

# Anwendungsmöglichkeiten der Kapillarelektrophorese in der forensischen Toxikologie

**Michael Frost und Helga Köhler**

## **1. Einleitung**

Seit den 80er Jahren ist die Kapillarelektrophorese (CE), bezogen auf die Anzahl der Publikationen, eine der am schnellsten wachsenden Analysetechniken. Dabei erstrecken sich die Anwendungen auf verschiedenste Gebiete wie z.B. Biochemie (Peptide, Oligosaccharide), Molekularbiologie (DNA, RNA), Umweltanalytik (anorganische Ionen, Pestizide, Tenside), Zellbiologie (ganze Zellen, Bakterien, Viren) u.v.m. Einen großen Bereich nehmen auch die pharmazeutischen und biomedizinischen Wissenschaften ein. Die kapillarelektrophoretische Analytik forensisch relevanter Substanzen entwickelt sich dagegen deutlich langsamer.

Die vielseitige Anwendbarkeit der CE beruhen u.a. auf dem hohen Auflösungsvermögen, den kurzen Trennzeiten, dem geringen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln, dem sehr geringen Injektionsvolumen (wenige nl), der schnellen und einfachen Methodenentwicklung und den geringen Kosten für Verbrauchsmaterialien (insbesondere Kapillaren im Vergleich zu z.B. HPLC-Säulen).

## **2. Theoretische Grundlagen**

Das Prinzip der Elektrophorese, die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld, wurde erstmals von Kohlrausch (1897) untersucht und beschrieben. Die Elektrophorese als Trenntechnik wurde 1937 von Tiselius für die Trennung von Proteinen eingesetzt (Nobelpreis, 1948). Bei der Trennung in dünnen Röhren (Hjerten, 1967) ist die thermische Diffusion und Konvektion gering, und durch die Vergrößerung der Oberfläche ist ein schnellerer Abtransport der Jouleschen Wärme gewährleistet. Dadurch sind durch Anlegen höherer Feldstärken kürzere Analysenzeiten erreichbar. Mit der Verwendung einer offenen Quarzkapillare mit 75 µm I.D. und einer angelegten Spannung von 30000 V für die Trennung derivatisierter Aminosäuren und Peptide (Jorgenson, 1981) schlägt gewissermaßen die Geburtsstunde der heutigen CE [1,2].

Der Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes läßt eine Einteilung in Spannungsquelle, Trenneinheit -bestehend aus Kapillare und Puffern- und Detektor erkennen (Abb.1).

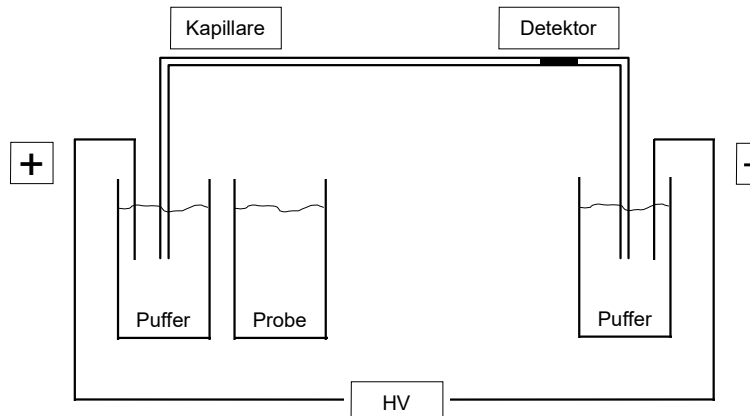


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur.

Die dünne Quarzkapillare mit einem Innendurchmesser von üblicherweise 50 oder 75  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 20 - 100 cm überbrückt die Puffergefäße, zwischen denen während der Trennung eine Spannung von bis zu 30000 V angelegt wird. Vorher wird ein relativ kurzer Probenpfropfen (wenige nl) zeitgesteuert in der Regel am anodischen Ende der Kapillare aufgegeben. Nach Anlegen der Spannung wandern die Teilchen entsprechend ihrer Ladung zu den jeweiligen Polen. Dabei ist die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit u.a. abhängig von der angelegten Spannung (U), der Kapillarlänge (l), dem Ladungs- Ionenradiusverhältnis (q/r) und der Temperatur (T) bzw. Viskosität ( $\eta$ ) (Abb. 2).

$$v = \mu \cdot E$$

$$= \frac{U}{l}$$

$$= \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

$$= A \cdot e^{\frac{b}{T}}$$

Abb. 2: Elektrophoretische

Wanderung.

Bei der Verwendung von Quarzkapillaren mit unbehandelter innerer Oberfläche wird die effektive elektrophoretische Mobilität immer von dem zur Kathode gerichteten elektroosmotischen Fluß (EOF) überlagert (Abb. 3).

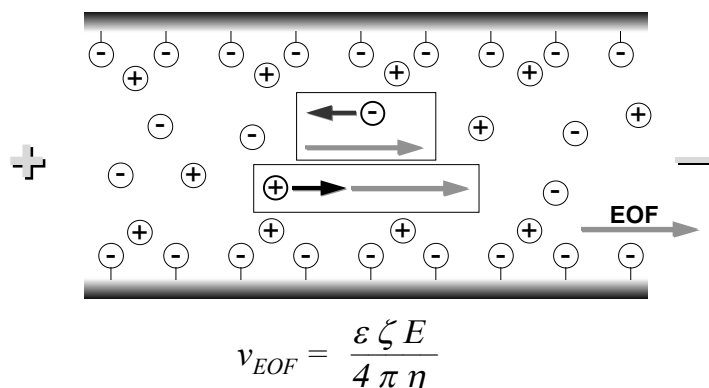


Abb. 3: Unterschiedliches Migrationsverhalten von Kationen und Anionen verursacht durch den EOF.

Die Elektroosmose beruht auf der Ausbildung einer Doppelschicht, die entsteht, wenn eine geladene Oberfläche mit einem Elektrolyten in Kontakt steht. An der durch Dissoziation der Silanolgruppen negativ geladenen Quarzoberfläche der Kapillare bildet sich eine im Vergleich zum übrigen Laufpuffer positive Doppelschicht aus. Diese besteht aus einer starren, direkt anliegenden und einer diffusen, weiter innen liegenden Schicht. Die frei beweglichen Ionen der diffusen Schicht wandern unter dem Einfluß des elektrischen Feldes. Aufgrund der Reibungskräfte veranlassen sie den gesamten Laufpuffer entsprechend seiner Viskosität mitzuströmen. Die Geschwindigkeit des EOFs ist proportional der Potentialdifferenz an der Doppelschicht, dem sog.  $\zeta$ -Potentials („zeta“-Potential). Die Ausbildung des  $\zeta$ -Potentials wiederum ist abhängig vom pH-Wert des Puffers. Bei hohem pH-Wert sind die Silanolgruppen fast vollständig dissoziiert, was zur Entstehung eines hohen  $\zeta$ -Potentials und damit zu einer hohen Geschwindigkeit des EOFs führt. Die letztendlich beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit der zu analysierenden Substanzen ergibt sich aus der vektoriellen Addition von elektrophoretischer und der elektroosmotischer Geschwindigkeit. Auf diese Weise ist bei hohen pH-Werten die gleichzeitige Analyse von Kationen und Anionen möglich.

