

Quantitative Bestimmung von Benzodiazepinen mittels LC-MS

F. Dussy, C. Hamberg und Th. Briellmann

Institut für Rechtsmedizin, Pestalozzistrasse 22, CH-4004 Basel

1. Einleitung

Es gibt verschiedene Substanzen mit ungenügender Flüchtigkeit für eine direkte Identifizierung mittels GC-MS, der „goldenen analytischen Standardmethode“. Diese Verbindungen müssen derivatisiert oder hydrolysiert werden, um mittels GC-MS analysierbar zu werden. Die LC-MS ist eine alternative Analysenmethode für eine eindeutige Identifikation solcher Verbindungen ohne Derivatisierung oder Hydrolyse. Zu diesen Verbindungen gehören neben vielen anderen auch die Benzodiazepine und ihre Metaboliten.

Die Gruppe der Benzodiazepine umfasst mehr als 30 Substanzen, von welchen mehrere aktive oder auch inaktive Metaboliten bilden. Einige der bekanntesten Vertreter sind Diazepam (Valium), Flunitrazepam (Rohypnol) und Midazolam (Dormicum). Die therapeutischen Blutspiegel reichen über 4 Zehnerpotenzen von 0.5 µg/L für Flunitrazepam bis zu 3 mg/L für Chlordiazepoxid.

Im IRM Basel ist es üblich, in FUD-Fällen (Fahren unter Drogen), bei Delikten von und an Lebenden sowie bei aussergewöhnlichen Todesfällen mit toxikologischer Fragestellung ein immunochemisches Screening im Urin auf Betäubungsmittel und einige psychoaktive Medikamente durchzuführen. In den Fällen mit positivem Resultat auf Benzodiazepine erfolgt eine direkte Quantifizierung im Blut.

Vorgestellt wird eine Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von Benzodiazepinen basierend auf einer flüssig-flüssig Extraktion (LLE) mit Butylchlorid gefolgt von einer HPLC-Analyse mit serieller PDA- und MS-Detektion. Wegen Gradienten-bedingter mangelnder Spektrenqualität und Softwareproblemen erfolgt die Auswertung der PDA-Spektren auf einem zweiten HPLC-PDA System. Die PDA-Detektion stellt sicher, dass auch Verbindungen mit niedriger Ionisations-Affinität erfasst und mit der UV-Spektren-Bibliothek „UV Spectra of Toxic Compounds“¹⁾ identifiziert werden können.

Die Ionisierung in einer APCI-Ionenquelle (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) hat sich für die meisten Benzodiazepine als die geeignete erwiesen.

2. Probenvorbereitung und Chromatographie

Probenvorbereitung LLE:

- 1 mL Probe (Vollblut/Serum)
- 200 ng Brotizolam als IS zugeben
- 3 mL Butylchlorid zur Extraktion unter Vortexen zugeben
- Phasen durch Zentrifugieren trennen
- 20 µL Ethylenglycol in einem Reagenzglas vorlegen
- organische Phase zugeben
- unter N₂ bei Raumtemperatur einengen
- 40 µL Acetonitril zugeben
- 10 µL im LC-MS analysieren

¹⁾ UV Spectra of Toxic Compounds, F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T.Erxleben, M. Rothe, Institute of Legal Medicine - Humboldt-University Berlin

- 10 µL im HPLC-PDA analysieren

Brotizolam hat sich als interner Standard bewährt. Es ist selbst ein Benzodiazepin und verhält es sich bei der Extraktion ähnlich wie die anderen Benzodiazepine. Wesentlich ist, dass es (in der Schweiz) nur sehr selten als Medikament (Lendormin[®]) eingesetzt worden ist. Seit 2003 ist es nicht mehr auf dem Schweizer Markt erhältlich.

Der Arbeitskreis Extraktion der GTFCh hat gezeigt, dass bei Benzodiazepinen mit Butylchlorid Extraktionsausbeuten zwischen 85 und 100 % möglich sind.

Stehen statt Blut- oder Serumproben nur Gewebeproben zur Verfügung oder handelt es sich um eine Blutprobe mit starker Matrixbelastung, erfolgt die Extraktion mittels SPE mit einer Bond-Elut Certify (Varian, 300 mg, 3 mL) Kartusche.

