

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln

Leiter: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis

**Entwicklung einer vollautomatisierten massenspektrometrischen
Methode zum Nachweis von Neuen Psychoaktiven Substanzen in
Körperflüssigkeiten und deren Anwendung auf forensisch-
toxikologische Fragestellungen**

von der Deutschen Sporthochschule Köln

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sabrina Lehmann

aus Leipzig

Köln 2020

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis

Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Zweite Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Hilke Andresen-Streichert

Institut für Rechtsmedizin, Uniklinik Köln, Universität zu Köln

Vorsitzender des

Promotionsausschusses: Univ.-Prof. Dr. Mario Thevis

Datum der Disputation: 22.05.2020

Eidesstattliche Versicherungen gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4 und 5 der Promotionsordnung der Deutschen Sporthochschule Köln, 20.02.2013:

Hierdurch versichere ich:

Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Es ist mir an dieser Stelle ein ganz besonderes Anliegen mich bei den Personen, welche mir die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht bzw. mich dabei unterstützt haben, herzlichst zu bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Katja Mercer-Chalmers-Bender für die Bereitstellung des interessanten und praxisnahen Themas, für die Einführung in die forensische Toxikologie und für die Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Mario Thevis bedanken, welcher mir die Möglichkeit und die Rahmenbedingungen für mein Promotionsvorhaben an der Deutschen Sporthochschule Köln gegeben hat.

Des Weiteren möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Hilke Andresen-Streichert für die Erstellung des zweiten Gutachtens danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Markus Alexander Rothschild, welcher es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Institut für Rechtsmedizin der Uniklinik Köln zu erstellen.

Ferner gilt mein Dank meinen Kollegen am Institut für Rechtsmedizin der Uniklinik Köln, hier insbesondere vom Fachbereich Toxikologie. Besonders möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Martin Jübner und Herrn Dipl.-Ing. Tobias Kieliba für die fachliche Unterstützung danken. Mein Dank gilt ebenfalls meinen Promotionskolleginnen und –kollegen Franziska Gaunitz, Lina Gessner, Patrick Dahm und Jana Kietzerow für die gute Zusammenarbeit und für die entspannte sowie produktive Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. June Mercer-Chalmers-Bender ganz herzlich für das Korrekturlesen meiner englischsprachigen Fachartikel und Vorträge.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit (Förderkennzeichen: KF2429613MD3).

Mein herzlicher Dank gebührt meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung sowie ihren Glauben an mich.

Die Ergebnisse dieser kumulativen Dissertation wurden veröffentlicht in:

S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. Thevis, K. Mercer-Chalmers-Bender. Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1064, 124-138.

S. Lehmann, B. Schulze, A. Thomas, T. Kamphausen, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE. *Forensic Toxicol* **2018**, 36(2), 320-333.

S. Lehmann, T. Kieliba, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Fatalities associated with NPS stimulants in the Greater Cologne area. *Int. J. Legal Med.* **2019**, 1-13.

S. Lehmann, A. Sczyslo, J. Froch-Cortis, M.A. Rothschild, M. Thevis, H. Andresen-Streichert, K. Mercer-Chalmers-Bender. Organ distribution of diclazepam, pyrazolam and 3-fluorophenmetrazine, *Forensic Sci. Int.* **2019**, 303(109959).

Teilergebnisse wurden vorab veröffentlicht in folgen Tagungsbeiträgen:

Vorträge

S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Rapid determination of new psychoactive substances in biological matrices using an automated ITSP™ solid-phase extraction and LC-MS/MS. *XIX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 16. - 18. April, 2015.

S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Rapid determination of new psychoactive substances in biological matrices using an automated in-line ITSPTMSPE-LC-MS/MS-system. *53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)*, Florenz, Italien, 30. August – 04. September, 2015.

S. Lehmann, B. Schulze, T. Kamphausen, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE. *XX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 27. – 29. April, 2017.

S. Lehmann, B. Schulze, F. Gaunitz, T. Kamphausen, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Postmortem Distribution of 4-MEC, MDPV, Methoxetamine and α -PVP in Deaths Arising from Poisoning. *5th Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) and The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)*, Boca Raton, USA, 06. – 12. Januar, 2018.

S. Lehmann, T. Kieliba, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Postmortem-Analyse auf synthetische Stimulanzien. *97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM)*, Halle (Saale), Deutschland, 11. – 15. September, 2018.

S. Lehmann, A. Sczyslo, M. A. Rothschild, M. Thevis, H. Andresen-Streichert, K. Mercer-Chalmers-Bender. Organ distribution of diclazepam, pyrazolam and 3-fluorophenmetrazin. *XXI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 16. – 18. April, 2019.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Zusammenfassender Überblick	1
1.1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.2 Übersicht über den ersten Artikel	6
1.3 Übersicht über den zweiten Artikel.....	9
1.4 Übersicht über den dritten Artikel.....	12
1.5 Übersicht über den vierten Artikel.....	16
1.6 Zusammenfassung und Ausblick	19
1.7 Literatur	24
2. Abschließende Zusammenfassung.....	31
3. Abstract.....	33
4. Anhang	35
4.1 Abbildungsverzeichnis	35
4.2 Abkürzungsverzeichnis	36
4.3 Vollständige Publikationsliste	39

1. Zusammenfassender Überblick

1.1 Einleitung und Zielsetzung

Das Büro der Vereinten Nationen für Drogen- und Verbrechensbekämpfung (engl. *United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) definiert „Neue psychoaktive Substanzen“ (NPS) als Missbrauchsdrogen, welche weder in reiner Form noch als Zubereitung durch das „Einheitsabkommen über die Betäubungsmittel“ (engl. *Single Convention on Narcotic Drugs*) von 1961 noch über die „Konvention über psychotrope Substanzen“ (engl. *Convention on Psychotropic Substances*) von 1971 kontrolliert werden und eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellen können [1]. Das Attribut „Neu“ bedeutet dabei nicht, dass diese Substanzen zeitnah zum Auftreten auf dem Drogenmarkt neu entwickelt wurden - ganz im Gegenteil, viele der Substanzen wurden bereits Mitte bis Ende des 20-igsten Jahrhunderts synthetisiert und haben in den letzten 15 Jahren eine Renaissance als Rauschdroge erfahren. So hat beispielsweise Alexander Shulgin, der auch als „*Godfather of Ecstasy*“ bekannt ist, ab Ende der 1970-iger über 230 psychoaktive Substanzen (v. a. Phenethylamine und Tryptamine) synthetisiert [2, 3], von welchen viele zu Beginn des 21. Jahrhunderts, als Alternative zu herkömmlichen Missbrauchsdrogen, auf dem Drogenmarkt gehandelt wurden.

Die neuen Substanzen werden durch Modifikationen der chemischen Struktur von Wirksubstanzen klassischer Rauschdrogen (bspw. Amphetamin, Ecstasy (3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin, MDMA), Cocain, Tetrahydrocannabinol) sowie von Arzneistoffen (bspw. Benzodiazepine und Opioide) „designed“. Die „Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht“ (engl. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) teilt die NPS in folgende Substanzgruppen ein: synthetische Cannabinoide, Cathinone, Phenethylamine, Arylcyclohexylamine, Opioide, Benzodiazepine und in Substanzen, welche sich keiner der genannten Gruppen zuordnen lassen [4]. In der folgend dargestellten Abbildung (Abbildung 1.1) werden die Anzahl der von der EMCDDA neu registrierten NPS innerhalb ihrer Gruppen im Zeitraum von 2005 bis 2018 dargestellt. Bis Ende 2018 wurden über das EU-Frühwarnsystem der EMCDDA mehr als 730 NPS registriert [5]. Im Zeitraum von 2009 bis 2014 gab es einen stetigen Zuwachs an Neuregistrierungen [5]. Um der Masse an NPS entgegenzuwirken, wurden weltweit rechtliche Regulierungs- und Kontrollmaßnahmen getroffen. So konnte beispielsweise bis 2016 der Umgang mit NPS in Deutschland solange nicht bestraft werden, bis der konkrete Wirkstoff durch eine Änderungsverordnung in die Positivliste des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) aufgenommen wurde. In Folge dessen „hinkte“ der Gesetzgeber der Masse an neuentwickelten NPS stetig hinterher. Dies wurde in Deutschland erst mit Einführung des Gesetzes „Neue-psychoaktive-

Stoffe-Gesetz“ (NpSG, Inkrafttreten am 26. November 2016) geändert. Dem NpSG unterfallen – im Unterschied zum BtMG - ganze Stoffgruppen (Phenethylamin abgeleitete Verbindungen, Cannabimimetika/synthetische Cannabinoide, Benzodiazepine, N-(2-Aminocyclohexyl)amid abgeleitete Verbindungen und Tryptamin abgeleitete Verbindungen (Inkrafttreten der letzten Änderung: 18. Juli 2019)). Möglicherweise in Folge dieser seitens der europäischen Regierungen ergriffenen Maßnahmen zur Bekämpfung des Umgangs mit NPS sowie durch Kontroll- und Strafverfolgungsmaßnahmen, die in China gegen Labore eingeleitet wurden, welche derartige neue Substanzen herstellen, wurde ab dem Jahr 2016 ein Rückgang bei der Registrierung neuer NPS verzeichnet [5].

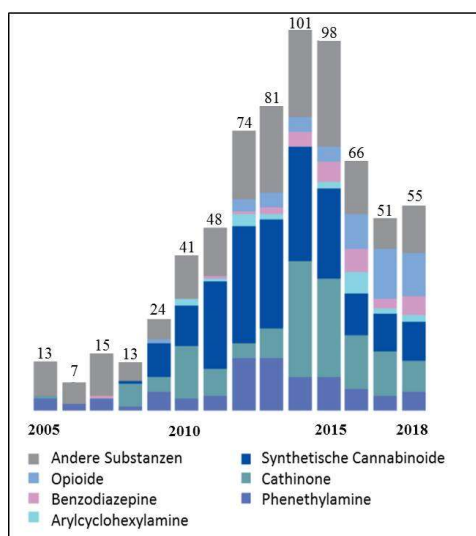


Abbildung 1.1: Anzahl und Kategorien der dem EU-Frühwarnsystem erstmals gemeldeten neuen psychoaktiven Substanzen, 2005-2018 [5].

Die in der Abbildung 1.1 aufgeführten Substanzgruppen unterscheiden sich in ihren pharmakologischen Wirkungen. Substanzen aus den Gruppen der Cathinone und Phenethylamine induzieren den direkten oder indirekten Anstieg von Neurotransmittern (Dopamin, Noradrenalin und Serotonin) im synaptischen Spalt [6-8]. Auch Arylcyclohexylamine [9, 10] sowie einige Substanzen aus der Gruppe „andere Substanzen“ (welche sich unter anderem in die Gruppen der Tryptamine [11], Piperazine [6, 12] und Piperidine [13, 14] unterteilen lassen) können einen Einfluss auf das serotonerge oder dopaminerge System ausüben. Die genannten Substanzgruppen werden im Folgenden als „synthetische Stimulanzien“ (inklusive der klassischen Stimulanzien) bzw. „NPS Stimulanzien“ zusammengefasst.

In einer Studie von Johnson und Johnson [15], welche im Zeitraum von Dezember 2012 bis April 2019 in den USA durchgeführt wurde, gaben Befragte (n = 113) folgende Konsummotivation für NPS Stimulanzien (hier Cathinone) an: Neugierde (79 %), Gefallen an der Wirkung (53 %), Erforschung des Geistes (52 %), Vermeidung eines positiven Drogentestes (26 %), Unterstützung des Wachbleibens

(22 %) und Verbesserung des sexuellen Erlebnisses (21 %). In der Literatur sind aber auch Fallbeispiele aufgeführt, bei denen Konsumenten in suizidaler Absicht offenbar bewusst auf NPS zugegriffen haben bzw. bei denen NPS in Körperflüssigkeiten von Personen, welche sich suizidiert haben, nachgewiesen wurden [16-19]. Die Konsumenten beziehen NPS hauptsächlich über das Internet bzw. „Darknet“, wo diese Substanzen in farbenprächtiger Aufmachung zum Verkauf angeboten werden. Oftmals werden NPS unter Pseudonymen (bspw. Kräuter- oder Räuchermischungen, Pflanzendünger, Badesalz oder Raumluftfrischer) bzw. mit unzureichender oder fehlender Kennzeichnung gehandelt [20]. Selbst bei einer vorliegenden Kennzeichnung können die Konsumenten, im Hinblick auf die Illegalität des Handels sowie die fehlende Qualitätskontrolle, nicht auf die Richtigkeit der Informationen vertrauen [21]. So können NPS beispielsweise mit anderen Substanzen gestreckt, verschnitten und/oder verunreinigt sein. Problematisch ist ebenfalls, dass Wirkstoffgehalte häufig nicht spezifiziert sind oder innerhalb und zwischen den „Chargen“ stark schwanken [20]. Da es dadurch für den Konsumenten schwierig bis gar unmöglich sein kann, die Substanzen für den gewünschten Effekt adäquat zu dosieren (insbes. bei hochpotenten Substanzen), bergen NPS ein hohes Gefahrenpotential für Überdosierungen. Im Gegensatz zu den klassischen Rauschdrogen besitzen NPS zudem häufig eine höhere Rezeptorbindungsaffinität [7, 12, 22, 23], was zu einer höheren Potenz der Substanzen führen kann. Zusammenfassend ergeben sich eine komplizierte Risikobewertung sowie ein erhöhtes Potential für Vergiftungen [24]. Es ist daher nicht überraschend, dass in der Literatur eine Vielzahl von Notfallaufnahmen und Todesfällen von Konsumenten synthetischer Stimulanzien beschrieben sind [25-27].

