

---

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Untersuchung von Kondensationsprodukten aus  
Amphetaminen und Alkoholmetaboliten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines „Doctor of Philosophy“ (PhD) in Medical Sciences

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Marianne Sonnenberg (geb. Knuth)

(2023)

---

---

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Henrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Daldrup, Prof. Dr. Georg Kojda

---

---

Für  
meine Zwillinge  
Henri & Louis

---

---

## Zusammenfassung

Die Auswirkungen eines simultanen Konsums von Amphetamin bzw. Amphetaminderivaten zusammen mit Alkohol sind bislang noch nicht ausreichend geklärt, besonders in Bezug auf mögliche Kondensationsprodukte, die durch die endogene Reaktion dieser Substanzen und deren Abbauprodukte (wie z. B. dem Ethanolmetaboliten Acetaldehyd) entstehen können. In der vorliegenden Arbeit wurde für den qualitativen Nachweis einiger relevanter Kondensationsprodukte, die der Substanzklasse der Tetrahydroisochinoline angehören, und deren Ausgangsstoffe eine Flüssig-Flüssig-Extraktion und eine LC-ESI-MS/MS-Methode entwickelt. Dabei sollten humane Blut- sowie Gehirn- und Leberproben auf die Ausgangsstoffe Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA sowie deren Kondensationsprodukte 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin, N-Methyl-1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin, 1,3-Dimethyl-7,8-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin und N-Methyl-1,3-Dimethyl-7,8-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin untersucht werden. Zuvor wurden die Reinsubstanzen 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin und N-Methyl-1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin synthetisiert und das Analyseverfahren in Bezug auf die Fragestellung des qualitativen Nachweises der Tetrahydroisochinoline validiert. Dabei wurden die Selektivität, die Spezifität, die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze, die Wiederfindung, die Matrixeffekte, die Stabilität in Blut, Gehirn und Leber und die Linearität der Methode im Serum geprüft bzw. bestimmt. Nach der Analyse der humanen Blut- und Gewebeproben, konnte in zwei Leberproben ein Nachweis des aus Amphetamin und Acetaldehyd gebildeten Kondensationsprodukts 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin erfolgen. In allen weiteren Gewebe- und Serumproben konnten ansonsten keine Tetrahydroisochinoline nachgewiesen werden.

---

## Abstract

The effects of the simultaneous consumption of amphetamin or amphetamine derivatives and alcohol have not yet been adequately clarified, especially with regard to possible condensation products that can arise from the endogenous reaction of these substances and their metabolites (e. g., the ethanol metabolite acetaldehyde). In this thesis, an LC-MS/MS method with liquid-liquid-extraction was developed for the qualitative detection of some relevant condensation products belonging to the class of tetrahydroisoquinolines and their substrates in human blood, brain, and liver samples. This includes the analysis of the substrates amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, as well as the condensation products 1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, 1,3-dimethyl-7,8-methylendioxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, and N-methyl-1,3-dimethyl-7,8-methylendioxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. Therefore, the reference standards of 1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline were synthesized in advance and the method was validated with regard to the question of the qualitative detection of these tetrahydroisoquinolines. This embraces selectivity, specificity, limit of detection, limit of quantification, recovery, matrix effects and stability in blood, brain, and liver samples as well as linearity of the method for serum samples. After the analysis of the human blood and postmortem tissue samples, evidence of the condensation product 1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline formed from amphetamine and acetaldehyde could be obtained in two liver samples. In all other tissue samples as well as the serum samples, no evidence of this or the other tetrahydroisoquinolines could be found.

---

## Abkürzungsverzeichnis

1,2,3,4TIQ	1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
1,3-diMe-7,8-MDTIQ	1,3-Dimethyl-7,8-Methylenedioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
1,3-diMeTIQ	1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
1-BnTIQ	1-Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
1-MeTIQ	1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
2- MeTIQ	2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
3-Me-6,7-MDTIQ	3-Methyl-6,7-Methylenedioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
90 %-KI	90 %-Konfidenzintervall
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	Blutalkoholkonzentration
CDCl <sub>3</sub>	deuteriertes Chloroform
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
D <sub>11</sub> -1-MeTIQ	D <sub>11</sub> -1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
EI-MS	Elektronenstoßionisation-Massenspektrometrie
GC-MID	<i>Gaschromatography-Multiple Ion Detection</i>
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HCl	Salzsäure

---

HPLC-ECD	Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrochemische Detektion
ISTD	Interner Standard
LC-ESI-MS/MS	Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie
LoD	Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> )
LoQ	Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantification</i> )
M	Molar
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
MAO	Monoaminoxidase
MDA	Methylendioxyamphetamin
MDMA	Methylendioxymethamphetamin
MEOS	Mikrosomal-Ethanol-oxidierendes-System
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MRM	<i>Multiple Reaction Mode</i>
MW	Mittelwert
n. a.	nicht angegeben
NAD <sup>+</sup> /NADH+H <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ	N-Me-1,3-Dimethyl-7,8-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
N-Me-1,3-diMeTIQ	N-Methyl-1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
N-MeSAL	N-Methyl-Salsolinol
N-MeTIQ	N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin
NorSAL	Norsalsolinol

---

---

$P_i$	Phosphat (anorganisch)
pos., n. q.	positiv, nicht quantifizierbar
Q1/3	Quadrupol 1/3
$R^2$	Regressionskoeffizient
SAL	Salsolinol
SD	Standardabweichung
TIQ	Tetrahydroisochinolin
$t_R$	Retentionszeit
v/v	Volumenverhältnis
$V_d$	Verteilungsvolumen

---

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Ethanol.....	2
1.1.1.	Pharmakologie .....	2
1.1.2.	Wirkung.....	4
1.1.3.	Postmortale Ethanolneogenese und -umverteilung.....	4
1.2.	Amphetamin und Amphetaminderivate .....	8
1.2.1.	Synthese und chemische Eigenschaften .....	9
1.2.2.	Pharmakologie .....	10
1.2.3.	Wirkung.....	14
1.2.4.	Wechselwirkungen zwischen Amphetamin und Alkohol.....	16
1.3.	Tetrahydroisochinoline .....	18
1.3.1.	Bildung von Tetrahydroisochinolininen.....	19
1.3.2.	Wirkung und Toxizität .....	21
1.3.3.	Analytische Methoden.....	23
1.4.	Prinzip der Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie .....	26
2.	Zielsetzung .....	29
3.	Materialien und Methoden.....	30
3.1.	Materialien – Synthese .....	30
3.1.1.	Geräte.....	30
3.1.2.	Chemikalien.....	31
3.1.3.	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.1.4.	Reinsubstanzen und Lösungen .....	32
3.2.	Materialien – Analytik.....	32
3.2.1.	Geräte .....	32
3.2.2.	Chemikalien.....	33
3.2.3.	Verbrauchsmaterial .....	33
3.2.4.	Reinsubstanzen und Lösungen .....	33
3.2.5.	Probenmaterial.....	34
3.3.	Methoden – Synthese.....	35

---

3.3.1.	Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin.....	36
3.3.2.	Synthese des N-Me-1,3-diMeTIQs aus 1,3-diMeTIQ.....	39
3.4.	Methoden – Analytik.....	40
3.4.1.	Analyseverfahren .....	40
3.4.2.	Extraktionsmethoden .....	42
3.4.3.	Validierung .....	44
4.	Ergebnisse.....	48
4.1.	Synthese.....	48
4.1.1.	Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin.....	48
4.1.2.	Synthese des N-Me-1,3-diMeTIQs aus 1,3-diMeTIQ.....	51
4.2.	Analytik.....	51
4.2.1.	Validierung .....	53
4.2.2.	Analyse von realen Blut- und Gewebeproben.....	63
5.	Diskussion .....	70
5.1.	Synthese.....	71
5.1.1.	Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin.....	71
5.1.2.	Synthese des N-Me-1,3-diMeTIQs aus 1,3-diMeTIQ.....	75
5.2.	Analytik.....	77
5.2.1.	Validierung .....	77
5.2.2.	Analyse von realen Blut- und Gewebeproben.....	83
5.3.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	93
	Literaturverzeichnis .....	95
	Abbildungsverzeichnis .....	107
	Tabellenverzeichnis.....	109

## 1. Einleitung

Heutzutage gehört der Genuss von berauschenden Mitteln für viele Menschen zum Alltag, sei es das abendliche Glas Rotwein oder der Joint auf einer Party. Aber auch der Konsum von sogenannten „harten Drogen“ wie Amphetaminen, Kokain oder Heroin und die missbräuchliche Verwendung dieser Betäubungsmittel sind weit verbreitet [1]. Besonders wenn der Konsum von Rauschmitteln in Verbindung mit Straftaten oder Ordnungswidrigkeiten steht, sind Untersuchungen im Rahmen der forensischen Toxikologie gefragt. Dabei ist ein gerichtsverwertbarer Nachweis der Substanzen im Körper, der die Aufnahme des Rauschmittels zum Zeitpunkt der Tat belegt, gefordert. Aber nicht nur der Nachweis auch die Kenntnis über die Wirkung der zu analysierenden Substanzen ist von essenzieller Bedeutung, wenn es um die Beurteilung der Fahrsicherheit im Straßenverkehr, die Frage der Schuldfähigkeit sowie die Klärung der Todesursache geht. Komplex wird diese, wenn nicht nur ein Rauschmittel im Körper nachgewiesen wird, sondern ein Mischkonsum vorliegt. Dabei kann es zu antagonistischen, additiven oder sogar synergistischen Effekten der aufgenommenen Substanzen kommen.

Das Zusammenwirken von Amphetamin bzw. Amphetaminderivaten und dem Trinkalkohol Ethanol wird seit langer Zeit kontrovers diskutiert [2]. Es ist schwer abzuschätzen, ob es bei einem simultanen Konsum dieser beiden Rauschmittel zu einer verstärkenden oder einer hemmenden Wirkung kommt, besonders wenn unterschiedliche Phasen der Rauschwirkung der einzelnen Substanzen gleichzeitig vorliegen. Hinzu kommen Forschungsergebnisse, die von einem potentiell neurotoxischen Kondensationsprodukt, einem Tetrahydroisochinolin (TIQ), berichten, welches nach der wiederholten Gabe von Ethanol und Amphetamin im Gehirn und Blut von Ratten nachgewiesen werden konnte [3]. Der Nachweis, dass dieses Kondensationsprodukt ebenfalls im Menschen entsteht und neurotoxische Effekte hervorrufen könnte, würde neue Erkenntnisse über das Zusammenwirken der beiden Rauschmittel erbringen. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Rauschmittel Ethanol und Amphetamin im Einzelnen beschrieben, aber auch Forschungsergebnisse über das Zusammenwirken beider Substanzen dargestellt. Weiterhin wird die Substanzklasse der TIQs vorgestellt und auf das Prinzip des Verfahrens, mit dem diese in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, eingegangen.

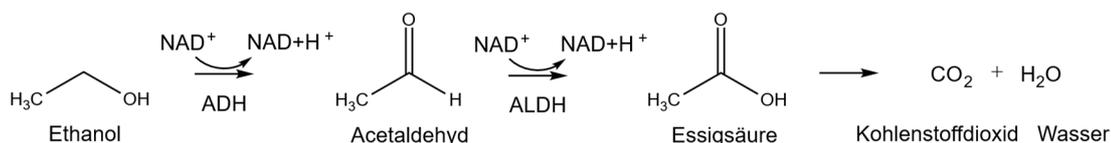
## 1.1. Ethanol

Alkohol gilt in den westlichen Ländern als ältestes bekanntes Rauschmittel und auch als das meist Konsumierte [4]. Allgemein ist mit dem Ausdruck „Alkohol“ der Trinkalkohol Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) gemeint [5]. Dabei dient dieser neben der Funktion des Rausch- und Suchtmittels weiterhin als Nahrungs- und Genussmittel, sowie als Bestandteil von Arzneien und als Lösungsmittel. Aber auch bei religiösen Zeremonien findet Alkohol Verwendung ([6] zitiert nach [7]). Ethanol wird bis zu einem Alkoholgehalt von 10 - 12 % durch Hefen und Bakterien während der Fermentation von Zucker aus z. B. Früchten und Getreiden (z. B. Roggen, Gerste, Malz) produziert. Alle höher-konzentrierten Alkoholika, wie z. B. Whiskey oder Branntweine, müssen durch Destillation gewonnen werden. Durch seine berauschende Wirkung hat vor allem Ethanol forensische Relevanz in Bezug auf Straftaten, Ordnungswidrigkeiten, Unfällen sowie bei der Fragen der Schuldfähigkeit. Jedoch sind auch andere Alkohole wie Methanol, Propanol und Butanol von Bedeutung, da sie als Begleitstoffe in diversen alkoholischen Getränken vorhanden sind und in forensischen Fragestellungen wie z. B. der Nachtrunkbehaftung Potential zur Aufklärung bieten [4], [5].

### 1.1.1. Pharmakologie

Ethanol ist im Vergleich zu anderen Rauschmitteln wie Amphetamin, Kokain und Opiate bezüglich seiner pharmakologischen Eigenschaften so gut erforscht, dass in Bezug auf die Rechtsprechung eine wissenschaftlich anerkannte Rückrechnung der Alkoholkonzentration im Blut zu einem bestimmten Zeitpunkt (wie z. B. dem Tatzeitpunkt) möglich ist. Vor allem ist dies auf dessen gewisse Gesetzmäßigkeit in Bezug auf die Stoffwechselprozesse Absorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination zurückzuführen [5]. Aufgenommen werden kann Alkohol oral, dermal, intravenös oder inhalativ, wobei die letzten drei Absorptionswege bei erwachsenen Personen kaum eine Rolle spielen [5]. Die Resorption nach einer oralen Aufnahme findet hauptsächlich durch Diffusion im oberen Dünndarm (80 - 90 %) statt. Nur ein kleiner Teil gelangt über die Mundschleimhaut oder den Magen in die Blutbahn [8]. Die Rate der Absorption hängt in hohem Ausmaß von der Ethanolkonzentration, der Durchblutung, der Hydrophilie und der Oberfläche des Gewebes [8], sowie der Dauer der Magenpassage [5] ab. Aufgrund der starken Durchblutung des Gehirns sind kurz nach Trinkbeginn stärkere Auffälligkeiten in

Bezug auf Psyche und Motorik möglich, als die Blutalkoholkonzentration – gemessen im peripheren Blut – anzeigt. Dies wird allgemein als Anflutungsphase bezeichnet [5], [8]. Die Verteilung von Alkohol findet hauptsächlich aufgrund seiner Hydrophilie über passive Diffusion in wässrige Kompartimente wie dem Körperwasser, den Muskeln und der Leber statt [5], [9]. Ethanol wird bis zu 95 % in der Leber durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert und weiter über die Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu Essigsäure verstoffwechselt. Diese wird schließlich innerhalb des Zitronensäurezyklus zu Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasser (H<sub>2</sub>O) abgebaut. Bei der Oxidation von Ethanol und Acetaldehyd wird jeweils der Cofaktor Nikotinamadadenindinukleotid NAD<sup>+</sup> zu NADH+H<sup>+</sup> reduziert (siehe Abbildung 1). Die Reoxidation dieses Faktors ist dabei geschwindigkeitslimitierend, weshalb der Ethanolabbau in erster Linie konzentrationsunabhängig einem linearen Verlauf folgt [5], [8].



**Abbildung 1: Metabolismus von Ethanol zu Acetaldehyd und Essigsäure über ADH und ALDH mittels des Cofaktors NAD<sup>+</sup>.**

Das Mikrosomal-Ethanol-oxidierende-System, kurz MEOS, ist ebenfalls in der Leber bei besonders hohen Blutalkoholkonzentrationen (ab ca. 2,5 ‰) am Alkoholmetabolismus beteiligt. Dabei handelt es sich im Speziellen um das CytochromP450-Enzym CYP2E1, welches bei regelmäßigem Alkoholkonsum induziert wird. Dadurch kann die Abbaurate, welche bei nicht gewöhnten Trinkern zwischen ca. 0,1 und 0,2 ‰/h liegt, auf bis zu ca. 0,35 ‰/h erhöht sein [4], [5], [8]. Ethanol wird zu einem sehr geringen Anteil unverändert über den Atem, den Urin und den Schweiß ausgeschieden (ca. 2 - 5 %), sowie u. a. über die Konjugation mit Fettsäureethylestern und Glucuroniden (Ethylglucuronid) eliminiert. Dabei ist der Nachweis von Ethylglucuronid in Blut, Haaren und Urin auch dann noch möglich, wenn Ethanol bereits eliminiert wurde [8]. Durch Enzyminhibitoren wie Disulfiram, welches zur unterstützenden Behandlung bei Alkoholabstinentzern eingesetzt wird, wird das Enzym ALDH gehemmt und Acetaldehyd akkumuliert. Dadurch werden Nebenwirkungen wie z. B. Hautrötung, Hyperventilation und hohe Herzraten induziert, sodass der Betroffene kein Verlangen mehr verspürt Alkohol zu konsumieren [4], [10].

### 1.1.2. Wirkung

Die Wirkung von Ethanol ist mannigfaltig. Dabei ist diese von Mensch zu Mensch unterschiedlich und in hohem Maß abhängig von dessen Persönlichkeit, dessen Gewöhnungsgrad und der physischen Verfassung. Unterschiedliche Effekte auf inhibitorische (z. B. GABA-Rezeptoren) und exzitatorische Rezeptortypen (z. B. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor) führen zu einer komplexen Pharmakodynamik und resultieren in unterschiedlichen Wirkungsweisen [4]. Hauptsächlich übt Ethanol eine dämpfende Wirkung auf das zentrale und periphere Nervensystem aus [5] und wirkt u. a. harntreibend sowie beeinträchtigend auf den Bewegungsapparat (Torkeln und Schwanken) und die Sprachmuskulatur (verwaschene bzw. lallende Aussprache). Weiterhin können nach dem Genuss von Alkohol Enthemmung, Selbstüberschätzung, Euphorisierung, eine verminderte Kritikfähigkeit, Distanzlosigkeit, Redseligkeit, ein aggressives Verhalten und Orientierungslosigkeit die Folge sein. In Bezug auf Ausfallerscheinungen, die sich im Straßenverkehr zeigen, sind vor allem eine enthemmte und riskante Fahrweise bzw. eine erhöhte Risikobereitschaft, das Fahren in Schlangenlinien, das übermäßige Korrigieren der Lenkbewegung, eine verlängerte Reaktionszeit sowie eine verminderte Konzentrationsfähigkeit relevant [5], [8].

### 1.1.3. Postmortale Ethanolneogenese und -umverteilung

Endogen gebildeter Ethanol erreicht bei lebenden Personen meist keine höheren Werte als 0,00075 ‰ und liegt gewöhnlich unterhalb der Nachweisgrenze [11]. Bei der Bestimmung von Alkohol in Leichenasservaten und -blut ist jedoch zu berücksichtigen, dass Fäulnis zu einer Neubildung von Ethanol und zu relevanten Konzentrationen führen kann [4]. Nach dem Eintritt des Todes werden Kohlenhydrate, Proteine und Aminosäuren durch körpereigene und mikrobielle Enzyme unter aeroben und anaeroben Bedingungen in ihre Ausgangsstoffe Glukose, Aminosäuren, Glycerol und Fettsäuren zersetzt [12]. Diese Substanzen dienen als Ausgangsstoffe für die Ethanolneogenese [13]. Die Fäulnis, als ein möglicher Zersetzungsprozess, beschreibt dabei Reaktionen, die von mikrobiellen Enzymen katalysiert werden [12]. Bakterien, Hefe und Pilze gelangen durch durchlässig gewordene Membranen aus dem Darm in umliegende Gewebe, wodurch die sogenannte „Leichenflora“ entsteht. Diese ist abhängig von Umweltfaktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Pharmaka [12]. Die Fermentation von Glukose oder anderen Zuckern (Hexosen) ist dabei eine spezielle Form des von Bakterien, Pilzen und

Hefen ausgeführten Stoffwechsels, der unter anaeroben Bedingungen abläuft [14]–[16]. Dabei wird zunächst innerhalb der Glykolyse Glukose zu Pyruvat abgebaut. Dieses wird im weiteren Verlauf vor allem in Hefen durch das Enzym Pyruvatdecarboxylase in Acetaldehyd und das wiederum durch die ADH in Ethanol umgewandelt. Als Cofaktoren dienen  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  (siehe Abbildung 2) [16]. Alkoholdehydrogenasen sind in der Lage sowohl Ethanol in Acetaldehyd umzuwandeln als auch Acetaldehyd in Ethanol, jedoch mit unterschiedlicher katalytischer Effizienz. Während der Fermentation recyceln Hefen  $\text{NADH}$  während der Acetaldehyd-Ethanol-Umwandlung. Sobald Sauerstoff vorhanden ist, wird Ethanol wieder zu Acetaldehyd oxidiert [17].

In Bakterien wie *Escherichia coli* dagegen wird Ethanol über das Intermediat Acetyl-CoA gebildet. Dabei katalysiert unter aeroben Bedingungen die Pyruvatdecarboxylase und in einem anaeroben Umfeld die Pyruvat-Formatlyase die Oxidation von Pyruvat in Acetyl-CoA [18], [19]. Je nachdem ob die Zelle einen Bedarf an Reduktionsnukleotiden oder Energie hat, wird entweder Ethanol über die ADH gebildet (dabei wird  $\text{NAD}^+$  generiert), oder über das Phosphotransacetylase-Acetatkinase-System durch das Intermediat Acetylphosphat und das Endprodukt Acetat Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen [18] (siehe Abbildung 2).

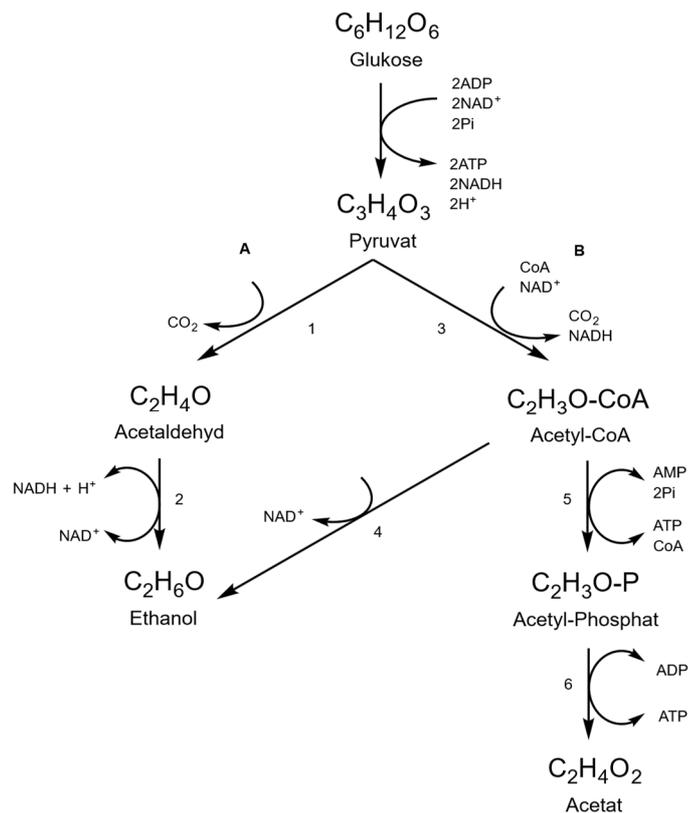


Abbildung 2: Fermentationsprozess in Hefen (A): Glukose wird innerhalb der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Dieses kann nach Abspaltung von  $CO_2$  durch die Pyruvatdecarboxylase (1) in Acetaldehyd umgewandelt und weiter durch die ADH (2) mittels des Cofaktors  $NADH+H^+$  zu Ethanol reduziert werden. Fermentationsprozess in einigen Bakterien (B): Pyruvat wird durch die Pyruvatdecarboxylase (unter aeroben Bedingungen) bzw. durch die Pyruvat-Formylase (unter anaerobe Bedingungen) unter Abspaltung von  $CO_2$  und Reduktion von  $NAD^+$  zu Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA wird entweder über die ADH zu Ethanol oder über das Phosphotransacetylase-Acetatkinase-System (5+6) über das Intermediat Acetyl-Phosphat zu Acetat verstoffwechselt. Bei letzterem wird Energie in Form von ATP frei [13], [16], [18].

Nach dem Eintritt des Todes werden von Mikroben zuerst Kohlenhydrate als präferiertes Substrat konsumiert. Die Kohlenhydratfermentation macht den größten Teil des postmortal produzierten Ethanols aus, was möglicherweise der Grund dafür ist, warum die Bildung von Ethanol schon in den frühen Stadien der Fäulnis beobachtet werden kann [13]. Die Geschwindigkeit der Neubildung von Ethanol ist dabei abhängig von der Menge an Glukose im Blut und Gewebe, der Temperatur, der Bakterienflora und dem Zeitpunkt der Probenentnahme. [4]. Wird kurz vor dem Tod aufgrund von notärztlichen Maßnahmen (z. B. einer Hirnblutung) Mannitol verabreicht, so kann dies die postmortale Bildung von Ethanol beschleunigen [4]. Dabei wurden in zwei Fallberichten Blutalkoholkonzentrationen von 0,53 ‰ und 0,64 ‰ beschrieben, in denen es keinen Hinweis auf eine Alkoholaufnahme vor Todeseintritt gab, jedoch Mannitol kurz zuvor verabreicht wurde (der Zeitraum zwischen Todeseintritt

und Autopsie lag bei zwölf Stunden bzw. sechs Tagen) [4], [20]. Sind die Kohlenhydrate von den Mikroorganismen aufgebraucht, werden andere Substrate wie Aminosäuren, Glycerol und Fettsäuren verstoffwechselt. Währenddessen ändert sich die Mikroflora in der Leiche. Als Konsequenz sinkt die Rate der Ethanolproduktion und die Ethanolkonzentration im Körper bleibt konstant. Gleichzeitig können höherkettige Alkohole produziert werden [13].

Ein weiterer Aspekt, der bei der Ermittlung von Ethanolkonzentrationen in Leichengewebe zu berücksichtigen gilt, ist die Möglichkeit der postmortalen Umverteilung. Dies spielt meist dann eine Rolle wenn sich noch große Mengen Alkohol im Magen befinden, die durch die Membranen in umliegendes Gewebe diffundieren können. Dabei können z. B. perikardiale und pleurale Flüssigkeiten sowie der linke Leberlappen kontaminiert werden. Das Ausmaß der Umverteilung ist abhängig vom Zeitpunkt des letzten Getränks, der getrunkenen Menge und Konzentration des Alkohols, sowie der Verdünnung mit weiterem Mageninhalt. Das Risiko für eine Verteilung von Ethanol aus dem Magen wird darüber hinaus größer, wenn eine Magenruptur besteht. Ansonsten ist die postmortale Umverteilung bezüglich Ethanol eher weniger von Bedeutung, da Ethanol als nicht-ionisierbares Molekül sich rasch aus dem Darm im gesamten Körperwasser verteilt [21].

Die Beurteilung von Ethanolkonzentrationen in postmortalem Geweben und Körperflüssigkeiten ist damit deutlich komplexer als die im Blut lebender Personen, da es einige Aspekte wie die postmortale Umverteilung, die Neubildung von Ethanol durch Fermentation sowie Störfaktoren aufgrund fäulnisveränderten Matrices zu berücksichtigen gilt.

## 1.2. Amphetamin und Amphetaminderivate

*„Speed, Chrystal, Ice, Ecstasy, Love Pill“*

Nur einige wenige Namen unter denen man Amphetamin und dessen Derivate Methamphetamin und Methylenedioxyamphetamin (MDMA) kennt (siehe Abbildung 3) [22].

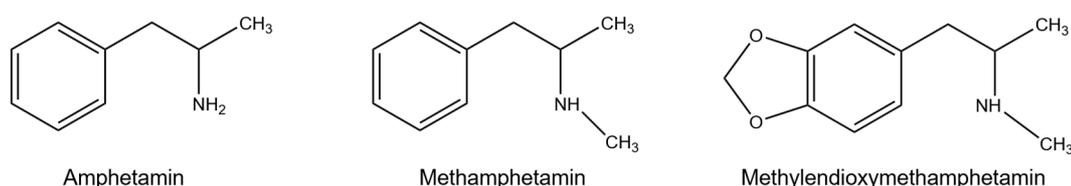


Abbildung 3: Strukturformeln von Amphetamin, Methamphetamin und Methylendioxyamphetamin (MDMA).

1887 publizierte der rumänische Chemiker L. Edeleano als Erstes an der Universität Berlin die Synthese des Phenisopropylamins, besser bekannt unter dem Namen Amphetamin [23]. Dieses Stimulans, welches mit den Hormonen Adrenalin und Noradrenalin strukturverwandt ist, wurde in den späten 1920er Jahren zur Behandlung von Schnupfen eingesetzt und fand wenig später als Appetitzügler, gegen Narkolepsie und Hyperaktivität bei Kindern therapeutische Anwendung [4], [24]. Im zweiten Weltkrieg war sein Suchtpotential bereits bekannt und unter Soldaten vertreten, die Amphetamin konsumierten um ihre Wachsamkeit zu erhöhen bzw. ihre Müdigkeit zu bekämpfen [4].

Amphetamin, Methamphetamin und MDMA sind neben Kokain inzwischen die am weit verbreitetsten Stimulantien in Europa und 3,7 % der erwachsenen Europäer zwischen 15 und 64 Jahren haben in ihrem Leben schon einmal Amphetamin konsumiert [25]. Dabei hat die Zahl der konsumierten Delikte in Verbindung mit Methamphetamin in Deutschland 2020 im Vergleich zum Vorjahr stark zugenommen (+21,1 %, 10103 Fälle) und blieb für Amphetamin auf einem hohen Niveau (33740 Fälle) [26]. Amphetamin wird vorwiegend in Belgien, den Niederlanden und Polen in illegalen Drogenlaboren hergestellt [25]. Für Methamphetamin wurde vom Bundeskriminalamt für das Jahr 2020 eine Verlagerung der Synthesestätten von Tschechien vor allem in die Niederlande und Mexiko beobachtet [26].

### 1.2.1. Synthese und chemische Eigenschaften

Amphetamin kann über verschiedene Syntheserouten aus unterschiedlichen Substraten hergestellt werden. Die einfachste Methode stellt die Leuckart-Methode dar (siehe Abbildung 4). Dabei wird aus Phenylacetone und Formamid unter Verwendung von Ameisensäure das Zwischenprodukt N-Formylamphetamin gebildet, welches zusammen mit Salzsäure (HCl) zu Amphetamin hydrolysiert wird. Das gewonnene Amphetaminöl kann schließlich durch Zugabe von Schwefelsäure in das wasserlösliche Amphetaminsulfat überführt werden [27].

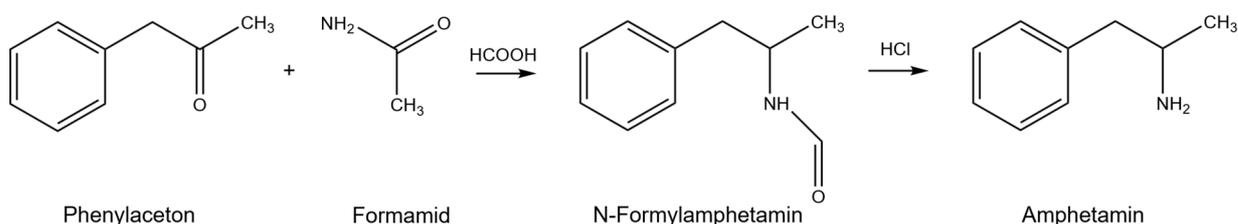


Abbildung 4: Amphetaminsynthese nach Leuckart unter Verwendung von Phenylacetone, Formamid und Ameisensäure. Über das Intermediat N-Formylamphetamin wird Amphetamin nach Hydrolyse mit HCl gebildet (in Anlehnung an [27]).

Ein weiterer Syntheseweg ist die reduktive Aminierung eines Aldehyds oder Ketons in Verbindung mit Ammoniak, wodurch ein Imin oder Iminium-Intermediat gebildet wird. Dieses wird im darauffolgenden Schritt über einen Katalysator reduziert. Dabei können je nach Reaktionstyp verschiedene Reduktionsmittel verwendet werden wie z. B. Platinoxid, Aluminiumamalgam oder Lithiumaluminiumhydrid [27]. Methamphetamine kann analog zu Amphetamin hergestellt werden, jedoch unter Verwendung von Methylamid anstelle von Ammoniak [28]. Weitaus populärer ist jedoch die Synthese aus den Substraten Ephedrin und Pseudoephedrin [29]. Beide Substanzen sind in herkömmlichen Erkältungsmitteln enthalten und daher leicht beschaffbar [27]. Ein möglicher Reaktionsweg ist dabei die Reduktion mit Iod und rotem Phosphor [29]. Das extrahierte Methamphetamineöl wird anschließend in einem weiteren Schritt unter Verwendung von HCl in das Hydrochlorid-Salz überführt [30].

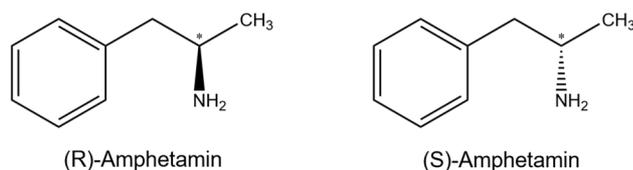


Abbildung 5: Enantiomere von Amphetamin ((R)-Amphetamin (links) und (S)-Amphetamin (rechts), das chirale Zentrum ist mit einem Asterix gekennzeichnet).

Aufgrund des chiralen Zentrums am C<sub>2</sub>-Atom kommen Amphetamin und dessen Derivate als Enantiomere vor (siehe am Beispiel von Amphetamin in Abbildung 5). Dies führt u. a. zu Unterschieden in der pharmakologischen Wirkung und zu einem selektiven Metabolismus. (S)-Amphetamine üben z. B. einen stärkeren pharmakologischen Effekt aus als die (R)-Amphetamine. (S)-MDMA ist z. B. verantwortlich für den psychostimulierenden Effekt während (R)-MDMA halluzinogene Eigenschaften besitzt [4], [31]–[33]. Straßenamphetaminzubereitungen bestehen meist aus einem 1:1 Gemisch aus (R)- und (S)-Amphetamin, wohingegen in Arzneimitteln (z. B. Attentin, Elvanse) ausschließlich die potentere S-Form enthalten ist [4].

### 1.2.2. Pharmakologie

Amphetamin wird auf unterschiedliche Weise konsumiert. Neben der oralen Einnahme von Tabletten, Kapseln oder Pulver kann die Substanz auch nasal oder intravenös aufgenommen werden, wobei die letzte Form die schnellste und effektivste Art der Aufnahme darstellt und zu einer unverzüglichen Absorption und Verteilung im Körper führt. Der Wirkeintritt nach oraler Aufnahme dauert hingegen ca. zwei Stunden [4], [34]. Methamphetamin kann zusätzlich durch Rauchen des Hydrochlorid-Salzes mit einer speziellen Pfeife konsumiert werden. Eine rasche Resorption mit einem Wirkeintritt von wenigen Sekunden ist dabei die Folge. Die Dauer der Wirkung kann anschließend zwischen 12 und 24 Stunden betragen [4], [34], [35]. MDMA wird dagegen wie Amphetamin in erster Linie oral als Tabletten, Kapseln oder in Pulverform eingenommen und führt zu einer Wirkdauer von ein bis sechs Stunden [34].

Nach dem oralen Konsum von Amphetaminen kommt es zu einer Verzögerung der Magenentleerung und zu einer verminderten Darmmotilität, sodass die Absorption von Amphetamin selbst als auch die von gleichzeitig konsumierten Rauschmitteln oder Pharmaka verzögert wird [4]. Die Lipophilie von Amphetaminen ist im Vergleich zum strukturverwandtem Ephedrin erhöht [24], wodurch es zu einer

schnellen Passage der Blut-Hirn-Schranke und einer raschen Verteilung in das Gehirn kommt [36]. In Bezug auf das Verteilungsvolumen zeigen (R)- und (S)-Amphetamin laut einer Studie von Wan et al. (1978) keine großen Unterschiede ( $V_d = 3 - 3,5 \text{ l/kg KG}$ ) [37].

Nach erfolgter Absorption und Distribution können je nach aufgenommener Menge folgende Amphetaminkonzentrationen im Blut gemessen werden: 20 - 100 ng/ml nach einer therapeutischen Aufnahme bzw. eines missbräuchlich-gelegentlichen Konsums von 2,5 - 30 mg; 200 - 500 ng/ml bzw. >500 ng/ml nach Tagesdosen von bis zu 2 g, die gewöhnte Konsumenten aufnehmen können. Dabei handelt es sich um Konzentrationen im toxischen bzw. komatös-letalen Bereich, zumindest bei Personen, die nicht an die Wirkung von Amphetamin gewöhnt sind [22], [38].

Der Metabolismus der Amphetamine führt hauptsächlich über zwei Wege (siehe Abbildung 6): Zum einen über die oxidative Desaminierung und zum anderen über die Hydroxylierung in  $\beta$ -Position, para- oder ortho-Stellung am Phenylring mit anschließender Methylierung einer der zwei Phenylhydroxygruppen [39], [40]. Bei der oxidativen Desaminierung wird aus Amphetamin Phenylaceton gebildet, welches weiter zu Benzoesäure oxidiert und in Phase II der Biotransformation über eine Glycinkonjugation zu Hippursäure verstoffwechselt wird [39]–[42]. Einen weiteren Metabolismusweg stellt die  $\beta$ -Hydroxylierung zu Norephedrin oder die Hydroxylierung am Phenylring zu 4-Hydroxyamphetamin und 4-Hydroxynorephedrin dar. Sowohl Phenylaceton als auch 4-Hydroxyamphetamin und 4-Hydroxynorephedrin können zu Dihydroxyderivaten metabolisiert werden und zusätzlich an einer der beiden Hydroxygruppen am Phenylring methyliert werden. Ebenfalls findet in Phase II eine Sulfatierung oder Glucuronidierung der Hydroxyderivate statt [40], wobei ein großer Anteil des 4-Hydroxyamphetamins sulfatiert wird [43]. 18 - 30 % des Amphetamins werden unverändert bzw. 21 - 28 % als Benzoesäure und 16 % als Hippursäure ausgeschieden. Lediglich 1 - 4 % bzw. 0,3 - 4 % werden zu 4-Hydroxyamphetamin und 4-Hydroxynorephedrin eliminiert. Dies beinhaltet sowohl den freien als auch den konjugierten Anteil [43]–[46]. Der Metabolismus erfolgt stereoselektiv: (S)-Amphetamin wird im Vergleich zu (R)-Amphetamin zu einem geringeren Anteil am Phenylring hydroxyliert ((S)-Amphetamin: 1,1 %; (R)-Amphetamin: 3,9 %) und hauptsächlich zu Benzoesäure verstoffwechselt ((S)-Amphetamin: 21 %; (R)-Amphetamin: 13 %) [46]. Amphetamin selbst ist ebenfalls

ein Metabolit des Methamphetamins und wird in geringem Ausmaß (7 %) durch N-Demethylierung gebildet. Methamphetamin wird dabei zum großen Teil unverändert ausgeschieden (37 - 45 %) [47] oder am Phenylring hydroxyliert [39], [48].

