



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Nachweis von neuen psychoaktiven Substanzen in Körperproben mittels LC-MS/MS

verfasst von / submitted by

Lorenz Göschl Bsc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 863

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Biologische Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Gunda Köllensperger

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Danksagung

Vorab möchte ich bei den Menschen bedanken, ohne die das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein allererster Dank gebührt meinen Eltern, welche mir eine gute Schulausbildung sowie ein Studium ermöglich haben. Ohne ihre liebevolle, persönliche, aber auch finanzielle Unterstützung wären mir diese Möglichkeiten nicht offen gestanden. Ich konnte jederzeit auf Verständnis, offene Ohren und einen helfenden Rat vertrauen. Das eine oder andere mahnende Wort meiner Eltern hat bestimmt auch seinen Beitrag zu meinem Werdegang geleistet. Trotzdem wurden mir bei meiner beruflichen Entwicklung alle Freiheiten und Möglichkeiten gelassen.

Als nächstes möchte ich meinem Betreuer Dr. Günter Gmeiner, welcher mich mit seiner erstklassigen fachlichen Expertise und freundschaftlichen Betreuung über die gesamte Zeit unterstützt und mir immer wieder neue Motivation für das Vervollständigen dieser Arbeit geschenkt hat. Neben seiner akademischen Betreuung glänzt er als wünschenswerter Vorgesetzter, welcher meine berufliche Weiterentwicklung ebenfalls stets fördert. Ebenfalls möchte ich dem Rest des Teams der Anti-Doping- bzw. forensischen Analytik der Seibersdorf Labor GmbH für deren fachliche Unterstützung danken.

An dieser Stelle muss ich mich auch bei Univ.-Prof. Dr. Gunda Köllensperger bedanken, welche die akademische Betreuung von seitens der Universität Wien übernommen hat.

Ebenso muss ich mich bei der Firma Seibersdorf Labor GmbH bedanken, welche mich finanziell, mit Material und Räumlichkeiten für das Erarbeiten dieses Projekts unterstützt hat.

Der letzte Dank gilt meiner Lebensgefährtin Melanie, welche mich privat auch in den hektischsten Zeiten immer unterstützt und gestärkt hat. Ohne ihre Geduld wäre diese Zeit mit Sicherheit nicht so angenehm und reibungslos verlaufen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Abstract	9
1.1 Deutsch.....	9
1.2 Englisch.....	10
2. Einleitung.....	11
2.1 Themenstellung.....	11
2.2 Problemstellung	15
2.3 Ziel der Arbeit	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Analyten	16
3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	23
3.1.3 Geräte.....	24
3.1.4 Sonstige Utensilien und Geräte.....	36
3.1.5 Programme.....	36
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Massenspektrometrie und Chromatographie.....	37
3.2.2 Probenaufarbeitung	40
3.2.3 Validierung	45
3.2.4 Realproben	47
4. Ergebnisse und Diskussion	48
4.1 Probenaufarbeitungen	48
4.2 Massenspektrometrie und Chromatographie.....	50
4.2.1 Massenspektrometrie	50
4.2.2 Chromatographie	53
4.3 Validierung	57
4.3.1 Nachweisgrenze	57
4.3.2 Spezifität und Robustheit	59
4.3.3 Verschleppung.....	61
4.3.4 Suppression	63
4.3.5 Wiederfindung.....	65

4.4 Realproben	67
4.4.1 Mephedron.....	67
4.4.2 JWH-018	68
4.5 Schlusswort.....	69
5. Anhang.....	71
5.1 Literaturverzeichnis.....	71
5.2 Strukturformeln und Summenformeln der Analyten.....	75
5.2.1 Synthetische Cathinone.....	75
5.2.2 Synthetische Cannabinoide	78
5.2.3 Cannabinoid Metaboliten.....	80
5.2.4 Interne Standards	81
5.3 Standardmischungen – Auszüge aus Datenbank	82
5.3.1 Synthetische Cathinone (Std NPS I).....	82
5.3.2 Synthetische Cannabinoide (Std NPS II)	83
5.3.3 Interner Standard (IS)	84
5.4 Xcalibur Beispiel-Reports.....	85
5.4.1 Synthetische Cathinone.....	85
5.4.2 Synthetische Cannabinoide	88

Abkürzungsverzeichnis

[M]	Molekülmasse
°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
µl	Microliter
4-EMC	4-Ethylmethcathinon
4-MEC	4-Methylethcathinon
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Alpha-PPP	Alpha-Pyrrolidinopropiophenon
API	Atmospheric Pressure Ionisation
Ar	Argon
BGBI	Bundesgesetzblatt
BW	Blindwert
bzw	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CB	Cannabinoid-Rezeptoren
cc	Kubikzentimeter
CE	Kollisionsenergie
CID	Collision Induced Dissociation
CO	Carry over
D	Deuterium
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EG	Ethylenglycol
EI	Elektronenstoßionisation
EMCDDA	Centre for Drugs and Drug Addiction
ESI	Elektrospray-Ionisation
Ethylacetat	EtAc
EU	Europäische Union
FA	Ameisensäure
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Wasserstoff
h	Stunde
HCl	Salzsäure
He	Helium
HPLC	Hochleistung Flüssigkeitschromatographie
IEC	Internationale Elektrotechnische Kommission
IS	Interner Standard
ISL	International Standard for Laboratories
ISO	Internationale Organisation für Normung
kV	Kilovolt

LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection
LW	Leerwert
M	Molarität
m/z	Masse / Ladung
MDMA	Methylene-dioxymethamphetamine
MDPPP	3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone
MDPV	Methylenedioxypropylvaleron
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MQ	Milli-Q-Wasser
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektroskopie
N	Stickstoff
ng	Nanogramm
NH₄⁺	Ammoniak
NPS	Neue psychoaktive Substanzen
NPSG	Neue psychoaktive Substanzen Gesetz
O	Sauerstoff
PC	Personal Computer
Q	Quadrupol
QC	Qualitätskontrolle
R	Rest
RT	Retentionszeit
S	Schwefel
SEV	Sekundärelektronen-Vervielfacher
Si	Silizium
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Solid phase extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
SS	Spritzen Standard
THC	Tetrahydrocannabinol
TIC	Total ion chromatogram
TMS	Trimethylsilyl
UNDOC	united nations office on drugs an crime
UV	Ultraviolett
VIS	visible - sichtbar
WAADS	World Association of Anti-Doping Scientists
WADA	World Anti-Doping Agency
Xe	Xenon
z.B.	Zum Beispiel

1. Abstract

1.1 Deutsch

Neue psychoaktive Substanzen sind ein nach wie vor aktuelles Problem in der einschlägigen Drogenszene. Diese in Österreich bis zum Jahre 2012 teilweise noch völlig legal erwerblichen Substanzen führen weltweit, aber auch in Österreich, durch Überdosierungen immer wieder zu schlimmen Notfällen oder im Extremfall auch zum Tod. Wegen der enormen Vielfalt dieser Substanzklassen, sind diese in Österreich nicht im Suchtmittelgesetz (SMG), sondern in dem extra für diese Wirkstoffe entwickelten „NeuePsychoaktive- Substanzen Gesetz“ (NPSG) geregelt. Für diese meist sehr potenten Psychopharmaka sind lediglich vereinzelt toxikologischen Daten vorhanden, weshalb sie als sehr gefährlich eingestuft werden. Diese Substanzen versprechen dieselben Wirkungen wie andere gut erforschte Suchtmittel, wie beispielsweise Amphetamine, Kokain oder Cannabis, haben aber oft unerwartete und fatale Nebenwirkungen. Ebenso sind diese Substanzen im professionellen Sport untersagt und stehen daher auf der Verbotsliste der World Anti-Doping Agentur (WADA). Die zuverlässige Analyse solcher Substanzen muss daher sowohl das Ziel einer erfolgreichen Anti-Doping Analytik als auch vor allem der forensischen Analytik sein. Diese Masterarbeit hat sich zur Aufgabe gemacht, eine zuverlässige, effektive und ökonomische Methode für den analytischen Nachweis dieser neuen psychoaktiven Substanzen zu entwickeln, welche sowohl für Harn- als auch für Blutserumproben anwendbar sein soll. Die neuen psychoaktiven Substanzen setzen sich Großteils aus den synthetischen Cathinonen und den synthetischen Cannabinoiden zusammen. Beide leiten sich chemisch von deren namensgebenden, natürlichen Vertretern ab. Für diese zwei chemisch divergenten Substanzklassen, galt es eine geeignete Extraktion und Messmethode zu entwickeln. Dafür wurde die Festphasenextraktion als Isolationsmethode und die an Flüssigchromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie als Trenn- bzw. Messmethode gewählt. Dabei war es entscheidend die richtigen Materialien für die Extraktion auszuloten, die chromatographischen und spektrometischen Eigenschaften der Analyten zu ermitteln und die richtigen Anpassungen der Messgeräte für eine erfolgreiche Analyse zu treffen. Diese Bemühungen erbrachten eine hocheffiziente Methode für den Nachweis von über 30 relevante Vertretern der neuen psychoaktiven Substanzen im Blutserum und Harn, welche durch eine Methodenvalidierung im Sinne des „International Standard for Laboratories“ (ISL) der WADA bestätigt und dokumentiert wurde. Dabei wurden Nachweisgrenzen bis zu 0.1ng/ml und eine hohe Spezifität sowohl für Serum- als auch für Harnproben erreicht. Dies ließ sich an Realproben aus dem Bereich der Forensik und der Anti-Doping Analytik bestätigen.

1.2 Englisch

New psychoactive substances are still a current problem in the relevant drug scene. These substances were legally available until the year 2012 in Austria. These drugs lead, all over the world, but also in Austria to serious emergencies, in extreme cases even death. Because of the enormous diversity of these substance classes, they are excluded of the Austrian "Suchtmittelgesetz" (SMG). Therefore a new law, the "Neue Psychoaktive- Substanzen Gesetz" (NPSG), was developed especially for these substances. Since there is only few toxicological data of these mostly very potent psychotropic drugs available, they are classified as very dangerous. These substances promise the same effects as other well-known addictive substances, such as amphetamines, cocaine or cannabis, but often have unexpected and fatal side effects. These substances are also prohibited in professional sports and therefore they are on the prohibition list of the World Anti-Doping Agency (WADA). The reliable analysis of such substances must be the goal of both a successful anti-doping- and especially of forensic analysis. This thesis has set itself the objective of developing a reliable, effective and economical method for the analytical detection of new psychoactive substances, which should be applicable to both urine and blood serum samples. The new psychoactive substances consist mainly of synthetic cathinones and synthetic cannabinoids. Both are derived chemically from their eponymous, natural representatives. The goal of this work was to develop an appropriate extraction and measurement method for these two chemically divergent classes of substances. For this purpose, solid-phase extraction as isolation method and tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography as the separation and measurement method was chosen. The deciding factors were to explore the right materials for the extraction, to determine the chromatographic and spectrometric properties of the analytes, and to find the right adjustments to the instruments for the successful analysis. These efforts resulted in a highly efficient method for the detection of more than 30 relevant representatives of the new psychoactive substances in blood serum and urine. In addition, this application was confirmed and documented by a method validation in accordance with the International Standard for Laboratories (ISL) of WADA. Detection limits of up to 0.1ng / ml and high specificity for both serum and urine samples were achieved. This was confirmed by real samples in the field of forensics and anti-doping analysis.

2. Einleitung

2.1 Themenstellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem chemisch analytischen Nachweis von so genannten „Neuen psychoaktiven Substanzen“, kurz NPS. Diese Namensgebung hat sich durch die EU-Ratsentscheidung zur Einrichtung des Frühwarnsystems, welches von EMCDDA (Centre for Drugs and Drug Addiction) und Europol durchgeführt werden, zum Informationsaustausch über diese Stoffe eingebürgert ^[1,2]. Diese Substanzen haben weitgehend ein starkes psychoaktives Wirkpotenzial, unterliegen aber größtenteils nicht der internationalen Suchtmittelkontrolle. Auch in Österreich sind diese Substanzen nur in sehr kleinem Maße im Suchtmittelgesetz abgebildet. Sie tragen Namen wie „legal highs“, „herbal highs“, „research chemicals“ oder auch Designerdrogen und werden hauptsächlich in fernöstlichen Laboratorien hergestellt und nach Europa importiert ^[3]. Dort entstehen diese oft als Abfallprodukte der Arzneimittelforschung, oder werden als Forschungschemikalien produziert. Die NPS setzen sich hauptsächlich aus der Gruppe der synthetischen Cannabinoide (Cannabinoidmimetika) und der synthetischen Cathinone zusammen und es wird weltweit jährlich ein starker Zuwachs an neuen Vertretern dieser Gruppen registriert ^[4]. Beide Substanzgruppen sind einerseits im professionellen Sport verboten und müssen daher, im Sinne der Anti-Doping Kontrolle, Ziel einer leistungsfähigen Screeninganalytik sein. Andererseits sind diese Wirkstoffe zunehmend ein Problem in der einschlägigen Drogenszene, da Konsumenten von gängigen Suchtmitteln in Richtung neuer psychoaktiver Substanzen abdriften, um der gesetzlichen Verfolgung zu entgehen. Da es für die große Vielzahl an Substanzen jedoch in der Regel keine toxikologischen und pharmakologischen Daten gibt, spiegeln diese ein enormes Risikopotential für den Konsumenten wider. User sind Versuchskaninchen, Todesfälle infolge von Überdosierungen treten weltweit immer häufiger auf, auch in Österreich ereigneten sich schon lebensbedrohliche Notfälle auf Grund von NPS ^[5]. Daher betrifft dieses Thema neben der Anti-Doping- vor allem auch die forensische Analytik.

Die World Anti-doping Agency (WADA) nahm beide Substanzklassen gezielt in ihrer international geltenden Anti-Doping Liste auf. Beide gehören zu den Klassen von Substanzen, welche in Wettkämpfen verboten, allerdings bei einer Kontrolle außerhalb eines Wettkampfes toleriert werden. In folgender Abbildung soll der entsprechende Auszug aus der Anti-Doping Liste gezeigt werden:

PROHIBITED SUBSTANCES

S6 STIMULANTS

All stimulants, including all optical isomers, e.g. *d*- and *l*- where relevant, are prohibited.

Stimulants include:

a: Non-Specified Stimulants:

Adrafinil;
Amfepramone;
Amfetamine;
Amfetaminil;

b: Specified Stimulants.

Including, but not limited to:

4-Methylhexan-2-amine (methylhexanamine);

Benzfetamine;

Cathine**;

Cathinone and its analogues, e.g. mephedrone, methedrone, and α -pyrrolidinovalerophenone;

Dimethylamphetamine;

Ephedrine***;

S8 CANNABINOIDS

Prohibited:

- Natural, e.g. cannabis, hashish and marijuana, or synthetic Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC).
- Cannabimimetics, e.g. "Spice", JWH-018, JWH-073, HU-210.

Abbildung 1: Auszug aus der aktuellen WADA Anti-Doping Substanzliste^[6]

Bei den in dieser Liste angeführten Substanzen handelt es sich lediglich um Beispiele und decken diese bei weitem nicht das gesamte Spektrum ab. Neben den in der Anti-Doping-Liste angeführten Substanzen, orientierte sich die Auswahl weiterer repräsentativer Vertreter dieser Substanzgruppen an deren forensischen Relevanz. Zu diesem Zweck geben Beschlagnahmen und Warnungen offizieller Anti-Drogen-Programme wie das „Early Warning System“ der EU oder „Checkit!“ der Suchthilfe Wien GmbH Informationen darüber. Diese Institutionen überwachen und dokumentieren die einschlägigen Szenen und erstatten regelmäßig Bericht über den aktuellen Status der sich im Umlauf befindlichen Wirkstoffe. Die Informationen des „Checkit!“ aus Wien wurden besonders in dieser Arbeit berücksichtigt, da diese Methode vor allem in Österreich Anwendung finden soll.

Sowohl die synthetischen Cannabinoide, als auch die synthetischen Cathinone leiten sich chemisch von ihren natürlichen und namensgebenden Wirkstoffen ab, werden aber teilweise sehr unterschiedlich und in großer Vielfalt chemisch modifiziert^[8].

Ende des Jahres 2008 wurden die ersten dieser neuen psychoaktiven Substanzen in Österreich identifiziert. Dabei handelt es sich um das Cannabinoid JWH-018, damals ein Abfallprodukt der Pharmaforschung. Dieses wurde mit dem rauchbaren und wirkungsneutralen Eibischkraut vermischt, in kleinen Päckchen abgefüllt und unter dem Namen „Spice“ als Räucherwerk für die Aromatisierung der Raumluft in einschlägigen Shops, Tankstellen oder auf Webseiten völlig legal verkauft^[9] (siehe Abb. 2). Die meist sehr jungen Konsumenten wussten allerdings über die tatsächliche Zweckbestimmung dieser Produkte Bescheid und rauchten sie, was zu einer cannabisähnlichen Wirkung führt. In den folgenden Jahren wurden laufend weitere synthetische Cannabinoide identifiziert und zusätzlich tauchten die ersten synthetischen Cathinone auf dem österreichischen Markt auf, welche im Vergleich zu den Cannabinoiden oral oder nasal konsumiert werden. Diese wurden als Badesalze, Luftreiniger oder Pflanzendünger legal verkauft. In folgender Abbildung sind

Mephedron und Spice, die zwei populärsten Vertreter dieser Substanzgruppen in einer ihrer Verkaufsformen gezeigt:



Abbildung 2: Verkaufsformen NPS. Links: Mephedron; Recht: Spice (JWH-018) ^[5]

Nach Bekanntwerden der ersten Substanzen dieser Art begann der österreichische Gesetzgeber zu reagieren und zog das Arzneimittelgesetz für die Regelungen dieser Stoffe heran. Zuerst wurde ein generelles Verbot des Inverkehrbringens, der Einfuhr und des Verbringens von Räuchermischungen erlassen, welche Naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)-methanon (JWH-018) enthalten (BGBl. II Nr. 6/2009). Dieses Vorgehen hatte allerdings nur bedingt Erfolg, da laufend neue chemische Variationen der verbotenen Substanzen (z.B. JWH-015, JWH-073) auf den Markt kamen, für welche infolge kein Verbot mehr bestand, wodurch diese wiederum legal in den Geschäften verkauft werden konnten. Dennoch wurden bis Anfang 2011 weiter gezielt einzelne Substanzen in das Arzneimittelgesetz aufgenommen, bis dem Gesetzgeber klar wurde, dass diese Vorgehensweise nicht zielführend ist, da bis zu diesem Zeitpunkt bereits über 100 verschiedene neue Substanzen identifiziert wurden ^[9]. Auf globaler Ebene wurde ein noch schwerwiegenderer Anstieg der NPS festgestellt, wie folgende Abbildung des united nations office on drugs an crime (UNDOC) veranschaulicht ^[10]:

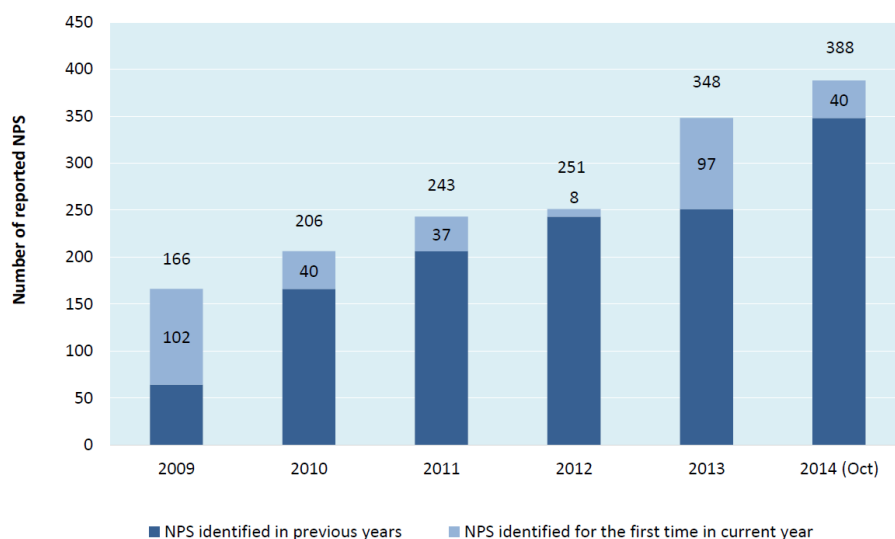


Abbildung 3: Weltweites Auftreten von neuen psychoaktiven Substanzen 2009-2014 ^[10]

Ende 2011 wurde das neue psychoaktive Substanzen Gesetz (NPSG, BGBl I Nr. 146/2011) vorgestellt, welches mit 01.01.2012 in Kraft trat. Dieses Gesetz definiert nun nicht mehr gezielte Substanzen, sondern ganze chemische Verbindungsklassen, in welche automatisch alle Variationen dieser Wirkstoffe fallen. Folgende Abbildung zeigt den entsprechen Auszug aus dem NPSG ^[11]:

BGBl. II - Ausgegeben am 30. Dezember 2011 - Nr. 468

1 von 1

Anlage II

1. Cannbinomimetisch wirksame Verbindungen

Die folgenden chemischen Grundstrukturen:

- a) (Naphthalin-1-yl)(1H-indol-3-yl)methanon aus der Gruppe der Naphthoyl-Indole,
- b) (Naphthalin-1-yl)(1H-indol-3-yl)methan aus der Gruppe der Naphthylmethyl-Indole,
- c) (Naphthalin-1-yl)(1H-pyrrol-3-yl)methanon aus der Gruppe der Naphthoyl-Pyrrole,
- d) 1-(Naphthalin-1-ylmethyl)-1H-inden aus der Gruppe der Naphthylmethyl-Indene,
- e) (Phenyl)(1H-indol-3-yl)methanon aus der Gruppe der Benzoyl-Indole,
- f) (2-Phenyl)(1H-indol-3-yl)methanon aus der Gruppe der Phenacetyl-Indole,
- g) 2-(3-hydroxycyclohexyl)phenol aus der Gruppe der Cyclohexyl-Phenole, weiters die
- h) Indolcarbon-2-säure-amide und
- i) Tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol,

sowie jede Verbindung, die von einer dieser chemischen Grundstrukturen abgeleitet werden kann, auch wenn sie eine oder mehrere der chemischen Strukturen gemäß § 1 Abs. 2 als Substituent(en) aufweist.

2. Phenethylamin-Verbindungen

Jede Verbindung, die von einer Phenethylamin-Grundstruktur abgeleitet werden kann, auch wenn sie ein heterocyclisches oder polycyclisches Ringsystem (Naphthyl-, Tetralin-, Indol-, Indan-, Methylendioxy-, Benzofuran-, Dihydro-Benzofuran- oder Thienyl-Ringsystem) oder eine oder mehrere der chemischen Strukturen gemäß § 1 Abs. 2 als Substituent(en) aufweist.

3. Amino-Phenyl-Ethanon-Verbindungen

Amino-Phenyl-Ethanon sowie jede Verbindung, die von dieser chemischen Grundstruktur abgeleitet werden kann, auch wenn sie ein heterocyclisches oder polycyclisches Ringsystem (Naphthyl-, Tetralin-, Indol-, Indan-, Methylendioxy-, Benzofuran-, Dihydro-Benzofuran-Ringsystem) oder eine oder mehrere der chemischen Strukturen gemäß § 1 Abs. 2 als Substituent(en) aufweist.

Abbildung 4: Auszug aus dem BGBl. II Nr. 468/2011; Anlage II ^[11]

Die markierten Stellen weisen auf die hier behandelten Substanzgruppen hin. Dieser so genannte generische Ansatz hat den Vorteil, dass die Substanzen, sobald sie auftreten, bereits aus dem Verkehr gezogen und Hersteller bzw. Vertreiber zur Rechenschaft gezogen werden können, ohne dass immer wieder zunächst erst eine Anpassung des Gesetztes bedarf. Nachteil dieses Ansatzes ist, dass Substanzen, welche keine psychoaktive Wirkung zeigen, dennoch dieser Klassen zugehören und trotzdem in das Verbot fallen. Im Gegensatz zum Suchtmittelgesetz wird im NPSG der Konsument nicht kriminalisiert. Was bedeutet, dass gefundene Substanzen aus Gründen des Gesundheitsschutzes zwar eingezogen werden, der Betroffene sich aber mit dem Kauf bzw. dem Besitz solcher Substanzen keiner Straftat schuldig macht. So werden nur die Hersteller und Händler dieser Wirkstoffe zur Rechenschaft gezogen ^[3]. Dieser kurze Auszug der Geschichte der NPS in Österreich zeigt, dass sich das Aufkommen dieser Substanzen schlagartig entwickelt hat und daher seriöse Informationen, sowie gut funktionierende Messmethoden rar sind. Da diese Messmethoden nach wie vor relevant sind und weiterhin sein werden, wurde die Erstellung einer solchen Analyseverfahren zur Aufgabe dieser Arbeit gemacht.

2.2 Problemstellung

Neben wenigen sehr unspezifischen kolorimetrischen und immunanalytischen Methoden, gibt es einige chromatographische Methoden, welche sich hauptsächlich auf eine der Substanzklassen, bzw. auf sehr wenige Analyten kombiniert, bezieht ^[12]. Daher ist die Entwicklung einer solchen kombinierten Methode, mit einem großen Analytenspektrum, zum Ziel dieser Arbeit erwählt worden. Zusätzlich muss diese Methode sowohl im Fachbereich der Forensik als auch in der Anti-Doping Analytik verwendet werden können. Dies bedeutet unter anderem, dass das Verfahren mit den beiden üblichen Matrices humanen Harn und Blutserum funktionieren und qualitativ den sehr hohen Ansprüchen der jeweiligen Gebiete entsprechen muss. Eine Validierung im Sinne der DIN EN ISO / IEC 17025 soll dies bestätigen und dokumentieren.

Diese Methode verbindet die Analytik von zwei chemisch unterschiedlichen Substanzgruppen. Die Cathinone auf der einen Seite haben geringe molekulare Massen, sind hydrophil und eher polar, die Cannabinoide dagegen sind höhermolekular, lipophil und zeigen apolare Eigenschaften. Dadurch unterscheiden sie sich in ihren spektrometrischen und vor allem chromatographischen Eigenschaften sehr stark. Aber auch die Art und Weise der Isolationen der Analyten aus einer komplexen Matrix unterscheidet sich für die beiden Substanzgruppen. Diese Problematiken gilt es in einem gemeinsamen Extraktions- und anschließenden Messverfahren zu lösen. Als grundlegende Technik wurde die an Flüssigchromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie mit vorgeschalteter Festphasen-Extraktion gewählt, da diese den sehr hohen, spezifischen und reproduzierbaren Ansprüchen gerecht werden können.

2.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von ausgewählten synthetischen Cathinonen und Cannabinoiden und deren Metaboliten durch die Entwicklung einer effizienten, gut reproduzierbaren und ökonomischen, qualitativen und semi-quantitativen Methode. Diese muss dem Neue-Psychoaktive-Substanzen- Gesetz (BGBl. I Nr. 146/2011), sowie der zugehörigen Verordnung (BGBl. II Nr. 468/2011) für die Bereiche der Anti-Doping und forensischen Analytik und eine Validierung dieser im Sinne der DIN EN ISO / IEC 17025 entsprechen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Analyten

Die Auswahl der Analyten war ein wesentlicher Teil dieser Arbeit. Neben der oben genannten Auflistung der WADA, galt es herauszufinden, welche Substanzen besonders für den forensischen Bereich relevant sind. Um eine aktuelle Übersicht über die sich im Umlauf befindlichen Substanzen zu bekommen, war es notwendig, verschiedene Quellen zu Rate zu ziehen. Da es sich vor allem um für Österreich relevante Substanzen handelt, war die erste Anlaufstelle das „Check-it!“ aus Wien, ein Kompetenz- und Beratungszentrum für Freizeitdrogen. Dieses erfasst monatlich den aktuellen Markt und listet die gefundenen Substanzen auf seiner Homepage auf und gibt Information über die Inhaltsstoffmenge, Qualität und Aussehen der geprüften Produkte an. Konsumenten können bei diversen Veranstaltungen kostenfrei und anonym ihre Produkte auf deren Inhaltsstoffe und Qualität testen lassen, wodurch diese gewarnt sind wenn sich gefährliche Substanzen in den Produkten befinden. Da dieses Angebot sehr gut angenommen wird, erhält diese Institution regelmäßig Informationen über die aktuelle Situation in der Drogenszene. In folgender Abbildung 5 ist ein aktueller Auszug eines Berichtes des „Checkit!“ dargestellt:

Aktuelle **Warnungen** und besondere Ergebnisse November 2017

Seit Anfang November 2017 haben wir eine Reihe an gesundheitlich besonders bedenklichen Substanzen getestet. In einer als Ecstasy abgegebenen Tablette wurde neben dem erwarteten Wirkstoff MDMA eine **unbekannte Substanz** identifiziert. Eine weitere Ecstasy-Tablette wies neben MDMA die neue psychoaktive Substanz **Methylon (3,4-Methylenedioxy-methcathinon, bk-MDMA)** auf. Eine als Speed abgegebene Probe enthielt neben dem erwarteten Amphetamin auch Koffein und die halluzinogen wirkende Substanz 2C-E (2,5-dimethoxy-4-ethylphenethylamin).



Abbildung 5: Aktueller Auszug aus dem „Checkit“ Warnungsbericht für November 2017; Gefundene NPS: Methylon^[7]

Die rote Markierung zeigt die für diese Arbeit relevante neue psychoaktive Substanz Methylon. Weiters wurde die Suche auf Europa ausgeweitet, wobei hier hauptsächlich die Homepage des European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) Informationen lieferte, welches – neben vielen anderen Tätigkeiten – ebenfalls in regelmäßigen Abständen über die aktuelle Drogensituation in Europa Bericht erstattet. Weiters wurde ein zwei tages Symposium mit dem Titel „New Psychoactive Substances (NPS) – The Highs and Lows“ in München besucht, um sich über

den aktuellen internationalen Forschungsstand zu informieren. Diese Bemühungen ergaben eine Liste von über 90 relevanten neuen psychoaktiven Substanzen, Metaboliten nicht eingerechnet. Um eine seriöse Methode für die Analyse bestimmter Substanzen zu erstellen, ist es notwendig diese Substanzen als Standard zu besitzen, da sonst keine zuverlässigen analytischen Daten erhoben werden können. Da aber viele dieser Substanzen nicht legal produziert und für wissenschaftliche Zwecke verkauft werden und somit nicht frei erwerbbar sind, musste die Liste der zu analysierenden Substanzen eingeschränkt werden. Daraus ergab sich folgende Liste der in dieser Methode behandelten Substanzen, wie in Tabelle 1 dargestellt. Da bekannt ist, dass synthetische Cannabinoide im Harn hauptsächlich verstoffwechselt ausgeschieden werden, sind auch einige Metaboliten der prominentesten Vertreter dieser Substanzen in diese Methode aufgenommen worden ^[13,14]. Die genaue Struktur- und Summenformeln aller Analyten sind im Anhang unter 5.2 dargestellt.

Für alle folgenden Untersuchungen wurde jeweils ein Standard-Mix für synthetische Cathinone und für synthetische Cannabinoide + Metaboliten erstellt. Dabei wurde jeweils jede Substanz mit einer Konzentration von 1 µg/ml in 5ml Methanol gelöst. Diese Mischlösungen werden in Folge als „Std NPS I“ (Cathinone) und „Std NPS II“ (Cannabinoide) bezeichnet. Für genaue Zusammensetzung siehe Anhang 5.3.