Probenvorbereitung SPE

- 1 mL bzw. 1 g biologisches Material
- 200 ng Brotizolam (IS) zugeben
- 9 mL 0.1 M Phosphatpuffer pH=6.0 zugeben

Säulenvorbereitung

- 2 mL MeOH
- 2 mL 0.1 M Phosphatpuffer pH=6.0

Probenaufgabe

Spülen/Waschen

- 2 mL dest. H₂O
- 2 mL 20 % MeOH
- 3 mL 0.1 M Phosphatpuffer pH=1.0
- 2 mL MeOH
- 2 mL Chloroform
- 15 Min. trockensaugen

Elution

- 2 mL Chloroform / Isopropanol (70:30 v/v) mit 2 % Ammoniak (frisch hergestellt) (in ein Reagenzglas mit 20 µL Ethylenglycol)

Die chromatographische Trennung erfolgt auf einem HPLC-System der Firma Thermo Finnigan mit quaternärer Pumpe. Folgende Parameter sind für die Trennung massgebend:

Säule: Restek Allure C18 (mit Filter und Vorsäule)
150 x 3.2 mm, 5 µm

Gradient: flow 0.45 mL/min

t(min)	NH ₄ Oac (AA) 5mM, pH 4.75	Acetonitril (AN)	Methanol (MeOH)
0	90	5	5
7	50	25	25
27	10	45	45
30	10	45	45
31	90	5	5

Spülmittel des Autosamplers: Acetonitril

Die Verwendung eines organischen Lösungsmittels zur Spülung des Autosamplers ist von grosser Wichtigkeit, um Verschleppungen vorzubeugen.

Der Gradient vermag die Benzodiazepine in einem Zeitfenster von 9 bis 20 Minuten zu eluieren und die meisten zu trennen. Er ist ein Kompromiss zwischen schneller Elution und Trennung der einzelnen Benzodiazepine.

3. Gegenüberstellung: Electro Spray Ionisation (ESI) vs. Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)

Für die massenspektrometrische Analyse der Benzodiazepine hat sich die APCI der ESI als überlegen erwiesen. Der Effekt der Ionisierungs-Suppression, der bei der ESI bei gleichzeitiger Elution mehrerer Substanzen zu einem „blinden System“ führen kann, wird bei der APCI nicht beobachtet. Die Optimierung der MS-Parameter auf Diazepam im „Positiv Ionen Modus“ über einen Massenbereich von 75 bis 500 amu ist für „alle“ Benzodiazepine geeignet.

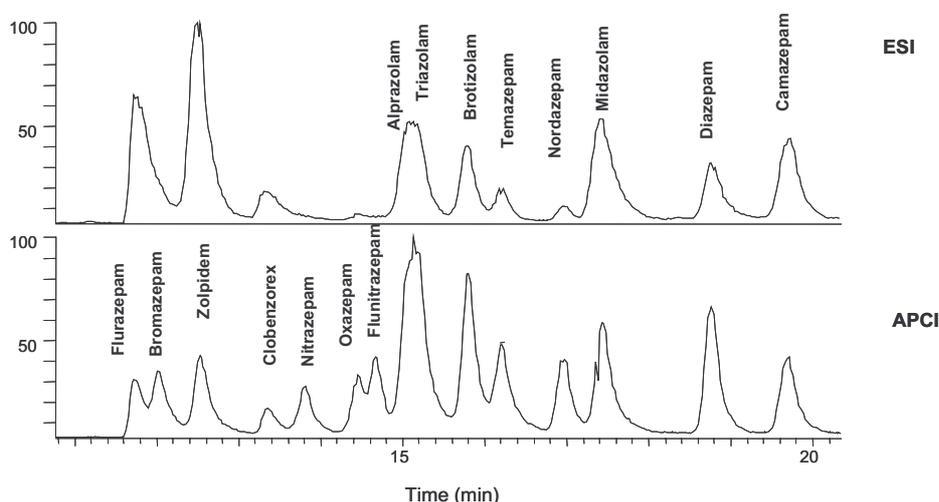


Abb. 1. Standardlösung, je 30 ng der Substanz

Der Einsatz der APCI öffnet uns auch die Möglichkeit, mit einem einzigen Internen Standard zu arbeiten und auf deuterierte Standards verzichten zu können. Dies wiederum ist wichtig für die Analyse des Extraktes mit dem PDA-Detektor und hilft die Kosten der Analysen gering zu halten.

