

**Zur Bestimmung von Ecstasy-Tabletten:
Vergleich von Reflexions- und
Transmissionsmessung im Nahen Infrarot**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Ralph Carsten Schneider

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Oktober 2002

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. K.-A. Kovar

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-J. Machulla

Für meine Familie

Die kürzesten Wörter, nämlich 'ja' und 'nein'
erfordern das meiste Nachdenken.

Pythagoras von Samos

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar in der Zeit von April 1999 bis September 2002 am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar, danke ich für die Überlassung des Themas, die anregenden Diskussionen und die freundliche Unterstützung, sowie den großen Freiraum bei der Durchführung meiner Arbeit.

Dem Bundeskriminalamt Wiesbaden danke ich für die Überlassung der konfiszierten Proben und der Firma Foss Deutschland GmbH für die Bereitstellung der NIR-Spektrometer.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises möchte ich für die offizielle und inoffizielle Zeit in Tübingen herzlich danken, insbesondere Herrn Dr. Jochen Büchler, Frau Iris Dinkelacker, Frau Dr. Stefanie Essig, Frau Melanie Gaub, Herrn Reinhard Graser, Frau Dr. Antje Harms, Herrn Dr. Thorsten Herkert, Herrn Timo Kohles, Herrn Dr. Klaus-Peter Kreth, Frau Dr. Anja Meißel, Frau Dr. Inge Muszynski, Herrn Christoph Nimptsch, Frau Maja Obradovic, Frau Dr. Irene Rager, Frau Dr. Gudrun Roos, Herrn Christoph Röseler, Frau Dr. Meike Schulze-Alexandru, Frau Dr. Nicole Sondermann, Frau Sandra Trkulja, Herrn Ernst Ulmer, Frau Julia Wellsow und Frau Kim Wuthold.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Irene Rager und Frau Dr. Gudrun Roos für die vielen vergangenen und kommenden Diskussionen, seien sie wissenschaftlicher oder philosophischer Natur.

Für das sorgfältige und schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Kim Wuthold und Frau Dr. Gudrun Roos.

Schließlich danke ich der DFG für die Teilnahme am Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“ an der Universität Tübingen und für das gewährte Stipendium.

Teile dieser Arbeit wurden und werden veröffentlicht bzw. vorgestellt:

- Schneider RC, Kovar KA. Identification of Different Ecstasy Analogues in Complex Matrices using Near-Infrared Spectroscopy. Posterpräsentation. DPhG-Jahrestagung, 05.-07. Oktober 2000, Münster, D
Archiv der Pharmazie 2000; 333; Suppl 2, 45.
DPhG-Fachgruppentagung Analytik, 20.-22. November 2000, Blaubeuren, D

- Schneider RC, Kovar KA. Anwendung der Nah-Infrarot Spektroskopie in der Forensischen Analytik. Vortrag. Weiterbildungskurs der Bundesapothekerkammer zur Nahen-Infrarot Spektroskopie, 9.-11. Oktober 2000, Tübingen, D

- Schneider RC, Kovar KA. Ecstasy Analytic with a Monolithic Reversed Phase Column. (eingereicht)

- Schneider RC, Kovar KA. Analysis of Ecstasy Tablets: Comparison of Reflectance and Transmittance Near Infrared Spectroscopy. (eingereicht)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Ecstasy.....	3
2.2 Problemstellung	3
3 Theoretische Grundlagen	7
3.1 Nahe Infrarot Spektroskopie.....	7
3.1.1 Prinzip der Absorption	7
3.1.2 Messmethodik	10
3.1.2.1 Apparative Voraussetzungen	10
3.1.2.2 Diffuse Reflexion.....	10
3.1.2.3 Transmission.....	11
3.1.3 Datentransformation	12
3.1.3.1 Scheinbare Absorption.....	12
3.1.3.2 Derivativspektroskopie	14
3.1.3.3 Standard Normal Variate (SNV).....	14
3.1.3.4 1/x-Transformation	15
3.1.4 Multivariate Datenanalyse	16
3.1.4.1 Einleitung	16
3.1.4.2 Principal Component Analysis (PCA).....	17
3.1.4.3 Partial Least Squares Regression (PLS).....	17
3.1.5 Erstellung und Validierung einer Kalibrierung.....	18
3.1.5.1 Quantitative Kalibrierung.....	18
3.1.5.2 Validierung	18
3.1.5.3 Statistische Kenngrößen	19
3.2 High Performance Liquid Chromatography	22
3.2.1 Allgemeines	22
3.2.2 Monolithische Säulen.....	22
4 NIR Analytik von Ecstasy-Tabletten	25
4.1 Identifizierung von Ecstasy-Tabletten mittels NIR-Transmissionsmessung	25
4.1.1 Vorbemerkungen	25

4.1.2 Rohspektren	25
4.1.3 Datenvorbehandlung.....	27
4.1.4 Diskussion	31
4.2 HPLC-Analytik als Referenzmethode der NIR.....	33
4.2.1 Vorbemerkungen	33
4.2.2 Wahl des Internen Standards	33
4.2.3 Entwicklung und Optimierung der Trennmethode.....	34
4.2.4 Evaluierung unterschiedlicher Flussraten	36
4.2.5 Quantifizierung der konfiszierten Proben	37
4.2.6 Diskussion	41
4.2.6.1 Methodenentwicklung und Kalibrierung.....	41
4.2.6.2 Quantifizierung der konfiszierten Proben	42
4.3 Quantifizierungsmodelle von Ecstasy-Tabletten mittels NIR.....	44
4.3.1 Vorbemerkungen	44
4.3.2 Probenpräsentation.....	44
4.3.3 Modellerstellung für Tablettenmessung in diffuser Reflexion.....	46
4.3.3.1 Rohspektren.....	46
4.3.3.2 Datenvorbehandlung.....	47
4.3.4 Modellerstellung für Tablettenmessung in Transmission	50
4.3.4.1 Rohspektren.....	50
4.3.4.2 Datenvorbehandlung.....	51
4.3.5 Modellerstellung für die Messung der gepulverten Tabletten in diffuser Reflexion	53
4.3.5.1 Datenvorbehandlung.....	53
4.3.6 Diskussion	55
5 Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerung.....	59
6 Experimenteller Teil.....	63
6.1 Referenzmethode HPLC	63
6.1.1 Vorbemerkungen	63
6.1.2 Chemikalien und Reagenzien	63
6.1.3 HPLC-Säule.....	63
6.1.4 Geräte.....	63
6.1.4.1 pH-Wertbestimmung	63
6.1.4.2 Waage.....	64

6.1.4.3 HPLC-DAD.....	64
6.1.5 Probenvorbereitung	64
6.1.6 Chromatographische Bedingungen	65
6.1.7 Änderung der Flussraten	66
6.1.8 Validierung der HPLC-Gehaltsbestimmungen	66
6.1.8.1 Allgemeine Vorgehensweise bei der Validierung einer Methode ...	66
6.1.8.2 Festlegung der Arbeitsbereiche	67
6.1.8.3 Prüfung auf Normalverteilung	67
6.1.8.4 Ausreißertest.....	68
6.1.8.5 Trendtest.....	69
6.1.8.6 Prüfung auf Linearität.....	70
6.1.8.7 Wiederfindung.....	71
6.1.8.8 Präzision	73
6.1.8.9 Richtigkeit	74
6.1.8.10 Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenze	75
6.1.8.11 Messgröße und Vertrauensbereich.....	76
6.1.8.12 Robustheit.....	76
6.1.8.13 Weitere Kalibrierkenndaten	77
6.1.9 Detektion	78
6.1.9.1 UV-VIS Diodenarray.....	78
6.2 NIR-Spektroskopie	86
6.2.1 Spektrometer	86
6.2.2 Gerätequalifizierung.....	86
6.2.3 Spektrenaufnahme	88
6.3 Hardware.....	88
6.4 Software	89
6.4.1 VISION	89
6.4.2 The Unscrambler	89
6.5 Identifizierungsmodelle.....	90
6.5.1 Zusammensetzung des Datensatzes.....	90
6.5.2 Korrelationsparameter der Identifizierungsmodelle	91
6.6 Quantifizierungsmodelle.....	92
6.6.1 Vorbemerkungen	92
6.6.2 Zusammensetzung der Datensätze	92

6.6.3 Tabletten.....	92
6.6.3.1 Externes Testset	92
6.6.3.2 Regressionsplots.....	94
6.6.4 Gepulverte Proben.....	99
7 Anhang	101
7.1 Strukturformeln der verwendeten Substanzen	101
7.2 Höhe und Durchmesser der untersuchten Ecstasy-Tabletten	102
7.3 NIR-Spektren.....	107
7.3.1 Rohspektren	107
7.3.1.1 Reflexionsmessung	107
7.3.1.2 Transmissionsmessung.....	109
7.3.2 Rohspektren nach 1/x-Transformation.....	111
7.3.2.1 Reflexionsmessung	111
7.3.2.2 Transmissionsmessung.....	113
7.3.3 Derivativspektren - Reflexionsmessung.....	115
7.3.4 Derivativspektren nach 1/x-Transformation-Reflexionsmessung	117
8 Literaturverzeichnis	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ACN	Acetonitril
ANOVA	Analysis Of Variance
AU	Absorbance Units
CE	Kapillarelektrophorese
CV	Cross Validation; Kreuzvalidierung
DAD	Diodenarray-Detektor
FCV	Full Cross Validation
FIR	Fernes Infrarot
FL	Fluoreszenz
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference On Harmonization
IS	Interner Standard
log 1/R	Scheinbare Reflexion
MBDB	N-Methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-butan-2-amin
MCP	Metoclopramid
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDE	N-Ethyl-3,4-methylendioxyamphetamin
MDMA	N-Methyl-3,4-methylendioxyamphetamin
MIR	Mittleres Infrarot
MLR	Multiple Linear Regression
MS	Massenspektroskopie
MSC	Multiple Scatter Correction
NIPALS	Non-Linear Iterative Partial Least Squares
NIR	Nahes Infrarot
PbS	Bleisulfid
PC	Principal Component; Hauptkomponente

PCA	Principal Component Analysis
PCR	Principal Component Regression
PLS	Partial Least Squares
R	Reflexion
RMSEC	Root Mean Square Error Of Calibration
RMSEP	Root Mean Square Error Of Prediction
RP	Reversed Phase
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SIMCA	Soft Independent Modelling Of Class Analogy
sd	Standardabweichung
SNV	Standard Normal Variate
srel	relative Standardabweichung
T	Transmission
UV	Ultraviolett
VIS	Visible; Sichtbares Licht
VK	Varianzkoeffizient
XB	Bestimmungsgrenze
XN	Nachweisgrenze

1 Zusammenfassung

Ausführliche Untersuchungen von Ecstasy-Tabletten werden i.A. mit den gängigen Methoden wie GC oder HPLC in Kombination mit MS unter hohem personellen und apparativen Aufwand durchgeführt. Darüber hinaus ist die Analyse mit der Zerstörung eines Teils der Proben verbunden. Aus diesem Grund stand in dieser Arbeit die Entwicklung einer schnellen Identifizierungs- und Quantifikationsmethode mittels der zerstörungsfreien NIR-Spektroskopie im Mittelpunkt. Ein Vergleich der Messungen in diffuser Reflexion und in Transmission sowie die Evaluierung einer neuen monolithischen HPLC-Trennsäule für die Referenzanalytik waren hierbei notwendig.

Da die Zusammensetzungen illegal hergestellter Tabletten nicht wie bei solchen pharmazeutischer Herkunft von vorne herein bekannt sind, muss man mit Einbußen in der Vorhersagegenauigkeit rechnen. Um diese auszugleichen, wurde die Kalibrierung erstmalig mit konfisziertem Material, das vom Bundeskriminalamt zur Verfügung gestellt wurde und ein hohe Varianz aufwies, durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine validierte Methode zur Identifizierung der wichtigsten Inhaltsstoffe in Ecstasy-Tabletten – MDMA, Amphetamin, MDE und MBDB – hierdurch erreicht wurde. Die Identifizierungsmodelle wurden über Transmissionsmessung und Fokussierung auf die relevanten Wellenlängen der strukturellen Unterschiede zwischen den untersuchten Substanzen erstellt. Die Verbindung aus einer Konzentrationsunterschiede nivellierenden Normalisierung (SNV) und einer die Streulichteffekte reduzierenden 2. Ableitung mit 5-Punktglättung resultierte im besten Modell zur Unterscheidung aller Substanzen. Als Basis für die Berechnungen diente ein PLS-2-Algorithmus.

Für die Quantifizierung war die Transmissionsmessung der Reflexionsmessung (gleiche Datenvorbehandlung, aber Aufnahme der 2. Ableitung) ebenfalls überlegen, da Inhomogenitäten wegen der kompletten Durchstrahlung der Probe ausgeglichen wurden. Durch Wellenlängenselektion und einer Transformation der Originalspektren in die Ebene der Wellenzahlen ($1/x$ -Transformation) wurden die geringsten Vorhersagefehler in diesem Fall mittels PLS-1 Berechnung erzielt. Die Genauigkeit der Vorhersagewerte ist mit 0,4 - 1 % Fehler zufriedenstellend.

Die ausgearbeitete Referenzanalytik mittels HPLC unter Verwendung einer monolithischen SpeedRod RP-18e-Säule ergab bei hoher Präzision und Genauigkeit der Kalibrierung sehr gute Linearitätskoeffizienten. Die Trennung erfolgte über einen Gradienten mit einem Phosphatpuffer ($\text{pH} = 2,28$) und Acetonitril. Als Interner Standard wurde Metoclopramid verwendet. Die Evaluierung der Leistungsfähigkeit der Trennsäule zeigte, dass Erhöhungen der Flussraten für die Trennung ohne Probleme möglich sind. Eine Reduktion der Analysenzeit von 11 auf 3,5 min, also eine Verkürzung auf ein Drittel, konnte hierdurch erreicht werden.

Die ausgearbeitete NIR-Methode zur Mustererkennung von sichergestellten Ecstasy-Tabletten weiter zu entwickeln, ist naheliegend, wobei der Schwerpunkt auf die Wiedererkennung der Hersteller und auf die Charakterisierung der Chargenzugehörigkeit zu legen sein wird.

2 Einleitung

2.1 Ecstasy

Ecstasy war ursprünglich eine Szenebezeichnung für illegale Zubereitungen (Pulver, Tabletten) mit dem psychotropen Wirkstoff MDMA, welcher 1912 das erste mal von der Firma Merck, Darmstadt patentrechtlich erwähnt wurde [1]. Heutzutage wird die Bezeichnung in der Drogenszene und den Kriminalämtern als Oberbegriff für synthetische Drogen in Form von Tabletten oder Kapseln benutzt, die vorwiegend psychotrope Wirkstoffe aus der Gruppe der Amphetamine oder Methylenedioxyamphetamine einzeln oder kombiniert enthalten. Derzeit gängige Ecstasy-Tabletten enthalten überwiegend MDMA und Amphetamin neben MDE und MBDB [2]. Ecstasy kommt oral zur Anwendung und bewirkt ein Wachsein und eine „Bewusstseinsweiterung“ bei Zunahme der Kommunikativität [3]. Der regelmäßige Konsum kann zu einer psychischen Abhängigkeit führen.

2.2 Problemstellung

Seit Beginn der neunziger Jahre spielt Ecstasy in der Drogenszene eine wachsende Rolle. Dies macht sich auch in den steigenden Zahlen der in der Bundesrepublik Deutschland durchgeführten Sicherstellungen durch die Kriminalämter bemerkbar [4]. Das daraus resultierende hohe Probenaufkommen in den forensischen Untersuchungslabors kann unter Umständen zu Verzögerungen bei weiterführenden Recherchen nach den Herstellern dieser illegalen Drogen führen.

Die für die Analyse der Ecstasy-Proben verwendeten Methoden bringen einen hohen apparativen oder personellen Aufwand mit sich oder sind zeitaufwendig und nicht vor Ort durchführbar. In der Routineanalytik haben sich Methoden aus den Bereichen der Gaschromatographie (GC) [5, 6], Immunoassays [7], Kapillarelektrophorese (CE) [8, 9] und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) [10-12] etabliert. All diese Methoden haben jedoch den großen Nachteil, dass ein Teil des Beweismaterials bei der Analyse der Tabletten zerstört werden muss und dass teilweise gesundheitsgefährdende Stoffe zum Einsatz kommen, die eine Durchführung der Bestimmungen in einem vollausgestatteten Labor notwendig machen. Als

zerstörungsfreie und schnelle analytische Methode ohne den Einsatz von Lösungsmitteln empfiehlt sich die Nahe Infrarot Spektroskopie (NIR).

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe von Ecstasy-Tabletten durch NIR-Reflexionsmessung führten Sondermann und Kovar [13, 14] als erste 1999 durch. Die dafür notwendigen Modelle wurden auf der Basis im Labor hergestellter Tabletten aufgebaut. Jedoch mussten in einigen Fällen die Proben zur eindeutigen Unterscheidung von MDE und MDMA gepulvert werden.

Für die Analytik herkömmlicher pharmazeutischer Tabletten im NIR hat sich eine Messung in diffuser Reflexion durchgesetzt. Viele Arbeiten widmen sich der Datenvorbehandlung aufgenommener Spektren zur Erstellung einer Methode oder stellen mögliche Anwendungen vor [15-19]. Trotzdem werden auch Transmissionsmessungen beschrieben [20, 21]. Die Fragestellung der Vor- und Nachteile der beiden Messmethoden wurde bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen bearbeitet [22-24] und im Zusammenhang mit Ecstasy-Tabletten bisher noch nicht aufgegriffen.

Alle oben erwähnten Arbeiten führten ihre Untersuchungen mit Tabletten durch, die entweder aus der Herstellung im Routinebetrieb stammten oder in Eigenarbeit unter pharmazeutischen Qualitätskriterien hergestellt wurden. Solche Tabletten zeichnen sich durch eine geringe, herstellungsbedingte Varianz aus, die nicht auf den Konzentrationsunterschieden der Inhaltsstoffe beruht. Ecstasy-Tabletten hingegen weisen hohe Inhomogenitäten auf, die zum einen auf der Verwendung von Ausgangsstoffen unterschiedlicher Qualität basieren und zum anderen mit einer mangelnden Durchmischung des Pulvers vor dem Verpressen zusammenhängen. Im Labor hergestellte Ecstasy-Tabletten können nur einen Teil der Varianz wiedergeben, da die generierten Datensätze auf der Pharmazeutischen Qualität beruhen.

Ziel dieser Arbeit ist, in Weiterentwicklung der Arbeiten von Sondermann eine NIR-Methode zur schnellen Identifizierung von konfiszierten Ecstasy-Tabletten über Transmissionsmessungen zu erstellen und dabei deren Inhomogenitäten zu berücksichtigen und auszugleichen. Eine weitere Fragestellung betrifft den Vergleich

der Messungen in diffuser Reflexion und in Transmission bezüglich der Quantifizierungsmöglichkeit. Evaluiert werden soll vor allem der Einfluss des inhomogenen Probenmaterials auf das Analyseergebnis.

Für die Modellerstellung und zur Validierung wird als Referenzmethode die HPLC gewählt und unter Nutzung einer neu auf dem Markt gekommenen monolithischen Trennsäule ein verbessertes, auf den neuesten Stand der Technik beruhendes Verfahren ausgearbeitet.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Nahe Infrarot Spektroskopie

3.1.1 Prinzip der Absorption

Innerhalb des elektromagnetischen Spektrums befindet sich der Infrarote Bereich zwischen dem der Mikrowellen und dem sichtbaren Licht. Er gliedert sich wie folgt in drei Teilbereiche: das Nahe Infrarot (NIR) von 780 – 2500 nm, das Mittlere Infrarot (MIR) von 2500 nm – 40 μm und das Ferne Infrarot (FIR) von 40 – 1000 μm [25]. Das Plancksche Gesetz (Gl. 3-1) besagt, dass die Energie eines Photons zur Frequenz der Strahlung proportional ist.

$$E = h \cdot u \qquad \text{Gl. 3-1}$$

mit:	E	Energie eines Photons (J)
	h	Plancksche Wirkungskonstante ($6,63 \cdot 10^{-34}$ Js)
	u	Frequenz (Hz oder s^{-1})

Trifft Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung auf ein Molekül und wird diese von ihm absorbiert, so ändert sich die Energie der Strahlung. Dies ist nach quantenmechanischen Vorstellungen nur möglich, wenn die eingestrahlte Energie genau der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand des Moleküls entspricht. Die Absorption von Strahlung im IR- bzw. NIR-Bereich kann zwei Arten von Molekülschwingungen erzeugen. Zum einen sind dies Valenz- oder Streckschwingungen, bei denen nur die Bindungslängen verändert werden. Zum anderen Deformations- oder Biegeschwingungen, bei denen die Bindungswinkel eine Änderung erfahren. Valenzschwingungen benötigen höhere Energiebeträge zur Anregung als Deformationsschwingungen. Nur solche Substanzen sind infrarot aktiv, die ein permanentes Dipolmoment besitzen, das sich während der Absorption von Strahlung verändern kann [26]. Beschrieben wird die Anregung zu Molekülschwingungen durch das Modell eines anharmonischen Oszillators, bei dem Übergänge nicht nur über ein, sondern auch

über mehrere Energieniveaus erlaubt sind. Hierbei treten Oberschwingungen und Obertöne auf, die eine wesentlich geringere Übergangswahrscheinlichkeit als die Grundschnwingungen besitzen. Die Absorptionskoeffizienten sind um den Faktor 10 – 1000 geringer als bei den Grundschnwingungen [25, 27]. Die Frequenzen liegen etwas unterhalb der ganzzahligen Vielfachen ihrer Grundschnwingungen [28]. Zumeist treten hier noch Kombinationsschnwingungen neben den Grund- oder Oberschnwingungen auf, wenn gleichzeitig zwei verschiedene Schnwingungen durch ein Photon angeregt werden, deren Energiesumme der Energie dieses Photons entspricht [28, 29]. Für die Kombinationen höherer Ordnung sinken hierbei die Intensitäten. Im NIR werden vorwiegend Ober- und Kombinationsschnwingungen, im MIR Grundschnwingungen und im FIR Gerüstschnwingungen beobachtet.

Das Charakteristische von NIR-Spektren sind breite, schlecht aufgelöste Banden und eine mit zunehmenden Wellenlängen ansteigende Basislinie. Ein Vergleich mit den MIR-Spektren zeigt, dass sie bandenärmer sind und eine Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Schnwingungen aufgrund der Überlappung von Ober- und Kombinationsschnwingungen kaum möglich ist [30]. Ausgeprägte Banden zeigen hauptsächlich Atome geringer Masse mit starker chemischer Bindung, wie C-H, O-H, N-H oder S-H. Da diese Gruppen in fast allen organischen Molekülen vorhanden sind, ist diese Methode universell einsetzbar. Trotz der mangelnden Beziehung zwischen den Strukturelementen und den einzelnen Banden, ist ein NIR-Spektrum in seiner Gesamtheit für jede Verbindung charakteristisch. Die zunächst als Nachteil erscheinenden geringeren Absorptionskoeffizienten (s.o.) im NIR, stellen sich bei der Probenmessung als Vorteil heraus. Spektren können ohne vorherige Verdünnung der Probe aufgenommen werden. Aus diesem Grunde existieren viele Anwendungen in den Bereichen der Chemie [31, 32], Landwirtschaft [33, 34], Nahrungsmittelindustrie [35-37], Medizin [38, 39] und gerade auch in der pharmazeutischen Industrie [18, 40-44]. Einen Überblick über die Anwendungsgebiete der NIR-Spektroskopie gibt Tab. 3-1.

Tab. 3-1: Wichtige Anwendungsgebiete der NIR-Spektroskopie (nach [45]).

Bereich	Anwendung
Chemie	Konventionell: Zusammensetzung, Struktur, Wassergehalt von organischen Verbindungen; Charakterisierung von synthetischen Polymeren; Additive in Polymeren. On-line monitoring: Polymerisation, Petrochemische Prozesse, Bioprozesse, Polymer-Extrusion.
Landwirtschaft	Protein, Wasser, Fett, Öl, Reis, Sojabohnen.
Nahrungsmittel-Industrie	Protein, Wasser, Fett in Backwaren, Molkereiprodukten, Fleisch, Snack Food, Kakao, Schokolade.
Pharmazie	Identität, Gehalt und Feuchte in Pulvern, Granulaten, Tabletten; Restfeuchte in Lyophilisaten; Feuchte in Gelatine-Kapseln; Kristallinitätsgrad, Polymorphie, Dichte; Modifikationsumwandlungen, Härtegrad von Tabletten; Stabilität; Korngröße; Mischungsgüte. On-line Monitoring: Mischen, Granulieren, Trocknen, Filmcoating, Direktpelletierung.
Medizin	Nichtinvasive in-vivo Bestimmung von Körperfett, Cholesterol, Blutzucker, Sauerstoff; Wassergehalt der Haut; Hautkrebs; Fett, Kohlenhydrate und Stickstoff in Fäzes.
Umweltschutz	Kunststoff-Recycling; Schadgasmessungen.

Zur graphischen Darstellung der Spektren wird die scheinbare Absorption $\log 1/R$ (Ordinate, s. 3.1.3.1) gegen die Wellenlänge in nm (Abszisse) aufgetragen. Diese Darstellung bietet sich besonders an, da ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen $\log 1/R$ und den Konzentrationen der absorbierenden Bestandteile besteht [46]. NIR-Spektren enthalten Information nicht nur über chemische Eigenschaften wie Molekülstruktur, Bindungsstärke, Elektronegativität und Wasserstoffbrückenbindungen, sondern auch über physikalische Parameter wie Teilchengröße, Oberflächenglanz und Brechungsindex [47].

Die o.a. Unterschiede zwischen der Spektroskopie im Nahen Infrarot und der im Mittleren Infrarot machen deutlich, dass sowohl qualitative als auch quantitative

Aussagen über die Probe nur durch neue Ansätze erreicht werden können. Die Vielfalt an Information, die ein Spektrum widerspiegelt, erfordert für die Beurteilung der chemischen und physikalischen Eigenschaften einer Probe den Einsatz chemometrischer (multivariater) Methoden.

3.1.2 Messmethodik

3.1.2.1 Apparative Voraussetzungen

Im Prinzip besitzen alle NIR-Spektrometer eine ähnliche Bauweise. Gemäß der NIR Monographie des Europäischen Arzneibuchs [48] bestehen sie aus Monochromator, Detektor und einer Einrichtung zur mathematischen Bearbeitung von Spektren. Zur Erzeugung des monochromatischen Lichts werden hier Filter, Gitter und Interferometer erwähnt. Darüber hinaus finden aber auch akustooptisch durchstimmbare Filter, lichtemittierende Dioden und Diodenarrays Anwendung. Das Arzneibuch fordert die Möglichkeit der Erzeugung elektromagnetischer Strahlung über den Bereich von 780 – 2500 nm [48]. Meist wird eine Wolfram-Halogenlampe als Lichtquelle eingesetzt, da diese im gewünschten Wellenlängenbereich eine hohe Intensität aufweist. Auf dem Markt befindliche Geräte nutzen je nach zu detektierendem Wellenlängenbereich unterschiedliche Detektoren. Anwendung finden hier halbleitende photoelektronische Elemente aus Ge, Si, PbS, InSb oder InGaAs [49]. Je nach Messtechnik werden verschiedene Anordnungen für die Detektoren gewählt (s. 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Die Referenzierung bei der Spektrenaufnahme erfolgt gegen einen hochreflektierenden Keramikstandard (z.B. Spectralon®). Die Rohdaten, die über die Kopplung mit Computersystemen erhalten werden, können dann je nach Anwendung bearbeitet bzw. ausgewertet werden.

3.1.2.2 Diffuse Reflexion

Bei Messung in diffuser Reflexion (Abb. 3-1) sind die Detektoren in einem Winkel von 45° zur Einstrahlebene der Probe angeordnet. Ziel dieser Anordnung ist es, nur die diffus reflektierte Strahlung, die sogenannte Remission, zu detektieren, da nur diese mit der Probe in Wechselwirkung treten kann und deswegen stoffbezogene Informationen enthalten kann [50]. Die Remission kann

näherungsweise mit der Kubelka-Munk-Funktion [51, 52] oder besser mit der scheinbaren Absorption (s. 3.1.3.1) beschrieben werden. Man geht davon aus, dass bei der Verwendung der diffusen Reflexion die Messwellenlängen um ein Vielfaches kleiner sind als die Schichtdicken der Proben und keine Transmission stattfindet. Abhängig von der Partikelgröße der Probe und der Packungsdichte, werden die Eindringtiefen des Lichts zwischen 0 und 5 mm geschätzt [53]. Auf diese Weise werden im Allgemeinen feste Substanzen wie Tabletten oder Pulver vermessen [54, 55].

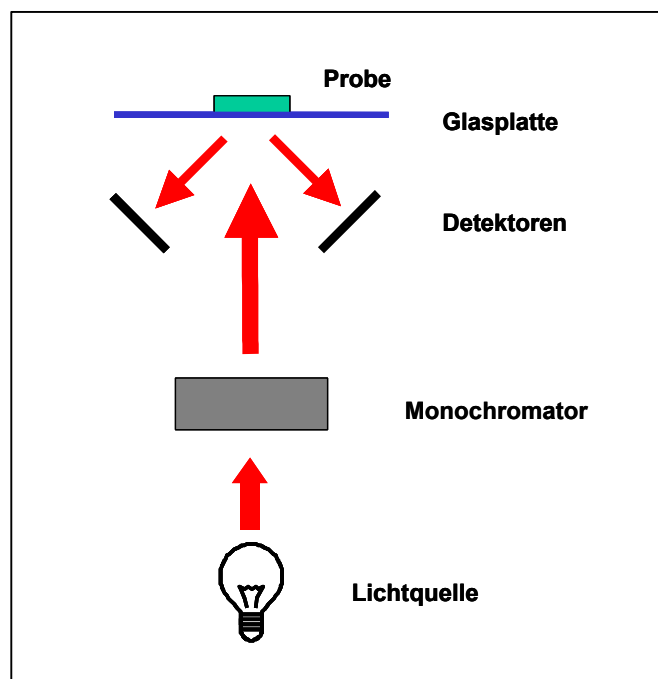


Abb. 3-1: Schematischer Aufbau eines NIR-Reflexionsspektrometers.

3.1.2.3 Transmission

Bei der Transmissionsmessung (Abb. 3-2) trifft nach direkter Durchstrahlung der Probe das um den absorbierten Anteil reduzierte Licht auf den Detektor, der sich direkt hinter der Probe befindet. Die Transmission wird hierbei bezeichnet als das Verhältnis aus dem durch die Probe abgeschwächten Energieteil zur Energie gegenüber einem geeigneten Transmissionsstandard. Unter Einschränkungen gilt hier das Gesetz nach Lambert-Beer [56]. Es liefert den funktionalen Zusammenhang zwischen der gemessenen Transmission und der Konzentration einer zu analysierenden Substanz in der Probe. Diese Messtechnik wird bei der

Analyse von Flüssigkeiten, Lösungen, Schüttgütern, Feststoffen und bei Tabletten angewendet [21, 57, 58]. Die Schichtdicke darf allerdings bei der Transmissionsmessung nicht zu groß sein, da sonst keine Information mehr aus der Probe am Detektor ankommt. Die Literatur spricht von möglichen Probendicken bis zu 7 mm Höhe [22].

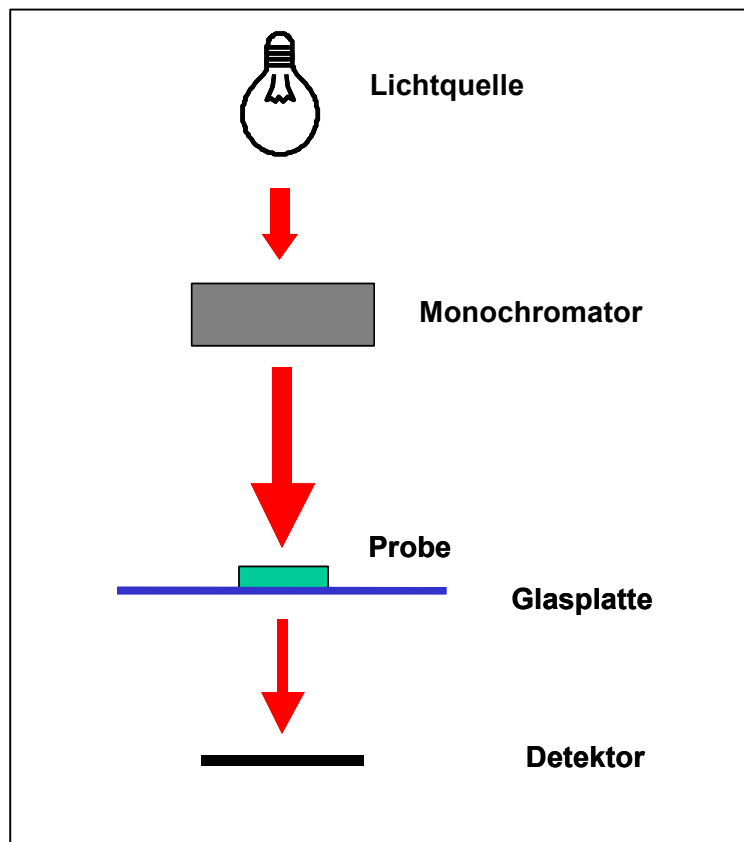


Abb. 3-2: Schematischer Aufbau eines NIR-Transmissionspektrometers.

3.1.3 Datentransformation

3.1.3.1 Scheinbare Absorption

In der NIR-Reflexionsspektroskopie wird die $\log 1/R$ -Transformation der Reflexionsspektren bevorzugt, die auch im Europäischen Arzneibuch empfohlen wird [48]. Diese Transformation geht vom Lambert-Beer'schen-Gesetz aus, das besagt, dass die Absorption (A) umgekehrt proportional zur Transmission (T) ist:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = e \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 3-2}$$

mit:	I_0	Intensität des eingestrahnten Lichts
	I	Intensität des Lichts nach Probendurchgang
	e	molarer Absorptionskoeffizient ($\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$)
	c	Konzentration (mol/l)
	d	Schichtdicke (cm)

Man geht von der Annahme aus, dass bei einer ausreichenden Schichtdicke das gesamte Licht im NIR entweder reflektiert oder absorbiert wird. Analog zur Transmission wird für die Reflexion folgender Zusammenhang definiert:

$$A \approx \log \frac{1}{R} \quad \text{Gl. 3-3}$$

Diese Absorption wird als scheinbare Absorption bezeichnet, da die Reflexion, auf der sie basiert, nicht absolut bestimmbar ist. Sie wird als scheinbare Reflexion [46] bezeichnet und wird erhalten durch Messungen gegen eine Referenz. Es ergeben sich für die Transmission und Reflexion folgende Beziehungen:

$$T = \frac{T_{\text{Probe}}}{T_{\text{Standard}}} \quad \text{Gl. 3-4}$$

$$R = \frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} \quad \text{Gl. 3-5}$$

mit:	T bzw. R_{Probe}	Intensität des von der Probe transmittierten, bzw. diffus reflektierten Lichts
	T bzw. R_{Standard}	Intensität des vom Standard transmittierten, bzw. diffus reflektierten Lichts

Die Transformation mit $\log 1/T$ bzw. $\log 1/R$ stellt einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten in der Probe und scheinbarer Absorption her.

3.1.3.2 Derivativspektroskopie

Die Derivativspektroskopie ist eines von vielen Verfahren, die in der Literatur beschrieben wurden, um Streueffekte in NIR-Absorptionsspektren zu minimieren. In der Untersuchung von Blanco et al. [59] führte die Derivativspektroskopie mit der 2. Ableitung zu den besten Ergebnissen in Bezug auf die Möglichkeit, bei einer Messung in Reflexion die besten Ergebnisse für eine quantitative Aussage zu erhalten. Die 2. Ableitung beschreibt die Krümmung der Spektren. Hierdurch werden die Spektren auf ihre Extremwerte normiert und Randeffekte der einzelnen Banden vernachlässigt. Die 1. Ableitung hingegen nimmt eine Basislinienkorrektur am Spektrum vor. Der lineare Anstieg der Basislinie mit der Wellenlänge wird beseitigt. Sie eignet sich somit ideal, um Basislinienversätze aufgrund unterschiedlicher physikalischer Einflussgrößen der Proben, z.B. die Teilchengröße, auszugleichen [60].

Häufig wird für die oben genannten Ableitungsfunktionen der Algorithmus von Savitzky-Golay verwendet [61, 62]. Diese Funktion glättet ein vorhandenes Spektrum in der Art, dass neue Datenpunkte unter Berücksichtigung der umliegenden Datenpunkte generiert werden. Es lässt sich sagen, dass die Umgebung eines Datenpunktes in jeden einzelnen Punkt mit eingeht.

3.1.3.3 Standard Normal Variate (SNV)

Proben, die in diffuser Reflexion vermessen werden, zeigen oftmals signifikante Unterschiede in den Spektren, bedingt durch inhomogene Teilchenverteilung und Teilchengrößenverteilung oder durch eine nicht reproduzierbare Probenpräsentation im Spektrometer. Diese Streueffekte können derart stark sein, dass nicht mehr Unterschiede in Bezug auf die Inhaltsstoffe, sondern vielmehr diese Effekte den größten Anteil bei der Festlegung der Differenzen zwischen den Spektren ausmachen. Typischerweise erscheinen diese Effekte als Basislinienverschiebung, wobei der Einfluss größer wird hin zu höheren Wellenlängen.

Die SNV Korrektur ist nun eine Methode, die versucht, die stärksten Streulichteffekte zu eliminieren. Sie erreicht dies durch Standardisierung jedes Spektrums unter Benutzung vom jeweiligen Mittelwert und der Standardabweichung jedes Einzelspektrums [63, 64]. Anders als bei der *Multiplicative Scatter Correction* (MSC) [65], wird kein ideales externes Spektrum als Referenz benötigt. Jedes Spektrum wird bei der SNV für sich selbst transformiert. Jedes Spektrum wird auf seinen Mittelwert zentriert und danach durch seine Standardabweichung dividiert (Gl. 3-6).

$$S_i^{SNV} = \frac{S_i - \bar{S}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (S_i - \bar{S})^2}{n-1}}} \quad \text{Gl. 3-6}$$

mit: S_i Jeder Datenpunkt des Spektrums
 \bar{S} Mittelwert des Spektrums
 n Anzahl Datenpunkte je Spektrum

3.1.3.4 1/x-Transformation

Das Absorptionsspektrum einer Substanz kann entweder als eine Funktion der Wellenlängen (λ , nm) oder der Wellenzahlen (\mathbf{u} , cm^{-1}) aufgenommen werden [66]. Die Darstellung ist abhängig von der Art des Monochromators im jeweilig benutzten Spektrometer. Der Zusammenhang zwischen der Wellenlänge und der Wellenzahl ergibt sich wie folgt:

$$\mathbf{u} = \frac{1}{\lambda} \cdot 10^7 \quad (\text{Gl. 3-7})$$

Jedoch ist nur die Wellenzahl direkt proportional zur Energie des absorbierten Lichts [67]. Die Beschreibung der NIR-Spektren in Abhängigkeit der Wellenlängen

basiert auf der Schreibweise in unserem metrischen System und hat sich als Standard etabliert [68]. Eine $1/x$ -Transformation eines NIR-Spektrums entspricht einer Konversion aller Datenpunkte aus der Ebene der Wellenlängen in die Ebene der Wellenzahlen, also die Umsetzung zur direkten Korrelation der Energie der Strahlung. Sie lässt eine realistischere Gewichtung der Spektren zu. In der Darstellung in I , erfahren die Datenpunkte in den Bereichen höherer Wellenlängen ein größeres statistisches Gewicht, was die multivariate Auswertung beeinflusst. Eine Umwandlung in u hingegen, gewichtet alle Datenpunkte gleich – entsprechend ihrer Energieniveaus [69].

3.1.4 Multivariate Datenanalyse

3.1.4.1 Einleitung

Wold und Kowalski haben in den frühen 80er Jahren den Begriff Chemometrie definiert [70]. Er umschreibt die Anwendung mathematischer und statistischer Methoden zur Extraktion maximaler Information aus chemischen oder spektroskopischen Daten [71]. Verschiedene chemometrische Verfahren stehen zur Untersuchung von Datensätzen zur Verfügung.