Tabelle 1: Liste der in dieser Methode erfassten Substanzen und Hersteller der erworbenen Standards

	Cathinone	Hersteller
1	4-Methylethcathinon (4-MEC)	Lipomed
2	Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP)	Lipomed
3	3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone (MDPPP)	Lipomed
4	Butylon	Lipomed
5	4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	Lipomed
6	Ethylon	Lipomed
7	Flephedron	Lipomed
8	MDPBP	Lipomed
9	Mephedron	Lipomed
10	Methedron	Lipomed
11	Methylon	Lipomed
12	Pentedron	Lipomed
13	Pentylon	Lipomed
14	Buphedrone	LGC
15	Cathinon	Lipomed
16	Methcathinon	Lipomed
17	Pyrovalerone	Lipomed
18	Methylendioxyprovaleron (MDPV)	Lipomed
	Cannabinoide	
1	AM-2201	Cayman Chemicals
2	HU-210	Cayman Chemicals
3	JWH-018	Cayman Chemicals
4	JWH-019	Lipomed
5	JWH-073	Cayman Chemicals
6	JWH-081	Lipomed
7	JWH-122	Cayman Chemicals
8	JWH-250	Cayman Chemicals
9	UR-144	Lipomed
10	JWH-200	Cayman Chemicals
11	RCS-4	Lipomed
12	JWH-210	Cayman Chemicals
13	JWH-015	Sigam Aldrich
14	JWH-307	Cayman Chemicals
	Cannabinoide Metaboliten	
1	AM-2201 M1	Cayman Chemicals
2	JWH-018 M2	Cayman Chemicals
3	JWH-073 M1	Cayman Chemicals
4	JWH-122 M1	Cayman Chemicals
5	JWH-210 M1	Cayman Chemicals
6	JWH-250 M1	Cayman Chemicals
7	UR-144 M1	Cayman Chemicals
8	JWH-081 M1	Cayman Chemicals
9	JWH-200 M2	Cayman Chemicals
10	RCS-4 M1	Cayman Chemicals

3.1.1.1 Synthetische Cathinone

Synthetische Cathinone sind Derivate, welche sich von dem natürlichen Cathinon ableiten. Das native Cathinon ist ein psychoaktiver Wirkstoff des Kathstrauchs (*Catha edulis*). In Ländern wie Jemen, Äthiopien, Somalia, oder Kenia werden die Blätter des Kathstrauchs von einem großen Teil der Bevölkerung als Rauschmittel verwendet. Durch Kauen der Blätter wird ein Amphetamin-ähnlicher, aber geschwächer, Rauschzustand erlangt, welcher auf die verstärkte Ausschüttung von Neurotransmittern zurückzuführen ist ^[15]. Synthetische Cathinone werden am Markt als so genannte Badesalze bezeichnet und als solche in speziellen Rauchwarengeschäften, aber auch Tankstellen und in Online-Shops verkauft, obwohl sie nicht für diesen Zweck zugelassen sind. Um sich vor der Anwendbarkeit des Gesetzes zu schützen, sind auf den Verpackungen oft Warnhinweise wie „not for human consumption“ oder „research chemicals“ angebracht. Diese Substanzmischungen tragen nicht selten klingende Namen wie Bloom, Ivory Wave, Vanilla Sky, White Lightning, Red Dove, Cloud 9, Cotton Cloud, Snow Day, und Ocean Snow ^[16]. Die Wirkung der Cathinone soll ähnlich dem Methamphetamine und Methylene-dioxymethamphetamine (MDMA) sein, jedoch ein viel höheres Suchtpotenzial besitzen. Aus diesem Grund werden die Wirkstoffe auch oft in Extasy-Tabletten oder anderen Partydrogen beigemischt gefunden.

Synthetische Abwandlungen des natürlichen Cathinons können in großer Vielzahl erfolgen, da das Cathinon fünf verschiedene Reste besitzt, welche modifiziert werden können. In folgender Abbildung 6 ist das natürliche Cathinon (A) und deren Abwandlungsmöglichkeiten gezeigt ^[17]:

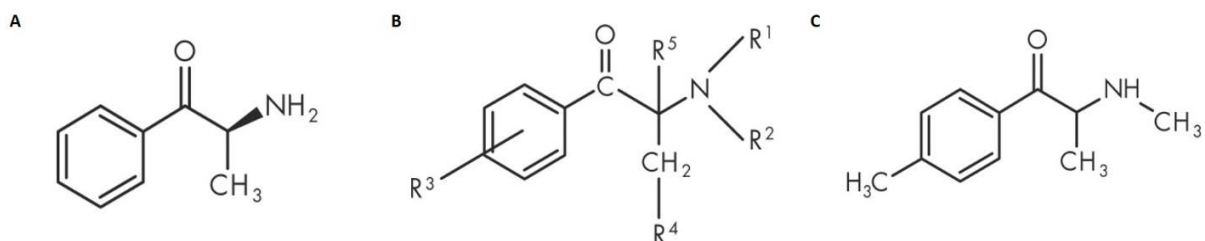


Abbildung 6: A: natürliches Cathinon; B: Mögliche veränderbare Reste (R^1 - R^5); C: Beispiel: Mephedron

In B sind die modifizierbaren Reste mit R^{1-5} gekennzeichnet, wobei R^3 an jeder der freien bzw. an mehreren Stellen des Benzolrings modifiziert werden kann. In C wird das Mephedron als Beispiel eines synthetischen Cathinons angeführt, wobei hier ein Wasseratom (H) des Stickstoffes (N) gegen eine Methylgruppe getauscht und eine Methylgruppe an die para-Stellung des Benzolringes gehängt wurde. Cathinon-Derivate sind die β -Keto-(β k-)-Analoga eines entsprechenden Phenethylamins ^[17]. Derivaten, welche am Benzolring modifiziert sind, wird eine aufputschende Wirkung, ähnlich dem Kokain oder Amphetamin, nachgesagt. Cathinon-Derivate können als zwei unterschiedliche Stereoisomere auftreten, welche sich durch ihre Potenz unterscheiden können. Genaue pharmakologische Daten liegen allerdings, wie allgemein bei den NPS, nicht vor. Innerhalb dieser Gruppe sind einige Substanzen auch als pharmazeutische Wirkstoffe zugelassenen, wie z.B.

Amfepramon, welches als Appetithämmer eingesetzt wird oder das Antidepressivum Bupropion. Der erste toxikologisch bestätigte Todesfall mit einem synthetischen Cathinon, in diesem Fall Mephedron, ereignete sich 2008 in Schweden ^[17]. Da die Wirkungsstärke der verschiedenen Cathinone sehr stark schwanken kann, sind auch die Angaben zu einer üblichen Dosis stark unterschiedlich, welche aber in einem Bereich von 5-250mg liegt. Cathinone werden meist geschnupft oder geschluckt, können durch ihre Wasserlöslichkeit aber auch gespritzt werden ^[18]. Einfache Cathinone können aus Ephedrin synthetisiert werden, welches auch zur Crystal-Meth Herstellung verwendet wird. Neben den gewünschten stimulierenden und halluzinierenden Effekten treten auch unerwünschte Nebenwirkungen wie Herz-Kreislauf-Anomalien, Schlaflosigkeit, Unruhe, Angst, Wahnvorstellungen, Halluzinationen, Muskelkrämpfe, Krampfanfälle, schwere Paranoia und Aggression auf ^[19]. Seriöse toxikologische Daten sind – wenn überhaupt – nur einzeln vorhanden. Die meisten Informationen liefern Erfahrungsberichte aus einschlägigen Internetforen oder fallweise Berichte von medizinischen Notfällen.

3.1.1.2 Synthetische Cannabinoide

Synthetische Cannabinoide sind unter anderem künstlich erzeugte Abwandlungen der natürlichen Cannabinoide, wie z.B. delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC), der Wirkstoff der Blüten der Hanfpflanze (*Cannabis*). Dessen psychoaktive Wirkung entsteht durch die Bindung an die Cannabinoid-Rezeptoren B1 im zentralen Nervensystem und B2 im peripheren Nervensystem und soll ähnlich der Wirkung des natürlichen THC sein ^[20]. Dennoch ist bei den synthetischen Cannabinoniden, im Vergleich zu den Cathinonen, der Erhalt einer gewissen chemischen Grundstruktur nicht vorhanden. Jedoch haben alle gemeinsam, dass sie, wie das endogene Anandamid, an die sich im Hirn und anderen Organen befindlichen Cannabinoid-Rezeptoren (CB₁, CB₂) binden und so physiologische Auswirkungen haben können ^[21]. Die meisten synthetischen Cannabinoide haben eine deutlich stärkere Affinität für diese Rezeptoren als natürliche Cannabinoide ^[22]. Es wird seit 40 Jahre versucht synthetische Cannabinoide als schmerzlindernde Substanzen herzustellen, wobei es sich als sehr schwierig erweist, die gewünschten von den ungewünschten Wirkungseigenschaften zu trennen. Viele dieser Fehlversuche findet man heute unter den NPS. Auf Grund ihrer chemischen Vielfältigkeit kann man die synthetischen Cannabinoide in folgende 7 Hauptstrukturgruppen einteilen ^[22]:

1. Naphthoylindole (JWH-018, JWH-017)
2. Naphthylmethyindole
3. Naphthoylpyrrole
4. Naphthylmethyindene
5. Phenylacetylindole
6. Cyclohexylphenole
7. Klassische Cannabinoide (HU-210)

In der folgenden Abbildung 7 ist A das natürliche Δ^9 -THC, B im Vergleich das strukturell davon abgewandelte HU-210 und C das JWH-018 abgebildet:

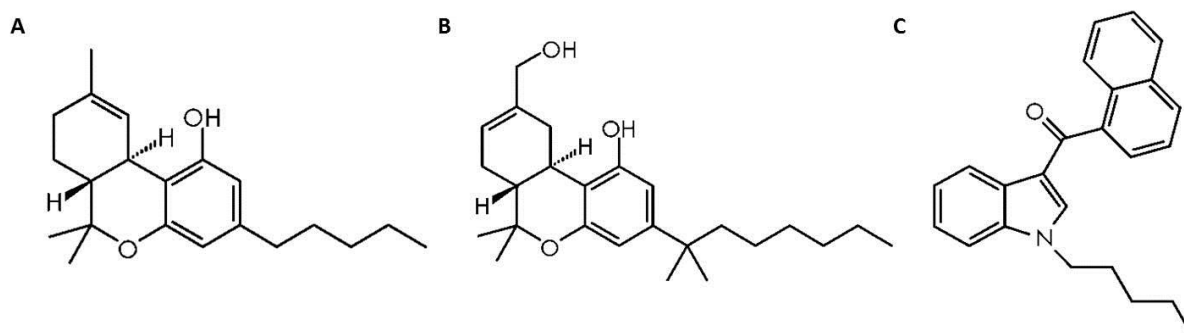


Abbildung 7: Strukturformeln natürliche und synthetische Cannabinode; A: Δ^9 -THC; B: HU-210; C: JWH-018

Diese Abbildung veranschaulicht, dass synthetische Cannabinoide von dem natürlichen THC abgewandelt sein können, aber auch stark unterschiedliche Strukturen aufweisen können. Dies sind nur zwei Beispiele der sieben Hauptstrukturgruppen. Meist handelt es sich bei all diesen Substanzen um fettlösliche, apolare Verbindungen mit einer Kohlenstoffanzahl von ungefähr 25 Atomen und meist einer Seitenkette mit 4 bis 9 gesättigte Kohlenstoffe. Die Substanzen werden oft unter dem Handelsnamen „Spice“ verkauft, wobei hier das Produkt mit rauchbaren, harmlosen Kräutern vermischt wird und häufig in farbenfrohen Päckchen abgefüllt wird. Nicht selten werden auch verschiedene Cannabinoide und andere Substanzen den Kräutern beigegeben. Dies führt zu stark schwankenden Dosierungen, was den Konsum zusätzlich gefährlich macht ^[22].

3.1.1.3 Interne Standards

Eine gängige Methode in der analytischen Chemie ist die Verwendung von so genannten „internen Standards“ (IS). Interne Standards sind Substanzen, welche der zu analysierenden Probe beigegeben werden, um die folgende Aufarbeitung und Messung der Probe überwachen bzw. kontrollieren zu können. Diese Substanzen müssen einerseits analytisch gut bekannt bzw. beschrieben sein und sollten andererseits den zu analysierenden Substanzen chemisch möglichst ähnlich sein. Nur so ist eine sinnvolle Kontrolle der Arbeitsschritte und der chemischen Analyse möglich.

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene, in der forensischen Analytik gut untersuchte, deuterierte (D) Analoga bekannter Wirkstoffe verwendet. Diese verhalten sich bei der Extraktion und der Chromatografie nahezu ident wie deren natürlicher Vertreter, lassen sich aber massenspektrometrisch eindeutig voneinander unterscheiden. Ebenfalls verhalten sie sich bei der Aufarbeitung und Extraktion nahezu ident. Dies hat den Vorteil, dass man die internen Standards auch zu mathematischen Korrekturen, wie z.B. Verluste bei der Aufarbeitung, verwenden kann. Dies kommt auch bei der Quantifizierung von Substanzen oder der Berechnung von Validierungsdaten zum Einsatz. Folgende Referenzsubstanzen wurden als interner Standard beigegeben. Für genaue Mischungszusammensetzung siehe 5.4.

Tabelle 2: Deuterierte Referenzsubstanzen im Interner Standard (IS NPS)

	Substanz	Konzentration
1	D5-MDMA	1 µg/ml
2	D5-Methamphetamin	1 µg/ml
3	D11-JWH-018	1 µg/ml
4	D3-Mephedron	1 µg/ml

Diese Substanzen wurden so ausgewählt, dass ein möglichst großes Retentionszeitspektrum in abgedeckt wird und die chemischen Eigenschaften den der Analyten ähnlich sind. Außerdem liefern alle Substanzen ein schönes Chromatogramm und haben eine hohe Ionenausbeute. Zusätzlich wird nach der Extraktion ein so genannter „Spritzen-Standard“ (SS) beigemischt, welcher Methyltestosterone in einer Konzentration von 1 µg/ml und 0,1% Ameisensäure enthält. Dieser dient dazu, die Qualität der Messung unabhängig von der Extraktion beurteilen zu können. Methyltestosteron ist in der Doping-Analytik ein gängiger interner Standard, welcher sowohl mit Flüssigkeits- als auch mit Gaschromatographie unter verschiedenen Ionisierungstypen gut funktioniert. Dadurch können unter anderem auch unterschiedliche Geräte mit verschiedenen Techniken verglichen werden.

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Folgenden Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurde verwendet.

3.1.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

		Firma
Lösungsmittel	Methanol- HPLC grade (MeOH) Acetonitril (ACN) Ethylacetat (EtAc) Wasser – HPLC grade (ddH ₂ O) Milli-Q-Wasser aus Filterungsanlage (MQ)	Chem-Lab NV Merck Chem-Lab NV Chem-Lab NV Merck Millipore
LC-Fließmittel	A: 2.5ml Ameisensäure in 2.5l MeOH (0.1%) B: 5ml Ameisensäure in 2.5l ddH ₂ O (0.2%)	
Elutionslösung HLB	EtOH / MeOH 1:1	
Elutionslösung MCX	MeOH mit 2% Ammoniak	
Injektionslösung	MeOH/MQ 1:5	
Chemikalien	Salzsäure (HCl) Ammoniak (NH ₄ ⁺) Glycerol Dimethylsulfoxid (DMSO) Ethylenglycol (EG) β-Glucoronidase Ameisensäure 99% (FA) Essigsäure	Merck Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Roche Biosolve B.V. Biosolve B.V.
1M Natriumacetat Puffer	16g Natriumacetat 200ml MQ pH 4.8 mit Essigsäure	Merck
Verbrauchsmaterial	HLB-Säule 1cc (30mg) MCX-Säule 1cc (30mg) 1.5ml Injektions-Spitz-Vial Schraubdeckel mit Septum 5ml Eppendorf Tube Gilson Pipettenspitzen	Waters Oasis Waters Oasis Phenomenex VWR Eppendorf Gilson

3.1.2.2 Blindwertmatrices

Alle Serum- bzw. Blindwertharne stammen von verschiedenen Mitarbeitern der Abteilung für analytische Chemie, Seibersdorf Labor GmbH, oder von Proben aus dem Routinebetrieb, welche von den Probanden offiziell für die Forschung frei gegeben wurden.

3.1.3 Geräte

3.1.3.1 An Flüssigchromatographie gekoppeltes Tandem-Massenspektrometer (LC-MSMS)

Das an Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometer (=Liquid chromatography–mass spectrometry), kurz LC-MS, dient der Auftrennung und der anschließenden Detektion der zu analysierenden Moleküle, wobei die Flüssigkeitschromatographie der Auftrennung der Moleküle in einem komplexen Gemisch und die anschließende Massenspektrometrie der Detektion und der Identifikation der Substanzen dient. Im Speziellen werden bei der Tandem-Massenspektrometrie, die Substanzen zu Fragmentierung gebracht und die dabei entstehenden Fragmente gemessen und analysiert. Für diese Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

- Thermo Scientific Finnigan Surveyor MS - Pumpe
- Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 - Autosampler
- MayLab Mistra switch - Säulenofen
- Thermo Scientific TSQ Quantum Discovery Max - Massenspektrometer

3.1.3.1.1 Flüssigkeitschromatographie (LC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography,) kurz HPLC oder LC, ist eine physikalische Trennmethode, wobei als mobile Phase ein Lösungsmittel und als stationäre Phase eine Trennsäule verwendet wird. Voraussetzung dafür ist, dass die zu analysierenden Substanzen in der mobilen Phase löslich sind. In der Regel wird dies mit passenden Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen erzielt. Es gibt viele unterschiedliche Packmaterialien der Säule mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche auf die Analyten abgestimmt werden müssen. Meist handelt es sich beim Sorbens um Kiesegel-Partikel, welche eine große spezifische Oberfläche bieten und inert gegenüber polaren und unpolaren Lösungsmitteln sind. An dessen Oberfläche sind bestimmte chemisch-funktionelle Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften gebunden. In dieser Arbeit werden drei verschiedene dieser funktionellen Gruppen, Octyl (C-8), Octadecyl (C-18) und Biphenyl, getestet und verglichen (siehe 3.2.1). Es handelt sich dabei um so genannte Umkehrphasen, da diese Ketten apolar sind und sich daher hydrophob verhalten. Das Trennprinzip der Umkehrphasen-LC beruht darauf, dass die sich in einem Substanzgemisch befindlichen Substanzen nach Auftragen auf die Säule, unterschiedlich stark daran binden und durch anschließendes Spülen (Eluieren) mit einem geeigneten polaren Lösungsmittel (Eluat) einzeln nacheinander wieder gelöst und so getrennt voneinander detektiert werden können. Dieser Vorgang der Flüssigkeitschromatographie ist in folgender Abbildung veranschaulicht:

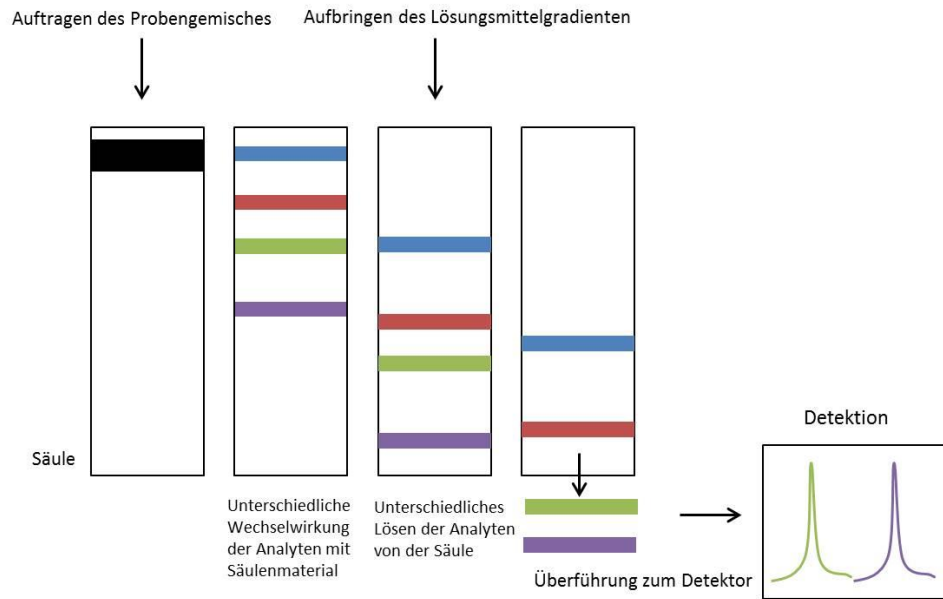


Abbildung 8: Funktionsprinzip der Flüssigkeitschromatographie

Verstärken kann man den Trennungseffekt, wenn mit einem bestimmten Gradienten von Lösungsmittelgemischen als Eluat gearbeitet wird. Hierbei werden zwei oder mehr Lösungsmittel, z.B. MeOH und Wasser, über die Zeit verschieden stark gemischt und somit wird eine Änderung der Elutionskraft über die Zeit generiert. Dies führt bei richtiger Anwendung zu noch schärferer Trennung einzelner Analyten im Vergleich zur isokratischen Elution, welche sich nur eines Lösungsmittels bedient ^[23]. Vorausgesetzt für diese Anwendung ist ein LC-System, das mehrere Pumpen enthält und dadurch verschiedene Lösungsmittelreservoirs angesteuert werden können. Die Veränderung des Lösungsmittelgemisches kann in folgenden Möglichkeiten geschehen:

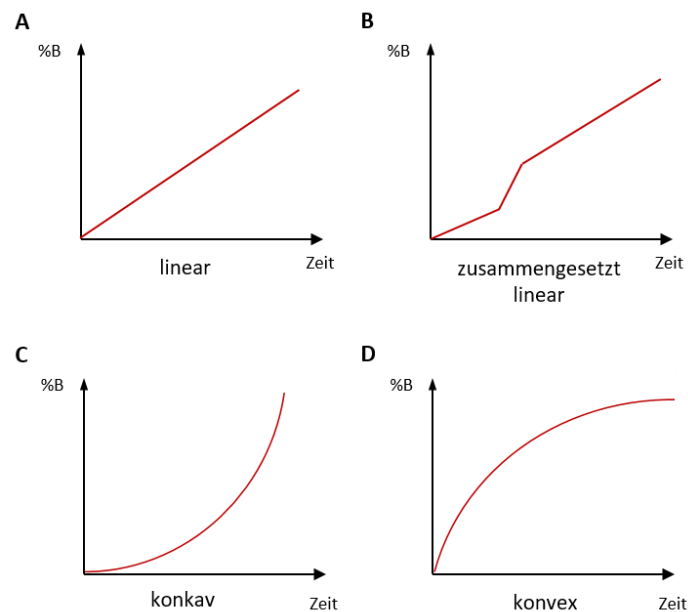


Abbildung 9: Arten der Gradientenzusammensetzung; A: Linear; B: zusammengesetzt linear; C: Konkav; D: Konvex; X-Achse: Zeit; Y-Achse: Anteil Lösungsmittel B in Prozent

Abb. 9 zeigt die vier grundlegenden Möglichkeiten der Gradientenzusammensetzungen ^[24]. Auf der X-Achse ist die Zeit aufgetragen und auf der y-Achse der Anteil des Lösungsmittel B zum Lösungsmittel A in Prozent. Lineare bzw. zusammengesetzt lineare Gradienten reichen für die meisten Anwendungen aus. Konkave und konvexe Gradienten kommen in der Praxis eher selten vor, werden allerdings für sehr spezielle Trennungsprobleme angewendet. Es können auch Kombinationen aus den gezeigten Varianten verwendet werden. Bei dieser Arbeit wurde ein zusammengesetzt linearer Gradient verwendet, wie in 3.2.1.1 veranschaulicht ist.

Als Detektor können verschiedene Geräte mit unterschiedlichen physikalischen Messprinzipien verwendet werden, wie z.B. UV/Vis-Absorption oder Fluoreszenz. In dieser Arbeit wurde allerdings ein Massenspektrometer als Detektor verwendet, weil dieser eine sehr hohe Selektion und Empfindlichkeit aufweist und zusätzlich wichtige spektrometrische Informationen liefert. Als Output wird ein Diagramm, auf welchem die Signalintensität über die Zeit dargestellt wird, generiert, welches anhand des Methyltestosterons hier veranschaulicht wird:

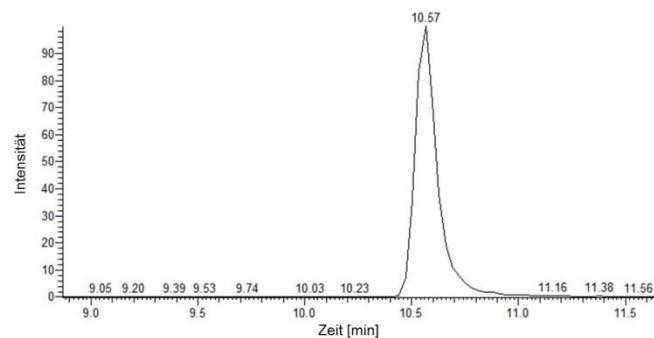


Abbildung 10: Chromatogramm des Methyltestosterons; X-Achse: Zeit; Y-Achse: relative Intensität

Am Intensitätsmaximum eines Signales wird die so genannte Retentionszeit (RT) eines Moleküls gemessen. Im Fall dieses Beispiels ist das die Retentionszeit von 10.57 min. Dies entspricht der Zeit zwischen Injektion der Probe und Signalmaximum am Detektor. Diese Zeit ist bei identen chromatographischen Bedingungen, abgesehen von kleinen Schwankungen, immer gleich und ist somit ein wichtiger physikalischer Parameter für die analytische Beschreibung von Substanzen. Durch Integration eines Peaks kann dessen Fläche ermittelt werden. Diese spiegelt, neben der Peakhöhe, die Intensität eines Signals wieder und kann somit als analytische Information dienen. Diese Integration bzw. Flächenmessen wurde in dieser Arbeit mit der Software Xcalibur von Thermo Fisher Scientific unternommen.

Moderne LC-MS/MS Geräte, wie in dieser Arbeit verwendet wurden, beinhalten folgende Komponenten, mit welchen eine Automatisierung der Messungen und dadurch eine sehr gute Reproduzierbarkeit gewährleistet werden.

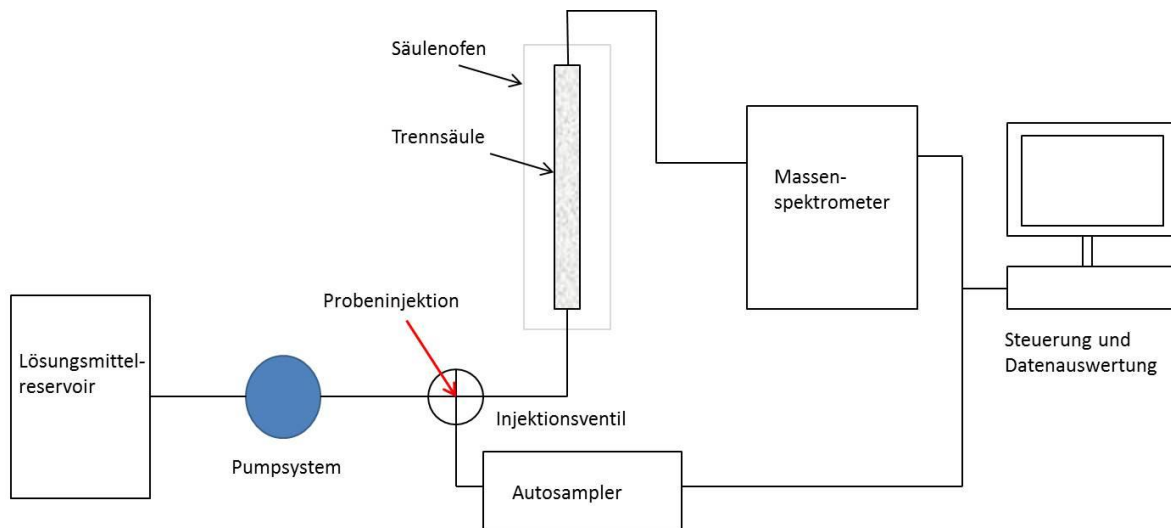


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Komponenten eines LC-MS/MS-Systems

Im Lösungsmittelreservoir befinden sich verschiedene Lösungsmittel, welche durch das Pumpsystem mittels Schläuche in bestimmten Mischverhältnissen in das System eingebracht werden, wodurch sich auch der Lösungsmittelgradient erzeugen lässt. Am Injektionsventil wird die Probe mittels Autosampler automatisch injiziert und in den Laufmittelfluss (=Lösungsmittelgemisch) gespritzt und somit weiter Richtung Trennsäule gepumpt. Diese befindet sich in einem Säulenofen, um eine gleichbleibende Temperatur und somit gleichbleibende chromatographische Bedingungen zu gewährleisten. Es können sich auch verschiedene Säulen im Säulenofen befinden, welche je nach Bedarf über ein Säulenauswahlventil einzeln zugeschaltet werden können. Die in der Probe enthaltenen Moleküle binden zuerst an die Säule und werden anschließend eluiert, indem das Lösungsmittelgemisch verändert wird. Man spricht nun vom Eluat, welches weiter Richtung Massenspektrometer gepumpt und in die Ionenquelle übertragen wird. Hier beginnt die Prozedur der eigentlichen Messung der Probe. Die Steuerung der LC-Anlage, wie auch die des Massenspektrometers, sowie die Auswertung der generierten Daten erfolgen am PC.