4. Eindeutige Identifikation mittels Daten abhängigem“ MS-MS

Die API (Atmospheric Pressure Ionisation) der LC-MS ist generell eine milde Ionisationsmethode. Dies hat zur Folge, dass im Regelfall nur das protonierte Molekülion ohne Fragmentbildung beobachtet wird. Für eine eindeutige Identifikation muss nun dieses Molekülion zur Fragmentierung angeregt werden. Bei Ionenfallen- und Triplestage Quadrupol-Geräten erfolgt dies sinnigerweise mittels MS-MS.

Bei der softwaregesteuerten Daten-abhängigen MS-MS Funktion wird auf jedem detektierten m/z-Verhältnis oberhalb einer definierten Intensität ein MS-MS Experiment durchgeführt. Das so erhaltene MS-MS Spektrum kann dann mit Spektren aus einer MS-MS Datenbank verglichen werden und so zu einer eindeutigen Identifikation führen.

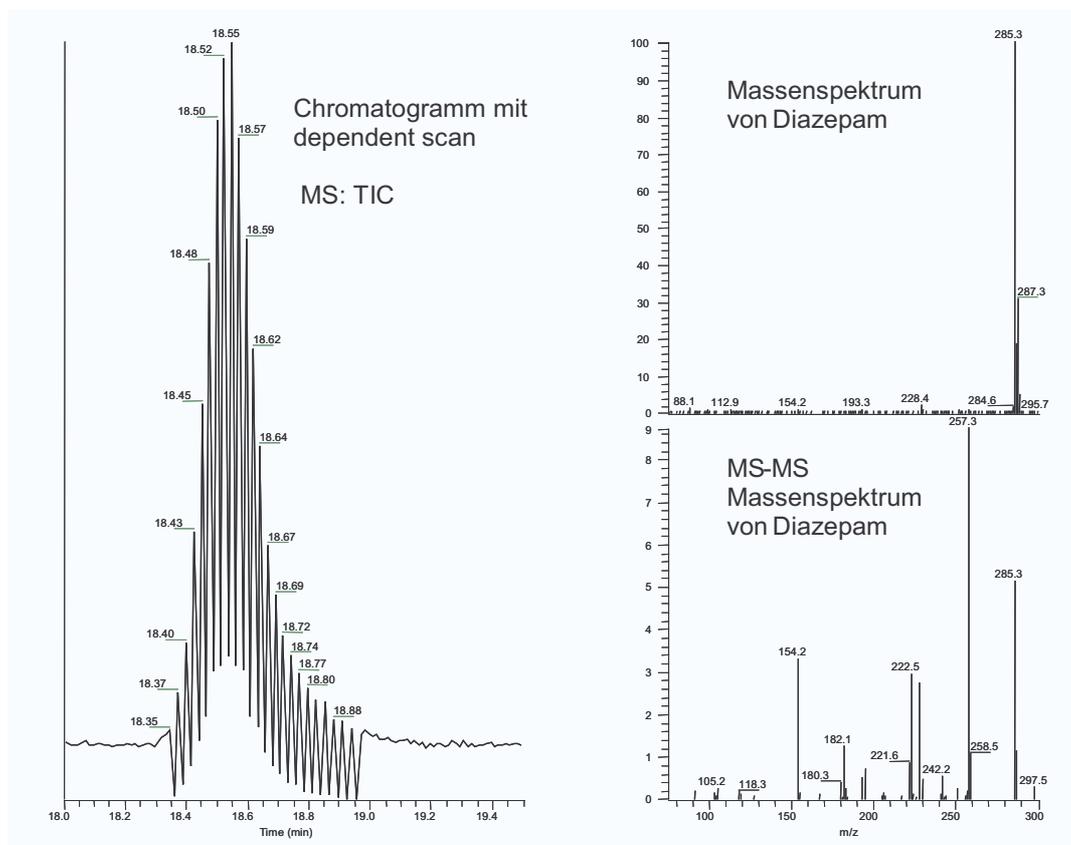


Abb. 2. Peak des Diazepams mit alternierender MS- und MS-MS-Messung

Die Programmierung von 2 Scan Events, Full Scan und Daten-abhängiges MS-MS, dient einer Identifikation von Analyten, ohne sich schon vor der Analyse auf einzelne Benzodiazepine festzulegen. Zusätzlich können weitere im Extrakt vorhandene Substanzen erkannt und gegebenenfalls identifiziert werden. Als Beispiele hierzu lassen sich Methaqualon, Zolpidem, Amitriptylin neben vielen anderen aufführen. Nicht erfasst werden Substanzen, welche sich mit dieser Methode nicht extrahieren lassen wie z.B. Benzoyllecgonin, Morphin oder Salicylsäure sowie tiefdosierte bzw. thermolabile Wirkstoffe wie Buprenorphin oder LSD.

