

*Dissertation zur toxikologischen Analyse*

**Über die Aussagesicherheit der Substanzidentifizierung mittels HPLC-DAD in der Systematischen Toxikologischen Analyse unter Verwendung einer selbsterstellten UV-Spektrenbibliothek mit 2.682 Einträgen**

---

**M. Herzler**

---

*Institut für Rechtsmedizin der Charité, Humboldt-Universität, Hannoversche Straße 6, D-10115 Berlin  
Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, 2003*

Die Systematische Toxikologische Analyse (STA) stellt das zentrale diagnostische Werkzeug für die Analyse vermuteter Vergiftungen sowohl in der Notfallmedizin als auch bei ungeklärten Todesfällen dar. Während im konkreten Verdachtsfall in der Regel eine Vielzahl gut untersuchter, nachweisstarker Analysenverfahren für den gerichteten Substanznachweis zur Verfügung steht, bedeutet die ungerichtete Suchanalyse (General Unknown Analysis) eine besondere Herausforderung: die eingesetzten Analysenverfahren sollen mit vertretbarem zeitlichen und ökonomischen Aufwand eine beinahe unüberschaubare Zahl potenzieller Analyte mit hoher Selektivität und Identifikationssicherheit im relevanten Konzentrationsbereich nachweisen und nach Möglichkeit wenigstens halbquantitativ bestimmen können.

Heutzutage kommen hierfür ausschließlich Kombinationen leistungsstarker chromatographischer Trennverfahren mit hochselektiver Detektion wie die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photodiodenarraydetektion (HPLC-DAD), die Kapillargaschromatographie mit massensensitiver Detektion (GC-MS) und - seit einigen Jahren zunehmend - auch die LC-MS zum Einsatz, wobei umfangreiche Datenbanken, sog. Spektrenbibliotheken, mit z. T. mehreren tausend Einträgen die Identifizierung auch solcher Verbindungen ermöglichen, die dem untersuchenden Labor als Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung stehen.

Eingebettet in Überlegungen zur Validierung von STA-Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit die Leistungsfähigkeit und Aussagesicherheit der HPLC-DAD im Rahmen der STA ausführlich untersucht und bewertet. Als zentrale Parameter wurden hierbei Selektivität bzw. Spezifität gesehen, wobei der letztgenannte Ausdruck auf Messgrößen, hier vor allem das UV-Spektrum, ersterer dagegen auf das gesamte Analysenverfahren bezogen wurde. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) der Mess- wie der Referenzdaten sowie zur Abschätzbarkeit der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen vorgenommen.

Um eine aussagefähige Datengrundlage für diese Untersuchungen zu schaffen, wurde zunächst eine in einer älteren Vorgängerversion vorliegende UV-Spektrenbibliothek mit modernen Diodenarraydetektoren vollständig neu gemessen und auf einen Substanzbestand von 2.682 UV-aktiven, toxikologisch relevanten Wirkstoffen erweitert. Die Messungen wurden im Wellenlängenbereich von 195 - 380 nm durchgeführt, die Trennung erfolgte an einer RP8-Säule, als mobile Phasen kamen verschiedene Mischungen von Acetonitril und Phosphatpuffer pH 2,3 zum Einsatz. Neben UV-Spektren und relativer Retentionszeit (RRT) wurden in die Datenbank auch spektroskopische Extrema und Schultern, CAS-Nummer, Strukturformel, sowie Wirkung bzw. Verwendungszweck der untersuchten Substanzen aufgenommen. Die aktualisierte Spektrenbibliothek wurde als Buch und als in die HPLC-Software direkt einzu- bindende CD-ROM mittlerweile einem breiten Anwenderkreis zur Verfügung gestellt [1].

Wird zur Analyse einer Probe ein mehrdimensionales Verfahren wie die HPLC-DAD eingesetzt, liefert dieses zunächst einen multivariaten Datensatz (relative Retentionszeit + Extinktionen auf verschiedenen Wellenlängen). Dieses Messergebnis lässt sich am besten als Punkt in

einem multidimensionalen (orthogonalen) Koordinatensystem, dem sog. Ergebnisraum darstellen, dieser umfasst dabei sämtliche möglichen Messergebnisse (analytischen Zustände). In dieser Betrachtungsweise ist ein analytisches Verfahren dann umso selektiver, je unähnlicher sich die Messergebnisse verschiedener Analyte sind, d.h. je besser sich die verschiedenen möglichen analytischen Zustände im Ergebnisraum voneinander unterscheiden lassen. Hierzu können verschiedene (Un-)Ähnlichkeitsmaße zum Einsatz kommen. Beispielhaft soll im folgenden der Ähnlichkeitsvergleich zweier UV-Spektren beschrieben werden (Abb. 1), bei dem diese als Vektoren im Ergebnisraum der Extinktionen auf den einzelnen Wellenlängen dargestellt werden.

