

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Büttner

Trialkylsulfoniumhydroxide und höhere Alkyljodide –
Innovative Alkylierungsmethoden zum Cannabinoidnachweis
aus verschiedenen Matrices

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Robert Steinhagen

aus Rostock

Rostock, Juli 2016

Datum der Einreichung der Dissertation: 13.07.2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Rostock am: 25.07.2016

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Büttner, Institut für Rechtsmedizin Rostock
2. Gutachter: Dr. rer. nat. Dipl.-Lebensmittelchem. Frank Sporkert, Centre Universitaire Romand de Médecine légale, Lausanne (Schweiz)
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Volker Auwärter, Institut für Rechtsmedizin Freiburg

Disputation am: 19.09.2017

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Pharmakokinetik der Cannabinoide	1
1.2	Inkorporation der Cannabinoide in das Haar	3
1.3	Pharmakodynamik der Cannabinoide	4
1.4	Einflüsse der Cannabinoid-Wirkungen auf die Fahrtüchtigkeit	4
1.5	Deutung eines positiven Cannabinoidnachweises im Hinblick auf forensische Fragestellungen	6
1.6	Rechtliche Aspekte zum Cannabiskonsum	7
1.7	Zielstellung	11
2	Theoretische Grundlagen	12
2.1	Extraktionsverfahren und Methoden der Derivatisierung in der Gaschromatographie	12
2.2	Grundlagen der Gaschromatographie/Massenspektrometrie	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Reagenzien und Standardsubstanzen	15
3.2	Probenaufarbeitung: Übersicht verwendeter Geräte	16
3.3	GC/MS-Bedingungen und Software	16
3.4	Allgemeine Synthesevorschrift für Trialkylsulfoniumiodide	17
3.5	Serumanalyse	18
3.5.1	Herstellung eines cannabinoidnegativen Serumpools	18
3.5.2	Aufarbeitung von Seren und Derivatisierung mit Alkylididen	18
3.5.3	Aufarbeitung von Seren und Derivatisierung mit Trialkylsulfoniumhydroxiden (TASH)	19
3.5.4	Kalibration	19
3.6	Haaranalyse	19
3.6.1	Herstellung eines Haarpoons und Haarvorbehandlung	19
3.6.2	Aufarbeitung der Haarmatrix	20
3.6.3	Kalibration	21
3.7	Urinanalyse	21
4	Ergebnisse und Diskussion	23
4.1	Voruntersuchungen	23
4.1.1	Derivatisierung der Cannabinoide mit Alkylididen	23
4.1.2	Ermittlung von SIM-Ionen der Analyten, der ISTD und RT	25
4.2	Serumanalyse	27
4.2.1	GC/MS-SIM-Messungen und Ermittlung der BG über das S/N-Verhältnis	27
4.2.2	Beurteilung der Alkylidide als Derivatisierungsreagenz für Cannabinoide	28
4.2.3	Basisvalidierung der ethylierten Cannabinoidderivate unter Verwendung von 1-Iodethan	31
4.2.3.1	Basisvalidierung des ethylierten THC-Derivates	31
4.2.3.2	Basisvalidierung des ethylierten THC-OH- bzw. THC-COOH-Derivates	33
4.2.3.3	Fazit zur Ethylierung der Cannabinoide mit 1-Iodethan	34
4.2.4	Derivatisierung der Cannabinoide mit TASH	35
4.2.4.1	Syntheseergebnisse der Trialkylsulfoniumsalze	35

4.2.4.2	Auswertung der GC/MS-Totalionenchromatogramme	35
4.2.4.3	Auswertung der GC/MS-SIM-Chromatogramme der mittels TESH ethylier- ten Cannabinoide	37
4.2.4.4	BG der via TASH gebildeten Cannabinoide	39
4.2.4.5	Beurteilung der TASH als Derivatisierungsreagenz für Cannabinoide	39
4.2.5	Basisvalidierung der ethylierten Cannabinoide unter Verwendung von TESH	43
4.2.5.1	Basisvalidierung des ethylierten THC-Derivates	43
4.2.5.2	Basisvalidierung des Monoethyl-THC-OH- bzw. Ethylierten THC-COOH- Derivates	44
4.2.5.3	Fazit zur Ethylierung der Cannabinoide mittels TESH	46
4.3	Vergleich der beschriebenen Ethylierungsverfahren	46
4.4	Vergleich eigener Validierungsparameter (Serum) mit Literaturmethoden	47
4.5	Optimierung der Reaktionsbedingungen	49
4.5.1	Derivatisierung im Trockenschrank	50
4.5.2	Derivatisierung in der Mikrowelle	51
4.5.2.1	Derivatisierung in Abhängigkeit vom Abstand zum Mittelpunkt der Mikro- welle	51
4.5.2.2	Derivatisierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	52
4.5.3	Derivatisierung in Abhängigkeit von der Injektortemperatur	53
4.5.4	Derivatisierung in Abhängigkeit von der Lösemittelzusammensetzung	54
4.5.5	Fazit zu den Optimierungsmessungen	55
4.5.6	Beurteilung der optimierten Reaktionsbedingungen	56
4.6	Haaranalyse	58
4.6.1	Derivatisierung der Cannabinoide nach Extraktion aus der Haarmatrix	58
4.6.2	GC/MS-SIM-Messungen und Ermittlung der BG über das S/N-Verhältnis	59
4.6.3	Basisvalidierung des butylierten THC-Derivates	60
4.6.4	Beurteilung des THC-Nachweises im Haar mittels Butylierung	61
4.6.5	Vergleich eigener Validierungsparameter (Haar) mit Literaturmethoden	61
4.6.6	Analyse zweier authentischer Haarstränge auf Cannabinoide	63
4.6.6.1	Fall 1: Analyse einer 19 cm langen Rastalocke	64
4.6.6.2	Beurteilung der Analyseergebnisse aus Fall 1	65
4.6.6.3	Fall 2: Analyse eines 23 cm langen Haarstranges	65
4.6.6.4	Beurteilung der Analyseergebnisse aus Fall 2	66
4.6.6.5	Qualitative Bestimmung von THCA-A in dem 23 cm langen Haarstrang	67
4.6.6.6	Beurteilung der THCA-A-Extraktion	68
4.7	Urinanalyse	69
4.7.1	Gegenüberstellung von MSTFA und TESH als Derivatisierungsreagenz zum Nachweis von THC-COOH aus Urin	69
4.7.2	Beurteilung der Urinanalyse	70
5	Erfassung von Buprenorphin	71
6	Zusammenfassung	74
7	Literaturverzeichnis	76
8	Anhang	84

Abkürzungsverzeichnis

BG	Bestimmungsgrenze
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CIF	Cannabis-Influence-Factor
CTU	chemisch-toxikologische Untersuchung
CYP-Enzym	Cytochrom-P ₄₅₀ -Enzym
DMSO	Dimethylsulfoxid
EG	Erfassungsgrenze
EI	Elektronenstoßionisation
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HCl	Salzsäure
HS-SPME	Headspace-Solid-Phase Microextraction
ISTD	interner Standard
LC	Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid-Chromatography/tandem Mass Spectrometry
LLE	Liquid-Liquid-Extraction (engl. Flüssig-Flüssig-Extraktion)
LMG	Lösungsmittelgemisch
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NG	Nachweisgrenze
R ²	Bestimmtheitsmaß
RI	Alkyliodid
RSD	relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
S/N	Signal/Noise (engl. Signal/Rausch-Verhältnis)
SIM	Selected-Ion-Monitoring
SoHT	Society of Hair Testing
SPE	Solid-Phase-Extraction
TASH	Trialkylsulfoniumhydroxid
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TBSH	Tributylsulfoniumhydroxid
TESH	Triethylsulfoniumhydroxid
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
THCA-A	Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A
THC-COOH	11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THC-OH	11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TIC	Totalionenchromatogramm
TIPSH	Triisopropylsulfoniumhydroxid
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TPSH	Tripropylsulfoniumhydroxid
UHPLC-MS/MS	Ultra-High Performance Liquid-Chromatography/tandem Mass Spectrometry

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung von Biosynthese, Aufnahmewegen, Metabolisierung und Ausscheidung der untersuchten Cannabinoide sowie deren Einlagerung in die Haare bzw. dessen Kontamination	1
Abb. 2	Schematische Darstellung verschiedener Einlagerungs- und Eliminationswege von Drogen in das menschliche Haar	3
Abb. 3	Verlauf der positiven Nachweise für Cannabis und weitere Drogen zwischen 2002 bis 2012 am Rostocker Institut für Rechtsmedizin	10
Abb. 4	Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer	14
Abb. 5	EI-Massenspektrum und Fragmentierungsmuster des ethylierten THC-Derivates	23
Abb. 6	TIC des mit 1,1,1-Trifluor-2-iodethan derivatisierten THC	25
Abb. 7	Ausschnitt eines Ionenchromatogramms einer Serumprobe	27
Abb. 8	Postulierte S _N 2-Reaktion zur Bildung von Alkyl-THC unter Verwendung von TBAH, DMSO und 1-Iodpropan	29
Abb. 9	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels 1-Iodethan ethylierten THC	32
Abb. 10	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-OH	33
Abb. 11	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-COOH	34
Abb. 12	TIC der mit TESH derivatisierten Cannabinoide	37
Abb. 13	SIM-Chromatogramm der Ionen m/z 327 und 330 der ethylierten Cannabinoidderivate	38
Abb. 14	SIM-Chromatogramm der Ionen m/z 327 und 330 und Strukturformeln der ethylierten Cannabinoidderivate	38
Abb. 15	Postuliertes S _N 2-Reaktionsschema zur Bildung von Trialkylsulfoniumiodiden	40
Abb. 16	Synthese von Tripropylsulfoniumhydroxid ausgehend von dem korrespondierenden -iodid	41
Abb. 17	Vermuteter Reaktionsverlauf der (pyrolytischen) <i>n</i> -Alkylierung des THC am Beispiel von TPSH	41
Abb. 18	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels TESH ethylierten THC	43
Abb. 19	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels TESH einfach ethylierten THC-OH-Derivates	44
Abb. 20	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels TESH ethylierten THC-COOH-Derivates	45
Abb. 21	Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Trockenschrank bei 80 °C	50

Abb. 22	Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit vom Abstand zum Mittelpunkt der Mikrowelle bei 400 W und 3 min Inkubation	51
Abb. 23	Integrale des Fragmention m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in der Mikrowelle bei 4 cm Abstand zum Mittelpunkt und 400 W	52
Abb. 24	Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Injektortemperatur nach Inkubation in der Mikrowelle für 3 min und Abstand vom Mittelpunkt von 4 cm	53
Abb. 25	Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Lösemittelzusammensetzung nach 3 min Behandlung in der Mikrowelle bei 4 cm Abstand vom Mittelpunkt, Injektortemperatur 320 °C	54
Abb. 26	Postuliertes Reaktionsschema des THC-OH bei der Umsetzung mit TESH	57
Abb. 27	EI-Massenspektrum und Ionen des butylierten THC-Derivates	58
Abb. 28	Ausschnitt eines Ionenchromatogramms einer authentischen Haarprobe nach Butylierung mit TBSH	59
Abb. 29	Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des <i>n</i> -butylierten THC-Derivates nach Derivatisierung mit TBSH	60
Abb. 30	Strukturformeln, SIM-Ionen und RT von Dibutyl-CBD, Butyl-CBN sowie Dibutyl-THCA-A	63
Abb. 31	Segmentweise bestimmte Konzentrationen von THC, CBN und CBD in einer 19 cm langen Rastalocke	64
Abb. 32	Segmentweise bestimmte Konzentrationen von THC, CBN, CBD eines 23 cm langen Haarstranges	66
Abb. 33	Boxplot des Quotienten der Flächen aus Zweit- und Erstmessung des Ions m/z 341 der THCA-A	68
Abb. 34	THC-COOH-Konzentrationen der Probennummern 1-5 nach Derivatisierung mit MSTFA bzw. TESH	69
Abb. 35	THC-COOH- Konzentrationen der Probennummern 6-9 nach Derivatisierung mit MSTFA bzw. TESH	70
Abb. 36	Strukturformel des butylierten Buprenorphins sowie EI-Massenspektrum	71
Abb. 37	Ausschnitt eines SIM-Chromatogramms des butylierten Buprenorphin nach Serumextraktion	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Auflistung verwendeter Geräte	16
Tab. 2	GC/MS-Messbedingungen und gerätetechnische Ausstattungen	17
Tab. 3	Volumina der Edukte für die Synthese der entsprechenden Trialkylsulfoniumiodide	17
Tab. 4	Kalibratorkonzentrationen für den Nachweis von THC, THC-OH und THC-COOH im Serum	19
Tab. 5	Kalibratorkonzentrationen für den Nachweis von THC im Haar	21
Tab. 6	Auswertung der TIC nach Derivatisierung von THC, THC-OH und THC-COOH ohne Matrix mit den aufgeführten Alkylididen	24
Tab. 7	SIM-Ionen der Analyten, der ISTD und ermittelte RT der Cannabinoidderivate	26
Tab. 8	BG der mittels Alkylididen derivatisierten Cannabinoiden	28
Tab. 9	Regressionsgleichungen, Bestimmtheitsmaße (R^2), NG, Erfassungsgrenzen (EG) und BG des mittels 1-Iodethan ethylierten THC	32
Tab. 10	Regressionsgleichungen, R^2 , NG, EG und BG des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-OH	33
Tab. 11	Regressionsgleichungen, R^2 , NG, EG und BG des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-COOH	34
Tab. 12	Auszug aus den Ergebnissen der Ringversuche für Betäubungsmittel im Serum	35
Tab. 13	Auswertung der TIC nach Derivatisierung von THC, THC-OH und THC-COOH ohne Matrix mit dem jeweiligen TASH	36
Tab. 14	BG der via TASH alkylierten Cannabinoide	39
Tab. 15	Regressionsgleichungen, R^2 sowie NG, EG und BG des mittels TESH ethylierten THC	44
Tab. 16	Regressionsgleichungen, R^2 sowie NG, EG und BG des mittels TESH einfach ethylierten THC-OH	45
Tab. 17	Regressionsgleichungen, R^2 sowie NG, EG und BG des mittels TESH ethylierten THC-COOH	46
Tab. 18	Vergleich der vorgestellten mit publizierten Methoden in Bezug auf verwendete Verfahren, linearem Bereich, NG und BG des THC, THC-OH und THC-COOH	48
Tab. 19	BG des via TASH alkylierten THC nach Analyse authentischer Haarproben	59
Tab. 20	Regressionsgleichungen, R^2 sowie NG, EG und BG des mittels TBSH butylierten THC-Derivates	60
Tab. 21	Auszug aus den Ergebnissen der Ringversuche für Betäubungsmittel im Haar	61
Tab. 22	Vergleich der vorgestellten mit publizierten Methoden in Bezug auf verwendete Verfahren, linearem Bereich, NG und BG des THC im Haar	62
Tab. 23	SIM-Ionen von Buprenorphin (Analyt/ISTD) sowie RT	71
Tab. 24	BG nach Analyse von Leerseren gespiked mit Buprenorphin und Alkylierung mittels TASH	72

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1 Berechnung des CIF mit der „vereinfachten“ Formel von Daldrup und Meininger 8

1 Einleitung

1.1 Pharmakokinetik der Cannabinoide

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA-A) (Abb. 1) stellen die Hauptvertreter von etwa 70 bekannten, natürlich vorkommenden Cannabinoiden dar, die überwiegend in der weiblichen Hanfpflanze der Art *Cannabis sativa* gebildet werden [1, 2]. Bei Hanf handelt es sich um ein ein- bis zweijähriges, zweihäusiges Kraut, das bis zu 5 m hoch werden kann und in zahlreichen Pflanzenteilen wie Stängeln, Blättern, Blüten sowie dem sich bildenden Harz Cannabinoide in unterschiedlichen Konzentrationen enthält [3–6].

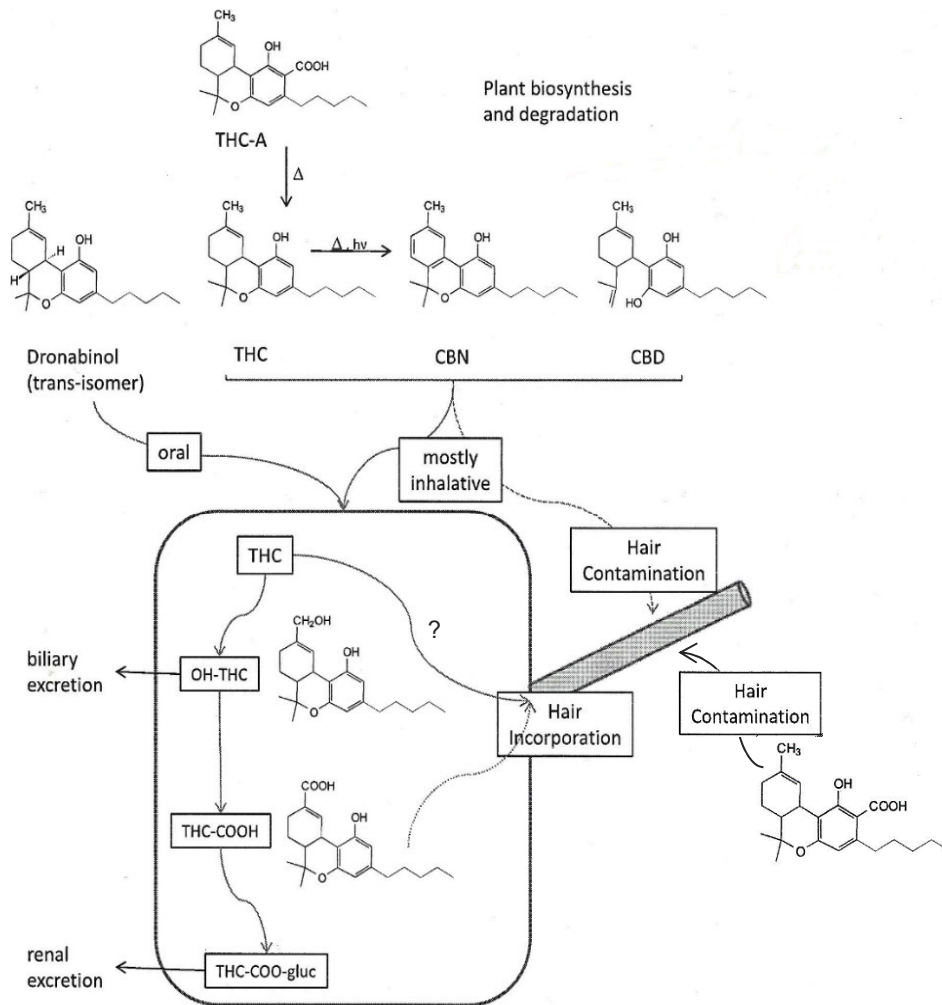


Abb. 1: Schematische Darstellung von Biosynthese, Aufnahmewege, Metabolisierung und Ausscheidung der untersuchten Cannabinoide sowie deren Einlagerung in die Haare bzw. dessen Kontamination (nach Thieme et al. [12], modifiziert)

Aus den verschiedenen Pflanzenteilen lassen sich diverse Zubereitungen herstellen: Im allgemeinen Sprachgebrauch sind Haschisch, das aus dem Harz oder aus gepressten Harzdrüsen der Pflanze gewonnen wird, und Marihuana, was aus getrockneten Pflanzenteilen – vorwiegend der Triebspitzen und Blüten – erzeugt werden kann, am bekanntesten [1–3]. Cannabis kann nach dem Verhältnis von THC zu CBD in bis zu drei verschiedene Chemotypen eingeteilt werden, wobei Typ I durch ein THC/CBD-Verhältnis > 1 , Typ II durch ein ausgeglichenes Verhältnis von THC zu CBD (~ 1) und Typ III durch ein THC/CBD-Verhältnis < 1 charakterisiert ist [1, 3]. Da THC die höchste psychoaktive Potenz besitzt [1, 2, 6–10], wird Typ I für die Drogenherzeugung, Typ III vielmehr zur Fasergewinnung in der Textilindustrie genutzt [1]. Durchschnittlich beträgt der THC-Gehalt von handelsüblichem Marihuana 0,5–0,7 %, der von Haschisch liegt bei 5–20 %, kann bei sehr guter Qualität aber auch deutlich darüber liegen [10].

Häufig werden Cannabinoide inhalativ über das Rauchen einer Zigarette, welche neben Marihuana auch oftmals Tabak enthält und u. a. als „Joint“ bezeichnet wird, mit dem Hauptstrom dem menschlichen Organismus zugeführt und erreichen nach Resorption in den Alveolen über den Blutfluss die Zielorgane [4, 9]. Weiterhin können Cannabinoide dem Organismus oral über Gebäck (wie Kekse oder Kuchen) zugeführt werden, wenn diese bspw. mit Haschisch-Öl versetzt wurden. Bei oraler Zufuhr reduziert sich die Bioverfügbarkeit des aufgenommenen THC erheblich, da ein ausgeprägter First-Pass-Metabolismus in der Leber stattfindet [4, 9], zudem werden lediglich 5–20 % des zugeführten THC resorbiert [11]. Weitere Aufnahmewege (rektal, sublingual, transdermal, über Augentropfen oder Aerosole) sind beschrieben, aber von untergeordneter Relevanz [9].

Die sich der Aufnahme anschließende polyphasische Verteilung kann grob in drei Phasen eingeteilt werden: In der ersten Phase flutet THC rasch in Organen mit hoher Durchblutungsrate (u. a. Herz, Leber, Niere, Zentralnervensystem) an [2, 4, 6, 9, 11]. Nachfolgend kommt es durch Umverteilung des THC zu einer Depotbildung in Geweben mit geringerer Durchblutung, wobei THC aufgrund der Lipophilie besonders im Fettgewebe und anderen fettreichen Kompartimenten akkumuliert [4, 6, 11]. Das Verteilungsvolumen von THC beträgt im „steady state“ etwa 10 L/kg Körpergewicht [2, 5, 6, 9]. Ein Wert, der für lipophile Verbindungen typisch ist und hinweisend für die Einlagerung in verschiedene Körperkompartimente sein kann [2]. Letztlich wird THC langsam aus den Depots in die Blutbahn freigesetzt und abgebaut [11].

Im Verlauf der Elimination unterliegen die Cannabinoide einer komplexen hepatischen Metabolisierung. Der für die forensische Analytik wichtigste Stoffwechselweg ist die mikrosomale Hydroxylierung des THC am allylständigen Kohlenstoffatom durch Cytochrom-P₄₅₀-Enzyme (CYP-Enzyme) – hauptsächlich CYP-2C9 – zu 11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

(THC-OH). Letzteres wird anschließend ebenfalls durch CYP-Enzyme oder Alkoholdehydrogenasen zu 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) oxidiert [2, 11]. Während THC-COOH in freier Form oder an Glucuronsäure gebunden renal ausgeschieden wird [9], erfolgt die Elimination von THC-OH hauptsächlich biliär [12] (Abb. 1). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der polyphasischen Elimination wird vor allem bei regelmäßigen Konsumenten durch Rückdiffusion von THC aus den fettreichen Geweben in das Blut in der Spätphase der Verteilung bestimmt. Dabei verlängert sich die Ausscheidungsphase bei dauerhaften Konsumenten im Gegensatz zu sporadisch Konsumierenden aufgrund der Kumulation von THC [6, 11, 13].

1.2 Inkorporation der Cannabinoide in das Haar

Substanzen, die vermehrt über den Blutfluss in die Haarmatrix eingelagert werden, weisen im Allgemeinen eine hohe Lipo- und Basophilie auf, ferner spielen die Melaninaffinität der Substanz und der pH-Gradient (zwischen Blut und Haarmatrix) entscheidende Rollen [10, 14, 15].

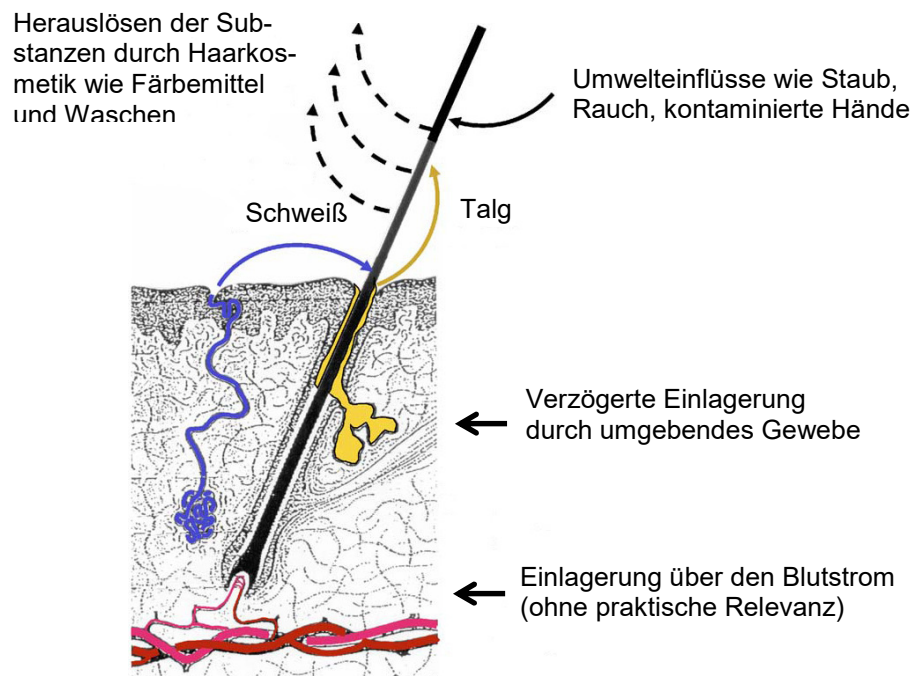


Abb. 2: Schematische Darstellung verschiedener Einlagerungs- und Eliminationswege von Drogen in das menschliche Haar (nach Pragst et al. [15], modifiziert)

Über den Blutfluss erfolgt keine relevante Einlagerung von THC in die Haare (aufgrund der physikochemischen Eigenschaften); auch THC-COOH ist nur in sehr geringen Konzentrationen detektierbar [10, 16]. Vielmehr wird eine externe Kontamination (über den Nebenstrom, Schweiß, Talg, kontaminierte Hände etc.) als wahrscheinlicher erachtet (Abb. 2) [16].

1.3 Pharmakodynamik der Cannabinoide

THC kann wenige Sekunden nach dem ersten Zug an einem Joint im Plasma nachgewiesen werden; Wirkungen sind innerhalb weniger Minuten spürbar [2, 9]. Diese beruhen auf Interaktionen mit den endogenen Cannabinoid-Rezeptoren (CB-Rezeptoren), von denen bisher zwei (CB₁- und CB₂-Rezeptor) bekannt sind. Beide sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren physiologische Stimulierung u. a. über Derivate der Arachidonsäure wie Anandamid erfolgt [4, 9, 17]. CB₁-Rezeptoren werden im gesamten Körper exprimiert, ihre Dichte ist aber im zentralen und peripheren Nervensystem (Großhirnrinde, limbisches System, Basalganglien, Kleinhirn und Hinterstränge des Rückenmarks) besonders hoch. Aber auch in anderen Organen, wie endokrinen Drüsen, Herz und Milz, ist dieser nachweisbar. CB₂-Rezeptoren werden hingegen vermehrt auf Zellen des Immunsystems gebildet und sind an der Regulation der Zytokinausschüttung beteiligt [9, 17].

Wichtigster exogener Agonist für die CB₁- und CB₂-Rezeptoren ist THC, welches durch thermische Decarboxylierung (bspw. durch Rauchen oder Backen im Ofen) aus THCA-A (psychoinaktiv) entsteht [1, 18]. CBD entsteht ebenso aus aciden Vorstufen durch thermische Decarboxylierung [1]. CBN ist ein Oxidationsprodukt des THC, welches sowohl in der Pflanze als auch durch nicht-enzymatische Oxidation aus THC entsteht. Sowohl CBN als auch CBD – ein Isomer des THC – haben keine psychotropen Wirkungen. Jedoch modifiziert CBD den Effekt von THC [9, 19], obwohl es selbst nicht an die CB-Rezeptoren bindet [20]. Das Oxidationsprodukt THC-OH besitzt in etwa die gleiche psychoaktive Potenz wie THC; THC-COOH ist psychoinaktiv [9, 11].

1.4 Einflüsse der Cannabinoid-Wirkungen auf die Fahrtüchtigkeit

Der Rauschverlauf nach Konsum cannabishaltiger Produkte kann in eine akute, subakute und postakute Phase untergliedert werden. Die akute Phase umfasst den Zeitraum zwischen Konsumbeginn und 1-2 h nach Konsumende [5, 11, 21] und äußert sich u. a. in Form von Stimmungsveränderungen, Störung der Denkabläufe, Wahrnehmungen, Aufmerksamkeit und

Motorik, Abwendung von Leistungsverpflichtungen und/oder Modulation des Schmerzempfindens [4, 9–11]. Hinsichtlich des Fahrverhaltens fallen besonders Geschwindigkeitsänderungen, Lenkkorrekturen und leichte Ablenkbarkeit auf [5]. Möller et al. [22] zeigten, dass bei THC-Konzentrationen von 5-10 ng/mL Serum, die ca. 2-3 h nach Cannabiskonsum erreicht werden, signifikante Beeinträchtigungen u. a. in Feinmotorik und Impulskontrolle für diesen Zeitraum feststellbar waren. Die Beeinträchtigungen der Feinmotorik waren bis zu 5 h nach Rauchen spürbar, die entsprechenden THC-Konzentrationen lagen dann noch bei 2-5 ng/mL [22]. Ursächlich für die zahlreichen Wirkungen im zentralen und peripheren Nervensystem ist die Verteilung des CB₁-Rezeptors (Kapitel 1.3).

Im weiteren zeitlichen Verlauf führt die Stimulation des CB₁-Rezeptors in der sich anschließenden subakuten Phase (ca. 4-6 h nach Konsum) zu positiven Empfindungen, dem so genannten „high“-Gefühl, welches sich bspw. in Form von gehobener Stimmung, Euphorie und Heiterkeit ausdrückt [10, 11, 21]. Dabei sind die als belohnend empfundenen subjektiven Gefühle vermutlich auf die THC-bedingte Dopamin-, Noradrenalin- und Acetylcholinfreisetzung im mesolimbischen Kortex zurückzuführen [4, 9, 17]. Das „high“-Gefühl ist nicht linear zu den gemessenen THC-Konzentrationen im Blut, sondern gleicht einer Hysterese [9, 11], bei der Wirkungssteigerungen selbst dann noch erreicht werden, wenn die THC-Konzentration bereits wieder rückläufig ist. Die in dieser Phase begangenen Fahrfehler sind mit der Euphorie zu begründen und zeichnen sich durch Überschätzung der eigenen Leistungsfähigkeit aus.

Die letztlich folgende postakute Phase umfasst den Zeitraum von 12-24 h nach Konsum. In dieser Phase ist meist kein auffälliges Fahrverhalten mehr zu beobachten [5]. Da auch andere Gewebe den CB₁-Rezeptor exprimieren, existieren zahlreiche weitere Effekte wie Tachykardie, Vasodilatation, konjunktivale Injektionen und Mydriasis. Neben den oben aufgeführten Effekten werden den Cannabinoiden u. a. eine Appetitsteigerung, antiemetische und analgetische Eigenschaften sowie antiinflammatorische Effekte zugeschrieben [19, 20], sodass synthetisch hergestelltes THC (Marinol) aber auch Dronabinol (*trans*-Isomer von THC, Abb. 1) als Arzneimittel zugelassen sind und in begründeten Fällen (u. a. bei chronischem Schmerzsyndrom oder Multipler Sklerose) als Pharmazeutika verschrieben werden können [11, 23, 24]. Im Allgemeinen sind die subjektiven Empfindungen nach Cannabiskonsum stark von der Ausgangssituation des Konsumenten abhängig. So nehmen aktuelle Befindlichkeit und Zustand des Konsumenten („Set“), aber auch die Umgebung („Setting“) Einfluss auf das Rauscherlebnis [5, 11, 25]. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Gewalttätigkeit im Zusammenhang mit Cannabiskonsum ein kontrovers diskutiertes Thema. In einer Studie von Tönnies et al. [25] konnte gezeigt werden, dass aggressive Verhaltensweisen unter Cannabiseinfluss im Vergleich zum

Alkoholkonsum signifikant seltener auftraten und diese auch nicht mit der Wirkstoffkonzentration korrelierten. Stattdessen zeigte sich tendenziell, dass Aggressivität durch Cannabiskonsum vielmehr reduziert als gesteigert werde. Nur in Ausnahmefällen und unter bestimmten individuellen Vorbelastungen wird eine Zunahme der Enthemmung und damit eine Steigerung des Gewaltpotentials für möglich erachtet. Eine Cannabisintoxikation kann zu einer meist nur wenige Stunden anhaltenden Cannabispsychose führen, in denen psychotische Zustände mit schizophrenen Symptomen wie Wahn- und Angstvorstellungen beschrieben wurden. Die Existenz eines eigenständigen Krankheitsbildes in Form einer „cannabis-induzierten Psychose“ wird jedoch bezweifelt [25].

1.5 Deutung eines positiven Cannabinoidnachweises im Hinblick auf forensische Fragestellungen

THC stellt einen Marker für den aktuellen Cannabiskonsum dar und kann bereits Sekunden nach inhalativer Aufnahme im Blut detektiert werden. Maximale Plasmakonzentrationen lassen sich wenige Minuten nach Rauchbeginn messen [9, 11]. Ein aktueller Konsum (≤ 6 h zurückliegend) liegt nach Tönnes [26] mit hoher Wahrscheinlichkeit vor, wenn eine der nachfolgenden Konzentrationen im Serum bestimmt wurden: $\text{THC} \geq 10,58 \text{ ng/mL}$ oder $\text{THC-OH} \geq 5,46 \text{ ng/mL}$ oder $\text{THC/THC-COOH} \geq 0,19 \text{ ng/mL}$ oder $\text{THC} \geq 1,42 \text{ ng/mL}$ und $\text{THC-COOH} \leq 16,29 \text{ ng/mL}$ [25, 26]. Jedoch kann die gemessene THC-Blutkonzentration von der Gewebekonzentration am Wirkort abweichen, da THC aufgrund der Lipophilie besonders in fettreichen Geweben akkumuliert und aus diesen Kompartimenten nur langsam ins Blut zurück diffundiert [2, 5].

Nach einmaligem Konsum können THC und THC-OH etwa 4-6 h im Serum nachgewiesen werden. THC-COOH ist mit 2-3 Tagen im Serum bzw. Urin deutlich länger detektierbar und kann bei regelmäßigem Cannabismisbrauch bis zu drei Monaten im Urin bestimmt werden [11, 21]. Nach oraler Cannabiszufuhr soll eine höhere THC-OH-Konzentration im Blut detektierbar sein als nach inhalativer Aufnahme, sodass das Verhältnis von THC zu THC-OH möglicherweise Rückschlüsse auf die Konsumart geben kann [27].

Blutanalysen auf THC-COOH dienen der Differenzierung, ob einmaliger, gelegentlicher oder regelmäßiger Konsum stattfand. Zusätzlich bestimmte THC-Konzentrationen können für Aussagen über den aktuellen Konsum herangezogen werden. Liegen die THC-COOH-Konzentrationen $< 5,0 \text{ ng/mL}$, kann ein einmaliger, bei $\geq 5,0 \text{ ng/mL}$ und $< 75 \text{ ng/mL}$ ein gelegentlicher

und bei THC-COOH-Konzentrationen > 75 ng/mL ein regelmäßiger Konsum unterstellt werden. Die hohen THC-COOH-Konzentrationen bei regelmäßigem Konsum kommen durch Kumulationseffekte aufgrund verzögerter Eliminationskinetik zustande [28]. Der Gesetzgeber gibt für „gelegentlichen“ Konsum keine Häufigkeit an, sondern beruft sich auf die im allgemeinen Sprachgebrauch gängige Definition. Somit findet „gelegentlicher“ Konsum häufiger als einmal statt, bleibt aber hinter dem regelmäßigen zurück [29]. Weiterhin gilt, dass ein THC-positiver Serumbefund ebenfalls durch passive Inhalation möglich ist, wenn ein hochempfindliches Nachweisverfahren zugrunde gelegt wird und eine enge räumliche Beziehung zum aktiven Konsumenten (kleiner, unbelüfteter Raum) bestand [30].

Zur Differenzierung des Konsummusters wird die Blutanalyse der Urin- bzw. Haaranalytik bevorzugt. Die Aussagekraft eines positiven THC-Nachweises im Haar wird aktuell kritisch diskutiert, da bei einem positiven Nachweis von Cannabinoiden im Haar nicht eindeutig geklärt werden kann, ob der Untersuchte selbst cannabishaltige Zigaretten konsumiert hat oder ob lediglich eine Kontamination stattfand [12, 16, 31, 32]. Mit dem Nachweis von THCA-A stieg die Wahrscheinlichkeit, dass der Untersuchte zumindest direkten Kontakt zu cannabishaltigen Produkten gehabt haben muss, da es größtenteils durch Streichen mit kontaminierten Fingern durch das Haar bei dem „Drehen“ eines Joints zu einer Einlagerung von THCA-A kommt [1, 16, 18]. Lediglich die Erfassung der Metabolite THC-OH [33] und THC-COOH [10, 14, 15, 34, 35] im Haar können als Indiz für aktiven Drogenkonsum angesehen werden, da diese nicht von der Pflanze, sondern ausschließlich über körpereigene Metabolisierung gebildet werden. Jedoch kann THC-COOH auch durch Körperkontakt auf das Haar anderer Personen übertragen werden [16].

1.6 Rechtliche Aspekte zum Cannabiskonsum

Der Cannabiswirkstoff THC ist im Betäubungsmittelgesetz [24] (Anlage 1 zu § 1 Absatz 1) gelistet und gehört entsprechend nicht zu den verkehrsfähigen Stoffen. Außer mit einer Genehmigung, die u. a. zu wissenschaftlichen Zwecken ausgestellt wird, sind Anbau, Zucht, Ein- und Ausfuhr usw. gemäß § 29 Betäubungsmittelgesetz strafbar [24] und können mit bis zu fünf Jahren Haftstrafe oder einer Geldbuße geahndet werden [2]. Nur in begründeten Ausnahmefällen wird der käufliche Erwerb von Cannabisblüten durch einen Antrag bei dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte [23] erlaubt. Dies kann erfolgen, wenn nachweislich eine Therapie mit den in Deutschland zugelassenen Cannabisersatzpräparaten kontraindiziert ist oder diese nicht von den Krankenkassen erstattet werden. Dem Antrag auf Selbsttherapie ist

eine ärztliche Stellungnahme beizufügen [23, 24]. In einer aktuellen Einzelfallentscheidung wurde einem an Multipler Sklerose erkrankten Mann vom Bundesverwaltungsgericht in Leipzig sogar eine Ausnahmegenehmigung zum Anbau von Cannabis für den Eigenbedarf erteilt [36]. Sedierung, Verlängerung der Reaktionszeit, Einschränkung der Konzentrationsfähigkeit und Störungen der Motorik stellen die Hauptaspekte dar, die für typische Fahrauffälligkeiten verantwortlich sind [5, 11]. Entsprechend ist die aktive Teilnahme am Straßenverkehr unter Cannabiseinfluss nach aktueller Gesetzeslage nicht erlaubt. Ein wissenschaftlich akzeptierter Grenzwert für Cannabinoide konnte bisher auf Basis der THC-Konzentration in Analogie zur 1,10 ‰-Grenze für Alkohol nicht etabliert werden [11]. Dass THC kein verlässlicher Marker ist, auf dessen Grundlage juristisch anerkannte Grenzwerte definiert werden können, ist u. a. mit der polyphasischen Eliminationskinetik des THC (Kapitel 1.1) zu begründen. Folglich kann sich die THC-Konzentration zwischen Polizeikontrolle und Blutentnahme (Zeitspanne bis zu 2 h) erheblich reduzieren, wie Drasch et al. [13] zeigten. Somit lässt sich auf die THC-Konzentration zum Abnahmezeitpunkt nicht sicher schließen [13]; ggf. kann die THC-Konzentration innerhalb dieser Zeitspanne sogar unterhalb der rechtlich relevanten Konzentration von 1 ng/mL absinken [37].

Durch Berechnung des Cannabis-Influence-Factors (CIF) entsprechend der „vereinfachten“ Formel von Daldrup und Meininger [13] (Gleichung 1) hingegen erhält man einen dimensionslosen Wert, der besser mit den Ausfallerscheinungen (insbesondere Konzentrationsfähigkeit) und Zeugenfeststellungen über Fahrauffälligkeiten zum Tatzeitpunkt korrelieren soll als die bloße THC-Konzentration [11, 13].

$$\text{CIF}_{\text{vereinfacht}} = \frac{c_{\text{THC}}[\text{ng/mL}] + c_{\text{THC-OH}}[\text{ng/mL}]}{c_{\text{THC-COOH}}[\text{ng/mL}]} * 100 \quad (1)$$

Gleichung 1: Berechnung des CIF mit der „vereinfachten“ Formel von Daldrup und Meininger (nach Drasch et al. [13])

Zudem gäbe es in einem Zeitraum von $t \leq 2$ h keine Veränderungen des CIF (Zeitraum zwischen polizeilichen Tests und Blutentnahme), was den CIF somit innerhalb dieser Zeitspanne als Grenzwert geeignet erscheinen lässt. Es wurde geschlossen, dass ab einem $\text{CIF} > 10$ eine absolute Fahruntüchtigkeit vorliege [13], was in etwa mit einem Alkoholwert von 1,10 ‰ korrelieren soll [1, 2, 38]. Für die Berechnung des CIF sind die Bestimmungen der Konzentrationen von THC, THC-OH und THC-COOH unerlässlich (Gleichung 1), sodass diese Cannabinoide zwangsläufig in einem entsprechenden Detektionsverfahren mit erfasst werden müssen [13,

39]. Obwohl der CIF besser mit den Fahrauffälligkeiten korrelieren soll als die bloße THC-Konzentration, wurde dieser zur Beurteilung der Fahrtüchtigkeit in der ständigen Rechtsprechung bisher kaum berücksichtigt [11].

Unter forensischen Gesichtspunkten kann eine zutreffende Rückrechnung auf den Konsumzeitpunkt auch Urteilsbildung und Strafmaß beeinflussen. Mit den bisher bekannten Rechenmodellen (einschließlich CIF) kann eine befriedigende Berechnung des Konsumzeitpunktes außerhalb von Laborbedingungen jedoch nicht gewährleistet werden. Lediglich die Rechenformeln von Huestis et al. [40] lieferten zumindest teilweise zufriedenstellende Resultate. Ungeachtet der ermittelten Konzentration zum Tatzeitpunkt sind eine Verminderung der Schuldfähigkeit und eine Einschränkung der strafrechtlichen Verantwortung nach Cannabiskonsum im Regelfall nicht zu erwarten. Lediglich bei Wahn- oder Angstzuständen ist im Einzelfall von einer Beeinträchtigung der Schuldfähigkeit (bis hin zur dessen Aufhebung) auszugehen [25].

