

Vorschlag von Empfehlungen zur Festphasenextraktion von postmortal gewonnenen Körperflüssigkeiten und Geweben

Thomas Stimpfl, Thomas Daldrup, Ulrich Demme, Freidoon Erdmann, Harald Krause, Lars Kröner, Klaas Jürgen Lusthof, Arthur Reiter, Gertrud Rochholz, Erhard Schneider, Frank Sporkert, Jörg Teske, Jens-Peter Weller und Siegfried Zörntlein

Abstract

In the field of post-mortem forensic toxicology, a wide variety of body fluids and tissues have to be analyzed. Due to the heterogeneity of these specimens, the possibility of post-mortem changes, and the vast number of potentially toxic compounds, it is difficult to recommend one single, generally applicable procedure for sample preparation. However, the Extraction Working Group of the Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh) has set-forth recommendations for the solid-phase extraction (SPE) of post-mortem body fluids and tissue specimens. Whereas urine samples require only dilution, body fluids and tissue samples need careful homogenization in order to obtain a sample that is suitable for extraction. To gain maximum control over the whole procedure, internal standards (preferably stable isotopes of the analytes) should be added as early as possible.

Two alternative procedures for sample pretreatment were tested and found effective: (1) A combination of protein precipitation and subsequent extraction with acetonitril under alkaline conditions. (2) Homogenization in buffer solution (pH 7.4, to avoid protein precipitation). Following these procedures for sample pretreatment, solid-phase extraction with either of the following two *nonselective* sorbent types are recommended: (1) Mixed-mode bonded silica or (2) styrene copolymer-sorbents.

1. Einleitung:

Im Rahmen der forensischen Todesursachenermittlung müssen postmortal gewonnene Körperflüssigkeiten und Gewebe toxikologisch untersucht werden. Zwischen Tod und Obduktion verändern sich diese Untersuchungsmaterialien auf unvorhersehbare Weise und daher kann erst ab dem Zeitpunkt der Probennahme der weitere Verlauf der toxikologischen Untersuchung kontrolliert und damit gelenkt werden. Diesem Umstand trägt die Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) mit „Empfehlungen zur Asservierung von Obduktionsmaterial“ und „Richtlinien zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen“ Rechnung [1,2].

Um die große Zahl toxikologisch relevanter Substanzen aus diesem sehr heterogenen Untersuchungsmaterial zuverlässig isolieren zu können, benötigt man eine Kombination verschiedener Extraktionsverfahren. Eine dabei recht häufig

eingesetzte Methode ist die Festphasenextraktion, da sie in der Lage ist, ein breites Spektrum an Analyten zu isolieren.

Der Arbeitskreis Extraktion der GTFCh führte Untersuchungen zur Festphasenextraktion von postmortal gewonnenen Körperflüssigkeiten und Geweben durch. Es wurden verschiedene Sorbentien und unterschiedliche Aufschluss- und Durchführungstechniken (z.B. Automatisierung) für diverse Matrices (Blut, Leber, Gehirn) erprobt und mittels laborübergreifender Vergleichsuntersuchungen auf ihre Praxistauglichkeit getestet. Daraus resultierende Empfehlungen sollen forensische Experten bei der Auswahl und Entwicklung einer geeigneten Methode zur Extraktion von postmortal veränderten Körperflüssigkeiten und Geweben unterstützen.

2. Diskussion:

Alle postmortal gewonnenen Körperflüssigkeiten und Gewebe benötigen eine ausreichende Probenvorbereitung vor dem Extraktionsschritt. Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten ist eine sorgfältige Homogenisierung (z.B. mit einem Ultra Turrax) eine wichtige Grundvoraussetzung. Bei gründlicher Homogenisierung von Gewebeproben, ist davon auszugehen, dass die ermittelte Konzentration die tatsächliche Konzentration im Gewebe ausreichend repräsentiert. In der Praxis wird man eine größere Probenmenge (z.B. 5g Gewebe) homogenisieren, um lokale Konzentrationsunterschiede zu kompensieren; aus dem Homogenisat wird dann ein Aliquot für die Analyse entnommen.

Für quantitative Analysen, aber auch zur Kontrolle des Extraktionsvorganges bei qualitativen Analysen, sind geeignete interne Standards so früh wie möglich dem Untersuchungsmaterial zuzusetzen. Als interne Standards eignen sich beim Einsatz der Massenspektrometrie stabile Isotope der Analyte. Zur Durchführung einer systematischen toxikologischen Analyse müssen die eingesetzten Standards die chemisch/physikalischen Eigenschaften der möglichen Analyte ausreichend repräsentieren.