Im Gegensatz zum laminaren, durch Druck verursachten Flußprofil, welches parabelförmig ist, bildet sich durch den EOF ein extrem flaches, stempel-förmiges Profil aus, welches zu wesentlich schmalen Peaks führt. (Abb. 4).

Die breite Anwendbarkeit der CE beruht u.a. auf der Vielzahl von Operationsmodi. Wie bei der herkömmlichen Elektrophorese sind auch bei der Kapillarelektrophorese folgende verschiedene Trennprinzipien zu unterscheiden: Kapillaronenelektrophorese (CZE), Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC), Kapillargelelektrophorese (CGE), Kapillarisotachophorese (cITP), Kapillarisoelektrische Fokussierung (cIEF) und Kapillarelektrochromatographie

(CEC). Die jeweiligen Techniken und Trennprinzipien sind in Tab. 1 zusammengestellt.

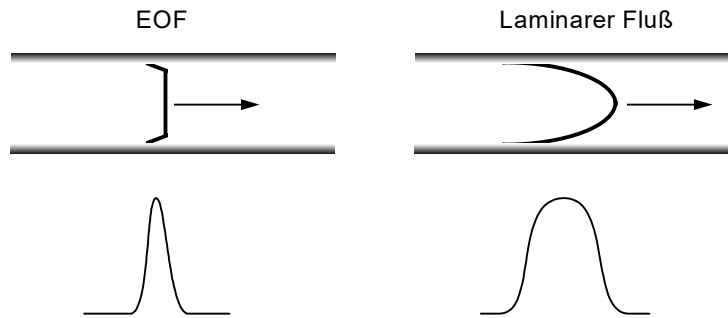


Abb. 4: Unterschiedliche Flußprofile und resultierende Peakformen.

Tab. 1: Trennprinzipien der CE

Technik	Trennung aufgrund
• CZE	Größe / Ladung
• MEKC	Wechselwirkung mit Mizelle
• CGE	Größe
• cITP	Mobilität zwischen Leit- u. Folgeelektrolyt
• cIEF	isoelektrischer Punkt
• CEC	Wechselwirkung mit stat. Phase

Die CZE, die am häufigsten angewandte Trenntechnik, ist die einfachste Form der CE, da die Kapillare in der Regel nur mit Puffer gefüllt ist. Die Trennung beruht auf den Mobilitätsunterschieden der einzelnen Substanzen, hervorgerufen durch Größe- und/oder Ladungsdifferenzen.

Bei der MEKC (Abb. 5) werden dem Puffer Detergenzien zugesetzt, die ab einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration, Mizellen bilden. Die neutralen Moleküle verteilen sich nach ihrer Hydrophobie zwischen Puffer und den Mizellen, die eine pseudo-stationäre Phase darstellen. Die Trennung beruht auf der Mobilität der meist negativ geladenen Mizelle (z.B. durch SDS = Na-dodecylsulfat) und dem Transport der Analyten außerhalb der Mizellen mit dem elektroosmotischen Fluß (Abb. 5). Aus diesem Verteilungsprozeß ergibt sich ein echtes chromatographisches Verfahren. Ohne die Wechselwirkungen mit den Mizellen würden die ungeladenen Verbindungen zusammen mit dem EOF migrieren.

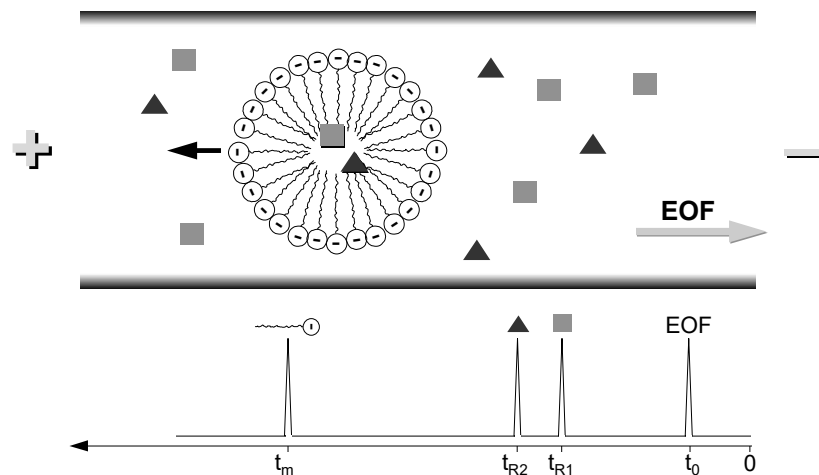


Abb. 5: Trennprinzip der MEKC.

Bei der CGE ist die Kapillare mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt. Die elektrophoretische Migration von Makromolekülen ist durch die Gelmatrix behindert. Der Transport der Probe durch die Kapillare beruht auf der Ladung, die Trennung jedoch auf der Größe der Makromoleküle.

Bei der cITP, der ältesten Kapillartrenntechnik, wandern die Zonen mit gleicher Geschwindigkeit zwischen einem Leit- und einem Folgeelektrolyten. Das Trennprinzip der cIEF beruht auf der Ausbildung eines pH-Gradienten durch den Zusatz von Ampholyten zum Puffer. Die Wanderung der Probe erfolgt bis zu ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt.

Als letztes sei die CEC zu nennen, der in der letzten Zeit immer mehr Aufmerksamkeit zugekommen ist. Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus HPLC und CE. Es sollen die Trennmöglichkeiten durch die stationären Phasen der HPLC und das hohe Auflösungsvermögen, hervorgerufen durch den elektrophoretischen und elektroosmotischen Transport, verbunden werden.

Die chirale Trennung von Substanzen mit der CE erfolgt in den meisten Fällen mit Hilfe von Cyclodextrinen. Das Trennprinzip ist am Beispiel von neutralen Cyclodextrinen in Abb. 6 dargestellt.

Bei Verwendung von meist sauren Puffern wandern die positiv geladenen Analyten in Richtung Kathode. Da keine Mobilitätsunterschiede zwischen R- und S-Enantiomer vorherrschen, erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlich starken Komplexbildungskonstanten zwischen Analyt und CD. Als andere chirale Selektoren bieten sich z. B. Kronenether, Proteine, chirale Metallkomplexe oder chirale Micellbildner (Cholate) an. Die eingesetzten Cyclodextrine sind entweder ungeladen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD und deren neutrale Derivatisierungsprodukte) oder ionisierbar (z. B. Carboxymethyl- oder Sulfobutylether-Verbindungen).

