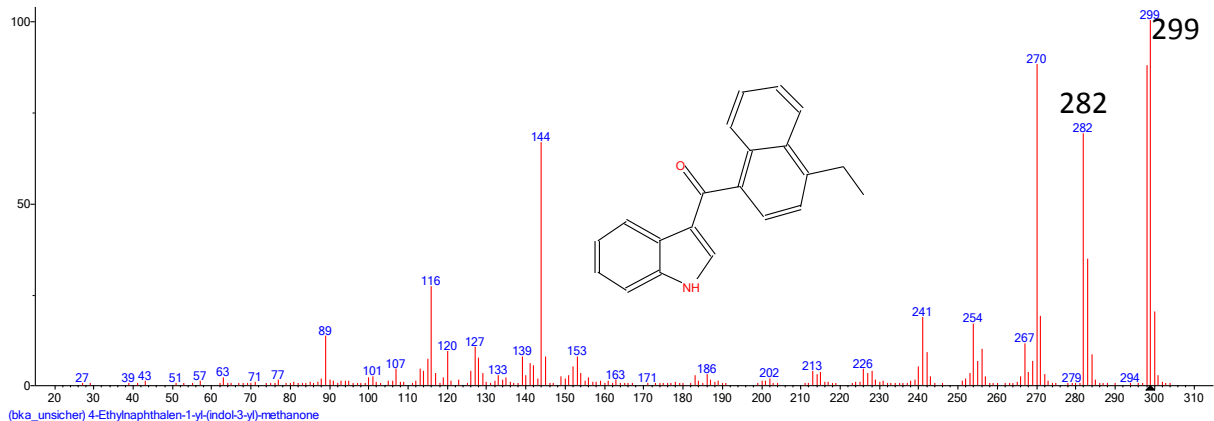


Abbildung 94: EI-Spektrum der in dem Spektrum dargestellten Modifikation der Substanz JWH-210.

Für die Aufklärung, welches Proton, aus welchem Aromaten, für die Abspaltung als Hydroxy-Gruppe verwendet wird, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Diese konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da eine eindeutige Beantwortung der Fragestellung nur mit radioaktiv markierten Molekülen möglich ist.

Bei der Untersuchung von anabolen Steroiden viel auf, dass die Ionisierung in der Direct Probe-Quelle gemischt ist. So traten bei der Untersuchung von Testosteron zwei  $m/z$ -Werte, einer bei 288 ( $M^{++}$ ) und einer bei 289 ( $[M+H]^+$ ), auf (siehe Abbildung 96). Die Fragmentierung der beiden  $m/z$ -Werte ergeben ebenfalls unterschiedliche Massenspektren (siehe Abbildung 96), wobei die des  $m/z$ -Wert 289 der Fragmentierung bei DESI-MS Messungen entspricht (siehe Abbildung 95). Diese Mischionisierung konnte auch bei weiteren anabolen Steroiden beobachtet werden.

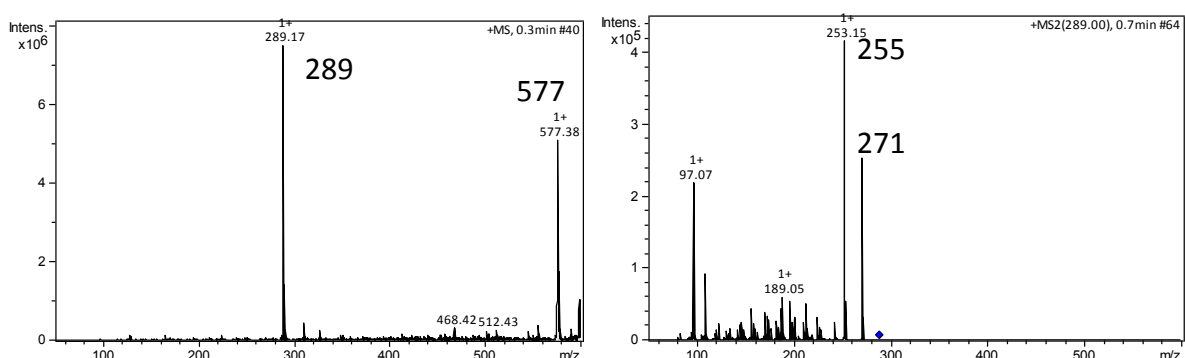


Abbildung 95: DESI-MS Spektrum von Testosteron (links) und zugehöriges  $MS^2$ -Spektrum (rechts).

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Vergleich von DESI und APCI (Direct Probe)

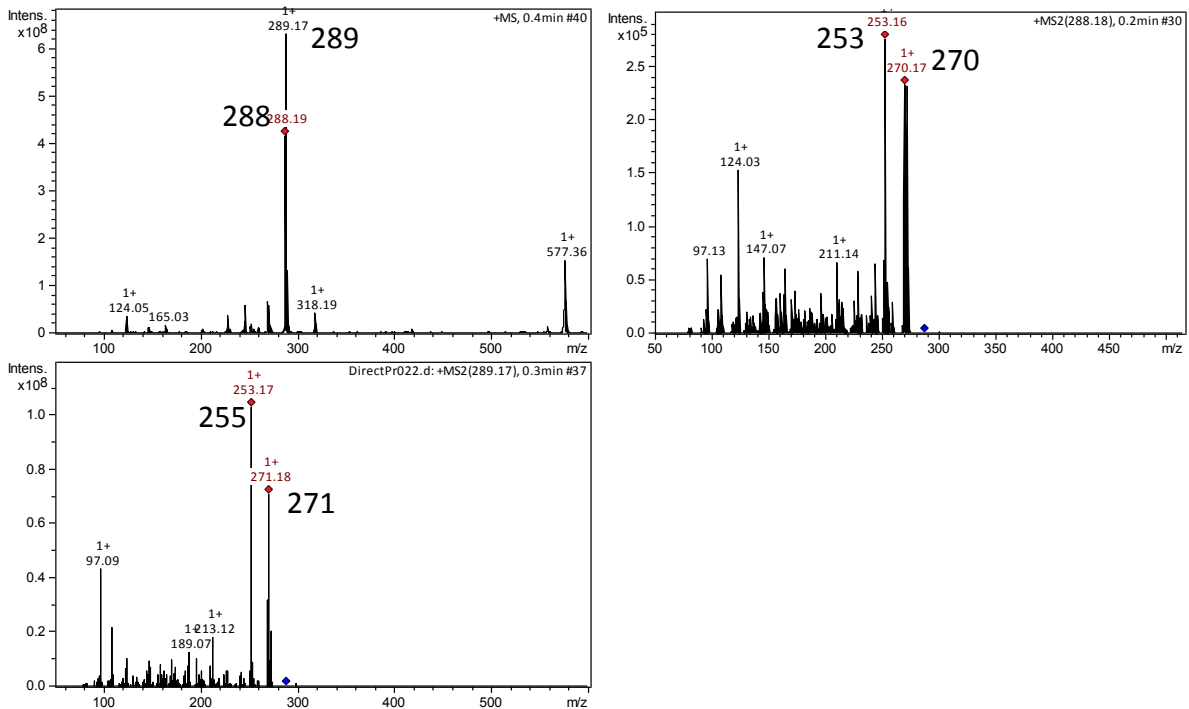


Abbildung 96: Direct Probe Massenspektren der Substanz Testosteron. Fullscan-Spektrum (links oben),  $MS^2$ -Spektrum des  $m/z$ -Wert 288 (rechts oben),  $MS^2$ -Spektrum des  $m/z$ -Wert 289 (links unten).

Weiterhin sollte anhand der Untersuchungen von anabolen Steroiden geklärt werden, wie sich Proben, in denen mehr als ein Wirkstoff vorhanden ist, bei Direct Probe Messungen verhalten. Zu diesem Zweck wurde die Probe Sustanon 250 mit Direct Probe analysiert. Der zeitliche Verlauf der Analyse ist in Abbildung 97 dargestellt.

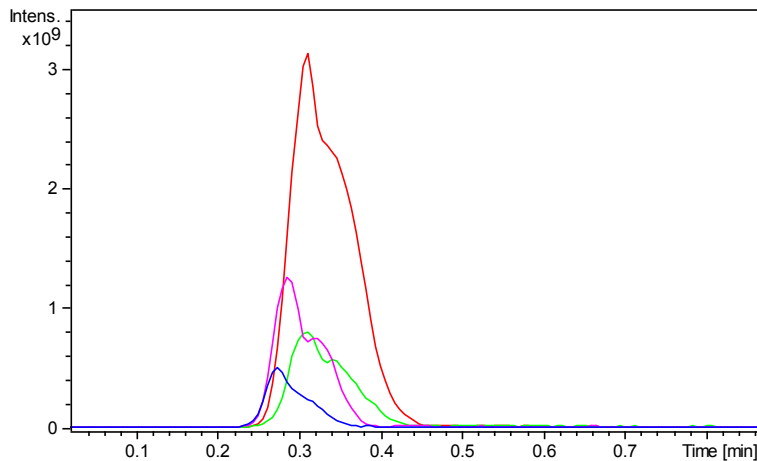


Abbildung 97: Zeitlicher Verlauf des EIC des  $m/z$ -Wert 442 (rot), des EIC des  $m/z$ -Wert 421 (grün), des EIC des  $m/z$ -Wert 387 (lila) und des des EIC des  $m/z$ -Wert 345 (blau) einer Direct Probe Messung von Sustanon 250.

