



Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

Arbeitskreis  
Qualitätssicherung

# Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen

Seite  
1 von 35

Version  
01

*Autoren: L. D. Paul, München; F. Mußhoff, Bonn;  
Untergruppe „Richtlinienerstellung“ des Arbeitskreises  
Qualitätssicherung  
(B. Aebi, Bern; V. Auwärter, Freiburg; T. Krämer, Homburg; F.  
T. Peters, Jena; G. Skopp, Heidelberg;); sowie R. Aderjan,  
Heidelberg; M. Herbold, Heidelberg; G. Schmitt, Heidelberg;  
D. Thieme, München; S. Tönnies, Frankfurt;  
Autoren der ersetzten Richtlinien (siehe Kapitel  
Schlussbestimmung);  
Mitglieder des Arbeitskreises Qualitätssicherung unter  
dem Vorsitz von G. Rochholz, Kiel  
(H. Andresen, Hamburg; V. Auwärter, Freiburg; J. Becker,  
Mainz; J. Beike, Köln; T. Briellmann, Basel; H.H. Bussemas,  
Dortmund; F. Erdmann, Giessen; M. Hanke, München; S.  
Kreutzberg, Berlin; G. Krüger, Berlin; F. Mußhoff, Bonn; L.D.  
Paul, München; F. Peters, Jena; G. Schmitt, Heidelberg; G.  
Skopp, Heidelberg; S. Toennes, Frankfurt; ehemaliger Vorsit-  
zender, ausgeschieden: L. von Meyer, München).*

## Änderungshinweise:

Keine – erste Fassung

Datum

01.06.2009

Seite

--

## Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Maßnahmen zur Qualitätssicherung .....	4
1.1	Personelle Voraussetzungen .....	4
1.2	Räumliche Voraussetzungen und Umgebungsbedingungen .....	5
1.3	Apparative Voraussetzungen .....	5
1.4	Maßnahmen zur Labor- und Gerätesicherheit .....	5
2	Anforderungen an Untersuchungsproben und deren Handhabung .....	6
2.1	Anforderungen an die Asservierung und den Probentransport .....	6
2.2	Probeneingang .....	7
2.3	Probenaufbewahrung .....	7
3	Anforderungen an Immunoassay-Bestimmungen .....	9
4	Beweisende, identifizierende bzw. Bestätigungsverfahren .....	11
4.1	Probenvorbereitung .....	11
4.1.1	Wahl des Internen Standards .....	11
4.1.2	Extraktion und Derivatisierung .....	12

4.2	Chromatographische Trennung: Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	13
4.2.1	Funktionsstüchtigkeitsprüfung der GC-Anlagen .....	14
4.2.2	Funktionsstüchtigkeitsprüfung der HPLC-Anlagen .....	15
4.3	Massenspektrometrische (MS) Detektion .....	16
4.3.1	Ionisierungstechniken .....	16
4.3.2	Identifizierungskriterien bei MS-Detektion .....	16
4.4	UV-VIS-Detektion mittels Diodenarray .....	20
4.4.1	Generelle Anforderungen .....	20
4.4.2	Suchanalyse mittels DAD-Detektion .....	20
5	Qualitätssicherungsaspekte bei quantitativen Bestimmungen .....	22
5.1	Messreihen und laborinterne Qualitätssicherung .....	23
5.1.1	Abwechselnde Injektion von Real- und Nullproben .....	23
5.1.2	Kalibration .....	23
5.1.3	Nullproben (Zero samples) .....	24
5.1.4	Quality Control (QC)-Proben .....	24
5.2	Kontrollkarten für QC-Proben .....	26
5.2.1	Akzeptanzkriterien .....	26
5.3	Externe Qualitätskontrollen (Ringversuche) .....	27
5.4	Messunsicherheit .....	27
5.4.1	Schätzung der Messunsicherheit über Ringversuche und der aus Kontrollproben ermittelten Laborpräzision .....	28
5.4.2	Schätzung der Messunsicherheit in anderen Fällen .....	29
5.4.3	Formelverzeichnis .....	29
5.4.4	Abkürzungen .....	30
6	Ergebnisbericht/Gutachten .....	31
7	Dokumentation .....	32
8	Literatur und mitgeltende Bestimmungen .....	33
9	Anhänge .....	34
10	Schlussbestimmung .....	35
11	Inkrafttreten .....	35

## Geltungsbereich

Forensisch-toxikologische Untersuchungen zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen, Suchtmitteln oder sonstigen chemischen bzw. körperfremden Stoffen werden insbesondere im Rahmen der Rechtspflege (straf-, ordnungswidrigkeits-, versicherungs- und verwaltungsrechtlich relevante Sachverhalte), aber auch in der Heilfürsorge (klinische Toxikologie) durchgeführt.

Für Untersuchungen im Rahmen der klinischen Toxikologie ist vornehmlich die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Rili-bäk) zu beachten. Empfehlungen für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung und für die Validierung solcher Methoden wurden vom Arbeitskreis Klinische Toxikologie der GTFCh herausgegeben.

Vorgaben für forensisch-chemische Untersuchungen sind in einer eigenen Richtlinie der GTFCh niedergelegt.

Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien finden sich als Grundlage zur Akkreditierung in der jeweils gültigen Fassung der DIN-Norm EN ISO/IEC 17025. Diese sind in den vorliegenden Richtlinien berücksichtigt. Die in dieser Richtlinie bezeichneten Qualitätsstandards gelten, sobald Laboratorien Befunde erheben, die für rechtliche Verfahren gültig sein sollen. Die Ergebnisse der Untersuchungen müssen mit beweistauglichen speziellen Methoden gesichert und der hierzu erforderliche Standard durch regelmäßige interne und externe Qualitätskontrollen gewährleistet werden. Grundsätzlich kann auch eine toxikologische Untersuchung im Rahmen der Heilfürsorge rechtsrelevant werden.

Geltungsbereiche sind insbesondere:

- Suchanalysen in biologischen Matrices bei Verdacht auf Beeinflussung durch Arzneimittel, Gifte oder Suchtstoffe, bspw. im Rahmen von Verkehrsordnungswidrigkeiten oder -straftaten und Kriminalstraftaten,
- gezielte forensisch-toxikologische Untersuchungen, vor allem quantitative Bestimmungen, z.B. auf Sucht- oder Arzneimittel in verschiedenen Biomatrices,
- toxikologische Untersuchungen zur Ermittlung der Todesursache (Postmortem-Toxikologie),
- toxikologische Untersuchungen im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung,

Spezielle Anforderungen an die Untersuchung von Haaren werden im Anhang C, solche zu Begleitstoffuntersuchungen mit Dampfraum-Gaschromatographie im biologischen Material in Anhang E behandelt. Empfehlungen zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensisch-toxikologische Untersuchungen und spezielle Aspekte der Postmortem-Analytik sind im Anhang D niedergelegt.

## 1 Allgemeine Maßnahmen zur Qualitätssicherung

Im Rahmen der Qualitätssicherung sind die Maßnahmen in einem Qualitätsmanagementhandbuch festzulegen und umzusetzen. Dieses muss Zielsetzungen, Aufgabenbereiche, Verantwortlichkeiten, Zuständigkeiten und Verfahrensabläufe eines Labors beinhalten. Aufgabenbereiche müssen definiert, Verantwortlichkeiten und Zuständigkeiten erfasst, aufeinander abgestimmt, festgelegt sowie aus einem Organigramm ersichtlich sein.

Die Laboratorien müssen die Gewähr dafür bieten, dass Analysen nach dem aktuellen und anerkannten Stand der Analysetechnik ausgeführt werden. Die Analysemethoden müssen in Form von Standardarbeitsanweisungen (Standard Operating Procedures, SOPs) niedergelegt sein. Grundsätzlich ist es dem Labor freigestellt, welche Methoden eingesetzt werden. Je nach Fragestellung können dabei gerichtete oder ungerichtete Methoden zur Anwendung kommen. Es muss jedoch gewährleistet sein, dass das Ergebnis zuverlässig ist.

### 1.1 Personelle Voraussetzungen

Die Leiterin/der Leiter eines Labors, in dem die bezeichneten Untersuchungen durchgeführt werden, muss ein abgeschlossenes naturwissenschaftliches oder medizinisches Universitätsstudium möglichst mit Promotion, entsprechende Weiter- und Fortbildung und forensisch-toxikologische Erfahrung nachweisen. Dieser Nachweis ist z.B. durch die Anerkennung eines Fachtitels der GTFCh für den jeweiligen Fachbereich („Forensische/r Toxikologe/in, GTFCh“ oder „Forensische/r Chemiker/in GTFCh“ mit dem Arbeitsbereich „Forensisch-chemische Untersuchungen von Körperflüssigkeiten und anderen biologischen Materialien von lebenden Personen“) oder durch eine Habilitation in forensischer Toxikologie erbracht. Ansonsten ist eine vergleichbare Qualifikation erforderlich (vgl. Gegenstandskataloge der GTFCh zum Erwerb der Fachtitel).

Die Leiterin/der Leiter bzw. deren/dessen Stellvertreter(in) muss eine Überwachung aller Tätigkeiten gewährleisten. Zur Überwachung und zur Durchführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen muss mindestens ein(e) weitere(r) qualifizierte(r) Mitarbeiter(in) autorisiert sein. Beim technischen Personal wird eine qualifizierte Berufsausbildung auf dem Gebiet der Labortätigkeit vorausgesetzt. Vertretungsregelungen für alle Mitarbeiter sind in einem Qualitätsmanagementhandbuch festzulegen. Durch die Leiterin/den Leiter des Labors oder deren/dessen Stellvertreter(in) muss zusätzlich eine regelmäßige fachbezogene Weiter- und Fortbildung für alle Mitarbeiter erfolgen bzw. veranlasst werden.

## 1.2 Räumliche Voraussetzungen und Umgebungsbedingungen

Die Laborräume müssen so beschaffen sein, dass Unbefugte keinen Zugang haben. Nichtautorisierte Personen dürfen sich nur in Begleitung von autorisiertem Personal in den Laborräumen aufhalten. Die Laborfläche muss genügend groß sein, um eine geeignete Laborausrüstung zur eindeutigen Identifizierung und quantitativen Bestimmung einzelner Substanzen unterbringen zu können. Substanzproben und biologisches Material müssen in voneinander getrennten Laborräumen aufgearbeitet werden; Kontaminationen müssen ausgeschlossen werden. Es müssen ausreichende Kühl- bzw. Tiefkühleinheiten vorhanden sein, damit Analysenstandards und die Proben vor und nach der Untersuchung sachgerecht gelagert werden können und vor unbefugtem Zugriff geschützt sind.

## 1.3 Apparative Voraussetzungen

In einem forensisch-toxikologischen Labor müssen Geräte vorhanden sein, die eine eindeutige Identifizierung von Einzelstoffen und eine genaue Bestimmung der Konzentration erlauben (qualitative und quantitative Analyse).

Die derzeit erforderliche Ausrüstung umfasst neben der Grundausstattung eines analytischen Labors in der Regel Geräte für

- Gaschromatographie mit speziellen Detektoren, wie stickstoffspezifischer Detektor, Elektroneneinfang-, Flammenionisationsdetektor oder Massenspektrometer,
- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit speziellen Detektoren wie Diodenarray-, UV-, Fluoreszenz-Detektor oder Massenspektrometer,
- immunchemische und photometrische Untersuchungen.

