

Nachweis von Amphetaminderivaten
im Speichel mittels
immunchromatographischer Teststreifen
und
enantioselektiver Kapillarelektrophorese

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fachbereich Chemie

vorgelegt von
Jörg Zimmermann
aus Hamburg

Hamburg 2003

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein
Prof. Dr. Detlef Geffken

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1999 bis März 2003 in der Grundlagenentwicklung der Drägerwerke AG Lübeck und der Universität Hamburg am Institut für Pharmazie unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein,

dem ich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung sowie die stete Diskussionsbereitschaft herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken

möchte ich für die Übernahme des Koreferates herzlich danken.

Für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die kritische Anleitung und Diskussion möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Rainer Polzius und seinen Mitarbeitern in der Grundlagenentwicklung bedanken. Für die Ermöglichung des Praktikums bei den Drägerwerken danke ich Herrn Dr. Andreas Manns.

Frau Nele Samyn gilt mein besonderer Dank für die Zusammenarbeit am NICC in Brüssel während meines Aufenthalts dort.

Bei Herrn Dr. Ulrich Riederer und Herrn Dr. Wolfgang Thimann möchte ich mich für die stets spontane Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Frau Tanja Pies, Herrn Thorwald Winkler, Herrn Rudi Nohr-Jürgens und allen anderen Mitgliedern des Instituts, die auf dem einen oder anderen Weg zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt ebenfalls mein Dank.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und Nicole für die Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BGE	Hintergrundelektrolyt
BSA	Rinderserum-Albumin
CE	Kapillarelektrophorese
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
EIA	Enzymimmunoassay
EOF	elektroosmotischer Fluss
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
GC	Gaschromatographie
gt	Ziege (goat)
ID	innerer Durchmesser
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
LC	Flüssigchromatographie
m	Maus
MS	Massenspektrometrie
MT	Migrationszeit
NICC	Nationaal Instituut voor Criminalistiek en Criminologie
OD	optische Dichte
Pat.	Patent
PBS	Phosphatpufferlösung (phosphate buffer solution)
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
Q-TOF	Quadropol / Time of flight-MS- Kopplung
rac.	racemisch
RIA	Radioimmunoassay
SAMSHA	Substance Abuse and Mental Health Administration
Stabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
UPT	up-converting phosphor technology

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Untersuchungsmatrix Speichel	1
1.1.1	Physiologische Grundlagen der Speichelbildung	2
1.1.2	Übergang von Arzneistoffen in den Speichel	4
1.1.3	Nachweis körperfremder Substanzen im Speichel.....	5
1.2	Möglichkeiten für einen positiven Amphetaminnachweis	6
1.2.1	Arzneistoffe.....	6
1.2.2	Famprofazon.....	11
1.2.3	Selegilin	13
1.2.4	Drogenkonsum im Straßenverkehr.....	15
2	Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen	17
2.1	Methodik und Arbeitstechniken	17
2.1.1	Grundlagen der Immunoassay Technik.....	17
2.1.2	Vorausgehende Überlegungen.....	18
2.1.3	Testprinzip: Immunchromatographischer Teststreifen	19
2.2	Herstellung eigener Teststreifen.....	22
2.2.1	Eingesetzte Antikörper.....	22
2.2.2	Biotinylierung des Detektionsantikörpers	22
2.2.3	Verhältnis Streptavidin-Gold	23
2.2.4	Membranauswahl und Auftrageversuche	24
2.2.5	Übertragung auf den Iso flow-Dispenser	27
2.3	Denkbare Probennahmeverfahren	29
2.3.1	Spülvariante.....	31
2.3.2	Wischtest	32
2.3.2.1	Sammelbare Speichelmenge.....	32
2.3.2.2	Abweichende Speichelmengen.....	33
2.3.2.3	Erforderliche Puffermenge	35
2.3.2.4	Einfluss von Analytkonzentration und Speichelvolumen auf das Testergebnis.....	36
2.3.3	Salivettenspeichel.....	37
2.3.3.1	Beurteilung der Fließfähigkeit	38
2.3.3.2	Dotierter Salivettenspeichel	39

2.3.3.3	Bestimmung des optimalen Verdünnungsfaktors	41
2.3.3.4	Verschiedene Tenside und Membranen	43
2.3.3.5	Vergleich Wischtest vs. Salivettenspeichel.....	45
2.3.3.6	Stabilitätstest.....	48
2.4	Arbeiten mit fertig gekoppelten Antikörper	51
2.4.1	Empfindlichkeitsüberprüfung	51
2.4.2	Verschiedene Kombinationen der Bandenanordnung.....	53
2.4.3	Amphetamin-Gruppentest	55
2.4.3.1	Kreuzreaktivität Amphetamin und Methamphetamin	55
2.4.3.2	Vergleich der Empfindlichkeit des Amphetamin- und Methamphetamintest auf MDMA.....	57
2.4.3.3	Kombination Methamphetaminpolyhapten mit konjugiertem Amphetaminantikörper	58
2.4.3.4	Umstellung auf den Iso Flow-Dispenser	60
2.4.4	Kreuzreaktivität	62
2.5	Arbeiten am NICC.....	65
2.5.1	Eingesetzte Teststreifen	66
2.5.2	Speichelproben.....	68
2.5.3	Oberflächenbeprobung.....	73
2.5.4	Stabilitätstest der Teststreifen für das NICC	77
3	Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese.....	80
3.1	Grundlagen	80
3.1.1	Stellenwert und Trennprinzip.....	80
3.1.2	Enantioselektives Arbeiten mit Cyclodextrinen.....	84
3.1.3	Injektion	85
3.1.4	Detektion.....	86
3.1.5	„Sample Stacking“	87
3.2	Methodenentwicklung.....	89
3.2.1	Einführung	89
3.2.2	Analyten.....	90
3.2.3	Trennpuffer	93
3.2.4	Kapillare.....	94
3.2.5	Cyclodextrinauswahl.....	97
3.2.6	Temperatureinfluss	100

3.2.7	Probleme während der Methodenentwicklung	102
3.2.8	„Replanishment“- System	103
3.2.9	Injektion	105
3.2.10	Änderung der Migrationszeit in Abhängigkeit von der Analytkonzentration	108
3.2.11	Festlegung der CE Methode.....	109
3.3	Probenvorbereitung	110
3.3.1	Direktvermessung.....	110
3.3.2	Flüssig/Flüssig Extraktion.....	110
3.3.3	Extraktion über Festphasen.....	112
3.3.4	Festlegung der Extraktionsprozedur.....	113
3.4	Validierung.....	114
3.4.1	Vorgehensweise	114
3.4.2	Selektivität	114
3.4.3	Wiederfindung.....	116
3.4.4	Präzision	118
3.4.5	Richtigkeit	123
3.4.6	Linearität.....	124
3.5	Messung von Speichelproben	126
3.5.1	Selegilin	126
3.5.2	Famprofazon.....	128
4	Diskussion	131
4.1	Teststreifen	131
4.1.1	Materialauswahl und Testzusammenstellung.....	131
4.1.2	Probennahme	132
4.1.3	Einsatz bereits gekoppelter Antikörper.....	133
4.1.4	Bewertung der Testergebnisse.....	133
4.1.4.1	UPT-Technologie	134
4.1.5	Kreuzreaktivität.....	135
4.1.6	Veränderungen in der Testzusammensetzung.....	135
4.1.7	Auswertung der am NICC eingesetzten Tests	136
4.1.8	Oberflächenbeprobungen.....	137
4.1.9	Stabilitätsuntersuchung	137
4.2	Kapillarelektrophorese.....	139

4.2.1	Methodenentwicklung.....	139
4.2.1.1	Auftrennung der Phenylpropanamine	139
4.2.1.2	Empfindlichkeit der Methode.....	140
4.2.2	Validierungsparameter.....	141
4.2.3	Untersuchungen nach Arzneistoffgabe	142
4.2.3.1	Selegilin.....	142
4.2.3.2	Famprofazon.....	142
4.3	Bewertung der Ergebnisse und Ausblick.....	144
5	Zusammenfassung.....	146
6	Summary.....	148
7	Literatur.....	150
8	Anhang.....	158
8.1	Geräte.....	158
8.2	Pufferlösungen.....	159
8.3	Gefahrstoffe	161

1 Einleitung

1.1 Die Untersuchungsmatrix Speichel

Aus Speichel lassen sich zahlreiche körpereigene sowie körperfremde Substanzen nachweisen¹. Durch Speicheluntersuchungen kann man Informationen über den Allgemeinzustand des Körpers gewinnen, aber auch gezielt bestimmte Fragestellungen untersuchen. Zum Beispiel kann die Beeinflussung einer Person durch nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel untersucht werden^{2,3}.

Diese Fragestellung spielt seit einer Änderung des Straßenverkehrsgesetzes 1998 eine hervorgehobene Rolle bei der Untersuchung von Speichelproben⁴. Seither ist das Führen von Kraftfahrzeugen unter dem Einfluss berauschender Mittel verboten.

Nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel sind, im Gegensatz zu Ethanol, in der Atemluft nur unter großem Aufwand detektierbar⁵. Da der Polizei, wie auch bei dem Ethanolnachweis, die Möglichkeit zur Blutuntersuchung fehlt, kommt zur Beantwortung dieser Fragestellung die Untersuchungsmatrix Speichel in Frage. Die Konzentrationen im Speichel liefern in etwa ein Abbild der Konzentrationsverhältnisse in der Blutbahn zum Zeitpunkt der Testung. Diese Speichelproben können mit Immunoassays, wie sie auch beim „klassischen“ Drogenscreening im Urin oder Plasma eingesetzt werden, nicht ohne eine Anpassung an die veränderte Testmatrix untersucht werden. Für die beabsichtigten Einsatzgebiete (Straßenverkehr und Arbeitsplatztestungen) ist es zusätzlich erforderlich, dass die Spezifität der Tests, anders als im Urin, auf die pharmakologisch aktiven Substanzen gerichtet wird.

Die Entwicklung bzw. Adaption solcher Tests für die Matrix Speichel steckt noch in den Kinderschuhen. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Entwicklung von immunchromatographischen Teststreifen zur Speicheluntersuchung. Um den grundlegenden Testaufbau zu untersuchen und Optimierungsschritte durchzuführen, wurde Amphetamin als Modellanalyt gewählt.

Der Nachweis von Amphetaminen im Speichel ist wegen der relativ hohen Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Betäubungsmitteln einfach. Es

kann jedoch aufgrund der Einnahme von Arzneistoffen zu falsch positiven Drogentestergebnissen kommen.

Amphetamine sind chirale Verbindungen. Wegen der unterschiedlichen pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Enantiomere werden sie nicht immer als Racemat eingesetzt. Durch enantioselektive Analysemethoden lassen sich die Enantiomerenverhältnisse im Organismus untersuchen, aus diesen können dann Rückschlüsse über die Herkunft der gefundenen Amphetamine gezogen werden. So lassen sich Verwechslungsmöglichkeiten deutlich einschränken und Hinweise für den Ursprung eines positiven Testergebnisses finden. Diese Problematik hat für Urin und Blutuntersuchungen umfangreichen Niederschlag in der Literatur gefunden⁶.

Um im Speichel Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen dem Konsum nicht verkehrsfähiger Betäubungsmittel und der Einnahme von Arzneistoffen, die zu Amphetaminen metabolisiert werden, zu finden, wurden die Amphetaminkonzentrationen im Speichel nach Arzneistoffgabe mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten enantioselektiven Kapillarelektrophorese-Analytik untersucht.

1.1.1 Physiologische Grundlagen der Speichelbildung

Würde man die Bevölkerung fragen, welche Assoziationen das Wort Speichel weckt und welche Funktion dieser im Organismus hat, so würde wahrscheinlich das Anlecken von Briefmarken auf den vorderen Plätzen liegen. Würden Naturwissenschaftler gefragt, so wäre wohl auch die Antwort: Pavlov'scher Reflex recht häufig. In der Matrix Speichel steckt aber deutlich mehr.

Die Hauptaufgabe des menschlichen Speichels ist es, die Schleimhäute der Mundhöhle und des Rachenraumes feucht zu halten, damit das Sprechen und Schlucken erleichtert wird. Eine ausreichende Speichelproduktion ist für die Zahngesundheit essentiell⁷.

Man kann drei Gruppen von Speicheldrüsen unterscheiden: a) die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis), b) die Unterkieferdrüse (Glandula submandibularis) und c) die Unterzungendrüse (Glandula sublingualis). Würde

1. Einleitung

man Speichel an den verschiedenen Drüsen sammeln, so ließen sich Unterschiede in der Zusammensetzung erkennen: a) liefert serösen Speichel, b) und c) liefern Speichel mit einem größeren Gehalt an Mucinen. Diese Glykoproteine (ca. 0,3% Anteil) führen zu der typischen Viskosität des Speichels. Insgesamt werden von den Speicheldrüsen 0,5 bis 1,5 L Speichel am Tag produziert. An der Gesamtproduktion sind a) mit ca. 26%, b) mit ca. 6% und c) mit ca. 68% beteiligt.

Aufgrund dieser Unterschiede hat sich im englischen Sprachgebrauch die Bezeichnung *oral fluid* anstelle von *saliva* durchgesetzt. Dieses reflektiert besser, dass Speichel nicht eine homogene Flüssigkeit ist, sondern ein Gemisch, welches je nach Körperzustand eine andere Zusammensetzung aufweisen kann.

Der gebildete Speichel weist im Mittel neben einem Wassergehalt von 99 % nur geringe Mengen anderer Bestandteile auf. Neben Lysozym und sekretorischem IgA ist im Speichel α -Amylase enthalten. Diese leitet erste Schritte der Stärkeverdauung ein. Sie liegt, wie die schon erwähnten Mucine, mit einem Anteil von ca. 0,3 % im Speichel vor. Auch Zellbruchstücke aus der Mundschleimhaut sowie Essensreste können im Speichel enthalten sein.

Im Speichel sind die üblichen Elektrolyte des Organismus vorhanden. Diese spielen bei der Produktion in den Drüsen eine wichtige Rolle⁸. Anfänglich wird Cl^- durch einen $\text{Na}^+ / 2 \text{Cl}^- / \text{K}^+$ -Kotransporter in die Zellen der Speicheldrüse aufgenommen und von dort über einen *Cl-Kanal* in den oberen Teil des Ausführungsgangs sezerniert. Na^+ und Wasser folgen passiv auf parazellulärem Weg. Während der Passage des Ausführungsganges, der im mittleren Teil relativ wasserundurchlässig ist, werden Na^+ und Cl^- aus dem Lumen resorbiert und kleine Mengen K^+ und HCO_3^- sezerniert. So wird der entstehende Speichel zunehmend hypoton. Der pH-Wert des Speichels liegt im Ruhezustand zwischen 5,5 und 6,5. Nach Stimulation steigt er bis auf einen pH-Wert von 7,8 an. Bei gesteigertem Speichelfluss ändert sich auch die Elektrolytzusammensetzung des Speichels, da die Zeiten für Resorption und Sezernierung verkürzt bzw. die Transportmechanismen gesättigt sind. Es kommt zu einem Anstieg der Na^+ - und Cl^- -Konzentration und dadurch zu einer Erhöhung der Osmolalität.

1.1.2 Übergang von Arzneistoffen in den Speichel

Damit Arzneistoffe, die in der Blutbahn zirkulieren, im Speichel nachweisbar werden, müssen sie im Zuge der Sekretion in den Speicheldrüsen in das Lumen übergehen. Prinzipiell kommen dafür mehrere Wege in Frage:

- Passive Diffusion durch Membranen
- Aktive Transportprozesse, auch gegen ein Konzentrationsgefälle
- (Ultra-)Filtration durch Membranporen

Welche Prozesse für einzelne Stoffe in Frage kommen, hängt im Wesentlichen von der Molekülgröße ab⁹. Kleine Moleküle wie Ethanol gelangen durch Ultrafiltration im Parazellularraum in den Speichel. Für Ionen und große Moleküle (z.B. IgA) sind aktive Transportmechanismen beschrieben. Auch für einige Arzneistoffe werden solche postuliert, so z.B. Penicillin, Metoprolol und Methotrexat.

Die meisten anderen niedermolekularen Verbindungen gelangen durch einfache Diffusionsprozesse entlang einer Konzentrationsdifferenz in den Speichel. Bei diesem Vorgang spielen deren Lipophilie, der pKa-Wert und die Molekülgröße eine Rolle.

Lipophile und wenig ionisierte Stoffe können leichter die Zellmembran bzw. die Barrieren zwischen Plasma und Speichel überwinden. Werden diese im Speichel ionisiert, sind sie in dieser Matrix „gefangen“ und werden im Vergleich zur Plasmakonzentration angereichert. Viele Arzneistoffe und auch die Mehrzahl der nichtverkehrs-fähigen Betäubungsmittel sind entweder schwache Basen oder schwache Säuren. Für deren Übergang in den Speichel ist der pH-Wert des Speichels bzw. die Differenz zwischen Plasma-pH-Wert und Speichel-pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Dieses wird deutlich wenn man den Zusammenhang zwischen Plasma- und Speichelkonzentration betrachtet.

1. Einleitung

Für schwache Basen ergibt sich:

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pKa - pH_s)}}{1 + 10^{(pKa - pH_p)}} \cdot \frac{F_p}{F_s}$$

S= Konzentration im Speichel

P= Konzentration im Plasma

pKa= pKa-Wert der entsprechenden Substanz

Für schwache Säuren dementsprechend:

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pH_s - pKa)}}{1 + 10^{(pH_p - pKa)}} \cdot \frac{F_p}{F_s}$$

pH_s= pH-Wert des Speichel

pH_p= pH-Wert des Plasma

F_p= freie Konzentration im Plasma

F_s= freie Konzentration im Speichel

Die freie Konzentration im Speichel F_s wird meist, anders als im Blut, gleich der Gesamtkonzentration gesetzt. Denn im Speichel ist die Proteinbindung von Fremdstoffen aufgrund des geringeren Proteingehalts vernachlässigbar gering.

Für eine Reihe von Arzneistoffen sind so S/P-Relationen berechnet worden. Bei in vivo-Untersuchungen wurden aber auch stark abweichende Werte gefunden. Diese Veränderungen sind durch Änderungen des pH-Wertes bei stimuliertem Speichelfluss erklärbar. Durch Stimulation steigt im Wesentlichen die HCO_3^- -Konzentration, welche zu einem Anstieg des pH-Wertes führt.

1.1.3 Nachweis körperfremder Substanzen im Speichel

Schon zu Beginn der 70er Jahre wurden Untersuchungen durchgeführt, um Arzneistoffe aus Speichel nachzuweisen. 1982 wurden die bis dahin gesammelten Erkenntnisse von Mühlenbruch zusammenfassend dargestellt ¹⁰. Auch damals wurden die selben Vorteile genannt, wie sie heute für Speicheluntersuchungen ins Feld geführt werden.

In der Praxis haben Speicheluntersuchungen allerdings nicht den zu dieser Zeit erwarteten Stellenwert erreicht. Inzwischen wird der Probenmatrix Speichel im Bereich der Straßenverkehrsüberwachung und auch der Arbeitsplatztestung wieder eine Bedeutung zuteil, die in der Zwischenzeit nicht so stark ausgeprägt war ¹¹.

1.2 Möglichkeiten für einen positiven Amphetamin-nachweis

1.2.1 *Arzneistoffe*

Für einen positiven Amphetaminnachweis gibt es grundsätzlich zwei mögliche Quellen. Zum einen ist dieses der missbräuchliche Konsum von Amphetamin-derivaten, um einen stimulierenden Effekt zu erzielen; zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Einnahme von Arzneistoffen, die zu Amphetaminen metabolisiert werden, zu einem positiven Amphetamin-Testergebnis führen kann.

Neben den zahllosen Methoden, die in der Rechtsmedizin zum Amphetamin-nachweis aus Urin und Blut existieren¹²⁻¹⁴, gibt es inzwischen auch einige Arbeiten zum Amphetaminnachweis aus Speichel. Wan et al.¹⁵ beschäftigten sich bereits 1978 mit dem Auftreten von Amphetaminenantiomeren im Speichel und Plasma. Dabei wurde auch untersucht, welchen Einfluss der pH-Wert des Urins auf die Amphetaminkonzentration im Speichel hat. Die meisten anderen Untersuchungen sind neueren Datums, nachdem Speichel eine Renaissance als Untersuchungsmatrix erlangte. Navarro et al.¹⁶ untersuchten im Jahre 2001 in einer kontrollierten Studie den Metabolismus von MDMA nach Einmalgabe von 100 mg dieser Substanz. Bei 8 Probanden wurden die Speichel- und Plasmakonzentrationen der Muttersubstanz und deren Metabolite über einen Zeitraum von 24 h bestimmt. Anhand der ermittelten Konzentrationen und pH-Werte wurden S/P-Relationen berechnet. Diese lagen zwischen 32,3 und 1,2, d.h. im Speichel lagen zum Teil erheblich höhere Konzentrationen als im Plasma vor. Samyn et al.¹⁷ bestimmten in einer Placebo kontrollierten Doppelblindstudie nicht nur die Mengen MDMA nach Gabe von 75 mg Substanz, sondern untersuchten auch den Einfluss auf die psychomotorischen Fähigkeiten der Testpersonen.

Schepers et al. veröffentlichten kürzlich eine Studie, in der die Pharmakokinetik nach kontrollierter Methamphetamingabe in Speichel untersucht wurde¹⁸.

Mortier et al.¹⁹ entwickelten basierend auf LC-MS/MS (Q-TOF)-Technik eine Methode zum gleichzeitigen Nachweis von Opiaten, Kokain und Amphet-

1. Einleitung

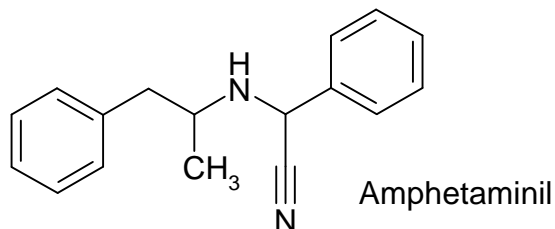
aminen im Speichel. Für die Bestimmungsgrenze wurde ein Wert von 2 ng/mL für alle Analyten angegeben.

Es gibt insgesamt 14 Arzneistoffe, die im Körper zu Methamphetamin und / oder Amphetamin metabolisiert werden. Über die hieraus resultierenden Verwechslungsmöglichkeiten bzw. mögliche Unterscheidungen gibt es zahlreiche Berichte in der Literatur ⁶. Diese Untersuchungen beschränken sich jedoch auf die beiden klassischen Drogentestmatrices Urin und Blut.

Um eine Unterscheidung zwischen missbräuchlichem Konsum und Arzneistoffeinnahme treffen zu können, ist es notwendig, entweder durch enantioselektive Trennmethode eine Unterscheidung zu erkennen, oder durch Nachweis spezifischer Arzneistoffmetabolite einen Beleg für die Arzneistoffgabe zu liefern.

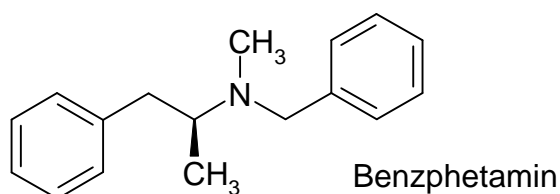
Für diese Arzneistoffe sind bisher folgende Beobachtungen in Blut und Urin beschrieben:

Amphetaminil



Amphetaminil wird bei hyperkinetischem Syndrom und Narkolepsie sowie als Anorektikum eingesetzt. Es bildet im Organismus eine Schiffsche Base und HCN. Die Schiffsche Base wird dann zu Benzaldehyd und Amphetamin gespalten. Die Substanz besitzt zwei Stereozentren. Für die (R,R') und (R,S') Enantiomere wurde eine deutlich niedrigere erregende Wirkung im Maus-Tierversuch gefunden.

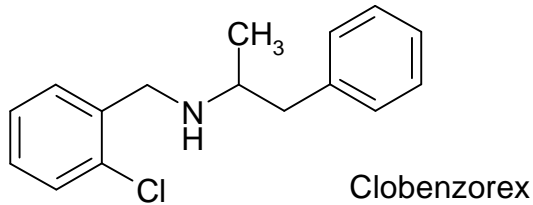
Benzphetamin



Benzphetamin gilt als Anorektikum und wird fast vollständig metabolisiert. Der Hauptmetabolit ist im Urin das 1-(4-Hydroxyphenyl)-2-(N-benzylamino)propan. Der Nachweis kann als Beweis für Benzphetamineinnahme gelten. Die Amphetaminkonzentrationen lagen immer höher als die des gefundenen Methamphetamins. Es wurden nur die S-(+)-Enantiomere nachgewiesen.

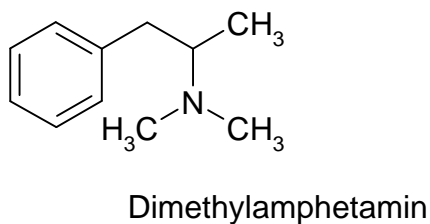
1. Einleitung

Clobenzorex



Clobenzorex wird als Anorektikum eingesetzt und wegen seiner sympathomimetischen Eigenschaften auch missbräuchlich konsumiert. Beim Abbau entsteht kein Methamphetamin. Hauptmetabolite sind Amphetamin und p-Hydroxyclobenzorex, welches mindestens so lang nachweisbar ist, wie das gebildete Amphetamin^{20,21}.

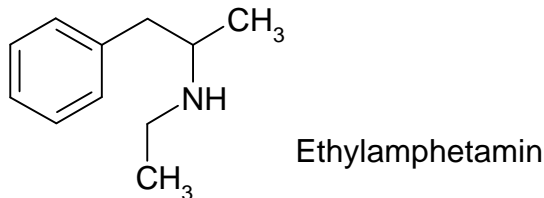
Dimethylamphetamin



Auch wenn diese Substanz nicht als Arzneistoff vorkommt, so können sich falsch positive Befunde durch die Einnahme von Dimethylamphetamin erklären lassen.

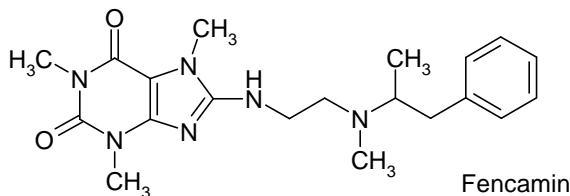
Neben der Muttersubstanz kann das Auftreten des N-Oxids beobachtet werden (15 bzw. 21 % der Dosis in 24 h).

Ethylamphetamin



Ethylamphetamin wurde als Anorektikum eingesetzt. Es wird zu Amphetamin abgebaut. Der überwiegende Teil der Dosis wird jedoch unverändert ausgeschieden. Auch hier wurde beobachtet, dass das S-(+)-Enantiomer schneller dealkyliert wird als das R-(-)-Enantiomer. Somit werden größere Mengen R-(-)-Ethylamphetamin und größere Mengen S-(+)-Amphetamin gefunden.

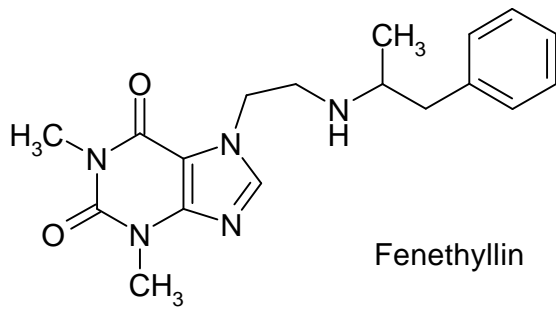
Fencamin



Die Substanz wurde aufgrund ihrer zentral erregenden Wirkung bei Depressionen eingesetzt. Da die Substanz als Racemat vorkommt, liegen auch beide Amphetaminantimere vor. Ca. 32 % der Dosis werden unverändert ausgeschieden.

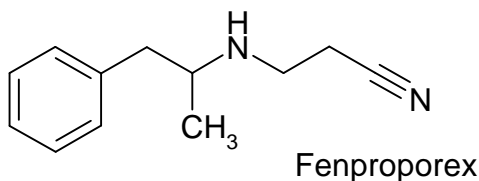
1. Einleitung

Fenethylin



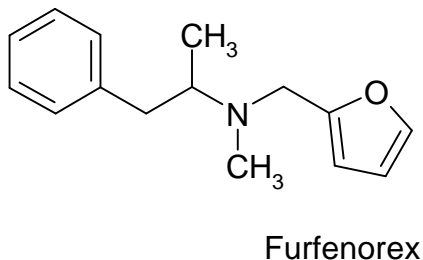
Fenethylin wird bei hyperkinetischem Syndrom als zentrales Stimulans und bei Narkolepsie eingesetzt. Zur Ausscheidung im Urin kommen 3,6% der Dosis als Muttersubstanz, 24,5 % Amphetamin, 27,2 % Hippursäure, 6,6% p-Hydroxyamphetamin und 13,7 % Theophyllin.

Fenproporex



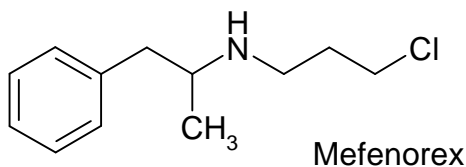
Fenproporex wird als Anorektikum eingesetzt. Etwa 30 % der Dosis werden als Amphetamin ausgeschieden. Beide Enantiomere treten auf. Der Anteil des ausgeschiedenen Amphetamins entspricht etwa der Menge, die auch nach equimolarer Gabe von Amphetamin beobachtet würde.

Furfenorex



Furfenorex ist ebenfalls ein Anorektikum und führt zur Bildung von Amphetamin und Methamphetamin. Mit über 30 % der ausgeschiedenen Dosis wurde 1-Phenyl-2-(N-methyl-N-valerolactonylamino)propan als Hauptmetabolit gefunden. Der Nachweis gilt als Charakteristikum einer Furfenorex-einnahme.

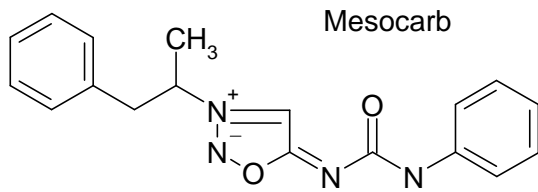
Mefenorex



Mefenorex wirkt sympathomimetisch und wird als Anorektikum eingesetzt. Die Muttersubstanz taucht nur zu 1% im Urin auf. Die Chlorpropyl-Kette verhindert zu einem gewissen Teil die N-Dealkylierung, so dass p-OH-Mefenorex als Indikator für die Einnahme der Substanz gilt. Amphetamin ist von den 13 gefundenen Metaboliten am längsten nachweisbar²².

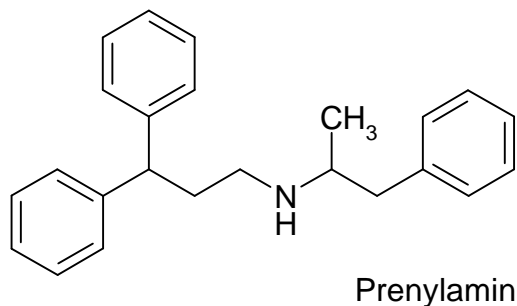
1. Einleitung

Mesocarb



Mesocarb ist ein Stimulans, welches die Benzodiazepinwirkungen abschwächen und die Aufmerksamkeit steigern soll. Amphetamin tritt als Metabolit nur zu 4% neben Spuren von Mesocarb im Urin auf. Den Hauptanteil mit 60% der Dosis bilden hydroxylierte Metabolite, die auch konjugiert vorliegen.

Prenylamin



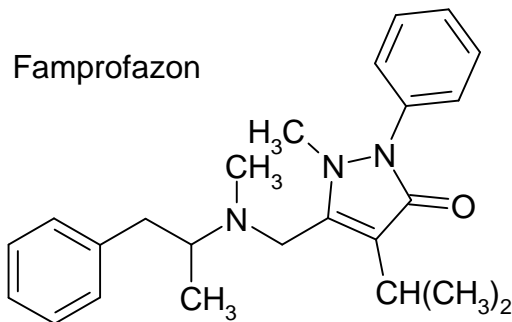
Prenylamin ist als Vasodilatator in der Angina pectoris-Behandlung und Ca-Kanal Blocker eingesetzt worden. Zur Anwendung kommt das Racemat. Der Metabolismus verläuft stereoselektiv. Das S-(+)-Prenylamin wird schneller abgebaut als das R-(-)-Enantiomer, daher ist auch mit einer höheren Konzentration an S-(+)-Amphetamin zu rechnen. Methamphetamin tritt nicht auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wird, anders als in der organischen Chemie, das Wort Konjugation bzw. konjugieren benutzt,

a) um im Zusammenhang mit Metabolisierungsreaktionen die Kondensationsreaktionen von Glucuron-, Schwefelsäure usw. mit hydroxylierten Verbindungen im Sinne einer Phase 2-Metabolisierung zu beschreiben oder

b) um im Zusammenhang mit Antikörpermarkierungen die Kopplungsreaktion von kolloidalen, mit Streptavidin markierten Goldpartikeln und biotinylierten Antikörpern zu beschreiben.

1.2.2 Famprofazon



Neben den zuvor erwähnten Substanzen treten auch nach der Einnahme von Famprofazon Amphetamine auf. Für diese Substanz wurden im Rahmen dieser Arbeit die Amphetaminkonzentrationen im Speichel nach Einnahme der Substanz mit Hilfe der Kapillarelektrophorese bestimmt.

Famprofazon ist in dem apothekenpflichtigen Kombinationsanalgetikum Gewodin Geistlich[®] enthalten. In einer Tablette sind 25 mg Famprofazon (4-Isopropyl-2-methyl-3-[[N-methyl-N-(α -methylphenylethyl)amino]methyl]-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on) zusammen mit 250 mg Paracetamol, 75 mg Propyphenazon und 30 mg Koffein enthalten.

Dieses Medikament war bis Anfang 2002 in Deutschland im Handel. In Korea wurde es in den 90er Jahren vom Markt genommen, da es beim Methamphetamin-Nachweis zu falsch positiven Befunden führen kann²³.

In der Literatur finden sich mehrere Berichte über die Metabolisierung nach Einnahme dieser Verbindung. Alle Analysen wurden mittels GC/MS Analytik durchgeführt.

Cody untersuchte die (Meth)-Amphetamin Ausscheidung nach Einnahme von 50 mg Famprofazon (2 Tabletten Gewodin Geistlich[®]) über 6 Tage im Urin²⁴. Die Maximalwerte für Amphetamin und Methamphetamin wurden nach 14 h mit 420 bzw. 1996 ng/ml erreicht. Die Konzentration an R-(-)-Amphetamin lag dabei anfänglich bei ca. 50 % und erhöhte sich später auf 55%. Für Methamphetamin wurden anfänglich 67% R-(-)-Methamphetamin und in späteren Proben 100 % gefunden.

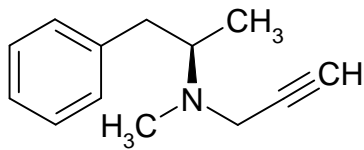
Neugebauer et al. untersuchten die Metabolisierung nach Gabe von 50 mg Famprofazon über 48 h ebenfalls im Urin von 6 Personen²⁵. Dabei wurde die

1. Einleitung

ausgeschiedene Menge an Methamphetamin bzw. Amphetamin je Probe errechnet und das entsprechende Verhältnis von R- zu S- Enantiomer angegeben. Im Mittel wurde ein Verhältnis von 3 zu 1 (R- zu S-Enantiomer) gefunden. Auch diese Gruppe beobachtete ein Ansteigen von R-(-)-Methamphetamin bei späteren Probenzeitpunkten.

Musshoff et al. berichteten über ein vermeintlich positiven Amphetamin-Screening-Befund, der sich nach Befragung und anschließender chiraler GC/MS-Analytik als Einnahme von Gewodin Geistlich[®] bestätigen ließ²⁶. In einem Immunoassay-Screening ergaben sich positive Befunde für die Blut- und Urinprobe einer Person. Auch eine Bestätigungsuntersuchung mittels GC/MS lieferte positive Werte. Unter Anwendung einer enantioselektiven GC/MS-Methode wurden 69% der zuvor ermittelten Konzentration von 2831 ng/mL Methamphetamin im Urin als R-(-)-Methamphetamin identifiziert. Von den 567 ng/mL Amphetamin waren 54 % dem R-(-)-Enantiomer zuzuordnen. Ein eindeutiger Nachweis für die Einnahme von Gewodin Geistlich[®] ergibt sich weder hieraus, noch aus dem Vorhandensein von 3-Hydroxymethylpyrazolon, da dieses auch aus der alleinigen Einnahme von Propyphenazon herrühren kann. Nur der Nachweis der Muttersubstanz ist dafür geeignet.

1.2.3 Selegilin



Selegilin

Die letzte Substanz in dieser Gruppe ist der irreversible MAO B- Hemmer Selegilin [Deprenyl; R(-)-N,α-Dimethyl-N-2-propinylphenethylamin]. Die Substanz liegt als enantiomerenreiner Stoff vor und wird zusammen mit L-Dopa in der Parkinsontherapie eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch für diese Verbindung Untersuchungen der Speichelkonzentration durchgeführt.

Verschiedene Autoren haben den Metabolismus von Selegilin im Urin untersucht^{27, 28}. Shin beschrieb das Auftreten von Selegilin und dessen Metaboliten im Urin bis zu 48 h nach Gabe von 2,5, 5 und 10 mg Selegilin²⁹. Er führte die Arbeiten mittels GC/MS-Technik durch. 4 Personen wurden in die Untersuchung einbezogen, 2 Europäer und 2 Asiaten. Es wurden die relativen Mengen der verschiedenen Stoffe, sowie das Verhältnis zwischen konjugierten und nicht konjugierten Metaboliten bestimmt. Es wurde gefunden, dass R(-)-Methamphetamin mit ca. 37 % der Dosis den Hauptmetaboliten im Urin darstellte. 7,9% der Dosis lagen als p-OH-R(-)-Methamphetamin vor, davon waren 71,4 % konjugiert. R(-)-Amphetamin lag mit ca. 3% der Dosis in fast gleicher Menge wie die hydroxylierte Form vor. Es waren 65 % des p-OH-R(-)-Amphetamins konjugiert.

Zwischen den asiatischen und europäischen Probanden ergaben sich Unterschiede in der Metabolisierung. Bei den Asiaten lag der Anteil dealkylierter Metaboliten mit 48 % der Dosis deutlich höher als bei den Europäern (ca. 30%). Wohingegen die para-hydroxylierten Metaboliten bei den europäischen Probanden mit 12-17 % im Vergleich zu 5-9% bei den asiatischen Probanden überwogen.

Kim et al. untersuchten die Metabolite nach der Einnahme von 10 mg Selegilin-HCl im Urin mittels einer chiralen Kapillarelektrophorese-Methode³⁰.

1. Einleitung

Es wurde insbesondere die Verwechslungsmöglichkeit zwischen Selegilin und illegal konsumiertem S-(+)-Methamphetamin untersucht. Diese Substanz spielt auf dem südkoreanischen Schwarzmarkt für illegale Betäubungsmittel eine hervorgehobene Rolle. Das Verhältnis von R-(-)-Amphetamin und R-(-)-Methamphetamin lag bei den Probanden nach Gabe von Selegilin bei 0,28-0,36 (Amph/Meth). Für die Urinproben nach missbräuchlichem Konsum von Methamphetamin wurde das Verhältnis von S-(+)-Amphetamin und S-(+)-Methamphetamin bestimmt. Es lag bei 0,2 ($\pm 0,12$).

Die Autoren schließen daraus, dass, aufgrund der Unterschiede im Verhältnis zwischen Amphetamin und Methamphetaminenantiomeren, eine Unterscheidung zwischen der therapeutischen Einnahme von Selegilin und Methamphetaminkonsum möglich ist.

Nach der Einnahme wird folgendes Metabolisierungsmuster beobachtet: die Muttersubstanz wird zu R-(-)-Methamphetamin und weiter zu R-(-)-Amphetamin metabolisiert. Ein weiterer Metabolit ist das Desmethylselegilin, welches spezifisch für den Konsum von Selegilin ist. Aus Desmethylselegilin wird im weiteren Verlauf R-(-)-Amphetamin gebildet.

1.2.4 Drogenkonsum im Straßenverkehr

In den letzten 5 Jahren hat neben Alkohol eine zweite Stoffgruppe großes Interesse in Bezug auf die Verkehrssicherheit gefunden. Der Konsum nicht verkehrsfähiger Betäubungsmittel wurde als wachsendes Problem für die Sicherheit im Straßenverkehr erkannt³¹. Nachdem in einem Zeitraum von 1975 bis 1990 die Zahl der Unfälle mit Beteiligung von Drogen mehr oder weniger konstant geblieben war, haben sich im Verlauf der 90er Jahre die entsprechenden Zahlen mehr als verdreifacht³². Zu dem Themenbereich Verkehrssicherheit gehörten sicherlich auch die Wirkungen von Arzneistoffen auf die Wahrnehmungsfähigkeit der Verkehrsteilnehmer. Dieses bleibt aber bei der nachfolgenden Betrachtung außer Acht, da hier vom Gesetzgeber noch keine eindeutige Regelung getroffen wurde.

Für den Konsum von berauschenden Mitteln hingegen gibt es seit 1998 eine Regelung im Straßenverkehrsgesetz (StVG)⁴. In § 24a (2) wird das Führen von Kraftfahrzeugen unter dem Einfluss von berauschenden Stoffen sanktioniert. Entscheidend dabei ist der Nachweis von aktiven Substanzen im Blut. Hierfür existieren heute eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden³³. In einer Anlage zu dem Gesetz sind die berauschenden Mittel und die einzelnen, nachzuweisenden Verbindungen genannt. Damit fallen diese aus den allgemeinen Regelungen des § 316 StGB heraus. Dort wird das Führen von Kraftfahrzeugen bei Fahruntüchtigkeit behandelt. Diese Bestimmung ist allgemein gefasst und trifft z.B. auch auf die Fahruntüchtigkeit aufgrund von Medikamentenkonsum zu.

Nachdem diese Änderung erfolgt ist, hat die Polizei begonnen, Straßenverkehrskontrollen auch im Hinblick auf Drogenkonsum durchzuführen. In einer ersten Phase wurden diese Tests im Rahmen eines EU-Projektes namens *ROSITA* (**R**oad**S**ide **T**esting **A**ssessment) durchgeführt³⁴.

In mehreren Arbeitspaketen wurden die Erfordernisse an eine Testung im Straßenverkehr in verschiedenen Mitgliedsstaaten ermittelt.

1. Einleitung

Die Arbeitspakete befassten sich mit den folgenden Themen:

- Drogen und Arzneistoffe, die einen Einfluß auf die Fahrtüchtigkeit besitzen können (Drugs and medicines, that are suspected to have a detrimental impact on road user performance)
- Auflistung der erhältlichen Testsysteme (Inventory of state-of-the-art road side testing equipment)
- Vergleich der verschiedenen Regularien und Bestimmungen in den teilnehmenden Ländern (Operational, user and legal requirements across EU member states for roadside drug testing equipment)
- Evaluation unterschiedlicher Testsysteme (Evaluation of different roadside drug tests)
- Zusammenfassung und Anforderungen an einen Test (General conclusions and recommendations)

Als zentrales Ergebnis können folgende Punkte genannt werden:

- Notwendigkeit, gegen das Führen von Kraftfahrzeugen unter dem Einfluss berauschender Mittel vorzugehen
- Akzeptanz von Speichelproben zum Nachweis des „Impairment“
- abschreckender Effekt durch Testung überhaupt (Bewusstseinsänderung)
- Entwicklung von eindeutig interpretierbaren Testsystemen mit ausreichender Empfindlichkeit

Inzwischen werden unabhängig von diesem Projekt von den Bundesländern Kontrollen an Schwerpunkten z.B. vor Diskotheken oder im Umfeld von Tanzveranstaltungen wie der Loveparade durchgeführt. Dabei werden Verhaltens- und Wahrnehmungstests durchgeführt, die einen Verdacht auf Konsum berauschender Mittel begründen können. Bei diesen oder anderen Anhaltspunkten wird dann eine weitere Untersuchung, meist ein Speicheltest, durchgeführt.

Wie schon erwähnt, bleibt das entscheidende Kriterium bei der strafrechtlichen Verfolgung der Nachweis der entsprechenden Substanzen im Blut.

2 Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

2.1 Methodik und Arbeitstechniken

2.1.1 Grundlagen der Immunoassay Technik

Immunoassays sind Nachweistechiken, die zum Stoffnachweis Antikörper einsetzen. Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Glykoproteine, die im Wirbeltierorganismus als Antwort des Immunsystems auf eingedrungene Fremdstoffe gebildet werden.

Beim Menschen unterscheidet man 5 Klassen von Immunglobulinen, IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Alle besitzen die gleiche Grundstruktur.

Exemplarisch ist in Abb. 1 die Struktur eines IgG Antikörpers dargestellt³⁵.

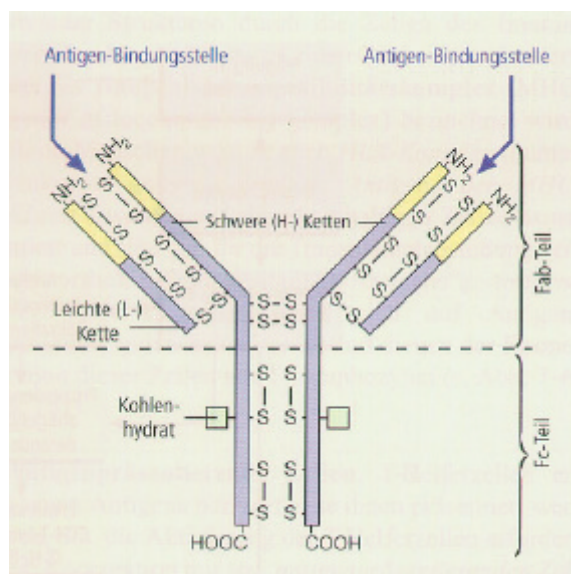


Abb. 1 Aufbau eines IgG -Antikörpers

Die Möglichkeit Immunoassays einzusetzen, ist an das Vorhandensein eines geeigneten Antikörpers gebunden. Antikörper lassen sich auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen gewinnen. Nach Immunisierung eines

Wirtstieres mit dem Antigen lassen sich die gebildeten Antikörper gewinnen. Es resultieren polyklonale Antikörper.

