

Pharmazeutische Chemie

Entwicklung und Anwendung
immunologischer Extraktionsphasen und der
Laser - induzierten Fluoreszenz - Detektion
für die Bestimmung von
Morphin und Morphinmetaboliten
in Blut unter forensischen Aspekten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Yvonne Hupka
aus Georgsmarienhütte

2003

Dekan:	Prof. Dr. J. Leker
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dr. G. Blaschke
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Dr. B. Brinkmann
Tag der mündlichen Prüfungen:	17., 22. und 24.04.2003
Tag der Promotion:	24.04.2003

INHALTSVERZEICHNIS

I. THEORETISCHER TEIL

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	HEROIN	3
2.1	Biotransformation und Wirkung von Heroin	7
2.1.1	Aufnahme und Metabolismus	7
2.1.2	Aspekte der Opioidwirkung	9
2.2	Bestimmung von Opiaten aus Körperflüssigkeiten und Organmaterial	12
3	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT FLUORESZENZDETEKTION	15
3.1	Spektroskopische Detektionsverfahren	15
3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Trennung von Morphin und Morphinglucuroniden mit Fluoreszenzdetektion	18
3.2.1	Festphasenextraktion von M, M3G und M6G aus Blut	20
3.2.2	Validierung der HPLC-Bestimmung von M, M3G und M6G in Blut nach Festphasenextraktion	21
3.2.2.1	Spezifität	21
3.2.2.2	Wiederfindung	22
3.2.2.3	Linearität	24
3.2.2.4	Präzision und Richtigkeit	26
3.2.2.5	Bestimmungsgrenze	30
3.2.2.6	Nachweisgrenze	30

3.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	30
3.3.1	Aufbau des Detektionssystems	31
3.3.2	HPLC-LIF bei Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 266 \text{ nm}$	38
3.3.2.1	Spezifität	38
3.3.2.2	Linearität	39
3.3.2.3	Detektionsgrenze	41
3.3.3	HPLC-LIF bei Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$	41
3.3.3.1	Spezifität	42
3.3.3.2	Linearität	43
3.3.3.3	Detektionsgrenze	44
3.3.3.4	Eigenfluoreszenz der Durchflusszelle	44
3.4	Vergleich des HPLC-LIF-Systems ($\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$) mit dem HPLC-Fluoreszenzdetektor	47
3.4.1	Linearität	47
3.4.2	Detektionsgrenze	50
3.4.3	Nachweisgrenze in Blut	50
3.4.4	Ergebnis	50
3.5	Diskussion	51

4	KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT FLUORESZENZDETEKTION	53
4.1	Trenn- und Detektionsmethoden in der CE	55
4.1.1	Aufbau und Elektrophoretische Trennung	55
4.1.2	Trennprinzipien und Detektionsmethoden	58
4.2	Methodenentwicklung	62
4.2.1	UV-Absorption und Fluoreszenz der Analyten	63
4.2.2	Trennpuffer	66
4.2.3	Interner Standard	66
4.2.4	Probenvorbereitung	69

4.3	Kapillarelektrophoretische Trennung von Morphin und Morphinglucuroniden mit UV-Detektion	70
4.3.1	Linearität	71
4.3.2	Detektionsgrenze	72
4.4	Kapillarelektrophoretische Trennung von Morphin und Morphinglucuroniden mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	73
4.4.1	Aufbau des Detektionssystems	73
4.5	Anregung zur Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{EX}} = 257 \text{ nm}$	77
4.5.1	Linearität	79
4.5.2	Detektionsgrenze	81
4.5.3	Spezifität	82
4.5.4	Nachweisgrenze	83
4.5.5	Urinproben	83
4.6	Anregung zur Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$	85
4.6.1	Kapillarelektrophoretische Trennung	85
4.6.2	Validierung	87
4.6.2.1	Spezifität	88
4.6.2.2	Wiederfindung	89
4.6.2.3	Linearität	90
4.6.2.4	Präzision und Richtigkeit	92
4.6.2.5	Bestimmungsgrenze	96
4.6.2.6	Nachweisgrenze	96
4.6.3	Applikation – Forensische Fälle	96
4.7	Diskussion	97

5	ANTIKÖRPERGESTÜTZTE FESTPHASENEXTRAKTION VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN	99
5.1	Affinitätschromatographie mit immobilisierten Antikörpern	99
5.2	Reinigung der Rohantikörperseren	103
5.2.1	Reinigungsschritte	103

5.2.2	Proteinbestimmung zur Charakterisierung der Antikörperfraktionen	105
5.3	Immobilisierung der Antikörper durch kovalente Bindung an Cyanbromid-aktivierte Sepharose	106
5.3.1	Immobilisierung der Antikörper	106
5.3.2	Extraktion von M, M3G und M6G mit immobilisierten Antikörpern	107
5.3.2.1	Bestimmung der Kapazitäten bei verschiedenen pH-Werten	108
5.3.2.2	Bestimmung der Wiederverwendbarkeit bei pH 8	109
5.4	Immobilisierung der Antikörper durch Ausrichtung an Protein A und Crosslinking	113
5.4.1	Immobilisierung der Antikörper	114
5.4.2	Extraktion von M, M3G und M6G mit immobilisierten Antikörpern	116
5.4.2.1	Bestimmung der Kapazitäten bei verschiedenen pH-Werten	116
5.4.2.2	Bestimmung der Wiederverwendbarkeit bei pH 8	118
5.5	Immobilisierung der Antikörper durch den Einschluss in Sol-Gel	121
5.5.1	Immobilisierung der Antikörper	123
5.5.2	Extraktion von M, M3G und M6G mit immobilisierten Antikörpern	124
5.5.2.1	Bestimmung der Kapazitäten bei verschiedenen pH-Werten	124
5.5.2.2	Bestimmung der Wiederverwendbarkeit bei pH 8	126
5.5.3	Validierung der HPLC-Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden in Blut nach antikörpergestützter Festphasenextraktion an Sol-Gel	131
5.5.3.1	Herstellung der Immunoadsorber und Extraktion	131
5.5.3.2	Spezifität	132
5.5.3.3	Wiederfindung	133
5.5.3.4	Linearität	134

5.5.3.5	Präzision und Richtigkeit	136
5.5.3.6	Bestimmungsgrenze	140
5.5.3.7	Nachweisgrenze	140
5.5.4	Applikation – Forensische Fälle	140
5.5.5	Analytik von Sol-Gel-Extrakten per HPLC-LIF	142
5.6	Diskussion	143
6	ZUSAMMENFASSUNG	145

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1	ALLGEMEINES	155
1.1	Allgemeine Geräte	155
1.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	156
1.2.1	HPLC / Fluoreszenzdetektion	156
1.2.2	HPLC / Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion	156
1.3	Kapillarelektrophorese	158
1.3.1	CE / UV-Detektion	158
1.3.2	CE / Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion	158
1.4	Liste der Verbindungen	159
1.4.1	Analyten	159
1.4.2	Chemikalien und Materialien	160
1.4.3	Pufferlösungen und Fließmittel	163

2	ERLÄUTERUNGEN UND ABKÜRZUNGEN	165
2.1	Analytische Kenngrößen	165
2.2	Statistische Kenngrößen und Formeln	166
2.3	Abkürzungen	167
3	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT FLUORESZENZDETEKTION	171
3.1	Verbesserung der Fluoreszenzausbeute	171
3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Trennung von Morphin und Morphinglucuroniden mit Fluoreszenzdetektion	171
3.2.1	Festphasenextraktion von M, M3G und M6G aus Blut	172
3.2.2	Validierung der HPLC-Bestimmung von M, M3G und M6G in Blut nach Festphasenextraktion	172
3.2.2.1	Spezifität	173
3.2.2.2	Wiederfindung	173
3.2.2.3	Linearität	175
3.2.2.4	Präzision und Richtigkeit	176
3.2.2.5	Bestimmungsgrenze	178
3.2.2.6	Nachweisgrenze	178
3.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	179
3.3.1	Fluoreszenzeigenschaften von M, M3G und M6G	179
3.3.2	HPLC-LIF bei Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 266 \text{ nm}$	179
3.3.2.1	Spezifität	180
3.3.2.2	Linearität	180
3.3.2.3	Detektionsgrenze	181
3.3.3	HPLC-LIF bei Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$	181
3.3.3.1	Spezifität	182
3.3.3.2	Linearität	182
3.3.3.3	Detektionsgrenze	183

	3.3.3.4	Eigenfluoreszenz der Durchflusszelle	183
3.4		Vergleich des HPLC-LIF-Systems ($\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$) mit dem HPLC-Fluoreszenzdetektor	184
	3.4.1	Linearität	184
	3.4.2	Detektionsgrenze	187
4		KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT FLUORESZENZDETEKTION	189
4.1		Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Analyten	189
4.2		Methodenentwicklung	189
	4.2.1	Trennpuffer	190
	4.2.2	Interner Standard	190
4.3		Kapillarelektrophoretische Trennung von Morphin und Morphinglucuroniden mit UV-Detektion	192
	4.3.1	Linearität	192
	4.3.2	Detektionsgrenze	192
4.4		Kapillarelektrophoretische Trennung von Morphin und Morphinglucuroniden mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	193
	4.4.1	Aufbau des Detektionssystems	193
4.5		Anregung zur Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$	194
	4.5.1	Linearität	194
	4.5.2	Detektionsgrenze	195
	4.5.3	Spezifität	195
	4.5.4	Nachweisgrenze	195
	4.5.5	Urinproben	195
4.6		Anregung zur Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$	196
	4.6.1	Interner Standard	196
	4.6.2	Validierung	196
		4.6.2.1 Spezifität	196
		4.6.2.2 Wiederfindung	197
		4.6.2.3 Linearität	199

4.6.2.4	Präzision und Richtigkeit	200
4.6.2.5	Bestimmungsgrenze	203
4.6.2.6	Nachweisgrenze	204
4.6.3	Applikation – Forensische Fälle	204

5	ANTIKÖRPERGESTÜTZTE FESTPHASENEXTRAKTION VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN	205
5.1	Reinigung der Rohantikörperseren	205
5.1.1	Reinigungsschritte	205
5.1.2	Proteinbestimmung zur Charakterisierung der Antikörperfraktionen	207
5.2	Immobilisierung der Antikörper durch kovalente Bindung an Cyanbromid-aktivierte Sepharose	208
5.2.1	Immobilisierung der Antikörper	208
5.2.2	Extraktion von M, M3G und M6G mit immobilisierten Antikörpern	210
5.2.2.1	Bestimmung der Kapazitäten bei verschiedenen pH-Werten	211
5.2.2.2	Bestimmung der Wiederverwendbarkeit bei pH 8	212
5.3	Immobilisierung der Antikörper durch Ausrichtung an Protein A und Crosslinking	216
5.3.1	Immobilisierung der Antikörper	216
5.3.2	Extraktion von M, M3G und M6G mit immobilisierten Antikörpern	218
5.3.2.1	Bestimmung der Kapazitäten bei verschiedenen pH-Werten	218
5.3.2.2	Bestimmung der Wiederverwendbarkeit bei pH 8	218
5.4	Immobilisierung der Antikörper durch den Einschluss in Sol-Gel	222
5.4.1	Immobilisierung der Antikörper	222

5.4.2	Extraktion von M, M3G und M6G mit immobilisierten Antikörpern	224
5.4.2.1	Bestimmung der Kapazitäten bei verschiedenen pH-Werten	225
5.4.2.2	Bestimmung der Wiederverwendbarkeit bei pH 8	226
5.4.3	Validierung der HPLC-Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden in Blut nach antikörpergestützter Festphasenextraktion an Sol-Gel	230
5.4.3.1	Herstellung der Immunoadsorber und Extraktion	230
5.4.3.2	Spezifität	231
5.4.3.3	Wiederfindung	232
5.4.3.4	Linearität	234
5.4.3.5	Präzision und Richtigkeit	235
5.4.3.6	Bestimmungsgrenze	238
5.4.3.7	Nachweisgrenze	239
5.4.4	Applikation – Forensische Fälle	239
5.4.5	Analytik von Sol-Gel-Extrakten per HPLC-LIF	240

LITERATURVERZEICHNIS

241

**THEORETISCHER
TEIL**

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

In der zweiten Hälfte der 80er Jahre stieg die Zahl der jährlichen Drogentodesfälle in Deutschland innerhalb von vier Jahren von unter 500 auf über 2000 an. Seitdem schwankte diese Zahl zwischen 1500 und 2000, wobei in den letzten zwei Jahren ein leichter Rückgang zu verzeichnen war (2002: 1397 Drogentote). Die meisten Todesfälle sind auch heute noch Folge von Heroinintoxikationen.

Heroin wird meist intravenös konsumiert und besitzt eine sehr geringe Plasmahalbwertszeit. Auch das unmittelbar nach der Injektion aus dem Heroin gebildete 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) besitzt eine Plasmahalbwertszeit von wenigen Minuten und wird zu Morphin abgebaut. Daher ist für die forensisch-toxikologische Untersuchung der Blutproben von Heroinkonsumenten vor allem die Blutkonzentrations-Bestimmung des Phase-I-Metaboliten Morphin (M) und der Phase-II-Metaboliten Morphin-3- β -D-glucuronid (M3G) und Morphin-6- β -D-glucuronid (M6G) ausschlaggebend. Während der Hauptmetabolit M3G als weitgehend frei von analgetischen Effekten gilt, konnte dem M6G eine sehr starke analgetische Wirkung bei intrathekaler Verabreichung nachgewiesen werden. Da für M6G ein Beitrag zur Heroinwirkung angenommen wird und die Halbwertszeit von Morphin bei ca. 2 Stunden liegt, ist die Bestimmung der Morphinglucuronide forensisch-toxikologisch ebenso angezeigt wie die des Morphins. Obwohl in kurzem zeitlichem Abstand zu einer Heroininjektion die Heroinmetaboliten in höheren Konzentrationen (ca. 500 ng/ml Blut und mehr) im Blut auftreten können, ist der Nachweis im unteren Nanogrammbereich erforderlich. Unmittelbar nach einer Heroininjektion und in einem größeren zeitlichen Abstand von einer Injektion sind die Metaboliten im Blut oft nur in Spuren vorhanden.

Aufgrund des hohen Mortalitätsrisikos des Heroinkonsums muss die Bestimmung von M, M3G und M6G oft in Leichenblut durchgeführt werden. Da sich aus diesem kein Serum gewinnen lässt, muss aus der komplexen Matrix Vollblut ein möglichst reiner Extrakt gewonnen werden, der dann einer sensitiven und selektiven Analytik zugeführt wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte eine hochleistungsflüssigkeitschromatographische Methode mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion im tiefen UV-Bereich entwickelt werden. Bei dieser Detektion handelt es sich um eine sehr empfindliche Methode, bei der die Analyten durch ihre UV-induzierte charakteristische Fluoreszenz spezifisch quantifiziert werden können. Da die Intensität der Fluoreszenz von der eingestrahlten Energie des anregenden UV-Lichts abhängt, sollte die Sensitivität durch den Einsatz eines Hochleistungslasers mit geeigneter Emissionswellenlänge als Anregungsquelle gesteigert werden. Durch die spektral aufgelöste Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes sollte sowohl die spezifische und sensitive als auch die quantitative Auswertung erfolgen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Vorteile der hohen Trennleistung und des geringen Probenverbrauchs der Kapillarelektrophorese (CE) für die Bestimmung von M, M3G und M6G in Blut eingesetzt werden können. Durch den Einsatz der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion im tiefen UV-Bereich mit spektral aufgelöster Detektion sollte das Problem der Nachweisempfindlichkeit, das sich in der CE bei optischen Detektionsmethoden durch den kurzen Lichtweg innerhalb der Kapillare ergibt, kompensiert werden.

Ziel des dritten Teils der Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer antikörpergestützten Festphasenextraktion von M, M3G und M6G aus Blutproben. Durch die Immobilisierung spezifischer Antikörper gegen M, M3G bzw. M6G sollten Immunoadsorber hergestellt und zur Gewinnung weitgehend Matrix-unbelasteter Extrakte eingesetzt werden.

2 HEROIN

Heroin wird aus Rohopium, dem an der Luft getrockneten Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae), hergestellt. Schlafmohn ist eine einjährige Pflanze, die bis zu 1,5 m hoch wird, längliche graugrüne Blätter besitzt und zur Blütezeit weiße bis rotviolette Blüten bildet. Zur Reifezeit trägt die Pflanze Porenkapseln mit einigen hundert nierenförmigen, feingrubigen, meist blauschwarzen Samen [1]. In der Zeit zwischen Blüte und Reife produziert der Schlafmohn in seinem Röhrensystem einen Milchsaft (Latex), in dem Alkaloide wie z.B. Morphin, Codein und Papaverin angereichert sind. Die höchste Alkaloid-Konzentration erreicht die Mohnpflanze ca. 10 Tage nach der Blüte. Zu diesem Zeitpunkt wird Rohopium gewonnen, indem die grüne Mohnkapsel abends nach Sonnenuntergang angeritzt und der über Nacht ausgetretene und getrocknete Milchsaft am folgenden Morgen vor Sonnenaufgang abgekratzt wird. 20.000 Mohnkapseln liefern dabei rund 1 kg Rohopium.

Rohopium besteht zu 20 - 30 % aus ca. 40 verschiedenen, überwiegend als Salze der Mekonsäure, Milchsäure, Fumarsäure und Schwefelsäure vorliegenden Alkaloiden vom Morphinan- und Benzylisochinolin-Typ. Vom Morphinan-Typ sind insbesondere Morphin (bis zu 23 %), Codein (bis zu 3,5 %) und Thebain (bis zu 1,0 %) im Rohopium enthalten, vom Benzylisochinolin-Typ vor allem Papaverin (bis zu 3,0 %), Noscapin (bis zu 12 %) und Narcein (bis zu 0,7 %). Je nach Anbaugebiet variieren die Alkaloidanteile.

Die Kultivierung konzentriert sich in den letzten Jahren mehr und mehr auf einige wenige Länder. Allein Afghanistan und Myanmar sind seit einigen Jahren mit zusammen etwa 90 Prozent der illegalen Weltopiumproduktion die Hauptlieferanten, wobei in Afghanistan mehr als drei Viertel der Weltproduktion an Opium stattfindet. Die übrigen früheren Hauptproduzenten für Opium, die im „goldenen Dreieck“ (Südwest-China, Laos) und dem „goldenen Halbmond“ (Pakistan, Iran, Türkei) liegen, konnten während der letzten 5 - 15 Jahre mit

internationaler Unterstützung die illegale Opiumproduktion stark einschränken oder gar eindämmen. Auch Vietnam, Libanon, Ägypten, Guatemala und Indien spielen für die Belieferung der internationalen Drogenmärkte keine wesentliche Rolle mehr [2].

Der Gebrauch von Morphin und Heroin, dem 6-mal stärker als Morphin wirkenden Diacetylmorphin, ist schon lange bekannt:

- Schon im 4. Jahrtausend vor Christus wurde in den Schriften der Sumerer festgehalten, dass der Saft der Mohnkapsel als Schmerz- und Beruhigungsmittel eingesetzt wurde.
- Um 500 vor Christus wurde das Missbrauchspotenzial des Opiums von den Griechen erkannt.
- Ab dem 16. Jahrhundert war in China das Rauchen von Opium mit Tabak weit verbreitet.
- 1804 isoliert der Paderborner Apotheker Sertürner das Alkaloid Morphin aus Opium und gilt als Entdecker des Morphins.
- 1828 bietet die Firma Merck Morphin als Medikament an.
- Die erstmalige Synthese des Heroins erfolgte 1874 im Londoner St. Mary's Hospital durch Acetylierung von Morphin. Man erhoffte sich ein analgetisch wirksames Medikament ohne Suchtpotenzial.
- 1879 weist Louis Lewin die suchterzeugenden Eigenschaften von Morphin nach.
- 1897 kommt das Medikament "Heroin" der Firma Bayer zur Behandlung der Morphinabhängigkeit und u. a. zur Behandlung von Atemwegserkrankungen auf den Markt.
- Erst sieben Jahre später (1904) wird das im Vergleich zu Morphin erhöhte Suchtpotenzial des Heroins erkannt.
- 1921 wurde Heroin ein verschreibungspflichtiges Arzneimittel und ist seit 1958 als Fertigarzneimittel nicht mehr erhältlich [3,4].

Heute fallen Heroin und Morphin unter das Betäubungsmittelgesetz (BtmG), in dem Morphin als verkehrsfähiges und verschreibungsfähiges Betäubungsmittel (Btm) eingestuft wird (§1 Abs.1 i.V. m. Anlage III), wogegen das Heroin als nicht verkehrsfähiges Btm gilt (§1 Abs.1 i.V. m. Anlage I). Die Indikation für das starke Analgetikum Morphin ist die Behandlung starker bis stärkster Schmerzen, wie sie z. B. bei Tumorpatienten auftreten.

Zur Gewinnung von Heroin werden die Alkaloide aus dem Ausgangsprodukt Rohopium extrahiert, anschließend erfolgt die Fällung bei pH 9 oder mittels eines organischen Lösungsmittels. Nach der Aufarbeitung der Alkaloidfraktion durch Umkristallisieren wird Heroin gewonnen, indem mittels Essigsäureanhydrid beide OH-Gruppen der Morphin-Base acetyliert werden und das Heroin alkalisch ausgefällt wird. Auf dem illegalen Markt schließlich wird vereinzelt die ungestreckte Heroin-Base, meist jedoch ein Heroingemisch angeboten, das Coffein und Paracetamol enthält und einen Gehalt von maximal 20 % Heroin hat [3].

Die illegale Herstellung und der illegale Handel mit Heroin hatten ihren Ursprung in den USA, wo Heroin bereits 1924 verboten wurde. Viele US-Soldaten, die aus dem Vietnamkrieg zurückkehrten, waren heroinabhängig. Sie wurden auf dem Rückweg aus Vietnam zur Entgiftung zunächst in das bis dahin drogenfreie Deutschland geschickt. So kam Anfang der 70er Jahre das Heroinproblem in die Bundesrepublik.

In den Jahren 1987 bis 1991 nahm die Anzahl der Rauschgifttodesfälle in Deutschland sprunghaft zu. Diese Entwicklung ging einher mit einem gleichzeitigen starken Anstieg der Konsumenten harter Drogen. Vermehrt traten Fälle auf, bei denen relativ niedrige Heroin-Konzentrationen neben gleichzeitiger Alkohol- und / oder Medikamenteneinnahme todesursächlich waren (Mischintoxikation). Seit Anfang der 90er Jahre ist eine Stagnation bzw. ein leichter Rückgang bei der Anzahl der Rauschgifttodesfälle zu beobachten (Abb. 1).

Der Begriff Rauschgifttodesfall wurde vom Bundeskriminalamt (BKA) definiert. Demzufolge handelt es sich um Todesfälle, die in einem kausalen Zusammenhang mit dem missbräuchlichen Konsum von Betäubungs- oder Ausweichmitteln bzw. Ersatzstoffen stehen.

Darunter fallen insbesondere:

- Todesfälle infolge Überdosierung,
- Todesfälle infolge langzeitigen Missbrauchs,
- Selbsttötungen aus Verzweiflung über die Lebensumstände oder unter der Einwirkung von Entzugserscheinungen,
- Tödliche Unfälle von unter Drogeneinfluss stehenden Personen [5].

Die meisten dieser Rauschgifttoten sind Heroinabhängige, da Heroin unter den illegal verwendeten BTM die Substanz ist, die durch akzidentelle und suizidale Überdosierung das höchste Mortalitätsrisiko birgt.

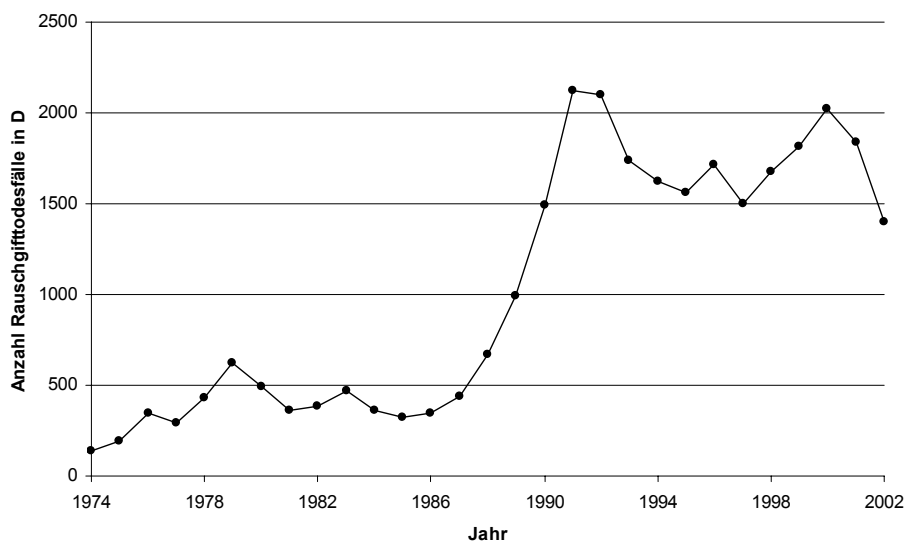


Abb. 1: Rauschgifttodesfälle in Deutschland.

2.1 BIOTRANSFORMATION UND WIRKUNG VON HEROIN

2.1.1 AUFNAHME UND METABOLISMUS

Die Aufnahme von Heroin erfolgt vor allem intravenös. Die Injektionslösung wird aus Heroin-Pulver unter Zugabe von Ascorbinsäure und einer geringen Menge Wasser unter Aufkochen bereitet. Wegen des plötzlichen, intensiven Wirkungseintritts („Flash“) wird diese Konsumform bevorzugt. Die Aufnahme von Heroin kann auch nasal erfolgen. Dabei wird das Heroin als fein zerkleinertes Pulver geschnupft und über die Nasenschleimhaut absorbiert. Eine weniger übliche Konsummethode ist das Erhitzen von Heroin-Pulver auf dünnen Metallfolien und das Inhalieren der entstehenden Dämpfe durch eine Röhre. Heroin wird ebenfalls als Zusatz in Zigaretten geraucht. Bei den drei zuletzt genannten Methoden sind größere Mengen nötig, um einen ähnlichen Effekt wie bei einer intravenösen Heroininjektion zu erzielen. Der sog. „Flash“ fällt bei diesen Konsumformen weniger stark aus. Die orale Bioverfügbarkeit von Heroin liegt < 1 % [3, 6, 7].

Nach der intravenösen Aufnahme von Heroin beträgt die Plasmahalbwertszeit in Vollblut nur ca. 3 Minuten. Heroin wird zunächst unter Katalyse von Esterasen des Bluts zu 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) und dann zu Morphin deacetyliert. Die Plasmahalbwertszeit des entstehenden und ebenfalls analgetisch wirksamen 6-MAM beträgt ca. 10 Minuten, Morphin besitzt eine Plasmahalbwertszeit von ca. 120 Minuten. [6, 8 - 11]. Die Hydrolyse von 6-MAM zu Morphin findet vor allem in der Leber statt. Durch Konjugation von Morphin an aktivierte Glucuronsäure entstehen die Phase-II-Metaboliten, Morphin-3- β -D-glucuronid (M3G) und Morphin-6- β -D-glucuronid (M6G). Durch Konjugation über die phenolische Hydroxylfunktion in Position 3 entsteht der Hauptmetabolit M3G, durch Konjugation der sekundären alkoholischen Hydroxylgruppe in Position 6 entsteht M6G.

Das Verhältnis M3G : M6G beträgt ca. 4 : 1. In geringem Ausmaß werden auch Morphin-3,6-Diglucuronid, Morphin-3-ethersulfat sowie Normorphin gebildet (Abb. 2). Codein wird bei der Metabolisierung von Morphin nicht gebildet. Nach einem Heroinkonsum im Blut nachweisbare geringe Gehalte von Codein oder Acetylcodein sind auf deren Anwesenheit im Heroin zurückzuführen.

Nach der Injektion von Heroin erfolgt die Resorption sehr schnell. Die schon 2 Minuten nach der Injektion erreichte höchste Heroin-Plasmakonzentration sinkt innerhalb von ca. 30 Minuten unter die Nachweisgrenze ab, während Morphin wenige Minuten nach der Injektion im Plasma nachgewiesen werden kann. Die Wirkdauer nach einer Heroininjektion beträgt ca. 4-8 Stunden. Im Zeitraum von 2-8 Stunden nach der Injektion sind 6-MAM und Morphin in geringen Mengen im Urin nachweisbar. Insgesamt werden innerhalb von 24 Stunden bis zu 85 % der aufgenommenen Menge als Glucuronid über den Urin (glomeruläre Filtration) und bis zu 10 % über den Darm (Galle) ausgeschieden [3, 12 - 15].

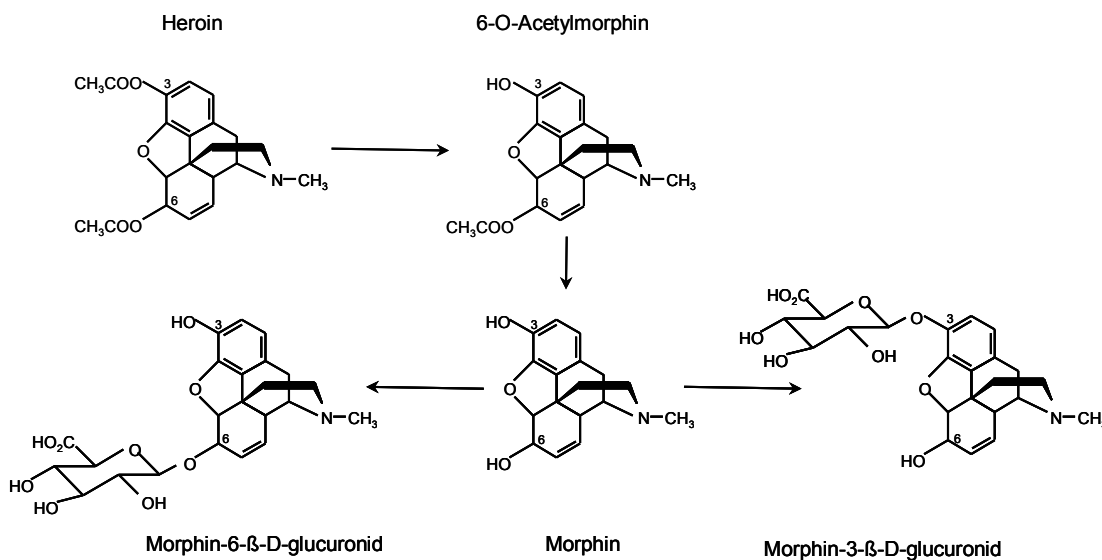


Abb. 2: Biotransformation von Heroin.

2.1.2 ASPEKTE DER OPIOID-WIRKUNG

Zentrale beobachtete Wirkungen nach der Aufnahme von agonistisch wirkenden Opiaten wie Heroin oder Morphin sind das Auftreten von Euphorie, Analgesie, Sedation, eine mehr oder minder ausgebildete antiemetische Wirkung, Atemdepression, im tödlichen Verlauf bis zur Atemlähmung, sowie eine antitussive Wirkung, hervorgerufen durch eine Hemmung des Hustenzentrums. Außerdem treten Bradykardie, bedingt durch Zunahme des zentralen Vagotonus, und Miosis, verursacht durch die Erregung von Neuronen im Kerngebiet des Nucleus oculomotorius, auf. Durch die Wirkungen auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltraktes ist die Motilität herabgesetzt, der Tonus ist jedoch stark erhöht. Morphin wirkt ferner direkt auf Mastzellen ein und setzt dort Histamin frei. Es kann eine so genannte anaphylaktoide Reaktion erfolgen, die sich durch eine Hautrötung und Juckreiz bemerkbar macht.

Die o. g. Beobachtungen sind auf Wirkungen an den Opioid-Rezeptoren zurückzuführen. Die Aktivitäten der Opiate führen zu einer Stabilisierung des Membranpotentials und somit zu einer Verminderung der Transmitterfreisetzung (Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin) aus Neuronen in den schmerzvermittelnden Neuronenketten. Bei diesem Prozess wird der Ca^{2+} -Ionen-Einstrom in das Zellinnere gehemmt, und eine antagonistische Wirkung dieser Ionen bezüglich der morphinerzeugten Analgesie wird unterdrückt.

Die Opioid-Rezeptoren können prä- oder postsynaptisch lokalisiert sein. Sie werden in μ -, κ - und δ - Rezeptoren unterteilt. Die μ - Rezeptoren findet man vor allem in schmerzbezogenen Kerngebieten wie dem Limbischen System, Thalamus, Cuneatum, Raphe-Kern, Nucleus gracilis, Locus coeruleus, Nucleus reticularis gigantocellularis und dem zentralen Höhlengrau sowie auch in respirationsbezogenen Kerngebieten, wie dem Nucleus ambiguus und dem Nucleus tractus solitarii, als auch in der Area postrema. Die κ - Rezeptoren sind im Hypothalamus lokalisiert, die δ - Rezeptoren in der dorsalen grauen spinalen Substanz. Man unterscheidet die Rezeptoren μ_1 und μ_2 , κ_1 und κ_3 sowie δ_1 und

δ_2 . Den einzelnen Rezeptoren werden verschiedene Wirkungen zugeordnet (Tab. 1).

Tab. 1: Opioid-Rezeptoren und zugehörige Wirkungen [16]

Rezeptor-Typ	μ	κ	δ
Analgesie:			
supraspinal	μ_1	κ_3	δ_2
spinal	μ_2	κ_1	δ_1
Stimmung	Euphorie	Dysphorie	
Atmung	μ_2 Depression	Depression	
Sedation	ja		ja
Pupille	Miosis		
Dependenz erzeugend	ja	wenig	ja
Erbrechen	ja		

Die Wirkung des Morphins und seiner Derivate ist unterschiedlich intensiv auf die μ - Rezeptoren (sehr starke agonistische Wirkung) und die κ - bzw. δ -Rezeptoren (weniger stark ausgeprägte agonistische Wirkung) verteilt [16 – 23].

Durch Heroin wird eine rascher eintretende und schneller anflutende Wirkung als beim Morphin hervorgerufen. Die euphorisierende Wirkung wird daher als intensiver empfunden. Heroin passiert aufgrund seiner besseren Lipidlöslichkeit die Blut-Hirn-Schranke leichter als das Morphin selbst. Wie in allen Geweben wird Heroin auch im Gehirn schnell zu 6-MAM und Morphin, sowie zu den Phase-II-Metaboliten abgebaut, woraufhin die agonistische Wirkung auf die Opioidrezeptoren in den entsprechenden Bereichen des Gehirns eintritt. Die Passiergeschwindigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Opiode ist individuell und könnte von einer variierenden Aktivität bestimmter Transportsysteme in der Blut-Hirn-Schranke abhängen. Als Transportprotein

wird das P-Glykoprotein, das Produkt des MDR 1-Gens (MDR = multidrug resistance), vermutet [24, 25].

Die Beiträge von M3G und M6G zum opioiden Effekt wurden ausführlich in den letzten Jahren erforscht. Mittlerweile hat sich die Meinung etabliert, dass M3G frei von opioider Aktivität ist, obwohl vereinzelt anregende Effekte nach M3G-Gabe beobachtet wurden [26, 27]. Die Erforschungen der M6G-Effekte führten zu komplexeren Ergebnissen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die intravenöse Gabe von M6G Schmerzlinderung verschaffte, war eine präventive intravenöse Gabe von M6G für die Behandlung postoperativer Schmerzen ineffektiv [26, 28]. Ebenso wurden nach einer kurzzeitigen M6G-Infusion keine EEG- (Elektroenzephalogramm) Effekte beobachtet [29]. Nach intrathekaler Verabreichung von M6G konnte jedoch wiederholt eine sehr gute postoperative Analgesie erreicht werden, wobei die Wirksamkeit im Vergleich mit Morphin größer war [30 - 33]. Es gibt außerdem Anhaltspunkte für die Wechselwirkung von M6G mit einem spezifischen Opiod-Rezeptor [34] und dafür, dass M6G ein günstigeres Toxizitätsprofil als Morphin bezüglich Atemdepression, Erbrechen, Sedierung und der so genannten anaphylaktoiden Reaktion hat [26, 35 - 39].

Die primäre Intention beim Missbrauch von Heroin und Morphin ist das Erzielen der euphorisierenden Wirkung. Schon der Konsum weniger Einzeldosen ruft eine Abhängigkeit sowohl psychischer als auch körperlicher Art hervor. Sie fällt unter die Abhängigkeit vom Morphintyp, die innerhalb von Tagen auftritt und von schneller Ausbildung von Gewöhnung und Toleranz gekennzeichnet ist. Diese Toleranz gegenüber Opioiden kann beträchtlich sein. So kann eine intravenös verabreichte Morphin-Dosis von 20 mg für einen Morphin-ungewohnten Erwachsenen tödlich sein, jedoch kann eine gewöhnte Person eine tägliche Menge von > 2000 mg tolerieren.

Der gleichzeitige Konsum von Heroin mit Alkohol, Cannabis oder Benzodiazepinen ist weit verbreitet. Die Aufsummierung und / oder Verstärkung der toxischen Symptome der Einzeldrogen wie z. B. Atemdepression, Hypotonie, Bradykardie oder Erbrechen mit gleichzeitiger Hemmung des Hustenzentrums kann auch bei einer niedrigen Heroindosis zum Tode führen [40].

2.2 BESTIMMUNG VON OPIATEN AUS KÖRPERFLÜSSIGKEITEN UND ORGANMATERIAL

Seit Mitte der 70er Jahre war mittels der Gaschromatographie (GC) die Substanzidentifizierung in Extrakten aus organischem Material möglich [41 - 43]. Die Kopplung der GC mit der massenspektrometrischen (MS) - Detektion zu Beginn der 80er Jahre ermöglichte den Nachweis in biologischen Extrakten mit hoher Sensitivität [44]. Für die GC-Trennung von Opiaten müssen diese in thermostabile, verdampfbare Derivate überführt werden. Dies erfolgt z. B. durch die Veresterung der Hydroxylgruppen mit Säureanhydriden wie Essigsäureanhydrid, Propionsäureanhydrid, Trifluoressigsäureanhydrid oder Pentafluorpropionsäureanhydrid [45 - 48] oder durch Reaktion zu Alkylsilylderivaten mit z.B. N-O-bis-(Trimethylsilyl)trifluoracetamid oder Methyl-tert-butylsilylfluoracetamid [46, 49 - 50]. Die massenspektrometrische Bestimmung erfolgt sowohl nach positiver als auch nach negativer Ionisierung, die durch CI (chemical ion mode) oder EI (electron impact mode) erreicht werden, mit verschiedenen Massenspektrometertypen (Nachweisgrenze M: ca. 3 ng/ml Plasma) [51]. Allen GC-Bestimmungen gemein ist der Nachteil, dass weder eine Identifizierung noch eine Differenzierung der Glucuronide per GC erfolgen kann. Die Bestimmung der Summe von M3G und M6G ist lediglich als errechnete Differenz zwischen den Gehalten an gesamtem Morphin und freiem Morphin möglich. Dazu müssen zwei Probenansätze, von denen einer der enzymatischen oder säurekatalysierten Hydrolyse zur Spaltung der Glucuronide unterzogen wurde, parallel aufgearbeitet und analysiert werden. Die ermittelte Differenz der beiden Morphingehalte wird als gebundenes Morphin bezeichnet und den Morphinkonjugaten zugeordnet.

Die Bestimmung der Phase-II-Metaboliten neben Morphin in biologischem Material ist seit Mitte der 80er Jahre mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) möglich. Vorteil bei der HPLC ist die Möglichkeit zur Trennung sowohl lipophiler als auch hydrophiler Substanzen in einem einzigen Analysengang durch die Gradientenführung des Fließmittels. Zur gleichzeitigen Quantifizierung von M, M3G und M6G wurde

die HPLC-Trennung an unpolaren RP (reversed phase) - Phasen mit der UV-Detektion [52 - 54], der durch Xe-Hg-Lampen angeregten Fluoreszenzdetektion [55, 56] und der elektrochemischen Detektion [57 - 59] gekoppelt. Auch die Kombination von Detektionsverfahren wird beschrieben [57, 59, 60]. Die Sensitivität der Bestimmungen wurde hier jedoch bei der Analytik in biologischen Materialien durch Interferenzen aus der komplexen Matrix immer wieder eingeschränkt. Durch die Kopplung der HPLC mit der massenspezifischen Detektion (LC-MS) wurden Sensitivität und Selektivität gesteigert. Der sensitive und selektive Nachweis von Morphin und Metaboliten in biologischen Matrices wie Blut und Urin gelang mit der Kopplung von HPLC an APCI-MS (atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry) und an ESI-MS (electrospray ionization-mass spectrometry). Die Nachweisgrenze im Blutextrakt liegt für Morphin nach der LC-MS-Kopplung bei ca. 5 ng/ml Plasma [61 - 65].

Die Kapillarelektrophorese (CE) bietet auch für thermolabile, nicht verdampfbare Moleküle die Möglichkeit einer schnellen, hochaufgelösten Trennung bei minimalem Proben- und Pufferverbrauch. Die CE wurde für die forensische Analytik zunächst als Screening-Methode entwickelt [66]. Die sensitive Analytik von Morphin nach Extraktion gelang hier mit der Kopplung der CE an einen massenspektrometrischen Detektor (Nachweisgrenze M in Urin: 10 ng/ml) [67].

Immunologische Testverfahren für Opiate wurden ab 1969 entwickelt und gehören heute als Screeningverfahren in der forensischen Toxikologie zur Routineanalytik. Zur quantitativen Bestimmung von Morphin sind ELISA- (enzyme-linked immunosorbent assay) und RIA- (Radioimmunoassay) Testkits kommerziell erhältlich. Jedoch können immunologische Verfahren z.B. bei der Analytik im Urin durch Zusatz bestimmter Störsubstanzen (sog. Stealth-Substanzen) empfindlich gestört werden. Ein immunologisch ermitteltes quantitatives Ergebnis sollte daher stets mit einer anderen Analysenmethode abgesichert werden [48, 68, 69].

Wichtig für eine sensitive Analytik in biologischem Material ist eine geeignete Extraktionsmethode. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion nach einem vereinfachten Stas-Otto-Trennungsgang bei pH 9,5 und die extractive

Derivatisierung machten aufgrund des hohen Lösungsmittelverbrauchs und der schlechten Übertragbarkeit auf größere Probenzahlen den Festphasenextraktionsmethoden Platz. Festphasenextraktionen (solid phase extractions, SPE) werden an reinen RP-Phasen (reversed phase, C₈-, C₁₈-, C₁₀-Material) oder an Mischphasen, bestehend aus RP-Material und Ionenaustauschermaterial, durchgeführt. Vorgefüllte Einweg-Extraktionssäulen sind in großer Vielfalt kommerziell erhältlich. Hier kann durch Waschschrirte und pH-Variation während der Extraktion ein Extrakt erhalten werden, der nur wenig durch Störsubstanzen aus der Matrix belastet ist.

3 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT FLUORESZENZDETEKTION

3.1 SPEKTROSKOPISCHE DETEKTIONSVERFAHREN

Die UV-Detektion und die Fluoreszenzdetektion gehören zu den spektroskopischen Detektionsverfahren. Beide Detektionsverfahren setzen voraus, dass im zu detektierenden Molekül ein sog. Chromophor vorliegt, ein Molekülteil, in dem ein delokalisiertes π -Elektronensystem existiert, welches Photonen absorbieren kann. Durch die Absorption von Photonen werden π -Elektronen des Chromophors vom Grundenergieniveau auf energetisch höhere Niveaus angehoben, und das Molekül wird vom Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt. Für diese Anregung ist energiereiches, kurzwelliges Licht (UV-Bereich: 200 - 380 nm) notwendig. Die Absorption von Photonen bewirkt die Abschwächung der Intensität des eingestrahnten Lichts, welche in der UV-Detektion gemessen und ausgewertet wird.

Die angeregten Moleküle verweilen nur kurz in dem angeregten Zustand. Die auf dem höheren Energieniveau befindlichen Elektronen verlieren Energie und fallen dann unter Energieabgabe in Form von Wärme, Schwingungen oder Emissionslicht auf das ursprüngliche Niveau zurück [70]. Im letzteren Fall spricht man von Fluoreszenz und bei dem fluoreszierenden Molekül von einem Fluorophor [71]. Dabei ist die emittierte Wellenlänge stets größer als die Anregungswellenlänge (Stokes-Shift, d.h. $\lambda_{Em} > \lambda_{Ex}$), da bei dem beschriebenen Anregungsprozess Energie verbraucht wird. Bei der Fluoreszenzdetektion wird die Intensität des emittierten Lichts gemessen und quantitativ ausgewertet. Das Wellenlängenspektrum der Fluoreszenz ist ein spezifisches Merkmal für das fluoreszierende Chromophor. Bei der Auswertung eines für die Fluoreszenz des Analyten typischen Wellenlängenbereichs bietet die Fluoreszenzdetektion daher gegenüber der UV-Detektion eine sehr hohe Selektivität. Die Fluoreszenz ausgedehnter π -Elektronensysteme kann sehr intensiv sein. So kann die

Fluoreszenzdetektion nicht nur selektive, sondern auch sehr sensitive Messergebnisse liefern.

Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz (Abb. 3) sind bei der UV-Detektion die optische Weglänge, die molare Konzentration des Analyten sowie der molare lineare Extinktionskoeffizient die limitierenden Größen für die Nachweisgrenze.

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Abb. 3: Lambert-Beersches Gesetz, UV-Detektion.

(A = Extinktion, I_0 , I = Intensität des eingestrahnten und abgeschwächten Lichts, ε = molarer linearer Extinktionskoeffizient, c = molare Konzentration des Analyten, d = optische Weglänge)

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit kann eine Verlängerung des Lichtwegs, die Aufkonzentrierung des Analyten in der Probe sowie die Vergrößerung des molaren Extinktionskoeffizienten durch die Verschiebung der Detektionswellenlänge, meist zu kürzeren Wellenlängen hin, herangezogen werden [72].

Auch bei der Fluoreszenzdetektion sind der Lichtweg, die Konzentration des Analyten in der Probe und der molare Extinktionskoeffizient die limitierenden Größen für die Empfindlichkeit der Detektion. Während bei der UV-Detektion das Verhältnis von abgeschwächter zu eingestrahler Lichtintensität ausgewertet wird, ist bei der Fluoreszenzdetektion die Intensität des emittierten Lichts direkt proportional zur Intensität des eingestrahnten Lichts, wie in der Gleichung von Parker beschrieben wird (Abb. 4).

$$I_{em} = \varphi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d})$$

Abb. 4: Gleichung von Parker, Fluoreszenzdetektion.

(φ_f = Quantenausbeute, I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichts, I_{em} = Intensität des emittierten Lichts, ε = molarer linearer Extinktionskoeffizient, c = molare Konzentration des Analyten, d = optische Weglänge)

Die Verwendung von leistungsstarken Lichtquellen ist für eine empfindliche Fluoreszenzdetektion daher von entscheidender Bedeutung [73]. Laser können mit hoher Leistung Licht einer Wellenlänge emittieren und den Lichtstrahl auf einen Punkt fokussieren. Sie sind für die on-line-Detektion direkt im Detektionsfenster der Quarz-Kapillare daher sehr gut geeignet. Bisher fand die Laser – induzierte Fluoreszenz – Detektion vor allem Anwendung in der Kapillarelektrophorese [74 - 79] und nur selten in der HPLC [80 - 83]. Bei dem Einsatz von Lasern stehen in der Regel nur bestimmte feste Wellenlängen zur Verfügung. Die meisten kommerziell erhältlichen Laser emittieren mit einer Leistung von maximal 5 mW im oberen UV - oder VIS - Bereich. In diesem Wellenlängenbereich arbeiten z. B. der Argon – Ionen - Laser (λ_{Em} = 488 nm), der Helium – Cadmium - Laser (λ_{Em} = 325 nm, 442 nm) oder der Diodenlaser (λ_{Em} = 635 nm).

Für die Analytik der meisten Arzneistoffe ist jedoch die Anregung im tiefen UV-Bereich für die native Fluoreszenz-Analytik notwendig. Zu den in diesem Bereich emittierenden Lasern gehören die in dieser Arbeit verwendeten Laser: ein gepulster Neodym – Yttrium – Aluminium – Granat – Laser (λ_{Em} = 266 nm), ein frequenzverdoppelter Argon – Ionen – Laser (λ_{Em} = 229 nm, 244 nm, 257 nm, 264 nm) und ein Titan – Saphir – Laser ($\lambda_{Em} \geq 244$ nm). Die beiden Letzteren emittieren das UV-Licht quasikontinuierlich mit einer Leistung bis zu 100 mW und eignen sich daher besonders gut für quantitativ auswertbare Fluoreszenzanregungen.

Neben den beschriebenen Faktoren hängt das Fluoreszenzverhalten eines Fluorophors ebenfalls von den Bedingungen der Flüssigkeit, in der es gelöst ist, ab. Wechselwirkungen des fluoreszierenden Moleküls mit organischen Lösungsmitteln können zu einer Verschiebung des Emissionsspektrums führen [84], höhere Temperaturen können eine Fluoreszenzschwächung verursachen [85, 86]. Auch der pH-Wert der Lösung kann das Verhalten eines Fluorophors beeinflussen. So kann die Dissoziation des Analyten zu Fluoreszenzeinbußen (Quenching) führen [87,88].

3.2 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT FLUORESZENZDETEKTION

Die Trennung von Morphin und seinen Metaboliten M3G und M6G wurde an einer unpolaren stationären Phase (reversed Phase, C₁₈- Material) nach dem Prinzip der Ionenpaarchromatographie durchgeführt. Die Auftrennung der drei Analyten wurde durch den Zusatz eines Alkylsulfonats als Gegenion im sauren, polaren Fließmittel erreicht. Die Ionenchromatographie dient vor allem der Trennung unterschiedlich dissoziierter Verbindungen, wie in diesem Fall das stärker basische Morphin ($pK_a = 8,3$ bzw. $9,5$) auf der einen und die Glucuronide ($pK_{a(M3G)} = 2,8$ bzw. $pK_{a(M6G)} = 3,2$) auf der anderen Seite. Die Basen-Kationen bilden mit der zugegebenen Heptansulfonsäure Ionenpaare, die nach außen hin neutral und lipophil sind und daher mit der unpolaren stationären Phase in Wechselwirkung treten können. Durch diese Maskierung der Polarität ist es möglich, sowohl unpolare als auch polare Substanzen länger auf der C₁₈- Säule zu halten.

Die Detektion erfolgte über die Fluoreszenz-Anregung im tiefen UV mittels einer Hg-Xe-Lampe, wodurch eine sensitive und selektive Bestimmung der Analyten ermöglicht wurde.

Das Fluoreszenzmaximum von M, M3G bzw. M6G in Lösung in Fließmittel bei der Anregung durch UV-Licht ($\lambda = 235 \text{ nm}$) liegt bei ca. 345 nm. Die drei Analyten zeigen ein sehr ähnliches Fluoreszenzspektrum (Abb. 5).

Die maximale Fluoreszenzintensität, die bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$ emittiert wird, ist bei einer Anregungswellenlänge von ca. $\lambda_{\text{Ex}} = 235 \text{ nm}$ gegeben (Abb. 6).

Die Anregungswellenlänge wird aufgrund dieser Fluoreszenzeigenschaften bei ca. $\lambda_{\text{Ex}} = 235 \text{ nm}$ gewählt, die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt bei ca. $\lambda_{\text{Em}} = 345 \text{ nm}$. Der hier verwendete Fluoreszenzdetektor erlaubte die Einstellung der Wellenlängen nur mit einer Genauigkeit von $\pm 5 \text{ nm}$.

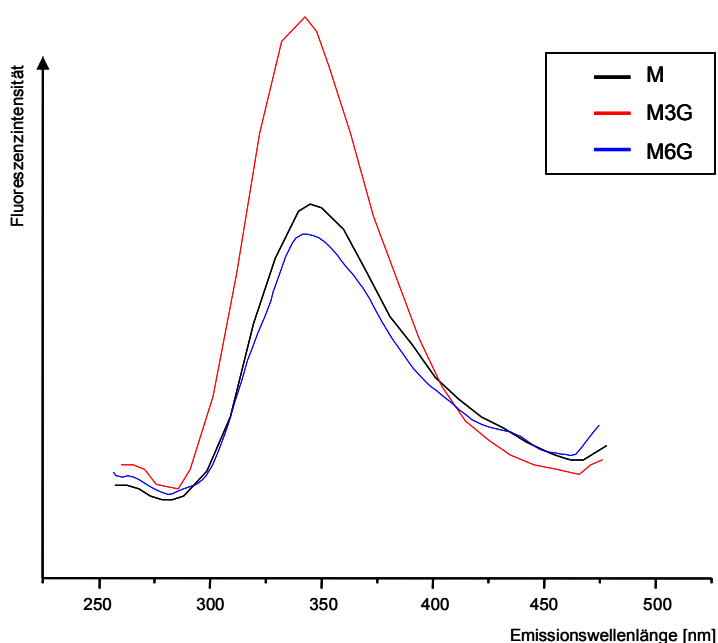


Abb. 5: Fluoreszenzspektrum M, M3G, M6G (10 $\mu\text{g/ml}$, Lsg. in Fließm.) bei Anregung durch UV-Licht ($\lambda_{\text{Ex}} = 235 \text{ nm}$).

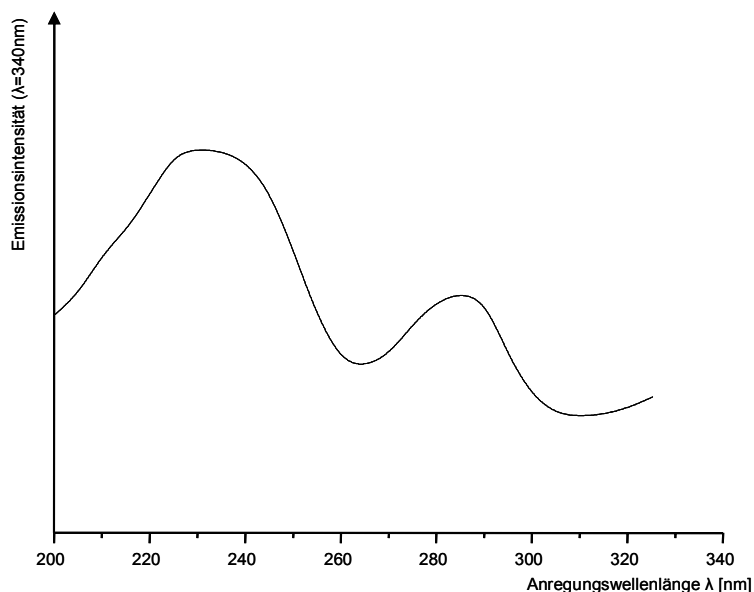


Abb. 6: Anregungsspektrum M HCl · 3 H₂O (Lsg. in Fließm.):
Emissionsintensitäten ($\lambda_{Em} = 345 \text{ nm}$) bei der Anregung im UV-Bereich.

3.2.1 FESTPHASENEXTRAKTION VON M, M3G UND M6G AUS BLUT

Bei verschiedenen pH-Werten wurden Festphasenextraktionen an unterschiedlichen Materialien durchgeführt. Dabei kamen handelsübliche unpolare C₁₈-Phasen und C₈-Phasen sowie Mischphasen, bestehend aus hydrophobem C₈-Material und geladenem Kationenaustauscher, zum Einsatz. Dabei stellte sich heraus, dass eine Adsorption von M, M3G und M6G am besten bei pH 9,3 an unpolarem C₈-Material erreichbar war.

Die C₈-Säulen wurden mit MeOH, H₂O und Puffer (pH 9,3) konditioniert. Die auf pH 9,3 gepufferten Vollblutproben wurden nach dem Abzentrifugieren auf die konditionierten Säulen gegeben. Nach dem Auswaschen von Matrixbestandteilen und dem Trocknen der Phase erfolgte die Elution der Analyten mit MeOH. Das Eluat wurde zur Trockene eingengt und anschließend in HPLC-Fließmittel aufgenommen, wobei eine

Aufkonzentrierung um den Faktor 5 erreicht werden konnte. Die so erhaltenen Extrakte wurden zur HPLC eingesetzt.

3.2.2 VALIDIERUNG DER HPLC - BESTIMMUNG VON M, M3G UND M6G IN BLUT NACH FESTPHASENEXTRAKTION

Die Validierung umfasste den Nachweis der Spezifität und Linearität. Präzision und Richtigkeit wurden für drei Kalibrationsstufen ermittelt und die Wiederfindungsraten bestimmt. Außerdem wurden Bestimmungs- und Nachweisgrenze von Morphin, M3G und M6G erfasst.

3.2.2.1 SPEZIFITÄT

Zur Bestimmung der Spezifität wurde das Chromatogramm eines Leerblutextrakts mit dem eines mit M, M3G und M6G gespikten Blutes verglichen (Abb. 7). Im Bereich der Analyten traten keine störenden Matrixsignale auf.

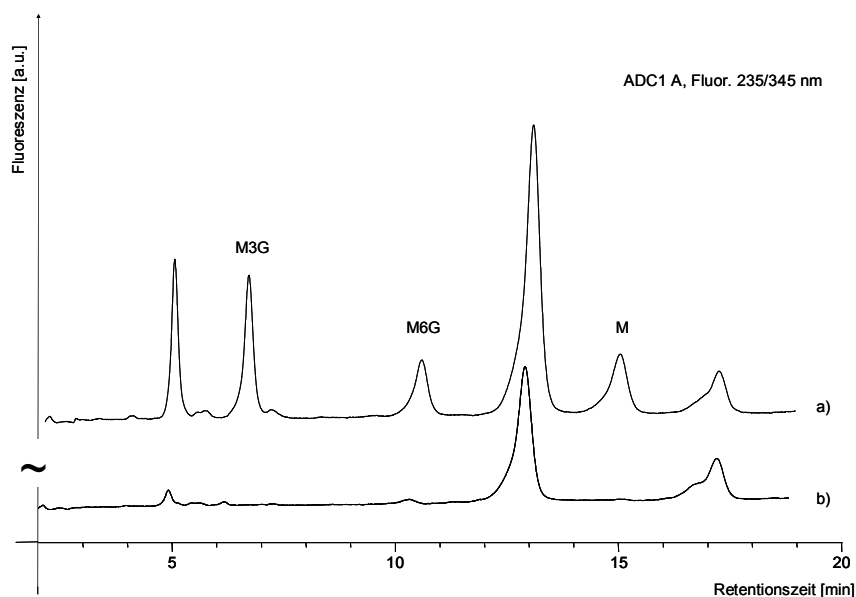


Abb. 7: a) Chromatogramm des Extraktes eines mit je 250 ng/ml M, M3G und M6G gespickten Blutes.
b) Chromatogramm des Leerblutextraktes.
Chromatographische Bedingungen: siehe Kap. 3.1 des exp. Teils.

3.2.2.2 WIEDERFINDUNG

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden je 3 gespickte Blutproben in 4 Konzentrationen (je 50 ng/ml Blut, 250 ng/ml Blut, 500 ng/ml Blut und 1000 ng/ml Blut) sowie eine Blindprobe extrahiert und analysiert. Als Vergleich dienten Standardlösungen mit den gleichen Konzentrationen, welche ohne Extraktion analysiert wurden. In Abb. 8 - Abb. 10 sind die Peakflächen und Regressionsgeraden beider Versuchsreihen je Analyt dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten betragen für die Standardlösungen 0,9999 – 1 und für die extrahierten Blutproben 0,9921 – 0,9997. Die Wiederfindungsraten wurden aus dem Verhältnis der Steigungen beider Regressionsgeraden pro Analyt ermittelt und betragen für Morphin 64 %, für M3G 56 % und für M6G 49 %.

Während Morphin über den gesamten Konzentrationsbereich bis 1000 ng/ml mit gleich bleibender Wiederfindung extrahiert wurde, waren die für M3G und M6G ermittelten Wiederfindungsraten jeweils bis zu einer Konzentration von 500 ng/ml konstant.

Bei pH 9,3 zeigen M, M3G und M6G ein unerwartet lipophiles Verhalten, jedoch ist die Lipophilie der Glucuronide aufgrund der Glucuronidstruktur stets geringer ausgeprägt als beim M [89].

Sie hatten daher erwartungsgemäß eine geringere Affinität zu der unpolaren C₈-Phase als das M.

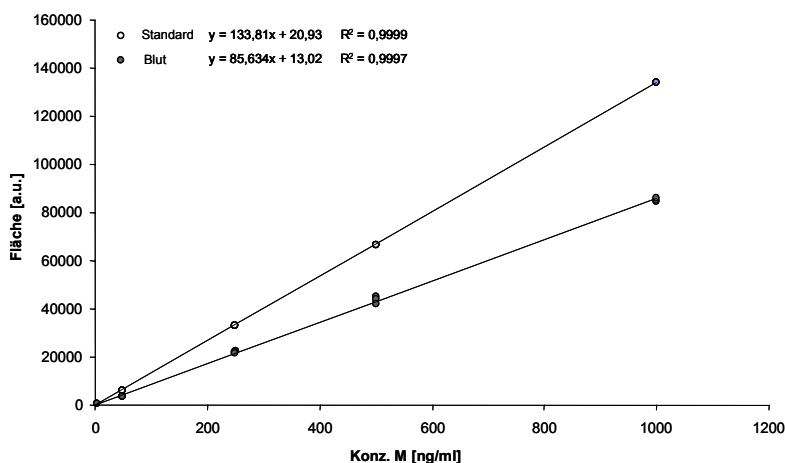


Abb. 8: Wiederfindung von Morphin aus Vollblut, C₈- Extraktion.

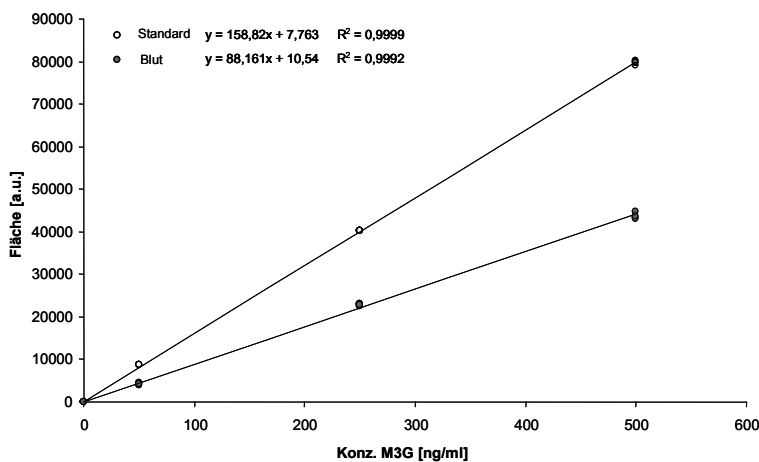


Abb. 9: Wiederfindung von M3G aus Vollblut, C₈- Extraktion.