Wie anhand der Messung zu erkennen ist, werden alle vier, in der Probe vorhandenen Testosteronester, ionisiert und detektiert. Dabei wird das T. Decanoat als  $M^+$  mit einem  $m/z$ -Wert von 442 und die anderen drei Testosteronester (T. Phenylpropionat,  $m/z$  421; T. Isoca-

proat,  $m/z$  387; T. Propionat,  $m/z$  345) jeweils als  $[M+H]^+$  nachgewiesen. Auch hier ist somit wieder eine Mischionisierung zu beobachten. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Analyse von Substanzgemischen mittels Direct Probe möglich ist, allerdings mit der Einschränkung, dass  $MS^n$ -Experimente, aufgrund der kurzen Detektionsfenster, nur bedingt möglich sind und damit eine eindeutige Identifizierung nicht gewährleistet ist.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass pulvrige und flüssige (auch ölige Zubereitungen) direkt mittels Direct Probe analysiert werden können. Bei festen Substanzen, wie z.B. Tabletten war keine direkte Untersuchung möglich, da mit dem Glasstab keine Beprobung der Tablette möglich war. Aufgrund der Probenzufuhr mittels Glasstab konnte für die Direct Probe-Quelle auch keine Nachweisgrenze ermittelt werden, da keine definierte Menge an Substanz auf den Glasstab aufgebracht werden konnte.

Abschließend lässt sich zu den beiden Techniken sagen, dass die Untersuchung von pulvrigen Proben mit der Direct Probe-Technik, im Gegensatz zu der DESI-Technik, ohne Probenvorbereitung möglich ist. Feste Proben, wie z.B. Tabletten, können nicht oder nur eingeschränkt (wenn beim Reiben mit dem Glasstab Substanz an diesem haften bleibt, oder nach vorangegangener Zerkleinerung) direkt mittels Direct Probe analysiert werden. Flüssigkeiten können sowohl mit der DESI- wie auch mit der Direct Probe-Technik nach Eintrocknung untersucht werden. Der Nachteil der Direct Probe-Technik ist allerdings, dass die Detektionsfenster aufgrund der schnellen Desorption sehr kurz sind und damit  $MS^n$ -Experimente bei Mischungen nur eingeschränkt möglich sind. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch eine unterschiedliche Ionisierung eine zur DESI/ESI abweichende Fragmentierung auftritt und aus diesem Grund vorhandene Datenbanken nicht genutzt werden können. Weiterhin kommt bei der Direct Probe-Technik negativ hinzu, dass durch die schwierige Probennahme eine hohe Kontaminationsgefahr des Massenspektrometers besteht. Somit bleibt der einzige Vorteil der Direct Probe-Technik gegenüber der DESI-Technik die direkt Untersuchung von Pulvern. Für die Überwindung dieser Einschränkung der DESI-Technik wurden jedoch in dieser Arbeit (siehe Kapitel 5.1.3.1) verschiedene Vorgehensweisen entwickelt. Aus diesen Gründen wird für die direkte massenspektrometrische Untersuchung von festen Substanzen die Verwendung der DESI-Technik bevorzugt.



## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden qualitative und quantitative Analysenverfahren für die forensisch-toxikologische Materialanalytik von Designerdrogen, Arznei- und Dopingmitteln entwickelt.

Für die Analytik von anabolen Steroiden in öligen Zubereitungen wurden zwei UHPLC-DAD-Verfahren entwickelt und validiert, die es ermöglichen, neben unterschiedlichen Wirkstoffen auch die jeweilige Esterform ein und derselben Substanz zu quantifizieren, wodurch Proben aus verschiedenen Sicherstellungen miteinander verglichen werden können (Gewinn von Profilinginformationen). Für das erste Verfahren wurde durch Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion die Ölmatrix entfernt und so eine Kopplung mit einem Massenspektrometer ermöglicht. Für das zweite Verfahren wurde eine monolithische Trennsäule eingesetzt, weswegen hier auf eine Probenvorbereitung verzichtet werden konnte. Beide Verfahren wurden in die kriminaltechnische Fallarbeit überführt und anhand von Ringversuchsproben verifiziert. Für die direkt-massenspektrometrische Analyse von öligen Zubereitungen wurde ein DESI-MS Verfahren entwickelt, was zu einer erheblichen Zeitersparnis unter Aufrechterhaltung des hohen Identifizierungspotentials der Massenspektrometrie führte.

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

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

Ein weiterer Aspekt in dieser Arbeit bestand in einer Gegenüberstellung der Kopplung der DESI-Quelle an unterschiedliche Massenspektrometer. Dabei stellte sich heraus, dass die

Verwendung eines Ionenfallenmassenspektrometers (IT-MS) oder eines Flugzeitmassenspektrometers (TOF-MS) vorzuziehen ist, da die zusätzliche Information der exakten Masse nicht den Verlust der Fragmentierungsinformation ausgleicht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass mittels DESI-IT-MS<sup>n</sup> eine Unterscheidung von Regioisomeren möglich ist, die mittels DESI-TOF-MS nicht getroffen werden konnte.

Für die quantitative Analytik von synthetischen Cannabimimetika in ‚Spice‘-Produkten wurde ein UHPLC-DAD-MS Verfahren entwickelt, validiert und es wurden systematische Untersuchungen zu der Wirkstoffverteilung in Kräutermischungen durchgeführt. Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede in den Wirkstoffgehalten unterschiedlicher Materialproben verschiedener Produktgenerationen. Weiterhin wurden verschiedene Probenvorbereitungsvarianten für die qualitative und quantitative Analyse untersucht. Anhand der Ergebnisse konnte eine flexible Untersuchungsstrategie für die kriminaltechnische Materialuntersuchung von Kräutermischungen erarbeitet werden. Diese beinhaltet neben der Quantifizierung und Identifizierung auch eine Schnelluntersuchung mittels einer entwickelten DESI-MS Methode zur direkten Untersuchung von Kräutermaterial. In diesem Zusammenhang wurden DESI/ESI-MS<sup>n</sup>-Spektren von neuen synthetischen Cannabimimetika aufgenommen und die Fragmentierungswege (bis MS<sup>4</sup>) aufgeklärt. Die erarbeitete Vorgehensweise wurde durch die Teilnahme an Ringversuchen validiert und in die Fallarbeit überführt.