In der qualitativen Analytik kommen Mustererkennungsmethoden wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA), *Soft Independent Modelling Of Class Analogy* (SIMCA) oder die Varianzanalyse (*Analysis Of Varianz*, ANOVA) zum Einsatz.

Für die quantitative Untersuchung wird die Beziehung zwischen (spektralen) Daten und der Konzentration eines oder mehrerer Analyten hergestellt. Hierbei werden die *Multiple Linear Regression* (MLR), die *Principal Component Regression* (PCR) oder die *Partial Least Squares Regression* (PLS) eingesetzt. In der NIR-Analytik haben sich diese multivariaten Methoden seit der Entwicklung leistungsfähigerer Computersysteme fest etabliert [72, 73]. Im Folgenden soll kurz auf die beiden Hauptmethoden eingegangen werden, die in dieser Arbeit Verwendung finden. Für die Beschreibung der anderen Verfahren wird die Lektüre der zusammenfassenden Werke von Burns und Ciurczak [27], sowie Massart et al. [70] und Otto [71] empfohlen, die auch auf weiterführende Literatur verweisen.

3.1.4.2 Principal Component Analysis (PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Mustererkennung in Datensätzen [74, 75]. Sie dient zur Erkennung latenter Strukturen innerhalb der Datenmatrix und lässt dadurch Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Elementen erkennen [76]. Mit Hilfe des verwendeten Algorithmus (z.B. NIPALS [77]) wird die Datenmatrix in sogenannte Hauptkomponenten zerlegt, die jeweils eine Linearkombination der ursprünglichen Matrixelemente darstellt. Die erste Hauptkomponente beinhaltet die größten Varianzen zwischen den Datensätzen. Die nächstgrößten Unterschiede zwischen den Elementen werden in der zweiten Hauptkomponente abgebildet, usw. Die Hauptkomponenten oder auch Faktoren werden nacheinander bestimmt und sind orthogonal zueinander [70]. Die so berechneten Hauptkomponenten können als ein neues, unter Umständen mehrdimensionales Raumgitter dargestellt werden. Sogenannte **Scores** beschreiben die Koordinaten der Proben in diesem Raumgitter. Liegen Proben in diesem Raumgitter nahe beieinander oder bilden einzelne Gruppen Cluster in diesem Koordinatensystem, besitzen diese ähnliche Eigenschaften [37]. **Loadings** hingegen beschreiben die Gewichtung der einzelnen x-Variablen in Bezug auf ihren Beitrag zur Varianz entlang einer Hauptkomponente. Mit ihrer Hilfe ist es möglich festzustellen, welche Datenpunkte die größte Varianz zwischen den Proben ausmachen. Somit kann die Bedeutung der einzelnen Variablen auf die Kalibrierung abgeschätzt werden.

3.1.4.3 Partial Least Squares Regression (PLS)

Die PLS ist ein multivariates Regressionsverfahren für die quantitative Auswertung von Datensätzen. Hierbei wird im Gegensatz zur PCA nicht erst die Datenmatrix in Hauptkomponenten und scores auf der Basis der größten Unterschiede zerlegt, sondern vielmehr werden die Faktoren von Anfang an unter Berücksichtigung der Konzentration des oder der Analyten gebildet [78, 79].

Zwei unterschiedliche PLS-Algorithmen stehen zur Berechnung der Faktoren zur Verfügung. Die PLS-1 generiert die Hauptkomponenten und scores auf der Basis der Information über einen Analyten. Beim PLS-2 Algorithmus werden die Faktoren unter Berücksichtigung mehrerer Analyten berechnet.

3.1.5 Erstellung und Validierung einer Kalibrierung

3.1.5.1 Quantitative Kalibrierung

Die NIR-Spektroskopie ist eine Sekundärmethode bei der Analyse von Arzneistoffen oder Fertigprodukten. D.h. die Konzentrationen der Proben, mit denen eine NIR-Kalibrierung erstellt werden soll, müssen über eine Referenzanalytik bestimmt werden. Auf der Basis dieser quantitativen Aussagen, kann ein Kalibrationsmodell für die NIR entwickelt werden, um neue Proben vorherzusagen. Die Bereitstellung von Mustern, die anschließende Referenzanalytik und die multivariate Methodenentwicklung und Validierung stellen den anspruchsvollsten und zeitaufwendigsten Teil einer NIR-Kalibrierung dar.

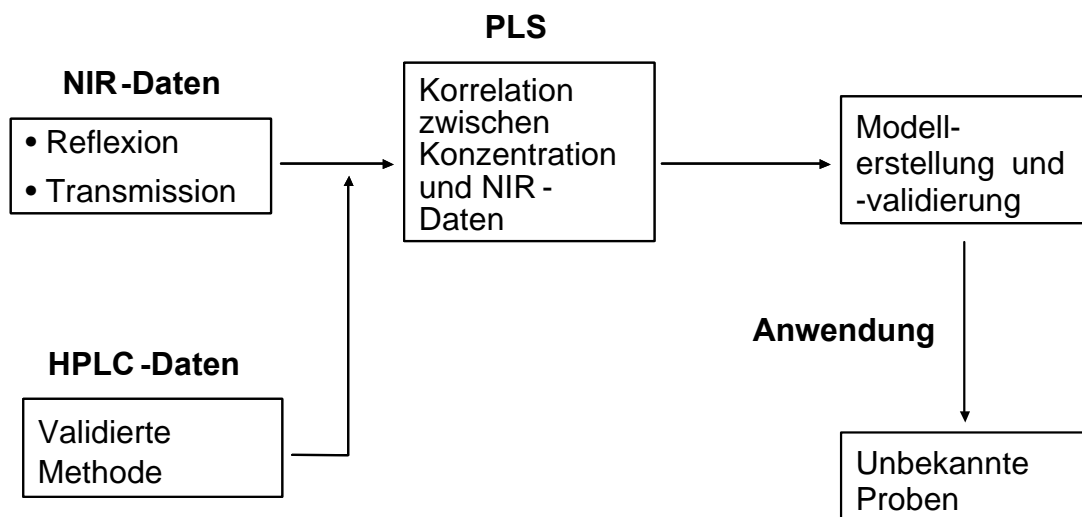


Abb. 3-3: Überblick über die Durchführung einer quantitativen Kalibrierung.

3.1.5.2 Validierung

Die Güte eines Quantifizierungsmodells in der NIR wird während der Validierung auf der Basis der Vorhersagefähigkeit der entwickelten Methode überprüft. Die Abschätzung der Fehler geschieht über die Vorhersage von Proben mit bekanntem Gehalt.

Bei der **internen Validierung** wird während der Berechnung auf die Kalibrierdaten selbst zurückgegriffen. Die sogenannte Kreuzvalidierung (*Cross Validation*) klammert während der Modellerstellung sukzessive einige Proben aus der

Berechnung aus, um diese dann mit dem Modell vorherzusagen und die Fehler auf der Basis der Kalibrierdaten zu errechnen. Anschließend werden die durchschnittlichen Abweichungen aller vorhergesagten Werte zusammengefasst. Bei der *Full Cross Validation* (FCV) wird jede einzelne Probe auf diese Art vorhergesagt.

Eine **externe Validierung** erfolgt über die Aufteilung aller Proben der Kalibrierung in ein Kalibrier- und ein Testset. Auf der Basis des Kalibriersets wird ein Modell erstellt, mit dem die Proben des Testsets vorhergesagt werden. Diese Methode liefert ein aussagekräftigeres Ergebnis, da die Daten des Testsets zu keinem Zeitpunkt zur Berechnung des Modells herangezogen wurden, wie dies bei der internen Validierung der Fall ist.

3.1.5.3 Statistische Kenngrößen

Der Vergleich unterschiedlicher Modelle geschieht auf der Basis verschiedener Kalibrierdaten, die im folgenden aufgeführt werden (nach [77]).

Achsenabschnitt der Regressionsgerade (*Offset*)

Er sollte bei einer optimalen linearen Beziehung möglichst Null sein und berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Achsenabschnitt} = \frac{1}{N} (\sum y - \text{Steigung} \cdot \sum x) \quad \text{Gl. 3-8}$$

Bias

Unter Bias versteht man den Mittelwert aller Abweichungen zwischen NIR- und Referenzwert (wahrer Wert). Für um den Mittelwert normalverteilte Werte wäre der Bias gleich Null.

$$\text{Bias} = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - y_i) \quad \text{Gl. 3-9}$$

Korrelationskoeffizient (*Correlation Coefficient*)

Der Korrelationskoeffizient $r_{k_1k_2}$ ist ein Maß für die lineare Abhängigkeit zweier Variablen ohne Einheit. Er variiert zwischen -1 (gegenläufige Korrelation) und $+1$ (gleichläufige Korrelation).

$$r_{k_1k_2} = \frac{\sum_{i \in S_k} (x_{ik_1} - \bar{x}_{k_1}) \cdot (x_{ik_2} - \bar{x}_{k_2})}{(I-1) \cdot S_x(k_1) \cdot S_x(k_2)} \quad \text{Gl. 3-10}$$

für $k_1, k_2 = 1 \dots K$

Residual Variance

Residual Variance ist das gemittelte Quadrat aller Residuen der Proben und der Variablen. Es ist ein Maß des Fehlers, der durch die Bestimmung der vorgegebenen Werte durch die vom Modell errechneten gemacht wird.

$$\text{ResVar}(a, z) = \frac{1}{d} \sum_{n=1}^N Ra^2 \quad \text{Gl. 3-11}$$

Bei der Methodvalidierung mittels Kreuzvalidierung wird der Vergleich der Residual Variance von Kalibrierung und Validierung gegen die Zahl der Hauptkomponenten aufgetragen. Verlaufen beide Kurven schnell auf ein Minimum und möglichst parallel, ist sowohl die Robustheit des Modells als auch die Güte für die Vorhersage unbekannter Proben sehr hoch.

Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC)

Der RMSEC ist ein Maß für die mittlere Differenz zwischen vorhergesagten und vorgegebenen Werten im Stadium der Kalibrierung. Er kann als der durchschnittliche Modellfehler, ausgedrückt in den gleichen Einheiten wie die Originalwerte, interpretiert werden.

$$\text{RMSEC} = \frac{1}{y\text{Weight}} \sqrt{\text{ResYCalVar}} \quad \text{Gl. 3-12}$$

Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP)

Der RMSEP ist ein Maß für die mittlere Differenz zwischen vorhergesagten und gemessenen Werten im Stadium der Vorhersage oder Validierung. Er kann als durchschnittlicher Vorhersagefehler, ausgedrückt in den gleichen Einheiten wie die Originalwerte, interpretiert werden. Für die Kreuzvalidierung errechnet er sich wie folgt (4-6).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{I_{tot}} \sum_{s=1}^{N_{seg}} \frac{1}{yWeights^2} \sum_{i=1}^{I_s} Fiy_s(i, j)^2} \quad \text{Gl. 3-13}$$

Steigung der Regressionsgeraden (Slope)

Die Regressionsstatistik gibt die Beziehung zwischen den vorgegebenen und errechneten Werten als 2-dimensionalen Plot in Form einer Regressionsgeraden mit der Steigung m wieder. Im Idealfall beträgt dieser Wert 1.

$$m = \frac{N \sum y \cdot x - \sum y \sum x}{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad \text{Gl. 3-14}$$

Tabelle 4-1: Beschreibung der in den Formeln Gl. 3-8 bis 3-14 verwendeten Symbole.

Symbol	Beschreibung
yWeight	Gewichte von y
Fiy	Reste von y
A	Anzahl der verwendeten Hauptkomponenten
i, I	Anzahl der Proben
j, J	Nummer/ Anzahl der y-Variablen
k, K	Nummer/ Anzahl der x-Variablen
N	Anzahl der Elemente
r	Korrelation
R	Varianz pro x- oder y-Variablen
S	Standardabweichung
X	Mittelwert von x
x, X	x-Wert, X-Matrix
\hat{y}_i	Vorhergesagter Wert von y
y, Y	y-Wert, Y-Matrix

3.2 High Performance Liquid Chromatography

3.2.1 Allgemeines

Als gängigste Analysenmethode, nicht nur zur Bestimmung forensisch relevanter Substanzen, ist die HPLC ein fester Bestandteil jedes analytischen Labors. Immer robustere Anlagen mit sehr gut reproduzierbaren Messergebnissen und hoher Methodenpräzision machen sie zur Methode der 1. Wahl auf der Suche nach einer Referenzanalytik für die quantitative NIR-Spektroskopie. Die vielen Varianten an Trennsäulen ermöglichen weitgefächerte Anwendungsgebiete in der Analytik. Unterschiedliche HPLC-Säulen lassen sich u.a. kategorisieren nach Trägermaterial (Kieselgel, *Reversed-Phase*, chirale Phasen etc.), Partikelgröße und Säulenlänge. Die üblichste Form der Säulenherstellung ist hierbei das Packen der Säule mit dem entsprechenden körnigen Säulenmaterial. Vor kurzer Zeit ist die sogenannte vierte Generation an Trägermaterial zur Marktreife gebracht worden: monolithische HPLC-Säulen [80].

3.2.2 Monolithische Säulen

Monolithische HPLC-Säulen werden nach einem völlig neuen Verfahren hergestellt. Die Säule wird nicht mehr gepackt, sondern in einem Arbeitsgang aus einer Basislösung heraus in einem Sol-Gel Verfahren als ein Kieselgelstäbchen polymerisiert [81]. Hierbei bildet sich ein poröses Kieselgelgerüst aus Alkoxysilanen aus, welches eine charakteristische bimodale Porenstruktur aufweist. Die so generierten Trennsäulen bestehen zum einen aus Makroporen (durchgängige Poren) mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 2 μm , durch die das Lösungsmittel ungehemmt durchfließen kann und zum anderen aus Mesoporen mit einer Größe von ca. 13 nm [82] (s. Abb. 3-4), die zusammen eine fein-poröse Struktur der Säule bilden mit einer Oberfläche von 300m²/g, an welcher die Absorption der Probe stattfindet. Hieraus resultiert die große Permeabilität dieses Kieselgelskeletts, die zu einem ungewöhnlich niedrigem Säulenrückdruck führt. Aufgrund dieses geringen Drucks können nun HPLC-Analysen in einem Bruchteil der üblichen Zeit durchgeführt werden. Höhere Flussraten, die bei gepackten Säulen einen zu hohen Druck auf der Säule aufgebaut hätten, wodurch diese dann durch Kompression zerstört worden wäre,

sind jetzt nicht mehr der limitierende Faktor. Trennzeiten mit GC-üblichem Standard oder besser lassen sich dadurch bewerkstelligen [83, 84].

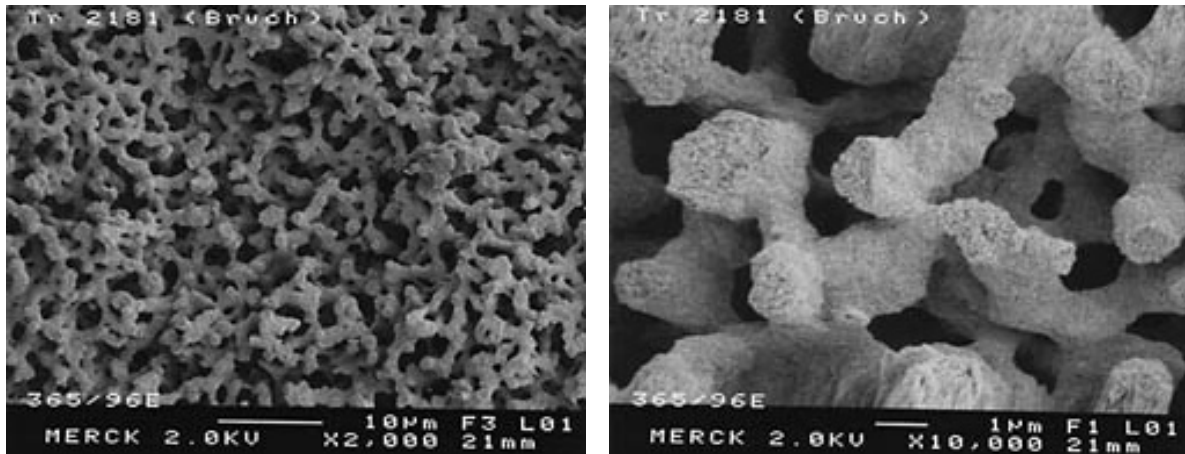


Abb. 3-4: Elektronenmikroskopische Aufnahme der a) Makroporen und b) Mesoporen (aus [83])

4 NIR Analytik von Ecstasy-Tabletten

4.1 Identifizierung von Ecstasy-Tabletten mittels NIR-Transmissionsmessung

4.1.1 Vorbemerkungen

Die Identifizierung von Ecstasy-Tabletten bildet die Grundlage für die quantitative Analytik dieser Proben. Die Ausführungen von Sondermann [14, 85] in ihren Arbeiten zeigen, dass vor der Berechnung des Gehaltes von Ecstasy-Tabletten zuerst eine Identifizierung der zu untersuchenden Substanzen mittels eines geeigneten Modells stattfinden muss, bevor dann der Gehalt durch ein spezielles, quantifizierendes Modell, das für jede Substanz spezifisch ist, bestimmt werden kann. Sie schlägt Identifikationsmodelle auf der Basis einer PLS-1 nach der 2. Ableitung der Rohdaten und ein zusätzliches PLS-2 Modell auf Basis der Rohdaten vor [14]. Ihre Untersuchungen der Tabletten fanden allesamt mittels diffuser Reflexionsmessung im NIR statt. Im Folgenden soll die Möglichkeit einer Identifikation mittels Transmissionsmessung untersucht werden.

4.1.2 Rohspektren

Für die Berechnung einer Identifikationsmethode wurde nicht die übliche Hauptkomponentenanalyse (PCA) genutzt, bei der die Hauptkomponenten (PCs) auf der Basis der größten Varianzen berechnet werden, sondern mittels einer PLS Kalibrierung ein Zusammenhang zwischen Spektren und dem Vorhandensein der Inhaltsstoffe in den Tabletten hergestellt. Da keine Konzentrationsangabe über die einzelnen Substanzen in den Tabletten gemacht werden konnte, wurde je Substanz eine Y-Komponente definiert (Amphetamin, MBDB, MDE und MDMA), also eine Quasi-Konzentrationsangabe. Für jede Tablette wurde bei dem Vorhandensein einer Substanz der Wert 1 gesetzt, bei ihrer Abwesenheit der Wert 0. Der Arbeit von Sondermann [85] folgend, wurde eine PLS-2 Kalibrierung unter Berücksichtigung aller 4 Substanzen mit den Rohspektren durchgeführt (600 – 2500 nm). Jedes der folgenden Modelle wurde über eine *Full Cross Validation* (FCV) validiert. Abb. 4-1 zeigt einen Score-Plot des Datensatzes für die ersten drei

Hauptkomponenten, also die Projektion der einzelnen Proben in den Probenraum auf der Basis der berechneten Hauptkomponenten. Deutlich ist zu erkennen, dass die einzelnen Substanzgruppen nicht auf diese Berechnungsweise voneinander zu unterscheiden sind. Die entsprechenden Parameter der Kalibrierung sind in 6.5.2 aufgeführt.

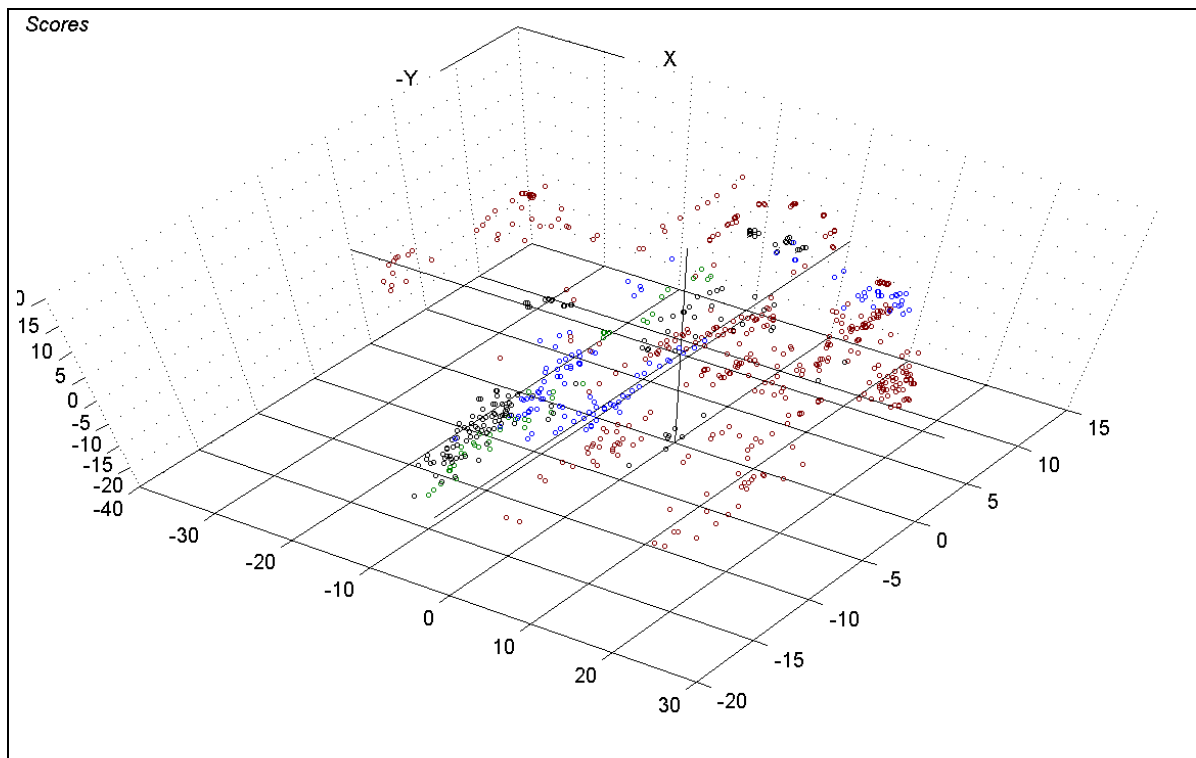


Abb. 4-1: Anordnung der Proben im 3 dimensionalen Score-Plot der Hauptkomponenten 1 bis 3 (Achsen x, y, z) für die Substanzen Amphetamin, MBDB, MDE und MDMA. Ergebnis einer PLS-2 Berechnung mit allen Datenpunkten.

Obige Berechnungen auf der Basis der Gesamtspektren beinhalten jedoch viele Datenpunkte, die den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Substanz oder ihrer Abwesenheit nicht oder kaum beschreiben. Nach Einengung des Wellenlängenbereichs auf die Schwingungsbanden der CH-, CH₂- und CH₃-Gruppen, d.h. den Bereich von 800 – 1400 nm, ergab sich nach PLS-2 Berechnung folgendes Ergebnis (Abb. 4-2).

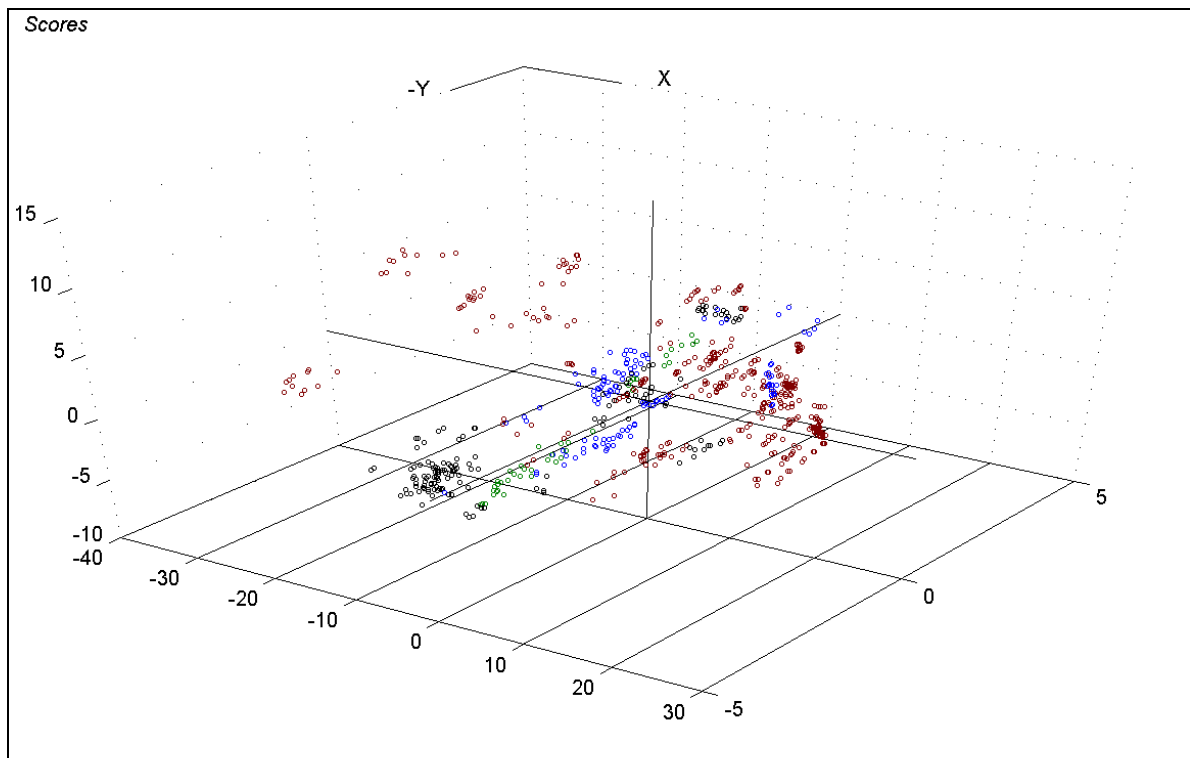


Abb. 4-2: Anordnung der Proben im 3 dimensionalen Score-Plot der Hauptkomponenten 1 bis 3 (Achsen x, y, z) für die Substanzen Amphetamin, MBDB, MDE und MDMA. Ergebnis einer PSL-2 Berechnung mit den Wellenlängen von 800 bis 1400 nm.

Eine deutliche Gruppierung der Substanzgruppen im Hauptkomponentenraum ist nicht zu erkennen. Lediglich eine Abnahme der Streuung in den einzelnen Untergruppen. Die Parameter der Kalibrierung sind in 6.5.2 dargestellt.

4.1.3 Datenvorbehandlung

Der obige PC-Plot zeigt, dass durch die angewandte Datenreduktion eine bessere Trennung der Substanzen kaum möglich wird. Da der eingesetzte Datensatz nicht den Qualitätskriterien pharmazeutisch hergestellter Tabletten entsprach – gleicher Gehalt, gleiche Masse, identische Ausmaße - wie dies bei Sondermann der Fall war, muss mit einer höheren Varianz innerhalb der Substanzgruppen gerechnet werden. Alle Ecstasy-Proben unterschieden sich hinsichtlich ihrer Teilchengrößen, Höhen, Durchmesser, Massen und Stempelprägungen. Diese Inhomogenitäten der physikalischen Parameter werden teilweise durch eine 2. Ableitung unter Benutzung einer 5 Punktglättung der Daten ausgeglichen [86]. Eine

anschließende PLS-2 Berechnung ergab eine Verbesserung der Unterscheidung der untersuchten Substanzen. Im PC-Plot ist ein deutliches Clustering der Substanzgruppen zu erkennen (Abb. 4-3). Ebenfalls verbessert haben sich nach der Datenvorbehandlung die Parameter der jeweiligen Kalibrierungen (Tab. 4-1).

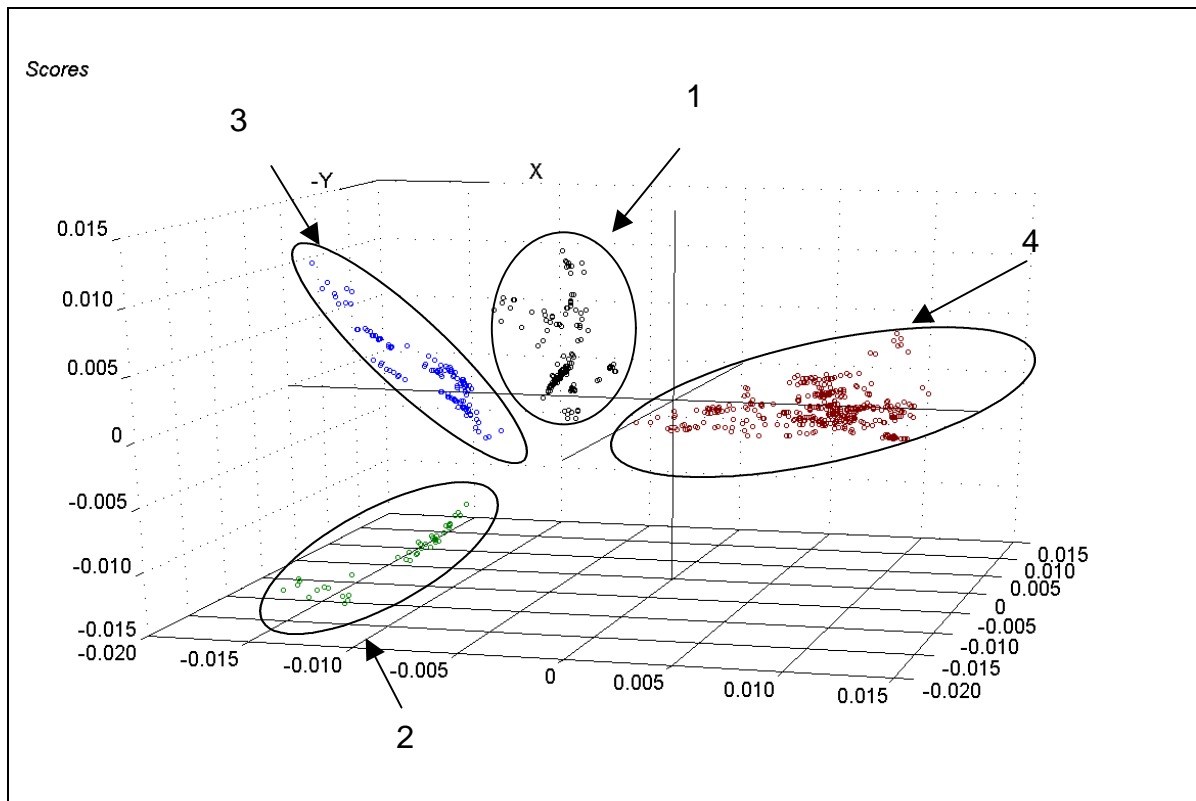


Abb. 4-3: Clustering der Proben im 3 dimensionalen Score-Plot der Hauptkomponenten 1 bis 3 (Achsen x, y, z) für die Substanzen Amphetamin (1), MBDB (2), MDE (3) und MDMA (4). Ergebnis einer PLS-2 Berechnung mit den Wellenlängen von 800 bis 1400 nm nach 2. Ableitung und 5 Punkt Glättung nach Savitzky-Golay.

Tab. 4-1: Parameter der Modelle aus der Berechnung mit Wellenlängenauswahl (800 – 1400 nm) und 2. Ableitung mit 5 Punktglättung (PLS-2).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	10	10	10	10
Steigung	0,9424	0,9602	0,9512	0,8828
y-Achsenabschnitt	0,0121	0,0223	0,0083	0,0070
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9708	0,9799	0,9753	0,9396
RMSEC (%)	0,0978	0,0990	0,0831	0,0811
RMSEP (%)	0,1020	0,1031	0,0895	0,0844
Bias	-1,385•10 ⁻⁸	-2,129•10 ⁻⁸	6,244•10 ⁻⁹	-4,516•10 ⁻⁹

In den obigen Modellen werden alle Proben in Abhängigkeit vom Gehalt der Substanzen in den Proben in ihrer Lage im Hauptkomponentenraum (PC-Plot) beeinflusst. Eine Reduktion dieser Unterschiede lässt sich über eine Datennormalisierung erreichen. Eine sogenannte *Standard Normal Variate* (SNV) Normalisierung berechnet je Einzelspektrum unter Zentrierung auf den Mittelwert des Spektrums und Standardisierung auf die Standardabweichung jeden Datenpunkt neu. Die so transformierten Daten zeigen eine größere Unabhängigkeit von physikalischen Parametern und Konzentrationen. Die Berechnung einer PLS-2 erbrachte folgenden PC-Plot (Abb. 4-4). Die Parameter der Kalibrierung für die einzelnen Substanzen sind in Tab. 4-2 dargestellt.

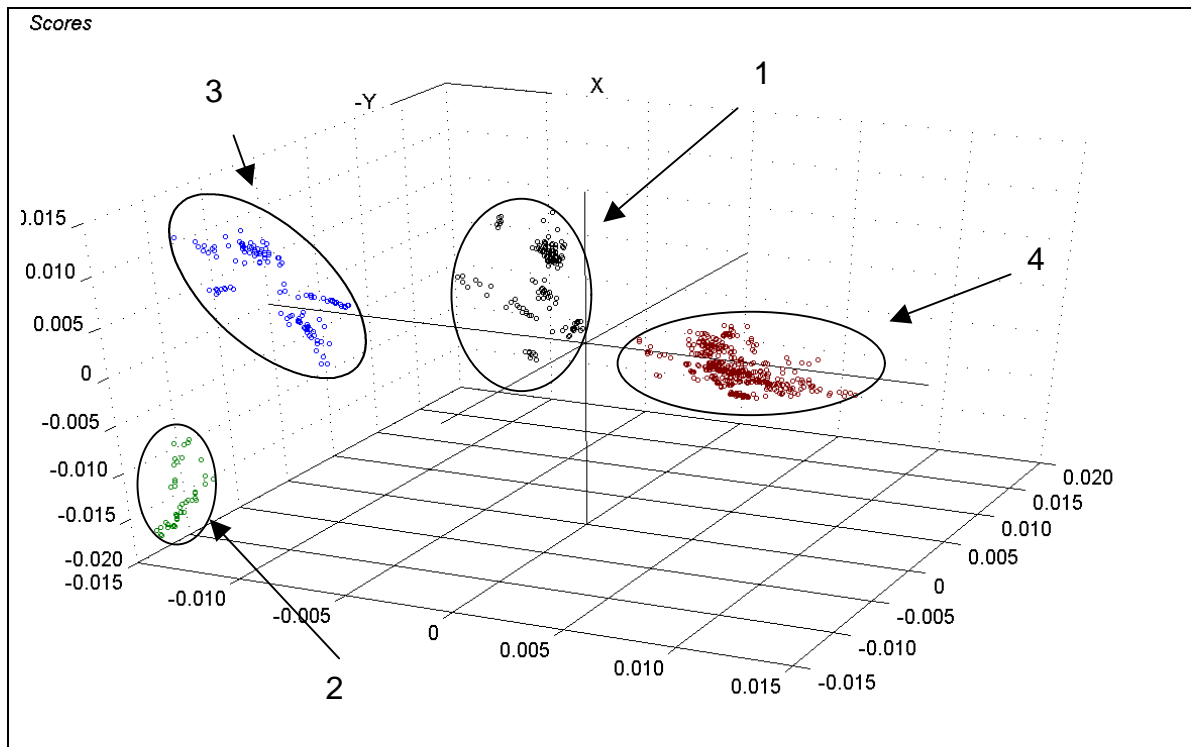


Abb. 4-4: Clustering der Proben im 3 dimensionalen Score-Plot der Hauptkomponenten 1 bis 3 (Achsen x, y, z) für die Substanzen Amphetamin (1), MBDB (2), MDE (3) und MDMA (4). Ergebnis einer PLS-2 Berechnung nach SNV-Normalisierung mit den Wellenlängen von 800 bis 1400 nm nach 2. Ableitung und 5 Punkt Glättung nach Savitzky-Golay.

Tab. 4-2: Parameter der Modelle aus der Berechnung mit SNV-Normalisierung, Wellenlängenauswahl (800 bis 1400 nm) und 2. Ableitung mit 5 Punktglättung (PLS-2).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	6	6	6	6
Steigung	0,9524	0,9629	0,9525	0,9664
y-Achsenabschnitt	0,0097	0,0212	0,0079	0,0020
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9759	0,9813	0,9760	0,9831
RMSEC (%)	0,0878	0,0953	0,0811	0,0429
RMSEP (%)	0,0897	0,0968	0,0832	0,0441
Bias	5,469•10 ⁻¹⁰	-1,651•10 ⁻⁸	2,002•10 ⁻⁹	-1,581•10 ⁻⁹

4.1.4 Diskussion

Mittels beschlagnahmter Ecstasy-Tabletten wurden in Anlehnung an Sondermann mehrere mögliche Identifikationsmethoden entwickelt. Ausgehend von Rohspektren der Transmissionsmessung konnte keine visuelle oder mathematisch belegbare Korrelation zwischen dem Vorhandensein oder der Abwesenheit einer Substanz in einer Tablette nach PLS-2 Berechnung festgestellt werden. Die Datensätze zeigten auf Grund der intensiveren Analyse der Tabletten durch Messung in Transmission, bei der ein größerer Teil einer Probe analysiert wird als bei Messung in Reflexion, eine stärkere Varianz untereinander. Die unter pharmazeutischen Bedingungen und mit Reinstoffen hergestellten Labortabletten von Sondermann zeigten im Unterschied zu den beschlagnahmten Proben von der Strasse eine geringere strukturelle Varianz, die sich in einer besseren Identifikationsmöglichkeit bei einer Berechnung auf der Basis der Rohspektren abzeichnet. Darüber hinaus wurden bei diesen Methoden verschiedene spektrale Bandbreiten analysiert. Bei der Messung in Transmission bestand im Gegensatz dazu ein großer Teil des Spektrums aus den Absorptionsbanden der schwachen dritten Oberschwingungen der CH-, CH₂- und CH₃-Gruppen [87-89]. Hierdurch gingen diese Banden - ohne ausgeprägte spektrale Information aufzuweisen - mit einem größeren Gewicht als bei der Reflexionsmessung, die diese dritte Oberschwingung nicht aufweist, in die Berechnung mit ein. Eine Restriktion auf die zweiten Oberschwingungen, d.h. den spektralen Bereich von 800 – 1400 nm, erlaubte ein geringfügig besseres Clustering der Proben im Probenraum und Identifizierung. Die Anwendung einer 2. Ableitung unter Glättung der Spektren zur Egalisierung der oben genannten Variabilitäten, resultierte in genaueren Vorhersagen bei der Identifizierung, was sich vor allem in den Parametern der Kalibrierungen der einzelnen Substanzen niederschlug. Eine deutliche Gruppierung der Proben mit denselben Inhaltsstoffen ist im Hauptkomponenten-Plot sichtbar. Die Anwendung einer Normalisierungsfunktion, der *Standard Normal Variate* (SNV), glich Unterschiede basierend auf verschiedenen physikalischen Parametern oder unterschiedlichen Konzentrationen aus [16, 90, 91]. Die Gruppierung der vier analysierten Substanzgruppen und die über das PLS-2 Modell erhaltenen Parameter der Kalibrierung verbesserten sich merklich. Nur 6 Hauptkomponenten wurden zur unterscheidenden Beschreibung der 4 Substanzgruppen benötigt. Der normalisierende Effekt wird auch anhand der

geringeren Streuung der Probengruppen einer jeweiligen Substanz im PC-Plot sichtbar, d.h. Konzentrationsunterschiede wurden egalisiert. Die Restvarianz in den Untergruppen kann auf dem Vorhandensein unterschiedlicher Hilfsstoffe basieren.

Schlussfolgernd wird deutlich, dass der Aufbau eines Identifikationsmodells der wichtigsten Inhaltsstoffe aus Ecstasy-Tabletten mittels NIR-Spektroskopie bei Messung in Transmission möglich ist. Die vorgeschlagene Vorgehensweise von Sondermann wurde hinsichtlich der Einengung des spektralen Bereiches und der Anwendung einer Normalisierungsfunktion verbessert. Das entwickelte Modell bildet die Basis für die weiter unten aufgeführten NIR-Methoden zur Bestimmung des Gehalts der Ecstasy-Tabletten (s. 4.3), die eine Identifizierung der jeweiligen Substanzen vor der Bestimmung mittels eines geeigneten Quantifizierungsmodells voraussetzen. Die Identifizierung mittels NIR lässt also eine qualitative Beschreibung konfiszierter Ecstasy-Tabletten ohne zerstörende Analytik und damit eine Aufbewahrung der Beweismittel für z.B. gerichtliche Zwecke zu.