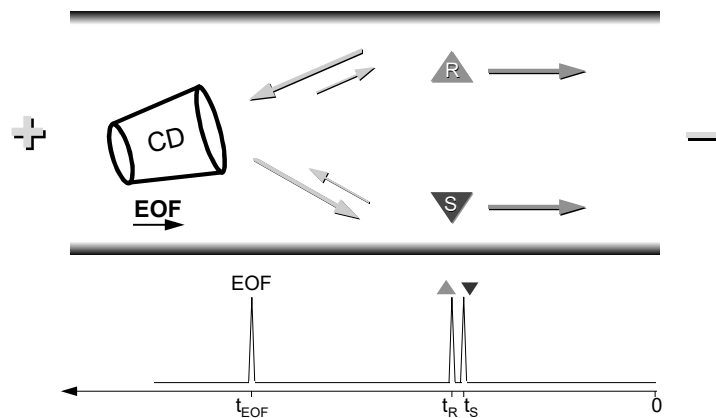


Abb. 6: Trennprinzip bei der chiralen Trennung mit neutralen Cyclodextrinen (CD).

### 3. Anwendungsmöglichkeiten

Bei der Anwendung der Kapillarelektrophorese muß man aus analytischer Sicht unterscheiden zwischen Bestimmungen von hohen und niedrigen Konzentrationen. Die Analytik aus Betäubungsmittelsicherstellungen ist aufgrund der relativ hohen Stoffkonzentrationen mit der CE kein Problem. Hier ist die CE vorteilhaft, wenn man kurze Trennzeiten und einen geringen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln berücksichtigt. Beispiele sind die Untersuchungen von Heroin- und Amphetaminproben (Kap. 3.1.)

Bei der Bestimmung aus Körperflüssigkeiten können Matrixbestandteile oder die geringe Konzentration der zu bestimmenden Substanz Schwierigkeiten hervorrufen. Bei hohen Wirkstoffgehalten kann eine einfache Probenvorbereitung (z.B. nur Proteinfällung mit Acetonitril) die Analysezeit verkürzen (Kap. 3.2.1.). Eine Empfindlichkeitssteigerung bei niedrigen Konzentrationen ist z.B. durch spezielle Injektions- und Detektionsverfahren zu erzielen. Die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF-) Detektion führt bei der LSD-Bestimmung zu einer Sensitivitäts- und Selektivitätssteigerung (Kap. 3.2.2.).

#### 3.1. Bestimmungen aus Betäubungsmittelsicherstellungen

Die Bestimmung aus Betäubungsmittelsicherstellungen nimmt einen großen Teil forensisch relevanter, kapillarelektrophoretischer Anwendungen ein. Eine gute Zusammenstellung über die Analyse sichergestellter Drogen wurde von I.S. Lurie verfaßt [3]. Die unseres Wissens erste Anwendung der CE auf die genannten Substanzen wurde 1991 von Weinberger und Lurie veröffentlicht [4]. Sie entwickelten ein MEKC-Methode, die zu einer Trennung von 18 Verbindungen

(u.a. Opiate, Amphetamine, Benzodiazepine, Cannabinoide) in weniger als 40 min führte (Abb. 7) und übertrug sie auf Heroin- und Cocainproben. Die Trennung erfolgte in einer 25 cm x 50 µm I.D. Kapillare bei einer angelegten Spannung von 20 kV. Als Puffer wurde ein Gemisch aus 85 mM SDS, 8,5 mM Phosphat, 8,5 mM Borat und 15 % Acetonitril, pH 8,5 verwendet.

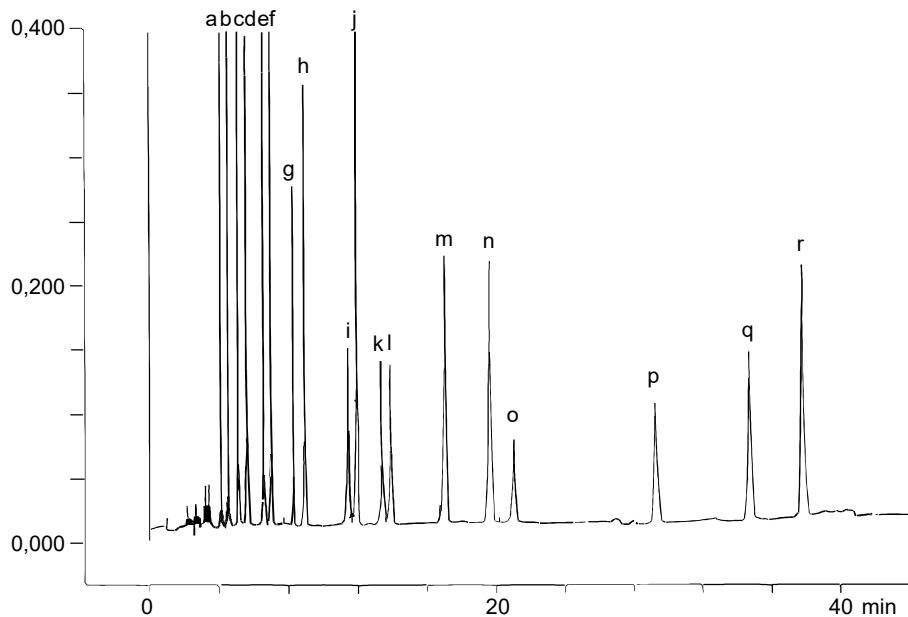


Abb. 7: MEKC forensic drug screen. (a) Psilocybin, (b) Morphin, (c) Phenobarbital, (d) Psilocin, (e) Codein, (f) Methaqualon, (g) LSD, (h) Heroin, (i) Amphetamin, (j) Chlordiazepoxid, (k) Cocain, (l) Methamphetamin, (m) Lorazepam, (n) Diazepam, (o) Fentanyl, (p) PCP, (q) Cannabidiol, (r)  $\Delta^9$ -THC, nach [4].

Eine Veränderung der Pufferzusammensetzung und der CE-Bedingungen führte zu einer Optimierung der MEKC-Technik v.a. für die Bestimmung von Heroin und Amphetaminderivaten. Als Beispiel sei hier die von Walker et al. [5] entwickelte Methode zur Untersuchung von Heroinproben (Abb. 8) genannt. Durch die Verwendung einer sehr kurzen Kapillare (27 cm) und der Absenkung der SDS-Konzentration auf 40 mM wurde Heroin innerhalb von 2 min detektiert. Weitere Heroinverunreinigungen konnten ebenso identifiziert werden.

Die CZE ist sehr gut geeignet, Amphetaminderivate in kurzer Zeit zu trennen (Abb. 9). Zur Untersuchung wurden Ecstasy-Tabletten und Amphetaminpulver homogenisiert, in verdünnter Salzsäure gelöst und unter Zusatz eines internen Standards (Phenylephrin) verdünnt.