Der analytische Nachweis von NPS in biologischen Proben spielt daher für klinische und forensische Fragestellungen eine wichtige Rolle. Die NPS-Analytik hat in der klinischen Chemie vor allem bei der Abklärung von akuten NPS-Intoxikationen einen hohen Stellenwert. Bei klinischen Fragestellungen liegt der Fokus auf einer schnellen Analytik, bei welcher eine genaue Quantifizierung häufig von untergeordneter Bedeutung ist [28]. Indikationen zur NPS-Analytik in der forensischen Toxikologie stellen u. a. das Feststellen des Drogenkonsums im Kontext von Straftaten oder Gerichtsverfahren, die *post-mortem*-Toxikologie zur Aufklärung der Todesursache, sowie die Abstinenzkontrolle bei Fahreignungsbegutachtungen dar [28]. Die Relevanz bei der Fahreignungsdiagnostik wird u. a. durch eine Studie von Hutter et al. [29] unterstrichen, welche darauf hinweist, dass im Rahmen von Abstinenzprogrammen in nicht unerheblichem Ausmaß auf den Konsum von NPS (hier synthetische Cannabinoide) zurückgegriffen wird. Da die Ergebnisse im Zusammenhang mit der forensischen Toxikologie gerichtsverwertbar sein müssen, werden an die Analysemethoden strenge Qualitätsanforderungen gestellt, welche in spezifischen Richtlinien festgehalten werden (Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)) [28].

Den NPS kommt aber nicht nur eine klinische und forensische Relevanz zu - einige werden aufgrund ihrer Wirkeigenschaften auch missbräuchlich beim Leistungssport konsumiert. So werden Substanzen mit stimulierenden Eigenschaften beispielsweise missbräuchlich eingesetzt, um den Energieumsatz zu erhöhen oder die Ermüdung zu verzögern [30]. Cannabis-Produkte (inkl. synthetischen Cannabinoiden) können aufgrund ihrer sedierenden Wirkung bei gefährlichen Sportarten (bspw. Downhill Radfahren) eingesetzt werden, um die Risikobereitschaft zu erhöhen [31]. Aus diesem Grund sind bereits einige dieser Substanzen bzw. ganze Substanzgruppen in die Verbotliste (engl. *Prohibited List*) der Welt-Anti-Doping-Agentur (engl. *World Anti-Doping Agency*, WADA) aufgenommen worden [32]. Dabei werden die Stimulanzien in dieser Liste zusätzlich in „nicht spezifizierte Stimulanzien“ (bspw. Amphetamin, Methamphetamin) und in „spezifizierte Substanzen“ (bspw. Cathinone und Analoga, MDMA) unterteilt. Bei verbotener Anwendung von Substanzen aus der Gruppe der „nicht spezifizierten Substanzen“ im Rahmen von Wettkämpfen fordert die WADA eine zweijährige Sperre [33, 34]. Im Gegensatz dazu kann die Anwendung von Substanzen aus der Gruppe der „spezifizierten Substanzen“ bei Wettkämpfen zu reduzierten Sanktionen (z. B. Disqualifikation vom Wettkampf und eine Sperre unterhalb von 2 Jahren) führen, da diese Substanzen aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und weiten Verbreitung in medizinischen Produkten unter Umständen unbeabsichtigt eingenommen worden sein können [33, 34].

In Anbetracht dessen war es Ziel dieser Arbeit, Methoden zum Nachweis von synthetischen Stimulanzien in biologischen Matrices zu entwickeln sowie die Relevanz synthetischer Stimulanzien bei Verstorbenen im Großraum Köln aufzuklären. Dabei hatte insbesondere die Erfassung einer möglichst hohen Anzahl an synthetischen Stimulanzien aus verschiedenen Substanzgruppen sowie möglichst niedrige Nachweisgrenzen (engl. *Limit of Detection*, LOD) höchste Priorität. Die wissenschaftlichen Ergebnisse werden in den vier Artikeln der kumulativen Arbeit eingehend erläutert. Als ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit wurde die Standardaddition unter Anwendung der QuEChERS-Methode (Akronym für *Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe* (schnell, einfach, günstig, effizient, robust, sicher)) im Vergleich zur Festphasenextraktion bei postmortal gewonnenen Proben mit dem Ziel der Untersuchung der Organverteilung und der postmortalen Umverteilung ausgewählter NPS angewandt.

Der erste Artikel dieser Arbeit beschreibt die Entwicklung sowie Validierung einer voll automatisierten in-line Festphasenextraktion-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenpektrometrie-Methode (engl. *Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, SPE-LC-MS/MS) zum Nachweis von 74 synthetischen Stimulanzien im Serum sowie deren Anwendung auf Realfälle. Blutserum ist in der forensischen Toxikologie die bevorzugte Probenmatrix, wenn es um die Beurteilung der akuten Substanzbeeinflussung geht. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden für die Extraktion "Instrument Top Sample Prep"-Kartuschen (ITSP™) mit unterschiedlichen Sorbentien hinsichtlich ihrer Wiederfindung verglichen. Die Validierung der Methode erfolgte nach den Richtlinien der GTFCh.

Der zweite Artikel befasst sich mit der Relevanz des Konsumverhaltens von Stimulanzien aus der Gruppe der NPS bei Verstorbenen im Großraum Köln. Hierzu wurde die im ersten Artikel beschriebene in-line SPE-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 97 synthetischen Stimulanzien im Urin weiterentwickelt und nach den Richtlinien der GTFCh validiert. Mit der entwickelten, auf Urin abgestimmten Methode wurden anschließend Urinproben (bzw. bei Nichtvorhandensein Nierenhomogenate) von 268 Verstorbenen (Alter zum Zeitpunkt des Versterbens: 12 bis 35 Jahre) im Rahmen der durch die Staatsanwaltschaft beauftragten Todesursachenfeststellung im Zeitraum von Januar 2011 bis Mai 2017 untersucht. Da die Substanzen in der Niere aufkonzentriert werden, werden im Urin höhere Substanzkonzentrationen und längere Nachweiszeiten als im Blut erreicht, weswegen Urin bevorzugt für eine Screeninganalyse verwendet wird. In Anbetracht des Umstandes, dass ein Rückschluss auf die Wirkstoffkonzentration der Substanz im Blut zum Zeitpunkt des Versterbens aus Urinproben nicht möglich ist, wurden bei positiven NPS-Fällen (sofern vorhanden) noch die dazugehörigen Blutproben analysiert.

Der dritte Artikel beschreibt die Organverteilung der Stimulanzien Methylendioxypropyvaleron (MDPV), α -Pyrrolidinopentiophenon (α -PVP), Methoxetamin und 4-Methylethcathinon (4-MEC) bei zwei Verstorbenen. In diesem Zusammenhang wurden zwei verschiedene Probenvorbereitungsmethoden zur Extraktion der genannten Analyten aus Körperflüssigkeiten und Geweben getestet. Bei den Extraktionsmethoden handelt es sich um ITSPTM-SPE und QuEChERS. Die QuEChERS-Methode wurde ursprünglich für die Pestizidanalytik von pflanzliche Lebensmittel entwickelt [35] und wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Anwendbarkeit in der forensischen Toxikologie getestet.

In einem vierten Artikel werden die Organverteilung eines synthetischen Stimulans - 3-Fluorphenmetrazin (3-FPM) - sowie zweier Designer-Benzodiazepine – Diclazepam und Pyrazolam – ermittelt, um nähere Erkenntnisse zur postmortalen Umverteilung (engl. *post-mortem redistribution* (PMR)) dieser Substanzen zu gewinnen. Für die Probenaufarbeitung wurden die beiden Extraktionsmethoden ITSPTM-SPE und QuEChERS verwendet. Um eine bessere Einschätzung zur PMR treffen zu können, wurde das Verteilungsverhältnis (C/P-Ratio) von Herz- (C) zu Femoralblut (P) der jeweiligen Substanzen bestimmt.

In den folgenden Abschnitten wird nun ein Überblick über die in den einzelnen Artikeln relevanten Hintergründe, Experimente und Ergebnisse gegeben.

1.2 Übersicht über den ersten Artikel

Die rasante Entwicklung und schnelle Verbreitung der NPS führt zu analytischen Herausforderungen hinsichtlich Identifizierung und Quantifizierung. Sensitive und selektive Methoden werden benötigt, um Konzentrationen einer möglichst hohen Anzahl an NPS im unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich im Blutserum nachweisen zu können. Im Jahr 2015 gab es gerade einmal zwei in internationalen Zeitschriften veröffentlichte Methoden zum Nachweis von NPS Stimulanzien in Blutseren. Wohlfahrt et al. [36] veröffentlichten im Jahr 2010 eine LC-MS/MS-Methode zum semi-quantitativen Nachweis von 35 NPS aus den Stoffgruppen der Phenethylamine, Cathinone, Tryptamine und Piperazine aus 1 mL Probenvolumen. Die chromatographische Methode besitzt eine Gesamtlaufzeit von 15 min. Die Nachweisgrenzen der Substanzen lagen in einem Bereich von 1 bis 5 $\mu\text{g/L}$. Swortwood et al. [37] publizierten 2013 eine weitere LC-MS/MS-Methode, welche für die Bestimmung von 32 NPS aus den Stoffgruppen der Cathinone, Phenethylamine, Piperazine und Tryptamine validiert wurde, wobei 27 Analyten die Validierungskriterien erfüllten. Hier wurde ebenfalls ein Probenvolumen von 1 mL Serum eingesetzt. Die chromatographische Methode besitzt eine Gesamtlaufzeit von 11 min. Mit der Methode konnten Nachweisgrenzen im Bereich von 0,01 bis 0,1 $\mu\text{g/L}$ erzielt werden.

Das erste Projekt beschreibt die Entwicklung und Validierung einer voll automatisierten in-line SPE-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 95 synthetischen Stimulanzien aus Blutseren mit einem Probenvolumen von 150 μL . Bei der Substanzauswahl wurden nach ausführlicher Literaturrecherche alle zum damaligen Zeitpunkt (Februar 2015) in Deutschland kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen von synthetischen Stimulanzien (insgesamt 69 NPS Stimulanzien) aus den Substanzgruppen der Cathinone, der Phenethylamine, der Arylcyclohexylamine, der Tryptamine, der Piperazine, der Piperidine, der Pyrrolidine, der Aminoindane sowie der Arylalkylamine in der Methodenentwicklung berücksichtigt. Neben den NPS wurden die fünf klassischen Stimulanzien Amphetamin, Methamphetamin, 3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin (MDMA), 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA) und 3,4-Methylendioxy-N-ethylamphetamin (MDEA) in die Methode aufgenommen. Durch eben diese Möglichkeit, auch klassischen Stimulanzien zu quantifizieren, erhält die Methode für die Routineanalytik in forensischen Instituten eine zusätzliche Attraktivität, da NPS Stimulanzien einerseits oft in Kombination mit klassischen Stimulanzien aufgenommen werden [25, 38] und andererseits die klassischen Stimulanzien in Deutschland eine hohe Lebenszeitprävalenz besitzen und aktuell immer noch – im Gegensatz zu NPS – am häufigsten konsumiert werden [5]. Ebenfalls wurden die, in der Clubscene populären und auch häufig in Kombination mit synthetischen Stimulanzien konsumierten Substanzen Ketamin [39, 40] und Methylphenidat [41] in die Methode integriert. Nach der abgeschlossenen Validierung wurde die Methode hinsichtlich der Detektion von 21 „weiteren“ NPS Stimulanzien – welche

nach der Beendigung der Validierung als Referenzsubstanzen erhältlich waren – überprüft und für die qualitative Erfassung dieser Analyten validiert.

Mittels der entwickelten und optimierten Methode können 89 Substanzen, inklusive einiger Strukturisomere, in einem Zeitraum von 5,5 Minuten aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeit und/oder ihres unterschiedlichen Fragmentierungsmusters nachgewiesen werden. Die Strukturisomere 3-MeO-PCP und 4-MeO-PCP sowie 2-FMA und 3-FMA können aufgrund ihrer gleichen Retentionszeit sowie ihres identischen Fragmentierungsmusters mit der entwickelten Methode nicht voneinander getrennt werden und müssen in der Routineanalytik als Summenparameter angegeben werden. Falls fallspezifisch die genaue Aufklärung der Strukturisomere erforderlich ist, wären weitere gezielte Methoden erforderlich.

Die Methode wurde für 74 Substanzen hinsichtlich Selektivität, Linearität, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Genauigkeit, Labor- und Wiederholpräzision, Matrixeffekt, Wiederfindung und Stabilität (Stabilität aufgearbeiteter Proben, Einfrier-/Auftaustabilität) nach den Richtlinien der GTFCh validiert. Es wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,2 und 4,0 µg/L sowie eine Bestimmungsgrenze von 5,0 µg/L für alle Substanzen im Serum ermittelt. Die Wiederfindung der meisten Analyten (93 %) lag bei über 50 %. Die Validierungskriterien, inklusive Linearität, Matrixeffekt sowie Genauigkeit und Präzision, wurden von 62 Analyten vollständig erfüllt. Die 21 „weiteren“ NPS Stimulanzien, welche nur qualitativ mit der Methode erfasst werden, wurden hinsichtlich Selektivität und Nachweisgrenze nach den Richtlinien der GTFCh validiert. Hier wurden Nachweisgrenzen im Bereich zwischen 0,4 und 1,6 µg/L bestimmt. Im Vergleich mit veröffentlichten Fallberichten erscheinen die ermittelten Nachweisgrenzen der meisten NPS Stimulanzien im Serum als angemessen. Für Substanzen der Gruppe 2C-X-NBOMe (Untergruppe der Phenethylamine, hier 25B-NBOMe und 25H-NBOMe) wurden in der Literatur in Fallberichten Konzentrationen im Blut bzw. Serum unterhalb der in der hier beschriebenen Methode ermittelten Nachweisgrenzen bestimmt [42, 43]. Zukünftig muss die Methode für diese Analyten optimiert bzw. weiterentwickelt werden, um niedrigere Nachweisgrenzen zu erreichen.