Ein zweiter Ansatz ist die Fusion antikörperproduzierender Körperzellen mit einer Tumorzelle *in vitro*. Diese werden in Zellkultur vermehrt. Es werden monoklonale Antikörper erhalten.

Grundlage für den immunchemischen Nachweis ist die spezifische Bindungsreaktion zwischen Antigen und dem entsprechenden Antikörper. Kleine Antigene, wie Amphetamine, werden auch als Haptene bezeichnet. Um diese Bindungsreaktion zu detektieren, ist es häufig notwendig, die Bindungsreaktion durch Markierung eines der Reaktionspartner erkennbar zu machen. Man kann zum Beispiel durch Kopplung mit radioaktiven Verbindungen (RIA), mit Fluorogenen (FIA und FPIA), mit Enzymen (EIA) oder auch durch kolloidale Goldpartikel diese Reaktion detektieren. Diese Techniken werden als indirekte Immunoassays bezeichnet.

Ist aufgrund der Größe der Reaktionspartner die Immunreaktion auch ohne diese Kopplungen auswertbar, so spricht man von direkten Immunoassays.

Zur Detektion der Amphetamine wurden im Rahmen dieser Arbeit immunchromatographische Teststreifen eingesetzt. Die Visualisierung erfolgt bei diesem indirekten Verfahren durch kolloidale Goldpartikel. Das Testprinzip wird unter 2.1.3 näher dargestellt.

2.1.2 Vorausgehende Überlegungen

Bevor mit der Entwicklung eines Testsystems begonnen wurde, war es entscheidend, eine Vorstellung von den zu erwartenden Konzentrationen an Analyt im Speichel zu bekommen. In der Literatur fanden sich relativ wenig Angaben über diesen Bereich. Für die unterschiedlichen Substanzen lagen jeweils nur einzelne Studien mit wenigen Probanden vor, die zum Teil stark voneinander abweichende Analytkonzentrationen ermittelt haben.

In einer 1998 in Belgien durchgeführten Studie³⁶ waren Speichelproben mittels des Drugwipe[®] Tests, einem Schnelltest zur Oberflächenbeprobung, analysiert worden. Parallel dazu wurde eine Referenzbestimmung mittels GC/MS-Analytik durchgeführt. Da die Speichelproben auf freiwilliger Basis von

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Probanden auf der Straße gesammelt wurden, sind die aufgenommene Menge an Substanz und der Zeitpunkt der Einnahme nicht bekannt. Da es sich aber im Gegensatz zu den anderen Studien nicht um „Laborwerte“, sondern um reale Proben handelt, lassen die Ergebnisse mit einiger Sicherheit auf eine reale Testsituation schließen.

Aus den Referenzbestimmungen ergab sich, dass die Konzentration von Amphetamin im Speichel gegenüber den anderen Analyten am höchsten liegt (100 bis 12000 ng/mL). Für THC wurden dagegen nur Konzentrationen von 1,4 – 42 ng/mL ermittelt. In anderen Studien³⁷ wurden für THC Konzentrationsbereiche von 5 - 330 ng/mL angegeben.

2.1.3 Testprinzip: Immunchromatographischer Teststreifen

Neben der Entwicklung einer geeigneten Probennahmeprozedur wurde ein Teststreifensystem für die Matrix Speichel entwickelt. Es sollte das Format eines kompetitiven immunchromatographischen Teststreifens Anwendung finden. Die Funktionsweise soll kurz erläutert werden:

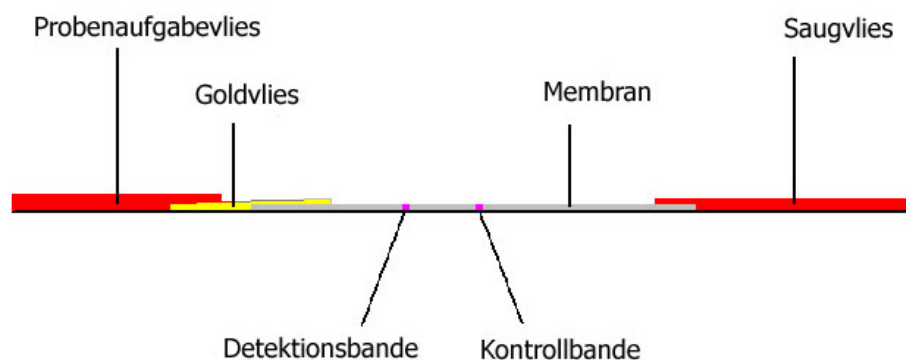


Abb. 2 Aufbau eines immunchromatographischen Teststreifens

Auf einer flexiblen Kunststoffkarte sind die verschiedenen Komponenten des Testsystems fixiert. Mittig ist eine Membran aufgeklebt. Vor der Membran befindet sich das Probenaufgabevlies, das aus verschiedenen Materialien bestehen kann und die Probelösung vor dem Auftreffen auf die Antikörper bzw. die Membran konditionieren soll. Dieses Vlies kann zuvor mit Tensiden, Puffersubstanzen oder unspezifischen Proteinen behandelt worden sein.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Zwischen dem Probenaufgabevlies und der Membran befindet sich das Goldvlies. Hier ist der mit kolloidalen Goldpartikeln markierte Detektionsantikörper gebunden. Beim Durchstrom von Lösung wird dieser aus dem Goldvlies gelöst und auf die Membran ausgewaschen. In der Lösung enthaltene Analytmoleküle können an diese Antikörper binden.

Auf der Membran sind, in Fließrichtung nacheinander, zwei Banden aufgetragen. In der ersten Bande (Detektionsbande) ist das Polyhaptan an die Membran gebunden. Welches die Struktur des Analyten nachahmt. Strömen unbesetzte Detektionsantikörper an dieser Bande vorbei, werden sie dort gebunden und führen zu einer Färbung. Bereits mit Analyt besetzte Antikörper werden weiter über die Membran transportiert, d.h. je stärker die Detektionsbande erscheint, desto geringer ist die Konzentration an Analyt. In der zweiten Bande ist ein Kontrollantikörper (Kontrollbande) immobilisiert, der spezifisch Proteine des Wirtstieres bindet, aus dem der Detektionsantikörper stammt. Hier muss zur Auswertbarkeit des Tests immer eine Färbung auftreten. Die verschiedenen Bindungsmöglichkeiten des Detektionsantikörpers sind in Abb. 4 dargestellt.

In Fließrichtung hinter der Membran befindet sich das Saugvlies. Hier wird die durch die Membran gezogene Prüflösung aufgesaugt, damit ein größeres Volumen über die Membran gezogen werden kann. Einerseits wird so nicht an die Banden gebundener Antikörper von der Membran gewaschen –sie entfärbt sich wieder. Andererseits wird der Test empfindlicher, da eine größere Menge Analyt zur Bindung am Antikörper zur Verfügung steht.

Für den Test wird eine Nitrocellulose-Membran eingesetzt. Bei diesem Membrantyp erfolgt die Bindung der Proteine durch elektrostatische Kräfte zwischen den Peptiden und den Nitrogruppen der Membran. Um die unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers an die Membran während des Entwickelns zu verhindern, wird den PBS-Testpuffern Crotein C, ein unspezifisches Protein, zugesetzt.

Neben dem Material sind andere Eigenschaften der Membran für ihre Eignung entscheidend. Die Porengröße ist ausschlaggebend für die Fließgeschwindigkeit der Analysenlösung. Die Porösität -die innere Membranoberfläche pro Fläche- gibt Aufschluss über die Proteinbindungskapazität der verwendeten Membran. Für den zu entwickelnden Test ist die Fließgeschwindigkeit eine

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

besonders wichtige Größe (das Ergebnis soll möglichst schnell vorliegen), so dass eine Membran mit möglichst großem Porendurchmesser (20 μm) eingesetzt wird.

Die Membrankarten werden nach dem Auftragen der Antikörperlösungen getrocknet. Danach werden die unterschiedlichen Vliesmaterialien aufgeklebt. Die Membrankarten haben eine Länge von 26 cm und werden mit Hilfe einer automatischen Schneidemaschine in einzelne Teststreifen zerteilt. Zur Testung werden die Streifen entweder in ein Gehäuse der Fa. MDI mit einem trichterförmigen Probenreservoir oder in das Wischtestgehäuse der Fa. Dräger (vgl. Kap. 2.3.2) eingelegt.

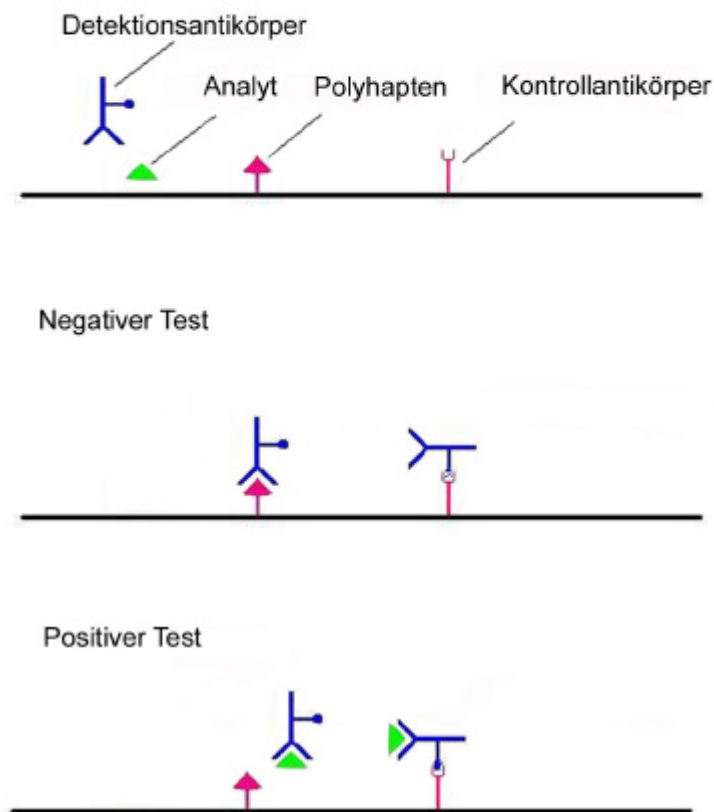


Abb. 4 Bindungsmöglichkeiten des Detektionsantikörpers

2.2 Herstellung eigener Teststreifen

2.2.1 Eingesetzte Antikörper

Um aus einem Antikörperpaar ein Teststreifensystem zu erstellen, ist eine Vielzahl von Versuchen notwendig³⁸. Zum einen müssen die Komponenten für das Testsystem ausgesucht werden, zum anderen müssen die Konzentrationen und Ansatzverhältnisse der unterschiedlichen Auftragslösungen optimiert werden.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

D-Amphetamin-BSA	Biostride Inc.	Lot: F 15	$c_A=8,14$ mg/mL
Amphetamin AK	Biostride Inc.	Lot: G 15	$c_A=4,91$ mg/mL
gt<m> Ig G	Arista	Lot:0421780	$c_A=9,50$ mg/mL

Die Lagerung der eingesetzten Polyhapten- und Antikörper-Stammlösungen erfolgte bei -30 °C.

2.2.2 Biotinylierung des Detektionsantikörpers

Um den Detektionsantikörper mit den kolloidalen Goldpartikeln zu koppeln, wird die sehr stabile Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ausgenutzt. Trotz einer hohen Bindungsaffinität (10^{15} M^{-1}) handelt es sich nicht um eine kovalente Bindung. Diese Technik wird in verschiedenen Bereichen der Bioanalytik ausgenutzt, um auf schonendem Wege Substanzen zu koppeln³⁹. Die Goldpartikel wurden mit bereits gebundenem Streptavidin bezogen. Zur Herstellung der markierten Antikörper musste dieser im Labor biotinyliert werden. Dazu wurde die Antikörper-Stammlösung mit einem 30fachen Überschuss an Sulfo-LC-NHS-Biotin versetzt und 2 h geschüttelt⁴⁰. Dabei bindet das aktivierte Biotin an freie Aminogruppen des Antikörpers. Diese Reaktion ist in Abb. 3 dargestellt.

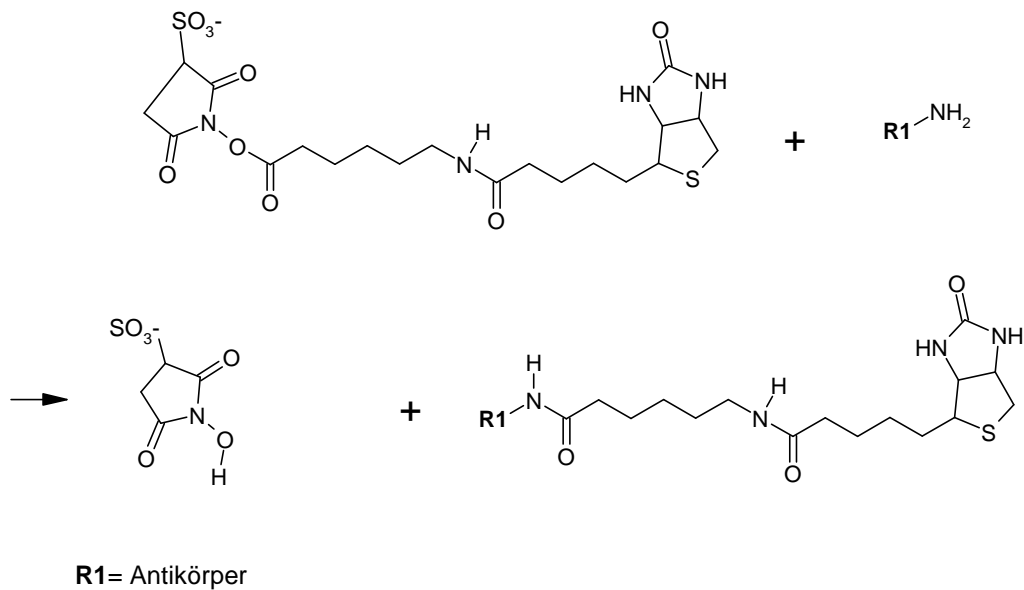


Abb. 3 Reaktionsschema für die Biotinylierung mit LC-Sulfo-NHS-Biotin

Anschließend wurde eine Dialyse mit einem Größenausschluss von 3 kD gegen 80mM Phosphatpufferlösung durchgeführt. So wurden überschüssige niedermolekulare Bestandteile (Biotin) aus der Antikörper-Lösung entfernt. Die Kopplung zwischen den biotinylierten Antikörpern und den markierten Goldpartikeln erfolgte durch Mischen der entsprechenden Lösungen bei Raumtemperatur. Danach wurde das Goldvlies mit der Lösung getränkt und getrocknet.

2.2.3 Verhältnis Streptavidin-Gold

Um das Verhältnis zwischen biotinylierten Antikörpern und Streptavidin-markierten Goldpartikeln zu ermitteln, gibt es zwei Methoden. Zum einen wird diese Bestimmung als Eintauchtest in Lösung (dip-stick-Methode) durchgeführt, Hier werden die mit einer Polyhaptenebande versehenen Membranteile in Gold-Antikörper-Lösungen verschiedener Konzentrationen eingebracht. Die Lösungen werden in kleinen Glasgefäßen vorgelegt (ca. 3 mm Flüssigkeitsstand) und die Membranteile werden senkrecht eingestellt. Nachdem die Gold-Antikörper-Lösung über die Membran gewandert ist, wird diese in ein Gefäß mit Wasser senkrecht hineingestellt. Noch auf der

Membran befindliche Antikörper werden durch das Wasser von der Membran gewaschen, und sie entfärbt sich. Die aufgetragene Bande bleibt gefärbt. Die resultierenden Bandenintensitäten werden verglichen und das Gold-Antikörper-Verhältnis mit der größten Bandenintensität bestimmt. In darunter liegenden Konzentrationen liegt noch unmarkierter Antikörper vor, der Bindungsstellen ohne entsprechende Farbgebung besetzt. In darüber liegenden Konzentrationen treten Konkurrenzreaktionen auf.

Die zweite Art, die Bestimmung des Gold-Antikörper-Verhältnisses durchzuführen, erfolgt auf Teststreifen mit Probenaufgabe- und Goldvlies, d.h. hier liegt der Detektionsantikörper immobilisiert vor. Es werden unterschiedlich präparierte Goldvliese aufgeklebt und die Bandenintensität entsprechend der dip-stick-Methode verglichen.

Die Konzentration der kolloidalen Goldpartikel wird nach der optischen Dichte ihrer wässrigen Suspension bemessen (OD). Die verwendete Stammlösung der eingesetzten, mit Streptavidin markierten, Goldpartikel (Durchmesser 40 μm) betrug OD 9. Aus dieser wurden für die Durchführung des dip-stick-Tests Lösungen mit Verhältnissen zwischen 1 und 16 $\mu\text{g}/\text{OD } 1/\text{mL}$ hergestellt und erprobt. Für den Amphetamin-Antikörper wurde bei einem Verhältnis von 8 $\mu\text{g}/\text{OD } 1/\text{mL}$ die größte Bandenintensität erreicht. Bei höheren Konzentrationen war keine Intensitätszunahme mehr zu beobachten. Bei der Herstellung der Teststreifen wurde daher ein Verhältnis von 8 $\mu\text{g}/\text{OD } 1/\text{mL}$ gewählt.

2.2.4 Membranauswahl und Auftrageversuche

Zum Einsatz kam die FF 60 Membran der Fa. Schleicher & Schüll, eine Nitrocellulosemembran mit 20 μm Porendurchmesser. Die Wahl der Auftrage-lösungen erfolgte so, dass möglichst einheitliche Banden mit ausreichender Intensität gebildet wurden. Zu Beginn der Arbeiten wurden die entsprechenden Versuche mit dem Camag Linomat 4 durchgeführt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

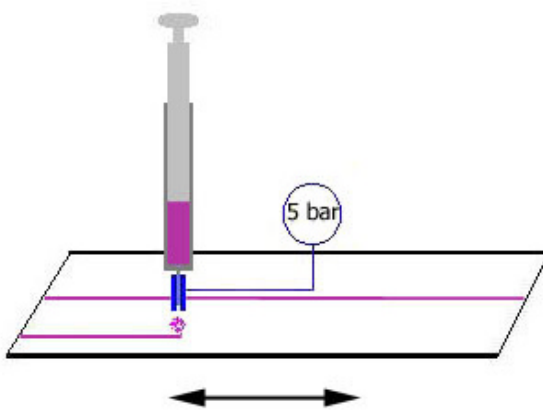


Abb. 5 Funktionsprinzip des Camag Linomat 4

Die Antikörper- bzw. Konjugatlösungen wurden mit einer Mikroliterspritze aufgesprüht. Dabei wurde ein Auftragevolumen von $1 \mu\text{L}/\text{cm}$ und eine Auftragegeschwindigkeit von $7 \text{ sec}/\mu\text{L}$ gewählt. Die Membran wurde durch eine um die Spritzenöffnung reichende Düse mit 5 bar Stickstoff begast. Bei dieser Arbeitsweise musste die Membranoberfläche vor dem Auftragen antistatisch behandelt werden, da durch elektrostatische Aufladung der Flüssigkeitsnebel von der Membran weggelenkt werden könnte. Im Anschluss an das Auftragen der Lösungen musste die Membran getrocknet werden, um Zersetzungsreaktionen zu vermeiden. Bei den durchgeführten Arbeiten wurde die Membran für 30 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet. Die hergestellten Goldkonjugatvliese wurden bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min getrocknet.

Um einen möglichst sensitiven Test zu erhalten, wurden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Polyhaptens und des Kontrollantikörpers auf die Membran aufgetragen und die Empfindlichkeit bestimmt. Für die Detektionsbanden wurden Konzentrationen von 0,25, 0,5 und $1,0 \text{ mg}/\text{mL}$ D-Amphetamin-BSA (bovine serum albumin) eingesetzt. Für die Kontrollbande wurden Konzentrationen von 0,125, 0,25 und $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$ $\text{gt}\langle\text{m}\rangle$ Ig G gewählt. Die Empfindlichkeit wurde durch Zugabe von RS-Amphetaminsulfat-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0 bis $300 \text{ ng}/\text{mL}$ bestimmt. Die Kombination von $0,25 \text{ mg}/\text{mL}$ Polyhaptens und $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$ Kontrollantikörper erwies sich als die Empfindlichste.

Um die Testempfindlichkeit weiter zu steigern, wurde die Polyhaptenskonzentration erniedrigt und in einer Spannweite von $0,25$ bis $0,0625 \text{ mg}/\text{mL}$

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

getestet. Gleichzeitig sollte ermittelt werden, wieviel markierter Detektionsantikörper benötigt wird, um eine ausreichende Färbung der Banden zu gewährleisten. Je geringer die Menge an Detektionsantikörper ist, desto empfindlicher wird auch der Test, da entsprechend weniger Analyt zur vollständigen Absättigung der Bindungsstellen benötigt wird.

Aus der Goldpartikel-Stammlösung wurden Gold-Antikörper-Konjugate mit OD 1, 2 und 3 hergestellt (8 µg/OD 1/mL). Die erhaltenen Goldvliese wurden in Teststreifen eingebaut und die resultierende Empfindlichkeit bzw. Bandenintensität verglichen. Die Streifen mit OD 3 lieferten die besten Ergebnisse.

Als optimale Zusammenstellung für weitere Versuche ergab sich:

Goldkonjugat:	8µg/OD 1/mL	mit OD 3
Detektionsbande:	0,25 mg/mL	in PBS-Gebrauchslösung ohne Salz mit 1 µL/cm aufgetragen

2.2.5 Übertragung auf den Iso flow-Dispenser

Die gefundene Auftragekombination wurde auf einen Iso flow-Dispenser übertragen. Die Banden wurden mit dieser Maschine ebenfalls mit einem Volumen von 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ aufgetragen.

Anders als bei dem Camag Linomat 4 werden die Lösungen hier nicht auf die Membran gesprüht, sondern durch zwei Nadeln aufgetragen, die mit bestimmter Geschwindigkeit direkt über die Membran gezogen werden. Durch Variation der Auftragegeschwindigkeit könnte sich die Bandenbreite bzw. die Flüssigkeitsausbreitung auf der Membran verändern.

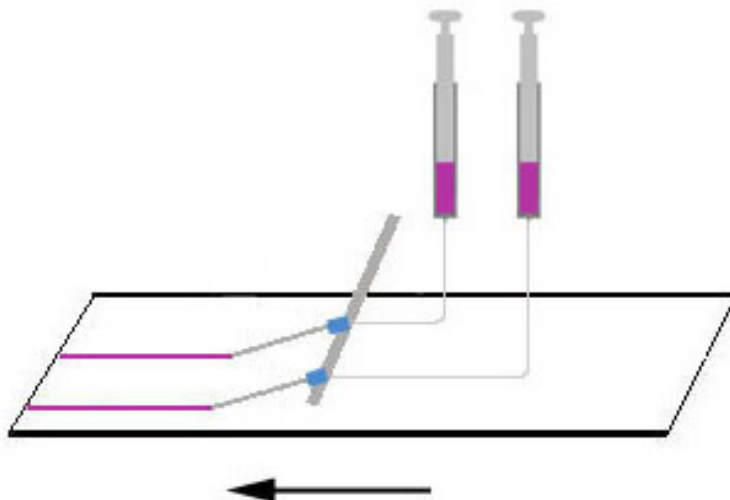


Abb. 6 Funktionsprinzip des Iso Flow Dispenser

Bei Auftragegeschwindigkeiten zwischen 8 mm/sec und 60 mm/sec wurden keine Veränderungen des Auseinanderfließens der Banden beobachtet. Es wurde eine Geschwindigkeit von 10 mm/sec zur Auftragung gewählt.

Mögliche Änderungen der Empfindlichkeit im Vergleich zur Auftragung mit dem Camag Linomat wurden durch eine „Cut-off“-Bestimmung ermittelt. Es wurden Konzentrationen von 0 bis 160 ng/mL RS-Amphetaminsulfat eingesetzt. Durch die Änderung des Herstellungsverfahrens erhöhte sich die Empfindlichkeit nicht signifikant. Der „Cut-off“ lag weiterhin bei ca. 50 ng/mL RS-Amphetaminsulfat in PBS-Gebrauchslösung.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Bei so hergestellten Teststreifen war die Detektionsbande deutlich breiter als die Kontrollbande. Da sich auch die Farbintensitäten unterschieden, beide Banden jedoch gleich breit sein sollten, wurden Auftragsvolumen und Auftragepuffer so geändert, dass die Detektionsbande schmaler wurde. Durch Wechsel des Auftragspuffers und Zusatz von Ethanol war die Detektionsbande schmaler als zuvor.

Nach diesen Optimierungsschritten wurden folgende Lösungen auf dem Iso flow-Dispenser eingesetzt:

Polyhaptensbande: D-Amphetamin-BSA 0,25 µg/µL mit 0,8 µL/cm aufgetragen
Biostride Inc. $c_A = 8,14$ mg/mL
in 50 mM Carbonatpuffer + 5% Ethanol

Kontrollbande: gt<m> Ig G 0,5 µg/µL mit 1,0 µL/cm aufgetragen
Arista $c_A = 9,5$ mg/mL
in PBS-Gebrauchslösung ohne Salz

2.3 Denkbare Probennahmeverfahren

Neben der Entwicklung der Immunchemie, wurde die Probennahme für einen Speicheltest untersucht. Zu Beginn standen vier Probennahmevarianten zur Diskussion. Diese wurden auf ihre Durchführbarkeit und Zuverlässigkeit getestet. Eine wichtige Vorgabe war es, ein Probennahmesystem zur Verfügung zu haben, dass es möglich macht, zuverlässig ein bestimmtes Volumen Speichel zu entnehmen. So kann zum einen das Testergebnis leichter quantifiziert werden, zum anderen ist die Testdurchführung reproduzierbarer. Diese 4 Varianten sind in Tab. 1 aufgeführt.

Spülen	Der Mund wird mit einer Spülflüssigkeit, im einfachsten Fall Wasser, ausgespült und ein bestimmtes Volumen der erhaltenen Flüssigkeit, die dann auch Speichel enthält, wird auf den Teststreifen aufgetragen.
Separater Probennehmer (Salivette)	Es wird mittels eines Probennehmers eine Speichelprobe gesammelt. In dem Probennehmer befindet sich auch eine bestimmte Menge Pufferlösung, mit der in einem zweiten Schritt die Speichelprobe auf den Teststreifen aufgespült werden kann.
Wischtest	Mit dem Dräger-Wischprobennehmer wird auf der Zunge eine Speichelprobe genommen. Anschließend wird der im Pin gesammelte Speichel mit Pufferlösung auf den Teststreifen eluiert.
Direkte Speicheltestung	Der gesammelte Speichel wird so konditioniert, dass er ohne weiteres Verdünnen direkt auf den Teststreifen gegeben werden kann.

Tab. 1 Verschiedene Probennahmevarianten

Die direkte Testung von Speichel auf einem Teststreifen erschien nur schwer vorstellbar, denn die Viskosität des Speichels verhinderte das Laufen des

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Speichels auf dem Teststreifen. Außerdem waren die inter- und intra-individuellen Schwankungen in der Speichelkonsistenz zu groß, als dass man ein einheitliches Laufverhalten erwarten konnte. Daher wurden nur die drei anderen Varianten erprobt.

Um die Spülvariante umzusetzen, war es wichtig zu wissen, wieviel Speichel aus der Mundhöhle durch Ausspülen gewonnen werden kann und wie stark der Speichel verdünnt werden kann bzw. muss. Durchgeführt wurden Versuche, die Aufschluss geben sollten über die

- Fließfähigkeit von Speichelverdünnungen und die
- gewinnbare Speichelmenge.

Bei der Durchführung als Wischtest ist der Probensammler (Pin) von entscheidender Bedeutung, weil er die Speichelaufnahme beeinflusst. Es wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Festlegung des Wischverfahrens
- Verschiedene Imprägnierungen des Probensammlers
- Menge und Zusammensetzung des zugegebenen Puffers
- Dotierungen und Bestimmung des tatsächlichen Verdünnungsfaktors.

Um die Speichelprobennahme durch Einsatz einer Salivette zu untersuchen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

- Ermittlung der gewinnbaren Speichelmenge
- Laufeigenschaften des Salivettenspeichels
- Verbesserte Handhabung durch Verbindung mit einer Spritze
- Dotierungen
- Verdünnung mit Puffer.

2.3.1 Spülvariante

Um eine Vorstellung von der gewinnbaren Speichelmenge zu erhalten, wurde ein Modellversuch zur ausspülbaren Menge von Speichel durchgeführt.

Verschiedene Probanden spülten den Mund 5 sec lang mit 10 mL gelber Farbstofflösung. Die Lösungen wurden anschließend gesammelt, und es wurde die Änderung der Absorption nach Mikrofiltration der Lösung gegenüber der Ausgangslösung bestimmt. Weil bekannt war, dass Raucher weniger Speichel bilden als Nichtraucher, wurde dieser Versuch aufgeteilt in zwei Gruppen durchgeführt. Im Ergebnis konnte bei den Nichtrauchern 1,1 mL Speichel durch Ausspülen gewonnen werden ($n=10$, $S_{rel}=24\%$). Für Raucher lag dieser Wert bei 0,8 mL ($n=5$, $S_{rel}=23\%$). Während der Untersuchung zeigte sich bei den Probanden großes Misstrauen gegenüber dieser Testmethode. Dieses lag zum einen an der Farbe der Spüllösung, die gewählt wurde (Gelb weckte Assoziationen zum Urin), zum anderen daran, dass die erhaltenen Lösungen nicht appetitlich aussahen.

Aus Versuchen zur Fließfähigkeit ergab sich, dass erst ab einer Verdünnung von 1:10 sicher mit einheitlichem Fließverhalten zu rechnen war. Damit verschob sich auch die Nachweisgrenze zu höheren Werten. Begründet durch die ablehnende Haltung, das Nichtvorhandensein eines geeigneten Prüfgefäßes und der Problematik, die sich aus dem starken Verdünnen des Speichels ergibt, wurde diese Variante im weiteren Verlauf nicht näher untersucht.

2.3.2 Wischtest

Von Anfang an war der Einsatz des Wischtestgehäuses der Drägerwerke (Pat. Nr. DE19909891)⁴¹ auch für einen Speicheltest in der Diskussion. Schematisch ist diese Anordnung in Abb. 7 dargestellt.

2.3.2.1 Sammelbare Speichelmenge

Es wurde ermittelt, wieviel Speichel mit Probennehmern verschiedener Porengrößen, abhängig vom Wischverfahren, aufgenommen werden kann. Aus Vorversuchen ergab sich, dass das bloße Abwischen der Zunge nicht genügt, um ausreichend Speichel zu gewinnen. An 5 Probanden wurden zwei Wischverfahren untersucht.

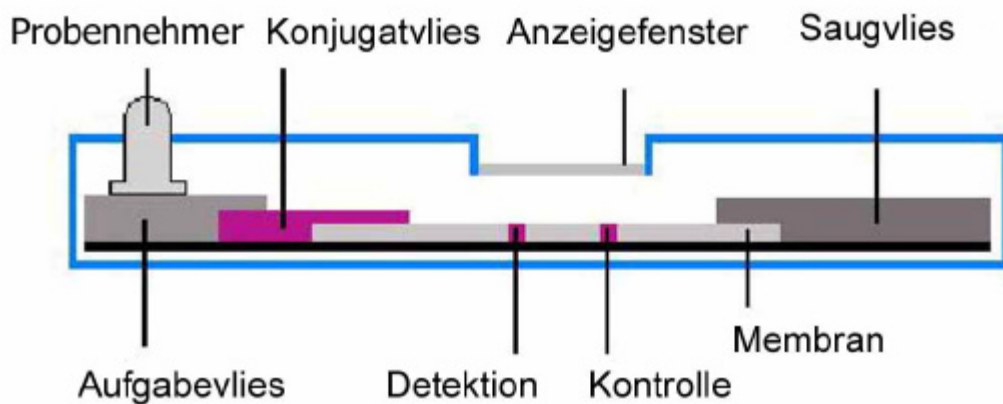


Abb. 7 Aufbau des Wischtests (Patent DE19909891 Drägerwerke Lübeck)

Bei dem ersten Verfahren wurde für 5 sec über den vorderen Teil der Zunge gewischt. Bei dem zweiten wurde 1x von hinten nach vorne über die Zunge gewischt. Beide Durchführungen wurden je Proband dreimal ausgeführt. Die Gewichtszunahme der vorher ausgewogenen Probennehmer (Pin) wurde auf einer Analysenwaage ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt:

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Porengröße		35 µm	50 µm	70 µm	90 µm
5 sec	S _{rel.} ges	19,752	24,69	47,535	23,953
wischen	Massenmittel [mg]	10,645	8,77	6,020	9,267
1x wischen	S _{rel.} ges	34,448	43,607	52,710	26,109
	Massenmittel [mg]	7,573	6,368	5,534	6,470

Tab. 2 Auswertung der mit verschiedenen Verfahren und Pins gesammelten Speichelmengen

Der Pin mit einer Porengröße von 35 µm lieferte die größte Speichelmenge. Dieses ist für den Wischtest gewollt, um den Verdünnungsfaktor so klein wie möglich zu halten bzw. eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen.

2.3.2.2 Abweichende Speichelmengen

Aus den Schwankungen der gesammelten Speichelmengen ergab sich die Frage, wie das System auf abweichende Speichelmengen im Pin reagiert. Dazu wurden Speichelproben in verschiedenen Volumina auf den Pin im Testgehäuse aufgetragen und die Laufzeit im Anzeigefenster registriert. In Tab.3 ist der Zeitpunkt des Erscheinens der Flüssigkeitsfront im Anzeigefenster und der Zeitpunkt für das Erreichens der Oberseite des Anzeigefensters angegeben. Abb. 8 zeigt die entsprechenden Teststreifen als Scanbild. Eingesetzt wurde das Wischgehäuse mit 35 µm Pins von Porex, imprägniert mit 0,75 % Tween 20.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Proband 1

Speichelmenge (µL)	Laufzeit (sec)	Bemerkungen
5	0:20-0:56	
10	0:18-0:55	
15	0:20-0:56	
20	0:21-0:58	geringe und uneinheitliche Goldauswaschung
25	0:30-1:16	Speichel zieht langsam ein Gold läuft uneinheitlich

Proband 2

Speichelmenge (µL)	Laufzeit (sec)	Bemerkungen
5	0:19-1:01	
10	0:20-0:59	
15	0:20-0:56	geringe Goldauswaschung
20	0:31-1:09	geringe Goldauswaschung, Speichel zieht langsam ein
25	0:28-1:10	Speichel zieht schlecht ein

Tab. 3 Laufzeiten in Abhängigkeit von der gesammelten Speichelmenge

An den beobachteten Laufzeiten und insbesondere den unterschiedlichen Bandenintensitäten zeigte sich, dass die Auftragemenge des Speichels auf dem Pin entscheidend für die Testdurchführung war. Eine große Speichelmenge, die an sich wünschenswert wäre, verursachte eine Abschwächung der Detektionsbande, so dass falsch positive Ergebnisse entstehen konnten.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen



Abb. 8 Verschiedene undotierte Speichelvolumina mit 100 μ L PBS-Testpuffer 1 eluiert

Eine Möglichkeit zur Standardisierung der gesammelten Speichelmenge ist es, den porösen Probennehmer komplett mit Speichel zu füllen. In einem Pin ließen sich ca. 40 μ L Speichel sammeln. Der aufgetragene PBS-Testpuffer 1 zog nur langsam in den Pin ein. Die Laufzeit war erheblich länger als bei den anderen durchgeführten Versuchen (1:47-2:30 min). Somit schied dieses Verfahren zur definierten Probennahme durch konstantes Speichelvolumen aus.

2.3.2.3 Erforderliche Puffermenge

Um den gesammelten Speichel möglichst wenig zu verdünnen, aber eine Standardisierung der Fließeigenschaften auf dem Test zu erreichen, sollte das zugegebene Puffervolumen möglichst klein sein. Durch Zugabe verschiedener Puffervolumina wurde die mindestens notwendige Menge Puffer bestimmt. Es zeigte sich, dass ein Volumen von 100 μ L PBS-Testpuffer 1 zur Durchführung erforderlich war. Bei darunterliegenden Volumina war die Laufzeit verlängert bzw. die Goldauswaschung wurde behindert.

2.3.2.4 Einfluss von Analytkonzentration und Speichelvolumen auf das Testergebnis

Ebenso wie die Puffermenge das Testergebnis beeinflusst, ist es denkbar, dass die Empfindlichkeit des Tests nicht von der Konzentration des Amphetamins allein abhängt, sondern auch von der entsprechenden Gesamtmenge an Analyt bzw. vom Speichelvolumen beeinflusst wird.

Daher wurden unterschiedliche Konzentrationen und unterschiedliche Volumina dotierten Speichels auf Teststreifen aufgetragen. In diesem Versuch wurde eine neue Pufferkombination erprobt. In PBS-Testpuffer 1 wurde statt des Tween 20 0,25 % Triton X-100 eingesetzt (PBS-Testpuffer 2), dieser Wechsel des Tensidzusatzes sollte zu einer einheitlicheren Goldauswaschung führen.

In einem ersten Schritt wurde der Speichel nacheinander in Volumina zwischen 0,5-10 μL und Konzentrationen von 500-16000 ng/mL RS-Amphetaminsulfat auf die Streifen aufgetragen.

In einem zweiten Schritt wurden Speichelproben verschiedener Probanden mit Konzentrationen von 500, 2000 und 4000 ng/mL RS-Amphetaminsulfat dotiert und in Volumina von 2,5 bzw. 5 μL aufgetragen.

Die Teststreifen haben eine konstante Laufzeit gezeigt, die Front tauchte nach 18-23 sec im Anzeigefenster auf und hatte nach 0:52-1:04 min das obere Ende des Anzeigefensters erreicht.

Die erhaltenen Bandenintensitäten waren reproduzierbar. Bei zu kleinen Volumina ($< 1 \mu\text{L}$) ergaben sich jedoch Schwankungen, so dass es sinnvoll erschien, ein Mindestvolumen an Speichel von 1 μL festzulegen.

2.3.3 Salivettenspeichel

Als ein geeignetes System zur Probennahme erscheint die Salivette von Sarstedt. Da in der Vor-Ort-Testung keine Zentrifuge zur Verfügung steht bzw. dieser Prozess die Probennahme zu sehr verlängern würde, wurde eine neue Kombination zur Probennahme entwickelt. Dazu wurde eine Geweberolle am Stempel einer Polypropylen-Spritze befestigt. Ein Schema dieses Probennehmers zeigt Abb. 9. Dieser Probennehmer wird für einen definierten Zeitraum in die Mundhöhle eingebracht. Dabei werden Kaubewegungen auf diesem ausgeführt. Anschließend wird der Stempel in den dazugehörigen Spritzenkörper eingesteckt, dabei wird die Geweberolle ausgepresst. Der so erhaltene Speichel weist eine geringere Viskosität als der durch Ausspucken gesammelte Speichel auf. Ob dieses an dem von der Geweberolle angeregten Speichelfluss liegt, oder ob die Geweberolle aktiv den Speichel so konditioniert, ist nicht klar. Wahrscheinlich kommen beide Effekte zusammen.

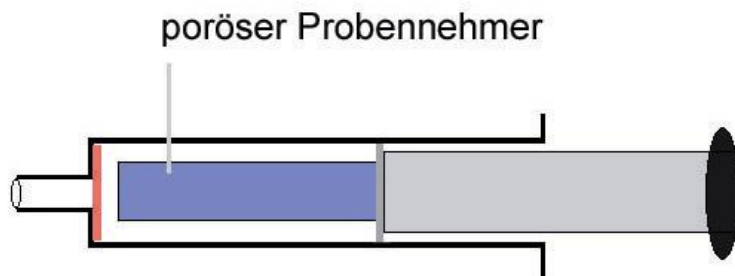


Abb. 9 Speichelprobennehmer bestehend aus Geweberolle und Spritze

Nachfolgend sollen die Entwicklungsstufen der Salivettenspeichelprobennahme dargestellt werden.

2.3.3.1 Beurteilung der Fließfähigkeit

Der in der Salivette gesammelte Speichel war nach dem Auspressen auf dem gewählten Testsystem (FF 60 Membran) fließfähig. Um das Fließverhalten zu verbessern, wurde der Einsatz von verschiedenen Tensiden bzw. Pufferzusätzen erprobt.

Zuvor wurde untersucht, wieviel Speichel auf diesem Weg bei verschiedenen Probanden (n=19) gesammelt werden kann. Anschließend wurde überprüft, ob dieser Speichel auch auf einem Amphetamin-Teststreifen im MDI Gehäuse zuverlässig läuft.

Es wurden verschiedene Parameter zur Bewertung erfasst:

Verweilzeit der Salivette im Mund:	33-45 sec
Volumen des erhaltenen Speichels:	100-850 μL \bar{x} =320,8 μL $S_{\text{rel.}}$ =61,24 %
Laufverhalten auf der Membran:	0:16-1:15 min Anfang 0:58-3:10 min Ende
Frühstmögliche Ablesbarkeit:	1:00-4:30
Bandenintensität:	nicht einheitlich
Hintergrund auf der Membran:	zum Teil langanhaltend
Goldauswaschung:	nur selten gut, eher schlecht

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Menge Speichel die man aus der Salivette auspressen konnte, ausreicht, um einen Lauf auf dem Teststreifen zu ermöglichen. Beim Ausdrücken machte sich allerdings ein Problem bemerkbar. Der Speichel schäumte stark, sobald er aus der Geweberolle ausgepresst wurde. Dieses verlängerte die Zeit der Probennahme und führte zum Überlaufen des Testreservoirs. Um weniger Schaum zu erzeugen, wurden die Proben durch eine auf die Spritze des Probennehmers aufgesetzte Kanüle ausgedrückt. So konnte die Schaumbildung reduziert werden.

Das Erscheinungsbild der Banden war allerdings nicht so, als dass man den Salivettenspeichel unbehandelt zur Testdurchführung einsetzen konnte. Die Goldauswaschung war zum Teil schlecht und es bildeten sich verschwommene Banden bzw. Ablagerungen auf der Membran. Die Bandenintensität war nicht bei allen Streifen von gleicher Stärke. Die Kontrollbande war teilweise sehr schwach.

2.3.3.2 Dotierter Salivettenspeichel

In einem Dotierungsexperiment sollte geklärt werden, wie empfindlich Amphetamin aus unbehandeltem Salivettenspeichel detektiert werden kann. Dazu wurden Speichelproben, die durch Auspressen aus der Geweberolle gewonnen wurden, auf Konzentrationen von 312,5 bis 2500 ng/mL RS-Amphetaminsulfat dotiert. Von diesen Lösungen wurden 150 µL auf die Teststreifen gebracht. Die Laufeigenschaften wurden registriert und die Bandenintensitäten zwischen den verschiedenen Probanden verglichen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 4 und Abb. 10-13 dargestellt.

Proband	Blindwert	312,5 ng/mL	625 ng/mL	1250 ng/mL	2500 ng/mL
Je	0:57-2:40	Det. stark	Det. stark	Det. stark	Abschwächung
J1	0:27-1:20	Gold läuft nicht			
Ra	0:50-2:00	Entfärbung	Entfärbung	Entfärbung	Entfärbung
J2		Entfärbung	Entfärbung	Entfärbung	Entfärbung

Tab. 4 Visuelle Beurteilung der Bandenintensität für erste Dotierungsversuche

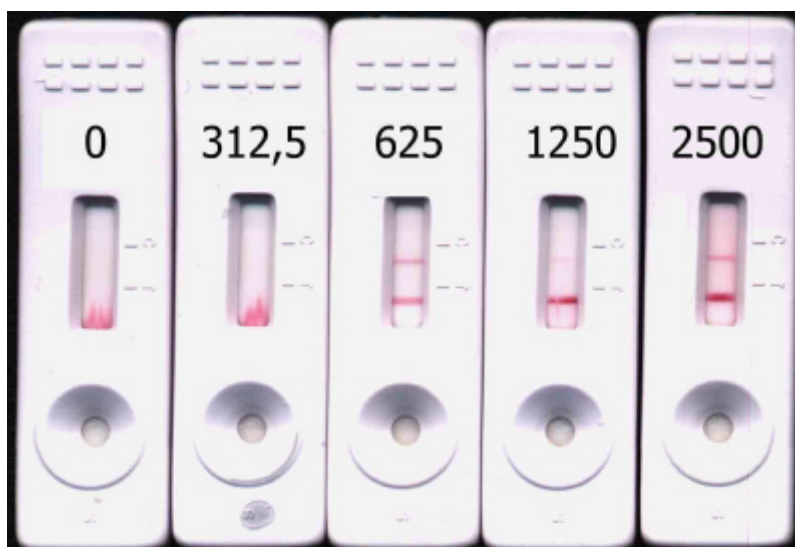


Abb. 10 Proband Je

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

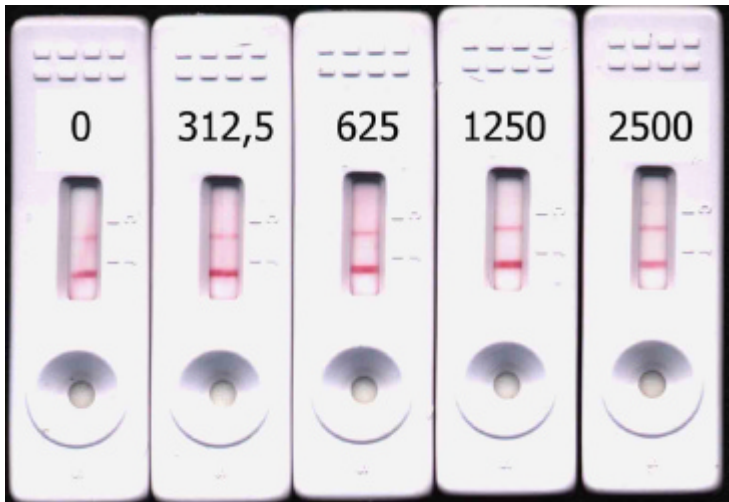


Abb. 11 Proband J1



Abb. 12 Proband Ra



Abb. 13 Proband J2

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Bei diesen Versuchen konnte für einige Probanden beobachtet werden, dass auch mit unbehandeltem Salivettenspeichel eine Abschwächung der Detektionsbande erzielt werden konnte. Der Anteil an nicht auswertbaren Proben war jedoch für einen zuverlässigen Vor-Ort-Test zu hoch. Um die angestrebte möglichst hohe Robustheit zu erreichen, wurde versucht, die Testdurchführung dahingehend zu verändern. Um zu besseren Fließeigenschaften des Salivettenspeichels zu gelangen, erschien der Einsatz von Pufferlösungen sinnvoll.