Aktuell wird ein Gefährdungspotential beim Führen eines Kraftfahrzeuges ab einer Serumkonzentration von 1 ng/mL THC gesehen [11]. Folglich können nach § 24a Straßenverkehrsgesetz (StVG) Ordnungswidrigkeiten, aber auch Straftaten wegen eingeschränkter Fahrsicherheit gemäß §§ 315c und 316 Strafgesetzbuch [41] (fahrlässige oder vorsätzliche Gefährdung des Straßenverkehr aufgrund Konsum berauschender Mittel) begangen werden, wenn ein Kraftfahrzeug unter dem Einfluss von ≥ 1 ng/mL THC im Serum geführt wird und zusätzlich charakteristische Fahrauffälligkeiten vorliegen, die eine relative bzw. absolute Fahruntfähigkeit begründen [13, 41, 42]. Die Rechtsprechung beruft sich in ihren Urteilen auf die von der Grenzwertkommission angegebene Konzentration von 1 ng/mL THC im Blutserum [42–44], bei der es sich um eine „analytische“ Grenzwertkonzentration handele, die nicht zwingend mit der Wirkung gleichzusetzen sei [43]. Zwar kann nach neueren Empfehlungen erst ab einer THC-Konzentration von ≥ 2 ng/mL mit Leistungseinschränkungen und ab ≥ 4 ng/mL mit erhöhtem Unfallrisiko gerechnet werden, dennoch ist eine Neubewertung des bestehenden Grenzwertes nicht vorgesehen [45]. In einem aktuellen Gesetzesentwurf wird dagegen erstmalig eine Erhöhung des Grenzwertes auf 5,0 ng/mL THC im Blutserum gefordert. Zugleich sollen u. a. Cannabis aus dem Betäubungsmittelgesetz gestrichen und ein streng kontrollierter legaler Markt eingeführt werden [43].

Nicht nur Vollblut bzw. Blutserum sind für die Analytik zum Nachweis von Cannabiskonsum von besonderem Interesse, sondern auch Haare werden u. a. für die Fahreignungsdiagnostik im Rahmen der Drogenabstinenzkontrolle herangezogen. Bei positivem THC-Nachweis im Haar kann ein medizinisch-psychologisches Gutachten angefordert werden, mit dem geprüft werden

soll, in welchem Umfang der Betroffene cannabishaltige Produkte im zurückliegenden Zeitraum konsumiert hat und ob dieser zwischen Konsum und Teilnahme am Straßenverkehr trennen kann [28, 46]. Aus aktueller Literatur geht hervor, dass ein positiver Nachweis von Cannabinoiden im Haar nicht auf ein retrospektives Konsummuster schließen lässt, da eine ausschließliche Einlagerung über den Blutfluss nicht gegeben ist [16]. Dennoch soll die Haaranalyse auf Cannabinoide Bestandteil der Fahreignungsdiagnostik bleiben, insbesondere bei nachgewiesenen Metaboliten kann auf stattgefundenen Konsum geschlossen werden. Die Interpretation der erzielten Analyseergebnisse ist allerdings vom Einzelfall abhängig und positive Nachweise sollen allenfalls richtungweisend sein [47].

Dass Cannabis eine der häufigsten illegal konsumierten Drogen weltweit ist, wird nicht nur in zahlreichen Literaturstellen, sondern auch anhand der im Jahr 2012 vom Bundeskriminalamt [48] registrierten 106.215 Straftaten in Verbindung mit Cannabis deutlich. Aber auch der ständige Zuwachs der positiven Cannabisnachweise am hiesigen Institut für Rechtsmedizin [49] (Abb. 3) hebt die Notwendigkeit einer robusten, sensitiven und ökonomischen Nachweismethode deutlich hervor.

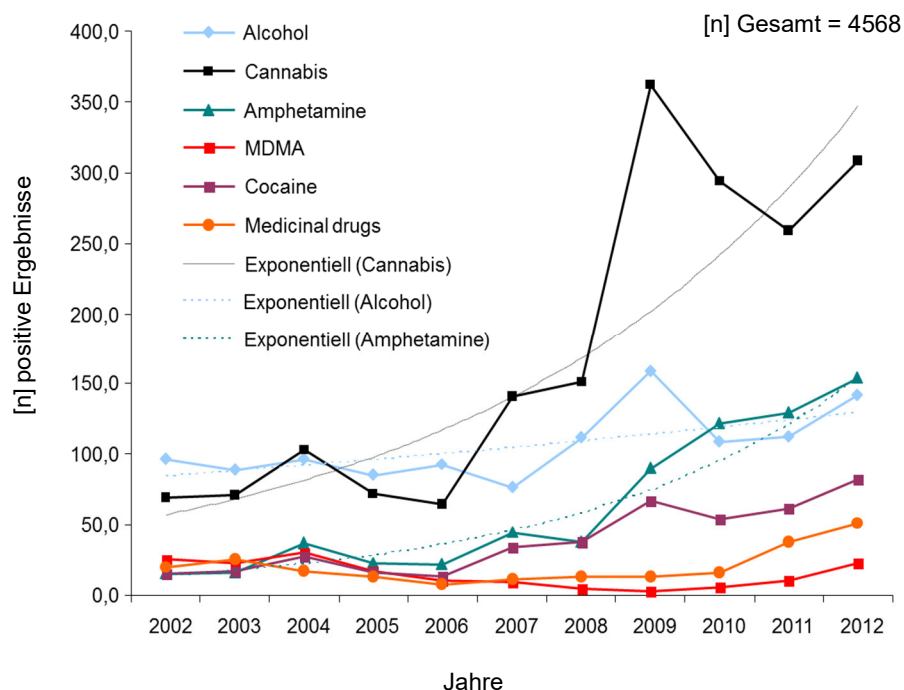


Abb. 3: Verlauf der positiven Nachweise für Cannabis und weitere Drogen zwischen 2002 bis 2012 am Rostocker Institut für Rechtsmedizin (aus Nowotnik [49])

Wie aktuellen Ringversuchsergebnissen zu entnehmen, setzen die Mehrzahl der teilnehmenden Laboratorien Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) als Verfahren der Wahl – trotz modernerer Alternativmethoden wie Liquid-Chromatography/tandem Mass

Spectrometry (LC-MS/MS) – zur Detektion von Cannabinoiden ein. Vorteile der GC/MS-Analytik sind u. a. die geringeren Kosten – sowohl in der Anschaffung des Gerätes als auch in der Unterhaltung – und die jahrzehntelange Expertise im Vergleich zur LC-MS/MS-Analytik.

1.7 Zielstellung

Es war Ziel dieser Arbeit, Nachweisverfahren für die GC/MS-Analytik für Cannabinoide (THC, THC-OH, THC-COOH, CBN, CBD und THCA-A) zu optimieren, die ökonomisch und zeitsparend sein sollen, zugleich aber auch die aktuellen Empfehlungen der chemisch-toxikologischen Untersuchung (CTU) [50], der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) [44, 51, 52] und der Society of Hair Testing (SoHT) [53] berücksichtigen. Primär sollte untersucht werden, ob der Einsatz höherer Alkyljodide als Derivatisierungsreagenz zu einer besseren massenspektrometrischen Detektion im Vergleich zur Alkylierung mit Iodmethan führen kann und ob damit eine Steigerung der Performance (Selektivität, Spezifität, Genauigkeit, Empfindlichkeit etc. [54]) einhergeht.

Ein weiteres wesentliches Ziel bestand darin, mit der Verwendung kommerziell bisher nicht erhältlicher Trialkylsulfoniumsalze als Alkylierungsreagenz zum Nachweis von Cannabinoiden in verschiedenen Matrices (Serum, Haare und Urin) eine GC/MS-Methode zu entwickeln, die im Gegensatz zur Alkylierung mit Alkyljodiden potentiell weniger arbeits- und zeitaufwendig ist.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Extraktionsverfahren und Methoden der Derivatisierung in der Gaschromatographie

Bevor das Untersuchungsmaterial einer Analyse auf Cannabinoide mittels GC/MS unterzogen werden kann, müssen die Analyten und der interne Standard (ISTD) möglichst selektiv aus dem Probenmaterial extrahiert, konzentriert und derivatisiert werden. In dieser Arbeit wurde dazu das Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) gewählt, mit dem die Cannabinoide aus einer flüssigen Phase (Serum, Urin, alkalisches Hydrolysat der Haare) in eine andere flüssige organische Phase entsprechend des Nernst'schen Verteilungssatzes [55] überführt werden. Da Cannabinoide mit Carboxylgruppen lipophil, jedoch aufgrund ihrer sauren Eigenschaften bei neutralem pH-Wert deprotoniert und somit geladen sind, muss die Matrix angesäuert werden, um eine Überführung dieser Cannabinoide in ein organisches Lösungsmittel (z. B. 1-Chlorbutan) zu ermöglichen. Nach Eindampfen des Extraktionsmittels kann eine Alkylierung erfolgen. Eine sich der Derivatisierung anschließende zweite LLE führt zur Isolierung der Alkyl-Cannabinoide aus dem Reaktionsmedium, bestehend aus Dimethylsulfoxid (DMSO), Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) und einem Alkyljodid (RI).

Alternativ zur LLE kann eine Festphasen-Extraktion zur Isolierung der Cannabinoide durchgeführt werden. Bei der Festphasen-Extraktion können unter Verwendung von Octadecylsilan-Säulenmaterialien je nach Aufarbeitungsmethode abweichende Konzentrationen von THC-COOH bestimmt werden, da es zu einer partiellen Mitextraktion von THC-COOH-Glucuronid kommt. Dies führt wiederum zu einer artifiziellen Erhöhung des THC-COOH-Wertes nach Derivatisierung mit Silylierungsreagenzien und folglich zu falsch hohen Messwerten [2, 56].

Auch bei Alkylierung im System DMSO, TBAH und RI kann es zu einer artefaktischen Konzentrationserhöhung von THC-COOH kommen, da THC-COOH-Glucuronid unter den stark alkalischen Bedingungen der Methylierung leicht zu THC-COOH und Glucuronsäure hydrolysiert wird [57]. Aufgrund der in dieser Arbeit gewählten Extraktionsweise (siehe Kapitel 3.5.2) wird THC-COOH-Glucuronid jedoch nicht erfasst, da dessen Polarität zu hoch ist, um mit 1-Chlorbutan im sauren Milieu extrahiert zu werden.

Eine Derivatisierung ist in der gaschromatographischen Analytik ein oftmals eingesetztes Verfahren, mit dessen Hilfe die polaren, funktionellen Gruppen der Analyten in apolare umge-

wandelt werden können. Durch diese Modifikation soll u. a. eine Verringerung des Siedepunktes und Erhöhung der thermischen Stabilität sowie der Lipophilie erzielt werden, sodass sich die Gefahr der pyrolytischen Zersetzung reduziert [35, 55]. Weiterhin kann so die Säulentemperatur herabgesetzt werden, was das „Säulenbluten“ verringert und so deren Haltbarkeit steigert [55]. Die mit der Derivatisierung erzeugten Massenzunahme der Analyten erhöht zudem häufig die Sensitivität der Messmethode, da sich die Massen der Analyten deutlicher von denen der Matrix differenzieren, was eine spezifischere Detektion zur Folge haben kann [35]. Mit der derivatisierungsbedingten Abnahme der Polarität nähert sich die Peakform einer Normalverteilung (Reduzierung des Peaktailings bzw. -frontings), was mit einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit verbunden ist [35, 55, 58]. Da THC-OH und THC-COOH aufgrund von zwei hydrophilen Gruppen höhere Polaritäten als THC aufweisen, ist eine Modifikation hin zu lipophileren Derivaten hier von besonderer Bedeutung, da ohne Derivatisierung diese Analyten gaschromatographisch nicht detektierbar sind [19, 35].

Eine für Cannabinoide verwendete Derivatisierungsmethode stellt die Acylierung bspw. mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) [7] oder Pentafluorpropionsäureanhydrid dar. Stark saure Gruppen können nicht acyliert werden, entsprechend muss für die Derivatisierung der Carboxylgruppe von THC-COOH ein zusätzliches Alkylierungsmittel wie Heptafluorisopropanol [35] oder 1,1,1,3,3-Pentafluorpropanol [59] eingesetzt werden.

Ein weiteres Verfahren ist die Silylierung u. a. mit N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) [19, 31, 60] oder mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) [14, 61, 62]. Bei der Silylierung kann es in Abhängigkeit von dem Silylierungsreagenz unter Umständen zu Reaktionen zwischen dem Injektor und dem Silylierungsmittel kommen, sodass sich im Verlauf die Detektorempfindlichkeit verringert [58] und dieser unbrauchbar werden kann [63]. Eine andere Methode ist die Alkylierung der Cannabinoide über Iodmethan [27, 39, 64–66]. Sporkert et al. [67] führten zudem Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) als Methylierungsreagenz für Cannabinoide ein.

2.2 Grundlagen der Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie ist ein physikalisch-chemisches Verfahren in der Analytik, um Moleküle aus Gemischen zu separieren. Voraussetzung ist, dass die Moleküle thermostabil sind und sich in die Gasphase überführen lassen [1, 58, 68, 69]. In einem beheizbaren Injektor wird ein einstellbares Volumen des zu analysierenden Extraktes über ein Septum in den Liner injiziert. Über eine mobile Phase (i. d. R. ein inertes Trägergas wie Stickstoff oder Helium) werden die

einzelnen Moleküle des Gemisches über die stationäre Phase der Kapillarsäule (Abb. 4) geleitet, mit der sie u. a. aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität und ihres spezifischen Molekulargewichtes interagieren und somit chromatographisch getrennt werden. Polare Moleküle mit hohem Dampfdruck sollten bei Verwendung apolarer Säulen durch Derivatisierung (Alkylierung, Silylierung, Acylierung etc.) zuvor modifiziert werden, um deren Polarität herabzusetzen [1, 58, 68, 69], wie bereits im vorherigen Abschnitt aufgeführt.

Nach der gaschromatographischen Separation der einzelnen Moleküle werden diese am Ende der Kapillarsäule einem Massenspektrometer zugeführt. Dabei werden die Moleküle im Vakuum mittels Elektronenstoßionisation (EI) ionisiert. Die zugeführte Energie von 70 eV [1] führt im Allgemeinen zur Bildung von Molekülionen, aber auch zu molekülspezifischen Fragmentationen mit charakteristischen Masse/Ladungs-Verhältnissen (m/z). Diese so entstandenen Ionen werden im Massenspektrometer detektiert.

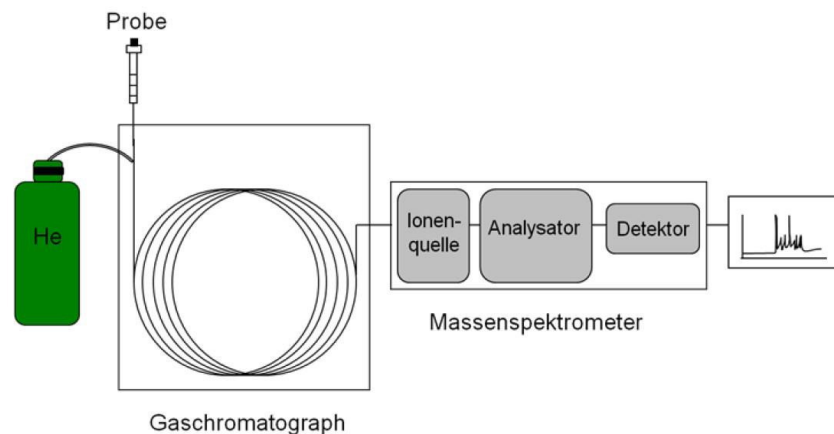


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer (aus Roth [1])

Bei Verwendung von Single-Quadropolmassenspektrometern ist zwischen zwei verschiedenen Messmodi zu unterscheiden: Im Totalionenstrom (Scan-Modus) werden alle Molekül- und Fragmentationen in einem festgelegten Massenbereich detektiert. Die somit innerhalb eines Peaks generierten Massenspektren lassen sich durch Abgleich mit Datenbanken idealerweise eindeutig einer Substanz zuordnen [1, 69].

Hingegen werden im Selected-Ion-Monitoring (SIM) lediglich Fragmentationen mit ausgewählten m/z -Verhältnissen erfasst. Dadurch kann die Sensitivität erheblich gesteigert werden. Eine eindeutige Substanzidentifizierung erfolgt in diesem Fall über die selektierten spezifischen Ionen, die zu einer bestimmten Retentionszeit (RT) auftreten und bestimmte Verhältnisse zueinander aufweisen müssen [1, 39, 69]. Ein weiteres Kriterium zur Substanzidentifizierung ist das Vorhandensein der chronologisch leicht vorversetzten SIM-Ionen der deuterierten Substanzanaloga nahe der RT der Analyten [39].

3 Materialien und Methoden

3.1 Reagenzien und Standardsubstanzen

Folgende Lösungsmittel, Reagenzien und Standards wurden verwendet:

- DMSO, *iso*-Octan, Acetonitril, Aceton, Salzsäure (HCl), Dinatriumhydrogenphosphat, Diethylether von Merck (Darmstadt, Deutschland)
- TBAH (40 %ige wässrige Lösung), Ethylacetat, *tert*-Butylmethylether (TBME), Silber(I)oxid, Dipropylthioether, Diisopropylthioether, Dibutylthioether, Iodmethan, 1-Iodethan, 1-Iodpropan, 2-Iodpropan, 1-Iodbutan, 1-Iod-2-methylpropan, 2-Iod-2-methylpropan, 1-Iodpentan, 1,1,1-Trifluor-2-iodethan, 1,1,1-Trifluor-3-iodpropan, MSTFA, Trimethylsulfoniumhydroxid, Cyclohexan von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- 1-Chlorbutan von Acros (Geel, Belgien)
- Triethylsulfoniumiodid von Alfa Aesar GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumhydroxid (NaOH), Methanol von Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Standardlösungen von THCA-A, THC, THC-D₃, THC-OH, THC-OH-D₃, THC-COOH, THC-COOH-D₃, CBN, CBN-D₃, CBD, CBD-D₃, Buprenorphin, Buprenorphin-D₄ von Lipomed (Arlesheim, Schweiz):

Alle hier aufgeführten Standardlösungen waren methanolische Lösungen in einer Konzentration von 1 mg/mL bzw. 100 µg/mL (deuterierte Analoga). Ausgehend von den oben genannten Standardlösungen wurden Arbeitslösungen durch Verdünnung mit Methanol hergestellt.

3.2 Probenaufarbeitung: Übersicht verwendeter Geräte

In Tab. 1 sind alle verwendeten Geräte aufgeführt. Materialien wie Pipetten, Pipettenspitzen u. a., die standardmäßig in einem chemischen Labor vorhanden sind, sind nicht gelistet.

Tab. 1: Auflistung verwendeter Geräte

Geräte (Hersteller)	Verwendungszweck
Trockenschrank Modell 200 (Mettler)	Derivatisierung der Proben, Inkubation zur alkalischen Hydrolyse, Synthese der Trialkylsulfoniumiodide
Rüttler Typ Vibrax VXR und MS2- Minishaker (IKA)	LLE der Proben
Turbovap LV (Biotage)	Einengen der Lösungsmittel
Sonorex TK 52 Ultraschallbad (Badelin)	Synthese von Trialkylsulfoniumhydroxiden (TASH)
Sonorex Digitec (Badelin)	Dekontamination der Haarmatrix
Feinwaage MC1 Analytic AC 210S (Sartorius)	Abwiegen der Haarmatrix
Tischzentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus)	Zentrifugation von Serummonovetten
Zentrifuge Typ 5804 R (Eppendorf)	Zentrifugation des Probenmaterials
Mikroliterflasche (GC/MS Vial) 0,9 mL mit Aluminiumkappen (IVA)	Aufbewahrung der derivatisierten Analyten zur Injektion in die GC/MS
Kugelmühle Modell 2001 (Retsch)	Pulverisieren der Haarmatrix
Mikrowelle Modell MG-5807C (LG)	Inkubation des Probengutes

3.3 GC/MS-Bedingungen und Software

Für die Basisvalidierung der Methoden wurde das Programm Valistat 2.00.1 der Firma Arvecon GmbH herangezogen. Weiterhin wurden für die Erstellung dieser Arbeit die Microsoft Office Programme Excel, Word und PowerPoint 2013 verwendet. Die Verwaltung der Quellen erfolgte mittels Citavi 4.0 der Swiss Academic Software GmbH, der Boxplot (Kapitel 4.6.6.5) wurde mit Hilfe von SigmaPlot (Version 11) erstellt. In Tab. 2 sind GC/MS-Messbedingungen und gerätetechnische Ausstattungen aufgelistet, die, wenn nicht gesondert aufgeführt, für die Untersuchungen genutzt wurden.

Tab. 2: GC/MS-Messbedingungen und gerätetechnische Ausstattungen (wenn nicht gesondert aufgeführt)

GC/MS	Agilent GC 6890 + MSD 5973 (Hewlett Packard)
Autosampler	Agilent 7683 (Hewlett Packard)
Injektor	Agilent 7683 Series G 2613A (Hewlett Packard)
Injektionsliner	Agilent Typ 5188-6574 (Hewlett Packard)
Injektionsmodus	splitless
Injektionsvolumen	2 μL
Injektortemperatur	290 °C
Trägergas	Helium, Flussrate 1 mL/min
GC-Temperaturprogramm	80 °C, 3 min halten, 20 °C/min bis 300 °C, 10 °C/min bis 320 °C, 8,5 min halten; Gesamtanalysezeit 24,50 min
Säule	apolare Säule Agilent CP8936; VF-5 ms 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm
Modus	Scan bzw. SIM
Software	Agilent MSD ChemStation D. 03.00.611 und E. 02.02.1431

3.4 Allgemeine Synthesevorschrift für Trialkylsulfoniumiodide

Zur Synthese der Trialkylsulfoniumiodide wurden 9 mL eines organischen Lösungsmittelgemisches (LMG) bestehend aus Acetonitril und Methanol in einem Verhältnis 7:2 (v/v) in ein 20 mL Headspace-Gefäß vorgelegt. Anschließend wurde ein bestimmtes Volumen (Tab. 3) eines Alkyljodides und des korrespondierenden Dialkylthioethers im molaren Verhältnis 2:1 (Abb. 15, Kapitel 4.2.4.5) in das Headspace-Gefäß gegeben [70].

Tab. 3: Volumina der Edukte für die Synthese der entsprechenden Trialkylsulfoniumiodide, $n = 0,04$ mol für die Alkyljodide, $n = 0,02$ mol für die Dialkylthioether; Dichte gemäß Herstellerangaben

Verbindung	Dichte [g/mL]	Molekulargewicht [g/mol]	Errechnetes Volumen [mL]
1-Iodpropan	1,743	169,99	3,9
Dipropylthioether	0,838	118,24	2,8
2-Iodpropan	1,703	169,99	3,9
Diisopropylthioether	0,814	118,24	2,9
1-Iodbutan	1,617	184,02	4,5
Dibutylthioether	0,838	146,29	3,5

3.5 Serumanalyse

3.5.1 Herstellung eines cannabinoidnegativen Serumpools

Um einen möglichst breiten, authentischen und cannabinoidnegativen Serumpool für die Untersuchungen verwenden zu können, wurde humanes Blut in 4 mL Serummonovetten steril abgenommen und bis zur Koagulation bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde das gewonnene Serum entnommen, gepoolt und in Portionen zu je 1 mL in 1,5 mL Reagenz-Gefäßen abgefüllt und bei -25 °C eingefroren.

3.5.2 Aufarbeitung von Seren und Derivatisierung mit Alkyljodiden

Für die Ausgangsuntersuchungen wurden die Cannabinoide THC, THC-OH und THC-COOH zuerst ohne Matrix, anschließend aus den Matrices Wasser und Serum nach folgender Vorgehensweise extrahiert und derivatisiert. Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die von Marschner [71] entwickelte Methode, welche mittlerweile bereits akkreditiert ist:

- (1) Zu 1 mL Matrix wurden die Analyten THC, THC-OH und THC-COOH sowie die deuterierten Analoga als interner Standard (ISTD) hinzugegeben
- (2) Ansäuern der Lösung durch Zugabe von 100 µL einer wässrigen 1 M HCl-Lösung
- (3) LLE mit 4 mL 1-Chlorbutan für 10 min auf dem Rüttler
- (4) Zentrifugation für 3 min bei 4000 rpm, abdekantieren der organischen Phase und anschließende Einengung bis zur Trockene bei 40 °C unter Druckluft
- (5) Derivatisierung der Cannabinoide nach Rekonstitution des Bodensatzes mit 50 µL einer 40 %igen wässrigen TBAH-Lösung, 200 µL DMSO und 50 µL RI
- (6) Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur, anschließend abstoppen der Derivatisierungsreaktion durch Zugabe von 100 µL einer wässrigen 1 M HCl-Lösung
- (7) LLE mit 3 mL *iso*-Octan für 20 min auf dem Rüttler
- (8) Zentrifugation der Lösung für 3 min bei 4000 rpm, nachfolgend abpipettieren und einengen der organischen Phase unter Druckluft bei 40 °C
- (9) Rekonstitution des Bodensatzes mit 50 µL Ethylacetat, vortexen und überführen in ein GC/MS-Vial und Messung mit GC/MS

Sofern die Cannabinoide ohne Matrix derivatisiert wurden, entfielen die Schritte 1-4.

3.5.3 Aufarbeitung von Seren und Derivatisierung mit Trialkylsulfoniumhydroxiden (TASH)

Die unter Kapitel 3.5.2 beschriebene Vorgehensweise für die Derivatisierung mit Alkyljodiden wurde bis einschließlich Punkt (4) unverändert für die Alkylierung der Cannabinoide mit den TASH-Lösungen befolgt. Nach dem Einengen der organischen Phase wurde der Bodensatz mit 25 µL TBME und 25 µL einer 0,1 M TASH-Lösung rekonstituiert, in ein GC/MS-Vial überführt und ggf. inkubiert (in Anlehnung an Sporkert et al. [67]). Danach erfolgte ohne weitere Aufarbeitungsschritte die Messung mit der entsprechenden GC/MS-Methode.

Für die Bestimmung von Buprenorphin nach Extraktion aus Serum wurde analog der Aufarbeitung und Derivatisierung der Cannabinoide mit TASH vorgegangen. Abweichend zu der genannten Extraktion wurde in Schritt (2) aus Kapitel 3.5.2 das Serum mit 1 mL Dinatriumhydrogenphosphat alkalisiert; die weiteren Schritte wurden unverändert beibehalten.

3.5.4 Kalibration

Die Berechnung der Grenzwerte erfolgte sowohl über das Signal/Noise-Verhältnis (S/N), als auch mit Hilfe der Kalibrierfunktion, welche sich nach linearer Regression aus den Mittelwerten der Sechsfachmessung ergaben. Die in Tab. 4 aufgeführten Kalibratoren wurden für die 5-Punkt-Kalibrierung verwendet.

Tab. 4: Kalibratorkonzentrationen für den Nachweis von THC, THC-OH und THC-COOH im Serum

Kalibratorkonzentration	1	2	3	4	5
THC [ng/mL]	0,5	1	2	3	4
THC-OH [ng/mL]	0,5	1	2	3	4
THC-COOH [ng/mL]	5	10	15	20	25

Als ISTD wurden folgende Konzentrationen gewählt: 10 ng/mL THC-D₃, 10 ng/mL THC-OH-D₃ und 20 ng/mL THC-COOH-D₃

3.6 Haaranalyse

3.6.1 Herstellung eines Haarpoools und Haarvorbehandlung

Für diverse Voruntersuchungen konnte auf asserviertes Probenmaterial eines authentischen THC-positiven Haarpoools eines Obduktionsfalles aus dem Rostocker Institut für Rechtsmedizin [72] zurückgegriffen werden.

Die Haare lagen bereits aufgrund früherer Analysen dekontaminiert und pulverisiert vor, sodass die unter 3.6.2 genannten Aufbereitungsschritte entfielen. Für die Untersuchungen wurden die Segmente 1-10 gepoolt und anschließend in einem luftdicht verschlossenem Gefäß bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die Validierungsmessungen wurde ein Haarpool aus dem Haarschnitt von Freiwilligen verwendet, die nach eigenen Angaben keine Betäubungsmittel konsumierten. Der gewonnene Haarpool wurde gründlich durchmengt und nacheinander in einer Detergenzlösung, Aceton und Diethylether im Ultraschallbad für je 15 min pro Lösungsmittel dekontaminiert. Nach Trocknung des Probenmaterials zwischen Filterpapier erfolgte die Zerkleinerung der Haare in einer Kugelmühle bis zur Pulverisierung. Anschließend wurde dieser Pool gründlich vermengt und in einem verschraubbaren Gefäß aufbewahrt.

Um Cannabinoidkonzentrationsprofile im Haar darzustellen, wurden in den Kapiteln 4.6.6.1 und 4.6.6.3 zwei Haarstränge von zwei freiwilligen Probanden analysiert, die anamnestisch über regelmäßigen Cannabiskonsum berichteten. Dazu wurden die Haare aus der Okzipitalregion des jeweiligen Probanden entnommen, mit der eben aufgeführten Aufarbeitung dekontaminiert und in Abschnitte zu je einem Zentimeter gegliedert. Anschließend erfolgte eine segmentweise Aufarbeitung und Analyse der gesamten Stränge nach der im folgenden Kapitel beschriebenen Vorgehensweise.

3.6.2 Aufarbeitung der Haarmatrix

Für die Validierungsmessungen und weiteren Analysen zur Cannabinoidbestimmung im Haar wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

- (1) 50 mg des Haarpoools wurden eingewogen, in ein 10 mL Plastikgefäß gegeben und mit Analyt (für die Basisvalidierung), 200 pg/mg THC-D₃ sowie 2 ng/mg CBN-D₃ bzw. CBD-D₃ als ISTD versetzt
- (2) Zugabe von 1 mL einer wässrigen 1 M NaOH-Lösung und Inkubation im Trockenschrank für 30 min bei 80 °C
- (3) Überführen des Hydrolysates in ein Reagenzglas mit anschließender LLE nach Zugabe von 4 mL 1-Clorbutan
- (4) Extraktion für 15 min auf dem Rüttler mit nachfolgender Zentrifugation für 3 min bei 3000 rpm
- (5) Überführen der organischen Phase in ein Zentrifugenglas, anschließend einengen des Lösungsmittels bei 40 °C unter Druckluft bis zur Trockene

- (6) Rekonstitution des Bodensatzes mit 25 μL TBME und 25 μL der jeweiligen TASH-Lösung, vortexen und überführen in ein GC/MS-Vial
- (7) Inkubation für 30 min bei 80 °C im Trockenschrank, Messung mit GC/MS

Da in bestimmten Fällen auch der Nachweis von CBN und CBD als Plausibilitätskontrolle gefordert wird [51], wurden diese im Rahmen der Messungen zu den Kapitel 4.6.6.1 und 4.6.6.3 semiquantitativ mitbestimmt. THCA-A konnte qualitativ nur in dem Haarstrang, der in Kapitel 4.6.6.3 dargestellt ist, bestimmt werden. Um die zusätzliche Bestimmung der THCA-A durchführen zu können, musste nach Abpipettieren der organischen Phase (Schritt 5) erneut eine LLE des Hydrolysates mit einem LMG bestehend aus 1-Chlorbutan und Ethylacetat (3/1, v/v) durchgeführt werden; die nachfolgenden Schritte erfolgten wie oben aufgeführt.

3.6.3 Kalibration

Mit der Wahl der in Tab. 5 aufgelisteten Kalibratorkonzentrationen wurde versucht, einen Kompromiss zwischen den Grenzwertempfehlungen der GTFCh und SoHT einerseits und dem in der Literatur beschriebenen Erwartungsbereich für die THC-Konzentrationen im Haar (zwischen 0,06-7,6 ng/mg) [15] andererseits einzugehen.

Tab. 5: Kalibratorkonzentrationen für den Nachweis von THC im Haar

Kalibratorkonzentration	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
THC [pg/mg]	10	20	50	100	200	500	700	1000	2000	3000

3.7 Urinanalyse

Für die Analysen wurden authentische, bereits positiv auf THC-COOH getestete, asservierte Urinproben des Rostocker Instituts für Rechtsmedizin verwendet.

- (1) Zu 1 mL Urin wurden 20 ng/mL THC-COOH-D₃ (ISTD) hinzugegeben
- (2) Alkalisieren des Urins mit 200 μL einer 1 M NaOH-Lösung (Glucuronidspaltung), vortexen und Inkubation bei 80 °C im Trockenschrank für 1 h
- (3) Ansäuern des Urins durch Zugabe von 300 μL einer 1 M HCl-Lösung
- (4) LLE mit 4 mL 1-Chlorbutan für 10 min auf dem Rüttler

- (5) Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm, Überführung der organischen Phase in ein Zentrifugenglas mit nachfolgendem Einengen bei 40 °C unter Druckluft bis zur Trockene
- (6) Rekonstitution des Bodensatzes mit 50 µL MSTFA bzw. 25 µL TESH und 25 µL TBME, GC/MS-Messung

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Voruntersuchungen

4.1.1 Derivatisierung der Cannabinoide mit Alkyljodiden

Die wie in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Derivatisierungs- und Messvorgänge im GC/MS-Scan führten zu Totalionenchromatogrammen (TIC), aus denen die für die Erstellung einer SIM-Methode benötigten Molekül- und Fragmentationen sowie die RT ermittelt wurden. Abb. 5 zeigt beispielhaft das Massenspektrum und Fragmentierungsmuster des ethylierten THC-Derivates ($c = 3 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ Ethylacetat) nach EI. Es konnten u. a. drei Fragmentationen sowie das Molekülion (m/z 342) identifiziert werden. Die Ionen mit der höchsten Intensität (ethyliertes THC: m/z 327, 342 und 313; RT 13,76 min) wurden zum Aufbau einer SIM-Methode herangezogen. Die entsprechenden Ionen des ISTD sind nicht dargestellt, ihre Massen liegen jeweils um 3 u höher als die der Analyten.

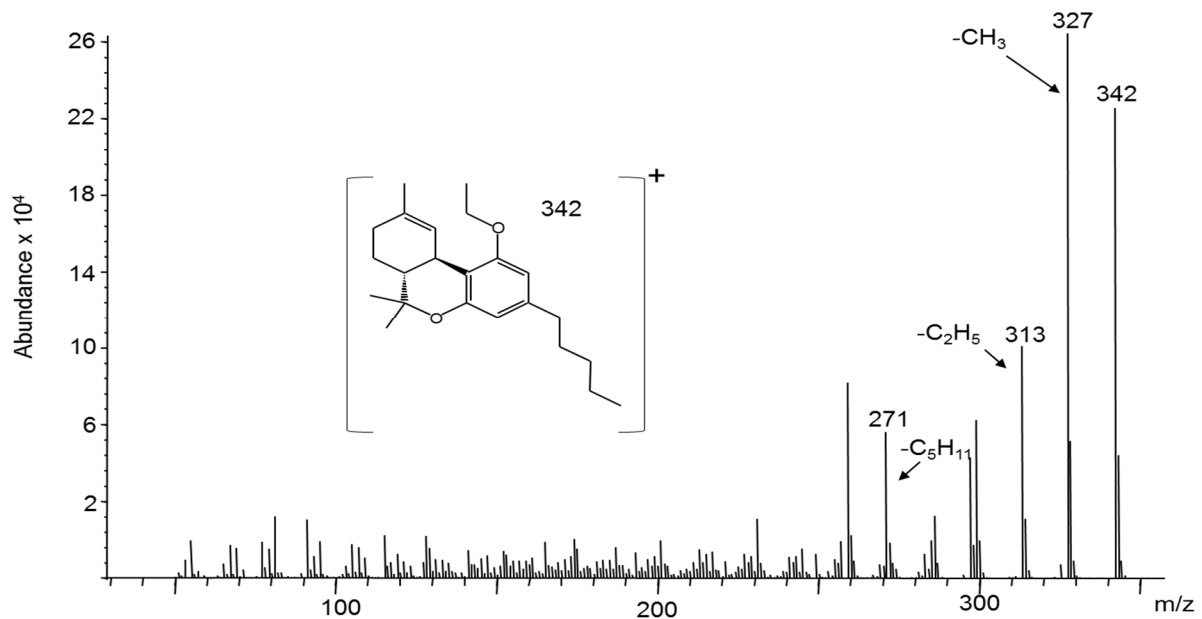


Abb. 5: EI-Massenspektrum und Fragmentierungsmuster des ethylierten THC-Derivates bei einer Konzentration von $c = 3 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ Ethylacetat

Neben der Ermittlung von SIM-Ionen aus den Massenspektren wurden die Alkylierungsreagenzien in Bezug auf das jeweilige Cannabinoid anhand der TIC kategorisiert (Tab. 6): Mit „+“ wurden alle Cannabinoidderivate versehen, bei denen im TIC ein prominenter Peak (ein Reaktionsprodukt) imponierte. Waren im Chromatogramm mindestens zwei prominente Peaks feststellbar, welche dem Analyten potentiell zuzuordnen waren, so erfolgte eine Bewertung mit „+/-“. Ein „-“ symbolisiert, dass eine Detektion des Analyten ohne Umsetzung stattfand (gilt

nur für THC) bzw. dass der Analyt aufgrund mangelnder Umsetzung nicht detektiert werden konnte (gilt für THC-OH und THC-COOH).

Tab. 6: Auswertung der TIC nach Derivatisierung von THC, THC-OH und THC-COOH ohne Matrix mit den aufgeführten Alkyljodiden; + ein Produkt, +/- mehrere Produkte, - kein Umsatz bzw. keine Detektion des Analyten

Alkylierungsmittel	THC	THC-OH	THC-COOH
1-Iodmethan	+	+	+
1-Iodethan	+	+	+
1-Iodpropan	+	+	+
2-Iodpropan	+	+/-	+
1-Iodbutan	+	+	+
1-Iod-2-methylpropan	+	+/-	+
2-Iod-2-methylpropan	-	-	-
1-Iodpentan	+	+	+
1,1,1-Trifluor-2-iodethan	+/-	-	-
1,1,1-Trifluor-3-iodpropan	-	-	-

n-Alkyljodide erwiesen sich als die geeignetsten Derivatisierungsreagenzien für THC, THC-OH und THC-COOH, da bei allen getesteten *n*-Alkyljodiden jeweils nur ein erwartetes Reaktionsprodukt detektiert wurde (Kategorisierung mit „+“ in Tab. 6). Bei THC-COOH und THC-OH traten mit zunehmendem Molekulargewicht des Derivatisierungsreagenzes Reduzierungen der absoluten Peakhöhen auf. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in den TIC der *iso*-alkylierten THC- bzw. THC-COOH-Derivaten in Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster der isomeren *n*-Alkyl-Cannabinoide nur ein prominentes Signal detektiert wurde. Zu THC-OH konnten jeweils zwei Peaks zugeordnet werden, wobei der intensivere ein Peaktailling aufwies. In den entsprechenden Chromatogrammen wurden sowohl einfach als auch doppelt *iso*-alkyliertes THC-OH identifiziert, entsprechend erfolgte die Kategorisierung mit „+/-“. Unter Verwendung von 2-Iod-2-methylpropan als Alkylierungsreagenz konnte lediglich undervivatisiertes THC detektiert werden, ein Signal von THC-OH und THC-COOH oder den entsprechenden Derivaten war nicht registrierbar (Kategorisierung mit „-“ in Tab. 6).

Alternativ zu den Alkyljodiden wurde getestet, ob Trifluoralkyljodide als Derivatisierungsreagenzien Verwendung finden können. Dreifach fluorierte Kohlenstoffatome sind aufgrund der starken Elektronegativität des Fluors (mit 3,98 höchste Elektronegativität) sehr elektrophil und reagieren entsprechend leicht mit nukleophilen Gruppen wie Phenolaten. Zudem wird durch die Anwesenheit von drei zusätzlichen Fluoratomen eine weitere Massenzunahme der Analyten erreicht, was zu einer Erhöhung der Signalintensitäten führen kann. Weiterhin zeichnen sich

fluorierte Derivate wegen erhöhter Lipophilie durch gute chromatographische Eigenschaften aus.

Mit 1,1,1-Trifluor-2-iodethan wurde lediglich eine Alkylierung des THC detektiert, für THC-OH und THC-COOH konnten keine Umsetzungen festgestellt werden. Es zeigte sich aber, dass es bei der Umsetzung mit 1,1,1-Trifluor-2-iodethan zu einer Abspaltung eines Fluoratoms statt des Iodatoms kam, sodass 1,1-Difluor-2-iodethan-THC (Peak 3 in Abb. 6) mit einer Masse von m/z 504 entstand. Zusätzlich waren ethyliertes THC (Peak 1) und underivatisiertes THC (Peak 2) im Chromatogramm nachweisbar.

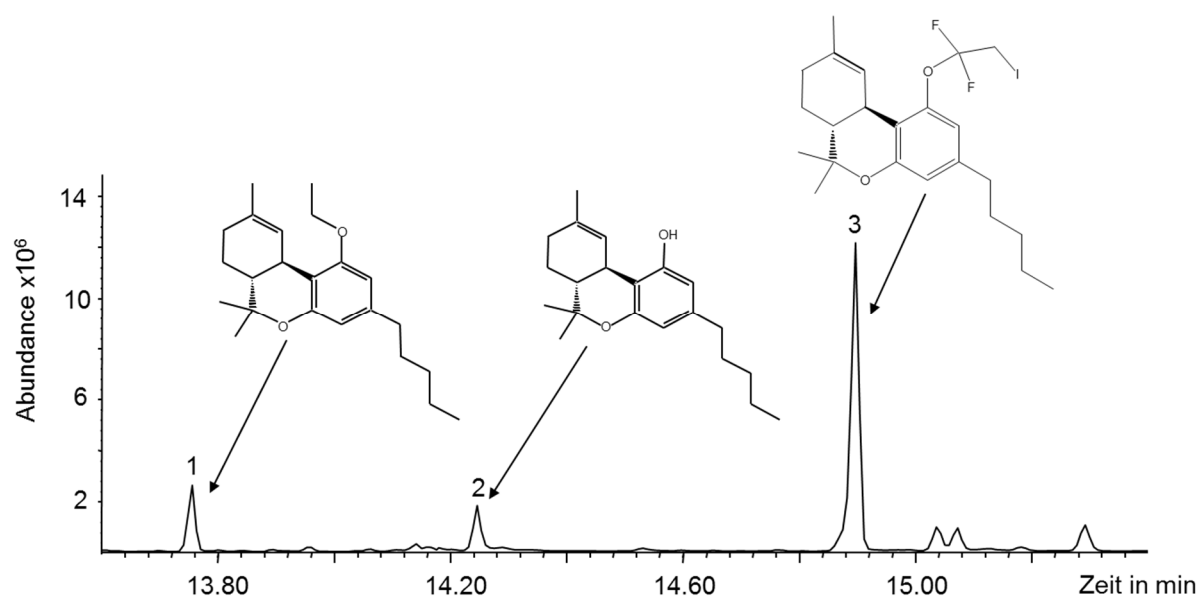


Abb. 6: TIC des mit 1,1,1-Trifluor-2-iodethan derivatisierten THC in einer Konzentration von $c = 3 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ Ethylacetat; Ethyl-THC (1), underivatisiertes THC (2), 1,1-Difluor-2-iodethyl-THC (3)

Mit 1,1,1-Trifluor-3-iodopropan konnte nur underivatisiertes THC detektiert werden. Ein Umsatz mit dem Reagenz war bei allen drei Analyten nicht zu beobachten.