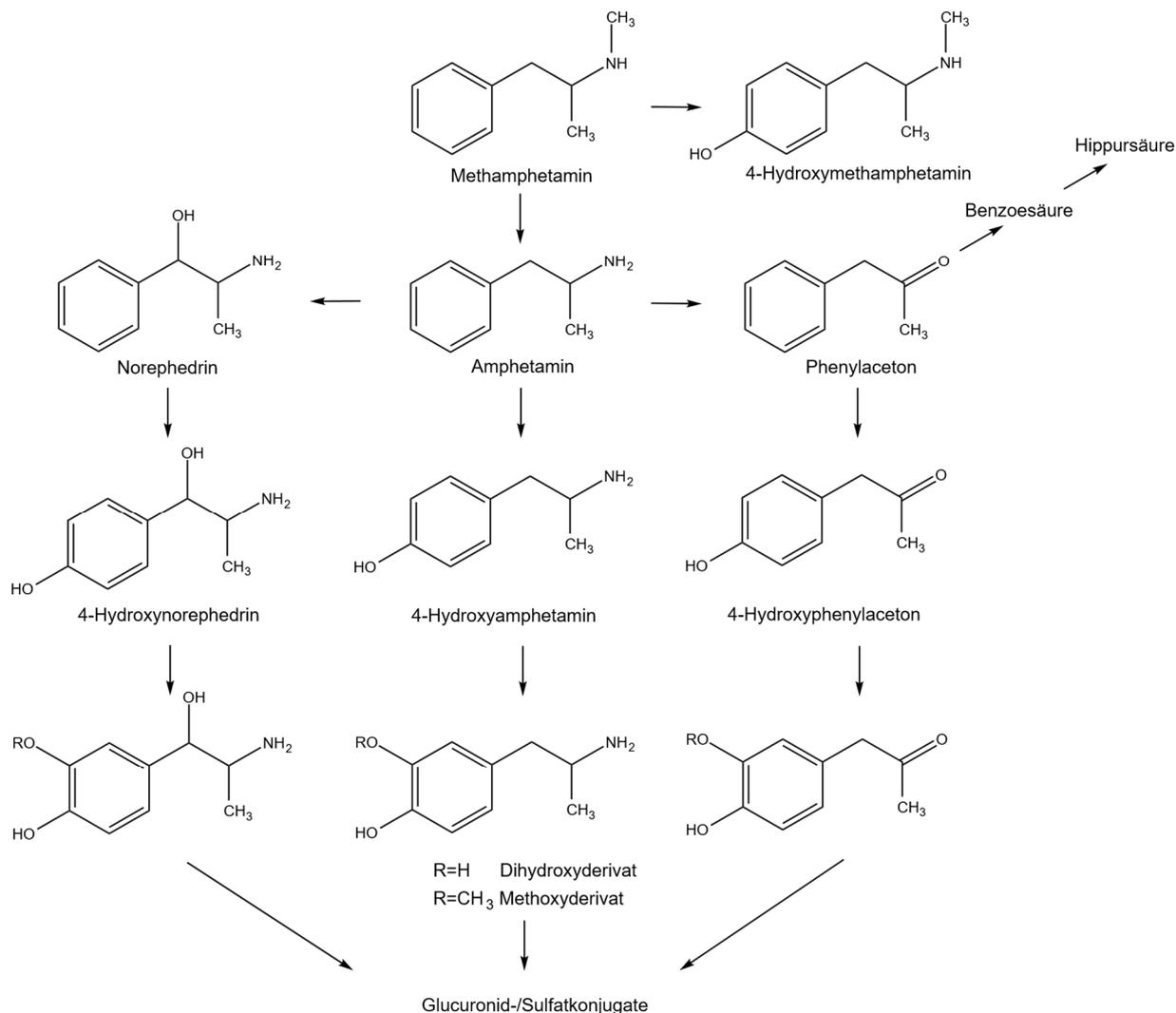


Abbildung 6: Biotransformation von Amphetamin und Methamphetamin (in Anlehnung an [39]–[42], [48]).

Der Metabolismus des MDMAs läuft ähnlich wie die Biotransformation des Methamphetamins und des Amphetamins ab (siehe Abbildung 6). Aus MDMA wird dabei durch eine N-Demethylierung der Metabolit MDA gebildet, welcher analog zum Amphetamin weiter verstoffwechselt wird. Ausnahme bildet hierbei die O-Dealkylierung anstelle der Hydroxylierung des Aromaten. Dabei werden jedoch ebenfalls verschiedene Dihydroxyderivate gebildet, welche anschließend einfach oder zweifach methyliert bzw. glucuronidiert oder sulfatiert werden können [33], [49]–[51]. Darüber hinaus postulierten

Lim und Foltz 1991 eine aromatische Hydroxylierung des MDMAs und MDAs zu den Metaboliten 6-Hydroxy-MDMA und 6-Hydroxy-MDA [52].

Amphetamine werden überwiegend über den Urin ausgeschieden. Dabei ist der pH-Wert des Urins entscheidend dafür, wie schnell und in welcher Form die Substanzen eliminiert werden und wie lange die Wirkung der Amphetamine anhält. Ist der Urin ernährungsbedingt sauer, so liegen die Amphetamine in dissoziierter Form vor und werden direkt und in einem hohen Anteil unverändert ausgeschieden. In einer Studie von Beckett et al. (1965) wurde gezeigt, dass nach Ansäuerung des Urins durch die Einnahme von Ammoniumchlorid durchschnittlich 57 - 66 % des Amphetamins unverändert im Urin vorliegen. Im Gegensatz dazu wurden im gleichen Zeitraum lediglich 2,2 - 2,6 % unveränderten Amphetamins über einem basischen Urin (eingestellt durch die Einnahme von Natriumbicarbonat) eliminiert [53]. Aufgrund der undissoziierten Form des Amphetamins im basischen Milieu wird dieses in den Nieren rückresorbiert und dadurch die Wirkung aufrechterhalten bzw. der Metabolismus forciert. Neben der Ernährung kann auch die Einnahme von Pharmaka und der Konsum anderer Drogen den pH-Wert des Urins beeinflussen [4]. Die Plasmahalbwertszeit hängt dementsprechend massiv von dem pH-Wert des Urins ab [54]. In einer Studie von Wan et al. (1978) wurden die folgenden Plasmahalbwertszeiten von (R)- und (S)-Amphetamin nach einer Basifizierung bzw. Ansäuerung des Urins durch die Einnahme von Natriumbicarbonat bzw. Ammoniumchlorid gemessen: (R)-Amphetamin 23,7 h und (S)-Amphetamin 17,0 h im basischen Milieu und (R)-Amphetamin 7,7 h und (S)-Amphetamin 6,8 h im sauren Milieu [37]. In einer weiteren Studie von Caras et al. (2020) wurden Plasmahalbwertszeiten von  $13,4 \pm 3,29$  h für (R)-Amphetamin und  $10,8 \pm 1,97$  h für (S)-Amphetamin ermittelt [55]. Die Halbwertszeit von Methamphetamin liegt laut Regenthal et al. (1999) bei 6 - 9 h [38]. Für MDMA wurde in einer Studie von De la Torre et al. (2006) nach einer Dosis von 100 mg eine mittlere Halbwertszeit von  $8,96 \pm 2,27$  h ermittelt (n = 8) [56].

### 1.2.3. Wirkung

Der Wirkmechanismus der Amphetamine beruht auf einer gesteigerten Freisetzung von Monoaminen wie Dopamin, Noradrenalin und Serotonin aus den Nervenenden in den synaptischen Spalt und des daraus resultierenden erhöhten Stimulus an den postsynaptischen Membranrezeptoren [57]. Die erhöhte Konzentration dieser Neurotransmitter führt sowohl zu zentralen als auch peripheren Effekten wie z.B. Euphorie, erhöhte Erregbarkeit und Aufmerksamkeit, Hyperaktivität, Appetitlosigkeit, gesteigerter Blutdruck und Puls sowie erweiterte Pupillen [58]. In der Literatur werden dabei u. a. die folgenden Hypothesen diskutiert, wie es im Einzelnen zu der gesteigerten Freisetzung der obengenannten Monoamine kommt:

- Neurotransmitter wie Dopamin werden aus den Speichervesikeln durch Interaktion am vesikulären Monoamintransporter VMAT2 [59] in das Zytosol freigesetzt [60], [61]. Somit wird ein umgekehrter Dopamintransport aus dem Zytosol in den synaptischen Spalt durch eine Transporter-vermittelte-erleichterte-Diffusion ermöglicht [61], [62].
- Bei der Amphetamin-induzierten Freisetzung von Dopamin spielt die Phosphorylierung am N-Terminal des Dopamintransporter eine entscheidende Rolle [63].
- Die Wiederaufnahme der Monoamine wird durch eine Blockade der Transporter gehemmt [62].
- Die Monoaminoxidase-A (MAO-A), die Dopamin verstoffwechselt, wird inhibiert [64].
- Die Dopaminaufnahme in die Speichervesikel wird gehemmt [31].

Neben den als angenehm empfundenen Wirkungen von Amphetamin und Amphetaminderivaten in der akuten Phase wie z. B. der Steigerung der Stimmung, Wachsamkeit und Konzentration, können in der Phase der abklingenden Wirkung Müdigkeit und Depression auftreten. Ebenso gehen mit dem Konsum dieser Stimulantien unerwünschte Effekte wie Aggressionen, Gewaltbereitschaft, Unruhe, und stereotypes Verhalten einher. Bei einem chronischen Konsum oder einer Aufnahme von hohen Mengen an Amphetamin können ebenfalls Psychosen auftreten [4], [65]. Amphetamine üben zudem Effekte auf das kardiovaskuläre System und die glatte Muskulatur aus. Dadurch sind Blutdruck, Herzrate und Schlagkraft sowie der Muskeltonus erhöht und die Darmmotilität verzögert [4], [36].

In der Literatur werden zudem weitere toxische Wirkungen beschrieben. Neben paranoider Psychosen, der beschleunigten Herzrate, einem erhöhten Blutdruck, Krämpfen, intravaskulären Koagulationen und Blutungen in Herz und Blutgefäßen, ist allen voran die Hyperthermie zu nennen, die in einer Rhabdomyose resultieren kann. Dies kann wiederum eine Muskelnekrose und Nierenversagen zur Folge haben [4], [34], [57]. Ebenso werden für Methamphetamin und MDMA neurotoxische Eigenschaften ausgelöst durch oxidativen Stress, Exzitotoxizität von glutamatergen Neuronen, mitochondrialer Dysfunktion und Entzündungen beschrieben [57], [65].

#### 1.2.4. Wechselwirkungen zwischen Amphetamin und Alkohol

Der Konsum von Amphetamin geht nicht selten mit der Aufnahme von alkoholischen Getränken einher. In den Niederlanden wurden in 32 % der Verdachtsfälle in Bezug auf das Führen eines Kraftfahrzeuges unter der Wirkung von Amphetamin sowie in 40 % der Amphetamin-assoziierten Todesfällen auch Alkohol nachgewiesen [66]. Dies war ebenfalls in knapp der Hälfte der MDMA-Intoxikationen in Portugal (49 %) und Australien (46 %) zwischen 2001 und 2017 zu beobachten [67].

In den Kapiteln 1.1.2 und 1.2.3 wurden die Wirkungen von Alkohol und Amphetamin im Einzelnen ausführlich erläutert. Während Amphetamin und dessen Derivate zentral stimulierend wirken, übt Alkohol eine eher dämpfende Wirkung auf das Nervensystem aus. Yamamura et al. (1991) vermuten, dass die meisten Konsumenten durch die Aufnahme beider Rauschmittel unter Ausnutzung des vermeintlichen Antagonismus die unerwünschten Wirkungen jeder einzelnen Substanz zu vermindern versuchen [2]. Im Gegensatz zu Todzy et al., die 1978 einen zentralen Antagonismus anhand einer *in vivo* Studie in Ratten postulierten [68], konnten Hughes und Forney (1964) keinen eindeutigen Antagonismus nach der kombinierten Gabe von Alkohol und Dexamphetamin in humanen Probanden feststellen [69]. Die Interaktion von Amphetaminen und Alkohol führt nicht zu einem strikten Stimulans-Sedativum-Antagonismus, sondern scheint einen komplexen Synergismus dieser Substanzen zur Folge zu haben [2]. Wird neben Amphetaminen zusätzlich Alkohol konsumiert, soll es laut Makino et al. (1990) zu einer signifikanten Verstärkung von psychotischen Zuständen kommen (z. B. einer Intensivierung von Halluzinationen und Wahnvorstellungen) [3]. Die Ergebnisse der Studie von Yamamura et al. (1991) zeigen ebenfalls, dass der simultane Konsum von Methamphetamin und Alkohol zu einer Erhöhung der Manifestationsrate von somatischen und mentalen Störungen führt, sodass davon auszugehen ist, dass Alkohol eine Methamphetamin-induzierte Psychose beschleunigen kann [2]. In einer Studie an acht Probanden, denen Methamphetamin (30 mg, i.v.) und Alkohol (bis zum Erreichen einer Blutkonzentration von 1,0 ‰) zusammen verabreicht wurden, kam es zu einer erhöhten Herzrate, Herzleistung und myokardialen Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu einem Konsum von Methamphetamin allein. Dabei wurde die Methamphetaminwirkung durch Alkohol nicht gemindert, jedoch die primäre Alkoholwirkung durch das Stimulans gedämpft [70]. Es handelt sich demnach

insgesamt um eine komplexe Wechselwirkung zwischen Amphetaminen und Alkohol, bei der jedes Rauschmittel einige Effekte des anderen beeinflusst [71]. Rech et al. stellten zudem in einer Studie an Ratten fest, dass diese komplexe Interaktion abhängig von der Dosis des Stimulans zu sein scheint [72]. Makino et al. schrieben 1990 die nach der kombinierten Gabe von Alkohol und Amphetamin zu beobachteten neurotoxischen Effekte (Zittern, ein Krümmen des Rückens und eine Lähmung der Beine) der Bildung von spezifischen Kondensationsprodukten (z.B. der des 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolins (1,3-diMeTIQ)) zu, welche enzymatisch durch eine Ringzyklisierung aus Amphetamin und den Ethanolmetaboliten Acetaldehyd gebildet werden [3]. Die Substanzklasse der Tetrahydroisochinoline wird im Nachfolgenden nun näher beschrieben.

### 1.3. Tetrahydroisochinoline

Tetrahydroisochinoline (TIQs) stellen eine Substanzklasse von natürlich vorkommenden Alkaloiden dar [73] und weisen eine Vielzahl an pharmakologischen Effekten auf, darunter u. a. zytotoxische [74], antitumorale [75] oder antidiabetische [76]. Weiterhin wirken einige als Histamin H<sub>3</sub>-Rezeptor Antagonisten, als Serotoninwiederaufnahmehemmer [77] oder führen zu einer starken bradykarden Aktivität [78]. TIQs sind in Pflanzen und Nahrungsmitteln zu finden und wurden als endogene Substanzen in Säugern nachgewiesen. Zu den in Pflanzen vorkommenden TIQs gehören u. a. das im Mohn enthaltene Alkaloid Laudanosin vom Benzylisochinolin-Typ und die aus der *Cryptostylis* (Orchidaceae) isolierbaren Alkaloide Cryptostylin I, II und III vom Phenylisochinolinalkaloid-Typ (siehe Abbildung 7) [73], [79], [80].

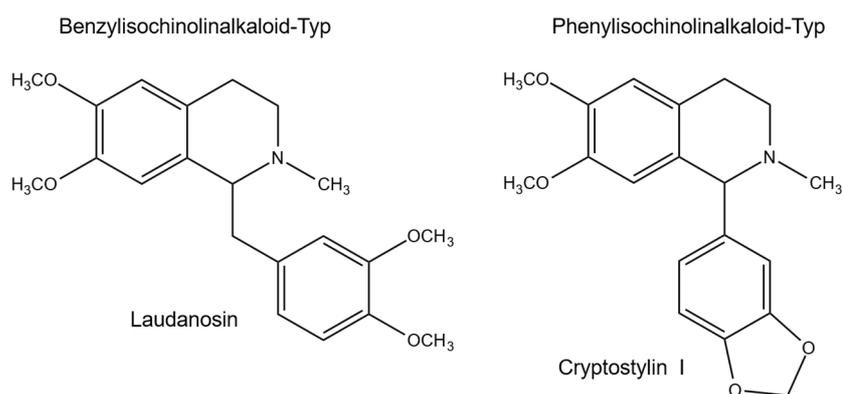


Abbildung 7: Tetrahydroisochinoline des Benzylisochinolin-Typs (Laudanosin - links) und des Phenylisochinolin-Typs (Cryptostylin I - rechts) (in Anlehnung an [79]).

Das Kondensationsprodukt 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (1,2,3,4TIQ), das die Grundstruktur der meisten TIQs bildet und aus dem biogenen Amin Phenylethylamin und Formaldehyd entsteht, wurde in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln detektiert. Darunter u. a. in Käse, Bananen, gebratenen Sardinen, gebratenem Rindfleisch, Mehl, gekochtem Ei, Bier, Whiskey und Milch [81]. Zusammen mit 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (1-MeTIQ) ist es weiterhin in Kakao und Weißwein enthalten [82]. Das aus Dopamin und Acetaldehyd gebildete 1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (Salsolinol - SAL) wurde ebenfalls in getrockneten Bananen nachgewiesen [83]. In humanen Proben (Urin, Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und Gehirn) wurden bereits u. a. die TIQs 1,2,3,4TIQ, 1-MeTIQ, 1-

Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (1-BnTIQ), SAL und Norsalsolinol (NorSAL) (siehe Abbildung 8) als endogene Stoffwechselprodukte aufgefunden [84]–[90].

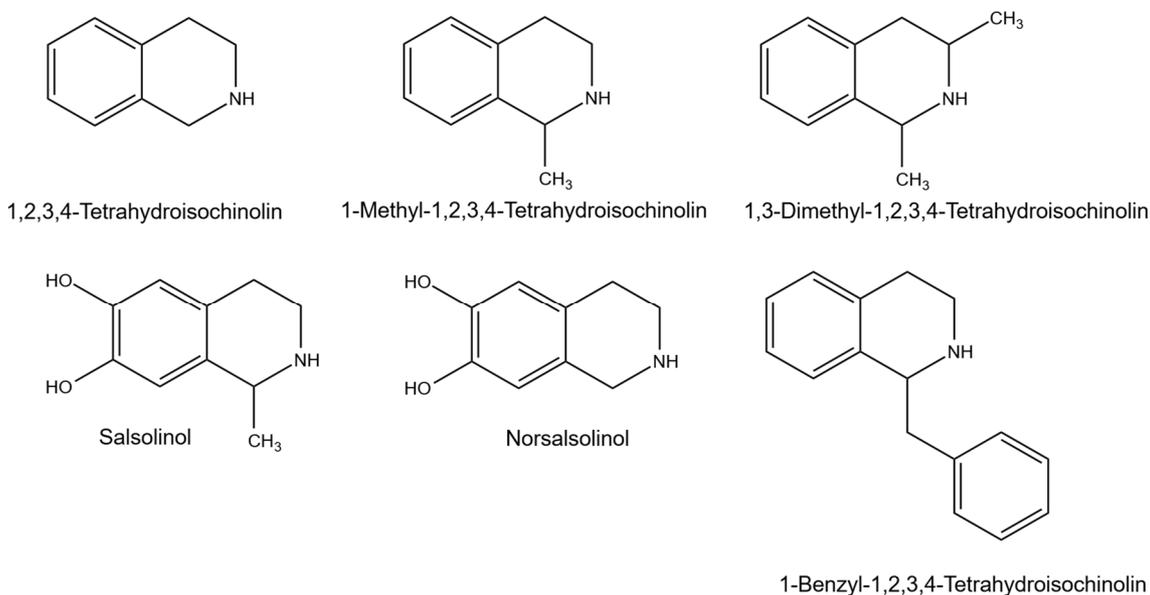


Abbildung 8: Strukturformeln von 1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ; 1,3-diMeTIQ (obere Reihe von links nach rechts); SAL; NorSAL und 1-BnTIQ (untere Reihe von links nach rechts).

### 1.3.1. Bildung von Tetrahydroisochinolinen

Amé Pictet und Theodor Spengler gelang 1911 erstmals die Synthese des 1,2,3,4TIQs aus Phenylethylamin und Formaldehyd in konzentrierter Salzsäure [91]. Diese Pictet-Spengler-Reaktion hat sich als Standardmethode für die Synthese von zahlreichen Isochinolin- und Indol-Alkaloidgerüsten in den letzten 100 Jahren etabliert [92]. In Abbildung 9 ist diese vereinfacht am Beispiel der Reaktion von Amphetamin und Acetaldehyd zum Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ dargestellt. Dabei greift im ersten Schritt die Aminogruppe des Amphetamins nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Acetaldehyds an und es kommt zur Ausbildung eines Iminium-Ions. Der Ringschluss zum TIQ erfolgt dann in einem zweiten Schritt durch den nukleophilen Angriff des Aromaten an das Iminium-Ion mit anschließender Deprotonierung des Aromaten an der Bindungsstelle [93].

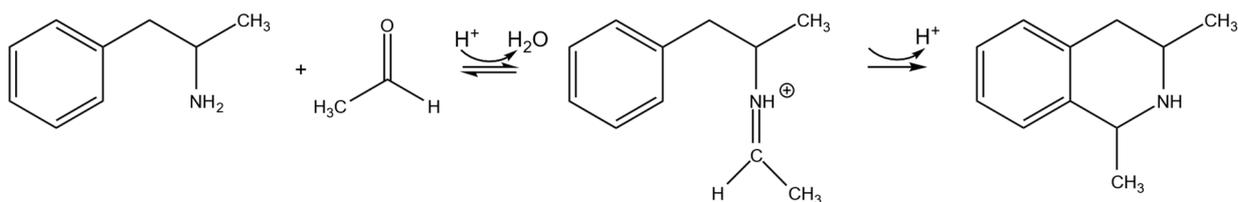


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Pictet-Spengler-Reaktion am Beispiel des 1,3-diMeTIQs, gebildet aus Amphetamin und Acetaldehyd (in Anlehnung an [73], [93], [94]).

Laut Haber et al. (1995) läuft die Kondensationsreaktion für das 1,3-diMeTIQ ausschließlich enzymkatalysiert und nicht unter physiologischen Bedingungen ab [95]. Der Mechanismus der enzymkatalysierten Reaktion und die unter physiologischen Bedingungen ablaufende Reaktion scheinen sich nach Maresh et al. (2008) nicht voneinander zu unterscheiden. Dies publizierten sie für das aus Tryptamin und Secologanin gebildete Kondensationsprodukt Strictosidin, welches in einer Pictet-Spengler-Reaktion durch das Enzym Strictosidinsynthase generiert wird [93]. Weist dagegen der Aromat des Ausgangsamins elektronenspendende Substituenten wie z. B. Hydroxy- oder Methoxygruppen auf, so kann die Ringzyklisierung aufgrund der erhöhten Elektronendichte im Aromaten auch unter physiologischen Bedingungen ablaufen [94], [95]. So auch beim Kondensationsprodukt SAL, welches aus Dopamin und Acetaldehyd sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch über die (R)-Salsolinolsynthase gebildet werden kann [90], [96]. Dies ist für das 1,3-diMeTIQ aufgrund der fehlenden Substituenten jedoch nicht gegeben. Für das strukturverwandte aus Phenylethylamin und Pyruvat gebildete Kondensationsprodukt 1-MeTIQ wurde aus Rattengehirn ein Enzym isoliert, welches im Verdacht steht, spezifisch die Kondensation von TIQs zu generieren, die am Aromaten unsubstituiert vorliegen, wie z. B. 1,2,3,4TIQ, 1-MeTIQ, 1-Methyl-3,4-Dihydroisochinolin und 1-BnTIQ [97].

Amphetamin und Amphetaminderivate weisen, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, jeweils ein Stereozentrum auf. Nach der Kondensation mit Acetaldehyd werden durch Einbringen eines weiteren Chiralitätszentrums vier Stereoisomere gebildet. Dabei verhalten sich cis-1S,3R- und cis-1R-3S-diMeTIQ sowie trans-1R,3R- und trans-1S,3S-diMeTIQ jeweils wie Bild und Spiegelbild zueinander und werden daher als Enantiomere bezeichnet (siehe Abbildung 10). Diese lassen sich nur auf einer speziellen chiralen Analysensäule chromatographisch voneinander trennen. Die cis-Isomere und die trans-Isomere sind dagegen diastereomer zueinander und können über ein einfaches chromatographisches Verfahren getrennt werden.

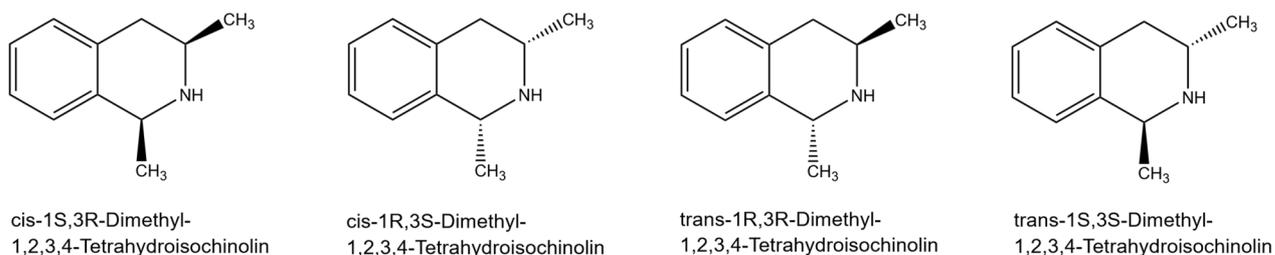


Abbildung 10: Stereoisomere des 1,3-diMeTIQ (von links nach rechts): cis-1S,3R-diMeTIQ; cis-1R-3S-diMeTIQ; trans-1R,3R- diMeTIQ und trans-1S,3S-diMeTIQ.

### 1.3.2. Wirkung und Toxizität

Wie zuvor bereits beschrieben, weisen TIQs eine Vielzahl an pharmakologischen Effekten in Mensch und Tier auf. Das aus Amphetamin und Acetaldehyd gebildete Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ (siehe Abbildung 8) hat in einer Studie von Makino et al. (1990) in Ratten zu einigen Auffälligkeiten geführt, wie z. B. Tremor, Krümmungen des Rückens, eine vollständige Lähmung der Beine, Sabbern, Hypersensitivität und Hypertrophie der Genitalien. Den Ratten wurde dazu über insgesamt acht Wochen durch steigende Ethanolkonzentrationen im Trinkwasser ein chronischer Alkoholismus induziert und ihnen täglich ab der vierten bis zur achten Woche Amphetamin intraperitoneal gespritzt. Nach acht Wochen wurde in den Ratten, die ein abnormales Verhalten gezeigt haben, signifikant höhere Konzentrationen an 1,3-diMeTIQ im Gehirn festgestellt ( $12,7 \pm 2,9$  ng/g ( $n = 7$ )) als in den Gehirnen der Ratten, die sich verhaltensunauffällig gezeigt haben ( $4,5 \pm 1,1$  ng/g ( $n = 9$ ) –  $p < 0,05$ ). Die direkte Gabe des genannten Kondensationsprodukts hat dabei zu ähnlichen Auffälligkeiten geführt wie nach der simultanen Gabe von Amphetamin und Alkohol über acht Wochen. Zudem wurde vermutet, dass die Gabe von 1,3-diMeTIQ zu einer verminderten Aktivität der MAO führt [3]. Ähnliche Wirkungsweisen haben auch die strukturverwandten TIQs 1,2,3,4TIQ, 1-MeTIQ und N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (N-MeTIQ) gezeigt, die als moderate MAO-A und MAO-B Inhibitoren wirken, sowie das als schwacher Inhibitor agierende 1-BnTIQ [98]. SAL weist darüber hinaus u. a. inhibitorische Eigenschaften gegenüber der Tyrosin-Hydroxylase [98], [99], der Tryptophan-Hydroxylase [100] sowie der Catechol-O-Methyltransferase auf [101]. In einer Studie von Kotake et al. (2007) an SH-SY5Y humanen Neuroblasten konnte gezeigt werden, dass 1,3-diMeTIQ weiterhin eine starke Zytotoxizität und eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber des mitochondrialen Komplex 1 der Atmungskette aufweist. Die Autoren vermuten, dass dies mit der Methylierung an der C3-Position einhergeht [74].

Dagegen wurde gezeigt, dass 1-MeTIQ sogar eine protektive Wirkung gegenüber einem durch das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) induzierten Zelltod besitzt [102]. In C57/BL-Mäusen konnte ein protektiver Effekt des 1,3-diMeTIQ gegenüber einer durch 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) induzierten Bradykinesie festgestellt werden. Es wurde jedoch auch eine verminderte konzentrationsabhängige Viabilität sowie ähnliche Verhaltensauffälligkeiten, wie sie schon Makino et al. (1990) an den Ratten beobachtet hatten [103], nachgewiesen. Nakagawa et al. haben 1993 ein ähnliches Experiment wie 1990 Makino et al. durchgeführt. Dabei wurde das Kondensationsprodukt 3-Methyl-6,7-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (3-Me-6,7-MDTIQ), das aus dem Amphetaminderivat MDA und einer C1-Einheit gebildet wird, im Gehirn und im Urin von Ratten untersucht, denen (R)- bzw. (S)-MDA intraperitoneal verabreicht wurde. Dabei konnte nach Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) im Gehirn der Ratten, die (R)-MDA verabreicht bekamen, eine signifikant höhere Konzentration des 3-Me-6,7-MDTIQs ( $6,80 \pm 1,68$  pmol/g) festgestellt werden als nach Gabe von (S)-MDA ( $1,12 \pm 1,09$  pmol/g –  $p < 0,05$ ). Zum anderen wurde ein *Open Field Test* nach direkter Gabe des 3-Me-6,7-MDTIQ durchgeführt. Dabei zeigten die Ratten, die das Kondensationsprodukt verabreicht bekamen, ein anderes Verhaltensmuster als diejenigen nach Gabe von MDA (Kontrollgruppe). Weiterhin richteten sie sich mitunter weniger auf und wanderten weniger umher als im Vergleich zur Kontrollgruppe und zeigten eine leichte Dyskinesie sowie eine Hyperaktivität [104].

Einige Tetrahydroisochinoline wie z. B. das 1,2,3,4TIQ oder das 1-BnTIQ stehen zudem im Verdacht an der Pathogenese von Parkinson beteiligt zu sein [86], [105]–[107]. Es wird vermutet, dass ihre Neurotoxizität auf der Metabolisierung zum N-Methylisochinolinium-Ion beruht, welches inhibitorisch gegenüber MAOs [108], Tyrosinhydroxylasen und aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylasen [109] wirkt. Dazu werden die obengenannten TIQs zunächst durch die N-Methyltransferase methyliert [110], [111] und anschließend durch eine Monoaminoxidase oxidiert [112]. Der genaue Mechanismus und das Ausmaß, in dem die TIQs an der Pathogenese von Parkinson beteiligt sind, sind jedoch bislang nicht vollständig aufgeklärt.

### 1.3.3. Analytische Methoden

Da sich die toxikologische Fragestellung hauptsächlich in Bezug auf die Neurotoxizität der TIQs beschäftigt, ist es nicht verwunderlich, dass in der Literatur insbesondere das Gehirn, als Ort des Wirkgeschehens, zur Analyse der Kondensationsprodukte herangezogen wird [3], [88]–[90], [95], [104], [113]. Allerdings wurden auch andere Matrices wie u. a. Blut, Urin, CSF, Niere oder Nahrungsmittel auf diese Substanzklasse hin untersucht [81], [82], [86], [87], [95], wobei vor allem GC-MS-Analysen zum Einsatz kamen (siehe Tabelle 1). Wenn es um die Trennung enantiomerer TIQs auf einer achiralen Trennsäule geht, ist bei der GC-MS-Analyse bislang die Verwendung eines chiralen Derivatisierungsmittels zum Einsatz gekommen. Durch Einbringen eines weiteren chiralen Zentrums in das Molekül kann ein Diastereomergemisch erzeugt werden, welches über ein chromatographisches Verfahren aufgetrennt werden kann. So konnten z. B. die Tetrahydroisochinoline (R)- und (S)-SAL unter Verwendung des enantiomerenreinen Derivatisierungsmittel (R)-(2)-2-Phenylbutyrylchlorid analysiert werden [89], [90]. Jedoch können die TIQs ebenso gut mittels flüssigchromatographischer-massenspektrometrischer Untersuchungsmethoden (LC-MS/MS) bestimmt werden [113], sodass eine wassersensitive Derivatisierung entfällt [114]. Auch ohne den Einsatz einer chiralen Säule kann die Trennung eines Enantiomergemisches durch ein flüssigchromatographisches Verfahren erfolgen. DeCuyper et al. haben dazu 2008 durch den Einsatz des zyklischen Oligosaccharides  $\beta$ -Cyclodextrin in der mobilen Phase eine Trennung von (R)- und (S)-SAL sowie von N-Me-(R)- und N-Me-(S)-SAL auf einer Umkehrphasen  $C_{18}$ -Säule erreicht [113].

In der nachfolgenden Tabelle sind einige der in der Literatur beschriebenen Methoden zur Untersuchung der TIQs zusammengefasst. Dabei liegen die Nachweisgrenzen (LoD – Limit of Detection) der Methoden, sofern angegeben, zwischen 0,2 und 3 ng/g bzw. ng/ml [114].

Tabelle 1: Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Analyseverfahren zur Untersuchung der TIQs.

Publikation	Analyten	Matrix	Analyse- verfahren	LoD / LoQ	Konzentration
[115]	1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ	Gehirn (Ratte)	GC-MID	n. a.	1,2,3,4TIQ: 5 - 7 ng/g 1-MeTIQ: 1 - 3 ng/g
[84]	1,2,3,4TIQ; 2-MeTIQ	Gehirn	GC-MS	n. a.	1,2,3,4TIQ: 1 - 10 ng/g 2-MeTIQ: 2 - 3 ng/g
[85]	1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ	Gehirn	GC-MS	n. a.	1,2,3,4TIQ: 0,25 ± 0,08 ng/g - 0,86 ± 0,23 ng/g 1-MeTIQ: 0,05 ± 0,02 - 0,75 ± 0,25 ng/g
[82]	1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ	Käse; Kakao; Wein	GC-MS	n. a.	1,2,3,4TIQ: 0,8 ± 0,3 ng/g (Kakao) 15,0 ± 2,2 ng/g (Käse) 1-MeTIQ: 0,5 ± 0,1 ng/g (Käse) - 354 ± 236 ng/g (Wein)
[83]	SAL	Banane; Urin	HPLC-ECD	LoD: 2,5 ng/ml (Urin)	49,56 bzw. 50,94 µg/g (Banane) 6,9 - 28,6 ng/ml (Urin)
[81]	1,2,3,4TIQ	Käse; Bananen; Sardinen; Rindfleisch; Mehl; Ei; Bier; Whiskey; Milch	GC-MS	LoD: 0,25 ng/ml	0,36 ng/ml (Bier) - 5,2 ng/g (Käse)
[110]	N-MeTIQ	Gehirn (Primaten)	GC-MS	n. a.	1,7 µg/g - 2,2 µg/g (nach TIQ-Injektion)
[3]	1,3-diMeTIQ	Gehirn; Plasma	GC-MS	n. a.	4,5 ± 1,1 ng/g - 12,7 ± 2,9 ng/g (Gehirn) 5,5 ± 2,5 ng/ml - 13,1 ± 2,1 ng/ml (Plasma)
[104]	3-Me-6,7-MDTIQ	Gehirn; Urin	GC-MS	n. a.	1,12 ± 1,09 pmol/g - 6,80 ± 1,68 pmol/g (Gehirn)
[95]	1,3-diMeTIQ	Niere; Nebenniere; Hirnstamm	GC-MS	n. a.	n. a.
[86]	1-BnTIQ	Gehirn (Maus); CSF (human)	GC-MS	n. a.	0,40 ± 0,10 ng/ml - 1,17 ± 0,35 ng/ml (CSF) 7,67 ± 1,60 ng/g (Gehirn Maus)
[87]	1,2,3,4TIQ; SAL; u. a.	Urin	GC-MS	n. a.	n. a.
[88]	SAL; NorSAL	Gehirn	LC-ECD	LoD: 0,2 ng/g	SAL: 0,5 ± 1,1 ng/g - 43,1 ± 33,7 ng/g

Publikation	Analyten	Matrix	Analyse- verfahren	LoD / LoQ	Konzentration
[89]	(R/S)-SAL; NorSAL; u. a.	Gehirn	GC-MS	LoD: 0,5 ng/g	(R)-SAL: 11,96 ± 9,8 ng/g - 28,66 ± 18,3 ng/g (S)-SAL: 7,86 ± 6,1 ng/g - 18,56 ± 14,1 ng/g
[90]	(R/S)-SAL; NorSAL; u. a.	Gehirn	GC-MS	n. a.	(R)-SAL: 1,1 ± 2,0 ng/g - 24,8 ± 24,9 ng/g (S)-SAL: 0,9 ± 1,6 ng/g - 5,6 ± 4,3 ng/g
[114]	1,2,3,4TIQ; 1-BnTIQ; SAL; u. a.	Gehirndialysat (Ratte)	Kapillar-LC- MS/MS	LoD: 2 - 3 ng/ml	n. a.
[113]	1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ; N-MeTIQ; 1-BnTIQ; (R/S)-SAL; N-Me-(R/S)-SAL; NorSAL; u. a.	Gehirnregionen (Maus; Ratte; human)	HPLC-ECD; LC-MS/MS	LoQ: 0,7 ng/ml (HPLC-ECD); LoQ: 0,3 ng/ml (LC-MS/MS)	TIQ: 3,03 ± 0,90 ng/g - 10,19 ± 1,57 ng/g (Nager) TIQ: 0,91 ± 0,31 ng/g - 5,61 ± 1,81 ng/g (human)

LoD: Limit of Detection (Nachweisgrenze); LoQ: Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze); n. a. nicht verfügbar

Wie bereits erwähnt, kann durch die Verwendung eines LC-MS/MS-Verfahrens auf eine wassersensitive Derivatisierung verzichtet werden. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt, um sowohl die TIQs als auch Amphetamin und Amphetaminderivate in verschiedenen Matrices nachzuweisen. Im Folgenden wird das Funktionsprinzip der gewählten Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie erläutert.

