

Petra Gerhards, Ulrich Bons, Jürgen Sawazki
Jörg Szigan, Albert Wertmann

GC/MS in der klinischen Chemie



Weinheim · New York
Basel · Cambridge · Tokyo

This Page Intentionally Left Blank

P. Gerhards, U. Bons, J. Sawazki
J. Szigan, A. Wertmann

GC/MS in der klinischen Chemie



Weitere Titel zum Thema:

H.-J. Hübschmann

Handbuch der GC/MS. Grundlagen und Anwendung

1996. XVI, 586 Seiten mit 554 Abbildungen und 86 Tabellen. Gebunden
ISBN 3-527-28604-7

K. Pfleger, H. Maurer, A. Weber

**Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons,
Pesticides, Pollutants and Their Metabolites**

Parts I – III

1992. 2. Aufl. XXX, 3378 Seiten. Gebunden
ISBN 3-527-26989-4

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), 1997

Vertrieb:

VCH, Postfach 10 11 61, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland)

Schweiz: VCH, Postfach, CH-4020 Basel (Schweiz)

United Kingdom und Irland: VCH (UK) Ltd., 8 Wellington Court, Cambridge CB1 1HZ (England)

USA und Canada: VCH, 333 7th Avenue, New York, NY 10001 (USA)

Japan: VCH, Eikow Building, 10-9 Hongo 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113 (Japan)

ISBN 3-527-28803-1

Petra Gerhards, Ulrich Bons, Jürgen Sawazki
Jörg Szigan, Albert Wertmann

GC/MS in der klinischen Chemie



Weinheim · New York
Basel · Cambridge · Tokyo

Petra Gerhards
Shimadzu Europa GmbH
Albert-Hahn-Straße 6–10
D-47269 Duisburg

Ulrich Bons
Jürgen Sawazki
Apotheke der Rheinischen
Landeslinik Viersen
Johannisstraße 70
D-41749 Viersen

Jörg Szigan
Albert Wertmann
Labor Dr. Lembke und
Dr. Lempfrid
An der Wachsfabrik 25
D-50996 Köln

Das vorliegende Werk wurde sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren und Verlag für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler keine Haftung.

Lektorat: Dr. Steffen Pauly, Cornelia Claub
Herstellerische Betreuung: Claudia Grössl

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme
GC, MS in der klinischen Chemie / Petra Gerhards ... -
Weinheim ; New York ; Basel ; Cambridge ; Tokyo : VCH, 1997
ISBN 3-527-28803-1
NE: Gerhards, Petra

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), 1997

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, daß diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this book may be reproduced in any form – by photoprinting, microfilm, or any other means – nor transmitted or translated into a machine language without written permission from the publishers. Registered names, trademarks, etc. used in this book, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Einbandbild: Susanne Baum

Satz: Typo Design Hecker GmbH, D-69115 Heidelberg

Druck und Bindung: Strauss Offsetdruck GmbH, D-69509 Mörlenbach

Printed in the Federal Republic of Germany

Geleitwort

Die Entwicklung in den letzten Jahren hat gezeigt, daß isolierte Drogenabhängigkeit zu den Ausnahmen gehört und Mehrfachmißbrauch, auch die Mehrfachabhängigkeit, zur Regel geworden sind. Der Drogenkonsument experimentiert mit verschiedenen Stoffen unterschiedlicher Wirkung, d. h. er konsumiert verschiedene Substanzen gleichzeitig oder nacheinander, z. T. ganz bewußt „pharmakologisch abgestimmt“. Daher müssen leistungsfähige Analyseverfahren eingesetzt werden, die die Erfassung des breiten Spektrums suchtrelevanter Stoffe ermöglichen. Oft sind die Empfindlichkeit und Spezifität der verwendeten Screening-Methoden nicht ausreichend, niedrige Dosen oder selten konsumierte Stoffe möglichst vollständig zu erfassen. Ein immer wichtiger werdender Aspekt ist die analytische Erfassung des Mißgebrauchs aller Substanzen, die den substituierten Patienten und die Substitution an sich gefährden.