So erzielt man zum einen einen Verdünnungseffekt, zum anderen können Substanzen zugesetzt werden, die die Auswertbarkeit des Tests verbessern können z.B. unspezifische Proteine und Tenside.

2.3.3.3 Bestimmung des optimalen Verdünnungsfaktors

In dem nachfolgenden Versuch sollte geklärt werden, in welchem Verhältnis der PBS-Testpuffer 2 zum Speichel zugesetzt werden muss, um eine bestmögliche Empfindlichkeit zu erreichen. Ein weiteres Augenmerk war die nötige Robustheit. Aus dem unter 2.3.3 beschriebenen Probennehmer waren unterschiedliche Volumina Speichel erhältlich, d.h. eine Veränderung des Verdünnungsfaktors musste berücksichtigt werden.

Es wurden Speichelproben mittels dieses Probennehmers genommen und ausgewogen. Anschließend wurde der Speichel auf eine Konzentration von 200 ng/mL RS-Amphetaminsulfat dotiert. Jede Speichelprobe wurde nach dem in Tabelle 5 dargestellten Schema verdünnt.

Verdünnungsfaktor	0,5	1	2	4
Speichel (µL)	100	75	50	30
Puffer (µL)	50	75	100	120

Tab. 5 Speichelverdünnungen

Je 150 µL der hergestellten Verdünnungen der Speichelproben wurden auf einen Teststreifen gegeben. Neben der Empfindlichkeit wurde auch die Laufzeit registriert. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

1. Proband J Speichelmenge 1412 mg

Verdünnungsfaktor	0,5	1	2	4
Laufzeit im Fenster	0:30- 1:55 min	0:31- 1:51 min	0:23- 1:36 min	0:20- 1:23 min

2. Proband Je Speichelmenge 1111 mg

Verdünnungsfaktor	0,5	1	2	4
Laufzeit im Fenster	0:27- 1:38 min	0:25- 1:32 min	0:22- 1:28 min	0:20- 1:20 min

3. Proband Ra Speichelmenge 801 mg

Verdünnungsfaktor	0,5	1	2	4
Laufzeit im Fenster	0:54- 2:37 min	0:40- 2:15 min	0:35- 2:01 min	0:27- 1:41 min

4. Proband C Speichelmenge 1140 mg

Verdünnungsfaktor	0,5	1	2	4
Laufzeit im Fenster	0:29- min	0:23- 1:30 min	0:23- 1:23 min	0:19- 1:20 min

Tab. 6 Laufzeiten bei unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren

Es zeigte sich, dass die Verdünnung mit Puffer die Analyse des Salivettenspeichels wesentlich verbessert.

Auch hier wurden deutliche Empfindlichkeitsunterschiede für verschiedene Probanden beobachtet. Zum Teil erhielt man kaum eine Abschwächung der Detektionsbande; aber auch eine komplette Entfärbung war möglich. Bei einem Verdünnungsfaktor von 4 bewegt man sich, bezogen auf die Dotierkonzentration 200 ng/mL, im Bereich des mit dotiertem Puffer ermittelten „Cut-off“ von ca. 50 ng/mL RS-Amphetaminsulfat. Auch hier trat eine Entfärbung auf.

2.3.3.4 Verschiedene Tenside und Membranen

Nachdem erste Erfahrungen mit dem Einsatz der Salivette gemacht wurden, sollte durch gezielte Materialauswahl versucht werden, das Testergebnis zu verbessern. Dazu wurde der Einsatz von verschiedenen Tensiden und Membranen erprobt.

Die hergestellten 26 cm Standard-Amphetaminkarten wurden unterschiedlich laminiert:

- Unbehandeltes Probenaufgabevlies (Sample pad)
- Probenaufgabevlies in 1%iger Triton X-100-Lösung getränkt und getrocknet
- Probenaufgabevlies in 1%iger Tween 20-Lösung getränkt und getrocknet

Diese drei Varianten wurden zusammen mit einem Streifen 15 µm Membran von MDI, ebenfalls mit der bekannten Bandenzusammenstellung, getestet. Es wurden Speichelproben von verschiedenen Probanden mit der Geweberolle gesammelt und auf die verschiedenen Teststreifen aufgetragen. Die Laufzeiten wurden registriert und sind in Abb.14 dargestellt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

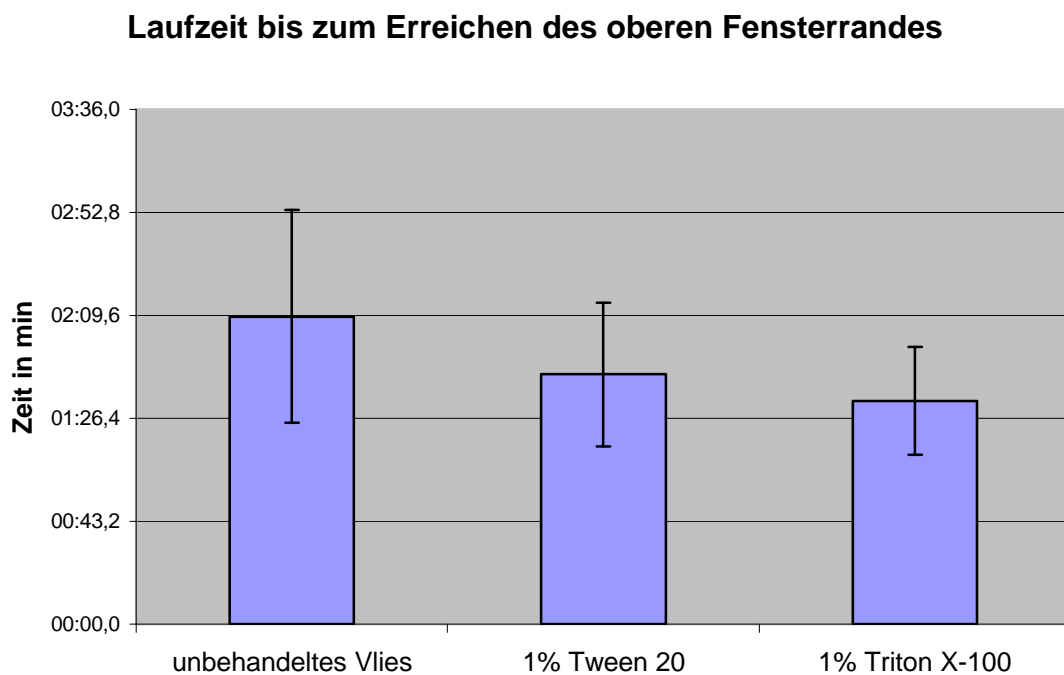
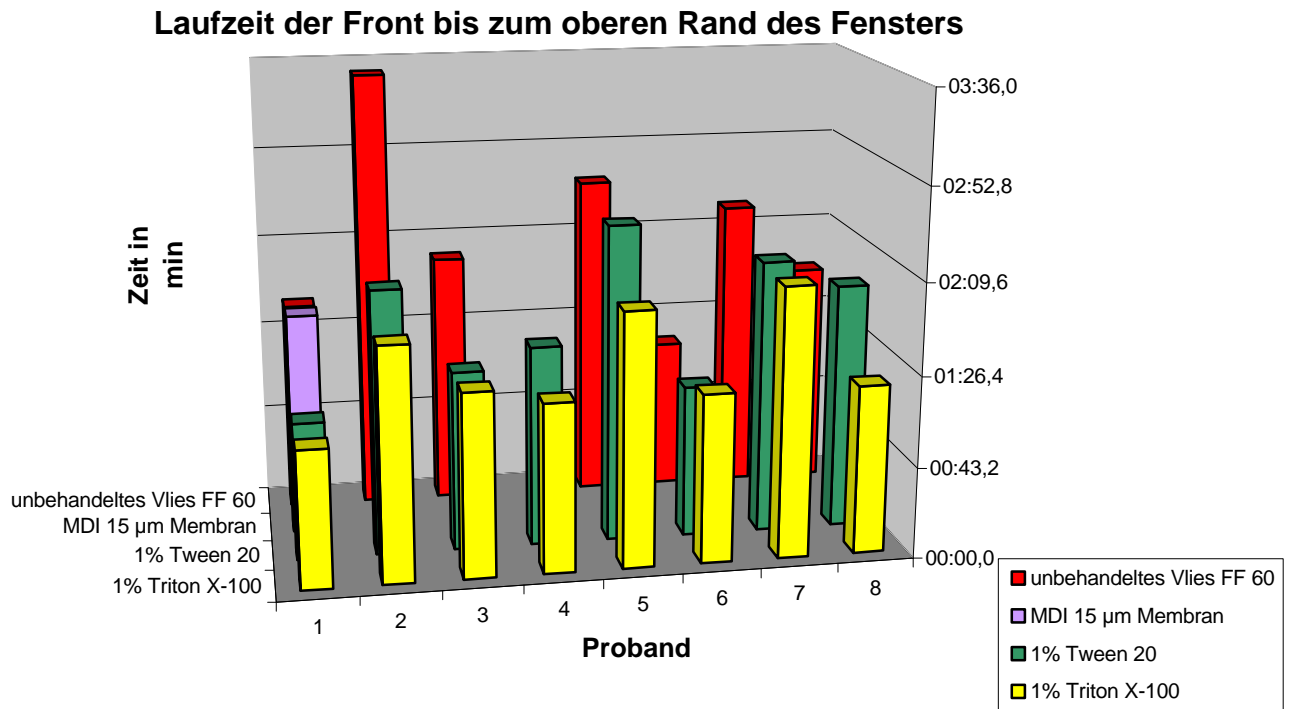


Abb. 14 Ergebnisse für verschiedene Testzusammenstellungen an mehreren Probanden ermittelt

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Aus den Versuchen ging hervor, dass ein Tensidzusatz auf dem Proben-
aufgabevlies sinnvoll war. Die Zeit bis zum Erreichen des oberen Fenster-
randes konnte deutlich verkürzt werden, und auch die Ausbildung der Banden
wurde durch den Tensidzusatz beschleunigt. Im Fall von Triton X-100 ergab
sich bei dotierten Proben eine Abschwächung der Detektionsbande. Im
Vergleich der drei Varianten war diese am besten geeignet, um die
Testdurchführung zu verbessern. Jedoch gelang auch hier die Testdurch-
führung nicht mit hinreichender Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit.

2.3.3.5 Vergleich Wischtest vs. Salivettenspeichel

Um die beiden Verfahren miteinander vergleichen zu können, wurden beide
Testsysteme mit derselben Speichelprobe getestet und die Empfindlichkeiten
gegenübergestellt. Aus der Speichelprobe wurde mit Hilfe der Geweberolle ein
Teil abgenommen und aus der Rolle in ein zweites Gefäß ausgepresst. Aus
diesen beiden Speichelsorten wurden nach dem folgenden Schema Dotier-
lösungen hergestellt (Tab. 7).

Konzentration	Amphetamin Stammlösung	Speichelmenge
1000 ng/mL	6 µL (25000 ng/mL)	144 µL
2000 ng/mL	12 µL (25000 ng/mL)	138 µL
4000 ng/mL	24 µL (25000 ng/mL)	126 µL
8000 ng/mL	1,2 µL (1 mg/mL)	149 µL

Tab. 7 Verdünnungsschema für Salivettenspeichel

Es wurden je 150 µL dotierter Salivettenspeichel auf die MDI Gehäuse
gegeben und die Laufzeit notiert.

Von dem dotierten, unbehandelten Speichel wurden 4 µL auf den Pin gegeben
und anschließend mit 100 µL PBS-Testpuffer 1 ausgespült. Auch hier wurde
die Laufzeit registriert. Es wurde jeweils ein Blindwert durchgeführt. Die
ermittelten Laufzeiten sind in Tab. 8 dargestellt. In Abb. 15 und 16 sind die
entsprechenden Teststreifen gezeigt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Vergleich der Laufzeiten:

	1000 ng/mL	2000 ng/mL	4000 ng/mL	8000 ng/mL	Blindwert
Wischtest	0:22-1:04	0:21-1:02	0:22-1:04	0:20-0:58	0:19-0:58
MDI	0:33-1:30	0:26-1:23	0:27-1:20	0:35-1:31	0:31-1:52

Tab. 8 Vergleich der Laufzeiten für unterschiedlich dotierten Salivettenspeichel

Betrachtet man die Ergebnisse, so bestätigen diese die Annahme, dass der Wischtest schneller läuft. Bedingt durch die große Puffermenge erfolgt hier eine Standardisierung der Fließeigenschaften.

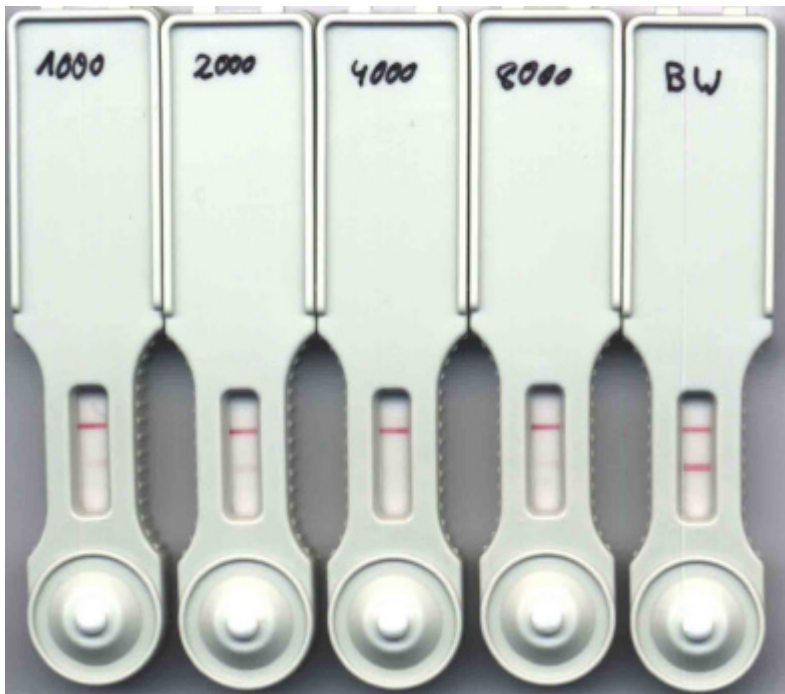


Abb. 15 Dotierter Speichel auf dem Wischtest

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

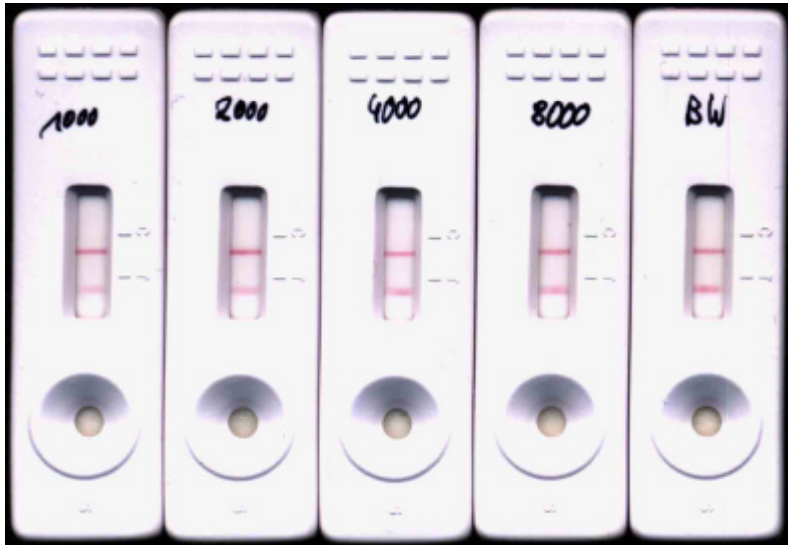


Abb. 16 Dotierter Salivettenspeichel im MDI Gehäuse

Der gleiche Versuch wurde nun mit Teststreifen durchgeführt, deren Proben-aufgabevlies mit 1%iger Triton X-100 Lösung getränkt wurde.

Dabei ergaben sich folgende Laufzeiten:

	1000 ng/mL	2000 ng/mL	4000 ng/mL	8000 ng/mL	Blindwert
Wischtest	0:22-0:57	0:21-0:53	0:22-0:57	0:18-1:01	0:20-1:00
MDI	0:30-1:25	0:26-1:23	0:22-1:05	0:27-1:22	0:27-1:12

Tab. 9 Vergleich der Laufzeiten für unterschiedlich dotierten Salivettenspeichel mit Tensidzusatz

Die Ergebnisse zeigten, dass durch den Tensideinsatz die Laufeigenschaften des Salivettenspeichels verbessert werden konnten. Bei visueller Auswertung erschien auch die Empfindlichkeit des Tests erhöht.

Für den Wischtest ließ sich kein Vorteil des Tensideinsatzes erkennen. Dieses ist auch erklärlich, da hier die Speichelmenge hinter dem Puffervolumen deutlich zurücksteht. Wenn also der Test mittels einer Salivette durchgeführt wird, müsste auch ein Tensid (Triton X-100) eingesetzt werden.

2.3.3.6 Stabilitätstest

Zur Abrundung der Ergebnisse wurde ein Stabilitätstest durchgeführt, um Aussagen über die Praxistauglichkeit des Tests machen zu können. Hierzu wurden die Bandenintensitäten, die durch verschiedene Kalibrierlösungen nach unterschiedlicher Lagerzeit bei 60° C erzeugt wurden, mit einem Camag DC-Scanner ermittelt und mit den Ausgangswerten verglichen.

Die zu prüfenden Teststreifen wurden in das Wischtestgehäuse eingebaut. Jeweils 8 Streifen wurden mit 8 Trockenkissen in Alubeutel eingeschweißt. Die Stabilitätsuntersuchung hatte eine Laufzeit von einer Woche. Zur Bestimmung der Ausgangswerte wurden die Teststreifen direkt nach der Herstellung mit den Kalibrierlösungen dotiert und wie unten beschrieben mit dem Camag DC-Scanner ausgewertet. Es wurden Teststreifen bei Raumtemperatur und 60 °C eingelagert. Die Proben wurden so eingelagert, dass am Ende der Testzeit Proben für 7, 4, 3, 2 und 1 Tag Lagerung bei 60 °C zusammen ausgewertet werden konnten. Zur Auswertung wurden die Bandenintensitäten für die Konzentrationen 0, 12.5, 25 ,50 und 100 ng/mL 30 min nach Auftragen der Testlösungen mit dem Camag DC-Scanner bestimmt.

In Tabelle 10 sind die jeweiligen Bandenintensitäten zusammenfassend dargestellt. Für die Ausgangsintensitäten wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Stabilitätstest Amphetamin Teststreifen

Mittelwerte bei RT

	Standard		7 Tage RT		3 Wochen RT	
	Kontrolle	Detektion	Kontrolle	Detektion	Kontrolle	Detektion
100 ng/ml	28,83	5,57	32,15	5,75	37,80	3,60
25 ng/ml	24,10	12,10	29,45	16,00	36,70	18,70
12,5 ng/ml	25,87	22,37	31,15	22,85	37,60	35,30
BW	23,70	39,67	30,15	48,10	40,00	59,65

Mittelwerte Detektion 60 C

	Standard	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	7 Tage
100 ng/ml	5,57	3,20	3,65	2,65	3,70	3,40
25 ng/ml	12,10	8,85	9,05	8,80	2,80	5,45
12,5 ng/ml	22,37	15,45	15,65	9,45	12,90	5,95
BW	39,67	26,80	29,80	22,70	18,95	15,50

Mittelwerte Kontrolle 60 C

	Standard	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	7 Tage
100 ng/ml	28,83	26,95	29,10	21,40	23,20	16,50
25 ng/ml	24,10	26,30	26,50	22,20	20,85	16,25
12,5 ng/ml	25,87	25,85	26,25	21,65	25,60	16,35
BW	23,70	26,15	29,65	23,85	20,50	17,40

Tab. 10 Bandenintensität für Stabilitätstest laut Camag DC-Scanner

Die beiden Graphen in Abb. 17 zeigen die Veränderung der Bandenintensität über den Lagerungszeitraum. Aus dem Vergleich der beiden Graphen ist erkennbar, dass die Stabilität der Kontrollbande nicht zufriedenstellend ist. Sowohl bei der Lagerung bei Raumtemperatur, als auch bei der Lagerung bei 60° C verändert sich die Intensität der Bande deutlich.

Die Verdrängung der Detektionsbande erfolgt auch nach Lagerung bei 60 °C relativ gleichbleibend. Nur im Bereich unterhalb von 60 ng/mL ergibt sich ein unterschiedlicher Kurvenverlauf.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

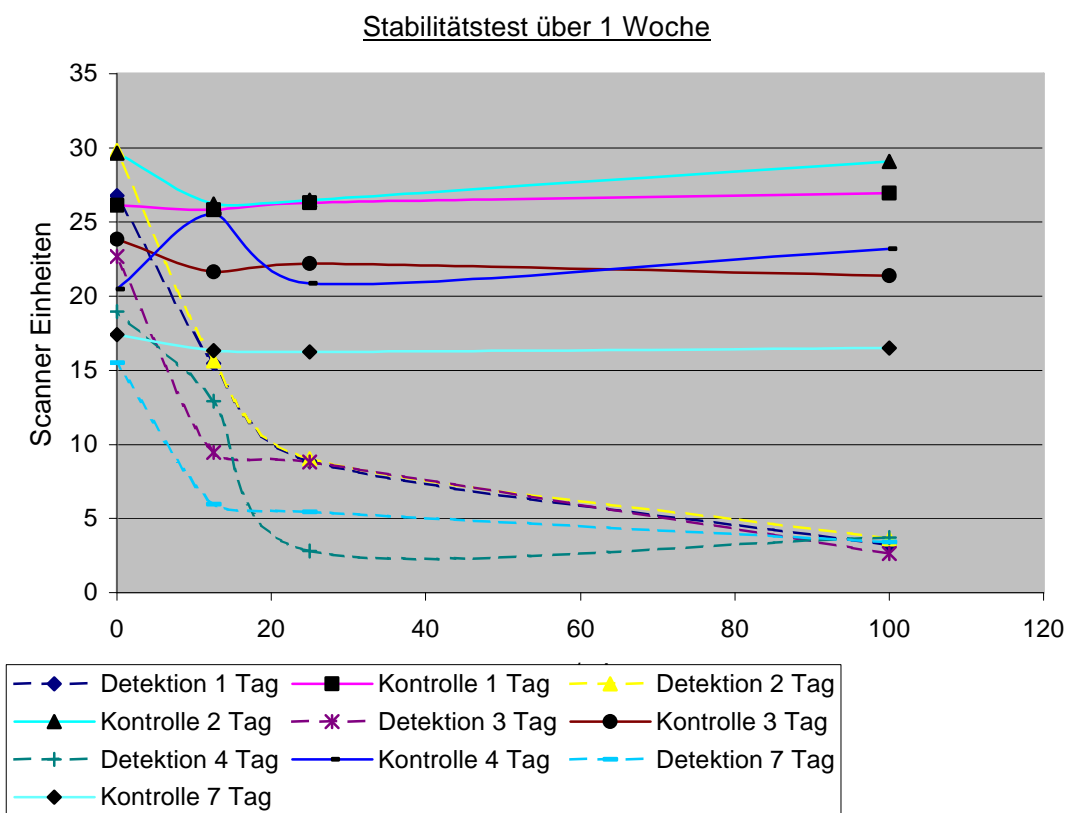
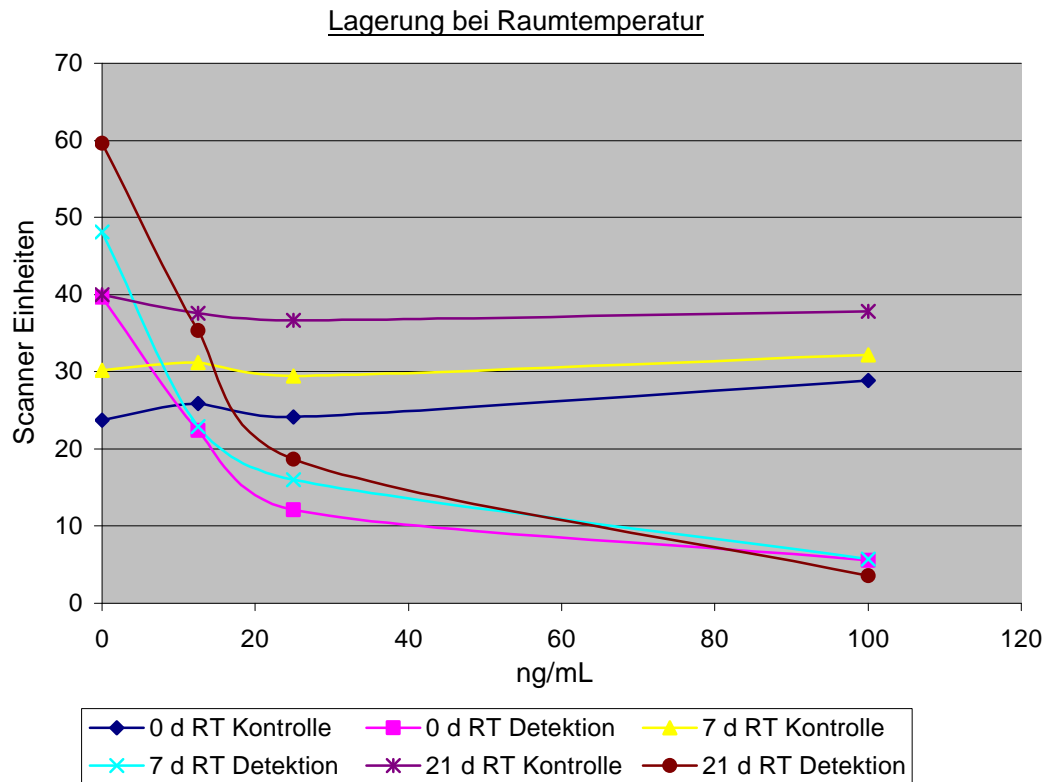


Abb. 17 Ergebnisse des Stabilitätstests Vergleich Raumtemperatur vs. Lagerung bei 60°C

2.4 Arbeiten mit fertig gekoppelten Antikörper

2.4.1 Empfindlichkeitsüberprüfung

Als Weiterführung der Arbeiten wurde der Einsatz eines bereits an kolloidale Goldpartikel gekoppelten Detektionsantikörpers erprobt. So konnten die Kopplungsreaktion zwischen Antikörper und Biotin und die Reaktion zwischen Goldpartikeln und biotinyliertem Antikörper im Labor entfallen.

Es wurden verschiedene Antikörper von der Firma Alchemy Laboratories Ltd. mit kolloidalen Goldpartikeln gekoppelt.

Amphetamin-AK [m]

OD 10,5 Lot 9564 3 µg/mL/OD 1

OD 9,9 Lot 9563 3 µg/mL/OD 1

Methamphetamin-AK [m]

OD 10,5 Lot 9558 3 µg/mL/OD 1

OD 9,48 Lot 9557 3 µg/mL/OD 1

Diese Antikörperlösungen (Konjugatgröße 40 nm) lagen in einem Puffer aus 50 mM Tris, 0,5 % BSA, 150 mM NaCl bei pH 8,0 vor und waren mit 0,1 % Natriumazid konserviert.

Es wurden mit den konjugierten Antikörpern anfänglich neue Teststreifen mit der zuvor entwickelten Rezeptur hergestellt (vgl. Kapitel 2.2 und 2.3). Damit für diese Überprüfung nicht zu viel Konjugatlösung verbraucht wurde, wurde der Camag Linomat 4 zur Auftragung der Banden auf Schleicher&Schüll FF 60 Fertiglamine verwendet.

Antikörper	konj. D-Amphetamin AK Biostride	OD 10,5 bzw. 9,9
	D-Amphetamin-BSA Biostride	Lot: F15 8,14 mg/mL
	gt<m> Ig G Arista	Lot:421780 9,5 mg/mL
Membran	FF 60	S&S Lot: BN0855-1

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Herstellung der Antikörperlösungen:

Detektionsbande: 0,25 mg/mL D-Amphetamin-BSA

in 50 mM Carbonatpuffer+ 5% Ethanol

Kontrollbande: 0,5 mg/mL $\text{gt}<m>$ Ig G

in PBS-Gebrauchslösung ohne Salz

Die Trockenprozeduren für die Vliese wurden insofern verändert, als dass die Membran-Karte bei 60° C für eine Stunde und das Goldvlies bei 70° C für 45 min getrocknet wurden.

Die erhaltenen Teststreifen wurden mit S-(+)-Amphetamin-Lösungen getestet. Je 10 μL wässrige Amphetaminlösung wurde auf den Probennehmer aufgetragen und anschließend mit 100 μL PBS-Testpuffer 2 eluiert. Als Vergleich wurde eine Konzentration von 100 ng/mL RS-Amphetamin eingesetzt.

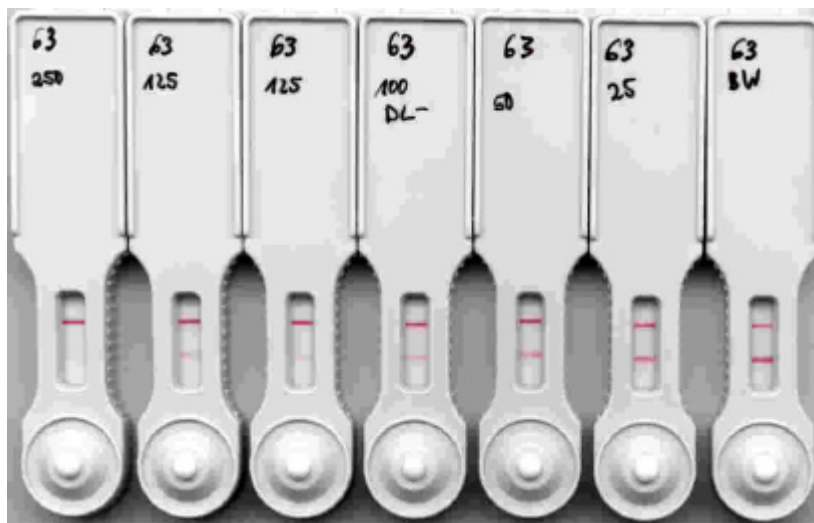


Abb. 18
Konjugierter Amphetamin
Antikörper mit Dotierung

Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt und zeigen, dass ab einer Konzentration von >250 ng/mL S-(+)-Amphetamin eine komplette Verdrängung der Detektionsbande vorliegt. Die Detektionsbande ist beim Blindwert intensiver gefärbt, als die Kontrollbande und bereits ab einer Konzentration von 25 ng/mL in der Analysenlösung erfolgt eine Abschwächung der Detektionsbande. Aus dem Vergleich zwischen 100 ng/mL RS- und 50 ng/mL S-(+)-Amphetamin geht hervor, dass auch R(-)-Amphetamin an der Ver-

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

drängung des Signals beteiligt ist, denn das Racemat zeigt eine deutlichere Abschwächung als die gleiche Menge des S-(+)-Enantiomers.

Mit Lösungen von RS-Amphetaminsulfat wurde vergleichend der Cut-off Wert bestimmt. Dazu wurden Konzentrationen von 200, 100, 50, 25, 12.5 und 6.25 ng/mL mit einer Auftragsmenge von 100 μ L eingesetzt. Die entsprechenden Teststreifen sind in Abb. 19 dargestellt.

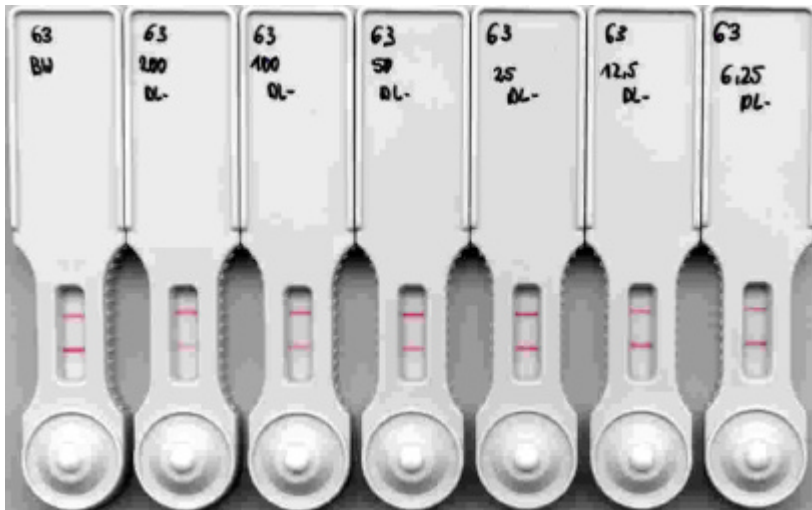


Abb. 19
RS-Amphetamin Konzentrationsserie auf Teststreifen mit konjugiertem Amphetamin-Antikörper

2.4.2 Verschiedene Kombinationen der Bandenanordnung

Kombination von Amphetamin und Methamphetamin-Antikörpern

Neben dem Amphetaminantikörper sollte in einer dritten Bande auf dem Teststreifen parallel die Detektion von Methamphetamin erfolgen. Um diese Variante zu erproben, wurden die folgenden Antikörperlösungen auf die Membran aufgetragen:

Amphetamin:	0,25 mg/mL in 50 mM Carbonatpuffer+ 5% Ethanol
Methamphetamin:	0,15 mg/mL in 50 mM Carbonatpuffer+ 5% Ethanol
Kontrolle:	0,5 mg/mL in PBS-Gebrauchslösung ohne Salz

Die Detektionsantikörperkonjugate wurden mit einer Konzentration von OD 3 eingesetzt. Um den Einfluß der Reihenfolge bei der Bandenanordnung zu untersuchen, wurden die Banden in der Reihenfolge Kontrolle (K), Amphetamin (A) und Methamphetamin (M) (also KAM) sowie Kontrolle,

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Methamphetamin und Amphetamin (somit KMA) jeweils von oben nach unten aufgetragen. Zu Beginn wurden KAM-Streifen mit beiden Goldpads erprobt. Der Blindwert zeigte, dass die untere Bande am intensivsten gefärbt war. Wurden Amphetamin- oder Methamphetaminlösungen hinzugegeben, so veränderten sich lediglich die Intensitäten der Banden. Eine Verdrängung, wie sie bei den entsprechenden Konzentrationen bei Einzeltests zu erwarten wäre, trat nicht auf.

Wurde jeweils nur ein Goldkonjugatvlies eingesetzt, so ließen sich, wie auch in Einzeltests beobachtet, die Banden verdrängen. Beim Vergleich der vier möglichen Kombinationen bei Einsatz nur eines Detektionsantikörpers zeigte sich, dass der Amphetaminantikörper stärker an der Amphetaminbande gebunden wurde, als es bei dem Methamphetaminantikörper an der Methamphetaminbande zu beobachten war.

Um auf diesem Wege ein Kombinationstest für Amphetamin und Methamphetamin zu entwickeln, war es sinnvoll, diesen mit der Reihenfolge KMA auf der Karte zu erstellen. Eine andere Möglichkeit war der Einsatz von nur einer Detektionsbande auf der Membran.

Diese Variante ist sinnvoller, da eine Unterscheidung zwischen den beiden Analytklassen auch mit zwei Detektionsbanden nicht gelingt. Die Konzentration, die benötigt wird, um die Epitope beider Detektionsantikörper zu sättigen, ist aufgrund der unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten ebenfalls stark erhöht. In nur einer Detektionsbande könnten entweder beide Polyhaptene oder nur das Amphetamin-Polyhaptene immobilisiert sein. Dieses erschien möglich, da auch der Methamphetamin-Detektionsantikörper eine Affinität zu D-Amphetamin-BSA gezeigt hat.

Eine Unterscheidung, welcher Analyt für die Verdrängung verantwortlich ist, gelingt dann nicht. Aufgrund der Antikörperauswahl müsste auch eine im Vergleich zur Kontrolle abgeschwächte Bande als positives Testergebnis gewertet werden, da eine komplette Verdrängung der Detektionsbande erst bei sehr hohen Konzentrationen erfolgt.

2.4.3 Amphetamin-Gruppentest

2.4.3.1 Kreuzreaktivität Amphetamin und Methamphetamin

Um eine geeignete Kombination der Antikörper für einen Amphetamin-Gruppentest mit einer Detektionsbande zu finden, wurde zunächst die Kreuzreaktivität von Amphetamin mit dem Methamphetamintest und umgekehrt bestimmt. Ziel war es, mit einem Detektionsantikörper bzw. einem Gemisch beider und einer Detektionsbande einen empfindlichen Amphetamin-Gruppenachweis, wie oben erläutert, zu erhalten.

Bei dem Amphetamintest wurde die Verdrängung mit MDMA und bei dem Methamphetamintest mit RS-Amphetamin ermittelt.

Bei dem Amphetamintest war ab einer Konzentration von ca. 1000 ng/mL MDMA die Detektionsbande deutlich schwächer gefärbt als die Kontrollbande. Auch bei Konzentrationen bis zu ca. 250 ng/mL MDMA ließ sich noch eine Abschwächung im Vergleich zum Blindwert erkennen. Die eingesetzten Teststreifen sind in Abb. 20 dargestellt.

Zur Testung der Kreuzreaktivität der Methamphetaminstreifen wurden wegen der deutlicheren Bandenausbildung 15 µm Membran von MDI verwendet. Es zeigte sich, dass eine erkennbare Verdrängung der Detektionsbande erst ab einer Konzentration von ca. 10000 ng/mL RS-Amphetaminbase möglich war, bei 50000 ng/mL war die Bande nur noch als Schatten erkennbar. Abb. 21 zeigt die entsprechenden Teststreifen.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen



Abb. 20
MDMA-Konzentrationsreihe auf
Teststreifen mit konjugiertem Amphet-
amin-Antikörper



Abb. 21
RS-Amphetamin-Konzentrationsreihe
auf Teststreifen mit konjugiertem
Methamphetamin-Antikörper

2.4.3.2 Vergleich der Empfindlichkeit des Amphetamin- und Methamphetamintest auf MDMA

MDMA ist in der Praxis einer der wichtigsten Analyten für einen Drogentest. Um die Empfindlichkeit der Teststreifen für MDMA zu ermitteln, wurden in einem Parallelversuch Konzentrationen von 62,5 bis 4000 ng/mL MDMA auf dem Amphetamin- sowie Methamphetamintest vermessen. Auf der nächsten Seite sind die entsprechenden Teststreifen in Abb. 22 dargestellt.

Es zeigte sich, dass der Methamphetamintest wesentlich empfindlicher anspricht als der Amphetamintest. Bei dem Amphetamintest erhielt man bei 4000 ng/mL eine stark abgeschwächte Bande. Schon bei einer Konzentration von 2000 ng/mL war die Bande recht deutlich zu erkennen, um bei ca. 250 ng/mL die selbe Intensität zu haben, wie die Kontrollbande. Ab dieser Konzentration war keine Unterscheidung von Blindwert und Probe mehr möglich.

Bei dem Methamphetamintest war die Detektionsbande bis zu einer Konzentration von 1000 ng/mL praktisch nicht zu erkennen und wurde erst bei ca. 250 ng/mL deutlich sichtbar. Auch bei einer Konzentration von 62,5 ng/mL MDMA war die Detektionsbande noch schwächer gefärbt als beim Blindwert. Die Kontrollbande war im Vergleich intensiver gefärbt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

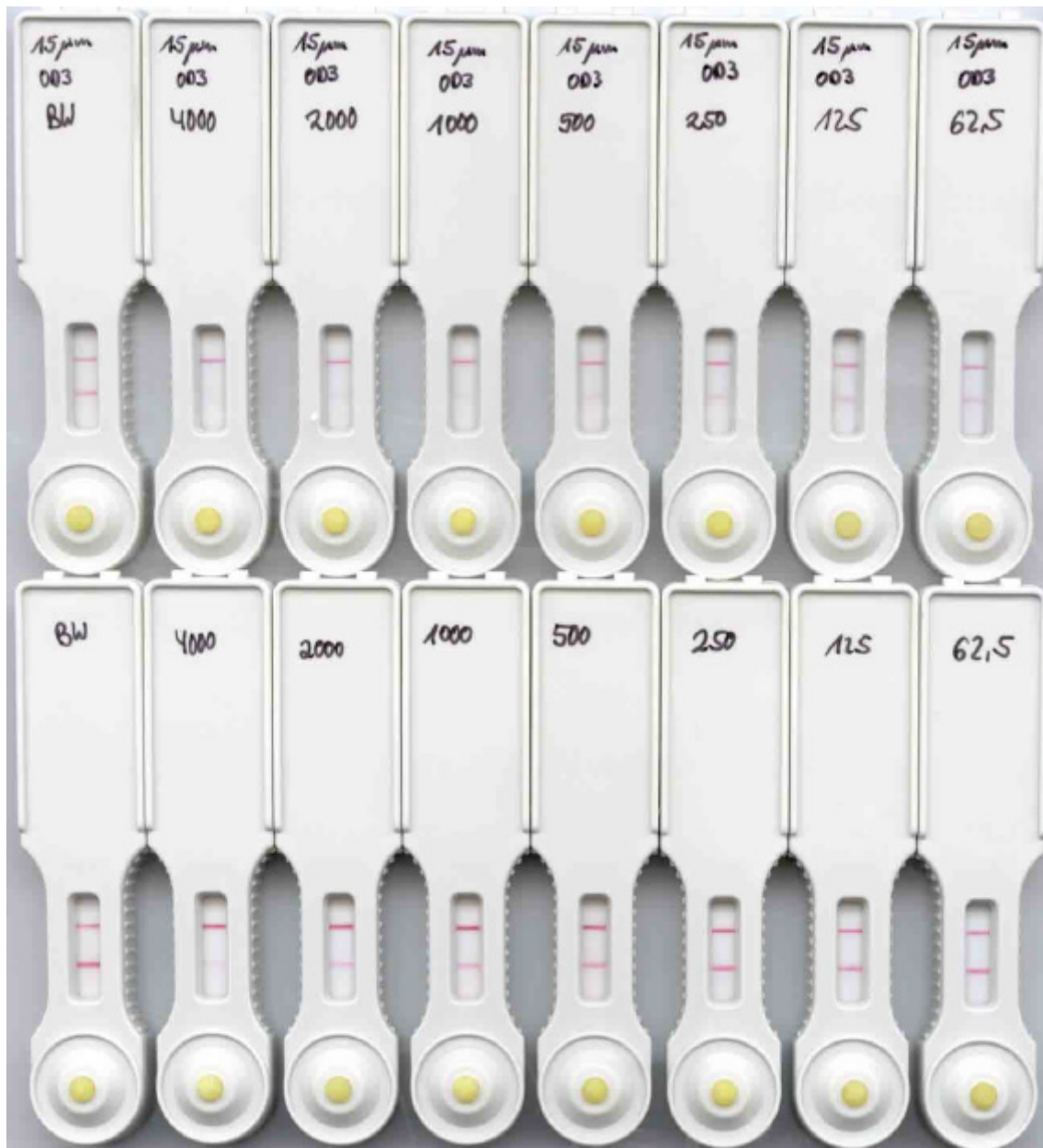


Abb. 22 Methamphetamin- und Amphetaminteststreifen mit konjugiertem Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen MDMA dotiert

2.4.3.3 Kombination Methamphetaminpolyhapten mit konjugiertem Amphetaminantikörper

Aufgrund der Ergebnisse der zwei zuvor beschriebenen Versuche, wurde die Kombination aus Amphetamin-Detektionsantikörper und Methamphetamin-Polyhapten auf deren Empfindlichkeit untersucht. Dazu wurden der Amphetamin-Detektionsantikörper in einer Konzentration von OD 3 eingesetzt und das Methamphetamin-Polyhapten mit 0,15 mg/mL aufdosiert.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Wie Abb. 23 zeigt, war eine sehr empfindliche Amphetamindetektion möglich. Konzentrationen von 500 ng/mL MDMA konnten ebenfalls anhand einer Abschwächung der Detektionsbande erkannt werden. Ein positives Ergebnis war erst ab einer Konzentration von 1000 ng/mL deutlicher zu erkennen.

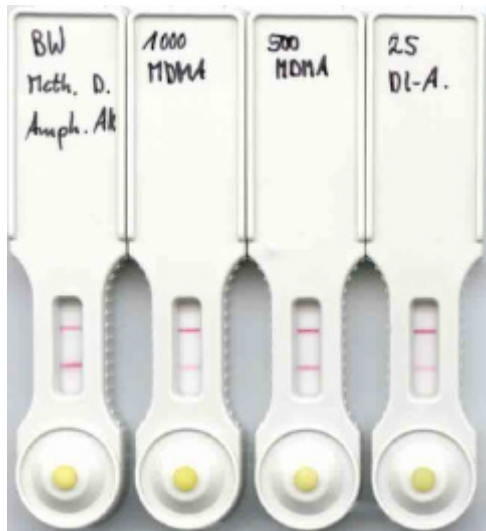


Abb. 23

Empfindlichkeit der Kombination konjugierter Amphetamin-Antikörper und Methamphetamin Polyhapten

Um Verbesserungsmöglichkeiten für diesen Test zu finden, wurden die Parameter für die Detektionsbande variiert. Die optische Dichte des eingesetzten Gold-Antikörperkonjugats wurde im Bereich von 2 bis 4 verändert. Die Polyhaptenkonzentration wurde zwischen 0,1 und 0,25 mg/mL variiert. Die Ergebnisse wurden anhand von je zwei Konzentrationen an Analyt (1000 und 500 ng/mL MDMA und 25 und 12,5 ng/mL RS-Amphetaminsulfat) im Vergleich zum Blindwert bewertet.

Bei den Streifen mit einer Polyhaptenkonzentration von 0,25 mg/mL ließ sich die Detektionsbande nicht gut verdrängen. Beim Blindwert war sie jedoch immer deutlich intensiver als die Kontrolle. Wegen der schlechten Verdrängung war diese Kombination nicht sinnvoll. Für die beiden anderen Polyhaptenkonzentrationen ergab sich folgendes Bild:

Bei OD 2 erschienen die Banden nicht ausreichend intensiv, wobei bei einer Konzentration von 0,15 mg/mL auch hier die Detektionsbande des Nullwertes intensiver gefärbt war. Mit OD 4 war die Verdrängung des Signals nicht so ausgeprägt wie mit OD 3, so dass die Kombination OD 3 mit 0,15 mg/mL Detektionsantikörper als beste Wahl erschien.

