

**Entwicklung eines Screeningverfahrens zum
simultanen Nachweis von Opioiden in menschlichen
Körperflüssigkeiten, Geweben und Haaren für
forensisch-toxikologische und klinische
Untersuchungen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Pharmazie

Am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Karin Eckart
geboren in Zittau

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

In den letzten Jahren stieg in Deutschland der Gebrauch bzw. Missbrauch von Opioid-Analgetika zunehmend an (1-4). Auffällig dabei war die steigende Diversität der verwendeten Opioide. Neben der Vielzahl an medizinisch eingesetzten Präparaten treten zunehmend auch chemisch modifizierte Varianten auf dem illegalen Markt auf. Das zielt sicherlich in erster Linie auf eine Umgehung von betäubungsmittelrechtlichen Beschränkungen ab. Das entwickelte Verfahren sollte unter Einbeziehung neuer Substanzen möglichst viele verschiedene Opioide und auch ihre pharmakologisch aktiven Stoffwechselprodukte berücksichtigen.

Vor Analyse wurden Blut-, Serum- oder Urinproben mit Phosphatpuffer versetzt und mittels Festphasenextraktion an C18-Säulenmaterial aufgearbeitet. Post-Mortem-Gewebematerial wurde mit isotonischer Kochsalzlösung versetzt, homogenisiert und anschließend durch eine Festphasenextraktion aufgereinigt. Haarproben wurden nach Zerkleinerung mit Methanol unter Ultraschall extrahiert. Die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (Elektrosprayionisation im positiven Modus) erwies sich als geeignetes Verfahren für die simultane Bestimmung der Opioide in biologischem Probenmaterial (Körperflüssigkeiten, Gewebe und Haaren). Der Multi-Analyt Assay erlaubt die quantitative Analyse von Alfentanil, Buprenorphin, Codein, Desomorphin, Dextromethorphan, Dextrophan, Dihydrocodein, Dihydromorphin, Ethylmorphin, Fentanyl, Hydrocodon, Hydromorphon, Methadon, Morphin, Naloxon, Naltrexon, Oxycodon, Oxymorphon, Pentazocin, Pethidin, Pholcodin, Piritramid, Remifentanil, Sufentanil und Tramadol. Außerdem können die Metaboliten 6-Monoacetyl-morphin, Bisnortilidin, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid, Naltrexol, Norbuprenorphin, Norfentanyl, Norpethidin, Nortilidin und O-Desmethyltramadol nachgewiesen werden. Die Analyten wurden durch eine Phenyl-Hexyl Säule und einen Wasser/Acetonitril Gradienten durch eine UPLC 1290 Infinity gekoppelt mit einem 6490 Triple Quadrupol von Agilent Technologies separiert.

Die LC/MS Methode zur simultanen Bestimmung von 35 Opioiden in Serum und Haaren wurde nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert. Im Fall der Serumvalidierung lagen die Nachweisgrenzen zwischen 0.02 und 0.6 ng/ml und die Bestimmungsgrenzen im Bereich von 0.1 bis 2.0 ng/ml. Die Kalibrationskurven waren für die Kalibrationslevel 1 bis 6 linear. Wiederfindungsraten lagen für alle Verbindungen zwischen 51 und 88 %, außer für Alfentanil, Bisnortilidin, Pethidin und Morphin-3-Glucuronid. Der Matrixeffekt lag zwischen 86 % (Ethylmorphin) und 105 % (Desomorphin). Für fast alle Analyten konnten akzeptable Werte bei der Bestimmung der Genauigkeit und Richtigkeit nach den Richtlinien der GTFCh erhalten werden. Im Fall der Validierung der Haarproben lagen die Nachweisgrenzen zwischen 0.004 und

0.6 ng/Probe und die Bestimmungsgrenzen zwischen 0.1 ng/Probe und 2.0 ng/Probe. Für die Kalibrationslevel 1 bis 6 waren alle Kalibrationsgeraden linear. Die Wiederfindungsraten lagen für die Opiode im Bereich von 73.5 % (Morphin-6-Glucuronid) und 114.1 % (Hydrocodon). Die Werte für die Bestimmung der Richtigkeit lagen zwischen - 6.6 % (Methadon) und + 11.7 % (Pholcodin). Präzisionsdaten wurden zwischen 1.0 % für Dextromethorphan und 11.5 % für Methadon ermittelt. Die Kriterien der GTFCh konnten bei Ermittlung des Matrixeffekts für alle Substanzen erfüllt werden, außer für 6-Monoacetylmorphin, Bisnortilidin, Meperidin, Methadon, Morphin-3-glucuronid, Morphin-6-glucuronid, Normeperidin, Nortilidin und Tramadol.

Zum Test des Verfahrens an authentischem Probenmaterial wurden 206 Proben von Körperflüssigkeiten (zum großen Teil Serumproben) mit Hilfe der simultanen LC/MS Screening Methode untersucht. Über 150 Proben wurden im Rahmen von forensisch-toxikologischen Untersuchungen am Instituts für Rechtsmedizin Mainz analysiert (Auftraggeber Polizei, Staatsanwaltschaft etc.). Dabei konnten 23 der 35 Opiode (beispielsweise Morphin, Codein, Bisnortilidin und Fentanyl) in den realen Proben nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden bei Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit Sepsis wurden über 50 Blutproben untersucht. Den Patienten wurde im Rahmen einer klinischen Studie einmal täglich vier Tage lang Blut abgenommen. In den Serumproben wurde hauptsächlich Sufentanil (0.2 – 0.8 ng/ml in 58 Fällen) und Piritramid (0.4 – 11 ng/ml in 56 Fällen), aber auch Morphin und Fentanyl gefunden. Außerdem wurden die Proben von Körperflüssigkeiten und Gewebe von 13 verschiedenen Autopsiefällen mit Hilfe des Multi-Analyt Assays auf Opiode untersucht.

In einem zweiten Schritt wurde die Extraktions- und Messmethode zur Quantifizierung der 35 Opiode am Forensic Medicine Center in Ho Chi Minh City (Vietnam) etabliert. Insgesamt wurden 85 Herzblutproben von Obduktionsfällen mit Verdacht auf Opiatintoxikation vom Zeitraum Januar bis November 2014 näher untersucht. Der überwiegende Teil der untersuchten Fälle konnte auf eine Heroin- bzw. Morphin-Vergiftung zurückgeführt werden. Morphin wurde in 68 Fällen im Konzentrationsbereich 1.7 – 1400 ng/ml und der Heroinmetabolit 6-Monoactetylmorphin in 34 Fällen (0.3 – 160 ng/ml) nachgewiesen werden. Einzelfälle mit hohen Konzentrationen des Antitussivums Dextromethorphan und dem Opioid-Analgetikum Pethidin wurden erfasst. Es handelte sich überwiegend um Personen männlichen Geschlechts im Alter von 30 – 40 Jahren.

Schließlich wurden noch 15 Haarproben von Patienten einer psychiatrischen Klinik, die illegale Rauschmittel konsumiert hatten, mit Hilfe der simultanen Opioid-LC/MS Screeningmethode gemessen. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden mit früheren Auswertungen von gaschromatographischen Analysen verglichen. Es zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse für die Opiode 6-

Monoacetylmorphin, Morphin, Codein, Dihydrocodein und Methadon. Mit der LC/MS Methode konnten weitere Substanzen, wie zum Beispiel Bisnortilidin, Dextromethorphan und Tramadol in den Haarproben gefunden werden, die bislang nicht entdeckt worden waren.

Summary

Opioids are widespread therapeutics for treatment of pain, especially chronic pain syndromes and are also frequently abused (1-4). Besides the broad variety of medical preparations an increasing number of new synthetic derivatives appear on the illicit drug market. Therefore the aim of the study was to develop an analytical method which enables the detection of large number of opioids simultaneously. The method should also detect pharmacological active metabolites as well as new designer drugs.

Blood, serum or urine samples were diluted with phosphate buffer and purified by C18 solid-phase extraction. Saline was added to post mortem tissues, thoroughly mixed and purified by solid-phase extraction. Methanol was added to hair samples and incubated in an ultrasonic bath. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using electrospray ionization in positive ionization mode was developed for the simultaneous detection of multiple opioid-type drugs in biological samples like body fluids, tissues and hair. The presented assay allows the quantitative determination of alfentanil, buprenorphine, codeine, desomorphine, dextromethorphan, dextrorphan, dihydrocodeine, dihydromorphine, ethylmorphine, fentanyl, hydrocodone, hydromorphone, methadone, morphine, naloxone, naltrexone, oxycodone, oxymorphone, pentazocine, pethidine, pholcodine, piritramide, remifentanil, sufentanil and tramadol as well as the metabolites 6-monoacetylmorphine, bisnortilidine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide, naltrexol, norbuprenorphine, norfentanyl, norpethidine, nortilidine and O-desmethyltramadol. The analytes were separated on a phenyl-hexyl column by formic acid/acetonitrile gradient elution using an UPLC 1290 Infinity coupled with a 6490 Triple Quadrupole mass spectrometer.

The LC/MS method for the simultaneous detection of 35 opioids in serum and hair samples was validated according the current standards of the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh). In case of the serum validation the limits of detection ranged from 0.02 to 0.6 ng/ml and the lower limits of quantification ranged from 0.1 to 2.0 ng/ml. The calibration curves were linear between Calibration Levels 1 to 6 for all 35 substances. Recovery rates ranged between 51 and 88 % for all compounds except alfentanil, bisnortilidine, pethidine and morphine-3-glucuronide. The matrix effect ranged from 86 % (ethylmorphine) to 105 % (desomorphine). Using the validation procedure proposed by the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry, acceptable precision and accuracy data for almost all analytes were obtained. In case of the hair validation the limits of detection ranged from 0.004 to 0.6 ng/sample and the lower limits of quantification ranged from 0.1 to 2.0 ng/sample. The calibration curves were linear for all substances between Calibration Level 1 to 6. Recovery data ranged between 73.5 % (morphine-3-glucuronide) und 114.1 % (hydrocodone). Accuracy data ranged from - 6.6 % (methadone) to + 11.7 %

(pholcodine). Precision data ranged from 1.0 (dextromethorphan) to 11.5 % (methadone). According to the standards of the GTFCh acceptable matrix effect data for all opioids were obtained, instead of 6-monoacetylmorphine, bisnortilidine, pethidine, methadone, morphine-3-gucuronide, morphine-6-glucuronide, nortilidine and tramadol.

206 authentic body fluid samples, mostly blood serum, were analyzed to test the applicability of the liquid chromatography tandem mass spectrometry method for opioids. More than 150 samples were provided by police authorities. 25 of the 35 analytes (for example morphine, codeine, bisnortilidine and fentanyl) were found in serum samples. Over 50 blood samples were taken from sepsis patients from the intensive care unit (department of anesthesiology, university hospital medical center Mainz) to study the pharmacokinetics of opioids. Blood samples were taken daily for 4 days. Sufentanil and piritramide were the analytes found most frequently in the samples from the intensive care unit. The blood serum concentration of sufentanil detected ranged from 0.2 – 0.8 ng/ml in 58 cases. The blood level concentrations of piritramide ranged from 0.4 - 11 ng/ml in 56 cases. Morphine and fentanyl were detected as well. Moreover, the method was used to investigate 13 drug-related deaths. Therefore body fluids and post mortem tissues were analyzed.

The extraction and LC/MS multi-analyte assay was well-established in the forensic medicine center in Ho Chi Minh City (Vietnam). Moreover, the method was used to investigate suspected fatal opiate intoxication from autopsy cases (January until November 2014). 85 heart blood samples were analyzed. The majority proportion of these cases could be reduced to heroin or rather morphine intoxications. The blood serum concentrations of morphine detected ranged from 1.7 – 1400 ng/ml in 68 case. The blood level of 6-monoacetylmorphine (main metabolite of heroin) ranged from 0.3 – 160 ng/ml in 34 cases. Dextromethorphan and pethidine were found as well. The majority of the autopsy cases were male and between 30 to 40 years old.

The method presented for the detection of opioids is also an excellent tool for the investigation of hair samples. Furthermore 15 hair samples from patients of a psychiatric hospital were analyzed. The results were compared with previous investigations using gas chromatography/mass spectrometry. The results of the LC/MS and GC/MS measurements were largely identical for the opioids 6-monoacetylmorphine, morphine, codeine, dihydrocodeine and methadone. The presented LC/MS Screening method enables the detection of more analytes comparing GC/MS assay. Bisnortilidine, dextromethorphan and tramadol were now found in the hair samples, too.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Forensische Toxikologie	1
1.1.1	Aufgaben	1
1.1.2	Untersuchungsmaterial	1
1.2	Datenlage zum Arzneimittelgebrauch und Drogenkonsum von Opioiden	2
1.3	Wichtige Vertreter der Opioiden	5
1.4	Analysenverfahren.....	24
1.4.1	Auswahl des analytischen Verfahrens	24
1.4.2	Methodenvalidierung.....	26
1.5	Behandlung von Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit opioiden Arzneimitteln.....	29
1.5.1	Akutes Nierenversagen und Sepsis-Erkrankungen	29
1.5.2	Kontinuierliche Nierenersatzverfahren	30
1.5.3	Einsatz von Opioiden bei Patienten mit Sepsis	31
2	Zielsetzung der Arbeit	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Material.....	35
3.1.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	35
3.1.2	Chemikalien, Lösungen und Referenzsubstanzen	39
3.1.3	Analytische Säulen	44
3.1.4	Stammlösungen, Kalibratoren, Kontrollen und interne Standards	45
3.2	Methoden.....	47
3.2.1	Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten	47
3.2.2	Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Propofol in Serum	51
3.2.3	Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Opioiden in Gewebe	52
3.2.4	Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Opioiden in Haaren ..	52
3.2.5	Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem- Massenspektrometrie zum simultanen Nachweis von 35 Opioiden inklusive ihre Stoffwechselprodukte.....	53
3.2.6	Nachweis von Tapentadol mittels LC-MS Messung	57
3.2.7	Quantitative Bestimmung von Propofol aus Serum mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung	58
3.2.8	Validierung der analytischen Methode zur Bestimmung der Opioiden in Serum- und Blutproben	59

3.2.9	Validierung der analytischen Methode zur Bestimmung der Opioide im menschlichen Haar	62
3.2.10	Klinische Studie zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden bei Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit Sepsis.....	62
3.2.11	Analyse von authentischen Proben der forensischen Toxikologie im Institut für Rechtsmedizin Mainz.....	66
3.2.12	Untersuchung von Blutproben des Forensischen Centers Ho Chi Minh City ..	66
3.2.13	Haarentnahme und Asservierung.....	66
4	Ergebnisse und Diskussion	67
4.1	Entwicklung einer Untersuchungsmethode zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten.....	67
4.1.1	Wahl der Extraktionsmethode	67
4.1.2	Entwicklung der LC-MS Methode.....	71
4.2	Methodenvalidierung zum Nachweis von Opioiden in Serum, Plasma und Urin....	82
4.2.1	Selektivität	82
4.2.2	Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell	84
4.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	89
4.2.4	Präzision und Richtigkeit.....	91
4.2.5	Wiederfindung und Matrixeffekt	91
4.3	Untersuchungsmethode zum Nachweis von Tapentadol mittels LC-MS/MS	92
4.4	Opioid-Befunde im forensischen Untersuchungsmaterial von 2013 und 2014.....	93
4.4.1	Forensische Proben.....	94
4.4.2	Autopsie Fälle	97
4.5	Klinische Proben zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden und Propofol bei Patienten mit einer Sepsis-Erkrankung.....	102
4.6	Ergebnisse der Untersuchung von Blutproben des forensischen Centers in Ho Chi Minh City	113
4.7	Übertragung der Untersuchungsmethode sowie Methodenvalidierung zum Nachweis von Opioiden im Haar.....	121
4.7.1	Selektivität	123
4.7.2	Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell	123
4.7.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	128
4.7.4	Präzision und Richtigkeit.....	130
4.7.5	Wiederfindung und Matrixeffekt	130
4.8	Haaruntersuchungen auf Opioide im forensischen Untersuchungsmaterial	131
4.9	Haaruntersuchungen auf Opioide von Patienten einer psychiatrischen Klinik	133
5	Ausblick	137

6	Anhang	140
6.1	Literaturverzeichnis.....	140
6.2	Lebenslauf	157
6.3	Veröffentlichungen.....	158
6.4	Danksagung.....	159

Abkürzungsverzeichnis

6-MAM	6-Monoacetylmorphin
ALF	Alfentanil
ANV	Akutes Nierenversagen
BNT	Bisnortilidin
BPS	behavioral pain skala
BUP	Bubprenorphin
CAM-ICU	confusion assessment method for the intensive care unit
COD	Codein
CRRT	Kontinuierliche Nierenersatzverfahren
CVVHD	continuous veno-venous hemodialysis
DES	Desomorphin
DH	Dihydrocodein
DM	Dihydromorphin
DMP	Dextromethorphan
DP	Dextrorphan
EDDP	2-Ethyliden-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin
EMDP	2-Ethyl-5-Methyl-3,3-Diphenylpyrrolin
EM	Ethylmorphin
ESI	electrospray ionization
FEN	Fentanyl
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HC	Hydrocodon
HM	Hydromorphon
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPLC/DAD	Hochdruckflüssigchromatographie gekoppelt mit Photodioden-Arraydetektor
ISTD	Interner Standard
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung
LLOQ	lower limit of quantification
LOD	limit of detection
MEP	Meperidin
MET	Methadon
MOR	Morphin
M3G	Morphin-3-Glucuronid

M6G	Morphin-6-Glucuronid
MRM	multiple reaction monitoring
NON	Naloxon
NEL	Naltrexol
NEN	Naltrexon
NB	Norbuprenorphin
NF	Norfentanyl
NM	Normeperidin
NT	Nortilidin
ODT	O-Desmethyltramadol
OC	Oxycodon
OM	Oxymorphon
PEN	Pentazocin
PHO	Pholcodin
PIR	Piritramid
PRO	Propofol
RAS	Richmond agitation sedation scale
REM	Remifentanil
RT	Raumtemperatur
SPE	solid phase extraction
StGB	Strafgesetzbuch
StVG	Straßenverkehrsgesetz
SUF	Sufentanil
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
TIC	Total Ion Chromatogram
TRA	Tramadol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeit der konsumierten "§ 24a STVG Drogen" im Zeitraum 2003 - 2014 (n = 57514).....	4
Abbildung 2: Zuordnung der Opioide und ihre Metaboliten zu den verschiedenen Anwendungsbereichen in der Forensik, der Allgemeinmedizin und auf Intensivstation bzw. in der Palliativmedizin.....	6
Abbildung 3: Chemische Struktur von ALF.....	7
Abbildung 4: Chemische Struktur von BUP und NB.	8
Abbildung 5: Chemische Struktur von COD.	8
Abbildung 6: Chemische Struktur von DES.....	9
Abbildung 7: Chemische Struktur von DMP und DP.....	10
Abbildung 8: Chemische Struktur von Heroin (Diacetylmorphin) und Metabolit 6-MAM.....	11
Abbildung 9: Chemische Struktur von DH und DM.....	11
Abbildung 10: Chemische Struktur von EM.....	12
Abbildung 11: Chemische Struktur von FEN und Stoffwechselprodukt NF.....	12
Abbildung 12: Chemische Struktur von HC.....	13
Abbildung 13: Chemische Struktur von HM.....	14
Abbildung 14: Chemische Struktur von MET.....	14
Abbildung 15: Chemische Struktur von MOR und Metaboliten M3G und M6G.....	15
Abbildung 16: Chemische Struktur von NON.....	16
Abbildung 17: Chemische Struktur von NEN und Metabolit NEL.....	16
Abbildung 18: Chemische Struktur von OC.....	17
Abbildung 19: Chemische Struktur von OM.....	18
Abbildung 20: Chemische Struktur von PEN.....	18
Abbildung 21: Chemische Struktur von Meperidin (MEP) und seinem pharmakologisch aktiven Stoffwechselprodukt Normeperidin (NM).....	19
Abbildung 22: Chemische Struktur von PHO.....	19
Abbildung 23: Chemische Struktur von PIR.....	20

Abbildung 24: Chemische Struktur von REM.	21
Abbildung 25: Chemische Struktur von SUF.	21
Abbildung 26: Chemische Struktur von Tapentadol.....	22
Abbildung 27: Chemische Struktur von Tilidin und seiner Metaboliten NT und BNT.....	23
Abbildung 28: Chemische Struktur von TRA und seinem Stoffwechselprodukt ODT.....	23
Abbildung 29: Übersicht der verschiedenen Extraktionsverfahren für die Opioide aus Haarproben, Körperflüssigkeiten und Asservaten nach Sektionen.	51
Abbildung 30: Schema zur Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor, modifiziert nach Valistat 1.0.....	61
Abbildung 31: Übersicht zur Erfassung der Inzidenz eines sepsis-assoziierten Delirs, modifiziert nach E. Wesley 2002.	63
Abbildung 32: Erfassung der Sedierungstiefe mittels RASS (Richmond Agitation Sedation Skala), modifiziert nach Hopf 2010.....	64
Abbildung 33: Produktionenscan von (a) Alfentanil bei einer Kollisionsenergie von 13, 25, 33 und 17 eV und (b) Tramadol bei einer CE von 80, 5, 10 und 29 eV.....	74
Abbildung 34: Vergleich der Peakflächen der einzelnen Opioide (in Methanol, 0.1 ng absolut) bei Messung mit default und optimierten Ionenquellenparametern.....	77
Abbildung 35: Total Ion Chromatogramm der LC/MS Messung von den Opioiden in Methanol bei Verwendung einer Eclipse Plus C18 100 mm Säule. Es wurde der Anteil von Eluent B (Acetonitril) variiert. (a) Eluent B: 0 – 2 min 10 %, 2 – 32 min -> 100 %, 32 - 37 min 100 %, 37 – 38 min -> 10 %, 38 – 42 min 10 %; (b) Eluent B: 0 – 2 min 10 %, 2 – 32 min -> 30 %, 32 – 37 % -> 100 %, 37 – 38 min -> 10 %, 38 – 42 min 10 %; (c) Eluent B: 0 – 2 min 0 %, 2 – 25 min -> 25 %, 25 – 28 min -> 100 %, 28 – 30 min -> 0 %, 30 – 32 min 0 %.....	79
Abbildung 36: Total Ion Chromatogramm der 35 Opioide inklusive der Metaboliten. Verwendete HPLC-Säulen von Agilent Technologies: Eclipse Plus C 8 150 mm, Eclipse Plus C 18 150 mm und Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 150 mm.	81
Abbildung 37: Total Ion Chromatogramm der Messung von Kalibrationslevel 6 mit einer Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Säule 100 mm.	82
Abbildung 38: Charakteristische Chromatogramme, welche die MRM-Übergänge von Naltrexol (342.2 -> 282.0 @ 29) und Naltrexon-d ₃ (345.2 -> 285.0 @ 29)	

darstellen. Abgebildet ist die Interferenz von Naltrexon-d3 bei den aufgearbeiteten Kalibrationslevel 2 (a), 6 (b) und 8 (c).	83
Abbildung 39: Überprüfung der Linearität. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 LC-MS/MS Messungen von 6 verschiedenen Konzentrationen der 35 Opiode in gespikten Serumproben.	88
Abbildung 40: Aufbau der Elektronenspray Ionenquelle mit der Agilent Jet Stream Technologie (a) und orthogonaler Einleitung des Lösungsmittelstroms (b)...	91
Abbildung 41: Kalibrationsgeraden von Tapentadol (10, 50 und 100 ng/ml) mittels LC-MS Messung.	92
Abbildung 42: TIC und MRM-Übergänge von Tapentadol (222.0 -> 77.0 @ 61, 222.0 -> 107.0 @ 33, 222 -> 121.0 @ 21) und Tapentadol-d3 (225.0 -> 77.0 @ 61, 225.0 -> 107.0 @ 33, 225 -> 121.0 @ 21) bei der Messung einer realen forensischen Serumprobe.	93
Abbildung 43: Kalibrationsgeraden der LC-MS Messung von 5 unterschiedlichen Konzentrationen von Sufentanil (a) und Piritramid (b) im Serum (n = 3). Kalibrationsgerade der GC-MS Messung von 4 unterschiedlichen Konzentrationen Propofol (c).....	103
Abbildung 44: Blutspiegelkonzentrationen (a) und 24 h kumulative Dosis (b) von Sufentanil an den 4 Tagen der klinische Studie der 12 Patienten.....	110
Abbildung 45: 24 h kumulativ Dosis [mg] und Blutspiegel [ng/ml] von Propofol bei Patient Nr. 14 a) und 7 (b).	112
Abbildung 46: Anzahl der Autopsiefälle nach Geschlecht und Alter in Jahren geordnet. Bei 6 männlichen Fällen war das Alter der Verstorbenen nicht bekannt.	119
Abbildung 47: Blutspiegelkonzentrationen der Opiate 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Codein, Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid der 85 Obduktionen.....	121
Abbildung 48: Total Ion Chromatogramm der Messung von Kalibrationslevel 2 einer gespikten Leerhaarprobe mit der Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Säule 100 mm.	123
Abbildung 49: Überprüfung der Linearität. Dargestellt sind Mittelwerte der 6 LC-MS/MS Messungen von 6 verschiedenen Konzentrationen der 35 Opiode in gespikten Haarproben.	127

Abbildung 50: Vergleich der Untersuchungsergebnisse der GC/MS und LC/MS Haaranalyse am Beispiel von Patient Nummer 17 (a), 41 (b) und 48 (c). Mit Sternchen markierte Verbindungen konnten nur in Spuren nachgewiesen werden. 136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte "§ 24a Drogen" Amphetamine, Cannabis, Kokain, Morphin und Alkohol. Anzahl der positiven Befunde und positive Befunde [%].	3
Tabelle 2: Übersicht zu der verwendeten HPLC mit Triple Quadrupol Massendetektor.	35
Tabelle 3: Übersicht zu dem verwendeten GC/MS System.	36
Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte.	36
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	38
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen.	39
Tabelle 7: Übersicht der Kalibrationsstandards Opioid 1 - 8. Konzentrationen der Substanzen in den verschiedenen Kalibratoren.	45
Tabelle 8: Konzentrationen der Kalibrationslevel 1 – 3 von Tapentadol nach Zugabe zu 200 µl Serum.	46
Tabelle 9: Konzentrationen der Kalibrationslevel 1 - 4 von Propofol nach Zugabe zu 200 ml Serum.	47
Tabelle 10: Kalibrationsstandards Opioid 1 - 8. Konzentrationen nach Zugabe des Kalibrators zu Serum.	48
Tabelle 11: Kalibrationsstandards Opioid 1 - 8, die im forensischen Center Ho Chi Minh City verwendet wurden. Konzentrationen nach Zugabe des Kalibrators in Serum.	49
Tabelle 12: Kalibrationsstandards Opioid 1 – 8. Konzentrationen nach Zugabe des Kalibrators zur Haarprobe.	53
Tabelle 13: Lösungsmittelgradient der LC-MS Methode zur Bestimmung der 35 Opioid (Eluent A: Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat; Eluent B: Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure).	54
Tabelle 14: MRM (Multiple reaction monitoring) Übergänge, Kollisionsenergien, Scan Segmente und Retentionszeiten für die einzelnen Analyten.	54
Tabelle 15: Transitionen im ESI + MRM Modus für die internen Standardsubstanzen.	55
Tabelle 16: Lösungsmittelgradient der LC-MS Methode zur Bestimmung von Tapentadol (Eluent A: Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat; Eluent B: Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure).	58

Tabelle 17: Precursor Ionen, Produkt Ionen, Kollisionsenergien und Retentionszeiten zur Bestimmung von Tapentadol und Tapentadol-d ₃	58
Tabelle 18: Massenspuren und Messzeitfenster zur Bestimmung von Propofol und Thymol.	59
Tabelle 19: Erfassung des Analgesieniveaus mittels Behavioral Pain Skala, modifiziert nach Payen et al. 2001.....	64
Tabelle 20: Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausbeuten von 2 unterschiedlichen Aufarbeitungen bei Extraktionsmethode A und B ab 1 % mit Hilfe der C18 Bakerbond Extraktionssäulen. Die Extrakte waren dabei folgendermaßen zusammengesetzt: Extrakt A1: Wasser/Methanol (80:20 v/v), Extrakt A2: Dichlormethan/Aceton (50:50 v/v), Extrakt A3: Dichlormethan/Isopropanol/Ammoniak (40:10:2 v/v/v), Extrakt B1: Wasser/Acetonitril (80:20 v/v), Extrakt B2: Acetonitril/Methanol/Wasser (30:30:20 v/v/v) und Extrakt B3: 0.6 % Diethylamin in Methanol (v/v).	68
Tabelle 21: Dargestellt sind die Extraktionsausbeuten für die Festphasenextraktion mit einer C18 Bakerbond SPE und C18-OH Bond-Elut SPE Säule bei Verwendung der Extraktionsmethode A und Fällung mit Methanol (jeweils n = 1).	70
Tabelle 22: Summenformeln, Molare Massen [g/mol] und die 4 geeignetsten Kollisionsenergien (Collision Energie = CE) nach der Messung mit der Optimizer Software der 35 Opiode.	72
Tabelle 23: Variation der Ionenquelleparameter Gastemperatur [°C], Gasfluß [l/min], Nebulizer Druck [psi], Sheat Gastemperatur [°C], Sheat Gassfluss [l/min], Kapillarspannung [V] und Nozzle Spannung [V].	75
Tabelle 24: Vergleich der Peakflächen der einzelnen Opiode bei Messung mit den default bzw. optimierten Ionenquellenparameter und dem Flächenquotienten [optimiert/default].	76
Tabelle 25: Daten der Methodvalidierung für Serumproben.	89
Tabelle 26: Untersuchungsergebnisse der Blutspiegelkonzentrationen von authentischen forensischen Proben im Überblick (n = 148).	94
Tabelle 27: Konzentrationen der Opiode in post mortem Körperflüssigkeiten und Gewebe (n = 13).	97
Tabelle 28: Untersuchungen zur Stabilität der Opiode in Vollblut nach 0, 8, 24 und 48 h bei Raumtemperatur (n = 3).	104

Tabelle 29: Patientenkollektiv der Klinischen Studie zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden bei Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit Sepsis. Dargestellt sind Patienten-ID, Geschlecht, Geburtsdatum, Körpergröße, Gewicht, BMI und ASA-Klassifikation.	106
Tabelle 30: Dargestellt sind die Blutspiegel (BS) und kumulative Dosen über 24 h (KD) der einzelnen Opioide und Propofol für Patienten 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 und 19 an den Tagen 1 - 4. In der Tabelle finden sich außerdem die Werte von RASS (Richmond Agitation Sedation Skala), BPS (Behavioral Pain Skala), CAM-ICU (Confusion assessment method for the intensive care unit) und ob ein Nierenersatzverfahren (NEV) durchgeführt wurde. Im Fall von der Bestimmung von CAM-ICU bedeutet: nk = not known, negativ = kein Delir vorhanden, X = CAM-ICU wurde nicht erhoben, positiv = Delir vorliegend.	106
Tabelle 31: Analyse der Autopsiefälle im Forensichen Center Ho Chi Minh City von Januar - November 2014, welche im GC-MS Full Scan Screening positiv auf Opiate waren.	114
Tabelle 32: Daten der Methodvalidierung für Haarproben.	129
Tabelle 33: Vergleich der Analyseergebnisse der Patientenhaarproben auf Opioide mittels GC MS und LC MS Messungen.	135

1 Einleitung

1.1 Forensische Toxikologie

1.1.1 Aufgaben

Die allgemeine Toxikologie (griech. "Giftkunde") ist die Wissenschaft von Giftstoffen (Toxinen), den schädlichen Wirkungen von Toxinen auf den menschlichen und tierischen Organismus und der Behandlung von Vergiftungen.

Die forensische Toxikologie stellt ein Teilgebiet der Toxikologie dar und beschäftigt sich mit dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Giften (Haushaltschemikalien, Pestizide, flüchtige Gase), illegalen Drogen, Medikamenten und Alkohol in Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Urin), Mageninhalt, Haaren und Gewebeproben von Organen. Die Untersuchungen der humanen Proben und die Interpretation der Analysenergebnisse durch den forensischen Toxikologen dienen der Aufklärung von speziellen Fragestellungen im Straf-, Zivil- und Versicherungsrecht (5).

Untersuchungsanlass für forensisch-toxikologische Analysen sind folgende Fragestellungen, die entweder eine entsprechende Wirkung einer Substanz oder deren Aufnahme bzw. Abstinenz belegen:

- Vergiftungen (Selbst- oder Fremdbeibringung, Aufklärung von Todesfällen und Körperverletzungen oder gar Tötungen)
- Feststellung der Grundlagen zur Beurteilung der strafrechtlichen Verantwortlichkeit
- Delikte im Straßenkehr durch Konsum von berauschenden Mitteln
- Fahreignungsüberprüfung
- Berufliche Eignung ("Drug-Workplace-Testing")
- Kontrolluntersuchungen bei Drogenentzug und Bewährungsauflagen
- Kontrolluntersuchungen bei Blutspendern (Alkohol und illegale Drogen).

1.1.2 Untersuchungsmaterial

Die Auswahl des Untersuchungsmaterials hängt bei forensisch-toxikologischen Analysen entscheidend von der Fragestellung ab. Es ist zwischen dem Nachweis einer akuten Beeinflussung oder Langzeitwirkung, dem Nachweis einer Aufnahme oder eines chronischen Gebrauchs (evtl. schon länger zurückliegend) und einer Aufnahme und Verteilung in den verschiedenen Körperkompartimenten zu unterscheiden.

Blut (Vollblut, Serum, Plasma) eignet sich als Probenmaterial für den Nachweis einer aktuellen Wirkung. Der Nachweis der Wirkung einer Substanz ist bei Verdacht einer Intoxikation (im Zuge von Todesermittlungsverfahren oder Vergiftungen z. B. im Rahmen

von Sexualdelikten) und bei Delikten im Straßenverkehr durch Konsum psychotroper Stoffe unerlässlich. Häufig lassen sich Substanzen im Blut nach einer erfolgten Aufnahme nach wenigen Minuten quantifizieren. Das Nachweisfenster liegt dabei je nach Substanz bei einigen Stunden oder manchmal auch Tagen.

Wenn nur eine gegebenenfalls todesursächliche Aufnahme belegt werden soll, werden Asservate wie Urin, Mageninhalt und auch Blut nach Sektionen (Femorale Blut und Herzblut) untersucht. Bei Urinanalysen finden sich Substanzen häufig noch Tage oder Wochen nach erfolgter Applikation. Im Urin sind Muttersubstanzen und ihre Metaboliten meist höher als im Blut konzentriert. Das mögliche Zeitfenster einer Analyse ist demnach wesentlich größer als bei Blutuntersuchungen. So kann bei Screeninguntersuchungen von Urin eine subakute Aufnahme bewiesen bzw. eine Abstinenz von Drogen und Medikamenten belegt werden. Analysen von Urin werden beispielsweise bei Verkehrskontrollen, Fahreignungsüberprüfungen und bei "Drug-Workplace-Testing" verwendet.

Eine erfolgte Resorption und Verteilung im Körper kann durch die Untersuchung von Körperflüssigkeiten (Blut, Gallenflüssigkeit, Liquor, Herzbeutelflüssigkeit, und Glaskörperflüssigkeit) und Gewebe (Gehirn, Leber, Lunge, Muskel, Niere, Fettgewebe) bestätigt werden.

Durch die Analytik von Haaren lassen sich Substanzeinlagerungen je nach Länge der Haare häufig nach sehr langen Zeiträumen (Wochen, Monate bis zu Jahren) nachweisen. Es können bei der Einnahme von illegalen Drogen oder Medikamenten Aussagen zur aufgenommenen Dosis und Konsumzeiträumen gemacht werden. Die Haaranalytik spielt heute bei der Überprüfung von Fahreignung und zum Teil bei beruflicher Eignung eine Rolle. Ebenfalls kann die chronische Aufnahme von kleinen Giftmengen (zum Beispiel Umweltgifte) untersucht werden.

1.2 Datenlage zum Arzneimittelgebrauch und Drogenkonsum von Opioiden

Opioide (griech. "dem Opium ähnlich") sind eine chemisch heterogene Gruppe von Substanzen, die natürlichen oder synthetischen Ursprung sein können. Allen Opioiden ist gemein, dass sie an Opioidrezeptoren (μ_1 -, μ_2 -, δ - und κ - Rezeptor) wirksam sind und morphinartige Eigenschaften aufweisen. Sie werden hauptsächlich als Arzneimittel zur Therapie starker nicht anderweitig beherrschbarer Schmerzen und in der Anästhesie eingesetzt, aber auch als illegale Betäubungsmittel mißbraucht.

In den letzten Jahren haben der Missbrauch und die Abhängigkeit von medizinisch eingesetzten Opioiden deutlich zugenommen. In der Europäischen Union verursachen Opioide und Heroin die meisten schweren drogenbezogenen Probleme (1). Die Abhängigkeit von Opioiden stellt den häufigsten Grund für eine Drogentherapie dar. Ein Opioidmissbrauch ist oft mit körperlichen und psychiatrischen Komplikationen wie HIV (Human Immunodeficiency Virus), Hepatitis Infektionen und Suizidalität verbunden. Außerdem verursacht der Missbrauch die Mehrheit der drogenbezogenen Todesfälle (6, 7). Der Gebrauch von Heroin nimmt jedoch seit Jahren kontinuierlich ab. Das ist beispielsweise der Anzahl und auch Menge von Heroinsicherstellungen zu entnehmen. 2011 lag die Anzahl von Heroinsicherstellungen auf dem niedrigsten Level seit 2001. Sie betrug lediglich die Hälfte. In Deutschland sank die Anzahl der Heroinerstkonsumenten von 7868 in 2001 auf 2090 im Jahr 2012 (2, 3).

Die Analyse von polizeilich beauftragten Untersuchungen am Institut für Rechtsmedizin Mainz für die Drogen des § 24a des Straßenverkehrsgesetzes (Amphetamin, Cannabis, Kokain, Morphin und Alkohol) im Untersuchungszeitraum von 2003 – 15.04.2014 ist in Tabelle 1 und Abbildung 1 dargestellt. Dazu wurden 57514 Untersuchungen von Blut-, Urin- und Haaranalysen ausgewertet (8). Insgesamt wurde Amphetamin in 18851 (33 %), Cannabis in 47144 (82 %), Kokain in 4250 (7 %), Alkohol in 9798 (17 %) und Morphin in 3487 (6 %) Fällen nachgewiesen. Seit 2003 ist auch in diesem Untersuchungskollektiv ein stetiger Rückgang der positiven Befunde von Morphin/Heroin zu verzeichnen. 2003 lag der Anteil der positiven Befunde noch bei 10 %, sank 2009 auf 6 % und lag 2014 bei gerade mal 3 %.

Tabelle 1: Untersuchte "§ 24a Drogen" Amphetamine, Cannabis, Kokain, Morphin und Alkohol. Anzahl der positiven Befunde und positive Befunde [%].

Untersuchte Drogen	Anzahl positiver Befunde	Positive Befunde [%]
Amphetamine	18.851	33%
Cannabis	47.144	82%
Kokain	4.250	7%
Morphin	3.487	6%
Alkohol	9.498	17%

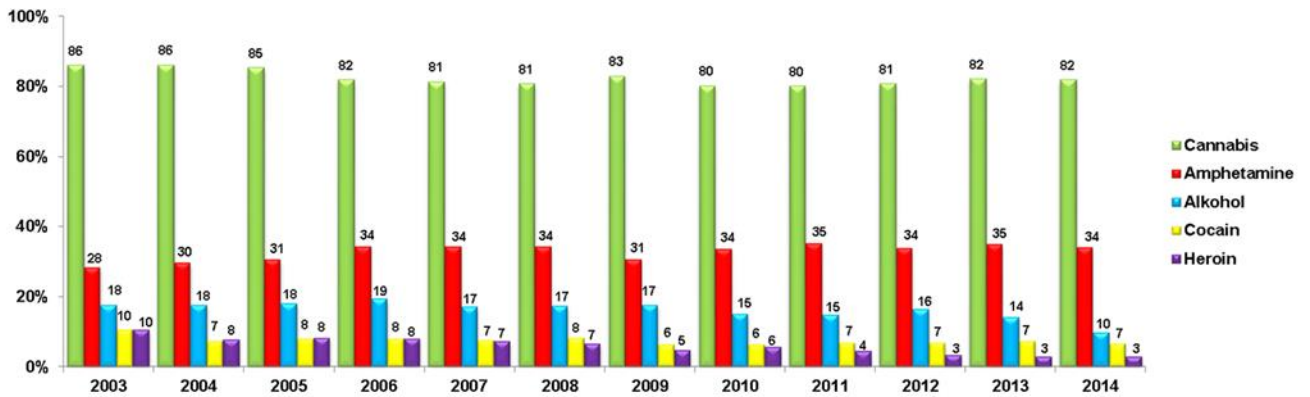


Abbildung 1: Häufigkeit der konsumierten "§ 24a STVG Drogen" im Zeitraum 2003 - 2014 (n = 57514).

In den letzten zehn Jahren wurde Heroin in großem Maße durch andere Opiode ersetzt. 2011 berichteten 11 Länder der europäischen Union, dass mindestens 10 % der Personen, die eine Drogentherapie begannen, sich andere Opiode wie Fentanyl, Methadon oder Buprenorphin appliziert hatten. Zum Beispiel benutzen Drogenabhängige in Finnland hauptsächlich Buprenorphin. Fentanyl wurde am häufigsten von Personen, die sich in einer Drogensubstitutionstherapie in Estland befinden, illegal benutzt (2). Fentanyl wird häufig auch in anderen Applikationsformen benutzt. So werden Fentanylpflaster extrahiert und in die Vene gespritzt, gekaut oder geschluckt (9-11). Heutzutage sind die weit verbreitetsten Substitutionsmittel Methadon (57.7 %, Levomethadon 2010: 23 %) und Buprenorphin (2002: 9.7 % und 2010: 23 %). 2010 wurden Dihydrocodein (0.3 %), Diacetylmorphin (0.3 %), Codein (0.1 %) und langsam freisetzende Morphintabletten ebenfalls als Substitutionsmittel genutzt (12, 13).

Schwabe und Paffrath et al. zeigten im Arzneimittelreport für Deutschland von 2013, dass opioide Arzneimittel 3 mal häufiger als noch 1997 von Ärzten verschrieben wurden (4). Über die Hälfte dieser Verschreibungen waren relativ schwach wirksame Arzneistoffe wie Tramadol und Tilidin. Die häufigsten stark wirksamen Produkte waren transdermale Fentanylpflaster und Oxycodon. Jedoch ist die Anzahl von Verschreibungen für den "Goldstandard" Morphin seit Jahren rückläufig. Noch vor 50 Jahren waren über 60 % der Verschreibungen von Opioiden auf Morphin Verordnungen zurückzuführen. In heutiger Zeit kann eine kontinuierliche Verringerung der Morphinverschreibungen verzeichnet werden. So lag diese 2013 bei nur 12 % der gesamten Opioidverordnungen. Im Jahr 2012 war die Gruppe an verschriebenen Opioiden weiter angestiegen. Seit 2011 hat sich der Gebrauch von Oxycodon + 7 %, Hydromorphon + 5.1 % und Tilidin + 5.9 % relativ stark erhöht (4, 14). Außerdem erscheint eine Vielzahl an medizinischen Präparaten und gut bekannten

Opioiden, die nicht mehr legal verfügbar sind, wie Pentazocin und Pholcodin in Deutschland und Desomorphin in Russland und den USA, auf dem illegalen Drogenmarkt (15).

1.3 Wichtige Vertreter der Opioide

Die wichtigsten Opioide inklusive ihrer Metaboliten (16) können im Hinblick auf ihr Anwendungsgebiet eingeteilt werden (siehe Abbildung 2).

Auf Intensivstationen aber auch in der Palliativmedizin werden vor allem stark und schnell wirksame Analgetika und Narkotika wie Alfentanil, Pethidin (Norpethidin), Piritramid, Remifentanil und Sufentanil verwendet. In der Allgemeinmedizin werden ebenfalls Schmerzmittel, wie Hydrocodon und Tapentadol angewandt. Außerdem spielen Präparate gegen Reizhusten wie zum Beispiel Codein, Dihydrocodein (Dihydromorphin) und Dextrometorphan (Dextrorphan) eine bedeutende Rolle. Zur Substitution bei Heroinmissbrauch wird Methadon eingesetzt. Einige Arzneistoffe werden sowohl auf Intensivstation bzw. in der Palliativmedizin, wie auch in der Allgemeinmedizin verwendet. Schmerzmittel hierbei sind Fentanyl (Norfentanyl), Hydromorphon, Morphin (Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid), Tilidin (Nortilidin, Bisnortilidin), Oxycodon, Oxymorphon und Tramadol (O-Desmethyltramadol). Buprenorphin (Norbuprenorphin) wird als Analgetikum und zur Heroinsubstitution eingesetzt. Einige Opioide spielen in Deutschland hauptsächlich im forensischen Bereich eine Rolle, wie beispielsweise Diacetylmorphin (6-Monoacetylmorphin), Desomorphin, Ethylmorphin, Pentazocin und Pholcodin. Alle in Abbildung 2 aufgeführten Substanzen können je nach Fragestellung eine forensisch-toxikologische Relevanz haben.

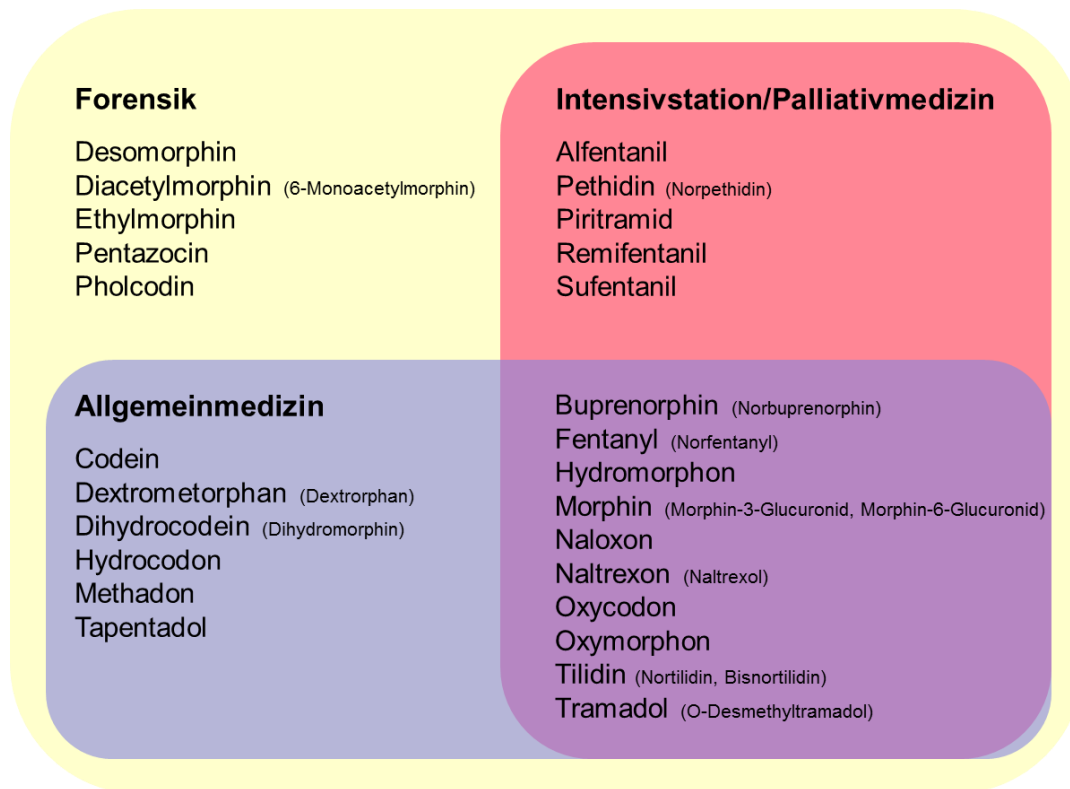
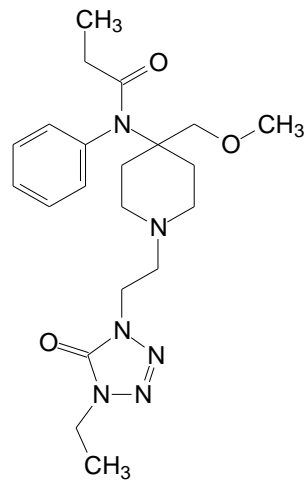


Abbildung 2: Zuordnung der Opioide und ihre Metaboliten zu den verschiedenen Anwendungsbereichen in der Forensik, der Allgemeinmedizin und auf Intensivstation bzw. in der Palliativmedizin.

Alfentanil (ALF)

Alfentanil ist ein stark wirksames Analgetikum, welches in der Anästhesie verwendet wird. Die Wirkstärke ist in etwa 40- bis 70-mal größer als die des Morphins. Bei einer i.v. Injektion ist die Wirkung nach etwa einer Minute erreicht und hält in etwa 10 – 15 min an. Es wird für kurzfristige und sehr schmerzhafte operative Eingriffe (Dosierung 15 – 50 µg/kg Körpergewicht) eingesetzt. Das Neben- und Wechselwirkungsprofil entspricht in etwa dem chemisch verwandten Fentanyl. In Deutschland ist Alfentanil als Handelspräparat Rapifen durch Janssen-Cilag und als Generikum auf dem Markt erhältlich.



Alfentanil

Abbildung 3: Chemische Struktur von ALF.**Buprenorphin (BUP) und Norbuprenorphin (NB)**

Buprenorphin wird als starkes Analgetikum verwendet. Seit 1990 wird es aufgrund der starken Schmerzlinderung, dem Ceiling-Effekt und dem geringen Abhängigkeitspotenzial in der Substitutionstherapie von Opiatkonsumenten eingesetzt. Durch eine geringe Toleranzentwicklung ist eine leichtere Abdosierung mit milderem Entzugssymptomen im Vergleich zu Methadon möglich (17). Es wird halbsynthetisch aus dem Opiumalkaloid Thebain hergestellt. Buprenorphin ist ein partieller Agonist am μ -Rezeptor (relative intrinsische Affinität von 0.5) und ein Antagonist am κ -Rezeptor. Primär wird Buprenorphin durch N-Dealkylierung zu dem pharmakologisch aktiven Metaboliten Norbuprenorphin (Abbildung 4) abgebaut (18). Norbuprenorphin selbst besitzt etwa 1/50 der analgetischen Wirkstärke von Buprenorphin. In der Substitutionsmedizin liegt die Buprenorphin-Initialdosis bei 2 – 4 mg und kann auf maximal 24 mg/Tag gesteigert werden (19, 20). In Deutschland wurden 2012 11.1 Mio Tagesdosen von Buprenorphinpräparaten verordnet. Damit stieg die Anzahl der Verschreibungen leicht um + 0.3 % gegenüber 2011 (4). Bei den Verordnungen stark wirkender Opioidanalgetika zur Substitution wurden 2012 0.3 Mio Tagesdosen verschrieben (+ 53.7 % im Vergleich zu 2011). Buprenorphin wird in Deutschland als Monopräparat Subutex, Temgesic, Transtec, verschiedene Generika und als Kombinationspräparat mit Naloxon (Suboxone) vertrieben.

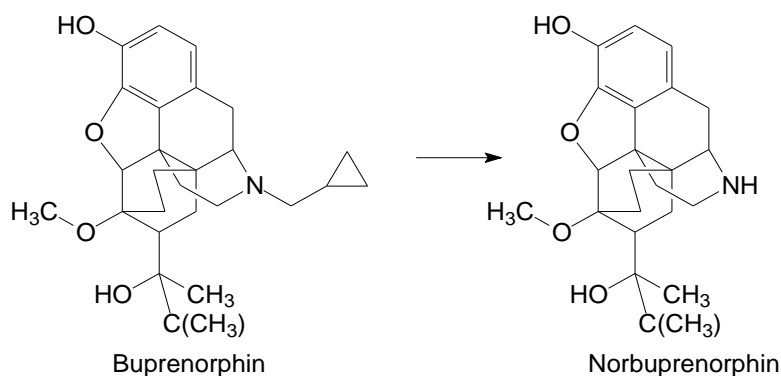
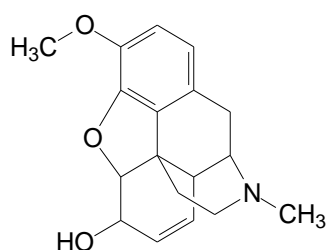


Abbildung 4: Chemische Struktur von BUP und NB.

Codein (COD)

Codein wird als Analgetikum und Antitussivum verwendet. Es kommt nativ im Opiumsaft mit einem Anteil von 0,3 – 3 % vor. Codein wirkt selbst agonistisch am μ -Rezeptor und wird etwa zu 10 % durch CYP2D6 zu seinem aktiven Metaboliten Morphin demethyliert. Seine analgetische Potenz liegt im Vergleich zu Morphin bei etwa 0,1. Als Arzneistoff wird es in Einzeldosen von 10 – 60 mg (maximale Tagesdosis 184 mg) verwendet. 2012 war ein Anstieg der Verordnungen von Codeinkombinationen um mehr als 10 % zu verzeichnen, wobei Verschreibungen der Kombination mit Paracetamol rückläufig waren (4). In Deutschland ist Codein als Monopräparat gegen Husten, beispielsweise Codicaps mono und als Kombinationspräparat gegen Schmerzen (Dolomo N, Gelonida) erhältlich.



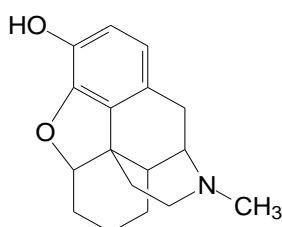
Codein

Abbildung 5: Chemische Struktur von COD.

Desomorphin (DES)

Ist ein starkes Schmerzmittel, welches 1932 zum ersten Mal in den USA hergestellt wurde (21). Vor Jahrzehnten war es unter dem Handelsnamen Permonid in der Schweiz (Hersteller Roche) zugelassen. In Deutschland ist Desomorphin ein nicht verkehrsfähiges Betäubungsmittel. 2011 erlangte Desomorphin als "Droge des armen Mannes" in Russland traurige Berühmtheit. Die Heroinpreise stiegen in Russland durch verstärkte Grenzkontrollen zum Teil auf das Fünffache. Desomorphin wurde als

Heroinersatz illegal aus Codein, Jod und rotem Phosphor (damals in Russland in Apotheken freiverkäuflich) hergestellt. Ausgangskemikalien und organische Lösungsmittel wurden nach der Herstellung kaum abgetrennt. Zusammen mit den stark toxischen Nebenprodukten führt die Injektion des illegal hergestellten Desomorphin Gemischs zu schweren Gewebeschäden bis hin zu notwendigen Amputationen von Gliedmaßen. Desomorphin wird auf Grund von grünlichen Verfärbungen an der Injektionsstelle als "Krokodil Droge" bezeichnet (22, 23). Die Überlebensdauer für Konsumenten liegt nach Aussage einer Drogen-Initiative in Russland bei einem Jahr. 2013 wurde illegales Desomorphin auch in den USA benutzt (24). In Deutschland wurde Desomorphin als Verschnitt von Heroin in kleinsten Mengen sichergestellt.



Desomorphin

Abbildung 6: Chemische Struktur von DES.

Dextromethorphan (DMP) und Dextrorphan (DP)

Dextromethorphan wurde medizinisch nur als Hustenstiller bei Reizhusten eingesetzt, obwohl sein L-Isomer narkotische und analgetische Wirkung besitzt. Seit 2013 ist es in der Europäischen Union darüber hinaus bei schweren neurologischen Störungen zur Behandlung von Gefühlsregulationsstörungen zugelassen. Dextromethorphan wird bei Husten in Einzeldosen von 2.5 bis 30 mg (maximale Tagesdosis 120 mg) verordnet. Im Körper wird Dextromethorphan durch CYP2D6 an der Hydroxylgruppe zum Dextrorphan (Abbildung 7) demethyliert (25). Dextrorphan selbst wirkt hustenreizstillend und antagonistisch am NMDA-Rezeptor. Dies kann zu psychoaktiven Nebenwirkungen von Dextromethorphan bei Stoffwechselanomalien oder höheren Dosierungen führen (26). Dextromethorphan kann bei entsprechenden Dosen als Rauschmittel missbraucht werden (27). Bei chronischem Konsum besteht die Gefahr der Entwicklung von Psychosen (28).

In Deutschland sank die Anzahl der Verordnungen des Arzneimittels Neo Tussan 2012 um -23.3 % im Vergleich zum Vorjahr. Es sind beispielsweise die Fertigarzneimittel Hustenstiller-Ratiopharm, Neo Tussan, Wick MediNait und Contac

Erkältungs-Trunk freiverkäuflich in Apotheken erhältlich.

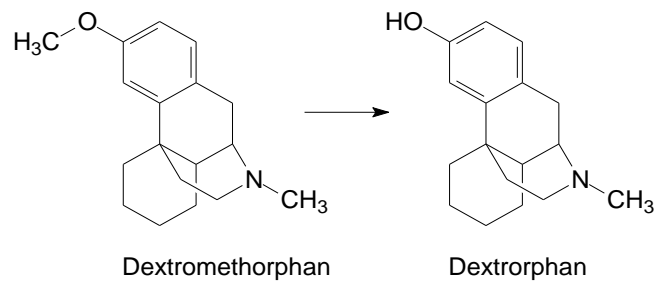


Abbildung 7: Chemische Struktur von DMP und DP.