4.2 HPLC-Analytik als Referenzmethode der NIR

4.2.1 Vorbemerkungen

Eine quantitative NIR-Analytik benötigt für eine Modellerstellung eine Referenzmethode, welche die nötigen Konzentrationsinformationen für den Modelldatensatz liefert. Erst nach einer NIR-Kalibrierung auf der Basis dieser Daten, ist eine Vorhersage neuer Proben möglich. Die Referenzmethode hat über die Präzision ihrer Ergebnisse einen hohen Einfluss auf die Güte des Kalibrationsmodells in der NIR. Aus diesem Grund wurde für die Quantifizierung der Inhaltsstoffe des Modelldatensatzes die HPLC gewählt (s. auch Kapitel 3.1.5 und 3.2.1).

4.2.2 Wahl des Internen Standards

Durch einen Substanzverlust während der Probenaufbereitung oder durch Unregelmäßigkeiten bei der Analyse, können sich die Peakflächen der über die HPLC getrennten Substanzen trotz gleichbleibender Konzentration verändern. Eine Korrektur der erhaltenen Peakflächen lässt sich mittels eines internen Standards vornehmen. Dieser wird den jeweiligen Analysen von Beginn an zugesetzt und durchläuft den gesamten Weg der Probenvorbereitung und HPLC-Analyse. Er besitzt immer die gleiche Konzentration und kann auf diese Weise korrigierend bei der Berechnung des Gehalts an Analysesubstanz genutzt werden. Anforderungen an den Internen Standard sind seine ähnlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften, sowie eine ähnliche Retentionszeit bei gleichzeitig ähnlichen Absorptionsmaxima in der entsprechenden Detektionsmethode [92]. Der Interne Standard darf darüber hinaus naturgemäß nicht in der Probe vorhanden sein.

Büchler schlägt im Rahmen seiner Dissertation einige eigens synthetisierte mögliche interne Standards für die HPLC-Analyse von Amphetaminderivaten vor [93]. Keiner dieser Standards stellte sich jedoch für die Analyse des in der vorliegenden Arbeit vorkommenden Stoffgemisches als adäquat heraus. Die Arbeit von Bogusz liefert in einem Vergleich mit Amphetaminen die Retentionszeiten vieler Substanzen [10], von denen Metoclopramid (MCP) (Formel s. Abb. 7-1) sich als die geeignetste herausstellt und deshalb als Interner Standard

in dieser Arbeit genutzt wurde. Alle Konzentrationsberechnungen in der Validierung und Routineanalytik der Ecstasy-Tabletten wurden auf der Basis dieses internen Standards gemäß Engelhardt [94] durchgeführt.

4.2.3 Entwicklung und Optimierung der Trennmethode

Viele Arbeiten widmeten sich der HPLC-Analyse von Amphetaminderivaten der Ecstasy-Reihe (Abb. 7-1). Doch werden diese nur auf eine Auswahl aus dieser Amphetaminreihe eingeschränkt oder vernachlässigten wichtige Zusatzstoffe wie Coffein, welches hauptsächlich mit Amphetamin kombiniert wird und die Bestimmung stört [10-12, 14, 95-97]. Bei der Ausarbeitung der HPLC-Methode zur gleichzeitigen Analyse und Quantifizierung mehrerer Amphetamine unter Berücksichtigung dieser Zusatzstoffe (s. Abb. 7-1), wurde auf die Veröffentlichungen von Sadeghipour und Veuthey [12] und Longo et al. [97] zurückgegriffen (vgl. Tab. 4-3). Da in dieser Arbeit ein anderes Sorbens bei der HPLC-Analytik benutzt wurde, musste zur vollständigen Trennung aller Substanzen sowohl der Gradient als auch der pH angepasst werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die HPLC-Trennung mittels Kalium-dihydrogenphosphat-Puffer unter Triethylaminzusatz mit einem Acetonitril-Gradienten optimiert (Abb. 4-5). Die Detektionswellenlänge des Diodenarray Detektors (DAD) wechselt von 210 nm zwischen 0 und 3 Minuten auf 285 nm ab der 3. Minute der Analyse. Ebenfalls mittels DAD wurde während der HPLC-Läufe die Reinheit jedes Signals überprüft. Die entsprechenden Werte für die Peakreinheit wurden automatisch durch ein in die Software implementiertes Verfahren berechnet und am Ende jedes Laufs ausgegeben. Hierdurch wurde mögliche Überlappung zweier Peaks im Chromatogramm und damit eine zu hohe Konzentrationsberechnung für die entsprechende Substanz verhindert. Jede der detektierten Substanzen wies eine errechnete Reinheit im Chromatogramm auf der Basis des DAD nahe 100 % auf.

Tab. 4-3: Vergleich der HPLC-Methoden

Parameter	Methode Sadeghipour und Veuthey [12]	Methode Longo et al. [97]	Optimierte Methode
Sorbens	RP ₁₈ , 5 µm	RP ₁₈ , 5 µm	RP ₁₈ , monolithisch
Eingestellter pH-Wert	3,8	3,8	2,28
Flussrate	1 ml/min	1,5 ml/min	1,5 ml/min
Acetonitril-Anteil	15 %	Gradient: 3-15%	Gradient: 6-13%
Puffersalz	20 mM Na ₂ HPO ₄	20mM KH ₂ PO ₄	20 mM KH ₂ PO ₄
Säulentemperatur	40°C	Raumtemperatur	Raumtemperatur
Detektion	FL	DAD	DAD
Detektierte Verbindungen	MDA, MDMA, MDE, MBDB, Coffein	Amphetamin, MDA, MDMA, MDE, Coffein	Amphetamin, MDMA, MDE, MBDB, MDA, Coffein
Quantifizierte Verbindungen	MDA, MDMA, MDE, MBDB	Amphetamin, MDA, MDMA, MDE	Amphetamin, MDMA, MDE, MBDB

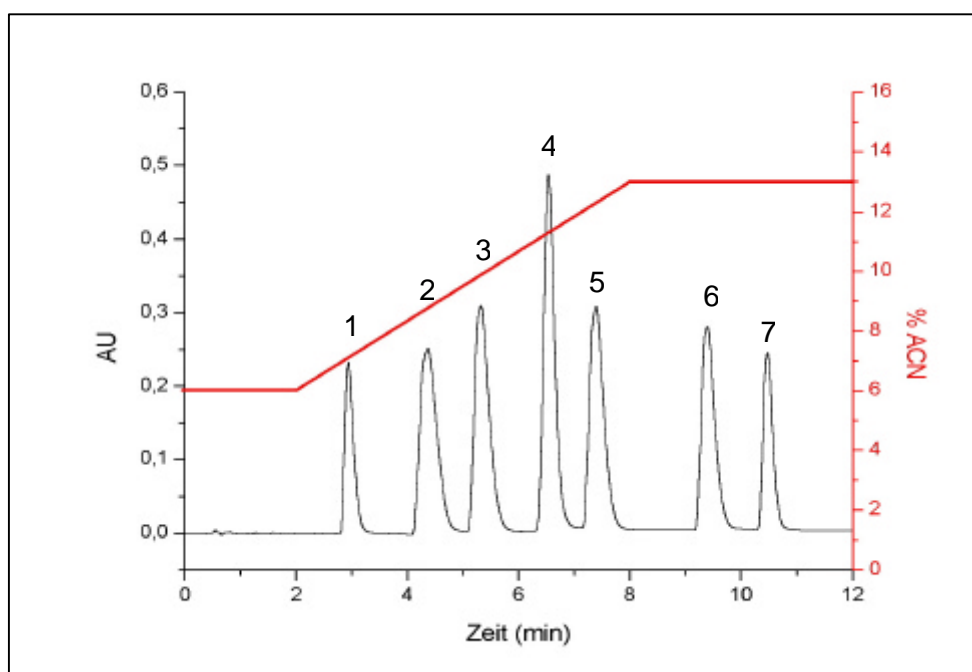


Abb. 4-5: HPLC-DAD Chromatogramm der analysierten Substanzen mit Verlauf des Acetonitril-Gradienten. Peakidentifikation: 1 = Amphetamin; 2 = MDA; 3 = MDMA; 4 = Coffein; 5 = MDE; 6 = MBDB; 7 = MCP (optimierte Methode).

4.2.4 Evaluierung unterschiedlicher Flussraten

Die Leistungsfähigkeit der benutzen monolithischen HPLC-Säule in Bezug auf höhere Flussraten der mobilen Phase wurde im Rahmen der Methodenentwicklung evaluiert. Die Durchführung der Analysen fand unter Beibehaltung der mobilen Phasen, aber mit unterschiedlichen Flussraten statt (Abb. 4-6). Da Coffein hierbei seine Retentionszeit nicht parallel zu den Amphetaminderivaten veränderte und es zu Peaküberlappungen kam, konnten die Chromatogramme nur unter Anpassung des Gradienten verglichen werden (s. 6.1.7).

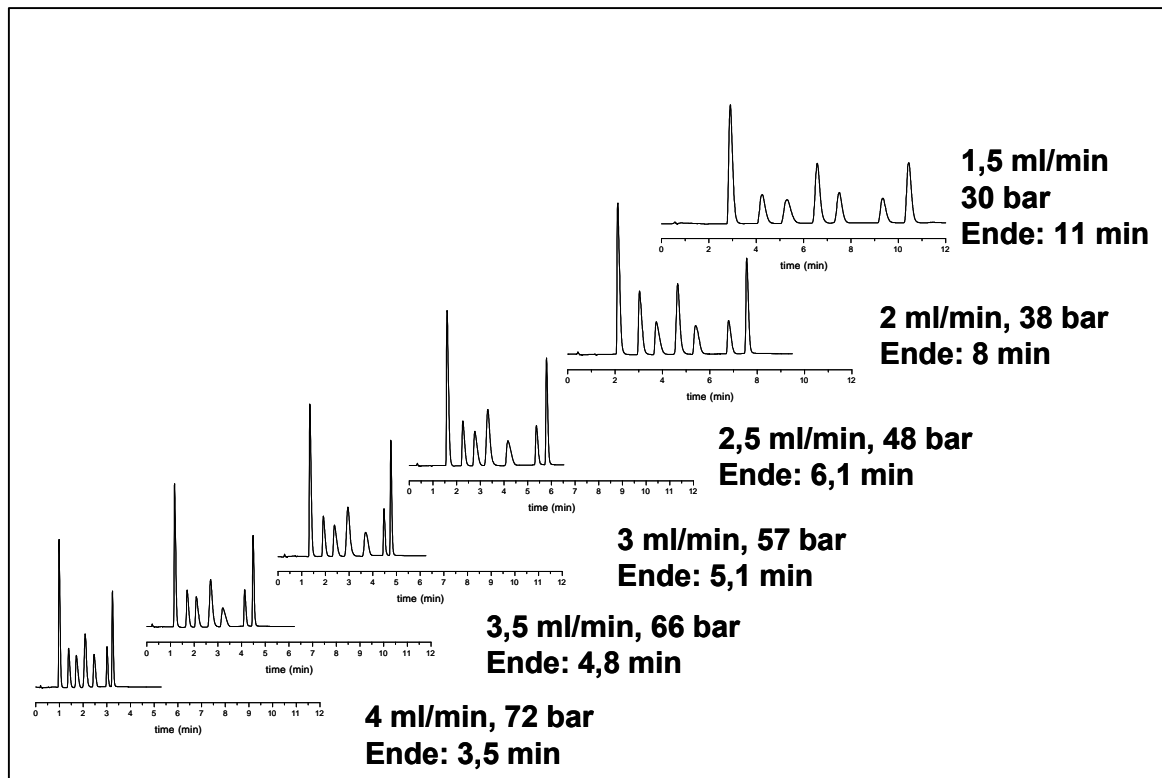


Abb. 4-6: Unterschiedliche Flussraten bei gleichem Analysengemisch; Darstellung der Analysenzeiten und Säulenrückdrücke (Gradientenverlauf s. Tab. 6-1).

4.2.5 Quantifizierung der konfiszierten Proben

Die konfiszierten Ecstasy-Tabletten, die den Datensatz für die NIR-Kalibrierung bildeten, wurden allesamt auf der Basis dieser validierten HPLC-Methode identifiziert und quantifiziert. Alle Proben wurden vom Bundeskriminalamt (BKA) in Wiesbaden zur Verfügung gestellt. Der Datensatz gliederte sich in 10 Chargen á 15 Tabletten, wobei eine Charge definiert wurde als eine Gruppe von Tabletten mit derselben Stempelprägung (s.u.). An jede Tablettencharge wurde eine Chargennummer vergeben und die Tabletten innerhalb der Chargen fortlaufend nummeriert. Im folgenden sind Informationen über die einzelnen Chargen und die Ergebnisse der HPLC-Untersuchung aufgeführt. Eine detaillierte Übersicht befindet sich in Tab. 6-14 - Tab. 6-23.



Charge 162 „Pitbull“ (Abb. 4-7)

Das Gewicht der Tabletten bewegte sich zwischen 215,28 und 225,64 mg. Sie waren zwischen 3,05 und 3,3 mm hoch bei einem Durchmesser von 9,1 bis 9,2 mm. Die HPLC-Untersuchung ergab einen Gehalt von 54,74 bis 60,52 mg MDE pro Tablette oder 25,26 – 27,53 % (m/m).

Abb. 4-7: Pitbull.



Charge 262 „Bad Boy“ (Abb. 4-8 und Abb. 4-9)

Die Tabletten beinhalteten allesamt MDE in den Konzentrationen von 63,47 - 85,89 mg oder 25,3 - 34,12 % je Probe bei einem Tabletten-gewicht von 240,65 – 256,49 mg. Ihre Durchmesser waren 9,1 – 9,2 mm und die Höhe 3,65 – 3,85 mm.

Abb. 4-8: Bad Boy, Vorderseite.

Abb. 4-9: Bad Boy, Rückseite.

**Charge 461 „Bundesadler“ (Abb. 4-10)**

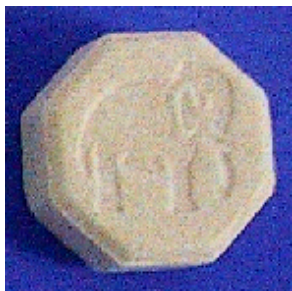
Der Gehalt dieser Charge lag bei 68,95 – 81,38 mg MBDB je Tablette oder 30,45 – 32,47 %. Ihr Gewicht lag bei 221,09 – 250,61 mg bei einer Höhe von 4 – 4,2 mm und einem Durchmesser von 8,1 mm.

Abb. 4-10: Bundesadler.

**Charge 488 „Spatz“ (Abb. 4-11)**

Der Inhaltsstoff war bei jeder Tablette MDMA mit einem Gehalt von 29,85 – 33,59 % oder 70,95 – 80,55 mg. Ihr Durchmesser lag bei 8,3 – 8,4 mm bei einer Höhe von 4,05 – 4,15 mm bei 226,68 – 241,75 mg Gesamtgewicht.

Abb. 4-11: Spatz.

**Charge 491 „Elephant“ (Abb. 4-12)**

Diese achteckigen Tabletten waren 3,9 – 4,2 mm hoch und 8,6 – 8,65 mm breit. Ihr Gewicht lag bei 273,53 – 308,78 mg. Als Inhaltsstoff wurde MDMA mit einem Gehalt von 19,94 – 25,4 % oder 54,54 – 76,63 mg je Tablette festgestellt.

Abb. 4-12: Elephant.

**Charge 862 „Schmetterling“ (Abb. 4-13)**

Die Tabletten beinhalteten allesamt MDMA in den Konzentrationen von 68,36 - 88,54 mg oder 34,29 - 38,13 % je Probe bei einem Tablettengewicht von 192,12 – 242,40 mg. Ihr Durchmesser war 8,3 mm und die Höhe 3,25 – 4,00 mm.

Abb. 4-13: Schmetterling.

**Charge 863 „e“** (Abb. 4-14)

Der Inhaltstoff war bei jeder Tablette MDMA mit einem Gehalt von 34,27 – 39,30 % oder 64,10 – 77,64 mg. Ihr Durchmesser lag bei 8,2 mm bei einer Höhe von 3,05 – 3,50 mm bei 179,33 – 210,38 mg Gesamtgewicht.

Abb. 4-14: e.**Charge 969 „X-Files“** (Abb. 4-15)

Das Gewicht der Tabletten bewegte sich zwischen 261,56 und 292,64 mg. Sie waren zwischen 4,30 und 4,60 mm hoch bei einem Durchmesser von 9,15 bis 9,25 mm. Die HPLC-Untersuchung ergab einen Gehalt von 19,65 bis 31,79 mg Amphetamin pro Tablette oder 7,22 – 11,68 % (m/m). Zusätzlich zu Amphetamin beinhalteten alle Proben Coffein als Beimengung.

Abb. 4-15: X-Files.**Charge 1234 „Euro“** (Abb. 4-16)

Der Gehalt dieser Charge lag bei 68,87 – 81,39 mg MDMA je Tablette oder 23,60 – 27,15 %. Ihr Gewicht lag bei 285,82 – 305,67 mg bei einer Höhe von 3,5 – 4,65 mm und einem Durchmesser von 9,15 – 9,4 mm.

Abb. 4-16: Euro.**Charge 1238 „Calvin Klein“** (Abb. 4-17)

Diese orangefarbenen Tabletten waren 4 mm hoch und 8,2 8,25 mm breit. Ihr Gewicht lag bei 245,31 – 253,25 mg. Als Inhaltsstoff wurde MDMA mit einem Gehalt von 33,45 – 37,19 % oder 82,75 – 94,18 mg je Tablette festgestellt.

Abb. 4-17: Calvin Klein.

In den folgenden Diagrammen ist der Gehalt jeder Charge in mg oder % (m/m) aufgezeigt. Die angezeigten Fehlerbalken ergeben sich aus den absoluten Unterschieden zwischen dem Mittelwert jeder Charge und dem jeweils höchsten oder niedrigsten Wert. Eine Beschreibung der Tabletten in Bezug auf ihre Höhe und ihren jeweiligen Durchmesser befindet sich im Anhang unter 7.2.

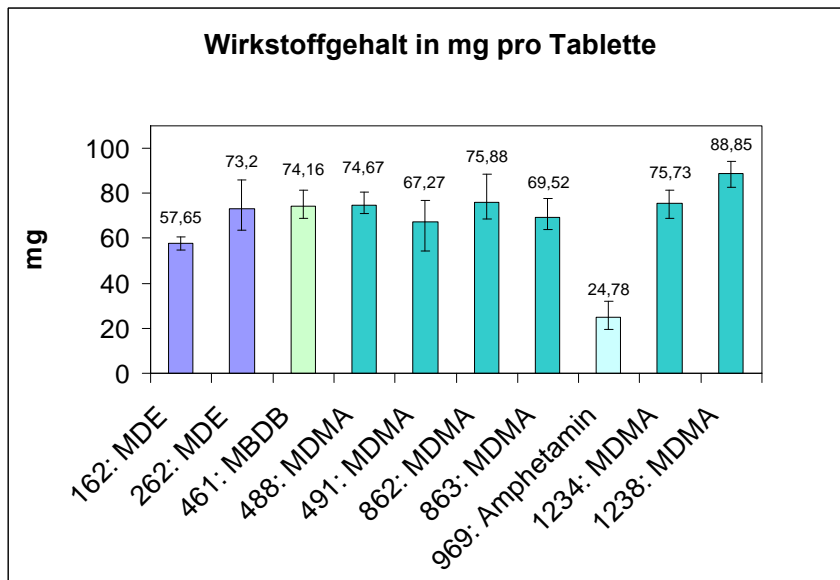


Abb. 4-18: Durchschnittlicher Wirkstoffgehalt der untersuchten Tabletten in mg je Charge.

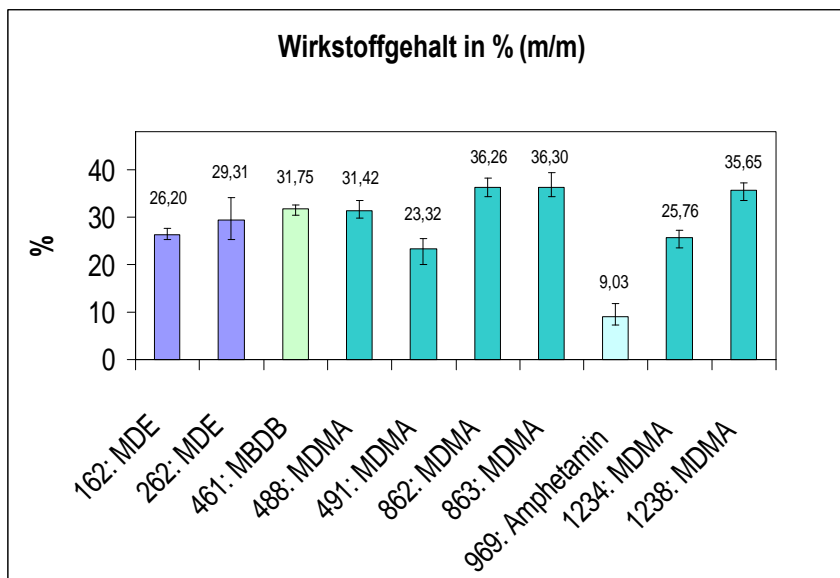


Abb. 4-19: Durchschnittlicher Wirkstoffgehalt in % (m/m).

4.2.6 Diskussion

4.2.6.1 Methodenentwicklung und Kalibrierung

Die Durchführung der Analyse unter Einsatz eines steilen Gradienten und der Zusatz von Triethylamin als *Blocking Agent* führten zu einer schnellen Basislinientrennung aller 7 Substanzen bei guter Peaksymmetrie. Die unspezifische Detektionswellenlänge am Anfang der Analyse musste wegen des unspezifischen chromophoren Systems des Amphetamins gewählt werden. Alle weiteren Substanzen ließen sich bei 285 nm spezifisch detektieren (s. 6.1.9). Der Einsatz eines Diodenarray Detektors (DAD) erwies sich als vorteilhaft, weil dadurch auch die Peakreinheit der detektierten Substanzen im Chromatogramm überprüft werden konnte. Die Analyse von Amphetaminderivaten in Gegenwart von Coffein machte einen hohen pH-Wert notwendig, weil nur so der Coffeinpeak im Chromatogramm unter Beibehaltung einer praktikablen Analysenzeit basisliniengetreunt von den anderen Substanzen detektiert werden konnte. Ein höherer Acetonitril-Anteil verringerte die Elutionszeit der Amphetamine von der RP-Phase. Aus diesem Grund wurde für die Berücksichtigung einer kurzen Analysendauer ein steiler Gradient gewählt, um die lipophileren Substanzen von der Säule zu eluieren.

Obwohl die benutzte Säule laut Herstellerangaben einen RP₁₈ Charakter besitzen soll [98], konnte eine entwickelte RP₁₈-Methode von Longo et al. [97], die Coffein schon bei der Trennung der Amphetamine mit berücksichtigten, nicht deckungsgleich übernommen werden. Erst die Umstellung des pHs, die eine Verschiebung des Coffeins innerhalb der getrennten Reihe der Amphetamine verursachte und die Einführung eines Gradienten führten zum vorliegenden Ergebnis. Eher weist die in dieser Arbeit beschriebene Methode auf der SpeedROD-Säule Parallelen im Chromatogramm zu der Methode von Sondermann und Kovar [14] auf, die mit einer LiChrospher® 60 RP-Select B Säule, einer RP₈-Phase, gearbeitet hatten.

Bei der Anwendung unterschiedlicher Flussraten ohne Anpassung des Gradientenverlaufs, veränderte sich die Retentionszeit von Coffein, da es kein Amphetaminanalogon darstellt und sich deshalb auch nicht in die homologe Reihe der benutzten Substanzen eingliedert. Damit sich bei den getesteten Flussraten

die erzeugten Chromatogramme vergleichen ließen, wurden die Anfangswerte und der Verlauf des Gradienten leicht korrigiert. Eine Trennung aller Substanzen war selbst bei einer Flussrate von 4 ml/min mit 3,5 Minuten Gesamtanalysenzeit möglich. Die Säule erzeugte hierbei nur einen Gegendruck von 72 bar, was bei ihrer Gesamtbelastbarkeitsgrenze von 200 bar [98] erst die untere Hälfte ihrer Belastbarkeit bei höheren Fließmittelgeschwindigkeiten bedeutet. Trotz der Möglichkeit dieser schnellen Trennung, wurde eine Analysenzeit von 11 Minuten auf der Basis eines Flusses von 1,5 ml/min gewählt. Dies geschah aus mehreren Gründen. Die konfiszierten Proben hätten unter Umständen Verunreinigungen oder Verfälschungen enthalten können, die bei einer zu schnellen Analytik als falsch-positiv eingestuft worden wären, da die Peaks in den Chromatogrammen hoher Flussraten sehr eng beieinander liegen. Diese Tatsache hätte auch eine Fehlzuzuordnung bei der Routineuntersuchung der eingesetzten Substanzen zur Folge haben können. Des weiteren verringern sich die Peakflächen bei zu hohen Geschwindigkeiten des Fließmittels, da die zu detektierenden Substanzen schneller am Detektorsystem vorbeiziehen. Hierdurch wird u. U. ein unnötiger Präzisionsverlust generiert, der bei langsameren Geschwindigkeiten nicht ins Gewicht fällt, da hier die detektierten Peakflächen ausreichend groß sind.

Die Methode erzielte trotz des zwischengeschalteten Schrittes einer Probenvorbereitung sehr gute Werte für Präzision und Richtigkeit der Analyten, was sich insgesamt auch in einer kleinen Verfahrensstandardabweichung und hohem Grad an Linearität der Kalibrierkurven niederschlägt (Tab. 6-6). Erst die Nutzung des internen Standards ermöglichte diese guten Validierungswerte, da er Differenzen basierend auf Verlusten bei der Probenaufbereitung und beim Injektionsvorgang in die HPLC-Anlage ausgleicht.

4.2.6.2 Quantifizierung der konfiszierten Proben

Der Datensatz war insgesamt sehr heterogen, was zum einen die jeweiligen Konzentrationen innerhalb der Tablettenchargen betrifft, als auch die unterschiedlichen Durchmesser, Höhen und Massen der Ecstasy-Tabletten. Die kleinsten Konzentrationsschwankungen für die jeweiligen Amphetamine fanden sich bei der Charge „Spatz“, die größten bei „X-Files“, „Bad Boy“ und „Elephant“.

Bis auf wenige Ausnahmen verbesserten sich die prozentualen Abweichungen der Einzelgehälter vom Mittelwert innerhalb jeder Charge bei Umrechnung des Gehalts unter Berücksichtigung der einzelnen Tablettenmassen in Massenprozent. Am stärksten machte sich diese Umrechnung bei der Charge „Schmetterling“ und „Bundesadler“ bemerkbar. Dies spricht hier für eine ungenaue Dosierung der Pulvermenge bei der Tablettenherstellung, aber insgesamt doch für eine gleichmäßige Substanzverteilung, wodurch der Gehalt in % mit kleineren Abweichungen um den Mittelwert dieser Chargen erklärt werden kann. Die bei einigen Tablettenchargen vorgefundene geringe Abweichung vom Mittelwert in Massenprozent ($\pm 5\%$ relativ), zeugt von der relativ genauen Dosierung beim Herstellungsvorgang. Tablettenchargen mit sehr großen Schwankungen hingegen sind ein Indiz für eine inhomogene Mischung der Pulver vor der Kompression zur Tablette. Fast alle Tabletten enthielten die Amphetaminderivate in den üblichen Größenordnungen, um psychotrope Effekte zu erhalten. Lediglich die Proben „Pitbull“ mit MDE und „Bundesadler“ mit MBDB als Inhaltsstoff wichen von der üblichen Dosierung mit 80 – 200 mg für MDE und 180 - 210 mg für MBDB je Dosis ab [99].

4.3 Quantifizierungsmodelle von Ecstasy-Tabletten mittels NIR

4.3.1 Vorbemerkungen

Für die Erstellung quantitativer Modelle in der NIR standen zwei unterschiedliche Messmethoden zur Verfügung. Die aus der Referenzmethode HPLC erhaltenen Gehaltsdaten für jede Tablette wurden mit den jeweiligen Spektren aus der Reflexionsmessung und der Transmissionsmessung verknüpft. Hierbei wurden in Anlehnung an Arbeiten von [17] und [20] alle Werte als Gehalt in % (m/m) eingesetzt, da diese die Erstellung genauerer Modelle zulassen als die Benutzung des Gehalts in mg pro Tablette für die Berechnung. Die Auswahl der jeweils besten Methode für die Kalibrierung der unterschiedlichen Amphetamine wurde anhand des Grades der Verbesserung der Parameter eines jeden Modells gewählt. Hierbei sind die Anzahl der benötigten Hauptkomponenten zur Beschreibung der Proben, der Korrelationskoeffizient, der RMSEP und Bias anzuführen. Alle Tabletten wurden in diffuser Reflexion und Transmission, sowie in gepulverter Form in diffuser Reflexion vermessen und geeignete Quantifizierungsmodelle auf der Basis einer PLS-1 Kalibrierung erstellt. Eine PLS-2 Kalibrierung wurde lediglich für die Identifizierungsmodelle genutzt und nicht für die im Folgenden beschriebenen Quantifizierungsmodelle, da nach Sondermann [85] mit einer PLS-2 ungenauere quantitative Ergebnisse erhalten werden als mit der Bestimmung über eine PLS-1.

4.3.2 Probenpräsentation

In Abb. 4-20 und Abb. 4-21 sind exemplarisch jeweils vier Rohspektren aus den Tablettenmessungen in Reflexion und Transmission aufgezeigt. Deutlich sind die Unterschiede zwischen den Spektren einer Messreihe zu erkennen, obwohl es sich um dieselbe Probe handelt. Diese Variabilität zwischen den Spektren derselben Tablette macht eine Mehrfachmessung notwendig.

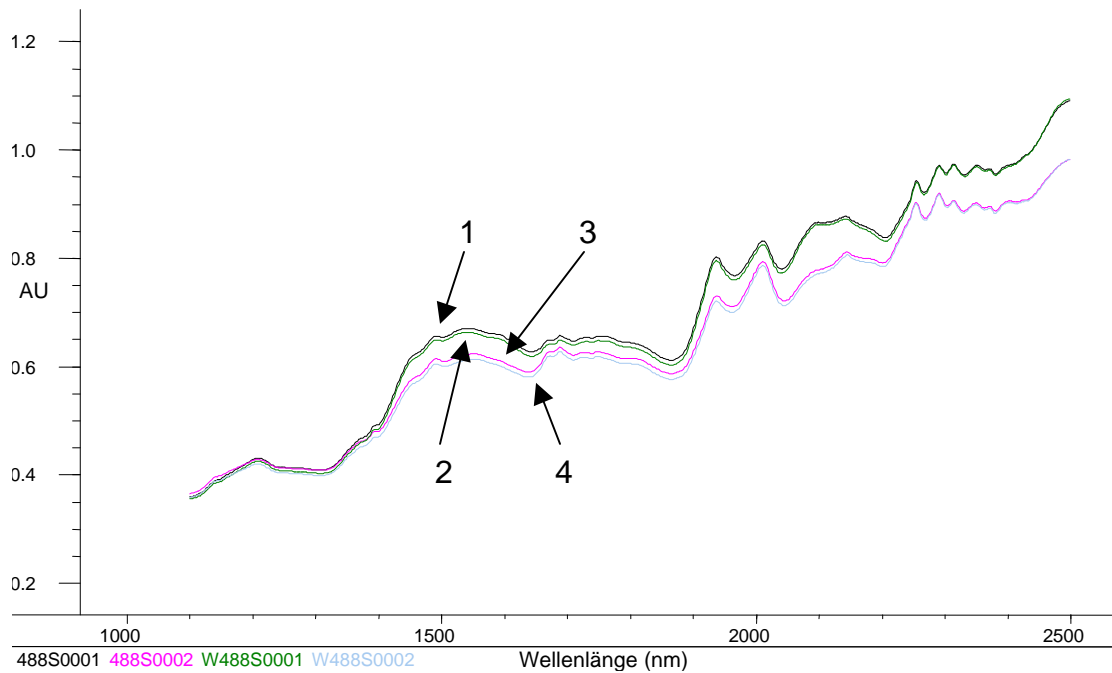


Abb. 4-20: Wiederholungsmessungen der Probe 488S0001 in Reflexion; Spektrum 1: Messung der Rückseite; 2: Wiederholungsmessung Rückseite; 3: Messung Prägeseite; 4: Wiederholungsmessung Prägeseite. (Ordinate: AU = Absorbance Units)

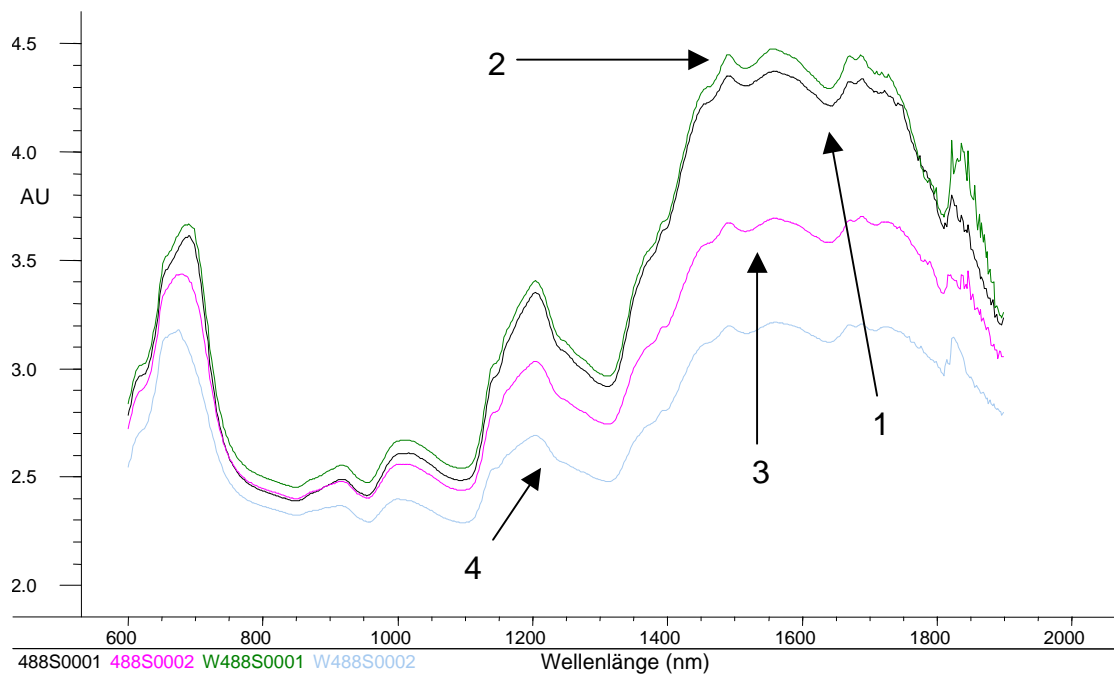


Abb. 4-21: Wiederholungsmessungen der Probe 488S0001 in Transmission; Spektrum 1: Messung der Prägeseite; 2: Wiederholungsmessung Prägeseite; 3: Messung Rückseite; 4: Wiederholungsmessung Rückseite. (Ordinate: AU = Absorbance Units)

4.3.3 Modellerstellung für Tablettenmessung in diffuser Reflexion

4.3.3.1 Rohspektren

Rohspektren werden definiert als die unveränderten Spektren, wie sie nach der Aufnahme im NIR vorliegen. Ausgehend von den Rohspektren und dem über die HPLC-Analytik erhaltenen Gehalt der einzelnen Ecstasy-Analoga in % (m/m), wurde für jede Substanz eine PLS-1 Kalibrierung mit *Full Cross Validation* (FCV) berechnet (Tab. 4-4). Durch die FCV sind die erhaltenen RMSEPs auf der Basis aller Proben in den jeweiligen Datensätzen errechnet worden. Die angegebenen Hauptkomponenten stellen die jeweilige optimale Auswahl auf der Basis der beschriebenen Varianz der Datensätze dar.

Tab. 4-4: Parameter der Modelle aus Rohdaten (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	8	3	9	1
Steigung	0,7011	0,8926	0,9214	0,01995
y-Achsenabschnitt	2,6981	3,3796	2,1818	31,1190
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,8373	0,9448	0,9599	0,1412
RMSEC (%)	0,6838	1,7506	0,7206	0,5513
RMSEP (%)	0,9583	1,7784	0,8595	0,5715
Bias	5,3•10 ⁻⁶	-6,888•10 ⁻⁸	2,75•10 ⁻⁶	5,404•10 ⁻⁷

Für die Berechnung der Modelle auf Basis der Rohdaten wurde der gesamte spektrale Bereich des NIR-Spektrums dieser Messung für die Kalibrierung genutzt (1100 – 2500 nm).

Ein weiterer Schritt der Optimierung einer Kalibrierung ist die Eingrenzung des Datensatzes auf die wichtigen Datenpunkte. Zwar wird eine Probe durch ihr Gesamtspektrum am besten beschrieben, für eine Quantifizierung einer oder mehrerer Substanzen in einer Probe steigert sich aber die Vorhersagegenauigkeit bei Restriktion auf die relevanten Punkte im Spektrum. Im Fall der Ecstasy-Analoga ergeben sich die größten Unterschiede zwischen den Substanzen durch das Vorhandensein oder Fehlen von CH-, CH₂- oder CH₃-Schwingungen (s. Abb. 7-1). In der Literatur sind für CH-Kombinationsschwingungen und deren erste und

zweite Obertonschwingungen der Bereich von 1100 bis 1900 nm angegeben [87-89]. Dieser Bereich umschließt die zweiten Obertöne der Kombinationsschwingungen des Wassers (1400 – 1450 nm), deren Basiskombinationsschwingung bei den Wellenlängen von 1900 bis 1980 nm liegt. Der Wassergehalt der Ecstasy-Proben ist aufgrund der unterschiedlich großen Wassermengen in den Tabletten aber ein großer Varianzfaktor zwischen den Proben und wurde deshalb aus dem Spektrum von der Berechnung ausgeschlossen, um nicht als zu gewichtige Komponente in die Modellbildung einzufließen. Die Daten der auf diese Weise generierten Kalibrierung sind in Tab. 4-5 dargestellt.

Tab. 4-5: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	10	8	6	1
Steigung	0,8138	0,9488	0,8856	0,0182
y-Achsenabschnitt	1,6805	1,6101	3,1758	31,1759
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9021	0,9741	0,9410	0,1347
RMSEC (%)	0,5397	1,283	0,8694	0,5518
RMSEP (%)	0,7555	1,285	0,9569	0,5718
Bias	6,31•10 ⁻⁶	-2,856•10 ⁻⁶	-6,994•10 ⁻⁷	6,994•10 ⁻⁷

4.3.3.2 Datenvorbehandlung

Datenvorbehandlungen dienen dazu Unterschiede, die auf verschiedener Probenbeschaffenheit oder unterschiedlicher Probenpräsentation basieren, zu eliminieren. Im Rahmen der Modellentwicklung wurden mehrere Datenvorbehandlungen zur Ermittlung des besten Modells durchgeführt. Nach Wellenlängenselektion ergaben sich nach Berechnung der 2. Ableitung mit 5 Punkt Glättung nach Savitzky-Golay folgende Daten:

Tab. 4-6: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion und 2. Ableitung (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	8	7	3	1
Steigung	0,9337	0,9560	0,8073	0,0293
y-Achsenabschnitt	0,5983	1,3840	5,3473	30,8235
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9663	0,9778	0,8985	0,01710
RMSEC (%)	0,3220	1,1176	1,1282	0,5487
RMSEP (%)	0,8488	1,1844	1,2173	0,5717
Bias	$-2,543 \cdot 10^{-7}$	$-2,763 \cdot 10^{-7}$	$-4,768 \cdot 10^{-8}$	$5,722 \cdot 10^{-7}$

In 3.1.3.4 wurde der Vorteil einer Umwandlung des Spektrums von der Ebene der Wellenlängen in die der Wellenzahlen erläutert. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde eine Berechnung mit 1/x-Transformation durchgeführt und zusätzlich mit 2. Ableitung. Die Berechnung der einzelnen Konzentrationen nach der Umgewichtung der Daten mittels dieser Umwandlung ergab deutlich kleinere Vorhersagefehler (vgl. Tab. 4-7). In Tab. 4-8 sind die Kennzahlen der Kalibrierung nach zusätzlicher 2. Ableitung aufgeführt. Die Kombination dieser beiden Datenvorbehandlungen sollte hierbei ausgetestet werden.

