



Forensische Toxikologie

So einfach lässt sich Drogenanalytik automatisieren

Manuelle Analysenmethoden vollständig zu automatisieren, kann sich sehr wirksam auf die Produktivität auswirken. Auch bei der forensisch-toxikologischen Bestimmung von Opioiden, Cocain und deren Metaboliten in Serum, Urin und Gewebe.

Auch forensisch-toxikologische Laboratorien haben ein Interesse daran, Optimierungspotenziale zu erschließen. Oft geht es um die Frage, wie man den auch aus ökonomischer Sicht hohen Anforderungen, die an den Nachweis von Drogen, Toxinen und Arzneimittelwirkstoffen aus den üblicherweise sehr komplexen biologischen Matrices geknüpft sind, effizient und ohne Qualitätseinbußen gerecht wird. Zielführend könne es sein, sagt Dr. Oliver Lerch, „arbeits- und zeitintensive, bislang von Hand ausgeführte oder nur eingeschränkt automatisierte Laborroutinen vollständig zu automatisieren“.

Wie sich ein solches Vorhaben in der Praxis umsetzen lässt, hat der promovierte Chemiker und GERSTEL-Applikationsexperte im Rahmen eines Gemeinschaftsprojekts mit der forensischen

Toxikologie des Instituts für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ergebnishaft dokumentiert [1, 2]. „Aufgabe war es“, schildert Dr. Oliver Lerch, „die bislang halbautomatisierte, mit einem RapidTrace-SPE-Extraktor durchgeführte Analyse unter anderem von Opioiden und



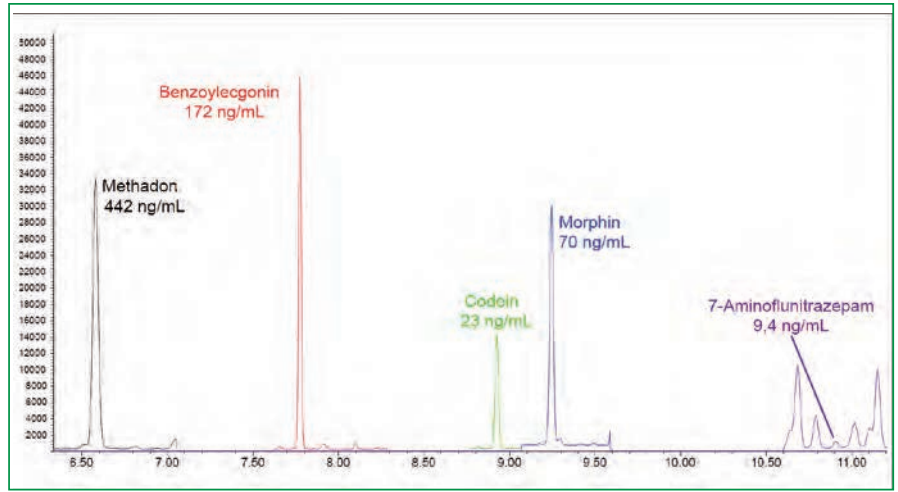
GC/MS-System zur automatisierten Probenvorbereitung (SPE, Eindampfen, Derivatisieren), verwendet für die Bestimmung von Opioiden und Cocain und deren Metaboliten, ebenso für den Nachweis von THC und dessen Abbauprodukte im Blutserum [3].

Text: Guido Deußing, Abbildungen: GERSTEL, Istockphoto

Cocain sowie deren Metaboliten aus Serum, Herzblut, Urin und verschiedenen Körpergewebe im Vorfeld der GC/MS- oder LC/MS-Analyse idealerweise eins zu eins auf einen x-y-z-Roboter und Probenwechsler (Autosampler) zu übertragen.“