Diacetylmorphin und sein Stoffwechselprodukt **6-Monoactelymorphin (6-MAM)**

Diacetylmorphin (Diamorphin) wird zumeist umgangssprachlich als Heroin (griech. heros für Held) bezeichnet. 1896 wurde Heroin von Felix Hoffman in der Firma Bayer halbsynthetisch durch die Reaktion von Morphin mit Essigsäureanhydrid hergestellt. Das Präparat Heroin wurde als Schmerz- und Hustenmittel verwendet. 1931 wurde die Heroinproduktion von Bayer wegen massiver Abhängigkeitserscheinungen eingestellt. 1971 wurde Heroin generell für den medizinischen Einsatz verboten. Diacetylmorphin wird im Körper nach wenigen Minuten zu 6-Monoactelymorphin abgebaut und etwas später in 3 Position zu Morphin deacetyliert (29). Die intrinsische Aktivität von 6-Monoactelymorphin am μ -Rezeptor ist größer als die des Morphins. Außerdem ist die Lipophile von 6-Monoactelymorphin höher, wodurch es leichter die Bluthirnschranke überwinden kann. Das erklärt die starke Rauschentwicklung nach intravenöser Injektion von Heroin.

Heute wird Heroin fast ausschließlich als illegale Droge auf dem Schwarzmarkt gehandelt. Es wird i.v. und nasal appliziert oder geraucht. Obwohl der Konsum von Heroin in der Europäischen Union seit Jahren rückläufig ist (neue Heroinpatienten 2007: 59000; 2012: 31000 in Europa), stellt die Heroinsucht für den einzelnen Konsumenten ein großes Problem dar (30). Aufgrund der extremen psychischen und körperlichen Abhängigkeit der Konsumenten von illegalem Straßenheroin und der zum Teil sehr schlechten Therapierbarkeit der Heroinsucht, wird seit 2002 in einigen Bundesländern ein Modellprojekt zur kontrollierten heroingestützten Behandlung opiatabhängiger Patienten durchgeführt.

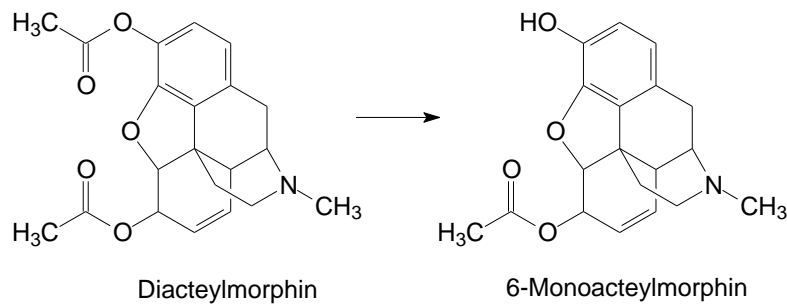


Abbildung 8: Chemische Struktur von Heroin (Diacetylmorphin) und Metabolit 6-MAM.

Dihydrocodein (DH) und Dihydromorphin (DM)

Dihydrocodein ist ein semisynthetisches Opioid, welches durch Hydrierung von Codein entsteht. Verwendet wird Dihydrocodein als Schmerzmittel und Antitussivum. Vor einigen Jahren wurde es relativ häufig zur Substitution opiatabhängiger Patienten eingesetzt. Die Tageshöchstdosis liegt bei 192 mg (Einzeldosen 7.5 – 30 mg).

Durch das Enzym CYP2D6 wird Dihydrocodein im Körper zu Dihydromorphin abgebaut (31). In Deutschland geht die Anzahl an Verordnung von Dihydrocodein kontinuierlich zurück. 2012 wurden 6.5 Mio Tagesdosen verordnet, was einer Änderung von – 9.8 % zum Vorjahr entspricht (4). Fertigarzneimittel sind zum Beispiel Paracodein, Tiamon und verschiedene Generika wie DHC.

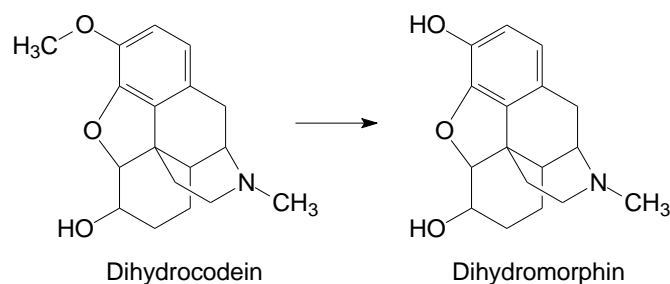


Abbildung 9: Chemische Struktur von DH und DM.

Ethylmorphin (EM)

Ethylmorphin wurde zum ersten Mal 1884 von der Firma Merck synthetisiert und als schwächere Alternative zu Diacetylmorphin verwendet. Heute wird es in einigen Ländern für verschiedene Indikationen in Dosierungen von 5 bis 50 mg eingesetzt. Ethylmorphin wird als Antitussivum (in Frankreich Tussipax), mittelstarkes Schmerzmittel (Indalgin), in der Ophthalmologie bei Augeninfektionen und als Substitutionsmittel bei Heroinmissbrauch verwendet (32).

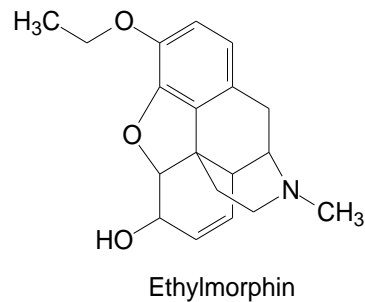


Abbildung 10: Chemische Struktur von EM.

Fentanyl (FEN) und Norfentanyl (NF)

Fentanyl ist ein synthetisches Opioid, welches 1960 von Paul Janssen entwickelt wurde. Es wird bereits seit 1963 bei akuten und chronischen Schmerzen und als Narkotikum eingesetzt. Der μ -Rezeptor-Agonist hat mehr als die hundertfache analgetische Potenz von Morphin. Fentanyl wird als Injektion in Dosierungen von 25 – 100 μg (Notfallmedizin), im Fall von Pflastern 25 – 100 $\mu\text{g/h}$ (chronische Schmerzen), bucal 100 – 1600 μg (Durchbruchschmerzen bei Tumorpatienten) und nasal 100 – 400 μg (Durchbruchschmerzen bei Tumorpatienten) verwendet.

Fentanyl wird sehr häufig als illegales Rauschmittel missbraucht. Auf dem Drogenmarkt erscheinen oft chemisch-modifizierte Varianten des Fentanyls als Designerdrogen. So sind zum Beispiel 3-Methylfentanyl (10000-fache Potenz von Morphin), α -Methylfentanyl (200-fache Potenz von Morphin), α -Methylthiofentanyl (450-fache Morphinpotenz) noch potenter als Fentanyl selbst (33).

Fentanyl wird im Körper zu Norfentanyl abgebaut (Abbildung 11). Norfentanyl kann im menschlichen Plasma in gleichen Konzentrationen wie die Muttersubstanz selbst gefunden werden (34). Fentanyl ist neben Oxycodon das führende stark wirkende Opioidanalgetikum bei starken Schmerzen. 2012 wurden 59.2 Mio Tagesdosen verschrieben (4).

In Deutschland gibt es zahlreiche Fertigarzneimittel mit Fentanyl auf dem Markt, wie zum Beispiel Abstral (Sublingualtabletten), Actiq (Lutschtabletten) und Durogesic (transdermales Pflaster).

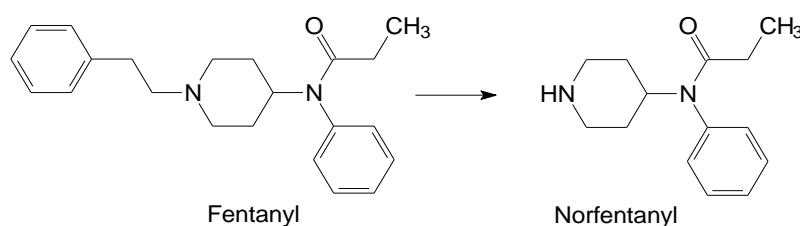
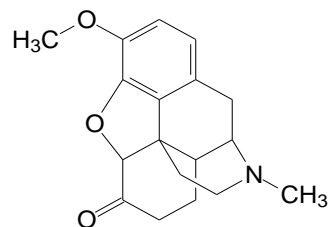


Abbildung 11: Chemische Struktur von FEN und Stoffwechselprodukt NF.

Hydrocodon (HC)

Hydrocodon ist ein halbsynthetisches Opioid, das ausgehend vom Codein oder Thebain hergestellt wird. Es wirkt stark analgetisch (etwa 0.2 bis 0.6 analgetische Potenz im Vergleich zu Morphin) und hustenreizstillend (etwa 2 bis 8-fache Potenz von Codein). Die maximale Tageshöchstdosis liegt bei 45 mg (Einzeldosis bei Husten: 2.5 – 5 mg, Einzeldosis bei Schmerzen: 5 – 10 mg). Hydrocodon wird im Körper durch O-Demethylierung zum pharmakologisch aktiven Metaboliten Hydromorphon verstoffwechselt (35, 36). Hydrocodon ist beispielsweise in den USA (häufig in Kombination mit Paracetamol oder Ibuprofen, wie z.B. Vicodin) und Luxemburg (Biocodone) als Arzneimittel erhältlich. In Deutschland ist es nicht verschreibungsfähig.



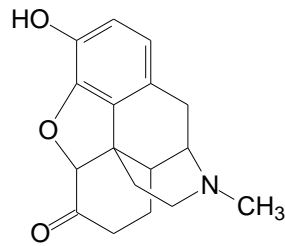
Hydrocodon

Abbildung 12: Chemische Struktur von HC.

Hydromorphon (HM)

Hydromorphon ist ein stark wirkendes Analgetikum (etwa 7 bis 10-fache Potenz von Morphin) und Arzneimittel gegen Reizhusten, welches seit 1953 verordnet wird. Hydromorphon wird bevorzugt zur Schmerztherapie bei älteren Patienten eingesetzt. Oral wird Hydromorphon in Dosierungen von 1 – 4 mg und i.v. 1 – 2 mg alle 4 bis 6 h gegeben. Oft haben ältere Patienten eine verringerte Ausscheidungsfunktion über die Niere. Bei Morphingabe kann es dadurch zur Kumulation von Morphin-3-glucuronid im Körper und damit zu Nebenwirkungen, wie Agitation und Krampfanfällen kommen (37, 38). 2012 wurden in Deutschland 18.6 Mio Tagesdosen Hydromorphon verschrieben. Damit stieg die Anzahl an Verordnungen in einem Jahr um + 5.1 (4).

In Deutschland gibt es die Handelspräparate Palladon, Jurnista und Generika.

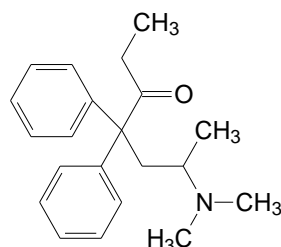


Hydromorphon

Abbildung 13: Chemische Struktur von HM.**Methadon (MET)**

Methadon ist stark schmerzstillend und wirkt rein agnostisch am μ -Rezeptor. Als Methadon wird das Racemat aus Levo- und Dextromethadon bezeichnet. Es wird u.a. vollsynthetisch durch die Kolbe-Nitrilsynthese hergestellt und liegt häufig im Verhältnis 1:1 von L- und D-Methadon vor.

1964 wurde Methadon erstmalig in New York durch Melzack und Wall zur kontrollierten Substitution von Opiatabhängigen eingesetzt (39). Methadon hat eine lange Plasmahalbwertszeit und ist oral verfügbar. Bei der Methadonsubstitution sollen Abstinenzsymptome vom Heroinkonsum neutralisiert und der Konsument physisch, sozial und beruflich stabilisiert werden. Bei der Entzugsbehandlung wird Methadon zunächst als Vorsichtsmaßnahme unterhalb der letalen Dosis von nichttoleranten Individuen in einer Dosis von 30 bis 40 mg gegeben. Diese wird dann täglich gesteigert (maximal 5 – 10 mg pro Tag), bis der Patient sich wohl fühlt und weder Entzugssymptome noch Überdosierungserscheinungen zeigt. Methadon ist in Deutschland als Fertigarzneimittel u.a. als Racemat (Methadict, 2012 3.1 Mio Verordnungen) oder nur als ein Enantiomer (L-Polamidon, 2012 4.1 Mio Verordnungen in Deutschland) verfügbar. 2012 wurden in Deutschland 5.2 Mio Verordnungen von Methadonzubereitungen als Rezeptur verschrieben (4).



Methadon

Abbildung 14: Chemische Struktur von MET.

Morphin (MOR) und seine aktiven Stoffwechselprodukte **Morphin-3-Glucuronid (M3G)** und **Morphin-6-Glucuronid (M6G)**

Morphin wurde 1804 von dem Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner erstmalig aus getrocknetem Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) isoliert. Das Opiat wurde wegen seiner stark analgetisch und betäubenden Wirkung (hauptsächlich μ -Rezeptor-Agonist) nach dem griechischen Gott der Träume Morpheus benannt.

Initial wird Morphin in Dosen von 1 – 10 mg i.v. bei 70 kg Körpergewicht gegeben. Oral wird Morphin in Dosen von 5 – 30 mg aller 4 h bzw. in retardierter Form 15 – 200 mg alle 8 – 24 h eingenommen. Es wird hauptsächlich bei starken und sehr starken akuten und chronischen Schmerzen (z. B. bei Tumorpatienten) verwendet.

Um das apolare Morphin auszuschleiden wird es in der Leber durch Bindung an Glucuronsäure zu den 2 Hauptstoffwechselprodukten Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid umgebaut (siehe Abbildung 15). Morphin-6-Glucuronid ist analgetisch wirksam (40). Morphin-3-Glucuronid wirkt nicht schmerzlindernd, steht aber zusammen mit seinen Metaboliten im Verdacht starke Nebenwirkungen wie Atemdepression bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen auszulösen (41). Die Anzahl der Verschreibungen des als Goldstandard (Stufe 3 des Schemas bei Tumorschmerzen der World Health Organization) empfohlenen Morphins ist in Deutschland seit Jahren rückläufig. Die Anzahl der verordneten Tagesdosen lag 2012 bei 17.6 Mio (Verordnungsanteil der starken Opiode 12 %). Das sind 1.8 % weniger als noch 2011 (4).

Morphin wird in Deutschland als Generika (Kapanol, M-beta, MSI, M-Stada) u.a. in Form von Tabletten, Kapseln, Zäpfchen und als Injektionslösung vertrieben.

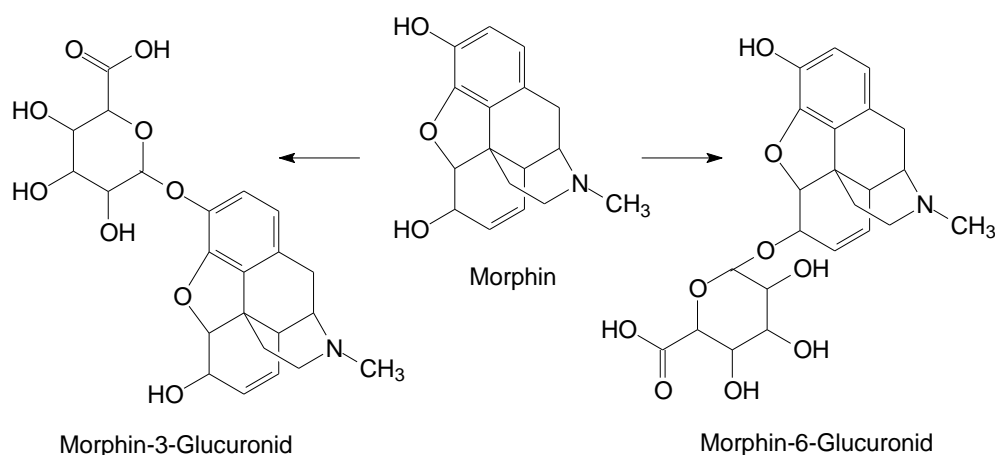
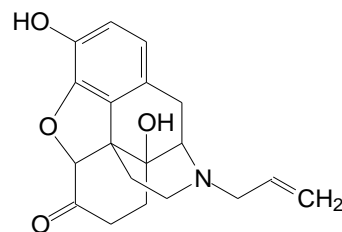


Abbildung 15: Chemische Struktur von MOR und Metaboliten M3G und M6G.

Naloxon (NON)

Naloxon wird seit 1962 klinisch genutzt um die Wirkung von Opiaten und Opioiden aufzuheben. Es ist ein kompetitiver Antagonist an den μ -, κ - und δ -Rezeptoren (42, 43). Der Arzneistoff wird als Antidot gegen Atemdespression bei Überdosierung von Opioiden, zur Diagnostik einer Opiatabhängigkeit und als Arzneimittel gegen Suchtdruck (Anti-craving) verwendet. Ferner wird Naloxon (0.5 – 20 mg) in Kombination mit Opioidanalgetika (Tilidin, Oxycodon und Buprenorphin) benutzt, um eine missbräuchliche, parenterale Verwendung von Medikamenten zur oralen Anwendung auszuschließen.

Monopräparate in Deutschland sind Narcanti (Injektionslösung) und Kombinationspräparate wie Suboxone (mit Buprenorphin), Valoron (mit Tilidin) und Targin (mit Oxycodon).



Naloxon

Abbildung 16: Chemische Struktur von NON.

Naltrexon (NEN) und Naltrexol (NEL)

Naltrexon wirkt wie Naloxon auch antagonistisch an allen Opioidrezeptoren (42). Es wird wegen der langfristigen Rezeptorblockade zur Abstinenzhilfe (Anti-craving) bei Opiat- oder Alkoholabhängigkeit eingesetzt (44, 45). Die übliche Tagesdosis liegt bei 50 mg. Naltrexon wird im Körper zu 6 β -Naltrexol abgebaut (46). Naltrexol ist pharmakologisch aktiv und hat eine höhere Eliminationshalbwertszeit (47, 48). In Deutschland ist Naltrexon als Adepend, Nemexin und als Generikum auf dem Markt.

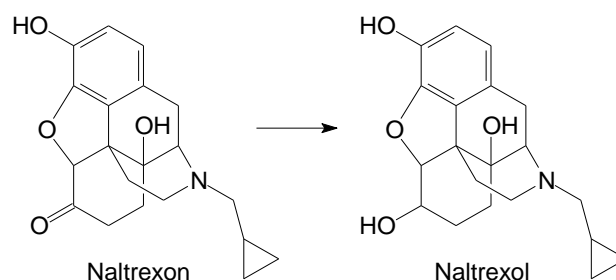
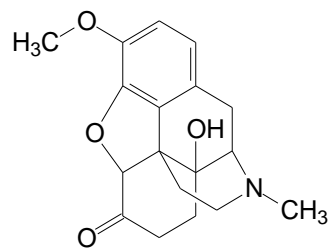


Abbildung 17: Chemische Struktur von NEN und Metabolit NEL.

Oxycodon (OC)

Oxycodon ist ein halbsynthetisches Opioid, welches sich vom Thebain ableitet und stark analgetisch wirkt. Bei subkutaner Gabe wirkt es etwa equipotent wie Morphin. Wird es jedoch oral oder parenteral gegeben hat es die doppelte analgetische Wirkung im Vergleich zu Morphin. Erwachsenen wird Oxycodon oral in Dosen von 2.5 – 5 mg alle 4 – 6 h bzw. 10 – 80 mg alle 12 h bei retardierter Freisetzung gegeben. 2012 war das Arzneimittel Targin (Oxycodon und Naloxon) mit 131.0 Mio Nettokosten eines der 30 führenden Fertigarzneimittel in Deutschland (4).

1917 wurde Oxycodon von der Firma Merck als Eukodal auf den Markt gebracht. In Deutschland wurde es 1990 wegen sehr hoher Sucht- und Missbrauchsgefahr vom Markt genommen und 2003 als Oxygesic (Mundipharma) wieder eingeführt. Heute gibt es zahlreiche Generika und Kombinationen mit Naloxon (Targin).

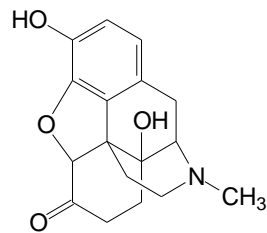


Oxycodon

Abbildung 18: Chemische Struktur von OC.

Oxymorphon (OM)

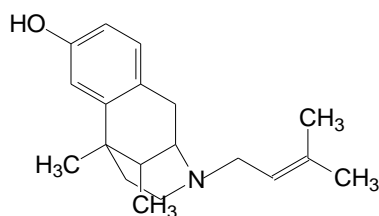
Oxymorphon wird bei starken Schmerzen in der Akut- und Langzeitbehandlung eingesetzt. Seine analgetische Potenz ist etwa 6 – 8 mal so hoch wie die des Morphins, da es agonistisch am μ - und κ -Rezeptor mit hoher intrinsischer Aktivität und Rezeptoraffinität wirkt. Darüber hinaus wird es als Anästhetikum verwendet. Oral wird Oxymorphon alle 4 – 6 h 5 – 20 mg und subkutan alle 4 – 6 h 0.5 – 1.5 mg gegeben. Oxymorphon wurde bereits 1957 von Lewenstein und Weiss synthetisiert und patentiert, jedoch erst 1995 von der Food and Drug Administration (FDA) in Amerika als Arzneimittel zugelassen. Oxymorphon wird wie Oxycodon großtechnisch aus dem Opiat des Schlafmohns Thebain hergestellt. Das Opioid ist ein aktiver Metabolit von Oxycodon (49). Fertigarzneimittel mit Oxymorphon sind in Deutschland nicht zugelassen, da es nach Anlage II des Betäubungsmittelgesetzes verkehrsfähig, aber nicht verschreibungsfähig ist. In den Vereinigten Staaten ist Oxymorphon (OxyContin) oral und als Injektionslösungen (Numorphan) zugelassen.



Oxymorphon

Abbildung 19: Chemische Struktur von OM.**Pentazocin (PEN)**

Pentazocin ist ein zentralwirksames Schmerzmittel. Das Präparat Fortral ist in Deutschland seit 2006 nicht mehr im Handel, da die fiktive Zulassung erloschen ist. Verglichen mit Morphin zeigt Pentazocin eine Potenz von 0.4 und wurde in Einzeldosen von 30 – 100 mg eingesetzt (43). Pentazocin ist ein gemischter Agonist/Antagonist am Opioidrezeptor. Es wirkt agonistisch am κ -Rezeptor, wodurch die analgetische Wirkung ausgelöst wird und antagonistisch am μ -Rezeptor. Liganden, die am κ -Rezeptor statt am μ -Rezeptor binden, lösen eine geringere Abhängigkeitsentwicklung als reine μ -Agonisten aus. In Tierversuchen ließ sich dies durch eine fehlende Selbstinjektion bei Pentazocin-gewöhnten Affen und einer fehlenden Unterdrückung von Abstinenzsymptomen bei morphinabhängigen Hunden nachweisen (50).



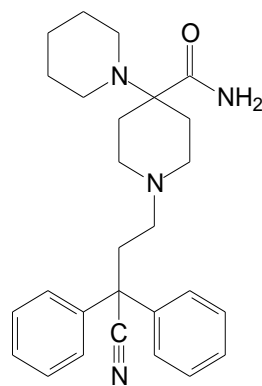
Pentazocin

Abbildung 20: Chemische Struktur von PEN.**Pethidin (MEP) und Norpethidin (NM)**

Pethidin wurde in den 30-iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Otto Schaumann und Otto Eisleb erstmalig hergestellt. Damit ist es das älteste vollsynthetische Opioid und weltweit eines der bedeutendsten Analgetika (in USA als Meperidine bezeichnet). Der μ -Rezeptor-Agonist hat in etwa 1/8 der analgetischen Potenz von Morphin.

Pethidin wird im Körper zu seinem pharmakologisch aktiven Metaboliten Norpethidin

patientenkontrollierte Analgesie verwendet. Seine analgetische Potenz liegt verglichen mit Morphin bei 0.7. Die Wirkdauer beträgt etwa 5 bis 8 h. Bei intravenöser Applikation wird dem Patienten zunächst 3, 6 oder 9 mg Piritramid gegeben, anschließend Kreislauf und Atmung kontrolliert und evtl. erneut 3 oder 6 mg appliziert (bei patientenkontrollierter Analgesie beträgt die Lockoutzeit 15 min). In Deutschland ist das Analgetikum das meist verwendete Opioid nach einer Operation. Es wurde 2012 in 0.08 Mio Tagesdosen verordnet. Im Vergleich zu 2011 ist ein leichter Rückgang der Verordnungen von - 5.8 % zu verzeichnen (4). In Deutschland ist Piritramid als Präparat Dipidor von Janssen-Cilag und als Generika (Arzneimittelhersteller Hameln) auf dem Markt.

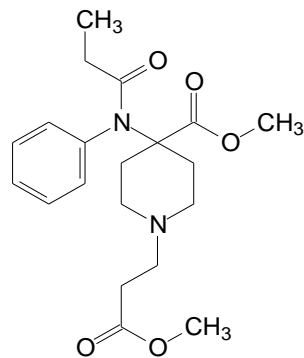


Piritramid

Abbildung 23: Chemische Struktur von PIR.

Remifentanil (REM)

Remifentanil wird überwiegend in der totalen intravenösen Anästhesie (TIVA) und der Neuroleptanästhesie verwendet. Das Analgetikum ist ein reiner μ -Opioidrezeptoragonist und wirkt in etwa 200-mal stärker als Morphin. Das Wirkungsmaximum wird wie beim Alfentanil innerhalb einer Minute erreicht. Nach Abstellen der Infusion erholt sich der Patient bereits nach 5 min. Remifentanil wird im Blut sehr schnell durch Esterasen zu pharmakologisch unwirksamen Metaboliten abgebaut (54). Das starke Opioid wird zur Einleitung einer Narkose (initial: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht, Erhaltungsdosis: 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht) zusammen mit Propofol oder Etomidate (USA) verwendet. Neben dem Handelspräparat Ultiva von GlaxoSmithKline sind in Deutschland noch mehrere Generika auf dem Markt. 2012 lagen die hausärztlichen Verordnungen von Remifentanil nur bei ungefähr 300. Davon waren etwa 39.7 % Generika (4).

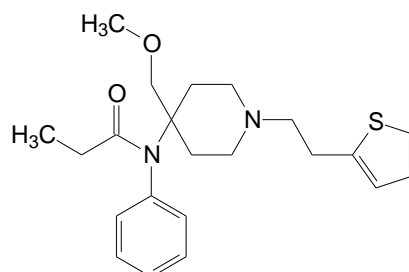


Remifentanyl

Abbildung 24: Chemische Struktur von REM.**Sufentanyl (SUF)**

Sufentanyl ist das stärkste Schmerzmittel, das in Deutschland in der Humanmedizin zugelassen ist. Seine analgetische Potenz ist in etwa 900-mal stärker als die des Morphins. Noch wirksamer sind Carfentanyl und Lofentanyl. Carfentanyl ist in etwa 4000-mal potenter als Morphin und wird in der Veterinärmedizin zur Betäubung von Löwen und Eisbären eingesetzt. Lofentanyl wirkt 6000-fach stärker analgetisch als Morphin. Es bindet jedoch bis zu 24 h am μ -Rezeptor und wird daher praktisch nicht verwendet.

Aufgrund seiner starken Schmerzunterdrückung (hohe Affinität und hohe intrinsische Aktivität am μ -Rezeptor) wird Sufentanyl in der Intensivmedizin und der Anästhesie verwendet. Je nach Operationstyp wird für Sufentanyl eine Einleitungs-dosis von 0.55 bis 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht und eine Erhaltungsdosis von 5 bis 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht empfohlen. Sufentanyl ist in Deutschland als Arzneimittel zur Injektion zugelassen. 2010 erreichte Sufentanyl als transdermale Applikation Labtec die Phase II der klinischen Prüfung als Arznei gegen chronische Schmerzen.

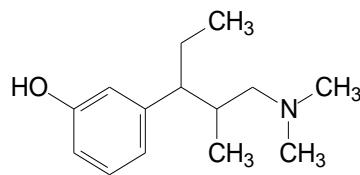


Sufentanyl

Abbildung 25: Chemische Struktur von SUF.

Tapentadol

Tapentadol ist das erste neuentwickelte, starke und zentralwirksame Analgetikum seit 1981. Es wirkt agonistisch am μ -Opioidrezeptor und hemmt zudem die selektive Noradrenalinwiederaufnahme. Es wird bei akuten und chronischen nozizeptiven und neuropathischen Schmerzen eingesetzt. Im Vergleich zu Oxycodon ist die Rate von gastrointestinalen und zentralnervösen Nebenwirkungen vermindert (55-57). In der europäischen Union ist Tapentadol seit August 2010 durch den Hersteller Grünenthal GmbH zugelassen. In Deutschland ist das Handelspräparat Palexia (50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg und 250 mg) als Filmtabletten und als Tabletten mit retardierter Freisetzung erhältlich. 2012 wurden in Deutschland 4.6 Mio Tagesdosen Palexia retard verordnet. Im Vergleich zu 2011 bedeutet das ein Anstieg von 67.9 % (4).



Tapentadol

Abbildung 26: Chemische Struktur von Tapentadol.

Tilidin und seine Metaboliten **Bisnortilidin** (BNT) und **Nortilidin** (NT)

Tilidin ist ein synthetisches Opioid, welches bei starken Schmerzen eingesetzt wird. Tilidin selbst hat kaum analgetische Potenz und wirkt eher als Prodrug. In der Leber wird es durch eine N-Demethylierung zu den schmerzstillenden Metaboliten (μ -Rezeptor Agonisten) Nortilidin und Bisnortilidin abgebaut (58). Tilidin wird bei Erwachsenen in Einzeldosen von 50 bis 100 mg alle 4 – 6 Stunden und maximal 600 mg pro Tag gegeben. Fertigarzneimittel mit Tilidin werden häufig als illegale Droge benutzt. Um eine intravenöse Applikation von aufgelösten Tilidinarzneien zu unterbinden, enthalten die Tabletten den Opiatrezeptorantagonist Naloxon. Bei bestimmungsgemäßen Gebrauch ist die antagonistische Wirkung vom Naloxon durch einen schnellen First-Pass-Effekt kaum vorhanden. Wird das Arzneimittel jedoch i.v. appliziert, hebt Naloxon die Wirkung vom Tilidin auf.

Tilidin macht zusammen mit Tramadol über die Hälfte der Verschreibungen von schwachen Opioiden aus. In Deutschland wurden 2012 143.1 Mio Tagesdosen verordnet. Im Vergleich zum Vorjahr bedeutet das eine Steigerung von 5.9 % (4). Dies liegt sicherlich an der Sonderstellung von Tilidinkombinationspräparaten, die für schwere Schmerzen ähnlich erfolgreich wie stark wirkende Opioiden verwendet werden

können, aber nicht den Bestimmungen der Betäubungsmittelverschreibungsverordnung unterliegen. Seit 1.1.2013 dürfen jedoch Tilidintropfen nur noch auf Betäubungsmittelrezept verordnet werden. Tilidinzubereitungen sind in Deutschland Valoron (seit 1967 im Handel) und zahlreiche Generika.

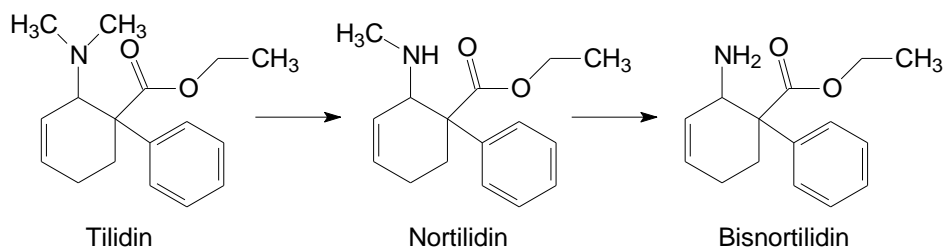


Abbildung 27: Chemische Struktur von Tilidin und seiner Metaboliten NT und BNT.

Tramadol (TRA) und O-Desmethyltramadol (ODT)

Tramadol wurde erstmalig von der Firma Grünenthal GmbH 1977 als Arzneimittel bei mäßigen und starken Schmerzen auf den Markt gebracht. Es ist ein Agonist mit schwacher Affinität am μ -, δ - und κ -Opioidrezeptor (0.1 fache analgetische Potenz von Morphin). Außerdem hemmt es die Wiederaufnahme von Noradrenalin und führt zu einer verstärkten Freisetzung von Serotonin. Deshalb wirkt Tramadol auch leicht anxiolytisch und antidepressiv. Im Körper wird es durch Methylabspaltung am Sauerstoff zum O-Desmethyltramadol abgebaut (59). Der pharmakologisch aktive Metabolit soll etwa 2 – 4 fach so stark wirken wie die Muttersubstanz selbst (60).

In Deutschland entfallen die Hälfte der Opioid Verordnungen auf Tramadol und Tilidin Präparate. 2012 wurden 81.2 Mio Tagesdosen Tramadol verordnet, wobei im Vergleich zu 2011 ein leichter Rückgang von - 3.5 % zu verzeichnen war. Die täglichen Dosen von Tramadol liegen im Bereich von 100 bis 400 mg (Einzeldosis ab 50 mg). Tramadolfertigarzneimittel sind beispielsweise Tramal, Tramagit, T-long (retardiert) und zahlreiche Generika.

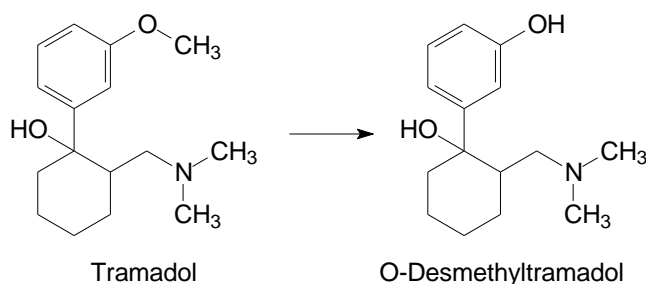


Abbildung 28: Chemische Struktur von TRA und seinem Stoffwechselprodukt ODT.

1.4 Analysenverfahren

1.4.1 Auswahl des analytischen Verfahrens

In der forensisch-toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin Mainz gibt es die Möglichkeit Medikamente oder Drogen quantitativ mittels Hochdruckflüssigchromatographie gekoppelt mit Photodiodenarraydetektor (HPLC/DAD), Gaschromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung (GC/MS) oder Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung (LC-MS/MS) in biologischen Proben nachzuweisen. Im Folgenden wird nun kurz erläutert, welchen entscheidenden Vorteil die Verwendung eines LC-MS/MS Analysengeräts gegenüber der GC/MS bzw. HPLC/DAD hat.

Die Hochdruckflüssigchromatographie mit Diodenarray-Detektor stellt kein geeignetes Verfahren zur Untersuchung von Opioiden dar. Die 35 verschiedenen Opioide sind zum Teil strukturell sehr ähnlich und liefern somit identische UV-Spektren. Um einzelne Verbindung voneinander zu unterscheiden und zu quantifizieren, müssten diese chromatographisch getrennt werden. Dies würde, insofern es überhaupt für alle Verbindungen praktisch durchführbar ist, sehr lange Analysenzeiten beanspruchen. Zum anderen ist die Empfindlichkeit des Diodenarray-Detektors für die meisten Opioide auf Grund der starken Wirksamkeit und damit relativ niedrigen resultierenden Blutspiegel (Fentanyl, Buprenorphin) viel zu gering.

Auch die Gaschromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung erwies sich als wenig geeignet um simultan möglichst viele Opioide zu bestimmen. Einige opioide Substanzen besitzen identische Molare Massen und bilden nach der Elektronenstoßionisation identische Fragmente und sehr ähnliche Massenspektren. Zur Unterscheidung dieser Verbindungen müssten die einzelnen Peaks auch hierbei chromatographisch basislinien-getrennt werden. Dies würde zu sehr langen Retentionszeiten führen. Zusätzlich müsste bei der Probenaufarbeitung ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt eingeführt werden, um die Verdampfung der Substanzen in der GC/MS zu ermöglichen. Die Empfindlichkeit ist verglichen mit LC-MS/MS herabgesetzt, so dass der Nachweis von niedrig-konzentrierten Arzneistoffen (Sufentanil) unzureichend sein könnte. Zudem wären Nachweis- und Bestimmungsgrenzen vergleichsweise hoch. Im Hinblick auf Routinetauglichkeit wäre die Untersuchung von vielen verschiedenen Opioide gleichzeitig relativ zeit- und kostenaufwendig. Nachteilig wäre außerdem die vergleichsweise große Menge an benötigtem Probenmaterial.

Die moderne Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung erwies sich als sehr geeignetes Verfahren zur simultanen Bestimmung von Opioiden in biologischen Matrices. Es handelt sich um eine sehr empfindliche, sichere Methode, mit unkomplizierter

Aufarbeitung, welche die zeitgleiche Analyse von strukturell sehr ähnlichen Substanzen ermöglicht. Da zur Detektion ein Tandem-Massenspektrometer verwendet wird, können Substanzen mit identischem Molekulargewicht aufgrund der unterschiedlichen Fragmentationen sicher voneinander unterschieden werden, ohne dass eine vorherige chromatographische Trennung notwendig wäre. Weitere Vorteile des breiten Screenings mittels LC-MS/MS sind geringe benötigte Probenvolumina und die hohe Messempfindlichkeit, welche eine Untersuchung von sehr niedrig dosierten Opioiden ermöglicht und zu relativ niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen führte.

1.4.2 Methodenvalidierung

Definition

Nach Dertinger, Gänshirt und Steinigen versteht man unter Validierung den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer analytischen Methode (61). Bosshardt, Schorderet, Feltkamp, Fuchs und Sucker definierten Validierung als die Gesamtheit aller sich über Planung, Ausführung und Dokumentation erstreckenden Maßnahmen, die die Gültigkeit einer analytischen Methode beweisen. Der Prüfaufwand richtet sich demnach nach der Methodik, der Apparatur und den Anforderungen an die Güte des Resultats (62). Die Methodenvalidierung ist ein wichtiger Bestandteil der Qualitätssicherung eines Labors und wird in vielen Bereichen wie beispielsweise der Umwelt-, Wasser-, Arzneimittel- und Spurenanalytik gefordert. Die internationale Norm ISO 17025 "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" legt dabei die allgemeinen Anforderungen fest. Für forensisch-toxikologische Untersuchungen hat der Arbeitskreis Qualitätssicherung der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh), folgende Validierungsparameter festgelegt:

- Selektivität
- Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell (Linearität)
- Analytische Grenzen (Nachweis- und Bestimmungsgrenze)
- Genauigkeit (Richtigkeit, Wiederhol- und Laborpräzision)
- Wiederfindung und Matrixeffekt.

Im Folgenden werden die Validierungsparameter definiert und ihre Kriterien gemäß dem Anhang B "Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden" der GTFCh vorgestellt (63).

Selektivität

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmenden Analyten ohne gegenseitige Störung oder Störung durch andere Substanzen (endogen durch Metaboliten oder exogen durch Verunreinigungen, Matrixbestandteile) zu erfassen und sie damit eindeutig zu identifizieren. Mit Hilfe einer selektiven Methode werden richtige Ergebnisse für alle interessierenden Substanzen erhalten. Zur Überprüfung der Selektivität dürfen in den Messungen keine Störsignale mit gleicher Retentionszeit auftreten, wie die zu analysierenden Komponenten (64).

Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

Der Arbeitsbereich sollte dem analytischen Problem angepasst sein und wird vor der Validierung so festgelegt, dass die zu erwartenden Konzentrationen der späteren Realprobenmessungen in diesen Bereich fallen. Der therapeutische Konzentrationsbereich sollte innerhalb des Arbeitsbereichs liegen. Eine Verdünnung oder Aufkonzentrierung der Probe sollte vermieden werden. Der Arbeitsbereich ist das Intervall zwischen niedrigstem und höchstem Kalibrationslevel, für das ein geeignetes Maß an Linearität, Präzision und Richtigkeit gezeigt werden konnte (65).

Linearität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, in einem vorgegebenen Konzentrationsbereich Messergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Menge bzw. Konzentrationen der Analyten in der Realprobe sind.

Jeder Analyt muss mittels Grubbs-Test (Signifikanz 95 bzw. 99 %) auf Ausreißer, durch den Mandel-Test auf lineare Auswertbarkeit (Signifikanz 99 %) und auf Homogenität der Varianzen mittels F-Test (Signifikanz 99 %) überprüft werden.

Analytische Grenzen

Die Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLOQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Analyten in einer Matrixprobe, die sicher quantitativ bestimmt werden kann. Werte oberhalb dieser Grenze können als quantitative Messergebnisse angegeben werden. Die LLOQ muss mit einem akzeptablen Bias ($\pm 20\%$) und einer Präzision (relative Standardabweichung $\leq 20\%$) bzw. mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit (33 %, Signifikanz 99 %) bestimmt werden.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist die niedrigste Konzentration einer zu analysierenden Substanz in einer Probe, bei der die Identifizierungskriterien noch erfüllt sind und die Anwesenheit sicher qualitativ nachgewiesen werden kann. Oberhalb der Nachweisgrenze und unterhalb der Bestimmungsgrenze kann die Anwesenheit von Substanzen nur qualitativ bzw. "in Spuren" angegeben werden. Sie ist die kleinste nachweisbare Konzentration eines Analyten in der Probe, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens 1:3 sowohl für das Target- wie auch Qualifierion bei einer massenspektrometrischen Bestimmung beträgt (63).

Genauigkeit

Die Genauigkeit ist das Ausmaß der Annäherung eines einzelnen Wertes an den Bezugswert. Der Abstand zwischen einem Messwert und Sollwert entsteht durch zufällige und systematische Fehler. Eine Methode weist eine hohe Genauigkeit auf, wenn die Messergebnisse präzise und richtig sind. Die Genauigkeit ist also kein eigenständiger Prüfpunkt sondern ein Oberbegriff für die Richtigkeit und Präzision eines Analysenverfahrens.

Die Richtigkeit ist definiert als Abstand des Mittelwerts einer ausreichend Anzahl von Messungen vom Sollwert. Sie wird häufig als systematischer Fehler (Bias) ausgedrückt.

Die Präzision gibt den Grad der Streuung von einzelnen Werten um den Mittelwert an und ist damit ein Maß für zufällige Fehler eines Verfahrens. Sie wird als relative Standardabweichung von den Messergebnissen berechnet. Je kleiner die Streuung der Messergebnisse, umso kleiner ist die ermittelte relative Standardabweichung und umso präziser ist eine Methode. Die Präzision wird in Wiederhol- und Laborpräzision unterteilt. Zur Ermittlung der Wiederholpräzision (intraseriell, intraassay) wird eine zweite Messung innerhalb von kurzer Zeit mit gleicher Messmethode, dem gleichen Analysengerät, in dem identischen Labor von einer Person gemessen. Die Laborpräzision (interseriell, interassay) wird mit Hilfe derselben Probe, aber durch Änderung eines Parameters wie Person, Messgerät und Messzeitpunkt, bestimmt. Am häufigsten wird die tagesverschiedene Laborpräzision ermittelt, bei die Probe nochmal an einem anderen Tag gemessen wird. Es variiert demnach der Zeitfaktor.

Wiederfindung und Matrixeffekt

Die Wiederfindung ist definiert als vollständiger Transfer der Analysensubstanz aus der Probenmatrix in die zu vermessende Probenlösung und bezieht sich stets auf absolute Signale bei einer Messung. Sie wird aus dem Verhältnis der Messsignale einer zugesetzten Menge Analyt und interner Standardlösung zu einer Matrixprobe und einer nicht extrahierten Kalibrationslösung berechnet. Die Kalibrationslösung wird dabei auf 100 % absolutes Messsignal festgesetzt.

Der Matrixeffekt zeigt eine Veränderung der Intensität des Messsignals der Probe hervorgerufen durch die Anwesenheit von interferierenden Substanzen. Solche Substanzen können Analyten, Metaboliten, Phospholipide und Salze aus der Probe selbst sein oder durch Aufarbeitungsschritte wie beispielsweise Kieselgel der Extraktionssäulen oder Weichmacher aus verwendeten Plastikgefäßen in die Probenmatrix gelangen. Dabei sind

sowohl eine Erniedrigung (Ionensuppression) wie auch eine Erhöhung der Messsignalintensität (Ioneneenhancement) denkbar.

1.5 Behandlung von Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit opioiden Arzneimitteln

1.5.1 Akutes Nierenversagen und Sepsis-Erkrankungen

Das akute Nierenversagen oder auch die akute Niereninsuffizienz ist definiert als eine reversible Verschlechterung der Nierenfunktion, die häufig in wenigen Stunden bis Tagen auftritt. Zurzeit tritt ein akutes Nierenversagen bei etwa 5 % aller hospitalisierten Patienten auf. Bei Patienten der Intensivstation ist es mit etwa 50 % mit einem septischen Schock assoziiert. Auch heute noch liegt die Mortalität bei Patienten der Intensivstation mit akuten Nierenversagen bei über 50 %. Beim akuten Nierenversagen kann eine Behandlung auf der Intensivstation durch ein kontinuierliches Nierenersatzverfahren notwendig sein (66, 67).

Das akute Nierenversagen (ANV) wird nach der Ursache in drei verschiedene Formen eingeteilt:

- Prärenales akutes Nierenversagen
- Intrarenales akutes Nierenversagen
- Postrenales Nierenversagen.

Beim prärenal ANV ist die Ursache der Niere vorgelagert. Häufig ist das Blutvolumen durch Herzinsuffizienz, eine Leberfunktionsstörung oder eine Sepsis-Erkrankung reduziert. Zur Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens werden Katecholamine und Vasopressin ausgeschüttet und Natrium und Wasser zurückgehalten. Die Gefäße und Tubuli werden beim prärenal ANV nicht geschädigt (68).

Beim intrarenalen akuten Nierenversagen hingegen können die Gefäße durch eine Endothelschädigung bzw. durch vermehrte Calciumfreisetzung irreversibel geschädigt werden. Ursachen für das intrarenale ANV sind beispielsweise Interjektionen, allergische Reaktionen auf Penicillin-Antibiotika und nichtsteroidale Antiphlogistika, Sepsis, Intoxikationen mit Schwermetallen (Quecksilber) oder Schocknieren (69, 70).

Beim postrenal ANV ist die Ursache der Niere nachgelagert. Ableitende Harnwege (Harnblase, Harnleiter, Blase) sind durch Abflussstörungen durch Tumore, Harnsteine oder Prostatavergrößerung nicht voll funktionsfähig.

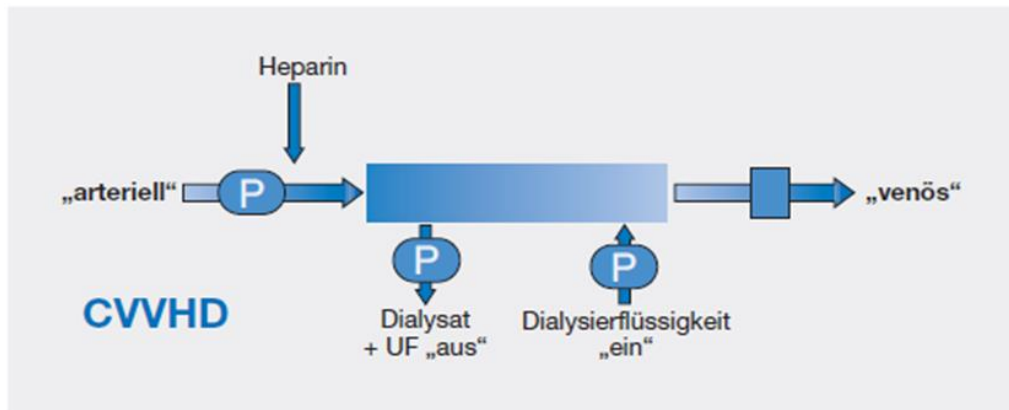
Sepsis (griechisch "Fäulnis") ist eine systemische Entzündung des Körpers durch eine Infektion. Umgangssprachlich wird Sepsis auch als "Blutvergiftung" bezeichnet. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu lebensbedrohlichen Störung der Körperfunktionen und zum Multiorganversagen kommen. Je nach Schweregrad der Sepsis-Erkrankung unterscheidet man systemisches inflammatorisches Response-Syndrom, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 150.000 Menschen an einer Sepsis, wobei die Sterberate bei etwa 50 % liegt. Bei 19 % aller Patienten mit Sepsis tritt ein akutes Nierenversagen auf. Etwa 23 % aller Patienten mit schweren Sepsis und über 50 % der Patienten mit septischen Schock erleiden ein akutes Nierenversagen (71, 72). Je früher eine Therapie mit intensivmedizinischen Maßnahmen (Nierenersatztherapie, Beatmung, Kreislauftherapie und Gerinnungstherapie) begonnen wird, desto höher sind die Überlebenschancen.

1.5.2 Kontinuierliche Nierenersatzverfahren

Bei der Nierenersatzbehandlung werden die Funktionen der Niere zeitweilig durch intensivmedizinische Geräte übernommen, so dass eine ausreichende Entgiftung und Entwässerung des Körpers nach wie vor möglich ist. Beim kontinuierlichen Nierenersatzverfahren (CRRT) werden kleine und mittelgroße Stoffe wie exogene Substanzen und Stoffwechselprodukte über eine semipermeable Membran ausgeschieden. Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten, Leukozyten und Plasmaproteine werden auf Grund ihrer Molekülgröße von der Filtermembran zurückgehalten und dem Blutkreislauf wieder kontinuierlich zugeführt (68).

Bei der kontinuierlichen veno-venösen Hämodialyse (CVVHD) wird das Blut durch einen Hämofilter entlang einer semipermeablen Membran gepumpt (siehe Abbildung 29 (a)). Das vorherrschende Transportprinzip ist die Diffusion (siehe Abbildung 29 (b)). Gelöste Substanzen treten durch den Konzentrationsgradienten vom Blut in die entgegengesetzt fließende Dialysierflüssigkeit über. Es werden umso mehr Substanzen aus dem Blut eliminiert, desto größer der Konzentrationsunterschied zwischen dem Blut und der Dialysierflüssigkeit ist (73).

(a)



(b)

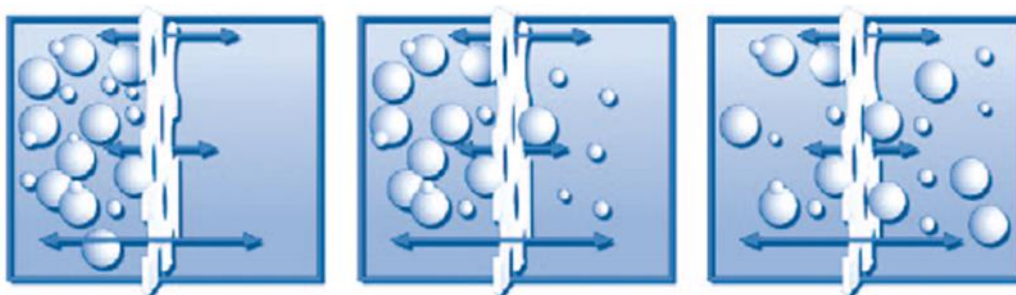


Abbildung 29: (a) Vereinfachter Aufbau der kontinuierlichen veno-venösen Hämodialyse (CVVHD). (b) Reinigung des Bluts durch Diffusion mittels CVVHD. Beide Abbildungen sind den Ausführungen von Prof. Kindgen-Milles "Akutes Nierenersatzverfahren – Die Behandlung des akuten Nierenversagens mit kontinuierlichen Nierenersatzverfahren" entnommen (73).

1.5.3 Einsatz von Opioiden bei Patienten mit Sepsis

Die multimorbiden Patienten der anästhesiologischen Intensivstation der Universitätsmedizin Mainz wurden auf Grund ihres Krankheitsbildes analgosediert. Um eine effektive, ausreichende Schmerzlinderung zur gewährleisten wurde die Analgesie mit einem starken Opioid der WHO-Stufe 3 durchgeführt. Die Schmerzmittel wurden mittels einer intravenösen Spritzenpumpe appliziert. Am häufigsten wurde die Opioiden Sufentanil und Piritramid verwendet.

Sufentanil ist das stärkste in Deutschland zugelassene Schmerzmittel in der Humanmedizin. Es wirkt etwa 900-mal stärker analgetisch als Morphin, weshalb es in der Intensivmedizin verwendet wird. Die Dosis liegt bei etwa 5 – 50 µg/kg Körpergewicht. Eine strenge Kontrolle der Atemfunktion bzw. eine zeitweilige "künstliche Beatmung" ist dabei unerlässlich. Die Applikation von Sufentanil wird für jeden Patienten individuell berechnet und nur durch das Klinikpersonal durchgeführt.

Piritramid wird bei mittleren bis starken Schmerzen eingesetzt. Es besitzt nur die 0.7-fache Potenz von Morphin und seine Wirkung beträgt bis zu 8 h. Es wird daher zur

patientenkontrollierten Analgesie verwendet, wobei der Patient selbst bei Schmerzspitzen Analgetikum nachdosieren kann. Zunächst wird 3 bis maximal 9 mg Piritramid gegeben. Erst nach Kontrolle der Atmung und anderer Vitalfunktionen durch das Klinikpersonal kann Piritramid nachdosiert werden. Der Patient kann selbst eine weitere Dosierung von 3 oder 6 mg Piritramid am Perfusor auslösen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Opioide bzw. Opiate werden, wie beschrieben, in erheblichem Umfang therapeutisch und missbräuchlich verwendet. Neben der großen Vielzahl an medizinisch eingesetzten Präparaten treten auch zunehmend chemisch modifizierte Varianten auf dem illegalen Markt auf. Im Rahmen von forensisch-toxikologischen und klinischen Fragestellungen ist die Konzentrationsbestimmung der Opioide in Blut, Urin, Haaren und menschlichen Gewebe von zunehmender Bedeutung. Im Mai 2012 war am Institut für Rechtsmedizin Mainz die quantitative Bestimmung von 9 verschiedenen Opioiden mittels Gaschromatographen mit massensensitivem Detektor möglich. Auch in anderen Laboratorien existierte häufig eine Vielzahl von Einzelmethoden zur Quantifizierung von Opioiden (74-82). Dazu waren verschiedene Probenextraktionen und Messungen notwendig. Nachteilig bei dieser Vorgehensweise war, dass relativ große Probenvolumina benötigt wurden und diese Verfahren sehr zeit- und kostenaufwendig waren. Ein simultanes Untersuchungsverfahren hätte außerdem bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen den Vorteil, dass Probenmaterialien auf möglichst viele Substanzen gleichzeitig analysiert und damit eine Materialverbrauchsminimierung bei regelmäßig eingeschränkt zur Verfügung stehender Probenmenge erreicht werden könnte. In der Forensik sind häufig gar keine Informationen über die inkorporierte Substanz bekannt. Die neue Methode sollte ferner die Verifizierung positiver Immunoassay-Ergebnisse für Opiate durch eine hohe Empfindlichkeit und das breite Screening einschließlich seltener Substanzen erleichtern.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb ein analytisches Verfahren zu entwickeln, das den Nachweis von möglichst vielen therapierelevanten Opioiden erlaubt, wobei auch neu und gegebenenfalls illegal auf den Markt kommende Substanzen und als wesentlicher Aspekt auch Phase-I und Phase-II-Metaboliten mit berücksichtigt werden sollten. In der Literatur gab es bereits vielversprechende Ansätze zur simultanen Bestimmung von mehreren Opioiden (83-87). Die Quantifizierung der Stoffwechselprodukte ermöglicht häufig Rückschlüsse zur aufgenommenen Dosis und Dauer der Applikation bzw. des Konsums. Außerdem ist das Nachweisfenster von zahlreichen Medikamenten und Drogen bei der Untersuchung von Metaboliten wesentlich größer (Überprüfung der Fahreignung und beruflichen Eignung). Bei Haaruntersuchung wird durch den Nachweis von Stoffwechselprodukten einer Substanz eine Körperpassage erst sicher belegt. Illegale Substanzen können auch exogen in die Haare gelangen, durch Verpacken oder Anbau von Drogen bzw. passiv Rauchen und engen Kontakt (Kinder von Drogenkonsumenten).

Zum simultanen Nachweis der Opioide sollte zunächst ein geeignetes Extraktionsverfahren für die Analyse von Blut-, Haar- und Gewebeproben gefunden werden. Problematisch war hierbei die Aufarbeitung von hydrophilen Analyten (Morphin-3-Glucuronid

und Morphin-6-Glucuronid) zusammen mit eher apolaren Substanzen. Anschließend sollte ein Multi Analyt Assay für den Nachweis von 35 Opioiden auf einem LC-MS/MS System der Firma Agilent Technologies, bestehend aus UPLC 1290 Infinity und 6490 Triple Quad, erarbeitet werden. Hierfür war es notwendig die optimalen chromatographischen Bedingungen, wie Auswahl der stationären Phase, Fließmittelzusammensetzung und Gradient zu finden. Die massenspektrometrischen Bedingungen, wie Masse der Molekülfragmente und Parameter der Ionenquelle, sollten ermittelt werden.

Nach erfolgreicher Testung sollte die Methode entsprechend den Richtlinien der "Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie" validiert werden. Die Validierung von analytischen Methoden ist ein wichtiges Werkzeug der Qualitätssicherung, so wird der Nachweis erbracht und dokumentiert, dass ein Verfahren zuverlässig ist. Das Institut für Rechtsmedizin ist akkreditiert, somit werden Methodenvvalidierungen in regelmäßigen Abständen überprüft.

Darüber hinaus sollte die dann validierte Methode an konkreten forensischen Proben auf "Alltagstauglichkeit" getestet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Analysengeräte

Die analytische Untersuchung auf die 35 Opioiden und Tapentadol wurde mit einer HPLC 1290 Infinity und einem Triple Quadrupol Massenspektrometer 6490 Triple Quad der Firma Agilent Technologies durchgeführt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht zu der verwendeten HPLC mit Triple Quadrupol Massendetektor.

<i>HPLC</i>	
Binäre Pumpe mit integriertem Degasser	1290 Bin Pump, Model-Nr. G4220A (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Datenaufnahme	Mass Hunter Software B.05.00 inklusive Optimizer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Probengeber	1290 Autosampler, Model-Nr. G4226A (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Säulenofen mit Säulenschaltventil	1290 thermostatischer Säulenofen, Model-Nr. G1316C (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
<i>Triple Quadrupol Massenspektrometer</i>	
Ionenquelle	ESI-Jet Stream iFunnel, Material-Nr. G1958-65138 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
Triple Quadrupol Massenspektrometer	6490 Triple Quad (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

Die quantitative Bestimmung von Propofol erfolgte an einem Gaschromatographen der 6890 Serie mit massensensitivem Detektor 5973 Network der Firma Agilent Technologies. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Gerätekomponenten verwendet.