Das GC/MS-Verfahren liefert insbesondere bei polyvalentem Drogengebrauch hohe Informationsgehalte. Fundierte Grundkenntnisse der GC/MS-Analytik, ihrer Leistungsfähigkeit in der klinischen Chemie, der Probenvorbereitung, der Chemie und Pharmakokinetik der Suchtstoffe, Manipulationsmöglichkeiten seitens der Konsumenten bzw. Patienten sowie der Vor- und Nachteile anderer analytischer Verfahren sind essentielle Voraussetzungen für kompetente Interpretationen der Ergebnisse. Darüber hinaus muß sich das Wissen des im Drogenscreening tätigen Analytikers ständig um neue Substanzen und/oder Mißbrauchsmuster erweitern.

Nur mit diesem breit angelegten Wissen kann der Analytiker hier seiner Verantwortung im Hinblick auf die sozialen, gesundheitlichen und juristischen Konsequenzen für die Betroffenen gerecht werden.

Tübingen, November 1996

K.-A. Kovar

This Page Intentionally Left Blank

Vorwort

Das vorliegende Buch ist vor allem für den Praktiker geschrieben. Auf Vortragsreisen wurden wir durch viele Gespräche angeregt, die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten der GC/MS in der klinischen Chemie in einem Buch darzustellen.

Ziel ist es, dem Leser durch die Vermittlung von Grundkenntnissen zur Gaschromatographie und Massenspektrometrie einen schnellen Einstieg in die GC/MS-Analytik zu ermöglichen und die Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Arbeitsmedizin und der Drogenanalytik in einfacher und praxisgerechter Form anzuschließen. Begleitinformationen aus anderen Fachgebieten sollen dem Analytiker im klinischen Labor helfen, Zusammenhänge zu verstehen und die Analysergebnisse zu beurteilen.

So gibt das Buch beispielsweise zum Thema „Drogenscreening“ nicht nur Informationen zur GC/MS-Analytik, sondern stellt auch Bezüge zu anderen Analyseverfahren her. Darüber hinaus behandelt es geeignete Verfahren zur Probenaufbereitung und Qualitätssicherung in der Analytik und liefert Begleitinformationen zur Epidemiologie und Pharmakologie, ohne die ein effizientes Drogenscreening nicht möglich ist.

Das Drogenscreening nimmt in diesem Buch einen breiten Raum ein, da die Bedeutung dieser Untersuchung stetig zunimmt und die GC/MS-Analytik seit Jahren hier als „Gold Standard“ gilt.

Da immer wieder zu Unrecht die GC/MS-Analytik als extrem kostspielig bezeichnet wird, haben wir auch diesen Punkt im Kapitel „Interne Kostenrechnung“ untersucht. Wir konnten nachweisen, daß die Kosten der Analytik vorwiegend von der Auslastung der Maschine abhängen und daß durch die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten der GC/MS in der klinischen Chemie große Synergieeffekte und niedrige Analysekosten möglich sind.

Mönchengladbach, November 1996

Petra Gerhards
Ulrich Bons
Jürgen Sawazki
Jörg Szigan
Albert Wertmann

This Page Intentionally Left Blank

Inhalt

Teil I	Analytische Grundlagen der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie	1
1	Physikalische Grundlagen und Aufbau	3
1.1	Adsorption	3
1.2	Verteilung	4
1.3	Aufbau eines gaschromatographischen Systems	5
2	Injektion und Headspace-Technik	7
2.1	Injektion	7
2.1.1	Splitlose Injektion	7
2.1.2	Split-Injektion	8
2.1.3	Temperaturprogrammierte Injektion	9
2.1.4	On-Column-Injektion	9
2.2	Headspace-Technik	10
2.2.1	Statische Headspace	10
2.2.2	Dynamische Headspace	11
3	Säulen und Trägergas	13
3.1	Gepackte Säulen	13
3.2	Kapillarsäulen	13
3.3	Stationäre Phasen	14
3.4	Filmdicke	15
3.5	Trägergas	16
4	GC-Detektoren und Massenspektrometrie	19
4.1	Selektivität	20
4.2	Flammenionisationsdetektor (FID)	21
4.3	Electron Capture Detector (ECD)	22
4.4	Massenspektrometrie	23
4.4.1	Aufbau und Funktionsweise eines Quadrupol-Massenspektrometers	23
4.4.2	Detektion	24
4.4.3	Probenaufgabe – GC/MS-Interface	25

