



Medizinische Fakultät  
der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

## **Bachelorarbeit**

zur Erlangung des Grades Bachelor of Science (B. Sc.)

# **Optimierung der quantitativen Bestimmung von Amphetamin und Amphetaminderivaten im Blutserum mittels GC/MS**

*Fachbereich*

Ingenieur – und Naturwissenschaften

*Studiengang*

Angewandte Chemie

*eingereicht bei*

Prof. Dr. Valentin Cepus

Dr. Karen Blümke-Anbau

*Abgabetermin*

17.10.2023

*bearbeitet von*

Fabian Picht

*Matrikel*

27439

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Merseburg, 17.10.2023

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Fabian Picht

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>2</b>
2.1 Gaschromatographie – Massenspektrometrie	2
2.1.1 Mobile Phase	2
2.1.2 Stationäre Phase	2
2.1.3 Injektor	3
2.1.4 Ofen	4
2.1.5 Detektor	4
2.2 Methoden zum Nachweis von Amphetamin und Amphetaminderivaten	6
2.3 Derivatisierung	7
2.4 Optimierung des bestehenden Verfahrens	9
2.5 Analyten – Amphetamin und Derivate	11
2.5.1 Amphetamin	12
2.5.2 Methamphetamin	13
2.5.3 MDMA	14
2.5.4 MDA	15
2.5.5 MDEA	15
2.5.6 MBDB	16
2.6 Validierung – Prüfparameter	16
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Material	17
3.1.1 Lösungsmittel und Chemikalien	17
3.1.2 Matrixproben	17
3.1.3 Kontrollproben	18
3.1.4 Stammlösungen	18
3.1.5 Interner Standard	19
3.1.6 Testlösung	19
3.2 Analytische Methode	20

3.2.1	Probenvorbereitung	20
3.2.2	GC/MS Bedingungen	20
3.2.3	Identifizierungskriterien	22
3.3	Methodenvalidierung	23
3.3.1	Selektivität und Spezifität	23
3.3.2	Linearität der Kalibration	24
3.3.3	Genauigkeit	26
3.3.4	Analytische Grenzen	31
3.3.5	Stabilität	33
3.3.6	Wiederfindung	34
3.3.7	Messunsicherheit	35
<b>4</b>	<b>Auswertung und Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Selektivität und Spezifität	37
4.2	Linearität der Kalibration	39
4.3	Genauigkeit	40
4.4	Analytische Grenzen	42
4.5	Stabilität	43
4.6	Wiederfindung	44
4.7	Messunsicherheit	44
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>50</b>
7.1	Valistat-Validierungsprotokoll: Amphetamin	50
7.2	Valistat-Validierungsprotokoll: Methamphetamin	57
7.3	Valistat-Validierungsprotokoll: MDMA	64
7.4	Valistat-Validierungsprotokoll: MDA	71
7.5	Valistat-Validierungsprotokoll: MDEA	78
7.6	Valistat-Validierungsprotokoll: MBDB	85
7.7	Messunsicherheit	92



## Kurzfassung

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Optimierung und Validierung einer quantitativen Methode zur Bestimmung von Amphetamin und Amphetaminderivaten im Blutserum. Alle Experimente wurden mit einem Gaschromatographen gekoppelt an ein Massenspektrometer durch Elektronenstoßionisation im SIM-Modus durchgeführt. Die zu entwickelnde Methode sollte insbesondere hinsichtlich der Probenaufarbeitung vereinfacht werden und eine Reduzierung der Nachweisgrenzen bei gleichzeitiger Volumenreduktion erkennbar sein. Dies beinhaltete auch die Bewertung und Auswahl eines alternativen Derivatisierungsmittel beziehungsweise Derivatisierungsverfahren.

Das unter diesen Kriterien neu konzipierte Verfahren ersetzte die bisherige Festphasenextraktion durch eine kostengünstigere und weniger lösungsmittelintensive Flüssig-Flüssig-Extraktion. Eine weitere Verbesserung zeigte sich durch den Wechsel des Derivatisierungsmittel von Trifluoressigsäureanhydrid zu Pentafluorpropionsäureanhydrid. Die dadurch deutlich gestiegene Empfindlichkeit brachte trotz einer parallelen Verkleinerung des verwendeten Probenvolumens niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Hierbei konnte auch das eingesetzte Probenvolumen von 1 auf 0,25 mL reduziert werden. Abschließend wurde ebenfalls die Dauer der Probenaufarbeitung signifikant verkürzt. Dies gelang durch einen mikrowellengestützten Derivatisierungsprozess der den ursprünglichen von 30 auf 5 Minuten verringerte.

Nach Abschluss der einzelnen Optimierungsschritte erfolgte die Prüfung der entwickelten Methode auf Gültigkeit und Richtigkeit mit Hilfe einer Validierung. Dabei durchlief das Analysenverfahren unterschiedlichste Prüfparameter, welche es im Rahmen bestimmter Grenzen zu bestehen galt. Die Validierung wurde nach den Richtlinien der GTFCh durchgeführt, die Ergebnisse wurden dokumentiert und durch die Software Valistat ausgewertet.

Im Experiment zur Selektivität konnten keine Störungen durch exogene oder endogene Substanzen erfasst werden. Die Linearität der Methode wurde belegt und führte zu einem Arbeitsbereich über alle Analyten von 10 bis 1000 ng/mL. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 1,1 und 1,4 ng/mL und die Bestimmungsgrenzen zwischen 5,0 und 5,7 ng/mL. Die Akzeptanzkriterien der Kenngrößen Richtigkeit, Wiederholpräzision und Laborpräzision wurden erfüllt. Die Extraktionsausbeute betrug für alle Analyten  $\geq 95\%$ . Die Stabilität der aufgearbeiteten derivatisierten Proben beträgt bei 25 °C mindestens 4 Tage. Zusätzlich zum Validierungsumfang wurde die Messunsicherheit bestimmt, welche ebenfalls akzeptable Ergebnisse hervorbrachte.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Bestätigungsverfahren, dass die hier entwickelte Methode in Bezug auf sämtliche Analyten vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse liefert und somit für ihren Einsatzzweck zur Bestimmung von Amphetamin und Amphetaminderivaten in Blutserum geeignet ist.

## Abstract

The aim of this work was to optimize and validate a quantitative method for the determination of amphetamine and amphetamine derivatives in blood serum. All experiments were carried out with a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer by electron impact ionization in SIM mode. The method to be developed was to be simplified, particularly regarding sample preparation, and a reduction in detection limits with simultaneous volume reduction was to be apparent. This also included the evaluation and selection of an alternative derivatization agent or derivatization procedure.

The newly designed procedure based on these criteria replaced the previous solid-phase extraction with a more cost-effective and less solvent-intensive liquid-liquid extraction. A further improvement was achieved by changing the derivatization agent from trifluoroacetic anhydride to pentafluoropropionic anhydride. The resulting significant increase in sensitivity brought lower detection and quantification limits despite a parallel reduction in the sample volume used. The sample volume used could also be reduced from 1 to 0.25 mL. Finally, the time of sample processing was also significantly reduced. This was achieved by a microwave-assisted derivatization process that lowered the original time from 30 to 5 minutes.

After completion of the individual optimization steps, the developed method was tested for validity and correctness with the help of a validation. The analytical procedure was subjected to a wide range of test parameters, which had to be passed within certain limits. The validation was carried out according to the guidelines of the GTFCh, the results were documented and evaluated by the Valistat software.

In the experiment on selectivity, no interference from exogenous or endogenous substances could be detected. The linearity of the method was proven and resulted in a working range over all analytes from 10 to 1000 ng/mL. The limits of detection ranged between 1.1 and 1.4 ng/mL and the limits of quantification ranged between 5.0 and 5.7 ng/mL. The acceptance criteria of the parameter's trueness, repeatability and laboratory precision were fulfilled. The extraction yield was  $\geq 95\%$  for all analytes. The stability of the processed derivatized samples is at least 4 days at 25 °C. In addition to the scope of validation, the measurement uncertainty was determined, which produced acceptable results.

In summary, the confirmatory procedures performed show that the method developed here provides comparable and reproducible results for all analytes and is therefore suitable for its intended use in the determination of amphetamine and amphetamine derivatives in blood serum.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen (verändert nach [9])	2
Abbildung 2: Trennphase der verwendeten Kapillarsäule	3
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Split-Splitless-Injektors (verändert nach [9])	3
Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Ionenquelle	4
Abbildung 5: Schematisches Funktionsprinzip eines Quadrupols (verändert nach [10])	5
Abbildung 6: Reaktion von Amphetamin mit ausgewählten Derivatisierungsmitteln	8
Abbildung 7: Massenspektrum von Methamphetamin / -d5 nach PFPA-Derivatisierung	9
Abbildung 8: Struktur der sechs Phenethylaminderivate (verändert nach [5])	11
Abbildung 9: Metabolismus von Amphetamin (verändert nach [1, 29])	12
Abbildung 10: Metabolismus von Methamphetamin (verändert nach [1, 29])	13
Abbildung 11: Metabolismus von MDMA (verändert nach [1])	14
Abbildung 12: Metabolismus von MDA (verändert nach [1])	15
Abbildung 13: Metabolismus von MDEA (verändert nach [1])	15
Abbildung 14: Metabolismus von MBDB (verändert nach [1])	16
Abbildung 15: Massenspektrum von Methamphetamin-PFP ( gemäß [40])	21
Abbildung 16: Chromatogramme unterschiedlicher Testsituationen	37
Abbildung 17: Mittelwerte der sechsfach Bestimmung aller Kalibrationsgeraden	39
Abbildung 18: Zusammenfassung 95%-Intervalle (Valistat)	40
Abbildung 19: SIM-Ionen von MDEA bei zwei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus	42
Abbildung 20: Glasinserthalter und Glasinsert mit 60 µL Dichlormethan	43
Abbildung 21: Stabilitätsverhalten von Amphetamin	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der bisherigen und neuen Extraktionsbedingungen	10
Tabelle 2: Chemikalien mit Herstellerangabe	17
Tabelle 3: Referenzsubstanzen	17
Tabelle 4: Analytkonzentration der verwendeten Kontrollproben	18
Tabelle 5: Ansatz zur Herstellung der Stammlösungen	18
Tabelle 6: Zusammensetzung des Internen Standards	19
Tabelle 7: Zusammensetzung der Testlösung	19
Tabelle 8: Geräteeinstellung der validierten Methode	20
Tabelle 9: Ionen zum Nachweis der PFPA-Derivate	21
Tabelle 10: Toleranzen der relativen Intensitäten von Ionen (verändert nach [41])	22
Tabelle 11: Volumenangaben zur Herstellung der Kalibrationsgeraden	26
Tabelle 12: Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung der Genauigkeit	41
Tabelle 13: Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Vorgaben der GTFCh [41]	42
Tabelle 14: Ermittelte Wiederfindung und relative Standardabweichung	44
Tabelle 15: Ergebnisse zur Abschätzung der Messunsicherheit über Ringversuche	44

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Acetic anhydride, Essigsäureanhydrid
BDB	3,4-(Methylenedioxyphenyl)-2-butanamin
DIN	Deutsche Industrie Norm
EMA	European Medicines Agency
FDA	US Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GC-MS/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer
GTFCCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HHA	3,4-Dihydroxy-amphetamin
HHMA	3,4-Dihydroxy-methamphetamin
HMA	3-Methoxy-4-hydroxy-amphetamin
HMMA	3-Methoxy-4-hydroxy-methamphetamin
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
MBFTA	N-Methyl-bis-trifluoracetamid
MDA	3,4-Methylenedioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylenedioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylenedioxyamphetamin
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
MTBSTFA	N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoracetamid
NaOH	Natronlauge
PFPFA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
SIM	Selected Ion Monitoring
SL	Stammlösung
SWGTOX	Scientific Working Group of Forensic Toxicology
TFAA	Trifluoroacetic anhydride, Trifluoressigsäureanhydrid
QC	Quality Control, Qualitätskontrolle

# 1 Einleitung

Amphetamin und seine Derivate besitzen eine sympathomimetische Wirkung, begleitet von einem hohen Missbrauchspotential [1]. Trotz der Risiken, die mit einem illegalen Konsum einhergehen, belegen aktuelle Statistiken den steigenden Bedarf und die Verbreitung dieser Substanzklasse. So kam es im Jahr 2020 zu 25000 Sicherstellungen von Amphetamin mit einer Gesamtmenge von 21,2 Tonnen durch die EU-Mitgliedsstaaten [2]. Die Motivation eines Konsums ist dabei recht verschieden und spiegelt sich somit auch in unterschiedlichen Settings wider. Werden aus sportmedizinischer Betrachtung diese Verbindungen als leistungssteigernde Substanzen (Doping) eingesetzt, so betrachtet die Rechtsmedizin selbige in der Klärung nicht natürlicher Todesfälle, zur Ursachenfindung von Intoxikationen sowie einer möglichen Beeinflussung im Rahmen strafrechtlicher Fragestellungen.

Amphetamin, Methamphetamin, 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDMA), 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), 3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA) und N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin (MBDB) stellen Analoga von Phenylethylamin dar und weisen durch ihre Strukturähnlichkeit vergleichbare Wirkungsmechanismen auf. Bei diesem wird ein zentral stimulierender Effekt ausgelöst, resultierend aus der Freisetzung von Monoamin-Neurotransmittern [3]. Aufgrund des weitverbreiteten Missbrauchs und deren möglicher Beteiligung in den oben genannten Situationen ist ein methodisch sicherer und verlässlicher Nachweis dieser Substanzen notwendig.

Der Beleg eines Konsums kann dabei mit unterschiedlichen analytischen Methoden realisiert werden. Neben qualitativen Verfahren, die alleinstehend keine eindeutige Aussage erlauben, finden häufig gaschromatographische- oder flüssigchromatographische-Analysemethoden Anwendung. Beide Varianten erlauben eine massenspektrometrische Kopplung, die in Publikationen häufig beschrieben wird [4, 5, 6, 7]. Die mit diesen Methoden erzeugten Ergebnisse können dabei helfen, die Beeinflussung durch psychoaktive Wirkstoffe zu interpretieren.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, dass im Institut für Rechtsmedizin Halle angewandte Verfahren zur Bestimmung von Amphetamin und Amphetaminderivaten im Blutserum zu optimieren. Zunächst sollte die Probenextraktion vereinfacht werden. Dabei zu berücksichtigen war die Reduzierung des Probenvolumens. Weiterhin sollte die reformierte Methode niedrigere Nachweisgrenzen aufweisen, um ihren Anwendungsbereich zu erweitern. Ferner musste geprüft werden, ob ein alternatives Derivatisierungsmittel chromatographische Vorteile und / oder zu einem Intensitätsgewinn führen könnte.

Die unter diesen Aspekten neu entwickelte Methode musste nun die Fähigkeit, forensisch gesicherte Ergebnisse zu erzeugen, belegen. Mit dem Ziel, reproduzierbare und vergleichbare Daten zu generieren, durchlief das Verfahren eine Validierung, welche ein essentielles Kriterium in der forensisch-toxikologischen Analytik darstellt [8].

Insgesamt sollte diese Arbeit die Möglichkeiten und Grenzen der zur Verfügung stehenden Nachweismethoden für die Amphetaminanalytik im Blutserum aufzeigen und die Zuverlässigkeit eines routinemäßig eingesetzten quantitativen Verfahrens unter Beweis stellen. Damit besitzt die vorliegende Arbeit erhebliche praktische Relevanz für die Amphetaminanalytik in einem forensisch-toxikologischen Labor.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie (GC) ist ein Trennverfahren zur Detektion flüchtiger Substanzen. Dabei strömt ein Gasstrom über oder durch eine stationäre Phase, welche in einem langen dünnen Rohr fixiert ist [9]. Das inerte Trägergas transportiert dabei die durch eine Injektion eingebrachten Substanzen. Das Trennprinzip beruht auf komplexen Wechselwirkungsprozessen, bei denen die Komponenten von der stationären Phase gelöst oder adsorbiert werden. Diese Interaktionen führen zu unterschiedlichen Verweildauern der einzelnen Verbindungen, welche dadurch verzögert austreten.

Abbildung 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Gaschromatographen. Im Injektor wird die eingespritzte Probe erhitzt und verdampft. Das Trägergas transportiert die vaporisierte Probe in die Säule, welche sich in einem temperierbaren Ofen befindet. Die am Säulenende austretenden Komponenten gelangen anschließend in den Detektor. Die vom Analysator erfassten Daten werden dann mit Hilfe spezieller Programme verarbeitet.

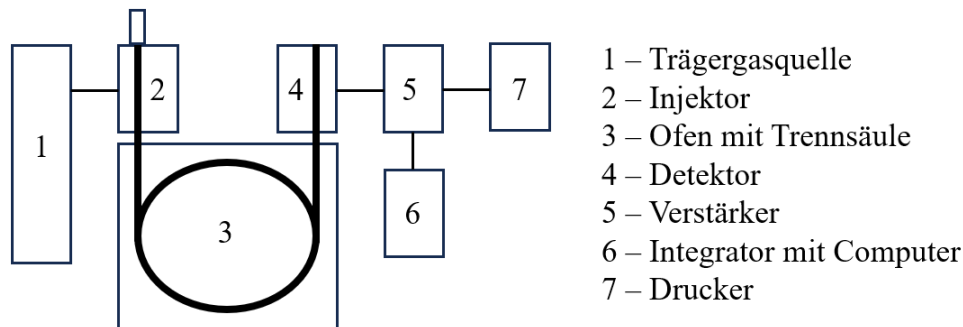


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen (verändert nach [9])

Im Folgenden werden nur die im Rahmen dieser Bachelorarbeit verwendeten Funktionen und Bauteile erläutert, können doch in Abhängigkeit der Anwendung unterschiedlichste Gerätekonfigurationen vorliegen.

#### 2.1.1 Mobile Phase

Häufig eingesetzt werden Inertgase wie Wasserstoff, Stickstoff oder Helium. Diese werden ausgewählt, da sie weder mit der stationären Phase noch mit den Analyten interagieren und keinen Einfluss auf Verteilungskonstanten oder Elutionsreihenfolgen haben. Die gewählte mobile Phase beeinflusst jedoch die Trenneffizienz und wird durch die Van-Deemter-Gleichung beschrieben. Im hier verwendeten System wurde Helium eingesetzt.

#### 2.1.2 Stationäre Phase

Die stationäre Phase befindet sich in der Regel in einer Säule. Zu unterscheiden sind gepackte und Kapillarsäulen, wobei letztere den verbreitetsten Typen darstellen und auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fand. Hierbei ist die stationäre Phase eine immobilisierte Flüssigkeit, die auf der Innenwand der Kapillare aufgetragen wurde [9]. Die äußere Beschichtung stellt ein Kunststoff dar. Die Phase selbst wird so gewählt, dass sie die den zu untersuchenden Verbindungen nach Möglichkeit sehr ähnlich ist.

Im Fall der hier bearbeiteten Analyten wurde ein Polysiloxan aus 5 % - Diphenyl – 95 % dimethylsiloxan verwendet (Abbildung 2).

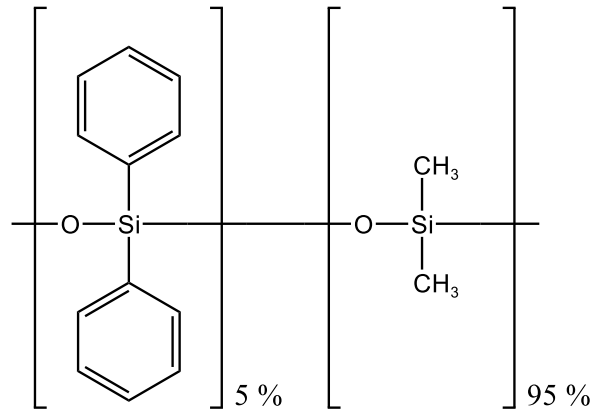


Abbildung 2: Trennphase der verwendeten Kapillarsäule

### 2.1.3 Injektor

Die Aufgabe des Injektors besteht in der Verdampfung und dem anschließenden Transport der Probe in die chromatographische Säule. Ein weitverbreiteter und hier genutzter Typ ist der Split-Splitless-Injektor (Abbildung 3). Bei diesem wird die Probe mit Hilfe einer Mikroliterspritze durch ein gasdichtes Septum in einen beheizten Glasliner eingespritzt. Die dabei gängigen Volumina bewegen sich zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{L}$ . Anschließend wird die Probe schlagartig verdampft und mit dem Trägergasstrom in die Kapillarsäule transportiert. Fakultativ kann ein Splitfluss aktiviert werden, welcher einen Teil der gasförmigen Probe abtransportiert und dadurch das Risiko von Überladungseffekten verhindern kann.

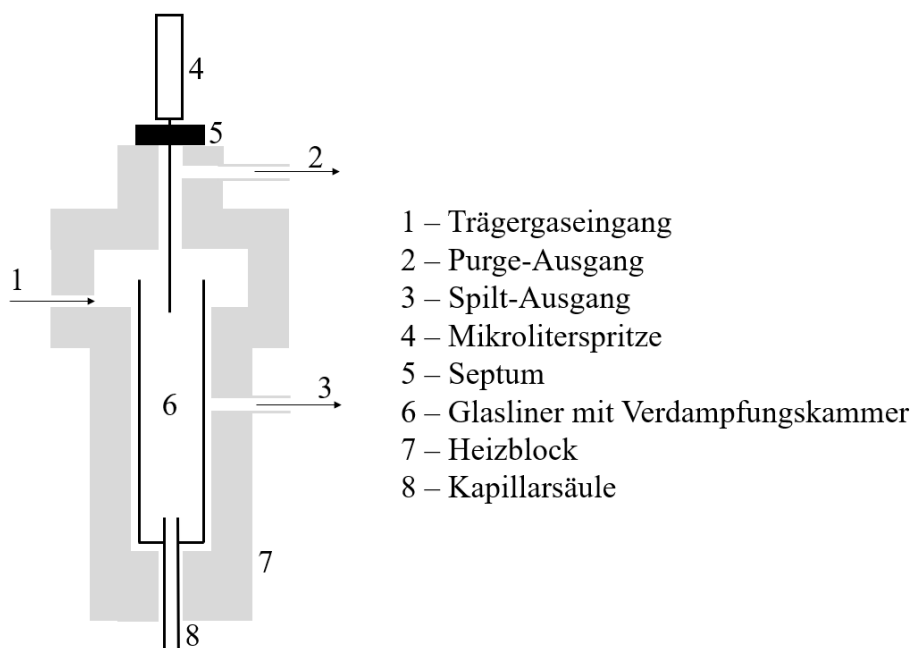


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Split-Splitless-Injektors (verändert nach [9])



## 2.1.4 Ofen

Aufgrund der Tatsache, dass die gaschromatographische Trennung primär nach den Siedepunkten der einzelnen Komponenten erfolgt, stellt neben der stationären Phase ein im Ofen ablaufendes Temperaturprogramm eine weitere Möglichkeit zur Trennung von Verbindungen mit engem Siedepunktsbereich dar. Ein isothermer Betrieb ließe Analyten mit niedrigen Siedepunkten schneller eluieren und würde möglicherweise zu Überlappungen führen. Darüber hinaus könnten höhersiedende Komponenten vollständig auf der Säule zurückgehalten werden [9]. Durch die Wahl eines geeigneten Temperaturprogrammes während eines chromatographischen Laufes kann dagegen der optimale Siedebereich erfasst werden, welcher idealerweise zu Basislinien getrennten Peaks führt.

## 2.1.5 Detektor

Es gibt eine Vielzahl nach unterschiedlichen Prinzipien arbeitenden Detektoren. Diese variieren in Selektivität, Empfindlichkeit, dem dynamischen Bereich und Preis. Dabei wird die Wahl des Analysators häufig durch die analytische Fragestellung bestimmt. Bei dem hier verwendeten Detektor handelt es sich um ein Massenspektrometer, welches eine massenselektive Detektion via Elektronenstoßionisation erlaubt. Bei diesem Prozess gelangt eingangs der Eluat-Strom ( $M$ ) von der Säule in die Ionisierungskammer. Hier emittiert ein Filament Elektronen im rechten Winkel zum Stoffstrom ( $M + e^-$ ), welche durch eine Spannung von 70 eV beschleunigt werden [10]. Der Beschuss führt zur Bildung positiv geladener Radikal-Ionen ( $M^+ + 2e^-$ ), werden doch Elektronen aus den Molekülen herausgeschlagen (Abbildung 4).

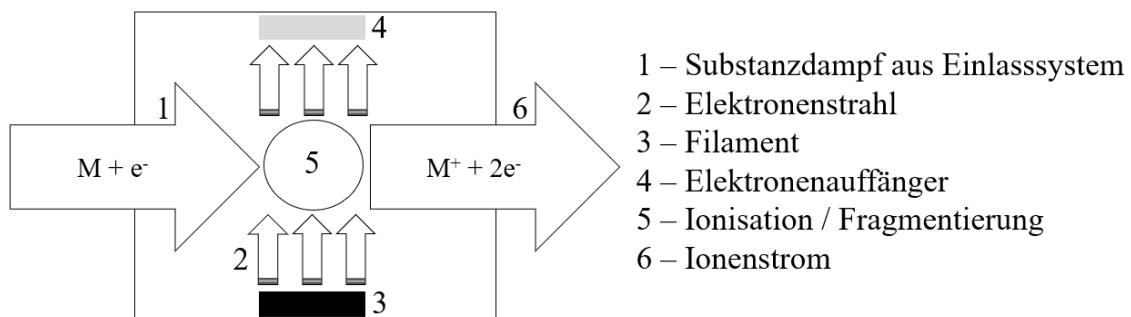


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Ionenquelle

Durch die Energie der Ionisierung werden neben positiv geladenen Molekülonen auch Fragmentionen gebildet, welche einen Aufschluss über die Struktur der Moleküle geben. Die ionisierten Molekül- und Fragmentionen werden anschließend in einen Quadrupol-Analysator geleitet. Dieser besteht aus vier achsenparallelen Stäben, an denen eine Gleichspannung angelegt ist, wobei je zwei gegenüberliegende Stäbe die gleiche Polarität aufweisen (Abbildung 5).

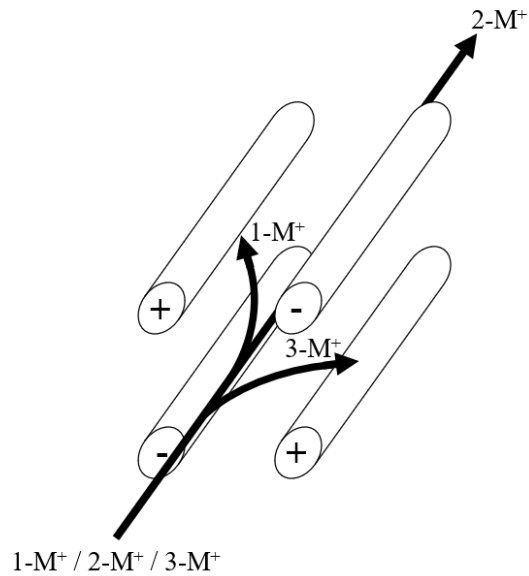


Abbildung 5: Schematisches Funktionsprinzip eines Quadrupols (verändert nach [10])

Darüber hinaus ist eine Hochfrequenzspannung überlagert. Die Veränderung der Spannung und Frequenz des Hochfrequenzfeldes führt jetzt dazu, dass jeweils nur ausgewählte Ionen gleicher Masse auf einer bestimmten Bahn den Quadrupol passieren, während andere abgelenkt und neutralisiert werden [10]. Die finale Detektion findet dann an einem Sekundärelektronenvervielfacher statt. Die hier erfassten Signale werden dann so transformiert, dass eine softwaregestützte Auswertung der Daten möglich ist.

## 2.2 Methoden zum Nachweis von Amphetamin und Amphetaminderivaten

Der Nachweis von Amphetamin und Amphetaminderivaten mit Hilfe analytischer Verfahren ist in der Literatur vielfach beschrieben. Eingeteilt werden diese in qualitative und quantitative Methoden. Die qualitative Analytik beinhaltet dabei unter anderem hinweisgebende Verfahren zur Untersuchung von Feststoffen über Farb-, Anion- oder Mikrokristall-Tests [11]. Diese Tests sind kostengünstig und vergleichsweise einfach durchzuführen. In Proben humanen Ursprungs werden dagegen häufig initial immunochemische Verfahren eingesetzt [12]. Diese Analysetechniken bergen jedoch das Risiko falsch positiver beziehungsweise falsch negativer Ergebnisse und stellen damit nur ein vorläufiges Ergebnis dar, welches durch weiterführende Verfahren bestätigt werden muss [13].

Zu den (semi-) quantitativen Methoden zählt die Dünnschichtchromatographie [14], Gaschromatographie gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor [15], Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie [16] aber auch elektrochemische Methoden wie Voltammetrie [17] und Potentiometrie [18]. Trotz der Vielzahl an Analysetechniken dominieren gegenwärtig durch Massenspektrometrie gestützte Nachweisverfahren den forensisch-toxikologischen Bereich. Unterschieden wird hierbei die Kopplung des Massenspektrometers an ein gaschromatographisches- oder flüssigchromatographisches-System sowie der Typ des Massenanalysators selbst. Beispiele dafür sind Quadrupol-Massenspektrometer, Tandem-Massenspektrometer oder Flugzeit-Massenspektrometer.

Die Autoren in [4] präsentieren eine validierte GC/MS Methode für den Nachweis von 26 Stimulanzien aus Blut und Urin. Die Extraktion erfolgt mittels DLLME (Dispersive Liquid Liquid Microextraction) und beinhaltet einen Derivatisierungsschritt mit Hexylchlorformiat. Hervorgehoben werden die kurze Probenaufarbeitungszeit sowie der geringe Verbrauch an organischen Lösungsmitteln. Dem gegenüber steht jedoch ein Mindestprobenvolumen von 2 mL sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Bereich von 1 – 50 ng/mL die insbesondere für den Nachweis von Amphetamin (50 ng/mL) im Blut als nicht hinreichend empfindlich bewertet werden müssen.

Eine validierte GC-MS/MS Methode für die Bestimmung von 11 Amphetaminen und 34 synthetischen Cathinonen in Vollblut wird in [19] vorgestellt. Das Verfahren benötigt lediglich ein Probenvolumen von 0,2 mL welches mittels Ethylacetat extrahiert wird. Die Derivatisierung erfolgt mit Pentafluorpropionsäureanhydrid. Die Nachweisgrenzen von 0,02 – 0,72 ng/mL und Bestimmungsgrenzen von 1 – 2,5 ng/mL sind sehr niedrig und gewähren dadurch selbst bei verminderten Probeneinsatz eine ausreichend hohe Detektionsfähigkeit. Die Schwächen dieser Methode liegen in der Methodenlaufzeit von 32 Minuten sowie der Verwendung von lediglich zwei deuterierten internen Standards.

Eine auf Flüssigchromatographie basierende Methode zur Identifizierung von 90 zentral stimulierenden neuen psychoaktiven Substanzen in Blutserum wird in [6] beschrieben. Von den 90 Verbindungen wurden 62 vollständig validiert. Unter Verwendung von 0,15 mL Probe werden hier nach Festphasenextraktion Nachweisgrenzen von 0,2 – 4 ng/mL erreicht. Die Methodenlaufzeit von 11 Minuten ist unter Berücksichtigung der Menge zu detektierender Analyten als hervorragend zu bewerten. Nebst aller Stärken dieser Methode ist der damit verbundene Aufwand und die Pflege einer solch umfangreichen Analysenmethode durchaus zu beachten.

