

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Eisenmenger

Immunochemisches Drogenscreening von Blut ohne Vorbehandlung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Bernd Kottenhahn

aus München

Jahr 2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Referent: Prof. Dr. rer. nat. L. von Meyer

Coreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

Prof. Dr. K. Horn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2003

Für meinen verstorbenen Freund Andreas Matschi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Vorbehandlung der Proben	5
a. Methanolfällung.....	5
b. Zinksulfatfällung.....	6
c. Acetonfällung	6
d. Trichloressigsäurefällung	7
e. Fällung mit Dimethylformamid	7
f. Extraktionsverfahren.....	8
g. Verdünnung mit Kochsalzlösung.....	8
h. Zentrifugation	9
i. Ultrafiltration.....	9
j. Nachteile der Vorbereitungsmethoden	9
3. Material und Methoden	10
a. CEDIA - Messung.....	10
1. Immunoassay.....	10
2. Messgerät	12
b. HPLC	14
1. Benzodiazepine	15
2. Barbiturate.....	15
3. LSD	15
c. GC-MS.....	15
1. Amphetamine	16
2. Morphinderivate	16
3. Cocain	16
4. Cannabis.....	16
5. Methadon	17
d. Matrixbereinigte Nachweisgrenze	17
e. Datenverarbeitung.....	19
f. Begriffe.....	19
4. Stoffgruppen	20
a. Abhängigkeit und Sucht.....	20
b. Amphetamine	21
c. Barbiturate	23
d. Benzodiazepine.....	24
e. Cannabinoide.....	26
f. Cocain	28
g. LSD.....	30
h. Methadon	32
i. Morphinderivate	33

5. Ergebnisse der Leichenblutuntersuchung	35
1. Allgemeines.....	35
2. Amphetamine	36
3. Barbiturate.....	36
4. Benzodiazepine.....	37
5. Cocain.....	38
6. LSD.....	39
7. Methadon	40
8. Morphinderivate	40
9. THC.....	41
10. Diskussion.....	42
6. Ergebnisse der quantitativen Messversuche	45
1. Allgemeines	45
2. Amphetamine	46
3. Barbiturate.....	46
4. Benzodiazepine.....	47
5. Cocain.....	48
6. LSD.....	49
7. Methadon	49
8. Morphinderivate	50
9. THC.....	51
10. Diskussion.....	51
7. Zusammenfassung	56
8. Anhang	57
1. Tabellen - und Abbildungsverzeichnis.....	57
2. Abkürzungsverzeichnis	58
3. Verwendete Materialien und Reagenzien	59
4. Methoden der HPLC – Messungen.....	60
4.1 Benzodiazepine	60
4.2 Barbiturate	61
4.3 LSD	61
5. Methoden der GC – MS Messungen	62
5.1 Amphetamin	62
5.2 Morphinderivate.....	63
5.3 Cocain	64
5.4 Cannabis	65
5.5 Methadon	67
6. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Leichenblutuntersuchung	68
7. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Plasma– und Serenmessungen	70
9. Referenzen	80

1. Einleitung

Ende der sechziger Jahre wurden in der Klinischen Chemie erstmals Immunoassays zum Nachweis komplexer Substanzen eingesetzt. Die zu bestimmende Substanz wird dabei in einer Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden. Diese Reaktion lässt sich quantitativ, z.B. durch die dadurch verursachte Trübung des Reaktionsansatzes erfassen. Im allgemeinen sind jedoch die Konzentrationen der gesuchten Substanzen zu gering, um diese Reaktionen direkt zu messen. Aus diesem Grund werden zur Verstärkung des Mess-Signals verschiedene Detektionsverfahren eingesetzt. Das älteste dieser Verfahren war die Markierung der Antikörper mit Radioisotopen im Radioimmunoassay (RIA). Nach dem RIA fanden vor allem die enzymgestützten Immunoassays (ELISA; EMIT (Armbruster et al. 1993) breite Verwendung, was auf die niedrigen Kosten, die hohe Präzision und die unkomplizierte Durchführung vor allem aufgrund der fehlenden Radioaktivität im Gegensatz zum RIA zurückzuführen ist. Es werden auch Immunoassays mit anderen Verstärkerprinzipien wie z.B. Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA, beim Abbott TDx) angewendet (Meyer, von et al. 1988), (Budgett et al. 1992).

Das Screening von Drogen in Körperflüssigkeiten stellt eine der Hauptanwendungen von immunologischen Methoden in der forensischen Toxikologie dar. Dies ist unter anderem auf die schnelle und kostengünstige Durchführung im Gegensatz zu den aufwendigeren chromatographischen Verfahren zurückzuführen.

Bisher wurden hauptsächlich Urinproben untersucht. Serum bietet jedoch im Vergleich zu Urin mehrere Vorteile: Erstens kann über die aktuelle Serumkonzentration die momentane Wirkung abgeschätzt werden, zweitens ist die Konzentration nicht wie bei Urin von weiteren Faktoren, z.B. der filtrierten Harnmenge oder dem Harn-pH abhängig. Desweiteren können Blutproben in weit geringerem Ausmaß verfälscht werden, wie das bei Urinproben z.B. schon durch Zusatz von Kochsalz, Essig, Zitronensaft, Kräutertee oder anderen Substanzen versucht wurde (Schütz 1993).

Es gibt aber auch ein rein pragmatisches Argument für die Verwendung von Blut als Untersuchungsmaterial: Verkehrsteilnehmer, die im Verdacht stehen unter Drogen- oder Alkoholeinfluss am Straßenverkehr teilzunehmen, können nicht zu einer Urinprobe gezwungen werden. Laut §81a StPO (Penning 1992) müssen sie aber eine Blutentnahme tolerieren.

Diese Gründe haben dazu geführt, dass der Anteil der Blut- im Vergleich zu den Urinuntersuchungen in den letzten Jahren stark gestiegen ist.

Abbildung 1 zeigt die Entwicklung in den letzten Jahren am Beispiel der Fallzahlen im Institut für Rechtsmedizin der Universität München:

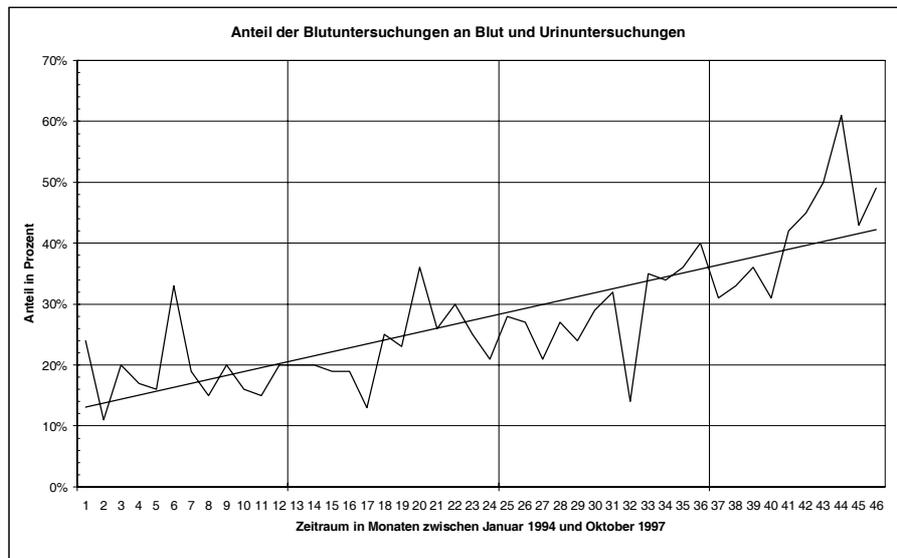


Abb.1: Anteil der Blutuntersuchungen an den Blut- und Urinuntersuchungen

Die meisten der gängigen Immunoassays sind für den Einsatz von Urin konzipiert worden, so auch der CEDIA-Test, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Zur Untersuchung von Blut war daher bis jetzt eine Probenvorbereitung z.B. in Form einer Eiweißfällung oder Extraktion erforderlich (siehe Kap. 2. Vorbehandlung der Proben). Diese Vorbereitungen sind aber zeitaufwendig und mit höheren Kosten verbunden sind. Außerdem wird vermutet, dass sie einen Sensitivitätsverlust verursachen (Iwersen-Bergmann, Schmoldt 1998)

Das CEDIA – Verfahren bietet gegenüber anderen Immunoassays den Vorteil, dass nicht wie üblich im ultravioletten, sondern im längerwelligen Bereich bei 660/570 nm gemessen wird. Dadurch ist eine geringere Störanfälligkeit gegenüber gefärbten Lösung zu erwarten.

Von den Studien von Iwersen (Iwersen et al. 1996) angeregt, testeten wir, ob ein direkter Einsatz von sowohl leicht hämolytischen Seren (Coty et al. 1992) oder Plasmen, als auch von weitgehend flüssigen Leichenbluten möglich ist, wie dies für andere Immunoassays gezeigt wurde (Caplan et al. 1988). Die Aufgabe war, zu prüfen, ob eine sichere Aussage über die Anwesenheit bestimmter Stoffgruppen gemacht werden kann, wie dies bei Verwendung von Urinen möglich ist (Way et al. 1998), (Armbruster et al., Clin. Chem. 1993). Zum anderen sollte die Möglichkeit einer semiquantitativen Abschätzungen über den in Frage kommenden Konzentrationsbereich getestet werden.

2. Vorbehandlung der Proben

Wie oben schon erwähnt, wurden bisher verschiedene Methoden angewandt, um die eigentlich für Urin entwickelten Immunoassay an die Verwendung von Blut anzupassen. Einige der Vorbehandlungsmethoden sollen im Folgenden besprochen werden.

a. Methanolfällung

Eine relativ einfache Methode der Methanolfällung wurde von Schütz (Schütz 1989) veröffentlicht:

- 100µl Serum werden mit 200µl Methanol versetzt, kräftig geschüttelt, eventuell etwas stehen gelassen und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird abgenommen, vorsichtig unter Stickstoff abgeblasen und mit 100µl TDx-Arbeitspuffer rekonstituiert.

Simonick (Simonick et al. 1992) prüften die Möglichkeit auf die Einengung unter Stickstoff zu verzichten:

- 200µl Blut und 200µl Methanol werden gemischt und bei 9600g 5min zentrifugiert. Der klare Überstand wird zur Messung verwendet.

Eine andere Methode wurde von von Meyer (Meyer, von 1985) publiziert:

- 2ml Methanol werden vorsichtig zu 1ml Blut entlang der Gefäßwand hinzugegeben. Die Mischung wird 5min mechanisch geschüttelt und dann weitere 5min zentrifugiert. Ungefähr 1,5ml der Flüssigkeit werden abgehoben und über Nacht bei -20°C im Gefrierschrank ausgefroren. Die resultierende partikelfreie Flüssigkeit wird entsprechend dem Urin eingesetzt.

Mit veränderten Mengenangaben wurde diese Methode auch von Peel / Perrigo (Peel, Perrigo 1981) und Perrigo / Joynt (Perrigo, Joynt 1989) veröffentlicht.

Diosi und Harvey (Diosi, Harvey 1993) erweiterten die Methode:

- Nach der Fällung mit Methanol und dem Ausfrieren werden zum Überstand 50µl Ammoniumhydroxidlösung hinzugegeben, um den pH auf einen Wert größer als 9,5 ins basische zu verschieben. Der basische Überstand wird mit 3ml Pentan versetzt und kurz bei 3000rpm zentrifugiert. Die Pentanschicht wird mit 100µl 1% methanolischer HCl – Lösung versetzt, abgehoben und unter Stickstoff vorsichtig bei unter 40°C getrocknet. Die Rekonstitution zum Einsatz mittels EMIT erfolgt mit 0,1% wässriger HCl – Lösung.

Daldrup (Daldrup et al. 1987) beschrieb eine weitere Methode:

- 0,3ml Serum werden mit 0,9ml Methanol präzipitiert, zentrifugiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. 0,5ml des klaren Überstandes werden unter Stickstoff vorsichtig eingeengt und in 0,1ml Methanol aufgenommen.
- Bei dem Verfahren, das 2 Jahre zuvor publiziert worden war (Daldrup et al. 1985), wurde bei gleichen Arbeitsschritten einmal nach Aufnahme des klaren Überstandes in 200µl Methanol unter Stickstoff eingeengt, dann nochmals nach Aufnahme in 100µl Methanol.

Asselin (Asselin et al. 1988) entwickelten ein anderes Verfahren:

Nach Mischen von 1ml Blut mit 2ml Methanol, Schütteln und 5min Zentrifugation bei -20°C mit 3000rpm wird der klare Überstand auf einen Filter mit der Porengröße $0,45\mu\text{m}$ gegeben und mit Luft durchgeblasen. Das Filtrat wird direkt zur Messung verwendet.

b. Zinksulfatfällung

Als eine verlässliche Methode wird von Simonick und Watts eine Fällung mit Zinksulfat (ZnSO_4) und Methanol angegeben (Simonick, Watts 1992). Je 200µl Blut und 200µl einer 3,5% Zinksulfatlösung in 50% Methanol werden gemischt, eine Minute geschüttelt und 5min bei 9600g zentrifugiert. Der klare Überstand wird zur Messung verwendet.

c. Acetonfällung

Bogusz (Bogusz, Schmitt et al. 1990), (Bogusz, Aderjan et al. 1990) hat folgende Methode entwickelt:

- Zugabe von 1ml Blut tropfenweise zu 3ml Aceton. Nach einminütiger Mischung und fünfminütiger Zentrifugation bei 5000rpm wird der Überstand unter Stickstoff getrocknet und mit 500µl Wasser (TDx-Messung) oder 500µl eines 1:1-Gemisches aus Methanol und Puffer (EMIT) versetzt. Danach erfolgt die Messung.

