

GTFCh-Reisestipendium zur TIAFT Conference 2025

Verwendung von Serum-basierten kommerziellen Referenzmaterial zur Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 151 für DFC relevante Analyten im Urin

Johanna Schubarth, Frank T. Peters, Daniela Wissenbach*

Universitätsklinikum Jena, Institut für Rechtsmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena

*Korrespondierende Autorin: Daniela.Wissenbach@med.uni-jena.de

1. Einleitung

Das Drug-Facilitated-Crime (DFC)-Komitee der Society of Forensic Toxicology (SOFT) hat in seiner Richtlinie Empfehlungen für die Bearbeitung von Fällen im Zusammenhang mit DFC gegeben. Für die Analyse wird Urin als Matrix der Wahl durch das SOFT-DFC-Komitee empfohlen. Darüber hinaus sind sowohl Wirkstoffe als auch Metabolite – insgesamt mehr als 130 Analyten – gelistet, auf welche bei derartigen Fragestellungen mindestens untersucht werden soll. Zusätzlich erarbeitete das SOFT-DFC-Komitee Vorschläge für die entsprechenden Analytkonzentrationen, welche für die Matrix Urin als Konzentration im Sinne der Mindestnachweisbarkeitsgrenze (recommended minimum performance limit, RMPL) zu betrachten sind.

Für die Validierung der Analysemethoden sind entsprechende Qualitätskontrollen (QK) erforderlich, die möglichst alle Analyten in einer Probe enthalten. Das Herstellen von Multi-Analyt-QK durch Pipettieren von käuflich erworbenen Einzelsubstanz-Referenzlösungen ist jedoch mit einem hohen Zeitaufwand und mit hohen Kosten verbunden. Explizite Vorgaben zur Validierung von Methoden für die DFC-Analytik werden durch das SOFT-DFC-Komitee nicht gemacht. Bei Methoden mit dieser Fragestellung sollten jedoch neben der Selektivität die Nachweisbarkeit der Analyten an den empfohlenen RMPLs im Fokus der Validierung stehen. Durch den häufigen Einsatz von flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischen Methoden und dem bekannten Phänomen der Matrixeffekte sollte dies in einer möglichst großen Anzahl von verschiedenen Urinen gegeben sein.

Das Ziel unserer Studie war, den Arbeitsaufwand für die Herstellung von Urin-basierten Multi-Analyt-QK durch die Verwendung kommerzieller Serum-basierter Multi-Analyt-QK zu minimieren. Diese QK wurden für die Methodenentwicklung und -validierung verwendet.

2. Methoden

Für die Herstellung der Urin-basierten QK wurden einerseits Serum-basierte QK für Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) (ClinCheck ADD Level 2 Serum, ClinCheck AEP Level 2 Serum, ClinCheck BZP Level 2 Serum, ClinCheck NLP Level 2 Serum, ClinCheck TCA Level 2 Serum) sowie die QK für den Nachweis von Drogen (Drug Confirmation Tests (DCT), Level C Serum) verwendet. Diese wurden wie in Abbildung 1 dargestellt verdünnt.

Dafür wurden zunächst gleiche Volumina der fünf kommerziellen TDM-QK gemischt (Verdünnung 1:5). Diese wurden weiter mit synthetischem Urin verdünnt, um eine Verdünnung von 1:30 zu erreichen (Verdünnung 1:30). Die DCT-QK wurde im Verhältnis 1:5 und 1:15 mit synthetischem Urin verdünnt. Für die Betrachtung der durch die individuelle Urinmatrix hervorgerufenen Matrixeffekte und damit einhergehend den bestehenden Einfluss auf die Nachweisbarkeit der Analyten, wurden diese Verdünnungen mit jeweils 30 authentischen Leerurinen im

Verhältnis 1:10 weiterverdünnt. In Abbildung 1 ist zusätzlich die finale Verdünnung sowie der final enthaltene Urinanteil in den neuen Kontrollen angegeben.