Die für Serum entwickelte und validierte Methode zeigte sich auch für die Bestimmung von synthetischen Stimulanzien in Vollblut als geeignet. Dies wurde durch in Vollblut angesetzte Qualitätskontrollen, deren Konzentrationen mittels in Serum angesetzter Kalibration berechnet wurden, überprüft. Die entwickelte Methode wurde anschließend erfolgreich auf 28 Proben (20 Seren und 8 Vollblutproben) aus forensischen Routinefällen angewandt, bei denen in sieben Proben NPS Stimulanzien nachgewiesen werden konnten.

Es ist zu erwarten, dass auch weitere NPS aus den oben erwähnten Substanzgruppen aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Strukturen mit der SPE-LC-MS/MS-Methode extrahiert und analysiert werden können. Aufgrund der rasanten Entwicklung und des Inverkehrbringens neuer NPS ist es wichtig, neue

Substanzen ständig nachzupflegen. Es muss allerdings beachtet werden, dass bei Integration neuer Analyten in eine bereits bestehende LC-MS/MS-Methode ebenfalls die Anzahl an MRM-Übergänge erhöht wird. Dies führt zu einer Reduzierung der Messzeit je MRM-Übergang (engl. *dwell-Time*), welches mit einem Verlust an Empfindlichkeit einhergeht. Aufgrund dessen sollte im Falle der Aufnahme neuer Substanzen in eine bereits bestehende Methode eine Revalidierung in Betracht gezogen werden. Um eine Revalidierung zu umgehen, können die neuen NPS mit einer neuen massenspektrometrischen Methode (bei gleicher Extraktionsmethode und gleicher chromatographischer Methode) analysiert werden. Letztere Option wurde für die 21 „weiteren“ Analyten gewählt.

Im Vergleich zu den zum Publikationszeitpunkt der eigenen Methode bereits veröffentlichten Multi-Target-Methoden zum Nachweis von NPS Stimulanzien im humanen Serum der Arbeitsgruppen Wohlfarth et al. [36] und Swortwood et al. [37] bietet die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode relevante Weiterentwicklungen beziehungsweise Neuerungen. Die voll-automatisierte in-line SPE-LC-MS/MS Methode besitzt aufgrund der Verschachtelung von Probenaufarbeitung sowie Analyse eine Gesamtzykluszeit von 11 Minuten. In gerade einmal 150 µL Probenvolumen können 95 synthetische Stimulanzien nachgewiesen werden. Die Methode wurde für 74 Substanzen nach den Richtlinien der GTFCh voll-validiert, wobei 62 Analyten alle Kriterien erfüllten und somit quantitativ im Blutserum bestimmt werden können. Für alle 95 Analyten wurden Nachweisgrenzen im Bereich von 0,2 und 4,0 µg/L bestimmt.

1.3 Übersicht über den zweiten Artikel

Das NPS ein ernstes Gesundheitsrisiko bergen, wird durch eine Vielzahl an Kasuistiken, welche in der Literatur beschrieben werden, verdeutlicht [26]. Laut den Statistiken des Bundeskriminalamtes gab es in den Jahren von 2012 bis 2017 185 Todesfälle in Deutschland, bei denen die Todesursache mit dem Konsum von NPS in Zusammenhang gebracht wurde [44-50]. Aufgrund der schwierigen analytischen Erfassbarkeit von NPS und da nicht immer eine forensisch-toxikologische Untersuchung (inklusive NPS) zur Aufklärung der Todesursache durch die Staatsanwaltschaft angeordnet wird, ist von einer weitaus größeren Dunkelziffer auszugehen [51]. Prävalenz-Studien zum Konsumverhalten von NPS-Konsumenten bzw. zur Todesursachenermittlung bei möglicher NPS-Intoxikation wurden u. a. in Polen durch die Arbeitsgruppe Adamowicz et al. [38] und in Großbritannien durch die Arbeitsgruppe Elliott und Evans [25] durchgeführt. Beide Arbeitsgruppen untersuchten Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe von sowohl lebenden als auch verstorbenen Personen. Adamowicz et al. [38] konnte in den biologischen Matrices von 98 Lebenden (9,3 %) und 14 Verstorbenen (1,3 %) NPS nachweisen ($n_{\text{Gesamt}} = 1058$). Elliott und Evans [25] wiesen in 203 Fällen NPS nach, wobei die Gesamtanzahl der untersuchten Fälle nicht aufgeführt wird. In 7 % der NPS positiven Fälle wird vermutet, dass NPS todesursächlich bzw. am todesursächlichen Geschehensablauf mitbeteiligt gewesen sind [25].

Um eine Aussage über die Relevanz des Konsumverhaltens von Verstorbenen hinsichtlich NPS Stimulanzien im Großraum Köln tätigen zu können, wurden in 268 Fällen Urinproben – und, falls nicht vorhanden, Nierenhomogenate - von Verstorbenen im Alter von 12 bis 35 Jahren untersucht. Hierfür wurde die im ersten Artikel beschriebene Methode für die Analyse von 97 synthetischen Stimulanzien im Urin weiterentwickelt und validiert. Die Untersuchung der Urinproben (bzw. Nierenhomogenate) erfolgte innerhalb einer erweiterten systematischen toxikologischen Untersuchung (STA), welche von der Staatsanwaltschaft zur Aufklärung der Todesursache angeordnet wurde. Bei einem NPS-Nachweis im Urin wurde zusätzlich zur routinemäßigen Analytik auf andere relevante Substanzen noch die dazugehörige Blutprobe untersucht (sofern vorhanden), um auch eine Aussage über die Beeinflussung durch NPS zum Zeitpunkt des Versterbens treffen zu können. Eine mögliche postmortale Umverteilung der Substanzen wurde dabei nicht berücksichtigt. Ferner ist zu beachten, dass das NPS-Screening ausschließlich auf synthetische Stimulanzien beschränkt wurde. Eine Untersuchung auf weitere NPS-Substanzklassen (z.B. synthetische Cannabinoide, Designer-Benzodiazepine, Designer-Opioide) erfolgte nur bei einem konkreten Verdacht (z.B. Auffinden einer bestimmten Substanz am Sterbeort).

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte in 50 der 268 Fälle (19 %, 74 % männlich) eine Aufnahme von Stimulanzien bestätigt werden. In 33 dieser Fälle (12 %, 76 % männlich) wurden konventionelle Stimulanzien und in 17 Fällen (6 %, 71 % männlich) NPS Stimulanzien (teils in Kombination mit konventionellen Stimulanzien) nachgewiesen. Letztere 17 Fälle werden innerhalb des zweiten Artikels

ausführlicher dargestellt. Zudem wurden vier dieser Fälle bereits in drei weiteren Publikationen detailliert beschrieben [52-54]. Artikel 3 [52] und 4 [54] dieser Dissertation beschreiben die Untersuchung der Organverteilung von drei der vier Fälle. In acht der 268 Fälle konnte Ketamin nachgewiesen werden. Ketamin ist zwar kein NPS, wird aber häufig zusammen mit synthetischen Stimulanzien aufgenommen und wurde deshalb in die Analysenmethode integriert. Da keine Informationen vorlagen, ob Ketamin im Krankenhaus als Narkosemittel verabreicht wurde und da in diesen Fällen keine NPS-Stimulanzien nachgewiesen werden konnten, wurde auf eine weitergehende Betrachtung dieser Fälle verzichtet.

Innerhalb der untersuchten Jahre wurden im Jahr 2013 die meisten NPS-positiven Fällen detektiert (2011: 1 Fall, 2012: 3 Fälle, 2013: 8 Fälle, 2014: kein Fall, 2015: 2 Fälle, 2016: 1 Fall, Mai 2017: 2 Fälle). Bei allen NPS-positiven Fällen konnten weitere konventionelle Drogen und/oder andere NPS und/oder Medikamentenwirkstoffe nachgewiesen werden. In der häufigsten Kombination lagen die NPS Stimulanzien mit konventionellen Stimulanzien (bspw. Amphetamin und MDMA) vor (8 der NPS Stimulanzien-positiven Fälle), gefolgt von Antidepressiva/Neuroleptika (7 Fälle), (exklusive Designer-Benzodiazepine; 6 Fälle), Opioiden (6 Fälle), Cannabis (4 Fälle), Cocain (2 Fälle) und Designer-Benzodiazepinen (1 Fall).

In zwei Fällen waren ausschließlich NPS Stimulanzien nachweisbar. In sechs Fällen konnten drei oder mehr NPS detektiert werden. In fünf Fällen konnte aufgrund einer anschließenden Blutuntersuchung bewiesen werden, dass NPS entweder todesursächlich oder von toxikologischer Relevanz beim Versterben gewesen sind. In zwei Fällen waren NPS Stimulanzien innerhalb einer Polyintoxikation von geringerer Bedeutung. In drei Fällen ist aufgrund des Sachverhalts davon auszugehen, dass die Drogen in suizidaler Absicht aufgenommen wurden.

Para-Methoxymethamphetamin (PMMA) konnte in acht der 17 Fälle im Zeitraum von 2011 bis 2013 nachgewiesen werden und ist somit das am häufigsten nachgewiesene NPS innerhalb dieser Studie. In drei Fällen war zusätzlich die Substanz para-Methoxyamphetamin (PMA) nachzuweisen, wobei es sich hier um den Metaboliten von PMMA handeln dürfte. Die gehäufte Präsenz von PMMA in diesem Zeitraum wird auch durch die Arbeitsgruppen Vevelstad et al. [55] und Nicol et al. [56] belegt. Vevelstad et al. [55] beschrieben 12 PMMA-Intoxikationen mit tödlichem Ausgang sowie 22 PMMA-Intoxikationen mit nicht-tödlichem Ausgang, welche sich in dem Zeitraum zwischen Juli 2010 und Januar 2011 in Norwegen ereigneten. Nicol et al. [56] dokumentierten eine Serie von 27 PMMA-Intoxikationen mit tödlichem Ausgang im Zeitraum zwischen Juni 2011 und April 2012 in Kanada.

Während die Arbeitsgruppen Elliott und Evans [25] (Zeitraum der Studie: 2010 bis 2012) sowie Adamowicz et al. [38] (Zeitraum der Studie: 2012 bis 2013) in den Ländern Großbritannien bzw. Polen eine von Jahr zu Jahr stetig steigende Anzahl an NPS beobachteten, wurde in der vorliegenden Studie ab

2013 eine rückläufige Anzahl an positiven Fällen beobachtet. Neben den regionalen Unterschieden muss allerdings berücksichtigt werden, dass die zitierten Arbeitsgruppen Proben (hauptsächlich Blut und Urin) sowohl von Lebenden als auch von Verstorbenen untersucht haben. Des Weiteren waren die methodisch erfassten NPS nicht gänzlich deckungsgleich. Die von der Arbeitsgruppe Adamowicz et al. [38] entwickelte Methode erfasst(e) 143 NPS (inklusive syntetischer Cannabinoide); die von der Arbeitsgruppe Elliott and Evans [25] entwickelte Methode erfasst(e) mindestens 26 NPS (eine genaue Anzahl wird nicht genannt; inklusive synthetischer Cannabinoide). Wie bereits in den Studien von Elliott und Evans [25] sowie Adamowicz et al. [38] beschrieben, belegt auch diese im Rahmen der Dissertation durchgeführte Studie, dass NPS-Konsumenten häufig noch weitere Substanzen (anderen Rauschdrogen, Sedativa und Psychopharmaka) aufnehmen.

Im Rahmen der hiesigen Studie gilt es zu beachten, dass gegebenenfalls etwaige neuartige, nicht in der Methode integrierte, NPS nicht detektiert worden sein können. Eine mögliche Aufnahme dieser Substanzen wäre somit übersehen worden.

1.4 Übersicht über den dritten Artikel

Da keine klinischen Studien zu NPS durchgeführt werden, sind folgende Daten für eine Risikoabschätzung von hoher Relevanz: Fallberichte/-serien, die auf analytisch bestätigter Verwendung beruhen; freiwillige Humanstudien, in denen mögliche akute toxikologische Wirkungen bewertet werden; Informationen von Giftinformationszentren; Benutzerberichte aus Internet-Diskussionsforen [57]. Für viele NPS ist die Datenlage zu Fallberichten/-serien allerdings sehr spärlich [57]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass in vielen forensischen Laboratorien gegebenenfalls keine adäquaten Nachweismethoden für NPS vorhanden sind.

Im ersten Teil des dritten Projekts wurde die Organverteilung von drei verschiedenen NPS Stimulanzien bei zwei Verstorbenen untersucht. Dabei handelt es sich um die Substanzen Methylenedioxypropylammonium (MDPV), 4-Methylethcathinon (4-MEC) und Methoxetamin (MXE). Bei einem Verstorbenen wurde zudem die Organverteilung des NPS Stimulanz α -Pyrrolidinopentiophenon (α -PVP) analysiert. Die ermittelten Daten sollen zukünftig die Interpretation von ähnlich gelagerten Intoxikationsfällen unterstützen.