In [7] wird die erfolgreiche Entwicklung einer LC-HRMS-QTOF (liquid chromatography high resolution mass spectrometry quadrupole-time-of-flight) Methode zum Beleg des Konsums von 39 Designerdrogen im Urin dargestellt. Die hier verwendete Probenmenge von 0,2 mL wird via SALLE (salting out liquid-liquid extraction) extrahiert und führt zu Nachweisgrenzen von < 10 ng/mL und Bestimmungsgrenzen von < 25 ng/mL. Die Laufzeit von 12 Minuten bestätigt die Routinefähigkeit dieser Methode, weist aber auch hier Schwächen hinsichtlich der Menge verwendeter korrespondierender Interner Standards auf.

Die hier vorgestellten Methoden stellen nur einen äußerst geringen Teil der bisher publizierten Literatur dar. Unter Vernachlässigung von unterschiedlichsten Analyt-Panels und der aktuellen Gerätetechnik repräsentieren diese aber den Stand der Technik.

## 2.3 Derivatisierung

Die Gaschromatographie ist eine robuste Analysentechnik, die die Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Analyten aus komplexen Matrices erlaubt. Die Trennung selbst erfolgt primär nach dem Siedepunkt einer Komponente. Der Nachteil dieses Verfahrens ist das polare, thermolabile, schwerflüchtige und große Moleküle nicht analysiert werden können. Diese Limitierungen können jedoch durch eine Derivatisierung überwunden werden, welche weitere Vorteile wie die Verbesserung der Peakform, ein vorteilhafteres Fragmentierungsverhalten und eine gesteigerte Empfindlichkeit mit sich bringen kann [20]. Das Reaktionsprinzip vieler Derivatisierungen ist eine nucleophile Substitution, bei der eine elektrophile Gruppe durch Verdrängung eines reaktiven Wasserstoffatoms an die nucleophile Stelle gebunden wird. Der Austausch kann bei polaren Gruppen wie Alkoholen, Carbonsäuren, Thiolen, Aminen oder auch Amidinen stattfinden [20]. Die Reaktionstypen lassen sich anhand der eingeführten Gruppen unter anderen in Alkylierung, Silylierung und Acylierung unterteilen.

Werden im Rahmen einer Derivatisierung Alkylgruppen in ein Molekül eingebracht, so spricht man dabei von einer Alkylierung. Charakterisieren lässt sich die Alkylierung durch den Alkyltyp (z. B. Methylierung oder Ethylierung) oder die Art des Atoms, an dem die Alkylgruppe bindet (z. B. O-Alkylierung, N-Alkylierung, S-Alkylierung). Die Methylierung wird frequent bei Verbindungen mit mehreren funktionellen Gruppen eingesetzt und bildet sehr stabile Derivate [21]. Diese Form der Derivatisierung wird in der Literatur bei den hier betrachteten Substanzen vernachlässigt, sollte der Vollständigkeit halber aber genannt sein.

Eine ebenfalls weniger populäre Derivatisierungstechnik stellt die Silylierung dar. Hierbei handelt es sich um eine Substitutionsreaktion, bei der nach Reaktionsende eine Alkylsilylgruppe im Molekül vorliegt. Ein Vorteil silylierter Derivate ist, dass die Probe direkt injiziert werden kann, wodurch die Aufarbeitungszeit verringert wird. Ein negativer Aspekt des Silylierungsverfahrens ist, dass die silylierten Verbindungen oft feuchtigkeitsempfindlich sind [21]. Dennoch wird die erfolgreiche Verwendung von N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA, N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide) in [22] beschrieben. Betont wird die Bildung stabiler Derivate, hochmolekularer Fragmente, einem großen Arbeitsbereich sowie einer verlängerten Lebensdauer der verwendeten chromatographischen Säule.

Bei der Acylierung wird eine Acylgruppe in das Molekül eingeführt, wodurch Amine, Alkohole und Thiole in Amide, Ester und Thioelektrolyte umgewandelt werden können. Es gibt drei Haupttypen von Acylierungsmitteln: Anhydride, Acylhalogenide und komplexere Derivate wie

acylierte Imidazole. Dabei ist die Verwendung von Anhydriden wie Essigsäureanhydrid (AA, Acetic anhydride) oder fluorierten Acylreagenzien wie Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA, Trifluoroacetic anhydride), Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA, Pentafluorpropionic anhydride) und Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA, Heptafluorobutyric anhydride) häufig für den Nachweis von Amphetaminen beschrieben [23, 24, 19, 25]. Der Vorteil halogenierter Derivate liegt in einem sehr spezifischen Fragmentierungsmuster resultierend aus den gebildeten Ionen mit hohem m/z-Wert. Nachteilig ist jedoch die gegebenenfalls notwendige Entfernung des Acylierungsmittels zur Verhinderung einer sekundären Derivatisierung, welche durch die Injektion am Gaschromatographen hervorgerufen werden kann [21]. Darüber hinaus bergen derlei halogenierte Verbindungen per se ein erhöhtes Gefährdungspotential in sich. Eine generelle Empfehlung des zu verwendenden Acylierungsmittels kann nicht gegeben werden, kommen unterschiedliche Arbeitsgruppen doch zu verschiedenen Ergebnissen.

In [23] wird PFPA, HFBA, AA, TFA und N-Methyl-bis-trifluoroacetamid (MBFTA, N-Methyl-bis-trifluoroacetamide) für die Derivatisierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDA und MDEA miteinander verglichen. Hinsichtlich Signal-Rausch-Verhältnis, absoluter Peakflächen, relativer Standardabweichung, Linearität, Nachweisgrenze und Selektivität schneidet AA als das am besten geeignete Derivatisierungsmittel ab. Entgegen dem wird in [26] und [25] PFPA unter Berücksichtigung der dort beschriebenen Validationsparameter empfohlen. Hier nicht weiter erwähnte, aber dennoch zu berücksichtigende Derivatisierungsparameter sind Temperatur und Zeit, welche es individuell zu ermitteln gilt. Die chemische Struktur der im Text erwähnten Reagenzien und deren Reaktion mit Amphetamin ist in Abbildung 6 zu finden.

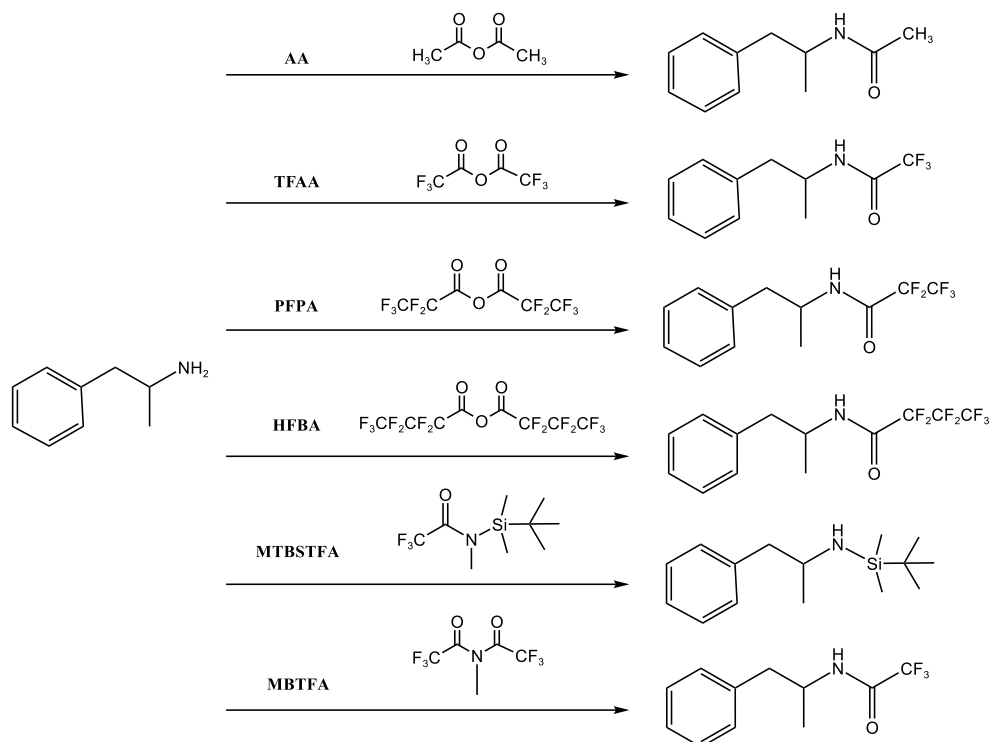


Abbildung 6: Reaktion von Amphetamin mit ausgewählten Derivatisierungsmitteln

## 2.4 Optimierung des bestehenden Verfahrens

Die hier validierte Methode sollte die bisher zur Quantifizierung verwendete nicht nur ersetzen, sondern wesentlich reformieren. Dabei galt es insbesondere den Extraktionsprozess zu verbessern, dabei ein geringeres Probenvolumen einzusetzen und deutlich niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erreichen. Die methodische Optimierung fand bereits im Vorfeld der Erstellung dieser Arbeit statt. Dennoch sollen die entscheidenden Schritte hier erläutert werden.

In der bis dato durchgeführten Methode wurden die Analyten via Festphasenextraktion von Matrixkomponenten getrennt. Der Nachteil dieser Verfahrensweise lag zum einen in den hohen Kosten der verwendeten Säulen als auch die große Menge an Elutionslösungsmittel und dessen anschließender, sehr zeitaufwendigen Entfernung. Die erfolgreiche Eliminierung dieser Punkte sollte durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion realisiert werden. Die in der Literatur [5, 19] beschriebene und durch eigene Experimente bestätigte erfolgreiche Extraktion mit Hilfe von Ethylacetat beschrieb die erste wesentliche Verbesserung des hier validierten Verfahrens.

Die Substitution des bislang verwendeten Derivatisierungsmittels sollte eine weitere darstellen. Neben dem bislang eingesetzten Reagenz (TFAA) wurde vor allem PFPA in aktuellen Publikationen [19, 25, 26] propagiert. Zum Vergleich wurden die Analyten unter identischen Bedingungen derivatisiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Hierbei wurden auch die erhaltenen Massenspektren (Beispielhaft in Abbildung 7) so vorhanden mit Literaturdaten abgeglichen und auf Plausibilität geprüft.

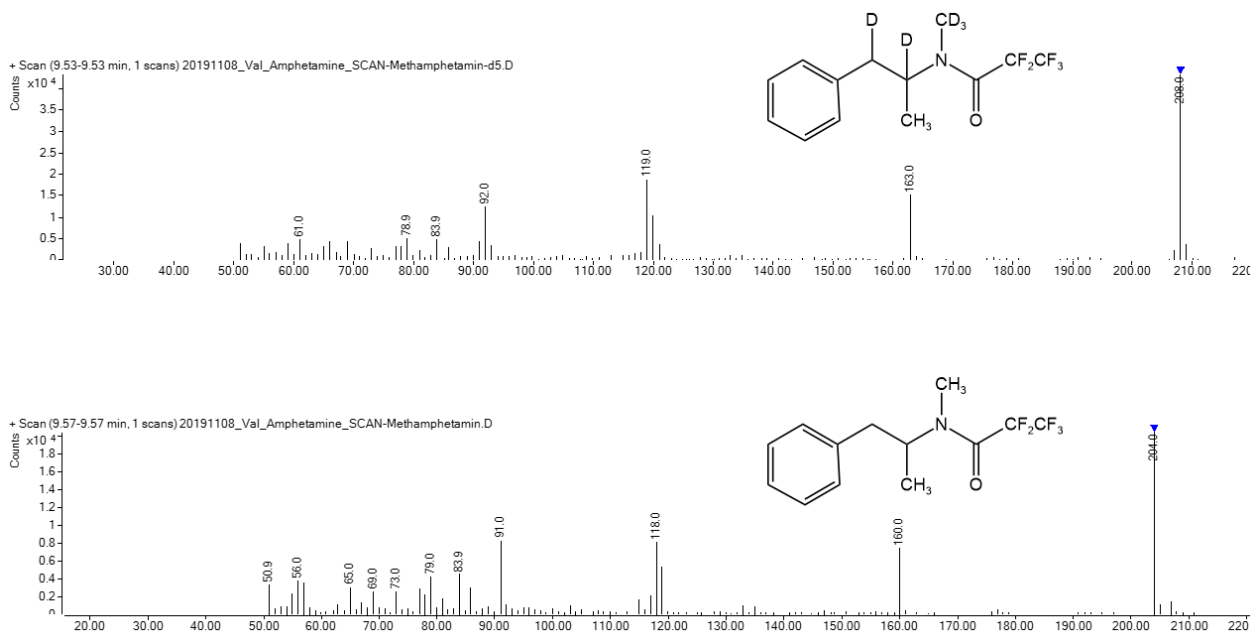


Abbildung 7: Massenspektrum von Methamphetamin / -d5 nach PFPA-Derivatisierung

Eine bessere chromatographische Trennung sowie gesteigerte Analytsignale bestätigten die zu bevorzugenden Hinweise hinsichtlich des Einsatzes von PFPA. Die höhere Empfindlichkeit der PFPA-Derivate erlaubte eine Reduzierung des Probenvolumens unter gleichzeitiger Verbesserung der analytischen Grenzwerte.

Weiterhin konnte der Derivatisierungsprozess, welcher in der Regel sehr zeitintensiv ist, deutlich verkürzt werden. In [21] wird die Reduktion dieses Vorgangs durch mikrowellengestützte Verfahren bereits beschrieben. Die Reaktionszeit von fünf Minuten bei 385 Watt verringerte die bisherige um 25 Minuten.

Unverändert dagegen blieb die Addition von Salzsäure nach dem Extraktionsschritt. Da die Analyten mitunter eine hohe Flüchtigkeit aufweisen, werden diese so von freien Basen in Salze umgewandelt. Dadurch können Verluste während des Eindampfens minimiert werden.

Das neu entwickelte Extraktionsverfahren führte zu einer drastischen Reduzierung des eingesetzten Probenvolumens von 1 auf 0,25 mL. Die Menge an Extraktionspuffer (Natronlauge) wurde um den Faktor acht von 2 auf 0,25 mL verringert. Das Volumen an organischem Lösungsmittel konnte ebenfalls um das sechseinhalbfache vermindert werden. Weiterhin führte der Verzicht der Festphasensäulen zu einer erheblichen Kostenreduzierung. In Tabelle 1 sind abschließend alle relevanten Probenaufarbeitungsschritte beider Methoden aufgeführt.

Tabelle 1: Vergleich der bisherigen und neuen Extraktionsbedingungen

	<b>Methode alt</b>	<b>Methode neu</b>
Serum [mL]	1	0,25
Interner Standard [ $\mu$ L]	250	25
0,1 M NaOH [mL]	2	0,25
Extraktion	<u>Festphase</u> komplette Probe auf Festphasensäule geben und mit 8 mL Ether eluieren	<u>Flüssig-Flüssig</u> mit 1,2 mL Ethylacetat ausschütteln und anschließend zentrifugieren
0,1 M Salzsäure [ $\mu$ L]	50	50
Eindampfschritt	Eluat bei 30°C mit N <sub>2</sub> bis zur Trockne einengen	organische Phase
Derivatisierung	70 $\mu$ L TFAA bei 55°C für 30 Minuten	50 $\mu$ L Ethylacetat und 50 $\mu$ L PFPA bei 385 W für 5 Minuten
weitere Schritte	--	erneut bei 30°C mit N <sub>2</sub> bis zur Trockne einengen und in 60 $\mu$ L Dichlormethan aufnehmen

## 2.5 Analyten – Amphetamin und Derivate

Amphetamin und die Amphetamin-Derivate Methamphetamin, MDMA, MDA, MDEA und MBDB stellen Analoga von Phenylethylamin (Abbildung 8) dar [5]. Durch beispielsweise Substitution eines Protons an der aliphatischen Kette kann dieses leicht in entsprechende Homologe wie Amphetamin überführt werden. Es handelt sich bei diesen Verbindungen um vollsynthetische Feststoffe, die ein hohes Missbrauchspotenzial aufweisen, charakterisiert durch die Eigenschaft, einen zentral stimulierenden Effekt auszulösen sowie mitunter halluzinogene Wirkungsweisen hervorzurufen [27]. Dieser Effekt beruht auf der Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke leicht zu überwinden, die Biotransformation im Gehirn in Teilen zu umgehen und Monoamin-Neurotransmitter aus den Nervenendigungen freizusetzen. Die  $\alpha$ -Methylgruppe verhindert die Oxidation der Aminogruppe durch die Enzyme der Monoaminoxidase und erhöht die Fähigkeit, Membranen zu durchqueren [3]. Darüber hinaus wirken Amphetamine aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Monoamin-Neurotransmittern als konkurrierende Substrate an den Membrantransportern von Noradrenalin, Dopamin und Serotonin, wodurch sie die Wiederaufnahme endogener Neurotransmitter verringern und den umgekehrten Transport endogener Neurotransmitter induzieren [3]. Amphetamine fördern auch die Freisetzung von Dopamin und Serotonin aus den Speicherbläschen und verhindern die Aufnahme in die Bläschen, wodurch die zytoplasmatischen Konzentrationen der Neurotransmitter erhöht werden und sie leichter für den umgekehrten Transport verfügbar sind [3].

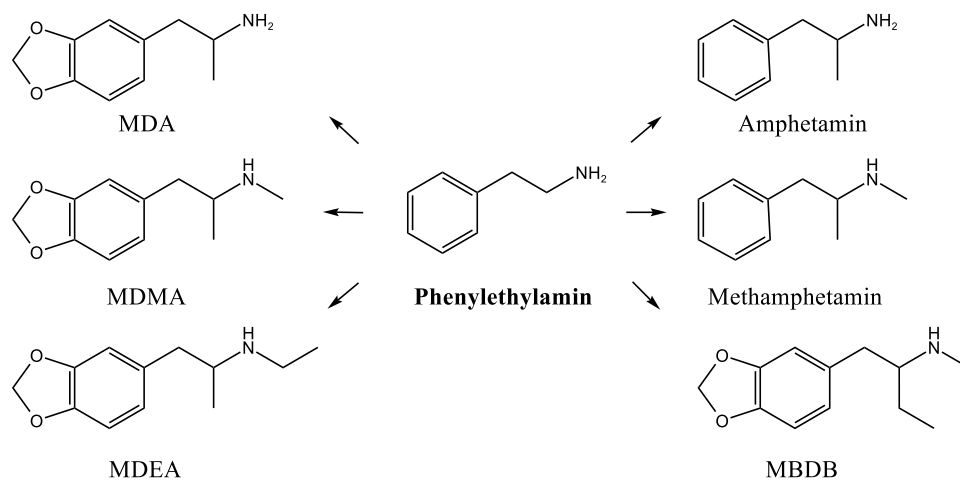


Abbildung 8: Struktur der sechs Phenethylaminderivate (verändert nach [5])



## 2.5.1 Amphetamin

Amphetamin erstmalig 1887 synthetisiert, ist eine niedermolekulare, lipophile und schwache Base. Ursprünglich entwickelt als Medikament für die Behandlung von Adipositas, Narkolepsie und Hypotonie wird diese Verbindung aufgrund aufputschender und euphorisierender Effekte häufig missbräuchlich konsumiert [1]. Sie ist weiterhin unter dem Straßennamen Speed bekannt. Amphetamin besitzt ein chirales Zentrum und liegt somit in zwei optisch aktiven Formen als L- und D-Isomer vor, wobei das D-Isomer eine drei bis vierfach größere zentral stimulierende Aktivität aufweist. Amphetamin wird hauptsächlich zu Phenylaceton desaminiert (Abbildung 9), welches wiederum zu Benzoesäure oxidiert und unter anderem als Glucuronid ausgeschieden wird. Der Anteil des im Urin unverändert vorzufindenden Amphetamins ist stark pH-abhängig. Unter sauren Bedingungen können bis zu 74 % unverändert vorliegen, hingegen fällt der Anteil auf bis zu 1 % im basischen Milieu. Darüber hinaus ist Amphetamin ein Metabolit vieler weiterer Substanzen wie beispielsweise Metamphetamin [1]. Bei Konsumeinheiten von 10 – 100 mg liegen im Blut Konzentrationen von 0,2 mg/L vor, wobei die Halbwertszeit zwischen 4 – 30 Stunden beträgt. [28]. Der Beleg für einen Missbrauch erfolgt über die Bestimmung von Amphetamin.

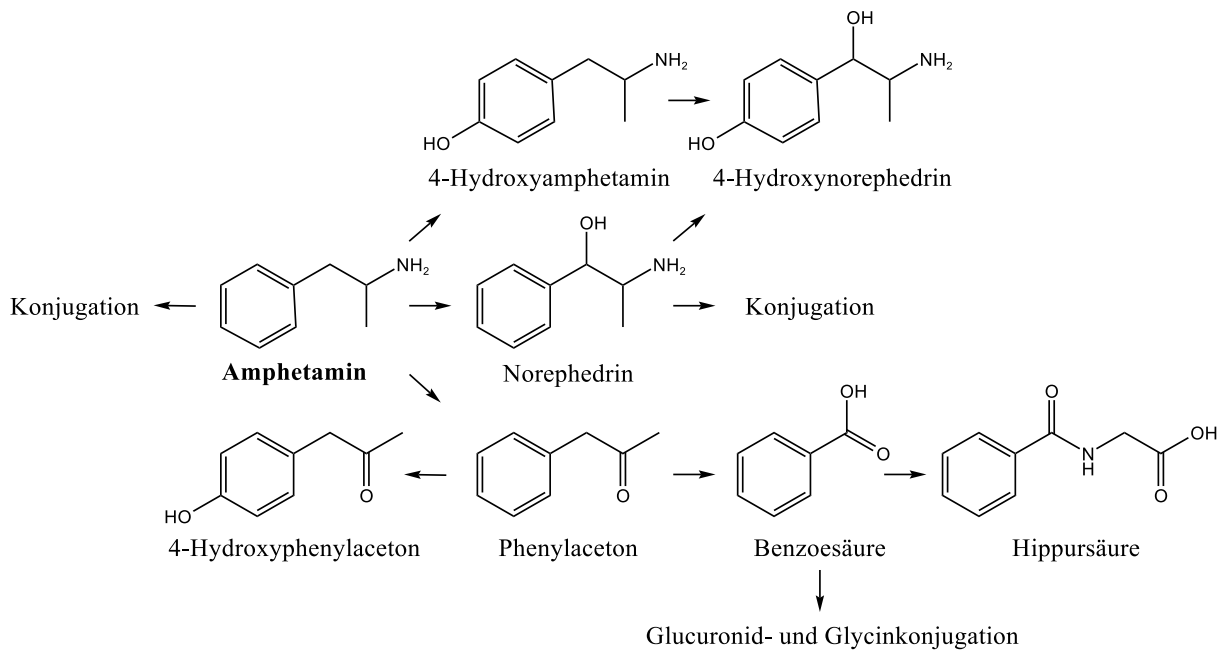


Abbildung 9: Metabolismus von Amphetamin (verändert nach [1, 29])

## 2.5.2 Methamphetamin

Methamphetamin ist ein N-Methylderivat von Amphetamin und wurde 1919 zum ersten Mal synthetisch hergestellt. Wie Amphetamin liegt auch Methamphetamin in zwei optisch aktiven Formen vor. Das D-Isomer wird zur Therapie von Adipositas eingesetzt. Die L-Form ist in einigen nicht verschreibungspflichtigen Inhalatoren aufgrund seiner abschwellenden Wirkung enthalten [1]. Das Racemat als auch das D-Isomer ist als missbrauchsrelevante Verbindung unter dem Namen Crystal Meth bekannt und stellt die weltweit zweithäufigst illegal konsumierte Droge dar [30]. Der Konsum von niedrigen bis moderaten Dosen (5 – 30 mg) führt unter anderem zu einer verminderten Müdigkeit, Euphorie und wird durch eine positive Stimmung begleitet. Methamphetamin wird multipel verstoffwechselt und unter anderem via N-Demethylierung zu Amphetamin abgebaut (Abbildung 10). Ähnlich Amphetamin verändert der im Urin vorliegende pH-Wert auch hier die Ausscheidungsraten der unveränderten Substanz deutlich [1]. Die Substanz wird intravenös, intranasal, oral aber auch durch Rauchen eingenommen. Im Blut treten dabei Werte von 0,2 mg/L auf, wobei die Konzentration des Metaboliten Amphetamin in etwa 10 % der Methamphetaminkonzentration entspricht. Die Halbwertszeit variiert zwischen 4 – 30 Stunden [28].

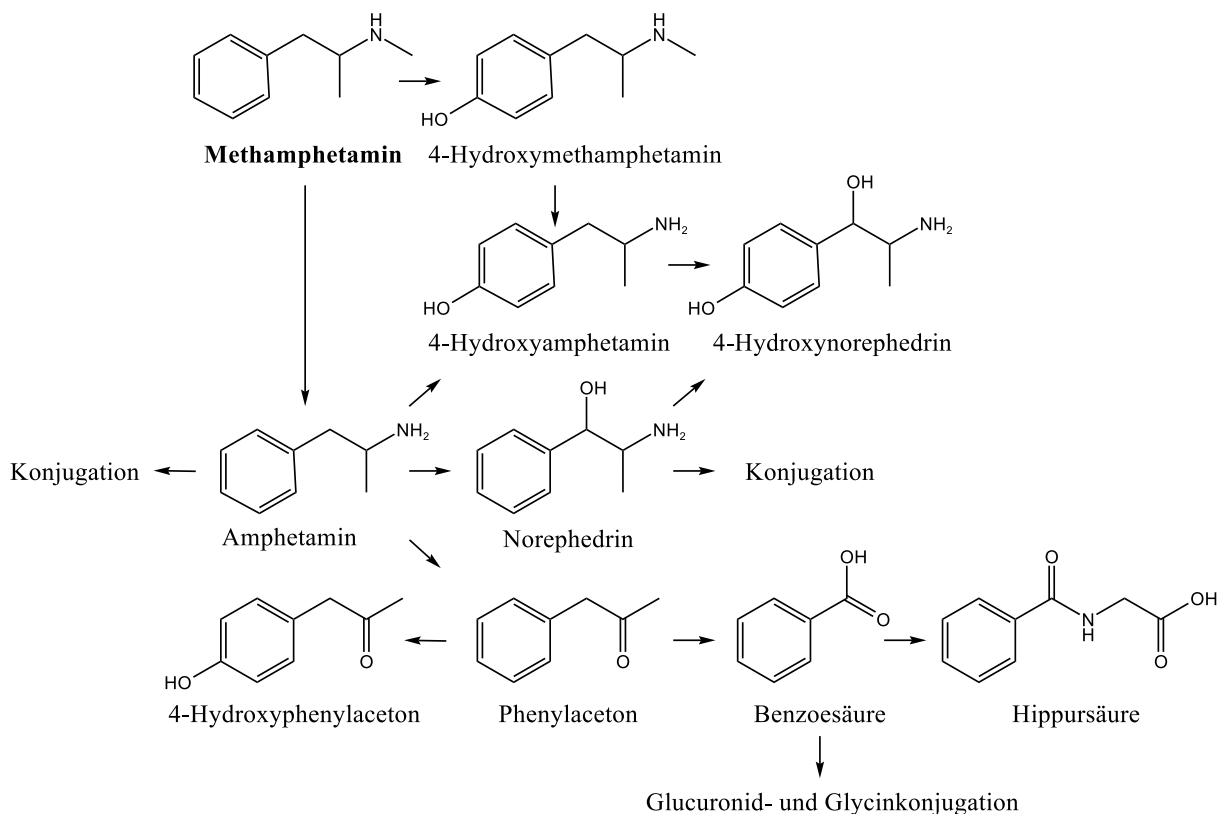


Abbildung 10: Metabolismus von Methamphetamin (verändert nach [1, 29])

### 2.5.3 MDMA

MDMA, besser bekannt als Ecstasy oder XTC, ist ein ringsubstituiertes Derivat von Methamphetamin, welches seit dem 1. August 1986 dem Betäubungsmittelgesetz unterliegt. „Die Substanz ist heute besonders in Szenen der elektronischen Musik verbreitet und ist als klassische Partydroge bekannt“ [31]. MDMA weist entaktogene Eigenschaften auf und führt unter anderem zu einer Steigerung von Euphorie, Liebesgefühlen und Kommunikation. Seine sympathomimetischen Wirkungen zeigen sich auch in Form von einem Anstieg der Herz-Kreislauf-Parameter als auch Mundtrockenheit und Appetitlosigkeit [32]. MDMA wird unter anderem via N-Demethylierung zu MDA und durch Spaltung der Methylenbrücke zu Mono- und Dihydroxyderivaten metabolisiert (Abbildung 11), die anschließend konjugiert werden [1]. In Dosen von 50 – 250 mg werden Blutspiegel von 0,3 mg/L erreicht. Die Halbwertszeit beträgt acht Stunden [28]. Der Nachweis im Blut erfolgt über die Bestimmung von MDMA und MDA.

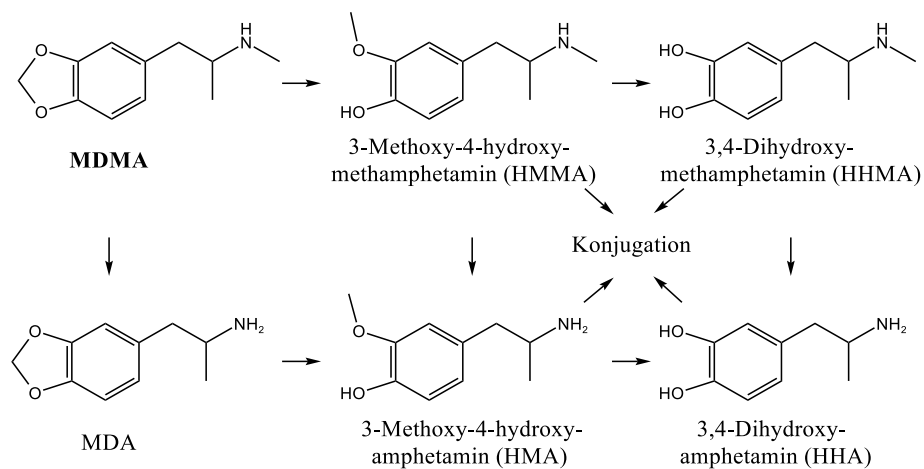


Abbildung 11: Metabolismus von MDMA (verändert nach [1])

## 2.5.4 MDA

MDA ist ein Amphetamin-Derivat mit psychotropen Eigenschaften, welches erstmalig 1910 synthetisiert wurde [1]. Berichte deuten darauf hin, dass es eine ähnliche sozialemotionale Wirkung wie MDMA hervorruft. Weiterhin führt der Konsum zu einem Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck und erhöht die Cortisol- als auch Prolaktinkonzentration [33]. MDA wird über O-Dealkylierung, Deaminierung und Konjugation verstoffwechselt (Abbildung 12). Die Substanz wird in Dosen von 50 – 250 mg oral und intravenös eingenommen [1]. Es ergeben sich Spiegel von 0,2 mg/L für MDA und 0,09 mg/L für den Hauptmetaboliten HMA (3-Methoxy-4-hydroxy-amphetamin). Die Halbwertszeit von MDA beträgt zehn Stunden [33].