X Inhalt

4.4.4	Der Totalionenstrom (TIC)	25
4.4.5	Selected Ion Monitoring (SIM)	26
4.4.6	Auswertung	26
5	Quantifizierung	29
5.1	Interne Standardmethode	29
5.2	Standardaddition	30
5.3	Externe Eichung	31
5.4	Quantifizierung im Splitmodus	31
5.5	Nachweisgrenzen	33
Literatur zu Teil I		35
Teil II Drogenscreening		37
6	Epidemiologie des Drogen- und Arzneimittelmißbrauchs	39
6.1	Einleitung	39
6.2	Spezifische Daten und Trends	40
6.2.1	Opioide/Opiate	40
6.2.1.1	Heroin	40
6.2.1.2	Codein	41
6.2.1.3	Dihydrocodein (DHC)	42
6.2.1.4	Methadon	42
6.2.1.5	Tramadol	42
6.2.1.6	Tilidin	43
6.2.1.7	Andere zentral wirksame Analgetika	43
6.2.2	Periphere Analgetika	43
6.2.3	Benzodiazepine	44
6.2.3.1	Diazepam	44
6.2.3.2	Flunitrazepam	45
6.2.3.3	Bromazepam	45
6.2.4	Barbiturate	45
6.2.5	Andere Schlaf- und Suchtmittel	46
6.2.5.1	Clomethiazol	46
6.2.5.2	Antihistaminika	46
6.2.6	Amphetamine und verwandte Substanzen	46
6.2.6.1	Substanzen der Drogenszene	46
6.2.6.2	Psychoanaleptika und Antihypotonika	48
6.2.6.3	Anorektika	48
6.2.7	Designer-Drogen	49
6.2.8	Cannabis	49

6.2.9	Cocain	50
6.2.10	Weitere Halluzinogene	51
6.2.10.1	Lysergsäurediethylamid (LSD)	51
6.2.10.2	Andere Indol-Derivate	51
6.2.10.3	Mescaline	52
6.2.10.4	Muskatnuß	52
6.2.10.5	Piperidin-Derivate	52
6.2.10.6	Fliegenpilz	52
6.2.10.7	Biperiden	53
6.2.11	Schnüffelstoffe	53
7	Probenvorbereitungsverfahren für die Drogenanalytik	55
7.1	Historie der Probenvorbereitung	55
7.2	Prinzip der Festphasenextraktion	56
7.2.1	Praktischer Teil	58
7.2.1.1	Probenvorbereitung für die Matrix Urin	59
7.2.1.2	Probenvorbereitung für die Matrix Vollblut	61
7.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE)	61
7.4	Vergleich zwischen FPE und FFE	61
8	Drogenscreening aus Urin mit GC/MS	65
8.1	Allgemeines zum Drogenscreening aus Urin	65
8.1.1	Abgrenzung des Drogenscreenings zu anderen Screening-Verfahren	66
8.1.2	Probenmaterial	66
8.1.3	Manipulationsmöglichkeiten	67
8.1.4	Immunologische Analyseverfahren	68
8.1.4.1	Immunologische Tests auf Einzelsubstanzen und Stoffgruppen	69
8.1.4.2	Gängige immunologische Testprinzipien (Auswahl)	70
8.1.5	Chromatographische Verfahren	72
8.1.5.1	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion	72
8.1.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarraydetektion (HPLC/DAD)	73
8.2	GC/MS-Methoden zum Drogenscreening aus Urin	74
8.2.1	Allgemeines zu Screening-Methoden	75
8.2.1.1	Silanisiertes Insert und silanisierte Glaswolle	75
8.2.1.2	Trennsäulen	76
8.2.1.3	Temperatur-Druckprogramm	77
8.2.1.4	Interner Standard	78
8.2.1.5	Nachweisempfindlichkeiten	79
8.2.1.6	Methodenvalidierung	80
8.2.1.7	Qualitätssicherung	84