4.1.2 Ermittlung von SIM-Ionen der Analyten, der ISTD und RT

Aus den TIC wurden die für die Erstellung von GC/MS-SIM-Methoden benötigten SIM-Ionen der alkylierten Analyten, der ISTD sowie die entsprechenden RT ermittelt (Tab. 7). Ionen, die in Tab. 7 mit „*“ markiert sind, wiesen die am wenigsten gestörten Messsignale auf und wurden zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen (BG) über $S/N = 10$ herangezogen. Gelb markierte Ionenpaare wurden als Quantifier, grüne Ionen (geringere Signalintensitäten als Quantifier-Ionen) als Qualifier für die Basisvalidierung verwendet. Die eben genannte Kennzeichnung wurde der Übersichtlichkeit halber lediglich für diejenigen Derivate vorgenommen, die für weitere Analysen von Bedeutung waren. Pro Alkylierungsreagenz wurde eine GC/MS-SIM-Methode

entwickelt, mit der die jeweiligen Cannabinoidderivate, die in Tab. 6 mit „+/-“ oder mit „+“ beurteilt wurden, simultan erfasst werden konnten. Für THCA-A wurden lediglich die Ionen des Analyten ermittelt, da ein deuteriertes Analogon nicht zur Verfügung stand.

Tab. 7: SIM-Ionen der Analyten, der ISTD und ermittelte RT der Cannabinoidderivate; * am wenigsten gestörte Ionen, Quantifier gelb, Qualifier grün

Derivatisierungsmittel	Analyt/ISTD	SIM-Ionen Analyt/ISTD [m/z]	RT [min]
Iodmethan/TMSH	THC/THC-D ₃	245/248, 313*/316, 328/331	13,71
	THC-OH/THC-OH-D ₃	313*/316, 358/361	14,48
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	313*/316, 357/360, 372/375	15,18
	CBN/CBN-D ₃	309/312, 324/327	13,94
	CBD/CBD-D ₃	243/246, 274/279, 342/345	12,94
	THCA-A	339, 386, 371	14,66
1-Iodethan/TESH	THC/THC-D ₃	313/316, 327*/330, 342/345	13,76
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (2 x ethyliert)	327*/330, 371/374, 386/389	14,75
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (1 x ethyliert)	313/316, 327*/330, 358/361	14,94
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	327*/330, 385/388, 400/403	15,52
	CBN/CBN-D ₃	323/326, 338/341	14,05
	CBD/CBD-D ₃	249/252, 302/305, 370/373	13,19
	THCA-A	339, 414, 369	14,84
1-Iodpropan/TPSH	THC/THC-D ₃	313/316, 341*/344, 356/359	14,07
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (2 x propyliert)	341*/344, 399/402, 414/417	15,35
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (1 x propyliert)	341*/344, 372/375, 329/332	15,23
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	341*/344, 413/416, 428/431	16,19
	CBN/CBN-D ₃	337/340, 352/355	14,35
	CBD/CBD-D ₃	277/280, 330/333, 398/401	13,72
	THCA-A	341, 383, 442	15,36
2-Iodpropan	THC/THC-D ₃	313*/316, 341/344, 356/359	13,69
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (2 x <i>iso</i> -propyliert)	341*/344, 399/402, 414/417	14,74
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (1 x <i>iso</i> -propyliert)	341/344, 372/299, 299/302	14,85
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	341*/344, 413/416, 428/431	15,47
1-Iodbutan/TBSH	THC/THC-D ₃	313/316, 355/358, 370*/373	14,37
	THC-OH/THC-OH-D ₃	355*/358, 427/430, 442/445	16,04
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	355*/358, 441/444, 456/459	17,01
	CBN/CBN-D ₃	366/369, 351/354	14,68
	CBD/CBD-D ₃	305/308, 358/361, 426/429	14,29
	THCA-A	341, 397, 470	16,01
1-Iod-2-methylpropan	THC/THC-D ₃	313/316, 355/358, 370*/373	14,18
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (2 x <i>iso</i> -butyliert)	355*/358, 367/370, 442/445	15,53
	THC-OH/THC-OH-D ₃ (1 x <i>iso</i> -butyliert)	355/358, 371/374, 386/389	15,36
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	355*/358, 399/402, 456/459	16,42
1-Iodpentan	THC/THC-D ₃	313/316, 369/372, 384*/387	14,77
	THC-OH/THC-OH-D ₃	369*/372, 455/458, 470/473	16,92
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	369*/372, 469/472, 484/487	18,09
1,1,1 Trifluor-2-iodethan	THC/THC-D ₃	460/463, 489/492, 504*/507	14,91
	THC-OH/THC-OH-D ₃	—————	—
	THC-COOH/THC-COOH-D ₃	—————	—

4.2 Serumanalyse

4.2.1 GC/MS-SIM-Messungen und Ermittlung der BG über das S/N-Verhältnis

Nach den durchgeführten Scan-Messungen schlossen sich zur genaueren Analyse GC/MS-SIM-Messungen an. Beispielhaft ist ein aus diesen Messungen resultierender Ausschnitt eines Ionenchromatogramms des ethylierten THC-Derivates (nach Serumextraktion) in Abb. 7 dargestellt.

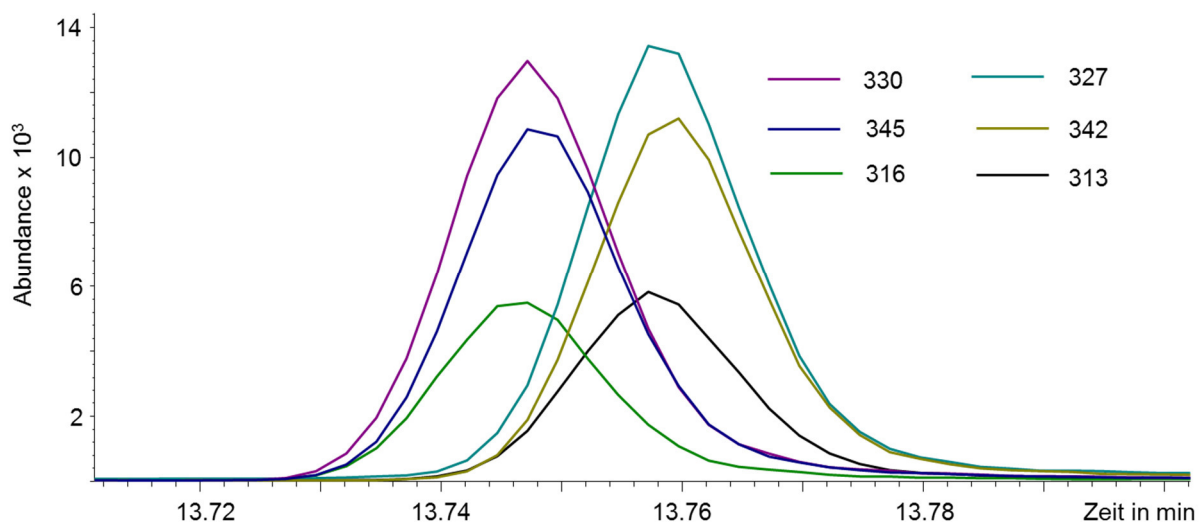


Abb. 7: Ausschnitt eines Ionenchromatogramms einer Serumprobe bei einer Konzentration von $c = 10 \text{ ng/mL}$ (THC sowie THC-D₃) nach Ethylierung mit 1-Iodethan

Die detektierten Ionenspuren des Analyten (m/z 313, 327 und 342) sowie die des deuterierten ISTD (m/z 316, 330 und 345) waren ungestört. Die berechneten Responsefaktoren [73, 74] lagen bei 1 ($RF_{[313/316]} = 1,03$, $RF_{[327/330]} = 1,06$, $RF_{[342/345]} = 1,01$), sodass diese bei einer semiquantitativen Ermittlung der Analytkonzentration per Isotopenverdünnung nicht berücksichtigt werden müssen.

Anhand der GC/MS-SIM-Chromatogramme wurden mit Hilfe der ChemStation-Software E. 02.02.1431 unter Verwendung der Quantifier (Tab. 7) die BG der jeweiligen Cannabinoid-derivate über das S/N-Verhältnis ($S/N = 10$) ermittelt (Tab. 8). Als Matrix wurde Serum genutzt. Die Konzentrationen für THC und THC-OH betragen jeweils 10 ng/mL , für THC-COOH wurden 20 ng/mL eingesetzt.

Tab. 8: BG (S/N = 10) der mittels Alkyljodiden derivatisierten Cannabinoiden bei einer Konzentration von 10 ng/mL THC bzw. THC-OH sowie 20 ng/mL für THC-COOH (n = 3, MW und Spannweite); Daten der Ethyl-Cannabinoiden fett

Derivatisierungsmittel	THC		THC-OH		THC-COOH	
	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]
1-Iodethan	3,13	2,56-3,55	0,77	0,67-0,97	2,15	1,87-2,44
1-Iodpropan	2,08	1,38-2,52	0,92	0,75-1,04	1,43	0,76-1,81
2-Iodpropan	1,81	1,79-1,84	28,1	26,3-30,3	7,64	4,31-9,35
1-Iodbutan	2,09	1,77-2,38	2,34	1,72-2,79	3,28	1,19-5,49
1-Iod-2-methylpropan	1,10	1,05-1,15	18,0	12,2-27,8	18,0	7,87-31,3
1-Iodpentan	2,68	2,28-3,05	18,1	14,9-20,8	24,6	14,9-34,5

Für THC ließ sich unter Verwendung von 1-Iodethan eine BG von 3,13 ng/mL eruieren, mit 1-Iod-2-methylpropan als Derivatisierungsmittel betrug diese 1,1 ng/mL (Tab. 8). Bei THC-OH und THC-COOH traten Erhöhungen der BG für die *n*-Alkyl-Derivate mit zunehmender Kettenlänge des Alkylierungsreagenzes auf (mit Ausnahme des *n*-Propyl-THC-COOH). Die BG der untersuchten *n*-Alkyl-THC-OH- bzw. *n*-Alkyl-THC-COOH-Derivate waren im Gegensatz zu den *iso*-Alkyl-THC-OH- bzw. *iso*-Alkyl-THC-COOH-Derivaten deutlich niedriger; für THC konnte Gegenteiliges festgestellt werden. Da 1-Iodethan als Derivatisierungsreagenz für die Basisvalidierung verwendet wurde, sind die Daten der Ethyl-Cannabinoiden in Tab. 8 fett hervorgehoben.

4.2.2 Beurteilung der Alkyljodide als Derivatisierungsreagenz für Cannabinoide

Die u. a. von Möller et al. [65] bzw. Kintz et al. [64] etablierte Reaktion von Methyljodid mit den Cannabinoiden THC, THC-OH und THC-COOH basiert auf folgender theoretischer Überlegung:

Aufgenommen in DMSO reagiert das Proton der phenolischen Hydroxygruppe des THC unter Zusatz von TBAH zu Wasser (Abb. 8). DMSO (dipolar-aprotisch) dient als Lösungsvermittler zwischen den Reaktanten. Anschließend erfolgt an dem THC-Anion durch ein Alkyljodid eine Alkylierung des Phenolates. Dabei kommt es zur nukleophilen Substitutionsreaktion (S_N2-Reaktion) zwischen dem Phenolatrest des THC (nukleophil) mit dem Kohlenstoff der Alkylkette (elektrophil), sodass alkyliertes THC als ein Produkt entsteht [75]. Das zusätzlich bei der Reaktion entstehende freie Iodidion (entsprechend des „Hard and Soft Acids and Bases“-Konzepts eine weiche Base) kann mit dem Tetrabutylammonium-Ion (weiche Säure) [76] ein

thermodynamisch stabiles Salz bilden. Analog reagieren die allylständige OH-Gruppe des THC-OH und die Carboxylgruppe der THC-COOH.

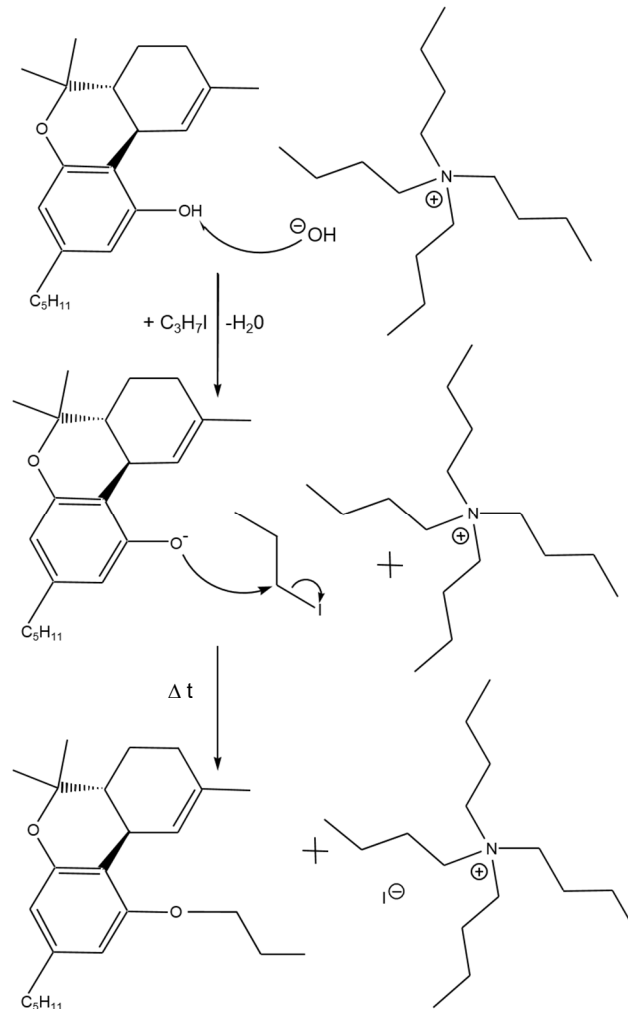


Abb. 8: Postulierte S_N2-Reaktion zur Bildung von Alkyl-THC unter Verwendung von TBAH, DMSO und 1-Iodpropan; es entstehen Wasser, Tetrabutylammoniumiodid und propyliertes THC

An Voruntersuchungen im GC/MS-Scan zeigte sich, dass *n*-Alkyljodide mit allen drei Analyten jeweils nur zu einem detektierbaren Hauptprodukt reagierten (Tab. 6). Entsprechend scheinen diese besonders für die Umsetzung der analysierten Cannabinoide geeignet zu sein. Es war auffällig, dass die Peakhöhen mit zunehmendem Molekulargewicht des Derivatisierungsreagenzes bei allen Cannabinoiden abnahmen.

Bei THC-OH entstanden unter Verwendung der *iso*-Alkyljodide im Vergleich zu den isomeren *n*-Alkyljodiden zwei prominente Signale, wobei das intensivere ein Peaktailing aufwies. Peaktailing kann immer dann beobachtet werden, wenn es zur Absorption polarer Substanzen am Füllstoff des Verdampfers kommt [73] oder diese in die Säule der GC eingetragen werden

[63]. Aufgrund der Intensitätsunterschiede der Peaks war es offensichtlich, dass das Reaktionsgleichgewicht zugunsten des Monoalkyl-THC-OH verschoben war. Dies ist mit einer eventuell geringeren Reaktivität der *iso*-Alkyliodide begründbar. Weiterhin könnte die geringere Reaktivität allylständiger im Vergleich zu phenolischen Hydroxyfunktionen (höhere Reaktivität) für die unvollständige Umsetzung des THC-OH mit den *iso*-Alkyliodiden in Frage kommen. Da THC lediglich über eine phenolische Hydroxygruppe verfügt, konnte eine Aufspaltung in mehrere Produkte nicht beobachtet werden. Gleiches galt für THC-COOH, die neben der phenolischen Hydroxygruppe auch eine ohnehin stärker acide allylständige Carboxylfunktion besitzt, sodass beide Gruppen alkyliert werden.

Unter Verwendung von 2-Iod-2-methylpropan (*tert*-Butyliodid) wurde bei keinem Analyten eine Umsetzung registriert. Entsprechend lag die Vermutung nahe, dass mit zunehmender Verzweigung der Alkyliodide eine Abnahme der Reaktivität verbunden ist. Die Annahme, dass underivatisiertes THC-OH bzw. THC-COOH nicht erfasst werden können, wird nur in einer Literaturstelle beschrieben [19], deckt sich aber mit den hier vorgestellten Ergebnissen.

Um validere Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit eine Erhöhung der Molekülmasse der Analyten mit einer sensitiveren und selektiveren massenspektrometrischen Detektion einhergeht, wurden GC/MS-SIM-Messungen an die durchgeführten Scan-Messungen angeschlossen. Ein aus diesen Messungen resultierender Ausschnitt eines Ionenchromatogrammes des ethylierten THC-Derivates ist in Abb. 7 dargestellt. Die detektierten Ionenspuren waren nahezu ungestört. Somit konnte ein bekanntes Problem bei der Methylierung der Cannabinoide behoben werden, da sich dort häufig nur vier Ionen (zwei des Analyten, zwei des ISTD) ungestört detektieren ließen [39].

Anhand von GC/MS-SIM-Chromatogrammen wurden die BG ermittelt. Nach Auswertung der Chromatogramme und Berechnung des Grenzwertes [54] ($S/N = 10$, Tab. 8) wurde deutlich, dass sich unter Verwendung der *iso*-Alkyliodide im Vergleich zu den isomeren *n*-Alkyliodiden deutlich höhere BG für THC-OH und THC-COOH über das S/N -Verhältnis ermitteln ließen. Bei THC-OH wurde das Signal des Dialkyl-Produktes zur Ermittlung der BG herangezogen, obwohl dieses Signal im TIC von geringerer Intensität als das des Monoalkyl-Produktes war. Bei dem einfach alkylierten Produkt war jedoch aufgrund des Peaktailing mit einem deutlichen Sensitivitätsverlust zu rechnen, entsprechend wurde auf dessen zusätzliche Erfassung in der SIM-Methode an dieser Stelle verzichtet. Die Erhöhung der THC-COOH-Bestimmungsgrenzen, die mit den *iso*-Alkyliodiden im Vergleich zu den *n*-Alkyliodiden eruiert wurden, könnten auf eine sterische Hinderung der Reaktanten zurückgeführt werden. Gleiches trifft auf den Anstieg der BG des *n*-pentylierten THC-OH sowie des THC-COOH-Derivates im Vergleich zu

den *n*-butylierten oder *n*-propylierten zu.

Anhand der in Tab. 8 dargestellten Daten ließ sich die Annahme einer sensitiveren massenspektrometrischen Detektion mit Erhöhung des Molekulargewichtes der Analyten, die doppelt derivatisiert werden müssen, nicht bestätigen. Niedrige Grenzwerte mit höhermolekularen Alkylierungsreagenzien wurden über das S/N-Verhältnis für THC-OH und THC-COOH ebenfalls nicht festgestellt. Für THC konnte die Tendenz nicht beobachtet werden, da die BG zwischen 3,13 ng/mL (Ethyl-THC) und 1,1 ng/mL (*iso*-Butyl-THC) schwankten, sodass 1-Iod-2-methylpropan als Reagenz der Wahl diskutiert werden kann, sollte nur der Nachweis von THC gefordert sein, was in der Praxis jedoch nicht üblich ist.

4.2.3 Basisvalidierung der ethylierten Cannabinoide unter Verwendung von 1-Iodethan

Aufgrund der ungestörten Ionenspuren (Abb. 7) wurde 1-Iodethan als Alkylierungsreagenz für die Basisvalidierung verwendet. Die Messwerte, die in den Kapiteln 4.2.3.1 und 4.2.3.2 dargestellt sind, wurden sechs Kalibrationsgeraden entnommen, die innerhalb des Routinebetriebes generiert wurden.

4.2.3.1 Basisvalidierung des ethylierten THC-Derivates

Die Basisvalidierung der entwickelten Methode orientierte sich an den Empfehlungen der GTFCh [51] und beinhaltet u. a. die Parameter Linearität, Berechnung der analytischen Grenzwerte, Bias und Wiederholpräzision, welche mit Hilfe von Valistat bestimmt wurden. Zur Bestimmung der Linearität wurden 5-Punkt-Kalibrierungen mit sechs Wiederholungsmessungen an verschiedenen Tagen erstellt. Anschließend erfolgte die Quotientenbildung aus den Integralen des Quantifier (signalstärkstes Ion des Analyten/signalstärkstes Ion des ISTD) bzw. Qualifier (signalschwächstes Ion des Analyten/signalstärkstes Ion des ISTD). Abb. 9 zeigt die Kalibrierfunktionen, die über lineare Regression ermittelt wurden. In Tab. 9 sind die dazugehörigen Regressionsgleichungen, Bestimmtheitsmaße und Grenzwerte aufgeführt. Eine zusätzliche Prüfung auf Linearität erfolgte mittels F-Test.

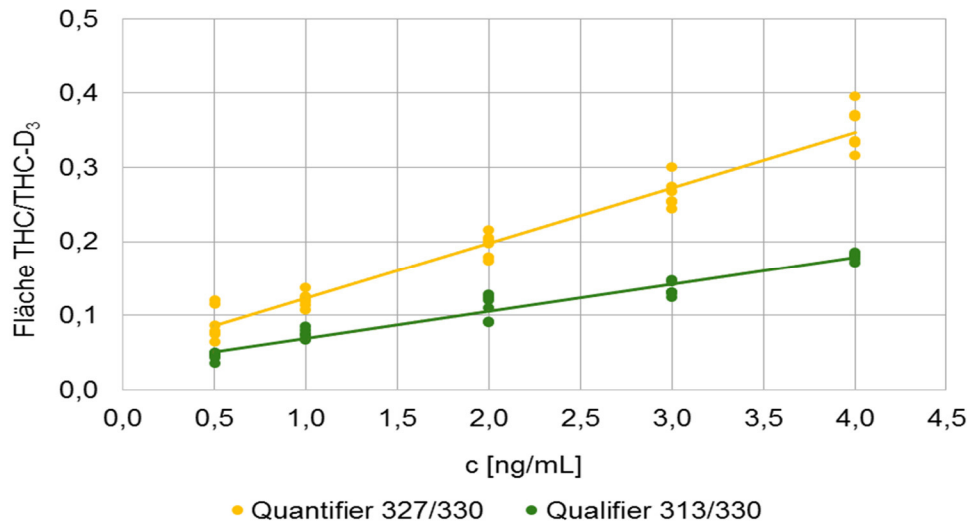


Abb. 9: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels 1-Iodethan ethylierten THC (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

Die in Tab. 9 angegebenen Grenzwerte für Ethyl-THC wurden auf Grundlage der Kalibrierfunktion mit Rechenformeln ermittelt, die der DIN 32645 entsprechen und Valistat zugrunde liegen. Für die statistische Berechnung der BG wurde nach den Empfehlungen der GTFCh [77] ein α -Fehler von 1 % und eine Ergebnisunsicherheit von 33 % ($k = 3$) angenommen (Tab. 9, fett), bei der Nachweisgrenze (NG) betrug $\alpha = 10$ % bei gleicher Ergebnisunsicherheit (ebenfalls fett in Tab. 9). Nicht hervorgehobene Werte in Tab. 9 dienen der Vollständigkeit.

Tab. 9: Regressionsgleichungen, Bestimmtheitsmaße (R^2), NG, Erfassungsgrenzen (EG) und BG des mittels 1-Iodethan ethylierten THC; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngröße	Regressionsgleichung	R^2	NG [ng/mL]	EG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Quantifier	$y = 0,0749x + 0,0479$	0,9988	0,35	0,69	1,00
Qualifier	$y = 0,0351x + 0,0344$	0,9935	0,29	0,59	0,99

Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden zwei Qualitätskontrollen in einer Konzentration von $c = 1$ ng/mL bzw. 4 ng/mL (Sollwerte) an acht verschiedenen Tagen gemessen und deren Konzentration über die Analysefunktion berechnet. Während die Messwerte der niedrigen Qualitätskontrollen eng um den Erwartungswert von 1 ng/mL streuten, zeigten die hohen Qualitätskontrollen im betrachteten Zeitraum eine geringfügige systematische Abweichung nach oben, die aber als tolerierbar eingestuft wurden. Dies spiegelte sich auch in der ermittelten Präzision (relative Standardabweichung (RSD) niedrige Kontrolle 4,9 %, hohe Kontrolle 6,3 %) und Bias (niedrige Kontrolle bei 5,4 %, hohe Kontrolle bei 11,6 %) wider. Weitere Parameter der Validierung werden zugunsten der Übersichtlichkeit im Hauptteil nicht weiter aufgeführt, sondern sind den Valistat-Protokollen im Anhang zu entnehmen.

4.2.3.2 Basisvalidierung des ethylierten THC-OH- bzw. THC-COOH-Derivates

Entsprechend der Vorgehensweise aus Kapitel 4.2.3.1 wurden die linearen Regressionen für die THC-OH- bzw. THC-COOH-Kalibratoren durchgeführt. Sowohl für THC-OH (Abb. 10), als auch für THC-COOH (Abb. 11), konnten lineare Zusammenhänge festgestellt werden, wie u. a. aus den in den Tab. 10 und 11 aufgeführten Parametern ersichtlich wird.

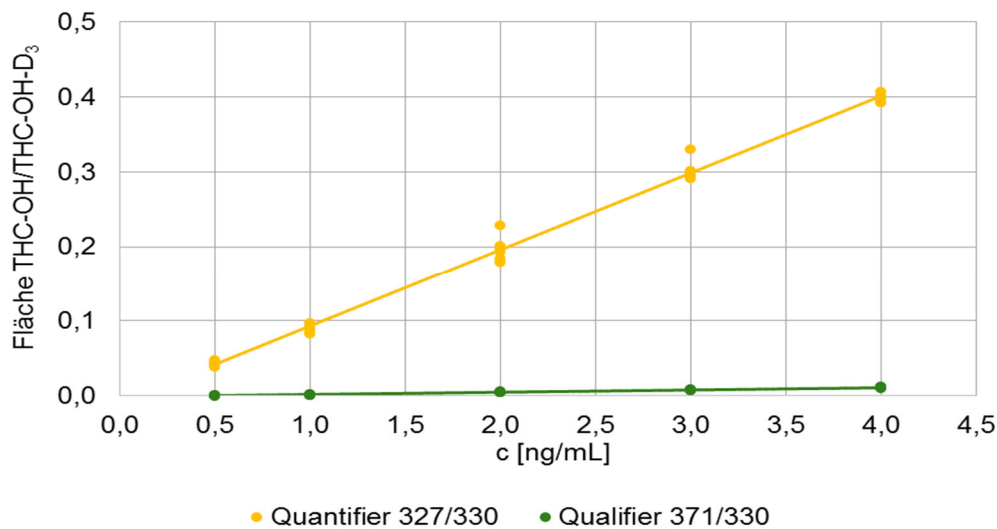


Abb. 10: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-OH (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

Tab. 10: Regressionsgleichungen, R², NG, EG und BG des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-OH; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngröße	Regressionsgleichung	R ²	NG [ng/mL]	EG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Quantifier	$y = 0,1026x - 0,0093$	0,9997	0,16	0,32	0,54
Qualifier	$y = 0,0031x - 0,0010$	0,999	0,12	0,23	0,46

Die Ergebnisse der Genauigkeitsanalyse der THC-OH-Detektion konnten mit einer Präzision von RSD = 5,0 % für die niedrige bzw. RSD = 2,5 % für die hohe Kontrolle sowie einem Bias von -3,2 % (niedrige Kontrollen) bzw. -2,9 % (hohe Kontrollen) ermittelt werden und lagen somit dicht an den Erwartungswerten.

Gleiches galt für die Genauigkeit des THC-COOH-Nachweises (siehe Anhang). Wie auch bei dem ethylierten THC, wurden die Vorgaben der GTFCh [44] zur Detektion des THC-COOH erfüllt.

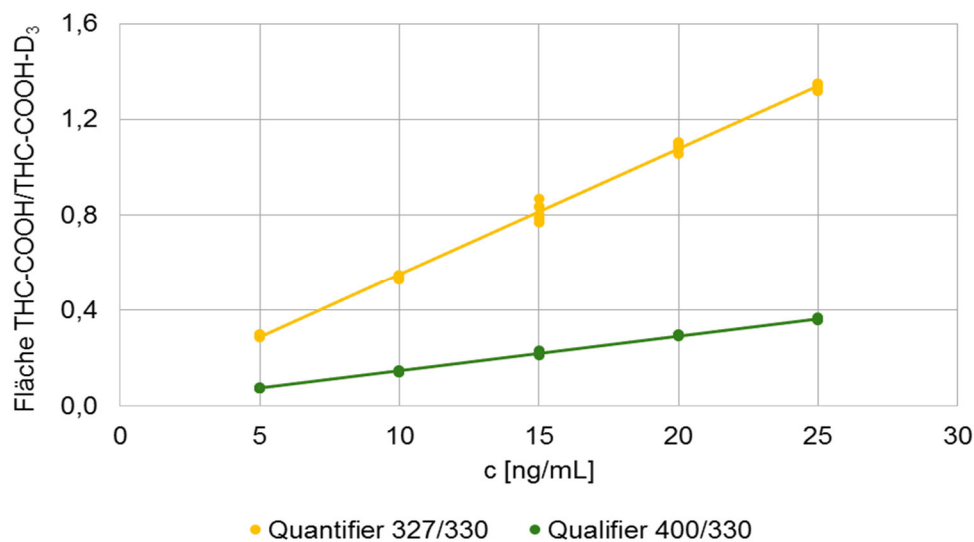


Abb. 11: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-COOH (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

Tab. 11: Regressionsgleichungen, R², NG, EG und BG des mittels 1-Iodethan ethylierten THC-COOH; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngroße	Regressionsgleichung	R ²	NG [ng/mL]	EG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Quantifier	$y = 0,0526x + 0,0257$	0,9998	1,00	2,01	3,34
Qualifier	$y = 0,0144x + 0,0295$	0,9997	0,38	0,76	1,55

4.2.3.3 Fazit zur Ethylierung der Cannabinoide mit 1-Iodethan

Während sich über das S/N-Verhältnis eine BG für Ethyl-THC von 3,13 ng/mL (Tab. 8, fett) ermitteln ließ, ergab sich mit Hilfe der linearen Regression eine BG von 1,00 ng/mL. Eine Senkung der BG ließ sich weiterhin für THC-OH (0,77 ng/mL über das S/N-Verhältnis im Vergleich zu 0,54 ng/mL bei der linearen Regression) erzielen. Eine konsequenzenlose Erhöhung dagegen zeigte sich für das ethylierte THC-COOH-Produkt.

Aus den hier auszugsweise aufgeführten Validierungsparametern und weiterer, im Anhang befindlicher Werte, resultiert, dass die Nachweismethode mit 1-Iodethan als Alkylierungsmittel auch nach den Empfehlungen der GTFCh geeignet ist. Entsprechend wurde diese unverändert zur Anwendung in die tägliche Routineanalytik überführt. Ergebnisse, die in regelmäßig durchgeführten Ringversuchen erzielt werden (Tab. 12), rechtfertigen fortlaufend den Einsatz der Methode und bestätigen deren Robustheit.

Tab. 12: Auszug aus den Ergebnissen der Ringversuche für Betäubungsmittel im Serum; Ist-Wert, Soll-Wert und z-score der via 1-Iodethan ethylierten Cannabinoide

Ringversuchsnummer	THC			THC-OH			THC-COOH		
	Ist [ng/mL]	Soll [ng/mL]	z-score	Ist [ng/mL]	Soll [ng/mL]	z-score	Ist [ng/mL]	Soll [ng/mL]	z-score
BTMF 3/14 [78]	4,4	3,68	1,04	2,31	2,53	-0,44	51,2	57,6	-0,90
BTMF 1/15 [79]	2,74	2,14	1,36	2,13	2,06	0,16	27,1	28,3	-0,30
BTMF 2/15 [80]	6,34	6,04	0,28	3,01	2,64	0,71	70,9	70,9	0,00
BTMF 3/15 [81]	9,47	9,41	0,03	5,25	4,92	0,37	73,3	73,8	-0,05
BTMF 1/16 [82]	1,4	1,93	-1,32	1,82	1,73	0,24	26,8	30,8	-0,95

4.2.4 Derivatisierung der Cannabinoide mit TASH

4.2.4.1 Syntheseresultate der Trialkylsulfoniumsalze

Nach luftdichtem Verschluss und Inkubation des Gemisches (Kapitel 3.4) für eine Woche bei 80 °C im Trockenschrank, konnte eine Farbveränderung der Lösung von ursprünglich farblos zu bernsteinfarben beobachtet werden. Nach Einengen der Lösung bis zur Trockene unter Druckluft bei 40 °C entstand ein bräunlich-violettes Rohprodukt. Durch mehrmaliges Waschen mit Ethylacetat kristallisierte ein weißes Salz aus, das bei -25 °C aufbewahrt wurde. Die Ausbeute an Tripropylsulfoniumiodid betrug ca. 28 %, an Tributylsulfoniumiodid ca. 27 % und an Triisopropylsulfoniumiodid ca. 14 %. Eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zugunsten der Produkte über Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde nicht angestrebt, da ausreichend Material für umfangreiche Untersuchungen zur Verfügung stand.

Aus dem jeweils entstandenen Trialkylsulfoniumiodid wurde eine 0,1 M Trialkylsulfoniumhydroxidlösung hergestellt, in dem eine berechnete Masse des Trialkylsulfoniumiodids (Triethylsulfoniumiodid = 121 mg, Tripropylsulfoniumiodid bzw. Triisopropylsulfoniumiodid = 144 mg, Tributylsulfoniumiodid = 166 mg) in 5 mL Methanol gelöst wurde. Nachfolgend wurde zu der Lösung eine äquimolare Menge Silber(I)oxid (115 mg) gegeben und die Suspension für 30 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zentrifugation und Abdekantieren des Überstandes erfolgte die Lagerung der Lösung bei -25 °C, der Bodensatz (bestehend aus Silberiodid) wurde verworfen. Abschließend wurde die Identität der Produkte durch ¹³C-, ¹³C-DEPT- und ¹H-NMR-Messungen abgesichert.

4.2.4.2 Auswertung der GC/MS-Totalionenchromatogramme

Es wurde geprüft, ob sich mit den synthetisierten TASH die zu erwartenden Cannabinoidderivate bildeten. Dazu wurden THC, THC-OH und THC-COOH in einer Konzentration von c = 3 µg/50 µL LMG (bestehend aus 25 µL TBME und 25 µL TASH) im Totalionenstrom

gemessen. Um die erzielten Ergebnisse übersichtlich darzustellen, erfolgte eine tabellarische Einteilung in drei Kategorien (Tab. 13): Mit „+“ wurde bewertet, wenn das jeweilige Derivat aufgrund des Fragmentierungsmusters und der RT dem vollständig alkylierten Produkt, welches bereits aus Kapitel 4.1.1 bekannt war, entsprach. Wenn sowohl die Mono- als auch die Dialkyl-Derivate im Massenspektrum detektiert wurden, erfolgte die Bewertung mit „+/-“. Ein „-“ symbolisiert, dass keine Umsetzung stattfand bzw. keine Detektion des Analyten möglich war.

Tab. 13: Auswertung der TIC nach Derivatisierung von THC, THC-OH und THC-COOH ohne Matrix mit dem jeweiligen TASH; + ein vollständig umgesetzter Analyt, +/- einfach und doppelt alkylierte Derivate, - keine Umsetzung (THC) bzw. keine Detektion möglich (THC-OH und THC-COOH)

Derivatisierungsmittel	THC	THC-OH	THC-COOH
TMSH	+	+	+
TESH	+	+/-	+
TPSH	+	+/-	+
TIPSH	-	-	-
TBSH	+	+/-	+

Bis auf Triisopropylsulfoniumhydroxid (TIPSH) reagierten alle getesteten TASH mit den Analyten (Tab. 13). Auffällig bei den THC-OH-Derivaten war, dass unter Verwendung von Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) ausschließlich ein doppelt methyliertes Produkt auftrat, während sich bei der Alkylierung mit Triethylsulfoniumhydroxid (TESH), Tripropylsulfoniumhydroxid (TPSH) und Tributylsulfoniumhydroxid (TBSH) zusätzlich die einfach umgesetzten Derivate detektierten ließen. Von THC ließ sich im TIC jeweils nur ein Produkt ausfindig machen, gleiches galt für THC-COOH.

In Abb. 12 ist das TIC der ethylierten Cannabinoide nach Derivatisierung mit TESH dargestellt. Obwohl alle drei Cannabinoide in einer Konzentration von $c = 3 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ LMG vorlagen, zeigten sich unterschiedliche Signalintensitäten von THC (1) im Vergleich zu THC-OH (2 und 3) und THC-COOH (4). Peak (1) konnte Ethyl-THC zugeordnet werden. Signal (2) entsprach doppelt umgesetztem THC-OH, Signal (3) Monoethyl-THC-OH und Peak (4) Ethyl-THC-COOH. Ein Peak tailing des Monoethyl-THC-OH war im TIC nicht auffällig, zeigte sich jedoch in den nachfolgenden GC/MS-SIM-Messungen.

Die unterschiedlichen Peakflächen des Ethyl-THC-OH und des Ethyl-THC-COOH im Vergleich zum THC waren bei THC-OH mit der Bildung der eben genannten Aufspaltung in zwei Produkte erklärbar. Auch THC-COOH bildete mehrere Derivate (Abb. 13 und 14), sodass auch hier die geringere Signalintensität im Vergleich zu THC plausibel war.

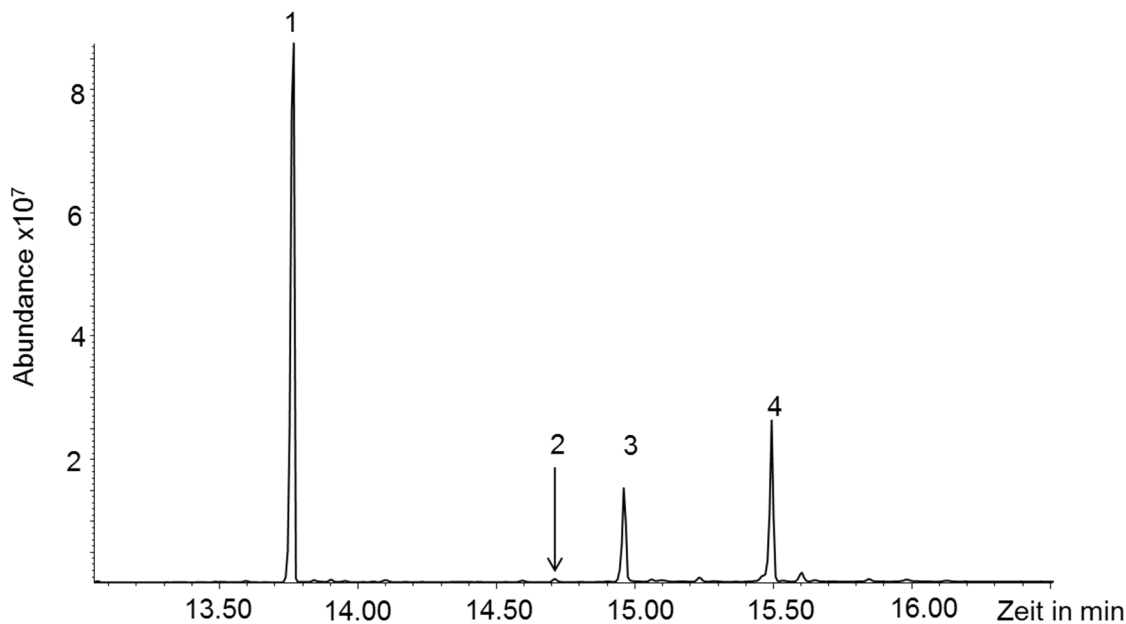


Abb. 12: TIC der mit TESH derivatisierten Cannabinoide ausgehend von einer Konzentration $c = 3 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ LMG; Ethyl-THC (1), Diethyl-THC-OH (2), Monoethyl-THC-OH (3), Ethyl-THC-COOH (4)

4.2.4.3 Auswertung der GC/MS-SIM-Chromatogramme der mittels TESH ethylierten Cannabinoidderivate

Die durchgeführten GC/MS-SIM-Messungen erfolgten nach Ergänzung der SIM-Ionen der Monoalkyl-THC-OH-Produkte (Analyt und ISTD) sowie des Detektionszeitraumes entsprechend den RT. Die Konzentrationen für THC und THC-OH betragen jeweils $10 \text{ ng}/50 \mu\text{L}$ LMG und $20 \text{ ng}/50 \mu\text{L}$ LMG für THC-COOH. Abb. 13 zeigt beispielhaft das Ergebnis dieser Messung nach Derivatisierung mit TESH. Es sind die in allen Produkten vorkommenden Ionen m/z 327 und 330 dargestellt. Deutlich erkennbar ist das Signal des Ethyl-THC (1) mit leicht vorversetztem ISTD (Abb. 13). Chronologisch schlossen sich die Peaks des Diethyl-THC-OH (2) sowie des Monoethyl-THC-OH (3) an, bei dem ein Tailing aufgrund einer freien Hydroxygruppe auffiel. Das letzte Signal (5) konnte der Diethyl-THC-COOH zugeordnet werden. Obwohl Signal (4) im Massenspektrometer in Abb. 13 die gleichen Ionen wie Monoethyl-THC-OH aufwies, konnte es durch Weglassen des THC-COOH-D₃ eindeutig THC-COOH zugeordnet werden (Abb. 14). Bei Peak (4) in Abb. 14. handelt es sich vermutlich um dehydratisierte Monoethyl-THC-COOH.

Die dehydratisierten Monoalkyl-THC-COOH-Derivate wurden im weiteren Verlauf nicht weiter berücksichtigt.