2.4.3.4 Umstellung auf den Iso Flow-Dispenser

Zu Erprobungszwecken erfolgte in den vorangehenden Versuchen die Bandenauftragung mit dem Camag Linomat 4. Für die Herstellung größerer Stückzahlen wurde die Herstellung auf den Iso Flow-Dispenser angepasst. Mit diesen Teststreifen wurde erneut die Konzentration an MDMA bestimmt, die nötig ist, um die Detektionsbande vollständig zu verdrängen.

Für die Herstellung blieben die Konzentrationen für Kontroll- und Detektionsbande unverändert.

Kontrolle: gt<m> Ig G Aldrich 0,5 mg/mL Lot 421780
in PBS-Gebrauchslösung ohne Salz+2% Saccarose
+ 5% EtOH pH 7,6

Detektion: Methamphetamin-BSA Biostride 0,15 mg/mL Lot D 07
in 50 mM Carbonatpuffer + 5% EtOH pH 9,6

Da bei der Herstellung der Amphetaminstreifen auf dem Iso Flow-Dispenser das Auftragevolumen pro cm reduziert werden musste, wurden zwei verschiedene Auftragevolumina für die Detektionsbande verwendet. Es wurden 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ sowie 0,8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ aufgetragen. Nach der Herstellung wurde die Bandenbildung der Streifen verglichen. Abb. 24 zeigt die erhaltenen Teststreifen.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

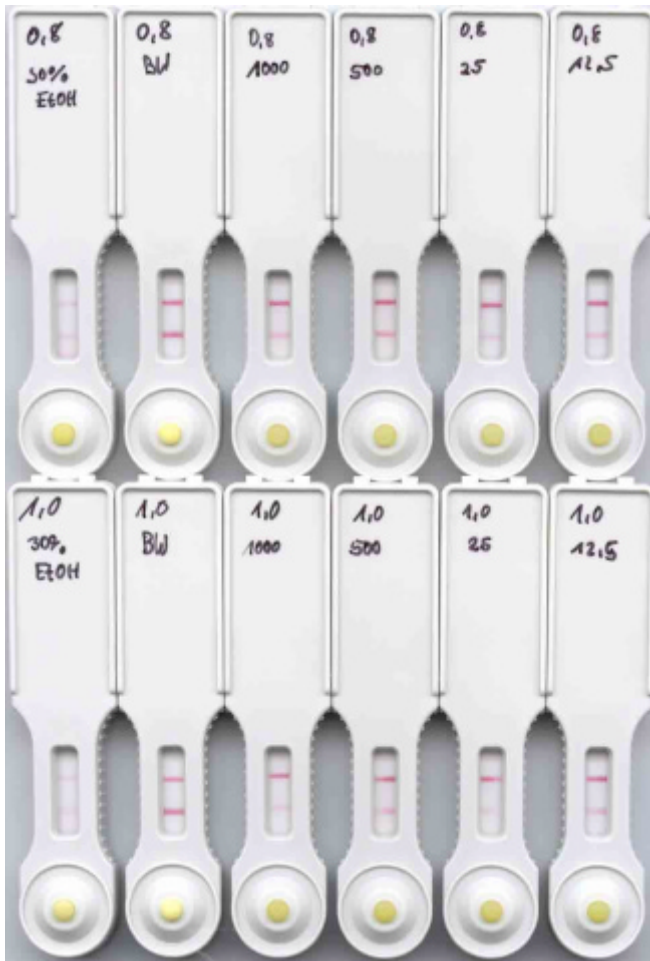


Abb. 24

Konzentrationsreihe mit RS-Amphetamin auf Teststreifen mit konjugiertem Amphetamin-Antikörper und unterschiedlichem Auftragsvolumen für die Methamphetamin-BSA Polyhaptenbande

Wie zuvor bei den Amphetaminstreifen zeigte sich beim Wechsel zum Iso Flow-Dispenser, dass die Banden breiter und uneinheitlicher wurden. Für ein Auftragsvolumen von $0,8 \mu\text{L}/\text{cm}$ ergaben sich Banden, die intensiver als mit $1 \mu\text{L}/\text{cm}$ erschienen. Bei einem Auftragsvolumen von $1 \mu\text{L}/\text{cm}$ waren die Banden bei Dotierung mit Amphetamin nicht so intensiv wie bei $0,8 \mu\text{L}/\text{cm}$ gefärbt, daher war eine empfindlichere Detektion möglich und das Auftragsvolumen wurde auf $1 \mu\text{L}/\text{cm}$ festgelegt.

Die Verdrängung der Detektionsbande durch MDMA wurde anhand einer Konzentrationsreihe zwischen 10000 und 1250 ng/mL MDMA untersucht. Die Teststreifen sind in Abb. 25 gezeigt. Eine vollständige Verdrängung der Detektionsbande war oberhalb einer Konzentration von 5000 ng/mL möglich.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen



Abb. 25
Konzentrationsreihe mit MDMA auf
Teststreifen mit konjugiertem
Amphetamin-Antikörper und unter-
schiedlichem Auftragsvolumen für die
Methamphetamin-BSA Polyhaptenbande

2.4.4 Kreuzreaktivität

Um abschätzen zu können, welchen Einfluss andere Substanzen auf die Testanzeige haben, wurden Standardlösungen verschiedener Arzneistoffe auf die hergestellten Teststreifen gebracht. Zum Einsatz kamen Lösungen mit einer Konzentration von 100 µg Substanz / mL.

Folgende Arzneistoffe wurden zur Bestimmung der Kreuzreaktivität eingesetzt:

Amitryptillin

Ampicillin

Ascorbinsäure

Acetylsalicylsäure

Atropin

Benzocain

Butobarbital

Codein

Chinin

Chlorpromazin

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Cyclamat-Ca	Nicotinsäure
Dextromethorphan	DL-Norephedrin
Diclofenac	Phenylephrin
Doxylamin-succinat	Procainamid
Diphenhydramin	Promethazin
Dopamin	Ranitidin
L-Ephedrin	Saccharin-Na
Gentamycin	Salbutamol
Guajacol	Selegilin
Imipramin	Theophillin
Ketamin	Tramadol
Lidocain	Trifluoperazin

Bei der visuellen Begutachtung der Teststreifen zeigte sich für die Substanzen Dopamin, DL-Norephedrin und Ranitidin eine Abschwächung der Detektionsbande.

Für die beiden Erstgenannten war dieses Ergebnis nicht sehr überraschend. Sie sind dem Amphetamin in ihrer räumlichen Struktur ähnlich, und werden deshalb u.U. miterfasst. Beim Ranitidin überraschte das Ergebnis. Betrachtet man die angegebene Kreuzempfindlichkeit von käuflichen Methamphetamin-teststreifen, so wird dort auch in zwei Fällen eine Kreuzreaktivität für Ranitidin angegeben (vgl. dazu Workpackage 2 ROSITA).

In weiteren Verdünnungsreihen zeigte sich, dass Dopamin auch noch bei einer Konzentration von 625 ng/mL zu einer Abschwächung der Detektionsbande führte.

DL-Norephedrin lieferte bei einer Konzentration von 1562,5 ng/mL keine abgeschwächte Bande mehr, für Ranitidin lag dieser Wert bei 6250 ng/mL. Die entsprechenden Teststreifen sind in Abb. 26 und 27 dargestellt.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen



Abb. 26 Kreuzreaktivität DL-Norephedrin



Abb. 27 Kreuzreaktivität Ranitidin

2.5 Arbeiten am NICC

Nachdem die Laborentwicklung der Teststreifen abgeschlossen war, wurde deren Praxistauglichkeit anhand von Speichelproben, die bei Straßenverkehrskontrollen in Belgien gesammelt wurden, ermittelt.

Das NICC (*Nationaal Instituut voor Criminalistiek en Criminologie*) in Brüssel ist eine zentrale Polizeinstitution Belgiens. Verschiedene Abteilungen beschäftigen sich, vergleichbar zum BKA, mit der Untersuchung von Asservaten, dem Aufklären von Verbrechensabläufen und der Sicherung und Aufklärung von Spuren. Im Oktober 2000 besuchte ich für 1 Woche dieses Institut, um dort Speichelproben, die im Zuge des ROSITA Projektes in Belgien bei Straßenverkehrskontrollen gesammelt wurden, mit Hilfe der entwickelten Tests zu untersuchen.

2.5.1 Eingesetzte Teststreifen

Zum Einsatz kam ein Amphetamin-Test mit folgender Zusammensetzung:

Reagenzien

- a) Fangantikörper: Methamphetamin BSA Biostride.Inc. Lot :D 07
- b) Kontrollantikörper:gt <m>IgG Arista Biologics Lot :0421780
- c) Detektionsantikörper:Gold-Amphetamin Alchemy Lot :9563
- e) Puffer für Kontrolle:PBS-Gebrauchslösung ohne Salz + 2 % Saccarose + 10% EtOH pH 7,6
- f) Puffer für Testlinie: PBS-Gebrauchslösung ohne Salz + 2 % Saccarose + 5% EtOH pH 7,6
- g) Goldverdünnungspuffer:200 mM PIPES + 26,6% Saccarose + 1,2 % BSA + 0,08 % Tween 20 + 0,02 % NaN₃ pH 6,5

Membranmaterial

- a) Laminate: 15 µm SS 12 MDI Lot:IC026269/886
- b) Konjugatvlies: PT-R1 MDI Lot: 1268/240
- c) Probenahmevlies: CGF MDI Lot: 16169
- d) Saugvlies: AP 120 MDI Lot: S028

Sonstiges Material

Wischstifte 35 µm Normpin + 0,75% Triton X-100 Porex
Gehäuse DW Protech

Herstellung

Dispensierung der Laminate:

Testlinienkonzentration: 0,1µL/mm 0,2 mg/mL in PBS
Kontrolllinienkonzentration: 0,1µL/mm 0,25 mg/mL in PBS
Trocknung: 1,5 h / 60°C

Dispensierung Gold: per Hand
Konzentration: OD 3
Trocknung: 60 min. / 70°C

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Der zweite Test, der in diese Erprobung einbezogen wurde, war ein Kombi-nationstest auf Kokain und Morphin mit folgender Zusammensetzung:

Reagenzien

- a) Fangantikörper 1: Benzylecgonin-BSA Biostride Inc. Lot: H10
Fangantikörper 2: Morphin-BSA Biostride Inc. Lot H 37
- b) Kontrollantikörper:gt <m>IgG Arista Biologics Lot :0421780
- c) Detektionsantikörper:Gold-Benzylecgonin Alchemy Lot :9562
Detektionsantikörper:Gold-Morphin Alchemy Lot :9560
- e) Puffer für Kontrolle:PBS-Gebrauchslösung + 2 % Saccarose
+ 5% EtOH pH 7,6
- f) Puffer für Testlinie:PBS-Gebrauchslösung + 2 % Saccarose
+ 5% EtOH pH 7,6
- g) Goldverdünnungspuffer:200 mM PIPES + 26,6% Saccarose + 1,2 %
BSA + 0,08 % Tween 20 + 0,02 % NaN₃ pH 6,5

Membranmaterial

- a) Laminate: 15 µm SS 12 MDI Lot:IC026269/886
- b) Konjugatvlies: PT-R1 MDI Lot: 1268/240
- c) Probenahmevlies: CGF MDI Lot: 16169
- d) Saugvlies: AP 120 MDI Lot: S028

Sonstiges Material

Wischstifte 35 µm Normpin + 0,75% Triton X-100 Porex
Gehäuse DW Protech

Herstellung

Dispensierung der Laminate:

Testlinienkonzentration BE: 0,1µL/mm 0,1 mg/mL in PBS
Testlinienkonzentration Mo: 0,1µL/mm 0,5 mg/mL in PBS
Kontrolllinienkonzentration: 0,1µL/mm 0,5 mg/mL in PBS
Trocknung: 15 h / 50°C

Dispensierung Gold: per Hand

Konzentration: OD 1,5
Trocknung: 60 min. / 70°C

2.5.2 Speichelproben

70 Speichelproben standen zur Testung zur Verfügung. Für diese Proben wurden am NICC mittels GC/MS-Analytik die Konzentration der enthaltenen Betäubungsmittel bestimmt. Einige Proben wurden darüber hinaus mit Immunoassays auf Teststreifenbasis ausgewertet.

Diese eingefrorenen Proben wurden retrospektiv mit den entwickelten Teststreifen vermessen. Dazu wurden 10 µL der jeweiligen Speichelprobe auf den Pin aufgegeben und mit 100 µL PBS-Testpuffer 2 versetzt. Jede Probe wurde zweimal vermessen.

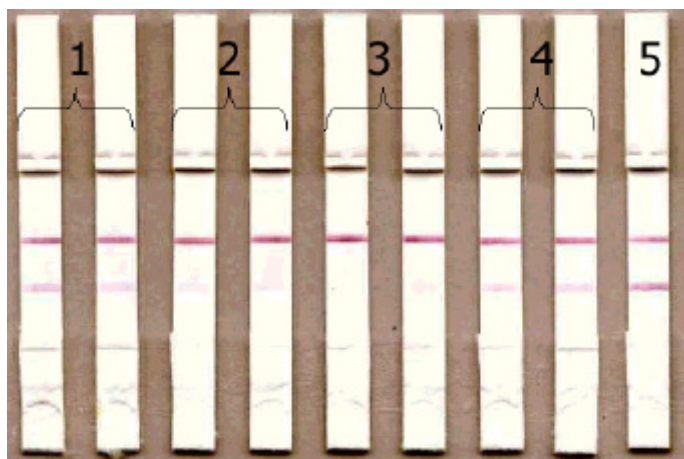
In den Abbildungen 28 und 29 sind einige der ausgewerteten Teststreifen dargestellt. Wobei in Abb. 28 Amphetamintests abgebildet sind. Die obere Bande ist die Kontrolllinie, die untere ist die Detektionsbande.

Probe Nr. 1 war eine Negativprobe. Auf Test Nr. 5 wurde zum Vergleich nur 100 µL PBS-Testpuffer 2 aufgetragen. Die Proben Nr. 2-4 waren positiv, bei einer GC/MS-Bestimmung wurden die nebenstehenden Werte in ng/mL ermittelt.

Abb. 29 zeigt die Ergebnisse für Kokain-Opiat Tests. Die obere Bande ist die Kontrollbande, die mittlere Bande ist sensitiv für Opiate, die untere detektiert Kokain.

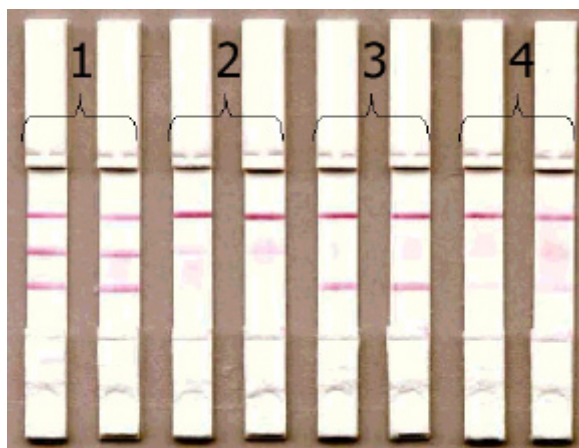
Probe Nr. 1 war eine negative Speichelprobe. Probe Nr. 2 war stark positiv für Kokain, geringe Konzentrationen an Opiaten wurden gemessen. Probe Nr. 3 war Opiat positiv und zeigte geringe Mengen Kokain. In Probe Nr. 4 wurden beide Analyten gefunden.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen



	1	2	3	4	5
Amph	ND	377	2378		BW
MDMA	ND	767	5646	967	BW
MDA	ND	56	256	34	BW
MDEA	ND	8			BW

Abb. 28 Amphetaminteststreifen (Konzentrationen laut GC/MS Messung in ng/mL)
 Amph: Amphetamin, MDMA: Methylenedioxyamphetamin, MDA: Methylenedioxyamphetamin, MDEA: Methylenedioxyethylamphetamin; ND: nicht detektierbar; BW: Blindwert



	1	2	3	4
Kokain		10000	128	424
BE		1266	4	1470
EME		482		570
AEME	<LOD	1340		
MAM	<LOD	56	6600	61
Mor	<LOD	15	6421	163
Cod	<LOD	<LOD	434	98

Abb. 29 Opiat-Kokain Teststreifen (Konzentrationen laut GC/MS Messung in ng/mL)
 BE: Benzoylcegonin, EME: Ecgoninmethylester, AEME: Acetylcgoninmethylester, MAM: Monoacetylmorphin, Mor: Morphin, Cod: Codein; LOD: Detektionsgrenze

Da die Auswertung über den Vergleich der Bandenintensitäten erfolgte, wurden die Teststreifen, um objektive Ergebnisse zu erhalten, mittels eines Camag DC-Scanners ausgewertet. Dazu wurden die Teststreifen aus den Gehäusen herausgenommen und in trockenem Zustand vermessen. Als Ergebnis lieferte der Scanner Intensitätswerte für die einzelnen Banden. Um die Ergebnisse mit denen der GC/MS-Analyse zu vergleichen, wurde der Quotient aus Detektionsbandenintensität und Kontrollbandenintensität gebildet

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

und gegen die in der Referenzanalyse ermittelten Konzentrationen an Analyt aufgetragen.

Die Auswertung erfolgte nach folgender Formel:

$$V_B = \frac{I_D}{I_K}$$

V_B = Bandenverhältnis
 I_D =Scannerwert Detektionsbande
 I_K =Scannerwert Kontrollbande

In den Abb. 30 bis 32 sind die Diagramme dargestellt, die die Bandenintensität mit den gefundenen Analytkonzentrationen ins Verhältnis setzen. Auf den Ordinaten ist die Konzentration in logarithmischer Darstellung aufgetragen. Auf der Abszisse ist das Verhältnis zwischen Detektions- und Kontrollbandeintensität dargestellt.

Da jeweils nicht nur eine Substanz in den Proben enthalten war, wurden im Fall von Kokain und bei den Opiaten die Konzentrationen von Kokain und Metaboliten sowie Morphin und anderen addiert, da der Test in etwa gleich gut auf Kokain und BE bzw. Morphin und Codein anspricht. Bei den Amphetaminen wurden die Amphetaminderivate addiert und die Methamphetaminderivatkonzentrationen, wegen der verringerten Sensitivität des Teststreifens, nicht direkt addiert, sondern durch 15 dividiert und dann addiert. Für die Amphetaminproben ergab sich folgendes Bild (Abb. 30). Die positiven Proben zeigen bei zunehmender Analytkonzentration eine abnehmende Detektionsbandenintensität, die das Verhältnis zwischen den beiden Banden immer kleiner werden lässt. Ein Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration und dem Bandenverhältnis ist erkennbar. Jedoch streuen die Negativwerte sehr stark, so dass sie in einem großen Bereich die gleiche Bandenintensität wie die positiven Proben zeigen.

Dadurch ist eine Abgrenzung der Proben schwierig und gelingt erst bei stark positiven Proben ab einem Verhältnis von 0,2, d.h. bei einer Konzentration von ca. 1000 ng/mL für Amphetamin.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

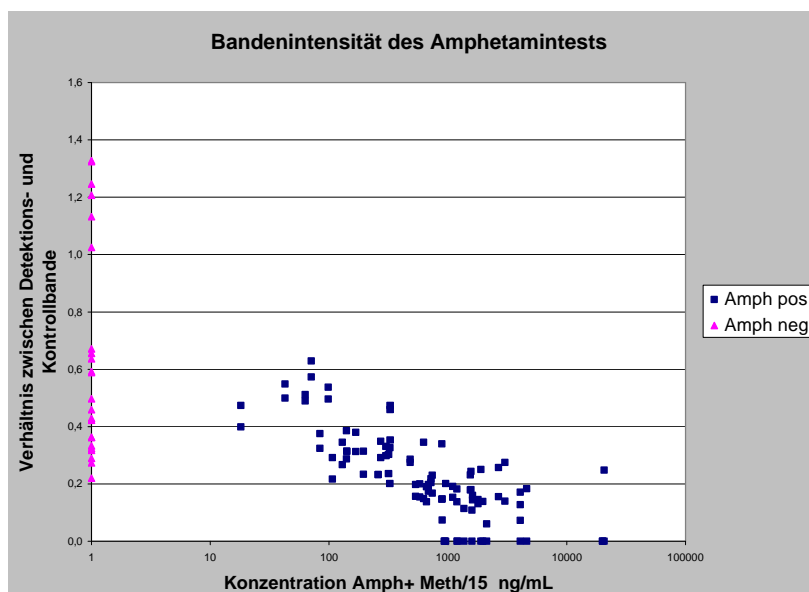


Abb. 30 Bandenintensität des Amphetamintests

Für die Kokain Proben ergab sich ein anderes Bild (Abb. 32). Die positiven Proben zeigen ein ähnliches Verhalten, wie es auch bei dem Amphetamintest beobachtet wurde. Auch wenn sich hier die Bereiche der tatsächlich positiven Proben und der tatsächlich negativen Proben überlappen, ist es jedoch unter Inkaufnahme weniger falsch positiver Proben möglich, die tatsächlich positiven Proben zu identifizieren. Die beiden Negativwerte mit einem Verhältnis von $<0,6$ sind zwei Bestimmungen der selben Speichelprobe.

Der Opiattest lieferte nicht nur wegen der geringen Anzahl von untersuchten Proben, sondern auch wegen der klaren Unterscheidung der beiden Gruppen gute Ergebnisse (Abb. 31). Die positiven Proben besitzen deutlich schwächere Detektionsbanden als die negativen. Auch bei geringen Konzentrationen zeigte sich eine Abschwächung des Signals. Abgesehen von zwei Werten, die der selben Speichelprobe zuzuordnen sind, zeigten die negativen Speichelproben alle eine intensivere Detektionsbande als die positiven.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

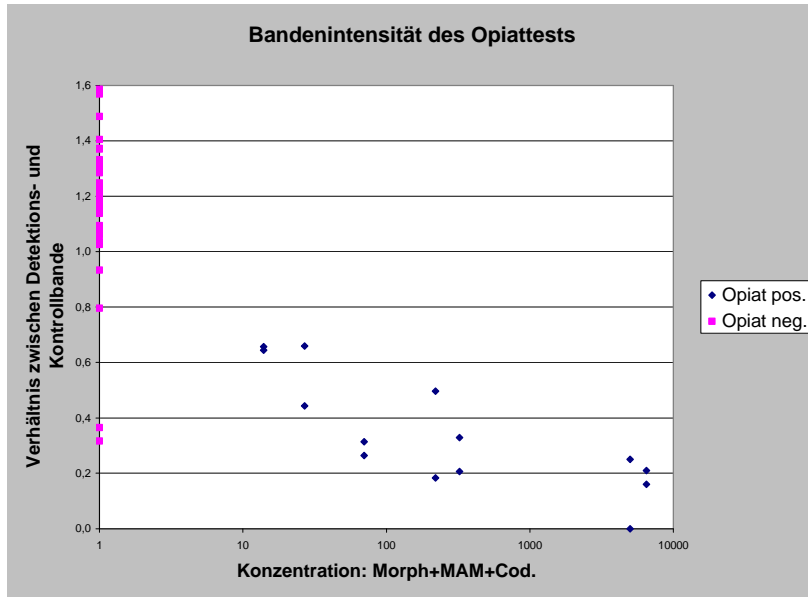


Abb. 31 Bandenintensität des Opiattests

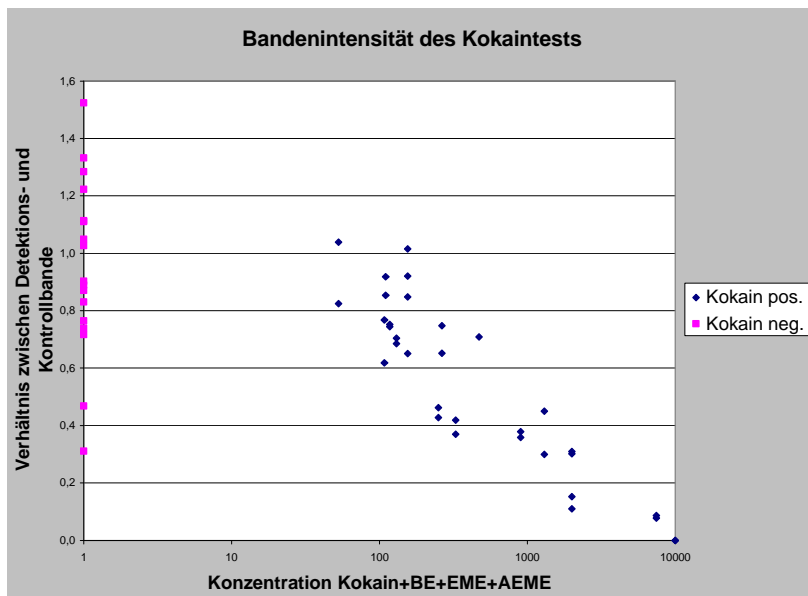


Abb. 32 Bandenintensität des Kokaintests

2.5.3 Oberflächenbeprobung

Neben der Evaluation der Teststreifen an Speichelproben bot sich am NICC die Gelegenheit, in einem Labor und an Asservaten den Stoffnachweis auf Oberflächen zu erproben. Da das Testgehäuse ursprünglich zur Oberflächenbeprobung entwickelt wurde, und die Teststreifen eine hohe Sensitivität aufweisen, waren diese Versuche erfolversprechend. Bei Untersuchungen von Dollarbanknoten konnte Jenkins⁴² zeigen, dass über 90 % mit Kokain kontaminiert waren. Amphetamin und Methamphetamin konnten auf 8% der Geldscheine nachgewiesen werden.

In einem Labor, in dem Pulver und Tabletten auf ihre Zusammensetzung untersucht werden, wurden verschiedene Oberflächen auf Kontamination mit Betäubungsmitteln untersucht. Weitere Proben erfolgten in einem Büronebenraum. Auch die Jacke eines Beschuldigten, sowie die Arbeitskleidung der im Labor Beschäftigten konnte auf Kontamination untersucht werden. Nachfolgend sind die entsprechenden Teststreifen dargestellt (Abb. 33). Die mit einem Camag DC-Scanner ermittelten Intensitätswerte der Banden sind in Tab. 11 angegeben.

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

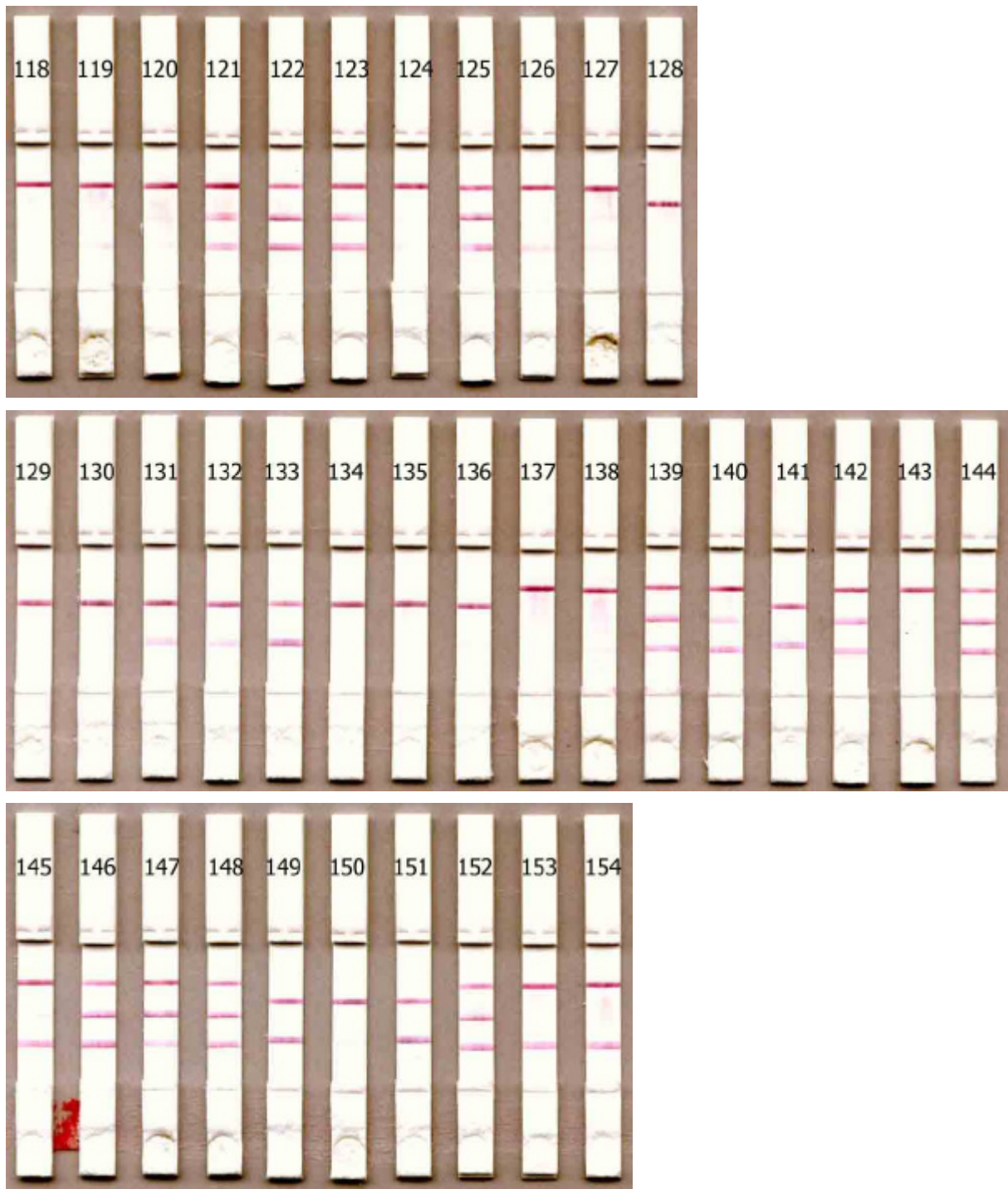


Abb. 33 Scanbilder der Oberflächen Teststreifen

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Probenfläche	Teststreifen Nr.	Bande	Scannerwert	Relative Intensität
5*5 cm Pappschreibtisch- unterlage	118	K	60,6	93,81%
		M	0	0,00%
		C	4	6,19%
2*2 cm Staub auf GC	119	K	61,1	88,29%
		M	0	0,00%
		C	8,1	11,71%
1*2,5 cm Waageninneres	120	K	62,8	78,70%
		M	11	13,78%
		C	6	7,52%
1,5*2 cm Jeans auf Oberschenkel 2-3 Wochen getragen	121	K	77,3	52,27%
		M	38,8	26,23%
		C	31,8	21,50%
2*2 cm offenes Laborjournal	122	K	40,2	28,82%
		M	51,3	36,77%
		C	48	34,41%
3*3 cm Kachel- arbeitsfläche	123	K	53	43,05%
		M	31,9	25,91%
		C	38,2	31,03%
3*3 cm Kacheln in Chemieabzug	124	K	58,1	83,00%
		M	5,3	7,57%
		C	6,6	9,43%
3*3 cm Papier an der Wand	125	K	43,9	33,13%
		M	52	39,25%
		C	36,6	27,62%
3*3 cm Mousepad	126	K	57,1	74,84%
		M	6,3	8,26%
		C	12,9	16,91%
3*3 cm offener Laborschrank (Holz)	127	K	72,3	79,36%
		M	8,4	9,22%
		C	10,4	11,42%
1,5*2 cm Waageninneres	128	K	74	100,00%
		D	0	0,00%
3*3 cm Staub auf GC	129	K	65,4	87,90%
		D	9	12,10%
3*3 cm Chemikalien- abzug	130	K	74,7	100,00%
		D	0	0,00%
2*2 cm Bildschirm- oberseite	131	K	69,1	69,94%
		D	29,7	30,06%
3*3 cm Schreib- tischunterlage	132	K	61,9	70,50%
		D	25,9	29,50%
Blindwert	133	K	46,4	42,76%
		D	62,1	57,24%
Pillenverpackung	134	K	70,8	87,52%
		D	10,1	12,48%

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Pulververpackung	135	K	67,2	91,18%
		D	6,5	8,82%
Pillenverpackung	136	K	60,1	83,82%
		D	11,6	16,18%
Mit Fingern über Schreibtischunterlage gewischt 3 Fingerspitzen abgewischt	137	K	79,6	93,87%
		M	0	0,00%
		C	5,2	6,13%
Mit Fingern über Schreibtischunterlage gewischt 3 Fingerspitzen abgewischt	138	K	67,8	89,21%
		M	0	0,00%
		C	8,2	10,79%
Büro Lamellen auf Bildschirmoberseite	139	K	46,4	42,34%
		M	36,3	33,12%
		C	26,9	24,54%
Büro GC Ausdruck auf Schreibtisch	140	K	66,7	52,56%
		M	17,6	13,87%
		C	42,6	33,57%
Ärmel Jeansjacke nicht aus Labor	141	K	60,4	55,67%
		D	48,1	44,33%
Ärmel Jeansjacke nicht aus Labor	142	K	60,4	49,96%
		M	32,8	27,13%
		C	27,7	22,91%
Tasche aus dem Pulverlabor	143	K	63	81,82%
		M	7,9	10,26%
		C	6,1	7,92%
Blindwert	144	K	36,1	28,20%
		M	45,6	35,63%
		C	46,3	36,17%
3 Fingerspitzen 30 min nach Kontamination	145	K	62,1	54,57%
		M	10,3	9,05%
		C	41,4	36,38%
5*5 cm Hemdunterarm	146	K	34,8	25,49%
		M	50,3	36,85%
		C	51,4	37,66%
Staub auf Vincent's GC	147	K	41,7	37,64%
		M	46,2	41,70%
		C	22,9	20,67%
Nele's GC	148	K	35,4	28,66%
		M	46,5	37,65%
		C	41,6	33,68%
Blindwert	149	K	59,2	47,13%
		D	66,4	52,87%
Tasche aus dem Pulverlabor	150	K	66,5	83,23%
		D	13,4	16,77%
Nele's GC	151	K	45,6	41,16%
		D	65,2	58,84%

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Vincent´s GC normal	152	K	35,5	27,35%
		M	50,2	38,67%
		C	44,1	33,98%
Taschensaum "Jacke Vincent"	153	K	52,9	61,94%
		M	0	0,00%
		C	32,5	38,06%
Ärmelsaum "Jacke Vincent"	154	K	59,9	61,12%
		M	0	0,00%
		C	38,1	38,88%

Tab. 11 Bandenintensität für die Oberflächentests laut Camag DC-Scanner

2.5.4 Stabilitätstest der Teststreifen für das NICC

Nach der Erprobung der Streifen mit realen Speichelproben und auf kontaminierten Oberflächen wurde zur weiteren Abschätzung der Verwendbarkeit eine Stabilitätsuntersuchung durchgeführt. Die Streifen wurden dafür einzeln in Alubeuteln verschweißt. Mit Standardlösungen wurden Konzentrationskurven der Analyten für eine Lagerung von 0, 1 und 2 Wochen bei 60 °C aufgezeichnet.

Zur Auswertung wurden die Streifen ca. 2 Stunden vor dem Vermessen ausgepackt. Dann wurden die Standardlösungen, jeweils 150 µL pro Streifen, aufpipettiert. Nach 10 min wurden die Streifen aus den Gehäusen genommen und auf Klarsichtfolie geklebt. Nach weiteren 30 min wurden sie im Camag DC-Scanner vermessen.

Die entsprechenden Ergebnisse sind auf den nachfolgenden Seiten dargestellt (Abb. 34 und 35).

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

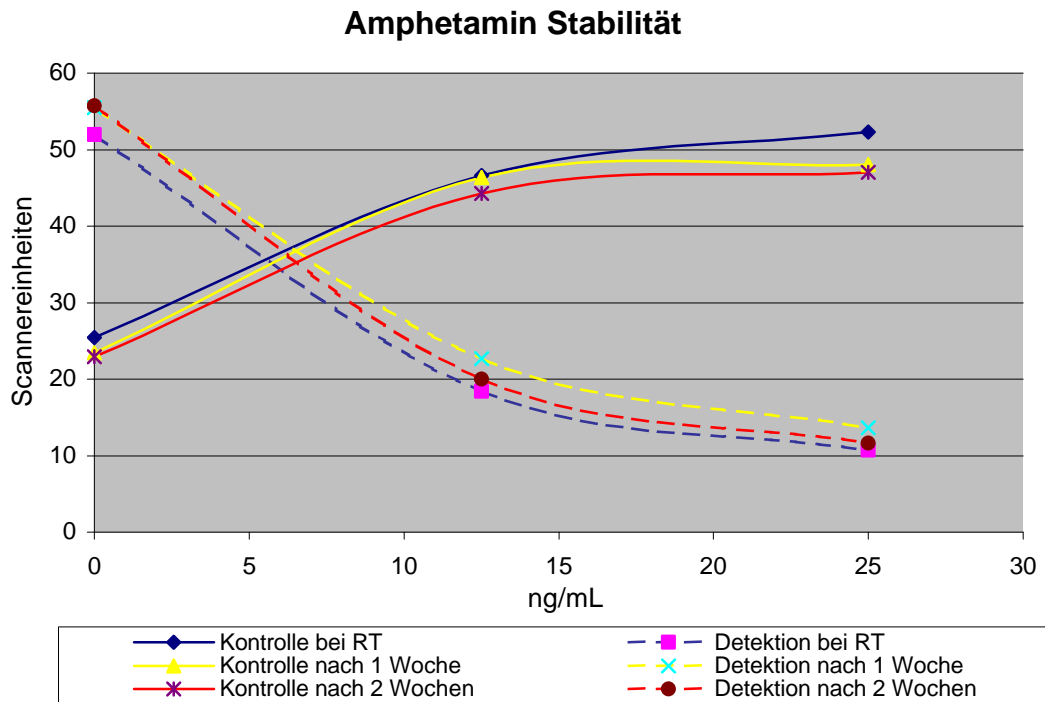


Abb. 34 Stabilitätstest mit Amphetamin als Analyt

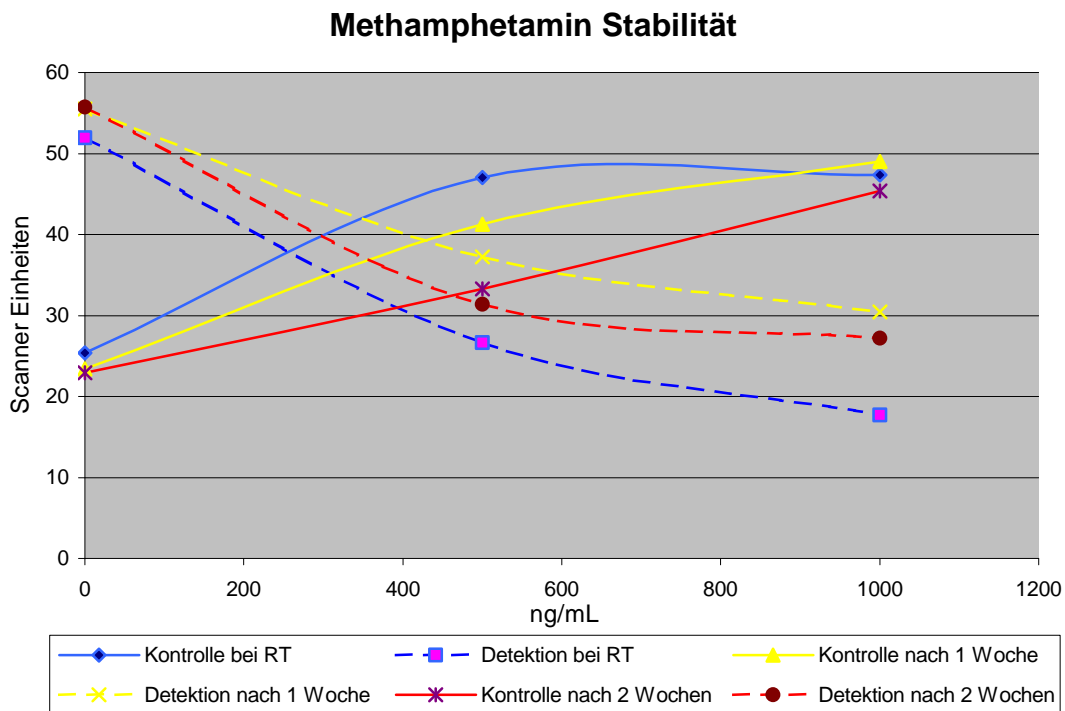


Abb. 35 Stabilitätstest mit Methamphetamin als Analyt

2. Arbeiten mit immunchromatographischen Teststreifen

Die Detektion von Amphetamin gelang, wie aus Abb. 34 hervorgeht, auch nach Lagerung bei 60 °C gut. Die Detektionsbande wurde gut verdrängt und auch die Kontrollbandenintensität blieb über den Lagerzeitraum beständig. Der „crosspoint“ lag für die drei Bestimmungen immer bei ca. 6 ng/mL.

Wurde Methamphetamin als Analyt eingesetzt, so zeigte sich eine deutliche Veränderung des Testergebnisses über die Lagerdauer. Die Verdrängung der Detektionsbande nahm während der Lagerung ab und die Kontrollbandenintensität stieg nach Lagerung nicht wie erwartet an. Als Folge davon verschob sich der „crosspoint“ für die Detektion von anfänglich ca. 250 ng/mL auf ca. 450 ng/mL.

3 Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

3.1 Grundlagen

3.1.1 Stellenwert und Trennprinzip

Neben den etablierten Trennverfahren in der Analytik von Arzneistoffen, hat sich in den vergangenen Jahren auch die Kapillarelektrophorese (CE) immer mehr als Alternative hervorgetan.

Die klassischen Methoden HPLC und GC mit verschiedenen Detektionsmethoden sind u.a. in der Pharmaindustrie sowie in den Bereichen klinische und forensische Chemie routinemäßig im Einsatz. Dabei werden so unterschiedliche Einsatzbereiche wie Gehaltsbestimmungen von Wirkstoffen, Bestimmung von Verunreinigungen, Therapeutisches Drug Monitoring und „General Unknown Screening“ in der Toxikologie abgedeckt⁴³. Für die genannten Einsatzgebiete finden sich inzwischen auch Beispiele für den Einsatz der Kapillarelektrophorese⁴⁴⁻⁴⁹. Von Thormann wurde die Entwicklung in den einzelnen Feldern zusammenfassend dargestellt⁵⁰.

In einigen Bereichen steht die Kapillarelektrophorese heute nicht nur als Alternative, sondern auch aufgrund ihrer spezifischen Vorteile als Methode der Wahl zur Diskussion. So bietet die Kapillarelektrophorese im Bereich der enantioselektiven Trennungen gegenüber den zuvor genannten Methoden deutliche Vorteile⁵¹⁻⁵³.

Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese ist von den chromatographischen Methoden zu unterscheiden. Die Trennung der Analyten erfolgt hier aufgrund der unterschiedlichen Beweglichkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld.

$$u = \frac{v}{E}$$

u= Ionenbeweglichkeit ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$)

v= Ionenwanderungsgeschwindigkeit ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

E= Feldstärke ($\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$)

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Die zu trennenden Komponenten werden in eine Quarzglaskapillare von 5-100 cm Länge und 25-75 µm Durchmesser eingebracht und bei Feldstärken von bis zu 500 V·cm⁻¹ getrennt. Die Kapillare ist dabei mit wässrigen Pufferlösungen gefüllt. Ist diesem wässrigen Milieu ein organisches Lösungsmittel (z.B. Methanol oder Acetonitril) zugesetzt, so spricht man von nichtwässriger Kapillarelektrophorese. Dieser Anteil kann zwischen 10 und bis zu 70 % betragen. Trennpufferlösungen werden allgemein auch als Hintergrundelektrolyt (BGE) bezeichnet.

Im elektrischen Feld wirkt auf ein geladenes Teilchen die Kraft:

$$F = E \cdot z \cdot e$$

F= am geladenen Teilchen angreifende Kraft
E= elektrische Feldstärke
z= Zahl der Elementarladungen pro Teilchen
e= Elementarladung

Dieser elektrischen Kraft wirkt aufgrund der Viskosität in der Lösung eine Reibungskraft entgegen. Diese ergibt sich für kugelförmige Teilchen nach dem Stokes'schen Gesetz als:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

F_R= Reibungskraft am wandernden Teilchen
R= Radius des Teilchens
η= Viskosität des Mediums
v= Wanderungsgeschwindigkeit

Während der Trennung stehen diese beiden entgegengesetzt wirkenden Kräfte im Gleichgewicht, und es ergibt sich die konstante Wanderungsgeschwindigkeit:

$$v = \frac{E \cdot z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

oder für die Ionenbeweglichkeit: $u = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Hervorzuheben ist bei der Kapillarelektrophorese die im Vergleich zu chromatographischen Methoden deutlich bessere Auflösung. Dieses ergibt sich beim Betrachten der van-Deemter-Gleichung für die Stufenhöhe:

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x$$

H= Stufenhöhe [cm]

A= zusätzlich zurückgelegte Strecke

B/ u_x = longitudinale Diffusion

C u_x = Zeit zur Gleichgewichtsausbildung

Da bei der CE die Trennung in einem Glasrohr - zwar in sehr kleinen Dimensionen - erfolgt, gibt es im Unterschied zu gepackten Säulen keine zusätzlich zurückgelegten Strecken durch unterschiedliches Umströmen der Partikel.

In der CE ist keine stationäre Phase an der Stofftrennung beteiligt, deshalb fällt auch der Term C u_x für die Gleichgewichtseinstellung zwischen der stationären und der mobilen Phase in der Gleichung weg.

Lediglich die longitudinale Diffusion hat in Analogie zu den chromatographischen Methoden einen Einfluss auf die Höhe der Trennstufen. Sie steigt mit zunehmender Analysenzeit an. Neben diesem ist der Anteil der Kapillare, der während der Injektion mit Analytlösung gefüllt wird, wichtig für eine gute Auflösung.

Neben dem eben Ausgeführten, spielt auch ein weiteres, für die Kapillarelektrophorese typisches Phänomen bei Stofftrennungen eine Rolle, nämlich der sogenannte elektroosmotische Fluss (EOF). Ursache des elektroosmotischen Flusses ist die pH-Wert abhängige Deprotonierung der, auf der Quarzglasoberfläche der Kapillareninnenwand befindlichen, Silanol-Gruppen (Si-OH). Diese liegen bei pH-Werten über 2,5 zunehmend negativ geladen vor. Diese Ladungen werden durch kationische Ladungsträger unter Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht kompensiert (Abb. 36).