## 1.4. Prinzip der Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Die Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) ist ein sehr selektives und sensitives Analyseverfahren, das sich sowohl für polare Moleküle, Xenobiotika und deren Metabolite sowie Peptide eignet [116]. Dabei wird zunächst ein Stoffgemisch über eine chromatographische Säule aufgetrennt. Im Anschluss werden die einzelnen Substanzen durch ein Massenspektrometer detektiert, welches zusätzlich eine Aussage über die Struktur der Analyten erlaubt. Das Prinzip der Chromatographie basiert auf unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu trennenden Stoffe zwischen einer festen stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase. Die Probe wird nach Injektion über die mobile Phase mit hohem Druck durch die mit der stationären Phase ausgekleideten Säule gepresst, wobei eine adsorptionsbedingte Trennung aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten der stationären und der mobilen Phase stattfindet. Die Zeit, die eine Substanz zum Durchlaufen der Säule benötigt, wird Retentionszeit ( $t_R$ ) genannt und kann auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden, z. B. durch die Auswahl der stationären Phase, der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, der Zusammensetzung des Elutionsmittels sowie der Temperatur der Säule [117]. Das nachgeschaltete Massenspektrometer ist aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einer detektierenden Einheit aufgebaut. Die Substanzen werden über die mobile Phase aus der Säule in die Ionenquelle geleitet und unter Atmosphärendruck in die Gasphase überführt. Die Elektrospray-Ionisation stellt dabei eine sanfte Ionisierungsmethode dar, sodass die Analyten nicht fragmentiert werden [116]. Voraussetzung für diese Ionisation ist, dass die Analytmoleküle in der Lösung als Ionen vorliegen. Dies kann im Vorfeld u. a. durch Säure-Base-Reaktionen im Elutionsmittel erfolgen. Der Eluentenstrom wird in ein feines Spray aus geladenen Tröpfchen überführt. Dies passiert durch Ausbildung eines elektrischen Feldes an der Spitze einer Metallkapillare sowie eines zusätzlichen Gasstroms (z. B. Stickstoff), der das Aerosol weiter vernebelt. Die geladenen Tröpfchen verlieren auf dem Weg zur gegenüberliegenden Kathode an Größe, sodass die Abstoßungskräfte der in der Lösung befindlichen Ionen größer werden als die Oberflächenspannung der Tröpfchen. Durch eine Coloumb-Explosion zerplatzen die Tröpfchen solange bis eine Desorption der Ionen erfolgt. Durch die Ausbildung von Addukten aus Analytmolekülen und einem Kation, z. B. eines Protons, liegen Quasi-Molekülonen

$[M+H]^+$  vor, welche in den Massenanalysator, z. B. einem Tandemquadrupol geleitet und im Hochvakuum nach ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) getrennt werden [116], [118]. Dabei kann entweder ein definierter Massenbereich gescannt oder ein spezifisches Masse zu Ladungs-Verhältnis eingestellt werden, wobei nur Ionen dieses Verhältnisses stabil den Quadrupol passieren können. Ein Tandemmassenspektrometer ist aus zwei Quadrupolen (Q1 und Q3) und einer dazwischen geschalteten Kollisionszelle aufgebaut. In einem *Multiple Reaction Mode* (MRM) wird im Q1 lediglich das Molekülion durchgelassen, welches anschließend in einer Kollisionszelle durch einen Gasstrom (z. B. Argon) fragmentiert wird. Den Q3 können dann schließlich nur noch die gebildeten Fragmentionen passieren. Dadurch wird der Übergang vom Molekülion zum Fragmention in einem Chromatogramm als Peak dargestellt. Im Vergleich zu einem Scan-Modus können somit deutlich niedrigere Nachweisgrenzen erzielt werden [116], [119]. In Abbildung 11 sind der Aufbau und das Funktionsprinzip des LC-ESI-MS/MS schematisch dargestellt.

Für den Nachweis der Amphetamine und der TIQs wurde in der hier vorliegende Arbeit die LC-ESI-MS/MS als Analyseverfahren ausgewählt, da sehr geringe Nachweisgrenzen aufgrund der hohen Selektivität und Sensitivität des Tandemmassenspektrometers erzielt werden können. Darüber hinaus ist eine Derivatisierung nach der Extraktion nicht erforderlich, wie es gegebenenfalls bei der GC-MS notwendig wäre.

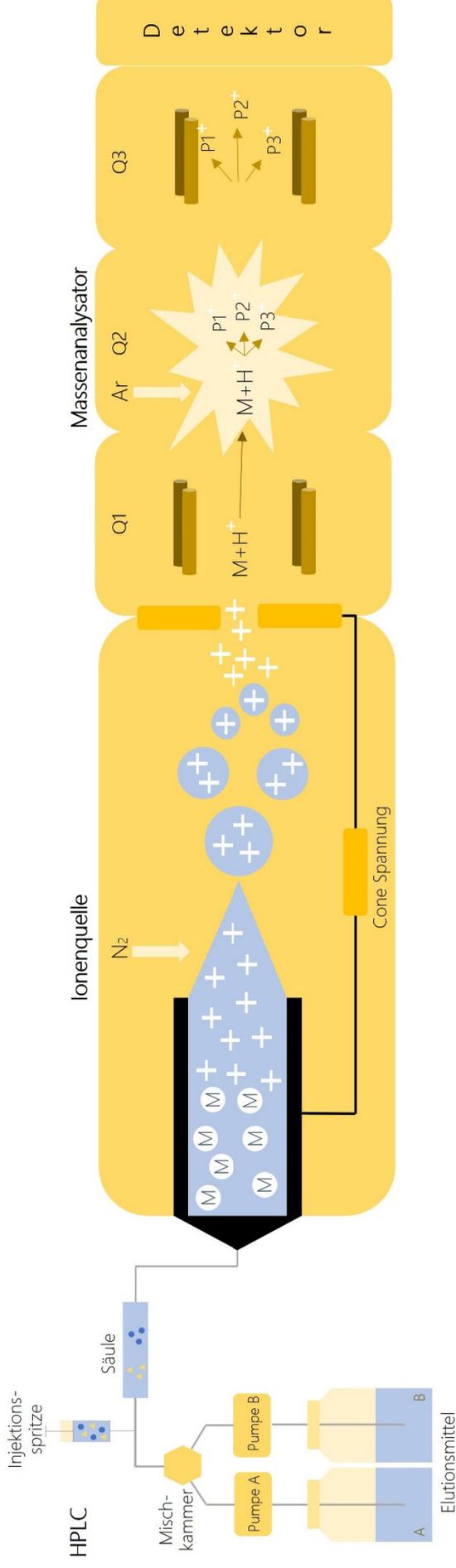


Abbildung 11: Aufbau und Funktionsprinzip einer Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie (in Anlehnung an [120]). Die Komponenten des Elutionsmittels befinden sich in separaten Vorratsflaschen (A und B) und werden über einzelne Pumpen (A und B) zunächst in eine Mischkammer geleitet. Dort wird die mobile Phase zusammengesetzt. Die Probe wird nach der Injektion über die mobilen Phase mit hohem Druck durch die mit der stationären Phase ausgekleideten Säule gepresst. Hier findet eine adsorptionsbedingte Trennung aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten der stationären und der mobilen Phase statt. Die aufgetrennten Substanzen werden über die mobile Phase aus der Säule in die Ionenquelle geleitet und unter Atmosphärendruck in die Gasphase überführt sowie anschließend in den Massenanalysator geleitet. Im Hochvakuum werden diese nach ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) getrennt. Bei dem hier dargestellten Massenanalysator handelt es sich um ein Tandemquadrupol, der aus zwei Quadrupolen (Q1 und Q3) und einer dazwischen geschalteten Kollisionszelle (Q2) aufgebaut ist. Je nach eingestelltem Modus können dadurch Ionenübergänge durch den Detektor als Peaks im Chromatogramm dargestellt werden.

## 2. Zielsetzung

Die Nebenwirkungen, die nach dem simultanen Konsum von Amphetaminen und Alkohol auftreten, sind bislang noch nicht ausreichend geklärt, insbesondere in Bezug auf mögliche potentiell-neurotoxische Kondensationsprodukte, die durch die endogene Reaktion aus Amphetaminen und dem Alkoholmetaboliten Acetaldehyd entstehen können. Dabei handelt es sich um Substanzen aus der Stoffgruppe der TIQs, die lediglich in *in vitro* oder *in vivo* Studien untersucht wurden, wie z. B. das 1,3-diMeTIQ und das N-Me-1,3-diMeTIQ. Diese werden aus Amphetamin und Methamphetamin gebildet. Die Kondensationsprodukte aus MDA bzw. MDMA und Acetaldehyd wurden bislang nicht untersucht.

Das Ziel dieser Dissertation war es daher die TIQs 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-Dimethyl-7,8-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (1,3-diMe-7,8-MDTIQ) und N-Methyl-1,3-Dimethyl-7,8-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ) zusammen mit deren Ausgangsstoffen Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in humanem Blut- und postmortalen Gehirn- und Leberproben qualitativ nachzuweisen. Das Gehirn wurde aufgrund des neurotoxischen Potentials der Kondensationsprodukte und der damit einhergehenden Funktion als Zielstruktur als Analysematrix ausgewählt. Da der primäre Alkoholmetabolismus in der Leber stattfindet und daher die Konzentration des Ethanolmetaboliten Acetaldehyd dort besonders hoch ist, schien dieses Gewebe ebenfalls bedeutsam für die Untersuchung der TIQs. Die obengenannten TIQs waren auf dem Markt nicht zu erwerben, weshalb diese im ersten Schritt synthetisiert werden sollten. Anschließend sollten ein geeignetes Extraktionsverfahren und ein flüssigchromatographisch-massenspektrometrisches Analyseverfahren entwickelt und teilvalidiert werden. Abschließend galt es mit dieser teilvalidierten Methode reale Blut, Gehirn und Leberproben von Personen, die Amphetamin konsumiert hatten bzw. die nach einem Amphetaminkonsum verstorben sind, auf die zuvor genannten Kondensationsprodukte zu untersuchen.

### 3. Materialien und Methoden

Für die Untersuchung der TIQs in humanen Blut- und postmortalen Gewebeproben mussten vorab analytische Standards, die es für die hier zu untersuchenden Substanzen nicht käuflich zu erwerben gab, synthetisiert werden. Dazu wurden die Synthesen des 1,3-diMeTIQ und des N-Me-1,3-diMeTIQ am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie in der Arbeitsgruppe für Asymmetrische Synthesen und Katalyse (Düsseldorf) durchgeführt. Anschließend sollten für diese beiden TIQs sowie für 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ und deren Ausgangsstoffe (Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA) ein geeignetes Extraktionsverfahren und eine sensitive und valide Analyseverfahren am Institut für Rechtsmedizin Düsseldorf entwickelt werden. Im Folgenden werden zunächst die Materialien für die Synthese (Kapitel 3.1) sowie die für die Extraktion und die Analyse verwendeten Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Reinsubstanzlösungen und Probenmaterialien aufgelistet (Kapitel 3.2). Anschließend werden die Reaktionsbedingungen der einzelnen Syntheseschritte beschrieben (Kapitel 3.3) sowie das entwickelte flüssigchromatographisch-massenspektrometrische Analyseverfahren und die für die einzelnen Probenmaterialien optimierten Extraktionsverfahren vorgestellt (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2). Zuletzt erfolgt eine Übersicht über die Durchführung zur Bestimmung der Validierungsparameter, die im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurden (Kapitel 3.4.3).

#### 3.1. Materialien – Synthese

Die für die Synthesen verwendeten Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Reinsubstanzen und Lösungen, die neben der Standardlaborausrüstung verwendet wurden, werden in den nachfolgenden Kapiteln (3.1.1 – 3.1.4) aufgelistet.

##### 3.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller	Standort
Analysewaage 0,1-200 g	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Gaschromatograph 7890A mit Autosampler 7693, GC-Säule, HP-5 Phenylmethylpolysiloxan, 30 m x 250 µm x 0,25 µm, Massenspektrometer 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector	Agilent	Santa Clara, USA

Geräte	Hersteller	Standort
Lösungsmitteltrocknungsanlage MB-SPS-800	M. Braun Inertgassysteme GmbH	Garching, Deutschland
NMR-Spektrometer AVANCE III	Bruker	Billerica
Rotationsverdampfer Heidolph Wb eco	Heidolph	Schwabach, Deutschland

### 3.1.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Standort
Acetonitril, über Molekularsieb getrocknet	Acros Organics	Geel, Belgien
Acetylchlorid; 98 %	Alfa Aesar	Haverhill, USA
Baysilone-Paste	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Bromwasserstoffsäure in Methanol; 37 %	Merck	Darmstadt, Deutschland
Chloroform-d <sub>1</sub> ; 99,8 %	Deutero	Kastellaun, Deutschland
Dichlormethan aus der Trocknungsanlage	VWR	Radnor, USA
Diethylether; p. a.	Honeywell	Morristown, USA
Ethylacetat; technisch, destilliert	Institut für organische Chemie	Düsseldorf, Deutschland
Formaldehyd; 37 %	Grüssing	Filsum, Deutschland
Kieselgel 60 M, 0,04 - 0,06 mm	Machery-Nagel	Düren, Deutschland
Lithiumaluminiumhydrid, 95 %; p. a.	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Methanol; 99,8 %	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfat; anhydrous	VWR	Radnor, USA
N-Hexan; technisch, destilliert	Institut für organische Chemie	Düsseldorf, Deutschland
Phosphoroxychlorid; for synthesis	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure; 37 %	VWR	Radnor, USA
Seesand; for analysis	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Tetrahydrofuran aus der Trocknungsanlage	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Tetrahydrofuran; p. a.	VWR	Radnor, USA
Triethylamin	Acros Organics	Geel, Belgien
Trimethylaluminium; 2 M in Hexan	Sigma Aldrich	St. Louis, USA

### 3.1.3. Verbrauchsmaterialien

Dünnschichtchromatographieplatten (Glas, Si60 mit F-254-Fluoreszenzindikator – Machery-Nagel), Papierfilter, Pasteurpipetten, Spritzen, Einmalkanülen und Umstülpstopfen verschiedener Größen wurden vom Institut für Organische Chemie und Makromolekular Chemie (Arbeitsgruppe für Asymmetrische Synthesen und Katalyse) bereitgestellt.

### 3.1.4. Reinsubstanzen und Lösungen

Methylphenylethylaminsulfat (Amphetaminsulfat) wurde aus dem Bestand des Instituts für Rechtsmedizin (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Aus dem Institut für Organische Chemie und Makromolekular Chemie wurden weiterhin Kaliumpermanganatlösung, 2 N Salzsäure, gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigte Natriumchloridlösung und 1 M wässrige Ammoniaklösung bezogen.

## 3.2. Materialien – Analytik

Die für die Extraktion und die Analyse verwendeten Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Reinsubstanzlösungen und Probenmaterialien (Kapitel 3.2.1 - 3.2.5) werden nachfolgend vorgestellt. Laborwaren, die zur Grundausstattung eines forensisch-toxikologischen Laboratoriums gehören, wie z. B. Glasgeräte oder Obduktionsbesteck, werden dabei nicht berücksichtigt.

### 3.2.1. Geräte

Geräte	Hersteller	Standort
ACQUITY UPLC (Binary Solvent Manager, Sample Manager, PDA Detektor, TQ-Detektor)	Waters	Milford, USA
Analysewaage	Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
Heizblock mit und ohne stickstoffbegasbaren Vialpositionen	Medax / Liebisch	Neumünster, Deutschland
HPLC Säule ACE® Excel™ C18-AR, Edelstahl, 2,1 x 150 mm, Porengröße 2 µm	ACE	Aberdeen, Schottland
EXL-PCF05 ACE®, UHPLC pre-column filter, Porosität: 0,5 µm, Frittenmaterial: Titan	ACE	Aberdeen, Schottland
Mikropipetten, 100 - 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikropipetten, 25 - 1000 µl	Gilson	Villieur-le-Bel, Frankreich
Nahrungsmittelzerkleinerer KaloKelvin	Amazon	Bellevue, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein	Bruchsal, Deutschland
Zentrifuge	Beckman-Coulter	Krefeld, Deutschland

### 3.2.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Standort
Acetonitril, HPLC grade und LC-MS grade	VWR	Radnor, USA
Ameisensäure, ≥99 %, LC-MS grade	VWR	Radnor, USA
Dichlormethan, gradient grade	Merck	Darmstadt, Deutschland
Diethylether, p. a.	Merck	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol, gradient grade	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol, HPLC grade und LC-MS grade	VWR	Radnor, USA
Natronlauge, p. a.	Merck	Darmstadt, Deutschland
Perchlorsäure, 60 %, p. a.	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure, 25 %, p. a.	Merck	Darmstadt, Deutschland
Wasser, HPLC grade und LC-MS grade	VWR	Radnor, USA

### 3.2.3. Verbrauchsmaterial

- Safe Lock Tubes, 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- IKA Ultra Turrax Stahlkugeln (IKA-Werke, Staufen, Deutschland)
- Total Recovery Snap Cap Vials, 12 x 32 mm (Waters, Milford, USA)
- Pipettenspitzen, 100 - 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen, 25 - 1000 µl (Gilson, Villieur-le-Bel, Frankreich)
- CorpHast™, pH-Indikatorstreifen (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Injektionsflaschen, 10 ml, 20 ml (Forche Chromatographie, Moers, Deutschland)

### 3.2.4. Reinsubstanzen und Lösungen

- 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ (eigens synthetisiert am Institut für Organische Chemie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland)
- 1,3-diMe-7,8-MDTIQ, N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ, D<sub>11</sub>-1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (D<sub>11</sub>-1-MeTIQ) (Referenzsubstanzen des Instituts für Organische Chemie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland)
- d-/l-Amphetaminsulfat (Referenzsubstanz aus dem Institut für Rechtsmedizin, Düsseldorf, Deutschland)
- Methamphetamin-HCl (1 mg/ml), d-/l-MDA-HCl (1 mg/ml), d-/l-MDMA-HCl (1 mg/ml) (Lipomed, Herne, Deutschland)

- D<sub>11</sub>-Amphetamin (1 mg/ml), D<sub>5</sub>-MDA (1 mg/ml), (Cerilliant, Round Rock, USA)

### 3.2.5. Probenmaterial

Für die Bestimmung der TIQs wurden aus dem Bestandgut der nachfolgenden rechtsmedizinischen Institute postmortal asserviertes humanes Probenmaterial (Leber- und Gehirngewebe) nach Anonymisierung zur Verfügung gestellt:

- Institut für Rechtsmedizin, Düsseldorf, Deutschland (sechs Gehirn- und sechs Leberproben)
- Institut für Rechtsmedizin Bonn, Deutschland (eine Gehirnprobe)
- Institut für Rechtsmedizin Essen, Deutschland (acht Gehirn- und acht Leberproben)
- Institut für Rechtsmedizin Köln, Deutschland (neun Gehirn- und sechs Leberproben)
- Institut für Rechtsmedizin, Rostock, Deutschland (drei Gehirn- und fünf Leberproben)

Weiterhin wurden aus dem hiesigen Institut 42 Serumproben nach forensisch-toxikologischer Untersuchung und Ablauf der entsprechenden Aufbewahrungsfrist ausgewählt. Die Grundvoraussetzung für die Auswahl aller Proben war dabei ein positives Analyseergebnis bezüglich Amphetamin bzw. der Amphetaminderivate Methamphetamin, MDMA, MDA und Ethanol, welche aus vorherigen routinemäßigen Untersuchungen ermittelt wurden. Für diese Proben lag ein Untersuchungsauftrag der Polizei bzw. Staatsanwaltschaft zur Durchführung forensisch-toxikologischer Screeninganalysen vor. Zudem wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität am 29.08.2016 ein positives Ethikvotum für die hiesige Studie erteilt (Studiennummer: 5669).

Für die Validierung wurde humanes postmortales Gehirn- und Lebergewebe verwendet, welches im Rahmen der gerichtlichen Leichenöffnungen am Institut für Rechtsmedizin Düsseldorf asserviert und negativ auf die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Substanzen getestet wurde. Um im Vorfeld potenzielle Einflüsse der verschiedenen Matrices auf die Validierungsergebnisse auszuschließen, wurden vier Gehirnproben vereint und mit einem Skalpell grob zerkleinert. Eine vollständige Homogenisierung war hier nicht das Ziel, sondern lediglich eine grobe Durchmischung aller vier Gehirngewebe. Darüber hinaus wurden Leberproben zweier Leichen mit einem Nahrungsmittelzerkleinerer der Marke KaloKelvin

grob zerkleinert und vermischt. Für die vorangegangenen Extraktionsversuche wurden Gehirn und Leber vom Schwein genutzt, welche aus örtlichen Metzgereien bezogen wurde. Die Lagerung aller Proben erfolgte identisch bei -20 °C, zeitweise bei Raumtemperatur.

### 3.3. Methoden – Synthese

Im Folgenden werden die einzelnen Syntheseschritte für die Umwandlung von Methylphenylethylaminsulfat (Amphetaminsulfat) in das 1,3-diMeTIQ beschrieben (siehe Kapitel 3.3.1). Dabei wurden die Zwischenprodukte N-Acetylmethylphenylethylamin und 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin synthetisiert. Anschließend wird die Methylierung des 1,3-diMeTIQ in das N-Me-1,3-diMeTIQ vorgestellt (siehe Kapitel 3.3.2).

Die beschriebenen Reaktionen wurden in ausgeheizten Rund- oder Schlenkkolben unter Inertgasatmosphäre und unter Verwendung der Septen- und Kanülentechnik durchgeführt. Dabei wurden die Glaskolben mit Umstülpstopfen versehen, durch die eine Entnahme oder Zugabe von Reagenzien mittels Einwegspritzen mit aufgesetzten Kanülen unter Stickstoffatmosphäre möglich war. Lösungsmittel wurden entweder aus einer Lösungsmitteltrocknungsanlage bezogen, über Molekularsieb getrocknet oder in entsprechender Reinheit (siehe Kapitel 3.1.2) direkt aus gewerblich erworbenen Flaschen entnommen.

Die Reaktionskontrollen wurden mittels Dünnschichtchromatographie an kieselgelbeschichteten und mit UV-Indikator versetzten Glasplatten 60F-254 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte entweder bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Anfärben mit basisch-wässriger Kaliumpermanganatlösung.

Zur Aufnahme eines <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums wurden die Produkte in deuterierten Chloroform (CDCl<sub>3</sub>) gelöst und mit einem Bruker Avance III (300 MHz bzw. 600 MHz) gemessen. Spinmultiplizitäten werden mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplet), dtd (Dublett vom Triplet vom Dublett), dtt (Dublett vom Triplet vom Triplet) und m (Multiplet) abgekürzt. Für eine gaschromatographische-massenspektrometrische Analyse wurde ein Agilent Gaschromatograph 7890A mit Autosampler 7693 mit einer HP-5 Phenylmethylpolysiloxan,

30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$  gekoppelt an ein Massenspektrometer 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector verwendet. Folgende Parameter wurden dazu eingestellt:

GC-Injektor: Temperatur: 270  $^{\circ}\text{C}$

Injektionsvolumen: 1  $\mu\text{l}$ , splitless

GC-Ofen: Temperaturprogramm: 60  $^{\circ}\text{C}$  für 2 Min., Anstieg mit 40  $^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$  auf 110  $^{\circ}\text{C}$ , Anstieg mit 13  $^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$  auf 300  $^{\circ}\text{C}$  für 25 Min.

Trägergas: Helium

Flussrate: 0,9 ml/Min.

MS: Scan-Modus (m/z 33,0 - 550)

### 3.3.1. Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin

Die Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin (siehe Abbildungen 12 - 14) erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Grunewald et al. (1999) [121].

#### Schritt 1: Synthese des N-Acetylmethylphenylethylamins aus Methylphenylethylamin

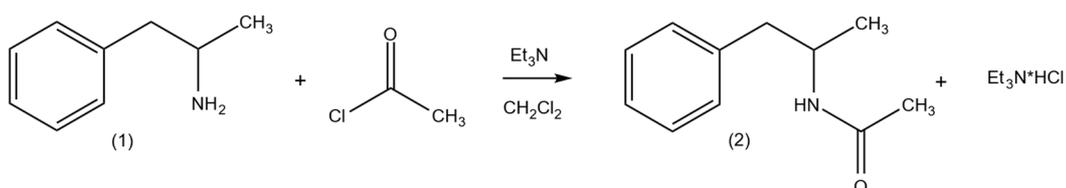


Abbildung 12: Reaktionsschema von Methylphenylethylamin (1) mit Acetylchlorid unter Verwendung von Triethylamin in Dichlormethan zu N-Acetylmethylphenylethylamin (2).

Unter Schutzatmosphäre wurde in einem ausgeheizten 100 ml Rundkolben Methylphenylethylaminsulfat (1) (0,471 g; 2,04 mmol) vorgelegt und mit trockenem Dichlormethan (40 ml) versetzt. Unter Rühren wurde der Ansatz im Eisbad heruntergekühlt. Anschließend wurden trockenes Triethylamin (0,917 ml; 6,62 mmol) und Acetylchlorid (0,280 ml; 3,95 mmol) vorsichtig zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde zunächst mit Salzsäure (2 N, 30 ml) gewaschen. Im Anschluss wurden die wässrige und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde nachfolgend zwei Mal mit Dichlormethan (je 10 ml) extrahiert. Die organischen

Phasen wurden vereint und erneut mit 2 N Salzsäure (10 ml) sowie mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (10 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (10 ml) gewaschen. Mit wasserfreiem Natriumsulfat wurde die organische Phase getrocknet und über einen Faltenfilter filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung des Produkts erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel. Dabei wurde als mobile Phase ein Lösungsmittelgemisch bestehend aus N-Hexan/Ethylacetat (2/1 v/v) mit 1 % Methanol verwendet. Der Extrakt wurde in Dichlormethan gelöst auf die Säule aufgetragen.

### Schritt 2: Synthese des 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolins aus N-Acetylmethylphenylethylamin

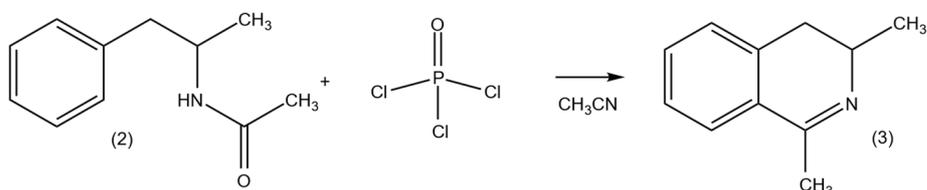


Abbildung 13: Reaktionsschema von N-Acetylmethylphenylethylamin (2) mit Phosphoroxychlorid in Acetonitril zu 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (3).

Unter Schutzatmosphäre wurden in einem ausgeheizten 250 ml Kolben N-Acetylmethylphenylethylamin (2) (0,324 g; 1,83 mmol) in trockenem Acetonitril (55 ml) gelöst. Anschließend wurde Phosphoroxychlorid (0,880 ml; 9,41 mmol) vorsichtig zugetropft und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde im Anschluss über Nacht bei 90 °C unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde eiskaltes Wasser (50 ml) zu dem Ansatz hinzugegeben und für ca. 10 Min. gerührt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin zwei Mal mit Dichlormethan (je 30 ml) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 M Ammoniaklösung (20 ml) basisch gestellt (pH 10-11) und erneut drei Mal mit Dichlormethan (je 30 ml) extrahiert. Nachfolgend wurden die organischen Phasen vereint und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Der Extrakt wurde über einen Faltenfilter abfiltriert und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend in Anlehnung an Schritt 1 säulenchromatographisch aufgereinigt mit der Ausnahme, dass die Probe in N-Hexan/Ethylacetat (2/1 v/v) mit 1 % Methanol aufgenommen und aufgetragen wurde.

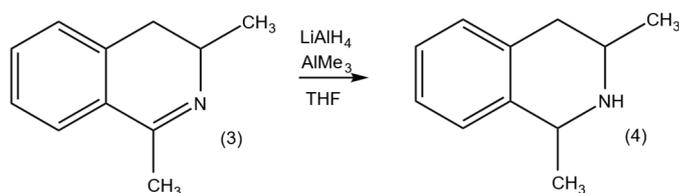
Schritt 3: Synthese des 1,3-diMeTIQs aus 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin

Abbildung 14: Reaktionsschema von 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (3) zu 1,3-diMeTIQ (4) unter Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid, Trimethylaluminium in Tetrahydrofuran.

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde unter Schutzatmosphäre Lithiumaluminiumhydrid (346 mg; 9,12 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (20 ml) gelöst und mit einem Gemisch aus Trockeneis und Aceton gekühlt. Weiterhin wurden in den Schlenkkolben das in trockenem Tetrahydrofuran (20 ml) gelöste 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (**3**) (140 mg; 0,877 mmol) und 2 M Trimethylaluminium in Hexan (3,18 ml; 6,36 mmol) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  (mittels Trockeneis/Aceton), für eine Stunde bei  $-45\text{ }^\circ\text{C}$  (mittels Trockeneis/Acetonitril), für eine weitere Stunde bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (mittels Eis/Natriumchlorid) und zum Schluss eine Stunde lang bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit Tetrahydrofuran (10 ml) verdünnt sowie mit Natriumfluorid (3,66 mg; 87,2 mmol) und Wasser (1,23 ml) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann über eine Fritte unter Verwendung von Celit abfiltriert. Das Filtrat wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingedunstet, erneut in Dichlormethan gelöst und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Im Anschluss wurde das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Dichlormethan, Methanol und wässriger Ammoniaklösung (10/1/0,05 v/v/v), gereinigt. Von der ersten und der letzten positiv getesteten Fraktion der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde ein separates  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen sowie nach Verdünnung (1:100) eine GC-MS-Analyse durchgeführt. Zuletzt wurde das aufgereinigte Produkt in Diethylether (10 ml) gelöst und mit methanolischer Bromwasserstoffsäure (100  $\mu\text{l}$ ) unter Rühren versetzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt.

## 3.3.2. Synthese des N-Me-1,3-diMeTIQs aus 1,3-diMeTIQ

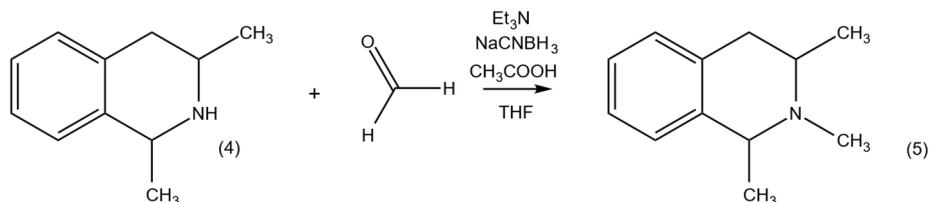


Abbildung 15: Reaktionsschema von 1,3-diMeTIQ (4) zu N-Me-1,3-diMeTIQ (5) unter Verwendung von Formaldehyd, Triethylamin, Natriumcyanoborhydrid und Essigsäure in Tetrahydrofuran.

Die Synthese erfolgt in Anlehnung an Khong & Judeh (2016) [122] (siehe Abbildung 15). In einem 50 ml Kolben wurde 1,3-diMeTIQ (4) (30 mg; 0,124 mmol) in Tetrahydrofuran (10 ml) gelöst. Zudem wurden Triethylamin (20  $\mu$ l; 0,149 mmol), Formaldehyd (930  $\mu$ l; 11,5 mmol), Natriumcyanoborhydrid (122 mg; 1,94 mmol) und Essigsäure (222  $\mu$ l; 3,88 mmol) nacheinander hinzugegeben. Der Ansatz wurde über 24 Stunden gerührt und anschließend mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure (2 ml) versetzt und mit 0,1 M Natriumhydroxidlösung auf pH 11 eingestellt. Weiterhin wurde Wasser (30 ml) zu dem Ansatz hinzugefügt und im Scheidetrichter fünf Mal mit Dichlormethan (je 20 ml) extrahiert. Der Extrakt wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und über einen Faltenfilter abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel säulenchromatographisch unter Verwendung eines Lösungsmittelgemischs aus Dichlormethan, Methanol und wässriger Ammoniaklösung (10/1/0,05 v/v/v) aufgereinigt. Das Produkt wurde in Diethylether (5 ml) gelöst und mit Bromwasserstoffsäure (50  $\mu$ l) versetzt. Zuletzt wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

### 3.4. Methoden – Analytik

Im Folgenden werden das entwickelte flüssigchromatographische-massenspektrometrische Analyseverfahren sowie die Gewebehomogenisierungen mit den anschließenden Flüssig-Flüssig-Extraktionen für die hier untersuchten Gehirn-, Leber- und Serumproben vorgestellt. Darüber hinaus wird die Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit überprüften Validierungsparameter beschrieben.

#### 3.4.1. Analyseverfahren

Für die Analyse der TIQs und deren Ausgangsstoffe wurde ein ACQUITY UPLC LC-System, gekoppelt mit einem TQ-Detektor, verwendet. Eine ACE® Excel™ C18-AR Säule (2,1 x 150 mm, Porengröße 2 µm) wurde zur chromatographischen Trennung ausgewählt. Im Folgenden werden die im Vorfeld optimierten chromatographischen Bedingungen vorgestellt:

- Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser; Fließmittel B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
- Injektionsvolumen / -modus: 10 µl im *Partial Loop Overfill*
- Flussrate: 0,55 ml/min
- Ofentemperatur: 60 °C
- Gradientenzusammensetzung:

Zeit in Min.	Fließmittelverhältnis A : B in %
0	95 : 5
4,00	71 : 29
7,50	50 : 50
8,25	5 : 95
8,75	5 : 95
9,00	95 : 5
11,50	95 : 5

Durch die Optimierung der massenspektrometrischen Parameter konnten die in Tabelle 2 zusammengefassten MRM-Übergänge, *Cone* und *Collision*-Energien zusammen mit den Verhältnissen aus Qualifier- und Targetübergang für die entsprechenden Verbindungen ermittelt werden. Zudem wurden die folgenden massenspektrometrischen Parameter definiert:

- Modus: ESI positiv
- Source Temperature: 150 °C
- Desolvation Temperature: 400 °C
- Desolvation Gas Flow: 800 l/h
- Cone Gas Flow: 20 l/h
- Collision Gas Flow: 0,2 ml/Min.

Tabelle 2: TIQs - Retentionszeiten in Min., MRM-Übergänge, Verhältnisse von Qualifier- zu Targetübergang\* in % mit den jeweiligen optimierten Parametern für die *Cone*- und *Collision*-Energien in V.

Analyt	Retentionszeit in Min.	Molekülion [M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragmention m/z	Verhältnis Qualifier- zu Targetübergang in %	<i>Cone</i> Energie in V	<i>Collision</i> Energie in V
D <sub>11</sub> -1-MeTIQ	3,68	156,0	96,0 126,0*	10	35 35	30 25
1,3-diMeTIQ	3,89/4,15**	162,0	117,0 145,0*	47 / 44**	28 28	22 12
1,3-diMe-7,8-MDTIQ	4,24/4,57**	206,0	105,0 163,0*	15 / 19**	28 28	24 15
N-Me-1,3-diMeTIQ	4,28	176,0	117,0 145,0*	56	28 28	20 14
N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ	4,62	220,0	131,0 163,0*	9	26 26	25 12

\*\*Retentionszeiten und MRM-Übergänge der jeweiligen trans- und cis-Diastereomerenpaare

Für die Analyse von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA wurden die massenspektrometrischen Parameter aus der MRM-Routine-Methode des Instituts für Rechtsmedizin Düsseldorf übernommen, welche in Tabelle 3 dargestellt sind.

Tabelle 3: Amphetamin, Amphetaminderivate und interne Standards - Retentionszeiten in Min., MRM-Übergänge, Verhältnisse von Qualifier- zu Targetübergang\* in % mit den jeweiligen optimierten Parametern für die *Cone*- und *Collision*-Energien in V (übernommen aus der Routine-Methode des Instituts für Rechtsmedizin Düsseldorf).

Analyt	Retentionszeit in Min.	Molekülion [M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragmention m/z	Verhältnis Qualifier- zu Targetübergang in %	<i>Cone</i> Energie in V	<i>Collision</i> Energie in V
Amphetamin	3,41	136,1	91,1 119,1*	67	15 15	23 8
D <sub>11</sub> -Amphetamin	3,29	147,3	130,2 98,2*	63	15 15	8 23

Analyt	Retentionszeit in Min.	Molekülion [M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragmention m/z	Verhältnis Qualifizier- zu Targetübergang in %	Cone Energie in V	Collision Energie in V
Methamphetamin	3,78	150,1	119,1 91,1*	47	20 20	10 12
MDA	3,83	180,1	133,1 163,1*	19	22 22	18 10
D <sub>5</sub> -MDA	3,78	185,1	138,1 168,1*	26	22 22	18 10
MDMA	4,15	194,1	133,1 163,0*	32	20 20	20 14

### 3.4.2. Extraktionsmethoden

Die Extraktion der Gehirn- und Leberproben für die anschließende chromatographisch-massenspektrometrische Analyse der TIQs, des Amphetamins und der Amphetaminderivate wurde in Anlehnung an Kohno et al. (1986) [115] und die Homogenisierung des Lebergewebes zusätzlich in Anlehnung an Hara et al. (2009)[123] entwickelt.

#### Extraktion der Gewebeproben

Zu Beginn der Extraktion der TIQs und der Amphetamine aus Gehirn- und Lebergewebe war zunächst eine Homogenisierung erforderlich:

500 mg der Leberprobe wurden mit einer Sektionsschere grob zerkleinert, mit 1 ml verdünnter Salzsäure (0,1 M) sowie 10 µl des internen Standards (c (D<sub>11</sub>-Amphetamin, D<sub>5</sub>-MDA) = 5 ng/µl; c (D<sub>11</sub>-1-MeTIQ) = 10 ng/µl) versetzt und für eine Stunde bei 70 °C in einer geschlossenen 10 ml Injektionsflasche inkubiert. Anschließend wurden sowohl die Probe als auch die Salzsäure in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Gewebe erneut mit einer Sektionsschere zerkleinert. Im Anschluss wurde dem Ansatz eine Stahlkugel zugesetzt, die die Probe für 10 Min. auf einem Schüttelteller homogenisiert.

Für die Homogenisierung des Gehirngewebes wurden 500 mg Probe mit internem Standard (s. o.), 0,5 ml verdünnter Perchlorsäure (0,4 M) und einer Stahlkugel versetzt. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Probe auf dem Schüttelteller.

Nachfolgend wurden die Gehirn- und die Leberproben für 10 Min. bei 10 °C zentrifugiert (14000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut mit 0,4 ml Salzsäure (0,1 M – Leber) bzw. 0,4 ml Perchlorsäure (0,4 M – Gehirn) für 10 Min. auf dem Schüttelteller aufgeschlämmt und für 10 Min. bei 10 °C zentrifugiert (14000 rpm). Die jeweiligen Überstände der Leber- und Gehirnproben wurden vereint und mit 0,9 ml Diethylether gewaschen.

Sofern sich bei einer Leberprobe aufgrund eines sehr hohen Fettgehalts eine Emulsionsschicht zwischen der wässrigen und der organischen Phase gebildet hatte, wurde die organische Diethyletherphase soweit wie möglich abgenommen. Die wässrige Phase sowie die darüberstehende Emulsion wurden gut durchmischt und nachfolgend gemeinsam extrahiert.