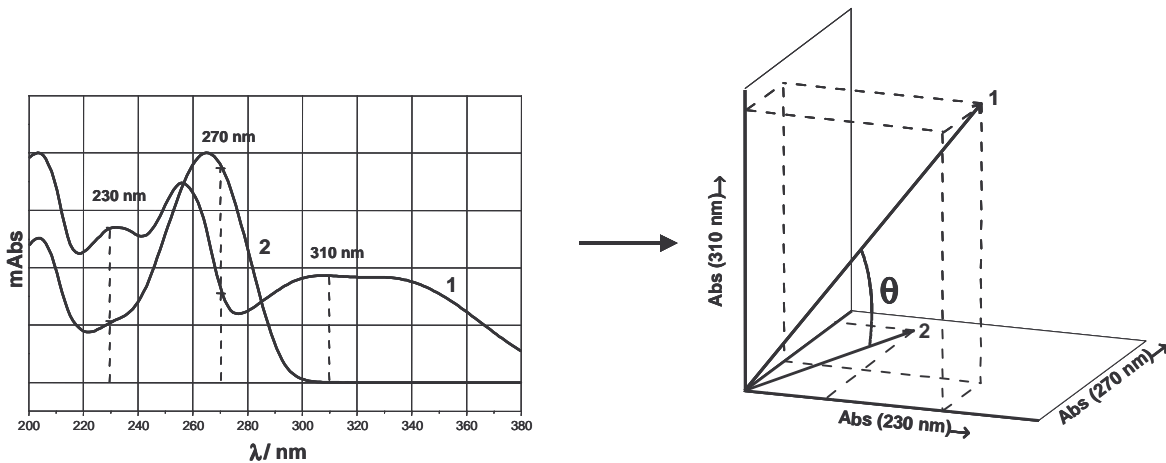


Abb. 1. Umwandlung von UV-Spektren in Vektoren. In diesem Beispiel werden "Spektren" aus drei Extinktions-Wellenlängen-Wertepaaren in den dreidimensionalen Vektorraum überführt. Analog erfolgt die (nicht mehr direkt anschauliche) Darstellung von UV-Spektren mit 181 Wertepaaren im 181-dimensionalen Vektorraum.

Die Ähnlichkeit zwischen den Spektren wird dann durch den Similarity Index als Kosinus des von den beiden betreffenden Vektoren gebildeten Winkels ausgedrückt. Basierend auf empirischen Erwägungen kann nun ein Schwellenwert für den SI festgelegt werden, oberhalb dessen zwei Spektren in der Praxis nicht mehr sicher voneinander zu unterscheiden sind. In ähnlicher Weise kann für jede (relative) Retentionszeit ein RRT-Fenster festgelegt werden: liegt der RRT-Wert einer Substanz A im RRT-Fenster der Substanz B, so können beide - zumindest auf der Grundlage der RRT - nicht sicher voneinander unterschieden werden. Die Details des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahrens wurden bereits an anderer Stelle [2] beschrieben.

Auf dieser Grundlage wurden nun sämtliche möglichen Substanzpaarungen aus der Spektrenbibliothek miteinander hinsichtlich ihrer Unterscheidbarkeit verglichen, die Ergebnisse wurden in sog. Ähnlichkeits- bzw. Identifikationsmatrizen festgehalten (Abb. 2).

Aus diesen wurde anschließend die Zahl möglicher falsch positiver Identifizierungen durch Auszählung ermittelt. Die Berechnungen wurden zusätzlich für verschiedene Untergruppen und SI-/RRT-Schwellenwerte durchgeführt. Des Weiteren wurden jeweils die Ergebnisse für die Substanzidentifikation nur auf der Basis des UV-Spektrums, nur über die RRT sowie für die Kombination beider Parameter berechnet.

