

# Wirkstoffnachweis in Haaren mit Gaschromatographie – Ion Trap-Massenspektrometrie

Ulrich Demme, Monika Dorn und Otto Wallbraun

## Abstract

The aim of this paper is to investigate the suitability of Gas Chromatography - Ion Trap – Mass Spectrometry for the detection not only of 'classic' groups of addictive drugs but also of legal drugs in hair. Amphetamines and Tetrahydrocannabinol (+CBD, CBN) were extracted by 1-chlorobutane after alkaline hydrolysis of the hair. The amphetamines were re-extracted by weak acid, the cannabinoids were directly detected after evaporation of the remaining organic phase. The acid solution was extracted (alkaline) again and the amphetamines were derivatized at room temperature by MBHFBA. All other substances were extracted by treatment of the hair with buffer (pH=6) in an ultrasonic bath. From this solution cocaine, 6-monoacetylmorphin, codeine, and many pharmaceutical drugs were extracted by a two-step liquid-liquid-extraction and detected without any derivatization. Benzoylcegonine and morphine were extracted by solid phase extraction and derivatized by PFPA/PFPOH.

The detection of the gaschromatographic separated drugs takes place automatically by retention times, FULL SCAN mass spectra, and qualifiers. The detection limit for the 'classic' groups (amphetamines, cannabinoids, cocaine and opiates) is clearly lower than 0.5 ng/mg hair. In the case of about 50 other drugs the sensitivity of Ion Trap – Mass Spectrometry was high enough to detect them with at least this detection limit assuming a recovery of 0.7 for the puffer treatment of hair in the ultrasonic bath; some examples will be demonstrated. It will be demonstrated that, after simple preparations of hair samples, a detection of illegal and legal drugs by Ion Trap–Mass Spectrometry is possible and the advantage of this equipment - the identification by the FULL SCAN-spectra - is also useful in hair analysis. Using the MS-MS technique, a clear decrease of detection limit should be possible.

## 1. Einleitung und Zielstellung

Hauptziel dieser Arbeit ist es zu testen, inwieweit die Gaschromatographie – Ion Trap Massenspektrometrie für den Nachweis nicht nur der ‚klassischen‘ Betäubungsmittel (BTM) sondern auch von Arzneistoffen in Haarproben geeignet ist. Zu diesem Zweck sollte eine für die Ion Trap – Massenspektrometrie geeignete Probenvorbereitung entwickelt werden.

## 2. Material und Methoden

Nach üblicher Probenvorbereitung (waschen mit aqua dest., evtl. mehrfach zur Entfernung von Haargel, und Aceton) wurden für die ‚klassischen‘ BTM-Gruppen folgende Analysenverfahren als brauchbar empfunden:

Cannabinoide und Amphetamine wurden durch Lösen in Natronlauge und anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion analysiert (Tab.1, Spalte 1); Opiate und

Cocain durch Behandlung mit Puffer pH 6 im Ultraschallbad und anschließender Festphasen-Extraktion (Tab. 1, Spalte 2).

Tab. 1: Aufarbeitung der Haarproben für die GC-MS-Analyse auf BTM

Cannabinoide und Amphetamine	Opiate und Cocain
Haarprobe (~30mg) + 25 ng THC-d3 + 25 ng Amphetamine-d5	Haarprobe (~30mg) + 25 ng int. St.-d3
+2ml 1 N NaOH, 15 min 100°C, +2ml ges. NaCl-Lsg., 1 h bei -18°C	+ 5ml Phosphat-Puffer pH=6 (PP6), 2 h Ultraschall- Bad bei 45°C
2,5 ml 1-Chlorbutan (org. Phase 1)	SPE mit ISOLUTE HCX XL, 10ml, 130mg
org. Phase1 extrah. mit 1ml 0,2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ., H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaHCO <sub>3</sub> →pH~9, extrah. mit 1,2 ml 1-Chlorbutan (org. Phase 2)	Kond. mit MeOH, Phosphatpuffer pH6; Probenaufgabe, Waschen mit H <sub>2</sub> O, 0,1 n HCl, MeOH, gründlich trocknen
Evp. von org. Phase 1 (Cannabinoide)	Elution mit 2ml MeOH/NH <sub>3</sub> (98:2),
Evp. von org. Phase 2 (+25 µl MeOH/HCl), Rs + 100 µl HFBA, 30min bei 75°C, oder: evp. von org. Phase1 bis ca. 30 µl + 5 µl MBHFBA (Amphetamine); Rs in 25 µl Ethylacetat lösen, 2µl injizieren	evp., Rs + 100 µl PFPA + 70 µl PFPOH, 30min bei 70°C; Rs in 25 µl Ethylacetat lösen, 2µl injizieren

Die Chromatogramme nach Behandlung mit Methanol und direkter Injektion dieser Extraktionsrückstände wiesen eine für die Ion Trap Massenspektrometrie (Identifizierung über die FULL SCAN-Spektren) ungeeignet hohe Matrixbelastung auf.