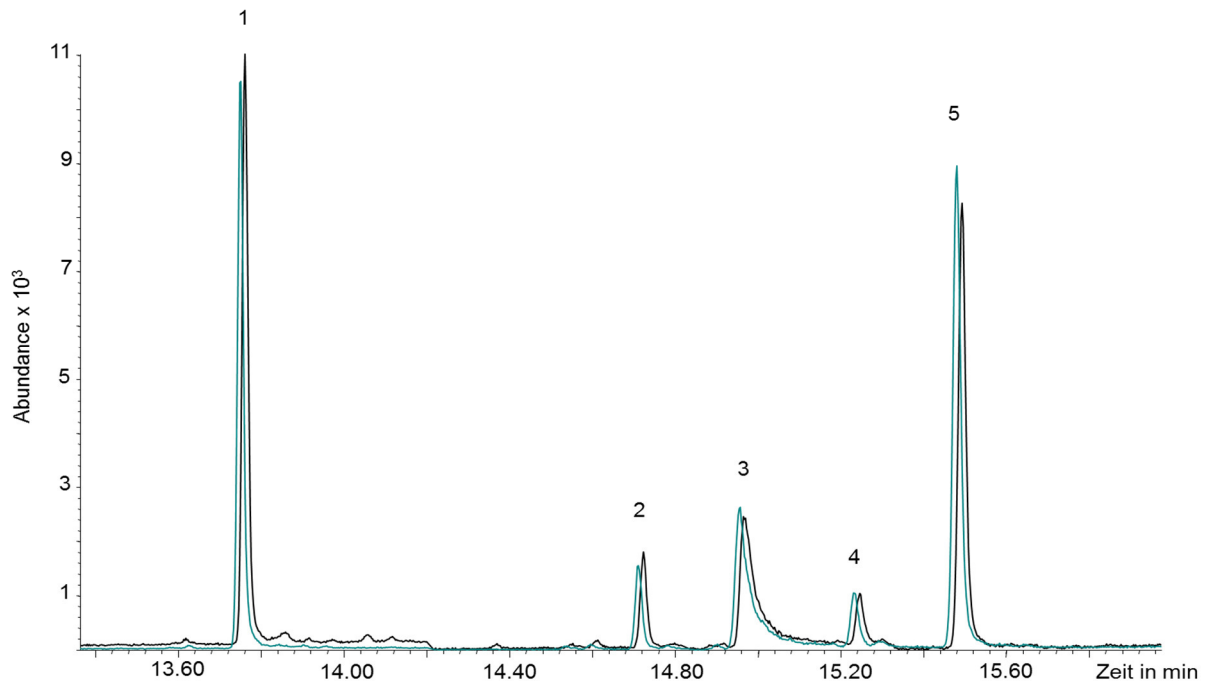


Abb. 13: SIM-Chromatogramm der Ionen m/z 327 und 330 der ethylierten Cannabinoidderivate ausgehend von einer Konzentration von 10 ng/50 μ L LMG für THC und THC-OH sowie 20 ng/50 μ L THC-COOH; Ethyl-THC (1), Diethyl-THC-OH (2), Monoethyl-THC-OH (3), Ethyl-THC-COOH (5); Analyt schwarz, ISTD blau

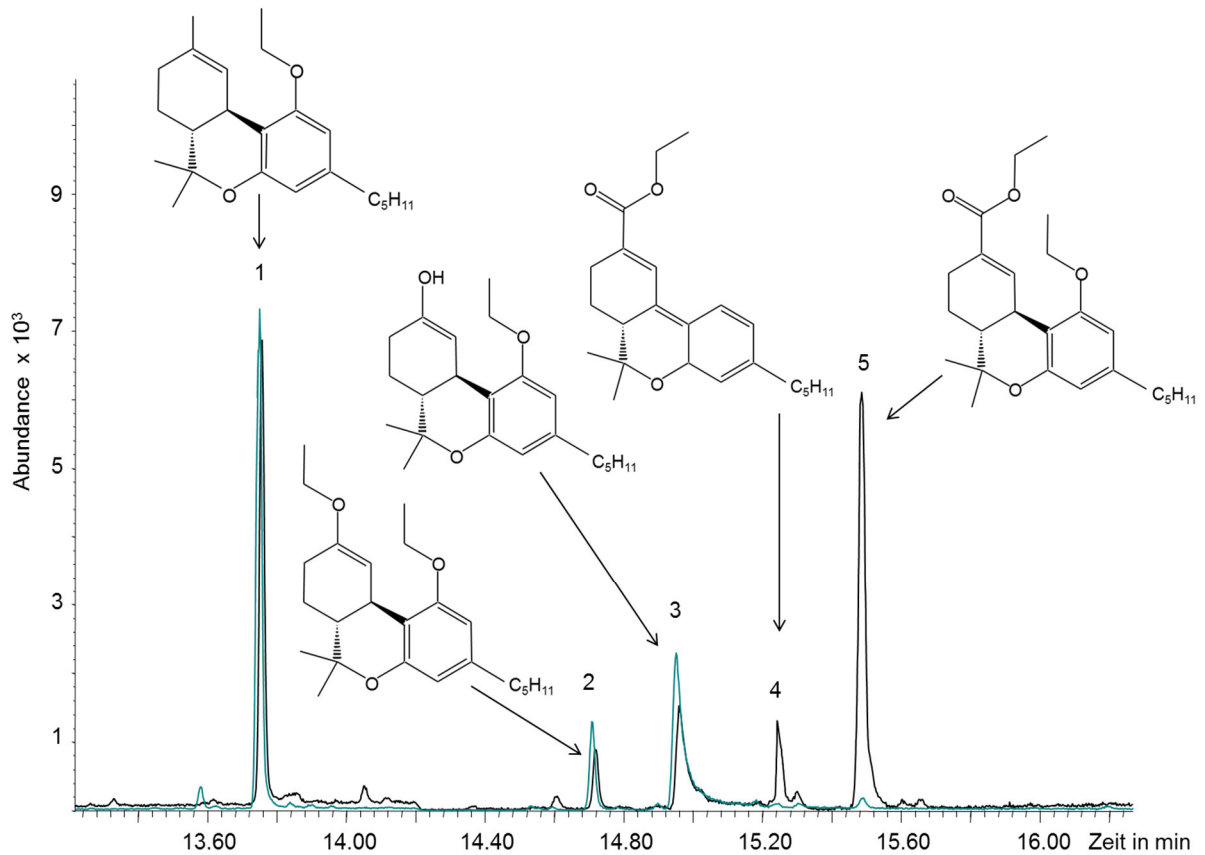


Abb. 14: SIM-Chromatogramm der Ionen m/z 327 und 330 und Strukturformeln der ethylierten Cannabinoidderivate unter den gleichen Bedingungen wie Abb. 13, aber ohne THC-COOH-D₃-Zusatz; Ethyl-THC (1), Diethyl-THC-OH (2), Monoethyl-THC-OH (3), dehydratisierte Monoethyl-THC-COOH (4), Diethyl-THC-COOH (5); Analyt schwarz, ISTD blau

4.2.4.4 BG der via TASH gebildeten Cannabinoide

Ausgehend von Ionenchromatogrammen, wie sie beispielhaft in Abb. 13 dargestellt sind, wurden die BG (entsprechend der Vorgehensweise aus Kapitel 4.2.1) über das S/N-Verhältnis ($S/N = 10$) ermittelt (Tab. 14). Als Matrix wurde Serum verwendet. Die Konzentrationen für THC und THC-OH betragen jeweils 10 ng/mL, für THC-COOH wurden 20 ng/mL eingesetzt.

Tab. 14: BG ($S/N = 10$) der via TASH alkylierten Cannabinoide ausgehend von einer Konzentration von je 10 ng/mL THC und THC-OH bzw. 20 ng/mL THC-COOH ($n = 3$, MW und Spannweite); * unter TMSH entstand kein Monomethyl-THC-OH

Derivatisierungsmittel	THC		Monoalkyl-THC-OH		Dialkyl-THC-OH		THC-COOH	
	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]
TMSH	0,62	0,53-0,72	-*	-*	0,20	0,18-0,24	0,99	0,92-1,11
TESH	0,39	0,32-0,43	0,17	0,15-0,18	0,54	0,48-0,59	0,40	0,36-0,44
TPSH	0,52	0,41-0,63	0,37	0,29-0,41	1,11	1,06-1,21	0,93	0,73-1,21
TBSH	0,58	0,50-0,67	0,23	0,10-0,44	1,16	0,70-1,75	0,44	0,26-0,77

Aus den GC/MS-Scan-Messungen war bekannt, dass TIPSH mit keinem der Cannabinoide reagierte, sodass auf eine Analyse nach Umsetzung mit TIPSH im GC/MS-SIM verzichtet wurde. Mit den getesteten Derivatisierungsreagenzien (Tab. 14) war ein selektiver und sensitiver Nachweis der Analyten möglich. Es stellte sich heraus, dass bei den analysierten Cannabinoiden unter Einsatz von TESH als Alkylgruppenüberträger die niedrigsten BG ermittelt wurden (Tab. 14, fett). Auffällig war, dass die BG der Monoalkyl-THC-OH-Derivate trotz des Signaltailings niedriger ausfielen als die der doppelt umgesetzten Produkte.

4.2.4.5 Beurteilung der TASH als Derivatisierungsreagenz für Cannabinoide

Basierend auf der Arbeit von Butte [83], der mit Hilfe von TMSH Fettsäuren veresterte, wurde erstmals von Sporkert et al. [67] eine Methode zur Cannabinoide derivatisierung unter Verwendung von TMSH vorgestellt. Auf dieser Grundlage aufbauend entstand die Überlegung, höhere TASH für die Modifikation der Cannabinoide zu nutzen, um so u. a. Matrixinterferenzen, die nach der Umsetzung mit TMSH die Sensitivität erheblich stören, zu minimieren. Limitierend war, dass lediglich TMSH und Triethylsulfoniumiodid käuflich zu erwerben waren. Höhere Trialkylsulfoniumsalze mussten selbst synthetisiert werden. Dazu wurde, abweichend von dem Verfahren, das Haiber et al. [84] anwandten, dass jeweilige Alkyliodid und der korrespondierende Dialkylthioether in einem Medium (bestehend aus Acetonitril und Methanol) bei 80 °C zur Reaktion gebracht. Dabei erfolgt eine S_N2 -Reaktion des Schwefels (Lewis-Base) an der

Alkylkette (Lewis-Säure) [75] (Abb. 15). Folglich kommt es zur Bildung von Trialkylsulfoniumiodiden, bei der das Sulfoniumkation mit dem Iodidanion ein stabiles Salz bildet [75]. Acetonitril (aprotisch) begünstigt die Reaktion, da es das Nukleophil nur gering solvatisiert; Methanol dient als zusätzliches Lösungsmittel.

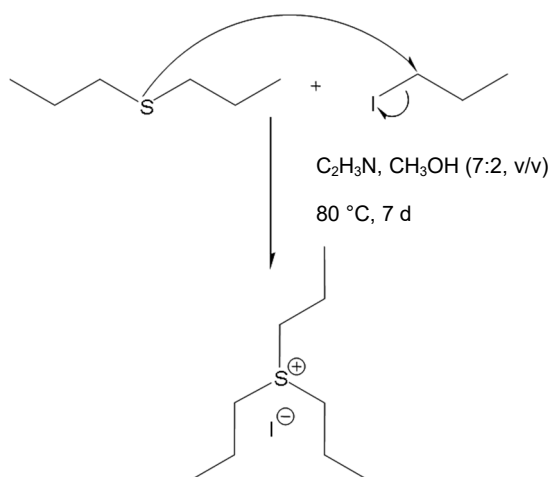


Abb. 15: Postuliertes $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionsschema zur Bildung von Trialkylsulfoniumiodiden am Beispiel des Tripropylsulfoniumiodids (nach Buddrus et al. [75], modifiziert)

Aus der Literatur war bekannt, dass Methanol das beste Lösungsmittel für Sulfoniumhalogenide ist [85]. Entsprechend wurden die für die Derivatisierung der Cannabinoide benötigten TASH durch Lösen des jeweiligen Trialkylsulfoniumiodids in Methanol mit anschließender Fällung des Iodids via Silber(I)oxid (Abb. 16) synthetisiert. Die bei dieser Fällungsreaktion entstehenden Oxidionen (O_2^-) reagieren vermutlich mit den Protonen der Hydroxygruppen des Methanols zu Hydroxidionen und Methanolat, sodass sich eine Lösung bestehend aus Trialkylsulfoniumhydroxid und -methanolat bildete. Der Einfachheit halber wird im Folgenden nur noch von Trialkylsulfoniumhydroxiden gesprochen.

Haiber et al. [84] griffen für die Herstellung der Trialkylsulfoniumhydroxide auf eine Methode von Schulte et al. [86] zurück, die mit Hilfe von starken Anionenaustauschern die Trialkylsulfoniumiodide zu den entsprechenden -hydroxiden umsetzten.

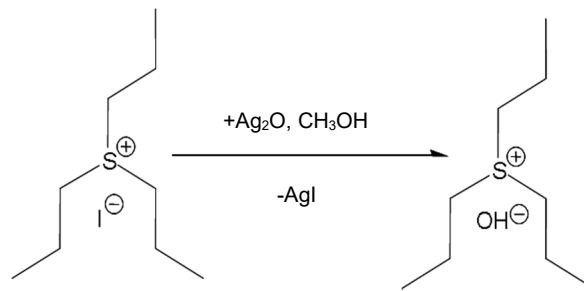


Abb. 16: Synthese von Tripropylsulfoniumhydroxid ausgehend von dem korrespondierenden –iodid

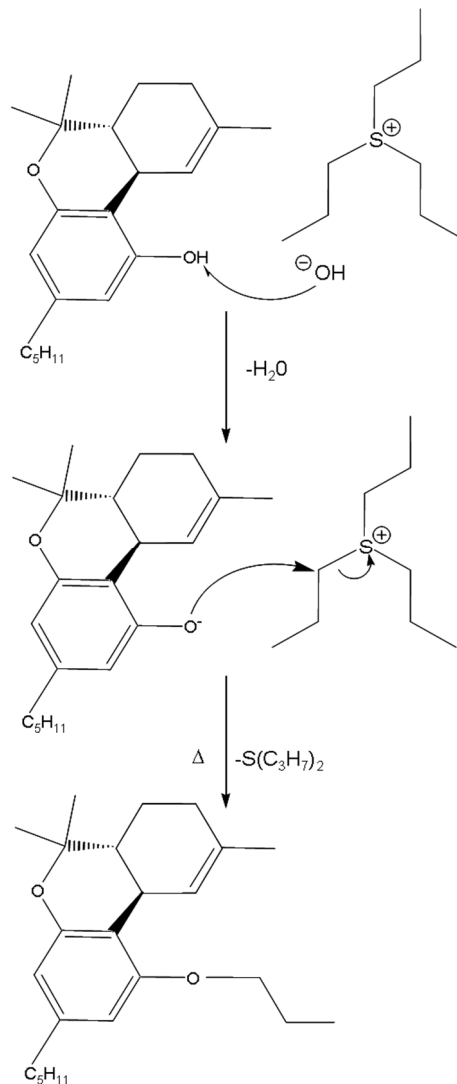


Abb. 17: Vermuteter Reaktionsverlauf der (pyrolytischen) *n*-Alkylierung des THC am Beispiel von TPSH

Der Reaktion (zwischen Analyt und TASH) liegt die Substitution von aciden Protonen saurer Hydroxygruppen der Analyten durch einen Alkylrest des TASH (Reagenz) in methanolischer Lösung unter Zusatz von TBME zugrunde. Dazu lagert sich das Analytanion an das Reagenzkation an und bildet einen ionischen Komplex (Abb. 17) [87]. Anschließend wird dieser Komplex teils durch Vorinkubation (im Trockenschrank bei 80 °C bzw. in der Mikrowelle) aber

auch durch Pyrolyse im Injektor zerstört und eine Alkylgruppe an den Analyten übertragen. Dabei entstehen neben dem Analytderivat chemisch inerte, austrittsfreudige Dialkylthioether und geringe Mengen Wasser, die den gaschromatographischen Prozess jedoch nicht beeinflussen [67, 84, 87].

Bei der Alkylierung mit TASH ist zu beachten, dass ausschließlich saure funktionelle Gruppen wie Hydroxy- und Carboxylgruppen alkyliert werden können [84]. Aliphatische Alkohole reagieren nicht; allylständige Hydroxygruppen sind nur bedingt derivatisierbar [88]. Wie Tab. 13 zu entnehmen, waren bis auf TIPSH alle getesteten TASH geeignet, mit den Cannabinoiden die vollständig- oder teilalkylierten Derivate zu bilden. Der mangelnde Umsatz der Cannabinoide mit TIPSH könnte damit begründet werden, dass Triisoalkylsulfoniumhydroxide eine geringere Reaktivität aufweisen als die isomeren *n*-TASH bzw., dass eine Reaktion aufgrund sterischer Hinderung erschwert wird. Ähnliche Vermutungen wurden bereits für die *iso*-Alkyljodide (Kapitel 4.2.2) aufgestellt.

Bis auf TMSH, bei dem ausschließlich Dimethyl-THC-OH entstand, bildeten sich unter Verwendung von TESH, TPSH und TBSH sowohl die Mono- als auch die Dialkyl-THC-OH-Derivate. Ursächlich für diese zwei Produkte kann das geringere Alkylierungspotential der *n*-TASH im Vergleich zu den *n*-Alkyljodiden (im System TBAH, DMSO und RI) diskutiert werden. Entsprechend sind allylständige Hydroxyfunktionen (aufgrund geringerer Reaktivität im Vergleich zu phenolischen Hydroxygruppen) mit den *n*-TASH nur teilweise alkylierbar (Abb. 13 und 14). Aber auch THC-COOH zeigte im GC/MS-SIM eine Aufspaltung in zwei Produkte. Es kann vermutet werden, dass THC-COOH im Zuge der Chromatographie u. a. aufgrund der hohen Injektortemperaturen dehydratisiert. Bei der Dehydratisierung spaltet sich vermutlich die phenolische Hydroxygruppe mit einem Proton unter Bildung von Wasser ab, sodass ein inertes Reaktionsprodukt nach Derivatisierung der Carboxylgruppe vorliegt (Abb. 14, Nr. 4). Daraus resultiert ein Massenspektrum, das dem des Monoethyl-THC-OH ähnelt. Eine Dehydratisierung konnte bei der Umsetzung der THC-COOH mit Alkyljodiden nicht beobachtet werden; in der Literatur sind ebenfalls keine Daten darüber eruiert.

Wie Tab. 14 zu entnehmen, konnten für alle getesteten Derivate BG im unteren ng/mL-Bereich ermittelt werden. THC kommt die größte Bedeutung zu, da der Grenzwert des THC gemäß den Empfehlungen der GTFCh [44] die höchste analytische Hürde darstellt. Die BG des Ethyl-THC (S/N = 10) lag im Mittel bei 0,39 ng/mL und somit unter der mit 1-Iodethan (3,13 ng/mL) ermittelten. Diese Reduzierung des Grenzwertes war vermutlich auf eine optimale Geräteleistung der GC/MS zurückzuführen, da die BG nach Alkylierung mit den TASH unmittelbar nach der

Wartung des GC und Reinigung der MS-Quelle erhoben wurden. Aussagen zu eventuellen Vorzügen von TASH im Vergleich zu Alkyljodiden anhand der über das S/N-Verhältnis ermittelten BG können nicht getroffen werden, da unterschiedliche Geräteperformances bei der Datenerhebung vorlagen.

4.2.5 Basisvalidierung der ethylierten Cannabinoide unter Verwendung von TESH

Für die durchgeführten Validierungsmessungen wurde TESH herangezogen, da alle via TESH umgesetzten Cannabinoide die geringsten BG aufwiesen. Aus der Datenlage war ersichtlich, dass sich unter Berücksichtigung des Monoethyl-THC-OH eine niedrigere BG als bei dem doppelt ethylierten Produkt ergab (Tab. 14), sodass Monoethyl-THC-OH trotz leichtem Peaktailings für die Validierungsmessungen herangezogen wurde. Für die Validierungsexperimente wurden die Proben für 30 min im Trockenschrank bei 80 °C inkubiert. Das Vorgehen bei der Basisvalidierung entsprach dem in Kapitel 4.2.3.1 beschriebenen.

4.2.5.1 Basisvalidierung des ethylierten THC-Derivates

Abb. 18 zeigt die Kalibrierfunktion des Ethyl-THC. In Tab. 15 sind Regressionsparameter sowie Grenzwerte aufgelistet. Über die Analysefunktion wurden die Konzentrationen der Kontrollproben berechnet und auf Richtigkeit und Präzision hin geprüft.

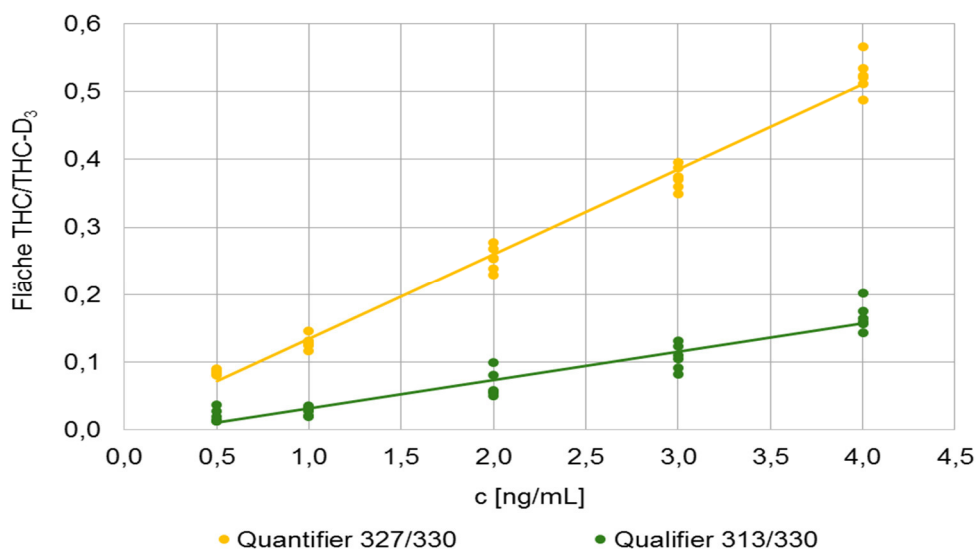


Abb. 18: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels TESH ethylierten THC (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

Es zeigte sich, dass die Messwerte der niedrigen und der hohen Qualitätskontrolle von den jeweiligen Erwartungswerten (1 bzw. 4 ng/mL) mit einer Präzision von RSD = 8,6 % bzw. 4,7 %

(niedrige bzw. hohe Kontrolle) sowie einem Bias von 0,8 % bzw. 2,9 % (niedrige bzw. hohe Kontrolle) nur gering abwichen. Somit ließ sich die Genauigkeit der Methode bestätigen (Anhang).

Tab. 15: Regressionsgleichungen, R^2 sowie NG, EG und BG des mittels TESH ethylierten THC; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngröße	Regressionsgleichung	R^2	NG [ng/mL]	EG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Quantifier	$y = 0,1253x + 0,0098$	0,9978	0,47	0,95	1,25
Qualifier	$y = 0,0418x - 0,0100$	0,9889	0,39	0,77	1,21

4.2.5.2 Basisvalidierung des Monoethyl-THC-OH- bzw. Ethylierten THC-COOH-Derivates

Die lineare Regression erfolgte wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben. In Abb. 19 sind die für THC-OH ermittelten Regressionsfunktionen des Quantifiers und Qualifiers dargestellt. Tab. 16 zeigt die berechneten Regressionsgleichungen, Bestimmtheitsmaße sowie Nachweis-, Bestimmungsgrenzen und Erfassungsgrenzen.

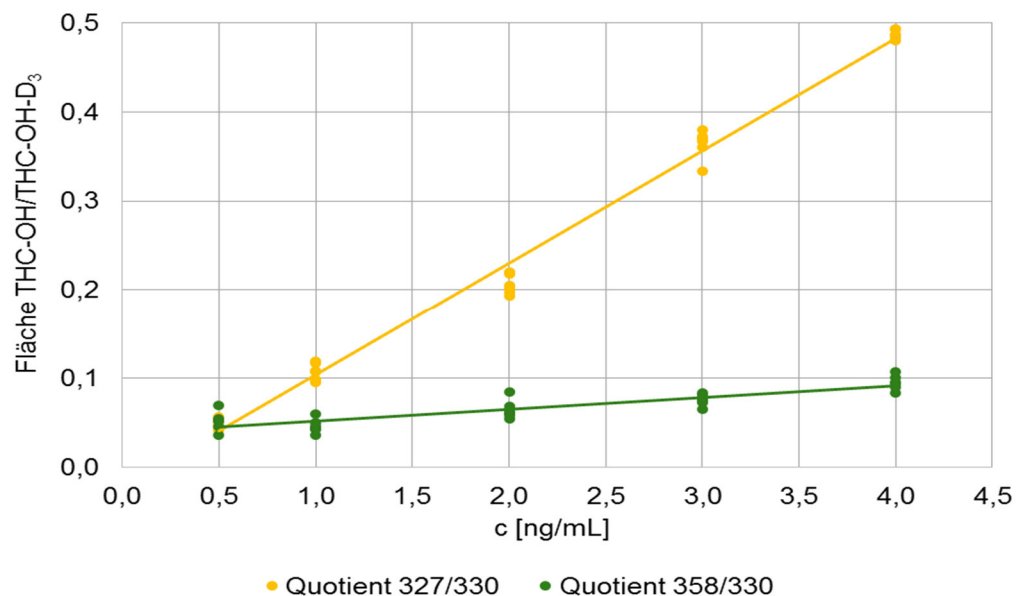


Abb. 19: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels TESH einfach ethylierten THC-OH-Derivates (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

Trotz der potentiell geringeren Sensitivität des Monoethyl-THC-OH, die durch Peak tailing bedingt sein kann, ließ sich eine NG unterhalb von 1 ng/mL ermitteln. Quantitativ valide Aussagen sind dagegen erst ab einer THC-OH-Konzentration von 1,38 ng/mL möglich. Diese BG ist bspw. eine wichtige Voraussetzung für die hinreichend genaue Berechnung des CIF nach geringfügigem oder länger zurückliegendem Cannabiskonsum.

Tab 16: Regressionsgleichungen, R² sowie NG, EG und BG des mittels TESH einfach ethylierten THC-OH; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngröße	Regressionsgleichung	R ²	NG [ng/mL]	EG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Quantifier	$y = 0,1267x - 0,0229$	0,9971	0,54	1,08	1,38
Qualifier	$y = 0,0137x + 0,0381$	0,9928	0,31	0,62	1,03

Die Genauigkeit des Monoethyl-THC-OH (Anhang) konnte mit einer Präzision von RSD = 6,5 % bzw. 5,6 % (niedrige bzw. hohe Kontrollen) und einem Bias von -2,0 % bzw. -3,3 % (niedrige bzw. hohe Kontrollen) bestimmt werden, sodass diese Methode als genau angesehen werden konnte.

Die Kalibrierfunktionen des Quantifiers und Qualifiers für THC-COOH sind in Abb. 20 dargestellt. Wie die nach der DIN 32645 mit Hilfe von Valistat statistisch ermittelten Konzentrationen für die Grenzwerte verdeutlichen (Tab. 17), ist TESH nach Maßgabe der GTFCh-Empfehlungen [44] als Ethylierungsreagenz zum Nachweis von THC-COOH aus Serum geeignet.

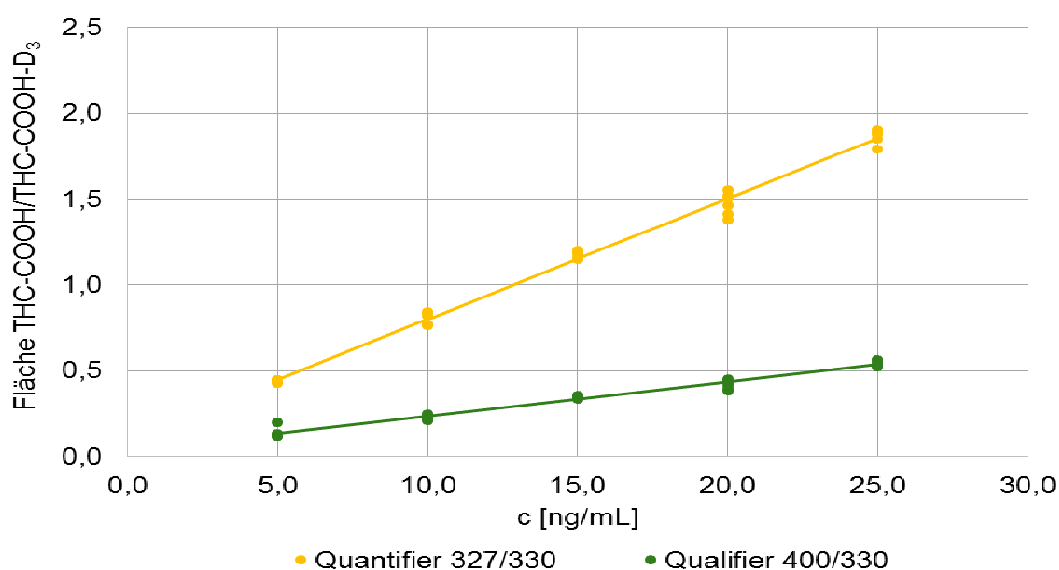


Abb. 20: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des mittels TESH ethylierten THC-COOH-Derivates (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

Bei der Genauigkeitsanalyse konnten über die Analysefunktion Konzentrationen der niedrigen und der hohen Kontrollproben entsprechend den Erwartungswerten eruiert werden (Anhang). Die Messwerte der niedrigen Kontrollprobe wichen in dem Untersuchungszeitraum von acht Tagen nur gering von dem Erwartungswert ab. In der hohen Kontrollprobe waren leichte Schwankungen auffällig, die jedoch innerhalb des Toleranzbereiches lagen und somit keine Auswirkungen auf die Genauigkeit der Methode hatten.

Tab. 17: Regressionsgleichungen, R² sowie NG, EG und BG des mittels TESH ethylierten THC-COOH; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngroße	Regressionsgleichung	R ²	NG [ng/mL]	EG [ng/mL]	BG [ng/mL]
Quantifier	$y = 0,0710x + 0,0904$	0,9998	0,98	1,97	3,28
Qualifier	$y = 0,0203x + 0,0308$	0,9989	0,79	1,58	3,04

4.2.5.3 Fazit zur Ethylierung der Cannabinoide mittels TESH

Mit TESH als Derivatisierungsmittel war ein sensitiver und selektiver Nachweis der Analyten auch in matrixbelasteten Proben möglich. Über das S/N-Verhältnis konnten für THC eine BG von 0,39 ng/mL, für THC-OH (einfach ethyliert) von 0,17 ng/mL und für THC-COOH von 0,40 ng/mL ermittelt werden (Tab. 14). Damit lagen diese Werte deutlich unterhalb der Grenzwerte, die sich in der Validierung bestimmen ließen. Entsprechend den Validierungsdaten war eine Quantifizierung des über TESH ethylierten THC erst ab 1,25 ng/mL möglich, sodass auf eine Überführung der Methode in die tägliche Routine zunächst verzichtet wurde.

4.3 Vergleich der beschriebenen Ethylierungsverfahren

Aus den Ausführungen der Kapitel 4.2.3.1 bis 4.2.5.3 wird geschlussfolgert, dass ein sensitiver und selektiver Nachweis der Analyten THC, THC-OH und THC-COOH sowohl mit 1-Iodethan als auch mit TESH als Derivatisierungsreagenz gewährleistet ist. Bei der Umsetzung von THC mit TESH muss beachtet werden, dass erst ab einer Konzentration von 1,25 ng/mL (BG) quantitative Aussagen möglich sind [51, 54, 60]. Bei geringeren Konzentrationen können lediglich semiquantitative Ergebnisse angegeben werden. Da – orientierend an den Werten der Grenzwertkommission – bei einer aktiven Teilnahme am Straßenverkehr eine Ordnungswidrigkeit begangen wurde, wenn eine THC-Konzentration ≥ 1 ng/mL vorliegt [42], sollte eine Detektionsmethode, deren BG unterhalb von 1 ng/mL THC liegt, Standard sein.

Bezüglich des THC-OH zeigte sich im Verlauf der Routine, dass die Signalintensitäten des via TESH monoethylierten THC-OH abnahmen. Mit weiterer Belastung der GC/MS kam der Sensitivitätsverlust des Monoethyl-THC-OH – bedingt durch das Peak tailing – immer deutlicher zum Tragen. Weiterhin musste abweichend von den Empfehlungen zur Grenzwertermittlung [60] das zweitintensivste Ion für die Ermittlung der Nachweisgrenze herangezogen werden, da die Signale des signalschwächsten Ions bei niedrigen Konzentrationen vom Rauschen kaum

mehr differenzierbar waren. Diethyl-THC-OH war unter Routinebedingungen aufgrund des ohnehin schlechten S/N-Verhältnisses in der Mehrzahl der Fälle nicht detektierbar. Die eben genannten Auffälligkeiten wurden bei der Ethylierung des THC-OH mittels 1-Iodethan nicht beobachtet. Hier ist die Sensitivität der Methode ($BG < 1 \text{ ng/mL}$) bezüglich der THC-OH Bestimmung deutlich hervorzuheben. Dies wird zwar nicht ausdrücklich von der GTFCh gefordert [44], ermöglicht aber, u. a. zusammen mit den ermittelten Konzentrationen von THC und THC-COOH, eine genaue Bestimmung des CIF [13].

Eine suffiziente THC-COOH-Quantifizierung ist sowohl mit 1-Iodethan als auch mit TESH möglich, da die geforderte NG von THC-COOH im Plasma bei einer Konzentration von 10 ng/mL liegt. Diese wurde mit beiden Methoden unterschritten.

Die Zeit- und Arbeitseinsparung bei Verwendung von TESH als Derivatisierungsreagenz beträgt im Vergleich zu 1-Iodethan ca. 45 min bei Aufarbeitung einer Probe. Dies spricht somit ausdrücklich für den Einsatz von TESH. Dennoch wird wegen der hier aufgeführten Gründe von der Verwendung des TESH als Derivatisierungsmittel für Cannabinoide im Routineeinsatz abgesehen. Um den hohen analytisch-forensischen Anforderungen im Hinblick auf THC gerecht zu werden, wurde 1-Iodethan als Mittel der Wahl in der Routine beibehalten. Lediglich für schnelle semiquantitative Bestimmungen kommt TESH derzeit zur Anwendung.

4.4 Vergleich eigener Validierungsparameter (Serum) mit Literaturmethoden

In dieser Arbeit wurden eine LLE, eine Derivatisierung mit 1-Iodethan bzw. TESH sowie eine Messung mittels GC/MS vorgestellt. Über die daraus resultierenden Chromatogramme konnten die in Kapitel 4.2.3.1 bis 4.2.5.2 aufgeführten Validierungsdaten ermittelt werden. In ergänzenden Validierungen konnte der lineare Bereich für THC auf 50 ng/mL , für THC-OH auf 30 ng/mL und für THC-COOH auf 200 ng/mL erweitert werden (Ethylierung mittels 1-Iodethan). In der aktuelleren Literatur fanden sich keine Publikationen, die ebenfalls eine LLE zum Nachweis von Cannabinoiden aus Serum beinhalteten. Goodall et al. [89] präsentierten 1995 eine Methode, mit der THC, THC-OH und THC-COOH mit Hilfe eines LMG bestehend aus Hexan und Ethylacetat aus dem Blut extrahiert, via BSTFA derivatisiert und mit GC/MS gemessen wurden. Die ermittelten Grenzwerte (NG für THC $0,2 \text{ ng/mL}$, für THC-OH $0,2 \text{ ng/mL}$ und für THC-COOH 2 ng/mL) lagen in etwa in der gleichen Größenordnung wie die hier berechneten Werte mit 1-Iodethan oder TESH (Tab. 18).

Für die Extraktion der Cannabinoide aus Serum ist in der Literatur oftmals die Festphasenextraktion mit anschließender Derivatisierung beschrieben. Bromberger et al. [39], Steinmeyer et

al. [27] sowie Nadulski et al. [19] ermittelten jeweils mit den von ihnen beschriebenen Methoden Grenzwerte, die sich ebenso unwesentlich von den hier vorgestellten unterscheiden. Zu bemerken ist der geringe lineare Bereich von Bromberger et al. [39], der auf die geringen Kalibrator-konzentrationen (von 0,05 ng/mL bis 2 ng/mL) zurückzuführen ist. Die Verwendung dieses schmalen Kalibrationsbereiches ist für die Routineanalytik trotz der niedrigen Grenzwerte kritisch.

Tab. 18: Vergleich der vorgestellten (fett) mit publizierten Methoden in Bezug auf verwendete Verfahren, linearem Bereich, NG und BG des THC; wenn nicht explizit von den Autoren angegeben, wurde der Bereich zwischen BG und höchstem Kalibrator als kalibrierter Bereich festgelegt, Solid-Phase-Extraktion (SPE)

Autor	verwendetes Verfahren	THC			Anmerkung
		kalibrierter Bereich [ng/mL] (linear)	NG [ng/mL]	BG [ng/mL]	
eigene Parameter	LLE, 1-Iodethan, GC/MS	1,00-50	0,29	1,00	statistische Ermittlung von NG und BG
eigene Parameter	LLE, TESH, GC/MS	1,25-4	0,39	1,25	statistische Ermittlung von NG und BG
Goodall et al. [89]	LLE, BSTFA, GC/MS	0,2-25	0,2	0,2	NG und BG bei S/N = 5
Bromberger et al. [39]	C ₁₈ -SPE, Methylidid, GC/MS	0,7-2,0	0,2	0,7	statistische Ermittlung von NG und BG
Steinmeyer et al. [27]	C ₁₈ -SPE, Methylidid, GC/MS	0,62-10,0	0,52	0,62	statistische Ermittlung von NG und BG
Nadulski et al. [19]	C ₁₈ -SPE, BSTFA, GC/MS	0,8-10,0	0,24	0,8	statistische Ermittlung von NG und BG
Maralikova et al. [8]	SPE, LC-MS/MS	0,8-100	0,2	0,8	statistische Ermittlung von NG und BG
Grauwiler et al. [20]	SPE, LC-MS/MS	0,2-100	0,1	0,2	NG bei S/N = 3, BG bei CV < 10 %

Tab. 18 (Fortsetzung): Vergleich der vorgestellten (fett) mit publizierten Methoden in Bezug auf linearem Bereich, NG und BG des THC-OH und der THC-COOH

Autor	THC-OH			THC-COOH		
	kalibrierter Bereich [ng/mL] (linear)	NG [ng/mL]	BG [ng/mL]	kalibrierter Bereich [ng/mL] (linear)	NG [ng/mL]	BG [ng/mL]
eigene Parameter	0,54-30	0,12	0,54	3,34-200	0,38	3,34
eigene Parameter	1,38-4	0,31	1,38	3,28-25	0,79	3,28
Goodall et al. [89]	0,2-25	0,2	0,2	2-100	2	2
Bromberger et al. [39]	0,7-2,0	0,2	0,7	1,3-10	0,5	1,3
Steinmeyer et al. [27]	0,62-10,0	0,49	0,68	3,35-50,0	0,65	3,35
Nadulski et al. [19]	0,51-10,0	0,15	0,51	0,88-50	0,26	0,88
Maralikova et al. [8]	0,8-100	0,2	0,8	4,3-500	1,6	4,3
Grauwiler et al. [20]	0,2-100	0,1	0,2	0,2-100	0,1	0,2

Mit der Verwendung von LC-MS/MS-Verfahren zur Detektion von Cannabinoiden konnten zum einen die Grenzwerte deutlich reduziert werden, zum anderen ließ sich der lineare Kalibrationsbereich nach oben stark erweitern. Maralikova et al. [8] bzw. Grauwiler et al. [20] beschrieben für THC und THC-OH einen linearen Bereich von < 1-100 ng/mL, für THC-COOH betrug dieser 4,3-500 ng/mL bzw. 0,2-100 ng/mL (Tab. 18). Wie die beiden, stellvertretend für den Cannabinoidnachweis via LC-MS/MS aufgeführten Beispiele verdeutlichen, scheint dieses Verfahren der Detektion mit GC/MS hinsichtlich Grenzwerten und Kalibrationsbereich mit Vorteilen behaftet zu sein. Eine definitive Gegenüberstellung zwischen den beiden Verfahren ist kritisch, da es sich um unterschiedliche Nachweismethoden handelt, die nur schwer miteinander vergleichbar sind. Trotz einiger Argumente, die für den Einsatz von LC-MS/MS in der Analytik sprechen, wurde aus aktuellen Ringversuchsergebnissen deutlich, dass die Mehrzahl der Laboratorien in Deutschland die Cannabinoidanalyse mittels GC/MS durchführten. Entsprechend ist ein weiteres Analysenverfahren für die GC/MS durchaus zeitgemäß.

4.5 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Im Verlauf der täglichen Anwendung ergab sich ein Sensitivitätsverlust des Monoethyl-THC-OH. Ein doppelt ethyliertes Produkt war teilweise nicht mehr nachweisbar. Da die BG des mit TESH ethylierten THC zudem nicht zufriedenstellend war, wurden Optimierungsversuche (Variation des Lösungsmittelverhältnisses, Vorinkubation, Erhöhung der Injektortemperatur u. a.) durchgeführt, um das Reaktionsgleichgewicht vom Monoethyl-THC-OH zum Diethyl-THC-OH zu verschieben. Weiterhin sollte so die BG des THC gesenkt werden, damit dieses Analyseverfahren zukünftig für quantitative Bestimmungen von THC auch unterhalb einer Konzentration von 1 ng/mL Anwendung finden kann. Um die auftretenden Veränderungen in den Peakflächen des jeweiligen Cannabinoids unter dem Einfluss der verschiedenen Reaktionsbedingungen zu verdeutlichen, wurde das nach Umsetzung mit TESH in allen vier Derivaten prominente Ion m/z 327 als diagnostischer Marker genutzt. Die Analytkonzentrationen betragen in allen nachfolgend aufgeführten Untersuchungen (Kapitel 4.5.1-4.5.4) für THC und THC-OH je 10 ng/50 μ L LMG und für THC-COOH 20 ng/50 μ L LMG. Alle Messungen erfolgten ohne Matrix, die GC/MS-Bedingungen entsprachen, wenn nicht gesondert aufgeführt, den in Kapitel 3.3 aufgelisteten.

4.5.1 Derivatisierung im Trockenschrank

Durch Vorinkubation im Trockenschrank für maximal eine Stunde bei 80 °C und der damit verbundenen Zufuhr von Aktivierungsenergie wurde untersucht, ob sich dadurch eine Ethylierung beider Hydroxygruppen des THC-OH ergibt.

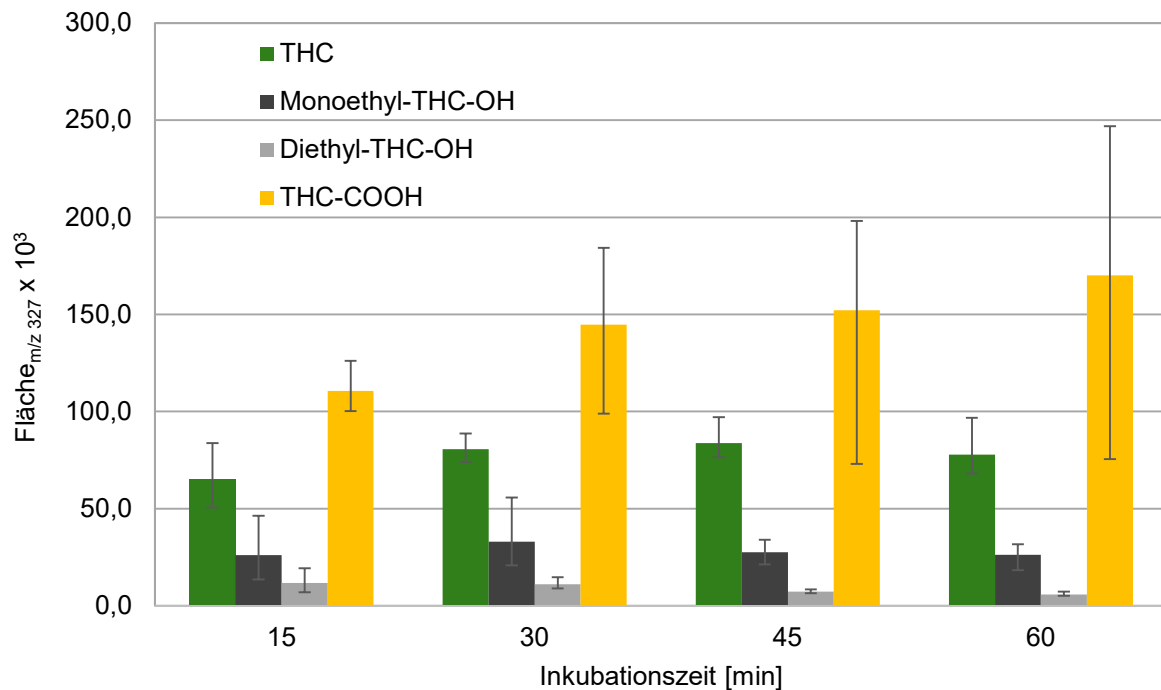


Abb. 21: Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Trockenschrank bei 80 °C (n = 3, MW ± Spannweiten)

Für THC wurde keine merkliche Peakflächenveränderung mit zunehmender Inkubationszeit festgestellt (Abb. 21). Gleiches galt für einfach und doppelt ethyliertes THC-OH. Bei THC-COOH war tendenziell eine Erhöhung der Mittelwerte mit Zunahme der Inkubationszeit erkennbar, zugleich nahmen jedoch auch die Spannweiten zu.