Eine Variante hierzu wurde von Becker (Becker et al.1993) beschrieben:

- Abweichend von der Methode von Bogusz (Bogusz et al.1992) werden nur 0,3ml Serum und 2,7ml Aceton verwendet. Die Rekonstitution erfolgt mit 0,2ml ADx- oder TDx-Puffer.

Simonick und Watts (Simonick, Watts 1992) vereinfachten diese Methode:

- Je 200µl Blut und Aceton werden gemischt und bei 10.000rpm für 5min zentrifugiert. Der klare Überstand dient zur Messung.

Lewellen und McCurdy (Lewellen, McCurdy 1988) veröffentlichten eine andere Vorbereitungsmethode:

- 2ml Blut wird am Rand des Gefäßes zu 5ml Aceton gegeben. Nach Schütteln und Zentrifugation bei 2500g für 10min wird der Überstand abgenommen und auf 80°C erhitzt. Es wird ohne Vakuum erhitzt, bis die Blasenbildung stoppt. Danach wird mit Vakuum bis zur vollständigen Trockenheit weiter erwärmt. Der Rest wird mit einem 1:1 EMIT-Puffer/Methanol - Gemisch versetzt und für 10min zentrifugiert. Der klare Überstand wird zur Messung mittels EMIT eingesetzt.

Diese Methode wurde von Cagle (Cagle, McCurdy et al. 1997) modifiziert:

- 1ml Blut wird zu 2,5ml Aceton gegeben. Nach 10min Ruhe wird 15s geschüttelt und bei 2500g für 10min zentrifugiert. Danach gibt man den Überstand auf einen Filter mit 10µm-Porengröße und wäscht mit 0,5ml Aceton. Salzsäure in methanolischer Lösung (50µl bei 1%) wird zur Probe zugegeben und kurz geschüttelt. Man trocknet die Probe dann bei 75°C für genau 20min und rekonstituiert den Rest in 0,5ml einer 1:1 EMIT-Puffer/Methanol-Lösung. Die Mischung wird kurz geschüttelt und 10min zentrifugiert. Der Überstand wird dann zur Messung verwendet.

d. Trichloressigsäurefällung

McCord (McCord et al. 1998) beschrieben eine Eiweißfällung mit Trichloressigsäure. Bei dieser Vorbereitungsmethode werden 300µl einer 10% Trichloressigsäure zu 300µl einer Blutprobe gegeben. Nach 10s Schütteln wird die Mischung für 10min zentrifugiert (5min bei 10.000rpm [9600g]) (Simonick, Watts 1992), der klare Überstand abgenommen und für die Messung im Immunoassay eingesetzt.

e. Fällung mit Dimethylformamid

Gute Ergebnisse konnten Blum (Blum et al. 1989) und Klinger (Klinger et al. 1990) für den EMIT mit einer Fällung mittels N,N-Dimethylformamid (DMF) vorweisen. Zu 1ml der Probe

(Plasma, Vollblut oder Leichenblut) werden 2ml DMF vorsichtig entlang des Randes des Probengefäßes zugegeben. Nach 30s mischen, ließ man die Probe für 30min bei Raumtemperatur stehen und zentrifugierte dann 10min mit 5000rpm. Der Überstand wurde direkt zur Messung verwendet.

f. Extraktionsverfahren

Slightom beschrieb 1978 Extraktionsmethoden, die je nach der zu untersuchenden Stoffgruppe variierten (Slightom 1978). Es wurden Extraktionen mit Chloroform bei Barbituraten und Benzodiazepinen, mit Diethylether bei Kokain und mit Hexan bei THC durchgeführt.

So wurden z.B. bei THC 5ml Blut zweimalig mit 30ml Hexan extrahiert, die Extrakte gemischt und mit methanolischer Kalilauge versetzt. Nach Ansäuerung erfolgte erneut eine zweimalige Extraktion mit 20ml Hexan. Das Extrakt wird nach Trocknung mit einem 5%tigen Ethanol – Wasser – Gemisch rekonstituiert und zur Messung eingesetzt.

Für Morphin-Bestimmungen mittels EMIT-DAU wurde von von Meyer (Meyer, von et al. 1980) ein Verfahren vorgestellt bei dem auch niedrige Konzentrationen von Morphin im Blut erfasst werden können. Bei dem empfohlenen Aufarbeitungsgang wird ein Gemisch von 5ml Blut und 15ml Puffer pH 9,5 auf die Kieselgursäule gegeben und nach halbstündigem Einziehen mit 60ml Äther/Ethylacetat 1:1 eluiert. Das Eluat wurde nach Zusatz von 0,5ml einer 0,01N Salzsäurelösung rückextrahiert und 25µl dieser Lösung zur Analyse eingesetzt.

Zur Messung von Benzodiazepinen und Benzodiazepinmetaboliten mittels EIA (enzyme immunoassay), RIA (radio immunoassay) und FPIA (fluorescence polarization immunoassay) wurde von Huang (Huang, Moody 1995) eine Extraktion mittels Butylchlorid durchgeführt. Hierbei wurden 1ml Blut mit 1ml 0,1M Kaliumphosphat (pH 7,4) und 7ml n-Butyl-chlorid 15min gemischt und bei 2250rpm für 10min zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, unter Luft eingedampft und mit 0,5ml TDx Puffer rekonstituiert.

g. Verdünnung mit Kochsalzlösung

Lee und Lee (Lee, Lee 1988) versuchten die einfache Verdünnung der Blutproben mit Kochsalzlösung. Die Vollblutproben wurden 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dann direkt zur Analyse von u.a. Morphinhydrochlorid auf einem Abbott TDx

eingesetzt. Bei den Messreihen ergab sich aber, dass unterhalb einer Konzentration von 200ng/ml in den verdünnten Proben, also 400ng/ml in den Originalproben keine direkte Ausgabe von Messwerten mehr möglich war. Auch wurde die Messungen durch Trübung der Proben stark beeinträchtigt.

h. Zentrifugation

Zur Untersuchung von Phenobarbitalkonzentrationen mittels FPIA in Leichenbluten verwendete Marker (Marker et al.1987) zentrifugierte Proben. Die mit Phenobarbital versetzten Leichenblutproben wurden nach einer Verdünnungsreihe 5min bei 1500g zentrifugiert und dann zur Messung eingesetzt.

i. Ultrafiltration

Maier (Maier et al. 1992) zeigten, dass eine Ultrafiltration für die Untersuchung auf Opiate und Barbiturate verwendet werden kann. Sie ist allerdings nicht als generelle Vorbereitungsmethode für Blut zum Einsatz für ein Drogenscreening geeignet, da z.B. THC und Benzoyllecgonin nach einer Ultrafiltration nicht mehr nachweisbar waren.

j. Nachteile der Vorbereitungsmethoden

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle gängigen oder bisher entwickelten Vorbereitungsmethoden die Vorteile des Immunoassays zum Teil stark reduzieren. So wird einer der größten Vorteile, die schnelle und einfache Anwendbarkeit durch Trocknungsschritte oder Zentrifugationen gemindert (Meyer, von et al. 1981). Auch entstehen durch Trocknung Verluste von Drogen die durch andere Aufarbeitungsschritte aufgefangen werden müssen (Cagle et al. 1997). Aus der Verdünnung resultiert eine herabgesetzte Empfindlichkeit der Testverfahren. Außerdem muss eine größere Menge Blut abgenommen werden, um den Verlust bei der Aufarbeitung auszugleichen. Durch diesen Mehraufwand an Arbeitszeit und Reagenzien steigen die Kosten für die Untersuchungen.

Insgesamt wäre es also wünschenswert, ohne Aufarbeitung auskommen zu können.

3. Material und Methoden

a. CEDIA - Messung

1. Immunoassay

CEDIA steht für cloned enzyme donor immunoassay. Das Testprinzip wurde erstmals 1986 von Henderson beschrieben (Henderson et al. 1986). Der Test beruht auf dem Enzym β -galactosidase (EC 3.2.1.23) des Bakteriums *Escheriaca coli*. Das lac operon von *E.coli* besteht aus 5 Einheiten. Einem Operator, einem Promotor, sowie einem Z, Y und A-Gen. Das Z-Gen wird in eine messenger-RNA transskribiert, die ein Polypeptid aus 1021 Aminosäuren codiert, das enzymatisch inaktiv ist. Erst durch spontane Aggregation von vier gleichen Peptidketten wird das aktive tetramere Enzym gebildet.

Durch rekombinante DNA-Techniken (Kopetzki et al. 1994) wurden aus diesem Polypeptid ein Enzymakzeptor (EA) und ein Enzymdonor (ED) konstruiert. Diese monomeren EA's und ED's sind in Lösung inaktiv, können aber spontan zum aktiven tetrameren Enzym rekombinieren .

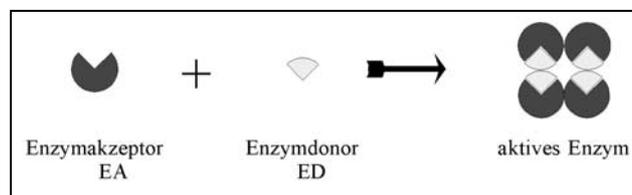


Abb.2: EA und ED rekombinieren spontan zum aktiven Enzym

An die ED's wurde ein Analyt kovalent angelagert, der die Rekombination nicht behindert.

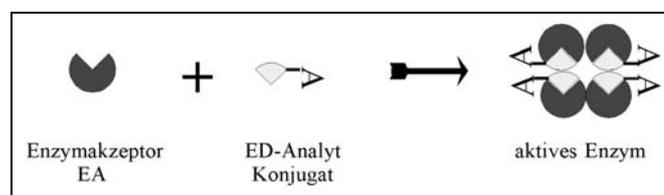


Abb.3: Ein Analyt wird an den ED angelagert ohne die spontane Rekombination zu behindern

Gibt man einen Antikörper (Ak) in die Lösung, so lagert sich dieser an das Analyt-ED-Konjugat an und behindert sterisch die spontane Rekombination.

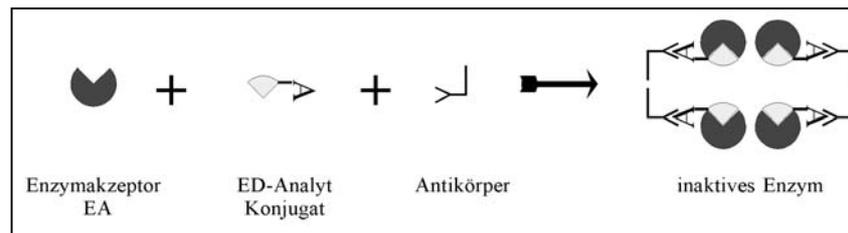


Abb.4: Die Anlagerung des Ak an das ED – Analyt Konjugat behindert sterisch die Rekombination

Ein eventuell in der zu untersuchenden Probe enthaltenes Analyt konkurriert um die Bindung an den Antikörper. Die so frei gewordenen Analyt-ED-Konjugate formieren sich mit den EA's zum aktiven Enzym. Die Menge des gebildeten Enzyms kann mittels einer geeigneten Farbreaktion, z.B. der Hydrolyse von o-nitrophenol- β -D-galactopyranosid sicht- und damit bei 660/570 nm messbar gemacht werden. Die Menge des gebildeten Enzyms ist dabei direkt proportional zur Menge des in der Probe vorhandenen Analytes, d.h. eine hohe Enzymaktivität bedeutet, dass sich viel freies Analyt in der Probe befindet. Bei niedriger Enzymaktivität ist wenig oder kein freies Analyt vorhanden.

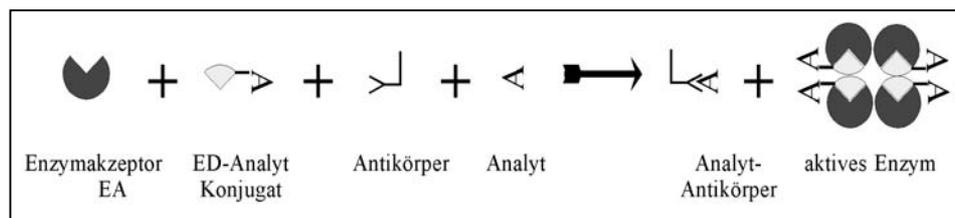


Abb.5: Das Analyt konkurriert um die Bindung an den Antikörper

Nach diesem Testprinzip brachte Boehringer Mannheim die CEDIA[®] DAU-Testserie für Urin auf den Markt. Diese arbeitet analog wie oben beschrieben.