3.1.3.1.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Messung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Die zu analysierenden Substanzen werden in die Gasphase überführt, ionisiert, durch ein elektrisches Feld beschleunigt und zu einem Analysator transferiert, welche die Substanzen nach ihrem Massen-Ladungs-Verhältnis (m/z) selektiert. Das Hochvakuum muss vorhanden sein, um die Produktion von freien Ionen und Elektronen in der Gasphase zu gewährleisten. Außerdem sind Ionenkollisionen und Reaktionen mit Sauerstoff und anderen Luftmolekülen zu vermeiden. Der Grundaufbau jedes Massenspektrometers ist in folgender Abbildung gezeigt:

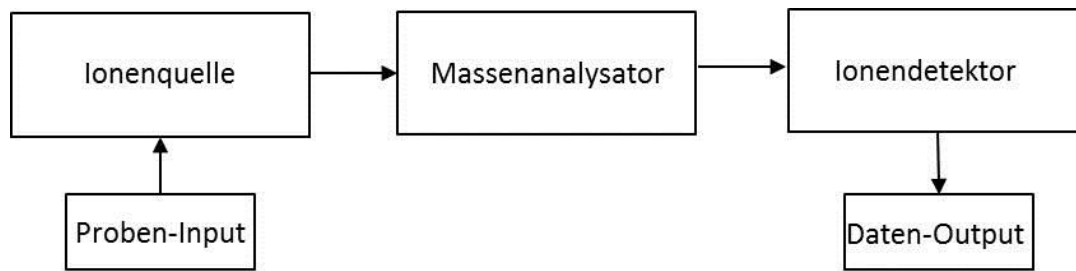
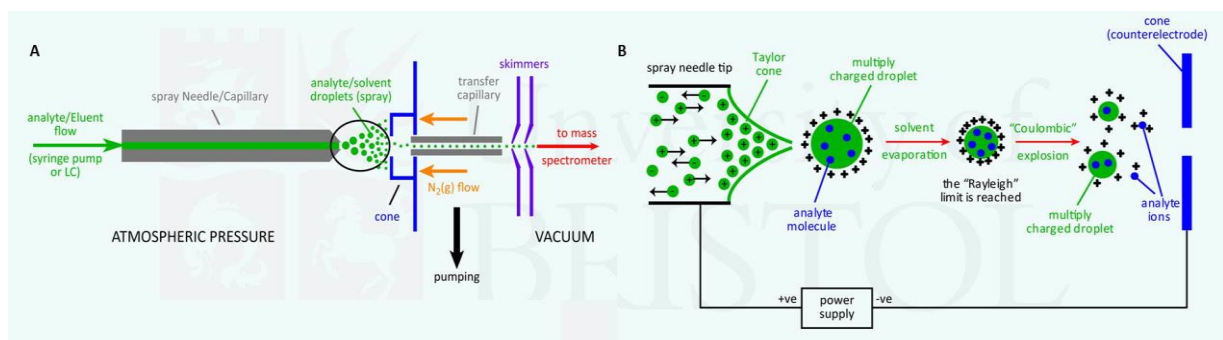


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Ionenquelle

Die Ionenquelle dient der Verdampfung des Lösungsmittels und der Ionisierung des Analyten. Die Ionisierung ist ein elementarer Teil der Massenspektrometrie, da die Detektoren nur geladene Teilchen erfassen können. Grundsätzlich können Moleküle positiv oder negativ geladen bzw. ionisiert werden, wobei in dieser Arbeit die negative Ionisierung außer Acht gelassen wurde. Die positive Ionisierung geschieht nach folgendem Muster: $M \rightarrow [M+H]^+$, wobei M für Molekül und H für ein Proton steht. Das ionisierte Molekül wird also protoniert. Folglich muss dann für die Masse des geladenen Molekülions eine Masseneinheit von 1 addiert werden. Die Probe kann direkt in die Ionenquelle injiziert oder aus einem vorgeschaltetem Chromatographiesystem kommen, wie es bei dieser Arbeit der Fall ist. Die Ionenquelle stellt somit das Verbindungsstück zwischen LC und MS dar. Es gibt verschieden Arten von Ionenquelle, wobei die Elektrospray-Ionisation (ESI) die heutzutage am häufigsten genutzte Quelle für LC-Systeme ist und auch hier verwendet wurde. Diese Technik wird als sanfte Methode bezeichnet, weil bei dieser Anwendung kaum bis gar keine Fragmentierung der zu ionisierenden Moleküle vorkommt, wie es z.B. bei der ebenfalls sehr häufig genutzten Elektronenstoßionisation (EI) der Fall ist. Der Prozess der Ionisierung mittels ESI ist auf folgender Abbildung veranschaulicht.:


Abbildung 13: A: Aufbau des ESI-Interfaces; B: Vergrößerung des ESI-Ionisierungsprozesses ^[25]

Der Analyt bzw. das Eluat der LC wird über eine Spritzenadel an den Ort der Ionisierung befördert. An der Spitze der Spritzenadel wird eine hohe elektrische Spannung angelegt, wodurch ein elektrisches Feld zwischen Nadelspitze und der Gegenelektrode (cone), welche sich am Eingang zum Massenspektrometer befindet, entsteht. Dieses Feld kann nach Bedarf positiv oder negativ geladen

sein. Vorhandene gleich wie das Feld geladene Ionen wandern entlang des Feldes Richtung Gegenelektrode und akkumulieren sich so an der Nadelspitze. Durch das gegenseitige Abstoßen der Moleküle bildet sich zuerst ein so genannter Taylor-Kegel, wie in B ersichtlich, und schließlich ein geladener Aerosoltropfen, welcher sich ablöst und Richtung Elektrode wandert. Dieser enthält geladene Lösungsmittel-Moleküle an der Oberfläche so wie ungeladene Analytmoleküle im Inneren. Im weiteren Verlauf verdampft fortlaufend Lösungsmittel, sodass die Ladungen an der Oberfläche des Tropfens immer mehr zunehmen und schließlich das sogenannte Rayleigh-Limit erreicht wird ^[26]. An diesem Punkt ist die abstoßende Kraft der gleichnamigen Ladung so hoch, dass die Oberflächenspannung des Tropfens nachgibt und der Tropfen zu kleineren Tropfen zerfällt. Man spricht an diesem Punkt von der Coulomb-Explosion ^[26]. Dieser Zerfallsprozess geht so lange weiter bis nur noch das Analytmolekül vorhanden ist. Auf dieses wird nun die Ladung $[H^+]$ übertragen und es wird zum Ion, welches dann über eine Transferkapillare in das Vakuum überführt wird. Je nach Größe des Moleküls können auch mehrere Ladungen übertragen werden, was bei der Auswertung der generierten Spektren zu beachten ist. Da die Mehrfachladung aber Molekülgrößenabhängig ist und die Moleküle, die in dieser Arbeit analysiert wurden, deutlich zu klein für Mehrfachladungen sind, ist das hier nicht weiter relevant. Um die Desolvatation des Lösungsmittels zu unterstützen, wird eine beheizte Transferkapillare oder einem dem Spray entgegengesetzter Stickstoffstrom verwendet. Dies begünstigt die Tröpfchenbildung und somit die Ionenausbeute. Die Ionisierung an sich läuft noch unter Atmosphärendruck ab, weshalb man auch von Atmospheric Pressure Ionisation (API) spricht.

Massenanalysator

Der Massenanalysator ist ein essentieller Bestandteil des Massenspektrometers, denn er sortiert die in der Ionenquelle erzeugten Ionen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis m/z bevor sie zum eigentlichen Detektor gelangen. Die verschiedenen Arten von Massenanalysatoren unterscheiden sich sehr stark in ihrer Funktionsweise was die Selektion der Ionen betrifft. Für diese Arbeit wurde ein Triple-Quadrupol-Analysator verwendet, weshalb nur dieser hier im Detail beschrieben wird. Andere übliche Analysatoren wären Sektorfeld-, Ionenfallen-, Flugzeit- oder Orbitrap-Analysatoren ^[27]. Diese unterscheiden sich alle in ihrem detektierbaren Massenbereich, in der Empfindlichkeit, ihrer Geschwindigkeit und Auflösung. Der Output ist bei allen ident. Ein Balkendiagramm, welches auf der Ordinate die relative Intensität und auf der Abszisse das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) angibt. Die Intensität bezieht sich immer auf das größte Signal, dem so genannten Basispeak. Bei dem Peak mit der höchsten Masse, handelt es sich bei der Messung einer Reinsubstanz meistens um den unfragmentierten Molekülpeak, aus welchem direkt das Molekulargewicht des Analyten errechnet werden kann. Durch das Auftreten von natürlichen Isotopen sind viele Peaks von Isotopenpeaks, welcher in der Masse abweichen, rechts und links begleitet. Bei nicht sanften Ionisierungsmethoden sind Signale der entstandenen Fragmente zu erkennen. Aus diesen können auch strukturelle

Informationen abgeleitet werden. Die eben beschriebenen Bestandteile eines Massenspektrums sind in folgendem Beispiel dargestellt:

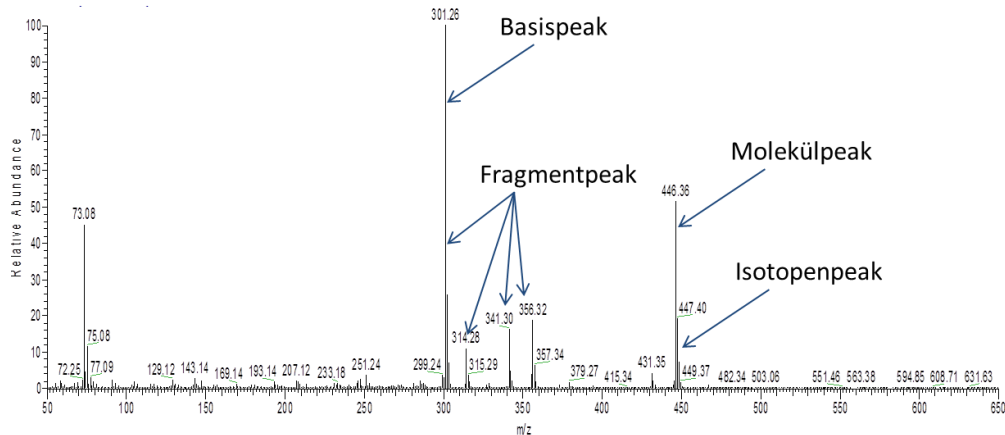


Abbildung 14: Massenspektrum des mit Trimethylsilyl derivatisierten Methyltestosterons mit EI-Quelle; Y-Achse: Relative Intensität; X-Achse: m/z-Verhältnis

Aus anschaulichen Gründen handelt es sich hier um ein EI-Spektrum eines zweifach mit Trimethylsilyl (TMS) derivatisierten Methyltestosteron, mit einem m/z von 446. Das hier am meisten entstandene Fragment hat ein m/z von 301 und stellt gleichzeitig den Basispeak dieses Massenspektrums dar. Der Molekülpeak (446) wird von einem Isotopenpeak mit dem m/z von 447 begleitet. Der Peak mit dem m/z von 73 ganz links im Bild stellt unreaktierte TMS-Gruppen dar.

Wie oben erwähnt wurde in dieser Arbeit ein Triple-Quadropol-Analysator verwendet. Diese sehr robusten, wartungsarmen und relativ preiswerten, dennoch sehr sensitiven Analysatoren sind in den meisten analytischen Laboratorien Standard. In folgender Abbildung ist ein solcher Triple-Quadropol-Analysator schematisch skizziert:

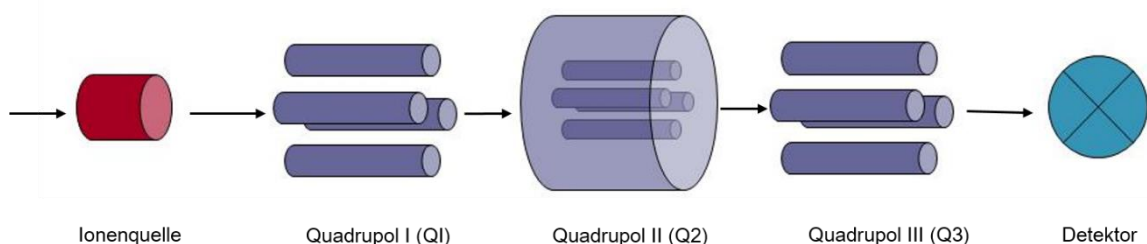


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadropol-Analysators ^[28]

Wie in dieser Abbildung zu erkennen ist und der Name erraten lässt, besteht eine Triple-Quadropol aus drei einzeln Quadrupolen, welcher jeder unabhängig voneinander eine andere Funktion erfüllen kann. Ein Quadrupol besteht aus vier zylindrischen Elektroden, wobei jeweils zwei gegenüber in einem bestimmten Abstand angeordnet sind, wie in Abbildung 16 ersichtlich. Die zwei gegenüberstehenden Stäbe werden mit einem Gleich- und Wechselspannungsanteil auf demselben elektronischen Potential gehalten.

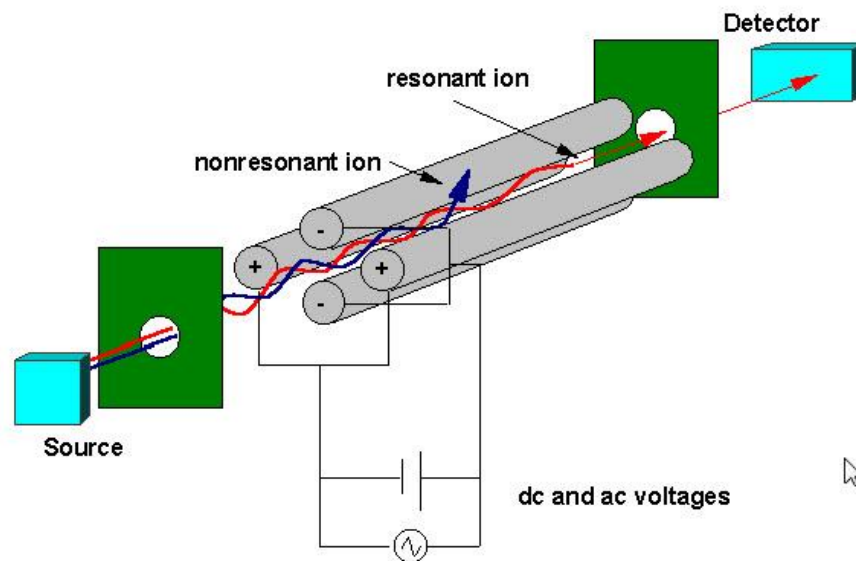


Abbildung 16: Schema der Funktionsweise eines Quadrupols ^[29]

Durch die Variation der Stärke dieser Gleich- und Wechselspannungen werden die einströmenden Ionen, je nach ihrem Masse-Ladungsverhältnisses, auf stabilen bzw. unstabilen sinusförmigen Bahnen, auch Trajektorien genannt, gelenkt bzw. gehalten. Stabile Ionen (roter Pfeil) gelangen zum Detektor, wobei instabile Ionen (blauer Pfeil) abgelenkt werden, auf einen der Stäbe stoßen und so neutralisiert werden. Durch sehr schnelles (im ms-Bereich) Umschalten der verschiedenen Spannungen, können viele verschiedene Ionen auf stabilen Bahnen gehalten werden, zum Detektor transferiert und somit simultan gemessen werden ^[29].

Ionendetektor

Die nach ihrem m/z -Verhältnis geladenen Ionen können auf verschiedene Arten nachgewiesen werden. Die am häufigsten in einem Quadropol verwendeten Detektorenarten sind der Faraday-Auffänger, der Kanalelektronenvervielfacher und der Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), welcher sich in dem hier verwendeten Gerät befindet. Am Eingang des SEVs ist die Konversionsdynode angebracht, worauf das eintretende Analyt ion prallt und dadurch die Freisetzung eines Sekundärelektrons induziert. Folglich wird ein einströmendes Ion in ein Elektron konvertiert. Dieses Sekundärelektron trifft auf eine weitere Dynode, wodurch wieder ein Elektron freigesetzt wird. Dieser Vorgang wiederholt sich in Form einer Dynodenkaskade so lange, bis die Elektronenzahl zu einem messbaren elektrischen Signal anschwillt. Dieser Vorgang ist in folgender Abbildung dargestellt:

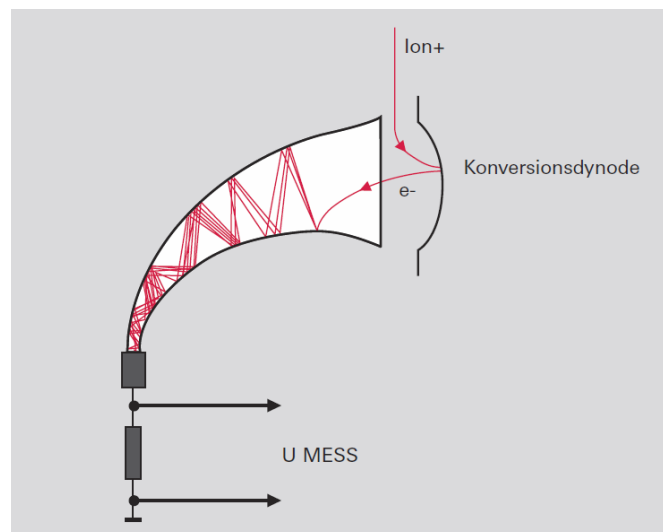


Abbildung 17: Funktionsschema eines Sekundärelektronen-Vervielfachers (SEV) ^[30]

Dieses entstandene Signal wird dann gemessen, mittels EDV ausgewertet und in ein Spektrum umgewandelt. Hierbei kann ein Signalverstärkungsfaktor von 10^4 bis 10^8 erreicht werden. Allerdings hat der SEV durch die physikalische Veränderung der Konversionsdynode eine endliche Lebensdauer, die mit einer Verringerung der Empfindlichkeit einhergeht ^[31]. Dies führt dazu, dass dieser von Zeit zu Zeit ersetzt werden muss.

Messmodi

- **Full scan**

Stellt man den Messmodus auf einen großen Massenbereich ein, z.B. 50-600 m/z, spricht man von full scan. Hierbei kann eine sehr große Massenbandbreite über eine gewisse Messzeit auf einmal erfasst werden. Da hier aber simultan alle möglichen Massen aufgenommen werden und die Messzeit jeder einzelnen Massenspur dadurch sehr kurz sein muss, ist die Empfindlichkeit stark beschränkt. Dies findet oft Anwendung, wenn eine Probe oder Einzelsubstanz unbekannter Masse charakterisiert werden soll. Verbunden mit einem chromatographischen Trennungssystem können hier erste Hinweise auf enthaltene Substanzen, deren molekularen Massen und Retentionszeiten generiert werden. Bei einem Triple-quad-Gerät kann dies im Q1 oder Q3 geschehen. Der full scan Modus wird in dieser Arbeit zur Ermittlung bzw. Überprüfung der molekularen Massen der Reinsubstanzen und deren Retentionszeit, bzw. für den unten beschriebenen Produkt-Scan verwendet.

- **Single Ion Monitoring**

Beim Single Ion Monitoring (SIM) wird wie beim full scan Modus nur ein einziger Quadrupol benötigt. Der Unterschied zum full scan liegt darin, dass kein Massenbereich gemessen, sondern auf eine ganz bestimmte Masse selektiert wird, welche die ionisierte Molekülmasse oder die eines bei der Ionisierung entstandenen Fragmentions sein kann. Dies hat den Vorteil, dass durch die starke Minimierung von Messereignissen, die Empfindlichkeit stark erhöht wird. Voraussetzung für diesen Modus ist das Wissen über die Masse des gewünschten Ions. Dieser Modus kommt jedoch in dieser Arbeit nicht zur Anwendung.

- **Selected Reaction Monitoring (SRM)**

Durch den dreiteiligen Aufbau eines Triple-quad-Analysators, kann jeder Quadrupol (Q1,Q2,Q3) eine separate Aufgabe übernehmen, was eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten ermöglicht. Man spricht bei diesem Vorgang von der Tandem-Massenspektrometrie oder kurz MS/MS. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich das sogenannte „Selected Reaction Monitoring“ (SRM), oder auch „Multiple reaction monitoring“ (MRM) genannt, verwendet. Bei dieser Anwendung sieht die

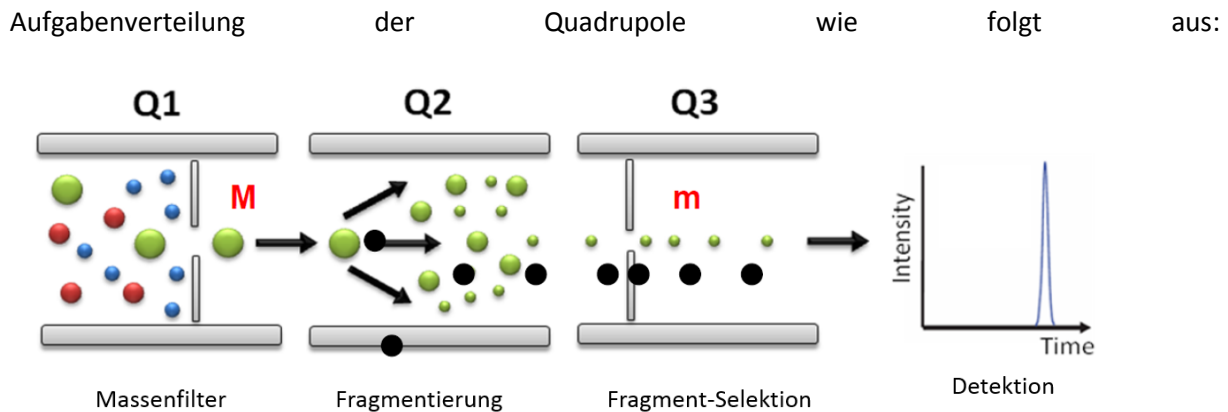


Abbildung 18: Schematischer Ablauf des Selected Reaction Monitorings (SRM) ^[32]

Der Q1 dient hier als Massenfilter und lässt somit nur Ionen mit dem gewünschten m/z -Verhältnis passieren. Der Q2 dient als Kollisionszelle, wobei hier ein neutrales Stoßgas, wie N_2 , He, Ar oder Xe, unter hohem Druck eingeflößt wird und somit die Ionen zur Kollision gebracht werden. In unserem Fall wurde Argon verwendet. Dabei werden die Ionen vibratorisch angeregt, dadurch aufgeheizt und sie zerfallen schließlich bei ausreichend hoher Vibrationsenergie zu kleineren Fragmenten. Man spricht hierbei von der „Collision Induced Dissociation“ (CID). Diese Fragmente wandern weiter in den Q3 und werden dort wieder nach einer ausgewählten Masse selektiert, weiter zum Detektor überführt und detektiert. Diese Bruchstücke sind sehr Molekül-spezifisch und können gut reproduziert werden. Die Ausbeute bzw. das Entstehungsmuster der Fragmente kann über das Einstellen der Kollisionsenergie (CE) optimiert werden. Wenn man nun im Q1 das m/z -Verhältnis für ein bestimmtes Vorläuferion (=precursor ion), im Q2 eine bestimmte Kollisionsenergie und im Q3 das m/z -Verhältnis für ein bestimmtes Molekülfragment (=product ion) einstellt, spricht man vom Massenübergang (=transition).

Die Transitionen sind sehr gut reproduzierbar und hochmolekülspezifisch, wodurch die Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur einfachen Massenspektrometrie sehr stark erhöht wird. In dieser Arbeit wurden die zwei intensivsten dieser Massenübergänge für jeden Analyten ermittelt und für die weiteren Messungen herangezogen. Die ermittelten Massenübergänge sind im Ergebnisteil unter 4.2 angeführt. Durch das Verhältnis der Intensitäten dieser zwei Übergänge kann man zusätzliche analytische Information gewinnen, da das Verhältnis unter gleichbleibenden analytischen Bedingungen konstant ist. Das SRM kann und wird auch für die Quantifizierung von Substanzen verwendet.

• Product Scan und CE-Optimierung

Wenn die Fragmente, welche in der Kollisionszelle entstehen, nicht bekannt sind, muss der so genannte Produkt Scan angewendet werden. Hierbei geht es um die Fragmentfindung für ein bestimmtes Molekül. Der Q1 wird auf das m/z des precursor ions des gewünschten Analyts

eingestellt und wirkt somit als Filter, im Q2 kommt es zu Fragmentierung mit einer festen Kollisionsenergie und im Q3 wird ein full scan der entstandenen Fragmente durchgeführt, wobei hier Signale in einem eingestellten Massenbereich aufgenommen werden. Abbildung 19 zeigt ein Beispiel solch einer Fragmentfindung anhand des Mephedrons.

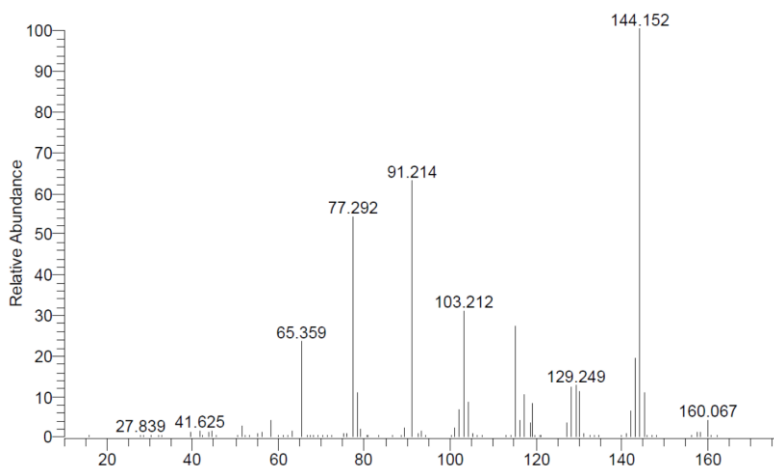
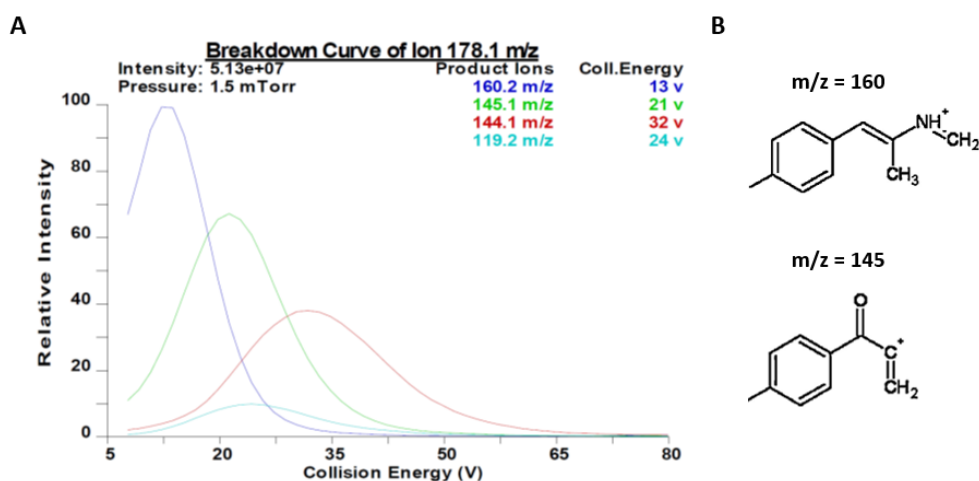


Abbildung 19: Fragmentierungsmuster des Mephedrons; x-Achse: m/z; y-Achse: Relative Intensität

Das Massenspektrum zeigt das Fragmentierungsmuster des Mephedrons. Für das precursor ion wurde ein m/z von 178, was der Molekülmasse +H⁺ entspricht, eingestellt. In diesem Fall entstanden die Fragmente mit dem m/z von 65, 77, 91, 103, 129, 144, 145 und 160. Nachdem die Fragmente eines Moleküls ermittelt wurden, ist der nächste Schritt die Optimierung der Kollisionsenergie um gezielt die Ausbeute ausgewählter Fragmente zu erhöhen. Dafür wird die CE schrittweise erhöht und die entstehenden Fragmente im Q3 gemessen, bis ein Intensitätsmaximum für das jeweilige Fragment gefunden wurde. Diese Schritte werden mittels der Software TSQ Tune automatisch ausgeführt. Die entsprechenden Kollisionsenergien an diesem Intensitätsmaximum für das jeweilige Fragment wird anschließend als Ergebnis graphisch dargestellt, wie in folgender Abbildung 20 ersichtlich ist;



**Abbildung 20: A: CE-Optimierungsversuch von Mephedron; X-Achse: Kollisionsenergie in eV; Y-Achse: Relative Intensität
B: Struktur der 2 intensivsten Massenfragmente**

Wie in A zu sehen ist wird die Kollisionsenergie gegen die Intensität des entstandenen Fragments aufgetragen. Die jeweilige Energie beim Intensitätsmaximum wird dann für das SRM verwendet.

In dieser Arbeit wurden die zwei intensivsten Fragmente für die Analyse des jeweiligen Analyten weiterverwendet. Im Fall des Mephedrons sind diese das Fragmentation mit dem m/z von 160.2 bei einer CE von 13eV und das Fragmentation mit einem m/z von 145.1 bei einer CE von 21eV, dessen Strukturen in Abb. 20 B dargestellt sind. Diese Fragmentfindung und CE-Optimierung wurden bei allen zu analysierenden Substanzen und internen Standards unternommen und die zwei intensivsten Fragmente für das SRM verwendet. Diese Massenübergänge wurden anschließend in die MS/MS-Messmethode übernommen.

3.1.4 Sonstige Utensilien und Geräte

- Messzylinder Glas
- Bechergläser Glas
- Schliffeprouvetten Glas
- Glasstopfen
- Messkolben Glas
- Vollpipette
- Glastrichter
- Gilson Microman Pipette, 1000 μ l, 250 μ l, 50 μ l, 25 μ l, 10 μ l
- Supelco Visiprep 24 DL Vakuum-Block Glas
- Wasserstrahlpumpe
- Vakuumkonzentrator (SC250EXP speed Vac, Thermo)
- Rotavapor Labo Rota SE320 (Resona Technics)
- Heizblock (Liebisch)

3.1.5 Programme

- Thermo Xcalibur, Quan Browser, Qual Browser
- Thermo TSQ Tune
- Microsoft Office
- PerkinElmer ChemDraw

3.2 Methoden

3.2.1 Massenspektrometrie und Chromatographie

3.2.1.1 Massenspektrometrie

Der erste Schritt zur Erstellung dieser Methode ist das massenspektrometrische Erfassen der Analyten für das SRM, also das Finden der optimalen Massenübergänge für die internen Standards und Analyten. Für die massenspektrometrische Erfassung einer Substanz wird der unter 3.1.3 beschriebene SRM-Modus ausgenutzt, welcher 3 maßgebliche Schritte enthält. 1. Das Ermitteln des precursor ions, 2. Das Finden von Molekülfragmente (product ion) mittels CID und 3. die Optimierung der Kollisionsenergie. Die exakte Masse des jeweiligen Analyten ist durch die Literatur bekannt, wird aber im ersten Schritt durch ein einfaches Injizieren in das MS-System und der Messung eines full scans bestätigt. Hier werden manuell 1-3µl der jeweiligen Reinsubstanz, gelöst in Injektionslösung (c= 1µg/ml) direkt in das System injiziert, während das Massenspektrometer auf full scan gestellt ist. Nach der Bestätigung der Molekülmasse, wird die Fragmentfindung und CE-Optimierung unternommen. Hierfür werden 5µl derselben Analytlösung über eine Schleifeninjektion in das System injiziert und anschließend die automatische Optimierung, wie unter 3.1.3.1.2 beschrieben, mittels der Software TSQ Tune durchgeführt. Nach Erfassen aller Massenübergänge und Optimieren der Kollisionsenergien aller Substanzen, Ergebnisse siehe 4.2.1, werden diese in der Instrumentenmethode vereint, wobei ein Messfenster von 4 min pro Analyt gewählt und zusätzlich folgende Einstellungen getroffen wurden.

- Positive ion mode
- Kapillartemperatur: 320°C
- Vaporizer Temperatur: 400°C
- Sheath gas Druck: 25
- Ion sweep gas Druck: 0
- Aux valve Flow: 10.0
- Spray voltage: 4500 V
- Discharge current: 4V

3.2.1.1 Chromatographie

Die zwei bestimmenden Faktoren, welche eine Flüssigkeitschromatographie beeinflussen, sind die Auswahl des Lauf- bzw. Elutionsmittels und die Beschaffenheit der Trennsäule.