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

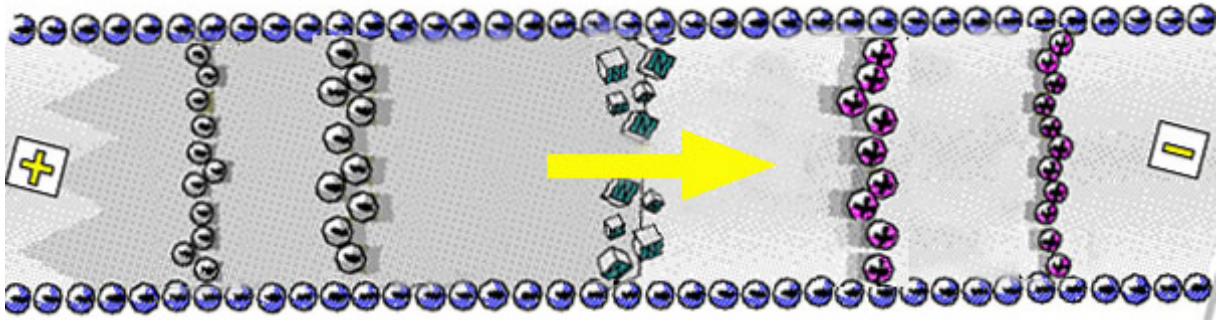


Abb. 36 Ausbildung des elektroosmotischen Flusses

Wie alle anderen Ladungsträger bewegen sich diese kationischen Ladungsträger der diffusen Schicht im elektrischen Feld. Da sie aber in diesem Bereich der Lösung im Überschuss vorliegen, kommt es, bedingt durch die gebildeten Hydrathüllen, zu einer Nettotriebkraft in Richtung Kathode. Das Resultat ist ein pfeifenförmiger Volumenstrom in Richtung der Kathode. Durch diesen Volumenstrom bewegen sich auch die Neutralteilchen über die Trennstrecke ohne jedoch voneinander separiert zu werden.

Deutlich zu unterscheiden vom EOF sind die Verhältnisse beim Durchstrom einer Flüssigkeit durch die Kapillare. Zum einen ist die Ursache hier eine Druckdifferenz zwischen den beiden Kapillarenden, zum anderen stellt sich so ein parabolisches Strömungsprofil ein (Abb. 37).

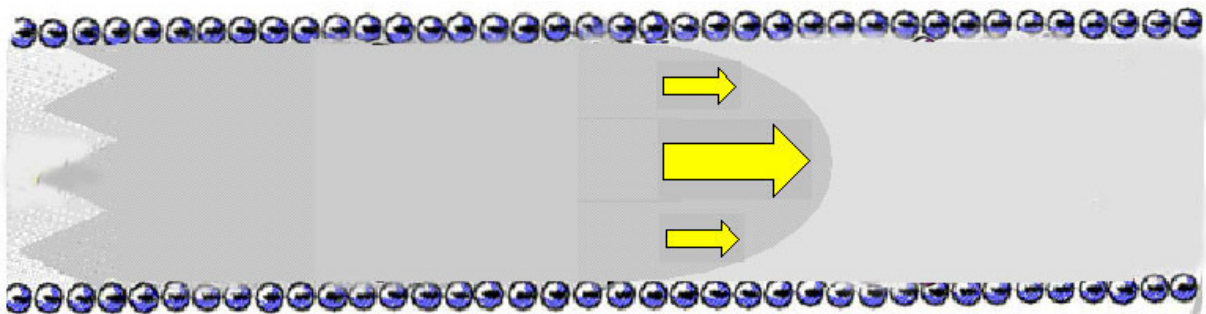


Abb. 37 Parabolisches Strömungsprofil

3.1.2 Enantioselektives Arbeiten mit Cyclodextrinen

Durch den Einsatz von chiralen Selektoren, lassen sich, bei passender Auswahl, mit der Kapillarelektrophorese Racemate bzw. optisch aktive Gemische in ihre Bestandteile auftrennen. Diese Selektoren, meist werden dafür Cyclodextrine eingesetzt, werden zu dem BGE hinzugegeben und liegen dann gelöst vor.

Für die Trennung ist die Einlagerung der Enantiomere in den, durch die Cyclodextrine gebildeten, Hohlraum verantwortlich. Die Trennung durch Cyclodextrine ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. Nach Überschreiten eines Optimums kann bei weiterer Konzentrationszunahme auch eine Verschlechterung der Auflösung beobachtet werden⁵⁴. Sofern die Komplexbildungskonstanten und dadurch die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für die beiden Enantiomere unterschiedlich sind, kommt es unterschiedlich lange zu einer Beeinflussung der Migrationzeit. In dem Moment, wo das Analyt den Komplex mit dem Cyclodextrin bildet, ändert sich das Masse/Ladungsverhältnis, welches ausschlaggebend für die Wanderungsgeschwindigkeit ist. Ist das Cyclodextrin ungeladen, so wird die Geschwindigkeit erniedrigt. Kommen geladene Cyclodextrine zum Einsatz, können die Analytionen entweder beschleunigt oder abgebremst wandern. In Abb. 38 ist die Struktur von nativem β -Cyclodextrin dargestellt ($R=H$). Es gibt, u.a. zur Verbesserung der Löslichkeit hergestellte Derivate, die mit Alkyl-, Sulfonyl- oder Hydroxyalkyl-Gruppen substituiert sein können. Ähnlich wie bei den Polysorbat-Tensiden liegen dann verschiedene mögliche Substitutionsmuster (Isomere) vor. Diese Mischung führt im Hinblick auf Trenneigenschaften zu einem Verlust an Präzision. Diesem Problem wird durch den Einsatz von „Single Isomere“-Cyclodextrinen begegnet. Diese sind aber um ein vielfaches teurer als die anderen Vertreter dieser Stoffgruppe.

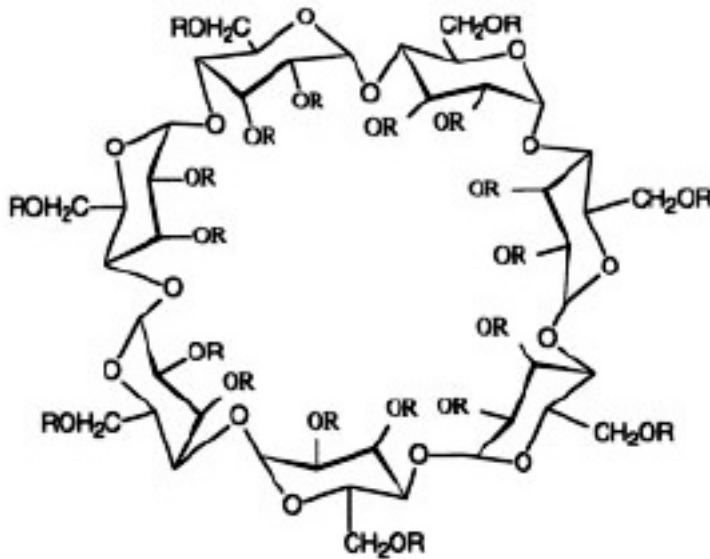


Abb. 38 Strukturformel eines β-Cyclodextrin Moleküls (R=H)

3.1.3 Injektion

Um die zu trennende Probe in die Kapillare einzubringen, gibt es zwei prinzipiell unterschiedliche Möglichkeiten. Bei der hydrodynamischen Injektion wird durch Überdruck auf einer Kapillarseite ein Probenvolumen in die Kapillare eingebracht. Dabei ergibt sich das injizierte Volumen durch folgenden Zusammenhang:

$$V = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot p \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L_{\text{tot}}}$$

ΔP= Druckdifferenz über die Kapillare [Pa]

d= Kapillarinne Durchmesser [m]

t= Injektionsdauer [s]

η= Pufferviskosität [Pa·s]

L_{tot}= Gesamtlänge der Kapillare [m]

Um eine hydrodynamische Injektion zu charakterisieren, erfolgt die Angabe meist in mbar·sec.

Die zweite Variante Probenmaterial in die Kapillare einzubringen, ist die elektrokinetische Injektion. Durch Anlegen einer Spannung über Probengefäß und Kapillare werden, bei entsprechend gewählter Polarität, die zu trennenden

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Ionen aus der Probe in die Kapillare eingesogen. Dabei ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$Q = (m_e + m_{EOF}) E \cdot p \cdot r^2 \cdot C$$

μ_e = effektive Mobilität des Analyten
 μ_{EOF} = EOF Mobilität
E = elektrische Feldstärke
r = Radius der Kapillare
C = Konzentration des Analyten

Da die unterschiedlichen Probenbestandteile auch unterschiedliche Mobilitäten besitzen, ergibt sich u.U. eine von der ursprünglichen Probenzusammensetzung abweichende Zusammensetzung. Durch eine elektrokinetische Injektion lässt sich bei entsprechender Wahl von Puffer- und Probenlösungsleitfähigkeit eine Aufkonzentrierung von Ionen aus der Probenlösung erreichen (vgl. Kap. 3.1.5).

3.1.4 Detektion

Um die Wanderung der Analyten in der Kapillare auswerten zu können, kommen die klassischen Detektionsmethoden zum Einsatz. Hier sind sie nach Einsatzhäufigkeit geordnet:

- UV-VIS Detektion
- Fluoreszenz Detektion
- Massensensitive Detektion
- Konduktometrische Detektion
- Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Dabei ergeben sich jedoch durch den instrumentellen Aufbau spezifische Limitationen: Für die am häufigsten eingesetzte UV-Detektion ist die zur Detektion nutzbare, geringe Schichtdicke ein einschränkender Faktor. Es sind verschiedene Anordnungen beschrieben, um dieses Problem zu beherrschen. Die Schichtdicke kann durch am Detektionsfenster aufgeweitete Kapillaren (bubble-cell) erhöht werden. Ein Faktor gibt dann an, wie vielfach der Durchmesser am Detektorfenster erhöht ist. Durch Z-förmig gebogene Kapillaren, wobei die Detektion dann nicht in Quer- sondern in Längsrichtung erfolgt, kann die Schichtdicke ebenfalls verlängert werden. Eine weitere Technik ist die

indirekte UV-Detektion. Hier wird durch Verdrängung eines dem BGE zugesetzten Chromophors eine Absorptionsminderung erzeugt, die ausgewertet wird.

Besitzen die Analytmoleküle eine Fluoreszenz, so kann sie zur Detektion ausgenutzt werden. Im Vergleich zur UV-Detektion ist so eine deutlich empfindlichere Detektion möglich.

Die Kopplung von CE und Massenspektrometer war lange Zeit schwer zu beherrschen, da ein Stoffübergang der Analyten in das Massenspektrometer stattfinden muss. Die Trennung in der CE ist aber nicht an einen Volumenstrom gebunden. Durch den Einsatz einer Überträgerflüssigkeit (sheath liquid) wird bei dieser Kopplung der Stoffübergang aus der Kapillare in das Massenspektrometer gewährleistet. Diese Flüssigkeit muss, wie auch der Trennpuffer, organischer Natur sein, um Salzablagerungen am Injektor des MS zu verhindern. Grard et al. berichten über den Einsatz einer CE-MS/MS-Methode zur enantioselektiven Analyse eines Adrenorezeptor-Agonisten⁵⁵. Die konduktometrische und die NMR-Detektion sind im Moment noch keine Routineverfahren. In miniaturisierten Kapillarelektrophorese-Geräten findet die elektrochemische Detektion vermehrt Einsatz.

3.1.5 „Sample Stacking“

Neben den eben dargestellten Bemühungen, durch eine Vergrößerung der Schichtdicke in der Kapillare zu einer höheren Empfindlichkeit zu gelangen, gibt es eine zweite, wesentlich effektivere Methode, um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen. Diese Methode führt auf unterschiedlichen Wegen zu einer Aufkonzentration der Analyten vor Erreichen des Detektors (*Sample Stacking*).

Durch gezieltes Ausnutzen der unterschiedlichen Feldstärken in Abhängigkeit von der Pufferleitfähigkeit lässt sich eine Anreicherung bei der Injektion erreichen. Dieses wird dann als *Field-Amplified Sample Injection* bezeichnet.

Zhang et al.⁵⁶ berichteten über eine Verbesserung der Sensitivität um bis zu einen Faktor Tausend durch Injektion in einen Bereich geringer Leitfähigkeit, wobei doppeldestilliertes Wasser eingesetzt wurde. Zhu und Lee⁵⁷ beschreiben eine Vorgehensweise zur Analyse von anionischen Herbiziden.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Bei einem pH-Wert von 3-4 liegen die Analyten geladen vor. Bei diesem pH-Wert kommt es auch zur Ausbildung des EOF. Diese beiden Triebkräfte arbeiten jedoch in zwei Richtungen gegeneinander. Durch Leitfähigkeitsunterschiede und durch die gegenläufige Strömungsrichtung des BGE kommt es hier zu einem Stacking-Effekt. Weil durch den EOF die Probelösung wieder aus der Kapillare gedrängt wird, kann diese zur Injektion fast zur Hälfte mit Probelösung gefüllt werden. Durch den Pumpeneffekt des EOF und die schnellere Wanderung der Analytanionen wird aber effektiv fast die gesamte Kapillarlänge als Trennstrecke genutzt.

Diese Injektionstechniken werden in vielen Varianten routinemäßig angewendet.

3.2 Methodenentwicklung

3.2.1 Einführung

Verschiedene Autoren haben bisher den Einsatz der Kapillarelektrophorese zur Analyse von Amphetaminen beschrieben.

Lurie et al. untersuchten die Einflüsse von verschiedenen anionischen Selektoren auf die Auftrennung von Amphetaminen und deren Synthesenebenprodukten⁵⁸. Es wurden 10 verschiedene Selektoren, wie (R)-N-Dodecylcarbonylvalin und sulfatierte Cyclodextrine getestet. (R)-N-Dodecylcarbonylvalin zeigte für neutrale Analyten eine gute Auftrennung. Enantiomerentrennung wurde dabei nur für die α -Hydroxyphenethylamine beobachtet. 8-Sulfonyl- β -cyclodextrin zeigte die beste Selektivität der getesteten Selektoren. Unter Einsatz von 7-Sulfobutylether- β -cyclodextrin war es möglich, alle 15 eingesetzten Methamphetaminverwandten zu trennen.

Tagliarolo et al. entwickelten eine Methode zum Nachweis von Amphetamin, Methamphetamin, MDMA, MDA und MDE unter Einsatz von nativem β -Cyclodextrin⁵⁹. Diese Methode wurde für Urin- und Haaruntersuchungen eingesetzt. Für die Urinuntersuchungen ist nach SAMSHA-Richtlinien (Substance Abuse & Mental Health Service Administration) eine Bestimmungsgrenze von 500 ng/mL ausreichend. Um auch die Konzentrationen bei Haaruntersuchungen quantifizieren zu können, wurde eine „sample stacking-Technik“ eingesetzt.

Hellriegel et al. untersuchten die Einlagerung von Ephedrinderivaten in Cyclodextrinen⁶⁰. Dabei war ein Ziel, die Lage der Moleküle in dem Innenraum der Cyclodextrine aufzuklären. Es wurde gezeigt, dass für neutrale Cyclodextrine der Phenylkern in dem Innenraum der Cyclodextrine zeigt; die Seitenkette ragt aus der größeren Öffnung des Cyclodextrins heraus. Für anionisch substituierte Cyclodextrine ist die Lage des Phenylringes ähnlich. Hier legen die Daten jedoch nahe, dass die Seitenkette aus der engeren Öffnung des Cyclodextrins herausragt. Aufgrund des protonierten Stickstoffs in der Seitenkette kommt es bei dieser Orientierung zu Wechselwirkungen mit den

anionische Gruppen des Cyclodextrins und damit zu einer Stabilisierung des Zustandes.

Daneben wurde von Gausepohl et al. die stereoselektive Analyse von Clenbuterol, einem β_2 -Sympathomimetikum, beschrieben⁶¹. Um eine Detektionsgrenze von 0,5 ng/mL zu erreichen, wurde eine elektrokinetische Injektion aus methanolischer Lösung durchgeführt (50 s, 10 kV).

In keiner dieser Arbeiten finden sich Ergebnisse für Untersuchungen in der Matrix Speichel. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag entweder auf der Optimierung des Trennsystems, oder es wurden Blut, Urin oder Haare untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein möglichst einfaches Trennsystem zur Analyse von Amphetaminen im Speichel auf Basis der vorhandenen Geräte zu etablieren. Da nicht auf Erfahrungen im Umgang mit der Kapillarelektrophorese zurückgegriffen werden konnte, beschäftigte sich ein Teil der durchgeführten Arbeiten mit grundsätzlichen Techniken dieser Analysenmethode.

3.2.2 Analyten

Mit Hilfe der zu entwickelnden Methode sollte geprüft werden, ob es durch die Einnahme von Arzneistoffen zu falsch positiven Befunden bei Amphetamin-Drogentests im Speichel kommen kann. Wegen der betäubungsmittelrechtlichen Einstufung der Substanzen war es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich, reale Proben von Drogenkonsumenten zu untersuchen. Es wurde nicht nur mit dotierten Lösungen gearbeitet, sondern es wurden auch die Amphetaminkonzentrationen nach Einnahme von Arzneistoffen untersucht. Die Problematik von Verwechslungen mit nichtverkehrs-fähigen Betäubungsmitteln wurde unter 1.2 näher erläutert.

Während der Methodenentwicklung wurden zunächst unterschiedliche Analyten und Cyclodextrine erprobt. Neben nativem β -Cyclodextrin wurde auch Dimethyl- β -cyclodextrin zur Trennung der in Abb. 39 dargestellten Phenylpropanamine verwendet. Diese wurden im Verlauf der Arbeit in unterschiedlichen Testmischungen eingesetzt:

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

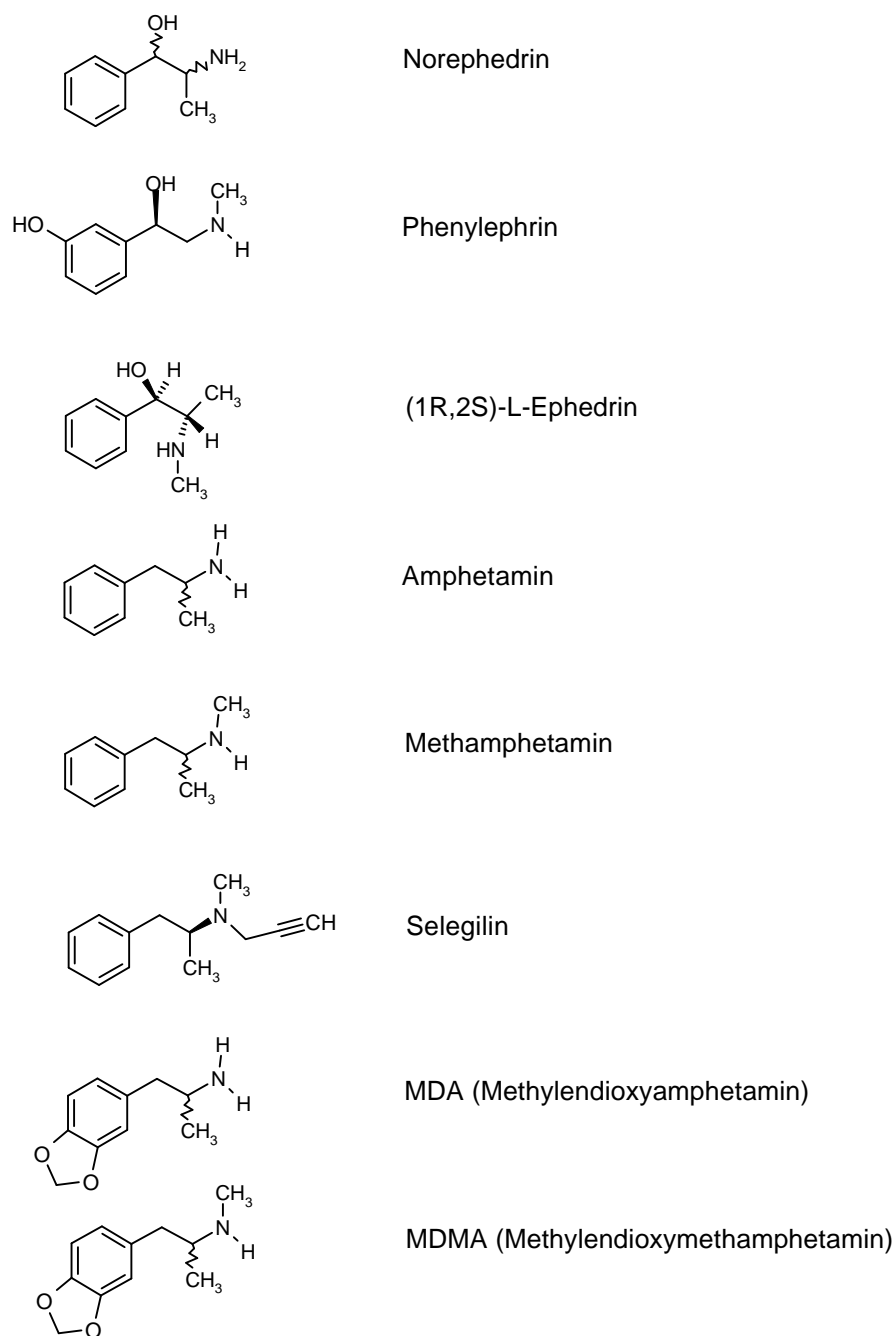


Abb. 39 Strukturformeln der eingesetzten Phenylpropanamine

Bedeutung der Substanzen

Ephedrin und Norephedrin sind indirekt wirkende Sympathomimetika. L-Ephedrin ist Hauptinhaltsstoff von chinesischen *Ephedra* -Arten und wird heute überwiegend zum Abschwellen der Nasenschleimhäute und in Expektorantien-Mischungen eingesetzt⁶². Bei L-Ephedrin handelt es sich nach der CIP-Nomenklatur (Cahn, Ingold und Prelog) um das 1R, 2S-Diastereomer des 1-Phenyl-1-hydroxy-2-methylaminopropan. Wegen der noch großen

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Verbreitung der DL-Nomenklatur bei der Bezeichnung von Ephedrinen wird auch in dieser Arbeit das native Ephedrin als L-Ephedrin bezeichnet. Die Gabe von L-Ephedrin wird aufgrund der Nebenwirkungen – u.a. pulmonale Hypertonie - jedoch kritisch bewertet⁶³. Phenylephrin ist ein α_1 -selektives Sympathomimetikum und wird heute zur Pupillenerweiterung in Augentropfen eingesetzt. Selegilin wird, wie unter 1.2.3 besprochen, in der Parkinsontherapie eingesetzt.

Amphetamin/Methamphetamin

Amphetamin und auch Methamphetamin sind zentral wirksame, indirekt sympathomimetisch wirkende, chirale Moleküle. Ihre Wirkung beruht überwiegend auf der Erhöhung der Noradrenalin- und Dopaminspiegel. Diese werden sowohl durch vermehrte Freisetzung wie auch durch Verminderung der Rückaufnahme erhöht. Wegen ihrer leistungs- und aufmerksamkeitssteigernden Wirkung wurden sie als Dopingsubstanzen und beim Militär eingesetzt.

Auch für die Amphetamine findet die DL-Noemklatur noch häufig Anwendung. Das R-(-)-Enantiomer entspricht hier dem L- bzw. das S-(+)-Enantiomer entspricht der D- Form.

MDA/MDMA

Neben den als Metaboliten nach Arzneistoffeinnahme gebildeten Substanzen Amphetamin und Methamphetamin werden auch die Amphetaminderivate MDMA (3,4-Methylendioxy-methamphetamin) und MDA (3,4-Methylendioxy-amphetamin) in die zu entwickelnde Methode eingeschlossen.

MDMA ist die Substanz, die im engeren Sinne als Ecstasy bezeichnet wird. 1914 wurde der Firma E. Merck (Darmstadt) für deren Herstellung ein Patent erteilt⁶⁴, wobei die Substanz als Arzneistoff nie eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu Amphetamin hat MDMA neben den Amphetamineigenschaften aufgrund der Methylendioxy-Struktur auch mescalinartige Eigenschaften, weshalb diese Stoffklasse auch als Klasse der Entaktogene (kontakt-

steigernden Substanzen) bezeichnet wird⁶⁵. MDMA bildet heute in Europa den Großteil der missbräuchlich eingesetzten Menge an Amphetaminderivaten.

3.2.3 Trennpuffer

In den unter 3.2.1 erwähnten Arbeiten wurden die Amphetamine unter Einsatz von Phosphatpufferlösungen mit einem pH-Wert von 2,5 getrennt. Da Amphetamine aufgrund ihres pK_a -Wertes in diesem Bereich vollständig ionisiert vorliegen, wird dieser pH-Wert für diese Arbeit beibehalten.

Die Racemate können durch die im BGE gelösten Cyclodextrine in ihre Enantiomere aufgetrennt werden. Dabei ist es erforderlich, den Analyten ausreichend Zeit zur Komplexbildung mit den Selektormolekülen zu geben⁶⁶. Neben der Variation von Trennungsspannung und Kapillarlänge kann die Kontaktzeit auch über Änderungen des elektrischen Feldes (der Pufferionenkonzentration) erfolgen. Im Laufe der Entwicklung wurden KH_2PO_4 Puffer mit pH-Wert 2,5 und verschiedener Konzentration an PO_4^{3-} eingesetzt.

Der Zusatz von Cyclodextrin erfolgte täglich neu, da eine Flockenbildung während der Lagerung der fertigen Pufferlösung auftrat. Es wurde die entsprechende Menge an Cyclodextrin abgewogen und mit dem erforderlichen Volumen Pufferlösung aufgefüllt. Nachdem das Cyclodextrin durch Schütteln suspendiert wurde, wurde die Lösung solange im Ultraschallbad behandelt, bis die Lösung frei von erkennbaren Partikeln war. Anschließend wurde die Lösung durch einen Membranfilter mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,45 μm direkt in die Puffervails oder das Vorratsgefäß des Gerätes filtriert.

3.2.4 Kapillare

Die Auftrennung der Substanzen wurde mit einer 48,5 cm langen „bubble-cell“-Kapillare (Bubblefaktor 2) und einer 80,5 cm langen Kapillare, jeweils mit 50 µm innerem Durchmesser, untersucht. Die Darstellung der Elektropherogramme erfolgt in Abb. 40 bzw. Abb. 41.

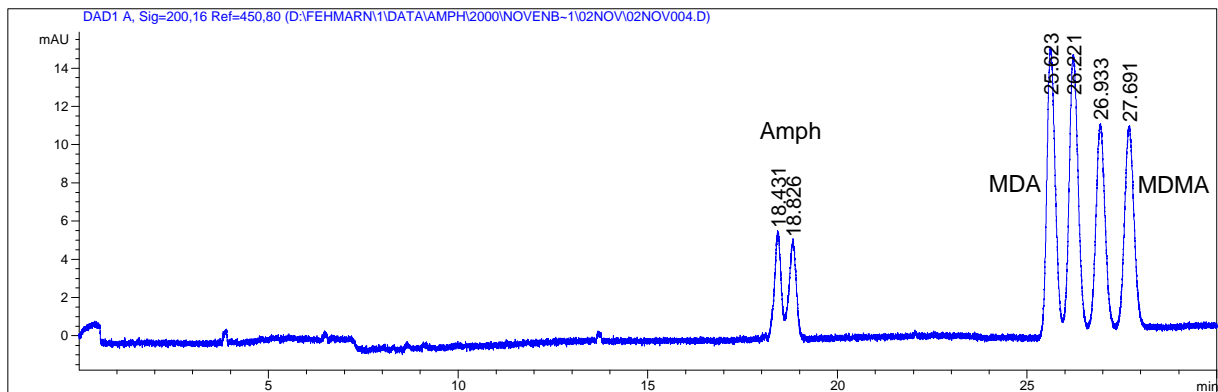


Abb. 40 Elektropherogramm einer wässrigen Probe mit je 100 ng/mL racemischem Amphetaminsulfat, MDA-HCl und MDMA-HCl; Kapillare 48,5 cm-50µm ID, Trennpuffer 200 mM KH_2PO_4 pH2,5+ 15 mg β -Cyclodextrin, Trennungsspannung: 17 kV bei 15 °C, Injektion.: 10 kV 50sec

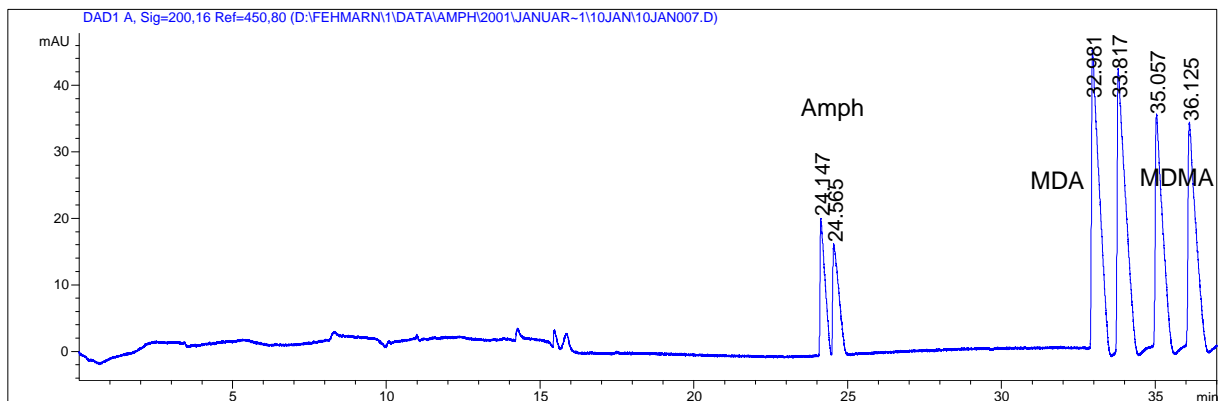


Abb. 41 Elektropherogramm einer wässrigen Probe mit je 1000 ng/mL racemischem Amphetaminsulfat, MDA-HCl und MDMA-HCl; Kapillare 80,5 cm-50µm ID, Trennpuffer 100 mM KH_2PO_4 pH2,5+ 15 mg β -Cyclodextrin, Trennungsspannung: 25 kV bei 15 °C, Injektion: 20 kV 10 sec

Dabei zeigte sich, dass bei der Verwendung von β -Cyclodextrin eine bessere Trennung, unabhängig von der Trennpufferionenkonzentration, immer mit der 80,5 cm Kapillare gegeben war. Durch die Berechnung der Auflösung

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

zwischen den Enantiomeren in den entsprechenden Elektropherogrammen konnte dieses belegt werden. Die Werte sind in Tab. 12 angegeben. Die Auflösung wurde dabei nach der folgenden Formel berechnet:

$$R = \frac{2(MT_2 - MT_1)}{(PW_1 + PW_2)}$$

R= Auflösung

MT₂=Migrationszeit 2. Peak

MT₁=Migrationszeit 1. Peak

PW₁=Peakbreite 1. Peak an der Basis

PW₂=Peakbreite 2. Peak an der Basis

40 cm

	MT 1	MT 2	PW 1	PW 2	Auflösung R
Amphetamin	18,43	18,825	0,184	0,21	2,005
MDA	25,623	26,221	0,2381	0,2481	2,460
MDMA	26,932	27,691	0,2633	0,2704	2,844

80,5 cm

	MT 1	MT 2	PW 1	PW 2	Auflösung R
Amphetamin	24,133	24,553	0,1643	0,2109	2,239
MDA	32,969	33,806	0,2332	0,2492	3,470
MDMA	35,048	36,116	0,2355	0,2459	4,437

Tab. 12 Berechnung der Auflösung für die 40 cm und 80,5 cm Kapillare

Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurde daher nur mit einer 80,5 cm langen Kapillare gearbeitet.

Auch die Trennungsspannung beeinflusst die Migrationszeit. Im oberen Teil der Abbildung 42 ist ein mit 12 kV Trennungsspannung aufgenommenes Elektropherogramm dargestellt. Im unteren Teil beträgt die Trennungsspannung 15 kV. Durch die Erhöhung der Trennungsspannung kann die Migrationszeit deutlich verkürzt werden. Die Peaks liegen näher beieinander und sind schmaler.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

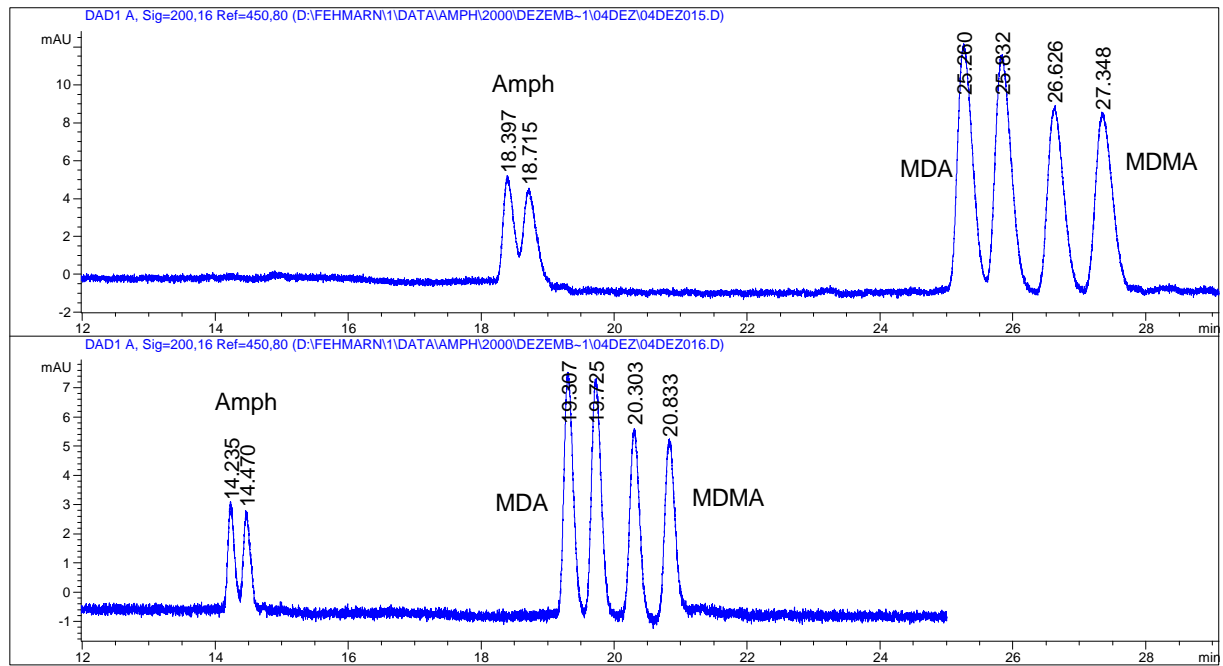


Abb. 42 Vergleich unterschiedlicher Trennspannungen: Kapillare: 48,5 cm·50 µm ID, Trennpuffer 50 mM KH₂PO₄ pH 2,5+ 15 mg β-Cyclodextrin, Trennspannung: oben 12kV unten 15 kV bei 15 °C, Injektion: 20 kV 10 sec

3.2.5 Cyclodextrinauswahl

Es ist bekannt, dass sich Amphetamin-, Methamphetamin-, MDA- und MDMA-Racemate mittels β -Cyclodextrin in ihre Enantiomere trennen lassen. Unter gleichen Bedingungen wurde auch die Auftrennung dieser Racemate durch Dimethyl- β -cyclodextrin erprobt. Die erhaltenen Elektropherogramme sind in Abb. 43 gezeigt. Mit β -Cyclodextrin wurden die Racemate von Amphetamin, MDA und MDMA eindeutig in ihre Enantiomere aufgetrennt. Dimethyl- β -cyclodextrin führte zu deutlich schlechteren Ergebnissen und blieb daher unberücksichtigt.

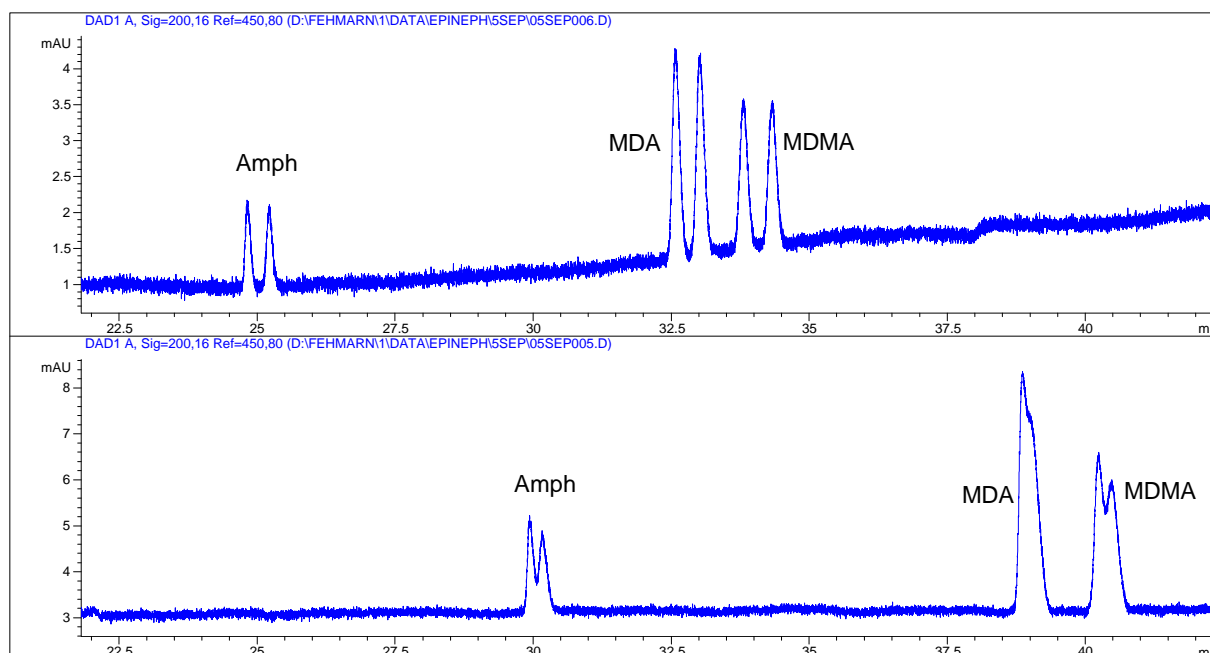


Abb. 43 Vergleich der Auflösung zwischen 20 mg/mL β -Cyclodextrin (oben) und 30 mg/mL Dimethyl- β -Cyclodextrin (unten) Probe: 25 ng/mL rac. Amph, MDA und MDMA Kapillare 48,5 cm-50 μ m ID, Trennpuffer 50 mM KH_2PO_4 pH 2,5, Trennungsspannung: 25 kV bei 25 °C, Injektion: 15 kV 10 sec aus H_2O

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

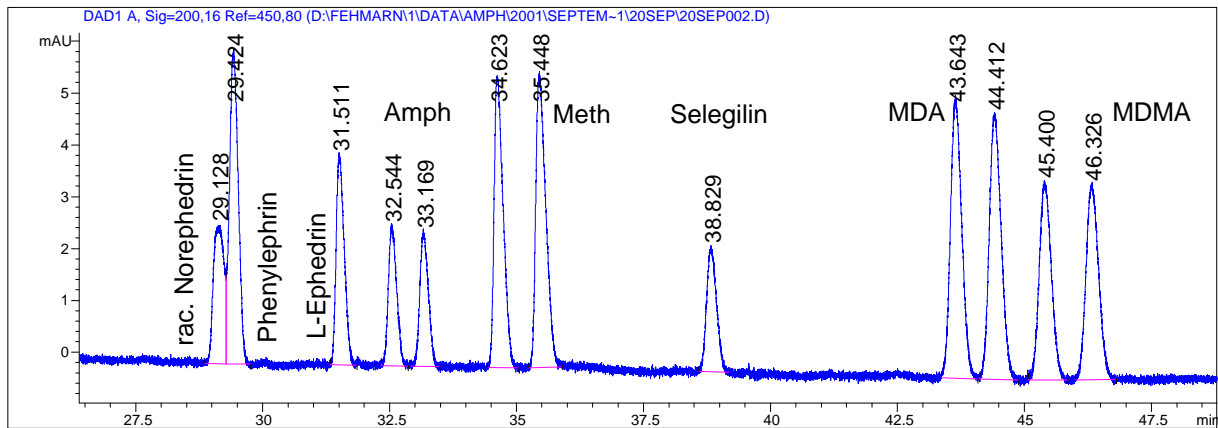


Abb. 44 Elektropherogramm einer wässrigen Probe mit je 500 ng/mL rac. Norephedrin, Phenylephrin, L-Ephedrin, rac. Amph, rac. Meth, Selegilin, rac. MDA und rac. MDMA Kapillare 80,5 cm-50µm ID, Trennpuffer 75 mM KH_2PO_4 pH 2,5+ 15 mg β -Cyclodextrin, Trennungsspannung: 25 kV bei 15 °C, Injektion: 10 kV 20 sec

Betrachtet man nicht nur diese drei Substanzen, sondern überprüft die Auftrennung aller verfügbaren Substanzen, so zeigte sich, dass sich durch β -Cyclodextrin allein die Signale von Norephedrin und Phenylephrin nicht trennen ließen (Abb. 44). Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht, durch Kombination der beiden untersuchten Cyclodextrine eine Auftrennung auch dieser beiden Substanzen zu erreichen.

Chinaka et al. untersuchten die Auftrennung von Methamphetamin und verwandter Substanzen durch Mischungen von β -Cyclodextrin und Dimethyl- β -cyclodextrin⁶⁷.

In Abb. 45 sind die Elektropherogramme dargestellt, die durch Variation der Mischungsverhältnisse der beiden Cyclodextrine im BGE erhalten wurden.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

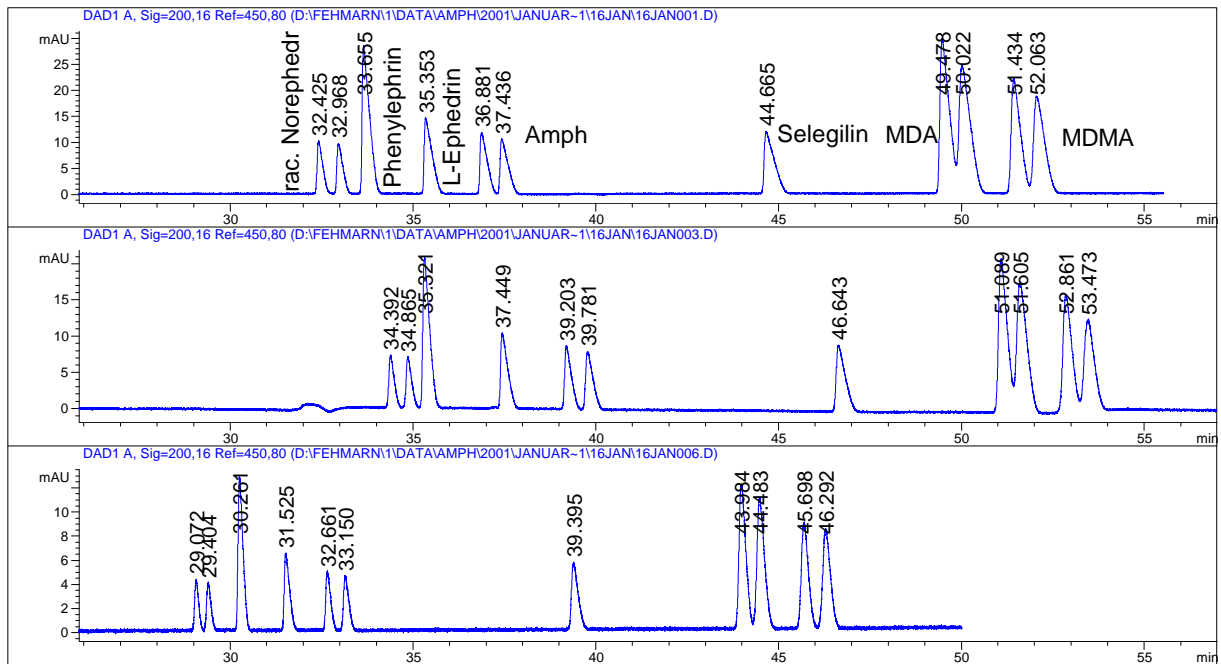


Abb. 45 Verschiedene Cyclodextrinmischungen im Vergleich
 oben 15 mg/mL β -Cyclodextrin und 15 mg/mL Dimethyl- β -cyclodextrin
 mitte 20 mg/mL β -Cyclodextrin und 15 mg/mL Dimethyl- β -cyclodextrin
 unten 15 mg/mL β -Cyclodextrin und 10 mg/mL Dimethyl- β -cyclodextrin

Als Ergebnis dieser Untersuchung wurde eine Mischung von 10 mg/mL Dimethyl- β -cyclodextrin mit 15 mg/mL β -Cyclodextrin gewählt. Ein Elektropherogramm mit 500 ng/mL je Racemat ist in Abb. 46 vergrößert dargestellt.