Um einen Vergleich zur Selektivität anderer Analyseverfahren herstellen zu können, wurden dann verschiedene in der Literatur beschriebene oder abgeleitete Kenngrößen wie die "Relative Identification Power" (RIP), die "Discriminating Power" (DP) oder die "Mean List Length" (MLL) und auch die in dieser Arbeit versuchsweise neu eingeführte "mittlere Selektivität" (XM) berechnet. Schon über das UV-Spektrum alleine waren gut 60 % (RIP) der 2.682 Substanzen aus der Spektrenbibliothek eindeutig identifizierbar. Mit einer MLL von

1,25 und einer DP von 0,9999 für die kombinierte Identifikation (Spektrum + RRT) sowie einem Anteil eindeutig identifizierbarer Substanzen in Höhe von 84 %, ermittelt auf der Basis von knapp 2.000 Substanzen, wurden hier sehr gute Resultate erzielt (Abb. 3).

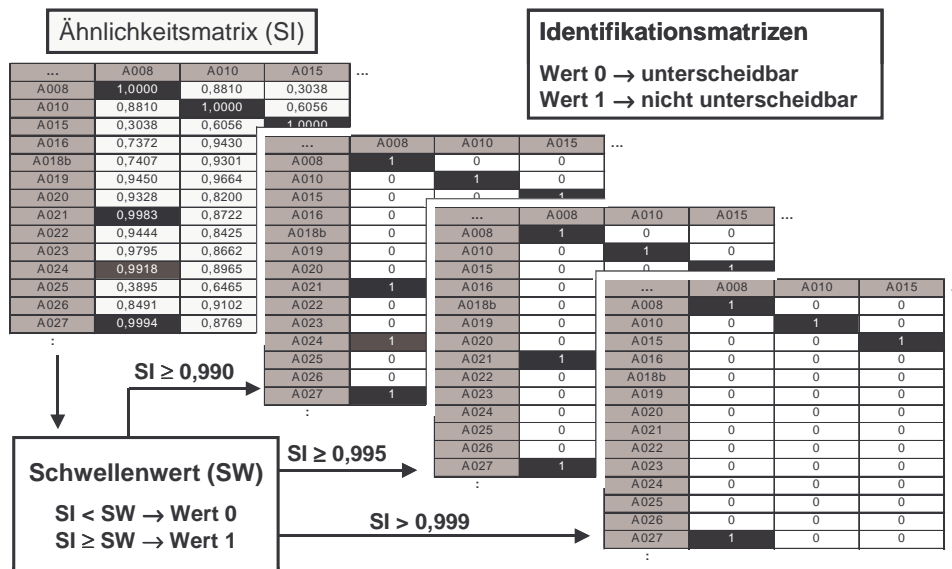


Abb. 2. Umwandlung der Ähnlichkeitsmatrix in Identifikationsmatrizen in Abhängigkeit vom Schwellenwert.

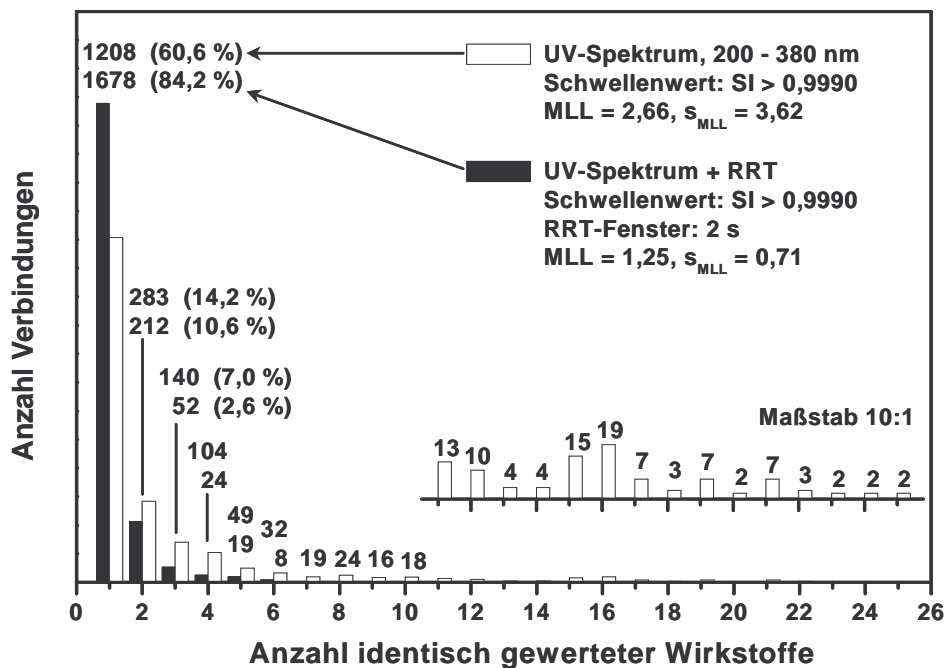


Abb. 1: Verteilung der Anzahl identisch gewerteter Substanzen ("Listenlänge") für die in Eluent A gemessenen Verbindungen aus der Spektrenbibliothek (n = 1.993, Vergleichsgrundlage: UV-Spektrum, Schwellenwert:  $SI > 0,9990$  und RRT, Fenster: 2 s). Der Einschub zeigt die kleineren Werte vergrößert im Maßstab 10:1.