Andere Verfahren oder Geräte, die gleichwertige Ergebnisse liefern, können eingesetzt werden.

## 1.4 Maßnahmen zur Labor- und Gerätesicherheit

Für Laborarbeiten eingesetzte Geräte müssen in funktionstüchtigem Zustand gehalten, regelmäßig gewartet bzw. kalibriert werden und -sofern vorgeschrieben- geeicht werden. Die Betriebsanweisungen der Hersteller sind zu beachten. Es müssen Gerätehandbücher zur Nutzung und Wartung geführt werden. Die Sicherheitsausrüstung des Labors muss den Vorschriften entsprechend vorhanden sein und regelmäßig überprüft werden. Die Sicherheitsvorschriften für das Arbeiten im Labor einschließlich des eventuellen Umgangs mit radioaktiven Substanzen sind einzuhalten. Eine besondere Einweisung des technischen Personals über den Umgang mit infektiösem Material, mit Betäubungsmitteln sowie mit Gefahrstoffen und deren sachgerechter Entsorgung ist notwendig. Belehrungen über Sicherheitsvorschriften müssen regelmäßig erfolgen und dokumentiert werden.

## **2 Anforderungen an Untersuchungsproben und deren Handhabung**

### **2.1 Anforderungen an die Asservierung und den Probentransport**

Soweit es nicht durch entsprechende Vorschriften geregelt oder im Rahmen dieser Richtlinien anders empfohlen ist, teilt das Untersuchungslabor dem Auftraggeber Art, Menge, Lagerungs- und Transportbedingungen des für die Fragestellung erforderlichen Probenmaterials mit, damit eine ordnungsgemäße Untersuchung gewährleistet ist.

Die Asservatgefäße müssen für die entsprechenden Proben und die Probenvorbereitung geeignet sein (unter anderem sauber, genügende Größe, Glas oder Kunststoff mit entsprechenden Verschlüssen, geeigneter Durchmesser zur Entnahme von Material oder ggf. für Serumentrenner).

Innerhalb Deutschlands (Auftraggeber) werden forensisch-toxikologische Untersuchungen nicht in Vollblut, sondern in Serum oder Plasma durchgeführt (soweit aus dem vorhandenen Probenmaterial gewinnbar). Für toxikologische Untersuchungen mit oder ohne Blutalkoholkonzentrationsbestimmung sollten unstabilisierte Blutproben zur Gewinnung von Serum oder Plasma und zusätzlich eine mit Fluorid versetzte Blutprobe (insbesondere zur Bestimmung von Cocain) zur Gewinnung von Serum oder Plasma gewonnen werden. Im Gutachten ist anzugeben, ob Vollblut oder Serum/Plasma eingesetzt wurde. Die Angabe "Blut" ist nicht ausreichend.

Bei der Gewinnung von Urinproben sind je nach Fragestellung besondere Maßnahmen zwingend zu beachten, wie z.B. die Abnahme unter Sichtkontrolle bei Drogenabstinenzkontrollen (vgl. auch Beurteilungskriterien zur Fahreignungsdiagnostik).

Der Auftraggeber ist auf die Notwendigkeit einer eindeutigen und vollständigen Kennzeichnung der Probe und des Untersuchungsauftrages hinzuweisen. Im Untersuchungsauftrag sollen zusätzlich Datum und Uhrzeit der Probennahme, Art des Untersuchungsmaterials und die gewünschte Untersuchung mit Fragestellung und Vorgeschichte angegeben werden.

Für den Transport muss das Probenmaterial bruchsicher verpackt und dicht verschlossen sein. Ein Ausschluss von Hitze- und Lichteinwirkung muss gewährleistet sein. Die Schnelligkeit des Transportes und eventuelle besondere Transportbedingungen (z.B. Tiefkühlung) werden durch die Fragestellung der angeforderten Untersuchung bestimmt. Die Bestimmungen des ADR (Europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße) sind vom Einsender zu beachten.

Spezielle Empfehlungen zur Asservierung von Haaren werden in Anhang C, solche zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensisch-toxikologische Untersuchungen in Anhang D behandelt.

## 2.2 Probeneingang

Sämtliche eingehenden Aufträge und Proben sind durch das Laboratorium zu registrieren. Die eingehenden Proben werden unmittelbar auf Vollständigkeit, Unversehrtheit und gegebenenfalls auf Tauglichkeit zur Untersuchung geprüft. Unbeschriftete oder mangelhaft bezeichnete Proben sind ausreichend zu kennzeichnen. Nicht eindeutig zuzuordnende Proben werden nicht bearbeitet und ggf. zurückgesandt. Vermerke hierüber sind in den Laborunterlagen zu dokumentieren und dem Auftraggeber mitzuteilen. Jeder Auftrag und jede dazugehörige Probe wird einem laborinternen Code zugeordnet und somit eindeutig gekennzeichnet (gegebenenfalls durch einen Barcode). Eine Verwechslung der Proben im Labor muss ausgeschlossen sein. Probenmengen und -beschaffenheit sind zu dokumentieren. Im Falle von Körperflüssigkeiten, Spritzen etc. ist das Material als potentiell infektiös zu betrachten.

Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes müssen beachtet werden. Alle mit den Proben umgehenden bzw. im Labor tätigen Personen sind über die Schweigepflicht zu belehren. Diese Belehrung ist schriftlich niederzulegen.

Das Labor informiert den Auftraggeber unverzüglich, wenn die Probe beschädigt ist, die Probe für die gewünschte Untersuchung oder Fragestellung ungeeignet bzw. die Probenmenge zu gering ist oder der Auftrag von diesem Labor nicht durchgeführt werden kann.

## 2.3 Probenaufbewahrung

Es sind Maßnahmen zu treffen, damit Unbefugte keinen Zugang zu den Proben haben und diese nicht entwendet, verfälscht oder manipuliert werden können.

Ab Probeneingang sind Proben so aufzubewahren, dass sich die Analyten möglichst nicht verändern und die Proben nicht kontaminiert werden.

Die Identität der Probe und deren durch Aufarbeitung erhaltenen Folgeprodukte (Extrakte) müssen während der gesamten Analysendauer durch korrekte Kennzeichnung sichergestellt sein. Bei jedem Analysengang muss sich die/der mit dem Probenmaterial tätige Bearbeiter(in) bei Anfertigung von Arbeitslisten oder Ergebnisprotokollen von der korrekten Übertragung der internen Kennzeichnung des Untersuchungsmaterials überzeugen. Aus der Dokumentation muss hervorgehen, welche Personen an den jeweiligen Untersuchungsgängen beteiligt waren.

Die nach Durchführung der Untersuchungen verbliebenen Reste des Probenmaterials und die Originalbehältnisse (Blutentnahmesystem, Urinprobengefäße, Asservatgefäße usw.) sind nach der Erstattung von Berichten oder Gutachten entsprechend der jeweiligen Verwaltungsvorschrift, zumindest jedoch noch sechs Monate, Blutproben 2 Jahre, aufzubewahren. Eine generelle Aufbewahrungsfrist von mind. 2 Jahren wird empfohlen. Sofern rechtswirksame Anordnungen andere Zeiten vorgeben, sind diese zu beachten. Der Auftraggeber ist über die

Aufbewahrungsfristen in Kenntnis zu setzen. Die Originalbehältnisse müssen zusammen mit sämtlichen Restmengen der Proben auf Anordnung vorgelegt werden können.

Die Aufbewahrung von Körperflüssigkeiten erfolgt grundsätzlich gekühlt. Bei Aufträgen aus Deutschland müssen Blutproben möglichst zeitnah nach Eingang im Labor zentrifugiert werden. Es können geeignete Seruntrenner verwendet werden. Erfolgt die Untersuchung nicht unverzüglich, müssen ein Teil oder Anteile des Serums bzw. Plasmas in geeignete Behältnisse überführt werden. Dies darf nur in Anwesenheit von zwei Personen („Vier-Augen-Prinzip“) erfolgen und muss protokolliert werden. Sofern kein Fluorid-Blutentnahmesystem verwendet wurde, muss zumindest zur Bestimmung von Cocain der separierte Anteil mit z.B. Natrium- oder Kaliumfluorid versetzt werden (mindestens 0,25 % w/v, entspricht 2,5 mg/mL). Durch die Zugabe von Fluorid wird der *in vitro* Zersetzung von Cocain sowie unter Umständen von Flunitrazepam und anderen Stoffen entgegengewirkt.

Die abgetrennte Serum- oder Plasmaprobe(n) bzw. - wenn kein Serum oder Plasma zu gewinnen ist - ein Teil der Vollblutprobe (Blut zuvor homogenisieren) wird/werden unverzüglich tiefgefroren (mind. -15°C), um eine Alterung der Probenmatrix und Verluste an Analyten zu vermeiden. Das Original-Blutentnahmesystem mit dem Restblut wird weiterhin gekühlt gelagert. Es muss nachvollziehbar sein, ob und wieviel Serum oder Plasma entnommen worden ist, etwa durch einen Vermerk auf den Asservatgefäßen.

Urinproben oder Aliquote davon sind nach Probeneingang tiefzufrieren und zu lagern. Alle weiteren Untersuchungsmaterialien sind ebenfalls geeignet aufzubewahren.

### 3 Anforderungen an Immunoassay-Bestimmungen

Untersuchungen können in hinweisgebende Analysen und beweisende, identifizierende Analysen unterschieden werden. Hinweisgebende Analysen sind immunchemische Testverfahren und einfache chromatographische Techniken. Positive Resultate hinweisgebender Analysen sind isoliert genommen nicht gerichtsverwertbar und müssen durch ein zweites unabhängiges, spezifisches und identifizierendes Verfahren mit mindestens gleicher Empfindlichkeit bestätigt werden. Ein immunchemisches Analysenergebnis kann nicht durch einen zweiten Immunoassay bestätigt werden.

Ergebnisse monospezifischer Immunoassays bspw. auf Arzneistoffe wie Paracetamol und Valproinsäure im Plasma/Serum können bei bestimmten Fragestellungen eine Ausnahme darstellen. Hier können bei entsprechender Kalibration auch quantitative Werte akzeptiert werden.

Kalibratoren und Kontrollen sollten mit der authentischen Matrix hergestellt werden, soweit erhältlich. Prinzipiell sollte für die Herstellung von Kalibratoren derjenige Analyt (Muttersubstanz oder Metabolit) der zu testenden Substanz(klasse) eingesetzt werden, der in der entsprechenden Matrix zu erwarten ist.

Bei einigen Substanzklassen sollte vor der Analyse eine (enzymatische) Hydrolyse der Phase II-Konjugate durchgeführt werden, um die notwendige Sensitivität zu erlangen. Insbesondere für die Bestimmung von Benzodiazepinen im Urin ist eine Hydrolyse der Phase II-Konjugate erforderlich.