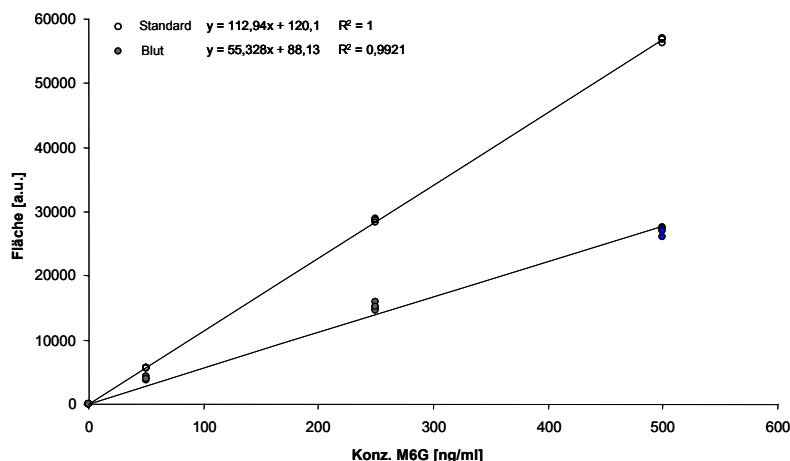


Abb. 10: Wiederfindung von M6G aus Vollblut, C₈- Extraktion.

3.2.2.3 LINEARITÄT

Zur Überprüfung der Linearität wurde für jeden Analyten eine Kalibrationsgerade erstellt, wobei das mit der jeweiligen Kalibrationslösung versetzte Leerblut wie in Kap. 3.2 extrahiert und der Extrakt zur HPLC nach Kap. 3.1 eingesetzt wurde. Es wurden je Analyt 5 Kalibrationsstufen im Konzentrationsbereich zwischen 25 ng/ml Blut und 500 ng/ml Blut gewählt, da hier für alle drei Analyten konstante Wiederfindungsraten gegeben waren. Die Korrelationskoeffizienten waren bei allen drei Kalibrationsgeraden $> 0,999$ und entsprachen somit den Akzeptanzkriterien für die bioanalytische Methodvalidierung [90]. Die Kalibrationsgeraden für die Bestimmung von M, M3G und M6G im C₈- Blutextrakt sind in Abb. 11 – Abb. 13 dargestellt.

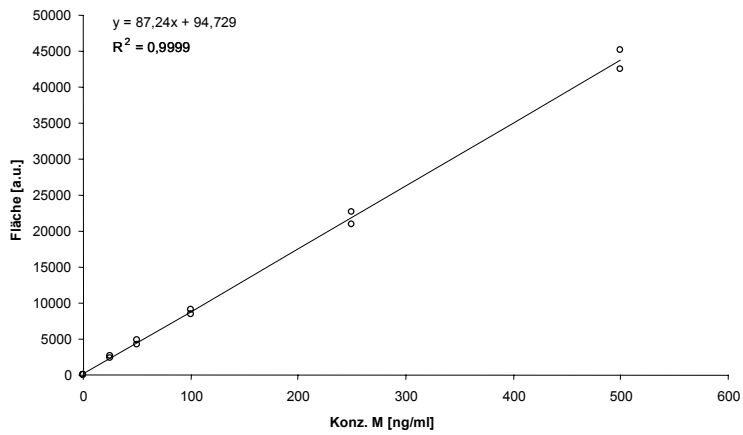


Abb. 11: Kalibrationsgerade für M aus Vollblut.

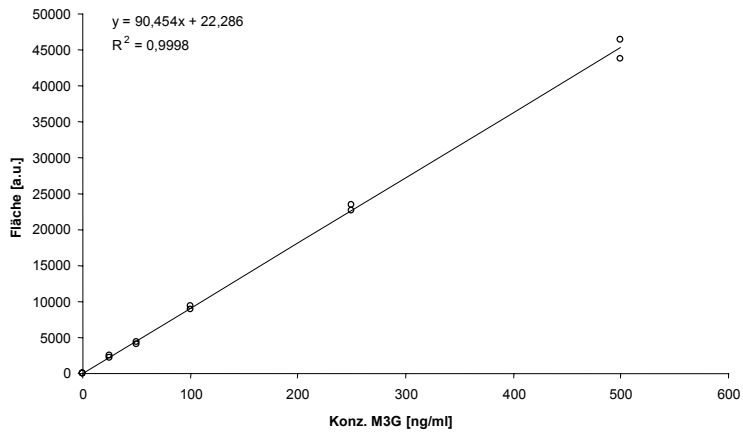


Abb. 12: Kalibrationsgerade für M3G aus Vollblut.

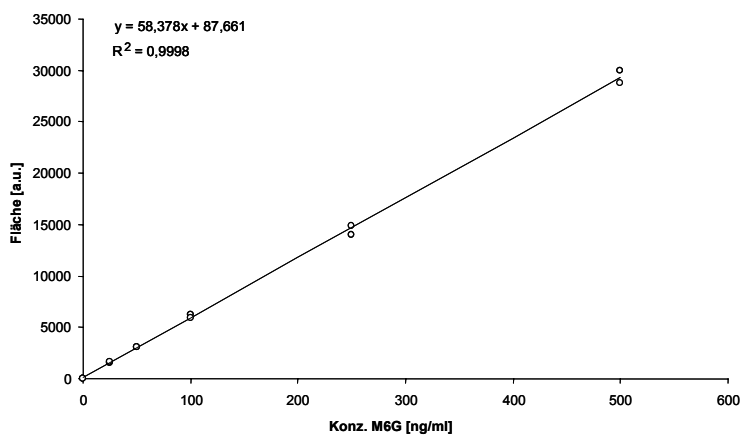


Abb. 13: Kalibrationsgerade für M6G aus Vollblut.

3.2.2.4 PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

Die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit erfolgte für alle drei Analyten für die Kalibrationsstufen 50 ng/ml Blut, 250 ng/ml Blut und 500 ng/ml Blut. An drei aufeinander folgenden Tagen wurden je drei mit den Analyten versetzte Blutproben aufgearbeitet und analysiert.

Die relativen Standardabweichungen lagen bei Morphin zwischen 0,3 % und 9,5 %, bei M3G zwischen 2,4 % und 8,5 % und bei M6G zwischen 2,3 % und 10,0 %.

Die Werte für die Richtigkeit betragen bei Morphin zwischen 90,3 % und 109,1 %, bei M3G zwischen 90,7 % und 109,9 % und bei M6G zwischen 90,3 % und 108,5 %.

Die Akzeptanzkriterien für die bioanalytische Methodvalidierung bezüglich Präzision und Richtigkeit [90] wurden somit erfüllt. Demnach müssen die Werte für die Präzision innerhalb der +/- 15 %-Grenze liegen. Die Werte für die Richtigkeit müssen für alle Kalibrationsstufen im vorgeschriebenen Bereich zwischen 85% und 115% liegen.

Die ermittelten Intraday- und Interday-Werte für Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von M, M3G und M6G sind in Abb. 14 – Abb. 16 graphisch dargestellt.

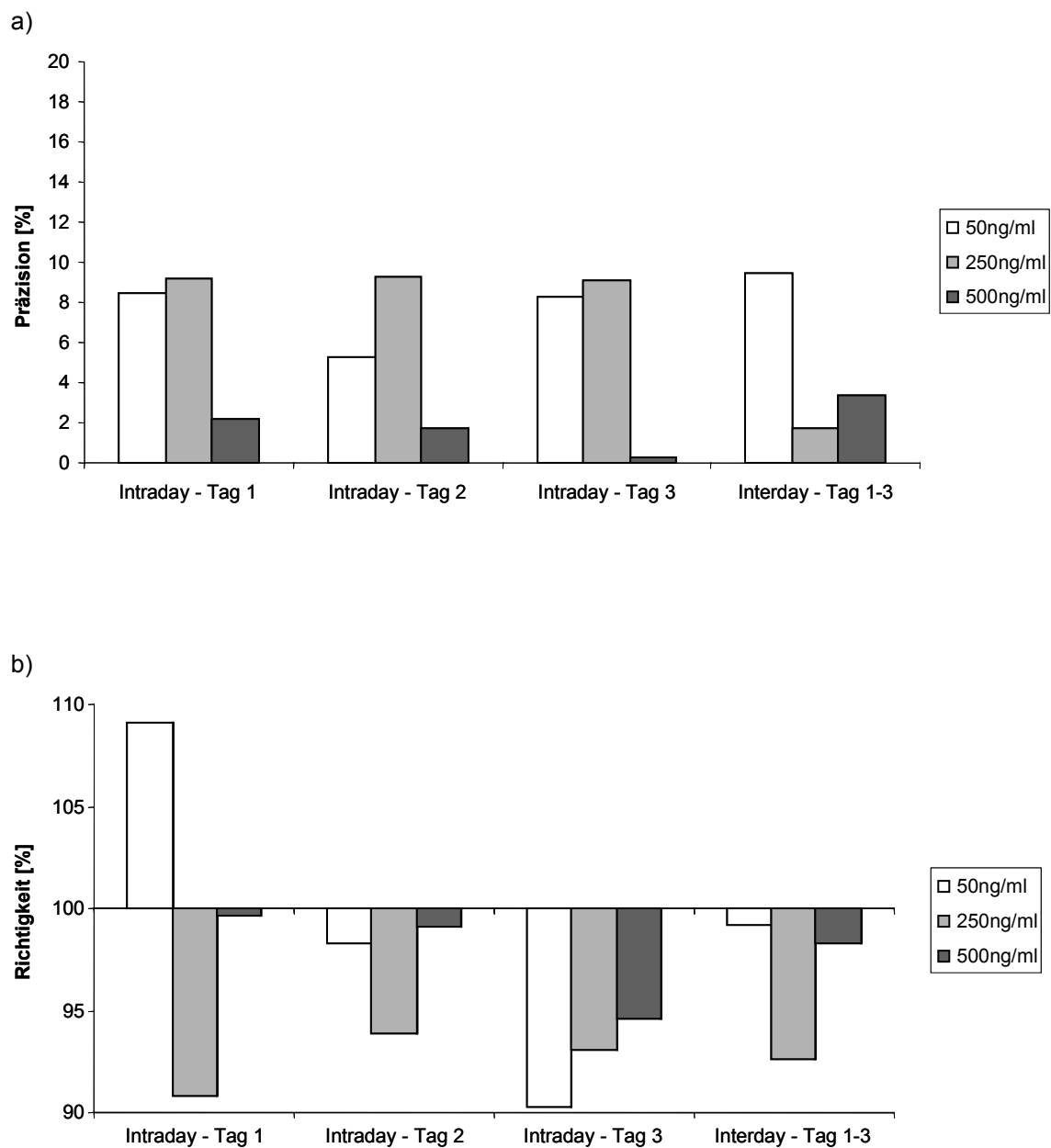


Abb. 14: a) Präzision; b) Richtigkeit für Morphin.

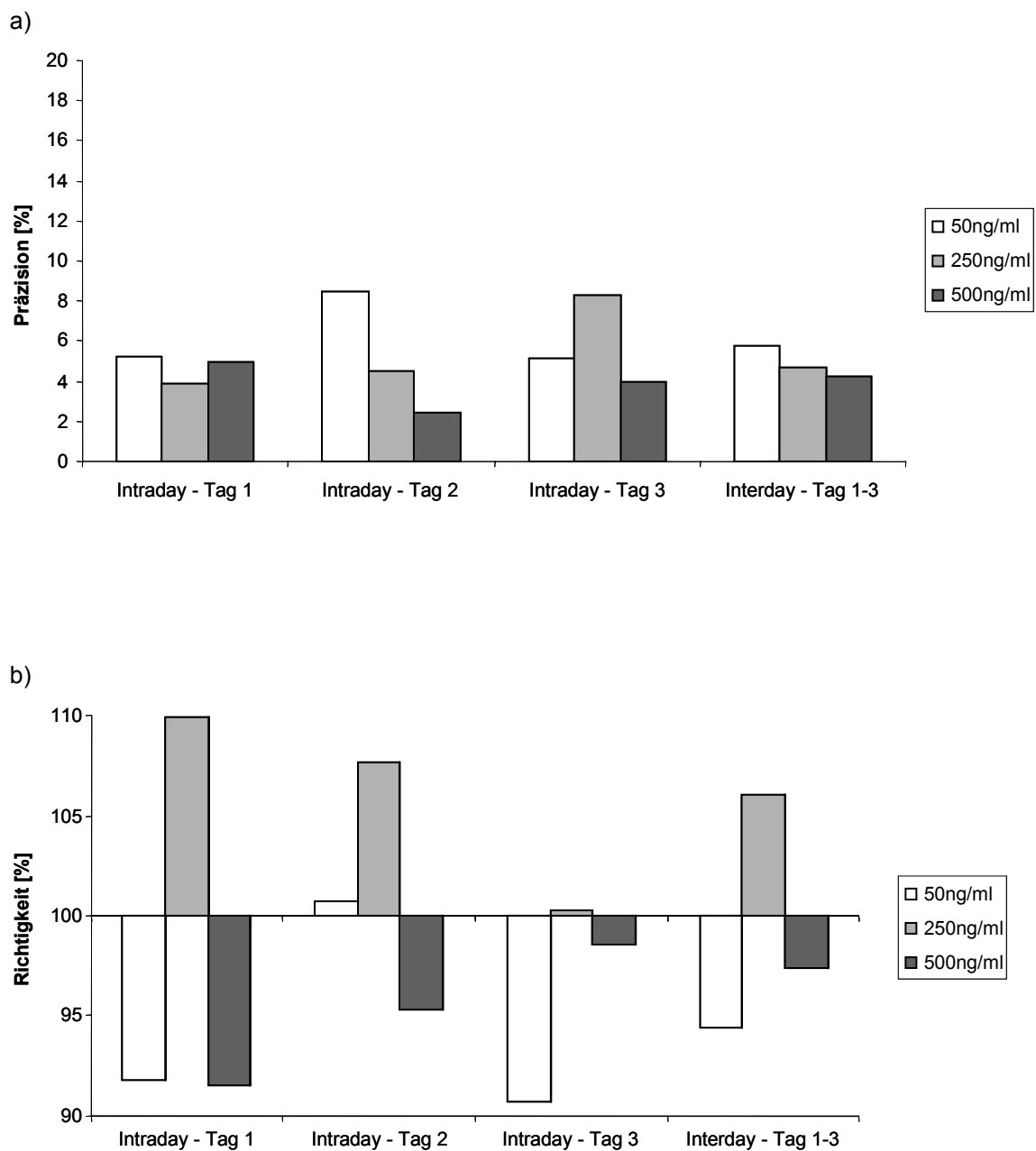


Abb. 15: a) Präzision; b) Richtigkeit für M3G.

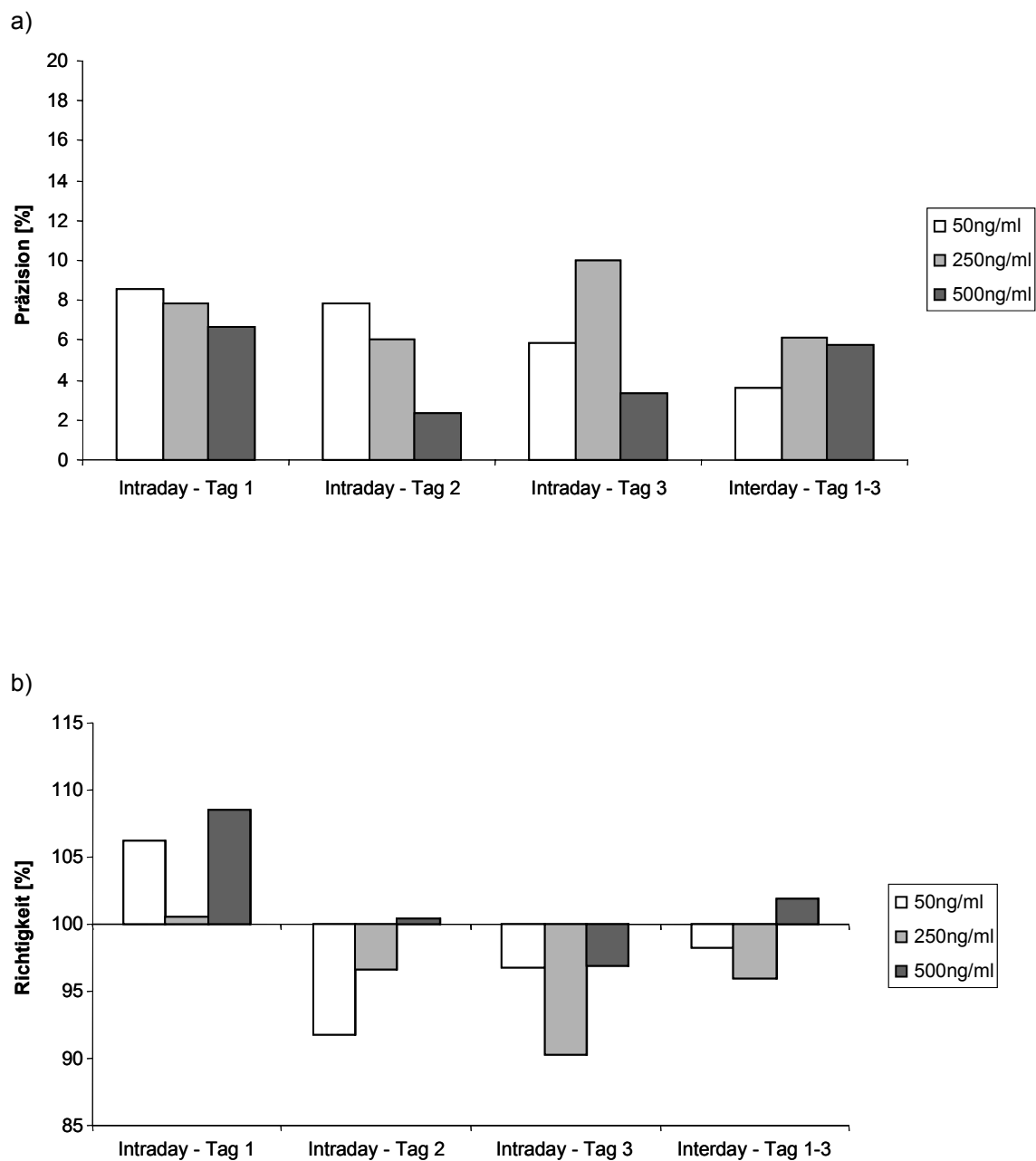


Abb. 16: a) Präzision; b) Richtigkeit für M6G.

3.2.2.5 BESTIMMUNGSGRENZE

Definitionsgemäß [90] ist die Bestimmungsgrenze die geringste Konzentration, bei der Präzision und Richtigkeit den Akzeptanzkriterien entsprechen. An der Bestimmungsgrenze dürfen die Werte für die Präzision maximal 15 % erreichen, während die Werte für die Richtigkeit zwischen 85 % und 115 % liegen müssen. Diese Grenzen sind bei allen drei Analyten bei einer Konzentration von 50 ng/ml Blut eingehalten worden.

3.2.2.6 NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze ist definiert [90] als die niedrigste Konzentration des Analyten, die noch mit einem Signal/Rausch - Verhältnis von 3:1 nachweisbar ist. Diese Konzentration lag für alle drei Analyten bei 10 ng/ml Blut.

3.3 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT LASER-INDUZIERTER FLUORESZENZDETEKTION

Die Analytik mittels Laser-induzierter Fluoreszenz sollte gegenüber der auf Lampen basierenden Fluoreszenz-Analytik den Vorteil haben, dass der Laserstrahl auf die Küvette fokussiert wird. Das vom Laser emittierte UV-Licht ist um ein Vielfaches energiereicher als die Strahlung, die von einer UV-Lampe ausgeht. Moderne Hochleistungslaser können UV-Licht mit einer Leistung bis zu 100 mW emittieren. Durch die stark gebündelte, höhere Energiedichte im Detektionsfenster kann eine stärkere Anregung der Analyten zur Fluoreszenz erfolgen.

Zur Verfügung standen Laser mit den Emissionswellenlängen $\lambda = 266$ nm (6 mW) und $\lambda = 244$ nm (50 mW). Eine Anregung der Analyten zur Fluoreszenz war bei beiden Wellenlängen möglich, wobei das Fluoreszenzverhalten der drei Analyten bei der Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 244$ nm besser war. Ein weiterer Vorteil der hier angewandten HPLC-LIF-Methode war die wellenlängenaufgelöste

Detektion durch eine CCD-Kamera (charged coupled device - Kamera), welche eine qualitative und quantitative Auswertung des gesamten Fluoreszenzspektrums ermöglichte.

3.3.1 AUFBAU DES DETEKTIONSSYSTEMS

Die Entwicklung des Detektionssystems erfolgte in der Fakultät für Physik, Abteilung Angewandte Laserphysik, Universität Bielefeld, durch J. Rögner.

Abb. 17 zeigt den schematischen Aufbau des Detektionssystems.

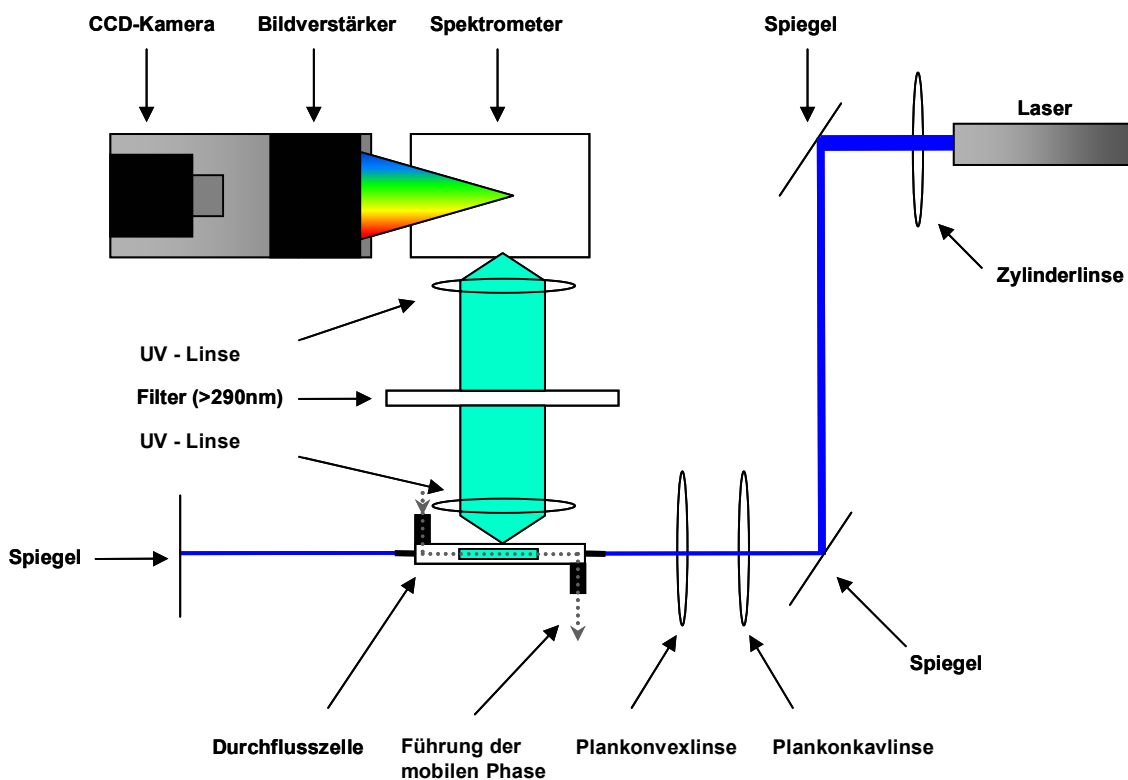


Abb. 17: Schematischer Aufbau des Detektionssystems.

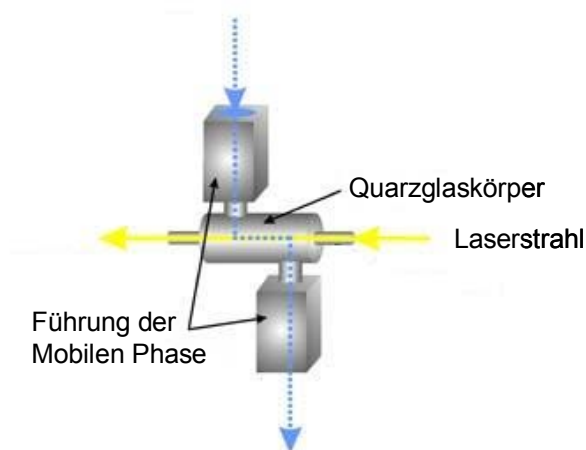


Abb. 18: Schematischer Aufbau einer Durchflusszelle.

Mit einer HPLC-Pumpe vom Typ LKB HPLC Pump 2248, kombiniert mit LKB Low Pressure Mixer (Pharmacia), wurde eine konstante Flussrate von 1,5 ml/min erzeugt. Für die Trennung wurden RP- (reversed phase) Säulen (Merck LiChroSpher 60 RP-select B, 5 μm , 250 x 4 mm) verwendet.

Zunächst wurde ein Dioden-gepumpter frequenzvervierfacher Nd: YAG-Laser, $\lambda_{\text{Ex}} = 266 \text{ nm}$, mit einer Frequenz von 7,67 kHz und 0,4 ns Pulslänge und einer Leistung von ca. 6 mW eingesetzt.

Bei der später benutzten Hochleistungs-UV-Quelle handelte es sich um einen frequenzverdreifachten Ti:SA-Laser, der bei $\lambda = 720 \text{ nm}$ betrieben wurde und mit einer Frequenz von 80 MHz und 100 fs Pulslänge eine quasikontinuierliche Lichtwellenlänge (cw) von 244 nm mit einer Leistung von ca. 50 mW erzeugte. Die Fluoreszenzintensitäten der Lösungen von Morphin und der Morphinglucuronide in Fließmittel sowie des Fließmittels bei der Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 266 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ sind Abb. 20 dargestellt. Die Analyten zeigten bei beiden Anregungswellenlängen Fluoreszenz und ein Emissionsmaximum bei ca. $\lambda = 340 \text{ nm}$. Die Fluoreszenz aller drei Analyten war bei der Anregung durch das energiereichere Licht mit $\lambda = 244 \text{ nm}$ intensiver als bei der Anregung durch $\lambda = 266 \text{ nm}$. Durch die günstigere Anregungswellenlänge und die höhere Emissionsleistung des Ti:SA-Lasers war

bei Fluoreszenzanregung durch diesen ein empfindlicherer Nachweis zu erwarten.

Die mobile Phase für die chromatographische Trennung zeigte bei keiner der beiden Anregungswellenlängen eine Fluoreszenz. Eine Beeinträchtigung der Messergebnisse durch eine auftretende Eigenfluoreszenz des Fließmittels wurde so ausgeschlossen.

Die Durchflusszelle (Abb. 19) wurde mit einem 3 mm x 1 mm Laserstrahlprofil entlang der Durchflusslänge über einen Lichtweg von 3 mm bestrahlt. Die mobile Phase wurde dabei dem Laserstrahl entgegen geführt. Hinter der Durchflusszelle war ein Spiegel so platziert, dass der austretende Laserstrahl noch einmal auf demselben optischen Weg reflektiert und infolgedessen die effektive Laserleistung in der Durchflusszelle verdoppelt wurde.

Das Fluoreszenzsignal wurde im Winkel von 90 ° zum Laserstrahl über zwei UV - Fokussierlinsen gesammelt, auf den Spalt eines Spektrometers abgebildet und durch eine intensivierete CCD-Kamera (charge coupled device - Kamera) detektiert. Um die Miterfassung von Streulicht zu vermeiden, passierte das Fluoreszenzlicht vor dessen Abbildung auf den Spektrometerspalt ein Filter, welches undurchlässig für Licht im tiefen UV wie z.B. der Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{Ex}} = 266 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ war.

Das Spektrometer erlaubte eine Spektralzerlegung des Fluoreszenzsignals in 5 nm - Segmente und deckte den Wellenlängenbereich $\lambda = 270 \text{ nm}$ bis $\lambda = 390 \text{ nm}$ ab.

Die CCD-Kamera wurde mit einer Ausleserate von 1 Hz und einem Binning-Faktor (Aufsummierungs-Faktor) von 1 x 64 Pixel betrieben.

Eine Bildverstärkung erfolgte mit einer Quanteneffizienz von > 65 % (16 bit dynamic range). Die Rohdaten der Kamera wurden durch spezifische Algorithmen mittels kommerzieller Software (Davis 6.2) ausgewertet. Die Software ermöglichte eine nachträgliche Auswahl eines bestimmten spektralen Teilbereichs des während der Messung erfassten Gesamtspektrums.

Die Vorteile dieser spektralen Auswertung werden anhand der Abb. 20 und 21 deutlich. In Abb. 20 ist die gesamte von der CCD-Kamera aufgezeichnete

Spektralinformation einer Standardlösung (M, M3G, M6G je 250 ng/ml) dargestellt. Es stand die Spektralinformation innerhalb des vom Spektrometer vorgegebenen Wellenlängenbereichs zwischen 270 nm und 390 nm zur Verfügung, die während der Messzeit von der CCD-Kamera aufgezeichnet wurde. Für die Auswertung herangezogen wurde jedoch lediglich der spektrale Bereich von 300 nm - 340 nm, in dem die messbare Fluoreszenz der Analyten am intensivsten war. Die Fluoreszenzintensität in diesem gewählten Bereich wurde aufsummiert und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

In Abb. 21 ist die von der CCD-Kamera aufgezeichnete Spektralinformation eines stark Matrix-belasteten Extraktes aus einem mit Morphin versetzten Blut dargestellt. Hier zeigte sich, dass durch die Auswertung eines bestimmten Teilbereichs des Gesamtfluoreszenzspektrums die Matrixfluoreszenz gezielt aus der graphischen Darstellung ausgegrenzt werden konnte. Der spektrale Ausschnitt von 300 nm – 340 nm beinhaltete nahezu keine Störung durch Matrixbestandteile. Ein spektraler Ausschnitt im Bereich 350 – 390 nm dagegen zeigte deutlich die Eigenfluoreszenz der mitextrahierten Matrixbestandteile.

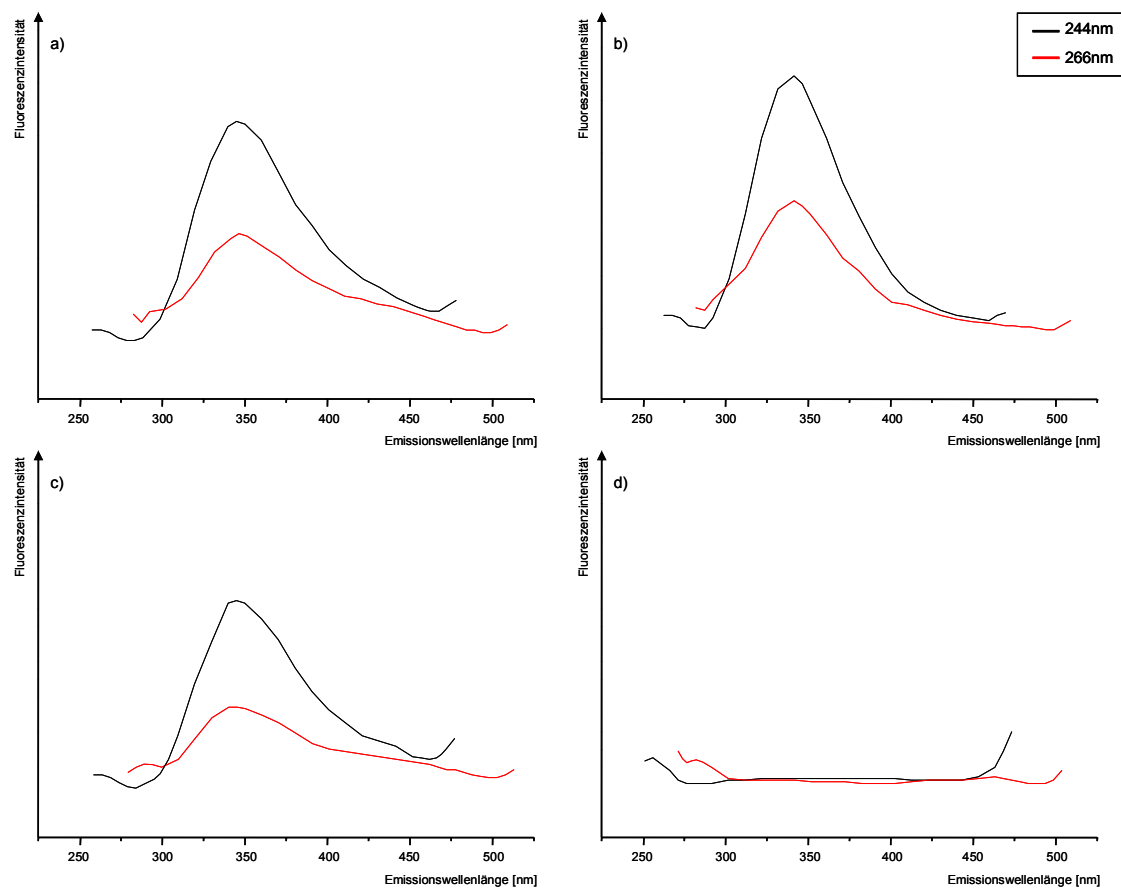


Abb. 19: Fluoreszenzspektrum von a) M, b) M3G, c) M6G (Lsgn. in Fließmittel, 10 µg/ml) und d) Fließmittel, λ_{Ex} = 244 nm bzw. 266 nm).

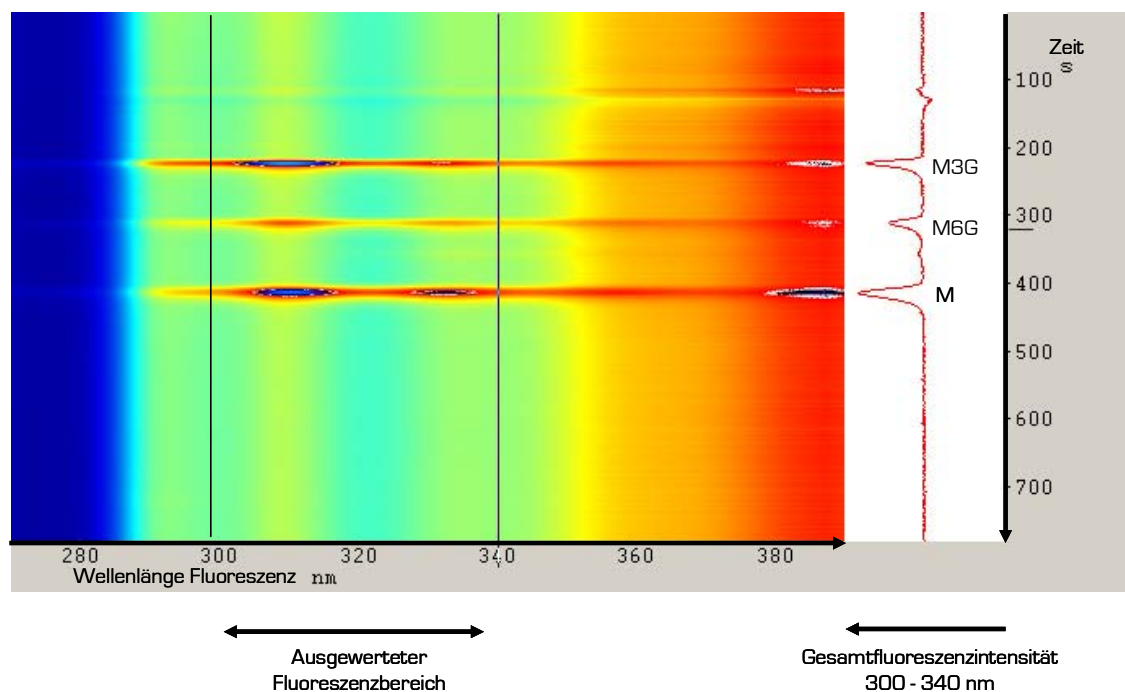
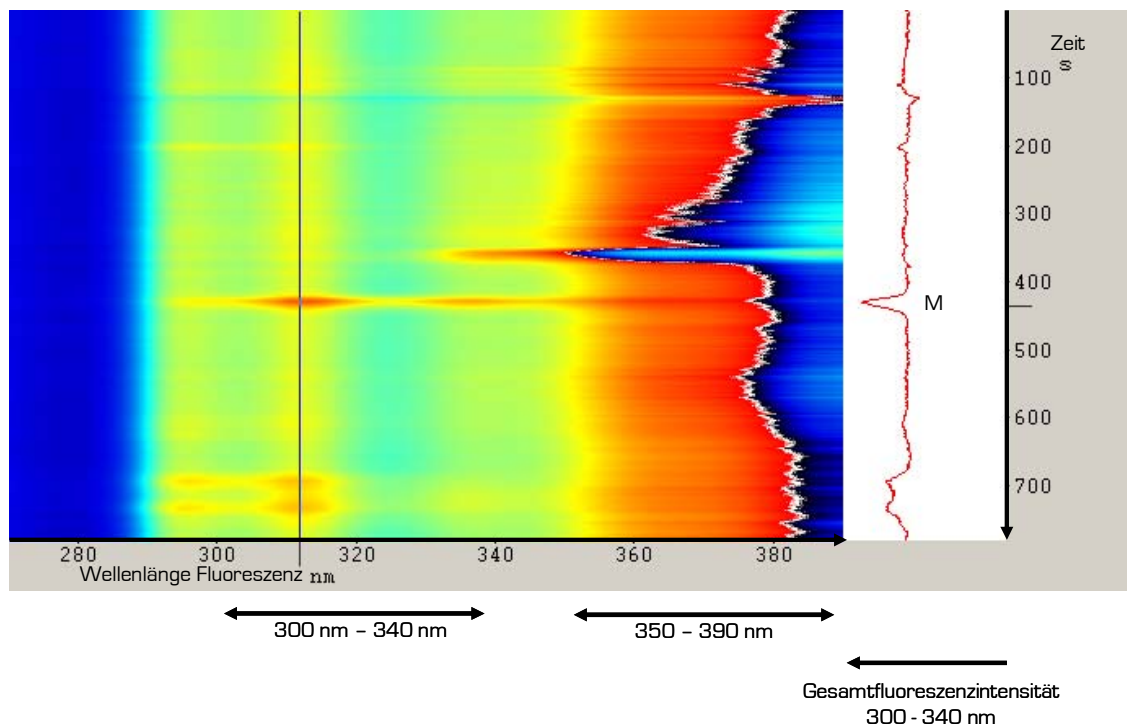
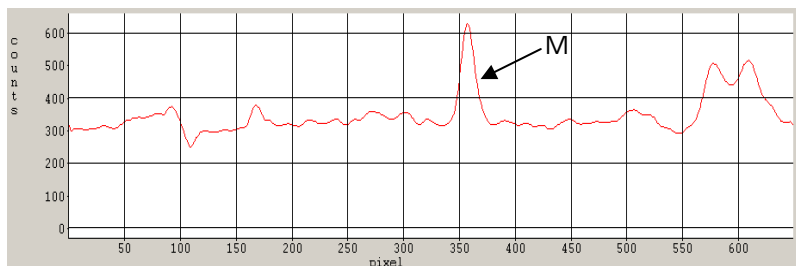


Abb. 20: Standardlösung M, M3G, M6G, je 250 ng/ml:
Gesamtspektrum und Darstellung der aufsummierten Fluoreszenzintensität
des Ausschnitts (300 – 340 nm) als Graph. $\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm} / 50 \text{ mW}$.



a)



b)

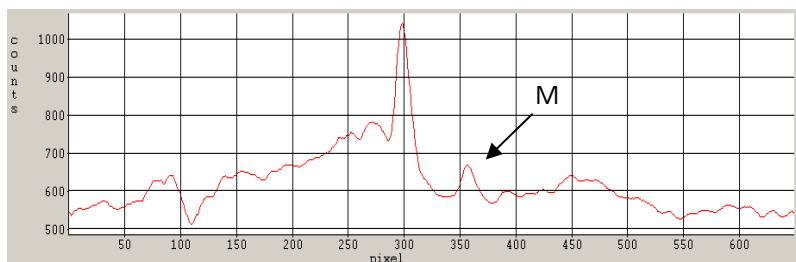


Abb. 21: Blutextrakt: M 250 ng/ml:
Gesamtspektrum und Darstellung der aufsummierten Fluoreszenzintensität des Ausschnitts (300 – 340 nm) als Graph. $\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm} / 50 \text{ mW}$.

- a) Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität 300 – 340 nm,
- b) Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität 350 – 390 nm.
 $\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm} / 50 \text{ mW}$.

3.3.2 HPLC-LIF BEI ANREGUNG DURCH $\lambda_{\text{EX}} = 266 \text{ nm}$

Die erste Anwendung der Laser-induzierten Fluoreszenzanregung nach HPLC-Trennung wurde mit einem gepulster Laser, der Licht der Wellenlänge $\lambda = 266 \text{ nm}$ emittierte und mit einer Leistung von ca. 6 mW arbeitete, durchgeführt. Es wurde mit einem größeren Injektionsvolumen gearbeitet, um in der Durchflusszelle eine höhere Dichte fluoreszenzfähiger Moleküle zu erhalten. Die Peakschärfe nahm dadurch ab.

Anhand von Standardlösungen wurden für die drei Analyten die Spezifität und Linearität überprüft sowie die Detektionsgrenze ermittelt.

3.3.2.1 SPEZIFITÄT

Die Überprüfung der Spezifität wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass durch die starke Fluoreszenzanregung keine Störpeaks auftraten. Dazu wurde das Chromatogramm einer mit M, M3G und M6G versetzten wässrigen Standardlösung mit dem von H_2O verglichen (Abb. 22). Im Bereich der Analyten traten keine Störpeaks auf.

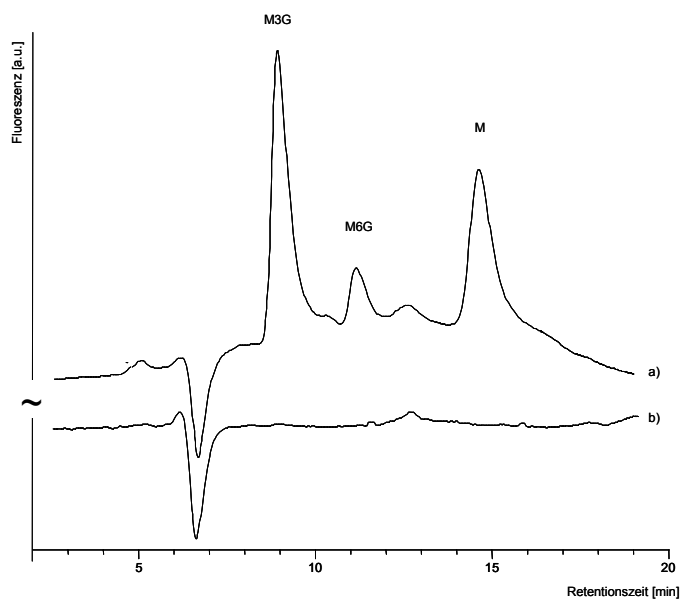


Abb. 22: a) Chromatogramm einer Standardlösung mit je 300 ng/ml M, M3G und M6G.
b) Chromatogramm eines Leerstandards.
Chromatographische Bedingungen: siehe Kap. 3.3 des exp. Teils.

3.3.2.2 LINEARITÄT

Zur Überprüfung der Linearität wurde für jeden Analyten eine Kalibrationsgerade mittels wässriger Standards erstellt. Der Konzentrationsbereich wurde zwischen 10 ng/ml und 300 ng/ml gewählt. Linearität war für alle drei Analyten über den gesamten Konzentrationsbereich gegeben. Die Korrelationskoeffizienten R^2 lagen bei $> 0,99$. Die Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten für M, M3G und M6G sind in Abb. 23 – 25 dargestellt.

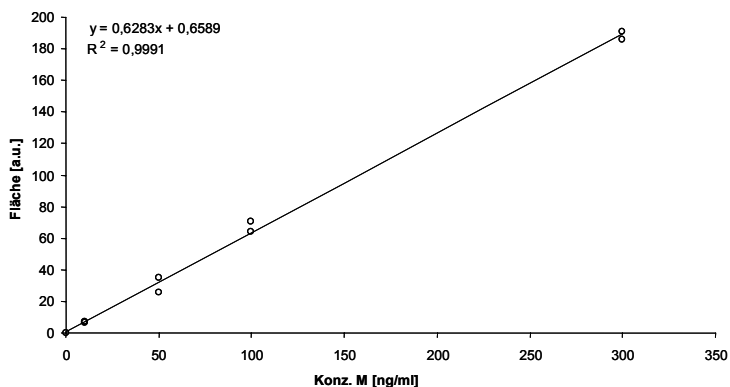


Abb. 23: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für Morphin.

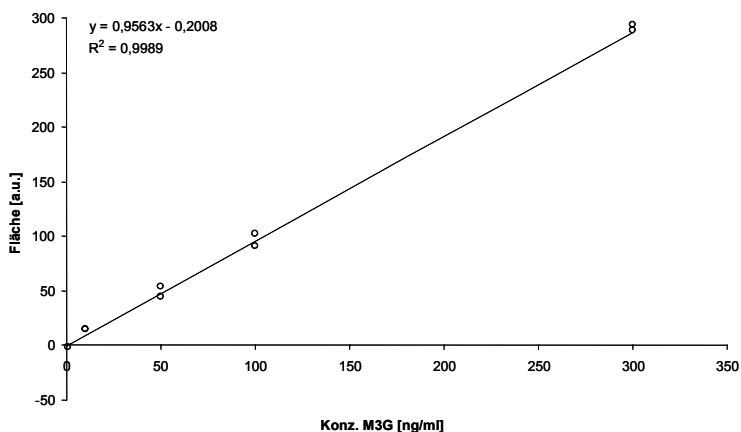


Abb. 24: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für M3G.

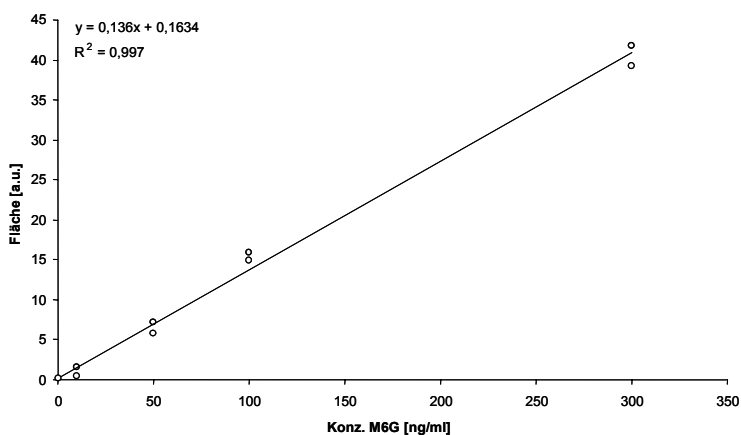


Abb. 25: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für M6G.

3.3.2.3 DETEKTIONSGRENZE

Die Detektionsgrenze ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Analyten, die bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 detektierbar ist [90]. Für M6G lag diese Konzentration bei 10 ng/ml, für M und M3G bei ca. 5 ng/ml.

Ein Nachteil des eingesetzten Lasers war die mit relativ geringer Leistung emittierte Wellenlänge, die nur eine mäßig intensive Fluoreszenz bei M, M3G und M6G hervorrief, sowie der gepulste Betrieb, welcher eine Grundschwankung der Intensität des Laserlichts und folglich auch des induzierten Fluoreszenzsignals bedingte. Beide Umstände beeinträchtigen die Empfindlichkeit des Detektionsverfahrens. Für eine ausreichend sensitive Detektion musste ein Hochleistungslaser mit einer besser geeigneten Emissionswellenlänge eingesetzt werden.

3.3.3 HPLC-LIF BEI ANREGUNG DURCH $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$

Um die Fluoreszenzausbeute zu erhöhen, wurde ein Laser eingesetzt, der bei einer Leistung von 50 mW Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$ emittierte. Das Anregungsspektrum von Morphin (Abb. 6, S. 20) zeigte, dass bei der Anregung bei $\lambda = 244 \text{ nm}$ ein besser geeigneter Anregungsbereich der Analyten genutzt werden konnte. Durch die optimierte Wellenlänge und die höhere Leistung des Lasers sollte nun eine Steigerung der Sensitivität der Methode erzielt werden.

Der hier benutzte Hochleistungs-UV-Laser erzeugte Licht der Wellenlänge $\lambda = 244 \text{ nm}$ mit einer Frequenz von 80 MHz und einer Pulslänge von 100 fs. Diese quasikontinuierliche Anregung durch den nahezu ungepulsten Betrieb des Lasers bedingte eine praktisch schwankungsfreie Fluoreszenz der Analyten und führte zu einer Reduzierung des Grundrauschens bei der Detektion durch die CCD-Kamera. Das Injektionsvolumen von 50 μl wurde zunächst beibehalten, um einen direkten Vergleich zu den in Kap. 3.3.2 erzielten LIF-

Ergebnissen ziehen zu können. Wieder wurden Spezifität, Linearität und Detektionsgrenze für die drei Analyten ermittelt.

3.3.3.1 SPEZIFITÄT

Das Chromatogramm einer mit M, M3G und M6G versetzten wässrigen Standardlösung wurde mit dem einer Leerprobe verglichen (Abb. 26). Im Bereich der Analyten traten keine Störpeaks auf.

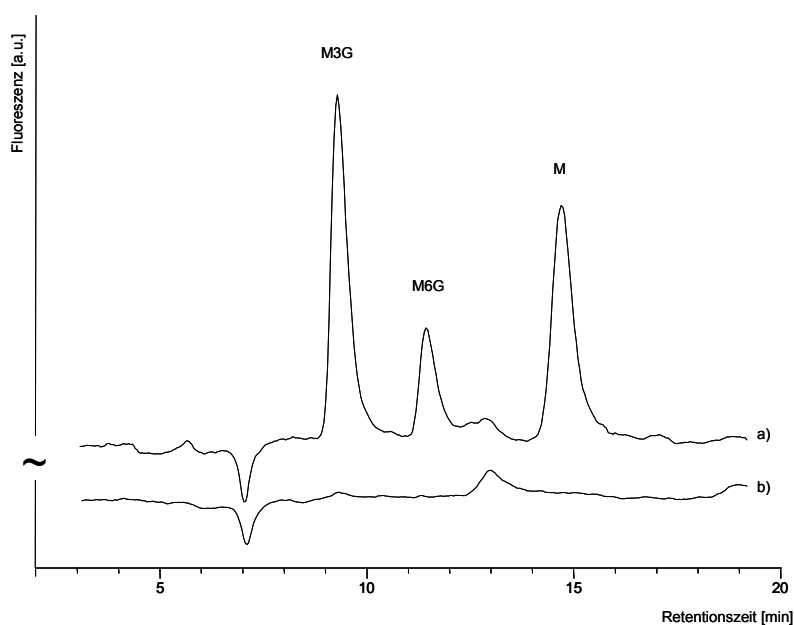


Abb. 26: a) Chromatogramm einer wässrigen Standardlösung mit je 100 ng/ml M, M3G und M6G.
b) Chromatogramm eines Leerstandards.
Chromatographische Bedingungen: siehe Kap. 3.3 des exp. Teils.

3.3.3.2 LINEARITÄT

Für jeden Analyten wurde eine Kalibrationsgerade mittels wässriger Standards erstellt. Der Konzentrationsbereich wurde zwischen 2 ng/ml und 300 ng/ml gewählt. Linearität war für Morphin und M6G über den Bereich 10 ng/ml bis 300 ng/ml gegeben und für M3G über den Bereich 2 ng/ml bis 300 ng/ml. Die Korrelationskoeffizienten R^2 lagen $> 0,99$. Die Abb. 27 – 29 zeigen die Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten für die drei Analyten.

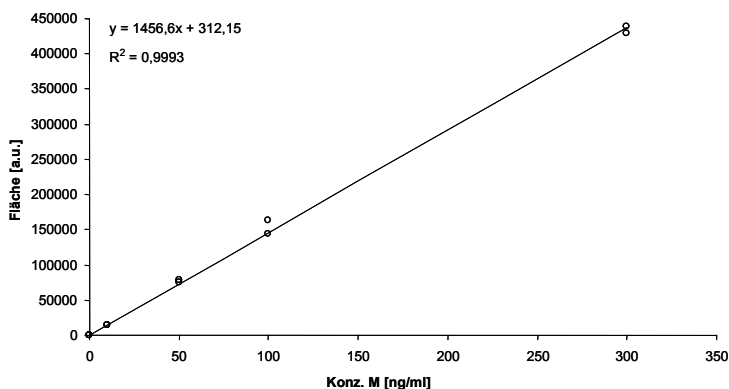


Abb. 27: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für Morphin.

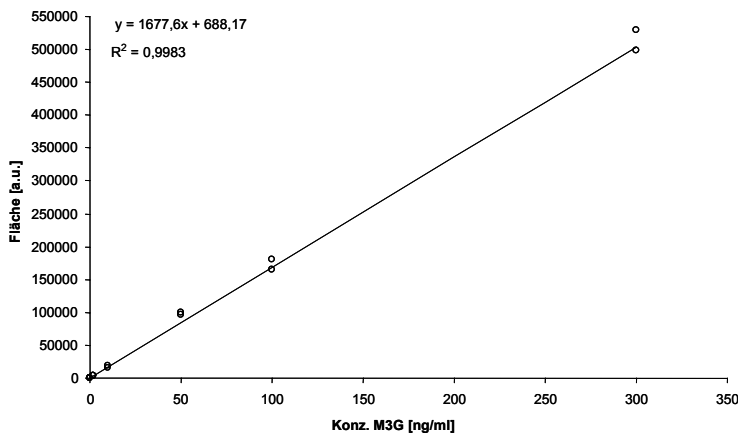


Abb. 28: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für M3G.

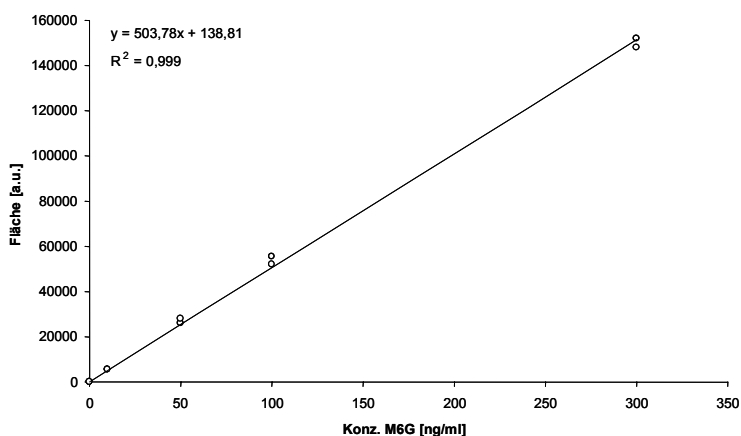


Abb. 29: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für M6G.

3.3.3.3 DETEKTIONSGRENZE

Die Detektionsgrenze [90] lag für M3G bei 2 ng/ml, für M und M6G bei 10 ng/ml.

3.3.3.4 EIGENFLUORESZENZ DER DURCHFLUSSZELLE

Im Vergleich mit den Messergebnissen aus 3.3.2. konnte durch die geeignetere Anregungswellenlänge und die höhere Leistung des Lasers keine wesentliche Absenkung der Nachweisgrenze erreicht werden. Stattdessen wurde bei der Anregung bei $\lambda_{\text{EX}} = 244$ nm eine Eigenfluoreszenz der Durchflusszelle verzeichnet, die mit dem bloßen Auge erkennbar war. Diese Fluoreszenz war bei der Anregung durch $\lambda_{\text{EX}} = 266$ nm nicht aufgetreten.

Die Durchflusszelle bestand überwiegend aus fluoreszenzarmem Quarzglas. Zur Ein- und Auskopplung des Lichtstrahls waren jedoch Saphirstäbe in das Quarzglas eingeschmolzen. Diese fluoreszierten bei der Bestrahlung mit energiereichem UV-Licht. Beim Vergleich des Fluoreszenzspektrums einer Lösung von Morphin in Fließmittel und dem Spektrum der Eigenfluoreszenz der mit Fließmittel gefüllten Durchflusszelle bei Anregung durch $\lambda_{\text{EX}} = 244$ nm zeigte sich, dass die Emissionsmaxima in sich

überschneidenden Wellenlängenbereichen lagen (Abb. 30). Während Morphin bei ca. $\lambda_{Em} = 340 \text{ nm}$ eine maximale Emission zeigte, lag das Emissionsmaximum der in die Durchflusszelle eingeschmolzenen Saphirstäbe bei ca. $\lambda_{Em} = 330 \text{ nm}$. Eine hohe Untergrundfluoreszenz war die Folge, welche für ein erhöhtes Grundrauschen sorgte und dadurch die Sensitivität beeinträchtigte.

Abb. 31 zeigt ein mit der CCD-Kamera aufgenommenes, wellenlängenaufgelöstes Bild der Fluoreszenzen, welche von der mit Fließmittel gefüllten Durchflusszelle und von einer Morphinlösung in Fließmittel während der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm}$ (50 mW) ausgingen. Für weitere Messungen wurde eine speziell für diese Anwendungen angefertigte fluoreszenzarme Durchflusszelle verwendet, welche ausschließlich aus Quarzglas gefertigt war.

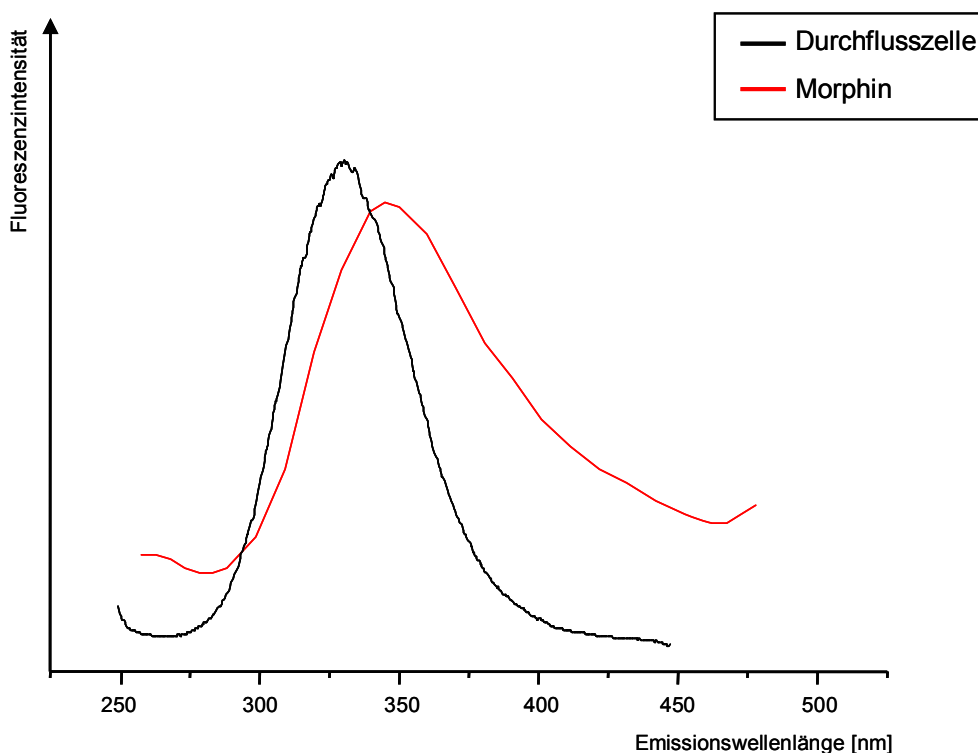


Abb. 30: Fluoreszenzspektrum einer M-Lösung ($c = 10 \mu\text{g/ml}$ in Fließmittel) bzw. der mit Fließmittel gefüllten Durchflusszelle. $\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm} / 50 \text{ mW}$.

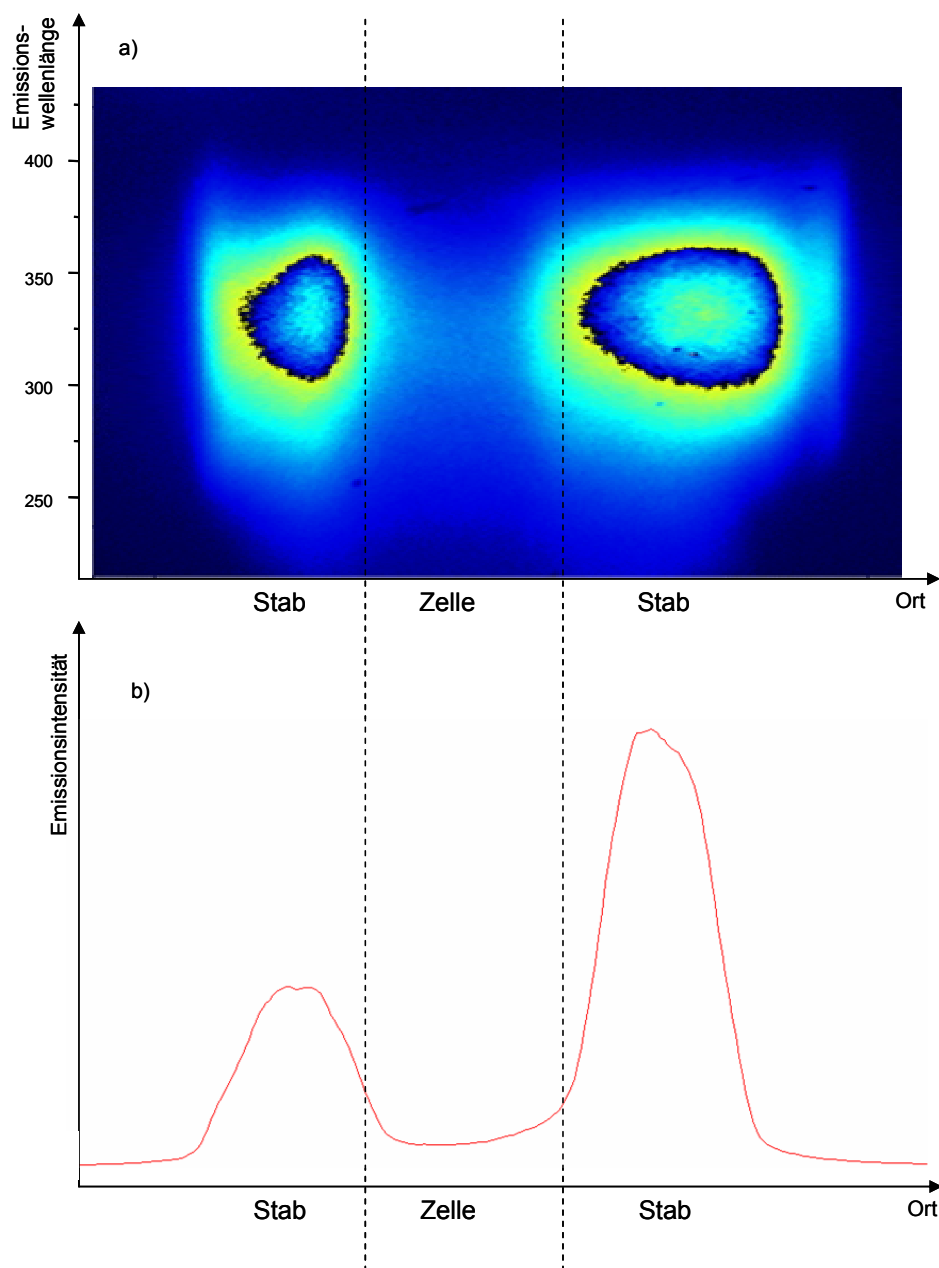


Abb. 31: Eigenfluoreszenz der Saphirstäbe in der mit Fließmittel gefüllten Durchflusszelle.