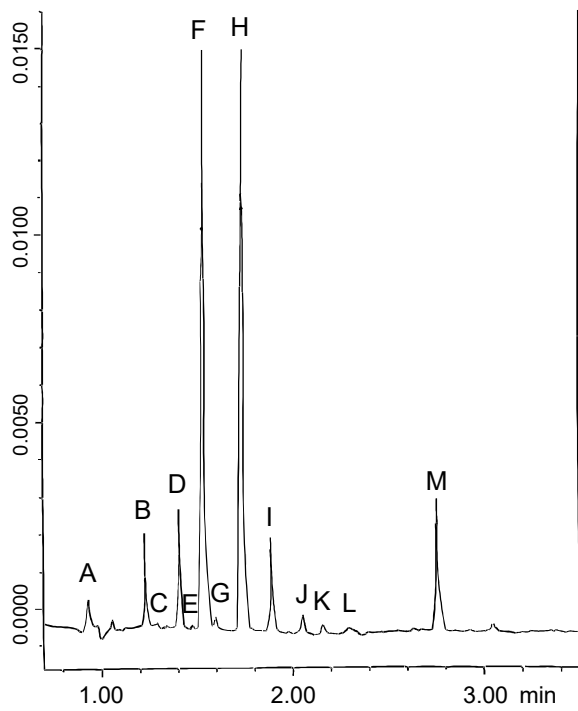


Abb. 8: Elektropherogramm einer Heroinprobe.  
 (A) Phenacetin,  
 (B) Coffein,  
 (C) Morphin,  
 (D) O<sup>6</sup>-Acetylmorphin,  
 (E) Codein,  
 (F) Methaqualon,  
 (G) Phenobarbital,  
 (H) N-propyl-p-hydroxybenzoesäure (interner Standard),  
 (I) Heroin,  
 (J) Acetylcodein,  
 (K) Papaverin,  
 (L) Thebain,  
 (M) Noscapin, nach [5].

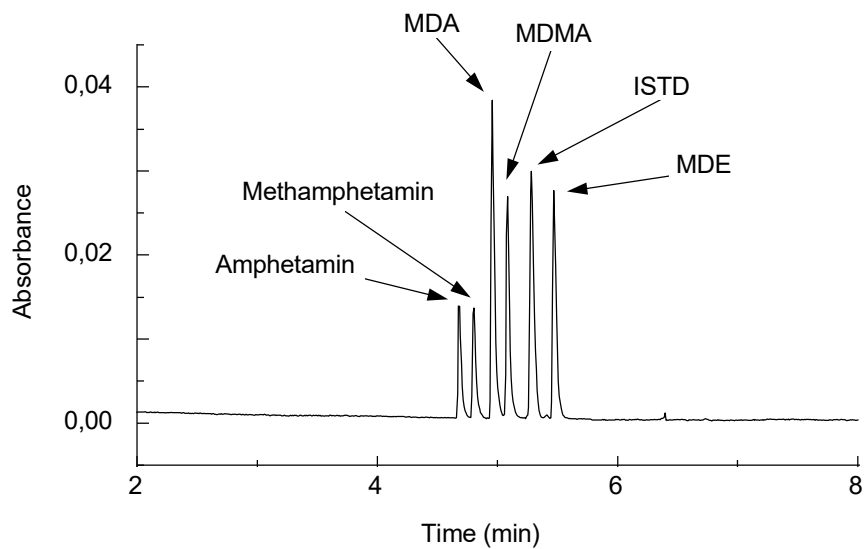


Abb. 9: CZE-Analyse von Amphetaminderivaten. Bedingungen: Kapillare: 47 cm (40 cm zum Detektor) x 50 µm I.D., Puffer: 100 mM Phosphat pH 2,2, Spannung: 23,5 kV, Detektion: 200 nm., ISTD=Phenylephrin.



Um die CE-Methode mit einer in der Routine angewandten HPLC-Methode zu vergleichen und auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurden insgesamt 56 Ecstasy-Tabletten und Pulver analysiert. Der Vergleich beider Verfahren ist in Abb. 10 dargestellt. Eine sehr gute Übereinstimmung der quantitativen Ergebnisse ist zu erkennen.

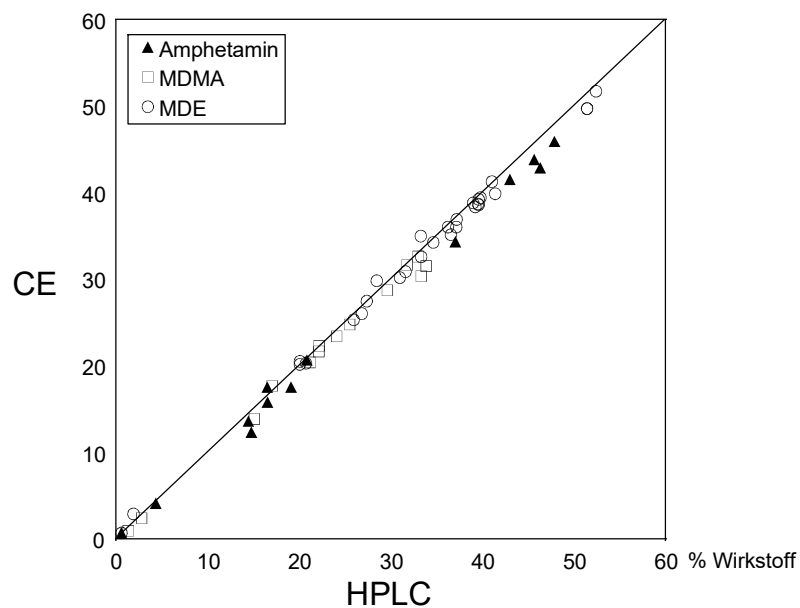


Abb. 10: Vergleich der mit CE und HPLC bestimmten Wirkstoffgehalte von Ecstasy-Tabletten und Pulvern (N=56).

### 3.2. Bestimmungen aus Körperflüssigkeiten

Bei der Analytik aus Körperflüssigkeiten bietet die CE immer dann Vorteile, wenn man z.B. eine aufwendige Probenvorbereitung umgehen, spezielle Detektionsverfahren wie z.B. laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF) anwenden oder das gute Auflösungsvermögen ausnutzen kann (z.B. Enantiomerentrennung).

#### 3.2.1. Beispiel: Dichlorpropintoxikation

Als Beispiel für die kapillarelektrophoretische Anwendung von höher konzentrierten Substanzen und der damit verbundenen vereinfachten Probenvorbereitung dient die CE-Bestimmung von Dichlorprop (Abb. 11) in Körperflüssigkeiten und Organen bei einem suizidalen Vergiftungsfall [7].