Zur Unterscheidung positiver und negativer Immunoassay-Befunde werden so genannte Cut-off-Werte (festgelegte Entscheidungsgrenzen bzgl. des Messwertes) zugrunde gelegt. Falsch positive Ergebnisse aufgrund von Matrixeffekten sollen so möglichst verhindert werden. Da immunchemische Vortests der Vorauswahl für weitere bestätigende chromatographische Verfahren dienen, sind aber insbesondere falsch-negative Ergebnisse unter Berücksichtigung dieser für den jeweiligen Analyten bzw. die jeweilige Substanzklasse festzulegenden Cut-off-Werte so weit wie möglich zu vermeiden. Ein Immunoassay-Ergebnis ist falsch negativ im Sinne dieser Richtlinien, wenn es unterhalb des Cut-offs liegt, jedoch mit dem identifizierenden Verfahren entsprechende Analyten oberhalb definierter Grenzen nachgewiesen werden können (siehe auch Anhang A).

Die Cut-off-Werte sind auch deshalb niedrig zu veranschlagen, da neben dem Nachweis einer akuten Beeinflussung häufig auch der Nachweis eines zurückliegenden Konsums oder der Beleg einer Abstinenz Fragestellung sein kann. Die von den Herstellern immunchemischer Tests vorgeschlagenen Cut-off-Werte sind daher für forensische Untersuchungen häufig zu hoch gewählt. Prinzipiell ist es aber aus wissenschaftlicher Sicht nicht möglich, für immunche-

mische Methoden generell feste Cut-off Werte vorzugeben, da diese stark vom verwendeten Test und dem entsprechenden Antikörper bzw. den Kreuzreaktivitäten strukturverwandter Substanzen abhängen.

Jedes Labor muss prüfen, ob die verwendeten Cut-off-Werte immunchemischer Verfahren für die Differenzierung "positiv" versus "negativ" adäquat gewählt sind: Authentische Proben mit Analytkonzentrationen an der forensisch erforderlichen Grenze des identifizierenden, chromatographischen Verfahrens in der jeweiligen Matrix sollten im immunchemischen Vortestverfahren ein positives Ergebnis anzeigen. Genauere Anforderungen hierzu finden sich im Anhang B zu dieser Richtlinie (Validierung). Für bestimmte Analyten sind in Anhang A maximal zulässige Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen in verschiedenen biologischen Matrices angegeben.

## 4 Beweisende, identifizierende bzw. Bestätigungsverfahren

Bestätigungsmethoden müssen Aufschluss über die Struktur des Analyten liefern. Die Bestätigungsanalyse muss zum sicheren, mindestens qualitativen Nachweis der Einzelstoffe führen. In der Regel kommen hierzu nur eine Gaschromatographische (GC) oder eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC) Methode in Verbindung mit einem spektrometrischen Verfahren in Betracht. Die Leistungsfähigkeit der Analysengeräte (Empfindlichkeit, Stabilität der Retentionszeiten, Massengenauigkeit etc.) muss regelmäßig durch Injektion eines geeigneten Testsubstanzgemisches überprüft werden, um falsch negative Suchanalysen auszuschließen (siehe auch Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). Die Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden sind zu beachten (siehe Anhang B).

Im Rahmen der systematisch-toxikologischen Analyse in Biomatrices muss die Auswertung zur Analytenidentifizierung fallbezogen erfolgen und muss von qualifizierten Mitarbeitern mit analytischen und toxikologischen Kenntnissen vorgenommen oder durch diese kontrolliert werden. Diese müssen die Möglichkeiten und Grenzen der Methode berücksichtigen und das Resultat im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Methoden und der jeweiligen Aufgabenstellung kritisch würdigen können. Generell müssen Phase I-Metaboliten bei Urinsuchanalysen mit erfasst werden, da die Muttersubstanzen oftmals nur in geringer Konzentration im Urin enthalten sind. Suchanalysen im Urin sollte eine enzymatische oder saure Hydrolyse zur Spaltung von Phase II-Konjugaten vorgeschaltet werden, es sei denn Glukuronide und Sulfate werden ebenfalls detektiert.

### 4.1 Probenvorbereitung

Das Probenmaterial ist möglichst sparsam zu verwenden, um Nachuntersuchungen unter erweiterter Fragestellung oder zur externen Überprüfung der Analysenresultate zu ermöglichen.

Für den quantitativen Nachweis von Betäubungsmitteln u.a. mit GC-MS (Massenspektrometrie) oder LC-UV oder -MS (z.B. Betäubungsmittel im Blut, Serum oder Plasma) werden diese in der Regel aus dem biologischen Probenmaterial z.B. durch Flüssig-flüssig- oder Festphasenextraktion isoliert und gegebenenfalls derivatisiert.

#### 4.1.1 Wahl des Internen Standards

Insbesondere für quantitative Untersuchungen sollten Interne Standards mitgeführt werden, die in ausreichender, aber nicht zu hoher Konzentration vor der Extraktion zur Probe gegeben werden.

Ein großer Vorteil der Massenspektrometrie ist die Möglichkeit des Einsatzes deuterierter Analoga der zu quantifizierenden Analyten, die sehr ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaf-

ten wie die entsprechenden Analyten besitzen. Es sollten möglichst deuterierte Standards aller zu quantifizierenden Substanzen verwendet werden. Es muss gewährleistet sein, dass deuterierte Substanzen keinen das Ergebnis verfälschenden nicht-deuterten Anteil enthalten. Die Anzahl und Position der durch Deuterium ersetzten Wasserstoffatome im Molekül sollen zu Massenfragmenten führen, die eindeutig von denen der undeuterten Verbindung zu unterscheiden sind. Um eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden, sollten keine Ionen als Target- oder Qualifieren des Analyten ausgewählt werden, die im deuterierten Standard enthalten sind und umgekehrt. Der Deuterierungsgrad sollte mindestens drei betragen. Diese Ausführungen gelten in analoger Weise für die Verwendung anderer isotopenmarkierter Interner Standards.

Bei Verwendung nicht-deuterierter Standards (etwa bei HPLC-DAD (Diodenarraydetektion/UV) sollten diese ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie die Analyten aufweisen. Eine chromatographische Trennung muss zumindest im Falle von UV-Detektion jedoch möglich sein. Von einem Einsatz von Substanzen, die bereits in der entsprechenden Probe enthalten sein könnten (z.B. Arznei- und Suchtstoffe sowie Nahrungsbestandteile) als Internem Standard ist abzusehen. Auch in Screening-Verfahren sollte ein Interner Standard enthalten sein, um z.B. Extraktion und Derivatisierung überprüfen zu können.

#### **4.1.2 Extraktion und Derivatisierung**

Zur Probenvorbereitung werden z.B. Methoden der Flüssig-flüssig- (LLE) oder Festphasenextraktion (SPE) sowie der Proteinfällung angewendet. Hinweise zu und Anforderungen an Wiederfindungsraten und Extraktionsraten können dem Anhang B (Validierung) entnommen werden.

Alle Reagenzien, Probenentnahmegefäße usw. müssen auf Störsignale geprüft werden. Regelmäßig auftretende matrixbedingte Störsignale (körpereigene Substanzen, Fäulnis- und Abbauprodukte) sind so weit wie möglich zu beseitigen, da sie nachzuweisende Analyten überdecken (UV-Detektion) oder die Signalintensität des Analyten verändern könnten (ion suppression/enhancement, Adduktbildung).

Eine Derivatisierung kann zur Verbesserung der analytischen Eigenschaften durchgeführt werden. Die mögliche Bildung von das Ergebnis verfälschenden Artefakten ist zu berücksichtigen.

## 4.2 Chromatographische Trennung: Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Identifizierung von Substanzen oder Substanzgemischen aus biologischer Matrix erfordert im Regelfall die primäre Durchführung einer chromatographischen Trennung. Zur Verfügung stehen in erster Linie die Gaschromatographie und die Flüssigkeitschromatographie.

Die Kapillar-Gaschromatographie bietet eine hohe Trennleistung und ist deshalb zur Trennung von chemisch sehr ähnlichen Vertretern einer Substanzklasse bzw. Metaboliten sehr gut geeignet. Die chromatographische Trennung auf der HPLC-Säule kann isokratisch oder durch einen Gradienten der mobilen Phase erfolgen.

Auf eine hohe chromatographische Auflösung und geringe Signalbreiten ohne Tailing ist Wert zu legen. Die Signale jedes Ionen- und besonders UV-Chromatogramms sollen chromatographisch von anderen Substanzen oder Matrixbestandteilen abgetrennt sein.

Ein Kriterium für die positive Identifizierung einer Substanz mittels chromatographischer Analyseverfahren ist die Vergleichbarkeit der Retentionszeiten (siehe Tabelle 1) und Peakformen (Symmetrie, Breite) aller zu dieser unbekanntem Substanz gehörenden Signale mit den Eigenschaften einer Referenzprobe. Die chromatographische Retentionszeit (RT) des Analyten bzw. das Verhältnis der Retentionszeiten des Analyten zu der eines Internen Standards, d.h. die relative Retentionszeit (RRT) des Analyten, muss derjenigen einer in der selben Sequenz analysierten Referenzlösung (mit Reinsubstanz gespickte Matrixprobe oder externe Referenzprobe) entsprechen. Tabelle 1 beschreibt die akzeptierten Toleranzen. Abweichungen von Retentionszeiten und/oder veränderte Peakformen (Schulter, Tailing) sind akzeptabel, sofern diese Veränderungen z.B. durch eine erkennbare Co-Elution von Matrixkomponenten, eine Probenüberladung oder anderweitig erklärbar sind.

Analysenverfahren mit hohem Identifizierungscharakter (etwa Full scan MS-Analysen) sind von diesen strengen Vorgaben ausgenommen; die RT oder RRT muss jedoch in einem vergleichbaren Bereich liegen wie in einer Referenzprobe oder wie in einer Datenbank angegeben.

Werden die in einer HPLC-DAD-Spektrenbibliothek angegebenen Retentionsdaten zur Identifizierung herangezogen, so ist auf Einhaltung aller dort angegebenen chromatographischen Bedingungen (Zusammensetzung der mobilen Phase (insbesondere pH-Wert), Temperaturkonstanz, stationäre Phase, Fließgeschwindigkeit, Retentions-Standardsubstanzen) zu achten. Aufgrund von trotzdem schwankenden Analysenbedingungen kann eine gewisse Abweichung der Retentionszeit (z.B.  $\pm 15\%$ ) von der in der Datenbank angegebenen bei der Substanzsuche toleriert werden. Zur sicheren Identifizierung sollte bei solch großen Abweichungen eine direkte Vergleichsmessung der entsprechenden Referenzsubstanzen vorgenommen werden.

**Tabelle 1: Anforderungen an die Reproduzierbarkeit der absoluten (RT) oder relativen (RRT) Retentionszeit für Analysenverfahren mit eingeschränktem Identifizierungscharakter**

Chromatographische Trennung	Akzeptierte Toleranz	
	$\Delta$ RRT*	$\Delta$ RT**
Flüssigkeitschromatographie	$\pm 2,5\%$	$\pm 5\%$
Gaschromatographie	$\pm 1\%$	$\pm 2\%$

\* Relative Retentionszeit der Substanz im Verhältnis zum Internen Standard im Vergleich zu einer Referenzprobe

\*\* Retentionszeit der Substanz im Vergleich zu einer zeitnah unter vergleichbaren Bedingungen gemessenen Referenzprobe

Eine regelmäßige Wartung der Gaschromatographen und HPLC-Anlagen und die Überprüfung der chromatographischen Trennung sind durchzuführen. Bei Targetanalysen kann die Funktionstüchtigkeit anhand einer QC-Probe überprüft werden. Für Screening-Verfahren wird ein Standardtestgemisch aus Substanzen unterschiedlicher chromatographischer Eigenschaften empfohlen, welches bei regelmäßiger (messtäglicher) Injektion eine Lokalisierung von Fehlerquellen ermöglicht.