Die Ergebnisse aller in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu synthetischen Cannabimimetika zeigten, dass für Konsumenten von Kräutermischungen ein hohes Gesundheitsrisiko besteht. Dieses ergibt sich aus der großen Vielzahl aufgetretener synthetischer Cannabimimetika mit sehr unterschiedlichen Wirkungspotentialen in Verbindung mit stark variierenden Wirkstoffgehalten in diversen ‚Spice‘-Produkten. Somit ist die auftretende Wirkung für den Konsumenten kaum einschätzbar und es besteht eine hohe Gefahr der Überdosierung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Vordermaier, G.; Zirk, W., *Kriminaltechnik und Spurenkunde*. Richard Boorberg Verlag, 1998.
2. Thorwald, J., *Die Stunde der Detektive, Werden und Welten der Kriminalistik*. Droemersch Verlagsgesellschaft Zürich: 1966.
3. Hargreaves, M., Chapter 6a: Drugs of Abuse - Application of handheld FT-IR and Raman Spectrometers. *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science, John Wiley&Sons, Ltd* **2012**, 339-349.
4. Keller, T.; Schneider, A.; Tutsch-Bauer, E.; Jaspers, J.; Aderjan, R.; Skopp, G., Ion mobility spectrometry for the detection of drugs in cases of forensic and criminalistic relevance. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* **1999**, 2 (1), 22-34.
5. Eiceman, G.; Stone, J., Ion Mobility Spectrometers in national defense. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 390A - 397A.
6. In *Recommendations of the "scientific working group for the analysis of seized drugs" (SWGDRUG), 4th Edition*, 2008.
7. Takáts, Z.; Wiseman, J.; Gologan, B.; Cooks, G., Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* **2004**, 306, 471 - 473.
8. Härtel, C. Direkte forensisch-toxikologische Materialanalytik mittels Desorptions-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (DESI-MS). Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, 2010.
9. Rodriguez-Cruz, S., Rapid screening of seized drug exhibits using desorption ionisation mass spectrometry (DESI-MS). *Microgram Journal* **2008**, 6, 10 - 25.
10. Holzgrabe, U., Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2010**, 57 (2), 229-240.
11. Maier, J., Voll auf dem Bio-Trip. *Die Zeit*, Nr. 49 2008.
12. UNODC, *World drug report (2013) - New psychoactive substances (NPS)*. 2013.
13. EMCDDA, *New drugs in Europe*. 2012.
14. Bican-Fister, T., Quantitative Separation and Estimation of Steroid Mixtures by Thin-Layer Chromatography II. Determination of Progesterone and Estradiol Benzoate and of Progesterone, Testosterone Propionate, and Estradiol Benzoate in Mixtures. *Journal of Pharmaceutical Science* **1968**, 57 (1), 169-172.
15. Cavina, G.; Moretti, G., Quantitative separation of steroids in oily solutions by means of Thin-Layer Chromatography with continuous elution. *Journal of Chromatography A* **1966**, 22, 41-51.
16. Walters, M.; Ayers, R.; Brown, D., Analysis of Illegally Distributed Anabolic-Steroid Products by Liquid-Chromatography with Identity Confirmation by Mass-Spectrometry or Infrared Spectrophotometry. *J Assoc Off Ana Chem* **1990**, 73 (6), 904-926.
17. Lurie, I.; Sperling, A.; Meyers, R., The determination of anabolic steroids by MECC, gradient HPLC, and capillary GC. *Journal of forensic sciences* **1994**, 39 (1), 74-85.
18. In *Monograph "Testosterone and Esters" (SWGDRUG), Latest updated June 2005*.
19. Leuthold, L.; Mandscheff, J.; Fathi, M.; Giroud, C.; Augsburg, M.; Varesio, E.; Hopfgartner, G., Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit Ecstasy tablets. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, 20 (2), 103 - 110.
20. Cotte-Rodriguez, I.; Mulligan, C.; Cooks, G., Non-Proximate Detection of Small and Large Molecules by Desorption Electrospray Ionization and Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Forensics, Chemistry, and Biology. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 7069 - 7077.
21. Chen, H.; Talaty, N.; Takts, Z.; Cooks, G., Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for High-Throughput Analysis of Pharmaceutical Samples in the Ambient Environment. *Analytical Chemistry* **2005**, 77 (21), 6915 - 6927.
22. Ratcliffe, L.; Rutten, F.; Barrett, D.; Whitmore, T.; Seymour, D.; Greenwood, C.; Aranda-Gonzalvo, Y.; Robinson, S.; McCoustra, M., Surface analysis under ambient conditions using plasma-assisted desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (16), 6094-6101.

23. Lusoujarvi, L.; Laakkonen, U., Letter to the Editor. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2009**, *23*, 1401-1404.
24. Wintermeyer, A.; Moller, I.; Thevis, M.; Jubner, M.; Beike, J.; Rothschild, M.; Bender, K., In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398* (5), 2141-53.
25. Teske, J.; Weller, J.; Fieguth, A.; Rothamel, T.; Schulz, Y.; Troger, H., Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2010**, *878* (27), 2659-63.
26. Neukamm, M.; Mürdter, T.; Knabbe, C.; Wehner, H.; Wehner, F., Quantitative Detection of the active "Spice" Ingredient JWH-018 in Serum by means of Liquid chromatography-Tandem Mass spectrometry. *Blutalkohol* **2009**, *46*, 373-379.
27. Rosenberg, E., The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000* (1-2), 841-889.
28. Rätsch, C., *Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen*. AT-Verlag, Aarau: 1998.
29. Diehm, J.; Pütz, M., Spice und vergleichbare Produkte - Harmlose Kräutermischungen oder raffinierte Strategie für neue gefährliche Produkte auf dem Rauschgiftmarkt. *Kriminalistik* **2009**, *63*, 131- 137.
30. Auwärter, V.; Dresen, S.; Weinmann, W.; Müller, M.; Pütz, M.; Ferreiros, N., Spice and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44* (5), 832 - 837.
31. Schäffer, M.; Gröger, T.; Pütz, M.; Zimmermann, R., Assessment of the presence of Damiana in herbal blends of forensic interest based on comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Forensic Toxicology* **2013**, *31* (2), 251-262.
32. 146. Bundesgesetz: Neue-Psychoaktive-Substanzen-Gesetz, NPSG. *Bundesgesetzblatt Republik Österreich*. 2011.
33. The Misuse of Drugs Act 1971 (Amendment) Order 2010, Dangerous Drugs No. 1207. *British Government* 2010.
34. Kidawa, M., Personal communication. In *National Bureau for drug Prevention, Warsaw (Poland)*, 2012.
35. Grotenhermen, F., Cannabinoide und das Cannabinoidsystem. *Cannabinoids* **2006**, *1*, 11-16.
36. Devane, W.; Hanus, L.; Breuer, A., Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **1992**, *258*, 1946 - 1949.
37. D'Ambra, T.; Estep, K.; Bell, M.; Eissenstat, M.; Josef, K.; Ward, S.; Haycock, D.; Baizman, E.; Casiano, F.; Beglin, N.; Chippari, S.; Grego, J.; Kullnig, R.; Daley, G., Conformationally Restrained Analogues of Pravadoline: Nanomolar Potent, Enantioselective, (Aminoalkyl)indole Agonists of the Cannabinoid Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35*, 124-135.
38. Nutt, D. *Consideration of the major cannabinoid agonists*; Advisory Council on the Misuse of Drugs: 2009.
39. Devane, W.; Dysarz, F.; Johnson, M.; Melvin, L.; Howlett, A., Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology* **1988**, *34* (5), 605 - 613.
40. Munro, S.; Thomas, K.; Abu-Shaar, M., Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **1993**, *365*, 61 - 65.
41. Ledent, C.; Valverde, O.; Cossu, G., Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **1999**, *283*, 401 - 404.
42. Buckley, N.; McCoy, K.; Mezey, E., Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor. *European Journal of Pharmacology* **2000**, *396* (2-3), 141 - 149.

43. Huffman, J.; Dai, D., Design, Synthesis and Pharmacology of Cannabimimetic Indoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 563-566.
44. Kumar, V.; Alexander, M.; Bell, M.; Eissenstat, M.; Casiano, F.; Chippari, S.; Haycock, D.; Luttinger, D.; Kuster, J.; Miller, M.; Stevenson, J.; Ward, S., Morpholinoalkylindenes as antinociceptive agents: novel cannabinoid receptor agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1995**, *5*, 381-386.
45. Reggio, P., *The Cannabinoid Receptors*. Springer-Verlag New York, LLC: 2010.
46. Tao, Q.; Mcallister, S.; Andreassi, J.; Nowell, K.; Cabral, G.; Hurst, D.; Bachtel, K.; Ekman, M.; Reggio, P.; Abood, M., Role of a Conserved Lysine Residue in the Peripheral Cannabinoid Receptor (CB2): Evidence for Subtype Specificity. *Molecular Pharmacology* **1999**, *55*, 605-613.
47. Song, Z.; Bonner, T., A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Molecular Pharmacology* **1996**, *49*, 891-896.
48. Chin, C.; Lucas-Lenard, J.; Abadji, V.; Kendall, D., Ligand binding and modulation of cyclic AMP levels depend on the chemical nature of residue of the human cannabinoid receptor 1. *Journal of Neurochemistry* **1998**, *70*, 366-373.
49. Huffman, J. W.; Yu, S.; Showalter, V.; Abood, M. E.; Wiley, J. L.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Bramblett, R. D.; Reggio, P. H., Synthesis and Pharmacology of a Very Potent Cannabinoid Lacking a Phenolic Hydroxyl with High Affinity for the CB2 Receptor. *Journal of Medical Chemistry* **1996**, *39*, 3875-3877.
50. Kuhn, C., Anabolic steroids. *Recent Progress in Hormone Research* **2002**, *57*, 411-434.
51. (a) Boos, C., Medikamentenmißbrauch beim Freizeitsportler im Fitneßbereich. *Deutsches Ärzteblatt* **1998**, *45* (16), 953-957; (b) Striegel, H.; Simon, P.; Frisch, S.; Roecker, K.; Dietz, K.; Dickhuth, H.; Ulrich, R., Anabolic ergogenic substance users in fitness-sports: A distinct group supported by the health care system. *Drug and Alcohol Dependence* **2006**, *81* (1), 11-19.
52. Kläber, M., Körper-Tuning Medikamentenmissbrauch im Fitness-Studio. *Sport und Gesellschaft* **2010**, *7*, 213-235.
53. Peters, C.; Selg, P. J.; Schulz, T.; Pabst, H.; Michna, H., Die Dopingproblematik aus Sicht des Sportmediziners: Erfahrungen von deutschen Verbandsärzten und bayerischen Sportmediziner. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **2007**, *58* (6), 160-177.
54. Laure, P., Doping in sport: doctors are providing drugs. *British Journal of Sports Medicine* **1997**, *31*, 258-259.
55. Schänzer, W.; Thevis, M., Doping in sport. *Medizinische Klinik* **2007**, *102* (8), 631-646.
56. Luellmann, H.; Mohr, K.; Ziegler, A.; Bieger, D., *Color Atlas of Pharmacology*. Thieme: New York, 2000; Vol. 2nd edition.
57. Mutschler, E., *Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie*. Stuttgart, 2008; Vol. 9.
58. Stutz, H., Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1254 - 1290.
59. Chech, N.; Enke, C., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 362 - 387.
60. Siethoff, C.; Nigge, W.; Linscheid, M., Characterization of a Capillary Zone Electrophoresis/Electrospray-Mass Spectrometry Interface. *Analytical Chemistry* **1998**, *70* (7), 1357 - 1361.
61. Cody, R.; Laramée, J.; Durst, H., Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (8), 2297-2302.
62. Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M., Easy ambient sonic-spray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (3), 898-903.
63. Chen, H.; Yang, S.; Wortmann, A.; Zenobi, R., Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Angewandte Chemie* **2007**, *46*, 7591-7594.