- a) Darstellung des Emissionsspektrums im Wellenlängenbereich 270 nm – 390 nm in Ortsabhängigkeit. Das Farbspektrum drückt die unterschiedliche Intensität der jeweiligen Emissionswellenlänge aus.
- b) Darstellung der Emissionsintensität, aufsummiert über den Wellenlängenbereich $\lambda_{Em} = 332 \text{ nm} - 362 \text{ nm}$, in Ortsabhängigkeit.

3.4 VERGLEICH DES HPLC-LIF-SYSTEMS ($\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$) mit dem HPLC-Fluoreszenzdetektor

Nachdem die im tiefen UV fluoreszierende Durchflusszelle durch eine fluoreszenzfreie Zelle aus reinem Quarzglas ersetzt wurde, wurden parallel Verdünnungsreihen aus wässrigen Standards am HPLC-LIF-System nach Kap.3.3.3 und am HPLC-Fluoreszenz-System nach Kap.3.2 vermessen. Für den direkten Vergleich der Sensitivitäten der beiden Systeme wurde das Injektionsvolumen des HPLC-LIF-Systems dem des HPLC-Fluoreszenz-Systems angepasst und auf 20 μl verringert.

Die Ergebnisse beider Systeme wurden im Hinblick auf Linearität und Detektionsgrenze verglichen.

Schließlich wurde die Spezifität in Vollblutextrakten überprüft. Die Blutextrakte wurden mittels Sol-Gel-immobilisierter Antikörper erhalten (s. Kap. 5.5.5). Außerdem wurden die Nachweisgrenzen in Vollblutextrakten (Kap. 5.5.5) für die drei Analyten bei beiden HPLC-Systemen ermittelt.

3.4.1 LINEARITÄT

Mit wässrigen Standards wurde für jeden Analyten eine Kalibrationsgerade im Konzentrationsbereich von 5 ng/ml bis 250 ng/ml erstellt. Bei der mit einer Lampe angeregten Fluoreszenzdetektion war die Linearität für Morphin über den gesamten Konzentrationsbereich gegeben, allerdings betrug die Standardabweichung der Peakflächen teilweise $> 20 \%$. Für M3G war die lineare Konzentration / Fluoreszenz - Abhängigkeit zwischen 10 ng/ml und 250 ng/ml und für M6G zwischen 25 ng/ml und 250 ng/ml gegeben. Die Korrelationskoeffizienten R^2 lagen bei allen Analyten $> 0,999$ (Abb. 32).

Bei der LIF-Detektion war für alle drei Analyten Linearität über den gesamten Konzentrationsbereich gegeben. Die relative Standardabweichung war stets $< 10 \%$. Hier lagen alle Korrelationskoeffizienten $> 0,99$ (Abb.33).

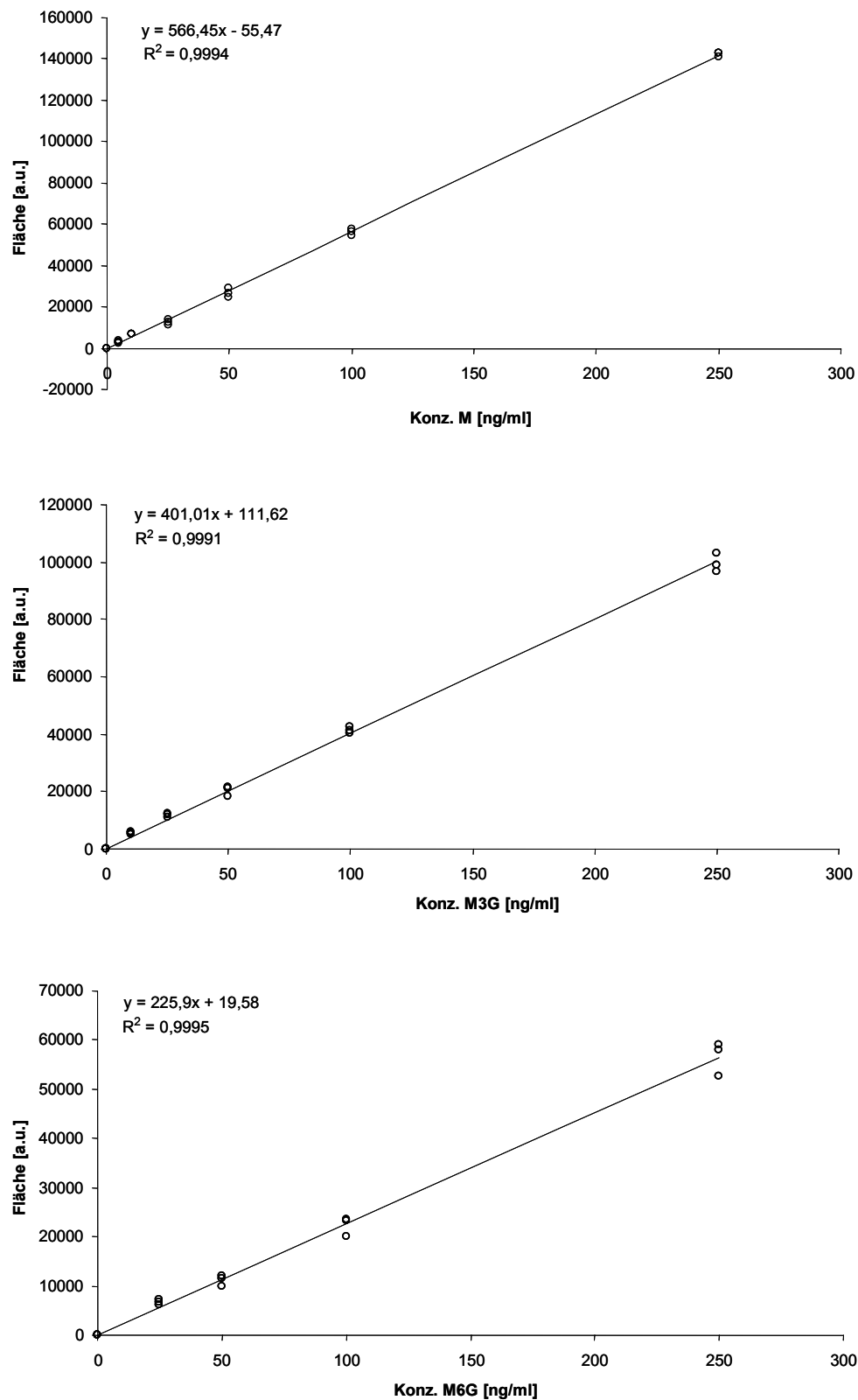


Abb. 32: Standardlösungen – Kalibrationsgeraden für M, M3G und M6G: HPLC / Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{Ex} = 235 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 345 \text{ nm}$).

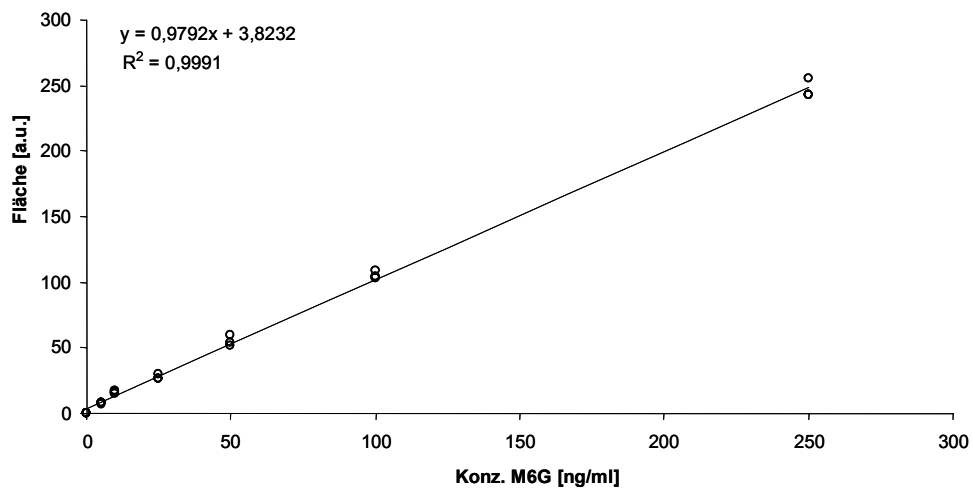
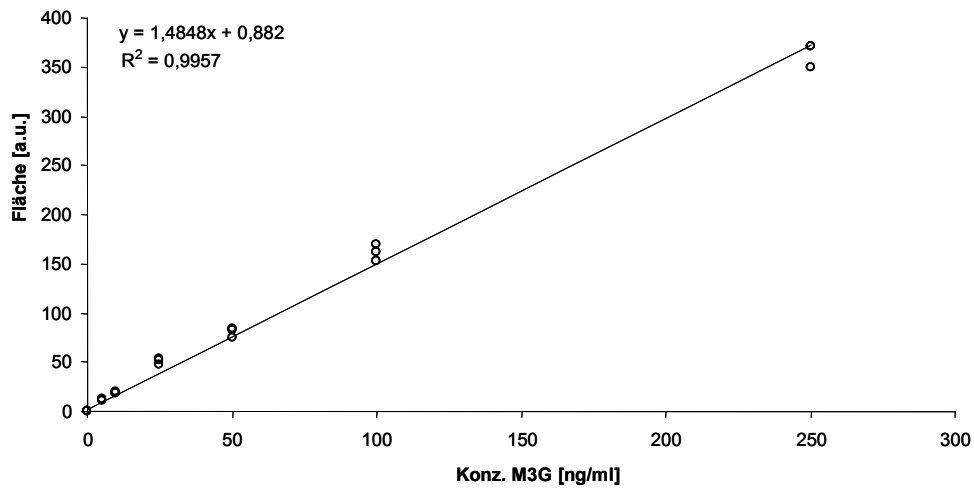
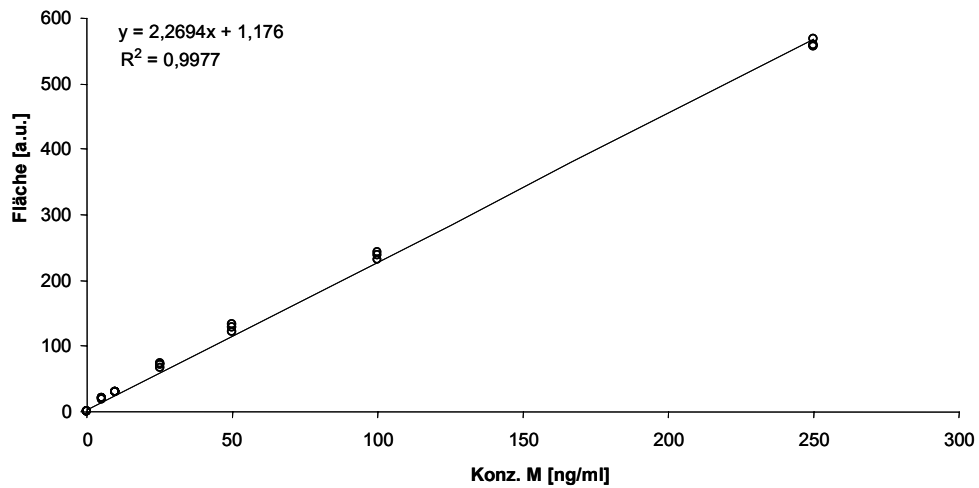


Abb. 33: Standardlösungen – Kalibrationsgeraden für M, M3G und M6G: HPLC / LIF – Detektion ($\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 300 - 340 \text{ nm}$).

3.4.2 DETEKTIONSGRENZE

Bei dem HPLC / Fluoreszenzdetektor - System lag die kleinste mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 detektierbare Konzentration [90] für Morphin bei 5 ng/ml und für M3G bzw. M6G bei 10 ng/ml.

Bei dem HPLC/LIF - System lagen die Detektionsgrenzen für M, M3G und M6G < 5 ng/ml.

3.4.3 NACHWEISGRENZE IN BLUT

Bei dem HPLC/Fluoreszenzdetektor - System lag die kleinste im Blut nachweisbare Konzentration für Morphin bei 5 ng/ml Blut und für M3G bzw. M6G bei 10 ng/ml Blut.

Bei dem HPLC / LIF - System lagen die Nachweisgrenzen im Blut für M, M3G und M6G < 5 ng/ml Blut (s. Kap. 5.5.5).

3.4.4 ERGEBNIS

Die Analyten M, M3G und M6G konnten durch das HPLC-LIF-System sensitiver nachgewiesen werden als durch das HPLC-Fluoreszenzdetektor-System. Die Sensitivität konnte durch die LIF-Detektion um den Faktor 2 bzw. 5 gesteigert werden. Folglich konnte der lineare Bereich, der bei dem HPLC-Fluoreszenzdetektor-System zwischen 10 ng/ml (M, M3G) bzw. 25 ng/ml (M6G) und 250 ng/ml lag, bei der Detektion mit dem LIF-System an der unteren Grenze auf 5 ng/ml ausgeweitet werden. Die erhöhte Sensitivität der Bestimmung von M, M3G und M6G durch das HPLC-LIF-System ist auf die wellenlängenaufgelöste Detektion zurückzuführen. Hier waren im nachweislich intensivsten Emissionsbereich die Auswertung der von den Analyten ausgehenden Fluoreszenzen und deren Abgrenzung von eventuell auftretenden Matrixfluoreszenzen möglich.

3.5 DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion Vorteile bezüglich der Spezifität und Sensitivität mit sich bringt. Ein Hochleistungslaser als Lichtquelle ermöglichte die intensive und fokussierte Bestrahlung der Durchflusszelle mit Licht einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Wellenlänge im tiefen UV-Bereich ($\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$). Durch die intensive Anregung wurde eine starke Fluoreszenz der Analyten erreicht, welche durch eine CCD-Kamera mit angeschlossenem Spektrometer im Wellenlängenbereich $\lambda_{\text{Em}} = 270 \text{ nm} - 390 \text{ nm}$ mit einer Auflösung von 5 nm aufgezeichnet wurde. Die Emissionsmaxima der Analyten, die zuvor im Fluorospektrometer ermittelt worden waren, waren bei der online-Messung im Detektionssystem leicht zu tieferen Emissionswellenlängen hin verschoben. Der Auswertungsbereich wurde daraufhin den hier ermittelten Fluoreszenzmaxima angepasst.

Die Kopplung dieser Detektionsmethode mit der HPLC-Einheit eröffnete die Möglichkeit, das gesamte während eines Trennlaufs in der Detektionszelle emittierte Licht in Abhängigkeit von den Dimensionen Zeit, Intensität und Wellenlänge aufzuzeichnen. Die so erhaltenen spektral aufgelösten Informationen erlaubten gleichzeitig die qualitative und quantitative Auswertung. Matrixbedingte Fluoreszenzen waren ebenfalls Wellenlängen-aufgelöst im Datenpool der Messung enthalten und konnten erkannt und gezielt ausgegrenzt werden. Durch Auswertung nur des für die Analyten charakteristischen Wellenlängenbereichs konnte eine hohe Spezifität erreicht werden. Die Sensitivität wurde durch das Aufsummieren der Fluoreszenzintensität über einen möglichst breiten spektralen Ausschnitt erreicht.

Diese Vorteile können jedoch nur dann genutzt werden, wenn Verunreinigungen, die mit einem Analyten komigrieren, einen anderen Fluoreszenzbereich als dieser besitzen. Komigrieren zwei Substanzen mit nah beieinander liegenden Fluoreszenzmaxima, so sind nur die Bereiche der Spektren auswertbar, die sich nicht überschneiden. Die verringerte auswertbare Datenmenge wirkt sich negativ auf die Sensitivität aus.

Eine spezifische Extraktionsmethode, mit der wenig Matrix-belastete Extrakte erhalten werden, ist somit auch für die HPLC-LIF- Methode erforderlich.

4 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT FLUORESZENZDETEKTION

Die Kapillarelektrophorese (CE) stellt neben der Gaschromatographie und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie die dritte kommerziell genutzte große Trenntechnik dar.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Schon Ende des letzten Jahrhunderts wurden von Kohlrausch [91] die Grundlagen der Ionenbewegung in einer Elektrolytlösung beschrieben. Als Trenntechnik wurde die Elektrophorese jedoch erst 1937 von Tiselius [92] für die Trennung von Proteinen eingesetzt. Den Vorläufer der CE stellte die elektrophoretische Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren in dünnen Röhren von 1-2 mm ID dar (Hjerten, [93]). Hjerten erkannte, dass bei einer elektrophoretischen Trennung in dünnen Röhren die thermische Diffusion und die Wärmekonvektion gering bleiben, da eine große Oberfläche einen schnellen Abtransport der Jouleschen Wärme gewährleistet. Durch Anlegen höherer Spannungen waren so kurze Analysenzeiten erreichbar. 1981 schließlich führte Jorgenson unter Verwendung offener Quarzkapillaren von 75 µm ID und Spannungen von 30.000 V die Trennung derivatisierter Aminosäuren oder Peptide durch [94]. 1984 gelang Terabe et al. erstmals die kapillarelektrophoretische Trennung ungeladener Teilchen mit Hilfe von Detergentien als Mizellbildnern [95]. Seit 1988 sind CE-Geräte kommerziell erhältlich und werden üblicherweise mit Kapillaren von 50 µm bzw. 75 µm ID betrieben.

Gegenüber der HPLC zeichnet sich die CE durch kürzere Analysenzeiten, höhere Trennleistung und ein geringes Probenvolumen, das nur wenige Nanoliter beträgt, aus. In der Regel werden in der CE wässrige Puffersysteme im Maßstab nur weniger Milliliter pro Analyse verwendet, wogegen in der HPLC

oft Fließmittel zum Einsatz kommen, die organische Lösungsmittel enthalten und deren Verbrauch bei bis zu 1,5 ml/min liegt.

Ein Nachteil der CE ist die im Verhältnis zur HPLC geringe Nachweisempfindlichkeit beim Einsatz optischer online-Detektionsmethoden. Bedingt durch den geringen Innendurchmesser der Kapillare und das minimale Probenvolumen gehören der kurze Lichtweg durch die Probe und die daraus resultierende geringe Menge der detektierbaren Moleküle zu den Hauptproblemen der CE-Analytik. Gegenüber der Detektion per UV-Absorption bietet die Fluoreszenzdetektion sowohl für die HPLC als auch für die CE gute Sensitivitäts- und Selektivitätssteigerungen. Ein Laser fokussiert die von ihm emittierte Lichtenergie auf einen Punkt und ist somit für die Anregung zur Fluoreszenz direkt in der CE-Kapillare hervorragend geeignet. Die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion wurde für die CE-Analytik erstmals 1985 angewendet [74]. Üblicherweise werden Laser verwendet, die im UV-Vis-Bereich mit einer Leistung von ca. 5 mW arbeiten [75 – 77, 96 – 102]. Da für die Anregung von M, M3G und M6G zur Fluoreszenz jedoch Wellenlängen im tiefen UV erforderlich sind, war die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion für diese Analyten bisher nicht geeignet. Der hier eingesetzte Hochleistungslaser emittiert Licht im tiefen UV-Bereich und stellt die Wellenlängen $\lambda = 257$ nm bzw. $\lambda = 244$ nm mit einer Leistung bis zu 100 mW zur Verfügung. Es bieten sich hier nicht nur die Vorteile der besser geeigneten Anregungswellenlänge, sondern auch die der hohen Emissionsleistung. Die Fokussierung dieser hohen Lichtenergie auf das Detektionsfenster der Kapillare, durch das die elektrophoretisch getrennten Analyten migrieren, verspricht eine hohe Fluoreszenzausbeute. Die spektralaufgelöste Detektion der gesamten während der Trennung auftretenden Fluoreszenz mittels einer CCD-Kamera über einen ausgedehnten Wellenlängenbereich bietet zusätzlich die Möglichkeit, den Auswertungsbereich zu variieren. So kann durch die individuelle Auswertung eines spektralen Ausschnitts der Gesamtfluoreszenz nach Abschluss der Messung eine hohe Selektivität erzielt werden, indem eventuell auftretende Untergrundfluoreszenzen ausgegrenzt werden können [103, 104].

Dagegen muss bei der konventionellen Fluoreszenzdetektion bereits vor der Messung durch ein Gitter oder ein Filter der Wellenlängenbereich gewählt werden, in dem die Fluoreszenz detektiert werden soll.

Die Kombination der hohen Trennleistung der CE-Analytik mit dem sensitiven und selektiven LIF-Detektionssystem verspricht einen empfindlichen Nachweis von M, M3G und M6G auch in komplexen Matrices.

4.1 TRENN- UND DETEKTIONSMETHODEN IN DER CE

4.1.1 AUFBAU UND ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG

Ein CE-Trennsystem besteht prinzipiell aus einer Spannungsquelle sowie Kapillare und Puffer, welche die Trenneinheit bilden, und einem Detektionssystem, dargestellt in Abb. 34.

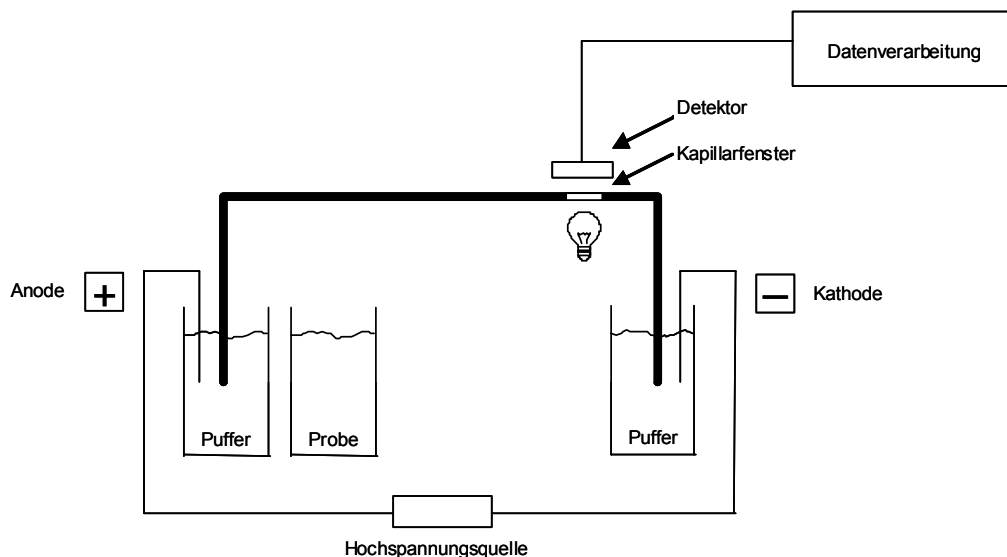


Abb. 34: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur.

Die beiden Enden einer dünnen Quarzkapillare mit einem Innendurchmesser von 50 μm oder 75 μm und einer Länge von 20-100 cm tauchen in zwei Pufferlösungen ein, zwischen denen während der Trennung eine Spannung von bis zu 30.000 V angelegt wird. Die Kapillare ist mit einer Polyimidschicht umhüllt, welche sie vor Bruch schützt. Im Bereich des Detektionsfensters ist die Polyimidschicht entfernt.

Ein Probevolumen von wenigen Nanolitern wird hydrostatisch, hydrodynamisch oder elektrokinetisch auf die Kapillare gegeben. Nach Anlegen der Spannung verteilen sich die Teilchen entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld und wandern zu den jeweiligen Polen. Dabei ist die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Mobilität (μ) und der elektrischen Feldstärke (E), welche wiederum u. a. von der angelegten Spannung (U), der Kapillarlänge (l), dem Ladungs/Ionenradius-Verhältnis (q/r) und der Viskosität (η) bzw. der Temperatur (T) beeinflusst sind (Abb. 35 a)).

Bei der Verwendung von Quarzkapillaren mit unbehandelter innerer Oberfläche wird die elektrophoretische Wanderung der geladenen Teilchen immer von dem zur Kathode gerichteten elektroosmotischen Fluss (EOF) überlagert. Er beruht auf der Ausbildung einer Doppelschicht, die durch Dissoziation der Silanolgruppen an der Quarzinnenoberfläche entsteht, wenn sie in Kontakt mit einem Elektrolyten (Trennpuffer) geraten. Es bildet sich eine im Vergleich zum übrigen Trennpuffer positiv geladene Doppelschicht, bestehend aus einer unbeweglichen, direkt an der Quarzinnenoberfläche anliegenden, und einer diffusen, weiter innen liegenden Schicht, aus. Die beweglichen Kationen der diffusen Schicht wandern im elektrischen Feld in Richtung Kathode. Durch Reibungskräfte und die Viskosität des Trennpuffers strömt dieser in dieselbe Richtung. Die Geschwindigkeit des EOF ist abhängig von der Potenzialdifferenz an der Doppelschicht, dem sog. ζ -Potenzial. Da die Ausbildung des ζ -Potenzials abhängig vom pH-Wert ist, kann die Geschwindigkeit des EOF und somit die Trenneigenschaft des Systems durch pH-Wert-Variation gesteuert werden (Abb. 35 b)).

Die vektorielle Addition der elektrophoretischen und elektroosmotischen Geschwindigkeiten ergibt die beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten (Abb. 36).

Im Gegensatz zum hydrodynamischen Flussprofil, das parabolförmig ist, ist das Profil des EOF stempelförmig. Die Geschwindigkeit des EOF ist mit Ausnahme des Bereichs der diffusen Doppelschicht über den gesamten Querschnitt der Kapillare konstant. Aufgrund der konstanten Flussgeschwindigkeit erfolgt durch den EOF keine Peakverbreiterung, wie sie in der HPLC beobachtet wird. Eine hohe Peakschärfe ist die Folge (Abb. 37) [72, 105].

a) $v = \mu \cdot E$
 $E = \frac{U}{l}$
 $\mu = \frac{q}{6 \pi \eta r} = A \cdot e^{\frac{b}{T}}$

b) $v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta E}{4 \pi \eta}$
 $E = \frac{U}{l}$
 $4 \pi \eta = A \cdot e^{\frac{b}{T}}$

Abb. 35: a) Geschwindigkeit der elektrophoretischen Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld.
 b) Geschwindigkeit des EOF.
 (μ : Mobilität, E : elektrische Feldstärke, U : Spannung, l : Kapillarlänge, q : Ladung, r : Ionenradius, η : Viskosität, T : Temperatur
 ϵ : Dielektrizitätskonstante, ζ : Zeta-Potenzial, A , b = stoffspezifische Konstanten)

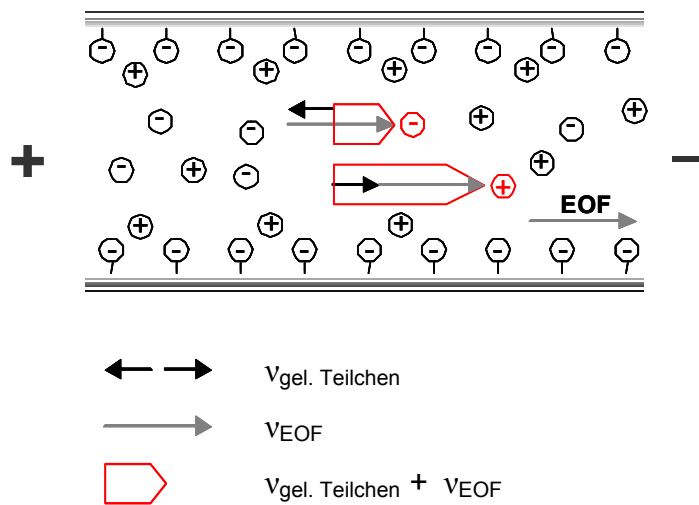


Abb. 36: Überlagerung der elektrophoretischen Mobilität von Kationen und Anionen durch den EOF.

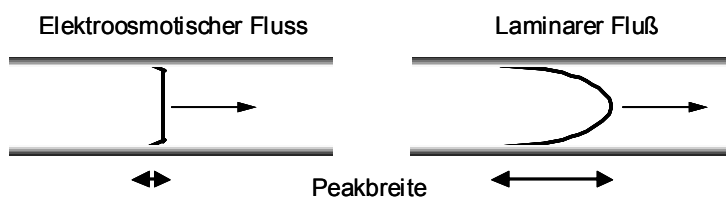


Abb.37: Durch EOF und laminaren Fluß verursachte Flussprofile und resultierende Peakbreiten.

4.1.2 TRENNPRINZIPIEN UND DETEKTIONSMETHODEN

Für die elektrophoretische Trennung können verschiedene Mechanismen genutzt werden.

Die Kapillarzonenoelektrophorese (CZE) ist die am weitesten verbreitete Anwendung. Hier werden wässrige Puffersysteme verwendet und die Analyten werden aufgrund ihrer Mobilitätsunterschiede getrennt. Bei der CZE können nur

elektrisch geladene Moleküle getrennt werden. Ungeladene Moleküle strömen zusammen mit dem Trennpuffer mit der Geschwindigkeit des EOF.

Bei der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) werden die Moleküle nicht nur aufgrund der Mobilitätsunterschiede, sondern auch aufgrund ihrer Polarität getrennt. Dem Puffer werden Detergentien zugesetzt, die ab einer bestimmten Konzentration (kritische Mizellkonzentration, CMC) zu Mizellen aggregieren. Diese Mizellen sind nach außen hin geladen, die hydrophoben Gruppen der Mizellbildner weisen ins Innere der Mizelle. Neutrale Moleküle verteilen sich entsprechend ihrer Polarität auf die wässrige mobile Phase, den Trennpuffer, oder auf die pseudostationäre hydrophobe Phase, das Mizellinnere. Der Trennpuffer wandert mit der Geschwindigkeit des EOF, während die Mizelle langsamer wandert. Die Migrationszeiten verschiedener neutraler Analyten ergeben sich aus den jeweiligen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in Mizelle oder Trennpuffer. Mit dieser Technik ist es möglich, auch neutrale Analyten elektrophoretisch aufzutrennen. Abb. 38 zeigt schematisch den Aufbau einer Natriumlaurylsulfat (SDS) – Mizelle, die zu den anionischen Mizellbildnern gehört. Die typische Aggregationszahl einer SDS-Mizelle liegt bei 62.

Die elektrophoretische Trennung von M, M3G und M6G gelang mit der MEKC-Methode unter Verwendung eines Boratpuffers und Zusatz von SDS. Weitere mögliche Trennprinzipien sind die Kapillarisotachophorese (CITP), die Kapillargelelektrophorese (CGE), die kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF) und die Kapillarelektrochromatographie (CEC). Durch Zusatz chiraler Selektoren zum Trennpuffer ist auch die kapillarelektrophoretische Trennung von Enantiomeren nach den o. g. Trennprinzipien möglich [72, 105, 106].

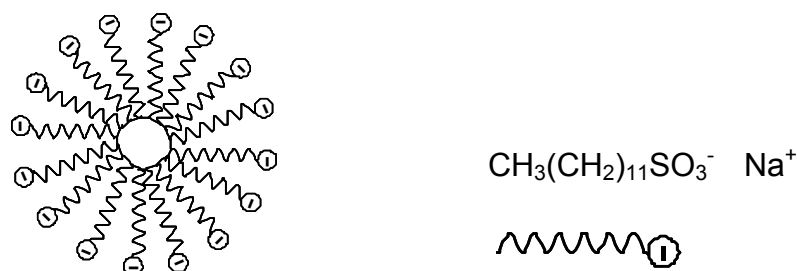


Abb. 38: Schematischer Aufbau einer Natriumdodecylsulfat (SDS)-Mizelle.

Die häufigsten Detektionsmethoden in der CE sind die Messung der UV-Absorption mit einem Dioden-Array-Detektor oder die Kopplung mit einem Massenspektrometer. Weitere Methoden sind die elektrochemische Detektion, die Anregung zur Fluoreszenz mit Lampen und Lasern oder die Messung des Brechungsindex.

Eine Erhöhung der Sensitivität kann generell durch eine Aufkonzentrierung der Probe erreicht werden. Das kann während der Aufarbeitung geschehen oder speziell in der CE-Analytik durch die elektrokinetische Aufgabe auf die Kapillare. Die elektrokinetische Aufgabe ist stark matrixabhängig, und durch die Diskriminierung wenig mobiler Ionen ist eine zweifache Aufgabe aus demselben Probengefäß nicht möglich. Bei der Bestimmung von M, M3G und M6G aus komplexen Matrices wurde der Extrakt durch Eindampfen aufkonzentriert. Auf die elektrokinetische Aufgabe wurde aus den genannten Gründen verzichtet.

Bei den optischen online-Detektionsverfahren in der CE stellt der kurze Lichtweg, bedingt durch den geringen Kapillardurchmesser, die kritische Größe dar. Das Lambert-Beersche Gesetz und die Gleichung von Parker (s. Kap. 3.1) sagen aus, dass die optische Weglänge sowohl für die Nachweisgrenze in der UV-Detektion als auch in der Fluoreszenzdetektion von entscheidender Bedeutung ist. Eine Verlängerung des Lichtwegs bei der Detektion in der CE und folglich eine Empfindlichkeitssteigerung kann durch sog. Bubble Cell-Kapillaren [107] oder Z-Zellen [108] erreicht werden. Diese sind jedoch nur bedingt einsetzbar, da durch die Vergrößerung der Schichtdicke (Bubble Cell) bzw. die z-förmige Führung (Z-Zelle, Längsführung des Lichtstrahls durch die Kapillare) Auflösungsverluste auftreten.

Die Wahl der günstigsten Anregungswellenlänge sorgt dafür, dass eine möglichst große Photonenmenge von der Probe absorbiert und ggf. in Form von Fluoreszenzlicht wieder abgegeben wird, also eine optimale Fluoreszenzausbeute erzielt wird.

Da bei der Entstehung der Fluoreszenz die Emissionsintensität direkt proportional zur Intensität des Anregungslichts ist, kann bei Vergrößerung der auf die Kapillare fokussierten Photonenmenge eine Intensivierung der Fluoreszenz und somit eine Absenkung der Detektionsgrenze erfolgen. Laser sind in der Lage, die emittierte Lichtenergie auf einen Punkt zu fokussieren, und somit für die online-Detektion in der CE sehr gut geeignet (s. Kap. 3.1).

Um Morphin und die Morphinglucuronide zur Fluoreszenz anzuregen, war energiereiches Licht im tiefen UV-Bereich notwendig. Der Lichtstrahl des hier verwendeten Lasers wurde mit einer Leistung von 50 ($\lambda_{Em}=244\text{ nm}$) bzw. 100 mW ($\lambda_{Em}=257\text{ nm}$) emittiert und direkt auf das Detektorfenster der Kapillaren gerichtet.

Die Detektionsgrenze kann auch durch Aufkonzentrierung der Probe in der Kapillare herabgesetzt werden. Dies kann durch die elektrokinetische Injektion erreicht werden. Die Probe wird bei diesem Verfahren auf die Kapillare gebracht, indem eine Hochspannung an die Probenlösung angelegt wird. Die Analytmenge, die bei diesem Verfahren auf die Kapillare gelangt, ist stark abhängig von der Leitfähigkeit der Probenmatrix, in der sich der Analyt befindet. Befindet sich der Analyt in einer Probenmatrix mit hohem Anteil an mobilen Matrixionen, ist die Menge des applizierten Analyten vergleichsweise geringer als bei der elektrokinetischen Injektion aus einer weitgehend ionenfreien wässrigen oder alkoholischen Probenlösung. Im letzteren Fall wird der gelöste Analyt als nahezu einzige mobile Ionenart an der Grenzschicht zum Puffer, also am Beginn der eintauchenden Kapillare angereichert. Bei einer ionenarmen Matrix kann diese Art der Injektion, das sog. Samplestacking, eine bis zu 100-fache Steigerung der Sensitivität bewirken. Die elektrokinetische Injektion zeichnet sich jedoch durch eine schlechte Reproduzierbarkeit aus. Mehrere Injektionen aus einer Probelösung sind nicht möglich.

Bei Matrix-belasteten Extrakten kann sich die elektrokinetische Probenaufgabe dann nachteilig auswirken, wenn die Mobilität der Matrixionen größer ist als die des Analytens. Die Matrixionen würden in diesem Fall bevorzugt an der Grenzschicht zur Kapillare angereichert [109, 110].

4.2 METHODENENTWICKLUNG

Für die forensische Analytik wurde die Kapillarelektrophorese vor allem für die Trennung einer Vielzahl von Verbindungen und deren Bestimmung in Betäubungsmittelsicherstellungen eingesetzt. Sie hat mittlerweile aber auch bei der qualitativen und quantitativen Analyse von Arzneistoffen und Drogen in biologischen Proben ihren Platz gefunden [111-124]. Die hohe Peakschärfe dieser Analysenmethode und die daraus resultierende Trennleistung sowie der geringe Probenverbrauch machen die CE für die forensische Analytik interessant, denn oft kann Probenmaterial nur schwer und in geringem Umfang gewonnen werden, so dass Matrix-belastete Probenextrakte von geringem Volumen zur Verfügung stehen. In solchen Fällen kann die CE gegenüber der HPLC und der GC einen entscheidenden Vorteil bieten.

Ein Nachteil der CE ist die geringe Konzentrationsempfindlichkeit bei optischen Detektionsverfahren, bedingt durch den kurzen Lichtweg innerhalb der Kapillare (s. Kap. 3.1). Der Einsatz eines Hochleistungslasers, der Licht im tiefen UV-Bereich emittiert, zur Fluoreszenzanregung in Verbindung mit einer Wellenlängen-aufgelösten Detektion kann eine Quantifizierung von M, M3G und M6G im unteren Nanogrammbereich im Vollblutextrakt ermöglichen. Die Bestimmung aus Vollblut ist aus forensischer Sicht deshalb notwendig, da viele Blutproben von Heroinopfern stammen und sich aus Leichenblut durch Zentrifugation kein Serum mehr gewinnen lässt. Durch die CE-LIF-Methode mit der Anregung im tiefen UV-Bereich war bereits bei einigen Arzneistoffen eine Steigerung der Sensitivität um den Faktor 1000 gegenüber der UV-Detektion und eine Direktbestimmung aus Urin möglich [125, 126].

Für die Bestimmung von M, M3G und M6G in Vollblut wurde zunächst eine Methode zur Trennung der Analyten mit UV-Detektion entwickelt. Anschließend sollte durch die Kopplung mit dem LIF-System eine empfindliche Bestimmung der Analyten in Vollblutextrakten erfolgen.

4.2.1 UV-ABSORPTION UND FLUORESZENZ DER ANALYTEN

Für die Anwendung der UV-Absorptions-Detektion und der später eingesetzten Laser- induzierten Fluoreszenzdetektion war es notwendig, die optischen Eigenschaften der Analyten im Trennpuffer (s. Kap. 4.2.2) zu ermitteln.

Während der Entwicklung der Trennmethode erfolgte die Detektion mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD). Abb. 39 zeigt beispielhaft für alle drei Analyten das UV-Spektrum einer Lösung von Morphin in Borat/SDS-Puffer. Die maximale Absorption wurde bei UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 200 - 220$ nm gemessen. Zur Detektion mittels DAD wurde folglich die Absorption diesem Wellenlängenbereich ausgewertet.

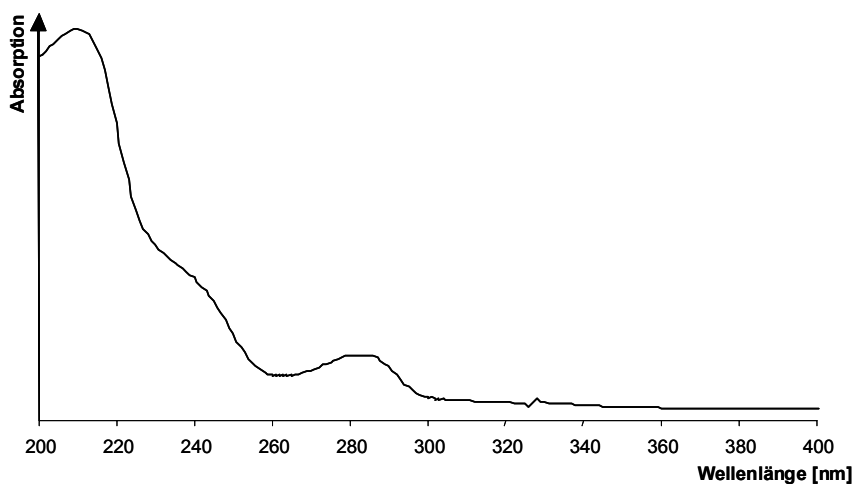


Abb. 39: UV- Spektrum von Morphin (10 µg/ml, Lösung in Trennpuffer, pH 9,2).

Bereits in der HPLC-Analytik wurden die guten Fluoreszenzeigenschaften von M, M3G und M6G zur selektiven und sensitiven Bestimmung genutzt. Für die CE-Analytik mit LIF-Detektion konnte ein Hochleistungslaser eingesetzt werden, der im tiefen UV-Bereich die Wellenlängen $\lambda = 257$ nm (100 mW) resp. 244 nm (50 mW) emittierte. Um den späteren Auswertungsbereich der Fluoreszenz optimal wählen zu können, wurden die Emissionsmaxima der drei Analyten, gelöst in Trennpuffer, ermittelt. Lösungen mit je 10 $\mu\text{g/ml}$ von M, M3G bzw. M6G in Borat/SDS-Puffer wurden im Spektrometer sowohl bei $\lambda_{\text{Ex}} = 257$ nm als auch bei $\lambda_{\text{Ex}} = 244$ nm zur Fluoreszenz angeregt und die Emissionsspektren im Bereich von $\lambda_{\text{Em}} = 280$ nm – 480 nm aufgenommen. Bei allen drei Analyten und beiden Anregungswellenlängen lagen die Emissionsmaxima im Bereich $\lambda_{\text{Em}} = 340$ nm – 350 nm. Die Fluoreszenzausbeute war bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 244$ nm stets größer als bei der Bestrahlung mit $\lambda_{\text{Ex}} = 257$ nm. Die Anregung im LIF-System war für die Wellenlänge $\lambda = 244$ nm mit einer Leistung von 50 mW möglich, während die maximale Laserleistung bei der Wellenlänge $\lambda = 257$ nm doppelt so hoch war. Daher wurden beide Wellenlängen zur Laser-induzierten Fluoreszenz-Anregung eingesetzt.

Da die Emission aller drei Analyten im Bereich 340 nm – 350 nm maximal war, konnte der spätere Auswertungsbereich für alle drei Analyten gleich gewählt werden.

Abb. 40 zeigt die aufgenommenen Emissionsspektren der drei Analyten in Trennpuffer gelöst bei den beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{Ex}} = 257$ nm und $\lambda_{\text{Ex}} = 244$ nm.

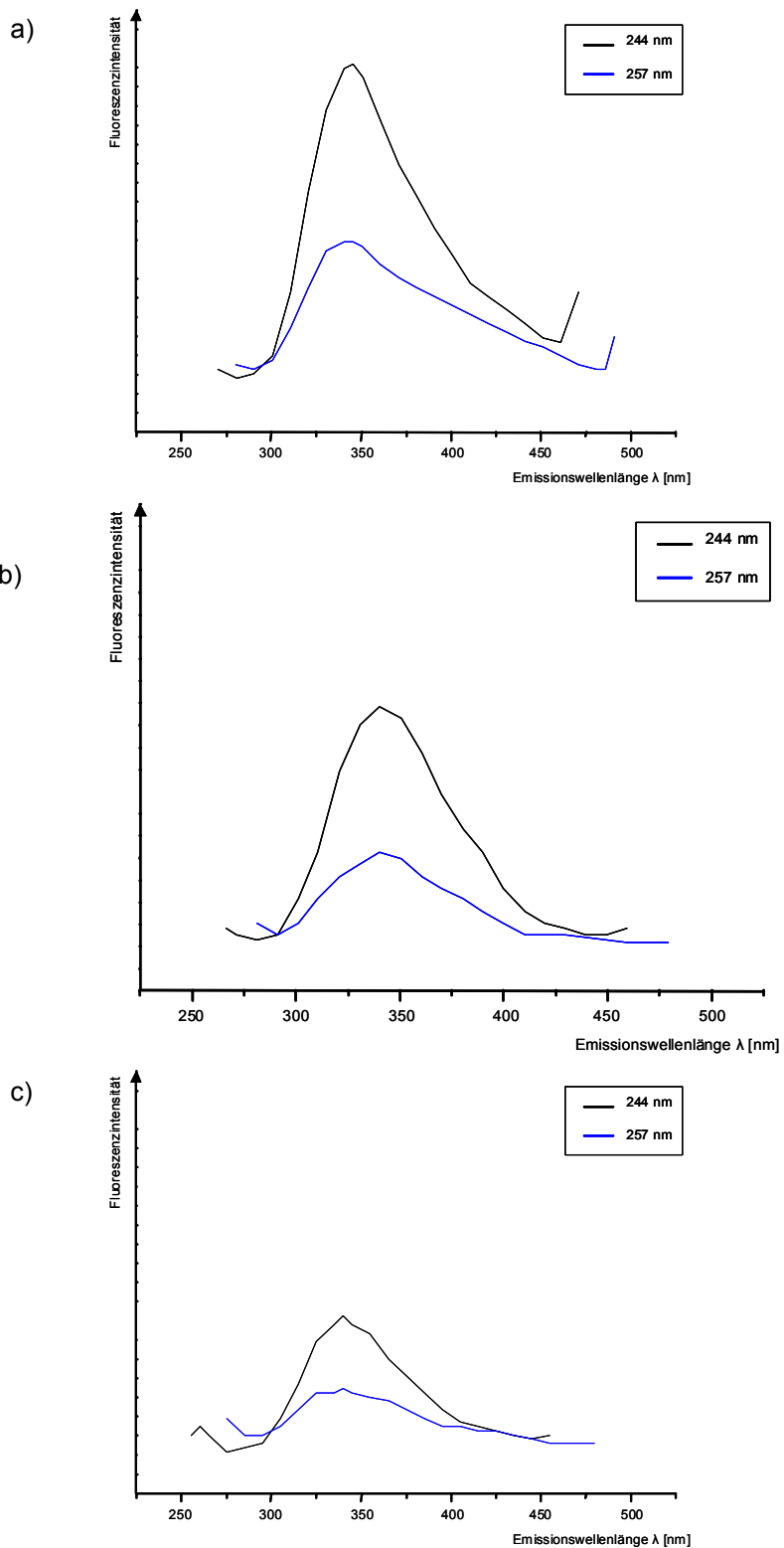


Abb. 40: Fluoreszenzspektren von a) Morphin, b) M3G und c) M6G, $c = 10 \mu\text{g/ml}$ in Trennpuffer. Anregungswellenlängen: $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$.

4.2.2 TRENNPUFFER

Verschiedene Puffersysteme wurden zunächst auf ihre Eignung zur Trennung von M, M3G und M6G hin untersucht.

Trennversuche mittels Phosphatpuffern verschiedener Konzentrationen und pH-Werte gelangen nicht.

Die Trennung der drei Analyten gelang mit einem 100 mM Boratpuffer, pH 9,2, dem 75 mM Natriumdodecylsulfat zugesetzt wurden.

Für die Trennungen wurden unbelegte fused-silica-Kapillaren, 50 µm ID, mit einer effektiven Länge von 40 cm und einer Gesamtlänge von 47 cm eingesetzt.

4.2.3 INTERNER STANDARD

Um Extraktionsverluste bei der Aufarbeitung und Schwankungen bei der Aufgabe auf die Kapillare zu kompensieren, ist die Verwendung eines internen Standards erforderlich. Der ideale interne Standard sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- ähnliches Migrationsverhalten
- ähnliches Fluoreszenzverhalten
- ähnliches Extraktionsverhalten
- nicht endogen in Realproben enthalten

12 verschiedene Substanzen, die Strukturähnlichkeiten mit Morphin oder den Glucuroniden aufwiesen, wurden auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Zeitnah mit den Analyten migrierten unter den für die Trennung von M, M3G und M6G geeigneten Trennbedingungen Hydromorphon, Apomorphin und N-(3-Aminopropyl-) normorphen-3-β-D-glucuronid (NAPG-3). Ihre Strukturformeln sind in Abb. 41 a) – c) dargestellt.

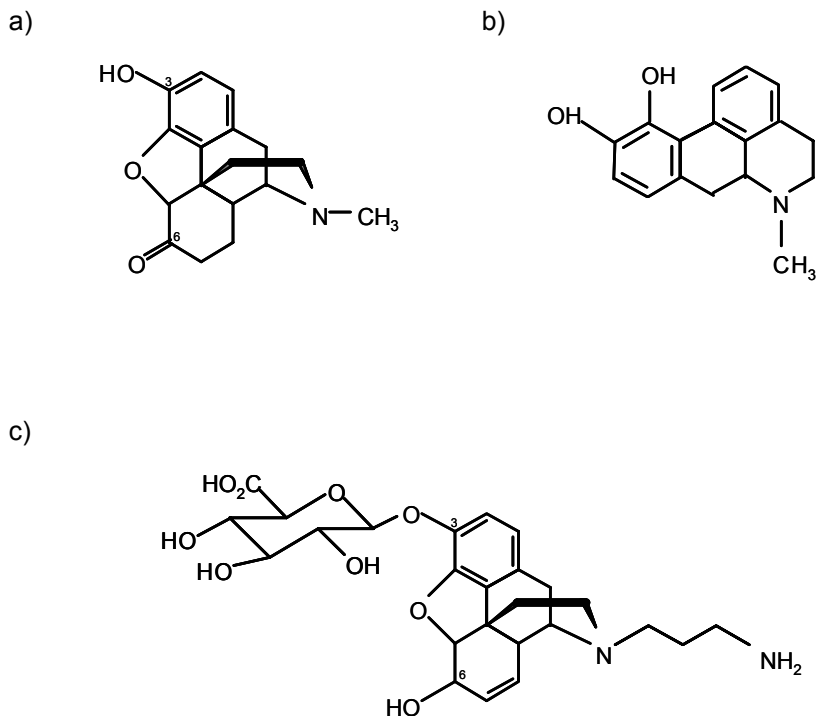


Abb. 41: Molekülstrukturen potenzieller interner Standards: a) Hydromorphon, b) Apomorphin, c) N-(3-Aminopropyl)-normorphin-3-β-D-glucuronid.

Alle drei potenziellen internen Standards wurden auf ihre Absorptions-, Fluoreszenz- und Extraktionseigenschaften hin untersucht.

Hydromorphon (a) erwies sich für die Trennung von M, M3G und M6G mit UV-Detektion als ein geeigneter interner Standard mit günstigen Absorptionseigenschaften und geeignetem Migrationsverhalten. Jedoch zeigte Hydromorphon bei der Anregung durch die Wellenlängen $\lambda_{\text{EX}} = 257 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$ kaum Fluoreszenz. Daher schied diese Substanz für die CE-Trennung mit LIF-Detektion als interner Standard aus. Außerdem besaß Hydromorphon bei der Extraktion an C_8 -Phasen bei pH 9 nur eine sehr geringe Wiederfindungsrate.

Apomorphin (b) zeigte ein günstiges Fluoreszenz- und Migrationsverhalten bei scharfer Peakform unter den für die Analyten geeigneten Trennbedingungen. Apomorphin konnte jedoch an C₈-Phasen bei pH 9 ebenfalls nur schlecht reproduzierbar und mit geringer Wiederfindungsrate extrahiert werden.

N-(3-Aminopropyl)-normorphin-3-β-D-glucuronid (c) zeigte bei der Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ ein günstiges Fluoreszenzverhalten, das dem der Analyten sehr ähnlich war. Diese Substanz migrierte jedoch bei gleichzeitiger Trennung von den drei Analyten mit flacher, breiter Peakform und war somit für die Peakintegration nicht geeignet. N-(3-Aminopropyl)-normorphin-3-β-D-glucuronid war an C₈-Phasen bei pH 9 nur mit unbefriedigender Wiederfindung extrahierbar. Die Substanz war somit als interner Standard nicht geeignet.

Von den drei möglichen internen Standards war keiner für die zusammen mit den Analyten erfolgende C₈- Festphasenextraktion geeignet. Der interne Standard konnte folglich nur für die CE- Trennung eingesetzt werden. Daher wurde Hydromorphon aufgrund seiner günstigen UV-Absorptionseigenschaften als interner Standard für die CE- Trennung von M-, M3G- und M6G- Standardlösungen mit UV- Detektion gewählt (s. Kap. 4.3).

Für die CE-LIF- Analytik wurde Apomorphin als interner Standard erst nach erfolgter Extraktion zugesetzt (s. Kap. 4.4). Eine mögliche Umlagerung von Morphin zu Apomorphin ist unter den gewählten Extraktions- und Analysenbedingungen nicht zu erwarten, da diese nur unter dem Einfluss heißer konzentrierter Salzsäure eintritt.

4.2.4 PROBENVORBEREITUNG

Eine sorgfältige Probenvorbereitung ist für die kapillarelektrophoretische Bestimmung aus Vollblut äußerst wichtig, da Protein- und Lipidbestandteile des Blutes die Trenneigenschaften der Kapillare beeinträchtigen und diese mechanisch verstopfen.

Prinzipiell wurde die Extraktion aus Vollblut nach 3.2.1 übernommen. Da eine möglichst niedrige Nachweisgrenze erzielt werden sollte, musste der Grad der Aufkonzentrierung noch einmal unter dem Aspekt der Trennmethode betrachtet werden. Auf der einen Seite ist eine möglichst starke Aufkonzentrierung angestrebt, da das Probenvolumen und die optische Weglänge für eine on-column-Detektion der Fluoreszenz bzw. der UV-Absorption in der CE wesentlich geringer sind als in der HPLC. Dem gegenüber steht, dass sich trotz der Selektivitätssteigerung durch die Fluoreszenzdetektion im Extrakt befindliche, gleichermaßen aufkonzentrierte Matrixbestandteile negativ auf die Detektion, die Trennung und das Injektionsverhalten auswirken können. Es muss also ein optimales Maß bezüglich der Aufkonzentrierung gefunden werden. Eine Aufkonzentrierung um einen Faktor 5 erwies sich als optimal.

Der eingedampfte Extrakt wurde in einem Methanol + H₂O - Gemisch 50 + 50 aufgenommen. So erhielt man eine Lösung der extrahierten Analyten in einer ionenarmen Matrix.

4.3 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT UV-DETEKTION

Für die CE-Analytik von M, M3G und M6G mit UV - Detektion wurde die Absorption bei 200 - 210 nm gemessen. Der geeignete interne Standard für die CE-UV- Methode war Hydromorphon. Er migrierte zu den gegebenen kapillarelektrophoretischen Bedingungen zwischen Morphin und den Glucuroniden mit schlanker Peakform. Die Trennung erfolgte in weniger als 8 Minuten (Abb. 41). Für diese Trennung wurde die Linearität überprüft und die Detektionsgrenze ermittelt.

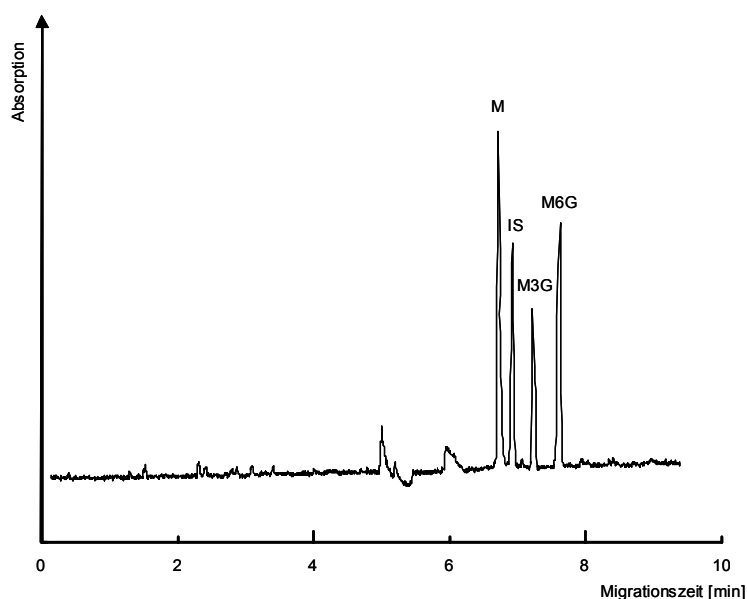


Abb. 41: Elektropherogramm einer wässrig-methanolischen Standardlösung mit je 25 µg/ml M, M3G, M6G und dem internen Standard Hydromorphon. UV- Absorption: 200-210 nm. Elektropherographische Bedingungen: s. Kap. 4.2 d. Exp. Teils.

4.3.1 LINEARITÄT

Für jeden Analyten wurde eine Kalibrationsgerade mittels wässrig-methanolischer Standards erstellt. Der Konzentrationsbereich wurde zwischen 1 µg/ml und 50 µg/ml gewählt. Lineare Konzentrations-/Absorptions-Abhängigkeit war für M über den gesamten Konzentrationsbereich gegeben, für M3G und M6G über den Konzentrationsbereich 5 µg/ml bis 50 µg/ml. Die Korrelationskoeffizienten lagen > 0,999. Die Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten sind in den Abb. 42 – 44 dargestellt.

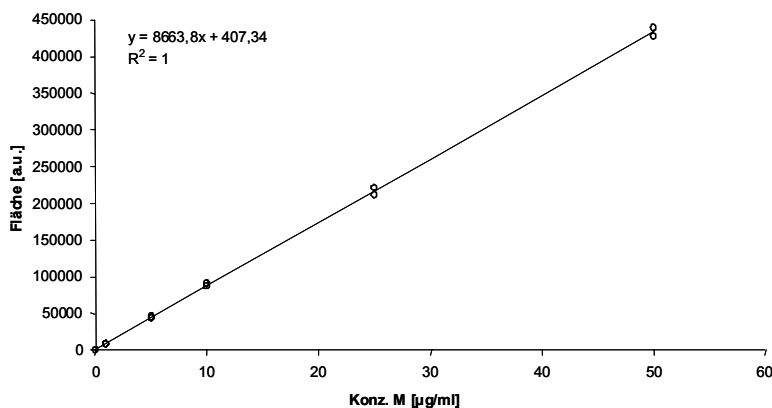


Abb. 42: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für Morphin.

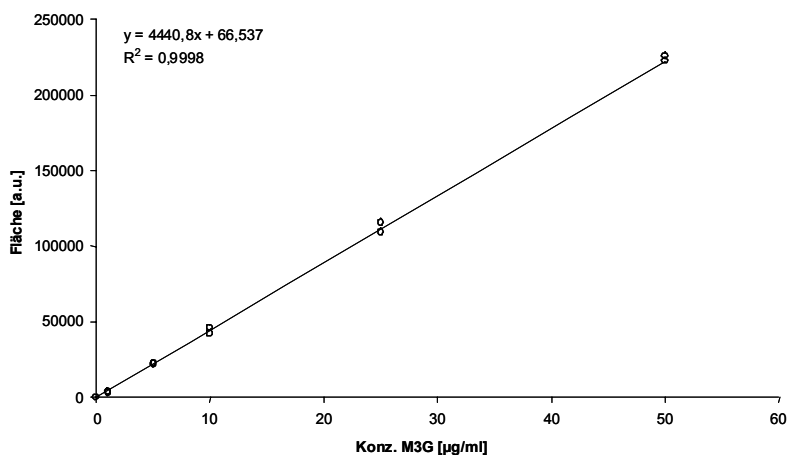


Abb. 43: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für M3G.

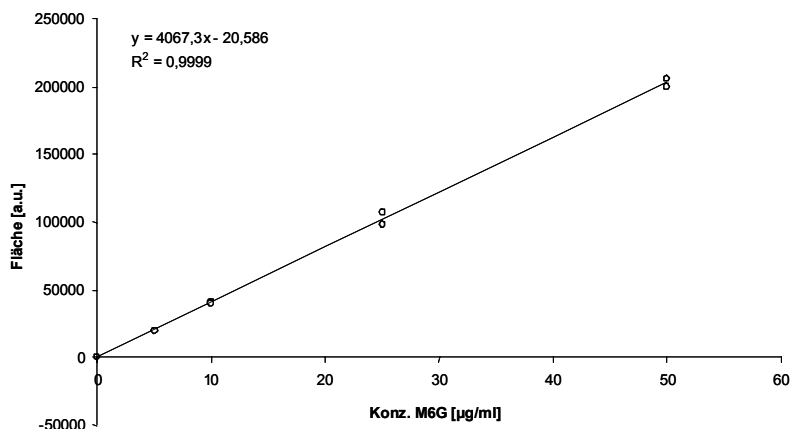


Abb. 44: Standardlösungen - Kalibrationsgerade für M6G.

4.3.2 DETEKTIONSGRENZE

Die Detektionsgrenze ist als diejenige Konzentration definiert [90], die noch bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 nachweisbar ist. Für M lag diese Konzentration bei 1 µg/ml, für M3G und M6G bei 5 µg/ml.

Der Konzentrationsbereich, der für den Nachweis von M, M3G und M6G in Blut von Heroinkonsumenten von forensischer Bedeutung ist, liegt im Nanogrammbereich, im Falle des in geringer Konzentration auftretenden M6G im unteren Nanogrammbereich. Dieser Bereich konnte auch durch eine Aufkonzentrierung um den Faktor 5, wie sie im Falle einer Extraktion aus Blut nach Kap. 4.2.4 erfolgt wäre, nicht erreicht werden. Die UV-Detektion war daher für die Bestimmung von M, M3G und M6G in Blutextrakten unter forensischen Aspekten nicht geeignet. Daher wurde von der CE-UV-Analyse von Blutextrakten abgesehen und direkt durch die Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektion eine Erniedrigung der Detektionsgrenze angestrebt.

4.4 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT LASER-INDUZIERTER FLUORESCENZ-DETEKTION

Zur Erhöhung der Sensitivität wurde als Detektionsmethode die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion mit einem frequenzverdoppelten Argon-Ionen-Laser mit den Anregungswellenlängen 257 nm und 244 nm eingesetzt [127]. Bei 257 nm konnte eine Emissionsleistung von 100 mW erreicht werden, bei 244 nm eine Emissionsleistung von 50 mW.

Während der Messung wurde die gesamte spektrale Information der Probe von einer CCD-Kamera erfasst. Die wellenlängenaufgelöste Detektion ermöglichte einen für jeden Analyten spezifischen Auswertbereich. Dieser konnte auch nach einer Messung noch variiert und auf die Analyten in der vorliegenden Matrix abgestimmt werden.