Die Substanzen MDPV, 4-MEC, MXE und α -PVP wurden innerhalb eines mutmaßlichen Doppelsuizides von einem Pärchen (A: männlich, 27 Jahre alt; B: männlich 28 Jahre alt) aufgenommen. Beide Verstorbene wurden in einem stark fäulnisveränderten Zustand in ihrer Wohnung aufgefunden. Folgende Matrices wurden innerhalb der Organverteilung untersucht: Femoralblut (nur vom Verstorbenen A), Herzblut (nur vom Verstorbenen B), Urin (nur vom Verstorbenen B), Herzbeutel Flüssigkeit, Gallenflüssigkeit, Mageninhalt, Gehirn, Leber, Lunge, Niere und Muskel (Psoas). Eine mögliche postmortale Umverteilung konnte nicht beurteilt werden, da von dem Verstorbenen A nur Femoralvenenblut (P) und von dem Verstorbenen B nur Herzblut (C) vorhanden und somit eine Berechnung des Verhältnisses der Substanzkonzentrationen im Herzblut und Femoralblut (C/P-Wert) nicht möglich war.

Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Organverteilung wurden in einem zweiten Teil dieses Projektes zwei verschiedene Extraktionsverfahren – nämlich eine QuEChERS-Methode und eine SPE-Methode - miteinander verglichen. Bei der QuEChERS-Methode handelt es sich um eine Methode, welche erstmals im Jahr 2003 ursprünglich im Zusammenhang mit der Extraktion von Pflanzenschutzmitteln aus pflanzlichen Lebensmitteln veröffentlicht wurde [35]. In den letzten 11 Jahren hat diese Methode allerdings auch vereinzelt Anwendung in der forensischen Toxikologie gefunden [58-61]. Aufgrund postmortalen Veränderungen unterscheiden sich Proben (Körpergewebe und Körperflüssigkeiten) von Verstorbenen sehr stark von Proben Lebender und stellen eine Herausforderung in der forensischen Analytik dar. QuEChERS-Methoden, die auch bei komplexen Lebensmitteln (z. B. fettreiche

Nahrungsmittel [62-64]) zur Anwendung kommen, könnten eine Alternative zu klassischen SPE- oder flüssig/flüssig-Extraktionsverfahren bieten. Um eine Aussage über die Effizienz und Effektivität der QuEChERS-Methode in der forensischen Toxikologie treffen zu können, wurde diese mit einer ITSP-SPE-Methode hinsichtlich Genauigkeit (Vollblut; $n = 3$, 4-MEC = 100 $\mu\text{g/L}$, MXE = 100 $\mu\text{g/L}$, MPDV = 100 $\mu\text{g/L}$, α -PVP = 20 $\mu\text{g/L}$), Wiederfindung und Matrixeffekte (Vollblut, Leber, Niere und Gehirn; $n = 2$; 4-MEC = 100 $\mu\text{g/L}$, MXE = 100 $\mu\text{g/L}$, MPDV = 100 $\mu\text{g/L}$, α -PVP = 20 $\mu\text{g/L}$), Lösungsmittelverbrauch, Zeitaufwand sowie Anzahl der manuell durchgeführten Arbeitsschritte verglichen. Die Extraktion mittels der QuEChERS-Methode erfolgte mit leichten Modifikationen nach dem Protokoll von Hasegawa et al. [58]. Die Extraktion der NPS mittels ITSP-SPE wurde bereits im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellt [65]. Die Organgewebe wurden vor der ITSP-SPE-Extraktion mit Phosphatpuffer (0,1 M) zerkleinert und homogenisiert. Für die Konzentrationsbestimmungen der NPS innerhalb der Organverteilung wurde bei beiden Extraktionsmethoden das Standardadditionsverfahren gewählt, um den Einfluss von Matrixeffekten gering zu halten. Da die Zusammensetzung von Proben von Verstorbenen aufgrund von Zersetzungsprozessen von Fall zu Fall erheblich variieren kann, sind Validierungsstudien in der „post-mortem Analytik“ nicht zweckdienlich [66]. Aufgrund dessen ist die Standardaddition, bei welcher die Kalibrierung und Quantifizierung in der Probenmatrix des jeweiligen Falls durchgeführt wird, der „goldene Standard“ bei den chemisch-toxikologischen Untersuchungen von Organgeweben und Körperflüssigkeiten Verstorbener.

Die Substanzen 4-MEC, MDPV und MXE konnten in allen gesammelten Geweben und Körperflüssigkeiten des Verstorbenen A nachgewiesen werden. Zudem war α -PVP in einigen Körperflüssigkeiten und Geweben nachweisbar. Der Verstorbene A wies folgende Femoralblut-Konzentrationen auf: 97 $\mu\text{g/L}$ 4-MEC, 396 $\mu\text{g/L}$ MDPV, 295 $\mu\text{g/L}$ MXE und 4 $\mu\text{g/L}$ α -PVP mittels QuEChERS; 118 $\mu\text{g/L}$ 4-MEC, 342 $\mu\text{g/L}$ MDPV, 385 $\mu\text{g/L}$ MXE und 4 $\mu\text{g/L}$ α -PVP mittels ITSP-SPE. Bei der Organverteilung zeigte sich bei dem Verstorbenen A, dass für MDPV die Konzentrationen in den Körpergeweben höher als in den Körperflüssigkeiten (Femoralblut und Herzbeutel­flüssigkeit) gewesen sind. Für 4-MEC wurden die niedrigsten Konzentrationen in den Körpergeweben Leber und Niere nachgewiesen. Es muss berücksichtigt werden, dass 4-MEC eine instabile Substanz ist [67] und aufgrund von Reaktions- und Zerfallsprozessen die Möglichkeit besteht, dass zum Sterbezeitpunkt in allen Matrices höhere Konzentrationen vorlagen. Für MXE wurden in der Herzbeutel­flüssigkeit sowie in den Körpergeweben ähnliche Konzentrationen festgestellt; im Femoralblut wurde die niedrigste MXE-Konzentration nachgewiesen. Im Vergleich zu Literaturdaten (bezüglich Intoxikationen) sind die ermittelten Konzentrationen von 4-MEC, MDPV und MXE im Femoralblut als hoch zu bewerten, weshalb bei eingeschränkter Beurteilbarkeit wegen starker Fäulnisveränderung und einer fehlenden

konkurrierenden Todesursache am ehesten davon auszugehen ist, dass die Person A an einer Polyintoxikation mit NPS verstarb.

Bei dem Verstorbenen B konnten ebenfalls in allen Matrices 4-MEC, MDPV und MXE nachgewiesen werden (mit Ausnahme von MDPV in Herzblut extrahiert mit ITSP-SPE). α -PVP war in keiner der untersuchten Matrices nachweisbar. Bei dem Verstorbenen B ergaben sich folgende Herzblutkonzentrationen: 8 $\mu\text{g/L}$ 4-MEC, 3 $\mu\text{g/L}$ MDPV und 2 $\mu\text{g/L}$ MXE mittels QuEChERS; 8 $\mu\text{g/L}$ 4-MEC und 1 $\mu\text{g/L}$ MXE mittels ITSP-SPE. Bei dem Verstorbenen B zeigten sich keine Blutkonzentrationen der NPS, die geeignet wären, zweifelsfrei den Tod erklären zu können. Da in der Nähe des Verstorbenen B allerdings leere Insulin-Pens aufgefunden wurden, besteht der Verdacht, dass dieser sich mit Insulin suizidiert hat, zumal auch hier bei eingeschränkter Beurteilbarkeit infolge von Fäulnis sich keine anderweitige Todesursache abgrenzen ließ. Eine Aufnahme von Insulin ließ sich allerdings durch Analysen der Deutschen Sporthochschule Köln weder im Blut noch im Urin des Verstorbenen nachweisen. Ein fehlender Nachweis kann aber auch auf die fortgeschrittenen Leichenveränderungen zurückzuführen sein.

Grundsätzlich sind beide Extraktionsmethoden für die Extraktion von NPS Stimulanzien aus Körpergewebe und -flüssigkeiten geeignet. Beide Methoden zeigten bei der Aufarbeitung von dotiertem Blut eine ausreichende Genauigkeit mit einer geringen Abweichung zum Sollwert (innerhalb $\pm 15\%$). Relevante Vorteile der QuEChERS-Methode zeigten sich in den höheren Wiederfindungsraten (QuEChERS: $\geq 55\%$; ITSP-SPE: $\geq 28\%$) und den niedrigeren Matrixeffekten (QuEChERS: innerhalb Akzeptanzbereich ($\pm 25\%$), ITSP-SPE: teils außerhalb des Akzeptanzbereichs). Ein wesentlicher Nachteil der QuEChERS-Methode besteht in den hohen Verdünnungsfaktoren (Verdünnungsfaktor Körperflüssigkeiten 1 zu 22), wodurch die Problematik gegeben ist, dass sehr niedrige Konzentrationen trotz suffizienter Wiederfindung möglicherweise nicht mehr nachgewiesen werden können. Bei der QuEChERS-Methode fällt zudem ein hoher Lösungsmittelverbrauch an, da die Gewebeproben gemäß dem verwendeten (und teilweise optimierten) Standardprotokoll mit 9 mL Acetonitril homogenisiert werden [58]. Die einzelnen Arbeitsschritte sind bei der QuEChERS-Methode relativ einfach gehalten, da sie nur aus pipettieren, mischen auf einem Vortex-Gerät und zentrifugieren bestehen, allerdings ist die Methode, bedingt durch die manuell durchzuführenden Schritte, zeitaufwändiger (ungefähre Dauer für eine Probe: 15 min) und anfällig für menschliche Fehler. Ein wesentlicher Vorteil der ITSP-SPE ist die Automatisierbarkeit der Extraktionsmethode und die damit verbundene Zeitersparnis beim Laborpersonal sowie die Vermeidung von menschlichen Fehlern innerhalb der Arbeitsabläufe. Einzig das Pipettieren und Mischen von Probe, internem Standard (und ggf. Standardadditionslösung) und Puffer in einem kleinen Gefäß (sogenanntes Vial) muss händisch durchgeführt werden (ungefähre Dauer für eine Probe: 1 min). Die anschließende automatische Extraktion dauert acht Minuten. Ein weiterer Vorteil ist der sehr

geringe Lösungsmittelverbrauch, der pro Arbeitsschritt nur 100 µL Lösungsmittel beträgt, und die Methode somit umweltfreundlich macht. Ein relevanter Nachteil der ITSP-SPE ist der sehr dünne Durchmesser der Spritzenadel (\varnothing 1,46 mm), welche für die Aufarbeitung von Körperflüssigkeiten standardmäßig eingesetzt wird, wodurch es aber zu Verstopfungen bei der Aufarbeitung viskoser Flüssigkeiten (bspw. Galle, Mageninhalt) kommen kann. Alles in allem ist die QuEChERS-Methode in der forensischen Toxikologie eine attraktive Alternative zur Extraktion von Organgewebe oder von Proben, die aufgrund starker Zersetzung (aufgrund des Fäulniszustandes) zu stark matrix-belasteten Extrakten bei der Anwendung klassischer Verfahren führen.

1.5 Übersicht über den vierten Artikel

Häufig spiegelt die ermittelte postmortale Konzentration eines Wirkstoffes nicht die Konzentration zum Zeitpunkt des Todes wider, da innerhalb der Zeitspanne zwischen Todeseintritt bis zur Probenahme bereits postmortale Umverteilungsprozesse (engl. *post-mortem redistribution* (PMR)) sowie chemische Veränderungen des Wirkstoffes stattgefunden haben können. Ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der postmortalen Umverteilung ist das Konzentrations-Verhältnis zwischen Herz- und Femoralblut (C/P-Wert) [68]. Es wird angenommen, dass bei Lebenden die Konzentration von Substanzen im Blut an allen zentralen und peripheren Stellen gleich ist [69]. Wenn der C/P-Wert von dieser Einheitlichkeit abweicht, ergibt sich der Hinweis, dass postmortale Veränderungen stattgefunden haben. Aufgrund anatomischer Gegebenheiten unterliegt das Herzblut eher postmortalen Konzentrationsveränderungen als Femoralblut, da es von den (für viele Substanzen) typischen Wirkstoffdepots, wie Gastrointestinaltrakt, Lungen, Leber und Myokard, umgeben ist [70]. Wirkstoffkonzentrationen im Femoralblut, welches aus der Oberschenkelvene gewonnen wird, unterliegen dahingegen aufgrund der räumlichen Distanz zu den konzentrationsreichen Organen und Geweben weniger der postmortalen Umverteilung. Daher wird für die Beurteilung der Wirkstoffkonzentration zum Sterbezeitpunkt bevorzugt Femoralblut eingesetzt. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass bei Vorliegen hoher Konzentrationen der Wirkstoffe bzw. deren Metaboliten in einer (vornehmlich prall-gefüllten) Harnblase die Substanzen in die umliegenden Blutgefäße diffundieren und somit die Konzentrationen im Femoralblut erhöhen können [71]. Wenn bei der toxikologischen Analyse aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von Femoralblut auf Herzblut zurückgegriffen werden muss - bspw. beim Versterben von Kleinkindern oder bei starker Körperzerstörung – ist es umso wichtiger, dass die ermittelten Herzblutkonzentrationen kritisch betrachtet und mögliche postmortale Umverteilungsprozesse berücksichtigt werden.