Tab. 4-7: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion und 1/x Transformation (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	10	7	6	1
Steigung	0,8451	0,9345	0,8850	0,0149
y-Achsenabschnitt	1,3984	1,9671	3,1912	31,2788
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9193	0,9682	0,9405	0,1221
RMSEC (%)	0,4923	1,3356	0,8715	0,5527
RMSEP (%)	0,6907	1,1011	0,9498	0,5729
Bias	$-2,273 \cdot 10^{-6}$	$1,505 \cdot 10^{-6}$	$1,415 \cdot 10^{-6}$	$7,312 \cdot 10^{-7}$

Tab. 4-8: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion, 1/x Transformation und 2. Ableitung (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	9	6	6	1
Steigung	0,9570	0,9464	0,9076	0,0277
y-Achsenabschnitt	0,3886	1,6871	2,5636	30,8741
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,97824	0,9728	0,9527	0,1663
RMSEC (%)	0,2595	1,2368	0,7811	0,5491
RMSEP (%)	0,8351	1,2927	1,0369	0,5894
Bias	-4,21•10 ⁻⁷	-5,298•10 ⁻⁷	-2,066•10 ⁻⁷	6,358•10 ⁻⁷

Die Validierungskennzahlen einer FCV basieren auf den Vorhersagefehlern aller Proben des Datensatzes. In einem weiteren Schritt wurde der bestehende Datensatz in einen Kalibrierdatensatz, auf dessen Basis das Quantifizierungsmodell erstellt wurde, und in einen externen Datensatz, der zum Vergleich der Unterschiede zwischen den vorhergesagten und wahren Werten (HPLC-Werten) herangezogen wurde, unterteilt. Die Unterteilung fand durch Zufallsauswahl statt. Berücksichtigt wurde hierbei, dass alle Spektren einer ausgewählten Tablette, Vorder- und Rückseite und die Wiederholungsmessungen, im externen Set und somit nicht im Kalibrierset vorhanden waren. Ansonsten wäre die Information für die Modellbildung redundant gewesen. Für eine detaillierte Übersicht über die Einteilung s. 6.6.3.1. Nur wenn diese durch externe Validierung erhaltenen Werte vergleichbar mit denen der FCV sind, kann man von einer robusten Kalibrierung ausgehen. Da hierbei Proben des externen Datensatzes, die nicht zum Aufbau der Kalibrierung genutzt wurden, mit dem gleichen oder ähnlichen Fehler vorhergesagt werden konnten wie die Proben des Kalibriersets während der *Full Cross* validierten Kalibrierung.

Tab. 4-9: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion, 1/x Transformation und 2. Ableitung; externe Testsetvalidierung (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	1	5	6	1
Steigung	0,5193	0,9358	0,9165	0,1190
y-Achsenabschnitt	4,3233	2,0167	2,3189	27,9638
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,7206	0,9674	0,9573	0,3450
RMSEC (%)	0,8347	1,3614	0,7500	0,5278
RMSEP (%)	0,9567	1,2817	0,9069	0,7160
Bias	-2,38•10 ⁻⁷	1,134•10 ⁻⁶	3,034•10 ⁻⁷	1,300•10 ⁻⁷

4.3.4 Modellerstellung für Tablettenmessung in Transmission

4.3.4.1 Rohspektren

Deckungsgleich zur Modellerstellung der Quantifizierung in Reflexionsmessung wurde die Kalibrierung in der Transmissionsmessung durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit dieser beiden Methoden zu erhalten. Die Kalibrierung auf der Basis des Gesamtspektrums (Tab. 4-10) wurde der nach Wellenlängenauswahl (Tab. 4-11) gegenübergestellt. Bei letzterer wurde gemäß den Daten in [87-89] folgend wegen des unterschiedlichen Detektorbereichs in der Transmissionsmessung der Datenbereich von 800 bis 1350 nm ausgewählt. Wie aus den Parametern dieser Kalibrierung ersichtlich (Tab. 4-11), konnte durch weniger Hauptkomponenten ein vergleichbares Quantifizierungsmodell nach Datenreduktion erreicht werden.

Tab. 4-10: Parameter der Modelle aus Rohdaten (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	8	8	5	3
Steigung	0,9016	0,964	0,9220	0,1446
y-Achsenabschnitt	0,8885	1,1196	2,1640	27,1622
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9495	0,9820	0,9602	0,3802
RMSEC (%)	0,3924	1,0076	0,7177	0,5150
RMSEP (%)	0,6188	1,0659	0,7740	0,5509
Bias	9,060•10 ⁻⁷	1,907•10 ⁻⁷	-1,907•10 ⁻⁷	6,040•10 ⁻⁷

Tab. 4-11: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	5	5	5	5
Steigung	0,8703	0,9615	0,9278	0,5547
y-Achsenabschnitt	101708	1,2102	2,0036	14,1408
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9329	0,9806	0,9632	0,7448
RMSEC (%)	0,4546	1,0416	0,6906	0,3716
RMSEP (%)	0,5347	1,0744	0,7320	0,4121
Bias	1,478•10 ⁻⁶	-1,748•10 ⁻⁷	4,450•10 ⁻⁷	7,629•10 ⁻⁷

4.3.4.2 Datenvorbehandlung

Ebenso wie bei der Reflexionsmessung wurden verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Datenvorbehandlungen erstellt. Die Modelle mit 2. Ableitung sollten aufzeigen, ob eventuell auftretende Streulichteffekte bei der Transmissionsmessung durch diese Datenbehandlung eliminiert und so genauere oder robustere Kalibrierungen erstellt werden können (Tab. 4-12). Hierbei wurde eine Wellenlängenselektion genutzt, da obige Berechnungen schon große Verbesserungen der Kalibrierungen durch diese Auswahl haben erkennen lassen.

Tab. 4-12: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion und 2. Ableitung (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	4	4	4	5
Steigung	0,8766	0,9625	0,9287	0,5793
y-Achsenabschnitt	1,1141	1,1787	1,9783	13,3580
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9363	0,9811	0,9637	0,7611
RMSEC (%)	0,4394	1,0339	0,6862	0,3612
RMSEP (%)	0,5697	1,0983	0,7356	0,4157
Bias	-3,894•10 ⁻⁷	-3,179•10 ⁻⁷	-1,907•10 ⁻⁷	5,404•10 ⁻⁷

Eine Veränderung des Datensatzes hinsichtlich Wellenlängenselektion und 1/x-Transformation, die Datenpunkte in kleineren Wellenlängenbereichen in ihrer Gewichtung gegenüber den höheren anhebt, brachte nochmals eine Verbesserung der Parameter der Modelle (Tab. 4-13).

Tab. 4-13: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion und 1/x-Transformation (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	5	5	6	5
Steigung	0,87515	0,97228	0,9411	0,5691
y-Achsenabschnitt	1,1270	0,8720	1,6340	13,6827
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9355	0,9860	0,9701	0,7544
RMSEC (%)	0,4420	0,8892	0,6236	0,3656
RMSEP (%)	0,5246	0,9103	0,6696	0,4088
Bias	2,877•10 ⁻⁶	-3,126•10 ⁻⁷	4,053•10 ⁻⁶	6,358•10 ⁻⁸

In den letzten beiden Modellberechnungen wurde zusätzlich noch die 2. Ableitung auf die Daten angewandt. Die Notwendigkeit dieser Korrektur zur Reduktion der Unterschiede in der Probenpräsentation wurde auf diese Weise getestet. Ein Vergleich der Validierungsparameter zwischen der FCV und der Validierung über ein externes Testset (s.o.), zeigen die Tab. 4-14 und Tab. 4-15.

Tab. 4-14: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion, 1/x-Transformation und 2. Ableitung (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	4	3	3	4
Steigung	0,8915	0,9684	0,9266	0,6086
y-Achsenabschnitt	0,9790	0,9951	2,0377	12,4282
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,9442	0,9841	0,9626	0,7801
RMSEC (%)	0,4119	0,9499	0,6964	0,3484
RMSEP (%)	0,5313	0,9691	0,7237	0,4045
Bias	-3,020•10 ⁻⁷	-3,126•10 ⁻⁷	-9,537•10 ⁻⁸	5,722•10 ⁻⁷

Tab. 4-15: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion, 1/x-Transformation und 2. Ableitung; externe Testsetvalidierung (PLS-1).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	2	2	3	5
Steigung	0,7883	0,9540	0,9186	0,6837
y-Achsenabschnitt	1,9041	1,4468	2,2577	10,0402
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,8879	0,9767	0,9584	0,8269
RMSEC (%)	0,5540	1,1520	0,7441	0,3162
RMSEP (%)	0,5540	1,0141	0,5518	0,4454
Bias	-1,192•10 ⁻⁷	-4,118•10 ⁻⁷	-7,586•10 ⁻⁷	3,468•10 ⁻⁷

4.3.5 Modellerstellung für die Messung der gepulverten Tabletten in diffuser Reflexion

4.3.5.1 Datenvorbehandlung

Wie unter 6.6.2 beschrieben, wurden die Tabletten der MDMA- und MDE-Chargen fein verrieben und nachfolgend auf die gleiche Art und Weise datenvorbehandelt wie das optimalste Modell in diffuser Reflexionsmessung. Eine nachfolgende PLS-1 Berechnung sollte den Vergleich zwischen den Modellen der unzerstörten

Tabletten einerseits und den Modellen auf der Basis der homogenisierten Proben andererseits ermöglichen. Beide Kalibrierungen wurden mit FCV oder mit einem externen Testset, das dieselbe Zusammensetzung hatte wie bei der Tablettenmessung, validiert (s. 6.6.3.1). Da für eine Messung in Transmission eine geeignete Probenpräsentationseinheit nicht vorhanden war, die eine gleichbleibende Schichtdicke der vermessenen Pulver gewährleistet, wurde diese Messung nicht durchgeführt.

Tab. 4-16: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion, $1/x$ -Transformation und 2. Ableitung (PLS-1).

	MDMA	MDE
Hauptkomponentenzahl	5	2
Steigung	0,9783	0,9424
y-Achsenabschnitt	0,6835	1,5985
Korrelationskoeffizient (R^2)	0,9891	0,9708
RMSEC (%)	0,7872	0,6168
RMSEP (%)	0,8971	0,6155
Bias	$-2,331 \cdot 10^{-7}$	$3,179 \cdot 10^{-8}$

Tab. 4-17: Parameter der Modelle nach Wellenlängenselektion, $1/x$ -Transformation und 2. Ableitung; externes Testset (PLS-1).

	MDMA	MDE
Hauptkomponentenzahl	5	2
Steigung	0,9783	0,9647
y-Achsenabschnitt	0,6823	0,9799
Korrelationskoeffizient (R^2)	0,9891	0,9822
RMSEC (%)	0,7911	0,4576
RMSEP (%)	0,8254	0,9232
Bias	$-2,890 \cdot 10^{-7}$	$2,167 \cdot 10^{-7}$

4.3.6 Diskussion

Die Probenpräsentation spielt bei der Messung und Modellerstellung im NIR sowohl bei Reflexions- als auch bei Transmissionsmessung eine große Rolle. Die Abb. 4-20 und Abb. 4-21 zeigen deutlich den Unterschied der Messung der Vorder- oder Rückseite einer Tablette oder der Messung an verschiedenen Tagen auf. Damit dies bei der Erstellung der Kalibrierung Berücksichtigung findet, wurden alle Tabletten auf diese Art unterschiedlich vermessen und alle Spektren zur Berechnung der Quantifizierungsmodelle herangezogen. Die von Herkert [100] und Sondermann [85] vorgeschlagene Mittelung der Spektren nach Mehrfachmessung vereint zwar diese Abweichung in einem Spektrum, verursacht aber eine geringere Streuung der Kalibrierdatenpunkte. Ein Einfließen aller Spektren in das Modell, wie in dem in dieser Arbeit geschilderten Fall, ermöglicht eine robustere Kalibrierung, da unterschiedlichen Spektren derselbe Gehalt zugewiesen wird. Aus diesem Grund empfiehlt sich eine Aufnahme von Vorder- und Rückseite bei der Analyse unbekannter Proben ohne Mittelung der Spektren und die nachfolgende Mittelung der Analyseergebnisse für eine durchschnittliche quantitative Aussage, da nicht immer die Art der Probenpräsentation vom Nutzer beeinflusst werden kann.

Tablettenmessung in diffuser Reflexion

Ausgehend von einer Kalibrierung mit den Rohspektren, kann für alle Substanzen festgestellt werden, dass eine Wellenlängenselektion auf die relevanten Bereiche des Spektrums unter Ausschluss des Bereiches der O-H Schwingungen einen positiven Einfluss auf die Kalibrierung hat. Dies äußert sich in einer starken Erniedrigung des RMSEP unter gleichzeitiger Verbesserung der Korrelation. Das MDE-Modell unter Beibehaltung aller Wellenlängen zeigt hingegen bessere Ergebnisse als nach Selektion. Die dafür benötigte Hauptkomponentenzahl von 9 für die Rohspektren gegenüber 6 nach Selektion zeigt, dass sich hier bereits ein Effekt des Übertrainierens (*Overfitting*) des Modells äußert, bei dem die Beschreibung der Varianz schon in Bereiche des Rauschens kommt. Eine dann folgende Korrektur der Probenpräsentation und des Streulichts über die 2. Ableitung verbessert wiederum die Kennzahlen der jeweiligen Modelle. Die benötigte Hauptkomponentenzahl verringerte sich für MDE von 6 auf 3.

Berechnungen nach der Transformation von der Wellenlängenebene in die der Wellenzahlen, die eine bessere Gewichtung der kleineren Wellenlängen zulässt, verringert die Vorhersagefehler aller Modelle. Der Versuch einer Kombination der 2. Ableitung nach $1/x$ -Transformation ergab für Amphetamin und MDMA eine bessere Korrelation und folglich auch geringere RMSEC bei kleinerer Hauptkomponentenzahl. Dies zeigt, dass der quantitative Zusammenhang zwischen den Spektren und dem Gehalt der Einzelsubstanzen durch die Ableitung klarer aus den Spektren extrahiert wurde. Die Validierung gegen das externe Testset zeigte ähnliche Werte für die Vorhersagefehler. Hierdurch ist mittels eines unabhängigen Datensatzes die Robustheit – und damit die Qualität - der Methoden bestätigt.

Bei genauerer Begutachtung der Parameter für alle MBDB Modelle zeigt sich, dass diese Modelle keine validen Analyseergebnisse liefern. Die Korrelation nähert sich bei keiner Form der Modellentwicklung der zu erwartenden Zahl 1. Der Verlauf der Kalibriergerade ist in Bezug auf Steigung und y-Achsenabschnitt nicht einer üblichen Kalibration entsprechend (s. Abb. 6-12). Die Modellerstellung für MBDB war nicht möglich, da der Konzentrationsbereich der zur Verfügung stehenden Proben zu gering war. Ein weiterer Grund ist in der unsachgemäßen Herstellung der MBDB-Proben zu sehen, die eine zu große Varianz der Spektren verursacht und sich mangels Konzentrationsspanne nicht rechnerisch nivellieren lässt.

Aus dem Vergleich der anderen Werte ergibt sich, dass für die Quantifizierung der Amphetamine die nachfolgende Kombination an Datenvorbehandlungen am besten geeignet ist: Wellenlängenselektion, $1/x$ -Transformation und 2. Ableitung mit Glättung nach Savitzky-Golay. Durch die Durchführung einer Ableitung wird der Faktor der unterschiedlichen Probenpräsentation aufgrund verschiedener Korngrößenverteilungen, unterschiedlicher Probendurchmesser und Streulicht bei unterschiedlicher Lage der Tabletten nivelliert.

Tablettenmessung in Transmission

Bei Transmissionsmessung der Ecstasy-Tabletten auf der Basis der Rohspektren zeigt sich im Vergleich mit dem äquivalenten Modell der Reflexion, dass in Transmission schon ohne Datenrestriktion oder -vorbehandlung bessere Modelle zur Quantifizierung erzeugt werden. Verdeutlicht wird dies durch höhere

Korrelationskoeffizienten und kleinere Vorhersagefehler. Eine Wellenlängenselektion zeigt keine Verbesserung dieser Werte, ermöglicht aber die Beschreibung der Quantifizierungsmodelle mit deutlich weniger Hauptkomponenten. Eine zusätzliche Korrektur der Spektren durch eine 2. Ableitung und Glättung erbringt unter weiterer Reduktion der Hauptkomponenten hingegen wieder eine Verbesserung der Parameter der jeweiligen Kalibrierungen. Die den einzelnen Datenpunkten energetisch korrektere Darstellung in Wellenzahlen nach $1/x$ -Transformation und die anschließende PLS-1, ergeben die kleinsten Vorhersagefehler aller erstellten Quantifizierungsmodelle. Eine zusätzliche Ableitung vor der Berechnung einer Regression liefert als Ergebnis eine Verschlechterung der Vorhersagefehler um 1 – 8 %, je nach untersuchter Substanz. Eine vergleichende Berechnung mit dem externen Testset bestätigt die Robustheit der Methode.

Aus der obigen Aufstellung geht hervor, dass bei der Messung in Transmission die Modelle unter Beibehaltung des ursprünglichen Datensatzes mit $1/x$ -Transformation und Wellenlängenselektion, aber ohne Ableitung, die besseren Ergebnisse liefern. Obwohl der vorhandene Datensatz der Tabletten mit MBDB auch hier nicht für eine valide Quantifizierung mittels NIR ausreicht, zeigen die berechneten Modelle deutlich bessere Kalibrationsparameter bei der Kalkulation mit den Daten der Transmissionsmessung als mit denen durch Reflexion erhaltenen. Dies bestätigt die Möglichkeit der genaueren quantitativen Analyse von Ecstasy-Tabletten mittels Transmissionsmessung.

Da alle Ecstasy-Tabletten vermutlich nicht „lege artis“, d.h. ohne pharmazeutischen Sachverstand hergestellt wurden und somit nicht ausreichend homogenisiert worden waren, macht sich dieser Umstand bei der NIR-Analyse bemerkbar. Eine Reflexionsmessung erreicht beim Eindringen des Lichtstrahls in die Probe mit Wegstrecken von wenigen mm nur einen Bruchteil der Tablette. Hierdurch wird nur der an der Tablettenoberfläche vorhandene Substanzanteil detektiert. Da dieser Bereich aber nicht repräsentativ für die gesamte Probe ist, muss man bei einer Reflexionsmessung mit fehlerbehafteten quantitativen Analyseergebnissen rechnen. Im Gegensatz hierzu durchdringt bei der Transmissionsmessung das eingestrahelte Licht fast die gesamte Probe, sodass selbst bei einer nicht homogenen Mischung ein repräsentativeres Abbild der Tablette erfasst wird. Dies äußerte sich in den mehr als 10 % geringeren

Vorhersagefehlern der Transmissions- gegenüber den Reflexionsmodellen im Vergleich mit den „wahren Werten“ der HPLC-Bestimmung.

Vergleich der Messung von Pulver und unzerstörten Tabletten

Zum Vergleich wurden MDMA- und MDE-Tabletten herangezogen, da deren Datensätze ausreichend Proben beinhalteten. Deutlich zeigt sich bei der Gegenüberstellung der Kalibrierparameter der Einfluss einer inhomogen vermischten Probe auf das Ergebnis. Die Messung der verriebenen Proben liefert für die quantitativen Modelle Korrelationswerte näher an 1 und Vorhersagefehler, die sogar kleiner sind, als bei der Messung in Transmission. Durch die Verreibung wurde die Probe nachträglich homogenisiert, also ihre Inhaltsstoffe statistisch in der gesamten Pulvermischung verteilt. Folglich liefert nunmehr die Reflexionsmessung ein genaueres Abbild der Gesamtprobe, obwohl sie nur einen kleinen Anteil der Probe erfasst. Darüber hinaus verkleinert ein Verreiben der Proben die durchschnittliche Korngröße, was zu geringeren Streueffekten und dadurch gleichförmigerer Probenpräsentation führt. Die Messung in identischen Glasvials liefert immer dieselbe bestrahlte Fläche, im Gegensatz zu den Tablettenmessungen, bei denen die Proben in ihren Durchmessern stark voneinander differieren (vgl. Tab. 7-1 bis Tab. 7-10).

5 Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerung

Die ausführliche Untersuchung von Ecstasy-Tabletten wird mit den gängigen Methoden wie GC oder HPLC unter hohem personellen und apparativen Aufwand durchgeführt. Darüber hinaus ist die Analyse mit deren Zerstörung verbunden. Aus diesem Grund stand in dieser Arbeit die Entwicklung einer schnellen Identifikations- und Quantifikationsmethode mittels der zerstörungsfreien NIR-Spektroskopie im Mittelpunkt.

Da die Zusammensetzungen illegal hergestellter Tabletten nicht wie bei solchen pharmazeutischer Herkunft [17, 20, 22] von vorne herein bekannt sind, muss man mit Einbußen in der Vorhersagegenauigkeit rechnen. Um dies auszugleichen, wurde in dieser Arbeit die Kalibrierung erstmalig mit konfisziertem Material hoher Varianz und in Transmissionsmessung durchgeführt. Dies hat auch den Vorteil, dass im Gegensatz zu Sondermann [13, 14] keine Pulverisierung der Tabletten notwendig wird. Die Ergebnisse zeigen, dass eine validierte Methode zur Identifizierung der wichtigsten Inhaltsstoffe in Ecstasy-Tabletten – MDMA, Amphetamin, MDE und MBDB – mittels konfisziertem Probenmaterial und einer Messung in Transmission erreicht wird. Entsprechend den Arbeiten von Eustaquio et al. [20], Gottfries et al. [22] und Thosar et al. [24] wird die Verbesserung eines aus Transmissionsdaten entwickelten Kalibrationsmodells durch Wellenlängenselektion bestätigt.

Die Fokussierung auf den Wellenlängenbereich der strukturellen Unterschiede der untersuchten Substanzen, eine 2. Ableitung zur Streulichtkorrektur und die Anwendung einer Normalisierung zur Nivellierung der Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben erbrachte eine Verbesserung der Identifizierung. In der entwickelten Methode fand eine Berechnung Anwendung, eine *Partial Least Squares* (PLS-2) Korrelation, die auch eine Identifizierung von Stoffgemischen zulässt.

Nach der Identifizierung der untersuchten Inhaltsstoffe können diese durch spezifische Quantifizierungsmodelle auf ihren Gehalt hin untersucht werden. Diese

wurden ebenfalls auf der Basis konfiszierter Proben erstellt. Zum einen geschah dies unter dem Gesichtspunkt der Zeitersparnis bei der Methodenentwicklung und zum anderen unter Berücksichtigung einer hohen Varianz zwischen den Proben, welche später die zu quantifizierenden Ecstasy-Tabletten repräsentieren sollte. In Weiterführung zu der Untersuchung von Sondermann, wurde in dieser Arbeit die Methode der Gehaltsbestimmung mittels NIR-Spektroskopie nicht nur auf der Basis der Messung in diffuser Reflexion, sondern auch in Transmission untersucht. Ein Vergleich der jeweils besten Modelle beider Messmethoden mit den kleinsten Vorhersagefehlern für neue Proben wurde durchgeführt. Die PLS-1 Kalibrierung einer Messung in diffuser Reflexion mit Wellenlängenselektion, $1/x$ -Transformation und einer 2. Ableitung der Spektren war der Transmissionsmessung mit Wellenlängenselektion und $1/x$ -Transformation unterlegen. Dies spiegelten auch die Ergebnisse von Merckle und Kovar [23], Gottfries et al. [22] und Thosar et al. [24] wieder, die im Vergleich der beiden Messmethoden eine genauere Analytik mittels Transmissionsmessung belegten. Im vorliegenden Fall konnte nur durch zusätzliche Homogenisierung der Tabletten, d.h. durch Zerstörung mittels Verreiben der Proben, die Analysenergebnisse verbessert werden.

Im Fall der Untersuchung beschlagnahmter Proben muss aus den oben aufgeführten Gründen die Entscheidung getroffen werden, ob eine schnelle, zerstörungsfreie Analytik erwünscht ist, oder eine präzisere Bestimmung mittels NIR in Frage kommt, die aber eine Zerstörung der Proben voraussetzt.

Die von Sondermann postulierte Problematik bezüglich einer zwingenden Unterscheidung von Vorder- oder Rückseite einer Tablette von Ecstasy-Tabletten für eine quantifizierende Kalibrierung oder die Verschlechterung von Modellen durch Datenselektion konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Ebenfalls in Frage zu stellen ist die Anmerkung im Kommentar des Europäischen Arzneibuchs für die NIR-Spektroskopie, dass eine Messung in Transmission nur auf Flüssigkeiten oder Pulver begrenzt ist [101].

Weiterführende Entwicklung dieser Arbeit sollte die Erweiterung der vorhandenen Konzentrationsbereiche der untersuchten Substanzen, vor allen Dingen von

MBDB sein. Ein weiterer Ansatz für die präzisere Gehaltsbestimmung der konfiszierten Proben könnte die Bestimmung des Wassergehalts einer jeden Probe des Kalibrierdatensatzes und seine Berücksichtigung bei PLS-2 Korrelation sein, da das in den Proben befindliche Wasser die Basis für einen großen Anteil der Varianz zwischen den Proben darstellt. Zu bedenken ist jedoch, ob der eventuell hiermit erreichte Präzisionsgewinn den damit verbundenen zeitlichen und analytischen Aufwand bei der Erstellung und Analyse des Datensatzes aufwiegt.

Da die Nahe Infrarot Spektroskopie eine Sekundärmethode ist, wurde für die Bestimmung der wahren Konzentrationswerte der Inhaltsstoffe in Ecstasy eine HPLC-Methode entwickelt und validiert. Hierbei wurde eine neuartige monolithische HPLC-Säule hinsichtlich ihrer reproduzierbaren Trenneigenschaften und ihrer maximalen Analysengeschwindigkeit für die Trennung von 7 Substanzen evaluiert. Alle untersuchten Substanzen wurden gleichzeitig detektiert und quantifiziert. Die entwickelte Methode zeichnet sich durch eine hohe Präzision und Genauigkeit aus, sowie durch eine kleine Verfahrensstandardabweichung, die auf der Nutzung eines internen Standards beruht. Dies qualifiziert die Methode als geeignete Referenzanalytik für die NIR-Spektroskopie. Eine Evaluierung unterschiedlicher Flussraten lässt eine Verkürzung der Analysenzeiten für 7 Substanzen auf 3,5 Minuten pro Analyse zu. Eine eventuelle falsche Zuordnung der Peaks wegen der geringen Unterschiede in den Retentionszeiten aufgrund ihrer schnellen Elution von der Säule könnte durch eine Kopplung mit MS (MS-MS) ausgeglichen werden. Die untersuchte monolithische HPLC-Säule eignet sich besonders zur schnellen Entwicklung von HPLC-Trennungen, sowohl für einfache als auch für komplexe Stoffgemische, wie sie in der Pflanzenanalytik anzutreffen sind. Ebenfalls vorstellbar ist ihr Einsatz in der Hochdurchsatzanalytik (High Throughput), bei der sie kürzere Analysenzeiten bei HPLC-Anwendungen ermöglichen kann.

Die in dieser Arbeit vorgeschlagene Vorgehensweise zeigt, dass der Aufbau und die Nutzung von Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Ecstasy-Tabletten auf der Basis konfiszierter Straßenproben mittels NIR-Spektroskopie möglich ist. Als Vorgehensweise der Analyse von Ecstasy-Tabletten ist die

Anwendung der Identifikationsmethode und eine nachfolgende Quantifizierung der Inhaltsstoffe durch das entsprechende Modell auch in einem mobilen Labor direkt am Ort der Sicherstellung (Diskothek, illegale Labors) vorstellbar, um weitere Schritte kriminologischer Recherchen schneller in die Wege leiten zu können. Möglich ist hierbei auch die Kombination beider Modelle in automatisierter Abfolge mittels entsprechender Software bei nur einer Messung der Probe.

Zu bedenken bleibt aber immer, dass die hierbei ermittelten Ergebnisse nie die Genauigkeit einer HPLC-Methode erreichen können, da auch Zusatzstoffe in den Tabletten die Analysenergebnisse beeinflussen. Aus diesem Grund wird die HPLC-Analytik auch weiterhin Bestand bei der Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe von Ecstasy-Tabletten haben. Als zweite von HPLC/MS oder GC/MS völlig unabhängige Analysenmethode genügt die vorliegende NIR-Bestimmung den Anforderungen an eine forensische Analyse.

Als zukünftige Entwicklung der Nahen Infrarot Spektroskopie ist auch ihre Anwendung als Methode zur Mustererkennung vorstellbar, bei der sichergestellt Ecstasy-Tabletten nicht nur hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe, sondern auch bezüglich ihrer Hersteller erkannt und ihrer Chargenzugehörigkeit charakterisiert werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Referenzmethode HPLC

6.1.1 Vorbemerkungen

Die NIR-Spektroskopie ist als Sekundärmethode von der Qualität ihrer Referenzanalytik abhängig. Daher werden solche Primärmethoden bevorzugt, die nur wenige Probenvorbereitungsschritte benötigen und deren Fehlerquellen möglichst gering sind. Aus diesem Grund wurde für alle Tabletten, die die Grundlage für die Quantifizierungsmodelle in der NIR darstellen, die im folgenden beschriebene HPLC-Analytik ausgewählt.

6.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Racemate von MDMA, MDE und MDA wurden im eigenen Arbeitskreis synthetisiert [102]. Amphetaminsulfat wurde von der Firma Geyer, Renningen in Arzneibuchqualität bezogen, MBDB von der Firma Sigma-Aldrich. Die für analytische Zwecke verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel entsprachen mindestens p.a.-Qualität und wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck und Sigma bezogen. Bidestilliertes Wasser für die HPLC-Analytik wurde im technologischen Institut der Universität Tübingen hergestellt.

6.1.3 HPLC-Säule

Alle Messungen der Entwicklung, Validierung und Analytik der Amphetaminderivate erfolgten mit einer SpeedRod RP-18e, 50 x 4,6 mm, der Firma Merck/Darmstadt (jetzt VWR), wobei als Vorsäule eine LICHROSPHER 100 RP-18e, 5 µm, 4 x 4 mm verwendet wurde.

6.1.4 Geräte

6.1.4.1 pH-Wertbestimmung

Die Einstellung der pH-Werte für die HPLC-Puffer erfolgte mit einem Mikroprozessor pH-Meter pH 320 der WTW.

6.1.4.2 Waage

Das Auswägen der Chemikalien für die analytischen Methoden erfolgte mit einer SBA/SBC-Laborwaage der Firma Scaltec.

6.1.4.3 HPLC-DAD

Die HPLC-Anlage umfasste einen L-7200 LaChrom Autosampler, eine L-6200A Intelligent Pump und einen L-7455 Dioden Array Detektor der Firma Merck. Die Auswertung der Chromatogramme bezüglich Retentionszeit und Integration der Peakflächen erfolgte durch ein D-7000 Interface Modul und der D-7000 HPLC-System-Manager Software, Version 4.0, der Firma Merck.

6.1.5 Probenvorbereitung

Jede Tablette wurde zu einem feinen, homogenen Pulver verrieben. Die Prüflösungen wurden durch Einwiegen von 40 mg einer pulverisierten Probe in einen 50 ml Messkolben und suspendieren in Puffer (20 mmol/l KH_2PO_4 , 0,1 % Triethylamin, pH 2,28) hergestellt. Jedem Messkolben mit Prüflösung wurden zusätzlich vor dem Auffüllen eine Lösung von MCP-Hydrochlorid in Puffer in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die Suspension wurde im Ultraschallbad 10 Minuten dispergiert und nach dem Abkühlen vor jeder Injektion durch einen 0,45 μm HPLC-Membranfilter (regenerierte Cellulose, Firma Roth, Karlsruhe) filtriert. Sollte sich das Analyseergebnis außerhalb des Kalibrierbereiches befunden haben, wurde die eingewogene Pulvermenge angepasst, um mit dem Analyseergebnis innerhalb der Validierungsgrenzen zu liegen.

6.1.6 Chromatographische Bedingungen

- ◆ Stationäre Phase: SpeedRod[®] RP-18e, 50 x 4,6 mm
- ◆ Vorsäule: LICHROSPHER[®] 100 RP-18e, 5 µm, 4 x 4 mm
- ◆ Mobile Phasen: Phase A KH₂PO₄-Puffer (20 mmol/l) mit 0,1 % Triethylamin, eingestellt auf pH 2,28, mit 85 % H₃PO₄
- Phase B Acetonitril
- ◆ Gradient:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0	94	6
2	94	6
8	87	13
13	87	13
- ◆ Äquilibrierzeit: 7 Minuten
- ◆ Flussrate: 1,5 ml/Minute
- ◆ Einspritzvolumen: 20 µl
- ◆ Detektion:

0-3,5 min	210 nm
3,5-13 min	285 nm

6.1.7 Änderung der Flussraten

Die unterschiedlichen Flussraten, die während der Methodenentwicklung zur Analyse des Substanzgemisches eingesetzt wurden und ihre jeweiligen Gradientenprogramme, setzen sich wie in Tab. 6-1 beschrieben zusammen.

Tab. 6-1: Änderungen der HPLC-Bedingungen bei unterschiedlichen Flussraten.

Flussrate (ml/min)	Zeit (min)	Phase A (%)	Phase B (%)	Flussrate (ml/min)	Zeit (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
1,5	0	94	6	3	0	95	5
	2	94	6		2	95	5
	8	87	13		3	87	13
	13	87	13		6	87	13
2	0	95	5	3,5	0	94	6
	2	95	5		2	94	6
	6	87	13		3	87	13
	9	87	13		6	87	13
2,5	0	95	5	4	0	94	6
	2	95	5		1	94	6
	4	87	13		2	87	13
	7	87	13		4	87	13

6.1.8 Validierung der HPLC-Gehaltsbestimmungen

6.1.8.1 Allgemeine Vorgehensweise bei der Validierung einer Methode

Die Validierung des Gehaltsbestimmungsverfahrens per HPLC wurde nach Funk [103], Kromidas [104] und der ICH-Guideline zur Validierung von Analysemethoden durchgeführt [105]. Die Auswertung der durch Diodenarray Detektion aufgenommenen Chromatogramme erfolgte über die Peakflächen, wobei diese nach Engelhardt und Aitzetmüller [94] durch den Einsatz eines internen Standards korrigiert wurden. Jede Substanz wurde in der entsprechenden Konzentration unter Zugabe des internen Standards MCP in der HPLC-Pufferlösung A gelöst.

6.1.8.2 Festlegung der Arbeitsbereiche

Für jede der zu quantifizierenden Substanzen wurde ein Arbeitsbereich definiert. Er wurde so gewählt, dass sich die zu erwartende Konzentration der Probensubstanz im Schwerpunkt der jeweiligen Kalibriergerade befindet. Fünf äquidistante Punkte wurden zum Erstellen der Kalibrierfunktion herangezogen. Der oberste, der mittlere und der unterste Punkt der Kalibriergeraden wurde jeweils in 10-fach Messung bestimmt. Die dazwischenliegenden Punkte wurden jeweils über eine dreifach Messung berechnet (s. Tab. 6-2).

Tab. 6-2: Arbeitsbereiche der untersuchten Substanzen.

Substanz	Arbeitsbereich ($\mu\text{g/ml}$)
Amphetamin	100-500
MDMA	100-500
MDE	100-500
MBDB	67,2-336

6.1.8.3 Prüfung auf Normalverteilung

Viele statistische Prüfungen setzen eine Normalverteilung der Prüfwerte voraus. Die Normalverteilung ist eine Wahrscheinlichkeitsverteilung von Messwerten, bei der nur zufällige Fehler auftauchen und die Messwerte von der Standardabweichung und dem Mittelwert abhängen. Zur Prüfung der Normalverteilung wurde der Test nach David durchgeführt. Hierbei wird der Quotient aus der Spannweite R (Differenz zwischen dem größten Wert und dem kleinsten Wert) und der Standardabweichung sd gebildet. Befindet sich der Wert innerhalb der von David vorgegebenen Grenzwerte, dann sind die Werte mit einer Wahrscheinlichkeit größer 99 % normalverteilt [106]. Die Prüfungen wurden für die Arbeitsbereiche in den oberen und unteren Grenzen der Kalibrierung durchgeführt. Der vorgegebene Grenzwert für die untere Grenze ist $g_u = 2,51$. Der für die obere Grenze ist $g_o = 4,24$ ($P=99\%$, $n=10$). Alle Werte waren normalverteilt (s. Tab. 6-3).

Tab. 6-3: Werte der Prüfung auf Normalverteilung.

Substanz	Arbeitsbereich (µg/ml)	Untere Grenze	Obere Grenze
Amphetamin	100-500	3,394	2,828
MDMA	100-500	3,32	3,34
MDE	100-500	3,232	3,797
MBDB	67,2-336	3,283	2,67

6.1.8.4 Ausreißertest

Der Ausreißertest oder auch Verlässlichkeitstest wird durchgeführt, um festzustellen, ob ein Wert einer Wertereihe mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit ein Ausreißer ist. Es wurden die obersten, mittleren und untersten Punkte der Kalibriergerade auf Ausreißer untersucht. Da die Anzahl der Messwerte je Konzentrationspunkt zehn ist, wurde der Grubbs-Test zur Auswertung herangezogen [104]. Man bildet den Quotienten aus dem Betrag der Differenz zwischen dem Mittelwert (\bar{x}) der Wertereihe und dem ausreißerverdächtigen Wert (x_i) und der Standardabweichung sd . Der Wert gilt als Ausreißer, wenn der Prüfwert größer ist als der entsprechende Tabellenwert (hier: 2,41; P=99%). Für alle Datenpunkte lag der Prüfwert unter dem Tabellenwert (s. Tab. 6-4). Es konnten keine Ausreißer festgestellt werden.

Tab. 6-4: Prüfwerte für Ausreißertest.

Substanz	Konzentration (µg/ml)	Prüfwert
Amphetamin	100	2,136
	300	1,144
	500	1,116
MDMA	100	1,926
	300	1,603
	500	1,025

Substanz	Konzentration (µg/ml)	Prüfwert
MDE	100	1,976
	300	1,640
	500	1,636
MBDB	67,2	1,960
	202	1,643
	336	1,630

6.1.8.5 Trendtest

Der Trendtest nach Neumann stellt fest, ob die Messwerte im zeitlichen Verlauf ansteigen oder fallen [104]. Alle Messreihen aus den Datenpunkten wie im Ausreißertest beschrieben, wurden dieser Prüfung unterzogen. Der Prüfwert Q wird wie folgt berechnet:

$$Q = \frac{1}{(n-1)sd^2} \sum_{i=1}^{n-1} (x_i - x_{i+1})^2 \quad \text{(Gl. 6-1)}$$

mit: n Anzahl der Messwerte
 x_i, x_{i+1} Messwerte in chronologischer Reihenfolge
sd Standardabweichung

Der berechnete Wert wird mit einem entsprechenden Tabellenwert verglichen. Für die Anzahl von Messpunkten $n = 10$ und einem Signifikanzniveau von $P = 95 \%$, ergibt sich der Grenzwert aus der Tabelle mit 1,0523. Ist der Prüfwert größer als der Tabellenwert, dann liegt mit der gewählten Wahrscheinlichkeit ein Trend nicht vor. In keiner Datenreihe konnte ein Trend festgestellt werden (s. Tab. 6-5).

Tab. 6-5: Werte der Prüfung auf einen Trend während der Messung.