#### 4.2.1 Funktionstüchtigkeitsprüfung der GC-Anlagen

Folgendes Standardtestgemisch kann beispielsweise für GC-Screening-Verfahren eingesetzt werden:

Ein Testgemisch bestehend aus Valproinsäure, Metamfepramon, Phenobarbital, Pentobarbital, Methaqualon, Nalorphin, Codein, Morphin, Chinin, Strychnin, Diphenhydramin, Haloperidol und ggf. acetyliertes Amphetamin sowie C<sub>40</sub>, jeweils 0,05 mg/mL, Injektionsvolumen 1  $\mu$ L (siehe Maurer, Pfleger, Weber)

Beurteilungskriterien sind:

- Valproinsäure darf nicht im solvent delay liegen.
- Die Intensität des Morphinpeaks sollte nicht weniger als 15% der des Codeinpeaks betragen.
- C<sub>40</sub> muss noch im Chromatogramm vorhanden sein.
- Alle Peaks müssen sauber voneinander getrennt sein.
- Alle Peaks sollten eine möglichst symmetrische Peakform aufweisen (Ausnahme Valproinsäure).

#### 4.2.2 Funktionstüchtigkeitsprüfung der HPLC-Anlagen

Folgendes Standardtestgemisch kann beispielsweise für HPLC-DAD-Screening-Verfahren eingesetzt werden (z.B. in saurer isokratischer mobiler Phase (Acetonitril/Phosphatpuffer pH 2,3, 37:63 v/v)) und bei Verwendung einer RP8-Säule wie folgt (Injektion 10 µL):

- Histamindihydrochlorid (0,1 mg/mL) zur Kontrolle der Totzeit
- Coffein (0,1 mg/mL) zur Kontrolle der Peakfläche
- 5-p-Methylphenyl-5-phenylhydantoin (MPPH; 0,1 mg/mL) als Retentionszeit-Standard
- Benzol (1 mg/mL, Zugabe von 11,4 µl pro 10 mL Testlösung mittels Mikroliterspritze) zur Kontrolle der Wellenlängen-Richtigkeit des DADs (siehe Kapitel 4.4.2)

Die Lösung sollte so zusammengesetzt sein, dass das erhaltene Chromatogramm Aufschluss über die Richtigkeit folgender Parameter gestattet:

- Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (HPLC-Pumpe)
- Injiziertes Volumen der Probelösung (Autoinjektor)
- Totzeit und chromatographisches Trennvermögen (HPLC-Säule)
- Durchlässigkeit der mobilen Phase im gesamten Wellenlängenbereich (mobile Phase und Entgasung)

Das Chromatogramm ist bezüglich folgender Parameter mit Sollwerten zu vergleichen:

- Retentionszeiten der Peaks (messtäglich)
- Halbwertsbreite und Symmetrie der Peaks (wöchentlich)

Die Ergebnisse sind zu dokumentieren.

Für LC-MS-Anlagen ist ein für die entsprechende Fragestellung geeignetes Testgemisch einzusetzen.

Die verwendete(n) mobile(n) Phase(n) der HPLC muss/müssen in ihrer Zusammensetzung konstant gehalten werden. Bei jedem Ansatz ist insbesondere der pH-Wert durch pH-Meter zu kontrollieren und einzustellen, da die UV-Spektren hiervon erheblich beeinflusst werden.

### 4.3 Massenspektrometrische (MS) Detektion

Zur Qualitätssicherung massenspektrometrischer Analysen ist es erforderlich, dass die Anwenderin/der Anwender sich der Grenzen und Möglichkeiten der Analysenmethode und des Gerätes bewusst ist und dieses ordnungsgemäß bedient. Dies beinhaltet das regelmäßige Einstellen und Überprüfen der Geräte-Parameter („Tuning“): die regelmäßige Überprüfung und ggf. Kalibrierung der Massenachse, die Herstellung der erforderlichen massenspektrometrischen Auflösung und die Kontrolle der massenspektrometrischen Empfindlichkeit. Mit Hilfe des zur Kontrolle der chromatographischen Trennung eingesetzten Testgemischs kann auch die Empfindlichkeit des Massenspektrometers überprüft werden.

#### 4.3.1 Ionisierungstechniken

Die Ionisationsart unterliegt keinen prinzipiellen Restriktionen und muss den Anforderungen des Analyten hinsichtlich Ionisierbarkeit und Stabilität angepasst werden (Polarität, Ionisationsenergie, Fragmentierung). Der Ionisationsprozess muss zur reproduzierbaren Bildung von diagnostischen Ionen in hinreichender Anzahl, Selektivität und Intensität führen.

Die Elektronenstoßionisation (EI) ist bei der GC-MS die zur Zeit am häufigsten verwendete Ionisationstechnik zum Nachweis der genannten Substanzgruppen in biologischen Matrices. Für spezielle Fragestellungen kann der Einsatz von chemischer Ionisation mit negativen oder positiven Ionen (NICI oder PICI) vorteilhaft sein.

Ein Vorteil der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) ist die vereinfachte Probenvorbereitung, da im Allgemeinen kein Derivatisierungsschritt erforderlich wird. Die gängigsten Ionisierungsarten sind Elektrosprayionisation (ESI) und chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Bei Verwendung von LC-MS-Techniken ist besonders auf Matrixeffekte zu achten, durch die das Signal des Analyten unterdrückt oder verstärkt werden kann.

#### 4.3.2 Identifizierungskriterien bei MS-Detektion

Als Minimalanforderung zur Identifizierung muss jedes diagnostische Ion einen chromatographischen Peak bilden, dessen Peakhöhe sich um den Faktor drei vom Untergrundrauschen (Rauschamplitude) abhebt (Signal-Rausch-Verhältnis  $\geq 3:1$ ).

Die massenspektrometrische Identifizierung einer Substanz sollte sich auf eine einheitliche Spezies beziehen, z.B. Molekülion und zugehörige Fragmentionen. Alternativ zum Molekülion können auch Addukte (z.B.  $\text{NH}_4$ , Na) oder mehrfach geladene Ionen analysiert werden. Grundsätzlich soll eine Alternativmethode bzgl. Derivatisierung oder Ionisationsart *qualitativ* andere diagnostische Ionen liefern, um als Zusatzinformation akzeptiert zu werden.

#### 4.3.2.1 Full scan MS Detektion

Der Full scan MS-Modus wird vor allem für ungerichtete Suchanalysen eingesetzt. Diese schließen eine Datenbankrecherche mit ein. Bei der Aufzeichnung von vollständigen Spektren sollten in der Regel alle gemessenen Ionen mit einer relativen Intensität von mehr als 10% im Referenzspektrum (Molekül-Ion, charakteristische Addukte des Molekül-Ions, charakteristische Fragment-Ionen und Isotopen-Ionen) im Substanzspektrum vorhanden sein. Als Mindestanforderung sollten vier diagnostische Ionen eines Referenzspektrums von mindestens 10% Intensität (relativ zum intensivsten Ion) im MS vorhanden sein. Das Molekül-Ion sollte eingeschlossen sein, wenn es im Referenzspektrum mit einer relativen Intensität von  $\geq 10\%$  vorhanden ist. Liefert die Substanz kein solch aussagefähiges MS-Spektrum, sind zusätzliche Plausibilitätstests durchzuführen (Einbeziehung der Retentionsindices, Suche nach Artefakten oder Metaboliten, Einbeziehung der Ergebnisse von Vortests usw.).

Das Auftreten zusätzlicher (im Referenzspektrum fehlender) Ionen, sollte durch Koelution mit Matrixkomponenten erklärbar sein.

Bei Verwendung einer computerunterstützten Datenbanksuche (z.B. mit der Maurer, Pfleger, Weber-Datenbank oder Rösner, Junge, Westphal, Fritschi-Datenbank) sind potentielle Treffer durch einen erfahrenen Analytiker auf Plausibilität zu prüfen. Die Durchführung einer Untergrundsubtraktion oder Dekonvolution muss nachvollziehbar und dokumentiert sein.

#### 4.3.2.2 Einzelionendetektionen

Bei der Anwendung von Quadrupolmassenspektrometern ist für quantitative Methoden aufgrund der höheren Empfindlichkeit und besseren statistischen Sicherheit die Einzelionendetektion der Analyse über einen großen Massenbereich (Full scan) überlegen.

Die Substanzidentifizierung mit Hilfe der Einzelionendetektion erfordert den Nachweis von drei strukturspezifischen (diagnostischen) Ionen pro Analyt mit entsprechendem Signal-Rausch-Verhältnis und der selben Retentionszeit.

Die diagnostischen Ionen sollen möglichst das gesamte Molekül repräsentieren, demnach nicht ausschließlich aus demselben Fragment des Moleküls stammen. Vorzugsweise sollte das Molekül-Ion eines der ausgewählten diagnostischen Ionen sein. "A+2" Element-Isotopenpeaks (Cl, Br) sind als diagnostische Ionen akzeptabel. "A+1" Isotopenpeaks und Fragmente, die aus unspezifischen Fragmentierungsreaktionen resultieren (z.B. M-H<sub>2</sub>O, M-TMS) dürfen nur neben charakteristischen Ionen verwendet werden. Nur in analytisch begründeten Ausnahmefällen kann die Identifizierung mit nur zwei Ionen erfolgen.

Ein Ion dient zur Identifizierung und Quantifizierung (sogenanntes Targetion oder Quantifier), zwei weitere Ionen nur zur Identifizierung (sogenannte Qualifier). Beim Targetion handelt es

sich üblicher-, aber nicht zwingenderweise, um das signalstärkste Ion. Die für die Quantifizierung herangezogenen Ionensignale dürfen weder durch Fremdstoffen, noch durch die jeweils analogen Verbindungen (deutert/undeutert) gestört sein (Isotopenverteilung beachten!). Bei Verwendung deuterteter Interner Standards ist die Aufzeichnung zweier SIM-Spuren oder eines Massenübergangs für den Internen Standard ausreichend.

Das Intensitätsverhältnis der gewählten Ionen zueinander ist ein wichtiges Kriterium zur Identifizierung. Die relativen Ionenintensitäten (Fragmentionen-Peakflächen- bzw. -Peakhöhenverhältnisse) müssen den Verhältnissen in einer Referenzprobe entsprechen (mitgeführte QC-Proben, Kalibrierstandards oder dotierte Matrixprobe in vergleichbaren Konzentrationen, gemessen unter den gleichen Analysenbedingungen). Sie werden ausgedrückt als Prozentsatz der Intensität (Peakfläche oder Peakhöhe) des intensivsten Ions (= 100%) oder Übergangs. Akzeptierte Toleranzen finden sich in Tabelle 2.