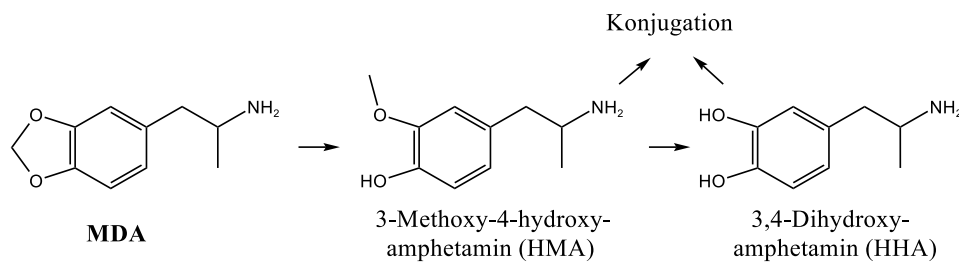


Abbildung 12: Metabolismus von MDA (verändert nach [1])

## 2.5.5 MDEA

MDEA, verbreitet unter dem Namen Eve zeigt eine große chemische Ähnlichkeit zu MDMA auf. Beide Substanzen unterscheiden sich lediglich durch eine Methyl – beziehungsweise Ethylgruppe am Stickstoffatom. Wie MDMA weist auch diese Verbindung entaktogene Eigenschaften auf und findet aufgrund halluzinogener Wirkweisen als illegale Droge große Bedeutung [1]. Aufgrund der strukturellen Nähe zu MDMA wundert es nicht, dass auch hier, jedoch durch N-Deethylierung MDA als Metabolit auftritt (Abbildung 13). Nach der Einnahme von 50 – 200 mg werden Konzentrationen von bis zu 0,5 mg/L erwartet [28].

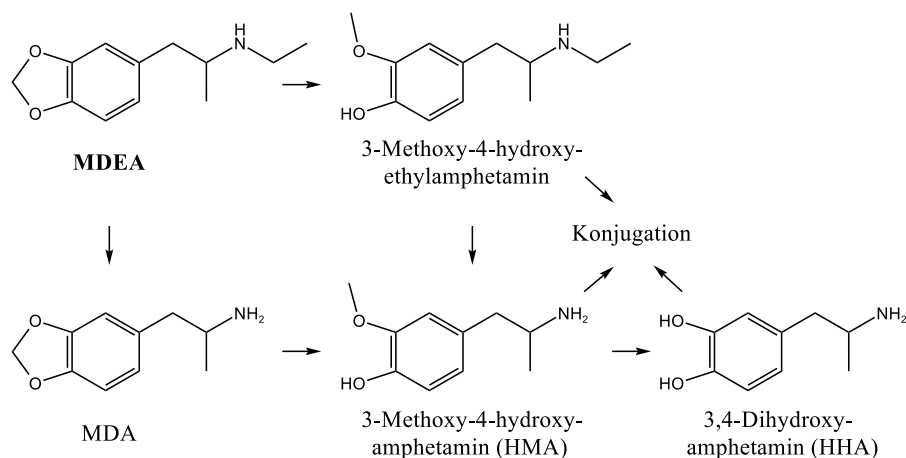


Abbildung 13: Metabolismus von MDEA (verändert nach [1])

## 2.5.6 MBDB

MBDB ist ein MDMA-Analog das sich durch eine Butylkette am aromatischen System unterscheidet und als weniger potent beschrieben wird. Es wurde 1986 erstmalig synthetisiert und findet eine Einstufung als missbrauchsrelevante Substanz. Der im Urin auftretende Hauptmetabolit BDB (3,4-(Methylenedioxyphenyl)-2-butanamin) ist die Folge einer N-Dealkylierung (Abbildung 14), wobei der Beleg für einen Konsum über die Muttersubstanz MBDB im Blut erfolgt. Die Substanz wird in Tablettenform in Dosen von 50 – 200 mg peroral eingenommen [1]. Dabei werden Blut- beziehungsweise Plasmaspiegel von bis zu 0,5 mg/L erreicht [28].

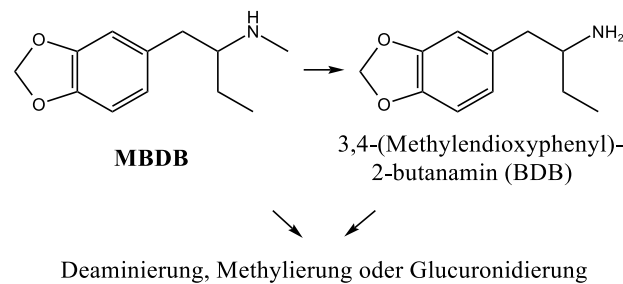


Abbildung 14: Metabolismus von MBDB (verändert nach [1])

## 2.6 Validierung – Prüfparameter

Der Begriff Validierung beschreibt die Prüfung auf Gültigkeit und Richtigkeit eines Verfahrens, dass zuverlässig und reproduzierbar im Rahmen definierter Bedingungen das prognostizierte Ergebnis liefert [34]. Somit dient die Validierung einer analytischen Methode im forensisch-toxikologischen Bereich der Erhebung rechtssicherer Ergebnisse und schafft darüber hinaus die Möglichkeit, Analyseergebnisse zu vergleichen und zu bewerten. Weiterhin kann die Eignung eines Analyseverfahrens für seinen Bestimmungszweck nachvollziehbar belegt werden [34]. Der Umfang einer Validierung kann dabei recht unterschiedlich sein. Handelt es sich um eine einzige Anforderung beziehungsweise um eine sehr seltene, so kann der Validierungsaufwand stark reduziert oder aber alternative Verfahren wie die Standardadditionsmethode Anwendung finden [35]. Sollte das entsprechende Verfahren jedoch gehäuft in Anspruch genommen werden, so gilt es eine Methodvalidierung durchzuführen. Obwohl der Umfang einer Validierung prinzipiell im Ermessen des Analytikers liegt und verschiedene Richtlinien existieren wie der US Food and Drug Administration (FDA) [36], der European Medicines Agency (EMA) [37] oder der Scientific Working Group of Forensic Toxicology (SWGTOX) [38], stellt im deutschsprachigen Raum des forensisch-toxikologischen Bereiches die Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) die Rahmenbedingungen einer solchen [8]. Diese beinhaltet die Prüfung verschiedener Verfahren wie Selektivität, Linearität der Kalibration, Genauigkeit, Stabilität, Analytische Grenzen und Wiederfindung. Wenngleich die Auswertung der einzelnen Experimente in dieser Bachelorarbeit weitestgehend mit Hilfe des Programmes Valistat [39] durchgeführt wurde, soll in einem späteren Kapitel der mathematische Ursprung der einzelnen Prüfpunkte aufgeführt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Die zur Probenaufarbeitung verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Chemikalien mit Herstellerangabe

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Methanol	Sigma-Aldrich
Ethylacetat	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	Carl Roth
Natronlauge 1 M	Carl Roth
Salzsäure 0,1 M in Isopropanol	Dr. K. Holborn & Söhne
Pentafluorpropionsäureanhydrid	ChemCruz

In Tabelle 3 sind die Referenzsubstanzen zur Herstellung der Stammlösungen, Kalibratoren und des internen Standards abgebildet. Alle Substanzen wurden über die Firma Cerillant bezogen und lagen in Methanol vor.

Tabelle 3: Referenzsubstanzen

<b>Analyt</b>	<b>Konzentration [mg/mL]</b>
Amphetamin-d5	1,0
Amphetamin	1,0
Methamphetamin-d5	1,0
Methamphetamin	1,0
MDMA-d5	1,0
MDMA	1,0
MDA-d5	1,0
MDA	1,0
MDEA-d5	1,0
MDEA	1,0
MBDB-d5	0,1
MBDB	1,0

##### 3.1.2 Matrixproben

Für die Experimente zur Bestimmung der Prüfparameter Selektivität oder auch Linearität musste analytfreie Matrix vorliegen. Bei dem verwendeten Serum handelte es sich um Restprobenmaterial, welches randomisiert und anonym Blutproben entnommen wurde. Die Blutproben stammten von Personen, die von der Polizei untersucht wurden und bei denen der Verdacht auf einen Betäubungsmittelkonsum bestand. Diese wurden vor Gebrauch einer Analyse auf Interferenzen und Abwesenheit der Analyten unterzogen und bis zur Anwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.3 Kontrollproben

Die Nutzung von externem Kontrollmaterial bietet zahlreiche Vorteile. Der möglicherweise wichtigste liegt in der Fähigkeit, die gespikete Konzentration eines Analyten in einer Probe zu prüfen. Um dies zu gewährleisten, wurden für die Experimente Linearität der Kalibration und Genauigkeit, die in Tabelle 4 aufgeführten Qualitätskontrollproben verwendet.

Tabelle 4: Analytkonzentration der verwendeten Kontrollproben

Analyt	Medichem DOA-I S low Charge: GG121	Medichem DOA-I S mid Charge: GG121	ACQ Science DCT-C SE Charge: 20030917208
	Konzentration [ng/mL]	Konzentration [ng/mL]	Konzentration [ng/mL]
Amphetamin	25,2	90,4	501
Methamphetamin	25,2	90,4	505
MDMA	25,1	90,7	501
MDA	25,2	60,4	504
MDEA	25,1	90,8	499
MBDB	25,1	60,5	501

### 3.1.4 Stammlösungen

Die benötigten Stammlösungen (SL) lagen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,001 mg/mL. Die entsprechenden Volumina an Referenzmaterial beziehungsweise notwendigen Verdünnungsschritte sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Ansatz zur Herstellung der Stammlösungen

Analyt	Konzentration [mg/mL]	SL 0,1 [mg/mL]	SL 0,01 [mg/mL]	SL 0,001 [mg/mL]
		Volumen je Referenz auf 80 µL MeOH [µL]	Volumen SL 0,1 auf 180 µL MeOH [µL]	Volumen SL 0,01 auf 180 µL MeOH [µL]
Amphetamin	1,0	20	20	20
Methamphetamin	1,0	20		
MDMA	1,0	20		
MDA	1,0	20		
MDEA	1,0	20		
MBDB	1,0	20		

### 3.1.5 Interner Standard

Als Interner Standard wurde eine methanolische Lösung der deuterierten Analoga verwendet. Dafür wurde eine Glasschraubflasche mit 99,625 mL Methanol gefüllt und anschließend mit den deuterierten Analoga gespikt. Die Zusammensetzung des internen Standard kann der unten aufgeführten Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Internen Standards

<b>Analyt</b>	<b>Konzentration [mg/mL]</b>	<b>Volumen Referenz [µL]</b>
Amphetamin-d5	1,0	25
Methamphetamin-d5	1,0	25
MDMA-d5	1,0	25
MDA-d5	1,0	25
MDEA-d5	1,0	25
MBDB-d5	0,1	250

### 3.1.6 Testlösung

Um die Messbereitschaft des Systems zu prüfen, wurde vor jeder Probenserie eine Testlösung der Analyten gemessen. Mit dieser können unter anderem die Retentionszeiten bestimmt, die Ionenverhältnisse erfasst und auf eine hinreichende Empfindlichkeit getestet werden. Die Testlösung setzt sich aus 4,895 mL Methanol und den in Tabelle 7 aufgeführten Volumina der entsprechenden Substanzen zusammen.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Testlösung

<b>Analyt</b>	<b>Konzentration Referenz [mg/mL]</b>	<b>Volumen Referenz [µL]</b>
Amphetamin-d5	1,0	5
Amphetamin	1,0	5
Methamphetamin-d5	1,0	5
Methamphetamin	1,0	5
MDA-d5	1,0	5
MDA	1,0	5
MDMA-d5	1,0	5
MDMA	1,0	5
MDEA-d5	1,0	5
MDEA	1,0	5
MBDB-d5	0,1	50
MBDB	1,0	5



## 3.2 Analytische Methode

### 3.2.1 Probenvorbereitung

In einem Reagiergefäß (2 mL) wurden 250 µL Probenmaterial vorgelegt. Anschließend wurden 25 µL Interner Standard hinzugegeben und für fünf Sekunden geschüttelt. Danach wurde 250 µL 0,1 M Natronlauge hinzupipettiert und für 10 Sekunden geschüttelt. Abschließend wurden 1,2 mL Ethylacetat hinzugegeben und für 30 Sekunden geschüttelt. Jetzt wurden die Probe bei 14000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurden 50 µL 0,1 M Salzsäure (in Isopropanol) in einem 1,5 mL Glasschraubfläschchen vorgelegt und danach der komplette organische Überstand überführt und für 20 Minuten bei 30°C mittels Stickstoff vollständig eingengt. Anschließend wurden 50 µL Ethylacetat und 50 µL PFPA hinzugegeben, das Fläschchen mit einem Schraubdeckel verschlossen und für fünf Sekunden geschüttelt. Die Probe wurde dann für fünf Minuten bei 385 W (Programm: Med) in einer Mikrowelle derivatisiert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Schraubdeckel entfernt und der Extrakt für 10 Minuten bei 30°C mittels Stickstoff eingengt. Zum Schluss wurde die Probe in 60 µL Dichlormethan aufgenommen, mit einem Schraubdeckel verschlossen und für fünf Sekunden geschüttelt. Diese 60 µL wurden nun in ein 200 µL Glasinsert überführt, mit einer Bördelkappe verschlossen und in einem Teflon-Glasinsert-Halter eingesetzt. Die Probe konnte jetzt auf dem Autosampler positioniert werden.

### 3.2.2 GC/MS Bedingungen

Die Experimente wurden mit einem GC/MS der Firma Agilent, bestehend aus einem 7890 GC System, 7693 Autosampler und einem 5977A MSD Massenanalysator durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Agilent HP – 5MS Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke). Die weiteren Analysebedingungen sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Geräteeinstellung der validierten Methode

Parameter	Einstellung
Injektionstemperatur	260 °C
MSD Transfer Line	285 °C
Säulenofentemperatur	50 °C
Ofenprogramm	50 °C halten für 1 Minute 13 °C / Minute auf 160 °C 5 °C / Minute auf 250 °C 20 °C / Minute auf 300 °C und anschließend für 1 Minute halten
Post Run	300 °C halten für 2 Minuten
Druck	7,5103 psi
Säulenfluss	1 mL / Minute
Flow Control Mode	Contant Flow
Aufzeichnungsmodus	SIM
Laufzeit	30,9 Minuten
Injektionsvolumen	1 µL

Die zur Identifizierung herangezogenen Ionen wurden durch Injektion der Derivatisierten Reinsubstanzen im SCAN-Modus erhalten (Abbildung 15). Die erhaltenen Massenspektren wurden mit Literaturdaten verglichen und auf Plausibilität hinsichtlich ihrer Fragmentierung überprüft.

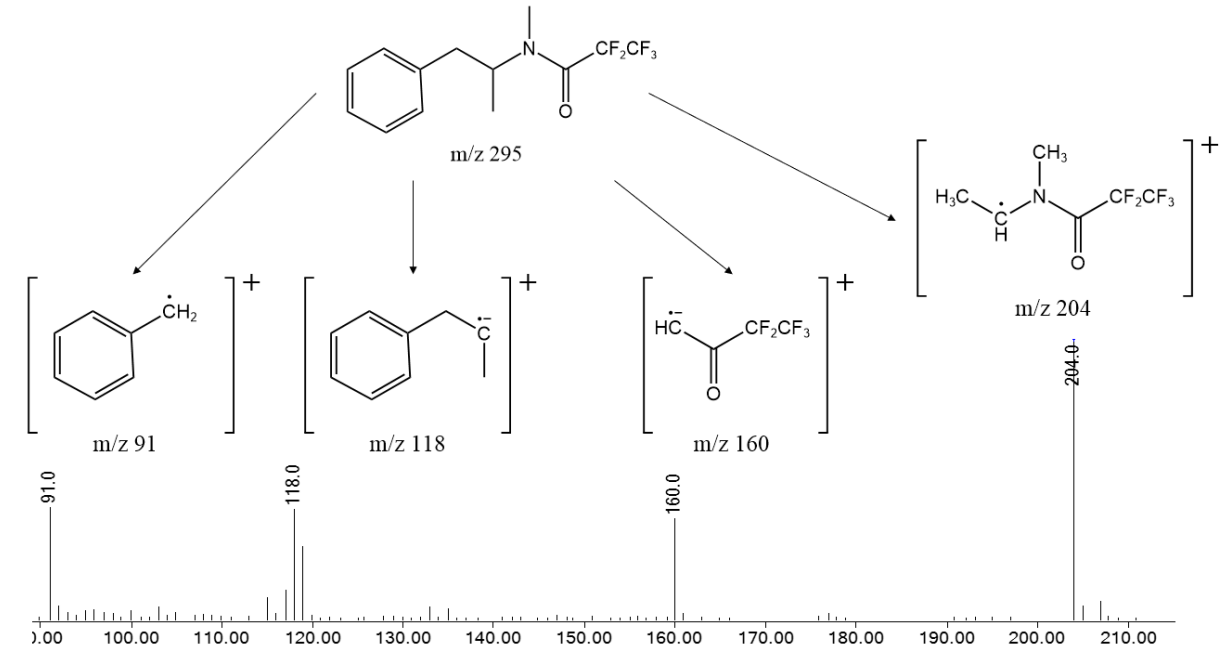


Abbildung 15: Massenspektrum von Methamphetamine-PFP ( gemäß [40])

Die daraus gewonnen Ionen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Ionen zum Nachweis der PFFA-Derivate

Analyt	Target-Ion	Qualifier-Ion 1	Qualifier-Ion 2
Amphetamin-d5	194	123	--
Amphetamin	190	118	117
Methamphetamine-d5	208	163	--
Methamphetamine	204	160	118
MDMA-d5	208	344	--
MDMA	204	339	160
MDA-d5	167	330	--
MDA	162	325	135
MDEA-d5	223	358	--
MDEA	218	353	190
MBDB-d5	222	163	--
MBDB	218	160	353

### 3.2.3 Identifizierungskriterien

Die zweifelsfreie Identifizierung eines Analyten stellt die Basis aller daraus folgenden Erhebungen und muss somit stets gewährleistet sein. In Abhängigkeit des verwendeten analytischen Messinstrumentes und der gewählten Detektionstechnik sind dabei verschiedene Anforderungen zu berücksichtigen. Die hier zu realisierende Validierung wird mit Hilfe einer gaschromatographischen Methode gekoppelt an ein (Quadrupol-)Massenspektrometer durch Elektronenstoßionisation im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) durchgeführt. In diesem Modus wird der Massenanalysator so gesteuert, dass nur die analytisch relevanten Ionen betrachtet werden, welches einen positiven Effekt auf Empfindlichkeit und Peakform hat [9].

Der Abgleich der Retentionszeit eines Analyten aus einer Referenzprobe mit der Retentionszeit aus einer unbekannt Probe wird als eingehendes chromatographisches Identifizierungskriterium verwendet. Da für jede zu validierende Substanz jedoch der deuterierte interne Standard vorliegt, wird die relative Retentionszeit des Analyten im Verhältnis zum internen Standard im Vergleich zu einer Referenzprobe betrachtet. Die zu tolerierende prozentuale Abweichung beträgt  $\pm 1\%$  [41].

Die massenspektrometrische Identifikation erfolgt über die Bestimmung von mindestens drei charakteristischen Ionen für den Analyten respektive zwei für seinen deuterierten internen Standard, wobei die einzelnen Fragmentionen nach Möglichkeit das gesamte Molekül beschreiben sollten. Das in der Regel signalstärkste Ion wird zur Quantifizierung verwendet und folgend als Quantifier bezeichnet. Die beiden weiteren Ionen dienen der Verifizierung und werden als Qualifier betitelt. Alle Signale müssen sich um den Faktor drei vom Untergrund abheben und sollten eine symmetrische Peakform aufweisen [41].

Die finale Identifizierung erfolgt jetzt über das Verhältnis zwischen dem Quantifier und zwei weiteren Qualifiern, wobei das Signal des Quantifiers 100 % entspricht. Auch hier werden die Verhältnisse zum Abgleich einer entsprechenden Referenzprobe entnommen. Die erlaubten Toleranzen sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Toleranzen der relativen Intensitäten von Ionen (verändert nach [41])

<b>relative Ionenintensität [%]</b>	<b>akzeptierte Toleranz [%]</b>
> 50	20
> 20-50	20
> 10-20	25
$\leq 10$	50

### 3.3 Methodenvalidierung

Die regelmäßige Anforderung einer analytischen Methode zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer gegebenen Matrix erfordert eine vollumfängliche Validierung. Das Ausmaß dieser wird durch die Richtlinien der GTFCh festgelegt und umfasst relevante Prüfpunkte wie Selektivität, Linearität der Kalibration, Genauigkeit, Stabilität, Analytische Grenzen und Wiederfindung. Im Folgenden sollen die einzelnen Prüfpunkte erläutert, die zum Bestehen zu erfüllenden Kriterien genannt werden und die theoretisch als dann auch praktisch gegebenenfalls abweichend durchgeführte Bestimmung beschrieben werden.

#### 3.3.1 Selektivität und Spezifität

##### *Erläuterung*

Die Fähigkeit einer Methode, mehrere Analyten parallel, ohne gegenseitige Beeinflussung und auch unter Anwesenheit endogener und / oder exogener Verbindungen störungsfrei und eindeutig zu detektieren, wird als Selektivität bezeichnet. Hingegen beschreibt die Spezifität die Identifizierung eines Analyten oder einer Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in einer Probe vorhandene Komponenten [34].

##### *Kriterien*

Bei keinem der hier durchzuführenden Experimente dürfen keine Störungen in der Nähe des Analyten auftreten [8]. Derlei Matrixbestandteile können zu einer Verfälschung der Peakfläche führen und somit zu fehlerbehafteten Messwerten. Interferenzen dieser Art können zum Beispiel in Form von Co-Eluierenden Peaks auftreten.

##### *Theoretische Bestimmung*

Es müssen mindestens sechs Leerproben (Leermatrix ohne internen Standard) aus zwei verschiedenen Chargen und zwei Nullproben (Leermatrix mit internen Standard) untersucht werden. Weiterhin sollen Leerproben mit in authentischen Proben zu erwartenden Substanzen versetzt und gemessen werden, besser jedoch authentische Proben, die die entsprechenden Verbindungen bereits enthalten. Die Verwendung von authentischem Probenmaterial hat den Vorteil, dass hier möglicherweise nicht kommerziell erhältliche und interferenzverursachende Metaboliten, also aus dem Stoffwechsel resultierende oder im Stoffwechsel umgesetzte Produkte enthalten sind [8].

##### *Praktische Bestimmung*

Es wurden folgende Proben vermessen, um den Einfluss eventueller Störungen durch Matrixkomponenten oder anderer Substanzen festzustellen: zehn verschiedene Serumproben ohne Analyten und ohne Internem Standard, zehn verschiedene Serumproben ohne Analyten und mit Internem Standard, zehn verschiedenen Serumproben mit hohen Konzentrationen der folgenden Substanzen und Substanzklassen: Kokain, Opiate, THC, Methadon und fünf verschiedenen kommerziell erhältlichen Serum Kontrollen (Chromsystems und Recipe) mit hohen Konzentrationen verschiedener Analyten der folgenden Substanzklassen: Antidepressiva, Benzodiazepine, Antiepileptika, Antiarrhythmika, Neuroleptika.

### 3.3.2 Linearität der Kalibration

#### *Erläuterung*

Die Linearität einer Kalibration ist dann gegeben, wenn in einem definierten Konzentrationsbereich eine direkte Proportionalität zwischen dem Analytsignal und der Analytmenge vorzufinden ist. Dieser Bereich muss zwingend den Arbeitsbereich einschließen. Der Arbeitsbereich selbst soll dabei etwaige Entscheidungsgrenzen, therapeutische Bereiche, in jedem Fall aber zu erwartende Konzentrationen von Realproben inkludieren. Das anzuwendende mathematische Modell entspricht einer linearen Regression:

$$y = m \cdot x + n \quad (\text{Gl. 1})$$

[y]            y-Achsenabschnitt (entspricht der Signalgröße)

[m]            Steigung (entspricht der Empfindlichkeit)

[x]            x-Achsenabschnitt (entspricht der Konzentration)

[n]            Achsenabschnitt (entspricht einem Blindwert)

Die sich daraus ergebende Kalibrierfunktion unter Verwendung eines internen Standards lautet wie folgt:

$$\frac{y_A}{y_i} = m \cdot \frac{x_A}{x_i} + n \quad (\text{Gl. 2})$$

[y<sub>A</sub>]            y-Achsenabschnitt des Analyten

[y<sub>i</sub>]            y-Achsenabschnitt des internen Standards

[m]            Steigung (entspricht der Empfindlichkeit)

[x<sub>A</sub>]            x-Achsenabschnitt des Analyten

[x<sub>i</sub>]            x-Achsenabschnitt des internen Standard

[n]            Achsenabschnitt (entspricht einem Blindwert)

#### *Kriterien*

Als Ausreißer werden Messpunkte bezeichnet, die sich numerisch signifikant von den restlichen Messwerten einer Messreihe unterscheiden. Mit Hilfe des **Grubbs-Tests** können diese erkannt werden, wobei zwei Niveaus berücksichtigt werden. Liegt ein Messwert auf dem 95 %-Signifikanzniveau so handelt es sich um einen Straggler. Dieser darf eliminiert werden, wenn die Ursache seiner Abweichung erklärt werden kann. Ist dies nicht der Fall, so darf eine Eliminierung nur erfolgen, wenn der Wert auch auf dem 99 %-Niveau signifikant ist [8]. Die Ermittlung kann folgendermaßen beschrieben werden, wobei die bestimmte Prüfgröße mit Tabellenwerken verglichen wird, die das Signifikanzniveau sowie die Anzahl der Messwerte berücksichtigen:

$$PG = \frac{|x' - \bar{x}|}{s} \quad (\text{Gl. 3})$$

[PG]	Prüfgröße
[x']	Messwert mit der größten Abweichung vom Mittelwert
[ $\bar{x}$ ]	Mittelwert
[s]	Standardabweichung

Ein weiter zu prüfendes Kriterium ist der **Cochran-Test auf Varianzhomogenität**. Dieser untersucht die Homogenität der Varianzen zwischen den Messwerten und den einzelnen Kalibrationspunkten. Bei Nichterfüllung muss der Kalibrationsbereich eingeschränkt oder ein gewichtetes Kalibrationsmodell mit Wichtungsfaktoren herangezogen werden, würden doch die oberen Kalibrationspunkte übermäßig berücksichtigt und die Richtigkeit im unteren Bereich beeinträchtigt [8]. Auch hier wird der ermittelte Wert mit tabellierten Werten verglichen:

$$C_j = \frac{s_j^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (\text{Gl. 4})$$

[ $C_j$ ]	Cochran für die Datenreihe j
[ $S_j$ ]	Standardabweichung der Datenreihe j
[ $S_i$ ]	Standardabweichung der Datenreihe i
[n]	Anzahl der Bestimmungen

Der **F-Test auf Linearität** (Mandeltest) prüft, ob die Anwendung einer quadratischen Regression signifikant besser ist als die einer linearen Regression. Hierfür werden die Quadrate der Reststandardabweichung aus 1. und 2. Ordnung verwendet. Bei Erfüllung kann mit einem linearen Kalibrationsmodell gearbeitet werden [8].

#### *Theoretische Bestimmung*

Hierfür werden wenigstens fünf von Null verschiedene Konzentrationen gewählt und mit Leermatrix versetzt. Dabei gilt, dass der niedrigste Kalibrator größer oder gleich der Bestimmungsgrenze sein muss. Die einzelnen Kalibratoren werden dann sechsmal vermessen [8].

#### *Praktische Bestimmung*

Es wurde eine 10-Punkt-Kalibration mit Kalibratoren aus gespiktem Negativserum in sechsfach Bestimmung für Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDA, MDEA und MBDB verwendet. In Tabelle 11 finden sich die einzelnen Konzentrationen sowie die zu verwendenden Volumen an analytfreien Serum und Stammlösung für Herstellung von je 1 mL Material pro Kalibrator.

Tabelle 11: Volumenangaben zur Herstellung der Kalibrationsgeraden

Kalibrator	Konzentration [ng/mL]	Volumen Serum [µL]	SL [mg/mL]	Volumen SL [µL]
1	10	990	0,001	10
2	15	985	0,001	15
3	20	980	0,001	20
4	50	995	0,01	5
5	70	993	0,01	7
6	150	985	0,01	15
7	300	970	0,01	30
8	600	994	0,1	6
9	800	992	0,1	8
10	1000	990	0,1	10

### 3.3.3 Genauigkeit

Der Begriff Genauigkeit beherbergt systematische und zufällige Fehler. Er stellt einen Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision dar und beschreibt somit das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen einem als wahr angenommenen und dem ermittelten Messwert [34].

#### 3.3.3.1 Richtigkeit

##### *Erläuterung*

Die Abweichung zwischen Mittelwert und Sollwert wird als Richtigkeit bezeichnet [34]. Der Einfluss durch systematischen Fehler auf diese wird als Bias ausgedrückt. Jener beschreibt die Differenz zwischen einem Messergebnis und einem Sollwert mit folgender Gleichung:

$$Bias = \frac{\bar{x} - \mu}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (Gl. 5)$$

[Bias]            systematischer Fehler

[ $\bar{x}$ ]            Mittelwert

[ $\mu$ ]            Sollwert

##### *Kriterien*

Es sind nur Bias-Wert von  $\pm 15\%$  beziehungsweise  $\pm 20\%$  nahe der Bestimmungsgrenze zu tolerieren [8].

### *Theoretische Bestimmung*

Aus so verfügbar kommerziellen Kontrollen bei nicht weniger als zwei, besser drei Konzentrationen, die den gesamten Kalibrationsbereich abdecken, müssen Aliquote (Teilproben der Gesamtprobe) gebildet und unter Gewährleistung der Stabilität entsprechend gelagert werden. Die hergestellten Qualitätskontrollproben werden jetzt zumindest in Doppelbestimmung an nicht weniger als acht Tagen analysiert [8].

### *Praktische Bestimmung*

Für die Ermittlung wurden drei kommerziell erhältliche Serum-Kontrollproben (Medichem, ACQ Science) eingesetzt. Die Messungen für jede der drei Kontrollproben wurde in sechsfach an Tag eins und dreifach Bestimmungen Tag zwei bis acht an verschiedenen Werktagen von derselben Person an einem Gerät durchgeführt (jeweils  $n = 27$ ) und wurden mit einer Mehrpunkt-Kalibration ausgewertet.

#### **3.3.3.2 Präzision**

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung von Analysenergebnissen um einen Mittelwert. Sie dient somit der Beschreibung zufälliger Fehler [34]. Es existieren verschiedene Arten der Präzisionsbestimmung wie Vergleichspräzision, Wiederholpräzision oder Laborpräzision. Bei der hier durchgeführten Validierung werden jedoch nur die beiden zuletzt genannten erfasst. Die Präzision kann mit Hilfe der Standardabweichung beziehungsweise relativen Standardabweichung wie folgend ausgedrückt werden:

$$s_{rel} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Gl. 6})$$

$$s_{rel} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \quad (\text{Gl. 7})$$

$[s_{rel}]$	relative Standardabweichung
$[s]$	Standardabweichung
$[\bar{x}]$	Mittelwert
$[n]$	Anzahl der Bestimmungen
$[x_i]$	Messwert der i-ten Bestimmung



### 3.3.3.2.1 Wiederholpräzision

#### *Erläuterung*

Die Wiederholpräzision wird durch die Verwendung derselben Methode, an einem Gerät, durch einen Analytiker, mit identischem Probenmaterial innerhalb eines kurzen Zeitintervalles erfasst [34]. Berechnet werden kann diese unter Zuhilfenahme der Wiederholvarianz folgendermaßen [8]:

$$RSD_r = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 8})$$

$$RSD_r = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_i)^2}{p \cdot (n-1)}}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 9})$$

$[RSD_r]$	Wiederholpräzision
$[s_r]$	Wiederholvarianz
$[\bar{x}]$	Mittelwert
$[p]$	Anzahl der Tage
$[n]$	Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag
$[x_{ik}]$	k-te Bestimmung am i-ten Tag
$[\bar{x}_i]$	Mittelwert der n Bestimmungen am i-ten Tag

#### *Kriterien*

$RSD_r$ -Werte von  $\leq 15\%$  respektive  $\leq 20\%$  an der Bestimmungsgrenze sind akzeptabel [8].