Substanz	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Prüfwert
Amphetamin	100	2,736
	300	1,436
	500	2,404
MDMA	100	2,678
	300	2,102
	500	1,792
MDE	100	1,329
	300	1,921
	500	1,331
MBDB	67,2	1,829
	202	1,923
	336	2,512

6.1.8.6 Prüfung auf Linearität

Unter Linearität versteht man die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [106]. Für die Überprüfung der Linearität stehen zum einen die Möglichkeit der visuellen Überprüfung zur Auswahl, wobei hier nur grobe Abweichungen erkannt werden können. Zum anderen kann mit Hilfe des Mandeltests objektiv entschieden werden, ob Linearität vorliegt. Hierbei wird auf die Signifikanz der Verringerung der Restvarianz geprüft. Der Prüfwert wird mit dem Tabellenwert verglichen. Er sollte zum Beleg der direkten Proportionalität kleiner sein, als der tabellierte F-Wert. Aus den zwei Reststandardabweichungen wird die Differenz der Abweichungsvarianzen DS berechnet:

$$DS^2 = (N - 2)sy_1^2 - (N - 3)sy_2^2 \quad (\text{Gl. 6-2})$$

- mit: DS^2 Differenz der Abweichungsvarianzen
 sy_1 Reststandardabweichung der linearen Funktion
 sy_2 Reststandardabweichung der quadratischen Funktion
 N Anzahl der Messungen, d.h. Anzahl der Konzentrationen, bei Mehrfachbestimmungen deren Mittelwerte

Anschließend wird der Prüfwert (PW) berechnet:

$$PW = \frac{DS^2}{sy_2^2} \quad (\text{Gl. 6-3})$$

Der Tabellenwert aus der F-Tabelle (Freiheitsgrad $f_1 = 1$, $f_2 = N-3 = 2$, $P = 95\%$) beträgt 98,5. Wie in Tab. 6-6 ersichtlich, sind alle Kalibrierfunktionen über ihren jeweiligen Arbeitsbereich linear, da die Prüfwerte jeweils kleiner als der Tabellenwert sind.

Tab. 6-6: Kennzahlen der Prüfung auf Linearität.

Substanz	Arbeitsbereich (µg/ml)	Prüfwert	Korrelationskoeffizient
Amphetamin	100-500	4,37	0,999957
MDMA	100-500	7,04	0,999997
MDE	100-500	0,01	0,999981
MBDB	67,2-336	0,03	0,999946

6.1.8.7 Wiederfindung

Die Wiederfindung oder Wiederfindungsrate ist das Verhältnis zwischen dem Mittelwert der Wiederholungsmessungen zum richtigen Wert der Analyten in der Probe. Der Idealwert ist 100%. Mit Hilfe der Wiederfindung (W) kann die gesamte Methode beurteilt werden. Denn wird der Idealwert von 100% tatsächlich

gefunden, dann sind die Selektivität, die Richtigkeit und die Robustheit mit einer Überprüfung gemeinsam bewiesen [104].

$$W = \frac{\bar{x}}{x_r} * 100\% \quad (\text{Gl. 6-4})$$

mit: \bar{x} Mittelwert der vermessenen Pulvermischungen
 x_r Richtiger Wert

Da über die Korrektur jedes Analysenwertes mit Hilfe des internen Standards eventuelle Substanzverluste bei der Filtration egalisiert werden, wurde hier exemplarisch an einer Konzentration gezeigt, dass sich Wiederfindung des internen Standards nach Probenvorbereitung ähnlich der Wiederfindung der Analyten verhält. Hierzu wurde eine Pulvermischung üblicher Tablettierhilfsstoffe (Cellulose, Lactose, Sorbit im Verhältnis 1:1:1) hergestellt. Mischungen aus den zu analysierenden Substanzen und dieser Hilfsstoffmischung wurden derart zubereitet, dass sich die Endkonzentrationen der Amphetamine in „handelsüblicher“ Höhe befand. Je 10 mg der Analyten wurden mit der entsprechenden Menge Hilfsstoff verrieben und der Probenvorbereitung unterzogen. Diese Werte wurden mit den Werten der wässrigen Referenzlösungen verglichen. Jeder Wert wurde durch Dreifachbestimmung ermittelt. Die prozentualen Wiederfindungsraten werden in den Tab. 6-7 aufgeführt.

Tab. 6-7: Wiederfindungsraten der untersuchten Substanzen.

Substanz	Wiederfindungsrate (%)
Amphetamin	99,68
MDMA	99,99
MDE	99,6
MBDB	98,17
MCP	102,20

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, besitzen alle untersuchten Substanzen ähnliche Wiederfindungsraten.

6.1.8.8 Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen, durch die zufällige Fehler erfasst werden. Als Maß dient die Standardabweichung sd oder der Variationskoeffizient VK . Zur Berechnung der Präzision an den oberen und unteren Arbeitsbereichsgrenzen wurden die Einzelwerte der Zehnfachbestimmungen benutzt.

$$VK = \frac{sd}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 6-5})$$

mit: sd Standardabweichung
 \bar{x} Mittelwert

An den oberen Bereichsgrenzen lag die Präzision bei 0,26-0,89 %, an den unteren Grenzen nahm sie Werte von 0,34-1,07 % (Tab. 6-8) an.

Tab. 6-8: Präzision der Arbeitsbereiche.

Substanz	Arbeitsbereich ($\mu\text{g/ml}$)	Präzision; obere und untere Grenze (%)
Amphetamin	100-500	0,34; 0,26
MDMA	100-500	0,43; 0,89
MDE	100-500	0,96; 0,68
MBDB	67,2-336	1,07; 0,37

6.1.8.9 Richtigkeit

Die Richtigkeit oder relative systemische Abweichung ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem aus der Regressionsanalyse erhaltenen Mittelwert und dem wahren Wert. Die Richtigkeit wurde mit jeweils 10 Proben im unteren, mittleren und oberen Bereich überprüft (s. Tab. 6-9). Angegeben wird die relative systemische Abweichung in Prozent [104].

Tab. 6-9: Richtigkeit der vermessenen Substanzen.

Substanz	Arbeitsbereich (µg/ml)	Richtigkeit, untere Grenze (%)	Richtigkeit, obere Grenze (%)
Amphetamin	100-500	0,92	0,37
MDMA	100-500	0,48	0,06
MDE	100-500	0,31	0,15
MBDB	67,2-336	0,88	0,19

Verfahrensstandardabweichung

Dieser Parameter beschreibt den Quotienten der Reststandardabweichung und der Steigung der Regressionsgeraden. Die relative Verfahrensstandardabweichung ermöglicht den Vergleich verschiedener Analysenverfahren und ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Methode [104].

$$V_{ko} = \frac{(S_{xo} \cdot 100)}{x} \quad \text{wobei} \quad S_{xo} = \frac{sdv(x)}{a} \quad (\text{Gl. 6-6, Gl. 6-7})$$

mit: a Steigung der Kalibriergeraden
 $sdv(x)$ Reststandardabweichung
 x Konzentration in der Mitte des Kalibrierbereiches

Tab. 6-10: Verfahrensstandardabweichung und rel. Verfahrensstandardabweichung der untersuchten Substanzen.

Substanz	Verfahrenstandardabweichung	Rel. Verfahrensstandardabweichung (%)
Amphetamin	7,17	2,39
MDMA	7,72	2,57
MDE	2,04	0,68
MBDB	2,39	1,19

6.1.8.10 Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die kleinste Menge beziehungsweise Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko von 5% qualitativ nachgewiesen werden kann, wird als Nachweisgrenze definiert. Unter der Bestimmungsgrenze dagegen versteht man ebenso die Menge beziehungsweise Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko kleiner oder gleich 5% quantitativ nachgewiesen werden kann [107]. Die Nachweis- (XN) und Bestimmungsgrenze (XB) wurden rechnerisch aus den Kalibrierdaten ermittelt [103].

Tab. 6-11: Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyte.

Substanz	Arbeitsbereich ($\mu\text{g/ml}$)	Theor. XN ($\mu\text{g/ml}$)	Theor. XB ($\mu\text{g/ml}$)
Amphetamin	100-500	15,13	22,61
MDMA	100-500	4,05	6,06
MDE	100-500	10,15	15,19
MBDB	67,2-336	11,46	17,12

6.1.8.11 Messgröße und Vertrauensbereich

Um aus einer unbekanntem Probe über eine Kalibrierfunktion die wahrscheinlichste Konzentration zu berechnen, wird die Umkehrfunktion der Kalibrierfunktion gebildet. Der Analysenfaktor setzt sich hierbei aus dem Fehler bei der Bestimmung des zu analysierenden Wertes und dem Fehler aus der Kalibrierfunktion zusammen. Die Quadrate der Fehler summieren sich. Aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz folgt ein durch zwei Hyperbeläste begrenzter Vertrauensbereich (Prognoseintervall). Der Vertrauensbereich ist umso größer, je weiter man vom Datenschwerpunkt entfernt ist (Fehlertrumpete) .

6.1.8.12 Robustheit

Unter der Robustheit einer Methode versteht man das Ausmaß der Unabhängigkeit eines Ergebnisses von der Änderung aller relevanten Parameter, die Einfluss ausüben können. Deshalb gehört sie eigentlich nicht zur Methodenkalibrierung, sondern bereits zur Methodenentwicklung. Dennoch wurden die verwendeten HPLC-Methoden während ihrer Nutzung ständig auf ihre Robustheit hin geprüft, um eventuelle Veränderungen im Analysensystem festzustellen (z.B. Alterung der HPLC-Säule und damit verbundenes Nachlassen der Trennleistung der Säule). Dieses wurde mit Hilfe einer Referenzlösung durchgeführt, die alle zu bestimmenden Substanzen enthielt. Alle 10 Proben wurde diese Standardlösung injiziert und ihre Daten, in Relation zum internen Standard MCP, auf Retentionszeit und Peakfläche überprüft. Eine etwaige Verschlechterung der Auflösung wurde visuell begutachtet.

Tab. 6-12: Robustheit der Peakflächen und Retentionszeiten aller Proben.

Substanz	Rel. Standardabweichung AUC (%)	Rel. Standardabweichung Retentionszeit (%)
Amphetamin	3,41	0,78
MDMA	2,85	4,50
MDE	1,61	0,65
MBDB	0,88	2,89

6.1.8.13 Weitere Kalibrierkenndaten

Im Zuge der Validierung des HPLC-Verfahrens wurden noch weitere Kenndaten wie die Empfindlichkeit (Steigung der Kalibrierfunktion) und Achsenabschnitt bestimmt (Tab. 6-13).

Tab. 6-13: Kalibrierkenndaten aller Analyte.

Substanz	Arbeitsbereich (µg/ml)	Kalibrierpunkte	Steigung (rel. zu IS)	Achsenabschnitt (rel. zu IS)
Amphetamin	100-500	5	1,531	0,089
MDMA	100-500	5	0,572	-0,002
MDE	100-500	5	0,538	-0,006
MBDB	67,2-336	5	0,530	0,014

6.1.9 Detektion

6.1.9.1 UV-VIS Diodenarray

Die zu untersuchenden Substanzen wurden auf der Basis ihrer Retentionszeiten im Chromatogramm des HPLC-Laufs und ihrer Spektren, die mit Hilfe des UV-VIS Diodenarray Detektors erstellt wurden, identifiziert. Folgende Abbildung zeigt den Konturplot eines HPLC-Laufs aller zu analysierender Substanzen.

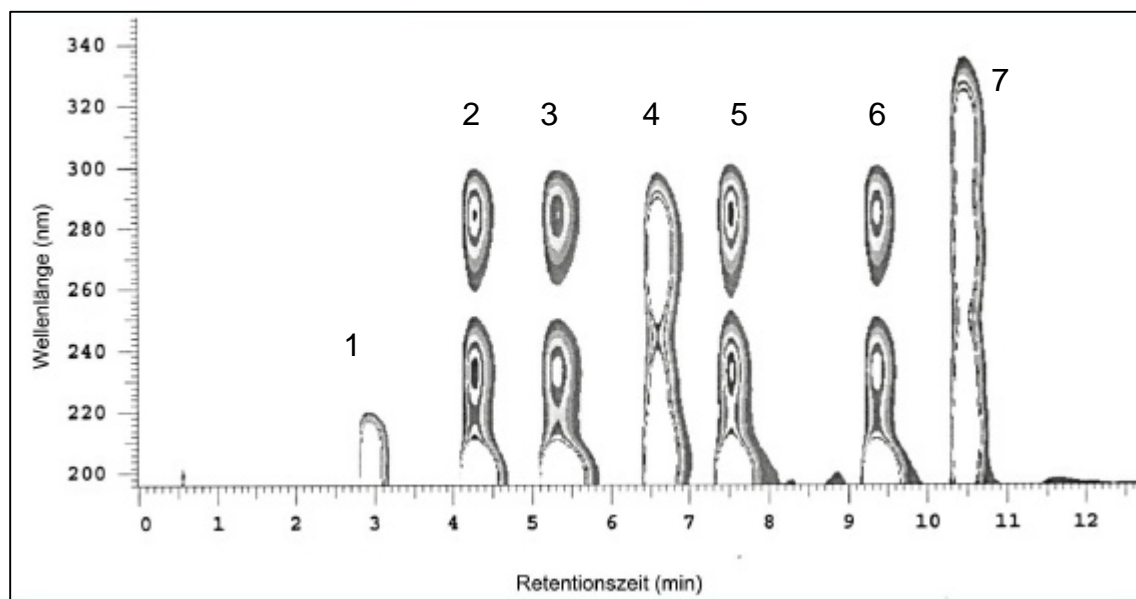


Abb. 6-1: Konturplot eines HPLC-Laufs. Peak 1 = Amphetamin; Peak 2 = MDA; Peak 3 = MDMA; Peak 4 = Coffein; Peak 5 = MDE; Peak 6 = MBDB; Peak 7 = MCP (Optimierte Methode).

Die Einzelspektren jedes Substanzpeaks sind im folgenden aufgeführt (Abb. 6-2 bis Abb. 6-8):

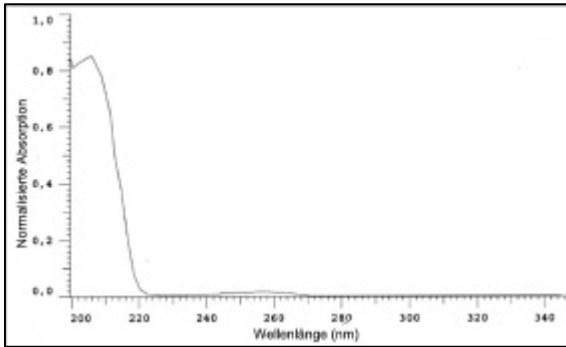


Abb. 6-2: Amphetamin.

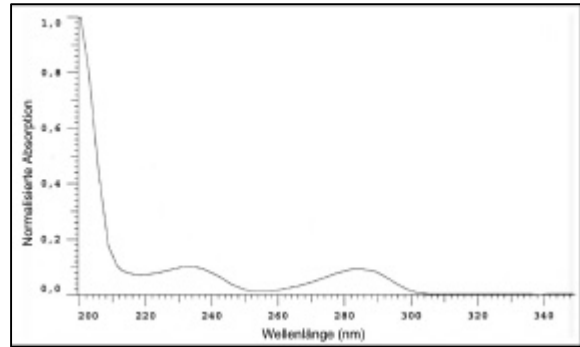


Abb. 6-3: MDA.

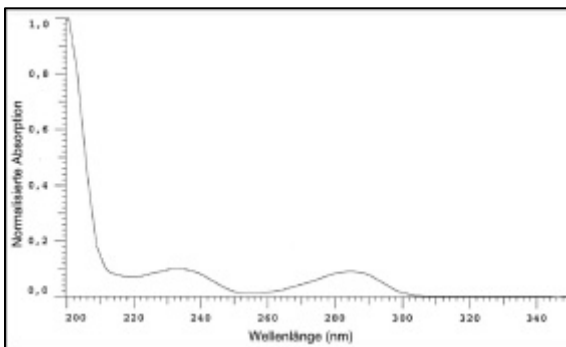


Abb. 6-4: MDMA.

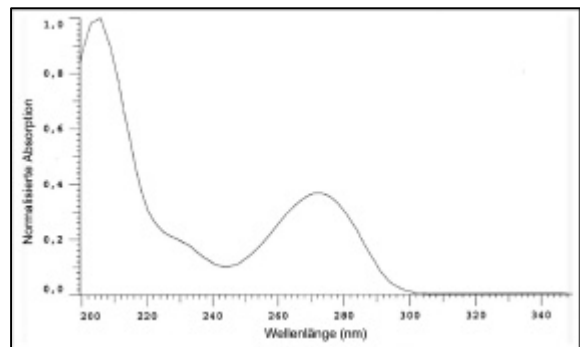


Abb. 6-5: Coffein.

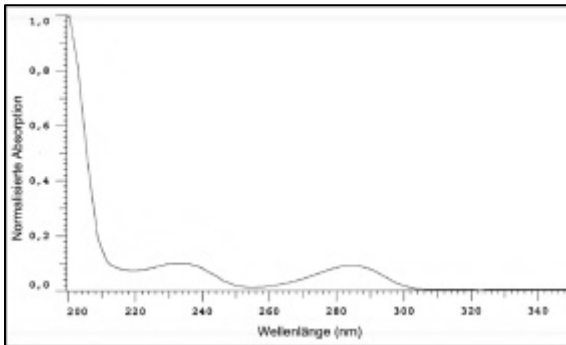


Abb. 6-6: MDE.

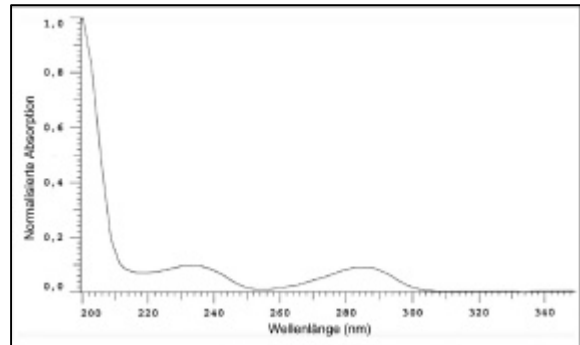


Abb. 6-7: MBDB.

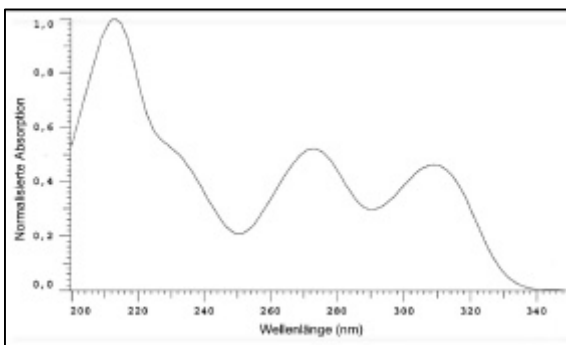


Abb. 6-8: MCP.

Quantitative Auswertung

Die Ergebnisse der Quantifizierung der analysierten Ecstasy-Tabletten sind in Tab. 6-14 - Tab. 6-23 zusammengefasst, wobei zur Kennzeichnung interne Namen auf der Basis ihrer jeweiligen eingepprägten Motive mit fortlaufender Nummerierung innerhalb jedes Prägemusters (Tablettencharge) vergeben wurden. Die Aufstellung beinhaltet neben dem berechneten Gehalt an Wirkstoff in mg (gemittelt aus jeweiliger Zweifach-Bestimmung), noch die Masse der Tablette und den prozentualen Gehalt je Probe. Für jede Tablettengruppe wurde der Mittelwert des Gehaltes in mg und %, sowie der Minimal- und Maximalwert berechnet.

Tab. 6-14: „1234 Euro“; Wirkstoff: MDMA.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
1234E01	296,65	74,97	25,27
1234E02	300,99	81,39	27,04
1234E03	291,18	73,50	25,24
1234E04	291,72	77,71	26,64
1234E05	294,77	71,12	24,13
1234E06	305,67	77,05	25,21
1234E07	291,87	68,87	23,60
1234E08	292,90	76,89	26,25
1234E09	285,82	73,10	25,58
1234E10	300,67	77,09	25,64
1234E11	292,06	78,94	27,03
1234E12	297,8	78,34	26,31
1234E13	288,87	74,85	25,91
1234E14	290,52	73,94	25,45
1234E15	287,64	78,10	27,15

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	68,87	81,39	75,72
%	23,60	27,15	25,76

Tab. 6-15: „1238 CK“; Wirkstoff: MDMA.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
1238C01	246,31	86,92	35,29
1238C02	250,06	90,07	36,02
1238C03	248,47	86,90	34,97
1238C04	253,25	94,18	37,19
1238C05	249,77	90,03	36,05
1238C06	248,91	88,66	35,62
1238C07	247,38	82,75	33,45
1238C08	250,71	92,90	37,05
1238C09	252,00	91,44	36,29
1238C10	249,87	88,23	35,31
1238C11	246,75	84,66	34,31
1238C12	250,12	89,79	35,90
1238C13	249,02	88,06	35,36
1238C14	249,07	89,96	36,12
1238C15	246,37	88,13	35,77

mg/Tablette	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
%	82,75	94,18	88,85
	33,45	37,19	35,65

Tab. 6-16: „863 e“; Wirkstoff: MDMA.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
863E01	188,22	69,22	36,78
863E02	188,88	68,06	36,03
863E03	179,94	65,40	36,34
863E04	189,29	71,02	37,52
863E05	201,98	69,22	34,27
863E06	193,95	70,95	36,58
863E07	210,38	77,51	36,84
863E08	185,81	64,10	34,50
863E09	187,90	66,88	35,60
863E10	187,68	67,33	35,87
863E11	179,33	67,51	37,65
863E12	185,7	72,99	39,30
863E13	200,43	70,00	34,92
863E14	208,78	77,64	37,19
863E15	185,21	65,03	35,11

mg/Tablette	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
%	64,10	77,64	69,52
	34,27	39,30	36,30

Tab. 6-17: „488 Spatz“; Wirkstoff: MDMA.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
488S01	226,68	72,73	32,08
488S02	235,88	71,66	30,38
488S03	235,90	74,49	31,58
488S04	236,42	78,21	33,08
488S05	238,90	74,67	31,26
488S06	238,65	72,74	30,48
488S07	241,75	73,98	30,60
488S08	240,64	73,61	30,59
488S09	238,13	75,99	31,91
488S10	237,66	70,95	29,85
488S11	240,06	74,47	31,02
488S12	239,95	80,55	33,57
488S13	238,14	72,97	30,64
488S14	237,78	79,86	33,59
488S15	238,61	73,25	30,70

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	70,95	80,55	74,67
%	29,85	33,59	31,42

Tab. 6-18: „862 Schmetterling“; Wirkstoff: MDMA.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
862S01	241,06	87,13	36,14
862S02	206,34	75,07	36,38
862S03	193,64	71,37	36,86
862S04	199,64	72,80	36,47
862S05	201,40	69,07	34,29
862S06	242,40	88,54	36,53
862S07	202,43	74,67	36,89
862S08	192,12	71,19	37,06
862S09	202,03	69,39	34,35
862S10	198,81	68,36	34,38
862S11	194,02	72,28	37,25
862S12	209,63	75,03	35,79
862S13	209,42	77,98	37,24
862S14	208,78	79,60	38,13
862S15	237,55	85,74	36,10

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	68,36	88,54	75,88
%	34,29	38,13	36,26

Tab. 6-19: „969 X-files“; Wirkstoff: Amphetamin.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
969X01	270,38	25,43	9,40
969X02	276,49	25,04	9,06
969X03	282,64	31,79	11,25
969X04	273,29	22,33	8,17
969X05	292,64	24,17	8,26
969X06	276,73	21,78	7,87
969X07	275,26	24,62	8,94
969X08	273,66	23,60	8,62
969X09	261,56	19,99	7,64
969X10	266,80	26,91	10,09
969X11	266,48	31,13	11,68
969X12	272,19	19,65	7,22
969X13	279,13	27,82	9,97
969X14	278,73	25,98	9,32
969X15	270,66	21,40	7,90

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	19,65	31,79	24,78
%	7,22	11,68	9,03

Tab. 6-20: „461 Bundesadler“; Wirkstoff: MBDB.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
461B01	240,93	76,23	31,64
461B02	232,20	73,54	31,67
461B03	221,09	68,95	31,19
461B04	233,15	74,78	32,07
461B05	235,04	75,81	32,26
461B06	230,31	70,12	30,45
461B07	239,63	74,19	30,96
461B08	225,70	71,48	31,67
461B09	224,19	72,33	32,26
461B10	228,99	73,62	32,15
461B11	248,19	77,95	31,41
461B12	233,91	73,84	31,57
461B13	237,25	76,74	32,35
461B14	222,11	71,47	32,18
461B15	250,61	81,38	32,47

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	68,95	81,38	74,16
%	30,45	32,47	31,75

Tab. 6-21: „491 Elephant“; Wirkstoff: MDMA.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
491E01	299,37	67,65	22,60
491E02	292,05	66,61	22,81
491E03	284,03	72,13	25,40
491E04	273,53	54,54	19,94
491E05	308,78	76,63	24,82
491E06	294,87	68,11	23,10
491E07	290,70	71,17	24,48
491E08	280,38	62,66	22,35
491E09	282,03	70,99	25,17
491E10	301,33	66,39	22,03
491E11	287,85	73,10	25,40
491E12	287,93	62,53	21,72
491E13	284,61	62,11	21,82
491E14	278,33	66,13	23,76
491E15	279,15	68,34	24,48

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	54,54	76,63	67,27
%	19,94	25,40	23,32

Tab. 6-22: „162 Pitbull“; Wirkstoff: MDE.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
162P01	223,25	57,48	25,75
162P02	220,84	56,65	25,65
162P03	219,56	56,66	25,80
162P04	225,64	60,52	26,82
162P05	221,49	58,33	26,33
162P06	215,28	56,68	26,33
162P07	221,95	60,12	27,09
162P08	216,31	59,55	27,53
162P09	216,69	54,74	25,26
162P10	218,57	56,30	25,76
162P11	221,08	56,92	25,74
162P12	221,50	57,26	25,85
162P13	219,68	58,27	26,52
162P14	218,42	57,34	26,25
162P15	220,74	57,91	26,24

	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
mg/Tablette	54,74	60,52	57,65
%	25,26	27,53	26,20

Tab. 6-23: „262 Bad Boy“; Wirkstoff: MDE.

Tabl.Ch. + Nr.	Gewicht (mg)	Analyt je Tablette (mg)	Analyt je Tablette (%)
262B01	253,78	85,04	33,51
262B02	255,48	74,31	29,09
262B03	240,65	69,49	28,88
262B04	253,35	66,79	26,36
262B05	256,49	70,55	27,51
262B06	252,69	63,92	25,30
262B07	252,33	72,64	28,79
262B08	250,45	71,46	28,53
262B09	250,92	83,65	33,34
262B10	245,70	70,54	28,71
262B11	251,74	85,89	34,12
262B12	246,31	82,56	33,52
262B13	247,67	63,47	25,63
262B14	241,90	68,38	28,27
262B15	246,79	69,28	28,07

mg/Tablette	Minimalwert	Maximalwert	Mittelwert
%	63,47	85,89	73,20
	25,30	34,12	29,31

6.2 NIR-Spektroskopie

6.2.1 Spektrometer

Alle spektroskopischen Untersuchungen im NIR-Bereich der Tabletten und Pulver wurden auf einem Foss NIRSystems Modell 6500 Spektrometer (Foss NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA) durchgeführt. Die Messung der Tabletten und Pulver in diffuser Reflexion erfolgte mittels eines Direct Contact Analyzer Aufsatzes. Für die Transmissionsmessung der Tabletten wurde eine InTact Tablet Analyzers benutzt. In beiden Fällen wird das Licht mit einer Breitband-Quarz-Halogenlampe erzeugt. Das so erhaltene polychromatische Licht wird durch ein holographisches Gitter in monochromatisches Licht zerlegt. Bei der Messung in diffuser Reflexion tritt das Licht durch einen Austrittsspalt und ein Messfenster auf die Probe. Im Falle der Tabletten wurde diese direkt auf dem Messfenster positioniert. Im Falle der Pulvermessungen befanden sich diese in einem Probengefäß. Die von der Probe reflektierte Strahlung wird mittels vierer, in 45° Winkel zum anregenden Strahl angeordneter, Bleisulfiddetektoren erfasst. Der Messbereich beträgt hierbei 1100 – 2500 nm. Bei der Messung in Transmission wird wegen der größeren Eindringtiefe der energiereicheren kurzwelligeren Strahlung ein Wellenlängenbereich von 600 – 1900 nm detektiert. Das durch die Probe gestrahlte Licht wird in direkter Linie hinter der Probe durch einen Indium-Gallium-Arsenid-Detektor detektiert. Die Detektoren unterscheiden sich hinsichtlich Arbeitsbereich und Sensitivität [108]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Absorptionen in allen Spektren über die Datentransformation $\log 1/R$ bzw. $\log 1/T$ ermittelt.

6.2.2 Gerätequalifizierung

Im Europäischen Arzneibuch wird eine Reihe von Überprüfungen zur Kontrolle der Leistungsfähigkeit eines NIR-Spektrometers erwähnt [48]. Aufgeführt sind eine Kontrolle der Wellenlängenskala, Wiederholpräzision der Wellenlängen, die Messwert-Wiederholpräzision und das Spektrometerrauschen.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor jeder Messreihe die Gerätespezifikation überprüft. Die Messungen erfolgten in den jeweiligen Detektionsbereichen der

unterschiedlichen Messmethoden (vgl. Tab. 6-24). Als Referenz diene bei Messung in diffuser Reflexion und bei Transmissionsmessung der geräteimplementierte interne Polystyrol-Standard.

Tab. 6-24: Gerätespezifikation des NIR-Spektromters.

Kenngroße	Spezifikation
Spektrale Bandbreite	Reflexion: 10 nm, ± 1 nm Transmission: 9,5nm, ± 1 nm
Wellenlängengenauigkeit -reproduzierbarkeit	$\pm 0,3$ nm $\pm 0,010$ nm
Rauschen: <i>Peak-to-Peak</i> <i>Root Mean Square Average</i>	Transmission: < 0,500 mAu Reflexion: < 0,400 mAu Transmission: < 0,025 mAu Reflexion: < 0,040 mAu

◆ Spektrale Bandbreite

Die spektrale Bandbreite wird aus zehn aufeinanderfolgenden Messungen der Referenzsubstanz bestimmt. Es handelt sich hierbei um den Wellenlängenbereich, der bei 50 % der Peakhöhe bestimmt wird.

◆ Wellenlängengenauigkeit und –reproduzierbarkeit

Der Polystyrol-Standard wird zehnmal mit 32 scans aufgenommen. Die Genauigkeit der Wellenlängenskala kann aufgrund der charakteristischen Signale bei 1144, 1681, 2167 und 2306 nm untersucht werden (Reflexion). Die Nulldurchgänge der 1. Ableitung der Spektren ermöglichen als Indiz für die Maxima eine genaue Peakzuordnung. Der Standard der Transmissionsmessung prüft bei den Wellenlängen 804, 878, 1144 und 1681 nm.

Ebenso werden diese charakteristischen Banden der Referenzstandards durch Berechnung der Abweichung von 10 aufeinanderfolgenden Messungen zur Überprüfung der Wellenlängenreproduzierbarkeit herangezogen.

◆ Spektrometer Rauschen

Aus 20 Spektren (jeweils Mittelung aus 32 scans) des Referenzstandards wird durch Differenzbildung das Rauschen ermittelt. Die hierbei ermittelten Kenngroßen sind das *Peak-To-Peak* Rauschen (Differenz zwischen dem niedrigsten

Peakminimum und dem höchsten Peakmaximum) und der *Root Mean Square Average* (RMS, Quadratwurzel des Rauschens über das gesamte Spektrum).

◆ Sonstige Prüfungen

Bestimmte Bauteile des Spektrometers (Ventilator, Lampe, etc.) werden in einem weiteren Test auf ihre Funktionstüchtigkeit hin untersucht.

6.2.3 Spektrenaufnahme

Alle NIR-Spektren wurden in den oben beschriebenen Bereichen mit einer Auflösung von 2 nm aufgenommen. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verringern, also zufällige Fehler bei der Messung zu minimieren, wurde jedes Spektrum als Mittelwertsspektrum von 32 Einzelscans berechnet. Die Referenzierung der Spektren erfolgte bei Messung in diffuser Reflektion mittels eines im Gerät implementierten hochreflektierenden weißen Keramikstandards. Bei der Messung in Transmission diente Luft als Referenz.

Um bei der Spektrenaufnahme möglichst viele Parameter der Probenpräsentation zu berücksichtigen (z.B. Unterschiede in der Oberfläche und damit unterschiedliches Reflexionsverhalten, Unterschiede im Glasvial), wurde jede Tablettenprobe nach Lageveränderung auf der Messplatte je zwei mal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf der Vorder- und Rückseite vermessen (4 Spektren pro Tablette). Bei der Pulvermessung wurden die Packungsdichte über zwei Messungen durch umschütteln der Probengefäße variiert. Alle Spektren gingen in die Berechnungen ein.

6.3 Hardware

Das Foss NIRSystems Modell 6500 Spektrometer wurde über einen Personal Computer Pentiumprozessor I (75 MHz / 64 MB RAM) gesteuert. Die Auswertung der Daten erfolgte auf einem Personal Computer (Pentium II; 300 MHz / 128 MB RAM). Das verwandte Betriebssystem war auf beiden Rechnersystemen Windows 95 ®.

6.4 Software

6.4.1 VISION

Die Software „VISION[®]“ Version 2.21 (Foss NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA) ist die Steuer- und Auswertesoftware der Foss NIRSystems Spektrometer. Sie dient zur Steuerung der Systemeignungstests, der Datenaufnahme und Verwaltung der produzierten Daten. Neben den Möglichkeiten der Datenvorbehandlung (Spektrenglättung, SNV, Derivativspektren), ermöglicht die Software eine Erstellung und Validierung von Identifikationsbibliotheken zur Routineanalytik auf der Basis von NIR-Spektren. Ebenso lassen sich Quantifizierungsmodelle mit Hilfe von PLS-1 oder PLS-2 Algorithmen generieren und validieren. Die Software benötigt die Betriebssysteme Windows 9X oder WinNT. Sie wurde zur Datenaufnahme und Durchführung der Systemeignungstests, sowie zur Generierung der SNV-normalisierten Spektren mit nachfolgendem Export in Microsoft Excel herangezogen.

6.4.2 The Unscrambler

Die Software „The Unscrambler[®]“ Version 7.01 (CAMO AS, Trondheim, Norwegen) stellt ein Programm-Paket zur multivariaten Datenanalyse dar. Es enthält Berechnungsmodule zur Mustererkennung (PCA, SIMCA, ANOVA) und quantitativen Datenauswertung (MLR, PCR, PLS-1, PLS-2). Datenvorbehandlungen wie Glättungen, Normalisierungen und Derivativspektren, sowie die Möglichkeit mathematische Transformationen anzuwenden, stehen in diesem Programmpaket zur Verfügung. Der Datenaustausch zwischen der „VISION[®]“ Software und „The Unscrambler[®]“ erfolgte über den NSAS Import- und Exportfilter sowie indirekt über den Umweg des Exports der normalisierten Daten aus Vision in Microsoft Excel und den Import aus Excel in „The Unscrambler[®]“. Als mögliche Betriebssysteme kommen Windows 9X, 2000 oder WinNT in Frage. Alle spektralen Bearbeitungen und die Erstellung der Identifikations- und Quantifizierungsmodelle erfolgte mit „The Unscrambler[®]“.

6.5 Identifizierungsmodelle

6.5.1 Zusammensetzung des Datensatzes

Der Datensatz, der zur Erstellung der Identifikationsmodelle herangezogen wurde, bestand aus insgesamt 352 Ecstasy-Tabletten mit einer Unterteilung in 43 Chargen, d. h. 43 unterschiedliche Tablettengruppen mit verschiedenen äußerlichen Merkmalen oder Prägemustern. Alle Tabletten stammten aus Sicherstellungen des Bundeskriminalamts Wiesbaden (BKA), das auch die Identifizierung der Inhaltsstoffe als Referenzdaten für die Modellerstellung zur Verfügung stellte. Jede Tablette wurde in Zweifachmessung mittels Transmission im NIR aufgenommen (je einmal Vorder- und Rückseite). Der Datensatz setzte sich zusammen aus 148 Spektren amphetaminhaltiger Proben, 42 MBDB-, 120 MDE- und 394 MDMA-Spektren. In Tab. 6-25 sind die intern vergebenen Referenznummern, das jeweilige Prägemotiv und die Inhaltsstoffe zusammengestellt.

Tab. 6-25: Aufstellung der für die Identifikationsmodelle benutzen Ecstasy-Tabletten.

Referenznummer	Motiv	Inhaltsstoff	Referenznummer	Motiv	Inhaltsstoff
488	Spatz	MDMA	863	e	MDMA
491	Elephant	MDMA	865	Herz	MDMA
863	e	MDMA	463	Bundesadler	MBDB
862	Schmetterling	MDMA	629	Spatz	Amfet
1238	CalvinKlein	MDMA	214	Cappies	Amfet
162	Pitbull	MDE	676	Musiknote	Amfet
262	BadBoy	MDE	678	Ring	Amfet
461	Bundesadler	MBDB	740	Nike	Amfet
969	X-Files	Amfet	785	Sonne; rot	Amfet
286	love	MDMA	786	Schlumpf	Amfet
377	Asterix	MDMA	792	Ferrari	Amfet
435	Simba	MDMA	97	X-Files	Amfet
488	Spatz;grün	MDMA	117	Herz	MDE
490	Krone	MDMA	173	Mario	MDE
491	Elephant	MDMA	174	Luigi	MDE
492	Herz	MDMA	216	Halbmond	MDE

Referenznummer	Motiv	Inhaltsstoff	Referenznummer	Motiv	Inhaltsstoff
498	Luigi	MDMA	232	Elephant	MDE
507	Obelix	MDMA	262	BadBoy	MDE
679	Elephant	MDMA	244	125MA	MDMA
685	Tasman	MDMA	306	Donald Duck	MDMA
687	Rolling	MDMA	880	Mitsubishi	MDMA
862	Schmetterling	MDMA			

6.5.2 Korrelationsparameter der Identifizierungsmodelle

Tab. 6-26: Parameter der Modelle aus der Berechnung mittels Rohspektren ohne Wellenlängenauswahl (PLS-2).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	10	10	10	10
Steigung	0,7486	0,8006	0,6746	0,2755
y-Achsenabschnitt	0,0529	0,1116	0,0555	0,0432
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,8652	0,8948	0,8214	0,5249
RMSEC (%)	0,2043	0,2217	0,2145	0,2016
RMSEP (%)	0,2119	0,2300	0,2200	0,2049
Bias	-4,268•10 ⁻⁸	8,064•10 ⁻⁸	-7,028•10 ⁻⁸	2,574•10 ⁻⁹

Tab. 6-27: Parameter der Modelle aus der Berechnung mittels Rohspektren mit Wellenlängenauswahl von 800 bis 1400 nm (PLS-2).

	Amphetamin	MDMA	MDE	MBDB
Hauptkomponentenzahl	10	10	10	10
Steigung	0,7107	0,8306	0,7995	0,7209
y-Achsenabschnitt	0,0608	0,0948	0,0342	0,0167
Korrelationskoeffizient (R ²)	0,8430	0,9114	0,8942	0,8490
RMSEC (%)	0,2192	0,2043	0,1684	0,1251
RMSEP (%)	0,2277	0,2130	0,1720	0,1291
Bias	-4,606•10 ⁻⁸	-4,026•10 ⁻⁸	-2,666•10 ⁻⁸	7,959•10 ⁻⁸

6.6 Quantifizierungsmodelle

6.6.1 Vorbemerkungen

Bei der Erstellung eines quantitativen Modells in der NIR bilden alle Schritte der Methodenentwicklung die Basis für eine spätere Diskussion der Daten. Wegen der schlechten Trennbarkeit der Entwicklung und Diskussion der Daten, wird in diesem Abschnitt der experimentellen Daten nur auf einen Teil der Informationen eingegangen, die zur Reproduktion des Versuches nötig sind. Für detaillierte Informationen wird auf den Ergebnisteil der NIR-Kalibrierung verwiesen.

6.6.2 Zusammensetzung der Datensätze

Der Datensatz zur Erstellung der verschiedenen Kalibrierungen der ungepulverten Proben bestand aus insgesamt 150 Ecstasy-Tabletten. 90 Tabletten enthielten MDMA, 30 MDE und jeweils 15 Amphetamin oder MBDB. Jede Probe wurde zur Erhöhung der Variabilität der Datensätze von der Vorder- und Rückseite vermessen. Eine Wiederholungsmessung wurde am folgenden Tag durchgeführt. Insgesamt bestand der Datensatz somit aus 600 Spektren. Für die Messung der Pulver wurden die verriebenen Tabletten der MDMA und MDE Chargen genutzt. Jede Probe wurde zweimal vermessen, wodurch der Datensatz für die Pulvermessung eine Größe von 240 Spektren erreichte. Der Gehalt der jeweiligen Substanz der unterschiedlichen Tabletten in % (m/m) wurde über die HPLC-Analytik ermittelt.