4.5.2 Derivatisierung in der Mikrowelle

4.5.2.1 Derivatisierung in Abhängigkeit vom Abstand zum Mittelpunkt der Mikrowelle

Alternativ zur Inkubation im Trockenschrank wurde getestet, ob mit einer Behandlung in der Mikrowelle und der damit verbundenen Zufuhr von Aktivierungsenergie eine Ethylierung beider Hydroxygruppen des THC-OH ermöglicht wird. Es wurde angenommen, dass der Bereich mit der höchsten Erwärmung nicht genau im Mittelpunkt des Drehtellers, sondern weiter peripher lag. Folgend wurde ausgehend vom Zentrum des Glastellers der Radius markiert und Proben auf dem Mittelpunkt sowie in 4, 6 bzw. 8 cm Abstand davon in der Mikrowelle platziert und bei 400 W für 3 min inkubiert (Abb. 22). Die Leistung und die Zeit wurden jeweils so hoch gewählt, dass sich die Proben möglichst stark erwärmten, aber gleichzeitig niedrig genug, um einer eventuellen Explosion durch Gasbildung vorzubeugen.

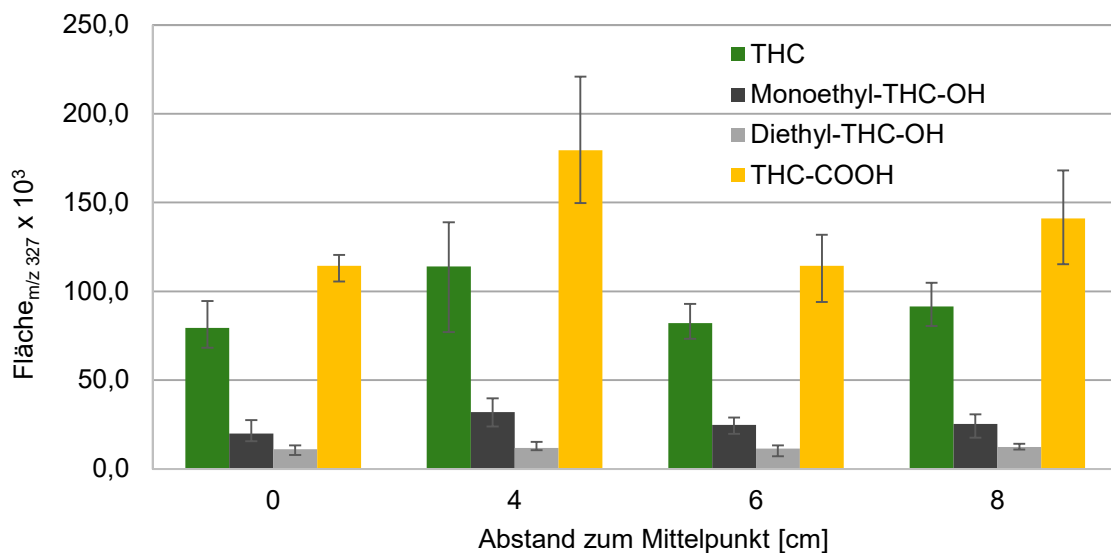


Abb. 22: Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit vom Abstand zum Mittelpunkt der Mikrowelle bei 400 W und 3 min Inkubation (n = 3, MW ± Spannweiten)

Es ist zu erkennen, dass die Integrale der Cannabinoidderivate im Mittel bei 4 cm Abstand vom Zentrum des Drehtellers am höchsten waren (Abb. 22). Am deutlichsten stellte sich dies für THC-COOH (Flächenerhöhung um 57 % im Vergleich zu der Fläche, die ohne Erwärmung generiert wurde) dar. Keinen merklichen Effekt hatte die Mikrowellenbehandlung auf die Integrale des THC-OH.

4.5.2.2 Derivatisierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Der bestmögliche Abstand bezüglich der Ausbeute an gewünschten Reaktionsprodukten lag 4 cm vom Mittelpunkt des Drehtellers entfernt (Abb. 22). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss die Inkubationszeit auf den Derivatisierungsprozess hat. Dazu wurden Proben in einem Abstand von 4 cm in der Mikrowelle jeweils für 1, 2, 3, 4 und 5 min bei 400 W behandelt und die Flächen des Fragmentions m/z 327 integriert (Abb. 23).

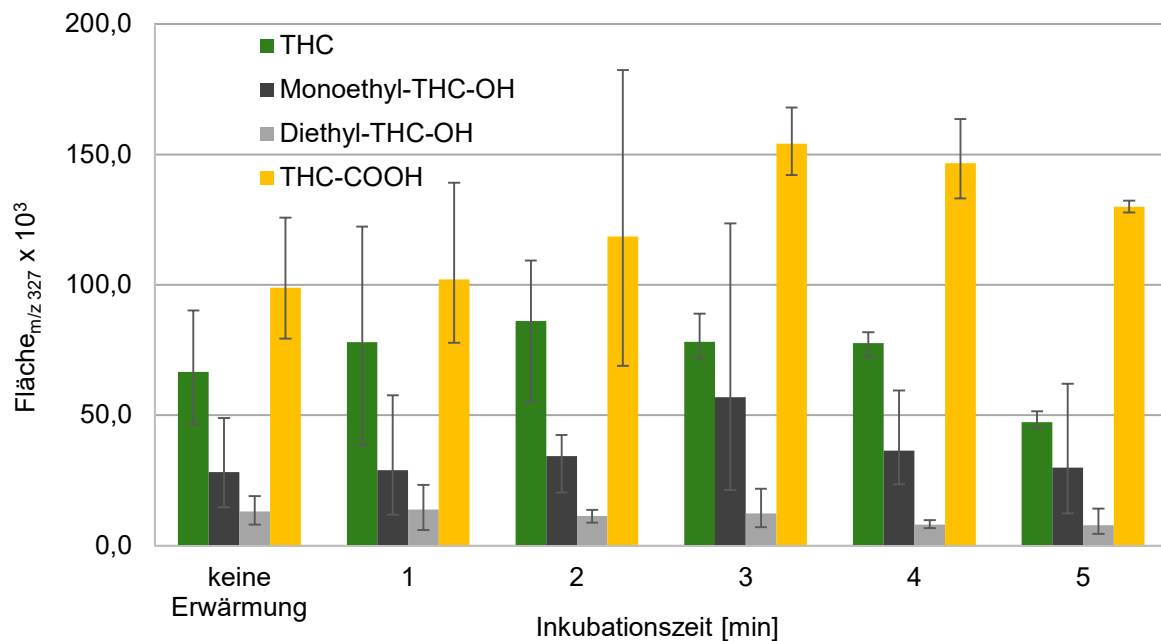


Abb. 23: Integrale des Fragmention m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in der Mikrowelle bei 4 cm Abstand zum Mittelpunkt und 400 W (n = 3, MW ± Spannweiten)

Das Integral von THC-COOH zeigte nach dreiminütiger Inkubation eine Steigerung um etwa 56 % im Vergleich zu der Fläche, die ohne Erwärmung ermittelt wurde. Die Integrale des THC und des Monoethyl-THC-OH zeigten nach einer Inkubationszeit von 3 min ebenfalls diskrete Erhöhungen der Signalflächen. Bei Inkubationszeiten über 3 min hinaus konnten für alle vier Analyten keine Erhöhungen der Signalflächen eruiert werden, viel mehr ergaben sich im Mittel geringere Integrale.

4.5.3 Derivatisierung in Abhängigkeit von der Injektortemperatur

Es wurde geprüft, welche Auswirkung die Injektortemperatur auf den Derivatisierungsprozess besitzt, da eine Umsetzung in Form einer pyrolytischen Alkylierung auch teilweise im Injektor stattfand [67]. Folglich sind verschiedene Experimente unter Variation der Injektortemperatur zusätzlich zur Behandlung in der Mikrowelle durchgeführt worden.

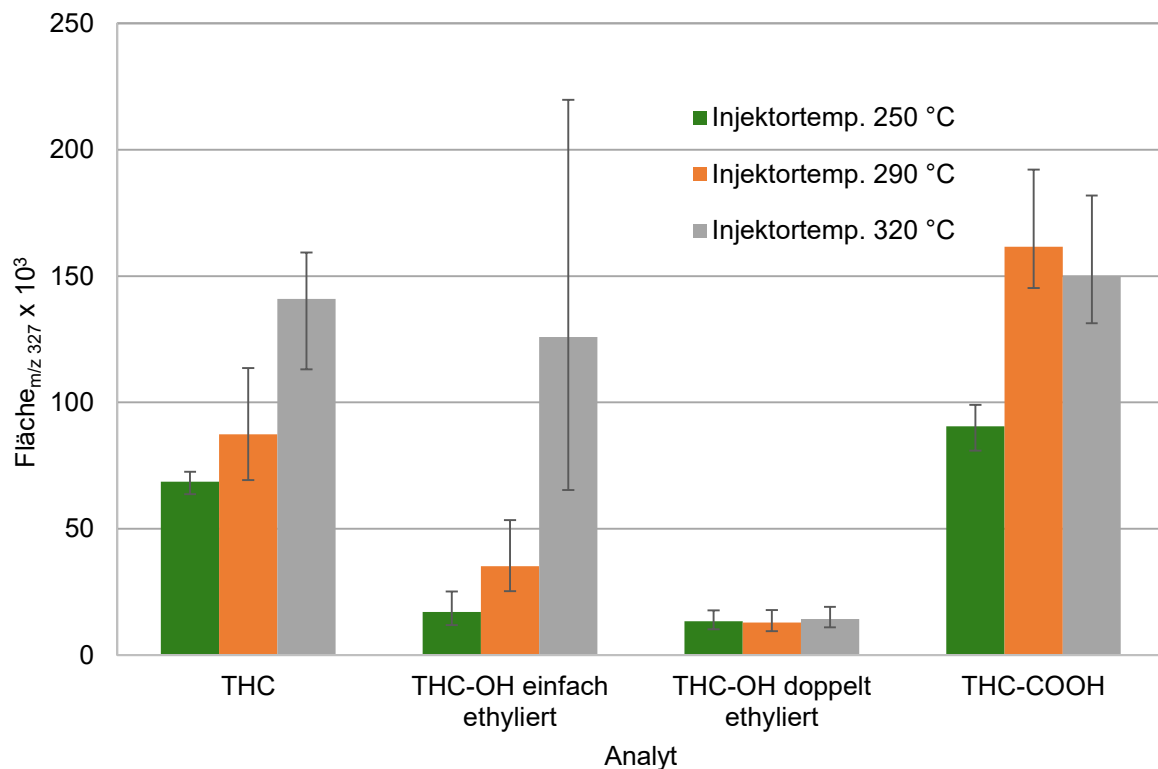


Abb. 24: Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Injektortemperatur nach Inkubation in der Mikrowelle für 3 min bei einem Abstand von 4 cm vom Mittelpunkt ($n = 3$, MW \pm Spannweite)

Trotz der Vorbehandlung in der Mikrowelle führte die Erhöhung der Injektortemperatur zu deutlichen Signalsteigerungen des THC, des Monoethyl-THC-OH und der THC-COOH (Abb. 24). Bei Diethyl-THC-OH zeigte sich hingegen kein Zuwachs der Peakfläche, wie aus Abb. 24 hervorgeht. Entsprechend können alle bisher durchgeführten Optimierungsversuche, die zum Ziel hatten, das Reaktionsgleichgewicht zugunsten des doppelt ethylierten THC-OH zu verschieben, als nicht erfolgreich angesehen werden.

4.5.4 Derivatisierung in Abhängigkeit von der Lösemittelzusammensetzung

Bisher erfolgten die Untersuchungen lediglich bei einer Lösemittelzusammensetzung von 25 μL TBME und 25 μL TESH. Durch Variation des Lösungsmittels wurde nunmehr versucht, die Ausbeute des Diethyl-THC-OH zu steigern. Dazu wurden sowohl Cyclohexan als auch *iso*-Octan anstelle des TBME getestet. Weiterhin fanden auch unterschiedliche Volumina TBME, zusätzlich zu der Inkubation in der Mikrowelle, Verwendung.

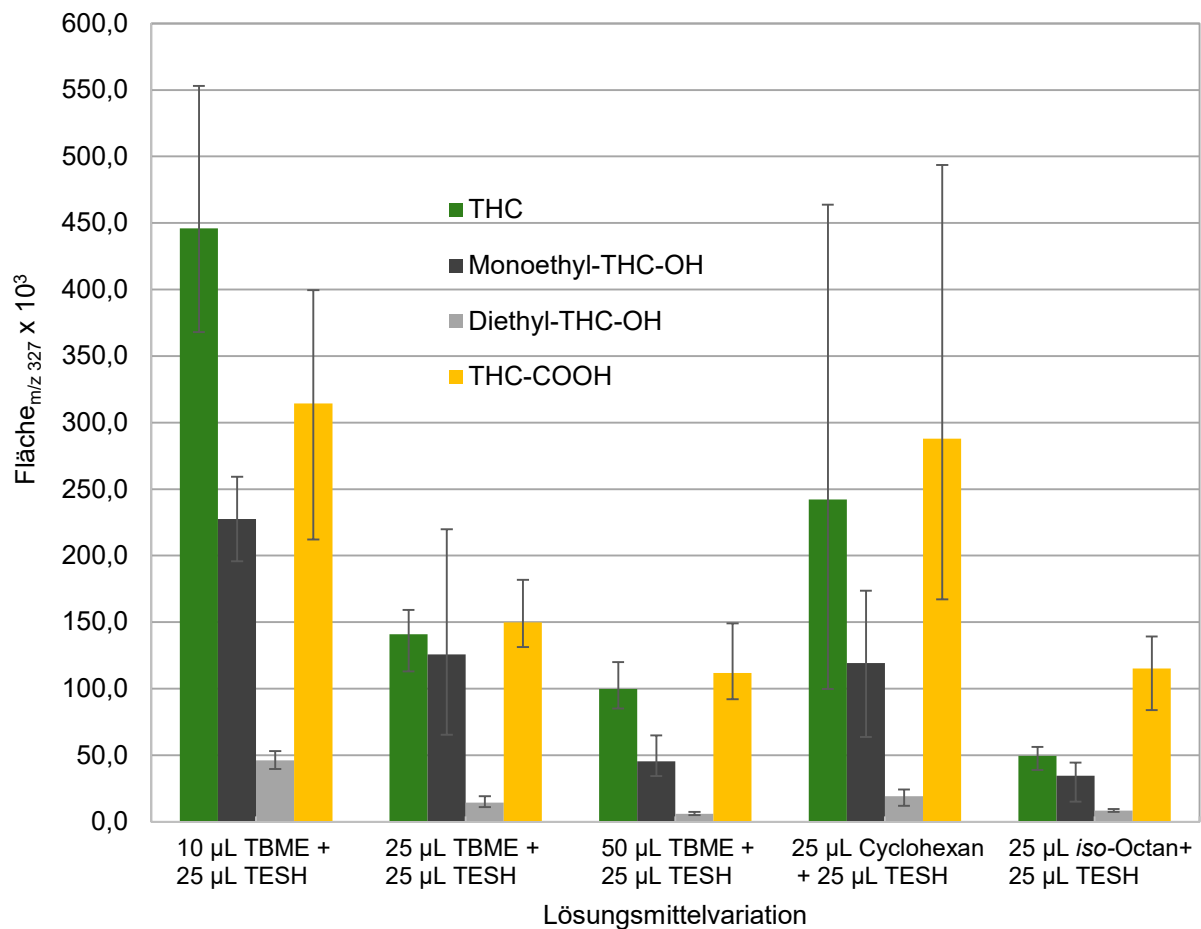


Abb. 25: Integrale des Fragmentions m/z 327 der jeweiligen Cannabinoidderivate in Abhängigkeit von der Lösemittelzusammensetzung nach 3 min Behandlung in der Mikrowelle bei 4 cm Abstand vom Mittelpunkt, Injektortemperatur 320 $^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$, $MW \pm$ Spannweite)

Wurden anstelle von 25 μL nur 10 μL TBME eingesetzt, ergaben sich Peakflächen für THC, die fast dreimal so hoch waren wie unter den bisher optimierten Bedingungen. Auch bei dem Monoethyl-THC-OH und bei THC-COOH waren bei 10 μL TBME deutliche Flächenzunahmen feststellbar. Selbst bei doppelt ethyliertem THC-OH, bei dem sich die Signalintensität durch die bisherigen Versuche nicht steigern ließ (Abb. 24), resultierte durch ein geringeres TBME-Volumen ein Flächenzuwachs.

Bei Verwendung von Cyclohexan anstelle TBME wurde ebenfalls eine Erhöhung der Signalintensitäten generiert, zugleich waren diese aber auch mit einer erheblichen Streuung verbunden. Eine Substitution des TBME-Anteils durch *iso*-Octan führte zu stark erniedrigten Produktausbeuten, sodass dieses Vorgehen keine brauchbare Option darstellte.

4.5.5 Fazit zu den Optimierungsmessungen

Die größtmögliche Erwärmung der Proben erfolgte in der Mikrowelle 4 cm vom Mittelpunkt des Drehtellers entfernt, sodass sich hier auch die größten Integrale für THC und THC-COOH detektiert ließen (Abb. 22). Folgerichtig wurde dieser Abstand für die weiteren Untersuchungen beibehalten.

Als bestmögliche Inkubationszeit konnte 3 min Erwärmung in der Mikrowelle festgelegt werden (Abb. 23). Zwar traten für THC und Monoethyl-THC-OH nur geringe Flächenerhöhungen nach dreiminütiger Inkubation auf, bei THC-COOH ergab sich jedoch im Vergleich zu den Integralen, die ohne Erwärmung bestimmt wurden, eine Peakflächenerhöhung um ca. 56 %.

Eine Erwärmung im Trockenschrank bot im Vergleich zur Mikrowelleninkubation keine Vorteile. Die mit zunehmender Inkubationszeit nur geringfügige Peakflächenerhöhung des THC und THC-OH (Abb. 21) rechtfertigte nicht die dafür benötigte Zeit von etwa einer Stunde. Bei THC-COOH zeigte sich zwar eine Erhöhung der Mittelwerte mit zunehmender Inkubationszeit, zugleich nahmen jedoch auch die Spannweiten zu, sodass den steigenden Mittelwerten nur geringfügige Bedeutung beigemessen werden konnte.

Zusätzlich zur Inkubation in der Mikrowelle hat die Injektortemperatur einen wesentlichen Einfluss auf die Peakflächen. Mit steigender Injektortemperatur wurden die Signalintensitäten des THC und des Monoethyl-THC-OH erhöht, bei THC-COOH führte eine Erhöhung von 290 °C auf 320 °C zu keiner weiteren pyrolytischen Alkylierung.

Eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes vom Mono- zum Diethyl-THC-OH konnte mit den durchgeführten Untersuchungen nicht erreicht werden (Abb. 24). Mit der TBME-Reduzierung (von 25 µL auf 10 µL) war eine Erhöhung der Peakflächen aller Derivate (auch des Diethyl-THC-OH) registrierbar. Diese Steigerung ist nur teilweise mit der Aufkonzentrierung (75 µL vs. 35 µL) erklärbar (Abb. 25). Cyclohexan konnte nicht als Alternative zu TBME als Lösungsvermittler in Betracht gezogen werden, da die generierten Messergebnisse eine erhebliche Streuung insbesondere von THC und THC-COOH aufwiesen. *iso*-Octan kam aufgrund der geringen Produktausbeuten ebenfalls nicht in Frage (Abb. 25).

Es kann festgehalten werden, dass eine Probenvorbehandlung in der Mikrowelle für 3 min bei 400 W, ein Probenabstand von 4 cm zum Mittelpunkt des Drehtellers, eine Injektortemperatur von 320 °C, sowie ein TBME-Volumen von 10 µL tendenziell vielversprechende Resultate hervorbrachte. Auf eine Validierung bei diesen optimierten Bedingungen wurde jedoch verzichtet, da dies den Umfang dieser Arbeit überstiegen hätte.

4.5.6 Beurteilung der optimierten Reaktionsbedingungen

Nicht nur die Arbeits- und Zeitersparnisse, sondern auch die Kosteneinsparungen machen den Einsatz der Trialkylsulfoniumhydroxide als Derivatisierungsreagenz lukrativ: Nach der Synthese der TASH müssten voraussichtlich über Jahre hinweg keine Alkylierungsmittel für die Cannabinoidnachweise mehr erworben werden. Folgerichtig war diese Form der Derivatisierung auch aus ökonomischer Sicht (steigende Nachweise, Abb. 3) erstrebenswert. Deshalb wurde über Variation verschiedener Parameter wie Lösungsmittelverhältnis, Vorinkubation etc. eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes vom Monoethyl-THC-OH hin zum Diethyl-Produkt angestrebt mit dem Ziel, in einer erneuten Validierung doppelt ethyliertes THC-OH heranziehen zu können. Des Weiteren wurde versucht, die BG des THC zu senken, damit dieses Analyseverfahren zukünftig für quantitative Bestimmungen auch unterhalb einer Konzentration von 1 ng/mL zur Verfügung steht.

Wie den Kapiteln 4.5.1 bis 4.5.4 zu entnehmen, konnte eine Steigerung der Diethyl-THC-OH-Flächen mit keiner der durchgeführten Analysen erzielt werden. Warum eine Ausbeuteerhöhung hin zum zweifach ethylierten THC-OH trotz Variation der Reaktionsbedingungen nicht gelingt, kann anhand eines postulierten Reaktionsschemas verdeutlicht werden (Abb. 26): Da THC-OH über eine saure phenolische und eine weniger acide (weniger reaktive) allylständige Hydroxygruppe (Nr. 1) verfügt, erfolgt eine Umsetzung primär an der phenolischen Hydroxyfunktion (Nr. 2). Dadurch könnte es zu einer Inhibierung der Reaktivität der allylständigen OH-Gruppe kommen (sterische Hinderung), sodass das einfach alkylierte Produkt das thermodynamisch günstigere Derivat darstellt. Erfolgt die Reaktion hingegen primär an der allylständigen Hydroxygruppe (Nr. 3), ist eine weitere Umsetzung an der reaktiveren phenolischen Hydroxyfunktion (Nr. 4) mit Bildung des vollständig derivatisierten THC-OH denkbar (Nr. 4).

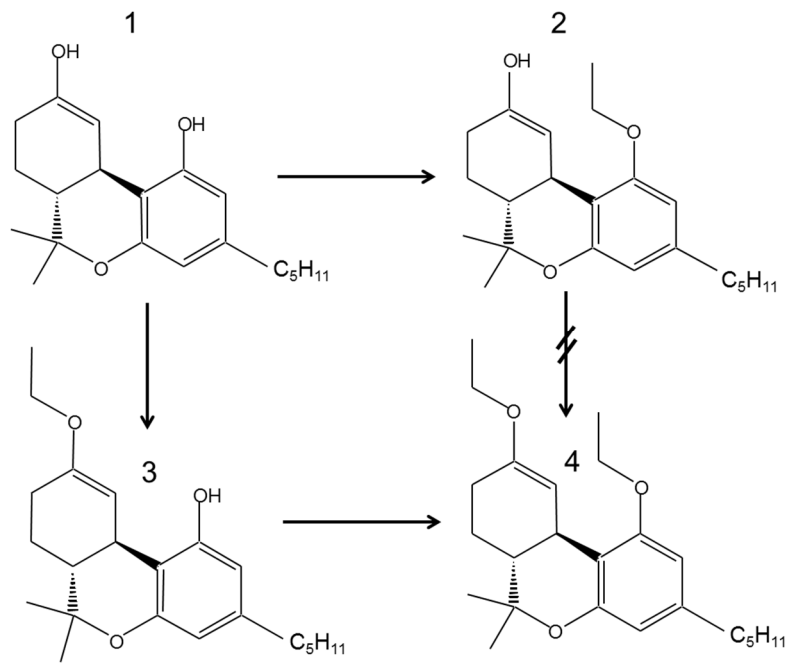


Abb. 26: Postuliertes Reaktionsschema des THC-OH bei der Umsetzung mit TESH; underivatisiertes THC-OH (1), an der phenolischen Hydroxygruppe ethyliertes THC-OH (2), an der allylständigen Hydroxygruppe ethyliertes THC-OH (3), Diethyl-THC-OH (4)

4.6 Haaranalyse

4.6.1 Derivatisierung der Cannabinoide nach Extraktion aus der Haarmatrix

In Analogie zur Serumextraktion wurden zunächst GC/MS-Scan-Messungen durchgeführt. Aus Serumuntersuchungen war bekannt, dass bis auf TIPSH die verwendeten TASH mit THC Derivate bildeten. Somit konnten ohne weitere Vortestungen matrixbelastete Proben im Scan-Modus gemessen werden. Dazu wurden 50 mg Leerhaare mit THC und THC-D₃ (c = 3 µg/mL) gespiked. Ein aus diesen Messungen resultierendes Massenspektrum ist in Abb. 27 dargestellt. Die intensiven Fragment- (m/z 313, 355 bzw. 316 und 358 des ISTD) und Molekülionen (m/z 370 bzw. 373 des ISTD) im hohen Massenbereich waren bereits aus den Serumanalysen bekannt und konnten auch hier eindeutig identifiziert werden. Trotz der matrixbelasteten Probe wurden bei der entsprechenden RT (14,37 min) keine störenden Ionen ermittelt.

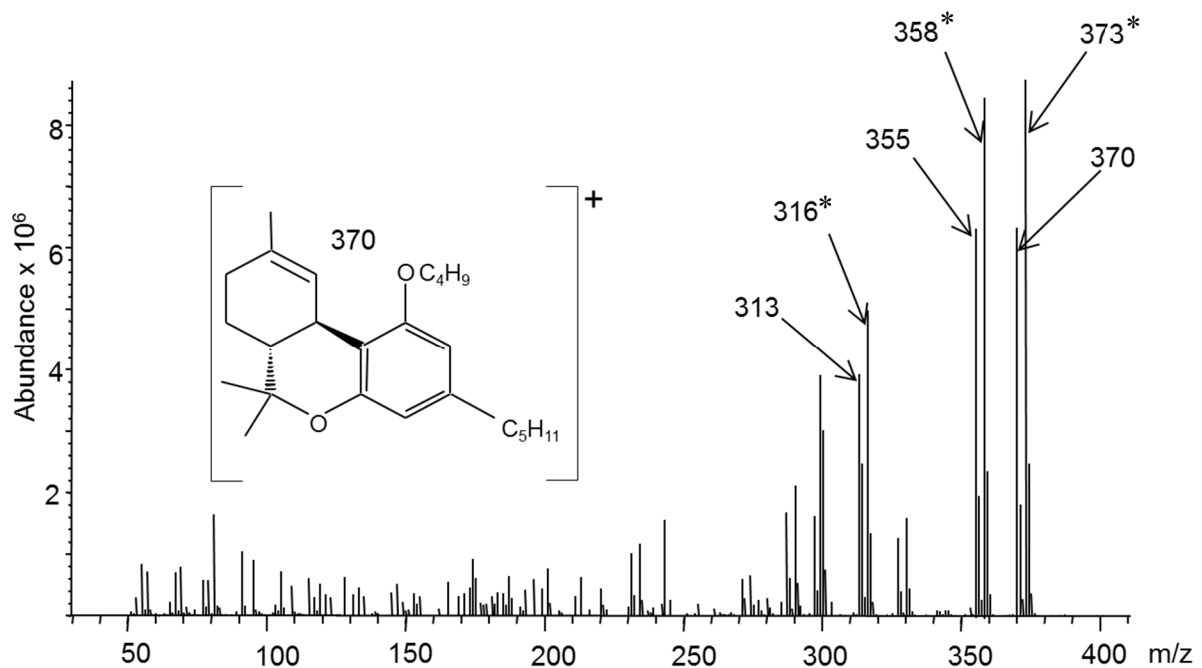


Abb. 27: EI-Massenspektrum und Ionen des butylierten THC-Derivates bei einer Konzentration von 3 µg/mL in 50 mg Leerhaar; * Ionen des ISTD (aus Rentsch et al. [70], modifiziert)

4.6.2 GC/MS-SIM-Messungen und Ermittlung der BG über das S/N-Verhältnis

In den nachfolgenden GC/MS-SIM-Messungen, für die gepoolte Segmente einer authentischen Haarprobe herangezogen wurden (Kapitel 3.6.1), zeigte das butylierte THC-Derivat die geringsten Matrixinterferenzen (Abb. 28).

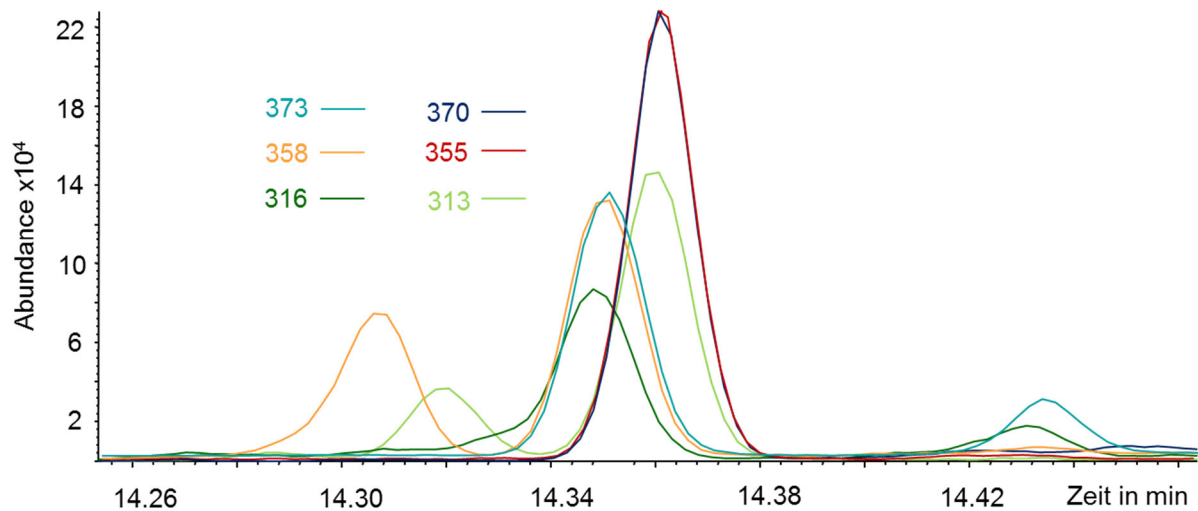


Abb. 28: Ausschnitt eines Ionenchromatogramms einer authentischen Haarprobe nach Butylierung mit TBSH; THC 370 pg/mg, THC-D₃ 200 pg/mg (aus Rentsch et al. [70])

Weiterhin lieferte das butylierte THC-Derivat das beste S/N-Verhältnis [70]; folgerichtig wurde hier die niedrigste BG (ca. 7,8 pg/mg Haar) bestimmt (Tab. 19, fett). Entsprechend erfolgte auf Grundlage dieser Ergebnisse eine Validierung des via TBSH butylierten THC nach GTFCh-Empfehlungen.

Tab. 19: BG (S/N = 10) des via TASH alkylierten THC nach Analyse authentischer Haarproben (n = 3, MW und Spannweite)

Derivatisierungsmittel	THC	
	MW [pg/mg]	Spannweite [pg/mg]
TMSH	15,8	11,8-20,5
TESH	12,8	9,54-16,0
TPSH	20,7	15,4-30,1
TBSH	7,8	6,24-9,67

4.6.3 Basisvalidierung des butylierten THC-Derivates

Für die Erstellung der Kalibrierfunktion und Bestimmung der Linearität wurde die gleiche Herangehensweise gewählt wie im Kapitel 4.2.3.1 beschrieben. Abb. 29 zeigt die Kalibrierfunktion, die ausgehend von den Mittelwerten der Sechsfachmessung mit Hilfe von Valistat generiert wurden (Kalibratorkonzentrationen siehe Kapitel 3.6.3). In Abweichung zu den Empfehlungen der Grenzwertermittlung [60] musste das zweitintensivste Ion zur Bestimmung der Nachweisgrenze herangezogen werden, da bei den Kalibratoren im unteren Konzentrationsbereich das Ion mit der niedrigsten Intensität nicht basisliniengetrennt war.

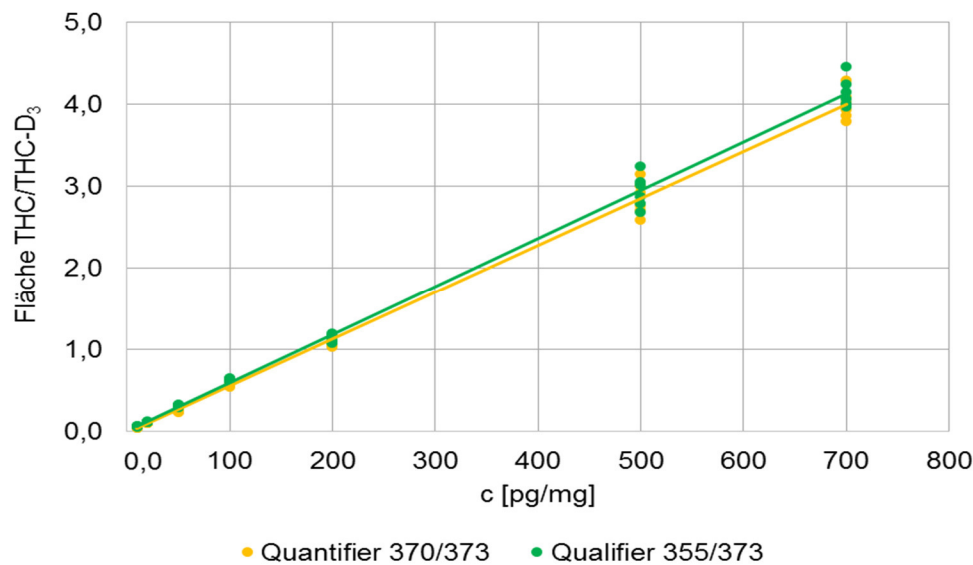


Abb. 29: Kalibrierfunktion von Quantifier und Qualifier des *n*-butylierten THC-Derivates nach Derivatisierung mit TBSH (n = 6 Messungen pro Kalibrator)

In Tab. 20 sind die dazugehörigen Regressionsparameter und Grenzwerte aufgelistet, welche den Empfehlungen der GTFCh gerecht werden.

Tab. 20: Regressionsgleichungen, R² sowie NG, EG und BG des mittels TBSH butylierten THC-Derivates; nach den Empfehlungen der GTFCh bestimmte Grenzwerte fett

Kenngroße	Regressionsgleichung	R ²	NG [pg/mg]	EG [pg/mg]	BG [pg/mg]
Quantifier	$y = 0,0057x - 0,0163$	0,9999	8,8	17,6	30,7
Qualifier	$y = 0,0059x + 0,0048$	0,9999	4,8	9,6	19,4

Obwohl gemäß Kapitel 3.6.3 zehn Kalibratoren (von 10-3000 pg/mg Haar) eingesetzt wurden, zeigt Abb. 29 nur die ersten sieben, da lediglich bis zu einer Konzentration von 700 pg/mg ein linearer Zusammenhang mittels F-Test feststellbar war. Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden mit Hilfe der Analysefunktionen die Konzentrationen der niedrigen und hohen Kontrollproben berechnet (Anzahl der Wiederholungsmessungen auf fünf Messtage reduziert [52]).

Die ermittelten Konzentrationen lagen mit einer Präzision von RSD = 4,8 % bzw. 3,9 % (niedrige bzw. hohe Kontrollen) und einem Bias von -0,1 % bzw. -2,0 % (niedrige bzw. hohe Kontrollen) eng bei den erwarteten Konzentrationen von 20 pg/mg und 200 pg/mg. Die Genauigkeit der Methode ließ sich somit bestätigen.

4.6.4 Beurteilung des THC-Nachweises im Haar mittels Butylierung

Oberhalb des linearen Bereiches korrelierte eine quadratische Anpassung der Analysefunktion besser als eine lineare [70]. Bei Messergebnissen, die sich oberhalb von 700 pg/mg befinden, müssen erneute Analysen mit einer geringeren Haareinwaage durchgeführt werden, damit die Ergebnisse im linearen Messbereich liegen. Um anschließend die THC-Konzentration möglichst genau berechnen zu können, ist diese verringerte Einwaage mit einem Korrekturfaktor zu berichtigen, da die Analysefunktion auf 50 mg Haar kalibriert wurde. Die über das S/N-Verhältnis ermittelte BG von 7,8 pg/mg konnte mit der Kalibrierfunktion nicht erreicht werden. Diese lag mit ca. 31 pg/mg höher als von den aktuellen CTU-Kriterien [50] (20 pg/mg) empfohlen, sodass Konzentrationen zwischen 20-31 pg/mg nur als semiquantitativ betrachtet werden können. In regelmäßigen Ringversuchen (Tab. 21) ließen sich die Genauigkeit und Sensitivität des Verfahrens bestätigen. Konzentrationen, die unterhalb der BG lagen, wurden semiquantitativ mit dieser Methode bestimmt und entsprachen unter Berücksichtigung der zulässigen Abweichungen den vorgegebenen Sollwerten. Dieses Verfahren lässt sich somit als zuverlässige Alternativmethode zu dem bereits bestehenden Detektionsverfahren in der Routineanalytik einsetzen.

Tab. 21: Auszug aus den Ergebnissen der Ringversuche für Betäubungsmittel im Haar; Ist-Wert, Soll-Wert und z-score des ethylierten THC

Ringversuchsnummer	THC		
	Ist [ng/mg]	Soll [ng/mg]	z-score
DHF 1/15 [90]	0,2	0,217	-0,38
DMS 1/15 [91]	0,065	0,0472	1,50

4.6.5 Vergleich eigener Validierungsparameter (Haar) mit Literaturmethoden

Aus den in Tab. 19 angegebenen Werten, zusätzlich zu denen im Anhang, kann abgeleitet werden, dass sich TBSH als Derivatisierungsmittel zum quantitativen Nachweis von THC im Haar ab einer Konzentration von 31 pg/mg eignet. Zwar werden die Empfehlungen der GTFCh [44] und der SoHT [53] damit erfüllt, jedoch wird nach aktuellen CTU-Kriterien [50] eine BG von

0,02 ng/mg gefordert, welche mit dieser Methode nicht erreichbar ist. Es ist nicht unproblematisch eine Nachweismethode für die erforderlichen Grenzwertkonzentrationen von THC im Haar zu entwickeln, wie anhand der Literatur ersichtlich wird (Tab. 22).

Tab. 22: Vergleich der vorgestellten (fett) mit publizierten Methoden in Bezug auf verwendete Verfahren, linearen Bereich, NG und BG des THC im Haar; wenn nicht von den Autoren angegeben, wurde der Bereich zwischen BG und höchstem Kalibrator als kalibrierter Bereich festgelegt

Autor	verwendetes Verfahren	THC			Anmerkung
		kalibrierter Bereich [pg/mg] (linear)	NG [pg/mg]	BG [pg/mg]	
eigene Parameter	LLE, TBSh, GC/MS	31-700	4,8	30,7	statistische Ermittlung von NG und BG
Cirimele et al. [92]	LLE, GC/MS	keine Angabe	100	keine Angabe	keine Derivatisierung, NG bei S/N = 3
Mußhoff et al. [14]	HS-SPME, MSTFA, GC/MS	200-20.000	50	270	statistische Ermittlung von NG und BG
Nadulski et al. [31]	LLE, HS-SPME, BSTFA, GC/MS	37-1.000	12	37	statistische Ermittlung von NG und BG
Salomone et al. [93]	LLE, UHPLC-MS/MS	20-1.000	1,2	3,9	NG bei S/N = 3, BG bei S/N = 10
Franz et al. [33]	LLE, Picolinsäure, LC-MS/MS	keine Angabe	5	10	keine Angabe

Cirimele et al. [92] präsentierten eine Methode zur simultanen Bestimmung von THC, CBN und CBD im Haar, mit der die drei Analyten ohne Derivatisierung erfasst wurden, sodass die hohe BG für THC von 100 pg/mg plausibel ist. Mußhoff et al. [14] konnten durch den kombinierten Einsatz von Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME), Derivatisierung mit MSTFA und GC/MS zur Detektion von THC, CBN und CBD Grenzwerte im mittleren pg/mg-Bereich erzielen (Tab. 22). Nadulski et al. [31] erhielten ebenfalls durch die kombinierte Verwendung von HS-SPME, BSTFA als Derivatisierungsmittel und GC/MS Grenzwerte, die sich in der gleichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit ermittelten Werte befanden. Mit der Verwendung von Ultra-High Performance Liquid-Chromatography/tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS), wie von Salomone et al. [93] beschrieben wurde, ist es möglich BG für THC von 3,9 pg/mg zu erreichen, weiterhin verfügt die Methode über einen weiten linearen Bereich. Wie in Kapitel 4.4 bereits erläutert, ist eine Gegenüberstellung zwischen den beiden Verfahren (GC/MS vs. LC-MS/MS) kritisch, da es sich um unterschiedliche Nachweismethoden handelt, die nur schwer miteinander vergleichbar sind.

Die Gerstel GmbH & Co. KG [94] stellte 2014 ein System vor, das eine automatische Durchführung der in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Aufarbeitungsschritte gewährleistet. Lediglich Einwiegen und Mahlen der Haare sowie Zugabe des ISTD müssen manuell durchgeführt werden. So können unter Umständen Fehlerquellen vermieden und Arbeitszeit eingespart werden. Ob

sich das System jedoch in der Routineanalytik bewährt bleibt offen, da Störanfälligkeit und Wartungsintervalle zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschätzbar sind.

4.6.6 Analyse zweier authentischer Haarstränge auf Cannabinoide

Zu Beginn der Analysen wurden CBN, CBD und THCA-A nach Derivatisierung mit den TASH ohne Matrix im GC/MS-Scan (Ermittlung von Fragment- bzw. Molekülionen sowie RT) analysiert. Anschließend wurden Leerproben gespiked und im GC/MS-SIM gemessen. Letztlich erfolgten Messungen an authentischen Haarproben. Ein aus diesen Untersuchungen resultierendes SIM-Chromatogramm für CBN, CBD und THCA-A ist in Abb. 30 dargestellt.