Durch Behandlung einer zusätzlichen Haarprobe bei pH 6 im Ultraschallbad und anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion (+Re-Extraktion) ließen sich eine Reihe zentralwirksamer Wirkstoffe nachweisen. Die Vorgehensweise ist in Tab.2 zusammengefasst.

Tab. 2: Aufarbeitung der Haarproben für die GC-MS-Analyse auf Arzneistoffe

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

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

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

*MS-Bedingungen:* EI-Modus (Emissionsstrom: 10-15µA), m/z: 50-600, background-Masse: 49, automatische Verstärkungskontrolle (AGC), Scan-Zeit: 1sec, Trap-Temperatur: 220°C

Die Substanzidentifizierung erfolgte automatisch (Software: Varian workstations: Versionen 4.51 – 6.6 (+DOS-Version 1.4 ,AUTOQUAN')) durch Vergleich der FULL SCAN-Massenspektren und der Retentionszeiten mit den in selbst erstellten Datenbanken gespeicherten Massenspektren und Retentionszeiten der in die Untersuchung einbezogenen Wirkstoffe (FIT-Threshold 600 - 700, Retentionszeitfenster: 20 – 40 sec). Zur sicheren Identifizierung wurden zusätzlich die Massenchromatogramme (Einzelmassen bzw. Summe von bis zu drei charakteristischen Massen) im Vergleich zum Totalionen-Chromatogramm dargestellt. Außerdem stand zur Bestätigung der Nachweise die Spektrenbibliothek von PFLEGER/MAURER/WEBER [1] zur Verfügung.

### 3. Ergebnisse

84 Haarproben wurden mittels des beschriebenen Untersuchungsprogramms untersucht: 75 zur Testung auf Drogenfreiheit (bei diesen meist jüngeren Personen ist eine Aufnahme von Medikamenten weniger wahrscheinlich) und 9 Haarproben von Sektionsfällen. Neben den üblichen BTM (Tab.3) ließen sich insgesamt 23 Substanzen aus verschiedenen Wirkstoffgruppen in diesen Haarproben nachweisen, zusätzlich Metaboliten zweier Wirkstoffe sowie Nikotin, Cotinin und Coffein. (Tab. 4).

Tab. 3: Zahl der nachgewiesenen BTM in den 84 Haarproben

BTM	Anzahl	BTM	Anzahl
Amphetamin	15	Cannabidiol	5
Methamphetamin	2	Cannabinol	6
MDA	6	Cocain	6
MDMA	7	Benzoylecgonin	5
MDEA	1	Mono-Acetylmorphin	2
THC	16	Morphin	2

Tab. 4: In den authentischen Haarproben (n=84) nachgewiesene Wirkstoffe

Wirkstoff	m/z	FIT	„c“	Fall
Biperiden	98+213+333	844	~0,1	S80/07: Tod in Psychiatrie
Carbamazepin	193+236+237	819	-	S546/06: Epilepsie, Opfer-Tötungsdelikt
Chlorprothixen-Sulfoxid	58+221	833	-	S100/07: Psychose, keine Intoxikation
Diazepam	255 – 286	943	~1,2	F1223: ?
Diphenhydramin	58+165	853	~2	S32
Diphenhydramin-Mb	102+116+167	754	-	S32
Doxepin	58+280	866	~1	S634
Doxepin-Mb	116+221+234	825	-	S634
EDDP	262+276+277	761	-	F1886/05
Haloperidol	123+224+237	943	~0,1	S80/07: Tod in Psychiatrie
Hydroxy-Carbazepin	193+211+237		-	S546/06: Epilepsie, Opfer-Tötungsdelikt
Levorphanol	150+256+257	855	-	S32
Lidocain	58+86+235	858	~0,6	S80/07:
Methadon	72+223+294	882	~1	F1886/05: Opiat-Konsument, Substitutionstherapie
Metorphan	270 – 272	814	-	S32
Noscapin	205+220+221	534	-	F1886/05
Ox-Carbazepin	180+209+252		-	S546/06: Epilepsie, Opfer-Tötungsdelikt
Paracetamol	80+109+151	817	-	S32
Pipamperon	138+165+331	959	~4	F1863: chronische Aufnahme?
Tetrazepam	253 – 290	908	~0,1	F1820: angeblich jeden 2.Tag ½ Tablette
Tramadol	58+264	634	1,4	
Zotepin	58+72+208	879	~0,5	S80/07: Tod in Psychiatrie
Zotepin-Mb	227+260+262	878	-	S80/07: Tod in Psychiatrie

In Spalte 2 (m/z) sind die Massen angegeben, die zur Quantifizierung des entsprechenden Wirkstoffs verwendet wurden, die Größenordnung der Konzentrationen („c“) wurden aus den für Serum erstellten Kalibrationskurven ermittelt.<sup>1</sup> Mit FIT (Spalte 3) ist die Übereinstimmung des FULL SCAN-

<sup>1</sup> Die Quantifizierung der BTM erfolgte mit Hilfe entsprechender Kalibrationskurven unter Bezug auf die entsprechenden deuterierten Standards.