XII Inhalt

8.2.1.8	Massenspektren	85
8.2.1.9	Auswertung	87
8.2.1.10	Probenvorbereitung, Glucuronidspaltung	92
8.2.1.11	Derivatisierung	93
8.2.2	Screening-Methode A, ohne Derivatisierung	94
8.2.3	Screening-Methode B, nach Derivatisierung mit Acetanhydrid	96
8.3	Nachweis relevanter Stoffe/Stoffgruppen	98
8.3.1	Opiate/Opioide	99
8.3.1.1	Metabolisierung	100
8.3.1.2	Analytik	103
8.3.2	Benzodiazepine	108
8.3.2.1	Metabolisierung	109
8.3.2.2	Analytik	114
8.3.3	Amphetamine	120
8.3.3.1	Metabolisierung	123
8.3.3.2	Analytik	125
8.3.4	Designer-Drogen	130
8.3.4.1	Pharmakologie und Metabolisierung	131
8.3.4.2	Analytik	134
8.3.5	Cocain	137
8.3.5.1	Metabolisierung	137
8.3.5.2	Analytik	138
8.3.6	Clomethiazol	140
8.3.6.1	Metabolisierung	141
8.3.6.2	Analytik	142
8.3.7	Methadon	144
8.3.7.1	Metabolisierung	144
8.3.7.2	Analytik	145
8.3.8	Antihistaminika	146
8.3.8.1	Metabolisierung	146
8.3.8.2	Analytik	147
8.3.9	Biperiden	148
8.3.9.1	Analytik	148
8.3.10	Begleitmedikation	149
8.3.11	Tetrahydrocannabinol	150
8.3.11.1	Metabolisierung	151
8.3.11.2	Analytik	151
Literatur zu Teil II		153

Teil III Umweltrelevante Stoffe in der Arbeitsmedizin	157
9 Quantitative Bestimmung von Pentachlorphenol und Lindan in Blut	159
9.1 Pentachlorphenol	159
9.2 Technische Voraussetzungen für die Analyse	161
9.3 Probenvorbereitung	162
9.3.1 Prinzip der Probenvorbereitung für Lindan	163
9.3.2 Prinzip der Probenvorbereitung für PCP	168
9.4 Messung der Realproben	171
9.5 Zusammenfassung	171
10 Headspace-Gaschromatographie in der klinischen Chemie	173
10.1 Einleitung	173
10.2 Geräteparameter	176
10.3 Bestimmung von Benzol, Toluol und Xylole (BTX)	177
10.4 Bestimmung von Phenol	179
10.5 Bestimmung leichtflüchtiger halogener Kohlenwasserstoffe (LHKW's)	181
10.6 Bestimmung von Trichloressigsäure (TCA)	183
10.7 Bestimmung von Blutalkoholen	183
Literatur zu Teil III	185
Teil IV Organisation und Wirtschaftlichkeit im klinischen Labor	187
11 Probenversand für das medizinische Laboratorium	189
11.1 Zeitpunkt	190
11.2 Probengewinnung	190
11.3 Blutprobe	190
11.3.1 Auswahl der Probengefäße	191
11.3.2 Urinprobe	192
11.4 Probentransport und Probenlagerung	193
11.4.1 Transportbedingungen	193
12 Interne Kostenrechnung zur GC/MS-Analytik am Beispiel des Drogenscreenings aus Urin	195
12.1 Maschinenkosten pro Analyse bei der GC/MS-Analytik	195
12.1.1 Kalkulationsgrundlagen	196
12.1.1.1 Anteilige Beschaffungskosten	196
12.1.1.2 Betriebskosten	197

XIV Inhalt

12.1.2	Ermittlung der Maschinenkosten pro Meßergebnis	199
12.1.2.1	Anteilige Beschaffungskosten	199
12.1.2.2	Trägergas, Strom, Inserts und Wartung	199
12.1.2.3	Säulen, Septen, Filamente, Reparaturpauschale	200
12.1.3	Kapazitätsgrenze einer GC/MS	202
12.1.4	Schlußfolgerungen	202
12.2	Materialkosten der Probenvorbereitung	203
12.3	Personalkosten	203
12.4	Raumkosten	204
12.5	Gesamtkosten	204
12.6	Diskussion der Ergebnisse	205
13	Qualitätssicherung im klinischen Labor am Beispiel der Drogenanalytik	207
13.1	Interne Qualitätssicherung	207
13.1.1	Kontrollstandards	208
13.1.2	Kontrollurine	209
13.1.3	Interner Standard	213
13.2	Externe Qualitätssicherung	215
	Literatur zu Teil IV	219
	Register	221