**Tabelle 2: Akzeptierte Toleranzen der relativen Intensitäten von diagnostischen Ionen bei verschiedenen MS- Techniken**

Relative Ionenintensität	GC-EI-MS (relativ*)	GC-CI-MS, GC-MS <sup>n</sup> , LC-MS, LC-MS <sup>n**</sup> (relativ*)
>50%	20%	20%
>20-50%	20%	25%
>10-20%	25%	30%
≤10%	50%	50%

\* Relativ = bezogen auf den Wert der relativen Ionenintensität

\*\* n>1

Bei größeren Abweichungen ist die Analyse zu wiederholen bzw. darzulegen, weshalb eine höhere Abweichung einer einzelnen Masse toleriert werden kann. Eine mögliche Plausibilitätskontrolle wäre z.B. die Anwesenheit von Metaboliten (mit ähnlichen Halbwertszeiten) oder die Einbeziehung der Ergebnisse anderer Analysenverfahren.

Bei einer Abweichung beider Qualifierionen-Verhältnisse ist die Identität der Substanz im speziellen Fall nicht gesichert und gegebenenfalls die Validität der Analysenmethode zu prüfen.

### 4.3.2.3 Tandem MS

#### Produktionenscans

Mindestens 4 diagnostische Ionen eines Referenzspektrums von mindestens 10% Intensität (relativ zum intensivsten Ion) müssen im MS vorhanden sein. Ausnahmefälle sind zu begründen. Das Auftreten zusätzlicher (im Referenzspektrum fehlender) Ionen sollte durch Koelution mit Matrixkomponenten erklärbar sein.

Bei Verwendung einer computer-unterstützten Datenbanksuche sind potentielle Treffer durch einen erfahrenen Analytiker auf Plausibilität zu prüfen. Die Durchführung einer Untergrundsubtraktion oder Dekonvolution muss nachvollziehbar sein.

#### Detektion mehrerer Fragmentierungsreaktionen:

Der Nachweis von zwei Massenübergängen im multiple reaction monitoring (MRM) Modus gilt als hinreichende Identifikation, sofern sich die relativen Fragmentionenintensitäten im akzeptierten Bereich bewegen (s. Tabelle 2). Das Vorläuferion (beispielsweise das Pseudomolekül-Ion) kann identisch sein, sofern sich die Produkt-Ionen hinreichend unterscheiden (verschiedene charakteristische Fragmentierungen).

Bei größeren Abweichungen der Ionenintensitätsverhältnisse ist die Analyse zu wiederholen bzw. darzulegen, weshalb eine höhere Abweichung einer einzelnen Masse toleriert werden kann. Eine mögliche Plausibilitätskontrolle wäre z.B. die Anwesenheit von Metaboliten (mit ähnlichen Halbwertszeiten) oder die Einbeziehung der Ergebnisse anderer Analysenverfahren.

## 4.4 UV-VIS-Detektion mittels Diodenarray

### 4.4.1 Generelle Anforderungen

Die Identifizierung erfolgt durch die Retentionszeit bzw. einen davon abgeleiteten geeigneten Retentionsparameter (siehe auch Kapitel 4.2) und das UV-Spektrum. Das UV-Spektrum muss dem einer unter gleichen Bedingungen analysierten Referenzsubstanz entsprechen. Es besteht auch die Möglichkeit eines Datenbank-Abgleichs.

Die HPLC-DAD (Photodiodenarray-Detektion)-Anlage ist regelmäßig entsprechend den Vorgaben des Herstellers zu warten. In diesem Zusammenhang wird unbedingt eine Wellenlängenkalibrierung und die Prüfung der Lampenenergie des DAD durchgeführt.

### 4.4.2 Suchanalyse mittels DAD-Detektion

Bei Einsatz zur systematischen toxikologischen Analyse ist die volle Funktionstüchtigkeit aller Bestandteile der HPLC-DAD-Anlage zu Beginn jedes Arbeitstages durch Messung einer geeigneten Testlösung zu überprüfen und zu dokumentieren (siehe auch Kapitel 4.2.2).

Die Lösung sollte so zusammengesetzt sein, dass das erhaltene Chromatogramm im Hinblick auf die UV-Detektion Aufschluss über die Richtigkeit folgender Parameter gestattet:

- Wellenlängenzuordnung/-richtigkeit (DAD)
- Spektroskopisches Auflösungsvermögen (DAD)

Empfohlen wird hierzu der Einsatz von Benzol (siehe 4.2.2). Benzol wurde trotz seiner Toxizität wegen der ausgeprägten Schwingungsstruktur der längstwelligsten aromatischen Absorptionsbande gewählt. Eine Gefährdung ist bei den eingesetzten Mengen nicht zu befürchten.

Das Chromatogramm ist bezüglich folgender Parameter mit Sollwerten zu vergleichen:

- Übereinstimmung der UV-Spektren mit den Sollspektren (Spektrenüberlagerung, Similarity-Index > 0,999)
- Richtigkeit der  $\lambda_{\max}$ -Werte: Die vier stärksten Schwingungsbanden des Benzols sollten bei 242-243 nm, 247-248 nm, 253-254 nm und 259-260 nm liegen.
- Auflösung der Schwingungsstruktur von Benzolbanden: Die Feinstruktur des Spektrums muss deutlich ausgeprägt sein. Der Extinktionsquotient  $E_{258}/E_{254}$  sollte mehr als 2 betragen. Dieses wird durch ältere Detektoren häufig nicht erreicht. Entscheidend ist hier gleichbleibendes Auflösungsvermögen.
- Rauschpegel im gesamten Wellenlängenbereich bei hoher Empfindlichkeit. Hierzu wird ein Spektrum an einer peakfreien Stelle des Chromatogramms, bei z.B. 1 mAbs./Vollausschlag

bewertet (1 mAbs. = 0,001 Extinktionseinheiten). Das Rauschen sollte im gesamten Wellenlängenbereich weniger als 0,05 mAbs. sein.

Die Ergebnisse sind zu dokumentieren.

Im Falle der Gradientenelution kann eine Funktionskontrolle analog mit Testlösungen basischer und saurer Wirkstoffe nach einem Verfahren von Bogusz und Erkens erfolgen. Bei Abweichungen müssen die Fehlerquellen umgehend beseitigt werden. Die Testchromatogramme sind aufzubewahren.

Vor Anwendung der Bibliothekssuche (bspw. mit der Pragst-Datenbank) muss jeder Peak durch die von der DAD-Software gebotenen Möglichkeiten auf Einheitlichkeit überprüft werden. Lässt sich aus einem Peak kein einheitliches Spektrum gewinnen oder besteht an der Einheitlichkeit anderweitig begründeter Zweifel, so muss die Analyse gegebenenfalls zur Trennung der überlagerten Peaks unter veränderten chromatographischen Bedingungen wiederholt werden. Jedoch kann in bestimmten Fällen zur Identifizierung auch die Auswertung des Spektrums in der Peakflanke sinnvoll sein.

UV-Spektren besitzen eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Daher erfordert die Identifizierung eine völlige Übereinstimmung des gesamten Proben- und Bibliotheksspektrums. Neben einem hohen Ähnlichkeitsindex des Suchergebnisses muss dieses in jedem Fall durch visuelle Kontrolle der übereinander gelegten Spektren vom Untersucher bestätigt werden. Bei sehr niedriger Konzentration kann das Probenspektrum durch Rauschen verändert sein. Als untere Identifizierungsgrenze kann die Konzentration angesehen werden, bei der das Rauschen 10% der maximalen Extinktion des Spektrums erreicht. Bei stärkerem Rauschen kann zur Klärung eine größere Substanzmenge injiziert werden.

UV-Spektren besitzen je nach spektraler Ausdehnung im erfassten Wellenlängenbereich und der Häufigkeit des zugrunde liegenden Chromophors eine unterschiedliche Spezifität. Gegebenenfalls, insbesondere bei Spektren geringerer Spezifität, sind daher andere, unabhängige Verfahren, insbesondere mit massenspektrometrischer Detektion, zur Bestätigung der Identität heranzuziehen.

Wird zur Bibliothekssuche eine kommerziell erhältliche Spektrenbibliothek benutzt, so ist vorher zu sichern, dass die verwendete mobile Phase, insbesondere deren pH-Wert, mit der für die Bibliothek angegebenen übereinstimmt.

Generell ist an ausgewählten Beispielen die Übereinstimmung der selbst gemessenen Spektren mit den Bibliotheksspektren zu bestätigen. Es empfiehlt sich, für häufig vorkommende Substanzen eine eigene Spektrensammlung parallel zu der kommerziell erhältlichen Bibliothek zu erstellen.

## 5 Qualitätssicherungsaspekte bei quantitativen Bestimmungen

Jeder zu quantifizierende Peak muss vorher eindeutig identifiziert sein; bspw. ist eine einzige Wellenlänge nicht ausreichend zur Identifizierung. Die quantitative Bestimmung erfolgt in der Regel anhand der Peakflächen oder Peakhöhen.

Im Falle von UV-Detektion ist eine chromatographische Trennung des Analyten von anderen Analyten und Matrixbestandteilen Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung. Für die Quantifizierung wird eine Wellenlänge gewählt, bei der einerseits im Bereich eines Absorptionsmaximums eine möglichst hohe Empfindlichkeit erreicht wird und andererseits störende Effekte von koelutierenden Verbindungen ausgeschlossen sind.

Im Falle von massenspektrometrischer Detektion ist die mögliche Verfälschung eines quantitativen Analyseergebnisses durch Einflüsse auf den Ionisationsprozess, insbesondere bei der Analyse komplexer Matrices zu beachten. Durch Verwendung deuterierter oder strukturanaloger Interner Standards mit annähernd gleicher Retentionszeit können diese Effekte teilweise kompensiert werden.

Grundsätzlich muss eine quantitative Bestimmungsmethode nach den aktuellen Richtlinien (Anhang B) validiert werden; bei selten in Untersuchungsfällen vorkommenden Wirkstoffen ist die Erstellung einer komplett validierten quantitativen Methode jedoch nicht immer erforderlich. Zur semiquantitativen Abschätzung der Substanzkonzentration ist eine matrixbasierte Einpunktkalibrierung ausreichend.

Insbesondere bei Postmortem-Analysen steht oft keine direkt vergleichbare Referenzmatrix zur Verfügung, so dass eine Validierung auch gar nicht möglich ist. In solchen Fällen kann zur semi-quantitativen Bestimmung auf das Standard-Additionsverfahren zurückgegriffen werden, bei dem die Kalibrierfunktion direkt in der Probenmatrix des aktuellen Falls erstellt wird, was bspw. bei Postmortem-Analysen eine individuelle Berücksichtigung der Matrixeigenschaften (inkl. postmortaler Veränderungen) ermöglicht. Die zu untersuchende Probe wird bei dieser semiquantitativen Methode in völlig gleicher Weise einmal unverändert und nach Zusatz definierter Mengen des zu bestimmenden Wirkstoffs aufgearbeitet und gemessen. Eine zugesetzte Konzentration soll dabei etwa der höchsten zu erwartenden Probenkonzentration entsprechen. Sofern die Probenmenge ausreicht, sollten mehrere verschiedene Konzentrationen zugesetzt werden. Durch lineare Regression kann auf die ursprüngliche Analytkonzentration in der Probe geschlossen werden. Voraussetzungen für die Anwendung des Standard-Additionsverfahrens sind ein lineares Ansprechverhalten der eingesetzten Analysenmethode für den untersuchten Analyten im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich, die Verlässlichkeit der zugesetzten Analytkonzentrationen, sowie die Homogenität des Untersuchungsmaterials.