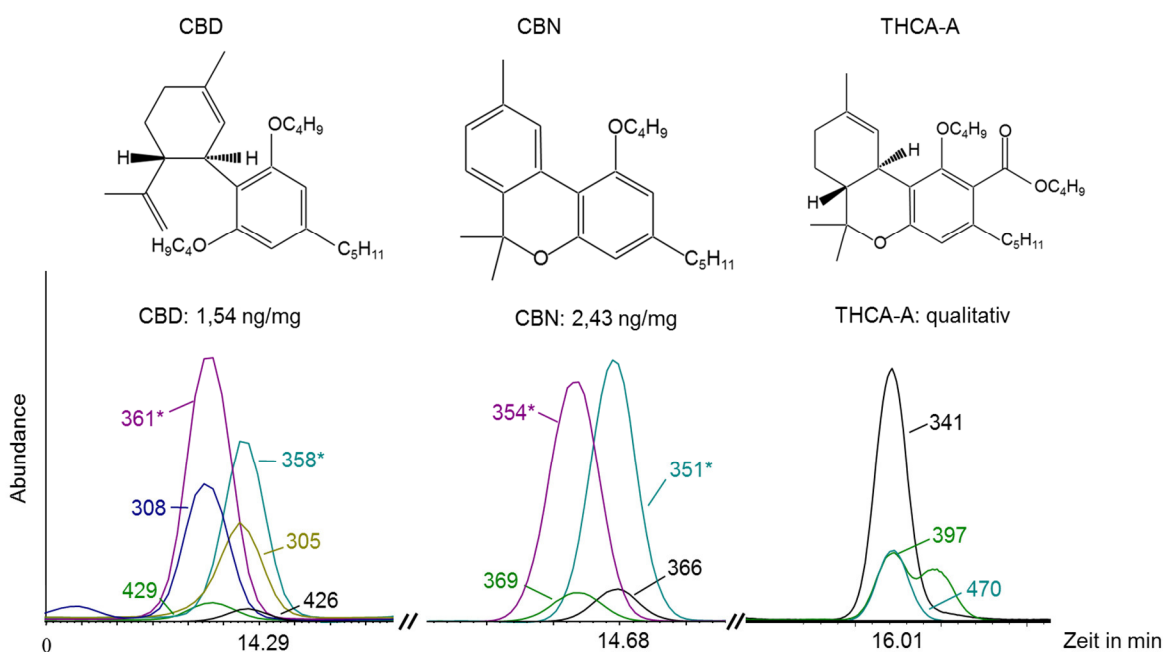


Abb. 30: Strukturformeln, Konzentrationen, SIM-Ionen und RT von Dibutyl-CBD und Butyl-CBN am Beispiel von Segment 2 aus Fall 1 (Kapitel 4.6.6.1) sowie Dibutyl-THCA-A am Beispiel von Segment 2 aus Fall 2 (Kapitel 4.6.6.3); *Quantifier (aus Steinhagen et al. [88])

CBD verfügt über zwei phenolische Hydroxygruppen (*meta*-Position), CBN besitzt eine phenolischen Hydroxyfunktion, THCA-A hat zusätzlich eine Carboxylgruppe (*ortho*-Position). Somit besitzen die drei Cannabinoide chemische Voraussetzungen, um mit TASH derivatisiert zu werden. In den SIM-Chromatogrammen zeigten sich Fragment- und Molekülionen im hohen Massenbereich, die ungestört von Matrixinterferenzen waren (Abb. 30). Da für THC eine validierte Methode für das butylierte Derivat bereits vorlag und sich für Dibutyl-CBD und Butyl-CBN ebenfalls BG (CBN = 10,2 pg/mg, CBD = 9,5 pg/mg) über das S/N-Verhältnis im unteren

pg/mg-Bereich ergaben, wurde die Butylierung via TBSH für den Cannabinoidnachweis im Haar gewählt.

4.6.6.1 Fall 1: Analyse einer 19 cm langen Rastalocke

Eine 19 cm lange, „naturbelassene“ Rastalocke aus der Okzipitalregion eines freiwilligen Spenders, der nach eigenen Angaben regelmäßig cannabishaltige Zigaretten konsumiert habe, wurde dekontaminiert. Anschließend erfolgte die Teilung des Haarstranges in 19 Abschnitte (1 Abschnitt $\hat{=}$ 1 cm). Die Nummerierung erfolgte von proximal nach distal. Jedes Segment wurde nach entsprechender Aufarbeitung (Kapitel 3.6.1) auf das Vorhandensein der Cannabinoide THC, CBN und CBD untersucht. Die quantitative Berechnung von THC erfolgte über die ermittelte Analysefunktion, die semiquantitative Bestimmung von CBN und CBD wurde mit Hilfe der Isotopenverdünnung abgeschätzt.

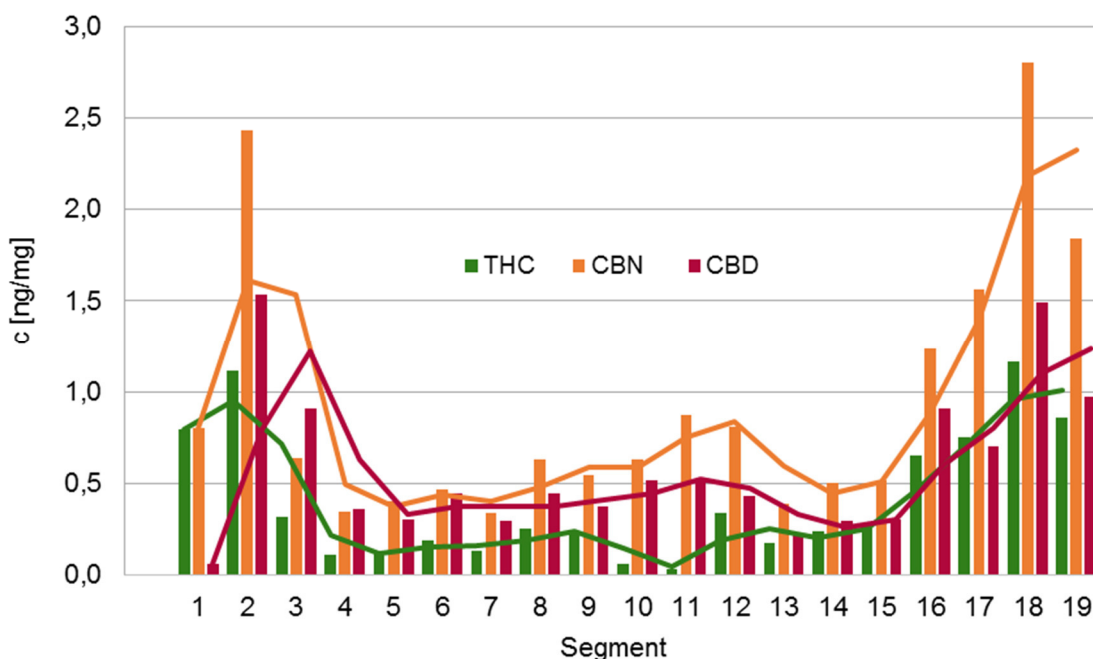


Abb. 31: Segmentweise bestimmte Konzentrationen von THC, CBN und CBD in einer 19 cm langen Rastalocke; 1 cm pro Segment (Trendlinie gleitender Durchschnitt, $n = 2$; aus Steinhagen et al. [88])

Die Konzentrationen von THC, CBN und CBD erhöhten sich vom erstem zum zweiten Segment (Abb. 31). Ab dem dritten Abschnitt fielen die Konzentrationen der drei Analyten auf mindestens unter 1 ng/mg und blieben in etwa auf diesem Niveau bis zum Segment 15 relativ konstant. Danach erhöhten sich die Konzentrationen bis zum Segment 18 und fielen dann im Abschnitt 19 wieder leicht ab. Über den gesamten Verlauf hinweg konnten, bis auf eine Ausnahme, in allen Segmenten für CBN die höchsten Konzentrationen ermittelt werden. In den mittleren Abschnitten (Segment 3-15) lagen die CBD-Konzentrationen durchgehend über der

von THC, während an den proximalen (Abschnitt 1-2) und distalen (Abschnitt 16-19) Bereichen die THC-Konzentrationen höher waren als die des CBD.

4.6.6.2 Beurteilung der Analyseergebnisse aus Fall 1

Die identifizierten Ionen (Tab. 7) der Analyten THC, CBN und CBD sowie der ISTD waren in allen 19 untersuchten Segmenten ungestört nachweisbar. Es wird diskutiert, ob THC überwiegend über den Nebenstrom die Haarmatrix kontaminiert [16]. Entsprechend ist die Expositionsfläche von entscheidender Bedeutung. Da der Haarstrang am proximalen (Segment 1-3) und distalen Ende (Segment 16-19) kaum verfilzt war, wurden dort die Analyten aufgrund der größeren Oberfläche im Vergleich zu den verfilzten Arealen (Segment 4-15) in einer wesentlich höheren Konzentration angelagert.

CBN ist ein Oxidationsprodukt des THC, welches u. a. durch Sauerstoff in der Umgebungsluft aus THC entsteht [19]. Da CBN auch in geringen Mengen von der Cannabispflanze selbst synthetisiert wird, erscheinen durchgehend höhere CBN-Konzentrationen (mit Ausnahme von Segment 1) aufgrund dieses Summationseffektes plausibel. Im ersten Segment konnten in etwa gleiche Konzentrationen für THC und CBN ermittelt werden. Als Ursache wäre eine eingeschränkte Luftzirkulation nahe der Kopfhaut denkbar. Demnach kann weniger THC zu CBN oxidiert werden, was zu annähernd gleichen Konzentrationen der beiden Analyten führt. Die CBD-Konzentrationen lagen mit bis auf wenigen Ausnahmen fast durchgehend über der von THC. Zwar enthält kultivierter Hanf vom Drogentyp mehr THC als CBD [3], dennoch lassen sich die höheren CBD-Konzentrationen durch die Oxidation von THC zu CBN erklären.

4.6.6.3 Fall 2: Analyse eines 23 cm langen Haarstranges

Ein mit Haarfärbe- und Pflegemitteln behandelter Haarstrang wurde aus der Okzipitalregion einer Probandin gewonnen, die gleichfalls über das regelmäßige Rauchen von marihuanahaltigen Zigaretten berichtete. Die Aufarbeitung, Segmentierung und Analyse der jeweiligen Cannabinoide erfolgten wie in den Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 beschrieben. Zusätzlich erfolgte ein qualitativer Nachweis von THCA-A.

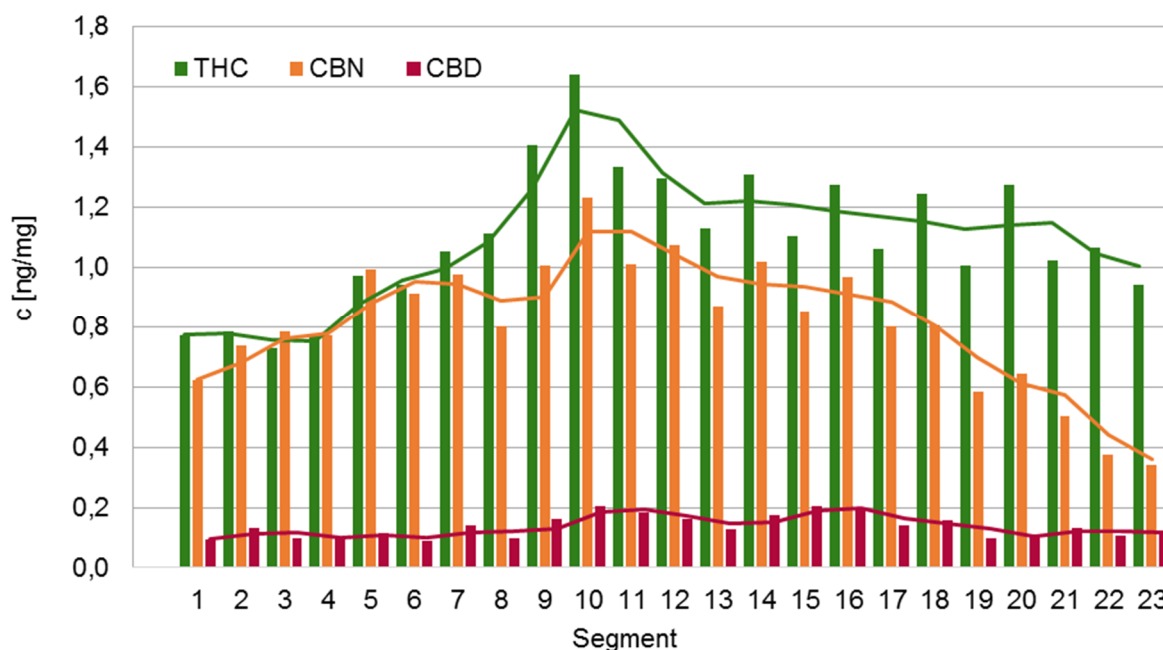


Abb. 32: Segmentweise bestimmte Konzentrationen von THC, CBN und CBD in einem 23 cm langen Haarstrang; 1 cm pro Segment (Trendlinie gleitender Durchschnitt, n = 2; aus Steinhagen et al. [88])

Die Konzentrationen von THC und CBN stiegen vom ersten bis zum zehnten Segment an (Abb. 32), ab dem zehnten bis zum 23. Abschnitt war tendenziell ein Abfall der beiden Cannabinoidkonzentrationen zu verzeichnen. Die CBD-Konzentrationen blieben über den gesamten relativ Haarstrang konstant.

4.6.6.4 Beurteilung der Analyseergebnisse aus Fall 2

THC, CBN und CBD waren in allen 23 analysierten Segmenten ungestört nachweisbar. Ansteigende Konzentrationen von THC und CBN in den proximalen zehn Segmenten lassen sich einerseits durch vermehrte Rauchbelastung, andererseits durch Anlagerung von THC und CBN über Schweiß und Talg erklären [31]. Der anschließende Konzentrationsabfall beider Analyten kann u. a. mit der durch die Blondierung (etwa ab dem 10. Segment) bedingten Zerstörung der Haarmatrix, der schädigenden Wirkung von UV-Strahlung auf die Cannabinoide [10, 15, 34] und den verwendeten Haarpflege- bzw. -färbeprodukten in Zusammenhang gebracht werden [10, 34, 31]. Im Gegensatz zum Fall 1 (Abb. 31) lagen die THC-Konzentrationen (bis auf wenige Ausnahmen) über der von CBN. Ein Resultat, welches Nadulski et al. [31] ebenfalls beschrieben. Als Ursache kann eine Konservierung und inhibierter Abbau des THC aufgrund vermehrter Haarpflege diskutiert werden [88]. Dass die CBD-Konzentration oftmals starken Variationen unterlegen ist und in allen Segmenten (im Gegensatz zur Abb. 31) durchgehend die niedrigsten Konzentration aufwies, wird nach Abgleich mit Literaturangaben für plausibel

gehalten [31]. Weiterhin könnten die relativ konstant niedrigen CBD-Konzentrationen auf den ohnehin geringen CBD-Gehalt des gerauchten Cannabis zurückgeführt werden.

Ein Vergleich zwischen den Fällen 1 und 2 und die eventuelle Ableitung eines Konsummusters anhand der Verläufe der Cannabinoidkonzentrationen können nicht erfolgen, da über die genaue haarkosmetische Behandlung beider Probanden, den THC-Gehalt des verwendeten Marihuanas und die Bedingungen, unter denen geraucht wurde, (bspw. offene oder geschlossene Räume) etc. keine Informationen vorliegen.

Bei einer durchschnittlichen Haarwachstumsrate von $1,1 \pm 0,2$ cm pro Monat [34] kann im Fall 2 anhand der 23 Segmente ein Untersuchungszeitraum von min. 18 bis max. 25 Monaten abgegrenzt werden. Im Fall 1 gestaltet sich der Rückschluss auf den Untersuchungszeitraum anhand der Haarlänge schwierig, da sich die Haarlänge durch Verfilzen stark verkürzt. Über die segmentale Analyse ganzer Haarstränge wird in der Literatur nur spärlich berichtet [31]. Meist werden nur die für eine Abstinenzprüfung empfohlenen proximalen 3-6 cm des Haarstranges berücksichtigt [50]. Dies entspricht etwa einem Untersuchungszeitraum von etwa 3 bzw. 6 Monaten [95]. Aussagen über die Cannabiskonsumgewohnheiten besonders im Hinblick auf die proximalen Haarsegmente sollten jedoch mit Vorsicht getroffen werden: Pragst et al. [15] konnten zeigen, dass selbst nach viermonatiger Abstinenz unter Umständen noch THC-Konzentrationen in den nachgewachsenen Haarabschnitten gemessen werden, die gewöhnlich auf einen gelegentlichen Konsum hindeuten würden.

4.6.6.5 Qualitative Bestimmung von THCA-A in dem 23 cm langen Haarstrang

Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass THCA-A mit der in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Extraktion, Derivatisierung via TASH und Messung mit der GC/MS erfasst werden konnte (Abb. 30). In der Analyse des 23 cm langen Haarstranges (Fall 2, Abb. 32) wurde in jedem Segment THCA-A detektiert. Das Signal war jedoch von geringer Intensität. Durch eine Zweitextraktion mit Hilfe eines LMG bestehend aus 1-Chlorbutan und Ethylacetat (3/1, v/v) konnte aus der wässrigen Phase des Hydrolysates ein größerer Anteil der verbliebenen THCA-A extrahiert werden, was intensivere Signale zur Folge hatte. Um zu prüfen, in welchem Umfang die Variation des Lösungsmittels die Signalintensität steigerte, wurden die Peakflächen der Erst- und Zweitmessung des prominentesten Ions der butylierten THCA-A (m/z 341) auf die Einwaage bezogen. Anschließend erfolgte die Quotientenbildung (Zweit-/Erstmessung).

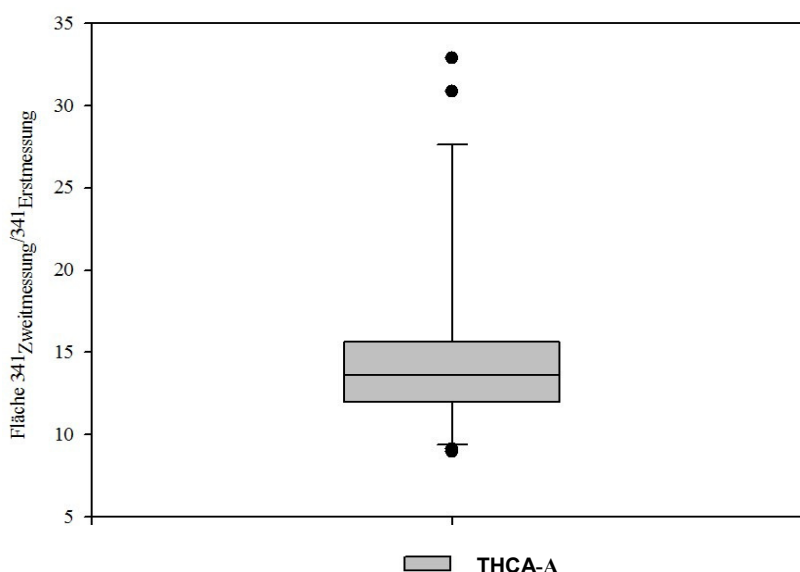


Abb. 33: Boxplot des Quotienten der Flächen aus Zweit- und Erstmessung des Ions m/z 341 der THCA-A (n = 23)

Durch den zusätzlichen Einsatz von 1 ml Ethylacetat erhöhten sich die Flächen des prominentesten Ions (m/z 341) im Median um das 13-fache (Abb. 33). Folgerichtig ist es zur Bestimmung der THCA-A sinnvoll, eine zweite LLE mit 1-Chlorbutan und Ethylacetat (3/1, v/v) durchzuführen.

4.6.6.6 Beurteilung der THCA-A-Extraktion

Eine quantitative Bestimmung von THCA-A im Haar ist entgegen Literaturangaben nach alkalischer Hydrolyse und basischer Extraktion prinzipiell möglich [34]. Jedoch ist für eine Quantifizierung ein ISTD, der nicht zwangsläufig aus der deuterierten THCA-A bestehen müsse, notwendig. Roth et al. [18] konnten zeigen, dass stattdessen auch THC-COOH-D₃ geeignet sei. Dies ließ sich an matrixfreien Proben bestätigen. In matrixbelasteten Proben zeigten sich, wie auch schon von Roth et al. [18] angegeben, deutliche Signalstörungen des Standards im alkalischen Milieu. Somit musste von THC-COOH-D₃ als ISTD für THCA-A abgesehen werden. In nachfolgenden Versuchen, die die Extraktion der Cannabinoide im sauren Milieu beinhalteten, zeigten alle vier Analyten erhebliche Matrixinterferenzen. Demnach stellte eine Ansäuerung des alkalischen Haarhydrolysates keine Option dar. In Abhängigkeit von der Haarmatrix war das THCA-A-Signal durch starkes Rauschen gestört, sodass THCA-A nicht immer bestimmt werden konnte. Fraglich ist, ob durch weitere Lösungsmittelvariationen und ergänzende methodischen Veränderungen eine robuste Methode zur Detektion von THCA-A erstellt werden kann. Eine alleinige Extraktion mit 1-Chlorbutan und Ethylacetat war nicht geeignet, da die

Signale von CBD und THC in einigen Untersuchungen deutlich gestört waren und so erhebliche Sensitivitätsverluste vorlagen.

4.7 Urinanalyse

4.7.1 Gegenüberstellung von MSTFA und TESH als Derivatisierungsreagenz zum Nachweis von THC-COOH aus Urin

Es wurde analysiert, ob TESH als alternatives Derivatisierungsmittel für MSTFA zum Nachweis von THC-COOH im Urin in Frage kommt. Dazu wurden neun asservierte Urine verwendet, welche bereits mit MSTFA in der Routineanalytik positiv auf THC-COOH getestet wurden. Diese Urine wurden wie in Kapitel 3.7 beschrieben aufgearbeitet und mit TESH bzw. MSTFA derivatisiert (drei Messungen pro Derivatisierungsmittel). Die Konzentrationsberechnungen erfolgten über die Isotopenverdünnung. Nachfolgend sind die Analyseergebnisse gegenübergestellt. Vergleichend sind in den Abb. 34 und 35 die berechneten Konzentrationen von je drei Urinen in niedriger (Nr. 1-3), mittlerer (Nr. 4-6) und hoher Konzentration (Nr. 7-9) aufgeführt.

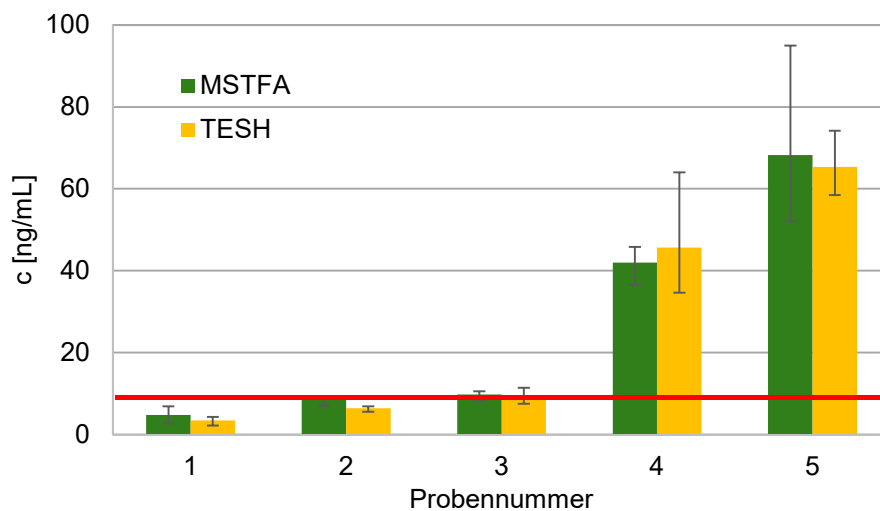


Abb. 34: THC-COOH-Konzentrationen der Probennummern 1-5 nach Derivatisierung mit MSTFA bzw. TESH (n = 3, MW ± Spannweite); Cutoff = 10 ng/mL (rote Linie)

Die ermittelten THC-COOH-Konzentrationen differierten in dem entscheidenden Bereich von 10 ng/mL (Cutoff) [96] nur geringfügig voneinander, gleiches galt für die mittleren Konzentrationen (Abb. 34). Im hohen Bereich (Abb. 35) lagen die THC-COOH-Konzentrationen nach Derivatisierung mit TESH im Durchschnitt höher als nach Umsetzung mit MSTFA.

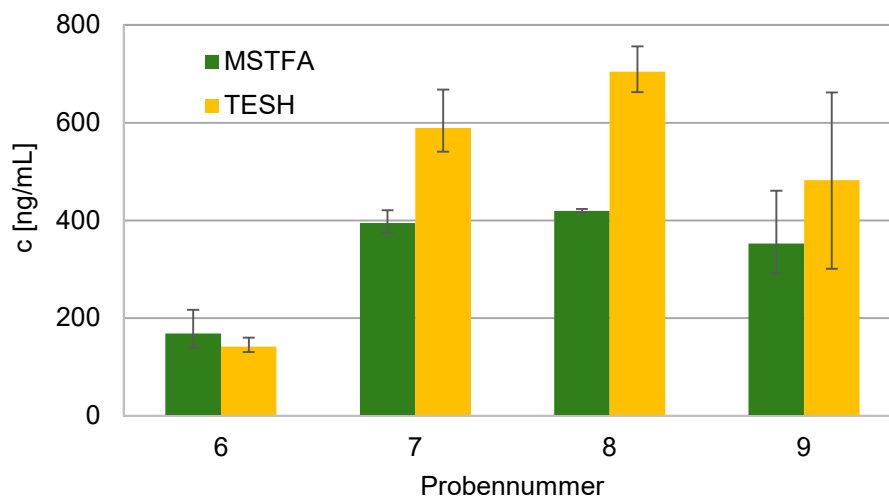


Abb. 35: THC-COOH-Konzentrationen der Probennummern 6-9 nach Derivatisierung mit MSTFA bzw. TESH (n = 3, MW ± Spannweite)

4.7.2 Beurteilung der Urinanalyse

Die Konzentrationsbestimmungen der THC-COOH wurden über die Isotopenverdünnung durchgeführt, da eine Validierung mit praktischem Nutzen aufgrund von Konzentrationsschwankungen des Urins (u. a. variierende Trinkmenge) nur schwer realisierbar ist [28]. Generell stellt TESH eine mögliche Alternative zu MSTFA dar, da sich die ermittelten Konzentrationen im Grenzbereich von 10 ng/μL (Cutoff) (Abb. 32, Probe 1-3) kaum unterschieden.

5 Erfassung von Buprenorphin

Buprenorphin ist ein synthetisches Opioid und wird u. a. zur Substitution bei Heroinabhängigkeit verabreicht. Es weist zwei Hydroxygruppen – eine phenolische und eine aliphatische – auf, die am hiesigen Institut bisher mit TFAA acyliert wurden, um die chromatographischen Eigenschaften des Buprenorphins zu verbessern. Da es möglich erscheint, mit den TASH nicht nur Cannabinoide, sondern jegliche Verbindungen mit sauren funktionellen Gruppen zu derivatisieren, wurde Buprenorphin nach Derivatisierung mit TASH im GC/MS-Scan gemessen.

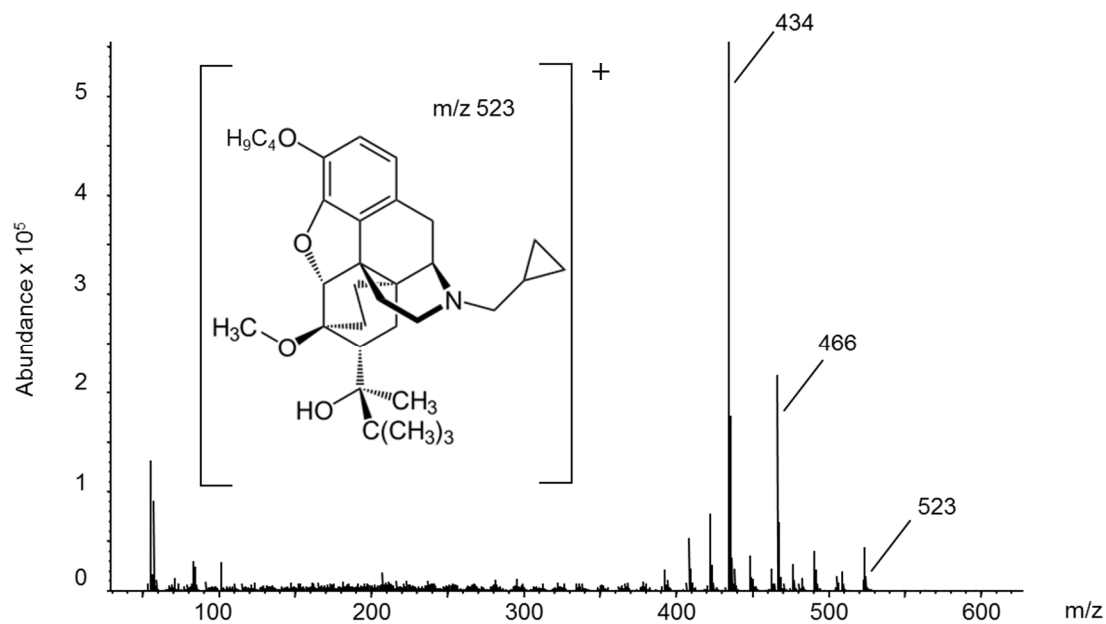


Abb. 36: Strukturformel des butylierten Buprenorphins sowie EI-Massenspektrum (c = 500 µg/50 µL)

Es konnte jeweils ein prominentes Signal mit wenigen Fragmentationen im hohen Massenbereich sowie das Molekülion (im Fall des butylierten Derivates m/z 523) identifiziert werden (Abb. 36 und Tab. 23).

Tab: 23: SIM-Ionen von Buprenorphin (Analyt/ISTD) sowie RT; * am wenigsten gestörte Ionen des Analyten

Derivatisierungsmittel	SIM-Ionen Analyt/ISTD [m/z]	RT [min]
TMSH	481/485, 424/428, 392*/396	19,51
TESH	495/499, 438/442, 406*/410	19,67
TPSH	420*/424, 452/456, 509/513	20,59
TBSH	434*/438, 466/470, 523/527	21,76

Im GC/MS-SIM waren die ausgewählten Ionen auch in Serumproben nahezu ungestört von Matrixinterferenzen detektierbar (Abb. 37). Entsprechend konnten über die am wenigsten gestörten Ionen, die in Tab. 23 mit „*“ markiert sind, BG (S/N = 10) im unteren ng/mL-Bereich eruiert werden (Tab. 24).

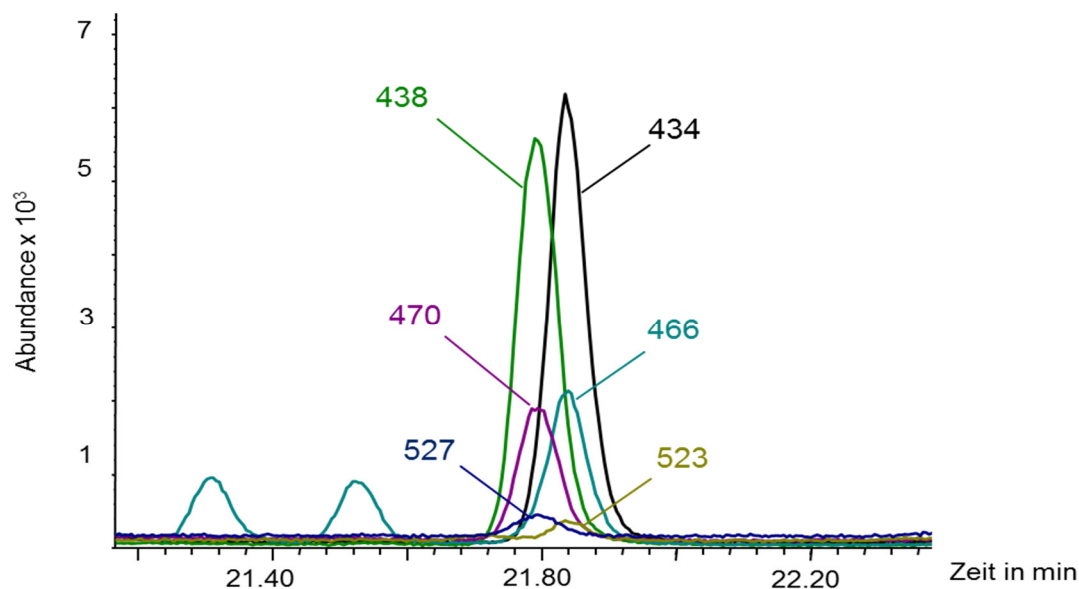


Abb. 37: Ausschnitt eines SIM-Chromatogramms des butylierten Buprenorphin nach Serumextraktion (c = 10 ng/mL Analyt und ISTD)

Tab. 24: BG (S/N = 10) nach Analyse von Leerseren gespiked mit Buprenorphin und Alkylierung mittels TASH (c = 10 ng/mL; n = 3, MW und Spannweite)

Derivatisierungsreagenz	MW [ng/mL]	Spannweite [ng/mL]
TMSH	0,40	0,39-0,42
TESH	0,47	0,35-0,61
TPSH	1,42	0,81-2,07
TBSH	1,26	0,91-1,53

Mit allen getesteten TASH konnten die entsprechenden alkylierten Buprenorphinderivate gebildet werden. Die BG des methylierten und des ethylierten Buprenorphins lagen im Mittel am niedrigsten, die des propylierten sowie butylierten Derivates lagen etwas höher. Auf Grundlage der in Tab. 24 aufgelisteten Grenzwerte könnte eine Validierung des via TMSH oder TESH alkylierten Buprenorphins durchgeführt werden.

Anhand der Molekülstruktur konnte abgeleitet werden, dass Buprenorphin vermutlich nur an der phenolischen, nicht aber an der aliphatischen Hydroxygruppe alkyliert wird, da aliphatische Hydroxygruppen nicht sauer sind und somit auch nicht mit den TASH reagieren. Entsprechend waren, unabhängig von dem verwendeten TASH, nur die einfach alkylierten Derivate registrierbar. Anders als bei THC-OH ließ sich – trotz der freien Hydroxyfunktion – kein Peak tailing

feststellen. Denkbar wäre eine „Abschirmung“ dieser underivatisierten hydrophilen Gruppe aufgrund der Konformation des Buprenorphinmoleküls (Strukturformel Abb. 36). Somit hatte die verbliebene Polarität keine negativen Auswirkungen auf die Chromatographie.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Analyten stellen lediglich eine kleine Auswahl an Verbindungen dar, die mit Hilfe von TASH derivatisierbar sind. Voraussetzung für die Alkylierung von Substanzen mittels TASH ist, dass diese Verbindungen über saure funktionelle Gruppen verfügen. Somit müssten weitere forensisch relevante Substanzen wie Codein und Hydrocodon, aber auch Propofol und Lysergsäure aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften mit TASH alkylierbar sein. Durch Derivatisierung könnten sich auch hier die chromatographischen Eigenschaften und nicht zuletzt die Sensitivität des Nachweisverfahrens verbessern.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden GC/MS-Methoden zum Nachweis von THC, THC-OH und THC-COOH im Serum, sowie für THC, CBN, CBD und THCA-A im Haar unter Verwendung von homologen Alkyljodiden (C₂-C₅) bzw. synthetisierter, kommerziell nicht erhältlicher Trialkylsulfoniumhydroxide (C₂-C₄) entwickelt.

Für THC, THC-OH und THC-COOH konnten mit allen verwendeten *n*-Alkyljodiden – im System TBAH, DMSO und RI – geeignete Derivate gebildet werden. Für die ethylierten Derivate wurde zudem eine Basisvalidierung durchgeführt. Verzweigt-kettige Alkyljodide (*iso*- bzw. *tert*-Alkyljodide) besitzen im Vergleich zu den isomeren *n*-Alkyljodiden im System TBAH, DMSO und RI eine geringere Reaktivität, sodass sich abhängig von dem Verzweigungsgrad nur bedingt die erwarteten Derivate von THC, THC-OH und THC-COOH detektieren ließen. 1,1,1-Trifluor-2-iodethan bildete ein unerwartetes Iod-substituiertes THC-Derivat.

Mit Hilfe von Trialkylsulfoniumhydroxiden gelang es, phenolische Hydroxy- und Carboxylgruppen vollständig, allylständige Hydroxygruppen hingegen nur bedingt zu alkylieren. Bis auf Triisopropylsulfoniumhydroxid reagierten alle getesteten Trialkylsulfoniumhydroxide mit den untersuchten Cannabinoiden. Weiterhin zeigte sich, dass mit Ausnahme von Trimethylsulfoniumhydroxid THC-OH nur teilweise in die Dialkyl-Derivate überführt werden konnte. Nach Modifikation der Cannabinoide mit Triethylsulfoniumhydroxid ergab sich in Voruntersuchungen die ungestörteste massenspektrometrische Detektion, entsprechend wurde dieses Reagenz für die Basisvalidierung herangezogen. Unter Routinebedingungen verschlechterte sich jedoch die THC-OH-Detektion, sodass auf einen Einsatz dieser Methode in der Routineanalytik vorerst verzichtet wurde.

Bei Derivatisierung mit Trialkylsulfoniumhydroxiden beträgt die Zeit- und Arbeitersparnis bei Aufarbeitung einer Probe im Vergleich zur Alkylierung mit Alkyljodiden ca. 45 min.

Durch Variation der Reaktionsbedingungen gelang es teilweise, die Ausbeute der Derivate zu erhöhen. Das Optimum für die Umsetzung der Analyten stellte eine 3 minütige Vorinkubation in der Mikrowelle bei 400 W, 4 cm Abstand zum Mittelpunkt des Drehtellers und eine Injektortemperatur von 320 °C dar. Allerdings gelang es beim THC-OH nicht, die Ausbeute an Diethyl-THC-OH zu erhöhen. Unter diesen Bedingungen erscheint es dennoch möglich, die derzeit noch bestehenden Defizite in der Umsetzung mit Triethylsulfoniumhydroxid zu beheben, was sich in weiteren matrixbelasteten Probenmessungen bestätigen muss.

Unter Verwendung von Tributylsulfoniumhydroxid konnte eine sensitive Methode entwickelt werden, welche THC quantitativ, CBN und CBD semiquantitativ sowie THCA-A qualitativ im Haar erfasst.

Grundsätzlich sind Trialkylsulfoniumhydroxide auch zur THC-COOH-Bestimmung aus der Matrix Urin geeignet. Da Trialkylsulfoniumhydroxide mit allen sauren Hydroxyfunktionen reagieren müssten, wurde beispielhaft der kritische Analyt Buprenorphin ausgewählt und dabei eine vielversprechende Sensitivität aus der Matrix Serum erzielt.

7 Literatur

1. Roth NB (2014) Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A-Studien und Untersuchungen zur Anwendung als Cannabis-Konsummarker in der forensischen Toxikologie. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Freiburg
2. Freisleben SK (2011) Interpretation von quantitativen Cannabinoid-Bestimmungen in Blutproben in Zusammenhang mit Straßenverkehrsdelikten. Medizinische Dissertation, Universität Freiburg
3. Prentner A (2010) Bewusstseinsverändernde Pflanzen von A-Z. 2. Aufl. Springer, Wien New York
4. Ashton CH (2001) Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 178: 101–106
5. Sticht G, Käferstein H (1998) Grundbegriffe, Toxikokinetik und Toxikodynamik. In: Berghaus G, Krüger HP (Hrsg) Cannabis im Straßenverkehr. Fischer, Stuttgart Jena Lübeck Ulm, S 1-11
6. Lott S (2009) Isotopenverdünnungsmassenspektrometrische Primärmethode zur Analyse von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) in Serum und Prüfung von THC-Glucuronid (THCglu) als Urinmarker für THC in Serum. Medizinwissenschaftliche Dissertation, Universität Heidelberg
7. Shaw LM, Edling-Owens J, Mattes R (1991) Ultrasensitive measurement of Δ^9 -tetrahydrocannabinol with a high energy dynode detector and electron-capture negative chemical-ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 37: 2062–2068
8. Maralikova B, Weinmann W (2004) Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39: 526–531
9. Grotenhermen F (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 42: 327–360
10. Mußhoff F, Lachenmeier DW, Madea B (2004) Cannabinoide. In: Madea B, Mußhoff F (Hrsg) Haaranalytik: Technik und Interpretation in Medizin und Recht. Deutscher Ärzteverlag Köln, S 179-188

11. Madea B, Mußhoff F (2012) Fahrsicherheit bei einer Teilnahme am Straßenverkehr unter Drogeneinfluss aus medizinischer Sicht. In: Madea B, Mußhoff F, Berghaus G (Hrsg) Verkehrsmedizin-Fahreignung, Fahrsicherheit, Unfallrekonstruktion. 2. Aufl. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, S 487-498
12. Thieme D, Sachs H, Uhl M (2014) Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography-tandem and multistage mass spectrometry. *Drug Test Anal* 6: 112–118
13. Drasch G, Meyer L von, Roeder G et al. (2003) Absolute Fahruntüchtigkeit unter der Wirkung von Cannabis. Vorschlag für einen Grenzwert. *Blutalkohol* 40: 269–286
14. Mußhoff F, Junker HP, Lachenmeier DW et al. (2002) Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 26: 554–560
15. Pragst F, Balikova MA (2006) State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370: 17–49
16. Moosmann B (2015) Neue Aspekte in der Haaranalytik auf Cannabinoide. *Toxichem Krimtech* 82: 311–317
17. Stevens A (2002) Cannabis und Cannabinoide als Medizin. *Sucht* 48: 329–335
18. Roth N, Moosmann B, Auwärter V (2013) Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair. *J Mass Spectrom* 48: 227–233
19. Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M et al. (2005) Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J Anal Toxicol* 29: 782–789
20. Grauwiler SB, Scholer A, Drewe J (2007) Development of a LC-MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of cannabis sativa extracts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850: 515–522
21. Mußhoff F, Madea B (2006) Fahrunsicherheit durch Drogen und Medikamente. *Rechtsmedizin* 16: 88–107
22. Möller MR, Kauert G, Schneider E et al. (2006) Leistungsverhalten und Toxikokinetik der Cannabinoide nach inhalativer Marihuanaaufnahme. *Blutalkohol* 43: 361–375
23. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2009) Antrag auf Erteilung einer Ausnahmeerlaubnis nach § 3 Absatz 2 BtMG zum Erwerb von Cannabis zur Anwendung im Rahmen einer medizinisch betreuten und begleiteten Selbsttherapie.