Alle Selektivitätsparameter wurden ausführlich hinsichtlich ihrer tatsächlichen Eignung für den Methodenvergleich diskutiert. Im Ergebnis wurde keine der untersuchten Kenngrößen als alleine geeignet befunden, so dass eine Zusammenschau aller Parameter als sinnvoll erachtet wurde. Aufgrund einer starken Abhängigkeit der Selektivitätsparameter von der Anzahl untersuchter Substanzen (mit Ausnahme der DP) wurde als Fazit eine nur begrenzte Vergleichbarkeit zwischen Methoden konstatiert, bei denen sich diese Anzahl stark unter-

schied. Insofern war auch eine Einordnung der hier erzielten Ergebnisse vor dem Hintergrund anderer in der Literatur veröffentlichter Arbeiten nur eingeschränkt möglich, da eine auch nur annähernd vergleichbar große Substanzzahl nirgendwo untersucht worden war. Die Resultate der vorliegenden Arbeit lagen jedoch trotz dieses Handicaps im Bereich der besten Literaturwerte.

Zur Untersuchung der Spezifität der UV-Spektren wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurden sämtliche im Substanzbestand der Spektrenbibliothek angetroffenen Chromophore/Absorptionssysteme erfasst und ausgezählt. Hierbei zeigte sich, dass 53,5 % der Wirkstoffe über ein einzigartiges Absorptionssystem verfügten, weitere 13,3 % enthielten ein Absorptionssystem, das nur noch ein weiteres Mal in der Spektrenbibliothek angetroffen wurde. Diese Zahlen wurden als Beleg für eine große strukturelle und damit auch spektroskopische Variabilität des betrachteten Substanzkreises gewertet.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Prüfung der Einsatzmöglichkeiten multivariater statistischer Verfahren zur "Ausbeutung" der bei der STA anfallenden umfangreichen Daten. Über den Einsatz solcher "chemometrischer" Methoden in der forensischen Analytik wurde bisher nur wenig berichtet. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu in einem zweiten, indirekten Ansatz zur Charakterisierung der Spezifität von UV-Spektren die Anwendung der Diskriminanzanalyse zur rechnergestützten Unterscheidung zwischen ausgewählten Substanzgruppen erprobt, die nach ihrer Bedeutung in der forensisch-toxikologischen Praxis ausgewählt worden waren.

Insgesamt gingen 487 Wirkstoffe in die Untersuchungen mit ein. Im Ergebnis gelang nicht nur die Trennung zwischen den zunächst festgelegten Hauptgruppen, es war sogar eine weitere Unterscheidung in einem hierarchischen System von Untergruppen möglich, wobei teilweise bis zu vier Hierarchieebenen erreicht wurden, bevor aufgrund der verbliebenen, geringen Substanzzahlen weitere Aussagen unmöglich wurden. Die gefundenen Resultate belegen, dass die Unterscheidung von Substanzen mit verschiedenen Chromophoren/Absorptionssystemen über das UV-Spektrum sicher gelingt; selbst bei Verbindungen mit gleichem Absorptionssystem sind oftmals noch spektrale Unterschiede zu erkennen, die auch von nicht unmittelbar in der Nachbarschaft des Absorptionssystems befindlichen strukturellen Unterschieden herrühren können. Gleichzeitig wurden bei strukturell ähnlichen Vertretern derselben Wirkstoffklasse grundsätzlich ähnliche spektrale Verläufe gefunden, so dass auch die Zuordnung unbekannter, nicht in der Spektrenbibliothek enthaltener Substanzen anhand ihres UV-Spektrums zu einer Wirkstoffgruppe prinzipiell möglich sein sollte.