64. Takáts, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, G., Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chemical Communications* **2005**, *15*, 1950 - 1952.
65. Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R.; Franssila, S.; Kauppila, T.; Kostianen, R., Desorption atmospheric pressure photoionization. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 7867-7872.
66. Cooks, G.; Ouyang, Z.; Takáts, Z.; Wiseman, J., Ambient Mass Spectrometry. *Science* **2006**, *311*, 1566 - 1570.
67. Van Berkel, G.; Pasilis, S.; Ovchinnikova, O., Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *43* (9), 1161-1180.
68. Costa, B.; Cooks, G., Simulation of atmospheric transport and droplet–thin film collisions in desorption electrospray ionization. *Chemical Communications* **2007**, (38), 3915 - 3917.
69. Cammann, K., *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: 2001.
70. March, R., An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32* (4), 351 - 369.
71. Yoshinari, K., Theoretical and numerical analysis of the behavior of ions injected into a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14* (4), 215-223.
72. Paul, W., Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Nobel Lecture* **1989**.
73. Stafford, G.; Kelley, P.; Syka, J.; Reynolds, W.; Todd, J., Recent Improvements in and Analytical Applications of Advanced Ion Trap Technology. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1984**, *60* (Sep), 85-98.
74. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag: 2005.
75. Brekenfeld, A. Leichte Bruckstückionen mit Ionenfallen messen, Patent DE102005025497B4. 2005.
76. Hawkes, S., Modernization of the van Deemter Equation for Chromatographic Zone Dispersion. *Journal of chemical education* **1983**, *60*, 393-398.
77. Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N., Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **1996**, *68* (20), 3498-3501.
78. Cabrera, K.; Kreher, K.; Neuroth, W. Ummantelung für monolithische Chromatographiesäulen. *Patentblatt* 2009/47. 2007.
79. Logan, B.; Reinhold, L.; Xu, A.; Diamond, F., Identification of Synthetic Cannabinoids in herbal incense blends in the United States. *Journal of Forensic Science* **2012**, *57* (5), 1168-1180.
80. Merola, G.; Artuki, Z.; D'Orazio, G.; Gottardo, R.; Macchia, T.; Tagliaro, F.; Fanali, S., Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, *71*, 45-53.
81. Esteve-Turrillas, F.; Armenta, S.; Moros, J.; Garrigues, S.; Pastor, A.; de la Guardia, M., Validated, non-destructive and environmentally friendly determination of cocaine in euro bank notes. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1065* (2), 321-325.
82. Musah, R. A.; Domin, M. A.; Walling, M. A.; Shepard, J. R., Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal samples via direct analysis in real time mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2012**, *26* (9), 1109-14.
83. Seely, K.; Lapoint, J.; Moran, J.; Fattore, L., Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2012**, *39* (2), 234-243.
84. Schneir, A.; Cullen, J.; Ly, B., "Spice" girls: synthetic cannabinoid intoxication. *The Journal of emergency medicine* **2011**, *40* (3), 296-299.

85. Simmons, J.; Skinner, C.; Williams, J.; Kang, C.; Schwartz, M.; Wills, B., Intoxication from smoking "spice". *Annals of Emergency Medicine* **2011**, *57* (2), 187-188.
86. Lundahl, A.; Lennernas, H.; Knutson, L.; Bondesson, U.; Hedeland, M., Identification of finasteride metabolites in human bile and urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2009**, *37* (10), 2008-2017.

## 8 Anhang

Tabelle 83: Kalibrierdaten von JWH-210, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	7
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999991
Relative Reststreuung	0,51%
Nachweisgrenze	0,17 µg/mL
Bestimmungsgrenze	0,45 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	1 – 60 µg/mL
y-Achsenabschnitt	974,658
Steigung	101112

Tabelle 84: Kalibrierdaten von JWH-200, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	6
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999961
Relative Reststreuung	0,95%
Nachweisgrenze	0,44 µg/mL
Bestimmungsgrenze	1,14 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	2 – 60 µg/mL
y-Achsenabschnitt	29028,8
Steigung	103248

Tabelle 85: Kalibrierdaten von JWH-122, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	7
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999886
Relative Reststreuung	1,75%
Nachweisgrenze	1,04 µg/mL
Bestimmungsgrenze	2,63 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	3 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-30951
Steigung	106421



## 8 Anhang

---

Tabelle 86: Kalibrierdaten von JWH-081, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	7
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Quadratische Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999894
Relative Reststreuung	1,72%
Nachweisgrenze	1,01 µg/mL
Bestimmungsgrenze	2,55 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	3 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	71379
Steigung	93895,4

Tabelle 87: Kalibrierdaten von JWH-073, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	5
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Zu wenig Messwerte für F-Test
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999724
Relative Reststreuung	2,08%
Nachweisgrenze	2,57 µg/mL
Bestimmungsgrenze	6,62 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	7 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-124788
Steigung	149033

Tabelle 88: Kalibrierdaten von JWH-019, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	5
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Zu wenig Messwerte für F-Test
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999842
Relative Reststreuung	1,55%
Nachweisgrenze	1,94 µg/mL
Bestimmungsgrenze	5,07 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	6 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-34902
Steigung	122830

## 8 Anhang

---

Tabelle 89: Kalibrierdaten von JWH-018, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	5
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Zu wenig Messwerte für F-Test
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999497
Relative Reststreuung	2,79%
Nachweisgrenze	4,16 µg/mL
Bestimmungsgrenze	10,68 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	11 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-81339
Steigung	130686

Tabelle 90: Kalibrierdaten von CP47,497-C8, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	5
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Zu wenig Messwerte für F-Test
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999783
Relative Reststreuung	1,82%
Nachweisgrenze	2,37 µg/mL
Bestimmungsgrenze	6,14 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	7 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-20764
Steigung	98580,8

Tabelle 91: Kalibrierdaten von AM-694, Acquity UPLC® BEH Phenyl 1,7 µm Säule.

Anzahl der Messpunkte	6
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,99991
Reststandardabweichung	1,42%
Nachweisgrenze	1,09 µg/mL
Bestimmungsgrenze	2,79 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	5 – 100 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-56618
Steigung	51859,5

## 8 Anhang

---

Tabelle 92: Kalibrierdaten von Testosteron Enanthat, Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> Säule.

Anzahl der Messpunkte	10
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,99989
Relative Reststreuung	1,69%
Nachweisgrenze	4,25 µg/mL
Bestimmungsgrenze	10,47 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	60 – 400 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-24096
Steigung	17426,1

Tabelle 93: Kalibrierdaten von Testosteron Acetat, Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> Säule.

Anzahl der Messpunkte	10
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999735
Relative Reststreuung	2,58%
Nachweisgrenze	5,00 µg/mL
Bestimmungsgrenze	12,25 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	60 – 400 µg/mL
y-Achsenabschnitt	88149,6
Steigung	23258,4

Tabelle 94: Kalibrierdaten von Testosteron Cypionat, Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> Säule.

Anzahl der Messpunkte	10
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999868
Relative Reststreuung	1,85%
Nachweisgrenze	4,67 µg/mL
Bestimmungsgrenze	11,49 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	60 – 400 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-25952
Steigung	19485,1

## 8 Anhang

---

Tabelle 95: Kalibrierdaten von Testosteron Decanoat, Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> Säule.