Teil I Analytische Grundlagen der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie

Petra Gerhards, Jörg Szigan

This Page Intentionally Left Blank

1 Physikalische Grundlagen und Aufbau

Die Gaschromatographie (GC) beruht auf der wiederholten Verteilung oder Adsorption der zu trennenden Komponenten zwischen einer mobilen und einer stationären Phase (Abb. 1-1). Bei der mobilen Phase handelt es sich stets um ein Gas, das sogenannte Trägergas. Die stationäre Phase kann sowohl ein Feststoff als auch eine Flüssigkeit sein [1].

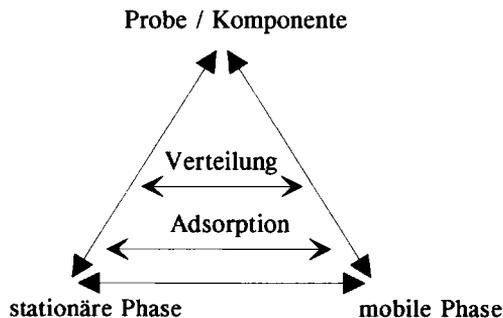


Abb. 1-1: Prinzip der GC-Trennung

1.1 Adsorption

Bei der Adsorptionschromatographie, auch GSC (Gas-Solid-Chromatography) genannt, werden die Komponenten an der festen, stationären Phase adsorbiert. Als stationäre Phasen finden Materialien wie Aktivkohle, Kieselgel, Molekularsiebe, Aluminiumoxid und Porapak Verwendung.

Das Prinzip der Trennung beruht auf unterschiedlich starken Adsorptionen der einzelnen Komponenten an den Adsorbentien. Dabei werden die Komponenten aus einer gasförmigen oder flüssigen Probe an der Oberfläche reversibel angelagert [1, 2].

1.2 Verteilung

Bei der Verteilungschromatographie, auch als GLC (Gas-Liquid-Chromatography) bezeichnet, werden die Komponenten zwischen den beiden Phasen verteilt. Die stationäre Phase ist hierbei eine Flüssigkeit, welche direkt in Form eines dünnen Films auf die Säulenwandung gebracht wird, oder die Säule ist mit einem festen Material gepackt (Kieselgel, Kieselgur, Chromosorbe usw.), das mit der Flüssigkeit imprägniert wird.

Für die Trennung der einzelnen Komponenten ist die Verteilung zwischen den Phasen wichtig. Durch den Kontakt der mobilen Phase mit der stationären Phase kann eine Komponente i von der einen Phase in die andere Phase gebracht werden (Abb. 1-2). Dadurch stellen sich unterschiedliche Konzentrationen dieser Komponenten in beiden Phasen ein. Das Verhältnis der Konzentrationen dieser Komponenten in beiden Phasen wird durch die Gleichgewichtskonstante K_i ausgedrückt.