4. Weitband-Aktivierung

Von grosser Wichtigkeit für die Identifikation ist die Möglichkeit der „Weitband-Aktivierung“. Bei dieser Art von MS-MS wird nicht nur das eine isolierte Ion energetisch zum Zerfall angeregt sondern ein Bereich, der von diesem Ion noch 20 amu zu geringeren Massen abweicht. Dies ist immer dann von Interesse, wenn der gesuchte Analyt leicht Wasser oder Ammoniak abspalten kann und somit keine wesentlichen strukturellen Informationen preisgibt. Bei der „Weitband-Aktivierung“ wird dieses primäre Spaltprodukt ebenfalls erfasst und zu weiterem Zerfall angeregt. Es ergibt sich daraus ein pseudo MS³ Experiment.

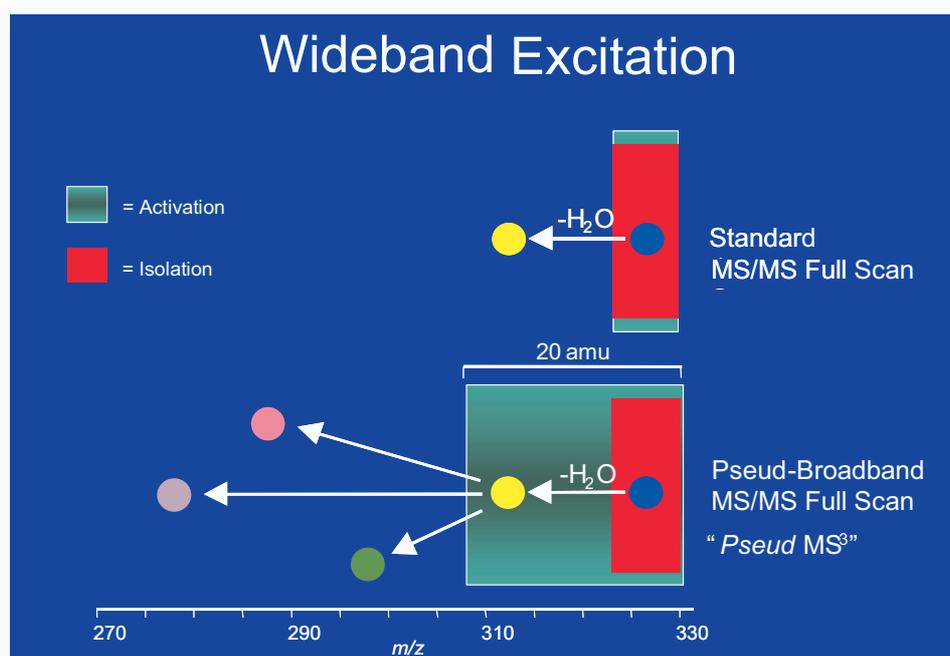


Abb. 3. Prinzip der Weitband-Aktivierung

Für die Benzodiazepine selbst ist diese Weitband-Aktivierung nicht interessant, hingegen für einige ihrer Metaboliten sowie für die Identifikation weiterer im gleichen Extrakt befindliche Substanzen.

5. Suche in MS-Datenbanken

Anders als bei der GC-MS, wo die Spektren weitgehend unabhängig vom Gerät sind, können sich die LC-MS-MS Spektren unterschiedlicher Geräte stark voneinander unterscheiden. Es überrascht deshalb auch nicht, dass viele mit einem LC-MS aufgezeichnete Spektren nicht in einer GC-MS-Datenbank gefunden werden können. Für die Quantifizierung der Benzodiazepine spielt das keine Rolle. Hingegen gilt es, dies bei weiteren im Extrakt gefundener Substanzen zu berücksichtigen.

In Abb. 4 wird die Gegenüberstellung von MS-MS-Spektren am Beispiel von Midazolam, einmal in einem GC-Trap aufgenommen sowie mit einem LC-Trap gezeigt.