Im vorliegenden Fall wurde ein 27-Jahre alt gewordenen Mann im stark fäulnisveränderten Zustand in kopfüber-kniender Position in seinem WG-Zimmer aufgefunden. Letztmalig wurde er sechs Tage zuvor lebend gesehen. In seinem Zimmer wurden diverse Plastiktütchen mit den Kennzeichnungen “Diclazepam 2mg”, “Pyrazolam”, “3F-Phenmetrazine”, “1-(2-fluorophenyl)propan-2-amine” und “Aristo Pharma Emesan Diphenhydraminhydrochlorid” sichergestellt. Ein weiteres Plastiktütchen wies keine Kennzeichnung auf. In den Tütchen konnte jeweils die deklarierte Substanz nachgewiesen werden; das nicht gekennzeichnete Tütchen enthielt ebenfalls 3-Fluorophenmetrazin (wie “3F-Phenmetrazine”). Die Analyse von Femoralblut und Urin erwies, dass die Person vor ihrem Versterben Diclazepam, Pyrazolam, 3-Fluorophenmetrazin (3-FPM), 2-Fluoramphetamin (2-FA), 2-Fluorometamphetamin (2-FMA), Amphetamin, Methiopropamin und Diphenhydramin aufgenommen hat. Weiterhin konnten die aktiven Metaboliten von Diclazepam, nämlich Delorazepam, Lormetazepam und Lorazepam im

Femoralblut und im Urin nachgewiesen werden. Da die Datenlage zu Intoxikationsfällen für die Substanzen 3-FPM, Pyrazolam und Diclazepam nur spärlich ist, wurde innerhalb des vierten Projektes dieser Arbeit die Organverteilung (Matrices: Femoralblut, Herzblut, Herzbeutel­flüssigkeit, Zerebrospinalflüssigkeit, Urin, Gallenflüssigkeit, Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Muskel (Psoas) und Mageninhalt) sowie die postmortale Umverteilung ebendieser Substanzen inklusiver der Metaboliten von Diclazepam untersucht.

Diclazepam, Delorazepam, Pyrazolam und 3-FPM konnten in allen untersuchten Matrices nachgewiesen werden; Lormetazepam und Lorazepam waren lediglich nicht im Mageninhalt nachweisbar. Dass Delorazepam in einer relativ hohen Konzentration im Mageninhalt (ca. 210 µg/L) nachweisbar war, ist vermutlich auf eine erhöhte Permeabilität der Magenwand sowie auf die passive Diffusion des – im Gegensatz zu Lormetazepam und Lorazepam - generell in allen untersuchten Geweben und Körperflüssigkeiten in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegenden Delorazepams zurückzuführen. Im Vergleich zu den Körperflüssigkeiten Femoralblut, Herzblut, Herzbeutel­flüssigkeit und Zerebrospinalflüssigkeit konnten in den Organen Leber, Lunge und Niere sowie im Mageninhalt (400 mL viskose Flüssigkeit, pH 4,0) höhere Konzentrationen an Diclazepam, Pyrazolam und 3-FPM nachgewiesen werden. Die genannten Organe bzw. der Gastrointestinaltrakt fungieren häufig als bevorzugte Wirkstoffdepots für Xenobiotika im menschlichen Organismus [72]. Dahingegen konnten nur niedrige Konzentrationen im Femoral- und im Herzblut nachgewiesen werden. Aufgrund der gering gefüllten Harnblase (50 mL) ist im vorliegenden Fall nicht davon auszugehen, dass die nachgewiesenen Wirkstoffe bzw. Metaboliten in relevanten Konzentrationen von der Harnblase in das Femoralblut diffundiert sind [71].

Es zeigte sich, dass Pyrazolam (C/P = 1), 3-FPM (C/P = 0,9) sowie Diclazepam (C/P = 1) und dessen Metaboliten Lormetazepam (C/P = 0,7) und Lorazepam (C/P = 1) nicht zu einer erhöhten postmortalen Umverteilung neigen, da das C/P-Verhältnis ≤ 1 betrug. Für die Substanzen Lorazepam und 3-FPM wird dies auch durch weitere Literatur bestätigt, welche für Lorazepam C/P-Werte von 0,8 bis 1,76 [73, 74] und für 3-FPM einen C/P-Wert von 1,08 [75] angaben. Für die Substanzen Diclazepam, Lormetazepam und Pyrazolam wurden bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Publikation keine C/P-Werte in der Literatur angegeben. Für Delorazepam wurde ein C/P-Wert von 2,5 ermittelt, woraus sich schlussfolgern lässt, dass Delorazepam zur postmortalen Umverteilung neigt. Dies wird durch die im Muskel (430 µg/L) und im Mageninhalt (ca. 210 µg/L, absolut 84 µg) ermittelten Konzentrationen gestützt. Limitierend bei den ermittelten C/P-Werten ist, dass die Bestimmung an nur einem Verstorbenen durchgeführt werden konnte.

Die im Femoralblut bestimmten Konzentrationen von Diclazepam ($c = 1 \mu\text{g/L}$), Delorazepam ($c = 100 \mu\text{g/L}$), Lormetazepam ($c = 6 \mu\text{g/L}$), Lorazepam ($c = 22 \mu\text{g/L}$), Pyrazolam ($c = 28 \mu\text{g/L}$), 3-FPM

(c = 10 µg/L), 2-FA (ca. c = 89 µg/L), 2-FMA (Hinweis), Amphetamin (ca. c = 21 µg/L) und Methiopropamin (c = 2.2 µg/L) sind im Vergleich zu Literaturwerten für sich genommen als eher niedrig einzustufen. Als Todesursache wurde – in Verbindung mit den Ergebnissen der Obduktion - eine positionelle Asphyxie beschrieben, welche dahingehend verursacht wurde, dass sich der Verstorbene aufgrund der sedierenden Wirkeigenschaften der Benzodiazepine nicht mehr selbstständig aus seiner positionellen Lage befreien konnte.

1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Validierung einer in-line SPE-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 74 synthetischen Stimulanzien aus Serum- und 76 synthetischen Stimulanzien aus Urinproben. Dotierte Serum- und Urinproben zeigten bei der Methodenentwicklung bei den gleichen Extraktionsbedingungen (u. a. SPE-Material, Wasch- und Elutionslösung) die höchsten Wiederfindungsraten für ausgewählte Analyten verschiedener Substanzgruppen, weswegen letztendlich beide Matrices mit der gleichen SPE-Methode extrahiert werden können. Die in-line SPE-LC-MS/MS-Methode läuft voll automatisiert ab – ausschließlich das Pipettieren der Probe sowie einer Pufferlösung und des internen Standards erfolgt händisch. Aufgrund des hohen Automatisierungsgrades beträgt die Gesamtzykluszeit 11 Minuten.

Es konnten Nachweisgrenzen von bis zu 4 µg/L im Serum und im Urin für die meisten Analyten erreicht werden. Im Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Fallberichten sind diese Nachweisgrenzen für die Analytik von den meisten der hier einbezogenen NPS Stimulanzien ausreichend. Einzig für die beiden Substanzen aus der *2C-X-NBOMe*-Gruppe (25B-NBOMe (LOD im Serum: 0,4 µg/L) und 25H-NBOMe (LOD im Serum: 0,4 µg/L) [65]) werden in der Literatur Serum- bzw. Blut-Konzentrationen unterhalb der - für die entwickelte Methode - bestimmten Nachweisgrenzen (bis Faktor 4 niedriger) angegeben [42, 43]. Zukünftig sind hier weitere Optimierungsschritte notwendig, um für diese Substanzen niedriger Nachweisgrenzen zu erhalten.

Die entwickelte Methode zeichnet sich durch eine zusätzliche Attraktivität für die Routineanalytik aus, da sie neben NPS auch die herkömmlichen Stimulanzien (Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDA, MDEA) erfasst. Die herkömmlichen Stimulanzien besitzen laut EMCCDA immer noch eine hohe Lebenszeit- bzw. 12-Monatsprävalenz [5]. Zudem werden NPS Stimulanzien auch häufig in Kombination mit herkömmlichen Stimulanzien eingenommen [25, 38]. Dies geht u. a. auch aus der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Studie zur Relevanz des Konsumverhaltens von NPS Stimulanzien bei Verstorbenen im Großraum Köln, in welcher bei 48 % der NPS-positiven Fällen auch herkömmliche Stimulanzien nachgewiesen werden konnten, hervor [76].

Bei der Methode zum Nachweis von NPS aus Urin muss berücksichtigt werden, dass ausschließlich die ursprünglichen Muttersubstanzen in die Methode aufgenommen wurden. Metaboliten dieser Substanzen wurden nicht mit in die Methode integriert. Laut Literatur werden die meisten Substanzen der innerhalb dieser Arbeit fokussierten Stoffgruppen zwar metabolisiert, sind bei einer relevanten Aufnahme aber dennoch im Urin nachweisbar (Metabolismus-Studien bzw. Kasuistiken [77-83]). Für einige Substanzen war der Metabolismus zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung noch nicht bekannt bzw. es ging aus Kasuistiken nicht hervor, ob die Muttersubstanz im Urin nachweisbar gewesen wäre. Zu diesen

Substanzen gehören 3-Fluorotropacocain (3-FBT) und 4-Acetoxy-N-methyl-N-ethyltryptamin (4-AcO-Met). Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Substanz 4-Fluoro-3 β -Tropacocain komplett und das Epimer 4-Fluoro-3 α -Tropacocain nur zu etwa 10 % im menschlichen Plasma hydrolysiert werden [84]. Erste Experimente - welche im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden - zeigten, dass das Tryptamin 4-AcO-Met im menschlichen Serum wahrscheinlich ebenfalls nahezu vollständig verstoffwechselt wird [65]. Um auch die Aufnahme dieser Substanzen sicher im Urin nachweisen zu können, müssen die Hauptmetaboliten in die analytischen Methoden integriert werden. Gleiches gilt für die Hauptmetaboliten weiterer neuer Substanzen, die (zukünftig) auf dem Drogenmarkt erhältlich sind und deren ursprüngliche Muttersubstanzen nicht mehr im Urin nachweisbar sind. Es sind daher Studien zur Aufklärung des Metabolismus von neuen Substanzen unerlässlich.

Es werden jährlich neue NPS Stimulanzien auf dem europäischen Drogenmarkt registriert. Es ist deswegen unabdingbar die Analysenmethoden kontinuierlich zu aktualisieren, soll heißen neue Substanzen in die Methode einzupflegen. Es ist allerdings zu beachten, dass sich mit steigender Anzahl der Analyten in einer Methode ebenfalls die Anzahl der MRM-Übergänge erhöht. Dies führt zu einer Reduzierung der Messzeit je MRM-Übergang, wodurch es zu einem Verlust an Empfindlichkeit kommt. Zur Vermeidung dessen, kann die Zykluszeit (engl. *cycle time*) erhöht werden, was allerdings wiederum mit einer unerwünschten Verschlechterung der chromatographischen Daten (Reduzierung der Datenpunkte pro Peak) einhergeht. Aufgrund dessen sollte im Falle der Aufnahme neuer Substanzen in eine bereits bestehende massenspektrometrische Methode eine Revalidierung in Betracht gezogen werden. Um eine Revalidierung zu umgehen, können die neuen NPS mit einer neuen massenspektrometrischen Methode analysiert werden. Diese Option wurde für 46 weitere Analyten gewählt, wobei im Jahr 2016 21 und im Jahr 2018 25 weitere Analyten in eine zweite LC-MS/MS-Methode integriert wurden (bei gleichen Extraktions- und chromatographischen Bedingungen). Somit werden momentan 120 synthetische Stimulanzien im Serum und 122 synthetische Stimulanzien im Urin mittels zweier massenspektrometrischer Methoden erfasst. Da – wie bereits erwähnt - die Integration neuer Substanzen in eine bestehende Methode mit Verlusten der Empfindlichkeit oder chromatographischen Informationen einhergehen kann, ist es fraglich, in wie weit die derzeit routinemäßig angewandten MRM-Methoden bei einer immer größer werdenden Anzahl an NPS zukünftig anwendbar bleiben. Neue Messmethoden, wie beispielsweise die „Data Dependent Acquisition“ (DDA), können hier eine Alternative zur klassischen Targetanalytik (z. B. mittels MRM-Methoden) darstellen. Die DDA ist ein massenspektrometrisches Verfahren, bei der in Abhängigkeit eines Messergebnisses zugleich weitere Experimente angeschlossen werden [85]. Beispielsweise können bei dem DDA-Verfahren eine Fullscan („Survey“-Scan)-Methode mit einer Product-Ion-Scan („Dependent“-Scan)-Methode innerhalb eines chromatographischen Laufs gekoppelt werden [86].