$$K_i = \frac{c_i(s)}{c_i(m)}$$

$c_i(s)$ – Konzentration der Komponente i in der stationären Phase

$c_i(m)$ – Konzentration der Komponente i in der mobilen Phase

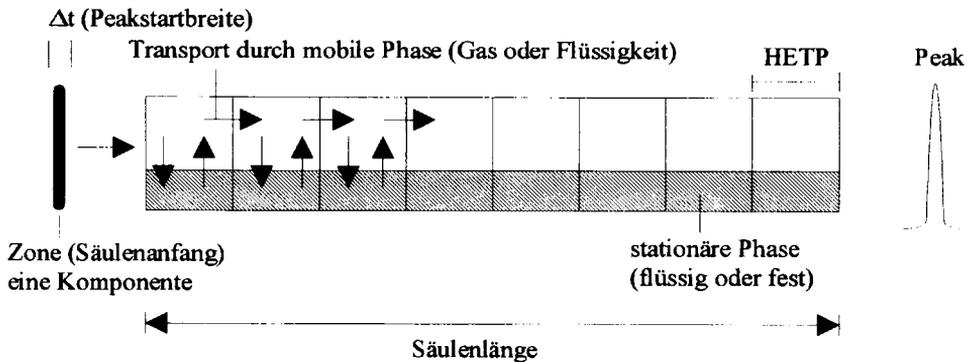


Abb. 1-2: Stoffaustausch und -transport in einer chromatographischen Säule [3]

Während des Transportes durch die mobile Phase stellt sich das Verteilungsgleichgewicht längs der Säule an verschiedenen Stellen permanent neu ein. Eine solche Stelle, die einem kurzen Längenabschnitt der Säule entspricht, wird als theoretischer Boden (HETP = High-Equivalent-of-a-Theoretical-Plate) bezeichnet. Die Anzahl dieser Böden ist ein Maß für das Trennvermögen einer Säule.

Eine große Anzahl theoretischer Böden erhält man durch derartige Säulenabschnitte mit geringer Länge (kleine Bodenhöhe) [1, 3].

1.3 Aufbau eines gaschromatographischen Systems

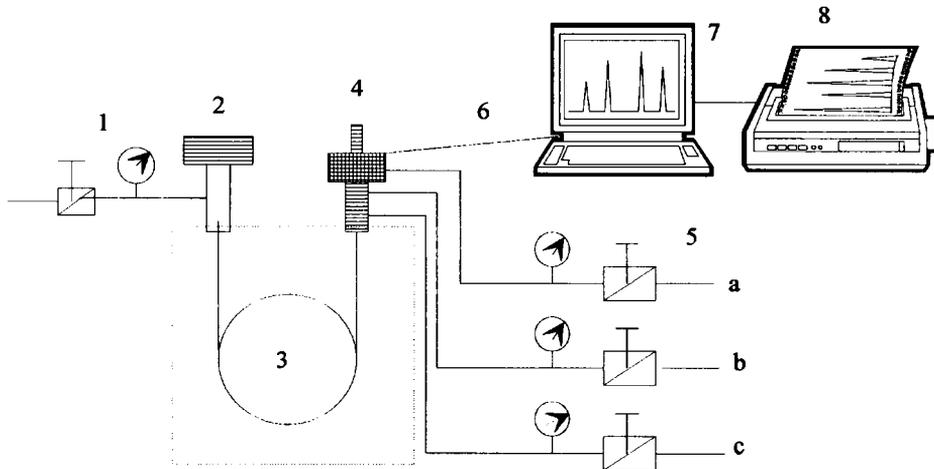


Abb. 1-3: Prinzipieller Aufbau eines gaschromatographischen Systems

- 1 = Trägergasversorgung
- 2 = Injektor (split- oder splitloser)
- 3 = Säule
- 4 = Detektor (FID – Flammenionisationsdetektor)
- 5 = Gasversorgung für den FID: a = Luft; b = Brenngas (Wasserstoff); c = Spülgas (Argon, Helium oder Stickstoff)
- 6 = serielle Schnittstelle zum Computer
- 7 = Rechner zur Aufzeichnung und Integration der Chromatogramme sowie zur Steuerung des Gaschromatographen
- 8 = Drucker als Ausgabeeinheit [3]

This Page Intentionally Left Blank

2 Injektion und Headspace-Technik

2.1 Injektion

In der Gaschromatographie müssen die Proben gasförmig in das Analysensystem eingebracht werden. Dies kann während der Probenaufgabe oder nach der Probenaufgabe geschehen.

Flüssige Proben können mittels einer Mikroliterspritze in den Gaschromatographen injiziert werden. Feste Proben werden zu diesem Zweck aufgelöst. Die einfachste Methode der Verdampfung besteht darin, die Probe während der Injektion in ein heißes Injektorsystem einzubringen und zu verdampfen. Die Probenaufgabe stellt den eigentlichen kritischen Schritt in der Gaschromatographie dar. Auftretende Probleme können unter anderem sein, daß Probenkomponenten miteinander reagieren oder daß es zur Komponentendiskriminierung kommt.

