



## 1 Zweck/Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Morphin, Codein, Noscapin und Papaverin in Mohnsaat, backfertigen Mohnmischungen (Backmix) und Backwaren nach saurer methanolischer Kaltextraktion mittels einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) gekoppelt mit einem Massenspektrometer (im folgenden LC/MS).

## 2 Grundlagen

Mohnsaat enthält in geringen Mengen die pharmakologisch wirksamen Alkaloide Morphin, Codein, Papaverin und Noscapin als natürliche Begleitstoffe. Es können jedoch auch unerwünscht hohe Gehalte dieser Alkaloide auftreten. Ihr Gehalt in Mohnsaat kann sortenabhängig, witterungsabhängig und auch gewinnungsbedingt großen Schwankungen unterliegen. Er resultiert überwiegend aus Verunreinigungen der Mohnsaat durch getrocknet anhaftenden Milchsaft aus der Samenkapsel bzw. aus Kapselbestandteilen, die als Fremdkörper in der Mohnsaat enthalten sind. Der Anteil an gebundenem Morphin, der lt. Literatur (Anlage 3) in der gemahlene Probe durch Säurehydrolyse mit 1M Salzsäure freigesetzt werden kann, leistet mit etwa 10 % verglichen mit den Inhomogenitäten in den Proben nur einen geringen Beitrag zum Gesamt-Morphingehalt der Probe und wird hier nicht berücksichtigt. Zur Beurteilung wird der Morphingehalt als Hauptalkaloid, sowie Codein, Papaverin und Noscapin erfasst.

Für die Beurteilung ist zu berücksichtigen, dass bei der Verwendung von Mohn zur Kuchenherstellung bis zu 85 % des vorhandenen Morphins eliminiert werden (Backversuche am CVUA Karlsruhe, Anlage 6). Laut Literatur werden bis zu 90 % des Morphins beim Backen durch die Hitzeeinwirkung zerstört (siehe Anlage 7).

## 3 Sicherheitshinweise

Bei der Bedienung der verwendeten Geräte sind die Warnhinweise in den Bedienungshandbüchern der Hersteller unbedingt zu beachten. Insbesondere sind die Sicherheitshinweise der Geräte-Standardarbeitsanweisung für das Massenspektrometer (SOP N14G013vv) einzuhalten.

## 4 Kurzbeschreibung

Die Proben werden sauer mit 0,1 % Essigsäure in Methanol extrahiert (siehe Hinweis unten). Die Analyse wird zunächst als Doppelbestimmung aus mindestens je 10 g der ungemahlene Probe durchgeführt. Zusätzlich kann die Untersuchung aus der gemahlene Probe durchgeführt werden. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass es beim Mahlen probenabhängig zu Morphin-Verlusten kommen kann. Die Ursache liegt in einer Oxidation, die durch natürliche Probeninhaltsstoffe katalysiert wird. Da die Alkaloide in Abhängigkeit von der Probenbeschaffenheit in der Matrix sehr inhomogen verteilt sein können, kann eine sehr große Streuung der Messwerte bei der Untersuchung aus der ungemahlene Probe auftreten. Hier muss eine ausreichend große Anzahl an Mehrfachuntersuchungen durchgeführt werden, um eine ausreichende statistische Sicherheit zu erzielen. Der membranfiltrierte Extrakt der Proben wird nach Zusatz von Morphin-D3 als internem Standard (ISTD) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und der Ionisierungsquelle (ESI: Elektrosprayionisation) zugeführt. Die erzeugten Ionen werden massenspektroskopisch nach Fragmentierung (MS-MS, Selected Reaction Monitoring (SRM) analysiert).



Verfahren zur Bestimmung von Morphin und anderen Alkaloiden in Mohnsaat, Backmohnmischungen und Backwaren mittels LC-MS/MS

**Hinweis:** Die Extraktion ist grundsätzlich auch mit Citronensäure bei 80 °C im Ultraschallbad möglich. Diese Extraktionstechnik führt jedoch zu schlecht filtrierbaren Extrakten, was eine nachfolgende Aufarbeitung über SPE erforderlich macht. Nach am CVUA Karlsruhe und Stuttgart durchgeführten Untersuchungen führt die Extraktion mit Citronensäure nicht zu anderen Ergebnissen als die Extraktion mit saurem Methanol bei Raumtemperatur (Extraktionsversuch CVUA KA siehe Anlage 5).