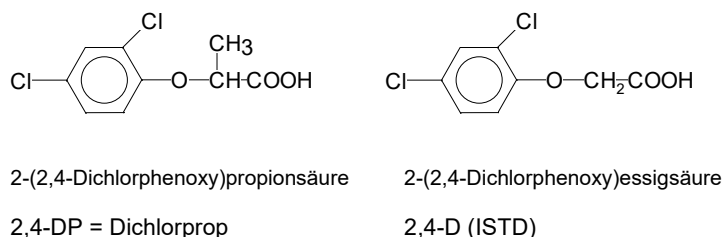


Abb. 11: Strukturformeln von Dichlorprop (2,4-DP) und dem internen Std. (2,4-D)

Nachdem durch GC-MS-Untersuchungen in Magenspülflüssigkeit, Urin und Vollblut im Rahmen einer general unknown-Analyse Dichlorprop nachgewiesen worden war, wurde die Wirkstoffbestimmung mit jeweils optimierten HPLC- und CE-Methoden durchgeführt. Die Probenvorbereitung für Vollblut und Galle bestand bei anschließender Kapillarelektrophorese lediglich in einer Proteinfällung mit Acetonitril. Eine Übertragung der einfachen ACN-Fällung als Probenvorbereitung für die HPLC ist nicht zweckmäßig, da selbst bei Verwendung von Vorsäulen die Chromatogramme reich an Matrixpeaks und außerdem unreproduzierbar waren. Für die HPLC-Bestimmung war die aufwendigere Festphasenextraktion unumgänglich. Sie besteht aus den Schritten Säulenconditionierung, Verdünnen und Zentrifugieren der Probe, Probenaufgabe, verschiedenen Waschschritten, Trocknen der Festphase und Probenelution. Die Organe Leber, Niere, Milz und Gehirn wurden jeweils zunächst einer enzymatischen Proteinspaltung mit der Protease Subtilisin unterworfen. Aliquote Teile wurden für die HPLC wiederum zur Festphasenextraktion eingesetzt, während bei der CE eine einfache Diethyletherextraktion ausreichte. Als Beispiele sind in Abb. 12 die Elektropherogramme eines Herzblut- und eines Leberextraktes dargestellt.

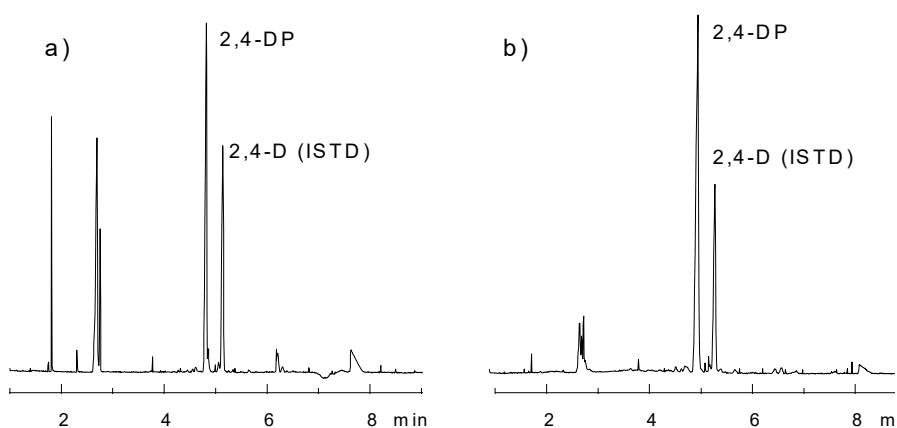


Abb. 12: Elektropherogramme von einem a) Herzblut- und b) Leberextrakt. Bedingungen: Kapillare: 47 cm (40 cm zum Detektor) x 50  $\mu$ m I.D., Puffer: 50 mM Phosphat pH 6,4, Spannung: 25 kV, Injektion: hydrodynamisch, 5 sec., Detektion: 200 nm, [7].

Die in Tab. 2 zusammengestellten Konzentrationen der bei der Obduktion asservierten Proben zeigen eine gute Übereinstimmung beider Untersuchungsverfahren.

Tab. 2: Vergleich der mit HPLC und CE ermittelten Dichlorpropkonzentrationen in verschiedenen Leichenasservaten (in  $\mu\text{g/g}$ ).

Leichenasservate	HPLC	CE
• Mageninhalt	nicht nwb.	nicht nwb.
• Herzblut	350	354
• Gallenflüssigkeit	372	386
• Milz	430	402
• Leber	619	605
• Niere	413	397
• Gehirn	113	116

### 3.2.2. Beispiel: LSD mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion

Ein Nachteil der CE im Vergleich zur HPLC ist die geringe Empfindlichkeit bei der UV-Detektion. Am Beispiel der Bestimmung von LSD in Vollblut werden Möglichkeiten aufgezeigt, die Empfindlichkeit zu steigern [8]. Grundsätzlich ist die Steigerung der Empfindlichkeit technisch sowohl im Bereich der Detektion als auch der Probenaufgabe möglich.

Die gewöhnlich in der CE verwendeten Kapillaren besitzen einen Innendurchmesser von 50 oder 75  $\mu\text{m}$ . Bei Absorptionsdetektoren ist die Limitierung der Empfindlichkeit durch das Lambert-Beer'sche Gesetz gegeben und damit proportional der durchstrahlten optischen Weglänge. Hieraus wird deutlich, daß die kritische Größe generell der Kapillarinne Durchmesser ist. Eine blasenförmige Aufweitung des Kapillarinne im Bereich des Detektorfensters, die sog. Bubble Cell Kapillare (Abb. 13), führt zu einer Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 2-3.

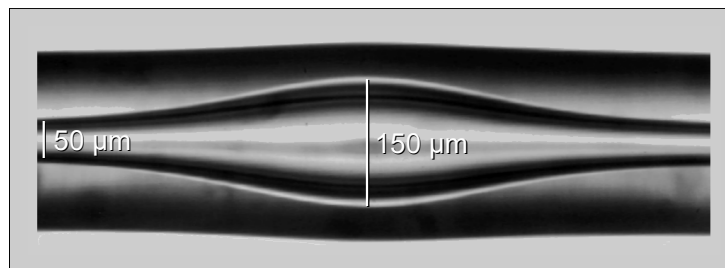


Abb. 13: Extended light path (Bubble Cell) Kapillare.

Eine weitere, gerade für LSD entscheidene Möglichkeit der Empfindlichkeitssteigerung auf der Detektorseite bietet die Fluoreszenzdetektion. Um die erforderliche Energie auf das geringe Kapillarvolumen zu bündeln, ist der laserinduzierte Fluoreszenz-Detektor (abgekürzt: LIF-Detektor) die geeignetste Lösung. Leider stehen nicht für alle gewünschten Anregungswellenlängen die entsprechenden Laserquellen zur Verfügung. Die gebräuchlichsten Laser mit den jeweiligen Anregungswellenlängen sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: verschiedene Laser für die CE.

