

SOLUTIONS BY



# Bestimmung von Drogen und Arzneistoffen in menschlichem Gehirn via bidirektionaler Festphasenextraktion

Dr. Birgit Reiter,  
Dr. Thomas Stimpfl  
Medizinische Universität Wien

## Inhalt

1.	Einführung .....	3
2.	Methodenentwicklung .....	4
2.1	Reagentien und Materialien .....	4
2.2	Probenvorbereitung .....	5
2.3	Geräte .....	5
2.3.1	Das Robotiksystem FREESTYLE .....	5
2.3.2	Bidirektionale SPE (BD-SPE) mit FREESTYLE SPE .....	6
2.3.3	Beschreibung der bidirektionalen SPE (BD-SPE) .....	6
2.3.4	Software Protokoll .....	8
2.3.5	GC-MS Messung .....	9
3.	Ergebnisse .....	9
4.	Zusammenfassung .....	9

## 1. Einführung

Im Rahmen von forensischen Untersuchungen werden zur Klärung der Frage, ob Drogenmissbrauch oder andere toxische Substanzen eine Rolle gespielt haben, menschliche post-mortem Gewebeproben erfolgreich via Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction – SPE) analysiert.

In der folgenden Applikationsnote ist ein neues automatisiertes Verfahren, die sogenannte bidirektionale SPE (BD-SPE), beschrieben. Dieses besondere Verfahren wird durchgeführt, wenn entweder Matrices untersucht werden, die aufgrund ihres hohen Fett- und Proteingehalts schwierig zu bearbeiten sind, wie beispielsweise Gehirn, oder Kreuzkontamination aufgrund der Einmaligkeit der extrahierten Probe ausgeschlossen werden muss.

Kurz zusammengefasst werden bei dem Verfahren handelsübliche 3 mL SPE Kartuschen eingesetzt, die die Standard-Schritte des Konditionierens, Waschens, Trocknens und Eluierens durchlaufen. Der kritische Schritt des Ladens, bei dem die Matrix normalerweise mit dem Robotiksystem in Berührung kommt, wird jedoch in umgekehrter Richtung durchgeführt. Das heißt, dass die homogenisierte und gepufferte Probe, z. B. Hirngewebe, nicht von oben auf die Kartusche geladen wird, sondern über die Luer-Spitze in das Sorbens gesaugt wird. Da die aufgesaugte Probe danach in „normaler“ Richtung abgegeben wird, kommt sie zu keinem Zeitpunkt mit dem Robotiksystem in Berührung. Darüber hinaus durchläuft die Probe das Sorbens zweimal. Aus diesem Grund ist das Verfahren bidirektionale SPE genannt worden.



## 2. Methodenentwicklung

### 2.1 Reagentien und Materialien

- 0,05 M Phosphatpuffer pH 7.4 p.a.
- Wasser p.a.
- 0,1 N Essigsäure p.a.
- Ethylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Triethylamin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethylacetat/Isopropanol (3/1, v/v)
- Ethylacetat/Isopropanol/Triethylamin (75/25/3, v/v/v)
- MSTFA (MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland)
- Evolute CX-50 Kartuschen (50 mg, Biotage, Uppsala, Schweden)
- Standards in einer von der Arbeitsgruppe zur Extraktion der GTFCh (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie) empfohlenen Zusammensetzung. Alle Standards in Methanol in einer Konzentration von 1 mg/mL. Für niedrig konzentrierte Kontrollproben wurden 50 ng/g Gewebe für basische, und 500 ng/g für neutrale/saure Substanzen vor der Extraktion zur Probe hinzugefügt; für hochkonzentrierte Kontrollproben waren die Level 10 mal höher.
  - Benzoylecgonin (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Amphetamin (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Kokain (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Codein (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Diazepam (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Morphin (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Doxepin (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Metoprolol (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Methadon (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Phenobarbital (Lipomed, Arlesheim, Schweiz)
  - Ibuprofen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

## 2.2 Probenvorbereitung

2 g Gehirn wurden gründlich homogenisiert, z. B. in einem IKA 15 mL Gefäß (IKA, BMT-20-S Mischgefäß mit 6 Edelstahlkugeln) mit einem Turrax Tube Drive (IKA, Staufen, Deutschland). Zu 0,5 g der homogenisierten Probe wurden 5,5 mL Phosphatpuffer pH 7.4 hinzugefügt. Dann wurde die Probe für 5 Min. im Ultraschallbad behandelt und bei 600 x g für 20 Min. zentrifugiert.