6.6.3 Tabletten

6.6.3.1 Externes Testset

Die Validierung einer Kalibrierung in der NIR kann über mehrere Wege erfolgen. Zwei der gängigsten sind die *Full Cross Validation* (FCV) und die Validierung über ein externes Datenset (s. 3.1.5.2). Für die Durchführung einer Validierung über ein externes Set wurden nach Zufall vier der 15 Tabletten jeder Charge aus dem Datensatz zur Erstellung der Kalibrierung herausgenommen und zu einem externen Set zusammengeführt. Diese Proben wurden dann bei der externen

Validierung durch das jeweilige Modell vorhergesagt und ihre berechneten Werte mit denen der HPLC verglichen. Die mittlere Abweichung der so erhaltenen Daten gaben die Basis für die Berechnung der jeweiligen Validierungsparameter. In den folgenden Tabelle sind die Tabletten aus den einzelnen Chargen aufgeführt, die in den externen Datensätzen zusammengefasst worden waren (Tab. 6-28 - Tab. 6-31).

Tab. 6-28: Tablettennummern des externen Datensatzes für Amphetamin.

969X03	969X05	969X09	969X14
--------	--------	--------	--------

Tab. 6-29: Tablettennummern des externen Datensatzes für MBDB.

461B01	461B07	461B13	461B14
--------	--------	--------	--------

Tab. 6-30: Tablettennummern des externen Datensatzes für MDE.

162P05	162P07	162P11	162P12
262B02	262B12	262B13	262B14

Tab. 6-31: Tablettennummern des externen Datensatzes für MDMA.

488S02	488S09	488S12	488S13
491E01	491E03	491E12	491E15
862S01	862S03	862S09	862S11
863e01	863e08	863e10	863e11
1234E02	1234E05	1234E09	1234E12
1238C08	1238C05	1238C11	1238C13

6.6.3.2 Regressionsplots

Zusätzlich zu den statistischen Kenngrößen einer quantitativen Methode im NIR kann für jedes Modell ein Regressionsplot dargestellt werden. Er wird gebildet, indem die vorhergesagten Werte (Abszisse) gegen die gemessenen, also wahren Werte (Ordinate) aufgetragen werden. In den folgenden Abbildungen sind diese Korrelationsgeraden für die jeweils optimalen Modelle zur Quantifizierung der unterschiedlichen Substanzen bei Reflexions- oder Transmissionsmessung für den jeweilig berechneten Gehalt in % (m/m) dargestellt.

Regressionsplots der PLS-1 Kalibrierung aus den Messungen in diffuser Reflexion nach Wellenlängenselektion, 1/x-Transformation und 2. Ableitung:

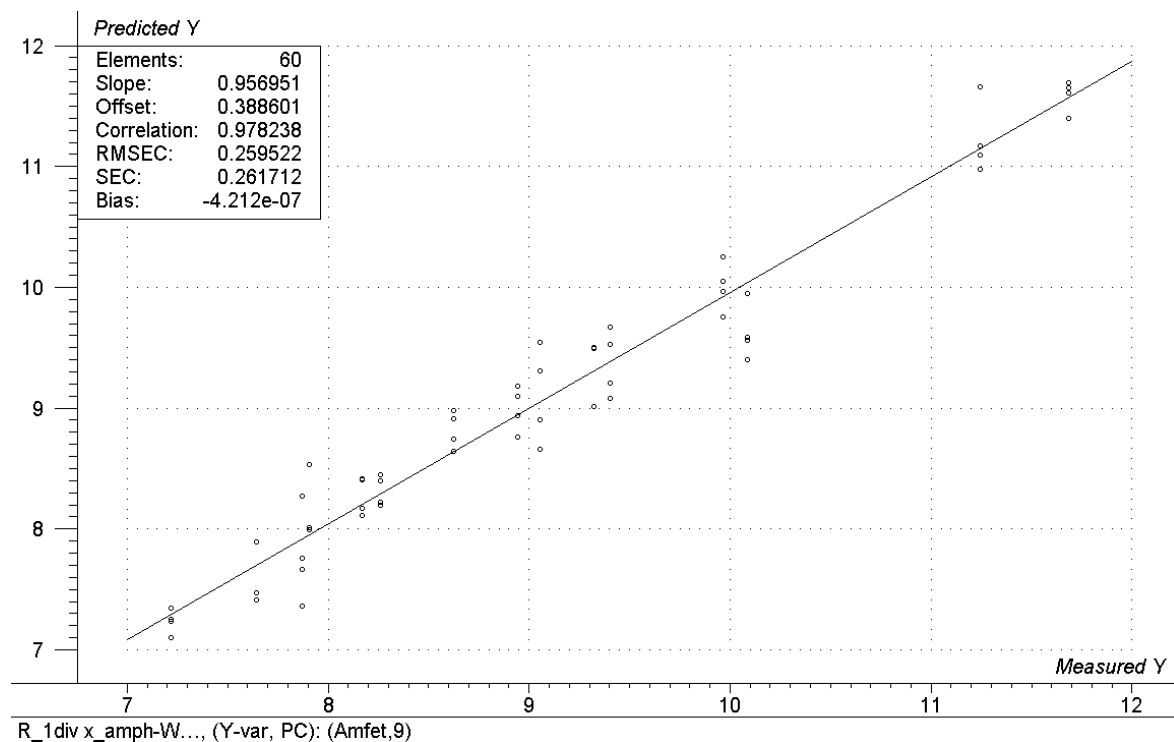


Abb. 6-9: Regressionsplot des PLS-1 Modells für Amphetamin.

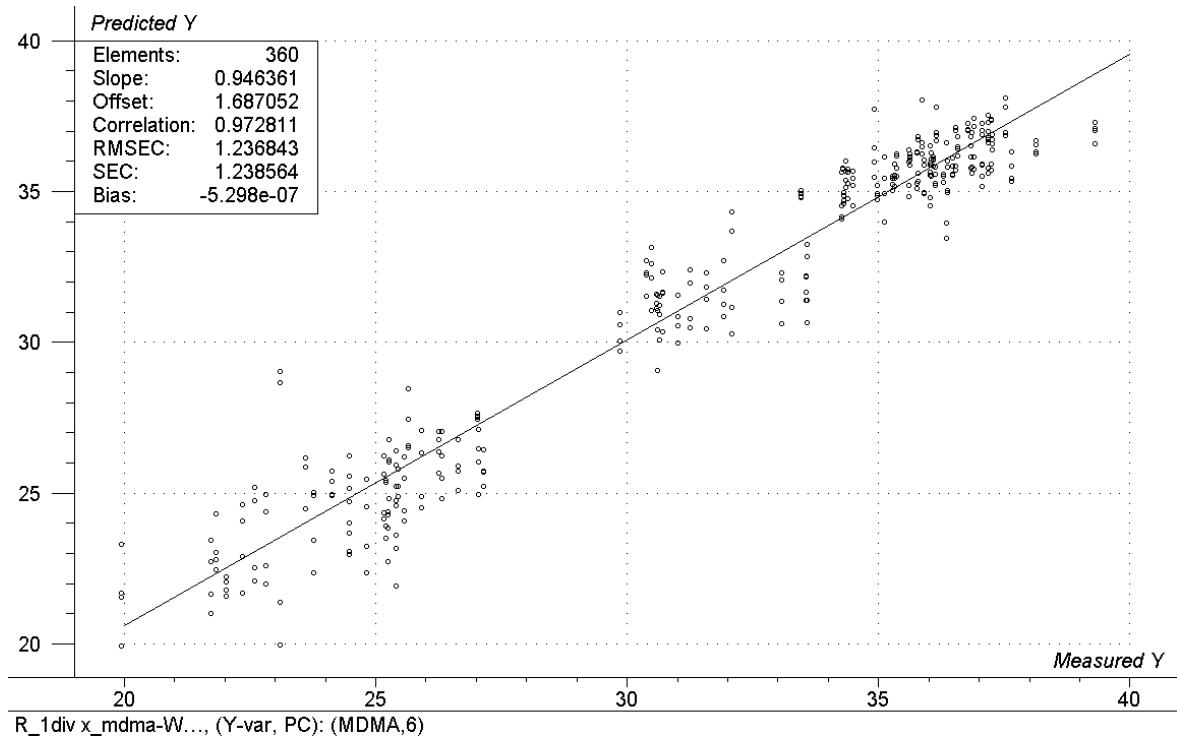


Abb. 6-10: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MDMA.

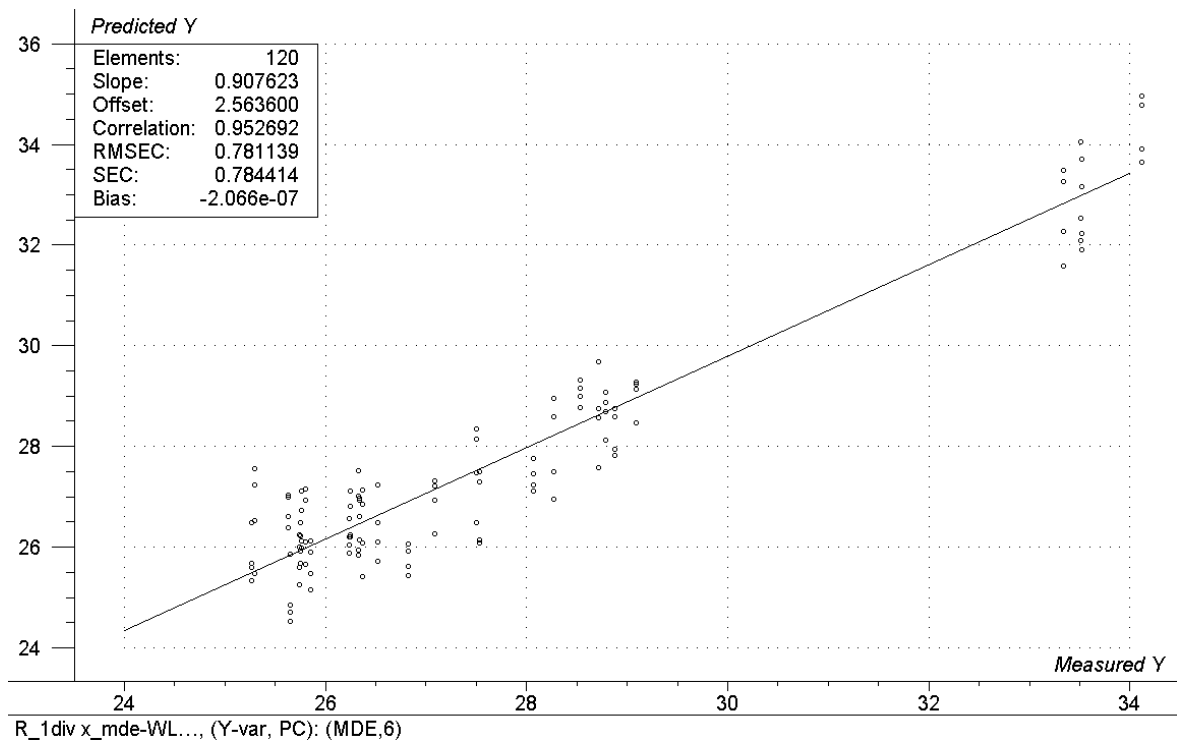


Abb. 6-11: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MDE.

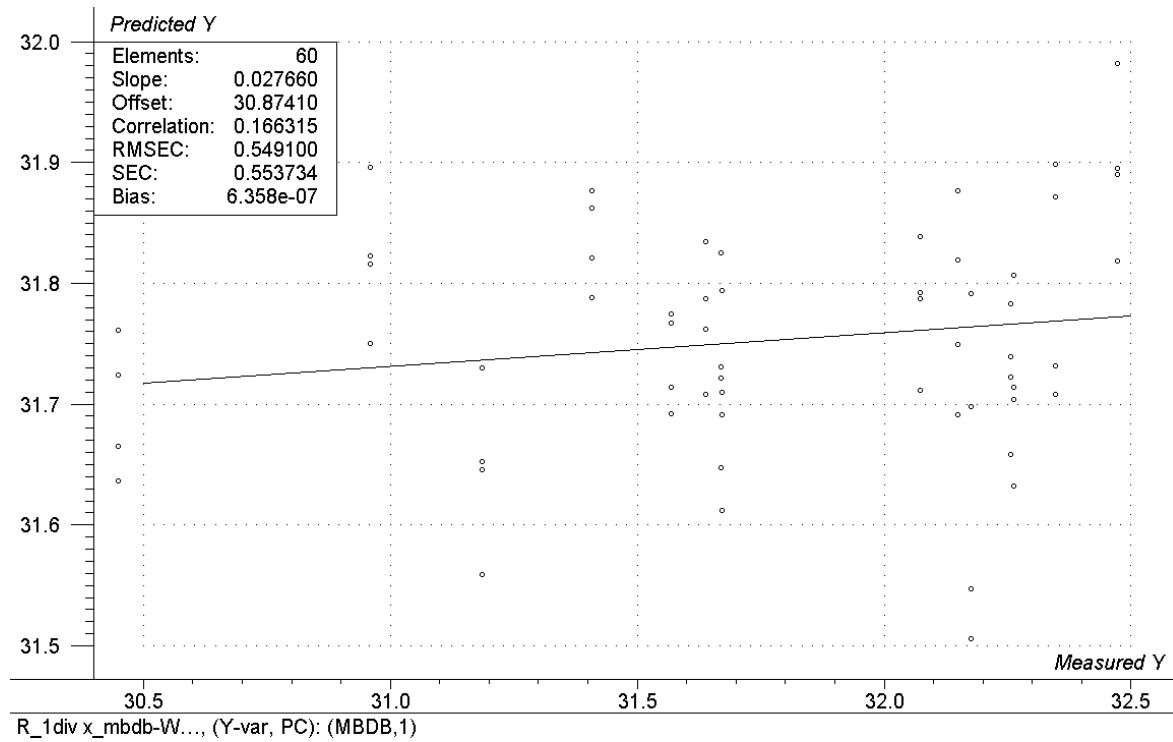


Abb. 6-12: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MBDB.

Regressionsplots der PLS-1 Kalibrierungen aus den Messungen in Transmission nach Wellenlängenselektion und 1/x-Transformation

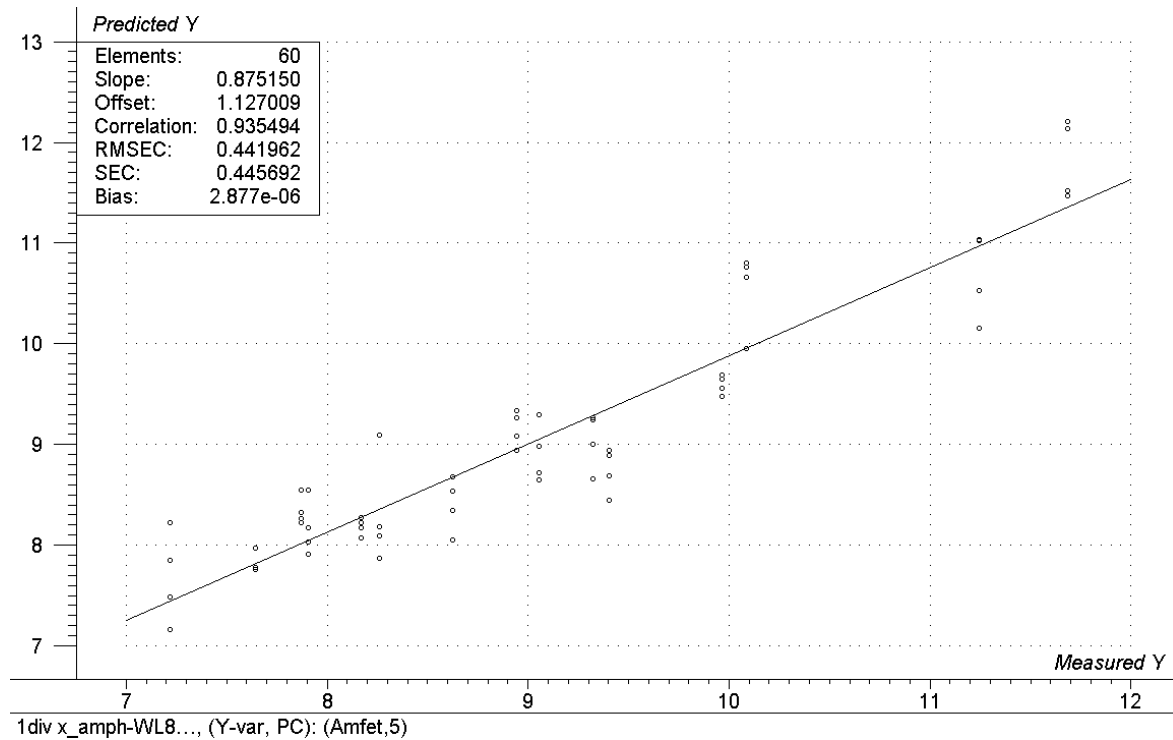


Abb. 6-13: Regressionsplot des PLS-1 Modells für Amphetamin.

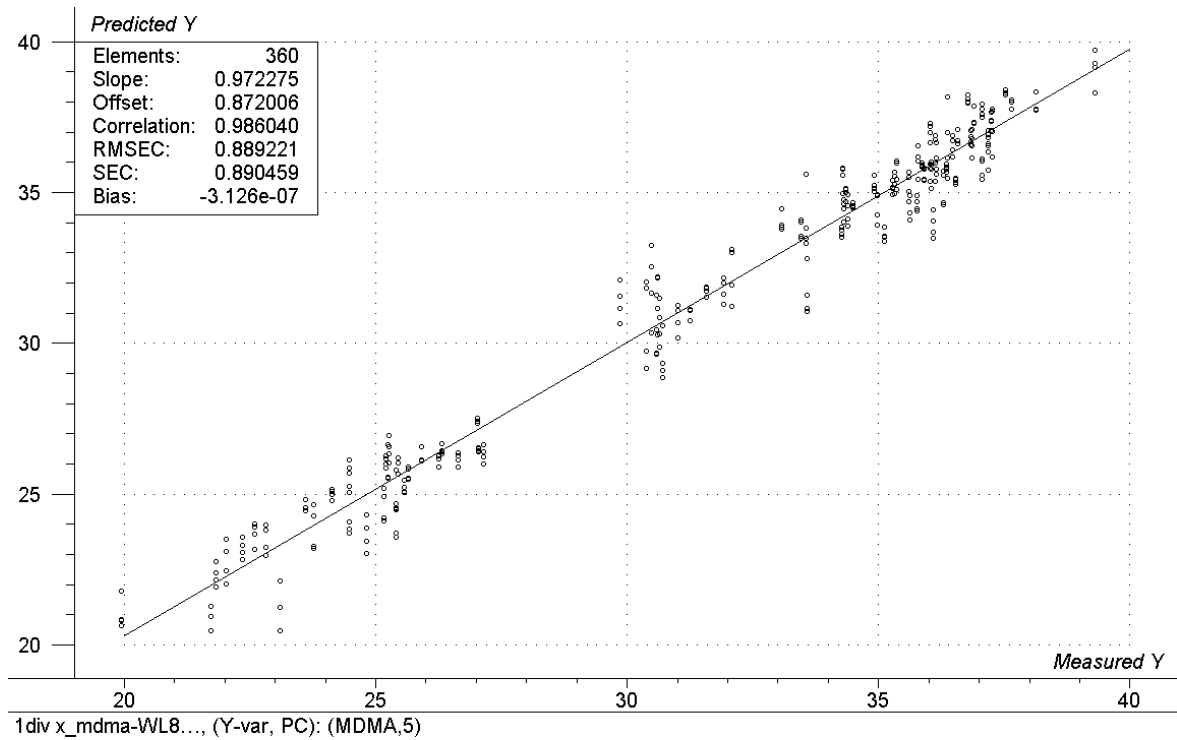


Abb. 6-14: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MDMA.

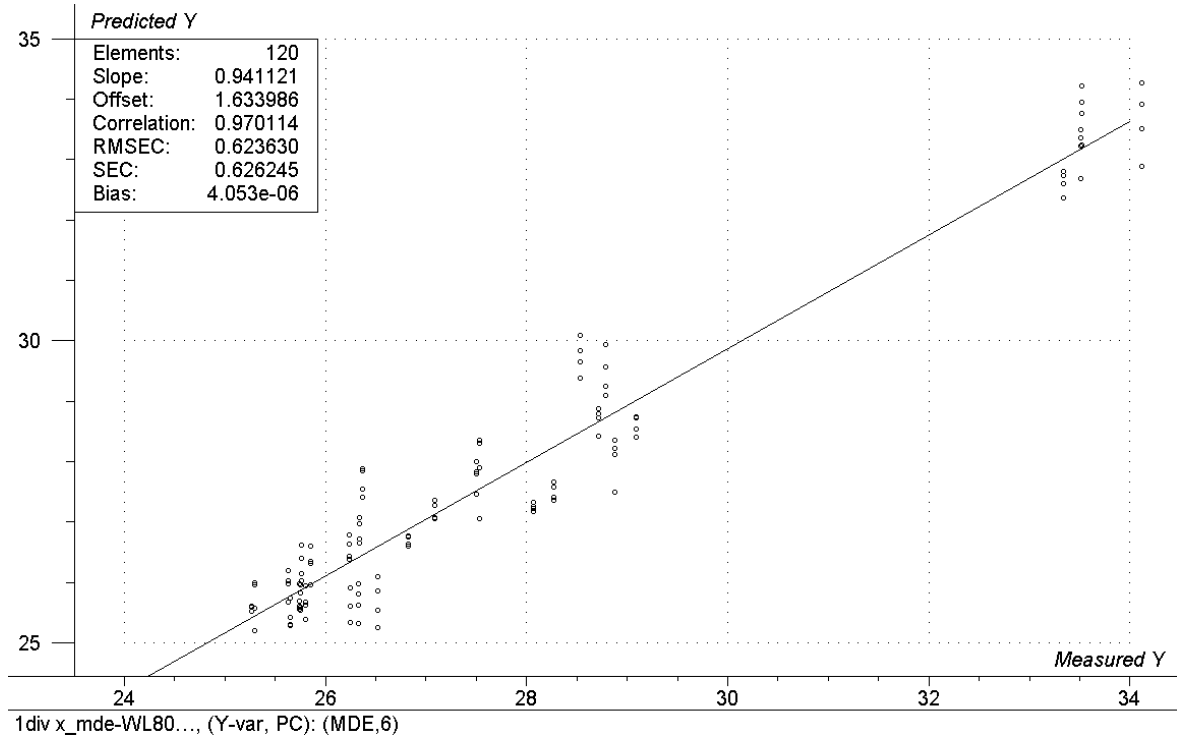


Abb. 6-15: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MDE.

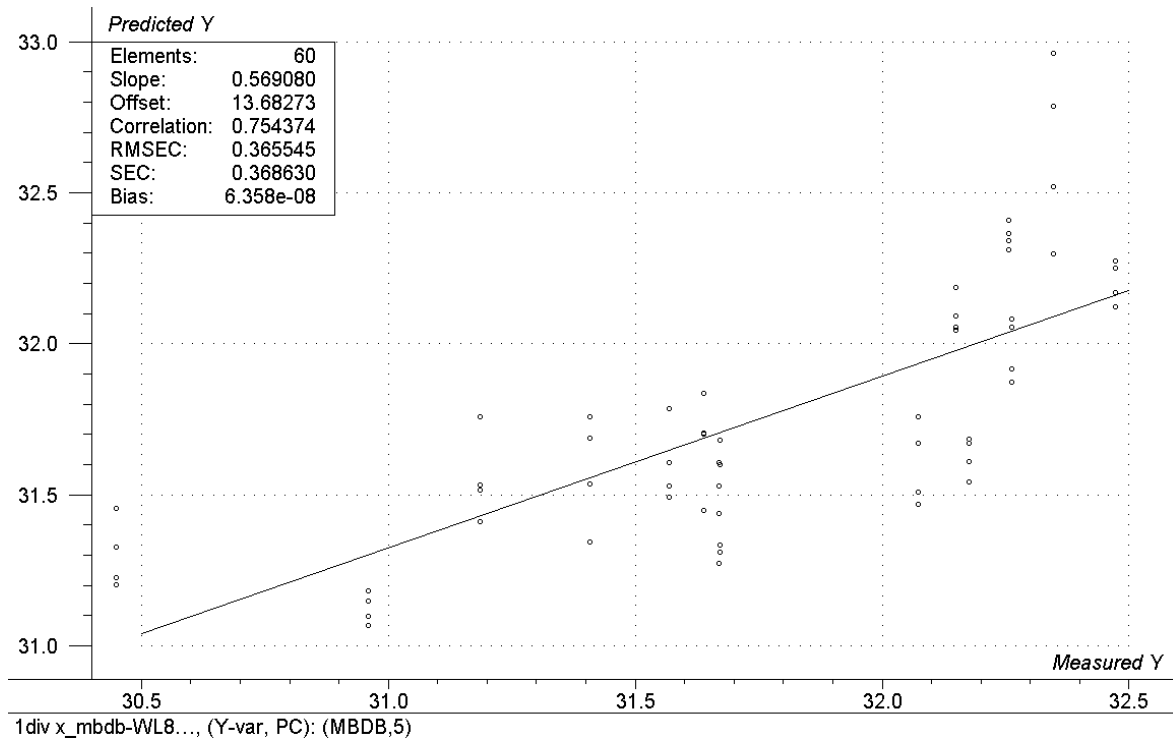


Abb. 6-16: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MBDB.

6.6.4 Gepulverte Proben

Regressionsplots der PLS-1 Kalibrierung aus den Messungen in diffuser Reflexion nach Wellenlängenselektion, $1/x$ -Transformation und 2. Ableitung:

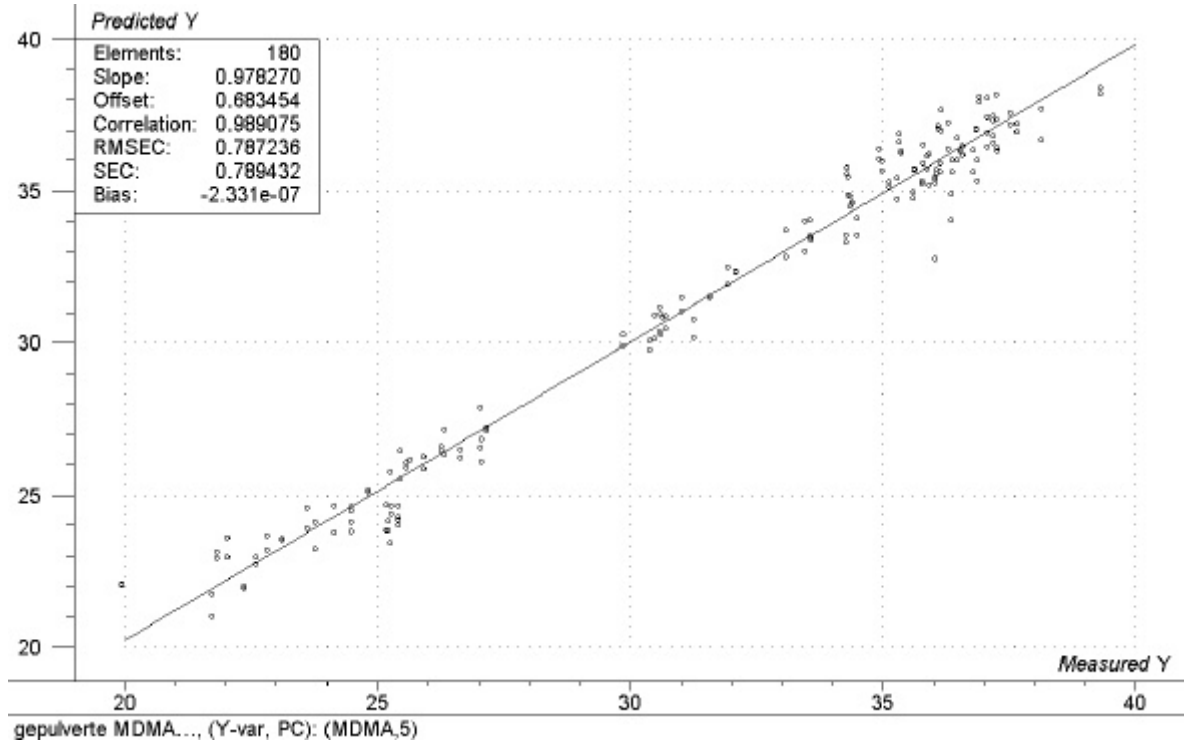


Abb. 6-17: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MDMA.

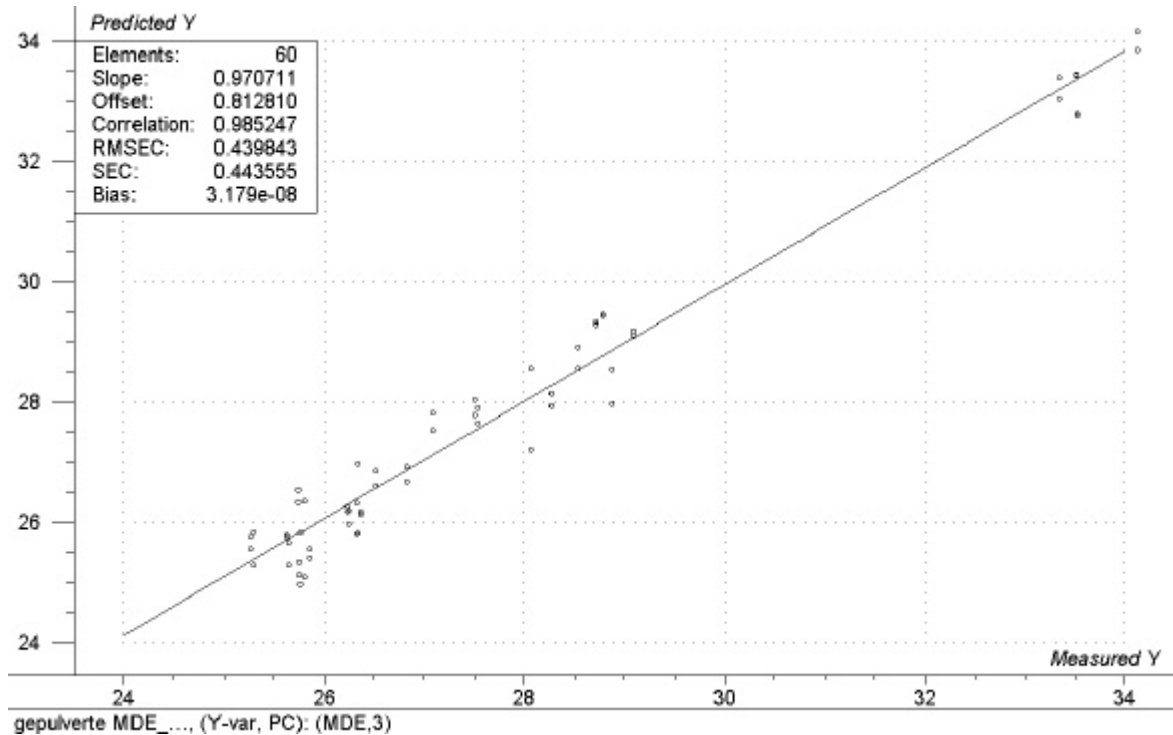


Abb. 6-18: Regressionsplot des PLS-1 Modells für MDE.

7 Anhang

7.1 Strukturformeln der verwendeten Substanzen

Die Darstellung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge ohne Berücksichtigung ihrer Salzformen.

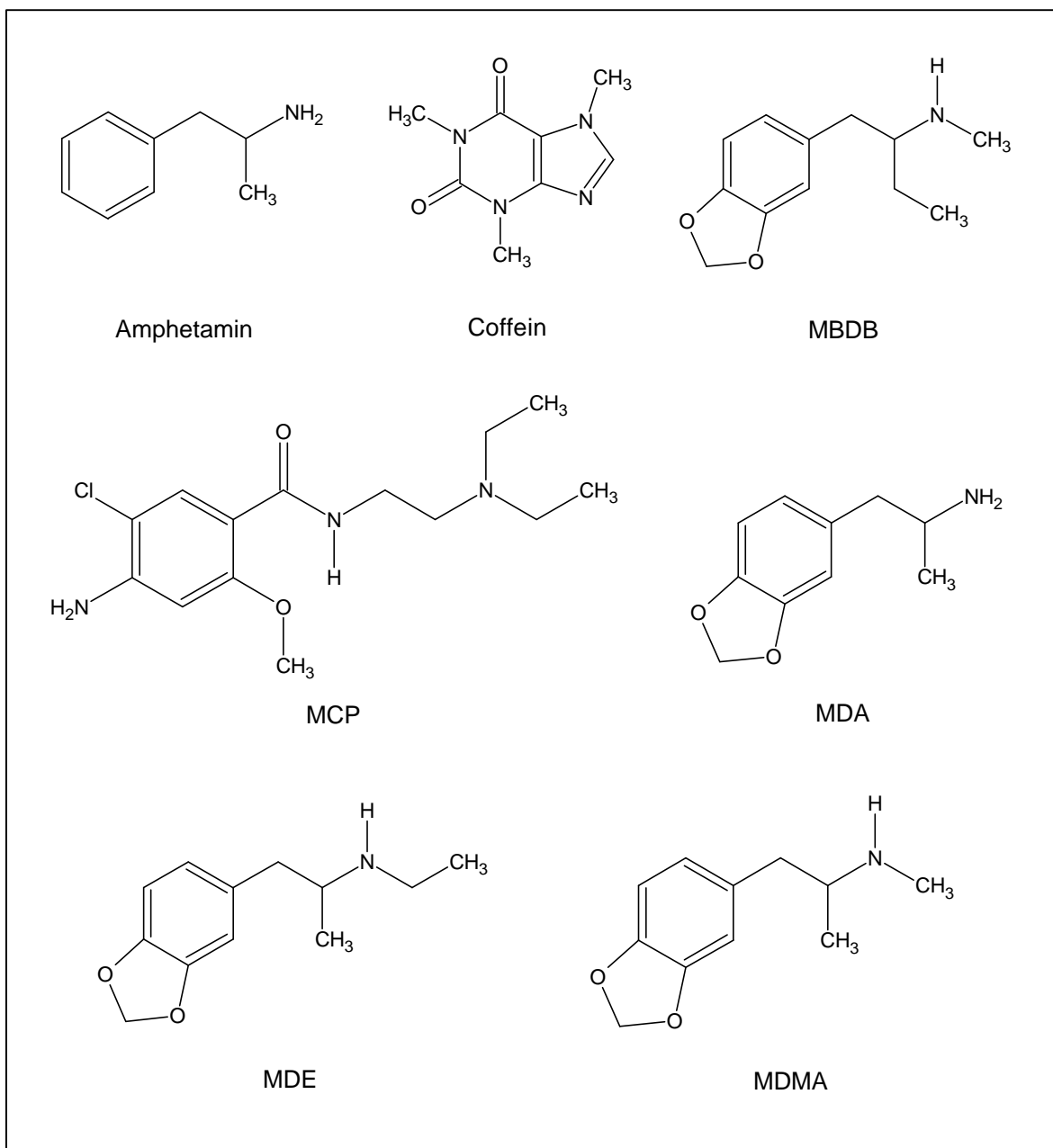


Abb. 7-1: Strukturformeln der verwendeten Substanzen

7.2 Höhe und Durchmesser der untersuchten Ecstasy-Tabletten

Die Tabellen Tab. 7-1 - Tab. 7-10 beinhalten die Höhen und Durchmesser der mit HPLC und quantitativer NIR untersuchten Ecstasy-Tabletten.

Tab. 7-1: 162 Pitbull.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
162P01	3,1	9,1
162P02	3,1	9,1
162P03	3,15	9,2
162P04	3,15	9,15
162P05	3,3	9,15
162P06	3,15	9,15
162P07	3,1	9,15
162P08	3,1	9,15
162P09	3,1	9,15
162P10	3,15	9,15
162P11	3,1	9,15
162P12	3,15	9,15
162P13	3,05	9,15
162P14	3,1	9,15
162P15	3,1	9,1

Tab. 7-2: 262 Bad Boy.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
262B01	3,85	9,15
262B02	3,85	9,1
262B03	3,65	9,15
262B04	3,8	9,15
262B05	3,85	9,2
262B06	3,8	9,15
262B07	3,85	9,15
262B08	3,8	9,15
262B09	3,85	9,15
262B10	3,75	9,2
262B11	3,85	9,15
262B12	3,8	9,2
262B13	3,75	9,15
262B14	3,75	9,15
262B15	3,8	9,15

Tab. 7-3: 461 Bundesadler.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
461B01	4,15	8,1
461B02	4,1	8,1
461B03	4,0	8,1
461B04	4,0	8,1
461B05	4,1	8,1
461B06	4,1	8,1
461B07	4,05	8,1
461B08	4,1	8,1
461B09	4,05	8,1
461B10	4,0	8,1
461B11	4,2	8,1
461B12	4,1	8,1
461B13	4,1	8,1
461B14	4,0	8,1
461B15	4,15	8,1

Tab. 7-4: 488 Spatz.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
488S01	4,05	8,35
488S02	4,1	8,3
488S03	4,1	8,35
488S04	4,1	8,3
488S05	4,05	8,3
488S06	4,1	8,35
488S07	4,15	8,3
488S08	4,05	8,3
488S09	4,15	8,3
488S10	4,05	8,4
488S11	4,1	8,35
488S12	4,1	8,3
488S13	4,05	8,35
488S14	4,1	8,3
488S15	4,05	8,35

Tab. 7-5: 491 Elephant.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
491E01	4,15	8,65
491E02	4,1	8,6
491E03	4,05	8,65
491E04	3,9	8,65
491E05	4,15	8,65
491E06	4,2	8,65
491E07	4,05	8,65
491E08	4,0	8,65
491E09	4,05	8,65
491E10	4,1	8,65
491E11	4,05	8,65
491E12	4,0	8,65
491E13	4,0	8,65
491E14	4,05	8,65
491E15	4,0	8,65

Tab. 7-6: 862 Schmetterling.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
862S01	3,9	8,3
862S02	3,45	8,3
862S03	3,25	8,3
862S04	3,45	8,3
862S05	3,45	8,3
862S06	4	8,3
862S07	3,45	8,3
862S08	3,3	8,3
862S09	3,4	8,3
862S10	3,4	8,3
862S11	3,3	8,3
862S12	3,45	8,3
862S13	3,5	8,3
862S14	3,4	8,3
862S15	3,9	8,3

Tab. 7-7: 863 „e“.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
863E01	3,15	8,2
863E02	3,1	8,2
863E03	3,05	8,2
863E04	3,1	8,2
863E05	3,3	8,2
863E06	3,2	8,2
863E07	3,5	8,2
863E08	3,1	8,2
863E09	3,1	8,2
863E10	3,1	8,2
863E11	3,1	8,2
863E12	3,1	8,2
863E13	3,35	8,2
863E14	3,4	8,2
863E15	3,05	8,2

Tab. 7-8: 969 X-Files.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
969X01	4,45	9,15
969X02	4,4	9,25
969X03	4,5	9,15
969X04	4,4	9,15
969X05	4,6	9,15
969X06	4,45	9,15
969X07	4,4	9,15
969X08	4,35	9,2
969X09	4,3	9,15
969X10	4,35	9,15
969X11	4,4	9,15
969X12	4,4	9,15
969X13	4,45	9,15
969X14	4,45	9,15
969X15	4,35	9,15

Tab. 7-9: 1234 Euro.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
1234E01	4,65	9,4
1234E02	3,6	9,3
1234E03	3,65	9,2
1234E04	3,55	9,2
1234E05	3,6	9,15
1234E06	3,65	9,25
1234E07	3,5	9,15
1234E08	3,6	9,2
1234E09	3,65	9,2
1234E10	3,85	9,4
1234E11	3,75	9,25
1234E12	3,6	9,3
1234E13	3,65	9,2
1234E14	3,7	9,25
1234E15	3,65	9,2

Tab. 7-10: 1238 Calvin Klein.