## 5 Chemikalien/Materialien

- Reinstwasser, HPLC-taugliche Reinheit, z.B. aus einer Millipore-Anlage
- Methanol für die HPLC, z.B. Fa. Merck Art. Nr. 8402 >99,8 %
- Essigsäure p.a. 99-100 %, z. B. Fa. Baker
- Ammoniumhydrogencarbonat p.a., z.B. Fluka
- Ammoniaklösung, 25%ig p.a., z.B. Merck
- Referenzsubstanzen:
  - Morphinhydrochlorid p.a., z.B. VWR
  - Codeinphosphathemihydrat p.a., z.B. VWR
  - Noscapinhydrochloridhydrat p.a., z.B. Sigma-Aldrich (Best Nr. N9007)
  - Papaverinhydrochlorid, z.B. Sigma-Adrich (Best. Nr. P3510)
  - ISTD: Morphin-D3, 100 mg/ml in Methanol, 99 % (Best. Nr. 610097)
- **Extraktionsmittel (EM):** Methanol mit 0,1 % Essigsäure (100 µl konz. Essigsäure/100 ml Methanol)

**Hinweis:** Die Referenzsubstanzen Morphin und Codein fallen bezüglich ihrer Handhabung unter das Betäubungsmittelgesetz. Eine Erlaubnis für die Handhabung besteht für den Laborleiter von L11 (GC-MS). Die Substanzen und die Stammlösung werden dort in einem gesonderten Kühlgerät gelagert und nur bei unmittelbarem Bedarf zur Einwaage bzw. weiteren Verdünnung ausgehändigt und unverzüglich wieder zurückgegeben. Alle Entnahmen aus dem Originalgebinde werden für Morphin und Codein auf der in Fabasoft geführten Liste „BTM“ dokumentiert. Alle weiteren Verdünnungen enthalten keine arzneilich wirksamen Gehalte mehr und können in Labor 14 gelagert und gehandhabt werden.

### - Eluenten für die HPLC:

Eluent A = 20 mmol  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in Reinstwasser, pH 9:

2,37 g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  werden in 1 000 ml Reinstwasser gelöst und durch Zusatz einiger Tropfen 25%iger  $\text{NH}_3$  am pH-Meter auf pH 9 eingestellt.

Eluent B = 20 mmol  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in Methanol mit 5 % Reinstwasser, pH 9

2,37 g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  werden in 50 ml Reinstwasser gelöst, 950 ml Methanol hinzugegeben und durch Zusatz einiger Tropfen 25%iger  $\text{NH}_3$  am pH-Meter auf pH 9 eingestellt.

Die Eluenten sind mindestens eine Woche ohne Kühlung haltbar. Eine Überprüfung/Korrektur des pH-Wertes ist in dieser Zeit nicht erforderlich.



## 6 Geräte/Hilfsmittel

- LC/MS mit ESI, z.B. TSQ 7000 von Thermo Finnigan, gekoppelt mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) der 1100er Serie von Agilent
- alkalistabile analytische Reversed Phase -Trennsäule z.B. Gemini (Phenomenex) 3  $\mu$ , RP18, 150 x 2.00 mm
- für fett-, öl- und wasserhaltige Proben geeignete Mühle zum Mahlen des Mohns, z.B. Messermühle Retsch Grindomix GM 200
- Wasserbad, regelbar auf 20 °C +/- 3 °C
- Waage, auf 0,01 g genau
- Rollrandgläser mit Bördelkappen
- Eppendorf-Pipetten
- Messkolben
- Membranfilter 0,2  $\mu$ m und Spritzen zur Filtration, z.B. Polyesterfilter von Macherey&Nagel
- Dispenser, für ein Volumina von 30 ml

## 7 Durchführung

### 7.1 Aufarbeitung der Proben

Bei Mohnsaat wird die gesamte Probe vor der Entnahme von Teilproben in einem ausreichend großen gut verschlossenen Behälter gut durchgeschüttelt. Bei Backwaren werden nur die mohnhaltigen Teile untersucht. Falls keine Abtrennung z.B. von Mohnfüllung und Tortenboden möglich ist wird die Gesamtprobe homogenisiert und untersucht.