6. Serielle Detektion mit PDA- und MS-Detektor

Clobazam, der Wirkstoff von Urbanyl[®] (in Deutschland Frisium[®]) ist ein Benzodiazepin, welches sich bei therapeutischer Dosierung mit der hier vorgestellten Methode nicht im MS detektieren lässt. Von den anderen Benzodiazepinen unterscheidet es sich durch die Stellung der Stickstoffatome im 7-Ring. Durch die serielle Schaltung des PDA-Detektors kann diese Verbindung aber ebenfalls erfasst werden. Ein Beispiel zeigt Abb. 5. Da wir in unserer Sammlung keine Fälle mit Clobazam haben (Ausnahme: Ringversuche der GTFCh), wird die serielle Detektion an einem Beispiel mit Coffein und Midazolam vorgestellt: Während im gezeigten Chromatogramm mit dem PDA Coffein und eine unbekannte Verbindung (rt 12.08) detektiert werden, kann Midazolam aufgrund der geringen Konzentration nicht mehr erfasst werden. Durch Legen der Massenspur wird Midazolam im MS noch deutlich nachgewiesen. Coffein lässt sich selbst durch Legen der Massenspur nicht detektieren.

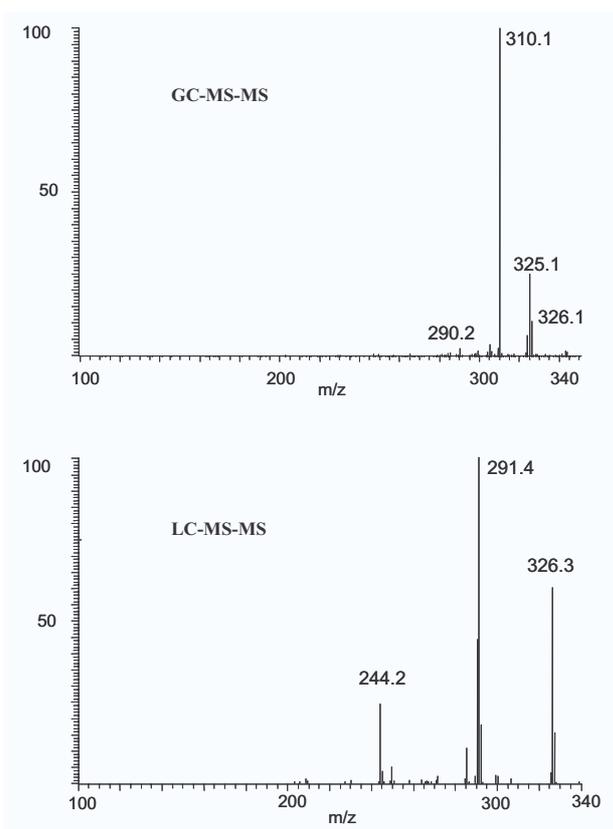


Abb. 4. Vergleich des GC-MS-MS- und des LC-MS-MS-Spektrums von Midazolam

Analytische Grenzwerte

Die Bestimmungsgrenzwerte (BG, LOQ) liegen für alle geprüften Benzodiazepine und ihre Metaboliten unterhalb ihrer unteren therapeutischen Konzentration. Für spezifische Fragestellungen auf einzelne Benzodiazepine kann die Methode mit wenig Aufwand angepasst werden: Das Daten-abhängige MS-MS Experiment wird im entsprechenden Elutionszeitfenster durch ein gezwungenes MS-MS auf die entsprechende Masse ersetzt. Somit können die Bestimmungsgrenze und die Nachweisgrenze unter 1 ng/mL verschoben werden. In Tabelle 1 sind die mit BEN[®] ermittelten Bestimmungsgrenzwerte der Standardmethode den unteren therapeutischen Serumkonzentrationen gegenübergestellt.

Tab.1. Bestimmungsgrenzwerte und minimale therapeutische Konzentrationen einiger Benzodiazepinen

Substanz	BG [$\mu\text{g/L}$]	min. therap. ²⁾²⁾ [$\mu\text{g/L}$]
Flunitrazepam	3	5
7-Amino-Flunitrazepam	2	
Desmethyl-Flunitrazepam	3	
Flurazepam	2	20
Desalkyl-Flurazepam	2	
Bromazepam	6	50
Lorazepam	3	20
Diazepam	2	200
Nordazepam	2	20
Oxazepam	2	200
Midazolam	2	40
α -Hydroxy-Midazolam	3	

²⁾²⁾ M. Schulz, A. Schmoltdt, Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, Pharmazie 58 (2003) 447-474