Probenvorbereitung:

Zur Probenvorbereitung für eine anschließende Festphasenextraktion wurden zwei unterschiedliche Verfahren getestet [3]:

1. Proteinfällung und gleichzeitige Extraktion mit Acetonitril unter alkalischen Bedingungen.

Diese Methode wurde nur für Blut und Gehirn erprobt und eignet sich nicht für sehr kollagenhaltige Matrices (z.B. Leber), da es unter solchen Bedingungen zu massiven Fällungsverlusten kommt. Sie eignet sich besonders für Zielanalysen und quantitative Bestimmungen, da mögliche Fällungsverluste durch geeignete interne Standards ausreichend kompensiert werden können.

Durchführung: Zur Durchführung wird das Gewebe homogenisiert; nach Einwaage und Zugabe der internen Standards wird eine frisch bereitete Mischung von 1,0mL Acetonitril und 0,1mL gesättigter wässriger Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung zugesetzt. Nach dem Schütteln am Vortex für 5 min. wird bei 14000g zentrifugiert. Für eine weitere Verarbeitung mittels Festphasenextraktion empfiehlt es sich, das organische Lösungsmittel zu entfernen, oder zu verdünnen (der Acetonitril-Anteil sollte < 20% sein).

2. Homogenisieren der Probe in Puffer-Lösung (pH 7,4) unter Vermeidung der Proteinfällung

Durchführung: Zur Durchführung wird das Gewebe nach Einwaage und Zugabe des Phosphatpuffers und der internen Standards mittels Ultra Turrax bei 20.000U/min homogenisiert. Anschließend wird bei max. 2200g zentrifugiert (das empfohlene Verdünnungsverhältnis beträgt 1:10 für Blut und bis zu 1:50 für Gewebe).

Phosphatpuffer (pH 7,4): 10,3g Dinatriumhydrogenphosphat und 1,2g Kaliumdihydrogenphosphat in 1,0L Aqua dest.

Festphasenextraktion:

Zwei unterschiedliche, nichtselektive Sorbentientypen für die Festphasenextraktion wurden in Vergleichsuntersuchungen an Leber- und Gehirnproben getestet und führten in neun verschiedenen forensich-toxikologischen Untersuchungseinrichtungen zu vergleichbaren Ergebnissen [4]. Sie können deshalb alternativ empfohlen werden. Um ausreichende Reproduzierbarkeit zu erreichen, empfiehlt sich der Einsatz von geeigneten Extraktionsautomaten [5].

1. Modifizierte Kieselgele als „Mischphasen“

Durchführung: Bei der Methodenentwicklung können bereits publizierte Methoden als Basis verwendet werden [6,7]. Bei der Umsetzung dieser Methode für postmortal veränderte Proben (insbesondere bei Fäulnis) ist die limitierte Ionenaustauscher-Kapazität der „Mischphasen“ zu berücksichtigen.

2. Polymere auf Styrol-Basis

Durchführung: Bei der Methodenentwicklung können bereits publizierte Methoden als Basis verwendet werden [8,9]. Es ist zu beachten, dass vom Arbeitskreis Extraktion in Zusammenhang mit Polymer-Phasen nur die Probenvorbereitung unter Vermeidung der Proteinfällung getestet wurde. Der bei dieser Methode erhaltene Rohextrakt kann nicht direkt für die Analyse eingesetzt werden; eine weitere Aufreinigung (z.B. durch flüssig/flüssig-Extraktion) ist unumgänglich, um mit den „Mischphasen“ vergleichbare Resultate zu erzielen.

3. Schlussbemerkung:

Die wichtigste Voraussetzung für den Einsatz der Festphasenextraktion zur Aufarbeitung von postmortal gewonnenen Körperflüssigkeiten oder Geweben, ist die geeignete Probenvorbereitung.

Die Praxis hat gezeigt, dass eine entsprechende Anpassung existierender „SPE-Hausmethoden“ in der Regel die besten Ergebnisse liefert. Es kann bei der Methodenentwicklung auch auf schon publizierte Verfahren zurückgegriffen werden.

Um die Beweistauglichkeit der endgültig eingesetzten Aufarbeitungsmethode zu dokumentieren, sollten interne und externe Qualitätskontrollen durchgeführt werden. Dazu wäre zu überlegen, wie zertifiziertes Referenzmaterial bzw. entsprechende Ringversuche für postmortal veränderte Körperflüssigkeiten und Gewebe verfügbar gemacht werden könnten.

Die routinemäßige Untersuchung von Körpergewebe (z.B. Gehirn bei zentral wirksamen Substanzen) im Zusammenhang mit der Aufklärung der möglichen Todesursache wäre wünschenswert, um vermehrt Referenzdaten und Erfahrungen auf diesem Gebiet zu erhalten. Damit würde eine Kompetenz der forensischen Toxikologie gefördert, die kein anderes Fachgebiet vorweisen kann.