Tabl.Ch. + Nr.	Höhe (mm)	Durchmesser (mm)
1238C01	4	8,2
1238C02	4	8,2
1238C03	4	8,2
1238C04	4	8,2
1238C05	4	8,2
1238C06	4	8,2
1238C07	4	8,2
1238C08	4	8,2
1238C09	4	8,25
1238C10	4	8,2
1238C11	4	8,2
1238C12	4	8,2
1238C13	4	8,2
1238C14	4	8,2
1238C15	4	8,2

7.3 NIR-Spektren

Beispielhaft für alle NIR-Spektren sind im folgenden die Rohspektren und datentransformierten Spektren von jeweils einer Tablette eines jeden Inhaltsstoffs aufgezeigt. Alle Spektren sind Aufnahmen der Vorderseite einer Tablette, d.h. der Seite mit Prägung. Stellvertretend für die einzelnen Wirkstoffgruppen sind dies 162 „Pitbull“ 05 für MDE, 461 „Bundesadler“ 05 für MBDB, 969 „X-Files“ 05 für Amphetamin und 1238 „Calvin Klein“ 05 für MDMA.

Bei allen Spektren ist die Absorption gegen die Wellenlänge in nm aufgetragen.

7.3.1 Rohspektren

7.3.1.1 Reflexionsmessung

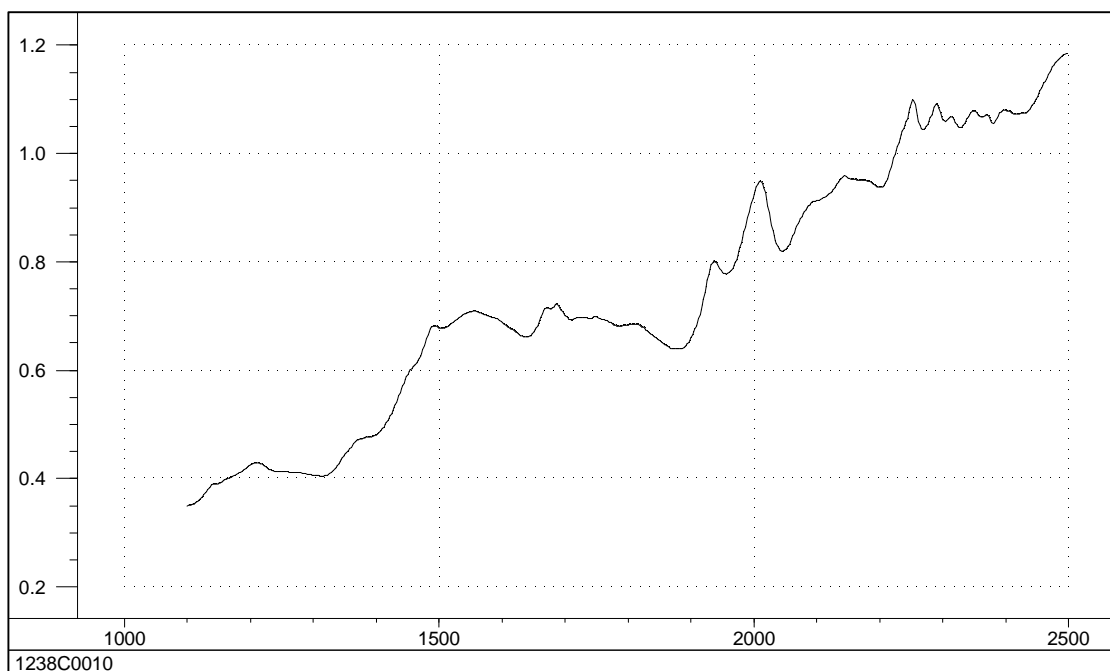


Abb. 7-2: NIR Reflexionsspektrum; 1238 Calvin Klein.

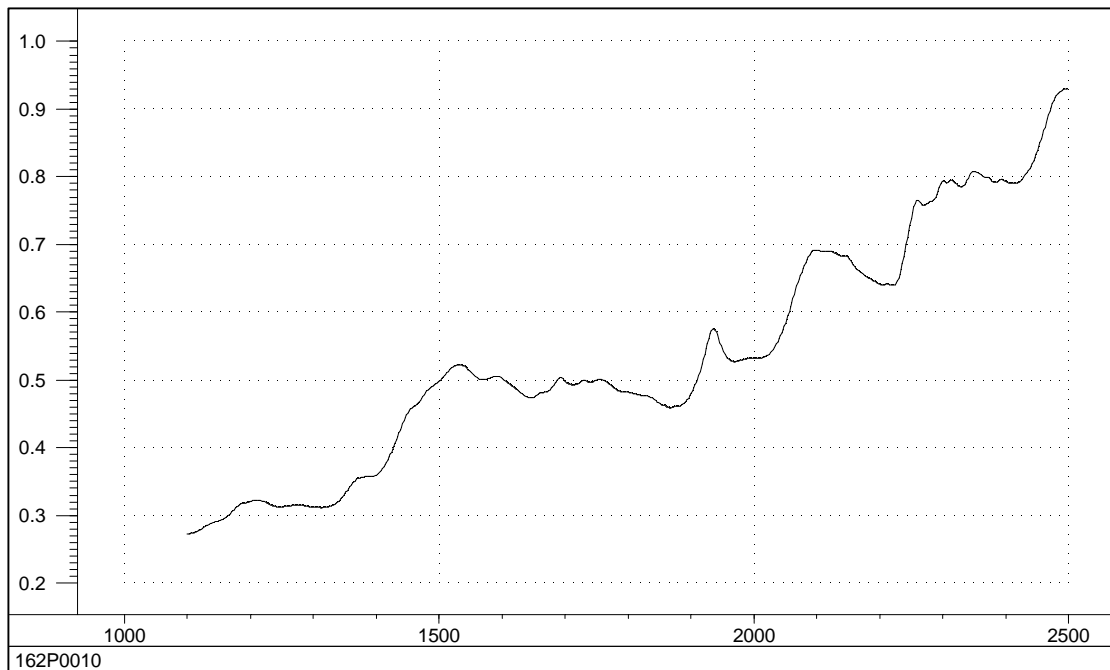


Abb. 7-3: NIR Reflexionsspektrum; 162 Pitbull.

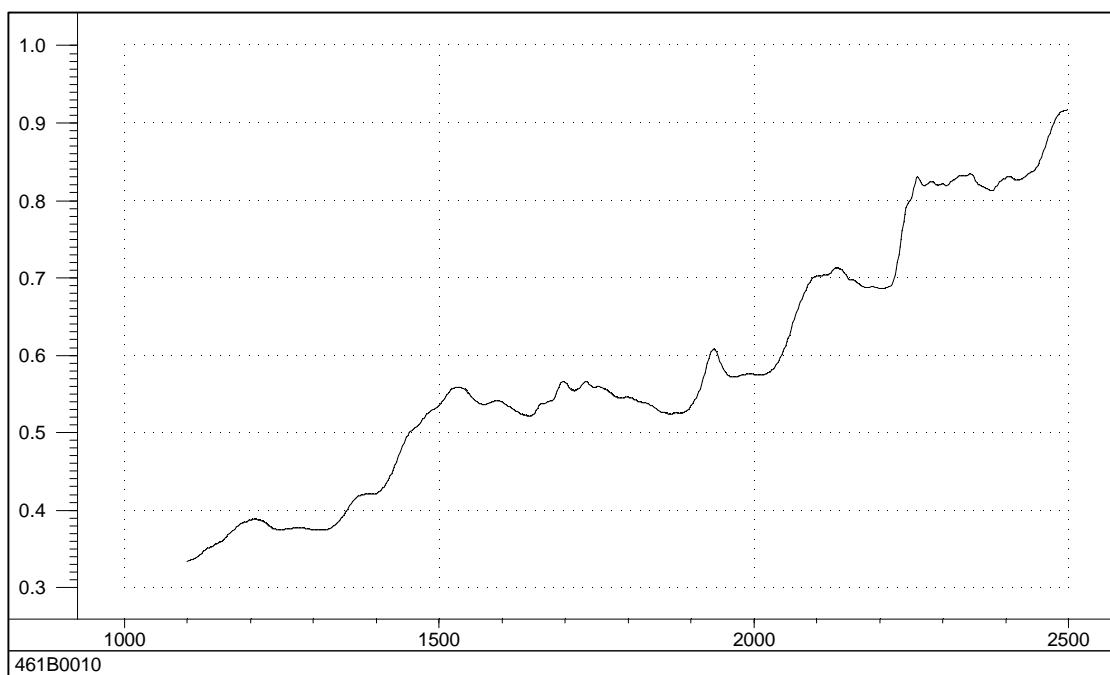


Abb. 7-4: NIR Reflexionsspektrum; 461 Bundesadler.

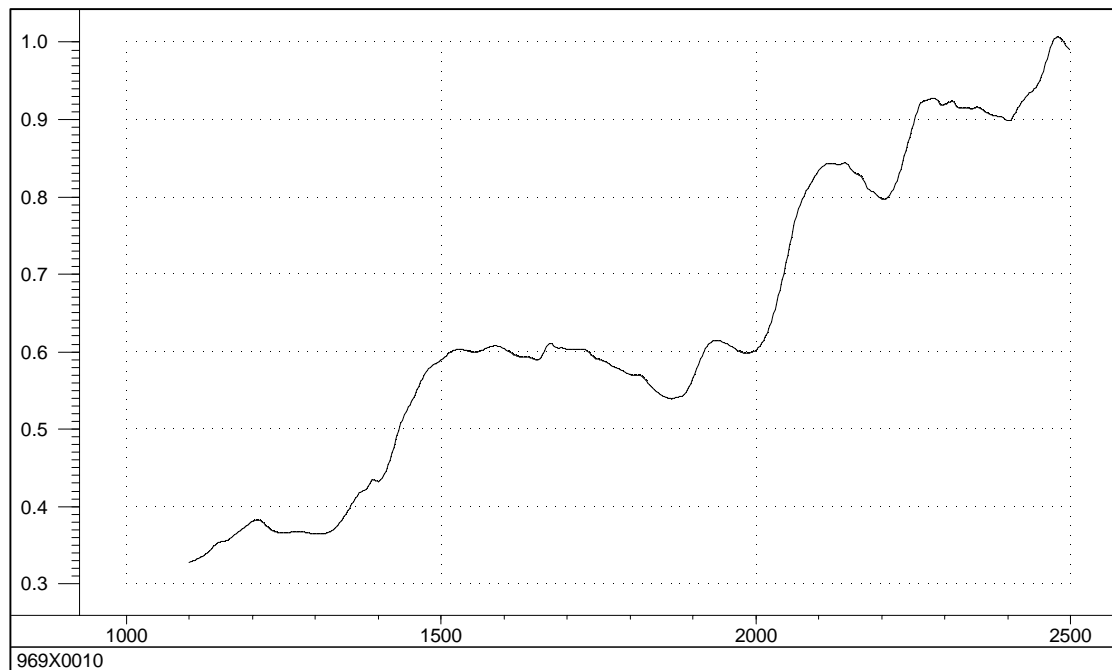


Abb. 7-5: NIR Reflexionsspektrum; 969 X-files.

7.3.1.2 Transmissionsmessung

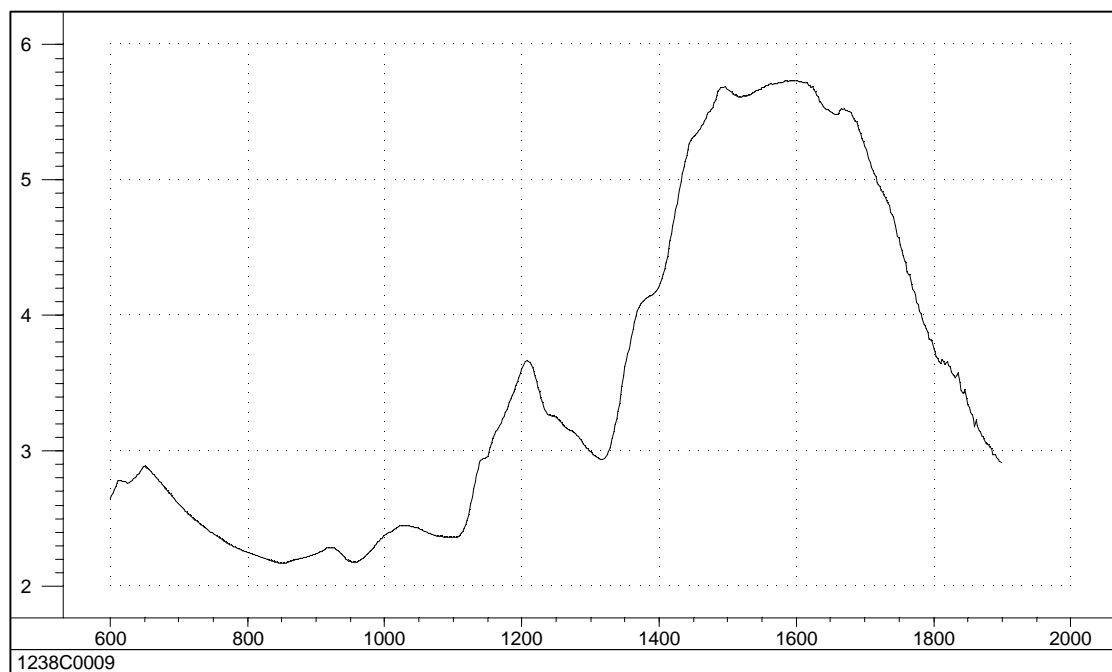


Abb. 7-6: NIR Transmissionsspektrum; 1238 Calvin Klein.

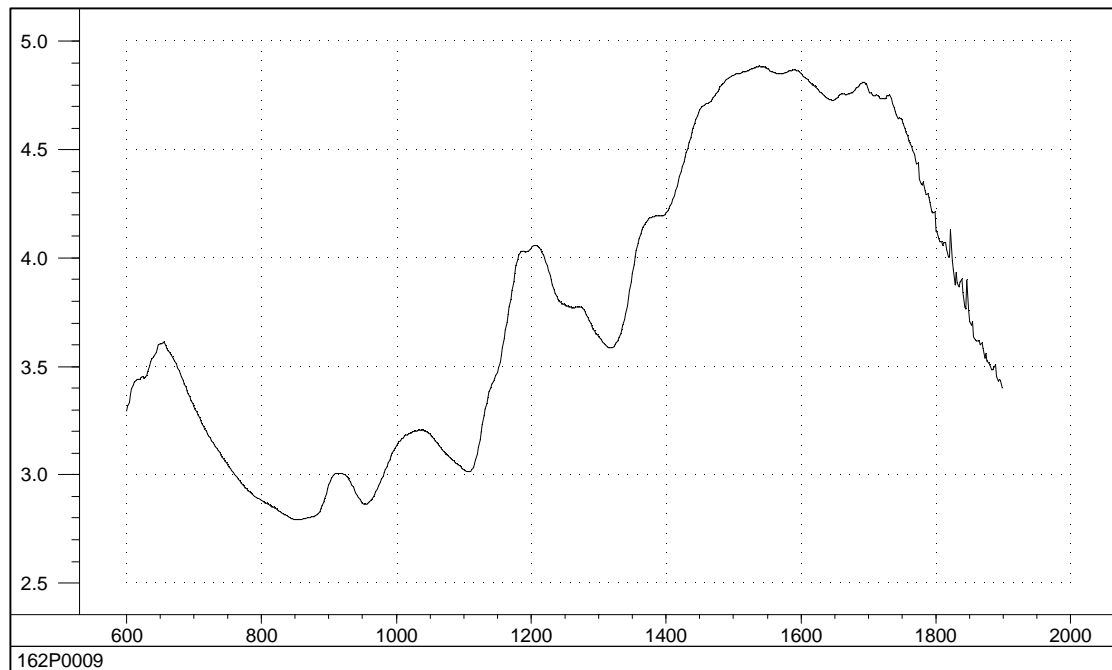


Abb. 7-7: NIR Transmissionsspektrum; 162 Pitbull.

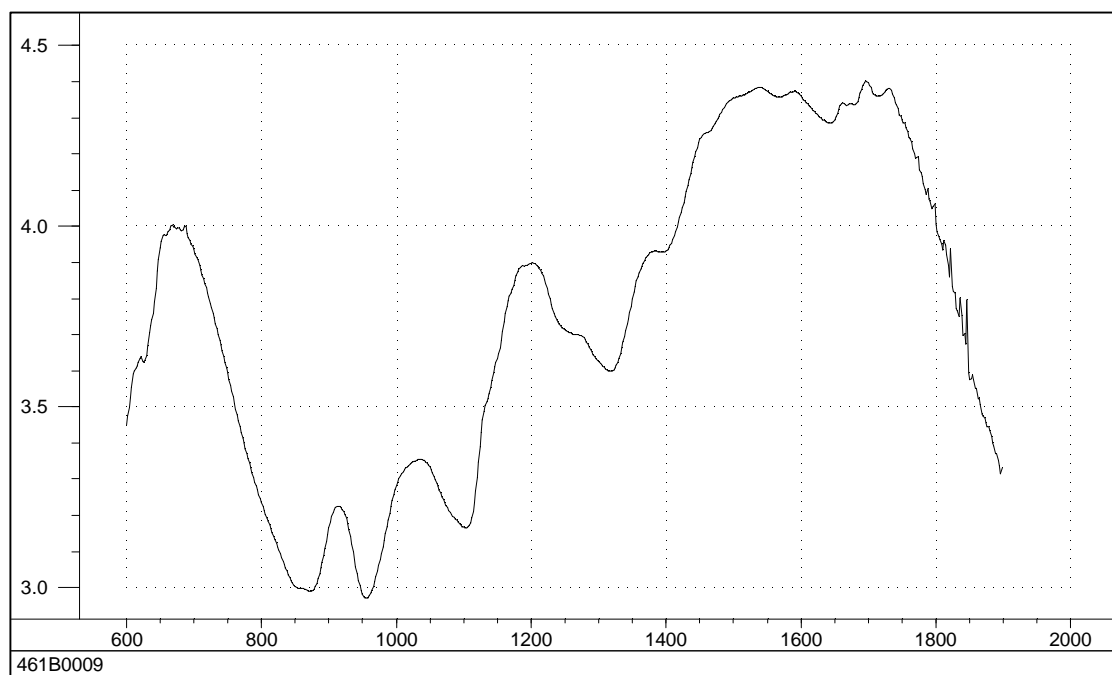


Abb. 7-8: NIR Transmissionsspektrum; 461 Bundesadler.

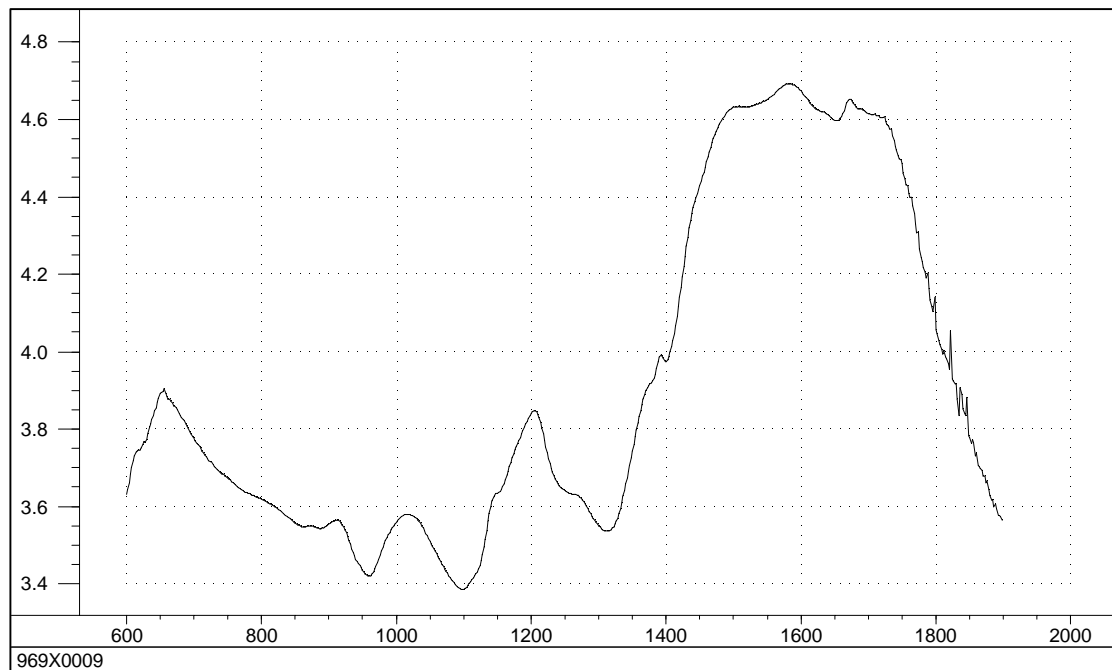


Abb. 7-9: NIR Transmissionsspektrum; 969 X-Files.

7.3.2 Rohspektren nach 1/x-Transformation

7.3.2.1 Reflexionsmessung

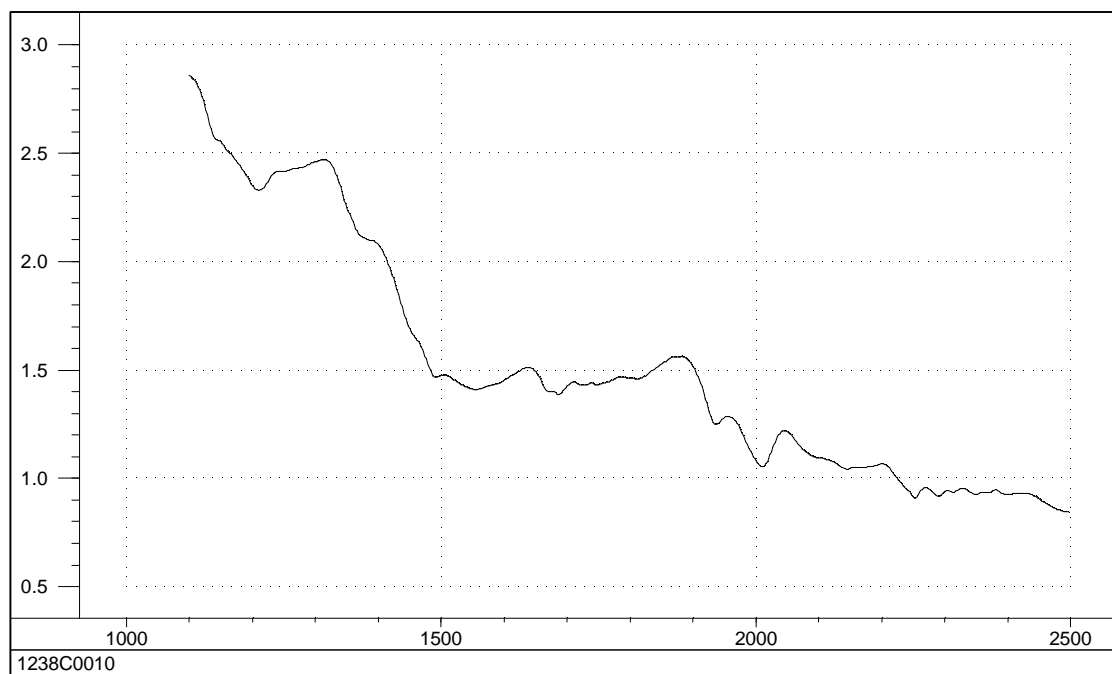


Abb. 7-10: 1/x transformiertes Reflexionsspektrum; 1238 Calvin Klein.

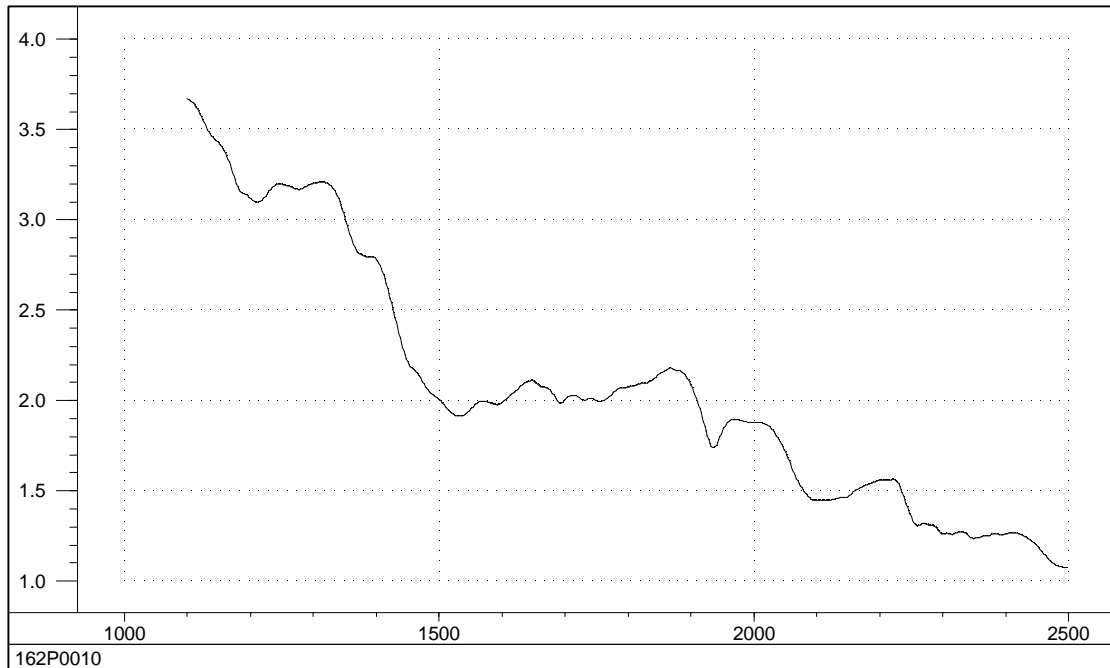


Abb. 7-11: 1/x transformiertes Reflexionsspektrum; 162 Pitbull.

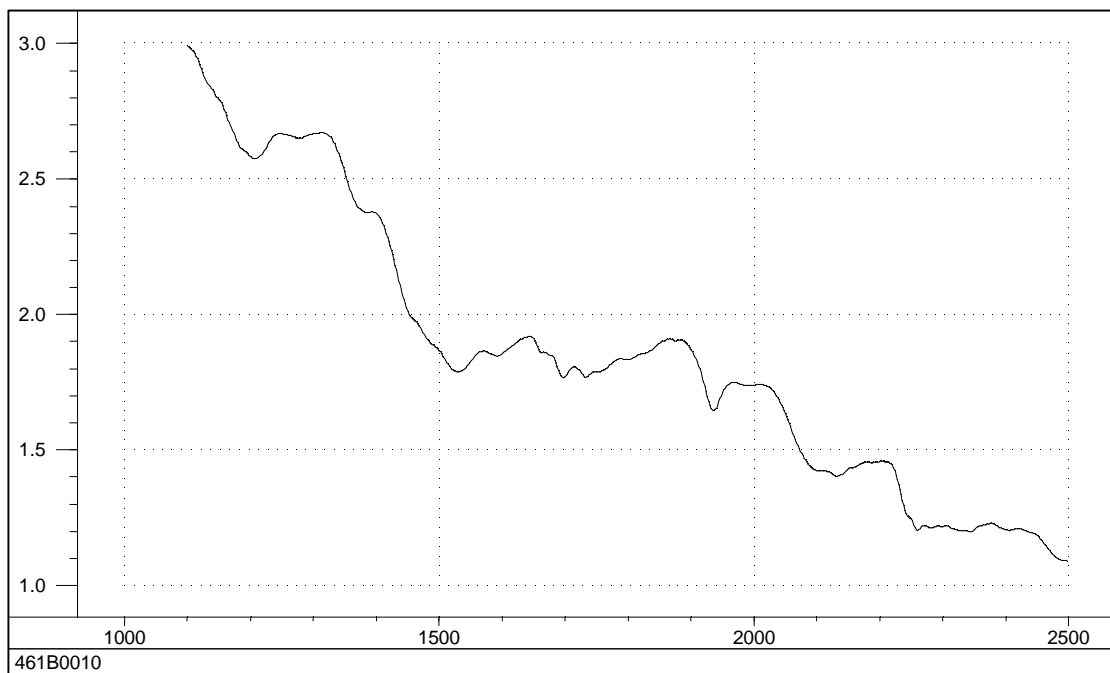


Abb. 7-12: 1/x transformiertes Reflexionsspektrum; 461 Bundesadler.

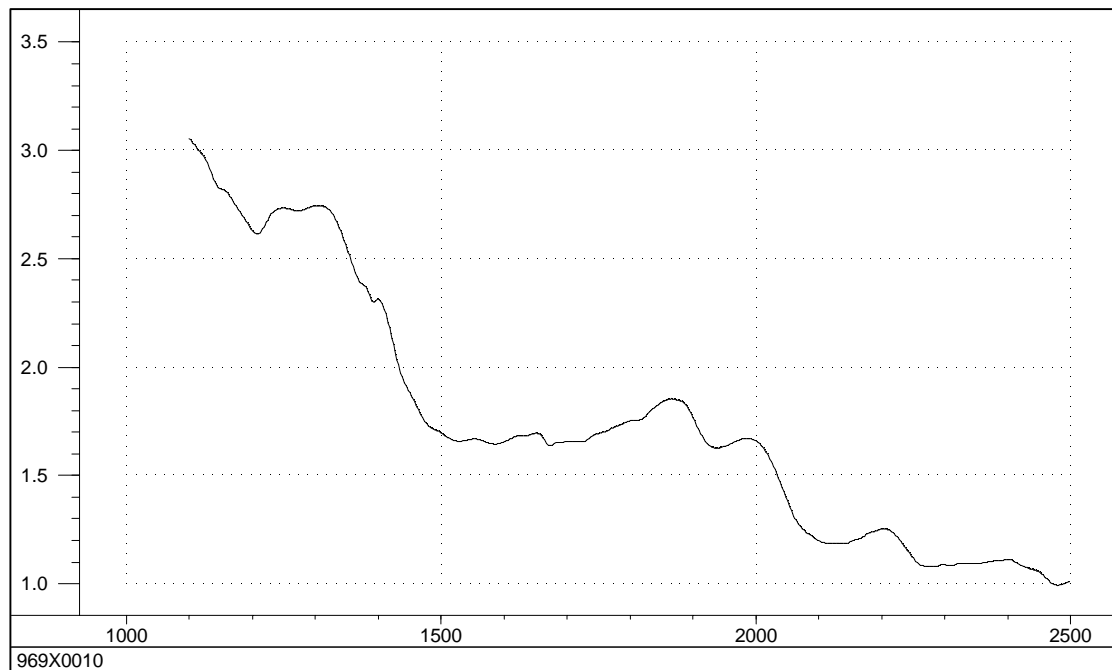


Abb. 7-13: 1/x transformiertes Reflexionsspektrum; 969 X-Files.

7.3.2.2 Transmissionsmessung

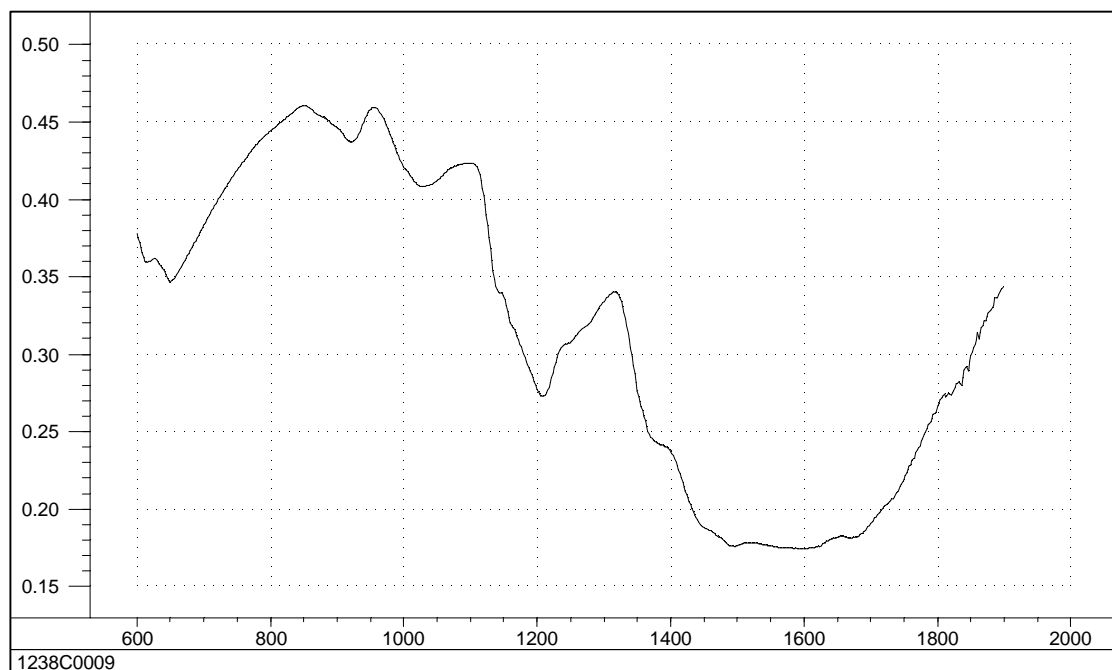


Abb. 7-14: 1/x transformiertes Transmissionspektrum; 1238 Calvin Klein.

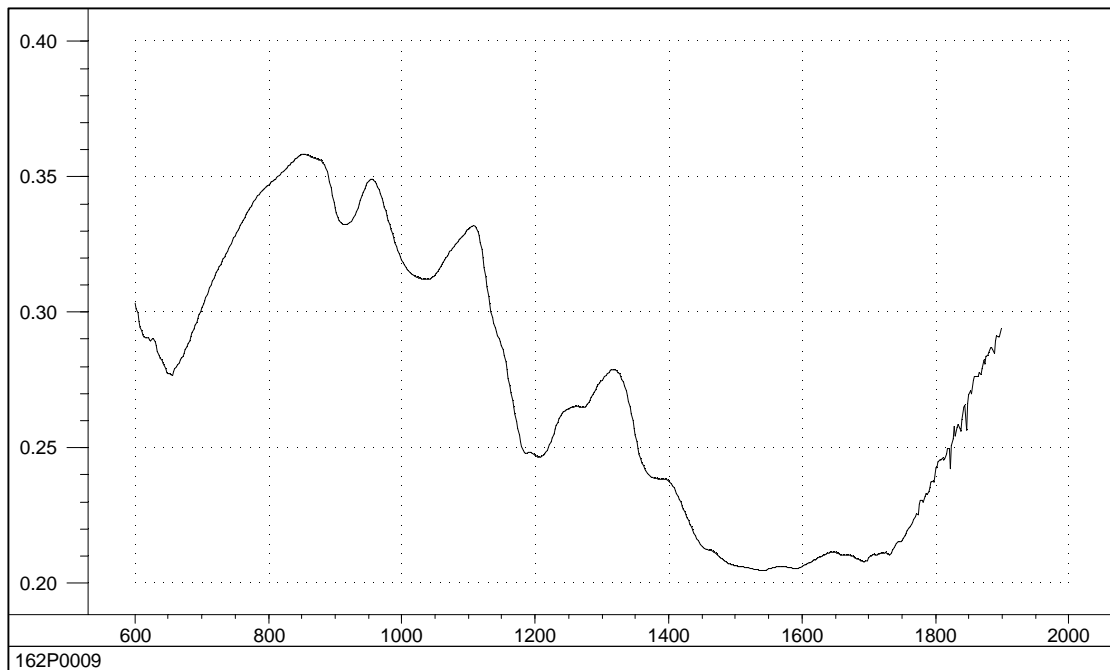


Abb. 7-15: 1/x transformiertes Transmissionsspektrum; 162 Pitbull.

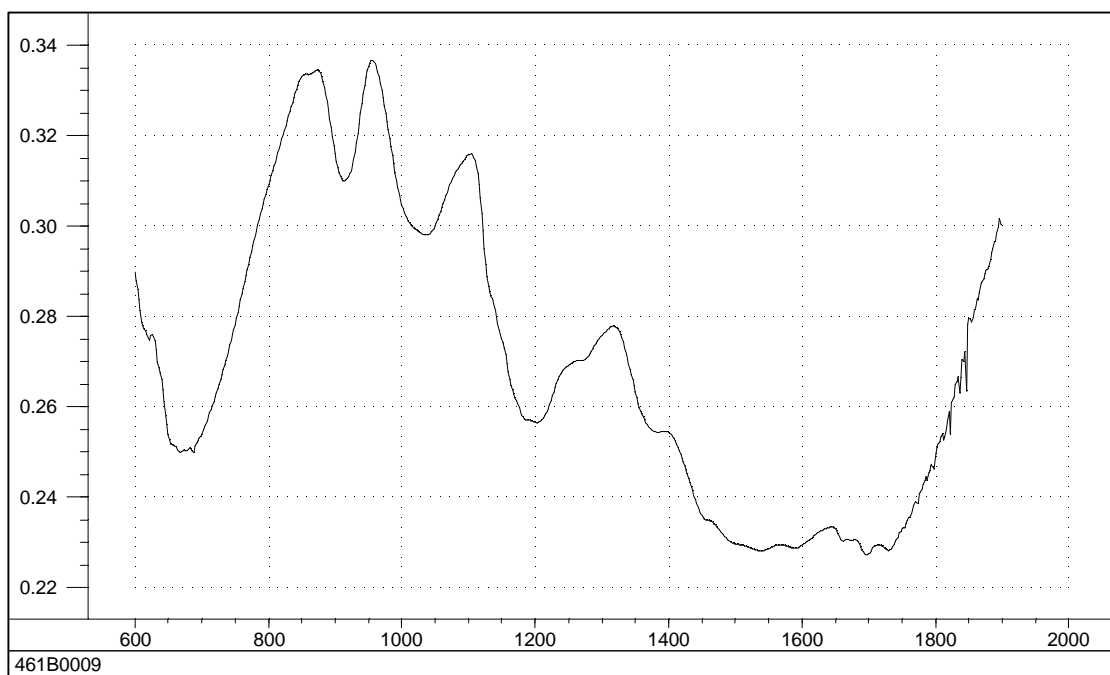


Abb. 7-16: 1/x transformiertes Transmissionsspektrum; 461 Bundesadler.

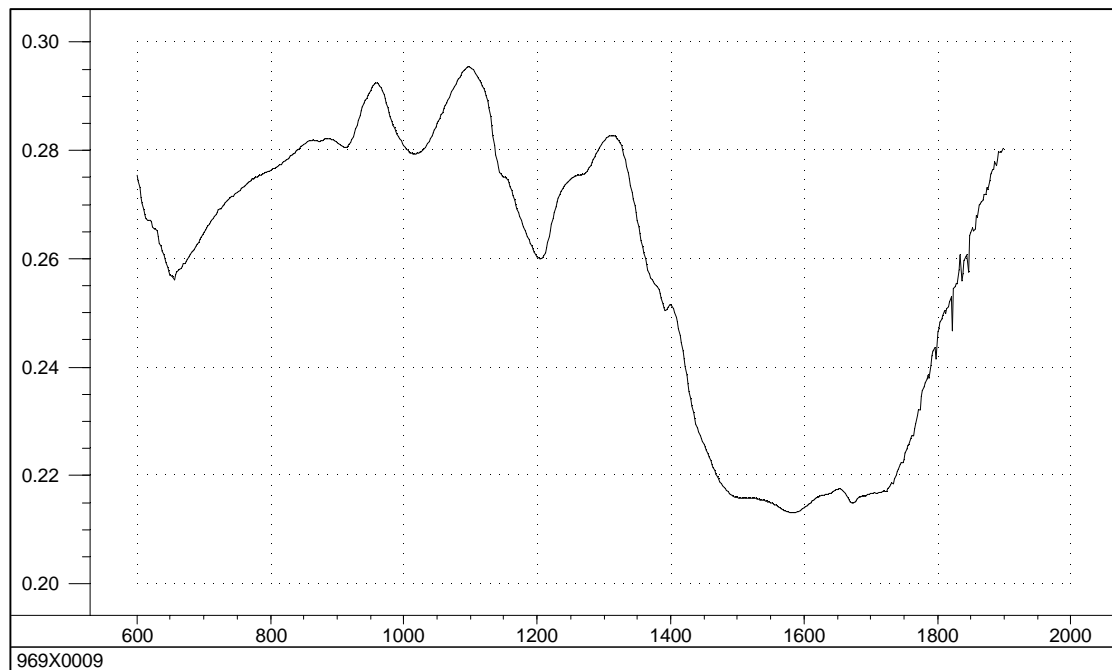


Abb. 7-17: 1/x transformiertes Transmissionsspektrum; 969 X-Files.