Die verwendeten Reagenzien bleiben für 8 Wochen stabil (Armbruster et al. 1995). Wir verwendeten die Tests nach den Arbeitsvorschriften der Toxikologischen Abteilung am Institut für Rechtsmedizin München auf Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Cannabinoide, Cocain, Methadon, LSD und Morphinderivate.

Durch den Vergleich mit einer Kalibrationskurve ist bei Verwendung von Urin als Testmaterial, eine qualitative (Way et al. 1998), (Caplan et al. 1989) bzw. semiquantitative Aussage über den Drogengehalt der Probe möglich, wobei die Eichsubstanz 100% Messreaktion hervorruft. Andere Substanzen, die Strukturähnlichkeit zur Eichsubstanz aufweisen, erreichen im allgemeinen bei gleicher Konzentration einen anderen Messwert. Der

prozentuale Unterschied zwischen tatsächlicher und gemessener Konzentration bei diesen Substanzen wird als Kreuzreaktivität bezeichnet.

2. Messgerät

Als Analysenautomat verwendeten wir einen Hitachi 911 der Firma Boehringer Mannheim, der über die Messtechnik der Absorptionsphotometrie verfügt. Dieser ist mit einer Rechneinheit gekoppelt, die das Ergebnis über einen Drucker bereits als Stoffmenge pro Volumeneinheit, also als Konzentration ausgibt.

Nach Eingabe der Testparameter wird der Küvettenleerwert vier mal bestimmt. Dies geschieht mittels zwei verschiedener Methoden. Einmal als Stopp-Leerwert, zum anderen als bewegter Leerwert. Sobald die Küvette in die optische Achse gelangt, werden die Leerwerte bei der Wellenlänge gemessen, bei der auch der angeforderte Test gemessen wird. Die Küvette mit dem Stopp-Leerwert wird dazu in der optischen Achse angehalten und die 12 Wellenlängen testunabhängig durchgemessen (Boehringer Mannheim 1994). Nach dem Küvettenpülvorgang beginnt die Probenentnahme aus den Einwegcups vom Probenteller mittels Probenpipettor. Zu der Probe in den 120 Kunststoffküvetten (Schichtdicke 6mm) des Reaktionstellers werden nacheinander mittels Reagenzpipettor die entsprechenden Reagenzien R1 – R4 zugegeben. Gemischt wird nach jeder Reagenzzugabe mittels Rührerpaddles.

Beim hier verwendeten CEDIA wird als R1 für alle verwendeten Stoffgruppen mit Ausnahme der Benzodiazepine 130µl eines Gemisches von Enzymakzeptor-Reagenz und Antikörpern pipettiert. Nach ca. 5min wird als R3 130µl Enzymdonor– Reagenz zugegeben.

Die Messung der Benzodiazepine weicht von diesem Schema ab. Als R1 wird in diesem Fall 130µl Enzymakzeptor, Antikörper und Glucuronidase zugegeben. Zur Verlängerung der Wirkungszeit des Enzyms wird erst als R4 nach ca. 9min das Enzymdonor – Reagenz beigemischt.

Das folgende Schema gibt ganz allgemein den Extinktionsverlauf in Abhängigkeit von der Reaktionszeit wieder. Die auf der Kurve aufgetragenen kleinen Zahlen bezeichnen die Photometermeßpunkte für eine bestimmte Küvette, d.h. jede Küvette wird innerhalb der ersten 10 Minuten 31mal gemessen. Als Messpunkte für die Extinktionsänderung werden für Benzodiazepine die Photometerpunkte 41–44, für LSD die Punkte 44–49 und für alle anderen Stoffgruppen die Punkte 28–31 verwendet.

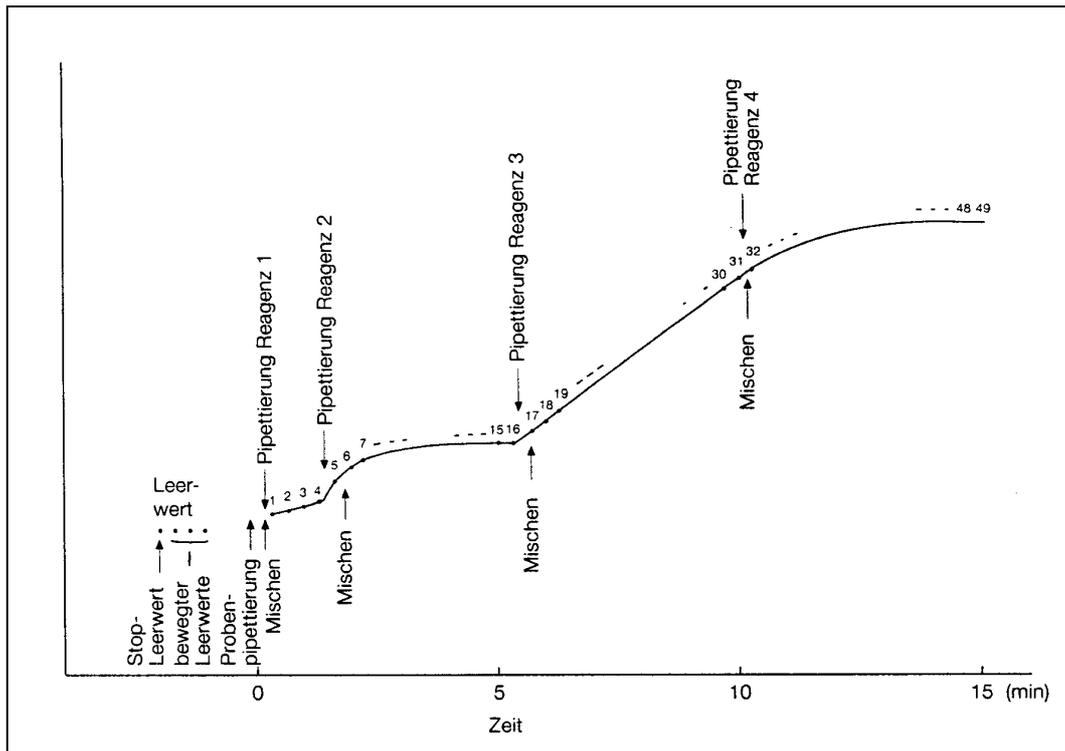


Abb.6: Allgemeiner Extinktionsverlauf in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Zur Vermeidung von Verschleppungsvorgängen werden Probenpipettiernadel, Rührerpaddles und Reagenzienpipettiernadeln nach jedem Arbeitsschritt in einem Spülbad mit demineralisiertem Wasser gespült. Das Probenvolumen kann zwischen 1 bis 50 μl , das Reagenzienvolumen von 50 bis 350 μl jeweils in 1 μl – Schritten variiert werden. Der Reaktionsverlauf wird photometrisch durch periodische Messung der Extinktion der Reaktionslösung während einer Reaktionszeit von 3 bis maximal 15 Minuten erfasst. Es handelt sich hierbei um ein Gitterphotometer, bei dem das weiße Licht der Photometerlampe gebündelt und durch die Küvetten geschickt wird. Anschließend wird das Licht durch ein konkaves Spaltgitter in seine Wellenlängen zerlegt und von den Photodioden des Detektors empfangen. Bei jeweils zwei von zwölf Wellenlängen zwischen 340 und 800nm (340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700, 800nm) kann über zwei jeweils separate Verstärker und Logkonverter die Extinktion oder Extinktionsdifferenz bestimmt werden. Der Vorteil dieser bichromatischen Messung besteht darin, dass bei Proben mit starker Eigenfärbung Abweichungen kompensiert und eine eventuelle, durch Spannungsschwankungen ausgelöste Photometerdrift, ausgeglichen werden kann. Das Zusammenspiel der Baugruppen wird auf Abbildung 7 deutlich.

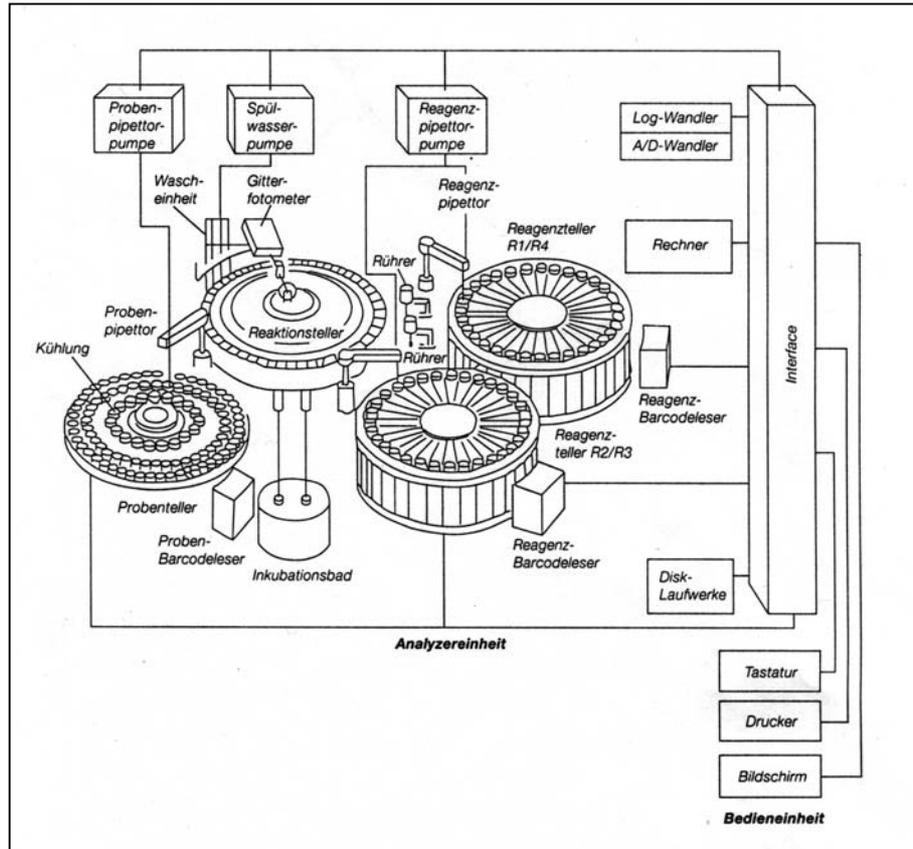


Abb.7: Baugruppen des Hitachi 911

Bei einem Durchsatz von 360 Tests/Stunde sind 10 verschiedene Messarten von 1-Punkt-messung über Kinetik A (im Rahmen dieser Arbeit verwendet) bis Kinetik B möglich. Desweiteren existieren 10 Kalibrationsmethoden, 5 lineare und 5 nicht lineare.

b. HPLC

Zur Absicherung der Immunoassayergebnisse verwendeten wir für Benzodiazepine, Barbiturate und LSD die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) als anerkannte Referenzmethode. Als Zentrifuge verwendeten wir eine Heraeus Medifuge 2000, desweiteren einen Heidolph REAX 2000 – Rüttler und einen Rotavapor (Büchl RE 111, Schweiz). Das HPLC-Gerät bestand aus einer Beckmann M114-Pumpe (Beckmann Instruments, San Remo, USA), einem Merck Hitachi L-7200 Probengeber (Merck, Darmstadt, Deutschland) und einem Hewlett Packard Diodenarraydetektor (DAD) Series 1100 (Hewlett-Packard Waldbronn, Deutschland) bzw. einem Merck F1000 Fluoreszenzspektrophotometer (Merck, Darmstadt, Deutschland) für die LSD-Messung. Die

verwendeten Reagenzien und Materialien sind im Anhang aufgeführt (siehe 8.3. Verwendete Materialien und Reagenzien).

1. Benzodiazepine

Prinzip: Das Plasma/Blut wird mit Chlorbutan flüssig/flüssig extrahiert, der Extrakt mit Ethylenglykol versetzt und hochleistungschromatographisch auf einer C₈-Phase im sauren Milieu (pH 2,0) getrennt. Die Detektion und Identifizierung erfolgt mittels Diodenarraydetektor (DAD).

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.4.1.

2. Barbiturate

Prinzip: Das Serum/Blut wird mit Chloroform flüssig/flüssig extrahiert und der Extrakt hochleistungschromatographisch auf einer Nucleosil C18-Säule im sauren Milieu (pH 2,5) getrennt. Die Detektion und Identifizierung erfolgt mittels Diodenarraydetektor (DAD).

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.4.2.

3. LSD

Prinzip: Das Serum/Blut wird mittels einer Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) mit LSD ImmunElute -Säulchen extrahiert. Der Extrakt wird durch HPLC mit Fluoreszenzdetektor quantifiziert.

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.4.3.

c. GC-MS

Als anerkannte Referenzmethode zum quantitativen Nachweis von Amphetaminen, Cannabinoiden, Cocain, Methadon und Morphinderivaten verwendeten wir die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Nach einer Aufarbeitung der Proben wurden diese auf einem Hewlett Packard MSD 5972 gemessen.

Die verwendeten Reagenzien und Materialien sind im Anhang (siehe 8.3 Verwendete Materialien und Reagenzien).

Bei der Extraktion von Amphetamin, Morphinderivaten und Cocain wurden die für die Festphasenextraktion verwendeten Säulchen mit folgenden Substanzen konditioniert:

5ml MeOH

5ml H₂O

5ml Puffer 8,9

Eine Auflistung der verwendeten Substanzen findet sich im Anhang (8.3. Verwendete Materialien und Reagenzien).