Im nächsten Schritt wurden zu den Ansätzen 100 µl Isopropanol, 500 µl Dichlormethan und 75 µl Natronlauge (6 M) gegeben und abermals für jeweils 10 Min. gemischt und zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden grob abgenommen und erneut mit Dichlormethan extrahiert. Die akkurate Trennung der organischen und der wässrigen Phase erfolgte durch Durchstechen des Eppendorfgefäßes mit einer Nadel und durch Ablassen der Dichlormethanphase in ein neues Gefäß. Die organischen Extrakte derselben Probe wurden vereint und mit 0,9 ml Salzsäure (0,1 M) versetzt. Nach Durchmischung und Zentrifugation der Proben für jeweils 10 Min. wurde die wässrige saure Phase mit 75 µl Natronlauge und 500 µl Dichlormethan extrahiert. Die Proben wurden ein weiteres Mal für 10 Min. gemischt und zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden abgetrennt, mit 20 µl methanolischer Salzsäure (0,1 M) versetzt und unter einem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur bis zur Trockne eingedampft. Die Extrakte wurden schließlich in 60 µl Fließmittel (Wasser / Methanol, 95/5, v/v) und 0,1 % Ameisensäure aufgenommen.

Bei offensichtlich stark fäulnisveränderten Gehirnproben wurde eine leicht veränderte Extraktionsmethodik angewandt, um so weniger Fäulnisprodukte zu extrahieren und ohne große Verluste der TIQs zu verzeichnen. Dazu wurden nach dem Waschen der Proben mit Diethylether 250 µl Methanol anstatt 100 µl Isopropanol und 500 µl Isooctan anstelle des Dichlormethans zu den Ansätzen hinzupipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte in Analogie zu der oben beschriebenen Methode.

### Flüssig-Flüssig-Extraktion der Serumproben

Die Isolation der TIQs und der Amphetamine aus der Blutmatrix erfolgte durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µl des internen Standards ( $c(\text{D}_{11}\text{-Amphetamin}, \text{D}_5\text{-MDA}) = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ;  $c(\text{D}_{11}\text{-1-MeTIQ}) = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) vorgelegt und 500 µl der Blutprobe hinzugefügt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 50 µl Natronlauge (2 N) und 500 µl eines Extraktionsmittelgemisches bestehend aus Dichlormethan / Diethylether (70/30, v/v). Nach Durchmischung und anschließender Zentrifugation des Ansatzes für jeweils 10 Min., wurde die organische Phase durch Durchstechen des Reaktionsgefäßes mit einer Nadel abgelassen und so von der wässrigen Phase abgetrennt. Vor der Evaporation der Probe unter einem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur wurden dem Extrakt 20 µl einer verdünnten methanolischen Salzsäure (0,1 M) zugesetzt. Nach dem Trocknen wurde die Probe in 60 µl des Fließmittelgemisches Wasser / Methanol (95/5, v/v) und 0,1 % Ameisensäure rekonstituiert.

#### 3.4.3. Validierung

Nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologie und forensische Chemie (GTFCh) ist im Rahmen einer Validierung die Zuverlässigkeit des Analyseverfahrens zu beweisen, um qualitative und reproduzierbare Ergebnisse sowie eine eindeutige Interpretation der Daten zu garantieren [124]. Dazu wurden die im nachfolgenden beschriebenen Parameter in der jeweiligen Probenmatrix bestimmt. Die Gewebeproben (Gehirn und Leber) wurden dabei nach Dotierung für einen Tag im Kühlschrank bei 8 °C gelagert, um eine annähernd realistische Substanzverteilung im Gewebe zu ermöglichen. Die Extraktion und die anschließenden flüssigchromatographische-massenspektromerische Analyse erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, nach den in Kapitel 3.4.2 und 3.4.1 aufgeführten Verfahren. Die Proben wurden im Anschluss an die Extraktion bis zur Messung bei -20 °C gelagert, sofern eine direkte Messung nicht möglich war. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde das Excel-basierte Programm Valistat 2.0 herangezogen.

### Selektivität und Spezifität

Die Bestimmung der Selektivität und der Spezifität erfolgte in Anlehnung an die Validierungsrichtlinien von Peters *et al.*, 2009 [124] durch die Extraktion sechs verschiedener humaner Leerproben (Serum, Gehirn und Leber) ohne den Zusatz eines internen Standards (Blankproben) sowie jeweils zwei verschiedener humaner Leermatrizes versetzt mit einem internen Standard (Nullproben).

### Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei MS-basierten Verfahren lassen sich über eine Kalibration bestehend aus mindestens fünf verschiedenen konzentrierter aufgestockter Leermatrizes ermitteln [124]. Für die Bestimmung der Parameter wurden für die verschiedenen Matrizes unterschiedliche Konzentrationsbereiche gewählt (Gehirn: 0,5 ng/g bis 25 ng/g; Serum: 0,1 bis 5,0 ng/ml; Leber: 0,75 bis 12,5 ng/g). In Valistat 2.0 wurde ein Signifikanzniveau von 99 % und  $k = 3$  zu Grunde gelegt. Die Messungen erfolgten in Einfachbestimmung.

### Wiederfindung und Matrixeffekte

Für die Bestimmung der Wiederfindung und der Matrixeffekte wurden für die drei verschiedenen Matrizes je sechs Kontrollproben, sechs aufgestockte Matrixproben und sechs aufgestockte Extrakte in jeweils einem Konzentrationslevel nahe der Bestimmungsgrenze ( $c(\text{Gehirn}) = 4 \text{ ng/g}$ ;  $c(\text{Leber}) = 4 \text{ ng/g}$ ;  $c(\text{Serum}) = 1 \text{ ng/g}$ ) hergestellt, extrahiert und vermessen. Hierbei standen drei verschiedene Leermatrixquellen für Leber, vier für Gehirn und fünf für Serum zur Verfügung.

### Stabilität

Für die nachfolgend beschriebenen Stabilitätsversuche wurden die Probenkonzentrationen in Analogie zur Wiederfindung und der Matrixeffekte gewählt. Um die Stabilität der aufgearbeiteten Proben über die Dauer einer durchschnittlichen Messreihe (*processed sample stability*) im Gerät zu ermitteln, wurden jeweils sechs Gehirn-, sechs Leber- und sechs Serumproben extrahiert. Vor dem Einengen unter einem Stickstoffstrom wurden die entsprechenden Extrakte gepoolt, mit 120  $\mu\text{l}$  methanolischer HCl (0,1 M) versetzt und nach dem Eindampfen in 360  $\mu\text{l}$  Fließmittelgemisch (Wasser / Methanol, 95/5 v/v)

aufgenommen. Zuletzt wurden die Proben in sechs Aliquote aufgeteilt. Die Aliquote der Hirn- und Leberproben wurden über einen Zeitraum von fünf Stunden und die der Serumproben über eine Dauer von achteinhalb Stunden bei 10 °C im Probenraum vermessen.

Für die Bestimmung der Einfrier- und Auftaustabilität wurden verschiedene Vergleichsproben hergestellt. Zum einen unbehandelte Kontrollen (dotierte Kontrollproben und undotierte Blindkontrollen) sowie Proben, die mehreren Einfrier- und Auftauzyklen unterzogen wurden (dotierte Stabilitätsproben und undotierte Stabilitätsblindproben). Die Konzentrationen der dotierten Proben wurden in Analogie zur Bestimmung der Wiederfindung und der Matrixeffekte gewählt. Die unbehandelten Kontrollen wurden direkt extrahiert und die Stabilitätsproben zunächst bei -20 °C gelagert. Diese durchliefen vor der Extraktion folgende Einfrier- und Auftauzyklen: Gehirnproben: drei Zyklen über drei Tage; Leberproben: drei Zyklen über drei Wochen; Serumproben: vier Zyklen über dreizehn Tage), wobei die Auftauzeit jeweils eine Stunde betrug.

Für die Überprüfung der Langzeitstabilität der besagten Matrices wurden ebenfalls neun unbehandelte Kontrollproben (sechs davon dotiert und drei undotiert) sowie neun Stabilitätsproben angesetzt, wobei Letztere vor der Extraktion je nach Matrix über unterschiedliche Zeitspannen bei -20 °C gelagert wurden (Gehirnproben: 100 Tage; Leberproben: 53 Tage; Serumproben: 65 Tage).

### Kalibrationsbereich

Der Kalibrationsbereich, in dem sich das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard durch ein mathematisches Modell zu den Analytkonzentrationen in Beziehung setzen lässt, wurde im Rahmen dieser Arbeit für Amphetamin und deren Derivate über die Herstellung von zehn unterschiedlich konzentrierter Level im Serum in Sechsfachbestimmung ermittelt. Die Level wurden so gewählt, dass sie der erwartenden Probenkonzentration entsprechen. Für Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA lag der Bereich bei 25 bis 625 bzw. 750 ng/ml. Dabei ist zu erwähnen, dass der niedrigste Level so gewählt wurde, dass dieser oberhalb der Bestimmungsgrenze des entsprechenden Analyten lag.

### Quantifizierung

Um die Konzentrationen der Amphetamine auch in den Gewebeproben bestimmen zu können, wurde neben der Kalibration im Serum zudem eine Kalibration in Doppelbestimmung in Gehirn angesetzt. Da kein humanes Probenmaterial in ausreichendem Maße zur Verfügung stand, wurde auf Gehirngewebe vom Schwein zurückgegriffen. Der Konzentrationsbereich lag bei 25 bis 500 ng/g.

## 4. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Syntheseschritte für die Umwandlung von Methylphenylethylaminsulfat in 1,3-diMeTIQ (Kapitel 4.1.1) und die darauffolgende Umsetzung in N-Me-1,3-diMeTIQ (Kapitel 4.1.2) beschrieben. Anschließend folgen die Ergebnisse der Teilvalidierung und die Untersuchung der realen Blut- und Gewebeproben.

### 4.1. Synthese

Nach der Synthese der oben genannten Substanzen erfolgte deren Identifizierung mit Hilfe eines NMR-Spektrometers und dem Abgleich der daraus folgenden Spektren mit den von Grunewald et al. publizierten Daten [121]. Zudem wurde für die Unterscheidung der Stereoisomere der hier synthetisierten TIQs eine gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse durchgeführt (siehe 4.1.1 Schritt 3).

#### 4.1.1. Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin

##### Schritt 1: Synthese des N-Acetylmethylphenylethylamins aus Methylphenylethylamin

Nach der Reaktion von Methylphenylethylaminsulfat (**1**) mit Acetylchlorid unter Verwendung von Triethylamin und der anschließenden Extraktion sowie der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde ein milchiges Öl erhalten. Dieses konnte über ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum als N-Acetylmethylphenylethylamin (**2**) identifiziert werden ( $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  7.33 – 6.98 (m, 5H), 5.23 (s, 1H), 4.19 (dtd,  $J = 8.3, 6.9, 5.6$  Hz, 1H), 2.92 – 2.50 (m, 2H), 1.86 (s, 3H), 1.04 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H)). Die Ausbeute belief sich auf 324 mg (1,83 mmol; 89 %).

##### Schritt 2: Synthese des 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolins aus N-Acetylmethylphenylethylamin

Nach der Reaktion von N-Acetylmethylphenylethylamin (**2**) mit Phosphoroxychlorid und der anschließenden Extraktion und Säulenchromatographie wurden 140 mg (0,877 mmol; 48 %) eines dunkelgelben Öls erhalten. Die Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums hat gezeigt, dass es sich bei diesem Produkt um das 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (**3**) handelt ( $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Chloroform-d)

$\delta$  7.53 – 7.14 (m, 4H), 3.57 (dtt,  $J = 12.1, 6.9, 1.8$  Hz, 1H), 2.76 (dd,  $J = 15.7, 5.2$  Hz, 1H), 2.50 (dd,  $J = 15.7, 12.3$  Hz, 1H), 2.41 (d,  $J = 1.9$  Hz, 3H), 1.40 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H)).

### Schritt 3: Synthese des 1,3-diMeTIQs aus 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin

Die Reaktion von 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (**3**) mit Triethylamin und Lithiumaluminiumhydrid führte zu dem Reaktionsprodukt 1,3-diMeTIQ (**4**), wie durch die Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums festgestellt werden konnte ( $^1\text{H NMR}$  (600 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  7.23 – 7.04 (m, 4H), 4.31 – 4.16 (m, 1H), 3.38 – 3.04 (m, 1H), 2.80 (ddd,  $J = 27.0, 16.2, 3.8$  Hz, 1H), 2.64 – 2.45 (m, 1H), 1.50 (dd,  $J = 10.5, 6.7$  Hz, 3H), 1.26 (dd,  $J = 17.0, 6.3$  Hz, 3H)). Die Ausbeute belief sich dabei auf 50,6 mg (0,314 mmol; 36 %). Die Überführung des 1,3-diMeTIQs (**4**) in die Bromwasserstoffsalzform hat 53,7 mg (0,222 mmol; 70 %) hellgelber schuppenartiger Salzkristalle ergeben.

Nach der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel wurden von der ersten und der letzten positiv getesteten Fraktion ein separates  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen sowie nach Verdünnung (1:100) eine GC-MS-Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). In der ersten positiv getesteten Fraktion (13) erschien lediglich ein Peak nach 7,52 Min mit dem zu erwartenden Massenspektrum des 1,3-diMeTIQ [EI-MS (70 eV):  $m/z$  (%) 161 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}^+$ , 2), 160 ( $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}^+$ , 11), 146 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}^+$ , 100), 129 (14), 117 (33)]. In der letzten positiv getesteten Fraktion (24) konnten dagegen zwei Peaks mit dem gleichen Spektrum aufgenommen werden ( $t_{\text{R}}$  (Peak 1) = 7,52 Min.;  $t_{\text{R}}$  (Peak 2) = 7,54 Min.), wobei der zweite Peak eine höhere Intensität aufwies.

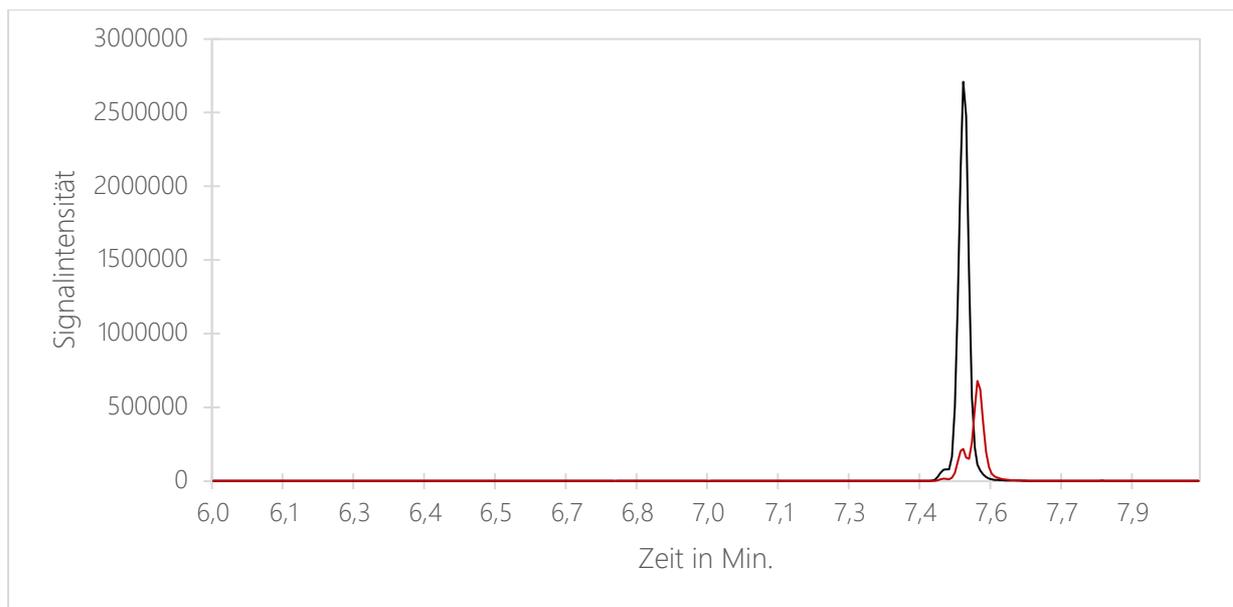


Abbildung 16: Zwei übereinanderliegende Scan-Chromatogrammausschnitte nach GC-MS-Analyse der Fraktionen 13 (schwarz) und Fraktion 24 (rot) aus der säulenchromatographischen Aufreinigung des 1,3-diMeTIQs (gelöst in  $\text{CDCl}_3$ , Konzentration unbekannt).

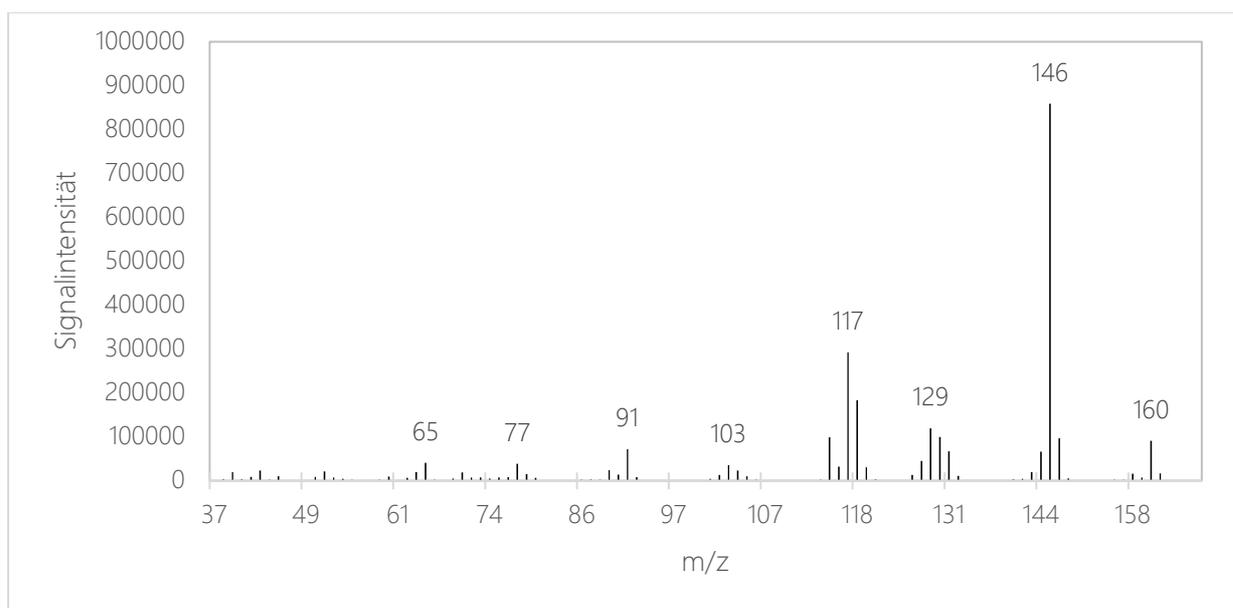


Abbildung 17: Massenspektrum von Peak 1 ( $t_R = 7,52$  Min.) nach GC-MS-Analyse der Fraktion 13 aus der säulenchromatographischen Aufreinigung des 1,3-diMeTIQs (gelöst in  $\text{CDCl}_3$ , Konzentration nicht bekannt).

Die Aufnahme eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums der Fraktion 13 ergab die folgenden Daten:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  7.21 – 7.04 (m, 4H), 4.18 (q,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 3.13 – 3.04 (m, 1H), 2.76 (dd,  $J = 16.1, 3.6$  Hz, 1H), 2.61 (dd,  $J = 16.1, 11.1$  Hz, 1H), 1.50 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.27 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

#### 4.1.2. Synthese des N-Me-1,3-diMeTIQs aus 1,3-diMeTIQ

Die Reaktion von 1,3-diMeTIQ (**4**) zu N-Me-1,3-diMeTIQ (**5**) erfolgte unter Verwendung von Formaldehyd, Triethylamin, Natriumcyanoborhydrid und Essigsäure. Nach der Extraktion und der säulenchromatographischen Aufreinigung wurden 18,9 mg (0,108 mmol; 87 %) eines orange-rötlichen Öls erhalten. Das Öl ließ sich nicht mit methanolischer Bromwasserstoffsäure in die Salzform überführen. Nach der Aufnahme eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum hat sich gezeigt, dass es sich bei dem Öl um das gewünschte Produkt N-Me-1,3-diMeTIQ handelt ( $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.15 – 6.96 (m, 4H), 3.92 – 3.81 (m, 1H), 3.32 – 2.78 (m, 1H), 2.78 – 2.53 (m, 2H), 2.31 (d,  $J = 19.6$  Hz, 3H), 1.42 (dd,  $J = 42.0, 6.8$  Hz, 3H), 1.19 (dd,  $J = 26.0, 6.4$  Hz, 3H)).

#### 4.2. Analytik

Die Untersuchung der hier vorliegenden 26 Gehirn-, 28 Leber- und 42 Blutproben auf die TIQs 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ und deren Ausgangsstoffe Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA erfolgte nach Optimierung der Extraktions- und LC-MS/MS-Methode sowie nach anschließender Teilvalidierung. Die zu untersuchenden Proben wurden im Vorfeld positiv auf Amphetamin bzw. die Amphetaminderivate Methamphetamin, MDA und MDMA sowie Ethanol getestet.

Das in Abbildung 18 dargestellte LC-MS-Chromatogramm zeigt eine mit den oben genannten Tetrahydroisochinolin- und Amphetamin- dotierte humane Gehirnkontrollprobe in einer Konzentration von 4 ng/g. Die während der Methodenentwicklung ermittelten Retentionszeiten der Substanzen wurden bereits in Kapitel 3.4.1 in den Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet. Aus dem Chromatogramm und oben genannten Tabellen ist ersichtlich, dass die Amphetamine geringfügig früher eluieren als die TIQs (Amphetamin ( $t_R = 3,43$  Min.); Methamphetamin ( $t_R = 3,82$  Min.); MDA ( $t_R = 3,84$  Min.); MDMA ( $t_R = 4,18$  Min.); 1,3-diMeTIQ ( $t_R = 3,92$  Min. und 4,19 Min.); 1,3-diMe-7,8-MDTIQ ( $t_R = 4,25$  Min. und 4,61 Min.); N-Me-1,3-diMeTIQ ( $t_R = 4,32$  Min.); N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ ( $t_R = 4,64$  Min.)). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass sich die beiden trans-Isomere (trans-1R,3R und trans-1S,3S) und die beiden cis-Isomere (cis-1R,3S und cis-1S,3R) des 1,3-diMeTIQ

( $t_R$  (Peak 4a) = 3,92 Min. und  $t_R$  (Peak 4b) = 4,19 Min.) und des 1,3-diMe-7,8-MDTIQ ( $t_R$  (Peak 6a) = 4,25 Min. und  $t_R$  (Peak 6b) = 4,61 Min.) chromatographisch trennen ließen. Eine derartige vollständige Trennung dieser beiden Diastereomerenformen war für die stickstoffmethylierten TIQs N-Me-1,3-diMeTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ unter den vorliegenden chromatographischen Bedingungen nicht möglich. Daher wurden alle vier Diastereomere dieser beiden Substanzen in jeweils einem Peak dargestellt (Peak 7 und 8).

Weiterhin ist anzumerken, dass die trans- und cis-Diastereomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (Peak 6a und 6b) ein anderes Verhältnis zueinander aufwiesen als die des 1,3-diMeTIQs (Peak 4a und 4b). Letztere besaßen ein annähernd gleiches Verhältnis zueinander. Die beiden trans-Diastereomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQs lagen jedoch in einem deutlich höheren Anteil (83 %) vor als die cis-Isomere (siehe Abbildung 18).

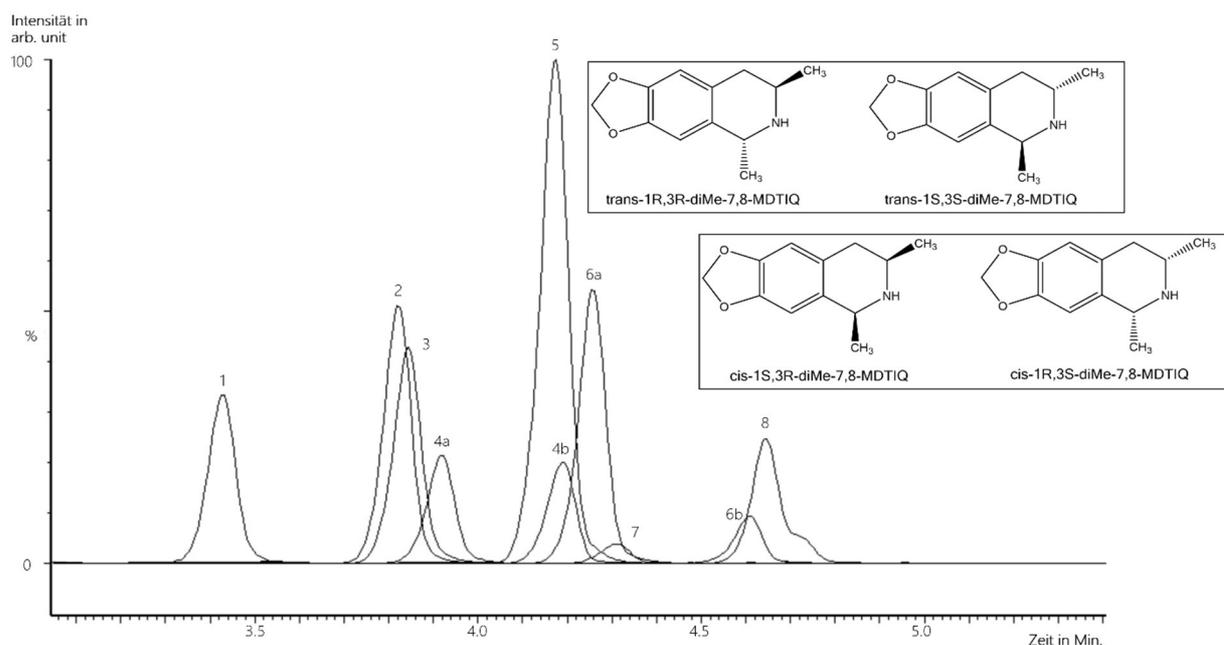


Abbildung 18: Chromatogrammausschnitt (Zeit in Minuten (Min.) vs. Intensität in arbitrary units (arb. Unit) dargestellt in Prozent (%) einer dotierten Kontrollprobe ( $c = 4 \text{ ng/g}$ ) in humanem Hirn nach Extraktion. 1: Amphetamin ( $t_R = 3,43 \text{ Min.}$ ); 2: Methamphetamin ( $t_R = 3,82 \text{ Min.}$ ); 3: MDA ( $t_R = 3,84 \text{ Min.}$ ); 4a+b: 1,3-diMeTIQ ( $t_R = 3,92 \text{ Min.}$  und  $4,19 \text{ Min.}$ ); 5: MDMA ( $t_R = 4,18 \text{ Min.}$ ); 6a+b: 1,3-diMe-7,8-MDTIQ ( $t_R = 4,25 \text{ Min.}$  und  $4,61 \text{ Min.}$ ); 7: N-Me-1,3-diMeTIQ ( $t_R = 4,32 \text{ Min.}$ ); 8: N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ ( $t_R = 4,64 \text{ Min.}$ ). Darstellung der Strukturformeln der trans- und cis-Isomere des 1,3-diMe-7,8MDTIQs (Peak 6a und 6b).

#### 4.2.1. Validierung

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der hier durchgeführten Teilvalidierung in den drei Matrices Gehirn, Leber und Serum vorgestellt. Dabei standen die eindeutige Identifizierung und die Stabilität der obengenannten Tetrahydroisochinoline und der Amphetamine im Vordergrund. Bei der Validierung wurden die Selektivität, die Spezifität sowie die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze, die Wiederfindung und die Matrixeffekte überprüft. Zudem wurden die Messstabilität (*processed sample stability*), die Einfrier- und Auftau- sowie die Langzeitstabilität ermittelt. Die Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA wurde zudem angestrebt, weshalb die Linearität dieser Substanzen in Serum geprüft und eine Kalibration in Serum und Gehirn erstellt wurde.

##### Selektivität und Spezifität

Die Bestimmung der Selektivität und der Spezifität der vier Tetrahydroisochinoline sowie von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA erfolgte wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Diese Proben wurden im Vorfeld negativ auf Amphetamin und Amphetaminderivate getestet. In Abbildung 19 wurden beispielhaft die Chromatogrammausschnitte zu dem Targetmassenübergang des 1,3-diMeTIQs ( $m/z$  162>145) in den jeweiligen humanen Hirn-, Leber- und Serumproben nach Extraktion dargestellt. Dabei stellen die Probe 1 die Reinsubstanzlösung, die Proben 2 bis 7 die Blankproben und die Proben 8 und 9 die Nullproben dar. Da es sich bei 1,3-diMeTIQ um ein Diastereomer handelt, sind in den Chromatogrammen jeweils bei 3,7 Min. und bei 4,0 Min. ein Peak je Diastereomerenpaar festzustellen. In keiner der gemessenen Gehirn-, Leber- und Serumproben konnten Störungssignale durch z. B. Matrixbestandteile oder anderer Stoffe zu diesen Retentionszeiten beobachtet werden. Auch die drei anderen TIQs sowie Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA waren störungsfrei. Im Chromatogrammausschnitt der Leberproben fällt in Abbildung 19 bei 3,27 Min. ein Peak auf, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um das Fäulnisamin Tryptamin handelt. Alle weiteren Signale in den unten stehenden Chromatogrammausschnitten sind auf endogene Substanzen oder unbekannte Stoffe zurückzuführen.

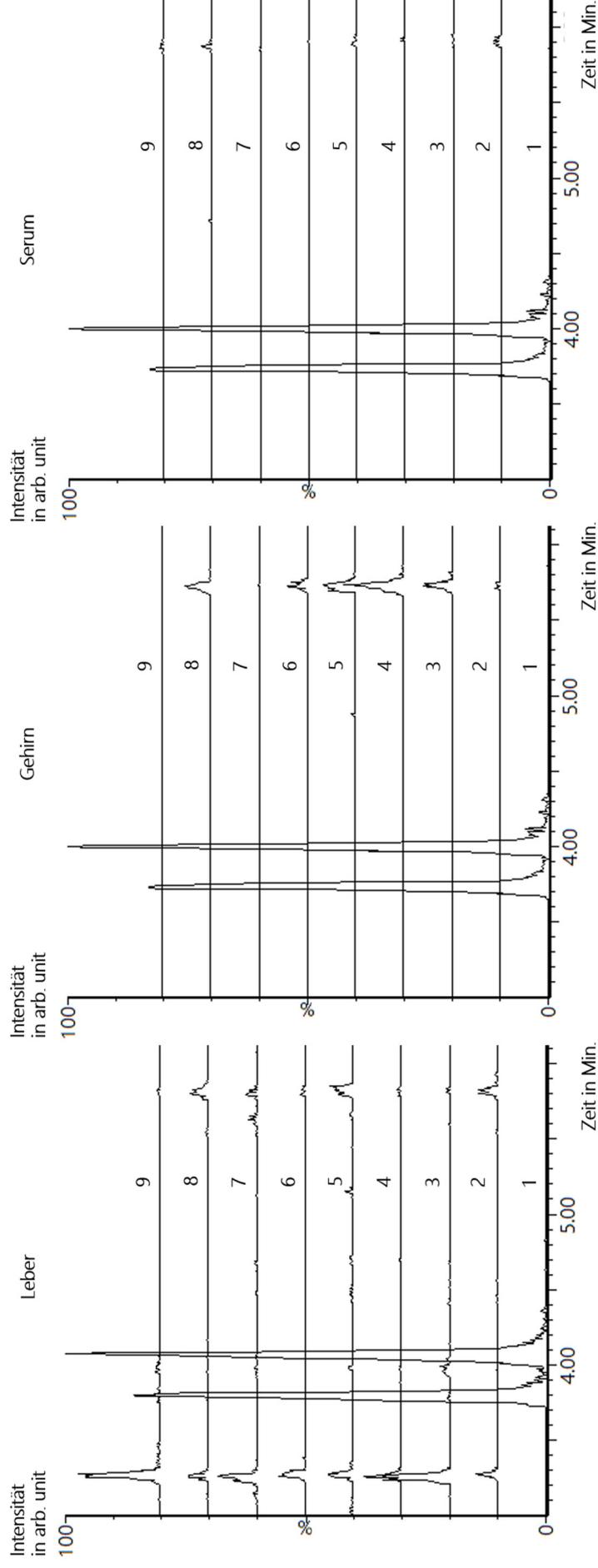
Selektivität und Spezifität

Abbildung 19: Chromatogrammausschnitte (Zeit in Minuten (Min.) vs. Intensität in arbitrary units (arb. Unit) dargestellt in Prozent (%)) mit einem inkrementierenden Offset von 10 % der Selektivitäts- und Spezifitätsmessungen in humaner Leber (links) und humanem Hirn (Mitte) sowie humanem Serum (rechts) nach Extraktion, beispielhaft dargestellt für den MRM-Übergang 162>145 des 1,3-diMeTIQs. Probe 1: Reinsubstanzlösung zur Darstellung der Retentionszeit; Proben 2 bis 7: Blankproben (Leermatrix ohne ISTD); Proben 8 und 9: Nullproben (Leermatrix mit ISTD). Im Chromatogrammausschnitt der Leberproben handelt es sich bei dem ersten Peak ( $t_R = 3,27$  Min.) mit aller Wahrscheinlichkeit um das Fäulnisamin Tryptamin und bei allen weiteren Signalen um endogene bzw. unbekannte Stoffe.

**Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenzen wurden in Gehirn, Leber und Serum in Einfachbestimmung ermittelt, indem mindestens fünf verschieden konzentrierte aufgestockte Leermatrizes hergestellt wurden. Für diese Kalibratoren wurden für die verschiedenen Matrizes unterschiedliche Konzentrationsbereiche gewählt (Gehirn: 0,5 bis 25 ng/g; Serum: 0,1 bis 5,0 ng/ml; Leber: 0,75 bis 12,5 ng/g) und ein Signifikanzniveau von 99 % sowie ein k-Wert von 3 für die Auswertung zu Grunde gelegt.

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass die niedrigsten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die TIQs in Serum ermittelt werden konnten (LoD: 0,1 - 0,3 ng/ml; LoQ: 0,2 - 1,2 ng/ml). Die höchsten LoDs von 2,2 ng/g und 4,5 ng/g wurden in Gehirn und Leber für die cis-Diastereomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (2) gemessen. Die niedrigste LoQ lag im Gehirn bei 1,1 ng/g (Methamphetamin) und in der Leber bei 0,9 ng/g (1,3-diMeTIQ (2)). Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA wiesen ausnahmslos eine Nachweisgrenze von 0,1 ng/g und ein LoQ von 0,3 ng/g bzw. 0,4 ng/g im Serum auf.

**Tabelle 4: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der TIQs und Amphetamine für die Matrizes Gehirn, Leber (jeweils in ng/g) und Serum (in ng/ml).**

Analyt	Gehirn		Leber		Serum	
	LoD in ng/g	LoQ in ng/g	LoD in ng/g	LoQ in ng/g	LoD in ng/ml	LoQ in ng/ml
1,3-diMeTIQ (1)	0,3	2,2	0,7	3,4	0,1	0,5
1,3-diMeTIQ (2)	0,3	1,2	0,1	0,9	0,2	0,6
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1)	0,4	1,6	1,3	1,5	0,1	0,2
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (2)	2,2	5,7	4,5	4,5	0,3	1,2
N-Me-1,3-diMeTIQ	1,3	3,6	1,2	2,2	0,3	0,6
N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ	1,1	1,9	1,2	6,3	0,5	2,0
Amphetamin	0,5	1,5	0,4	1,0	0,1	0,4
Methamphetamin	0,6	1,1	0,6	1,5	0,1	0,3
MDA	0,7	0,8	0,6	3,0	0,1	0,4
MDMA	0,4	1,9	0,4	1,2	0,1	0,3

LoD: Limit of Detection (Nachweisgrenze); LoQ: Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze); bei 1,3-diMeTIQ (1) und 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1) handelt es sich um die trans-Isomere, bei (2) um die cis-Diastereomerenformen.

### Wiederfindung und Matrixeffekte

Für die Bestimmung der Wiederfindung und der Matrixeffekte wurden die Proben wie in Kapitel 3.4.3 aufgearbeitet. Die Auswertung erfolgte anhand der absoluten Flächen der Analyten und ist der Tabelle 5 im Detail zu entnehmen.

Die Wiederfindungen im Gehirn und in der Leber lagen für alle TIQs und Amphetamine durchweg nahe der von der GTFCh geforderten Grenze von 50 %. In Serum wurden dagegen insgesamt höhere Wiederfindungen von 77 bis 86 % erzielt. Die kleinsten Wiederfindungen wurden für das TIQ N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ ermittelt (Gehirn: 41 %; Leber: 43 % und Serum 77 %). Methamphetamin wies dagegen die höchsten Wiederfindungen in Gehirn (53 %), Leber (52 %) und im Serum (85 %) auf. Darüber hinaus war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für alle Analyten in allen drei Matrices gegeben. Dies lässt sich anhand der durchweg geringen Standardabweichungen ( $SD \leq 20 \%$ ) ablesen.

Für die Matrixeffekte gilt nach den Richtlinien ein Grenzbereich von 80 bis 120 %. Dies konnte sowohl für die TIQs als auch für die Amphetamine mit mindestens 81 % (1,3-diMe-7,8-MDTIQ in Gehirn und Leber) im unteren Bereich und mit maximal 116 % (N-Me-1,3-diMeTIQ in Serum) im oberen Bereich in allen Matrices eingehalten werden. Allerdings lagen die Standardabweichungen, ermittelt in den Leberproben, für Amphetamin mit 30 %, für Methamphetamin und MDMA mit 26 % sowie für das N-Me-1,3-diMeTIQ mit 28 % ein wenig über dem Grenzwert von 25 %.

Tabelle 5: Wiederfindung und Matrixeffekte der TIQs und Amphetamine in % mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD), ermittelt in den Matrices Gehirn, Leber und Serum in einem Konzentrationslevel.

Analyt	Matrixeffekte in % ( $\pm$ SD)			Wiederfindung in % ( $\pm$ SD)		
	Gehirn	Leber	Serum	Gehirn	Leber	Serum
	c=4 ng/g	c=4 ng/g	c=1 ng/ml	c=4 ng/g	c=4 ng/g	c=1 ng/ml
1,3-diMeTIQ (1)	97 $\pm$ 2,9	94 $\pm$ 25	105 $\pm$ 12	50 $\pm$ 7,1	46 $\pm$ 12	84 $\pm$ 7,3
1,3-diMeTIQ (2)	96 $\pm$ 7,0	108 $\pm$ 24	99 $\pm$ 12	47 $\pm$ 7,0	47 $\pm$ 10	84 $\pm$ 7,5
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1)	96 $\pm$ 7,0	80 $\pm$ 19	106 $\pm$ 10	47 $\pm$ 7,4	47 $\pm$ 10	85 $\pm$ 8,8
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (2)	81 $\pm$ 17	81 $\pm$ 16	80 $\pm$ 18	48 $\pm$ 14	48 $\pm$ 9,8	79 $\pm$ 20
N-Me-1,3-diMeTIQ	102 $\pm$ 10	96 $\pm$ 28	116 $\pm$ 25	42 $\pm$ 9,3	51 $\pm$ 12	82 $\pm$ 20
N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ	100 $\pm$ 9,3	86 $\pm$ 25	78 $\pm$ 13	41 $\pm$ 5,5	43 $\pm$ 10	77 $\pm$ 12
Amphetamin	95 $\pm$ 4,2	96 $\pm$ 30	105 $\pm$ 9,1	41 $\pm$ 7,8	45 $\pm$ 10	77 $\pm$ 4,2
Methamphetamin	99 $\pm$ 4,8	100 $\pm$ 26	103 $\pm$ 6,4	53 $\pm$ 6,2	52 $\pm$ 12	85 $\pm$ 6,9
MDA	97 $\pm$ 6,2	107 $\pm$ 24	107 $\pm$ 7,0	49 $\pm$ 7,5	48 $\pm$ 9,5	82 $\pm$ 7,5
MDMA	90 $\pm$ 7,2	89 $\pm$ 26	106 $\pm$ 8,8	48 $\pm$ 7,0	48 $\pm$ 12	86 $\pm$ 6,7

Bei 1,3-diMeTIQ (1) und 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1) handelt es sich um die trans-Isomere, bei (2) um die cis-Diastereomerenformen.