Energiequelle	$\lambda_{\text{Ex}}$
Argon Ionen Laser	488
Helium Cadmium Laser	325 / 442
Diodenlaser	635

Der HeCd-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm ist für die Bestimmung von LSD, das ein UV-Absorptionsmaximum bei ca. 320 nm aufweist (Abb. 14) geradezu ideal. Die Fluoreszenzausbeute beim Emissionsmaximum von ca. 435 nm ist u.a. abhängig von dem verwendeten Puffersystem. Aus diesem Grunde wurde für die Bestimmungen des LSDs ein Citrat-Puffer ausgewählt.

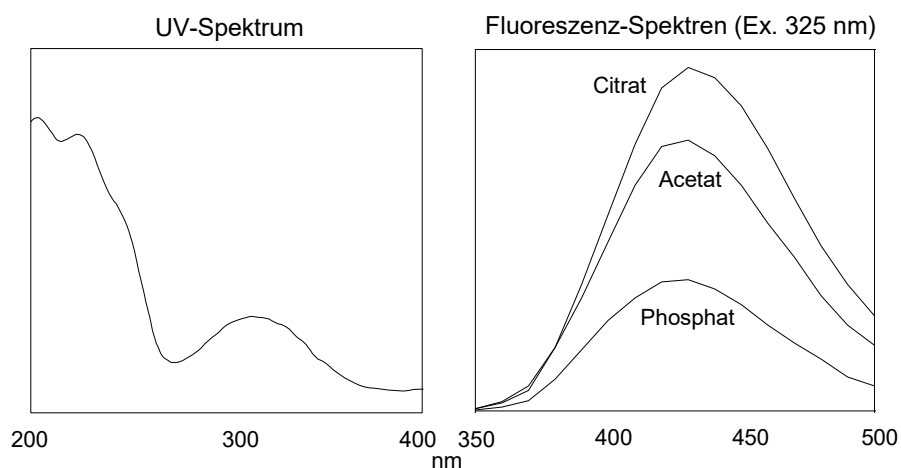


Abb. 14: UV- und Fluoreszenz-Spektren von LSD.

Auf der Injektorseite besteht die Möglichkeit, die Nachweisgrenze herabzusetzen, indem die üblich verwendete hydrodynamische Injektion durch die elektrokinetische Injektion ersetzt wird. Während bei der hydrodynamischen Injektion

die Probe mit Druck auf die Kapillare gebracht wird, erfolgt bei der elektrokinetischen Injektion die Probenaufgabe durch Anlegen einer Hochspannung an das Probengefäß. Die injizierte Analytmenge hängt bei dieser Injektionsart stark von der Probenmatrix und deren Leitfähigkeit ab. Je höher der Anteil und die Mobilität der Matrixionen, desto geringer ist die applizierte Analytmenge. Ist die Probe aber in Wasser oder Methanol gelöst, wird der Analyt (in diesem Fall das LSD) bis zur Grenzschicht an der mit Puffer gefüllten Kapillare beschleunigt und dort stark angereichert. Diesen Verfahren nennt man Electrostacking (Abb. 15).

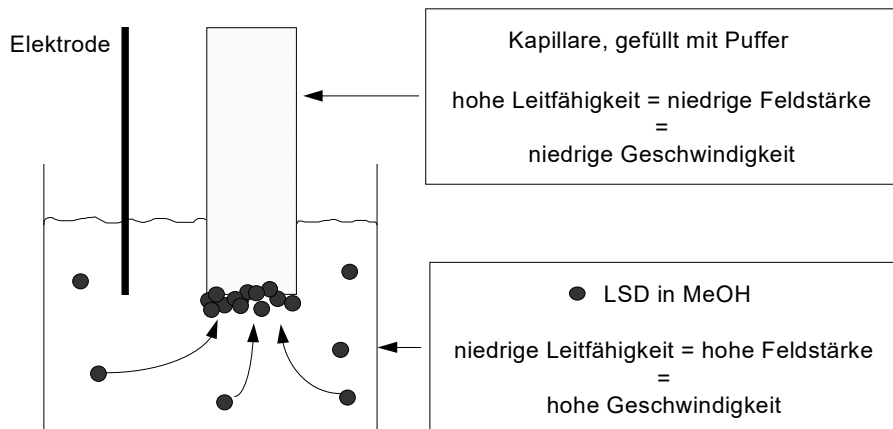


Abb. 15: Schematische Darstellung der elektrokinetischen Injektion/Electrostacking.

Vorteil der elektrokinetischen, im Vergleich zur hydrodynamischen Injektion ist also die Erhöhung der in die Kapillare gebrachten Analytmenge. Eine Steigerung der Empfindlichkeit bis zu dem Faktor 100 kann erreicht werden. Nachteil ist allerdings u.a. die deutliche Abhängigkeit von der Matrix und folglich, v.a. bei einer Aufkonzentrierung, von der Probenvorbereitung. Es resultiert eine schlechtere Reproduzierbarkeit, die allerdings mit Hilfe eines internen Standards zu relativieren ist.

Basierend auf den genannten Parametern wurden Probenvorbereitung und die kapillarelektrophoretischen Bedingungen für die Bestimmung von LSD in Vollblut entwickelt. Ziel der Probenvorbereitung war die Gewinnung möglichst matrixarmer und homogener Extrakte, um während der elektrokinetischen Injektion die injizierte Analytmenge möglichst reproduzierbar zu halten. Nach Eiweißfällung von 2 ml Blut mit ACN und waschen bei pH 4 mit n-Hexan wurde nach Alkalisierung mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Der in 50 µl Methanol aufgenommene Extrakt wurde elektrokinetisch für 10 sec mit 10 kV auf eine 50 µm Bubble Cell Kapillare injiziert. Zur Detektion diente ein LIF-Detektor mit HeCd-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm und einer Emission bei 435 nm.

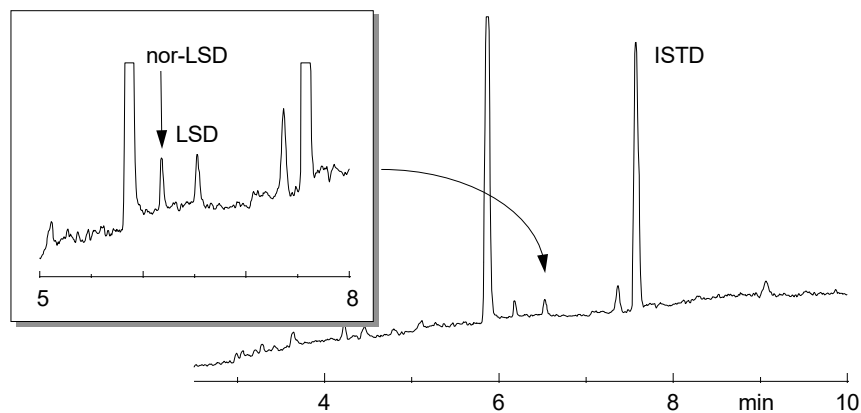


Abb. 16: Elektropherogramm einer gespikten Vollblutprobe. Konzentration von LSD, Nor-LSD beträgt 0,2 ng/ml. Bedingungen: Kapillare: 37 cm (30 cm zum Detektor) x 150 µm I.D. am Detektor (Bubble Cell), Puffer: 250 mM Citronensäure/Na-Acetat pH 4,0 / MeOH (30:70, v/v), Spannung: 25 kV, Injektion: elektrokinetisch, 10 kV, 10 sec., Detektion: LIF, Ex. 325 nm., Em. 435 nm, [8].