Tabelle 3: Übersicht zu dem verwendeten GC/MS System.

<i>Gaschromatograph</i>	
Probengeber	7683 Probeteller, Model-Nr. G2614A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 7683 Injektor, Model-Nr. G2613A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
Datenaufnahme	Agilent ChemStation D.01.00 Software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
<i>Massenselektiver Detektor</i>	
MSD	5973 Network Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)

Laborgerät

In Tabelle 4 findet sich eine Auflistung der verwendeten Laborgeräte.

Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte.

Laborgerät	Hersteller bzw. Lieferant
Analysenwaage	Mettler AC 100, Empfindlichkeit 0.00001 g (Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland)
Automatisches Abdampfsystem mit Stickstoffabblasvorrichtung	Turbovap LV Concentration Workstation (Zymark, Hopkinton, USA)
Automatisches Festphasenextraktionssystem	Gilson Aspec GX-271 Workstation (Middleton, Wisconsin, USA)
Dispensiergerät	Dispensor (Camlab Serving Science, Cambridge, England)
Feinwaage	Mettler PC 440 Delta Range ®, Empfindlichkeit 0.0001g (Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland)
Gefrierschrank	Liebherr Premium (Liebherr-International AG, Marica, Bulgarien)
Hochleistungs-Dispergiergerät	Ultra Turrax ® T25 basic (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)

Laborgerät	Hersteller bzw. Lieferant
Kühlschrank	Liebherr Premium (Liebherr-International AG, Marica, Bulgarien)
Magnetrührer	IKAMAG RCT (Janke und Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland)
pH-Meter	pH 2M Microprocessop pH-Meter (HANNA instruments GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Reinstwasseraufbereitungsanlage	PURELAB puls (Waters, Celle, Deutschland)
Rotations-Vakuum-Konzentrator	RVC 2-25 CD plus (Crist, Osterode am Harz, Deutschland)
Standzentrifuge	Heraeus Labofuge 300 (ThermoElectron LED GmbH, Osterode, Deutschland)
Temperaturregelbarer Heizblock mit Stickstoffabblasvorrichtung	Pierce Reacti Therm Heating Module 187090 (Thermo Fischer Scientific, Bellefonte, PA, USA)
Trockenschrank	Elma UL 30 (Memmert GmbH, Schwalbach, Deutschland)
Ultraschallbad	Elma Transsonic Digitalis (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland)
Vakuumextraktionskammer	IST Vac Master (IST Glamorgan, U.K.)
Vortex-Reagenzglas-Rüttler	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
Zange zum Verschließen und Öffnen von Bördelkappen	(Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland)

Laborübliche Glasgeräte wie Messzylinder, Erlenmeyer-Kolben, Messkolben, Messbecher, Glaspipetten, Reagenzgläser usw. standen für die Laborarbeiten zur Verfügung.

Verbrauchsmaterial

Eine Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Lieferant
Einmal-Mikro Pipetten mit Ringmarke	Ringcaps ® 10 µl und 50 µl (Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland)
Festphasenextraktionssäulen C18	Bakerbond™ spe Octadecyl C18, 500 mg, 3 ml (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA)
Festphasenextraktionssäulen C18 OH Bond-Elut	Bond Elut – C18 OH , 500 mg, 3 ml (Varian, Lake Forest, CA, USA)
Glasröhrchen	PYREX® Tube 12 x 75 mm, 13 x 100 mm (Corning Incorporated, NY, USA)
Headspace Gefäße + Bördelkappe	Headspace Vial 20 ml klar (A-Z Analytik-Zubehör GmbH, Langen, Deutschland)
Kanülen	Sterican® ø 0.8 x 22 mm, 21 G x 7/8 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Reaktionsgefäße 3810X, 1.5 ml Eppendorf Tubes® (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Rollrandflasche und Plastikkappe mit Naturkautschuk-Septe	Meßvials 1.5 ml (Agilent Technologies, Polen)
Rollrandflaschen mit integriertem Glas-µ-Einsatz und Bördelkappe	Meßvials (A-Z Analytik-Zubehör GmbH, Langen, Deutschland)
Pasteurpipetten mit Gummisauger	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen	Multi® Universal 1-200 µl, 1000 µl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Polypropylen-Röhrchen	Cellstar® Tubes 15 und 50 ml (Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen, Deutschland)
Spitzboden-Vials	Clear Crimp Vial for HP7673A (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Spritzen	Omnifix® 5 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Lieferant
Spritzenfilter	Membranfilter-Einheit PP 0.45 µm, 17 mm ø, regenerierte Cellulose (A-Z Analytik-Zubehör GmbH, Langen, Deutschland)
Verschlussfolie	Parafilm "M" (Bemis flexible Packing, Neenah, WI, USA)
Zentrifugenröhrchen	Rotilabo ® PP Spitzboden 13 ml (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien, Lösungen und Referenzsubstanzen

Chemikalien

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

Chemikalie	Hersteller bzw. Lieferant
Aceton ROTIPURAN ® ≥ 99.5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure ROTISOLV ® ≥ 99.9 % LC-MS grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril Optigrade	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Ammoniaklösung 32 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumformiat LC-MS Ultra grade	Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, Deutschland
Dichlormethan ROTIPURAN ® ≥ 99.5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Diethylamin ROTIPURAN ® ≥ 99.5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure ROTIPURAN ® 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kalilauge (1mol/l)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol, HPLC grade	Fischer Scientific, Leicestershire, UK
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid ≥ 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
n-Hexan ROTIPURAN ® ≥ 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol ROTIPURAN® ≥ 99.8 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, demineralisiert	Milli-Q Plus PF von Waters, Celle, Deutschland
Wasser, HPLC grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasser, HPLC grade	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland

Lösungen und Eluenten

- Acetonitril-Methanol-Wasser (30:30:20 v/v)
30 ml Acetonitril, 30 ml Methanol und 20 ml deionisiertes Wasser wurden in einem 100 ml Messzylinder zusammengemischt.
- Acetonitril-Wasser (20:80 v/v)
20 ml Acetonitril und 80 ml demineralisiertes Wasser wurden in einem 100 ml Messzylinder zusammengemischt.
- Dichlormethan-Aceton (50:50 v/v)
500 ml Dichlormethan und 500 ml Aceton wurden in einem 1000 ml Messzylinder zusammengemischt.
- Dichlormethan-Isopropanol-Ammoniak (40:10:2 v/v)
40 ml Dichlormethan und 10 ml Isopropanol wurden in einem 100 ml Schliff-Erlenmeyer-Kolben eingefüllt und durchmischt. Anschließend wurden 2 ml Ammoniaklösung (32 %) hinzugefügt und kräftig geschüttelt.
- Diethylamin in Methanol
0.6 ml Diethylamin wurde in einem 100 ml Messzylinder mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.
- Essigsäure, 0.1 M
100 ml einer 1 M Essigsäurelösung wurden in einen halb mit demineralisiertem Wasser aufgefüllten 1 l Messkolben eingefüllt. Anschließend wurde der Kolben gründlich gemischt und auf 1 l aufgefüllt.
- Isotonische Kochsalzlösung
9 g Natriumchlorid wurde in einem 1 l Kolben mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.
- Kaliumhydrogencarbonatlösung in Wasser
1 g KHCO_3 wurde in einer Mischung von 90 ml deionisiertem Wasser und 10 ml Acetonitril gelöst.

- Phosphatpuffer, 0.1 M, pH 6
13,61 g KH_2PO_4 wurden in einem 1000 ml Kolben in 900 ml demineralisiertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1.0 M KOH-Lösung auf einen pH von 6.0 eingestellt und auf 1000 ml Wasser aufgefüllt.
- Wasser mit Ammoniumformiat (5 mmol)
3.15 g Ammoniumformiat wurden in einem 10 ml Messkolben mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. 1 ml dieser Ammoniumformiatlösung wurden zu 1 l Wasser HPLC grade von Baker zugefügt (final 5 mmol Ammoniumformiat).
- Wasser-Acetonitril (80:20 v/v)
80 ml Wasser und 20 ml Methanol wurden in einem 100 ml Messzylinder zusammengemischt.
- Wasser-Methanol (80:20 v/v)
800 ml deionisiertes Wasser und 200 ml Methanol wurden in einem 1000 ml Messzylinder zusammengemischt.

Referenzsubstanzen

Alle folgenden Referenzsubstanzen zur Bestimmung der Opiode mittels LC/MS wurden von der Firma Cerilliant (Austin, TX) über LGC Standards (Wesel, Deutschland) erworben.

- 6-Monoacetylmorphin
- 6-Monoacetylmorphin- d_6
- Alfentanil
- Bisnortilidin
- Buprenorphin
- Buprenorphin- d_4
- Codein
- Codein- d_6
- Desomorphin
- Dextromethorphan
- Dextromethorphan- d_3
- Dextrorphan
- Dextrorphan- d_3

- Dihydrocodein
- Dihydrocodein-d₆
- Dihydromorphin
- Ethylmorphin
- Fentanyl
- Fentanyl-d₅
- Hydrocodon
- Hydrocodon-d₆
- Hydromorphon
- Hydromorphon-d₆
- Meperidin
- Meperidin-d₄
- Methadon
- Methadon-d₉
- Morphin
- Morphin-d₆
- Morphin-3-Glucuronid
- Morphin-3-Glucuronid-d₃
- Morphin-6-Glucuronid
- Morphin-6-Glucuronid-d₃
- Naloxon
- Naloxon-d₅
- Naltrexol
- Naltrexon
- Naltrexon-d₃
- Norbuprenorphin
- Norbuprenorphin-d₃
- Norfentanyl
- Norfentanyl-d₅
- Normeperidin
- Normeperidin-d₄
- Nortilidin
- Nortilin-d₃
- O-Desmethyltramadol
- O-Desmethyltramadol-d₆

- Oxycodon
- Oxycodon-d₆
- Oxymorphon
- Oxymorphon-d₃
- Pentazocin
- Pholcodin
- Remifentanil
- Sufentanil
- Sufentanil-d₅
- Tapentadol
- Tapentadol-d₃
- Tramadol
- Tramadol¹³C,-d₃

Entsprechend der Analysenzertifikate des Herstellers hatten die Standardlösungen mindestens eine Reinheit von 99.0 %. Bisnortilidin, Buprenorphin-d₃, Morphin-d₆, 6-Monoacetylmorphin-d₆, Meperidin-d₄, Dextrorphan-d₃, Desomorphin, Remifentanil, Morphin-6-Glucuronid, Naloxon, Naltrexol, Naltrexon, Hydromorphon und Dihydromorphon hatten eine Reinheit von mindestens 98.0 %. Nur Pholcodin besaß lediglich eine Reinheit von 95.7 %.

Alle Analyten wurden in Methanol verdünnt geliefert, mit Ausnahme von 6-Monoacetylmorphin (in Acetonitril), 6-Monoacetylmorphin-d₆ (in Acetonitril), Morphin-3-Glucuronid (in Methanol/Wasser 1:1 v/v) und Morphin-6-Glucuronid (in Methanol/Wasser 80:20 v/v).

Zur Bestimmung von Piritramid wurde die Injektionslösung Dipidolor 7.5 mg/ml (Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) verwendet und in Methanol verdünnt.

Die Referenzsubstanzen wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Blutspiegelkonzentrationen von Propofol mit Hilfe von GC/MS Messungen wurden folgende Substanzen verwendet. Disoprivan wurden ebenfalls bei -20 °C im Gefrierschrank und Thymol bei Raumtemperatur gelagert.

- Disoprivan ® 1 %, Fertigarzneimittel enthält 10 mg/ml Propofol (Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland)
- Thymol, research grade (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland)

3.1.3 Analytische Säulen

HPLC Säulen

Die LC/MS-Analysen zur chromatographischen Auftrennung der Opioid-Analgetika wurden mit Hilfe der nachfolgenden aufgeführten HPLC Säulen durchgeführt.

- ZORBAX Eclipse Plus C8 Rapid Resolution HD 2.1 x 150 mm, 1.8-Micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States)
- ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1 x 150 mm, 1.8-Micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States)
- ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1 x 100 mm, 1.8-Micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States)
- ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1 x 50 mm, 1.8-Micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States)
- ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Rapid Resolution HD 2.1 x 150 mm, 1.8-Micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States)
- ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Rapid Resolution HD 2.1 x 100 mm, 1.8-Micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States)

Vorsäulen oder sogenannte In-Line Filter schützen die eigentliche HPLC-Trennsäule vor Verunreinigung. Damit wird eine optimale und konstante Trennung der Analyten gewährleistet und die Verwendungsdauer der analytischen Säule erhöht. Nach Abwägung der Kosten- und Nutzenverhältnisse wurde auf die Verwendung einer Vorsäule verzichtet und stattdessen ein In-Line Filter der Firma Agilent Technologies für den Schutz der analytischen Säule verwendet. Diese Filtereinheit wurde nach dem Injektor noch vor der Trennsäule eingebaut.

GC Säule

Die GC/MS-Untersuchungen zur Bestimmung von Propofol erfolgten mit Hilfe der nachstehenden gaschromatographischen Trennsäule.

- AGILENT Kapillare HP-5MS Säule (5 % Phenyl Methyl Siloxan) 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm Filmdicke (A-Z Analytik-Zubehör GmbH, Langen, Deutschland)

3.1.4 Stammlösungen, Kalibratoren, Kontrollen und interne Standards

Stammlösungen, Kalibratoren und interne Standards wurden aus den in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Referenzsubstanzen durch Verdünnen in Methanol hergestellt.

Es wurde eine Stammlösung angesetzt, die alle 35 Opioide inklusive ihrer Metaboliten enthält. Diese Stammlösung (entspricht Kalibrationslevel 6) enthält jeweils eine Konzentration von 2 ng/μl von Bisnortilidin (BNT), Dihydrocodein (DH), Ethylmorphin (EM), Hydrocodon (HC), Meperidin (MEP), Methadon (MET), Morphin-3-Glucuronid (Morphin-3-Glucuronid), Normeperidin (NM), Nortilidin (NT), Oxycodon (OC), Pentazocin (PEN), Pholcodin (PHO), Piritramid (PIR), Tramadol (TRA) und 1 ng/μl von Codein (COD), Dihydromorphin (DM), Morphin (MOR), Morphin-6-Glucuronid (M6G), O-Desmethyltramadol (ODT), 6-Monoacetylmorphin (6-MAM), Alfentanil (ALF), Buprenorphin (BUP), Desomorphin (DES), Dextromethorphan (DMP), Dextrorphan (DP), Fentanyl (FEN), Hydromorphon (HM), Naloxon (NON), Naltrexol (NEL), Naltrexon (NEN), Norbuprenorphin (NB), Norfentanyl (NF), Oxymorphon (OM), Remifentanil (REM) und Sufentanil (SUF) sind in einer Konzentration von jeweils 0.2 ng/μl in der Stammlösung enthalten. Kalibrationslevel 1, 2, 3, 4 und 5 wurden aus dieser Stammlösung verdünnt. Kalibrationsstandard 7 und 8 wurden separat hergestellt. Die oben aufgeführten Konzentrationen der Kalibrationslevel sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Kalibrator 1 – 6 wurden entsprechend der zu erwartenden therapeutischen Blutspiegelkonzentrationen und Kalibrator 7 und 8 analog zu den erwarteten toxischen bzw. letalen Blutspiegeln berechnet und hergestellt (88).

Tabelle 7: Übersicht der Kalibrationsstandards Opioide 1 - 8. Konzentrationen der Substanzen in den verschiedenen Kalibratoren.

Kalibrationslevel	1	2	3	4	5	6	7	8	
ALF, BUP, DES, DP, FEN, HM, NON, NEL, NEN, NB, NF, OM, REM, SUF	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2	5	10	ng/μl
6-MAM	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2	5	10	ng/μl
DMP	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2	5	12	ng/μl
DM, MOR, M6G, ODT	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	5	10	ng/μl
COD	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	10	20	ng/μl
BNT, DH, EM, HC, MEP, MET, M3G, NM, NT, OC, PEN, PHO, PIR, TRA	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2	10	20	ng/μl

Die Lösung des internen Standards (ISTD) enthält jeweils 0.1 ng/μl von 6-Monoacetylmorphin-d₆, Buprenorphin-d₄, Dextromethorphan-d₃, Dextrorphan-d₃, Fentanyl-d₅, Hydromorphon-d₆, Naloxon-d₅, Naltrexon-d₃, Norbuprenorphin-d₃, Norfentanyl-d₅,

Oxymorphon-d₃ und Sufentanil-d₅. Je 0.5 ng/μl von Codein-d₆, Morphin-6-Glucuronid-d₃, Morphin-d₆, O-Desmethyltramadol-d₆ bzw. je 1 ng/μl von Dihydrocodein-d₆, Hydrocodon-d₆, Meperidin-d₄, Methadon-d₉, Morphin-3-Glucuronid-d₃, Normeperidin-d₄, Nortilidin-d₃, Oxycodon-d₆ und Tramadol-¹³C, d₃ sind die jeweiligen Konzentrationen des internen Standards. Opioide mit keinem entsprechenden deuterierten Analogon wurden folgenden internen Standards zugeordnet:

- Fentanyl-d₅ als ISTD für Alfentanil, Ethylmorphin und Remifentanyl
- Nortilidin-d₃ als ISTD für Bisnortilidin
- Codein-d₆ als ISTD für Desomorphin
- Morphin-d₆ als ISTD für Dihydromorphin
- Naloxon-d₅ als ISTD für Naltrexol
- Norbuprenorphin-d₃ als ISTD für Pentazocin
- Oxymorphon-d₃ als ISTD für Pholcodin
- und Sufentanil-d₅ als ISTD für Piritramid.

Für die quantitative Bestimmung von Tapentadol wurde eine Stammlösung angesetzt die 1 ng/μL Tapentadol in Methanol enthält. In Tabelle 8 findet sich eine Übersicht der Konzentrationen der Kalibrationslevel 1 – 3 nach Zugabe zu 200 μl Serum. Für Kalibrationslevel 1 wurden 2 μl, für Kalibrationslevel 2 wurden 10 μl und für Kalibrationslevel 3 wurden 20 μl der Tapentadol-Stammlösung zur Probe zugesetzt. Die Lösung des internen Standards enthält eine Konzentration von 1 ng/μl Tapentadol-d₃ und es wurden jeweils 10 μl der Lösung pro Probe hinzugefügt.

Tabelle 8: Konzentrationen der Kalibrationslevel 1 – 3 von Tapentadol nach Zugabe zu 200 μl Serum.

Kalibrationslevel	1	2	3	
Konzentration von Tapentadol in Serum	10	50	100	ng/ml

Die Quantifizierung von Propofol erfolgte mit Hilfe einer 100 μg/ml Propofol-Stammlösung, die in Methanol verdünnt wurde. Tabelle 9 enthält die Konzentrationen der Kalibrationslevel 1 – 4 in 200 μl Serum. Im Fall von Kalibrationslevel 1 wurden 2 μl, für Kalibrationslevel 2 4 μl, für Kalibrationslevel 3 10 μl und für Kalibrationslevel 4 20 μl der Propofol-Stammlösung in die Serumprobe gegeben. Als interner Standard wurden 10 μl einer 100 μg/ml Lösung von Thymol zur Probe hinzugefügt.

Tabelle 9: Konzentrationen der Kalibrationslevel 1 - 4 von Propofol nach Zugabe zu 200 ml Serum.

Kalibrationslevel	1	2	3	4	
Konzentration von Propofol in Serum	1	2	5	10	µg/ml

3.2 Methoden

3.2.1 Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten

Extraktionsmethode A zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten

Ein Aliquot von 200 µl Serum, Blut oder Plasma (evtl. auch Femoralblut, Galle, Herzbeutelflüssigkeit, Herzblut, Liquor, Natriumfluoridblut oder Urin) wurde in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Mittels Dispensor wurden 6 ml Phosphatpuffer (0.1 M, pH 6) zugesetzt. Anschließend wurden 10 µl der internen Standardlösung Opiode bzw. 10 µl der internen Standardlösung Tapentadol-d₃ mit Hilfe von Einmal-Mikro Pipetten zugefügt. Die Mischung wurde gevortext und für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 13 x 100 mm Glasröhrchen überführt. Der erhaltene Überstand wurde durch eine Festphasenextraktion mittels der voll-automatischen Gilson Aspec 271 Workstation oder unter Verwendung einer Vakuumextraktionskammer weiter aufgereinigt. Eine SPE C₁₈ Säule wurde bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min mit 2 x 3 ml Methanol und anschließend mit 2 ml Wasser konditioniert. Der bei der Probenvorbereitung erhaltene Überstand wurde langsam auf die vorkonditionierte Säule aufgebracht und langsam (ca. 1 ml/min) durch die Säule gesaugt. Die Säule wurde mit 2 x 2 ml Wasser gewaschen. Die weniger basischen Analyten Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min mittels 2 x 2 ml Wasser/Methanol (80:20 v/v) eluiert. Als Vorlage dienten 12 x 75 Glasröhrchen. Die C₁₈ Säule wurde anschließend mit 1 ml verdünnter Essigsäure (0.1 M) durchgesaugt, kurz getrocknet und für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Dann wurde 3 x 1 ml Dichlormethan/Aceton (50:50 v/v) durchgesaugt. Die stärker basischen Analyten (restlichen 33 Opiode der simultanen Screeningmethode und Tapentadol) wurde bei einer Flussrate von 0.5 ml/min mit 3 x 1 ml Dichlormethan/Isopropanol/Ammoniak (40:10:2 v/v/v) in ein 12 x 75 mm Glasröhrchen eluiert. Die 2 erhaltenen Extrakte wurden zur Trockne eingedampft. Das Abdampfen erfolgte im schwachen Stickstoffstrom bei 40 °C mittels Turbovap LV Workstation (89, 90). Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol gelöst, in eine Rollrandflasche mit integriertem Glas-µ-Einsatz überführt und dann wieder im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl

Methanol/Acetonitril/Wasser (3:3:2 v/v/v) gelöst, das Vial mittels Verschlusszange mit einer Bördelkappe (inkl. Septum) verschlossen und gevortext.

In Tabelle 10 findet sich eine Übersicht der Konzentrationen der Kalibrationsstandards 1 – 8 nach Zugabe von 10 µl Kalibrator zu 200 µl Serum.

Tabelle 10: Kalibrationsstandards Opiode 1 - 8. Konzentrationen nach Zugabe des Kalibrators zu Serum.

Kalibrationslevel	1	2	3	4	5	6	7	8	
ALF, BUP, DES, DP, FEN, HM, NON, NEL, NEN, NB, NF, OM, REM, SUF	1	2	4	6	8	10	50	100	ng/ml
6-MAM	1	2	4	6	8	10	250	500	ng/ml
DMP	1	2	4	6	8	10	250	600	ng/ml
DM, MOR, M6G, ODT	5	10	20	30	40	50	250	500	ng/ml
COD	5	10	20	30	40	50	500	1000	ng/ml
BNT, DH, EM, HC, MEP, MET, M3G, NM, NT, OC, PEN, PHO, PIR, TRA	10	20	40	60	80	100	500	1000	ng/ml

Modifizierte Extraktionsmethode A zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten im Forensischen Center Ho Chi Minh City

Ein Aliquot von 200 µl Blut wurde in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen vorgelegt und es wurden 6 ml Phosphatpuffer (0.1 M, pH 6) zugesetzt. Anschließend wurden 10 µl der internen Standardlösung Opiode mit Hilfe von Einmal-Mikro Pipetten zugefügt. Die Mischung wurde gevortext und für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipette abgenommen und in ein 20 ml Headspace-Gefäß überführt. Der erhaltene Überstand wurde durch eine Festphasenextraktion unter Verwendung einer Vakuumextraktionskammer weiter aufgereinigt. Eine SPE C18 Säule wurde bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min mit 2 x 3 ml Methanol und anschließend mit 2 ml Wasser konditioniert. Der bei der Probenvorbereitung erhaltene Überstand wurde langsam auf die vorkonditionierte Säule aufgebracht und langsam (ca. 1 ml/min) durch die Säule gesaugt. Die Säule wurde mit 2 x 2 ml Wasser gewaschen. Die weniger basischen Analyten Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min mittels 2 x 2 ml Wasser/Methanol (80:20 v/v) eluiert. Als Vorlage dienten 20 ml Headspace-Gefäße. Die C18 Säule wurde anschließend mit 1 ml verdünnter Essigsäure (0.1 M) durchgesaugt und für 10 min getrocknet. Dann wurde 3 x 1 ml Dichlormethan/Aceton (50:50 v/v) durchgesaugt.

Die stärker basischen Analyten (restliche 33 Opiode der simultanen Screeningmethode) wurden bei einer Flussrate von 0.5 ml/min mit 3 x 1 ml Dichlormethan/Isopropanol/Ammoniak (40:10:2 v/v/v) in ein 20 ml Headspace-Gefäß eluiert. Die zwei erhaltenen Extrakte wurden in Spitzboden-Vials überführt und mit Hilfe eines Rotations-Vakuum-Konzentrator bei etwa 250 mbar zur Trockne eingengt. Der Rückstand vom 1. und 2. Eluat wurde in je 250 µl Methanol/Acetonitril/Wasser (3:3:2 v/v/v) gelöst, vereinigt und ausgiebig gevortext. Im Anschluss wurde die Lösung in ein 1.5 ml Meßvial überführt und mit Plastikkappe inklusive Naturkautschuk-Septa verschlossen.

Tabelle 11 zeigt eine leicht veränderte Übersicht der Konzentrationen der Kalibrationsstandards 1 – 8 in 200 µl Serum, die bei den Messungen im Forensischen Center Ho Chi Minh City verwendet wurden. Die Konzentrationen von K7 bzw. K8 im Fall von 6-Monoacetylmorphin und Dextromethorphan sind hierbei niedriger. Im Center Ho Chi Minh City stand nur Kalibrationsstandard 6 als externer Standard zur Verfügung. Alle niedrigeren und höheren Kalibrationslevel wurden durch spiken von Serumproben aus K6 hergestellt.

Tabelle 11: Kalibrationsstandards Opiode 1 - 8, die im forensischen Center Ho Chi Minh City verwendet wurden. Konzentrationen nach Zugabe des Kalibrators in Serum.

Kalibrationslevel	1	2	3	4	5	6	7	8	
6-MAM, ALF, BUP, DES DMP, DP, FEN, HM, NON, NEL, NEN, NB, NF, OM, REM, SUF	1	2	4	6	8	10	50	100	ng/ml
COD, DM, MOR, M6G, ODT	5	10	20	30	40	50	250	500	ng/ml
BNT, DH, EM, HC, MEP, MET, M3G, NM, NT, OC, PEN, PHO, PIR, TRA	10	20	40	60	80	100	500	1000	ng/ml

Extraktionsmethode B zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten

0.2 ml Serum (Blut, Plasma etc.) wurde in einem 13 x 10 mm Glasröhrchen mit 4 ml Wasser verdünnt und 10 µl ISTD Opiode mit Hilfe von Einmal-Mikro Pipetten zugesetzt. Die Mischung wurde auf einem Vortex-Rüttler durchmischt und 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipette abgenommen und in ein neues 13 x 100 mm Glasröhrchen überführt. Der erhaltene Überstand wurde durch eine Festphasenextraktion mittels der voll automatischen Gilson Aspec 271 Workstation oder unter Verwendung einer Vakuumextraktionskammer weiter aufgereinigt. Eine SPE C₁₈ Säule wurde bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min (ca. 20 Tropfen/min) mit 3 ml 0.6 % Diethylamin in

Methanol (v/v) und anschließend mit 3 ml Kaliumhydrogencarbonatlösung in Wasser/Acetonitril (90:10 v/v) konditioniert. Das vorbereitete Serum wurde auf die vorkonditionierte Säule gebracht und langsam vollständig durchgesaugt. Danach wurde mit 3 x 1 ml Wasser/Acetonitril (80:20 v/v) gewaschen und die Säule 10 min trockengesaugt. Das 1. Eluat wurde bei einer Flussrate von ca. 0.5 ml/min mit 2 x 1.2 ml Acetonitril/Methanol/Wasser (3:3:2 v/v/v) in einem 12 x 75 mm Glasröhrchen aufgefangen. Die Säule wurde im Anschluss kurz trockengesaugt. Nach Wechseln der Vorlage wurde das 2. Eluat mit 2 x 1.2 ml 0.6 % Diethylamin in Methanol (v/v) erhalten. Beide Eluate wurden im schwachen Stickstoffstrom bei 40 °C mittels Turbovap abgedampft. Anschließend wurde der Rückstand in 200 µl Methanol gelöst und in eine Rollrandflasche mit Einsatz überführt. Es wurde erneut zur Trockne abgedampft und der Rückstand in 50 µl Methanol/Acetonitril/Wasser (3:3:2 v/v/v) gelöst. Das Vial wurde gevortext und mittels Verschlusszange mit einer Bördelkappe (inkl. Septum) verschlossen.

Fällung mit Methanol zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten

1 ml Serum oder Urin wurde in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 50 µl ISTD Opioide mit Hilfe einer Einmal-Mikro Pipette versetzt. Anschließend wurden 3 ml Methanol (Raumtemperatur) zugegeben, gefällt und 30 sec gründlich auf einem Vortex-Rührer durchmischt. Die Mischung wurde 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipette abgenommen und in ein 13 x 100 mm Glasröhrchen überführt und im schwachen Stickstoffstrom bei 40 °C mittels Turbovap abgedampft. Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol gelöst und in eine Rollrandflasche mit Einsatz überführt. Anschließend wurde nochmals zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 50 µl Methanol/Acetonitril/Wasser (3:3:2 v/v/v) gelöst. Das Gläschen wurde gevortext und durch eine Verschlusszange mit einer Bördelkappe verschlossen.

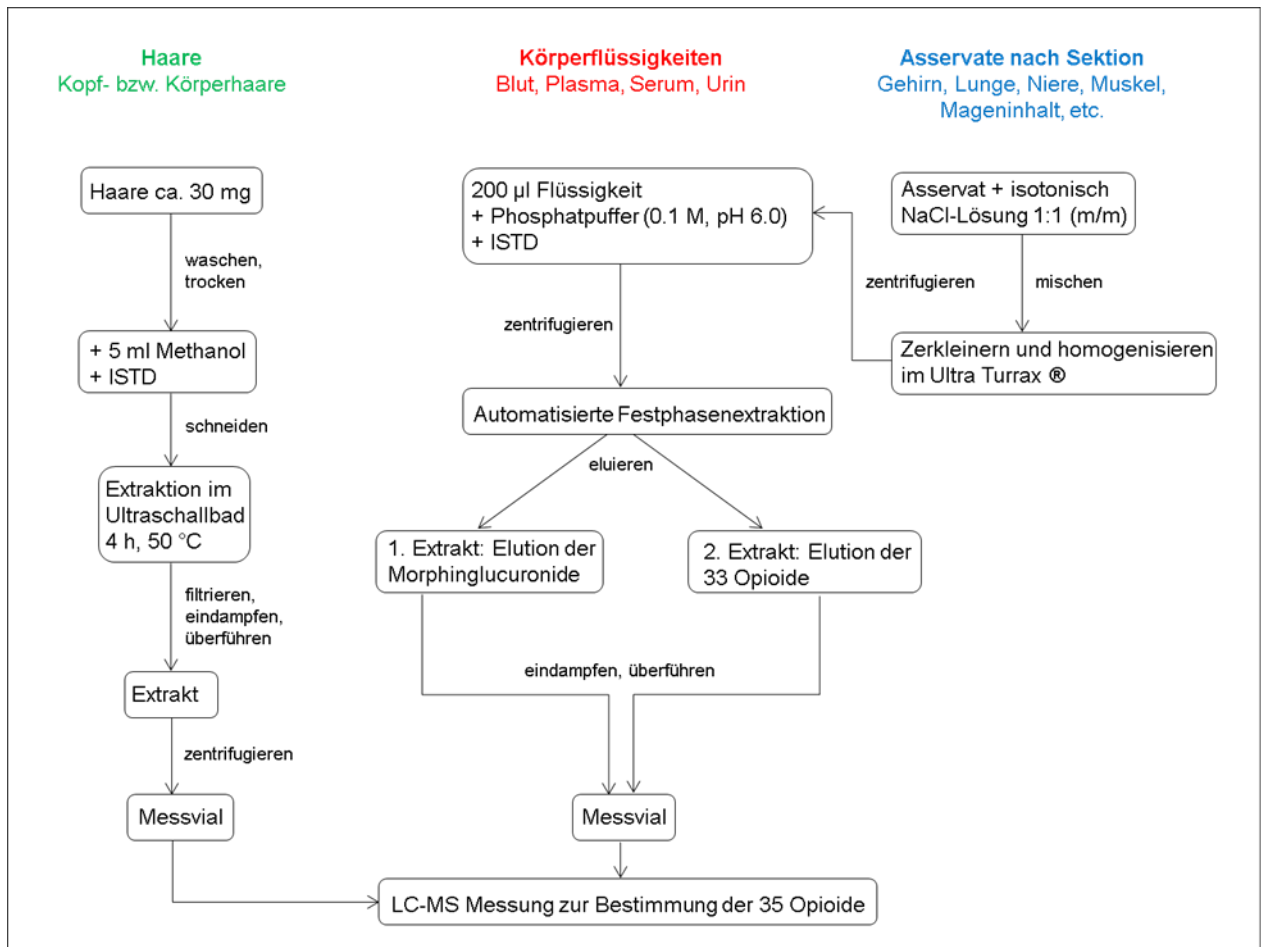


Abbildung 30: Übersicht der verschiedenen Extraktionsverfahren für die Opiode aus Haarproben, Körperflüssigkeiten und Asservaten nach Sektionen.

Eine schematische Darstellung für die verschiedenen Extraktionsmethoden der Opiode aus Körperflüssigkeiten, menschlichem Gewebe und Haaren findet sich in Abbildung 30.

3.2.2 Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Propofol in Serum

0.2 ml Serum wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 0.5 ml n-Hexan versetzt. Anschließend wurde mit Hilfe von Einmal-Mikro Pipetten 10 µl einer 100 µg/ml Thymollösung als interner Standard zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde 1 min auf einem Vortex-Rüttler gründlich durchmischt. Danach wurde die Mischung für 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. 100 µl des Überstands wurden in eine Rollrandflasche mit Einsatz überführt, mit Plastikkappe inklusive Naturkautschuk-Septe verschlossen und im Anschluss direkt an der GC/MS gemessen.

3.2.3 Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Opioiden in Gewebe

2 g Organmaterial (zum Beispiel Fett, Hirn, Leber, Lunge, Mageninhalt, Muskel oder Niere) wurde mit je 2 g isotonischer Kochsalzlösung versetzt (1:1 v/v). Die Mischung wurde mittels Ultra-Turrax-Rührers gründlich homogenisiert und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Mischung wurde gevortext und 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipette abgenommen. 200 µl des Überstandes wurden danach entsprechend der Probenvorbereitung und Extraktion von Körperflüssigkeiten weiter behandelt (siehe Extraktionsmethode A zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten).

3.2.4 Probenvorbereitung und Extraktion zum Nachweis von Opioiden in Haaren

Eine Haarprobe mit einem Gewicht von 20 – 60 mg wurde in einem Polypropylen-Röhrchen durch 1-minütiges vortexen mit 5 ml Wasser, dann mit 5 ml Aceton und zum Schluss mit 5 ml Hexan gewaschen. Danach wurde die Haarprobe für mindestens 2 h bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Haare wurden in ein neues Polypropylen-Röhrchen gegeben und exakt gewogen. 5 ml Methanol wurden hinzugefügt und die Haare mit einer Schere in ca. 1 mm lange Schnipsel geschnitten. Im Anschluss wurde 50 µl ISTD-Lösung Opioiden zugegeben, das Röhrchen verschlossen und für 4 h bei 50 °C in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurde der methanolische Extrakt portionsweise mit einer 5 ml Braun Einmalspritze durch einen Spritzenfilter in ein 13 x 100 mm Glasröhrchen überführt. Das Probenmaterial wurde bei 40 °C im schwachen Stickstoffstrom mittels Turbovap Workstation abgedampft. Der Rückstand wurde anschließend in 200 µl Methanol gelöst und in eine Rollrandflasche mit Einsatz überführt und darin erneut eingedampft. Danach wurde der Rückstand in 50 µl Methanol/Acetonitril/Wasser (3:3:2 v/v/v) gelöst, das Meßvial mit Hilfe einer Zange mit einer Bördelkappe verschlossen und gevortext. Das Vial wurde 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand in eine neue Rollrandflasche überführt und mit Bördelkappe (inkl. Septum) verschlossen.

In Tabelle 12 findet sich eine Übersicht der Konzentrationen der Kalibrationsstandards 1 – 8 nach Zugabe von 50 µl Kalibrator zur Haarprobe.

Tabelle 12: Kalibrationsstandards Opioide 1 – 8. Konzentrationen nach Zugabe des Kalibrators zur Haarprobe.

Kalibrationslevel	1	2	3	4	5	6	7	8	
ALF, BUP, DES, DP, FEN, HM, NON, NEL, NEN, NB, NF, OM, REM, SUF	1	2	4	6	8	10	50	100	ng/Probe
6-MAM	1	2	4	6	8	10	250	500	ng/Probe
DMP	1	2	4	6	8	10	250	600	ng/Probe
DM, MOR, M6G, ODT	5	10	20	30	40	50	250	500	ng/Probe
COD	5	10	20	30	40	50	500	1000	ng/Probe
BNT, DH, EM, HC, MEP, MET, M3G, NM, NT, OC, PEN, PHO, PIR, TRA	10	20	40	60	80	100	500	1000	ng/Probe

3.2.5 Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie zum simultanen Nachweis von 35 Opioide inklusive ihre Stoffwechselprodukte

LC-MS Untersuchung in Körperflüssigkeiten und Gewebe

Die Analyse der Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde mit einer UPLC 1290 Infinity und einem 6490 Triple Quad der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Für die analytische Trennung der verschiedenen Opioide wurde eine Phenyl-Hexyl-Säule 100 mm bei 50 °C Säulenofentemperatur verwendet. Es wurde die Agilent Mass Hunter B.05.00 Software inkl. Optimizer benutzt.

Die Messung wurde im ESI + (electrospray ionization) multiple reaction monitoring (MRM) Modus mit einem Injektionsvolumen von 1.0 µl und einer Flußrate von 0.8 ml/min in 36 min durchgeführt. Elutionsmittel A besteht aus Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat und Elutionsmittel B ist Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure. Der Elutionsgradient startete bei den ersten 2 Minuten mit 100 % Lösung A. Der Anteil der Mobile Phase B wurde in den nächsten 23 min auf 25 % B gesteigert und die nächsten 3 min bei 25 % B gehalten. Danach wurden die Startbedingungen (100 % Gradient A) in den nächsten 2 Minuten wiederhergestellt und für weitere 6 Minuten gehalten (siehe Tabelle 13).

Die ESI-MS/MS Messungen wurden im positiven Ionenmodus, Gastemperatur 200 °C, Gasfluß 18 l/min, Nebulizer Druck 60 psi, Sheath Gastemperatur 400 °C, Sheath Gasfluss 12 l/min, Kapillarspannung von 2000 V und Nozzle Spannung von 500 V durchgeführt. Das erste Zeitsegment wurde auf 0 – 6.5 min, das zweite Zeitsegment auf 6.5 – 11 min, das dritte Segment auf 11 – 18.5 min, das vierte Segment auf 18.5 – 24.5 min, das fünfte

Zeitsegment auf 24.5 – 28 min und 28 – 36 min für das letzte Zeitsegment festgesetzt. Der Flüssigkeitsstrom des letzten Zeitsegments wurde in den Abfall geleitet um die Ionenquelle vor Salzen und anderen Verunreinigungen zu schützen.

Eine Übersicht von Precursor Ionen, Produkt Ionen, Kollisionsenergien, Scansegmente und Retentionszeiten für alle 35 Opiode ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Precursor Ionen, Produkt Ion und Kollisionsenergien für alle 25 internen Standardsubstanzen werden in Tabelle 15 gezeigt.

Tabelle 13: Lösungsmittelgradient der LC-MS Methode zur Bestimmung der 35 Opiode (Eluent A: Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat; Eluent B: Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure).

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
2	100	0
25	75	25
28	75	25
30	100	0
36	100	0

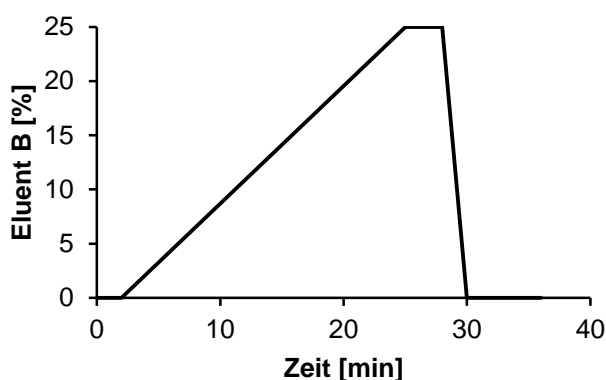


Tabelle 14: MRM (Multiple reaction monitoring) Übergänge, Kollisionsenergien, Scan Segmente und Retentionszeiten für die einzelnen Analyten.

Analyt	Precursor Ion m/z	Produkt Ion 1 m/z	Kollision 1 [eV]	Produkt Ion 2 m/z	Kollision 2 [eV]	Scan Segment	Retentionszeit [min]
6-MAM	328.2	211	29	193	25	2	8.9
ALF	417.3	268	13	385	17	4	20.6
BNT	246.2	155	13	229	5	3	13.5
BUP	468.3	55	53	396	41	4	22.9
COD	300.2	215	21	282	21	2	7.6
DES	272.2	152	65	165	69	2	8.2
DMP	272.2	171	41	213	25	4	19.6
DP	258.2	199	25	133	25	3	12.1
DH	302.2	199	33	245	17	2	7.3
DM	288.2	185	37	128	69	1	3.7
EM	314.2	152	77	165	41	2	10.4
FEN	337.2	105	37	188	21	4	21.3
HC	300.2	171	41	257	25	2	9.4
HM	286.2	185	45	227	21	1	5.3
MEP	248.2	220	17	174	17	3	13.9

Analyt	Precursor Ion	Produkt Ion	Kollision 1	Produkt Ion	Kollision 2	Scan Segment	Retentionszeit
MET	310.2	265	9	219	17	5	26.4
MOR	286.2	58	37	201	37	1	4.2
M3G	462.2	286	29	181	77	1	0.7
M6G	462.2	286	37	268	37	1	2.7
NON	328.2	310	21	253	25	2	7.8
NEL	344.2	326	17	254	37	2	9.2
NEN	342.2	282	29	212	53	2	9.0
NB	414.3	101	45	396	30	3	17.2
NF	233.2	84	21	177	9	2	10.2
NM	234.2	160	9	115	65	3	13.5
NT	260.2	155	13	229	5	3	14.1
ODT	250.2	58	37	232	5	2	7.9
OC	316.2	298	9	256	21	2	8.7
OM	302.2	284	21	242	25	1	4.7
PEN	286.2	218	13	175	21	3	17.1
PHO	399.2	114	41	381	25	1	6.0
PIR	431.3	98	25	386	13	5	24.9
REM	377.2	113	25	317	13	3	15.6
SUF	387.2	238	13	111	30	5	25.1
TRA	264.2	58	10	246	5	3	12.4

Tabelle 15: Transitionen im ESI + MRM Modus für die internen Standardsubstanzen.

Interner Standard	Precursor Ion m/z	Produkt Ion 1 m/z	Kollision 1 [eV]
6-MAM-d ₆	334.2	211	29
BUP-d ₄	472.3	59	53
COD-d ₆	306.2	218	31
DMP-d ₃	275.2	171	41
DP-d ₃	261.2	199	25
DH-d ₆	308.2	202	33
FEN-d ₅	342.2	105	37
HC-d ₆	306.2	174	41
HM-d ₆	292.2	185	45
MEP-d ₄	252.2	224	17
MET-d ₉	319.2	268	9
MOR-d ₆	292.2	64	37
M3G-d ₃	465.2	289	29

Interner Standard	Precursor Ion	Produkt Ion	Kollision 1
M6G-d ₃	465.2	289	37
NON-d ₅	333.2	315	21
NEN-d ₃	345.2	285	29
NB-d ₃	417.3	101	45
NF-d ₅	238.2	84	21
NM-d ₄	238.2	164	9
NT-d ₃	263.2	155	13
ODT-d ₆	256.2	64	37
OC-d ₆	322.2	304	9
OM-d ₃	305.2	287	21
SUF-d ₅	392.2	238	13
TRA- ¹³ C,-d ₃	268.2	58	10

LC-MS Untersuchung in Körperflüssigkeiten im Forensischen Center Ho Chi Minh City

Die Analysen der authentischen Proben wurden auch im Forensischen Center Ho Chi Minh City mit einer UPLC 1290 Infinity und einem 6490 Triple Quad der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Es wurde ebenfalls eine Phenyl-Hexyl-Säule 100 mm der Firma Agilent verwendet. Für die Akquirierung und Auswertung der Daten wurde die Agilent Mass Hunter B.04.00 Software benutzt.

Die Messung wurde im positiven Ionenmodus mit einem Injektionsvolumen von 10.0 µl und einer Flußrate von 0.8 ml/min in 36 min durchgeführt. Elutionsmittel A bestand aus Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat und Elutionsmittel B war Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure. Der Elutionsgradient startete bei den ersten 2 Minuten mit 100 % Lösung A. Der Anteil der Mobile Phase B wurde in den nächsten 23 min auf 25 % B gesteigert und die nächsten 3 min bei 25 % B gehalten. Danach wurden die Startbedingungen (100 % Gradient A) in den nächsten 2 Minuten wiederhergestellt und für weitere 6 Minuten gehalten (siehe Tabelle 13).

Die MS-Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Gastemperatur 200 °C, Gasfluß 18 l/min, Nebulizer Druck 60 psi, Sheath Gastemperatur 350 °C, Sheath Gasfluss 12 l/min, Kapillarspannung von 2000 V und Nozzle Spannung von 500 V. Das erste Scanssegment wurde auf 0 – 6.5 min, das zweite Zeitsegment auf 6.5 – 11 min, das dritte Segment auf 11 – 18.5 min, das vierte Segment auf 18.5 – 24.5 min, das fünfte Zeitsegment auf 24.5 – 28 min und 28 – 36 min für das letzte Scanssegment festgesetzt.

Die Precursor Ionen, Produkt Ionen und Kollisionsenergien der 35 Opioiden und 25 internen Standardsubstanzen wurden entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode aus dem Institut für Rechtsmedizin in Mainz übernommen (siehe Tabelle 14 und

Tabelle 15). Die internen Standards 6-Monoacetylmorphin-d₆ und Naltrexon-d₃ konnten im Forensischen Center Ho Chi Minh City nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde 6-Monoacetylmorphin auf Codein-d₆ und Naltrexon auf Naloxon-d₅ bei der quantitativen Auswertung bezogen.

LC-MS Untersuchungen in menschlichen Haaren

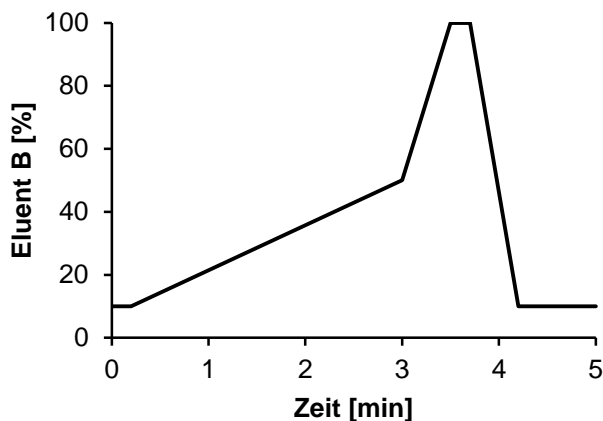
Die flüssigchromatographisch-massenspektrometrische Analyse auf Opioide in menschlichen Haaren erfolgte analog der Untersuchungen der Opioid-Analgetika in Körperflüssigkeiten mittels LC/MS Messung. MRM Übergänge, Kollisionsenergien und Scanssegmente der einzelnen Substanzen wurden ebenfalls übernommen (Tabelle 14 und Tabelle 15). Lediglich das fünfte Zeitsegment wurde von 24.5 min auf 30 min vergrößert. Dementsprechend wurde im sechsten Segment der Flüssigkeitsstrom von 30 – 36 min in den Abfall geleitet.

3.2.6 Nachweis von Tapentadol mittels LC-MS Messung

Die quantitative Bestimmung von Tapentadol wurde ebenfalls mittels LC-MS (UPLC 1290 Infinity und 6490 Triple Quad von Agilent Technologies) im ESI + MRM Modus mit einem Injektionsvolumen von 1.0 µl und einer Flußrate von 0.8 ml/min durchgeführt. Die Analysenzeit betrug 5 min und es wurde eine Eclipse Plus C18 50 mm HPLC-Säule bei 50 °C Säulenofentemperatur verwendet. Die Ionenquelle wurde mit folgenden Parametern verwendet: Gastemperatur: 200 °C, Gasfluß 15 l/min, Nebulizer Druck 50 psi, Sheat Gastemperatur 400 °C, Sheat Gasfluß 10 l/min, Kapillarspannung 3000 V und Nozzle Spannung 1000 V. Das Elutionsmittel A besteht aus Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat und Elutionsmittel B aus Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure. Tabelle 16 zeigt den verwendeten Lösungsmittelgradienten zur Quantifizierung von Tapentadol.

Tabelle 16: Lösungsmittelgradient der LC-MS Methode zur Bestimmung von Tapentadol (Eluent A: Wasser mit 5 mM Ammoniumformiat; Eluent B: Acetonitril mit 0.1 % (v/v) Ameisensäure).

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0.0	90.0	10.0
0.2	90.0	10.0
3.0	50.0	50.0
3.5	0.0	100.0
3.7	0.0	100.0
4.2	90.0	10.0
5.0	90.0	10.0



Das erste Zeitsegment wurde von 0.0 – 4.5 min gesetzt. Ab 4.5 min wurde der Flüssigkeitsstrom in den Abfall geleitet um die Ionenquelle vor Verunreinigung zu schützen. Eine Übersicht über die Precursor Ionen, Produktionen, Kollisionsenergie und der Retentionszeit für Tapentadol und Tapentadol-d₃ findet sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Precursor Ionen, Produkt Ionen, Kollisionsenergien und Retentionszeiten zur Bestimmung von Tapentadol und Tapentadol-d₃.

Analyt	Precursor Ion	Produkt Ion	Kollision	Retentionszeit
	m/z	m/z	[eV]	[min]
Tapentadol	222	121	21	1.9
	222	107	33	1.9
	222	77	61	1.9
Tapentadol-d ₃	225	121	21	1.9
	225	107	33	1.9
	225	77	61	1.9

3.2.7 Quantitative Bestimmung von Propofol aus Serum mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Propofol wurde mit Gaschromatographie gekoppelt mit Massenselektivem Detektor der Firma Agilent Technologies durchgeführt.

Die Messung erfolgte im Single Ion Monitoring Modus (SIM-Modus) mit 1 µl Injektionsvolumen (splitless). Für die chromatographische Trennung wurde eine HP-5MS Säule verwendet. Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Fluss von 1.3 ml/min verwendet. Die Injektortemperatur lag bei 250 °C, die Transferline-Temperatur bei 280 °C und die Elektronenstoßionisation erfolgte mit 70 eV. Es wurde folgendes Temperaturprogramm benutzt: Die Starttemperatur wurde für 3 min bei 60 °C gehalten,

danach wurde die Temperatur von 60 °C auf 120 °C mit 10 °C/min und anschließend von 120 °C auf 300 °C mit 30 °C/min erhöht. Die Ofentemperatur wurde danach für 8 min bei 300 °C gehalten. In Tabelle 18 sind die Targetionen, Qualifierionen und Messzeitfenster für die Analyten Propofol und Thymol aufgelistet.

Tabelle 18: Massenspuren und Messzeitfenster zur Bestimmung von Propofol und Thymol.

Analyt	Target m/z	Qualifier m/z	Messzeitfenster [min]
Propofol	91	117	7.00 – 13.00
		121	
		163	
Thymol	135	150	7.00 – 13.00

3.2.8 Validierung der analytischen Methode zur Bestimmung der Opiode in Serum- und Blutproben

Die Methode zur Untersuchung von Opioiden in Serum, Blut oder Plasma wurde entsprechend den Bestimmungen der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert (91, 92). Die genaue Richtlinie „Anforderung an die Validierung von Analysemethoden“ findet sich in Anhang B (63) zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Es wurde das Microsoft Excel-basierte Programm Valistat 2.0 für die statistische Auswertung verwendet (93).

Parameter für die Validierung waren die Selektivität, Linearität, Wiederhol- und Laborpräzision, Genauigkeit, Wiederfindung, Matrixeffekt, Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Für die Validierungsexperimente wurde Serum der Bluttransfusionszentrale des Uniklinikums in Mainz von gesunden, freiwilligen Spendern erhalten und vor Analyse auf Drogen- bzw. Medikamentenfreiheit untersucht. Diese sogenannte Leerprobe wurde mit 10 µl der jeweiligen Kalibrationslösung versetzt.

6 verschiedene Leermatrixproben (ohne Analyt und ohne interne Standardlösung) und 2 verschiedene Leerproben (ohne Analyt, aber mit 10 µl ISTD) wurden für die Überprüfung der Methode auf Selektivität vorbereitet.

Es wurde eine 6-Punkt Kalibration durch Messung der Kalibrationslevel 1 – 6 durchgeführt. Für die Festlegung des Kalibrations- und Arbeitsbereichs wurde die Leermatrix entsprechend dotiert (jeweils Kalibrator 1 – 6) und die Extraktion 6-mal wiederholt. Die Kalibrationskurven wurden auf Linearität (Mandel-F-Test), Varianzhomogenität (Cochran-Test) und Ausreißer (Grubbs Test) überprüft.

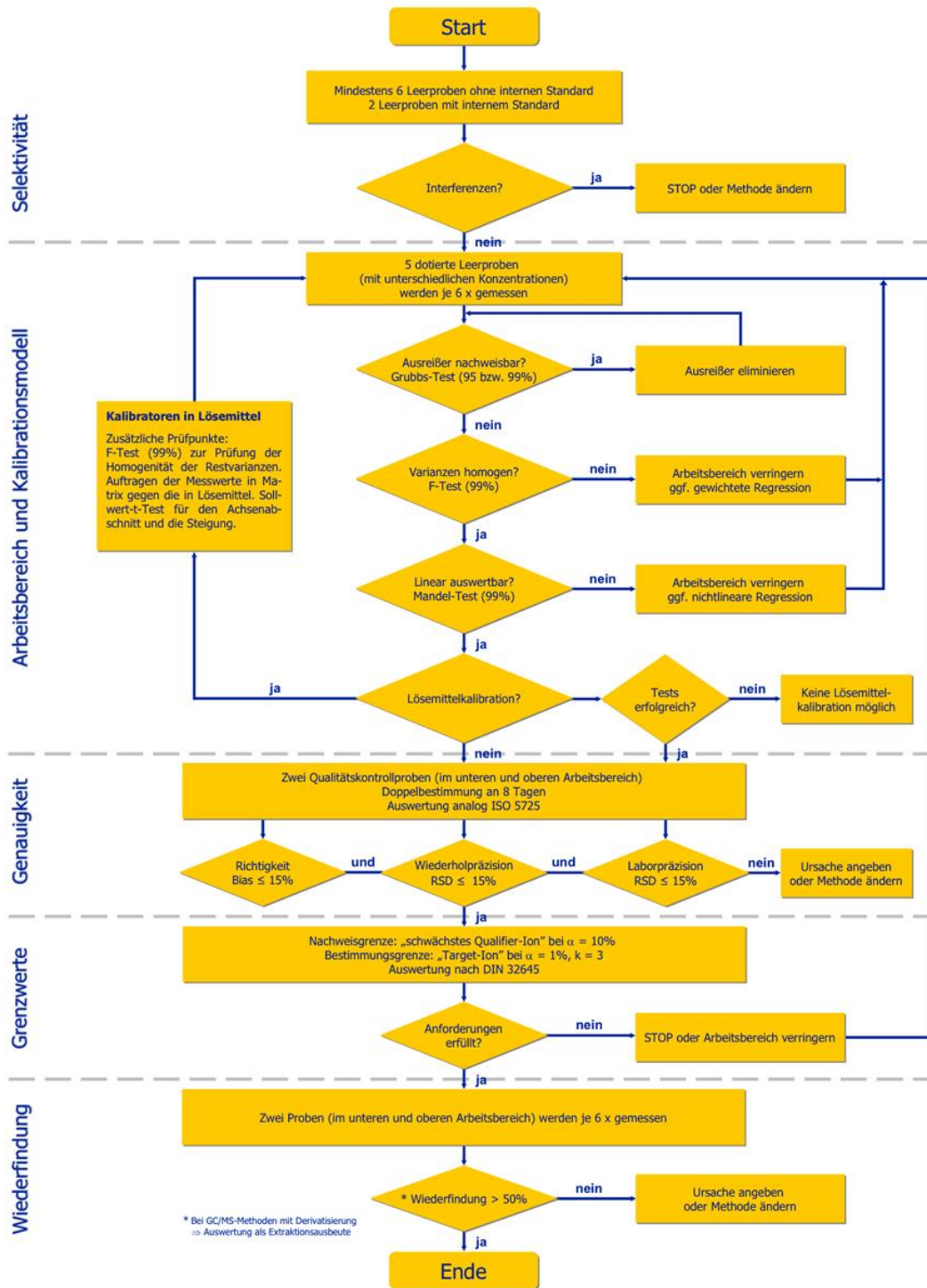
Wiederholpräzision (intraseriell), Laborpräzision (interseriell) und Richtigkeit wurden mit Hilfe von 2 Proben (niedrige Konzentration entspricht Kalibrationslevel 2, hohe Konzentration entspricht Kalibrationslevel 6) in Doppelbestimmungen über 8 Tagen ermittelt.