10,00 g Probe werden in ein 100 ml Erlenmeyerkölbchen mit Schliff und Schliffklemme oder einem anderen gut verschließbaren Gefäß eingewogen, das sicherstellt, dass kein Methanol verdunstet. Dann werden 30 ml EM, z.B. mittels Dispenser zugegeben und nach Sicherung des Stopfens mit einer Schliffklemme auf der Schüttelmaschine bei mäßiger Schüttelfrequenz (ca. 120-250/min) 30-60 min geschüttelt<sup>1</sup>, so dass sich die Mohnkörner ausreichend gut im Lösungsmittel bewegen, anschließend auf 20 ° +/- 3 °C temperiert und danach sofort abfiltriert. Dazu wird der Überstand bei abgenommenem Stempel und aufgesetztem Membranfilter in eine 5 ml Spritze gefüllt, nach Aufsetzen des Stempels in ein DGC-Gläschen passender Größe abfiltriert und bis zur Messung gut verschlossen aufbewahrt. Der Extrakt wird zur Messung direkt in einem HPLC-Vial verdünnt und mit ISTD versetzt. Routinemäßig werden 200  $\mu$ l Probenextrakt mit 700  $\mu$ l Methanol und 100  $\mu$ l ISTD (10  $\mu$ g/ml = Endkonzentration ISTD  $\mu$ g/ml in der Messlösung) verdünnt. Diese Verdünnung ist geeignet für Proben, die einen Gehalt bis 75 mg/kg Morphin aufweisen. Das Vial wird gut verdeckelt und geschüttelt. Als Chemikalien-Blindwert werden für jede Mess-Serie 900  $\mu$ l des EM mit 100  $\mu$ l ISTD versetzt. Jede Probe wird im Doppelansatz analysiert. Die meisten Proben enthalten Morphin in Konzentrationen unter 50 mg/l, wobei bei einem Teil der Proben mit deutlichen Schwankungen bedingt durch inhomogene Verteilung der Alkaloide zu rechnen ist. Bei Einwaagen von 10 g der ungemahlten Probe auf 30 ml EM ist bei einer Vielzahl von Proben dennoch eine ausreichende Homogenität gegeben. Wird beim Doppelansatz der Probe keine für die Beurteilung der Probe aus-

<sup>1</sup> Der Einfluss der Extraktionszeit, sowie die Schütteltechnik sind nach den durchgeführten Extraktionsversuchen von marginaler Bedeutung, siehe Anlage 4



Qualitätssicherung in den Untersuchungseinrichtungen für amtliche Überwachung Baden-Württemberg

reichende Übereinstimmung erzielt, werden 3 weitere Bestimmungen durchgeführt und eine Überschreitung des ggf. etablierten Höchstgehalts durch Grenzwert-t-Test nachgewiesen.

Für weitere Verdünnungen wird die folgende Verdünnungstabelle herangezogen:

#### **Verdünnungstabelle zur Verdünnung des Probenextraktes vor der Messung**

<b>Erwarteter Morphingehalt in [mg/kg]</b>	<b>Eingesetztes Volumen Probenextrakt in [µl]</b>	<b>Zugegebenes Volumen EM in [µl]</b>	<b>Volumen ISTD (c=10µg/ml)</b>	<b>Verdünnungsfaktor VF zur Berechnung</b>
< 17	900	-	100	1,112
< 30	500	400	100	2
< 75	200	700	100	5
< 150	100	800	100	10
> 150	Die Probe wird zuvor im Messkölbchen entsprechend verdünnt			

#### **7.2 Mahlen der Probe**

Die Probe kann zur Herstellung einer besseren Homogenität auch gemahlen werden. Bei bisherigen Untersuchungen am CVUA Karlsruhe und Stuttgart fiel auf, dass in der gemahlene Probe tendenziell etwas niedrigere Morphingehalte ermittelt wurden als in der ungemahlene Probe. Denkbar ist eine Degradation des Morphin durch Oxidation, worauf sich Hinweise in der Literatur finden. Die Bildung von Addukten mit anderen Mohninhaltsstoffen kann zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Etwa 100 g der Probe werden 30 Sekunden lang bei 8500 rpm gemahlen. Durch das Mahlen entsteht ein feines Pulver, das sofort nach dem Mahlen zu extrahieren ist. Die genannte Mahldauer muss exakt eingehalten werden. Die Probe ist nach dem Mahlen sofort zu extrahieren.

Beim Analyseergebnis wird angegeben, ob die Probe vor der Analyse gemahlen wurde.