Abb. 16 zeigt das Elektropherogramm einer gespikten Vollblutprobe. Die Konzentration von LSD und Nor-LSD beträgt 0,2 ng pro ml Vollblut. Man befindet sich mit dieser Konzentration im Bereich der Nachweisgrenze dieser Methode und vergleichbarer HPLC-Methoden. Mit dem validierten kapillarelektrophoretischen Verfahren wurden radioimmunologische Untersuchungen von Blut von Personen mit Verdacht auf LSD-Konsum qualitativ und quantitativ bestätigt. Wir haben demnach mit der CE in der hier vorgestellten Spezifizierung eine weitere, orthogonale Technik zur Absicherung von immunologisch positiven LSD Befunden.

### 3.2.3. Beispiel: Enantioselektive Bestimmung von Methadon

Für die chirale Trennung von Substanzen bietet gerade die CE enorme Vorteile gegenüber anderen Verfahren. Zum einen kommt die hohe Trenneffizienz der Kapillarelektrophorese zum Tragen, zum anderen kann durch einfaches Zumischen des chiralen Selektors zum Puffer eine sehr schnelle Methodenentwicklung erfolgen und der für die jeweiligen Substanzen optimale Selektor ausgewählt werden. Desweiteren sei die Kosteneinsparung zu nennen. Bei der chiralen Trennung mit der HPLC müssen im Vergleich dazu mehrere sehr teure Säulen eingesetzt werden, die zudem äußerst empfindlich und pflegeintensiv sind.

Zur enantioselektiven Bestimmung von Methadon [9] und dem Hauptmetaboliten EDDP wurde Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin (DIMEB) eingesetzt. Auch andere, verwendete Cyclodextrine führten zu einer Enantiomeren-trennung von Methadon; EDDP allerdings wurde in selteneren Fällen angetrennt.

Für die Analyse wurden Serum- und Urinproben einer einfachen alkalischen Extraktion unterzogen. Nach dem Einengen wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und elektrokinetisch injiziert (s. Beispiel LSD, Abb. 15).

Die entwickelte CE-Methode wurde validiert und auf verschiedene Serum- und Urinproben von Patienten, die mit rac- oder R-Methadon (= L-Polamidon<sup>®</sup>) substituiert wurden, angewendet. Die jeweiligen Elektropherogramme sind in den Abb. 17 und 18 dargestellt.

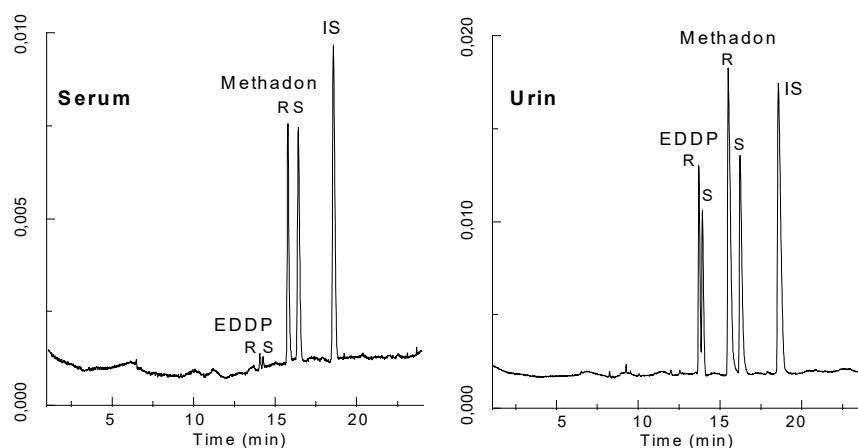


Abb. 17: Elektropherogramme einer Serum- und einer Urinprobe nach rac-Methadonbehandlung. Bedingungen: Kapillare: 47 cm (40 cm zum Detektor) x 50 µm I.D., Puffer: 100 mM Phosphat pH 2,3, DIMEB 2 mM, 10 % MeOH, Spannung: 20 kV, Injektion: elektrokinetisch, 10 kV, 4 sec., Detektion: 200 nm, [9].

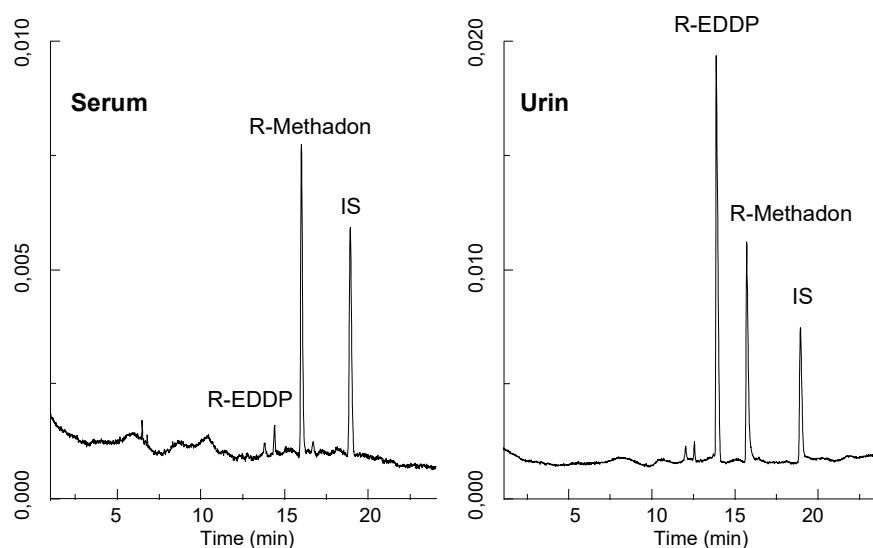


Abb. 18: Elektropherogramme einer Serum- und einer Urinprobe nach R-Methadonbehandlung. Bedingungen: s. Abb. 17.

Bei Patienten, die sich in einem Methadonsubstitutionsprogramm befinden ist immer mit dem Beigebrauch von Drogen oder anderen zentral wirksamen Arzneistoffen zu rechnen. Insbesondere der Konsum von Kokain, anderen Opiaten, Amphetaminderivaten oder Benzodiazepinen muß bei der Analyse von Methadon berücksichtigt werden. Aus diesem Grunde wurde die für Methadon entwickelte Methode hinsichtlich der Comigration der genannten Substanzen überprüft (Abb. 19).