Der Laufmittelgradient wurde von einer bekannten Methode übernommen und setzt sich aus Laufmittel A: Methanol mit 0.1% Ameisensäure und Laufmittel B: ddH₂O mit 0.2% Ameisensäure

zusammen. Die Ameisensäure wird zur Unterstützung der Protonierung der Analytmoleküle beigesetzt. Der verwendete Laufmittelgradient hat folgenden Verlauf:

Tabelle 3: Zusammensetzung des LC-Gradients; A: Methanol mit 0.1% Ameisensäure; B: ddH₂O mit 0.2% Ameisensäure

	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluss [µl/min]
0	0	10	90	250
1	1	10	90	250
2	9	100	0	250
3	20	100	0	250
4	20.1	10	90	250
5	25	10	90	250

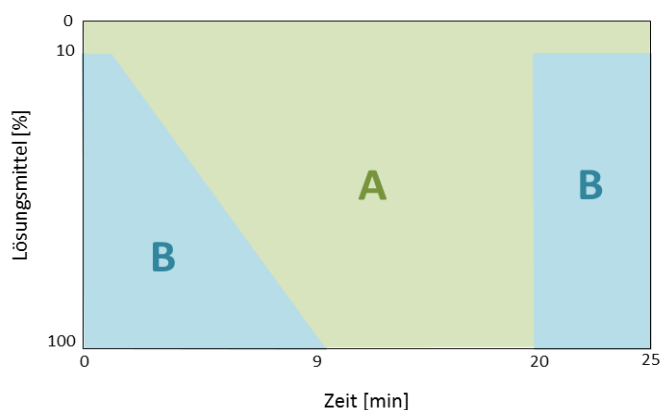


Abbildung 21: Graphische Darstellung des LC-Gradients; A: Methanol mit 0.1% Ameisensäure; B: ddH₂O mit 0.2% Ameisensäure; X-Achse: Zeit in Minuten; Y-Achse: Anteil des Laufmittels in Prozent

Als Laufzeit wurden 25min ausgewählt, wobei die letzten 5 Minuten der gründlichen Spülung der Säule und des LC-Systems dienen. Als Säulenofentemperatur wurden 25°C mit einer Temperaturtoleranz von $\pm 3.5^\circ\text{C}$ gewählt. Dieser Gradient führt dazu, dass zuerst die Elution der polaren Substanzen und anschließend die der apolaren erfolgt. Dies wiederum führt dazu, dass die zwei Substanzgruppen, synthetische Cathinone und Cannabinoide schön über die Laufzeit aufgeteilt werden. Wie im folgenden „total ion chromatogram“ (TIC) gut zu erkennen ist:

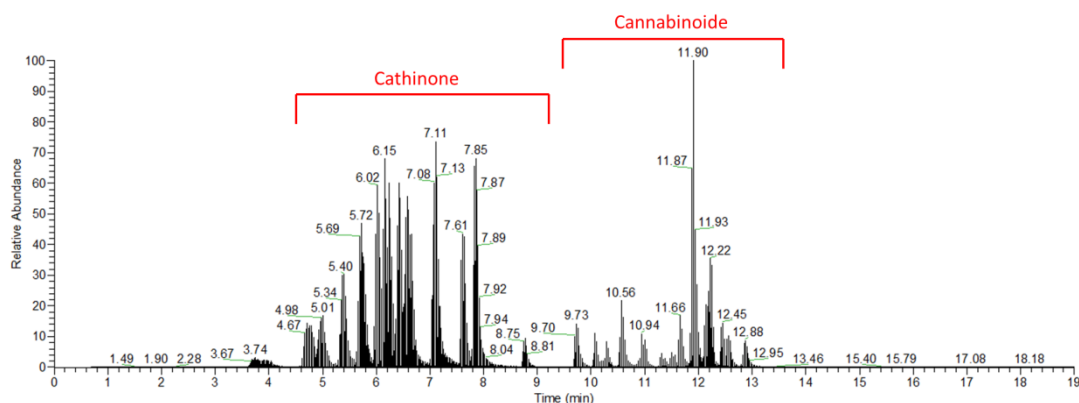
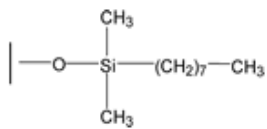
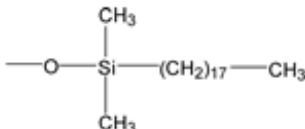
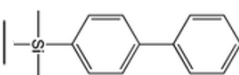


Abbildung 22: Total ion chromatogram (TIC); STD NPS I + II c=25ng/ml; X-Achse: Relative Intensität; Y-Achse: Zeit

Das hier abgebildete TIC wurde mit dem oben beschriebenen Gradienten, einer Biphenylsäule und der fertigen MS-Methode gemessen. Als Probe dienten 25µl Std NPS I + II in 1ml Injektionslösung, was eine Analytkonzentration von $c = 25\text{ng/ml}$ ergibt, und 50µl interner Standard. Hiervon wurden 20µl injiziert.

Nachdem sich der gewählte Gradient als geeignet herausstellte, wurde die Chromatographie mit der richtigen Wahl der Trennsäule optimiert. Dabei wurden folgende 3 Säulentypen getestet.

Tabelle 4: Eigenschaften der getestete LC-Trennsäulen

Säulenart	Struktur Packmaterial
Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 Partikelgröße: 3.5µm Porengröße: 80Å Maße: 75*4.6mm	
Phenomenex Kinetex Biphenyl Partikelgröße: 2.6µm Porengröße: 100Å Maße: 50*2.1mm	
Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Partikelgröße: 3.5µm Porengröße: 80Å Maße: 50*2.1mm	

Es stellte sich heraus, dass die Biphenyl-Säule am besten für diese Analytenkombination geeignet ist. Dieser Punkt wird im Ergebnisteil unter 4.2.2 genauer behandelt. Daher wurde diese Trennsäule für die Methode weiterverwendet.

Um die Retentionszeit jeder einzelnen Substanz mit dieser Methode zu erfassen, wurde jeder Analyt und interner Standard einzeln mit dem oben genannten Gradienten und der Biphenyl-Säule gemessen. Hierfür wurden 20µl der Injektionslösung, dotiert mit 200ng/ml des jeweiligen Analyten in das LC-System injiziert und die Probe vermessen. Nachdem die Retentionszeiten jedes Analyten bestimmt wurden, wurden alle Substanzen gemeinsam in einem Lauf gemessen, um etwaige Koelutionen oder andere ungewünschte Interaktionen zu erfassen. Dafür wurden 20µl von 1ml Injektionslösung, in welche 25µl Std NPS I+ II und 50µl IS + 50µl SS dotiert wurden, in das LC-System injiziert. Ergebnisse siehe 4.2.

3.2.2 Probenaufarbeitung

3.2.2.1 Hydrolyse

Da unpolare Substanzen, wie z. B. Steroidhormone, Glukokortikoiden oder Arzneistoffe, häufig eine zu geringe Wasserlöslichkeit aufweisen um über den Harn ausgeschieden zu werden, werden die Substanzen im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten in der Leber glucuronidiert. Man spricht hier auch von Phase-2 Metaboliten ^[33]. Darunter versteht man die Bindung von Glucuronsäure an ein Substrat, was die Hydrophilie einer Substanz deutlich erhöht und somit die Ausscheidung mittels Harn erleichtert. Um die Substrate bei der Extraktion erfolgreich isolieren und anschließend analysieren zu können, muss die Glucuronsäure mittels Hydrolyse abgespalten werden ^[34]. Dies geschieht enzymatisch mittels bakterieller β -Glucuronidase aus dem Bakterium *E. Coli* und stellt somit den ersten Schritt der Probenaufarbeitung für Harnproben dar.

Dafür werden 20 μ l der β -Glucuronidase, 1ml Natriumacetat-Puffer und 50 μ l interner Standard (IS) mit 1ml der Harn-Probe in einem 5ml Eppendorf-Gefäß vermengt. Anschließend wird das Probengemisch 1.5h bei 50°C im Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur kann mit der Extraktion fortgefahren werden.

Bei Serumproben werden 1ml des Serums mit 1ml Natriumacetat-Puffer und 50 μ l interner Standard (IS) vermengt und wird direkt mit der Extraktion begonnen. Eine Hydrolyse der Glucuronsäure ist hier nicht von Nöten, da sich im Blut keine Phase-2 Metaboliten befinden. Diese werden direkt über die Nieren im Harn ausgeschieden.

3.2.2.2 Extraktion

Der nächste Schritt für den Nachweis von Substanzen in einer komplexen Matrix, ist die Isolation bzw. die Aufreinigung der gewünschten Analyten. Da die vollständig isolierte Extraktion von einer oder mehrere Substanzen in der Regel nicht möglich ist, ist das Ziel der Probenaufarbeitung die höchstmögliche Reduktion von Matrix bedingten Effekten bzw. Störsignalen in der anschließenden Messung. In dieser Arbeit wurden mehrere Ansätze für Probenvorbereitung getestet, welche hier beschrieben werden. Als prinzipielle Extraktionsmethode wurde die Festphasenextraktion (solid phase extraction SPE) gewählt. Diese ist der traditionellen Flüssig-Flüssig-Extraktion vorzuziehen, da sie meist schneller und, wegen des geringeren Lösungsmittelbedarfs, billiger ist, und außerdem über eine höhere Selektivität verfügt und leichter automatisierbar ist. Die SPE ist ein physikalisches Extraktionsverfahren, welches zwischen einer festen Phase und einer flüssigen Phase, in der sich die zu isolierenden Substanzen befindet, stattfindet. Diese feste Phase (Sorbens), liegt im Normalfall gepackt in einer Säule vor, wodurch die flüssige Phase geleitet werden kann. Moderne Säulen enthalten hochporöse Kieselgelpartikel, mit einer sehr großen Oberfläche, auf welche funktionelle

Polymere gebunden sind, die die eigentliche Aufgabe der spezifischen Bindungen übernehmen. In Abbildung 23 ist der grundsätzliche Ablauf einer SPE dargestellt:

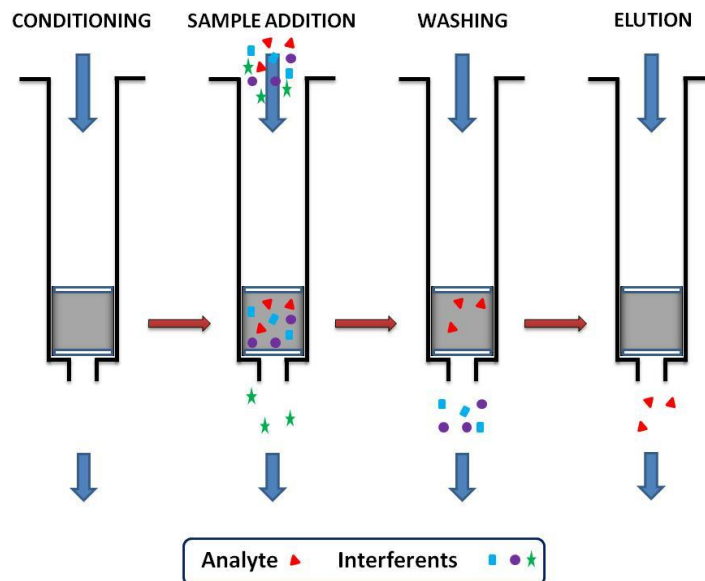


Abbildung 23: Funktionsprinzip der Festphasenextraktion ^[35]

Als erster Schritt wird die Säule mit einem geeigneten Lösungsmittel konditioniert um die optimale Aufnahmekapazität und Reproduzierbarkeit zu erreichen. Anschließend wird die Analytlösung auf die Säule aufgetragen. Trifft die Analytlösung auf das Sorbens wechselwirken die Analyten auf Grund verschiedener physikalisch-chemischer Vorgänge mit den funktionellen Gruppen der festen Phasen und binden somit an diese, wobei ungewünschte Moleküle in der flüssigen Phase verbleiben und somit abgetrennt werden. Nach Waschen der Säule können abschließend die Analyten gezielt mit Aufbringen des geeigneten Elutionsmittels wieder von der festen Phase gelöst und akkumuliert werden. Für eine bessere Handhabung wird meistens ein leichtes Vakuum an die Säulen angelegt. Für optimale Ergebnisse muss das Sorbens und das Elutionsmittel den physikalisch-chemischen Eigenschaften der zu isolierenden Substanzen angepasst werden. Man kann die feste Phase grob nach ihrer physikalisch-chemischen Wechselwirkungen einteilen: Unpolare und polare Wechselwirkungen bzw. Kationen- und Anionenaustauscher, wobei diese verschiedenen Trennprinzipien auch kombiniert werden können. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Säulen der Marke Waters Oasis ausprobiert und verglichen: MCX und HLB. Diese unterscheiden sich in der chemischen Struktur ihres Sorbens, wie in folgender Abbildung veranschaulicht:

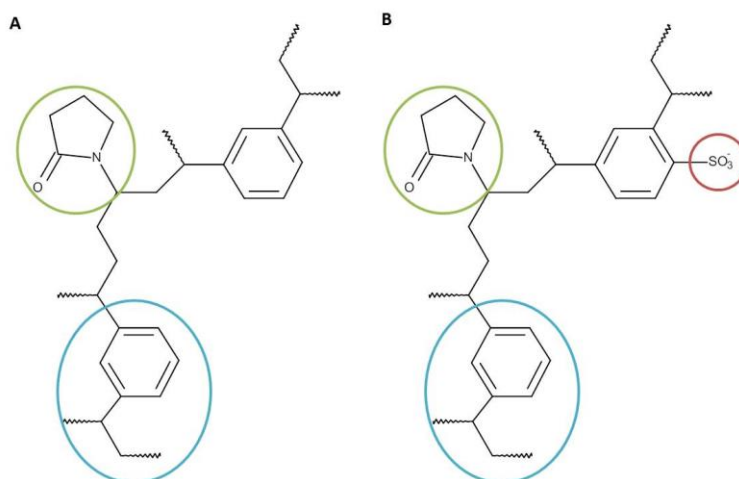


Abbildung 24: A: Struktur Packmaterial HLB; B: Struktur Packmaterial MCX; Farblich markiert die funktionellen Gruppen: grün: N-Vinylpyrrolidon, blau: Divinylbenzol, rot: Sulfonsäure

MCX

Die MCX-Säule enthält starkes wasserbenetzbares Umkehrphase-Mixed-Mode-Kationenaustausch-Polymer, welches selektiv stabil in Basen und in organischen Lösungsmitteln ist. Wobei die Sulfonsäure-Gruppe (SO_3^-) als Kationenaustauscher, das N-Vinylpyrrolidon als hydrophile und das Divinylbenzol als lipophile Komponente dient. Folgende Probenaufarbeitung wurde mit der MCX-Säule unternommen:

In dieser Arbeit wird eine 1ml große Einwegsäule verwendet, was 30mg Packmaterial entspricht. Um eine bessere Handhabung der Säulen zu gewährleisten wird ein gläserner Vakuum-Block verwendet, welcher mittels Wasserstrahlpumpe betrieben wird. Mit diesen können bis zu 24 Säulen unabhängig voneinander über Ventile gesteuert werden. Als erster Schritt wird die Säule mit 2ml MeOH gewaschen und anschließend mittels Auftragen von 2ml 0,1M HCl aktiviert. Dann wird 2ml des Puffer-Probe-Gemisches auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule erneut mit 2ml 0.1N HCL gewaschen, um nicht erwünschte Matrixkomponenten zu entfernen. Nach 10-minütiger Trocknung der Säule wird 2-mal 0.5 ml Methanol mit 2% Ammoniak auf die Säule aufgetragen, um die Analyten direkt in die Schraub-Spitz-Injektionsvials zu eluieren. Dem Eluat werden anschließend 50µl Spritzenstandard (SS), welcher zur Überprüfung der Chromatographie unabhängig von der Extraktion dient, beigemischt. Zusätzlich werden 10µl Ethylenglycol als so genannter „Keeper“ (Beschreibung siehe 3.2.2.3) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird anschließend mittels Vakuumkonzentrator eingedampft, dann in 50µl ACN aufgenommen, bei 60°C 10min erhitzt, um die Analyten erneut vollständig in Lösung zu bringen, und anschließend mit 440µl MQ aufgefüllt. Von diesem fertigen Injektionsgemisch werden 20µl in das LC-System injiziert.

HLB

Die HLB-Säule enthält ein stark hydrophiles, wasserbenetzbares Umkehrphasensorbens, wobei hier ebenfalls das N-Vinylpyrrolidon als hydrophile und das Divinylbenzol als lipophile Komponente dient. Folgende Probenaufarbeitung wurde mit der HLB-Säule unternommen:

Bei den HLB-Säulen handelt es sich ebenfalls um 1ml, 30mg Packmaterial, große Einwegsäulen. Die einfache Handhabung wird ebenfalls mittels Vakuumblock gewährleistet. Nach Waschen der Säule mit 2ml Methanol wird die Säule mit 2ml MQ aktiviert. Der nächste Schritt ist das Auftragen von 2ml des Proben-Puffer-Gemisches und das erneute Waschen mit 2ml MQ. Nach 10-minütiger Trocknung der Säule, wird 2-mal mit 0.5ml ACN/EtAc 1:1 direkt in das Injektionsvial eluiert. Dem Eluat wird anschließend ebenfalls 50µl Spritzenstandard (SS) und 10µl Ethylenglycol beigemischt. Dieses Gemisch wird anschließend eingedampft, dann in 50µl ACN aufgenommen, bei 60°C 10min erhitzt und darauf mit 440µl MQ vermischt, wovon ebenfalls 20µl in da LC-System injiziert werden. Diese zwei Aufarbeitungsvarianten werden sowohl für Harn als auch für Serum gleich durchgeführt und sollen in folgender Abbildung in Form eines Fließschemas übersichtlich dargestellt sein:

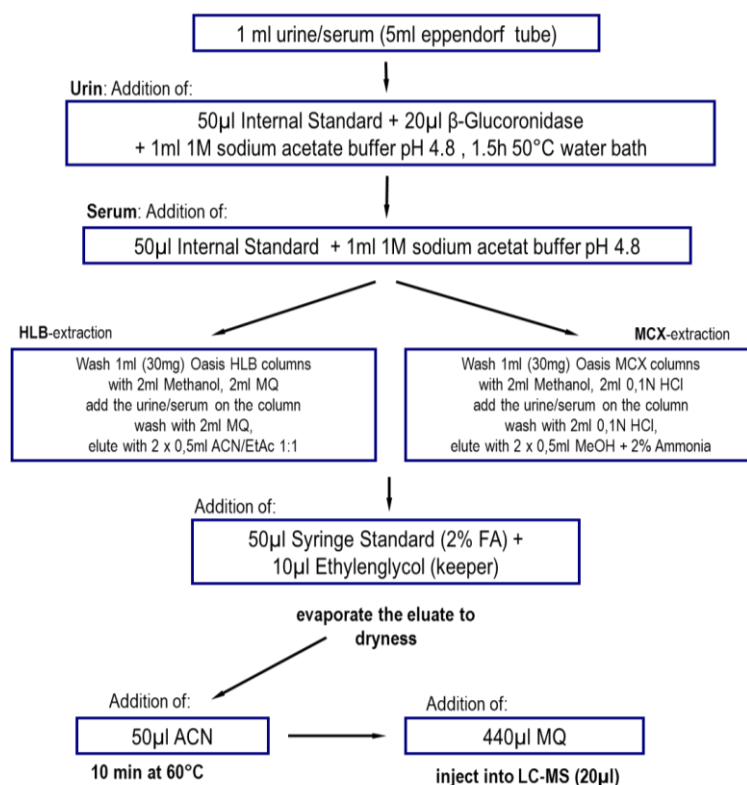


Abbildung 25: Fließschema der Probenaufarbeitung mit HLB- und MCX-SPE-Säulen

Bei den meisten Analyten wurde eine geringere Nachweisgrenze sowohl im Serum als auch im Harn mittels HLB-Säule erreicht, wie unter 4.1.1 ersichtlich. Daher wurde die HLB-Säule als die sich besser geeignete betrachtet und folglich ausschließlich mit dieser weiter gearbeitet.

3.2.2.3 Adsorption

Die zwei vorletzten Schritte beider Aufarbeitungsvarianten wurden erst nach einigen Vorversuchen als solche definiert. Die Rede ist von der Zugabe des Ethylenglykols und die Aufnahme des getrockneten Eluats in Acetonitril mit anschließender Erwärmung auf 60°C. Da sich nach ersten Messungen herausstellte, dass die meisten synthetischen Cannabinoide, bei gleichen Konzentrationen, deutlich geringere Signalintensitäten als die Cathinone aufwiesen, lag der Verdacht nahe, dass diese beim Verdampfungsschritt stark an der Gefäßoberfläche adsorbieren^[36,37]. Folglich wurde versucht, diese Effekte mittels Wahl eines geeigneten Aufnahmemittels und die Verwendung von sogenannten „Keepern“ zu minimieren. Keeper sind hochsiedende Lösungsmittel, welche bei der Verdampfung des Eluats im Gefäß verbleiben und somit die Analyten in Lösung halten sollen. Dies wiederum führt dazu, dass die Analyten weniger mit der Gefäßfläche in Berührung kommen und somit minimiert adsorbieren können. Ein Keeper wird in sehr geringen Mengen eingesetzt, um die folgenden Chromatographie und massenspektrometrische Messung nicht negativ zu beeinflussen. Das Aufnahmemittel, welches nach dem Verdampfungsschritt beigefügt wird, soll die dennoch adsorbierten Analyten von der Gefäßoberfläche lösen. Wobei ein Erwärmen auf 60°C und ein gelegentliches Schwenken des Injektionsvials diesen Prozess unterstützen soll. Folgende Keeper bzw. Aufnahmemittel wurden für diese Anwendung ausgesucht und getestet:

1. 50µl MeOH
2. 50µl ACN
3. 10µl Ethylenglykol (EG) + 50µl MeOH
4. 10µl Dimethylsulfoxid (DMSO) + 50µl MeOH
5. 10µl Glycerol + 50µl MeOH

Bei der Auswahl der Keeper war wichtig, dass diese hochsiedend und gut mischbar mit Wasser und dem Aufnahmemittel sind. Für diesen Versuch wurde 25ng/ml NPS I + II + 50µl IS zu je 3 Aliquoten ohne Aufarbeitung direkt in das Injektionsvial dotiert, der entsprechende Keeper und 50µl SS zugeführt und eingedampft, anschließend das entsprechende Aufnahmemittel beigemischt, 10min auf 60°C erwärmt, und mit 440µl MQ aufgefüllt. Diese Proben wurden dann mit der oben angeführten Methode vermessen. Da sich bei diesem Versuch, Ergebnisse siehe 4.1.1.1, herausstellte, dass sowohl die Anwendung von Acetonitril, als auch die Verwendung von Ethylenglykol als Keeper die Ausbeute deutlich erhöht, sind diese zwei Maßnahmen kombiniert in die Extraktionsmethode aufgenommen worden.

3.2.3 Validierung

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war eine Methodenvalidierung im Sinne der DIN EN ISO / IEC 17025, den weltweiten Standard für Laborakkreditierung. Als Vorlage der Vorgehensweise diente der von der WADA publizierte International Standard for Laboratories (ISL) ^[38], in welchem die Anforderungen an die Validierungsparameter definiert sind. Eine Methodenvalidierung soll den formellen und dokumentierten Nachweis erbringen, dass eine chemische oder physikalische Analyseverfahren für die an sie gestellten Anforderungen erfüllt. Hierfür wurden folgende Parameter für alle zu analysierenden Substanzen, im Harn so wie im Serum, unternommen:

- Nachweisgrenzen (limit of detection, **LOD**)
- Spezifität und Robustheit
- Verschleppung (Carry over, **CO**)
- Suppression
- Wiederfindung (recovery)

Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenzen, oder **LOD**, geben die kleinstmögliche messbare Konzentration in ng/ml in einer Matrix an. Diese wird durch das Dotieren der Substanz in eine Matrix in verschiedener Konzentration und die anschließende Aufarbeitung, Messung und Bewertung der Ergebnisse ermittelt. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen 0.1, 0.5, 1, 2, und 5ng/ml verwendet, da Vorversuche schon ein minimales LOD von 5ng/ml für alle Analyten zeigten. Für die Gültigkeit des LODs wurde ein Signal/Rausch – Verhältnis, kurz S/N; von 3 definiert, welches bei beiden gemessenen Massenübergängen erreicht werden musste. Dieser Versuch wurde sowohl für die HLB- als auch für die MCX-Aufarbeitung unternommen, wobei jeweils zwei 1ml-Probenaliquote aufgearbeitet wurden. Alle weiteren Validierungsparameter wurden nur für die HLB-Aufarbeitung ermittelt, da sich diese als die besser geeignete herausstellte. Siehe dafür 4.1.1. Für die Ergebnisse der LODs sind deshalb nur die für die HLB-Aufarbeitung angegeben. Siehe 4.3.1

Spezifität und Robustheit

Die Spezifität spiegelt die Signalqualität des Analyten in verschiedenen Matrizen mit verschiedenen Eigenschaften wieder. Eine Methode gilt als spezifisch, wenn ein Analyt ohne Störsignale durch Probeneinflüsse eindeutig identifiziert werden kann ^[39]. Hierfür wurden sechs verschiedene Harne, bzw. sechs verschiedene Seren, dotiert mit 10ng/ml der Analyten und undotiert, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und gemessen. Bei den Harnen und Seren handelt es sich um sechs verschiedenen Harne von sechs verschiedenen Personen, jeweils drei Männer und drei Frauen. Die Harne zeigten unterschiedliche spezifische Dichten und unterschiedliche pH-Werte (5-9) auf. Die Seren unterlagen verschiedenen Hämolysegraden (gelb-orange-rot). Durch die Variation solcher

chemisch-physikalischen Parameter soll zusätzlich eine Aussage über die Robustheit getroffen werden. Anhand der Signalqualität in den dotierten Proben verglichen mit den undotierten Proben wurde die Spezifität bzw. Robustheit in drei Kategorien eingeteilt.

1. Sehr gut: Der Analyt konnte in 6 von 6 Proben eindeutig identifiziert werden. (+)
2. Befriedigend: Der Analyt konnte in 4-5 von 6 Proben eindeutig identifiziert werden. (o)
3. Ungenügend: Der Analyt konnte in 3 oder weniger Proben von 6 identifiziert werden. (-)

Ergebnisse siehe 4.3.2.

Verschleppung

Das Verschleppen von einer Probe in die nächste kann sowohl während der Probenaufarbeiten als auch der Messung erfolgen. Dies kann stark von Substanz zu Substanz variieren. Hierfür wurde eine sehr hohe Konzentration der Analyten (200ng/ml) dem Harn bzw. Serum beigemischt und die Probe aufgearbeitet. Zusätzlich wurde jeweils eine Leerwert-Probe direkt danach und vor der dotierten Probe aufgearbeitet und vermessen. Wie erwartet wurden teilweise kleine Mengen des Analyten in der Leerwert-Probe nach der dotierten gefunden. Die Analyt-Konzentrationen in diesem Leerwert und die Konzentrationen in der dotierten Probe wurden verglichen und ein prozentueller Wert für eine mögliche Verschleppung errechnet. Die Konzentrationen wurden mittels interner 2-Punkt Kalibrierung ,25ng/ml und 50ng/ml, berechnet. Ergebnisse siehe 4.3.3.

Suppression

Die Suppression eines Analyten beschreibt die Unterdrückung bzw. auch eine Verstärkung der Signalintensität einer Substanz in der Matrix im Vergleich zu einer Matrix freien Umgebung. Diese Effekte treten durch ko-eluierende bzw. ko-ionisierende endogene Substanzen auf. Dies wird bei einer Unterdrückung mit einem negativen prozentuellen Wert , bzw. bei einer Verstärkung mit einem positiven prozentuellen Wert, angegeben. Hierfür wurden jeweils zwei Harn bzw. Serumproben mit 25ng/ml Analyten dotiert, aufgearbeitet und gemessen. Zusätzlich wurden zwei Aliquote mit 25ng/ml Analyten ohne Matrix aufgearbeitet und vermessen (Standard). Vergleich man dann die mittleren Peakflächen der einzelnen Analyten mit folgender Formel,

$$\text{Supression} = [(\text{Fläche}_{\text{Standard}} / \text{Fläche}_{\text{Probe}}) - 1] * 100\%$$

ergibt sich ein positiver bzw. negativer Suppressionswert, wobei ein negativer Wert eine Verminderung des Signals und ein positiver Wert eine Erhöhung des Signals bedeutet. Ergebnisse siehe 4.3.4. Die Suppression stellt vor allem ein Problem für die Quantifizierung einer Probe dar. Diese Problematik kann allerdings durch das Verwenden eines dotierten Analogons bzw. einer geeigneten Kalibriergeraden vermindert werden.

Wiederfindung

Bei der Wiederfindung handelt es sich um die Menge des Analyten, welche sich nach der Aufarbeitung noch in der Probe befindet, da man davon ausgehen kann, dass bei der Aufarbeitung eine gewisse Menge des Analyten verloren geht. Wie hoch dieser Anteil pro Analyt ist, gilt es zu ermitteln. Dabei wurden ein 1ml Aliquot der Matrices, Serum und Harn, vor der Probenaufarbeitung und ein 1ml Aliquot der Matrice nach der Aufarbeitung mit 25ng/ml der Analyten dotiert. Der interne Standard (50µl), welcher zur Berechnung der Konzentration benötigt wird, wird bei beiden Varianten erst nach der Extraktion beigegeben. Dadurch wird der Teilverlust des Analyten nicht durch den internen Standard korrigiert und man erhält die tatsächlich extrahierte Konzentration. Vergleicht man nun die Konzentrationen beider Probenaliquote erhält man den prozentuellen Anteil für die Wiederfindung des Analyten. Die Konzentrationen wurden mittels Doppelbestimmung ermittelt und mittels interner 2-Punkt Kalibrierung, 25ng und 50ng/ml, berechnet. Ergebnisse siehe 4.3.5.

3.2.4 Realproben

Um die entwickelte Methode unter realen Bedingungen zu testen, wurden folgende Proben aus dem Bereich der forensischen bzw. Anti-Doping-Analytik analysiert:

Tabelle 5: Liste der Realproben

Matrix	Probenart	Quelle	Gefundene Analyten
Harn	Realprobe aus Straßenverkehr	Forensik Seibersdorf Laboratories	Mephedron
Harn	Ringversuchsprobe	WAADS	JWH-018

Die Realprobe aus dem Straßenverkehr wurde von der Polizei Wien anonymisiert für Forschungszwecke zu Verfügung gestellt. Die Ringversuchsprobe wurde von der World Association of Anti-Doping Scientists (WAADS) an alle akkreditierten Anti-Doping Labore weltweit ausgesendet, um deren Vergleichbarkeit bewerten zu können. Reale Serumproben konnten zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht ausgemacht werden.

1ml der Proben, 1ml Leerwert (MQ), 1ml Blindwertharn und 2-mal 1ml dotierte Qualitätskontrollprobe (5ng/ml und 50ng/ml) wurden, wie oben beschrieben, einer Hydrolyse unterzogen, mit der HLB-Extraktion aufgearbeitet und unter den oben genannten Bedingungen gemessen und ausgewertet. Ergebnisse siehe 4.4.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Probenaufarbeitungen

4.1.1 Extraktion

Bei der oben beschriebenen Extraktion wurden zwei verschiedene Säulentypen, MCX und HLB, mit den dazugehörigen Lösungsmitteln bzw. Elutionsmitteln getestet. Die folgende Grafik zeigt den Vergleich der durchschnittlichen Nachweisgrenzen, insgesamt (A) und nach Substanzgruppen und Matrix aufgeteilt (B), zwischen den verschiedenen Säulenmaterialien, welche in Folge der Validierung, wie unter 3.2.3 beschrieben, bestimmt wurde.