- http://www.bfarm.de/SharedDocs/Formulare/DE/Bundesopiumstelle/BtM/Cannabis_Hinweise_Patient.pdf?__blob=publicationFile. Zugegriffen 16. Aug 2015
24. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (1994) Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln. https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/btmg_1981/gesamt.pdf. Zugegriffen 16. Aug 2015
 25. Tönnes S, Walter J, Wunder C et al. (2013) Zur Beurteilung von aggressiven Verhaltens bei Cannabiskonsum. *Blutalkohol* 50: 213-228
 26. Tönnes S (2012) Möglichkeiten und Grenzen der Interpretation von Cannabinoid-Blutkonzentrationen. Supplement II. *Blutalkohol* 49: 51-52
 27. Steinmeyer S, Bregel D, Warth S et al. (2002) Improved and validated method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 772: 239–248
 28. Daldrup T, Käferstein H, Köhler H et al. (2000) Entscheidung zwischen einmaligem/gelegentlichem und regelmäßigem Cannabiskonsum. *Blutalkohol* 37: 39–47
 29. Geiger H (2007) Die Zulässigkeit unbestimmter Rechtsbegriffe dargestellt an ausgewählten Beispielen aus dem Verkehrsrecht. In: Miltner E, Mattern R, Schubert W (Hrsg) Prüfmethoden der Fahreignungsbegutachtung in der Psychologie, Medizin und im Ingenieurwesen. 3. gemeinsames Symposium der DGVP und DGVM, Tagungsband. Kirschbaum, Bonn, S 18-19
 30. Wehner H, Wildemann H, Köhling R (2006) Quantitative Pharmakokinetik der passiven THC-Aufnahme. *Blutalkohol* 43: 349-360
 31. Nadulski T, Pragst F (2007) Simple and sensitive determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 846: 78–85
 32. Uhl M, Sachs H (2004) Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci Int* 145: 143–147
 33. Franz T, Dame T, Schwarz G et al. (2015): Einfluss der Probenvorbereitung auf die Bestimmung von THC und seinen Metaboliten in Haarproben. *Rechtsmedizin* 25: 399
 34. Skopp G, Mattern R (2010) Zum Stellenwert des Nachweises von Cannabinoiden im Haar. *Blutalkohol* 47: 1–9
 35. Schröder J, Nadulski T, Lehmann S et al. Nichtwässrige derivative Headspace-Festphasenmikroextraktion in Verbindung mit GC/MS in der Haaranalyse-eine sensitive Methode zur

- Bestimmung von Cannabis- und Alkoholmissbrauch. In: Pragst F, Aderjan R (Hrsg) Tagungsband zum 15. GTFCh-Symposium, S 393-402
36. Bundesverwaltungsgericht (2016) Eigenanbau von Cannabis zu therapeutischen Zwecken ausnahmsweise erlaubnisfähig. <http://www.bverwg.de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilung.php?jahr=2016&nr=26>. Zugegriffen 21. Mai 2016
 37. Rocholz G (2011) Gefahr im Verzug! Notwendigkeit einer zeitnahen Blutentnahme bei Straßenverkehrsdelikten. Rechtsmedizinische Hintergründe. Blutalkohol 48: 129–136
 38. Grotenhermen F, Karus M (2002) Grenzwertmodelle zur Bestimmung der Fahrtüchtigkeit und Messverfahren. In: Grotenhermen F, Karus M (Hrsg) Cannabis, Straßenverkehr und Arbeitswelt. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 315-318
 39. Bromberger A, Goerke R, Weinmann W (1999) Bestimmungsgrenzen für den Nachweis von Cannabinoiden in Serum. Rechtsmedizin 9: 131–137
 40. Daldrup T, Meininger I (1998) Begutachtung der Fahrtüchtigkeit unter Cannabis im Strafverfahren. In: Berghaus G, Krüger HP (Hrsg) Cannabis im Straßenverkehr. Fischer, Stuttgart Jena Lübeck Ulm, S 181-204
 41. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (1998) Strafgesetzbuch. <https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/stgb/gesamt.pdf>. Zugegriffen 20. Mai 2016
 42. Möller MR (2004) Analytische Grenzwerte und Paragraph 24a StVG. Supplement I. Blutalkohol 41: 16–22
 43. Anonym (2015) Zur Information: Gesetzesentwurf zur Legalisierung von Cannabis. Blutalkohol 52: 195-201
 44. Paul L, Mußhoff F, Peters F et al. (2009) Anhang A zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Qualitätsanforderungen an die Bestimmung spezieller Analyten aus biologischen Matrices mit Tabellenanhang (aktuelle Vorgaben zu Bestimmungsgrenzen). Toxichem Krimtech 76: 177-184
 45. Auwärter V, Daldrup T, Graw M et al. (2015) Empfehlung der Grenzwertkommission für die Konzentration von Tetrahydrocannabinol (THC) im Blutserum zur Feststellung des Trennungsvermögens von Cannabiskonsum und Fahren. Blutalkohol 52: 322–323
 46. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2010) Verordnung über die Zulassung von Personen zum Straßenverkehr (Fahrerlaubnis-Verordnung). http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/fev_2010/gesamt.pdf. Zugegriffen 20. Mai 2016
 47. Anonym (2016) Gemeinsame Stellungnahme zur forensisch-toxikologischen Haaranalytik. Toxichem Krimtech 83: 126

48. Bundeskriminalamt (2013) Polizeiliche Kriminalstatistik-Grundtabelle 01 Berichtszeitraum 2012. <http://www.bka.de/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/2012/2012Standardtabellen/pks2012StandardtabellenFaelleUebersicht.html>. Zugegriffen 17. Aug 2015
49. Nowotnik J (2015) Alkohol-, Drogen- und Medikamentenkonsum im Einzugsgebiet des Instituts für Rechtsmedizin Rostock unter besonderer Berücksichtigung der Verkehrsdelinquenz: eine Auswertung forensischer Untersuchungsaufträge und -befunde der Jahre 2002 bis 2012. Medizinwissenschaftliche Dissertation, Universität Rostock
50. Mußhoff F (2014) 3. Auflage "Urteilsbildung in der Fahreignungsbegutachtung-Beurteilungskriterien" Blutalkohol 51: 11-18
51. Paul LD, Mußhoff F, Aebi B et al. (2009) Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Toxichem Krimtech 76: 142–176
52. Mußhoff F, Skopp G, Pragst F et al. (2009) Anhang C zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben. Toxichem Krimtech 76: 209–216
53. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P (2012) Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. Forensic Sci Int 218: 20–24
54. Peters FT, Drummer OH, Mußhoff F (2007) Validation of new methods. Forensic Sci Int 165: 216–224
55. Gotta JC (2004) Nachweis und Quantifizierung von Drogen und anderen Fremdstoffen in Blutspuren auf verschiedenen Trägermaterialien. Medizinische Dissertation, Universität Gießen
56. Mauden M, Skopp G, Mattern R et al. (2000) GC/MS-Bestimmung von THCCOOH im Serum: Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden und Einfluß von THCCOOH-Glucuronid. Blutalkohol 37: 48–56
57. Weinmann W, Aebi B, Steinert C et al. (2008) Artefaktische Erhöhung der freien Δ^9 -THC-COOH im Serum: systematische Untersuchungen mit GC/MS und LC-MS/MS in zwei Laboratorien. Rechtsmedizin 18: 302
58. Vycudilik W (1977) Die Derivatisierung in der gaschromatographischen Analyse. Rechtsmedizin 80: 197–203
59. Baptista MJ, Monsanto PV, Marques E et al. (2002) Hair analysis for Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI: Comparison with GC/MS-NCI for Δ^9 -THC-COOH. Forensic Sci Int 128: 66–78

60. Schmitt G, Herbold M, Aderjan R (1999) Berechnung der Nachweis-, der Erfassungs- und der Bestimmungsgrenze von Tetrahydrocannabinol (THC) in Serum. *Blutalkohol* 36: 362–370
61. Coles R, Clements TT, Nelson GJ et al. (2005) Simultaneous analysis of the Δ^9 -THC metabolites 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC and 11-hydroxy- Δ^9 -THC in meconium by GC/MS. *J Anal Toxicol* 29: 522–527
62. ElSohly MA, Feng S (1998) Δ^9 -THC metabolites in meconium: identification of 11-OH- Δ^9 -THC, 8,11-diOH- Δ^9 -THC, and 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH as major metabolites of Δ^9 -THC. *J Anal Toxicol* 22: 329–335
63. Holtey-Weber R (2001) Multimethode zur Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Heidelberg
64. Kintz P, Cirimele V (1997) Testing human blood for cannabis by GC/MS. *Biomed Chromatogr* 11: 371–373
65. Möller MR, Doerr G, Warth S (1992) Simultaneous quantitation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in serum by using deuterated internal standards and its application to a smoking study and forensic cases. *Forensic Sci Int* 37: 969–983
66. Schütz H, Gotta JC, Erdmann F et al. (2002) Simultaneous screening and detection of drugs in small blood samples and bloodstains. *Forensic Sci Int* 126: 191–196
67. Sporkert F, Rentsch D (2004) Schnelle alternative Methylierung zum Nachweis von Cannabinoiden in Serum, postmortalem Blut und Haar unter Verwendung von Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) als Derivatisierungsreagenz. In: Pragst F, Aderjan R (Hrsg) *Ausgewählte Aspekte der Forensischen Toxikologie*. Dr. Dieter Helm, Heppenheim, S 334-342
68. Mladek C, Voemel R (2014) GC für Neueinsteiger. http://www.novia.de/fileadmin/novia/Downloads/docs/GC_fuer_Neueinsteiger.pdf. Zugegriffen 20. Mai 2016
69. Gerhards P, Szigan J (1997) Analytische Grundlagen der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie. In: Gerhards P, Bons U, Sawazki J et al. (Hrsg) *GC/MS in der klinischen Chemie*. VCH, Weinheim, S 1-35
70. Rentsch D, Steinhagen R, Kegler R et al. (2014) Innovative Bestimmung von THC im Haar nach Derivatisierung mit Trialkylsulfoniumhydroxiden. *Rechtsmedizin* 24: 369
71. Marschner P (2003) Zur Prävalenz von Drogen, psychotropen Medikamenten und Alkohol bei verkehrsauffälligen Kraftfahrern vor Vollendung des 25. Lebensjahres in Mecklenburg-Vorpommern im Zeitraum November 2000 bis Juli 2001. Medizinische Promotion, Universität Rostock

72. Kegler R, Rentsch D, Nowotnik J et al. (2012) Post-mortem investigation of an 88 cm long dreadlock for drugs of abuse: an unusual case report from the northeast of Germany. *Rechtsmedizin* 22: 340–341
73. Anonym (2014) Kapillargaschromatographie. www.uni-jena.de/unijenamedia/Anleitung_GC_2008_final.pdf. Zugegriffen 20. Mai 2016
74. Brüscheiler H, Felber H, Schwager F (1989) Bienenwachs-Zusammensetzung und Beurteilung der Reinheit durch gaschromatographische Analyse. *Lipid/Fett* 91: 73–79
75. Buddrus J, Schmidt B (2011) *Grundlagen der organischen Chemie*. 4. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin New York
76. Pearson RG (1963) Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc* 85: 3533–3539
77. Peters FT, Paul LD, Musshoff F et al. (2009) Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech* 76: 185–208
78. Arvecon GmbH (2015) Ringversuch - BTMF 3/14. Betäubungsmittel im Serum
79. Arvecon GmbH (2015) Ringversuch - BTMF 1/15. Betäubungsmittel im Serum
80. Arvecon GmbH (2015) Ringversuch - BTMF 2/15. Betäubungsmittel im Serum
81. Arvecon GmbH (2015) Ringversuch - BTMF 3/15. Betäubungsmittel im Serum
82. Arvecon GmbH (2016) Ringversuch - BTMF 1/16. Betäubungsmittel im Serum
83. Butte W (1983) Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification. *J Chromatogr A* 261: 142–145
84. Haiber G, Schöler HF (1995) Synthese und Verwendung von Sulfoniumsalzen als Alkylierungsmittel für acide Verbindungen. *Vom Wasser* 84: 155–162
85. Bost RW, Everett JE (1940) Sulfur studies XVI. The synthesis of certain higher alkyl sulfonium salts and related compounds. *J Am Chem Soc* 62: 1752–1754
86. Schulte E, Weber K (1989) Schnelle Herstellung der Fettsäuremethylester aus Fetten mit Trimethylsulfoniumhydroxid oder Natriummethylat. *Lipid/Fett* 91: 181–183
87. Geissler A, Schöler HF (1994) Gaschromatographic determination of phenol, methylphenols, chlorophenols, nitrophenols and nitroquinones in water at 0.1 µg/l. *Water res* 28: 2047–2053
88. Steinhagen R, Kegler R, Büttner A et al. (2015) Innovative, effiziente Methode zur simultanen Detektion von THC, CBN, CBD sowie THCA-A im Haar nach Derivatisierung mit Tributylsulfoniumhydroxid. *Rechtsmedizin* 25: 414

89. Goodall CR, Basteyns BJ (1995) A reliable method for the detection, confirmation and quantitation of cannabinoids in blood. *J Anal Toxicol* 19: 419–426
90. Arvecon GmbH (2015) Ringversuch - DHF 1/15. Betäubungsmittel in Haar
91. Arvecon GmbH (2016) Ringversuch - DMS 1/15. Drogenscreening im Haar
92. Cirimele V, Sachs H, Kintz P et al. (1996) Testing human hair for cannabis. III. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol. *J Anal Toxicol* 20: 13–16
93. Salomone A, Gerace E, D'urso F et al. (2012) Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples. *J Mass Spectrom* 47: 604–610
94. Lerch O, Gerstel GmbH & Co. KG (2014) Automatisierte Aufarbeitung zur Bestimmung von THC, CBN und CBD in Haaren mittels Gerstel Multi Purpose Sampler (MPS) und GC/MS. GTFCh Workshop Gießen
95. Nadulski T, Kahl HG, Agius R et al. (2014) Ergebnisse chemisch-toxikologischer Untersuchungen (CTU) von Urin- und Haarproben im Rahmen der Fahreignungsdiagnostik (MPU) vor und nach Anwendung der 2. Auflage der Beurteilungskriterien. *Blutalkohol* 51: 45–57
96. Mußhoff F (2011) Toxikologische Aspekte bei der Fahreignungsdiagnostik 3.0-Was ist zu beachten? In: Müller K, Dittmann V, Schubert W et al. (Hrsg) Fehlverhalten als Unfallfaktor-Kriterien und Methoden der Risikobeurteilung. 7. gemeinsames Symposium der DGVP und DGVM, Tagungsband. Kirschbaum, Bonn, S 82-84

8 Anhang

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan
Titel	THC ethyliert (1-Iodethan)		
SOP	Kombimethode, THC		
Angaben zur Methode			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan		
Anwendungsgebiet	§24a StVG und weitere		
Arbeitsbereich	0,5-4,0 ng/mL		
Analyt	THC		
Weitere bestimmbare Analyte	THC-OH, THC-COOH		
Verantwortlichkeiten			
Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch		
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Einsle, Robert Steinhagen		
Bearbeitungszeitraum	April 2011-November 2014		
Methode gültig erklärt am	01.11.2014		
Methode ungültig erklärt am			
Zusammenfassung und Bewertung	Methode ist basisvalidiert und für die Routine geeignet		

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1 Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2 Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3 Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET		Messsignal: 327					Messgröße: THC					Einheit: ng/mL	
MESSUNG	Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0							
	1	0,086	0,123	0,197	0,275	0,336							
	2	0,064	0,126	0,216	0,301	0,368							
	3	0,075	0,137	0,205	0,268	0,371							
	4	0,079	0,12	0,201	0,253	0,396							
	5	0,115	0,107	0,179	0,255	0,333							
	6	0,12	0,114	0,174	0,244	0,317							
	Mittelwert	0,09	0,121	0,195	0,266	0,353							
	SD	0,0225	0,0102	0,0162	0,0202	0,0297							
	Varianz	0,0005	0,0001	0,0003	0,0004	0,0009							
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0								
Ausreisser-Test nach Grubbs													
	Extremwert	0,12	0,137	0,174	0,301	0,396							
	Prüfwert	1,327	1,548	1,334	1,73	1,441							
Signifikanz 95%													
	Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822							
	Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein							
Signifikanz 99%													
	Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944							
	Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein							
Cochran-Test (Varianzhomogenität)		Mandel-F-Test auf Linearität				Lineare Kalibrationsfunktion				Quadratische Kalibrationsfunktion			
(Signifikanz 99%)		(Signifikanz 99%)				Y = a*x + b				Y = A*x ² + B*x + C			
Prüfwert	0,4083	Prüfwert	8,07			a	0,07488			A	0,00336		
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5			b	0,04789			B	0,059877		
Bestanden?	ja	Bestanden?	ja			R	0,9988			C	0,059065		
						Rest-SD	0,0060			R	0,9998		
										Rest-SD	0,0033		

1.2 QUALIFIER		Messsignal: 313					Messgröße: THC					Einheit: ng/mL	
MESSUNG	Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0							
	1	0,050	0,074	0,125	0,131	0,183							
	2	0,043	0,066	0,110	0,148	0,171							
	3	0,035	0,069	0,091	0,145	0,180							
	4	0,050	0,079	0,091	0,124	0,176							
	5	0,046	0,085	0,128	0,131	0,181							
	6	0,048	0,075	0,120	0,131	0,186							
	Mittelwert	0,045	0,075	0,111	0,135	0,18							
	SD	0,006	0,007	0,016	0,009	0,005							
	Varianz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0							
Werte	6	6	6	6	6								
Extremwert													
	Prüfwert	0,035	0,085	0,091	0,148	0,171							
	Prüfwert	1,798	1,533	1,219	1,384	1,585							
Tabellenwert													
	Straggler?	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822							
	Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein							
Tabellenwert													
	Ausreißer?	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944							
	Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein							
Cochran-Test (Varianzhomogenität)		Mandel-F-Test auf Linearität				Lineare Kalibrationsfunktion				Quadratische Kalibrationsfunktion			
(Signifikanz 99%)		(Signifikanz 99%)				Y = a*x + b				Y = A*x ² + B*x + C			
Prüfwert	0,5789	Prüfwert	0,1			a	0,036244			A	-0,000949		
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5			b	0,03298			B	0,040481		
Bestanden?	nein	Linear?	ja			R	0,9935			C	0,029823		
						Rest-SD	0,0069			R	0,9938		
										Rest-SD	0,0082		

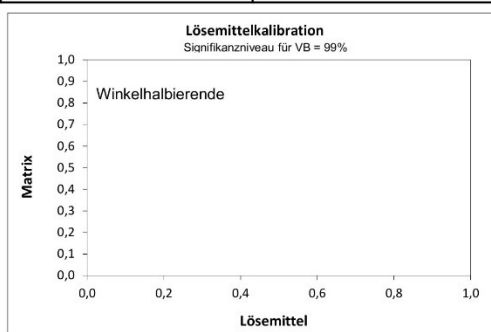
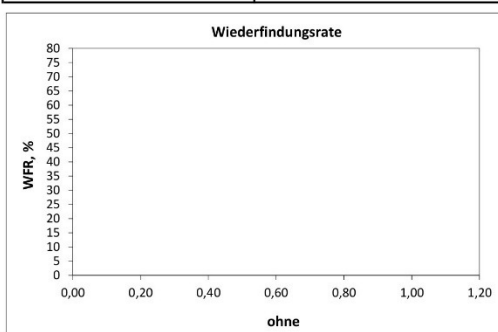
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	<input type="text"/>
Matrix (xm)	nicht durchgeführt
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 + x_0 + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
ao bo R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="1,0"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/mL"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	1,024719	1,052521	0,967494	1,11821	1,001913	1,111049	1,002653	0,984396	
	2	1,036363	1,118278	1,056377	1,122843	1,070027	1,114398	1,050484	1,035681	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	1,03	1,09	1,01	1,12	1,04	1,11	1,03	1,01		
BIAS, %	3,1	8,5	1,2	12,1	3,6	11,3	2,7	1,0		
SD	0,01	0,05	0,06	0,00	0,05	0,00	0,03	0,04		
RSD, %	0,8	4,3	6,2	0,3	4,6	0,2	3,3	3,6		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	1,05	SD	0,04	SD	0,05
SD	0,05	RSD, %	3,5	RSD, %	4,9
RSD, %	4,9				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	0,05	Faktor	2,382
Bias, %	5,4	β-Toleranz	0,98727 bis 1,23546
		Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3
		Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		4		Einheit:		ng/mL					
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	4,642509	4,344309	4,204629	4,618076	3,880059	4,709896	4,568292	4,664415		
	2	4,527219	4,3506	4,124855	4,546342	4,039397	4,621553	4,834273	4,774401		
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert		4,58	4,35	4,16	4,58	3,96	4,67	4,70	4,72		
BIAS, %		14,6	8,7	4,1	14,6	-1,0	16,6	17,5	18,0		
SD		0,08	0,00	0,06	0,05	0,11	0,06	0,19	0,08		
RSD, %		1,8	0,1	1,4	1,1	2,8	1,3	4,0	1,6		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	4,47	SD	0,09
SD	0,28	RSD, %	2,1
RSD, %	6,2		

Richtigkeit	95%-Intervall	Prüfen
Abw.	0,47	Faktor
Bias, %	11,64191237	β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:							
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	nicht durchgeführt									
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert											
BIAS, %											
SD											
RSD, %											

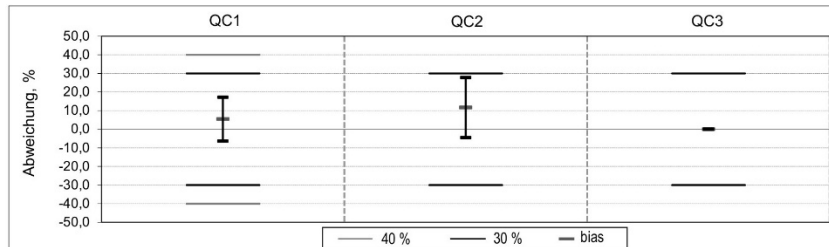
Kenndaten	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	SD	SD
SD	RSD, %	RSD, %
RSD, %		

Richtigkeit	95%-Intervall
Abw.	Faktor
Bias, %	β-Toleranz
	Prüfbereich (30%)

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	0,98727 bis 1,23546	4,26529 bis 5,70584	
%	- 6,35 bis 17,19	- 4,49 bis 27,77	
Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3	2,8 bis 5,2	
Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4		

3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Kalibrator	Target	Qualifier
1	0,5	0,090
2	1,0	0,121
3	2,0	0,195
4	3,0	0,266
5	4,0	0,353
6		
7		
8		
9		
10		

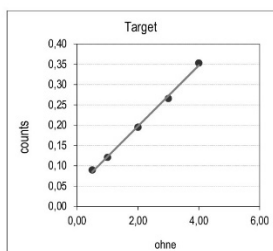
	6	6
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	4	1
Prüfwert	2,63	4,41
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Ausreißer	nein	nein

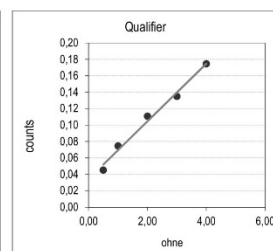
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	8,07	0,53
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Bestanden?	ja	ja

	6	6
a	0,07488	0,035085
b	0,047894	0,034411
R	0,9988	0,9935
Rest-SD	0,006	0,0066

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	0,35	0,29
Erfassungsgrenze	0,69	0,59
Bestimmungsgrenze	1,00	0,99



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ohne	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4	mit ChemStation-Software durchgeführt									
5										
6										
Nachweisgrenze :		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe ohne

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20	Krit. Wert, %	20

Beurteilung --- Kriterium: RSD und bias < 20%

4. WIEDERFINDUNG

4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	ohne	Matrix	ohne	Matrix
MESSUNG				
1				
2				
3				
4				
5	nicht durchgeführt			
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit		Zeit	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Werte	0		0	
min. Wert	0,0		0,0	
max. Wert	0,0		0,0	
Spanne	0,0		0,0	
Spanne, %	%		%	
Prüfwert	25,0 %		25,0 %	
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				

Konz-tief

Konz-hoch

Kriterium: Spanne < Prüfwert

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan
Titel	THC-OH ethyliert (1-Iodethan)		
SOP	Kombimethode, THC-OH		
Angaben zur Methode			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan		
Anwendungsgebiet	§24a StVG und weitere		
Arbeitsbereich	0,5-4,0 ng/mL		
Analyt	THC-OH		
Weitere bestimmbare Analyte	THC, THC-COOH		
Verantwortlichkeiten			
Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch		
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Einsle, Robert Steinhagen		
Bearbeitungszeitraum	April 2011-November 2014		
Methode gültig erklärt am	01.11.2014		
Methode ungültig erklärt am			
Zusammenfassung und Bewertung	Methode ist basisvalidiert und für die Routine geeignet		

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2. Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3. Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: 327	Messgröße: THC-OH	Einheit: ng/mL
------------	-----------------	-------------------	----------------

Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0				
MESSUNG	1	0,043	0,098	0,229	0,303	0,406			
	2	0,043	0,095	0,202	0,302	0,4			
	3	0,042	0,09	0,199	0,298	0,394			
	4	0,039	0,084	0,18	0,291	0,392			
	5	0,041	0,09	0,194	0,299	0,393			
	6	0,041	0,084	0,185	0,294	0,4			
Mittelwert	0,042	0,09	0,198	0,298	0,398				
SD	0,0014	0,0057	0,0173	0,0047	0,0055				
Varianz	0,0	0,0	0,0003	0,0	0,0				
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0				

Ausreisser-Test nach Grubbs

Extremwert	0,039	0,098	0,229	0,291	0,406				
Prüfwert	1,607	1,372	1,787	1,432	1,58				

Signifikanz 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				

Signifikanz 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,7763	Prüfwert	1,39
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	nein	Bestanden?	ja
		a	0,10225
		b	-0,00965
		R	0,9999
		Rest-SD	0,0027
		A	-0,00107
		B	0,107021
		C	-0,013201
		R	0,9999
		Rest-SD	0,0025

1.2 QUALIFIER	Messsignal: 371	Messgröße: THC-OH	Einheit: ng/mL
---------------	-----------------	-------------------	----------------

Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0				
MESSUNG	1	0,001	0,003	0,006	0,008	0,011			
	2	0,001	0,002	0,006	0,008	0,011			
	3	0,001	0,001	0,005	0,007	0,011			
	4	0,001	0,001	0,006	0,008	0,010			
	5	0,000	0,002	0,005	0,009	0,013			
	6	0,001	0,002	0,005	0,009	0,012			
Mittelwert	0,001	0,002	0,005	0,008	0,011				
SD	0,0	0,001	0,001	0,001	0,001				
Varianz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Werte	6	6	6	6	6				

Extremwert	0,000	0,003	0,006	0,007	0,013				
Prüfwert	1,313	1,326	1,665	1,470	1,491				

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,4455	Prüfwert	0,0
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	ja	Linear?	ja
		a	0,003103
		b	-0,00100
		R	0,9990
		Rest-SD	0,0002
		A	-0,000003
		B	0,003114
		C	-0,00101
		R	0,999
		Rest-SD	0,0003

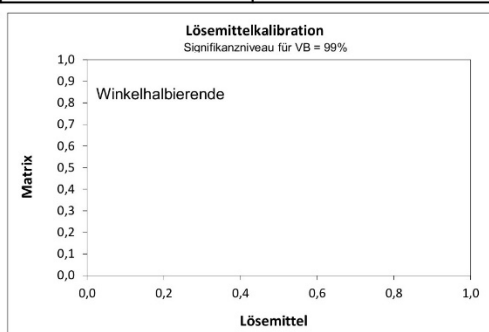
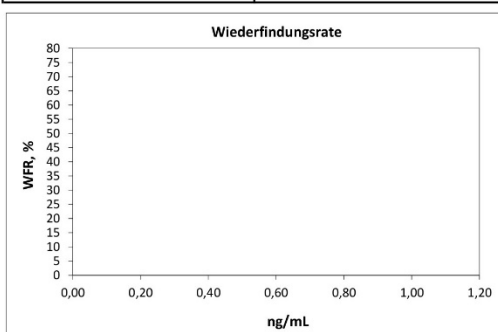
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	nicht durchgeführt
Matrix (xm)	
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 + x_0 + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
ao bo R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="1,0"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/mL"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	0,993034	0,964013	1,018167	0,98382	0,9901	0,91291	0,905584	0,998224	
	2	0,954127	0,964857	0,949949	1,054343	1,002714	0,855323	1,001745	0,945702	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	0,97	0,96	0,98	1,02	1,00	0,88	0,95	0,97		
BIAS, %	-2,6	-3,6	-1,6	1,9	-0,4	-11,6	-4,6	-2,8		
SD	0,03	0,00	0,05	0,05	0,01	0,04	0,07	0,04		
RSD, %	2,8	0,1	4,9	4,9	0,9	4,6	7,1	3,8		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	0,97	SD	0,04	SD	0,05
SD	0,05	RSD, %	4,2	RSD, %	5,1
RSD, %	5,0				

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2,376
Bias, %	β-Toleranz	0,82142 bis 1,05422
	Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3
	Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		4		Einheit:		ng/mL														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	3,764963	3,904322	3,873793	3,720445	3,966234	3,968353	3,888975	3,830852											
	2	3,880132	3,716589	3,911149	3,800573	4,052742	3,908126	4,015359	3,954794											
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert		3,82	3,81	3,89	3,76	4,01	3,94	3,95	3,89											
BIAS, %		-4,4	-4,7	-2,7	-6,0	0,2	-1,5	-1,2	-2,7											
SD		0,08	0,13	0,03	0,06	0,06	0,04	0,09	0,09											
RSD, %		2,1	3,5	0,7	1,5	1,5	1,1	2,3	2,3											

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	3,88	SD	0,08	SD	0,1
SD	0,1	RSD, %	2,0	RSD, %	2,6
RSD, %	2,5				

Richtigkeit	95%-Intervall		OK
Abw.	-0,12	Faktor	2,379
Bias, %	-2,9	β-Toleranz	3,53595 bis 4,01003
		Prüfbereich (30%)	2,8 bis 5,2

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:		ng/mL														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	nicht durchgeführt																		
	2																			
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert																				
BIAS, %																				
SD																				
RSD, %																				

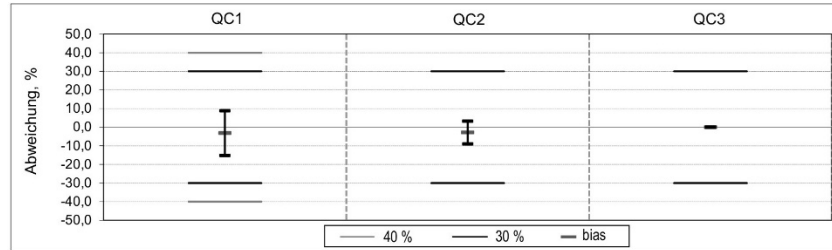
Kenndaten	Wiederholpräzision		Laborpräzision		
MW (ges.)		SD		SD	
SD		RSD, %		RSD, %	
RSD, %					

Richtigkeit	95%-Intervall	
Abw.		Faktor
Bias, %		β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	0,82142 bis 1,05422	3,53595 bis 4,01003	
%	-15,18 bis 8,86	-8,98 bis 3,22	
Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3	2,8 bis 5,2	
Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4		

3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

	Kalibrator	Target	Qualifier
Einheit			
1	0,5	0,042	0,001
2	1,0	0,090	0,002
3	2,0	0,198	0,005
4	3,0	0,302	0,008
5	4,0	0,398	0,011
6			
7			
8			
9			
10			

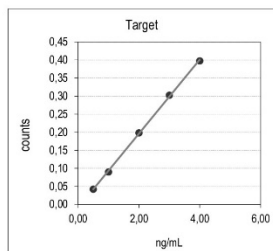
	6	6
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	4	3
Prüfwert	2,2	2,08
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Ausreißer	nein	nein

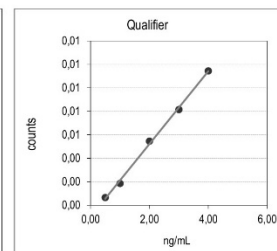
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	1,47	0,0
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Bestanden?	ja	ja

a	0,102585	0,003103
b	-0,009276	-0,001001
R	0,9997	0,999
Rest-SD	0,004	0,0002

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	0,16	0,12
Erfassungsgrenze	0,32	0,23
Bestimmungsgrenze	0,54	0,46



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
Nachweisgrenze :		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0

mit ChemStation-Software durchgeführt

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe

MESSUNG	Konz.	Wiederholpräzision	Bias
1		Mittelwert	Bias
2		SD	Bias, %
3		RSD, %	
4		Krit. Wert, %	20
5			
6			
Beurteilung		---	Kriterium: RSD und bias < 20%

4. WIEDERFINDUNG

4.1 WIEDERFINDUNG

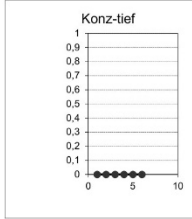
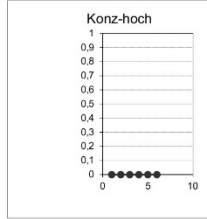
Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
MESSUNG 1				
2				
3				
4				
5				
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

nicht durchgeführt

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit	Zeit	Zeit	Zeit
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Werte	0	0	0	0
min. Wert	0,0	0,0	0,0	0,0
max. Wert	0,0	0,0	0,0	0,0
Spanne	0,0	0,0	0,0	0,0
Spanne, %	%	%	%	%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				

nicht durchgeführt

Kriterium: Spanne < Prüfwert

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan
Titel	THC-COOH ethyliert (1-Iodethan)		
SOP	Kombimethode, THC-COOH		
Angaben zur Methode			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan		
Anwendungsgebiet	§24a StVG und weitere		
Arbeitsbereich	5-25ng/mL		
Analyt	THC-COOH		
Weitere bestimmbare Analyte	THC, THC-OH		
Verantwortlichkeiten			
Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch		
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Einsle, Robert Steinhagen		
Bearbeitungszeitraum	April 2011-November 2014		
Methode gültig erklärt am	01.11.2014		
Methode ungültig erklärt am			
Zusammenfassung und Bewertung	Methode ist basisvalidiert und für die Routine geeignet		

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2. Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3. Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: 327	Messgröße: THC-COOH	Einheit: ng/mL
------------	-----------------	---------------------	----------------

Konzentration	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0				
MESSUNG	1	0,298	0,535	0,867	1,097	1,336			
	2	0,3	0,548	0,836	1,099	1,347			
	3	0,299	0,541	0,834	1,09	1,328			
	4	0,294	0,547	0,802	1,106	1,35			
	5	0,285	0,536	0,784	1,076	1,326			
	6	0,29	0,528	0,768	1,057	1,317			
Mittelwert	0,294	0,539	0,815	1,087	1,334				
SD	0,0059	0,0075	0,037	0,0181	0,0128				
Varianz	0,0	0,0001	0,0014	0,0003	0,0002				
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0				
Ausreißer-Test nach Grubbs									
Extremwert	0,285	0,528	0,867	1,057	1,317				
Prüfwert	1,532	1,433	1,41	1,694	1,337				
Signifikanz 95%									
Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Signifikanz 99%									
Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a·x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A·x ² + B·x + C
Prüfwert	0,7011	Prüfwert	0,0
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	nein	Bestanden?	ja
		a	0,05256
		b	0,02568
		R	0,9998
		Rest-SD	0,0103
		A	0,0
		B	0,052606
		C	0,025405
		R	0,9998
		Rest-SD	0,0126

1.2 QUALIFIER	Messsignal: 400	Messgröße: THC-COOH	Einheit: ng/mL
---------------	-----------------	---------------------	----------------

Konzentration	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0				
MESSUNG	1	0,075	0,140	0,232	0,294	0,359			
	2	0,077	0,139	0,220	0,289	0,357			
	3	0,077	0,147	0,226	0,294	0,358			
	4	0,075	0,146	0,221	0,299	0,368			
	5	0,075	0,148	0,215	0,298	0,366			
	6	0,074	0,147	0,209	0,294	0,359			
Mittelwert	0,076	0,144	0,221	0,295	0,361				
SD	0,001	0,004	0,008	0,004	0,005				
Varianz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Werte	6	6	6	6	6				
Extremwert	0,077	0,139	0,209	0,289	0,368				
Prüfwert	1,425	1,330	1,452	1,534	1,505				
Tabellenwert									
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Tabellenwert									
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a·x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A·x ² + B·x + C
Prüfwert	0,5665	Prüfwert	0,27
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	nein	Linear?	ja
		a	0,014422
		b	0,00295
		R	0,9997
		Rest-SD	0,003
		A	-0,000019
		B	0,015002
		C	-0,000429
		R	0,9998
		Rest-SD	0,0034

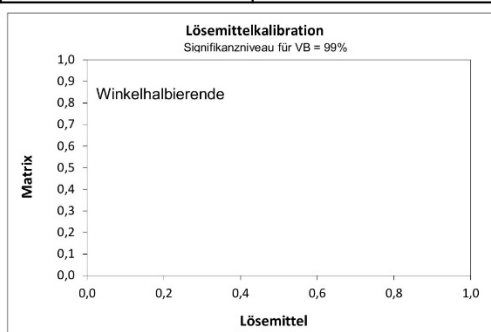
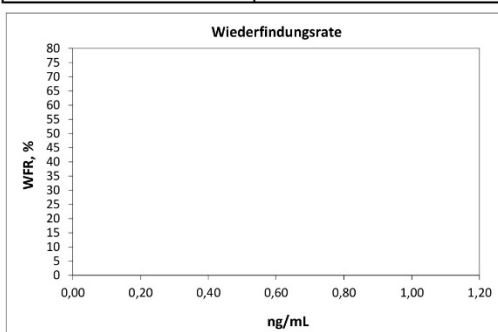
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	nicht durchgeführt
Matrix (xm)	
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 + x_0 + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
ao bo R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="5,0"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/mL"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	4,770981	4,171108	4,257862	4,275274	4,161026	4,275337	4,21018	4,160962	
	2	4,670193	4,23853	4,254719	4,270259	4,180591	4,248693	4,133865	4,232767	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	4,72	4,20	4,26	4,27	4,17	4,26	4,17	4,20		
BIAS, %	-5,6	-15,9	-14,9	-14,5	-16,6	-14,8	-16,6	-16,1		
SD	0,07	0,05	0,00	0,00	0,01	0,02	0,05	0,05		
RSD, %	1,5	1,1	0,1	0,1	0,3	0,4	1,3	1,2		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	4,28	SD	0,04
SD	0,18	RSD, %	1,0
RSD, %	4,2		
		SD	0,18
		RSD, %	4,3

Richtigkeit	95%-Intervall	OK (40%)	
Abw.	-0,72	Faktor	2,506
Bias, %	-14,4	β-Toleranz	3,20593 bis 4,12835
		Prüfbereich (30%)	3,5 bis 6,5
		Prüfbereich (40%)	3,0 bis 7,0

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		25		Einheit:		ng/mL														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	25,37998804	24,07332388	25,39202216	24,27679908	24,0360999	24,51408945	24,90638088	24,79913758											
	2	25,27553911	24,23726691	25,42137863	24,03987774	24,11338691	24,67310932	25,0663631	24,61384779											
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert		25,33	24,16	25,41	24,16	24,07	24,59	24,99	24,71											
BIAS, %		1,3	-3,4	1,6	-3,4	-3,7	-1,6	-0,1	-1,2											
SD		0,07	0,12	0,02	0,17	0,05	0,11	0,11	0,13											
RSD, %		0,3	0,5	0,1	0,7	0,2	0,5	0,5	0,5											

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	24,68	SD	0,11	SD	0,54
SD	0,52	RSD, %	0,4	RSD, %	2,2
RSD, %	2,1				

Richtigkeit	95%-Intervall		OK
Abw.	-0,32	Faktor	2,507
Bias, %	-1,3	β-Toleranz	23,0153 bis 25,69774
		Prüfbereich (30%)	17,5 bis 32,5

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:		ng/mL														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	nicht durchgeführt																		
	2																			
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert																				
BIAS, %																				
SD																				
RSD, %																				

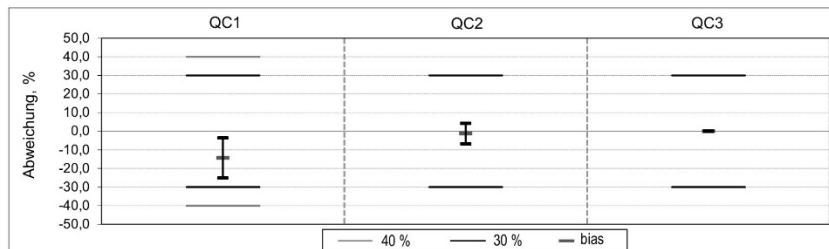
Kenndaten	Wiederholpräzision		Laborpräzision
MW (ges.)	SD	SD	SD
SD	RSD, %	RSD, %	RSD, %
RSD, %			

Richtigkeit	95%-Intervall	
Abw.	Faktor	
Bias, %	β-Toleranz	
	Prüfbereich (30%)	

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	3,20593 bis 4,12835	23,0153 bis 25,69774	
%	-25,13 bis -3,59	-6,73 bis 4,14	
Prüfbereich (30%)	3,5 bis 6,5	17,5 bis 32,5	
Prüfbereich (40%)	3,0 bis 7,0		

3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Einheit	Kalibrator	Target	Qualifier
1	5,0	0,294	0,076
2	10,0	0,539	0,144
3	15	0,815	0,221
4	20	1,087	0,295
5	25	1,334	0,361
6			
7			
8			
9			
10			

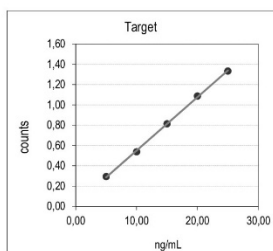
	6	6
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	2	4
Prüfwert	3,52	2,76
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Ausreißer	nein	nein

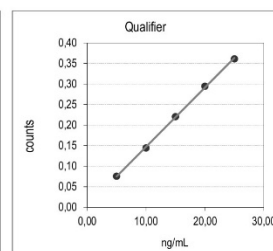
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	0,0	0,27
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Bestanden?	ja	ja

a	0,052559	0,014422
b	0,025681	0,002954
R	0,9998	0,9997
Rest-SD	0,01	0,003

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	1,00	0,38
Erfassungsgrenze	2,01	0,76
Bestimmungsgrenze	3,34	1,55



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.11.14	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit 1-Iodethan

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0
Nachweisgrenze :		0,0								

mit ChemStation-Software durchgeführt

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe

MESSUNG	Konz.	Wiederholpräzision	Bias
1		Mittelwert	Bias
2		SD	Bias, %
3		RSD, %	
4		Krit. Wert, %	20
5			
6			
Beurteilung		---	Kriterium: RSD und bias < 20%

4. WIEDERFINDUNG

4.1 WIEDERFINDUNG

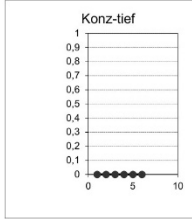
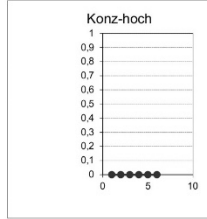
Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	ng/mL		ng/mL	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
MESSUNG 1				
2				
3				
4				
5				
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

nicht durchgeführt

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit		Zeit	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Werte	0		0	
min. Wert	0,0		0,0	
max. Wert	0,0		0,0	
Spanne	0,0		0,0	
Spanne, %		%		%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				

nicht durchgeführt

Kriterium: Spanne < Prüfwert

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH
Titel	THC ethyliert (TESH)		
SOP	Kombimethode, THC		
Angaben zur Methode			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH		
Anwendungsgebiet	§24a StVG und weitere		
Arbeitsbereich	0,5-4,0 ng/mL		
Analyt	THC		
Weitere bestimmbare Analyte	THC-OH, THC-COOH		
Verantwortlichkeiten			
Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch		
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Steinhagen		
Bearbeitungszeitraum	April 2014-Februar 2015		
Methode gültig erklärt am	01.02.2015		
Methode ungültig erklärt am			
Zusammenfassung und Bewertung	Die Methode ist basisvalidiert, aber aufgrund von Grenzwertüberschreitungen derzeit nicht für die Routineanalytik geeignet		

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2. Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3. Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: 327	Messgröße: THC	Einheit: ng/mL
------------	-----------------	----------------	----------------

Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0				
MESSUNG	1	0,089	0,132	0,255	0,36	0,535			
	2	0,085	0,125	0,23	0,371	0,523			
	3	0,081	0,146	0,239	0,35	0,487			
	4	0,081	0,116	0,269	0,374	0,521			
	5	0,09	0,125	0,278	0,388	0,512			
	6	0,086	0,128	0,254	0,396	0,566			
Mittelwert	0,085	0,129	0,254	0,373	0,524				
SD	0,0036	0,0099	0,0176	0,0171	0,026				
Varianz	0,0	0,0001	0,0003	0,0003	0,0007				
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0				
Ausreisser-Test nach Grubbs									
Extremwert	0,09	0,146	0,23	0,35	0,566				
Prüfwert	1,242	1,753	1,35	1,368	1,612				
Signifikanz 95%									
Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Signifikanz 99%									
Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert 0,4868	Prüfwert 10,39	a 0,12533	A 0,00789
Tabellenwert 0,5635	Tabellenwert 98,5	b 0,00981	B 0,09013
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 0,9978	C 0,036023
		Rest-SD 0,0138	R 0,9996
			Rest-SD 0,0068

1.2 QUALIFIER	Messsignal: 313	Messgröße: THC	Einheit: ng/mL
---------------	-----------------	----------------	----------------

Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0				
MESSUNG	1	0,014	0,036	0,058	0,082	0,159			
	2	0,013	0,032	0,056	0,104	0,164			
	3	0,014	0,027	0,056	0,091	0,144			
	4	0,027	0,020	0,100	0,110	0,157			
	5	0,020	0,021	0,080	0,123	0,175			
	6	0,037	0,030	0,050	0,131	0,202			
Mittelwert	0,021	0,028	0,067	0,107	0,167				
SD	0,01	0,006	0,019	0,019	0,02				
Varianz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Werte	6	6	6	6	6				
Extremwert	0,037	0,036	0,100	0,082	0,202				
Prüfwert	1,686	1,266	1,710	1,349	1,763				
Signifikanz 95%									
Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Signifikanz 99%									
Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert 0,3149	Prüfwert 23,82	a 0,04177	A 0,006236
Tabellenwert 0,5635	Tabellenwert 98,5	b -0,01002	B 0,013935
Bestanden? ja	Linear? ja	R 0,9889	C 0,0107
		Rest-SD 0,0104	R 0,9991
			Rest-SD 0,0035

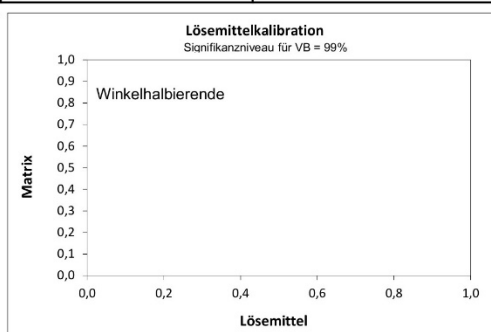
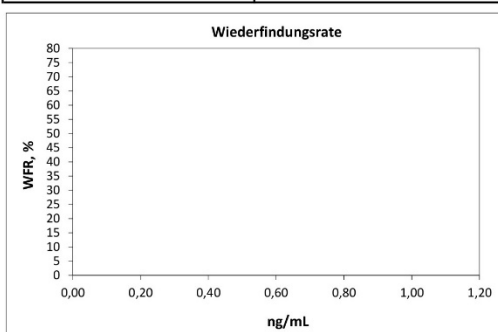
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	nicht durchgeführt
Matrix (xm)	
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 + x_0 + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
ao bo R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="1,0"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/mL"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	1,114491	0,996708	1,060141	0,995126	1,065687	0,970997	1,116309	0,920595	
	2	1,190517	0,93565	1,001136	1,010008	0,943979	1,016305	0,93993	0,846812	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	1,15	0,97	1,03	1,00	1,00	0,99	1,03	0,88		
BIAS, %	15,3	-3,4	3,1	0,3	0,5	-0,6	2,8	-11,6		
SD	0,05	0,04	0,04	0,01	0,09	0,03	0,12	0,05		
RSD, %	4,7	4,5	4,0	1,0	8,6	3,2	12,1	5,9		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	1,01	SD	0,06	SD	0,09
SD	0,09	RSD, %	6,4	RSD, %	8,7
RSD, %	8,6				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	0,01	Faktor	2,381
Bias, %	0,8	β-Toleranz	0,80681 bis 1,2244
		Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3
		Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		4		Einheit:		ng/mL													
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10								
MESSUNG	1	4,331573	3,847953	4,268422	4,395517	4,119565	4,040994	3,745536	4,087068										
	2	4,054393	4,094832	4,299546	4,454729	4,028022	4,126182	3,940414	4,04855										
	3																		
	4																		
	5																		
	6																		
	7																		
	8																		
	9																		
	10																		
Mittelwert		4,19	3,97	4,28	4,43	4,07	4,08	3,84	4,07										
BIAS, %		4,8	-0,7	7,1	10,6	1,8	2,1	-3,9	1,7										
SD		0,20	0,17	0,02	0,04	0,06	0,06	0,14	0,03										
RSD, %		4,7	4,4	0,5	0,9	1,6	1,5	3,6	0,7										

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	4,12	SD	0,11	SD	0,2
SD	0,19	RSD, %	2,7	RSD, %	4,8
RSD, %	4,7				

Richtigkeit	95%-Intervall		OK
Abw.	0,12	Faktor	2,435
Bias, %	2,9	β-Toleranz	3,75757 bis 4,72018
		Prüfbereich (30%)	2,8 bis 5,2

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:		ng/mL													
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10								
MESSUNG	1	nicht durchgeführt																	
	2																		
	3																		
	4																		
	5																		
	6																		
	7																		
	8																		
	9																		
	10																		
Mittelwert																			
BIAS, %																			
SD																			
RSD, %																			

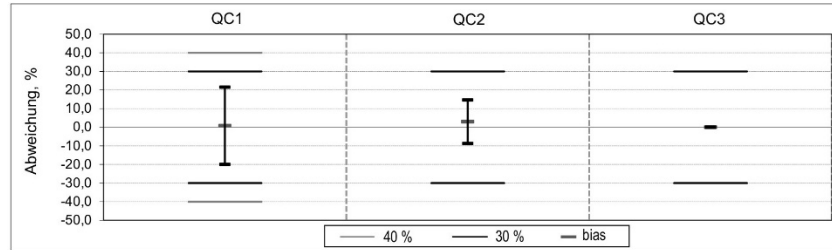
Kenndaten	Wiederholpräzision		Laborpräzision		
MW (ges.)		SD		SD	
SD		RSD, %		RSD, %	
RSD, %					

Richtigkeit	95%-Intervall	
Abw.		Faktor
Bias, %		β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	0,80681 bis 1,2244	3,75757 bis 4,72018	
%	- 19,94 bis 21,50	-8,75 bis 14,63	
Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3	2,8 bis 5,2	
Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4		

3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Kalibrator	Target	Qualifier
1	0,5	0,085
2	1,0	0,129
3	2,0	0,254
4	3,0	0,373
5	4,0	0,524
6		
7		
8		
9		
10		

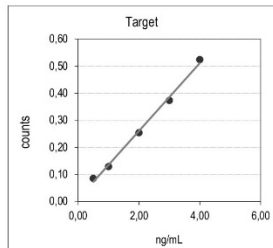
	6	6
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	1	1
Prüfwert	2,83	3,1
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Ausreißer	nein	nein

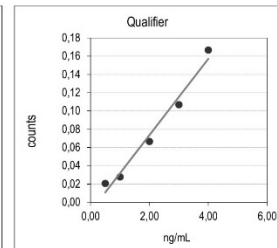
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	10,39	23,82
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Bestanden?	ja	nein

	0,125333	0,04177
a	0,009813	-0,010025
b	0,9978	0,9889
R	0,014	0,0104
Rest-SD		

	0,47	0,39
Nachweisgrenze	0,95	0,77
Erfassungsgrenze	1,25	1,21
Bestimmungsgrenze		



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
Nachweisgrenze :		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0

mit ChemStation-Software durchgeführt

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe

MESSUNG	Konz.	Wiederholpräzision	Bias
1		Mittelwert	Bias
2		SD	Bias, %
3		RSD, %	
4		Krit. Wert, %	20
5			
6			
Beurteilung		---	Kriterium: RSD und bias < 20%

4. WIEDERFINDUNG

4.1 WIEDERFINDUNG

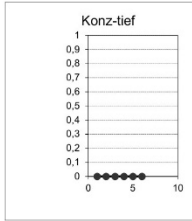
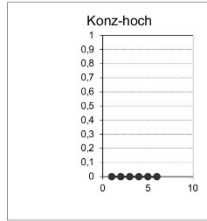
Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	ng/mL		ng/mL	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
MESSUNG 1				
2				
3				
4				
5				
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

nicht durchgeführt

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit		Zeit	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Werte	0	0	0	0
min. Wert	0,0	0,0	0,0	0,0
max. Wert	0,0	0,0	0,0	0,0
Spanne	0,0	0,0	0,0	0,0
Spanne, %	%	%	%	%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				

nicht durchgeführt

Kriterium: Spanne < Prüfwert

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH
Titel	THC-OH ethyliert (TESH)		
SOP	Kombimethode, THC-OH		
Angaben zur Methode			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH		
Anwendungsgebiet	§24a StVG und weitere		
Arbeitsbereich	0,5-4,0 ng/mL		
Analyt	THC-OH		
Weitere bestimmbare Analyte	THC, THC-COOH		
Verantwortlichkeiten			
Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch		
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Steinhagen		
Bearbeitungszeitraum	April 2014-Februar 2015		
Methode gültig erklärt am	01.02.2015		
Methode ungültig erklärt am			
Zusammenfassung und Bewertung	Die Methode ist basisvalidiert, aber aufgrund von Grenzwertüberschreitungen derzeit nicht für die Routineanalytik geeignet		

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2. Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3. Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: 327	Messgröße: THC-OH	Einheit: ng/mL
------------	-----------------	-------------------	----------------

Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0				
MESSUNG	1	0,057	0,098	0,22	0,38	0,493			
	2	0,056	0,095	0,218	0,367	0,492			
	3	0,042	0,109	0,202	0,364	0,48			
	4	0,05	0,117	0,198	0,372	0,483			
	5	0,046	0,108	0,206	0,37	0,486			
	6	0,045	0,12	0,193	0,36	0,486			
Mittelwert	0,049	0,108	0,206	0,369	0,487				
SD	0,006	0,0098	0,011	0,0069	0,0051				
Varianz	0,0	0,0001	0,0001	0,0	0,0				
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0				
Ausreisser-Test nach Grubbs									
Extremwert	0,042	0,095	0,22	0,38	0,48				
Prüfwert	1,242	1,294	1,281	1,558	1,315				
Signifikanz 95%									
Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Signifikanz 99%									
Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,3707	Prüfwert	0,76
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	ja	Bestanden?	ja
		a	0,12668
		b	-0,02229
		R	0,9969
		Rest-SD	0,0166
		A	0,00546
		B	0,102302
		C	-0,004141
		R	0,9977
		Rest-SD	0,0173

1.2 QUALIFIER	Messsignal: 358	Messgröße: THC-OH	Einheit: ng/mL
---------------	-----------------	-------------------	----------------

Konzentration	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0				
MESSUNG	1	0,046	0,060	0,062	0,072	0,093			
	2	0,036	0,042	0,055	0,074	0,095			
	3	0,053	0,036	0,059	0,065	0,095			
	4	0,052	0,050	0,059	0,077	0,084			
	5	0,054	0,044	0,061	0,081	0,100			
	6	0,070	0,046	0,069	0,084	0,108			
Mittelwert	0,052	0,046	0,061	0,076	0,096				
SD	0,011	0,008	0,005	0,007	0,008				
Varianz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Werte	6	6	6	6	6				
Extremwert	0,070	0,060	0,069	0,065	0,084				
Prüfwert	1,626	1,684	1,703	1,574	1,500				
Tabellenwert									
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Tabellenwert									
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,3849	Prüfwert	5,41
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	ja	Linear?	ja
		a	0,013455
		b	0,03777
		R	0,9627
		Rest-SD	0,0063
		A	0,003342
		B	-0,001462
		C	0,048874
		R	0,9901
		Rest-SD	0,004

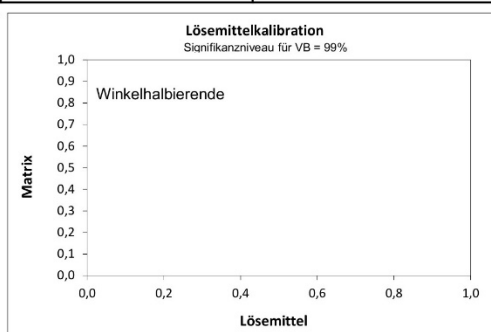
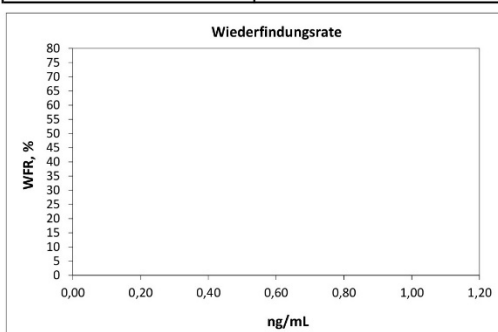
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	nicht durchgeführt
Matrix (xm)	
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 + x_0 + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
a ₀ b ₀ R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="1,0"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/mL"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	0,892863	0,991495	0,995071	0,936602	0,966997	1,043484	1,069619	1,054399	
	2	0,875968	0,936608	1,086177	0,942622	0,966267	0,968013	0,920247	1,039615	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	0,88	0,96	1,04	0,94	0,97	1,01	0,99	1,05		
BIAS, %	-11,6	-3,6	4,1	-6,0	-3,3	0,6	-0,5	4,7		
SD	0,01	0,04	0,06	0,00	0,00	0,05	0,11	0,01		
RSD, %	1,4	4,0	6,2	0,5	0,1	5,3	10,6	1,0		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	0,98	SD	0,05	SD	0,06
SD	0,06	RSD, %	5,1	RSD, %	6,6
RSD, %	6,5				

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2,379
Bias, %	β-Toleranz	0,80808 bis 1,1142
	Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3
	Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		4		Einheit:		ng/mL													
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10								
MESSUNG	1	3,94201	3,934144	3,682189	3,613056	3,632142	3,936226	4,421841	3,654406										
	2	3,823997	3,838301	3,741337	3,904694	3,788902	3,745702	4,201934	4,00669										
	3																		
	4																		
	5																		
	6																		
	7																		
	8																		
	9																		
	10																		
Mittelwert		3,88	3,89	3,71	3,76	3,71	3,84	4,31	3,83										
BIAS, %		-2,9	-2,8	-7,2	-6,0	-7,2	-4,0	7,8	-4,2										
SD		0,08	0,07	0,04	0,21	0,11	0,13	0,16	0,25										
RSD, %		2,1	1,7	1,1	5,5	3,0	3,5	3,6	6,5										

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	3,87	SD	0,15
SD	0,22	RSD, %	3,8
RSD, %	5,6		
			SD
			RSD, %
			0,22
			5,7

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2,431
Bias, %	β-Toleranz	3,20513 bis 4,27064
	Prüfbereich (30%)	2,8 bis 5,2

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:		ng/mL													
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10								
MESSUNG	1	nicht durchgeführt																	
	2																		
	3																		
	4																		
	5																		
	6																		
	7																		
	8																		
	9																		
	10																		
Mittelwert																			
BIAS, %																			
SD																			
RSD, %																			

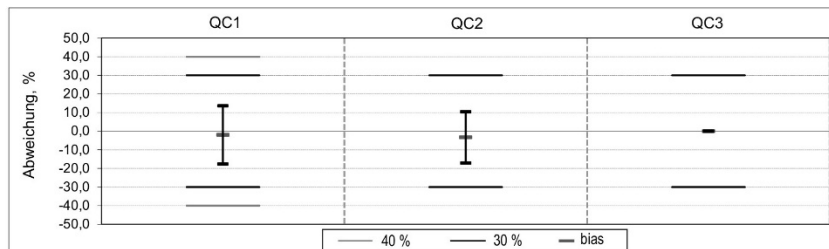
Kenndaten	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	SD	SD
SD	RSD, %	RSD, %
RSD, %		

Richtigkeit	95%-Intervall
Abw.	Faktor
Bias, %	β-Toleranz
	Prüfbereich (30%)

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	0,80808 bis 1,1142	3,20513 bis 4,27064	
%	- 17,57 bis 13,65	-17,11 bis 10,45	
Prüfbereich (30%)	0,7 bis 1,3	2,8 bis 5,2	
Prüfbereich (40%)	0,6 bis 1,4		

3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Kalibrator	Target	Qualifier
Einheit		
1	0,5	0,049
2	1,0	0,108
3	2,0	0,206
4	3,0	0,364
5	4,0	0,489
6		
7		
8		
9		
10		

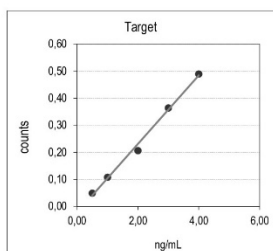
	6	6
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	3	4
Prüfwert	125,9	8,55
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Ausreißer	ja	nein

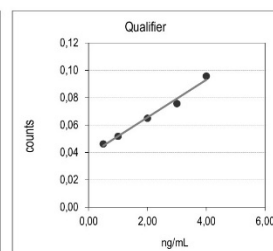
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	1,64	3,4
Krit.-Wert 99%	98,5	98,5
Bestanden?	ja	ja

a	0,126743	0,013738
b	-0,022901	0,038054
R	0,9971	0,9928
Rest-SD	0,016	0,0027

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	0,54	0,31
Erfassungsgrenze	1,08	0,62
Bestimmungsgrenze	1,38	1,03



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4	mit ChemStation-Software durchgeführt									
5										
6										
Nachweisgrenze :		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe

MESSUNG	Konz.	Wiederholpräzision	Bias
1		Mittelwert	Bias
2		SD	Bias, %
3		RSD, %	
4		Krit. Wert, %	20
5			Krit. Wert, %
6			20
Beurteilung		---	Kriterium: RSD und bias < 20%

4. WIEDERFINDUNG

4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
MESSUNG				
1				
2				
3				
4	nicht durchgeführt			
5				
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit	Zeit	Zeit	Zeit
Werte	0	0	0	0
min. Wert	0,0	0,0	0,0	0,0
max. Wert	0,0	0,0	0,0	0,0
Spanne	0,0	0,0	0,0	0,0
Spanne, %	%	%	%	%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				

Konz-tief

Konz-hoch

Kriterium: Spanne < Prüfwert

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH
Titel	THC-COOH ethyliert (TESH)		
SOP	Kombimethode, THC-COOH		
Angaben zur Methode			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH		
Anwendungsgebiet	§24a StVG und weitere		
Arbeitsbereich	5-25ng/mL		
Analyt	THC-COOH		
Weitere bestimmbare Analyte	THC, THC-OH		
Verantwortlichkeiten			
Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch		
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Steinhagen		
Bearbeitungszeitraum	April 2014-Februar 2015		
Methode gültig erklärt am	01.02.2015		
Methode ungültig erklärt am			
Zusammenfassung und Bewertung	Die Methode ist basisvalidiert, aber aufgrund von Grenzwertüberschreitungen derzeit nicht für die Routineanalytik geeignet		

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2. Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3. Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: 327	Messgröße: THC-COOH	Einheit: ng/mL
------------	-----------------	---------------------	----------------

Konzentration	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0				
MESSUNG	1	0,443	0,759	1,174	1,51	1,887			
	2	0,446	0,768	1,15	1,521	1,882			
	3	0,44	0,764	1,186	1,551	1,853			
	4	0,44	0,845	1,155	1,463	1,88			
	5	0,445	0,821	1,198	1,412	1,905			
	6	0,439	0,84	1,186	1,379	1,897			
Mittelwert	0,442	0,8	1,175	1,473	1,884				
SD	0,0029	0,0403	0,0188	0,0667	0,0179				
Varianz	0,0	0,0016	0,0004	0,0045	0,0003				
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0				
Ausreisser-Test nach Grubbs									
Extremwert	0,446	0,845	1,15	1,379	1,853				
Prüfwert	1,294	1,134	1,305	1,397	1,734				
Signifikanz 95%									
Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822				
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Signifikanz 99%									
Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944				
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,6589	Prüfwert	0,06
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	nein	Bestanden?	ja
		a	0,07114
		b	0,08747
		R	0,9991
		Rest-SD	0,0269
		A	0,00009
		B	0,068533
		C	0,102695
		R	0,9992
		Rest-SD	0,0324

1.2 QUALIFIER	Messsignal: 400	Messgröße: THC-COOH	Einheit: ng/mL
---------------	-----------------	---------------------	----------------

Konzentration	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0				
MESSUNG	1	0,119	0,210	0,339	0,437	0,538			
	2	0,125	0,214	0,338	0,440	0,538			
	3	0,126	0,228	0,349	0,385	0,526			
	4	0,127	0,214	0,332	0,450	0,560			
	5	0,129	0,245	0,357	0,417	0,562			
	6	0,120	0,240	0,343	0,396	0,523			
Mittelwert	0,124	0,225	0,343	0,421	0,541				
SD	0,004	0,015	0,009	0,026	0,016				
Varianz	0,0	0,0	0,0	0,001	0,0				
Werte	6	6	6	6	6				
Extremwert	0,129	0,245	0,357	0,385	0,562				
Prüfwert	1,255	1,330	1,577	1,380	1,271				
Tabellenwert									
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein				
Tabellenwert									
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein				

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,5358	Prüfwert	0,0
Tabellenwert	0,5635	Tabellenwert	98,5
Bestanden?	ja	Linear?	ja
		a	0,020583
		b	0,02215
		R	0,9984
		Rest-SD	0,0106
		A	-0,000002
		B	0,020651
		C	0,021755
		R	0,9984
		Rest-SD	0,013

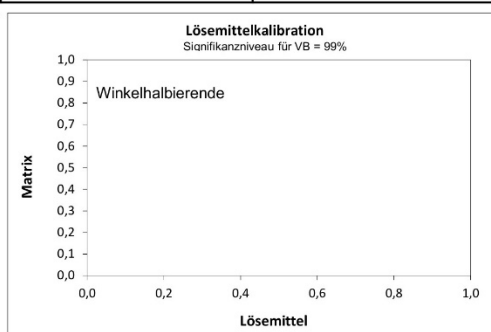
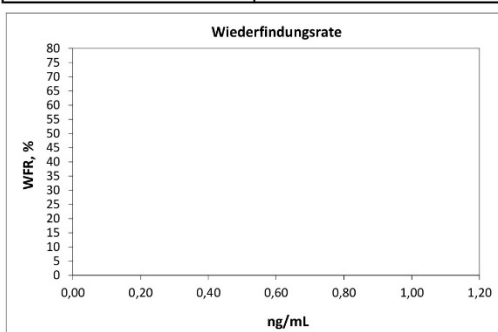
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	nicht durchgeführt
Matrix (xm)	
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 + x_0 + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
ao bo R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="5,0"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/mL"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	4,230732	5,183216	5,3462	5,065255	4,852656	5,225216	4,668035	4,444106		
2	4,027473	4,558678	4,80132	4,265955	5,675224	5,42008	3,963066	4,770518		
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
Mittelwert	4,13	4,87	5,07	4,67	5,26	5,32	4,32	4,61		
BIAS, %	-17,4	-2,6	1,5	-6,7	5,3	6,5	-13,7	-7,9		
SD	0,14	0,44	0,39	0,57	0,58	0,14	0,50	0,23		
RSD, %	3,5	9,1	7,6	12,1	11,0	2,6	11,6	5,0		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	4,78	SD	0,41
SD	0,51	RSD, %	8,6
RSD, %	10,7		

Richtigkeit	95%-Intervall	OK (40%)
Abw.	-0,22	Faktor
Bias, %	-4,4	β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)
		Prüfbereich (40%)

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		20		Einheit:		ng/mL														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	20,49842899	19,15419553	19,33593771	21,91203872	22,11894719	22,00020683	19,19346355	19,91472933											
	2	20,36327903	18,00813356	20,66910722	22,61649708	21,91269255	20,37602568	22,49513237	18,25017943											
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert		20,43	18,58	20,00	22,26	22,02	21,19	20,84	19,08											
BIAS, %		2,2	-7,1	0,0	11,3	10,1	5,9	4,2	-4,6											
SD		0,10	0,81	0,94	0,50	0,15	1,15	2,33	1,18											
RSD, %		0,5	4,4	4,7	2,2	0,7	5,4	11,2	6,2											

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	20,55	SD	1,12	SD	1,53
SD	1,5	RSD, %	5,4	RSD, %	7,4
RSD, %	7,3				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	0,55	Faktor	2,381
Bias, %	2,8	β-Toleranz	17,48458 bis 24,75055
		Prüfbereich (30%)	14,0 bis 26,0

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:		ng/mL														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	nicht durchgeführt																		
	2																			
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert																				
BIAS, %																				
SD																				
RSD, %																				

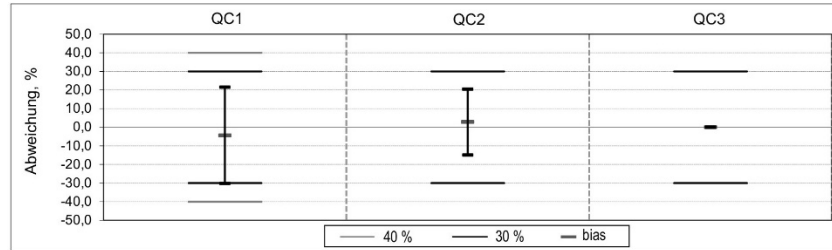
Kenndaten		Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)		SD		SD	
SD		RSD, %		RSD, %	
RSD, %					

Richtigkeit		95%-Intervall	
Abw.		Faktor	
Bias, %		β-Toleranz	
		Prüfbereich (30%)	

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

Zusammenfassung 95%-Intervall

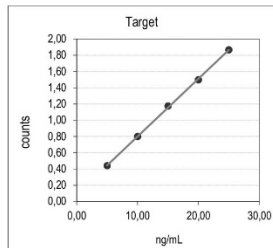


Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	3,33489 bis 5,80871	17,48458 bis 24,75055	
%	-30,25 bis 21,49	-14,92 bis 20,43	
Prüfbereich (30%)	3,5 bis 6,5	14,0 bis 26,0	
Prüfbereich (40%)	3,0 bis 7,0		

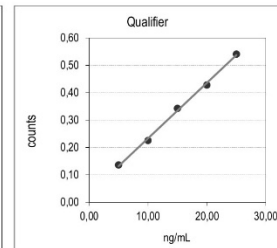
3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

	Kalibrator	Target	Qualifier
Einheit			
1	5,0	0,440	0,136
2	10,0	0,800	0,225
3	15	1,175	0,343
4	20	1,498	0,428
5	25	1,867	0,541
6			
7			
8			
9			
10			
		6	6
Signifikanz		99	90
k-Wert		3	3
Ausreißer-F-Test			
Kalibrator Nr.		3	3
Prüfwert		8,5	1,16
Krit.-Wert 99%		98,5	98,5
Ausreißer		nein	nein
Linearitäts-Mandel-Test			
Prüfwert		0,35	0,16
Krit.-Wert 99%		98,5	98,5
Bestanden?		ja	ja
a		0,07103	0,020257
b		0,090357	0,03078
R		0,9998	0,9989
Rest-SD		0,014	0,0087
		Grenzwerte	
Nachweisgrenze		0,98	0,79
Erfassungsgrenze		1,97	1,58
Bestimmungsgrenze		3,28	3,04



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.02.15	Methode:	Bestimmung von THC, THC-OH und THC-COOH nach Derivatisierung mit TESH

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0
Nachweisgrenze :				0,0						

mit ChemStation-Software durchgeführt

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20	Krit. Wert, %	20

Beurteilung	---	Kriterium: RSD und bias < 20%
-------------	-----	-------------------------------

4. WIEDERFINDUNG

4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	ng/mL		ng/mL	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
MESSUNG				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

nicht durchgeführt

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit		Zeit	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Werte	0		0	
min. Wert	0,0		0,0	
max. Wert	0,0		0,0	
Spanne	0,0		0,0	
Spanne, %		%		%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				

nicht durchgeführt

Kriterium: Spanne < Prüfwert

Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.08.14	Methode:	Bestimmung von THC nach Derivatisierung mit TBSH

Titel	THC butyliert (TBSH)
SOP	

Angaben zur Methode

Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	GC/MS-Methode zur Bestimmung von THC nach Extraktion aus alkalischem Haarhydrolysat und Derivatisierung mit TBSH
Anwendungsgebiet	FeV und weitere
Arbeitsbereich	10-700 pg/mg
Analyt	THC
Weitere bestimmbare Analyte	CBN, CBD, THCA-A

Verantwortlichkeiten

Leiter der Validierung	Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Daniel Rentsch
Beteiligte Mitarbeiter	Robert Steinhagen
Bearbeitungszeitraum	Februar 2014-August 2014
Methode gültig erklärt am	01.08.2015
Methode ungültig erklärt am	
Zusammenfassung und Bewertung	Die Methode ist basisvalidiert und kann in der Routineanalytik verwendet werden

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

- 1.1. Target
 - 1.1.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.1.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.2. Qualifier
 - 1.2.1 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)
 - 1.2.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
- 1.3. Lösemittelkalibration
 - 1.3.1 Prüfung auf Ausreißer (F-Test)
 - 1.3.2 Prüfung auf Linearität (Mandel-Test)
 - 1.3.3 Prüfung auf Varianzhomogenität (F-Test)

2. Genauigkeit

- 2.1. Level 1
 - 2.1.1 Wiederholpräzision
 - 2.1.2 Laborpräzision
 - 2.1.3 Richtigkeit
 - 2.1.4 95%-Intervall (40% / 30%)
- 2.2. Level 2
 - 2.2.1 Wiederholpräzision
 - 2.2.2 Laborpräzision
 - 2.2.3 Richtigkeit
 - 2.2.4 95%-Intervall (30%)
- 2.3. Level 3
 - 2.3.1 Wiederholpräzision
 - 2.3.2 Laborpräzision
 - 2.3.3 Richtigkeit
 - 2.3.4 95%-Intervall (30%)
- 2.4. Zusammenfassung 95%-Intervall

3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
 - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
 - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
 - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
 - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

4. Wiederfindung

- 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
 - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
 - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
- 4.2. Stabilität
 - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
 - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
- 4.3. Matrixeffekte
 - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
 - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.08.14	Methode:	Bestimmung von THC nach Derivatisierung mit TBSH

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: 370	Messgröße: THC	Einheit: pg/mg
------------	-----------------	----------------	----------------

Konzentration	10,0	20,0	50,0	100,0	200,0	500,0	700,0		
MESSUNG	1	0,051	0,108	0,251	0,626	1,066	2,999	4,091	
	2	0,049	0,109	0,228	0,616	1,133	2,92	4,284	
	3	0,047	0,11	0,247	0,587	1,124	3,143	3,86	
	4	0,05	0,109	0,257	0,605	1,129	2,707	3,928	
	5	0,045	0,108	0,264	0,611	1,081	2,77	3,786	
	6	0,05	0,112	0,25	0,593	1,03	2,586	4,014	
Mittelwert	0,049	0,109	0,25	0,606	1,094	2,854	3,994		
SD	0,0021	0,0015	0,0123	0,0146	0,0418	0,2045	0,1785		
Varianz	0,0	0,0	0,0002	0,0002	0,0017	0,0418	0,0319		
Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0		

Ausreißer-Test nach Grubbs

Extremwert	0,045	0,112	0,228	0,626	1,03	3,143	4,284		
Prüfwert	1,7	1,758	1,756	1,375	1,529	1,411	1,623		

Signifikanz 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822		
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		

Signifikanz 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944		
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,5517	Prüfwert	0,12
Tabellenwert	0,4866	Tabellenwert	21,19
Bestanden?	nein	Bestanden?	ja
		a	0,00572
		b	-0,01166
		R	0,9998
		Rest-SD	0,0293
		A	0,0
		B	0,005644
		C	-0,007146
		R	0,9999
		Rest-SD	0,0322

1.2 QUALIFIER	Messsignal: 355	Messgröße: THC	Einheit: pg/mg
---------------	-----------------	----------------	----------------

Konzentration	10,0	20,0	50,0	100,0	200,0	500,0	700,0		
MESSUNG	1	0,066	0,114	0,327	0,616	1,087	3,055	4,244	
	2	0,065	0,118	0,309	0,654	1,192	3,017	4,457	
	3	0,062	0,119	0,330	0,615	1,153	3,241	4,006	
	4	0,068	0,129	0,304	0,652	1,171	2,792	4,061	
	5	0,060	0,119	0,312	0,614	1,114	2,878	3,963	
	6	0,065	0,111	0,295	0,631	1,082	2,686	4,149	
Mittelwert	0,064	0,118	0,313	0,63	1,133	2,945	4,147		
SD	0,003	0,006	0,014	0,019	0,046	0,2	0,183		
Varianz	0,0	0,0	0,0	0,0	0,002	0,04	0,033		
Werte	6	6	6	6	6	6	6		

Extremwert	0,060	0,129	0,295	0,654	1,192	3,241	4,457		
Prüfwert	1,553	1,693	1,304	1,284	1,288	1,483	1,701		

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822		
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944		
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x ² + B*x + C
Prüfwert	0,5256	Prüfwert	1,31
Tabellenwert	0,4866	Tabellenwert	21,19
Bestanden?	nein	Linear?	ja
		a	0,005896
		b	0,00482
		R	0,9999
		Rest-SD	0,0295
		A	0,0
		B	0,005681
		C	0,017735
		R	0,9999
		Rest-SD	0,0286

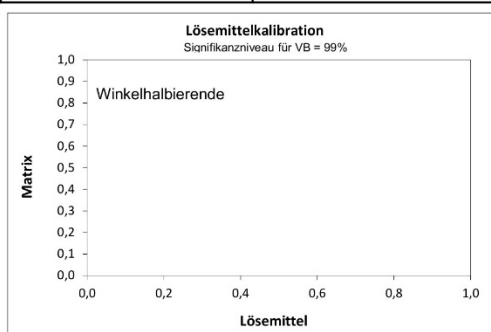
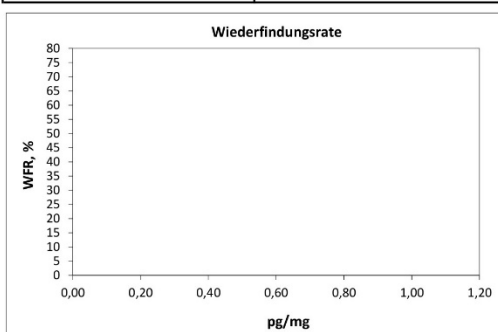
Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.08.14	Methode:	Bestimmung von THC nach Derivatisierung mit TBSH

1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (xo)	nicht untersucht
Matrix (xm)	
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

Wiederfindungsfunktion $x_m = a_0 \cdot x_o + b_0$	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
ao bo R Rest-SD	Kalibrator Nr. Prüfwert Kritischer-Wert Ausreisser?	Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?	RSD Grundkalibration RSD Wiederfindung Prüfwert Kritischer-Wert Bestanden?



2. Genauigkeit

2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="20"/>	Einheit:	<input type="text" value="pg/mg"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	20,3432955	18,87177517	19,63960714	20,26300149	21,89378389				
	2	20,40947441	20,19075304	19,54544076	18,33791471	20,22648419				
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	20,38	19,53	19,59	19,30	21,06					
BIAS, %	1,9	-2,3	-2,0	-3,5	5,3					
SD	0,05	0,93	0,07	1,36	1,18					
RSD, %	0,2	4,8	0,3	7,1	5,6					

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	19,97	SD	0,91	SD	0,97
SD	0,97	RSD, %	4,5	RSD, %	4,9
RSD, %	4,8				

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2,631
Bias, %	β-Toleranz	17,38481 bis 22,50388
	Prüfbereich (30%)	14,0 bis 26,0
	Prüfbereich (40%)	12,0 bis 28,0

Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.08.14	Methode:	Bestimmung von THC nach Derivatisierung mit TBSH

2.2. Level 2

QC-Sollwert:		200		Einheit:		pg/mg														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	196,5	201,6	189,0	203,6	187,4														
	2	198,8	200,5	183,7	206,1	191,9														
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert		197,64	201,07	186,37	204,87	189,65														
BIAS, %		-1,2	0,5	-6,8	2,4	-5,2														
SD		1,64	0,80	3,76	1,74	3,19														
RSD, %		0,8	0,4	2,0	0,9	1,7														

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	195,92	SD	2,48	SD	7,94
SD	7,53	RSD, %	1,3	RSD, %	4,1
RSD, %	3,8				

Richtigkeit	95%-Intervall		OK
Abw.	-4,08	Faktor	3,035
Bias, %	-2,0	β-Toleranz	167,80945 bis 216,02874
		Prüfbereich (30%)	140,0 bis 260,0

2.3. Level 3

QC-Sollwert:				Einheit:		pg/mg														
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10									
MESSUNG	1	nicht untersucht																		
	2																			
	3																			
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
	8																			
	9																			
	10																			
Mittelwert																				
BIAS, %																				
SD																				
RSD, %																				

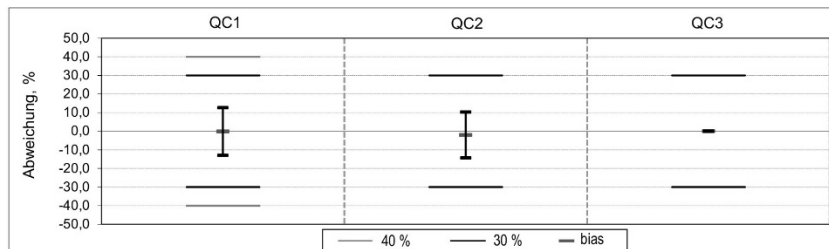
Kenndaten	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	SD	SD
SD	RSD, %	RSD, %
RSD, %		

Richtigkeit	95%-Intervall
Abw.	Faktor
Bias, %	β-Toleranz
	Prüfbereich (30%)

Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.08.14	Methode:	Bestimmung von THC nach Derivatisierung mit TBSH

Zusammenfassung 95%-Intervall

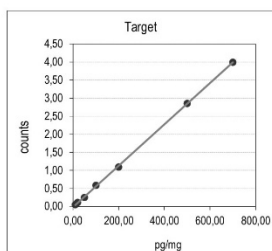


Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	17,38481 bis 22,50388	167,80945 bis 216,02874	
%	- 12,95 bis 12,68	-14,35 bis 10,26	
Prüfbereich (30%)	14,0 bis 26,0	140,0 bis 260,0	
Prüfbereich (40%)	12,0 bis 28,0		

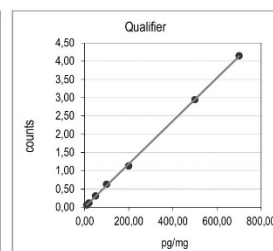
3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Kalibrator	Target	Qualifier
Einheit		
1	10,0	0,049
2	20	0,109
3	50	0,250
4	100	0,584
5	200,0	1,094
6	500,0	2,854
7	700,0	3,994
8		
9		
10		



Lineare Kalibration



Lineare Kalibration

	6	6
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3
Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	5	5
Prüfwert	4,74	9,22
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	0,38	1,31
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja
a	0,005726	0,005896
b	-0,016343	0,00482
R	0,9999	0,9999
Rest-SD	0,023	0,0295
Grenzwerte		
Nachweisgrenze	8,80	4,82
Erfassungsgrenze	17,61	9,63
Bestimmungsgrenze	30,68	19,39

Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Rostock, Forensische Toxikologie
Gültig ab:	01.08.14	Methode:	Bestimmung von THC nach Derivatisierung mit TBSH

3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert pg/mg	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
		NG-1		0,0	NG-2		0,0	NG-3		0,0
Nachweisgrenze :				0,0						

mit ChemStation-Software durchgeführt

3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20	Krit. Wert, %	20

Beurteilung --- Kriterium: RSD und bias < 20%

4. WIEDERFINDUNG

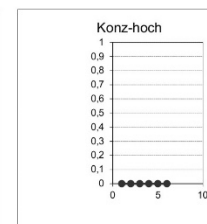
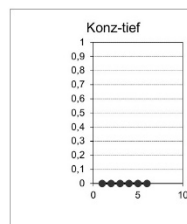
4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	pg/mg		pg/mg	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
MESSUNG				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Mittelwert				
SD				
RSD, %				
N (Werte)				
Wiederfindung, %				
RSD, %				

nicht durchgeführt

4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief	QC-Pool	Konz-hoch	QC-Pool
	Zeit		Zeit	
Werte	0	0	0	0
min. Wert	0,0		0,0	
max. Wert	0,0		0,0	
Spanne	0,0		0,0	
Spanne, %		%		%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung				
Abschnitt				
R				
Beurteilung				



Kriterium: Spanne < Prüfwert

Thesen

1. Mit Hilfe homologer *n*-Alkyliodide (C₂-C₅) können THC, THC-OH und THC-COOH – im System TBAH, DMSO und RI – in für die GC/MS-Analytik geeignete Derivate überführt werden. Diese höher molekularen Alkyl-Cannabinoide verbessern zudem teilweise die massenspektrometrischen Detektion im Vergleich zu den Methyl-Cannabinoiden.
2. Verzweigt-kettige Alkyliodide (*iso*- bzw. *tert*-Alkyliodide) besitzen im Vergleich zu den isomeren *n*-Alkyliodiden (im System TBAH, DMSO und RI) eine geringere Reaktivität, sodass sich abhängig von dem Verzweigungsgrad nur bedingt die erwarteten Derivate von THC, THC-OH und THC-COOH detektieren lassen. Fluorsubstituierte Alkyliodide reagieren, wenn überhaupt, nur mit THC zu einem entsprechenden Derivat.
3. Nach Extraktion der Cannabinoide aus dem Serum lassen sich mit mindestens einem der untersuchten Alkyliodide, sowohl über das Signal/Rausch-Verhältnis als auch über die Kalibrierfunktion, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren einstelligen ng/mL-Bereich ermitteln.
4. Mittels selbst synthetisierter Trialkylsulfoniumhydroxide (C₂-C₄) als Alkylierungsreagenz ist es möglich, Cannabinoide mit phenolischen Hydroxy- und Carboxylgruppen vollständig und allylständige Hydroxyfunktionen teilweise zu derivatisieren.
5. Trotz Variation der Reaktionsbedingungen lässt sich THC-OH mit Trialkylsulfoniumhydroxiden nur teilweise in das vollständig derivatisierte Produkt überführen.
6. Trialkylsulfoniumhydroxide sollten generell mit sauren Hydroxyfunktionen reagieren, sodass nicht nur Cannabinoide, sondern auch weitere Analyten mit Trialkylsulfoniumhydroxiden (beispielsweise Buprenorphin) derivatisiert werden können.
7. Mit Hilfe von Trialkylsulfoniumhydroxiden als Alkylierungsmittel für Cannabinoide kann eine deutliche Reduzierung der Aufarbeitungszeit und ein geringerer Verbrauch an Chemikalien im Vergleich zur Derivatisierung mit Alkyliodiden erzielt werden. Somit könnte dieses Verfahren als ökonomische Alternativmethode in der Routineanalytik etabliert werden.

8. Nach Extraktion der Cannabinoide aus dem Serum lassen sich mit mindestens einem der untersuchten Trialkylsulfoniumhydroxide, sowohl über das Signal/Rausch-Verhältnis als auch über die Kalibrierfunktion, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren einstelligen ng/mL-Bereich ermitteln.
9. Nach Extraktion der Cannabinoide aus dem Haar lassen sich mit mindestens einem der untersuchten Trialkylsulfoniumhydroxide, sowohl über das Signal/Rausch-Verhältnis als auch über die Kalibrierfunktion, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren pg/mg-Bereich ermitteln.
10. Grundsätzlich sind Trialkylsulfoniumhydroxide zur THC-COOH-Bestimmung auch aus der Matrix Urin geeignet, sodass eine Alternativmethode zu der am hiesigen Institut durchgeführten Silylierung etabliert werden könnte.

Publikationen im Rahmen der Promotion

Posterpräsentationen

- 1) Rentsch D, Steinhagen R, Kegler R, Büttner A (2014) Innovative Bestimmung von THC im Haar nach Derivatisierung mit Trialkylsulfoniumhydroxiden. Rechtsmedizin 24: 369
- 2) Steinhagen R, Kegler R, Büttner A, Rentsch D (2015) Innovative, effiziente Methode zur simultanen Detektion von THC, CBN, CBD sowie THCA-A im Haar nach Derivatisierung mit Tributylsulfoniumhydroxid. Rechtsmedizin 25: 414

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation ist weder zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch in der Vergangenheit bei einer anderen Fakultät eingereicht worden.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken dem Wort oder dem Sinn nach entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 12.07.2016

Robert Steinhagen