#### **7.3 Herstellung der Kalibrierlösungen**

Für die Messung werden im Messlabor 6 Kalibrierlösungen mit den Gehalten von je 5 / 2,5 / 1 / 0,5 / 0,25 und 0,1 µg/ml Morphin und Codein, sowie je 1 / 0,5 / 0,2 / 0,1 / 0,05 und 0,02 µg/ml Papaverin und Noscapin nach folgender Verdünnungstabelle hergestellt:



Geprüfte Sicherheit in den Lebensmittelkontrollen und der amtlichen Überwachung Baden-Württemberg

### Stammlösung Mohnalk

Name	Einwaage	in ml	Lösungsmittel	Gehalt Stammlösung (bezogen auf die freie Base und unter Berücksichtigung des Wassergehaltes lt. Analysenzertifikat des Herstellers <sup>2</sup> )
Morphin-hydrochlorid	66 mg	100	Methanol	500 µg Morphin/ml
Codeinphosphat-Hemihydrat	34 mg	50	Methanol	500 µg Codein/ml
Papaverin-hydrochlorid	55 mg	100	Methanol	500 µg Papaverin/ml
Noscapinhydrochloridhydrat	58 mg	100	Methanol	500 µg Noscapin/ml

### Mohn-Stammlösungs-Mix

Die genannten Volumina der Einzellösungen werden im 50 ml Messkölbchen zusammengeführt

aus Stammlösung	Name	Verdünnung von	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
500 µg/ml	Morphin	5 ml	50	Methanol	50 µg/ml
500 µg/ml	Codein	5 ml			50 µg/ml
500 µg/ml	Papaverin	1 ml			10 µg/ml
500 µg/ml	Noscapin	1 ml			10 µg/ml

### Verdünnung ISTD für Kalibrierlösungen

ISTD	Einwaage	in ml	Lösungsmittel	Gehalt ISTD
Morphin-D3	1 Original-Ampulle (Konzentration = 1 mg/ml)	20	Methanol	50 µg/ml

### Verdünnung ISTD für Proben c= 10 µg/ml

Aus Lösung	Name	Verdünnung von	in ml	Lösungsmittel	Gehalt ISTD
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	5 ml	25	Methanol	10 µg/ml

<sup>2</sup> für die hier gewählte Einwaage betrug der Wassergehalt für die Referenzsubstanz Morphin lt. Analysenzertifikat z.B. 13,6 %!



Das Institut ist eine Einrichtung in der Verantwortung von Einrichtungen der amtlichen Überwachung Baden-Württemberg

### Mohn-Mix-1

aus	Name	Verdünnung von	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	1	50	Methanol	1 µg/ml
Mohn-Stammlösungs-Mix	Morphin	5 ml			5 µg/ml
	Codein				5 µg/ml
	Papaverin				1 µg/ml
	Noscapin				1 µg/ml

### Mohn-Mix 2

aus	Name	Verdünnung	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	1 ml	50	Methanol	1 µg/ml
Mohn-Stammlösungs-Mix	Morphin	2,5 ml			2,5 µg/ml
	Codein				2,5 µg/ml
	Papaverin				0,5 µg/ml
	Noscapin				0,5 µg/ml

### Mohn-Mix 3

aus	Name	Verdünnung	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	1 ml	50	Methanol	1 µg/ml
Mohn-Stammlösungs-Mix	Morphin	1 ml			1 µg/ml
	Codein				1 µg/ml
	Papaverin				0,2 µg/ml
	Noscapin				0,2 µg/ml

### Mohn-Mix 4

aus	Name	Verdünnung	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	0,9 ml	50	Methanol	1 µg/ml
Mohn-Mix 1	Morphin	5 ml			0,5 µg/ml
	Codein				0,5 µg/ml
	Papaverin				0,1 µg/ml
	Noscapin				0,1 µg/ml



### Mohn-Mix 5

aus	Name	Verdünnung	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	0,9 ml	50	Methanol	1 µg/ml
Mohn-Mix 2	Morphin	5 ml			0,25 µg/ml
	Codein				0,25 µg/ml
	Papaverin				0,05 µg/ml
	Noscapin				0,05 µg/ml

### Mohn-Mix 6

aus	Name	Verdünnung	in ml	Lösungsmittel	Gehalt /Mischung
ISTD 50 µg/ml	Morphin-D3	0,9 ml	50	Methanol	1 µg/ml
Mohn-Mix 3	Morphin	5 ml			0,1 µg/ml
	Codein				0,1 µg/ml
	Papaverin				0,02 µg/ml
	Noscapin				0,02 µg/ml

Die so hergestellten Kalibrierlösungen werden mehrfach in Vials abgefüllt und für spätere Messungen tiefgefroren aufbewahrt. Die Proben werden bis zur Messung im Kühlschrank gekühlt.