0,1 mL der Standard Testmischung in Methanol wurde zu den 0,5 mL Phosphatpuffer pH 7.4 hinzugefügt, um jegliche Präzipitation zu verhindern. Dieses Gemisch wurde danach zu der Probe hinzugefügt und bei höchster Geschwindigkeit für 1 Min. vermischt.

## 2.3 Geräte

### 2.3.1 Das Robotiksystem FREESTYLE

Das FREESTYLE-System ist ein vollautomatisches Probenvorbereitungssystem und wird in nahezu allen Bereichen eingesetzt, die eine intensive Probenvorbereitung erfordern. Dies gilt für Nahrungs- und Futtermittelproben, für Umwelt- und pharmazeutische Proben, beim Drogenscreening und ebenso für forensische und toxikologische Proben.

Das System basiert auf der FREESTYLE BASIC Plattform, die abhängig von dem gewünschten Einsatzzweck mit unterschiedlichen Modulen ausgestattet werden kann – für diese Applikation mit dem FREESTYLE SPE Modul.

Die Racks für die Probengefäße und Vials werden in die Kammleiste des Robotiksystems eingehängt. Die Position der Racks ist nicht vorgegeben, aber im Fall der BD-SPE werden die Proben neben leere Vials in ein und dasselbe Rack gestellt.

Alle Module des FREESTYLE Systems werden über eine einfach zu bedienende Software mit einer Benutzeroberfläche gesteuert. Um die bidirektionale SPE nutzen zu können, wird ein Software Update benötigt.



SPE Modul – Robotik Arm



Einhängen der Racks

## 2.3.2 Bidirektionale SPE (BD-SPE) mit FREESTYLE SPE

Die unten aufgeführten Komponenten werden für die automatisierte Durchführung der BD-SPE mit dem FREESTYLE SPE benötigt. Die gepufferten, gespikten und homogenisierten Proben werden in ein 10 mL Vial überführt. Das System wird mit 3 mL Kartuschen, leeren 10 mL Vials sowie leeren Vials für die Eluate ausgestattet.

1. FREESTYLE BASIC	Produktnr. 12663-12
2. FREESTYLE SPE	Produktnr. 12668
3. Rack für Lösemittelversorgung	Produktnr. 13156
4. Rack für bis zu 18 SPE-Säulen	Produktnr. 13946-AD
5. Greifring für Standard 3 mL Säule	Produktnr. 14892
6. Kappen für 3 mL Säulenformat	Produktnr. 14862
7. Träger für Racks (100 mm)	Produktnr. 11915 (2 x benötigt)
8. Probenrack für 30 Reagenzröhrchen 75 x 12mm	Produktnr. 12117 (2 x benötigt)
9. Probenrack für 18 x 10 mL-Vials	Produktnr. 14711 (2 x benötigt)
10. Rollrandflasche, flacher Boden, 10 mL	Produktnr. V0010
11. Software upgrade	Produktnr. 14773

Die 5 mL 75 x 12 mm Reagenzgefäße können über jeden örtlichen Lieferanten bestellt werden.

Nach der Bearbeitung werden die Eluate mit einem Vakuum-Konzentrator (Christ Alpha RVC, Osterode am Harz, Deutschland) bis zur Trockene evaporiert. Der verbleibende Rückstand wird in 50 µL Ethylacetat wieder gelöst und via GC-MS gemessen. Nach der ersten Messung wird die Probe nochmals evaporiert und mit 50 µL MSTFA (20 Min. bei 80 °C) für einen zweiten GC-MS-Lauf derivatisiert.