Einen besonderen Vorteil bot diese Auswertungsmethode bei der Bestimmung von fluoreszierenden Substanzen in komplexen biologischen Matrices. Durch die Wahl eines bestimmten spektralen Ausschnitts aus der Gesamtinformation konnte das Fluoreszenzsignal endogener Bestandteile, die in einem anderen Wellenlängenbereich als dem der Analyten fluoreszieren, aus der Detektion ausgeschlossen werden.

4.4.1 AUFBAU DES DETEKTIONSSYSTEMS

Die Messungen erfolgten im Fachbereich Angewandte Laserphysik, Arbeitskreis Prof. Dr. P. Andresen, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, in Kooperation mit M.-O. Schierenberg.

In Abb. 45 ist der schematische Aufbau des Detektionssystems dargestellt.

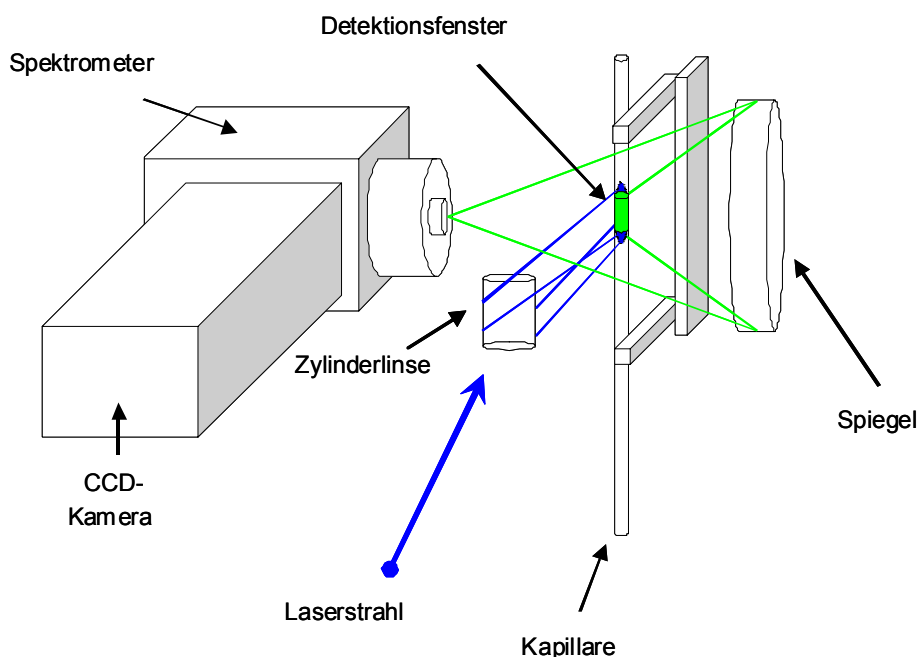


Abb. 45: Schematischer Aufbau des CE-LIF- Detektionssystems.

Das verwendete CE-Gerät war ein CE- System SpectraPhoresis 100 der Firma Thermoquest. Es wurden handelsübliche fused-silica-Kapillaren (50 μm ID, 350 μm AD) verwendet. Die Kapillare musste zur Detektion aus dem Gerät herausgeführt werden. Daher betrug die Mindestgesamtlänge der Kapillare 75 cm und die effektive Länge 55 cm.

In dem zur Fluoreszenz eingesetzten frequenzverdoppelten Argon-Ionen-Laser wurden die Wellenlängen der erzeugten Fundamentallaserlinien durch einen borathaltigen Kristall verdoppelt. Die Auswahl der gewünschten Emissionswellenlänge erfolgte über ein Prisma und einen Cut-Off-Endspiegel. Die maximale Emissionsleistung des Lasers in der gewählten Wellenlänge war abhängig von der Intensität der dazu gehörigen ursprünglichen Fundamentallaserlinie des im Laser erzeugten Grundspektrums. Für $\lambda = 257 \text{ nm}$ lag die maximale Leistung, die konstant erzeugt werden konnte, bei 100 mW. Die Wellenlänge $\lambda = 244 \text{ nm}$ konnte konstant mit einer Leistung von 50 mW emittiert werden. Über ein Linsensystem wurde der punktförmig

abgegebene Laserstrahl elliptisch geformt, so dass statt einer Fokussierung auf einen Kreis von weniger als 100 μm eine Bestrahlung eines Ovals von ca. 1,5 mm Länge ermöglicht wurde. Da es sich bei der Apparatur um einen Prototypen handelte, erfolgte die Einkopplung des Laserstrahls auf das Detektionsfenster nicht über fiberoptische Fasern, sondern durch ein Spiegelsystem mit offener Führung der Strahlung durch den Raum.

Die Detektion erfolgte direkt in der Kapillare. Dazu wurde ein ca. 4 mm langes Detektionsfenster durch Entfernung der Polyimidschicht in diesem Bereich geschaffen. Der elliptisch geformte Laserstrahl wurde so auf das Detektionsfenster gerichtet, dass ein 1,5 mm langer Bereich bestrahlt wurde. Die Analyten, die durch den bestrahlten Bereich wanderten, konnten so über einen verlängerten Aufenthaltszeitraum wiederholt zur Fluoreszenz angeregt werden. Auf diese Weise konnte durch die geringe Ausweitung des Detektionsbereichs die Fluoreszenzausbeute gesteigert werden, ohne dass ein Verlust der Peakschärfe eintrat [128 - 131]. Das Fluoreszenzlicht wurde im rechten Winkel zum Laserstrahl über einen Hohlspiegel auf den Spektrometerspalt abgebildet. Eine intensivierete CCD-Kamera (charged coupled device-Kamera) detektierte das Fluoreszenzlicht in einem Wellenlängenbereich zwischen 180 nm und 400 nm [132]. Die Ausleserate betrug 4,5 Hz und der Binning-Faktor $48 \cdot 40$ [133]. Die CCD-Kamera war in der Lage, sowohl wellenlängen- als auch orts aufgelöst zu detektieren. Die Ortsauflösung ermöglichte bei einem eventuellen gleichzeitigen Aufenthalt zweier Analyten, bedingt durch eine ähnliche Migrationsgeschwindigkeit, die Zuordnung der Fluoreszenzanteile zu den entsprechenden Analyten. Die spektrale Information ermöglichte neben der quantitativen Auswertung eines frei wählbaren Spektrumausschnitts auch die Identifizierung der emittierenden Substanz. Die Rohdaten der CCD-Kamera wurden über spezifische Algorithmen mit dem Programm Mathcad 7 verarbeitet und dargestellt.

Abb. 46 zeigt den für die CE-LIF-Detektion im tiefen UV entwickelten Prototypen [103].

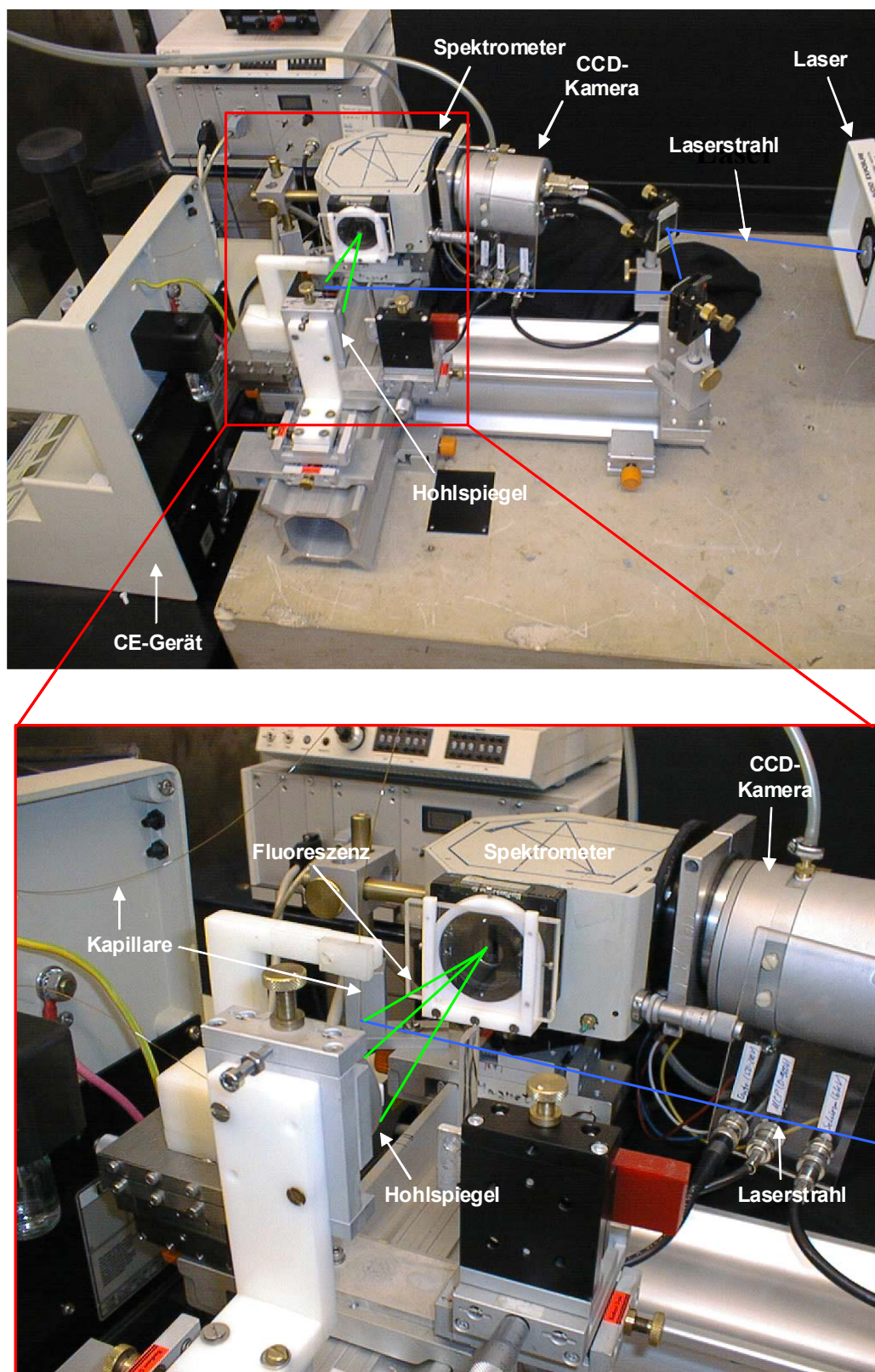


Abb. 46: Apparatur für die CE-LIF- Detektion im tiefen UV.

4.5 ANREGUNG ZUR FLUORESZENZ BEI $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$

Die Übertragung der CE-UV-Methode auf das CE-LIF-System fand zunächst unter Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ statt. Der Laser emittierte diese Wellenlänge mit einer konstanten Leistung von 100 mW. Bei Vortests zeigte sich, dass diese Wellenlänge weniger gut zur Fluoreszenzanregung geeignet ist als $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$. Die hier zunächst gewählte Wellenlänge stand jedoch mit einer doppelt so hohen Leistung zur Verfügung, wodurch dieses Defizit ausgeglichen werden sollte.

Da die Gesamt-Kapillarlänge mindestens 75 cm betrug, musste eine höhere Spannung angelegt werden, um ähnlich kurze Migrationszeiten wie bei der CE-UV-Methode zu erreichen.

Nach dieser Modifikation wurde mit dem CE-LIF-System eine Trennung erreicht, bei der die Migrationszeiten sich etwas von denen unterschieden, die bei den Messungen am CE-UV-System ermittelt worden waren. Dies ist durch die höhere angelegte Spannung sowie den längeren Migrationsweg, den die Analyten bis zum Detektionsfenster zurücklegen, zu begründen. Um eine direkte Übertragung der Methode auf das CE-LIF-System durchführen zu können, wurde mit Standardlösungen derjenigen Zusammensetzung gearbeitet, mit denen bereits die Trennmethode am CE-UV-System entwickelt worden war. Abb. 47 zeigt das Elektropherogramm einer wässrig-methanolischen Standardlösung, die je 10 $\mu\text{g/ml}$ M, M3G und M6G sowie 50 $\mu\text{g/ml}$ Hydromorphon enthält. Die Analyten und auch der interne Standard Hydromorphon konnten anhand der Laser-induzierten Fluoreszenz detektiert werden. Hydromorphon musste jedoch aufgrund seiner schlechten Fluoreszenzeigenschaften (Abb. 48) in hoher Konzentration in der injizierten Probe enthalten sein und migrierte dann mit flacher Peakform. Hier zeigte sich, dass Hydromorphon für eine spätere Verwendung als interner Standard nicht geeignet war.

Der zur Auswertung herangezogene spektrale Ausschnitt aus der Gesamtfluoreszenz war so gewählt, dass der Analyt M6G, der erwartungsgemäß in Realproben in der geringsten Konzentration vorliegt, am

sensitivsten detektiert werden konnte. Dadurch war auch die Sensitivität für M3G stark begünstigt. Von der aufgezeichneten Gesamtfluoreszenz wurde der spektrale Ausschnitt 325 nm – 400 nm durch Aufsummierung der Fluoreszenzintensität dieses Spektralbereichs ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Fluoreszenzspektren der Glucuronide zeigten einen flacheren Verlauf als die des Morphins (Abb. 40). Daher war die Erhöhung der Sensitivität durch eine Ausweitung des auszuwertenden Spektralausschnitts effektiver für die Glucuronide als für das Morphin.

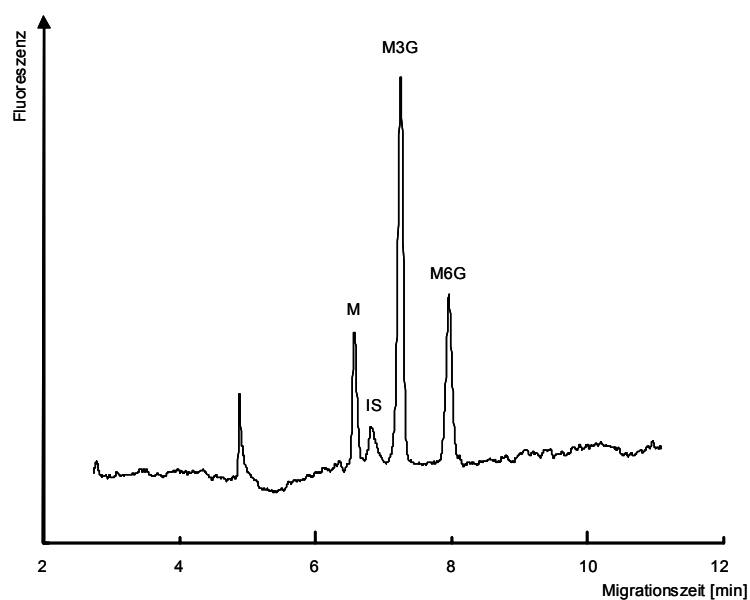


Abb. 47: Elektropherogramm einer wässrig-methanolischen Standardlösung mit je 10 µg/ml M, M3G, M6G und 50 µg/ml des internen Standards Hydromorphon. LIF-Detektion bei $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$, Detektionsbereich: 325 nm – 400 nm. Elektropherographische Bedingungen: s. Kap. 4.4 d. Exp. Teils.

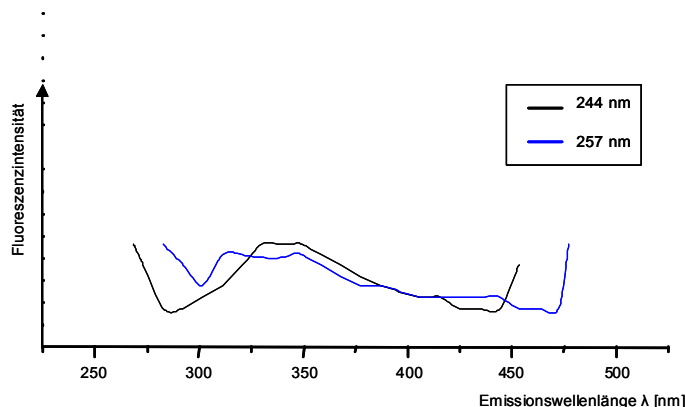


Abb. 48: Fluoreszenzspektren von Hydromorphon, $c = 10 \mu\text{g/ml}$ in Trennpuffer.
Anregungswellenlänge: $\lambda_{\text{EX}} = 257 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$

Anhand der Peakflächen von M, M3G und M6G erfolgte die Bestimmung der Linearitäten und der Detektionsgrenzen der Analyten in wässrig-methanolischer Lösung. Außerdem wurde die Übertragbarkeit der Bestimmung auf Körperflüssigkeiten überprüft und die Nachweisgrenze der drei Analyten in Blut ermittelt. Schließlich wurde die Anwendbarkeit der Methode für eine Direktbestimmung im Urin überprüft.

4.5.1 LINEARITÄT

Für jeden Analyten wurde eine Kalibrationsgerade mittels wässrig-methanolischer Standards erstellt. Der Konzentrationsbereich wurde zwischen 50 ng/ml und 5000 ng/ml gewählt. Bei Berücksichtigung einer Aufkonzentrierung um den Faktor 5 nach Extraktion aus Blut würde dieser Konzentrationsbereich ($10 - 1000 \text{ ng/ml}$ Blut) mit einem sinnvollen Konzentrationsbereich der drei Analyten für die Messung von Realproben übereinstimmen.

Linearität war für M und M6G im Bereich 500 ng/ml bis 5000 ng/ml gegeben und für M3G im Konzentrationsbereich 100 ng/ml – 5000 ng/ml. Die Korrelationskoeffizienten R^2 lagen $> 0,999$. Die Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten der drei Analyten sind in Abb. 49 – 51 dargestellt.

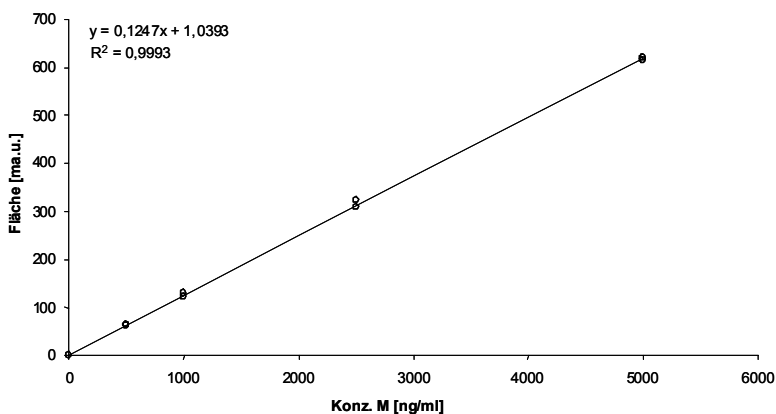


Abb. 49: Standardlösungen – Kalibrationsgerade für Morphin.

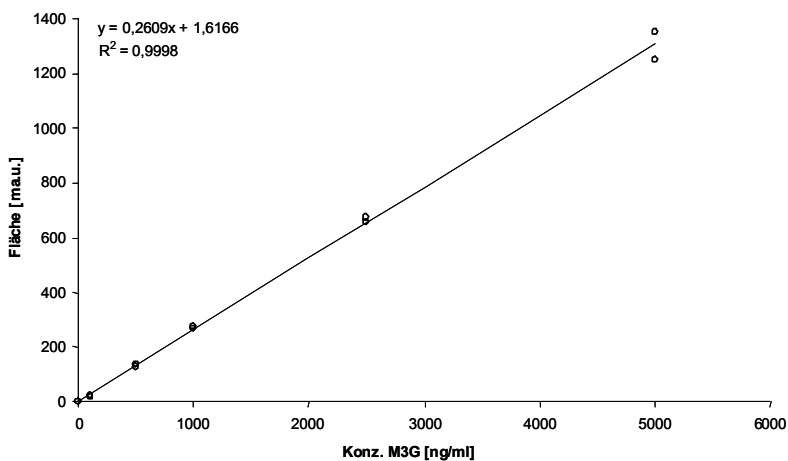


Abb. 50: Standardlösungen – Kalibrationsgerade für M3G.

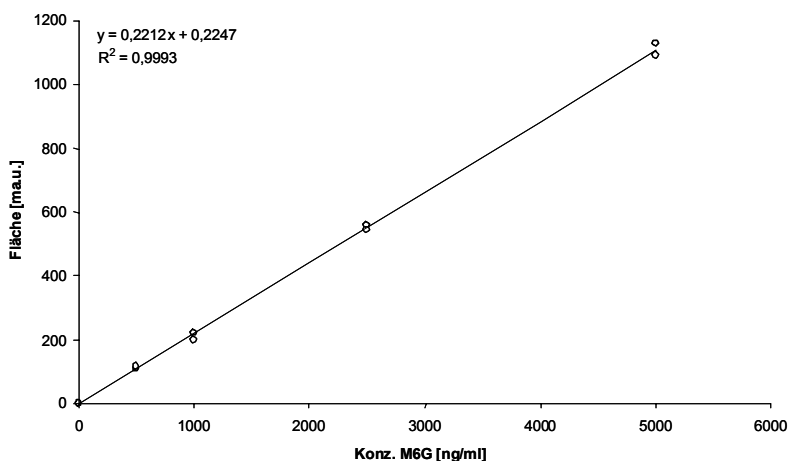


Abb. 51: Standardlösungen – Kalibrationsgerade für M6G.

4.5.2 DETEKTIONSGRENZE

Für M und M6G lag die Detektionsgrenze [90] bei 500 ng/ml, für M3G bei 100 ng/ml. Bei diesen Konzentrationen konnten die Analyten noch mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 detektiert werden. Im Vergleich zur CE-UV-Bestimmung konnte die Sensitivität in Standardlösungen für Morphin um den Faktor 2, für M3G um den Faktor 50 und für M6G um den Faktor 10 gesteigert werden. Für 5-fach aufkonzentrierte Blutextrakte entspräche das bei einer 100 % igen Wiederfindungsrate einer Nachweisgrenze von je 100 ng/ml Blut für M und M6G und 20 ng/ml Blut für M3G. Die Wiederfindungsraten der Extraktionsmethode wurden mit ca. 50 % - 60 % bestimmt (Kap. 3.2.2.2). Die angestrebte Sensitivität, die Analyten im unteren Nanogramm-Bereich in Blut nachweisen zu können, konnte mit dem CE-LIF-System durch Fluoreszenzanregung mit $\lambda_{\text{EX}} = 257 \text{ nm}$ somit nicht erreicht werden.

4.5.3 SPEZIFITÄT

Die in Kap. 4.5.2 abgeschätzten Nachweisgrenzen in Blut sollten jedoch durch direkte Bestimmung bestätigt werden. Dazu wurde zunächst die Spezifität überprüft. Ein Elektropherogramm einer mit M, M3G und M6G versetzten und nach Kap. 4.2.4 extrahierten Blutprobe wurde mit dem einer parallel extrahierten Leerblutprobe verglichen. Im Bereich der Analyten trat kein Störpeak auf, so dass die Spezifität für die Analyten im C₈- Blutextrakt gegeben war (Abb. 52).

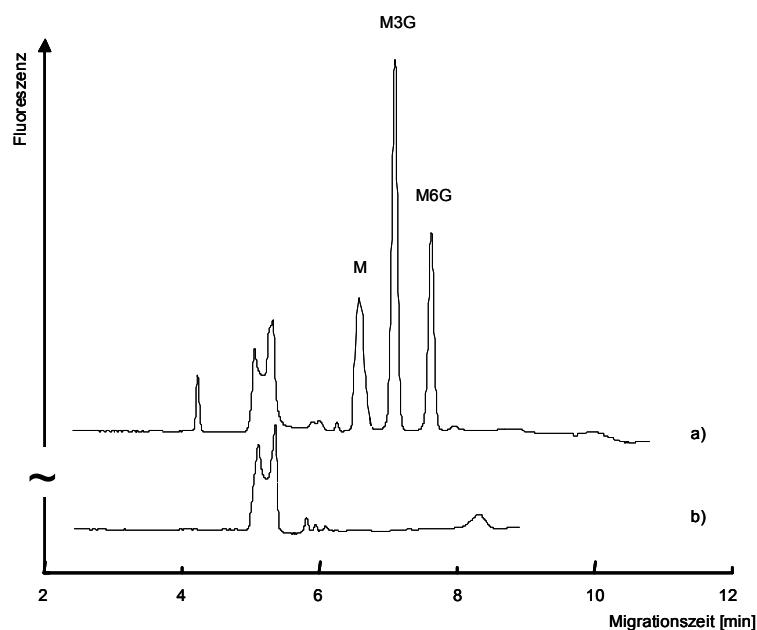


Abb. 52: a) Elektropherogramm des Extraktes eines mit je 10 µg/g M, M3G und M6G gespikten Blutes.
b) Elektropherogramm eines Leerblutextraktes.
LIF-Detektion bei $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$, Detektionsbereich: 325 nm – 400 nm.
Kapillarelektrophoretische Bedingungen: siehe Kap. 4.4 des Exp. Teils.

4.5.4 NACHWEISGRENZE

Die ermittelten Nachweisgrenzen im Blut [90], aufgearbeitet nach Kap. 4.2.4 (5- fache Aufkonzentrierung), lagen für M und M6G bei 500 ng/ml Blut und für M3G bei 100 ng/ml Blut. Aufgrund der Abschätzung basierend auf der Detektionsgrenze in Standardlösungen (Kap. 4.5.2) waren niedrigere Nachweisgrenzen zu erwarten gewesen (M, M6G: 200 ng/ml Blut, M3G: 40 ng/ml Blut, bei einer angenommenen Wiederfindung von 50 %). Die verringerte Sensitivität war durch eine aufgetretene Untergrundfluoreszenz zu erklären. Im C₈- Extrakt waren Matrixbestandteile enthalten, die eine leichte Fluoreszenz in dem gesamten spektralen Bereich zeigten, welcher für die Detektion der Analyten herangezogen wurde. Die durch diese leichte Fluoreszenz erhöhte auszuwertende Photonenmenge erzeugte im Spektrometer ein leicht erhöhtes Grundrauschen. Ein Signal, das in einem Verhältnis von 3:1 zum Rauschen detektierbar sein soll, muss bei erhöhtem Grundrauschen ebenfalls größer sein.

4.5.5 URINPROBEN

Die wellenlängenaufgelöste Detektionsmethode erlaubt es, selektiv den Bereich der Gesamtfluoreszenz auszuwerten, der spezifisch auf die Analyten zurückzuführen ist. Daher ist die selektive und sensitive Bestimmung auch in komplexen Matrices möglich, wenn die Matrixbestandteile in dem für die Analytik interessanten Bereich nicht oder nur wenig fluoreszieren. Eine sehr komplexe Matrix ist Humanurin. Hier war bereits eine Direktbestimmung eines Arzneistoffs mittels LIF-Detektion im tiefen UV- Bereich gelungen [125].

Die Spezifität der Detektionsmethode für diese Matrix wurde geprüft, indem eine Leerurinprobe und eine mit je 2 µg/ml M, M3G und M6G versetzte Urinprobe ohne vorherige Aufarbeitung mit der CE-LIF- Methode analysiert wurden. In Abb. 53 ist zu sehen, dass die Salze des Urins in dem Spektralbereich, der für die Detektion von M, M3G und M6G ausgewertet wird,

sehr stark fluoreszierten. Die Fluoreszenzen der Analyten waren neben der intensiven, von der Matrix ausgehenden Untergrundfluoreszenz nicht zu erkennen.

Eine Direktbestimmung von Morphinglucuroniden z. B. im Urin von Heroinkonsumenten, wie sie unter forensischen Aspekten interessant wäre, ist mit der CE-LIF- Technik nicht durchführbar, weil die Fluoreszenzeigenschaften der Analyten sich zu wenig von denen der Matrix unterscheiden.

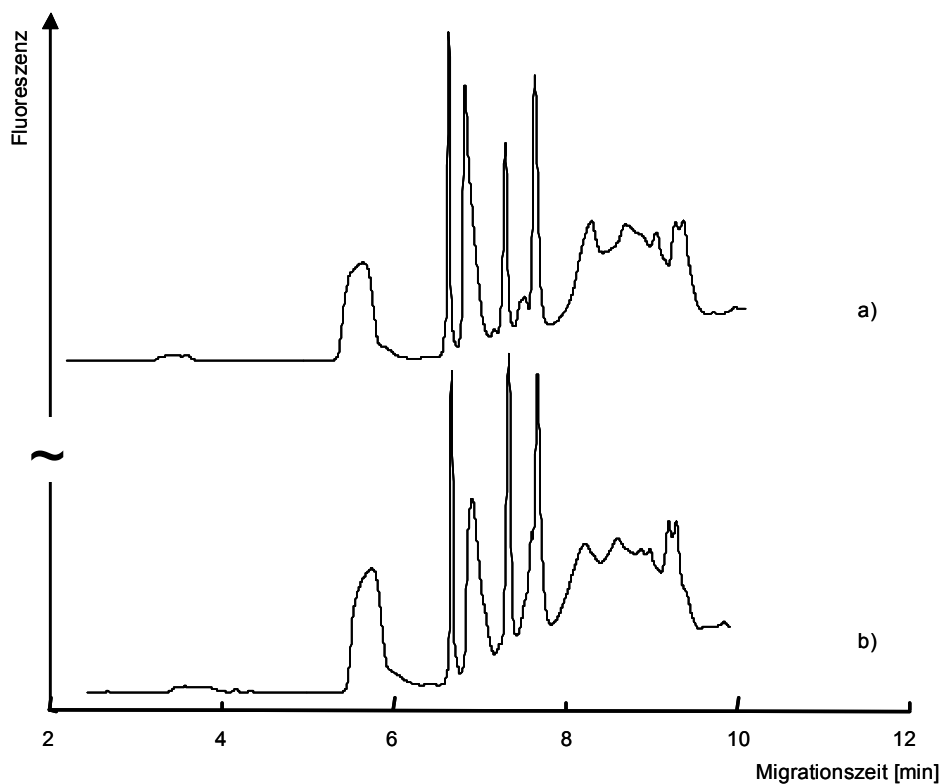


Abb. 53: a) Elektropherogramm eines mit je 2 $\mu\text{g/ml}$ M, M3G und M6G versetzten Urins.
b) Elektropherogramm eines Leerurins.
LIF-Detektion bei $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$, Detektionsbereich: 325 nm – 400 nm.
Kapillarelektrophoretische Bedingungen: siehe Kap. 4.4 des Exp. Teils.

4.6 ANREGUNG ZUR FLUORESZENZ BEI $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$

In Kap. 4.2.1 konnte anhand der Fluoreszenzspektren (Abb. 40) gezeigt werden, dass die Analyten bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ wesentlich stärker zur Fluoreszenz angeregt werden als bei der Bestrahlung mit $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$. Eine CE-LIF- Methode unter Verwendung dieser effektiveren Anregungswellenlänge sollte nun etabliert werden mit dem Ziel, die Sensitivität der Detektion zu steigern.

Der bisher für die LIF- Anregung bei $\lambda = 257 \text{ nm}$ verwendete frequenzverdoppelte Ar-Ionen- Laser wurde nun zur Erzeugung von Licht der Wellenlänge $\lambda = 244 \text{ nm}$ mit einer maximalen Leistung von 50 mW genutzt.

Für die Detektion der Analyten in der CE-Analytik hatte die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ im Vergleich mit der UV- Detektion bisher eine Sensitivitätssteigerung der Detektion in Standardlösungen für Morphin um den Faktor 2, für M3G um den Faktor 50 und für M6G um den Faktor 10 erbracht. Auch war die spezifische Detektion im Blutextrakt möglich. Bei der Anregung zur Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ wurde eine weitere Sensitivitätssteigerung sowie eine Nachweisgrenze im unteren Nanogrammbereich im Blutextrakt erwartet.

4.6.1 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG

Für die Fluoreszenzdetektion mit Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ wurde erneut der Emissionswellenlängenbereich optimiert, bei dessen Auswertung M6G, der in geringen Konzentrationen entstehende Phase-II-Metabolit des Morphins, optimal detektiert wurde. Bei der Anregung durch die Wellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ stellte sich die Aufsummierung der Fluoreszenzintensitäten im Wellenlängenbereich 325 nm – 350 nm als optimal heraus. Die kapillarelektrophoretischen Trennbedingungen entsprachen denen, die schon bei den CE-LIF-Messungen mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ gewählt worden waren. Während die Migrationszeiten von M3G

und M6G genau derjenigen entsprachen, welche bei den Messungen mit $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ ermittelt wurden, zeigte Morphin jedoch bei den ersten Trennungen, die mit einer neu verwendeten Kapillare durchgeführt wurden, eine variable Migrationszeit. Ausgehend von der Migrationszeit, die für M schon aus den vorangegangenen Messungen bei der Anregung mit $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ nm}$ bekannt war, verlängerte sich diese nun kontinuierlich während der folgenden 3-4 Messungen. Ab der 5. Messung in einer neuen Kapillare migrierte M mit einer konstanten und reproduzierbaren, jedoch entgegen der Erwartungen geringeren Geschwindigkeit hinter M3G und M6G.

Als interner Standard wurde Apomorphin aufgrund seiner günstigen Fluoreszenzeigenschaften eingesetzt.

Bei Apomorphin handelt es sich um ein Opioid, das aus Morphin bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ unter dem Einfluss von konzentrierter Salzsäure unter Umlagerung und Wasserabspaltung entsteht [135]. Da sowohl während der Extraktion und auch der CE-LIF- Bestimmung ständig unter alkalischen Bedingungen und bei gemäßigten Temperaturen gearbeitet wurde, konnte eine solche Reaktion ausgeschlossen werden. Apomorphin wirkt in höherer Dosierung als Emetikum. Seit kürzerer Zeit wird Apomorphin in niedrigerer Dosis zur Behandlung der erektilen Dysfunktion angewendet [134].

Apomorphin wurde aufgrund der ungünstigen Extraktionseigenschaften an C_8 (s. Kap. 4.2.3) erst dem Blutextrakt zugesetzt und somit lediglich als interner Standard für die CE-LIF- Methode genutzt. Die Substanz migrierte bei den gegebenen kapillarelektrophoretischen Bedingungen zwischen M3G und M6G.

In Abb. 54 ist ein Elektropherogramm der Trennung von M, M3G, M6G und dem internen Standard Apomorphin dargestellt.

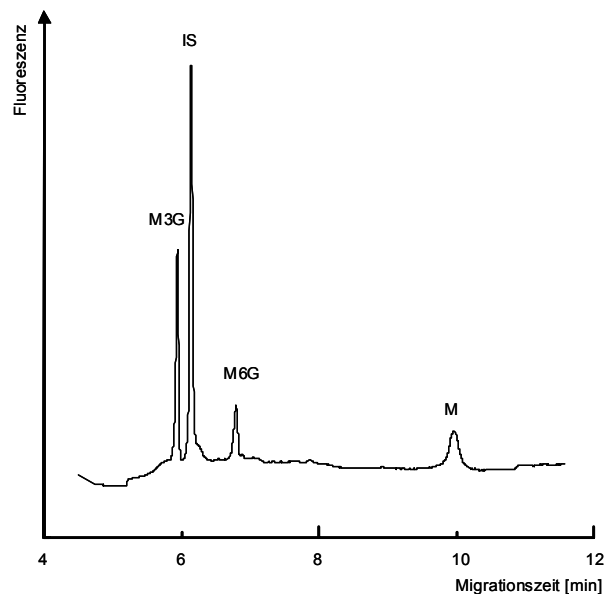


Abb. 54: Elektropherogramm einer wässrig-methanolischen Standardlösung mit je 10 µg/ml M, M3G, M6G und 2,5µg/ml des internen Standards Apomorphin. Anregungswellenlänge: $\lambda_{\text{Ex}}=244$ nm, Detektionsbereich: 325 nm – 350 nm. Elektropherographische Bedingungen: s. Kap. 4.4 des Exp. Teils.

Die CE-LIF- Methode mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}}=244$ nm sollte nun validiert und für die Analyse forensischer Blutproben von tödlich verlaufenen Heroinintoxikationen eingesetzt werden.

4.6.2 VALIDIERUNG

Die Validierung der Methode umfasste die Sicherstellung der Spezifität und der Linearität. Für 3 Kalibrationsstufen wurden Präzision und Richtigkeit ermittelt sowie die Wiederfindungsraten bestimmt. Außerdem wurden für die drei Analyten M, M3G und M6G Bestimmungs- und Nachweisgrenze ermittelt. Die Kriterien der Validierung wurden den Richtlinien für die bioanalytische Validierung entnommen [90].

4.6.2.1 SPEZIFITÄT

Zur Überprüfung der Spezifität wurden mit M, M3G und M6G versetztes Blut und Leerblut gleichermaßen nach Kap. 4.2.4 aufgearbeitet. Dem Extrakt des mit den Analyten versetzten Blutes wurde der interne Standard Apomorphin zugesetzt. Bei der CE-LIF-Analyse waren im Bereich der Analyten und des IS keine störenden Matrixsignale zu erkennen, so dass die Spezifität für die Methode gegeben war. Abb. 55 zeigt vergleichend die Elektropherogramme der beiden Blutextrakte.

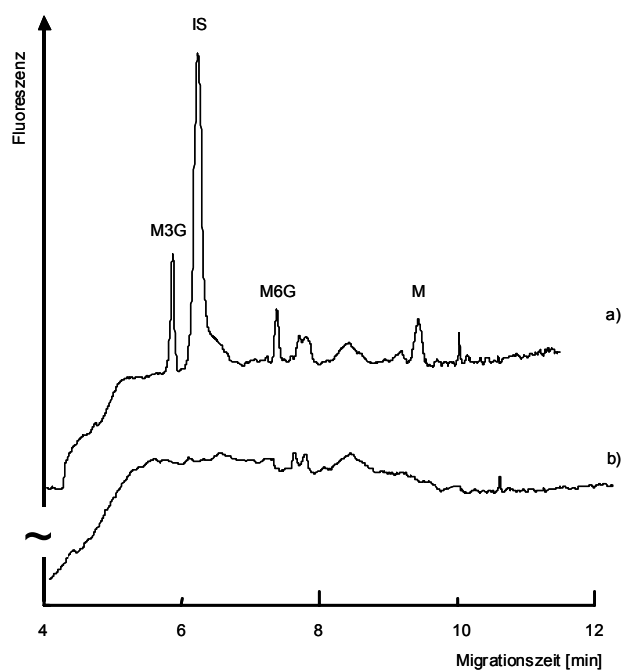


Abb. 55: a) Elektropherogramm des Extraktes eines mit je 100 ng/ml M, M3G und M6G versetzten Blutes, Endkonzentration Apomorphin: 125 ng/ml.
b) Elektropherogramm des Leerblutextraktes.
Elektropherographische Bedingungen: s. Kap. 4.4 des Exp. Teils.

4.6.2.2 WIEDERFINDUNG

Die Wiederfindung wurde bestimmt, indem je 3 mit den Analyten versetzte Blutproben in 3 Konzentrationen (je 25, 100 und 250 ng/ml Blut) sowie ein Leerblut parallel nach Kap. 4.2.4 aufgearbeitet und analysiert wurden. Als Vergleich wurden Standardlösungen ohne Extraktion analysiert. Die gewählten Konzentrationen deckten einen Bereich ab, der zur Analyse von Blutproben bei tödlich verlaufenden Heroinintoxikationen sinnvoll ist. Aus beiden Versuchsreihen wurden die Peakflächenverhältnisse Analyt / IS dargestellt und Regressionsgeraden erstellt (Abb. 56 – Abb. 58).

Die Korrelationskoeffizienten betragen sowohl für die Standardlösungen als auch für die extrahierten Blutproben $> 0,999$. Die Wiederfindungsraten wurden aus dem Verhältnis der Steigungen von Standardreihe und Extraktionsreihe ermittelt. Sie betragen für M 59 %, für M3G 65 % und für M6G 61 %. Die Wiederfindungsraten konnten aufgrund der Korrelationskoeffizienten gemäß den Richtlinien für die bioanalytische Validierung [90] über den gesamten Konzentrationsbereich von 25 ng/ml Blut bis 250 ng/ml Blut gewährleistet werden.

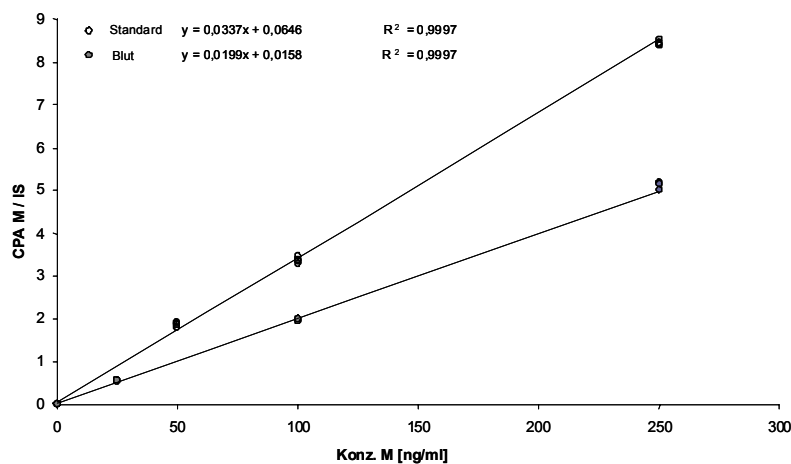


Abb. 56: Wiederfindung von Morphin aus Vollblut.

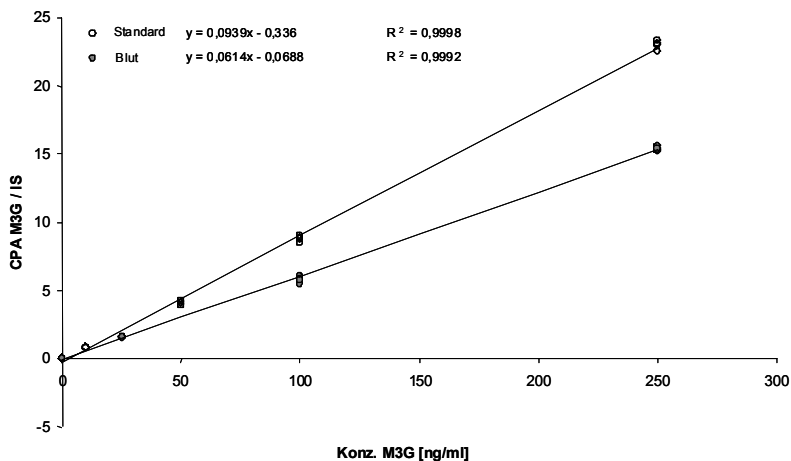


Abb. 57: Wiederfindung von M3G aus Vollblut.

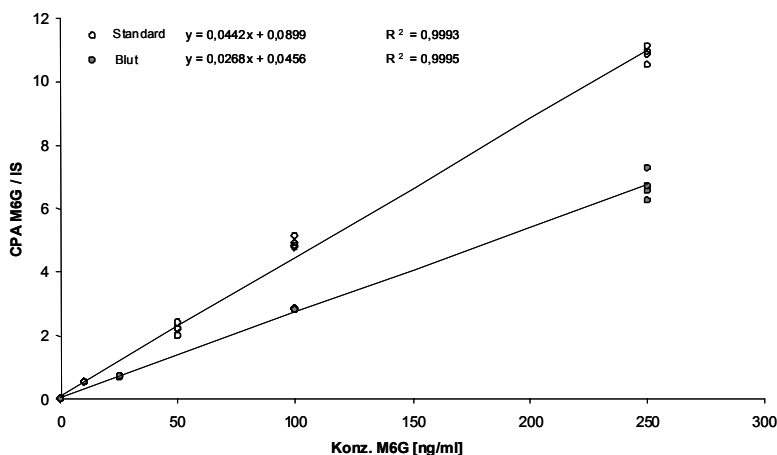


Abb. 58: Wiederfindung von M6G aus Vollblut.

4.6.2.3 LINEARITÄT

Zur Überprüfung der Linearität wurden M, M3G und M6G in 4 Konzentrationen dem Leerblut zugesetzt und nach Kap. 4.2.4 als Doppelbestimmung aufgearbeitet. In dem bereits zur Bestimmung der Wiederfindung gewählten Konzentrationsbereich zwischen 25 ng/ml und 250 ng/ml wurde durch die Aufarbeitung von Doppelproben auf mehreren Konzentrationsstufen die lineare Abhängigkeit der Peakflächenverhältnisse

Analyt / IS (korrigiertes Peakflächenverhältnis, CPA Analyt / IS) zur im Blut vorhandenen Konzentration überprüft. Die erstellten Kalibrationsgeraden wurden bei den später durchgeführten Analysen forensischer Realblutproben eingesetzt. In Abb. 59 sind die Kalibrationsgeradengleichungen und Korrelationskoeffizienten für die drei Analyten dargestellt. Auch bei der Doppelbestimmung mehrerer Konzentrationsstufen waren die Korrelationskoeffizienten $> 0,999$. Die Kalibrationsgeraden waren für die Bestimmung von M, M3G und M6G in Blut einsetzbar [90].

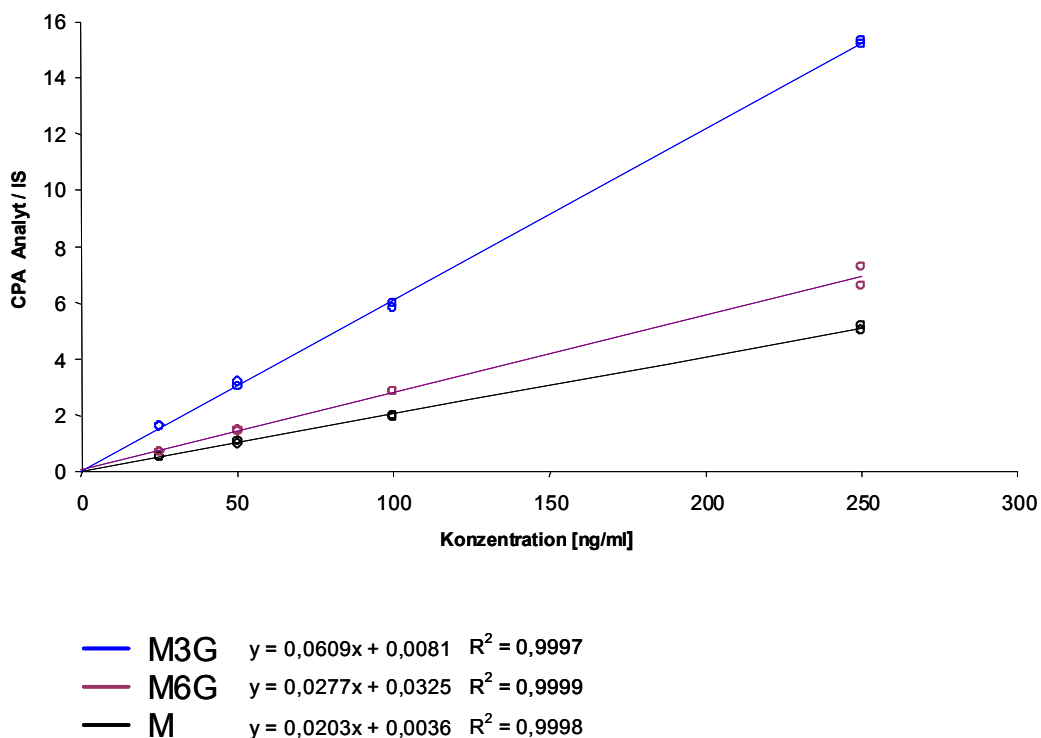


Abb. 59: Kalibrationsgeraden für M, M3G und M6G aus Blut.

4.6.2.4 PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

Die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit erfolgte bei allen drei Analyten in dem für die forensische Analytik sinnvollen Bereich für die Kalibrationsstufen 50 ng/ml Blut, 250 ng/ml Blut und 500 ng/ml Blut. An drei aufeinander folgenden Tagen wurden je drei mit den entsprechenden Konzentrationen gespikete Blutproben aufgearbeitet und analysiert.

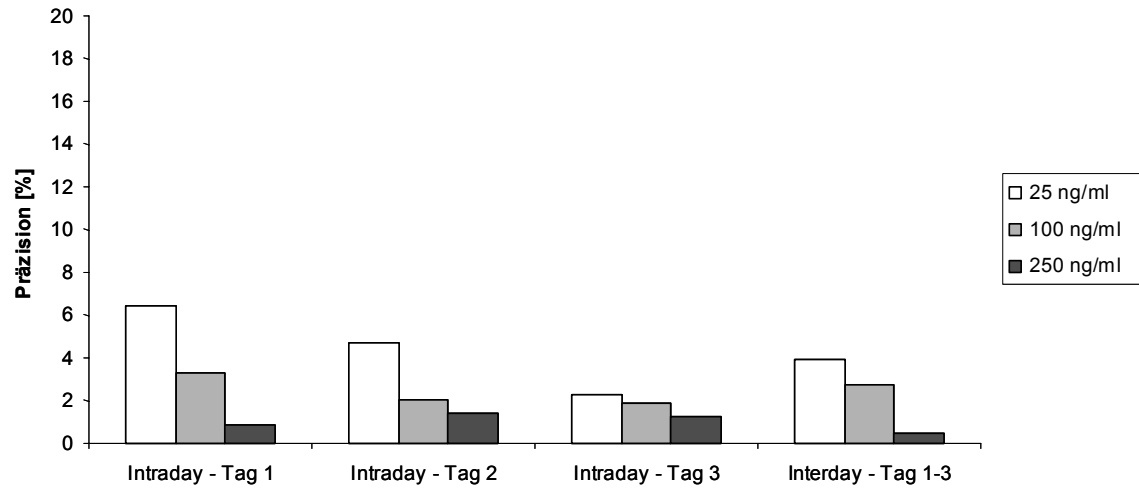
Die Werte für die relative Standardabweichung lagen bei Morphin zwischen 0,5 % und 6,5 %, bei M3G zwischen 1,0 % und 5,0 % und bei M6G zwischen 1,0 % und 6,0 %.

Die Werte für die Richtigkeit betragen bei Morphin zwischen 91,8 % und 103,5 %, bei M3G zwischen 91,1 % und 98,3 % und bei M6G zwischen 90,3 % und 102,0 %.

Die Werte für die Präzision lagen innerhalb der +/- 15 %- Grenze und die Richtigkeit für alle Kalibrationsstufen lag im vorgeschriebenen Bereich zwischen 85 % und 115 %. Die Werte für Präzision und Richtigkeit entsprachen somit den Akzeptanzkriterien für die bioanalytische Validierung [90].

Die ermittelten Intraday- und Interday-Werte für Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von M, M3G und M6G sind in Abb. 60 – Abb. 62 graphisch dargestellt.

a)



b)

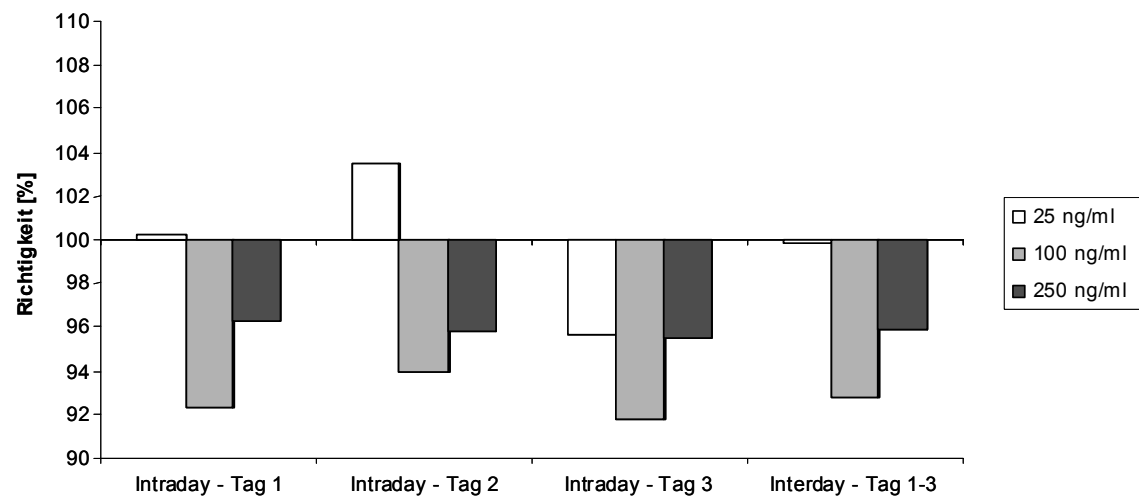
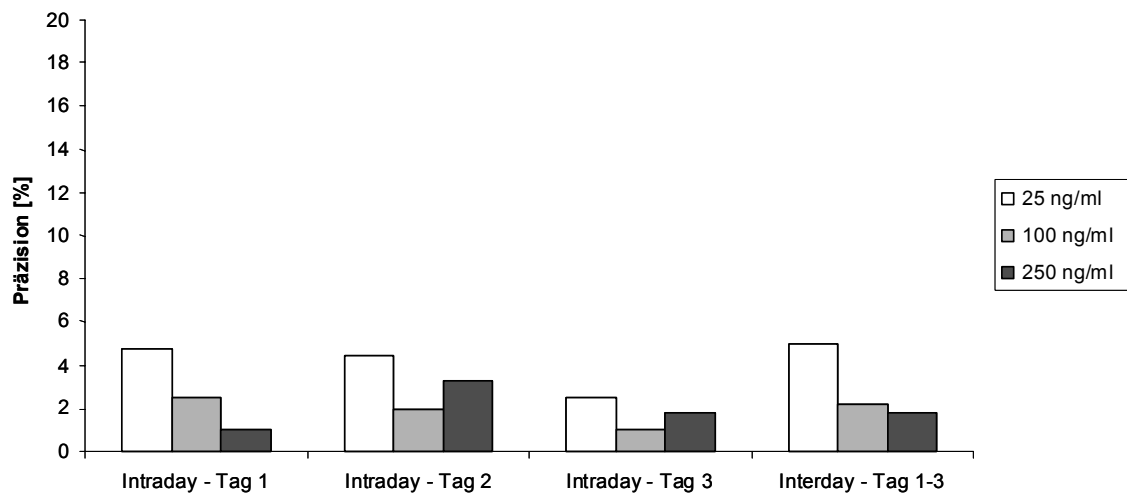


Abb. 60: a) Präzision; b) Richtigkeit für Morphin.

a)



b)

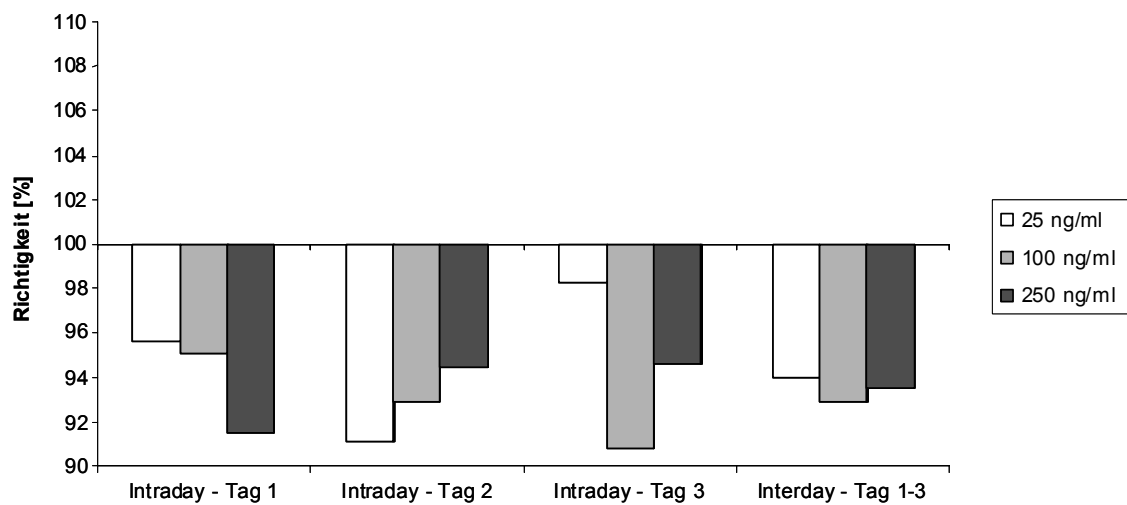
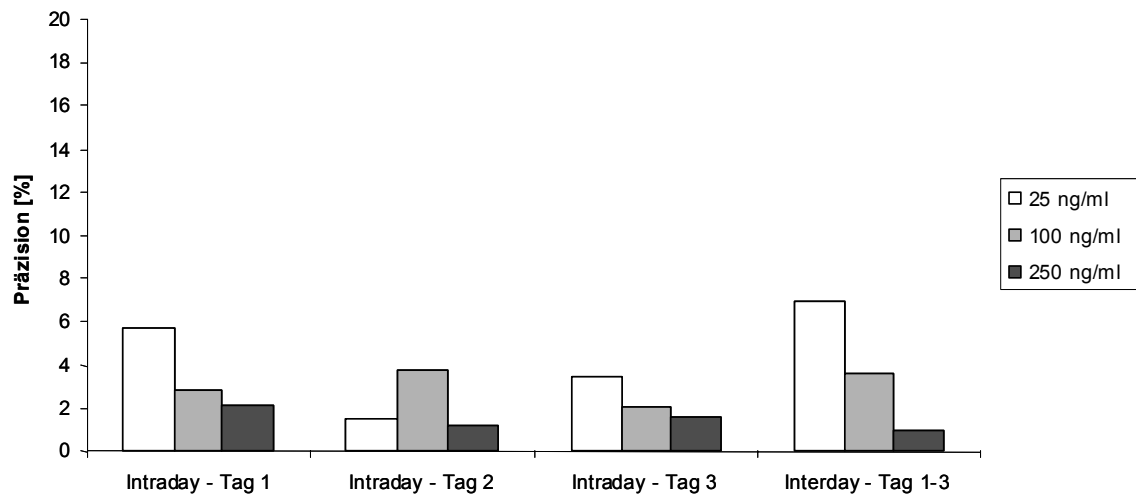


Abb. 61: a) Präzision; b) Richtigkeit für M3G.

a)



b)

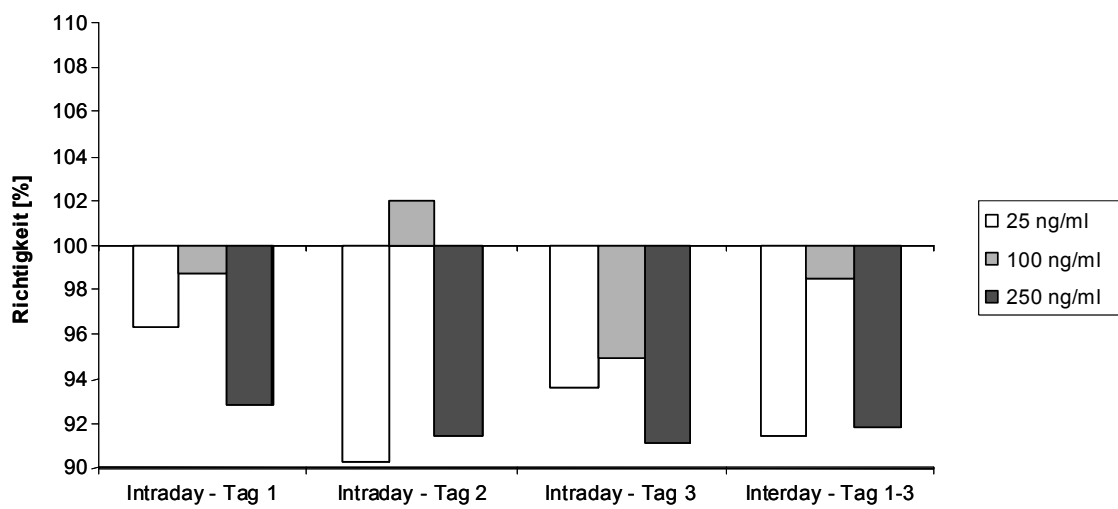


Abb. 62: a) Präzision; b) Richtigkeit für M6G.

4.6.2.5 BESTIMMUNGSGRENZE

Die Grenzen für Präzision und Richtigkeit sind bei allen drei Analyten bei der niedrigsten Konzentration von 25 ng/ml Blut eingehalten worden [90]. Die Bestimmungsgrenze wurde somit bei 25 ng/ml Blut ermittelt.

4.6.2.6 NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze [90] betrug für Morphin und M6G 10 ng/ml Blut und für M3G 5 ng/ml Blut.

4.6.3 APPLIKATION – FORENSISCHE FÄLLE

Die Methode wurde auf Blutproben von vier verstorbenen Heroinkonsumenten angewendet. Die Konzentrationen von M, M3G und M6G wurden über die Kalibriergeraden nach 4.6.2.3 ermittelt und mit den Ergebnissen einer alternativen GC / MS - Methode verglichen [136]. Abb. 63 zeigt das Elektropherogramm einer der vier extrahierten Blutproben mit 106 ng/ml Blut M, 73 ng/ml Blut M3G und 20 ng/ml Blut M6G. Die per CE-LIF ermittelten Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen der alternativen GC/MS-Methode gut überein. Die CE-LIF- Methode kann abschließend als tauglich für die Anwendung auf forensische Proben beurteilt werden.

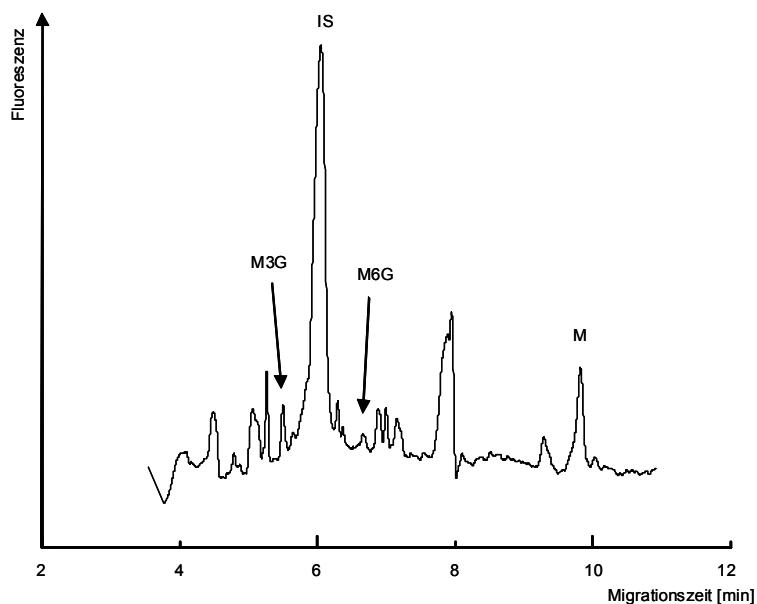


Abb. 63: Elektropherogramm des Vollblutextraktes eines Heroinopfers. Elektropherographische Bedingungen: s. Kap. 4.4 des exp. Teils.

4.7 DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, dass es mit der CE möglich ist, Morphin und Morphinglucuronide im unteren Nanogrammbereich in Blut von verstorbenen Heroinkonsumenten zu bestimmen. Durch den Einsatz der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion konnte eine hohe Sensitivität erreicht werden. Die Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden in Blut war ähnlich empfindlich wie mit der HPLC-Fluoreszenzdetektion möglich. Eine Sensitivität, wie sie mit einer massenspektrometrischen Detektion erreicht wird, ist mit der hier etablierten CE-LIF- Methode aber nicht erreicht worden.