#### 7.4 Haltbarkeit der Kalibrierlösungen

Bei Raumtemperatur mindestens 14 Tage, tiefgefroren in Vials portioniert mindestens 3 Monate. Die Stabilitätsprüfung ist noch nicht abgeschlossen.

#### 7.5 Haltbarkeit der Probelösungen

Gut verschlossen, z.B. im Vial bei Raumtemperatur: mehrere Wochen

#### 7.6 Messbereich

<b>Standardmessbereich Morphin, Codein</b>	5 µg/ml – 0,1 µg/ml
--	---------------------

<b>Standardmessbereich Noscapin, Papaverin</b>	1 µg/ml – 0,02 µg/ml
--	----------------------

Der Messbereich kann für Morphin und Codein im Bedarfsfall nach unten hin erweitert werden, da die Signale auch bei Gehalten unter 0,1 µg/ml ausreichend intensiv sind.



Qualitätssicherung in den Arzneimittelherstellung von der amtlichen Überwachungs-Richtlinien-Arztstellen

## 7.7 LC-Bedingungen

**Elutionsprogramm: (Volumenanteil des Einzel-eluenten an der Mischung in Vol.-%)**

Zeit in min.	Fluß ml/min	Eluent A	Eluent B
0.0	0.2	60	40
1.0	0.2	60	40
3.0	0.2	5	95
9.0	0.2	5	95
10.0	0.2	60	40
15.0	0.2	60	40

Stop Time: 15 min  
 Säulenraum: 40 °C  
 Injektionsvolumen : 1 µl

Unter den gewählten Bedingungen eluiert Morphin und Morphin-D3 bei 10,8 min, Codein bei 12 min, Papaverin bei 12,3 min und Noscapin bei 13,2 min.

## 7.8 Ionisierungsbedingungen und MS/MS-Bedingungen

Die Bestimmung am TSQ 7000 von Thermo Finnigan wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

<b>Ionenquelle</b>	Elektrospray (ESI)
<b>Kapillaren-Temperatur</b>	280 °Grad
<b>Sheath Gas</b>	Stickstoff 70 psi
<b>ESI Spray Voltage</b>	2,8 KV
<b>Tune File</b>	morphin150705
<b>Width</b>	2
<b>Scan time(sec. )</b>	0,1
<b>Collision Energy (offset Volt)</b>	45

	Modus	Polarität	Massenübergang m/z
<b>Morphin</b>	SRM	positiv	286 //153 (Quantifier) und 286 //165 (Qualifier)
<b>Morphin-D3</b>	SRM	positiv	289//165





Qualitätssicherung in den Untersuchungsrichtungen der amtlichen Überwachung BfArM Arzneimittel

<b>Codein</b>	SRM	positiv	300//165
<b>Noscapin</b>	SRM	positiv	340//202
<b>Papaverin</b>	SRM	positiv	414//220

Die Messmethode steht unter **Morphin\_ESI\_SRM.meth** im Laufwerk C im Ordner „Aktuelle Methoden“ zur Verfügung. Zusätzlich steht dort eine SIM-Methode zur Verfügung.

Es hat sich bewährt jeder Mess-Serie vor der Kalibrierung 3 Injektionen einer Matrixlösung (Messlösung einer beliebigen Probe) voranzustellen, da das System schneller ins Gleichgewicht kommt und bessere Kalibrierkurven erhalten werden.

Nach jeder Mess-Serie ist die Ionisierungskammer einer besonders gründlichen Reinigung (siehe Geräte SOP N14G0113vv) zu unterziehen. Insbesondere die Heated Capillary muss nach jeder Mess-Serie mittels Einführen des Reinigungsdrahts gesäubert werden.