Wiederfindung und Matrixeffekt wurde durch Untersuchung von 6 verschiedenen Proben jeweils mit Kalibrationslevel 2 und 6 bestimmt.

Die Bestimmungsgrenze (lower limit of quantification = LLOQ) und die Nachweisgrenze (limit of detection = LOD) wurden durch dotieren der Leermatrixproben mit verdünnten Kalibrationsstandards entsprechend den zu erwartenden Grenzen aufgearbeitet und ermittelt. Für die Bestimmungsgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 und für die Nachweisgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 für Targetion und Qualifierion vorausgesetzt.

Abbildung 31 zeigt das Flussdiagramm zur Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor der GTFCh als Übersicht.

Flussdiagramm zur Methodenvalidierung



Beilage zum Buch "Methodenvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor"

NOCHNER ©

Abbildung 31: Schema zur Methodenvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor, modifiziert nach Valistat 1.0.

3.2.9 Validierung der analytischen Methode zur Bestimmung der Opiode im menschlichen Haar

Die Methode zur Untersuchung von Opioiden in menschlichen Kopf- und Körperhaaren wurde ebenfalls entsprechend den Richtlinien der GTFCh validiert. Grundsätzlich gelten die in Abschnitt 3.2.8 aufgeführten Empfehlungen. Allerdings gibt es nach der GTFCh im Bereich der Haaranalytik einige Vereinfachungen entsprechend dem Anhang C „Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben“ zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen (94). So kann für die Bestimmung der Linearität der Kalibration die Anzahl der Kalibratoren von 5 auf 4 und die Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Kalibrator von 6 auf 5 verringert werden. Außerdem kann zur Bestimmung der Wiederhol- und Laborpräzision die Anzahl der Tage von 8 auf 5 reduziert werden.

Die menschlichen Kopfhare als Leermatrixprobe wurden von freiwilligen Spendern erhalten. Vor Verwendung der Haare wurden diese auf Betäubungsmittel und Medikamente geprüft.

3.2.10 Klinische Studie zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden bei Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit Sepsis

Die Blutspiegelbestimmungen der Opioidanalgetika wurden in einer klinischen Studie zur „Cerebrovaskulären Autoregulation bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock, Einfluss einer Nierenersatztherapie – SepsAR2“ (Bearbeitungsnummer der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz 837.437.12 [8538-F]) untersucht. Die Studie wurde in Zusammenarbeit der Klinik für Anästhesiologie und dem Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz durchgeführt.

Studienziele

Die oben genannte Studie untersucht u.a. die Fragestellung inwiefern die kontinuierliche Nierenersatztherapie die Inzidenz eines sepsis-assoziierten Delirs bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock beeinflusst. Auf Grund des Krankheitsbildes wurden die Patienten analgosediert, wobei die Analgesie mit einem starken Opioid der WHO-Stufe 3 intravenös mittels Spritzenpumpe erfolgte. Für Opiode ist bekannt, dass sie gerade im Fall einer langfristigen Gabe und bei Patienten mit akuter Organdysfunktion einen Einfluss auf das medikamentenbedingte Delir haben können (95, 96). Es war daher neben der klinischen Einschätzung auch notwendig die Blutproben der Studienteilnehmer auf

Opioide und deren Metaboliten zu untersuchen. Ziel war es demnach die möglichen Einflüsse auf das sepsis-assoziierte Delir zu untersuchen. Abbildung 32 (97) zeigt eine Übersicht zur Erfassung der Inzidenz eines Delirs durch die Bestimmung von CAM-ICU (Confusion assessment method for the intensive care unit).

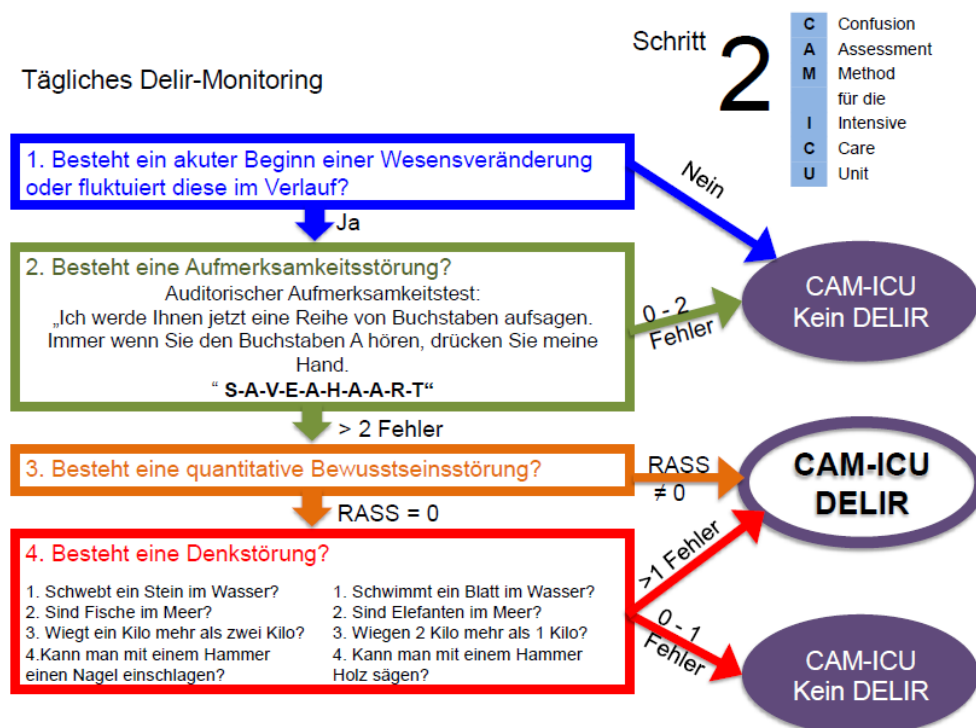


Abbildung 32: Übersicht zur Erfassung der Inzidenz eines sepsis-assoziierten Delirs, modifiziert nach E. Wesley 2002.

Die Erfassung des Analgesieniveaus bei sedierten Patienten erfolgte mit Hilfe der Behavioral Pain Skala. Dabei wurde durch Beobachtung des Gesichtsausdruckes, der Bewegung der oberen Extremitäten und der Adaption an das Beatmungsgerät ein Summenwert von jeweils 1 – 4 ermittelt. Tabelle 19 zeigt eine modifizierte Tabelle zur Behavioral Pain Skala, modifiziert nach Payen et al. 2001 (98). Die Sedierungstiefe der Patienten wurde mit Hilfe des RASS-Score (Richmond Agitation Sedation Scale) bestimmt (99). Es handelt sich dabei um ein etabliertes Verfahren bei dem die Einschätzung der Sedierungstiefe durch akustische und Berührungsreize eingeschätzt wurde (siehe Abbildung 33). Abbildung 32, Tabelle 19 und Abbildung 33 sind dem Studienprotokoll bzw. dem Amendment aus dem Ethikantrag zur Studie “Cerebrovaskulären Autoregulation bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock, Einfluss einer Nierenersatztherapie – SepsAR2“ entnommen.

Tabelle 19: Erfassung des Analgesieniveaus mittels Behavioral Pain Skala, modifiziert nach Payen et al. 2001.

Behavioral Pain Skala (BPS)

Item	Beschreibung	Punkte
Gesichtsausdruck	Entspannt	1
	Teilweise angespannt	2
	Stark angespannt	3
	Grimmassieren	4
Obere Extremität	Keine Bewegung	1
	Teilweise Bewegung	2
	Anziehen mit Bewegung der Finger	3
	Ständiges Anziehen	4
Adaption an das Beatmungsgerät	Toleration	1
	Seltenes Husten	2
	Kämpfen mit dem Beatmungsgerät	3
	Kontrollierte Beatmung nicht möglich	4

Schritt **1**

Tägliche Überwachung der Sedierung

R	A	S	S
Richmond	Agitation	Sedation	Skala

+4	sehr streitlustig	gewalttätig, unmittelbare Gefahr für das Personal	} Verbal
+3	sehr agitiert	Aggressiv, zieht Drainagen und Katheter heraus	
+2	agitiert	häufige ungezielte Bewegungen, kämpft gegen das Beatmungsgerät	
+1	unruhig	ängstlich, aber Bewegungen nicht aggressiv oder heftig	
0	aufmerksam, ruhig		
-1	schläfrig	nicht ganz aufmerksam, aber erweckbar auf Ansprache (Augenöffnen + Kontakt > 10 sec)	
-2	leichte Sedierung	kurzes Erwachen auf Ansprache (Augenöffnen + Kontakt < 10 sec)	
-3	mäßige Sedierung	Bewegung oder Augenöffnen auf Ansprache, aber kein Augenkontakt	} Berührung
↳ Wenn RASS > -3 ist, dann CAM-ICU erheben			
-4	tiefe Sedierung	Keine Reaktion auf Ansprache, aber Bewegung oder Augenöffnen durch Berührung	
-5	nicht erweckbar	Keine Reaktion auf Ansprache oder Berührung	
↳ Wenn RASS < -4 ist, dann STOP → Aufwachversuch			

Abbildung 33: Erfassung der Sedierungstiefe mittels RASS (Richmond Agitation Sedation Skala), modifiziert nach Hopf 2010.

Studiendesign

Es handelte sich um eine prospektive Beobachtungsstudie.

Patienten

Auf der anästhesiologischen Intensivstation der Klinik für Anästhesiologie (Universitätsmedizin Mainz) wurden erwachsene Patienten mit den klinischen Kriterien einer schweren Sepsis oder septischen Schock untersucht. Unter den Patienten wurden 2 Gruppen gebildet. Eine Interventionsgruppe mit kontinuierlichen Hämodialyseverfahren (Continuous veno-venous hemodialysis, kurz CVVHD) und eine Kontrollgruppe (ohne CVVHD). Die Probandenrekrutierung erfolgte im Zeitraum August 2013 bis August 2014. Es wurden Patienten mit einer standardisierten Opioidgabe eingeschlossen. Während des stationären Aufenthalts wurden die Patienten oder ihre rechtlichen Betreuer über die Studie informiert und es konnten 12 Probanden in die Studie aufgenommen werden. Diese Patienten wurden untersucht und die Daten für RASS, BPS und CAM-ICU erhoben. Ferner wurden die Blutproben der Studienteilnehmer auf Opioidanalgetika und zusätzlich Propofol analysiert.

Einschlusskriterien

- Schwere Sepsis und septischer Schock nach klinischen Kriterien
- Alter > 18 Jahre
- Durchführung der transkraniellen Dopplersonographie

Ausschlusskriterien

- Schwere Verletzungen des Schädels oder des Gehirn
- Infektionen des Gehirn oder der Meningen
- Vorbestehende terminale Niereninsuffizienz
- Schwangerschaft

Serumproben

Die Blutentnahme erfolgte auf der Station für Intensivmedizin der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz. Den Probanden wurde ein Blutvolumen von ca. 7 ml etwa im Abstand von 24 h entnommen und die Studiendauer pro Patient betrug 4 Tage. Die Blutprobe wurde aus einem bereits liegenden venösen Zugang entnommen. Das Blut wurde anschließend im Kühlschrank bis zum Proben transport (maximal 1 Tag) gelagert. Zur Serumgewinnung wurde die Blutprobe für 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Analyse bei – 20 °C in einem Tiefkühlschrank aufbewahrt.

3.2.11 Analyse von authentischen Proben der forensischen Toxikologie im Institut für Rechtsmedizin Mainz

Die am Institut für Rechtsmedizin Mainz in der forensischen Toxikologie eintreffenden Blutproben wurden zur Serumgewinnung bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, das Serum, wurde abgenommen und bei – 20 °C gelagert.

3.2.12 Untersuchung von Blutproben des Forensischen Centers Ho Chi Minh City

Von Januar bis November 2014 wurden im Forensischen Center in Ho Chi Minh City 1311 Autopsien durchgeführt. 882 dieser Fälle wurden mit einem Gaschromatographen mit Massenspektrometrie Kopplung (GC Clarus 680 und MS Clarus 600C, Rodgau, Deutschland) auf unbekannte Substanzen im Full Scan Modus gescreent. Davon waren 85 Proben positiv auf Morphin. Die Herzblutproben dieser 85 morphin-positiven Fälle wurden bis zur Aufarbeitung im Dezember 2014 bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.13 Haarentnahme und Asservierung

Die Haarprobe wurde am Institut für Rechtsmedizin entnommen, häufig im Rahmen von Abstinenzüberprüfung für Fahreignungsbegutachtungen wegen des Konsums von Betäubungsmitteln. Außerdem wurden Haarproben von Patienten einer psychiatrischen Klinik untersucht, die mit dem Verdacht einer toxischen Psychose in die Klinik aufgenommen worden waren (100). Die Haarentnahme erfolgt am Hinterhaupt. Die Haare wurden mit einem Faden fixiert und proximales bzw. distales Ende gekennzeichnet. Bis zur Untersuchung wurden die Haare bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss (in Alufolie) in einem Briefumschlag aufbewahrt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung einer Untersuchungsmethode zum Nachweis von Opioiden in Körperflüssigkeiten

Ziel war es, eine möglichst umfassende Multi-Analyt Methode für den simultanen Nachweis von Opioiden in Blut, Plasma, Serum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten zu entwickeln. Dabei sollten Arzneimittel, deren Metaboliten und auch illegale Drogen gleichermaßen erfasst werden.

4.1.1 Wahl der Extraktionsmethode

Vergleich der Extraktionsmethode A und B

In Tabelle 20 sind die Mittelwerte der Ausbeute von der Extraktionsmethode A (n = 5) und B (n = 2) ab 1 % aufgezeigt. Bei beiden Probenvorbereitungen wurde eine C18 SPE-Säule von Bakerbond benutzt. Das Säulenmaterial bestand aus einer Mischbettphase mit C18- (nicht endcapped) und Hydroxylgruppen. Das bedeutet, dass die OH-Gruppen in undefinierter Anzahl, Menge und Position im Kieselgel vorlagen. Es wurde für beide 2-stufige Elutionen eine unpolare C18-Umkehrphasenextraktion durchgeführt.

Extraktionsausmethode B wurde ursprünglich für die Aufarbeitung von polaren Substanzen wie Benzodiazepine (Extrakt B2) entwickelt. Eluat B3 wurde mit basischem Methanol extrahiert, so dass im dritten Extraktionsschritt die restlichen Substanzen, aber auch relativ viele Verunreinigungen eluiert wurden. Die opioiden Verbindungen wurden bei dieser Extraktionsmethode teilweise im Extrakt B1 und B2 gleichzeitig wiedergefunden (z.B. Morphin B2 41.9 % und B3 27.0 % Extraktionsausbeute, O-Desmethyltramadol B2 26.9 % und B3 52.0 % Ausbeute). Die polaren Metaboliten des Morphins (Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid) wurde nur zu weniger als 25 % in der Wasser/Acetonitril Lösung (80:20 v/v) eluiert. Die Extraktionsmethode B war somit nicht für die Aufarbeitung von forensischen Proben, die auf Opioide untersucht werden sollen, geeignet.

Die Extraktionsmethode A hat sich bei der Elution von den schwach polaren Cannabinhaltsstoffen wie Tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hydroxy-THC und THC-Carbonsäure (Extrakt A2) bewährt (101). Basische, stärker polare Drogenwirkstoffe wie Amphetaminderivate, Opiate und Kokain wurden im dritten Extraktionsschritt unter alkalischen Bedingungen (Extrakt A3) von der Säule gespült (90). Die Morphinglucuronide wurden nach der Elution (A1) mit Wasser/Methanol (80:20 v/v) von der Säule gewaschen. Diese Stoffwechselprodukte des Morphins sind wegen ihrer Bindung an die Glucuronsäure in 3 bzw. 6 Position sehr polar. Die ermittelte Extraktionsausbeute von 63.1 % für Morphin-3-

Glucuronid und 69.8 % für Morphin-6-Glucuronid war vollkommen ausreichend. Im Extrakt A2 (Dichlormethan/Aceton 50:50 v/v) konnten nur leicht lösliche unpolare Verbindungen extrahiert werden. Im Fall der Opioide wurden im Extrakt A2 kaum Analyten und nur in vernachlässigbarer Menge nachgewiesen (z.B. Fentanyl 2.0 % und Remifentanyl 12.2 % Extraktionsausbeute in A2). Nach dem Ansäuern mit verdünnter Essigsäure wurden die stickstoffhaltigen, basischen Opioide protoniert und bildeten mit den Acetationen Ionenpaare. Diese Ionenpaare aus basischen Opioidanalgetika und Acetationen wurden nun im Extrakt A3 von der Säule gespült. In diesen Vorversuchen lagen die Extraktionsausbeuten für alle Substanzen über 50 %. Alfentanil wurde mit einer Ausbeute von 55.6 % und Piritramid von 98.7 % extrahiert.

Tabelle 20: Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausbeuten von 2 unterschiedlichen Aufarbeitungen bei Extraktionsmethode A und B ab 1 % mit Hilfe der C18 Bakerbond Extraktionssäulen. Die Extrakte waren dabei folgendermaßen zusammengesetzt: Extrakt A1: Wasser/Methanol (80:20 v/v), Extrakt A2: Dichlormethan/Aceton (50:50 v/v), Extrakt A3: Dichlormethan/Isopropanol/Ammoniak (40:10:2 v/v/v), Extrakt B1: Wasser/Acetonitril (80:20 v/v), Extrakt B2: Acetonitril/Methanol/Wasser (30:30:20 v/v/v) und Extrakt B3: 0.6 % Diethylamin in Methanol (v/v).

Analyt	Ausbeute Extraktionsmethode B			Ausbeute Extraktionsmethode A		
	Extrakt B1 [%]	Extrakt B2 [%]	Extrakt B3 [%]	Extrakt A1 [%]	Extrakt A2 [%]	Extrakt A3 [%]
6-MAM		1.3				76.0
ALF		70.0	8.0		49.3	64.7
BUP			43.0		34.3	82.0
COD		51.5	28.0			69.5
DES			54.0			85.5
DMP			12.0			62.5
DP			57.0			83.0
DH			65.0			68.7
DM		36.8	25.0			82.0
EM		20.6	51.0			70.0
FEN		3.8	57.0		2.0	77.5
HC	2.3	17.5	22.0			64.0
HM	1.3	26.5	5.0			62.1
MEP						76.6
MET	34.4	41.9	13.0			73.2
MOR	21.5	41.9	27.0			83.4
M3G	18.2			63.1		
M6G	24.5			69.8		
NON		20.9	2.3		3.7	60.4
NEL		52.0	5.7			79.5

Analyt	Ausbeute Extraktionsmethode B		Ausbeute Extraktionsmethode A	
NEN	18.3	3.3	1.9	68.5
NB		45.0		80.6
NF		40.0		55.6
NM		25.0		77.8
NT	2.4	2.0		79.0
ODT	26.9	52.0		82.2
OC		6.0		73.9
OM	5.1	6.3		72.8
PEN		53.0		83.4
PIR	2.7	19.3		30.0
REM		57.5	12.2	59.0
SUF		23.3	8.6	69.1
TRA		3.1		74.8

Auswahl der SPE Extraktionssäule

Tabelle 21 zeigt die verschiedenen Extraktionsausbeuten für die Elutionsmethode A bei der Verwendung von C18 Bakerbond SPE und C18-OH Bond-Elut SPE Säulen. Außerdem sind auch die Ausbeuten nach einer Proteinfällung mit Methanol dargestellt.

Die C18-OH Bond-Elut SPE Säule hat neben C18-Alkyresten auch eine definierte Menge an Hydroxylgruppen am Kieselgelmateriale. Laut Angaben des Herstellers beträgt der Anteil an Hydrogen Loading 2.00 – 5.00 % H. Eigentlich wäre durch die etwas höhere Polarität des Säulenmaterials eine verbesserte Extraktion der basischen Opiode im unpolaren Extrakt A3 gegenüber der C18 SPE Säule von Bakerbond zu erwarten. Tabelle 21 ist jedoch zu entnehmen, dass die Ausbeuten der Extraktion bei Verwendung der C18 SPE von Baker für 34 Analyten höher waren. Zum Beispiel lagen die Ausbeuten für 6-Monoacetylmorphin bei Verwendung der C18 Säule bei 91 %, für die C18-OH Säule bei 72 % und bei Dextrorphan für die C18 Säule bei 97 % und C18-OH Säule bei nur 76 %. Lediglich im Fall von Meperidin lag die Extraktionsausbeute für die C18-OH Säule mit 72 % knapp über der Ausbeute mit der C18 Säule (71 %). Mögliche Ursachen für die schlechteren Ausbeuten nach der Elution an dem C18-OH Säulenmaterial könnten zum einen eine höhere Ionensuppression durch co-eluierende Substanzen gewesen sein. Interaktionen könnten endogenem (Verunreinigung, die bei der Probenaufbringung zunächst besser am Kieselgel haften) oder exogenem Ursprung gewesen sein (Salze aus der Bond-Elut Säule selbst). Denkbar wäre außerdem eine schlechtere Adsorption der Analyten bei dem Aufbringen der Probenlösung durch schwächere Van-der-Waals-Kräfte. Darüber hinaus ist der genaue Gehalt an

Hydroxylgruppen in der SPE Säulen von Bakerbond nicht definiert. Vielleicht finden sich im Bakerbond Material sogar noch mehr Hydroxylgruppen als bei den Bond-Elut Säulen.

In der Literatur existieren bereits vielversprechende Ansätze zur Extraktion von basischen Drogen durch eine Proteinfällung mit Methanol (102). Vorteil dieser Aufarbeitung war die schnelle und einfache Durchführung. Bei dem Vorversuch zur Extraktion der 35 Opioide aus Serum lagen die Wiederfindungsraten zum größten Teil unter 50 % (Buprenorphin 29 %, Hydromorphon 40 % und Piritramid 39 %). Grund hierfür waren wahrscheinlich sehr unreine Extrakte und damit eine hohe Matrixbelastung, die zu schlechten Messsignalen bei der LC/MS Messung führte.

Alle weiteren Experimente wurden im Anschluss mit der Extraktionsmethode A bei Verwendung der C18 Bakerbond SPE Säulen durchgeführt.

Tabelle 21: Dargestellt sind die Extraktionsausbeuten für die Festphasenextraktion mit einer C18 Bakerbond SPE und C18-OH Bond-Elut SPE Säule bei Verwendung der Extraktionsmethode A und Fällung mit Methanol (jeweils n = 1).

Analyt	Ausbeute der Extraktion [%]		
	Extrakt C18 Bakerbond	Extrakt C18-OH Bond-Elut	Methanol Fällung
6-MAM	91	72	17
ALF	57	1	49
BUP	57	3	29
COD	87	68	44
DES	86	78	44
DMP	85	71	37
DP	97	76	45
DH	80	72	45
DM	82	76	45
EM	81	69	43
FEN	87	70	44
HC	89	80	41
HM	81	77	40
MEP	71	72	25
MET	87	78	46
MOR	96	89	90
M3G	63	1	37
M6G	64	1	30
NON	80	12	38
NEL	93	73	43
NEN	85	49	41

Analyt	<u>Ausbeute der Extraktion [%]</u>		
NB	71	53	42
NF	78	75	43
NM	86	78	40
NT	86	75	29
ODT	84	76	44
OC	75	68	37
OM	75	62	36
PEN	84	74	43
PIR	75	55	39
REM	92	7	35
SUF	85	47	43
TRA	85	78	32

In den Vorversuchen wurden die Extraktionsausbeuten unter Verwendung einer Vakuumextraktionskammer per Hand bestimmt. Für späterer Validierungsexperimente und Aufarbeitung von Realfällen wurde die Festphasenextraktion mittels der Gilson Aspec Workstation voll automatisiert. Dies führte zu robusteren Ergebnissen und teilweise höheren Extraktionsausbeuten. Gründe hierfür waren sicherlich, dass am Anfang der manuellen Probenaufarbeitung eine routinierte Anwendung erst geübt werden musste. Beispielsweise führte eine anfänglich zu hohe Tropfgeschwindigkeit zu einer zu schnellen Extraktion oder zum Trockenlaufen der Extraktionssäulen und damit zur Bildung von undefinierten Hohlräumen in der Kieselgelmatrix.

4.1.2 Entwicklung der LC-MS Methode

Entwicklung und Optimierung der Detektion durch Massenspektrometrie

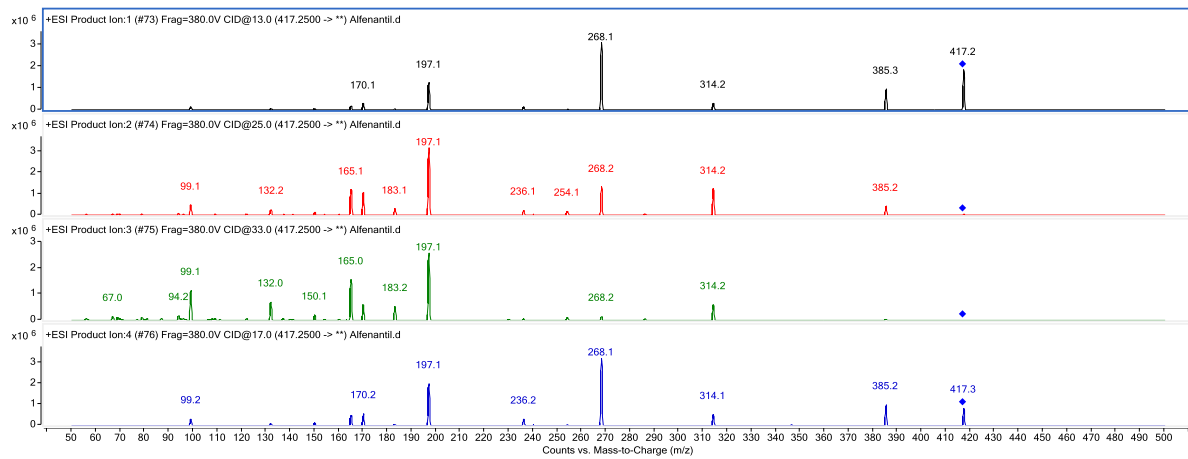
Es wurde für jeden der 35 Analyten anhand der chemischen Summenformel die Masse des Moleküls bestimmt. Jede Substanz wurde anschließend mit Hilfe der Optimizer Software von Agilent Technologies auf die optimale Kollisionsenergie zur Fragmentierung des Moleküls untersucht. Dazu wurde jedes Opioid einzeln eingespritzt und zuerst der Bereich von 5 – 80 eV und später 5 – 30 eV gemessen. Die 4 Kollisionsenergien, die am geeignetsten erschienen, sind in Tabelle 22 dargestellt und wurden danach in einem Produktionenscan für die einzelnen Opioide inklusive ihrer deuterierten internen Standards überprüft.

Tabelle 22: Summenformeln, Molare Massen [g/mol] und die 4 geeignetsten Kollisionsenergien (Collision Energie = CE) nach der Messung mit der Optimizer Software der 35 Opiode.

Opioid	Summenformel	Molare Masse [g/mol]	CE 1 [eV]	CE 2 [eV]	CE 3 [eV]	CE 4 [eV]
6-MAM	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.15	25	29	45	77
ALF	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₃	416.25	13	25	33	17
BNT	C ₁₅ H ₁₉ NO ₂	245.32	5	13	29	53
BUP	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	467.64	33	41	53	30
COD	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15	37	80	21	77
DES	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	271.35	29	30	65	69
DMP	C ₁₈ H ₂₅ NO	271.19	41	25	30	69
DP	C ₁₇ H ₂₃ NO	257.18	25	33	73	29
DH	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	301.17	33	17	61	41
DM	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287.15	37	17	45	69
EM	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	313.17	21	17	77	41
FEN	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	336.22	37	21	73	29
HC	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.15	29	41	25	69
HM	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.14	21	45	65	29
MEP	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	247.16	17	13	49	57
MET	C ₂₁ H ₂₇ NO	309.21	25	9	17	69
MOR	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285.14	69	37	17	61
M3G	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	461.17	29	77	61	77
M6G	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	461.17	33	45	69	37
NON	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.15	13	25	41	21
NEL	C ₂₀ H ₂₅ NO ₄	343.18	17	21	37	30
NEN	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.16	13	25	29	53
NB	C ₂₅ H ₃₅ NO ₄	413.26	45	80	30	41
NF	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	232.16	9	13	21	25
NM	C ₁₄ H ₁₉ NO ₂	233.14	9	45	21	65
NT	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.16	13	5	61	37
ODT	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	249.17	5	29	37	15
OC	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	315.15	9	29	21	45
OM	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301.13	13	25	21	53
PEN	C ₁₉ H ₂₇ NO	285.21	13	21	29	25
PHO	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄	399.55	25	41	30	61
PIR	C ₂₇ H ₃₄ N ₄ O	430.27	13	25	21	41
REM	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	376.45	30	29	13	25
SUF	C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₂ S	386.55	13	17	37	30
TRA	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263.19	5	80	29	10

Bei einem Produktionenscan werden in der Kollisionzelle nur die Precursor Ionen einer Verbindung durchgelassen. Diese werden dann im zweiten Quadrupol fragmentiert und die entstandenen Produktionen im dritten Quadrupol detektiert. Abbildung 34 zeigt einen solchen Produktionenscan am Beispiel von Alfentanil. Es wurden pro Analyt möglichst große, charakteristische Fragmente mit einer hohen Abundanz ausgewählt (Tabelle 14). Im Fall von Alfentanil wurden die Fragmente 268.1 m/z bei 13 eV, 385.1 m/z bei 17 eV und 197.1 m/z bei 25 eV für die weiteren Analysen ausgesucht. Außerdem wurde bei der Auswahl der Fragmente darauf geachtet, dass keine Interferenzen durch co-eluierten Substanzen auftraten, die sehr ähnliche Molekülmassen besaßen. Fast identische Massen besaßen beispielsweise 6-Monoacetylmorphin und Naloxon (jeweils 327.15 g/mol) oder Hydromorphon (285.14 g/mol), Morphin (285.14 g/mol) und Pentazocin (285.21 g/mol). Abbildung 34 (b) zeigt den Produktionenscan von Tramadol. Diese Verbindung lieferte wie O-Desmethyltramadol nur ein Hauptfragment mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 58. Dabei handelt es sich um das quaternäre Iminiumion mit der Summenformel $C_3H_8N^+$, welches im Tramadol als tertiäres Amin am Cyclohexanring gebunden ist. Die anderen beiden Produktionen (246.0 m/z bei 5 eV und 120.9 m/z bei 29 eV) konnten nur in sehr geringer Menge detektiert werden und dienten nur der sicheren Qualifizierung von Tramadol.

(a)



(b)

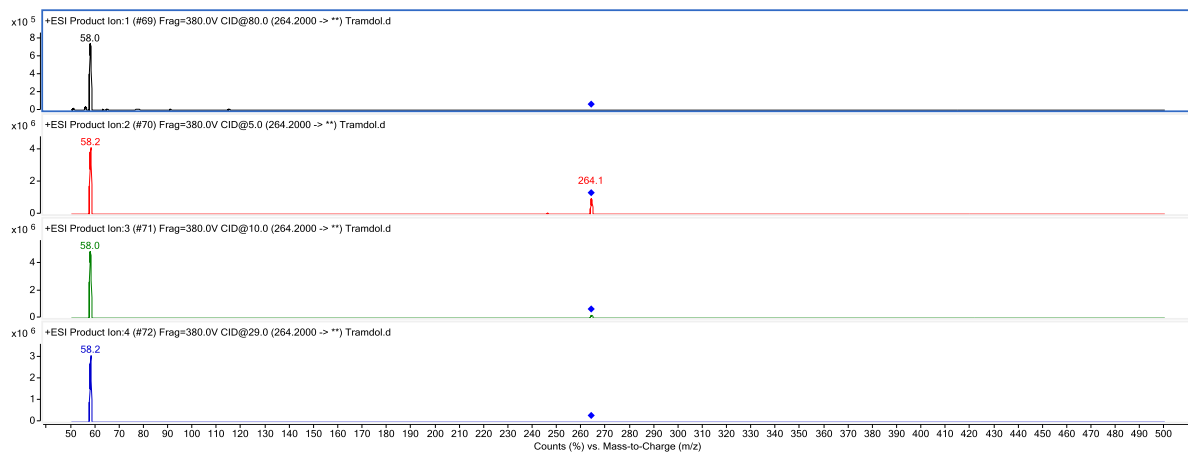


Abbildung 34: Produktionenscan von (a) Alfentanil bei einer Kollisionsenergie von 13, 25, 33 und 17 eV und (b) Tramadol bei einer CE von 80, 5, 10 und 29 eV.

Zum Schluss wurden die Parameter der Ionenquelle wie Gastemperatur, Gasfluss, Nebulizer Druck, Sheat Gastemperatur, Sheat Gasfluss, Kapillarspannung und Nozzle Spannung optimiert, um Peaks mit möglichst großen Flächen für jeden einzelnen Analyten zu erhalten. Dafür wurde immer nur ein Parameter variiert, alle übrigen Parameter wurden in der Default Einstellung (Werkseinstellung von Agilent Technologies) belassen (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Variation der Ionenquelleparameter Gastemperatur [°C], Gasfluß [l/min], Nebulizer Druck [psi], Sheat Gastemperatur [°C], Sheat Gassfluß [l/min], Kapillarspannung [V] und Nozzle Spannung [V].

Parameter	default	Variation der Ionenquellenparameter					optimiert
		Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	
Gastemperatur [°C]	200	250	300	350			200
Gasfluß [l/min]	14	12	16	18	20		18
Nebulizer Druck [psi]	20	10	30	40	50	60	60
Sheat Gastemperatur [°C]	400	200	250	300	350		400
Sheat Gassfluß [l/min]	11	8	10	12			12
Kapillarspannung [V]	3000	1000	2000	4000	5000	6000	2000
Nozzle Spannung [V]	1500	500	1000	2000			500

Tabelle 24 zeigt die Peakflächen der einzelnen Verbindungen nach Messung mit den Ionenquellenparametern in der Default Einstellung und den optimierten Parametern. Es zeigte sich bei allen Analyten eine zum Teil beachtliche Steigerung der Größe der Peakfläche. Abbildung 35 veranschaulicht diese Verbesserung graphisch. So konnte zum Beispiel bei 6-Monoacetylmorphin die Fläche von 48650 (default) auf 154609 (optimiert) erhöht und damit mehr als verdreifacht werden. Im Fall von Dihydromorphin, Hydromorphon, Morphin und OM konnte die Flächen der Peaks durch die Variation der Quellenparameter sogar vervierfacht werden. Besonders bei Analgetika, die in relativ geringen Dosierungen wie Buprenorphin, Fentanyl und Remifentanyl eingesetzt werden, sind möglichst große Peakflächen wichtig, da sie im Blut der Patienten auch nur in relativ geringen Konzentrationen vorkommen. Einzig bei Sufentanyl war die Peakfläche nach der Optimierung minimal geringer.

Es wurden dann die Parametereinstellungen in der Messmethode hinterlegt, welche für alle Opioide zu möglichst großen Peakflächen führten (siehe Kapitel 3.2.5). Damit konnten zum Teil erhebliche Steigerungen in der Sensitivität und damit auch relativ niedrige Werte für die Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze (siehe 4.2.3) erreicht werden. Es wurde sowohl die Temperatur wie auch die Fließgeschwindigkeit des in den Nebulizer eintretenden Gaststroms variiert. Die Veränderung der Gastemperatur hatte kaum einen Einfluss auf die resultierenden Peakflächen der einzelnen Opioide, da diese Verbindungen nicht besonders temperaturempfindlich sind. Im Fall der etwas temperaturlabileren Substanzen wie Buprenorphin und Norbuprenorphin führte eine Erhöhung der Gastemperatur zu deutlich kleinen Signalfächen. Mit einer Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Gasstroms verkürzt sich die Aufenthaltszeit der Analyten im Desolvationsbereich. Je schneller das Trägergas fließt, desto weniger Zeit bleibt zur Verdampfung der Moleküle. Bei einigen Molekülen sanken

mit steigender Flussrate die Peakflächen. Anlog verhält sich die Variation des Sheathgasheaters und Sheathgasflow. Der im Nebulizer eingestellte Druck verändert die Breite des Lösungsmittelsprays. Je höher der Druck ist, desto besser fokussierte der Spray. Eine deutliche Erhöhung der Signalfäche mit Erhöhung des Nebulizer Drucks konnte festgestellt werden, weshalb der Druck von der Default Einstellung (20 psi) auf 60 psi angehoben wurde. Die Spannungen, welche an der ESI-Quelle und Transferkapillare anliegen, wurden beide reduziert, da eine zu hohe Spannung vermutlich zu einer Zersetzung der Analyten führte und damit zu geringen Signalintensitäten.

Tabelle 24: Vergleich der Peakflächen der einzelnen Opioide bei Messung mit den default bzw. optimierten Ionenquellenparameter und dem Flächenquotienten [optimiert/default].

Opioid	Flächen der Ionenquellenparameter		Flächenquotient [optimiert/default]
	default	optimiert	
6-MAM	48650	154609	3.177986
ALF	474347	563709	1.18839
BUP	84541	125448	1.483872
COD	46313	123128	2.658606
DES	204007	618189	3.030234
DMP	631823	962552	1.523452
DP	755269	1458274	1.930801
DH	170615	412229	2.416136
DM	117251	510358	4.352696
EM	34884	87705	2.51419
FEN	1115165	1501552	1.346484
HC	61550	178639	2.90234
HM	32255	156908	4.86461
MEP	732609	1430293	1.952328
MET	1069113	1209198	1.131029
MOR	11566	54774	4.735777
M3G	317251	782659	2.467002
M6G	13242	16756	1.265368
NON	62121	211518	3.404936
NEL	317420	984268	3.100838
NEN	72925	269192	3.691354
NB	8675	22860	2.635159
NF	242852	747048	3.076145
NM	229382	693059	3.021418
NT	967928	1698565	1.754846
ODT	832703	1720848	2.066581

Opioid	Flächen der Ionenquellenparameter		Flächenquotient
OC	135454	302470	2.233009
OM	60698	271415	4.471564
PEN	697682	1097356	1.57286
PIR	266194	329942	1.239479
REM	299661	397385	1.326115
SUF	860340	848876	0.986675
TRA	1343540	2141449	1.593886

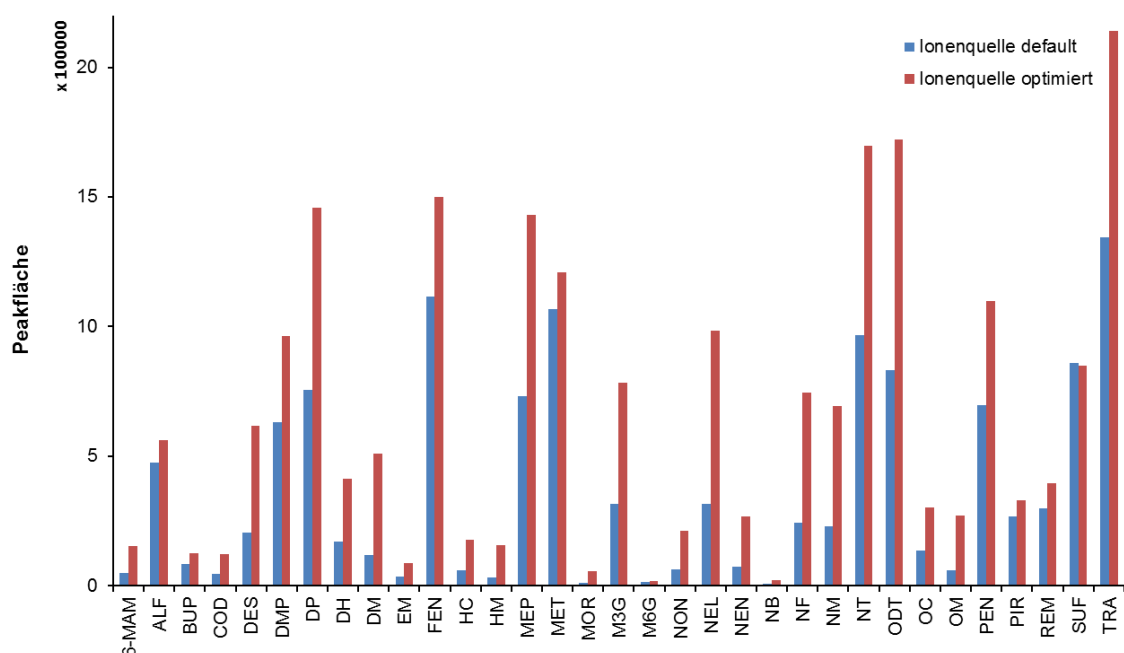


Abbildung 35: Vergleich der Peakflächen der einzelnen Opiode (in Methanol, 0.1 ng absolut) bei Messung mit default und optimierten Ionenquellenparametern.

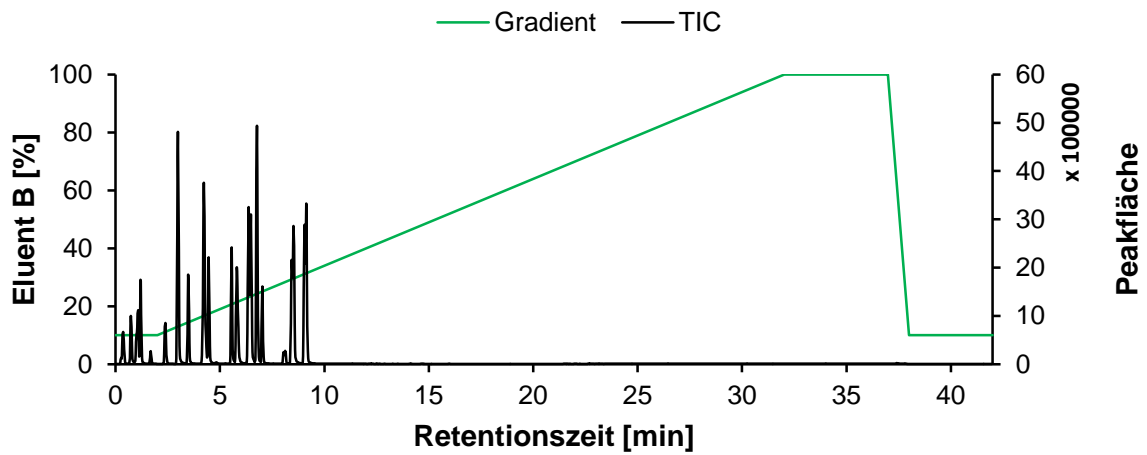
Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Außerdem wurden die chromatographischen Einflüsse wie Lösungsmittelgradient, Flussgeschwindigkeit und Wahl der analytischen Säule variiert und verbessert.

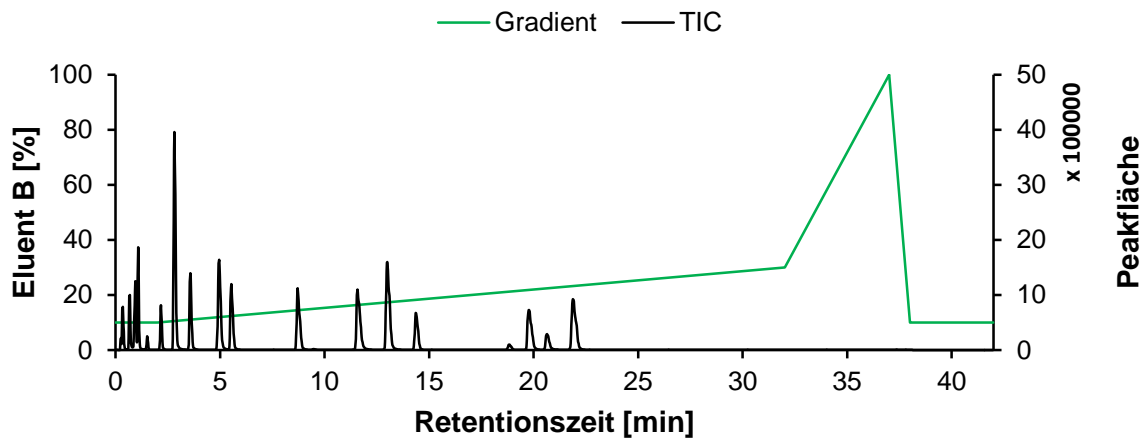
Drei Vorversuche zur Entwicklung des optimalen Lösungsmittelgradienten sind in der Abbildung 36 dargestellt. Hierfür wurde der Acetonitrilanteil (Eluent B) bei Verwendung einer Eclipse Plus C18 100 mm Säule variiert. In Abbildung 36 (a) wurde der Anteil an Acetonitril anfangs zu schnell gesteigert, was zu einer relativ schlechten Auftrennung der Peaks führte, die alle in den ersten 10 min eluierten. Deshalb wurde der Anteil von Eluent B in Abbildung 36 (b) wesentlich langsamer gesteigert, was zu einer besseren Verteilung der einzelnen Peaks über einen Retentionszeitraum von ungefähr 23 min führte. Als optimal erwies sich der Gradient in Abbildung 36 (c), da bereits zu Beginn der Retention viele Peaks wesentlich

besser aufgetrennt wurden. Dies wurde durch eine anfängliche Reduktion des Acetonitrilanteils auf 0 % erreicht. Auf Grund der guten chromatographischen Trennleistung über 25 min, konnten einzelne Zeitsegmente definiert werden. Durch die Einführung der verschiedenen Messzeitfenster konnte eine höhere Messempfindlichkeit erreicht werden. Später wurde der Anteil von Acetonitril bei maximal 25 % belassen, da die Opioide bereits vorher eluierten. Bei einem Gradienten von 100 % Eluent B würde relativ viel Zeit für die Äquilibrierung der HPLC Säule benötigt, was zu längeren Analysenzeiten führen würde. Am Ende jeder Messsequenz wurde eine Spülmethode mit 100 % Acetonitrilanteil nachgeschaltet, so dass potenzielle sehr unpolare Verunreinigungen von der Säule entfernt wurden.

(a)



(b)



(c)

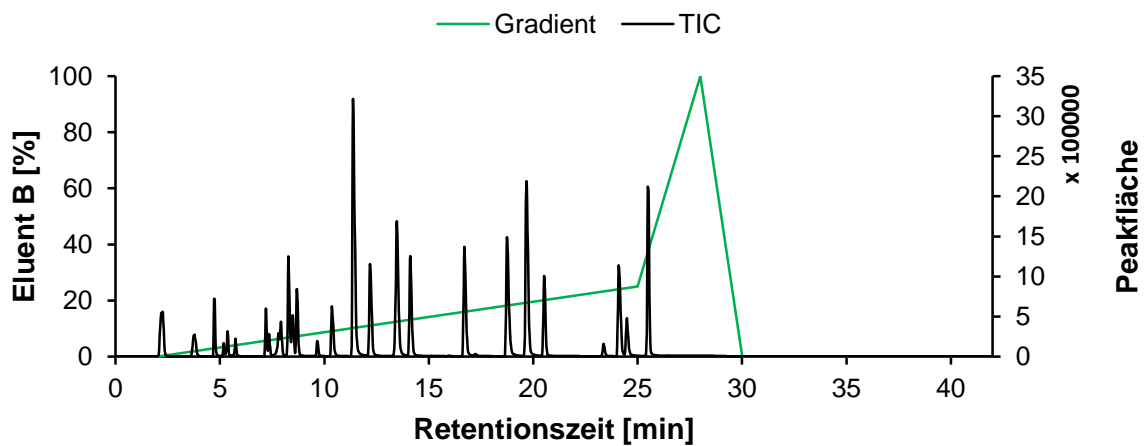


Abbildung 36: Total Ion Chromatogram der LC/MS Messung von den Opioiden in Methanol bei Verwendung einer Eclipse Plus C18 100 mm Säule. Es wurde der Anteil von Eluent B (Acetonitril) variiert. (a) Eluent B: 0 – 2 min 10 %, 2 – 32 min -> 100 %, 32 - 37 min 100 %, 37 – 38 min -> 10 %, 38 – 42 min 10 %; (b) Eluent B: 0 – 2 min 10 %, 2 – 32 min -> 30 %, 32 – 37 min ->

100 %, 37 – 38 min -> 10 %, 38 – 42 min 10 %; (c) Eluent B: 0 – 2 min 0 %, 2 – 25 min -> 25 %, 25 – 28 min -> 100 %, 28 – 30 min -> 0 %, 30 – 32 min 0 %.

Abbildung 37 zeigt das Total Ion Chromatogram (TIC) der 35 Analyten bei Verwendung der C8 Rapid Resolution (150 mm) Säule, der C18 Rapid Resolution Säule (150 mm) und der Phenyl-Hexyl Rapid Resolution (150 mm) Säule. Das Trennmateriale der C18 bzw. C8 Säule bestand aus Octadecyl Silica bzw. C8-gebundene Silica. Das Trägermaterial wurde dabei mit Alkylchlorosilanen hydrophobiert und doppelt endgecappt. Die beiden Materialien eigneten sich deshalb besonders für unpolare bzw. schwach polare Analyten bei Verwendung der Umkehrphasenchromatographie. Bei der Phenyl-Hexyl Säule hingegen wurden die Phenyl- bzw. Hexylreste monomer an die Kieselgeloberfläche gebunden und das Material zusätzlich doppelt endgecappt. Die Flussgeschwindigkeit bei diesen Messungen betrug 1 ml/min.

Eine gute chromatographische Trennung von z. B. Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid waren notwendig, da diese beiden Morphin-Metaboliten gleiche Precursor und Fragment Ionen aufwiesen und damit massenspektrometrisch nicht unterschieden werden konnten. Die Separierung der zwei Analyten konnte unter Verwendung einer Umkehrphasenchromatographie mit einer C8 oder C18 Säule auf Grund der chemischen Eigenschaften, wie hohe Polarität der Glucuronide nicht erreicht werden (siehe Abbildung 37). Zu diesem Zweck wurde eine Phenyl-Hexyl Säule (150 mm) getestet. Die Verwendung dieser Säule erlaubte eine gute chromatographische Trennung von alle Opioiden, wobei viele Peaks basisliniengetrennt waren. Besonders die 2 hydrophilen, weniger basischen Morphinglucuronide konnten sehr gut voneinander separiert werden. Dies bestätigte die gute Eignung der Phenyl-Hexyl Säule besonders zur Trennung von basischen und hoch polaren Analyten mit Hilfe der Umkehrphasenchromatographie (103).

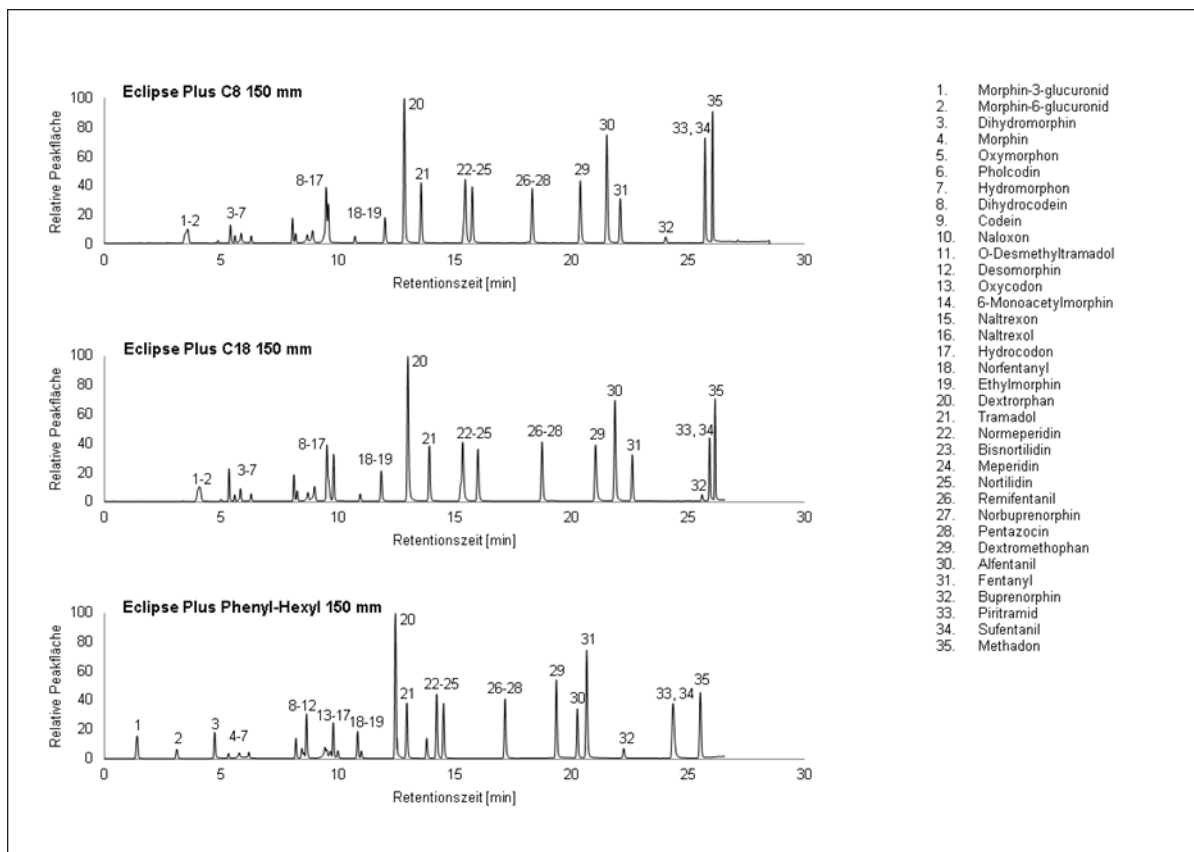


Abbildung 37: Total Ion Chromatogramm der 35 Opiode inklusive der Metaboliten. Verwendete HPLC-Säulen von Agilent Technologies: Eclipse Plus C 8 150 mm, Eclipse Plus C 18 150 mm und Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 150 mm.

Die Trennung der 35 Opiode mit Hilfe der Phenyl-Hexyl Rapid Resolution Säule (100 mm) ist als TIC der Messung von Kalibrationslevel 6 in Abbildung 38 dargestellt. Die Länge der analytischen Säule wurde von 150 mm auf 100 mm und die Flussrate von 1 ml/min auf 0.8 ml/min reduziert. Damit konnte der Druck in der HPLC enorm gesenkt werden, wobei die gute chromatographische Trennleistung erhalten blieb. Viele Signale in diesem TIC, besonders Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid, waren weiterhin basisliniengetrennt. Die Senkung des Drucks in dem analytischen Gerät war notwendig, um die Lebensdauer der Säulen und der Verschleißteile (Pumpenköpfe mussten weniger häufig gewechselt werden) zu erhöhen. Außerdem wurde damit die Methode im Hinblick auf Routinetauglichkeit robuster.

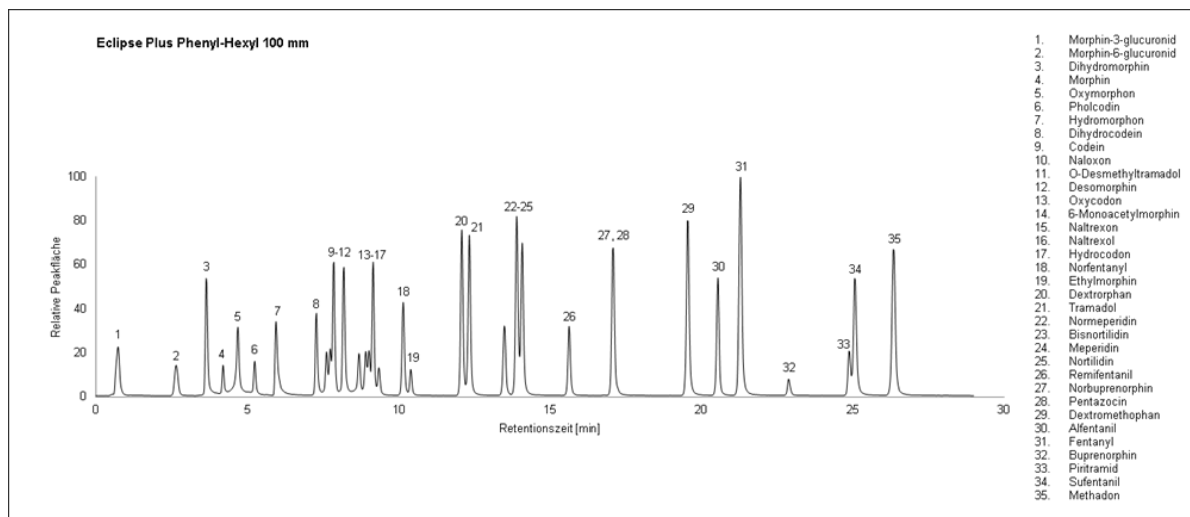


Abbildung 38: Total Ion Chromatogramm der Messung von Kalibrationslevel 6 mit einer Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Säule 100 mm.

4.2 Methodenvalidierung zum Nachweis von Opioiden in Serum, Plasma und Urin

Mit Hilfe der Methodenvalidierung wird der Nachweis erbracht und dokumentiert, dass eine Analysenmethode für ihren Bestimmungszweck geeignet ist. Sie ist Voraussetzung für die Qualität und Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen. Die Validierung ist ein wichtiges Instrument in der Qualitätssicherung bei Analysen und wird für die Akkreditierungen von forensisch-toxikologischen Laboratorien benötigt. Besonders bei diesen Laboren spielt eine verlässliche Interpretation der Untersuchungsergebnisse und ein nur schwer anfechtbares Ergebnis eine wichtige Rolle (104-108). Gemäß dem Anhang B "Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden" der Richtlinie der GTFCh muss die Selektivität, der Arbeitsbereich und das Kalibrationsmodell, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Genauigkeit und Richtigkeit, Wiederfindung und Matrixeffekt überprüft werden (63).