Ein Problem bei der Morphin- und Morphinglucuronid-Bestimmung in Blut stellten die auftretenden Störpeaks dar, welche auf mitextrahierte Matrixbestandteile zurückzuführen waren. Sie fluoreszierten bei der Anregung im tiefen UV in einem ähnlichen Wellenlängenbereich wie die Analyten. Die

spektral aufgelöste Detektion der Fluoreszenz ist bei der Komigration mehrerer Substanzen jedoch nur dann von Vorteil, wenn die Fluoreszenzen von Analyten und Störsubstanzen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen liegen. Wenn sich die Fluoreszenzbereiche von Störsubstanzen und Analyten überschneiden, ist nur der geringe Bereich der Gesamtfluoreszenz der Analyten für die spezifische Detektion auswertbar, der eindeutig dem Analyten zugeordnet werden kann. In diesem Fall kann das Potenzial der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion mit spektraler Wellenlängenauflösung nicht optimal genutzt werden. Bei der Bestimmung von M, M3G und M6G aus weniger Matrix-belasteten Extrakten wäre eine Steigerung der Empfindlichkeit möglich.

Die Empfindlichkeit der CE-LIF- Methode war jedoch auch bei der Detektion in reinen Standardlösungen nicht der von HPLC-Fluoreszenz und GC-MS überlegen. Die Führung des Laserstrahls erfolgte im rechten Winkel zur Kapillarführung. Wegen des geringen Durchmessers der Kapillare stand für die Anregung der Analyten zur Fluoreszenz auch bei optimaler Fokussierung des Laserstrahls auf die Kapillare nur ein kurzer Lichtweg zur Verfügung. Eine Führung des Laserstrahls innerhalb der Kapillare über eine längere Strecke und somit die Verlängerung des Lichtwegs war nicht in die Praxis umsetzbar. Aufgrund des genannten Versuchsaufbaus war hier die Leistungsgrenze der CE erreicht. Geringe Variationen im Meßsystem wie die Verwendung einer Bubble Cell-Kapillare könnten bereits zu einer deutlichen Anhebung der Empfindlichkeit führen, wurden jedoch aufgrund der o. g. Matrixbelastung nicht weiter verfolgt. Bei einer Verlängerung des Lichtweges wären nicht nur die Analyten, sondern auch die Matrixbestandteile stärker zur Fluoreszenz angeregt worden. Die CE-LIF-Methode bietet für den Nachweis von M und Morphinglucuroniden im C₈-Blutextrakt keinen entscheidenden Vorteil gegenüber der HPLC-Fluoreszenzmethode oder der GC / MS – Methode.

5 ANTIKÖRPERGESTÜTZTE FESTPHASENEXTRAKTION VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN

5.1 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Da eine direkte CE-LIF-Bestimmung des Morphins und seiner Glucuronide keine Vorteile gegenüber den etablierten Bestimmungsverfahren LC-MS-Kopplung sowie HPLC-Fluoreszenzdetektion wegen Matrixproblemen erbracht hatten, sollte eine Aufreinigung und Anreicherung der Analyten durch antikörpergestützte Festphasenextraktion erreicht werden. Die Affinitätschromatographie mit immobilisierten Antikörpern, auch als Immuno-Affinitätschromatographie bezeichnet, wird als Extraktionsverfahren zur Probenreinigung und Aufkonzentrierung sowohl online als auch separat eingesetzt [137-139]. Mit dieser Technik wurden zum Beispiel Östradiol [140], Clenbuterol [141], Amanitin [142], Tetrahydrocannabinol [143, 144], Benzodiazepine sowie deren Metaboliten [145, 146] und LSD [147,148] extrahiert.

Bei dieser speziellen Art der Adsorptionschromatographie wird die Zielsubstanz reversibel an einen immobilisierten Liganden gebunden und kann so aus einem komplexen Gemisch isoliert werden. Eine hohe Spezifität wird durch den Einsatz von Antikörpern als Liganden erhalten, deren Antigen der Analyt ist. Die Struktur des Antikörpermoleküls kann ypsilonförmig dargestellt werden (Abb. 64). Es besteht aus zwei durch Disulfid-Brücken verbundenen schweren Ketten, an die je eine durch eine Disulfid-Brücke gebundene leichte Kette (Typus k oder l) gebunden ist. Jede Kette ist in getrennten Domänen aufgefaltet, die Unterregionen von etwa 110 Aminosäuren entsprechen. Die obersten 4 Domänen haben stark variierende Sequenzen und werden als die variable Region oder Fab-Fragmente (Fragment-antigen-binding) bezeichnet. Die variablen Abschnitte von schwerer und leichter Kette bilden die Antigenbindungsstellen. Die weiteren Regionen bilden die konstante Region,

die auch Fc-Teil (Fragment crystallin) genannt wird. Sie haben konstante Domänen, die den Isotyp (schwere Kette) bestimmen und für die biologischen Eigenschaften des Antikörpers (k- oder l-Typus, leichte Kette) verantwortlich sind. Diese konstante Region kann genutzt werden, um das Antikörpermolekül zu immobilisieren, ohne die Bindungseigenschaften für das Antigen zu blockieren [149].

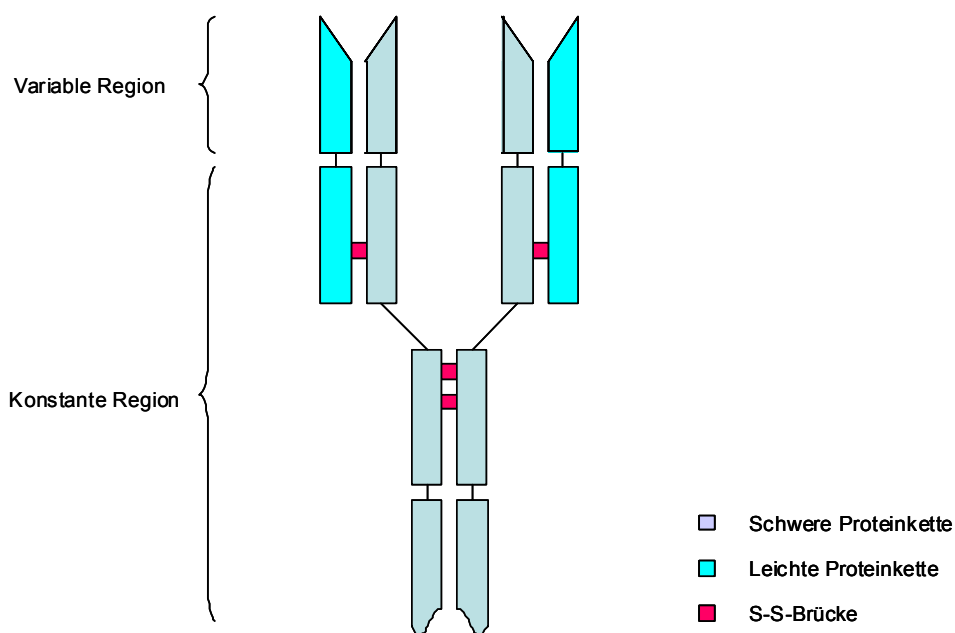


Abb. 64: Struktur eines Antikörpers.

Die Immobilisierung der Antikörper kann über kovalente Bindung, Affinität oder den Einschluss in Poren (Sol-Gel) erfolgen. Die Matrix, die den Antikörper trägt, sollte chemisch und biologisch weitgehend inert sein, doch müssen die Antikörper ohne den Verlust ihrer spezifischen Bindungseigenschaften immobilisiert werden können.

Geeignete Matrices für die kovalente Bindung sind zum Beispiel Polysaccharide (Agarose, Sepharose, Cellulose, Dextran), Polyacrylamid oder Trisacryl. Um Antikörper an diese Phasen zu binden, müssen diese zunächst aktiviert

werden, beispielsweise in Form einer Cyanbromid-, Oxiran-, Triazin- oder Carbonyldiimidazol-Aktivierung [142, 150, 151].

Die Bindung von Antikörpern kann auch durch eine Affinitätsbindung des unspezifischen Endes des Antikörpermoleküls an Protein A bzw. G erfolgen. Die zunächst relativ instabile Affinitätsbindung an das Protein wird in einem zweiten Schritt durch einen Crosslinker verstärkt. [147, 152]. Die Proteine können sich auf einer Polysaccharid-Oberfläche, auf Magnetic Beads oder auf biologischen Matrices wie Protein-exprimierenden Zellen befinden.

Die Immobilisierung der Antikörper kann ebenfalls durch den Einschluss in Poren erfolgen. Diesem Prinzip folgt die so genannte Sol-Gel-Methode. Die Antikörper werden in die Poren der dreidimensionalen Sol-Gel-Matrix direkt bei deren Herstellung eingearbeitet. Die Antikörper werden nicht durch eine Bindung festgehalten, sondern sind in den Poren der Matrix frei beweglich. Sie sind jedoch zu groß, um aus diesen Poren herausgespült zu werden [153, 154].

Nach der Immobilisierung der Antikörper kann der so hergestellte Immunoabsorber zur Extraktion des Analyten aus komplexer Matrix wie z. B. Blut eingesetzt werden (Abb. 65). Die nicht gebundenen Matrixbestandteile können anschließend von der Phase gewaschen werden, während die gebundenen Analyten auf der Phase verbleiben. In einem darauf folgenden Elutionsschritt wird der Analyt vom Antikörper gelöst und eine reine Phase erhalten, die den Analyten enthält. Diese Desorption kann auf verschiedene Arten herbeigeführt werden. Überwiegend wird die Lösung der Antigen-Antikörperbindung durch Änderung der Quaternärstruktur des Antikörpers, zum Beispiel durch die Änderung des pH-Wertes, Änderung der Ionenstärke, Änderung der Temperatur oder in Form einer elektrophoretischen Desorption [155] herbeigeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Desorption ein pH-Shift bzw. eine Änderung der Ionenstärke durchgeführt.

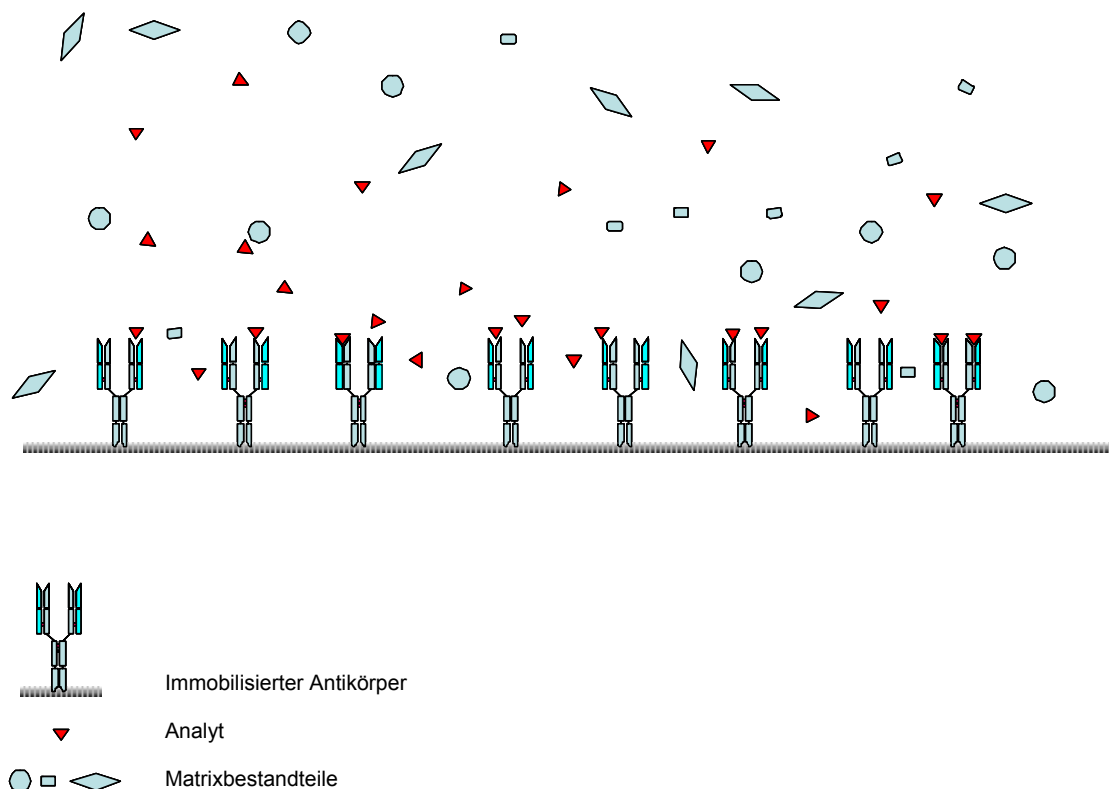


Abb. 65: Prinzip der antikörpergestützten Festphasenextraktion.

Für die Extraktion von M, M3G und M6G aus Blut standen drei verschiedene Rohseren mit spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) gegen je einen der Analyten zur Verfügung. Die Kreuzreaktivitäten wurden gegenüber verschiedenen, mit dem jeweiligen Analyten strukturverwandten Substanzen überprüft und waren allgemein vernachlässigbar niedrig [156].

Für die Immobilisierung der Antikörperfraktionen dieser Seren kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz. Die hergestellten Immunoabsorber wurden zur Extraktion von M, M3G und M6G aus Blut verwendet. Die quantitative Auswertung erfolgte per HPLC mit Fluoreszenzdetektion.

5.2 REINIGUNG DER ROHANTIKÖRPERSEREN

Ziel der Reinigung der Rohseren war es, eine möglichst reine und hoch konzentrierte spezifische Antikörperfraktion zu isolieren. Dadurch sollte die Herstellung eines möglichst effektiven Immunoadsorbers erreicht werden.

Die Aufarbeitung der Rohseren erfolgte in mehreren Schritten:

- Einstellung des pH-Werts
- Entfernung von Molekülen $> 0,45 \mu\text{m}$
- Isolieren der Gesamt-Antikörper-Fraktion
- Entfernung von Anti-BSA-Antikörpern
- Dialyse gegen PBS

Je Rohserum wurden 10 ml zur Aufarbeitung eingesetzt.

Die Effektivität der einzelnen Aufarbeitungsschritte wurde durch Proteinbestimmungen dokumentiert.

5.2.1 REINIGUNGSSCHRITTE

Es erfolgte zunächst Pufferung des Rohserums durch eine Verdünnung mit PBS auf pH 7,4. Dieser pH-Wert ist für die im Rohserum enthaltenen Antikörper, bei denen es sich um Proteine mit einer Molmasse von ca. 150.000 Dalton handelt, am unbedenklichsten. Es erfolgte eine einstündige langsame Rotation im Überkopfschüttler.

Im Serum sind neben 92 % Wasser ca. 7 % Eiweiße und ca. 1 % Fette, Kohlenhydrate, Salze, Hormone, Vitamine und Fermente enthalten. Serumbestandteile wie z. B. Lipidkonglomerate und Lipoproteine, die größer als $0,45 \mu\text{m}$ waren, wurden aus dem gepufferten Rohantikörperserum durch Zentrifugation und anschließende Filtration des Überstandes über ein $0,45 \mu\text{m}$ – Filter entfernt.

Die Antikörper-Fraktion wurde durch Affinitätschromatographie isoliert. IgG-Antikörper, zu denen die hier verwendeten spezifischen Antikörper gegen M, M3G und M6G gehören, sind in der Lage, an Protein A oder G zu binden. Die zentrifugierten und filtrierten Rohseren wurden bei pH 7,4 auf eine Protein-G-Säule gegeben. Die im Serum enthaltenen Antikörper wurden auf der Säule gehalten, indem ihre unspezifischen Enden mittels ihrer Affinität an die auf der Säule immobilisierten Protein-G-Moleküle gebunden wurden. Während des Durchlaufs und durch Waschen mit PBS pH 7,4 wurden die übrigen Bestandteile des Rohserums von der Säule entfernt. Die Elution der Antikörper von der Säule erfolgte über einen pH-Shift nach pH 2,7. Die Antikörperfraktion wurde in einer auf pH 9 gepufferten Vorlage aufgefangen.

Die Immunogene, die zur Gewinnung der Antikörperseren eingesetzt wurden, enthielten BSA als Trägerprotein [156]. Bei der Immunisierung erfolgte die Bildung der Antikörper gegen alle Teile des Immunogens und nicht nur gegen die gewünschte Teilstruktur. Dadurch lagen im Rohserum neben den Antikörpern gegen Morphin bzw. M3G oder M6G auch Antikörper gegen das Trägerprotein BSA vor. Diese wurden durch Präzipitation mit BSA entfernt. Die zur Präzipitation der Anti-BSA-Antikörper benötigte Menge an BSA wurde durch Immundiffusion an Agarosegel ermittelt. Bei einer Menge von je 250 µl Rohserum reichten 10 µl einer 0,25 %igen BSA-Lösung aus, um alle Antikörper gegen BSA zu binden [156]. Diesem Verhältnis entsprechend wurden den Antikörperfraktionen Aliquots der BSA-Lösung langsam und unter Rühren zugefügt. Nach 12 Stunden Inkubation bei 4 °C hatte sich das Präzipitat als Niederschlag abgesetzt und konnte abzentrifugiert werden.

Nach der Passage durch die Protein-G-Säule enthielt die Antikörperfraktion Phosphate, Chloride und Glycin in höherer Konzentration. Durch eine Dialyse gegen PBS wurde die Antikörperlösung in eine definierte Salzlösung überführt. Aufgrund seiner keimhemmenden Wirkung wurde Natriumazid zugesetzt.

5.2.2 PROTEINBESTIMMUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPERFRAKTIONEN

Nach der Durchführung der Aufarbeitungsschritte wurden die Proteingehalte der Antikörperfraktionen bestimmt. Sie wurden über die photometrische Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure ermittelt und als IgG-Gehalte dargestellt.

Tab. 2 zeigt die IgG-Konzentrationen für die einzelnen Antikörperfraktionen.

Tab. 2: Charakterisierung der Antikörperseren nach Aufarbeitung.

	M	M3G	M6G
Gesamt-IgG	112,5 mg	144,0 mg	150,0 mg
Gesamt-V	22,5 ml	36,0 ml	50,0 ml
Konz. IgG	5 mg/ml	4 mg/ml	3 mg/ml

5.3 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER DURCH KOVALENTE BINDUNG AN CYANBROMID-AKTIVIERTE SEPHAROSE

Bei der Aktivierung von Sepharose mit Cyanbromid (CNBr) entstehen als Produkte cyclische und acyclische Imidocarbonate, Carbamate, Carbonate sowie Cyanatester. Die Cyanatester reagieren bei pH 8-9 mit Aminogruppen zu einem positiv geladenen Isoharnstoffderivat (Abb.65). Mittels dieser Reaktion kann die kovalente Bindung von Antikörpern über die primären Amine der Antikörperproteine erfolgen. Diese Bindung kann spontan an jeder primären Aminogruppe des Antikörpers erfolgen und ist somit nicht auf die konstante Region beschränkt.

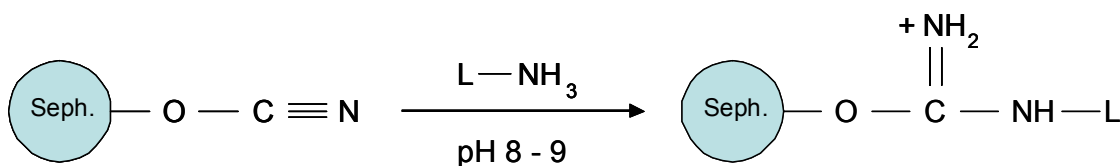


Abb. 66: Kovalente Bindung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose.

5.3.1 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER

Die Kopplungskapazität des verwendeten CNBr-aktivierten Sepharosegels wurde mit 5-10 mg IgG/ml Gel angegeben [157]. Entsprechend dieser Kapazität wurden die Aliquots der Antikörperseren so eingesetzt, dass die Kapazität des Gels ausreichend war. Zur Kupplung der Antikörper wurde ein Aliquot des jeweiligen Antikörperserums auf pH 8,3 gepuffert, während ein Aliquot CNBr-aktivierte Sepharose-Lyophilisat in 1 mmol/l HCl aufgequollen und gewaschen wurde. Anschließend wurden die beiden Komponenten vereinigt und unter langsamem Rotieren eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Aus dem Ablauf und dem Waschwasser nach der Kopplung wurde mittels einer Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure die Menge an nicht gebundenem Protein bestimmt und daraus die Kopplungsrate ermittelt. Da im Ablauf und im Waschwasser kein Protein nachweisbar war, war die Kopplung an die CNBr-aktivierte Sepharose somit vollständig gelungen. Die Ergebnisse für die Proteinbeladung und die Kopplungsrate der drei hergestellten Gele sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Proteinbeladung und Kopplungsraten bei CNBr-aktiverter Sepharose.

	M	M3G	M6G
Proteinbeladung [mg / ml Gel]	2,5	2,5	2,5
Kopplungsrate [%]	100	100	100

5.3.2 EXTRAKTION VON M, M3G UND M6G MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Die unter 5.3.1 hergestellten Immunoadsorber wurden zur Extraktion von M, M3G und M6G eingesetzt. Dazu wurden Säulen zu je 1 ml Gel hergestellt. Die Optimierung der Extraktionsmethode erfolgte durch Variieren des pH-Werts in der Anbindungsphase und Erprobung verschiedener Elutionsmittel. Anschließend wurde die Wiederverwendbarkeit der optimierten Methode ermittelt. Hierbei wurde mit Lösungen der Analyten in PBS gearbeitet. Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion.

5.3.2.1 BESTIMMUNG DER KAPAZITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN

Zur Bestimmung der Säulenkapazitäten bei den pH-Werten 7, 8 und 9 wurden die je zwei 1 ml-Säulen eines jeden Gels in acht 50 ng – Schritten beladen (maximale Beladung: 400 ng Analyt/ml Gel). Dazu wurden die Säulen pro Beladungsschritt 20 Minuten mit 1 ml einer 50 ng/ml-Lösung des jeweiligen Analyten im Überkopfschüttler inkubiert. Die ablaufenden Lösungen nach Inkubation und die Waschlösungen wurden per HPLC-Fluoreszenzdetektion auf das Vorhandensein des jeweiligen Analyten überprüft. Sobald in der ablaufenden Lösung Spuren des Analyten nachweisbar waren, war die Kapazität der Säule erreicht und die Beladung wurde nicht weiter fortgesetzt. Anschließend wurden die Säulen eluiert und die Wiederfindungsraten aus dem Gehalt an M bzw. M3G und M6G in der Elutionslösung bestimmt.

Bei pH 7 erfolgte an das mit Anti-M beladene Gel nur eine geringe Anbindung von 100 ng Analyt. Die Wiederfindung betrug hier 57 %. An das mit Anti-M3G beladene Gel konnten insgesamt 250 ng des Analyten gebunden werden. Die Wiederfindung betrug hier nur 31 %. Das mit Anti-M6G-Gel konnte mit 200 ng des Analyten beladen werden bei einer Wiederfindung von 88 %.

Die Anbindung bei pH 8 war wesentlich effektiver. An das Anti-M-Gel konnten 200 ng Analyt mit einer Wiederfindungsrate von 93 % gebunden werden. Das Anti-M3G-Gel und das Anti-M6G-Gel konnten mit je 400 ng des jeweiligen Analyten beladen werden, wobei die Wiederfindung bei M3G bei 85 % lag und bei M6G 107 % betrug.

Die Ergebnisse bei pH 9 waren nicht befriedigend. Alle Säulen konnten nur mit ca. 100 ng beladen werden, wobei die Wiederfindung bei M ca. 40 %, bei M3G ca. 55 % und bei M6G nur 23 % betrug.

Die Anbindung bei pH 8 ist für eine effektive Extraktion am besten geeignet.

Als geeignetes Elutionsmittel stellte sich ein Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 95 + 5 heraus. Die Säulen wurden 5x mit je 1 ml der Elutionslösung für 20 Minuten im Überkopfschüttler behandelt, die ablaufenden Volumina wurden vereinigt, im N₂-Strom eingengt für die HPLC in PBS aufgenommen.

5.5.3.3 BESTIMMUNG DER WIEDERVERWENDBARKEIT DER IMMUNOADSORBER BEI PH 8

Der ideale pH-Wert für die Extraktion von M, M3G und M6G durch an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisierte Antikörper liegt bei pH 8. Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit wurde eine mittlere Konzentration (100 ng Analyt) angebunden und nach einem Waschschrift eluiert. Die Eluate wurden im N₂-Strom eingedampft und in PBS aufgenommen. Die Analytik erfolgte per HPLC-Fluoreszenzdetektion durch den Vergleich mit Standardlösungen der Analyten in PBS. Diese Extraktion wurde 30 x wiederholt. Die Wiederfindungsraten und die Säulenkapazitäten der einzelnen Extraktionen wurden ermittelt, um eine eventuelle Verschlechterung der Extraktionseigenschaften der Immunoabsorber bei mehrfacher Wiederverwendung zu dokumentieren. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Kapazität wurde aus der Konzentration des Analyten in Durchlauf und Waschwasser bestimmt. Die Wiederfindungsrate wurde aus der Analytenkonzentration im Eluat bestimmt. In Abb. 67 – 69 sind die ermittelten Kapazitäten und Wiederfindungsraten der drei Gele über 30 Extraktionen dargestellt.

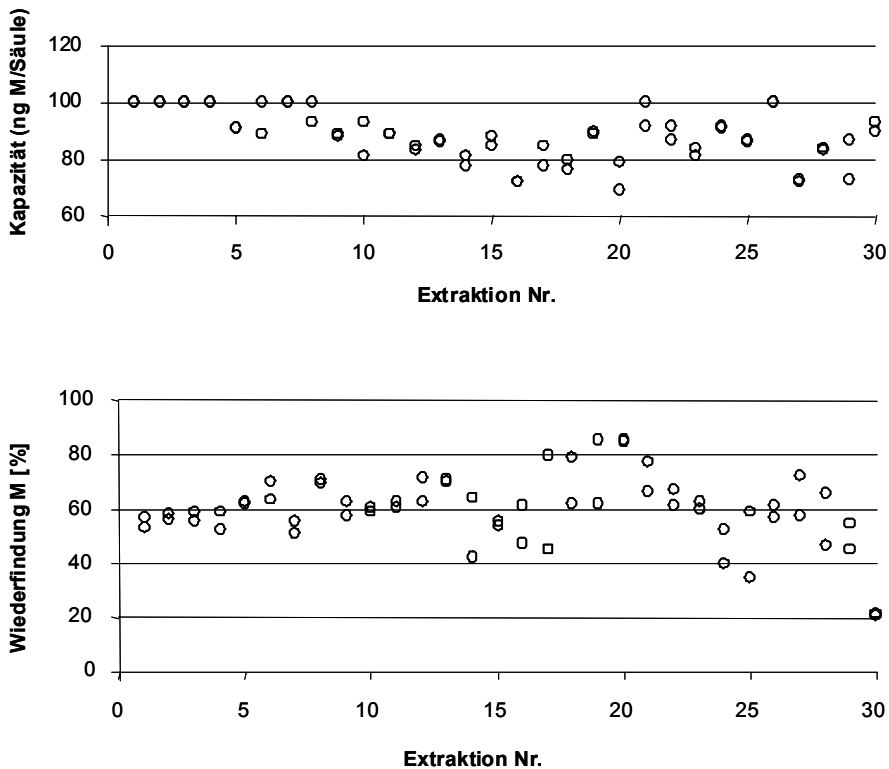


Abb. 67: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung von mit Anti-M beladenen CNBr-Säulen, 30 Wiederholungen.

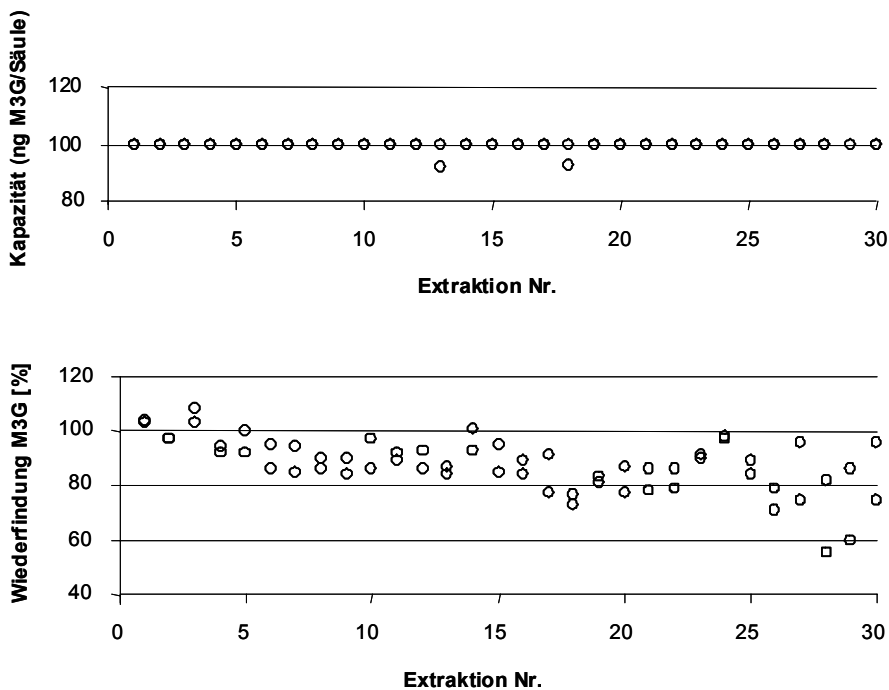


Abb. 68: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung von mit Anti-M3G beladenen CNBr-Säulen, 30 Wiederholungen.

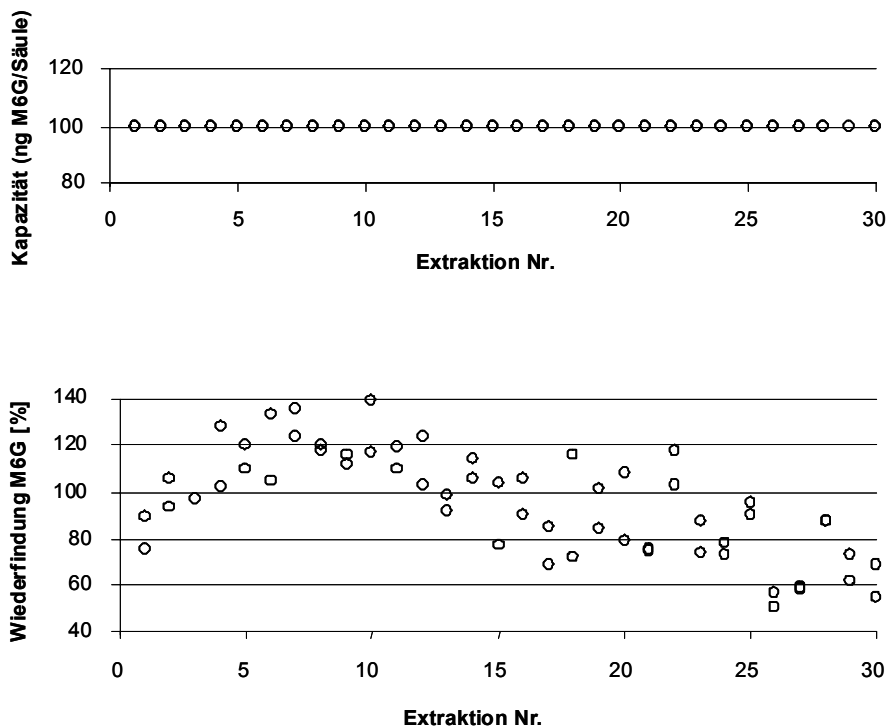


Abb. 69: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung von mit Anti-M6G beladenen CNBr-Säulen, 30 Wiederholungen.

Die Kapazitäten der M-Immunoabsorber lagen bis zur 10. Extraktion relativ konstant bei 90 – 100 ng/ml. Die M3G- und M6G- Immunoabsorber konnten über den gesamten Wiederholungsbereich konstant mit 100 ng/ml beladen werden.

Die Wiederfindungsraten der M-Immunoabsorber lagen bis zur 10. Extraktion bei 60 %. Bei weiteren Wiederholungen nahmen Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate ab. Der M-Immunoabsorber konnte also maximal 10 x eingesetzt werden. Die Wiederfindungsraten der M3G-Immunoabsorber lagen bis zur 15. Extraktion im Bereich von 90 %. Bei weiterer Benutzung schwankten Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate stark. Daher konnte dieser Immunoabsorber maximal 15 x zur Extraktion eingesetzt werden. Die Wiederfindungsraten des M6G-beladenen Gels schwankten über den gesamten Wiederholungsbereich stark. Eine nicht reproduzierbare Ablösung des Analyten

vom Antikörper bewirkte Wiederfindungsraten zwischen 60 % und 140 %. Dieser Immunoadsorber war für quantitative Aussagen wenig geeignet.

Die zum Teil schwankenden Wiederfindungsraten waren durch ungleichmäßiges Elutionsverhalten bedingt. Hier machte sich die zufällige Ausrichtung der Antikörper am Gel nachteilig bemerkbar. Nur ein Teil der immobilisierten Antikörpermenge konnte zur Extraktion genutzt werden, da aufgrund der teilweise ungünstigen lokalen Immobilisierung und der resultierenden sterischen Hinderung ein anderer Teil der Antikörper nicht mehr zur Bindung der Analyten in der Lage war.

5.4 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER DURCH AUSRICHTUNG AN PROTEIN A UND CROSSLINKING

Protein A und Protein G sind Zelloberflächenproteine, die spezifisch an die Fc-Region von IgG binden. Da diese Bindung am nicht spezifischen Ende des Antikörpermoleküls stattfindet, handelt es sich also um eine Nicht-Immunreaktion. Diese Zelloberflächenproteine können nicht nur auf Protein-exprimierenden Zellen (sog. Pansorbinzellen, Protein A), sondern auch auf der Oberfläche von organischem (Agarose-Beads) oder anorganischem Material (Magnetic Beads) platziert werden. Je nach Trägermaterial kann die Matrix als Säulenfüllmaterial oder im Batch-Verfahren genutzt werden.

Werden z.B. Agarose-Beads mit auf der Oberfläche immobilisiertem Protein A eingesetzt, so können die Antikörper hier gerichtet immobilisiert werden (Abb. 70, 1.). Nach der Ausrichtung wird in einem zweiten Schritt die Immobilisierung durch einen Crosslinker mittels einer kovalenten Bindung verstärkt (Abb.70, 2.). Für die Verstärkung der intermolekularen Bindung des Antikörpers an das Protein bedient man sich eines homobifunktionalen unverzweigten Moleküls mit einer Spacerlänge von ca. 11 Å, das an beiden Enden schnell mit Aminogruppen reagierende funktionelle Gruppen aufweist. Geeignete Crosslinker sind zum Beispiel Dimethylpimelimidat (DMP) oder Disuccinimidylsuberat (DSS). Man erhält eine stabile, wenig „blutende“ Immunoaffinitätsmatrix. Bei der Herstellung eines solchen Immunoadsorbers mit gerichteten Antikörpern muss ein Antikörper-Überschuss geboten werden, um eine ausreichende Beladung des Gels zu erreichen.

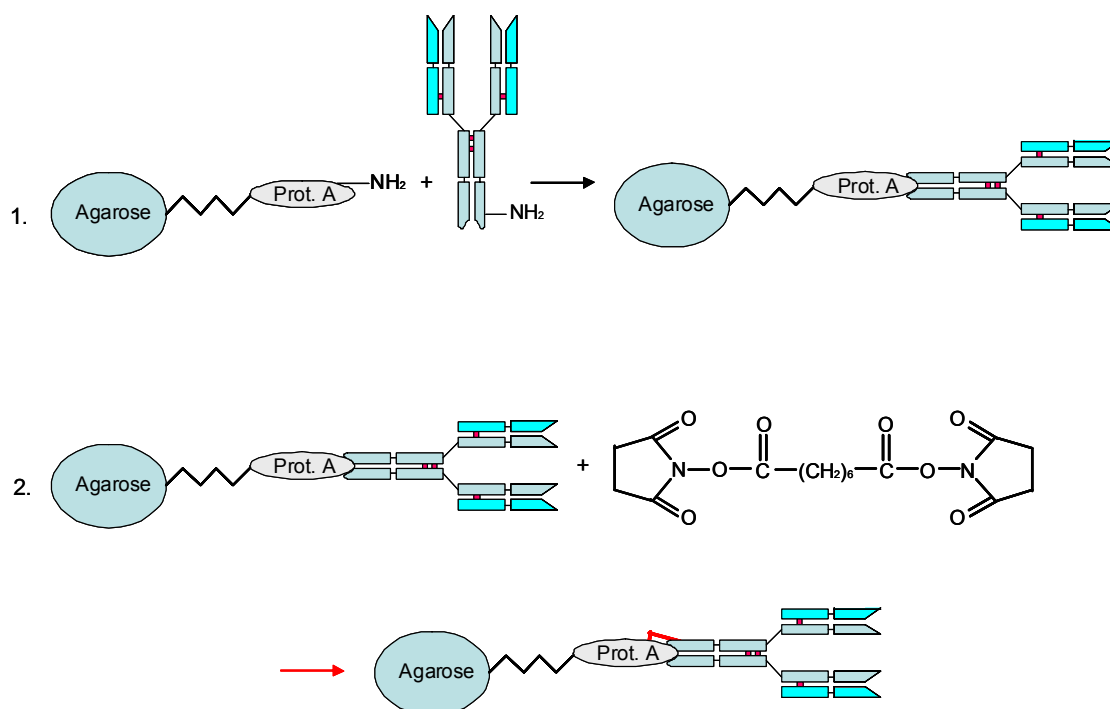


Abb. 70: Immobilisierung von Antikörpern durch Ausrichtung an Protein A (1.) und Crosslinking mittels DSS (2.).

5.4.1 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER

Es wurde ein mit Protein A belegtes Agarosegel verwendet, dessen Kapazität für IgG mit ca. 6 - 8 mg/g Gel angegeben wurde [158]. Die Antikörperseren wurden in einem 1,5-fachen Überschuss eingesetzt, da bei dieser gerichteten Immobilisierung eine weniger spontane Anbindung zu erwarten war als bei einer ungerichteten kovalenten Bindung wie an CNBr-aktivierter Sepharose.

Drei verschiedene Immunoadsorber wurden hergestellt. Zur Vorbereitung auf die Ligandenkupplung wurde das Protein A-Agarosegel mit einem Phosphatpuffer pH 8,2 gewaschen. Die für die Kupplung vorgesehenen Antikörperaliquots wurden mit dem Phosphatpuffer ebenfalls auf pH 8,2 eingestellt. Gewaschenes Gel und gepufferte Antikörperlösung wurden vereinigt

und in einem Reagenzglas mit Stopfen unter langsamem Rotieren um die Längsachse für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Aus dem Ablauf und dem Waschwasser nach der Kopplung wurde mittels einer Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure die Menge an nicht gebundenem Protein bestimmt und daraus die Kopplungsrate ermittelt.

Für den Crosslinking-Schritt wurde das mit Antikörpern beladene Gel mit PBS pH 7 gewaschen und für 1 Stunde bei RT mit einer Lösung von DSS in DMSO inkubiert. Anschließend werden die überschüssigen Amin-Bindungsstellen mit Ethanolamin-haltigem Puffer blockiert.

Die Ergebnisse für die Proteinbeladung und die Kopplungsrate der drei hergestellten Gele sind in Tab. 4 dargestellt. Die Kopplungsrate liegt trotz der höheren eingesetzten Antikörper-Mengen wesentlich niedriger als bei der kovalenten Bindung der Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose.

Tab. 4: Proteinbeladung und Kopplungsraten bei Ausrichtung und Crosslinking der Antikörper an Protein A – Agarose.

	M	M3G	M6G
Proteinbeladung [mg / ml Gel]	4,7	3,4	4,8
Kopplungsrate [%]	63	45	64

5.4.2 EXTRAKTION VON M, M3G UND M6G MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Die unter 5.4.1 hergestellten Immunoadsorber wurden zur Extraktion von M, M3G und M6G eingesetzt. Dazu wurden je zwei Säulen zu je 1 ml Gel pro Immunoadsorber hergestellt. Wie in 5.3 wurde die Extraktionsmethode durch Variieren des pH-Werts in der Anbindungsphase und Erprobung verschiedener Elutionsmittel optimiert. Danach wurde die Wiederverwendbarkeit der optimierten Methode ermittelt. Es wurde mit Lösungen von M, M3G und M6G in PBS gearbeitet. Die quantitative Bestimmung erfolgte per HPLC-Fluoreszenzdetektion.

5.4.2.1 BESTIMMUNG DER KAPAZITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN

Die Säulenkapazitäten wurden bei den pH-Werten 7, 8 und 9 überprüft. Dazu wurden die je zwei 1 ml-Säulen eines jeden Gels in 6 x 50 ng – Schritten beladen (Gesamt-Beladung: 300 ng Analyt/ml Gel). Die Säulen wurden pro Beladungsschritt 20 Minuten mit 1 ml einer 50 ng/ml-Lösung des jeweiligen Analyten im Überkopfschüttler inkubiert. Die Konzentration des jeweiligen Analyten wurde in den ablaufenden Lösungen sowie in den Waschlösungen per HPLC-Fluoreszenzdetektion kontrolliert. Die Kapazität einer Säule war erreicht, wenn in der ablaufenden Lösung Spuren des Analyten nachweisbar waren. Die Beladung der Säule wurde in diesem Fall nicht fortgesetzt. Anschließend wurden die Säulen eluiert und die Wiederfindungsraten aus dem Gehalt an M bzw. M3G und M6G in der Elutionslösung bestimmt.

Bei der Anbindung bei pH 7 konnte das Anti-M-Gel mit 100-150 ng Analyt /ml beladen werden. Die Wiederfindungsrate von 18 % war jedoch sehr gering. Die Kapazität des Anti-M3G-Gels lag bei 250 ng/ml, wobei die Wiederfindung bei 113 % lag. An den M6G-Immunoadsorber konnte bei diesem pH-Wert nachweislich kein Analyt gebunden bzw. eluiert werden.

Bei pH 8 erfolgte an das Anti-M-Gel nur eine Anbindung von ca. 50 ng Analyt/ml. Die Wiederfindung betrug hier ca. 75 %. An das Anti-M3G-Gel konnten insgesamt 250 ng des Analyten gebunden werden. Die Wiederfindung wurde hier mit ca. 76 % ermittelt. Das Anti-M6G-Gel konnte ebenfalls mit 250 ng des Analyten beladen werden bei einer Wiederfindung von 66 %.

Die Ergebnisse der Anbindung bei pH 9 waren nicht befriedigend. Die mit Anti-M beladenen Säulen konnten nur mit ca. 100 ng des Analyten beladen werden, wobei die Wiederfindung nur 18 % betrug. Die Kapazität des M3G-Immunoadsorbers wurde mit 250 ng Analyt / Säule ermittelt, die Wiederfindung wurde mit 121 % bestimmt. Bei pH 9 konnte an das Anti-M6G-Gel nachweislich kein Analyt gebunden bzw. eluiert werden.

Nur bei pH 8 konnten alle drei Analyten an den jeweiligen Immunoadsorber gebunden werden. Die effektivste Elutionsmethode war das mehrmalige Inkubieren mit MeOH+H₂O 95+5. Die Elution mit anderen Kombinationen aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln erwies sich als weniger effektiv. Eine salzhaltige Elutionslösung konnte schlecht aufkonzentriert und nur erschwert per HPLC-Fluoreszenzdetektion analysiert werden. Die Kapazität der hergestellten Immunoadsorber war sehr gering, was auf die ausgerichtete und daher reduzierte Anbindung im Vergleich zu CNBr-aktivierter Sepharose zurückzuführen war.

5.4.2.2 BESTIMMUNG DER WIEDERVERWENDBARKEIT BEI PH 8

Der einzige geeignete pH-Wert für die Extraktion an allen hergestellten Immunoadsorbern lag bei pH 8. Zur Ermittlung der Wiederverwendbarkeit der Säulen bei diesem pH-Wert wurde je 12 x eine mittlere Konzentration (100 ng Analyt) angebunden und nach einem Waschschrift eluiert. Die Eluate wurden im N₂-Strom eingengt und in PBS aufgenommen zur HPLC-Fluoreszenzanalyse eingesetzt. Die Wiederfindungsraten und die Säulenkapazitäten der einzelnen

Extraktionen wurden ermittelt, um die Extraktionseigenschaften der Immunoadsorber bei Mehrfachbenutzung zu dokumentieren.

Die Kapazitätsbestimmungen erfolgten aus den Konzentrationen der jeweiligen Analyten in Durchlauf und Waschwasser. Die Wiederfindungsraten wurden aus den Analytenkonzentrationen im Eluat bestimmt. In Abb. 70 – 72 sind die ermittelten Kapazitäten und Wiederfindungsraten der drei Immunoadsorber bei den 12 Extraktionen dargestellt.

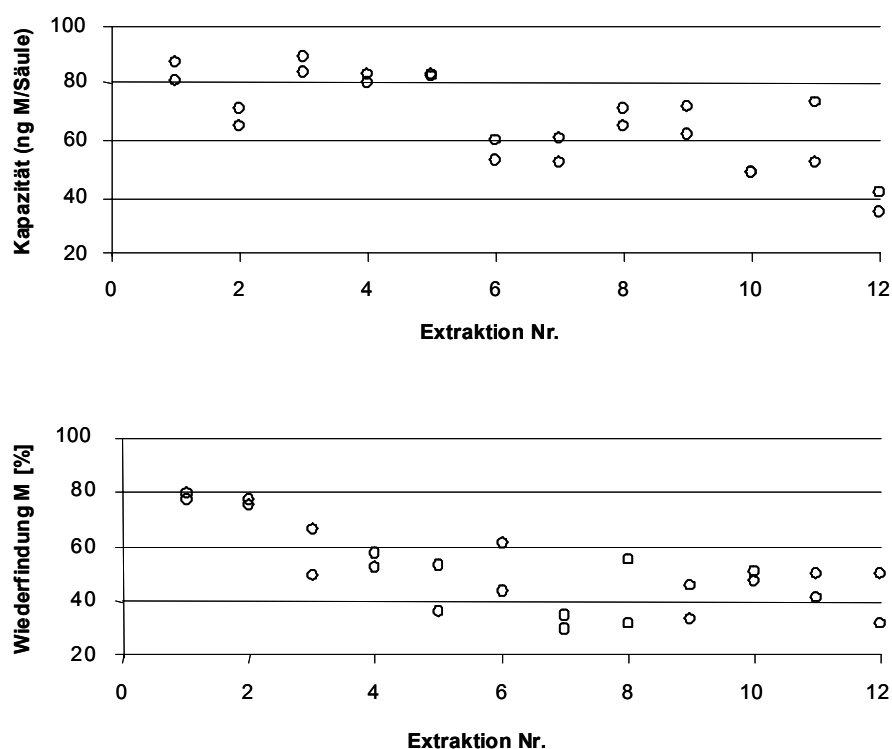


Abb. 70: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung nach Ausrichtung von Anti-M an Protein A- Agarose + Crosslinker, 12 Wiederholungen.

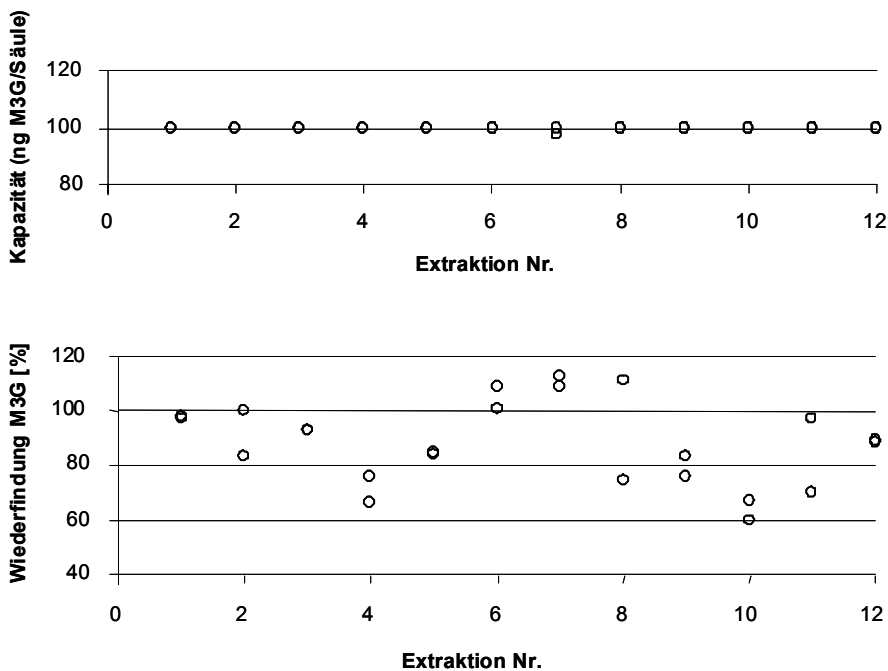


Abb. 71: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung nach Ausrichtung von Anti-M3G an Protein A- Agarose + Crosslinker, 12 Wiederholungen.

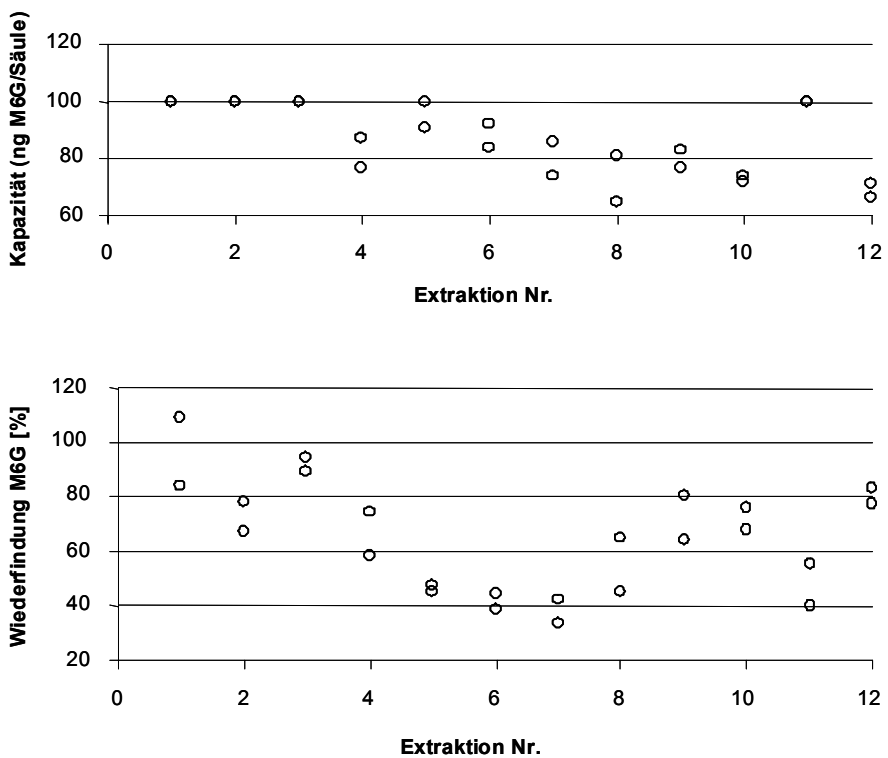


Abb. 72: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung nach Ausrichtung von Anti-M6G an Protein A- Agarose + Crosslinker, 12 Wiederholungen.

Die Kapazität der M-Immunoabsorber schwankte bis zur 5. Extraktion um 70 – 90 ng/ml. Dabei lagen die Einzelwerte der Doppelbestimmungen gut zusammen. Bei den Extraktionen 6-12 konnten die M-Immunoabsorber nur noch mit ca. 60 ng beladen werden, wobei die Einzelwerte teilweise stark differierten. Die Wiederfindungsraten waren nur bei den ersten beiden Extraktionen zufrieden stellend. Die Einzelwerte lagen bei 80 % und differierten nur wenig. Bei den Extraktionen 3 - 12 wurden mit abnehmender Tendenz Wiederfindungsraten zwischen 70 % und 30 % ermittelt. Die Einzelwerte wichen teilweise stark voneinander ab.

Die M3G- Immunoabsorber konnten über den gesamten Wiederholungsbereich konstant mit 100 ng/ml beladen werden. Die Wiederfindungsraten bei Extraktion mit diesem Gel lagen bis zur 3. Extraktion bei 90 %. Bei weiteren Wiederholungen nahm die Reproduzierbarkeit der Extraktion ab. Schwankungen zwischen 60 % und 110 % wurden beobachtet.

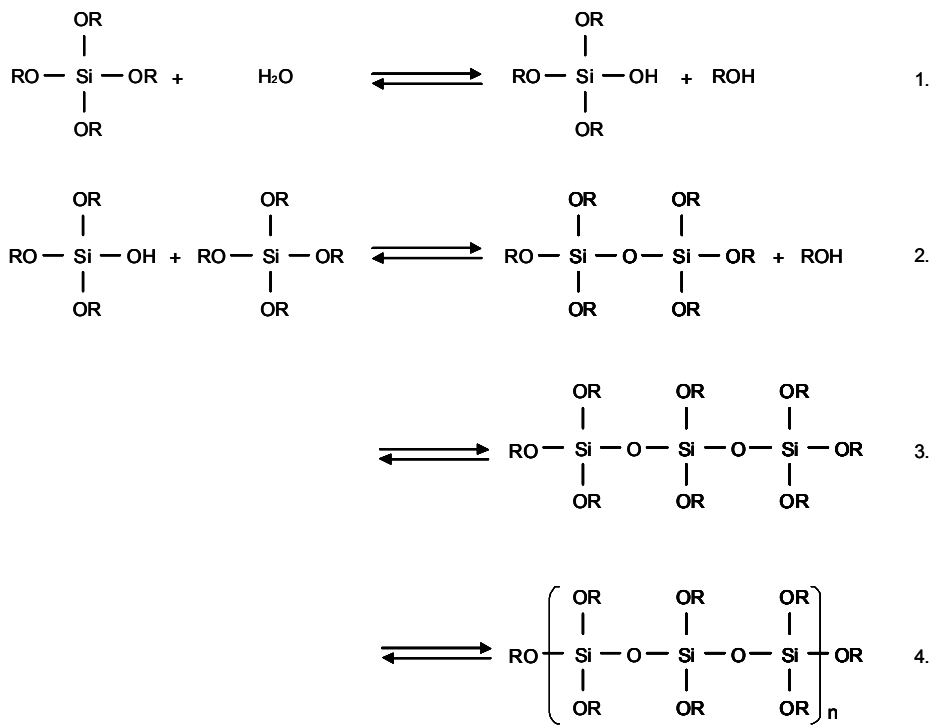
Die M6G-Immunoabsorber konnten bis zur 3. Extraktion mit 100 ng/ml beladen werden. Anschließend schwankte die Kapazität zwischen 80 und 100 ng/ml, wobei die Einzelwerte wenig differierten. Die Wiederfindungsraten der Extraktionen mit den M6G-Immunoabsorbern schwankten über den gesamten Wiederholungsbereich stark. Wiederfindungsraten zwischen 35 % und 110 % wurden ermittelt. Genaue quantitative Aussagen waren bei der Extraktion mit diesem Immunoabsorber nicht möglich.

5.5 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER DURCH DEN EINSCHLUSS IN SOL-GEL

Zur Herstellung der glasartigen Sol-Gele werden Metalloxide verwendet, wobei vor allem Si-Oxide eingesetzt werden. Bei niedriger Temperatur findet nach einer säurekatalysierten Hydrolysereaktion von Alkoxyd-Precursoren eine Kondensation statt, durch die ein amorphes, polymer O-verbrücktes Si-Oxid-Netzwerk ausgebildet wird. Diese Reaktionen führen zunächst zu kolloidalen Partikeln. Eine Suspension aus diesen Partikeln stellt ein Sol dar, das aufgrund weiterer entstehender Querverbindungen zu einem festen Gel erstarrt. Während das Gel altert, finden weitere Quervernetzungen statt. Dabei wird das Gel starrer und die Poren verkleinern sich. Am Ende erhält man ein festes, glasiges Material, das eine gebundene wässrige Phase enthält. Ein gealtertes, getrocknetes Gel wird als Xerogel bezeichnet.

Die Gleichgewichtsreaktionen (Abb. 73) werden durch die Beeinflussung der Reaktionsbedingungen wie pH-Wert und Temperatur gesteuert, so dass gezielt Sol-Gele mit bestimmter Porengröße bzw. Vernetzungsgrad hergestellt werden können.

Werden zu Beginn der Polymerisationsreaktion biologische Komponenten wie z.B. Antikörper dem Reaktionsgemisch zugefügt, werden diese in das sich bildende Polymer eingeschlossen. Bei ausreichender Porengröße der Glasmatrix wird die biologische Aktivität der Antikörper nicht beeinflusst. Idealerweise wird ein Sol-Gel synthetisiert, dessen Poren so bemessen sind, dass die Antikörper nicht von der Säule bluten können und gleichzeitig eine uneingeschränkte Antigen-Antikörper-Reaktion möglich ist (Abb. 74). Denkbar ist auch eine Steigerung der Effizienz der Antikörper durch den Einschluss in Sol-Gel, da eine Reaktion im (immobilisierten) wässrigen Medium stattfinden kann und gleichzeitig intermolekulare Wechselwirkungen mit Matrixbestandteilen reduziert werden [159].



- 1. Hydrolyse
 - 2. Kondensation
 - 3. Endprodukt Oligomer
 - 4. Endprodukt Polymer
- Monomere: $M(\text{OR})_x$, $R'-M(\text{OR})_3$, $R'R''-M(\text{OR})_2$
 Liganden: $R, R', R'' = \text{z.B. } -\text{CH}_3, -\text{CH}_2\text{CH}_3, -\text{Ph}$
 Metallionen: $M = \text{z.B. Si, Al, Ti, Zr}$

Abb. 73: Reaktionsmechanismus des Sol-Gel-Herstellungprozesses.

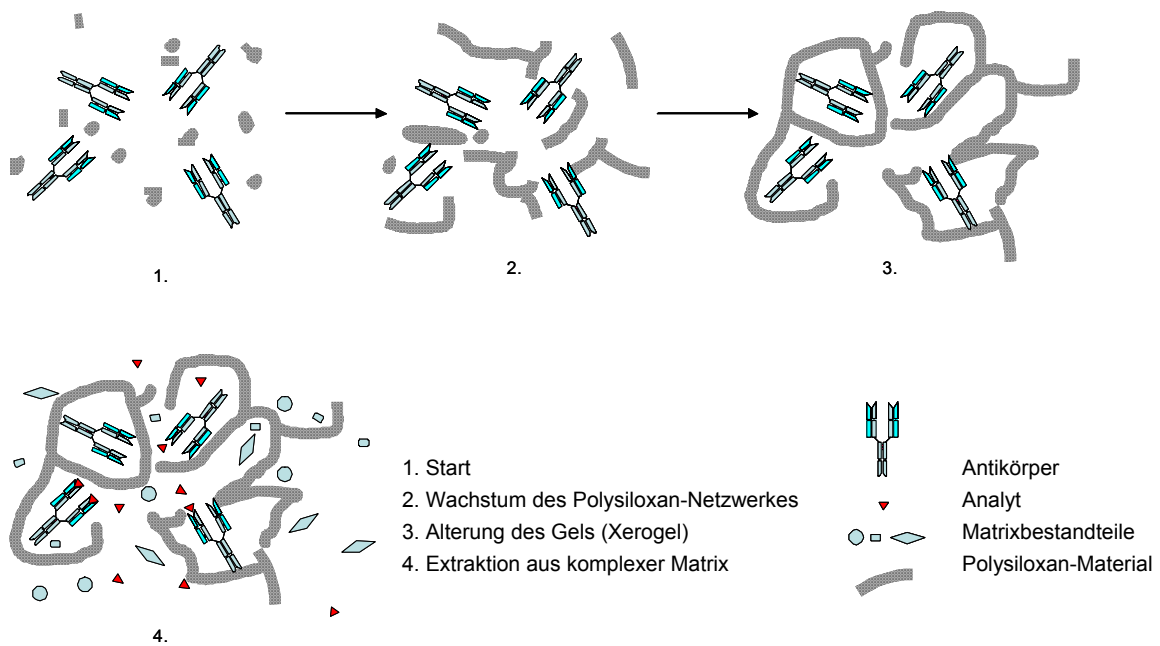


Abb. 74: Schema Herstellung und Extraktion: Antikörper-beladenes Sol-Gel.

5.5.1 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER

Drei verschiedene Sol-Gele wurden mit je einem speziellen Antiserum hergestellt. Für die Herstellung je ml Sol-Gel wurden 4 mg IgG abs. eingesetzt. Zunächst wurde das Silika-Sol vorbereitet. Als Monomer wurde Tetramethoxysilan (TMOS) eingesetzt. Die Porengröße, die das Sol-Gel ausbilden sollte, war von der Menge und von der durchschnittlichen Länge der gebildeten polymeren Ketten abhängig. Durch das Verhältnis von Monomer, Wasser und Säureanteil konnte die Beschaffenheit des herzustellenden Sol-Gels gesteuert werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde herabgesetzt, indem unter Eiskühlung gearbeitet wurde. Für einen Poreneinschluss von IgG optimierte Anteile [160, 161] von TMOS, 0,04 mol/l HCl und H₂O, wurden im Eisbad verrührt. Unter Eiskühlung wurde im Ultraschallbad eine partielle Hydrolyse durchgeführt. Die PBS-gepufferte IgG-Lösung wurde erst nach diesem Vorgang zugegeben. So wurden die Antikörper nicht den sauren, denaturierenden Bedingungen ausgesetzt, sondern unter gemilderten Bedingungen in das polymerisierende Si-Oxid-Material eingeschlossen. Nach Zugabe des Antikörper-PBS-Gemisches zum vorbereiteten Silika-Sol wurde das Gemenge in eine Kristallisierschale zur Gelausbildung und Alterung gegossen. Die Polymerisierung / Alterung des Gels wurde bis zu einem Gewichtsverlust des Gels von 50 % gestattet. Entstehende Reaktionsprodukte (H₂O, MeOH) wurden aus dem Gleichgewicht entfernt und für eine Proteinbestimmung zur Bestimmung der Kopplungseffizienz eingesetzt. Die Polymerisation wurde gestoppt, indem das trockene Xerogel gemörsert und unter PBS pH 7 aufbewahrt wurde. In der ablaufenden Flüssigkeit wurde ebenfalls der Proteingehalt bestimmt.

Weder im überstehenden MeOH – H₂O – Gemisch noch in dem PBS-Puffer, in dem das gemörserte Sol-Gel aufbewahrt wurde, konnte Protein nachgewiesen werden. Demnach lag die Immobilisierungsrate der Antikörper für jedes Gel bei 100 %. In Extraktionsversuchen musste jedoch geklärt werden, ob die biologische Aktivität der immobilisierten Antikörper erhalten geblieben war.