Anzahl der Messpunkte	13
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,99997
Relative Reststreuung	1,20%
Nachweisgrenze	2,76 µg/mL
Bestimmungsgrenze	6,76 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	60 – 400 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-48215
Steigung	17927,1

Tabelle 96: Kalibrierdaten von Testosteron Propionat, Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> Säule.

Anzahl der Messpunkte	10
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	quadratische Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999462
Relative Reststreuung	3,68%
Nachweisgrenze	11,57 µg/mL
Bestimmungsgrenze	38,81 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	60 – 400 µg/mL
y-Achsenabschnitt	104692
Steigung	22213,7

Tabelle 97: Kalibrierdaten von Testosteron-Undecanoat, Kinetex 2,6 u C<sub>18</sub> Säule.

Anzahl der Messpunkte	14
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999948
Relative Reststreuung	1,49%
Nachweisgrenze	4,88 µg/mL
Bestimmungsgrenze	11,89 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	80 – 800 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-96288
Steigung	17218,7

## 8 Anhang

---

Tabelle 98: Kalibrierdaten von Danazol, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	7
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	quadratische Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999986
Relative Reststreuung	1,08%
Nachweisgrenze	1,79 µg/mL
Bestimmungsgrenze	4,55 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	5 – 500 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-9525
Steigung	9790,19

Tabelle 99: Kalibrierdaten von Nortestosteron, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	9
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	quadratische Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999996
Relative Reststreuung	0,47%
Nachweisgrenze	1,29 µg/mL
Bestimmungsgrenze	3,23 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	4 – 750 µg/mL
y-Achsenabschnitt	4789,99
Steigung	18416

Tabelle 100: Kalibrierdaten von Testosteron Acetat, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	9
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	quadratische Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999893
Relative Reststreuung	1,91%
Nachweisgrenze	3,69 µg/mL
Bestimmungsgrenze	9,12 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	10 – 450 µg/mL
y-Achsenabschnitt	18735,4
Steigung	13367,4

## 8 Anhang

---

Tabelle 101: Kalibrierdaten von Testosteron Cypionat, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	8
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999999
Relative Reststreuung	0,21%
Nachweisgrenze	0,42 µg/mL
Bestimmungsgrenze	1,05 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	2 – 400 µg/mL
y-Achsenabschnitt	1700,41
Steigung	10415,5

Tabelle 102: Kalibrierdaten von Trenbolon, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	7
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999996
Relative Reststreuung	1,28%
Nachweisgrenze	2,24 µg/mL
Bestimmungsgrenze	5,70 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	6 – 350 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-7980,1
Steigung	15263,3

Tabelle 103: Kalibrierdaten von Testosteron Enanthat, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	9
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999946
Relative Reststreuung	1,38%
Nachweisgrenze	6,86 µg/mL
Bestimmungsgrenze	17,03 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	18 – 1000 µg/mL
y-Achsenabschnitt	34316,3
Steigung	8398,29

## 8 Anhang

Tabelle 104: Kalibrierdaten von Testosteron Propionat, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	9
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	quadratische Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0,999945
Relative Reststreuung	1,44%
Nachweisgrenze	2,48 µg/mL
Bestimmungsgrenze	6,14 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	7– 400 µg/mL
y-Achenabschnitt	16597,5
Steigung	12385,1

Tabelle 105: Kalibrierdaten von Testosteron Undecanoat, Chromolith Performance RP-18e Säule.

Anzahl der Messpunkte	8
Wiederholmessungen	2
Linearitätstest	Lineare Kalibrierfunktion
Vertrauensbereich	95%
Korrelation	0.999994
Relative Reststreuung	0,47%
Nachweisgrenze	1,57 µg/mL
Bestimmungsgrenze	3,94 µg/mL
Linearer Arbeitsbereich	4 – 700 µg/mL
y-Achsenabschnitt	-5416,8
Steigung	91,62,16

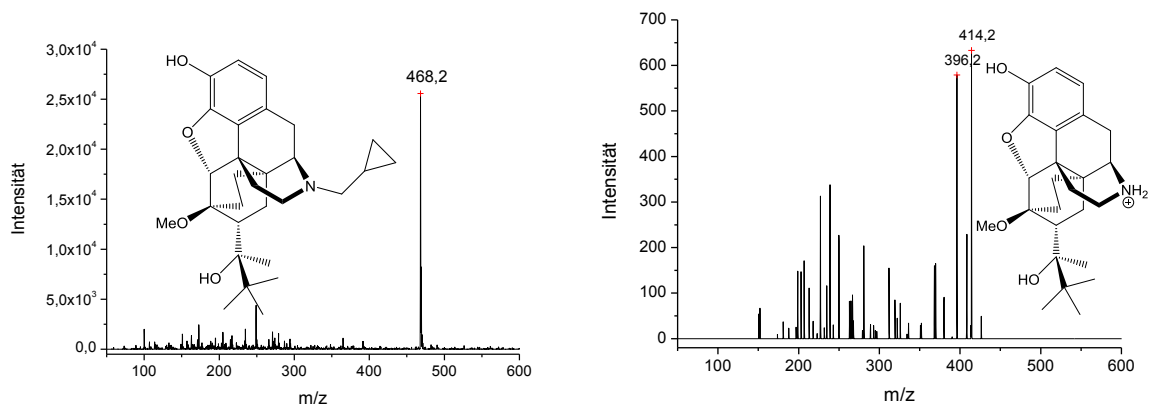


Abbildung 98: DESI-MS Spektrum einer Tablette Subutex 0,4 mg (links) und das dazugehörige MS<sup>2</sup>-Spektrum (rechts).

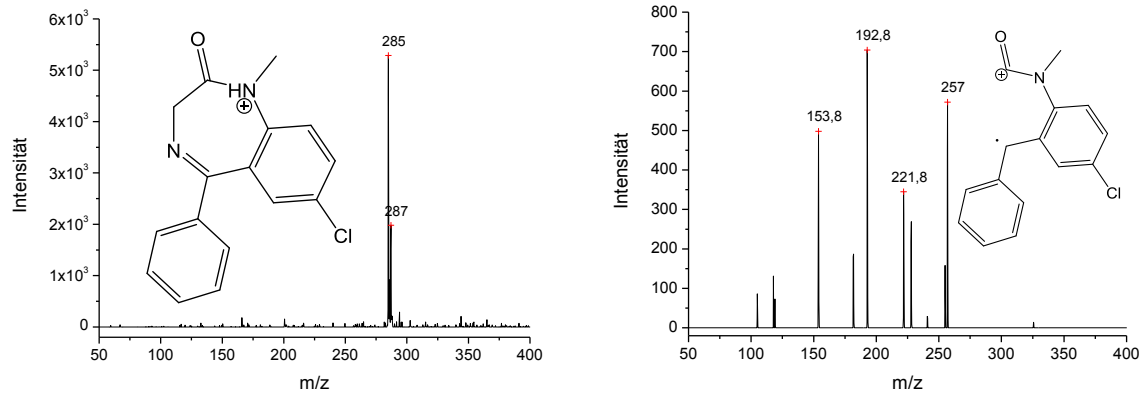


Abbildung 99: DESI-MS Spektrum einer Tablette Diazepam AbZ 5 mg (links) und das dazugehörige MS<sup>2</sup>-Spektrum (rechts).