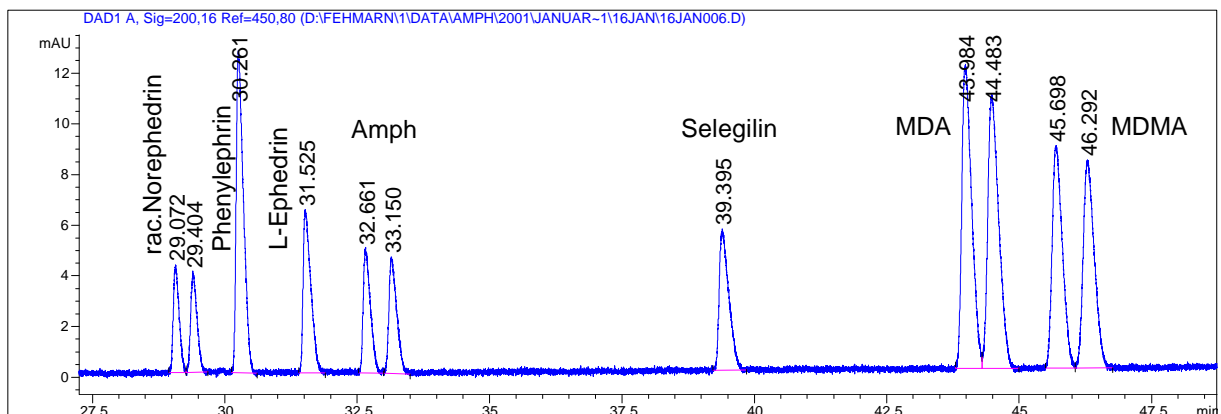


Abb. 46 Elektropherogramm einer wässrigen Probe mit je 500 ng/mL rac. Norephedrin, Phenylephrin, L-Ephedrin, rac. Amph, rac. Meth, Selegilin, rac. MDA und rac. MDMA Kapillare 80,5 cm-50 μ m ID, Trennpuffer 75 mM KH_2PO_4 pH 2,5 + 10 mg Dimethyl- β -cyclodextrin und 15 mg/mL β -Cyclodextrin, Trennungsspannung: 25 kV bei 15 °C, Injektion: 10 kV 6 sec

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Neben der visuellen Auswertung konnte mit Hilfe der Auflösung gezeigt werden, wie sich die unterschiedlichen Cyclodextrine auf die Trennung auswirken. Die Ergebnisse für die Elektropherogramme aus Abb. 44 und 46 sind in der nachfolgenden Tabelle gegenübergestellt:

Mischung aus 15 mg/mL β -Cyclodextrin und 10 mg/mL Dimethyl- β -cyclodextrin					
	MT 1	MT 2	PW 1	PW 2	Auflösung R
Norephedrin	29,073	29,404	0,1231	0,1337	2,578
Amph	32,662	33,151	0,1471	0,1574	3,212
MDA	43,984	44,483	0,1962	0,2184	2,407
MDMA	45,698	46,292	0,2025	0,2202	2,811

Nur 15 mg/mL β -Cyclodextrin					
	MT 1	MT 2	PW 1	PW 2	Auflösung R
Amph	32,544	33,169	0,1792	0,1836	3,445
Meth	34,623	35,448	0,1857	0,2171	4,096
MDA	43,643	44,412	0,237	0,2596	3,097
MDMA	45,399	46,327	0,2566	0,2642	3,564

Tab. 13 Berechnung der Auflösung für den Einsatz von β -Cyclodextrin und β -Cyclodextrin in Kombination mit Dimethyl- β -cyclodextrin

Durch die Mischung der beiden Cyclodextrine konnte auch Norephedrin in seine Enantiomere aufgetrennt werden. β -Cyclodextrin allein sorgte bei den für die Arzneistoffmetabolitenuntersuchung wichtigen Analyten für eine bessere Peaktrennung und wurde daher allein eingesetzt.

3.2.6 Temperatureinfluss

Die Enantiomerentrennung durch Cyclodextrine beruht auf der unterschiedlichen Einlagerungswahrscheinlichkeit der Enantiomere in das Cyclodextrin. Die damit verbundenen Gleichgewichtskonstanten sind temperaturabhängig, d.h. je geringer die Temperatur ist, desto länger bleibt der gebildete diastereomere Komplex beständig. Die Unterschiede zwischen den Enantiomeren bezüglich ihrer Einlagerungsdauer werden so immer größer. Dieses Phänomen wird durch die Abb. 47 belegt. Dort ist der Unterschied in den Migrationszeiten zwischen 15 °C und 20 °C Kapillarentemperatur dargestellt.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

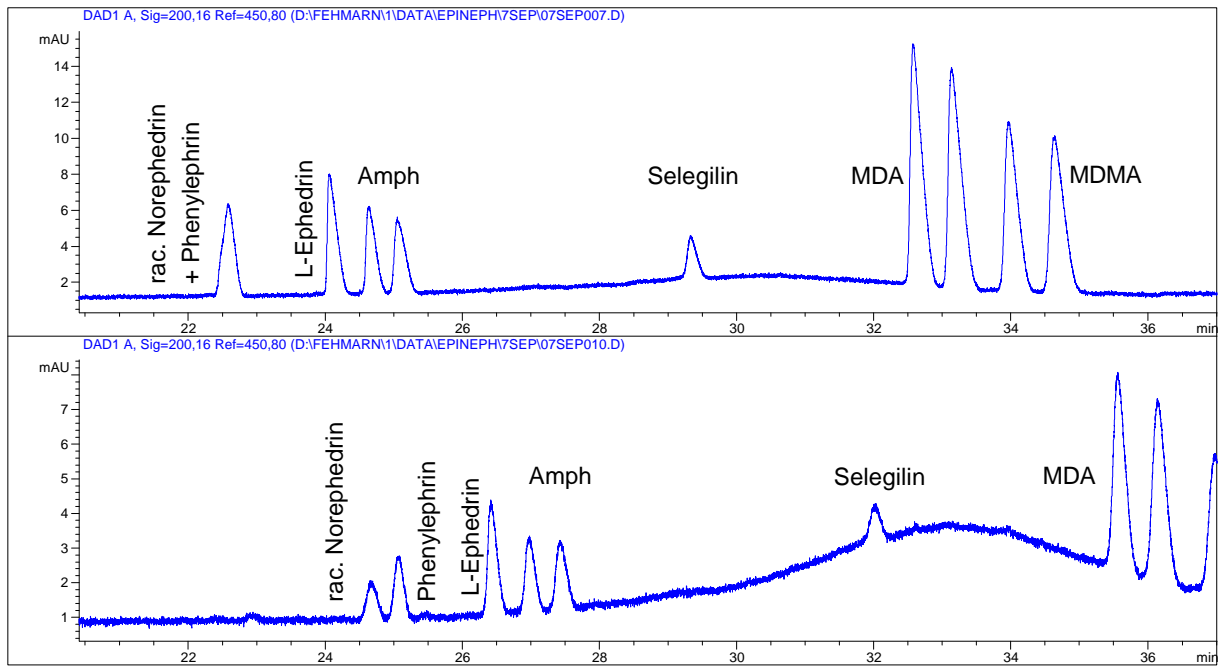


Abb. 47 Temperatureinfluss auf die Trennung oben Trennung bei 20 Grad unten Trennung bei 15 Grad

3.2.7 Probleme während der Methodenentwicklung

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist das Konstanthalten der Versuchsbedingungen obligatorisch. Ein Problem, welches in der Methodenentwicklung häufiger zu beobachten war, ist das Einbrechen der Stromstärke. Dieses hat eine Verlängerung der Migrationszeit zur Folge. Ein Kapillarelektrophoreselauf mit Stromabriss ist exemplarisch in Abb. 48 einem Lauf ohne Komplikationen gegenübergestellt.

Nachdem über das „Replishmentsystem“ der BGE vor jedem Lauf in den entsprechenden Vails erneuert wurde, trat dieses Phänomen nur sehr selten auf.

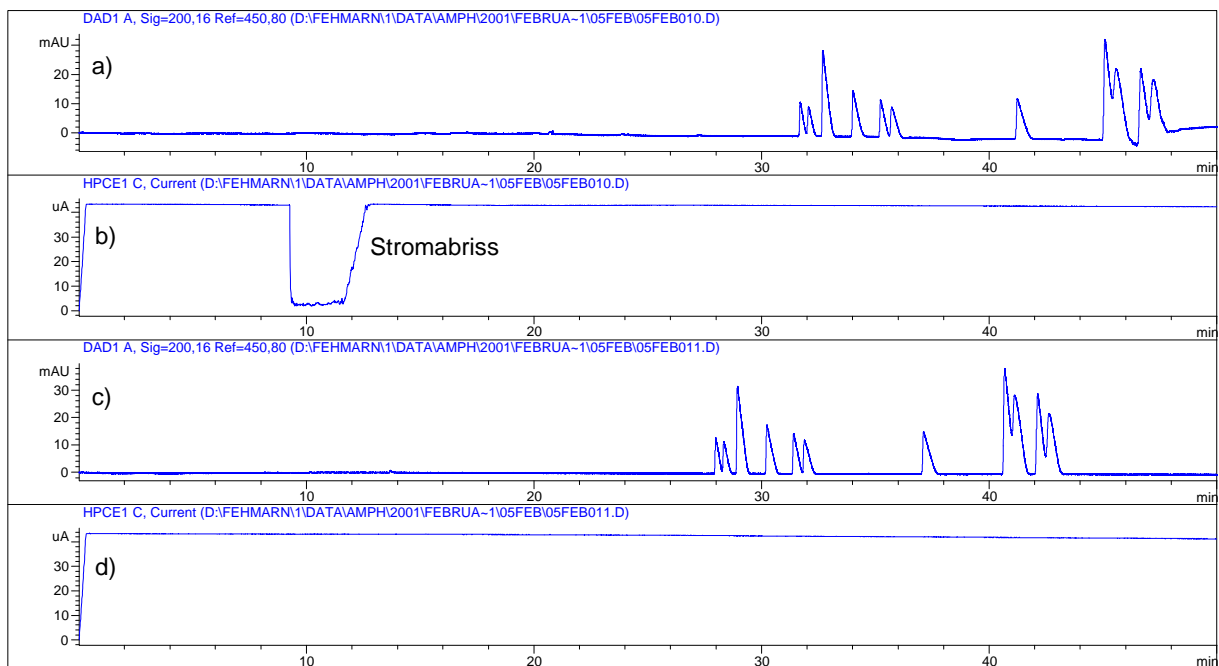


Abb. 48 Auswirkung eines Stromabrisses (a,b) im Vergleich zu einem Lauf ohne Komplikationen (c,d) (Bedingungen siehe Abb. 46)

Aufgrund von Pufferalterung und Veränderungen an der Kapillaroberfläche kann es im Fortgang von Analysensequenzen zu Verschiebungen der Migrationszeiten kommen. Dieses wurde auch für die hier entwickelte Methode beobachtet und dokumentiert. Die Versuche mit hydrodynamischer Injektion wurden ohne Austausch des Hintergrundelektrolyten (BGE) durchgeführt. Aus Tab. 15 geht hervor, dass über den Verlauf der 6 Injektionen die Migrations-

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

zeiten kontinuierlich abnehmen. Diese Abnahme der Migrationszeiten ließ sich durch Austausch des BGE verhindern, sodass mit frisch nachgefülltem BGE Migrationszeitverschiebungen, ausgedrückt als Standardabweichung, von $< 0,5 \%$ erzielt wurden. In Kapitel 3.4.4 finden sich die entsprechenden Werte für die Präzisionsbestimmung.

3.2.8 „Replanishment“- System

Die oben beschriebenen Phänomene der Migrationszeitverkürzung und des Stromabbrisses können bei dem eingesetzten Kapillarelektrophoresesystem durch ein so genanntes Replanishmentssystem verhindert werden. Ein Schema der einzelnen Bedienungselemente der 3D Kapillarelektrophorese der Fa. Agilent findet sich in Abb. 49. Links ist dort das Replanishmentssystem mit einer Vorrats- und der Abfallflasche zu sehen. Die beiden Flaschen fungieren zusätzlich als Über- und Unterdruckreservoir für die durch Druckunterschiede ausführbaren Operationen des Gerätes.

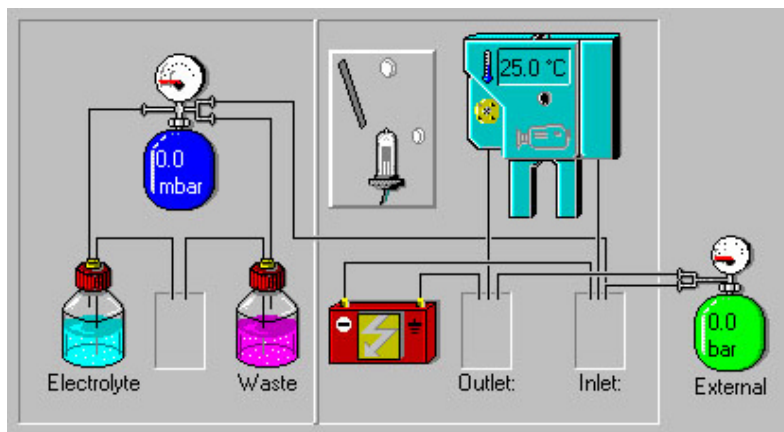


Abb. 49 Schematische Darstellung der Komponenten des 3D CE Gerätes der Fa. Agilent

Vor jedem neuen Analysenlauf wurde über dieses System frischer BGE in die beiden Puffergefäße gefüllt, dieses führte zu einer deutlich verbesserten Wiederholbarkeit der ermittelten Migrationszeiten (Tab.14). Hier sind 2 Präzisionsbestimmungen gegenübergestellt. Im linken Teil der Tabelle sind Werte ohne Replanishment zu Beginn der Entwicklung, im rechten Teil exemplarisch ein Ausschnitt aus den Bestimmungen der Validierung dargestellt.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

	300 ng/mL ohne Replanishment injiziert (n=6)				400 ng/mL mit Replanishment injiziert (n=6)			
	MT		Fläche		MT		Fläche	
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw
L-Ephedrin	31,250	0,95%	308,133	9,57%	29,15	0,09%	220,47	1,18%
R-(-)-Amphetamin	32,324	0,94%	211,650	8,52%	29,82	0,11%	199,10	1,60%
S-(+) Amphetamin	32,954	0,96%	208,033	8,82%	30,42	0,11%	199,07	1,95%
R-(-) Meth-amphetamin	34,169	0,98%	472,383	7,26%	31,85	0,11%	211,33	1,57%
S-(+) Meth-amphetamin	35,023	0,99%	520,383	7,22%	32,67	0,12%	210,60	1,53%
Selegilin	38,398	1,01%	255,783	8,12%	35,96	0,13%	237,78	1,56%
MDA 1	42,810	0,97%	631,000	8,67%	40,74	0,13%	456,62	1,85%
MDA 2	43,567	0,96%	633,550	8,47%	41,55	0,13%	466,48	1,85%
MDMA 1	44,572	0,96%	474,483	8,60%	42,63	0,13%	449,52	1,48%
MDMA 2	45,470	0,96%	481,067	9,07%	43,65	0,13%	453,37	1,56%

Tab. 14 Wiederholpräzision der Migrationszeit: Vergleich mit und ohne Replanishment

3.2.9 Injektion

Wie in der Einführung dargestellt, gibt es verschiedene Injektionstechniken, die unterschiedlich empfindliche Messungen erlauben. Für die untersuchten Analyten zeigte sich, dass die hydrodynamische Injektion nur bis in einen Bereich von 1 µg/mL Analyt ein erkennbares Signal bei 200 nm ergibt.

Bei der 6maligen Injektion (100 mbar·sec) von 50 µg/mL der angegebenen Amphetaminracemate lagen die Werte für die Standardabweichung der Peakflächen für alle Substanzen bei <3,3 %. Die Werte sind in Tab. 15 dargestellt.

		1	2	3	4	5	6	Mittelwert	rel.Stabw
R(-)-	MT	31,109	30,938	30,757	30,624	30,441	30,235	30,68	1,05%
Amphetamin	Fläche	28,2	27	27,4	27,1	26,9	26,4	27,17	2,22%
S(+)-	MT	31,698	31,523	31,334	31,199	31,008	30,794	31,26	1,06%
Amphetamin	Fläche	27,7	26,1	27,4	26,9	26,9	28,8	27,30	3,35%
R(-)-	MT	33,174	32,985	32,782	32,637	32,429	32,2	32,70	1,09%
Methamphetamin	Fläche	26,3	25,9	26,2	26,4	26,1	24,6	25,92	2,58%
S(+)-	MT	33,962	33,765	33,554	33,401	33,184	32,945	33,47	1,12%
Methamphetamin	Fläche	29,9	28,9	29,3	29,3	29,7	28	29,18	2,32%
MDA 1	MT	42,044	41,748	41,443	41,219	40,9	40,557	41,32	1,32%
	Fläche	69,5	68	68,6	68,9	67,4	67,2	68,27	1,31%
MDA 2	MT	42,827	42,521	42,204	41,971	41,64	41,286	42,07	1,35%
	Fläche	70	69,2	69,7	69	68,8	68,5	69,20	0,81%
MDMA 1	MT	43,846	43,525	43,197	42,954	42,61	42,241	43,06	1,37%
	Fläche	62,3	60,2	61,6	61	59,7	60,2	60,83	1,62%
MDMA 2	MT	44,799	44,463	44,12	43,865	43,504	43,12	43,98	1,40%
	Fläche	63,2	61,5	61,9	61,9	61	60,8	61,72	1,39%

Tab. 15 Präzision für hydrodynamische Injektion ohne Replanishment durchgeführt
 Probenkonzentration 50 µg/mL je Racemat bzw. Substanz injiziert mit
 100 mbar·sec

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

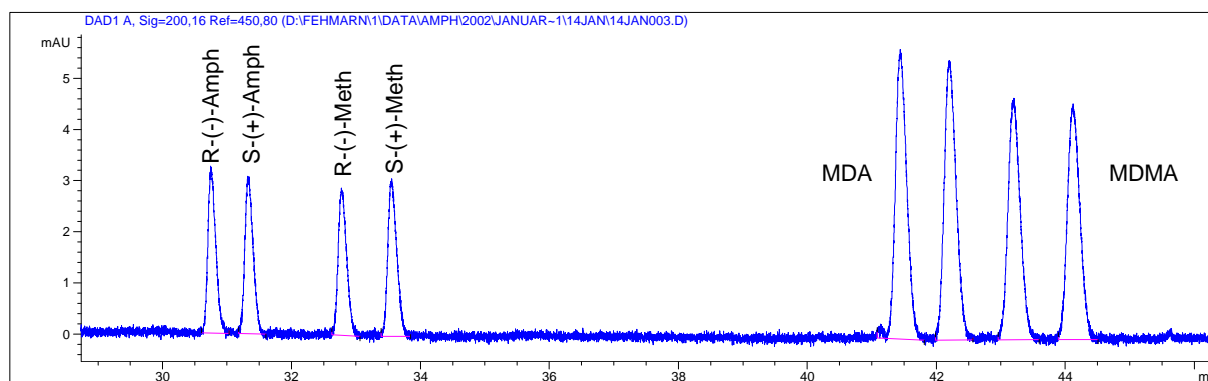


Abb. 50 Elektropherogramm einer wässrigen Lösung mit je 50 µg/mL rac. Amph, rac. Meth, rac. MDA und rac. MDMA; Kapillare 80,5 cm·50µm ID, Trennpuffer 75 mM KH_2PO_4 pH 2,5+ 15 mg/mL β -Cyclodextrin, Trennungsspannung: 25 kV bei 15 °C, Injektion: 100 mbar·sec

Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, wurde die elektrokinetische Injektion näher untersucht. Im Vergleich zu hydrodynamischen Injektionen besitzen diese eine geringere Wiederholpräzision. Um trotzdem zu einer möglichst geringen Impräzision zu gelangen, wurden unterschiedliche Injektionsvarianten erprobt. Die Methode die zur Auswertung der Speichelproben eingesetzt wurde, beruht auf einer Injektion aus 0,1 mM H_3PO_4 .

Tagliarro fand für seine Methode zur Quantifizierung von Amphetaminen in Haaren eine Standardabweichung für die Peakflächen von 5,1 bis zu 20,7 % (n=5 an 2 Tagen) ⁵⁹. Die Proben wurden mit 10 kV für 20 sec, nach einer Wasserzone, die mit 35 mbar für 5 sec in die Kapillare eingebracht wurde, injiziert. Anfänglich wurden bei den durchgeführten Untersuchungen ähnliche Standardabweichungen für die Peakflächen beobachtet (vergleiche Tab. 16). Durch Abwandlungen bei der Injektionstechnik sollte versucht werden, eine Verbesserung dieser Werte zu erzielen.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Substanz		1	2	3	4	5	6	7	8	Mittelwert	rel. Stabw [%]
L-Ephedrin	MT	29,642	29,609	29,47	29,53	29,537	29,212	29,255	29,246	29,438	0,591
	Fläche	289	282,3	271,2	206,9	153,2	256,3	182,1	183,5	228,063	23,121
R(-)-Amphetamin	MT	30,684	30,646	30,496	30,55	30,554	30,223	30,256	30,246	30,457	0,616
	Fläche	201	198,5	189,5	149,3	110,3	178,5	135,7	131,8	161,825	21,304
S(+)-Amphetamin	MT	31,276	31,237	31,078	31,128	31,121	30,793	30,818	30,807	31,032	0,638
	Fläche	196,8	195,7	186,4	146,3	108,2	175	129,2	129,2	158,350	21,742
R(-)-Methaphetamin	MT	32,39	32,355	32,186	32,264	32,284	31,882	31,942	31,93	32,154	0,639
	Fläche	450,2	443,4	425,4	328,7	246	400,6	294,7	294,5	360,438	21,882
S(+)-Methamphetamin	MT	33,198	33,16	32,978	33,04	33,04	32,653	32,693	32,68	32,930	0,676
	Fläche	497	488,5	471,4	362,7	272,2	444,3	327,1	324,9	398,513	21,827
Selegillin	MT	36,303	36,273	36,04	36,083	36,039	35,646	35,659	35,646	35,961	0,766
	Fläche	266,1	258,4	248,4	185,4	139,7	232,3	164,8	166,8	207,738	23,637
MDA 1	MT	40,358	40,332	40,035	40,094	40,046	39,541	39,568	39,547	39,940	0,859
	Fläche	663,2	649	622,4	473,5	356,9	584,5	424,5	425,7	524,963	22,582
MDA 2	MT	41,05	41,022	40,711	40,759	40,695	40,196	40,208	40,186	40,603	0,891
	Fläche	671,2	656,5	630,6	476,7	358,4	596,2	432,1	430,2	531,488	22,741
MDMA 1	MT	41,957	41,932	41,6	41,635	41,547	41,059	41,051	41,03	41,476	0,929
	Fläche	511,9	497,5	478,1	363,6	272,1	448,4	323	324,7	402,413	22,950
MDMA 2	MT	42,776	42,747	42,399	42,42	42,316	41,834	41,81	41,785	42,261	0,964
	Fläche	515,3	504,5	482,6	367,2	273	455,4	325,7	326,9	406,325	23,135

Tab. 16 Anfänglich ermittelte Präzision für die elektrokinetische Injektion

Bei der Injektion aus einer Probe mit geringerer Leitfähigkeit bzw. größerer Feldstärke als der BGE wird im Eingangsbereich der Kapillare Analyt angereichert. Diese trifft mit hoher Geschwindigkeit aus der Probelösung auf den BGE am Kapillarbeginn. Dort erniedrigt sich seine Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund der Abnahme der Feldstärke. Wird nun das Probengefäß unter dem Kapillaranfang gegen das BGE-Vail getauscht, kann durch Konvektion und/oder Tropfenbildung an dem Kapillarende ein Teil dieser injizierten Analyten aus der Kapillare entfernt werden.

Um dieses Phänomen zu verhindern, wird nach der elektrokinetischen Injektion für kurze Zeit ein Druckimpuls auf das Probenvail gegeben. Dadurch wird ein Teil der niedriger konzentrierten Probelösung in die Kapillare gedrückt. So kommt es bei Konvektion nur zu einem Verlust an gering konzentrierter Probelösung. Wegen der erkennbaren Vorteile wurde für die weiteren Messungen diese Art der Injektion beibehalten.

Die ermittelte Präzision für diese Injektionstechnik wurde u.a. im Zuge der Validierung ermittelt worden. Die Werte sind in Kapitel 3.4.4 in Tab.19 bis 22 dargestellt.

3.2.10 Änderung der Migrationszeit in Abhängigkeit von der Analytkonzentration

Neben den Bemühungen, die Peakflächen reproduzierbar zu ermitteln, wurde ein weiteres Phänomen beobachtet, welches zu Komplikationen bei der Auswertung führen kann. Die einzelnen Substanzen änderten ihre Migrationszeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Bei zunehmender Konzentration wurden die Migrationszeiten für die Amphetamin-derivate kürzer. Dadurch konnte es bei der Auswertung zu Verwechslungen der Peaks bzw. falschen Zuordnungen kommen. Daher wurde versucht, die Migrationszeiten so zu steuern, dass zwischen den einzelnen Migrationszeitfenstern der Enantiomere immer noch etwas Zeit verstreicht. Dieses konnte durch Begrenzung der Peakbreite bei der Injektion erreicht werden (siehe Tab. 17).

Migrationszeitänderung in Abhängigkeit der Analysenkonzentration

	10 ng/mL (n=8)		25 ng/mL (n=3)		100 ng/mL (n=3)		400 ng/mL (n=3)		gesamt		
	Mittelwert	rel. Stabw	Mittelwert	rel. Stabw	Mittelwert	rel. Stabw	Mittelwert	rel. Stabw	MT	rel Stabw Gesamt	
	Min/max										
L-Ephedrin	29,627	0,23%	29,446	0,20%	29,440	0,18%	29,372	0,27%	29,523	29,280	0,42%
	585,913	8,59%	681,833	7,50%	684,833	9,59%	545,033	4,11%		29,760	
R-(-)- Amphetam	30,907	0,25%	30,737	0,17%	30,616	0,11%	30,206	0,27%	30,713	30,111	0,88%
	12,450	10,85%	31,767	5,56%	119,233	9,31%	460,300	4,14%		31,050	
S-(+)- Amphetam	31,513	0,26%	31,336	0,17%	31,221	0,11%	30,851	0,26%	31,324	30,757	0,82%
	11,525	10,66%	31,200	6,94%	118,300	9,27%	456,233	4,35%		31,664	
R-(-)- Methamph	32,995	0,26%	32,800	0,18%	32,690	0,11%	32,326	0,27%	32,800	32,225	0,80%
	13,725	7,11%	34,400	8,68%	110,600	9,14%	403,733	4,63%		33,155	
S-(+)- Methamph	33,796	0,27%	33,594	0,18%	33,480	0,11%	33,140	0,26%	33,600	33,039	0,77%
	10,875	7,25%	30,367	7,29%	115,733	9,72%	451,100	4,52%		33,968	
Selegilin	36,525	0,28%	36,271	0,22%	36,286	0,18%	36,324	0,28%	36,409	36,209	0,40%
	572,525	8,29%	679,700	8,53%	697,433	9,57%	546,400	4,22%		36,728	
MDA 1	41,936	0,31%	41,641	0,20%	41,511	0,13%	40,988	0,30%	41,658	40,844	0,89%
	25,125	8,06%	71,633	8,38%	269,833	9,34%	1063,300	4,28%		42,179	
MDA 2	42,726	0,32%	42,424	0,20%	42,299	0,13%	41,815	0,30%	42,453	41,671	0,85%
	25,400	7,54%	72,500	7,58%	272,567	9,57%	1074,233	4,41%		42,979	
MDMA 1	43,741	0,33%	43,436	0,21%	43,326	0,13%	42,891	0,30%	43,479	42,745	0,78%
	22,400	6,01%	64,100	7,77%	244,433	9,61%	942,000	4,60%		44,004	
MDMA 2	44,694	0,33%	44,382	0,22%	44,283	0,12%	43,903	0,29%	44,442	43,755	0,73%
	23,650	6,57%	67,567	8,25%	250,600	9,79%	958,233	4,72%		44,963	

Tab. 17 Migrationszeitänderung in Abhängigkeit der Analytkonzentration
(Konzentration je Racemat bzw. Substanz)

3.2.11 Festlegung der CE Methode

Nachdem die verschiedenen Parameter der Kapillarelektrophorese-Methode optimiert wurden, ergab sich folgende Durchführung für die Untersuchung von Speichelproben:

Die Analyse erfolgt bei 15° C in einer 80,5 cm langen Quarzglaskapillare mit einem Innendurchmesser von 50 µm. Das entspricht einer effektiven Länge von 72 cm zwischen Probeneinlass und Detektorfenster. Die Detektion erfolgt bei 200 nm. Die Kapillare ist mit 75 mM KH₂PO₄ Puffer mit einem pH-Wert von 2,5 als BGE gefüllt. Über das Replanishmentssystem werden vor jedem Lauf die beiden BGE-Gefäße mit frischem Elektrolyt gefüllt.

Das Konditionieren der Kapillare erfolgt sequentiell: 0,2 min mit 0,1 M NaOH; dann 3 min mit BGE, jeweils mit einem Überdruck von ca. 940 mbar. Die Injektion erfolgt aus 100 µL Probelösung. Es wird für 7 sec mit 10 kV, gefolgt von 10 mbar-sec injiziert. Bis zum Zeitpunkt 0,3 min wird die Trennungsspannung linear auf 25 kV erhöht und für den Rest der Analysendauer konstant gehalten. Es stellte sich ein Strom von ca. 42 µA ein. Die Trennung wird nach 50 min beendet. Abb. 51 zeigt das DAD-Detektorsignal einer so analysierten Probe.

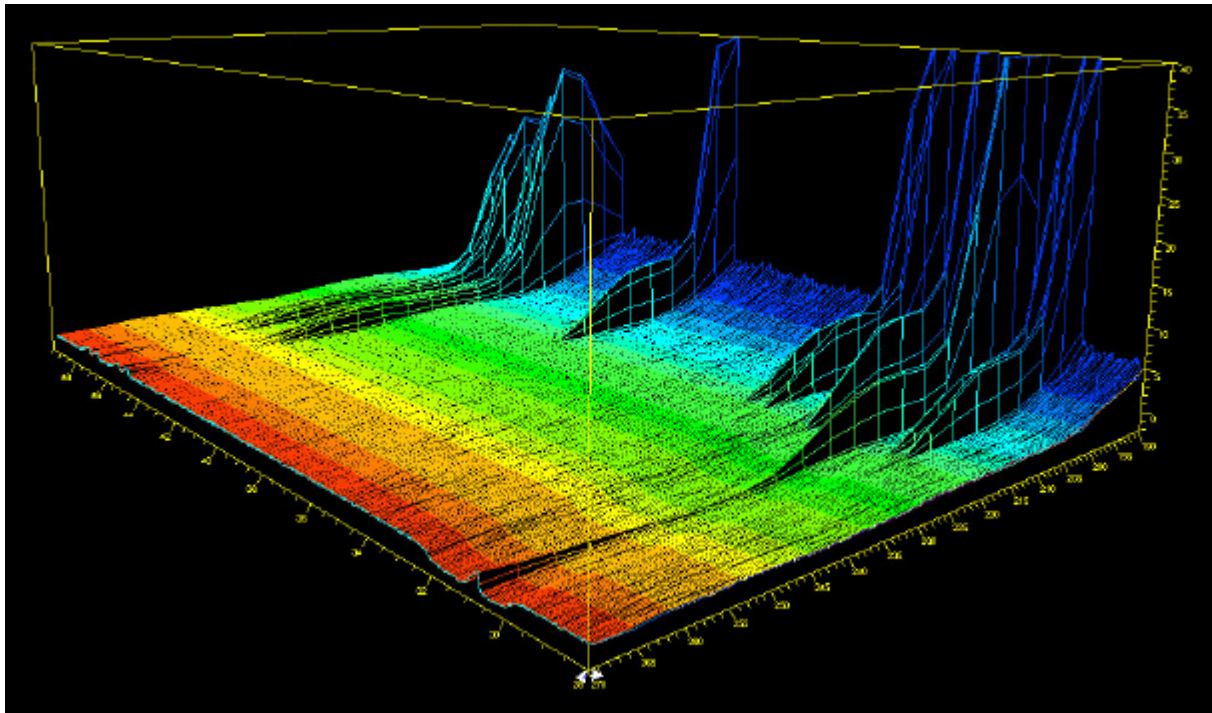


Abb. 51 DAD-Signal einer Probe in 3D-Darstellung (MT= von vorn nach hinten rechts, mAU= nach oben, Wellenlänge= von rechts nach links jeweils zunehmend)

3.3 Probenvorbereitung

3.3.1 *Direktvermessung*

Unter den Gesichtspunkten Einfachheit und Fehlerminimierung wäre eine direkte Vermessung von Speichelproben, wie auch schon in Kap. 2.3 diskutiert, mit der Kapillarelektrophorese das bevorzugte Verfahren. Unter den Bedingungen einer Vor-Ort-Kontrolle wäre eine solche Untersuchung aufgrund der beschränkten Zeit quasi obligatorisch.

Mehrere Gründe sprechen hier jedoch gegen eine direkte Vermessung. So treten auch hier die auch schon unter 2.3 erwähnten Probleme mit der Viskosität und Variabilität des Speichels auf. Eine Direktvermessung ist aufgrund der begrenzten Empfindlichkeit des zur Verfügung stehenden Detektionssystems ebenfalls unmöglich.

3.3.2 *Flüssig/Flüssig Extraktion*

Ein klassischer Weg, um Substanzen unterschiedlicher Eigenschaften voneinander zu trennen, ist das Ausnutzen von Löslichkeitsunterschieden bei verschiedenen pH-Werten. So lassen sich Säuren in saurem Milieu mit aprotischen organischen Lösungsmittel ausschütteln. Die hier untersuchten Verbindungen sind aufgrund ihrer primären oder sekundären Aminofunktion allesamt schwache Basen und somit im basischen Milieu durch organische Lösungsmittel abtrennbar.

Eine Flüssig/Flüssig-Extraktion gelang für frisch gesammelten Speichel nicht zufriedenstellend. Hauptproblem war dabei die schlechte Phasentrennung nach dem Ausschütteln. Es wurden verschiedene Ansätze zur Aufarbeitung gewählt, die kurz dargestellt werden sollen.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Wie von Mortier et al. beschrieben, ist eine Speichelaufarbeitung durch Proteinfällung mit Acetonitril möglich.

500 µL frisch gesammelter Speichel wurde mit 20 µL Acetonitril versetzt und mittels eines Vortex-Gerätes geschüttelt. Mit einer Laborzentrifuge wurde der Rückstand abgetrennt. 100 µL des Überstandes wurden mit 10 kV für 7sec injiziert. Bei dieser Art der Injektion reichte auf Grund der hohen Leitfähigkeit der Probe die Empfindlichkeit des Detektors nicht aus, um Methamphetamin in einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/mL zu detektieren.

Nachdem der Weg, nur durch Proteinfällung zu einer injektionsfähigen Lösung zu gelangen, nicht erfolgreich verlief, wurde der Einsatz von CHCl₃/2-Propanol (3:1) als Extraktionsmittel erprobt.

500 µL frischer Speichel wurde mit 100 µL 0,5 M NaOH und 200 µL des Extraktionsmittels versetzt. Nach Ausschütteln und Zentrifugation konnte eine gelartige organische Phase beobachtet werden, die nicht abgetrennt und weiter bearbeitet werden konnte. Wurde der Anteil der organische Phase bei der Extraktion auf 600 µL erhöht, so ergab sich anschließend ein klarer Überstand mit Gelbildung an der Grenzschicht. Hier konnten ca. 375 µL Lösung abpipettiert werden.

Nach Versuchen, diese Proben in der Kapillarelektrophorese auszuwerten, kam es zu einem Abfall der Stromstärke während der Analysen. Ursache dafür waren die möglicherweise in der Lösung enthaltenen Verunreinigungen, die zu Ablagerungen an der Kapillarwand oder anderen Störungen führten. Diese ließen sich erst durch Spülen der Kapillare mit 0,1 M NaOH und Wasser entfernen.

Wegen der vergleichsweise geringen Menge der erhaltenen organischen Phase, wurde versucht, durch Variation der Lösungsmittel die Gelbildung zu vermindern.

500 µL Speichel wurden mit 500 µL 0,5 M NaOH versetzt. Es wurde mit 750 µL Ethylacetat/n-Hexan (1:9) extrahiert. Hier waren nach Zentrifugation bei einem Parallelversuch 350 bzw. 450 µL organische Phase abpipettierbar.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Phasentrennung war ein weiterer Gedanke, nur einen Bruchteil der abgetrennten organischen Phase weiter zu bearbeiten.

750 μL Speichel wurden wie oben mit 750 μL 0,1 M NaOH versetzt und mit 2 mL Ethylacetat/n-Hexan (1:9) extrahiert. 500 μL des Überstandes wurden abpipettiert, eingeengt und in 250 μL 0,1 mM H_3PO_4 aufgenommen. Bei dieser Vorgehensweise waren, nach vorheriger Dotierung im Elektropherogramm, die entsprechenden Substanzsignale zu erkennen.

Wegen der schwankenden Größe der Gelschicht und der daraus resultierenden Schwankungen bei der Wiederfindung wurde die Idee einer Flüssig/Flüssig-Extraktion von frischem Speichel nicht weiter verfolgt und stattdessen eine Festphasenextraktion erprobt.

3.3.3 Extraktion über Festphasen

Grundprinzip dieses Extraktionsverfahrens ist die Adsorption von bestimmten Probenbestandteilen an eine stationäre Phase, wünschenswerterweise nur die zu bestimmenden Substanzen. Anschließend kann diese Phase gewaschen, und die zurückgehaltenen Substanzen können eluiert werden. Durch Vermessen dieses Eluats können die Analyten ohne Interferenzen bestimmt werden.

Festphasen bestehen zumeist aus oberflächenmodifizierten Kieselgel-Partikeln. Die Oberflächen können mit Kohlenwasserstoffketten (meist C8-C18), oder polaren Funktionalitäten, wie Cyano-, Aminopropyl- oder Diolgruppen, sowie Kationenaustauschern wie Carboxyl-, Propylsulfon- oder Benzensulfonsäuregruppen und Anionenaustauschern wie Diethylaminopropyl- oder Trimethylaminopropylresten substituiert sein.

Auf der Basis vorhandener Applikationen für Urin und Plasma, wurde eine Mischbettkartusche der Firma Varian zur Speichlextraktion eingesetzt. In diesen Bond Elut Certify[®] Kartuschen besteht das Bett aus Octyl- und Benzensulfonsäurefunktionen, so dass unpolare und starke polare (Kationenaustauscher) Wechselwirkungen für die Retention der Analyten verantwortlich sind.

Um den pH-Wert der Probe für eine optimale Bindung an die Festphase einzustellen, wurde der Speichel mit 0,1 M KH_2PO_4 Lösung mit einem pH-Wert von 6,0 versetzt. Damit die Probe mittels Vakuum durch die Festphase gezogen werden konnte, war eine Mindestverdünnung des Speichels

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

erforderlich. Eine zu starke Verdünnung führte hingegen zu einer Abnahme der Extraktionsrate (Abb. 52).

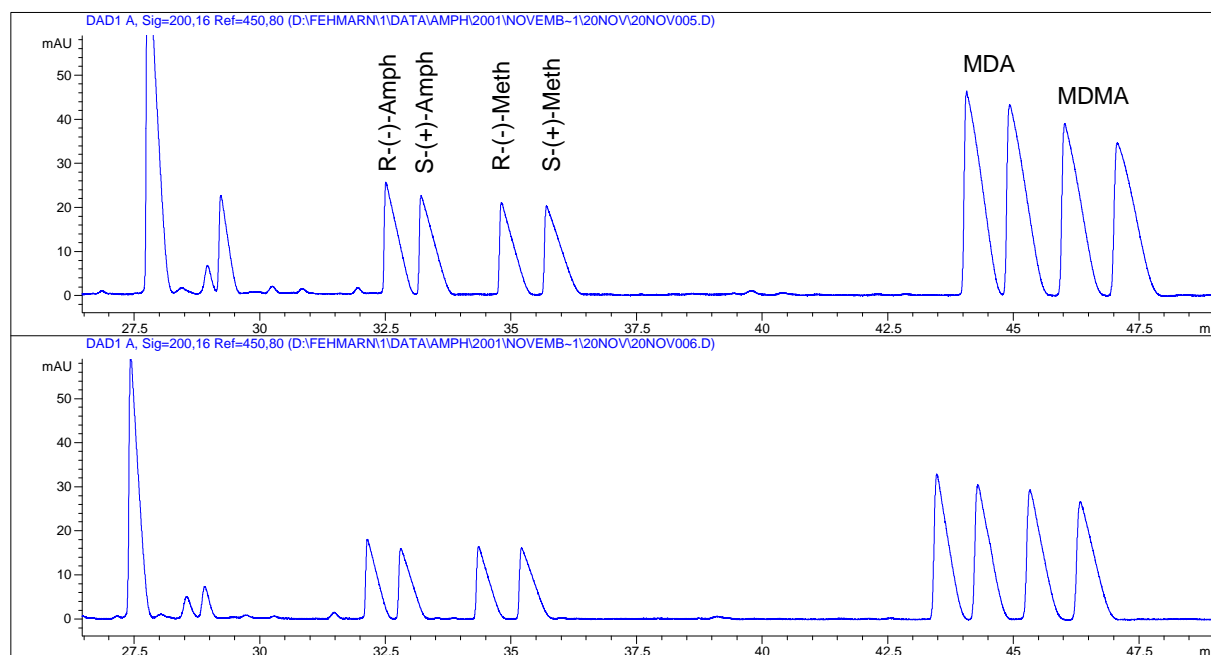


Abb. 52 Wiederfindungsvergleich einer dotierten Speichelprobe:
oben extrahiert mit 3-fachem Überschuss 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,0
unten extrahiert mit 10-fachem Überschuss 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,0
(Bedingungen siehe Abb. 46)

3.3.4 Festlegung der Extraktionsprozedur

1 mL einer aufgetauten Speichelprobe wird mit der internen Standardlösung und 3 mL 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,0 versetzt und geschüttelt. Nach Konditionieren der Festphasenkartusche mit 2 mL Methanol und 2 mL 0,1 M KH_2PO_4 pH 6,0 wird die vorher zentrifugierte Lösung auf die Säule gegeben und bei max. 500 mbar Unterdruck tropfenweise durch die Festphasenkartusche gezogen. Anschließend wird mit 1 mL 1 M Essigsäure gewaschen und 5 min mit 500 mbar Unterdruck getrocknet. Nach dem Trocknen wird mit 6 ml Methanol gewaschen. Anschließend wird die Kartusche 2 min bei 500 mbar Unterdruck getrocknet. Die Elution erfolgt mit 2 mL Ethylacetat:25% Ammoniak (98:2) tropfenweise in ein 2 mL Eppendorf Gefäß.

Das Eluat wird bei 45° C in einem Eppendorf Concentrator bei 820 mbar bis zur Trockene eingengt und anschließend in 1 mL 0,1 mM H_3PO_4 aufgenommen.

3.4 Validierung

3.4.1 Vorgehensweise

Nachdem in den vorherigen Kapiteln die Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Amphetaminen im Speichel beschrieben wurde, sollte geprüft werden, ob die Methode auch zuverlässig arbeitet und mit ihr verwertbare Ergebnisse ermittelt werden können.

In der Literatur finden sich zahlreiche Definitionen, was unter dem Begriff bzw. dem Verfahren einer Validierung zu verstehen ist⁶⁸. Diese Definitionen sind nicht alle allgemeingültig, sondern resultieren zum Teil aus den zugrundeliegenden Anwendungen. Eine allgemeingültige Beschreibung ergibt sich aus der ISO-Norm 8402: „Die Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachwieses, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden.“

Da es sich bei dem beabsichtigten Einsatzfeld um eine bioanalytische Fragestellung handelt, erfolgt die Ermittlung der entsprechenden Parameter in Anlehnung an eine Richtlinie, die von der Food and Drug Administration (FDA) für bioanalytische Analyseverfahren herausgegeben wurde⁶⁹. Hier ist festgelegt, welche Kriterien mit welchen Fehlergrenzen an eine bioanalytische Methode angelegt werden sollen.

3.4.2 Selektivität

Neben allen anderen Kriterien an eine bioanalytische Analyseverfahren ist es entscheidend zu überprüfen, ob unter den gewählten Bedingungen Interferenzen durch andere Probenbestandteile zu erwarten sind. Würde ein Analytsignal durch ein anderes Signal überlagert, würde daraus ein systematischer Fehler für die Messung resultieren.

Dieses wurde durch Vermessung von negativen Speichelproben geprüft. Nach den Vorgaben soll an 6 verschiedenen Proben keine Störung im Bereich der nachzuweisenden Substanzen zu beobachten sein. Bei den untersuchten Proben wurde in dem fraglichen Bereich keine Interferenz gefunden.

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Beispielhaft ist in Abb.53 ein Elektropherogramm einer undotierten negativen Speichelprobe im Vergleich zu einer dotierten Probe dargestellt.

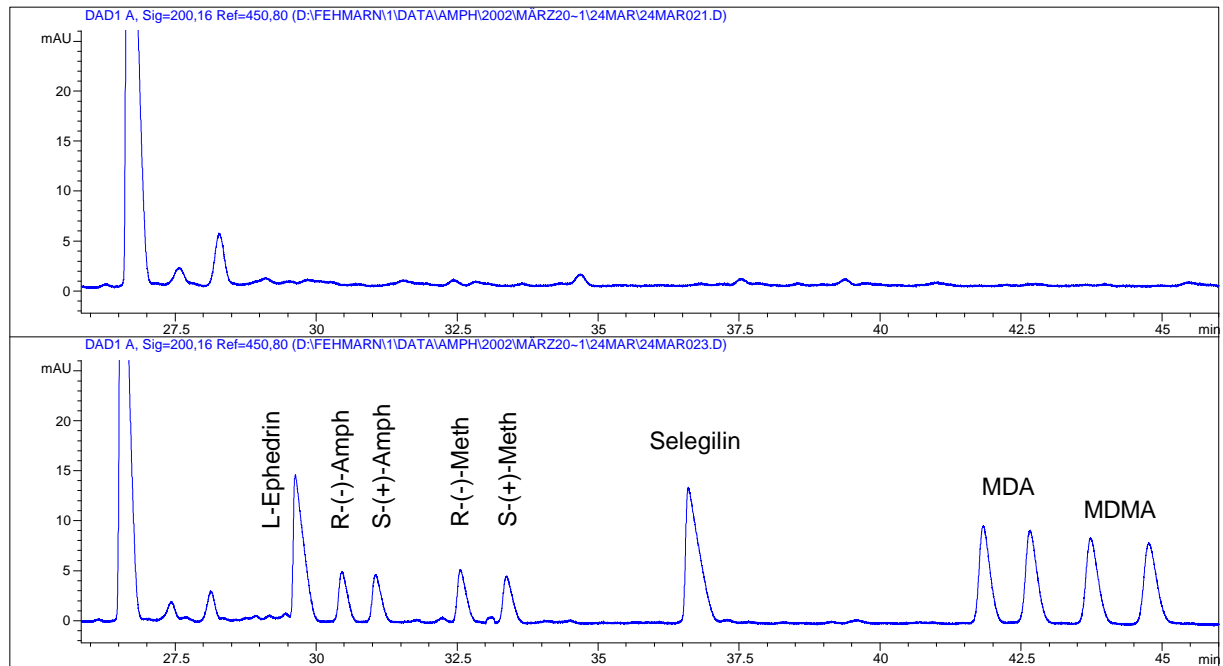


Abb. 53 Vergleich zwischen einer undotierten und dotierten Speichelprobe:
oben ohne Dotierung
unten dotiert mit je 400 ng/mL L-Ephedrin und Selegilin sowie 100 ng/mL je rac.
Amphetamin, rac. Methamphetamin, rac. MDA und rac. MDMA
(Bedingungen siehe Kap. 3.2.11)

3.4.3 Wiederfindung

Wegen des Verlustes an Substanz im Laufe der Probenvorbereitung kann es, im Vergleich zu nach der Probenvorbereitung zugesetzten Standards, zu einer geringeren Detektorantwort kommen. Das allein ist nicht von vornherein eine Beeinträchtigung für die Methode. Einzige Voraussetzung bleibt, dass mit ausreichender Empfindlichkeit gemessen werden kann. Viel wichtiger ist zu wissen, wie zuverlässig eine gewählte Probenvorbereitung ist, d.h. welche Schwankung in der Wiederfindungsrate auftreten können.