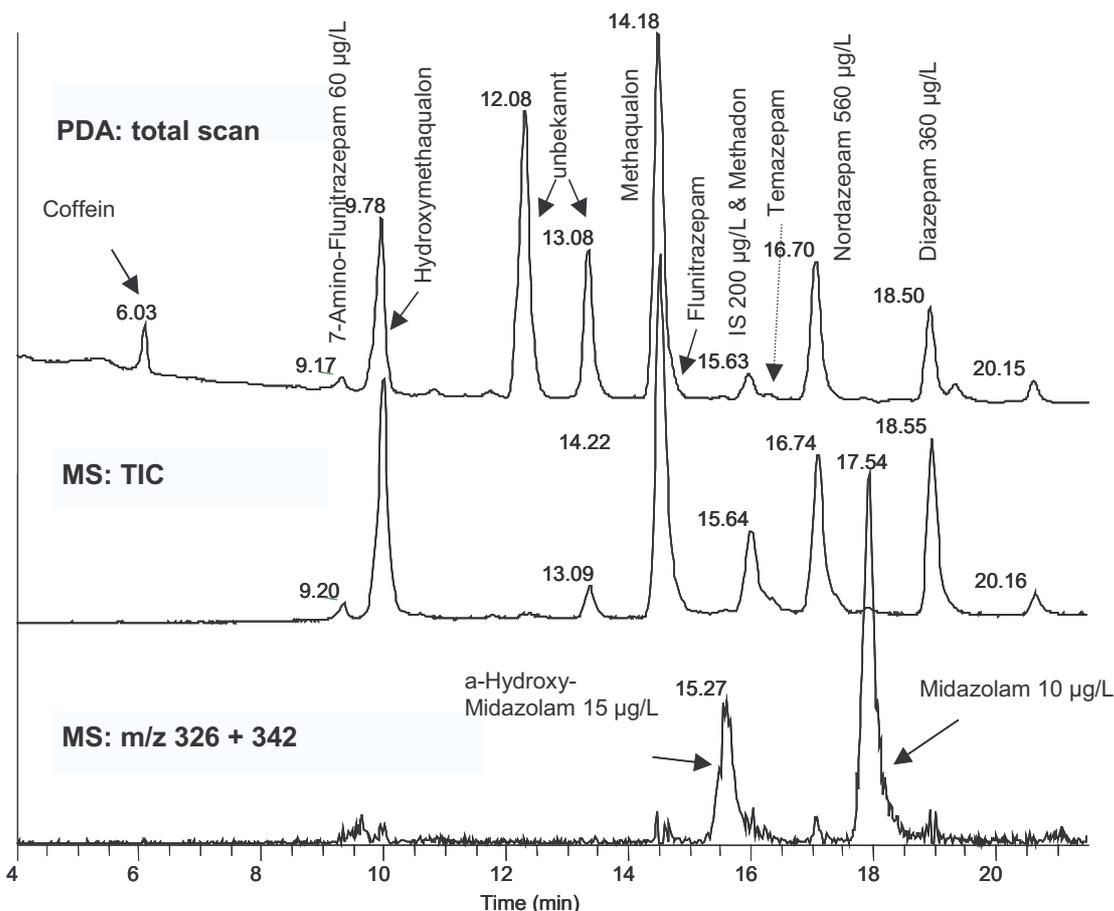


Abb. 5. Beispiel für die serielle Detektion mit PDA- und MS-Detektor

Von der Kontrollkarte zur Messunsicherheit

Die Kontrollkarten können für die Beurteilung Qualität der Resultate der aktuellen Serie als auch für die Abschätzung der Messunsicherheit u herangezogen werden. Dabei hat sich gezeigt, dass die Resultate der MS-Detektion denjenigen der PDA-Detektion in etwa gleichwertig sind (siehe Kontrollkarten am Beispiel Oxazepam in Abb. 6).

Die vorgestellte Abschätzung der Messunsicherheit setzt voraus, dass die Streuung der ermittelten Mittelwerte über den Konzentrationsmessbereich unabhängig vom jeweiligen Benzodiazepin ist. Nach unserer Erfahrung ist diese Annahme zulässig.

Als erster Schritt für die Abschätzung der Messunsicherheit wurden die aus den Kontrollkarten entnommenen Variationskoeffizienten V_k gegen den Mittelwert der ermittelten Konzentration x des entsprechenden Benzodiazepins aufgetragen (Abb. 6). Die V_k wurden mit einer Funktion vom Typ $V_k = a * x^b$ angepasst. Aus den aus dieser Funktion abgeleiteten V_k lassen sich nun die zugehörigen Standardabweichungen s berechnen ($s = V_k / 100 * x$). Schliesslich lässt sich die Messunsicherheit $u_{95\%}$ aus diesen s -Werten gemäss $u_{95\%} = 2 * s$ abschätzen.