5.5.2 EXTRAKTION VON M, M3G UND M6G MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Die unter 5.5.1 hergestellten Sol-Gele wurden zur Extraktion von M, M3G und M6G in je zwei Säulen zu je 1 ml Gel gefüllt und für die Extraktion der Analyten genutzt. Die am besten geeignete Extraktionsmethode wurde durch Variieren des pH-Werts in der Anbindungsphase und Erprobung verschiedener Elutionsmittel ermittelt. Außerdem wurde die Anwendung im Batch-Verfahren erprobt. Für die optimale Methode wurden die Wiederholbarkeit bezüglich der Säulenkapazität und der Wiederfindungsrate bestimmt. Hier wurde zunächst mit Lösungen von M, M3G und M6G in PBS gearbeitet. Die quantitativen Bestimmungen wurden per HPLC-Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

In einem zweiten, größeren Ansatz wurden Bestimmungen aus gespikten Blutproben durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte per HPLC-Fluoreszenzdetektion und per HPLC-LIF-Detektion. Aus den drei charakterisierten Sol-Gelen wurde eine Mischphase hergestellt. Es erfolgte eine Validierung für die antikörpergestützte Extraktion an Sol-Gel von M, M3G und M6G mit anschließender HPLC-Fluoreszenzdetektion.

Abschließend wurde die Extraktion und Bestimmung von M, M3G und M6G aus Blut von Heroinkonsumenten mit tödlich verlaufenen Intoxikationen durchgeführt.

5.5.2.1 BESTIMMUNG DER KAPAZITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN

Die Säulenkapazitäten wurden bei den pH-Werten 7, 8 und 9 überprüft. Dazu wurden je zwei 1 ml-Säulen jedes Gels in 50 ng – Schritten beladen. Die Gesamt-Beladung bei pH 7 und pH 9 betrug 300 ng Analyt/ml. Bei den Kapazitätsversuchen bei pH 8 betrug die Gesamt-Beladung pro Säule 500 ng Analyt. Die Säulen wurden pro Beladungsschritt 20 Minuten mit 1 ml einer 50 ng/ml-Lösung des jeweiligen Analyten im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die ablaufenden Lösungen und Waschlösungen wurden per HPLC-Fluoreszenzdetektion kontrolliert und für die Berechnung der

Säulenkapazitäten herangezogen. Anschließend wurden die Säulen eluiert, die Eluate im N₂-Strom eingedampft und die in PBS aufgenommenen Extrakte ebenfalls zur HPLC-Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Die Wiederfindungsraten wurden aus dem Gehalt an M bzw. M3G und M6G in der Elutionslösung bestimmt.

Bei pH 7 konnten an den M-Immunoabsorber 300 ng Analyt/ml mit einer Wiederfindungsrate von 67 % gebunden werden. Die Anti-M3G-Säulen konnten nur mit 150 ng des Analyten beladen werden, wobei die Wiederfindung ca. 95 % betrug. Die Kapazität des Anti-M6G-Sol-Gels wurde mit 250 ng Analyt/ml bestimmt. Die Wiederfindung betrug hier allerdings nur 28%.

Bei pH 8 konnten an das Anti-M-Sol-Gel 500 ng Analyt/ml gebunden werden. Die Wiederfindung betrug hier ca. 65 %. An das mit Anti-M3G-Sol-Gel konnten insgesamt 450 ng M3G/ml gebunden werden. Die Wiederfindung betrug hier ca. 67 %. Das Anti-M6G-Sol-Gel konnte mit 400 ng des Analyten pro Säule beladen werden bei einer Wiederfindung von 53 %.

Die Anbindung bei pH 9 erwies sich als weniger effektiv. Das Anti-M-Sol-Gel konnte mit 300 ng Analyt/ml beladen werden. Die Wiederfindungsrate betrug 66 %. Die Kapazität des Anti-M3G-Sol-Gels lag bei 250 ng Analyt/ml, wobei die Wiederfindung bei 73 % lag. An den M6G-Immunoabsorber konnten bei pH 9 250 ng Analyt/ml gebunden werden mit einer Wiederfindungsrate von 44 %.

Auch bei der Extraktion mit in Sol-Gel eingeschlossenen Antikörpern fand die effektivste Anbindung an den Immunoabsorber bei pH 8 statt. Die effektivste Elutionsmethode war auch hier das mehrmalige Inkubieren mit MeOH+H₂O 95+5. Die Elution mittels anderer Kombinationen aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln erwies sich als unvollständig und nicht reproduzierbar.

5.5.2.2 BESTIMMUNG DER WIEDERVERWENDBARKEIT BEI PH 8

Der optimal geeignete pH-Wert für die Extraktion an den drei hergestellten Sol-Gelen lag bei pH 8. Zur Ermittlung der Wiederverwendbarkeit der Säulen bei diesem pH-Wert wurden je 18 x 100 ng Analyt (Standardlösung in PBS pH 8) angebunden und nach Waschschrinen (PBS pH 8, H₂O und Aceton/H₂O) mit MeOH+H₂O 95+5 eluiert. Die Wiederfindungsraten und die Säulenkapazitäten der einzelnen Extraktionen wurden per HPLC-Fluoreszenzdetektion ermittelt. Außerdem wurde die Extraktionsmethode auf mit den Analyten versetzte Blutproben übertragen. Die Wiederfindungsraten wurden bei 6 aufeinander folgenden Extraktionen bestimmt. Hierbei wurde je 1 ml Vollblut ($C_{\text{Analyt}} = 100 \text{ ng/ml}$) mit 1 ml PBS gepuffert und zur Extraktion eingesetzt.

In Abb. 75 – 80 sind die ermittelten Kapazitäten und Wiederfindungsraten der drei Immunoadsorber bei den 18 Extraktionen sowie die ermittelten Wiederfindungsraten bei den je 6 Extraktion aus gespiktem Vollblut dargestellt.

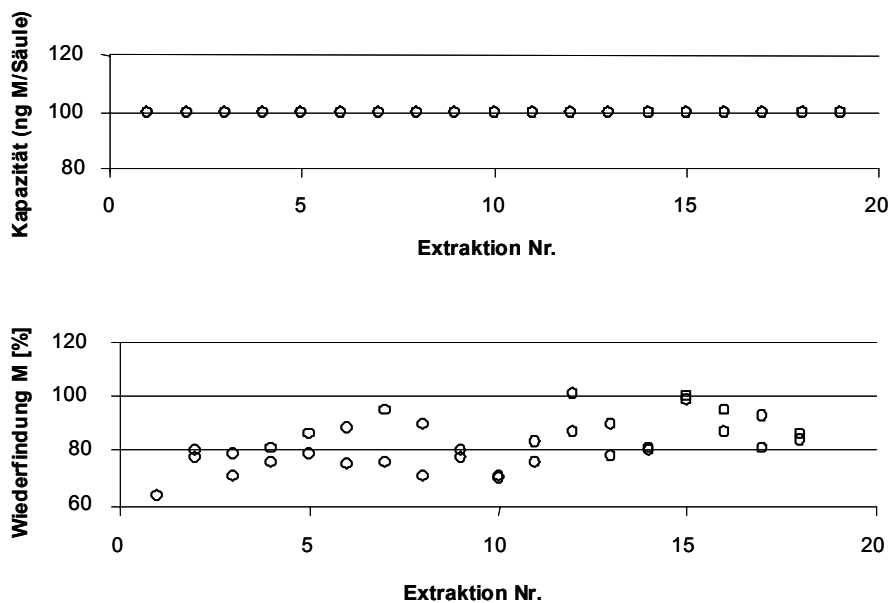


Abb. 75: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung nach Einschluss von Anti-M in Sol-Gel, 18 Wiederholungen.

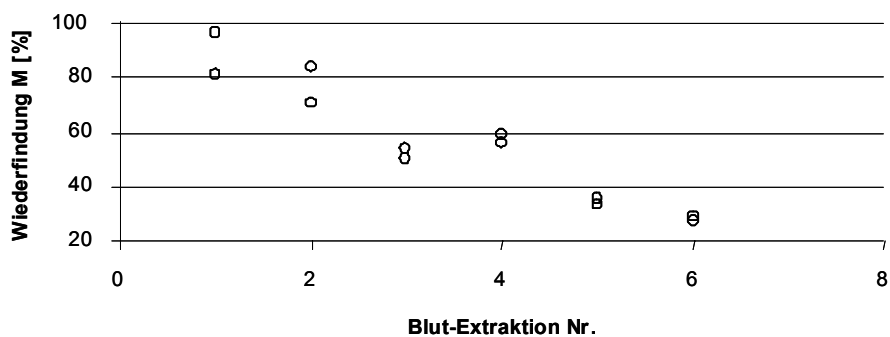


Abb. 76: Bestimmung der Wiederfindung aus Blut nach Einschluss von Anti-M in Sol-Gel, 6 Wiederholungen.

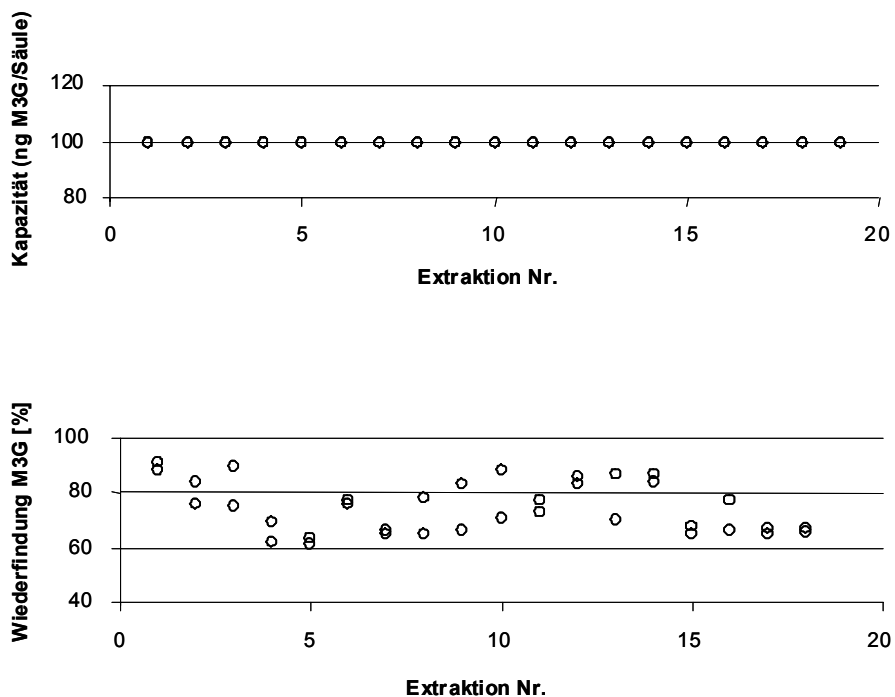


Abb. 77: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung nach Einschluss von Anti-M3G in Sol-Gel, 18 Wiederholungen.

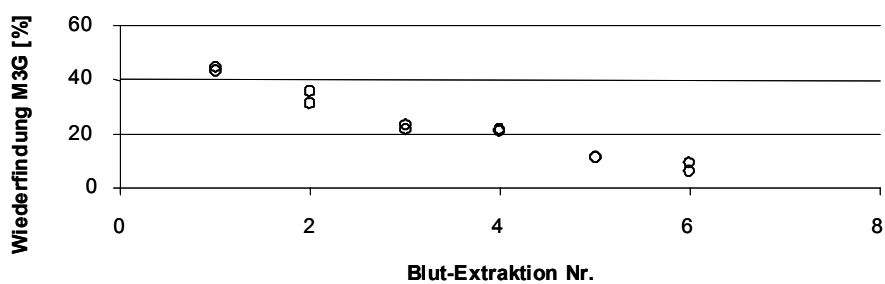


Abb. 78: Bestimmung der Wiederfindung aus Blut nach Einschluss von Anti-M3G in Sol-Gel, 6 Wiederholungen.

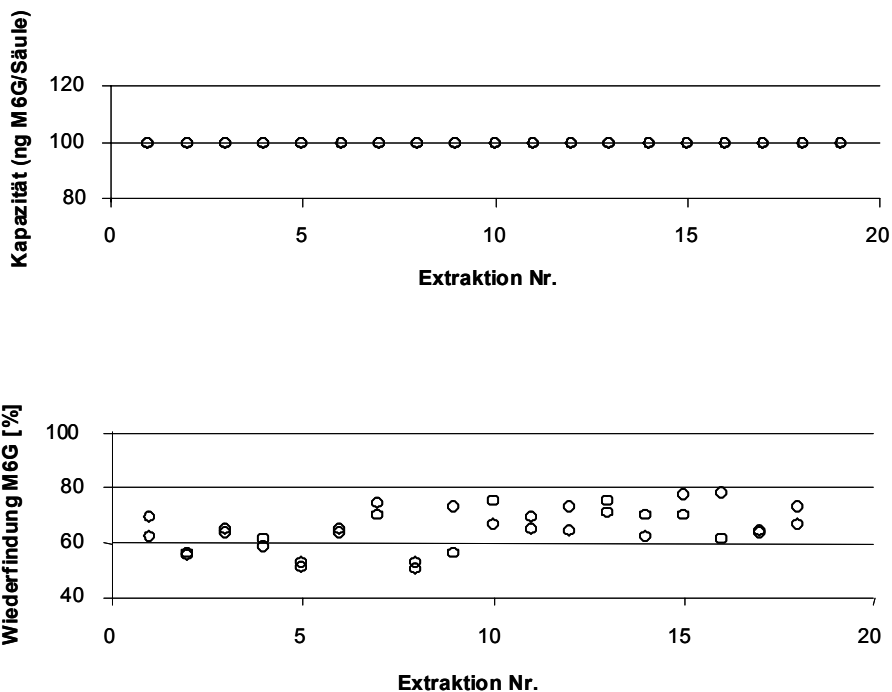


Abb. 79: Bestimmung der Kapazität und Wiederfindung nach Einschluss von Anti-M6G in Sol-Gel, 18 Wiederholungen.

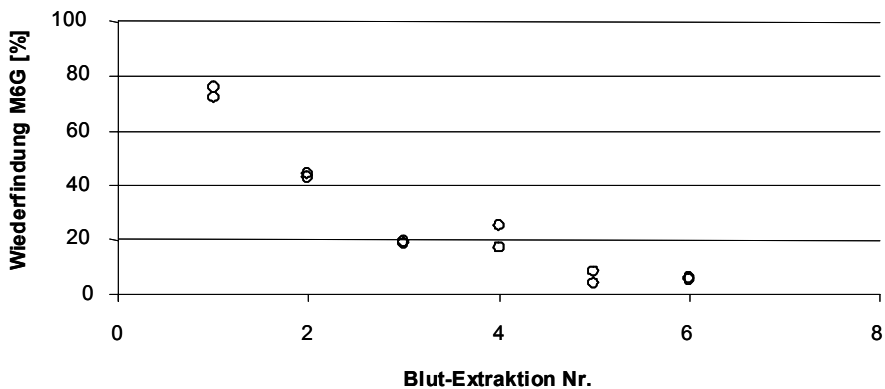


Abb. 80: Bestimmung der Wiederfindung aus Blut nach Einschluss von Anti-M6G in Sol-Gel, 6 Wiederholungen.

Die Kapazität aller Immunoadsorber betrug über den gesamten Wiederholungsbereich > 100 ng/ ml.

Die Wiederfindungsraten bei Extraktion mittels der in Sol-Gel eingeschlossenen M-Antikörper schwankte über den gesamten Wiederholungsbereich um ca. 80 %, wobei Einzelwerte der Doppelbestimmungen nur wenig differierten. Die erste Extraktion aus Vollblut konnte mit akzeptabler Wiederfindung von ca. 90 % durchgeführt werden, bei den folgenden 5 Extraktionen wurden jedoch mit stetig abnehmender Tendenz Wiederfindungsraten von ca. 60 % und schließlich ca. 30 % ermittelt. Die Einzelwerte der Doppelbestimmungen differierten wenig.

Die Wiederfindungsraten bei Extraktion mit M3G-Sol-Gel lagen bei den ersten Wiederholungen um ca. 90 %, ab der 4. Wiederholung um die 80 %. Die Einzelwerte der Doppelbestimmungen differierten geringfügig. Die ersten Wiederfindungsraten aus Vollblut wurden in einer Doppelbestimmung mit 44 % ermittelt. Die Wiederfindungsraten der darauf folgenden Extraktionen sanken stetig bis auf unter 10 % bei der 6. Bestimmung.

Die M6G-Immunoadsorber zeigten Wiederfindungsraten um die 70 % über den gesamten Wiederholungsbereich. Auch mit diesem Sol-Gel war nur eine Extraktion aus Vollblut mit einer Wiederfindungsrate von 75 % möglich. Die Ausbeuten der Extraktionen 2 – 6 nahmen stetig ab von ca. 40 % bis < 10 %.

Mit diesen Immunoadsorbentien war die wiederholte Extraktion prinzipiell problemlos durchführbar. Jedoch war die Extraktion aus einer komplexen Matrix wie Vollblut nicht reproduzierbar. Reste von Matrixbestandteilen konnten nicht wieder von der Säule entfernt werden, was auch an der bleibenden Dunkelfärbung des Sol-Gel-Materials nach der Extraktion aus Vollblut optisch sichtbar war. Außerdem verstopften Blutbestandteile die Säulen, so dass die Extraktion bei Blutproben schwieriger durchzuführen war als bei Standardlösungen. Die Säulen waren somit zur Extraktion aus nicht vorbehandeltem Blut einsetzbar, jedoch nur als Einweg-Material. Die zur Extraktion verwendete Menge des Immunoadsorbenters musste daher minimiert werden. Außerdem sollte die Vorbehandlung der Blutproben durchgeführt werden.

5.5.3 VALIDIERUNG DER HPLC - BESTIMMUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN IN BLUT NACH ANTIKÖRPERGESTÜTZTER EXTRAKTION AN SOL-GEL

Die Validierung umfasste den Nachweis der Spezifität und Linearität. Präzision und Richtigkeit wurden für drei Kalibrationsstufen ermittelt und die Wiederfindungsraten bestimmt. Außerdem wurden Bestimmungs- und Nachweisgrenze von Morphin, M3G und M6G erfasst.

Zur Durchführung der Validierung mussten die Immunoadsorber in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Damit die Validierungsdaten einheitlich ausgewertet werden konnten, wurde die gesamte Menge Sol-Gel-Material in je einer einzigen Charge hergestellt. Die drei Sol-Gel-Materialien wurden zu kombinierten Säulen zusammengestellt, die eine ausreichende Kapazität für jeden der drei Analyten besaßen.

5.5.3.1 HERSTELLUNG DER IMMUNOADSORBER UND EXTRAKTION

Wie unter 5.5.1 beschrieben wurden drei verschiedene Immunoadsorber hergestellt. Auch bei diesem Ansatz konnte weder im überstehenden MeOH – H₂O – Gemisch noch im ablaufenden PBS-Puffer Protein nachgewiesen werden, so dass auch hier von einer vollständigen Immobilisierung auszugehen war. Je Immunoadsorber wurden 12,5 g Sol-Gel erhalten. Der IgG-Gehalt betrug bei jedem Immunoadsorber 2 mg/g Gel. Aus diesen drei Sol-Gelen wurden gemischte Extraktionssäulen hergestellt, indem von jedem Gel 0,12 g / Säule eingesetzt wurden. Bei Aufschlammung der insgesamt eingewogenen 0,36 g Sol-Gel pro Säule entsprach die Einwaage einem Gelvolumen von 1 ml. Die Säulen wurden mit einem Teflonhahn versehen und mit einem Gummistopfen verschlossen.

Die Anbindung der Analyten an die Immunoadsorber erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter langsamem Rotieren. Eingesetzt wurden PBS pH 8 - gepufferte Lösungen, wobei Blutproben vor der Aufgabe auf die Säulen einer Proteinfällung (MeOH) unterzogen wurden. Nach

verschiedenen Waschschritten (PBS pH 8, H₂O, Aceton+H₂O 95+5) wurde die Ablösung der Analyten vom Immunoadsorber durch 20-minütige Inkubation mit MeOH+H₂O 95+5 im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur erreicht. Der Elutionsschritt wurde 6 x wiederholt. Die eingedampften vereinigten Eluate wurden in HPLC-Fließmittel aufgenommen und zur HPLC eingesetzt.

5.5.3.2 SPEZIFITÄT

Zur Bestimmung der Spezifität wurde das Chromatogramm eines Leerblutextrakts mit dem Extrakt einer mit M, M3G und M6G versetzten Blutprobe verglichen (Abb. 81). Im Bereich der Analyten traten keine störenden Matrixsignale auf.

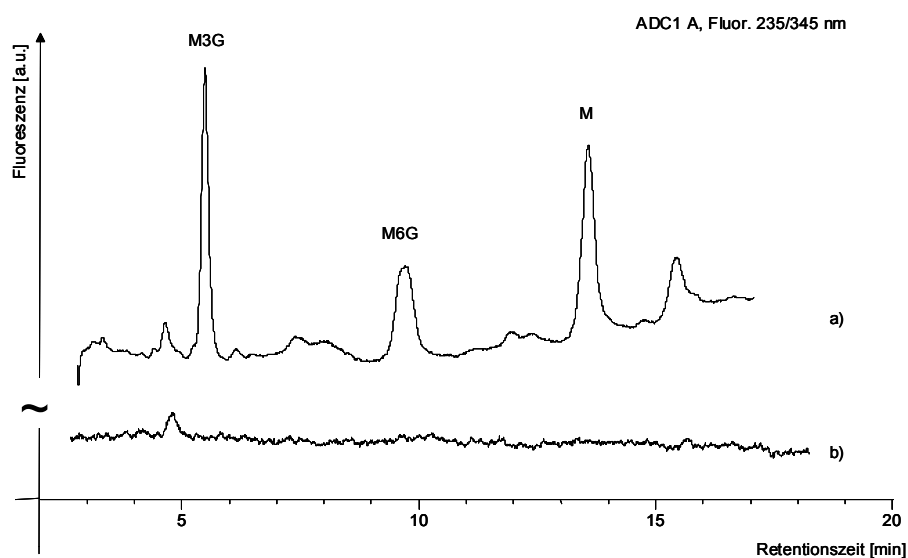


Abb. 81: a) Chromatogramm des Sol-Gel-Extraktes eines mit je 250 ng/ml M, M3G und M6G versetzten Blutes.
b) Chromatogramm des Leerblutextraktes.
Chromatographische Bedingungen: siehe Kap. 3.1 des exp. Teils.

5.5.3.3 WIEDERFINDUNG

Zur Bestimmung der prozentualen Wiederfindungsrate nach Extraktion wurden je 2 gespikete Blutproben in 6 Konzentrationen (je 5, 10, 25, 50, 100 und 250 ng/ml Blut) sowie 2 Blindproben extrahiert und analysiert.

Als Vergleich dienten Standardlösungen mit den gleichen Konzentrationen, welche ohne Extraktion analysiert wurden. In Abb. 82 - Abb. 84 sind die Peakflächen und Regressionsgeraden beider Versuchsreihen dargestellt.

Die Korrelationskoeffizienten betragen für die Standardlösungen 0,9991 - 0,9999 und für die extrahierten Blutproben 0,9912 – 0,9982. Die Wiederfindungsraten wurden aus dem Verhältnis der Steigungen beider Regressionsgeraden pro Analyt ermittelt und betragen für Morphin 46,5%, für M3G 81,4% und für M6G 51,6%.

Die für M, M3G und M6G ermittelten Wiederfindungsraten sind jeweils bis zu einer Konzentration von 250 ng/ml Blut konstant. Bei der Extraktion von Bluten mit einer Analytenkonzentration > 250 ng/ml wurde eine geringere Wiederfindungsrate ermittelt.

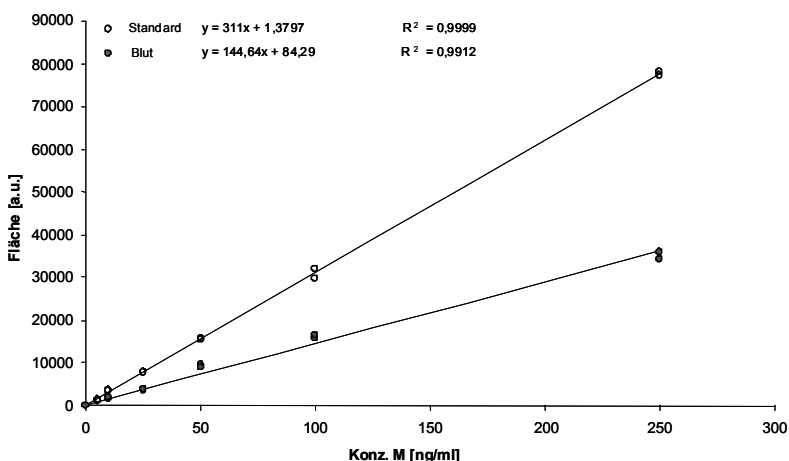


Abb. 82: Wiederfindung von Morphin aus Vollblut.

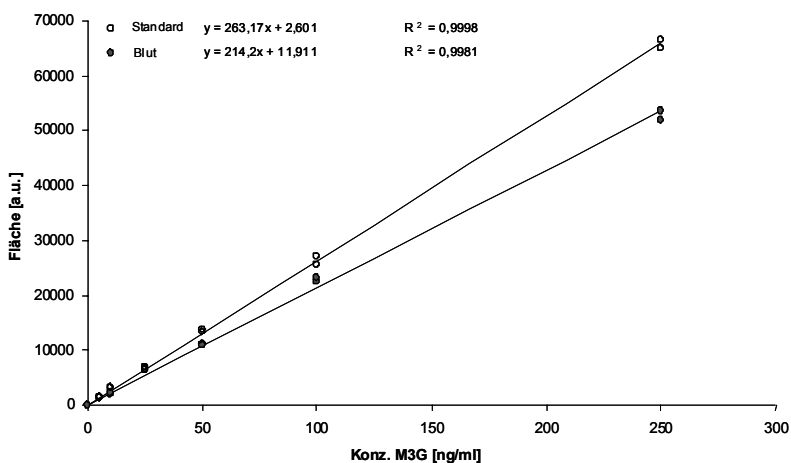


Abb. 83: Wiederfindung von M3G aus Vollblut.

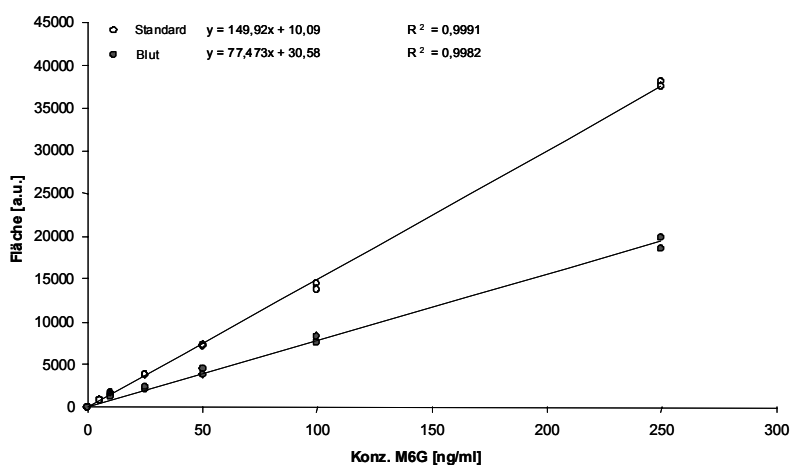


Abb. 84: Wiederfindung von M6G aus Vollblut.

5.5.3.4 LINEARITÄT

Zur Überprüfung der Linearität wurde für jeden Analyten eine Kalibrationsgerade erstellt, wobei das mit der jeweiligen Kalibrationslösung versetzte Leerblut nach 5.5.3.1 extrahiert und der Extrakt zur HPLC nach 3.1. eingesetzt wurde. Der Konzentrationsbereich wurde zwischen 5 ng/ml und 250 ng/ml gewählt. So war der Bereich abgedeckt, für den bei allen drei Analyten konstante Wiederfindungsraten gegeben waren. Abb. 85 zeigt die Kalibrationsgeraden für M, M3G und M6G. Linearität war für alle drei Analyten über den Bereich 10 ng/ml – 250 ng/ml gegeben. Die Korrelationskoeffizienten lagen $> 0,99$.

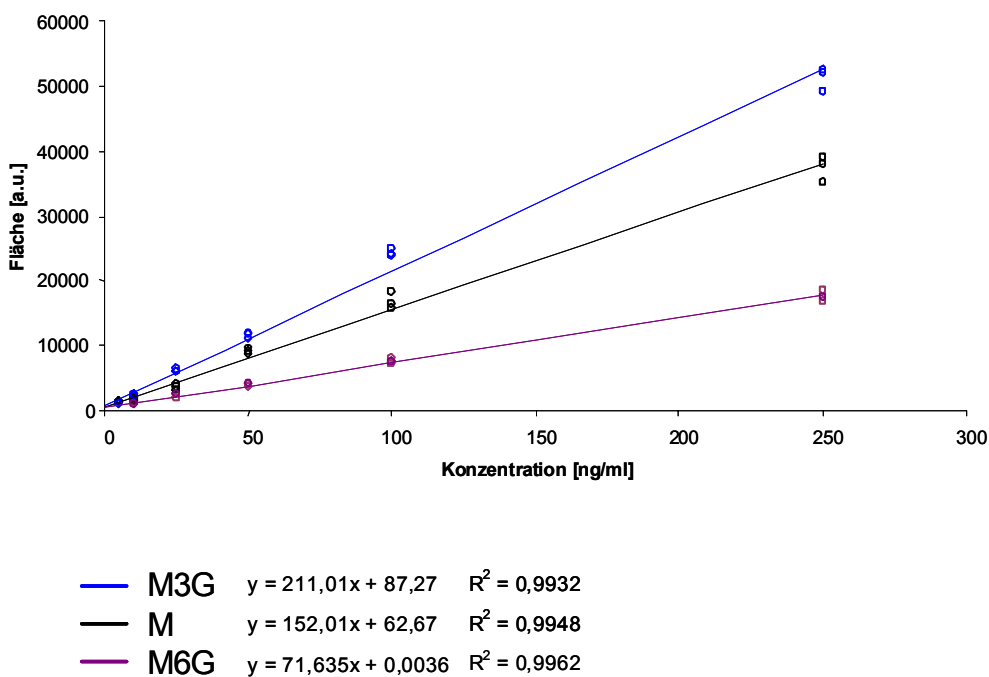


Abb. 85: Kalibrationsgeraden für M, M3G und M6G, Sol-Gel-Extrakte aus Blut.

5.5.3.5 PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

Die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit erfolgte für jeden der drei Analyten für die Kalibrationsstufen 25 ng/ml Blut, 100 ng/ml Blut und 250 ng/ml Blut. An drei aufeinander folgenden Tagen wurden je drei gespikete Blutproben aufgearbeitet und analysiert.

Die Werte für die relative Standardabweichung lagen bei Morphin zwischen 0,8 % und 9,3 %, bei M3G zwischen 0,9 % und 9,5 % und bei M6G zwischen 1,2 % und 6,9 %.

Die Werte für die Richtigkeit betragen bei Morphin zwischen 99,0 % und 109,7 %, bei M3G zwischen 95,1 % und 104,8 % und bei M6G zwischen 95,0 % und 104,1 %.

Die allgemeinen Akzeptanzkriterien für Präzision und Richtigkeit [90] werden somit erfüllt. Demnach müssen die Werte für die Präzision unterhalb der 15 %-Grenze liegen. Die Richtigkeit für alle Kalibrationsstufen liegt im vorgeschriebenen Bereich zwischen 85 % und 115 %.

Die ermittelten Intraday- und Interday-Werte für Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von M, M3G und M6G sind in Abb. 86 – Abb. 88 graphisch dargestellt.

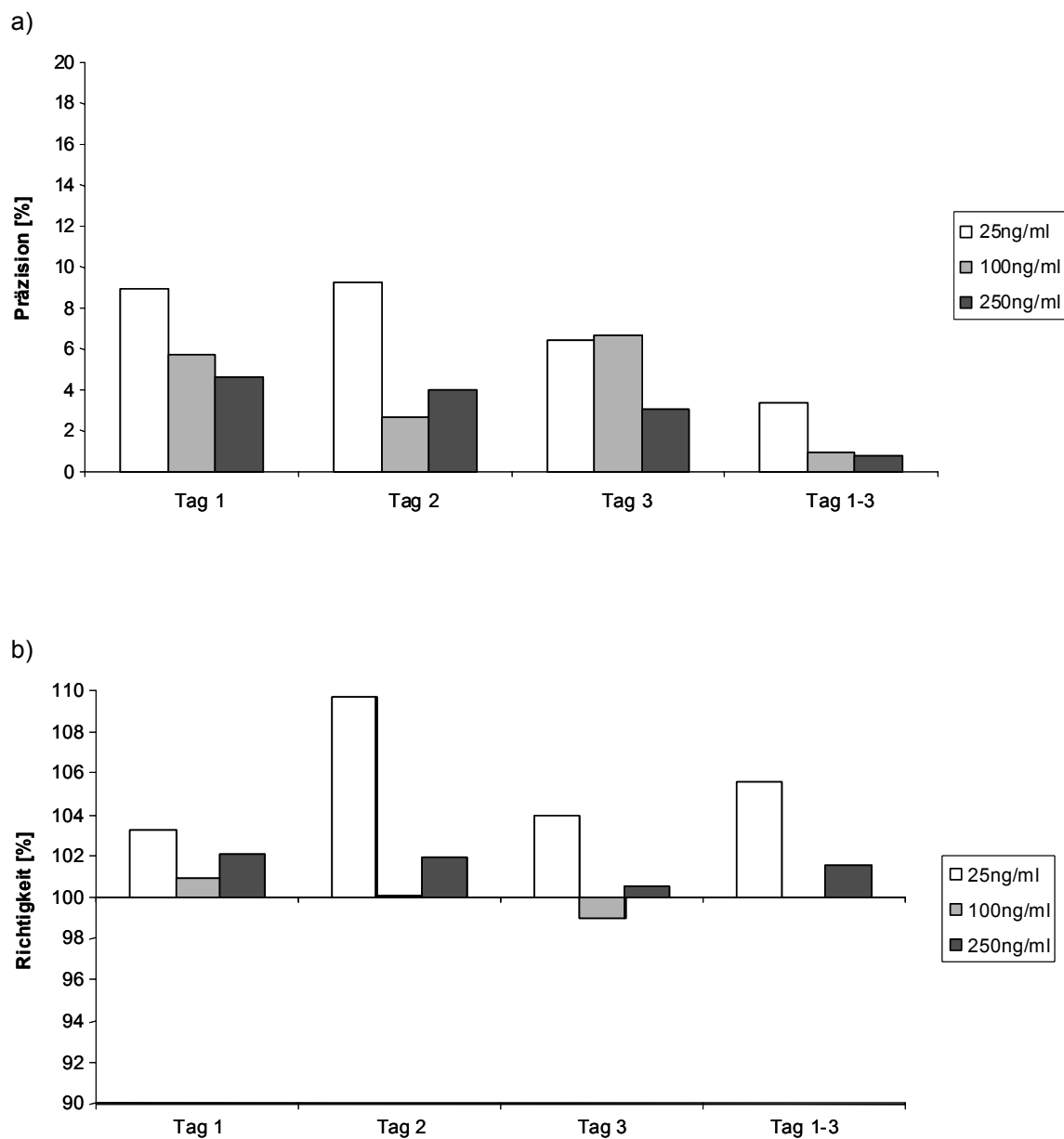


Abb. 86: a) Präzision; b) Richtigkeit für Morphin.

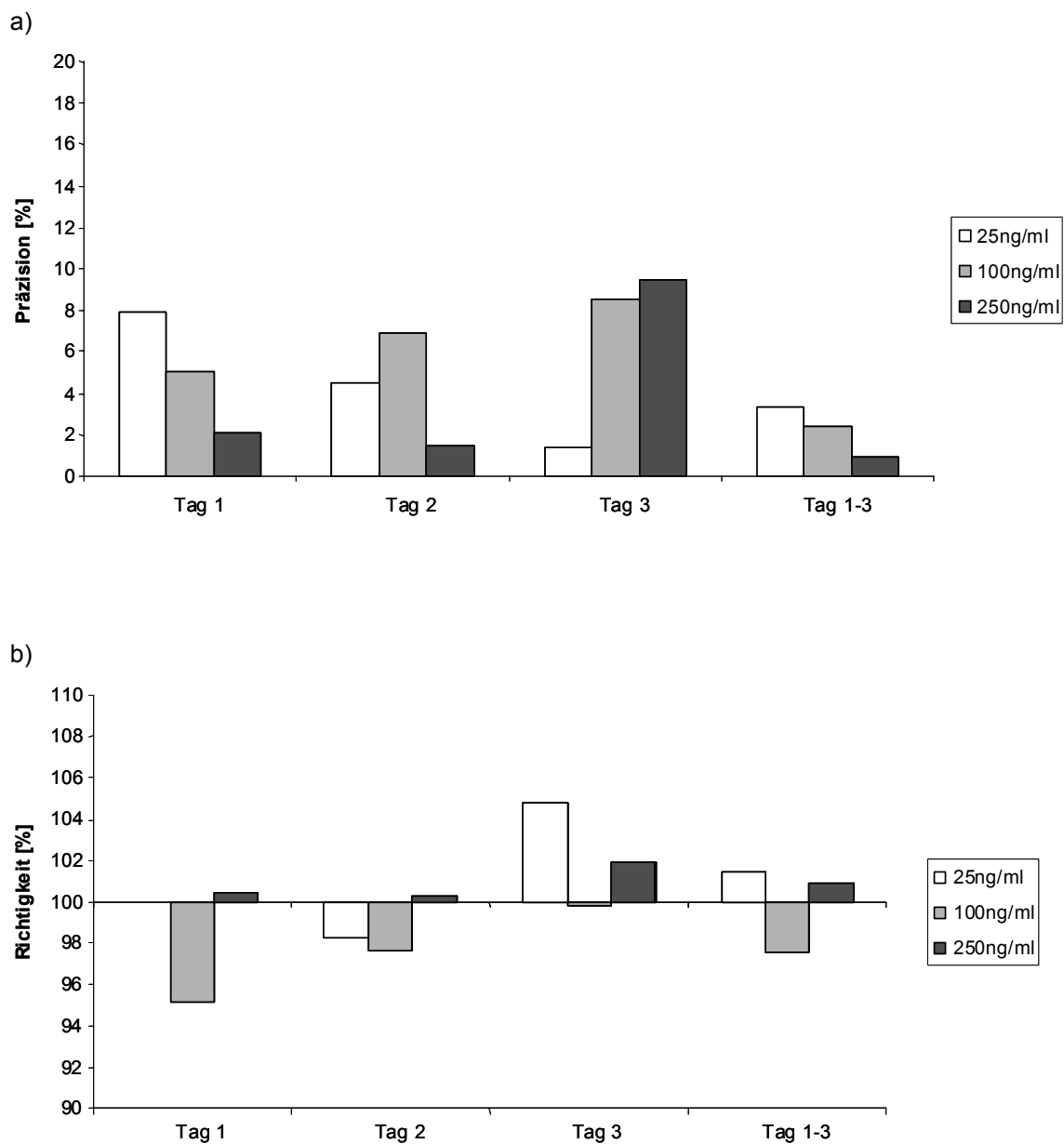


Abb. 87: a) Präzision; b) Richtigkeit für M3G.

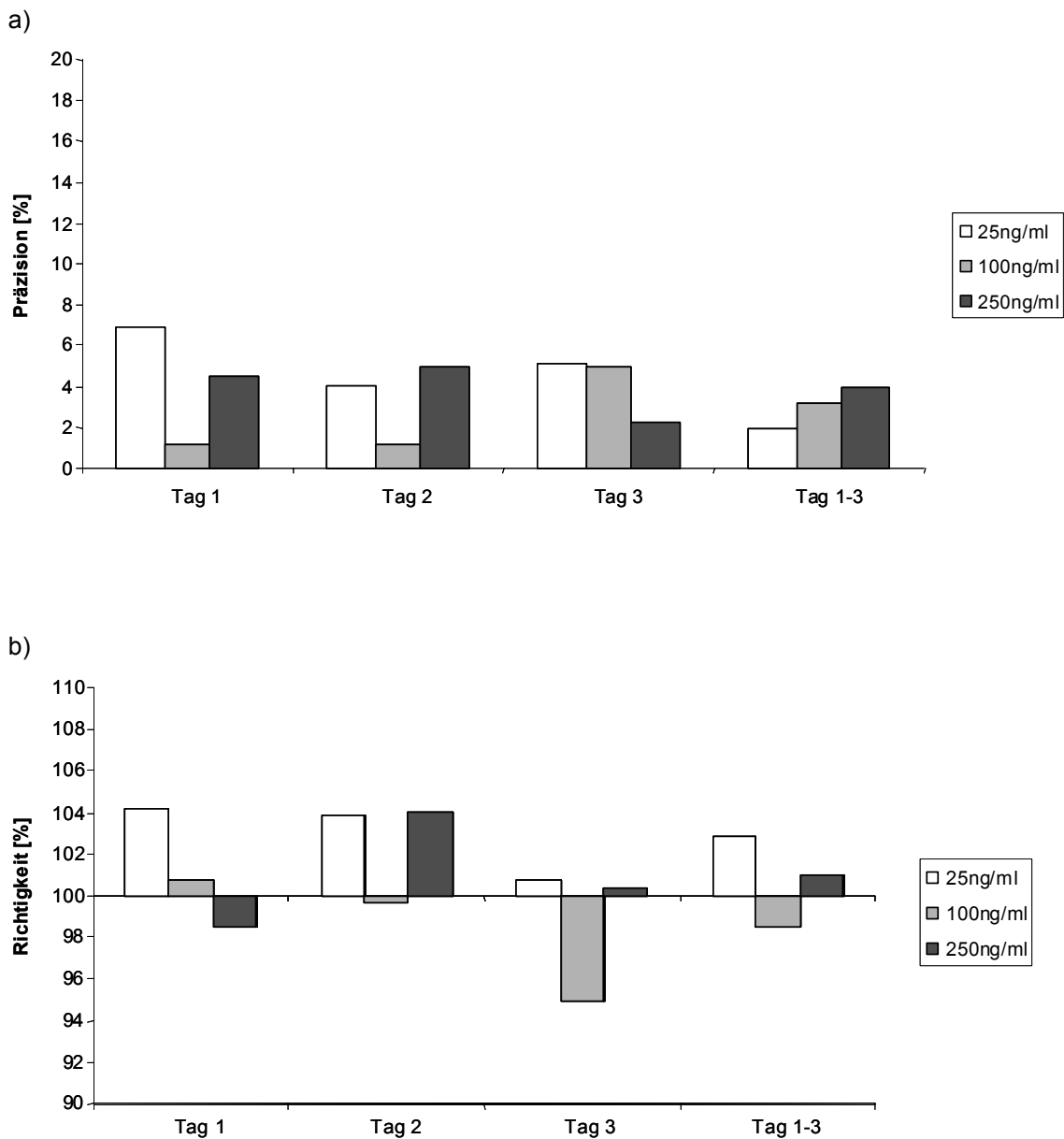


Abb. 88: a) Präzision; b) Richtigkeit für M6G.

5.5.3.6 BESTIMMUNGSGRENZE

Definitionsgemäß ist die Bestimmungsgrenze die geringste Konzentration, bei der Präzision und Richtigkeit den Akzeptanzkriterien entsprechen [90]. Die Werte für die Präzision dürfen maximal 15 % erreichen, während die Werte für die Richtigkeit zwischen 85 % und 115 % bleiben müssen. Diese Grenzen sind bei allen drei Analyten bei einer Konzentration von 25 ng/ml Blut eingehalten worden.

5.5.3.7 NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze wird als die niedrigste Konzentration des Analyten, die noch mit einem Signal/Rausch - Verhältnis von 3:1 nachweisbar ist, definiert [90]. Diese Konzentration liegt für M bei 5 ng/ml Blut, für M3G und M6G bei 10 ng/ml Blut.

5.5.4 APPLIKATION – FORENSISCHE FÄLLE

Blutproben aus 5 tödlich verlaufenen Heroinintoxikationen sowie 5 Nativblutproben von lebenden Heroinkonsumenten wurden mit der unter 5.4.3.1 (Exp. Teil) beschriebenen Methode mittels Sol-Gel-Antikörper-Säulen extrahiert und per HPLC-Fluoreszenzdetektion analysiert.

Die Asservierung der Blutproben erfolgte bei den Drogentoten während der Sektion aus dem Herzen. Die Blutproben der lebenden Heroinkonsumenten waren zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem letzten Heroinkonsum entnommen worden, so dass verschiedene Morphin- und Glucuronid- Gehalte zu erwarten waren.

Die Konzentrationen von M, M3G und M6G wurden über die Kalibriergeraden nach 5.5.3.4 ermittelt und mit den Ergebnissen einer GC/MS-Methode [136] verglichen. Bei den Lebenden lagen die GC/MS- Ergebnisse für freies Morphin, bei den Leichenbluten für freies und Gesamtmorphin vor. Die Bestimmung von

Gesamtmorphin erfolgte nach Spaltung der Konjugate mit einer Mischung aus Arylsulfatase und β -Glucuronidase. In diesem Analysengang wurde also die Summe aus freiem M, Morphinsulfat und Morphinglucuronide erfasst.

In Abb. 89 sind zwei Chromatogramme von extrahierten Blutproben, die von Heroinopfern stammen, dargestellt. In Blutprobe a) war der Morphingehalt relativ gering, wogegen erhöhte Gehalte bei den Glucuroniden vorlagen. Blutprobe b) besaß einen sehr hohen Morphingehalt und geringe Gehalte an M3G und M6G.

In Blutprobe a) wurden 72 ng/ml M, 304 ng/ml M3G und 57 ng/ml M6G festgestellt. Blutprobe b) enthielt 646 ng/ml M, 248 ng/ml M3G und 32 ng/ml M6G.

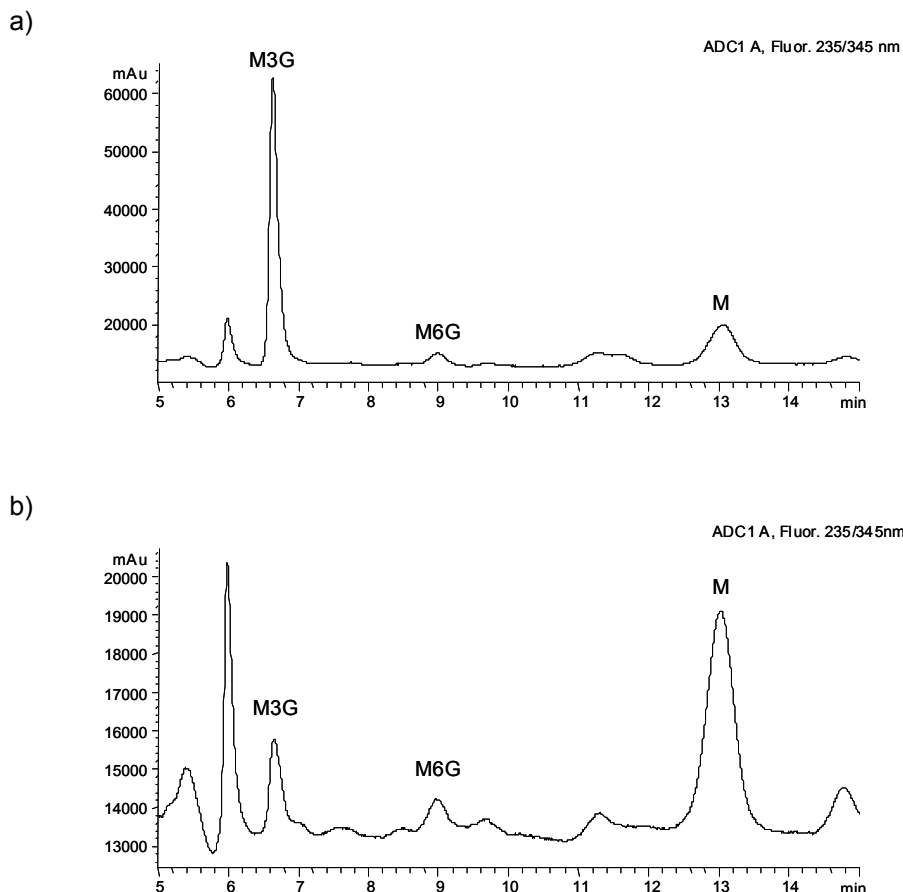


Abb. 89: Chromatogramme der Vollblutextrakte von zwei Heroinopfern.

a) M: 72 ng/ml, M3G: 304 ng/ml, M6G: 57 ng/ml Blut,

b) M: 646 ng/ml, M3G: 248 ng/ml, M6G: 32 ng/ml Blut.

Chromatographische Bedingungen: s. Kap. 3.1 des Exp. Teils.

5.5.4 ANALYTIK VON SOL-GEL-EXTRAKTEN PER HPLC-LIF

Die Chromatogramme der Sol-Gel-Extrakte sowohl von gespikten Bluten als auch von Leichenbluten zeigten bei der Fluoreszenzdetektion kaum Matrixbedingte Störpeaks. Um das gesamte Fluoreszenzspektrum beurteilen zu können, wurden Sol-Gel-Extrakte aus Bluten verschiedener Konzentrationen parallel mittels HPLC-Fluoreszenz und der HPLC-LIF-Technik unter Anregung im tiefen UV bei $\lambda = 244 \text{ nm}$ (s. Kap. 3.3) analysiert. Die quantitative Analyse von M, M3G und M6G durch HPLC-LIF zeigte eine akzeptable Übereinstimmung mit den HPLC-Fluoreszenz-Ergebnissen.

In Abb. 90 ist deutlich sichtbar, dass die Extraktion mittels Sol-Gel-immobilisierter Antikörper sehr reine Extrakte auch aus der komplexen Blutmatrix liefert. Hier wurde ein Extrakt aus mit 200 ng/ml M versetztem Blut analysiert. Im Vergleich mit einem an einer C_8 -RP-Phase erhaltenen Extrakt (s. Abb. 21) waren die mit dem hier hergestellten Immunoabsorbentmaterial gewonnenen Extrakte kaum Matrix-belastet.

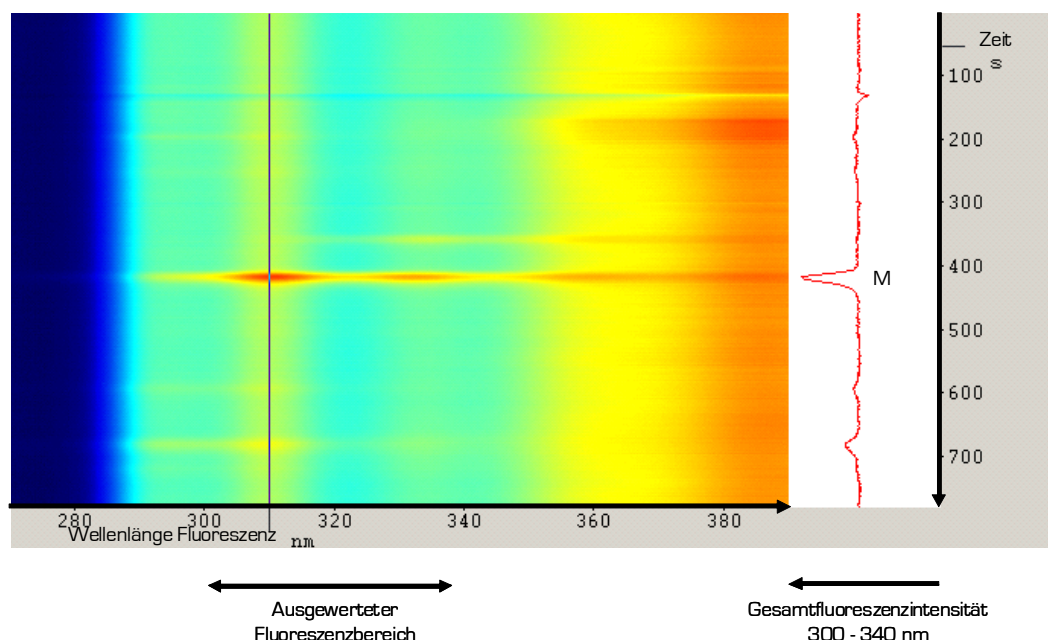


Abb. 90: Chromatogramm eines Vollblutextraktes, Konz. M: 200 ng/ml Blut, Chromatographische Bedingungen: s. Kap. 3.3.2 des Exp. Teils.

5.6 DISKUSSION

Im vorliegenden Kapitel wurden spezifische Antikörper gegen M, M3G und M6G mittels verschiedener Methoden immobilisiert. Die hergestellten Immunoabsorber wurden bezüglich ihrer Kapazitäten, Wiederfindungsraten und Wiederverwendbarkeiten charakterisiert.

Die Immobilisierung der Antikörper an CNBr-aktivierter Sepharose war ohne Komplikationen und effektiv umsetzbar. Sie beruhte auf der zufällig ausgerichteten Immobilisierung der Antikörper über kovalente Bindungen zwischen CN- Gruppe und einer primären Aminogruppe. Die zufällige Ausrichtung war für die Extraktionseigenschaften der hergestellten Immunoabsorber von Nachteil. Nur ein Teil der immobilisierten Antikörper konnten zur Extraktion genutzt werden, da der andere Teil durch lokal ungünstige Immobilisierung sterisch daran gehindert war, das Antigen zu binden. Die ungünstige sterische Ausrichtung eines Teils der Antikörper konnte dafür verantwortlich gemacht werden, dass die Wiederfindungsraten teilweise extrem schwankten, bedingt durch ungleichmäßiges Elutionsverhalten.

Die Herstellung eines Immunoabsorbers durch Immobilisierung von Antikörpern an Protein A- Agarose mit anschließender kovalenter Anbindung durch Crosslinker war weniger effektiv durchführbar als die Bindung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose. Durch die nicht spontane, sondern gerichtete Anbindung der Antikörpermoleküle an die Matrix war der Anteil der immobilisierten Antikörper hier geringer. Daher musste bei der Immobilisierung eine größere Antikörper-Menge eingesetzt werden. Dennoch bedeutete die Ausrichtung der Antikörper am Protein für die Kapazität der hergestellten Immunoabsorber keinen Vorteil. Das M6G-Immuno-absorbermaterial besaß eine nicht reproduzierbare Wiederfindungsrate, so dass hier keine genauen quantitativen Aussagen möglich waren. Außerdem konnten die Immunoabsorber bei der Ermittlung der Wiederverwendbarkeit nicht häufiger als 3 x mit befriedigendem Ergebnis bezüglich Kapazität und Wiederfindung

beladen werden. Hier wurden bei den M3G- und M6G- Immunoadsorbern teilweise Wiederfindungsraten über 100 % ermittelt. Diese Ergebnisse ließen auf ein ungleichmäßiges Elutionsverhalten schließen. Die Immobilisierung von Antikörpern mit der beschriebenen Methode bot also keinen Vorteil gegenüber der ungerichteten kovalenten Bindung an CNBr-aktivierte Sepharose.

Mit der Sol-Gel-Methode wurden die Antikörper schonend, vollständig und irreversibel immobilisiert. Die hergestellten Immunosorbentmaterialien konnten bei gleich bleibender Wiederfindungsrate mindestens 20 x wiederholt mit dem entsprechenden Analyten aus einer Standardlösung be- und entladen werden. Die Kapazität der Immunoadsorber betrug ca. 100 ng/ml Sol-Gel-Material. Die Bestimmung aus Vollblut gelang bis zu einer Konzentration von 250 ng/ml Blut mit konstanter Wiederfindungsrate und Linearität sowie mit ausreichender Präzision und Richtigkeit. Die Anwendung dieser Extraktionsmethode auf das Blut von lebenden Heroinkonsumenten sowie tödlich verlaufenen Intoxikationen konnte problemlos und mit sehr guter Selektivität durchgeführt werden, so dass mit dem vorliegenden Immunoadsorber ein zuverlässiges, sehr spezifisches Extraktionsmaterial hergestellt wurde. Der Vorteil gegenüber den konventionellen apolaren RP-Phasen liegt in der Selektivität und der guten Reproduzierbarkeit.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sensitive und spezifische Bestimmung von Morphin, Morphin-3- β -D-glucuronid und Morphin-6- β -D-glucuronid in Leichenblut erarbeitet. Besonderer Wert wurde dabei auf die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion gelegt, da Morphin und die Morphinglucuronide als nativ fluoreszierende Verbindungen eine Selektivitäts- und Sensitivitätssteigerung erwarten ließen.

Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit eine hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC) Trennmethode mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) im tiefen UV-Bereich entwickelt und eingesetzt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine kapillarelektrophoretische Trennung für Morphin und Morphinglucuronide entwickelt und nach Kopplung mit der LIF-Detektion im tiefen UV-Bereich für die Bestimmung der Analyten in Blutextrakt etabliert. Schließlich wurden mittels spezifischer Antikörper gegen Morphin, Morphin-3- β -D-glucuronid bzw. Morphin-6- β -D-glucuronid durch verschiedenartige Immobilisierungswege Immunoextraktionsphasen hergestellt. Die am besten geeignete Immunoextraktionsphase wurde für die Extraktion der Analyten aus Blutproben mit anschließender HPLC-Fluoreszenzanalyse etabliert.

Die Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) als Trennverfahren mit der Laser-induzierten Fluoreszenz- (LIF-) Anregung im tiefen UV-Bereich und spektralaufgelöster Fluoreszenzauswertung wurde für die qualitative und quantitative Bestimmung von Morphin Morphin-3- β -D-glucuronid und Morphin-6- β -D-glucuronid in Blutextrakten entwickelt und eingesetzt. Es handelte sich hierbei um eine Kooperation mit dem Institut für Angewandte Laserphysik der Universität Bielefeld.

Als Referenzmethode wurde die konventionelle HPLC-Analytik mit lampenangeregter Fluoreszenzdetektion (Hg-Xe-Lampe) von Blutextrakten validiert.

Das HPLC-LIF-Detektionssystem wurde mit einem Dioden-gepumpten frequenzvervierfachen Nd: YAG-Laser ($\lambda_{Em} = 266 \text{ nm}$, 6 mW) als Lichtquelle entwickelt. Für die Anwendung bei Blutextrakten wurde als Hochleistungs-Lichtquelle ein Ti: SA-Laser ($\lambda_{Em} = 244 \text{ nm}$, 50 mW) eingesetzt. Durch den Einsatz einer CCD-Kamera wurde während der gesamten Messung die auftretende Fluoreszenz in Abhängigkeit von Zeit, Wellenlänge und Intensität aufgezeichnet.

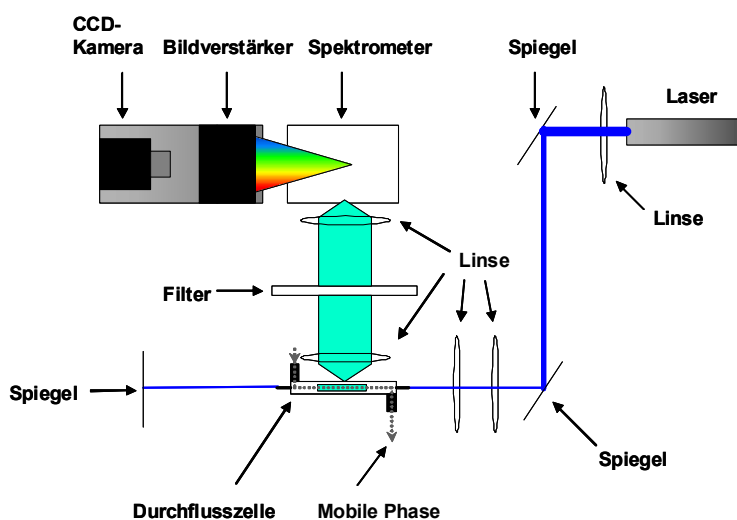


Abb. 91: Schematischer Aufbau des HPLC-LIF-Detektionssystems.

Die von der CCD-Kamera erfassten spektral aufgelösten Daten wurden über spezifische Algorithmen berechnet. Aus dem Datenpool wurde lediglich der Datenbereich zur Auswertung herangezogen, der die charakteristische Fluoreszenz der Analyten beschrieb. Durch Aufsummierung der Fluoreszenzintensität in diesem Datenbereich wurden eventuell auftretende Untergrundfluoreszenzen aus der Darstellung ausgeschlossen. Die beschriebene Methode war somit von hoher Spezifität und konnte für die Analytik von Blutextrakten erfolgreich eingesetzt werden.

Im Vergleich mit der validierten Referenzmethode konnte durch Einsatz des Hochleistungslasers als Lichtquelle die Sensitivität mindestens um den Faktor 2 erhöht werden. Während die Detektionsgrenze des HPLC-Fluoreszenz-Systems für Morphin bei 5 ng/ml und für die Glucuronide bei je 10 ng/ml lag, wurden die Detektionsgrenzen beim HPLC-LIF-System alle mit < 5 ng/ml bestimmt.

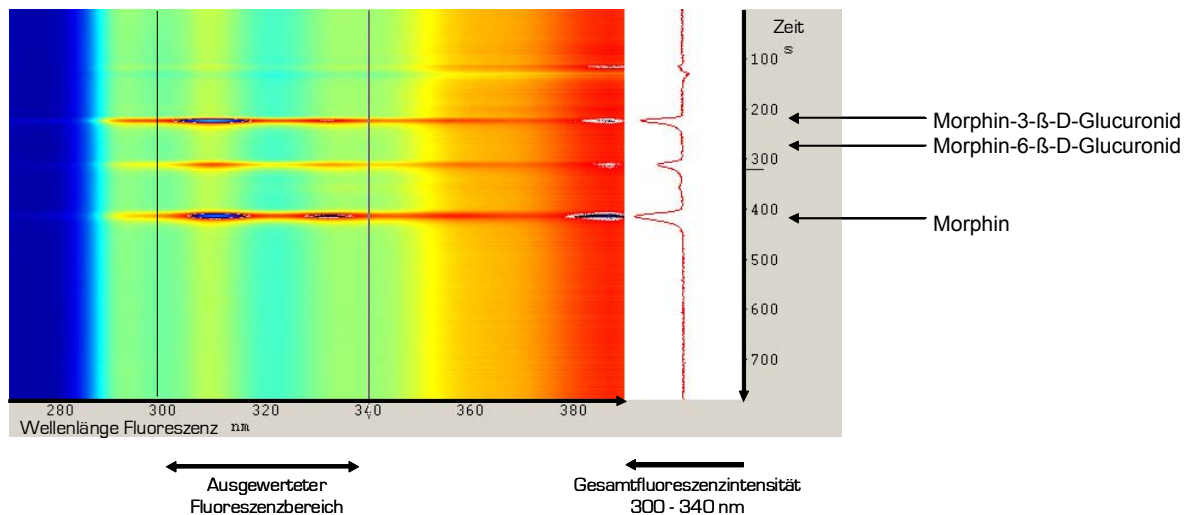


Abb. 92: Spektral aufgelöste Detektion eines HPLC-LIF-Analysenlaufs.