#### *Theoretische Bestimmung*

Die Wiederholpräzision wird parallel im Experiment zur Bestimmung der Richtigkeit ermittelt.

#### *Praktische Bestimmung*

Die praktische Bestimmung muss wie die theoretische Bestimmung nicht separat durchgeführt werden und wird ebenfalls bereits im Kapitel Richtigkeit erläutert.

### 3.3.3.2.2 Laborpräzision (tagesverschieden)

#### *Erläuterung*

Die Laborpräzision ähnelt der Wiederholpräzision sehr stark, erlaubt jedoch die Variation eines Parameters wie Analytiker oder Gerät. Bei der hier durchzuführenden tagesverschiedenen Laborpräzision wird jedoch nur die Zeit, das heißt der Tag der Analyse verändert [8]. Die mathematische Beschreibung erfolgt durch folgende Gleichung:

$$RSD_T = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 10})$$

$$RSD_T = \frac{\sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{p-1} - \frac{s_r^2}{n}\right) + s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 11})$$

$[RSD_T]$	tagesverschiedene Laborpräzision
$[s_t]$	Varianz zwischen den Tagen
$[s_r]$	Wiederholvarianz
$[\bar{x}]$	Mittelwert
$[\bar{x}_i]$	Mittelwert der n Bestimmungen am i-ten Tag
$[p]$	Anzahl der Tage
$[n]$	Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag

#### *Kriterien*

$RSD_T$ -Werte von  $\leq 15\%$  respektive  $\leq 20\%$  an der Bestimmungsgrenze gelten als akzeptabel [8].

#### *Theoretische Bestimmung*

Analog der Wiederholpräzision wird auch die Laborpräzision im Experiment zur Bestimmung der Richtigkeit ermittelt.

#### *Praktische Bestimmung*

Erneut kann auch hier auf die praktische Bestimmung der Richtigkeit verwiesen.

### 3.3.3.2.3 Gemeinsames Akzeptanzintervall für Bias und Präzision

#### Erläuterung

Die unter Richtigkeit (Bias) und Laborpräzision ( $RSD_T$ ) bestimmten Werte werden in Kombination als 95 %  $\beta$ -Toleranzintervall ausgedrückt. Der folgende Zusammenhang gilt nur, wenn die Anzahl der Wiederholbestimmungen für alle Tage gleich ist [8]:

$$L_u = Bias - t_{f;0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B^2}} \cdot RSD_T \quad (\text{Gl. 12})$$

$$L_o = Bias + t_{f;0,975} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot B^2}} \cdot RSD_T \quad (\text{Gl. 13})$$

$$f = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{p \cdot n}} \quad (\text{Gl. 14})$$

$$R = \frac{s_t^2}{s_r^2} \quad (\text{Gl. 15})$$

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{n \cdot R+1}} \quad (\text{Gl. 16})$$

$[L_u]$	untere Grenze des 95 % $\beta$ -Toleranzintervall
$[L_o]$	obere Grenze des 95 % $\beta$ -Toleranzintervall
$[Bias]$	systematischer Fehler
$[t_{f;0,975}]$	97,5 %-Perzentil der t-Verteilung bei f Freiheitsgraden
$[p]$	Anzahl der Tage
$[n]$	Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag
$[B]$	Hilfsgröße zur Berechnung des 95 % $\beta$ -Toleranzintervall
$[f]$	Anzahl der Freiheitsgrade
$[RSD_T]$	tagesverschiedene Laborpräzision
$[R]$	Hilfsgröße zur Berechnung der Anzahl der Freiheitsgrade
$[s_t]$	Varianz zwischen den Tagen
$[s_r]$	Wiederholvarianz

#### Kriterien

Das 95 %  $\beta$ -Toleranzintervall darf innerhalb eines Akzeptanzintervalls von  $\pm 30$  % beziehungsweise  $\pm 40$  % nahe der Bestimmungsgrenze liegen [8].

### *Theoretische Bestimmung*

Die Bestimmung der einzelnen Größen sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

### *Praktische Bestimmung*

Für die Bestimmung des 95 %  $\beta$ -Toleranzintervall bedarf es abermals keinem eigenständigen Experiment.

## **3.3.4 Analytische Grenzen**

Zur Charakterisierung der Empfindlichkeit eines analytischen Verfahrens gehören Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze. Da die Richtlinien der GTFCh [8] nur die Nachweis- und Bestimmungsgrenze vorsieht, wird die Erfassungsgrenze nicht ermittelt.

### **3.3.4.1 Nachweisgrenze**

#### *Erläuterung*

Die Konzentration eines Analyten in einer Probe, bei der die Nachweiswahrscheinlichkeit 50 % beträgt, diesen unter Einhaltung von Identifizierungskriterien und mit einer definierten statistischen Aussagesicherheit qualitativ sowie unterscheidbar von einer Nullprobe nachzuweisen wird als Nachweisgrenze (LOD , Limit of Detection) bezeichnet. Die Bestimmung dieser kann über das Signal-Rausch-Verhältnis oder nach DIN 32645 [42] erfolgen, wobei letztere Anwendung findet [8]:

$$X_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (\text{Gl. 17})$$

$[X_{NG}]$	Nachweisgrenze
$[s_{x_0}]$	Verfahrensstandardabweichung
$[t_{f,\alpha}]$	Quantil der t-Verteilung
$[m]$	Anzahl der Messungen
$[n]$	Anzahl der Kalibrationsniveaus
$[\bar{x}]$	Mittelwert
$[Q_x]$	Summe der Abweichungsquadrate
$[\alpha]$	Signifikanzniveau (Fehler 1. Art, $\alpha = 0,1$ )

### *Kriterien*

Grundlegend ist zu prüfen, ob die ermittelte Nachweisgrenze hinreichend niedrig ist, um den Bestimmungszweck der Methode zu erfüllen. Weiterhin muss eine eindeutige Identifizierung gewährleistet sein [8].

### *Theoretische Bestimmung*

Es müssen zumindest fünf Kalibratoren durch Aufstocken von Leermatrix hergestellt werden. Die Konzentrationsniveaus sollten dabei äquidistant und im Bereich der erwarteten Nachweisgrenze liegen. Weiterhin darf die Konzentration des höchsten Kalibrators maximal das Zehnfache der errechneten Nachweisgrenze sein. Es erfolgt eine Einfachbestimmung. Die erhaltenen Peakflächenverhältnisse aus Analyt und internen Standard des schwächsten Ions werden gegen die Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen. Die Nachweisgrenze wird über eine lineare Regression bestimmt [8].

### *Praktische Bestimmung*

Mit Referenzmaterial wurde Negativpoolserum mit den Analyten in äquidistanten Konzentrationen angesetzt und in einfach Bestimmung analysiert, dabei wurden 20 Punkte mit folgenden Konzentrationen gewählt: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ng/mL.

## **3.3.4.2 Bestimmungsgrenze**

### *Erläuterung*

Mit einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 100 % und unter Einhaltung der Kriterien zur Bestimmung der Nachweisgrenze stellt die Bestimmungsgrenze (LOQ, Limit of Quantification) die Konzentration eines Analyten in einer Probe dar, ab der quantitative Aussagen getroffen werden können. Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze kann anhand von Bias- und Präzisionsdaten oder nach DIN 32645 [42] erfolgen, wobei hier die Erfassung nach DIN vorgesehen ist:

$$X_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{NG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad (\text{Gl. 18})$$

$[X_{BG}]$	Bestimmungsgrenze
$[k]$	relative Ergebnissunsicherheit ( $k = 3$ )
$[s_{x_0}]$	Verfahrensstandardabweichung
$[t_{f,\alpha}]$	Quantil der t-Verteilung
$[m]$	Anzahl der Messungen
$[n]$	Anzahl der Kalibrationsniveaus
$[\bar{x}]$	Mittelwert

$[Q_x]$	Summe der Abweichungsquadrate
$[\alpha]$	Signifikanzniveau (Fehler 1. Art, $\alpha = 0,01$ )
$[\beta]$	Wahrscheinlichkeit (Fehler 2. Art)
$[X_{NG}]$	Nachweisgrenze

#### *Kriterien*

Es liegen identische Kriterien wie bei der Bestimmung der Nachweisgrenze vor. Ferner gilt, dass die Bestimmungsgrenze die Nachweisgrenze nicht unterschreiten darf. Ist dies dennoch der Fall, so wird die Nachweisgrenze auch die Bestimmungsgrenze [8].

#### *Theoretische Bestimmung*

Die Bestimmungsgrenze wird im Experiment zur Bestimmung der Nachweisgrenze ermittelt. Es werden jedoch die Peakflächenverhältnisse aus Analyt und internen Standard des stärksten Ions gegen die Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen [8].

#### *Praktische Bestimmung*

Auch hier muss die praktische Bestimmung nicht isoliert durchgeführt werden und wird bereits im Kapitel der Nachweisgrenze beschrieben.

### **3.3.5 Stabilität**

#### *Erläuterung*

In der forensisch-toxikologischen Analytik beschreibt die Stabilität die chemische Beständigkeit eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen für gegebene Zeitintervalle. Hierbei zu betrachten ist die Stabilität eines Analyten von der Probennahme bis zur Analyse, die Einfrier- und Auftaustabilität unbearbeiteter Proben, die Langzeitstabilität sowie die Stabilität aufgearbeiteter (derivatisierter) Proben. Liegt bereits Literatur vor, die mit Stabilitätsdaten diese hinreichend beschreibt, kann die Durchführung der ersten drei Prüfpunkte vernachlässigt werden. Da die Stabilität aufgearbeiteter (derivatisierter) Proben jedoch methodenabhängig ist, muss diese zwingend geprüft werden [8].

#### *Kriterien*

Die maximal zu akzeptierende Signalab- beziehungsweise Signalzunahme beträgt  $\pm 15 \%$  respektive  $\pm 20 \%$  nahe der Bestimmungsgrenze und unter Verwendung deuterierter Interner Standards  $\pm 25 \%$  [8].

### *Theoretische Bestimmung*

Es dürfen nicht weniger als sechs Bestimmungen bei jeweils zwei Konzentrationen aus idealerweise kommerziellen Material untersucht werden. Diese müssen den Arbeitsbereich abdecken. Hierbei werden alle Proben gleichzeitig aufgearbeitet, die entsprechenden Konzentrationsniveaus vereint und auf sechs Aliquote verteilt. Die aufgearbeiteten Proben werden dann in gleichmäßigen Abständen injiziert, wobei die Intervalle den Zeitraum einer regulären Analysenserie berücksichtigen sollen. Die gemessenen Peakflächen werden dann gegen die einzelnen Zeitpunkte der entsprechenden Konzentration aufgetragen und via linearer Regression ausgewertet [8].

### *Praktische Bestimmung*

Die Stabilität wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationen mit kommerziellen Kontrollmaterial (ACQ Science) ermittelt. Die Proben wurden aufgearbeitet und nach 10, 20, 30, 40, 50 und 70 h injiziert.

## **3.3.6 Wiederfindung**

### *Erläuterung*

Die Extraktion eines Analyten aus einer Matrix in ein Lösungsmittel kann mitunter unvollständig sein. So können Verluste durch Transferschritte im Rahmen der Probenaufarbeitung auftreten, als auch der analytisch methodische Kompromiss mehrere strukturell unterschiedliche Verbindungen parallel zu Erfassung ursächlich sein. Die Leistung einer Extraktion wird mit Hilfe der Wiederfindung bestimmt. Hierbei werden die Signale einer mit dem Analyten versetzten Matrixprobe mit denen einer nicht extrahierten Originallösung verglichen. Von Extraktionsausbeute wird gesprochen, wenn der Analyt einen Derivatisierungsschritt durchläuft und die zu vermessenden Derivate nicht als Reinsubstanz vorliegen. Diese berücksichtigt den gesamten Transfer des Analyten in den primären Extrakt und wird folgendermaßen ermittelt:

$$W = \frac{\bar{x}_M}{\bar{x}_L} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 19})$$

[W]            Wiederfindung

$[\bar{x}_M]$         Peakflächenverhältnismittelwert der Matrixproben

$[\bar{x}_L]$         Peakflächenverhältnismittelwert der Lösungsmittelproben

### *Kriterien*

Die Extraktionsausbeute muss  $\geq 50 \%$  betragen [37].

### *Theoretische Bestimmung*

Als minimale Anforderung sollten sechs Analysen bei niedrigen und hohen Konzentrationen, so erhältlich aus kommerziellem Material durchgeführt werden, bei denen der interne Standard und der Analyt erst nach der Extraktion hinzugegeben werden. Weitere sechs Messungen werden bei den identischen Konzentrationsniveaus durchgeführt, jedoch wird jetzt der Analyt vor und der interne Standard nach der Extraktion hinzugegeben. Die so erhaltenen Peakflächenverhältnisse (Analyt und Interner Standard) können anschließend miteinander verglichen werden [8].

### *Praktische Bestimmung*

Die Wiederfindung wurde ermittelt, in dem sechs Matrixproben der normalen Aufarbeitung unterzogen wurden, jedoch der interne Standard einmal vor der Extraktion und einmal nach der Extraktion hinzugefügt wurde. Die nach Aufarbeitung der Matrixproben und Zugabe des Internen Standard erhaltenen Peakflächenverhältnisse wurden mit den Peakflächenverhältnisse der gespikten Lösemittelproben in Beziehung gesetzt.

## **3.3.7 Messunsicherheit**

### *Erläuterung*

Ein analytischer Prozess ist per se mit einer Unsicherheit verknüpft, wobei die Größe dieser durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Mögliche Ursachen resultieren aus Fehlern während der Probennahme und dem Probentransport, den Lagerungsbedingungen vor der eigentlichen Analyse, aber auch Pipettierfehler und die Robustheit beziehungsweise Leistungsfähigkeit des Analysensystems spielen dabei eine Rolle. Wenngleich der Einfluss des jeweiligen Unsicherheitsbetrages unterschiedlich groß sein kann. Dies führt dazu, dass auch unter genormten Bedingungen die Mehrfachbestimmung einer Probe nur im Einzelfall zu einem identischen Ergebnis führt. Infolgedessen unterliegt der finale Messwert einer Streuung, die als Messunsicherheit bezeichnet wird [43]. Die Bestimmung kann über die Schätzung durch zertifiziertes Referenzmaterial oder über die Schätzung durch Ringversuche und ein Referenzmaterial erfolgen [44], wobei letztere Anwendung findet und sich wie folgt berechnet [8]:

$$U = k \cdot u(y) \quad (\text{Gl. 20})$$

$$U = k \cdot \sqrt{(RMSBias)^2 + (u(Cref))^2 + (u(RSD_{PK}))^2} \quad (\text{Gl. 21})$$

$$U = k \cdot \sqrt{\left( \sqrt{\frac{\sum (100\% \cdot \frac{Bias}{SW})^2}{m}} \right)^2 + \left( \frac{\left( \frac{\sum 100\% \cdot \frac{SRV}{SW}}{m} \right)}{\sqrt{p}} \right)^2 + \left( 100\% \cdot \frac{SPK}{MW} \right)^2} \quad (\text{Gl. 22})$$



[ <i>Bias</i> ]	Abweichung des Messwertes vom Ringersuchswert
[ <i>k</i> ]	Erweiterungsfaktor
[ <i>m</i> ]	Anzahl der Ringversuche
[ <i>p</i> ]	Mittlere Anzahl der teilnehmenden Laboratorien
[ <i>RMSBias</i> ]	Unsicherheitsbeitrag durch die Unrichtigkeit der Messung
[ <i>S<sub>PK</sub></i> ]	Standardabweichung für die Messung des Kontrollmaterials über die Messtage
[ <i>S<sub>RV</sub></i> ]	Standardabweichung im Ringversuch (Vergleichsstandardabweichung)
[ <i>SW</i> ]	Sollwert im Ringversuch
[ <i>U</i> ]	Erweiterte Messunsicherheit
[ <i>u(Cref)</i> ]	Unsicherheitsbeitrag durch die im Ringversuch ermittelten Sollwerte
[ <i>u(RSD<sub>PK</sub>)</i> ]	Unsicherheitsbeitrag durch die Laborpräzision (tagesverschieden)
[ <i>u(y)</i> ]	Kombinierte Messunsicherheit

### *Kriterien*

Da die Richtlinien der GTFCh keine maximal zulässige Messunsicherheit vorgibt, wird diese mit  $\leq 30\%$  eigenständig festgelegt.

### *Theoretische Bestimmung*

Die Ermittlung der Messunsicherheit erfolgt über Richtigkeit und Laborpräzision. Für den Richtigkeitsanteil dürfen nicht weniger als fünf aufeinanderfolgende Ringversuche verwendet werden. Zur Bestimmung des Präzisionsanteils müssen zehn niedrige Konzentrationsniveaus analysiert werden, die tagesverschieden untersucht wurden. Zur Auswertung wird das durch die GTFCh bereitgestellte Excel-Tabellenmakro Messunsicherheit [45] verwendet.

### *Praktische Bestimmung*

Zur Berechnung des Richtigkeitsanteils wurden fünf beziehungsweise sechs bestandene Ringversuchsauswertungen herangezogen. Hierfür wurden folgende Ringversuche (ARVECON) eingesetzt: BTMF3/17-A, BTMF3/17-B, BTMF1/18-A, BTMF1/18-B, BTMF2/18-A, BTMF3/18-A. Da für MBDB keine Ringversuche zu Verfügung standen, wurden hier fünf Werte vom mittleren Kontrolllevel und fünf Werte vom hohen Kontrolllevel verwendet. Zur Berechnung des Präzisionsanteils wurden die ersten zehn Werte der Genauigkeitsbestimmung der Qualitätskontrollprobe vom niedrigsten Kontrolllevel herangezogen.

## 4 Auswertung und Ergebnisse

### 4.1 Selektivität und Spezifität

Die Untersuchung der Leeproben ergab keine Hinweise auf eine Störung durch endogene Matrixbestandteile. Es konnten zwar vereinzelt Signale in der Nähe der Analyten beobachtet werden, diese eluierten jedoch nicht zum Zeitpunkt der Substanzen und betrafen maximal ein zu untersuchendes Ion je Analyt. Weiterhin waren die Nullproben analytfrei was darauf schließen lässt, dass der undeuterte Anteil in den internen Standards sehr gering beziehungsweise mit dieser Methode nicht nachweisbar ist. Darüber hinaus konnte keine die internen Standards betreffenden Interferenzen entdeckt werden. Das Verhalten der Nachweisen zeigt Abbildung 16 am Beispiel von MDMA / -d5 in den einzelnen Testsituationen.

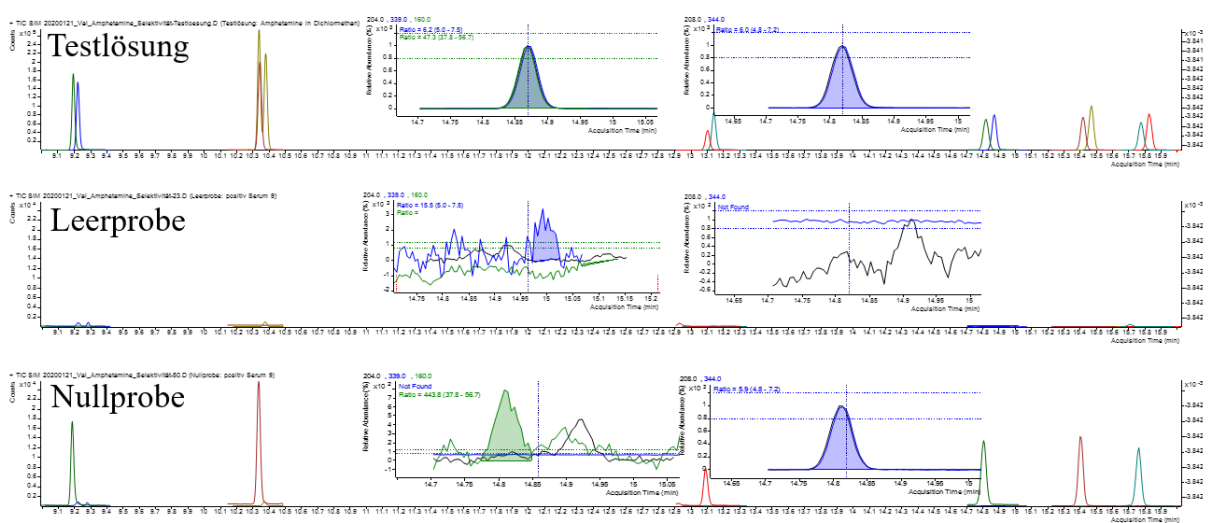


Abbildung 16: Chromatogramme unterschiedlicher Testsituationen

Darüber hinaus konnte mit Hilfe der weiteren Experimente eine potentielle Störung durch die folgenden Substanzklassen beziehungsweise Substanzen ausgeschlossen werden:

**Antiarrhythmika:** Acebutolol, Ajmalin, Amiodaron, Desethylamiodaron, Aprindin, Atenolol, Bisoprolol, Diltiazem, Disopyramid, Dronedaron, Debutyldronedaron, Flecainid, Flunarizin, Gallopamil, Lidocain, Metoprolol, Mexiletin, Propafenon, Propranolol, Chinidin, Hydrochinidin, Sotalol, Tocainid, Verapamil, Norverapamil

**Antidepressiva:** Agomelatin, Atomoxetin, Bupropion, erythro-Dihydro-Bupropion, threo-Dihydro-Bupropion, Citalopram, Clomethiazol, Desmethylcitalopram, Desmethylfluoxetin, Desmethylmianserin, Desmethylmirtazapin, Desmethylsertralin, O-Desmethyltramadol, O-Desmethylvenlafaxin, Dosulepin, Duloxetin, Fluoxetin, Fluvoxamin, Guanfacin, Hydroxybupropion, Methylphenidat, Mianserin, Milnacipran, Mirtazapin, Moclobemid, Nefazodon, Opipramol, Paroxetin, Reboxetin, Ritalinsäure, Sertralin, Tianeptin, Tramadol, Tranylcypromin, Trazodon, Venlafaxin, Vortioxetin

Antiepileptika:	Carbamazepin, Carbamazepin-10,11-epoxid, 10,11-Dihydroxycarbamazepin, 10-OH-Carbamazepin, Ethosuximid, Felbamat, Gabapentin, Lacosamid, Lamotrigin, Levetiracetam, N-Desmethylnesuximid, Oxcarbazepin, Phenobarbital, Phenylethylmalonamid, Phenytoin, Pregabalin, Primidon, Rufinamid, Stiripentol, Sultiam, Theophyllin, Tiagabin, Topiramat, Valproinsäure, Vigabatrin, Zonisamid
Benzodiazepine:	7-Aminoclonazepam, 7-Aminoflunitrazepam, 7-Aminonitrazepam, Alprazolam, Bromazepam, Brotizolam, Chlordiazepoxid, Clobazam, Clonazepam, Demoxepam, Desalkylflurazepam, Desmethylflunitrazepam, Diazepam, Estazolam, Flunitrazepam, Flurazepam, $\alpha$ -Hydroxyalprazolam, 3-Hydroxybromazepam, $\alpha$ -Hydroxymidazolam, $\alpha$ -Hydroxytriazolam, Lorazepam, Lormetazepam, Medazepam, Midazolam, Nitrazepam, Norclobazam, Nordiazepam, Oxazepam, Prazepam, Temazepam, Tetrazepam, Trazodon, Triazolam, Zaleplon, Zolpidem, Zopiclon, Zopiclon, ACP
Cannabinoide:	Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy-Tetrahydrocannabinol, Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure
Kokain:	Kokain, Benzoylcegonin, Ecgoninmethylester
Neuroleptika:	Amisulprid, Aripiprazol, Chlorpromazin, Chlorprothixol, Clozapin, Dehydro-Aripiprazol, Desmethylolanzapin, Flupentixol, Fluphenazin, Haloperidol, Levomepromazin, Melperon, Norclozapin, Norquetiapin, Olanzapin, Paliperidon (9-OH-Risperidon), Perazin, Pipamperon, Promethazin, Prothipendyl, Quetiapin, Risperidon, Sertindol, Sulpirid, Thioridazin, Ziprasidon, Zotepin, Zuclopenthixol
Opiate / Opioide:	Morphin, Codein, Methadon

## 4.2 Linearität der Kalibration

Mit Hilfe der einzelnen Messwerte wurden Kalibrationsgeraden erstellt, welche in Abbildung 17 dargestellt sind. In dieser Abbildung ist jeweils das Bestimmtheitsmaß hervorgehoben, welches die Güte der Anpassung durch die Regressionsgerade beurteilt. Ist das Bestimmtheitsmaß nahe Null, ist ein funktionaler Zusammenhang zwischen x und y nicht erkennbar. Bei Werten in der Nähe von Eins ist ein linearer Zusammenhang zwischen den Konzentrationswerten x und den Signalwerten y gegeben. Man kann anhand des Bestimmtheitsmaß jedoch nicht entnehmen, ob eine lineare oder eine quadratische Anpassung günstiger wären, hierfür eignet sich der Mandel-Test.

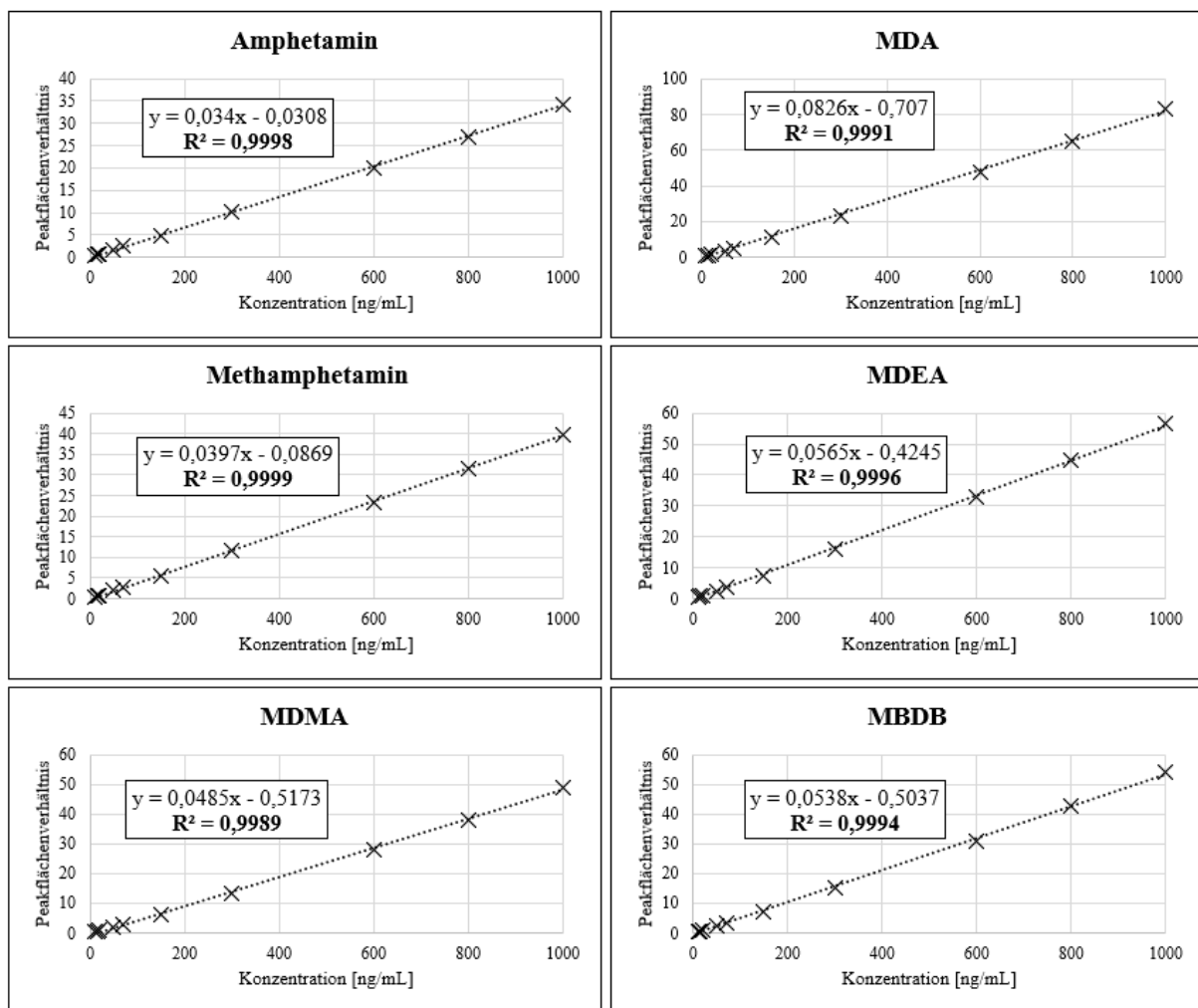


Abbildung 17: Mittelwerte der sechsfach Bestimmung aller Kalibrationsgeraden

In den sechs Kalibrationsgeraden konnten keine signifikanten Abweichungen einzelner Messwerte beobachtet werden. Die 95 % und 99 % Signifikanzniveaus wurden nicht erreicht. Somit wurden keine Ausreißer oder Straggler festgestellt, wodurch der Grubbs-Test als bestanden bewertet werden kann.

Mit dem Cochran-Test wird über den gesamten Kalibrationsbereich auf Homogenität der Varianzen geprüft. Hierfür wurde ein Prüfwert aus den Varianzen der Messwerte berechnet, der den Tabellenwert nicht überschreiten durfte. Bei allen Analyten war dies erfüllt.

Der Test auf Linearität der Kalibration nach Mandel ist bei allen Analyten bestanden, demnach darf bei jedem Analyten ein lineares Kalibrationsmodell anstatt eines quadratischen gewählt werden.

### 4.3 Genauigkeit

Die Prüfung auf Richtigkeit wird durch den Bias-Wert, das heißt der Abweichung zum Zielwert ausgedrückt. Der von der GTFCh festgelegte Grenzwert von 15 % wurde von keinen Analyten überschritten. Entsprechend dem gilt die Prüfung auf Richtigkeit als bestanden.

Anschließend wurde die Wiederholpräzision betrachtet, deren Grenzwert als relative Standardabweichung mit 15 % angegeben wird. Diese wurde an keinem der acht Tage von einem der Analyten überschritten. Dies belegt, dass die hier validierte Methode bei wiederholter Messung von Proben am gleichen Tag in der Lage ist, vergleichbare Ergebnisse zu liefern und die zufälligen Fehler den Toleranzbereich dabei nicht überschreiten.

Mit der Messung an verschiedenen Tagen wurde die Laborpräzision überprüft. Dabei wurde die Abweichungen der einzelnen Messwerte zwischen den verschiedenen Tagen miteinander verglichen. Auch die (tagesspezifische) Laborpräzision war für alle Analyten erfüllt, der Grenzwert der Standardabweichung wurde nicht überschritten.