## 2.3.3 Beschreibung der bidirektionalen SPE (BD-SPE)

Der Robotikarm des FREESTYLE Systems nimmt die SPE Kartusche und bewegt sie über das Probengefäß. Die SPE Kartusche taucht mit der Luer Spitze in die Probe und saugt diese von unten nach oben auf, wodurch sie das Sorbens passiert. Der Robotikarm bewegt danach die Kartusche zu dem leeren Vial auf der Plattform, das neben dem Probengefäß platziert ist. Dort wird die Probe von oben nach unten durch das Sorbens wieder abgegeben. Die Probe steht für weitere Analysen zur Verfügung.

Der beschriebene Vorgang kann für einen quantitativen Transfer bis zu drei Mal wiederholt werden.





BD-SPE: Die Probe wird von unten nach oben durch das Sorbens aufgesaugt und in entgegengesetzter Richtung wieder abgegeben.




Standard Elutionsschritt



Der Robotikarm stellt die benutzten Kartuschen zurück in das Rack.

## 2.3.4 Software Protokoll

Die folgende Einstellung der Software kann ausgewählt werden, um die Proben auf dem FREESTYLE System mit dem Verfahren der BD-SPE zu bearbeiten. Die Methode ist bereits definiert und in der FREESTYLE Software gespeichert. Sie kann bei Bedarf abgeändert und unter neuem Namen abgespeichert werden.

	
AUTOMATISIERTE PROBEVORBEREITUNG	
LCTech FreeStyle - Bericht zu Methoden: SPE      Datum: 08.06.2016    Zeit: 10:29:20	
<b>Name: method_evolute_7.spe</b> SPE Säulentyp: LCTech_3ml.col	
Verlängerungs- spitze:	nein
Verarbeitungsgeschwindigkeit:	Standard (organische LM)
Spülintensität:	Standardspülzyklus
Bei Laden und Waschen Maximaldruck überwachen:	nein
<b>Schritt: Konditionieren</b> Basistyp: Konditionieren      Schritt - ID: 695	
Volumen: 4 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 15 ml/min Wiederholungen: 2      Wartezeit nach Dosierung: 10 sec.	Abgabe Geschwindigkeit: 5 ml/min      Port: 8 (phosphate buffer) Wartezeit nach Schritt: 5 sec.      Abgabe: In Abfall
<b>Schritt: Trocknen</b> Basistyp: Trocknen - Trocknung mit definiertem Luftvolumen      Schritt - ID: 682	
Luftvolumen: 20 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 100 ml/min	Abgabe Geschwindigkeit: 70 ml/min      Abgabe: In Abfall
<b>Schritt: Laden</b> Basistyp: Laden - Transfer Proben-Aliquot über Spitze SPE-Säule      Schritt - ID: 670	
Volumen: 5 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 5 ml/min Glas Typ: Type1@10      Wartezeit nach Dosierung: 60 sec.	Abgabe Geschwindigkeit: 1 ml/min      Wartezeit nach Schritt: 150 sec. Abgabe: In Gläser      Glasanzahl: 1 ohne Nachspülen      Glas Typ: Type1@10
<b>Schritt: Waschen</b> Basistyp: Waschen      Schritt - ID: 671	
Volumen: 9.5 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 20 ml/min Wiederholungen: 0      Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. Trocknungszeit: 50 min	Abgabe Geschwindigkeit: 5 ml/min      Port: 1 (Wasser) Wartezeit nach Schritt: 0 sec.      Abgabe: In Abfall
<b>Schritt: Trocknen</b> Basistyp: Trocknen - Trocknung mit definiertem Luftvolumen      Schritt - ID: 683	
Luftvolumen: 10 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 100 ml/min	Abgabe Geschwindigkeit: 50 ml/min      Abgabe: In Abfall
<b>Schritt: Waschen</b> Basistyp: Waschen      Schritt - ID: 672	
Volumen: 3.5 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 15 ml/min Wiederholungen: 0      Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. Trocknungszeit: 50 min	Abgabe Geschwindigkeit: 5 ml/min      Port: 10 (1 M Acetic acid) Wartezeit nach Schritt: 0 sec.      Abgabe: In Abfall
<b>Schritt: Trocknen</b> Basistyp: Trocknen - Trocknung mit Stickstoff über definierte Zeit      Schritt - ID: 684	
Trocknungszeit mit Stickstoff 120 sec.	Abgabe: In Gläser      Glasanzahl: 1 Glas Typ: Type1@8
<b>Schritt: Eluieren</b> Basistyp: Eluieren      Schritt - ID: 673	
Volumen: 3 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 10 ml/min Wiederholungen: 0      Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. Trocknungszeit: 0 min	Abgabe Geschwindigkeit: 0.5 ml/min      Port: 7 (EA/IP 3:1) Wartezeit nach Schritt: 40 sec.      Abgabe: In Gläser      Glasanzahl: 1 Glas Typ: Type1@8
<b>Schritt: Trocknen</b> Basistyp: Trocknen - Trocknung mit definiertem Luftvolumen      Schritt - ID: 685	
Luftvolumen: 20 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 100 ml/min	Abgabe Geschwindigkeit: 50 ml/min      Abgabe: verbleibe an Ort und Stelle
<b>Schritt: Eluieren</b> Basistyp: Eluieren      Schritt - ID: 674	
Volumen: 3 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 10 ml/min Wiederholungen: 0      Wartezeit nach Dosierung: 0 sec. Trocknungszeit: 0 min	Abgabe Geschwindigkeit: 0.5 ml/min      Port: 9 (EA/IP/TEA) Wartezeit nach Schritt: 0 sec.      Abgabe: In Gläser      Glasanzahl: 1 Glas Typ: Type1@8
Luftvolumen: 20 ml      Ansaug Geschwindigkeit: 100 ml/min	Abgabe Geschwindigkeit: 50 ml/min      Abgabe: verbleibe an Ort und Stelle