Automatisierungspotenzial im Fokus

Um die Aufgabe den Vorgaben gemäß zu erfüllen, hatten Oliver Lerch und Kollegen zunächst die einzelnen Arbeitsschritte der manuellen Methode aufzulisten und auf ihr Automatisierungspotenzial hin zu überprüfen. Biologische Proben wie Blut, Serum, Urin oder Gewebe sind komplex aufgebaut; die Matrix enthält zahlreiche Proteine, die den Nachweis von enthaltenen forensisch-toxikologisch relevanten Analyten mittels Gas- oder Hochleistungsflüssigchromatographie (GC/LC) und Massenspektrometrie (MS) erschweren und die daher vor der Analyse zu entfernen sind. Dies geschieht in einem Fällungsschritt unter Einsatz geeigneter Reagenzien, gefolgt von der Abtrennung der gefällten Matrixbestandteile in einer Zentrifuge. Aliquote aus dem proteinfreien Überstand gelangen zur Analyse. Der manuelle Verlauf gestaltete sich im Institut für Rechts-



Extrahiertes Ionen-Chromatogramm einer realen Probe. Die quantifizierten Komponenten sind namentlich bezeichnet.

medizin der Universität Düsseldorf zum damaligen Zeitpunkt wie folgt: Aliquot mit Phosphatpuffer verdünnen. SPE-Kartusche mit Methanol und Phosphatpuffer konditionieren. Probe aufgeben und Kartusche mit Wasser, Essigsäure und Methanol waschen, unter Stickstoff trocknen und den Rückstand in einer Mischung aus Dichlormethan, Isopropanol und Ammoniak eluieren. Eluat unter Stickstoff bei 60 °C evaporieren. Rückstand in Derivatisierungsreagenz (Isooctan/MSTFA) aufnehmen. Lösung 30 min bei 90 °C schütteln, abkühlen lassen und 2 µL davon per Heißinjektion bei 270 °C ins GC/MS-System injizieren. Aufgetrennt wurden die Analyten mittels einer unpolaren Trennsäule bei konstantem Heliumfluss (1 mL/min).

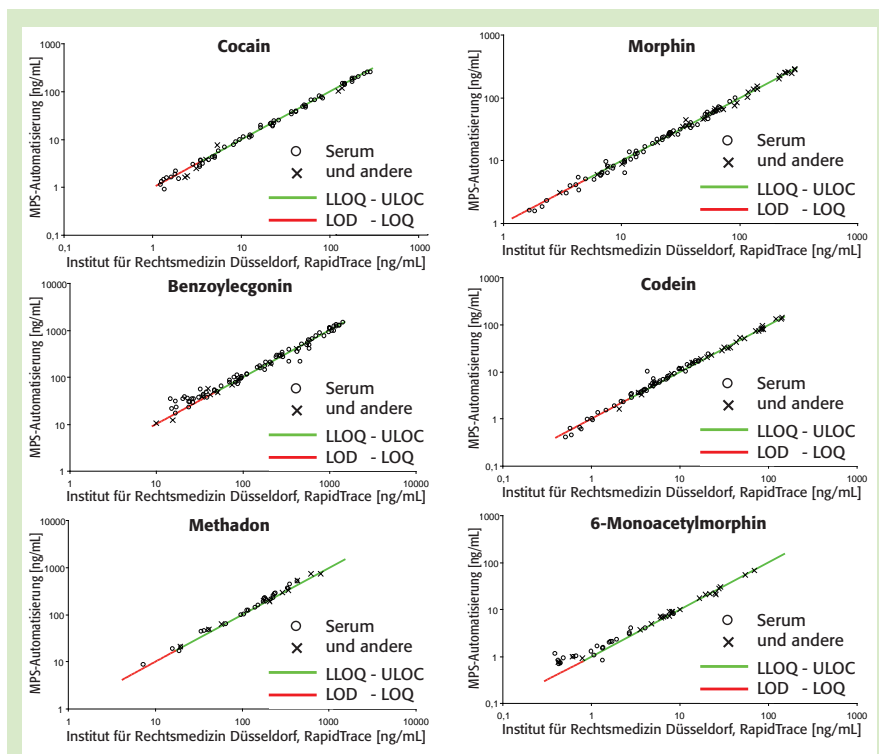
Der MSD wurde im Single Ion Monitoring (SIM)-Modus betrieben; aufgezeichnet wurden eine Quantifier- und zwei Qualifier-Massen.