Die unter Richtigkeit und Laborpräzision in Kombination als 95 %  $\beta$ -Toleranzintervall ausgedrückten graphischen Darstellung finden sich in Abbildung 18. Zu erkennen ist, dass insbesondere die hohe Kontrolle bei nahezu allen Analyten den gesamten Toleranzbereich von 30 % nutzt. Möglicherweise könnte ein weiterer Kalibrationspunkt im oberen Bereich diesem Phänomen entgegenwirken. Dennoch erfüllen auch hier alle Analyten die gesetzten Kriterien.

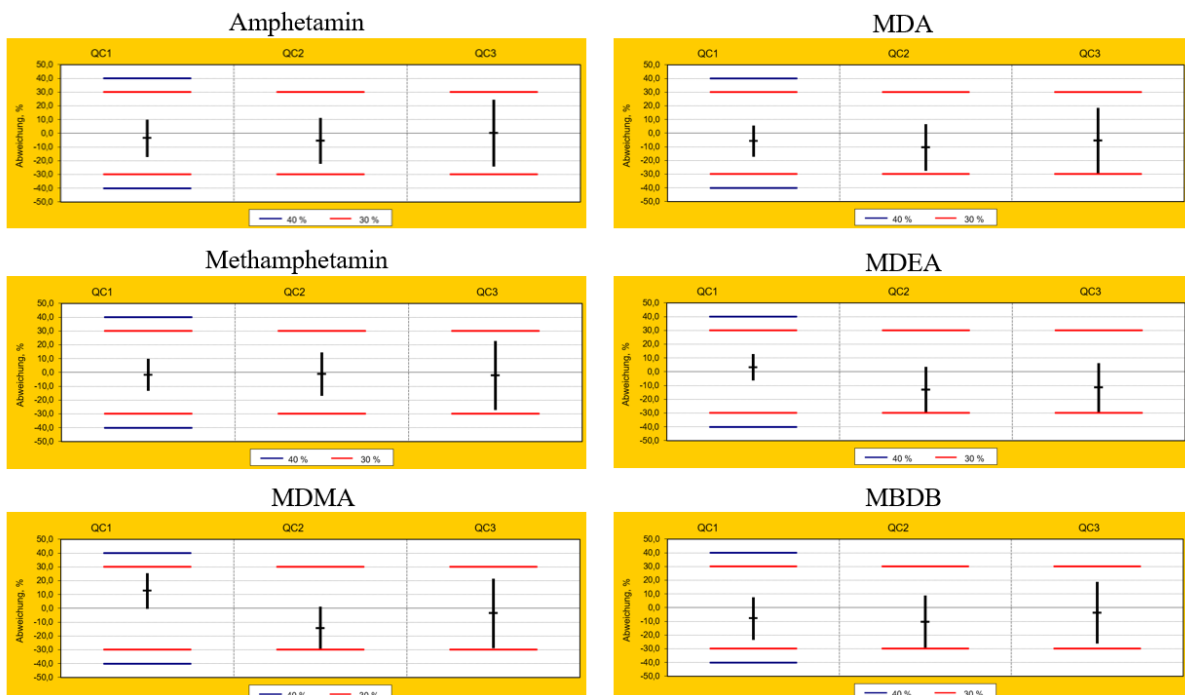


Abbildung 18: Zusammenfassung 95%-Intervalle (Valistat)

Abschließend sind die Ergebnisse der Kenngrößen Richtigkeit, Wiederholpräzision und Laborpräzision in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung der Genauigkeit

QC - 1					
<b>Analyt</b>	<b>Konzentration [ng/mL]</b>	<b>Mittelwert [ng/mL]</b>	<b>BIAS [%]</b>	<b>RSD<sub>r</sub> [%]</b>	<b>RSD<sub>T</sub> [%]</b>
Amphetamin	25,2	24,7	-1,9	3,2	5,7
Methamphetamin	25,2	24,9	-0,9	3,8	4,9
MDMA	25,1	26,7	6,1	3,1	5,0
MDA	25,2	24,4	-3,0	3,6	5,0
MDEA	25,1	25,4	1,6	3,4	4,0
MBDB	25,1	24,0	-4,0	2,6	6,5
QC - 2					
<b>Analyt</b>	<b>Konzentration [ng/mL]</b>	<b>Mittelwert [ng/mL]</b>	<b>BIAS [%]</b>	<b>RSD<sub>r</sub> [%]</b>	<b>RSD<sub>T</sub> [%]</b>
Amphetamin	90,4	87,8	-2,8	5,6	7,3
Methamphetamin	90,4	89,8	-0,6	5,3	6,8
MDMA	90,7	83,9	-7,1	5,7	7,2
MDA	60,4	57,1	-5,4	5,5	7,6
MDEA	90,8	84,6	-6,7	5,5	7,4
MBDB	60,5	57,2	-5,4	5,1	8,3
QC - 3					
<b>Analyt</b>	<b>Konzentration [ng/mL]</b>	<b>Mittelwert [ng/mL]</b>	<b>BIAS [%]</b>	<b>RSD<sub>r</sub> [%]</b>	<b>RSD<sub>T</sub> [%]</b>
Amphetamin	501	501	0,1	4,9	9,8
Methamphetamin	505	495	-1,2	5,3	10,1
MDMA	501	491	-1,8	5,7	10,5
MDA	504	489	-2,9	5,6	10,1
MDEA	499	469	-5,8	4,9	7,7
MBDB	501	491	-1,9	5,9	9,4

## 4.4 Analytische Grenzen

Durch die Messung der 20 Standards für jeden Analyten wurde die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze mit Hilfe einer linearen Regression nach DIN 32645 bestimmt. Von diesen 20 Kalibratoren wurden maximal zehn, zumindest jedoch fünf pro Substanz zur Auswertung herangezogen. Dabei wurde der erste Kalibrationspunkt jeweils unter Berücksichtigung der Identifizierungskriterien gewählt. In Abbildung 19 wird dies beispielhaft am Analyten MDEA demonstriert. Bei einem Konzentrationsniveau von 1 ng/mL weist das Ion mit m/z 353 keine symmetrische Peakform auf und das Ion 190 ist von einer deutlichen Co-Elution betroffen. Infolgedessen darf dieser Konzentrationspunkt nicht berücksichtigt werden. Dagegen sind bei einer Konzentration von 10 ng/mL alle Kriterien erfüllt, wodurch dieser Punkt hinzugezogen werden darf.

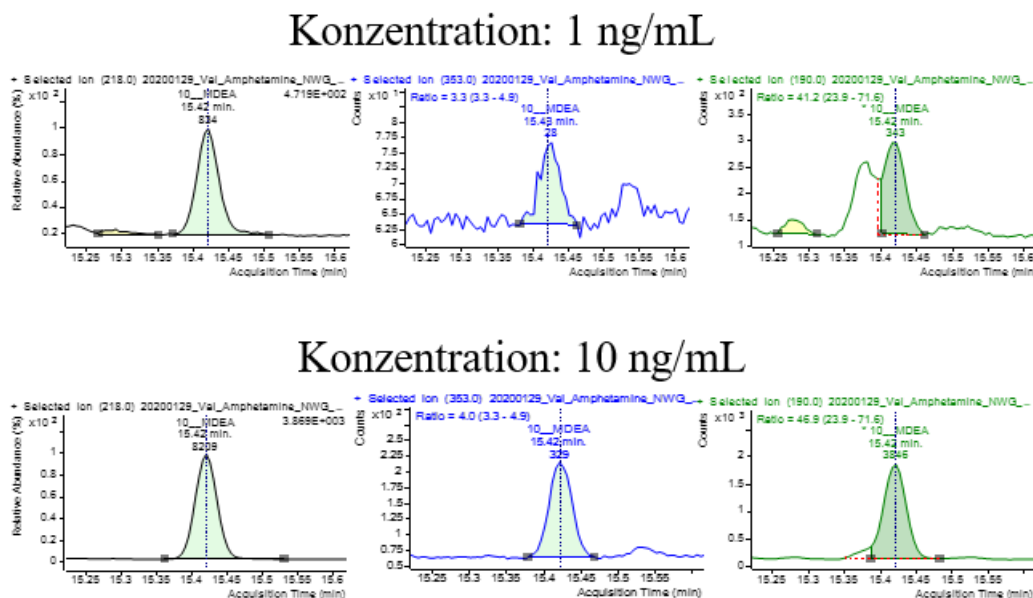


Abbildung 19: SIM-Ionen von MDEA bei zwei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus

Da diese Methode unter anderem zur Beantwortung forensischer Fragestellungen herangezogen werden soll, ist gemäß den Richtlinien der GTFCh zu belegen, dass die ermittelte Bestimmungsgrenze für die beweissichere Analyse in Serum / Plasma kleiner oder gleich der jeweils maximal zulässigen Werte ist. Die Eignung dafür wird mit den Daten in Tabelle 13 bewiesen.

Tabelle 13: Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Vorgaben der GTFCh [41]

Analyt	Nachweisgrenze [ng/mL]	Bestimmungsgrenze [ng/mL]	Vorgabe GTFCh [ng/mL]
Amphetamin	1,4	5,4	25
Methamphetamin	1,4	5,0	25
MDMA	1,2	5,6	25
MDA	1,4	5,7	25
MDEA	1,1	5,2	25
MBDB	1,3	5,2	25

## 4.5 Stabilität

Nach Abschluss der Experimente zur Bestimmung der Stabilität wurden die Analytflächen in Valistat übertragen. Dabei fiel auf, dass die Messwerte für jeden Analyten stark variierten und sich nicht wie erwartet konstant auf einem Niveau bewegten. Besonders auffällig war dabei der Anstieg der Peakflächen über den betrachteten Zeitraum. Eine Möglichkeit, dieses Verhalten zu erklären, liegt im verwendeten Injektionslösungsmittel Dichlormethan. Am Ende der Probenaufarbeitung befinden sich 60  $\mu\text{L}$  Lösungsmittel in einem Glasinsert mit einer Volumenkapazität von 200  $\mu\text{L}$  (Abbildung 20). Dichlormethan besitzt einen Siedepunkt von 39,8 °C. Bei Labortemperaturen von 25 bis 40 °C könnte ein Wechsel des Aggregatzustandes von Dichlormethan in die gasförmige Phase unter Berücksichtigung des vorhandenen Gasraumes bereits begünstigt sein. Auch wenn keine Angaben bezüglich des Siedepunktes vom zum Beispiel Amphetamin-PFP-Derivat in der Literatur beschrieben ist, kann dieser als deutlich höher angenommen werden. Schlussfolgernd kann eine Aufkonzentrierung der Analyten stattfinden, welches dieses Phänomen erklären würde.



Abbildung 20: Glasinserthalter und Glasinsert mit 60  $\mu\text{L}$  Dichlormethan

Auch wenn das oben beschriebene Verhalten erklärt werden konnte, galt es die gegebenen Akzeptanzkriterien zu erfüllen. In der Annahme, dass der deuterierte interne Standard ein identisches Verhalten zeigt, wurden die Peakflächenverhältnisse aus beiden gebildet und in die Software eingetragen. Dies führte zu homogenen Ergebnissen, die die zu erfüllenden Kriterien deutlich unterschritten. Abbildung 21 verdeutlicht die beiden Szenarien am Beispiel von Amphetamin.

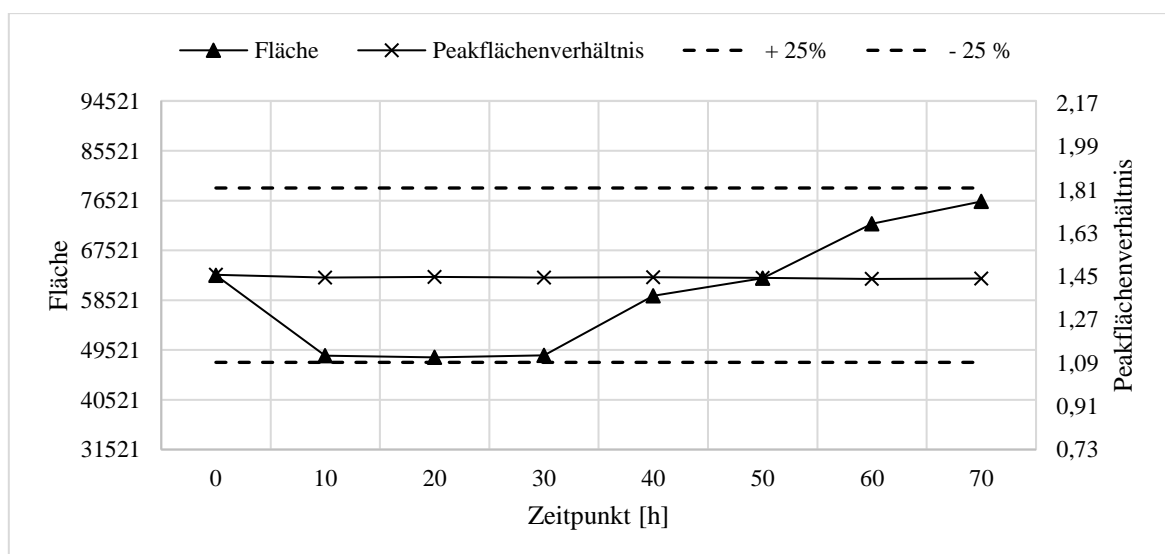


Abbildung 21: Stabilitätsverhalten von Amphetamin



## 4.6 Wiederfindung

Die erzielten Extraktionsausbeuten inklusive Standardabweichung sind in Tabelle 14 abgebildet. Die Wiederfindung beträgt bei allen Analyten  $\geq 95\%$  beziehungsweise  $\leq 105\%$ . Somit kann bei der unter alkalischen Bedingungen durchgeführten Extraktion mittels Ethylacetat von einem vollständigen Transfer des Analyten aus der Probe ausgegangen werden.

Tabelle 14: Ermittelte Wiederfindung und relative Standardabweichung

Analyt	Konzentration [ng/mL]	Wiederfindung [%]	relative Standardabweichung [%]
Amphetamin	50	95,8	4,2
	500	97,4	2,6
Methamphetamin	50	97,5	4,7
	500	99,4	2,7
MDMA	50	97,3	5,1
	500	98,4	2,9
MDA	50	96,6	3,9
	500	97,6	3,0
MDEA	50	98,5	5,4
	500	104	7,2
MBDB	50	98,0	3,9
	500	101	4,2

## 4.7 Messunsicherheit

Die Daten der gemessenen Ringversuche und Qualitätskontrollproben wurden in das zur Ermittlung vorgesehene Excel-Formular der GTFCh eingetragen. Die berechneten Werte sind in Tabelle 15 dargestellt. Die erweiterte Messunsicherheit mit dem Erweiterungsfaktor zwei liegt über alle Analyten zwischen 14,8 und 20 %. Die selbst gewählte Grenze von 30 % wurde somit für jede Verbindung unterschritten und das Kriterium erfüllt. Dies bedeutet das die mit dieser Methode erzeugten Messwerte konsistent und verlässlich sind.

Tabelle 15: Ergebnisse zur Abschätzung der Messunsicherheit über Ringversuche

Analyt	Unsicherheitsbetrag			Kombinierte Unsicherheit	Erweiterte Unsicherheit
	Richtigkeit RMSBias [%]	Sollwert u(Cref) [%]	Präzision u(RSD <sub>PK</sub> ) [%]		
Amphetamin	6,9	1,4	5,5	u(y) 8,9 [%]	U 17,8 [%]
Methamphetamin	4,8	1,4	5,5	7,4	14,8
MDMA	6,0	1,5	6,9	9,3	18,5
MDA	8,1	1,5	5,7	10,0	20,0
MDEA	7,9	1,5	5,5	9,7	19,4
MBDB	7,2	4,6	5,2	10,0	20,0

## **5 Zusammenfassung**

Im Kontext forensischer Fragestellungen erfolgt regelmäßig die Untersuchung von Amphetamin und Derivaten im Blut. Unter Berücksichtigung wissenschaftlicher Aspekte ist eine anhaltende Optimierung der eingesetzten Untersuchungsmethoden in Bezug auf Ergebnisqualität und Wirtschaftlichkeit unerlässlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte, die im Institut für Rechtsmedizin Halle bisher angewandte Methode durch ein neu entwickeltes Verfahren ersetzt werden. Die Vorteile dieser Methode zeigen sich in folgenden Punkten: Reduzierung des Probenvolumens, Verkleinerung des Lösungsmittelbedarfs, niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie der Einsatz eines alternativen Derivatisierungsreagenzes unter paralleler Verringerung der dafür notwendigen Reaktionszeit.

Das Verfahren wurde darüber hinaus nach den Richtlinien der GTFCh validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verwendete GC/MS-Methode verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefert, die den Forderungen der GTFCh an eine routinemäßig eingesetzte quantitative Untersuchungsmethode erfüllt. Die Methode ist somit für ihren Einsatzzweck geeignet.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Baselt R. C. (2002) Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Biomedical Publications, Foster City, California (USA), 6
- [2] Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (2022) Europäischer Drogenbericht 2022: Trends und Entwicklungen, Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Union, Luxemburg
- [3] Carvalho, M., Carmo, H., Costa, V. M., Capela, J. P., Pontes, H., Remiao, F., Carvalho, F., Bastos, M.deL. (2012). Toxicity of amphetamines: an update, *Arch Toxicol*, 86 (8), S 1167–1231
- [4] Mercieca G., Odoardi S., Cassar M., Rossi S. S. (2018) Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS, *J Pharm Biomed Anal*, 149, S 494-501
- [5] Wozniak MK, Wiergowski M, Aszyk J, Kubica P, Namiesnik J, Biziuk M. (2018) Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine, *J Pharm Biomed Anal*, 148, S 58-64
- [6] Lehmann S., Kieliba T., Beike J., Thevis M., Mercer-Chalmers-Bender K. (2017) Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chrom B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1064, S 124–138
- [7] Paul M., Ippisch J., Herrmann C et al. (2014) Analysis of new designer drugs and common drugs of abuse in urine by a combined targeted and untargeted LC-HR-QTOFMS approach, *Anal Bioanal Chem*, 406, S 4425–4441
- [8] Peters F. T., Hartung M., Herbold M., Schmitt G., Daldrup T., Mußhoff F. (2009) Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Version 01, online verfügbar unter [www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh\\_Richtlinie\\_Anhang%20B\\_Validierung\\_Version%201.pdf](http://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh_Richtlinie_Anhang%20B_Validierung_Version%201.pdf), zuletzt geprüft am 29.03.2023
- [9] Matissek R., Fischer M. (2021) Lebensmittelanalytik, Springer, Berlin, 7
- [10] Gross J. H. (2019) Massenspektrometrie – Spektroskopiekurs kompakt, Springer, Berlin
- [11] UNODC (2006) Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their Ring-substituted Analogues in Seized Materials, United Nations of Drugs and Crime, 2006. online verfügbar unter <https://www.unodc.org/pdf/scientific/stnar34.pdf>, zuletzt geprüft am 06.09.2023
- [12] Nieddu M., Baralla E., Pasciu V., Rimoli M.G., Boatto G. (2022) Cross-reactivity of commercial immunoassays for screening of new amphetamine designer drugs. A review, *J Pharm Biomed Anal*, 218

- [13] Broussard L. (2019) Chapter 16 - Critical Issues When Testing for Amphetamine-Type Stimulants: Pitfalls of Immunoassay Screening and Mass Spectrometric Confirmation for Amphetamines, Methamphetamines, and Designer Amphetamines, *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, Academic Press, S 207-214, 2
- [14] Zakrzewska A., Parczewski A., Kaźmierczak D., Ciesielski W., Kochana, J. (2007) Visualization of amphetamine and its analogues in TLC, *Acta Chimica Slovenica*, 54, S 106-109
- [15] Mitrevski B., Zdravkovski Z. (2005) Rapid and simple method for direct determination of several amphetamines in seized tablets by GC—FID, *Forensic Sci Int*, 152 (2-3), S 199–203
- [16] Kalasinsky K. S., Levine B., Smith M. L., Magluilo J., Schaefer T. (1993) Detection of amphetamine and methamphetamine in urine by gas chromatography/Fourier transform infrared (GC/FTIR) spectroscopy; *J Anal Toxicol*, 17(6), S 359–364
- [17] Garrido E. M. P. J., Garrido J. M. P. J., Milhazes N., Borges F., Oliveira-Brett A. M. (2010) Electrochemical oxidation of amphetamine-like drugs and application to electroanalysis of ecstasy in human serum, *Bioelectrochemistry*, 79 (1), S 77-83
- [18] Gallardo-González J., Baraket A., Bonhomme A., Zine N., Sigaud M., Bausells J., Errachid A. (2018) Sensitive Potentiometric Determination of Amphetamine with an All-Solid-State Micro Ion-Selective Electrode, *Analytical Letters*, 51 (3), S 348-358
- [19] Wozniak M. K., Banaszkiwicz L., Wiergowski M. et al. (2019) Development and validation of a GC–MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood, *Forensic Toxicol*, 38, S 42–58
- [20] Kusch P. (2019) *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*, IntechOpen
- [21] Söderholm, S., Damm, M., Kappe, C.O. (2010) Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis, *Molecular Diversity*, 14, S 869-888
- [22] Melgar, R., Kelly, R. C. (1993) A novel GC/MS derivatization method for amphetamines, *J Anal Toxicol*, 17 (7), S 399–402
- [23] Dobos, A., Hidvégi, E., Somogyi, G. P. (2012) Comparison of five derivatizing agents for the determination of amphetamine-type stimulants in human urine by extractive acylation and gas chromatography-mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 36 (5), S 340–344
- [24] Marais, A. A., Laurens, J. B. (2009) Rapid GC-MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation, *Forensic Sci Int*, 183 (1-3), S 78–86
- [25] Mohamed, K., Bakdash, A. (2017) Comparison of 3 Derivatization Methods for the Analysis of Amphetamine-Related Drugs in Oral Fluid by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal Chem Insights*, 12
- [26] Khalid A., Calum M. (2017) Comparison of Six Derivatizing Agents for the Determination of Nine Synthetic Cathinones Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal Methods*, 9 (18), S 2732-2743

- [27] Mußhoff F., Madea B. (2004) *Haaranalytik: Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
- [28] Drummer O. H. (2004) Postmortem toxicology of drugs of abuse, *Forensic Sci Int*, 142 (2-3), S 101-113
- [29] Mura P., Brunet B., Ghysel-Laporte M.-H., Gouille J.-P. (2015) Driving and amphetamines in blood-bibliographic data for a consensus of the French Society of Analytical Toxicology, *Toxicol Anal et Clin*, 27, S 142-152
- [30] Cruickshank C. C., Dyer K. R. (2009) A review of the clinical pharmacology of methamphetamine, *Addiction*, 104 (7), S 1085-1099
- [31] Von Heyden M., Jungaberle H., Majic T. (2018) *Handbuch Psychoaktive Substanzen*, Springer, Berlin, S 537-550
- [32] Kolbrich E. A., Goodwin R. S., Gorelick D. A., Hayes R. J., Stein E. A., Huestis M. A. (2008) Plasma pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxyamphetamine after controlled oral administration to young adults, *Ther Drug Monit*, 30 (3), S 320-32
- [33] Baggott M. J., Garrison K. J., Coyle J. R., Galloway G. P., Barnes A. J., Huestis M. A., Mendelson J. E. (2019) Effects of the Psychedelic Amphetamine MDA (3,4-Methylenedioxyamphetamine) in Healthy Volunteers, *J Psychoactive Drugs*, 51 (2), S 108-117
- [34] Kromidas S. (2000) *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim
- [35] Peters F. T., Drummer O. H., Mußhoff F. (2006) Validation of new methods, *Forensic Sci Int*, 165 (2-3), S 216-224
- [36] Guidance for industry-Bioanalytical method validation (2018) US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, online verfügbar unter [www.fda.gov/media/70858/download](http://www.fda.gov/media/70858/download), zuletzt geprüft am 19.03.2023
- [37] Guideline on bioanalytical method validation (2015) Committee for medicinal products for human use, European Medicines Agency, online verfügbar unter [www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf), zuletzt geprüft am 19.03.2023
- [38] Scientific Working Group for Forensic Toxicology (2013) Scientific Working Group for Forensic Toxicology standard practices for method validation in forensic toxicology, *J Anal Toxicol*, 37 (7), S 452-74
- [39] ARVECON GmbH in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis der GTFCh „Qualitätssicherung“ (2011) VALISTAT 2.0 - Programm auf Excel-Basis zur Validierung nach den Richtlinien der GTFCh unter Berücksichtigung der ISO 5725, Version 2.0, Heidelberg / Walldorf
- [40] Al-Ahmadi, T. M. (2007) A comparison of derivatisation procedures for the detection of multiple analytes in systematic forensic toxicology, PhD thesis, University of Glasgow

- [41] Paul L. D., Mußhoff F. (2016) Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Version 02, online verfügbar unter [www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh\\_Richtlinie\\_For-Tox\\_Version-2.pdf](http://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh_Richtlinie_For-Tox_Version-2.pdf), zuletzt geprüft am 29.03.2023
- [42] DIN 32645:2008-11
- [43] Ellison S. L. R., Rosslein M., Williams A. (2003) EURACHEM/CITAC Leitfaden Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen, 2, online verfügbar unter [https://eurolab-d.de/files/ermittlung\\_der\\_messunsicherheit\\_bei\\_analytischen\\_messungen.pdf](https://eurolab-d.de/files/ermittlung_der_messunsicherheit_bei_analytischen_messungen.pdf), zuletzt geprüft am 16.04.2023
- [44] Schmitt G., Herbold M., Aderjan R. (2007) Schätzung der Messunsicherheit über „zertifizierte“ Kontrollproben, online verfügbar unter [www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tb/tb2007/s551-557.pdf](http://www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tb/tb2007/s551-557.pdf), zuletzt geprüft am 13.04.2023
- [45] Schmitt G., Herbold M., Peters F. T., Toennes S. W., Excel-Formular zur Abschätzung der Messunsicherheit, Version 1.6, zur Verfügung gestellt durch das Institut der Rechtsmedizin Halle (Saale), online verfügbar im Mitgliederbereich auf der Homepage der GTFCh unter [www.gtfch.org](http://www.gtfch.org)

# 7 Anhang

## 7.1 Valistat-Validierungsprotokoll: Amphetamin

### Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS
Titel		Quantitative Bestimmung von Amphetamin und Derivaten im Serum mit GC-MS	
SOP		SAA-T-001	
<b>Angaben zur Methode</b>			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)		Amphetamin und Derivate im Serum mit GC-MS	
Anwendungsgebiet		Klinische / Forensische Toxikologie	
Arbeitsbereich		10 - 1000 ng/mL	
Analyt		Amphetamin (Interner Standard: Amphetamin-d5)	
Weitere bestimmbare Analyte		Quant: Methamphetamin, MDMA, MDA, MDEA, MBDB; Semi-Quant: Methylphenidat, Ethylon, Methylon, Methcathinon, Cathinon, 4-MTA, PMA, Ethylamphetamin, Mephedron, Ephedrin	
<b>Verantwortlichkeiten</b>			
Leiter der Validierung		Fr. Dr. K. Blümke-Anbau	
Beteiligte Mitarbeiter		F. Picht	
Bearbeitungszeitraum		November 2019 - Februar 2020	
Methode gültig erklärt am		02.03.2020	
Methode ungültig erklärt am		entfällt	
Zusammenfassung und Bewertung		Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, eindampfen und PFP-derivatisierung	

#### Inhaltsverzeichnis

##### 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

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

##### 2. Genauigkeit

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

##### 3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
  - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
  - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
  - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
  - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)
- 4. Wiederfindung
  - 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
    - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
    - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
  - 4.2. Stabilität
    - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
    - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
  - 4.3. Matrixeffekte
    - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
    - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

# Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET		Messsignal: m/z = 190								Messgröße: Ratio		Einheit: ng/ml	
Konzentration		10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0		
MESSUNG	1	0.329	0.532	0.692	1.744	2.431	5.026	10.152	20.8952	27.6108	36.3163		
	2	0.375	0.573	0.729	1.744	2.426	5.011	10.311	18.8419	25.673	34.2786		
	3	0.408	0.53	0.689	1.753	2.373	4.863	10.1275	20.7222	27.1854	34.3143		
	4	0.456	0.559	0.717	1.703	2.395	5.198	9.832	20.3663	26.6948	36.0598		
	5	0.402	0.581	0.752	1.716	2.492	4.575	10.0216	20.0874	26.122	33.2616		
	6	0.431	0.627	0.649	1.693	2.416	4.68	10.3995	19.7443	29.1485	32.7106		
Mittelwert		0.4	0.55	0.705	1.727	2.422	4.859	10.14183333	20.10955	27.07241667	34.32403333		
SD		0.0443	0.0238	0.0381	0.0275	0.0402	0.2367	0.2021	0.7482	1.2343	1.244		
Varianz		0.002	0.0006	0.0013	0.0006	0.0016	0.056	0.0409	0.5599	1.5234	1.5475		
Werte		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0		
Ausreisser-Test nach Grubbs													
Extremwert		0.329	0.581	0.649	1.763	2.492	4.576	9.832	18.8419	29.1485	36.0598		
Prüfwert		1.608	1.292	1.542	1.308	1.73	1.322	1.531	1.694	1.662	1.395		
Signifikanz 95%													
Tabellenwert		1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822		
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		
Signifikanz 99%													
Tabellenwert		1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944		
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x² + B*x + C
Prüfwert 0.4145	Prüfwert -6.99	a 000,000	A 0,00000177
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 000,000	B 0,03241308
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 00,001	C 0,08678637
		Rest-SD 0,00	R 0,99937952
			Rest-SD 0,09055183

1.2 QUALIFIER		Messsignal: m/z = 117								Messgröße: Ratio		Einheit: ng/ml	
Konzentration		10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0		
MESSUNG	1	0.081	0.117	0.166	0.440	0.606	1.320	2.674	5.413	7.166	9.054		
	2	0.094	0.136	0.168	0.418	0.607	1.311	2.703	5.324	6.599	8.660		
	3	0.093	0.129	0.188	0.415	0.607	1.290	2.647	5.360	7.106	8.862		
	4	0.095	0.130	0.190	0.439	0.623	1.332	2.575	4.960	6.930	9.505		
	5	0.088	0.139	0.190	0.439	0.640	1.211	2.537	5.026	6.815	8.629		
	6	0.091	0.132	0.177	0.440	0.658	1.252	2.757	4.907	7.601	8.487		
Mittelwert		0.09	0.13	0.175	0.432	0.624	1.293	2.666	5.165	7.036	8.999		
SD		0.006	0.007	0.013	0.012	0.021	0.059	0.062	0.225	0.344	0.387		
Varianz		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.003	0.004	0.051	0.119	0.127		
Werte		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
Extremwert		0.081	0.117	0.158	0.415	0.609	1.362	2.767	4.907	7.901	9.505		
Prüfwert		1.821	1.779	1.274	1.418	1.597	1.509	1.484	1.147	1.641	1.696		
Tabellenwert		1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822		
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		
Tabellenwert		1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944		
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x² + B*x + C
Prüfwert 0.418	Prüfwert 5.75	a 0,00883104	A 0,00000343
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 000,000	B 0,00843921
Bestanden? ja	Linear? ja	R 00,001	C 0,01672172
		Rest-SD 0,03416502	R 0,9999368
			Rest-SD 0,04131166



# Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz  %

Konzentration

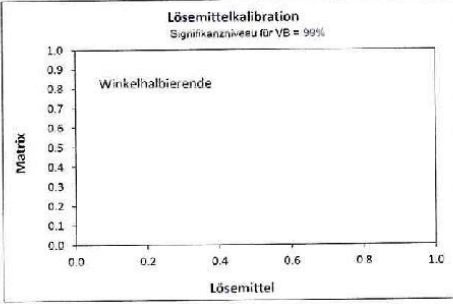
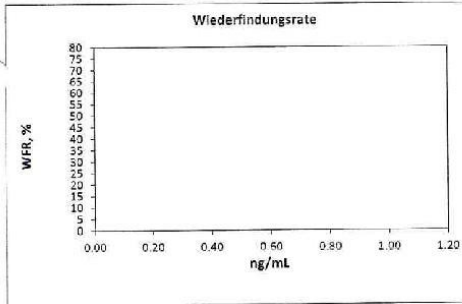
Lösemittel (x<sub>0</sub>)

Matrix (x<sub>m</sub>)

WFR gemessen

WFR berechnet

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



## 2. Genauigkeit

### 2.1. Level 1

QC-Sollwert:  Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	27.5	24.2	25.5	25.2	25.5	23.5	24.5	22.4		
1	25.5	27.3	25.4	24.6	24.7	23.5	24.7	22.6		
3	26.0	25.4	25.8	23.6	24.6	23.1	24.2	22.0		
4	25.3									
5	25.0									
6	25.2									
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	25.75	25.9667	25.5667	24.4667	24.9333	23.3667	24.4667	22.3333		
BIAS, %	2.2	3.0	1.5	-2.9	-1.1	-7.3	-2.9	-11.4		
SD	0.9224956	1.6947832	0.2081965	0.9082904	0.4532883	0.2909401	0.2516511	0.305505		
RSD, %	3.6	6.1	0.8	3.3	2.0	1.0	1.0	1.4		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	OK	Laborpräzision	OK
MW (ges.)	24.7333	SD	0.7827639	SD	1.408436
SD	1.3575997	RSD, %	3.2	RSD, %	5.7
RSD, %	5.5				

Richtigkeit	OK	95%-Intervall	OK
Abw.	-0.47	Faktor	2.436
Bias, %	-1.9	0-Toleranz	00.021 bis 00.028
		Prüfbereich (30%)	00.018 bis 00.033
		Prüfbereich (40%)	00.015 bis 00.036

# Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 2.2. Level 2

QC-Sollwert:		90.4		Einheit:		ng/mL											
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10						
1	MESSUNG	98.5	86.3	89.6	92.8	85.8	84.1	89.4	83.4								
2		95.8	85.2	82.1	81.0	84.6	86.3	84.0	80.0								
3		95.6	77.6	88.1	81.5	86.1	85.1	87.3	81.2								
4		107.0															
5		86.3															
6		87.4															
7																	
8																	
9																	
10																	
Mittelwert		95.1	83.0333	89.9333	88.4333	85.5	85.1667	86.9	81.5333								
BIAS, %		5.2	-8.1	-0.5	-2.2	-5.4	-5.8	-3.9	-9.8								
SD		7.6241721	4.7374895	2.0207259	6.470188	0.7987254	1.1015141	2.7221315	1.7243356								
RSD, %		8.0	5.7	2.2	7.3	0.9	1.3	3.1	2.1								

Kenndaten		OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision		
MW (ges.)		87.8558	SD		4.8787519	SD	6.3742087
SD		6.237192	RSD, %		5.6	RSD, %	7.3
RSD, %		7.1					

Richtigkeit		95%-Intervall		OK
Abw.	-2.54	Faktor		2.378
Bias, %	-2.8	$\beta$ -Toleranz		00,070 bis 00,101
		Prüfbereich (30%)		00,063 bis 00,118

## 2.3. Level 3

QC-Sollwert:		501.0		Einheit:		ng/mL											
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10						
1	MESSUNG	542.0	425.0	490.0	441.0	506.0	577.0	529.0	506.0								
2		538.0	428.0	472.0	456.0	477.0	551.0	521.0	514.0								
3		573.0	430.0	487.0	445.0	463.0	538.0	540.0	523.0								
4		565.0															
5		548.0															
6		455.0															
7																	
8																	
9																	
10																	
Mittelwert		536.8333	427.6667	483.0	447.3333	481.6667	554.6667	530.0	514.3333								
BIAS, %		7.2	-14.6	-3.6	-0.7	-3.9	10.7	5.8	2.7								
SD		42.3104	2.5166115	9.6436508	7.7674535	21.3854	20.7445	9.539392	8.6049006								
RSD, %		7.9	6.0	2.0	1.7	4.4	3.7	1.8	1.7								

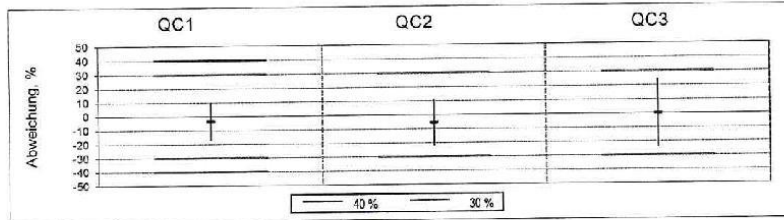
Kenndaten		OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision		
MW (ges.)		501.3704	SD		24.485	SD	49.0074
SD		47.0827	RSD, %		4.9	RSD, %	9.8
RSD, %		9.4					

Richtigkeit		95%-Intervall		OK
Abw.	0.37	Faktor		2.5
Bias, %	0.1	$\beta$ -Toleranz		00,379 bis 00,624
		Prüfbereich (30%)		00,351 bis 00,651

# Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
B-Toleranz	00,021 bis 00,028	00,070 bis 00,101	00,379 bis 00,624
%	-17 bis 10	-22 bis 11	-24 bis 25
Prüfbereich (30%)	00,018 bis 00,033	00,063 bis 00,118	00,351 bis 00,651
Prüfbereich (40%)	00,015 bis 00,035		

### 3. Grenzwerte 3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target	Qualifier
1	8,0	0,197	0,047
2	9,0	0,239	0,054
3	10,0	0,245	0,059
4	11	0,315	0,080
5	12	0,349	0,084
6	13	0,370	0,090
7	14	0,443	0,106
8			
9			
10			

Messungen	1	1
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

<b>Ausreißer-F-Test</b>		
Kalibrator Nr.	3	4
Prüfwert	4,16	2,16
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

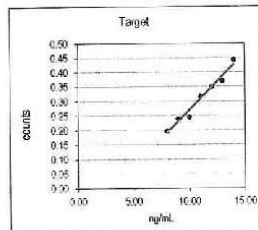
<b>Linearitäts-Mandel-Test</b>		
Prüfwert	1,13	0,32
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

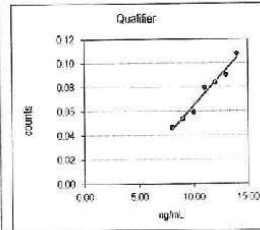
a	0,099418	0,010064
b	-0,125282	-0,036193
R	0,9864	0,9945
Rest-SD	0,016	0,0042

<b>Grenzwerte</b>	
Nachweisgrenze	3,211    1,449
Erfassungsgrenze	8,422    2,898
Bestimmungsgrenze	5,431    4,190



Lineare Kalibration  
 $Y = 000,000 \cdot X - 000,000$



Lineare Kalibration  
 $Y = 000,000 \cdot X - 000,000$

# Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

### 3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N	
1											
2											
3											
4											
5											
6											
		NG-1	0.0		NG-2	0.0		NG-3	0.0		
Nachweisgrenze:		0.0									

### 3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe	ng/mL
---------	-------

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20		
Beurteilung		--- Kriterium: RSD und bias < 20%	

## 4. WIEDERFINDUNG

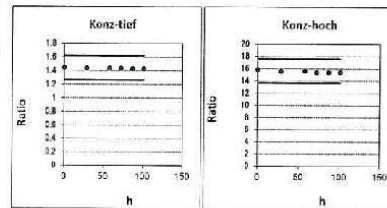
### 4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	50,1 ng/mL	ng/mL	501,0 ng/mL	ng/mL
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
MESSUNG				
1	2.3068	2.3214	23.0931	21.9574
2	2.4459	2.1644	22.7367	21.7505
3	2.4243	2.3842	22.07	22.1018
4	2.4662	2.3737	22.5393	21.409
5	2.4904	2.4254	22.5077	22.7448
6	2.5062	2.356	22.6583	22.0614
Mittelwert	2.44	2.338	22.60268333	22.00581667
SD	0.071	0.091	0.336	0.442
RSD, %	2.9	3.9	1.5	2.0
N (Werte)	6	6	6	6

Wiederfindung, %	95.8	97.4
RSD, %	4.2	2.6

### 4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool Ratio	Zeit h	QC-Pool Ratio
	0:00	1	0:00	16
	28:50	1	28:50	16
	57:50	1	57:50	16
	72:00	1	72:00	15
	88:50	1	86:50	15
	101:00	1	101:00	15
Werte	8		5	
min. Wert	1.4342	Ratio	15.3907	Ratio
max. Wert	1.4516	Ratio	15.863	Ratio
Spanne	0.0174	Ratio	0.4723	Ratio
Spanne, %	1.2	%	3.0	%
Prüfwert	25.0	%	25.0	%
Steigung	-5752.43069633		-183.32526655	
Abschnitt	8346.4522		2909.6061	
R	-0.95501		-0.93416	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert





## 7.2 Valistat-Validierungsprotokoll: Methamphetamin

### Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS
Titel		Quantitative Bestimmung von Amphetamin und Derivaten im Serum mit GC-MS	
SOP		SAA-T-001	
<b>Angaben zur Methode</b>			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	Amphetamin und Derivate im Serum mit GC-MS		
Anwendungsgebiet	Klinische / Forensische Toxikologie		
Arbeitsbereich	10 - 1000 ng/mL		
Analyt	Methamphetamin (Interner Standard: Methamphetamin-d5)		
Weitere bestimmbare Analyte	Quant: Amphetamin, MDMA, MDA, MDEA, MBDB; Semi-Quant: Methylphenidat, Ethylon, Methylon, Methcathinon, Cathinon, 4-MTA, PMA, Ethylamphetamin, Mephedron, Ephedrin		
<b>Verantwortlichkeiten</b>			
Leiter der Validierung	Fr. Dr. K. Bümke-Anbau		
Beteiligte Mitarbeiter	F. Picht		
Bearbeitungszeitraum	November 2019 - Februar 2020		
Methode gültig erklärt am	02.03.2020		
Methode ungültig erklärt am	entfällt		
Zusammenfassung und Bewertung	Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, eindampfen und PFA-Derivatisierung		

#### Inhaltsverzeichnis

##### 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

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

##### 2. Genauigkeit

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

##### 3. Grenzwerte

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

##### 4. Wiederfindung

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

# Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal:	m/z = 204	Messgröße:	Ratio	Einheit:	ng/mL
------------	-------------	-----------	------------	-------	----------	-------

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0	
MESSUNG	1	0.365	0.57	0.762	1.962	2.733	5.785	11.6573	24.1475	32.3431	41.0288
	2	0.41	0.606	0.785	1.975	2.739	5.699	12.0065	23.9788	29.8286	39.7853
	3	0.419	0.578	0.769	2.01	2.711	5.551	11.6781	24.0131	31.4227	39.5443
	4	0.485	0.596	0.781	1.943	2.751	6.02	11.4033	23.7322	31.0516	42.0055
	5	0.432	0.608	0.801	1.953	2.811	5.289	11.6513	22.4167	30.6202	36.7121
	6	0.421	0.571	0.717	1.935	2.784	5.386	12.1395	22.3103	34.0428	37.9439
Mittelwert	0.419	0.598	0.766	1.953	2.751	5.62	11.75516667	23.4334	31.5515	39.83666667	
SD	0.0326	0.0173	0.0299	0.0271	0.0341	0.2696	0.2696	0.8395	1.4789	1.4873	
Varianz	0.0011	0.0003	0.0009	0.0007	0.0012	0.0711	0.0722	0.7047	2.1871	2.2122	
Werte	5.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	
Ausreisser-Test nach Grubbs											
Extremwert	0.365	0.608	0.717	2.01	2.811	6.02	12.1395	22.3103	34.0428	42.0056	
Prüfwert	1.849	1.166	1.634	1.747	1.74	1.801	1.427	1.338	1.585	1.458	
Signifikanz 95%											
Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
Signifikanz 99%											
Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = ax + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = Ax <sup>2</sup> + Bx + C
Prüfwert 0.4213	Prüfwert -6.99	a 0.000,000	A 0.00000172
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 0.000,000	B 0.03805286
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 0.0001	C 0.02759028
		Rest-SD 0.00	R 0.9999817
			Rest-SD 0.08983787

1.2 QUALIFIER	Messsignal:	m/z = 180	Messgröße:	Ratio	Einheit:	ng/mL
---------------	-------------	-----------	------------	-------	----------	-------

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0	
MESSUNG	1	0.135	0.211	0.265	0.737	1.021	2.162	4.362	8.546	12.005	15.571
	2	0.155	0.225	0.266	0.738	1.032	2.151	4.523	9.071	11.349	15.161
	3	0.165	0.220	0.293	0.731	1.026	2.116	4.445	9.158	12.072	14.399
	4	0.179	0.228	0.302	0.741	1.046	2.294	4.359	9.086	11.984	15.157
	5	0.196	0.232	0.305	0.747	1.097	2.024	4.471	8.929	11.808	14.828
	6	0.166	0.219	0.274	0.743	1.055	2.034	4.663	8.892	12.895	14.760
Mittelwert	0.161	0.223	0.291	0.739	1.046	2.135	4.47	8.947	11.88538333	14.5989	
SD	0.015	0.008	0.012	0.006	0.028	0.094	0.114	0.221	0.436	0.436	
Varianz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.001	0.009	0.013	0.049	0.19	0.19	
Werte	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Extremwert	0.136	0.211	0.274	0.731	1.097	2.294	4.663	8.546	12.895	15.571	
Prüfwert	1.728	1.512	1.442	1.558	1.810	1.693	1.692	1.817	1.879	1.549	
Tabellenwert 1.822											
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
Tabellenwert 1.944											
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = ax + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = Ax <sup>2</sup> + Bx + C
Prüfwert 0.4207	Prüfwert 3.3	a 0.014099598	A 0.00000026
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 0.000,000	B 0.01476842
Bestanden? ja	Linear? ja	R 0.0001	C -0.00548414
		Rest-SD 0.03681584	R 0.99998498
			Rest-SD 0.03419704

# Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz  %

Konzentration

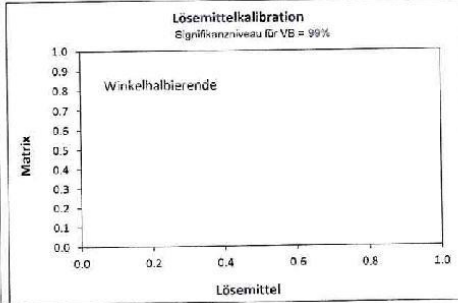
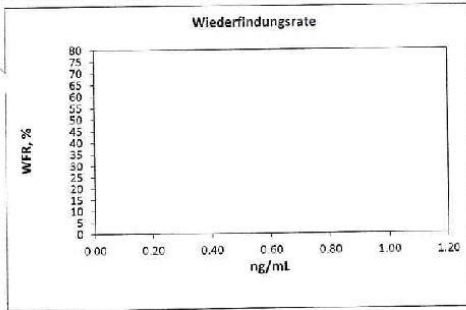
Lösemittel (x<sub>0</sub>)

Matrix (x<sub>m</sub>)

WFR gemessen

WFR berechnet

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



## 2. Genauigkeit

### 2.1. Level 1

QC-Sollwert:  Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	28.2	24.0	25.1	25.6	26.1	24.2	25.2	23.2		
1	25.0	27.1	25.4	24.9	24.4	24.0	25.2	23.0		
3	26.5	26.4	25.4	24.1	24.5	23.6	24.7	23.2		
4	25.0									
5	24.9									
6	25.4									
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	25.8333	25.8333	25.3	24.6667	25.0	23.9333	25.0333	23.1333		
BIAS, %	2.5	2.5	0.4	-1.3	-0.8	-5.0	-0.7	-9.2		
SD	1.3033291	1.6258331	0.1732051	0.7505553	0.9539392	0.305505	0.2886751	0.1134701		
RSD, %	5.0	6.3	0.7	3.0	3.8	1.3	1.2	0.5		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	24.9741	SD	0.9505308	SD	1.2279337
SD	1.2024311	RSD, %	3.8	RSD, %	4.9
RSD, %	4.8				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-0.23	Faktor	2.377
Bias, %	-0.9	B-Toleranz	00.022 bis 00.028
		Prüfbereich (30%)	00.018 bis 00.033
		Prüfbereich (40%)	00.015 bis 00.035



# Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 2.2. Level 2

		QC-Sollwert:	90.4		Einheit:	ng/mL					
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	100.0	87.5	92.1	95.8	87.3	88.8	91.7	88.5		
	2	98.5	88.7	93.8	83.3	88.3	87.6	86.8	82.6		
	3	90.9	79.6	88.9	93.9	88.3	87.7	90.3	83.8		
	4	106.0									
	5	88.8									
	6	88.2									
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert		96.4	84.6	91.8667	91.0	87.3	87.3	89.6	84.3		
BIAS, %		6.6	-8.4	1.6	0.7	-3.4	-3.4	-0.9	-5.7		
SD		7.4186252	4.348563	1.8810033	8.7357256	1.0	0.6082753	2.5238859	1.6974984		
RSD, %		7.7	5.1	2.0	7.4	1.1	0.7	2.8	2.4		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	89.863	SD	4.7800389
SD	5.9549687	RSD, %	5.3
RSD, %	6.6		
		SD	6.0747942
		RSD, %	6.8

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2.34
Bias, %	$\beta$ -Toleranz	00,075 bis 00,104
	Prüfbereich (30%)	00,063 bis 00,118

## 2.3. Level 3

		QC-Sollwert:	501.0		Einheit:	ng/mL					
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	530.0	417.0	479.0	437.0	497.0	568.0	526.0	495.0		
	2	522.0	450.0	463.0	449.0	465.0	549.0	524.0	508.0		
	3	578.0	422.0	481.0	437.0	455.0	531.0	538.0	513.0		
	4	575.0									
	5	533.0									
	6	460.0									
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert		531.0	423.0	474.3333	441.0	473.0	540.3333	529.3333	504.6667		
BIAS, %		6.0	-15.6	-5.3	-12.0	-5.6	9.6	5.7	0.7		
SD		46.0608	6.5574385	9.8657657	6.9282032	21.3776	18.5023	7.5718778	9.0737717		
RSD, %		8.7	1.6	2.1	1.8	4.5	3.4	1.4	1.8		

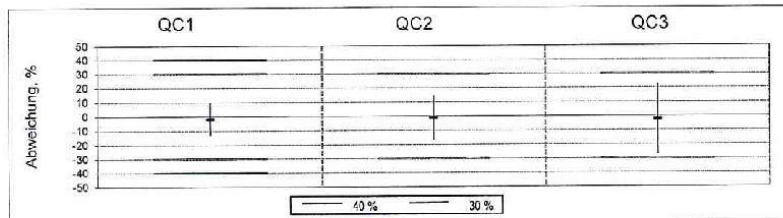
Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	495.1852	SD	26.0189
SD	48.176	RSD, %	5.3
RSD, %	9.7		
		SD	50.088
		RSD, %	10.11498857

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2.499
Bias, %	$\beta$ -Toleranz	00,384 bis 00,615
	Prüfbereich (30%)	00,351 bis 00,651

# Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
B-Toleranz	00,022 bis 00,028	00,075 bis 00,104	00,364 bis 00,615
%	-13 bis 10	-17 bis 15	-27 bis 23
Prüfbereich (30%)	00,018 bis 00,033	00,053 bis 00,118	00,351 bis 00,651
Prüfbereich (40%)	00,015 bis 00,035		

### 3. Grenzwerte 3.1 Bestimmung nach DIN 32845

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target	Qualifier
1	6,0	0,150	0,057
2	7,0	0,176	0,066
3	8,0	0,203	0,076
4	9,0	0,230	0,086
5	10,0	0,256	0,096
6	11	0,283	0,106
7	12	0,309	0,116
8			
9			
10			

Messungen	1	1
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	5	5
Prüfwert	3,31	4,92
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

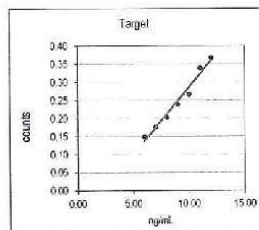
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	5,33	3,01
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

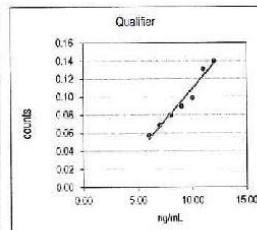
a	0,037239	0,013986
b	-0,096711	-0,0307
R	0,9871	0,9803
Rest-SD	0,014	0,0066

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	2,593	1,402
Erfassungsgrenze	5,185	2,805
Bestimmungsgrenze	5,074	4,005



Lineare Kalibration  
 $Y = 000,000 \cdot X - 000,000$



Lineare Kalibration  
 $Y = 000,000 \cdot X - 000,000$

# Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

### 3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N	
1											
2											
3											
4											
5											
6											
			NG-1	0.0		NG-2	0.0		NG-3	0.0	
Nachweisgrenze :			0.0								

### 3.2.2 Bestimmungsgränze

Vorgabe ng/mL

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20		
Beurteilung		--- Kriterium: RSD und bias < 20%	

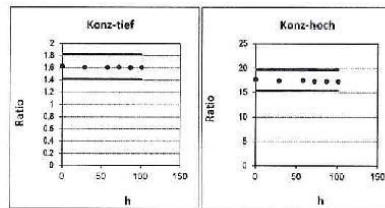
## 4. WIEDERFINDUNG

### 4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	60.5 ng/mL		505.0 ng/mL	
	Lösemittel Ratio	Matrix Ratio	Lösemittel Ratio	Matrix Ratio
1	2.2062	2.2498	21.3272	20.9498
2	2.3178	2.0728	21.3674	20.7903
3	2.2368	2.3019	20.4784	21.1918
4	2.3157	2.2824	21.2038	20.5178
5	2.3543	2.3614	21.2295	21.6417
6	2.3829	2.2525	21.2961	20.9771
Mittelwert	2.312	2.255	21.1484	21.0126667
SD	0.061	0.098	0.334	0.381
RSD, %	2.6	4.3	1.6	1.8
N (Werte)	6	6	6	5
Wiederfindung, %	97.5		99.4	
RSD, %	4.7		2.7	

### 4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool Ratio	Zeit h	QC-Pool Ratio
	0.00	2	0.00	18
	28.50	2	28.50	17
	57.50	2	57.50	18
	72.00	2	72.00	17
	88.50	2	88.50	17
	101.00	2	101.00	17
Werte	6		6	
min. Wert	1.6091	Ratio	17.3277	Ratio
max. Wert	1.629	Ratio	17.7044	Ratio
Spanne	0.0199	Ratio	0.3767	Ratio
Spanne, %	1.2	%	2.1	%
Prüfwert	25.0	%	25.0	%
Steigung	-3857.48825779		-216.64942849	
Abschnitt	6287.6197		3840.3257	
R	-0.72784		-0.69584	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert



## 7.3 Valistat-Validierungsprotokoll: MDMA

### Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS
Titel		Quantitative Bestimmung von Amphetamin und Derivaten im Serum mit GC-MS	
SOP		SAA-T-001	
<b>Angaben zur Methode</b>			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	Amphetamin und Derivate im Serum mit GC-MS		
Anwendungsgebiet	Klinische / Forensische Toxikologie		
Arbeitsbereich	10 - 1000 ng/mL		
Analyt	MDMA (Interner Standard: MDMA-d5)		
Weitere bestimmbare Analyte	Quant: Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDEA, MBDB; Semi-Quant: Methylphenidat, Methylon, Methoath., Cathinon, 4-MTA, PMA, Ethylamphetamin, Mephedron, Ephedrin, Ethylon		
<b>Verantwortlichkeiten</b>			
Leiter der Validierung	Fr. Dr. K. Blümke-Anbau		
Beteiligte Mitarbeiter	F. Picht		
Bearbeitungszeitraum	November 2019 - Februar 2020		
Methode gültig erklärt am	02.03.2020		
Methode ungültig erklärt am	entfällt		
Zusammenfassung und Bewertung	Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, eindampfen und PFPA-Derivatisierung		

#### Inhaltsverzeichnis

#### 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

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

#### 2. Genauigkeit

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

#### 3. Grenzwerte

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

#### 4. Wiederfindung

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



# Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET Messsignal: m/z = 204 Messgröße: Ratio Einheit: ng/mL

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0
1	0.387	0.605	0.785	2.048	2.899	6.143	12.7534	26.396	38.6019	50.8442
2	0.441	0.62	0.805	2.096	2.899	6.351	13.4727	27.5951	35.307	47.9099
3	0.44	0.59	0.786	2.119	2.906	6.192	12.9851	28.835	38.3138	48.8423
4	0.478	0.812	0.811	2.044	2.919	6.732	12.5068	28.6963	37.7457	52.015
5	0.465	0.624	0.819	2.08	3.055	5.891	13.6618	28.4151	37.146	47.0418
6	0.451	0.594	0.744	2.068	2.962	6.024	14.1704	28.9839	41.4833	47.3191
Mittelwert	0.444	0.607	0.792	2.069	2.935	6.189	13.25835667	27.81856667	38.08201667	49.96138333
SD	0.0312	0.0137	0.0268	0.0277	0.0651	0.346	0.6221	0.9958	2.0243	2.0232
Varianz	0.001	0.0002	0.0007	0.0008	0.0044	0.1197	0.387	0.9917	4.0677	4.0935
Werte	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

### Ausreisser-Test nach Grubbs

Extremwert	0.387	0.59	0.744	2.119	3.055	6.732	14.1704	26.396	41.4833	52.015
Prüfwert	1.802	1.274	1.779	1.803	1.818	1.57	1.465	1.439	1.68	1.509

### Signifikanz 95%

Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

### Signifikanz 99%

Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x <sup>2</sup> + B*x + C
Prüfwert 0.4226	Prüfwert 6.99	a 000.000	A 0.00000681
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b -000.001	B 0.04224151
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 00.001	C -0.06434251
		Rest-SD 0.00	R 0.99998702
			Rest-SD 0.10294284

1.2 QUALIFIER Messsignal: m/z = 339 Messgröße: Ratio Einheit: ng/mL

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0
1	0.023	0.035	0.044	0.124	0.174	0.371	0.707	1.632	2.295	2.832
2	0.027	0.037	0.048	0.123	0.172	0.375	0.800	1.668	2.102	2.786
3	0.026	0.036	0.047	0.125	0.172	0.353	0.788	1.697	2.239	2.731
4	0.028	0.036	0.047	0.120	0.169	0.393	0.690	1.677	2.222	2.996
5	0.027	0.036	0.047	0.121	0.173	0.318	0.792	1.653	2.193	2.637
6	0.026	0.034	0.043	0.120	0.170	0.335	0.821	1.605	2.438	2.747
Mittelwert	0.026	0.036	0.046	0.122	0.172	0.359	0.766	1.659	2.248	2.805
SD	0.002	0.001	0.002	0.002	0.028	0.054	0.031	0.031	0.113	0.113
Varianz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.001	0.003	0.001	0.013	0.013
Werte	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Extremwert	0.023	0.034	0.043	0.125	0.174	0.318	0.590	1.605	2.438	2.986
Prüfwert	1.771	1.659	1.424	1.189	1.326	1.500	1.418	1.714	1.682	1.607

Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x <sup>2</sup> + B*x + C
Prüfwert 0.4223	Prüfwert 6.34	a 0.0282121	A 0.0000021
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 000.000	B 0.00252503
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 00.001	C -0.01267753
		Rest-SD 0.02748818	R 0.99983574
			Rest-SD 0.02127985

# Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz  %

Konzentration

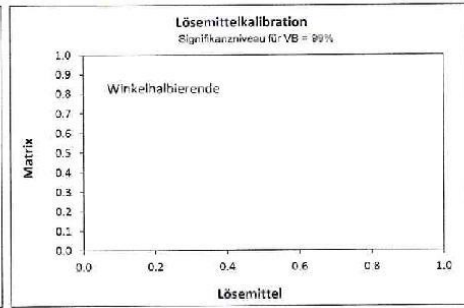
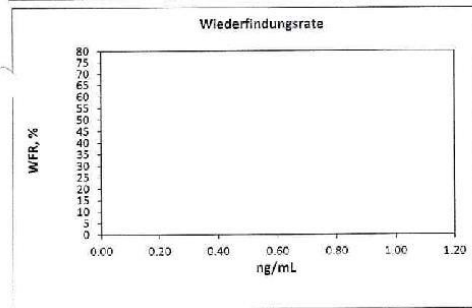
Lösemittel (x<sub>0</sub>)

Matrix (x<sub>m</sub>)

WFR gemessen

WFR berechnet

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



## 2. Genauigkeit

### 2.1. Level 1

QC-Sollwert:  Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	23.5	25.5	26.5	27.0	27.9	25.9	26.9	24.7		
1	27.7	29.1	26.7	26.8	26.1	25.9	26.7	24.8		
3	28.7	27.6	26.7	26.2	26.5	25.4	26.5	23.9		
4	27.5									
5	27.2									
6	27.9									
7										
8										
9										
10										
Mittelwert	28.0833	27.4	26.6333	26.6667	26.9333	25.7333	26.7	24.667		
BIAS, %	11.4	8.7	5.7	5.8	6.5	2.1	6.0	-2.9		
SD	0.8598762	1.8083141	0.1154701	0.4163332	0.9451631	0.2886751	0.2	0.4932883		
RSD, %	3.1	6.6	0.4	1.6	3.5	1.1	0.7	2.0		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	26.7333	SD	SD
SD	1.2991121	RSD, %	RSD, %
RSD, %	4.9		

Richtigkeit	OK
Abw.	Faktor 2.433
Bias, %	B-Toleranz 00.025 bis 00.032
	Prüfbereich (30%) 00.018 bis 00.033
	Prüfbereich (40%) 00.015 bis 00.035

# Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 2.2. Level 2

MESSUNG	QC-Sollwert: <input type="text" value="90.7"/> Einheit: <input type="text" value="ng/mL"/>									
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	95.0	81.2	81.5	86.2	81.6	80.6	85.7	82.9		
2	93.1	80.4	84.0	75.6	80.9	81.6	80.0	82.4		
3	93.8	76.8	80.0	80.9	83.3	81.2	83.0	82.1		
4	103.0									
5	82.7									
6	82.0									
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	91.6	79.4667	81.8333	82.5667	81.9333	81.1333	82.9	82.4667		
BIAS, %	1.0	-12.4	-9.8	-9.0	-9.7	-10.5	-8.6	-9.1		
SD	7.99975	2.3437861	2.0207259	6.0451747	1.2342339	0.5033223	2.8513155	0.4041452		
RSD, %	8.7	2.9	2.5	7.3	1.5	0.6	3.4	0.5		

Kenndaten		OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	83.9444		SD	4.7689787	SD	6.0284975
SD	5.911679		RSD, %	5.7	RSD, %	7.2
RSD, %	7.0					

Richtigkeit	95%-Intervall		OK
Abw.	-6.75	Faktor	2.34
Bias, %	-7.4	$\beta$ -Toleranz	00,064 bis 00,092
		Prüfbereich (30%)	00,063 bis 00,118