## 2.3.5 GC-MS Messung

Die Proben wurden an einem Agilent 6890 mit einem 5973net massenselektiven Detektor (Agilent, Santa Clara, CA, USA) gemessen.

Ein Autosampler ALS 7683 kam ebenso wie eine Zebron ZB-5MSi Kapillarsäule (15 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) zum Einsatz.

Injektor Temperatur	280 °C
Injektionsmodus	1 µL, getrennt
Trägergas	Helium mit 1.6 mL/min
Säulenofen	Initiale Temperatur 100 °C; für 2 Min. Erhitzen mit 25 °C/min bis 200 °C Erhitzen 20 °C/min bis 300 °C; für 7 Min.
Transferleitung Temperatur	300 °C
MS Analyse	El Scan Modus

## 3. Ergebnisse

Mit diesem Verfahren konnten für ein breites Spektrum von Analyten akzeptable Wiederfindungen erzielt werden (durchschnittlich zwischen 28-75%; n=6). Darüber hinaus war die Wiederholgenauigkeit (1,4-7,6 % RSD; n=8) und die Reproduzierbarkeit (3,6-18,3% RSD; n=8) für die komplexe Matrix Gehirn sehr gut. Damit sind verlässliche Ergebnisse für diese kritische Anwendung sichergestellt.

## 4 Zusammenfassung

Das vorgestellte BD-SPE Verfahren hat den Nachweis erbracht, für forensische Untersuchungen geeignet zu sein - sogar für sehr schwierige Matrices wie beispielsweise Gehirn.

Die Methodik kann bei sauren, neutralen und basischen Substanzen, die für forensische Routineuntersuchungen relevant sind, eingesetzt werden.

Durch das einzigartige Verfahren der BD-SPE ist jede Art der Kreuzkontamination explizit ausgeschlossen, da die Probe nur in die Extraktionskartusche, aber zu keinem Zeitpunkt mit dem System in Berührung kommt.

Die Wiederfindungen sind für eine Routine Screening Methode ausreichend hoch und zeigen eine exzellente Wiederholgenauigkeit und Reproduzierbarkeit, womit das Verfahren als sehr robust eingestuft werden kann.

Da die Probe nicht in den Abfall abgegeben wird, sondern in ein zweites Vial, steht sie für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

## Kontakt

LCTech GmbH  
Daimlerstraße 4  
84419 Obertaufkirchen  
Deutschland

Tel.: +49 8082 2717-0  
Fax: +49 8082 2717-100  
E-Mail: [info@LCTech.de](mailto:info@LCTech.de)

[www.LCTech.de](http://www.LCTech.de)  
[www.LCTech-online.com](http://www.LCTech-online.com)

SOLUTIONS BY