1. Amphetamine

Prinzip: Nach einer Festphasenextraktion des Blutes mittels XAD II - Säulchen (Biochemical Diagnostics, Detect Abuse Extraction Columns Type R) wird die Menge Amphetamin mittels GC-MS quantifiziert.

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.5.1.

2. Morphinderivate

Prinzip: Nach einer Festphasenextraktion des Blutes auf XAD II - Säulchen (Biochemical Diagnostics, Detect Abuse Extraction Columns Type R) wird die Menge Morphinderivate mittels GC-MS quantifiziert.

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.5.2.

3. Cocain

Prinzip: Nach einer Festphasenextraktion des Blutes auf Oasis - Säulchen (Waters Oasis Säulchen, HLB 6cc Extraction Cartridges) wird die Menge Cocain durch GC-MS quantifiziert.

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.5.3.

4. Cannabis

Prinzip: Nach einer Festphasenextraktion des Blutes auf Certify - Säulchen (Bond Elute LRC - Certify 300mg –Säulchen von Varian) wird die Menge Cannabis durch GC-MS quantifiziert.

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.5.4.

5. Methadon

Prinzip: Nach einer flüssig-flüssig Extraktion mit Ether/Ethylenacetat (1:1) wird die Probe quantitativ mittels GC-MS untersucht.

Eine genaue Beschreibung der Messdurchführung befindet sich im Anhang unter 8.5.5.

d. Matrixbereinigte Nachweisgrenze

Viele Immunoassays wie z.B. EMIT, TDx, ADx, aber auch die Originaltests von OnLine entscheiden anhand eines der Kalibratoren, ob die Probe positiv oder negativ ist. Die Extinktionsänderung der Probe wird direkt mit der Extinktionsänderung eines zuvor als cut-off definierten Standards verglichen. Dieser cut-off oder Schwellenwert wird für jede Stoffklasse individuell nach medizinischen Gesichtspunkten vorgegeben, wie das in den Vereinigten Staaten durch das *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA), früher das *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) oder das Verteidigungsministerium (*Department of Defense* = DOD) geschieht.

Ebenso ist es möglich, dass primär ein quantitativer Messwert angezeigt wird, der erst sekundär qualitativ interpretiert wird und dabei eine individuelle Aussage darüber zulässt, ob eine Droge oder ein Metabolit im Blut nachweisbar ist. Hierbei besteht allerdings das Problem, dass selbst eine garantiert drogenfreie Probe ein Mess-Signal liefern kann, das von Null verschieden ist, d.h. es würden fälschlicherweise Konzentrationen angezeigt, die nicht vorhanden sind. Nun stellt sich die Frage, ab welcher Höhe des Messwertes davon auszugehen ist, dass nicht mehr allein die Mess-Schwankung die Ursache der angegebenen Extinktion ist.

Hierzu wird die Methode der matrixbereinigte Nachweisgrenze (Hallbach et al. 1991) verwendet. Sie gibt an, ab welcher vom Gerät angezeigten Drogenkonzentration die Aussage gemacht werden kann, dass die Probe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,2% drogenpositiv ist.

Die matrixbereinigte Nachweisgrenze wird ermittelt, indem 30 sicher drogenfreie Proben verschiedener Probanden gemessen wurden. Aus diesen 30 Werten werden Mittelwert (MW) und Standardabweichung (s) errechnet und die Matrixbereinigte Nachweisgrenze (LD) wie folgt bestimmt (Rodbard 1990):

$$LD = MW + 3s$$

Man geht davon aus, dass die durch Leerproben hervorgerufenen Extinktionen normalverteilt sind. Aus der Gauß'schen Standardnormalverteilung lässt sich entnehmen, dass das Auftreten von Werten, die oberhalb von drei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt liegen, eine Wahrscheinlichkeit von $P = 0,2\%$ hat (Harms 1992). Es ist also mit anderen Worten unwahrscheinlich, dass ein Wert oberhalb der bestimmten matrixbereinigten Nachweisgrenze durch eine Leerreaktion hervorgerufen wird. Man spricht deshalb bei Proben, die über der Nachweisgrenze liegen von einem positiven Ergebnis. Im Unterschied zu einem relativ willkürlich definiertem cut-off, kann hier die Aussage getroffen werden, ob in der Probe tatsächlich etwas enthalten ist oder nicht.

Für die Ermittlung des cut-off für diese Arbeit wurden 30 durch GC/MS oder HPLC sicher als drogenfrei gemessene Proben aus der Routine des Labors nach oben dargestellter Methode verwandt. Die daraus errechneten und verwendeten Entscheidungsgrenzen werden in Tabelle 1 dargestellt:

<i>Stoffgruppe</i>	<i>Plasmen/Seren [ng/ml]</i>	<i>Leichenblute [ng/ml]</i>
Amphetamine	35	35
Barbiturate	1000	1000
Benzodiazepine	20	20
Cannabinoide	20	20
Cocain	50	50
LSD	0,2	0,2
Methadon	35	35
Opiate	20	20

Tabelle 1: Verwendete Matrixbereinigte Nachweisgrenzen des CEDIA DAU®

Diese Definition der Entscheidungsgrenze als Nachweisgrenze hat den Vorteil, dass die Empfindlichkeit (Sensitivität) des Immunoassays maximal ausgenutzt wird (Meyer, von et al. 1988). Dies ist ein wichtiger Anspruch an ein in der Forensischen Medizin einzusetzendes Testverfahren. Außerdem kann dadurch die Anzahl unnötiger Nachuntersuchungen von falsch-positiven Proben minimiert werden (Collison et al. 1998).

Desweiteren kann hiermit geprüft werden, ob die vom Hersteller empfohlenen cut-off-Werte sinnvoll sind.

Im allgemeinen wird in der Praxis die so ermittelte Nachweisgrenze auch als cut-off bezeichnet. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit genauso gehalten.

e. Datenverarbeitung

Die gesamte Datenverarbeitung erfolgte auf einem 133MHz-PC mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word 97 sowie Microsoft Excel 7.0. Die graphische und statistische Auswertung geschah mit dem Statistikprogramm SPSS 8.01.

f. Begriffe

Die im weiteren Verlauf verwendeten Begriffe der Sensitivität und Spezifität sind wie folgt definiert (Harms 1992), (Spiehler et al. 1988):

Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine positive Probe als positiv erkannt wird:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig positive}}{\text{richtig positive} + \text{falsch negative}}$$

Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine negative Probe, als negativ erkannt wird:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig negative}}{\text{richtig negative} + \text{falschpositive}}$$

Die Korrelation trifft eine Aussage darüber, wie stark der mathematische Zusammenhang zwischen mehreren Werten ist. Die Korrelation kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Steigt der x-Wert bei steigendem y-Wert so liegt der Korrelationskoeffizient im positiven Bereich. Fällt der x-Wert bei steigendem y-Wert so ergibt sich ein negativer Wert. Bei den Werten -1 und +1 ist der Zusammenhang so groß, dass sich y aus x errechnen lässt, bei

Werten um Null spielt die postulierte Abhängigkeit keine Rolle, d.h. die o.a. Errechnung ist nicht möglich.

4. Stoffgruppen

Im Folgenden werden nach der Erläuterung der Begriffe Sucht und Abhängigkeit die untersuchten Drogengruppen kurz in ihrer Geschichte, Wirkung, Verwendung, Häufigkeit und Gefährlichkeit dargestellt.

a. Abhängigkeit und Sucht

Der im Zusammenhang mit Drogen oft verwendete Begriff *Sucht* ist wegen seiner Unschärfe und Mehrdeutigkeit auf Vorschlag der WHO durch den Begriff *Abhängigkeit* ersetzt worden. Die Abhängigkeit (drug dependence) bezeichnet einen psychischen gegebenenfalls auch einen physischen Zustand, bei dem folgende Phänomene auftreten können (Forth et al. 1992):

1. Entwicklung einer Toleranz
2. Entwicklung einer körperlichen (physischen) Abhängigkeit, die durch das Auftreten eines substanzspezifischen Entzugssyndroms bei Aussetzen der Substanzzufuhr bzw. die Einnahme der Substanz in der Absicht die Entzugssymptome zu lindern oder zu vermeiden, gekennzeichnet ist.
3. Entwicklung einer psychischen Abhängigkeit u.a. gekennzeichnet durch:
 - starkes, gelegentlich übermächtiges oder zwanghaft auftretendes, i.d.R. nur schwer bezwingbares Verlangen, eine Substanz zu konsumieren, um sich positive Empfindungen zu verschaffen oder unangenehme zu vermeiden
 - verminderte Kontrollfähigkeit über Beginn, Beendigung und Menge des Substanzgebrauchs einschließlich erfolgloser Versuche, diesen zu verringern oder zu beenden
 - Einengung und Anpassung der Alltagsaktivitäten auf die Möglichkeit bzw. Gelegenheit zum Substanzkonsum
 - Vernachlässigung wichtiger sozialer und /oder beruflicher Interessen
 - fortgesetzter Substanzgebrauch trotz Kenntnis der schädlichen Folgen

b. Amphetamine

Die Gruppe der Amphetamine ist mit Adrenalin verwandt und wird zu den Sympathomimetika gerechnet. Neben der Stammsubstanz Amphetamin (Benzedrin[®], USA) (Wirth, Gloxhuber 1985) gehören ihr auch das am Stickstoff substituierte Methamphetamin, 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDA), 3,4-Methylenedioxyamphetamin (*Ecstasy*, MDMA) und 3,4-Methylenedioxyethylamphetamin (*Eve*, MDE, MDEA an (Ferrara et al.

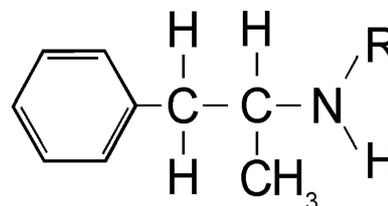


Abb.8: Strukturformel Amphetamine

1994). Ebenso in diese Gruppe einzuordnen sind viele Psychostimulantien und Appetitzügler.

Die Stammsubstanz Amphetamin konnte schon 1887 synthetisiert werden und wurde zur Behandlung von Rhinitiden in Inhalationspräparaten eingesetzt. Die aufputschende Wirkung wurde erst 1933 entdeckt. Durch die Verwendung als Aufputzmittel bei jugendlichen Diskobesuchern stieg die Zahl der Erstkonsumenten in den letzten Jahren stark an (Heinz 1997). Insbesondere viele Jugendliche haben auf Techno- und Houseparties Kontakt mit "Ecstasy" oder "Eve". So stieg z.B. in Deutschland die Zahl der auffällig gewordenen Erstkonsumenten von Amphetamin und Derivaten im Vergleich von 1995 zu 1996 um 39% (Fritze 1997). Von 1996 bis 2001 wurde eine Steigerung um 36,8% auf 28988 Fälle registriert (Rauschgiftstatistik des BKA 2001).

Als neue Methamphetaminzubereitung zum Rauchen hat das sog. "Ice" Schlagzeilen gemacht. Schon ein paar Züge machen für ca. 24 Stunden high (Forth 1992). In den 60er und 70er Jahren dürfte die Verwendung zur Leistungssteigerung im Spitzensport allgemein verbreitet gewesen sein. Beweis hierfür sind mehrere Todesfälle durch kardiovaskuläres Versagen nach Verbrauch der letzten Reserven. Im Gegensatz zu den Katecholaminen stimulieren die Weckamine nicht nur peripher, sondern sind durch das vollständige Fehlen von Hydroxy-Gruppen und einer alpha-Methylgruppe auch zentral wirksam (Kuschinsky et al. 1992). Diese zentrale Wirkung ist einem indirekten Agonismus am 5HT_{2C}-Rezeptor zuzuschreiben. Die Freisetzung von Serotonin in den synaptischen Spalt wird gefördert und die Inaktivierung durch Wiederaufnahme gehemmt (Fritze 1997).

Amphetamin und Methamphetamin werden oral in Form von Tabletten, Dragees und Flocken, oder nasal als Pulver, oder intravenös als Injektionslösung appliziert (Drummer 2001). Die therapeutische Konzentration für Methamphetamin liegt bei einer Serumkonzentration von

0,01-0,05 mg/l, die tödliche Konzentration bei 40mg/l (Schulz, Schmoldt 1997). Bei einer Abhängigkeit kann die benötigte Menge 0,5-2 g (Kuschinsky et al. 1992) pro Tag betragen.

Bei den Designeramphetaminen MDA, MDMA und MDEA liegt die durchschnittliche Dosis bei 50-100mg. Die euphorisierende Wirkung der Amphetamine setzt nach etwa 15 bis 60 Minuten ein und hält aufgrund der langen Halbwertszeit von 6-9 Stunden über viele Stunden bis Tage an (Schulz, Schmoldt 1997).

Amphetamin wird sowohl unverändert, als auch nach Hydroxylierung und Kopplung an Glucuronsäure über die Niere ausgeschieden. Die Eliminationszeit ist vom pH des Harns abhängig. Bei saurem Harn wird Amphetamin zu 80%, bei einem pH von 8,0 jedoch nur zu 2-3% renal als freies Amphetamin eliminiert.