Spektrums mit der Spektrenbibliothek von PFLEGER/MAURER/WEBER [2] bezeichnet (n.e. = Wirkstoffe in dieser Auflage noch nicht enthalten).

Cocain, Mono-Acetyl-Morphin, Codein (und Heroin) lassen sich ebenfalls in diesem Extrakt (d.h. ohne Derivatisierung) nachweisen, ebenso wie Coffein, Cotinin und Nikotin.

Aus der langjährigen Anwendung des beschriebenen Verfahrens (Tab.2) auf Serumproben kann abgeschätzt werden, welche Wirkstoffe zusätzlich auf diese Weise nachweisbar sein müssten. Für eine Nachweisgrenze von 0,5 ng/mg Haar und einer angenommenen Ausbeute von 0,7 (für die Behandlung mit Puffer pH=6 im US-Bad) müssten bei einer Probenmenge von 30 mg Haar ca. 10 ng erfassbar sein (bei einer NG von 0,2 ng/mg Haar entsprechend den Richtlinien der GTFCh wären es etwa 4ng). Von den über 300 in Serum bzw. Blut nachgewiesenen Wirkstoffen wurden von 33 Verbindungen - zusätzlich zu den Stoffen in Tab. 4 - Mengen in diesem Konzentrationsbereich sicher nachgewiesen. In Tab. 5 sind diese prinzipiell erfassbaren Wirkstoffe aufgeführt.

Tab. 5: Prinzipiell nachweisbare Wirkstoffe

Amitriptylin	Levomepromazin	Perazin
Budipin	Medazepam	Pethidin
Bupivacain	Melperon	Promazin
Citalopram	Memantin	Promethazin
Clomipramin	Mepivacain	Prothipendyl
Dihydrocodein	Methadon	Rivastigmin
Doxylamin	Methylphenidat	Tilidin
Fentanyl	Mirtazapin	Trimipramin
Flunitrazepam	Nitrazepam	Verapamil
Imipramin	Olanzapin	Zolpidem
Ketamin	Oxycodon	Zopiclon

#### 4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Es wird gezeigt, dass nach einfacher Probenvorbereitung ein Wirkstoff-nachweis in Haaren mittels Gaschromatographie – Ion Trap-Massenspektrometrie möglich ist und ihr Vorteil – die Identifizierung über das FULL SCAN-Spektrum – auch für die Haaranalyse nutzbar gemacht werden kann.

Neben den 12 wichtigsten illegalen Drogen (die auch im Ringversuch der GTFCh kontrolliert werden) wurden 23 legale Wirkstoffe in authentischen Haarproben nachgewiesen. Mehr als 30 Wirkstoffe besitzen ausreichend niedrige

Nachweisgrenzen, so dass ein Nachweis in Haarproben mit Hilfe des vorgestellten einfachen ‚Screening‘-Programms möglich sein müsste.

Es ist zu bemerken, dass z.B. Cocain mit diesem Verfahren (Tab. 2) wesentlich einfacher und schneller nachweisbar ist, als nach Isolation durch SPE und vor allem nach PFPA-Behandlung.

Am Beispiel des Tetrazepams ließ sich zeigen, dass mittels MS-MS das Signal-Rausch-Verhältnis um den Faktor  $>10$  erhöht werden kann und somit die Nachweisgrenzen entsprechend gesenkt werden können. Mittels MS-MS könnte somit die Ion Trap – Massenspektrometrie auch in DFSA bzw. DFC-Fällen, in denen sehr niedrige Nachweisgrenzen erforderlich sind [2,3,4], anwendbar sein.

### **Literaturverzeichnis**

- [1] Pflieger K, Maurer HH, Weber A (2000) Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites Second, revised and enlarged edition Part 4, WILEY VCH Weinheim 2000
- [2] Irving RC, Dickson SJ (2007) The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. *Forensic Science International* 166: 58-67
- [3] Kintz P, Villain M, Salquebre G, Cirimele V (2007) Toxicological strategy in case of drug-facilitated crime. Why are these analyses so expensive. XV. GTFCh-Symposium Mosbach (im Druck)
- [4] Sachs H (2005) Neuere Entwicklungen in der Haaranalytik. 4. Workshop „Neue Aspekte in der Drogenanalytik“ Bad Griesbach 2005

PD Dr. Ulrich Demme  
Institut für Rechtsmedizin  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Fürstengraben 23  
D-07740 Jena  
E-Mail: ulrich.demme@med.uni-jena.de