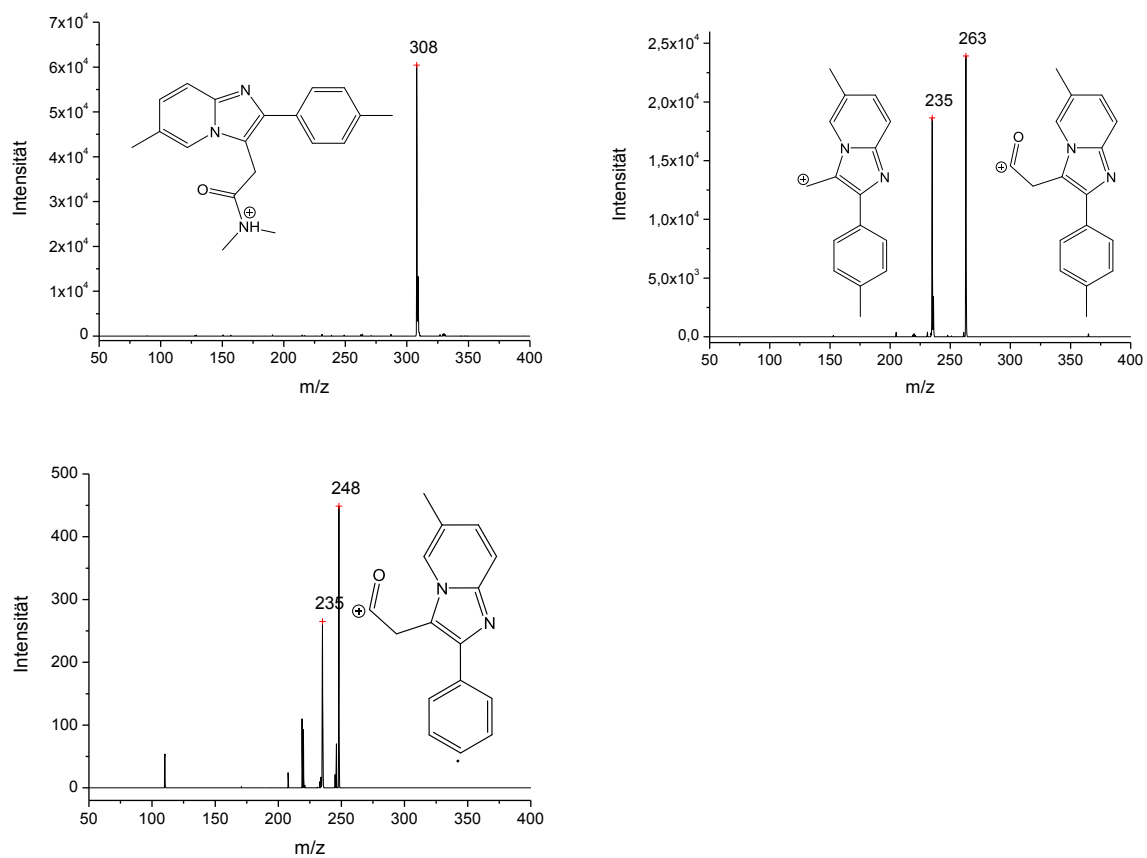


Abbildung 100: DESI-MS Spektrum einer Tablette Zolpidem AL 5 mg (links oben) und das dazugehörige MS<sup>2</sup>-Spektrum (rechts oben) und MS<sup>3</sup>-Spektrum des m/z-Wert 263 (links unten).



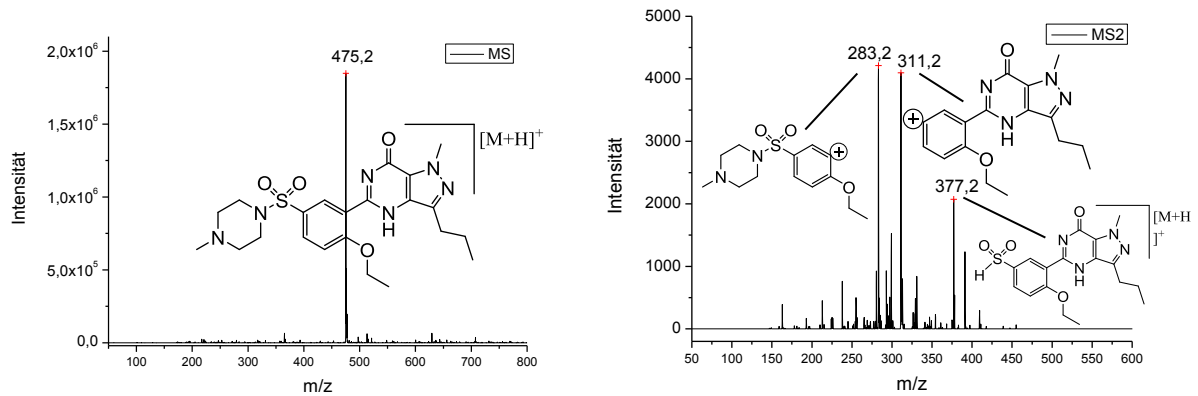


Abbildung 101: DESI-MS Spektren von einer Viagra Tablette; Links, MS-Spektrum; Rechts, MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 475,2.

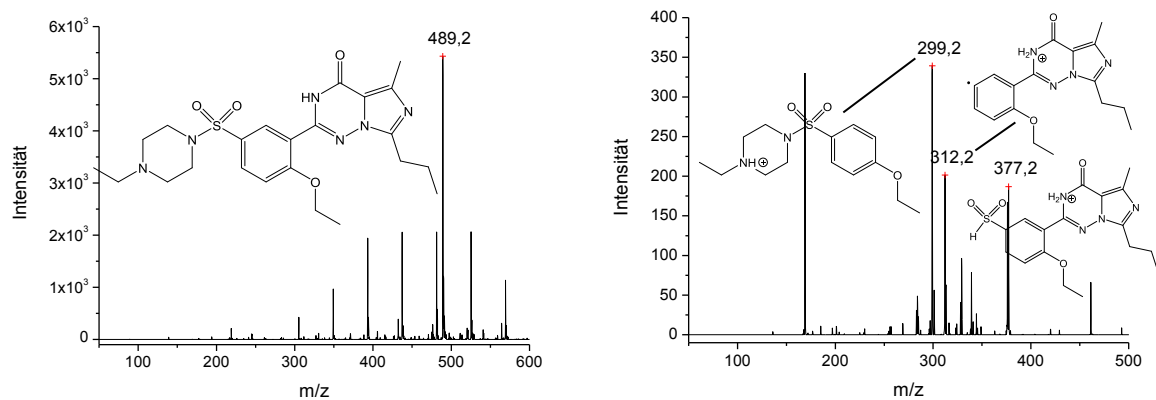


Abbildung 102: DESI-MS Spektren von einer Levitra Tablette; Links, MS-Spektrum; Rechts, MS<sup>2</sup>-Spektrum des m/z-Wert 489,2.

Tabelle 106: Retentionszeiten der drei Messungen des Robustheitsexperiments 1.

Steroid	Messung		
	1	2	3
Nortestosteron	2,57	2,53	2,54
Metandienon	2,91	2,87	2,88
Boldion	3,10	3,06	3,07
Testosteron	3,31	3,27	3,28
Methyltestosteron	4,24	4,19	4,20
T.Acetat	5,42	5,39	5,39
T.Propionat	5,88	5,85	5,85
T.Phenylpropionat	6,60	6,57	6,57
T.Isocaproat	7,23	7,19	7,19
T.Cypionat	8,25	8,21	8,21
T.Decanoat	11,20	11,17	11,17
T.Undecanoat	12,99	12,96	12,97
Danazol	5,04	5,02	5,01
Trenbolon	2,05	2,03	2,03
Tren.Acetat	4,96	4,93	4,93
Tren.Enantat	7,08	7,04	7,04

## 8 Anhang

Tabelle 107: Retentionszeiten der drei Messungen des Robustheitsexperiments 4. Farbcode: rot, Signal falsch zugeordnet; blau, Signal gar nicht zugeordnet.

Steroid	Messung		
	1	2	3
Nortestosteron	2,59	2,60	2,57
Metandienon	2,93	2,95	2,91
Boldion	3,12	3,14	3,11
Testosteron	3,33	3,35	3,31
Methyltestosteron	4,26	4,27	4,25
T.Acetat	5,42	5,42	5,42
T.Propionat	5,90	5,89	5,90
T.Phenylpropionat	6,66	6,65	6,65
T.Isocaproat	7,31	7,30	7,31
T.Cypionat	8,41	8,41	8,41
T.Decanoat	11,72	11,71	11,72
T.Undecanoat	13,77	13,76	13,77
Danazol	5,04	5,03	5,03
Trenbolon	2,07	2,08	2,05
Tren.Acetat	4,95	4,95	4,95
Tren.Enantat	7,15	7,14	7,15

Tabelle 108: Retentionszeiten der drei Messungen des Robustheitsexperiments 2. Farbcode: rot, Signal falsch zugeordnet; blau, Signal gar nicht zugeordnet.