Nach einer eingehenden Bestandsaufnahme sei zu überlegen gewesen, berichtet Dr. Oliver Lerch, ob und wenn ja, wie sich die identifizierten Optionen auf einen geeigneten Laborroboter, im vorliegenden Fall handelte es sich dabei um einen GERSTEL-MultiPurposeSampler (MPS), übertragen ließen, um die Zielanalyten Cocain, Benzoylcegonin, Morphin, Codein, Monoacetylmorphin, Dihydrocodein, Methadon und Aminoflunitrazepam nach Art und Menge hinreichend sensitiv, reproduzierbar und effizient zu bestimmen.

Umsetzung der Automatisierung

Wie sich im Verlauf der Methodenentwicklung zeigte, habe man die meisten Probenvorbereitungsschritte der bisher genutzten teilautomatisierten Vorgehensweise nahezu unverändert auf den MPS-Autosampler übertragen können, berichtet Dr. Lerch. Allerdings seien einige kleine Anpassungen erforderlich gewesen, die technischen beziehungsweise logistischen Gründen geschuldet waren, sich aber ohne Aufwand umsetzen ließen.

Vorrangig lag das Problem darin, dass die üblicherweise verwendeten Probengefäße nicht für den Einsatz auf einem Autosampler geeignet gewesen seien. Man habe kleinere Probenials benötigt und die automatisierte Methode so konzeptioniert, dass ein Teil der erforderlichen Verdünnung der Probenlösung in der Spritze ausgeführt wird. Auch die Elutionsmenge wurde dem kleineren MPS-Probenial (2 mL) angepasst und entsprechend reduziert, um auch den erforderlichen Eindampfschritt unter Einsatz der Multiposition-Evaporation-Station (M²VAP) des MPS automatisiert durchführen zu können.



Korrelation der ermittelten Konzentrationen der Analyten im doppelt logarithmischen Maßstab. Die Gerade mit der Steigung 1 spiegelt die optimale Übereinstimmung der Ergebnisse wider.



Standardkartusche für die herkömmliche Festphasenextraktion (u.) im Vergleich mit der modifizierten SPE-Kartusche für die automatisierte Vorgehensweise auf dem MPS-Autosampler.

Das optimale Elutionsvolumen wurde durch die Aufzeichnung des Elutionsprofils der Analyten von der SPE-Kartusche ermittelt. Um das Verfahren zu beschleunigen, wurde zudem die Derivatisierung in puncto Lösemittel und Reaktionszeit leicht modifiziert. Unverändert seien hingegen die GC/MS-Parameter geblieben. Die Injektion erfolgte automatisiert mittels MPS in den PTV-Einlass des GC, bei dem es sich um ein GERSTEL-KaltAufgabeSystem (KAS) handelte.

Aufgabe gemeistert, Ziel erreicht

„Wir haben unser Ziel, das teilweise automatisierte Verfahren zur Bestimmung von Opioiden und Cocain sowie deren Metaboliten von der Festphasenextraktion bis hin zur GC/MS-Injektion vollständig zu automatisieren, erreicht“, freut sich Dr. Lerch. Die Analysenwerte beider Methoden seien innerhalb statistisch zulässiger Grenzen äquivalent. Die Verdünnung in der Spritze ließ sich erfolgreich durchführen. Das Elutionsvolumen wurde auf

1,9 mL angepasst, wobei die ersten 0,6 mL verworfen, die nachfolgenden 1,3 mL in Glasfläschchen aufgefangen werden.

Die Dauer der Derivatisierung ließ sich von bislang einer halben Stunde auf fünf Minuten verkür-

zen; als Derivatisierungsreagenzmischung wurde Iso-Octan/Pyridin/MSTFA (automatisierte Vorgehensweise) genutzt anstelle von Iso-Octan/MSTFA (manuell). „Für keine Verbindung wurde ein Carryover festgestellt, wenn Leerseren nach hochkonzentrierten Proben extrahiert und analysiert wurden“, sagt der Experte. Neben mehr als 170 Serumproben wurden 50 Proben unterschiedlicher Matrices (Urin, Gewebe, Herzblut) sowie Qualitätskontrollproben untersucht. Wie der Wissenschaftler berichtet, habe man durch eine Verschachtelung von Probenvorbereitung und GC-Lauf einen Durchsatz von rund 30 Proben pro Tag realisiert.