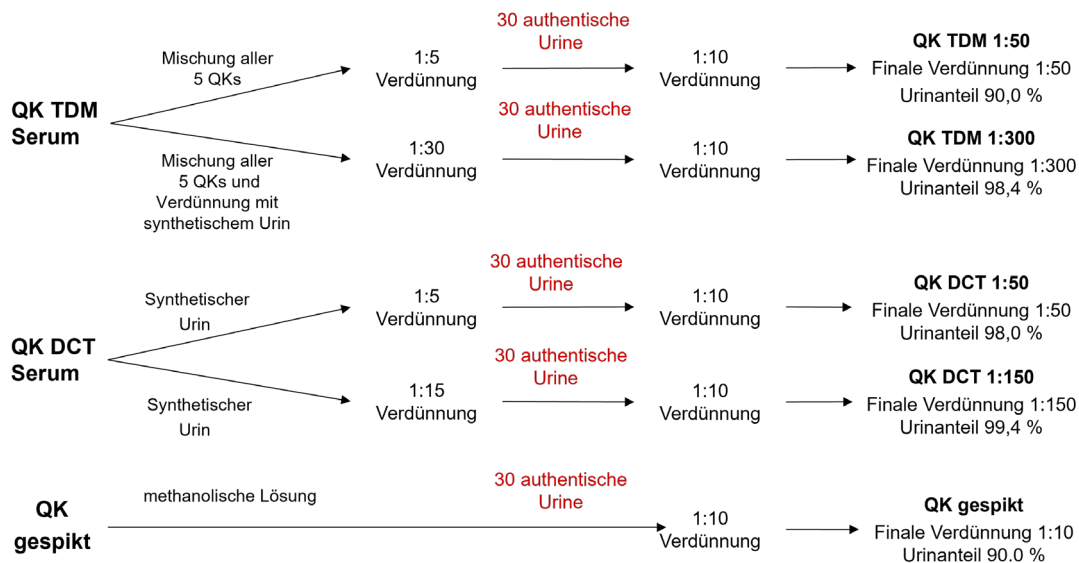


Abb. 1. Schematische Darstellung der Herstellung von Urin-basierten Qualitätskontrollen (QK) aus Serum-basierten QK (QK TDM und QK DCT) bzw. methanolischer Lösung (QK gespikt).

Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass die Konzentrationen der Analyten mindestens an, oft jedoch (weit) unterhalb des entsprechenden RMPL lagen. 45 Analyten waren nicht durch die kommerziellen Serumkontrollen abgedeckt. Für diese wurde eine methanolische Stammlösung in einer 10-fach höheren Konzentration als das RMPL hergestellt und anschließend ebenfalls mit den 30 authentischen Leerurinen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Jede der in authentischem Leerurin verdünnten QK-Verdünnungen wurde mit und ohne vorherige enzymatische Hydrolyse und anschließender Proteinfällung aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS analysiert (41 min, C18-Gradientenelution, ESI mit Polaritätsumschaltung, scheduled MRM).

3. Ergebnisse und Diskussion

Von den 151 in dieser Methode enthaltenen Analyten wurden 148 in jedem der 30 verschiedenen Urine an oder unterhalb ihres erforderlichen RMPL sicher nachgewiesen. In Abbildung 2 sind einige Analyten exemplarisch für den untersuchten Leerurin F4 dargestellt. Nur Valproinsäure, Topiramat und Primidon konnten nicht an deren geforderten RMPL nachgewiesen werden. Diese Substanzen waren erst in einer zehnfach höheren Konzentration nachweisbar.

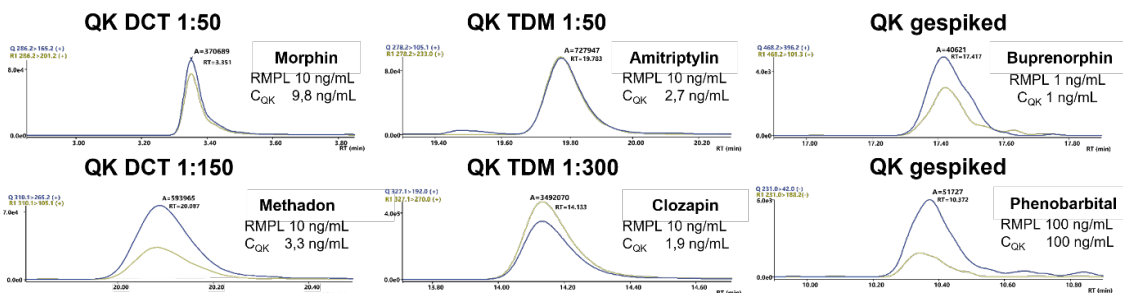


Abb. 2. Signalintensitäten für Quantifier (blaue Linien) und Qualifier (beige Linien) ausgewählter Analyten der 5 verschiedenen QK, hergestellt mit Leerurin F4; RMPL = recommended minimum performance limit, C_{QK} = Konzentration des Analyten in entsprechender Verdünnung.