## 8 Auswertung

Die Quantifizierung erfolgt durch die Integration der Peakflächen und/oder Peakhöhen mittels Internem-Standard-Verfahren für die genannten Fragmentionen bei den mittels Kalibrierlösungen ermittelten Retentionszeiten. Zur Auswertung wird die Methode **Morphin\_SRM.LQN** verwendet, die im gleichen Laufwerk im Ordner „Quantifizierungsmethoden“ zur Verfügung steht. Der Gehalt der Messlösungen wird dem Fachlabor auf zwei signifikante Stellen genau in mg/kg angegeben. Qualifier und Quantifier ergeben für Morphin etwa gleichstarke Signale und können äquivalent zur Ergebnismitteilung verwendet werden. Die Differenz zwischen Qualifier und Quantifier lag bei bisherigen Messungen unter 10 %.

Auswertestrategie: linear, Origin: forced

Alle zur Messung und Auswertung verwendeten Dateien und Methoden werden zusammen mit den Rohdaten im Ordner des Messtages abgelegt.

Berechnung des Ergebnisses bezogen auf **mg/kg Mohn**:

**Messergebnis in µg/ml x Extraktionsvolumen in ml x VF**

-----  
**Einwaage in g**

VF = Verdünnungsfaktor, lt. Verdünnungstabelle.

Werden 10 g Einwaage mit 30 ml EM extrahiert und 200 µl des Extraktes zur Messung, wie oben beschrieben auf 1000 µl verdünnt, erfolgt die Berechnung nach:

**Messergebnis in µg/ml x 15**



## 9 Validierungsdaten

### Mehrfachanalyse einer gemahlene und ungemahlene Probe mit niedrigem Gehalt

	Ungemahlene Probe	Gemahlene Probe
Einzelmesswerte [mg/kg]	19 / 6 / 8,9 / 9,3 / 4,0 / 20,0	8 / 8,7 / 8,0 / 7,3 / 7,3
Mittelwert [mg/kg]	11,2	7,9
Ausreißer (Grubbs/Dixon)	Keine	Keine
Standardabweichung [mg/kg]	6,7	0,59
Vertrauensbereich [mg/kg]	7,1	0,7
Erweiterte Messunsicherheit [mg/kg] (P=95 %; Erweiterungsfaktor k=1,96)	+/- 13	+/- 1,1

### Mehrfachanalyse einer ungemahlene Probe mit hohem Gehalt

	Ungemahlene Probe
Einzelmesswerte [mg/kg]	96 / 114 / 118 / 115
Mittelwert [mg/kg]	111
Ausreißer (Grubbs/Dixon)	Keine
Standardabweichung [mg/kg]	10
Vertrauensbereich [mg/kg]	16
Erweiterte Messunsicherheit [mg/kg] (P=95 %; Erweiterungsfaktor k=1,96)	+/- 20

### Verfahrenskennndaten

Verfahrensstandardabweichung [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,04
Verfahrensvariationskoeffizient [%]	1,96
Korrelationskoeffizient	0,9998
Linearitätstest (Vergleich mit Kalibrierfunktion 2. Grades/Residualanalyse; Signifikanzniveau 1 %)	Kalibrierung ist linear
Ausreißertest (t-Test/F-Test)	Kein Ausreißer
Nachweisgrenze nach DIN 32645 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Morphin und Codein 0,1 Papaverin und Noscapin 0,02
Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Morphin und Codein 0,3 Papaverin und Noscapin 0,06



## 10 Anlagen

**Anlage 1:** Ergänzungsblatt

**Anlage 2:** Ausdruck der Messmethodenbedingungen und Chromatogramm (nur Messlabor)

**Anlage 3:** Lo D.S.T., Chua T.H.: Poppy Seed: implications of consumption; Med.Sci.Law (1992)  
Vol. 32, No. 4, 296-302

**Anlage 4:** Zusammenfassung der Versuche zu Extraktionszeit und Schütteltechnik (30 -180 min,  
Horizontalschüttler; Magnetrührer, Kreisschüttler)

**Anlage 5:** Tabelle Vergleich Citronensäure-Heißextraktion/Methanol-Kaltextraktion

**Anlage 6:** Auswertung Backversuch CVUA Karlsruhe

**Anlage 7:** Brenneisen R., Borner S.: Psychotrope Drogen; Pharm.Acta Helv. 60, Nr.11(1985)

**Anlage 8** Auswertung Valoo-Validierungsdaten der Methode

**Anlage 2 bis 8 : nur Messlabor**