In den Richtlinien der FDA wird daher verlangt, dass die Wiederfindung für drei verschiedene Konzentrationen, eine niedrige, mittlere und eine hohe, bestimmt werden soll. Bezüglich der tolerablen Schwankungen werden keine absoluten Grenzen gesetzt. In Tab. 18 sind die Ergebnisse für die Wiederfindung bei 4 verschiedenen Probanden wiedergegeben. Eine Möglichkeit, Schwankungen in der Wiederfindungsrate bei der Quantifizierung von Analyseergebnissen auszugleichen, ist der Einsatz eines internen Standards, der bei Schwankungen ebenfalls mit veränderter Peakfläche vorliegt.

Um die Proben für die Wiederfindungsuntersuchungen zu erstellen, wurden die negativen Speichelproben der Probanden entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 3.3.4 aufgearbeitet. Diese Negativmatrixproben wurden anschließend mit Standardlösungen dotiert, so dass Konzentrationen von 20, 100 und 400 ng/mL an Substanz resultieren. Die mit diesen Proben erhaltenen Peakflächen (A) wurden mit den Peakflächen (B) verglichen, die erhalten wurden, wenn die Speichelproben vor der Aufarbeitung dotiert wurden. Aus dem Quotienten B/A, ausgedrückt in Prozent, ergibt sich die Wiederfindungsrate.

Ausgehend von Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL der Basen, gelöst in doppeltdestilliertem Wasser, wurden durch Verdünnen mit 0,1 mM H₃PO₄ folgende Lösungen hergestellt:

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Analytstammlösung:

je 100 µL 1 mg/mL Racemat bzw. Selegilin + 500 µL 0,1 mM H₃PO₄

L-Ephedrinlösung:

800 µL 100 µg/mL L-Ephedrin + 200 µL

5 µl in 1 mL Speichel => 400 ng/mL

Standard 400 ng/mL:

800 µL Analytstammlösung + 200 µL

5 µl in 1 mL Speichel => 400 ng/mL

Standard 100 ng/mL:

200 µL Analytstammlösung + 800 µL

5 µl in 1 mL Speichel => 100 ng/mL

Standard 20 ng/mL:

40 µL Analytstammlösung + 960 µL

5 µl in 1 mL Speichel => 20 ng/mL

Konzentration je Enantiomer [ng/mL]	Wiederfindung gesamt			Standardabweichung		
	10	50	200	10	50	200
L-Ephedrin immer 400 ng/mL	68,78%	61,66%	70,25%	14,79%	7,81%	13,02%
L-Amphetamin	76,18%	75,70%	71,31%	11,37%	8,61%	8,96%
D-Amphetamin	65,21%	73,64%	70,66%	14,39%	10,06%	8,56%
L-(-) Methamphetamin	92,58%	82,40%	75,76%	11,28%	10,45%	9,77%
D-(+) Methamphetamin	73,05%	77,85%	74,11%	10,53%	7,48%	7,71%
Selegilin Konzentration *2	70,19%	52,19%	58,68%	15,75%	9,14%	8,41%
MDA 1	73,93%	77,88%	74,14%	9,20%	8,29%	7,99%
MDA 2	75,33%	76,89%	73,86%	2,53%	9,88%	9,41%
MDMA 1	78,28%	81,74%	77,79%	10,10%	5,94%	8,59%
MDMA 2	74,41%	80,82%	77,17%	4,93%	7,80%	8,53%

Tab. 18 Wiederfindungsraten für 20, 100 und 400 ng/mL zugesetzte Substanz bestimmt an Speichel von 4 Probanden

3.4.4 Präzision

Wiederfindungsuntersuchungen charakterisieren die Probenvorbereitung. Ein Kriterium, welches die Analyse und Auswertung der Proben betrifft, ist die Bestimmung der Präzision.

Es wird geprüft, inwieweit einzelne Messwerte einer einheitlichen Probelösung auch gleiche Ergebnisse liefern. Es sollen für eine niedrige, mittlere und hohe Konzentration im Messbereich je mindestens fünf Bestimmungen durchgeführt werden. Als Akzeptanzkriterium nennt die FDA-Richtlinie, dass für keine der eingesetzten Konzentrationen die Standardabweichung $>15\%$ sein darf. Im Bereich der unteren Bestimmungsgrenze darf die Standardabweichung bei bis zu 20% liegen.

Die Untersuchung der Präzision wurde zweimal wiederholt, um sicherzustellen, dass die ermittelten Werte nicht durch Zufall erhalten wurden, und um belegen zu können, dass auch über einen längeren Zeitraum vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

In den Tabellen 19 bis 21 sind die Ergebnisse für die Präzisionsbestimmungen für Konzentrationen von 20, 100 und 400 ng/mL Testlösung zusammengefasst. An jedem der drei Tage wurde jede der drei Konzentrationen sechsmal injiziert. In Tab. 22 sind die an diesen drei Tagen ermittelten Werte insgesamt verglichen worden (interday precision).

Probenverdünnungen

Wie schon bei der Bestimmung der Wiederfindung wurde hier mit den drei Konzentrationen 20, 100 und 400 ng/mL gearbeitet. Zur Bestimmung der Präzision wurde mit denselben Stammlösungen gearbeitet. Da für die Präzisionsbestimmung mehr als 1 mL Lösung benötigt wurde ($3 \cdot 6 \cdot 100 \mu\text{L}$), wurden 2 mL Speichel nach dem bei der Wiederfindung angegebenen Schema dotiert. Diese Proben wurden auf 2 Festphasenkartuschen aufgeteilt, aufgearbeitet und vor der Analyse vereinigt. Je $100 \mu\text{L}$ wurden für eine Injektion in ein konisches Probengefäß gefüllt.

Tag 1

	Auswertung 20 ng/ml				Auswertung 100 ng/ml				Auswertung 400 ng/ml				David (n=6; 99%) qu=2,15 go=3,16		
	MT		Fläche		MT		Fläche		MT		Fläche		20	100	400
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw			
L-Ephedrin	29,359	0,17%	232,77	10,46%	29,340	0,09%	211,48	2,09%	29,154	0,09%	220,47	1,18%	2,724	2,766	2,643
R-(-)-Amphetamin	30,259	0,14%	13,33	11,58%	30,171	0,09%	51,92	6,08%	29,821	0,11%	199,10	1,60%	2,591	2,789	2,922
S-(+)-Amphetamin	30,845	0,14%	12,02	15,41%	30,757	0,09%	49,12	2,58%	30,421	0,11%	199,07	1,95%	2,916	2,680	2,761
R-(-)-Methamphetamin	32,328	0,15%	18,35	11,34%	32,232	0,10%	55,73	4,39%	31,851	0,11%	211,33	1,57%	2,596	2,942	2,889
S-(+)-Methamphetamin	33,118	0,16%	14,10	13,93%	33,022	0,10%	53,68	1,66%	32,666	0,12%	210,60	1,53%	2,954	2,239	2,644
Selegilin	36,206	0,20%	253,05	10,95%	36,178	0,11%	229,43	1,89%	35,959	0,13%	237,78	1,56%	2,644	2,601	2,725
MDA 1	41,446	0,20%	25,78	9,71%	41,296	0,12%	114,45	2,18%	40,742	0,13%	456,62	1,85%	2,637	2,680	2,840
MDA 2	42,253	0,18%	25,28	10,80%	42,102	0,12%	114,27	3,13%	41,551	0,13%	466,48	1,85%	2,965	2,603	2,829
MDMA 1	43,317	0,20%	30,62	10,54%	43,172	0,12%	116,87	2,10%	42,627	0,13%	449,52	1,48%	2,510	2,655	2,682
MDMA 2	44,326	0,21%	29,67	9,79%	44,178	0,13%	116,33	1,75%	43,649	0,13%	453,37	1,56%	2,823	2,792	2,922

Tab. 19 Präzisionsbestimmung Tag 1

Tag 2

	Auswertung 20 ng/ml				Auswertung 100 ng/ml				Auswertung 400 ng/ml				David (n=6; 99%) gu=2,15 go=3,16		
	MT		Fläche		MT		Fläche		MT		Fläche		20	100	400
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw			
L-Ephedrin	29,206	0,79%	229,53	3,70%	29,280	1,23%	217,16	7,90%	29,145	0,28%	228,45	3,32%	2,354	2,216	2,597
R-(-)-Amphetamin	30,108	0,82%	12,63	1,78%	30,116	1,23%	52,50	6,41%	29,817	0,30%	206,18	2,99%	2,666	2,405	2,628
S-(+)-Amphetamin	30,691	0,82%	11,33	5,28%	30,699	1,25%	52,06	6,95%	30,423	0,29%	206,37	2,89%	2,672	2,406	2,562
R-(-)-Methamphetamin	32,159	0,84%	17,55	3,62%	32,166	1,29%	54,52	4,06%	31,861	0,31%	216,17	2,43%	2,363	2,483	2,660
S-(+)-Methamphetamin	32,945	0,85%	13,75	3,87%	32,955	1,32%	52,92	3,76%	32,682	0,32%	216,40	2,45%	2,632	2,311	2,599
Selegilin	36,002	0,86%	253,12	4,09%	36,099	1,42%	232,68	5,01%	35,990	0,34%	248,27	2,56%	2,463	2,195	2,752
MDA 1	41,202	0,81%	26,25	2,41%	41,201	1,52%	120,82	6,95%	40,796	0,37%	480,25	3,38%	2,691	2,156	2,787
MDA 2	42,007	0,78%	26,43	1,49%	42,007	1,55%	121,24	6,51%	41,615	0,37%	486,93	3,10%	2,288	2,167	2,641
MDMA 1	43,063	0,76%	30,15	5,55%	43,072	1,56%	117,84	6,17%	42,697	0,38%	467,57	2,68%	2,807	2,160	2,637
MDMA 2	44,073	0,77%	28,20	4,01%	44,076	1,58%	118,38	4,96%	43,724	0,38%	475,43	2,77%	2,210	2,539	2,761

Tab. 20 Präzisionsbestimmung Tag 2

Tag 3

	Auswertung 20 ng/ml				Auswertung 100 ng/ml				Auswertung 400 ng/ml				David (n=6; 99%) gu=2,15 go=3,16		
	MT		Fläche		MT		Fläche		MT		Fläche		20	100	400
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw			
L-Ephedrin	29,298	0,95%	223,16	3,75%	29,147	0,12%	197,57	5,27%	29,194	0,08%	226,18	2,30%	2,545	2,803	2,580
R-(-)-Amphetamin	30,198	0,93%	12,94	10,06%	29,969	0,11%	47,80	5,47%	29,870	0,10%	203,18	1,54%	2,383	2,833	2,522
S-(+)-Amphetamin	30,779	0,94%	11,22	9,59%	30,549	0,11%	46,85	4,96%	30,480	0,09%	203,20	1,53%	2,417	2,929	2,600
R-(-)-Methamphetamin	32,258	0,98%	16,90	2,01%	32,005	0,12%	51,12	4,99%	31,926	0,09%	211,73	1,10%	2,359	2,820	2,448
S-(+)-Methamphetamin	33,048	1,01%	13,04	3,93%	32,787	0,12%	49,95	4,89%	32,753	0,10%	211,95	1,15%	2,340	2,783	2,501
Selegilin	36,118	1,07%	246,90	3,76%	35,901	0,14%	222,53	5,40%	36,081	0,11%	246,53	1,39%	2,615	2,837	2,773
MDA 1	41,335	1,14%	26,80	1,92%	40,966	0,19%	115,40	5,46%	40,929	0,12%	503,35	1,44%	2,720	2,761	2,464
MDA 2	42,148	1,15%	27,44	5,35%	41,767	0,19%	116,33	5,60%	41,762	0,13%	507,72	1,61%	2,249	2,778	2,576
MDMA 1	43,204	1,16%	28,54	2,01%	42,825	0,17%	112,78	5,83%	42,849	0,13%	485,70	1,43%	2,445	2,811	2,527
MDMA 2	44,206	1,17%	28,52	6,83%	43,819	0,16%	116,83	6,42%	43,881	0,13%	494,20	1,66%	2,568	2,745	2,578

Tab. 21 Präzisionsbestimmung Tag 3

Interday Präzision

	Auswertung 20 ng/ml				Auswertung 100 ng/ml				Auswertung 400 ng/ml			
	MT		Fläche		MT		Fläche		MT		Fläche	
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw
L-Ephedrin	29,287	0,70%	228,80	6,79%	29,255	0,68%	208,54	6,43%	29,164	0,18%	225,03	2,77%
R-(-)-Amphetamin	30,188	0,69%	12,97	8,71%	30,084	0,69%	50,64	7,06%	29,836	0,20%	202,82	2,51%
S-(+)-Amphetamin	30,771	0,70%	11,54	10,98%	30,667	0,70%	49,18	6,46%	30,441	0,20%	202,88	2,57%
R-(-)-Methamphetamin	32,248	0,72%	17,59	8,02%	32,132	0,72%	53,75	5,70%	31,879	0,21%	213,08	1,99%
S-(+)-Methamphetamin	33,036	0,73%	13,66	9,13%	32,919	0,74%	52,14	4,69%	32,700	0,23%	212,98	2,08%
Selegilin	36,108	0,77%	251,26	6,93%	36,057	0,80%	227,95	4,47%	36,010	0,25%	244,19	2,64%
MDA 1	41,327	0,78%	26,25	5,81%	41,163	0,87%	116,66	5,41%	40,822	0,30%	480,07	4,65%
MDA 2	42,135	0,77%	26,32	7,33%	41,956	0,86%	117,05	5,50%	41,643	0,31%	487,04	4,15%
MDMA 1	43,194	0,77%	29,84	7,50%	43,020	0,87%	115,57	5,11%	42,724	0,32%	467,59	3,73%
MDMA 2	44,201	0,78%	28,81	7,30%	44,022	0,88%	117,11	4,54%	43,751	0,32%	474,33	4,11%

Tab. 22 Präzisionsbestimmung über 3 Tage zusammengefasst

3.4.5 Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt an, inwieweit die mit der gewählten Methode ermittelten Messwerte ihren Sollwerten entsprechen. Auch für diese Parameter werden bei bioanalytischen Analysen maximale Abweichungen von 15 % toleriert. Im Bereich der Bestimmungsgrenze darf der Wert nicht über 20 % liegen.

Nachdem durch die Auswertesoftware anhand der gemessenen Kalibrationsproben Kalibrationsgeraden erstellt wurden (siehe dazu Kapitel 3.4.6), wurden die Präzisionsproben unter Einsatz dieser Geraden ausgewertet. Die durch das Programm errechneten Gehaltswerte wurden mit den Sollwerten verglichen. Die Richtigkeit gibt diese Abweichung in Prozent an.

Für die entwickelte Methode wurde die Richtigkeit für 20, 100 und 400 ng/mL an L-Ephedrin, Selegilin und den eingesetzten Amphetaminracematen bestimmt. Die ermittelten Messwerte sind in Tab. 23 zusammengefasst.

	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	400 ng/mL	100 ng/mL	20 ng/mL	400 ng/mL	100 ng/mL	20 ng/mL	400 ng/mL	100 ng/mL	20 ng/mL
R(-)-Amphetamin	0,82%	2,96%	0,42%	-0,36%	2,51%	-5,74%	-1,15%	3,62%	-1,89%
S(+)-Amphetamin	6,52%	7,57%	-0,04%	4,74%	11,75%	-2,18%	3,62%	10,53%	5,35%
R(-)-Methamphetamin	-1,57%	2,09%	15,92%	-4,33%	-2,53%	10,07%	-6,65%	1,95%	11,01%
S(+)-Methamphetamin	-3,14%	-1,96%	10,22%	-5,59%	-1,79%	3,42%	-6,36%	-0,50%	14,33%
Selegilin	-5,75%	-6,97%	-5,32%	-6,76%	-7,19%	-6,36%	-6,36%	-2,19%	-4,47%
MDA 1	2,92%	9,33%	14,11%	2,93%	9,41%	13,58%	8,55%	13,41%	19,04%
MDA 2	4,44%	10,31%	-2,88%	3,56%	7,08%	-1,64%	8,45%	10,72%	7,18%
MDMA 1	-10,42%	-6,93%	0,81%	-11,61%	-7,49%	-4,74%	-7,94%	-3,47%	5,39%
MDMA 2	-9,05%	0,36%	5,27%	-10,18%	-4,82%	3,73%	-6,34%	4,07%	9,46%

Tab. 23 Ergebnisse für die Bestimmung der Richtigkeit

3.4.6 Linearität

Damit die ermittelten Werte zuverlässig quantifiziert werden können, muss sichergestellt sein, dass das Detektionssystem über den gesamten Konzentrationsbereich exakt arbeitet und es nicht zu Verzerrungen kommt.

Die FDA Richtlinie schreibt dazu vor, dass zur Kalibration zwischen 6 und 8 Konzentrationsniveaus eingesetzt werden sollen. Um die Beziehung Konzentration–Detektorsignal auszuwerten, soll das einfachste anzuwendende Regressionsmodell herangezogen werden.

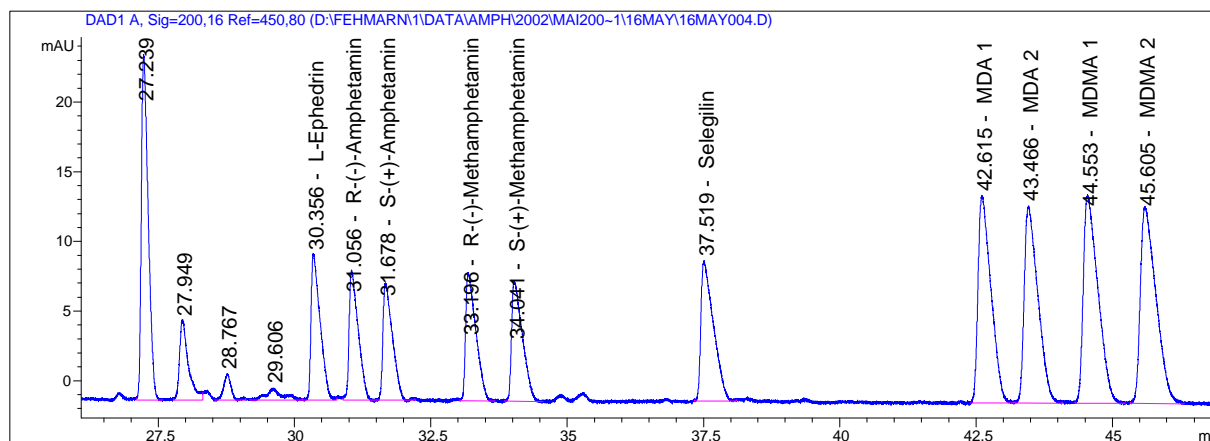


Abb. 54 Speichelkalibrator mit automatischer Peakzuordnung nach Auswertung mit der ChemStation Software, Konzentration 400 ng/mL L-Ephedrin, Selegilin und je Racemat (Bedingungen siehe Kap. 3.2.11)

	MT 1	MT 2	PW 1	PW 2	Auflösung R
Ephedrin	30,356	31,056	0,177	0,1753	3,974
Amph	31,056	31,678	0,1753	0,1795	3,506
Meth	33,196	34,041	0,1977	0,2084	4,162
MDA	42,615	43,466	0,2502	0,2726	3,256
MDMA	44,553	45,605	0,2914	0,3106	3,495

Tab. 24 Berechnung der Auflösung für die gewählte Methode anhand Abb. 53

Um Kalibrationsgeraden zu erstellen, wurde negativer Speichel mit 8 verschiedenen Konzentrationen einer Standardmischung und internem Standard versetzt und entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 3.3.4 aufgearbeitet. Der

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Konzentrationsbereich reichte für die eingesetzten Racemate und Selegilin von 10- 400 ng/mL. L-Ephedrin wurde den Proben als interner Standard immer in einer Konzentration von 400 ng/mL zugesetzt. Zu je 1 mL Speichel wurden je 5 µL L-Ephedrin Lösung [80 µg/mL] und 5 µL Dotierlösung für die entsprechende Konzentration zugesetzt. Jede dieser Proben wurde dreimal vermessen.

Nach der Analyse wurden die Flächenwerte der jeweiligen Konzentrationen gemittelt und einer statistischen Analyse unterzogen. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen wurden gemäß DIN 32645 bestimmt. Dazu wurde das DinTest-Programm eingesetzt. Die Untersuchungen schlossen einen Linearitätstest ein. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 25 dargestellt.

Um die Speichelproben nach Arzneistoffgabe auszuwerten, wurde die geräteinterne Software ChemStation von der Fa. Agilent eingesetzt. Mit ihr ist es möglich, eine Auswertung über internen Standard und korrigierte Peakflächen durchzuführen. Auch hier wurden für die einzelnen Substanzen Kalibriergeraden erstellt, deren Korrelationskoeffizienten sind ebenfalls in Tab. 25 angegeben.

In Abb. 54 ist ein Elektropherogramm eines Speichelkalibrators nach automatischer Peakerkennung und Integration dargestellt. Die berechneten Werte für die Auflösung zeigt Tab. 24.

	ChemStation		DinTest			
	Korrelationskoeffizient	Residuen Stabw.	Korrelationskoeffizient	Nachweisgrenze [ng/mL]	Erfassungsgrenze [ng/mL]	Bestimmungsgrenze [ng/mL]
R-(-)-Amphetamin	0,99947	0,01014	0,9994	3,58	7,16	13,13
S-(+)-Amphetamin	0,99974	0,00670	0,9998	2,02	4,04	7,50
R-(-)-Methamphetamin	0,99968	0,00816	0,9995	3,38	6,75	12,41
S-(+)-Methamphetamin	0,99948	0,01021	0,9995	3,34	6,67	12,26
Selegilin	0,99648	0,03374	0,9987	5,80	11,60	21,34
MDA 1	0,99996	0,00455	0,9997	2,43	4,85	8,98
MDA 2	0,99988	0,00806	0,9996	3,03	6,06	11,17
MDMA 1	0,99994	0,00613	0,9997	2,69	5,38	9,95
MDMA 2	0,99989	0,00815	0,9997	2,66	5,33	9,85

Tab. 25 Zusammenstellung der ermittelten Korrelationskoeffizienten und Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

3.5 Messung von Speichelproben

3.5.1 Selegilin

Nachfolgend werden die Ergebnisse nach Selegilineinnahme dargestellt. Ein Proband hat eine handelsübliche Tablette mit 10 mg Selegilin-HCl eingenommen. Vor Einnahme und nach festgelegten Zeiten wurden Speichelproben genommen und ausgewertet. Es sollte geklärt werden, ob Methamphetamin und Amphetamin im Speichel nach Einnahme in signifikanten Konzentrationen auftreten.

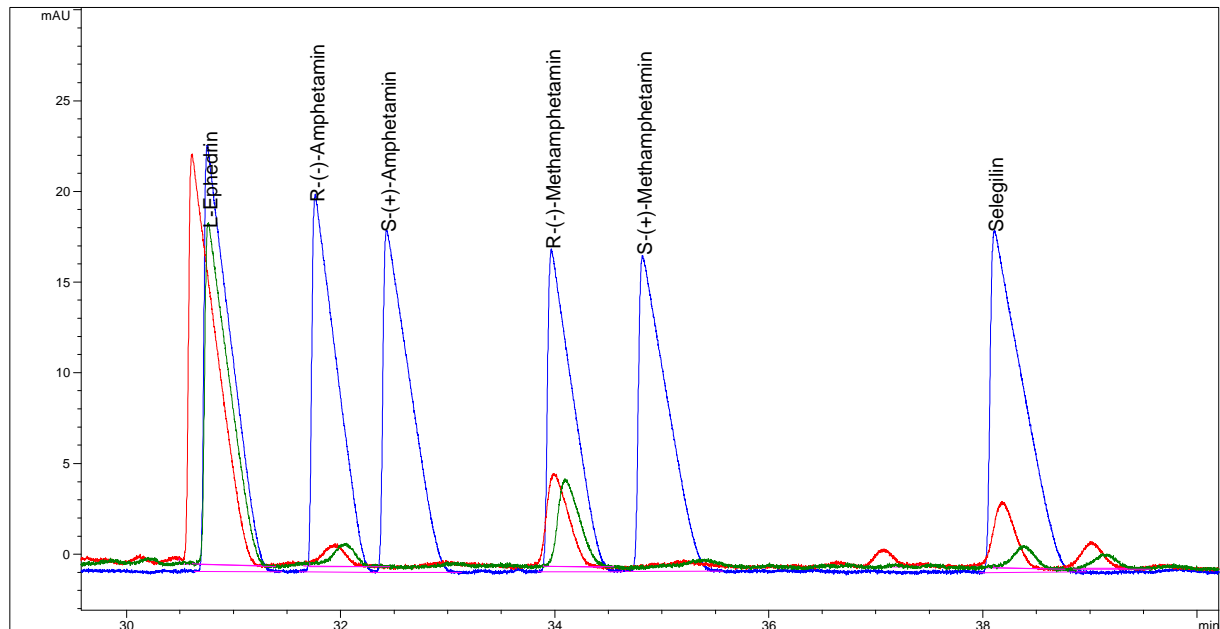


Abb. 55 Überlagerte Elektropherogramme:

blau wässrige Standardlösung mit 400 ng/mL je Racemat

rot 1 h nach Selegilin Einnahme

grün 2 h nach Selegilin Einnahme

(Bedingungen siehe Kap.3.2.11)

Wie auch für die anderen Untersuchungsmatrices bekannt, ließ sich im Speichel nur R(-)-Methamphetamin bzw. R(-)-Amphetamin nachweisen. Neben diesen konnte auch ein weiteres Signal nach Selegilineinnahme beobachtet werden. Vermutlich handelt es sich dabei um das

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

Desmethyloselegilin. Da eine Referenzsubstanz zum Abgleich für die Untersuchungen fehlte, konnte diese Hypothese aber nicht bestätigt werden. In Abb. 55 sind zwei Elektropherogramme nach Selegilineinnahme zusammen mit einem Standardlauf dargestellt. Aus der Peakzuordnung ist klar zu erkennen, dass nur die R-(-)-Enantiomere gefunden wurden. Die Speichelproben wurden 1 und 2 Stunden nach der Einnahme gesammelt. Die ermittelten Konzentrationen sind in Tab. 26 angegeben.

Substanz	Konzentration 1 Stunde nach Einnahme in ng/mL	Konzentration 2 Stunde nach Einnahme in ng/mL
R-(-)- Amphetamin	6,6	11,1
R-(-)- Methamphetamin	33,2	43,3
Selegilin	33,5	12,5

Tab. 26 Ermittelte Konzentrationen nach Einnahme von 10 mg Selegilin-HCl

3.5.2 Famprofazon

Im Blut und Urin werden nach Einnahme von Famprofazon beide Methamphetamin- und Amphetamin-Enantiomere gefunden. Um das Vorhandensein dieser Substanzen im Speichel zu untersuchen, wurden Gewodin Geistlich® Tabletten von Probanden eingenommen und zu definierten Zeitpunkten Speichelproben gesammelt. Diese Proben wurden nach den in den Kapiteln 3.2.11 und 3.3.4 festgelegten Verfahren aufgearbeitet und kapillarelektrophoretisch untersucht.

In einem ersten orientierenden Versuch wurde 105 min nach Einnahme von zwei Tabletten (50 mg Famprofazon) eine Speichelprobe untersucht. In dieser Probe wurden die in Tabelle 27 dargestellten Konzentrationen an Amphetamin- und Methamphetamin-Enantiomeren gefunden, das entsprechende Elektropherogramm ist in Abb. 56 dargestellt.

Substanz	Konzentration in ng/mL
R-(-)- Amphetamin	34,8
S-(+)- Amphetamin	21,5
R-(-)- Methamphetamin	151,2
S-(+)- Methamphetamin	71,8

Tab. 27 Konzentrationen 105 min nach Einnahme von 50 mg Famprofazon

In einer zweiten Untersuchung sollte der Amphetamin-Konzentrationsverlauf nach Einnahme von Famprofazon näher untersucht werden. Dazu wurden in einem Zeitraum von 1-5 h nach Gabe von 50 mg Famprofazon (2 Gewodin Geistlich® Tabletten) Speichelproben genommen und analysiert. Im Speichel von zwei Probanden wurden nach 1, 2, 3 und 5 Stunden die Konzentrationen der Amphetamine bestimmt. Hier lagen die Konzentrationen deutlich unterhalb der zuvor ermittelten Werte, die Ergebnisse sind in Tab. 28 dargestellt. Ursache für die deutlich geringeren Konzentrationen kann, zum einen die Auswahl der Probanden (unterschiedliches Körpergewicht und Geschlecht) sein, zum anderen war die Auswertung der Elektropherogramme

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

bei diesen Untersuchungen aufgrund einer unruhigen Basislinie und verlängerten Migrationszeiten nur schwer möglich. Abb. 57 zeigt eine zusammenfassende Graphik mit den mittleren Speichelkonzentrationen der jeweiligen Enantiomere im Zeitverlauf.

Substanz	Konzentration 1 h nach Gabe [ng/mL]	Konzentration 2 h nach Gabe [ng/mL]	Konzentration 3 h nach Gabe [ng/mL]	Konzentration 5 h nach Gabe [ng/mL]
R-(-)- Amphetamin	6,14	6,12	14,44	2,87
S-(+)- Amphetamin	n.D.	n.D.	n.D.	n.D.
R-(-)- Methamphetamin	15,22	29,39	46,04	28,17
S-(+)- Methamphetamin	5,37	4,85	10,96	7,09

Tab. 28 Amphetaminkonzentration im Zeitverlauf nach Gabe von 50 mg Famprofazon (n.D. nicht nachweisbar)

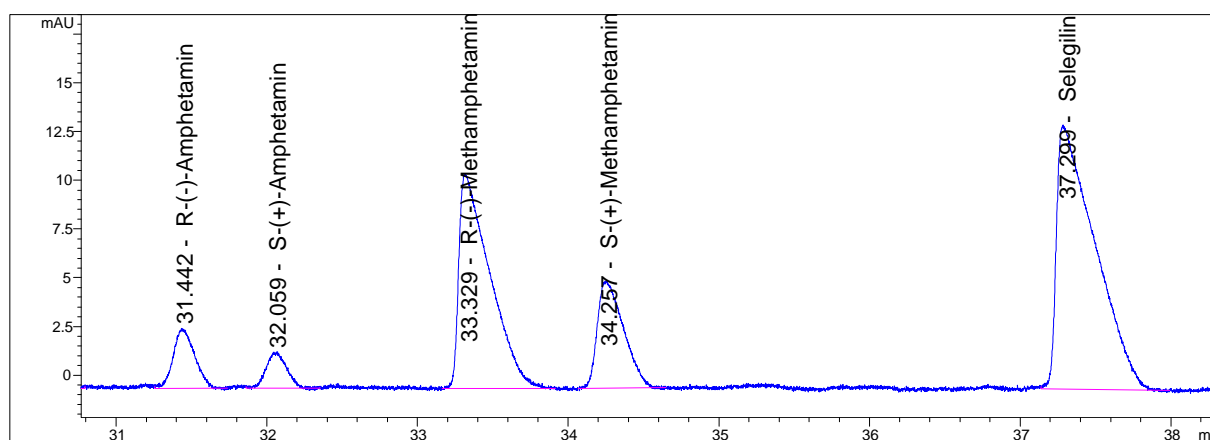


Abb. 56 Elektropherogramm einer Speichelprobe 105 min nach Gabe von 50 mg Famprofazon (Bedingungen siehe Kap. 3.2.11)

3. Arbeiten mit der Kapillarelektrophorese

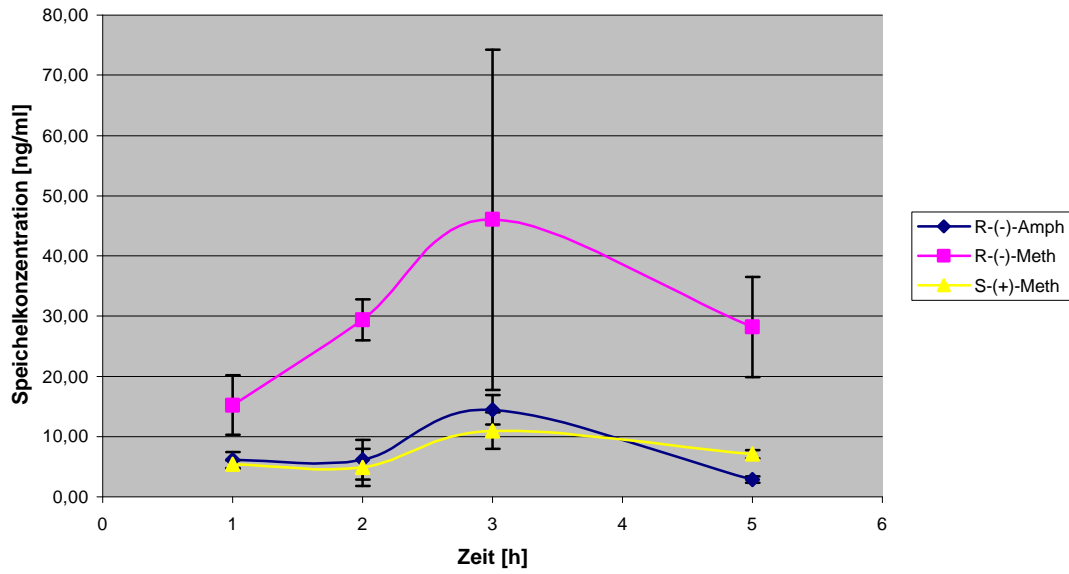


Abb.57 Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Amphetaminkonzentration im Speichel nach Gabe von 50 mg Famprofazon

4 Diskussion

Betrachtet man die statistischen Erhebungen zu der Unfallhäufigkeit und den Verletztanzahlen im Straßenverkehr, so wird deutlich, dass ein wachsendes Problem für die Verkehrssicherheit durch das Fahren unter dem Einfluss von berauschenden Stoffen vorliegt. Inzwischen ist die Polizei bundesweit mit dieser Problematik befasst, und es gibt zahlreiche Berichte in den Medien, dass Kontrollen auf Drogenkonsum im Straßenverkehr durchgeführt werden.

4.1 Teststreifen

Der Ausgangspunkt für die durchgeführten Arbeiten war 1999 eine Machbarkeitsuntersuchung. Es sollte geprüft werden, wie es möglich ist, das bekannte und routinemäßig eingesetzte System eines immunchromatographischen Teststreifens für Speicheluntersuchungen zu optimieren. Ziel dieser Arbeiten war der Einsatz solcher Tests bei Straßenverkehrskontrollen. Es gab zu diesem Zeitpunkt von verschiedenen Herstellern Tests, die Speichel vermessen können sollten. Die Bestellung dieser Tests war entweder nicht möglich, oder die Erprobung im Labor zeigte, dass es noch kein ausreichend zuverlässiges System gab. Die Zielsetzung war daher nicht nur eine möglichst große Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, sondern ein System zu finden, welches zu allererst zuverlässig arbeitet.

4.1.1 Materialauswahl und Testzusammenstellung

Mit den eingesetzten Antikörpern ließ sich ein empfindlicher Test herstellen. Wegen der Maßgabe, dass möglichst schnell das Ergebnis des Tests ablesbar sein sollte, war die Auswahl für die einzusetzende Membran begrenzt. Aufgrund der geringen Kontaktzeit zwischen den einzelnen Komponenten war es deshalb vorteilhaft, dass der limitierende Faktor bei diesen Arbeiten nicht die Affinität des Antikörpers zum Antigen war. Die Probleme während der Arbeiten resultierten überwiegend aus der Probenmatrix Speichel.

4.1.2 Probennahme

Die Testung der verschiedenen Probennahmevarianten hat gezeigt, dass dieser Schritt einen großen Teil der Arbeit auf dem Weg zu einem funktionsfähigen Test ausmacht.

Das Misstrauen gegenüber dem Ausspülen des Mundes war überraschend und führte letzten Endes dazu, diese Methode nicht weiter zu verfolgen. Obwohl so auch bei trockenem Mund, Substanz aus der Mundhöhle gewinnbar ist. Es wurde ein Unterschied für die ausspülbare Speichelmenge zwischen Rauchern und Nichtrauchern festgestellt. Nichtraucher haben in diesem Versuch mehr Speichel gebildet als Raucher.

Eine Probennahme durch Ausspülen wird erst bei Anwendung des Roche TestCup[®] oder vergleichbarer Systeme interessant. Der Test ist dabei komplett in einen Testbecher integriert. Aus einem Einsatz heraus wird eine Spüllösung in die Mundhöhle aufgenommen und der Mund gespült. Die nun mit Speichel beaufschlagte Lösung wird in den Becher zurückgegeben und dieser wird verschlossen. Die Auswertung erfolgt durch das Umdrehen des Bechers, wobei die integrierten Teststreifen befeuchtet werden.

Die Schaumbildung bei dem Einsatz des Spritzenprobennehmers war ebenfalls ein Punkt, der den Weg zu einem geeigneten Probennehmer verlängert hat.

Durch den Einsatz der Salivette erniedrigte sich die Viskosität des erhaltenen Speichels, vielleicht auch nur durch Anregung der Speichelproduktion. Das allein reichte jedoch nicht aus, um den Speichel zuverlässig auf der Membran fließen zu lassen. Bei der Verdünnung mit Puffer ließ sich darüber hinaus, wegen verbesserter Fließeigenschaften, die Empfindlichkeit des Tests steigern. Durch den zusätzlichen Schritt einer Verdünnung, erschien diese Variante mit Blick auf einen Vor-Ort-Test als zu kompliziert. Im Vergleich zu der ebenfalls untersuchten Wischvariante war die Empfindlichkeit nicht wesentlich verbessert.

Die inzwischen entwickelten Testsysteme von Orasure Inc. (Bethlehem PA, USA) und Cozart Ltd. (Abingdon Oxfordshire, UK) benutzen ebenfalls einen porösen Sammler, der aber, eingesteckt in eine Testkassette, zusammen-

gedrückt wird. Hier wird das Problem der Schaumbildung durch diese Anordnung umgangen.

Betrachtet man die heute erhältlichen Testsysteme, so wird häufig mit verdünntem Speichel auf dem Teststreifen gearbeitet. Aus den gemachten Erfahrungen ist dieses auch eine Konsequenz der durchgeführten Versuche. Durch Einsatz des Wischtestgehäuses wird dieser Verdünnungsschritt in die Testdurchführung einbezogen. Mit Hilfe des Wisch-Pins wird auf der Zunge eine Menge Speichel gesammelt. Durch die Zugabe des Puffers findet im nächsten Schritt eine Verdünnung des Speichels statt. Diese äußert sich unter anderem in einer Viskositätserniedrigung.

Vergleicht man die Empfindlichkeit der Teststreifen bei dem Einsatz von wässrigen Lösungen und bei Analyse von dotiertem Speichel und anschließender Elution mit Puffer, so fällt auf, dass bei der zweiten Durchführung eine empfindlichere Detektion, als über den errechnete Verdünnungsfaktor, möglich ist. Da der gesammelte Speichel aus dem Pin ausgewaschen wird, ist die anfängliche Konzentration höher als bei einer homogenen Mischung, die ein Verdünnungsfaktor charakterisiert.

4.1.3 Einsatz bereits gekoppelter Antikörper

Nachdem über die Materialauswahl eine Optimierung der Laufzeit erreicht wurde, die den Einsatz bei Vor-Ort Testung ermöglichte, wurde durch das Verwenden bereits an Goldpartikel gekoppelter Detektionsantikörper versucht, die Empfindlichkeit der Tests zu steigern. Wurden die fertig konjugierten Antikörper verwandt, so veränderte sich die erreichte Empfindlichkeit nicht wesentlich.

Können fertig konjugierte Antikörper eingesetzt werden, fällt das Biotinylieren im Labor als Herstellungsschritt weg. Weil auf diesem Wege größere Mengen Antikörper in einem Arbeitsschritt markiert werden können, kommt es zu geringeren Abweichungen bei der Großherstellung von Teststreifen.

4.1.4 Bewertung der Testergebnisse

Ein Diskussionspunkt bei der Bewertung der Teststreifenergebnisse ist das sichere Erkennen positiver Proben. Visuell kann es Unterschiede bei der Bewertung geben. Je nach Lichtverhältnissen und Betrachter kann eine noch

schwach vorhandene Bande als solche oder aber schon als komplett verdrängte Bande bewertet werden. Neben dem Kriterium „Komplette Verdrängung der Detektionsbande“ für einen positiven Test, ist auch das Kriterium „Schwächere Färbung als die Kontrollbande“ zur Bewertung möglich. Um schon geringere Konzentrationen an Analyt erfassen zu können, wurde der Test so eingestellt, dass bei negativen Proben die Detektionsbande ein stärkeres Signal als die Kontrollbande liefert. Bei zunehmender Analytkonzentration nimmt die Detektionsbandenintensität ab. Die Kontrollbandenintensität nimmt bei geringen Konzentrationen an Analyt zu. Ursache ist die größere Anzahl an Detektionsantikörpern, die an der Kontrollbande zur Bindung zur Verfügung stehen. Durch diesen Umkehreffekt, der zum Beispiel auch aus den Kurven der Bandenintensität bei den Stabilitätstests ersichtlich ist (vgl. Kap. 2.3.3.6 und 2.5.4), lässt sich ein „crosspoint“ ermitteln. An diesem Punkt ist die Bandenintensität für Kontroll- und Detektionsbande gleich. Unterschreitet die Detektionsbandenintensität diesen Wert, kann ein positives Ergebnis angenommen werden. Ein Qualitätskriterium für die Lagerstabilität ist ein möglichst gleichbleibender „crosspoint“. Damit ist über den Lagerzeitraum eine gleichbleibende Empfindlichkeit des Tests gewährleistet. Die absoluten Intensitätswerte müssen nicht zwangsläufig über den ganzen Lagerzeitraum gleich bleiben.

Ein Ergebnis der ROSITA-Untersuchungen war die Notwendigkeit einer objektivierbaren Testauswertung. Dafür sollte ein automatisches Auswertegerät eingesetzt werden, das eine Ja/Nein-Entscheidung anzeigt. Hierzu gibt es inzwischen kommerziell erhältliche Geräte auf Photometerbasis, die mit den entsprechenden Teststreifen vertrieben werden⁷⁰. Auch in diesem Fall ist es so, dass etliche Firmen Geräte anbieten, die aber schwer zu beschaffen sind.

4.1.4.1 UPT-Technologie

Durch die Firmen Orasure und Dräger soll in Zukunft eine neue Technologie zur Auswertung der Immunreaktion herangezogen werden^{71, 72}. Bei der UPT-Technologie[®] (up converting phosphor technology) werden die Detektionsantikörper nicht mit konventionellen Gold- oder Latex-Partikeln verbunden, sondern es werden Komplexe seltener Erden eingesetzt. Werden diese mit

einem IR-Laser bestrahlt, so wird kürzerwelliges Licht von diesen zurückgesandt. Das so erzeugte Signal kann ohne Interferenzen gemessen werden. Durch diese Technik kann die Empfindlichkeit der Anzeige im Vergleich zu der photometrischen Bestimmung deutlich gesteigert werden.

4.1.5 Kreuzreaktivität

Der eingesetzte Antikörper wurde ohne eine Charakterisierung, was Kreuzreaktivitäten anbetrifft, bezogen. Daher gehörte es zu dessen Evaluation dazu, mögliche Interferenzen durch Testung hoher Konzentrationen an Arzneistoffen zu testen. Als eine übliche Konzentration für diese Tests wurden 50 µg/mL gewählt. In Kapitel 2.4.4 wurden die entsprechenden Teststreifen abgebildet. Es zeigte sich, dass Dopamin, Norephedrin und Ranitidin, im Vergleich zu einer Negativkontrolle abgeschwächte Detektionsbanden lieferten.

Für die ersten beiden genannten Stoffe ist dieses durch die relative Ähnlichkeit zu dem eigentlichen Antigen S-(+)-Amphetamin erklärbar. Dass Ranitidin auch zu einer Abschwächung führt, lässt sich allein aus seiner Struktur nicht gut erklären. Allerdings gibt es auch käufliche Amphetamintests, die in den Kreuzreaktivitätstabellen Ranitidin als Interferenz aufführen. Möglicherweise wird in diesen Tests ein Antikörper ähnlichen Ursprungs eingesetzt.

4.1.6 Veränderungen in der Testzusammensetzung

Neben den eigenen Erfahrungen während der Entwicklung der Drogen-teststreifen sind bei den Drägerwerken parallel für andere Applikationen Versuche mit immunchromatographischen Teststreifen durchgeführt worden. Aus diesen Versuchen begründete sich die veränderte Zusammensetzung der Auftragepuffer für die beiden Testbanden. Es zeigte sich, dass sich durch Zusatz von Zucker die Lagerstabilität der Banden verbessern lässt. Daher wurden für die Herstellung der Amphetamin-Gruppentest in Kapitel 2.4 diese Puffer eingesetzt. Es konnten keine Interferenzen mit den weiteren Testbestandteilen beobachtet werden.

Neben der Entwicklung eines Teststreifens zum Nachweis der Amphetamine wurde auch ein Kombinationstest bei den Drägerwerken entwickelt. Hier war

es aufgrund der unterschiedlicheren Analyten möglich, zwei Detektionsbanden auf einem Teststreifen anzuordnen. Es konnten keine Konkurrenzreaktionen, wie bei dem Amphetamintest mit zwei Detektionsbanden beobachtet werden.

4.1.7 Auswertung der am NICC eingesetzten Tests

Der Aufenthalt beim NICC diene zum einen dazu, einen Einblick in die Arbeit eines toxikologischen Labors im Umgang mit Speichelproben zu gewinnen, zum anderen wurden die hergestellten Teststreifen auf Praxistauglichkeit geprüft.