Von den Konsumenten werden Amphetamine vor allem wegen ihrer stimulierenden, aufputschenden und euphorisierenden Wirkung geschätzt. Als positive Erscheinungen werden aber auch emotionale Enthemmung, Steigerung des Selbstwertgefühls und der Abbau der Kommunikationsbarrieren beschrieben. Die Gefahr des Amphetaminkonsums liegt in der nachgewiesenen Neurotoxizität (Ruangyuttikarn et al. 1988) v.a. von MDE, MDMA und MDA und der vermuteten Kanzerogenität, die bisher nur bei Ratten erwiesen wurde (Fritze 1997). Außerdem können bei Langzeitanwendung paranoide Psychosen auftreten, die bis zu 30 Tage anhalten können. Auch Todesfälle, die im Zusammenhang mit der Erhöhung der Ermüdbarkeitsschwelle und dem damit verbundenen Verbrauch der "letzten Reserven" stehen, sind sowohl bei Spitzensportlern (s.o.), als auch bei Discobesuchern bekannt geworden (Fritze 1997). Es kann zu kardiovaskulärem Versagen, hypertensiven Krisen (Iwersen, Schmoldt 1996), zu Apoplexie und Hirnblutungen kommen. Ein bemerkenswertes Vergiftungssymptom ist die Steigerung der Körpertemperatur (Wirth, Gloxhuber 1985). Eine therapeutische Verwendung ist bei Narkolepsie gegeben, bei Epilepsie wird sie diskutiert, ist aber umstritten und zeigt wohl keine überzeugenden Resultate (Kuschinsky et al. 1992). Die Entleerung der Speichervesikel für Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin führt zu einer schnellen Gewöhnung (Tachyphylaxie), die auch durch Erhöhung der Dosis nicht durchbrochen werden kann. Nach Absetzen kommt es zu keinem typischen Entzugssyndrom, meist entstehen der Wirkung entgegengesetzten Symptome wie erhöhtes Schlafbedürfnis, Heißhunger, Angst, Gereiztheit u.a. (Forth et al. 1992).

c. Barbiturate

Durch Kondensation von Malonsäure mit Harnstoff entsteht Malonylharnstoff, von Baeyer 1863 Barbitursäure genannt. Das Grundgerüst der Barbiturate ist auf nebenstehender Abbildung dargestellt. Die hypnotische Wirkung ist an eine Substitution an C5 (R_1 , R_2) gebunden. Die Substituenten einiger wichtiger Medikamente sind aus Tabelle 2 ersichtlich:

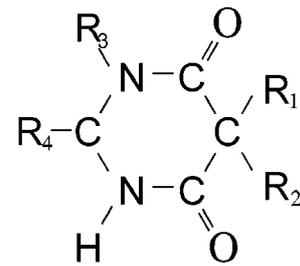


Abb.9: Strukturformel des Barbiturate-Grundgerüsts

	R_1	R_2	R_3	R_4
Barbital	- C ₂ H ₅	- C ₂ H ₅	- H	- O
Phenobarbital	- C ₂ H ₅	- Phenylring	- H	- O
Pentobarbital	- C ₂ H ₅	- C ₂ H ₄ -C ₃ H ₇	- H	- O
Hexobarbital	- CH ₃	- Cyclohexenyl	- CH ₃	- O
Thiopental	- C ₂ H ₅	- C ₂ H ₄ - C ₃ H ₇	- H	- S

Tabelle 2: Substituenten einiger wichtiger Barbiturate

Barbiturate waren die größte und gebräuchlichste Gruppe synthetischer Beruhigungs- und Schlafmittel. Insgesamt ist ihre Verwendung als Schlafmittel aber zugunsten eines gesteigerten Gebrauchs von Benzodiazepinen zurückgegangen. In zivilisierten Ländern stellten sie die größte Gruppe von Suiziden. Man unterteilt die Barbiturate in drei Gruppen, je nach Wirkdauer (Kuschinsky et al. 1992):

lang (z.B. Phenobarbital, $t_{1/2}$ =3d)

mittellang (z.B. Cyclobarbital $t_{1/2}$ =11h)

kurz (z.B. Thiopental $t_{1/2}$ =6h) (Schulz, Schmoldt 1997)

Appliziert werden Barbiturate in den meisten Fällen oral, mitunter werden sie auch in Wasser gelöst intravenös injiziert (Drummer 2001). Die hypnotische Dosis ist je nach Stoff unterschiedlich, meist zwischen 1 und 30 mg/l Serumkonzentration (Schulz, Schmoldt 1997). Die letale Konzentration liegt zwischen 15mg/l bei Pentobarbital und 60mg/l bei Phenobarbital. Bei chronischer Anwendung kann diese Konzentration um den Faktor 10-15 gesteigert werden (Forth et al. 1992).

Barbiturate werden im Blut zu unterschiedlichen Mengen an Albumin gebunden transportiert. Der freie Teil verlässt in der Niere mit dem Ultrafiltrat das Blut. Bei niedrigen pH-Werten

diffundiert ein großer Teil in Form der freien Säure zurück. Bei Einnahme von Substanzen, die den Harn alkalisieren, wird vermehrt Barbiturat ausgeschieden, da die Rückdiffusion behindert wird. Dies wird therapeutisch bei Überdosierungen ausgenutzt (Classen et al. 1994), (Ruß 1998). Der Abbau erfolgt überwiegend im endoplasmatischen Retikulum der Hepatocyten durch Oxidation der Radikale an C-5 durch mikrosomale Enzyme (Cytochrom P 450), durch N-Desalkylierung und evtl. Desulfierung und Ringspaltung (Drummer 2001).

Die Oxidationsprodukte sind wesentlich hydrophiler und daher unwirksam, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr überwinden können. Barbiturate wirken über eine unspezifische Hemmung des gesamten ZNS, wahrscheinlich durch eine Verstärkung der inhibitorischen Wirkung der γ - Amino-Buttersäure (GABA) (Kuschinsky et al. 1992). Sie wurden als Sedativa, Hypnotika oder Narkotika eingesetzt. Die antikonvulsive Komponente wird zur Behandlung von Epilepsien oder Vergiftungen mit z.B. DDT, Strychnin oder bei einer Überdosierung von Lokalanästhetika (Kuschinsky et al. 1992). eingesetzt. Aufgrund der Nebenwirkungen wie Schwindel, Amnesie, Übelkeit, Erbrechen, allergischen Hautreaktionen und Leberfunktionsstörungen, vor allem der letal verlaufenden Atemdepression werden Barbiturate heute meist nur noch als kurzwirksame Injektionsnarkotika verwendet. Nach wiederholter Zufuhr stellt sich bei einer konstanten Konzentration eine Gewöhnung ein, die nicht nur über eine Enzyminduktion, sondern zusätzlich über adaptive Vorgänge im Gehirn erklärbar ist. Bei Langzeitanwendung können Barbiturate zu schweren Depressionen, Amnesie und Persönlichkeitsänderungen führen (Forth et al. 1992).

d. Benzodiazepine

Seit den frühen 60er Jahren werden Benzodiazepine synthetisiert und zählen heute zu den am häufigsten verschriebenen und verwendeten Pharmaka (Schütz 1993). Bis heute wurden etwa zweitausend verschiedene Benzodiazepine hergestellt.

Folgende zählen zu den gängigen Medikamenten: Oxazepam (Adumbran[®]), Diazepam (Valium[®]), Temazepam (Planum[®]), Bromazepam (Bromazeni[®]), Flunitrazepam (Rohypnol[®]), Lorazepam (Tavor[®]) und Midazolam (Dormicum[®]).

Es können grundsätzlich drei, auch in toxikologischer Sicht relevante Gruppen unterschieden werden (Wirth, Gloxhuber 1985):

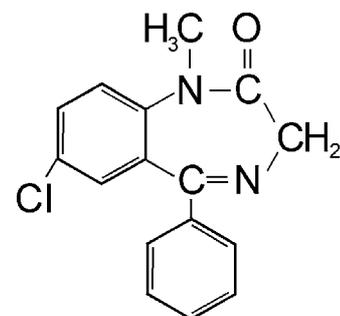


Abb.10: Strukturformel Diazepam

1. Die Substanz an sich ist unwirksam und wird erst im Organismus in eine wirksame Form überführt z.B. Chlordiazepoxid zu Demoxepam und weiter zu Nordiazepam.
2. Die Substanz an sich ist wirksam und wird in wirksame Metabolite abgebaut z.B. Diazepam zu Nordiazepam.
3. Die Substanz an sich ist wirksam, wird aber durch einen metabolischen Schritt, oder durch mehrere schnell aufeinander folgende Schritte biologisch unwirksam z.B. Midazolam.

Vor allem die Benzodiazepine der Gruppen 2 und 3 finden medizinische Verwendung. Gruppe 2 als Benzodiazepine mit schnellem Wirkungseintritt, aber relativ langer Wirkung. So hat z.B. Diazepam an sich eine Halbwertszeit von 24-48 Stunden. Dazu kommen die Halbwertszeiten des Hauptabbauproduktes Nordiazepam ($t_{1/2}=40-80h$) und des Hauptabbauproduktes des Nordiazepam, des Oxazepam ($t_{1/2}=6-20h$) (Schulz, Schmoldt 1997). Die Vertreter der Gruppe 3 werden hauptsächlich als Einschlafmittel oder parenteral als Injektionsnarkotikum verwendet.

Benzodiazepine spielen als Ersatz- oder Ausweichdroge in der sogenannten Szene eine immer größere Rolle. An erster Stelle wäre hier das Flunitrazepam (Rohypnol®) zur Unterdrückung von Entzugserscheinungen zu nennen (Drummer 2001).

Eine Übersicht über den Abbau einiger Benzodiazepine gibt Abb. 11 (nach Forth et al. 1992):

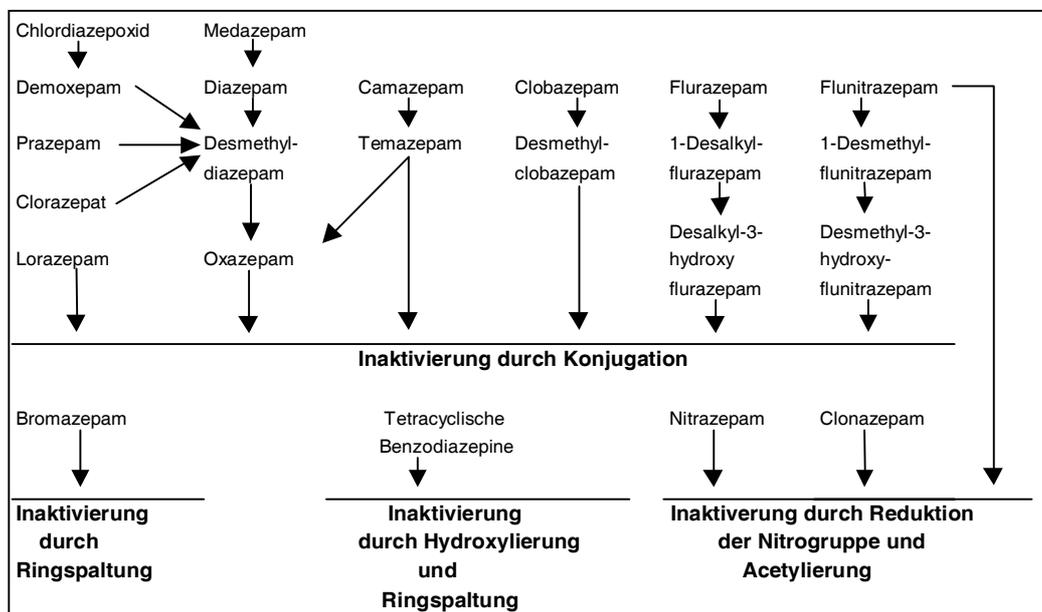


Abb.11: Abbauwege wichtiger Benzodiazepine

Der Beginn der toxischen Konzentration im Serum ist für die einzelnen Benzodiazepine recht unterschiedlich, so liegt der kritische Wert für Diazepam bei 3-5 mg/l, für Lorazepam bei 0,3-0,5mg/l und für Flunitrazepam bei 0,05mg/l (Schulz et al. 1997). Im Gegensatz zu den Barbituraten (siehe 4.c. Barbiturate) wirken Benzodiazepine in höheren Konzentrationen nicht

atemdepressiv, können aber bis zum Koma führen (Drummer 2001). Bei Einnahme von Benzodiazepinen werden beruhigende, hypnotische, anxiolytische, antikonvulsive und muskelrelaxierende Wirkungen beschrieben. Die Stärke der Wirkung differiert von Präparat zu Präparat. Akute Überdosierungen rufen ähnliche Wirkungen hervor: Schläfrigkeit, Verwirrung, Orientierungslosigkeit, reduzierte Reflexe, Dysphorie.