Des Weiteren wurde im zweiten Teil der Arbeit für die Analyten Morphin, Morphin-3-β-D-glucuronid und Morphin-6-β-D-glucuronid eine kapillarelektrophoretische Trennmethode als schnelles und hoch auflösendes Trennverfahren mit geringem Probeninjektionsvolumen entwickelt. Eine hohe Sensitivität und Spezifität konnte erreicht werden, indem auch hier die Anregung zur Fluoreszenz mittels eines Hochleistungslasers (frequenzverdoppelter Argon-Ionen-Laser, $\lambda_{Em} = 244 \text{ nm} / 50 \text{ mW}$) und die spektral aufgelöste Detektion durch eine CCD-Kamera erfolgte.

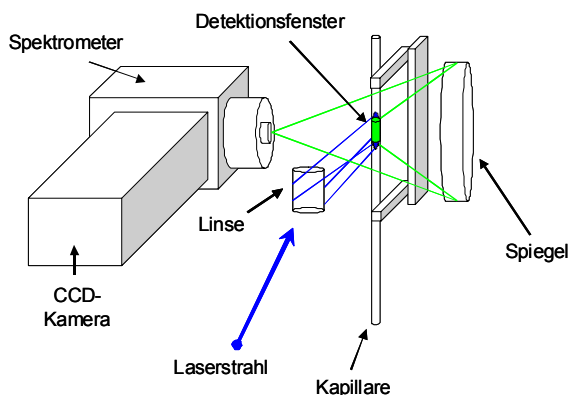


Abb. 93: Schematischer Aufbau des CE-LIF-Detektionssystems.

Mit dieser Analysenmethode konnte in Blutextrakten, die über C₈-Festphasen erhalten worden waren, eine Nachweisgrenze von 5 ng/ml Blut für Morphin-3-β-D-glucuronid und von 10 ng/ml Blut für Morphin und M6-β-D-glucuronid erreicht werden. Nach einer Validierung gemäß der Anforderungen der FDA [90] wurde die Methode zur Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden in Blut von verstorbenen Heroinkonsumenten eingesetzt.

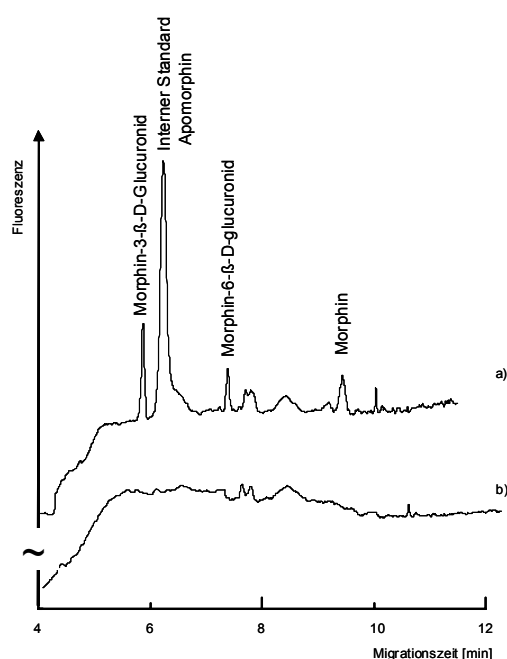


Abb. 94: Elektropherogramme (LIF-Detektion $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$) von extrahierten Blutproben a) mit je 100 ng/ml Morphin, Morphin-3-β-D-glucuronid und Morphin-6-β-D-glucuronid versetztes Blut, Endkonzentration Apomorphin (IS): 125 ng/ml. b) Leerblutextrakt.

Im dritten Teil der Arbeit wurden durch die Immobilisierung spezifischer Antikörper gegen Morphin, Morphin-3-β-D-glucuronid und Morphin-6-β-D-glucuronid Immunoabsorbentmaterialien hergestellt, die zur Extraktion von Morphin, Morphin-3-β-D-glucuronid und Morphin-6-β-D-glucuronid aus Standardlösungen eingesetzt wurden. Drei verschiedene Immunoabsorbentmaterialien wurden hergestellt, die sich durch die Art der Immobilisierung unterschieden. Das waren einmal die zufällige kovalente Bindung an Cyanbromid-aktivierte Sepharose, die Ausrichtung an Protein A - Agarose mit anschließender

Fixierung durch kovalente Bindung mittels eines Crosslinkers und der Einschluss in eine polymere Matrix (Sol-Gel). Die hergestellten Immunoadsorber wurden in ihren Eigenschaften bezüglich Kapazität, Wiederfindungsraten und Wiederverwendbarkeit charakterisiert.

Die effektivste Extraktion von Morphin und Morphinglucuroniden aus Standardlösungen war mit den Sol-Gel-Immunoadsorbentien durchführbar, wogegen die durch Immobilisierung an Protein A / Crosslinker erhaltenen Immunoadsorber am wenigsten geeignet waren. Das hergestellte Sol-Gel-Material war von hoher Kapazität bei guten Wiederfindungsraten und bis zur 20-fachen Wiederverwendbarkeit. Es wurde für die Extraktion von Morphin, Morphin-3- β -D-glucuronid und Morphin-6- β -D-glucuronid aus Blutproben mit anschließender HPLC-Fluoreszenzdetektion validiert. Die Methode konnte ohne Probleme für die Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden in Blut von Heroinopfern herangezogen werden. Die sehr geringe Matrix-Belastung sowohl der aus Vollblut als auch der aus Leichenblut gewonnenen Extrakte ermöglichte eine sensitive und spezifische Detektion (Abb. 95) und war auch bei der Betrachtung des Gesamtfluoreszenzspektrums im HPLC-LIF-System überzeugend (Abb. 96).

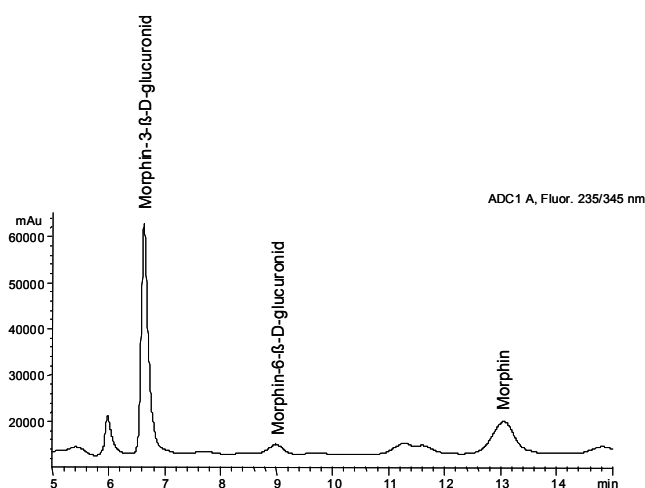


Abb. 95: Chromatogramm eines Vollblutextraktes (Sol-Gel) eines Heroinopfers. HPLC-Fluoreszenzdetektion, chromatographische Bedingungen s. Kap. 3.1 Exp. Teil.

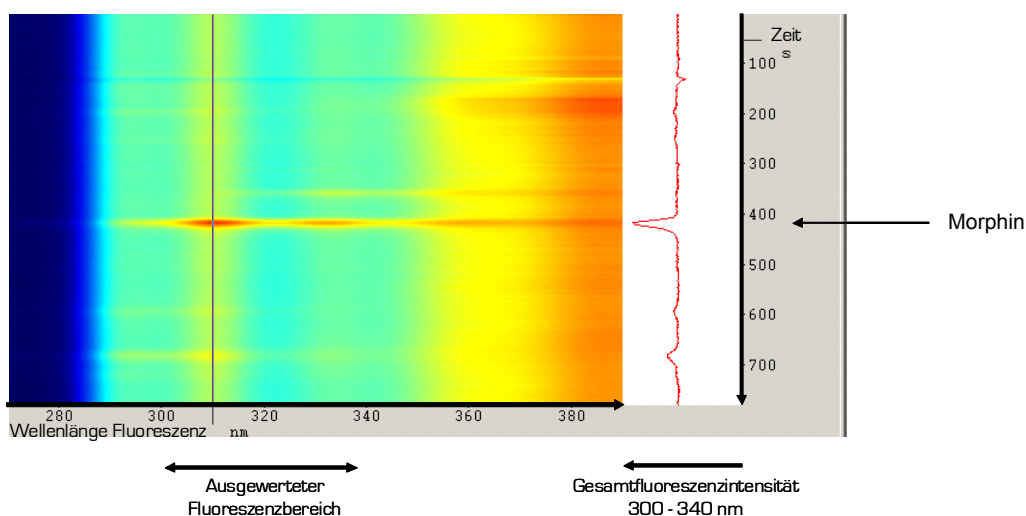


Abb. 96: Chromatogramm eines Vollblutextraktes (Sol-Gel) einer mit Morphin versetzten Blutprobe. HPLC-LIF-Detektion, $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$.

Für die Analytik von Morphin und Morphinglucuroniden ist durch den Einsatz der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion im tiefen UV-Bereich die Möglichkeit eines sehr sensitiven Nachweises gegeben. Durch die Kopplung der LIF-Detektion mit der HPLC wurde eine Nachweisgrenze im Blutextrakt für die drei Analyten im Konzentrationsbereich $< 5 \text{ ng/ml}$ Blut erreicht. Durch den Einsatz der LIF-Detektion in der Kapillarelektrophorese konnte der grundsätzliche Nachteil der CE bei optischen Detektionsmethoden, der kurze Lichtweg und die daraus resultierende schlechte Empfindlichkeit, kompensiert werden. Es wurden Nachweisgrenzen im Blutextrakt $< 10 \text{ ng/ml}$ Blut erreicht. Die Voraussetzung für den effektiven Einsatz bei Blutproben von verstorbenen Heroinkonsumenten ist das Vorliegen Matrix-freier Blutextrakte. Diese konnten durch die Extraktion mit Sol-Gel-immobilisierten Antikörpern gegen Morphin, Morphin-3- β -D-glucuronid und Morphin-6- β -D-glucuronid gewonnen werden. Somit konnte die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion als Detektionsmethode für Morphin und Morphinglucuronide in Blut von verstorbenen Heroinkonsumenten unter forensisch-analytischen Aspekten etabliert werden.

EXPERIMENTELLER

TEIL

1. ALLGEMEINES

1.1 ALLGEMEINE GERÄTE

Heizblock	regelbar von Raumtemperatur bis 100°C, 5 Ausgänge für Stickstoff, Fa. Juke
Analytische Waage	BP 121S, Fa. Sartorius
Laborwaage	MC1 LC2200P, Fa. Sartorius
Magnetrührer	Combimag REO, Fa. IKA
pH-Meter	pH-Meter 761, Fa. Knick
Pipetten	Reference Serie, Fa. Eppendorf
Rotationsverdampfer	Rotavapor R, Fa. Büchi
Wirbelmischer	Vortex Genie 2, G-560E, Fa. Scientific Industries
Spektralphotometer	CE 8020, Fa. CECIL
Spektralfluoriphotometer	RF 540, Fa. Shimadzu
Überkopfschüttler	Reax 2, Fa. Heidolph
Ultraschallbad	Sonorex RK 255H, Fa. Bandelin
Zentrifuge	Biofuge Primo, Fa. Heraeus Instruments

1.2 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

1.2.1 HPLC / FLUORESZENZDETEKTION

Hochleistungsflüssigkeits- chromatograph	Hewlett Packard Series II 1090
Analytische Säule:	Merck LiChrospher 60 RP-select B (5 µm, 250 x 4 mm), Fa. Merck
Detektionssystem	Series 1050 VWD/UV-Detektor, Fa. Hewlett Packard; F-1050 Fluoreszenzdetektor (12 µl- Durchflussküvette, Hg - Xe - Lampe, Fa. Hamamatsu), Fa. Hitachi Merck; Interface 35900, Fa. Hewlett Packard
Datenverarbeitung	Agilent ChemStation for LC, Fa. Agilent Technologies

1.2.2 HPLC / LASER-INDUZIERTE FLUORESZENZDETEKTION

Hochleistungsflüssigkeits- chromatograph	LKB HPLC Pump 2248 mit LKB Low Pressure Mixer und Inert Sample Injector, Fa. Pharmacia Probenschleifen: 10 µl; 50 µl Analytische Säule: s. Kap. 1.2.1
---	---

Detektionssystem 266 nm	Laser: Nano UV TM 266 nm, 5,7 mW, Fa. JDS Uniphase (Nd: YAG-Laser); Flusszelle: MicroFlowCell, Fa. Zeutec Opto- Elektronik; Spektrometer: MS125 TM – Spektrometer, Fa. Oriel Instruments; Bildverstärker: PP0340N, Delft Instruments; CCD-Kamera: Pixelfly VGA, Fa. PCO Computer Optics GmbH
Detektionssystem 244 nm	Laser: Ti:SA-Laser frequenzverdreifacht $\lambda = 720$ nm, 80 MHz, 100 fs, effektiv: ca. $\lambda = 240$ nm (cw), ca. 50 mW, TsunamiLaser, Fa. Spectra Physics; Durchflusszellen: s. Det.system 266 nm und Semi-Micro B0631133 (fluoreszenzfrei), V=100 μ l, Fa. Perkin Elmer; Spektrometer: MS260i, Fa. Oriel Instruments ; Bildverstärker / CCD-Kamera: Dyna Vision, Fa. LaVision Biotec
Datenverarbeitung	Davis 6.2, Fa. LaVision Mathcad 7, Fa. Mathsoft Inc. Origin 6.1G, Fa. Origin Lab Corp.

1.3 KAPILLARELEKTROPHORESE

1.3.1 CE / UV-DETEKTION

Elektrophoresegerät	Kapillarelektrophorese System P/ACE 5510 mit Diodenarray-Detektor (190 - 600 nm), Fa. Beckman Instruments Inc.
Probenaufgabe	hydrodynamisch (Stickstoff-Überdruck, 17.3 hPa)
Kapillare	eCAP Capillary Tubing, fused-silica, unbehandelte Oberfläche, 50 µm ID, 375 µm OD, Fa. Beckman Instruments Inc.
Kapillarkühlung	Flüssigkühlung mit FKW
Datenverarbeitung	P/ACE Station Version 1.21, Fa. Beckman Instruments Inc.

1.3.2 CE / LASER-INDUZIERTE FLUORESZENZDETEKTION

Elektrophoresegerät	SpectraPHORESIS 100 System, Fa. ThermoQuest Analytische Systeme
Detektionssystem	Laser: Lexel 95 SHG, 257 nm bzw. 244 nm, 50 – 100 mW, (Ar-Ionen-cw-Laser), Lexel Laser, Fa. Polytec; Spektrometer: Multispec 77417, Oriel, Fa. L.O.T.-Oriel

Probenaufgabe	hydrodynamisch (Vakuum an Outlet-Seite)
Kapillare	s. Kap. 1.3.1
Kapillarkühlung	Luftkühlung durch Ventilator
Datenverarbeitung	Davis 6.2, Fa. LaVision Mathcad 7, Fa. Mathsoft Inc. Origin 6.1G, Fa. Origin Lab Corp.

1.4 LISTE DER VERBINDUNGEN

1.4.1 ANALYTEN

6 - Acetylcodein	Fa. Lipomed, Arlesheim, CH
Apomorphin · HCl	Fa. Sigma, Deisenhofen
Hydrocodon · HCl	Fa. Knoll, Ludwigshafen
Hydromorphon · HCl	Fa. Knoll, Ludwigshafen
Levorphanol	Fa. Hoffmann - La Roche Ltd., Basel, CH
Morphin HCl · 3H ₂ O	Fa. Merck, Darmstadt
Morphin-3-β-D-glucuronid	Fa. Sigma, Deisenhofen
Morphin-6-β-D-glucuronid · 2 H ₂ O	Fa. Sigma, Deisenhofen

N-(3-Aminopropyl)-normorphin- 3- β -D-glucuronid	Syntheseprodukt Diss. J. Beike
Nalorphin · HBr	Fa. Burroughs, London, GB
Naloxon · HCl	Fa. Gödecke, Freiburg
Naltrexon · HCl	Fa. Sigma, Deisenhofen
Oxycodon · HCl	Fa. Sigma, Deisenhofen
Pholcodin	Fa. S.A.L.A.R.S., Como, I
Thebacon · HCl	Fa. S.A.L.A.R.S., Como, I

1.4.2 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

Acetonitril	Fa. Lab-Scan, Dublin, IRL
Ammoniak	Fa. Merck, Darmstadt
BCA Protein Quantitation Kit	Fa. Uptima / Interchim, Montluçon, F
CNBr – aktivierte Sepharose	CNBr-activated Sepharose™ 4B, Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB Uppsala, S
Dialyseschlauch	Visking Typ 20 / 32, Fa. Serva, Heidelberg
Diammoniumhydrogencarbonat	Fa. Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H ₂ O	Fa. Merck, Darmstadt
Dinatriumtetraborat · 10 H ₂ O	Fa. Fluka / Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Fa. Fluka / Sigma-Aldrich, Steinheim
Disuccinimidylsuberat - DSS	Fa. Pierce, Rockford II. USA
Ethanolamin	Fa. Merck, Darmstadt
Festphasenkartusche C ₈	Reserp [™] , 100 mg/1 ml, 100-pk, Fa. Restek, Sulzbach
Festphasenkartusche C ₁₈	Chromabond [®] , C18, 200 mg / 3 ml, Fa. Macherey-Nagel, Düren
Festphasenkartusche mixed-mode	Chromabond [®] Drug, 200 mg / 3 ml, Fa. Macherey-Nagel, Düren
Filtereinheit	Celtron 30 / 0,45 CA-GF92, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel
Glycin	Fa. Merck, Darmstadt
Heptansulfonsäure Na-Salz · H ₂ O	Fa. Fluka / Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck, Darmstadt
Methanol	Fa. Lab-Scan, Dublin, IRL
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt

Natriumazid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat · H ₂ O	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Fa. J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumlauryl-Sulfat	Fa. Fluka / Sigma-Aldrich, Steinheim
o-Phosphorsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Protein A – Agarose	Immunopure [®] Immobilized Protein A, Fa. Pierce, Rockford II. USA
Protein G - Sepharose - Säule	HiTrap [™] Protein G HP, 1 ml, Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Rinderserumalbumin	Fa. Pierce, Rockford II. USA
Salzsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Stickstoff 4.8	Fa. Westfalen Gas, Münster
Tetramethoxysilan	Fa. Fluka / Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris (hydroxymethyl) - aminoethan	Fa. Merck, Darmstadt

1.4.3 PUFFERLÖSUNGEN UND FLIEßMITTEL

HPLC – Fließmittel	10 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat, 2 mmol/l Heptansulfonsäure, pH 2,5 mit H ₃ PO ₄ einstellen, 5 % bzw. 10 % ACN
Trennpuffer CE	25 mmol/l Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O, 75 mmol/l SDS, pH 9,2 mit Natronlauge einstellen
Extraktionspuffer pH 9,3 für C ₈	Diammoniumhydrogencarbonat 10 mmol/l, pH 9,3 mit verd. Ammoniak einstellen
Phosphate Buffered Saline	8 g NaCl + 1,4 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O + 0,2 g KH ₂ PO ₄ + 0,2 g KCl, (+ 0,2 g NaN ₃) , pH 7,0 - 9,0
Elutionslösung AK – Isolierung	0,1 mol/l Glycin, pH 2,7 mit HCl einst.
Vorlagelösung AK – Isolierung	Mischung aus 0,5 mol/l NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O + 0,5 mol/l Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O, pH 9,0 mit NaOH einstellen
BSA – Lösung 25 % ig	25 mg BSA in 10 ml PBS lösen
Kopplungspuffer CNBr	0,1 mol/l NaHCO ₃ , 0,5 mol/l NaCl, pH 8,3 mit NaOH einstellen
Tris-HCl-Blockierpuffer	0,1 mol/l Tris, pH 8,0 mit HCl einstellen
Tris-HCl-Waschpuffer	0,1 mol/l Tris, 0,5 mol/l NaCl, pH 8,0 mit HCl einstellen

Acetatpuffer	0,1 mol/l Natriumacetat, 0,5 mol/l NaCl, pH 4,0 mit HCl einstellen
Kopplungspuffer Prot. A	12,4 mmol/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8,2 mit NaOH einstellen
Crosslinkerlösung Prot. A	13 mg/ml DSS in DMSO, frisch hergestellt
Ethanolamin-Blockierpuffer	0,1 mol/l Ethanolamin, pH 8,2 mit Ammoniak einstellen
Ethanolamin-Elutionspuffer	0,1 mol/l Ethanolamin, pH 8,2 mit NaOH einstellen
Elutionslösung AK- Extraktion	Methanol + H_2O , 95 + 5

2. ERLÄUTERUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

2.1 ANALYTISCHE KENNGRÖßEN

U	[V]	Spannung
I	[A]	Stromstärke
E	[V/cm]	elektrische Feldstärke
EL	[cm]	effektive Kapillarlänge
GL	[cm]	Gesamt-Kapillarlänge
ID	[μm]	Kapillarinne Durchmesser
OD	[μm]	Kapillaraußendurchmesser
EOF		Elektroosmotischer Fluss
t_M	[min]	Migrationszeit
R_S		Auflösung
λ_{Em}	[nm]	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	[nm]	Anregungswellenlänge
SPR	[kHz]	sample payback rate, Ausleserate

2.2 STATISTISCHE KENNGRÖßEN UND FORMELN

n Anzahl der Messwerte

AVG Mittelwert

R² Korrelationskoeffizient

RSD relative Standardabweichung

LOD Detektionsgrenze

LOQ Bestimmungsgrenze

Präzision VK

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{V}}$$

$$\text{mit } s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n_i - 1)}}$$

Richtigkeit R

$$R [\%] = \frac{\bar{V} - V_{Soll}}{V_{Soll}} \cdot 100$$

2.3 ABKÜRZUNGEN

ACN	Acetonitril
CCD-Kamera	charged coupled device-Kamera
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CGE	Kapillargelelektrophorese
CI	chemical ionization mode
CITP	Kapillarisotachophorese
CPA	korrigierte Peakfläche
CPA-ratio	Verhältnis der CPA zwischen Analyt und IS
cw	continuous wave
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAD	Dioden-Array-Detektor
EEG	Elektroenzephalogramm
EI	electron impact mode

GC	Gaschromatographie
Hg-Xe-Lampe	Quecksilber-Xenon-Lampe
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IS	interner Standard
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
M	Morphin
M3G	Morphin- β -3-D-glucuronid
M6G	Morphin- β -6-D-glucuronid
6-MAM	6-Monoacetylmorphin
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
n. a.	nicht auswertbar
n. b.	nicht bestimmt
n. n.	nicht nachweisbar
NAPG-3	N-(3-Aminopropyl)-normorphin-3- β -D-gucuronid

Nd: YAG- Laser	Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
RIA	Radioimmunoassay
RP	reversed phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	solid phase extraction
Ti:SA-Laser	Titan-Saphir- Laser
UV	Spektralbereich des ultravioletten Lichts
VIS	Spektralbereich des sichtbaren Lichts

3 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT FLUORESZENZDETEKTION

3.1 VERBESSERUNG DER FLUORESZENZAUSBEUTE

Um eine optimale Ausbeute der Fluoreszenz zu erreichen, wurden Anregungs- und Emissionsmaxima ermittelt. Es wurden Lösungen in Fließmittel von M, M3G bzw. M6G, $c = 10 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

3.2 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT FLUORESZENZDETEKTION

Die HPLC-Trennung von Morphin, M3G und M6G wurde mit einer Ionenpaar-Chromatographie an einer RP-Phase mit anschließender Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN:

System	Hewlett Packard 1090 Series II mit Hitachi Merck F-1050 Fluoreszenzdetektor
Detektion	Fluoreszenzdetektion, $\lambda_{\text{Ex}} = 235 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 245 \text{ nm}$
Stationäre Phase	LiCrospher 60-RP-select B (5 μm , 250x 4 mm)
Mobile Phase	10 mM KH_2PO_4 , 2 mM Heptansulfonsäure pH 2,5 + ACN 95 + 5
Flussrate	1,5 ml/min
Säulenthermostat	45 °C
Injektionsvolumen	20 μl

3.2.1 FESTPHASENEXTRAKTION VON M, M3G UND M6G AUS BLUT

C₈-EXTRAKTIONSPROTOKOLL:

Festphase	Reserp™ C ₈ , 1 ml, 100 mg				
Puffer	(NH ₄) ₂ CO ₃ 0,01 mol/l, pH 9,3				
Konditionierung	<table> <tr> <td>1 ml MeOH</td> <td rowspan="3">} 2 x</td> </tr> <tr> <td>1 ml H₂O</td> </tr> <tr> <td>1 ml Puffer</td> </tr> </table>	1 ml MeOH	} 2 x	1 ml H ₂ O	1 ml Puffer
1 ml MeOH	} 2 x				
1 ml H ₂ O					
1 ml Puffer					
Probenvorbereitung	0,5 ml Blut + 2 ml Puffer (Vortex)				
	5 min zentrifugieren (14.000 g)				
Extraktion	Überstand auf C ₈ - Säule geben				
	Waschen: 2 ml Puffer				
	Trocknen: 5 min Vakuum				
	Elution: 2 x 1 ml MeOH				
	Einengen im N ₂ - Strom, 40 °C				
Aufnehmen	100 µl HPLC- Fließmittel				
Analytik	HPLC / Fluoreszenzdetektion, s. Kap. 3.1				

3.2.2 VALIDIERUNG DER HPLC-BESTIMMUNG VON M, M3G UND M6G IN BLUT NACH FESTPHASENEXTRAKTION

Für die Validierung der Festphasenextraktion von M, M3G und M6G mit anschließender HPLC- Quantifizierung wurden Blutproben mit M, M3G und M6G versetzt. Die Extraktion erfolgte wie in Kap. 3.2.1 beschrieben und die Analytik per HPLC-Fluoreszenzdetektion wie in Kap. 3.2 aufgeführt.

3.2.2.1 SPEZIFITÄT

Die Spezifität der Methode wurde durch Aufarbeitung von 5 Leerblutproben verschiedener Personen, die mit gespikten Blutproben (je Analyt 250 ng/ml Blut) verglichen wurden, ermittelt.

3.2.2.2 WIEDERFINDUNG

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten nach Extraktion wurden jeweils drei Blutproben in vier Konzentrationen mit M, M3G und M6G versetzt und untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 2-4 dargestellt.

Tab. 2: Messwerte zur Wiederfindung von M
(Standardlösungen bzw. Extrakte aus Blut)

Morphin (n = 3)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG Peakfl.	RSD [%]	AVG Peakfl.	RSD [%]
50	6018,7	0,16	3528,1	2,81
250	32966,7	0,11	22014,0	1,96
500	66651,7	0,06	43525,3	3,50
1000	134021,7	0,06	85189,5	0,87
Kalibriergerade	y = 133,81x + 20,93		y = 85,634x + 13,02	
Korrelationskoeff.	R ² = 0,9999		R ² = 0,9997	

Wiederfindung: 64,0 %

Tab. 3: Messwerte zur Wiederfindung von M3G
(Standardlösungen bzw. Extrakte aus Blut)

M3G (n = 3)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG Peakfl.	RSD [%]	AVG Peakfl.	RSD [%]
50	8664,8	0,41	4171,5	5,26
250	40218,8	0,24	22890,2	1,28
500	79661,3	0,81	43696,0	2,00
1000	158546,3	0,54	(43776,4	12,57)
Kalibriergerade	$y = 158,82x + 7,763$		$y = 88,161x + 10,54$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 0,9999$		$R^2 = 0,9992$	

Wiederfindung: 55,5 %

Tab. 4: Messwerte zur Wiederfindung von M6G
(Standardlösungen bzw. Extrakte aus Blut)

M6G (n = 3)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG Peakfl.	RSD [%]	AVG Peakfl.	RSD [%]
50	5621,5	1,28	3971,1	6,94
250	28611,3	1,16	15209,0	4,55
500	56718,8	0,84	26995,8	3,11
1000	112933,8	0,64	25006,8	7,33
Kalibriergerade	$y = 112,94x + 120,1$		$y = 55,328x + 88,13$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 1$		$R^2 = 0,9921$	

Wiederfindung: 49,0 %

3.2.2.3 LINEARITÄT

Es wurde über 5 Kalibrationsstufen kalibriert. Pro Kalibrationsstufe wurden je 2 gespikete Leerblutproben (0,5 ml Blut) extrahiert und analysiert. Die Messwerte sind in Tab.5 dargestellt.

Tab. 5: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

	Morphin		M3G		M6G	
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2
25	2354	2628	2504	2212	1632	1578
50	4773	4146	4076	4399	3113	3056
100	8449	9106	8876	9319	5876	6232
250	22588	20897	22635	23447	14832	13964
500	42434	45150	46364	43768	28775	29988
Kalib.gerade	$y = 87,24x + 94,72$		$y = 90,45x + 22,28$		$y = 58,37x + 87,66$	
Korr.koeff.	$R^2 = 0,9999$		$R^2 = 0,9998$		$R^2 = 0,9998$	

3.2.2.4 PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

Drei Kalibrationsstufen wurden an 3 aufeinander folgenden Tagen je 3 x aufgearbeitet und analysiert. Aus den Einzelmessungen eines jeden Tages wurden die Intraday-Werte für Präzision und Richtigkeit berechnet, aus den Mittelwerten der Tage 1-3 wurden Interday-Präzision und Interday-Richtigkeit ermittelt (Tab. 6 - 8).

Tab. 6: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von Morphin

Morphin							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
50 ng/ml	1 (n=3)	54,53	49,2	57,6	56,8	109,1%	8,5%
	2 (n=3)	49,13	46,8	48,6	52,0	98,3%	5,3%
	3 (n=3)	45,17	47,8	39,4	48,3	90,3%	8,3%
		Interday 49,61				Interday 99,2%	Interday 9,5%
250 ng/ml	1 (n=3)	227,10	251,2	217,1	213,0	90,8%	9,2%
	2 (n=3)	234,73	238,9	254,2	211,1	93,9%	9,3%
	3 (n=3)	232,63	262,3	215,9	219,7	93,1%	9,1%
		Interday 231,49				Interday 92,6%	Interday 1,7%
500 ng/ml	1 (n=3)	505,43	533,8	492,6	489,9	99,6%	2,2%
	2 (n=3)	495,53	499,9	486,0	500,7	99,1%	1,7%
	3 (n=3)	472,93	474,8	472,1	471,9	94,6%	0,3%
		Interday 491,30				Interday 98,3%	Interday 3,4%

Tab. 7: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von M3G

M3G							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
50 ng/ml	1 (n=3)	45,90	48,5	43,7	45,5	91,8%	5,2%
	2 (n=3)	50,33	55,3	47,6	48,1	100,7%	8,5%
	3 (n=3)	45,37	47,5	42,9	45,7	90,7%	5,1%
		Interday 47,20				Interday 94,4%	Interday 5,8%
250 ng/ml	1 (n=3)	324,70	285,9	383,5	304,7	109,9%	3,9%
	2 (n=3)	317,49	282,4	361,7	308,3	107,7%	4,5%
	3 (n=3)	250,83	242,1	274,6	235,8	100,3%	8,3%
		Interday 297,67				Interday 106,0%	Interday 4,7%
500 ng/ml	1 (n=3)	473,43	467,2	499,8	453,3	91,5%	5,0%
	2 (n=3)	441,40	461,7	451,7	410,8	95,3%	2,4%
	3 (n=3)	510,57	534,1	497,4	500,2	98,6%	4,0%
		Interday 475,14				Interday 97,4%	Interday 4,2%

Tab. 8: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von M6G

M6G							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
50 ng/ml	1 (n=3)	53,10	56,6	48,0	54,7	106,2%	8,6%
	2 (n=3)	45,93	43,0	49,9	44,9	91,8%	7,8%
	3 (n=3)	48,43	42,9	47,8	54,6	96,8%	5,9%
		Interday 48,79				Interday 98,3%	Interday 3,6%
250 ng/ml	1 (n=3)	251,60	232,6	250,3	271,9	100,6%	7,8%
	2 (n=3)	251,57	235,2	254,7	264,8	96,6%	6,0%
	3 (n=3)	225,87	199,8	236,7	241,1	90,3%	10,0%
		Interday 243,01				Interday 95,9%	Interday 6,1%
500 ng/ml	1 (n=3)	542,50	541,2	537,6	548,7	108,5%	6,7%
	2 (n=3)	501,77	502,5	512,8	490,0	100,4%	2,3%
	3 (n=3)	484,77	490,3	497,5	466,5	96,9%	3,3%
		Interday 509,68				Interday 101,9%	Interday 5,8%

3.2.2.5 BESTIMMUNGSGRENZE

Die Bestimmungsgrenze für M, M3G und M6G lag bei 50 ng/ml Blut für jeden der drei Analyten.

3.2.2.6 NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze für M, M3G und M6G lag bei 10 ng/ml Blut für jeden der drei Analyten.

3.3 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT LASER-INDUZIERTER FLUORESZENZDETEKTION

3.3.1 FLUORESZENZEIGENSCHAFTEN VON M, M3G UND M6G

In einem Fluoreszenzspektrometer wurden Lösungen von M, M3G und M6G in HPLC-Fließmittel sowie das reine Fließmittel mit Licht der Wellenlängen $\lambda = 244 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 266 \text{ nm}$ bestrahlt und die Fluoreszenzspektren aufgenommen. Es wurden Lösungen von $10 \mu\text{g/ml}$ Analyt in Fließmittel für die Messungen eingesetzt.

3.3.2 HPLC-LIF BEI ANREGUNG DURCH $\lambda_{\text{EX}} = 266 \text{ nm}$

Die HPLC-Trennmethode von M, M3G und M6G nach Kap. 3.2 wurde auf das HPLC-LIF-System in leicht modifizierter Form übertragen. Da kein Säulentermostat zur Verfügung stand, wurde bei Raumtemperatur ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) gearbeitet und zur Verkürzung der Retentionszeiten der ACN-Anteil im Fließmittel erhöht. Die Anregung zur Fluoreszenz erfolgte bei $\lambda_{\text{EX}} = 266 \text{ nm}$ mit einer Laserleistung von ca. 6 mW .

Zur Detektion wurde die im Wellenlängenbereich $342 \text{ nm} - 367 \text{ nm}$ auftretende Fluoreszenz aufsummiert und als Gesamtfluoreszenzintensität dargestellt.

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN:

System	Pharmacia LKB HPLC Pump 2248 LKB Low Pressure Mixer Inert Sample Injector
Stationäre Phase	LiCrospher 60-RP-selectB (5 µm, 250 x 4 mm)
Mobile Phase	10 mM KH ₂ PO ₄ , 2 mM Heptansulfonsäure pH 2,5 + ACN 90 + 10
Flussrate	1,5 ml/min
Säulenthermostat	20 °C
Injektionsvolumen	Probenschleife 50 µl
Anregung	Nano UV TM 266 nm, 6 mW, JDS Uniphase (Nd: YAG-Laser)
Detektion	ausgewerteter Wellenlängenbereich $\lambda_{Em} = 342 \text{ nm} - 367 \text{ nm}$

3.3.2.1 SPEZIFITÄT

Die Spezifität wurde durch Messung einer wässrigen Standardlösung, die je 300 ng/ml M, M3G und M6G enthielt, sowie einer Leerprobe ermittelt.

3.3.2.2 LINEARITÄT

Es wurden wässrige Standardlösungen in 4 Konzentrationsstufen injiziert. Pro Kalibrationsstufe wurden je 2 Proben analysiert. Die Messwerte sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

	Morphin		M3G		M6G	
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2
10	6,1	6,9	14,8	15,0	0,47	1,53
50	25,4	35,0	44,4	53,6	5,7	7,2
100	70,7	64,1	91,3	102,0	14,9	15,9
300	190,5	185,8	288,4	294,0	39,3	41,7
Kalib.gerade	$y = 0,6283x + 0,6589$		$y = 0,9563x - 0,2008$		$y = 0,136x + 0,1634$	
Korr.koeff.	$R^2 = 0,9991$		$R^2 = 0,9989$		$R^2 = 0,9970$	

3.3.2.3 DETEKTIONSGRENZE

Die Detektionsgrenze in wässrigen Standardlösungen lag für M6G bei 10 ng/ml, für M und M3G bei ca. 5 ng/ml.

3.3.3 HPLC-LIF BEI ANREGUNG DURCH $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$

Die HPLC-Trennmethode von M, M3G und M6G nach 3.3.2 wurde mit einem Ti:SA-Laser kombiniert, der 244 nm mit einer Leistung von 50 mW emittierte. Das Injektionsvolumen von 50 μl wurde beibehalten.

Zur Detektion wurde die im Wellenlängenbereich 332 nm – 362 nm auftretende Fluoreszenz aufsummiert und als Gesamtfluoreszenzintensität dargestellt.

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN:

System, Stationäre Phase, Mobile Phase, Flussrate, Säulenthermostat, Injektionsvolumen: s. Kap. 3.3.2.

Anregung	Tsunami, Ti:SA-Laser, Fa. Spectra 244 nm, 50 mW (cw)
Detektion	ausgewerteter Wellenlängenbereich $\lambda_{Em} = 332 \text{ nm} - 362 \text{ nm}$

Es wurden wässrige Standardlösungen vermessen.

3.3.3.1 SPEZIFITÄT

Die Spezifität wurde durch Messung einer wässrigen Standardlösung, die je 100 ng/ml M, M3G und M6G enthielt, sowie einer Leerprobe ermittelt. Es traten keine Störpeaks auf.

3.3.3.2 LINEARITÄT

Es wurden wässrige Standardlösungen in 5 Konzentrationsstufen injiziert. Pro Kalibrationsstufe wurden je 2 Proben analysiert (Tab. 10).

Tab. 10: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

Konz. [ng/ml]	Morphin		M3G		M6G	
	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2
2	n.n.	n.n.	3605	4178	n.n.	n.n.
10	14767	14058	16310	19310	5296	5542
50	75228	78846	95877	99881	28008	26181
100	144114	163630	180696	165618	51791	55544
300	429045	438990	4098047	529347	147755	152082
Kalib.gerade	$y = 1456,6x + 312,15$		$y = 1677,6x - 688,17$		$y = 503,78x + 138,81$	
Korr.koeff.	$R^2 = 0,9993$		$R^2 = 0,9983$		$R^2 = 0,9990$	

3.3.3.3 DETEKTIONSGRENZE

Die Detektionsgrenze in wässrigen Standardlösungen lag für M und M6G bei 10 ng/ml, für M3G bei 2 ng/ml. Die Analyten konnten bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 noch detektiert werden.

3.3.3.4 EIGENFLUORESZENZ DER DURCHFLUSSZELLE

Das Fluoreszenzspektrum der Durchflusszelle wurde bei Anregung durch $\lambda_{Ex} = 244 \text{ nm} / 50 \text{ mW}$ durch die CCD-Kamera aufgenommen. Die gesamte Spektralinformation wurde über den Wellenlängenbereich $\lambda_{Em} = 225 \text{ nm} - 425 \text{ nm}$ aufgenommen, die Aufsummierung für die graphische Darstellung erfolgte über den Wellenlängenbereich $\lambda_{Em} = 332 \text{ nm} - 362 \text{ nm}$.

3.4 VERGLEICH DES HPLC-LIF-SYSTEMS ($\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm}$) mit dem HPLC-Fluoreszenzdetektor

Verdünnungsreihen wurden an den in Tab. 11 dargestellten Systemen parallel analysiert. Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf Linearität und Nachweisgrenze geprüft.

Tab. 11: Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Bedingungen bei HPLC-Fluoreszenzdetektion und HPLC-LIF

	HPLC – Fluoreszenzdetektion	HPLC – LIF - System
Stationäre Phase	LiChrospher 60-RP-select B (5 μm , 250 x 4 mm)	LiChrospher 60-RP-select B (5 μm , 250 x 4 mm)
Mobile Phase	10 mM KH_2PO_4 , 2 mM Heptansulfonsäure pH 2,5 + ACN 95+5	10 mM KH_2PO_4 , 2 mM Heptansulfonsäure pH 2,5 + ACN 90+10
Flussrate	1,5 ml/min	1,5 ml/min
Säulentemperatur	45 °C	20 °C
Injektionsvolumen	20 μl	20 μl
UV-Quelle	Hg-Xe-Lampe $\lambda_{\text{EX}} = \text{ca. } 235 \text{ nm}$	Ti:SA-Laser, $\lambda_{\text{EX}} = 244 \text{ nm (cw), } 50 \text{ mW}$
Detektion	$\lambda_{\text{EM}} = \text{ca. } 345 \text{ nm}$ Agilent ChemStation for LC	$\lambda_{\text{EM}} = 332 \text{ nm-}362 \text{ nm}$ Davis 6.2

3.4.1 LINEARITÄT

Zur Bestimmung der Linearität wurden wässrige Standardlösungen in 6 Konzentrationsstufen vermessen. Pro Kalibrationsstufe wurden je 3 Proben analysiert. Die Messwerte sind in den Tab. 12 und 13 dargestellt.

Tab. 12: Messwerte zur Linearität von M, M3G, M6G: Fluoreszenzdetektor ($\lambda_{\text{Ex}} = 235 \text{ nm}$)

Morphin				
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	RSD [%]
5	2943	2287	2676	12,51
10	6585	6462	6653	1,474
25	12319	11209	13527	9,38
50	26328	24750	29061	8,16
100	54530	56273	57669	2,80
250	142675	142537	140652	0,79
Kalib.gerade Korr.koeff.	$y = 556,45x - 55,47$ $R^2 = 0,9994$			

M3G				
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	RSD [%]
5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	5381	5228	6012	7,95
25	11187	12173	12077	4,60
50	20929	18471	21523	7,96
100	41017	42580	40365	2,75
250	103193	96772	99037	3,21
Kalib.gerade Korr.koeff.	$y = 401,01x + 111,62$ $R^2 = 0,9991$			

M6G				
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	RSD [%]
5	n.n.	n.n.	n.n.	n.a.
10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
25	6021	6617	7111	8,29
50	11382	9953	12100	9,80
100	23151	20133	23594	8,44
250	57937	52658	59093	6,06
Kalib.gerade Korr.koeff.	$y = 225,90x + 19,58$ $R^2 = 0,9995$			

Tab. 13: Messwerte zur Linearität von M, M3G, M6G: LIF-Detektion ($\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$)

Morphin				
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	RSD [%]
5	17,67	20,95	20,36	8,89
10	28,94	28,75	30,19	2,66
25	73,29	71,60	66,03	5,40
50	121,18	128,15	133,71	4,91
100	238,21	242,43	230,40	2,57
250	568,57	555,50	558,17	1,23
Kalib.gerade Korr.koeff.	$y = 2,269x + 1,176$ $R^2 = 0,9977$			

M3G				
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	RSD [%]
5	10,32	11,88	11,96	8,09
10	17,59	20,45	18,13	8,11
25	47,63	52,23	52,74	5,53
50	84,72	83,20	74,86	6,55
100	153,31	162,59	170,04	5,17
250	350,14	371,75	371,33	3,39
Kalib.gerade Korr.koeff.	$y = 1,148x + 0,882$ $R^2 = 0,9957$			

M6G				
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	RSD [%]
5	6,70	7,90	8,03	9,69
10	16,82	14,50	16,51	7,89
25	29,59	25,82	25,83	8,01
50	51,91	53,77	59,37	7,06
100	102,85	104,12	108,44	2,78
250	255,50	242,20	242,89	3,03
Kalib.gerade Korr.koeff.	$y = 0,9795x + 3,8036$ $R^2 = 0,9992$			

3.4.2 DETEKTIONSGRENZE

Die Detektionsgrenzen lagen bei der Fluoreszenzdetektion mit Hg-Xe-Lampe für Morphin bei 5 ng/ml und für M3G bzw. M6G bei 10 ng/ml. Bei der LIF-Detektion lagen die Detektionsgrenzen aller drei Analyten < 5 ng/ml.

4 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT FLUORESZENZDETEKTION

4.1 ABSORPTIONS- UND FLUORESZENZEIGENSCHAFTEN DER ANALYTEN

Lösungen von 10 µg/ml in Laufpuffer pH 9,2 wurden im Spektralfluorimeter mit Licht der Wellenlängen $\lambda = 257$ nm und $\lambda = 244$ nm zur Fluoreszenz angeregt. Die Emissionsspektren zwischen 250 nm und 450 nm wurden aufgenommen. Die Aufnahme des UV-Spektrums erfolgte ebenfalls als Lösung von 10 µg/ml in Laufpuffer.

4.2 METHODENENTWICKLUNG

System	Beckmann P/ACE System 5510
Kapillare	fused silica 50 µm ID, 375 µm OD 40 cm EL, 47 cm GL
Vorspülschritte	3 min 0,1 mol/l NaOH 2 min Laufpuffer
Trennpuffer	25 mmol/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 75 mmol/l SDS, pH 9,2
Probenaufgabe	hydrodynamisch, 5 sec
Spannung	7,5 kV
Temperatur	20 °C
Detektion	UV-Detektion, $\lambda = 200$ nm

M, M3G und M6G wurden unter diesen Bedingungen innerhalb von 8 Minuten getrennt: M3G ($t_M = 2,5$ min), M6G ($t_M = 4,0$ min) und M ($t_M = 7,9$ min).

Für die Entwicklung der Methode wurden Stammlösungen der Analyten M, M3G und M6G $\text{MHCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, M3G und M6G $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ von 1 mg/ml in MeOH+ bidest. H_2O 50+50 hergestellt. Aus diesen wurden Kombistandards hergestellt und mit o. g. MeOH + H_2O - Gemisch die entsprechenden Konzentrationsstufen erreicht.

4.2.1 TRENNPUFFER

Für die Herstellung des Trennpuffers wurden 9,53 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ und 21,62 g SDS in 1 Liter bidestilliertem Wasser gelöst. Vor der Verwendung des Puffers wurde dieser für 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die 0,1 M Natronlauge wurde aus 1 M Natronlauge durch Verdünnung mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

4.2.2 INTERNER STANDARD

Die wässrig-methanolischen Standardlösungen der potentiellen internen Standards hatten eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Tab. 14 führt die Migrationszeiten und Peakformen auf, die mit der unter Kap. 4.2 beschriebenen elektrophoretischen Bedingungen beobachtet wurden.

Tab. 14: Migrations- und Fluoreszenzverhalten der verschiedenen Testverbindungen.

Testverbindung	t_M [min]	Bemerkungen
NAPG-3	2,0	Breiter Peak, Hohe Fluoreszenzintensität
Apomorphin	3,1	Hohe Fluoreszenzintensität
Hydromorphon	n.n.	/
Thebacon	n.n.	/
Levorphanol	n.n.	/
Oxycodon	n.n.	/
Pholcodin	n.n.	/
Naloxon	8,5	Geringe Fluoreszenzintensität
Naltrexon	8,5	Geringe Fluoreszenzintensität
Nalorphin	10,0	Geringe Fluoreszenzintensität
Acetylcodein	14,6	Geringe Fluoreszenzintensität
Hydrocodon	16,5	Geringe Fluoreszenzintensität

4.3 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT UV-DETEKTION

Die Trennung von M, M3G und M6G wurde unter den Bedingungen wie in Kap. 4.2 beschrieben durchgeführt.

4.3.1 LINEARITÄT

Wässrig-methanolische Standardlösungen in 5 Konzentrationsstufen wurden injiziert. Pro Kalibrationsstufe wurden je zwei Proben analysiert.

Tab. 15: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

	Morphin		M3G		M6G	
Konz. [µg/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2
1	7757	8461	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
5	45139	43206	22467	22250	19914	19542
10	86613	90781	45935	42035	39988	41181
25	211532	221372	109338	115338	106972	98455
50	428045	438990	222677	225668	199840	205826
Kalib.gerade	$y = 8663,8x + 407,34$		$y = 4440,8x + 66,53$		$y = 4067,3x - 20,58$	
Korr.koeff.	$R^2 = 1$		$R^2 = 0,9998$		$R^2 = 0,9999$	

4.3.2 DETEKTIONSGRENZE

Für M lag die Detektionsgrenze bei 1 µg/ml, für M3G und M6G bei 5 µg/ml.

4.4 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN MIT LASER-INDUZIERTER FLUOREZENZ-DETEKTION

4.4.1 AUFBAU DES DETEKTIONSSYSTEMS

System	SpectraPHORESIS 100 CE System, Thermo Separation Products, Fa. ThermoQuest Analytische Systeme
Laser	Laser Lexel 95 SHG, 257 nm bzw. 244 nm, 50 bzw. 100 mW, (Ar-Ionen-cw-Laser), Lexel Laser, Fa. Polytec
CCD-Kamera	Imager, La Vision Biotec
Spektrometer	Multispec 77417, Oriel, Fa. L.O.T.-Oriel
Probenaufgabe	hydrodynamisch 5 s (Vakuum an Outlet-Seite)
Kapillare	Beckman, eCAP Capillary Tubing, fused-silica, unbehandelte Oberfläche, 50 µm ID, 375 µm AD 55 cm EL, 75 cm GL
Kapillarkühlung	Luftkühlung durch Ventilator, T= 20 °C
Spannung	angelegte Spannung: 20 kV Effektive Spannung: 266 V/cm
Puffer	100 mmol/l Borat, 75 mmol/l SDS, pH 9,2
Spülschritte	2 min 0,1 mol/l Natronlauge 3 min Puffer
Datenverarbeitung	Davis 6.2, Fa. LaVision Mathcad 7, Mathsoft Inc. Origin 6.1G, Origin Lab Corp.

4.5 ANREGUNG ZUR FLUORESZENZ BEI $\lambda_{\text{Ex}} = 257 \text{ NM}$

Die CE-Trennmethode für M, M3G und M6G nach 4.3 wurde leicht modifiziert auf das CE-LIF-System übertragen. Aufgrund der längeren Kapillare und der kühleren Außentemperatur wurde die angelegte Spannung erhöht. Aus dem bei $\lambda = 257 \text{ nm}$ angeregten Gesamtfluoreszenzspektrum wurde der Wellenlängenbereich zwischen 325 nm und 400 nm ausgewertet.

Für den internen Standard Hydromorphon wurden Fluoreszenzspektren im Spektrometer aus einer Lösung von 10 $\mu\text{g/ml}$ Hydromorphon in Trennpuffer erstellt.

4.5.1 LINEARITÄT

Wässrig-methanolische Standardlösungen in 6 Konzentrationen wurden injiziert. Pro Kalibrationsstufe wurden je 2 Proben analysiert. Die integrierten Flächen der einzelnen Messungen und die daraus resultierenden Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten sind in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 16: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

	Morphin		M3G		M6G	
Konz. [ng/ml]	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2	Fläche 1	Fläche 2
100	n.n.	n.n.	16,9	20,0	n.n.	n.n.
500	65,2	61,4	134,2	126,9	115,1	109,1
1000	129,0	120,9	276,1	266,8	198,3	220,5
2500	325,0	307,8	655,6	671,8	545,3	559,0
5000	620,9	614,2	1249,3	1350,2	1091,8	1127,18
Kalib.gerade	$y = 0,1247x + 1,0393$		$y = 0,2609x + 1,6166$		$y = 0,2212x + 0,2247$	
Korr.koeff.	$R^2 = 0,9992$		$R^2 = 0,9998$		$R^2 = 0,9993$	

4.5.2 DETEKTIONSGRENZE

Bei einer Analyse wie unter 4.4 beschrieben konnten in einer wässrig-methanolischen Standardlösung noch je 500 ng/ml M bzw. M6G und 100 ng/ml M3G detektiert werden.

4.5.3 SPEZIFITÄT

Es wurden 3 Leerblutproben und drei mit je 10 µg/ml M, M3G und M6G versetzte Blutproben wie unter 3.2 beschrieben aufgearbeitet und per CE-LIF wie unter 4.4 analysiert.

4.5.4 NACHWEISGRENZE

In gespikten Blutproben konnten 100 ng/g M3G und 500 ng/g M bzw. M6G nachgewiesen werden.

4.5.5 URINPROBEN

Elektropherogramme von Leerurin und mit je 2 µg/ml M, M3G und M6G gespiktem Urin wurden aufgenommen und die auftretende Fluoreszenz wurde im spektralen Detektionsbereich $\lambda_{Em} = 325 \text{ nm} - 400 \text{ nm}$ detektiert.

4.6 ANREGUNG ZUR FLUORESZENZ BEI $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$

Wie in Kap. 4.5 wurde die CE-Trennmethode nach 4.3 leicht modifiziert übernommen. Aus dem bei $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ hervorgerufenen Fluoreszenzspektrum wurde der Bereich zwischen 325 nm und 350 nm ausgewertet.

4.6.1 INTERNER STANDARD

Apomorphin zeigte eine sehr starke Fluoreszenz bei der Anregung durch $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$. Die Endkonzentration in der gemessenen Lösung betrug 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Apomorphin und je 10 $\mu\text{g/ml}$ M, M3G und M6G (Abb.54).

4.6.2 VALIDIERUNG

Für die Validierung der CE-LIF-Quantifizierung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 244 \text{ nm}$ von M, M3G und M6G in Vollblutextrakten nach Festphasenextraktion wurden Blutproben mit den Analyten versetzt, wie in Kap. 4.2.4 beschrieben extrahiert und nach Zugabe des internen Standards zum Extrakt wie in Kap. 4.4.1 beschrieben analysiert.

4.6.2.1 SPEZIFITÄT

10 Leerblutproben verschiedener Personen sowie mit je M, M3G und M6G 100 ng/ml versetzte Blutproben wurden parallel aufgearbeitet, mit dem internen Standard Apomorphin versetzt (Endkonzentration Apomorphin: 125 ng/ml) und analysiert.

4.6.2.2 WIEDERFINDUNG

Blutproben wurden mit je drei verschiedenen Konzentrationen der Analyten versetzt (25, 100, 250 ng/ml Blut). Die Zugabe des IS erfolgte nach der Aufarbeitung mit einer Endkonzentration von 125 ng/ml Apomorphin. Es wurden je Konzentrationsstufe drei Blutproben extrahiert und analysiert. Parallel wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich zwischen je 10 ng/ml und je 500 ng/ml aufgearbeitet. Die Wiederfindung wurde aus dem Vergleich der CPA-ratio zwischen Analyt und IS ermittelt. Die einzelnen Wiederfindungsraten nach Extraktion von M und Morphinglucuroniden aus Blut sind in den Tab. 17 - 19 dargestellt.

Tab. 17: Messwerte zur Wiederfindung von M
(Standardlösung bzw. Extraktion aus Vollblut)

Morphin (n = 3)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG	RSD [%]	AVG	RSD [%]
25	-	-	0,5477	2,28
50	1,8688	3,32	-	-
100	3,3713	2,51	1,9720	1,28
250	8,4445	0,88	5,1092	1,88
500	17,015	0,72	-	-
Kalibrationsgerade	y = 0,0337x + 0,0646		y = 0,0199x + 0,0158	
Korrelationskoeff.	R ² = 0,9997		R ² = 0,9997	

Wiederfindung: 59,1 %

Tab. 18: Messwerte zur Wiederfindung von M3G
(Standardlösung bzw. Extraktion aus Vollblut)

M3G (n = 3)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG	RSD [%]	AVG	RSD [%]
10	0,8094	1,77	-	-
25	-	-	1,5814	3,42
50	4,0782	4,30	-	-
100	8,7908	2,78	5,7850	4,01
250	22,963	1,62	15,386	1,24
500	46,746	1,23	-	-
Kalibrationsgerade	$y = 0,0939x - 0,336$		$y = 0,0614x - 0,0688$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 0,9998$		$R^2 = 0,9992$	

Wiederfindung: 65,4 %

Tab. 19: Messwerte zur Wiederfindung von M6G
(Standardlösung bzw. Extraktion aus Vollblut)

M6G (n = 3)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG	RSD [%]	AVG	RSD [%]
10	0,5221	6,84	-	-
25	-	-	0,7027	1,41
50	2,1979	8,77	-	-
100	4,9080	4,06	2,8180	0,71
250	10,862	2,83	6,7042	7,79
500	22,230	2,19	-	-
Kalibrationsgerade	$y = 0,0442x + 0,0899$		$y = 0,0268x + 0,0456$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 0,9993$		$R^2 = 0,9995$	

Wiederfindung: 60,6 %

4.6.2.3 LINEARITÄT

Es wurde über 4 Kalibrationsstufen kalibriert. Pro Kalibrationsstufe wurden je 2 mit der jeweiligen Analytmenge versetzte Leerblutproben (500 µl Blut) extrahiert und analysiert. Die ermittelten CPA-Ratios und die daraus resultierenden Gleichungen für die Kalibrationsgeraden sowie die Korrelationskoeffizienten sind in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

	Morphin		M3G		M6G	
Konz. [ng/ml]	CPA 1	CPA 2	CPA 1	CPA 2	CPA 1	CPA 2
25	0,5194	0,5393	1,6156	1,6097	0,7109	0,7056
50	0,9935	1,0828	3,0277	3,1902	1,4994	1,4080
100	2,0010	1,9608	5,9981	5,8189	2,8317	2,8273
250	5,1731	4,9989	15,225	15,337	7,2784	6,5789
Kalib.gerade	$y = 0,0203x + 0,0036$		$y = 0,0609x + 0,0081$		$y = 0,0277x + 0,0325$	
Korr.koeff.	$R^2 = 0,9998$		$R^2 = 0,9997$		$R^2 = 0,9999$	

4.6.2.4 PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

Drei Kalibrationsstufen wurden an 3 aufeinander folgenden Tagen je 3 x aufgearbeitet und analysiert. Aus den Einzelmessungen eines jeden Tages wurden die Intraday-Werte für Präzision und Richtigkeit berechnet, aus den Mittelwerten der Tage 1 - 3 wurden Interday-Präzision und Interday-Richtigkeit ermittelt (Tab. 21 - 23).

Tab. 21: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von Morphin

Morphin							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG Gem. 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
25	1 (n=3)	25,07	25,7	23,2	26,3	100,3%	6,5%
	2 (n=3)	25,87	24,5	26,3	26,8	103,5%	4,7%
	3 (n=3)	23,93	22,8	24,2	24,8	95,7%	2,3%
		Interday 24,96				Interday 99,8%	Interday 3,9%
100	1 (n=3)	92,57	92,3	89,7	95,7	92,3%	3,3%
	2 (n=3)	94,00	95,8	94,2	92,0	94,0%	2,0%
	3 (n=3)	91,80	91,6	90,2	93,6	91,8%	1,9%
		Interday 92,79				Interday 90,6%	Interday 2,8%
250	1 (n=3)	240,83	242,6	238,7	241,2	96,3%	0,8%
	2 (n=3)	239,60	235,7	242,0	241,1	95,8%	1,4%
	3 (n=3)	238,63	235,2	239,9	240,8	95,5%	1,3%
		Interday 239,69				Interday 95,9%	Interday 0,5%

Tab. 22: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von M3G

M3G							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG Gem.1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
25	1 (n=3)	23,90	22,6	24,8	24,3	95,6%	4,8%
	2 (n=3)	22,03	21,2	21,8	23,1	91,1%	4,4%
	3 (n=3)	24,57	24,5	25,2	24,0	98,3%	2,5%
		Interday 23,50				Interday 94,0%	Interday 5,0%
100	1 (n=3)	94,97	96,7	95,9	92,3	95,0%	2,5%
	2 (n=3)	92,90	90,8	94,2	93,7	92,9%	2,0%
	3 (n=3)	90,80	89,8	91,1	91,5	90,8%	1,0%
		Interday 92,89				Interday 92,9%	Interday 2,2%
250	1 (n=3)	228,83	228,2	227,0	231,3	91,5%	1,0%
	2 (n=3)	236,13	233,0	240,1	235,3	94,4%	3,2%
	3 (n=3)	236,50	237,6	231,9	240,0	94,6%	1,8%
		Interday 233,82				Interday 93,5%	Interday 1,8%

Tab. 23: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von M6G

M6G							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG Gem. 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
25	1 (n=3)	24,07	25,4	22,8	24,0	96,3%	5,7%
	2 (n=3)	21,07	20,7	21,3	21,2	90,3%	1,5%
	3 (n=3)	23,40	23,4	22,6	24,2	93,6%	3,4%
		Interday 22,84				Interday 91,4%	Interday 6,9%
100	1 (n=3)	98,67	95,8	101,3	98,9	98,7%	2,8%
	2 (n=3)	101,97	97,7	103,0	105,2	102,0%	3,8%
	3 (n=3)	94,97	93,3	97,2	94,4	95,0%	2,1%
		Interday 98,53				Interday 98,5%	Interday 3,6%
250	1 (n=3)	231,90	226,1	234,7	234,9	92,8%	2,2%
	2 (n=3)	228,57	229,1	231,0	225,6	91,4%	1,2%
	3 (n=3)	227,73	231,8	226,6	224,8	91,1%	1,6%
		Interday 229,40				Interday 91,8%	Interday 1,0%

4.6.2.5 BESTIMMUNGSGRENZE

Die Bestimmungsgrenze für M, M3G und M6G lag bei 25 ng/ml Blut für jeden der drei Analyten. Diese Konzentration erfüllt bei allen drei Analyten die Akzeptanzkriterien in Bezug auf Präzision und Richtigkeit [90].

4.6.2.6 NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze für M und M6G lag bei 10 ng/ml Blut und für M3G bei 5 ng/ml Blut. Diese Konzentration konnte noch mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 detektiert werden.

4.6.3 APPLIKATION – FORENSISCHE FÄLLE

Von vier Heroinkonsumenten mit tödlich verlaufenen Heroinintoxikationen wurde parallel Blut aufgearbeitet und per CE – LIF analysiert. Die ermittelten Gehalte für M, M3G und M6G wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit einer alternativen GC/MS-Methode ermittelt worden waren. Tab. 24 zeigt vergleichend die Konzentrationen von Morphin und Metaboliten, die in den Blutproben durch CE – LIF und GC / MS gefunden wurden. Die quantitative Analyse von M, M3G und M6G durch CE - LIF zeigt eine akzeptable Übereinstimmung mit den GC / MS – Ergebnissen für freies und gebundenes Morphin.

Tab. 24: Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden in Blut von Heroinkonsumenten mit tödlich verlaufenen Intoxikationen.

Fall Nr.	Gefundene Konz. HPLC-Fluoreszenz				Gefundene Konz. GC / MS	
	M [ng/ml Bl.]	M3G [ng/ml Bl.]	M6G [ng/ml Bl.]	Σ geb. M ¹ [ng/ml Bl.]	Freies M [ng/ml Bl.]	Gebundenes M ² [ng/ml Bl.]
1	194	96	45	87	188	94
2	106	73	20	58	68	88
3	451	72	19	56	441	63
4	311	117	23	87	285	127

M¹: Summe der Morphinglucuronide, berechnet als Morphin

M²: berechnet aus Gesamtmorphin – Freies Morphin

5 ANTIKÖRPERGESTÜTZTE FESTPHASENEXTRAKTION VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN

5.1 REINIGUNG DER ROHANTIKÖRPERSEREN

Je Antiserum wurde ein Volumen von 10 ml aufgearbeitet.