### Stabilität

Die *processed sample stability* wurde, wie in Kapitel 3.4.3 aufgeführt, bestimmt. Ausgewertet wurden dabei die absoluten Peakflächen gegen den Zeitpunkt der Injektion über die Dauer einer typischen Messreihe. Die Abnahme der Peakfläche wurde in % ausgedrückt (siehe Tabelle 6).

Für nahezu alle TIQs und alle Amphetamine lag die Abnahme der Peakflächen innerhalb des gemessenen Zeitraumes in den untersuchten Matrices unterhalb der tolerierbaren Grenze von 25 %. Diese lagen für MDA in Gehirn und Leber und für 1,3-diMeTIQ in Serum mit lediglich 6 bzw. 7 % am niedrigsten. Zu beobachten war jedoch, dass die cis-Isomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQs eine Abnahme von 31 % über den Messzeitraum von fünf Stunden im Hirngewebe aufwiesen (in den Leber- und Serumproben lag die Abnahme der Peakflächen über den jeweiligen Zeiträumen lediglich bei 17 bzw. 18 %).

Tabelle 6: *Processed sample stability* der TIQs und Amphetamine in den Matrices Gehirn, Leber und Serum, angegeben als Abnahme in % über einen Zeitraum von 5 Stunden (Gehirn und Leber) bzw. von 8,5 Stunden (Serum) eines Konzentrationslevels.

Analyt	Gehirn	Leber	Serum
	Abnahme der Peakfläche in % über 5 h c=4 ng/g	Abnahme der Peakfläche in % über 5 h c=4 ng/g	Abnahme der Peakfläche in % über 8,5 h c=1 ng/ml
1,3-diMeTIQ (1)	22	19	20
1,3-diMeTIQ (2)	14	14	18
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1)	22	20	6
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (2)	31	17	18
N-Me-1,3-diMeTIQ	13	16	23
N-Me-1,3-diMe-7,8- MDTIQ	16	18	18
Amphetamin	16	17	10
Methamphetamin	12	14	9
MDA	7	9	12
MDMA	19	13	11

Bei 1,3-diMeTIQ (1) und 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1) handelt es sich um die trans-Isomere, bei (2) um die cis-Diastereomerenformen.

Zur Überprüfung der Einfrier- und Auftaustabilität wurden die in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Proben gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der Flächenverhältnisse aus Analyt und internem Standard. Laut der GTFCh-Richtlinie sollen der Mittelwert (MW) bzw. das 90 %-Konfidenzintervall (90 %-KI) der Stabilitätsproben innerhalb von 90 bis 110 % bzw. 80 bis 120 % liegen. Für neun der zehn hier untersuchten Substanzen liegen sowohl der Mittelwert als auch das 90 %-Konfidenzintervall der Stabilitätsproben in den untersuchten Matrices in den vorgegebenen Grenzbereichen (z. B. MW (1,3-diMe-TIQ (1 bzw. 2) im Gehirn) = 99 % bzw. 102 %). Lediglich der Mittelwert des cis-1,3-diMe-7,8-MDTIQs liegt im Lebergewebe mit 115 % leicht oberhalb der angegebenen Obergrenze. Für das 90 %-Konfidenzintervall konnte hierbei jedoch keine Abweichung festgestellt werden (siehe Tabelle 7).

Die Auswertungen der undotierten Stabilitätsblindproben im Gehirn- und Lebergewebe wie auch im Serum ergaben darüber hinaus keine Hinweise auf neugebildete Substanzen zu den jeweiligen Retentionszeiten der TIQS und der Amphetamine, die durch die Behandlung der Proben möglicherweise hätten entstehen können.

Tabelle 7: Ergebnisse der Einfrier- und Auftaustabilitätsmessungen. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und 90 %-Konfidenzintervalle (90 %-KI) der Flächenverhältnisse aus Analyt und ISTD der Stabilitätsproben (n = 6) in % für die TIQs und Amphetamine in den Matrices Gehirn, Leber und Serum, anhand der angegebenen Konzentrationslevel.

Analyt	Gehirn c=4 ng/g		Leber c=4 ng/g		Serum c=1 ng/ml	
	MW in %	90 %-KI in %	MW in %	90 %-KI in %	MW in %	90 %-KI in %
1,3-diMeTIQ (1)	99	[95; 102]	108	[104; 111]	101	[96; 106]
1,3-diMeTIQ (2)	102	[98; 106]	107	[103; 112]	100	[99; 102]
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1)	102	[99; 104]	109	[109; 112]	101	[98; 104]
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (2)	100	[95; 105]	115	[111; 119]	101	[95; 107]
N-Me-1,3-diMeTIQ	108	[103; 112]	105	[103; 107]	104	[100; 107]
N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ	105	[99; 111]	109	[106; 112]	96	[92; 99]
Amphetamin	107	[104; 110]	96	[94; 98]	101	[96; 106]
Methamphetamin	110	[108; 115]	99	[97; 101]	100	[99; 102]
MDA	102	[100; 104]	97	[95; 98]	102	[100; 104]
MDMA	97	[94; 100]	102	[100; 103]	103	[101; 104]

Bei 1,3-diMeTIQ (1) und 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1) handelt es sich um die trans-Isomere, bei (2) um die cis-Diastereomerenformen.

Die Bestimmung der Langzeitstabilität erfolgte wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Ausgewertet wurden die absoluten Flächen (Leber) bzw. die Flächenverhältnisse aus Analyt und internem Standard (Gehirn und Serum). Die Grenzbereiche, die für die Einfrier- und Auftaustabilität gelten, finden auch hier Anwendung. Bei der Auswertung der Daten konnte lediglich eine Abnahme des Stabilitätsprobenmittelwertes im Vergleich zum Kontrollprobenmittelwert für Methamphetamin im Gehirn über den hier gemessenen Zeitraum (100 Tage) festgestellt werden (Methamphetamin: 82 %) (siehe Tabelle 8). Alle anderen Amphetamine und vor allem alle TIQs zeigten hier eine eindeutige Langzeitstabilität in den jeweiligen Matrices über die hier vorliegenden Zeitspannen (siehe Kapitel 3.4.3). Auch die hier gemessenen Stabilitätsblindproben haben gezeigt, dass durch die Lagerung weder Störsubstanzen noch ein falsch positiver Nachweis der Analyten erzeugt wurde.

Tabelle 8: Ergebnisse der Langzeitstabilitätsmessungen. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und 90 %-Konfidenzintervalle (90 %-KI) der absoluten Flächen bzw. der Flächenverhältnisse von Analyt und ISTD der Stabilitätsproben (n = 6) in % für die TIQs und Amphetamine in den Matrices Gehirn, Leber und Serum, bestimmt in einem Konzentrationslevel.

Analyt	Gehirn*		Leber**		Serum*	
	MW in %	90 %-KI	MW in %	90 %-KI	MW in %	90 %-KI
1,3-diMeTIQ (1)	100	[97; 104]	103	[96; 110]	109	[105; 112]
1,3-diMeTIQ (2)	97	[92; 103]	94	[90; 97]	109	[105; 113]
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1)	104	[101; 108]	110	[107; 113]	103	[102; 104]
1,3-diMe-7,8-MDTIQ (2)	99	[92; 105]	101	[98; 104]	105	[100; 109]
N-Me-1,3-diMeTIQ	107	[100; 114]	98	[94; 101]	108	[100; 117]
N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ	98	[95; 102]	109	[107; 111]	105	[101; 109]
Amphetamin	92	[88; 95]	98	[95; 100]	106	[99; 112]
Methamphetamin	82	[80; 83]	104	[102; 106]	108	[106; 110]
MDA	97	[95; 99]	97	[94; 100]	107	[104; 110]
MDMA	95	[92; 98]	99	[96; 101]	105	[103; 106]

\*MW gebildet aus den Flächenverhältnissen von Analyt und ISTD; \*\* MW gebildet aus den absoluten Flächen; bei 1,3-diMeTIQ (1) und 1,3-diMe-7,8-MDTIQ (1) handelt es sich um die trans-Isomere, bei (2) um die cis-Diastereomerenformen.

### Kalibrationsbereich

Die Bestimmung des Kalibrationsbereiches für Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA erfolgt nach Durchführung der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Methode. Bei der Auswertung wurde auf sogenannte Straggler bzw. Ausreißer geprüft sowie der Cochran-Test auf Varianzhomogenität und der Mandel-F-Test auf Linearität durchgeführt. Dabei konnte für keine der hier untersuchten Substanzen Ausreißer festgestellt werden. Lediglich ein Straggler für MDMA im Qualifier-MRM-Übergang war ersichtlich. Weiterhin wurde der Cochran-Test mit einer Signifikanz von 99 % bestanden, sodass hier keine Wichtung des Kalibrationsmodells erforderlich war. Mit Ausnahme des Methamphetamins galt dies ebenfalls für den Mandel-F-Test, sodass in einem Bereich von 25 bis 750 ng/ml die Linearität für die Analyten Amphetamin, MDA und MDMA gegeben war. Obwohl die Linearität für Amphetamin den getesteten Anforderungen genügt, scheint die Kurve einer quadratischen Kalibration zu folgen (Abbildung 20). Dies bestätigt auch der Vergleich der Bestimmtheitsmaße ( $R^2$  (lineare Kalibration) = 0,9982;  $R^2$  (quadratische Kalibration) = 0,9994). Methamphetamin besteht den Mandel-F-Test nicht, sodass hier zwingend die quadratische Kalibrationsfunktion für eine Quantifizierung

erforderlich ist (Abbildung 20). Hier war darüber hinaus auch ein leicht eingeschränkter Kalibrationsbereich von 25 bis 625 ng/ml zu verzeichnen.

Die für die Quantifizierung von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA im Serum und im Gehirn verwendeten Kalibrationen mit den jeweiligen Kurvenfunktionen und Bestimmtheitsmaßen ( $R^2$ ) sind in Abbildung 20 und in Abbildung 21 dargestellt. Dabei errechnet sich die Response aus der Fläche des Analyten multipliziert mit dem Verhältnis aus Konzentration und Fläche des internen Standards.

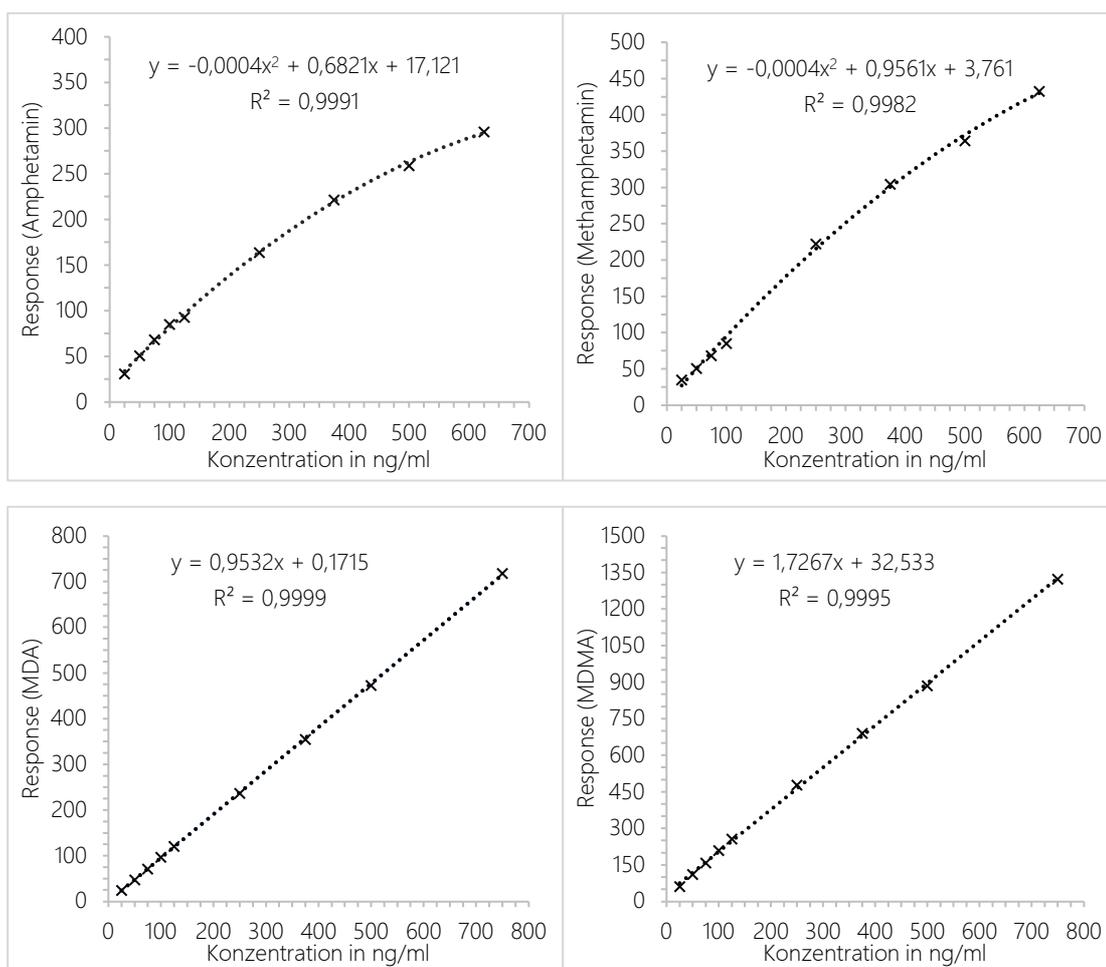


Abbildung 20: Kalibrationskurven von Amphetamin (o. l., quadratischer Verlauf), Methamphetamin (o. r., quadratischer Verlauf), MDA (u. l., linearer Verlauf) und MDMA (u. r., linearer Verlauf) in Serum (n = 2) nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit den jeweiligen Bestimmtheitsmaßen ( $R^2$ ) und Geradengleichungen (Response = Fläche (Analyt) \* Konzentration (ISTD) / Fläche (ISTD)).

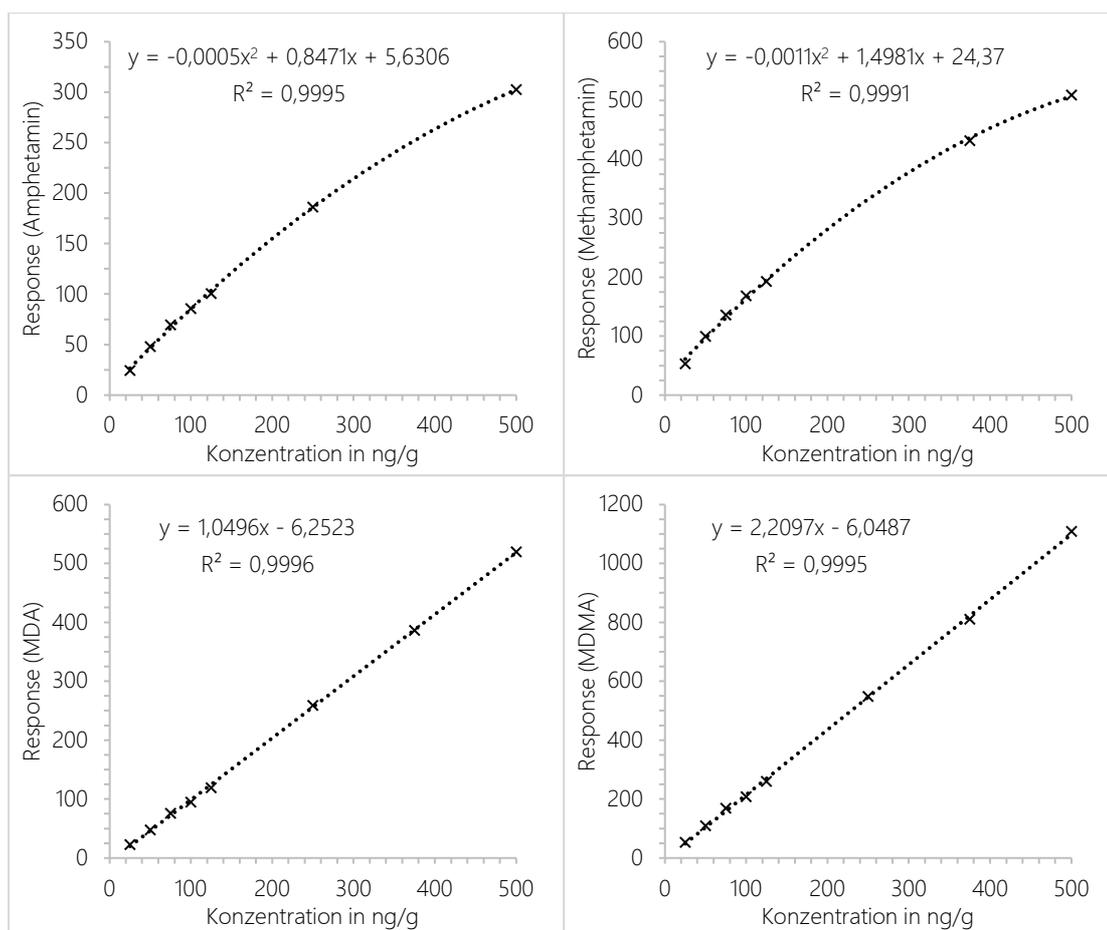


Abbildung 21: Kalibrationskurven von Amphetamin (o. l., quadratischer Verlauf), Methamphetamin (o. r., quadratischer Verlauf), MDA (u. l., linearer Verlauf) und MDMA (u. r., linearer Verlauf) in Gehirn vom Schwein (n = 2) nach Extraktion mit den jeweiligen Bestimmtheitsmaßen ( $R^2$ ) und Geradengleichungen (Response = Fläche (Analyt) \* Konzentration (ISTD) / Fläche (ISTD)).

#### 4.2.2. Analyse von realen Blut- und Gewebeproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 42 Blutproben, 26 Gehirnproben und 28 Leberproben hinsichtlich der vier TIQs 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ sowie auf Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA analysiert (siehe Kapitel 3.4.1 und 3.4.2). Die Quantifizierung der Proben bezüglich des Amphetamins, Methamphetamins, MDAs und MDMA erfolgte über die in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellten Kalibrationsfunktionen.

Die in den nachfolgenden Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 angegebenen Werte für die Blutalkoholkonzentrationen (BAK) stammen aus den Routineuntersuchungen der jeweiligen Institute, aus denen die Proben bezogen wurden (siehe Kapitel 3.2.5). Dabei lagen die BAK-Werte im Serum zwischen 0,31 ‰ (Probe 8) und 3,44 ‰ (Probe 15), wovon fünf Proben (Fall 8, 17, 21, 26 und 34) eine Konzentration <0,5 ‰ aufwiesen. In 13 Proben lagen die BAK zwischen 0,5 und 1,0 ‰ und in 24 Proben betrug die Werte >1 ‰. Von den insgesamt 42 gemessenen Blutproben wurden 36 Fälle positiv auf Amphetamin getestet. Dabei betrug die höchste hier gemessene Amphetaminkonzentration einen Wert von 542 ng/ml (Fall 26). In 13 weiteren Fällen konnte eine Konzentration über 100 ng/ml gemessen werden (siehe Tabelle 9). Zusätzlich wurden hierbei in 31 Proben Methamphetamin nachgewiesen, wobei in all diesen Fällen die Konzentration unterhalb des Kalibrationsbereiches lag und als „positiv, nicht quantifizierbar“ (pos., n. q.) angegeben wurden. Aus der Tabelle 9 ist weiterhin ersichtlich, dass 17 Blutproben positiv auf MDMA getestet wurden. Davon wiesen jedoch lediglich sieben eine Konzentration >25 ng/ml auf und davon wiederum nur drei Proben eine Konzentration  $\geq 100$  ng/ml (Fall 17, 19 und 31). Zusätzlich wurden in 14 dieser 17 Fälle zusätzlich MDA nachgewiesen, jedoch insgesamt nur sehr geringe Konzentrationen unterhalb des Kalibrationsbereiches.

In elf Proben konnte sowohl ein positives Ergebnis für Amphetamin als auch MDMA ermittelt werden, wovon lediglich in zwei Fällen beide Substanzen eine Konzentration oberhalb des Kalibrationsbereiches aufwiesen (siehe Tabelle 9, Probe 6 und 17).

Tabelle 9: Konzentrationen von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in Serum in ng/ml. Die Befunde der Blutalkoholkonzentrationen (BAK) in ‰ wurden innerhalb routinemäßiger Untersuchungen erhoben und hier übernommen\*.

Probe	c(Amphetamin) in ng/ml	c(Methamphetamin) in ng/ml	c(MDA) in ng/ml	c(MDMA) in ng/ml	BAK* in ‰
1	111	negativ	negativ	pos., n. q.	1,04
2	negativ	negativ	ca. 6**	47	0,97
3	negativ	negativ	ca. 2**	ca. 12**	1,78
4	40	pos., n. q.	negativ	negativ	1,03
5	96	pos., n. q.	negativ	negativ	1,49
6	353	pos., n. q.	ca. 10**	36	0,51
7	ca. 20**	pos., n. q.	negativ	negativ	1,31
8	487	pos., n. q.	pos., n. q.	pos., n. q.	0,31
9	ca. 6**	negativ	negativ	negativ	0,80
10	227	pos., n. q.	negativ	negativ	1,37
11	31	pos., n. q.	negativ	negativ	1,27
12	ca. 10**	pos., n. q.	negativ	negativ	1,93
13	61	pos., n. q.	negativ	negativ	1,39
14	45	negativ	negativ	negativ	1,05
15	44	pos., n. q.	negativ	negativ	3,44
16	39	pos., n. q.	negativ	negativ	1,95
17	341	pos., n. q.	ca. 10**	100	0,33
18	negativ	negativ	ca. 6**	94	1,58
19	pos., n. q.	negativ	ca. 10**	205	0,56
20	negativ	negativ	ca. 10**	84	1,74
21	77	pos., n. q.	negativ	negativ	0,40
22	219	pos., n. q.	negativ	negativ	0,79
23	negativ	negativ	ca. 5**	ca. 20**	0,96
24	58	pos., n. q.	negativ	negativ	0,57
25	54	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,08
26	542	pos., n. q.	negativ	negativ	0,49
27	55	pos., n. q.	negativ	negativ	0,55
28	401	pos., n. q.	negativ	negativ	1,34
29	43	pos., n. q.	negativ	negativ	1,87
30	89	pos., n. q.	ca. 3**	ca. 10**	0,74
31	negativ	negativ	ca. 10**	153	1,06
32	139	pos., n. q.	pos., n. q.	pos., n. q.	0,57
33	229	pos., n. q.	negativ	negativ	0,77
34	157	pos., n. q.	ca. 3**	ca. 10**	0,38
35	352	pos., n. q.	negativ	negativ	0,83
36	114	pos., n. q.	negativ	negativ	1,22
37	45	pos., n. q.	pos., n. q.	pos., n. q.	1,17
38	81	pos., n. q.	negativ	negativ	1,15
39	45	pos., n. q.	negativ	negativ	1,12
40	97	pos., n. q.	negativ	negativ	0,89
41	50	pos., n. q.	negativ	negativ	1,54

Probe	c(Amphetamin) in ng/ml	c(Methamphetamin) in ng/ml	c(MDA) in ng/ml	c(MDMA) in ng/ml	BAK* in ‰
42	115	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,26

\*\* Der Wert liegt unterhalb des kalibrierten Bereichs und unterliegt daher einer erhöhten Messunsicherheit.  
pos., n. q. = positiv, nicht quantifizierbar.

Die Quantifizierung der Amphetamine in den hier untersuchten Gehirnproben erfolgte anhand der in Abbildung 21 dargestellten Kalibrationskurven (siehe Tabelle 10). Amphetaminkonzentrationen oberhalb des Kalibrationsbereiches können aufgrund der Verwendung der quadratischen Kalibrationsfunktion nicht exakt angegeben werden. Die Angabe der Werte erfolgte insgesamt nach den Empfehlungen von Peters, Drummer und Musshoff (2007) als Schätzwerte. 24 von den hier untersuchten Proben wurden positiv auf Amphetamin getestet. Davon lagen in 17 Fällen die Konzentrationen oberhalb des Kalibrationsbereiches. Lediglich eine Probe konnte aufgrund der geringen Amphetaminkonzentration nur als „pos., n. q.“ angegeben werden. Weiterhin erfolgte in 21 der Amphetamin-positiven Fälle ebenfalls ein Nachweis von Methamphetamin. In sieben der 15 MDMA-positiven Proben konnten Konzentrationen in einem Bereich von ca. 280 bis ca. 6700 ng/g ermittelt werden. Zusätzlich wurde in jeder dieser Proben ebenfalls MDA bestimmt. Hierbei lag die kleinste ermittelte Konzentration für MDA bei ca. 20 ng/g (Fall: Essen 6) und die höchste bei ca. 320 ng/g (Fall: Düsseldorf 5). Die in den Instituten ermittelten BAKs beliefen sich in den obengenannten Proben auf Werte zwischen <0,1 ‰ und 2,32 ‰. 14 dieser 26 Proben wiesen dabei eine Blutalkoholkonzentration >1,0 ‰ auf.

Tabelle 10: Konzentrationen von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in humanen Gehirnproben in ng/g. Die Befunde der Blutalkoholkonzentrationen (BAK) in ‰ wurden innerhalb routinemäßiger Untersuchungen in den jeweiligen Instituten erhoben und hier übernommen\*.

Probe	c(Amphetamin) in ng/g	c(Methamphetamin) in ng/g	c(MDA) in ng/g	c(MDMA) in ng/g	BAK* in ‰
Bonn 1	>500	pos., n. q.	negativ	negativ	2,32
Düsseldorf 1	>500	pos., n. q.	ca. 80	ca. 830**	0,12
Düsseldorf 2	ca. 140	pos., n. q.	negativ	negativ	2,23
Düsseldorf 3	>500	negativ	ca. 40	ca. 2300**	1,68
Düsseldorf 4	>500	ca. 30	negativ	negativ	1,19
Düsseldorf 5	negativ	negativ	ca. 320	ca. 4600**	1,35
Düsseldorf 6	>500	pos., n. q.	negativ	negativ	0,65
Essen 1	>500	pos., n. q.	ca. 260	ca. 6500**	<0,1
Essen 2	ca. 400	pos., n. q.	negativ	negativ	0,25
Essen 3	>500	negativ	negativ	pos., n. q.	0,17
Essen 4	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,11
Essen 6	>500	pos., n. q.	ca. 20	ca. 280	<0,1
Essen 7	ca. 240	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,22
Essen 8	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,61
Köln 1	ca. 420	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,19
Köln 2	ca. 430	pos., n. q.	negativ	negativ	1,99
Köln 3	>500	pos., n. q.	negativ	negativ	0,62
Köln 4	pos., n. q.	negativ	ca. 70	ca. 6700**	0,89
Köln 5	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,80
Köln 6	ca. 490	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,64
Köln 7	negativ	negativ	ca. 80	ca. 3400**	1,54
Köln 8	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,41
Köln 9	>500	pos., n. q.	negativ	negativ	0,73
Rostock 1	> 500	pos., n. q.	negativ	negativ	1,69
Rostock 2	>500	pos., n. q.	negativ	negativ	1,12
Rostock 3	> 500	pos., n. q.	negativ	negativ	1,72

\*\* Der Wert liegt außerhalb des kalibrierten Bereichs und unterliegt daher einer erhöhten Messunsicherheit.

pos., n. q. = positiv, nicht quantifizierbar.

Die hier aufgeführten Leberproben wurden so benannt, dass auf eine eindeutige Zugehörigkeit der Hirnproben derselben Leiche zu schließen ist (siehe Tabelle 11). Auf die einzelnen Alkoholkonzentrationen wird daher nicht erneut eingegangen. Mit Ausnahme von sechs Proben lagen alle weiteren Amphetaminkonzentrationen oberhalb des kalibrierten Bereichs und konnten aufgrund der quadratischen Kalibrationsfunktion (siehe Abbildung 21) nicht näher als >500 ng/g angegeben werden. Weiterhin wurden in vier Proben Konzentrationen an Amphetamin unterhalb des kalibrierten Bereichs festgestellt und daher mit dem Vermerk „pos., n. q.“ beschrieben (Fall: Düsseldorf 3 und 5, Essen 5 und Köln 7). In den Fällen „Düsseldorf 4“ und „Rostock 4“ lagen jeweils Methamphetaminkonzentrationen von ca. 30 ng/g und ca. 90 ng/g vor. In allen weiteren Proben konnte kein Methamphetamin nachgewiesen werden oder eine Quantifizierung war aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich (pos., n. q.). 26 der 28 untersuchten Leberproben wurden darüber hinaus positiv auf MDMA getestet. Davon konnten in fünf Fällen eine Konzentration kleiner ca. 100 ng/g (Fall: Düsseldorf 2, 4, 6; Köln 5 und 8) und in acht weiteren Proben Konzentrationen zwischen ca. 400 und ca. 5400 ng/g (Fall: Düsseldorf 1, 3, 5; Essen 1, 5, 6; Köln 4 und 7) bestimmt werden. In diesen Fällen wurden jeweils auch MDA-Konzentrationen zwischen ca. 50 und ca. 690 ng/g festgestellt.

**Tabelle 11: Konzentrationen von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in humanen Leberproben in ng/g. Die Befunde der Blutalkoholkonzentrationen (BAK) in ‰ wurden innerhalb routinemäßiger Untersuchungen in den jeweiligen Instituten erhoben und hier übernommen\*.**

Probe	c(Amphetamin) in ng/g	c(Methamphetamin) in ng/g	c(MDA) in ng/g	c(MDMA) in ng/g	BAK* in ‰
Düsseldorf 1	>500	pos., n. q.	ca. 120	ca. 3200**	0,12
Düsseldorf 2	ca. 150	pos., n. q.	pos., n. q.	ca. 30	2,23
Düsseldorf 3	pos., n. q.	pos., n. q.	ca. 140	ca. 4100**	1,68
Düsseldorf 4	>500	ca. 30	negativ	ca. 20	1,19
Düsseldorf 5	pos., n. q.	pos., n. q.	ca. 690**	ca. 5400**	1,35
Düsseldorf 6	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	ca. 30	0,65
Essen 1	>500	pos., n. q.	ca. 240	ca. 3100**	<0,1
Essen 2	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	pos., n. q.	0,25
Essen 3	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,17
Essen 4	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	negativ	1,11
Essen 5	pos., n. q.	negativ	ca. 160	ca. 1100**	1,16 (Milz)
Essen 6	>500	pos., n. q.	ca. 50	ca. 400	<0,1
Essen 7	>500	pos., n. q.	ca. 30	pos., n. q.	1,22
Essen 8	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	pos., n. q.	1,61
Köln 1	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	pos., n. q.	1,19

Probe	c(Amphetamin) in ng/g	c(Methamphetamin) in ng/g	c(MDA) in ng/g	c(MDMA) in ng/g	BAK* in ‰
Köln 2	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,99
Köln 3	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,62
Köln 4	ca. 40	negativ	ca. 480	ca. 5700**	0,89
Köln 5	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	ca. 30	0,80
Köln 6	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,64
Köln 7	pos., n. q.	negativ	ca. 300	ca. 5300**	1,54
Köln 8	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	ca. 60	0,41
Köln 9	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	0,73
Rostock 1	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,69
Rostock 2	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,12
Rostock 3	>500	pos., n. q.	negativ	pos., n. q.	1,72
Rostock 4	>500	ca. 90	pos., n. q.	pos., n. q.	0,51
Rostock 5	>500	pos., n. q.	pos., n. q.	negativ	2,07 (Muskel)

\*\* Der Wert liegt außerhalb des kalibrierten Bereichs und unterliegt daher einer erhöhten Messunsicherheit.

pos., n. q. = positiv, nicht quantifizierbar.

In den hier untersuchten Serum- und Gehirnproben konnten die TIQs nicht nachgewiesen werden, auch in den Proben, in denen sehr hohe Konzentrationen der Ausgangssubstanzen Amphetamin und Alkohol ermittelt wurden (z. B. Gehirn: „Rostock 1“ und „Rostock 3“ (Tabelle 10); Seren: Fall 10 und 28 (Tabelle 9)). Dafür wurde ein positiver Befund für das cis-1,3-diMeTIQ in den Leberproben „Köln 6“ und „Rostock 3“ ermittelt. In Abbildung 22 sind jeweils beide MRM-Übergänge (m/z (Target) 162>145 und m/z (Qualifier) 162>117) bei der zu erwartenden Retentionszeit von 4,16 Min. dargestellt. Das Verhältnis von Qualifier- zu Targetübergang lag in der Probe „Köln 6“ bei 39 % und in der Probe „Rostock 3“ bei 38 %. Für das 1,3-diMeTIQ wurde innerhalb der Methodenentwicklung anhand von dotierten Gewebeproben ein Qualifier-zu-Target-Verhältnis von 44 % ermittelt (siehe Kapitel 3.4.1). Die von der GTFCh beschriebene tolerierbare Abweichung dieses Verhältnisses liegt bei 25 % [33 %; 55 %] [125]. Daher liegen die Qualifier- zu Targetverhältnisse beider Proben innerhalb der akzeptablen Grenzen. Der Peak des 1,3-diMeTIQs in der Probe „Köln 6“ wurde ohne Glättung integriert, um eine endogene Störung zwischen 4,10 und 4,14 Min. abzutrennen. Die Integration des Peaks bei 4,16 Min. der Probe „Rostock 3“ erfolgte dagegen mit Glättung. Anhand der Kalibrationsfunktion, die durch das Validierungsprogramm „Valistat“ innerhalb der Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze aus fünf Kalibratoren ermittelt wurden, konnte eine Abschätzung der hier vorliegenden cis-1,3-diMeTIQ-Konzentration erfolgen. Die Kalibrationskurve wurde dabei aus dem Flächenverhältnis von Analyt zu

internem Standard (y) des Targetübergangs und der jeweiligen Konzentration des Kalibrators (x) erstellt. Die daraus berechnete Kurvenfunktion lautet:  $y = 0,01 x + 0,0041$  ( $R^2 = 0,9997$ ). Für die Probe „Köln 6“ ergab sich näherungsweise eine Konzentration des cis-1,3-diMeTIQs von ca. 0,5 ng/g und für die Probe „Rostock 3“ eine von ca. 2 ng/g. Die Konzentration an cis-1,3-diMeTIQ in der Leberprobe „Köln 6“ lag somit knapp unterhalb und die der Leberprobe „Rostock 3“ oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,9 ng/g (Leber).

In beiden Proben wurde jeweils eine Amphetaminkonzentration  $> 500$  ng/g bestimmt. Die BAK lag in der Probe „Köln 6“ bei 0,64 ‰ und damit deutlich niedriger als die der Probe „Rostock 3“. Diese wies eine BAK von 1,72 ‰ auf (Tabelle 11).

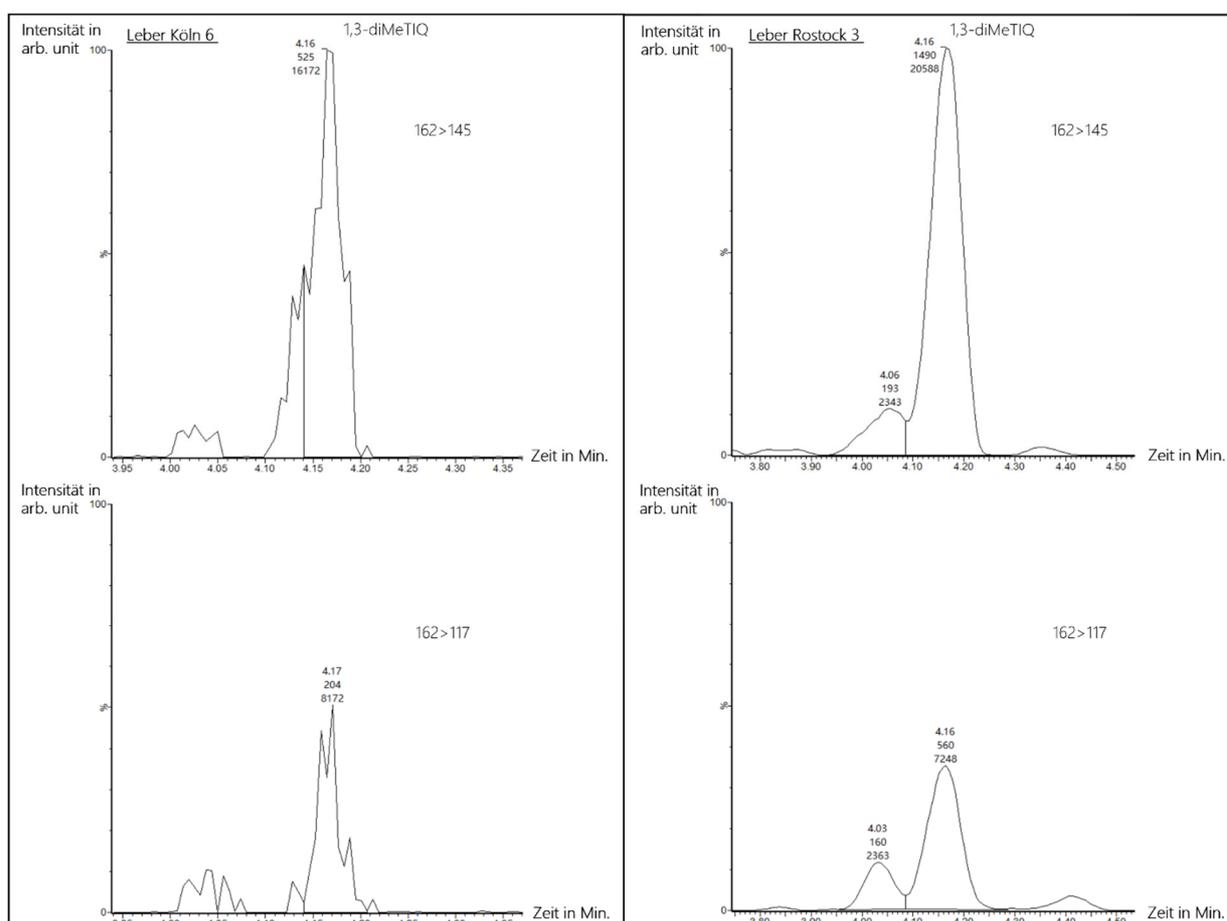


Abbildung 22: Chromatogrammausschnitte (Zeit in Min. vs. Intensität in arbitrary units (arb. Unit)) der Leberproben „Köln 6“ (links) und „Rostock 3“ (rechts) für cis-1,3-diMeTIQ (m/z 162>145 (oben) und m/z 162>117 (unten)) nach Extraktion. Der Peak in der Probe „Köln 6“ wurde ohne Glättung integriert, um die endogene Störung zwischen 4,10 und 4,14 Min abzutrennen. Die Integration des 1,3-diMeTIQs in der Probe „Rostock 3“ erfolgte nach Glättung. An der Peakspitze sind die Retentionszeit, die Fläche und die Höhe des Peaks (gelesen von oben nach unten) aufgelistet.