Die entwickelte und validierte in-line SPE-LC-MS/MS-Methode wurde erfolgreich in der Routineanalytik im Institut für Rechtsmedizin der Uniklinik Köln etabliert. Momentan wird die Methode bei NPS-Verdachtsfällen sowie als Screening-Methode bei Leichenasservaten eingesetzt. Weitere mögliche Einsatzgebiete der Methode wären innerhalb der Abstinenzüberwachung, wie sie beispielsweise innerhalb einer Medizinisch-Psychologischen Untersuchung (MPU) gefordert werden kann, oder bei der Überwachung von möglichen Dopingverstößen. Einige Konsumenten sind sich bewusst, dass NPS bei einem routinemäßigen Drogenscreening nicht erfasst werden und greifen aufgrund dessen bewusst auf NPS zurück [29, 87]. Hutter et al. [29] haben in einer Studie 495 negativ auf 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC-COOH, inaktiver Metabolit von Tetrahydrocannabinol (THC)) getestete Urinproben aus dem Jahr 2012 sowie 87 Haarproben aus dem Jahr 2010 aus der Fahreignungsdiagnostik aus verschiedenen Regionen Deutschlands hinsichtlich synthetischer Cannabinoide untersucht. Dabei waren 231 der Urinproben von Probanden, welchen die Fahrerlaubnis aufgrund von Auffälligkeiten mit THC entzogen wurde. Die weiteren Urin- und Haarproben wurden rein zufällig ausgewählt. Ca. 6 % der Urinproben waren positiv auf Metaboliten von mindestens einem synthetischen Cannabinoid und ca. 11 % der Haarproben waren positiv auf mindestens ein synthetisches Cannabinoid. Ob die von Hutter et al. [29] beschriebene Substitution eines Cannabiskonsums durch synthetische Cannabinoide in der Drogenabstinenzkontrolle auch bei der Substitution eines Konsums von herkömmlichen Stimulanzien durch NPS Stimulanzien eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Eine innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Studie belegt bereits, dass dem Konsum von NPS Stimulanzien im Großraum Köln eine relevante Bedeutung zukommt. Innerhalb der Studie wurden Urinproben (falls nicht vorhanden Nierenhomogenate) von 268 Personen im Alter von 12 bis 35 Jahren, welche im Zeitraum zwischen Januar 2011 bis Mai 2017 verstarben, untersucht. Es konnte in 17 (6 %) der untersuchten Fälle ($n = 268$) die Einnahme von NPS Stimulanzien bestätigt werden. In fünf Fällen konnte aufgrund einer anschließenden Blutuntersuchung bewiesen werden, dass die NPS entweder todesursächlich oder von toxikologischer Relevanz beim Versterben gewesen sind. In allen positiven NPS-Fällen konnte die Aufnahmen mehrere Substanzen mit einer Wirkung auf das zentrale Nervensystem (weitere NPS und/oder klassische Rauschdrogen und/oder Medikamentenwirkstoffe) nachgewiesen werden. Auffällig hoch war die Anzahl der positiven Fälle für die Substanz PMMA. PMMA wurde in acht Fällen in den Jahren zwischen 2011 und 2013 nachgewiesen. Aus der Literatur geht hervor, dass in diesem Zeitraum auch in anderen Ländern ein gehäuftes Auftreten von PMMA-Intoxikationen, teils mit tödlichem Ausgang, beobachtet wurde [55, 56]. In den Jahren nach 2013 wurden in den Urinproben (bzw. Nierenhomogenat) der Verstorbenen im Großraum Köln kein PMMA mehr nachgewiesen.

Eine Limitation der Studie zur Erfassung des Konsums von NPS Stimulanzien ist, dass aufgrund der Vielzahl an NPS die Möglichkeit besteht, dass nicht alle auf dem Markt illegal gehandelten NPS Stimulanzien in die entwickelte Methode integriert gewesen sind. Ursächlich hierfür kann auch sein, dass zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung kein Referenzstandard zur Verfügung stand. Folglich hätte eine NPS-Aufnahme übersehen werden können. Eine retrospektive Datenauswertung ist mit der entwickelten Methode nicht möglich. Als Alternative zu den klassischen LC-MS/MS-basierten MRM-Methoden werden in einigen forensischen Instituten bereits hochauflösende Massenspektrometrie-Systeme eingesetzt, die genau diesen Vorteil der retrospektiven Datenauswertung bieten. Die hochauflösenden Massenspektrometer (z. B. Orbitrap, Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS), Flugzeitmassenspektrometer) sind allerdings im Vergleich zu niedrigauflösenden Massenspektrometern (z. B. Triple-Quadrupol) kostenintensiver und weisen bei der zielgerichteten Analyse eine weniger gute Empfindlichkeit auf, weswegen die Verwendung insbesondere von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern die gängige Praxis in forensischen Laboren darstellt.

Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden, namentlich die im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellte Festphasenextraktion für Serum sowie eine QuEChERS-Methode hinsichtlich ihrer Effektivität und Effizienz miteinander verglichen. Die QuEChERS-Methode wird standardmäßig für die Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln in pflanzlichen Lebensmitteln eingesetzt. Beide Methoden zeigten sich als geeignet für die Extraktion von NPS in geringen Konzentrationen aus Körperflüssigkeiten und Organgeweben. Aufgrund der leichten Durchführbarkeit der QuEChERS-Methode - sowie die im Vergleich zur Festphasenextraktion - sehr guten Ergebnisse hinsichtlich Wiederfindung und Matrixeffekten, ist die QuEChERS-Methode eine gute Alternative zu den bereits in der forensischen Toxikologie routinemäßig eingesetzten Extraktionsverfahren.

Ferner wurde die Organverteilung von den NPS Stimulanzien 4-MEC, MDPV, MXE, α -PVP und 3-FPM sowie von den Designerbenzodiazepinen Pyrazolam und Diclazepam (inklusive der Metaboliten Delorazepam, Lormetazepam und Lorazepam) untersucht. Von 3-FPM, Pyrazolam und Diclazepam (inklusive Metaboliten) wurden weiterhin die C/P-Werte bestimmt, um Hinweise über eine mögliche postmortale Umverteilung zu erhalten. Da zu diesen Substanzen bis dato nur wenig Literatur zu Intoxikationen vorliegt, können die erhaltenen Erkenntnisse über die Organverteilung sowie die postmortale Umverteilung für die Beurteilung tödlicher Vergiftungen von erheblichem Wert sein.

Trotz der seit 2015 sinkenden Anzahl an Neuregistrierungen von NPS bleibt die Verfügbarkeit der Substanzen weiterhin hoch. Im Jahr 2017 wurden circa 64000 Sicherstellungen über das EU-Frühwarnsystem gemeldet, wobei die Stoffgruppen der synthetischen Cathinone und der synthetischen Cannabinoide den größten Anteil ausmachten [5]. In vielen europäischen Ländern wurden die vorhandenen „Drogengesetzgebungen“ ausgeweitet oder angepasst sowie spezifische neue Rechtsvorschriften konzipiert, um neuen psychoaktiven Substanzen entgegenzuwirken [88]. Dennoch werden NPS im Internet auf (frei zugänglichen) Webseiten zum Verkauf angeboten (Stand Januar 2020). Es stellt sich in Hinblick auf die (möglicherweise) hohe Eignung zur Beeinträchtigung der Fahrsicherheit und Steuerungsfähigkeit die Frage, ob Ermittlungsbehörden die Analysen von NPS stärker in den Fokus rücken sollten. Eine Analyse auf NPS erfolgt oftmals nur, wenn konkrete Hinweise bezüglich deren Konsums vorliegen. Aufgrund der teilweise hohen Gefährlichkeit von NPS können diese Substanzen einen – im Vergleich zu ihren herkömmlichen Pendanten - nicht minder schweren Einfluss auf Fahrsicherheit bzw. Steuerungsfähigkeit ausüben.

1.7 Literatur

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime, The challenge of new psychoactive substances, A Report from the Global SMART Programme, 2013.
- [2] A. Shulgin, A. Shulgin, PiHKAL: A Chemical Love Story, Transform Press, United States of America, 1991.
- [3] A. Shulgin, A. Shulgin, TIHKAL: The Continuation Transform Press, United States of America, 1997.
- [4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Fentanils and synthetic cannabiods: driving greater complexity into the drug situation. An update from the EU Early Warning System (June 2018), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018.
- [5] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, (2019).
- [6] N. Hohmann, G. Mikus, D. Czock, Effects and risks associated with novel psychoactive substances: mislabeling and sale as bath salts, spice, and research chemicals, *Deutsches Ärzteblatt International* 111(9) (2014) 139.
- [7] L. Simmler, T. Buser, M. Donzelli, Y. Schramm, L.H. Dieu, J. Huwyler, S. Chaboz, M. Hoener, M. Liechti, Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro, *Br. J. Pharmacol.* 168(2) (2013) 458-470.
- [8] L. King, New phenethylamines in Europe, *Drug Test. Anal.* 6(7-8) (2014) 808-818.
- [9] J. Ward, S. Rhyee, J. Plansky, Methoxetamine: a novel ketamine analog and growing health-care concern, *Clin. Toxicol.* 49(9) (2011) 874-875.
- [10] P. Ritter, M. Bauer, M. Pilhatsch, Ketamin als Antidepressivum, *Der Nervenarzt* 85(11) (2014) 1432-1435.
- [11] B.E. Blough, A. Landavazo, A.M. Decker, J.S. Partilla, M.H. Baumann, R.B. Rothman, Interaction of psychoactive tryptamines with biogenic amine transporters and serotonin receptor subtypes, *Psychopharmacology* 231(21) (2014) 4135-4144.
- [12] L.D. Simmler, A. Rickli, Y. Schramm, M.C. Hoener, M.E. Liechti, Pharmacological profiles of aminoindanes, piperazines, and pipradrol derivatives, *Biochem. Pharmacol.* 88(2) (2014) 237-244.
- [13] N.D. Volkow, G.-J. Wang, J.S. Fowler, J. Logan, M. Gerasimov, L. Maynard, Y.-S. Ding, S.J. Gatley, A. Gifford, D. Franceschi, Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain, *J. Neurosci.* 21(2) (2001) RC121-RC121.

- [14] C. Davidson, J. Ramsey, Desoxyipradrol is more potent than cocaine on evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens, *J. Psychopharmacol.* 26(7) (2012) 1036-1041.
- [15] P.S. Johnson, M.W. Johnson, Investigation of “bath salts” use patterns within an online sample of users in the United States, *J Psychoactive Drugs* 46(5) (2014) 369-378.
- [16] J. Klavž, M. Gorenjak, M. Marinšek, Suicide attempt with a mix of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones: Case report of non-fatal intoxication with AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, alpha-PHP, alpha-PVP and 4-CMC, *Forensic Sci. Int.* 265 (2016) 121-124.
- [17] S. Rojek, M. Kłys, M. Strona, M. Maciów, K. Kula, “Legal highs”—toxicity in the clinical and medico-legal aspect as exemplified by suicide with bk-MBDB administration, *Forensic Sci. Int.* 222(1-3) (2012) e1-e6.
- [18] E. Tomczak, M.K. Woźniak, M. Kata, M. Wiergowski, B. Szpiech, M. Biziuk, Blood concentrations of a new psychoactive substance 4-chloromethcathinone (4-CMC) determined in 15 forensic cases, *Forensic Toxicol* 36(2) (2018) 476-485.
- [19] L.J. Marinetti, H.M. Antonides, Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: method development, drug distribution and interpretation of results, *J. Anal. Toxicol.* (2013) bks136.
- [20] L. Zamengo, G. Frison, C. Bettin, R. Sciarrone, Understanding the risks associated with the use of new psychoactive substances (NPS): high variability of active ingredients concentration, mislabelled preparations, multiple psychoactive substances in single products, *Toxicology letters* 229(1) (2014) 220-228.
- [21] T.M. Brunt, A.M. Atkinson, T. Nefau, M. Martinez, E. Lahaie, A. Malzcewski, M. Pazitny, V. Belackova, S.D. Brandt, Online test purchased new psychoactive substances in 5 different European countries: A snapshot study of chemical composition and price, *International Journal of Drug Policy* 44 (2017) 105-114.
- [22] A. Rickli, M.C. Hoener, M.E. Liechti, Monoamine transporter and receptor interaction profiles of novel psychoactive substances: para-halogenated amphetamines and pyrovalerone cathinones, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25(3) (2015) 365-376.
- [23] L. Simmler, A. Rickli, M. Hoener, M. Liechti, Monoamine transporter and receptor interaction profiles of a new series of designer cathinones, *Neuropharmacology* 79 (2014) 152-160.
- [24] C.F. Oliver, J.J. Palamar, A. Salomone, S.J. Simmons, H.L. Philogene-Khalid, N. Stokes-McCloskey, S.M. Rawls, Synthetic cathinone adulteration of illegal drugs, *Psychopharmacology* (2018) 1-11.

- [25] S. Elliott, J. Evans, A 3-year review of new psychoactive substances in casework, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 55-60.
- [26] M. Kraemer, A. Boehmer, B. Madea, A. Maas, Death cases involving certain new psychoactive substances: a review of the literature, *Forensic Sci. Int.* (2019).
- [27] A. Helander, M. Bäckberg, P. Hultén, Y. Al-Saffar, O. Beck, Detection of new psychoactive substance use among emergency room patients: results from the Swedish STRIDA project, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 23-29.
- [28] Volker Auwärter, M. Neukamp, *Drogenanalytik im Wandel - Aktuelle Trends und Herausforderungen, Diagnostik im Dialog der Roche Diagnostics Deutschland GmbH* 54 (2017) 8-11.
- [29] M. Hutter, J. Ippisch, J. Hermeling, H. Schultis, V. Auwaerter, *Synthetische Cannabinoide in der Fahreignungsdiagnostik, Schriftenreihe Fahreignung* (2014).
- [30] Nationale Anti-Doping Agentur Austria, Stimulanzen. <<https://www.nada.at/de/medizin/risiken-nebenwirkungen/marketshow-stimulanzen>>, (accessed 25. Januar.2020).
- [31] Deutsche Sporthochschule Köln, Cannabis. <<https://www.dshs-koeln.de/institut-fuer-biochemie/doping-substanzen/doping-lexikon/c/cannabis/>>, 2020 (accessed 25.01.2020).
- [32] The World Anti-Doping Code. International Standard, Prohibited List January 2020, in: *World Anti-Doping Agency* (Ed.).
- [33] Deutsche Sporthochschule Köln, Verbotene Wirkstoffe - Stimulanzen. <<https://www.dshs-koeln.de/institut-fuer-biochemie/doping-substanzen/formen-des-dopings/verbotene-wirkstoffgruppen/stimulanzen/>>, 2019 (accessed 25.10.2019).
- [34] World Anti-Doping Agency, *Welt-Anti-Doping-Code 2015*, World Anti-Doping Agency, Canada.
- [35] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86(2) (2003) 412-431.
- [36] A. Wohlfarth, W. Weinmann, S. Dresen, LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum, *Anal. Bioanal. Chem.* 396(7) (2010) 2403-2414.
- [37] M.J. Swortwood, D.M. Boland, A.P. DeCaprio, Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 405(4) (2013) 1383-1397.