4. Literatur:

- [1] Skopp G., v. Meyer L. (2004) Empfehlungen der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensisch-toxikologische Untersuchungen. *Toxichem + Krimtech* 71(2): 101-106
- [2] Aderjan R., Briellmann T., Daldrup T., Demme U., Harzer K., Herbold M., Käferstein H., Kauert G., v. Meyer L., Möller M., Mußhoff F., Schmitt G., Weinmann W. (1998) Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. *Toxichem + Krimtech* 65(1): 18-24
- [3] Stimpfl T., Daldrup T. and Vycudilik W. (2001) Systematic toxicological analysis in tissue samples: Comparing alternative techniques to separate lipophilic drugs from the biological matrix, Beiträge zum XII. Symposium der GTFCh, Herausgegeben von F. Pragst u. R. Aderjan. Verlag Dr. D. Helm, Heppenheim, 178-185
- [4] T. Stimpfl, F. Erdmann, H. Krause, L. Kröner, K.J. Lusthof, A. Reiter, G. Rochholz, E. Schneider, J. Teske, W. Vycudilik and J.P. Weller (2006) Systematic toxicological analysis in tissue samples: Comparing different solid-phase extraction procedures to separate lipophilic drugs from the biological matrix, Beiträge zum XIV. Symposium der GTFCh, Herausgegeben von F. Pragst u. R. Aderjan. Verlag Dr. D. Helm, Heppenheim, 345-349
- [5] Stimpfl, T., Vycudilik, W. (2004) Automatic Screening in Postmortem Toxicology. *Forensic Sci. Int.* 142: 115-125
- [6] Franke, J.P.; De Zeeuw R.A. (1998) Solid-Phase Extraction Procedures in Systematic Toxicological Analysis. *J. Chromatogr. B* 713: 51-59
- [7] Lowe R.H., Barnes A.J., Lehrmann E., Freed W.J., Kleinman J.E., Hyde T.M., Herman M.M., Huestis M.A. (2006) A validated positive chemical ionization GC/MS method for the identification and quantification of amphetamine, opiates, cocaine, and metabolites in human postmortem brain. *J. Mass Spectrom.* 41: 175-184

- [8] Stimpfl T., Jurenitsch J. and Vycudilik W. (2001) General Unknown Screening in Postmortem Tissue and Blood Samples: A Semi-Automatic Solid-Phase Extraction using Polystyrene Resins Followed by Liquid-Liquid Extraction. *J. Anal. Toxicol.* 25(2): 125-129
- [9] Stimpfl T., Reichel S. (2007) Distribution of drugs of abuse within specific regions of the human brain. *Forensic Sci. Int.*; zur Publikation angenommen

Dr. Thomas Stimpfl
Institut für Rechtsmedizin,
Butenfeld 34
D 22529 Hamburg
Germany

Dr. Thomas Daldrup
Institut für Rechtsmedizin,
Moorenstr. 5
D 40225 Düsseldorf
Germany

Dr. Ulrich Demme
Institut für Rechtsmedizin
Fürstengraben 23
D 07740 Jena
Germany

Dr. Freidoon Erdmann
Institut für Rechtsmedizin
Frankfurterstr. 58
D 35392 Giessen
Germany

Dr. Harald Krause,
Flugmedizinisches Institut
der Luftwaffe
Postfach 1264/KFL
D 82242 Fürstfeldbruck
Germany

Dr. Lars Kröner
Institut für Rechtsmedizin
Melatengürtel 60/62
D 50823 Köln
Germany

Dr. Klaas Jürgen Lusthof
Nederlands Forensisch Instituut
Laan van Ypenburg 6
NL 2497 GB Den Haag
The Netherlands

Dr. Arthur Reiter
Institut für Rechtsmedizin,
Kahlhorststr. 31-35
D 23562 Lübeck, Germany

Dr. Gertrud Rochholz
Institut für Rechtsmedizin
Arnold-Hellerstr. 12
D 24105 Kiel
Germany

Dr. Erhard Schneider
Landeskriminalamt Baden-
Württemberg
Taubenheimstr. 85
D70372 Stuttgart
Germany

Dr. Frank Sporkert
Institut für Rechtsmedizin
Rue de Bugnon 21
CH 1005 Lausanne
Switzerland

Dr. Jörg Teske und
Dr. Jens-Peter Weller
Institut für Rechtsmedizin
Carl-Neuberg Str. 1
D 30625 Hannover
Germany

Dr. Siegfried Zörntlein
Institut für Rechtsmedizin
Am Pulverturm 3
D 55131 Mainz
Germany