## 5.1 Messreihen und laborinterne Qualitätssicherung

Innerhalb einer Messreihe müssen neben den Realproben so genannte Qualitätskontroll (QC)-Proben (externe oder interne Kontrollproben), Leerproben und gegebenenfalls Kalibrationsstandards mitgeführt werden.

Zusammenfassend sind pro Messreihe als Minimalanforderung mitzuführen: eine Nullprobe, eine niedrige QC-Probe und eine hohe QC-Probe. Mindestens nach 20 Realproben muss eine weitere QC-Probe gemessen werden.

Forensisch-toxikologische Analysen in Biomatrices erfolgen in der Regel in Einfachbestimmung.

### 5.1.1 Abwechselnde Injektion von Real- und Nullproben

Eine Verschleppung des Analyten von Probe zu Probe muss durch geeignete Maßnahmen ausgeschlossen werden. Eine Verschleppung von einer Probeninjektion zur nächsten kann z.B. durch Injektion von reinem Lösungsmittel oder besser einer Leerprobe (Blank, aufbereitete Matrix ohne Analyt und Internen Standard) vor jeder Analyse einer Realprobe vermieden werden. Ein verkürztes Programm kann eingesetzt werden, wenn bekannt ist, zu welcher Zeit die entsprechenden Analyten eluieren.

### 5.1.2 Kalibration

Eine neue Kalibration ist mit mindestens fünf Kalibratoren, die den relevanten Konzentrationsbereich abdecken, durchzuführen. Eine Null-Probe darf (mit Ausnahme von photometrischen Verfahren) nicht in die Berechnung der Kalibrationskurve einbezogen werden. Es dürfen keine Kalibratoren unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Die Kalibratoren werden durch Dotieren der entsprechenden Matrix hergestellt, es sei denn, es wurde während der Validierung (Anhang B) gezeigt, dass eine Lösungsmittelkalibration gleiche Ergebnisse liefert. Die Verwendung definierter Reinsubstanzen als Referenzmaterial muss gesichert sein. Erfolgt die Injektion der Kalibrationsstandards in aufsteigender Reihenfolge, sollte nach dem höchsten Kalibrator eine Injektion von Lösungsmittel oder einer Leerprobe erfolgen.

Zur Überprüfung der Kalibration erfolgt eine Rückrechnung der einzelnen Kalibratoren über die Kalibrationsfunktionsgleichung (Auftragung von Messsignal, wie z.B. Peakflächenverhältnis, gegen die Sollkonzentration). Die Istkonzentrationen dürfen dabei eine maximale Abweichung von  $\pm 15\%$  (bzw. 20% an der Bestimmungsgrenze) vom nominellen Sollwert zeigen. Kalibratoren mit höherer Abweichung werden eliminiert. 75% der Kalibratoren, aber mindestens fünf müssen innerhalb der Grenzen liegen.

Sofern die Kalibration den Akzeptanzkriterien entsprochen hat und die QC-Proben der entsprechenden Sequenz innerhalb der Grenzen liegen (siehe unten), kann zur Konzentrationsberechnung der Proben auf eine gespeicherte Kalibration zurückgegriffen werden.

Nach ins System eingreifenden Wartungsarbeiten wie Einsetzen einer neuen Säule, Reinigung der Quelle bzw. komplettes Neutuning ist zu Beginn der Sequenz zu überprüfen, ob die Qualitätskontrollproben innerhalb der akzeptierten Grenzen liegen, um eine gespeicherte Kalibration verwenden zu können.

Anhand der Kalibrationsstandards oder QC-Proben können die aktuellen Retentionszeiten und die Fragmentionen-Verhältnisse bei verschiedenen Konzentrationen zur Überprüfung der Analytidentität in den Proben bestimmt werden.

### **5.1.3 Nullproben (Zero samples)**

Es handelt sich um aufbereitete Matrixproben ohne Analyt- aber mit Zusatz des Internen Standards. Diese Probe sollte mindestens einmal innerhalb einer Messreihe (Sequenz) gemessen werden. Sie darf keine Analytenspuren enthalten. Um Hinweise auf Analyt-Verschleppungen zu erhalten, empfiehlt es sich, die Nullprobe nach dem höchstdotierten Kalibrator oder der höchsten QC-Probe zu analysieren.

### **5.1.4 Quality Control (QC)-Proben**

Qualitätskontrollproben sollen die Qualität der Messungen über die gesamte Messreihe kontrollieren und dokumentieren. Sie überprüfen kombiniert sowohl den Bias als auch die Präzision.

#### **5.1.4.1 Interne QC-Proben**

Es handelt sich um mit bekannter Konzentration des Analyten versetzte Matrix. Nach Möglichkeit sollte zur Herstellung der QC-Proben auf zertifiziert eingewogene Analytlösungen zurückgegriffen werden. Die Herstellung muss unabhängig von der Herstellung von Kalibrationsproben erfolgen. Es sollte ein möglichst großer Pool (abhängig von der Stabilität des Analyten) angesetzt und aliquotiert eingefroren werden. Die Homogenität des Pools ist durch Messung von sechs verschiedenen Aliquoten zu zeigen. Es gelten die gleichen Akzeptanzkriterien wie in der Validierung (siehe Anhang B), d.h. der Mittelwert der sechs Messungen darf höchstens  $\pm 15$  bzw.  $\pm 20\%$  (Bestimmungsgrenze) vom aufgestockten Sollwert abweichen (Bias), der Variationskoeffizient RSD der sechs Werte muss ebenfalls  $\leq 15\%$  (20% an der Bestimmungsgrenze) betragen.

Zudem sollte die Genauigkeit (Kombination Bias und Präzision), ausgedrückt als so genanntes 95%  $\beta$ -Toleranzintervall, vollständig innerhalb eines Akzeptanzintervalls von  $\pm 30\%$  liegen. Wurden der Bias und die Wiederholpräzision wie oben vorgeschlagen an einem Tag in Sechsfachbestimmung bestimmt, so kann eine Abschätzung des entsprechenden  $\beta$ -Toleranzintervalls mittels folgender Näherungsgleichungen erfolgen:

$$L_u [\%] = \text{Bias} [\%] - 2,57 \cdot \text{RSD}_r [\%]$$

$$L_o [\%] = \text{Bias} [\%] + 2,57 \cdot \text{RSD}_r [\%]$$

$L_u$  untere Grenze des 95%  $\beta$ -Toleranzintervalls

$L_o$  obere Grenze des 95%  $\beta$ -Toleranzintervalls

(Zeichenerklärung siehe Anhang B, Validierungsrichtlinie)

Nach Möglichkeit sollte der selbst hergestellte QC-Probenpool auch anhand von externem Referenzmaterial überprüft werden.

Die Haltbarkeits- bzw. Verwendbarkeitsdauer des eingefrorenen QC-Pools muss laborintern bestimmt werden und ist anzugeben.

Die Probenvorbereitung und Messung der QC-Proben erfolgt analog zu den Kalibrations- bzw. Realproben. Die QC-Proben umfassen mindestens zwei Konzentrationen. Eine Probe in der Nähe des untersten Kalibrators sollte mindestens einmal, z.B. am Anfang der Sequenz injiziert werden, um die Empfindlichkeit des Gerätes zu kontrollieren. Um eine Verschlechterung über die Zeit der Messungen zu erkennen, kann sie auch noch einmal am Ende der Sequenz vermessen werden. Die Wiederholungsmessungen eines QC-Standards sollten durch Injektion des gleichen Extraktes erfolgen. Empfehlenswert ist jedoch die Abfüllung in einzelne Autosampler-Vials, um Abdampf- und damit Aufkonzentrationseffekte in den angestochenen Vials zu vermeiden. Zumindest eine weitere QC-Probe muss im oberen Kalibrationsbereich liegen (etwa 75% des obersten Kalibrators oder höher). Auch diese QC-Probe muss mindestens einfach gemessen werden. Mindestens nach je 20 Realproben muss eine erneute QC-Proben-Messung (abwechselnd niedrig und hoch) erfolgen. Die Analytkonzentrationen der QC-Proben dürfen nicht mit Kalibratorkonzentrationen übereinstimmen. QC-Proben können, wie auch Kalibrationsproben, mehrere Analyten enthalten, solange diese sich nicht gegenseitig stören.

Die Ergebnisse sind auf Kontrollkarten zu dokumentieren. Akzeptanzkriterien sind in Kapitel 5.2. dargelegt.

#### 5.1.4.2 Externe QC-Proben

In regelmäßigen Abständen (mindestens jede 4. Sequenz) müssen externe Kontrollproben (zertifiziertes Referenzmaterial mit bekannter Konzentration, Stabilität und Vertrauensbereich), sofern erhältlich, mitgeführt werden. Sie werden in gleicher Weise ausgewertet wie die internen QC-Proben (siehe Kapitel 5.2).

## 5.2 Kontrollkarten für QC-Proben

Es muss pro Analyt, Konzentration und Messgerät eine Kontrollkarte angelegt werden. Eine Neukalibration sollte in der Kontrollkarte vermerkt werden. Werden QC-Proben einer Konzentration mehrfach gemessen, ist es ausreichend eine Probe in der Kontrollkarte zu führen. Es muss jedoch zuvor festgelegt werden, welche Probe eingetragen wird. Die Ergebnisse der übrigen QC-Proben müssen überprüft und dokumentiert werden.

### 5.2.1 Akzeptanzkriterien

Für die Abweichung des Messwertes (Istwert) vom Referenzwert (Sollwert) gelten maximal  $\pm 30\%$  (bzw.  $\pm 40\%$  an der Bestimmungsgrenze), da sie sowohl systematische als auch zufällige Fehler beinhaltet. Dies gilt auch für zertifiziertes Material.

Das Ergebnis der Kontrollen im Rahmen der Routineanalytik wird unmittelbar in eine Laborkontrollkarte eingetragen und einem graphisch-statistischen Test unterzogen. In der Laborkontrollkarte werden tabellarisch und graphisch aufgetragen (siehe graphisches Beispiel Abb. 1):

- der Sollwert (Zentrallinie),
- die Warngrenzen ( $\pm 30\%$  Abweichung vom Sollwert bzw.  $\pm 40\%$  an der Bestimmungsgrenze (BG)).

Die maximal zulässige Abweichung des Messwertes darf nicht überschritten werden. Alle QC-Proben einer Messreihe müssen die Anforderungen erfüllen. Ist die Abweichung größer, so müssen die Ursache festgestellt, Korrekturmaßnahmen ergriffen und gegebenenfalls die Untersuchungsreihe wiederholt werden.

Das Analysenverfahren muss auch überprüft werden, wenn sieben aufeinander folgende Werte monoton ansteigen oder abfallen.