Es kann aber auch zu sogenannten paradoxen Phänomenen wie Euphorie, Agitiertheit, Schlaflosigkeit u.a. führen. Als Antagonist steht Flumazenil (Anexate[®]) zur Verfügung. Benzodiazepine reagieren an einem Komplex an der Zellmembran, der aus "Benzodiazepin-Rezeptor", GABA_A-Rezeptor und einem Chlor-Ionen-Kanal besteht. Die Bindung bewirkt eine allosterische Veränderung des GABA_A-Rezeptors, an dem freigesetztes GABA nun effektiver reagieren kann. Die Folge ist eine verlängerte Öffnung der Chlorid-Kanäle, so dass mehr Cl-Ionen in die Zelle einströmen, wodurch die Erregbarkeit der Neuronenmembran vermindert wird. Die Dichte dieser überall im ZNS vorkommenden Rezeptoren für Benzodiazepine ist in einigen Regionen z.B. im Hippocampus, Cerebellum und frontalen und okzipitalen Cortex erhöht. Man nimmt daher an, dass der Hauptwirkungsort in den genannten Bereichen liegt (Forth et al. 1992). In Verbindung mit Alkohol oder Barbituraten potenzieren sich die Wirkungen der Substanzen. Bei häufigem Gebrauch tritt schnell Gewöhnung ein (Forth et al. 1992).

e. Cannabinoide

Unter dem Oberbegriff Cannabinoide versteht man heute alle psychoaktiven Inhaltsstoffe der Hanfpflanze *Cannabis sativa*, die v.a. aus der indischen Hanfpflanze *Cannabis indica* gewonnen werden (Wirth, Gloxhuber 1985). Die weiblichen Blüten der Hanfpflanze sondern über Drüsenhaare ein Harz ab, das verschiedene strukturverwandte Substanzen enthält. Das Harz der Blütenstände und Teile der Blüten und Blätter werden zu Haschisch verarbeitet. Marihuana besteht aus den luftgetrockneten Blatt-, Blüten- und Stengelteilen. Obwohl die psychotrope Wirkung seit Jahrhunderten bekannt ist, konnte erst 1964 das dafür verantwortliche

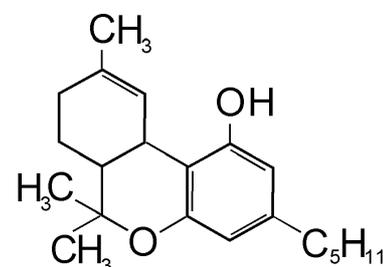


Abb.12: Strukturformel THC

Tetrahydrocannabinol (THC) isoliert werden. Cannabidiol (CBD) kann als Vorstufe von THC angesehen werden. Cannabinol (CBN) ist ein Oxidationsprodukt des THC, dessen Gehalt bei Alterung zunimmt, während der THC-Gehalt sinkt. CBD und CBN sind psychisch inaktiv,

können aber den mikrosomalen Abbau von Arzneimitteln hemmen. Cannabis gilt als die am meisten missbrauchte Droge. Bei postmortalen Untersuchungen an nicht ausgewählten Urinen in den USA ergab sich ein Anteil von 13% haschischpositiven Urinen bei einer starken Alterskorrelationen mit den 20- bis 25-jährigen (Isenschmid et al. 1988). In Wisconsin war THC nach Ethanol die häufigste gefundene Droge bei auffälligen Autofahrern (Goodall et al. 1995). In Deutschland nahmen die registrierten Fälle von Cannabiskonsum von 1993 bis 2000 von 50135 auf 131836 Fälle zu, um im Jahr 2001 auf hohem Niveau bei 131662 Fällen nahezu zu stagnieren (Rauschgiftstatistik des BKA 2001).

Die Aufnahme erfolgt meist durch Rauchen in reiner Form oder mit Tabak vermischt. Auch sogenannte Haschischplätzchen, Marihuana-Tees oder –Marmeladen finden Verwendung. Beim Rauchen erreicht der THC-Spiegel sein Maximum nach 15-20min, die Wirkung klingt innerhalb von 3 bis 4 Stunden ab. Bei oraler Aufnahme muss etwa dreimal soviel Wirkstoff aufgenommen werden, um denselben Effekt zu erzielen. Die psychischen Wirkungen treten nach etwa 0,1mg/kgKG Δ^9 - oder Δ^8 -THC auf (Forth et al. 1992). Die Halbwertszeit beträgt ca. 50 Stunden (Kuschinsky et al. 1992). Bei Aufnahme von 5-7mg Δ^9 -THC überwiegt die sedierende, bei Dosierung von über 15mg die erregende Komponente der Wirkung (Forth et al. 1992).

Als hochlipophile Substanz wird THC im Fettgewebe gespeichert und über Tage verteilt im Urin in Form des Metaboliten THC-Carbonsäure (THC-COOH), überwiegend mit Glucuronsäure konjugiert, ausgeschieden (Law et al. 1984). Unverändert erfolgt praktisch keine Exkretion. Innerhalb von 8 Tagen werden 30% der Radioaktivität von markiertem THC über die Niere, 50% über den Darm, wahrscheinlich mit der Galle als Metaboliten ausgeschieden (Forth et al. 1992).

Die genaue Wirkungsweise ist noch nicht geklärt, wahrscheinlich funktioniert sie über hochaffine Bindungsstellen, die G-Protein gekoppelt sind. Als Wirkungen werden milde Euphorie , subjektive Zufriedenheit, Benommenheit, Apathie, Übelkeit, Schläfrigkeit, Mydriasis und kardiovaskuläre Effekte wie Tachykardie, Blutdruck-veränderungen und verstärkte konjunktivale Durchblutung beschrieben (Forth et al. 1992). Die Denkabläufe werden als assoziationsreich, phantasievoll und beglückend erlebt. Die intraindividuelle Schwankung der Wirkungen ist stark (Iwersen et al. 1998). Die akute Toxizität von Cannabis ist gering. Es sind keine klar dokumentierten tödlichen Cannabisvergiftungen beim Menschen bekannt (Drummer 2001). Dennoch ist der Cannabiskonsum nicht als so harmlos anzusehen, wie er von manchen Personenkreisen dargestellt wird. Bei höheren Dosen können psychotische Zustände(Kuschinsky et al. 1992), v.a. mit paranoid-depressivem Charakter

auftreten. Durch einen Eingriff in den Hormonhaushalt kann es zu sekundärer Amenorrhoe, temporärer Sterilität, Gynäkomastie und Aborten kommen (Forth et al. 1992). Da Spuren des THC im Gehirn verbleiben, kann es bei fortgesetztem Cannabiskonsum zu schweren Persönlichkeitsveränderungen kommen, was bis zum völligen Verfall führen kann. Vorstufen dazu sind zunehmende Intoleranz, Unproduktivität und Vernachlässigung der Hygiene, so dass die Übernahme oder Erfüllung sozialer Aufgaben unmöglich wird, sog. *Amotivationssyndrom* (Kuschinsky et al.1992). Auch fungiert Cannabis oft als Schrittmacher für den Einstieg in Konsum härterer Drogen wie Cocain, LSD, Heroin oder anderen (Forth et al. 1992). Cannabiskonsum kann zur Abhängigkeit führen, diese wird aber eher als gering beschrieben und ist rein psychisch bedingt. Eine Toleranzentwicklung ist theoretisch möglich, wird aber nicht beobachtet, da die vom Konsumenten verwendete Menge meist zu gering und die Aufnahmefrequenz zu niedrig ist (Forth et al. 1992).

f. Cocain

Cocain wird aus den Blättern des Cocastrauches (*Erythroxylon coca*) gewonnen und ist ein Ester des Ecgonins, dessen Säuregruppe mit Methanol und dessen OH-Gruppe mit Benzoesäure verestert ist, 1-Benzoyl-ecgonin-methylester. Ecgonin ist ein Derivat des Tropan- β -ol, während die Alkaloide der Solanaceae (Belladonna-Arten, Stech- apfel, usw.) Derivate des stereoisomeren Tropan-3- α -ol sind (Hoppe 1985). Cocablätter dienten früher zur Herstellung eines in Künstlerkreisen um die Jahrhundertwende beliebten Cocaweines, der unter dem Namen *Vin Mariani* aus

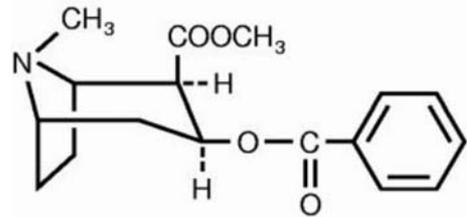


Abb.13: Strukturformel Cocain

Frankreich nach Deutschland importiert wurde (Wirth, Gloxhuber 1985). In Südamerika, vor allem in Peru und Bolivien ist das Kauen von mit Pottasche vermengten Cocablättern eine weitverbreitete Genussform. Durch die buccale Resorption des Cocains verschwinden Hunger- und Ermüdungsgefühle und es können große körperliche Anstrengungen auch in den Hochlagen der Anden erzielt werden. Aufgrund der Gefahr des Missbrauches wurde die Einfuhr von Cocablättern nach Deutschland, da sie zwischen 0,5 und 1% (Wirth, Gloxhuber 1985) Cocain enthalten, verboten. In Deutschland hat die Verwendung von Cocain zwischen 1996 und 2001 um 15,6% auf 22475 bekannte Fälle zugenommen (Rauschgiftstatistik des BKA 2001). Der Altersgipfel liegt bei 29 Jahren und das Verteilungsverhältnis Männer zu

Frauen beträgt 3:1 (Rich et al. 1991). Cocain wird üblicherweise intranasal durch sniffen oder schnupfen aufgenommen, manchmal auch als sogenannter Cocktail mit Heroin versetzt i.v. appliziert (Drummer 2001). Crack ist eine in Pillenform gehandelte Zubereitungsform des Cocains bei der beim Rauchen die freie Base freigesetzt wird. Diese Form des Cocains, die zum ersten Mal 1981 in Kalifornien auftauchte und seit Mitte der 80er Jahre auch in Europa verwendet wird, ist in den Herstellungskosten wesentlich günstiger als Cocain. Aufgrund der höheren Anflutungsgeschwindigkeit beim Rauchen werden deutlich niedrigere Mengen benötigt. So lassen sich aus 1g des meist nur 25% Cocain enthaltenden Gassencocains etwa 6 Crackportionen gewinnen. Daher betragen die Preise für eine Crackportion nur etwa ein Zehntel der einer Cocainportion.

Die Wirkdosen und toxischen Dosen variieren je nach Applikationsform: bei subkutaner Applikation gelten Dezigrammdosen, bei enteraler Aufnahme 1g als letale Dosis (Wirth, Gloxhuber 1985). Im Blut sind 0,1-0,3µg/ml als therapeutische, 0,5µg/ml als toxische und 1,8µg/ml und höher als letale Konzentrationen (Schulz, Schmoldt 1997) anzusehen. Die anfänglich aufgenommenen Cocaindosen liegen im Milligrammbereich, können aber bei Abhängigkeit bis zu 15g, in Einzelfällen bis auf 30g pro Tag gesteigert werden. Bedingt durch die kurze Halbwertszeit von weniger als 45min (Schulz, Schmoldt 1997) kann es zum Serienkonsum, bis hin zu Konsumwiederholungen im zehn-Minuten-Abstand kommen.

Cocain wurde bis vor Kurzem noch als Lokalanästheticum am Auge bei erwünschter Mydriasis in 5%-Lösung in Augentropfen verwendet. Eine weitere therapeutische Verwendung, wurde aber wegen möglicher Epithelschädigung und aufgrund des Suchtpotentials verlassen (Grehn, Leydhecker 1995). Andere Anwendungsgebiete, wie z.B. die örtlicher Betäubung bei zahnchirurgischen Eingriffen wurden auch wegen der akuten Toxizität aufgegeben (Kuschinsky et al. 1992).

Cocain wird in der Leber nichtenzymatisch, möglicherweise auch durch die Pseudocholinesterase des Serums hydrolysiert und vor allem als Benzoylecgonin eliminiert. Die N-Demethylierung spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle. Im Urin werden in Abhängigkeit des pH's innerhalb von 24h 1-9% unverändertes Cocain, 35-54% als Benzoylecgonin und 32-49% als Ecgoninmethylester und Ecgonin ausgeschieden (Drummer 2001). Im Blut lässt sich lagerungsbedingt hauptsächlich Benzoylecgonin nachweisen, wenn die Serumesterasen nicht durch Flourid gehemmt werden.