7.3.3 Derivativspektren - Reflexionsmessung

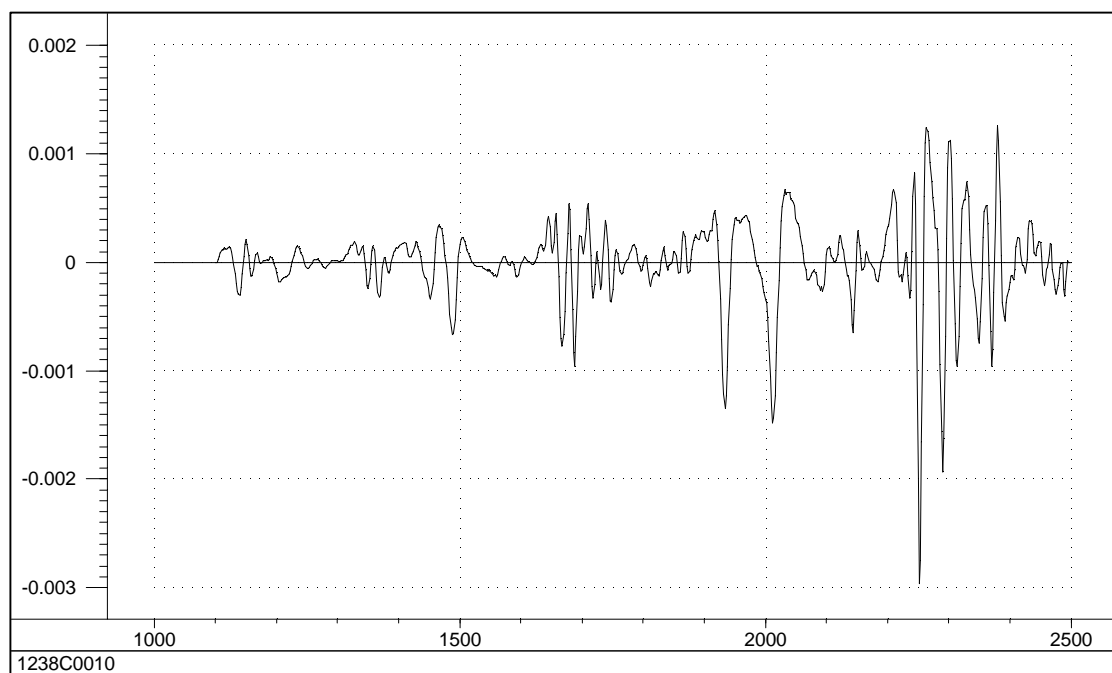


Abb. 7-18: 2. Ableitung, Reflexionsspektrum; 1238 Calvin Klein.

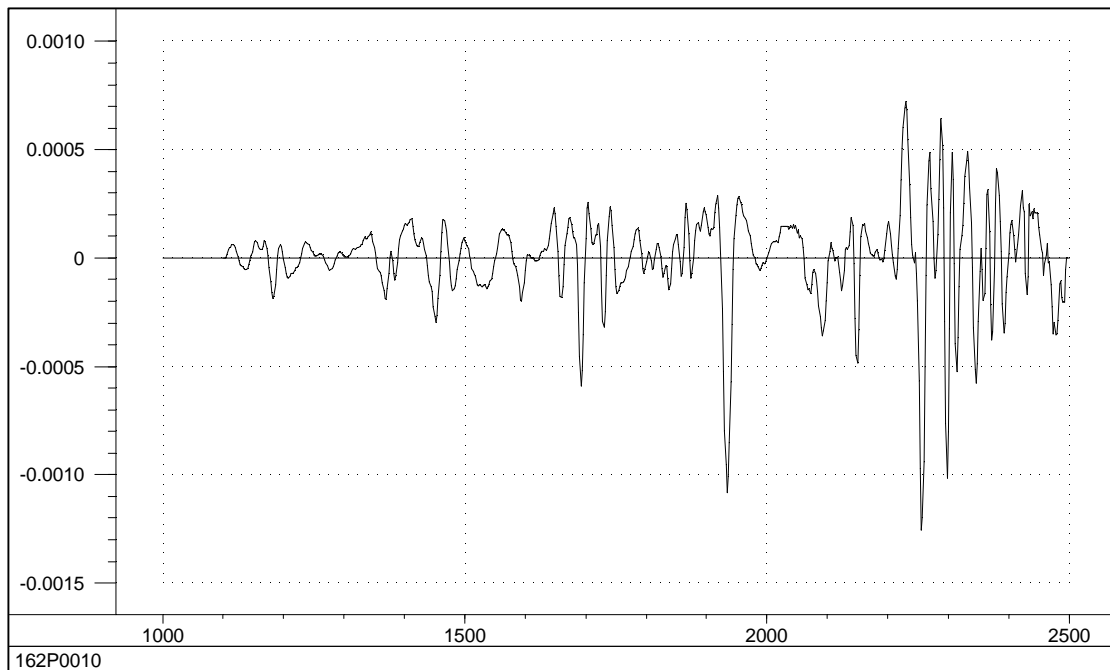


Abb. 7-19: 2. Ableitung, Reflexionsspektrum; 162 Pitbull.

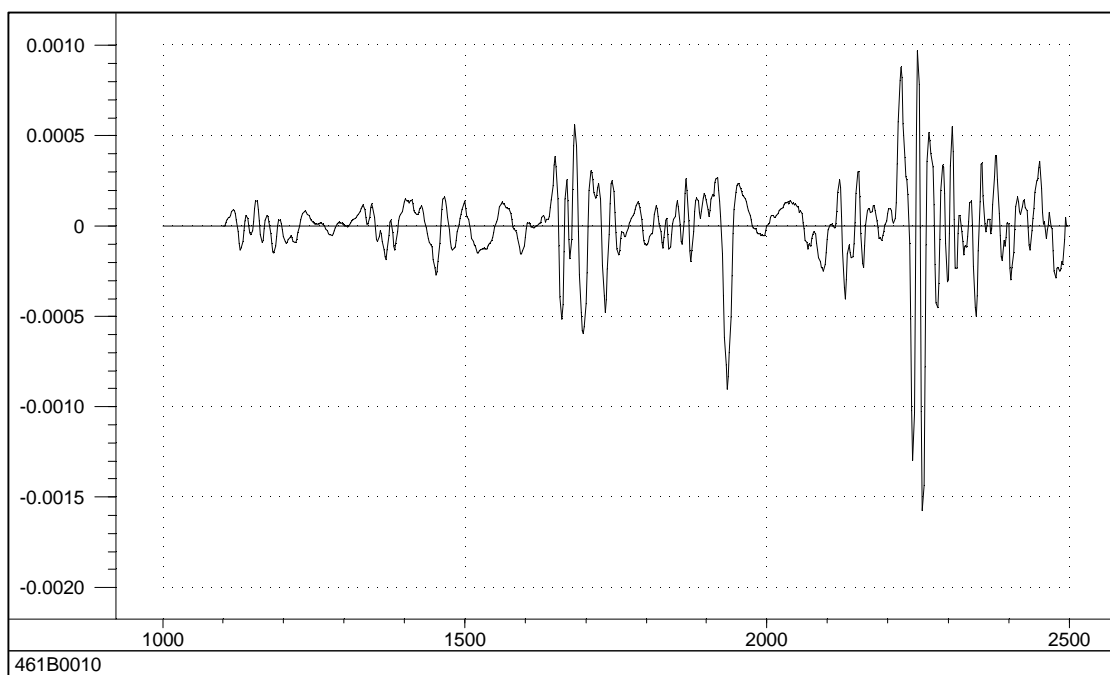


Abb. 7-20: 2. Ableitung, Reflexionsspektrum; 461 Bundesadler.

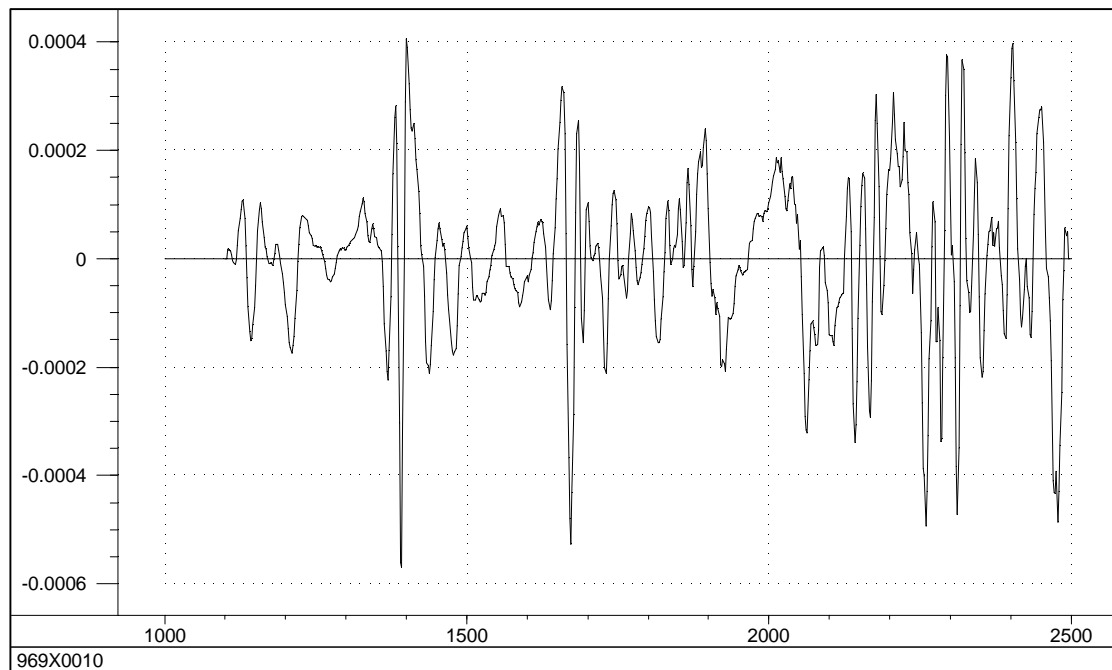


Abb. 7-21: 2. Ableitung, Reflexionsspektrum; 969 X-Files.

7.3.4 Derivativspektren nach $1/x$ -Transformation- Reflexionsmessung

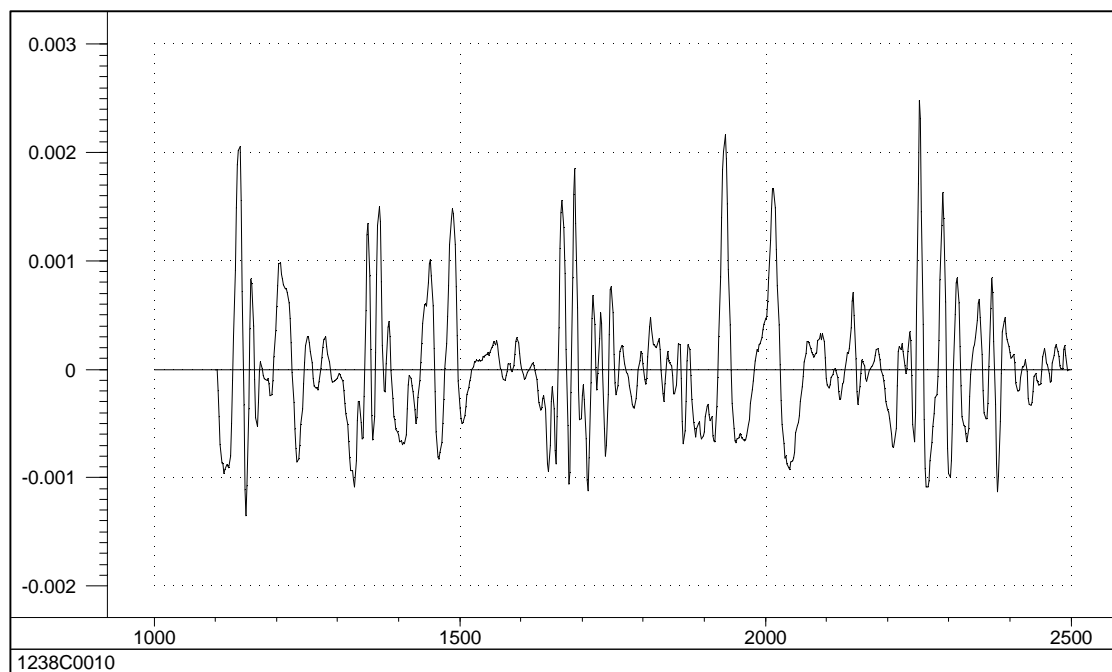


Abb. 7-22: $1/x$ transformiertes Derivativspektrum, Reflexion; 1238 Calvin Klein.

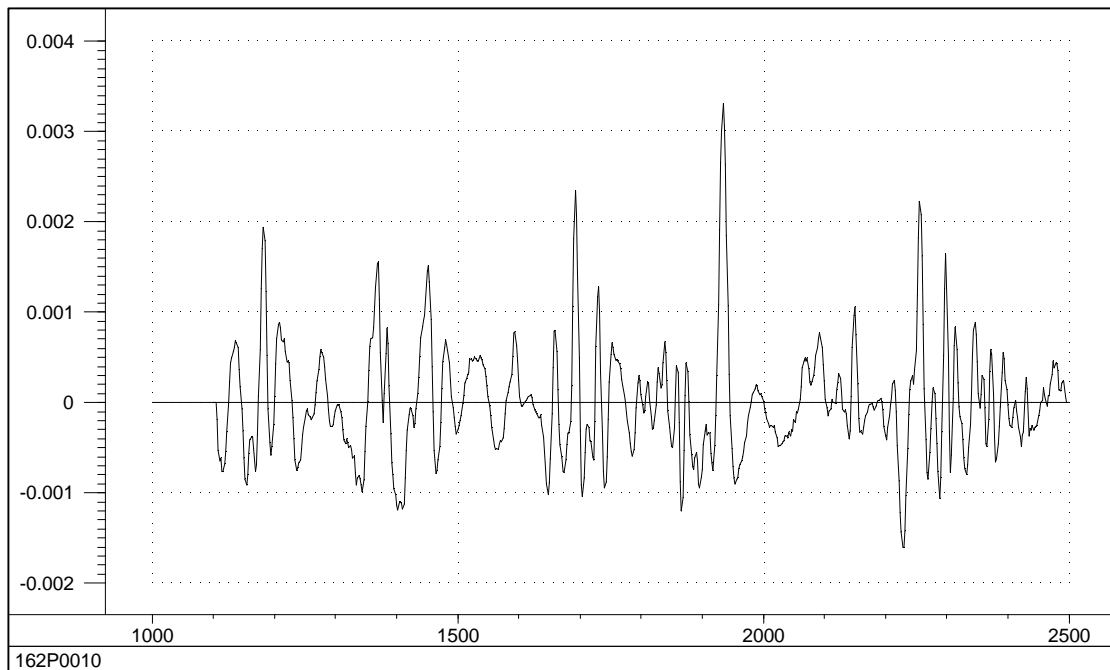


Abb. 7-23: 1/x transformiertes Derivativspektrum, Reflexion; 162 Pitbull.

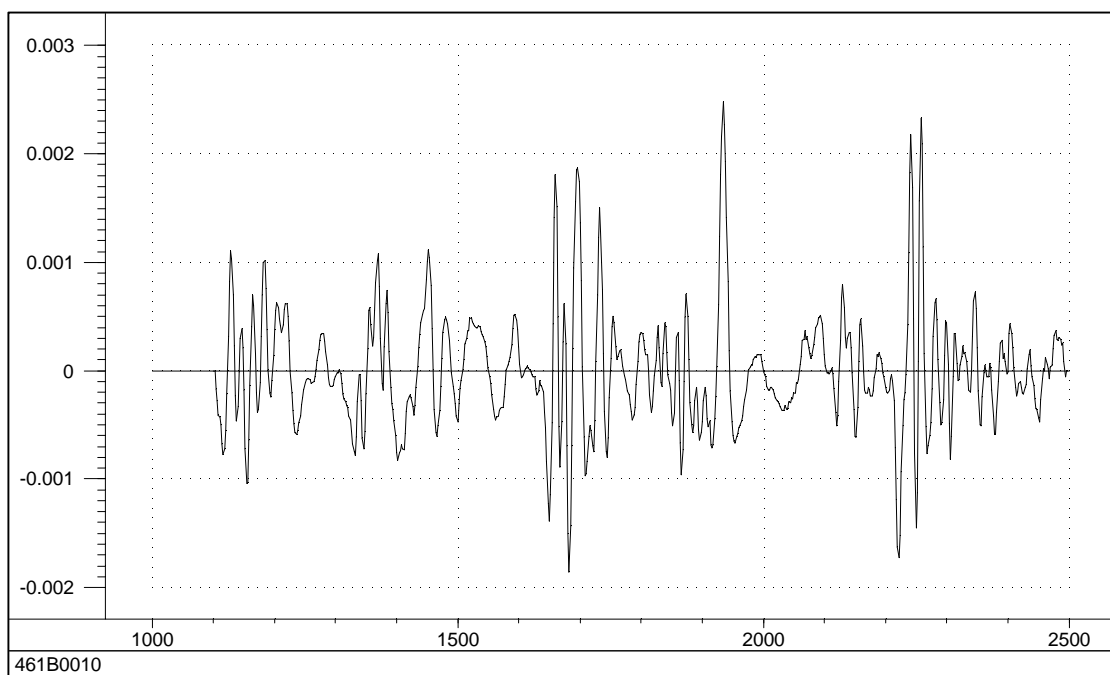


Abb. 7-24: 1/x transformiertes Derivativspektrum, Reflexion; 461 Bundesadler.

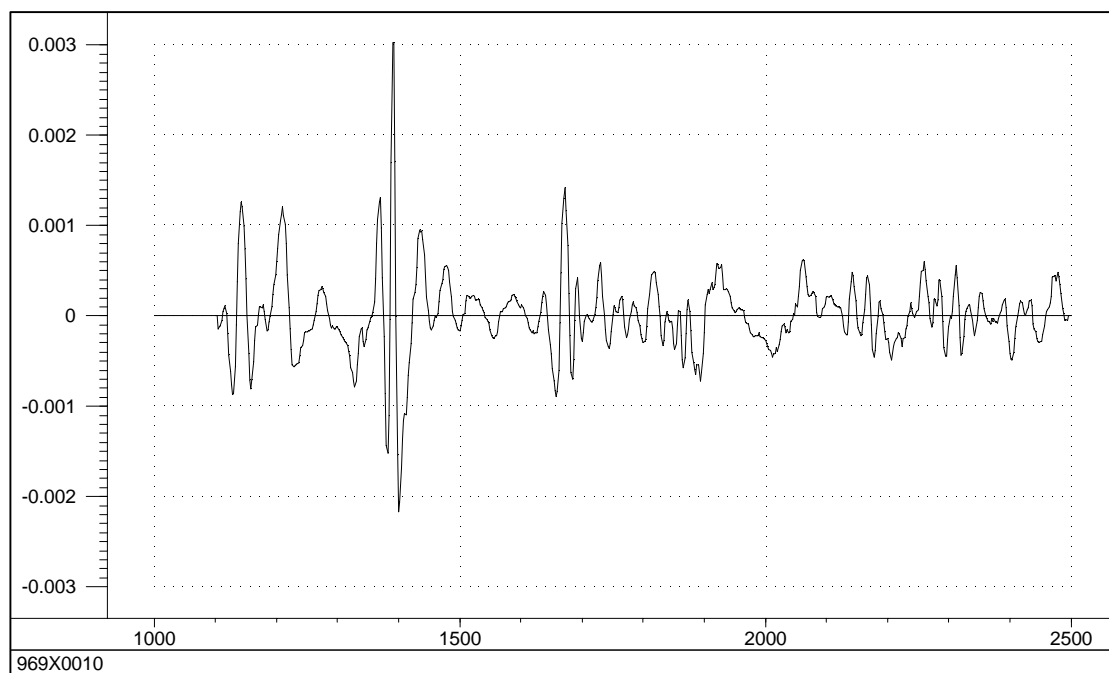


Abb. 7-25: 1/x transformiertes Derivativspektrum, Reflexion; 969 X-Files.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Merck, Verfahren zur Darstellung von Alkyloxyaryl-, Dialkyloxyaryl- und Alkylendioxyarylamino-*propanen* bzw. deren am Stickstoff monoalkylierten Derivaten. 1912: Deutsches Reich.
- [2] Bundeskriminalamt, OA 25 und KT.
- [3] Kovar KA, Roesch C, Rupp A, Hermle L. Second-generation drugs of abuse (designer drugs). Part 1. Amphetamines and other arylalkane amines. *Pharm. Unserer Zeit*. 1990; 19 (3): 99-107.
- [4] Rauschgiftjahresbericht 2001, Bundeskriminalamt.
- [5] Kongshaug KE, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Krogh M. Solid-phase microextraction/capillary gas chromatography for the profiling of confiscated ecstasy and amphetamine. *Chromatographia*. 1999; 50 (3/4): 247-252.
- [6] Ensslin HK, Kovar K-A, Maurer HH. Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 1996; 683 (2): 189-197.
- [7] Poklis A, Fitzgerald RL, Hall KV, Saady JJ. EMIT-d.a.u. monoclonal amphetamine/methamphetamine assay. II. Detection of methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Forensic Sci. Int.* 1993; 59 (1): 63-70.
- [8] Frost M, Kohler H, Blaschke G. Analysis of "Ecstasy" by capillary electrophoresis. *Int. J. Legal Med.* 1996; 109 (2): 53-57.
- [9] Varesio E, Gauvrit JY, Longerey R, Lanteri P, Veuthey JL. Optimization of fast CE analyses of ecstasy derivatives by use of experimental designs. *Chromatographia*. 1999; 50 (3/4): 195-201.
- [10] Bogusz M, Erkens M. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use. *J. Chromatogr., A*. 1994; 674 (1-2): 97-126.
- [11] Chan KB. A normal phase HPLC Method for the quantitation of MDMA in illicit ecstasy tablets. *MICROGRAMM*. 2001; XXXIV (9): 237-243.
- [12] Sadeghipour F, Veuthey JL. Sensitive and selective determination of methylenedioxyethylated amphetamines by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A*. 1997; 787 (1-2): 137-143.
- [13] Sondermann N, Kovar KA. Identification of ecstasy in complex matrices using near-infrared spectroscopy. *Forensic Sci.Int.* 1999; 102 (2-3): 133-147.
- [14] Sondermann N, Kovar KA. Screening experiments of ecstasy street samples using near infrared spectroscopy. *Forensic Sci.Int.* 1999; 106 (3): 147-156.
- [15] Han SM, Faulkner PG. Determination of SB 216469-S during tablet production using near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996; 14 (12): 1681-1689.

- [16] Candolfi A, Wu W, Massart DL, Heuerding S. Comparison of classification approaches applied to NIR-spectra of clinical study lots. *J Pharm Biomed Anal.* 1998; 16 (8): 1329-1347.
- [17] Trafford AD, Jee RD, Moffat AC, Graham P. A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy. *Analyst.* 1999; 124 (2): 163-167.
- [18] Andersson M, Josefson M, Langkilde FW, Wahlund KG. Monitoring of a film coating process for tablets using near infrared reflectance spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 1999; 20 (1-2): 27-37.
- [19] Blanco M, Eustaquio A, Gonzalez JM, Serrano D. Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near- infrared spectroscopy: validation of the procedure. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 22 (1): 139-148.
- [20] Eustaquio A, Blanco M, Jee RD, Moffat AC. Determination of paracetamol in intact tablets by use of near infrared transmittance spectroscopy. *Anal Chim Acta.* 1999; 383 (3): 283-290.
- [21] Scheiwe MW, Schilling D, Aebi P. Near infrared spectroscopy analysis of intact pharmaceutical diclofenac coated tablets in transmission. *Pharm Ind.* 1999; 61 (2): 179-183.
- [22] Gottfries J, Depui H, Fransson M, Jongeneelen M, Josefson M, Langkilde FW, Witte DT. Vibrational spectrometry for the assessment of active substance in metoprolol tablets: a comparison between transmission and diffuse reflectance near-infrared spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996; 14 (11): 1495-1503.
- [23] Merckle P, Kovar KA. Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 1998; 17 (3): 365-374.
- [24] Thosar SS, Forbess RA, Ebube NK, Chen YX, Rubinovitz RL, Kemper MS, Reier GE, Wheatley TA, Shukla AJ. A comparison of reflectance and transmittance near-infrared spectroscopic techniques in determining drug content in intact tablets. *Pharm Dev Technol.* 2001; 6 (1): 19-29.
- [25] Gottwald W, Wachter G. *IR-Spektroskopie für Anwender.* 1. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 1997.
- [26] Lindner E. *Infrarotspektroskopie für Anwender* in: Naumer H, Heller W (Hrsg.). *Untersuchungsmethoden in der Chemie.* 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme; 1997: 204-216.
- [27] Ciurczak EW. Principles of near-infrared spectroscopy in: Burns D, Ciurczak EW (Hrsg.). *Handbook of near-infrared spectroscopy.* New York: Marcel Dekker, Inc.; 1992.
- [28] Weidlein J, Müller U, Dehnike K. *Schwingungsspektroskopie. Eine Einführung.* 2. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1988: 34-41.
- [29] Günzler H, Böck H. *IR-Spektroskopie.* 2. Auflage. Weinheim: VCH; 1988: 44-51; 304-297.
- [30] Martin KA. Recent Advances in Near-Infrared Spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* 1992; 27: 325-383.
- [31] Howard WW, Sekulic S, Wheeler MJ, Taber G, Urbanski FJ, Sistare FE, Norris T, Aldridge PK. On-line determination of reaction completion in a closed-loop hydrogenator using NIR spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 1998; 52 (1): 17-21.

-
- [32] Chung H, Lee JS, Ku MS. Feasibility of simultaneous measurement of xylene isomers and other hydrocarbons in p-xylene production processes using near- infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 1998; 52 (6): 885-889.
- [33] McClure WF, Williamson RE. Near infrared analysis of tobacco. *Anal. Appl. Spectrosc.*, [Proc. Int. Conf.]. 1988: 109-132.
- [34] Osborne BG. Determination of fat in a variety of cereal foods using NIR spectroscopy. *Anal. Appl. Spectrosc.*, [Proc. Int. Conf.]. 1988: 68-71.
- [35] Buchanan BR, Honigs DE, Lee CJ, Roth W. Detection of ethanol in wines using optical-fiber measurements and near-infrared analysis. *Appl. Spectrosc.* 1988; 42 (6): 1106-1111.
- [36] Buning-Pfaue H, Hartmann R, Harder J, Kehraus S, Urban C. NIR-spectrometric analysis of food. Methodical development and achievable performance values. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998; 360 (7-8): 832-835.
- [37] Pierlot C, Lepretre A, Aubry JM. Experimental design, sensorial and principal components analysis: three complementary tools for cocktail optimization. *Analisis.* 1998; 26 (8): M71-M78.
- [38] Ding Q, Small GW, Arnold MA. Evaluation of data pretreatment and model building methods for the determination of glucose from near-infrared single-beam spectra. *Appl Spectrosc.* 1999; 53 (4): 402-414.
- [39] Zhang SB, Soller BR, Kaur S, Perras K, Vander Salm TJ. Investigation of noninvasive in vivo blood hematocrit measurement using NIR reflectance spectroscopy and partial least-squares regression. *Appl Spectrosc.* 2000; 54 (2): 294-299.
- [40] Rager I, Roos G, Schmidt PC, Kovar KA. Rapid quantification of constituents in St. John's wort extracts by NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 28 (3-4): 439-446.
- [41] Herkert T, Prinz H, Kovar KA. One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near-infrared spectroscopy on the packaging line. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001; 51 (1): 9-16.
- [42] Berntsson O, Zackrisson G, Ostling G. Determination of moisture in hard gelatin capsules using near- infrared spectroscopy: Applications to at-line process control of pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 15 (7): 895-900.
- [43] Blanco M, Coello J, Iturriaga H, Maspoch S, Pou N. Development and validation of a near infrared method for the analytical control of a pharmaceutical preparation in three steps of the manufacturing process. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000; 368 (5): 534-539.
- [44] Grummisch U. Qualitative and quantitative Near InfraRed spectroscopy applications in the pharmaceutical industry. *Pharm Ind.* 1998; 60 (11): 1002-1006.
- [45] Radtke G, Knop K, Lippold B. Near Infrared (NIR) Spectroscopy. Fundamentals and Application from a Pharmaceutical Point of View. *Pharm. Ind.* 1999; 61 (9): 848-857.
- [46] Williams PC, Norris K. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries.* 1. Auflage. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists Inc.; 1987.
- [47] Moffat AC, Trafford AD, Jee RD, Graham P. Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation of Analytical Procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets. *Analyst.* 2000; 125 (7): 1341-1351.

- [48] Europäisches Arzneibuch. NIR-Spektroskopie. 3. Auflage Auflage. Stuttgart: Dtsch. Apotheker Verlag; 1997.
- [49] Bertrand D. Principe de fonctionnement de spectromètres proche infrarouge de conception récente. *Analisis*. 1998; 26 (4): M29-M33.
- [50] Hecht E. *Optik*. 2. Auflage. Bonn, München: Addison Wesley; 1992.
- [51] Kubelka P, Munk F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Zeits. Tech. Physik*. 1931; 12 (112): 593-601.
- [52] Kubelka P. New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials, Part I. *J. Opt. Soc. Am.* 1948; 38: 448.
- [53] Workman JJ, Burns D. Commercial NIR instrumentation in: Burns D, Ciurczak EW (Hrsg.). *Handbook of near-infrared spectroscopy*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1992: 34-51.
- [54] Barges N, Conan H, Poisson N. NIR spectrophotometry: Qualitative and quantitative applications in pharmaceutical industry. *Analisis*. 1998; 26 (4): M43-M46.
- [55] Weiler H, Sarinas S. Non-destructive quality control of pharmaceutical tablets by near infrared reflectance spectroscopy. *Leaping Ahead Near Infrared Spectrosc.*, [Proc. Int. Conf. Near Infrared Spectrosc.], 6th. 1995: 412-416.
- [56] Lambert JH. *Photometria sive de mensura de gradibus luminis, colorum et umbrae*. Eberhard Klett, Augsburg, 1760 in: Englemann W (Hrsg.). *Lambert's Photometrie*. Leipzig; 1982.
- [57] Burger T, Kuhn J, Caps R, Fricke J. Quantitative determination of the scattering and absorption coefficients from diffuse reflectance and transmittance measurements: Application to pharmaceutical powders. *Appl Spectrosc.* 1997; 51 (3): 309-317.
- [58] Broad NW, Jee RD, Moffat AC, Eaves MJ, Mann WC, Dziki W. Non-invasive determination of ethanol, propylene glycol and water in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Analyst*. 2000; 125 (11): 2054-2058.
- [59] Blanco M, Coello J, Iturriaga H, MasPOCH S, delaPezuela C. Effect of data preprocessing methods in near-infrared diffuse reflectance spectroscopy for the determination of the active compound in a pharmaceutical preparation. *Appl Spectrosc.* 1997; 51 (2): 240-246.
- [60] Ciurczak EW, Torlini RP, Demkowiez MP. Determination of Particle Size of Pharmaceutical Raw Materials Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Spectrosc.* 1986; 1: 36-39.
- [61] Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least-Squares Procedures. *Anal. Chem.* 1964; 36: 1627-1639.
- [62] Steiner J, Termonia Y, Deltour J. Comments on Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least-Squares Procedure. *Anal. Chem.* 1972; 44: 1906-1909.
- [63] Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* 1989; 43 (5): 772-777.
- [64] Dhanoa MS, Lister SJ, Sanderson R, Barnes RJ. The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra. *J Near Infrared Spectrosc.* 1994; 2 (1): 43-47.

-
- [65] Isaksson T, Naes T. The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 1988; 42 (7): 1273-1284.
- [66] Schmidt W. *Optische Spektroskopie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker.* 1. Auflage. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH; 1994.
- [67] Günzler H, Heise HM. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung.* 3. Auflage. Weinheim: VCH; 1996.
- [68] Davies AMC. Near Infrared Spectroscopy: Time for the Giant to Wake Up! *European Spectroscopy News.* 1987; 73: 10-16.
- [69] Antonov L. Drawbacks of the present standards for processing absorption spectra recorded linearly as a function of wavelength. *Trac-Trend Anal Chem.* 1997; 16 (9): 536-543.
- [70] Massart D, Vandeginste B, Deming S, Michotte Y, Kaufmann L. (Hrsg.). *Chemometrics: a textbook.* Amsterdam: Elsevier; 1998.
- [71] Otto M. *Chemometrie, Statistik und Computereinsatz in der Analytik.* 1. Auflage. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH; 1997.
- [72] Davies T. The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, present and future - "From sleeping technique to the morning star of spectroscopy". *Analisis.* 1998; 26 (4): M17-M19.
- [73] Barton FE, II. Theory and principles of near infrared spectroscopy. *Spectrosc. Eur.* 2002; 14 (1): 12-18.
- [74] Henrion R, Henrion G. *Multivariate Datenanalyse : Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten.* Berlin ; Heidelberg ; New York ; London ; Paris ; Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag; 1995.
- [75] Gerhausser CI, Kovar KA. Strategies for constructing near-infrared spectral libraries for the identification of drug substances. *Appl Spectrosc.* 1997; 51 (10): 1504-1510.
- [76] Ogrinc N, Kosir IJ, Kocjancic M, Kidric J. Determination of Authenticity, Regional Origin, and Vintage of Slovenian Wines Using a Combination of IRMS and SNIF-NMR Analyses. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49 (3): 1432-1440.
- [77] CAMO ASA. *The Unscrambler User Manual.* Trondheim, Norwegen; 1998.
- [78] Bjorsvik H-K, Martens H. Data analysis: calibration of NIR instruments by PLS regression in: Burns D, Ciurczak EW (Hrsg.). *Handbook of near-infrared spectroscopy.* New York: Marcel Dekker, Inc.; 1992: 159-180.
- [79] Beebe K, Kowalski B. An introduction to multivariate calibration and analysis. *Anal. Chem.* 1987; 59: 1007A-1017A.
- [80] Cabrera K, Wieland G, Lubda D, Nakanishi K, Soga N, Minakuchi H, Unger KK. SilicaROD (TM) - A new challenge in fast high-performance liquid chromatography separations. *Trac-Trend Anal Chem.* 1998; 17 (1): 50-53.
- [81] Tanaka N, Nagayama H, Kobayashi H, Ikegami T, Hosoya K, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Cabrera K, Lubda D. Monolithic silica columns for HPLC, micro-HPLC, and CEC. *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* 2000; 23 (1): 111-116.
- [82] Nakanishi K, Shikata H, Ishizuka N, Koheiya N, Soga N. Tailoring mesopores in monolithic macroporous silica for HPLC. *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* 2000; 23 (1): 106-110.

- [83] Cabrera K, Lubda D, Eggenweiler HM, Minakuchi H, Nakanishi K. A new monolithic-type HPLC column for fast separations. *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* 2000; 23 (1): 93-99.
- [84] Zollner P, Leitner A, Lubda D, Cabrera K, Lindner W. Application of a chromolith SpeedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia.* 2000; 52 (11-12): 818-820.
- [85] Sondermann N. Screening von Ecstasy-Proben mit Hilfe der Nahen Infrarot (NIR)-Spektroskopie. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 1999.
- [86] Wiedemann SCC, Hansen WG, Snieder M, Wortel VAL. NIR calibration in practice. *Analisis.* 1998; 26 (4): M38-M43.
- [87] Workman J. UV-VIS-NIR Spectroscopy in: Workman J, Springsteen AW (Hrsg.). *Applied spectroscopy: a compact reference for practitioners.* 1. Auflage. San Diego: Academic Press; 1998: 40-47.
- [88] Bokobza L. Near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc.* 1998; 6 (1-4): 3-17.
- [89] Bokobza L. Origin of Near-Infrared Absorption Bands in: Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM (Hrsg.). *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, application.* 1. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 2002: 18-41.
- [90] Candolfi A, De Maesschalck R, Jouan-Rimbaud D, Hailey PA, Massart DL. The influence of data pre-processing in the pattern recognition of excipients near-infrared spectra. *J Pharm Biomed Anal.* 1999; 21 (1): 115-132.
- [91] de Groot PJ, Postma GJ, Melssen WJ, Buydens LMC. Influence of wavelength selection and data preprocessing on near-infrared-based classification of demolition waste. *Appl Spectrosc.* 2001; 55 (2): 173-181.
- [92] Gottwald W. *RP-HPLC für Anwender.* 1. Auflage. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH-Verlag; 1993.
- [93] Büchler J. Stereoselektive Gewinnung, Analytik und Pharmakokinetik der Enantiomere des Ecstasy-Analogons N-Ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamin (MDE) und seiner Hauptmetabolite. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2000.
- [94] Engelhardt H, Aitzetmüller K. *Practice of high performance liquid chromatography : applications, equipment and quantitative analysis.* 1. Auflage. Berlin: Springer; 1986.
- [95] Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *J Chromatogr B.* 1998; 713 (1): 91-109.
- [96] Helmlin HJ, Brenneisen R. Determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr.* 1992; 593 (1-2): 87-94.
- [97] Longo M, Martines C, Rolandi L, Cavallaro A. Simple and fast determination of some phenethylamines in illicit tablets by base-deactivated reversed phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 1994; 17 (3): 649-658.
- [98] Herstellerinformation zu Chromolith SpeedROD. Discover the secrets of the new chrom age, Merck, Darmstadt.
- [99] Shulgin A, Shulgin AT. Pihkal. A chemical love story. Berkeley: Transform press; 1992.
- [100] Herkert TV. Evaluierung einer NIR-Methode zur On-line Qualitätssicherung von Pharmazeutika auf der Verpackungsstraße. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2001.

-
- [101] Ebel S. Allgemeiner Teil, 2.2.40: NIR-Spektroskopie in: Hartke K, Hartke H, Mutschler E, Rücker G, Wichtl M (Hrsg.). Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 1997; Band 1. 10. Auflage. Stuttgart: Dtsch. Apotheker Verlag; 1999.
- [102] Ensslin HK, Maurer HH, Gouzoulis E, Hermle L, Kovar KA. Metabolism of racemic 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in humans. Isolation, identification, quantification, and synthesis of urinary metabolites. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24 (8): 813-820.
- [103] Funk W, Dammann V, Vonderheid C, Oehlmann G. Statistische Methoden in der Wasseranalytik. 1. Auflage. Weinheim, Germany: VCH; 1985.
- [104] Kromidas S. Handbuch Validierung in der Analytik. 1. Auflage. Weinheim, Germany; 2000.
- [105] Step 3: Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology, in *International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.* 1996.
- [106] Sachs L. Angewandte Statistik. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 1992.
- [107] Koch OG, Koch-Gedic GA. Handbuch der Spurenanalytik, Teil1. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1974.
- [108] Kawata S. New techniques in near-infrared spectroscopy in: Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM (Hrsg.). Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, application. 1. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH; 2002: 75-84.

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

K. Aktories	Pharmakologie
K. H. Bauer	Pharmazeutische Technologie
A. W. Frahm	Pharmazeutische Chemie
L. Heide	Pharmazeutische Biologie
M. Kist	Mikrobiologie
H.-J. Meyer	Klinische Pharmazie
H.-H. Otto	Pharmazeutische Chemie
H. Rimpler	Pharmazeutische Biologie
R. Schubert	Pharmazeutische Technologie
K. Starke	Pharmakologie

Meine akademischen Lehrer im Rahmen des Graduiertenkollegs "Analytische Chemie" waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer	Organische Chemie
G. Gauglitz	Physikalische Chemie
P. Grathwohl	Angewandte Geologie
V. Hoffmann	Physikalische Chemie
G. Jung	Organische Chemie
B. Koppenhöfer	Organische Chemie
H. M. Liebich	Klinische Chemie
V. Schurig	Organische Chemie
H. B. Stegmann	Organische Chemie
C. Ziegler	Physikalische Chemie