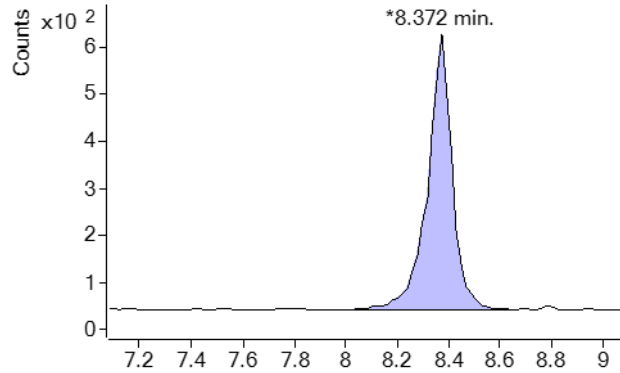
4.2.1 Selektivität

Weder das Chromatogramm der gemessenen Leerproben noch das Chromatogramm der mit Internem Standard gespickten Leerseren zeigte eine relevante Interferenz.

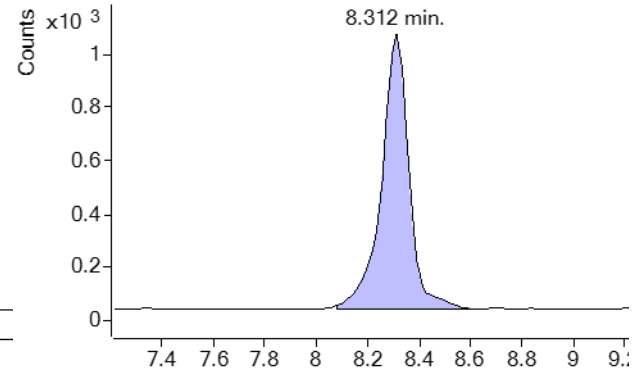
Einzig die MRM-Übergänge von Naltrexon-D3 (Interner Standard von Naltrexon) zeigten mit zunehmender Konzentration eine ansteigende Interferenz. In Abbildung 39 sind die Chromatogramme der Fragmente von Naltrexon (342.2 → 282.0 @ 29) und Naltrexon-d₃ (345.2 → 285.0 @ 29) der aufgearbeiteten Kalibrationslevel 2, 6 und 8 dargestellt.

(a)

+ MRM (342.2 -> 282.0) k3s2.d

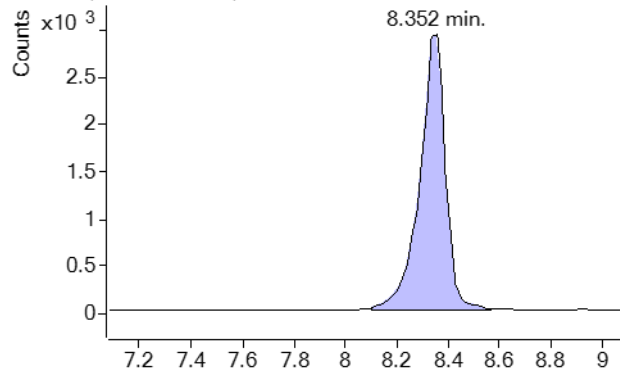


+ MRM (345.2 -> 285.0) k3s2.d

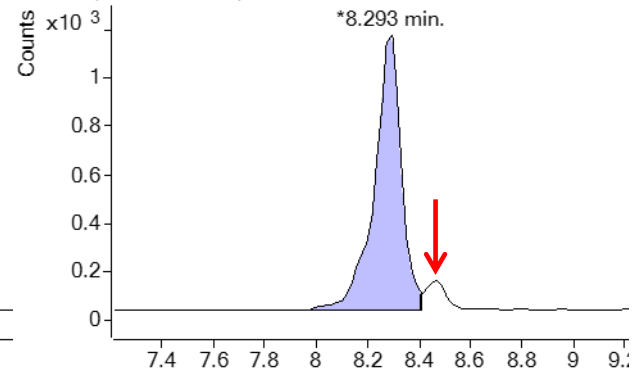


(b)

+ MRM (342.2 -> 282.0) k7s2.d

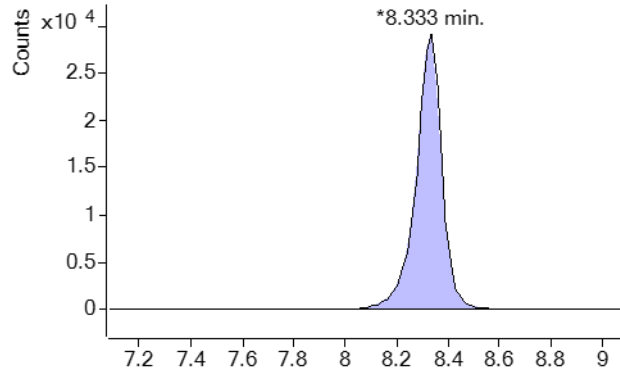


+ MRM (345.2 -> 285.0) k7s2.d



(c)

+ MRM (342.2 -> 282.0) k9s2.d



+ MRM (345.2 -> 285.0) k9s2.d

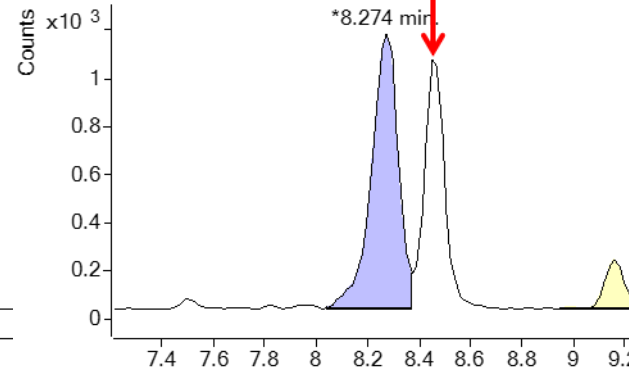


Abbildung 39: Charakteristische Chromatogramme, welche die MRM-Übergänge von Naltrexol (342.2 -> 282.0 @ 29) und Naltrexon-d₃ (345.2 -> 285.0 @ 29) darstellen. Abgebildet ist die Interferenz von Naltrexon-d₃ bei den aufgearbeiteten Kalibrationslevel 2 (a), 6 (b) und 8 (c).

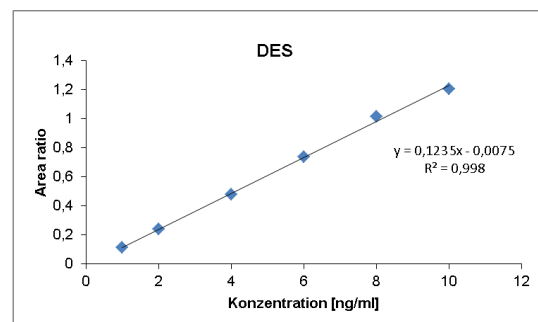
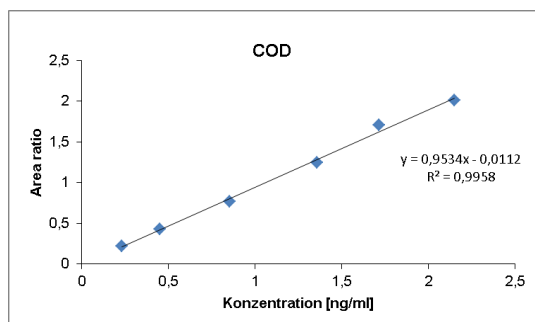
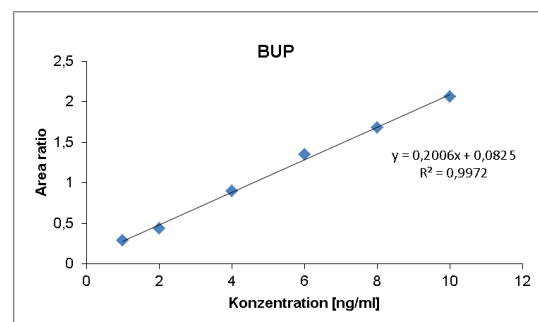
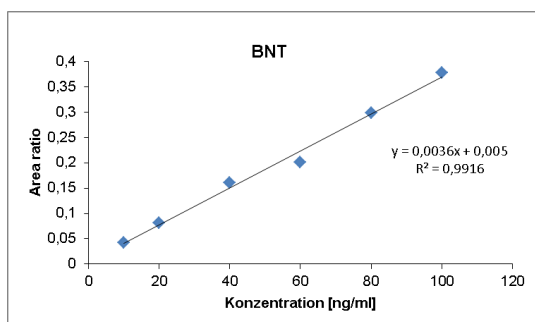
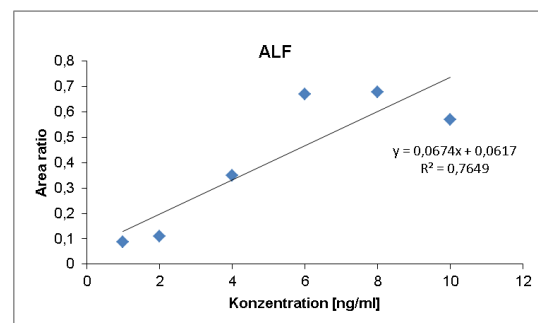
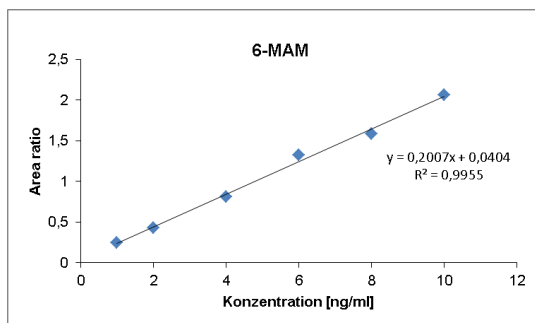
Diese Interferenz war jedoch erst bei hohen Konzentrationen wirklich relevant (ab Kalibrationslevel 7). Bei dem zweiten Peak handelt es sich um einen Isotopenpeak von 6β -Naltrexol. Der monoisotopische Peak von Naltrexon- d_3 besitzt nach Brünnen et al. dieselbe nominale Masse wie der erste Isotopenpeak von 6β -Naltrexol- d_4 (82) und führt zu der Interferenz. Bei Routineuntersuchungen spielen normalerweise Konzentrationen bis 10 ng/ml Naltrexon bzw. Naltrexol eine Rolle (entspricht Kalibrationslevel 6), so dass diese Störung gar nicht auftritt (109). Außerdem wurden die Proben nur bis Kalibrationslevel 6 validiert. Sollte es dennoch bei Realproben zu einer solchen Interferenz kommen, müssen entsprechende Chromatogramme in der Software evtl. manuell nachintegriert werden.

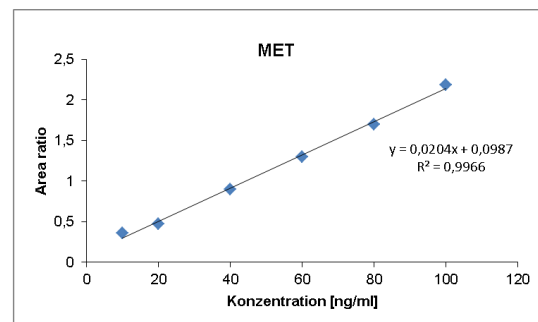
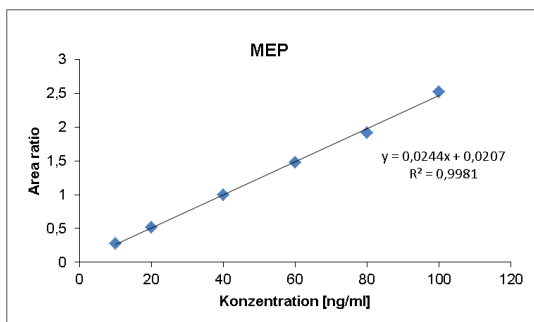
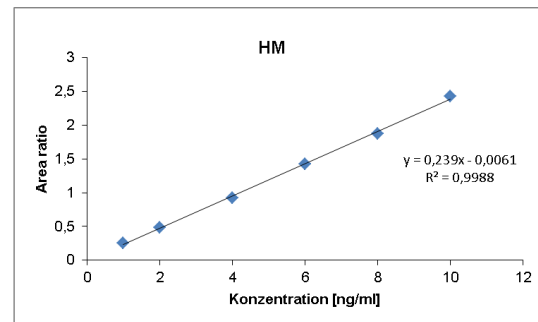
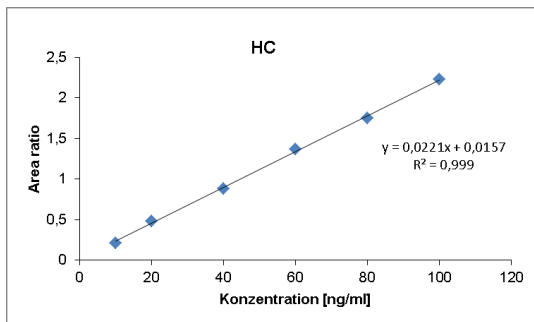
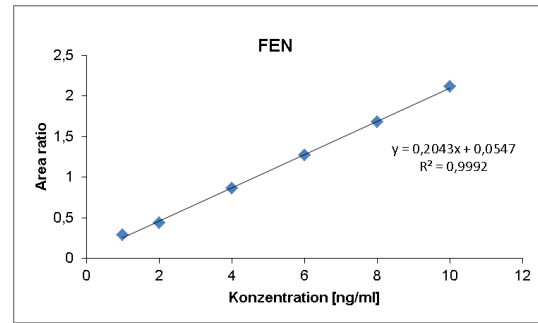
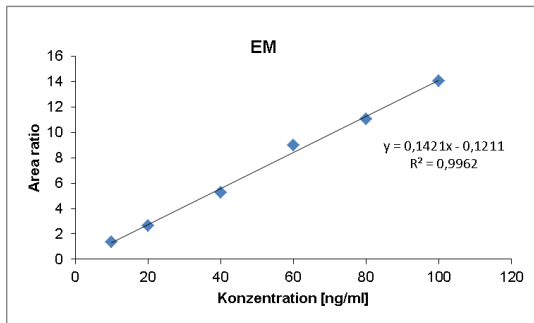
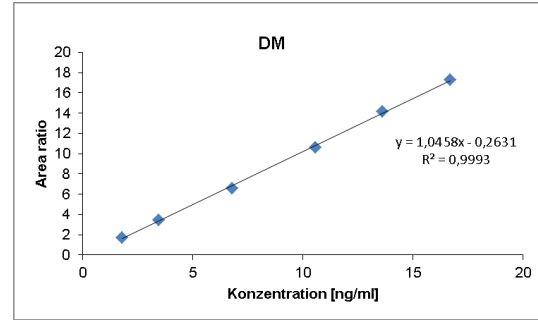
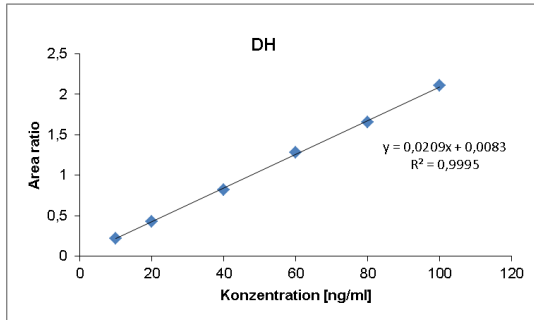
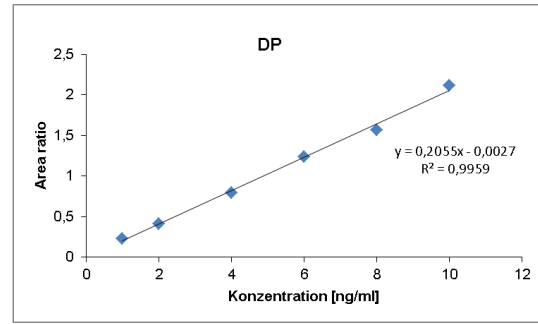
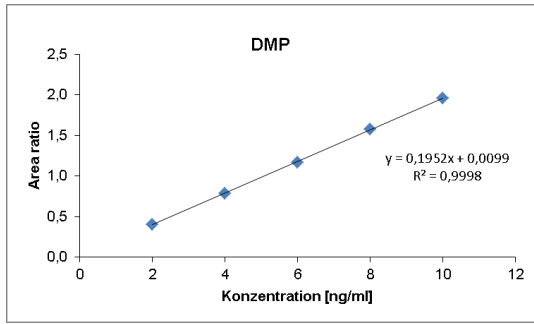
Bei einigen Testläufen bzw. Untersuchungen zeigten sich minimale Verschleppungen der Analyten Methadon, Bisnortilidin und Nortilidin in den Chromatogrammen. Nachdem diese Verunreinigungen wiederholt auftraten wurde ein zusätzlicher Waschschrift der Injektionsnadel im Autosampler in die Messmethode integriert um eine evtl. Verschleppung von Substanzen in die nachfolgende Probe zu vermeiden. Außerdem wurde ebenfalls ein mehrmaliges Schalten des Injektionsventils im Autosampler (während einer Messung) in die Analysenmethode aufgenommen, um alle Kanäle im Ventil ausreichend zu spülen. Aufgrund dieser Maßnahmen ist eine Verunreinigung der Chromatogramme von Spuren mit Methadon vollkommen verschwunden. Eine geringe Verschleppung von etwa 1 - 3 ng/ml Bisnortilidin oder Nortilidin ist weiterhin zu beobachten. Solche Kontaminationen bei LC/MS Messungen sind für die Substanzen Methadon und Kokain bekannt. Vermutlich treten die Kontaminationen von Spuren von Bisnortilidin und Nortilidin auf Grund von Polaritäts- bzw. Oberflächeneigenschaften des Materials in dem Injektionsventil oder aber in den Kapillaren in der HPLC auf. Ein weiterer Grund für das Entstehen von Verschleppungen können Totvolumina in dem Säulenschalt- und Injektionsventil sein. Die Verschleppung von Bisnortilidin und Nortilidin liegen allerdings bei so geringen Konzentrationen, dass sie irrelevant sind. Der niedrigste Kalibrator für beide Analyten liegt mit 10 ng/ml weit oberhalb der gemessenen Konzentrationen der Kontaminationen und die therapeutischen Blutspiegel beginnen für Bisnortilidin und Nortilidin ab 50 ng/ml.

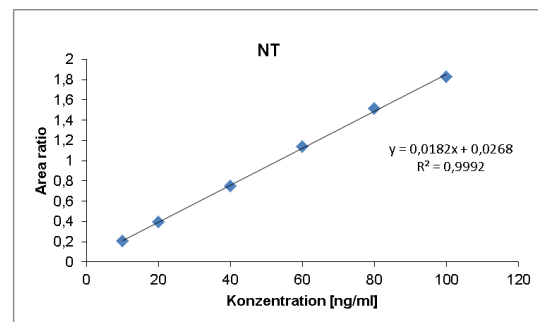
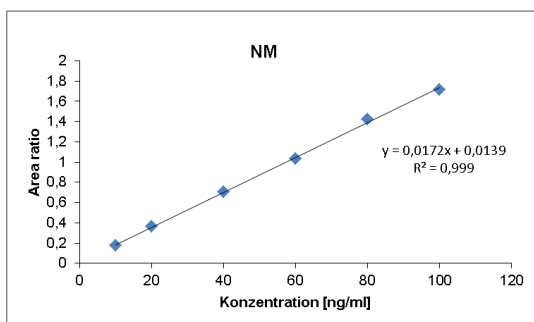
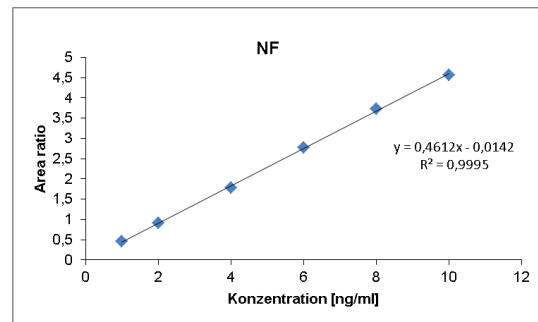
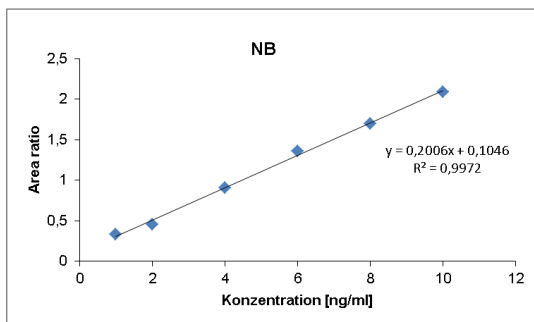
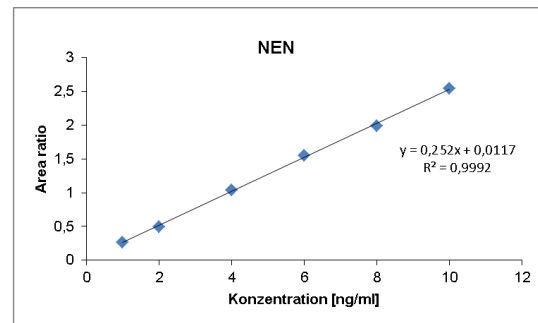
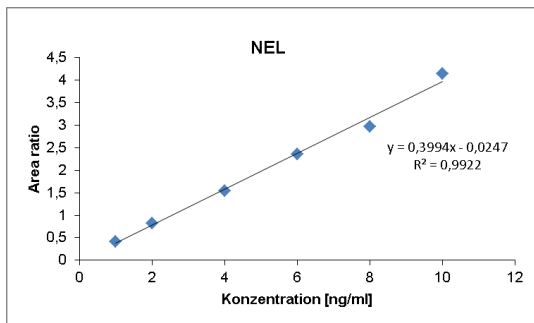
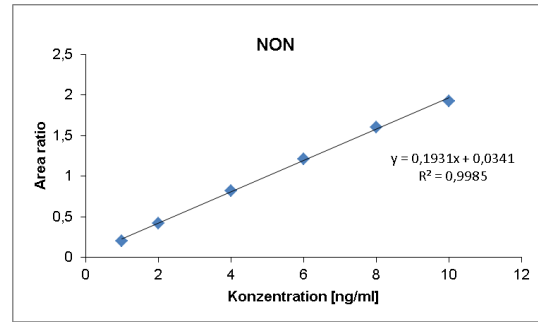
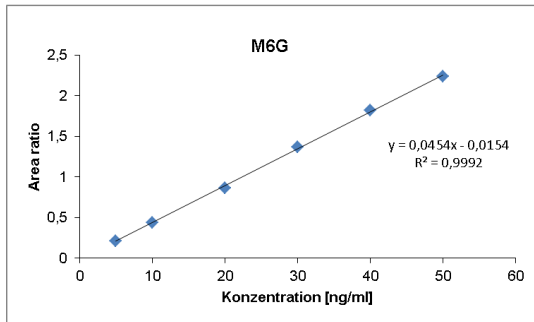
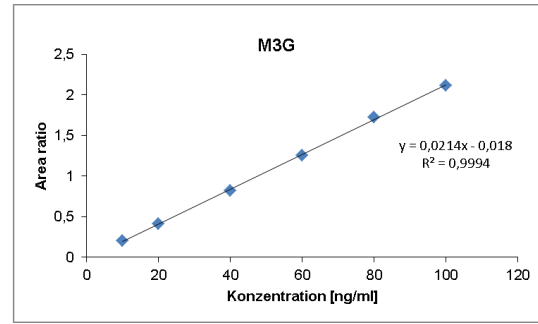
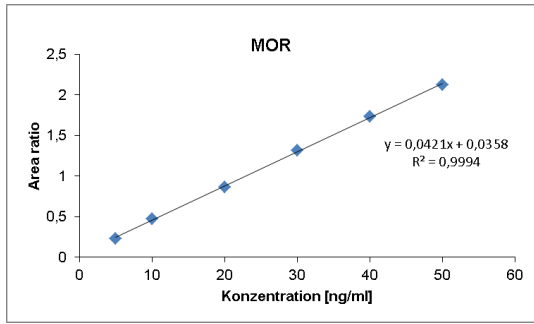
4.2.2 Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

Die Kalibrationslevel 1 – 6 für die verschiedenen Substanzen wurden so gewählt, dass sie etwa in dem zu erwartenden therapeutischen Bereich lagen (110). Die Konzentrationen der Kalibrationslevel 7 und 8 der einzelnen Opiode entsprachen eher toxischen bzw. letalen Serumspiegeln.

Die Kalibrationskurven für alle 35 Substanzen waren linear (gemäß linearer Regressionsanalyse, bestätigt durch Mandel-Test) über den getesteten Konzentrationsbereich von Kalibrationslevel 1 bis 6. Überprüft wurden 6 verschiedene Kalibrationslevel in 6 Serien (siehe Abbildung 40). Im Fall von Dextromethorphan wurden nur 5 Kalibrationslevel bestimmt, allerdings wurden von der GTFCH zur Bestimmung der Richtlinien auch nur 5 Kalibrationslevel bei 6 Wiederholbestimmungen gefordert. Bei dem Grubbs-Test zeigten sich keine Straggler oder Ausreißer für alle 35 Substanzen. Die Homogenität der Varianzen wurde durch den F-Test bestätigt. Der Korrelationskoeffizient lag immer oberhalb von 0.995. Nur im Fall von Alfentanil wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.8746 ermittelt. Der Grund für diesen niedrigen Koeffizienten dürfte sein, dass Fentanyl-d5 als Interner Standard für Alfentanil verwendet wurde, da zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung kein deuteriertes Analogon von Alfentanil kommerziell erhältlich war. Außerdem wies Alfentanil relativ schlechte und auch schwankende Extraktionsausbeuten auf.







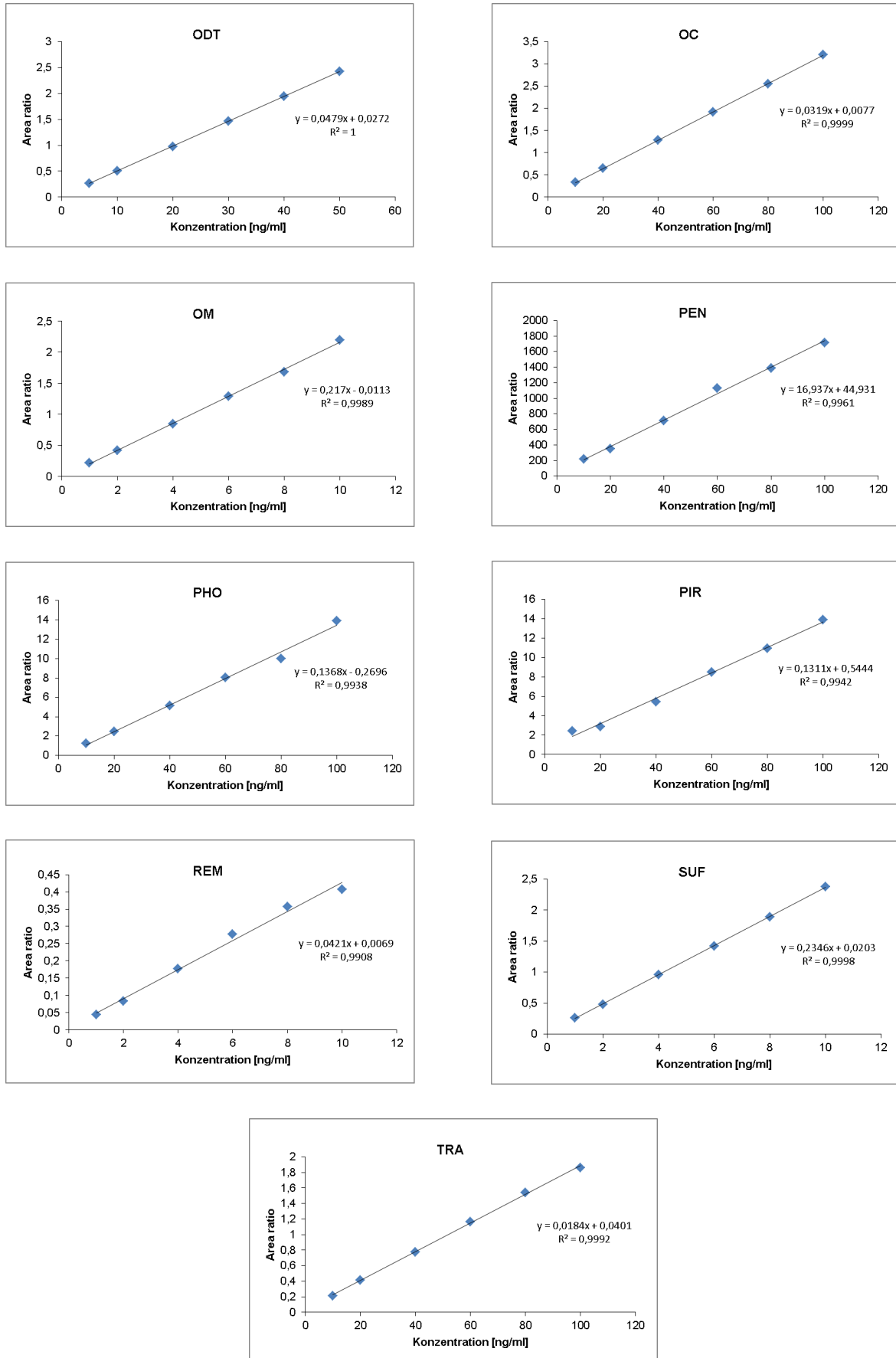


Abbildung 40: Überprüfung der Linearität. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 LC-MS/MS Messungen von 6 verschiedenen Konzentrationen der 35 Opiode in gespikten Serumproben.

4.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD = limit of detection) und die Bestimmungsgrenze (LLOQ = lower limit of quantification) wurden mit einem Signifikanzlevel von 99 %, einer Ergebnisunsicherheit von 33 % und einer relativen Standardabweichung von unter 20 % bestimmt. Die Bestimmungsgrenzen lagen im Bereich von 0.1 (Desomorphin, Dextromethorphan, Dextrorphan, Fentanyl, Norfentanyl, Oxymorphon, Remifentanyl und Sufentanyl) bis 2.0 ng/ml (Morphin-3-Glucuronid). Für die Nachweisgrenzen wurden Konzentrationen von 0.02 (Fentanyl, Pentazocin, Sufentanyl) bis zu 0.6 ng/ml (Morphin) bestimmt. Die Nachweisgrenzen wurden normalerweise über das Signal-Rausch-Verhältnis von Target- und Qualifierion ermittelt. Im Fall von Codein, Morphin-6-Glucuronid, Norbuprenorphin, Norfentanyl, Normeperidin, O-Desmethyltramadol und Tramadol wurde die Nachweisgrenze über das Targetion bestimmt. O-Desmethyltramadol und Tramadol haben zum Beispiel keine akzeptablen Fragmentationen bis auf das Targetion mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 58 (83).

Die Werte für Nachweis- und Bestimmungsgrenze der einzelnen Analyten finden sich in Tabelle 25.

Tabelle 25: Daten der Methodvalidierung für Serumproben.

Opioid	LOD [ng/ml]	LLOQ [ng/ml]	Richtigkeit (%)		Intraassay (%)		Interassay (%)		Wiederfindung (%)		Matrixeffekt (%)	
			(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)
6-MAM	0.10	1.0	-3.2	3.0	4.2	5.4	6.0	4.0	75	85	88	100
ALF	0.30	1.0	-19.7	7.8	36.6	21.2	33.8	20.3	49	60	98	99
BNT	0.30	1.0	1.2	-7.9	12.5	12.6	11.7	10.9	48	51	96	84
BUP	0.50	1.0	3.8	6.0	6.2	4.1	8.7	4.1	52	61	95	95
COD	0.20	0.5	0.4	3.6	2.3	3.7	2.9	3.1	75	83	100	95
DES	0.06	0.1	1.9	4.4	5.8	5.1	6.9	6.3	75	84	96	105
DMP	0.03	0.1	1.1	3.2	5.5	3.8	4.7	3.3	74	78	96	92
DP	0.03	0.1	1.0	-0.3	5.9	2.7	5.3	3.1	79	84	91	97
DH	0.04	1.0	0.1	0.4	2.9	4.1	5.5	3.6	79	85	97	94
DM	0.08	0.5	1.6	2.0	7.9	2.2	8.2	2.4	74	79	91	96
EM	0.04	1.0	-12.5	-1.6	7.4	9.5	21.7	10.0	77	86	86	89
FEN	0.02	0.1	-5.8	1.3	3.6	3.3	5.6	2.8	62	78	95	99
HC	0.20	1.0	-3.3	1.7	5.6	2.7	6.3	3.1	73	80	93	97
HM	0.06	0.1	2.7	0.8	3.9	3.2	6.3	3.0	71	75	92	95
MEP	0.04	1.0	2.0	7.6	5.2	5.2	4.7	5.3	60	44	93	93
MET	0.30	1.0	-5.6	3.7	5.1	3.9	5.9	3.8	70	78	97	94
MOR	0.60	1.0	-2.2	1.4	5.6	3.5	7.0	4.0	79	79	92	97
M3G	0.30	2.0	0.2	4.5	4.5	3.3	3.9	2.6	52	49	94	94
M6G	0.20	1.0	-1.0	1.9	3.1	2.7	5.2	2.3	53	59	89	91
NON	0.10	1.0	-5.0	1.6	4.6	4.7	6.3	5.2	51	67	94	97

Opioid	LOD	LLOQ	Richtigkeit (%)		Intraassay (%)		Interassay (%)		Wiederfindung (%)		Matrixeffekt (%)	
NEL	0.30	1.0	3.6	3.1	7.6	7.0	6.6	6.0	73	78	100	94
NEN	0.10	1.0	-4.3	-0.9	6.7	8.1	5.7	6.6	59	76	91	92
NB	0.50	1.0	6.3	0.7	23.1	8.8	18.7	8.5	52	69	89	95
NF	0.03	0.1	-1.0	2.5	7.8	2.1	5.8	3.0	62	70	92	99
NM	0.04	1.0	0.2	5.7	5.7	2.6	5.5	4.7	61	67	97	89
NT	0.08	1.0	-0.2	3.6	5.4	3.4	5.3	3.3	60	51	91	91
ODT	0.20	0.5	-2.7	0.6	7.9	4.1	7.3	3.8	81	86	92	95
OC	0.30	1.0	2.2	0.8	6.0	5.5	6.2	5.2	60	69	93	91
OM	0.06	0.1	3.9	3.8	5.4	4.4	6.0	4.2	64	67	92	94
PEN	0.02	1.0	-19.3	-7.8	22.6	8.5	32.9	14.0	77	86	92	89
PHO	0.30	1.0	-3.4	-1.8	8.3	7.2	7.8	7.8	88	77	96	98
PIR	0.04	1.0	6.4	-2.4	10.4	4.3	10.0	3.8	56	70	93	101
REM	0.10	1.0	2.1	2.7	11.1	5.5	8.6	7.2	51	63	95	95
SUF	0.02	0.1	-1.1	0.2	8.5	1.8	9.1	2.4	57	68	90	98
TRA	0.20	1.0	-5.8	0.5	4.1	3.1	4.7	2.9	77	72	96	94

Die relativ niedrigen Werte für LOD und LLOQ waren wahrscheinlich u.a. auf die Verwendung der neuen ESI Ionenquellentechnik zurück zu führen (siehe Abbildung 41). Die Jet Stream ESI Technologie verbesserte die Fokussierung und die Orientierung des Sheat Gas Stroms und reduzierte die Ionendispersion bei normaler Flussrate. Eine hexabore Kapillare leitete somit wesentlich mehr Ionen in das Massenspektrometer. Das Ergebnis waren Signale hoher Peakintensität mit niedriger relativer Standardabweichung (111).

Analgetika wie Alfentanil, Buprenorphin, Fentanyl, Remifentanyl und Sufentanyl, welche in niedrigen effektiven Dosen wirken, wurden auch in entsprechend niedrigen Konzentrationen nachgewiesen (siehe LOD und LLOQ). Im Fall von Fentanyl wurde beispielsweise eine Nachweisgrenze von 0.02 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 0.1 ng/ml erhalten. Kalibrationslevel 1 lag bei 1 ng/ml. Gemäß Uges et al. sind die therapeutischen Dosen von Fentanyl im Bereich von 1 bis 2 ng/ml im Serum (88). Morphin hingegen ist ein Opioid mit vergleichsweise hoher Blutspiegelkonzentration von 10 bis 120 ng/ml. Deshalb wurde das Kalibrationslevel 1 auf 10 ng/ml in Serum festgesetzt. Im Fall von Morphin lag die Bestimmungsgrenze bei 1 ng/ml und die Nachweisgrenze bei 0.6 ng/ml. Dies war für den erwarteten therapeutischen Bereich völlig ausreichend.



Abbildung 41: Aufbau der Elektronenspray Ionenquelle mit der Agilent Jet Stream Technologie (a) und orthogonaler Einleitung des Lösungsmittelstroms (b).

4.2.4 Präzision und Richtigkeit

Die Werte für die Richtigkeit (bias), die Wiederholpräzision (intraseriell, intraassay) und die Laborpräzision (interseriell, interassay) waren im geforderten Bereich entsprechend der Richtlinien der GTFCh. Die zulässige relative Standardabweichung betrug 15 % bzw. 20 % für Werte nahe der Bestimmungsgrenze. Die Richtigkeit lag im Bereich von -12.5 bis 7.8 %, Wiederholpräzision bei 2.2 bis 12.6 % und die Laborpräzision von 2.4 bis 18.7 %. Im Fall von Alfentanil (Richtigkeit K3 19.7 %, intraassay K3 36.6 %, intraassay K7 21.2 %, interassay K3 33.8 % und interassay K7 20.3%), Ethylmorphin (interassay K3 21.7 %), Norbuprenorphin (intraassay K3 23.1 %) und Pentazocin (Richtigkeit K3 -19.3 %, intraassay K3 22.6 %, interassay K3 32.9 %) wurden die akzeptablen Werte der entsprechenden Richtlinie nicht erfüllt. Die gesamten Daten der Validierung sind in Tabelle 25 aufgelistet.

4.2.5 Wiederfindung und Matrixeffekt

In Tabelle 25 sind die Werte für die Wiederfindung und den Matrixeffekt für alle 35 Substanzen wiedergegeben. Wiederfindungsraten wurden zwischen 51 % (Bisnortilidin) bis 88 % (Pholcodin) bestimmt. Nur im Fall von Alfentanil, Bisnortilidin, Meperidin und Morphin-3-Glucuronid lagen die Wiederfindungsraten unter 50 %. Alfentanil wurde beispielsweise bereits teilweise durch die Dichlormethan-Aceton-Lösung (50:50 v/v) eluiert, so dass die Wiederfindungsrate im Dichlormethan-Isopropanol-Ammoniak-Extrakt (40:10:2 v/v) reduziert war.

Der Matrixeffekt lag im Bereich von 86 % (Ethylmorphin) bis 105 % (Desomorphin) und erfüllte damit die Vorgaben zur Methodvalidierung der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie. Matrixeffekte wie Ionensuppression können von co-eluierenden Matrixbestandteilen (Salze, endogene Phospholipide) resultieren, die bei der Ionisation der

Zielanalyten interferieren (112). Um den Anteil der Matrixbestandteile zu reduzieren und saubere Eluate nach der Probenvorbereitung zu erhalten, wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt. Flüssig-Flüssig-Extraktionen und Fällungen führen normalerweise zu einer größeren Menge an Matrixbestandteilen und damit auch zu größeren Matrixeffekten wie Ionensuppression. Die vergleichsweise niedrigen Matrixeffekte der Serumproben können aber auch auf die relativ lange Analysenzeit zurückzuführen sein, da so die Anzahl der co-eluierenden Substanzen reduziert wurde (113, 114). Die geringe Ionensuppression wurde außerdem durch die Wahl der Ionenquelle begünstigt. Es wurde eine Quelle mit Elektrosprayionisation (ESI) anstelle einer Quelle mit chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) verwendet.

4.3 Untersuchungsmethode zum Nachweis von Tapentadol mittels LC-MS/MS

Seit August 2010 ist Tapentadol in Deutschland als stark wirksames Opioid-Analgetikum durch die Firma Grünenthal GmbH zugelassen. Dieses Arzneimittel gewann erst seit kurzer Zeit langsam an Bedeutung. Die Methode zum Nachweis der 35 Opiode war zu diesem Zeitpunkt jedoch schon vollständig geprüft und validiert, weshalb nachträglich noch eine Einzelmethode zur Quantifizierung von Tapentadol im Blut entwickelt wurde. In der Literatur wurden Blutspiegel von 0.200 – 200 ng/ml nachgewiesen (115). Abbildung 42 zeigt die Kalibrationsgeraden von 10, 50 und 100 ng/ml Tapentadol bei Verwendung einer Eclipse Plus C18 50 mm Säule. Die Analysendauer betrug nur 5 min. Die Kalibrationsgerade war linear und zeigte einen sehr guten Korrelationskoeffizienten ($R^2 = 0.9997$).

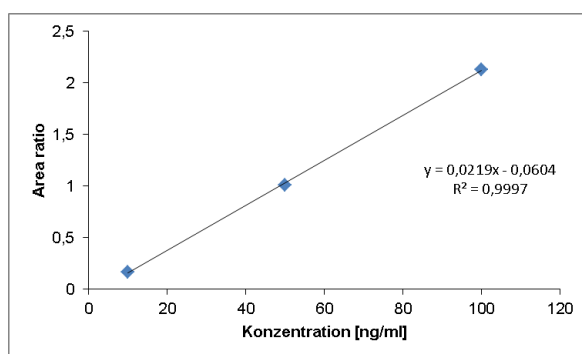


Abbildung 42: Kalibrationsgeraden von Tapentadol (10, 50 und 100 ng/ml) mittels LC-MS Messung.

In Abbildung 43 ist die Messung einer aufgearbeiteten Realprobe mit Tapentadol dargestellt. Erkennbar ist das Total Ion Chromatogramm und die zugehörigen MRM-Übergänge von Tapentadol (222.0 -> 77.0 @ 61, 222.0 -> 107.0 @ 33, 222 -> 121.0 @ 21) und dem internen Standard Tapentadol-d3 (225.0 -> 77.0 @ 61, 225.0 -> 107.0 @ 33, 225 -> 121.0

@ 21). Sowohl die Peaksymmetrie wie auch die Peakhöhe waren vollkommen zufriedenstellend. Keiner der MRM-Übergänge wurde durch andere Interferenzen gestört. Sollte sich das Probenaufkommen für Tapentadol Messungen in nächster Zeit stark erhöhen, kann über eine Integration der Substanz in die zusammenfassende Opioidmethode (im Augenblick 35 Analyten) und eine Validierung nachgedacht werden.

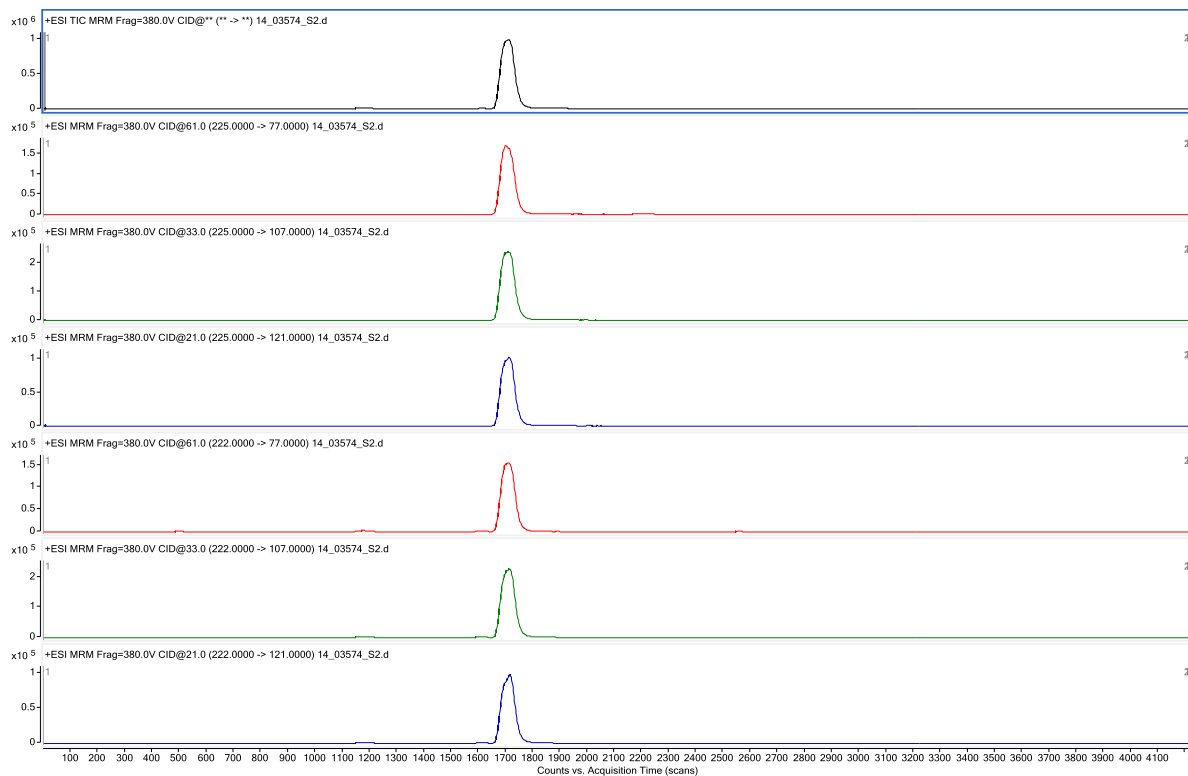


Abbildung 43: TIC und MRM-Übergänge von Tapentadol (222.0 -> 77.0 @ 61, 222.0 -> 107.0 @ 33, 222 -> 121.0 @ 21) und Tapentadol-d3 (225.0 -> 77.0 @ 61, 225.0 -> 107.0 @ 33, 225 -> 121.0 @ 21) bei der Messung einer realen forensischen Serumprobe.

4.4 Opioid-Befunde im forensischen Untersuchungsmaterial von 2013 und 2014

Insgesamt wurden im Zeitraum März 2013 bis August 2014 161 Realproben (zum großen Teil Serumproben) auf Opioidanalgetika im forensischen Untersuchungsmaterial der Rechtsmedizin Mainz untersucht. Dabei konnte die gute Anwendbarkeit und Robustheit der LC/MS Methode für 35 Opiode unter Beweis gestellt werden, so dass dieser neue Assay nun auch in der Routineanalytik am Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz verwendet wird. Insgesamt konnten 25 der 35 Analyten auch in Realproben gefunden werden, wobei keine Interaktionen mit dem Probenmaterial, der 35 Analyten untereinander oder mit anderen Substanzen (Medikamente oder illegale Drogen) aufgetreten sind.

4.4.1 Forensische Proben

Folgende Opioide wurden in den Blutproben am Institut für Rechtsmedizin Mainz am häufigsten gefunden (siehe Tabelle 26): Bisnortilidin (10 Fälle), Codein (14 Fälle), Fentanyl (8 Fälle), Morphin (11 Fälle) and Nortilidin (10 Fälle). Außerdem wurden auch die Substanzen BUP (5 Fälle), Dihydrocodein (5 Fälle), Dihydromorphin (3 Fälle), Hydromorphon (8 Fälle), Methadon (3 Fälle), Norbuprenorphin (6 Fälle), Norfentanyl (3 Fälle), O-Desmethyltramadol (4 Fälle), Oxycodon (6 Fälle), Oxymorphon (3 Fälle) and Tramadol (4 Fälle) nachgewiesen. Jeweils nur 2 Mal konnten Dextromethorphan, Hydrocodon und Piritramid bestimmt werden. Dextrorphan wurde nur in einem Fall nachgewiesen.

Tabelle 26: Untersuchungsergebnisse der Blutspiegelkonzentrationen von authentischen forensischen Proben im Überblick (n = 148).

Opioide	Konzentrationsbereich [ng/ml]	Anzahl positiver Fälle
Bisnortilidin	6.9 - 230	10
Buprenorphin	1.1 – 8.2	5
Codein	1.0 - 35	14
Dextromethorphan	3.6 - 18	2
Dextrorphan	8.0	1
Dihydrocodein	2.5 – 12	5
Dihydromorphin	0.5 – 2.4	3
Fentanyl	0.3 – 2.9	8
Hydrocodon	2.2 - 2.3	2
Hydromorphon	1.0 - 24	8
Methadon	3.1 - 72	3
Morphin	1.4 - 360	11
Norbuprenorphin	1.2 – 12.3	6
Norfentanyl	1.0 – 5.7	3
Nortilidin	1.8 - 250	10
O-Desmethyltramadol	74 - 210	4
Oxycodon	3.6 - 19	6
Oxymorphon	0.1 – 1.2	3
Piritramid	7.2 - 20	2
Tapentadol	45	1
Tramadol	2.5 - 2400	5

Bei dem überwiegenden Anteil der analysierten Proben wurde vom Auftraggeber als Untersuchungsanlass ein Verstoß im Straßenverkehr angegeben. Etwa bei der Hälfte dieser Proben wurde ein Verstoß gegen den § 24 a StVG (Straßenverkehrsgesetz) vermutet. Wer im Straßenverkehr aktiv ein Fahrzeug führt, handelt demnach ordnungswidrig, wenn im Blut ein Gehalt von mind. 0.5 ‰ Alkohol oder berauschende Mittel wie z. B. 10 ng/ml Morphin nachgewiesen wird (116). Bei der anderen Hälfte der Fälle handelt es sich um mögliche Straftaten im Sinne des §§ 315c, 316 StGB (Strafgesetzbuch). Paragraph 315 c befasst sich dabei mit der Gefährdung des Straßenverkehrs und § 316 mit Trunkenheit im Verkehr. Der Verkehrsteilnehmer führt im Straßenverkehr ein Fahrzeug, obwohl er auf Grund des Genusses von alkoholischen Getränken oder anderen berauschenden Mitteln nicht mehr dazu in der Lage ist (117, 118). Außerdem § 242 Strafgesetzbuch (119) Untersuchungsanlass. Ferner wurden aber auch Proben aus einem anderen Untersuchungsanlass analysiert, wie beispielsweise Versuch eines Tötungsdelikts, Verdacht sexuellen Missbrauchs Widerstandsunfähiger und Ladendiebstahl.

Nachfolgend werden nun ein paar wenige Fälle näher beschrieben.

Bei dem ersten hier vorgestellten Fall handelte es sich um eine toxikologische Untersuchung des Blutes einer 43-jährigen Frau. Der Auftrag wurde durch eine Polizeiinspektion wegen mutmaßlichem Ladendiebstahl erteilt. Ein Aliquot des Serums wurde nach Probenextraktion mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie auf 35 verschiedene Opioide untersucht. Dabei wurden Blutspiegel von 2400 ng/ml Tramadol, 210 ng/ml O-Desmethyltramadol, 360 ng/ml Morphin und 0.5 ng/ml Fentanyl festgestellt. Morphin ist ein starkes Analgetikum und ist das Hauptalkaloid des Schlafmohns. Fentanyl und Tramadol (Hauptstoffwechselprodukt: O-Desmethyltramadol) sind ebenfalls stark wirksame Schmerzmittel, wobei Fentanyl hoch wirksam ist. Die Konzentrationen der 3 Opioide Morphin, Tramadol und Fentanyl in der Blutprobe sind alle relevant. Die Blutspiegel von Morphin und Tramadol sind deutlich erhöht und liegen im stark toxischen Bereich. In der Literatur sind häufig schwere bzw. tödliche endenden Intoxikationen bei ähnlich festgestellten Morphin- bzw. Tramadolspiegeln belegt (120-123). In diesem Fall ist von einer hochdosierten Aufnahme von Tramadol und Morphin in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Blutentnahme und einer deutlichen Beeinflussung durch die zentral dämpfenden Arzneistoffe auszugehen. Diese Erprobungen der Messmethode verdeutlichen die hohe Leistungsfähigkeit der entwickelten LC/MS Analysenmethode auf Opioide. Es können 35 opioide Verbindungen selektiv und sehr sensitiv gleichzeitig erfasst werden. In diesem Fall wurde 4 Opioide simultan quantitativ bestimmt, wobei 2 Analyten in sehr hohen, toxischen Konzentrationen vorlagen und ein Analyt in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen analysiert wurde. Eine Bestimmung von sehr niedrigen Konzentrationen

wie beispielsweise 0.5 ng/ml Fentanyl war vor der Entwicklung der LC/MS Methode durch Analyse mit GC/MS nicht möglich. Dies ist besonders bedeutsam da Fentanyl ein hochpotentes, zentral dämpfendes Schmerzmittel ist und auch sehr geringe Konzentrationen forensisch-toxikologisch von Bedeutung sein können.

Beim zweiten Fall war das immunchemische Screening auf Opiate positiv. In der Serumprobe konnten die Opioide Codein (12 ng/ml), Dihydrocodein (5.3 ng/ml), Hydromorphon (24 ng/ml), Morphin (95 ng/ml), Oxycodon (13 ng/ml) und Oxymorphon (1.2 ng/ml) gleichzeitig quantifiziert werden und deuteten damit auf einen multiplen Drogenkonsum hin. Morphin stellt das Hauptstoffwechselprodukt vom Heroin dar. Codein ist ein Alkaloid des Schlafmohns und findet sich daher normalerweise als Begleitstoff in illegalen Heroinzubereitungen und kann damit auch in dem Blut der Konsumenten nachgewiesen werden. Hydromorphon und Oxycodon sind halbsynthetische Derivate des Morphins und als sehr starke Arzneimittel zur Schmerzreduktion zugelassen.

Hier wird nun kurz auf 2 Fälle mit dem Opioid Dextromethorphan eingegangen. Dextromethorphan ist ein zentral wirksames Arzneimittel aus der Gruppe der Opioide, welches normalerweise therapeutisch als Hustenstiller bei Reizhusten eingesetzt wird. Das Antitussivum ist rezeptfrei z. B. in den Handelspräparaten Hustenstiller-Ratiopharm, Neotussan Hustensaft oder Wick MediNait in Apotheken erhältlich. Dextromethorphan kann in höheren Dosen als Bewusstseins beeinflussendes KO-Mittel missbraucht oder auch als legales Rauschmittel eingenommen werden (124-128). Im dritten Fall wurde eine Blut- und Urinprobe mit Verdacht auf Beibringung eines KO-Mittels auf die 35 Opioide getestet. Es wurde 46 ng/ml Dextromethorphan und 8.3 ng/ml Dextrorphan im Urin und 3 ng/ml Dextromethorphan im Blut nachgewiesen. Dextrorphan ist der pharmakologisch aktive Hauptmetabolit vom Dextromethorphan. Die im dritten Fall festgestellte Serumkonzentration von Dextromethorphan liegt jedoch unterhalb der therapeutischen Blutspiegel. Dies spricht damit eher für die Aufnahme eines Arzneimittels gegen Reizhusten vor einiger Zeit.

Im vierten Fall wurde das Blut einer Zeugin auf zentral wirksame Substanzen untersucht, da ihr Gesamteindruck vom Arzt als deutlich zentral gedämpft beschrieben wurde. Im Serum fand sich eine relevante Konzentration von 18 ng/ml Dextromethorphan und 8 ng/ml Dextrorphan. Damit war eine Beeinflussung durch dieses zentralwirksame Arzneimittel zum Blutentnahmezeitpunkt denkbar.

Im letzten Fall wurde eine Blutprobe eines Straßenverkehrsteilnehmers auf Grund des Untersuchungsanlasses § 315c (Gefährdung des Straßenverkehrs), § 316 (Trunkenheit im Verkehr) StGB (Strafgesetzbuch) in der Forensischen Toxikologie Mainz analysiert. Es wurde die Einnahme des Arzneimittels Palexia 50 (Wirkstoff Tapentadol) eingeräumt. Dabei handelt es sich um ein opioides, zentral dämpfendes Schmerzmittel, welches in der Europäischen Union seit August 2010 zugelassen ist. Im Blut des Verkehrsteilnehmers fand

sich eine relevante Konzentration von Tapentadol (45 ng/ml). Zusätzlich wurde eine Blutalkoholkonzentration von 2.85 ‰ zum Blutentnahmezeitpunkt festgestellt. Die gemeinsame Aufnahme von den zentraldämpfenden Arzneimitteln und eine nicht unerhebliche Menge an Alkohol können zu gegenseitiger Wirkungsverstärkung und unberechenbaren Effekten dieser Kombination geführt haben (129, 130).

4.4.2 Autopsie Fälle

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Analysenmethode für Opioide eignet sich auch sehr gut zur Untersuchung von drogenbedingten Todesfällen. Eine Übersicht der Konzentrationen der Analgetika in verschiedenem Probenmaterial wie Oberschenkelvenenblut, Herzblut, Urin, aber auch Leber, Niere und Gehirn usw. findet sich in Tabelle 27. Diese Proben wurden im Rahmen von Sektionen am Institut für Rechtsmedizin Mainz entnommen und zur Aufklärung der Todesursache auf Medikamente und Drogen analysiert.

Tabelle 27: Konzentrationen der Opioide in post mortem Körperflüssigkeiten und Gewebe (n = 13).

Fall	Opioid	Probe	Konzentration [ng/ml]
1	Sufentanil	Oberschenkelvenenblut	27
		Herzblut	5.8
		Urin	4.0
		Liquor	0.2
		Leber [ng/g]	0.9
		Gehirn [ng/g]	0.3
		Niere [ng/g]	0.8
		Lunge [ng/g]	7.1
2	Buprenorphin	Oberschenkelvenenblut	22
	Norbuprenorphin		12
3	Methadon	Oberschenkelvenenblut	400
	Morphin		4
4	Bisnortilidin	Herzblut	43
	Codein		105
	O-Desmethyltramadol		2.4
	Tramadol		3.9
	Bisnortilidin	Urin	480
	Codein		1350

Fall	Opioid	Probe	Konzentration [ng/ml]
	Morphin		21
	Naloxon		1.1
	Nortilidin		140
	O-Desmethyltramadol		56
	Tramadol		91
5	Codein	Oberschenkelvenenblut	4.0
	Codein	Urin	28
	Norfentanyl		5.7
6	Fentanyl	Oberschenkelvenenblut	8.9
	Fentanyl	Urin	14
	Norfentanyl		4.1
7	Fentanyl	Oberschenkelvenenblut	10
	Norfentanyl		3.9
8	O-Desmethyltramadol	Oberschenkelvenenblut	180
	Tramadol		1110
9	O-Desmethyltramadol	Oberschenkelvenenblut	1000
	Oxycodon		68
	Tramadol		2500
10	Fentanyl	Oberschenkelvenenblut	22
11	Fentanyl	Oberschenkelvenenblut	0.5
12	Dihydrocodein	Herzblut	2.4
	Dihydromorphin		2.5
	Oxycodon		165
	Oxymorphon		4.7
13	O-Desmethyltramadol	Oberschenkelvenenblut	250
	Tramadol		750
14	Tapentadol	Oberschenkelvenenblut	710
		Urin	3200

Beispielhaft sollen vier Fälle hier näher erläutert werden.