Cocain wirkt zentral indirekt sympathomimetisch und lokalanästhetisch. Diese Wirkung beruht auf der Blockierung der Noradrenalinspeicherung und auf einer vermehrten Freisetzung des Transmitters aus den Speichervesikeln. Am Herzen können EKG-Veränderungen (Goldfrank et

al. 1991) und Angina pectoris Beschwerden (Zimmermann et al. 1991) ausgelöst werden. Cocain wirkt dopaminerg, damit zentral stimulierend und senkt die Krampfschwelle des Cortex. Beim Kokainrausch lassen sich drei Stadien unterscheiden: Im euphorischen Stadium werden gehobene Stimmung, Mut, Angstabbau, beschleunigte Denkabläufe, sexuelle Stimulation und erhöhte Kontaktfähigkeit erlebt. Diese Phase kann Minuten bis hin zu Stunden andauern. Im Rauschstadium werden angstbesetzte negative Verkennung der Umwelt, eigenbezüglige Erlebnisveränderungen, paranoid-halluzinatorische Zustände mit Verfolgungswahn und Trugwahrnehmungen beschrieben. Im folgenden depressiven Stadium kommt es zum Auftreten von Antriebsverlust, Müdigkeit, Erschöpfung, Reizbarkeit, Depression und damit zum Drang nach einem erneutem Cocainkonsum. Bei Dauergebrauch und Dosiserhöhung kann es zum raschen körperlichen und geistigen Verfall mit extremer Abmagerung bis hin zum Marasmus kommen. Des weiteren wurden Delirien, tiefe Depressionen und paranoide Zustände bei Cocainisten beobachtet. Entzündungen des Nasenseptums, Ulzerationen und Nekrosen beruhen auf dem vasokonstriktorischem Effekt des Cocains (Forth et al. 1992). Bei Überdosierung entstehen zentrale Erregung mit charakteristischen Zittern und anfänglicher Heiterkeit, die Delirien und Halluzinationen weichen. Der Tod tritt durch zerebrale Krampfanfälle und Atemlähmung ein. Trotz der oben erwähnten möglichen extremen Dosissteigerung, wird bei den meisten Süchtigen die Dosis kaum ansteigen, da eine nur mäßige Gewöhnung auftritt (Wirth, Gloxhuber 1985). Laut Definition der WHO entsteht beim Cocainabusus nur eine psychische Abhängigkeit, d.h. es fehlen die typischen körperlichen Entzugssymptome. Dennoch werden bei erzwungenem Absetzen Entzugserscheinungen wie Hyperphagie, extremes Schlafbedürfnis, Angst, Tremor und anderes beobachtet (Forth et al. 1992).

g. LSD

LSD steht für Lysergsäurediethylamid. Erstmals wurde diese Substanz von A. Stoll und A. Hoffmann 1938 bei Sandoz hergestellt. Es handelt sich um ein halbsynthetisches Derivat der in den Mutterkornalkaloiden vorkommenden d-Lyserg-säure. Hoffmann entdeckte 1943 zufällig die psychotomimetische Wirkung. Knapp zwei Jahrzehnte später, in den sechziger Jahren wurde LSD zur Kultdroge. Die Verwendung von LSD zur Bewußtseinsweiterung

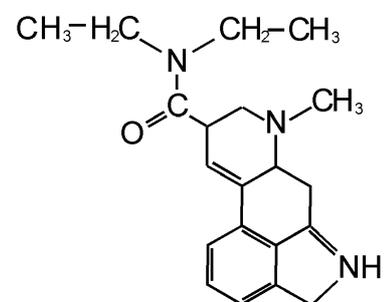


Abb.14: Strukturformel LSD

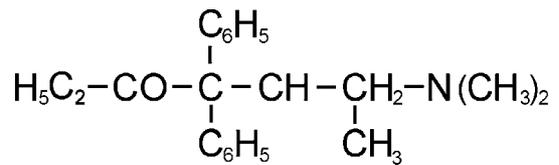
wurde von Künstlern, aber auch von anderen Personenkreisen propagiert. Der wohl bekannteste Vertreter war Timothy Leary, ein Professor in Harvard. Obwohl der Gebrauch von LSD in den letzten Jahrzehnten gemessen am Gesamtkonsum an harten Drogen abgenommen hat, ist es auch heute noch das am meisten verwendete Halluzinogen in Europa (Forth et al. 1992). Nach einem Anstieg Ende der 90er Jahre fiel die Zahl der gezählten LSD-Fälle in den letzten Jahren deutlich. So wurden 2001 mit 990 Fällen 23,1% weniger Fälle ermittelt, als im Jahr zuvor (Rauschgiftstatistik des BKA 2001).

Die Hoffnungen LSD zur Behandlung von psychischen Erkrankungen therapeutisch einsetzen zu können, haben sich nicht erfüllt (Wagner 1988). Die Aufnahme erfolgt oral über Minitabletten, aber auch über Löschpapiere oder Gelatinebögen, die mit LSD getränkt sind (Drummer 2001). Zur Erzeugung eines Rauschzustandes genügen winzige Mengen, etwa 0,2-0,4mg (Kuschinsky et al. 1992) beträgt etwa 6-12, die mittlere Halbwertszeit ca. 3 Stunden. LSD wird im Plasma zu 40-70% an Eiweiß gebunden. Hauptausscheidungsprodukt ist das Hydroxy-LSD (Forth et al. 1992).

Die Wirkung am Menschen liegt in einem Agonismus am $5HT_{2(C)}$ – Rezeptor (Fritze 1997) begründet. Es wird über visuelle und akustische Halluzinationen, Verzerrungen, Entstellungen nach Aufnahme der Droge berichtet. Die sympathomimetische Wirkung drückt sich in einem Anstieg der Pulsfrequenz und der Körpertemperatur aus. Es besteht eine Mydriasis und eine Steigerung des Reflexniveaus. Es können Wahrnehmungen entstehen, die der Realität nicht entsprechen, so werden z.B. Töne in bunten Farben gesehen, Musik wird gefühlt. Im LSD-Rausch entsteht das Gefühl fliegen zu können, oder unverwundbar zu sein. Da die therapeutische Breite relativ hoch ist, dürfte hierin die Hauptgefahr liegen. Immer wieder hat es Menschen gegeben, die in krankhafter Selbstüberschätzung beim Versuch zu fliegen aus dem Fenster stürzten oder versuchten Autos aufzuhalten, weil sie sich für unverwundbar hielten. In einigen Fällen kommt es auch zu Panikattacken und schweren Depressionen, die sich zu plötzlich einsetzenden Alpträumen steigern können (= Horrortrips). LSD erzeugt keine physische, sondern nur eine mäßige psychische Abhängigkeit. Eine starke Toleranzentwicklung wurde beschrieben (Forth et al. 1992). Nach Absetzen der Droge wurden bei psychisch labilen Personen wochenlang anhaltende Veränderungen des Bewußtseins festgestellt, sog. Echoeffekte (Kuschinsky et al. 1992).

h. Methadon

Methadon (C₂₁H₁₇NO) wird zur Ersatztherapie bei Heroin- und Morphinsüchtigen verwendet.



Auch als Droge wird Methadon gelegentlich missbräuchlich benutzt (Schütz 1993). Als

Abb.15: Strukturformel Methadon

Morphinagonist hat es in etwa dieselbe analgetische Wirkung wie Morphin (Forth et al. 1992). Die Entzugerscheinungen beim Heroinentzug werden ebenfalls durch Methadon gemildert, es fehlt jedoch die euphorisierende Wirkung der Opiate, woraus sich die große Rückfallquote ableiten lässt. Aus der Tatsache, dass sich viele Abhängige zusätzlich zur Methadontherapie noch einen "Kick" verschaffen wollen, resultieren tödliche Überdosierungen, mit Methadon und Heroin (Classen et al. 1994). Die therapeutische Konzentration des Methadon liegt bei 0,1-0,5µg/ml, der toxische Bereich kann aber schon bei 0,2µg/ml und der letale bei 0,4µg/ml beginnen (Schulz, Schmoldt 1997). Nach Einnahme von Methadon kommt es zur Sedierung, Stimmungsschwankung, Miosis und zu Veränderungen der kognitiven und sensitiven Leistungsfähigkeit. Bei Einnahme größerer Dosen treten Nausea, Schwindel Müdigkeit, Schlafbedürfnis, Pulsverlangsamung und Extrasystolen in den Vordergrund (Wirth, Gloxhuber 1985). Die Überwachung von Methadon substituierten Patienten spielt eine große Rolle bei der Compliance-Sicherung, aber auch bei Fragen der richtigen Dosierung, da die Bioverfügbarkeit recht unterschiedlich ausfällt (Schütz 1993). So liegt die Schwankungsbreite für die Bioverfügbarkeit zwischen 41 und 99%. Die Angaben zu den Halbwertszeiten variieren je nach Quelle zwischen 13 und 55 (Schulz, Schmoldt 1997) oder 4 und 91 Stunden (Schütz 1993).

Methadon wird im Plasma zu 85% an Eiweiß gebunden transportiert. Der größte Teil des Abbaus erfolgt in der Leber durch Demethylierung am Stickstoff sowie Ringbildung zu Pyrrolidin- und Pyrrolinderivaten. Der Hauptmetabolit das 2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (EDDP) wird mit dem Urin ausgeschieden (Ferrara et al. 1994). Durch Ansäuerung des Harns kann die Methadonausscheidung verbessert werden (Wirth, Gloxhuber 1985).

Grundsätzlich besitzen Ersatzstoffe von Suchtmitteln ein Abhängigkeitspotential, d.h. auch Methadon besitzt dieses Potential, wird aber im Vergleich zu Heroin als das kleinere Übel angesehen. Hierbei steht vor allem die Beseitigung der Beschaffungskriminalität und die Resozialisierung im Vordergrund.

i. Morphinderivate

Morphin [$C_{17}H_{17}(OH)_2ON$], ein Derivat des Phenantrens, wurde 1805 von dem deutschen Apotheker F.W.A. Sertürner im Opium entdeckt (Wirth, Gloxhuber 1985). Es wird aus dem erhärteten Milchsaft der unreifen Samenkapsel des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) hergestellt. Dieser Saft enthält je nach Standort Alkaloide im Gesamtgehalt von 20-30%, die im Konzentrationsverhältnis stark schwanken.

Die wichtigsten enthaltenen Alkaloide sind Morphin (3-23%), Narcotin (4-10%), Papaverin (0,8-1%), Codein (0,3-0,5%), Narcein (0,2-0,3%) und Thebain (0,2%) (Wirth, Gloxhuber 1985). Aus pharmazeutischer Hinsicht ist nicht die in Wasser kaum lösliche freie Base, sondern das salzsaure Salz, *Morphinum hydrochloricum*, das sich in Wasser oder Alkohol löst (Wirth, Gloxhuber 1985), von Bedeutung. Das offizielle Opium enthält 10% und die Tinctura Opii 1% Morphin sowie die entsprechende Menge an Nebenalkaloiden. Heroin ist ein halbsynthetisches Derivat, das aus Morphinbase durch Erwärmen mit Essigsäureanhydrid oder Einwirken von Acetylchlorid hergestellt wird, so dass beide Hydroxygruppen des Morphinmoleküls acetyliert sind (Diacetylmorphin) (Forth et al. 1992). Zum ersten Mal gelang das 1874. Bis 1958 fand Heroin in Deutschland als sehr starkes Schmerzmittel Verwendung, wurde aber aufgrund seines Suchtpotentials vom Markt genommen. Methylierung der phenolischen OH-Gruppe führt zum Codein.

Therapeutische Anwendung finden Opiate heute als Analgetika, Narkotika und Antitussiva. Morphin findet v.a. in der palliativen Schmerzbekämpfung von starken Malignomschmerzen Verwendung. Die mißbräuchliche Aufnahme des Morphins erfolgt parenteral in Wasser/Methanol aufgelöst und i.v. injiziert, oral (als Tee oder Gebäck) oder inhalativ (fermentiertes Rauchopium). Heroinbase wird in Zitronen- oder Ascorbinsäure unter Erhitzen aufgelöst und i.v., s.c. oder i.m. gespritzt. Der Abbau erfolgt über 6-Monoacetylmorphin und Morphin (Iwersen et al. 1998). Die Aufnahme von Codein erfolgt oral in Form von Hustensäften. Die Verwendung von Heroin stagniert in Deutschland in den letzten Jahren. So sank im Vergleich zum Vorjahr die Zahl der bekannten Fälle leicht um 0,5% auf 45376 Fälle (Rauschgiftstatistik des BKA 2001).

Der Grund für die Wirkung der Morphinderivate liegt in ihrer Strukturverwandtheit mit körpereigenen Neuropeptiden (Enkephalin, Dymorphin, Endorphin). Diese binden an Opiat-

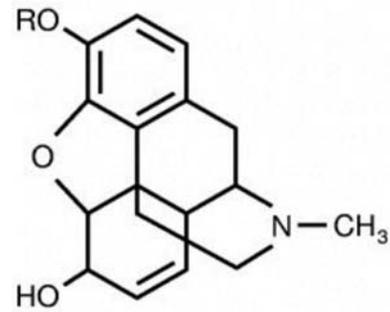


Abb.16: Strukturformel Opiate

Morphin: R = H

Codein: R = CH₃

Rezeptoren des antinozizeptiven Systems und hemmen Bahnen in Rückenmark und Thalamus. Opioid-Rezeptoren finden sich aber nicht nur im ZNS, sondern auch in Nervenplexus von Blase und Darm (Kuschinsky et al. 1992).

Die therapeutische Konzentration im Serum von Morphin liegt bei 0,01-0,1 µg/ml, die toxische beginnt bei über 0,1µg/ml und die letale Konzentration bei 0,1-4µg/ml. Bei Codein sind die entsprechenden Werte 0,03-0,25µg/ml, 1µg/ml und 1,8µg/ml (Schulz, Schmoldt 1997).

Bei regelmäßigem Gebrauch tritt ein Toleranzentwicklung auf, die vor allem die zentraldämpfenden Effekte betrifft. Sinkt die Toleranz bei Konsumunterbrechung, besteht bei erneuter Zufuhr die Gefahr einer Überdosierung, da die bisher tolerierte Menge nun zu hoch ist (Kuschinsky et al. 1992).