Steroid	Messung		
	1	2	3
Nortestosteron	2,44	2,41	2,42
Metandienon	2,75	2,71	2,73
Boldion	2,93	2,90	2,92
Testosteron	3,12	3,08	3,10
Methyltestosteron	3,99	3,93	3,98
T.Acetat	5,37	5,36	5,37
T.Propionat	5,84	5,83	5,83
T.Phenylpropionat	6,57	6,55	6,55
T.Isocaproat	7,19	7,17	7,18
T.Cypionat	8,21	8,19	8,20
T.Decanoat	11,16	11,15	11,16
T.Undecanoat	12,95	12,94	12,94
Danazol	5,00	4,98	4,99
Trenbolon	1,96	1,94	1,94
Tren.Acetat	4,91	4,89	4,90
Tren.Enantat	7,04	7,02	7,03

## 8 Anhang

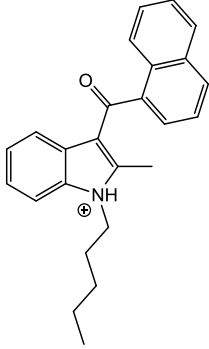
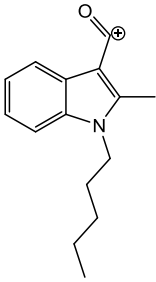
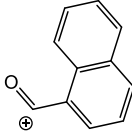
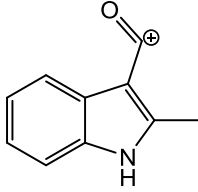
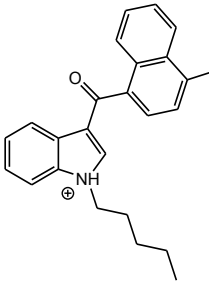
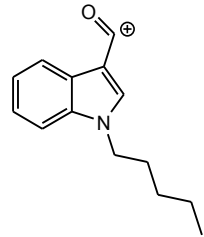
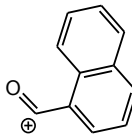
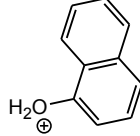
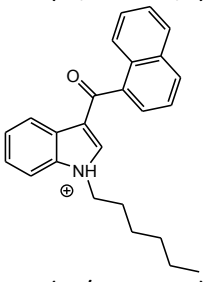
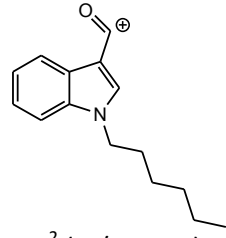
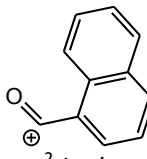
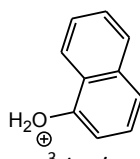
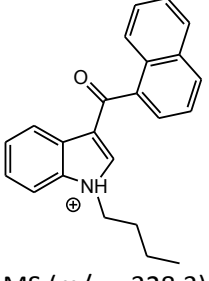
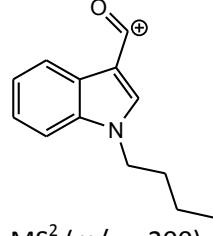
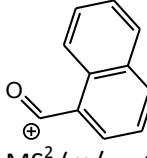
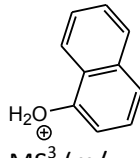
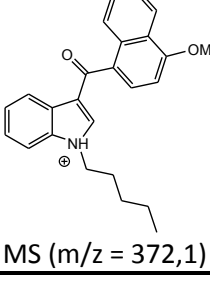
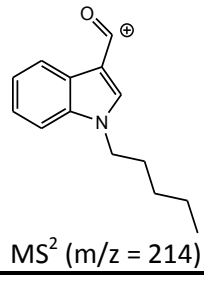
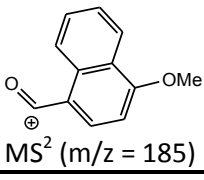
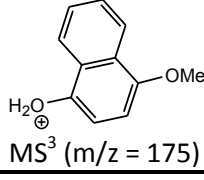
Tabelle 109: Retentionszeiten der drei Messungen des Robustheitsexperiments 3. Farbcode: rot, Signal falsch zugeordnet; blau, Signal gar nicht zugeordnet.

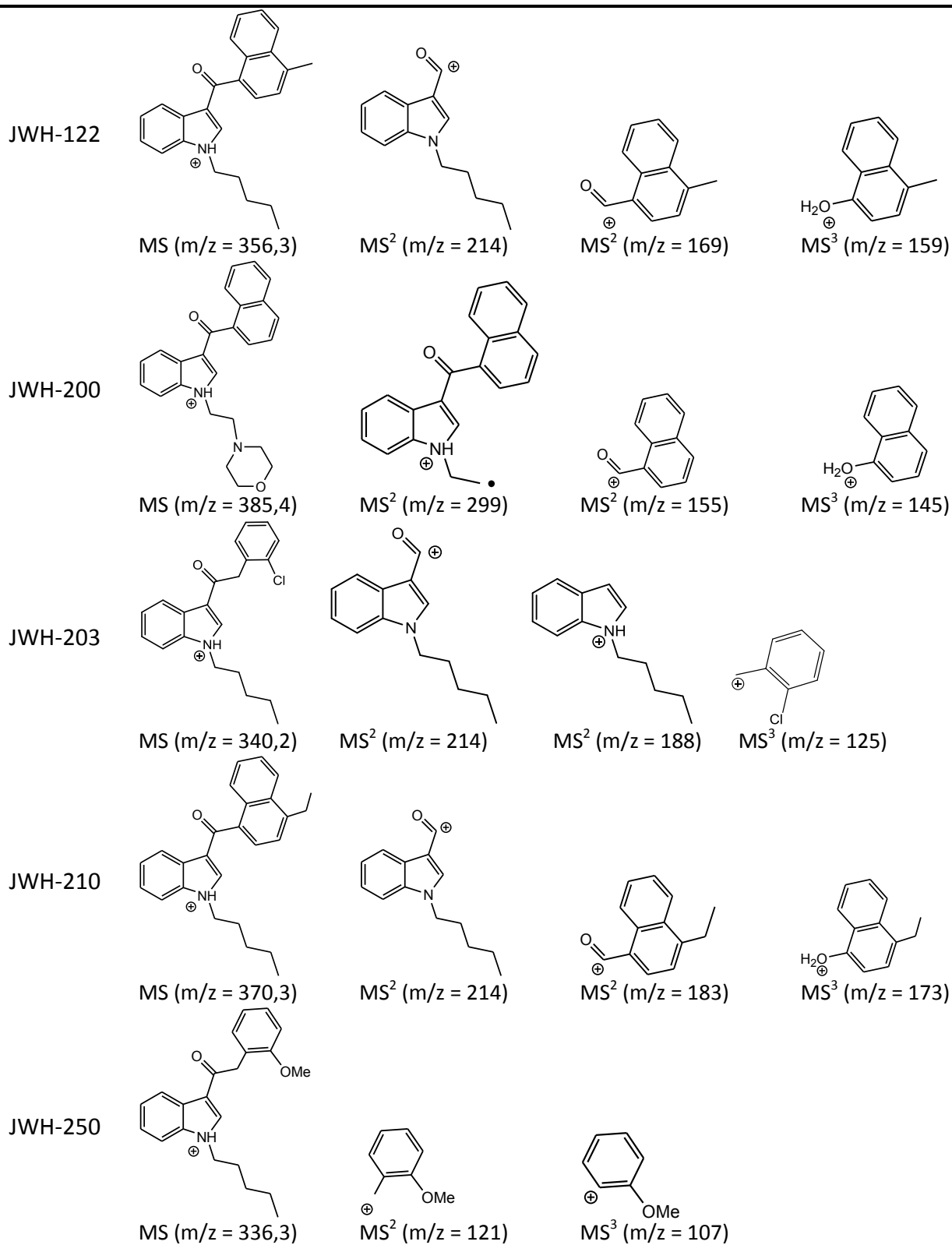
Steroid	Messung		
	1	2	3
Nortestosteron	2,55	2,50	2,49
Metandienon	2,89	2,82	2,82
Boldion	3,08	3,01	3,01
Testosteron	3,28	3,21	3,21
Methyltestosteron	4,19	4,12	4,11
T.Acetat	5,42	5,40	5,40
T.Propionat	5,90	5,88	5,88
T.Phenylpropionat	6,65	6,64	6,64
T.Isocaproat	7,31	7,29	7,29
T.Cypionat	8,41	8,39	8,39
T.Decanoat	11,71	11,69	11,69
T.Undecanoat	13,75	13,73	13,73
Danazol	5,04	5,02	5,02
Trenbolon	2,05	2,00	2,00
Tren.Acetat	4,95	4,93	4,93
Tren.Enantat	7,15	7,13	7,13