- [38] P. Adamowicz, J. Gieroń, D. Gil, W. Lechowicz, A. Skulska, B. Tokarczyk, The prevalence of new psychoactive substances in biological material—a three-year review of casework in Poland, *Drug Test. Anal.* 8(1) (2016) 63–70.
- [39] M. Gandilhon, A. Cadet-Taïrou, M. Martinez, Use of Ketamine in France: recent trends.
- [40] A.C. Lua, H.R. Lin, Y. Te Tseng, A.R. Hu, P.C. Yeh, Profiles of urine samples from participants at rave party in Taiwan: prevalence of ketamine and MDMA abuse, *Forensic Sci. Int.* 136(1-3) (2003) 47-51.
- [41] NorthPoint Staff, Top 10 Most Dangerous Party Drugs. <<https://www.northpointwashington.com/blog/top-10-dangerous-party-drugs/>>, 2019 (accessed 25.10.2019).
- [42] J.L. Poklis, C.R. Nanco, M.M. Troendle, C.E. Wolf, A. Poklis, Determination of 4-bromo-2, 5-dimethoxy-N-[(2-methoxyphenyl) methyl]-benzeneethanamine (25B-NBOMe) in serum and urine by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in a case of severe intoxication, *Drug Test. Anal.* 6(7-8) (2014) 764-769.
- [43] L. Morini, M. Bernini, S. Vezzoli, M. Restori, M. Moretti, S. Crenna, P. Papa, C. Locatelli, A.M.M. Osculati, C. Vignali, Death after 25C-NBOMe and 25H-NBOMe consumption, *Forensic Sci. Int.* 279 (2017) e1-e6.
- [44] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2013 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [45] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2014 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [46] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2015 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [47] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2016 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [48] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2017 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [49] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2018 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [50] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2012 - Tabellenanhang, Wiesbaden.
- [51] Bundeskriminalamt, Rauschgiftkriminalität - Bundeslagebild 2017, Wiesbaden.
- [52] S. Lehmann, B. Schulze, A. Thomas, T. Kamphausen, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender, Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE, *Forensic Toxicol* 36(2) (2018) 320-333.
- [53] S. Lehmann, D. Teifel, M.A. Rothschild, H. Andresen-Streichert, Tödliche Intoxikation mit dem Designer-Opioid U-47700, *Toxichem Krimtech* 85 (1) (2018) 36.

- [54] S. Lehmann, A. Sczyslo, J. Froch-Cortis, M.A. Rothschild, M. Thevis, H. Andresen-Streichert, K. Mercer-Chalmers-Bender, Organ distribution of diclazepam, pyrazolam and 3-fluorophenmetrazine, *Forensic Sci. Int.* 303(109959) (2019).
- [55] M. Vevelstad, E.L. Øiestad, G. Middelkoop, I. Hasvold, P. Lilleng, G.J.M. Delaveris, T. Eggen, J. Mørland, M. Arnestad, The PMMA epidemic in Norway: comparison of fatal and non-fatal intoxications, *Forensic Sci. Int.* 219(1) (2012) 151-157.
- [56] J.J. Nicol, M.C. Yarema, G.R. Jones, W. Martz, R.A. Pursell, J.C. MacDonald, I. Wishart, M. Durigon, D. Tzemis, J.A. Buxton, Deaths from exposure to paramethoxymethamphetamine in Alberta and British Columbia, Canada: a case series, *Can. Med. Assoc. J.* 3(1) (2015) E83-E90.
- [57] D.M. Wood, P.I. Dargan, Novel psychoactive substances: how to understand the acute toxicity associated with the use of these substances, *Ther Drug Monit.* 34(4) (2012) 363-367.
- [58] K. Hasegawa, A. Wurita, K. Minakata, K. Gonmori, H. Nozawa, I. Yamagishi, K. Watanabe, O. Suzuki, Postmortem distribution of AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB, and diphenidine in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case: usefulness of adipose tissue for detection of the drugs in unchanged forms, *Forensic Toxicol* 33(1) (2015) 45-53.
- [59] K. Kudo, Y. Usumoto, R. Kikura-Hanajiri, N. Sameshima, A. Tsuji, N. Ikeda, A fatal case of poisoning related to new cathinone designer drugs, 4-methoxy PV8, PV9, and 4-methoxy PV9, and a dissociative agent, diphenidine, *Legal Med-Tokyo* 17(5) (2015) 421-426.
- [60] K. Usui, T. Aramaki, M. Hashiyada, Y. Hayashizaki, M. Funayama, Quantitative analysis of 3, 4-dimethylmethcathinone in blood and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in a fatal case, *Legal Med-Tokyo* 16(4) (2014) 222-226.
- [61] K. Usui, Y. Hayashizaki, M. Hashiyada, M. Funayama, Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method, *Legal Med-Tokyo* 14(6) (2012) 286-296.
- [62] A. Buah-Kwofie, M.S. Humphries, Validation of a modified QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fatty biological tissues using two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. B* 1105 (2019) 85-92.
- [63] M. Colazzo, B. Alonso, F. Ernst, M.V. Cesio, A. Perez-Parada, H. Heinzen, L. Pareja, Determination of multiclass, semi-polar pesticide residues in fatty fish muscle tissue by gas and liquid chromatography mass spectrometry, *MethodsX* 6 (2019) 929-937.

- [64] K. Lichtmanegger, R. Fischer, F.X. Steemann, H. Unterluggauer, S. Masselter, Alternative QuEChERS-based modular approach for pesticide residue analysis in food of animal origin, *Anal. Bioanal. Chem.* 407(13) (2015) 3727-3742.
- [65] S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. Thevis, K. Mercer-Chalmers-Bender, Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 1064 (2017) 124-138.
- [66] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165(2) (2007) 216-224.
- [67] Y.N.A. Soh, S. Elliott, An investigation of the stability of emerging new psychoactive substances, *Drug Test. Anal.* 6(7-8) (2014) 696-704.
- [68] G. Skopp, Preanalytic aspects in postmortem toxicology, *Forensic Sci. Int.* 142(2) (2004) 75-100.
- [69] R. Ferner, Post-mortem clinical pharmacology, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66(4) (2008) 430-443.
- [70] A.-L. Pélissier-Alicot, J.-M. Gaulier, P. Champsaur, P. Marquet, Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review, *J. Anal. Toxicol.* 27(8) (2003) 533-544.
- [71] F. Moriya, Y. Hashimoto, Postmortem diffusion of drugs from the bladder into femoral venous blood, *Forensic Sci. Int.* 123(2-3) (2001) 248-253.
- [72] G. Skopp, Leichentoxikologie, *Rechtsmedizin* 18(6) (2008) 473-485.
- [73] E. Han, E. Kim, H. Hong, S. Jeong, J. Kim, S. In, H. Chung, S. Lee, Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs, *Forensic Sci. Int.* 219(1-3) (2012) 265-271.
- [74] M. Dalpe-Scott, M. Degouffe, D. Garbutt, M. Drost, A comparison of drug concentrations in postmortem cardiac and peripheral blood in 320 cases, *Can. Soc. Forensic Sci. J.* 28(2) (1995) 113-121.
- [75] K.N. Ellefsen, E.A. Taylor, P. Simmons, V. Willoughby, B.J. Hall, Multiple drug-toxicity involving novel psychoactive substances, 3-fluorophenmetrazine and U-47700, *J. Anal. Toxicol.* 41(9) (2017) 765-770.
- [76] S. Lehmann, T. Kieliba, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender, Fatalities associated with NPS stimulants in the Greater Cologne area, *Int. J. Legal Med.* (2019) 1-13.
- [77] D. Favretto, J.P. Pascali, F. Tagliaro, New challenges and innovation in forensic toxicology: focus on the “New Psychoactive Substances”, *J. Chromatogr. A* 1287 (2013) 84-95.
- [78] S. Pichini, M. Pujadas, E. Marchei, M. Pellegrini, J. Fiz, R. Pacifici, P. Zuccaro, M. Farré, R. de la Torre, Liquid chromatography-atmospheric pressure ionization electrospray mass spectrometry

determination of “hallucinogenic designer drugs” in urine of consumers, *J Pharm Biomed Anal* 47(2) (2008) 335-342.

[79] F.T. Peters, Recent developments in urinalysis of metabolites of new psychoactive substances using LC–MS, *Bioanalysis* 6(15) (2014).

[80] A. Helander, O. Beck, R. Hägerkvist, P. Hultén, Identification of novel psychoactive drug use in Sweden based on laboratory analysis—initial experiences from the STRIDA project, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 73(5) (2013) 400-406.

[81] S.L. Thornton, R.R. Gerona, C.A. Tomaszewski, Psychosis from a bath salt product containing flephedrone and MDPV with serum, urine, and product quantification, *J. Med. Toxicol.* 8(3) (2012) 310-313.

[82] K. Liveri, M.A. Constantinou, M. Afxentiou, P. Kanari, A fatal intoxication related to MDPV and pentedrone combined with antipsychotic and antidepressant substances in Cyprus, *Forensic Sci. Int.* 265 (2016) 160-165.

[83] D. Gil, P. Adamowicz, A. Skulska, B. Tokarczyk, R. Stanaszek, Analysis of 4-MEC in biological and non-biological material—three case reports, *Forensic Sci. Int.* 228(1) (2013) e11-e15.

[84] M.R. Meyer, A. Schütz, H.H. Maurer, Contribution of human esterases to the metabolism of selected drugs of abuse, *Toxicology letters* 232(1) (2015) 159-166.

[85] B. Güssregen, Data-dependent acquisition, in: A.M. Gressner, T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019, pp. 656-656.

[86] W.M. Niessen, D. Falck, Introduction to mass spectrometry, a tutorial, *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry* (2015) 1-54.

[87] A. Salomone, C. Luciano, D. Di Corcia, E. Gerace, M. Vincenti, Hair analysis as a tool to evaluate the prevalence of synthetic cannabinoids in different populations of drug consumers, *Drug Test. Anal.* 6(1-2) (2014) 126-134.

[88] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European Drug Report 2018: Trends and Developments*, Publications Office of the European Union, Luxembourg, (2018).

2. Abschließende Zusammenfassung

Das EU-Frühwarnsystem der Europäischen Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA) hatte bis Ende 2018 mehr als 730 neue psychoaktive Substanzen (NPS) registriert. Mit vermehrtem Aufkommen der NPS im Jahr 2005 wurden die forensische Toxikologie sowie die klinische Chemie aufgrund des unübersichtlichen und schnelllebigen Drogenmarktes vor große Herausforderungen hinsichtlich der analytischen Nachweisbarkeit und der Interpretation der Analysenbefunde gestellt. Um mögliche NPS-Intoxikationen sowie einen Substanzmissbrauch im Rahmen von Abstinenz- und Dopingkontrollen aufzudecken oder den Grad der Beeinflussung zu einem bestimmten Vorfallszeitpunkt bzw. dem Zeitpunkt des Versterbens beurteilen zu können, werden robuste und sensitive Analysemethoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von NPS in biologischen Matrices benötigt.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Entwicklung einer voll automatisierten in-line Festphasenextraktion-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenpektrometrie-Methode (in-line SPE-LC-MS/MS) zur Bestimmung von 95 synthetischen Stimulanzien im Blutserum. Diese Methode wurde nach forensisch-toxikologischen Richtlinien validiert und auf ihre Anwendbarkeit bei Realproben mit Verdacht auf eine entsprechende Substanzbeeinflussung getestet. In sieben von 28 Verdachtsfällen konnten NPS nachgewiesen werden. Die Methode wurde erfolgreich am Institut für Rechtsmedizin der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln in die Routineanalytik etabliert und wird durch die Aufnahme neuer Analyten kontinuierlich aktualisiert.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Prävalenz von NPS-Stimulanzien und ihrer Relevanz als Todesursache bei Verstorbenen im Großraum Köln. Zu diesem Zweck wurde die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene Methode für die Anwendung im Urin optimiert und ebenfalls nach den forensisch-toxikologischen Richtlinien validiert. Im Rahmen der gerichtlich beauftragten Todesursachenfeststellung wurden im Zeitraum von Januar 2011 bis Mai 2017 die Urinproben (bzw. bei Nichtvorhandensein Nierenhomogenate) von 268 jungen Verstorbenen (≤ 35 Jahre) im Hinblick auf eine Aufnahme von Stimulanzien, insbesondere NPS, systematisch untersucht. Insgesamt 17 Fälle (6%) wurden positiv auf NPS getestet. Eine anschließende Untersuchung der Blutproben (falls vorhanden) der Verstorbenen mit positivem NPS-Befund im Urin ergab, dass NPS in fünf Fällen todesursächlich oder von toxikologischer Relevanz beim Versterben gewesen sind. In zwei weiteren Fällen wurden NPS innerhalb einer Polyintoxikation nachgewiesen, wobei die bestimmten Konzentrationen allerdings auf eine untergeordnete Bedeutung für den todesursächlichen Geschehensablauf hinwiesen.