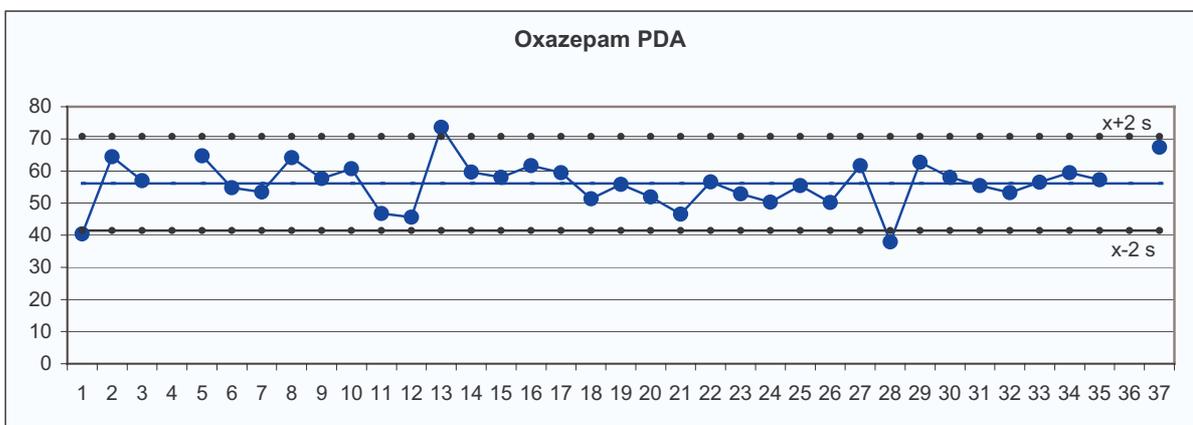
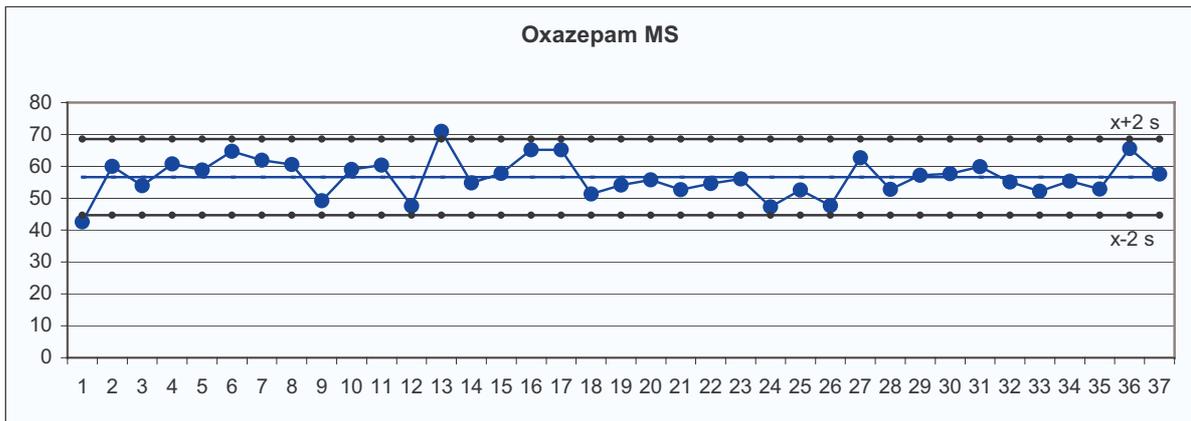