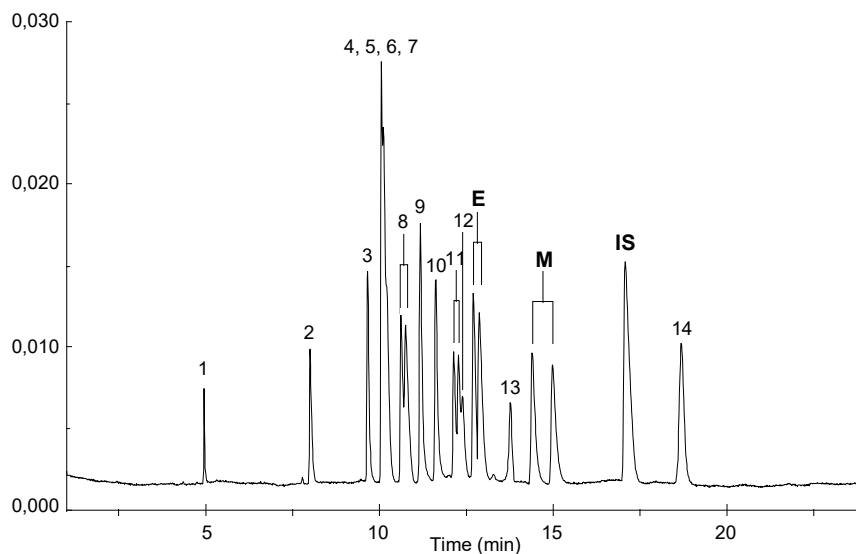


Abb. 19: Elektropherogramm eines „Beigebrauch“-Standards. Bedingungen: s. Abb. 17. (M) Methadon, (E) EDDP, (IS) int. Std. Diphenhydramin, (1) Nikotin, (2) Aminoflunitrazepam, (3) Amphetamin, (4) MDA, (5) Codein, (6) Morphin, (7) Dihydrocodein, (8) MDMA, (9) N-desmethyldiazepam, (10) Diazepam, (11) MDE, (12) Cocain, (13) Bromazepam, (14) Benzoylcegonin, [9].

### 3.3. Bestimmungen aus Haaren

#### *Beispiel: Enantioselektive Bestimmung von Methadon*

Ein weiterer Anwendungsbereich der Kapillarelektrophorese ist in der Haaranalytik zu finden. Mit der in Kap. 3.2.3. für die enantioselektive Bestimmung von Methadon beschriebenen Methode wurden Haarextrakte untersucht, die durch einfache Methanolextraktion erhalten worden sind. Die Haarproben wurden für die Analyse mit Methanol und Aceton gewaschen. 50 mg Haar wurde nach Zugabe von 200 ng Diphenhydramin als interner Standard 5 h mit 4 ml Methanol extrahiert. Nach Zentrifugieren und Einengen des Überstandes wurde der Rückstand in 500 µl Methanol aufgenommen und direkt, ohne weitere Aufreinigung oder Derivatisierung, in die CE injiziert.



In einer Haarprobe eines Patienten, der mit R-Methadon behandelt wurde, konnten 11 ng/mg R-Methadon nachgewiesen werden (Abb. 20). Gleichzeitig wurde mit dieser Methode nachgewiesen, daß der Betroffene Cocainmißbrauch betrieb.

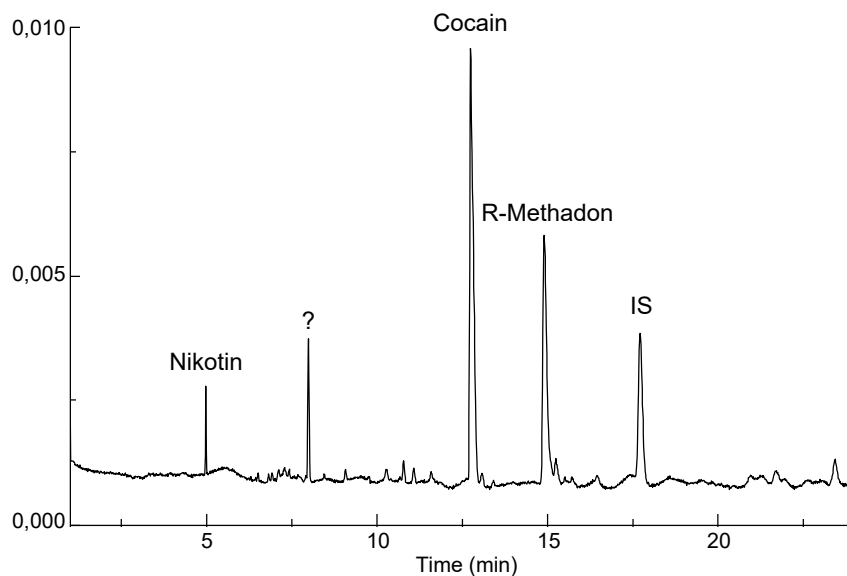


Abb. 20: Elektropherogramm einer Haarprobe nach einfacher Methanolextraktion. Bedingungen: s. Abb. 17.

#### 4. Literatur

- [1] D. N. Heiger: High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction. Hewlett Packard, Waldbronn (1992)
- [2] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt: Kapillarelektrophorese Methoden und Möglichkeiten. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsges. mbH, Braunschweig/Wiesbaden (1994)
- [3] I. S. Lurie: Analysis of seized drugs by capillary electrophoresis. In J. A. Adamovics (ed.) Analysis of Addictive and Misused Drugs, Marcel Dekker, New York (1994).
- [4] R. Weinberger, I. S. Lurie: Micellar electrokinetic capillary electrophoresis of illicit drug substances. Anal. Chem. 63 (1991) 823-827.
- [5] J. A. Walker, S. T. Krueger, I. S. Lurie, H. L. Marché, N. Newby: Analysis of heroin drug seizures by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). J. Forensic Sci. 40 (1994) 6-9.
- [6] M. Frost, H. Köhler, G. Blaschke: Analysis of "Ecstasy" by capillary electrophoresis. Int. J. Legal Med. 109 (1996) 53-57.

- [7] A. West, M. Frost, H. Köhler: Comparison of HPLC and CE for the analysis of dichorprop in a case of intoxication by Certrol. Submitted in Int. J. Legal Med.
- [8] M. Frost, H. Köhler, G. Blaschke: Determination of LSD in blood by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J. Chromatogr. B, in press.
- [9] M. Frost, H. Köhler, G. Blaschke: Enantioselective determination of methadone and its main metabolite EDDP in serum, urine and hair by capillary electrophoresis. Electrophoresis, in press.

Michael Frost  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Institut für Rechtsmedizin  
Von-Esmarch-Str. 86  
D-48149 Münster