Bei Auswertung aller Daten zeigte sich jedoch deutlich, dass die Signalfächen der einzelnen Analyten zwischen den getesteten 30 Leerurinen unterschiedlichen Schwankungen unterliegen. Für eine weitere Betrachtung dieser Schwankungen wurden die Variationskoeffizienten (CV) über die Signalfächen des jeweiligen Analyten in allen untersuchten 30 gespikten Leerurinen berechnet. Eine Auswahl an Ergebnissen ist in Tabelle 1 dargestellt. Die nicht schraffierten CV stellen die Ergebnisse der QK dar, welche für die Identifizierung an bzw. moderat unterhalb des RMPL herangezogen wurden.

Tab. 1. Name der Qualitätskontrolle (QK), finaler Urinanteil, sowie die Schwankung (CV in %) der Peakflächen ausgewählter Analyten in diesen QK über 30 untersuchte Urinproben; nicht schraffierte Kästchen zeigen die Ergebnisse der QK, welche für die Identifizierung an bzw. moderat unterhalb des RMPL herangezogen wurden, schraffierte Kästchen zeigen zusätzliche Ergebnisse.

Qualitätskontrolle	Urinanteil	Morphin	Methadon	Amitriptylin	Clozapin	Buprenorphin	Phenobarbital
		CV der Peakflächen n = 30 Urine [%]					
QK DCT 1:50	98 %	47,0	22,2				
QK DCT 1:150	99,4 %	61,9	59,3				
QK TDM 1:50	90 %			22,4	20,7		
QK DCT 1:300	98,4 %			33,0	20,5		
QK gespikt MeOH	90 %					50,9	15,1

Es zeigte sich, dass die Signale für einige Analyten, z. B. Amitriptylin und Clozapin, moderate, für andere Analyten, z. B. Morphin, Methadon und Buprenorphin, deutlich höhere Schwankungen aufwiesen. Dies war jedoch, unter Berücksichtigung aller Ergebnisse, unabhängig davon, ob die QK durch Verdünnung der Serum-basierten Kontrolle oder durch Spiken von methanolischer Lösung hergestellt wurde, sodass diese Beobachtung unabhängig von der QK-Herstellungsmethode erschien. Es ist deshalb eine Analytenabhängigkeit zu diskutieren.

Durch die sequenzielle Verdünnung der Proben konnten auch die Daten von höheren Konzentrationen bzw. Konzentrationen weit unterhalb des RMPL betrachtet werden (schraffierte Daten). Dabei zeigten sich für die individuellen Analyten bei der jeweils höheren Konzentration (meist) geringere Schwankungen. Bei niedrigeren Konzentrationen waren die Schwankungen hingegen oft größer. Somit ist auch von einer Konzentrationsabhängigkeit auszugehen.

Um einen Einfluss des Urinanteils zu untersuchen, wurden die CV der zugesetzten internen Standards betrachtet, welche in allen QK die gleiche Konzentration aufweisen. Die ermittelten Schwankungen über die Peakfläche zeigten auch hier deutliche Analyt-abhängige Unterschiede. Differenzen zwischen den CV der Peakflächen der internen Standards für QK gespikt (90 % Urin, 10 % Methanol) und QK TDM (90 % Urin, 10 % Serum) waren kaum zu beobachten. Jedoch war ein Trend zu erkennen, dass bei einigen internen Standards mit steigendem Urinanteil auch höhere CV der internen Standard-Peakflächen zu beobachten waren. Somit scheint der verbleibende Serumanteil, zwischen 10 % und 0,06 %, in den in Urin verdünnten QKs vernachlässigbar zu sein.

Der Nachweis von 148 von 151 Analyten zeigt trotz erheblicher Schwankungen der Signalintensitäten zwischen den 30 Urinproben, dass keine den Nachweis relevant beeinflussende Matrixeffekte in dieser Methode vorlagen. Die übrigen drei Antiepileptika konnten ebenfalls empfindlich nachgewiesen werden, wenn auch nicht so niedrig wie die zugehörigen RMPL.

Diese Daten zeigen, wie wichtig es ist, eine neue Methode zu validieren und extensiv zu charakterisieren. Insbesondere bei Anwendungen wie der hier diskutierten sollte dies mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Urinen durchgeführt werden.

4. Schlussfolgerung

Der beschriebene methodische Ansatz hat gezeigt, dass ein Matrixwechsel von Serum-basierten QK durch intensive Verdünnung mit Urin für die Herstellung von Urin-basierten QKs möglich ist. Die Details und weitere Aspekte sind für ein Peer-Review- Artikel geplant.

5. Danksagung

Ich danke der GTFCh für die Gewährung eines Reisestipendiums. Durch die finanzielle Unterstützung war es mir möglich, auf dem „62nd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2025“ in Auckland, Neuseeland, Teile meiner Forschungsergebnisse im Rahmen eines Vortrages zu präsentieren.