Zwischen den einzelnen Tests zeigten sich deutliche Unterschiede, was deren Eignung zur Speicheluntersuchung betrifft. Bei den Amphetamin-Teststreifen zeigte sich ein zuvor übersehener Fehler. Die Testentwicklung mit den konjugierten Antikörpern wurde nur mit wässrigen Lösungen durchgeführt. Die Ergebnisse hierfür waren zufriedenstellend. Erst beim Vermessen von Speichelproben zeigte sich, dass die Kombination konjugierter Amphetamin-Antikörper mit dem eingesetzten Methamphetamin-Polyhaptan und Speichel zu einer Abschwächung der Detektionsbande auch für negative Speichelproben führte. Aufgrund dessen verschob sich die Konzentration, die als positiv erkannt werden konnte, zu höheren Werten. Dieses ist an dem in Kapitel 2.5.2 dargestellten Graphen deutlich zu erkennen. Die Leistungsfähigkeit des Kombinationstests konnte während des Aufenthalts am NICC ebenfalls belegt werden. Wie die graphische Auftragung in Kap. 2.5.2 zeigt, liefert der Opiat-Test im Vergleich zu den anderen Tests die größte Empfindlichkeit.

Bei den Kokain-Teststreifen gibt es ebenfalls einen Bereich, in dem die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Speichelproben nicht möglich ist. Am besten gelingt die Unterscheidung für den Opiattest. Wegen der geringeren Prävalenz allgemein, aber auch wegen der geringen Zahl zur Verfügung stehender positiver Proben am NICC, bleibt abzuwarten, ob sich das Ergebnis auch durch eine größere Anzahl von Proben bestätigen lässt.

4.1.8 Oberflächenbeprobungen

Der ursprünglichen Bestimmung des Gehäuses folgend, wurden die Wischtests auch an anderen Probenmaterialien als Speichel getestet. Im Labor in Hamburg wurden dazu einige Vorversuche durchgeführt. Aus den in Kapitel 2.5.3 dargestellten Ergebnissen am NICC sind einige besonders hervorzuheben.

Auf einer Baumwolltasche, die zuvor nicht als Negativ-Kontrolle getestet wurde, konnten nach dem Abstellen in dem kontaminierten Labor deutliche Spuren von Opiaten und auch Kokain nachgewiesen werden.

An den Fingerkuppen einer Person, die in dem Labor gearbeitet hat, konnten nach Kontakt mit einer kontaminierten Schreibtischunterlage Kokain und Opiate nachgewiesen werden. 30 min nach der Kontamination waren nicht mehr so hohe Konzentrationen auf den Fingerkuppen nachweisbar. Auf dem Teststreifen zeigte sich aber immer noch eine abgeschwächte Detektionsbande.

An einer als Asservat beschlagnahmten Stoffjacke konnte gezeigt werden, dass sich auch der Ort einer Kontamination zur Bestätigung untersuchen lässt. Es war bekannt, dass der Besitzer in einer Tasche der Jacke einen verdächtigen Gegenstand lagerte. Dieser Gegenstand war aber zur Zeit der Sicherstellung nicht verfügbar. Es sollte der Verdacht erhärtet werden, dass es sich dabei um einen mit Betäubungsmitteln verunreinigten Gegenstand handelte. Am Taschensaum, sowie an den Nähten der Jacke wurden größere Mengen an Opiaten nachgewiesen. Der Kombinationstest zeigte zusätzlich, dass die Kokainbande nicht abgeschwächt war. Mittels instrumenteller Analysemethoden wurden auf der Jacke ebenfalls nur Opiate nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen zweierlei: Zum einen, dass der Test auch für diese Art von Untersuchungen geeignet ist. Zum anderen, dass relativ leicht positive Oberflächentests erhalten werden können. So könnten auch unabsichtliche Kontaminationen erkannt werden und weitere Nachfragen nach sich ziehen.

4.1.9 Stabilitätsuntersuchung

Als Abschluss der Arbeiten mit Teststreifen erfolgte ein Stabilitätstest. Für den Analyten Amphetamin ergab sich dabei ein eindeutiges Ergebnis. Der Test

4. Diskussion

war über die gesamte Lagerzeit hinreichend stabil. Dieses war daran festzumachen, dass sich der Punkt für die Intensitätsumkehr der Banden („crosspoint“) kaum verschiebt. Außerdem zeigte die Detektionsbande bei höheren Analytkonzentrationen über den gesamten Lagerzeitraum immer eine deutlich schwächere Färbung als die Kontrollbande. Deren Intensität veränderte sich über den Lagerzeitraum nur wenig.

Für das Methamphetamin zeigte sich, dass die Verdrängung der Detektionsbande nicht über den gesamten Zeitraum gleichbleibend war. Zusätzlich erfuhr auch die Kontrollbande eine Intensitätsabschwächung. Diese beiden Vorgänge hatten zur Folge, dass sich der „crosspoint“ deutlich verschob und die Erkennung von positiven Proben erst bei deutlich höheren Konzentrationen erfolgen konnte. Der „crosspoint“ verschob sich von ca. 250 ng/mL auf >500 ng/mL. Die Intensitätsunterschiede zwischen den beiden Banden waren nach Lagerung hier immer deutlich kleiner als für die bei RT gelagerten Tests.

4.2 Kapillarelektrophorese

Analysen mit der Kapillarelektrophorese haben schon in den vergangenen Jahren gezeigt, welches Potential diese Technik bietet. In den letzten Jahren ist die Anzahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet stark angestiegen. Waren es 1990 noch 171 Publikationen, so wurden 1994 über 1000 Artikel veröffentlicht. Seit 1997 liegt die Zahl bei über 2000 p.a. (laut SciFinder im Feb. 2003).

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine sehr empfindliche Detektion von Amphetaminen im Speichel möglich ist. Es ergaben sich aber auch neue Ansätze, die Technik in der Kapillarelektrophorese zu verbessern. Durch die kombinierte Injektion - zuerst eine elektrokinetische Injektion, dann ein kurzer Druckstoß - konnte eine deutliche Verbesserung der Injektionspräzision im Vergleich zu vorherigen Arbeiten erreicht werden.

4.2.1 Methodenentwicklung

4.2.1.1 Auftrennung der Phenylpropanamine

Im ersten Teil der Arbeiten wurde das vorhandene Gerät erprobt. Dabei stand nicht unmittelbar die Analyse von Speichelproben im Vordergrund, sondern es sollte getestet werden, welche Untersuchungsmöglichkeiten das Gerät am Beispiel der Phenylpropanamine bietet.

Es wurde am Anfang nicht unmittelbar das Stoffgemisch ausgesucht, welches am Ende in der Methode zur Speicheluntersuchung eingesetzt wurde, sondern es wurde eine Mischung verschiedener Substanzen eingesetzt.

Diese Substanzen ließen sich nicht durch Einsatz nur eines Cyclodextrins auftrennen. Wie in Kapitel 3.2.5 gezeigt, ergab sich eine Auftrennung der Norephedrin-Enantiomere und der anderen Racemate nur durch Kombination der beiden eingesetzten Cyclodextrine.

Ein Diskussionspunkt beim Einsatz substituierter Cyclodextrinen sind die Unterschiede zwischen verschiedenen Hersteller- und Herstellungschargen. Die genauen Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen wurden u.a. von Holzgrabe et al. systematisch untersucht⁷³. Andere Autoren haben kürzlich

den Einsatz von Highly-Sulfated- Cyclodextrinen zur Auftrennung von Amphetaminen beschrieben⁷⁴. Bezogen auf die durchgeführte Methode wäre der Einsatz dieser Cyclodextrine der weitaus teuerste Bestandteil. Natives β -Cyclodextrin hingegen bildet bei den Analysenkosten nur einen kleinen Posten.

Nachdem die allgemein auftretenden Probleme wie Migrationszeitverschiebungen und auch das Abreißen des Stromes durch den Einsatz des Replanimentsystems verringert werden konnten, wurde wegen der besseren Auflösung und Vereinfachung nur β -Cyclodextrin zur Trennung der Amphetamine bei der Speicheluntersuchung eingesetzt.

4.2.1.2 Empfindlichkeit der Methode

Die zu erreichende Empfindlichkeit stellte ein Problem dar. Ohne Konzentrationserhöhung ist es mit dem UV-DAD-Detektor nicht möglich, die Analyten mit einer Empfindlichkeit von <10 ng/mL zu detektieren. Um dieses Ziel zu erreichen, bieten sich prinzipiell zwei Wege. Durch eine Aufkonzentration im Zuge der Probenvorbereitung oder durch den Einsatz einer Stacking-Technik bei der Injektion kann eine Verbesserung der Empfindlichkeit erreicht werden. Da die nötige Konzentration nicht nur bei der Probenvorbereitung erzielt werden konnte, wurde diese Methode nicht angewandt. Zum Einsatz kam eine Stacking-Technik, die eine deutlich empfindlichere, um mehrere Dekaden gesteigerte, Detektion ermöglicht. Wie oben beschrieben, konnte durch die gewählte Injektion auch die Präzision im Vergleich zu konventioneller elektrokinetischer Injektion erhöht werden.

Wird der Rückstand nach der Extraktion nicht wie hier geschehen im gleichen, sondern in einem kleineren als dem Probenvolumen aufgenommen, so erzielt man eine weitere Anreicherung. Nimmt man in 0,2 mL statt in 1 mL auf, so würde man die Konzentration um den Faktor 5 erhöhen. Ließe man alle Versuchsparameter unverändert, wäre dann jedoch die Trennung der jeweiligen Racemate bei hohen Konzentrationen nicht mehr möglich. Der Messbereich würde so unter 1 ng/mL beginnen, die obere Grenze wäre dann bei ca. 100 ng/mL je Racemat erreicht. Gleiches gilt auch bei einer verlängerten Injektion.

4.2.2 Validierungsparameter

Entsprechend den Vorgaben der FDA für bioanalytische Methoden erfolgte für die eingesetzte Methode eine Validierung.

Bei der Untersuchung der Selektivität wurden keine Beeinträchtigungen für den Nachweis der Analyten beobachtet. Ein neuer Ansatz zur Probenvorbereitung, der im Zusammenhang mit einer Vor-Ort-Analytik mittels miniaturisierter Kapillarelektrophorese interessant ist, ist die von Pedersen-Bjergaard et al. beschriebene Flüssig/Flüssig/Flüssig-Mikroextraktion⁷⁵. Hierbei wird der ionisierbare Analyt durch pH-Änderung aus einem wässrigen Medium in eine organische Phase ausgetrieben. Diese organische Phase befindet sich in den Hohlräumen eines porösen Schlauches. Der Schlauch wird von einem Akzeptormedium durchströmt. In diesem wird der Analyt wieder ionisiert. Das Akzeptormedium kann dann direkt als Probelösung für die Kapillarelektrophorese dienen.

An den Wiederfindungsraten zeigte sich, dass es gut gelang, die Amphetamine aus Speichel zu extrahieren. Die nicht ganz zufriedenstellende Präzision, ausgedrückt als Standardabweichung, spiegelt u.U. die fehlende Routine für die Anwendung des Extraktionsverfahrens wieder. Eine andere Ursache dafür könnte an der Bedienung des Konzentrators liegen. Amphetamine sind als freie Basen volatil. Daher könnten es bei der Einengung im Concentrator 5301 der Fa. Eppendorf zu Substanzverlust gekommen sein. Auf diese Weise kann eine niedrigere bzw. schwankende Wiederfindung erklärt werden. Ein Versuch, dieses durch Zusatz von methanolischer HCl vor dem Einengen zu verhindern, scheiterte daran, dass bei der Analyse ein deutlicher Empfindlichkeitsverlust eintrat (Bildung von Ammoniumchlorid). Geht man davon aus, dass sich alle Analyten ähnlich verhalten, so werden diese Schwankungen durch den internen Standard bei der Quantifizierung jedoch berücksichtigt.

Ein Beleg für die gute Funktion der Kapillarelektrophorese-Technik an sich bildet die durchgeführte Präzisionsuntersuchung. Nicht nur für die Flächenpräzision, sondern auch für die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten wurden gute Werte ermittelt. So war es, trotz der geringen Migrationszeitunterschiede zwischen den jeweiligen Enantiomeren, immer möglich, eine Zuordnung durchzuführen.

Die Richtigkeit zeigte, ähnlich wie die Wiederfindung, deutlich größere Abweichungen als die Präzision. Erklären lässt sich dieses mit der schwankenden Wiederfindungsrate, die bei der Konzentrationsberechnung über die Kalibrierdaten nur durch den internen Standard ausgeglichen werden kann.

Die mit Hilfe des DIN-Test Programms oder der ChemStation Software erhaltenen Korrelationskoeffizienten zeigten, dass das Gerät im gewählten Konzentrationsbereich einwandfrei arbeitete.

4.2.3 Untersuchungen nach Arzneistoffgabe

4.2.3.1 Selegilin

Da Selegilin als enantiomerenreiner Stoff im Handel ist, überrascht es nicht, dass bei der Analyse der entsprechenden Speichelproben nur die R-(-)-Enantiomere von Methamphetamin und Amphetamin nachgewiesen wurden. Vielmehr kann dieses als Beleg dienen, dass die gewählte Methodik richtig arbeitet. Peters et al. fanden im Plasma nach Selegilingabe ebenfalls nur die R-(-)- Enantiomere der Selegilin-Metaboliten⁷⁶. Wie auch schon in Kap. 3.5.1 dargestellt, war es u.U. möglich das Desmethylselegilin zu detektieren. Kim et al. und Shin^{29, 30} beobachteten nach Selegilingabe im Urin auch das Auftreten von Desmethylselegilin. Kim et al. arbeiteten mit einer enantioselektiven CE-Methode unter Einsatz von Carboxymethyl- β -cyclodextrin. Die Reihenfolge der Signale für Amphetamin, Methamphetamin und Selegilin, stimmte mit der in der hier angewandten Methode überein. Desmethylselegilin ergab ein Signal kurz nach dem Signal der Muttersubstanz. Das hier im Speichel beobachtete Signal lag ebenfalls kurz nach dem von Selegilin. Daher könnte es sich hier auch um das Desmethylselegilin handeln.

4.2.3.2 Famprofazon

Im Speichel waren nach der Einnahme von Famprofazon beide Methamphetamin- und Amphetaminenantiomere nachweisbar. Nach den in der Literatur beschriebenen Plasma- und Urinuntersuchungen ist dieses auch plausibel. Musshoff et al.²⁶ haben bei einer enantioselektiven Analyse im Plasma in etwa gleiche Peakverhältnisse der Enantiomere gefunden, wie sie auch hier im Speichel ermittelt wurden.

Betrachtet man den Konzentrationsverlauf über die Zeit, so kann man, auch wenn zwei Probanden für eine genaue Abschätzung nicht ausreichen, sagen, dass nach 5 Stunden die maximale Konzentration im Speichel wahrscheinlich überschritten ist. Sie ist in einem Bereich zwischen 2-3 Stunden erreicht. Die Konzentration nimmt dann wieder ab.

Die große Streuung der ermittelten Konzentrationen war zum einen durch eine zu kleine Anzahl von Proben bedingt, zum anderen haben auch andere Arbeiten gezeigt, dass im Speichel mit stark unterschiedlichen Konzentrationen gerechnet werden muss. Samyn et al.¹⁷ haben nach kontrollierter Gabe von 75 mg MDMA (n=12) Speichelkonzentrationen bestimmt. Für die maximale Konzentration wurde ein Mittelwert von 1215 ± 944 ng/mL gefunden. Diese Konzentration war nach 2 Stunden erreicht. Für die anderen Probennahmezeitpunkte wurden ähnlich hohe Standardabweichungen gefunden.

4.3 Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

Ein Gesichtspunkt der Untersuchungen war es, zu klären, ob durch Einnahme von Arzneistoffen der Amphetaminnachweis im Speichel, zur Testung auf Drogenkonsum, gestört werden kann.

Die Rechtslage in Deutschland wurde bereits in der Einleitung dargelegt. Es gibt für berauschende Mittel im Speichel keinen Grenzwert, ab dessen Überschreitung ein positiver Befund vorliegt. Zieht man für die Bewertung von Testergebnissen im Speichel die Richtlinie der amerikanischen SAMSHA (Substance Abuse & Mental Health Service Administration) für Arbeitsplatzuntersuchungen heran⁷⁷, so wird dort inzwischen ein Grenzwert von 50 ng/mL für Amphetamine gefordert. Zielanalyt ist dabei das S-(+)-Methamphetamin. Mit einer Kreuzreaktivität von 50-150 % müssen auch MDA, MDMA und MDEA erfasst werden.

Diese Grenze kann nach Einnahme von Famprofazon überschritten werden. Bei Selegilin ist es nicht möglich, dass S-(+)-Amphetamine nachgewiesen werden können.

Beim Einsatz von Immunoassays für Screening–Untersuchungen ist nicht auszuschließen, dass durch Einnahme von Arzneistoffen ein positives Testergebnis erhalten wird. Bedingt durch die Kreuzreaktivität gegenüber dem anderen Enantiomer gelingt die Unterscheidung der Enantiomere im Immunoassay nicht sicher.

Die meisten Arzneistoffe, die für diese Art von falsch positiven Amphetaminbefunden in Frage kommen, sind ursprünglich als Anorektika vermarktet worden. Für diese wurden nach der Einführung von Aminorex, sowie Fenfluramin und Dexfenfluramin eine deutliche Zunahme der primären pulmonalen Hypertonie beschrieben, sodass die Substanzen auf freiwilliger Basis vom Markt genommen wurden⁷⁸. Nachdem 1995 die EMEA von Deutschland angerufen wurde, um eine Bewertung des Nutzen/Risiko-Verhältnisses für die Wirkstoffe Amfepramon, Phentermin, Clobenzorex, Fenproporex, Mefenorex, Norpseudoephedrin und Phendimetrazin zu erstellen, wurde im Jahr 2000 von der EU-Kommission angeordnet, dass Zubereitungen mit diesen Wirkstoffen vom Markt genommen werden müssen.

4. Diskussion

Diese Entscheidung wurde jedoch vor kurzem vom Europäischen Gerichtshof aufgehoben⁷⁹. Die Wahrscheinlichkeit, dass die genannten Substanzen in Europa erneut große Verbreitung finden, ist aufgrund ihres nicht zeitgemäßen Wirkungsprofils eher gering. Weltweit sind diese Substanzen nach wie vor anzutreffen. In Brasilien gibt es z. B. das bekannte Problem, dass LKW-Fahrer mit dem Konsum von Fenproporex Ermüdungserscheinungen vorbeugen wollen⁸⁰. Daher ist es auf internationale Ebene wahrscheinlich, dass die belegten Verwechslungsmöglichkeiten auch weiterhin eine Rolle bei der Interpretation von Amphetamin-Drogentests spielen werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zum Nachweis verschiedener Phenylpropanamine im Speichel entwickelt.

Im ersten Teil erfolgte der Nachweis von Amphetamin mittels kompetitiv arbeitender immunchromatographischer Teststreifen. Es sollte eine Methode zum Nachweis von berauschenden Mitteln im Straßenverkehr erprobt werden. Zuerst wurden die Testbestandteile aufeinander abgestimmt und eine Probenahme-prozedur entwickelt, die eine zuverlässige Analyse des Speichels mit diesem Testformat ermöglicht. Aus den Arbeiten ging hervor, dass Amphetamin mit einer Empfindlichkeit von <50 ng/mL mit diesem Test aus wässrigen Lösungen nachweisbar ist. Da der Speichel vor der Analyse durch einen Probennehmer oder einen Verdünnungsschritt konditioniert werden muss, verschiebt sich die Nachweisgrenze zu deutlich erhöhten Werten. Um Amphetamin und Methamphetamin mit nur einem Test nachweisen zu können, wurde die Kombination der Antikörper verändert, sodass Amphetamin und auch MDMA zu einer Verdrängung an der selben Bande führten. Diese Teststreifen, wie auch ein bei den Drägerwerken Lübeck entwickelter Opiat-Kokain- Kombinationstest, wurden anhand einer Speichelsammlung aus Straßenverkehrskontrollen auf ihre Praxistauglichkeit geprüft. Im Vergleich zu den mittels GC/MS-Analytik ermittelten Konzentrationen, zeigten die Bandenintensitäten eine gute Korrelation. Für niedrige Konzentrationen ergab sich jedoch kein Unterschied zu negativen Proben. Mit diesen Teststreifen wurden Versuche zur Oberflächenbeprobung und ein Stabilitätstest durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Kapillarelektrophoresemethode entwickelt, die es ermöglicht, Phenylpropanamine im Speichel nachzuweisen und Unterschiede zwischen verschiedenen Quellen (Arzneimittel oder nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel) aufzuzeigen. Dazu wurden die Racemate mittels nativem β -Cyclodextrin aufgetrennt.

Um die benötigte Empfindlichkeit zu erreichen, war es erforderlich, den Speichel mittels Festphasenextraktion aufzuarbeiten und in $0,1$ mM H_3PO_4 aufzunehmen. Durch elektrokinetische Injektion erfolgte ein „stacking“, sodass eine Nachweisempfindlichkeit von <10 ng/mL resultierte. Es konnte gezeigt werden, dass durch hydrodynamische Injektion einer kleinen Probenmenge

5. Zusammenfassung

nach der eigentlichen elektrokinetischen Injektion, die Impräzision deutlich verringert werden konnte.

Für die Untersuchung von Amphetaminkonzentrationen nach Arzneistoffgabe standen Famprofazon und Selegilin zur Verfügung. Im Speichel wurde nach Famprofazongabe überwiegend R-(-)-Methamphetamin gefunden. Es lagen ebenfalls kleinere Mengen S-(+)-Methamphetamin, sowie R(-)- und S-(+)-Amphetamin vor. Ähnliche Enantiomerenverhältnisse wurden im Blut von anderen Autoren beschrieben.

Nach Selegilingabe wurden R-(-)-Methamphetamin und R-(-)-Amphetamin gefunden. Selegilin ist ein enantiomerenreiner Stoff, daher ist dieses Ergebnis plausibel.

Legt man den aktuellen Grenzwert von 50 ng/mL S-(+)-Methamphetamin der SAMSHA zugrunde, so sind falsch positive Amphetainnachweise im Speichel auch durch die Einnahme von Arzneistoffen erklärbar. Dieses kann im Einzelfall die Interpretation von Drogenschnelltests im Speichel erschweren.

6 Summary

Different methods of analyzing phenylpropanamine in saliva were in the scope of this thesis.

The first part comprises the development of immunochromatographic test strips for amphetamine analysis with a competitive detection system. These test strips should be able to detect amphetamines in an on-site drug testing environment. The principle constituents for the test were experimentally determined and possible sampling procedures were explored and evaluated. After tuning the assay a complete displacement of the detection line could be observed for concentrations <50 ng/mL of aqueous amphetamine solution. Because dilution and conditioning were necessary this sensitivity decreased distinctly. The antibody composition was changed in order to achieve a higher cross reactivity for methamphetamines, thus leading to a test detecting both amphetamines and methamphetamines in one detection line. This test, as well as a opiate-cocain test developed by Drägerwerke Lübeck, was evaluated using saliva samples collected in road side tests in Belgium. Comparing the intensity of the detection line with the corresponding concentrations found by GC/MS analysis a good correlation was found. However, there was no difference in detection line intensity between samples with low drug concentration and negative saliva samples. The eligibility of the test strips was evaluated with respect to surface detection and a stress test was performed.

The second part reports on the development of a capillary electrophoresis method with a view to analysing phenylpropanamines in saliva and also finding differences between the legal intake of medications leading to metabolic amphetamine production on one hand and illegal drugs on the other hand. For enantioseparation native β -cyclodextine was used.

In order to enhance the sensitivity of the method, a solid phase extraction was performed. The residue was dissolved in 0,1 mM H_3PO_4 and electrokinetically injected, resulting in a sensitivity of <10 ng/mL. By hydrodynamically injecting a small portion of the sample solution subsequent to the electrokinetic injection, the precision concerning the injection could be significantly reduced. For the analysis of amphetamine concentrations after intake of medication, famprofanzone and selegilin also known as deprenyl were selected. After the

6. Summary

intake of famprofazone, mainly R-(-)-methamphetamine was observed. In addition to that, smaller amounts of S-(+)-methamphetamine besides R-(-)- and S-(+)- amphetamine were found. Literature describes similar enantiomeric distributions to be found in blood samples.

After the consumption of selegilin only R-(-)-methamphetamine and R-(-)-amphetamine were detected. Since selegilin is a enantiomeric pure drug this is plausible.

Taking into account that 50 ng/mL S-(+)-methamphetamine is the legal U.S. cutoff value for saliva amphetamine analysis, positive results do not necessarily have to originate from illegal drug abuse but can also be caused by the consumption of medication. This should be taken into consideration when the results are interpreted.

7 Literatur

1. Mandel, I.D., *The diagnostic uses of saliva*. J Oral Pathol Med, 1990. **19**(3): p. 119-25.
2. Kidwell, D.A., J.C. Holland und S. Athanaselis, *Testing for drugs of abuse in saliva and sweat*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **713**(1): p. 111-35.
3. Schramm, W., R.H. Smith, P.A. Craig und D.A. Kidwell, *Drugs of abuse in saliva: a review*. J Anal Toxicol, 1992. **16**(1): p. 1-9.
4. *Entwurf eines Gesetzes zur Änderung des Straßenverkehrsgesetzes*. 1998, Deutscher Bundestag: Bonn. p. Drucksache 13/3764.
5. Ziegler, T., *Anreicherung und Nachweis von Kokain aus der Gasphase unter Berücksichtigung der Wechselwirkung mit Lipiden*, in *Naturwissenschaftliche Fakultät*. 1996, Technische Universität Carolo-Wilhelmina: Braunschweig.
6. Musshoff, F., *Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine*. Drug Metab Rev, 2000. **32**(1): p. 15-44.
7. Mutschler, E., *Arzneimittelwirkungen*. 2001, Stuttgart: WVG.
8. *Saliva as an analytical tool in toxicology*, 1999, <http://www.criminology.fsu.edu/journal/hold.html>
9. Samyn, N., A. Verstraete, C. van Haeren und P. Kintz, *Analysis of Drugs of Abuse in Saliva*. Forensic Science Review, 1999. **11**(1): p. 2-19.
10. Mühlenbruch, B., *Arzneistoff-Bestimmung im Speichel*. Pharm Unserer Zeit, 1982. **11**: p. 41-47.
11. Cone, E.J., *Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale*. Forensic Sci Int, 2001. **121**(1-2): p. 7-15.
12. Cody, J.T., *Determination of methamphetamine enantiomer ratios in urine by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr, 1992. **580**(1-2): p. 77-95.
13. Moeller, M.R., S. Steinmeyer und T. Kraemer, *Determination of drugs of abuse in blood*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **713**(1): p. 91-109.

14. Cheung, S., H. Nolte, S.V. Otton, R.F. Tyndale, P.H. Wu und E.M. Sellers, *Simultaneous gas chromatographic determination of methamphetamine, amphetamine and their p-hydroxylated metabolites in plasma and urine*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997. **690**(1-2): p. 77-87.
15. Wan, S.H., S.B. Matin und D.L. Azarnoff, *Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH*. Clin Pharmacol Ther, 1978. **23**(5): p. 585-90.
16. Navarro, M., S. Pichini, M. Farre, J. Ortuno, P.N. Roset, J. Segura und R. de la Torre, *Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH*. Clin Chem, 2001. **47**(10): p. 1788-95.
17. Samyn, N., G. De Boeck, M. Wood, C.T. Lamers, D. De Waard, K.A. Brookhuis, A.G. Verstraete und W.J. Riedel, *Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions*. Forensic Sci Int, 2002. **128**(1-2): p. 90-7.
18. Schepers, R.J., J.M. Oyler, R.E. Joseph, Jr., E.J. Cone, E.T. Moolchan und M.A. Huestis, *Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers*. Clin Chem, 2003. **49**(1): p. 121-32.
19. Mortier, K.A., K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem und A.P. De Leenheer, *Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **779**(2): p. 321-30.
20. Baden, K.L., S. Valtier und J.T. Cody, *Metabolic production of amphetamine following multidose administration of clobenzorex*. J Anal Toxicol, 1999. **23**(6): p. 511-7.
21. Maurer, H.H., T. Kraemer, O. Ledvinka, C.J. Schmitt und A.A. Weber, *Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis. Studies on the detection of clobenzorex and its metabolites within a systematic toxicological analysis procedure by GC-MS and by immunoassay and studies on the detection of alpha- and beta-amanitin in urine by atmospheric pressure ionization electrospray LC-MS*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997. **689**(1): p. 81-9.

22. Kraemer, T., I. Vernaleken und H.H. Maurer, *Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic mefenorex in human urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997. **702**(1-2): p. 93-102.
23. Shin, H.S., J.S. Park, P.B. Park und S.J. Yun, *Detection and identification of famprofazone and its metabolite in human urine*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994. **661**(2): p. 255-61.
24. Cody, J.T., *Enantiomeric composition of amphetamine and methamphetamine derived from the precursor compound famprofazone*. Forensic Sci Int, 1996. **80**(3): p. 189-99.
25. Neugebauer, M., A. Khedr, N. el-Rabbat, M. el-Kommos und G. Saleh, *Stereoselective metabolic study of famprofazone*. Biomed Chromatogr, 1997. **11**(6): p. 356-61.
26. Musshoff, F. und T. Kraemer, *Identification of famprofazone ingestion*. Int J Legal Med, 1998. **111**(6): p. 305-8.
27. Hasegawa, M., K. Matsubara, S. Fukushima, C. Maseda, T. Uezono und K. Kimura, *Stereoselective analyses of selegiline metabolites: possible urinary markers for selegiline therapy*. Forensic Sci Int, 1999. **101**(2): p. 95-106.
28. Romberg, R.W., S.B. Needleman, J.J. Snyder und A. Greedan, *Methamphetamine and amphetamine derived from the metabolism of selegiline*. J Forensic Sci, 1995. **40**(6): p. 1100-2.
29. Shin, H.S., *Metabolism of selegiline in humans. Identification, excretion, and stereochemistry of urine metabolites*. Drug Metab Dispos, 1997. **25**(6): p. 657-62.
30. Kim, E.M., H.S. Chung, K.J. Lee und H.J. Kim, *Determination of enantiomeric metabolites of l-deprenyl, d-methamphetamine, and racemic methamphetamine in urine by capillary electrophoresis: comparison of deprenyl use and methamphetamine use*. J Anal Toxicol, 2000. **24**(4): p. 238-44.
31. Christophersen, A.S. und J. Morland, *Drugged driving, a review based on the experience in Norway*. Drug Alcohol Depend, 1997. **47**(2): p. 125-35.

32. *Straßenverkehrsunfälle unter Einfluss anderer berauschender Mittel (z. B. Drogen, Rauschgift) und dabei Verunglückte 1975 – 2000.* 2002, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden.
33. Moeller, M.R. und T. Kraemer, *Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs.* Ther Drug Monit, 2002. **24**(2): p. 210-21.
34. *ROSITA Roadside Testing Assessment*, European Union <http://www.rosita.org> 1999,
35. Thews, G., E. Mutschler und P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* 1999, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
36. Samyn, N. und C. van Haeren, *On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users.* Int J Legal Med, 2000. **113**(3): p. 150-4.
37. Gross, S.J., T.E. Worthy, L. Nerder, E.G. Zimmermann, J.R. Soares und P. Lomax, *Detection of recent cannabis use by saliva delta 9-THC radioimmunoassay.* J Anal Toxicol, 1985. **9**(1): p. 1-5.
38. *Developing Immunochromatographic Test Strips*, Millipore 2001, <http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/TB500>
39. Wilchek, M. und E.A. Bayer, *The avidin-biotin complex in bioanalytical applications.* Anal Biochem, 1988. **171**(1): p. 1-32.
40. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques.* 1996, San Diego, California: Academic Press Inc.
41. Wuske, T., R. Polzius, M. Cerqueira da Costa und J. Mahn, *Wischanalysator für den immunchemischen Stoffnachweis*, esp@cenet, 2001
42. Jenkins, A.J., *Drug contamination of US paper currency.* Forensic Sci Int, 2001. **121**(3): p. 189-93.
43. Clauwaert, K.M., J.F. Van Bocxlaer, E.A. De Letter, S. Van Calenbergh, W.E. Lambert und A.P. De Leenheer, *Determination of the designer drugs 3, 4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine.* Clin Chem, 2000. **46**(12): p. 1968-77.

44. Boone, C.M., J.W. Douma, J.P. Franke, R.A. de Zeeuw und K. Ensing, *Screening for the presence of drugs in serum and urine using different separation modes of capillary electrophoresis*. Forensic Sci Int, 2001. **121**(1-2): p. 89-96.
45. Glockl, I., G. Blaschke und M. Vei, *Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **761**(2): p. 261-6.
46. Horstkötter, C., S. Kober, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler und G. Blaschke, *Determination of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in human urine by capillary electrophoresis using ultraviolet absorbance and laser-induced fluorescence detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **769**(1): p. 107-17.
47. Thormann, W., R. Theurillat, M. Wind und R. Kuldvee, *Therapeutic drug monitoring of antiepileptics by capillary electrophoresis. Characterization of assays via analysis of quality control sera containing 14 analytes*. J Chromatogr A, 2001. **924**(1-2): p. 429-37.
48. Mrestani, Y. und R.H. Neubert, *Thiamine analysis in biological media by capillary zone electrophoresis with a high-sensitivity cell*. J Chromatogr A, 2000. **871**(1-2): p. 351-6.
49. Hillaert, S., T.R. De Beer, J.O. De Beer und W. Van den Bossche, *Optimization and validation of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of several angiotensin-II-receptor antagonists*. J Chromatogr A, 2003. **984**(1): p. 135-46.
50. Thormann, W., *Progress of capillary electrophoresis in therapeutic drug monitoring and clinical and forensic toxicology*. Ther Drug Monit, 2002. **24**(2): p. 222-31.
51. Blaschke, G. und B. Chankvetadze, *Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques*. J Chromatogr A, 2000. **875**(1-2): p. 3-25.
52. Hempel, G. und G. Blaschke, *Enantioselective determination of zopiclone and its metabolites in urine by capillary electrophoresis*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996. **675**(1): p. 139-46.
53. Zaugg, S. und W. Thormann, *Enantioselective determination of drugs in body fluids by capillary electrophoresis*. J Chromatogr A, 2000. **875**(1-2): p. 27-41.

54. Schmitt, U., J. Bojarski und U. Holzgrabe, *Enantioseparation of chiral thiobarbiturates using cyclodextrin-modified capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(15): p. 3237-42.
55. Grard, S., P.H. Morin, M. Dreux und J.P. Ribet, *Efficient applications of capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry to the analysis of adrenoreceptor antagonist enantiomers using a partial filling technique*. *J Chromatogr A*, 2001. **926**(1): p. 3-10.
56. Zhang, C.X. und W. Thormann, *Head-Column Field-Amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis: A Robust Approach Providing over 100-fold Sensitivity Enhancement*. *Anal Chem*, 1996. **68**: p. 2523-2532.
57. Zhu, L. und H.K. Lee, *Field-amplified sample injection combined with water removal by electroosmotic flow pump in acidic buffer for analysis of phenoxy acid herbicides by capillary electrophoresis*. *Anal Chem*, 2001. **73**(13): p. 3065-72.
58. Lurie, I.S., N.G. Odeneal, 2nd, T.D. McKibben und J.F. Casale, *Effects of various anionic chiral selectors on the capillary electrophoresis separation of chiral phenethylamines and achiral neutral impurities present in illicit methamphetamine*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(16-17): p. 2918-25.
59. Tagliaro, F., G. Manetto, S. Bellini, D. Scarcella, F.P. Smith und M. Marigo, *Simultaneous chiral separation of 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3-4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, ephedrine, amphetamine and methamphetamine by capillary electrophoresis in uncoated and coated capillaries with native beta-cyclodextrin as the chiral selector: preliminary application to the analysis of urine and hair*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(1): p. 42-50.
60. Hellriegel, C., H. Handel, M. Wedig, S. Steinhauer, F. Sorgel, K. Albert und U. Holzgrabe, *Study on the chiral recognition of the enantiomers of ephedrine derivatives with neutral and sulfated heptakis(2,3-O-diacetyl)-beta-cyclodextrins using capillary electrophoresis, UV, nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2001. **914**(1-2): p. 315-24.
61. Gausepohl, C. und G. Blaschke, *Stereoselective determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998. **713**(2): p. 443-6.

7. Literatur

62. Forth, W., D. Henschler und W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2001, München: Urban & Fischer Verlag.
63. *Advisory not to use products containing Ephedra or ephedrine*. 2001, Health Canada: Ottawa.
64. Merck, E., Verfahren zur Darstellung von Alkyloxyaryl-, Dialkyloxyaryl- und Alkylendioxyarylaminopropanen bzw. deren am Stickstoff monoalkylierten Derivaten, Kaiserliches Patentamt Pat.Nr. 274350, 1914
65. Kalant, H., *The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs*. Can Med Assoc J, 2001. **165**(7): p. 917-28.
66. Rizzi, A., *Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(15): p. 3079-106.
67. Chinaka, S., S. Tanaka, N. Takayama, K. Komai, T. Ohshima und K. Ueda, *Simultaneous chiral analysis of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. **749**(1): p. 111-8.
68. Kromidas, S., *Validierung in der Analytik*. 1999, Weinheim: Wiley-VCH.
69. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration May 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
70. Pichini, S., M. Navarro, M. Farre, J. Ortuno, P.N. Roset, R. Pacifici, P. Zuccaro, J. Segura und R. de la Torre, *On-site testing of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in saliva with Drugwipe and Drugread: a controlled study in recreational users*. Clin Chem, 2002. **48**(1): p. 174-6.
71. van De Rijke, F., H. Zijlmans, S. Li, T. Vail, A.K. Raap, R.S. Niedbala und H.J. Tanke, *Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays*. Nature Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 273-6.
72. Niedbala, R.S., H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle und R. Vallejo, *Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology*. Anal Biochem, 2001. **293**(1): p. 22-30.
73. Holzgrabe, U., *persönliche Mitteilung*. 2002.

74. Iwata, Y.T., A. Garcia, T. Kanamori, H. Inoue, T. Kishi und I.S. Lurie, *The use of a highly sulfated cyclodextrin for the simultaneous chiral separation of amphetamine-type stimulants by capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(9): p. 1328-34.
75. Pedersen-Bjergaard, S. und K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. *Anal Chem*, 1999. **71**(14): p. 2650-6.
76. Peters, F.T., T. Kraemer und H.H. Maurer, *Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers and its application to toxicology cases*. *Clin Chem*, 2002. **48**(9): p. 1472-85.
77. *MANDATORY GUIDELINES FOR FEDERAL WORKPLACE DRUG TESTING PROGRAMS*, 2001,
<http://workplace.samhsa.gov/ResourceCenter/DT/FA/GuidelinesDraft4.htm>
78. Michelakis, E.D. und E.K. Weir, *Anorectic drugs and pulmonary hypertension from the bedside to the bench*. *Am J Med Sci*, 2001. **321**(4): p. 292-9.
79. *Urteil des Gerichts Erster Instanz 2003/C19/53*. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft*, 2003. **C19/29**.
80. Silva, O.A., M. Yonamine, C.L.G. Antunes, J.M.D. Greve und A.F. Midio. *Fenproporex Abuse by Truck Drivers in Brazil*. in *Proceedings of the 1998 Joint SOFT/TIAFT International Meeting*. 1998. Albuquerque, New Mexico, USA.

8 Anhang

8.1 Geräte

Zentrifuge	Kontron	Hermle Z 424
Ultraschallbad	Bandelin	TK 52 H
Zentrifuge	Cenco	Laborzentrifuge
pH- Meter	Metrohm	632
Vakuumpumpe	Vacubrand	CVC 2 mit Pumpe
Eindampfgerät	Eppendorf	Concentrator 5301
Laminiergerät		
Dispensiergerät	Iso Flow Inc.	Dispenser
Dispensiergerät	Camag	Linomat 4
DC-Scanner	Camag	TLC 3
Schneidegerät	BioDot	Cutter
Trockenschränke	Heraeus	div. Typen
Waagen	Sartorius	Pro 11
	Chya Balance Corp.	MP 300
	Mettler	
Kapillarelektrophorese	Agilent	3D CE
Photometer	Uvikon	X-930
Destille	Heraeus	

8.2 Pufferlösungen

PBS-Gebrauchslösung

Durch Verdünnen mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 hergestellt aus:

2,0 g/L	KH_2PO_4	
2,0 g/L	KCl	
11,5 g/L	Na_2HPO_4	
80,0 g/L	NaCl	eingestellt auf pH 7,6

PBS-Gebrauchslösung ohne Salz

wie PBS-Gebrauchslösung jedoch ohne NaCl

PBS-Testpuffer 1

PBS-Gebrauchslösung+ 1 % Crotein C+ 0,25 % Tween 20

PBS-Testpuffer 2

PBS-Gebrauchslösung+ 1 % Crotein C+ 0,25 % Triton X-100

50 mM Carbonatpuffer

1,59 g/L	Na_2CO_3	
2,93 g/L	NaHCO_3	eingestellt auf pH 9,6

80 mM Phosphatpuffer

1,38 g/L	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	
9,94 g/L	Na_2HPO_4	
8,5 g/L	NaCl	eingestellt auf pH 7,6

8. Anhang

Phosphatpuffer pH 2,5

Die Herstellung erfolgt wie angegeben:

50 mM KH_2PO_4	0,6804 g in ca. 90 ml Wasser lösen, mit H_3PO_4 auf pH 2,5 einstellen und auf 100,0 mL auffüllen
75 mM KH_2PO_4	1,0207 g in ca. 90 ml Wasser lösen, mit H_3PO_4 auf pH 2,5 einstellen und auf 100,0 mL auffüllen
100 mM KH_2PO_4	1,3604 g in ca. 90 ml Wasser lösen, mit H_3PO_4 auf pH 2,5 einstellen und auf 100,0 mL auffüllen
200 mM KH_2PO_4	2,7218 g in ca. 90 ml Wasser lösen, mit H_3PO_4 auf pH 2,5 einstellen und auf 100,0 mL auffüllen

8.3 Gefahrstoffe

Stoffname	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Acetonitril	F, Xn	R: 11-20/21/22-36 S: 16-36/37
Ammoniak 25%	C, N	R34-50 S26-36/37/39-45-61
Amphetamin	T ⁺	R: 26/27/28-63 S: 22-36/37/39-45
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37
Dichlormethan	Xn	R 40, S 23.2-24/25-36/37
Ethanol	F	R: 11, S: 7-16
Ethylacetat	F, Xi	R 11-36-66-67, S 16-26-33
Ephedrin	Xn	R 22-36/37/38, S 26-36
n-Hexan	F, Xn, N	R 11-38-48/20-51/53-62-65-67 S9-16-29-33-36/37-61-62
Methamphetamin	T	R: 23/24/25-63, S: 22-36/37/39-45
MDA	T	R: 25-36/37/38 S: 26-27-36/37/39-45
MDMA	T	R: 25-36/37/38 S: 26-27-36/37/39-45
Methanol	F, T	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45
Natriumazid	T ⁺ , N	R: 28-32-50/53 S: 28-45-60-61
Norephedrin	Xn	R: 22, S: 22-36/37/39-45
Phosphorsäure 85 %	C	R: 34, S: 26-36/37/39-45
Phenylephrin	Xn	R: 22-36/37/38, S: 26-36
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67 S 7-16-24/25-26

Tagungsbeiträge:

Poster „**Drugs of Abuse: On-Site Saliva Sampling and Analysis**“

37th Triennial TIAFT Meeting 05.-09.09.1999 Krakow

Jörg Zimmermann, Hans-Jürgen Duchstein, Kai Bierans, Thomas Wuske, Rainer Polzius, Andreas Manns

Vortrag „**Immunchromatographischer Test zur Speicheluntersuchung**“

31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin 22-24.03.2001 Frankfurt/Main

Jörg Zimmermann, Nele Samyn, Hans-Jürgen Duchstein, Maria da Costa, Thomas Wuske, Rainer Polzius

Vortrag „**Immuno-chromatographic teststrips for saliva analysis**“

TIAFT Young Scientist Workshop 06.-07.04.2001 Gent

Jörg Zimmermann, Nele Samyn, Hans-Jürgen Duchstein, Maria da Costa, Thomas Wuske, Rainer Polzius

Poster „**Enantioselective Analysis of Amphetamines in Saliva with Capillary Electrophoresis**“

40th Triennial TIAFT Meeting 26.08.-30.08.2002 Paris

Jörg Zimmermann, Hans-Jürgen Duchstein

Vortrag „**Enantioselektive Analyse von Amphetaminen im Speichel mit Hilfe der Kapillarelektrophorese**“

DPhG Jahrestagung 2002 Berlin 10.-12.10.2002

Jörg Zimmermann, Hans-Jürgen Duchstein

Name	Jörg Robert Zimmermann
Geburtsdatum	25.07.1972
Geburtsort	Hamburg
Schulische Ausbildung:	
Juli 1979	Einschulung Grundschule Oldenfelde
Juli 1980	Umzug nach Berenbostel und Besuch der Grundschule Berenbostel
Mai 1992	Abitur am Gymnasium Berenbostel
Juli '92- Sept. '93	Wehrdienst in Hannover (SaM 15)
Berufsausbildung:	
Okt. '93- Okt. '97	Pharmaziestudium in Hamburg
14.02.-12.03.94	Famulatur Kronen-Apotheke Berenbostel
08.02.-07.03.95	Famulatur Apotheke der Krankenhäuser des Landkreises Hannover
01.11.97-30.04.98	Pharmaziepraktikum in der Qualitätskontrolle der Beiersdorf-Lilly GmbH
01.05.98-30.10.98	Pharmaziepraktikum in der Aesculap-Apotheke in Rostock
08.12.98	Abschluß der Pharmazeutischen Prüfung
18.01.99-30.04.00	Praktikum Drägerwerke Lübeck Grundlagenentwicklung Immunchemische Messverfahren
01.05.00-31.12.02	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie Universität Hamburg AK Prof. Duchstein Dissertation „ Nachweis von Amphetaminderivaten im Speichel mittels immunchromatographischer Teststreifen und enantioselektiver Kapillarelektrophorese“
SS 1999-SS 2002–	Betreuung des Praktikums 1. Semester „Qualitative anorganische Analyse“
WS 00/01-SS 2002	Betreuung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“ Teil 1 Elektrochemische Messverfahren