Neben Selektivität und Spezifität wurden auch weitere analytische Kenngrößen des Verfahrens näher betrachtet. So wurden Mess- und Methodenpräzision auf der Basis exemplarischer Messungen pauschal abgeschätzt. Aufgrund der detektoreigenen Kalibrationsmöglichkeiten und von Vergleichsmessungen mit Diodenarraydetektoren verschiedener Hersteller wurde dabei das UV-Spektrum hinsichtlich seiner Lage und der relativen Intensitätsverhältnisse als fehlerfrei messbar angesehen, sofern es nicht durch den Einfluss von Rauschen bei niedrigen Konzentrationen oder durch eine Überlagerung des chromatographischen Peaks verfälscht war. Für die absoluten Retentionszeiten wurden Variationskoeffizienten  $< 1\%$  (Wiederholpräzision) bzw. von  $3 - 5\%$  (laborinterne Vergleichspräzision) gefunden. Über das Gesetz der Fehlerfortpflanzung wurde dann der VK für die relative Retentionszeit RRT ermittelt. Dieser fiel von extrem hohen Werten in der Nähe der Totzeit rasch ab, um sich einem Wert von etwa  $5\%$  anzunähern.

Die Präzision bei der Bestimmung der Peakflächen wurde zu etwa  $1\%$  (Wiederholpräzision) bzw.  $8\%$  (laborinterne Vergleichspräzision) bestimmt. Des Weiteren wurden für eine Reihe im Rahmen der STA häufig gefundener Substanzen Wiederfindungsraten bestimmt. Als im Mittel realistische Schätzung für den Fehler der Wiederfindung wurde daraus ein Wert von

10-20 % angenommen. Für die verschiedenen vorgestellten Probenaufbereitungsverfahren wurden für den jeweiligen Gesamtfehler bei der quantitativen Ergebnisangabe aus den Einzelfehlern Werte zwischen 8 und 15 % errechnet. Sie lagen damit im Bereich des bei Analysen aus biologischem Material Üblichen und wurden als im Rahmen der STA akzeptabel angesehen.

Die pauschale Angabe von Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen für den gesamten Substanzbestand erschien unmöglich. Neben ihrer (optimalen, aber für die STA zu aufwändigen) Ermittlung durch die Kalibriergeradenmethode scheint für die Praxis eine Abschätzung über den Signal-Rausch-Abstand (Nachweisgrenze üblicherweise dreifaches, Bestimmungsgrenze zehnfaches Grundrauschen) die praktikabelste Lösung zu sein. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit durch die beispielhafte Überlagerung einiger UV-Spektren mit Rauschen gezeigt, dass an der solcherart festgesetzten Bestimmungsgrenze noch mit guten SI identifiziert werden kann, während allerdings für unstrukturierte Spektren eine Identifizierung an der theoretischen Nachweisgrenze wohl nur im gezielten Verdachtsfall möglich ist.

Die vorgestellte HPLC-DAD-Methode hat sich im täglichen Einsatz in der forensisch-toxikologischen Praxis gut bewährt. Ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten wurden in der Arbeit abschließend an einigen ausgewählten Vergiftungsfällen aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin demonstriert.

In der Summe erwies sich die HPLC-DAD als außerordentlich leistungsstarkes Analysenverfahren mit hoher Selektivität und Genauigkeit, das die Anforderungen der Systematischen Toxikologischen Analyse in allen wesentlichen Kriterien sehr gut erfüllte. Vergleichbar umfangreiche Arbeiten über Konkurrenzverfahren wie GC-MS oder LC-MS stehen noch aus, die dort zu erwartenden Ergebnisse dürften sich allerdings in einer ähnlichen Größenordnung bewegen, so dass von einer "einzig wahren" STA-Methode vermutlich nicht gesprochen werden kann. Ohnehin ergänzen sich die angesprochenen Verfahren hinsichtlich des zugänglichen Substanzkreises eher, als dass sie wirklich miteinander konkurrieren. Für die Zukunft der STA ist dabei die Möglichkeit der Online-Kopplung in der Kombination LC-DAD-MS als besonders interessant anzusehen.

Für Interessierte steht die Arbeit derzeit als PDF-Datei unter der URL <http://dohost.rz.hu-berlin.de/dissertationen/herzler-matthias-2003-03-17/PDF/Herzler.pdf> im Internet zum Download bereit; langfristig wird sie auch als HTML-Datei über den elektronischen Dokumentenserver der HU Berlin (<http://www.edoc.hu-berlin.de>) verfügbar sein.

## Literatur

[1] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.-T. Erxleben und M. Rothe, UV-Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and other Poisons. Edition 2001. Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim. ISBN 3-923032-13-7.

[2] M. Herzler, S. Herre und F. Pragst, Selectivity of Substance Identification by HPLC-DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds. *Journal of Analytical Toxicology*, 26 (4), 2003, 233-242