## 2.3. Level 3

MESSUNG	QC-Sollwert: <input type="text" value="501.0"/> Einheit: <input type="text" value="ng/mL"/>									
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	528.0	420.0	474.0	435.0	498.0	505.0	524.0	477.0		
2	539.0	417.0	458.0	483.0	489.0	536.0	511.0	495.0		
3	584.0	412.0	489.0	439.0	456.0	520.0	537.0	493.0		
4	588.0									
5	533.0									
6	452.0									
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	537.3333	415.3333	466.3333	442.3333	474.3333	540.3333	524.0	498.3333		
BIAS, %	7.3	-16.9	-5.9	-11.7	-5.3	7.9	4.6	-2.5		
SD	49.2853	4.0414519	9.2915732	9.4513313	21.5019	22.8108	13.0	9.8657657		
RSD, %	9.2	1.0	2.0	2.1	4.5	4.2	2.5	2.0		

Kenndaten		OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	491.8518		SD	26.1138	SD	51.8995
SD	49.9836		RSD, %	5.7	RSD, %	10.55186803
RSD, %	10.16233147					

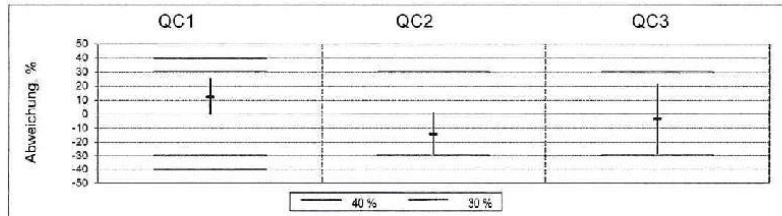
Richtigkeit	95%-Intervall		OK
Abw.	-9.15	Faktor	2.436
Bias, %	-1.8	$\beta$ -Toleranz	00,358 bis 00,609
		Prüfbereich (30%)	00,351 bis 00,851



# Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
<b>±-Toleranz</b>	00,025 bis 00,052	00,064 bis 00,092	00,356 bis 00,608
<b>%</b>	00 bis 25	-30 bis 01	-29 bis 22
<b>Prüfbereich (30%)</b>	00,018 bis 00,033	00,063 bis 00,118	00,351 bis 00,651
<b>Prüfbereich (40%)</b>	00,015 bis 00,035		

### 3. Grenzwerte 3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Kalibrator	Target	Qualifier
Einheit	ng/mL	
1	6.0	0.158
2	7.0	0.183
3	8.0	0.204
4	9.0	0.240
5	10.0	0.272
6	11	0.347
7	12	0.373
8		
9		
10		

Messungen	1	1
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test	
Kalibrator-Nr.	6
Prüfwert	2.36
Krit.-Wert 99%	21.19
Ausreißer	nein

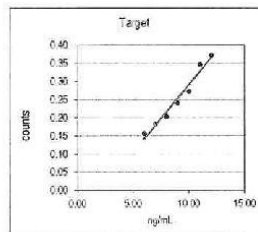
Linearitäts-Mandel-Test	
Prüfwert	5.76
Krit.-Wert 99%	21.19
Bestanden?	ja

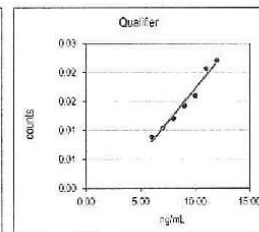
<b>a</b>	0.037345	0.002289
<b>b</b>	-0.082532	-0.005675
<b>R</b>	0.9637	0.9854
<b>Rest-SD</b>	0.016	0.009

Grenzwerte	
Nachweisgrenze	2.927
Erfassungsgrenze	5.854
Bestimmungsgrenze	5.603



Lineare Kalibration  
 $Y = 000,000 \cdot X - 000,000$



Lineare Kalibration  
 $Y = 000,000 \cdot X - 000,000$

# Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

### 3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N	
1											
2											
3											
4											
5											
6											
		NG-1	0.0		NG-2	0.0		NG-3	0.0		
Nachweisgrenze:		0.0									

### 3.2.2 Bestimmungsgrenze

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

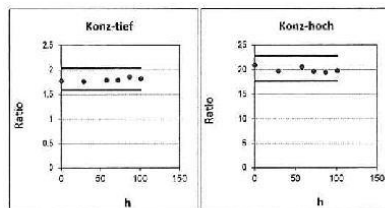
## 4. WIEDERFINDUNG

### 4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	50.3 ng/mL		501.0 ng/mL	
MESSUNG	Lösemittel Ratio	Matrix Ratio	Lösemittel Ratio	Matrix Ratio
	1	2.4524	2.5543	25.5174
2	2.6205	2.3683	25.1621	24.3147
3	2.5618	2.6087	24.0202	24.672
4	2.6022	2.5581	24.9346	24.1311
5	2.7758	2.6433	24.7853	25.1373
6	2.662	2.5467	24.8871	24.3346
Mittelwert	2.615	2.545	24.90116657	24.50921697
SD	0.109	0.099	0.524	0.358
RSD, %	4.2	3.9	2.1	1.5
N (Werte)	6	6	6	6
Wiederfindung, %	57.3		98.4	
RSD, %	5.1		2.9	

### 4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool Ratio	Zeit h	QC-Pool Ratio
	0:00	2	0:00	21
	28:50	2	28:50	20
	57:50	2	57:50	21
	72:00	2	72:00	20
	86:50	2	86:50	20
	101:00	2	101:00	20
Werte	6		6	
min. Wert	1.768	Ratio	19.5358	Ratio
max. Wert	1.8613	Ratio	20.9671	Ratio
Spanne	0.0933	Ratio	1.4313	Ratio
Spanne, %	5.0	%	6.8	%
Prüfwert	25.0	%	25.0	%
Steigung	811.519		-43.57537497	
Abschnitt	-1404.3135		931.8552	
R	0.7513		-0.67949	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert



## 7.4 Valistat-Validierungsprotokoll: MDA

### Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS
Titel		Quantitative Bestimmung von Amphetamin und Derivaten im Serum mit GC-MS	
SOP		SAA-T-001	
<b>Angaben zur Methode</b>			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)		Amphetamin und Derivate im Serum mit GC-MS	
Anwendungsgebiet		Klinische / Forensische Toxikologie	
Arbeitsbereich		10 - 1000 ng/mL	
Analyt		MDA (Interner Standard: MDA-d5)	
Weitere bestimmbare Analyte		Quant: Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDEA, MBDB; Semi-Quant: Methylphenidat, Methylon, Methcath., Cathinon, 4-MTA, PMA, Ethylamphetamin, Mephedron, Ephedrin, Ethylon	
<b>Verantwortlichkeiten</b>			
Leiter der Validierung		Fr. Dr. K. Blünke-Anbau	
Beteiligte Mitarbeiter		F. Picht	
Bearbeitungszeitraum		November 2019 - Februar 2020	
Methode gültig erklärt am		02.03.2020	
Methode ungültig erklärt am		entfällt	
Zusammenfassung und Bewertung		Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, eindampfen und PMPA-Derivatisierung	

#### Inhaltsverzeichnis

##### 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

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

##### 2. Genauigkeit

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

##### 3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32845
  - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
  - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
  - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
  - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)

##### 4. Wiederfindung

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

# Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methoda:	GC-MS

## 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET Messsignal: n/z = 182 Messgröße: Ratio Einheit: ng/mL

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0
1	0.672	1.05	1.379	3.651	4.996	11.0276	22.66	46.0501	65.9048	86.4778
2	0.775	1.094	1.427	3.68	5.147	11.1369	23.8183	51.0687	59.9038	82.9023
3	0.78	1.053	1.388	3.715	5.127	10.7869	23.2276	46.0774	65.9359	83.0522
4	0.778	1.091	1.445	3.633	5.138	11.6115	22.5906	47.9626	64.0311	89.2201
5	0.783	1.092	1.439	3.616	5.454	10.2291	23.33	47.9846	63.3217	79.5188
6	0.721	1.045	1.317	3.644	5.227	10.5207	24.0441	44.9534	70.8832	79.7143
Mittelwert	0.751	1.071	1.399	3.657	5.182	10.89545	23.27843333	47.35613333	64.87958333	83.48093333
SD	0.0455	0.0235	0.0484	0.0356	0.1529	0.4965	0.5897	2.1708	3.8022	3.8032
Varianz	0.0021	0.0006	0.0023	0.0013	0.0233	0.2368	0.3477	4.7114	14.45699836	14.48462149
Werte	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

### Ausreisser-Test nach Grubbs

Extremwert	0.672	1.045	1.317	3.715	5.454	11.6115	24.0441	51.0687	70.8832	89.2201
Prüfwert	1.747	1.058	1.696	1.643	1.785	1.492	1.298	1.71	1.579	1.609

### Signifikanz 95%

Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

### Signifikanz 99%

Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = ax + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = Ax <sup>2</sup> + Bx + C
Prüfwert 0.4224	Prüfwert 6.99	a 0.000,000	A 0.00001039
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b -0.000,001	B 0.07293492
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 0.0001	C -0.01624083
		Rest-SD 0.00	R 0.99997829
			Rest-SD 0.22650603

## 1.2 QUALIFIER

Messsignal: n/z = 325 Messgröße: Ratio Einheit: ng/mL

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0
1	0.088	0.145	0.192	0.506	0.687	1.511	3.123	6.481	8.907	11.138
2	0.099	0.151	0.196	0.505	0.700	1.492	3.213	6.836	7.915	10.569
3	0.104	0.141	0.188	0.496	0.682	1.435	3.076	6.539	8.604	10.513
4	0.104	0.145	0.192	0.482	0.683	1.530	2.962	6.395	8.448	11.603
5	0.111	0.144	0.190	0.477	0.717	1.339	3.028	6.261	8.276	10.403
6	0.104	0.138	0.171	0.478	0.689	1.366	3.125	6.047	9.263	10.474
Mittelwert	0.102	0.144	0.187	0.491	0.693	1.445	3.088	6.425	8.572	10.78295
SD	0.008	0.004	0.009	0.013	0.014	0.079	0.087	0.268	0.48	0.481
Varianz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.006	0.008	0.072	0.231	0.231
Werte	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Extremwert	0.068	0.151	0.171	0.506	0.717	1.339	2.962	6.836	9.283	11.903
Prüfwert	1.791	1.642	1.722	1.161	1.760	1.344	1.447	1.594	1.460	1.706

Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = ax + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = Ax <sup>2</sup> + Bx + C
Prüfwert 0.4218	Prüfwert 6.21	a 0.01080569	A 0.00000046
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 0.000,000	B 0.01037738
Bestanden? ja	Linear? ja	R 0.0001	C -0.03421025
		Rest-SD 0.06034939	R 0.99994545
			Rest-SD 0.04689907



# Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1.3 LÖSEMittelKALIBRATION

Signifikanz  %

Konzentration

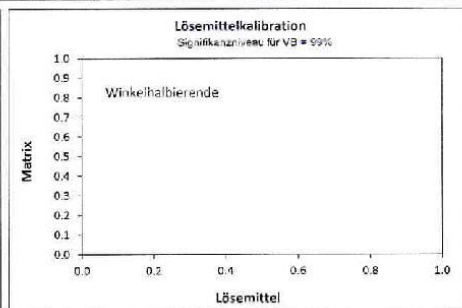
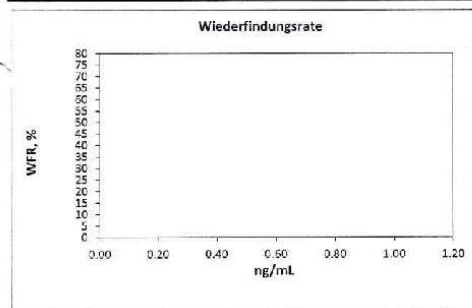
Lösemittel (x<sub>0</sub>)

Matrix (x<sub>m</sub>)

WFR gemessen

WFR berechnet

Wiederfindungsfunktion x <sub>m</sub> = a <sub>0</sub> + x <sub>0</sub> + b <sub>0</sub>	Ausreißer-F-Test	Linearitäts-Test	Varianzhomogenitäts-F-Test
a <sub>0</sub>	Kalibrator Nr.	Prüfwert	RSD Grundkalibration
b <sub>0</sub>	Prüfwert	Kritischer-Wert	RSD Wiederfindung
R	Kritischer-Wert	Bestanden?	Prüfwert
Rest-SD	Ausreisser?		Kritischer-Wert
			Bestanden?



## 2. Genauigkeit

### 2.1. Level 1

QC-Sollwert:  Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	28.0	23.5	24.8	24.6	24.7	24.2	24.5	23.0		
2	25.0	26.5	25.1	23.9	23.3	23.8	24.4	22.9		
3	25.7	25.3	25.2	23.4	23.4	23.7	24.4	22.2		
4	24.9									
5	24.6									
6	25.1									
7										
8										
9										
10										
Mittelwert	25.55	25.1	25.0333	23.9657	23.8	23.9	24.4333	22.7		
BIAS, %	1.4	-0.4	-0.7	4.9	-5.6	-5.2	-3.0	-9.9		
SD	1.2533954	1.5095669	0.2081665	0.6027714	0.781025	0.2645751	0.057735	0.4358899		
RSD, %	4.9	6.0	0.8	2.5	3.3	1.1	0.2	1.9		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	24.4481	SD	0.6877826
SD	1.186258	RSD, %	3.6
RSD, %	4.9		SD
			1.2157124
			RSD, %
			5.0

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	-0.75	Faktor
Bias, %	-3.0	β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)
		Prüfbereich (40%)

# Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 2.2. Level 2

		QC-Sollwert: 60,4		Einheit: ng/mL							
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	64,7	54,2	57,9	56,8	52,2	54,1	56,8	57,3		
	2	83,3	54,1	59,4	55,4	52,9	56,8	54,3	56,6		
	3	83,8	51,3	56,4	57,2	54,7	56,1	56,5	56,1		
	4	70,8									
	5	56,4									
	6	55,6									
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert		62,4	53,2	57,9	57,1333	53,2667	55,6667	55,8667	56,3333		
BIAS, %		3,3	-11,9	-4,1	-5,4	-11,8	-7,8	-7,5	-8,7		
SD		9,6628615	1,6462073	1,5	1,7009901	1,2897028	1,40119	1,3660397	0,8736895		
RSD, %		9,1	3,1	2,6	3,0	2,4	2,5	2,4	1,6		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	57,1296	SD	3,1502153
SD	4,2116884	RSD, %	5,5
RSD, %	7,4		
		SD	4,3164103
		RSD, %	7,6

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2,38
Bias, %	β-Toleranz	00,044 bis 00,064
	Prüfbereich (30%)	00,042 bis 00,079

## 2.3. Level 3

		QC-Sollwert: 504,0		Einheit: ng/mL							
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	519,0	455,0	478,0	420,0	481,0	579,0	532,0	482,0		
	2	521,0	436,0	459,0	436,0	457,0	549,0	521,0	493,0		
	3	566,0	420,0	492,0	428,0	457,0	528,0	540,0	489,0		
	4	564,0									
	5	512,0									
	6	436,0									
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert		519,5	437,0	468,3333	428,0	465,0	552,0	531,0	488,0		
BIAS, %		3,1	-13,3	-7,5	-15,1	7,7	9,5	5,4	-3,2		
SD		47,6267	17,5214	10,2144	8,0	13,6964	25,632	9,596992	5,6677644		
RSD, %		9,2	4,0	2,2	1,8	3,0	4,6	1,8	1,1		

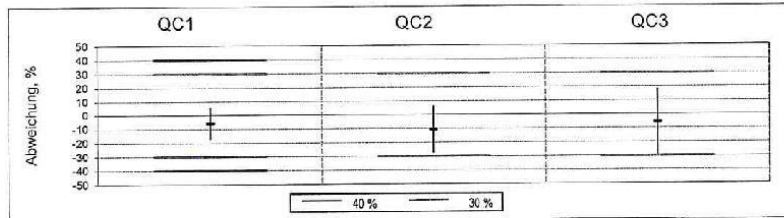
Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	469,5926	SD	27,3709
SD	47,859	RSD, %	5,6
RSD, %	9,8		
		SD	49,6652
		RSD, %	10,14418871

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	Faktor	2,436
Bias, %	β-Toleranz	00,355 bis 00,597
	Prüfbereich (30%)	00,353 bis 00,655

# Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
B-Toleranz	00,021 bis 00,027	00,044 bis 00,064	00,355 bis 00,587
%	-17 bis 08	-28 bis 03	-30 bis 18
Prüfbereich (30%)	00,018 bis 00,033	00,042 bis 00,079	00,353 bis 00,655
Prüfbereich (40%)	00,015 bis 00,035		

### 3. Grenzwerte

3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target	Qualifier
1	8,0	0,369	0,051
2	9,0	0,432	0,058
3	10,0	0,478	0,066
4	11	0,625	0,085
5	12	0,672	0,092
6	13	0,704	0,097
7	14	0,672	0,119
8			
9			
10			

Messungen	1	1
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test	6	6
Kalibrator Nr.		
Prüfwert	4,59	4,47
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

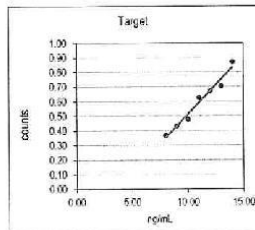
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	0,54	0,66
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

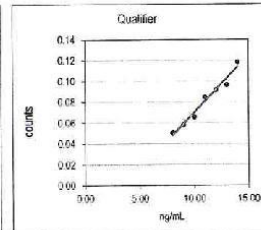
a	0,080361	0,010954
b	-0,290311	-0,039564
R	0,8828	0,985
Rest-SD	0,036	0,0345

Grenzwerte	
Nachweisgrenze	3,497    1,430
Erfassungsgrenze	6,994    2,860
Bestimmungsgrenze	5,773    4,156



Lineare Kalibration  
Y = 000,000·X - 000,000



Lineare Kalibration  
Y = 000,000·X - 000,000



# Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

### 3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
			NG-1	0.0		NG-2	0.0		NG-3	0.0
Nachweisgrenze:			0.0							

### 3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe: \_\_\_\_\_ ng/mL

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

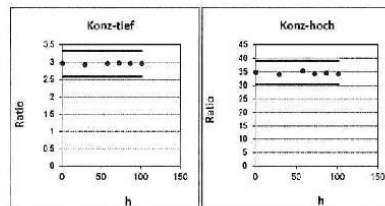
## 4. WIEDERFINDUNG

### 4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	50.5	ng/mL	504.0	ng/mL
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
MESSUNG				
1	4.0073	3.9656	41.3283	39.6657
2	4.1676	3.7206	41.5314	39.2078
3	4.1658	4.0768	38.5199	39.3696
4	4.1169	4.0757	40.4096	39.3706
5	4.1873	4.1428	40.8293	40.7377
6	4.2853	4.08	40.6271	38.8042
Mittelwert	4.153	4.01	40.50963333	39.5241
SD	0.091	0.153	1.069	0.658
RSD, %	2.2	3.8	2.6	1.7
N (Werte)	6	6	6	6
Wiederfindung, %	96.6	97.6		
RSD, %	3.9	3.0		

### 4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool Ratio	Zeit h	QC-Pool Ratio
	0.00	3	0.00	35
	28.50	3	28.50	34
	57.50	3	57.50	35
	72.00	3	72.00	34
	86.50	3	86.50	35
	101.00	3	101.00	34
Werte	5		6	
min. Wert	2.9348	Ratio	34.2091	Ratio
max. Wert	2.9795	Ratio	35.3903	Ratio
Spanne	0.0447	Ratio	1.1812	Ratio
Spanne, %	1.5	%	3.3	%
Prüfwert	25.0	%	25.0	%
Steigung	961.294		-22.03378305	
Abschnitt	-2793.7443		820.8355	
R	0.40961		-0.2628	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert



## 7.5 Valistat-Validierungsprotokoll: MDEA

### Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS
Titel		Quantitative Bestimmung von Amphetamin und Derivaten im Serum mit GC-MS	
SOP		SAA-T-001	
<b>Angaben zur Methode</b>			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)	Amphetamin und Derivate im Serum mit GC-MS		
Anwendungsgebiet	Klinische / Forensische Toxikologie		
Arbeitsbereich	10 - 1000 ng/mL		
Analyt	MDEA (Interner Standard: MDEA-d5)		
Weitere bestimmbare Analyte	Quant: Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDA, MBDB; Semi-Quant: Methylphenidat, Methylon, Methcath., Cathinon, 4-MTA, PMA, Ethylamphetamin, Mephedron, Ephedrin, Ethylon		
<b>Verantwortlichkeiten</b>			
Leiter der Validierung	Fr. Dr. K. Blünke-Anbau		
Beteiligte Mitarbeiter	F. Picht		
Bearbeitungszeitraum	November 2019 - Februar 2020		
Methode gültig erklärt am	02.03.2020		
Methode ungültig erklärt am	entfällt		
Zusammenfassung und Bewertung	Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, eindampfen und PFP-derivatisierung		

#### Inhaltsverzeichnis

#### 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

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

#### 2. Genauigkeit

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

#### 3. Grenzwerte

- 3.1. Bestimmung nach DIN 32645
  - 3.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze (schwaches Ion)
  - 3.1.2 Bestimmung der Bestimmungsgrenze (intensives Ion)
- 3.2. Bestimmung mittels Alternativmethode
  - 3.2.1 Nachweisgrenze aus dem Signal/Rauschverhältnis
  - 3.2.2 Bestimmungsgrenze aus der Wiederholpräzision (20%)
4. Wiederfindung
  - 4.1. Bestimmung der Wiederfindung
    - 4.1.1 Bestimmung der Wiederfindung für hohe Konzentration
    - 4.1.2 Bestimmung der Wiederfindung für niedrige Konzentration
  - 4.2. Stabilität
    - 4.2.1 Bestimmung der Stabilität bei hoher Konzentration
    - 4.2.2 Bestimmung der Stabilität bei niedriger Konzentration
  - 4.3. Matrixeffekte
    - 4.3.1 Überprüfung der Matrixeffekte bei hoher Konzentration
    - 4.3.2 Bestimmung der Matrixeffekte bei niedriger Konzentration

# Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET	Messsignal: m/z = 218	Messgröße: Ratio	Einheit: ng/ml
------------	-----------------------	------------------	----------------

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0
1	0.443	0.733	0.952	2.476	3.466	7.362	15.2277	31.0693	45.3534	59.6828
2	0.535	0.753	0.976	2.479	3.493	7.615	16.1752	33.7063	41.1743	56.6412
3	0.532	0.715	0.957	2.541	3.486	7.443	16.1157	33.9096	44.9223	56.5895
4	0.575	0.739	0.987	2.438	3.493	8.084	15.8904	33.5375	44.2904	58.7684
5	0.557	0.751	0.991	2.482	3.694	7.129	16.3251	33.3948	43.8249	54.5454
6	0.543	0.718	0.931	2.488	3.577	7.24	16.9624	31.532	47.9947	53.9753
Mittelwert	0.526	0.735	0.951	2.481	3.53	7.479	16.11603333	32.85825	44.59925	58.5636
SD	0.0468	0.0469	0.0395	0.0396	0.0759	0.3403	0.5663	1.2274	2.2192	2.2212
Varianz	0.0022	0.0008	0.0011	0.0011	0.0056	0.1158	0.3207	1.5066	4.9248	4.9339
Werte	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Ausreisser-Test nach Grubbs										
Extremwert	0.443	0.715	0.901	2.541	3.664	8.084	15.2277	31.0693	41.1743	59.5828
Prüfwert	1.763	1.208	1.785	1.793	1.767	1.778	1.569	1.457	1.541	1.305
Signifikanz 95%										
Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Signifikanz 99%										
Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Cochran-Test (Varianzenhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x <sup>2</sup> + B*x + C
Prüfwert 0.4177	Prüfwert -8.99	a 0.000,000	A 0.00000474
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 0.000,000	B 0.05207553
Bestanden? ja	Bestanden? ja	R 0.0001	C -0.10938312
		Rest-SD 0.03	R 0.99997933
			Rest-SD 0.15105453

## 1.2 QUALIFIER

	Messsignal: m/z = 353	Messgröße: Ratio	Einheit: ng/mL
--	-----------------------	------------------	----------------

Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0
1	0.018	0.031	0.040	0.102	0.142	0.307	0.603	1.350	1.752	2.302
2	0.022	0.031	0.039	0.101	0.143	0.311	0.661	1.373	1.695	2.319
3	0.021	0.029	0.038	0.103	0.141	0.300	0.651	1.381	1.812	2.320
4	0.023	0.030	0.040	0.098	0.142	0.325	0.637	1.368	1.805	2.379
5	0.022	0.030	0.040	0.100	0.142	0.284	0.652	1.344	1.769	2.241
6	0.022	0.029	0.035	0.099	0.143	0.288	0.674	1.306	1.874	2.207
Mittelwert	0.021	0.03	0.039	0.1	0.142	0.302	0.646	1.352	1.785	2.295
SD	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.015	0.024	0.026	0.061	0.052
Varianz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.001	0.001	0.004	0.004
Werte	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Extremwert	0.018	0.029	0.036	0.098	0.143	0.325	0.603	1.306	1.695	2.207
Prüfwert	1.770	1.275	1.784	1.363	1.524	1.495	1.751	1.745	1.473	1.426
Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822
Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944
Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

Cochran-Test (Varianzenhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x <sup>2</sup> + B*x + C
Prüfwert 0.4194	Prüfwert 11.78	a 0.00228246	A 0.00000017
Tabellenwert 0.423	Tabellenwert 12.24	b 0.000,000	B 0.00212511
Bestanden? ja	Linear? ja	R 0.0001	C -0.0056765
		Rest-SD 0.01919318	R 0.99991308
			Rest-SD 0.01252311



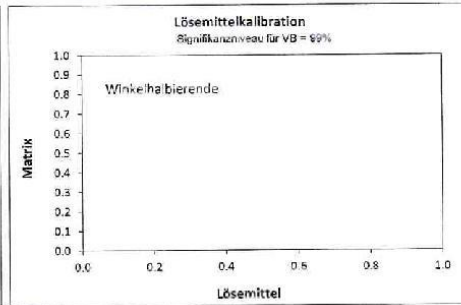
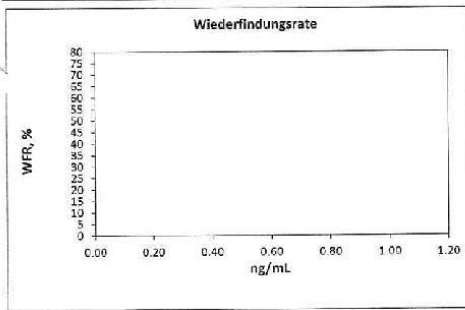
# Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1.3 LÖSEMittelKALIBRATION

Signifikanz	<input type="text"/> %
Konzentration	<input type="text"/>
Lösemittel (x <sub>0</sub> )	<input type="text"/>
Matrix (x <sub>m</sub> )	<input type="text"/>
WFR gemessen	<input type="text"/>
WFR berechnet	<input type="text"/>

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



## 2. Genauigkeit

### 2.1. Level 1

QC-Sollwert:	<input type="text" value="25.1"/>	Einheit:	<input type="text" value="ng/ml"/>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	28.3	24.0	25.5	25.8	26.7	25.0	26.1	23.9		
1	25.5	27.1	25.6	25.6	25.2	24.9	25.8	24.0		
3	25.6	26.2	25.8	24.7	25.5	24.9	25.5	23.6		
4	25.6									
5	25.1									
6	25.8									
7										
8										
9										
10										
Mittelwert	26.15	25.7657	25.6333	25.3667	25.8	24.9333	25.8	23.6333		
BIAS, %	4.2	2.7	2.1	1.1	2.8	-0.7	2.8	-5.0		
SD	1.1640447	1.5947832	0.1527525	0.5859485	0.7937254	0.057735	0.3	0.2081666		
RSD, %	4.5	6.2	0.6	2.3	3.1	0.2	1.2	0.9		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	25.4925	SD	0.8623204	SD	1.0316892
SD	1.0156188	RSD, %	3.4	RSD, %	4.0
RSD, %	4.0				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	0.39	Faktor	2.338
Bias, %	1.5	δ-Toleranz	00,023 bis 00,028
		Prüfbereich (30%)	00,016 bis 00,033
		Prüfbereich (40%)	00,015 bis 00,035

# Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 2.2. Level 2

QC-Sollwert:		90,8		Einheit:		ng/mL					
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	
MESSUNG	1	95,4	80,8	83,9	89,6	82,7	81,5	85,0	80,2		
	2	93,5	79,8	86,5	78,8	80,6	82,7	80,5	78,1		
	3	95,5	79,5	81,4	89,0	83,2	82,9	83,8	80,2		
	4	104,0									
	5	84,2									
	6	83,1									
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert	92,6167	80,0333	83,9333	85,8	82,1667	82,4	83,1	79,5			
BIAS, %	2,0	-11,9	-7,6	-5,5	-9,5	-8,3	-8,5	-12,4			
SD	7,8453792	0,6806859	2,5501634	6,0695664	1,3796135	0,7	2,330236	1,2124355			
RSD, %	8,5	0,9	3,0	7,1	1,7	0,8	2,8	1,5			

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	84,6852	SD	4,6680794	SD	6,3017169
SD	6,1641546	RSD, %	5,5	RSD, %	7,4
RSD, %	7,3				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-5,11	Faktor	2,38
Bias, %	-5,7	β-Toleranz	00,094 bis 00,094
		Prüfbereich (30%)	00,064 bis 00,118

## 2.3. Level 3

QC-Sollwert:		499,0		Einheit:		ng/mL					
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	
MESSUNG	1	486,0	439,0	451,0	433,0	484,0	533,0	498,0	468,0		
	2	481,0	439,0	448,0	421,0	439,0	496,0	484,0	485,0		
	3	540,0	422,0	467,0	435,0	425,0	480,0	511,0	478,0		
	4	536,0									
	5	495,0									
	6	440,0									
	7										
	8										
	9										
	10										
Mittelwert	496,3333	433,3333	452,0	429,6667	442,6667	503,6667	497,6667	477,0			
BIAS, %	0,5	-13,2	-9,4	-13,9	-11,3	0,9	-0,3	-4,4			
SD	37,4064	9,8149546	4,5825757	7,5748778	19,7559	28,9506	13,5031	8,5440037			
RSD, %	7,5	2,3	1,0	1,8	4,5	5,4	2,7	1,8			

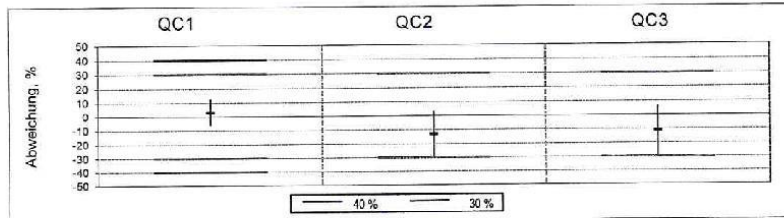
Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	469,6519	SD	23,0453	SD	36,3549
SD	35,2035	RSD, %	4,9	RSD, %	7,7
RSD, %	7,5				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-29,15	Faktor	2,432
Bias, %	-5,8	β-Toleranz	00,354 bis 00,531
		Prüfbereich (30%)	00,349 bis 00,649

# Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

Zusammenfassung 95%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
B-Toleranz	00,023 bis 00,028	00,054 bis 00,094	00,354 bis 00,531
%	-06 bis 13	-30 bis 03	-29 bis 06
Prüfbereich (30%)	00,018 bis 00,033	00,054 bis 00,118	00,349 bis 00,649
Prüfbereich (40%)	00,015 bis 00,035		