Obduktionsfall Nummer 1 untersuchte den Vorwurf einer angeblich beabsichtigten Beibringung von Sufentanil bei einem Krankenhauspatienten mit Todesfolge. Anlass der Untersuchung war ein anonymer Brief an die Polizei, indem der Vorwurf einer "aktiven Sterbehilfe" geäußert wurde. Nach der gerichtlichen Leichenöffnung wurde ein Multiorganversagen im Zusammenhang mit einer schweren Schädigung von nahezu allen Organen festgestellt. Nach der Untersuchung mittels Flüssigchromatographie-Tandem-

Massenspektrometrie selektiv auf Opioide ergaben sich folgende Spiegel von Sufentanil in den einzelnen Kompartimenten: Urin 4.0 ng/ml, Oberschenkelvenenblut 27 ng/ml, Herzblut 5.8 ng/ml, Liquor 0.2 ng/ml, Gehirn 0.3 ng/g, Niere 0.8 ng/g und Leber 0.9 ng/g. Sufentanil ist ein starkes und zentral wirksames Schmerzmittel. In Deutschland ist es das stärkste zugelassene Analgetikum und wird unter anderem zur Analgosedierung von künstlich beatmeten Patienten verwendet. Besonders auffällig war der Befund der sehr hohen Konzentration im Oberschenkelvenenblut mit 27 ng/ml. Dieser Blutspiegel ist hoch toxisch, bei dem mit einer zentralen Lähmung der Atmung zu rechnen wäre. Bei künstlicher Beatmung liegt der therapeutische Bereich bei 0.5 – 10 ng/ml. In der Literatur wurden postmortale Blutspiegel von 1 – 7 ng/ml bei Todesfällen gefunden (131). Betrachtet man nur die Konzentration von Sufentanil im Oberschenkelvenenblut wäre der Befund geeignet den Tod infolge einer Sufentanil-Intoxikation zu erklären. Allerdings betrug die Konzentration von Sufentanil im Herzblut lediglich 5.8 ng/ml. Diese starke Differenz zwischen der Sufentanil-Konzentration im peripheren und zentralen Blut ist physiologisch nicht erklärbar. Der Konzentrationsunterschied müsste bei aktiver Kreislauffähigkeit sehr viel geringer ausgeprägt sein. Im Liquor und Gehirn wurden nur moderate Spiegel von Sufentanil gefunden. Da Sufentanil gerade im Gehirn pharmakologisch wirksam ist, sprechen die Befunde im Gehirn gegen eine Intoxikation. Diese Schlussfolgerung steht im Gegensatz zur isolierten Betrachtung der Spiegel von Sufentanil im Femoralblut. Die Konzentration von Sufentanil im Urin, Niere und Leber sind nicht auffällig erhöht. Insgesamt ist davon auszugehen, dass vor dem Tode eine nicht auffällige erhöhte Applikation von Sufentanil vorlag. Die hohen Blutspiegel im Oberschenkelvenenblut stellen ein sehr ungewöhnliches Verteilungsphänomen dar. Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist dies nur durch eine Applikation von Sufentanil in die Oberschenkelvene in unmittelbarer zeitlicher Nähe zum Todeszeitpunkt bei nicht mehr relevanter Kreislauffähigkeit erklärbar. Da in diesem Fall keine Zirkulation des Blutes mehr stattfinden würde, würde auch keine Verteilung in das Herz und die andere Organe erfolgen.

Im Fall Nummer 2 wurde ein lebloser Körper aufgefunden. Neben dem Toten lag eine benutzte, leere Spritze und in seiner Jackentasche hatten sich zwei Tabletten des Arzneimittels Subutex befunden. Das Analgetikum Buprenorphin (Handelsname Subutex) wird häufig in der Substitutionsmedizin als Heroinersatzstoff eingesetzt. An der Leiche wurden mehrere frische Punktionsstellen an beiden Leisten gefunden, die Pupillen waren stark verkleinert (Miosis) und das Hirnvolumen stark vermehrt. Die Untersuchung des Oberschenkelvenenblutes zeigte eine hohe Konzentration von 22 ng/ml Buprenorphin und 12 ng/ml des Hauptmetaboliten Norbuprenorphin. Diese eindeutig übertherapeutische Konzentration von Buprenorphin hat eine zentral dämpfende und atemdepressive Wirkung.

Im Fall Nummer 7 wurde im Oberschenkelvenenblut des Verstorbenen eine Konzentration von 10.0 ng/ml Fentanyl und 3.9 ng/ml des inaktiven Hauptstoffwechselprodukts Norfentanyl gefunden. Der Patient wurde wegen starken chronischen Schmerzen mit einem Fentanylpflaster behandelt. Am Institut für Rechtsmedizin wurde der Vorwurf untersucht, ob eine Fentanylüberdosierung bedingt durch ein zu hoch konzentriertes Schmerzpflaster, welches zu lange auf der Haut des Patienten belassen wurde, todesursächlich gewesen sein könnte. Im Fall von Opioiden unterscheidet sich die niedrigste wirksame Konzentration, welche Nebenwirkungen verursacht, interindividuell relativ stark. Mit steigender Applikationszeitspanne kann auch eine Entwicklung einer Toleranz individuell stark unterschiedlich ausgeprägt sein. Eine Blutspiegelkonzentration von mehr als 3.0 ng/ml Fentanyl kann ohne künstliche Beatmung tödlich sein (88).

Beim Obduktionsfall Nummer 14 handelte es sich um eine 49-jährige Frau, die leblos in ihre Wohnung aufgefunden wurde. Nach Aussagen der Mutter sei sie medikamentenabhängig gewesen (Diazepam, Trimipramin, Tilidin und Tapentadol). Innerhalb eines Monats kurz vor ihrem Tode hätte sie Palexia (50 mg Tapentadol, 50 Tabletten) und Palexia retard (50 mg Tapentadol, 54 Tabletten) vom Arzt verschrieben bekommen. Tapentadol ist ein stark zentral wirksames, opioides Analgetikum. Im Urin der Verstorbenen wurde eine Konzentration von 3200 ng/ml und im Oberschenkelvenenblut eine Konzentration von 710 ng/ml Tapentadol gefunden. Zudem konnte eine Aufnahme von Diazepam und Trimipramin sicher belegt werden. Die Blutspiegelkonzentration von Tapentadol ist hoch einzuschätzen. Nach Aufnahme von 100 mg Tapentadol wurden maximale Blutspiegel von 20 ng/ml bis 60 ng/ml festgestellt. In der Literatur sind in 2 Fällen einer letalen Intoxikation nach einer Überdosierung mit Tapentadol Blutkonzentrationen von 300 und 1100 ng/ml im Femoralblut beschrieben (132, 133). Damit liegt die hier gemessene Konzentration von 710 ng/ml Blut in diesem Bereich und es ist unter Umständen mit einer tödlichen Intoxikation durch zentrale Atemlähmung zu rechnen. Ein Vergleich mit postmortalen Morphinblutspiegeln bei tödlichen Vergiftungen legt diesen Schluss ebenfalls nahe, da Tapentadol im Vergleich zu Morphin eine um den Faktor 0.3 – 0.5 geringe analgetische Wirkstärke aufweist. Zusätzlich ist von einer zentralen Dämpfung durch das Benzodiazepin Diazepam sowie eine Beeinflussung durch das trizyklische Antidepressivum Trimipramin auszugehen.

Problematisch bei der Untersuchung von forensischen Fällen ist, dass häufig keinerlei Informationen über evtl. inkorporierte Substanzen vorhanden sind. Deshalb werden häufig immunchemische Methoden vor einer genauen quantitativen Analyse durchgeführt. Unter Immunoassays sind Bestimmungsmethoden definiert, die durch Bindung eines Antigens an einen Antikörper die Anwesenheit eines Analyten in einer biologischen Matrix nachweisen.

Nach einer solchen Antigen-Antikörperreaktion werden Immunkomplexe gebildet, die direkt als Trübung bzw. Lichtstreuung oder indirekt durch zusätzliche Bindung an fluoreszierende Substanzen detektiert werden können. Hochsensitive immunochemische Verfahren, die Opiate in biologischen Proben nachweisen, detektieren lediglich morphin-ähnliche Strukturen mit Phenanthrengruppe, wie sie beispielsweise im Codein, Morphin oder 6-Monoacetylmorphin zu finden sind. Moderne Opioide, die keine morphin-ähnliche Struktur mit Phenanthrengruppe sondern eine Phenylpiperidingruppe enthalten, zeigen kein positives Ergebnis bei einem solchen immunochemischen Test für Opiate, wie dies zum Beispiel bei Tramadol, Buprenorphin, Fentanyl, Tilidin oder Sufentanil der Fall ist. Häufig existiert eine Vielzahl von Einzelmethoden zur quantitativen Bestimmung von Opioiden mit Hilfe von GC/MS Messungen. Nachteilig bei der Verwendung von verschiedenen GC/MS Einzelverfahren ist, dass verschiedene Probenextraktionen und mehrere gaschromatographischen Messungen durchgeführt werden müssen. Das ist sehr zeit- und kostenaufwendig. Ein anderer Nachteil der Untersuchung von Opiaten mittels GC/MS Messungen ist, dass vergleichsweise große Probenvolumina benötigt (GC/MS 1 ml Serum pro Analyse). Seltene Analyten (wie zum Beispiel Sufentanil) wären womöglich nicht entdeckt worden, wenn nur immunochemische Screeningmethoden und GC/MS Messung für einzelne Substanzen zur Verfügung gestanden hätten. Für Sufentanil existiert keine validierte Bestimmungsmethode für GC/MS und durch herkömmliche immunochemische Antigen/Antikörperreaktion mittels Elisa-Test kann Sufentanil auf Grund seiner chemischen Reaktion auch nicht erfasst werden. Die Verwendung dieses LC/MS Multi Target Assays ist zeit- und kostensparend. Außerdem können auch seltene Substanzen zusammen mit häufig vorkommenden Opioiden gleichzeitig untersucht werden.

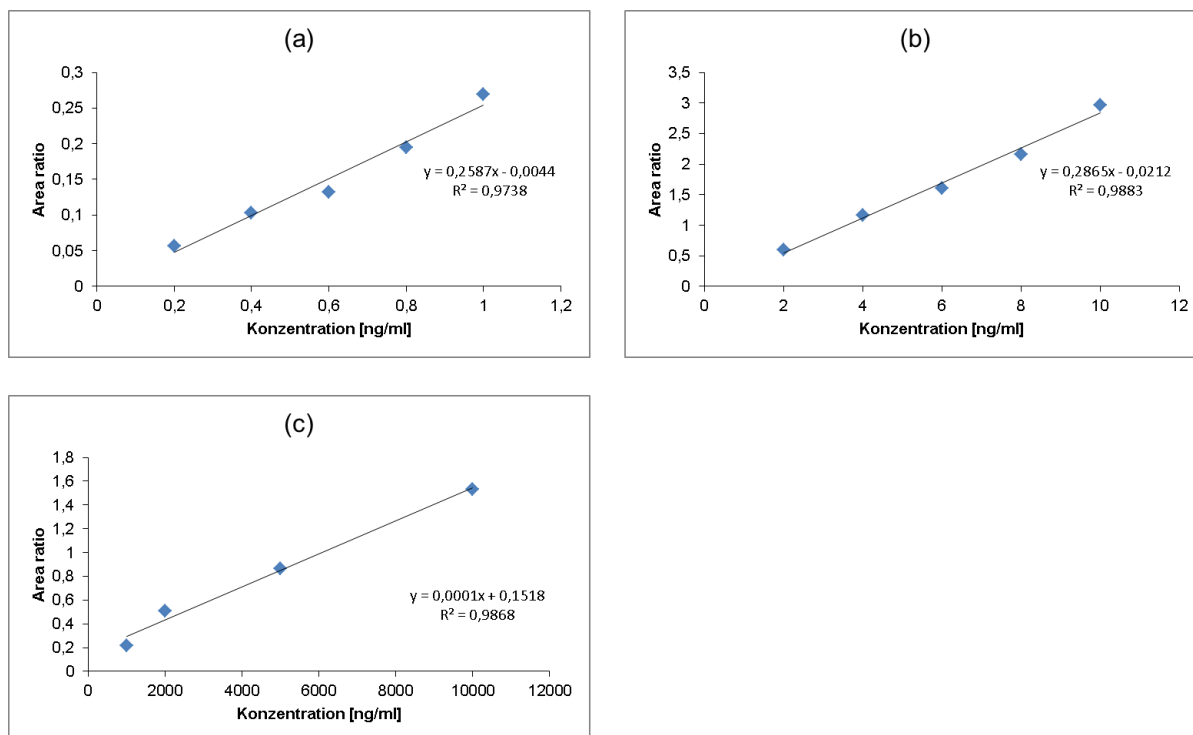
4.5 Klinische Proben zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden und Propofol bei Patienten mit einer Sepsis-Erkrankung

Das Patientenkollektiv dieser klinischen Studie wurde bereits in Abschnitt 1.5 und Abschnitt 3.2.10 näher erläutert. Die zum überwiegenden Teil multimorbiden Patienten könnten stark von einer verbesserten Pharmakotherapie profitieren. Die genaue Arzneistoffdosierung ist auf Grund der verschiedenen, häufig schweren Erkrankungen der Patienten auf Intensivstation schwierig zu handhaben. Durch Dialyse können Arzneistoffe in nicht bekanntem Ausmaß aus dem Blut ausgewaschen werden oder sich unter Umständen auch anreichern. Die Gefahr einer nicht ausreichenden Analgesie oder Überdosierung der Patienten mit den stark wirksamen, zentraldämpfenden Opioiden wie beispielsweise Sufentanil oder Piritramid besteht. Durch die Bestimmung der Blutspiegel können Anhaltspunkte gewonnen werden, die eine bessere Einstellung der Patienten mit Schmerzmitteln ermöglichen.

Kalibration von Sufentanil, Piritramid und Propofol

Abbildung 44 zeigt die Kalibrationsgeraden von Sufentanil, Piritramid und Propofol, welche zur Auswertung der klinischen Proben herangezogen wurden. Sufentanil und Piritramid wurden zum Teil in sehr niedrigen Konzentrationen in den Blutproben der Patienten der anästhesiologischen Intensivstation nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde neben dem Kalibrationsbereich der Serumprobenvalidierung (Sufentanil 1.0 – 10.0 ng/ml und Piritramid 10 – 100 ng/ml) ein zusätzlicher niedriger Kalibrationsbereich (Sufentanil 0.2 – 1.0 ng/ml und Piritramid 2.0 – 10.0 ng/ml) für Proben mit sehr niedrigen Blutspiegeln definiert. Im Fall von Sufentanil und Piritramid wurde eine 5-Punkt-Kalibration verwendet, für die jeweils 3 Serumproben aufgearbeitet wurden. Für Propofol wurde eine 4-Punkt-Kalibration benutzt. Der Korrelationskoeffizient lag für Sufentanil bei 0.9738, für Piritramid bei 0.9883 und für Propofol bei 0.9868.

Abbildung 44: Kalibrationsgeraden der LC-MS Messung von 5 unterschiedlichen Konzentrationen von Sufentanil (a) und Piritramid (b) im Serum (n = 3). Kalibrationsgerade der GC-MS Messung von 4 unterschiedlichen Konzentrationen Propofol (c).



Stabilität der Opiode in den Vollblutproben bei Raumtemperatur

Die Blutproben wurden den Patienten auf der anästhesiologischen Intensivstation von Mitarbeitern der Universitätsmedizin entnommen und möglichst zeitnah in einem Kühlschrank (4 – 8 °C) auf der Station gelagert. Im Anschluss wurde die Toxikologie der Rechtsmedizin Mainz informiert, die Proben von der Intensivstation abholt und das Serum nach der Zentrifugation bei -20 °C gelagert (innerhalb von 24 h nach Probenentnahme).

Vor Beginn der Studie wurden Blutproben auf Lagerstabilität bei Raumtemperatur bis zu 48 h überprüft. Dazu wurden drei Vollblutproben mit dem Kalibrationslevel 6 gespickt, homogenisiert und bei ca. 22 °C gelagert. Nach 0, 8, 24 und 48 h wurde 200 µl Blut entnommen, aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität der 35 Opiode bei Raumtemperatur finden sich in Tabelle 28. Prinzipiell sind 33 Opiode im Vollblut bei einer Lagerung bis zu 48 h stabil. Aufgrund der Inhomogenität des Vollbluts und schwankenden Extraktionsausbeuten, variiert die Konzentration von einzelnen Analyten etwas. 6-Monoacetylmorphin und Remifentanil degradierten jedoch bei Raumtemperatur relativ stark. 6-Monoacetylmorphin konnte nach 8h lediglich zu 42,6 %, nach 24 h zu 5,2 % und nach 48 h Lagerung gar nicht mehr nachgewiesen werden. Remifentanil konnte nur nach 8 h Lagerung zu 58,6 % quantifiziert werden. Die Instabilität von 6-Monoacetylmorphin und Remifentanil ist bereits in der Literatur

beschrieben (134-136). Nach Selinger et al. kann die Stabilität von Remifentanyl bis zu 20 h auch bei Raumtemperatur gewährleistet werden, wenn dem Blut Zitronensäure zugegeben wurde (137, 138). Sorensen et al. konnten bei Stabilitätsuntersuchungen im Blut nach 2 Wochen bei 22 °C keine signifikanten Änderungen der Konzentration von Propofol feststellen (139).

Im Rahmen dieser Studie wurden die Opioide Sufentanyl, Piritramid, Morphin, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid, Fentanyl, Norfentanyl und das Narkotikum Propofol bestimmt. Eine kurze Lagerung bei Raumtemperatur (bis zu 48 h), da Blutproben beispielsweise nicht unmittelbar in den Kühlschrank gebracht oder länger transportiert wurden, hatte demnach keinen Einfluss auf die Konzentrationsbestimmung der Opioide und Propofol in den Patientenproben.

Tabelle 28: Untersuchungen zur Stabilität der Opioide in Vollblut nach 0, 8, 24 und 48 h bei Raumtemperatur (n = 3).

Analyt	Stabilität [%] nach 0 h RT	Stabilität [%] nach 8 h RT	Stabilität [%] nach 24 h RT	Stabilität [%] nach 48 h RT
6-Monoacetylmorphin	97.0	42.6	5.1	0.0
Alfentanyl	89.0	86.5	54.2	123.5
Bisnortilidin	187.0	137.6	83.5	175.5
Buprenorphin	92.0	86.0	61.6	78.6
Codein	111.0	112.4	125.6	122.1
Desomorphin	95.0	78.4	96.7	88.5
Dextromethorphan	101.0	118.8	121.5	116.4
Dextrorphan	99.0	105.4	107.4	103.4
Dihydrocodein	101.0	116.3	121.4	117.2
Dihydromorphin	74.0	76.2	76.7	76.5
Ethylmorphin	109.0	80.9	108.5	84.1
Fentanyl	99.0	101.3	107.1	99.2
Hydrocodon	98.0	108.8	114.7	106.9
Hydromorphon	91.0	96.9	124.2	123.0
Meperidin	106.0	105.4	106.6	103.6
Methadon	107.0	103.5	107.4	101.9
Morphin	81.0	77.4	78.5	78.4
Morphin-3-Glucuronid	68.0	85.3	82.8	74.1
Morphin-6-Glucuronid	78.0	87.98	91.0	91.6
Naloxon	90.0	95.1	98.4	99.2
Naltrexol	87.0	61.1	63.4	61.0
Naltrexon	87.0	83.8	88.0	86.0
Norbuprenorphin	94.0	91.5	*	86.5

Analyt	Stabilität [%]	Stabilität [%]	Stabilität [%]	Stabilität [%]
	nach 0 h RT	nach 8 h RT	nach 24 h RT	nach 48 h RT
Norfentanyl	106.0	106.0	119.0	104.0
Normeperidin	102.0	109.8	114.0	109.7
Nortilidin	108.0	96.3	102.2	97.9
O-Desmethyltramadol	104.0	101.9	105.9	101.7
Oxycodon	94.0	97.4	97.4	95.1
Oxymorphon	84.0	100.7	100.9	100.3
Pentazocin	111.0	125.2	61.0	106.7
Pholcodin	87.0	145.1	*	74.3
Piritramid	102.0	150.5	136.2	147.5
Remifentanyl	86.0	58.6	0.0	0.0
Sufentanyl	107.0	103.3	101.9	103.4
Tramadol	87.0	102.8	104.1	101.9

*Werte nicht bestimmt

Patientenkollektiv

Die 12 Probanden, die an der klinischen Studie zur "Cerebrovaskulären Autoregulation bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock, Einfluss der Nierenersatztherapie – SepsAR2" teilgenommen haben, sind in Tabelle 29 aufgeführt. Die Studienteilnehmer wurden anonymisiert und ihnen wurde eine Patienten-ID zugeordnet. In der Tabelle finden sich außerdem das Geschlecht, das Geburtsdatum, Körpergröße, Körpergewicht, BMI (Body-Mass-Index; Quotient aus Körpermasse in kg und Körpergröße in Metern zum Quadrat) und die ASA-Klassifikation.

Die ASA-Klassifikation stellt ein Schema der American Society of Anesthesiologists (ASA) dar, welches dazu dient den Gesundheitszustand eines Patienten vor der Operation und damit sein perioperatives Risiko einschätzen zu können. Es werden folgende sechs ASA-Klassen unterschieden (140):

- ASA 1: Gesunder Patient
- ASA 2: Patient mit leichter Allgemeinerkrankung
- ASA 3: Patient mit schwerer systemischer Erkrankung
- ASA 4: Patient mit lebensbedrohlicher Allgemeinerkrankung
- ASA 5: Moribunder Patient, der ohne eine Operation voraussichtl. nicht überleben wird
- ASA 6: Hirntoter Patient (Organe können zur Organspende entnommen werden).

Tabelle 29: Patientenkollektiv der Klinischen Studie zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden bei Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit Sepsis. Dargestellt sind Patienten-ID, Geschlecht, Geburtsdatum, Körpergröße, Gewicht, BMI und ASA-Klassifikation.

Patienten-ID	Geschlecht	Geburtsdatum	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m ²]	ASA- Klassifikation
6	m	28.06.1957	180	90	27.7	3
7	m	29.11.1957	170	72	24.9	2
9	m	17.01.1940	178	60	18.9	3
11	w	08.05.1942	157	57	23.1	4
12	w	28.12.1955	175	83	27.1	3
13	w	15.09.1948	165	110	40.4	4
14	m	05.12.1934	170	102	35.2	3
15	w	13.10.1948	170	65	22.4	4
16	m	04.01.1929	185	85	24.8	x
17	m	21.09.1951	176	80	25.8	4
18	m	13.02.1935	177	80	25.5	4
19	m	19.08.1934	176	75	24.2	3

Klinische Parameter und Blutspiegelbestimmung der Opioiden und Propofol

In Tabelle 30 sind die Blutspiegel, kumulative Dosen der Opioiden und Propofol für die Patienten Nr. 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 und 19 für die Studiendauer von 4 Tagen dargestellt. Außerdem sind noch die Daten zur Einschätzung von RASS (Richmond Agitation Sedation Skala), BPS (Behavioral Pain Skala), CAM-ICU (Confusion assessment method for the intensive care unit) und ob ein Nierenersatzverfahren (NEV) durchgeführt wurde, aufgeführt (siehe 3.2.10 Klinische Studie zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Opioiden bei Patienten der anästhesiologischen Intensivstation mit Sepsis).

Tabelle 30: Dargestellt sind die Blutspiegel (BS) und kumulative Dosen über 24 h (KD) der einzelnen Opioiden und Propofol für Patienten 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 und 19 an den Tagen 1 - 4. In der Tabelle finden sich außerdem die Werte von RASS (Richmond Agitation Sedation Skala), BPS (Behavioral Pain Skala), CAM-ICU (Confusion assessment method for the intensive care unit) und ob ein Nierenersatzverfahren (NEV) durchgeführt wurde. Im Fall von der Bestimmung von CAM-ICU bedeutet: nk = not known, negativ = kein Delir vorhanden, X = CAM-ICU wurde nicht erhoben, positiv = Delir vorliegend.

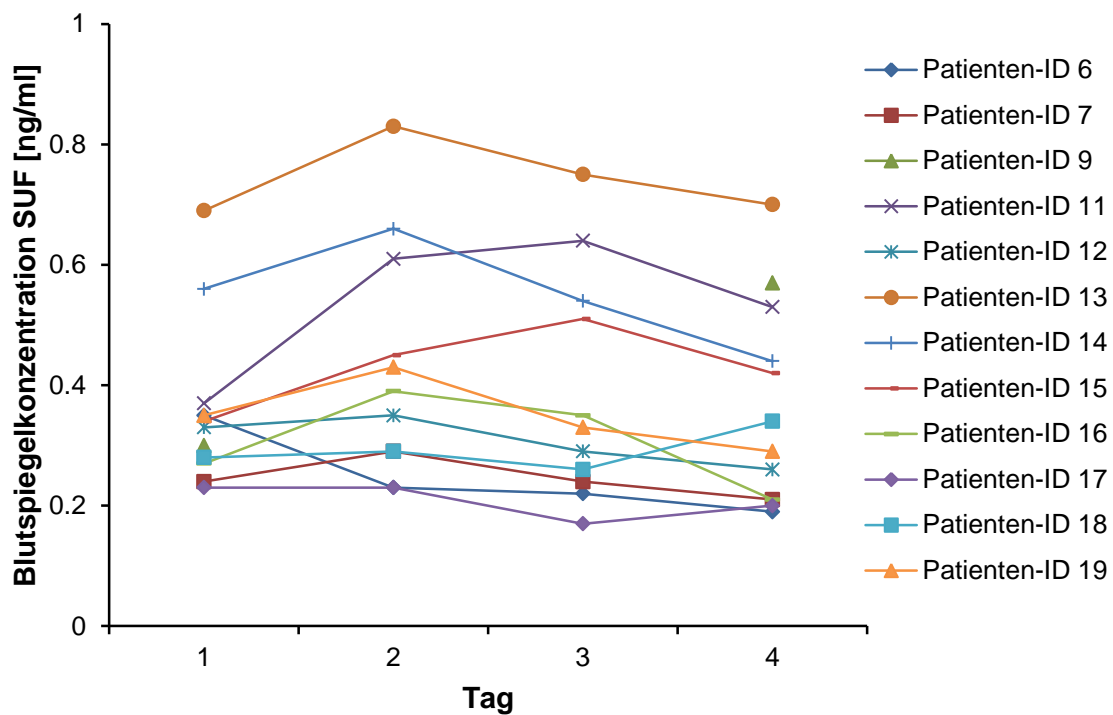
	<u>Sufentanil</u>		<u>Propofol</u>		Sonstige Opioide	NEV	RASS	BPS	CAM- ICU
	BS [ng/ml]	KD [µg]	BS [ng/ml]	KD [mg]	BS [ng/ml]				
<i>Patient 6</i>									
Tag 1	0.35	380	1296.79	3592	PIR 3.71 REM 0.23	nein	-5	3	nk
Tag 2	0.23	273	918.09	2513	PIR 1.48	nein	-4	4	nk
Tag 3	0.22	87	1020.82	697	PIR 1.02	nein	-4	4	nk
Tag 4	0.19	120	926.28	933	PIR 0.71	nein	-3	4	nk
<i>Patient 7</i>									
Tag 1	0.24	710	1835.8	2135	PIR 0.57	nein	-2	6	nk
Tag 2	0.29	333	1510.74	2340	PIR 0.55	nein	-2	4	negativ
Tag 3	0.24	425	1230.04	2340	PIR 0.46	nein	-2	6	nk
Tag 4	0.21	408	757.31	615	PIR 3.49	nein	-1	3	negativ
<i>Patient 9</i>									
Tag 1	0.3	294	1722.25	2641.66	PIR 10.98	ja	-5	3	nk
Tag 2									nk
Tag 3									nk
Tag 4	0.57	480	682.99		PIR 3.04	ja	x	x	nk
<i>Patient 11</i>									
Tag 1	0.37	494.16	2900.85	3905	PIR 1.00	CiCaCVVHD	-5	3	nk
Tag 2	0.61	480	7018.68	3840	PIR 0.62	CiCaCVVHD	-5	3	nk
Tag 3	0.64	798.33	4831.36	4341.66	PIR 0.91	CiCaCVVHD	-5	3	nk
Tag 4	0.53	360	3415.61	1703.33	PIR 0.47	CiCaCVVHD	-5	3	nk
<i>Patient 12</i>									
Tag 1	0.33	350	1818.06	4575		nein	-5	3	nk
Tag 2	0.35	397.8	686.85	4098.3		nein	-2	5	nk
Tag 3	0.29	392.8	380.03			nein	-1	6	nk
Tag 4	0.26	66.6	991.02	625		nein	-4	3	nk

	<u>Sufentanil</u>	<u>Propofol</u>			Sonstige Opioide	NEV	RASS	BPS	CAM- ICU
<i>Patient 13</i>									
Tag 1	0.69	562.9	2093.54	2400	MOR 1.05 M3G 88.96 M6G 15.38 PIR 1.63	CiCaCVVHD	-5	3	nk
Tag 2	0.83	506.25	3168.07	2050	MOR 0.81 M3G 70.41 M6G 12.74 PIR 1.57	nein	-5	3	nk
Tag 3	0.75	556.25	1961.43	2113.3	MOR 0.57 M3G 45.76 M6G 9.33 PIR 1.27	nein	-5	3	nk
Tag 4	0.70	380.83	1208.98	1070	MOR 0.49 M3G 34.17 M6G 7.22 PIR 1.16	nein	-3	3	nk
<i>Patient 14</i>									
Tag 1	0.56	886.67	1616.17	4663.3		nein	-3	5	nk
Tag 2	0.66	621.67	2006.4	4053.33		nein	-4	3	positiv
Tag 3	0.54	707.5	2014.09	4810		nein	-4	3	positiv
Tag 4	0.44	525	1836.14	3795		nein	-4	3	positiv
<i>Patient 15</i>									
Tag 1	0.34	258.33	1589.17	1233.33	FEN 1.46 NF 0.64 PIR 10.05	nein	-4	3	positiv
Tag 2	0.45	439.16	2463.08	2771.66	FEN 1.26 NF 0.47 PIR 5.03	nein	-4	3	nk
Tag 3	0.51	446.25	3671.79	4211.66	FEN 0.48 NF 0.37 PIR 1.77	nein	-4	3	nk
Tag 4	0.42	304.16	2648.43	4038.33	FEN 0.21 NF 0.21 PIR 0.85	nein	-3	6	positiv

	<u>Sufentanil</u>	<u>Propofol</u>		Sonstige Opioide	NEV	RASS	BPS	CAM- ICU	
<i>Patient 16</i>									
Tag 1	0.27	511.66	1465.02	4030	nein	-4	3	nk	
Tag 2	0.39	671.66	1729.87	3013.33	nein	-4	3	positiv	
Tag 3	0.35	590	947.68	2336.66	nein	-4	3	nk	
Tag 4	0.21	135	564.98		nein	-4	3	nk	
<i>Patient 17</i>									
Tag 1	0.23	250.83	936.54	2941.66	PIR 5.8	nein	-5	4	nk
Tag 2	0.20	240	1487.63	2880	PIR 2.33	nein	-3	5	nk
Tag 3	0.17	345.83	494.7	2020	PIR 1.16	nein	-2	4	negativ
Tag 4	0.20	240	815.56	1900	PIR 0.76	nein	-1	5	negativ
<i>Patient 18</i>									
Tag 1	0.28	208.3	954.69	986.66	PIR 1.32	nein	-5	3	positiv
Tag 2	0.29	383.3	1113.57	1916.66	PIR 1.13	nein	-5	3	positiv
Tag 3	0.26	184.16	1662.61	2095	PIR 0.90	nein	-2	5	positiv
Tag 4	0.34	240	815.56	1900	PIR 0.74	nein	0	3	positiv
<i>Patient 19</i>									
Tag 1	0.35	463.33	720.22	2526.66	PIR 2.98	CiCaCVVHD	-5	3	positiv
Tag 2	0.43	476.66	1233.83	2383.33	PIR 2.55	CiCaCVVHD	-5	2	nk
Tag 3	0.33	394.16	1183.28	2015	PIR 1.75	CiCaCVVHD	-5	3	positiv
Tag 4	0.29	209.58	843.33	1096.66	PIR 1.51	CiCaCVVHD	-4	4	positiv

In den 46 Patientenblutproben wurde Sufentanil in 46 Fällen (0.17 – 0.83 ng/ml) nachgewiesen, wobei die errechneten 24 h kumulativ Dosen im Bereich von 87 bis 886.67 µg lagen. Propofol wurde mittels GC/MS Untersuchungen in 45 Blutproben (494.7 – 4831.36 ng/ml) detektiert und die ermittelten 24 h kumulativ Dosen lagen zwischen 615 bis 4663.3 mg Propofol. Piritramid wurden in 34 Proben (0.46 – 10.98 ng/ml) gefunden. Bei Patient 13 konnte zusätzlich noch Morphin (0.49 – 1.05 ng/ml), Morphin-3-Glucuronid (34.17 – 88.96 ng/ml) und Morphin-6-Glucuronid (7.22 – 15.38 ng/ml) an allen vier Tagen nachgewiesen werden. Im Fall von Patient Nr. 15 wurden neben Sufentanil, Propofol und Piritramid auch Fentanyl (1.46 – 0.21 ng/ml) und sein Metabolit Norfentanyl (0.64 – 0.21 ng/ml) detektiert.

(a)



(b)

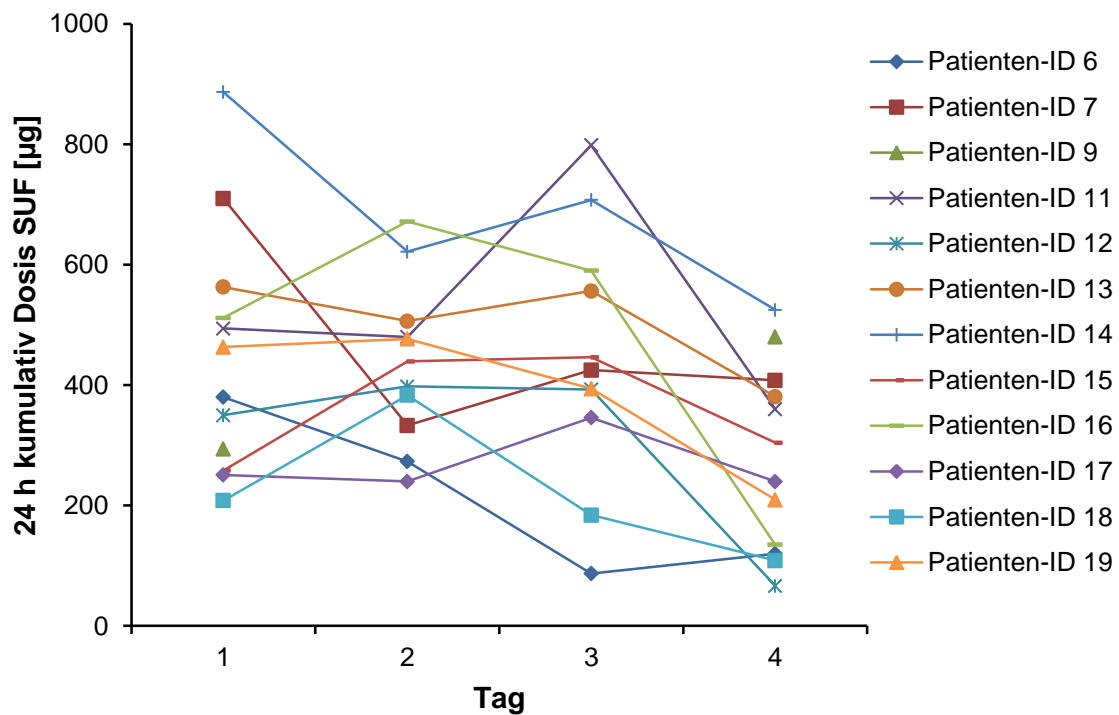


Abbildung 45: Blutspiegelkonzentrationen (a) und 24 h kumulative Dosis (b) von Sufentanil an den 4 Tagen der klinische Studie der 12 Patienten.

Die Veränderung der Blutspiegel und der 24 h kumulativ Dosis von Sufentanil ist für alle 12 Studienteilnehmer an den Tagen 1, 2, 3 und 4 in Abbildung 45 gezeigt. Sufentanil ist ein sehr starkes Opioid-Analgetikum und wurde den Patienten zur Schmerzlinderung durch eine Spritzenpumpe gegeben. Die Laufrate des Perfusors wurde dabei für jeden Patienten individuell entsprechend der benötigten Menge eingestellt. Die Blutspiegel der Patienten sind dabei alle sehr ähnlich, egal welche kumulative Dosis errechnet wurde. Die Gabe des Arzneistoffs scheint sich demnach an der ausreichend schmerzstillenden Wirkung zu orientieren. Die Einstellung der Patienten ist also völlig unabhängig von den verschiedenen Stoffwechselraten der Patienten. Unterschiedliche Stoffwechselraten und damit der Abbau von Arzneistoffen können durch Körpergewicht, Alter, Vorerkrankungen und verschiedene Ausstattung des Enzymsystems bedingt sein. Das Cytochrom P450 (CYP) System besteht aus einer Vielzahl von Hämproteinen mit enzymatischer Aktivität, die hauptsächlich in der Leber lokalisiert sind und wasserunlösliche Stoffe in wasserlösliche Verbindungen durch Oxidation umwandeln. Diese CYP-Enzyme sind damit auch für die Elimination von Arzneistoffen aus dem Körper verantwortlich. Besonders wichtige Vertreter für den Abbau von Opioiden sind beispielsweise CYP2D6 und CYP3A4.

Patient Nr. 13 benötigt im Vergleich zu anderen Studienteilnehmern relativ hohe Konzentrationen von Schmerzmitteln wie Sufentanil, Propofol, Piritramid und zusätzlich noch Morphin. Zum einen war dies evtl. durch das hohe Gewicht (BMI = 40.4) und die ASA-Klassifikation 4, zum anderen könnte dies auch durch Probleme im Arzneistoffabbau (Cytochrom P450 System) bedingt gewesen sein. Patient Nr. 13 erhielt am ersten Tag der klinischen Studie ein kontinuierliches Hämodialyseverfahren (CiCaCVVHD = Citrat-Calcium-Continuos veno-venous hemodialysis). Möglicherweise wurden die Arzneistoffe teilweise durch das Nierenersatzverfahren aus dem Blut ausgewaschen.

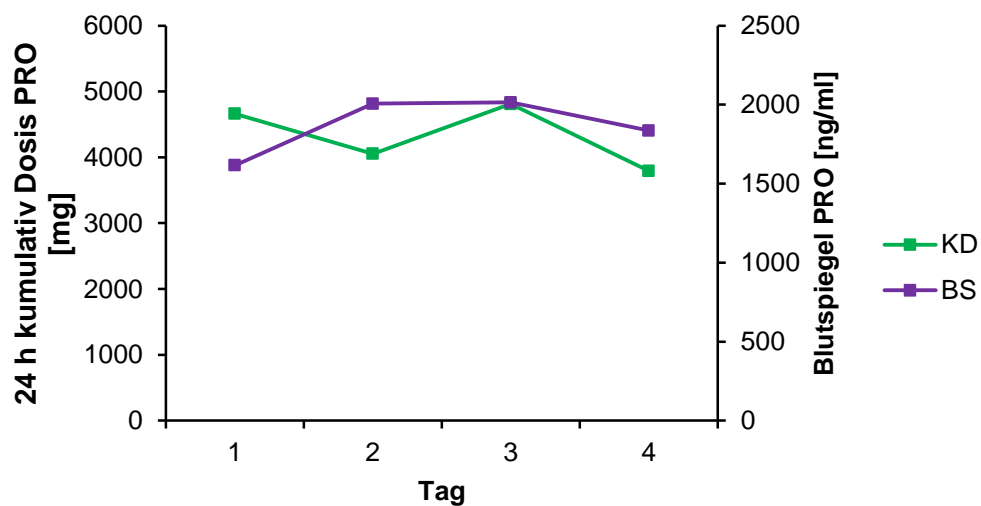
Die Blutspiegel und 24 h kumulative Dosen von Propofol sind für Patient 14 (a) und 7 (b) in Abbildung 46 aufgezeigt. Propofol ist ein Narkotikum mit relativ geringer Kumulation und kurzer Plasmahalbwertszeit. Auf Grund seiner "Kontext-sensitiven Halbwertszeit" ist es sehr gut steuerbar (141). Auf Station wird Propofol zur Analgosedierung der Patienten eingesetzt. Die benötigte Menge an Propofol variiert je nach Körpergröße, Gewicht, Alkoholkonsum und Gewöhnung an das Schmerzmittel. Außerdem benötigen Patienten, die eine hohe Konzentration eines Narkotikums brauchen, auch eine hohe Konzentration an Schmerzmittel.

Im Fall von Patient Nr. 14 (Abbildung 46 (a)) entsprachen die gemessenen Blutspiegel in etwa den kumulativen Dosen und der Sedierungstiefe. Blutspiegel (1. Tag 1616.17 ng/ml, 2. Tag 2006.4 ng/ml, 3. Tag 2014.09 ng/ml, 4. Tag 1836.14 ng/ml) und kumulative Dosen (1. Tag 4663.3 mg, 2. Tag 4053.33 mg, 3.Tag 4810 mg, 4. Tag 3795 mg) von Propofol blieben

über 4 Tage bei Studienteilnehmer Nr. 14 in etwa konstant. Der Patient war demnach ausreichend sediert und schmerzfrei.

Bei Patient Nr. 7 (Abbildung 46 (b)) konnte über 4 Tage eine Abnahme der Blutspiegel von Propofol (1. Tag 1835.8 ng/ml, 2. Tag 1510.74 g/ml, 3. Tag 1230.04 ng/ml, 4. Tag 757.31 ng/ml) festgestellt werden. Die kumulative Dosis blieb anfangs konstant (1. Tag 2135 mg, 2.Tag 2340 mg, 3. Tag 2340 mg), fiel aber am 4. Tag deutlich (615 mg) ab. Bei diesem Patienten konnte die künstliche Beatmung eingestellt werden. Der Studienteilnehmer ist am 4. Tag aus der Sedierung erwacht. Deshalb stieg die Konzentration von Piritramid im Blut von 0.46 ng/ml (Tag 3) auf 3.49 ng/ml (Tag 4) an. Piritramid wird auf Station nur zur Schmerzlinderung gegeben. Dies kann von Patienten, wenn nötig auch selbständig, nachdosiert werden.

(a)



(b)

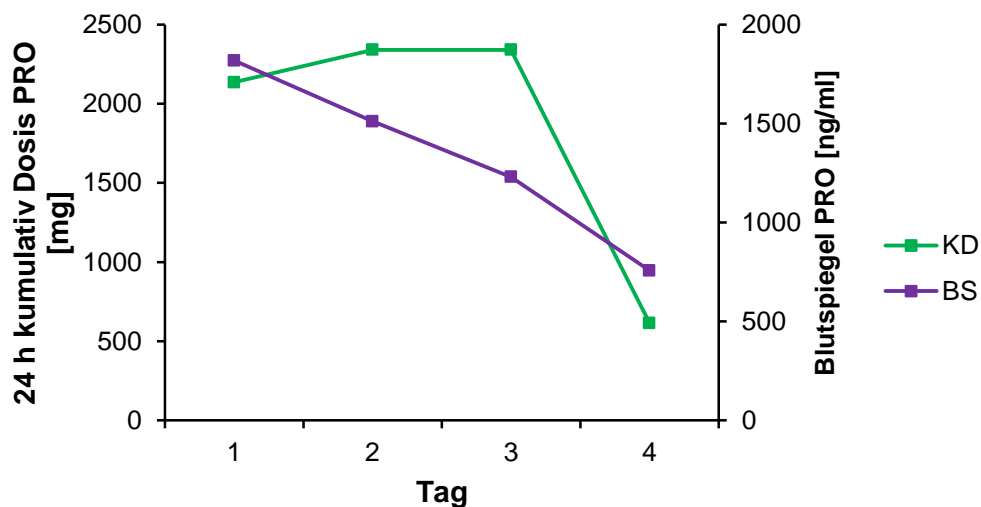


Abbildung 46: 24 h kumulativ Dosis [mg] und Blutspiegel [ng/ml] von Propofol bei Patient Nr. 14 a) und 7 (b).

4.6 Ergebnisse der Untersuchung von Blutproben des forensischen Centers in Ho Chi Minh City

Die Situation der Drogenentwicklung ist in Deutschland und Europa seit vielen Jahren relativ gut bekannt. Es gibt zahlreiche wissenschaftliche Publikationen. In Deutschland erscheint einmal im Jahr die "Polizeiliche Kriminalstatistik" und der "Arzneiverordnungsreport". Die europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA) veröffentlicht jährlich den "Europäischen Drogenreport". Hingegen ist die Lage in Entwicklungsländern, wie beispielsweise in Teilen von Afrika und Asien, wesentlich schlechter aufgeklärt. So ist über den Drogenkonsum in Vietnam bisher wenig bekannt. Es gibt kaum wissenschaftliche Veröffentlichungen, keine staatlichen Analysen zur derzeitigen Drogenlandschaft und dem Konsum von illegalen Substanzen in Vietnam. Erschwerend kommt hinzu, dass die Quantifizierung von Drogen in Laboren häufig problematisch ist, da teilweise die apparative Ausstattung fehlt und es staatliche Beschränkungen bei dem Erwerb von analytischen Standardsubstanzen und Labormaterialien gibt. Rückschlüsse auf die heutige Drogenlandschaft und den Konsum illegaler Substanzen werden daher eher aus der Historie gezogen. Noch im letzten Jahrhundert waren Opiumhöhlen und damit natürlich auch das Rauchen von Opium in Vietnam weit verbreitet, legal und gesellschaftlich voll akzeptiert. Zudem liegt Vietnam im Grenzgebiet der Staaten des sogenannten "Goldenen Dreiecks" Laos, Thailand und Myanmar, die nach wie vor relativ große Bedeutung bezüglich des Anbaus von Schlafmohn und der Weiterverarbeitung zu Heroin haben.

Um für die Situation zum Drogenkonsum in Vietnam etwas Licht ins Dunkel zu bringen wurden alle Autopsiefälle des Forensischen Centers in Ho Chi Minh City mit Verdacht einer Opiat-Intoxikation (GC/MS Full Scan) im Zeitraum Januar bis November 2014 näher untersucht. Die 85 Herzblutproben wurden im Dezember 2014 im Forensischen Center auf Opioide analysiert. Vorher musste die Extraktionsmethode und LC/MS-MS Methode zur Bestimmung der 35 Opioide in der Toxikologie des Forensischen Centers etabliert werden. Tabelle 31 zeigt die Ergebnisse der Analyse der 85 Autopsiefälle. Dabei sind Geburtsjahr, Geschlecht, Befund der Obduktion und die Blutspiegelkonzentrationen der nachgewiesenen Opioide aufgeführt.

Tabelle 31: Analyse der Autopsiefälle im Forensischen Center Ho Chi Minh City von Januar - November 2014, welche im GC-MS Full Scan Screening positiv auf Opiate waren.

Verstorbener	Befund Obduktion	Nachgewiesene Substanzen [ng/ml]					
		6-MAM	COD	MOR	M3G	M6G	Sonstige
Nr. 1 1976 geb., m	Morphin Intoxikation	8.7	72	460	970	120	
Nr. 2 1988 geb., m	Multiple Verletzungen Morphin Intoxikation		36	160	210	25	
Nr. 3 1979 geb., m	Morphin Intoxikation		24	23	35	14	
Nr. 4 1964 geb., m	Morphin Intoxikation	2.4	49	210	300	55	
Nr. 5 1981 geb., m	Morphin Intoxikation	3.9	18	30	370	51	
Nr. 6 unbekannt, m	Morphin Intoxikation Lungentuberkulose Akute Myokarditis Hypertrophie des Herzens Leberzirrhose AIDS	160	700	630	370	29	DH: 0.4 HC: 4.0 ODT: 38 TRA: 97
Nr. 7 1985 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation	0.9	26	120	28	3.3	
Nr. 8 1968 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation		12	27	130	22	
Nr. 9 1987 geb., m	Alkohol und Morphin Intoxikation		50	300	36	4.1	
Nr. 10 1971 geb., m	Morphin Missbrauch		33	180	390	96	NON: 130
Nr. 11 1981 geb., m	Morphin Intoxikation Pulmonale Alveolarproteinose AIDS	2.6	47	90	78	13	HC: 3.2
Nr. 12 1976 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation AIDS	1.4	45	150	700	82	
Nr. 13 1979 geb., w	Morphin Intoxikation AIDS	1.1	70	780	620	168	HC: 3.1
Nr. 14 1991 geb., m	Morphin Intoxikation		63	310	310	39	MEP: 680 NM: 77

Verstorbener	Befund Obduktion	Nachgewiesene Substanzen [ng/ml]					
Nr. 15 1980 geb., m	Morphin Intoxikation	2.0	54	600	350	77	
Nr. 16 1987 geb., m	Morphin Intoxikation	0.7	61	740	150	210	
Nr. 17 1984 geb., m	Morphin Intoxikation		60	290	500	110	HC: 3.7
Nr. 18 1975 geb., m	Morphin Intoxikation	4.8	71	850	130	120	
Nr. 19 1986 geb., m	Morphin Intoxikation	3.0	62	320	160	32	
Nr. 20 1983 geb., m	Morphin Intoxikation	2.2	39	220	210	25	
Nr. 21 1964 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation	1.1	36	420	130	99	
Nr. 22 1993 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation		43	210	88	22	
Nr. 23 1991 geb., m	Morphin Intoxikation		16	52	79	18	NON: 12
Nr. 24 1977 geb., m	Morphin Intoxikation	1.3	59	240	71	6.2	
Nr. 25 1988 geb., m	Morphin Intoxikation		70	560	340	92	
Nr. 26 unbekannt, m	Morphin Intoxikation	1.2	73	230	760	120	HC: 3.3
Nr. 27 unbekannt, m	Morphin Intoxikation Toxoplasma gondii Infektion AIDS	0.6	230	490	670	170	HC: 3.5
Nr. 28 1988 geb., m	Morphin Intoxikation	1.6	33	220	500	30	
Nr. 29 1974 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation	10	370	410	160	7	DH: 4.3
Nr. 30 1982 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation	1.7	810	1400	48	58	DH: 4.4
Nr. 31 1996 geb., m	Plötzlicher Tod						
Nr. 32 1986 geb., m	Morphin Intoxikation	11	110	340	720	95	

Verstorbener	Befund Obduktion	Nachgewiesene Substanzen [ng/ml]					
Nr. 33 1979 geb., m	Morphin Intoxikation	1.3	69	490	1000	210	
Nr. 34 1976 geb., m	Morphin Intoxikation AIDS	59	86	360	150	14	
Nr. 35 1986 geb., m	Morphin Intoxikation		47	220	940	160	NON: 190
Nr. 36 unbekannt, m	Morphin Intoxikation Leberzirrhose	0.3	38	140	210	39	
Nr. 37 1945 geb., w	Morphin Intoxikation Schilddrüsenkrebs		34				
Nr. 38 1986 geb., m	Morphin Intoxikation	4.5	89	490	390	99	NON: 13
Nr. 39 1982 geb., m	Lungenquetschung Morphin und Alkohol Intoxikation						
Nr. 40 unbekannt, m	Morphin und Alkohol Intoxikation	1.9	72	410	54	9.8	
Nr. 41 1963 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation		54	200	200	48	
Nr. 42 1982 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation	0.6	250	680	260	56	
Nr. 43 1992 geb., m	Morphin Intoxikation		190	1000	800	200	
Nr. 44 1986 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation		32	300	100	9.2	
Nr. 45 1980 geb., m	Morphin Intoxikation	150	330	830	630	28	
Nr. 46 1983 geb., m	Pneumonie Morphin Intoxikation AIDS	5.9	1000	870	73	7.7	
Nr. 47 1981 geb., m	Morphin Intoxikation		164	540	340	61	
Nr. 48 1995 geb., m	Morphin Intoxikation		17000	20		69	DH: 24 HC: 69
Nr. 49 1976 geb., m	Pneumonie Morphin Intoxikation		19	120	230	60	
Nr. 50 1996 geb., m	Laborunfall Morphin Intoxikation		20	2	13		

Verstorbener	Befund Obduktion	Nachgewiesene Substanzen [ng/ml]					
Nr. 51 1987 geb., m	Morphin und Alkohol Intoxikation	2.6					
Nr. 52 1974 geb., m	Morphin Intoxikation	92	420	61	7.7		
Nr. 53 1980 geb., m	Lungentuberkulose	OM: 3.1					
Nr. 54 1988 geb., m	Morphin Intoxikation	10	99	220	18		
Nr. 55 1978 geb., m	Morphin Intoxikation	32	530	FEN: 1.2			
Nr. 56 1981 geb., m	Morphin Intoxikation AIDS	40	320	160	32		
Nr. 57 unbekannt, m	Morphin und Alkohol Intoxikation	HC: 2.6					
Nr. 58 1986 geb., m	Morphin Intoxikation	1000	310	290	110	DH: 0.2 DMP: 2100 DP: 100 NON: 3.9	
Nr. 59 1982 geb., m	Morphin Intoxikation AIDS	530	1100	40	4.5	NON: 20	
Nr. 60 1963 geb., w	Lungenembolie	78	17	10	0.4		
Nr. 61 1984 geb., w	Morphin Intoxikation	2.1	900	1100	3100	660	
Nr. 62 1990 geb., m	Exposition elektrischer Strom Morphin Intoxikation	DMP: 1.7					
Nr. 63 1981 geb., m	Pneumonie Leberzirrhose	1.1	118	610	620	160	HC: 4.6
Nr. 64 1982 geb., m	Morphin Intoxikation AIDS	890			1500	210	
Nr. 65 1971 geb., m	Morphin Intoxikation	0.3	15	190	300	71	NON: 15
Nr. 66 1949 geb., m	Morphin Intoxikation (keine Autopsie durchgeführt)	DMP: 0.5					
Nr. 67 1982 geb., m	Pneumonie	22			3.9		

Verstorbener	Befund Obduktion	Nachgewiesene Substanzen [ng/ml]					
Nr. 68 1990 geb., m	Pneumonie Morphin Intoxikation AIDS	69	190	590	70		DMP: 0.7 HC: 3.1
Nr. 69 1968 geb., m	Morphin Intoxikation	20	330		15		
Nr. 70 1980 geb., m	Morphin Intoxikation	45	220	200	58		
Nr. 71 1980 geb., m	Morphin Intoxikation AIDS	350	13	18	3.5		HC: 4.1
Nr. 72 1974 geb., w	Morphin Intoxikation	44	1.7	12	2.8		HC: 3.0
Nr. 73 1983 geb., m	Morphin Überdosis AIDS	6.8	180	350	360	61	DMP: 2.0
Nr. 74 1984 geb., w	Morphin Überdosis Schwangerschaft	30	150	500	72		
Nr. 75 1999 geb., w	Pneumonie Morphin Intoxikation	1.1	3.9	100	15	3.4	ODT: 3.3 TRA: 4.8
Nr. 76 1985 geb., m	Erhängen Morphin Intoxikation AIDS		5.2	59	11		
Nr. 77 1963 geb., m	Laborunfall	6.5		6.4	2.1		DMP: 2.1 DP: 8.9
Nr. 78 1973 geb., m	Morphin Intoxikation						
Nr. 79 1984 geb., m	Akute Infektion des Herzens Morphin Intoxikation	5.3	26	350	58		
Nr. 80 1970 geb., m	Morphin Intoxikation	26					
Nr. 81 1976 geb., m	Suizid AIDS						
Nr. 82 1972 geb., m	Verkehrsunfall						
Nr. 83 1988 geb., m	Morphin Intoxikation						
Nr. 84 1965 geb., m	Morphin Intoxikation						

Verstorbener	Befund Obduktion	Nachgewiesene Substanzen [ng/ml]
Nr. 85	Verkehrsunfall	
1943 geb., m		

Nach der Obduktion wurde in 76 Fällen eine Morphin-Intoxikation als Todesursache angegeben. In 15 Fällen davon war eine Kombination mit Alkohol-Missbrauch belegt. Eine HIV-Infektion bzw. eine Erkrankung an AIDS wurde in 15 Fällen festgestellt. Neben einer Morphin-Intoxikation wurden als Todesursache auch Multiple Verletzungen, Tuberkulose, Toxoplasma gonii Infektion, Plötzlicher Tod, Leberzirrhose, Schilddrüsenkrebs, Pneumonie, Laborunfall, Suizid, Verkehrsunfall, akute Infektion des Herzens und Exposition von elektrischen Strom angegeben.

Abbildung 47 zeigt die Anzahl der Obduktionen nach Alter und Geschlecht geordnet. Die Identität von 6 männlichen Leichen war nicht bekannt, deshalb konnte das Alter der Verstorbenen nicht dokumentiert werden. Ein Großteil der Leichen war männlich. Die Altersverteilung der Fälle lag bei Frauen und Männern zumeist im Bereich von 30 bis 40 Jahren. Auch in Deutschland ist der überwiegende Teil der Herointoten männlich. Der Altersdurchschnitt scheint allerdings jünger, zwischen 20 und 30 Jahren, zu liegen. Zwingenberger et al. untersuchte beispielsweise die durch illegale Drogen verursachten Todesfälle in Ostdeutschland (Sachsen, Thüringen, Brandenburg, Mecklenburg Vorpommern und Sachsen-Anhalt) im Zeitraum 1995 bis 2004. Bei dieser epidemiologischen Untersuchung waren 85 % der Verstorbenen männlich. Das Durchschnittsalter betrug 24 Jahre (142).