Prinzipiell unterscheidet man vier Arten der Probenaufgabe:

- Splitlose Injektion
- Split-Injektion
- Temperaturprogrammierte Injektion
- On-Column-Probenaufgabe

2.1.1 Splitlose Injektion

Sinnvoll ist diese Methode bei sehr stark verdünnten Lösungen. Bei der splitlosen Aufgabe wird die Säule durch das Lösungsmittel überlastet. Aus diesem Grund hält man die Säulenstarttemperatur niedrig (10 bis 20 °C unterhalb der Siedetemperatur des Lösemittels), wodurch die schwerflüchtigen Komponenten und das Lösemittel kondensieren. Durch das Kondensieren werden die Komponenten fokussiert. Für leichtflüchtige Komponenten ist diese Methode nicht zu empfehlen, da diese mit dem Lösemittel aus der Säule eluieren. Bei der Aufgabe ist darauf zu achten, daß der Injektor nicht durch die Menge der eingebrachten Flüssigkeit überladen wird. Das Insert im Injektor hat ein Innenvolumen von ca. 0.4 ml.

Da die Flüssigkeit im Injektor schnell verdampft, kann bei großen Flüssigkeitsmengen das Material in die Zuleitungen gelangen. Da diese Leitungen kalt sind, kommt es dort zur Kondensation. Bei weiteren Messungen kann dies eine Quelle von Kontaminationen sein [1, 3].

2.1.2 Split-Injektion

Bei der sogenannten Split-Injektion (Abb. 2-1) gelangt nur ein Teil der Probe auf die Säule. Dieses Verfahren wird bei Kapillarsäulen angewendet. Hierbei wird die

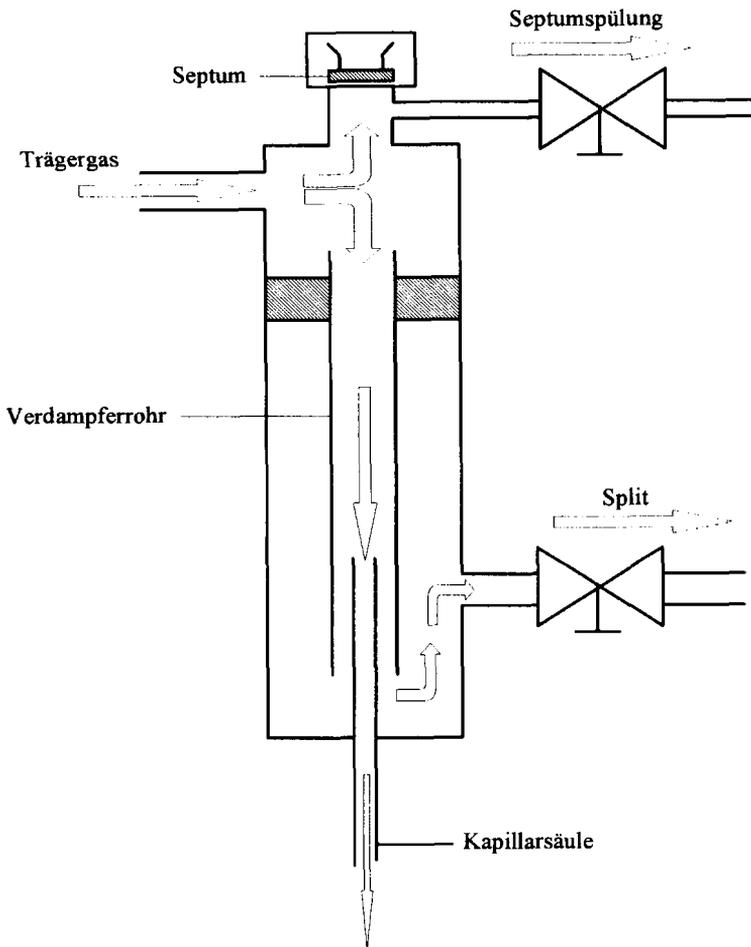


Abb. 2-1: Split-Injektion [5]