Auf den Punkt gebracht habe man das Ziel des oben beschriebenen Forschungsprojekts vollauf erreicht, resümiert Dr. Oliver Lerch, ein bislang halbautomatisiertes Analyseverfahren für Opiode, Cocain und deren Metaboliten aus Blutserum und anderen Matrices vollständig zu automatisieren. Die Analysenwerte der manuellen und der automatisierten Varianten seien äquivalent gewesen, betont der

Wissenschaftler, was bedeute, dass „das automatisierte Verfahren für die Routineanalyse in einem forensischen Labor geeignet ist“.

Obwohl sich die Analysenzeiten bei der Methoden gleichen, spare der Anwender einen großen Teil der bislang erforderlichen manuellen Arbeit ein und minimierte zudem die Zahl potenzieller Fehlerquellen, was sich positiv auf die Qualität und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse auswirke.

Quelle

- [1] O. Lerch, O. Temme, T. Daldrup: „Comprehensive automation of the solid phase extraction gaschromatographic mass spectrometric analysis (SPE-GC/MS) of opioids, cocaine, and metabolites from serum and other matrices“, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 4443 (www.gerstel.de/.../Applikationen); kostenfreier Download des Beitrags: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-014-7815-7>
- [2] O. Lerch, O. Temme, T. Daldrup: „Comprehensive Automation of the SPE-GC/MS Analysis of Opioids, Cocaine and Metabolites from Serum and Other Matrices“, GERSTEL AppNote 07/2013
- [3] GERSTEL Aktuell 46 (2012) 13-15

Danksagung

Die GERSTEL GmbH & Co. KG dankt Herrn Prof. Thomas Daldrup und Herrn Dr. Oliver Temme vom Institute für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die inzwischen über viele Jahre währende hervorragende Zusammenarbeit, die weit über das hinausgeht, was im hier vorliegenden Bericht an Resultaten beschrieben wurde.

Aroma Office 2D

Geruchs- und Geschmacksstoffe erfolgreich aufklären

GERSTEL erweitert Software-Portfolio um 2D-Retentionsindex-Datenbank zur schnelleren Identifizierung von Aromakomponenten.

Substanzen, die für einen Geruch beziehungsweise einen Fehlgeruch verantwortlich sind, lassen sich oft erfolgreich anhand ihrer Retentionsindices (RI) in Verbindung mit der GC/MS-Geruchsanalyse identifizieren. Diese Art der Aufklärungsarbeit ist durchaus gängig und weit verbreitet. Allerdings handelt es sich dabei um ein als bislang aufwendig zu bezeichnendes Prozedere.

Um den Abgleich ermittelter RI mit denen von Standardsubstanzen zu vereinfachen, hat die Nishikawa Keisoku Co. Ltd. in Tokio, Japan, eine Datenbank entwickelt: „Aroma Office 2D“, so der Name der Datenbank, enthält Retentionsindices (RI) von geruchsaktiven Komponenten mit rund 80.000 Einträgen und bildet damit ein wertvolles und unverzichtbares Werkzeug für Aromalaboratorien. „Aroma Of-

fice 2D“ zeichnet sich durch verschiedene Nutzwerte aus:

Die Datenbank enthält herkömmliche 1D-Daten, erlaubt den Abgleich von zwei, auf unterschiedlichen Säulen ermittelte RI sowie die Identifizierung unbekannter Substanzen durch Kombination von RI, ermittelt im Zuge der 1D- und 2D-Analyse, sowie weiterer unterschiedlicher Suchkriterien.

Anwender, die auf eine sichere Aufklärung und Identifizierung von Aromakomponenten aus sind, so das Fazit der Entwickler, tun gut daran, ihr Labor nicht nur Hardware-seitig auszubauen, etwa durch Installation von 1D/2D-GC/MS idealerweise in Verbindung mit einem olfaktorischen Detektionsport (ODP), sondern ebenso in die Auswertesoftware zu investieren. Weitere Informationen erhalten Sie auf Anfrage an aktuell@gerstel.de.