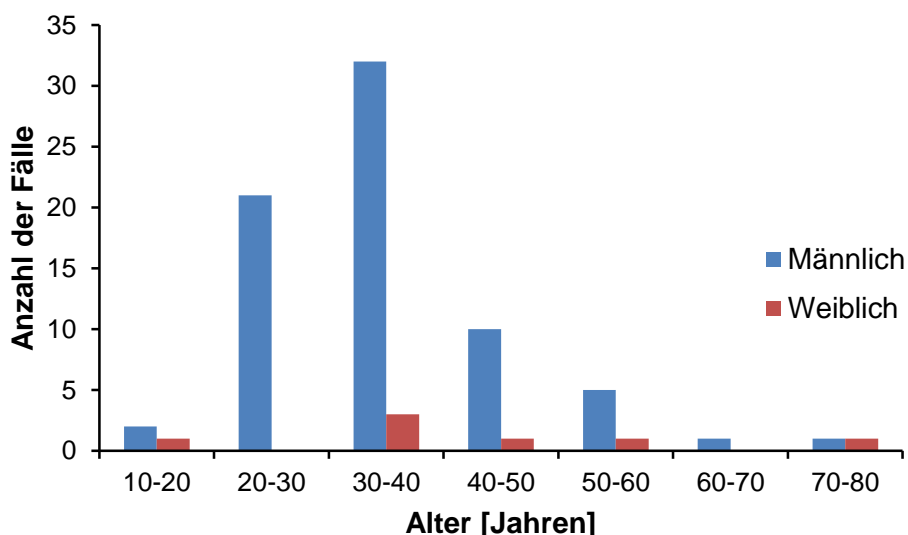


Abbildung 47: Anzahl der Autopsiefälle nach Geschlecht und Alter in Jahren geordnet. Bei 6 männlichen Fällen war das Alter der Verstorbenen nicht bekannt.

Bei der LC-MS/MS Messung konnte 6-Monoacetylmorphin in 34 Fällen (0.3 – 160 ng/ml, Mittelwert 13.4, Median 1.9), Morphin in 68 Fällen (1.7 – 1400 ng/ml, Mittelwert 363.3, Median 300), Morphin-3-Glucuronid in 67 Fällen (6.4 – 1500 ng/ml, Mittelwert 349.7, Median 210), Morphin-6-Glucuronid in 68 Fällen (0.4 – 660 ng/ml, Mittelwert 69.3, Median 49.5) und Codein in 70 Fällen (2.6 – 17000 ng/ml, Mittelwert 379, Median 54) nachgewiesen werden. Der überwiegende Teil der untersuchten Obduktionen konnte demnach auf eine Heroin- bzw. Morphin-Vergiftung zurückgeführt werden.

Es wurden aber auch synthetisch hergestellte Opioide mit Morphin-ähnlicher Struktur in den Herzblutproben gefunden. Dihydrocodein konnte in 5 Fällen (0.2 – 24 ng/ml, Mittelwert 6.6, Median 4.3), Hydrocodon in 12 Fällen (2.6 – 69 ng/ml, Mittelwert 8.9, Median 3.4) und Oxycodon in einem Fall (3.1 ng/ml) nachgewiesen werden. Das Antitussivum Dextromethorphan wurde in 6 Fällen (0.5 – 2100 ng/ml, Mittelwert 351.1, Median 54.4) und sein Metabolit Dextrorphan in 2 Fällen (8.9 – 100 ng/ml, Mittelwert 54.4) gefunden. Bei der Leiche Nr. 58 wurde ein Blutspiegel von 2100 ng/ml Dextromethorphan im Herzblut festgestellt. Bei derartig hohen Spiegel ist von einer missbräuchlichen Anwendung des Arzneimittels als Betäubungsmittel auszugehen. In der Literatur sind Blutspiegel von 1000 – 3200 ng/ml Dextromethorphan nach einer tödlichen Vergiftung belegt (143). Die bei Fall Nr. 58 festgestellten Blutspiegel liegen damit in dem nach Literaturangaben letalen Bereich. Bei dem Verstorbenen wurden aber außerdem noch vergleichsweise hohe Konzentrationen von Codein (1000 ng/ml) und Morphin (310 ng/ml) gefunden. Es ist daher anzunehmen, dass Nr. 58 auf Grund einer Mischintoxikation verstorben ist.

Die vollsynthetischen Opioide ohne Morphin-ähnliche Struktur konnten ebenfalls detektiert werden. Fentanyl wurde in einem Fall (1.2 ng/ml), Tramadol in 2 Fällen (4.8 – 97 ng/ml, Mittelwert 50.9) und sein Stoffwechselprodukt O-Desmethyltramadol in 2 Fällen (3.3 – 38 ng/ml, Mittelwert 20.6) quantifiziert. Verwunderlich war die Detektion von 680 ng/ml Meperidin und 77 ng/ml Normeperidin im Fall Nr. 14. Das starke Analgetikum ist, zumindest in Ho Chi Minh City, sehr schlecht verfügbar. Der Verstorbene hatte aber darüber hinaus 310 ng/ml Morphin im Herzblut.

Der Opiat-Antagonist Naloxon konnte in 7 Fällen (3.9 – 190 ng/ml, Mittelwert 54.8, Median 15) nachgewiesen werden. Naloxon wird in Vietnam häufig bei einer Opiatüberdosierung als Antidot im Krankenhaus verwendet. In Deutschland wird Naloxon außerdem in Kombination mit verschiedenen Opioiden, wie Buprenorphin oder Tilidin als Arzneimittel gegeben, um eine missbräuchliche intravenöse Injektion zu unterbinden (144).

Die Blutspiegelkonzentrationen der Opiate 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Codein, Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid der 85 Obduktionsfälle sind in Abbildung 48 graphisch dargestellt. Nach Heroinkonsum wird 6-Monoacetylmorphin im Körper zu Morphin

und dieses weiter zu Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid verstoffwechselt. Morphin und Codein kommen als Alkaloide des Schlafmohns auch im Rohopium vor und gelangen von daher zu einem gewissen Prozentsatz in die Blutprobe. Bei Fall Nr. 48 konnten 17 µg/ml Codein im Herzblut und 20 ng/ml Morphin, 69 ng/ml Morphin-6-Glucuronid, 24 ng/ml Dihydrocodein und 69 ng/ml Hydrocodon nachgewiesen werden. Derartige hohe Blutspiegel von Codein führen auf Grund einer zentralen Lähmung der Atmung zu einer tödlichen Vergiftung. Vergleichsweise hohe Konzentrationen von Codein in postmortalem Blut sind in der Literatur bereits beschrieben. So wurde beispielsweise bei 2 Erwachsenen nach suizidaler Einnahme von Codein Blutspiegel von 15 bis 48 mg/L gemessen (145). Beim Fall Nr. 48 handelt es sich demnach höchstwahrscheinlich um eine tödliche Vergiftung mit Codein.

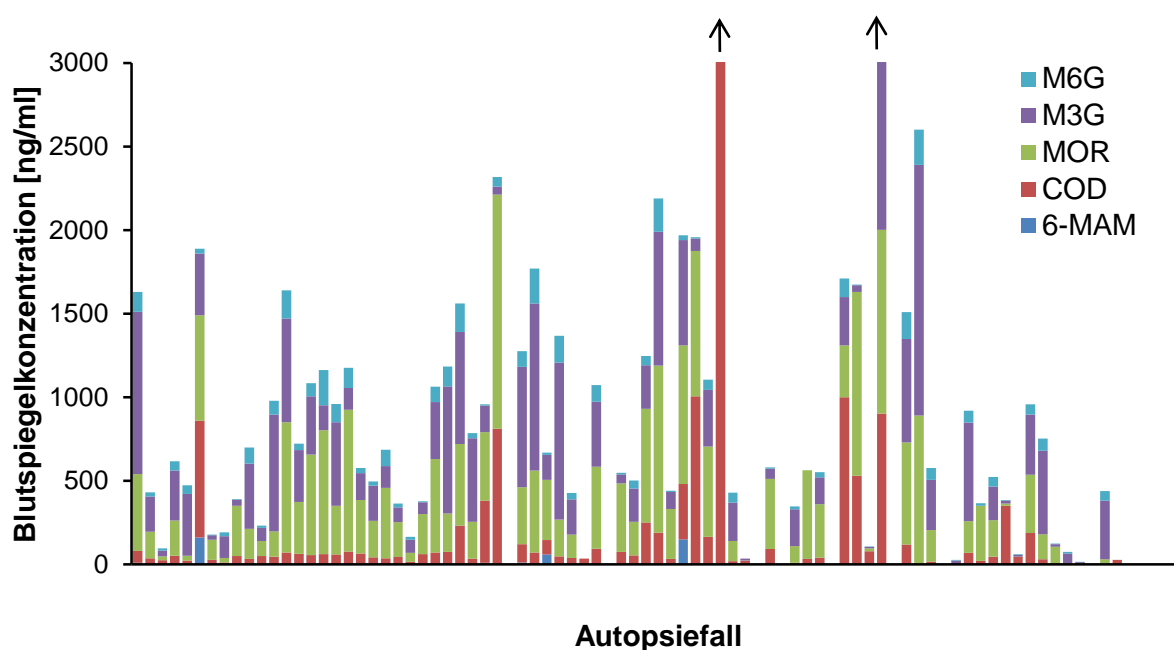


Abbildung 48: Blutspiegelkonzentrationen der Opiate 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Codein, Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid der 85 Obduktionen.

4.7 Übertragung der Untersuchungsmethode sowie Methodenvvalidierung zum Nachweis von Opioiden im Haar

In Haarproben finden sich häufig, im Gegensatz zu Serumproben, die Muttersubstanzen also die Arzneistoffe und Drogen selbst. So kann in Haarproben Diacetylmorphin (Heroin) oder Tilidin nachgewiesen werden (146). Tilidin und Diacetylmorphin werden im Blut durch den First-Past-Metabolismus in der Leber so schnell verstoffwechselt, dass im Blut meistens nur noch die Metabolite Bisnortilidin, Nortilidin bzw. Morphin gefunden werden. Deshalb wurde zunächst die bestehende Literatur auf den Nachweis von Opioiden und deren

Metaboliten im Haar untersucht. Bei Mußhoff et al. (147) findet sich beispielsweise der Nachweis von Bisnortilidin, Nortilidin, Fentanyl, Norfentanyl, Oxycodon, Oxymorphon, Hydromorphon, Methadon, Piritramid und Tramadol. 6-Monoacetylmorphin, Codein und Morphin konnten durch Kintz et al. nachgewiesen werden (148). Der Einbau von Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid konnten im Haar von Ratten nachgewiesen werden (149). Auch die Substanzen Alfentanil, Sufentanil (150), Buprenorphin, Norbuprenorphin (151), Dextromethorphan (152), Dihydrocodein (153), Ethylmorphin (154), Hydrocodon (155), Meperidin, Normeperidin (156), Naloxon (157), O-Desmethyltramadol (158), Pentazocin in Rattenhaar (159) und Pholcodin (160, 161) konnten aus Haaren extrahiert werden.

Abbildung 49 zeigt das Total Ion Chromatogramm einer Messung von Kalibrationslevel 2 einer gespikten Leerhaarprobe. Es erfolgte eine Auftrennung, der zum Teil basisliniengetrennten Peaks, über den gesamten Retentionszeitraum. Die Phase-II-Metaboliten des Morphins (Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid) eluierten gleich zu Beginn der Analyse und wurden gut voneinander separiert.

Im Vergleich zu dem TIC der Serumproben (Abbildung 38) erscheinen die Peaks im TIC der Haarmessung (Abbildung 49) etwas breiter und zum Teil in einander übergehend. Außerdem fällt ein leichtes Tailing der Peaks auf. Zu einer Asymmetrie der Peaks kommt es, wenn mehrere Wechselwirkungsmechanismen während der Auftrennung an der analytischen Säule wirken und diese überladen ist. So wirken während der Separierung nicht nur hydrophobe Wechselwirkungen, sondern es können auch freie Silanolgruppen oder Metallspuren (wie z. B. Eisen, Aluminium) stärker mit basischen Substanzen interagieren (162, 163). Bei der Serumaufarbeitung wurden durch die vorgeschaltete Festphasenextraktion reine Extrakte zur Untersuchung erhalten. Die Ionenbelastung der Eluate war gering und damit auch der resultierende Matrixeffekt. Die Haarproben wurden im Ultraschallbad inkubiert. Es wurden Extrakte mit sehr viel mehr Verunreinigungen (Salze, Keratine und Fette) erhalten. Damit war die Matrixbelastung wesentlich höher, die sowohl mit den Bestandteilen in der Phenyl-Hexyl Säule, wie auch den Ionen in der Ionenquelle stärker interagiert und zu einer schlechteren Peakauftrennung und Peaksymmetrie führte. Die chromatographische Trennung im Fall der Haarproben war jedoch dennoch völlig ausreichend. Substanzen mit gleichem Masse-Ladungsverhältnis der Precursor- oder Produktionen wurde chromatographisch separiert. Die restlichen Analyten konnten eindeutig auf Grund der verschiedenen molaren Massen und den unterschiedlichen Fragmentierungseigenschaften im Massenspektrometer getrennt werden.

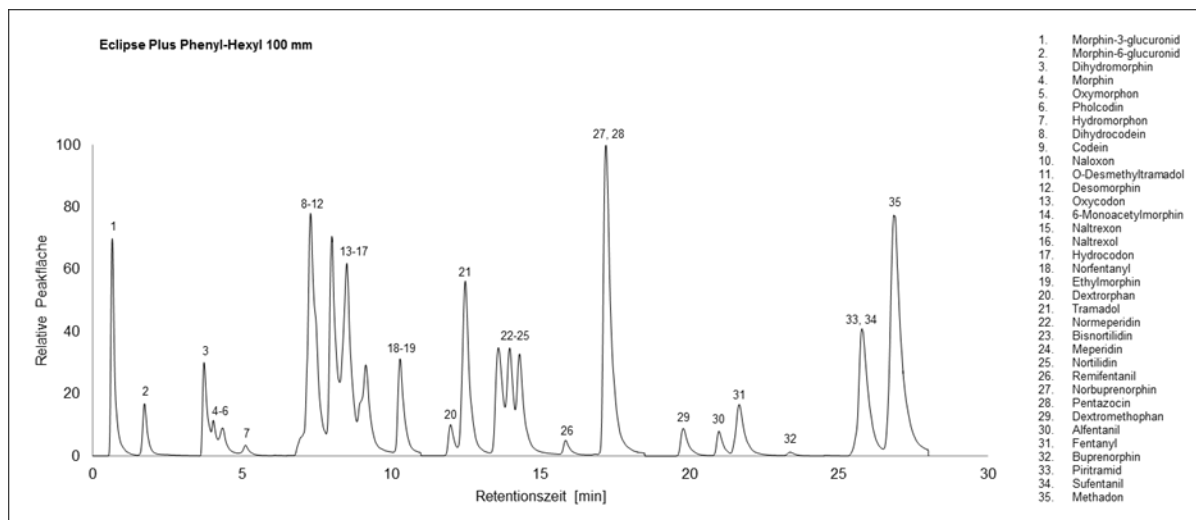


Abbildung 49: Total Ion Chromatogramm der Messung von Kalibrationslevel 2 einer gespickten Leerhaarprobe mit der Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Säule 100 mm.

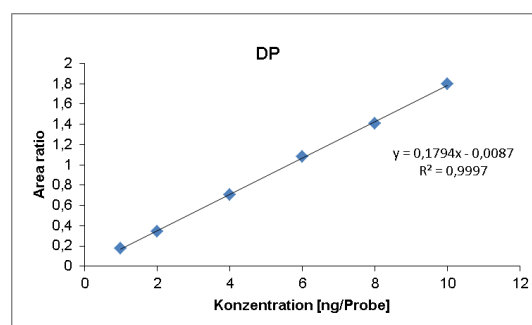
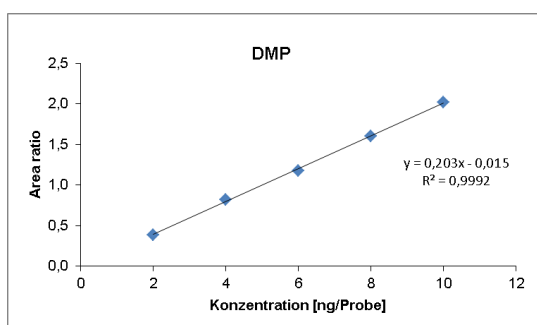
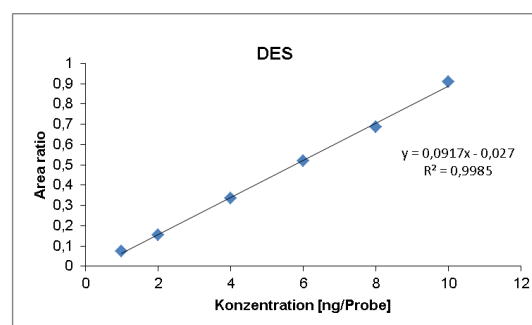
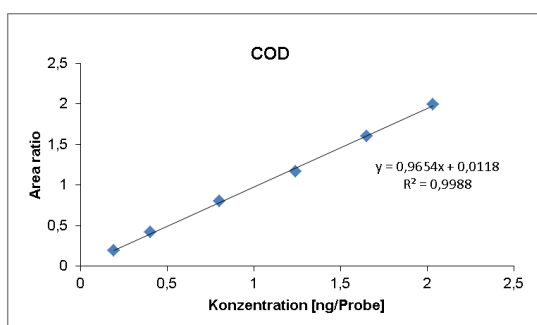
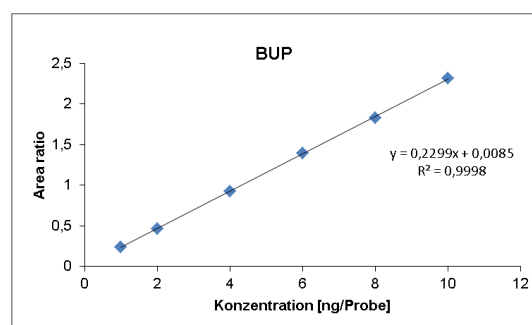
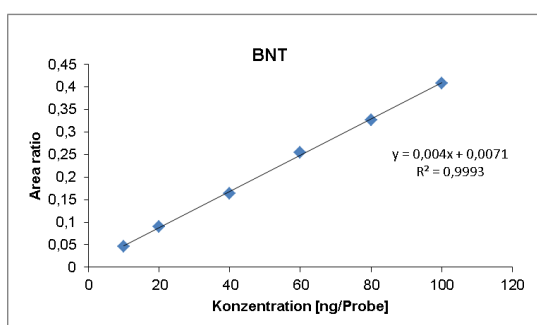
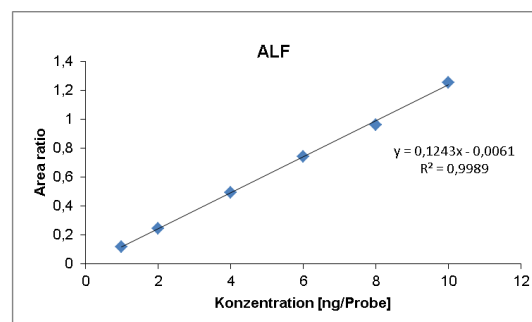
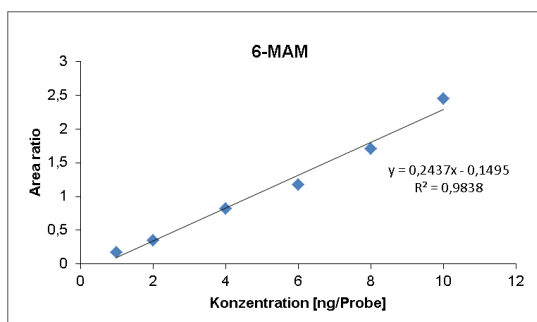
4.7.1 Selektivität

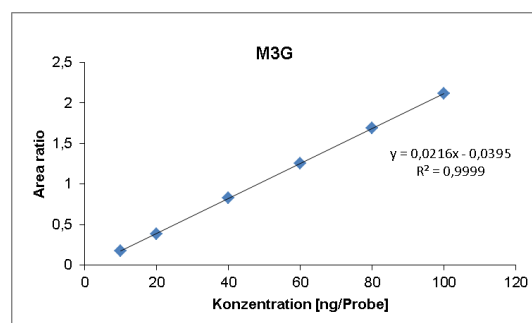
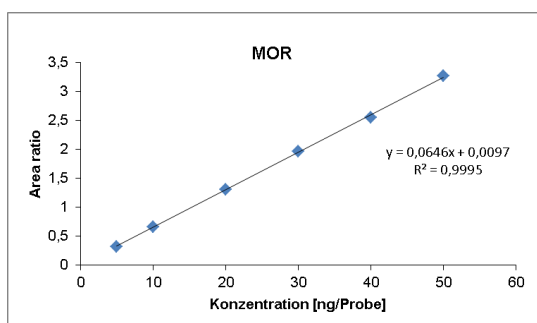
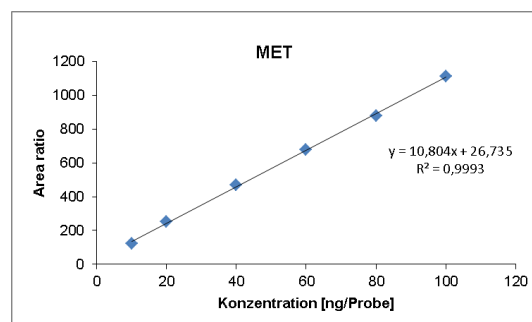
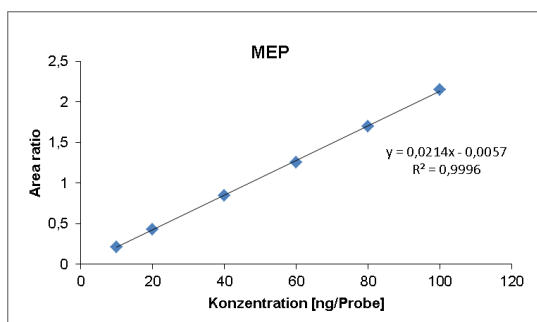
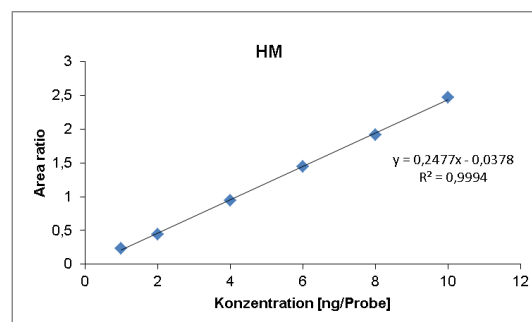
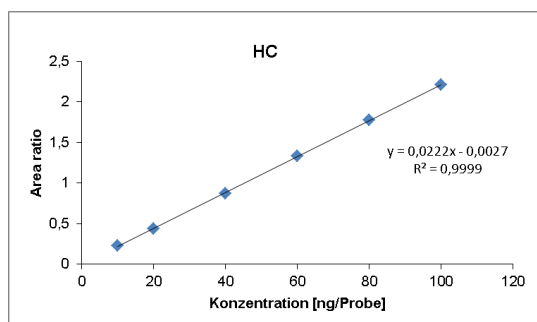
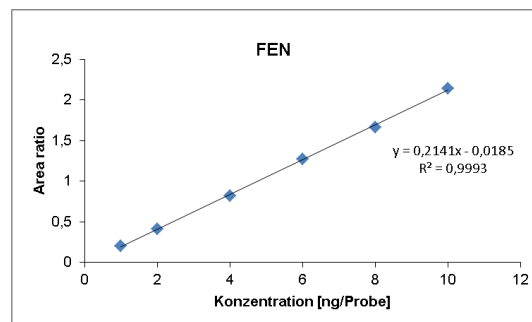
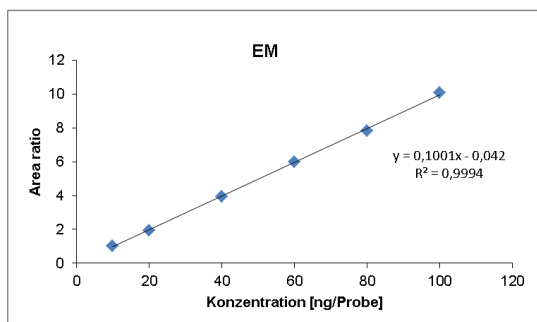
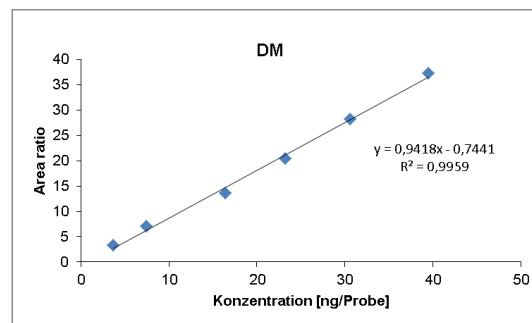
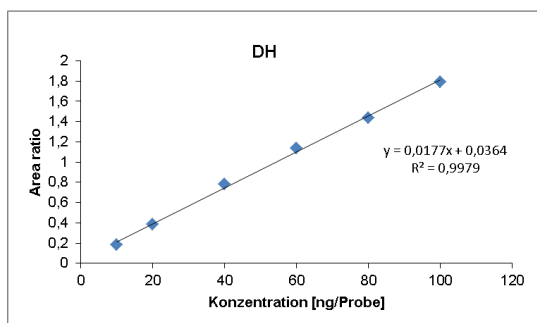
Es wurden 6 verschiedene Leerhaarproben ohne internen Standard und 2 verschiedene Leerhaarproben mit interner Standardlösung überprüft. Bei der Verwendung der Analysenmethode zur Untersuchung der Opiode aus Serum zeigten die Messungen für 34 Analyten keine relevante Interferenz. Lediglich im Fall einer Leerhaarprobe zeigte sich ein Störsignal für das Targetion beim Morphin. Deshalb wurde für die Untersuchung von Morphin und Morphin-d₆ in Haaren das Target- und Qualifierion vorsorglich getauscht. Die Quantifizierung von Morphin wurde über das Fragment 201.0 (Morphin-d₆ 201.0) errechnet. Die Fragmente, welche zur Identifizierung von Morphin nachgewiesen werden mussten, waren 58.0 und 77.0 (Morphin-d₆ 64.0).

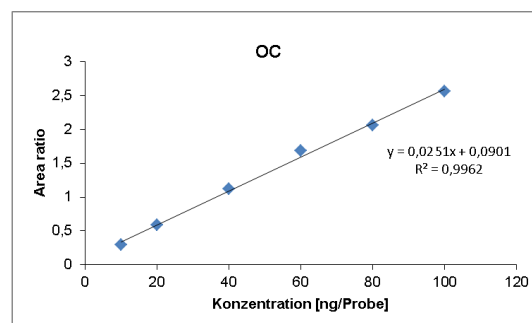
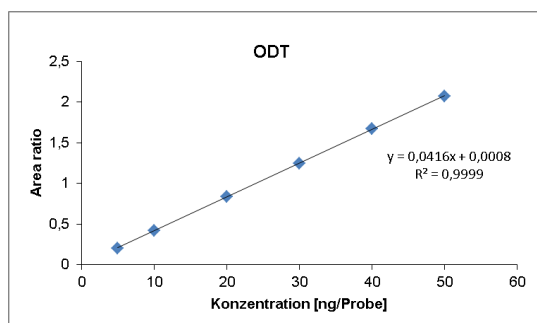
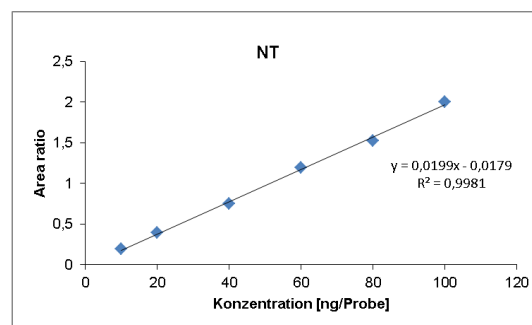
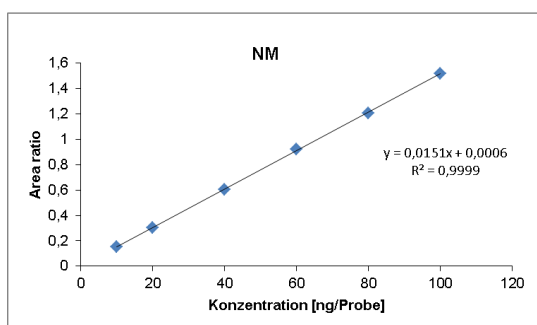
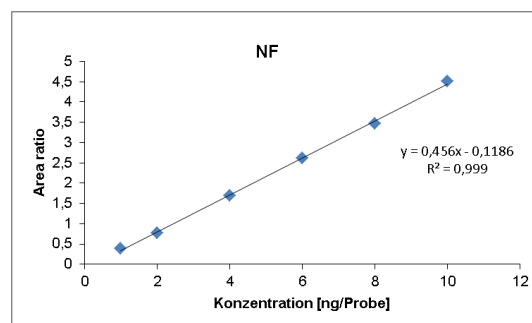
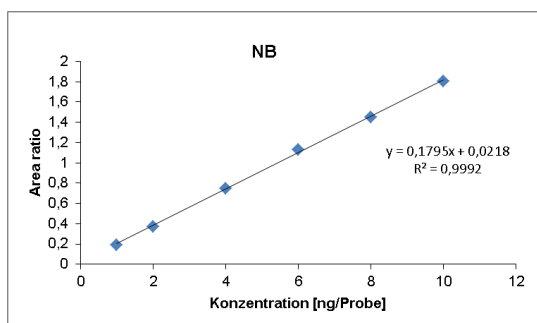
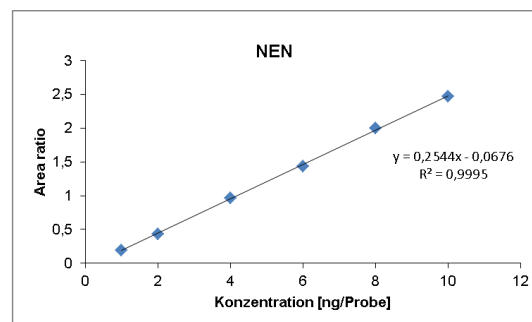
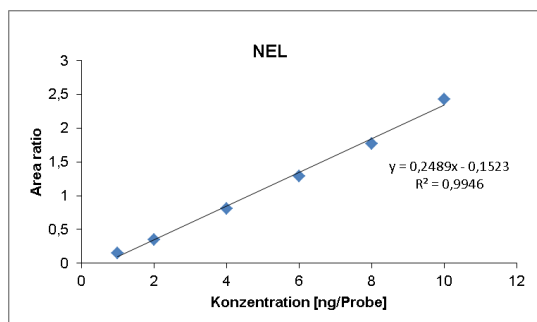
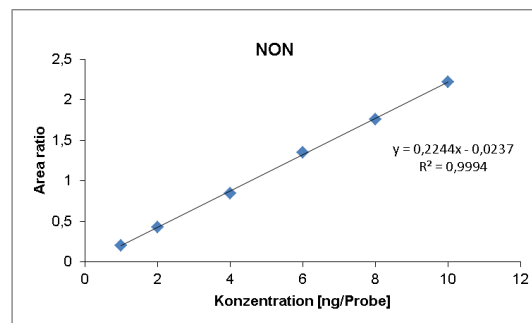
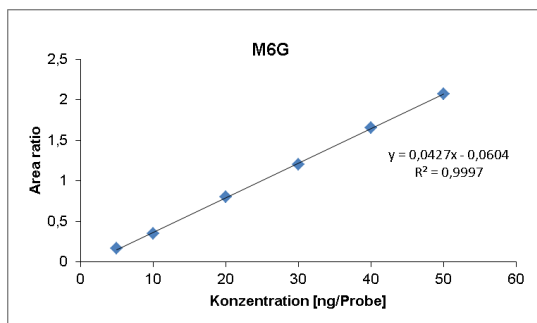
4.7.2 Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

Es wurden 6 verschiedene Kalibrationslevel 6-mal aufgearbeitet und mittels LC Triple Quad quantifiziert. Im Fall von Codein, Dihydrocodein, Norbuprenorphin, O-Desmethyltramadol, Pentazocin, Pholcodin, Remifentanil und Tramadol wurden nur 5 statt 6 Wiederholmessungen bestimmt. Gemäß dem Anhang C zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen "Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben" kann für die Validierung von Haarproben die Anzahl der Kalibrationslevel auf 4 verringert und die Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Kalibrator auf 5 verringert werden (164). Es wurden für alle 35 Analyten die Kalibrationslevel 1 – 6 überprüft. Über den gesamten getesteten Kalibrationsbereich waren die Kalibrationskurven linear (gemäß linearer Regressionsanalyse, bestätigt durch Mandel-Test). Der Grubbs-Test

zeigte keine Straggler oder Ausreißer und die Homogenität der Varianzen konnte durch den F-Test belegt werden (siehe Abbildung 50). Die Korrelationskoeffizienten (R^2) der einzelnen Substanzen lagen mindestens bei 0.997 (Naltrexol). Einzige Ausnahme stellte 6-Monoacetylmorphin mit einem $R^2 = 0.991$ dar. Prinzipiell konnte bei der Überprüfung der Linearität der Haarproben ein höherer Korrelationskoeffizient als bei den Serumproben erreicht werden, was vermutlich auf die höheren und weniger stark schwankenden Extraktionsbeuten bei den Haaren zurückzuführen war.







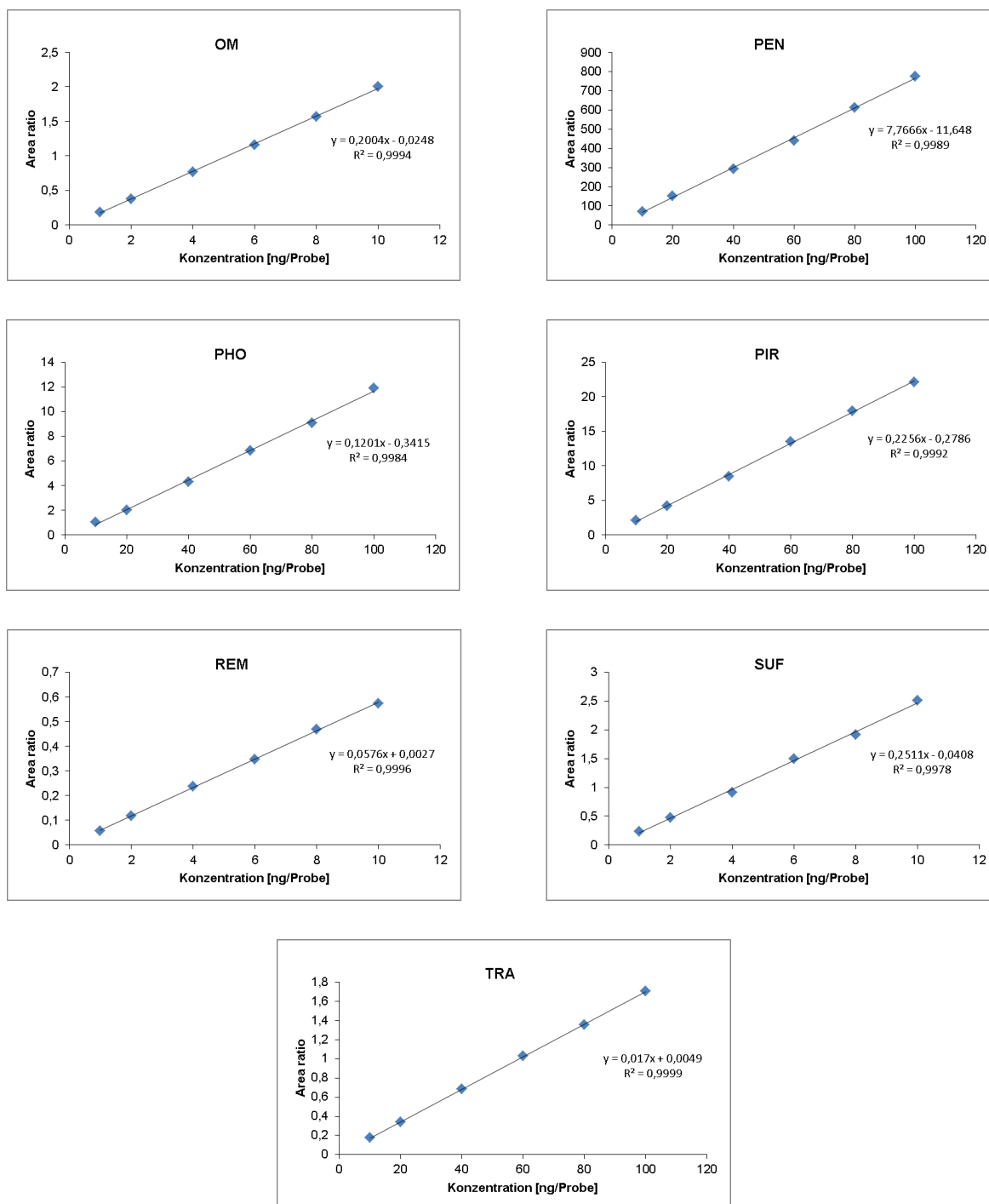


Abbildung 50: Überprüfung der Linearität. Dargestellt sind Mittelwerte der 6 LC-MS/MS Messungen von 6 verschiedenen Konzentrationen der 35 Opiode in gespikten Haarproben.

Die Kalibrationslevel 1 – 6 wurden für die einzelnen Opiode so gewählt, dass sie in etwa den bei forensisch-toxikologisch Untersuchungen entsprechenden Bereich abdecken (165). Die erweiterte 2. Auflage der "Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik – Beurteilungskriterien" von Schubert und Mattern wurde am 1.1.2011 als geltendes, verbindliches Regelwerk im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung durch das Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung (BMVBS) anerkannt.

Demnach gilt für die Medizinisch-Psychologische Untersuchung (MPU) zur Beurteilung der Fahreignung für 6-Monoacetylmorphin, Codein, Dihydrocodein, Morphin und Methadon 0.1 ng/mg Haar als Bestimmungsgrenze für ein identifizierendes Verfahren (166). Ausgehend von einer Einwaage von 50 mg Leerhaaren für die Bestimmung des Kalibrationsbereichs, entspricht das einem Konzentrationsbereich für 6-Monoacetylmorphin von 0.02 – 0.2 ng/mg bzw. 1 – 10 ng/Probe, für Codein und Morphin von 0.1 – 1 ng/mg bzw. 5 – 50 ng/Probe und für Dihydrocodein bzw. Methadon einem Bereich von 0.2 – 2 ng/mg bzw. 10 – 100 ng/Probe. Der niedrigste Kalibrator ist damit im Fall von 6-Monoacetylmorphin ($K_2 = 0.02$ ng/mg bzw. 1 ng/Probe), Codein (0.1 ng/mg bzw. 5 ng/Probe) und Morphin (ebenfalls 0.1 ng/mg bzw. 5 ng/Probe) auch für die Untersuchung von MPU-Fällen ausreichend. Im Fall von Dihydrocodein und Methadon ($K_2 = 0.2$ ng/mg bzw. 10 ng/Probe) sollte der Kalibrationsbereich für MPU-Überprüfungen etwas nach unten erweitert werden. Dies sollte in der Praxis allerdings kein Problem darstellen, da die Bestimmungsgrenzen im Fall von Dihydrocodein bei 0.04 ng/mg bzw. 2 ng/Probe und für Methadon bei 0.008 ng/mg bzw. 4 ng/Probe Haar und damit weit unter den für MPU-Untersuchungen geforderten Bereich liegen.

4.7.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Werte für die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LLOQ), die im Rahmen der Methodvalidierung für Haarproben erhoben wurden, sind in der Tabelle 32 aufgelistet. Diese wurde mit einem Signifikanzlevel von 99 %, einer Ergebnisunsicherheit von 33 % und einer relativen Standardabweichung von < 20 % ermittelt. Die Nachweisgrenzen lagen im Bereich von 0.004 ng/Probe (Alfentanil) und 0.6 ng/Probe (O-Desmethyltramadol, Pholcodin, Tramadol). Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen musste das Signal-Rausch-Verhältnis von Target- und Qualifierionen mindestens 1:3 betragen. Bei O-Desmethyltramadol und Tramadol wurde die Nachweisgrenze nur über das Signal-Rausch-Verhältnis des Targetions bestimmt, da diese Analyten keine brauchbaren Produktionen nach der Fragmentierung im Quadrupol liefern (167).

Für die Bestimmungsgrenzen wurden Konzentrationen von 0.1 ng/Probe (Dihydromorphin) und 2.0 ng/Probe (Dihydrocodein, Ethylmorphin, Morphin-3-Glucuronid, Oxycodon, Pentazocin, Pholcodin, Piritramid und Tramadol) ermittelt.

Die Opioide und ihre Hauptstoffwechselprodukte konnten entsprechend ihrer zu erwartenden Konzentrationen in den Haarproben nachgewiesen werden (siehe LLOQ und LOD). Huang et al. bestimmten beispielweise die analytischen Grenzen durch Verdünnen von Realproben. Die Nachweisgrenze von Morphin, Codein und 6-Monoacetylmorphin lag bei 10 pg/mg und die Bestimmungsgrenze jeweils bei 50 pg/mg Haar (168). Legt man die

Einwaage von ungefähr 50 mg Haar, für die der forensischen Toxikologie Mainz ermittelten Grenzen zu Grunde, konnte die LOD und LLOQ von Huang et al. sogar noch herabgesetzt werden. Die Nachweisgrenze lag für 6-Monoacetylmorphin bei 0.6 pg/mg, für Codein und Morphin bei 4.0 pg/mg Haar. Für 6-Monoacetylmorphin wurde 4 pg/mg und für Codein bzw. Morphin 20 pg/mg Haar als Bestimmungsgrenze ermittelt.

Tabelle 32: Daten der Methodvalidierung für Haarproben.

Opioid	LOD	LLOQ	Richtigkeit (%)		Intraassay (%)		Interassay (%)		Wiederfindung (%)		Matrixeffekt (%)	
	[ng/Probe]	[ng/Probe]	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)	(niedrig)	(hoch)
6-MAM	0.03	0.2	-0.6	1.37	6.13	3.7	9.47	8.33	96.6	95.2	71.7	73.3
ALF	0.004	0.2	1.7	8.04	1.64	1.5	7.81	1.87	94.0	93.8	96.7	100.7
BNT	0.2	0.4	-1.7	-0.73	4.11	2.5	6.04	5.63	87.0	85.5	119.3	221.3
BUP	0.06	0.2	-0.2	-4.08	2.54	7.0	2.56	5.8	93.2	88.0	107.3	113.7
COD	0.2	1.0	0.9	-0.51	4.41	3.5	5.03	3.86	95.1	88.0	99.2	102.3
DES	0.03	0.2	0.0	-3.19	3.03	3.2	4.75	3.29	97.6	93.8	102.4	89.1
DMP	0.01	0.2	3.4	-1.3	1.16	1.0	6.46	7.62	98.2	93.8	92.7	122.6
DP	0.02	0.2	0.2	1.14	2.62	2.4	2.1	1.9	93.3	90.1	98.5	96.7
DH	0.01	2.0	-1.5	-0.2	4.08	3.2	4.15	3.0	91.3	86.8	101.8	100.1
DM	0.01	0.1	-0.6	1.64	2.79	1.9	6.14	3.01	99.3	94.4	98.9	100.3
EM	0.3	2.0	4.1	2.44	4.64	5.3	6.25	7.3	92.5	93.3	96.5	98.9
FEN	0.02	0.2	0.2	9.38	2.97	2.6	9.58	2.63	90.0	91.0	92.7	93.4
HC	0.04	0.4	-2.5	-1.84	2.71	3.4	2.3	4.44	114.1	91.0	87.7	90.2
HM	0.06	0.2	0.3	4.12	4.04	2.0	7.54	3.63	96.9	93.6	92.6	100.0
MEP	0.005	0.4	1.8	0.76	2.09	2.6	2.87	2.0	92.1	91.8	119.1	384.6
MET	0.3	0.4	-6.6	5.8	2.68	1.8	7.86	11.47	93.0	98.5	98.4	134.7
MOR	0.2	1.0	1.1	0.06	1.7	3.3	2.69	2.7	92.2	99.1	105.2	95.2
M3G	0.08	2.0	-0.1	1.65	3.73	4.8	4.3	4.4	75.8	74.4	44.7	20.1
M6G	0.08	0.2	2.6	2.17	3.25	2.2	7.34	5.95	73.5	81.0	82.2	54.8
NON	0.01	0.2	-0.7	2.47	1.22	2.0	7.32	3.37	95.8	86.1	99.6	93.2
NEL	0.02	1.0	5.7	2.41	4.3	3.9	5.74	5.05	93.2	90.4	87.8	95.7
NEN	0.03	0.2	1.3	2.53	7.21	3.3	9.68	4.7	92.2	95.6	66.6	77.4
NB	0.06	0.2	0.0	-4.37	3.79	6.3	5.03	5.9	89.4	90.5	118.8	113.3
NF	0.2	1.0	-1.2	-0.49	4.54	5.1	8.72	7.15	91.0	88.3	100.8	100.2
NM	0.2	0.4	1.5	1.47	3.04	3.2	3.04	3.0	86.0	92.4	103.2	123.6
NT	0.005	0.2	-0.9	4.11	2.72	5.4	8.12	4.1	92.8	92.5	122.0	409.6
ODT	0.6	1.0	1.4	0.27	2.08	1.8	2.96	2.21	96.2	92.8	100.3	103.8
OC	0.08	2.0	1.3	0.79	3.45	4.6	10.61	5.4	96.8	98.9	84.6	82.8
OM	0.02	0.2	1.9	-0.42	2.98	2.3	2.7	2.57	92.8	96.5	100.8	97.4
PEN	0.08	2.0	1.5	-4.15	1.99	4.5	6.01	7.31	92.8	94.9	99.2	101.2
PHO	0.6	2.0	-0.6	11.69	4.33	3.8	5.59	3.99	83.3	85.2	90.2	89.7
PIR	0.02	2.0	2.6	0.36	5.32	3.6	8.96	7.09	94.6	93.3	81.0	80.8
REM	0.02	0.2	0.0	-0.48	5.45	2.9	5.0	3.52	90.0	90.4	103.4	98.0
SUF	0.004	0.2	0.8	5.98	1.43	3.0	8.96	2.7	90.7	96.7	89.0	89.3
TRA	0.6	2.0	0.5	0.85	2.36	1.5	2.2	2.05	93.9	91.7	108.4	243.2

4.7.4 Präzision und Richtigkeit

Alle experimentell bestimmten Werte für die Richtigkeit, Wiederhol- und Laborpräzision sind in Tabelle 32 aufgeführt. Die Richtigkeit für das niedrige Kalibrationslevel lag dabei im Bereich von -6.6 % (Methadon) bis 5.7 % (Naltrexol) und der Bias für das hohe Kalibrationslevel im Bereich von -4.37 % (Norbuprenorphin) bis 11.69 % (Pholcodin). Die Wiederholpräzision lag für das Kalibrationslevel 2 von 1.16 % (Dextromethorphan) bis 7.21 % (Naltrexon) und für das Kalibrationslevel 6 von 1.0 % (Dextromethorphan) bis 7.0 % (Buprenorphin). Die Werte der Laborgenauigkeit lagen für das niedrige Kalibrationslevel im Bereich von 2.1 % (Dextrophan) bis 10.61 % (Oxycodon) und für das hohe Kalibrationslevel im Bereich von 1.87 % (Alfentanil) bis 11.47 % (Methadon). Damit entsprachen alle Werte den Anforderungen an die Validierung von Analysen der GTFCh. Grund hierfür sind sicherlich vor allem die guten und konstanten Wiederfindungsraten bei der Probenaufarbeitung.

4.7.5 Wiederfindung und Matrixeffekt

In Tabelle 32 finden sich die Daten aller 35 Opioiden zur Bestimmung der Wiederfindung und des Matrixeffekts. Im Fall der Validierung der Analysenmethode zur Untersuchung von Opioiden in Haaren wurden Leerhaare mit ISTD und Methanol versetzt, im Ultraschallbad behandelt, die methanolische Lösung abgenommen und eingedampft. Es handelt sich demnach nicht um eine Extraktion oder die Bestimmung der Wiederfindung im engeren Sinne. Vielmehr wird der Verlust an Kalibrator bei der Aufarbeitung, Adsorption an Plastikgefäße und die Stabilität unter Ultraschall bestimmt. Für den niedrigen Kalibrator wurden Wiederfindungsraten von 73.5 % (Morphin-6-Glucuronid) bis 114.1 % (Hydrocodon) bestimmt. Die Wiederfindung lag für den hohen Kalibrator im Bereich von 74.4 % (Morphin-3-Glucuronid) und 99.1 % (Morphin). Die GTFCh fordert eine Wiederfindungsrate von mindestens 50 % bei einer Standardabweichung von unter 25 %. Alle 35 Analyten erreichten diese Anforderungen. Die niedrigsten Werte zeigten die Hauptstoffwechselprodukte des Morphin Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid. Dies ist vielleicht durch die relativ hohe Polarität der Glucuronide und damit schlechteren Löslichkeit in dem Extraktionsmittel Methanol zu erklären. Im Gegensatz dazu lagen die Wiederfindungsraten der Opioiden aus Serum niedriger, da die einzelnen Substanzen mit Hilfe einer SPE aus der Matrix extrahiert werden mussten. Bei der Validierung der Methode zur Haaruntersuchung für Opioiden wurden Leerhaarproben lediglich mit Kalibrator gespickt, ultraschallt und analysiert.

Der Matrixeffekt für das Kalibrationslevel 2 lag zwischen 44.7 % (Morphin-3-Glucuronid) und 122.0 % (Nortilidin). Einzig 6-Monoacetylmorphin (71.7 %), Morphin-3-

Glucuronid (44.7 %) und Naltrexon (66.6 %) erfüllten die geforderten Werte der Leitlinien von 75 bis 125 % nicht. Für das Kalibrationslevel 6 lagen die Werte des Matrixeffekts im Bereich von 20.1 % (Morphin-3-Glucuronid) bis 409.6 % (Bisnortilidin). Neun (6-Monoacetylmorphin, Bisnortilidin, Meperidin, Methadon, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid, Normeperidin, Nortilidin, Tramadol) der insgesamt 35 Substanzen lagen unter- bzw. oberhalb der geforderten 75 – 125 % für den Matrixeffekt. Die Ionensuppression (Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid) und das zum Teil massive Ionenehancement (Bisnortilidin, Meperidin, Nortilidin und Tramadol) sind durch co-eluierende Substanzen bedingt, welche während der Probenvorbereitung nicht entfernt wurden (169, 170). Diese könnten endogen (Haarbestandteile wie Salze, Keratine) oder exogen (Verunreinigungen aus Geräten, Chemikalien oder Lösungen, wie Weichmacher aus verwendeten Kunststoffgefäßen) in die Untersuchungslösung gelangt sein. Der größere Matrixeffekt von Haar- gegenüber Serumproben ist zum einen durch die stärkere Matrixbelastung der Haare bedingt. Bei der Serumaufarbeitung werden die Proben durch eine Festphasenextraktion zum größten Teil von diesen endogenen Bestandteilen befreit. Außerdem erfolgt die Probenaufarbeitung beim Haar mit dem Extraktionsmittel Methanol, welches relativ leicht die Weichmacher aus den verwendeten Plastikgefäßen löst. Dies wird durch die Inkubation von 4 h bei 50 °C im Ultraschallbad noch begünstigt. Bei der Extraktion der Serumproben hingegen wurde anfangs nur mit wässrigen Lösungsmitteln gearbeitet. Diese lösen Weichmacher wesentlich schlechter aus den Kunststoffgefäßen. Bei späteren Extraktionsschritten mit apolaren Lösungsmitteln konnten Glasgefäße statt Plastikgefäße verwendet werden, welche keine Weichmacher, wie beispielsweise Diethylhexylphthalat enthalten (171, 172).

4.8 Haaruntersuchungen auf Opioiden im forensischen Untersuchungsmaterial

Haaruntersuchungen eignen sich, im Gegensatz zu Untersuchungen von Blut oder Urin, für den Nachweis längerfristiger Exposition von Arzneistoffen, Dopingstoffen und Alkohol. Diese Moleküle können je nach Haarlänge noch Monate oder Jahre nach erfolgter Exposition nachgewiesen werden. Menschliche Kopfhaare wachsen während der Anagenphase circa 1 cm pro Monat. Diese Phase dauert in etwa 3 – 6 Jahre. Danach kommt es für etwas 1 – 2 Wochen zu Umbauvorgängen im Haar, der Katagenphase. Im Anschluss daran befindet sich das Haar für etwa 2 – 4 Monate in der Ruhephase, der sogenannten Telogenphase. Der Großteil der menschlichen Kopfhaare (etwa 90 %) ist normalerweise in der Anagenphase. Damit sind die Applikation von Medikamenten und eine Drogenexposition potenziell

(abhängig von den Konsumgewohnheiten und Haarlänge) bis zu maximal 6 Jahre im Haar nachweisbar.

In der forensischen Toxikologie spielen Haaranalysen beispielsweise bei letalen Drogenintoxikationen zur Bewertung des Konsumverhaltens vor dem Tod eine Rolle. Bei Medizinisch-Psychologischen Untersuchungen (MPU), die eine Begutachtung der Fahreignung wegen Fahrens unter Drogeneinfluss beurteilen, wird eine negative Haarprobe für die Wiedererlangung des Führerscheins gefordert. Eine berufliche Eignung kann in einigen Ländern durch den negativen Nachweis einer Haaranalyse auf Drogen gefordert werden ("Workplace Drug Testing"). Im Rahmen von Drogenabstinenz- bzw. Substitutionsprogrammen wird der Erfolg der Therapie bzw. ein Rückfall belegt (173).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden zwei Realfälle auf Opioide in Haaren aus dem forensisch-toxikologischen Untersuchungsmaterial analysiert.

Bei dem ersten Fall (weiblich, 39 Jahre) wurden Kopfhaare im Rahmen einer MPU untersucht. Es konnten keine Opioide oder andere Drogen in den Haaren (6 cm Länge von der Kopfhaut gemessen) nachgewiesen werden. Damit war eine positive Abstinenz-Kontrolle für die letzten 6 Monate belegt.

Im zweiten Fall (männlich, 51 Jahre) wurden eine Blut-, Urin- und Haarprobe eines approbierten Arztes untersucht. Bei dem praktizierenden Mediziner (Arbeitsort: Krankenhaus) wurden starke psychische Auffälligkeiten festgestellt. Außerdem fehlten Ampullen des Analgetikums Dipidolor (Arzneistoff Piritramid) im Bestand des Krankenhauses. Bei dem Arzt war in der Vergangenheit ein Opiatmissbrauch bekannt. Vom Arbeitgeber wurde die Untersuchung der Proben in Auftrag gegeben, um eine fragliche Opiatabhängigkeit zu be- oder widerlegen und den Arzt gegebenenfalls zu suspendieren. Die Untersuchung der Blut- und Urinprobe auf Opioide war negativ und damit gab es keinen Anhalt für einen Opioidkonsum im nahen zeitlichen Zusammenhang mit der Probenentnahme. In den 3 cm langen Kopfhaaren konnten jedoch 18.9 ng/mg Piritramid und Spuren von Fentanyl nachgewiesen werden. Der positive Piritramid-Befund in den Haaren stand damit nicht im Widerspruch zu den negativen Befunden im Blut und Urin. Das Nachweisfenster ist bei Haaranalysen deutlich größer. In diesem Fall betrug es in etwa 3 Monate. Bis zum jetzigen Zeitpunkt finden sich in der Literatur keine Angaben zur Bestimmung von Piritramid in authentischen Haarproben. Laut Information des Klinikpersonals ist von einem längerfristigen, massivem, intravenösen Missbrauch von Piritramid auszugehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei einer Konzentration von ungefähr 20 ng/mg Haar Piritramid eher von einem häufig, nicht toxischen Gebrauch von Piritramid auszugehen ist.

4.9 Haaruntersuchungen auf Opiode von Patienten einer psychiatrischen Klinik

Mit Hilfe der validierten LC/MS Methode zum Nachweis von Opioiden in Haaren wurden Proben von Patienten einer psychiatrischen Klinik untersucht. Die Haarproben wurden als ein wesentlicher Aspekt der Dissertation von Dr. Siegfried Zörntlein akquiriert und mittels GC/MS auf psychotrope Substanzen analysiert (100). Diese Haare wurden von April 1998 bis Januar 2000 entnommen und seit dem unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 33 zeigt die Ergebnisse der GC/MS Untersuchung auf die Opiate 6-Monoacetylmorphin (0.04 – 8.27 ng/mg, 9 Fälle), Morphin (0.01 – 1.02 ng/mg, 11 Fälle), Codein (0.03 – 0.27 ng/mg, 9 Fälle), Dihydrocodein (0.08 – 1.51 ng/mg, 4 Fälle) und Methadon (0.93 und 1.2 ng/mg, 2 Fälle). Außerdem sind die Ergebnisse der LC/MS Messung vom September 2014 ebenfalls in dieser Tabelle dargestellt. Bei der flüssigchromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung konnten neben 6-Monoacteylmorphin (0.08 – 8.36 ng/mg, 9 Fälle), Morphin (0.01 – 1.71 ng/mg, 8 Fälle), Codein (0.12 – 0.26 ng/mg, 7 Fälle), Dihydrocodein (0.06 – 2.17 ng/mg, 6 Fälle) und Methadon (0.9 und 7.06 ng/mg, 2 Fälle) weitere Opiode wie Bisnortilidin (0.03 ng/mg, 1 Fall), Dihydromorphin (> 0.01 ng/mg, 3 Fälle), Dextromethorphan (> 0.01 ng/mg, 3 Fälle), Dextrorphan (in Spuren, 3 Fälle), Hydrocodon (in Spuren, 4 Fälle), Hydromorphon (in Spuren, 2 Fälle), Nortilidin (0.05 ng/mg, 1 Fall), O-Desmethyltramadol (0.03 – 0.09 ng/mg, 7 Fälle), Tramadol (0.07 – 4.06 ng/mg, 7 Fälle) und der Opiat-Antagonist Naloxon (in Spuren, 1 Fall) nachgewiesen werden.