5.1.1 REINIGUNGSSCHRITTE

Die Verdünnung des Rohantiserums mit PBS auf pH 7,4 erfolgte im Verhältnis 1:1 auf ein Endvolumen von je 20 ml in einem Reagenzglas mit Stopfen. Bei einer Temperatur von 4 °C erfolgte langsame Rotation im Überkopfschüttler um die Längsachse.

Zentrifugation erfolgte 15 min bei 10 x g. Der Überstand wurde in eine Spritze aufgezogen und über einen nicht sterilen Celluloseacetat-Filter mit 0,45 µm Porenweite und Glasfaservorfilter filtriert.

Zur Gewinnung der Antikörperfraktionen wurde je Antiserum eine vorgepackte Protein G–Sepharose–Säule mit 1 ml Volumen eingesetzt. Die Bindungskapazität für IgG betrug mindestens 25 mg/ml Gel. Die Säulen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min betrieben. In 1 ml – Fraktionen wurde durch photometrische Messungen bei 280 nm der Verlauf der Extraktion überwacht.

EXTRAKTIONSPROTOKOLL:

Festphase	Hi Trap Protein G HP, 1 ml
Puffer	PBS pH 7,4, Na-Azid-frei
Konditionierung	10 ml Puffer
Probenvorbereitung	Rohserum, gepuffert, zentrifugiert und filtriert
Extraktion	Rohserum in 2 ml-Portionen auf Säule geben Waschen: 10 ml Puffer Elution: 5 x 1 ml 0,1 mol/l Glycin / HCl pH 2,7 Vorlage: 250 µl 0,5 mol/l Vorlagelsg. pH 9,0
Konditionierung	10 ml Puffer
Kontrolle der Fraktionen	Photometer, $\lambda = 280 \text{ nm}$

Zur Aufkonzentrierung gering konzentrierter Antikörperfraktionen wurden diese der Extraktion ein zweites Mal unterworfen.

Jeder Antikörperfraktion wurden langsam und unter Rühren 0,4 ml einer Lösung von 25 mg BSA/10 ml PBS zugefügt. Es folgten 12 Stunden Inkubation bei 4 °C bei langsamer Überkopfrotation. Das Präzipitat wurde 30 min x 30 g abzentrifugiert und verworfen.

Für die Dialyse wurde je Antiserum ein ca. 20 cm langes Stück Dialyseschlauch 1 h in PBS (0,02 % Na-Azid) eingeweicht und anschließend mit dem entsprechenden Antiserum gefüllt. Die Dialyse erfolgte für 48 h gegen PBS (0,02% Na-Azid) bei 4 °C.

Erhaltene Endvolumina nach diesem Schritt:

Anti-M:	22,5 ml
Anti-M3G:	36,0 ml
Anti-M6G:	50,0 ml.

5.1.2 PROTEINBESTIMMUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPERFRAKTIONEN

Der Proteingehalt wurde mit einem Bicinchoninicinsäure-Test ermittelt. In einem 20 ml-Reagenzglas wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 0,1 ml Proteinhaltige Lösung (Kalibrator, Probe, PBS, H₂O)
+ 2,0 ml Cu(II)-Sulfat-Reagenz
mischen
- 30 min Inkubation, 37 °C
- Abkühlen auf Raumtemperatur
- Photometrische Absorptionsmessung bei $\lambda = 562$ nm gegen Leerwert

Kalibrationsgerade: Durch Verdünnung von BSA-Stammlösungen (2,0 mg BSA/ml) mit PBS wurden je 2 Kalibrationslösungen der Konzentrationen 1000, 500, 250, 100, 50 und 25 $\mu\text{g/ml}$ sowie eine Leerprobe hergestellt und parallel mit den in den Konzentrationsbereich verdünnten Serumproben zur Bestimmung eingesetzt.

Kalibrationsgerade: $y = 0,0014x + 0,0206$

$$R^2 = 0,9984$$

5.2 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER DURCH KOVALENTE BINDUNG AN CYANBROMID-AKTIVIERTE SEPHAROSE

5.2.1 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER

Drei Gele wurden mit je einem spezifischen Antiserum hergestellt. Die für die Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose eingesetzten Mengen an aufgereinigten Antiseren sind aus Tab. 25 ersichtlich.

Tab. 25: Kopplungsverhältnisse bei CNBr-aktivierter Sepharose.

	M	M3G	M6G
V gereinigtes Serum [ml]	5	6,25	8,35
Enth. Menge IgG [mg]	25	25	25
V CNBr-aktiv. Sepharose-Gel [ml]	10	10	10

Bei der Kopplung wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

VORBEREITUNG DES GELS:

Das als Lyophilisat vorliegende Gel wurde in 0,1 mmol/l HCl suspendiert und zum Quellen bei 4 °C gelagert. Aus 1 g eingewogenem Lyophilisat entstanden ca. 3 ml Gel. Anschließend wurde das Gel 15 Minuten lang mit 0,1 mmol/l HCl gewaschen. Bei diesem Vorgang wurden Additive aus dem Gel entfernt.

VORBEREITUNG DES LIGANDEN:

Das Antiserum wurde in Kopplungspuffer (pH 8,4) suspendiert.

KOPPLUNG:

Das gequollene und gewaschene Gel wurde zusammen mit dem gepufferten Antiserum für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Reaktionsgefäß durch langsame Rotation vermischt. Anschließend wurde das beladene Gel auf einem Glasfiltertiegel G3 abgesaugt und mit 5 x 10 ml Kopplungspuffer gewaschen.

BLOCKIEREN AKTIVER GRUPPEN:

Überschüssige, nicht besetzte aktive Gruppen im Gel wurden durch 0,1 mol/l Tris-HCl-Blockierpuffer (pH 8,0) blockiert, indem das Gel in diesem Puffer 2 Stunden inkubiert wurde.

WASCHEN UND AUFBEWAHREN:

Das Gel wurde auf einem Glasfiltertiegel G3 abgesaugt und 3 x abwechselnd mit 0,1 mol/l Acetatlösung (pH 4,0) und 0,1 mol/l Tris-HCl-Waschpuffer (pH 8,0) gewaschen. Zur Aufbewahrung wurde das Gel in PBS/NaN₃ überführt.

Für die Proteinbestimmung zur Ermittlung der Kopplungseffizienz wurden der unverdünnte Ablauf und das unverdünnte Waschwasser eingesetzt.

5.2.2 EXTRAKTION VON M, M3G UND M6G MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Aus dem unter 5.3.1 hergestellten Immunoadsorber wurden je 6 Säulen mit je 1 ml Kopplungsprodukt hergestellt. Das Gel wurde in 2 ml-PE-Säulen mit Fritte gefüllt, welche mit einem Teflonhahn versehen waren und mit einem Gummistopfen verschlossen werden konnten. Für die Bestimmung der Kapazitäten bei den pH-Werten 7, 8 und 9 wurden je 2 Säulen eingesetzt.

Die Extraktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Konditionieren der Säulen mit PBS (pH 7 bzw. pH 8 oder pH 9)
 - 50 ng Analyt in 1 ml PBS auf die Säule geben.
Säule verschließen und 20 Minuten langsam rotierend im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.
 - Säule leer laufen lassen, Ablauf zur Analytik einsetzen.
 - Waschen mit 2 x 1 ml PBS, Waschwasser zur Analytik einsetzen.
 - Säule mit 1 ml H₂O waschen.
 - Elution: 5 x 1 ml MeOH/H₂O, je 20 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler
 - Eindampfen der vereinigten Eluate unter N₂ bei 60 °C
 - Aufnehmen in HPLC-Fließmittel
- } 8 x

Die Regeneration der Säulen erfolgte durch Spülen mit PBS.

5.2.2.1 BESTIMMUNG DER KAPAZITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN

In Doppelbestimmungen wurden die Säulen je 8 x mit 1 ml einer 50 ng/ml PBS-Lösung beladen und anschließend mit einem MeOH/H₂O –Gemisch 95 + 5 eluiert.

Tab. 26 zeigt die Ergebnisse für die Kapazität und die Wiederfindung der Extraktionen abhängig von den pH-Werten bei der Anbindung.

Tab. 26: Kapazität und Wiederfindung bei verschiedenen pH-Werten.

		M	M3G	M6G
pH 7	Σ Beladung	100 ng / 100 ng	250 ng / 250 ng	200 ng / 200 ng
	Eluat	62 ng / 52 ng	84 ng / 73 ng	162 ng / 191 ng
	Wiederfindung	62 % / 52 %	33 % / 29 %	81 % / 96 %
pH 8	Σ Beladung	200ng / 200 ng	400 ng / 400 ng	400 ng / 400 ng
	Eluat	187 ng / 187 ng	357 ng / 331 ng	415 ng / 446 ng
	Wiederfindung	94 % / 94 %	89 % / 82 %	103 % / 111 %
pH 9	Σ Beladung	100 ng / 150 ng	100 ng / 100 ng	100 ng / 100 ng
	Eluat	37 ng / 44 ng	54 ng / 55 ng	23 ng / 23 ng
	Wiederfindung	37 % / 44 %	54 % / 55 %	23 % / 23 %

5.2.2.2 BESTIMMUNG DER WIEDERVERWENDBARKEIT BEI PH 8

In Doppelbestimmungen wurde die Extraktion nach 5.3.2 je 30 x mit 1 ml einer 100 ng/ml PBS-Lösung durchgeführt. Die Kapazitäten wurden ermittelt, indem der Durchlauf und die Waschlösungen zur Analytik per HPLC-Fluoreszenzdetektion eingesetzt und mit Standardlösungen der Analyten in PBS verglichen wurden. Die Wiederfindung wurde ermittelt, indem die vereinigten Eluate eingedampft und in 1 ml PBS wieder aufgenommen wurden. Sie wurden zur HPLC-Fluoreszenzdetektion eingesetzt und mit PBS-Standardlösungen der Analyten verglichen.

Tab. 27- 29 zeigen die Ergebnisse für die Kapazität und die Wiederfindung der 30 Extraktionen für die drei Immunoadsorber.

Tab. 27: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M

M – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	100 / 100	57 / 53
2	100 / 100	56 / 58
3	100 / 100	59 / 55
4	100 / 100	52 / 59
5	91 / 91	62 / 63
6	89 / 100	63 / 70
7	100 / 100	55 / 53
8	93 / 100	71 / 69
9	88 / 89	63 / 57
10	81 / 91	59 / 60
11	89 / 89	63 / 61
12	85 / 83	72 / 63
13	87 / 86	70 / 71
14	78 / 81	42 / 64
15	88 / 85	55 / 54
16	72 / 72	47 / 61
17	85 / 78	45 / 79
18	80 / 76	79 / 62
19	90 / 89	62 / 85
20	69 / 79	86 / 85
21	92 / 100	66 / 77
22	87 / 92	61 / 67
23	81 / 84	63 / 60
24	92 / 91	52 / 40
25	86 / 87	35 / 59
26	100 / 100	61 / 57
27	73 / 72	58 / 72
28	83 / 84	46 / 65
29	73 / 87	55 / 45
30	90 / 93	21 / 20

Tab28: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M3G

M3G – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]	
1	}	104 / 103	
2		97 / 97	
3		103 / 108	
4		92 / 94	
5		100 / 92	
6		Ex. Nr. 1-12:	95 / 86
7		100 / 100	94 / 85
8			86 / 90
9			90 / 84
10			97 / 86
11			89 / 92
12			93 / 86
13	92 / 100	87 / 84	
14	}	101 / 93	
15		Ex. Nr. 14-17:	95 / 85
16		100 / 100	89 / 84
17			77 / 91
18	100 / 93	73 / 76	
19	}	81 / 83	
20			87 / 77
21			77 / 86
22			79 / 86
23			91 / 90
24		Ex. Nr. 19-30:	97 / 98
25		100 / 100	84 / 89
26			79 / 71
27			74 / 96
28			82 / 55
29			86 / 60
30		96 / 74	

Tab. 29: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M6G

M6G – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]	
1	}	89 / 76	
2		94 / 106	
3		97 / 97	
4		128 / 102	
5		110 / 120	
6		133 / 105	
7		124 / 136	
8		118 / 120	
9		116 / 112	
10		117 / 139	
11		110 / 119	
12		103 / 124	
13		99 / 92	
14		114 / 106	
15		Ex. Nr. 1-30: 100 / 100	77 / 104
16			90 / 106
17			85 / 69
18			72 / 116
19			101 / 84
20			79 / 108
21			76 / 75
22			118 / 103
23			88 / 74
24			73 / 78
25			90 / 95
26			51 / 57
27			58 / 59
28			88 / 88
29			73 / 62
30			69 / 55

5.3 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER DURCH AUSRICHTUNG AN PROTEIN A UND CROSSLINKING

5.3.1 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER

Drei Gele wurden mit je einem spezifischen Antiserum hergestellt. Die für die Kopplung an Protein A – Agarose eingesetzten Mengen an aufgereinigten Antiseren sind aus Tab. 30 ersichtlich.

Tab. 30: Kopplungsverhältnisse bei Ausrichtung und Crosslinking der Antikörper an Protein A – Agarose.

	M	M3G	M6G
V gereinigtes Serum [ml]	3	3,75	5
Enth. Menge IgG [mg]	15	15	15
V CNBr-aktiv. Sepharose-Gel [ml]	2	2	2

Bei der Kopplung wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

VORBEREITUNG DES GELS:

Die Gelaufschlammung wurde bei Raumtemperatur mit dem 6- fachen Volumen 50 mmol/l Boratpuffer pH 8,2 gewaschen und dabei von Additiven bereit.

VORBEREITUNG DES LIGANDEN:

Das Aliquot des Antiserums wurde in 50 mmol/l Boratpuffer pH 8,2 suspendiert.

KOPPLUNG / AUSRICHTUNG:

Das gewaschene Gel wurde zusammen mit dem gepufferten Antiserum für 8 Stunden bei 4 °C in einem geschlossenen Reaktionsgefäß durch langsame Rotation um die Längsachse inkubiert. Nach dem Abfließen der überschüssigen Antikörperlösung über einen Glasfiltertiegel G3 wurde das Gel mit 50 mmol/l Boratpuffer pH 8,2 (5-faches Gelvolumen) gewaschen.

CROSSLINKING:

Eine frisch hergestellte Lösung von 13 mg/ml DSS in DMSO wurde zu dem mit PBS pH 7,2 gewaschenen Gel gegeben. Es erfolgte 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur unter langsamem Rotieren um die Längsachse. Nach dem Ablassen der DSS-Lösung durch einen Glasfiltertiegel G3 wurde das Gel nochmals mit PBS pH 7,2 gewaschen.

BLOCKIEREN AKTIVER GRUPPEN:

Zum Blockieren aminoreaktiver Gruppen wurde das Gel mit 0,1 mol/l Ethanolamin-Puffer pH 8,2 (Blockierpuffer) gewaschen. Zur Entfernung immobilisierter Antikörper, die nicht durch Crosslinken kovalent gebunden wurden, behandelte man das Gel mit 0,1 mol/l Ethanolamin-Puffer pH 2,8 (Elutionspuffer).

WASCHEN UND AUFBEWAHREN:

Das Gel wurde mit 50 mmol/l Boratpuffer pH 8,2 gewaschen. Zur Aufbewahrung wurde das Gel in PBS/ NaN_3 überführt.

Für die Proteinbestimmung zur Ermittlung der Kopplungseffizienz wurden die zur Kopplung eingesetzte Antikörperlösung, der Ablauf nach der Kopplung und die verschiedenen Waschwässer eingesetzt und die ermittelten Proteingehalte in Relation gesetzt (Tab. 31).

Tab. 31: Ergebnisse der Proteinbestimmung zur Ermittlung der Proteinbeladung und der Kopplungsraten.

	M	M3G	M6G
inges. Menge IgG/ Säule	7,5 mg	7,5 mg	7,5 mg
DL IgG/Säule Σ (Ablauf Koppl. + Waschw.)	2,8 mg	4,1 mg	2,7 mg
Auf Säule verbl. Menge IgG	4,7 mg	3,4 mg	4,8 mg

5.3.2 EXTRAKTION VON M, M3G UND M6G MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Aus dem unter 5.2.1 hergestellten Immunoadsorber wurden je 2 Säulen mit je 1 ml Kopplungsprodukt hergestellt. Das Gel wurde in 2 ml-PE-Säulen mit Fritte gefüllt, welche mit einem Teflonhahn versehen waren und mit einem Gummistopfen verschlossen werden konnten. Diese Säulen wurden für die Bestimmung der Kapazitäten bei den pH-Werten 7, 8 und 9 eingesetzt. Die Extraktion wurde nach demselben Schema wie unter 5.2.2 durchgeführt.

5.3.2.1 BESTIMMUNG DER KAPAZITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN pH-WERTEN

Die Säulen wurden je 6 x mit 1 ml einer 50 ng/ml PBS-Lösung des jeweiligen Analyten beladen und mit MeOH/H₂O (95 + 5) eluiert.

Tab. 32 zeigt die Ergebnisse für die Kapazität und die Wiederfindung der Extraktionen bei den verschiedenen pH-Werten der Anbindung.

Tab. 32: Kapazität und Wiederfindung bei verschiedenen pH-Werten.

		M	M3G	M6G
pH 7	Σ Beladung	100 ng / 150 ng	250 ng / 250 ng	n.n.
	Eluat	19 ng / 25 ng	282 ng / 288 ng	n.n.
	Wiederfindung	19 % / 17 %	112 % / 115 %	n.a.
pH 8	Σ Beladung	50ng / 50 ng	250 ng / 250 ng	250 ng / 250 ng
	Eluat	40 ng / 35 ng	182 ng / 200 ng	186 ng / 146 ng
	Wiederfindung	80 % / 70 %	73 % / 80 %	74 % / 58 %
pH 9	Σ Beladung	100 ng / 100 ng	250 ng / 250 ng	n.n.
	Eluat	24 ng / 13 ng	317 ng / 291 ng	n.n.
	Wiederfindung	24 % / 13 %	127 % / 116 %	n.a.

5.3.2.2 BESTIMMUNG DER WIEDERVERWENDBARKEIT BEI PH 8

Die Extraktion bei pH 8 nach 5.3.2 wurde je 12 x mit je 1 ml einer 100 ng/ml -Lösung des jeweiligen Analyten in PBS durchgeführt. Die Kapazitäten wurden ermittelt, indem der Durchlauf und die Waschlösungen zur Analytik per HPLC-Fluoreszenzdetektion eingesetzt und mit Standardlösungen der Analyten in PBS verglichen wurden. Die vereinigten Eluate wurden in 1 ml PBS aufgenommen und zur Ermittlung der Wiederfindung per HPLC vermessen. Tab. 33 - 35 zeigen die Ergebnisse für die Kapazität und die Wiederfindung der 12 Extraktionen für die drei Immunoadsorber.

Tab. 33: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M

M – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	81 / 87	77 / 79
2	65 / 71	78 / 75
3	84 / 89	67 / 49
4	80 / 83	58 / 53
5	83 / 82	36 / 53
6	60 / 53	61 / 44
7	52 / 61	35 / 30
8	71 / 65	55 / 32
9	62 / 72	45 / 33
10	49 / 49	51 / 47
11	73 / 52	41 / 50
12	42 / 35	50 / 31

Tab. 34: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M3G

M3G – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	} Ex. Nr. 1-6: 100 / 100	98 / 97
2		83 / 100
3		93 / 93
4		76 / 66
5		85 / 84
6		109 / 101
7	98 / 100	113 / 109
8	} Ex. Nr. 8-12: 100 / 100	74 / 111
9		76 / 83
10		60 / 67
11		70 / 97
12		89 / 88

Tab. 35: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M6G

M6G – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	100 / 100	84 / 109
2	100 / 100	78 / 67
3	100 / 100	89 / 94
4	77 / 87	74 / 58
5	100 / 91	47 / 45
6	92 / 84	45 / 38
7	74 / 86	42 / 33
8	81 / 65	65 / 45
9	77 / 83	81 / 64
10	74 / 72	76 / 68
11	100 / 100	40 / 55
12	71 / 66	77 / 83

5.4 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER DURCH DEN EINSCHLUSS IN SOL-GEL

5.4.1 IMMOBILISIERUNG DER ANTIKÖRPER

Drei Gele wurden mit je einem spezifischen Antiserum hergestellt. Die für Einschluss in Sol-Gel eingesetzten Mengen an aufgereinigten Antiseren sind aus Tab. 36 ersichtlich.

Tab. 36: Kopplungsverhältnisse bei Einschluss der Antikörper in Sol-Gel.

	M	M3G	M6G
V gereinigtes Serum	1,6 ml	2 ml	2,66 ml
IgG abs.	8 mg	8 mg	8 mg
V Silica-Sol	3 ml	3 ml	3 ml
V Sol-Gel	2 ml	2 ml	2 ml

Die eingesetzten IgG-Mengen wurden vollständig immobilisiert. Proteinbestimmungen in ablaufenden und überstehenden Flüssigkeiten ergaben ein negatives Ergebnis.

Bei der Kopplung wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

VORBEREITUNG DES SILICA-SOLS / HYDROLYSE:

Für ca. 2 ml Gel wurden pro Ansatz unter Eiskühlung 0,4 ml 0,04 mol/l HCl mit 1,5 ml H₂O und 6,8 ml TMOS verrührt und 30 min im Ultraschallbad vermischt.

VORBEREITUNG DES LIGANDEN:

Das Aliquot des Antiserums wurde in PBS pH 7 suspendiert und im Eisbad gekühlt.

EINSCHLUSS DES LIGANDEN / POLYMERISATIONSREAKTION:

Gleiche Aliquots von Silica-Sol und Antikörpersuspension wurden gemischt und sofort in eine Kristallisierschale gegossen. Die gelierende Masse wurde gewogen und unter Parafilm bei 4 °C aufbewahrt, bis ein Gewichtsverlust von 50 % eingetreten war. Eventuell entstehende, überstehende Flüssigkeit wurde während des Alterungsprozesses regelmäßig mit einer Pipette abgesaugt.

FERTIGSTELLUNG:

Das entstandene Xerogel wird gemörsert. Je Säule werden 0,64 g gemörsertes Material eingewogen und in PBS pH 7,0 aufgeschlämmt.

AUFBEWAHREN:

Zur Aufbewahrung wurde das Gel in PBS/NaN₃ überführt.

5.4.2 EXTRAKTION VON M, M3G UND M6G MIT IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERN

Die unter 5.4.1 hergestellten Immunoadsorber wurden in PE-Säulen mit je 1 ml Kopplungsprodukt überführt. Es wurden je Immunoadsorber 2 Säulen hergestellt. Die 2 ml-PE-Säulen waren mit einer Fritte und einem Teflonhahn versehen und konnten mit einem Gummistopfen verschlossen werden. Diese Säulen wurden für die Bestimmung der Kapazitäten bei den pH-Werten 7, 8 und 9 eingesetzt.

Die Extraktion wurde nach dem modifizierten Schema wie unter 5.2.2 durchgeführt:

- Konditionieren der Säulen mit PBS (pH 7 bzw. pH 8 oder pH 9)
 - 50 ng Analyt in 1 ml PBS auf die Säule geben.
Säule verschließen und 20 Minuten langsam rotierend im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.
 - Säule leer laufen lassen, Ablauf zur Analytik einsetzen.
 - Waschen mit 2 x 1 ml PBS, Waschwasser zur Analytik einsetzen.
 - Säule mit 1 ml H₂O waschen.
 - Säule mit 0,5 ml Aceton/H₂O 95+5 waschen
 - Elution: 5 x 1 ml MeOH/H₂O 95+5, je 20 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler
 - Eindampfen der vereinigten Eluate unter N₂ bei 60 °C
 - Aufnehmen in HPLC-Fließmittel
- } 6 - 10 x

Die Regeneration der Säulen erfolgte durch Spülen mit PBS.

5.4.2.1 BESTIMMUNG DER KAPAZITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN pH-WERTEN

Die Säulen wurden je 6 - 10 x mit 1 ml einer 50 ng/ml PBS-Lösung des jeweiligen Analyten beladen und nach Waschschritten mit PBS, H₂O und Aceton + H₂O (95 + 5) mit MeOH + H₂O (95 + 5) eluiert.

Tab. 37 zeigt die Ergebnisse für die Kapazität und die Wiederfindung der Extraktionen bei den verschiedenen pH-Werten der Anbindung an die mit den verschiedenen Antikörpern hergestellten Sol-Gele.

Tab. 37: Kapazität und Wiederfindung bei verschiedenen pH-Werten.

		M	M3G	M6G
pH 7	Σ Beladung	300 ng / 300 ng	150 ng / 150 ng	250 ng / 250 ng
	Eluat	213 ng / 192 ng	156 ng / 131 ng	75 ng / 66 ng
	Wiederfindung	71 % / 64 %	104 % / 87 %	30 % / 26 %
pH 8	Σ Beladung	500 ng / 500 ng	450 ng / 450 ng	400 ng / 400 ng
	Eluat	337 ng / 306 ng	311 ng / 292 ng	220 ng / 208 ng
	Wiederfindung	67 % / 61 %	69 % / 65 %	55 % / 52 %
pH 9	Σ Beladung	300 ng / 300 ng	250 ng / 250 ng	250 ng / 250 ng
	Eluat	198 ng / 197 ng	181 ng / 184 ng	102 ng / 104 ng
	Wiederfindung	66 % / 66 %	72 % / 74 %	44 % / 44 %.

5.4.2.2 BESTIMMUNG DER WIEDERVERWENDBARKEIT BEI PH 8

Die Extraktion nach 5.4.2 wurde für jedes der drei hergestellten Sol-Gele 18 x mit je 1 ml einer 100 ng/ml -Lösung des jeweiligen Analyten in PBS pH 8 durchgeführt. Die Kapazitäten und Wiederfindungsraten wurden per HPLC ermittelt, zu der ablaufende Lösungen bzw. Eluate eingesetzt wurden. Für die Extraktionen aus gespiktem und mit PBS pH 8 gepuffertem Blut wurde nur die jeweilige Wiederfindungsrate bestimmt, da der Durchlauf und die ablaufenden Waschlösungen zu stark durch die Matrix belastet waren und daher nicht zur HPLC eingesetzt werden konnten.

Tab. 38 - 43 zeigen die Ergebnisse für die Kapazitäten und die Wiederfindungsraten der 18 Extraktionen aus Standardlösungen sowie die ermittelten Wiederfindungsraten der 6 Wiederholungen bei der Extraktion aus gespikten Blutproben.

Tab. 38: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M

M – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	} Ex. Nr. 1-18: 100 / 100	63 / 63
2		80 / 77
3		71 / 79
4		81 / 76
5		79 / 86
6		75 / 88
7		95 / 76
8		71 / 90
9		77 / 80
10		71 / 70
11		76 / 83
12		87 / 101
13		78 / 90
14		81 / 80
15		100 / 99
16		87 / 95
17		81 / 93
18		86 / 84

Tab. 39: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M aus Vollblut

M – Extraktion Nr.	Wiederfindung [%]
1	81 / 96
2	71 / 84
3	54 / 50
4	56 / 59
5	33 / 35
6	27 / 29

Tab. 40: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M3G

M3G – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	} Ex. Nr. 1-18: 100 / 100	88 / 91
2		84 / 76
3		75 / 90
4		62 / 69
5		61 / 63
6		76 / 77
7		66 / 65
8		65 / 78
9		66 / 83
10		71 / 88
11		77 / 73
12		83 / 86
13		87 / 70
14		87 / 84
15		65 / 68
16		77 / 66
17		65 / 67
18		67 / 65

Tab. 41: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M3G aus Vollblut

M3G – Extraktion Nr.	Wiederfindung [%]
1	44 / 43
2	35 / 31
3	21 / 23
4	20 / 22
5	11 / 11
6	6 / 9

Tab. 42: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M6G

M6G – Extraktion Nr.	Kapazität [ng/Säule]	Wiederfindung [%]
1	} Ex. Nr. 1-18: 100 / 100	69 / 62
2		55 / 56
3		63 / 65
4		58 / 61
5		51 / 52
6		63 / 65
7		74 / 70
8		52 / 50
9		56 / 73
10		66 / 75
11		65 / 69
12		64 / 73
13		71 / 75
14		70 / 62
15		70 / 77
16		78 / 61
17		63 / 64
18		67 / 73

Tab. 43: Messwerte zur Wiederverwendbarkeit der Extraktion von M6G aus Vollblut

M6G – Extraktion Nr.	Wiederfindung [%]
1	76 / 72
2	43 / 44
3	18 / 19
4	25 / 17
5	8 / 4
6	6 / 5

5.4.3 VALIDIERUNG DER HPLC - BESTIMMUNG VON MORPHIN UND MORPHINGLUCURONIDEN IN BLUT NACH ANTIKÖRPERGESTÜTZTER EXTRAKTION AN SOL-GEL

Für die Validierung der antikörpergestützten Festphasenextraktion von M, M3G und M6G mit anschließender HPLC - Quantifizierung wurden Blutproben mit M, M3G und M6G gespikt, wie unter 5.4.3.1 beschrieben extrahiert und per HPLC nach 3.1 quantifiziert.

5.4.3.1 HERSTELLUNG DER IMMUNOADSORBER UND EXTRAKTION

Die Herstellung der Immunoadsorber erfolgte nach dem Schema in 5.4.1. Tab. 44 zeigt die eingesetzten Mengen und Kopplungsverhältnisse von Silica-Sol und Antikörperfraktionen.

Tab. 44: Kopplungsverhältnisse bei Einschluss der Antikörper in Sol-Gel.

	M	M3G	M6G
V gereinigtes Serum	5 ml	6,25 ml	8,33 ml
IgG abs.	25 mg	25 mg	25 mg
V Silica-Sol	9 ml	9 ml	9 ml
erhaltene Menge Sol-Gel	13,18 g	13,18 g	12,51 g

Die eingesetzten IgG-Mengen wurden vollständig immobilisiert. Proteinbestimmungen in ablaufenden und überstehenden Flüssigkeiten führten zu einem negativen Ergebnis.

Die Extraktion wurde wie folgt durchgeführt:

- Vorbehandlung der Blutproben / Methanolfällung:
150 µl Blut + 100 µl H₂O + 100 µl MeOH vermischen (Vortex)
10 min Ultraschallbad
1 ml PBS pH 8 zufügen
10 min zentrifugieren (8000 x g)
Überstand zur Extraktion einsetzen.
- Konditionieren der Säulen mit PBS pH 8
- Überstand der Methanolfällung auf die Säule geben.
Säule verschließen und 30 Minuten langsam rotierend im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.
- Waschen mit 4 x 1 ml PBS
- Waschen mit 0,5 ml H₂O
- Waschen mit 0,5 ml Aceton/H₂O 95+5
- Elution: 6 x 1 ml MeOH/H₂O 95+5, je 20 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler
- Eindampfen der vereinigten Eluate unter N₂ bei 50 °C
- Aufnehmen in ACN-freiem HPLC-Fließmittel

5.4.3.2 SPEZIFITÄT

Die Spezifität der Methode wurde durch Aufarbeitung von 6 Leerblutproben verschiedener Personen, die mit je 250 ng/ml M, M3G und M6G versetzt waren, verglichen wurden, ermittelt. Es traten keine störenden Matrixpeaks auf.

5.4.3.3 WIEDERFINDUNG

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten nach Extraktion wurden jeweils 2 gespikte Blutproben in 6 Konzentrationen mit M, M3G und M6G gespikt und untersucht (Tab. 45 - 47).

Tab. 45: Messwerte zur Wiederfindung von M
(Standardlösung bzw. Extraktion aus Vollblut)

Morphin (n = 2)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG	RSD [%]	AVG	RSD [%]
5	1368	1,90	1341	6,49
10	3474	1,70	1752	5,88
25	7946	0,45	3809	2,57
50	15631	0,82	9389	3,53
100	30824	3,59	16153	3,25
250	77820	0,49	35158	2,08
Kalibrationsgerade	$y = 311x + 1,3797$		$y = 144,64x + 84,29$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 0,9999$		$R^2 = 0,9912$	

Wiederfindung: 46,5 %

Tab. 46: Messwerte zur Wiederfindung von M3G
(Standardlösung bzw. Extraktion aus Vollblut)

M3G (n = 2)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG	RSD [%]	AVG	RSD [%]
5	1388	3,31	1445	2,92
10	3159	2,66	2004	4,69
25	6823	2,52	6471	1,26
50	13585	1,27	10991	0,93
100	26346	2,99	22860	1,09
250	65652	1,16	52824	1,66
Kalibrationsgerade	$y = 263,17x + 2,601$		$y = 214,2x + 11,911$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 0,9998$		$R^2 = 0,9981$	

Wiederfindung: 81,4 %

Tab. 47: Messwerte zur Wiederfindung von M6G
(Standardlösung bzw. Extraktion aus Vollblut)

M6G (n = 2)				
Konz. [ng/ml]	Standard – Lösungen		Vollblut – Extrakte	
	AVG	RSD [%]	AVG	RSD [%]
5	849	0,85	n.n.	n.a.
10	1592	3,68	1357	4,00
25	3849	0,36	2213	6,67
50	7249	1,05	4095	8,52
100	14124	2,94	7929	4,99
250	37878	0,74	19253	3,34
Kalibrationsgerade	$y = 149,92x + 10,09$		$y = 77,473x + 30,58$	
Korrelationskoeff.	$R^2 = 0,9991$		$R^2 = 0,9982$	

Wiederfindung: 51,7 %

5.4.3.4 LINEARITÄT

Es wurde über 5 bzw. 6 Kalibrationsstufen kalibriert. Pro Kalibrationsstufe wurden je 3 gespikete Leerblutproben (500 µl Blut) extrahiert und analysiert (Tab. 48).

Tab. 48: Messwerte zur Linearität von M, M3G und M6G

Konz. [ng/ml]	Morphin			M3G			M6G		
	Fläche			Fläche			Fläche		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5	1499	1458	1532	1271	1018	1375	n.n.	n.n.	n.n.
10	1965	1532	1634	2132	2376	2515	1368	1057	1296
25	3564	3292	4047	5996	6457	6054	2013	2574	2480
50	8796	9092	9580	11018	11964	11640	3564	4376	4022
100	16543	15769	18338	24211	23860	25082	7195	7494	8031
250	37428	35158	39017	52548	52133	49199	16842	17605	18610
Kalib.gerade	y = 153,01x + 62,67			y = 211,01x + 87,27			y = 71,635x + 57,29		
Korr.koeff.	R ² = 0,9948			R ² = 0,9932			R ² = 0,9962		

5.4.3.5 PRÄZISION UND RICHTIGKEIT

Drei Kalibrationsstufen wurden an 3 aufeinander folgenden Tagen je 3 x aufgearbeitet und analysiert. Aus den Einzelmessungen eines jeden Tages wurden die intraday-Werte für Präzision und Richtigkeit berechnet, aus den Mittelwerten der Tage 1-3 wurden Interday-Präzision und Interday-Richtigkeit ermittelt (Tab. 49 – 51).

Tab. 49: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von Morphin

Morphin							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG Gem. 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
25 ng/ml	1 (n=3)	25,80	28,2	25,6	23,6	103,2 %	8,9 %
	2 (n=3)	27,43	29,0	28,8	24,5	109,7 %	9,3 %
	3 (n=3)	26,03	26,8	27,2	24,1	104,0 %	6,5 %
		Interday 26,42				Interday 105,6 %	Interday 3,4 %
100 ng/ml	1 (n=3)	101,03	97,2	98,5	107,4	100,9 %	5,7 %
	2 (n=3)	100,13	103,2	98,4	98,8	100,1 %	2,7 %
	3 (n=3)	99,00	106,1	93,2	97,7	99,0 %	6,6 %
		Interday 226,53				Interday 100,0 %	Interday 1,0 %
250 ng/ml	1 (n=3)	255,23	267,9	253,3	244,5	102,1 %	4,6 %
	2 (n=3)	254,87	260,2	243,2	261,2	101,9 %	4,0 %
	3 (n=3)	251,37	246,5	247,2	260,4	100,5 %	3,1 %
		Interday 253,82				Interday 101,5 %	Interday 0,8 %

Tab. 50: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von M3G

M3G							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG Gem.1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
25 ng/ml	1 (n=3)	25,00	27,3	23,8	23,9	100,0 %	8,0 %
	2 (n=3)	24,58	24,9	23,8	25,1	98,3 %	4,5 %
	3 (n=3)	26,20	26,6	26,1	25,9	104,8 %	1,4 %
		Interday 25,26				Interday 101,0 %	Interday 3,3 %
100 ng/ml	1 (n=3)	95,13	92,4	92,3	100,7	95,1 %	5,1 %
	2 (n=3)	97,70	89,9	101,9	101,3	97,7 %	6,9 %
	3 (n=3)	99,83	92,2	109,0	98,3	99,8 %	8,5 %
		Interday 97,56				Interday 97,6 %	Interday 2,4 %
250 ng/ml	1 (n=3)	251,23	248,8	257,0	247,9	100,5 %	2,1 %
	2 (n=3)	250,57	247,6	254,6	249,5	100,2 %	1,4 %
	3 (n=3)	254,67	278,3	230,2	255,5	101,9 %	9,5 %
		Interday 252,16				Interday 100,9 %	Interday 0,9 %

Tab. 51: Validierungsdaten zu Präzision und Richtigkeit von M6G

M6G							
Sollwert [ng/ml]	Tag	AVG Gem. 1-3 [ng/ml]	Gemessen 1 [ng/ml]	Gemessen 2 [ng/ml]	Gemessen 3 [ng/ml]	Richtigkeit Intraday	Präzision Intraday
25 ng/ml	1 (n=3)	26,03	26,1	27,8	24,2	104,1 %	6,9 %
	2 (n=3)	25,97	26,0	27,0	24,9	103,9 %	4,0 %
	3 (n=3)	25,17	24,1	26,6	24,8	100,7 %	5,1 %
		Interday 25,72				Interday 102,9 %	Interday 1,9 %
100 ng/ml	1 (n=3)	100,70	99,3	101,2	101,6	100,7 %	1,2 %
	2 (n=3)	99,63	98,3	100,4	100,2	99,6 %	1,2 %
	3 (n=3)	94,97	97,3	89,6	98,0	95,0 %	4,9 %
		Interday 98,43				Interday 98,4 %	Interday 3,1 %
250 ng/ml	1 (n=3)	246,23	254,5	233,5	250,7	98,5 %	4,5 %
	2 (n=3)	260,13	257,6	248,7	274,1	104,1 %	5,0 %
	3 (n=3)	250,97	244,4	254,8	253,7	100,4 %	2,3 %
		Interday 252,44				Interday 101,0 %	Interday 2,8 %

5.4.3.6 BESTIMMUNGSGRENZE

Die Bestimmungsgrenze für M, M3G und M6G lag bei 25 ng/ml für jeden der drei Analyten.

5.4.3.7 NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze für M, M3G und M6G lag bei 10ng/ml für jeden der drei Analyten.

5.4.4 APPLIKATION – FORENSISCHE FÄLLE

Von 5 Herointoten und 5 lebenden Heroinkonsumenten wurde Blut aufgearbeitet und per HPLC – Fluoreszenzdetektor bzw. GC / MS analysiert. (Tab. 52)

Tab. 52: Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden im Blut von Herointoten und lebenden Heroinkonsumenten.

Fall Nr.	Gefundene Konz. HPLC-Fluoreszenz				Gefundene Konz. GC / MS	
	M [ng/ml Bl.]	M3G [ng/ml Bl.]	M6G [ng/ml Bl.]	Σ geb. M ¹ [ng/ml Bl.]	Freies M [ng/ml Bl.]	Gebundenes M ² [ng/ml Bl.]
Leb. 1	94	141	72	131	108	n.b.
Leb. 2	97	42	n.n.	26	84	n.b.
Leb. 3	153	n.n.	n.n.	-	131	n.b.
Leb. 4	27	70	n.n.	43	35	n.b.
Leb. 5	89	45	26	44	72	n.b.
Leich. 1	121	248	n.n.	153	161	123
Leich. 2	169	186	25	130	188	152
Leich. 3	413	397	132	327	412	308
Leich. 4	646	248	32	173	608	164
Leich. 5	72	304	57	223	81	288

M¹: Summe der Morphinglucuronide, berechnet als Morphin

M²: berechnet aus Gesamtmorphin – Freies Morphin

5.4.5 ANALYTIK VON SOL-GEL-EXTRAKTEN PER HPLC-LIF

Von gespikten Blutproben wurden parallel Sol-Gel-Extrakte per HPLC – Fluoreszenzdetektor bzw. HPLC-LIF analysiert. Es wurden Extrakte der aus mit je 50 ng/ml und je 100 ng/ml versetzten Blutproben analysiert. Tab. 53 zeigt vergleichend die Konzentrationen von Morphin und Metaboliten, die in den Blutproben durch HPLC-Fluoreszenzdetektion und HPLC-LIF gefunden wurden. Die Berechnung erfolgte aus den Peakflächen über die Kalibrationsgeraden für die HPLC-Fluoreszenz- bzw. die HPLC-LIF-Methode (Kap. 3.4).

Tab. 53: Bestimmung von Morphin und Morphinglucuroniden im Blut per HPLC-Fluoreszenz und HPLC-LIF.

zugespikte Konzentration [ng/ml Blut]	Gem. Konzentration HPLC-Fluoreszenzdet. [ng/ml Blut]	Gem. Konzentration HPLC-LIF [ng/ml Blut]
M 50	48	47
M 100	99	102
M3G 50	55	53
M3G 100	110	113
M6G 50	43	58
M6G 100	90	120

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. P. Dörfler, G. Roselt, *Heilpflanzen – Gestern und Heute*, **1990**, Urbania Verlag Leipzig
- [2] United Nations Office of Drugs and Crime, *Weltdrogenbericht UNODC 2001, 2002*
- [3] Th. Geschwinde, *Rauschdrogen: Marktformen und Wirkungsweisen* **3. Aufl. 1996**, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- [4] K. Meyer, *DAZ* **1993**, 50, 85 - 86
- [5] Bundeskriminalamt, *Rauschgiftjahresbericht 1998, 1999*
- [6] A. J. Jenkins, R. M. Keenan, J. E. Henningfield, E. J. Cone, *J. Anal. Toxikol.* **1994**, 18, 317 – 330
- [7] O. H. Drummer, M. Odell, *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, **2001**, Arnold Verlag London New York New Delhi
- [8] C. L. Wright, *J. Pharmacol. Exp.* **1942**, 75, 328 - 337
- [9] G. R. Nakamura, J. L. Thornton, T. T. Noguchi, *J. Chromatogr.* **1975**, 110, 81 - 89
- [10] D. A. Smith, W. J. Cole, *Biochem. Pharmacol.* **1976**, 25, 367 - 370
- [11] O. Lockridge, N. Mottershaw-Jackson, H. W. Eckerson, B. N. Ladu, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1980**, 215, 1 - 8
- [12] C. Popa, O. Beck, K. Brodin, *J. Anal. Tox.* **1998**, 22, 142 - 147
- [13] Randall, Baselt, *Disposition of toxic drugs and chemicals in man* **1978**, Biomedical Publications Canzon, Connecticut, USA
- [14] Boerner, S. Abbott, R. L. Roe, *Drug Metab. Rev.* **1975**, 4, 39 - 73
- [15] S. F. Brunk, M. Delle, *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, 16, 51 - 57

-
- [16] H. H. Wellhöner, *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie* **6. Auflage 1997**, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- [17] Goodman, Gilman, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* **1996**, Mc Graw Hill New York
- [18] G. Di Chiara, R. A. North, *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, 13 (5), 185 - 193
- [19] W. L. Way, H. L. Fields, E. L. Way, in : B. G. Katzung, *Basic and clinical pharmacology* **7. Auflage 1998**, Prentice Hall International New Jersey
- [20] B. Geraghty, E. A. Graham, B. Logan, E. L. Weiss, *J. Hum. Lact.* **1997**, 13(3), 227 - 230
- [21] A. J. Rutenber, K. D. Kalter, P. Santinga, *Addiction* **1996**, 91(2), 1765 - 1772
- [22] J. Manzanares, J. Corchero, J. Romero, J. J. Fernandez – Ruiz, J. A. Ramos, J. A. Fuentes, *TIPS* **1999**, 20, 287 - 293
- [23] N. Rietbrock, A. H. Staib, D. Loew, *Klinische Pharmakologie* **2. Auflage 1994**, Steinkopff Verlag Darmstadt
- [24] R. Callaghan, J. R. Riordan, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16059 - 16064
- [25] I. Meinecke, S. Freudenthaler, U. Hofmann, E. Schaeffeler, G. Mikus, M. Schwab, H. W. Prange, C. H. Gleiter, J. Brockmöller, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, 54, 592 - 603
- [26] R. T. Penson, S. P. Joel, K. Bakshi, S. J. Clark, R. M. Langford, M. L. Slevin, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 68, 667 - 676
- [27] M. T. Smith, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, 27, 524 - 528
- [28] C. Motamed, X. Mazoit, K. Ghanouchi et al., *Anesthesiology* **2000**, 92, 355 - 360
- [29] J. Lötsch, M. Weiss, G. Kobal, G. Geisslinger, *Clin. Pharmacol. Ther.* **1998**, 63, 629 - 639

-
- [30] D. Grace, J. P. Fee, *Anesth. Analg.* **1996**, *83*, 1055 - 1059
- [31] R. Osborne, P. Thompson, S. Joel, D. Trew, N. Patel, M. Slevin, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *34*, 130 – 138
- [32] M. H. Hanna, S. J. Peat, M. Woodham, A. Knibb, C. Fung, *British Journal of Anaesthesia* **1990**, *64*, 547 - 550
- [33] D. Grace, J. P. H. Fee, *Anaesthesia and Analgesia* **1996**, *83*, 1055 - 1059
- [34] G. W. Pasternack, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 67 – 70
- [35] C. Cann, J. Curran, T. Milner, B. Ho, *Anaesthesia* **2002**, *57*, 1195 – 1212
- [36] R. Osborne, S. Joel, D. Trew, M. Slevin, *Lancet* **1988**, *i*, 828
- [37] P. I. Thompson, S. P. Joel, L. John, J. A. Wedzicha, M. Maclean, M. Slevin, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1995**, *40*, 145 - 152
- [38] J. Lötsch, G. Kobal, A. Stockmann, K. Brune, G. Geisslinger, *Anesthesiology* **1997**, *87*, 1348 - 1358
- [38a] M. H. Hanna, S. J. Peat, A. A. Knibb, C. Fung, *British Journal of Anaesthesia* **1991**, *66*, 103 - 107
- [39] S. J. Peat, M. H. Hanna, M. Woodham, A. A. Knibb, J. Ponte, *Pain* **1991**, *45*, 101 - 104
- [40] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 7. Auflage* **1996**, Spektrum akadem. Verlag
- [41] G. R. Nakamura, E. L. Way, *Analyt. Chem.* **1975**, *47*, 775 - 778
- [42] D. A. Smith, W. J. Cole, *J. Chromatogr.* **1975**, *105*, 377 - 381
- [43] S. Felby, *Forens. Sci. Int.* **1979**, *13*, 145 - 150
- [44] J. J. Saady, *J. Anal. Toxicol.* **1982**, *6*, 235 - 237
- [45] H. H. Maurer, C. F. Fritz, *Drug Res.* **1990**, *40*, 564 - 566

-
- [46] D. H. Catlin, R. C. Kammerer, C. K. Hatton, M. H. Sekera, J. L. Merdink, *Clin. Chem.* **1987**, 33, 319 - 327
- [47] J. Fehn, G. Megges, *J. Anal. Toxicol.* **1985**, 9, 134 - 138
- [48] C. Kollia-Baker, R. Sams, *J. Anal. Toxicol.* **2002**, 26, 81 - 86
- [49] J. Jones, K. Tomlinson, C. Moore, *J. Anal. Toxicol.* **2002**, 26, 171 - 175
- [50] K. Pflieger, H. H. Maurer, A. Weber, *Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites, part 1* **2. Auflage 1992**, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim Germany
- [51] H. J. Leis, G. Fauler, G. Raspotnig, W. Windischhofer, *J. Chromatogr. B* **2000**, 744, 113 - 119
- [52] J. O. Svensson, A. Rane, J. Säwe, F. Sjöqvist, *J. Chromatogr.* **1982**, 30, 427 - 432
- [53] R. W. Milne, R. L. Nation, G. D. Reynolds, A. A. Somogyi, J. T. V. Crugten, *J. Chromatogr.* **1991**, 565, 457 - 464
- [54] G. Cari, A. Gulati, R. Bhat, I. R. Tebbett, *J. Chromatogr.* **1991**, 571, 263 - 270
- [55] P. A. Glare, T. D. Walsh, C. E. Pippenger, *Ther. Drug Monit.* **1991**, 13, 226 - 232
- [56] R. F. Venn, A. Michalkiewicz, *J. Chromatogr.* **1990**, 525, 379 - 388
- [57] J. O. Svensson, *J. Chromatogr.* **1986**, 375, 174 - 178
- [58] A. W. E. Wright, J. A. Watt, M. Kennedy, T. Cramond, M. Smith, *Ther. Drug Monit.* **1994**, 16, 200 - 208
- [59] Q. C. Meng, M. S. Cepeda, T. Kramer, H. Zou, D. J. Matoka, J. Farrar, *J. Chromatogr. B* **2000**, 742, 115 - 122
- [60] M. Konishi, H. Hashimoto, *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 379 - 383

-
- [61] T. Toyo'oka, M. Yano, M. Kato, Y. Nakahara, *Analyst* **2001**, *126*, 1339 - 1345
- [62] M. Nishikawa, K. Nakajima, K. Igarashi, F. Kasuya, M. Fukui, H. Tsuchihashi, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* **1992**, *38*, 121 - 126
- [63] R. Pacifici, S. Pichini, I. Altieri, A. Caronna, A. R. Passa, P. Zuccaro, *J. Chromatogr. B* **1995**, *664*, 329 - 334
- [64] N. Tyrefors, B. Hyllbrant, L. Ekman, M. Johansson, B. Langström, *J. Chromatogr. A* **1996**, *729*, 279 - 285
- [65] M. Zheng, K. M. McErlane, M.C. Ong, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *16*, 971 - 980
- [66] I. S. Lurie, *J. Chromatogr. A* **1997**, *780*, 265 - 284
- [67] J. L. Tsai, W. S. Wu, H. H. Lee, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1580 - 1586
- [68] J. T. Cody, S. Valtier, J. Kuhlmann, *J. Anal. Toxicol.* **2001**, *25*, 572 - 575
- [69] S. Spector, C. W. Parker, *Science* **1970**, *168*, 1347 - 1348
- [70] D. M. Hercules, *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* **1986**, Wiley & Sons Inc. New York
- [71] G. Viswanath, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 1390
- [72] W. Schütz, C. Schwer, *Einführung in die Kapillarelektrophorese.* **1996**, Beckman Instruments / MPI für Biochemie, München
- [73] C. A. Parker, *Advances in Photochemistry, Vol II* **1964**, Interscience Publishers, Wiley & Sons New York
- [74] E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zare, *Science* **1985**, *230*, 813 - 814
- [75] G. Hempel, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **1996**, *675*, 131-137
- [76] G. Hempel, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **1996**, *675*, 139-146
- [77] K.-H. Bannefeld, H. Stass, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **1997**, *692*, 453-459

- [78] I. Rethfeld, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **1997**, 700, 249 - 253
- [79] A. J. G. Mank, H. Lingeman, C. Gooijer, *Trends Anal. Chem.* **1992**, 11, 210-217
- [80] N. Simeon, R. Myers, C. Bayle, M. Nertz, J. K. Stewart, F. Couderc, *J. Chromatogr. A* **2001**, 913, 253 - 259
- [81] N. Simeon, E. Chatelut, P. Canal, M. Nertz, F. Courderc, *J. Chromatogr. A* **1999**, 853, 449 - 454
- [82] Y. M. Liu, H. Jinno, M. Kurihara, N. Miyata, T. Toyo'oka, *Biomed. Chromatogr.* **1999**, 13, 75 - 80
- [83] S. J. Hart, G. J. Hall, J. E. Kennedy, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 372, 205 - 215
- [84] B. L. van Duuren, *Chem. Rev.* **1963**, 63, 325 ff.
- [85] E. J. Bowen, J. Sahn, *J. Phys. Chem.* **1959**, 63, 4 ff.
- [86] W. R. Ware, B. A. Baldwin, *J. Phys. Chem.* **1965**, 43, 1194 ff.
- [87] S. G. Schulmann, *Rev. Anal. Chem.* **1971**, 1, 85 ff.
- [88] C. A. Parker, W. T. Rees, *Analyst* **1962**, 87, 83 ff.
- [89] P. A. Carrupt, B. Testa, A. Bechalany, N. El Tayar, P. Descas, D. Perrissoud, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1055 – 1059
- [90] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, *Guidance for Industry, Bioanalytical Validation* **May 2001**, BP
- [91] F. Kohlrausch, *Ann. Phys. Chem.* **1887**, 62, 209
- [92] A. Tiselius, *Nova Acta Regia Soc. Sci. Ups. Ser. IV* **1930**, 7, 1
- [93] S. Hjerten, *Arkiv Kemi* **1958**, 13, 3

- [94] J. W. Jorgenson, K. D. Lukas, *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 209
- [95] A. S. Cohen, S. Terabe, J. A. Smith, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1021 - 1027
- [96] T. Tsuda, J. V. Sweedler, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2149
- [97] Y. Kuroso, T. Sasaki, M. Saito, *J. High Res. Chromatogr.* **1991**, 14, 186
- [98] T. Izumi, T. Nagahori, T. Okuyama, *J. High Res. Chromatogr.* **1991**, 62, 2149
- [99] N. J. Reinhold, U. R. Tjaden, H. Irth, J. Van der Greef, *J. Chromatogr.* **1992**, 574, 327
- [100] J. G. Möller, R. Heinig, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **1998**, 716, 325
- [101] D. Müller, Dissertation, Universität Münster **1999**
- [102] S. Michels, Dissertation, Universität Münster **2000**
- [103] M. O. Schierenberg, Dissertation, Universität Bielefeld **2000**
- [104] U. B. Soetebeer, Dissertation, Universität Münster **2001**
- [105] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese* **1994**, Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH Braunschweig
- [106] M. Frost, Dissertation, Universität Münster **1997**
- [107] D. N. Heiger, P. Kaltenbach, H. J. Sievert, *Electrophoresis* **1994**, 15, 1234
- [108] S. E. Moring, C. Pairaud, M. Albin, S. Locke, P. Thilbaud, G. W. Tindall, *American Lab.* **1993**, 25, 32
- [109] X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 375 - 377
- [110] R. L. Chien, D. S. Burgi, *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 141 - 152
- [111] W. Thormann, P. Meier, C. Marcolli, F. Binder, *J. Chromatogr.* **1991**, 545, 445 - 460

- [112] I. M. Johannson, R. Pavelka, J. D. Henion, *J. Chromatogr.* **1991**, *559*, 515 - 528
- [113] P. Wernly, W. Thormann, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2155 - 2159
- [114] P. Wernly, W. Thormann, D. Bourquin, R. Brenneisen, *J. Chromatogr. B.* **1993**, *616*, 305 - 310
- [115] F. Tagliaro, C. Ponesi, R. Aiello, R. Dorizzi, S. Ghielmi, M. Marigo, *J. Chromatogr.* **1993**, *638*, 303 - 309
- [116] Z. Deyl, F. Tagliaro, I. Miksik, *J. Chromatogr. B* **1994**, *656*, 3 - 27
- [117] M. Schafroth, W. Thormann, D. Allemann, *Electroporesis* **1994**, *15*, 72 - 78
- [118] L. Steinmann, W. Thormann, *J. Cap. Electrophoresis* **1995**, *2*, 81 - 88
- [119] R. B. Taylor, A. S. Low, R. G. Reid, *J. Chromatogr. B* **1996**, *675*, 213 - 223
- [120] X. Paez, P. Rada, S. Tucci, N. Rodriguez, L. Hernandez, *J. Chromatogr. A* **1996**, *735*, 263 - 269
- [121] D. K. Lloyd, *J. Chromatogr. A* **1996**, *735*, 29 - 42
- [122] M. Frost, H. Köhler, G. Blaschke, *Int. J. Legal Med.* **1996**, *109*, 53 - 57
- [123] M. Frost, H. Köhler, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **1997**, *693*, 313 - 319
- [124] M. Frost, H. Köhler, G. Blaschke, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1026 - 1034
- [125] U. B. Soetebeer, M. O. Schierenberg, H. Schulz, G. Grünefeld, P. Andresen, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 271 - 278
- [126] U. B. Soetebeer, M. O. Schierenberg, J. G. Möller, H. Schulz, G. Grünefeld, P. Andresen, G. Blaschke, G. Ahr, *J. Chromatogr. A* **2000**, *895*, 147 - 155
- [127] Lexel Laser, Polytec, Waldbronn, *Herstellerspezifikation* **2001**

- [128] T. E. Lee, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 3045
- [129] T. E. Lee, E. S. Yeung, *J. Chromatogr.* **1992**, *595*, 319
- [130] A. T. Timpermann, J. V. Sweedler, *Analyst* **1996**, *121*, 45R
- [131] J. Lillard, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2897
- [132] S. F. Li, *Capillary Electrophoresis, J. Chromatogr. Library* **1993**, *Vol. 50*
- [133] R. R. Fuller, L. L. Moroz, R. Gillette, J. V. Sweedler, *Neuron* **1998**, *20*, 173
- [134] S. Lenk, *Internist-(Berl.)* **2002**, *43*, 670 - 674
- [135] J. G. Cannon, H. Jackson, J. P. Long, P. Leonard, R. K. Bhatnagar, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1959 - 1962
- [136] G. Schmitt, M. Bogusz, R. Aderjan, C. Meyer, *Z. Rechtsmed.* **1990**, *103*, 513 - 521
- [137] M. G. Weller, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 635 - 645
- [138] J. M. Van Emon, C. L. Gerlach, *J. Chromatogr. B* **1998**, *715*, 211 - 228
- [139] D. S. Hage, *J. Chromatogr. B* **1998**, *715*, 3 - 28
- [140] C. G. Glencross, S. A. Abeywardene, S. J. Corney, H. S. Morris, *J. Chromatogr.* **1981**, *223*, 193 - 197
- [141] B. A. Rashid, P. Kwasowski, P. Stevenson, *J. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 635 - 639
- [142] H. H. Maurer, C. J. Schmitt, A. A. Weber, T. Kraemer, *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 125 - 135
- [143] U. Lemm, J. Tenczer, H. Baudisch, *J. Chromatogr.* **1985**, *342*, 392 - 398
- [144] S. Feng, M. A. El Solhly, S. Salamone, M. Y. Salem, *J. Anal. Tox.* **2000**, *24*, 395 - 402
- [145] C. Franzelius, I. Ackermann, I. Deinl, L. Angermaier, G. Machbert, *J. Anal. Tox.* **1998**, *22*, 359 - 362

- [146] I. Deinl, C. Franzelius, L. Angermaier, G. Mahr, G. Machbert, *J. Anal. Tox.* **1999**, 23, 598 - 602
- [147] S. Kerrigan, D. E. Brooks, *J. Immunol. Meth.* **1999**, 224, 11 - 18
- [148] J. Röhrich, S. Zörntlein, J. Becker, *Forensic Sci. Int.* **2000**, 107, 181 - 190
- [149] Firmenschrift Amersham Pharmacia Biotech, *Affinity Chromatography – Principles and Methods* **2001**, Uppsala, Sweden
- [150] P. D. Dean, W. S. Johnson, F. A. Middle, *Affinity Chromatography, a practical approach* **1985**, IRL Press Oxford
- [151] S. L. Fowell, H. A. Chase, *J. Biotechnology* **1986**, 4, 355 - 368
- [152] M. Venturi, A. Rimon, Y. Gerchman, C. Hunte, E. Padan, H. Michel, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 4734 - 4742
- [153] C. Roux, J. Livage, K. Farhati, L. Monjour, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1996**, 7, 135
- [154] A. Bronshtein, N. Aharonson, D. Avnir, A. Turniasnsky, M. Altstein, *Chem. Mater.* **1997**, 9, 2632 - 2639
- [155] J. M. Leah, E. E. Billett, T. Palmer, *Anal. Biochem.* **1988**, 170, 495 - 501
- [156] J. Beike, Dissertation, Universität Münster **1998**
- [157] Produktinformation *CNBr-activated SepharoseTM 4B*, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden
- [158] Produktinformation *Protein A SepharoseTM 4 Fast Flow*, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden
- [159] B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentie, J. I. Zink, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1120A – 1127A
- [160] B. Spitzer, M. Cichna, P. Markl, G. Sontag, D. Knopp, R. Niessner, *J. Chromatogr. A* **2000**, 83, 113 - 120
- [161] M. Cichna, D. Knopp, R. Niessner, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 339, 241 - 250

LEBENS LAUF

NAME	Yvonne Hupka	
GEBURTSDATUM	06.06.1970	
GEBURTSORT	Georgsmarienhütte	
FAMILIENSTAND	ledig	
ELTERN	Hans-Ullrich Hupka (†) Mechtild Hupka, geb. Klumpe	
SCHULBILDUNG	1976 - 1980 1980 - 1982 1982 - 1989 11. Mai 1989	Grundschule am Harderberg Orientierungsstufe Kl. -Oesede Gymnasium Oesede Abitur
BERUFS AUSBILDUNG	1989 -1992 24. Juni 1992	Ausbildung zur Chemielaborantin Klöckner Edelstahl GmbH Georgsmarienhütte Abschlussprüfung Chemielaborantin
STUDIUM	Oktober 1992 26. April 1995 15. Dez. 1995 27. Nov. 1997	Studium Lebensmittelchemie und Chemie Westfälische Wilhelms-Universität Münster Vordiplom Chemie Staatliche Zwischenprüfung Lebensmittelchemie Erstes Staatsexamen Lebensmittelchemie
PRAKTISCHES JAHR	Dez. 1997 – Nov. 1998 20. Januar 1999	Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker Zweites Staatsexamen Lebensmittelchemie
BEGINN DER DISSERTATION	März 1999	bei Prof. Dr. Dr. G. Blaschke, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, angefertigt bei Prof. Dr. Dr. B. Brinkmann, Institut für Rechtsmedizin

TÄTIGKEITEN

Juni – Okt. 1992	Anstellung als Chemielaborantin Klöckner Edelstahl GmbH, Georgsmarienhütte
Mai, Juli - Sept. 1995	Tätigkeit als Chemielaborantin, Georgsmarienhütte GmbH Georgsmarienhütte
Aug. – Okt. 1996	Auslandspraktikum Universidade Regional de Blumenau Blumenau - S.C., Brasilien
Feb. - März 1997,	Praktikum Chem. Labor Dr. Sperfeld – Dr. Stegemann Georgsmarienhütte
April – Aug. 1997	Praktikum OFG - Analytik GmbH, Münster
seit April 1999	Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Rechtsmedizin, Münster