### 3. Grenzwerte 3.1 Bestimmung nach DIN 32645

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target	Qualifier
1	6,0	0,182	0,007
2	7,0	0,214	0,008
3	8,0	0,245	0,010
4	9,0	0,295	0,011
5	10,0	0,324	0,013
6	11	0,412	0,017
7	12	0,445	0,017
8			
9			
10			

Messungen	1	1
Signifikanz	99	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test	5	6
Kalibrator Nr.		
Prüfwert	2,23	4,63
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

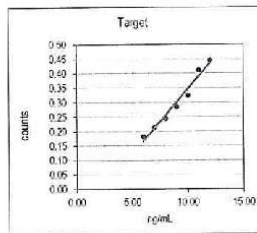
Linearitäts-Mandel-Test	5,92	2,82
Prüfwert		
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

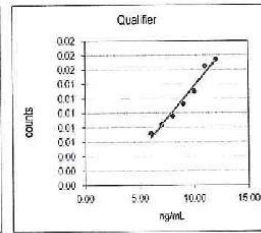
a	0,045171	0,001793
b	-0,105629	-0,004221
R	0,9959	0,9958
Rest-SD	0,018	0,0007

Grenzwerte	
Nachweisgrenze	2,710 1,194
Erfassungsgrenze	5,421 2,388
Bestimmungsgrenze	5,246 3,604



Lineare Kalibration  
 $Y = 0.00,000 \cdot X - 0.000,000$



Lineare Kalibration  
 $Y = 0.00,000 \cdot X - 0.000,000$

# Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

### 3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N		
1												
2												
3												
4												
5												
6												
			NG-1	0.0			NG-2	0.0			NG-3	0.0
Nachweisgrenze:			0.0									

### 3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe	ng/mL
---------	-------

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20		
Beurteilung		--- Kriterium: RSD und bias < 20%	

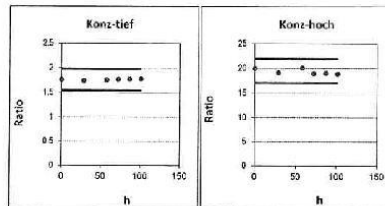
## 4. WIEDERFINDUNG

### 4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	50.1 ng/mL		499.0 ng/mL	
MESSUNG	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
1	2.8239	2.7674	26.1344	26.4069
2	2.7805	2.6477	25.7708	25.3714
3	2.9775	2.8459	27.8678	29.4927
4	2.8321	3.0483	25.4367	25.2951
5	2.8467	2.8555	25.8218	29.2584
6	2.8751	2.7997	25.6443	28.5553
Mittelwert	2.856	2.812	26.0793	27.23146667
SD	0.057	0.152	0.906	2.076
RSD, %	2.3	5.8	3.5	7.6
N (Werte)	6	6	6	6
Wiederfindung, %		98.5	104.4	
RSD, %		5.4	7.2	

### 4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool Ratio	Zeit h	QC-Pool Ratio
	0:00	2	0:00	20
	28:50	2	28:50	19
	57:50	2	57:50	20
	72:00	2	72:00	19
	86:50	2	86:50	19
	101:00	2	101:00	19
Werte	6		6	
min. Wert	1.7512	Ratio	18.8976	Ratio
max. Wert	1.7802	Ratio	20.1005	Ratio
Spanne	0.029	Ratio	1.2029	Ratio
Spanne, %	1.6	%	6.0	%
Prüfwert	25.0	%	25.0	%
Steigung	2741.006		-45.31804292	
Abschnitt	-4789.3818		935.6113	
R	0.73782		-0.64928	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert





## 7.6 Valistat-Validierungsprotokoll: MBDB

### Validierungsprotokoll

Seite:	1 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS
Titel		Quantitative Bestimmung von Amphetamin und Derivaten im Serum mit GC-MS	
SOP		SAA-T-001	
<b>Angaben zur Methode</b>			
Kurzbezeichnung der Methode (ggf. Nr. der SOP)		Amphetamin und Derivate im Serum mit GC-MS	
Anwendungsgebiet		Klinische / Forensische Toxikologie	
Arbeitsbereich		10 - 1000 ng/mL	
Analyt		MBDB (interner Standard: MSDB-05)	
Weitere bestimmbare Analyte		Quant: Amphetamin, Methamphetamine, MDMA, MDA, MDEA; Semi-Quant: Methyphenidat, Methylon, Methcath., Cathinon, 4-MTA, PMA, Ethylamphetamine, Mephedron, Ephedrin, Ethylon	
<b>Verantwortlichkeiten</b>			
Leiter der Validierung		Fr. Dr. K. Blünke-Anbau	
Beteiligte Mitarbeiter		F. Picht	
Bearbeitungszeitraum		November 2019 - Februar 2020	
Methode gültig erklärt am		02.03.2020	
Methode ungültig erklärt am		entfällt	
Zusammenfassung und Bewertung		Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, eindampfen und PFP-derivatisierung	

#### Inhaltsverzeichnis

##### 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

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

##### 2. Genauigkeit

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

##### 3. Grenzwerte

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

##### 4. Wiederfindung

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

# Validierungsprotokoll

Seite:	2 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET		Messsignal: m/z = 218									Messgröße: Ratio									Einheit: ng/mL		
MESSUNG	Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0											
	1	0.415	0.581	0.889	2.298	3.237	6.896	14.3526	29.8107	43.3598	58.2105											
	2	0.465	0.695	0.913	2.289	3.225	7.031	15.0767	31.759	40.0277	54.8177											
	3	0.494	0.56	0.854	2.322	3.205	6.876	15.2048	32.1206	42.4839	53.5947											
	4	0.532	0.685	0.913	2.272	3.26	7.355	14.8558	31.7148	41.9927	55.6766											
	5	0.52	0.695	0.918	2.305	3.344	6.614	15.2261	31.4564	41.5045	51.9113											
	6	0.501	0.658	0.827	2.298	3.303	6.708	15.6657	29.3736	45.6223	51.5106											
	Mittelwert	0.498	0.679	0.896	2.297	3.253	6.912	15.09661667	31.03918333	42.53166	53.9869											
	SD	0.0423	0.0765	0.0372	0.0165	0.0519	0.2617	0.4934	1.149	1.556	1.99											
	Varianz	0.0018	0.0003	0.0014	0.0003	0.0027	0.0685	0.2434	1.3203	3.626	3.9599											
	Werte	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0											
	Ausreisser-Test nach Grubbs																					
	Extremwert	0.415	0.658	0.827	2.322	3.344	7.355	15.6657	29.3736	45.6223	51.5106											
	Prüfwert	1.712	1.255	1.571	1.5	1.555	1.693	1.555	1.45	1.682	1.244											
	Signifikanz 95%																					
	Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822											
	Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein											
	Signifikanz 99%																					
	Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944											
	Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein											

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)		Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)		Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b		Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x <sup>2</sup> + B*x + C	
Prüfwert	0.4202	Prüfwert	-5.99	a	0.000.000	A	0.00000555
Tabellenwert	0.423	Tabellenwert	12.24	b	-0.000.001	B	0.04857613
Bestanden?	ja	Bestanden?	ja	R	0.0001	C	-0.13456571
				Rest-SD	0.00	R	0.99996594
						Rest-SD	0.18208189

1.2 QUALIFIER		Messsignal: m/z = 353									Messgröße: Ratio									Einheit: ng/mL		
MESSUNG	Konzentration	10.0	15.0	20.0	50.0	70.0	150.0	300.0	600.0	800.0	1000.0											
	1	0.021	0.034	0.044	0.113	0.160	0.339	0.706	1.416	2.124	2.587											
	2	0.024	0.034	0.046	0.111	0.157	0.342	0.736	1.544	1.950	2.683											
	3	0.023	0.032	0.043	0.114	0.155	0.333	0.731	1.533	2.042	2.608											
	4	0.026	0.033	0.043	0.110	0.157	0.353	0.709	1.524	2.033	2.610											
	5	0.025	0.033	0.044	0.111	0.154	0.315	0.725	1.506	1.986	2.419											
	6	0.024	0.032	0.049	0.109	0.158	0.318	0.752	1.461	2.217	2.489											
	Mittelwert	0.024	0.033	0.043	0.111	0.158	0.335	0.727	1.501	2.06	2.566											
	SD	0.002	0.001	0.002	0.002	0.003	0.017	0.017	0.052	0.095	0.095											
	Varianz	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.003	0.006	0.009											
	Werte	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6											
	Extremwert	0.021	0.032	0.049	0.114	0.164	0.363	0.752	1.419	2.217	2.419											
	Prüfwert	1.800	1.406	1.811	1.519	1.789	1.600	1.442	1.597	1.543	1.543											
	Tabellenwert	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822	1.822											
	Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein											
	Tabellenwert	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944	1.944											
	Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein											

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)		Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)		Lineare Kalibrationsfunktion Y = a*x + b		Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A*x <sup>2</sup> + B*x + C	
Prüfwert	0.4228	Prüfwert	8.62	a	0.00257704	A	0.00000117
Tabellenwert	0.423	Tabellenwert	12.24	b	0.000.000	B	0.00241648
Bestanden?	ja	Linear?	ja	R	0.0001	C	-0.00971173
				Rest-SD	0.02061733	R	0.9999054
						Rest-SD	0.01475045

# Validierungsprotokoll

Seite:	3 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 1.3 LÖSEMITTELKALIBRATION

Signifikanz  %

Konzentration

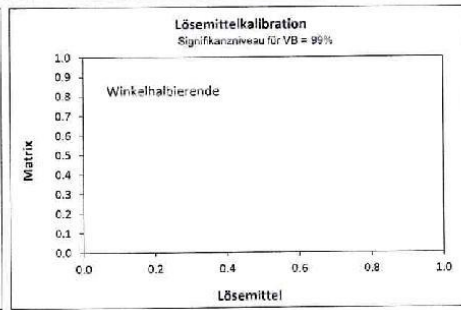
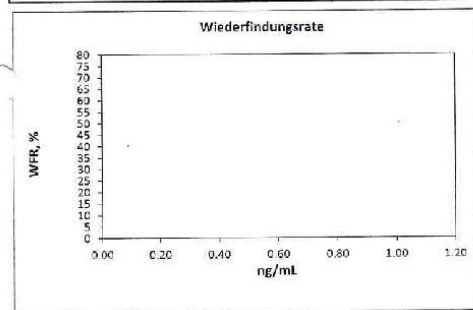
Lösemittel (x<sub>0</sub>)

Matrix (x<sub>m</sub>)

WFR gemessen

WFR berechnet

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



## 2. Genauigkeit

### 2.1. Level 1

QC-Sollwert:  Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	26.6	24.6	25.7	23.7	24.4	23.1	23.3	22.3		
3	24.6	25.6	26.0	22.9	22.7	22.8	23.2	22.1		
3	25.0	26.6	25.4	22.9	23.2	22.5	23.1	21.5		
4	25.4									
5	25.0									
6	25.2									
7										
8										
9										
10										
Mittelwert	25.4667	25.6	25.7	23.1667	23.4333	22.8333	23.2	21.9667		
BIAS, %	1.5	2.0	2.4	-7.7	-6.6	-9.0	-7.6	-12.5		
SD	0.722969	1.0	0.3	0.4618402	0.8736995	0.2516511	0.1	0.4163332		
RSD, %	2.8	3.9	1.2	2.0	3.7	1.1	0.4	1.9		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	24.0926	SD	0.6172946	SD	1.5686784
SD	1.4890473	RSD, %	2.6	RSD, %	6.5
RSD, %	6.2				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-1.01	Faktor	2.503
Bias, %	-4.0	β-Toleranz	00.019 bis 00.027
		Prüfbereich (30%)	00.018 bis 00.033
		Prüfbereich (40%)	00.015 bis 00.035



# Validierungsprotokoll

Seite:	4 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 2.2. Level 2

QC-Sollwert:		60,5		Einheit:		ng/mL											
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10						
MESSUNG	1	63,5	57,6	61,5	57,3	53,1	55,7	55,7	55,5								
	2	63,8	56,1	61,2	59,3	54,0	56,2	52,2	52,9								
	3	64,0	53,1	58,5	56,4	53,9	54,3	55,8	53,9								
	4	71,4															
	5	59,7															
	6	58,3															
	7																
	8																
	9																
	10																
Mittelwert		63,45	55,6	60,4	54,6667	53,6667	55,4	54,6667	54,0								
BIAS, %		4,9	-8,1	-0,2	-9,6	-11,3	-8,4	-9,8	-10,7								
SD		4,5554135	2,2312878	1,6522712	3,8083242	0,4932883	0,9848858	2,0502032	1,4525839								
RSD, %		7,2	4,1	2,7	7,0	0,9	1,8	3,8	2,7								

Kenndaten		OK		Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)		57,2444		SD		2,6400591	
SD		4,6198013		RSD, %		5,1	
RSD, %		8,1		SD			4,7742898
				RSD, %			8,3

Richtigkeit		95%-Intervall		OK		
Abw.		-3,26		Faktor		2,433
Bias, %		-5,4		$\beta$ -Toleranz		00,043 bis 00,065
				Prüfbereich (30%)		00,042 bis 00,079

## 2.3. Level 3

QC-Sollwert:		501,0		Einheit:		ng/mL											
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10						
MESSUNG	1	548,0	467,0	489,0	467,0	490,0	541,0	498,0	465,0								
	2	549,0	445,0	500,0	449,0	441,0	509,0	491,0	478,0								
	3	582,0	448,0	554,0	439,0	423,0	489,0	492,0	479,0								
	4	572,0															
	5	553,0															
	6	461,0															
	7																
	8																
	9																
	10																
Mittelwert		544,1667	453,3333	507,6667	451,6667	441,3333	512,3333	493,6667	474,0								
BIAS, %		8,6	-9,5	1,3	-9,8	-11,9	2,3	-1,5	-5,4								
SD		42,9857	11,9304	43,0155	14,1892	18,5023	26,7644	3,7959389	7,8102497								
RSD, %		7,9	2,6	8,5	3,1	4,2	5,2	0,8	1,6								

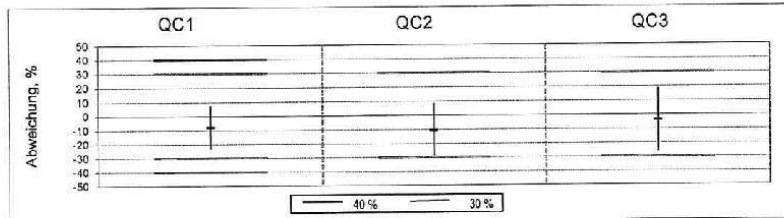
Kenndaten		OK		Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)		491,3704		SD		28,9235	
SD		44,8229		RSD, %		5,9	
RSD, %		9,1		SD			45,2935
				RSD, %			9,4

Richtigkeit		95%-Intervall		OK		
Abw.		-9,63		Faktor		2,433
Bias, %		-1,9		$\beta$ -Toleranz		00,388 bis 00,595
				Prüfbereich (30%)		00,351 bis 00,651

# Validierungsprotokoll

Seite:	5 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

Zusammenfassung 85%-Intervall



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β-Toleranz	00,019 bis 00,027	00,043 bis 00,066	00,369 bis 00,595
%	-23 bis 06	-30 bis 09	-26 bis 19
Prüfbereich (30%)	00,016 bis 00,033	00,042 bis 00,079	00,351 bis 00,851
Prüfbereich (40%)	00,015 bis 00,035		

### 3. Grenzwerte 3.1 Bestimmung nach DIN 32845

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target	Qualifier
1	6.0	0.172	0.009
2	7.0	0.204	0.010
3	8.0	0.227	0.011
4	9.0	0.274	0.013
5	10.0	0.311	0.015
6	11	0.394	0.019
7	12	0.416	0.020
8			
9			
10			

Messungen	1	1
Signifikanz	89	90
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	6	6
Prüfwert	4,21	5,25
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

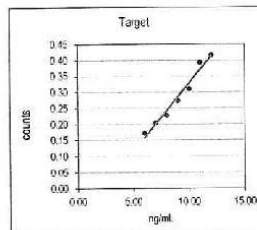
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	3,1	1,75
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

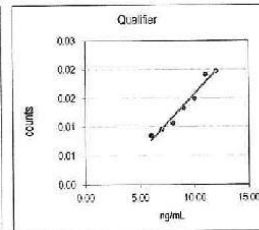
a	0.04275	0.002032
b	-0.09379	-0.004618
R	0.9862	0.9807
Rest-SD	0.017	0.001

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	2.590	1.397
Erfassungsgrenze	5.361	2.794
Bestimmungsgrenze	5.216	3.597



Lineare Kalibration  
 $Y = 0.00.000 \cdot X - 0.00.000$



Lineare Kalibration  
 $Y = 0.00.000 \cdot X - 0.00.000$

# Validierungsprotokoll

Seite:	6 von 7	Institution:	Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale)
Gültig ab:	02.03.2020	Methode:	GC-MS

## 3.2 Bestimmung mittels Alternativmethode

### 3.2.1 Nachweisgrenze aus Signal/Rauschverhältnis

	Dotiert ng/mL	Target 0	Untergrund 0	Target S/N	Q1 0	Untergrund 0	Q1 S/N	Q2 0	Untergrund 0	Q2 S/N
1										
2										
3										
4										
5										
6										
			NG-1	0.0		NG-2	0.0		NG-3	0.0
Nachweisgrenze:			0.0							

### 3.2.2 Bestimmungsgrenze

Vorgabe	ng/mL
---------	-------

MESSUNG	Konz.
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Wiederholpräzision		Bias	
Mittelwert		Bias	
SD		Bias, %	
RSD, %		Krit. Wert, %	20
Krit. Wert, %	20		
Beurteilung		--	Kriterium: RSD und bias < 20%

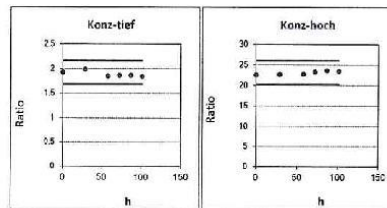
## 4. WIEDERFINDUNG

### 4.1 WIEDERFINDUNG

Konzentration	QC-untere		QC-obere	
	50 ng/mL		501.0 ng/mL	
MESSUNG	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
1	1.9682	2.0354	20.1072	19.4453
2	2.0453	1.8928	19.6852	19.1533
3	2.0596	2.0428	19.0403	19.8925
4	2.1151	2.0437	20.2037	19.7539
5	2.1007	2.1511	19.7866	20.7178
6	2.1437	2.0387	19.3685	20.3655
Mittelwert	2.078	2.034	19.69908333	19.89138333
SD	0.053	0.062	0.441	0.681
RSD, %	2.6	4.0	2.2	2.9
N (Werte)	6	6	6	6
Wiederfindung, %	98.0	101.0		
RSD, %	3.9	4.2		

### 4.2 STABILITÄT

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool Ratio	Zeit h	QC-Pool Ratio
	0:00	2	0:00	23
	28:50	2	28:50	23
	57:50	2	57:50	23
	72:00	2	72:00	23
	86:50	2	86:50	24
	101:00	2	101:00	23
Werte	6		6	
min. Wert	1.8513	Ratio	22.6906	Ratio
max. Wert	1.899	Ratio	23.6387	Ratio
Spanne	0.1377	Ratio	1.0481	Ratio
Spanne, %	6.9	%	4.4	%
Prüfwert	25.0	%	25.0	%
Steigung	-504.0282855		74.10630401	
Abschnitt	1011.2973		-1652.1577	
R	-0.73631		0.89354	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert





## 7.7 Messunsicherheit

### Zusammenfassung der Qualitätskontrolldaten zur Bestimmung der §24a-Analyte

Ansprechpartner für Rückfragen	Fr. Dr. K. Blunke-Anbau
Telefon	0345 597 1597

Erweiterungsfaktor für die erweiterte Unsicherheit U ( $2 = 95,5\%$ ,  $3 = 99,7\%$ ) 2

	Unsicherheitsbeitrag		Präzision u(Rw)	Kombinierte Unsicherheit u(x)	Erweiterte Unsicherheit U
	Richtigkeit RMSBias	Sollwertes u(Cref)			
Amphetamin	6,9%	1,4%	5,5%	8,9%	17,8%
Methamphetamin	4,8%	1,4%	5,5%	7,4%	14,8%
MDMA	6,0%	1,5%	6,9%	9,3%	18,5%
MDA	8,1%	1,5%	5,7%	10,0%	20,0%
MDEA	7,9%	1,5%	5,5%	9,7%	19,4%
MBDB	7,2%	4,6%	5,2%	10,0%	20,0%
0	.....	.....	.....	.....	.....
0	.....	.....	.....	.....	.....

Mittelwert ± Standardabweichung 18,4 ± 2,0%  
 Median (Minimum - Maximum) 19,0% (14,8% - 20,0%)

Analytische Grenzen	
NG	BG
1,4	5,4
1,4	5
1,2	5,6
1,4	5,7
1,1	5,2
1,3	5,2
.....	.....
.....	.....

Kalibrationslevel	
10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 800, 1000	
10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 800, 1000	
10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 800, 1000	
10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 800, 1000	
10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 800, 1000	
.....	
.....	

**Amphetamin**

Alle Konzentrationen in ng/ml (µg/L)

Richtigkeit		Ringversuch		Solwert		SD, %		Anzahl Labors		Eigener Messwert		Bias		SD, %		Anzahl	
BTMF 3/17-A	47,5	13%	79	43,70	-8,0%	13%	79										
BTMF 3/17-B	15,7	15%	69	14,00	-10,8%	15%	69										
BTMF 1/18-A	96,1	11%	70	93,50	-2,7%	11%	70										
BTMF 1/18-B	84	12%	71	77,10	-8,2%	12%	71										
BTMF 2/18-A	123	11%	69	118,00	-4,1%	11%	69										
BTMF 3/18-A	59,8	12%	77	58,00	-3,0%	12%	77										
<b>Mittelwert</b>			<b>n = 6</b>														
Grubbes-Test auf Strenger (95%) OK																	
Ausreißer (99%) OK																	

Präzision

Präzisionsmessdaten aus Kontrollkarte

27,50
24,20
25,30
25,20
25,50
23,50
24,50
22,40
24,50
25,00

Solwert der Präzisionskontrolle

25,20

Zusammenfassung

Unsicherheitsbeiträge von

Richtigkeit	Solwert	Präzision
<b>RMSBias</b>	<b>u(Cref)</b>	<b>u(Rw)</b>
6,9%	1,4%	5,5%

Kombinierte Unsicherheit **u(x)** 8,9%

Erweiterte Unsicherheit **U** 17,8%

Zusätzliche Informationen

Nachweisgrenze 1,40

Bestimmungsgrenze 5,40

Bestimmung mit Kalibratoren 10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 500, 800, 10

**Methamphetamin**

Alle Konzentrationen in ng/mL (µg/L)

Richtigkeit

Ringversuch	Sollwert	SD, %	Anzahl Labors	Eigener Messwert	Bias	SD, %	Anzahl
BTMF 3/17-A	72,2	12%	78	70,00	-3,0%	12%	78
BTMF 1/18-A	89,3	12%	69	85,80	-3,9%	12%	69
BTMF 1/18-B	77,1	12%	66	71,40	-7,4%	12%	66
BTMF 2/18-A	149	11%	68	142,00	-4,7%	11%	68
BTMF 3/18-A	68,6	12%	76	66,20	-3,5%	12%	76
<b>Mittelwert</b>				n= 5			71

Grubos-Test auf Stragglar (95%) Stragglar OK  
Ausreißer (99%)

Präzision

Präzisionsmessdaten aus Kontrollkarte

28,20
24,00
25,10
25,60
26,10
24,20
25,20
23,20
25,80
26,20

Sollwert der Präzisionskontrolle

25,20
-------

Zusammenfassung

Unsicherheitsbeiträge von

Richtigkeit	Sollwert	Präzision	Kombinierte Unsicherheit u(x)	Erweiterte Unsicherheit U
RMSbias	u(Cref)	u(Rw)	7,4%	14,8%
4,8%	1,4%	5,5%		

Zusätzliche Informationen

Nachweisgrenze

1,40
------

Bestimmungsgrenze

5,00
------

Bestimmung mit Kalibratoren

10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 800, 10
--

**MDMA**

Alle Konzentrationen in ng/mL (µg/L)

Richtigkeit		Ringversuch		Sollwert		S.D. %		Anzahl Labors		Eigener Messwert		Bias		S.D. %		Anzahl	
BTMF 3/17-A	89,4	12%	79	65,10	-6,2%	12%	79	79	74	15%	74	15%	74	15%	74	15%	74
BTMF 3/17-B	19,8	15%	74	20,10	1,5%	15%	74	20,10	1,5%	15%	74	15%	74	15%	74	15%	74
BTMF 1/18-A	77,7	12%	71	74,00	-4,8%	12%	71	74,00	-4,8%	12%	71	12%	71	12%	71	12%	71
BTMF 1/18-B	74,2	12%	70	67,80	-8,9%	12%	70	67,80	-8,9%	12%	70	12%	70	12%	70	12%	70
BTMF 2/18-A	111	12%	70	103,00	-7,2%	12%	70	103,00	-7,2%	12%	70	12%	70	12%	70	12%	70
BTMF 3/18-A	73,4	12%	76	69,90	-4,8%	12%	76	69,90	-4,8%	12%	76	12%	76	12%	76	12%	76
<b>Mittelwert</b>				<b>n = 6</b>													<b>73</b>
Grubbe-Test auf Stragglers (95%)																	
Ausreißer (95%)																	
Stragglers																	
CK																	

Präzision

Präzisionsmessdaten aus Kontrollkarte

29,50
25,50
25,50
27,00
27,90
25,90
26,90
24,70
24,20
23,50

Sollwert der Präzisionskontrolle

25,10
-------

Zusammenfassung

Unsicherheitsbeiträge von

Richtigkeit	Sollwert	Präzision
<b>RMSbias</b>	<b>u(Cref)</b>	<b>u(Rw)</b>
6,0%	1,5%	6,9%

Kombinierte Unsicherheit

<b>u(x)</b>
9,3%

Erweiterte Unsicherheit

<b>U</b>
18,5%

Zusätzliche Informationen

Nachweisgrenze

1,20
------

Bestimmungsgrenze

5,60
------

Bestimmung mit Kalibratoren

10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 600, 900, 10
--

**MDA**

Alle Konzentrationen in ng/mL ( $\mu\text{g/L}$ )

**Richtigkeit**

Ringversuch	Sollwert	SD, %	Anzahl Labors	Eigener Messwert	Bias	SD, %	Anzahl
BTMF 3/17-A	35,8	13%	74	31,50	-12,0%	13%	74
BTMF 1/18-A	59,2	12%	68	55,70	-5,9%	12%	68
BTMF 1/18-B	62,9	12%	67	58,00	-7,8%	12%	67
BTMF 2/18-A	40,5	13%	66	37,20	-8,1%	13%	66
BTMF 3/18-A	51,7	13%	74	49,50	-4,3%	13%	74
<b>Mittelwert</b>				<b>n = 5</b>		<b>13%</b>	<b>70</b>

Grubbs-Test auf Stragglers (95%)  OK  
 Ausreißer (99%)  OK

**Präzision**

Präzisionsmessdaten aus Kontrollkarte

26,00
23,50
24,80
24,50
24,70
24,20
24,50
23,00
23,30
23,80

Sollwert der Präzisionskontrolle

**Zusammenfassung**

Unsicherheitsbeiträge von	
Richtigkeit	Sollwert
<b>RMSbias</b>	<b>u(Cref)</b>
8,1%	1,5%
	<b>u(Rw)</b>
	5,7%

Kombinierte Unsicherheit	Erweiterte Unsicherheit
u(k)	U
10,0%	20,0%

**Zusätzliche Informationen**

Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
1,40	5,70

Bestimmung mit Kalibratoren

**MDEA**

Alle Konzentrationen in ng/mL (µg/L)

Richtigkeit		Ringversuch		SD, %		Anzahl		Eigenwert		Bias		SD, %		Anzahl	
		Sollwert		Labors		Messwert									
BTWF 3/17-A	76,6	12%	70	71,30	-8,9%	12%	70								
BTWF 1/18-A	58,1	12%	66	53,40	-8,1%	12%	66								
BTMF 1/18-B	83,1	12%	65	75,00	-9,7%	12%	65								
BTWF 2/18-A	85,1	12%	62	78,70	-7,5%	12%	62								
BTWF 3/18-A	69,6	12%	70	64,90	-6,8%	12%	70								
<b>Mittelwert</b>				<b>n=5</b>			<b>67</b>								
Grubos-Test auf Straggler (95%)		OK													
Ausreißer (99%)		OK													

**Präzision**

Präzisionsmessdaten aus Kontrollkarte

24,00
24,00
25,50
25,80
26,70
25,00
26,10
23,90
24,50
24,20

Sollwert der Präzisionskontrolle

25,10
-------

**Zusammenfassung**

Unsicherheitsbeiträge von

Richtigkeit	Sollwert	Präzision
RMSbias	u(Cref)	u(Rw)
7,9%	1,5%	5,5%

Kombinierte Unsicherheit

u(x)
9,7%

Erweiterte Unsicherheit

U
19,4%

**Zusätzliche Informationen**

Nachweisgrenze

1,10
------

Bestimmungsgrenze

5,20
------

Bestimmung mit Kalibratoren

10,15,20,50,70,150,300,600,800,10
-----------------------------------

**MBDB**

Alle Konzentrationen in ng/mL (µg/L)!

Richtigkeit						Präzision	
Ringversuch	Sollwert	SD, %	Anzahl Labors	Eigener Messwert	Bias	SD, %	Anzahl
Gen_Tag-1	60,5	7%	1	63,50	5,0%	7%	1
Gen_Tag-2	60,5	4%	1	57,60	-4,8%	4%	1
Gen_Tag-3	60,5	2%	1	61,50	1,7%	2%	1
Gen_Tag-4	60,5	7%	1	57,30	-5,3%	7%	1
Gen_Tag-5	60,5	1%	1	53,10	-12,2%	1%	1
Gen_Tag-1	501	8%	1	548,00	9,4%	8%	1
Gen_Tag-2	501	2%	1	467,00	-6,8%	2%	1
Gen_Tag-3	501	8%	1	469,00	-6,4%	8%	1
Gen_Tag-4	501	3%	1	487,00	-6,8%	3%	1
Gen_Tag-5	501,0	4%	1	480,00	-8,2%	4%	1
<b>Mittelwert</b>				<b>n = 10</b>		<b>5%</b>	<b>1</b>

Präzisionsmessdaten aus Kontrollkarte	
26,60	
24,60	
25,70	
23,70	
24,40	
23,10	
23,30	
22,30	
23,80	
24,60	

Sollwert der Präzisionskontrolle	
OK	25,10
Ausreißer (95%)	OK

Zusammenfassung	
Umsicherheitsbeiträge von	
Richtigkeit	Sollwert
<b>RMSBias</b>	<b>u(Cref)</b>
7,2%	4,6%
	<b>u(Rw)</b>
	5,2%

Zusätzliche Informationen	
Kombinierte Unsicherheit	<b>u(x)</b>
	10,0%
Erweiterte Unsicherheit	<b>U</b>
	20,0%

Nachweisgrenze	
	1,30
Bestimmungsgrenze	
	5,20

Bestimmung mit Kalibratoren	
	10, 15, 20, 50, 70, 150, 300, 500, 800, 10