## 5. Diskussion

Die Wechselwirkung des zentral stimulierenden Amphetamins und des vornehmlich zentraldämpfenden Ethanol ist bislang noch nicht vollständig geklärt, da diese keinem strikten Stimulans-Sedativum-Antagonismus folgen [69], sondern ein komplexes Wirkungsspektrum nach sich zieht [71]. Ein weiterer noch bislang ungenügend untersuchter Effekt des simultanen Konsums von Amphetamin und Alkohol soll nach einer Studie von Makino et al. 1990 die Bildung eines neurotoxischen Kondensationsproduktes sein, welches durch eine Ringzyklisierung aus Amphetamin und dem Ethanolmetaboliten Acetaldehyd gebildet wird. Untersuchungen zu diesem spezifischen 1,3-diMeTIQ wurden bislang lediglich an Tiermodellen oder in Zellkulturexperimenten durchgeführt [3], [95], [103], [104]. Weiterhin gibt es bislang noch keine Studien zu den aus den Amphetaminderivaten Methamphetamin, MDA und MDMA und Acetaldehyd gebildeten TIQs.

Ziel dieser Arbeit war es daher humane Blut- und postmortale Gewebeproben auf die vier TIQs 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ zu untersuchen, welche vorab in Routineuntersuchungen positiv auf Amphetamin bzw. die Amphetaminderivate Methamphetamin, MDA und MDMA sowie Alkohol getestet wurden. Eine spezielle Herausforderung stellte dabei die Analytik von postmortal-fäulnisverändertem Gewebe dar [126]. Nahezu alle Substanzen sind postmortalen Veränderungen unterlegen und die Komposition und die Qualität der Probe unterscheiden sich von Fall zu Fall [127]. Um auch Spuren der zu untersuchenden Substanzen in den Matrices Gehirn, Leber und Serum nachweisen zu können, war somit im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung einer sensitiven Analysemethode (Kapitel 3.4.1) von großer Bedeutung. Für die Probenuntersuchung wurde daher eine Kopplung aus Hochleistungsflüssigchromatographie und Quadrupol-Tandemmassenspektrometrie verwendet. Dafür mussten im Vorfeld die analytischen Standards des 1,3-diMeTIQs und des N-Me-1,3-diMeTIQs synthetisiert und das Extraktionsverfahren optimiert werden, um die Serum- und die Gewebeproben aufzureinigen (siehe Kapitel 3.4.2). Um die Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf mögliche Artefaktbildung bzw. Stabilitätsprobleme zu erleichtern, wurde weiterhin eine Teilvalidierung der Methode durchgeführt, welche die für die Fragestellung des qualitativen Nachweises der TIQs bedeutsamsten Validierungsparameter abdeckte.

Die nachfolgenden Kapitel umfassen die Diskussion der Synthesen, die kritische Bewertung der hier entwickelten Analysemethode anhand der Validierungsergebnisse sowie die Interpretation der Ergebnisse der Probenuntersuchung.

## 5.1. Synthese

Im Folgenden werden die Reaktionsmechanismen der einzelnen Syntheseschritte beschrieben, die zur Umsetzung des Methylphenylethylaminsulfats in das 1,3-diMeTIQ über die Zwischenprodukte N-Acetylmethylphenylethylamin und 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin geführt haben. Darüber hinaus wird die Reaktion zum N-Me-1,3-diMeTIQ diskutiert.

### 5.1.1. Synthese des 1,3-diMeTIQs aus Methylphenylethylamin

Die Synthese des 1,3-diMeTIQs umfasst drei Schritte, in denen die Zwischenprodukte N-Acetylmethylphenylethylamin und 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin generiert werden.

#### Schritt 1: Synthese des N-Acetylmethylphenylethylamins aus Methylphenylethylamin

Bei der Reaktion von Methylphenylethylaminsulfat (**1**) mit Acetylchlorid handelt es sich um eine nucleophile Substitution am Carbonyl-Kohlenstoffatom, wobei die Aminogruppe des Methylphenylethylaminsulfats (**1**) das Nucleophil und das Acetylchlorid das Elektrophil darstellt. Diese Reaktion stellt einen basenkatalysierten Additions-Eliminierungsmechanismus dar. Dabei wird im ersten Schritt das Methylphenylethylaminsulfat (**1**) mit Triethylamin versetzt, um das Sulfat in die freie Base zu überführen. Im nächsten Schritt greift die Aminogruppe den Carbonylkohlenstoff nukleophil an, wobei das Chlorid am Acetylchlorid eliminiert wird (siehe Abbildung 23).

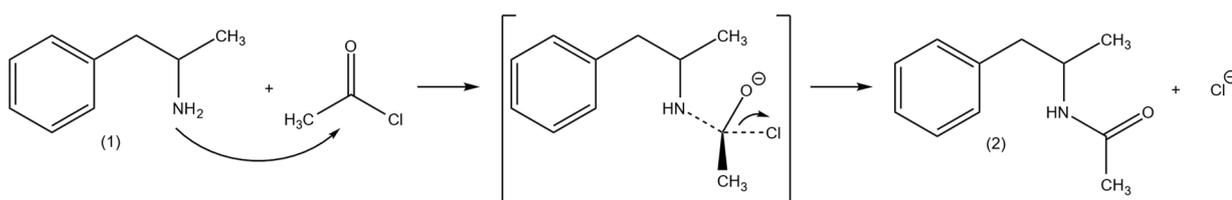


Abbildung 23: Nucleophile Substitution von Methylphenylethylamin (1) und Acetylchlorid.

Für die anschließende Extraktion wurde der Ansatz zunächst mit Salzsäure gewaschen, um überschüssiges Triethylamin zu entfernen. Zur Neutralisation der Salzsäure wurde darüber hinaus die

organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung behandelt. Aufgrund der hohen Osmolarität von gesättigter Natriumchloridlösung wurde diese verwendet, um der organischen Phase Wasser zu entziehen

Bei der hiesigen Reaktion von Methylphenylethylamin (**1**) mit Acetylchlorid wurde N-Acetylmethylphenylethylamin (**2**) in einer Ausbeute von 89 % gebildet und somit eine ähnlich gute Umsetzung wie bei Grunewald et al. (1999) [121] erzielt (Ausbeute von (R)-N-Acetyl- $\alpha$ -Methylphenylethylamin 74 % bzw. von (S)-N-Acetyl- $\alpha$ -Methylphenylethylamin 88 %). Die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmen mit den Literaturdaten [121] weitgehend überein, wobei zu berücksichtigen ist, dass bei der hiesigen Reaktion eine Mischung aus (R)- und (S)-Methylphenylethylamin eingesetzt wurde und nicht wie bei [121] jeweils die reinen (R)- bzw. (S)-Enantiomerenformen.

### Schritt 2: Synthese des 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolins aus N-Acetylmethylphenylethylamin

Bei der Umwandlung von N-Acetylmethylphenylethylamin (**2**) mit Phosphoroxychlorid zum Dihydroisochinolin unter Refluxierung in Acetonitril handelt es sich um eine Cyclodehydratisierung [128], [129]. Der Reaktionsmechanismus wurde als erstes 1893 von August Birschler und Bernard Napieralski beschrieben. Bei ihren Synthesen erzielten sie nach Zugabe von Phosphorpentoxid bzw. Zinkchlorid zu Phenylethylacetamid und fünfständigen Erhitzen bei 240 °C lediglich geringe Ausbeuten des Dihydroisochinolins, wobei damals eine genaue Charakterisierung des Produktes nicht möglich war [128]. Pictet und Kay bestätigten 1909 diesen Reaktionsansatz, indem sie Acylderivate des Phenylethylamins mit Phosphorpentoxid bzw. Zinkchlorid ebenfalls über 200 °C erhitzen. Dabei sei es jedoch zu einer Zersetzung des Produkts gekommen, sodass die Ausbeuten gering blieben. Durch Verwendung eines Lösungsmittels wie Toluol bzw. Xylol zusammen mit Phosphorpentoxid bei niedrigeren Reaktionstemperaturen konnten höhere Ausbeuten von u. a. 1-Methyl-Dihydroisochinolin (35 %) erzielt werden [130]. Über den Mechanismus der Reaktion äußerte Bergstrom 1944 die Vermutung, dass die Carbonylgruppe der Seitenkette mit einem Wasserstoff des Aromaten reagieren müsste [131]. Aufklärung des Reaktionsmechanismus lieferten letztendlich 1972 Fodor et al., indem sie N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]benzamid mit Phosphorpentachlorid bei Raumtemperatur reagieren ließen [132]. Dabei bildete sich zunächst ein Benzimidoylchlorid, welches langsam bei Raumtemperatur

und rasch bei 85 °C zum 6,7-Dimethoxy-1-Phenyl-3,4-Dihydroisochinolin zyklisierte. Die Bildung eines Nitrilium-Ions konnte dabei durch Fodor et al. (1972) [132] nachgewiesen werden. Die Reaktion konnte zudem durch Verwendung von Lewis-Säuren (z. B.  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{SnCl}_4$ ) beschleunigt werden. Dabei vermuteten sie, dass entweder ein nukleophiler Angriff des aromatischen Rings am Carbonylkohlenstoff bei gleichzeitiger Abspaltung des Chlorids durch die Lewis-Säure stattgefunden habe oder ohne die Verwendung dieser die Ausbildung eines intermediären Nitrilium-Ions erfolgt sei, was einen raschen Ringschluss zur Folge hätte.

Bei der hiesigen Reaktion wurde durch die Verwendung von Phosphoroxychlorid eine moderate Ausbeute des Dihydroisochinolins von 48 % erzielt, ähnlich wie bei Nicoletti et al. (2002) (29 - 60 %) [129]. Auch hier stimmen das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des synthetisierten Produkts mit dem Literaturspektrum überein [121]. In Anlehnung an Fodor & Nagubandi (1979) [133] dürfte bei der hiesigen Reaktion zuerst über eine Addition ein Imidoylphosphat ((2b) – siehe Abbildung 24) und im weiteren Verlauf ein Nitriliumion ((2c) gebildet worden sein. Weiterhin ist anzunehmen, dass der Ring durch einen nukleophilen Angriff des Aromaten unter Abspaltung eines aromatischen Wasserstoffs zyklisiert ist ((3) [133]. Im Vergleich zum Imidoylchlorid, welches bei Fodor et al. (1972) [132] entstanden ist, bilden Imidoylphosphate bessere Abgangsgruppen [133]).

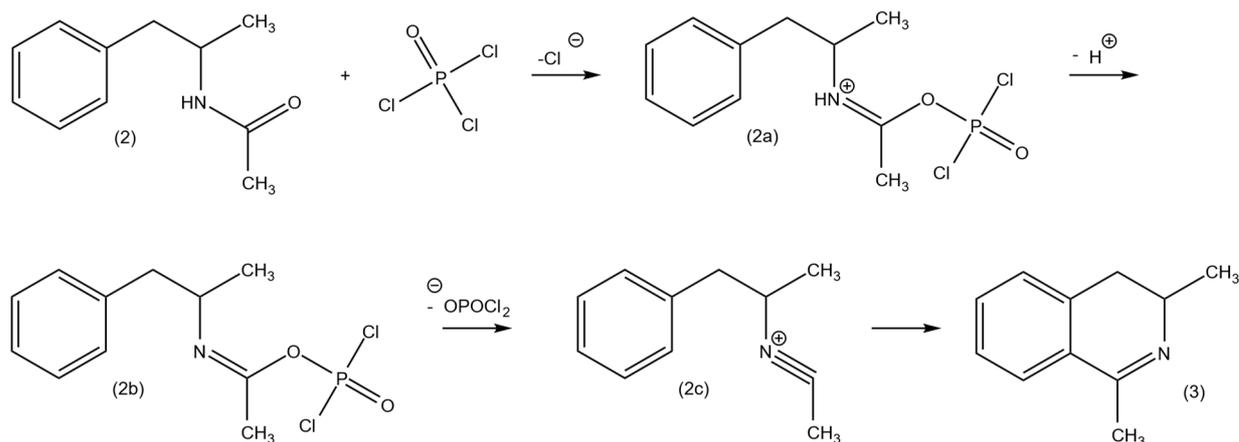


Abbildung 24: Reaktionsmechanismus zur Synthese von 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (3) (in Anlehnung an [133]).

### Schritt 3: Synthese des 1,3-diMeTIQs aus 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin

Die Überführung des 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolins (**3**) in das 1,3-diMe-TIQ (**4**) erfolgte unter Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid und Trimethylaluminium. Dabei reduziert Lithiumaluminiumhydrid Kohlenstoff-Heteroatombindungen unter Übertragung eines negativen Hydridions ohne Doppelbindungen zwischen Kohlenstoffen anzugreifen [134], [135]. Bei der Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid muss in einer wasserfreien Umgebung gearbeitet werden, da es sonst bevorzugt mit „aktiven Wasserstoffatomen“ reagiert. Um die Reaktion zu aktivieren, wurde zusätzlich Trimethylaluminium (eine Lewis-Säure) verwendet [136]. Die Reaktion wurde schließlich durch die Zugabe von Wasser beendet. Weiterhin wurde Natriumfluorid hinzugegeben, was zur Bildung von Kryolith ( $\text{Na}_3\text{AlF}_6$ ) und Wasserstoff führt.

Da aus der Literatur bekannt war, dass sowohl das cis- als auch das trans-1,3-diMeTIQ bei der Reaktion synthetisiert werden, sollte überprüft werden, welches Isomer unter definierten gaschromatographischen Bedingungen zu welcher Retentionszeit eluiert. Dazu wurden nach der säulenchromatographischen Reinigung des Rohproduktes die erste und die letzte positiv getestete Fraktion gaschromatographisch mit massenspektrometrischer Detektion analysiert. In der ersten Fraktion erschien lediglich ein Peak, welcher über das Massenspektrum als 1,3-diMeTIQ identifiziert werden konnte. In der letzten Fraktion dagegen wurden zwei Peaks mit jeweils dem gleichem Massenspektrum erhalten. Anschließend wurde von der ersten Fraktion, welches das isolierte TIQ enthielt ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums aufgenommen. Durch den Vergleich mit den Literaturdaten von Grunewald et al. (1999) [121] kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Stereoisomer, welches allein in der ersten Fraktion zu finden war, um die trans-Formen des 1,3-diMeTIQs handelt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die trans-Isomere des 1,3-diMeTIQs unter den verwendeten gaschromatographischen Bedingungen früher eluieren als die cis-Isomere.

### 5.1.2. Synthese des N-Me-1,3-diMeTIQs aus 1,3-diMeTIQ

Sowohl Eschweiler als auch Clarke et al. beschrieben Anfang des 20. Jahrhunderts die Methylierung von primären und sekundären Aminen unter Verwendung von Formaldehyd und Ameisensäure [137]. Dabei entsteht bei dieser Reaktion sowohl das sekundäre bzw. das tertiäre Amin als auch Kohlenstoffdioxid und Wasser [137], [138]. Diese Modifikation der Leukart-Reaktion, erfolgt dabei unter Ausbildung einer Schiffsch-Base, die durch eine Säurekomponente reduziert wird (siehe Abbildung 25).

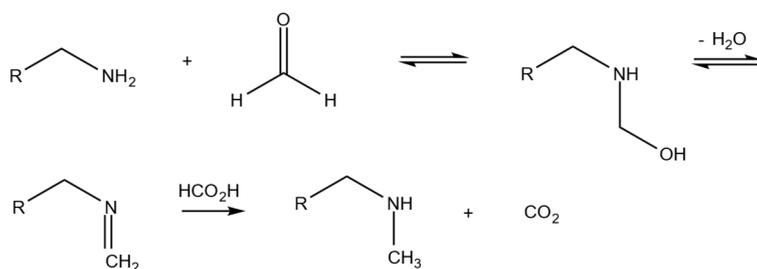


Abbildung 25: Schematische Darstellung der reductiven Aminierung [139].

Bei der hiesigen Reaktion wurde ebenfalls eine N-Methylierung des 1,3-diMeTIQs (**4**) mit Formaldehyd durchgeführt. In Anlehnung an Khong & Judeh (2016) [122] bzw. Irie et al. (2008) [140] erfolgte jedoch die Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid, da dieses in Abhängigkeit vom pH-Wert sehr selektiv ist. So werden Aldehyde und Ketone in einem pH-Bereich zwischen 3 bis 4 und Imine optimal zwischen pH 6 - 7 reduziert (wobei die Reaktion auch in einem größeren Bereich zwischen pH 4 - 10 zufriedenstellende Ergebnisse liefert [141]). Da bei Letzterem die Reduktion von Formaldehyd vernachlässigbar klein ist, kann die Bildung des Imins aus einem Aldehyd und einem Amin sowie die anschließende Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid in einem Ansatz erfolgen. Dabei erhielten Borch et al. (1971) [141] nach der Reaktion von Cyclohexanon und N-Propylamin mit Lithiumcyanoborhydrid in Methanol nach 24 Stunden N-Propylcyclohexylamin in einer Ausbeute von 85 %. Diese Reaktion sei speziell für primäre und sekundäre aliphatische Amine ausgelegt, wobei die Iminformation bei aromatischen Aminen langsamer ablaufen soll [141]. Dies kann durch die hier durchgeführte Reaktion (siehe Abbildung 26), welche ebenfalls nach 24 Stunden vollendet war und eine Ausbeute von 87 % ergab, nicht bestätigt werden.

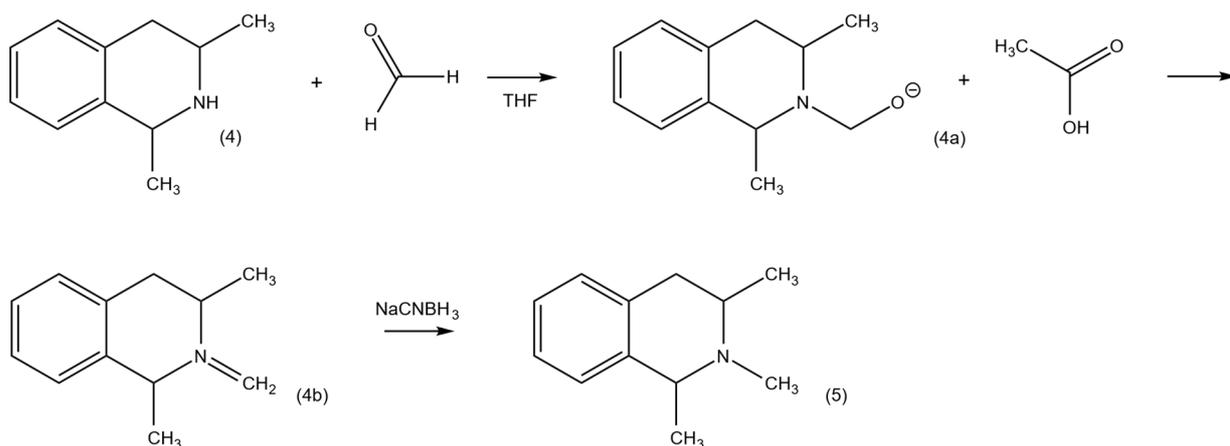


Abbildung 26: N-Methylierung des 1,3-diMeTIQs (4) (in Anlehnung an [122], [140]).

Nachdem 1,3-diMeTIQ-HBr (4) durch Zugabe von Triethylamin in die freie Base überführt wurde, konnte diese nucleophil am Formaldehyd angreifen. Das Imin (**4b**) entsteht nach Abspaltung von Wasser durch die Zugabe von Essigsäure und wird durch Natriumcyanoborhydrid letztendlich zu N-Me-1,3-diMeTIQ (**5**) reduziert.

## 5.2. Analytik

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen, erfolgreich synthetisierten TIQs 1,3-diMeTIQ und N-Me-1,3-diMeTIQ dienten als Referenzsubstanzen für die Entwicklung der flüssigchromatographischen-massenspektrometrischen Analyseverfahren sowie der Optimierung der Extraktionsverfahren. Damit konnten nach einer Teilvalidierung die Untersuchung der Gewebe- und Blutproben auf diese sowie zwei weitere TIQs (1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ) und deren Ausgangsstoffe Amphetamin, Methamphetamin, MDMA und MDA erfolgen. Diese werden nun in den folgenden Abschnitten diskutiert.

### 5.2.1. Validierung

Um einen eindeutigen qualitativen Nachweis der TIQs sowie der Amphetamine gewährleisten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Teilvalidierung durchgeführt. Diese umfasste die Parameter Selektivität bzw. Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Matrixeffekte und Wiederfindung sowie die Stabilität.

Durch die Überprüfung der Selektivität- und Spezifität der Methode wurde nachgewiesen, dass durch die hier angewandte Extraktion die Analyten auch in komplexen und sehr lipidreichen Gewebeproben (wie z. B. den Gehirnen) störungsfrei identifiziert werden konnten. Das komplexe Extraktionsverfahren der untersuchten Proben erfolgte in drei Aufreinigungsschritten. Zunächst wurde eine basische Extraktion mit anschließender saurer Reextraktion durchgeführt, wodurch endogene saure Komponenten, wie z. B. Fettsäuren, aus der Matrix entfernt wurden. Letztlich wurde der pH-Wert der Proben basisch gestellt und die Analyten in das organische Lösungsmittel überführt. Dieses Verfahren wurde bereits 1986 erfolgreich von Kohno, Ohta und Hirobe in ähnlicher Form angewandt, um die strukturverwandten TIQs 1,2,3,4TIQ und 1-MeTIQ aus Rattengehirn zu extrahieren. Bei der Selektivitäts- und Spezifitätsprüfung konnte gezeigt werden, dass die Methode in der Lage war sowohl mehrere unterschiedliche Analyten nebeneinander zu erfassen sowie diese ohne relevante Störung durch andere in der Probe enthaltenen endogenen bzw. exogenen Komponenten zu detektieren [142].

Damit auch geringe Mengen der untersuchten TIQs nachzuweisen waren, wurden geringe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen angestrebt. Mit der hier entwickelten Analysemethode wurden für die TIQs in Gehirn und Leber Nachweisgrenzen zwischen 0,1 und 4,5 ng/g und Bestimmungsgrenzen zwischen 0,9 und 6,3 ng/g ermittelt. Dabei waren die jeweils höheren Grenzwerte auf die cis-Diastereomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQs zurückzuführen, da diese in Bezug auf die Summe beider Stereoisomerenpaare lediglich einen Anteil von 17 % aufweisen (Abbildung 18). Makino et al. haben in ihrer Studie aus dem Jahr 1990 Konzentrationen des 1,3-diMeTIQs zwischen  $4,5 \pm 1,1$  ng/g und  $12,7 \pm 2,9$  ng/g im Gehirn sowie zwischen  $5,5 \pm 2,5$  ng/ml und  $13,1 \pm 2,1$  ng/ml im Plasma von Ratten nach GC-MS-Analyse ermittelt. Darüber hinaus wurden in weiteren Studien von Musshoff et al. (1999; 2000) zu den Dopaminkondensationsprodukten SAL und NorSAL in humanen Gehirn mittels LC-ECD bzw. GC-MS-Methodik Nachweisgrenzen von 0,2 ng/g bzw. 0,5 ng/g ermittelt [88], [89] (siehe auch Kapitel 1.3.3 Tabelle 1). Die hiesige Methode wäre demnach anhand der hier erzielten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dazu geeignet, die oben beschriebenen Konzentrationen des 1,3-diMeTIQs zu erfassen und außerdem vergleichbar mit den erzielten Nachweisgrenzen aus den obengenannten Studien [88], [89].

Ein wichtiger Aspekt der Methodvalidierung umfasste die Überprüfung der Stabilität, die bisher noch in keiner Studie für die Substanzen 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ untersucht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *processed sample stability*, die Einfrier- und Auftaustabilität sowie die Langzeitstabilität bestimmt. Dabei wurde eine Konzentration ausgewählt, die nahe der ermittelten Bestimmungsgrenze (Gehirn, Leber: 4 ng/g; Serum: 1 ng/ml) lag, da in diesem Bereich eventuelle Instabilitäten einen deutlicheren Effekt gezeigt hätten als in höheren Konzentrationsbereichen. Für die cis-Diastereomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQs lag aufgrund des ungleichen Stereoisomerenverhältnisses (trans-1,3-diMe-MDTIQ 83 % und cis-1,3-diMeMDTIQ 17 %) die hier gewählte Konzentration von 4 ng/g oberhalb der Nachweisgrenze (2,2 ng/g), jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze (5,7 ng/g). Im Hirngewebe zeigte diese Substanz bei der *processed sample stability* eine Abnahme der Peakfläche von 31 % über einen Zeitraum von fünf Stunden, bei einer vorgeschriebenen maximalen Abnahme von 25 %. Als Konsequenz daraus ergibt sich demnach für aufgearbeitete Hirnproben eine maximale Sequenzlänge von vier Stunden. Ebenfalls konnte eine leichte

Abweichung der tolerierbaren Grenze des Stabilitätsprobenmittelwertes bei der Einfrier-Auftaustabilität, gemessen in den Leberproben, für die cis-Diastereomere des 1,3-diMe-7,8-MDTIQ festgestellt werden (MW=115 % anstatt der erlaubten 110 %). Für alle anderen TIQs waren jedoch keine Diskrepanzen in Bezug auf die *processed sample stability*, die Einfrier-Auftaustabilität und die Langzeitstabilität zu verzeichnen. Die Substanzen sind demnach auch nach mehrmaligen Einfrier- und Auftauzyklen sowie nach längerer Lagerung bei -20°C und über die Messdauer in sehr geringen Konzentrationen in Gehirn, Leber und Serum stabil. Auch die Auswertung der Blindproben, die den Stabilitätstests unterzogen wurden, ergab keine Hinweise auf eine Neubildung der TIQs während der Lagerung bzw. den Einfrier- und Auftauzyklen. Die Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen der Studie von DeCuyper et al. (2008) in Bezug auf die thermische sowie die Einfrier- und Auftaustabilität einiger strukturverwandter TIQs (1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ; N-MeTIQ; 1-BnTIQ; (R/S)-SAL; N-Me-(R/S)-SAL; NorSAL). Dabei zeigten sich keine Hinweise auf Instabilitäten der Substanzen nach Lagerung über 28 Tage in wässriger Lösung bei 22 °C, 37 °C und 60 °C bzw. nach drei Einfrier- und Auftauzyklen (-80 °C / 22 °C) [113]. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Stabilitätstests sind für die weitere Beurteilung von großer Bedeutung, da diese Ergebnisse dafür sprechen, dass postmortale Veränderungen während der Probenlagerung keinen Einfluss auf diese Analyten in den hier untersuchten Zeiträumen haben.

Nicht außer Acht zu lassen ist zudem die Stabilität des Amphetamins und der Amphetaminderivate Methamphetamin, MDMA und MDA, da bei dem hiesigen Probenkontingent, das zum großen Teil aus institutsfremden Proben bestand, die Liegezeit der Leiche bzw. die Probenlagerungszeit nicht bekannt war. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen hierzu beruhen fast ausschließlich auf der Stabilität der genannten Substanzen in Serum oder Vollblut. Peters et al. haben dazu umfangreiche Untersuchungen mittels GC-MS-Verfahren angestellt. Die *processed sample stability* für Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA wurde in Blutproben über 30 Stunden ermittelt sowie eine Einfrier-Auftaustabilität über drei Zyklen mit einer Einfrierdauer von 21 Stunden und anschließender Probenlagerung über drei Stunden bei Raumtemperatur überprüft [143]. In weiteren Studien haben Peters et al. zudem zeigen können, dass keine Instabilitäten bezüglich der R- und S-Enantiomere von Amphetamin und Methamphetamin über sechs Monate zu verzeichnen sind [144], [145]. Maas et al., konnten 2018 mit einer enantioselektiven LC-MS/MS-Methode eine *processed sample stability* von

lediglich 14,4 Stunden für (R)- und (S)-Amphetamin sowie Methamphetamin bestimmen [146]. Werden die beiden Studien miteinander verglichen, scheint die *processed sample stability* in Bezug auf das verwendete Aufnahmemittel in unpolaren Lösungsmitteln besser zu sein. Peters et al. injizierten die extrahierten Proben in Hexan bzw. Cyclohexan während Maas et al. Methanol als Aufnahmemittel verwendeten. Bei der hiesigen Methode (Kapitel 3.4.2) wurde ein Aufnahmemittel gewählt, welches vorwiegend wässrig ist. Eine derart lange Stabilität der aufgearbeiteten Proben über eine Messsequenz von über 30 Stunden, wie die von Peters et al. ermittelt wurde, war für die hier durchgeführten Probenmessungen jedoch nicht von Nöten. Die hier gewählte Untersuchungsdauer für die *processed sample stability* erstreckte sich für die Amphetamine im Serum auf über 8,5 Stunden und zeigte hierbei auch nur eine eher geringe Abnahme der Peakflächen (9 - 12 %). Demnach könnte die Sequenzlänge für die Analyse der Amphetamine gegebenenfalls noch verlängert werden.

Clauwaert et al. haben 2001 für MDA, MDMA und MDE in Wasser, Urin, Serum und Vollblut die Stabilität über 21 Wochen bei drei verschiedenen Temperaturen (-20 °C, 4 °C und 20 °C) überprüft. Auch hier wurden keine Lagerinstabilitäten der Analyten festgestellt, jedoch traten in Serum und Vollblut starke Interferenzen durch Matrixbestandteile bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C und 20 °C auf, sodass der Nachweis der geringen Konzentrationen im Vollblut nach fünf Wochen und im Serum nach 13 Wochen nicht mehr möglich war [147]. Daher ist darauf zu achten, dass die Proben stets bei -20 °C zu lagern und nur kurzen Auftauzyklen zu unterziehen sind, um solche Interferenzen zu vermeiden.

Eine der wenigen Studien zur Stabilität von Amphetamin in humanem postmortalem Gewebe wurde von Lowe et al. 2006 durchgeführt. Allerdings wurde hier nur die Stabilität in Bezug auf die Homogenisierung von postmortalen Gehirngewebe mittels eines Ultraschallprozessors untersucht [148]. Die generierten Ergebnisse der Einfrier-Auftaustabilität und der Langzeitstabilität von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA bringen daher die Erkenntnis, dass sowohl Amphetamin als auch MDA und MDMA in postmortalem Gehirn- und Lebergewebe keinerlei Instabilität über den hier untersuchten Zeitraum (siehe Kapitel 3.4.3) aufwiesen. Lediglich die Stabilität des Methamphetamins in Gehirngewebe ergab eine leichte Abweichung von der GTFCH definierten Untergrenze ( $MW(\text{Stabilitätskontrollprobe}) = 82\%$  anstelle der erlaubten 90 %). Dies könnte möglicherweise daran

liegen, dass die Langzeitstabilität im Gehirngewebe im Vergleich zum Lebergewebe und Serum über eine längere Dauer getestet wurde (Gehirngewebe: 100 Tage; Lebergewebe: 53 Tage; Serum: 65 Tage). Jedoch haben Nagata et al. 1990 eine Studie bezüglich der Konzentrationen von Methamphetamin und Amphetamin nach Lagerung in postmortalem Kaninchenewebe veröffentlicht, die zeigt, dass Methamphetamin im Vollblut, wie auch in der Leber, über zwei Jahre relativ stabil war [149]. Dies steht in Einklang mit den hier vorliegenden Daten. Es wäre daher sinnvoll zu überprüfen, ob speziell im Gehirngewebe ein postmortaler Metabolismus stattfindet, der die bei der hiesigen Studie verzeichneten Verluste an Methamphetamin erklärt.

Die durchgeführten Extraktionen der Gehirn- und Leberproben ergaben sowohl für die TIQs als auch für die Amphetamine Wiederfindungen nahe 50 % und damit etwas geringere als im Serum (77 - 86 %). Dies ist möglicherweise auf die zusätzliche Homogenisierung und die aufwändigere Probenvorbereitung während der Flüssig-Flüssig-Extraktion der Gehirn- und Leberproben zurückzuführen. Die Bestimmung der Matrixeffekte hat darüber hinaus gezeigt, dass weder eine *ion suppression* noch ein *ion enhancement* während der Ionisation der Substanzen vorstättengeht.

Wie bereits beschrieben, lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf dem qualitativen Nachweis der hier aufgeführten TIQs. Um jedoch die Konzentrationen der Ausgangssubstanzen bestimmen zu können, sollten Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in Serum, Gehirn und Leber auch quantitativ bestimmt werden. Die Linearität für diese vier Analyten wurde zunächst in Serum geprüft. Es konnte festgestellt werden, dass in einem Kalibrationsbereich von 25 bis 750 ng/ml keine Ausreißer vorlagen und keine Wichtung der Kalibrationen erforderlich war. Zudem konnten für die Methylenedioxyamphetamine MDA und MDMA lineare Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung verwendet werden (siehe Kapitel 4.2.1). Für Amphetamin und Methamphetamin war jedoch die Verwendung einer quadratischen Kalibrationsfunktion in einem Bereich von 25 bis 625 ng/ml angeraten. Der Kurvenverlauf zeigte bei den höheren Konzentrationen eine Abflachung, was auf eine Detektorsättigung hindeutet und ebenfalls bei der Kalibration im Schweinegehirn zu beobachten war. Diese wurde erstellt, um die Ausgangsstoffe auch im postmortalen Gewebeproben bestimmen zu können. Für eine vollständige Kalibration in Doppelbestimmung erschien die Verwendung von humaner

Leermatrix nicht angemessen. Für die Herstellung der Kalibratoren wurde daher Gehirn vom Schwein verwendet. Dieses ist dem Menschen in Bezug auf Anatomie, Genetik und Physiologie sehr ähnlich [150]. Sowohl die Analytkonzentrationen in den realen Gehirn- als auch in den Leberproben wurden über die Kalibration im Schweinegehirn bestimmt, da im Vergleich zur Leber das Gehirn erfahrungsgemäß die Matrix ist, die aufgrund ihres hohen Fettgehalts schwieriger zu extrahieren ist. Laut Peters et al. (2007) ist eine präzise Quantifizierung von Substanzen in postmortalem Gewebe nicht sicher möglich, da mit Eintritt des Todes der beginnende Zerfall des Probenmaterials die Substanzkonzentrationen beeinflussen kann. Daher sollten die Analytenkonzentrationen lediglich als Schätzwerte angegeben werden. In der Publikation wird darüber hinaus eine Standardaddition für die Quantifizierung der Substanzen empfohlen, da somit die Kalibration und die Quantifizierung direkt in der für den Fall relevanten Probenmatrix mit dessen Einflussfaktoren durchgeführt werden [126]. Eine Standardaddition war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich, da dafür nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung stand. Insgesamt war die quantitative Bestimmung von Amphetamin im Gewebe mittels einer quadratisch verlaufenden Kalibrationskurve nicht geeignet, um hier die nötigen extrapolierten Konzentrationsangaben anstellen zu können. Daher konnten insbesondere für Gehirn und Leber keine konkreten Aussagen über eine genaue Konzentration getroffen werden. Durch Verdünnung des eingesetzten Probenmaterials und anschließender Hochrechnung der Konzentration, hätte dieses Problem möglicherweise umgangen werden können, allerdings hätte dann die Wahrscheinlichkeit bestanden, ein wohlmöglich falsch negatives Ergebnis in Bezug auf die TIQs zu erzielen, da diese lediglich in geringen Konzentrationen in den Proben zu erwarten waren. Zudem liegt laut Peters et al. die Schwierigkeit einer realitätsnahen Validierung darin, dass die postmortale Komposition des Körpers von Fall zu Fall unterschiedlich ist und dies nicht innerhalb einer Validierung durch die Verwendung von Leermatrix einer einzelnen oder wenigen Leichen abgedeckt werden könne [126]. Aus ethischen Gründen ist es jedoch nicht vertretbar, eine Leermatrix aus mehr als unbedingt nötigen Leichengeweben für die Methodenentwicklung und deren Validierung zu verwenden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben den verwendeten Leermatrices, die innerhalb routinemäßiger Obduktionen entnommen wurden, ebenfalls stark fäulnisverändertes Probenmaterial nach möglichen Störfaktoren (z. B. Fäulnisaminen) untersucht und die Störungen frühzeitig durch die Anpassung des Extraktionsverfahrens eliminiert.

Insgesamt konnte mit der hier durchgeführten Teilvalidierung mit Ausnahme der oben benannten Einschränkungen gezeigt werden, dass die entwickelte Analysemethode geeignet ist einen eindeutigen qualitativen Nachweis der hier untersuchten TIQs in Gehirn, Leber und Serum anzustellen.

### 5.2.2. Analyse von realen Blut- und Gewebeproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 42 Serumproben, 26 Gehirn- und 28 Leberproben untersucht, die aus den rechtsmedizinischen Instituten Bonn, Düsseldorf, Essen, Köln und Rostock bezogen wurden. Die Auswahlkriterien waren ein positives Ergebnis für Amphetamin bzw. Amphetaminderivate sowie für Alkohol, die für die Bildung der hier untersuchten TIQs erforderlich waren. Mit der bereits beschriebenen LC-MS/MS-Methode (siehe Kapitel 3.4.1) konnte das Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ in zwei Leberproben nachgewiesen werden. Jedoch wurde nur eines der beiden Stereoisomere ( $t_R = 4,16$  Min.) detektiert (siehe Abbildung 22). Dabei handelt es sich, wie bereits in Kapitel 5.1.1 (Schritt 3) beschrieben, um die Stereoisomere der cis-Konfiguration, also um das cis-1S,3R- bzw. das cis-1R,3S-diMeTIQ (siehe Abbildung 10). Laut Naoi et al. (1996) wird aus Dopamin und Acetaldehyd das Kondensationsprodukt SAL über die SAL-Synthase ausschließlich in R-Konfiguration gebildet [151]. Dass das 1,3-diMeTIQ rein enzymatisch gebildet wird und nicht unter physiologischen Bedingungen über eine Pictet-Spengler-Reaktion, wurde bereits von Haber et al. 1995 bewiesen [95], jedoch ist bislang noch nicht bekannt, welches Enzym für die Kondensation verantwortlich ist und ob eines der beiden cis-Stereoisomere präferiert gebildet wird.

Anhand der Kalibrationsfunktionen, die innerhalb der Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt wurden, konnten die Konzentrationen in den beiden positiv auf 1,3-diMeTIQ getesteten Proben näherungsweise bestimmt werden („Köln 6“:  $c(1,3\text{-diMeTIQ}) = \text{ca. } 0,5 \text{ ng/g}$ ; „Rostock 3“:  $c(1,3\text{-diMeTIQ}) = \text{ca. } 2 \text{ ng/g}$ ). In den beiden Leberproben wurden Amphetaminkonzentrationen oberhalb des Kalibrationsbereiches ( $>500 \text{ ng/g}$ ) gemessen. Die Blutalkoholkonzentrationen wurden anhand der Angaben der jeweiligen Institute übernommen. Dabei hat im Fall „Rostock 3“ eine deutliche und im Fall „Köln 6“ eine eher mäßige Alkoholisierung vorgelegen (BAK („Rostock 3“) = 1,72 ‰; BAK („Köln 6“) = 0,64 ‰) (siehe Kapitel 4.2.2).