Der wichtigste Vorteil der LC/MS Methode gegenüber der GC/MS Untersuchung lag dabei in der simultanen Bestimmung von 35 statt 5 Opioiden. Dadurch konnten zusätzliche Informationen über das frühere Konsumverhalten der Patienten erlangt werden. Abbildung 51 (c) veranschaulicht beispielsweise, dass in den Haaren von Patient Nr. 48 zusätzlich zu 6-Monoacteylmorphin, Codein, Methadon und Morphin auch Tramadol und O-Desmethyltramadol gefunden wurde. Tramadol (Fertigarzneimittel Tramal) unterliegt in Deutschland nicht dem Betäubungsmittelgesetz (174) und wird trotz der relativ geringen analgetischen Potenz wegen der leichten Verfügbarkeit und der möglichen intravenösen Applikation als Droge verwendet (175-177). In den Proben von Patient Nr. 17 und 41 konnten ferner noch Spuren von dem Antitussivum Dextromethorphan und seinem Metaboliten Dextrorphan nachgewiesen werden (siehe Abbildung 51 (b) und (c)). Neben der Anwendung gegen Reizhusten wird Dextromethorphan auf Grund seiner legalen, einfachen und kostengünstigen Verfügbarkeit (freiverkäuflich in öffentlichen Apotheken und Internetshops) als Rauschmittel von Drogenkonsumenten missbraucht (178). Es wurde in

der Vergangenheit aber auch zum Strecken von illegalem Straßenheroin benutzt (179) und könnte auch durch Konsum von Heroin in das Untersuchungsmaterial gelangt worden sein. Ein weiterer Vorteil der LC/MS Methode lag in der zusätzlichen Qualifizierung und Quantifizierung von Metaboliten. Dadurch können evtl. Rückschlüsse auf Dauer und Menge der konsumierten Drogen geschlossen werden. Durch den Nachweis von Stoffwechselprodukten lässt sich eine Körperpassage eigentlich erst eindeutig belegen. Drogen können beispielsweise auch extern, durch Verpacken von Drogen und passiv rauchen, in die Haare eingebaut werden.

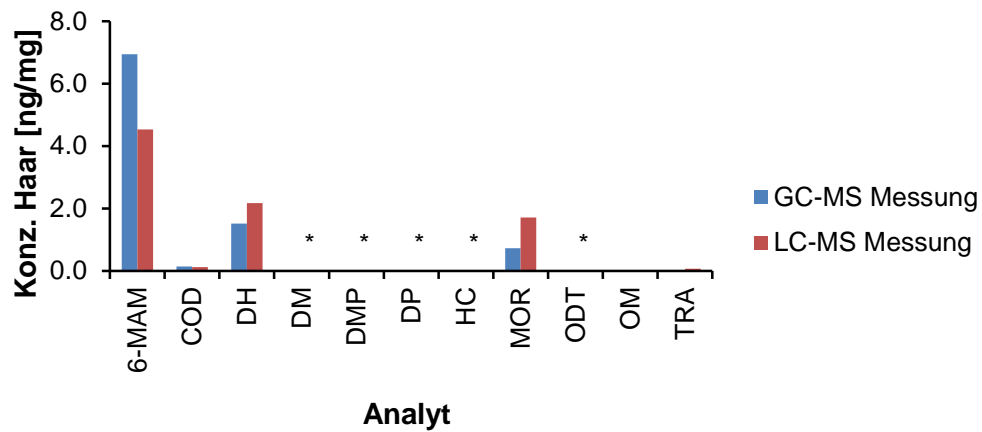
Im Allgemeinen waren die Ergebnisse der Untersuchung von GC/MS und LC/MS Bestimmungen relativ vergleichbar. Zum Beispiel wurden in den Haaren von Patient Nr. 41 Konzentrationen von 6-Monoacetylmorphin (GC: 8.27 ng/mg; LC: 8.36 ng/mg), Codein (GC: 0.27 ng/mg; LC: 0.26 ng/mg), Dihydrocodein (GC: 0.08 ng/mg; LC: 0.53 ng/mg) und Morphin (GC: 1.02 ng/mg; LC: 2.19 ng/mg) gemessen. Teilweise wurden bei der Bestimmung mittels LC/MS niedrigere Konzentrationen ermittelt. So wurde in der Probe von Patient Nr. 24 6-Monoacetylmorphin (GC: 0.31 ng/mg; LC: 0.08 ng/mg), Codein (GC: 0.03 ng/mg; LC: in Spuren), Dihydrocodein (GC: 1.08 ng/mg; LC: 0.48 ng/mg) und Morphin (GC: 0.05 ng/mg; LC: 0.01 ng/mg) nachgewiesen. Eine mögliche Ursache, für die zum Teil etwas verschiedenen ermittelten Konzentrationen der Opiate in den Haaren nach GC und LC Messungen, könnten Unterschiede in der Probenaufarbeitung sein. So wurde ursprünglich 50 – 100 mg Haarmaterial eingesetzt (LC/MS: 20 – 40 mg Haare). Außerdem wurden die Proben bei der GC/MS Methode nach der Behandlung im Ultraschallbad einer Festphasenextraktion unterzogen. Darüber hinaus lagerten die Proben über 15 Jahre am Institut für Rechtsmedizin und wurden erst dann mit Hilfe der LC/MS analysiert. Die Proben der Kopfhaare waren evtl. nicht vollständig homogen, sondern könnten zu unterschiedlichen Anteilen aus Haaren der Anagen-, Katagen- und Telogenphase bestanden und damit auch unterschiedliche Konzentrationen der Drogen enthalten haben.

Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid konnten in keiner Probe nachgewiesen werden, obwohl einige der Patienten vor ihrem Klinikaufenthalt regelmäßig Heroin konsumierten und auch 6-Monoacetylmorphin, Codein und Morphin in den Haaren gefunden wurde. Der Nachweis von Morphinglucuronide gelang bis jetzt nur im Haar von Ratten (149). Es wäre möglich, dass die Konzentration von dem eingebauten Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid im menschlichen Kopfhaar sehr gering ist und damit das hier vorgestellte Nachweisverfahren, zu wenig sensitiv war. Außerdem wäre eine zu schlechte Extraktionsausbeute der Glucuronide aus den Haaren durch die Verwendung von Methanol im Ultraschallbad denkbar. Im Fall des ähnlich polaren Alkoholmarkers Ethylglucuronid stellt die Extraktion mit Methanol und der Nachweis aus den Haaren jedoch kein Problem dar (180-182).

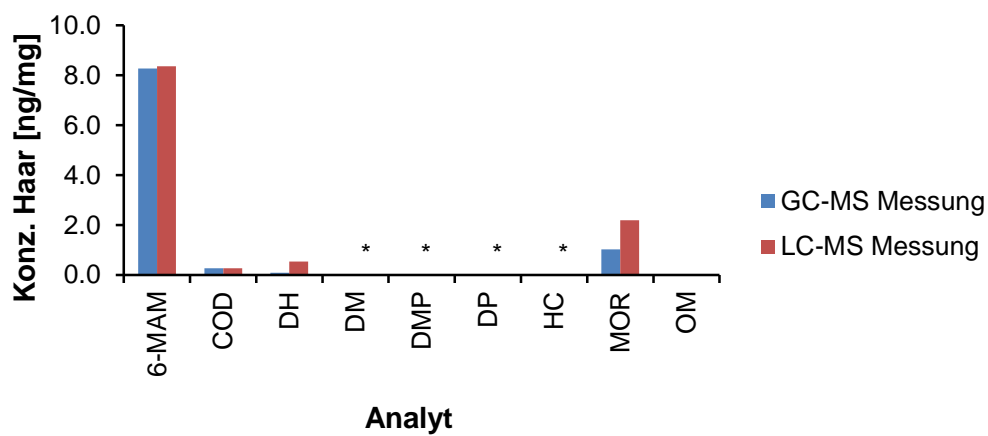
Tabelle 33: Vergleich der Analyseergebnisse der Patientenhaarproben auf Opioiden mittels GC MS und LC MS Messungen.

Nr.	Instrument	6-MAM	BNT	COD	DH	DM	DMP	DP	HC	HM	MET	MOR	NON	NT	ODT	OM	TRA
P 04	GC-MS [ng/mg]																
	LC-MS [ng/mg]														Spur		0,15
P 09	GC-MS [ng/mg]			0,13								0,13					
	LC-MS [ng/mg]																
P 17	GC-MS [ng/mg]	6,94		0,14	1,51							0,72					
	LC-MS [ng/mg]	4,53		0,12	2,17	Spur	Spur	Spur	Spur			1,71			Spur	0,005	0,07
P 18	GC-MS [ng/mg]				0,13												
	LC-MS [ng/mg]				0,06				Spur						0,04		3,08
P 23	GC-MS [ng/mg]										0,93						
	LC-MS [ng/mg]				2,10	0,01					7,06						
P 24	GC-MS [ng/mg]	0,31		0,03	1,08							0,05					
	LC-MS [ng/mg]	0,08		Spur	0,48				Spur			0,01					
P 40	GC-MS [ng/mg]			0,07								0,03					
	LC-MS [ng/mg]																
P 41	GC-MS [ng/mg]	8,27		0,27	0,08							1,02					
	LC-MS [ng/mg]	8,36		0,26	0,53	Spur	Spur	Spur	Spur			2,19				0,006	
P 43	GC-MS [ng/mg]	0,61		0,04								0,11					
	LC-MS [ng/mg]	0,31		Spur						Spur		0,09					
P 46	GC-MS [ng/mg]	0,30		0,08								0,03					
	LC-MS [ng/mg]	0,17	0,03	Spur								Spur	Spur	0,05	Spur		4,23
P 48	GC-MS [ng/mg]	0,34		0,05							1,20	0,14					
	LC-MS [ng/mg]	0,12		Spur						Spur	0,90	0,06			0,09		1,52
P 51	GC-MS [ng/mg]	0,86										0,04					
	LC-MS [ng/mg]	0,16		Spur	Spur		0,02	Spur				Spur			Spur		0,67
P 56	GC-MS [ng/mg]	0,08										0,01					
	LC-MS [ng/mg]	Spur										Spur					
P 60	GC-MS [ng/mg]			0,05								0,12					
	LC-MS [ng/mg]																
P 63	GC-MS [ng/mg]	0,04															
	LC-MS [ng/mg]	0,006													0,03		4,06

(a)



(b)



(c)

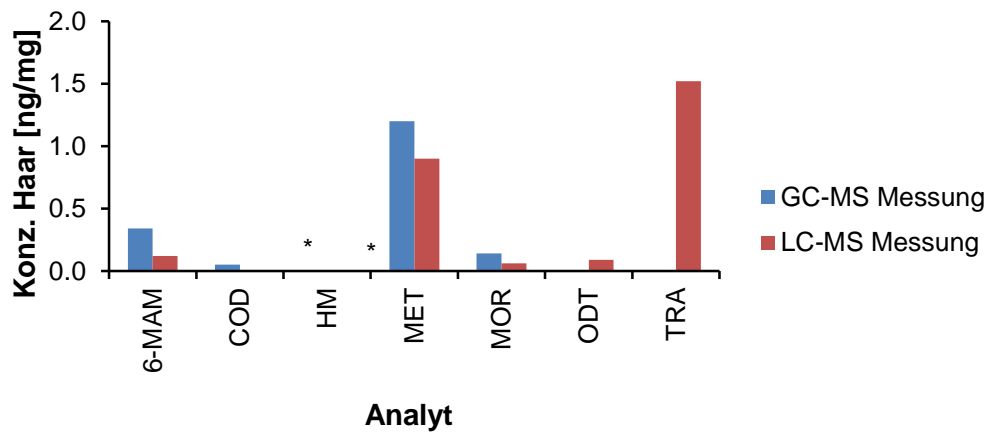


Abbildung 51: Vergleich der Untersuchungsergebnisse der GC/MS und LC/MS Haaranalyse am Beispiel von Patient Nummer 17 (a), 41 (b) und 48 (c). Mit Sternchen markierte Verbindungen konnten nur in Spuren nachgewiesen werden.

5 Ausblick

Die hochsensitive und spezifische LC-MS/MS Multi Analyt Methode zur simultanen Bestimmung von 35 Opioiden inklusive ihrer Metaboliten wurde für Serum- und Haarproben entwickelt und vollständig validiert. Damit die Screeningmethode auch in Zukunft die relevanten Opioide aus den Bereichen klinischer und forensischer Toxikologie, Intensiv- und Palliativmedizin abdeckt, sollte der Arzneimittel- und Drogenmarkt ständig beobachtet werden. Neu zugelassene Arzneistoffe, wie beispielsweise Tapentadol (Zulassung in Europa seit August 2010), könnten in die Screeningmethode integriert werden. Ebenfalls sollten neue, illegale Substanzen, die zunehmend an Bedeutung gewinnen, in den Assay aufgenommen werden. Desomorphin spielt zum Beispiel erst seit ca. 2002 in Russland und seit September 2013 in Amerika eine wichtige, verheerende Rolle unter den Rauschdrogen. Im Hinblick auf medizinisch-psychologische Untersuchungen zur Beurteilung der Fahreignung kann bei der Untersuchung von Urinen die Qualifizierung und Quantifizierung von weiteren Metaboliten von Bedeutung sein. Methadon wird im Körper zu 2-Ethyliden-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin (EDDP) und 2-Ethyl-5-Methyl-3,3-Diphenylpyrrolin (EMDP) verstoffwechselt (183-186). Diese beiden Metaboliten besitzen selbst keine pharmakologische Aktivität und werden im Blutplasma bei therapeutischer Dosierung auch nicht in signifikanten Konzentrationen gefunden. Im Rahmen von MPU Untersuchungen von Urin kann die Quantifizierung von EDDP (Bestimmungsgrenze für den Nachweis der Drogenabstinenz = 20 ng/ml in Urin) und EMDP jedoch wichtige Hinweise auf die Konsumgewohnheiten geben. Außerdem kann das Nachweisfenster, im Vergleich zur Bestimmung von Methadon allein, erweitert werden.

Seit Beginn des 21. Jahrhundert werden verstärkt neue psychoaktive Substanzen zumeist über das Internet aber auch in Headshops angeboten. Diese sogenannten "Legal Highs" oder "Research Chemicals" sind Drogen, die beispielsweise als Kräutermischungen, Lufterfrischer oder Badesalze angeboten werden. Sie unterliegen zumeist aber nicht dem Betäubungsmittelgesetz durch leichte Veränderung der Molekülstruktur von illegalen, bereits bekannten Drogen. Legal highs sind häufig synthetische Cannabinoide, Phenylethylamine, Cathinone, Benzodiazepine aber auch Opioide-Derivate (187-189). Sie können als Einzelsubstanzen konsumiert werden oder pflanzlichen Drogen beigemischt sein. Arndt et al. beschrieben die "Krypton herbal mixture", welche neben den Alkaloiden der Kratom Pflanze auch noch einen aktiven Metaboliten des Tramadols enthielt (190). Außerdem hat es zwischen 2013 und 2015 in Europa Todesfälle mit dem Opioid Ocfentanil gegeben, welches mehr als doppelt so stark wirksam wie Fentanyl ist (191, 192). Um mit dieser schnellen Entwicklung von neuen, zum Teil unbekanntem Substanzen schritthalten zu

können, sollte zusätzlich ein Quadrupol Time-of-Flight-Massenspektrometer (LC QTOF-MS) eingesetzt werden. Die Time-of-Flight-Massenspektrometrie ermöglicht hochgenaue Bestimmungen des Molekulargewichts (Feinmassenbestimmung). Dieses modifizierte Messprinzip ermöglicht auf Grund des Molekulargewichts und der Informationen der Fragmentationen eine Aufklärung von unbekanntem Strukturen und somit die Identifizierung neuer Substanzen. Vorteilhaft ist, dass keine analytischen Vergleichssubstanzen benötigt werden, welche bei neuen psychoaktiven Drogen häufig noch gar nicht käuflich zu erwerben sind. Außerdem könnte mit Hilfe des LC-QTFO Analysengeräts eine Spektren-Bibliothek zur Erfassung von Opioidrezeptoragonisten und –Antagonisten und vor allem auch ihren Metaboliten erstellt werden. Dabei sollen neben alt bekannten illegalen Drogen (Heroin, Morphin usw.), Substitutionsmitteln (Methadon, Buprenorphin, Dihydrocodein) und Arzneistoffen (Morphin, Fentanyl, Oxymorphon, Tilidin, Tramadol etc.) auch neue legale und illegale Substanzen mit aufgenommen werden.

Als "Therapeutic Drug Monitoring" (TDM) wird die Beurteilung des Blutspiegels von Arzneistoffen im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild (Diagnose, Schwere der Erkrankung), der Begleitmedikation, bisheriger Therapieerfolg, unerwünschte Nebenwirkungen und die daraus resultierende Empfehlung für die weitere Behandlung bezeichnet. Die entwickelte Opioid-Screening-Methode könnte als therapiebegleitendes Konzept auf Patientenblutproben der Klinik für Anästhesiologie, wie auch der Interdisziplinären Einrichtung für Palliativmedizin angewendet werden. Drei interessante Fragestellungen ergeben sich bei Patienten im Bereich der Anästhesiologie und der Palliativmedizin.

Opioid-gewöhnte Patienten, die präoperativ die Grenzdosierung überschreiten, müssen bei bestimmten Eingriffen perioperativ auf ein anderes Opioid und ggf. eine andere Applikationsform umgestellt werden (193-196). In der perioperativen Phase sind die üblichen Applikationswege (oral, transdermal) bezüglich der Resorption nicht kalkulierbar, ebenso spielen die Körpertemperaturdifferenz und Blut- und Flüssigkeitsverluste eine Rolle in der Steuerbarkeit dieser Substanzen. Daher erfolgt eine perioperative Umstellung auf eine parenterale Applikationsform. Postoperativ, nach Erreichen der Homöostase, wird auf die ursprüngliche (z.B. orale Applikationsform) eingestellt. Die Berechnung der Morphinäquivalente erfolgt hier nur näherungsweise anhand von Empfehlungen.

Eine weitere Fragestellung bezieht sich auf die Patientenpopulation, die perioperativ ein rückenmarknahes Verfahren erhalten (Periduralkatheter). Hier wird neben Lokalanästhetika auch peridural ein Opioid (Fentanyl) verabreicht, um eine lokale Schmerzreduktion zu erreichen. Vorstellung ist hierbei die regionale Bindung an den μ -Rezeptor auf spinaler Ebene. Ziel dieses Verfahrens ist eine lokale Schmerzreduktion zu erreichen, jedoch ist

davon auszugehen, dass ebenfalls eine Resorption des Opioids stattfindet und damit auch eine systemische Wirkung anzunehmen ist. Die Bestimmung des Blutspiegels mit dieser sensitiven Methodik könnte das klären.

Eine dritte klinische Fragestellung ergibt sich im klinischen Alltag in der Behandlung von Tumorschmerzen. In der Behandlung von Tumorpatienten kann es, trotz Dosisanpassung, zu einer nicht ausreichenden Schmerzreduktion durch Opiode kommen. Ebenfalls treten immer wieder starke, nicht tolerierbare Nebenwirkungen auf. In einem solchen Fall ist der Wechsel des Opioids indiziert. Ein Wechsel auf einen anderen μ -Liganden zeigt häufig eine verbesserte Schmerzreduktion mit Verringerung der Nebenwirkungen. Pathophysiologische Grundlage ist die hohe individuelle Variabilität gegenüber verschiedenen μ -Agonisten und das Phänomen der inkompletten Kreuztoleranz gegenüber analgetischen und nicht analgetischen Opioideffekten. Besteht dabei ein Problem mit der oralen Verfügbarkeit, ein Resorptionsproblem bzw. ein veränderter Metabolismus? Viele Ko-Medikationen haben einen Einfluss auf die opioid-abbauende Enzyme, sogenannte CYP450 Interaktionen (197-200). Auch die Einstellung von Patienten, welche verschiedene Opiode in unterschiedlichen Applikationsformen erhalten, ist nicht immer einfach.

In all diesen besonderen medizinischen Fällen kann ein TDM helfen die Schmerztherapie der Patienten mit Opioiden zu verbessern.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. The levels of use of opioids, amphetamines and cocaine and associated levels of harm: summary of scientific evidence [press release]. Luxembourg: Publications Office of the European Union 2014.
2. Europäischer Drogenbericht 2013.
3. Polizeiliche Kriminalstatistik 2013.
4. Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungsreport 2013. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2013.
5. E. Graf, R. Prauß. Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte. Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht.
6. Casati A, Sedefov R, Pfeiffer-Gerschel T. Misuse of medicines in the European Union: a systematic review of the literature. European addiction research. 2012;18(5):228-45.
7. Apelt SM, Scherbaum N, Golz J, Backmund M, Soyka M. Safety, effectiveness and tolerance of buprenorphine-naloxone in the treatment of opioid dependence: results from a nationwide non-interventional study in routine care. Pharmacopsychiatry. 2013;46(3):94-107.
8. Eckart K., Röhrich J., Kaufmann T., Zörntlein S., Urban R., editors. Prävalenz psychostimulierender Drogen vom Amphetamin-Typ in Rheinland-Pfalz im Zeitraum 2003 - 2014. 44 Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner und 23 Jahrestagung Region Süd; 2014; Basel, Schweiz.
9. Lilleng PK, Mehlum LI, Bachs L, Morild I. Deaths after intravenous misuse of transdermal fentanyl. Journal of forensic sciences. 2004;49(6):1364-6.
10. Tharp AM, Winecker RE, Winston DC. Fatal intravenous fentanyl abuse: four cases involving extraction of fentanyl from transdermal patches. The American journal of forensic medicine and pathology. 2004;25(2):178-81.
11. Woodall KL, Martin TL, McLellan BA. Oral abuse of fentanyl patches (Duragesic): seven case reports. Journal of forensic sciences. 2008;53(1):222-5.
12. Fischer M, Reimer J, Schafer I, Haasen C. [Status quo of opioid agonist maintenance therapy in Germany]. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz. 2010;53(4):332-9.
13. Wittchen H-U, Bühringer G, Rehm J. Ergebnisse und Schlussfolgerungen der PREMOS-Studie Suchtmedizin. 2011;15(5).

14. Gostomzyk JG, Heller W-D. Verschreibung von Betäubungsmitteln zur Schmerztherapie und zur Substitution durch niedergelassene Ärzte. *Der Schmerz*. 1996;10:292-8.
15. Grund JP, Latypov A, Harris M. Breaking worse: the emergence of krokodil and excessive injuries among people who inject drugs in Eurasia. *The International journal on drug policy*. 2013;24(4):265-74.
16. Smith HS. Opioid metabolism. *Mayo Clinic proceedings*. 2009;84(7):613-24.
17. Kosten T, Poling J, Oliveto A. Effects of reducing contingency management values on heroin and cocaine use for buprenorphine- and desipramine-treated patients. *Addiction (Abingdon, England)*. 2003;98(5):665-71.
18. Cone EJ, Gorodetzky CW, Yousefnejad D, Buchwald WF, Johnson RE. The metabolism and excretion of buprenorphine in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1984;12(5):577-81.
19. Amass L, Ling W, Freese TE, Reiber C, Annon JJ, Cohen AJ, et al. Bringing buprenorphine-naloxone detoxification to community treatment providers: the NIDA Clinical Trials Network field experience. *The American journal on addictions / American Academy of Psychiatrists in Alcoholism and Addictions*. 2004;13 Suppl 1:S42-66.
20. Johnson RE, Strain EC, Amass L. Buprenorphine: how to use it right. *Drug and alcohol dependence*. 2003;70(2 Suppl):S59-77.
21. Gahr M, Freudenmann RW, Hiemke C, Gunst IM, Connemann BJ, Schonfeldt-Lecuona C. "Krokodil": revival of an old drug with new problems. *Substance use & misuse*. 2012;47(7):861-3.
22. Zheluk A, Quinn C. Internet search and krokodil in the Russian Federation: an infoveillance study. 2014;16(9):e212.
23. Alves EA, Grund JP, Afonso CM, Netto AD, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ. The harmful chemistry behind krokodil (desomorphine) synthesis and mechanisms of toxicity. *Forensic science international*. 2015;249:207-13.
24. Thekkemuriyi DV, John SG, Pillai U. 'Krokodil'--a designer drug from across the Atlantic, with serious consequences. *The American journal of medicine*. 2014;127(3):e1-2.
25. East T, Dye D. Determination of dextromethorphan and metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography*. 1985;338(1):99-112.
26. Ryu JY, Song IS, Sunwoo YE, Shon JH, Liu KH, Cha IJ, et al. Development of the "Inje cocktail" for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2007;82(5):531-40.

27. Schwartz RH. Adolescent abuse of dextromethorphan. *Clinical pediatrics*. 2005;44(7):565-8.
28. Price LH, Lebel J. Dextromethorphan-induced psychosis. *The American journal of psychiatry*. 2000;157(2):304.
29. Nakamura GR, Thornton JI, Noguchi TT. Kinetics of heroin deacetylation in aqueous alkaline solution and in human serum and whole blood. *Journal of chromatography*. 1975;110(1):81-9.
30. Europäischer Drogenbericht [press release]. 2014.
31. Schmidt H, Vormfelde SV, Walchner-Bonjean M, Klinder K, Freudenthaler S, Gleiter CH, et al. The role of active metabolites in dihydrocodeine effects. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;41(3):95-106.
32. Smabrekke L, Melbye H. [Pharmacological treatment of acute cough]. *Tidsskrift for Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2009;129(10):998-9.
33. Henderson GL. Designer drugs: past history and future prospects. *Journal of forensic sciences*. 1988;33(2):569-75.
34. Hess R, Stiebler G, Herz A. Pharmacokinetics of fentanyl in man and the rabbit. *European journal of clinical pharmacology*. 1972;4(3):137-41.
35. Cone EJ, Darwin WD. Simultaneous determination of hydromorphone, hydrocodone and their 6alpha- and 6beta-hydroxy metabolites in urine using selected ion recording with methane chemical ionization. *Biomedical mass spectrometry*. 1978;5(4):291.
36. Cone EJ, Darwin WD, Gorodetzky CW, Tan T. Comparative metabolism of hydrocodone in man, rat, guinea pig, rabbit, and dog. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1978;6(4):488-93.
37. Smith GD, Smith MT. Morphine-3-glucuronide: evidence to support its putative role in the development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine in the rat. *Pain*. 1995;62(1):51-60.
38. Smith GD, Smith MT. The excitatory behavioral and antianalgesic pharmacology of normorphine-3-glucuronide after intracerebroventricular administration to rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998;285(3):1157-62.
39. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science (New York, NY)*. 1965;150(3699):971-9.
40. Hanks GW, Hoskin PJ, Aherne GW, Turner P, Poulain P. Explanation for potency of repeated oral doses of morphine? *Lancet*. 1987;2(8561):723-5.
41. Osborne RJ, Joel SP, Slevin ML. Morphine intoxication in renal failure: the role of morphine-6-glucuronide. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1986;292(6535):1548-9.

42. Magnan J, Paterson SJ, Tavani A, Kosterlitz HW. The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist and antagonist properties. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1982;319(3):197-205.
43. Freye E. *Opioid Agonists, Antagonists and Mixed Narcotic Analgesic*. Theoretical background and considerations for practical use. Berlin Heidelberg New York Tokio: Springer; 1987.
44. Stoner SA, Arenella PB, Hendershot CS. Randomized controlled trial of a mobile phone intervention for improving adherence to naltrexone for alcohol use disorders. *PloS one*. 2015;10(4):e0124613.
45. Wang AL, Elman I, Lowen SB, Blady SJ, Lynch KG, Hyatt JM, et al. Neural correlates of adherence to extended-release naltrexone pharmacotherapy in heroin dependence. *Translational psychiatry*. 2015;5:e531.
46. Wall ME, Brine DR, Perez-Reyes M. The metabolism of naltrexone in man. *NIDA research monograph*. 1981;28:105-31.
47. Davidson AF, Emm TA, Pieniaszek HJ, Jr. Determination of naltrexone and its major metabolite, 6-beta-naltrexol, in human plasma using liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1996;14(12):1717-25.
48. Huang W, Moody DE, Foltz RL, Walsh SL. Determination of naltrexone and 6-beta-naltrexol in plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*. 1997;21(4):252-7.
49. Lalovic B, Kharasch E, Hoffer C, Risler L, Liu-Chen LY, Shen DD. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral oxycodone in healthy human subjects: role of circulating active metabolites. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006;79(5):461-79.
50. Wood PL. Multiple opiate receptors: support for unique mu, delta and kappa sites. *Neuropharmacology*. 1982;21(6):487-97.
51. Armstrong PJ, Bersten A. Normeperidine toxicity. *Anesthesia and analgesia*. 1986;65(5):536-8.
52. Geller RJ. Meperidine in patient-controlled analgesia: a near-fatal mishap. *Anesthesia and analgesia*. 1993;76(3):655-7.
53. McHugh GJ. Norpethidine accumulation and generalized seizure during pethidine patient-controlled analgesia. *Anaesthesia and intensive care*. 1999;27(3):289-91.
54. Hermann D, Marton D, Donn H. Pharmacokinetic comparison of Gl87084B, a novel ultra-short acting opioid, and alfentanil. *Anesthesiology* 1991;75(A 379).

55. Daniels S, Casson E, Stegmann JU, Oh C, Okamoto A, Rauschkolb C, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study of the relative efficacy and tolerability of tapentadol IR and oxycodone IR for acute pain. *Current medical research and opinion*. 2009;25(6):1551-61.
56. Daniels SE, Upmalis D, Okamoto A, Lange C, Haeussler J. A randomized, double-blind, phase III study comparing multiple doses of tapentadol IR, oxycodone IR, and placebo for postoperative (bunionectomy) pain. *Current medical research and opinion*. 2009;25(3):765-76.
57. Hartrick C, Van Hove I, Stegmann JU, Oh C, Upmalis D. Efficacy and tolerability of tapentadol immediate release and oxycodone HCl immediate release in patients awaiting primary joint replacement surgery for end-stage joint disease: a 10-day, phase III, randomized, double-blind, active- and placebo-controlled study. *Clinical therapeutics*. 2009;31(2):260-71.
58. Vollmer KO, Poisson A. [On the metabolism of ethyl-DL-trans-2-dimethylamino-1-phenyl-cyclohex-3-ene-trans-1-carboxylate-hydrochloride (Tilidine-HCl). 2nd Communication: Studies with ¹⁴C-labelled substance on rats and dogs]. *Arzneimittel-Forschung*. 1976;26(10):1827-36.
59. Lintz W, Erlacin S, Frankus E, Uragg H. [Biotransformation of tramadol in man and animal (author's transl)]. *Arzneimittel-Forschung*. 1981;31(11):1932-43.
60. Hennies HH, Friderichs E, Schneider J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. *Arzneimittel-Forschung*. 1988;38(7):877-80.
61. Dertinger, Gänshirt, Steinigen. *GAP Praxisgerechtes Arbeiten in pharmazeutisch-analytischen Laboratorien*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1984.
62. H. Bosshardt, F. Schorderet, H. Feltkamp, P. Fuchs, Sucker H. *Pharmazeutische Kontrolle*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1983.
63. F. T. Peters MH, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Mußhoff. Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anforderung an die Validierung von Analysemethoden. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, Arbeitskreis Qualitätssicherung. 2009.
64. Kromidas S. *Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 1999.
65. M. Funk, V. Dammann, Donnevert G. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1992.

66. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine*. 2007;33(4):606-18.
67. Mandelbaum T, Scott DJ, Lee J, Mark RG, Malhotra A, Waikar SS, et al. Outcome of critically ill patients with acute kidney injury using the Acute Kidney Injury Network criteria. *Critical care medicine*. 2011;39(12):2659-64.
68. U. Kuhlmann, D. Walb, J. Böhler, Luft F. *Nephrologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008.
69. Conger JD, Robinette JB, Schrier RW. Smooth muscle calcium and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular responses of acute renal failure. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82(2):532-7.
70. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, , and therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(1):5-14.
71. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, et al. External validation of severity scoring systems for acute renal failure using a multinational database. *Critical care medicine*. 2005;33(9):1961-7.
72. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama*. 2005;294(7):813-8.
73. Kindgen-Milles D. Akutes Nierenersatzverfahren - Die Behandlung des akuten Nierenersatzversagens mit kontinuierlichen Nierenersatzverfahren http://www.fmc-austria.at/files/Therapiebrochuere_Akutes_Nierenversagen.pdf: Fresenius Medical Care; [14.08.2015].
74. McMillin GA, Davis R, Carlisle H, Clark C, Marin SJ, Moody DE. Patterns of free (unconjugated) buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*. 2012;36(2):81-7.
75. Said R, Pohanka A, Andersson M, Beck O, Abdel-Rehim M. Determination of remifentanil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing micro extraction in packed syringe (MEPS) as sample preparation. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2011;879(11-12):815-8.
76. Hegstad S, Khiabani HZ, Oiestad EL, Berg T, Christophersen AS. Rapid quantification of buprenorphine-glucuronide and norbuprenorphine-glucuronide in human urine by LC-MS-MS. *Journal of analytical toxicology*. 2007;31(4):214-9.
77. Murphy CM, Huestis MA. LC-ESI-MS/MS analysis for the quantification of morphine, codeine, morphine-3-beta-D-glucuronide, morphine-6-beta-D-glucuronide, and

- codeine-6-beta-D-glucuronide in human urine. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2005;40(11):1412-6.
78. Kronstrand R, Selden TG, Josefsson M. Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*. 2003;27(7):464-70.
 79. Al-Asmari A, Anderson RA, Kidd S, Thomson AH. Method for the quantification of diamorphine and its metabolites in pediatric plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*. 2010;34(4):177-95.
 80. Kacinko SL, Concheiro-Guisan M, Shakleya DM, Huestis MA. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, and metabolites in human urine. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2008;392(5):903-11.
 81. Cooreman S, Deprez C, Martens F, Van Bocxlaer J, Croes K. A comprehensive LC-MS-based quantitative analysis of fentanyl-like drugs in plasma and urine. *Journal of separation science*. 2010;33(17-18):2654-62.
 82. Brunen S, Kruger R, Finger S, Korf F, Kiefer F, Wiedemann K, et al. Determination of naltrexone and 6beta-naltrexol in human blood: comparison of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and tandem-mass-spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;396(3):1249-57.
 83. Musshoff F, Trafkowski J, Kuepper U, Madea B. An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2006;41(5):633-40.
 84. Marin SJ, Hughes JM, Lawlor BG, Clark CJ, McMillin GA. Rapid screening for 67 drugs and metabolites in serum or plasma by accurate-mass LC-TOF-MS. *Journal of analytical toxicology*. 2012;36(7):477-86.
 85. Dickerson JA, Laha TJ, Pagano MB, O'Donnell BR, Hoofnagle AN. Improved detection of opioid use in chronic pain patients through monitoring of opioid glucuronides in urine. *Journal of analytical toxicology*. 2012;36(8):541-7.
 86. Langman LJ, Korman E, Stauble ME, Boswell MV, Baumgartner RN, Jortani SA. Therapeutic monitoring of opioids: a sensitive LC-MS/MS method for quantitation of several opioids including hydrocodone and its metabolites. *Therapeutic drug monitoring*. 2013;35(3):352-9.
 87. Gergov M, Nokua P, Vuori E, Ojanpera I. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic science international*. 2009;186(1-3):36-43.

88. Welzen M, Uges D. TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances. 2004.
89. Rohrich J, Zorntlein S, Becker J. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying ImmunElute columns. *Forensic science international*. 2000;107(1-3):181-90.
90. Rohrich J, Zorntlein S, Becker J, Urban R. Detection of Delta9-tetrahydrocannabinol and amphetamine-type stimulants in oral fluid using the Rapid Stat point-of-collection drug-testing device. *Journal of analytical toxicology*. 2010;34(3):155-61.
91. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic science international*. 2007;165(2-3):216-24.
92. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accreditation and Quality Assurance*. 2002;7(11):441-9.
93. Schmitt G, Herbold M, Peters F. Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor: Auswertung von Validierungsdaten nach den Richtlinien der GTFCh mit VALISTAT: Arvecon GmbH; 2003.
94. F. Mußhoff BGS, F. Pragst, H. Sachs, D. Thieme. Anhang C zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, Arbeitskreis Qualitätssicherung. 2009.
95. Pfister D, Siegemund M, Dell-Kuster S, Smielewski P, Ruegg S, Strebel SP, et al. Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium. *Critical care (London, England)*. 2008;12(3):R63.
96. Plaschke K, von Haken R, Scholz M, Engelhardt R, Brobeil A, Martin E, et al. Comparison of the confusion assessment method for the intensive care unit (CAM-ICU) with the Intensive Care Delirium Screening Checklist (ICDSC) for delirium in critical care patients gives high agreement rate(s). *Intensive care medicine*. 2008;34(3):431-6.
97. E. W. Confusion Assessment Method für die Intensive Care Unit 2002 [cited 26.03.2015]. Available from: <http://marylandccproject.org/core-content/pain-agitation-and-delirium/>.
98. Payen JF, Bru O, Bosson JL, Lagrasta A, Novel E, Deschaux I, et al. Assessing pain in critically ill sedated patients by using a behavioral pain scale. *Critical care medicine*. 2001;29(12):2258-63.
99. H.-B. H. Delir und postoperative kognitive Dysfunktion (POCD) 2010 [cited 26.03.2015]. Available from: <http://www.management->

[krankenhaus.de/topstories/medizintechnik/delir-und-postoperative-kognitive-dysfunktion-pocd](http://www.krankenhaus.de/topstories/medizintechnik/delir-und-postoperative-kognitive-dysfunktion-pocd).

100. S. Z. Forensisch - toxikologische Untersuchungen menschlicher Haare und Körperflüssigkeiten auf psychotrope Substanzen unter besonderer Berücksichtigung halluzinogener Drogen: Universität Koblenz-Landau; 2002.
101. Rohrich J, Schimmel I, Zornlein S, Becker J, Drobnik S, Kaufmann T, et al. Concentrations of delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxytetrahydrocannabinol in blood and urine after passive exposure to Cannabis smoke in a coffee shop. *Journal of analytical toxicology*. 2010;34(4):196-203.
102. Sproll C, Perz RC, Lachenmeier DW. Optimized LC/MS/MS analysis of morphine and codeine in poppy seed and evaluation of their fate during food processing as a basis for risk analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(15):5292-8.
103. Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Rapid Resolution Threaded Column [press release]. 2008.
104. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 1997;689(1):175-80.
105. Dadgar D, Burnett PE. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1995;14(1-2):23-31.
106. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1995;13(2):89-97.
107. Hartmann C, Massart DL, McDowall RD. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1994;12(11):1337-43.
108. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1998;17(2):193-218.
109. Yun HY, Bang SC, Lee KC, Baek IH, Lee SP, Kang W, et al. Simultaneous analysis of naltrexone and its major metabolite, 6-beta-naltrexol, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a parent-metabolite kinetic model in humans. *Talanta*. 2007;71(4):1553-9.
110. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical care (London, England)*. 2012;16(4):R136.
111. Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS system [press release]. 2012.

112. Ismaiel OA, Halquist MS, Elmamly MY, Shalaby A, Thomas Karnes H. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2008;875(2):333-43.
113. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14(11):1290-4.
114. Patel D. Matrix Effect in a view of LC-MS/MS: an overview. *International Journal of Phrama and Bio Sciences*. 2011;2(1):559-64.
115. Hillewaert V, Pusecker K, Sips L, Verhaeghe T, de Vries R, Langhans M, et al. Determination of tapentadol and tapentadol-O-glucuronide in human serum samples by UPLC-MS/MS. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2015;981-982:40-7.
116. Straßenverkehrsgesetz § 24 a <https://dejure.org/gesetze/StVG/24a.html>: dejure.org; 2014 [12.05.2015].
117. Strafgesetzbuch, § 315c Gefährdung des Straßenverkehrs <http://dejure.org/gesetze/StGB/315c.html>: dejure.org; [12.05.2015].
118. Strafgesetzbuch § 316 <http://dejure.org/gesetze/StGB/316.html>: dejure.org; [12.05.2015].
119. Strafgesetzbuch § 242 Diebstahl <http://dejure.org/gesetze/StGB/242.html>: dejure.org; [12.05.2015].
120. Hernandez AF, Montero MN, Pla A, Villanueva E. Fatal moclobemide overdose or death caused by serotonin syndrome? *Journal of forensic sciences*. 1995;40(1):128-30.
121. Koren G, Butt W, Pape K, Chinyanga H. Morphine-induced seizures in newborn infants. *Veterinary and human toxicology*. 1985;27(6):519-20.
122. Osborne R, Joel S, Slevin M. Morphine intoxication in renal failure; the role of morphine-6-glucuronide. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1986;293(6554):1101.
123. Tjaderborn M, Jonsson AK, Hagg S, Ahlner J. Fatal unintentional intoxications with tramadol during 1995-2005. *Forensic science international*. 2007;173(2-3):107-11.
124. Antoniou T, Juurlink DN. Dextromethorphan abuse. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2014;186(16):E631.
125. Ahmed G, Saleem MD, Naim H. How many deaths before we put cough syrups behind the counter? *Perspectives in public health*. 2014;134(6):309.

126. Alam LY, Nelson A, Bastiampillai T. Cough syrup psychosis: Is it under-recognised? *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. 2013;47(12):1209-10.
127. Bortolotti F, Bertaso A, Gottardo R, Musile G, Tagliaro F. Dextromethorphan/levomethorphan issues in a case of opiate overdose. *Drug testing and analysis*. 2013;5(9-10):781-4.
128. Muller S, Jaffan L, Kloiber E, Laer S. [Dextromethorphan abuse in adolescents: what can the pharmacists do?]. *Medizinische Monatsschrift fur Pharmazeuten*. 2014;37(3):95-100.
129. Gjerde H, Normann PT, Christophersen AS, Samuelsen SO, Morland J. Alcohol, psychoactive drugs and fatal road traffic accidents in Norway: a case-control study. *Accident; analysis and prevention*. 2011;43(3):1197-203.
130. Legrand SA, Isalberti C, der Linden TV, Bernhoft IM, Hels T, Simonsen KW, et al. Alcohol and drugs in seriously injured drivers in six European countries. *Drug testing and analysis*. 2013;5(3):156-65.
131. Ferslew KE, Hagardorn AN, McCormick WF. Postmortem determination of the biological distribution of sufentanil and midazolam after an acute intoxication. *Journal of forensic sciences*. 1989;34(1):249-57.
132. Kemp W, Schlueter S, Smalley E. Death due to apparent intravenous injection of tapentadol. *Journal of forensic sciences*. 2013;58(1):288-91.
133. Anderson D. New drug: tapentadol, *ToxTalk* 34 (3) Nucynta. 2010.
134. Bevalot F, Bottinelli C, Cartiser N, Fanton L, Guitton J. Quantification of five compounds with heterogeneous physicochemical properties (morphine, 6-monoacetylmorphine, cyamemazine, meprobamate and caffeine) in 11 fluids and tissues, using automated solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*. 2014;38(5):256-64.
135. Jones JM, Raleigh MD, Pentel PR, Harmon TM, Keyler DE, Remmel RP, et al. Stability of heroin, 6-monoacetylmorphine, and morphine in biological samples and validation of an LC-MS assay for delayed analyses of pharmacokinetic samples in rats. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013;74:291-7.
136. Koster RA, Vereecke HE, Greijdanus B, Touw DJ, Struys MM, Alffenaar JW. Analysis of remifentanil with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and an extensive stability investigation in EDTA whole blood and acidified EDTA plasma. *Anesthesia and analgesia*. 2015;120(6):1235-41.
137. Peters FT. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical and forensic toxicology? *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007;388(7):1505-19.

138. Selinger K, Lanzo C, Sekut A. Determination of remifentanil in human and dog blood by HPLC with UV detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1994;12(2):243-8.
139. Sorensen LK, Hasselstrom JB. Simultaneous determination of propofol and its glucuronide in whole blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the influence of sample storage conditions on the reliability of the test results. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;109:158-63.
140. Koch. *Anästhesiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
141. Wappler F. Das Propofol-Infusionssyndrom. *Deutsches Ärzteblatt*. 2006;103(11):A 705-10.
142. Zwingenberger S, Pietsch J, Hommola A, Dressler J. Illegal drug-related deaths in East Germany between 1995 and 2004. *Forensic science international*. 2010;199(1-3):58-62.
143. Logan BK, Goldfogel G, Hamilton R, Kuhlman J. Five deaths resulting from abuse of dextromethorphan sold over the internet. *Journal of analytical toxicology*. 2009;33(2):99-103.
144. Tilidin <http://flexikon.doccheck.com/de/Tilidin>: DocCheck Flexikon; [29.05.2015].
145. Peat MA, Sengupta A. Toxicological investigations of cases of death involving codeine and dihydrocodeine. *Forensic science*. 1977;9(1):21-32.
146. Poetzsch M, Baumgartner MR, Steuer AE, Kraemer T. Segmental hair analysis for differentiation of tilidine intake from external contamination using LC-ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS imaging. *Drug testing and analysis*. 2015;7(2):143-9.
147. Musshoff F, Lachenmeier K, Trafkowski J, Madea B, Nauck F, Stamer U. Determination of opioid analgesics in hair samples using liquid chromatography/tandem mass spectrometry and application to patients under palliative care. *Therapeutic drug monitoring*. 2007;29(5):655-61.
148. Kintz P, Ludes B, Mangin P. Detection of drugs in human hair using Abbott ADx, with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Journal of forensic sciences*. 1992;37(1):328-31.
149. Toyo'oka T, Yano M, Kato M, Nakahara Y. Simultaneous determination of morphine and its glucuronides in rat hair and rat plasma by reversed-phase liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *The Analyst*. 2001;126(8):1339-45.
150. Kintz P, Villain M, Dumestre V, Cirimele V. Evidence of addiction by anesthesiologists as documented by hair analysis. *Forensic science international*. 2005;153(1):81-4.

151. Skopp G, Kniest A, Haisser J, Mann K, Hermann D. Buprenorphine and norbuprenorphine findings in hair during constant maintenance dosage. *International journal of legal medicine*. 2011;125(2):277-81.
152. Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Miyajima A, Sunouchi M, Goda Y. Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2011;400(1):165-74.
153. Chatterton C, Kintz P. Hair analysis to demonstrate administration of amitriptyline, temazepam, tramadol and dihydrocodeine to a child in a case of kidnap and false imprisonment. *Journal of forensic and legal medicine*. 2014;23:26-31.
154. Imbert L, Dulaurent S, Mercerolle M, Morichon J, Lachatre G, Gaulier JM. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic science international*. 2014;234:132-8.
155. Sun YY, Xiang P, Shen M. [Simultaneous determination of 11 opiates in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*. 2011;46(12):1501-6.
156. Shen M, Xiang P, Shen BH, Liu W, Huang ZJ, Bu J, et al. [Segmental analysis of hair from meperidine abusers and evaluation of the results]. *Fa yi xue za zhi*. 1999;15(4):204-7, 10, 54-5.
157. Grant JE, Odlaug BL, Schreiber LR, Kim SW. The opiate antagonist, naltrexone, in the treatment of trichotillomania: results of a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2014;34(1):134-8.
158. Pinho S, Oliveira A, Costa I, Gouveia CA, Carvalho F, Moreira RF, et al. Simultaneous quantification of tramadol and O-desmethyltramadol in hair samples by gas chromatography-electron impact/mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC*. 2013;27(8):1003-11.
159. Wada M, Kurogi R, Kaddoumi A, Nakashima MN, Nakashima K. Pentazocine monitoring in rat hair and plasma by HPLC-fluorescence detection with DIB-Cl as a labelling reagent. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 2007;22(3):157-62.
160. Maurer HH, Fritz CF. Toxicological detection of pholcodine and its metabolites in urine and hair using radio immunoassay, fluorescence polarisation immunoassay, enzyme immunoassay, and gas chromatography-mass spectrometry. *International journal of legal medicine*. 1990;104(1):43-6.
161. Maurer HH, Fritz CF. [Forensic-toxicologic detection of pholcodine in urine and hair]. *Beitrage zur gerichtlichen Medizin*. 1990;48:37-9.

162. Dolan JW. LC Troubleshooting - Why do peaks tail? http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublictopics.PublicPostFileLoader.html%3Fid%3D53bbf49fd039b1b46c8b461f%26key%3De3e2c098-eabe-4143-a743-f82f5e62983e&ei=VLFZVauhFYbXUYbXgcAJ&usg=AFQjCNE_ytdfBmaFL4A3HIZynT1qdg-ZTg [18.05.2015].
163. L. R. Snyder JJK, J. L. Glajch. Practical HPLC Method Development New York: John Wiley & Sons; 1997.
164. F. Mußhoff BGS, F. Pragst, H. Sachs, D. Thieme. GTFCh_Richtlinie_Anhang C_Haaranalysen_Version1: https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh_Richtlinie_Anhang%20C_Haaranalysen_Version1.pdf; 2009.
165. Kim J, Ji D, Kang S, Park M, Yang W, Kim E, et al. Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC-MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2014;89:99-105.
166. Wolfgang Schubert RM. Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik - Beurteilungskriterien: Kirschbaum Verlag Bonn; 2009. 228 p.
167. Vlase L, Leucuta SE, Imre S. Determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. Talanta. 2008;75(4):1104-9.
168. Huang DK, Liu C, Huang MK, Chien CS. Simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in hair by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2009;23(7):957-62.
169. Fernandez Mdel M, Di Fazio V, Wille SM, Kummer N, Samyn N. A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites). Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2014;965:7-18.
170. Jakobsson G, Kronstrand R. Segmental analysis of amphetamines in hair using a sensitive UHPLC-MS/MS method. Drug testing and analysis. 2014;6 Suppl 1:22-9.
171. Yang J, Lu J, Cui M, Fang C, Zhao Y. [Determination of phthalic acid esters plasticizer in food simulants by gas chromatography-mass spectrometry isotope

- dilution method]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*. 2015;44(1):99-105.
172. Farajzadeh MA, Sorouraddin SM, Mogaddam MR. Microextraction methods for the determination of phthalate esters in liquid samples: A review. *Journal of separation science*. 2015.
173. Madea B, Mußhoff F. *Haaranalytik - Technik und Interpretation in der Medizin und Recht*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2004.
174. Tramadol <http://flexikon.doccheck.com/de/Tramadol>: DocCheck Flexikon; [27.05.2015].
175. Dart RC, Surratt HL, Cicero TJ, Parrino MW, Severtson SG, Bucher-Bartelson B, et al. Trends in opioid analgesic abuse and mortality in the United States. *The New England journal of medicine*. 2015;372(3):241-8.
176. Verri P, Rustichelli C, Palazzoli F, Vandelli D, Marchesi F, Ferrari A, et al. Tramadol chronic abuse: an evidence from hair analysis by LC tandem MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;102:450-8.
177. West NA, Severtson SG, Green JL, Dart RC. Trends in abuse and misuse of prescription opioids among older adults. *Drug and alcohol dependence*. 2015;149:117-21.
178. Cooper RJ. Over-the-counter medicine abuse - a review of the literature. *Journal of substance use*. 2013;18(2):82-107.
179. Tedesco D, Di Pietra AM, Rossi F, Garagnani M, Del Borrello E, Bertucci C, et al. Determination of dextromethorphan and levomethorphan in seized heroin samples by enantioselective HPLC and electronic CD. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013;81-82:76-9.
180. Wurst FM, Seidl S, Alt A, Metzger J. [Direct ethanol metabolite ethyl glucuronide. Its value as alcohol intake and recurrence marker, methods of detection and prospects]. *Psychiatrische Praxis*. 2000;27(8):367-71.
181. Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide--a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 1999;34(1):71-7.
182. Kronstrand R, Brinkhagen L, Nystrom FH. Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months. *Forensic science international*. 2012;215(1-3):51-5.
183. Baselt RC, Bickel MH. Biliary excretion of methadone by the rat: identification of a para-hydroxylated major metabolite. *Biochemical pharmacology*. 1973;22(23):3117-20.

184. Pohland A, Boaz HE, Sullivan HR. Synthesis and identification of metabolites resulting from the biotransformation of DL-methadone in man and in the rat. *Journal of medicinal chemistry*. 1971;14(3):194-7.
185. Sullivan HR, Blake DA. Quantitative determination of methadone concentrations in human blood, plasma and urine by gas chromatography. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1972;3(3):467-78.
186. Sullivan HR, Due SL, McMahon RE. The identification of three new metabolites of methadone in man and in the rat. *Journal of the American Chemical Society*. 1972;94(11):4050-1.
187. Smith JP, Sutcliffe OB, Banks CE. An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs). *The Analyst*. 2015.
188. Thompson AG, Leite MI, Lunn MP, Bennett DL. Whippits, nitrous oxide and the dangers of legal highs. *Practical neurology*. 2015;15(3):207-9.
189. Watson R. EU report shows massive increase in legal highs. *BMJ (Clinical research ed)*. 2015;350:h3088.
190. Arndt T, Claussen U, Gussregen B, Schrofel S, Sturzer B, Werle A, et al. Kratom alkaloids and O-desmethyltramadol in urine of a "Krypton" herbal mixture consumer. *Forensic science international*. 2011;208(1-3):47-52.
191. Drogen Info Berlin - Research Chemical-
<http://www.drogen-info-berlin.de/html/research-chemicals.htm>: Drogen-Info-Berlin; [07.06.2015].
192. Fletcher JE, Sebel PS, Murphy MR, Mick SA, Fein S. Comparison of sufentanil and fentanyl as supplements to general anesthesia. *Anesthesia and analgesia*. 1991;73(5):622-6.
193. Mercadante S, Bruera E. The effect of age on opioid switching to methadone: a systematic review. *Journal of palliative medicine*. 2012;15(3):347-51.
194. Mercadante S, Ferrera P, Arcuri E, Casuccio A. Opioid-induced hyperalgesia after rapid titration with intravenous morphine: Switching and re-titration to intravenous methadone. *Annals of palliative medicine*. 2012;1(1):10-3.
195. Mercadante S, Ferrera P, Villari P, Casuccio A, Intravaia G, Mangione S. Frequency, indications, outcomes, and predictive factors of opioid switching in an acute palliative care unit. *Journal of pain and symptom management*. 2009;37(4):632-41.
196. Mercadante S, Valle A, Porzio G, Fusco F, Aielli F, Adile C, et al. Opioid switching in patients with advanced cancer followed at home. A retrospective analysis. *Journal of pain and symptom management*. 2013;45(2):298-304.
197. Carracedo A. *Forensic DNS Typing Protocols*. Totowa: Humana Press; 2005.

198. Gelston EA, Coller JK, Lopatko OV, James HM, Schmidt H, White JM, et al. Methadone inhibits CYP2D6 and UGT2B7/2B4 in vivo: a study using codeine in methadone- and buprenorphine-maintained subjects. *British journal of clinical pharmacology*. 2012;73(5):786-94.
199. Moody DE, Liu F, Fang WB. In vitro inhibition of methadone and oxycodone cytochrome P450-dependent metabolism: reversible inhibition by H2-receptor agonists and proton-pump inhibitors. *Journal of analytical toxicology*. 2013;37(8):476-85.
200. Shiran MR, Lennard MS, Iqbal MZ, Lagundoye O, Seivewright N, Tucker GT, et al. Contribution of the activities of CYP3A, CYP2D6, CYP1A2 and other potential covariates to the disposition of methadone in patients undergoing methadone maintenance treatment. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;67(1):29-37.

6.2 Lebenslauf

6.3 Veröffentlichungen

Publikation

Eckart, K.; Roehrich, J.; Breitmeier, D.; Ferner, M.*; Laufenberg-Feldmann, R.*; Urban, R.
Institute of Legal Medicine, University Hospital Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

*Department of Anesthesiology, University Hospital Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

Development of a new multi-analyte assay for the simultaneous detection of opioids in serum and other body fluids using Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry
Journal of Chromatography B, 1001 (2015) 1-8

Freie Vorträge

Eckart, K.; Röhrich, J.; Dinh Nguyen, TK.*; Nguyen, D.*; Hieu, P.*; Urban, R.
Institut für Rechtsmedizin, Toxikologie, Mainz

*Forensic Medicine Center, Ho Chi Minh City, Vietnam

Untersuchung von Autopsiefällen mit Verdacht auf Opiat-Intoxikation im Großraum Ho Chi Minh City (Vietnam) im Jahr 2014

45. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner und 24. Frühjahrstagung - Region Süd- der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, # 2, Würzburg, Deutschland

Eckart, K.; Röhrich, J.; Kaufmann, T.; Zörntlein, S*.; Urban, R.
Institut für Rechtsmedizin, Toxikologie Mainz

* Landeskriminalamt Rheinland-Pfalz, Mainz

Prävalenz psychostimulierender Drogen vom Amphetamin-Typ in Rheinland-Pfalz im Zeitraum 2003 – 2014

44. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner und 23. Frühjahrstagung -Region Süd- der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, # 12, Basel, Schweiz

Eckart, K.; Roehrich, J.; Urban, R.

Institute of Legal Medicine, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

Development of a new screening method for the simultaneous detection of opioids in body fluids and tissues using Liquid Chromatography-Tandem-Mass-spectrometry

11th Indo Pacific Association of Law, Medicine and Science Congress 2013, # 1979, Kuala Lumpur, Malaysia

Eckart, K.; Breitmeier, D.; Röhrich, J.; Uebbing, K.; Urban, R.
Institut für Rechtsmedizin, Toxikologie, Mainz

Screeningverfahren zum simultanen Nachweis von Opioiden und ihrer Metaboliten als therapiebegleitendes Konzept

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, # 166, Saarbrücken, Germany, 2013

6.4 Danksagung