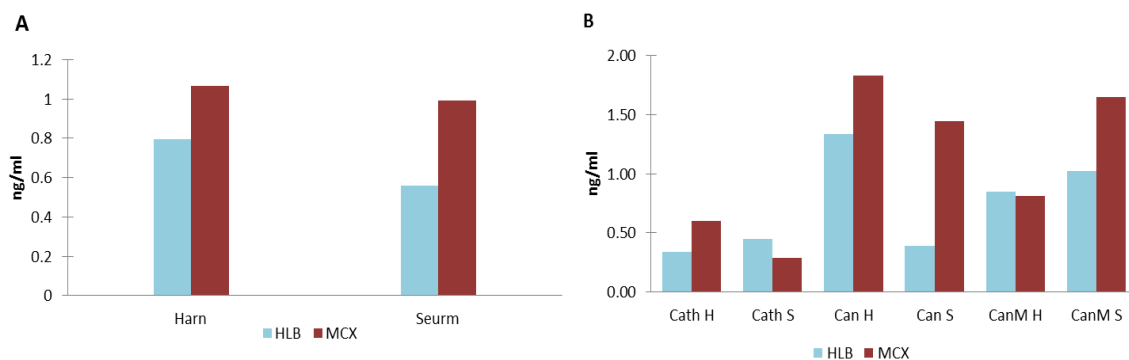


Abbildung 26: A: Durchschnittliche Nachweisgrenzen in ng/ml gesamt mit MCX- und HLB-Säulen in Harn und Serum; B: Nachweisgrenzen in ng/ml nach Substanzklassen und Matrix mit HLB- und MCX-Säulen. Cath H/S = Cathinone in Harn/Serum; Can H/S = Cannabinoide in Harn/Serum; CanM H/S = Cannabinoid Metaboliten in Harn/Serum

Beide Säulentypen bringen sehr gute Ergebnisse für die Extraktion von NPS. Dennoch ist im linken Bild A deutlich zu erkennen, dass die durchschnittliche Nachweisgrenze für die blau dargestellte HLB-Säule im Harn um ca. 20% und im Serum um ca. 40% geringer ist. Wenn man die Nachweisgrenzen aufgeteilt nach Substanzgruppen betrachtet, so zeigt sich ein ähnliches Bild, wobei die MCX-Säule offensichtlich etwas besser für Cathinone im Serum geeignet zu sein scheint. Besonders stark fällt der Unterschied zu Gunsten der HLB-Säule für Cannabinoide im Serum auf. Dem liegt die Tatsache zu Grunde, dass die HLB-Säule, ohne den starken Kationenaustauscher (SO_3^-) besser für apolare Substanzen geeignet ist. Man kann an diesen Daten auch erkennen, dass sich für die reine Analyse von Cathinonen die Matrix Harn besser eignen würde, wiederum für die Analyse von Cannabinoiden das Serum besser geeignet scheint, bzw. geringer Nachweisgrenzen zu erreichen sind. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die HLB-Säule für alle weiteren Untersuchungen herangezogen.

4.1.1.1 Adsorption

Da ein Verdacht der hohen Adsorptionsneigung der Cannabinoide an Gefäßwänden bestand, wurde ein Versuch mit verschiedenen Aufnahmemitteln und hochsiedenden Keepern unternommen. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Es wurden hier jeweils die Mittelwerte der

Peakflächen einer dreifach-Messung (25ng/ml NPS I + II + 50µl IS + 50µl SS) herangezogen. Diese wurde vorher auf die Peakflächen des entsprechenden Methyltestosterons normiert, um Unterschiede in der Messung möglichst auszumerzen. Anschließend wurden die Balkendiagramme auf den jeweils größten Wert skaliert. Der Verdacht, dass sich die Ausbeute mit den oben beschriebenen Maßnahmen erhöhen lässt, ließ sich eindeutig mit diesem Versuch beweisen. In der folgenden Abbildung sind vier repräsentative Analyten aus der Gruppe der synthetischen Cannabinoide und zwei der synthetischen Cathinone gezeigt. Vor allem bei den Cannabinoiden zeigt sich ein enormer Anstieg, teilweise um einen Faktor 30, der Peakflächen mit einerseits der Verwendung von ACN als Aufnahmemittel und andererseits die Anwendung von Keepern, wobei sich Ethylenglykol als der effektivste herausstellte. Man kann dieser Abbildung ebenfalls entnehmen, dass die Verwendung von Keepern auch eine Verbesserung der Ausbeute der Cathinone bewirkt, auch wenn diese nicht so enorm wie bei den Cannabinoiden ausfällt. Wobei sich DMSO, ungeeignet für die meisten Cannabinoide, auch für Cathinone verwenden lässt. Glycerin wiederum zeigt sich für beide Substanzklassen geeignet, wenn auch nicht so erfolgreich wie Ethylenglykol. Es zeigt sich auch, dass ACN etwas weniger geeignet scheint als MeOH für die Aufnahme der Cathinone, was vermutlich der höheren Polarität des Methanols geschuldet ist. Dies spiegelt auch die deutlich höhere Löslichkeit der Cannabinoide in ACN wieder.

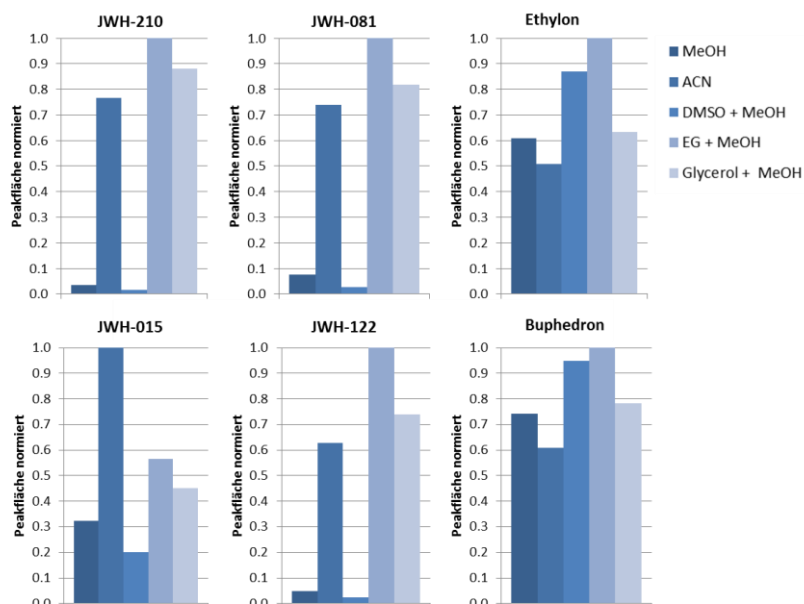


Abbildung 27: Adsorptionseffekte anhand repräsentativer Analyten; Peakflächen normiert auf Methyltestosterone und skaliert auf das größte Signal; EG = Ethylenglykol; DMSO = Dimethylsulfoxid

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für die weitere Aufarbeitung ein Aufnahmemittel von 50µl Acetonitril und ein Keeper von 10µl Ethylenglykol verwendet. Interessant wären noch weitere Versuche mit weiteren Kombinationen von Aufnahmemittel und Keepern, oder mit Verwendung von so genannten low-binding-vials, welche chemisch geschützte Oberflächen besitzen und dadurch

zusätzlich Adsorption vermindern. Da jedoch durchaus zufriedenstellende Ergebnisse für die Nachweisgrenzen, Suppression und Wiederfindung erreicht wurden, ist auf weitere Untersuchungen dieser Art verzichtet worden.

4.2 Massenspektrometrie und Chromatographie

4.2.1 Massenspektrometrie

Folgende Massenübergänge wurden für die internen Standards und Analyten im Zuge der Optimierungsversuche ermittelt. Alle Analyten sind dafür im positiven Modus gemessen worden. Die ermittelten Retentionszeiten der Einzel- und Gesamtmessungen der Flüssigkeitschromatographie werden der besseren Übersicht halber ebenfalls hier angeführt, um die gesamte analytische Beschreibung der Substanzen anzuführen. Die Messungen wurden unter den unter 3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Folgenden Retentionszeiten und Massenübergänge wurden für die synthetischen Cathinone ermittelt:

Tabelle 6: Massenspektrometrische und chromatographische Beschreibung der Cathinone; CE = Kollisionsenergie; eV = Elektronenvolt; m/z = Masse / Ladung

Cathinone	RT [min]	precursor ion [m/z]	product ion 1 / CE [m/z] / [eV]	product ion 2 / CE [m/z] / [eV]
4-Methylethcathinon (4-MEC)	6.60	192	144 / 32	174 / 16
Alpha-PPP	6.13	204	105 / 26	132 / 20
MDPPP	6.65	248	98 / 26	147 / 26
Butylon	6.47	222	174 / 18	204 / 14
4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	7.13	192	144 / 33	174 / 13
Ethylon	6.21	222	174 / 18	204 / 14
Flephedron	5.16	182	149 / 24	164 / 16
MDPBP	7.11	262	161 / 24	191 / 18
Mephedron (4-MMC)	6.29	178	145 / 21	160 / 13
Methedron	6.10	194	161 / 21	176 / 13
Methylon	5.80	208	132 / 28	160 / 17
Pentedron	6.57	192	91 / 25	132 / 18
Pentylon	7.08	236	188 / 18	218 / 14
Buphedrone	5.84	178	91 / 25	131 / 23
Cathinon	4.00	150	117 / 22	132 / 18
Methcathinon	4.93	164	131 / 22	146 / 16
Pyrovalerone	7.78	246	105 / 24	174 / 18
MDPV	7.61	276	126 / 28	175 / 24

Hier ist zu erwähnen, dass die Isomere 4-MEC und 4-EMC sowie Butylon und Ethylon massenspektrometrisch nicht voneinander zu unterscheiden sind. Diese unterscheiden sich jeweils ausschließlich durch die Position einer Methylgruppe. Beide Paare haben daher jeweils dieselbe

Molekülmasse und bilden identische Fragmente. Daher ist es wichtig sie ausreichen gut chromatographisch voneinander trennen zu können. Siehe dafür 4.2.2.2.

Folgenden Retentionszeiten und Massenübergänge wurden für die synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten ermittelt:

Tabelle 7: Tabelle 4: Massenspektrometrische und chromatographische Beschreibung der Cannabinoide und deren Metaboliten; CE = Kollisionsenergie; eV = Elektronenvolt; m/z = Masse / Ladung

Cannabinoide	RT [min]	precursor ion [m/z]	product ion 1 / CE [m/z] / eV	product ion 2 / CE [m/z] / eV
AM-2201	11.84	360	155 / 36	127 / 45
JWH-018	12.14	342	127 / 61	155 / 35
JWH-019	12.37	356	127 / 70	155 / 36
JWH-073	11.87	328	127 / 45	155 / 35
JWH-081	12.37	372	185 / 35	214 / 35
JWH-122	12.48	356	141 / 66	169 / 36
JWH-250	11.50	336	91 / 63	121 / 30
UR-144	11.25	312	125 / 21	214 / 23
JWH-200	9.60	385	127 / 48	155 / 24
RCS-4	11.44	322	77 / 77	135 / 34
JWH-210	12.77	370	183 / 35	214 / 35
JWH-015	11.60	328	127 / 43	158 / 40
HU-210	11.32	387	243 / 18	261 / 16
JWH-307	9.60	386	127 / 45	155 / 20
Cannabionide Metaboliten	RT [min]	precursor ion [m/z]	product ion 1 / CE [m/z] / eV	product ion 2 / CE [m/z] / eV
AM-2201 M1	11.29	376	160 / 36	248 / 22
JWH-018 M2	10.78	372	244 / 20	155 / 22
JWH-073 M1	10.50	358	127 / 43	155 / 21
JWH-122 M1	10.84	372	115 / 59	169 / 21
JWH-210 M1	11.32	400	115 / 52	186 / 22
JWH-250 M1	10.19	352	121 / 20	130 / 35
UR-144 M1	10.19	342	96 / 28	125 / 19
JWH-081 M1	10.91	388	157 / 44	185 / 26
JWH-200 M2	8.69	401	127 / 50	155 / 24
RCS-4 M1	9.96	338	77 / 46	135 / 24

Auch hier ist zu erwähnen, dass die Isomere JWH-015 und JWH-073 massenspektrometrisch nur bei einem Übergang voneinander zu unterscheiden sind. Beide Paare haben jeweils dieselbe Molekülmasse und das gleiche intensivste Fragment. Da aber beide Fragmente für eine eindeutige Zuordnung notwendig sind, ist die erfolgreiche chromatographische Trennung dieser zwei Analyten daher essentiell (siehe 4.2.2.2.). In den hier gut ersichtlichen, oft gleichen Fragmentationen der syntethischen Cannabinoiden spiegelt sich deren sehr nahe strukturelle Verwandtschaft wieder.

Folgenden Retentionszeiten und Massenübergänge wurden für die internen Standards ermittelt:

Tabelle 8: Massenspektrometrische und chromatographische Beschreibung der internen Standards; CE = Kollisionsenergie; eV = Elektronenvolt; m/z = Masse / Ladung

Interner Standard	RT [min]	precursor ion [m/z]	product ion / CE [m/z] / eV
D5-MDMA	6.08	199	165 / 13
D5-Methamphetamin	5.45	155	92 / 22
D11-JWH-018	12.03	353	127 / 45
D3-Memphedron	6.26	181	148 / 15
Methyltestosterone	10.44	303	109 / 28

Für die internen Standards wird nur die intensivste Massenspur verwendet, da diese Standards ohnehin in jeder Messung zu finden sein sollen und sich durch ihre Deuterierung deutlich von ihren natürlichen Analoga unterscheiden.

4.2.2 Chromatographie

4.2.2.1 Säulenvergleich

Der Vergleich der drei verschiedenen Trennsäulenmaterialien, C8, C18 und Biphenyl, zeigt einen deutlichen Unterschied in der Chromatographie. Da es sich bei folgenden Messungen um Voruntersuchungen handelt, sind noch nicht alle in der fertigen Methode erfassten Analyten enthalten, dennoch war ein deutlicher Unterscheid auszumachen. In folgender Abbildung 28 sind die Unterschiede der verschiedenen Säulen ersichtlich. Es wurden 25µl Std NPS I + II in 1ml Injektionslösung (c=25ng/ml) hierfür vermessen:

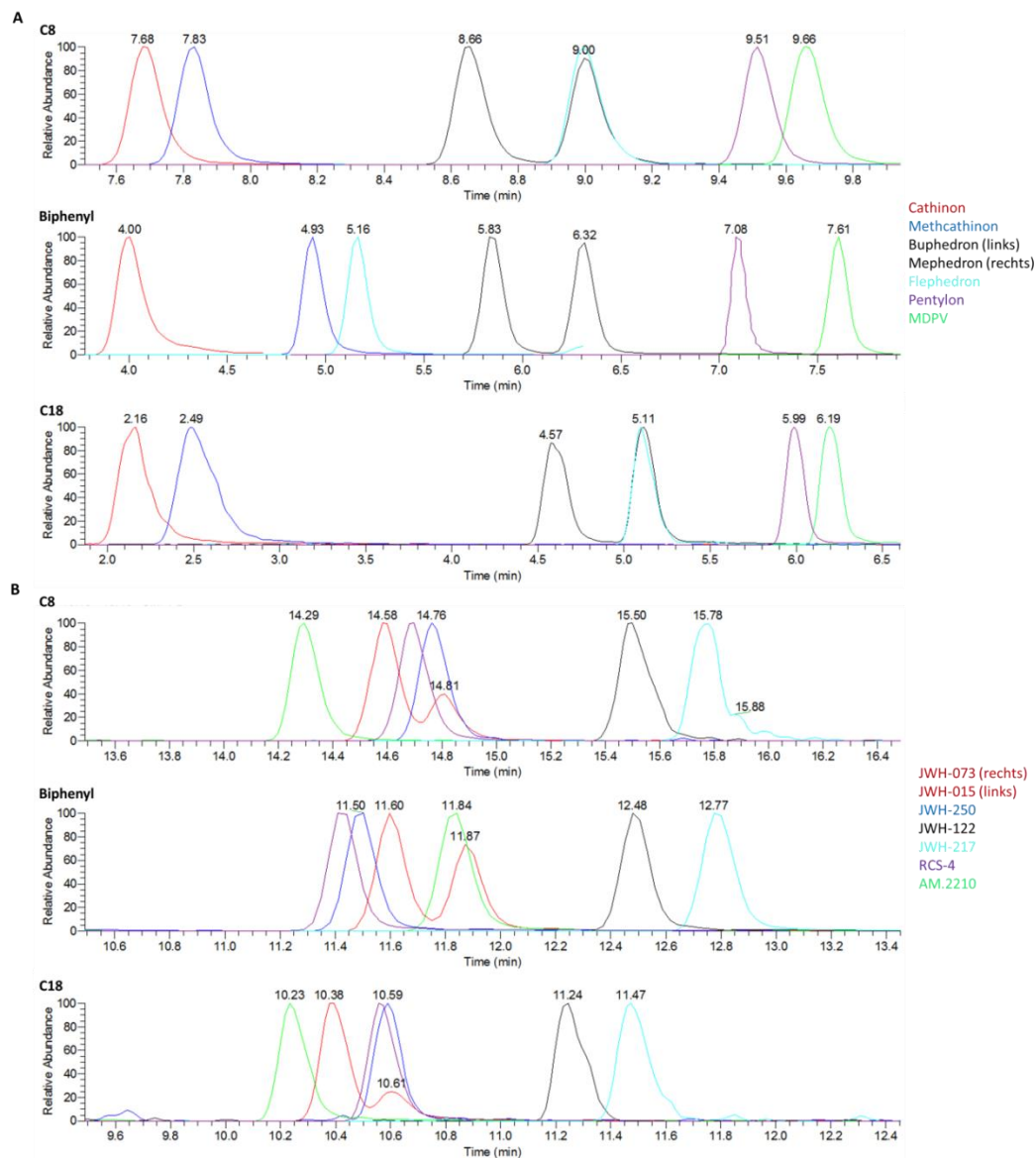


Abbildung 28: LC-Säulenvergleich; A: Synthetische Cathinone; Oben: C18 Säule; Mitte: Biphenyl Säule; Unten: C8-Säule; B: Synthetische Cannabinoide; Oben: C18 Säule; Mitte: Biphenyl Säule; Unten: C8-Säule; Y-Achse: Relative Intensität; X-Achse: Zeit; 20µl Injektion; 25ng/ml NPS I + NPS II in Injektionslösung

In A sind Chromatogramme der verschiedenen Säulen der Cathinone zu sehen. Bei der in der mitte dargestellten Biphenylsäule ist eindeutig ein besseres Auftrennen, bzw. eine schönere Aufteilung der

Analyten zu erkennen. Das Cathinon und Methcathinon eluieren deutlich früher, als bei der C8-Säule (oben), und sind weiter von einander entfernt. Während in der C8- sowie in der C18-Säule das Mephedron und das Flephedron beinahe simultan eluieren, führt die Biphenylsäule zu einer sehr weiten Trennung dieser zwei Analyten. Im Allgemeinen zeigen die C8- und C18-Trennsäule ein sehr ähnliches Trennungsmuster, allerdings um ca. 4-5min verschoben. Dieser Effekt beruht auf der Tatsache, dass das Sorbensvolumen der C8-Säule (75*4.6mm) wesentlich größer ist als das der C18-Säule (50*2.1mm). Die Peakform ist bei allen Säulen von zufriedenstellender Qualität, wobei die C8-, aber vorallem die C18-Säule ein leichtes Tailing an einigen Peaks aufweist. In B ist die Auftrennung einiger Vertreter der synthetischen Cannabinoiden dargestellt. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass die Cannabinoide weniger erfolgreich voneinander zu trennen sind als die Cathinone, unabhängig davon welche Säule man verwendet. Ebenso ist der Unterschied der verschiedenen Säulen deutlich geringer. Die C18 (unten) zeigt auch hier die schlechteste Trennleistung und Peakform. Die C8-Säule (oben) und die Biphenylsäule (mitte) zeigen eine ähnlich gute Trennleistung und Peakform. Der entscheidende Unterschied der Biphenylsäule im Vergleich zu C8-Säule ist, dass die Isomerentrennung von JWH-015 und JWH-073 deutlich besser funktioniert, und allgemein ein etwas geringeres Tailing auftritt. Diese zwei isomeren Analyten sind massenspektrometrisch nicht voneinander zu unterscheiden. Daher teilen sie sich dieselbe Massenspur, welche in Abbildung B rot gefärbt ist. Um so wichtiger ist hier deren chromatographische Trennung. Hier zeigt die Biphenyl-Säule eine deutlich schärfere Trennung dieser beiden Moleküle als die C18- oder C8-Säule. Aufgrund dieser Tatsache und die oben erwähnte bessere Trennung der Cathinone wurde die Biphenylsäule für diese Methode ausgewählt.

4.2.2.2 LC-Chromatogramme der Analyten

Folgende Abbildungen zeigen die überlagerten Massenspuren jedes einzelnen Analyten farblich markiert. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, werden maximal 8 Analyten pro Abbildung gezeigt. In Abbildung 29 sind die überlagerten Massenspuren der synthetischen Cathinone zu sehen. Es handelt sich hierbei um einen mit 10ng/ml jedes Analyten dotierten Harn, aufgearbeitet mit der oben beschriebenen HLB-Extraktion.

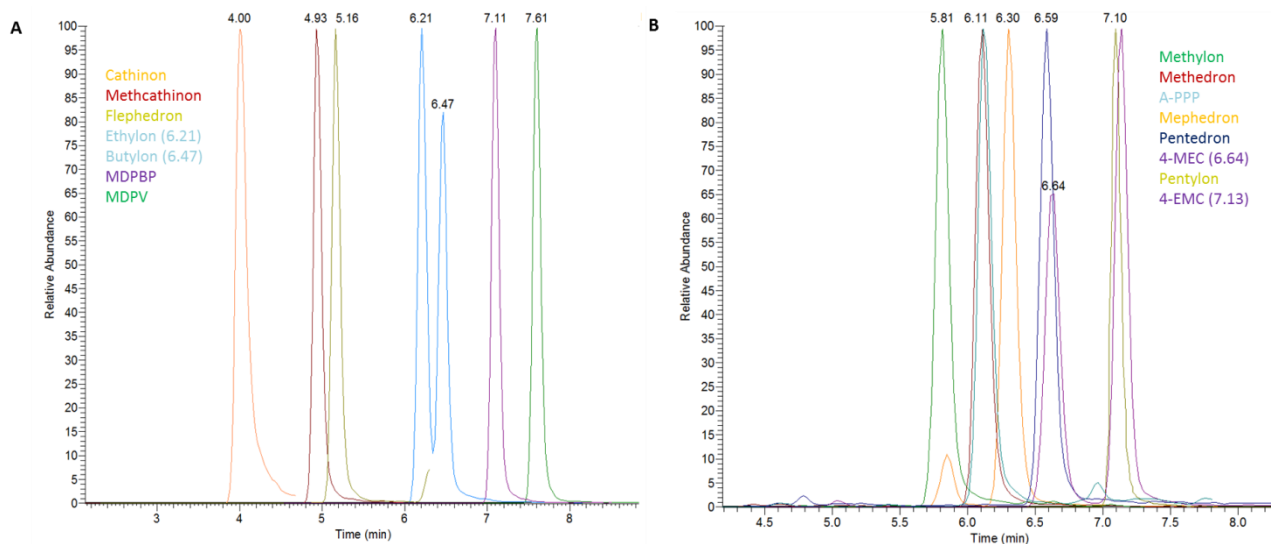


Abbildung 29: Überlagerte Massenspuren der synthetischen Cathinone, farblich markiert; HLB-Aufarbeitung; 10ng/ml dotierter Harn; X-Achse: Zeit; Y-Achse: Relative Intensität

Sowohl in A als auch in B sind sehr schöne Peakformen zu erkennen, welche die gute Qualität der Chromatographie widerspiegeln. Ein leichtes Tailing ist dennoch bei den meisten Peaks zu erkennen, welches aber nur geringen Einfluss auf die Form des Peaks hat. Das sehr hohe Signal/Rausch-Verhältnis, bzw. das sehr geringe Vorkommen von endogenen Signalen zeigt die äußerst erfolgreiche und saubere Extraktion. In A ist die notwendige chromatographische Trennung der massenspektrometrisch nicht zu unterscheidenden Analyten Ethylon und Butylon (hellblau markiert) gut zu erkennen. Die Trennung lässt sich nicht ganz bis zur Basislinie durchführen, reicht aber aus um diese zwei Analyten für eine qualitative Zuordnung deutlich unterscheiden zu können. Bei geringeren Konzentrationen erfolgt die Trennung komplett. In B ist das massenspektrometrisch nicht differenzierbare Isomerenpaar 4-MEC und 4-EMC (in lila dargestellt) sehr gut voneinander getrennt. Die Substanzen einzeln dargestellt sind in Form eines Xcalibur Reports unter 5.4.1 im Anhang zu finden.

4. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 30 sind die überlagerten Massenspuren der synthetischen Cannabinoide farblich markiert dargestellt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um einen mit 10ng/ml jedes Analyten dotierten Harn, aufgearbeitet mit der oben beschriebenen HLB-Extraktion.

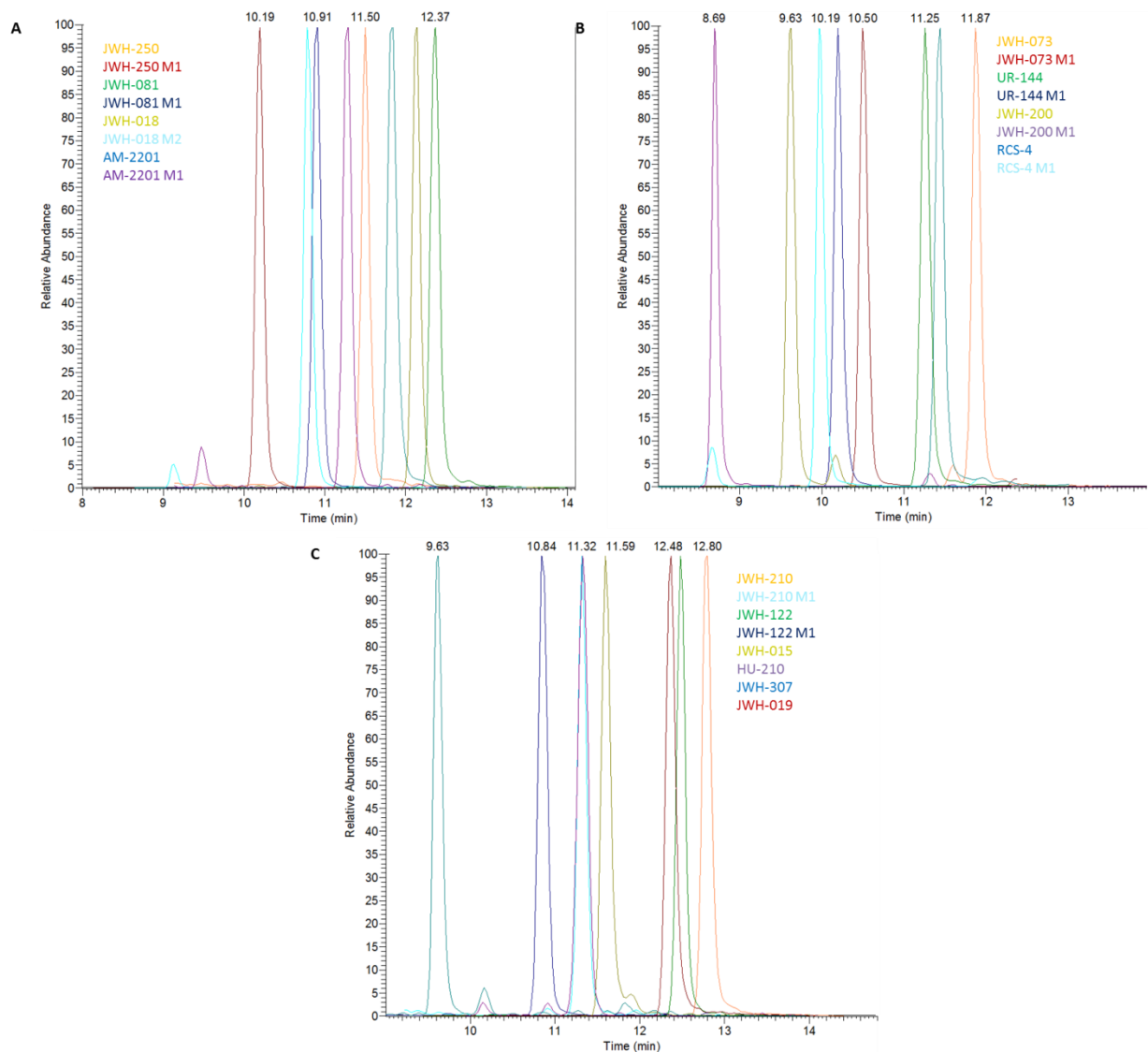


Abbildung 30: Überlagerte Massenspuren der synthetischen Cannabinoide, farblich markiert; HLB-Aufarbeitung; 10ng/ml dotierter Harn; X-Achse: Zeit; Y-Achse: Relative Intensität

Wieder zeugt eine sehr symmetrische und scharfe Peakform der einzelnen Analyten von einer sehr guten Chromatographie. Die Substanzen sind hier, wenn vorhanden, jeweils mit ihrem Metaboliten dargestellt, um die oft enormen Unterschiede in deren Retentionszeit zu illustrieren. Ebenfalls kann eine erfolgreiche und saubere Extraktion beobachtet werden. Die Substanzen einzeln dargestellt sind in Form eines Xcalibur Reports unter 5.4.2 im Anhang zu finden. Zusammenfassend ist eine schöne Selektivität durch die chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen gegeben, was eine eindeutige Identifizierung des jeweiligen Analyten zulässt

4.3 Validierung

4.3.1 Nachweisgrenze

In folgender Tabelle sind die erreichten Nachweisgrenzen für die synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten mittels HLB-Aufarbeitung im Serum bzw. Harn aufgelistet.

Tabelle 9: Nachweisgrenzen (LOD) in Harn und Serum (1ml) der synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten in ng/ml

Cannabinoide	LOD [ng/ml]	
	Harn	Serum
AM-2201	0.1	0.1
JWH-018	1	0.1
JWH-019	2	0.5
JWH-073	0.5	0.1
JWH-081	2	0.5
JWH-122	0.5	0.1
JWH-250	2	0.5
UR-144	5	0.5
JWH-200	0.1	0.1
RCS-4	2	0.1
JWH-210	0.5	0.5
JWH-015	0.5	0.1
HU-210	0.5	0.5
JWH-307	2	1
Cannabionide Metaboliten	Harn	Serum
AM-2201 M1	2	0.5
JWH-018 M2	0.5	5
JWH-073 M1	1	0.5
JWH-122 M1	0.5	2
JWH-210 M1	1	0.1
JWH-250 M1	0.5	0.5
UR-144 M1	0.5	0.5
JWH-081 M1	0.5	0.5
JWH-200 M2	0.5	0.5
RCS-4 M1	0.5	0.1

Bei den Nachweisgrenzen der synthetischen Cannabinoide zeigen sich durchgehend etwas höhere Werte als bei den Cathinonen. Dies liegt vermutlich an deren erhöhtem Adsorptionsvermögen und der daraus resultierenden verringerten Signalstärke. Die Nachweisgrenzen sind aber durchaus zufriedenstellend für die Anwendungsbereiche dieser Methode. Die WADA gibt ein Allgemeines-LOD von 1ng/ml für synthetische Cannabinoide im Harn an, welches bei den meisten der Analyten erreicht wird. Besteht der Verdacht auf die Einnahme solcher Substanzen, kann die Methode auch mit einer größeren Menge an Probenvolumen durchgeführt werden, um das entsprechende LOD zu

erreichen. Im Serum zeigt sich hier im Durchschnitt eine niedrigere Nachweisgrenze für die Cannabinoide als im Harn. Für die Metaboliten verhält es sich ausgeglichen. Vergleicht man die Ergebnisse mit folgenden Werten, die bei realen Proben gefunden wurden, werden die LODs durchaus den Anforderungen gerecht. In Blutproben wurde bei fatalen Fällen eine Konzentration von 0.1–199 ng/ml für JWH-018, 0.1–68.3 ng/ml für JWH-073 sowie 12 ng/ml für AM-2201 ermittelt ^[40]. Andere publizierte Methoden, welche ausschließlich auf die Analyse der synthetischen Cannabinoide abzielen, erreichen nur teilweise bessere Ergebnisse für die Nachweisgrenzen ^[41-43].