In 13 weiteren Fällen („Düsseldorf 4 und 6“; „Essen 4, 7 und 8“; „Köln 1, 2, 3, 5 und 9“; „Rostock 1, 2 und 5“ – siehe 4.2.2 Tabelle 11) wurden ähnliche Konzentrationen an Amphetamin (>500 ng/g) und Ethanol (BAK 0,62 - 1,99 ‰) nachgewiesen (in neun Proben lag die Blutalkoholkonzentration sogar über 1,0 ‰), jedoch konnte in diesen Fällen das Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ nicht aufgefunden werden. Es werden im Folgenden verschiedene Hypothesen diskutiert, warum in lediglich zwei Fällen bei insgesamt 15 Proben mit ähnlichen Substratkonzentrationen ein Nachweis des Kondensationsproduktes 1,3-diMeTIQ möglich war:

- 1. Die Bildung des Kondensationsproduktes 1,3-diMeTIQ ist abhängig von der vor Todeseintritt vorliegenden Konzentration des Substrates Acetaldehyd. Ein negativer TIQ-Befund lässt darauf schließen, dass nicht genügend Acetaldehyd für die Kondensationsreaktion zur Verfügung stand, um das Kondensationsprodukt zu bilden und damit detektieren zu können.*

Anhand der hier vorliegenden Blutethanolkonzentration kann die tatsächlich vor Todeseintritt vorliegende Acetaldehydkonzentration nicht direkt abgeleitet werden. Die zum Teil hohen Ethanolkonzentrationen von über 1,0 ‰ weisen zwar zunächst auf eine deutliche akute Alkoholisierung vor Todeseintritt hin und würden demnach auch eine hohe Acetaldehydkonzentration vermuten lassen, jedoch ist nicht auszuschließen, dass diese Werte auf eine postmortale Neubildung des Ethanols im Gewebe zurückzuführen sind. In der Literatur werden postmortal gebildete Blutethanolkonzentrationen zwischen 0,3 und 0,7 ‰ beschrieben. In einigen Fällen wurden sogar Konzentrationen zwischen 1,5 ‰ und 2,2 ‰ erreicht [152]–[157]. Die Tatsache, dass in 13 der oben beschriebenen Leberproben das Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ nicht nachgewiesen wurde, könnte darauf hindeuten, dass in diesen Fällen vor Eintritt des Todes keine bedeutende Alkoholisierung vorlag, sondern die Blutalkoholkonzentrationen durch eine postmortale Ethanolneubildung verfälscht wurden. Demzufolge hätte vor Todeseintritt nicht genügend Acetaldehyd für eine erfolgreiche Kondensation mit Amphetamin vorgelegen.

*II. Ein chronischer Alkoholismus und die daraus resultierende erhöhte Acetaldehydkonzentration stellt die Prämisse für die Bildung des 1,3-diMeTIQs dar.*

Diese These wurde anhand der Studie von Makino et al. (1990) abgeleitet. Dort wurde die endogene Bildung des 1,3-diMeTIQs in Gehirn und Plasma von Ratten nach Gabe von Amphetamin und Alkohol nachgewiesen. Den Ratten wurden dazu über acht Wochen Ethanol in steigender Konzentration über das Trinkwasser verabreicht, um so einen chronischen Alkoholismus zu induzieren. Nach vier Wochen wurde ihnen zusätzlich täglich Amphetamin intraperitoneal injiziert. Im Gehirn der Ratten wurden anschließend Konzentrationen des 1,3-diMeTIQs zwischen  $4,5 \pm 1,1$  ng/g bis  $12,7 \pm 2,9$  ng/g gemessen. Anhand dieses Versuchsaufbaus kann vermutet werden, dass ohne den induzierten Alkoholismus und die wiederholte Amphetamingabe die Kondensationsprodukte nicht hätten entstehen bzw. detektiert werden können. Vorversuche mit Einmalgaben der Substrate wurden in der Studie nicht beschrieben.

Anhand der vorliegenden Blutalkoholkonzentrationen kann lediglich eine Aussage über den akuten Alkoholisierungsgrad getroffen werden, jedoch nicht ob ein chronischer Alkoholkonsum in der Vergangenheit vorgelegen hat. Dazu würde es der Untersuchung mehrerer indirekter Alkoholmarker wie u. a. der  $\gamma$ -Glutamyltransferase, dem mittlere korpuskulären Volumen (MCV) der Erythrozyten oder der Aktivität der Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) bzw. der Alanin-Aminotransferase (ALT) bedürfen [158]–[163]. Ebenso wäre der Nachweis von Ethylglucuronid in Haaren eine geeignete Methode um ein chronisch exzessives Trinkverhalten zu beurteilen [164], da eine gute Korrelation zwischen der Ethylglucuronidkonzentration in Haaren und der täglichen Ethanolaufnahme besteht [165]. Eine der oben beschriebenen Untersuchungen konnte jedoch aufgrund der hier zu geringen zur Verfügung stehenden Probenmenge nicht durchgeführt werden. Es kann daher nur spekuliert werden, ob in den beiden TIQ-positiven Fällen möglicherweise ein chronischer Alkoholkonsum vorlag. Zudem wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob bei Alkoholikern im Vergleich zu Nichtalkoholikern eine höhere Acetaldehydkonzentration vorliegt, welches die Bildung des Kondensationsproduktes möglicherweise begünstigen könnte. Laut einer Studie von Harada et al. (1983) wurden sehr ähnliche Blutacetaldehydkonzentrationen in Alkoholikern und in Nicht-Alkoholikern von 5 bzw. 3  $\mu\text{mol/l}$  bei einer durchschnittlichen maximalen Blutalkoholkonzentration von 0,5 g/l gemessen [166]. Palmer et Jenkins

publizierten dagegen 1982 signifikant höhere Acetaldehydkonzentrationen in Alkoholikern im Vergleich zur Kontrollgruppe (MW (Acetaldehyd – Alkoholiker) =  $17,8 \pm 6$   $\mu\text{mol/l}$ ; MW (Acetaldehyd – Kontrolle) =  $10,0 \pm 4$   $\mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0,01$ ) bei ähnlichen maximalen Blutalkoholkonzentrationen von ca. 1,4 ‰ [167]. Aufgrund dieser und weiterer kontroverser Angaben in der Literatur bezüglich der Acetaldehydkonzentrationen in Alkoholikern bzw. Nicht-Alkoholikern, ist eine abschließende Beurteilung der oben beschriebenen These hier nicht möglich.

*III. Durch eine verminderte Aldehyddehydrogenaseaktivität könnte sich die Acetaldehydkonzentration erhöhen und die Bildung des 1,3-diMeTIQs begünstigen.*

Bei einem bestehenden genetischen Aldehyddehydrogenasedefizit wurden in der Studie von Harada et al. (1983) sowohl in Alkoholikern als auch in Nicht-Alkoholikern deutlich höhere Acetaldehydkonzentrationen im Blut von im Mittel  $30 \mu\text{mol/l}$  nachgewiesen als im Vergleich zu Probanden ohne Gendefizit ( $3 - 5 \mu\text{mol/l}$  - bei einer durchschnittlichen maximalen Blutalkoholkonzentration von  $0,5 \text{ g/l}$ ) [166]. Zusätzlich könnte die Acetaldehydkonzentration durch Aldehyddehydrogenaseinhibitoren wie Disulfiram erhöht werden, welches zur unterstützenden Behandlung bei Alkoholabstinenzlern eingesetzt wird [4], [10]. Nicht auszuschließen wäre demnach in den hiesigen TIQ-positiven Fällen auch eine aufgrund eines genetischen Defizits vorliegende verminderte Aldehyddehydrogenaseaktivität und der daraus resultierenden erhöhten Acetaldehydkonzentration im Gewebe, die die Kondensationsreaktion begünstigen würden.

IV. *Das Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ wird nach der Bildung weiter verstoffwechselt. Dadurch sinkt dessen Konzentration unterhalb der detektierbaren Grenze bzw. das Kondensationsprodukt wurde bereits vor Todeseintritt eliminiert.*

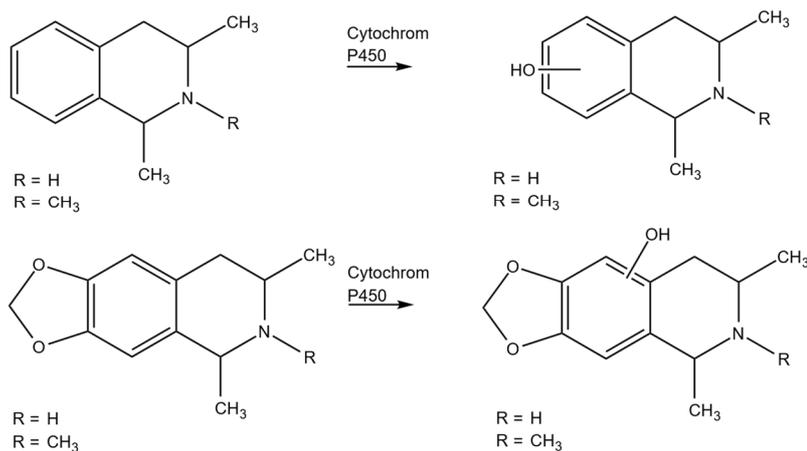
Aufgrund der Struktur der TIQs wären die in Abbildung 27 und im Nachfolgenden aufgeführten Metabolismusreaktionen denkbar:

- A) Eine aromatische Hydroxylierung an der Position C6, C7, C8 bzw. C9 von 1,3-diMeTIQ und N-Me-1,3-diMeTIQ bzw. an der Position C6 und C9 von 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ durch Cytochrom P450 (in Anlehnung an [52]).
- B) Eine oxidative N-Desalkylierung von N-Me-1,3-diMeTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ zu jeweils 1,3-diMeTIQ bzw. 1,3-diMe-7,8-MDTIQ durch Cytochrom P450, sowie eine O-Demethylierung von 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ durch Cytochrom P450, gefolgt von einer O-Methylierung durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (in Anlehnung an [33]).
- C) Eine N-Methylierung von 1,3-diMeTIQ bzw. 1,3-diMe-7,8-MDTIQ zu N-Me-1,3-diMeTIQ bzw. N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ (in Anlehnung an [110], [111]) und anschließender Oxidation durch Monoaminoxidasen zum N-Methylisochinoliniumion (in Anlehnung an [112]).
- D) Eine Glucuronidierung oder Sulfatierung der hydroxylierten TIQs aus den obengenannten Phase-I-Reaktionen.

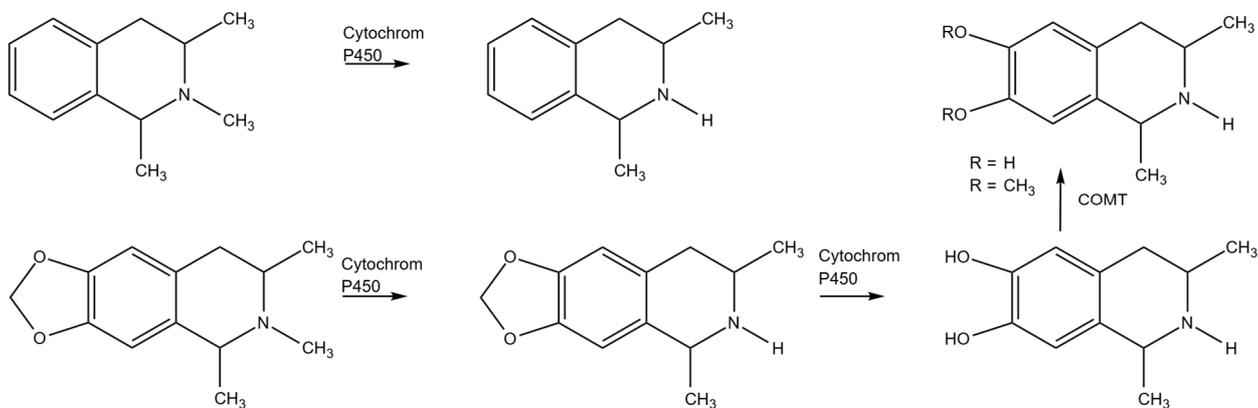
Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, findet die Biotransformation von Amphetamin zu dessen Hydroxyderivaten und jeweiligen konjugierten Derivaten lediglich in einem geringen Anteil von 1 bis 4 % statt [43]–[46]. Es wäre demnach denkbar, dass die hier beschriebene Hydroxylierung (A) und anschließende Glucuronidierung sowie die Sulfatierung (D) der TIQs ebenfalls nur in einem sehr geringen Ausmaß stattfindet. Ebenso wurde in den obengenannten Kapitel erwähnt, dass lediglich 7 % des Methamphetamins zu Amphetamin demethyliert werden, sodass vermutet werden könnte, dass auch die unter B) aufgeführte oxidative N-Desalkylierung weniger von Bedeutung für den TIQ-Metabolismus zu sein scheint. Wird die Verstoffwechslung des MDMA als Vergleich herangezogen, könnte die in B) beschriebene O-Demethylierung von 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-

MDTIQ eine Rolle für die negativ-getesteten Leberproben spielen. Durch die oben genannte Reaktion wird aus MDMA das Dihydroxyderivat 3,4-Dihydroxymethamphetamin und durch eine nachfolgende Methylierung an einer der zwei Hydroxygruppen im weiteren Verlauf das 4-Hydroxy-3-Methoxymethamphetamin gebildet. Der im Urin gefundene Anteil dieser beiden Metabolite beläuft sich dabei auf 17,7 % bzw. 22,7 % [33]. Falls sowohl das 1,3-diMe-7,8-MDTIQ als auch das N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ in ähnlichem Ausmaß verstoffwechselt werden würden, wäre dies eine mögliche Erklärung dafür, warum diese beiden TIQs in den hier gemessenen Proben nicht nachzuweisen waren, da die Konzentration dieser wohlmöglich durch den Metabolismus in der Leber unterhalb der Nachweisgrenze liegt. In welchem Ausmaß die N-Methylierung und die anschließende Oxidation zum N-Methylisochinoliniumion ablaufen könnte, ist aus den vorliegenden Literaturdaten nur schwer abzuschätzen. In einer Studie von Lau et al. (1988), wurden nur geringe Mengen an MPP<sup>+</sup> (einem dem N-Methylisochinoliniumion ähnlichem Metabolit des Neurotoxins MPTP) im Urin aufgefunden [168]. Ebenfalls detektierten Niwa et al. (1990) lediglich geringe Konzentrationen des N-Methylisochinoliniumion-Vorläufers N-MeTIQ im Gehirn von Affen, denen 1,2,3,4TIQ subkutan injiziert wurden. Hierbei vermuten die Autoren jedoch, dass das N-MeTIQ bereits weiter zum neurotoxischen N-Methylisochinoliniumion verstoffwechselt wurde. Ob die TIQs zum großen Anteil unverändert ausgeschieden werden oder die obengenannten Reaktionen erklären können, warum in den hier gemessenen Proben, kein TIQ nachgewiesen werden konnte, kann jedoch aufgrund der Datenlage nicht hinreichend beurteilt werden.

A



B



C

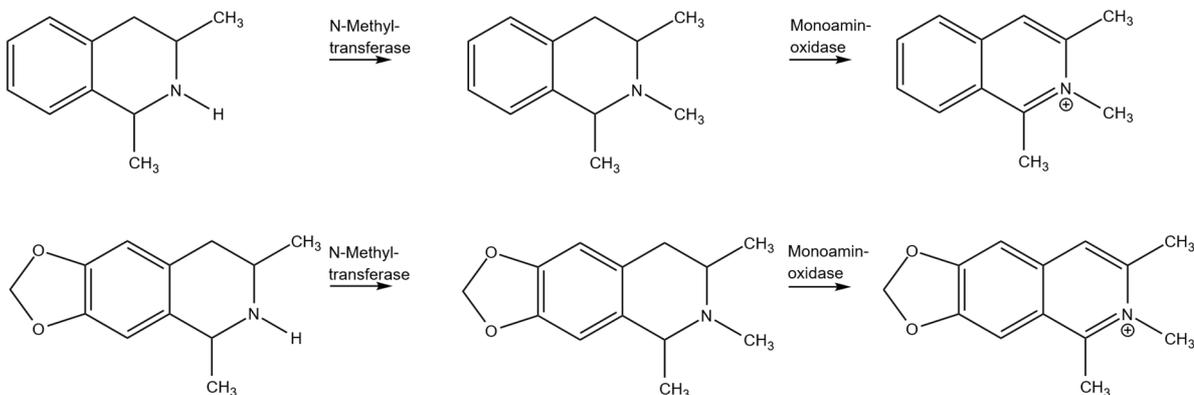


Abbildung 27: Mögliche Metabolite von 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ, N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ - A: Aromatische Hydroxylierung durch Cytochrom P450. B: Oxidative N-Desalkylierung durch Cytochrom P450 sowie O-Demethylierung von 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ durch Cytochrom P450, gefolgt von einer O-Methylierung durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT). C: N-Methylierung durch N-Methyltransferase gefolgt von einer Oxidation durch Monoaminoxidase zum N-Methylisochinolinium.

Eine der obengenannten Hypothesen könnte möglicherweise erklären, warum lediglich in zwei von 28 Leberproben ein Nachweis der TIQs möglich war. Zudem lagen in acht TIQ-negativen Proben vergleichsweise niedrige Substratkonzentrationen an Amphetamin bzw. Ethanol vor, sodass eine Bildung des 1,3-diMeTIQs hier unwahrscheinlich erscheint bzw. die Konzentration wohlmöglich unterhalb der Nachweisgrenze liegt. In den Proben „Düsseldorf 1“; „Essen 1, 2, 3; 6“; „Köln 8“; „Rostock 4“ wurden von den Betroffenen scheinbar vor dem Tod nur geringe Mengen an Ethanol aufgenommen (die BAKs lagen hierbei zwischen  $<0,1\text{ ‰}$  und  $0,51\text{ ‰}$ ) sowie in der Probe „Düsseldorf 2“ eine etwas geringere Menge an Amphetamin konsumiert worden zu sein scheint oder der Konsum bereits weiter zurückgelegen hat ( $c(\text{Amphetamin} - \text{Leber}) = 150\text{ ng/g}$ ). Ebenso ist aufgrund der kaum nennenswerten Methamphetaminkonzentrationen in den hier untersuchten Leberproben kein positives Ergebnis für das Kondensationsprodukt N-Me-1,3-diMeTIQ zu erwarten.

In fünf Proben wurden außergewöhnlich hohe Konzentrationen an MDMA und moderate bis hohe Konzentrationen des Metabolits MDA bestimmt ( $c(\text{MDMA}) = \text{ca. } 1100 - 5700\text{ ng/g}$ ;  $c(\text{MDA}) = \text{ca. } 140 - 690\text{ ng/g}$ ). Auch die dazugehörigen übermittelten Blutalkoholkonzentrationen ( $0,89 - 1,60\text{ ‰}$ ) deuten zunächst einmal auf eine mäßige bis deutliche Alkoholisierung hin. Trotz dieser recht hohen Substratkonzentrationen wurden keine Hinweise auf die Bildung der TIQs 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ erhalten. Aufgrund der positiven mesomeren Effekte der Methylendioxygruppen von MDA und MDMA sollte die Kondensation mit Acetaldehyd im Vergleich zu Amphetamin und Methamphetamin theoretisch erleichtert ablaufen (in Anlehnung an [95]), da durch die elektronenspendenden Substituenten die Elektronendichte im Aromaten erhöht wird. So sollte das nach der Reaktion des Amins (hier: MDMA bzw. MDA) mit der Carbonylverbindung (hier: Acetaldehyd) gebildete Imin erleichtert nukleophil vom Aromaten angegriffen werden können [94]. Ein ähnliches Kondensationsprodukt aus MDA und Formaldehyd (3-Methyl-6,7-Methylendioxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin) konnte 1992 durch Nakagawa et al. in Ratten nachgewiesen werden. Dabei wurde diesen lediglich eine Einmaldosis ( $10\text{ mg/kg}$ ) des MDAs verabreicht, nicht aber zusätzlich das zweite Substrat Formaldehyd bzw. dessen Vorstufe Methanol [104], wie es in der Studie von Makino et al. 1990 praktiziert wurde [3]. Dass dies bei Nakagawa et al. nicht notwendig war, scheint zum einen an der höheren Reaktivität des Formaldehyds im Vergleich zum Acetaldehyd zu liegen und zum anderen

an den elektronenspendenden Substituenten des Aromaten. Weshalb in den oben genannten Fällen ein Nachweis der Kondensationsprodukte 1,3-diMe-7,8-MDTIQ bzw. N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ nicht gelungen ist, könnte durch die zuvor diskutierten Thesen bezüglich des fehlenden Nachweises des 1,3-diMeTIQs im Lebergewebe erklärt werden, wie z. B. an einer zu geringen Acetaldehydkonzentration im Gewebe oder an einem bereits vollzogener Metabolismus der TIQs.

In den hier untersuchten Gehirn- und Serumproben wurden trotz zum Teil sehr hohen Amphetamin- bzw. Amphetaminderivat- und Blutalkoholkonzentrationen ebenfalls keine Kondensationsprodukte nachgewiesen. Einen Hinweis zu einer möglichen Ursache darauf liefert u. a. die *in vivo* Studie von Eriksson und Sippel (1977). Darin wurden die gemessenen Acetaldehydkonzentrationen u. a. in Gehirn- und Lebergewebe sowie im Blut von Ratten nach oraler Ethanolgabe beschrieben. Sie publizierten, dass 95 % des in der Leber entstandenen Acetaldehyds direkt weiter metabolisiert wurde und nur ein kleiner Anteil die Leber über das Blut verlässt. Gemessen wurden daher die höchsten Acetaldehydkonzentrationen in der Leber, gefolgt von cerebralen und peripheren Blut. Für reines Gehirngewebe konnte kein positives Acetaldehydergebnis ermittelt werden. Die Autoren vermuteten daher, dass Acetaldehyd bereits vor dem Eintritt in das Gehirn vollständig verstoffwechselt wird [169]. Dies wurde ebenfalls von Sippel (1974) in einer *in vivo* Studie an Ratten nach intraperitonealer Ethanolgabe im cerebralen Blut und Gehirn untersucht. Unterhalb einer cerebralen Acetaldehydkonzentration von 250 nmol/ml wurde im Gehirn kein Acetaldehyd gemessen. Dies begründet der Autor damit, dass die cerebralen Kapillarwände Aldehyddehydrogenase enthalten und somit als effektive Blut-Hirn-Schranke gegen exogenes Acetaldehyd wirken bis ihre Kapazität ab einer Konzentration von 250 nmol/ml gesättigt ist [170]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Jamal et al. in ihrer *in vivo* Studie von 2003. Um Blutacetaldehydlevel von über 70 µM zu erzeugen und somit Acetaldehyd nach Passage der Blut-Hirn-Schranke im Gehirn nachweisen zu können, musste den Ratten vor der Ethanolgabe der potente Acetaldehyddehydrogenaseinhibitor Cyanamid injiziert werden [171]. Tabakoff et al. (1975) haben dagegen in ihrer *in vivo* Studie an Mäusen geringe aber detektierbare Acetaldehydkonzentrationen im Gehirn nachgewiesen und geschlussfolgert, dass ein aktiver Metabolismus von Ethanol zu Acetaldehyd innerhalb des Gehirns stattfindet [172]. Eriksson und Sippel vermuten jedoch, dass Reaktionen wie die Kondensation von Acetaldehyd mit biogenen Aminen, die

hohe Acetaldehydlevel verlangen, nicht im Gehirn ablaufen [169]. Dies scheint nicht für die Kondensationsreaktion von Dopamin und Acetaldehyd zu SAL zu gelten, da Musshoff et al. dieses vor allem in dopaminreichen Hirnregionen nachgewiesen haben, und zwar gleichermaßen in postmortalen Gehirn von Alkoholikern als auch von Nicht-Alkoholikern. Sie vermuten aufgrund der (R)- und (S)-SAL-Konzentrationen, dass sowohl eine enzymkatalysierte als auch eine unter physiologischen Bedingungen ablaufende Pictet-Spengler Reaktion stattfindet [90]. Diese scheint für die hier relevante Kondensationsreaktion von Amphetamin und Acetaldehyd zum 1,3-diMeTIQ laut einer Studie von Haber et al. 1995 nicht zu gelten, in der sie das 1,3-diMeTIQ in Homogenaten von Hirnstamm, Nebenniere und Niere nach Inkubation von Amphetamin und Acetaldehyd nachgewiesen haben. Den Gewebekomponenten wurden dabei jedoch sehr hohe Acetaldehydkonzentrationen von umgerechnet 6400  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Da nach Inkubation der Ausgangssubstanzen in Pufferlösung kein Kondensationsprodukt aufgefunden wurde, vermuten sie, dass nur eine enzymatische Bildung stattfinden kann und nicht, wie beim SAL teils auch über eine Pictet-Spengler-Reaktion. Dies ist wahrscheinlich den fehlenden elektronenspendenden Substituenten am Phenylring des 1,3-diMeTIQs geschuldet, die eine Kondensation erleichtern [95]. Es ist demnach theoretisch möglich, dass die Kondensation im Gehirngewebe ablaufen kann, jedoch zweifelhaft, ob derartige Konzentrationen an Acetaldehyd das Gehirn erreichen und daher eine Kondensation im Gehirn wahrscheinlich ist. Es wäre daher denkbar, dass die Kondensation von Amphetamin und Acetaldehyd zu 1,3-diMeTIQ in der Leber von Statten geht und das Produkt von dort aus in das Gehirn verteilt wird. Makino et al. berichteten zudem in der bereits oben genannten Studie, dass 1,3-diMeTIQ in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wodurch sich die von ihnen publizierten positiven Ergebnisse für 1,3-diMeTIQ im Gehirn ableiten lassen würden [3]. Jedoch waren in den TIQ-positiven Leberproben der hiesigen Studie, die abgeschätzten Konzentrationen des 1,3-diMeTIQ so gering, dass ein Nachweis im Gehirn auch nicht zu erwarten gewesen wäre, sofern das Kondensationsprodukt nicht dort gebildet werden würde. Diese Annahme wird durch die hier erlangten Ergebnisse bezüglich des in der Leber jedoch nicht im Gehirn nachgewiesenen 1,3-diMeTIQs bestätigt.

Ein weiterer Aspekt, der zu diskutieren ist, ist die Verteilung der TIQs im Gehirn. Falls sich die aus Amphetamin bzw. Amphetaminderivaten abgeleiteten TIQs ähnlich zu dem SAL auf bestimmte

Hirnregionen (in diesem Fall auf dopaminreiche Areale) beschränken würden, wäre es von Bedeutung zu wissen, welches Hirnareal bei der Obduktion entnommen wurde. Diese Informationen lagen hier jedoch nicht vor, sodass bei einer regioselektiven Verteilung der hier untersuchten TIQs ein falsch-negatives Ergebnis möglich gewesen wäre. Die Studie von Kalasinsky et al. (2001), bei der 15 verschiedene Gehirnregionen chronischer Methamphetaminkonsumenten auf Methamphetamin und Amphetamin untersucht wurden, zeigt jedoch, dass nur geringe Konzentrationsunterschiede der Substanzen in den einzelnen Regionen vorherrschen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es durch postmortale Umverteilung innerhalb des Gehirns während der Leichenliegezeit zu einer Änderung des Konzentrationsprofils gekommen ist [173]. Zudem haben DeCuypere et al. (2008) sieben verschiedene TIQs (1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ; N-MeTIQ; 1-BnTIQ; (R/S)-SAL; N-Me-(R/S)-SAL; NorSAL) in 15 verschiedenen humanen Hirnregionen untersucht. SAL und dessen Derivate wurden in Einklang mit Musshoff et al. (2000 und 2005 - [89], [90]) in höheren Konzentrationen in Regionen mit erhöhtem Dopamingehalt aufgefunden. Die übrigen untersuchten TIQs (1,2,3,4TIQ, 1-MeTIQ, N-MeTIQ, 1-BnTIQ) lagen dagegen über alle Hirnregionen ähnlich konzentriert vor [113]. Zudem wurden in der hiesigen Untersuchung in jeder Probe ein positives Ergebnis für eines der (potenziellen) Substrate Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA erzielt, sodass für die hier zu untersuchenden TIQs es nicht von Bedeutung zu sein scheint, aus welchem Hirnareal die Probe asserviert wurde und daher ein falsch-negatives Ergebnis aufgrund dessen ausgeschlossen werden kann.

### 5.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Nach der erfolgreichen Synthese der aus Amphetamin bzw. Methamphetamin und Acetaldehyd gebildeten TIQs 1,3-diMeTIQ und N-Me-1,3-diMeTIQ wurde ein LC-ESI-MS/MS-Analyseverfahren und eine Flüssig-Flüssig-Extraktion entwickelt. Dieses umfasste die Untersuchung von 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ und N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ sowie Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in humanem Blut- und postmortalen Gehirn- und Leberproben. Insgesamt konnte anhand der hier durchgeführten Teilvalidierung mit nur wenigen Einschränkungen gezeigt werden, dass die entwickelte Analysemethode geeignet ist, um einen eindeutigen qualitativen Nachweis der hier untersuchten TIQs in Gehirn, Leber und Serum vorzunehmen. Nach Analyse der Blut-

und Gewebeproben konnte ein Nachweis auf das aus Amphetamin und Acetaldehyd gebildete Kondensationsprodukt 1,3-diMeTIQ in zwei Leberproben erfolgen. Dabei wurde in beiden Proben nur das cis-Diastereomerenpaar detektiert. Welches Enzym für die Kondensationsreaktion verantwortlich ist und ob eines der cis-Stereoisomere (cis-1R-3S oder cis-1S-3R) bevorzugt gebildet wird, bietet Potential für weitere Studien. In allen weiteren Leber- sowie auch in den Gehirn- und Serumproben konnten trotz zum Teil ähnlicher Konzentrationen der Substrate das 1,3-diMeTIQ sowie die übrigen TIQs nicht nachgewiesen werden. Mögliche Erklärungen hierfür wären u. a. ein fortgeschrittener Metabolismus der TIQs oder eine zu geringe Konzentration des Substrats Acetaldehyd, sodass die Bildung der TIQs nicht ausreichend forciert wird bzw. eine Detektion dieser trotz der geringen Nachweisgrenzen nicht möglich war.

Für weitere Studien sollten künftig verschiedene Hirn- und Leberareale untersucht werden, um zu prüfen, ob es Regionen gibt, in denen die Kondensationsprodukte präferiert gebildet werden. Weiterhin sollte die Validierung in Bezug auf eine quantitative Bestimmung vorangetrieben werden. Dazu sollten die Validierungsparameter Linearität und Genauigkeit in einem Pool aus mehreren humanen Gehirn- bzw. Leberproben bestimmt werden bzw. sofern mehr Probenmaterial zur Verfügung steht, die externe Kalibration mit einem Standardadditionsverfahren verglichen werden. Insgesamt sollten mehr Proben untersucht werden, die im Vorfeld positiv auf Amphetamin bzw. Amphetaminderivate und Ethanol gemessen wurden. Falls weitere Proben positiv auf die TIQs getestet werden sollten, wäre es zudem sinnvoll die dazugehörigen polizeilichen Untersuchungsergebnisse bezüglich möglicher neurotoxischer Auffälligkeiten und Ausfallerscheinungen zu begutachten. Möglicherweise lässt sich daraus die toxikologische Relevanz der aus Amphetamin und Alkohol gebildeten Kondensationsprodukte ableiten und somit ein Beitrag zur Aufklärung des komplexen Wirkungsspektrums eines simultanen Konsums von Amphetamin und Alkohol leisten.

## Literaturverzeichnis

- [1] EMCDDA, "Europäischer Drogenbericht 2022: Trends und Entwicklungen," Luxemburg, 2022.
- [2] T. Yamamura, S. Hisida, and K. Hatake, "Alcohol Addiction of Methamphetamine Abusers in Japan," *J. Forensic Sci.*, vol. 36, no. 3, pp. 754–764, 1991.
- [3] Y. Makino, S. Ohta, Y. Tasaki, O. Tachikawa, M. Kashiwasake, and M. Hirobe, "A Novel and Neurotoxic Tetrahydroisoquinoline Derivative In Vivo: Formation of 1,3-Dimethyl- 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, a Condensation Product of Amphetamines, in Brains of Rats Under Chronic Ethanol Treatment," *J. Neurochem.*, vol. 55, no. 3, pp. 963–969, 1990.
- [4] O. H. Drummer, *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*. London: Arnold, 2001.
- [5] R. Penning, T. Gilg, and L. von Meyer, "Alkohol, Drogen und Verkehrssicherheit," in *Rechtsmedizin systematisch*, 3rd ed., BADS, Ed. Bremen: UNI-MED, 1997.
- [6] W. Feuerlein, "Alkoholismus: Ein Problem verschiedener Kulturen und Jahrhunderte," *Psychiatria Danubina*, vol. 6, pp. 55–62, 1994.
- [7] M. V. Singer and S. Teyssen, *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten: Grundlagen - Diagnostik - Therapie*, vol. 53, no. 9. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1999.
- [8] T. Gilg, "Alkoholbedingte Fahruntüchtigkeit. Beurteilung und Begutachtung in der forensischen Praxis, Teil 2," *Rechtsmedizin*, vol. 15, no. 2, pp. 97–112, 2005.
- [9] B. Madea, *Praxis Rechtsmedizin*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2003.
- [10] R. E. Ferner, "Interactions between alcohol and drugs," *Adverse Drug React. Bull.*, vol. 189, pp. 719–722, 1998.
- [11] T. Gilg, "Alkoholbedingte Fahruntüchtigkeit. Beurteilung und Begutachtung in der forensischen Praxis, Teil 1," *Rechtsmedizin*, vol. 15, no. 1, pp. 39–50, 2005.
- [12] T. Daldrup, *Postmortaler Eiweisszerfall in menschlichen Organen, Reaktionen und zeitliche Zusammenhänge*. Düsseldorf: Tritsch-Verlag, 1979.
- [13] V. A. Boumba, K. S. Ziavrou, and T. Vougiouklakis, "Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses," *Forensic Sci. Int.*, vol. 174, pp. 133–151, 2008.
- [14] Y. Lin and S. Tanaka, "Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 69, no. 6, pp. 627–642, 2006.
- [15] B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, and G. Zacchi, "Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 12, pp. 549–556, 2006.
- [16] G. Gottschalk, *Bacterial Metabolism*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1979.
- [17] J. Piškur, E. Rozpedowska, S. Polakova, A. Merico, and C. Compagno, "How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?," *Trends Genet.*, vol. 22, no. 4, pp. 183–186, 2006.