Der dritte Teil beschreibt die Untersuchung der Organverteilung, welche bei zwei Verstorbenen, die die Stimulanzien Methylendioxypropylvaleron (MDPV), α -Pyrrolidinopentiophenon (α -PVP), Methoxetamin (MXE) und 4-Methylethcathinon (4-MEC) eingenommen hatten, durchgeführt wurde. In diesem Zusammenhang wurden zwei verschiedene Extraktionsmethoden – namentlich eine QuEChERS-Methode (Akronym für *Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe* (schnell, einfach, günstig, effizient, robust, sicher)) und eine automatisierte Festphasenextraktion (SPE) - hinsichtlich Geschwindigkeit der Analyse, Benutzerfreundlichkeit, Effizienz und Sicherheit miteinander verglichen. Beide Techniken zeigten sich für die Extraktion von NPS in geringen Konzentrationen aus Körperflüssigkeiten und Organgewebe als geeignet. Die SPE-Methode ist umweltfreundlicher (geringer Verbrauch an Lösungsmitteln) und zeigte Vorteile hinsichtlich Geschwindigkeit und Automatisierbarkeit. Die LC-MS/MS-Untersuchungen zeigten für die Analyten MDPV, α -PVP, MXE und 4-MEC, welche mittels QuEChERS aufgearbeitet wurden, nur geringe Matrixeffekte und hinreichende Wiederfindungsraten (>50 %). Die Ergebnisse legen nahe, dass der QuEChERS-Ansatz eine gute Alternative für die Extraktion von Substanzen aus Gewebe in der forensischen Toxikologie darstellen könnte. Insbesondere aufgrund der limitierten Datenlage zu Intoxikationsfällen mit den Substanzen MDPV, MXE, 4-MEC und α -PVP können die ermittelten Untersuchungsergebnisse zur Organverteilung zukünftig hinsichtlich der Bewertung von Intoxikationen mit ebendiesen Substanzen von großem Wert sein.

Im vierten und letzten Teil der Arbeit wurden die Organverteilung sowie die postmortale Umverteilung (einschließlich der Bestimmung des Verteilungsverhältnisses (C/P-Ratio) von Herz- (C) zu Femoralblut (P)) des synthetischen Stimulans 3-FPM sowie der Designer-Benzodiazepine Pyrazolam und Diclazepam, inklusive dessen Metaboliten, bei einem Verstorbenen untersucht. Da zu diesen Substanzen nur wenige Kenntnisse über post-mortem Konzentrationen sowie zur postmortalen Umverteilung vorliegen, können die generierten Daten eine nützliche Grundlage für die zukünftige Beurteilung ähnlich gelagerter Intoxikationen darstellen.

3. Abstract

As of the end of 2018 the EU Early Warning System of the *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA) was monitoring more than 730 new psychoactive substances (NPS). From 2005 onwards, with the increasing emergence of NPS and the accompanying diversity and swift development drug market, forensic toxicology and clinical chemistry faced major challenges with regard to the analytical detectability and interpretation of analysis results. Robust and sensitive analytical methods for the qualitative and quantitative determination of NPS in biological matrices were therefore needed in order to reveal NPS intoxication and substance abuse in abstinence and doping checks, or to evaluate the degree of influence at a specific time of incident or time of death.

The first part of this work describes the development of a fully automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (in-line SPE-LC-MS/MS) method for the determination of 95 synthetic stimulants in serum. This method was validated according to forensic-toxicological guidelines and was tested by application to samples where there was suspicion of drug influence. Seven out of the 28 samples were determined positive for NPS consumption. The method was successfully incorporated into routine analytical procedures at the Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, at the University of Cologne, and is continuously updated by inclusion of new analytes.

The second part of this work centres on the prevalence of NPS stimulant use, and its relevance as cause of death amongst individuals in the greater Cologne area. For that purpose, the method described in the first part of this work was optimized and validated according to the forensic-toxicological guidelines for application in urine. On behalf of public prosecutors, in the period between January 2011 and May 2017, urine-specimens (or, in cases where urine was not available, kidney tissue) from 268 young (≤ 35 years) deceased individuals were systematically investigated with regards to stimulants, especially NPS. A total of 17 cases (6%) were tested positive for NPS. A subsequent investigation of blood samples (if available) of the deceased with positive NPS urine results showed that, NPS could be assigned as the leading cause of death, or of toxicological relevance, in the cause of death in five cases. In two cases, NPS was judged to be a component of a multidrug poisoning, but of minor relevance.

The third part of the work describes an organ-distribution investigation, which was carried out on two deceased who consumed methylenedioxypropylamphetamine (MDPV), α -pyrrolidinopentiophenone (α -PVP), methoxetamine (MXE) and 4-methylethcathinone (4-MEC). In this context, two different extraction methods were compared with each other – a QuEChERS (acronym for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) approach and an automated solid phase extraction – comparisons focused on the “swiftness” (speed of analysis), easiness (ease of use), efficacy and safety. Both techniques were suitable for the extraction of NPS at low concentrations in body fluids and tissues. The SPE method was more

environmentally friendly (low consumption of solvents) with advantages such as rapidity and automation. Almost no matrix effects and sufficient recoveries (>50%) were observed on the analytes of interest (MDPV, α -PVP, MXE and 4-MEC) when analyzed by LC-MS/MS with the QuEChERS method. The results suggest that the QuEChERS approach could be an attractive alternative method for organ preparations in forensic casework. Especially due to the limited data, the insights gained into the post-mortem distribution of MDPV, MXE, 4-MEC and α -PVP will be of considerable value for the future assessment of fatal intoxications involving the aforementioned substances.

The fourth and last part of this work centres on the investigation surrounding a fatality of a young man, particularly the organ distribution and post-mortem redistribution (including determination of the heart blood/peripheral blood) ratio of the designer stimulant 3-fluorophenmetrazine (3-FPM) and the benzodiazepines pyrazolam as well as diclazepam and its metabolites delorazepam, lorazepam, and lormetazepam. As knowledge of post-mortem concentrations and redistribution effects of NPS is limited, the results will be beneficial in expanding the current knowledge of these NPS.

4. Anhang

4.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Anzahl und Kategorien der dem EU-Frühwarnsystem erstmals gemeldeten neuen psychoaktiven Substanzen, 2005-2018 [5].

4.2 Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
ACN	Acetonitril
AMG	Arzneimittelgesetz
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
bzw.	beziehungsweise
C18	Silica-basierte Octadecylphase
CE	Kollisionsenergie
DAD	Diodenarraydetektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMCDDA	Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	und andere
etc.	<i>et cetera</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FV	Fragmentorspannung
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
ggf.	gegebenfalls
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
inkl.	inklusive
ISTD	Interner Standard
ITSP	Instrument Top Sample Preparation
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)

L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
LOD	Nachweisgrenze (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>Limit of Quantification</i>)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mL	Milliliter
ng	Nanogramm
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	Methylendioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
ME	Matrixeffekt
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
MPU	Medizinisch-Psychologische Untersuchung
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N ₂	Stickstoff
ng	Nanogramm
NPS	Neue Psychoaktive Substanzen
NpSG	Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetz
PI	„Vorläuferion“ (<i>Precursor Ion</i>)
PMR	postmortale Umverteilungsprozesse (<i>Post-Mortem Redistribution</i>)
r	Korrelationskoeffizient
R	Wiederfindung
R ²	Regressionskoeffizient
RSD	Relative Standardabweichung (<i>Relative standard deviation</i>)
Q1	Ion, das zur Berechnung des Analysenergebnisses herangezogen wird (<i>Quantifier</i>)
Q2	Ion, das zur Bestätigung der Identität des Analyten mitgemessen wird (<i>Qualifier</i>)
QC-Proben	Qualitätskontrollproben
QuEChERS	<i>quick, easy, cheap, effective, rugged, safe</i>
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>Signal to Noise ratio</i>)

SPE	Festphasenextraktion (<i>Solid-Phase Extraction</i>)
STA	systematische toxikologische Analyse
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
THC	Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol
ToF	Flugzeitmassenspektrometer (<i>Time-of-Flight mass spectrometer</i>)
t_R	Retentionszeit
u. a.	unter anderem
UNODC	Büro der Vereinten Nationen für Drogen- und Verbrechensbekämpfung (<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)
WADA	Welt Anti-Doping Agentur
z. B.	zum Beispiel

4.3 Vollständige Publikationsliste

Als Erstautorin Zeitschriften mit Peer-Review:

S. Lehmann, T. Kieliba, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender, Fatalities associated with NPS stimulants in the Greater Cologne area. *Int. J. Legal Med.* **2019**, 1-13.

S. Lehmann, A. Sczyslo, J. Froch-Cortis, M.A. Rothschild, M. Thevis, H. Andresen-Streichert, K. Mercer-Chalmers-Bender, Organ distribution of diclazepam, pyrazolam and 3-fluorophenmetrazine. *Forensic Sci. Int.* **2019**, 303(109959).

S. Lehmann, A. Thomas, K.-H. Schiwy-Bochat, H. Geyer, M. Thevis, F. Glenewinkel, M.A. Rothschild, H. Andresen-Streichert, M. Juebner, Death after misuse of anabolic substances (clenbuterol, stanozolol and metandienone). *Forensic Sci. Int.* **2019**, 303 (109925).

S. Iwersen-Bergmann*, S. Lehmann*, A. Heinemann, C. Schröder, A. Müller, H. Jungen, H. Andresen-Streichert, K. Puschel, C. Vidal, K. Mercer-Chalmers-Bender, Mass poisoning with NPS: 2C-E and Bromo-DragonFly. *Int. J. Legal Med.* **2018**, 1-7.

* Geteilte Erstautorenschaft: S. Iwersen-Bergmann und S. Lehmann

S. Lehmann, B. Schulze, A. Thomas, T. Kamphausen, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender, Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE. *Forensic Toxicol* **2018**, 36(2), 320-333.

S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. Thevis, K. Mercer-Chalmers-Bender, Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1064, 124-138.

Als Co-Autorin in Zeitschriften mit Peer-Review:

F. Gaunitz, S. Lehmann, A. Thomas, M. Thevis, M.A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender, Post-mortem distribution of the synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and its metabolites in a case of combined drug intoxication. *Int. J. Legal Med.* **2018**, 1-13.

Zeitschriftenbeiträge:

S. Lehmann, D. Teifel, M.A. Rothschild, H. Andresen-Streichert. Tödliche Intoxikation mit dem Designer-Opioid U-47700. *Toxichem Krimtech* **2018**, 85(1), 36.

S. Lehmann, M.A. Rothschild, M. Jübner. Fundamentale Fehlmessung der Atemalkoholkonzentration. *Blutalkohol* **2017**.

Vorträge auf Konferenzen:

S. Lehmann, A. Sczyslo, J. Froch-Cortis, M.A. Rothschild, M. Thevis, H. Andresen-Streichert, K. Mercer-Chalmers-Bender. Organ distribution of diclazepam, pyrazolam and 3-fluorophenmetrazin. *XXI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 11. - 13. April 2019.

S. Lehmann, A. Thomas, K.-H. Schiwy-Bochat, H. Geyer, M. Thevis, F. Glenewinkel, M.A. Rothschild, H. Andresen-Streichert, M. Jübner. Death after misuse of anabolic substances (clenbuterol, stanozolol and metandienone). *XXI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 11. - 13. April 2019.

S. Lehmann, T. Kieliba, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Postmortem-Analyse auf synthetische Stimulanzien. *97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Halle (DGRM)*, Halle, Deutschland, 12. - 15. September 2018.

S. Lehmann, B. Schulze, F. Gaunitz, T. Kamphausen, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Postmortem Distribution of 4-MEC, MDPV, Methoxetamine and α -PVP in Deaths Arising from Poisoning. *5th Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) and The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)*, Boca Raton, USA, 06. – 12. Januar 2018.

S. Lehmann, B. Schulze, T. Kamphausen, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE. *XX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 27. – 29. April 2017.

S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Rapid determination of new psychoactive substances in biological matrices using an automated in-line ITSPTMSPE-LC-MS/MS-system. *53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)*, Florenz, Italien, 30. August – 04. September, 2015

S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Rapid determination of new psychoactive substances in biological matrices using an automated ITSPTM solid-phase extraction and LC-MS/MS. *XIX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 16. - 18. April 2015.

Poster auf Konferenzen:

S. Lehmann, F. Gaunitz, M. Jübner, M. Thevis, M. A. Rothschild, K. Mercer-Chalmers-Bender. Prevalence of new psychoactive substances (NPS) at a popular annual festival in Cologne. *XX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)*, Mosbach, Deutschland, 27. – 29. April 2017.

Sonstige Vorträge:

S. Lehmann, R. Eichelberg. Anwendung der ITSP-Festphasenextraktion zum Nachweis neuer psychoaktiver Substanzen. Workshop der *Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)*, Köln, Deutschland, 1. – 2. Oktober 2015.