Folgende Nachweisgrenzen (LOD) in ng/ml konnten mittels HLB-Aufarbeitung im Serum bzw. Harn für die synthetischen Cathinone erreicht werden:

Tabelle 10: Nachweisgrenzen (LOD) in Harn und Serum (1ml) der synthetischen Cathinone in ng/ml

Cathinone	LOD [ng/ml]	
	Harn	Serum
4-Methylethcathinon (4-MEC)	0.5	0.1
Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP)	0.5	0.1
3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone (MDPPP)	0.1	0.1
Butylon	0.1	0.1
4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	0.1	0.1
Ethylon	0.1	0.1
Flephedron	0.1	0.1
MDPBP	0.1	0.1
Mephedron (4-MMC)	0.1	0.1
Methedron (4-methoxymethcathinone)	0.5	1
Methylon	0.1	0.1
Pentedron	0.1	0.1
Pentylon	0.5	0.1
Buphedrone	0.1	0.1
Cathinon	2	5
Methcathinon	0.5	0.5
Pyrovalerone	0.5	0.1
Methylendioxypropyvaleron (MDPV)	0.1	0.1

Bei den synthetischen Cathinonen zeigt sich durchgehend, außer beim natürlichen Cathinon selbst, eine sehr niedrige Nachweisgrenze. Dies beruht auf der schlechten Chromatographie des Cathinons, wie im Anhang unter 5.4.1 zu erkennen ist. Auffällig ist zudem, dass für die meisten Analyten im Serum eine niedrigere Nachweisgrenze ermittelt wurde. Das lässt auf eine höhere Sauberkeit des Extraktes nach der Aufarbeitung schließen. Die Vermutung liegt nahe, dass die LODs teilweise auch noch niedriger liegen können, diese wurde aber im Zuge dieser Arbeit nicht mehr weiter getestet, da die Nachweisgrenzen für den Verwendungszweck dieser Methode völlig ausreichen, da die WADA ein LOD von 100ng/ml für synthetische Cathinone im Harn vorgibt. Für die Analyse im Serum reichen die

LODs ebenfalls aus wie die folgenden realen Fälle zeigen. In Blutproben wurde bei fatalen Fällen Konzentrationen von 60 – 1120 ng/ml für Methylone, 1.2 – 5.5 µg/ml für Mephedron oder 17 – 700 ng/ml für MDPV gefunden ^[40]. Die hier erreichten Nachweisgrenzen lassen sich ebenfalls mit Methoden messen, welche ausschließlich synthetischen Cathinone analysieren ^[40,44,45].

In der Literatur war keine andere Methode zu finden, welche diese zwei Analyttypen kombiniert, in so einer Vielfalt und mit solch niedrigen Nachweisgrenzen nachweist. Die einzig vergleichbare Methode, was den Analytenumfang betrifft, erreicht eine LOD von 1ng/ml für synthetische Cannabinoide und 5ng/ml für synthetische Cathinone ^[46].

4.3.2 Spezifität und Robustheit

In folgender Tabelle ist die Spezifität bzw. Robustheit der synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten dargestellt. Die drei Kategorien, sehr gut, befriedigend und ungenügend sind unter 3.2.3 definiert.

Tabelle 11: Spezifität in Harn und Serum der synthetische Cannabinoide

Cannabinoide	Spezifität + sehr gut o befriedigend - ungenügend	
	Harn	Serum
AM-2201	+	+
JWH-018	+	+
JWH-019	+	+
JWH-073	+	+
JWH-081	+	+
JWH-122	+	+
JWH-250	O	O
UR-144	+	+
JWH-200	+	+
RCS-4	+	+
JWH-210	+	+
JWH-015	+	+
HU-210	+	+
JWH-307	+	+
Cannabionide Metaboliten	Harn	Serum
AM-2201 M1	+	+
JWH-018 M2	+	+
JWH-073 M1	+	+
JWH-122 M1	+	+
JWH-210 M1	+	+
JWH-250 M1	+	+
UR-144 M1	+	+
JWH-081 M1	+	+
JWH-200 M2	+	+

RCS-4 M1

|| + | +

In Folgender Tabelle ist die Spezifität bzw. Robustheit der synthetischen Cathinone dargestellt. Die drei Kategorien, sehr gut, befriedigend und ungenügend sind unter 3.2.3 definiert.

Tabelle 12: Spezifität in Harn und Serum der synthetischen Cathinone

Cathinone	Spezifität + sehr gut o befriedigend - ungenügend	
	Harn	Serum
4-Methylethcathinon (4-MEC)	o	+
Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP)	+	+
3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone (MDPPP)	o	+
Butylon	+	+
4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	+	+
Ethylon	+	+
Flephedron	+	+
MDPBP	+	+
Mephedron (4-MMC)	+	+
Methedron (4-methoxymethcathinone)	+	+
Methylon	+	+
Pentedron	o	+
Pentylon	+	+
Buphedrone	+	+
Cathinon	+	+
Methcathinon	+	+
Pyrovalerone	+	+
Methylendioxypropyvaleron (MDPV)	+	+

Die Methode zeigt durchwegs eine sehr gute, bis auf einige wenige Ausnahmen befriedigende aber ausreichende, Spezifität für die jeweilige Substanz. Dies ließ durch die richtige Wahl der Aufarbeitungsmethode und die daraus resultierende Minimierung von Matrixeffekten erreichen. Dadurch ist der eindeutige Nachweis jedes Analyten in verschiedenen Matrices gegeben.

4.3.3 Verschleppung

In folgender Tabelle sind die Verschleppungswerte bei einer Dotierung von 200ng/ml der Analyten der synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten dargestellt:

Tabelle 13: Verschleppung (CO) in Harn und Serum bei 200ng Dotierung in Prozent für Cannabinoide und deren Metaboliten in Prozent

Cannabinoide	CO [%]	
	Harn	Serum
AM-2201	0,33	0.62
JWH-018	1.09	1.1
JWH-019	2.35	1.24
JWH-073	0.61	1.01
JWH-081	1.57	0.99
JWH-122	1.9	1.17
JWH-250	0.21	0.77
UR-144	1.15	1.46
JWH-200	0.11	0.15
RCS-4	0.22	0.68
JWH-210	1.65	0.38
JWH-015	0.22	0.52
HU-210	1.41	0.53
JWH-307	0.16	0.02
Cannabionide Metaboliten	Harn	Serum
AM-2201 M1	0.03	0.19
JWH-018 M2	0.1	0.01
JWH-073 M1	0.24	0.31
JWH-122 M1	0.09	0.09
JWH-210 M1	0.16	0.97
JWH-250 M1	< 0.01	0.2
UR-144 M1	0.17	0.25
JWH-081 M1	0.13	0.16
JWH-200 M2	< 0.01	0.06
RCS-4 M1	0.12	0.1

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Verschleppungsgefahr für die synthetischen Cannabinoide, was bei Betrachtung der durchaus erhöhten Adsorptionsneigung nachvollziehbar ist. Besonders die Parent-Substanzen neigen zur Verschleppung. Wenn eine sehr hohe Konzentration einer solchen Substanz zu erwarten ist, kann die Verschleppungsgefahr durch eine Verdünnung der Probe vor der Aufarbeitung minimiert werden.

In folgender Tabelle sind die Verschleppungswerte bei einer Dotierung von 200ng/ml der Analyten der synthetischen Cathinone dargestellt:

Tabelle 14: Verschleppung (CO) in Harn und Serum bei 200ng Dotierung in Prozent für synthetische Cathinone in Prozent.

Cathinone	CO [%]	
	Harn	Serum
4-Methylethcathinon (4-MEC)	< 0.01	< 0.01
Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP)	< 0.01	< 0.01
3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone (MDPPP)	0.19	0.08
Butylon	< 0.01	< 0.01
4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	0.05	< 0.01
Ethylon	< 0.01	< 0.01
Flephedron	0.41	0.15
MDPBP	< 0.01	0.04
Mephedron (4-MMC)	< 0.01	0.05
Methedron (4-methoxymethcathinone)	< 0.01	0.02
Methylon	< 0.01	0.05
Pentedron	0.02	< 0.01
Pentylon	< 0.01	0.04
Buphedrone	< 0.01	< 0.01
Cathinon	< 0.01	< 0.01
Methcathinon	< 0.01	< 0.01
Pyrovalerone	< 0.01	0.05
Methylendioxyprovaleron (MDPV)	< 0.01	0.02

Bei den synthetischen Cathinonen ist bei 200ng/ml faktisch kaum eine Verschleppung zu erkennen. Dies spiegelt die richtige Auswahl der verwendeten Lösungs- bzw. Laufmittel wider.

4.3.4 Suppression

Folgende Suppressionswerte wurden für die synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten ermittelt:

Tabelle 15: Suppression in Harn und Serum der synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten in Prozent

Cannabinoide	Suppression [%]	
	Harn	Serum
AM-2201	-31	1
JWH-018	-6	27
JWH-019	-3	7
JWH-073	-24	11
JWH-081	-14	8
JWH-122	-5	-5
JWH-250	-9	183
UR-144	12	203
JWH-200	-13	-12
RCS-4	-5	245
JWH-210	-2	-13
JWH-015	-15	94
HU-210	1	-12
JWH-307	-4	-16
Cannabionide Metaboliten	Harn	Serum
AM-2201 M1	-2	181
JWH-018 M2	3	-42
JWH-073 M1	22	10
JWH-122 M1	2	-45
JWH-210 M1	0	33
JWH-250 M1	34	6
UR-144 M1	50	36
JWH-081 M1	-5	-32
JWH-200 M2	-37	-2
RCS-4 M1	21	33

Es zeigt sich für einzelne Analyten (JWH-250, Ur-144, RCS-4, AM-2201 M1) eine sehr hohe positive Suppression im Serum, nicht allerdings im Harn. Dies kann auf das erhöhte Vorhandensein von chemisch ähnlichen (lipophil, apolar) Substanzen im Serum, verglichen zum Harn, beruhen, welche gleich eluieren bzw. ionisieren. Bei einer Quantifizierung dieser Substanzen muss Vorsicht geboten sein. Eine speziell auf diese Substanzen optimierte Probenaufarbeitung könnte Abhilfe schaffen.

Folgende Suppressionswerte wurden für die synthetischen Cathinone ermittelt:

Tabelle 16: Suppression in Harn und Serum der synthetischen Cathinone in Prozent

Cathinone	Suppression [%]	
	Harn	Serum
4-Methylethcathinon (4-MEC)	-31	-4
Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP)	-29	1
3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone (MDPPP)	-53	-3
Butylon	-53	-13
4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	-28	-12
Ethylon	-38	-3
Flephedron	-40	-23
MDPBP	-44	-17
Mephedron (4-MMC)	-25	-5
Methedron (4-methoxymethcathinone)	-28	-1
Methylon	-49	-10
Pentedron	-10	1
Pentylon	-31	-17
Buphedrone	-25	-7
Cathinon	12	43
Methcathinon	-23	-2
Pyrovalerone	-44	-28
Methylendioxyprovaleron (MDPV)	-52	-42

Für die meisten synthetischen Cathinone ist eine höhere negative Suppression im Harn, verglichen zum Serum, zu beobachten. Das kann, wie schon bei den Nachweisgrenzen, auf die höhere Reinheit des Extrakts nach der Aufarbeitung für Serumproben zurück zu führen sein. Verglichen zum Serum kann es allerdings auch an dem erhöhten Auftreten chemisch ähnlicher (polar, hydrophil) Substanzen im Harn liegen, da diese zu einer erhöhten negativen Suppression der Cathinone führen.

4.3.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungswerte der synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten sind in folgender Tabelle ersichtlich:

Tabelle 17: Wiederfindung in Harn und Serum der synthetischen Cannabinoide und deren Metaboliten in Prozent

Cannabinoide	Recovery [%]	
	Harn	Serum
AM-2201	77	32
JWH-018	52	46
JWH-019	69	51
JWH-073	69	35
JWH-081	55	39
JWH-122	59	47
JWH-250	88	74
UR-144	25	33
JWH-200	77	99
RCS-4	88	94
JWH-210	73	24
JWH-015	98	48
HU-210	62	24
JWH-307	78	93
Cannabinoide Metaboliten	Harn	Serum
AM-2201 M1	59	97
JWH-018 M2	74	41
JWH-073 M1	94	64
JWH-122 M1	92	46
JWH-210 M1	100	49
JWH-250 M1	100	109
UR-144 M1	128	119
JWH-081 M1	74	20
JWH-200 M2	54	97
RCS-4 M1	96	60

Bei den Cannabinoiden zeigt sich ein etwas geringerer Wiederfindungswert als bei den Cathinonen, was sich ebenfalls auf deren Adsorptionsverhalten zurück zu führen lässt. Es fällt außerdem auf, dass die Wiederfindung im Serum geringer ausfällt, als im Harn, was sich mit den guten Ergebnissen der LODs für Cannabinoide im Serum widerspricht. Dies wiederum lässt auf sehr saubere Serumextrakte nach der Aufarbeitung schließen.

Die Wiederfindungswerte der synthetischen Cathinone sind in folgender Tabelle ersichtlich:

Tabelle 18: Wiederfindung in Harn und Serum der synthetischen Cathinone in Prozent

Cathinone	Recovery [%]	
	Harn	Serum
4-Methylethcathinon (4-MEC)	88	85
Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP)	87	88
3,4-Methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone (MDPPP)	64	84
Butylon	58	81
4-Ethylmethcathinon (4-EMC)	84	75
Ethylon	79	86
Flephedron	63	69
MDPBP	73	65
Mephedron (4-MMC)	82	86
Methedron (4-methoxymethcathinone)	89	78
Methylon	70	77
Pentedron	100	82
Pentylon	85	69
Buphedrone	87	88
Cathinon	93	42
Methcathinon	79	66
Pyrovalerone	71	73
Methylendioxyprovaleron (MDPV)	62	52

Auf Grund der durchwegs guten Wiederfindungswerte aller Analyten von Durchschnittlich ca. 70%, kann man auf die richtige Wahl der Extraktionsmethode schließen. Wiederfindungswerte über 100%, sind auf eine positive Ionensuppression zurückzuführen. Eine exakte quantitative Bestimmung wäre dennoch nur mit einem deuterierten Analogon für den jeweiligen Analyten und einer exakten Kalibriergerade möglich. In der Literatur findet man sehr ähnliche Wiederfindungswerte für beide Substanzklassen ^[42,45].

4.4 Realproben

4.4.1 Mephedron

Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Mephedron-Realprobe, welche von der Polizei Wien aus einer Straßenverkehrskontrolle zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich hierbei um eine Harnprobe. In der ersten und zweiten Reihe sind die zwei Massenspuren des Mephedrons dargestellt. In der dritten Reihe die Massenspur des internen Standards Mephedron-D3. Es wurden hier nur 100µl der Probe genommen, weil durch einen Vorversuch bekannt war, dass die Probe eine sehr hohe Konzentration Mephedron enthält. Dieses Aliquot wurde mit 900µl MQ aufgefüllt, um gleiche Bedingungen für die Aufarbeitung zu schaffen.

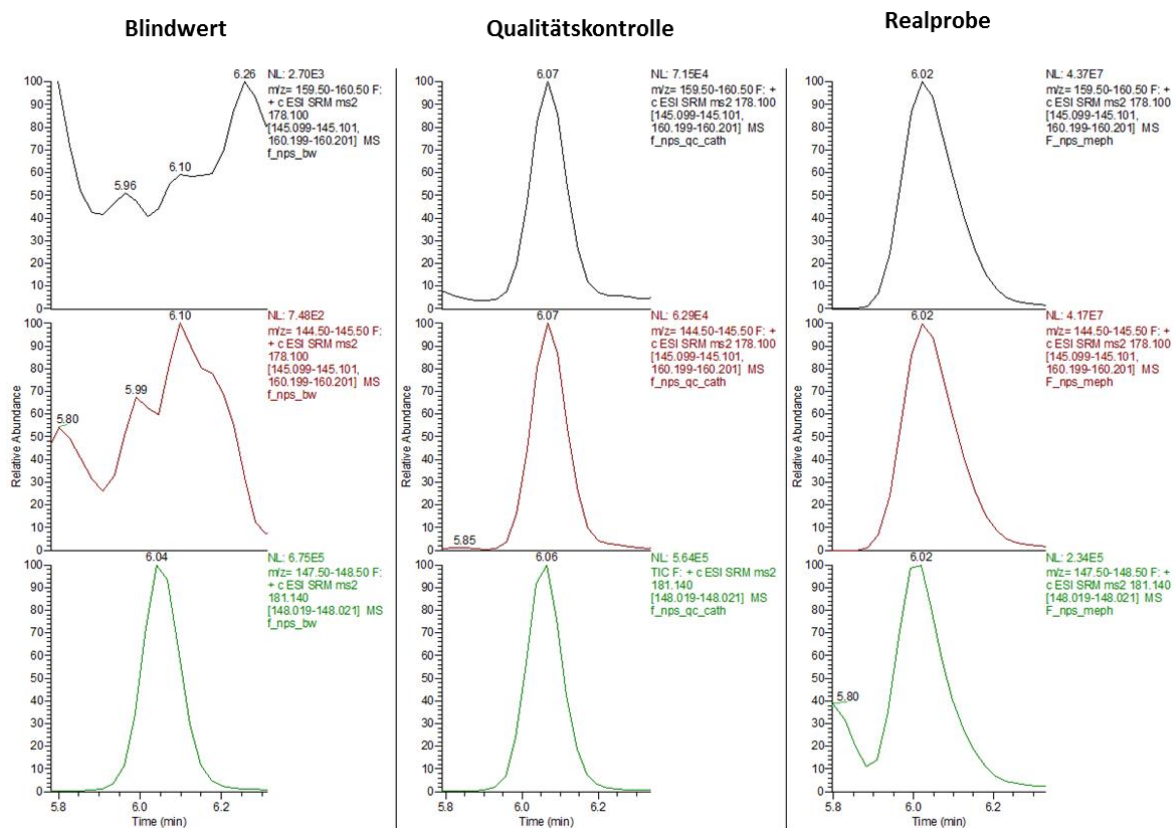


Abbildung 31: Chromatogramme der Mephedron-Realprobenmessung; Links: 1ml Blindwert; Mitte: 1ml Qualitätskontrolle 50ng/ml; Rechts: 100µl Realprobe verdünnt mit 900µl MQ; Oben: Massenspur 178->160; Mitte: Massenspur 178->145; Unten: IS Mephedron-D3; X-Achse: Zeit; Y-Achse: Relative Intensität

Die linke Spalte zeigt 1ml undotierten Blindwertharn, in welchem auf den Mephedronspuren nur ein endogenes Rauschen erkennbar ist. In der mittleren Spalte ist die 1ml Qualitätskontrolle (QC) mit 50ng/ml Dotierung zu sehen, die schöne Peaks für das Mephedron enthält. Die linke Spalte zeigt die 1ml Realprobe, welche ein extrem hohes Singal für Mephedron aufweist, wodurch auch der leichte Shift in der Retentionszeit und das starke Tailing entsteht, dennoch stimmen diese sehr gut überein. Das Verhältnis der Fragmentintensitäten von QC und Probe sind ebenfalls beinahe ident. Daher kann man davon ausgehen, dass diese Realprobe tatsächlich Mephedron enthält. Eine Abschätzung, anhand des dotierten QCs, ergibt eine Konzentration von 750µg/ml.

4.4.2 JWH-018

Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der JWH-018 Realproben, welche eine Harn-Ringversuchprobe der WAADS ist. In der ersten und zweiten Reihe sind die zwei Massenspuren des JWH-018 M2 dargestellt. In der dritten Reihe die Massenspur des internen Standards JWH-018-D11.

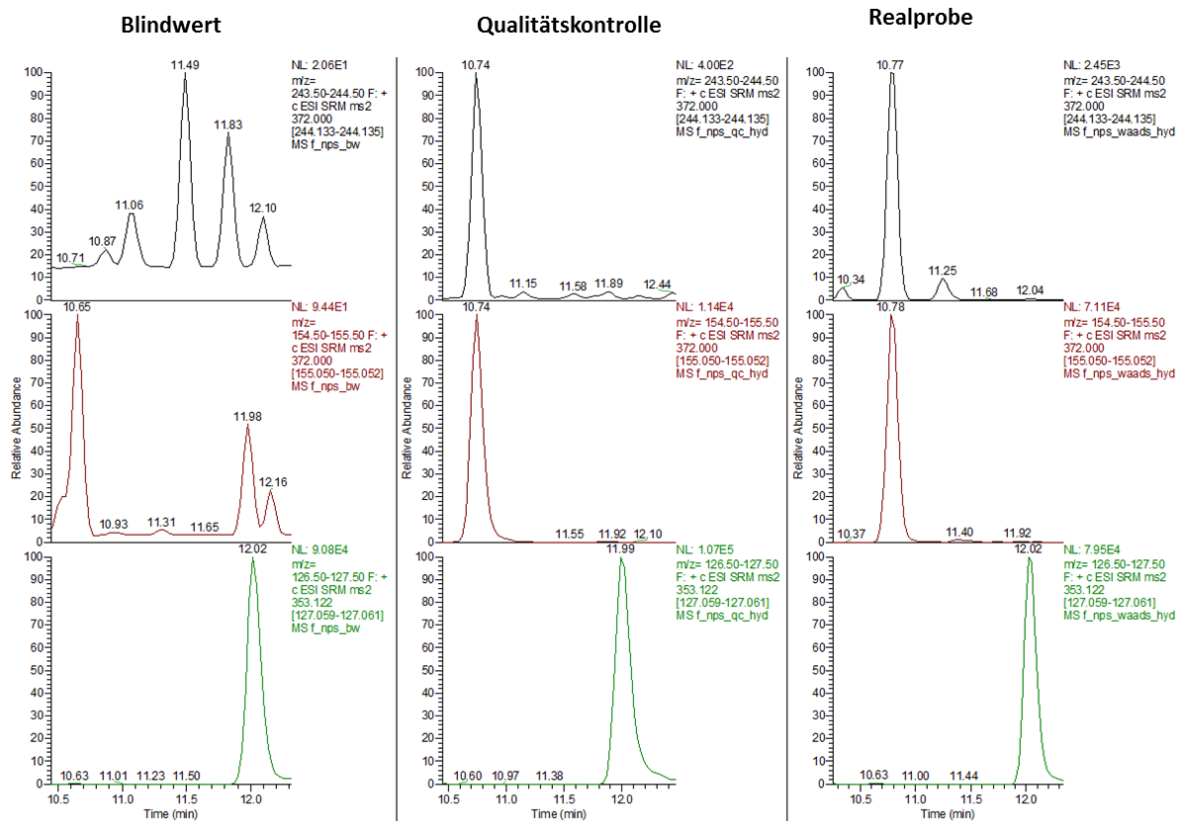


Abbildung 32: Chromatogramme der JWH-018 M2-Realprobenmessung; Links: 1ml Blindwert; Mitte: 1ml Qualitätskontrolle 5ng/ml; Rechts: 1ml Realprobe Harn; Oben: Massenspur 178->160; Mitte: Massenspur 178-145; Unten: IS Mephedron-D3; X-Achse: Zeit; Y-Achse: Relative Intensität

Die linke Spalte zeigt 1ml undotierten Blindwertharn, in welchem auf den JWH-018 M2 Spuren nur ein endogenes Rauschen erkennbar ist. In der mittleren Spalte ist die 1ml Qualitätskontrolle (QC) mit 5ng/ml Dotierung zu sehen, welche schöne Peaks für das JWH-018 M2 aufweist. Die Retentionszeiten stimmen sehr gut übereinander, wobei in der QC-Probe ein leichter Shift von 0.3min Richtung links zu erkennen ist. Die linke Spalte zeigt die 1ml Realprobe, welche ebenfalls ein sehr schönes Signal für JWH-018 M2 aufweist. Die relative Retentionszeit sowie das Fragmentintensitätsverhältnis stimmen perfekt überein, somit kann auch hier von einer positiven JWH-018 Probe ausgegangen werden. Eine Abschätzung, anhand des dotierten QC, ergibt eine Konzentration von 40ng/ml.

Die Analyse dieser Realproben spiegelt die Funktionalität dieser Methode zumindest im Harn wieder. Weitere Proben, vor allem mit Blutserum, sollten aber ein Teil weiterer Untersuchungen sein.

4.5 Schlusswort

Die Bemühungen dieser Arbeit haben eine effiziente und leistungsstarke Methode für die Analyse von 18 repräsentativen synthetischen Cathinonen und 14 synthetischen Cannabinoiden + 10 relevanten Metaboliten hervorgebracht. Die Nachweisgrenzen befinden sich für die synthetischen Cathinone in einem Bereich von 0.1ng/ml – 0.5ng/ml im Harn sowie im Serum. Für die synthetischen Cannabinoide wurden Nachweisgrenzen von und 0.1ng/ml – 5ng/ml im Harn sowie im Serum erreicht. Die anderen, im Zuge der Validierung erhobenen Parameter wie Spezifität bzw. Robustheit, Verschleppung, Ionensuppression und Wiederfindungen, zeigen ebenfalls sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Um diese Methode so leistungsstark zu machen, wurden im Vorfeld für alle 42 Substanzen die chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften, also die Retentionszeiten und jeweils zwei optimierte Massenübergänge ermittelt. Die richtige Wahl der chromatographischen Trennsäule und des Laufmittelgradienten führten zur schönen Auftrennung aller zu analysierenden Substanzen, bzw. der Abtrennung von störenden endogenen Matrixkomponenten. Die Entscheidung, die Festphasenextraktion als Isolationsmethode zu wählen, hat sich als richtig erwiesen, wie man den Validierungsdaten entnehmen kann. Durch die optimale Wahl des Säulenmaterials, des Elutions- und Aufnahmemittels konnten auch schwerwiegende Adsorptionsprobleme gelöst und eine Minimierung von Matrixeffekten sowohl im Harn, als auch im Serum, erreicht werden. Durch einen Vergleich mit weiteren Säulen, auch von anderen Herstellern, mit verschiedenen Elutions- und Aufnahmemitteln, Keepern bzw. verschiedenen Gefäßmaterialien könnten die Ergebnisse noch weiter optimiert werden, dies hätte aber den Umfang dieser Arbeit gesprengt. Die Festphasenextraktion stellte sich dennoch als sehr effektiv und zeit-, lösungsmittel- und materialsparend heraus, wodurch sie auch für einen Routinebetrieb geeignet ist. Durch die Analyse zweier realer Proben aus dem Feld der forensischen Analytik, sowie aus der Anti-Doping Analytik, konnte der Erfolg der Methode bestätigt werden.

Eine noch effizientere Art diese Analyten im Harn zu analysieren, könnte eine Messung mit hochauflösenden LC-MS/MS-Geräten sein. Solche Geräte haben allerdings einen sehr hohen Anschaffungswert und sind daher nicht in allen analytischen Labors vorhanden. Diese Geräte erlauben eine sogenannte „Dilute and shoot“-Methode, bei welcher die Probe ausschließlich mit einem geeigneten Lösungsmittel verdünnt und dann mittels LC-MS/MS aufgetrennt und gemessen wird. Da die Aufarbeitung quasi weggelassen wird, wird dadurch viel an Aufwand und Zeit gespart. Ob man allerdings dadurch auf vergleichbar gute Validierungsdaten kommt ist fraglich, da anzunehmen ist, dass größere Matrixinterferenzen auftreten werden. Zusätzlich ist eine erhöhte Kontamination des Messsystems zu erwarten. Ein Vergleich mit einer solchen Methode wäre durchaus interessant, wurde aber im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Durch die enorme Dynamik, wie diese neuen psychoaktiven Substanzen modifiziert und auf den Markt gebracht werden, ist es notwendig diese Methode regelmäßig zu aktualisieren. Es müssen Substanzen-Warnungssysteme wie „Checkit“ oder das EMCDDA regelmäßig konsultiert werden, um sich über aktuellen Stand der Wirkstoffe zu informieren. Diese müssen anschließend massenspektrometisch und chromatographisch erfasst werden und anschließend mit der Extraktionsmethode getestet und validiert werden. Ein limitierender Faktor wird hierbei allerdings stets der Erwerb von seriösen Referenzsubstanzen sein, sofern diese nicht selbst synthetisiert werden können.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Screeningprozedur, also eine Methode, welche möglichst schnell und effizient eine große Anzahl von Analyten detektieren soll. Normalerweise muss nach einem positiven Screening eine Bestätigungsanalyse vollzogen werden. Diese sollte im Idealfall eine abweichende Aufarbeitung und andere Messbedingungen enthalten. Dies könnte ein Wechsel von Flüssigkeits- auf Gaschromatographie, oder eine Verwendung von anderen Massenspuren sein. In der Anti-Doping Analytik ist eine Messung von vier anstatt zwei Massenspuren für eine Bestätigungsanalyse üblich. Die Intensitäten dieser vier Signale des Analyten in der Probe werden mit einer Qualitätskontrolle, welche den Zielanalyt enthält, verglichen. Stimmen alle vier überein, kann die Probe als bestätigt angesehen werden. Wenn man nun eine eigene Methode für jeden Analyten erstellt, können die Messereignisse sehr stark reduziert und die Empfindlichkeit dadurch erhöht werden. Ebenfalls können die chromatographischen Bedingungen für einige wenige Analyten (Zielsubstanz, interne Standards, evtl. verschiedene Metaboliten der Zielsubstanz) angepasst und die Messzeit dadurch meist deutlich reduziert werden. Die Erstellung solch einer Bestätigungsmethode für jeden Analyten ist für die Erbringung eines eindeutigen Nachweises einer Substanz essentiell und muss daher ein weiteres Ziel im Kontext der Thematik der Analyse von neuen psychoaktiven Substanzen sein.

5. Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

1. EMCDDA, EUROPOL. New drugs in Europe 2012: EMCDDA-Europol 2012 annual report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2013
2. Council Decision. Council Decision 2005/387/JHA of 10 May 2005 on the information exchange, risk-assessment and control of new psychoactive substances. Official Journal of the European Union 20 May 2005; 127: 32–37
3. Bundesministerium für Gesundheit. Informationen zu neuen psychoaktiven Substanzen und Drogen.https://www.bmgf.gv.at/home/Gesundheit/Drogen_Sucht/Drogen/Informationen_zu_neuen_psychoaktiven_Substanzen_und_Drogen
4. EMCDDA. European Drug Report 2015: Trends and Developments. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2015
5. Checkit!. Vortrag über NPS. *Mag. Karl Kociper*. Linz 2016.
https://www.fh-ooe.at/fileadmin/user_upload/linz/studiengaenge/bachelor/soziale-arbeit/news/2016/docs/Pr%C3%A4sentation_Karl_Kociper_2016-10-24.pdf
6. World anti doping agency. Prohibited list 2017. Online Ausgabe.
https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016-09-29_-_wada_prohibited_list_2017_eng_final.pdf
7. Checkit!. Drogenwarnungsbericht November 2017.
http://checkit.wien/media/checkit_Warnungen_1117.pdf
8. Treating the Phenomenon of New Psychoactive Substances: Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones. *Maurizio Coppola, Raffaella Mondola, Francesco Oliva, Rocco Luigi Picci, Daniele Ascheri, Federica Trivelli*. 2016, Pages 679–686
9. Bundesministerium für Gesundheit. Vortrag Neue Aspekte und Entwicklungen zum Thema Freizeitdrogenkonsum. *Johanna Schopper*. Wien 2012
<http://checkit.wien/media/Das-%E2%80%99Neue-Psychoaktive-Substanzen-Gesetz%E2%80%99C-NPSG-Johanna-Schopper.pdf>
10. UNDOC. Vortrag International monitoring of New Psychoactive Substances - The UNODC Early Warning Advisory on NPS. *Sabrina Levissianos*. Istanbul 2014. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-levissianos-unodc.pdf>
11. Rechtsinformationssystem des Bundes (RIS) - Österreich

12. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Akira Namera, corresponding author Maho Kawamura, Akihiro Nakamoto, Takeshi Saito, and Masataka Nagao*; *Forensic Toxicol.* 2015; 33(2): 175–194.
13. Pharmacological and Toxicological Effects of Synthetic Cannabinoids and Their Metabolites. *Tai S, Fantegrossi WE. Curr Top Behav Neurosci.* 2017; 32:249-262
14. Human metabolites of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 bind with high affinity and act as potent agonists at cannabinoid type-2 receptors. *Rajasekaran M, Brents LK, Franks LN, Moran JH, Prather PL. Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Jun 1; 269(2):100-8. Epub 2013 Mar 26.
15. S. W. Toennes, S. Harder, M. Schramm, C. Niess, G. F. Kauert: *Pharmacokinetics of cathinone, cathine and norephedrine after the chewing of khat leaves.* Institute of Forensic Toxicology, Universität Frankfurt, PMC 1884326
16. Synthetic Cathinones ('Bath Salts'); Legal and Health Care Challenges; *Jennifer A. Gershman, PharmD, CPh and Andrea D. Fass. P T.* 2012 Oct; 37(10): 571-572, 595.
17. EMCDDA. Drug profiles. Europäische Drogen-Informationsseite.
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones/de>
18. National Institute on Drug Abuse 'Bath salts': Emerging and dangerous products. Feb, 2011.
<https://www.drugabuse.gov/about-nida/directors-page/messages-director/2011/02/bath-salts-emerging-dangerous-products>
19. Synthetic cathinones (bath salts): legal status and patterns of abuse. *Fass JA, Fass AD, Garcia AS; Ann Pharmacother.* 2012 Mar; 46(3):436-41.
20. The effects of cannabinoids on the brain. *A. Ameri. Prog Neurobiol,* 58 (1999), pp. 315-348
21. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids *Kathryn A. Seelye, Jeff Lapointe, Jeffery H. Moran, Liana Fattore.* 3 December 2012, Pages 234-243
22. EMCDDA. Drug profiles. Europäische Drogen-Informationsseite.
<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids/de>
23. Analytische Chemie. *Matthias Otto.* Wiley-VCH Verlag
24. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie; *Veronika R. Meyer;* Wiley-VCH Verlag
25. University of Bristol. School of chemistry. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>
26. Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis. *Prof. Georg Schwedt, Torsten C. Schmidt, Oliver J. Schmitz.* Wiley-VCH Verlag

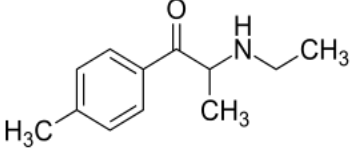
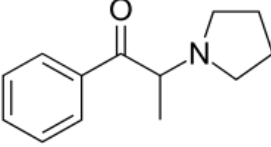
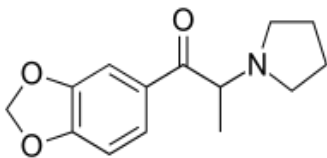
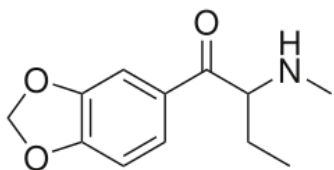
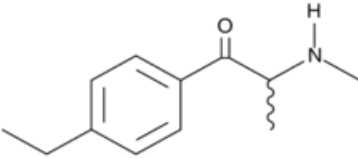
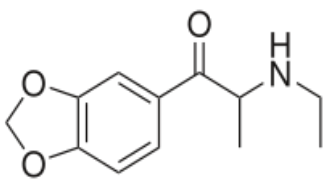
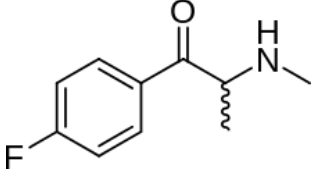
27. Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch. *Gross, Jürgen H.* Springer Verlag
28. Humboldt Universität Berlin. Institut für Biologie. https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass_sp
29. Iowa State University. Mass spectrometry Tutorial. <https://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial>
30. Virtual Institute of Applied Science (VIAS).
http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_channeltron.html
31. Massenspektrometrie in der organischen Chemie. *Horst Remane.* Springer Verlag
32. Freie Universität Berlin. Vortrag Proteomics WS14. <http://www.inf.fu-berlin.de/lehre/WS14/ProteomicsWS14/LUS/lu6a/345/index.html>
33. Klinische Pharmakologie. *Hans-Christoph Diener.* Thieme Verlag
34. Biological Fluids: Glucuronides from LC/MS. *Kadi, A. A. and M. M. Hefnawy (2009).* Encyclopedia of Chromatography, Third Edition: 203 – 209
35. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis. *Paolo Lucci, Deborah Pacetti, Oscar Núñez and Natale G. Frega (2012 InTech, DOI: 10.5772/47736.*
36. Stability of 11 prevalent synthetic cannabinoids in authentic neat oral fluid samples: glass versus polypropylene containers at different temperatures. *Kneisel S, Speck M, Moosmann B, Auwärter V.* Drug Test Anal. 2013 Jul;5(7):602-6. doi: 10.1002/dta.1497. Epub 2013 May 22.
37. Synthetic Cannabinoid Analysis – Standards & Methods. *Rudolf Köhling.* AnalytiX Volume 9 Article 4
38. WADA INTERNATIONAL STANDARD FOR LABORATORIES (ISL). Online Ausgabe.
<https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl>
39. Kromidas Stavros, Handbuch Validierung in der Analytik.2000. Wiley-VCH Verlag
40. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Akira Namera, Maho Kawamura, Akihiro Nakamoto, Takeshi Saito, Masataka Nagao.* Forensic Toxicology July 2015, Volume 33, Issue 2, pp 175–194

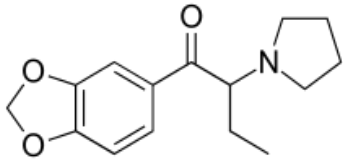
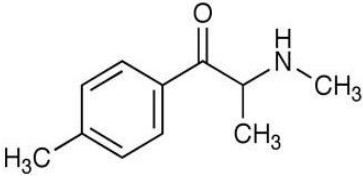
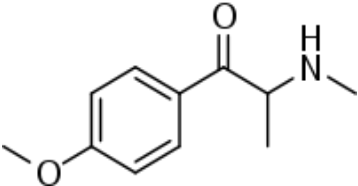
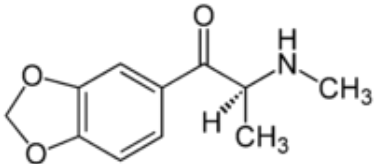
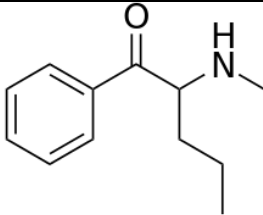
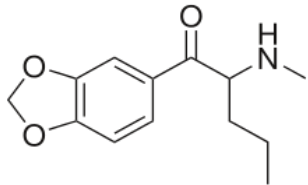
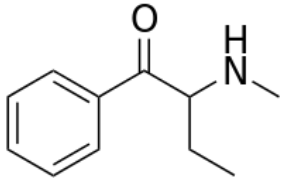
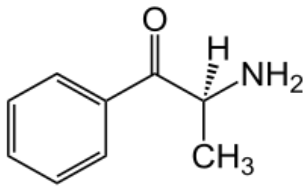
- 41.** A Rapid Quantitative Method for the Analysis of Synthetic Cannabinoids by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Tom D. Freijo Jr, Steve E. Harris and Subbarao V. Kala.* One Source Toxicology Laboratory, 1213 Genoa Red Bluff, Pasadena, TX 77504, USA
- 42.** Validation and application of an UPLC–MS/MS method for the quantification of synthetic cannabinoids in urine samples and analysis of seized materials from the Portuguese market. *Susana Sadler Simões*, Inês Silva, Antonio Castañera Ajenjo, Má rio João Dias.* National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences – South Branch, Rua Manuel Bento de Sousa n83, 1169-201 Lisbon, Portugal.
- 43.** Simultaneous detection of 93 synthetic cannabinoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and retrospective application to real forensic samples. *Cornelius Hess, Jacqueline Murach, Lynn Krueger, Lisa Scharrenbroch, Michael Unger, Burkhard Madea, Konrad Sydow.* Volume 9, Issue 5, May 2017 ,Pages 721–733.
- 44.** Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry. *Lindsay Glicksberg, Kelsie Bryand, Sarah Kerrigan.* Journal of Chromatography. Volume 1035, 1 November 2016, Pages 91-103
- 45.** Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Marta Concheiro, Sebastien Anizan, Kayla Ellefsen, Marilyn A. Huestis.* November 2013, Volume 405, Issue 29, pp 9437–9448
- 46.** Ultrafast Screening of Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones in Urine by RapidFire-Tandem Mass Spectrometry. *Jilian R. Neifeld, Laura E. Regester, Justin M. Holler, Shawn P. Vorce, Joseph Magluilo, Gerardo Ramos, Thomas Z. Bosy.* Journal of Analytical Toxicology, Volume 40, Issue 5, 1 June 2016, Pages 379-387

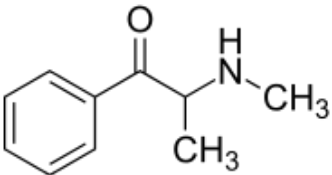
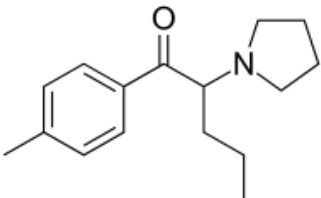
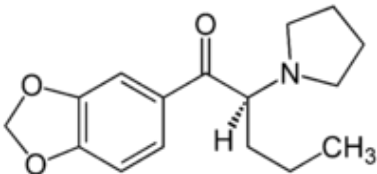
5.2 Strukturformeln und Summenformeln der Analyten

5.2.1 Synthetische Cathinone

Tabelle 19: Struktur, Summenformel und molare Masse der Cathinone

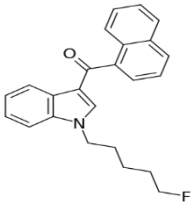
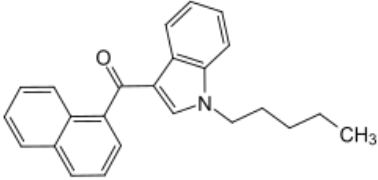
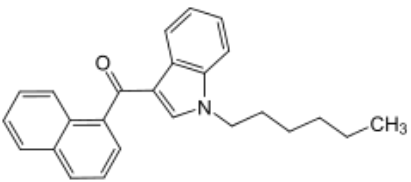
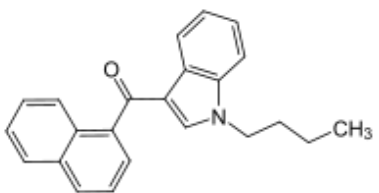
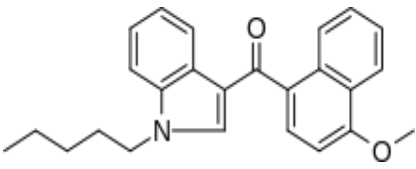
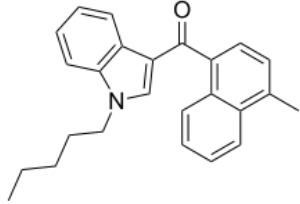
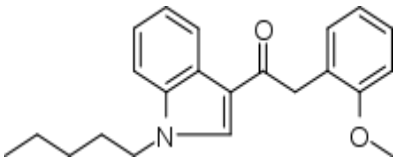
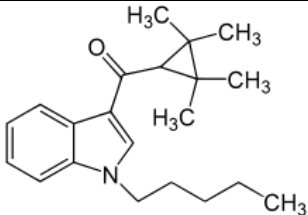
4-Methylethcathinon (4-MEC) $C_{12}H_{17}NO$ 191.27 g/mol	
Alpha-Pyrrolidinopropiophenon (Alpha-PPP) $C_{13}H_{17}NO$ 203.28 g/mol	
3,4-Methylenedioxy-α-pyrrolidinopropiophenone (MDPPP) $C_{14}H_{17}NO_3$ 247.28 g/mol	
Butylon $C_{12}H_{15}NO_3$ 221.25 g/mol	
4-Ethylmethcathinon $C_{12}H_{17}NO$ 191.27 g/mol	
Ethylon $C_{12}H_{15}NO_3$ 221.25 g/mol	
Flephedron $C_{10}H_{12}FNO$ 181.21 g/mol	

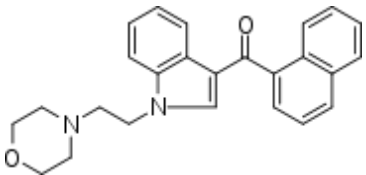
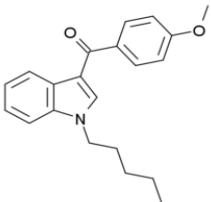
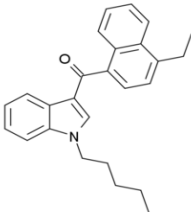
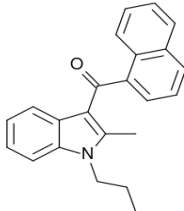
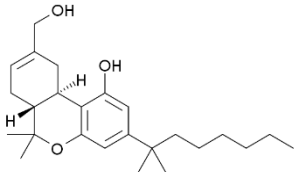
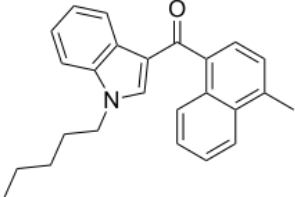
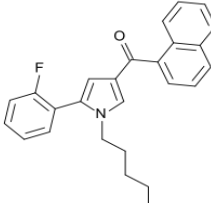
3,4-Methylenedioxy-α-pyrrolidinobutyrophenone (MDPBP) $C_{15}H_{19}NO_3$ 191.27 g/mol	
Mephedron (4-MMC) $C_{11}H_{15}NO$ 177.24 g/mol	
Methedron $C_{11}H_{15}NO_2$ 193.24 g/mol	
Methylon $C_{13}H_{13}NO_3$ 207.23 g/mol	
Pentedron $C_{12}H_{17}NO$ 191.27 g/mol	
Pentylon $C_{13}H_{17}NO_3$ 235.28 g/mol	
Buphedrone $C_{11}H_{15}NO$ 177.24 g/mol	
Cathinon $C_9H_{11}NO$ 149.19 g/mol	

Methcathinon $C_{10}H_{13}NO$ 163.22 g/mol	
Pyrovalerone $C_{16}H_{23}NO$ 245.36 g/mol	
Methylendioxypropylvaleron (MDPV) $C_{16}H_{21}NO_3$ 275.35 g/mol	

5.2.2 Synthetische Cannabinoide

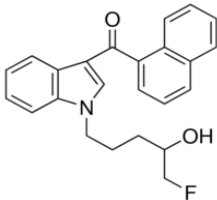
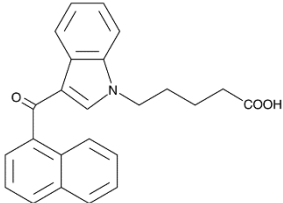
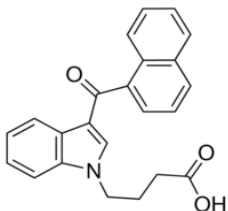
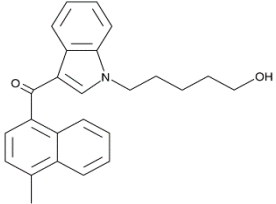
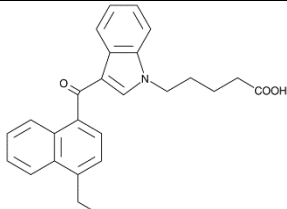
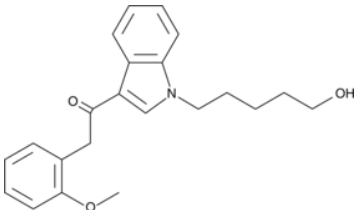
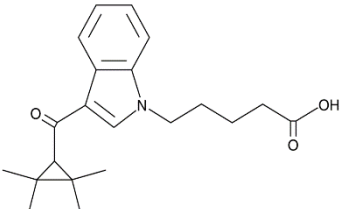
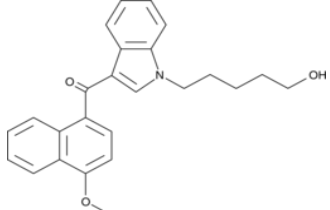
Tabelle 20: Struktur, Summenformel und molare Masse der Cannabinoide

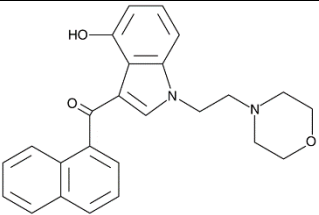
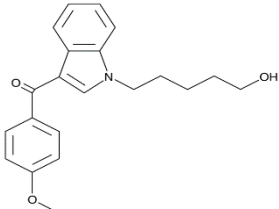
AM-2201 $C_{24}H_{22}FNO$ 359.44 g/mol	
JWH-018 $C_{24}H_{23}NO$ 341.45 g/mol	
JWH-019 $C_{25}H_{25}NO$ 355.47 g/mol	
JWH-073 $C_{23}H_{21}NO$ 327.42 g/mol	
JWH-081 $C_{25}H_{25}NO_2$ 371.47 g/mol	
JWH-122 $C_{25}H_{25}NO$ 371.47 g/mol	
JWH-250 $C_{22}H_{25}NO_2$ 335.44 g/mol	
UR-144 $C_{21}H_{29}NO$ 311.46 g/mol	

JWH-200 $C_{25}H_{24}N_2O_2$ 384.47 g/mol	
RCS-4 $C_{21}H_{23}NO_2$ 321.42 g/mol	
JWH-210 $C_{26}H_{27}NO$ 369.50 g/mol	
JWH-015 $C_{23}H_{21}NO$ 327.42 g/mol	
HU-210 $C_{25}H_{38}NO_3$ 386.56 g/mol	
JWH-122 $C_{25}H_{25}NO$ 371.47 g/mol	
JWH-307 $C_{26}H_{24}FNO_2$ 385.47 g/mol	

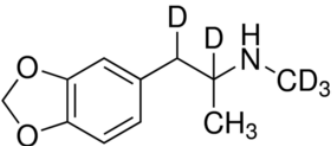
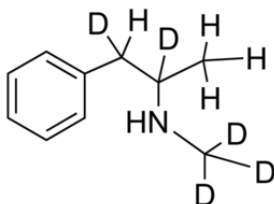
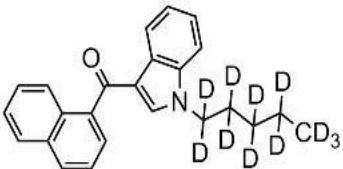
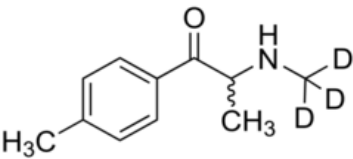
5.2.3 Cannabinoid Metaboliten

Tabelle 21: Struktur, Summenformel und molare Masse der Cannabinoid Metaboliten

AM-2201 M1 $C_{24}H_{22}FNO_2$ 375.40 g/mol	
JWH-018 M2 $C_{24}H_{21}NO_3$ 341.45 g/mol	
JWH-073 M1 $C_{23}H_{19}NO_3$ 357.40 g/mol	
JWH-122 M1 $C_{25}H_{25}NO_2$ 371.50 g/mol	
JWH-210 M1 $C_{26}H_{25}NO_3$ 399.50 g/mol	
JWH-250 M1 $C_{22}H_{25}NO_3$ 351.40 g/mol	
UR-144 M1 $C_{21}H_{27}NO_3$ 341.50 g/mol	
JWH-081 M1 $C_{25}H_{25}NO_3$ 387.50 g/mol	

JWH-200 M2 $C_{25}H_{24}N_2O_3$ 400.50 g/mol	
RCS-4 M1 $C_{21}H_{23}NO_3$ 337.40 g/mol	

5.2.4 Interne Standards

D5-MDMA $C_{11}D_5H_{10}NO_2$ 198.27 g/mol	
D5-Methamphetamin $C_{10}D_5H_{10}N$ 154.26 g/mol	
D11-JWH-018 $C_{24}D_{11}H_{12}NO$ 352.51 g/mol	
D3-Mephedron $C_{11}D_3H_{12}NO$ 180.24 g/mol	

5.3 Standardmischungen – Auszüge aus Datenbank

5.3.1 Synthetische Cathinone (Std NPS I)

Standardmischungen

Seibersdorf Laboratories

Mischungscode

SM142

Mischungs-ID

142

Bezeichnung

NPS 1 Cathinone

Volumen (ml)

5

Lösungsmittel

MeOH

Herstellungsdat.

13/10/2016

Hersteller

Göschl

Bemerkung

Masterarbeit Lorenz

Substanzname	Lösungscode	Konz (mg/ml)	Volumen (µl)	Mis.-Konz. (µg/ml)
3,4-Methylenedioxypropylvaleron	S0050_C01_L01	1.000	5	1.0000
4-Methylethcathinon	S0063_C01_L01	0.200	25	1.0000
Buphedrone HCl	S0214_C01_L01	0.750	6.67	1.0005
Cathinone	S0240_C02_L01	1.000	5	1.0000
Flephedron	S0447_C01_L01	1.000	5	1.0000
Methcathinone	S0655_C01_L01	1.000	5	1.0000
Mephedrone	S1068_C01_L01	0.200	25	1.0000
Methedrone	S1117_C01_L01	1.000	5	1.0000
Butylon	S1254_C01_L01	1.000	5	1.0000
4-Ethylmethcathinone	S1257_C01_L01	1.000	5	1.0000
Ethylone	S1258_C01_L01	1.000	5	1.0000
Methylone	S1260_C01_L01	1.000	5	1.0000
Pentedrone	S1262_C01_L01	1.000	5	1.0000
Pentylone	S1263_C01_L01	1.000	5	1.0000
α-Pyrrolidinopropiophenone	S1265_C01_L01	1.000	5	1.0000
Pyrovalerone	S1266_C01_L01	1.000	5	1.0000
3,4-Methylenedioxy-α-Pyrrolidinobutyropheno	S1267_C01_L01	1.000	5	1.0000
3,4-Methylenedioxy-α-Pyrrolidinopropiopheno	S1268_C01_L01	1.000	5	1.0000

Mischungs-ID

142

Seite 1 von 1

5.3.2 Synthetische Cannabinoide (Std NPS II)

Standardmischungen

Seibersdorf Laboratories

Mischungscode	SM143			
Mischungs-ID	143	Bezeichnung	NPS 2 Cannabinoide	
Volumen (ml)	5	Lösungsmittel	MeOH	Herstellungsdat. 13/10/2016
Hersteller	Göschl			
Bemerkung	Masterarbeit Lorenz			

Substanzname	Lösungscode	Konz (mg/ml)	Volumen (µl)	Mis.-Konz. (µg/ml)
AM2201	S0118_C01_L01	0.200	25	1.0000
AM2201 M1	S0119_C01_L01	0.200	25	1.0000
HU-210	S0511_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH 122	S0539_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH 122 M1	S0540_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH 210	S0542_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH 210 M1	S0543_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH-018	S0547_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH-018 M2	S0549_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH-019	S0556_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH-073	S0557_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH-073 M1	S0558_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH-200	S0560_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH-250	S0562_C01_L01	1.000	5	1.0000
JWH-015	S0910_C01_L01	0.216	23.148	1.0000
JWH 307	S1052_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH 081 M1	S1055_C01_L01	0.200	25	1.0000
RCS-4 M1	S1056_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH-081	S1081_C01_L01	0.200	25	1.0000
RCS-4	S1082_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH-200 M2	S1109_C01_L01	0.200	25	1.0000
JWH-250 M1	S1112_C01_L01	0.200	25	1.0000
UR-144 M1	S1162_C01_L01	0.196	25.51	1.0000
UR-144	S1170_C01_L01	0.990	5.0505	1.0000

5.3.3 Interner Standard (IS)

Standardmischungen

Seibersdorf Laboratories

Mischungscode	SM141			
Mischungs-ID	141	Bezeichnung	IS NPS	
Volumen (ml)	5	Lösungsmittel	MeOH	Herstellungsdat. 18/10/2016
Hersteller	Göschl			
Bemerkung	Masterarbeit Lorenz			

Substanzname	Lösungscode	Konz (mg/ml)	Volumen (µl)	Mis.-Konz. (µg/ml)
MDMA-d,l d5	S0603_C02_L01	1.000	5	1.0000
Mephedron D3	S0614_C03_L01	0.100	50	1.0000
Methamphetamine-d5	S0649_C01_L03	0.010	500	1.0000
JWH-018-D11	S0653_C01_L01	1.000	5	1.0000

5.4 Xcalibur Beispiel-Reports

5.4.1 Synthetische Cathinone

Forensik: Cathinones

Seite 1 of 5

File: F_nps_ham_50ng

Vial: CStk1-02:11

Dil.F: 1.00

Name: NPS 50ng

Path: M:\C4LC156\Daten\161207kh\NPS neu

Instr.: D:\Forschung\NPS\Biphenyl\F_nps_cannabinoide_50_biphenyl_20160330

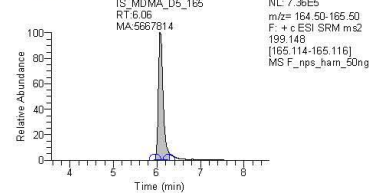
Date: 12/08/16 01:17:23

Cal File: N/A

Proc: N/A

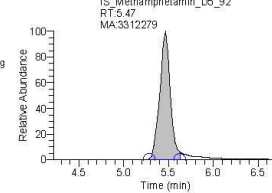
IS: D5 MDMA

RT: 3.56 - 8.56 SM: 5G



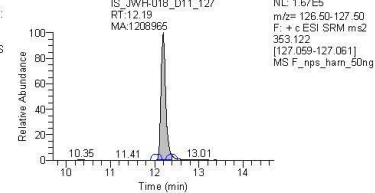
IS: D5 Methamphetamine

RT: 4.22 - 6.72 SM: 5G



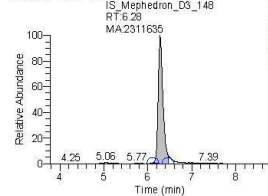
IS: JWH-018-D11

RT: 9.69 - 14.69 SM: 5G



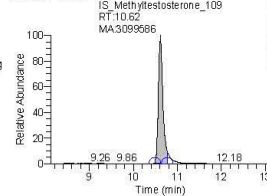
IS: D3-Mephedron

RT: 3.78 - 8.78 SM: 5G



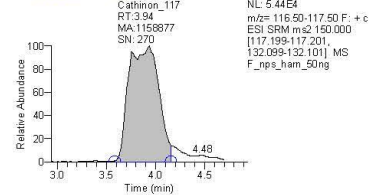
IS: Methyltestosterone

RT: 8.12 - 13.12 SM: 5G



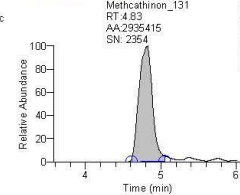
Cathinon

RT: 2.94 - 4.94 SM: 5G



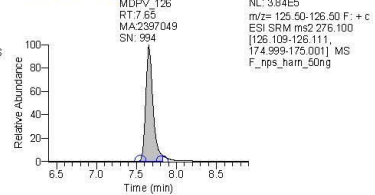
Methcathinon

RT: 3.58 - 6.08 SM: 5G

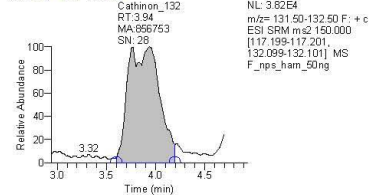


MDPV

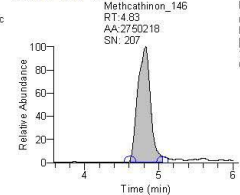
RT: 6.40 - 8.90 SM: 5G



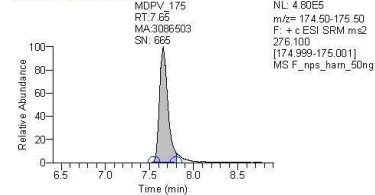
RT: 2.94 - 4.94 SM: 5G



RT: 3.58 - 6.08 SM: 5G

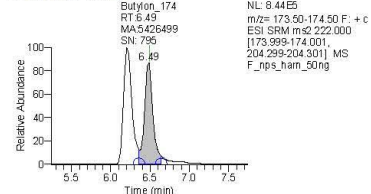


RT: 6.40 - 8.90 SM: 5G



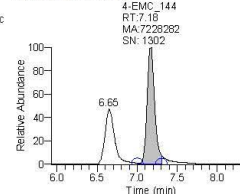
Butylon

RT: 5.24 - 7.74 SM: 5G



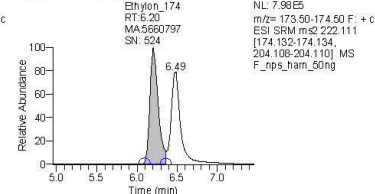
4-EMC

RT: 5.93 - 8.43 SM: 5G

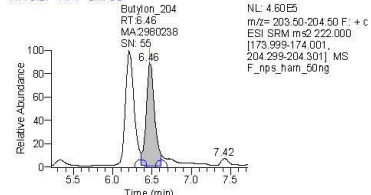


Ethylon

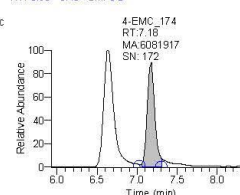
RT: 4.96 - 7.45 SM: 5G



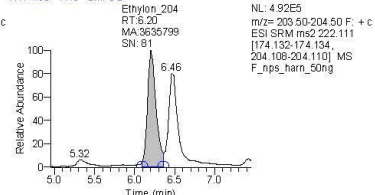
RT: 5.21 - 7.71 SM: 5G



RT: 5.93 - 8.43 SM: 5G



RT: 4.96 - 7.45 SM: 5G



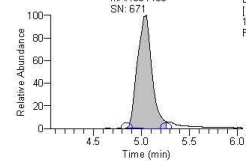
Forensik: Cathinones

Seite 2 of 5

Flephedron

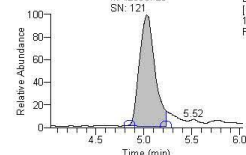
RT: 4.05 - 6.05 SM: 5G

Flephedron_149
RT: 5.09
MA: 196.1488
SN: 671
NL: 1.78E5
m/z= 148.50-149.50 F: + c
ESI SRM m/z 182.200
[148.999-149.001, 163.999-164.001] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 4.03 - 6.03 SM: 5G