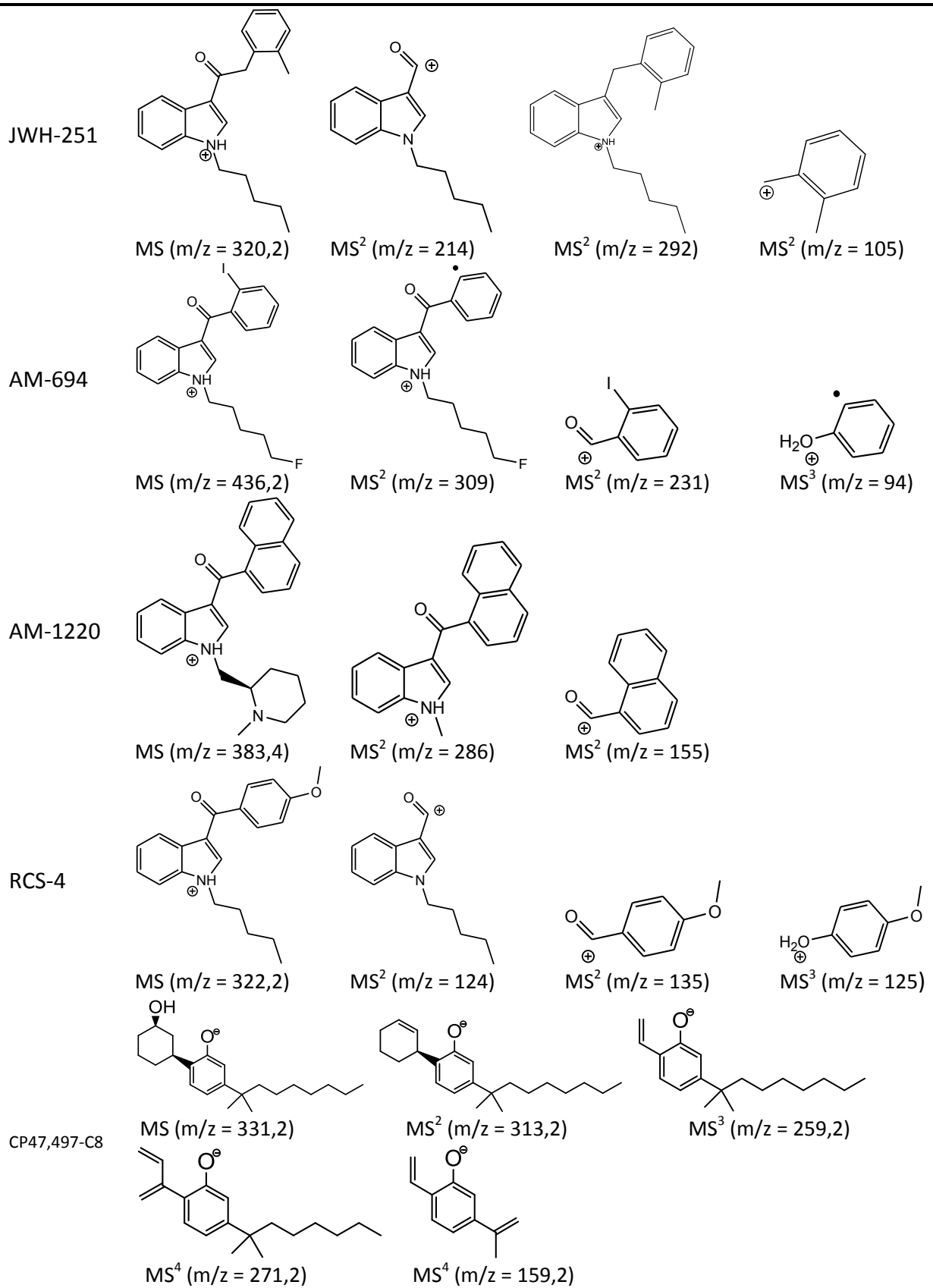
Tabelle 110: Übersicht über die GC-MS Analysen der anabolen Steroid Präparate.

Name	Wirkstoff	Quantität
Testoplex E	T. Propionat	mittel
	T. Enanthat	viel
Sustanon 250 (Präp 1)	T. Propionat	mittel
	T. Phenylpropionat	viel
	T. Isocaproat	viel
	T. Decanoat	Hauptsignal
Sustanon 250 (Präp 2)	T. Propionat	mittel
	T. Phenylpropionat	viel
	T. Isocaproat	viel
	unbekannt	
Sustanon 4-Blend	T. Decanoat	Hauptsignal
	unbekannt	
	T. Propionat	viel
Sustanon	T. Enanthat	viel
	T. Propionat	viel
	T. Phenylpropionat	viel
Testosteron Depot Galenika	T. Isocaproat	viel
	T. Decanoat	viel
	T. Enanthat	viel
	unbekannt	
Testosteron Propionat	T. Propionat	viel
	T. Enanthat	wenig

Tabelle 111: Hauptfragmente synthetischer Cannabinoide, erzeugt mittels DESI-MS/ESI-MS.

JWH-007				
	MS (m/z = 356,3)	MS <sup>2</sup> (m/z = 228)	MS <sup>2</sup> (m/z = 155)	MS <sup>3</sup> (m/z = 158)
JWH-018				
	MS (m/z = 342,3)	MS <sup>2</sup> (m/z = 214)	MS <sup>2</sup> (m/z = 155)	MS <sup>3</sup> (m/z = 145)
JWH-019				
	MS (m/z = 356,3)	MS <sup>2</sup> (m/z = 228)	MS <sup>2</sup> (m/z = 155)	MS <sup>3</sup> (m/z = 145)
JWH-073				
	MS (m/z = 328,3)	MS <sup>2</sup> (m/z = 200)	MS <sup>2</sup> (m/z = 155)	MS <sup>3</sup> (m/z = 145)
JWH-081				
	MS (m/z = 372,1)	MS <sup>2</sup> (m/z = 214)	MS <sup>2</sup> (m/z = 185)	MS <sup>3</sup> (m/z = 175)





## 9 Danksagung

Das Anfertigen und Schreiben dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe einer Reihe von Menschen nicht möglich gewesen. Deswegen möchte ich mich an dieser Stelle für all die unterschiedlichen Hilfestellungen herzlich bedanken und hoffe, dass ich dabei keinen vergessen habe.

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

Besonderen Dank schulde ich auch meinem Betreuer beim Bundeskriminalamt Dipl. Chem. Michael Pütz, der es mir ermöglicht hat, meine Forschung an einem spannenden Teilgebiet der Forensik durchzuführen. Neben der Hilfe bei der Organisation der finanziellen Mittel für meine Arbeit hat er es mir auch ermöglicht, eine Vielzahl von internationalen Konferenzen zu besuchen und mich dabei nach der Devise „Du hast die Arbeit gemacht, dann präsentierst Du das auch“ immer unterstützt, auch auf großen Konferenzen selbst meine Forschungsergebnisse zu präsentieren.

Ohne eine gesicherte Finanzierung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen, weswegen ich mich beim Bundeskriminalamt für die finanzielle Unterstützung und für die Bereitstellung von Räumen, Geräten und Messzeiten bedanke. Weiterhin möchte ich mich bei dem BMBF für die Finanzierung im Rahmen des „MIME“-Projektes (FKZ: 13N12007, 2011-2014) und bei der EU für die Finanzierung im Rahmen des Projektes „*Spice and synthetic cannabinoids: Fast responses by means of forensic and toxicological analyses with direct impact on prevention measures*“ (agreement number: JUST/2009/DPIP/AG/0948-30-CE-0379828/00-86, 2010-2012) bedanken.

Dank schulde ich auch den Mitarbeitern des Fachbereichs KT 34 des Bundeskriminalamts für ihre gute und kollegiale Zusammenarbeit und für die angenehme Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors. Vielen Dank auch für die Hilfe beim Auffinden von Chemikalien und Proben und als „Schlüsseldienst“. Ein großes Dankeschön geht dabei an die Bewohner der

„Vergnügungsfreien Zone“ Sandra und Christiane, die mich in ihrem Büro aufgenommen haben.

Meinen Mitdoktoranden Jan und Sára sowie Dr. Lars Müller danke ich besonders für die vielen wissenschaftlichen, philosophischen und sozialen Diskussionen und für ein immer offenes Ohr für Probleme während und neben der Arbeit.

Für Diskussionen über Massenspektren und für die Durchführung von NMR-Reinheitsuntersuchungen danke ich den Mitarbeitern von KT 12, Dr. Dieter Kirsch, Dieter Urbach und Vincent Guillou.

Für die gute Kooperation in und neben den EU-Projekten „Spice“ und „Spice II plus“ und für den Austausch von Referenzmaterialien bedanke ich mich bei Dr. Volker Auwärter und Stefan Kneisel im Rechtsmedizinischen Institut der Uniklinik Freiburg.

Bei allen Verbundpartnern und den Betreuern vom VDI im BMBF-Projekt „MIME“ bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, besonders bei Prof. Dr. Christian Neusüß für die Möglichkeit, die DESI-Quelle an ein micrOTOF-q-Massenspektrometer zu koppeln.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Studienfreunde die, obwohl in alle Himmelsrichtungen verstreut, immer zum Zuhören bereit waren und mit denen ich viele lustige Stunden verbracht habe.

Besonders wichtig war für mich der familiäre Rückhalt, weswegen ich mich bei meinen Eltern, meinen Brüdern und meinen Großeltern für deren Unterstützung herzlichst bedanke.

Die wichtigsten Menschen, ohne die diese Arbeit in keiner Weise möglich gewesen wäre, sind meine Frau Ilona und meine Tochter Elena-Sophie (wobei Elena auch viel dafür getan hat mich von der Arbeit abzuhalten). Vielen Dank, Ilona, für all die Zeit, die du diesem Projekt geopfert hast und die Stunden, in denen du auf Elena aufgepasst und mir das Verfassen dieser Arbeit ermöglichst hast.



## **10 Lebenslauf**