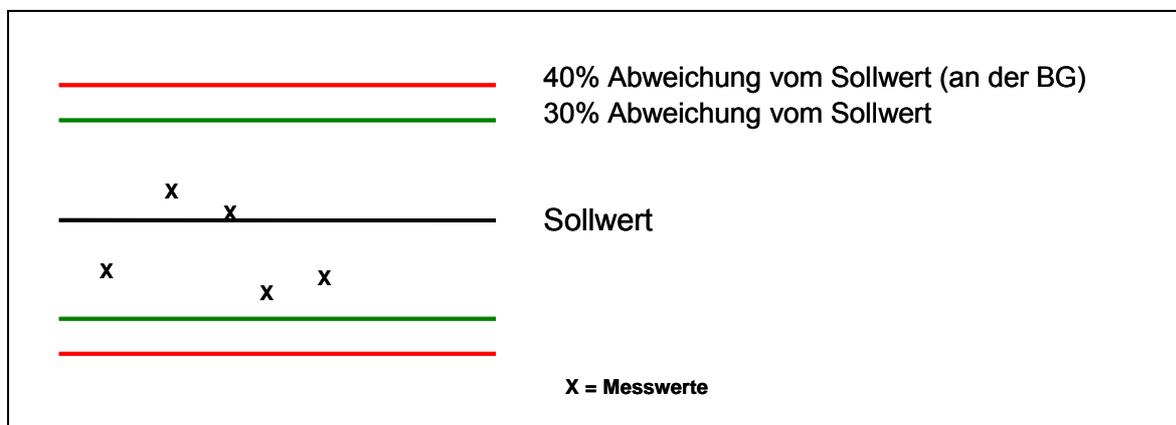


Abb. 1: Exemplarische Darstellung einer Kontrollkarte

### 5.3 Externe Qualitätskontrollen (Ringversuche)

Die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Ringversuche. Ringversuche ergänzen die laborinterne Richtigkeitskontrolle und gewährleisten zugleich die objektive Überwachung der Richtigkeit bzw. des Bias von Ergebnissen qualitativer und quantitativer forensisch-toxikologischer Untersuchungen.

### 5.4 Messunsicherheit

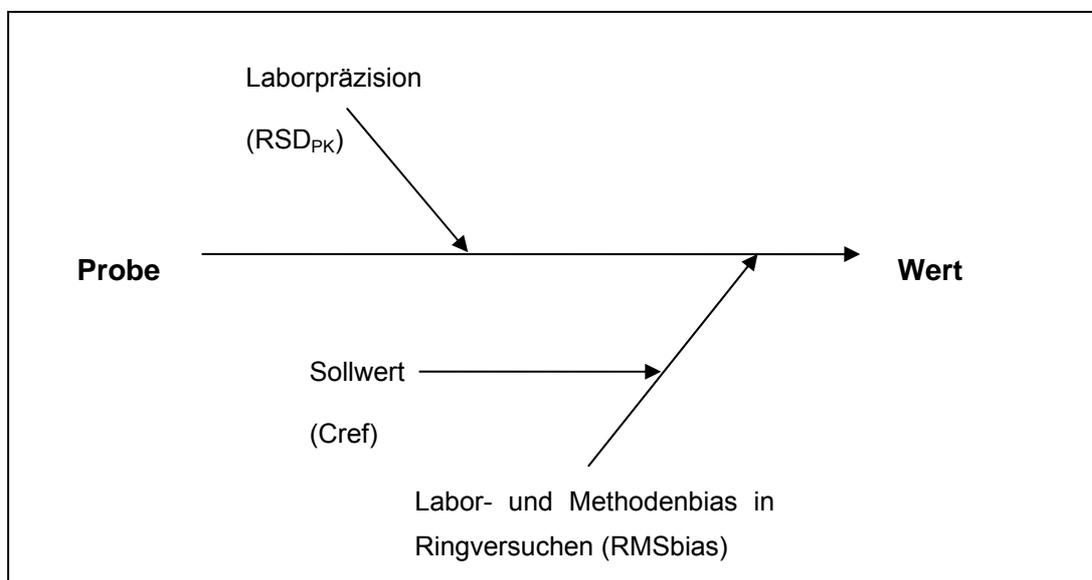
Die Messunsicherheit stellt für jedes Analyseverfahren eine wichtige Kenngröße dar. Mit ihrer Berechnung nach einem einheitlichen Verfahren kommt zum Ausdruck, dass der Grad des Vertrauens (z.B. 95%) den Wertebereich charakterisiert, welcher der Messgröße durch die durchgeführte Messung zugeschrieben werden kann. Je geringer die Breite des Wertebereichs bei einer vom Wert her richtigen Messung ausfällt, umso leistungsfähiger ist das Analyseverfahren (DIN 13005, Eurachem-Leitfaden, Int. Wörterbuch der Metrologie).

Die allgemeinen Grundlagen zur Bestimmung der Messunsicherheit ergeben sich aus dem „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“ (GUM). Aus diesem leiten sich sowohl der EURACHEM/CITAC Leitfaden für chemische als auch der Nordtest Technical Report für umweltanalytische Verfahren ab (DIN 13005, Eurachem-Leitfaden, Nordtest Technical Report). In diesen Dokumenten sind unterschiedliche Verfahren zur Ermittlung der Messunsicherheit beschrieben. Sie alle beruhen letztlich darauf, dass Komponenten der Messunsicherheit bestimmt oder geschätzt und anschließend nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz zur Gesamtmessunsicherheit addiert werden. Im Gegensatz zum „bottom-up approach“, bei dem alle Unsicherheitskomponenten einzeln ermittelt werden, können beim „top-down approach“ mehrere Unsicherheitskomponenten mittels statistischer Verfahren gemeinsam bestimmt werden.

Aufgrund der Komplexität bioanalytischer Methoden und angesichts der Tatsache, dass bei diesen die Richtigkeit und die Präzision erfahrungsgemäß den bei weitem größten Beitrag zur Gesamtmessunsicherheit liefern, erscheint die Anwendung des „bottom-up approach“ wenig sinnvoll. Es liegt daher nahe, bei solchen Methoden den alternativen „top-down approach“ anzuwenden. Hierbei ist darauf zu achten, dass alle wesentlichen Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Während die Präzisionskomponente problemlos mit selbst hergestellten Präzisionskontrollen ermittelt werden kann, kann die Richtigkeitskomponente nur mit Hilfe geeigneter Referenzproben oder durch Ringversuche ermittelt werden. Aufgrund dieser Erwägungen stellt die im Nordtest-Dokument vorgeschlagene und unten näher beschriebene Schätzung der Messunsicherheit mit Hilfe von Ringversuchsdaten und Präzisionsdaten die für toxikologische Analysenverfahren praktikabelste Lösung dar.

### 5.4.1 Schätzung der Messunsicherheit über Ringversuche und der aus Kontrollproben ermittelten Laborpräzision

Zur Schätzung werden die über Ringversuche gemittelten und prozentbezogenen Unsicherheitsbeiträge der Richtigkeit (Bias) mit den Unsicherheitsbeiträgen der im Ringversuch ermittelten Sollwerte ( $C_{ref}$ ) und der bei Kontrollproben gemessenen Laborpräzision kombiniert (Nordtest Technical Report). Die Daten für die Präzisionskontrollproben können aus laufenden Kontrollkarten übernommen werden. Referenzmaterial mit vorgegebenen Sollwerten ist zur Abschätzung des Unsicherheitsbeitrages der Laborpräzision nicht erforderlich. Die Vorgehensweise entspricht schematisch dem nachfolgend dargestellten Ursache-Wirkungs-Diagramm (Abb. 2).



**Abb. 2: Ursache-Wirkungs-Diagramm zur Abschätzung der Messunsicherheit über die Präzision und die Richtigkeit aufgrund von Ringversuchsergebnissen und einem mehrfach gemessenen Kontrollmaterial (Nordtest Technical Report)**

#### 5.4.1.1 Mindestanforderungen

Aufgrund der Tatsache, dass die Messunsicherheit im unteren Konzentrationsbereich erfahrungsgemäß am größten ist, sollte sie zumindest für den Bereich der Bestimmungsgrenze ermittelt werden. Aus statistischen Gründen ist für die Bestimmung eine Mindestanzahl von Werten erforderlich. In der Praxis sollten hierzu mindestens fünf konsekutive Ringversuchsergebnisse und mindestens 8 konsekutive Einzelbestimmungen von QC-Proben in verschiedenen Messserien herangezogen werden. Mit diesen Daten kann die Messunsicherheit bestimmt werden (Gl. 1-5 im Formelverzeichnis, Kapitel 5.4.3). Statistisch signifikante Ausreißer ( $P=95\%$ ) können in nachvollziehbar begründeten Fällen eliminiert werden.

### 5.4.1.2 Alternativansatz

Im Fall, dass keine fünf Ringversuchsergebnisse vorliegen, können ersatzweise auch Daten durch Messung von ehemaligen Ringversuchsmaterialien oder zertifizierten Referenzmaterialien ersetzt werden. Hierbei ist ebenfalls darauf zu achten, dass die Messungen in verschiedenen Messserien erfolgen.

### 5.4.2 Schätzung der Messunsicherheit in anderen Fällen

Wenn die Schätzung der Messunsicherheit am Mangel an Ringversuchsmaterialien oder Präzisionskontrollmaterial scheitert, kann nach den allgemeinen Leitlinien EURACHEM/CITAC vorgefahren werden.

Bei Analysen, die nur gelegentlich als Einzelbestimmungen durchgeführt werden, erscheint auch eine Abschätzung gemäß der Horwitz-Funktion (Horwitz, 1982) vertretbar.

### 5.4.3 Formelverzeichnis

$$U = k \cdot u(y) \quad \text{Gl. 1}$$

$$u(y) = \sqrt{(\text{RMSbias})^2 + u(\text{Cref})^2 + u(\text{RSD}_{\text{PK}})^2} \quad \text{Gl. 2}$$

$$\text{RMSbias} = \sqrt{\frac{\sum \left( 100 \cdot \frac{(\text{bias})^2}{\text{SW}} \right)}{m}} \quad \text{Gl. 3}$$

$$u(\text{cref}) = \frac{\left( \frac{\sum 100 \cdot \frac{\text{SD}_{\text{RV}}}{\text{SW}}}{m} \right)}{\sqrt{p}} \quad \text{Gl. 4}$$

$$u(\text{RSD}_{\text{PK}}) = 100 \cdot \frac{\text{SD}_{\text{PK}}}{\text{MW}} \quad \text{Gl. 5}$$

#### 5.4.4 Abkürzungen

<b>Bias</b>	Abweichung des Teilnehmer-Wertes vom Ringversuchs-Sollwert
<b>k</b>	Erweiterungsfaktor. Ein Erweiterungsfaktor von 2 entspricht einem Vertrauensniveau von etwa 95%.
<b>m</b>	Anzahl der Ringversuche
<b>p</b>	Mittlere Anzahl der teilnehmenden Laboratorien
<b>RMSbias</b>	Unsicherheitsbeitrag durch die Unrichtigkeit der Messung, entsprechend dem über mehrere Ringversuche gemittelten Bias
<b>SD<sub>PK</sub></b>	Standardabweichung für die Messung des Qualitätskontrollmaterials über die Messtage
<b>SD<sub>RV</sub></b>	Standardabweichung im Ringversuch (Vergleichsstandardabweichung)
<b>SW</b>	Sollwert im Ringversuch
<b>U</b>	Erweiterte Messunsicherheit, berechnet aus der kombinierten Messunsicherheit mit dem Erweiterungsfaktor k.
<b>u(Cref)</b>	Unsicherheitsbeitrag durch die im Ringversuch ermittelten Sollwerte
<b>u(RSD<sub>PK</sub>)</b>	Unsicherheitsbeitrag durch die Laborpräzision (RSD <sub>PK</sub> ) Diese beinhaltet alle in einem Labor variierenden Faktoren wie beispielsweise Operator und/oder Ausstattung und/oder Zeit und/oder Kalibration.  Hier kann auch die in Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung genannte tagesverschiedene Laborpräzision verwendet werden.
<b>u(y)</b>	Kombinierte Messunsicherheit

## 6 Ergebnisbericht/Gutachten

Dem Auftraggeber ist über das Ergebnis der Untersuchungen ein schriftlicher Bericht bzw. ein Gutachten zu erstatten. Der Bericht wird entsprechend der Fragestellung gestaltet.