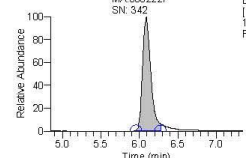
Flephedron_164
RT: 5.09
MA: 283.3726
SN: 121
NL: 2.60E5
m/z= 163.50-164.50 F: + c
ESI SRM m/z 182.200
[148.999-149.001, 163.999-164.001] MS
F_nps_harn_50ng



Methedron

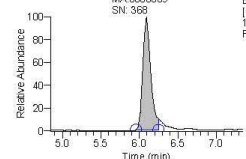
RT: 4.84 - 7.34 SM: 5G

Methedron_161
RT: 6.09
MA: 385.2227
SN: 342
NL: 5.23E5
m/z= 160.50-161.50 F: + c
ESI SRM m/z 194.128
[161.130-161.132, 176.140-176.142] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 4.84 - 7.34 SM: 5G

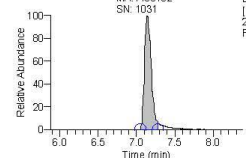
Methedron_176
RT: 6.09
MA: 609.0909
SN: 368
NL: 8.66E5
m/z= 175.50-176.50 F: + c
ESI SRM m/z 194.128
[161.130-161.132, 176.140-176.142] MS
F_nps_harn_50ng



Pentylton

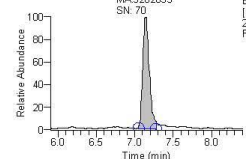
RT: 5.08 - 8.38 SM: 5G

Pentylton_188
RT: 7.13
MA: 443.3182
SN: 1031
NL: 7.31E5
m/z= 187.50-188.50 F: + c
ESI SRM m/z 236.100
[187.999-188.001, 217.999-218.001] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 5.90 - 8.40 SM: 5G

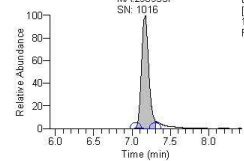
Pentylton_218
RT: 7.13
MA: 326.2653
SN: 70
NL: 5.61E5
m/z= 217.50-218.50 F: + c
ESI SRM m/z 236.100
[187.999-188.001, 217.999-218.001] MS
F_nps_harn_50ng



MDPBP

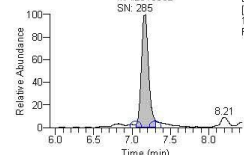
RT: 5.93 - 8.43 SM: 5G

MDPBP_161
RT: 7.18
MA: 289.9337
SN: 1016
NL: 4.69E5
m/z= 160.50-161.50 F: + c
ESI SRM m/z 262.130
[161.089-161.091, 191.079-191.081] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 5.93 - 8.43 SM: 5G

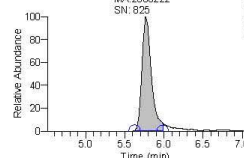
MDPBP_191
RT: 7.18
MA: 281.6852
SN: 285
NL: 4.48E5
m/z= 190.50-191.50 F: + c
ESI SRM m/z 262.130
[161.089-161.091, 191.079-191.081] MS
F_nps_harn_50ng



Methylton

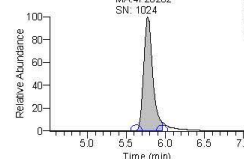
RT: 4.51 - 7.01 SM: 5G

Methylton_132
RT: 5.76
MA: 209.2222
SN: 625
NL: 2.86E5
m/z= 131.50-132.50 F: + c
ESI SRM m/z 208.112
[132.158-132.161, 160.117-160.119] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 4.51 - 7.01 SM: 5G

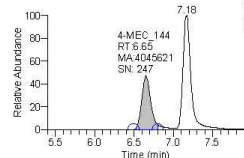
Methylton_160
RT: 5.76
MA: 4726.292
SN: 1024
NL: 5.93E5
m/z= 159.50-160.50 F: + c
ESI SRM m/z 208.112
[132.158-132.161, 160.117-160.119] MS
F_nps_harn_50ng



4-MEC

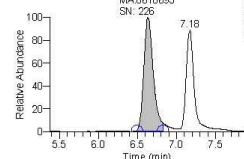
RT: 5.40 - 7.90 SM: 5G

4-MEC_144
RT: 6.65
MA: 404.5621
SN: 247
NL: 1.10E5
m/z= 143.50-144.50 F: + c
ESI SRM m/z 192.149
[144.153-144.155, 174.150-174.152] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 5.37 - 7.87 SM: 5G

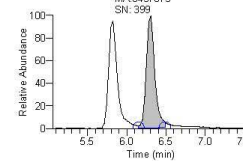
4-MEC_174
RT: 6.62
MA: 8610.695
SN: 225
NL: 1.03E5
m/z= 173.50-174.50 F: + c
ESI SRM m/z 192.149
[144.153-144.155, 174.150-174.152] MS
F_nps_harn_50ng



Mephedron

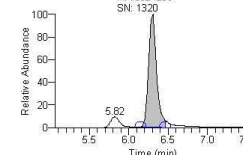
RT: 5.06 - 7.56 SM: 5G

Mephedron_160
RT: 6.31
MA: 540.7875
SN: 399
NL: 8.80E5
m/z= 159.50-160.50 F: + c
ESI SRM m/z 178.100
[145.099-145.101, 160.199-160.201] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 5.06 - 7.56 SM: 5G

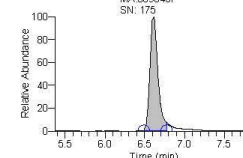
Mephedron_145
RT: 6.31
MA: 532.4269
SN: 1320
NL: 7.57E5
m/z= 144.50-145.50 F: + c
ESI SRM m/z 178.100
[145.099-145.101, 160.199-160.201] MS
F_nps_harn_50ng



Pentedron

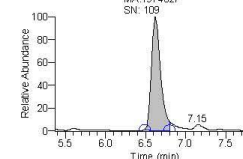
RT: 5.37 - 7.87 SM: 5G

Pentedron_132
RT: 6.62
MA: 3039.487
SN: 175
NL: 5.62E5
m/z= 131.50-132.50 F: + c
ESI SRM m/z 192.150
[132.158-132.161, 132.156-132.158] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 5.37 - 7.87 SM: 5G

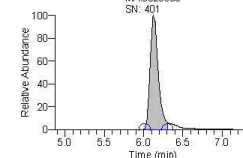
Pentedron_91
RT: 6.62
MA: 1974.527
SN: 109
NL: 2.51E5
m/z= 90.50-91.50 F: + c
ESI SRM m/z 192.150
[132.158-132.161, 132.156-132.158] MS
F_nps_harn_50ng



a-PPP

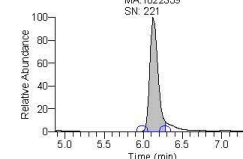
RT: 4.87 - 7.37 SM: 5G

a-PPP_105
RT: 6.12
MA: 3623.986
SN: 401
NL: 5.06E5
m/z= 104.50-105.50 F: + c
ESI SRM m/z 204.100
[105.099-105.101, 132.999-132.901] MS
F_nps_harn_50ng



RT: 4.87 - 7.37 SM: 5G

a-PPP_132
RT: 6.12
MA: 1822.359
SN: 221
NL: 2.51E5
m/z= 132.50-133.50 F: + c
ESI SRM m/z 204.100
[105.099-105.101, 132.999-132.901] MS
F_nps_harn_50ng



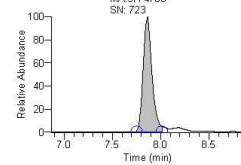
Forensik: Cathinones

Seite 3 of 5

Pyrovaleron

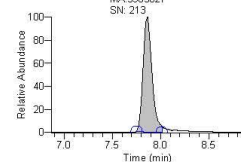
RT: 6.87 - 8.87 SM: 5G

Pyrovaleron_105
RT: 7.87
MA: 5774788
SN: 723
NL: 9.26E5
 m/z = 104.50-105.50 F⁺ + c
ESI SRM m/z 246.100
[105.099-105.101,
174.899-174.901] MS
F_nps_harm_50ng



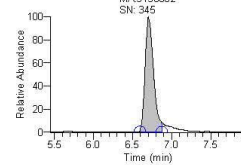
RT: 6.87 - 8.87 SM: 5G

Pyrovaleron_175
RT: 7.87
MA: 3965827
SN: 213
NL: 6.28E5
 m/z = 174.50-175.50 F⁺ + c
ESI SRM m/z 246.100
[105.099-105.101,
174.899-174.901] MS
F_nps_harm_50ng

**MDPPP**

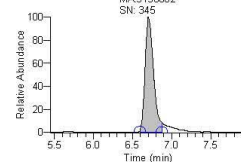
RT: 5.45 - 7.95 SM: 5G

MDPPP_147
RT: 6.70
MA: 3159002
SN: 345
NL: 4.24E5
 m/z = 146.50-147.50 F⁺ + c
ESI SRM m/z 246.100
[98.099-98.101,
146.999-147.001] MS
F_nps_harm_50ng



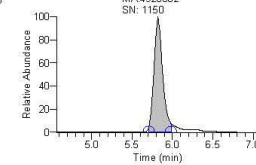
RT: 5.45 - 7.95 SM: 5G

MDPPP_147
RT: 6.70
MA: 3159002
SN: 345
NL: 4.24E5
 m/z = 146.50-147.50 F⁺ + c
ESI SRM m/z 246.100
[98.099-98.101,
146.999-147.001] MS
F_nps_harm_50ng

**Buphedron**

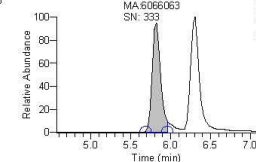
RT: 4.57 - 7.07 SM: 5G

Buphedron_131
RT: 5.82
MA: 4402082
SN: 1150
NL: 6.67E5
 m/z = 130.50-131.50 F⁺ + c
ESI SRM m/z 178.100
[91.199-91.201,
131.199-131.201] MS
F_nps_harm_50ng



RT: 4.57 - 7.07 SM: 5G

Buphedron_91
RT: 5.82
MA: 6066063
SN: 333
NL: 8.80E5
 m/z = 169.50-160.50 F⁺ + c
ESI SRM m/z 178.100
[145.099-145.101,
160.199-160.201] MS
F_nps_harm_50ng



5.4.2 Synthetische Cannabinoide

Forensik: Cannabinoids

Seite 1 of 3

File: F_nps_ham_50ng

Vial: CSTk1-02:11

Dil.F: 1.00

Name: NPS 50ng

Path: M:\C4LC156\Daten\161207kh\NPS neu

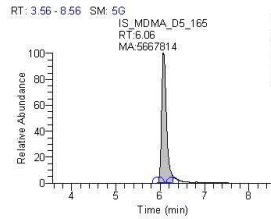
Instr.: D:\Forschung\NPS\Biphenyl\F_nps_cannabinoide_50_biphenyl_20160330

Date: 12/08/16 01:17:23

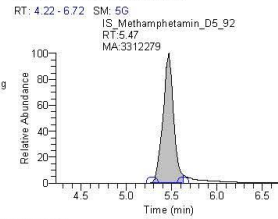
Cal File: N/A

Proc: N/A

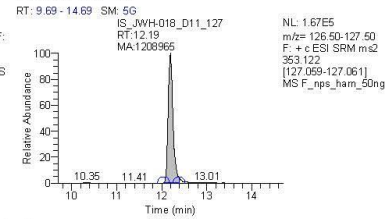
IS: D5 MDMA



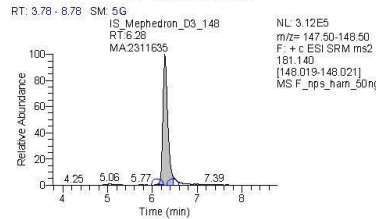
IS: D5 Methamphetamine



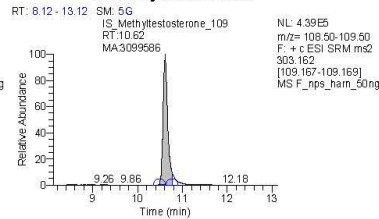
IS: JWH-018-D11



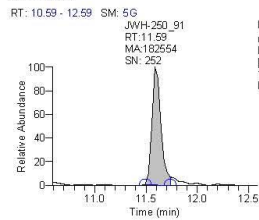
IS: D3-Mephedron



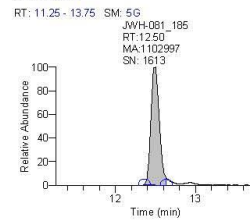
IS: Methyltestosterone



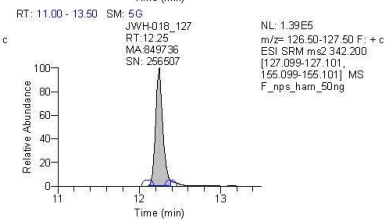
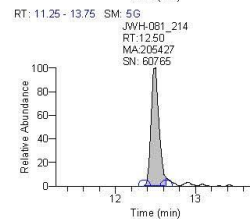
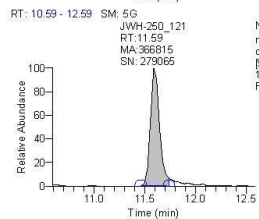
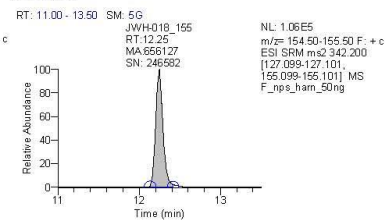
JWH-250



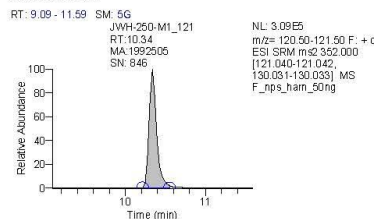
JWH-081



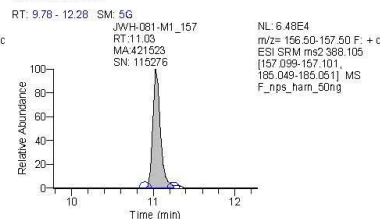
JWH-018



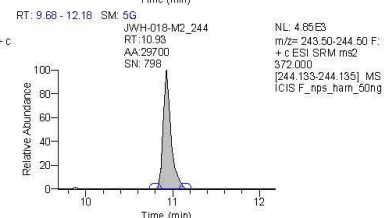
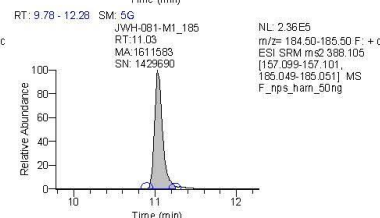
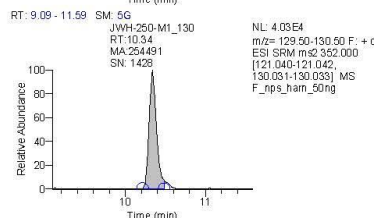
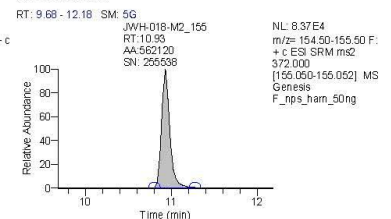
JWH-250 M1



JWH-081 M1



JWH-018 M2



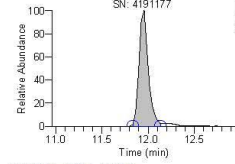
Forensik: Cannabinoids

Seite 2 of 3

AM-2201

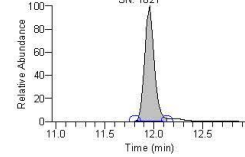
RT: 10.96 - 12.96 SM: 5G

AM-2201_127
RT: 11.96
AA: 6595119
SN: 4191177
NL: 9.57E5
m/z= 135.50-127.50 F: + c
ESI SRM ms2 360.300
[127.099-127.101]
[155.099-155.101] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



RT: 10.96 - 12.96 SM: 5G

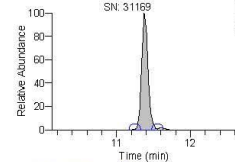
AM-2201_155
RT: 11.96
MA: 6217334
SN: 1021
NL: 9.10E5
m/z= 154.50-155.50 F: + c
ESI SRM ms2 360.300
[127.099-127.101]
[155.099-155.101] MS
F_nps_ham_50ng



AM-2201 M1

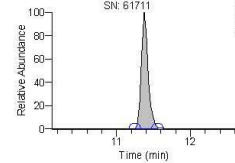
RT: 10.12 - 12.62 SM: 5G

AM-2201-M1_160
RT: 11.37
AA: 75920
SN: 31169
NL: 1.34E4
m/z= 159.50-160.50 F: + c
ESI SRM ms2 376.000
[160.142-160.144]
[249.148-249.150] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



RT: 10.12 - 12.62 SM: 5G

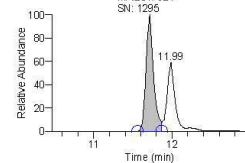
AM-2201-M1_248
RT: 11.37
AA: 156480
SN: 61711
NL: 2.49E4
m/z= 247.50-248.50 F: + c
ESI SRM ms2 376.000
[160.142-160.144]
[249.148-249.150] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



JWH-015

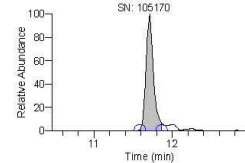
RT: 10.46 - 12.96 SM: 5G

JWH-015_127
RT: 11.71
MA: 2517924
SN: 1295
NL: 3.90E5
m/z= 126.50-127.50 F: + c
ESI SRM ms2 326.157
[127.145-127.147]
[144.133-144.135] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 10.46 - 12.96 SM: 5G

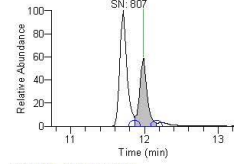
JWH-015_155
RT: 11.71
MA: 270779
SN: 105170
NL: 4.13E4
m/z= 157.50-158.50 F: + c
ESI SRM ms2 326.157
[127.152-127.154]
[158.119-158.121] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-073

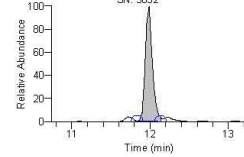
RT: 10.74 - 13.24 SM: 5G

JWH-073_127
RT: 11.99
AA: 1531739
SN: 807
NL: 3.80E5
m/z= 135.50-127.50 F: + c
ESI SRM ms2 326.157
[127.145-127.147]
[144.133-144.135] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



RT: 10.74 - 13.24 SM: 5G

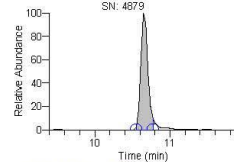
JWH-073_155
RT: 11.99
MA: 178471
SN: 3652
NL: 2.88E4
m/z= 143.50-144.50 F: + c
ESI SRM ms2 326.157
[127.145-127.147]
[144.133-144.135] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-073 M1

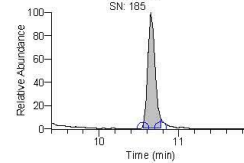
RT: 9.40 - 11.90 SM: 5G

JWH-073-M1_127
RT: 10.65
AA: 582430
SN: 4879
NL: 9.03E4
m/z= 126.50-127.50 F: + c
ESI SRM ms2 356.000
[127.056-127.058]
[155.036-155.038] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



RT: 9.40 - 11.90 SM: 5G

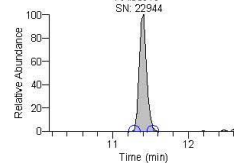
JWH-073-M1_155
RT: 10.65
MA: 618212
SN: 185
NL: 9.88E4
m/z= 154.50-155.50 F: + c
ESI SRM ms2 356.000
[127.056-127.058]
[155.036-155.038] MS
F_nps_ham_50ng



HU-210

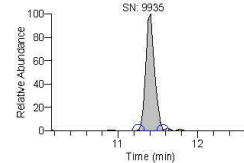
RT: 10.16 - 12.66 SM: 5G

HU-210_243
RT: 11.41
AA: 36919
SN: 22944
NL: 5.44E5
m/z= 242.50-243.50 F: + c
ESI SRM ms2 367.242
[243.068-243.070]
[261.103-261.105] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



RT: 10.16 - 12.66 SM: 5G

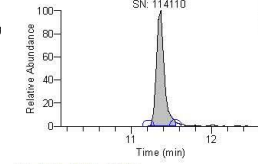
HU-210_261
RT: 11.41
MA: 23631
SN: 9935
NL: 3.09E5
m/z= 260.50-261.50 F: + c
ESI SRM ms2 387.242
[243.068-243.070]
[261.103-261.105] MS
F_nps_ham_50ng



UR-144

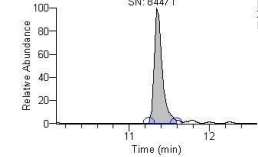
RT: 10.12 - 12.62 SM: 5G

UR-144_125
RT: 11.37
MA: 279200
SN: 114110
NL: 4.15E4
m/z= 124.50-125.50 F: + c
ESI SRM ms2 312.110
[125.100-125.102]
[214.228-214.230] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 10.09 - 12.59 SM: 5G

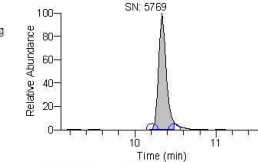
UR-144_214
RT: 11.34
MA: 203446
SN: 84471
NL: 2.94E4
m/z= 213.50-214.50 F: + c
ESI SRM ms2 312.110
[125.100-125.102]
[214.228-214.230] MS
F_nps_ham_50ng



UR-144 M1

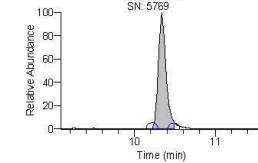
RT: 9.09 - 11.59 SM: 5G

UR-144-M1_125
RT: 10.34
MA: 1409293
SN: 5769
NL: 2.20E5
m/z= 124.50-125.50 F: + c
ESI SRM ms2 342.073
[125.082-125.084] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 9.09 - 11.59 SM: 5G

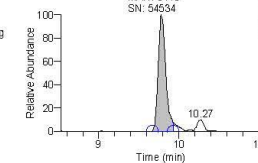
UR-144-M1_97
RT: 10.34
MA: 1409293
SN: 5769
NL: 2.20E5
m/z= 124.50-125.50 F: + c
ESI SRM ms2 342.073
[125.082-125.084] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-307

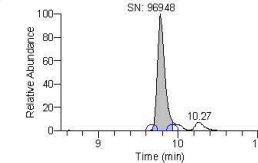
RT: 8.52 - 11.02 SM: 5G

JWH-307_127
RT: 9.77
MA: 175418
SN: 54534
NL: 2.67E4
m/z= 126.50-127.50 F: + c
ESI SRM ms2 306.300
[127.099-127.101]
[155.099-155.101] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 8.52 - 11.02 SM: 5G

JWH-307_155
RT: 9.77
MA: 311784
SN: 96948
NL: 4.87E4
m/z= 154.50-155.50 F: + c
ESI SRM ms2 306.300
[127.099-127.101]
[155.099-155.101] MS
F_nps_ham_50ng



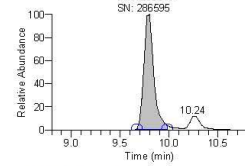
Forensik: Cannabinoids

Seite 3 of 3

JWH-200

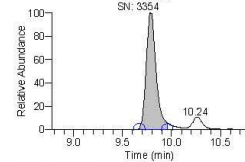
RT: 8.80 - 10.80 SM: 5G

JWH-200_127
RT: 9.80
MA: 1263319
SN: 286595
NL: 1.81E5
m/z= 126.50-127.50 F: + c
ESI SRM m/z 385.176
[127.143-127.151,
155.090-155.092] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 8.77 - 10.77 SM: 5G

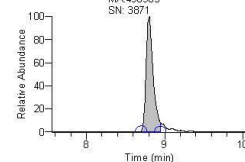
JWH-200_155
RT: 9.77
MA: 2037637
SN: 3364
NL: 2.90E5
m/z= 154.50-155.50 F: + c
ESI SRM m/z 385.176
[127.143-127.151,
155.090-155.092] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-200 M2

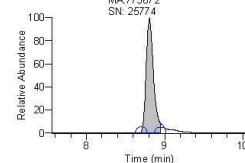
RT: 7.56 - 10.06 SM: 5G

JWH-200-M2_127
RT: 8.91
MA: 498905
SN: 3871
NL: 8.00E4
m/z= 126.50-127.50 F: + c
ESI SRM m/z 401.340
[127.119-127.121,
155.079-155.081] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 7.56 - 10.06 SM: 5G

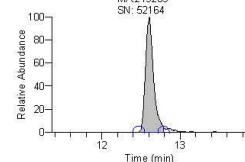
JWH-200-M2_155
RT: 8.91
MA: 723672
SN: 25774
NL: 1.21E5
m/z= 154.50-155.50 F: + c
ESI SRM m/z 401.340
[127.119-127.121,
155.079-155.081] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-122

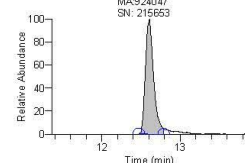
RT: 11.36 - 13.86 SM: 5G

JWH-122_141
RT: 12.61
MA: 219209
SN: 52164
NL: 3.13E4
m/z= 140.50-141.50 F: + c
ESI SRM m/z 356.200
[141.099-141.101,
169.099-169.101] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 11.36 - 13.86 SM: 5G

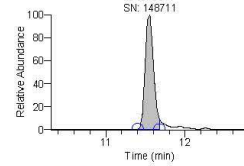
JWH-122_169
RT: 12.61
MA: 924047
SN: 215653
NL: 1.29E5
m/z= 168.50-169.50 F: + c
ESI SRM m/z 356.200
[141.099-141.101,
169.099-169.101] MS
F_nps_ham_50ng



RCS-4

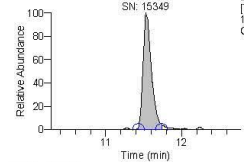
RT: 10.30 - 12.80 SM: 5G

RCS-4_135
RT: 11.56
MA: 516911
SN: 148711
NL: 7.09E4
m/z= 134.50-135.50 F: + c
ESI SRM m/z 322.200
[77.099-77.101,
135.099-135.101] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 10.27 - 12.77 SM: 5G

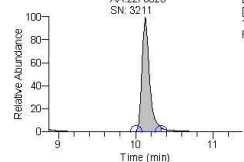
RCS-4_77
RT: 11.52
AA: 74437
SN: 15349
NL: 9.74E3
m/z= 76.50-77.50 F: + c
ESI SRM m/z 322.200
[77.099-77.101,
135.099-135.101] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



RCS-4 M1

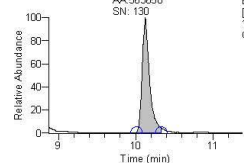
RT: 8.88 - 11.38 SM: 5G

RCS-4-M1_135
RT: 10.13
AA: 2276326
SN: 3211
NL: 3.40E5
m/z= 134.50-135.50 F: + c
ESI SRM m/z 338.248
[77.279-77.281,
135.099-135.101] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 8.88 - 11.38 SM: 5G

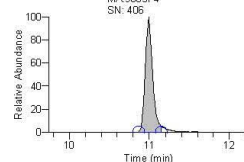
RCS-4-M1_77
RT: 10.13
AA: 56368
SN: 130
NL: 8.56E4
m/z= 76.50-77.50 F: + c
ESI SRM m/z 338.248
[77.279-77.281,
135.099-135.101] MS
Genesis F_nps_ham_50ng



JWH-122 M1

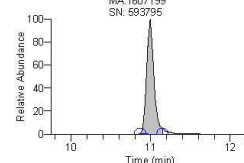
RT: 9.74 - 12.24 SM: 5G

JWH-122-M1_115
RT: 10.99
MA: 906374
SN: 406
NL: 1.45E5
m/z= 114.50-115.50 F: + c
ESI SRM m/z 372.100
[115.008-115.008,
169.086-169.086] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 9.74 - 12.24 SM: 5G

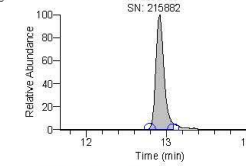
JWH-122-M1_196
RT: 10.99
MA: 1607199
SN: 593795
NL: 2.69E5
m/z= 168.50-169.50 F: + c
ESI SRM m/z 372.100
[115.008-115.008,
169.086-169.086] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-210

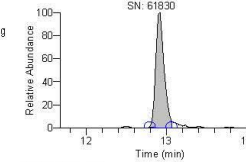
RT: 11.67 - 14.17 SM: 5G

JWH-210_183
RT: 12.92
MA: 895439
SN: 215822
NL: 1.27E5
m/z= 182.50-183.50 F: + c
ESI SRM m/z 370.200
[183.099-183.101,
214.199-214.201] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 11.67 - 14.17 SM: 5G

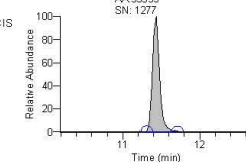
JWH-210_214
RT: 12.92
MA: 266904
SN: 61830
NL: 3.69E4
m/z= 213.50-214.50 F: + c
ESI SRM m/z 370.200
[183.099-183.101,
214.199-214.201] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-210 M1

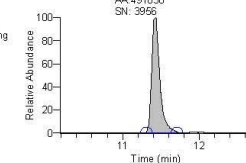
RT: 10.18 - 12.68 SM: 5G

JWH-210-M1_115
RT: 11.43
AA: 55535
SN: 1277
NL: 8.82E3
m/z= 114.50-115.50 F: + c
ESI SRM m/z 400.054
[115.064-115.066,
183.105-183.107] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 10.18 - 12.68 SM: 5G

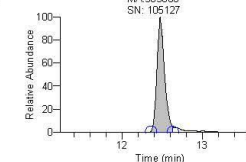
JWH-210-M1_183
RT: 11.43
AA: 491830
SN: 3956
NL: 6.75E4
m/z= 182.50-183.50 F: + c
ESI SRM m/z 400.054
[115.064-115.066,
183.105-183.107] MS
F_nps_ham_50ng



JWH-019

RT: 11.22 - 13.72 SM: 5G

JWH-019_127
RT: 12.47
MA: 385008
SN: 105127
NL: 5.98E4
m/z= 126.50-127.50 F: + c
ESI SRM m/z 356.100
[127.199-127.201,
155.199-155.201] MS
F_nps_ham_50ng



RT: 11.22 - 13.72 SM: 5G

JWH-019_155
RT: 12.47
MA: 433253
SN: 138129
NL: 5.88E4
m/z= 154.50-155.50 F: + c
ESI SRM m/z 356.100
[127.199-127.201,
155.199-155.201] MS
F_nps_ham_50ng