- [18] A. J. Wolfe, "The Acetate Switch," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 12–50, 2005.
- [19] J. Knappe and G. Sawers, "A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 75, no. 4, pp. 383–398, 1990.
- [20] A. W. Jones, R. Andersson, J. Sakshaug, and J. Morland, "Possible Formation of Ethanol in Postmortem Blood Specimens after Antemortem Treatment with Mannitol," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 15, no. 3, pp. 157–158, 1991.
- [21] F. C. Kugelberg and A. W. Jones, "Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature," *Forensic Sci. Int.*, vol. 165, no. 1, pp. 10–29, 2007.
- [22] P. X. Iten, *Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluss. Forensische Interpretation und Begutachtung*. Hallstadt: Rosch-Buch, 1994.
- [23] L. Edeleano, "Ueber einige Derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenylisobuttersäure," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 20, pp. 616–622, 1887.
- [24] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, and M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, 8th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
- [25] EMCDDA, "Europäischer Drogenbericht 2019: Trends und Entwicklungen," Luxemburg, 2019.
- [26] Bundeskriminalamt, "Rauschgiftkriminalität: Bundeslagebild 2020," Wiesbaden, 2021.
- [27] United Nations, "Recommended methods for the identification and analysis of Amphetamine, Methamphetamine and their ring-substituted Analogues in seized materials," New York, 2006.
- [28] V. Kunalan, N. N. Daéid, W. J. Kerr, H. A. S. Buchanan, and A. R. McPherson, "Characterization of Route Specific Impurities Found in Methamphetamine Synthesized by the Leuckart and Reductive Amination Methods," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 17, pp. 7342–7348, 2009.
- [29] H. F. Skinner, "Methamphetamine synthesis via hydriodic acid/red phosphorus reduction of ephedrine," *Forensic Sci. Int.*, vol. 48, no. 2, pp. 123–134, 1990.
- [30] EMCDDA, "EU Drug Markets Report - In-depth Analysis," Luxemburg, 2016.
- [31] T. E. Ary and K. H. L., "Phencyclidine: Effect on the accumulation of <sup>3</sup>[H]-Dopamine in synaptic vesicles," *Life Sci.*, vol. 26, pp. 575–578, 1980.
- [32] D. Jirovský, K. Lemr, J. Ševčík, B. Smysl, and Z. Stránský, "Methamphetamine - properties and analytical methods of enantiomer determination," *Forensic Sci. Int.*, vol. 96, no. 1, pp. 61–70, 1998.
- [33] R. De la Torre *et al.*, "Human Pharmacology of MDMA Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition," *Ther. Drug Monit.*, vol. 26, no. 2, pp. 137–144, 2004.
- [34] J. Gerchow, L. E. Hermle, K.-A. Kovar, and K. Wanke, *Drogenabhängigkeit*, 2nd ed. Hamm, 1995.
- [35] C. E. Cook *et al.*, "Plasma Levels of Methamphetamine After Smoking of Methamphetamine

- Hydrochloride," *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser.*, vol. 105, pp. 578–579, 1990.
- [36] S. M. Berman, R. Kuczenski, J. T. McCracken, and E. D. London, "Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior : a review," *Mol. Psychiatry*, vol. 14, pp. 123–142, 2009.
- [37] S. H. Wan, S. B. Matin, and D. L. Azarnoff, "Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 23, no. 5, pp. 585–590, 1978.
- [38] R. Regenthal, M. Krueger, C. Koepfel, and R. Preiss, "Drug Levels: Therapeutic and toxic Serum/Plasma Concentrations of Common Drugs," *J. Clin. Monit. Comput.*, vol. 15, pp. 529–544, 1999.
- [39] T. Kraemer and H. H. Maurer, "Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine," *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 713, no. 1, pp. 163–187, 1998.
- [40] N. A. Santagati, G. Ferrara, A. Marrazzo, and G. Ronsisvalle, "Simultaneous determination of amphetamine and one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 30, no. 2, pp. 247–255, 2002.
- [41] S. M. Krishnan, M. Pennick, and J. G. Stark, "Metabolism, Distribution and Elimination of Lisdexamfetamine Dimesylate - Open Label, Single-Centre, Phase I Study in Healthy Adult Volunteers," *Clin. Drug Investig.*, vol. 28, no. 12, pp. 745–755, 2008.
- [42] A. M. El Masry, J. N. Smith, and R. T. Williams, "Studies in Detoxication," *Biochem. J.*, vol. 64, no. 1, pp. 50–56, 1956.
- [43] P. S. Sever, L. G. Dring, and R. T. Williams, "Urinary Metabolites of p-Hydroxyamphetamine in Man, Rat and Guinea-pig," *Xenobiotica*, vol. 6, no. 6, pp. 345–353, 1976.
- [44] P. S. Sever, J. Caldwell, L. G. Dring, and R. T. Williams, "The Metabolism of Amphetamine in Dependent Subjects," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 6, no. 3, pp. 177–180, 1973.
- [45] J. Caldwell, L. G. Dring, and R. T. Williams, "Norephedrine as Metabolites of (14C)Amphetamine in Urine in Man," *Biochem. J.*, vol. 129, no. 1, pp. 23–24, 1972.
- [46] L. G. Dring, R. L. Smith, and R. T. Williams, "The Metabolic Fate of Amphetamine in Man and other Species," *Biochem. J.*, vol. 116, no. 1, pp. 425–435, 1970.
- [47] C. E. Cook *et al.*, "Pharmacokinetics of Methamphetamine Self-Administered To Human Subjects By Smoking S-(+)-Methamphetamine Hydrochloride," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 21, no. 4, pp. 717–723, 1993.
- [48] J. T. Cody, "Determination of methamphetamine enantiomer ratios in urine by gas chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 580, no. 1–2, pp. 77–95, 1992.
- [49] H. K. Lim and R. L. Foltz, "In Vivo and in Vitro Metabolism of 3,4-(Methylenedioxy)methamphetamine in the Rat: Identification of Metabolites Using an Ion Trap

- Detector," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 1, no. 6, pp. 370–378, 1988.
- [50] H. H. Maurer, "On the Metabolism and the toxicological analysis of Methylenedioxyphenylalkylamine Designer Drugs by Gas Chromatography-Mass Spectrometry," *Ther. Drug Monit.*, vol. 18, no. 4, pp. 465–470, 1996.
- [51] T. Kraemer and H. H. Maurer, "Toxicokinetics of Amphetamines: Metabolism and Toxicokinetic Data of Designer Drugs, Amphetamine, Methamphetamine, and their N-Alkyl Derivatives," *Ther. Drug Monit.*, vol. 24, no. 2, pp. 277–289, 2002.
- [52] H. K. Lim and R. L. Foltz, "In vivo Formation of Aromatic Hydroxylated Metabolites of 3,4-(Methylenedioxy)methamphetamine in the Rat: Identification by Ion Trap Tandem Mass Spectrometric (MS/MS and MS/MS/MS) Techniques," *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 20, pp. 677–686, 1991.
- [53] A. H. Beckett and M. Rowland, "Urinary excretion kinetics of amphetamine in man," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 17, no. 1, pp. 628–639, 1965.
- [54] A. M. Asatoor, B. R. Galman, J. R. Johnson, and M. D. Milne, "The Excretion of Dexamphetamine and Its Derivatives," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 24, no. 1, pp. 293–300, 1965.
- [55] S. Caras and T. Sharpe, "Pharmacokinetics of AR19, an Immediate-Release Amphetamine Sulfate Formulation Designed to Deter Manipulation for Administration Via Nonoral Routes: Bioequivalence to Reference Racemic Amphetamine Sulfate, Dose Proportionality, and Food Effect," *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.*, vol. 30, no. 2, pp. 69–80, 2020.
- [56] R. De La Torre *et al.*, "Pharmacology of MDMA in Humans," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 914, no. 1, pp. 225–237, 2006.
- [57] M. Carvalho *et al.*, "Toxicity of amphetamines: An update," *Arch. Toxicol.*, vol. 86, no. 8, pp. 1167–1231, 2012.
- [58] B. K. Logan, "Amphetamines: An Update on Forensic Issues," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 25, no. 5, pp. 400–404, 2001.
- [59] D. Peter, J. Jimenez, Y. Liu, J. Kim, and R. H. Edwards, "The Chromaffin Granule and Synaptic Vesicle Amine Transporters Differ in Substrate Recognition and Sensitivity to Inhibitors," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 10, pp. 7231–7237, 1994.
- [60] J. R. Nickell, K. B. Siripurapu, A. Vartak, P. A. Crooks, and L. P. Dwoskin, "The Vesicular Monoamine Transporter-2: An Important Pharmacological Target for the Discovery of Novel Therapeutics to Treat Methamphetamine Abuse," *Adv. Pharmacol.*, vol. 69, pp. 71–106, 2014.
- [61] D. Sulzer, T. K. Chen, Y. Y. Lau, H. Kristensen, S. Rayport, and A. Ewing, "Amphetamine Redistributes Dopamine from Synaptic Vesicles to the Cytosol and Promotes Reverse Transport," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 5 II, pp. 4102–4108, 1995.
- [62] J. F. Fischer and A. K. Cho, "Chemical Release of Dopamine release from Striatal Homogenates: Evidence for Exchange Diffusion Model," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 208, no. 2, pp. 203–209, 1979.
-

- [63] H. Khoshbouei *et al.*, "N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux," *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 387–393, 2004.
- [64] H.-H. Wellhöner, *Pharmakologie und Toxikologie*, 7th ed. Lindhöft: Harms Verlag, 2014.
- [65] B. K. Yamamoto, A. Moszczynska, and G. A. Gudelsky, "Amphetamine toxicities: Classical and emerging mechanisms," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1187, pp. 101–121, 2010.
- [66] M. Verschraagen, A. Maes, B. Rüter, I. J. Bosman, B. E. Smink, and K. J. Lusthof, "Post-mortem cases involving amphetamine-based drugs in the Netherlands. Comparison with driving under the influence cases," *Forensic Sci. Int.*, vol. 170, pp. 163–170, 2007.
- [67] A. Roxburgh *et al.*, "Trends in MDMA-related mortality across four countries," *Addiction*, vol. 116, pp. 3094–3103, 2021.
- [68] I. Todzy, H. Coper, and M. Fernandes, "Interaction Between d-Amphetamine and Ethanol With Respect to Locomotion, Stereotypies, Ethanol Sleeping Time, and the Kinetics of Drug Elimination," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 59, pp. 143–149, 1978.
- [69] F. W. . Hughes and R. B. Forney, "Dextro-Amphetamine, Ethanol and Dextro-Amphetamine-Ethanol Combinations on Performance of Human Subjects Stressed with Delayed Auditory Feedback ( DAF )\*," *Psychopharmacologia*, vol. 6, pp. 234–238, 1964.
- [70] J. Mendelson, R. T. Jones, R. Upton, and P. Jacob, "Methamphetamine and ethanol interactions in humans," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 57, no. 5, pp. 559–568, 1995.
- [71] L. Wilson, J. D. Taylor, C. W. Nash, and D. F. Cameron, "The Combined Effects of Ethanol and Amphetamine Sulfate on Performance of Human Subjects," *Can. Med. Assoc. J.*, vol. 94, pp. 478–484, 1966.
- [72] R. H. Rech, M. K. Vomachka, D. Rickert, and Braude M C, "Interactions between Amphetamine and Alcohol and their Effect on Rodent Behaviour," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 281, no. 1, pp. 426–440, 1976.
- [73] M. Chrzanowska, A. Grajewska, and M. D. Rozwadowska, "Asymmetric Synthesis of Isoquinoline Alkaloids: 2004–2015," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 19, pp. 12369–12465, 2016.
- [74] Y. Kotake, Y. Sekiya, K. Okuda, and S. Ohta, "Cytotoxicity of 17 tetrahydroisoquinoline derivatives in SH-SY5Y human neuroblastoma cells is related to mitochondrial NADH – ubiquinone oxidoreductase inhibition," *Neuro Toxicol.*, vol. 28, pp. 27–32, 2007.
- [75] H. R. Lin, M. K. Safo, and D. J. Abraham, "Identification of a series of tetrahydroisoquinoline derivatives as potential therapeutic agents for breast cancer," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 9, pp. 2581–2589, 2007.
- [76] S. Azukizawa *et al.*, "Synthesis and Biological Evaluation of (S)-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic Acids: A Novel Series of PPAR $\gamma$  Agonists," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 56, no. 3, pp. 335–345, 2008.
- [77] M. A. Letavic *et al.*, "Novel tetrahydroisoquinolines are histamine H3 antagonists and serotonin

- reuptake inhibitors," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 4, pp. 1047–1051, 2007.
- [78] H. Kubota *et al.*, "Synthesis and pharmacological evaluation of N-acyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives as novel specific bradycardic agents," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 12, no. 5, pp. 871–882, 2004.
- [79] M. Hesse, *Alkaloide - Fluch oder Segen der Natur?* Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta, 2000.
- [80] L. Yang, J. Zhu, C. Sun, Z. Deng, and X. Qu, "Biosynthesis of plant tetrahydroisoquinoline alkaloids through an imine reductase route," *Chem. Sci.*, vol. 11, no. 2, pp. 364–371, 2020.
- [81] T. Niwa, H. Yoshizumi, A. Tatematsu, S. Matsuura, and T. Nagatsu, "Presence of tetrahydroisoquinoline, a parkinsonism-related compound, in foods," *J. Chromatogr.*, vol. 493, pp. 347–352, 1989.
- [82] Y. Makino, S. Ohta, O. Tachikawa, and M. Hirobe, "Presence of Tetrahydroisoquinoline and 1-Methyl-Tetrahydroisoquinoline in Foods: Compounds Related to Parkinson's Disease," *Life Sci.*, vol. 43, pp. 373–378, 1988.
- [83] M. Strolin Benedetti, V. Bellotti, E. Pianezzola, E. Moro, P. Carminati, and P. Dostert, "Ratio of the R and S enantiomers of salsolinol in food and human urine," *J. Neural Transm.*, vol. 77, no. 1, pp. 47–53, 1989.
- [84] T. Niwa, N. Takeda, N. Kaneda, Y. Hashizume, and T. Nagatsu, "Presence of Tetrahydroisoquinoline and 2-Methyl-Tetrahydroquinoline in Parkinsonian and Normal Human Brains," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 144, no. 2, pp. 1084–1089, 1987.
- [85] S. Ohta, M. Kohno, Y. Makino, O. Tachikawa, and M. Hirobe, "Tetrahydroisoquinoline and 1-Methyl-Tetrahydroisoquinoline are Present in the Human Brain: Relation to Parkinson's Disease," *Biochem. Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 453–456, 1987.
- [86] Y. Kotake, Y. Tasaki, Y. Makino, S. Ohta, and M. Hirobe, "1-Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline as a Parkinson Inducing Agent: A Novel Endogenous Amine in Mouse Brain and Parkinsonian CSF," *J. Neurochem.*, vol. 65, pp. 2633–2638, 1995.
- [87] F. Musshoff, T. Daldrup, W. Bonte, A. Leitner, and O. M. Lesch, "Formaldehyde-derived tetrahydroisoquinolines and tetrahydro- $\beta$ -carbolines in human urine," *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 683, no. 2, pp. 163–176, 1996.
- [88] F. Musshoff, P. Schmidt, R. Dettmeyer, F. Priemer, H. Wittig, and B. Madea, "A systematic regional study of dopamine and dopamine-derived salsolinol and norsalsolinol levels in human brain areas," *Forensic Sci. Int.*, vol. 105, pp. 1–11, 1999.
- [89] F. Musshoff, P. Schmidt, R. Dettmeyer, F. Priemer, K. Jachau, and B. Madea, "Determination of dopamine and dopamine-derived (R)- / (S)-salsolinol and norsalsolinol in various human brain areas using solid-phase extraction and gas chromatography / mass spectrometry," *Forensic Sci. Int.*, vol. 113, pp. 359–366, 2000.
- [90] F. Musshoff, D. W. Lachenmeier, P. Schmidt, R. Dettmeyer, and B. Madea, "Systematic Regional

- Study of Dopamine , Norsalsolinol , and (R/S)-Salsolinol Levels in Human Brain Areas of Alcoholics," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 46–52, 2005.
- [91] A. Pictet and T. Spengler, "Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenylalanin und Tyrosin," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 44, no. 3, pp. 2030–2036, 1911.
- [92] J. Stöckigt, A. P. Antonchick, F. Wu, and H. Waldmann, "Die Pictet-Spengler-Reaktion in der Natur und der organischen Chemie," *Angew. Chemie*, vol. 123, no. 37, pp. 8692–8719, 2011.
- [93] J. J. Maresh *et al.*, "Strictosidine synthase: Mechanism of a Pictet-Spengler Catalyzing Enzyme," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 2, pp. 710–723, 2008.
- [94] A. Yokoyama, T. Ohwada, and K. Shudo, "Prototype Pictet - Spengler Reactions Catalyzed by Superacids . Involvement of Dicationic Superelectrophiles," *J. Org. Chem.*, vol. 64, pp. 611–617, 1999.
- [95] H. . Haber, M. . Collins, and M. F. . Melzig, "The in Vitro Formation of 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, a Neurotoxic Metabolite of Amphetamines," in *Alzheimer's and Parkinson's Diseases*, 1995, pp. 589–597.
- [96] M. Naoi, W. Maruyama, P. Dostert, K. Kohda, and T. Kaiya, "A novel enzyme enantio-selectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol," *Neurosci. Lett.*, vol. 212, no. 3, pp. 183–186, 1996.
- [97] T. Yamakawa and S. Ohta, "Isolation of 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-Synthesizing Enzyme from Rat Brain: A Possible Parkinson ' s Disease-Preventing Enzyme," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 236, pp. 676–681, 1997.
- [98] A. Patsenka and L. Antkiewicz-Michaluk, "Inhibition of Rodent Brain Monoamine Oxidase and Tyrosine Hydroxylase by Endogenous Compounds - 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Alkaloids," *Pol. J. Pharmacol.*, vol. 56, pp. 727–734, 2004.
- [99] M. Minami *et al.*, "Inhibition of Tyrosine Hydroxylase by R and S Enantiomers of Salsolinol, 1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4- Tetrahydroisoquinoline," *J. Neurochem.*, vol. 58, no. 6, pp. 2097–2101, 1992.
- [100] M. Ota, P. Dostert, T. Hamanaka, T. Nagatsu, and M. Naoi, "Inhibition of Tryptophan Hydroxylase by (R)- and (S)-1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines (Salsolinols)," *Neuropharmacology*, vol. 31, no. 4, pp. 337–341, 1992.
- [101] A. C. Collins, J. L. Cashaw, and V. E. Davis, "Dopamine-Derived Tetrahydroisoquinoline Alkaloids-Inhibitors of Neuroamine Metabolism," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 22, no. 18, pp. 2337–2348, 1973.
- [102] M. Kitabatake *et al.*, "Facile synthesis and in vitro properties of 1-alkyl- and 1-alkyl- N - propargyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivative on PC12 cells," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, pp. 4034–4043, 2009.
- [103] N. Katagiri *et al.*, "Preventative effects of 1,3-dimethyl- and 1,3-dimethyl-N-propargyl-1,2,3,4-

- tetrahydroisoquinoline on MPTP-induced Parkinson's disease-like symptoms in mice," *Brain Res.*, vol. 1321, pp. 133–142, 2010.
- [104] H. Nakagawa, Y. Makino, Y. Yoshida, S. Ohta, and M. Hirobe, "A Novel Metabolite of 3,4-Methylendioxyamphetamine (MDA): Formation of 3-Methyl-6,7-methylendioxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and Its Pharmacological Effect," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 16, no. 6, pp. 579–582, 1993.
- [105] T. Nagatsu and M. Yoshida, "An endogenous substance of the brain, tetrahydroisoquinoline, produces parkinsonism in primates with decreased dopamine, tyrosine hydroxylase and biopterin in the nigrostriatal regions," *Neurosci. Lett.*, vol. 87, pp. 178–182, 1988.
- [106] Y. Kotake, M. Yoshida, M. Ogawa, Y. Tasaki, M. Hirobe, and S. Ohta, "Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate," *Neurosci. Lett.*, vol. 217, pp. 69–71, 1996.
- [107] M. Yoshida, T. Niwa, and T. Nagatsu, "Parkinsonism in monkeys produced by chronic administration of an endogenous substance of the brain, tetrahydroisoquinoline: The behavioral and biochemical changes," *Neurosci. Lett.*, vol. 119, pp. 109–113, 1990.
- [108] M. Naoi, Y. Hirata, and T. Nagatsu, "Inhibition of Monoamine Oxidase by N-Methylisoquinolinium Ion," *J. Neurochem.*, vol. 48, no. 3, pp. 79–712, 1987.
- [109] M. Naoi *et al.*, "N-Methylisoquinolinium Ion as an Inhibitor of Tyrosine Hydroxylase, Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase and Monoamine Oxidase," *Neurochem. Int.*, vol. 15, no. 3, pp. 315–320, 1989.
- [110] T. Niwa *et al.*, "Endogeneous synthesis of N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a precursor of N-methylisoquinolinium ion, in the brains of primates with parkinsonism after systemic administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline," *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, vol. 533, pp. 145–151, 1990.
- [111] M. Naoi, S. Matsuura, T. Takahashi, and T. Nagatsu, "A N-Methyltransferase in Human Brain Catalyses N-Methylation of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline into N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin, a Precursor of Dopaminergic Neurotoxin, N-Methylisoquinolinium Ion," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 161, no. 3, pp. 1213–1219, 1989.
- [112] M. Naoi *et al.*, "Oxidation of N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline into the N-Methyl-Isoquinolinium Ion by Monoamine Oxidase," *J. Neurochem.*, vol. 52, no. 2, pp. 653–655, 1989.
- [113] M. DeCuyper, Y. Lu, D. D. Miller, and M. S. LeDoux, "Regional distribution of tetrahydroisoquinoline derivatives in rodent, human and parkinson's disease brain," *J. Neurochem.*, vol. 107, pp. 1398–1413, 2008.
- [114] Y. Song, J. Xu, A. Hamme, and Y.-M. Liu, "Capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry of tetrahydroisoquinoline derived neurotoxins: A study on the blood–brain barrier of rat brain," *J. Chromatography A*, vol. 1103, pp. 229–234, 2006.
- [115] M. Kohno, S. Ohta, and M. Hirobe, "Tetrahydroisoquinoline and 1-Methyl-

- Tetrahydroisoquinoline as Novel Endogeneous Amines in Rat Brain," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 140, no. 1, pp. 448–454, 1986.
- [116] J. J. Pitt, "Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 30, no. February, pp. 19–34, 2009.
- [117] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*, 10th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- [118] J. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, "Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules," *Science (80-. )*, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, 1989.
- [119] S. Kromidas, *Der HPLC-Experte - Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
- [120] A. Zimdahl Kahlin, "Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism," 2020.
- [121] G. L. Grunewald, T. M. Caldwell, Q. Li, and K. R. Criscione, "1,3-Dimethyl-7-substituted-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines as Probes for the Binding Orientation of Tetrahydroisoquinoline at the Active Site of Phenylethanolamine N-Methyltransferase," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 7, pp. 869–880, 1999.
- [122] D. T. Khong and Z. M. A. Judeh, "Synthesis of Chiral Tetrahydroisoquinoline and C<sub>2</sub>-Symmetric Bistetrahydroisoquinoline Ligands and Their Application in the Enantioselective Henry Reaction," *Synthesis (Stuttg.)*, vol. 48, pp. 2271–2279, 2016.
- [123] K. Hara, M. Kashiwagi, M. Kageura, A. Matsusue, and S. Kubo, "Solid-phase microextraction for amphetamines in solid tissues: washing the homogenates with ethyl ether enables their measurements by GC-MS after heptafluorobutyl derivatization," *Forensic Toxicol.*, vol. 27, pp. 52–53, 2009.
- [124] F. T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, and F. Mußhoff, "Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen - Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden," *Toxichem. Krimtech*, vol. 185, pp. 1–24, 2009.
- [125] L. D. Paul and F. Mußhoff, *Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen*, vol. 76, no. 3. 2009, pp. 142–176.
- [126] F. T. Peters, O. H. Drummer, and F. Musshoff, "Validation of new methods," *Forensic Sci. Int.*, vol. 165, pp. 216–224, 2007.
- [127] O. H. Drummer, "Postmortem toxicology of drugs of abuse," *Forensic Sci. Int.*, vol. 142, pp. 101–113, 2004.
- [128] A. Bischler and B. Napieralski, "Zur Kenntniss einer neuen Isochinolinsynthese," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 26, no. 2, pp. 1903–1908, 1893.
- [129] M. Nicoletti, D. O'Hagan, and A. M. Z. Slawin, "The asymmetric Bischler-Napieralski reaction:

- preparation of 1,3,4-trisubstitued 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, pp. 116–121, 2002.
- [130] A. Pictet and F. W. Kay, "Über eine synthetische Darstellungsmethode der Isochinolin-Basen," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 42, no. 2, pp. 1973–1979, 1909.
- [131] F. W. Bergstrom, "Heterocyclic Nitrogen Compounds Part II A. Hexacyclic Compounds: Pyridine, Quinoline, and Isoquinoline," *Chem. Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 77–277, 1944.
- [132] G. Fodor, J. Gal, and B. A. Phillips, "Mechanismus der Bischler-Napieralski-Reaktion," *Angew. Chemie*, vol. 84, no. 19, pp. 947–949, 1972.
- [133] G. Fodor and S. Nagubandi, "Correlation of the von Braun, Ritter, Bischler-Napieralski, Beckmann and Schmidt Reactions via Nitrilium Salt Intermediates," *Tetrahedron Rep.*, vol. 36, pp. 1279–1300, 1979.
- [134] H. G. O. Becker *et al.*, *Organikum - Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 2001.
- [135] F. Bohlmann, "Reaktionen mit Lithiumaluminiumhydrid: Reduktion von Heterocyclen mit Lithiumaluminiumhydrid," *Chem. Ber.*, vol. 85, no. 5, pp. 390–394, 1952.
- [136] J. Buddrus and B. Schmidt, *Grundlagen der Organischen Chemie*, 5th ed. Berlin: DeGruyter, 2015.
- [137] W. Eschweiler, "Ersatz von an Stickstoff gebundenen Wasserstoffatomen durch die Methylgruppe mit Hilfe von Formaldehyd," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 38, no. 1, pp. 880–882, 1905.
- [138] H. T. Clarke, H. B. Gillespie, and S. Z. Weisshaus, "The Action of Formaldehyde on Amines and Amino Acids," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 55, no. 11, pp. 4571–4587, 1933.
- [139] S. H. Pine, "The Eschweiler-Clark Methylation of Amines - An organic chemistry experiment," *J. Chem. Educ.*, vol. 45, no. 2, p. 118, 1968.
- [140] O. Irie *et al.*, "Overcoming hERG issues for brain-penetrating cathepsin S inhibitors: 2-Cyanopyrimidines. Part 2," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, pp. 5280–5284, 2008.
- [141] R. F. Borch, M. D. Bernstein, and H. D. Durst, "The Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, no. 12, pp. 2897–2904, 1971.
- [142] S. Kromidas, *Validierung in der Analytik*, 2nd ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
- [143] F. T. Peters, S. Schaefer, R. F. Staack, T. Kraemer, and H. H. Maurer, "Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, no. 6, pp. 659–676, 2003.
- [144] F. T. Peters, T. Kraemer, and H. H. Maurer, "Drug Testing in Blood: Validated Negative-Ion Chemical Ionization Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Assay for Determination of Amphetamine and Methamphetamine Enantiomers and Its Application to Toxicology Cases,"

- Clin. Chem.*, vol. 48, no. 9, pp. 1472–1485, 2002.
- [145] F. T. Peters *et al.*, "Drug Testing in Blood: Validated Negative-Ion Chemical Ionization Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Assay for Enantioselective Measurement of the Designer Drugs MDEA, MDMA, and MDA and Its Application to Samples from a Controlled Study with MDMA," *Clin. Chem.*, vol. 51, no. 10, pp. 1811–1822, 2005.
- [146] A. Maas, M. Losacker, and C. Hess, "Chromatographic separation of R/S-enantiomers of amphetamine and methamphetamine: Pathways of methamphetamine synthesis and detection in blood samples by qualitative enantioselective LC–MS/MS analysis," *Forensic Sci. Int.*, vol. 291, pp. 138–143, 2018.
- [147] K. M. Clauwaert, J. F. Van Bocxlaer, and A. P. De Leenheer, "Stability study of the designer drugs 'MDA, MDMA and MDEA' in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures," *Forensic Sci. Int.*, vol. 124, no. 1, pp. 36–42, 2001.
- [148] R. H. Lowe *et al.*, "A validated positive chemical ionization GC/MS method for the identification and quantification of amphetamine, opiates, cocaine, and metabolites in human postmortem brain," *J. Mass Spectrom.*, vol. 41, no. 2, pp. 175–184, 2006.
- [149] T. Nagata, K. Kimura, K. Hara, and K. Kudo, "Methamphetamine and Amphetamine Concentrations in Postmortem Rabbit Tissues," *Forensic Sci. Int.*, vol. 48, no. 1, pp. 39–47, 1990.
- [150] F. Meurens, A. Summerfield, H. Nauwynck, L. Saif, and V. Gerdtts, "The pig: a model for human infectious diseases," *Trend Microbiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 50–57, 2012.
- [151] M. Naoi, W. Maruyama, P. Dostert, K. Kohda, and T. Kaiya, "A novel enzyme enantio-selectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol," *Neurosci. Lett.*, vol. 212, pp. 183–186, 1996.
- [152] Y. H. Caplan and B. Levine, "Vitreous Humor in the Evaluation of Postmortem Blood Ethanol Concentrations," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 14, no. 5, pp. 305–307, 1990.
- [153] C. L. O'Neal and A. Poklis, "Postmortem Production of Ethanol and Factors that Influence Interpretation," *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, vol. 17, no. 1, pp. 8–20, 1996.
- [154] R. Mayes, B. Levine, M. L. Smith, G. N. Wagner, and R. Froede, "Toxicologic Findings in the USS Iowa Disaster," *J. Fo*, vol. 37, no. 5, pp. 1352–1357, 1992.
- [155] M. G. F. Gilliland and R. O. Bost, "Alcohol in Decomposed Bodies: Postmortem Synthesis and Distribution," *J. Forensic Sci.*, vol. 38, no. 6, pp. 1266–1274, 1993.
- [156] D. V. Canfield, T. Kupiec, and E. Huffine, "Postmortem Alcohol Production in Fatal Aircraft Accidents," *J. Forensic Sci.*, vol. 38, no. 4, pp. 914–917, 1993.
- [157] R. E. Zumwalt, R. O. Bost, and I. Sunshine, "Evaluation of Ethanol Concentrations in Decomposed Bodies," *J. Forensic Sci.*, vol. 27, no. 3, pp. 549–554, 1982.
- [158] T. Neumann and C. Spies, "Use of biomarkers for alcohol use disorders in clinical practice," *Addiction*, vol. 98, no. Suppl. 2, pp. 81–91, 2003.

- [159] T. P. Whitehead, C. A. Clarke, and A. G. W. Whitfield, "Biochemical and Haematological Markers of Alcohol Intake," *Lancet*, vol. 6, pp. 978–981, 1978.
- [160] P. C. Sharpe, "Biochemical detection and monitoring of alcohol abuse and abstinence," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 38, no. 6, pp. 652–664, 2001.
- [161] B. Rosalki and D. Rau, "Serum  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Activity in Alcoholism," *Clin. Chim. Acta*, vol. 39, pp. 41–47, 1972.
- [162] P. C. Sharpe, R. McBride, and G. P. R. Archbold, "Biochemical markers of alcohol abuse," *Q J Med*, vol. 89, no. 2, pp. 137–144, 1996.
- [163] A. W. K. Chan, J. W. Welte, and R. B. Whitney, "Identification of Alcoholism in Young Adults by Blood Chemistries," *Alcohol*, vol. 4, no. 3, pp. 175–179, 1987.
- [164] H. Andresen-Streichert, A. Müller, A. Glahn, G. Skopp, and M. Sterneck, "Alkoholmarker bei klinischen und forensischen Fragestellungen," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 115, no. 18, pp. 309–315, 2018.
- [165] L. Politi, L. Morini, F. Leone, and A. Poletini, "Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption?," *Addiction*, vol. 101, no. 10, pp. 1408–1412, 2006.
- [166] S. Harada, D. P. Agarwal, H. Werner Goedde, and S. Takagi, "Blood Ethanol and Acetaldehyde Levels in Japanese Alcoholics and Controls," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 18, no. Suppl. 1, pp. 139–140, 1983.
- [167] K. R. Palmer and W. J. Jenkins, "Impaired acetaldehyde oxidation in alcoholism," *Gut*, vol. 23, pp. 729–733, 1982.
- [168] Y. Lau, J. M. Crampton, and J. A. Wilson, "Urinary Excretion of MPTP and Its Primary Metabolites in Mice," *Life Sci*, vol. 43, no. 18, pp. 1459–1464, 1988.
- [169] C. J. P. Eriksson and H. W. Sippel, "The Distribution and Metabolism of Acetaldehyde in Rats During Ethanol Oxidation - I. The Distribution of Acetaldehyde in Liver, Brain, Blood, and Breath," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 26, pp. 241–247, 1977.
- [170] H. W. Sippel, "The acetaldehyd content in rat brain during ethanol metabolism," *J. Neurochem.*, vol. 23, pp. 451–452, 1974.
- [171] M. Jamal, K. Ameno, S. Ameno, N. Okada, and I. Ijiri, "In Vivo Study of Salsolinol Produced by a High Concentration of Acetaldehyde in the Striatum and Nucleus Accumbens of Free-Moving Rats," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 27, no. 8 Suppl., pp. 79–84, 2003.
- [172] B. Tabakoff, R. A. Anderson, and R. F. Ritzmann, "Brain Acetaldehyde After Ethanol Administration," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 25, no. 11, pp. 1305–1309, 1976.
- [173] K. S. Kalasinsky *et al.*, "Regional distribution of methamphetamine in autopsied brain of chronic human methamphetamine users," *Forensic Sci. Int.*, vol. 116, pp. 163–169, 2001.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metabolismus von Ethanol zu Acetaldehyd und Essigsäure über ADH und ALDH mittels des Cofaktors $\text{NAD}^+$ .....	3
Abbildung 2: Fermentationsprozess in Hefen [...] .....	6
Abbildung 3: Strukturformeln von Amphetamin, Methamphetamin und Methylenedioxyamphetamin (MDMA).....	8
Abbildung 4: Amphetaminsynthese nach Leuckart [...].....	9
Abbildung 5: Enantiomere von Amphetamin ((R)-Amphetamin (links) und (S)-Amphetamin (rechts) ...	10
Abbildung 6: Biotransformation von Amphetamin und Methamphetamin [...] .....	12
Abbildung 7: Tetrahydroisochinoline des Benzylisochinolin-Typs (Laudanosin - links) und des Phenylisochinolin-Typs (Cryptostylin I - rechts) [...].....	18
Abbildung 8: Strukturformeln von 1,2,3,4TIQ; 1-MeTIQ; 1,3-diMeTIQ (obere Reihe von links nach rechts); SAL; NorSAL und 1-BnTIQ (untere Reihe von links nach rechts).....	19
Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Pictet-Spengler-Reaktion am Beispiel des 1,3-diMeTIQs, gebildet aus Amphetamin und Acetaldehyd [...].....	20
Abbildung 10: Stereoisomere des 1,3-diMeTIQ (von links nach rechts): cis-1S,3R-diMeTIQ; cis-1R-3S-diMeTIQ; trans-1R,3R- diMeTIQ und trans-1S,3S-diMeTIQ.....	21
Abbildung 11: Aufbau und Funktionsprinzip einer Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie [...].....	28
Abbildung 12: Reaktionsschema von Methylphenylethylamin (1) mit Acetylchlorid unter Verwendung von Triethylamin in Dichlormethan zu N-Acetylmethylphenylethylamin (2).....	36
Abbildung 13: Reaktionsschema von N-Acetylmethylphenylethylamin (2) mit Phosphoroxychlorid in Acetonitril zu 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (3).....	37
Abbildung 14: Reaktionsschema von 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (3) zu 1,3-diMeTIQ (4) unter Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid, Trimethylaluminium in Tetrahydrofuran.....	38
Abbildung 15: Reaktionsschema von 1,3-diMeTIQ (4) zu N-Me-1,3-diMeTIQ (5) unter Verwendung von Formaldehyd, Triethylamin, Natriumcyanoborhydrid und Essigsäure in Tetrahydrofuran.....	39
Abbildung 16: Zwei übereinanderliegende Scan-Chromatogrammausschnitte nach GC-MS-Analyse der Fraktionen 13 (schwarz) und Fraktion 24 (blau) aus der säulenchromatographischen Aufreinigung des 1,3-diMeTIQ (gelöst in $\text{CDCl}_3$ , Konzentration unbekannt).....	50
Abbildung 17: Massenspektrum von Peak 1 ( $t_R = 7,52$ Min.) nach GC-MS-Analyse der Fraktion 13 aus der säulenchromatographischen Aufreinigung des 1,3-diMeTIQs (gelöst in $\text{CDCl}_3$ , Konzentration nicht bekannt).....	50
Abbildung 18: Chromatogrammausschnitt (Zeit in Minuten (Min.) vs. Intensität in arbitrary units (arb. Unit) dargestellt in Prozent (%) einer dotierten Kontrollprobe ( $c = 4$ ng/g) in humanem Hirn nach Extraktion [...].....	52
Abbildung 19: Chromatogrammausschnitte (Zeit in Minuten (Min.) vs. Intensität in arbitrary units (arb. Unit) dargestellt in Prozent (%) mit einem inkrementierenden Offset von 10 %) der Selektivitäts- und	

Spezifitätsmessungen in humaner Leber (links) und humanem Hirn (Mitte) sowie humanem Serum (rechts) nach Extraktion, beispielhaft dargestellt für den MRM-Übergang 162>145 des 1,3-diMeTIQs.[...]	54
Abbildung 20: Kalibrationskurven von Amphetamin (o. l., quadratischer Verlauf), Methamphetamin (o. r., quadratischer Verlauf), MDA (u. l., linearer Verlauf) und MDMA (u. r., linearer Verlauf) in Serum (n = 2) nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit den jeweiligen Bestimmtheitsmaßen ( $R^2$ ) und Geradengleichungen (Response = Fläche (Analyt) * Konzentration (ISTD) / Fläche (ISTD)).	61
Abbildung 21: Kalibrationskurven von Amphetamin (o. l., quadratischer Verlauf), Methamphetamin (o. r., quadratischer Verlauf), MDA (u. l., linearer Verlauf) und MDMA (u. r., linearer Verlauf) in Gehirn vom Schwein (n = 2) nach Extraktion mit den jeweiligen Bestimmtheitsmaßen ( $R^2$ ) und Geradengleichungen (Response = Fläche (Analyt) * Konzentration (ISTD) / Fläche (ISTD)).	62
Abbildung 22: Chromatogrammausschnitte (Zeit in Min. vs. Intensität in arbitrary units (arb. Unit)) der Leberproben „Köln 6“ (links) und „Rostock 3“ (rechts) für cis-1,3-diMeTIQ (m/z 162>145 (oben) und m/z 162>117 (unten)) nach Extraktion [...]	69
Abbildung 23: Nucleophile Substitution von Methylphenylethylamin (1) und Acetylchlorid.	71
Abbildung 24: Reaktionsmechanismus zur Synthese von 1,3-Dimethyl-3,4-Dihydroisochinolin (3) [...]	73
Abbildung 25: Schematische Darstellung der reduktiven Aminierung [139].	75
Abbildung 26: N-Methylierung des 1,3-diMeTIQs (4) [...]	76
Abbildung 27: Mögliche Metabolite von 1,3-diMeTIQ, N-Me-1,3-diMeTIQ, 1,3-diMe-7,8-MDTIQ, N-Me-1,3-diMe-7,8-MDTIQ [...]	89

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Analyseverfahren zur Untersuchung der TIQs.....	24
Tabelle 2: TIQs - Retentionszeiten in Min., MRM-Übergänge, Verhältnisse von Qualifier- zu Targetübergang* in % mit den jeweiligen optimierten Parametern für die <i>Cone</i> - und <i>Collision</i> -Energien in V.....	41
Tabelle 3: Amphetamin, Amphetaminderivate und interne Standards - Retentionszeiten in Min., MRM-Übergänge, Verhältnisse von Qualifier- zu Targetübergang* in % mit den jeweiligen optimierten Parametern für die <i>Cone</i> - und <i>Collision</i> -Energien in V (übernommen aus der Routine-Methode des Instituts für Rechtsmedizin Düsseldorf).....	41
Tabelle 4: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der TIQs und Amphetamine für die Matrices Gehirn, Leber (jeweils in ng/g) und Serum (in ng/ml). ....	55
Tabelle 5: Wiederfindung und Matrixeffekte der TIQs und Amphetamine in % mit den jeweiligen Standardabweichungen (SD), ermittelt in den Matrices Gehirn, Leber und Serum in einem Konzentrationslevel.....	57
Tabelle 6: <i>Processed sample stability</i> der TIQs und Amphetamine in den Matrices Gehirn, Leber und Serum, angegeben als Abnahme in % über einen Zeitraum von 5 Stunden (Gehirn und Leber) bzw. von 8,5 Stunden (Serum) eines Konzentrationslevels. ....	58
Tabelle 7: Ergebnisse der Einfrier- und Auftaustabilitätsmessungen. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und 90 %-Konfidenzintervalle (90 %-KI) der Flächenverhältnisse aus Analyt und ISTD der Stabilitätsproben (n = 6) in % für die TIQs und Amphetamine in den Matrices Gehirn, Leber und Serum, anhand der angegebenen Konzentrationslevel. ....	59
Tabelle 8: Ergebnisse der Langzeitstabilitätsmessungen. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und 90 %-Konfidenzintervalle (90 %-KI) der absoluten Flächen bzw. der Flächenverhältnisse von Analyt und ISTD der Stabilitätsproben (n = 6) in % für die TIQs und Amphetamine in den Matrices Gehirn, Leber und Serum, bestimmt in einem Konzentrationslevel.....	60
Tabelle 9: Konzentrationen von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in Serum in ng/ml. [...]	64
Tabelle 10: Konzentrationen von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in humanen Gehirnen in ng/g. [...]	66
Tabelle 11: Konzentrationen von Amphetamin, Methamphetamin, MDA und MDMA in humanen Leberproben in ng/g. [...]	67

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen Personen bedanken, die mich während meiner Zeit als Doktorandin begleitet haben:

Zuallererst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Daldrup, für die hervorragende Betreuung und die bereichernden Diskussionen während der Promotion.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Georg Kojda für den inspirierenden wissenschaftlichen Austausch.

Bei Dr. Oliver Temme und Dr. Evelyn Pawlik möchte ich mich für die überaus produktiven Gespräche und Anregungen bedanken.

Prof. Dr. Czekelius danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Synthese der Tetrahydroisochinoline und die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe für Asymmetrische Synthese und Katalyse.

Maja Ruderisch und Irina Steiner danke ich für die praktische Unterstützung im Labor während meiner Schwangerschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei den Laborleitern der Abteilungen für forensische Toxikologie der rechtsmedizinischen Institute Bonn, Essen, Köln und Rostock für die Bereitstellung und Zusendung der Proben bedanken, ohne deren Mitwirken diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Mario, der meine Launen während dieser Zeit ausgehalten, mich seelisch und moralisch unterstützt und immer wieder ermutigt hat.

---