Nach ISO 17025 sind als Kopfdaten mindestens Datum und Uhrzeit der Probenahme sowie Datum des Probeneingangs und der Analysenzeitraum (Analysenbeginn und –ende) im Ergebnisbericht anzugeben. Sofern bekannt, muss zusätzlich der Zeitpunkt des Vorfalls erfasst werden. Der Name der Person, die für die Untersuchung und die Vertretung nach außen verantwortlich ist, muss angegeben sein.

Bei Stellungnahmen müssen alle relevanten Anknüpfungstatsachen im Gutachten aufgeführt sein, sofern mit dem Auftraggeber keine andere Regelung vereinbart wurde.

Bei der Untersuchung biologischen Materials muss das Ergebnis der Person, von der die Probe stammt, sowie dem ggf. eingesandten Blutentnahmesystem eindeutig zuzuordnen sein. Die eingesetzten Analysemethoden sind anzugeben. Es ist mitzuteilen, welches Untersuchungsmaterial (z.B. Vollblut, Serum, Plasma, Restblut usw.) für die Analyse eingesetzt wurde. Auf den Einsatz nicht geeigneter Entnahmesysteme bzw. Probesysteme ist hinzuweisen.

Auf mögliche Verluste infolge nicht rechtzeitiger sachgerechter Lagerung z.B. von Serum- bzw. Plasmaproben (gefordert sind Tiefkühlbedingungen von mind. -15 °C) oder ungünstiger Analysebedingungen bei der Bestimmung aus Vollblut- oder Restblutproben ist im Bericht hinzuweisen. Die Aussagekraft des Ergebnisses ist ggf. zu erläutern (mit analytischer und gegebenenfalls toxikologischer Beurteilung).

Wird ein Ergebnis unterhalb des Kalibrationsbereiches erhalten, so ist dieses mit „ca.“ oder mit „positiv (kleiner als...)“ zu bezeichnen. Eine Bemerkung, dass dieser Wert unterhalb der Bestimmungsgrenze bzw. unterhalb des Kalibrationsbereiches liegt, sollte eingefügt werden. Ergebnisse, die oberhalb des Kalibrationsbereiches liegen, werden analog befundet.

Die Messwert-Angabe erfolgt nach Schneiden. Unabhängig von der verwendeten Konzentrationseinheit sollten maximal zwei signifikante Stellen (d.h. eine weitere Stelle nach der ersten von Null verschiedenen Stelle) angegeben werden, soweit keine anderen Anforderungen gestellt werden.

## 7 Dokumentation

Die Laborleiterin / der Laborleiter ist verantwortlich dafür, dass sämtliche vom Labor verwendeten methodischen Vorschriften, u.a. Standardarbeitsanweisungen (Standard Operation Procedures - SOPs) und Verfahrensanweisungen für alle wichtigen Abläufe im Labor, als Teil des Qualitätsmanagementhandbuchs schriftlich niedergelegt werden. Die Vorschriften müssen anerkannten Qualitätskriterien entsprechen und geprüft sein, z.B. im Rahmen einer Akkreditierung. Methodische Vorschriften müssen so ausgearbeitet und beschrieben sein, dass das technische Personal nach entsprechender Einweisung nach diesen arbeiten kann. Jede Änderung von Vorschriften ist zu dokumentieren. Es muss sichergestellt sein, dass genau nach den niedergelegten Vorschriften gearbeitet wird. Die Methoden müssen validiert sein. Das Ergebnis der Validierung ist mit der Vorschrift zu dokumentieren.

Analysen, für welche keine niedergelegten Vorschriften im Rahmen des Qualitätsmanagementsystem bestehen, können durchgeführt werden, wenn eine entsprechende Methode sorgfältig dokumentiert wird.

Die Untersuchungsaufträge, Begleitprotokolle und alle Unterlagen, wie Auswertungen von Messergebnissen oder Analysen, Messprotokolle, Kalibrationen, Chromatogramme, Spektren, Analysenberichte und Gutachten sowie die Analysenvorschriften der Untersuchung müssen vollständig gesammelt und so dokumentiert werden, dass sie jederzeit einer / einem vom Gericht beauftragten Gutachterin / Gutachter vorgelegt werden können. Anhand der Unterlagen müssen die korrekte Durchführung der Analysen und die daraus abgeleitete Begutachtung nachvollziehbar sein. Es muss nachvollziehbar sein, welche Person(en) die Untersuchung durchgeführt hat/haben und welcher Gutachter für deren Vertretung nach außen verantwortlich ist. Die für die Untersuchung verantwortliche Person versichert, dass diese gemäß diesen Richtlinien ausgeführt wurde. Die Dokumentation kann auch elektronisch erfolgen, sofern sichergestellt ist, dass über den entsprechenden Aufbewahrungszeitraum darauf zurückgegriffen werden kann. Die Laborleiterin / der Laborleiter bzw. der Qualitätsmanagementbeauftragte sorgt für die Schulung des Personals zur korrekten Ausführung der Dokumentation.

Die Dokumente sind mindestens sechs Jahre aufzubewahren, sofern die jeweils geltenden Verwaltungsvorschriften keine längeren Aufbewahrungsfristen vorsehen.

## 8 Literatur und mitgeltende Bestimmungen

- Begutachtungsleitlinien zur Kraffahreignung (2000): Berichte der Bundesanstalt für Straßenwesen (BASt), Mensch und Sicherheit, Heft M 115. Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven.
- Bogusz M, Erkens M (1994) Reversed-phase high performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use. *J. Chromatogr. A* 674, 97-126.
- DIN EN ISO/IEC 17025:2005
- DIN V ENV 13005 (1999). Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen. Beuth Verlag, Berlin
- Eurachem/CITAC, Leitfaden, Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen, 2003
- European Union Decision 2002/657/EC zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation; U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (Mai 2001)
- Herzler M, Herre S, Pragst F (2003) Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2,682 compounds. *J. Anal. Toxicol.* 27, 233-242.
- Horwitz W. (1982) Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* 54, 67-76
- Identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry; WADA Technical Document TD2003IDCR: I
- Internationales Wörterbuch der Metrologie (1994). Beuth Verlag Berlin-Wien-Zürich.
- Maurer HH, Pfleger K, Weber A (2007) Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites. Handbuch und CD. 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Nordtest Technical Report 537, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, 2003
- Pragst F, Herzler M, Herre S, Erxleben BT, Rothe M (2001) UV-Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons. Handbuch und CD, Verlag Dieter Helm, Heppenheim.
- Schubert W, Mattern R (Hrsg.) (2009) Beurteilungskriterien – Urteilsbildung in der medizinisch-psychologischen Fahreignungsdiagnostik, 2. Auflg. Kirschbaum Verlag, Bonn.
- Verwaltungsvorschriften über die Feststellung von Alkohol-, Medikamenten- und Drogeneinfluss bei Straftaten und Ordnungswidrigkeiten und über die Sicherstellung und Beschlagnahme von Führerscheinen (Fassungen der jeweiligen Bundesländer)

## 9 Anhänge

Folgende Richtlinien verstehen sich als Anhänge zur

"Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen"

Nr.	Titel	Ersetzt Richtlinie mit dem Titel
A	Qualitätsanforderungen an die Bestimmung spezieller Analyten aus biologischen Matrices mit Tabellenanhang (aktuelle Vorgaben zu Bestimmungsgrenzen)	Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyten T+K 67 (3), S. 78-80
B	Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden	Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen. 1. Validierung T+K 71 (3), S. 146-154; 13.11.2004
C	Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben	Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyte 2. Untersuchung von Haarproben T+K 71 (3), S. 140-145; 13.11.2004
D	Empfehlungen zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensisch-toxikologische Untersuchungen und spezielle Aspekte der Postmortem-Analytik (letzter Teil in Bearbeitung)	Empfehlungen der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensisch-toxikologische Untersuchungen T+K 71 (2), S. 101-107; 05.06.2004
E	Begleitstoffuntersuchungen mit Dampfraum-Gaschromatographie im biologischen Material	Neuerstellung (in Bearbeitung)

Die jeweils aktuellen Versionen sind der GTFCh-Homepage ([www.gtfch.org](http://www.gtfch.org)) zu entnehmen.

## 10 Schlussbestimmung

Diese Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen wurde vom Vorstand der GTFCh am 01.04.2009 verabschiedet und ersetzt die folgenden vorhergehenden Richtlinien und deren Anlagen:

Nr.	Titel	veröffentlicht
	Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen <i>R. Aderjan, Heidelberg; T. Briellmann, Basel; Th. Daldrup, Düsseldorf; U. Demme, Jena; K. Harzer, Stuttgart; M. Herbold, Heidelberg; H. Käferstein, Köln; G. Kauert, Frankfurt/M.; L. v. Meyer, München; M. Möller, Homburg; F. Mußhoff, Bonn; G. Schmitt, Heidelberg; W. Weinmann, Freiburg.</i>	T+K 65 (1), S. 2-8; 17.01.1998
A1	Anhang A: Anforderung an einzelne Analysemethoden 1. Analysen mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation <i>R. Aderjan, Heidelberg; B. Babel, Würzburg; T. Briellmann, Basel; T. Daldrup, Düsseldorf; U. Demme, Jena; J. Hallbach, München; M. Hartung, Homburg/Saar; K. Harzer, Stuttgart; M. Herbold, Heidelberg; L. von Meyer, München; M. Möller, Homburg/Saar; F. Mußhoff, Bonn; G. Schmitt, Heidelberg; W. Weinmann, Freiburg i.B.</i>	28.03.2000
A2	Anhang A: Anforderung an einzelne Analysemethoden 2. Analysen mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) <i>F. Pragst unter Mitwirkung des Arbeitskreises Qualitätssicherung der GTFCh</i>	04.06.2004
B1	Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyten <i>F. Mußhoff, T. Daldrup, M. Herbold, L. v. Meyer</i>	T+K 67 (3), S. 78-80
B2	Anhang B2: Qualitätsstandards für spezielle Analyten <i>F. Mußhoff, Bonn; T. Daldrup, Düsseldorf; R. Aderjan, Heidelberg; L. v. Meyer, München</i>	T+K 69 (1), S. 32-34; 14.03.2002

## 11 Inkrafttreten

Diese Richtlinie tritt mit der Publikation im Toxichem + Krimtech in Kraft.

Es gelten Übergangsfristen bis 31.03.2011.