Abb. 6. Kontrollkarten für die Detektion von Oxazepam mittels MS und PDA

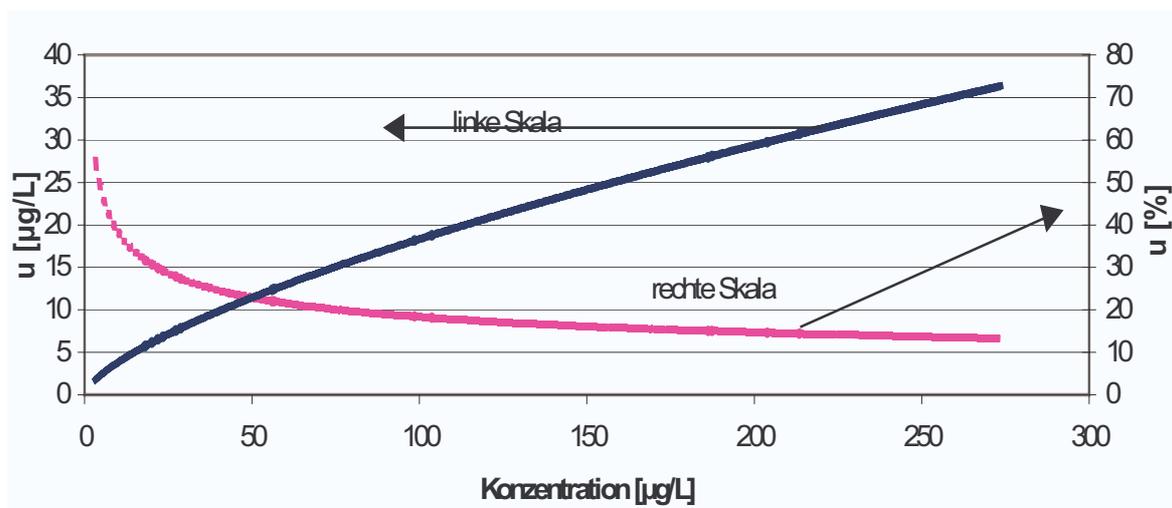


Abb. 7. Messunsicherheit u in Abhängigkeit von der Benzodiazepinkonzentration

Diese abgeschätzten Messunsicherheiten lassen sich sinnvoll in Klassen zusammenfassen. Wie schon Horwitz ³⁾ erkannte, ist die Genauigkeit einer Konzentrationsbestimmung abhängig von der Konzentration des Analyten: Je tiefer die Konzentration, desto ungenauer die Messung.

Konzentration [µg/L]	u _{95%} [%]
LOQ - 10	50
>10 - 20	40
>20 - 40	30
>40 - 70	25
>70 - 180	20
> 180 - 500	15

Mit der vorgestellten Methode lassen sich Benzodiazepine quantitativ erfassen. An den Ringversuchen der GTFCh wie auch der Schweizerischen Gesellschaft für Rechtsmedizin (SGRM) der letzten Jahre hat das IRM Basel mit dieser Methode erfolgreich teilgenommen.

³⁾ Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, W. Horwitz, Anal. Chem. 54 (1), 1982, 67A-76A

Screeningmethode auf Blausäure und GHB

Ludwig von Meyer

Institut für Rechtsmedizin der Universität München, Frauenlobstr. 7a, 80733 München

1. Allgemeines

Es hat sich gezeigt, dass mit der am Institut für Rechtsmedizin München verwendeten Routinemethode zur Begleitstoffbestimmung auch Arznei- und Giftstoffe erfasst werden können.

Das Prinzip des Verfahrens, das allgemein für flüchtige Substanzen anwendbar ist, besteht in der Erwärmung des Probenmaterials in einem geschlossenen System und der Analyse des Dampfes über der Probe (Headspace oder Dampfraum). Zur Dampfdruckerhöhung wird wasserfreies Natriumsulfat zugegeben. Durch den Aussalzeffekt resultieren je nach flüchtiger Substanz deutlich größere Signal- bzw. Peakhöhen.

Die Konzentration der gesuchten Substanz im Dampfraum ist proportional der Konzentration in der Lösung (Probe), entsprechend dem Henry-Daltonschen Gesetz und im idealen Fall nur von der Systemtemperatur abhängig (Machata 1967).

Die Zufuhr der Gasprobe erfolgt mit automatischer Dosierung. Die chromatographische Trennung wird mit Kapillarsäulen durchgeführt. Als Detektor kommt wegen ausreichender Empfindlichkeit der Flammenionisationsdetektor (FID) in Frage.

Der Dampfdruck der flüchtigen Substanzen ist matrixabhängig. Zur Verminderung des Matrixeinflusses wird im Probengefäß mit Perchlorsäure/Perchlorat-Lösung gefällt.

Diese Säure führt u.a. auch zur Freisetzung flüchtiger Säuren wie Blausäure aus cyanidhaltigen Lösungen und zur Bildung von Gammahydroxybutyrolacton aus Gammahydroxybutyrat.