Freies Morphin verlässt die Blutbahn sehr rasch und akkumuliert in den parenchymatösen Organen. Die Verteilung zwischen Plasma und Hirn steht im Verhältnis 5:1.

Die Inaktivierung erfolgt hauptsächlich über Konjugation mit Glucuronsäure, 5% werden am Stickstoff demethyliert (Forth et al. 1992). Die Ausscheidung erfolgt zu 90% über die Nieren, zu 3,6-6% über die Lunge und zu 7-10% über die Galle mit der Faeces (Drummer 2001).

Hierbei ist zu beachten, dass Morphin einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt und erklärt so das Vorhandensein kleinerer Mengen auch noch einige Tage nach der letzten Dosis. Die Eliminationshalbwertszeit liegt für Morphin bei ca. 6 Stunden, Spuren können noch nach mehr als 48 Stunden nachgewiesen werden (Schulz, Schmoldt 1997).

Morphin und seine Derivate haben sowohl erregende, als auch dämpfende Wirkung. Dies wird nicht über unterschiedliche Wirkungen an sich ausgelöst, sondern betrifft die Hemmung einer Hemmung, was zur Erregung führt z.B. einen emetischen Effekt bewirkt (Früheffekt). Morphin wirkt außerdem analgetisch, sedativ, hypnotisch-narkotisch, atemdepressiv, antiemetisch (Späteeffekt), antitussiv durch direkten Angriff im Atemzentrum der Medulla oblongata (Forth et al. 1992). Periphere Wirkungen sind die Steigerungen des Tonus der glatten Muskulatur in Urogenitalsystem, Gallenwegen und Gastrointestinaltrakt und eine damit verbundene Obstipation. Als gefährlichste Nebenwirkung dürfte wohl die Atemdepression gelten. Trotz des gesteigerten CO₂-Partialdrucks erfolgt durch die direkte Hemmung der Medulla oblongata keine Anpassung durch vertiefte oder beschleunigte Atmung.

Bei chronischem Abusus entsteht sehr schnell eine psychische und physische Abhängigkeit. Dazu kommen verstärkte Obstipation, Appetitmangel, Sprachstörungen, Gangataxie, Blutdruckabfall mit Bradykardien, Müdigkeit, Miosis, Impotenz und Haarausfall bis hin zu

schweren unabsehbaren, neuronalen Störungen (Wirth, Gloxhuber 1985). Die akute Vergiftung ist gekennzeichnet durch Koma, starke Miosis und eine extreme Reduzierung der Atmung, die dann schließlich zum Exitus führt. Als Gegenmittel wird Naloxon (Narcanti[®]) verwendet (Classen et al. 1994).

Entzugserscheinungen sind Niesen, Tränenfluss, Tachypnoe, Gähnen, Blutdruckkrisen, Schweißausbrüche, Diarrhöe, Blasenkrämpfe und motorische Unruhe, sowie Reizbarkeit (Forth et al. 1992).

5. Ergebnisse der Leichenblutuntersuchung

1. Allgemeines

Es wurden 25 weitgehend flüssige Leichenblute mit dem CEDIA – Verfahren nach folgenden 5 unterschiedlichen Methoden auf einem Hitachi 911 untersucht:

1. Verwendung der unbehandelten Probe. Hierzu wurden bei der Messung auf Amphetamine, Benzodiazepine und Morphin-derivate 3µl; bei THC, Cocain und Methadon 6µl; bei Barbituraten 9µl und bei der Testung auf LSD 12µl zur Analyse eingesetzt.
2. Verwendung einer 1:1 mit Wasser verdünnten Probe mit gleicher Probenmenge wie bei 1.
3. Verwendung eines reduzierten Volumens, das zur Analyse eingesetzt wurde. Dies waren jeweils $\frac{1}{3}$ der unter 1 angegebenen Mengen, d.h. 1,2,3 und 4µl je nach Stoffgruppe.
4. Kombination aus den Methoden 2. und 3., d.h. Verwendung einer verdünnten Probe wie bei 2 mit einem reduzierten eingesetzten Volumen, wie bei 3.
5. Verwendung einer Probe, die mit einer methanolischen Zinksulfat– Fällung (Simonick, Watts 1992) vorbehandelt wurde.

Zur einfacheren Handhabung wird im folgenden jeder Toxnummer einer Probe die Nummer der Untersuchungsmethode angefügt. So erhält z.B. das Ergebnis der Untersuchung einer unverdünnten Probe mit der Toxnummer 100 die Nummer 100.1. Entsprechend wird das Ergebnis der ZnSO₄– Fällung mit 100.5 beschriftet.

Die Ergebnisse werden im folgenden nach Stoffgruppen getrennt dargestellt.

Eine tabellarische Darstellung der Messergebnisse findet sich im Anhang.

2. Amphetamine

Aufgrund des seltenen Vorkommens von Amphetamin war keine der untersuchten 25 Leichenblutproben GC-MS positiv auf Amphetamine. Bei den Untersuchungen traten allerdings 11 Proben mit insgesamt 41 Messungen auf, bei denen ein CEDIA – Screening einen Wert ergab, der über dem cut-off von 35ng/ml lag und bei denen keine Fehlermeldung des Gerätes ausgegeben wurde. Diese Proben, immerhin 33%, müssen also als falsch-positiv angesehen werden. Hierbei spielte es kaum eine Rolle, auf welche Art die Messung durchgeführt wurde. Bei den Messungen mit unvorbehandelter Probe und denen mit verdünnter Probe ergaben sich jeweils 7, bei den Messungen mit reduziertem Probenvolumen oder reduziertem Probenvolumen und verdünnter Probe ergaben sich jeweils 8, und bei den Proben die mit Fällung vorbehandelt wurden 11 falsch- positive Ergebnisse (siehe Tabelle 3).

Methode	Falschpositives Ergebnis	Falschnegatives Ergebnis
1	7	0
2	8	0
3	7	0
4	8	0
5	11	0

Tabelle 3: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Amphetamine

3. Barbiturate

Weder bei der Untersuchung mit CEDIA, noch mit HPLC traten Resultate auf, die oberhalb des cut-off von 1000ng/ml lagen. Die 25 Proben wurden mit den 5 verschiedenen Vorbereitungsmethoden mit CEDIA untersucht. Unter den sich daraus ergebenden 125 Messungen befanden sich keine falsch-positiven Resultate. Bei 10 Messungen bei Verwendung der unbehandelten Proben wurden Fehlermeldungen angezeigt. Im weiteren Untersuchungsverlauf wurde nur noch bei einer Messung (457.2) ein solcher Fehler angezeigt.

4. Benzodiazepine

Unter den 25 untersuchten Leichenbluten befanden sich 19 Proben, die entweder bei der CEDIA – Untersuchung oder bei der Nachuntersuchung mittels HPLC über dem cut-off von 20ng/ml lagen.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden zeigt Abb. 17.

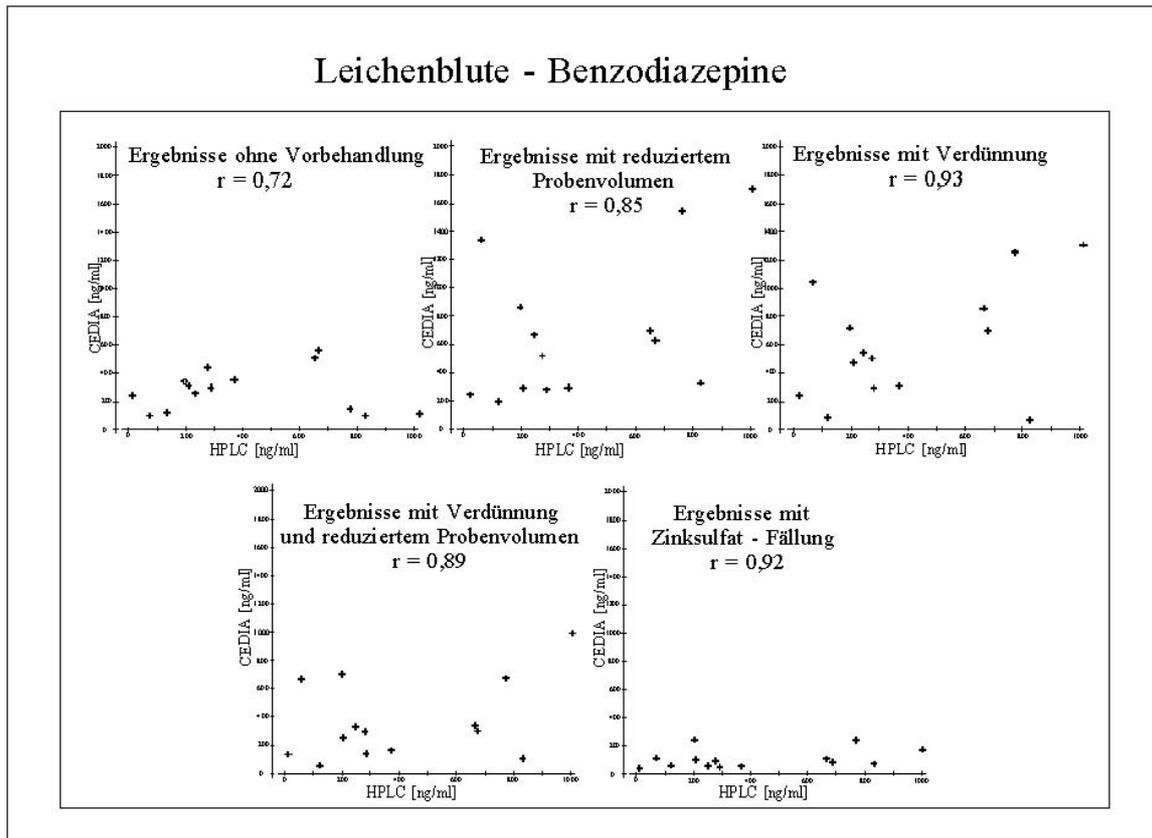


Abb.17: Vergleich der verschiedenen Vorbereitungsmethoden

Wie aus den angegebenen Korrelationskoeffizienten ablesbar ist, ergaben sich die besten Ergebnisse bei der Untersuchung mit verdünnter Probe oder nach durchgeführter $ZnSO_4$ – Fällung. Bei den Untersuchungsergebnissen 344.1, 344.2, 344.3, 411.1 und 1803.1 konnten die CEDIA – Ergebnisse, die zwischen 29 und 58 ng/ml lagen, mittels HPLC nicht bestätigt werden. Außer beim Ergebnis 411.1 wurde keine Fehlermeldung ausgegeben. Bei den drei oben angegebenen Proben (344, 411 und 1803) ergab sich nach $ZnSO_4$ – Fällung jeweils ein negatives CEDIA - Ergebnis. Alle nachuntersuchten CEDIA – negativen Proben wurden mittels HPLC als negativ bestätigt. Es traten also innerhalb dieser Untersuchung auf Benzodiazepine keine falsch - negativen Ergebnisse auf (siehe Tabelle 4):

Methode	Falschpositives Ergebnis	Falschnegatives Ergebnis
1	3	0
2	1	0
3	1	0
4	0	0
5	0	0

Tabelle 4: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Benzodiazepine

5. Cocain

Unter den 25 auf Cocain untersuchten Proben befanden sich 5 Proben, die mit GC-MS als cocainpositiv befunden wurden. Bei zwei dieser Proben (Tox-Nr. 60 und 183) maß der Immunoassay (Methode 1) die gefundenen GC-MS – Konzentrationen von 80 und 439ng/ml Benzoylcegonin ohne Fehlermeldung als 0ng/ml. Eine weitere Probe (Tox-Nr. 2372) wurde bei den Messungen 1, 2 und 4 mit Konzentrationen zwischen 13 und 17ng/ml gemessen, die alle unter dem cut-off von 50ng/ml lagen. Bei der GC-MS Untersuchung wurde in dieser Probe eine Konzentration von 15ng/ml BZE gefunden. Diese 3 Messergebnisse müssen als falsch-negativ gewertet werden, ebenso wie die Messung 2372.3, die 0ng/ml ergab.

Eine weitere Probe (Tox-Nr. 367), die in der Chromatographie positiv auf Cocain, BZE und Methylecgonin gemessen wurde, ergab beim Immunoassay bei der Untersuchung mit unbehandelten und verdünntem Leichenblut eine Fehlermeldung. Diese Fehlermeldung trat bei den anderen Behandlungsmethoden dieser Probe nicht mehr auf und die Probe wurde, da das Ergebnis über dem cut-off lag, als cocainpositiv gewertet.

Bei einer Probe (Tox-Nr. 2446) konnten die Ergebnisse aus den Messungen 2446.2 und 2446.4 von 64 und 56ng/ml mittels GC-MS nicht bestätigt werden. Bei weiteren drei Proben (Tox-Nr. 302, 345 und 1803) traten jeweils bei der Messung mit Methode 4 falsch-positive Ergebnisse zwischen 56 und 64ng/ml auf.

Bei der Untersuchung von unbehandelten Proben auf Cocain ergaben sich folglich 3 falsch-negative (Tox-Nr. 60, 183 und 2372) - das entspricht 12%. Bei der Verwendung eines reduzierten Messvolumens oder einer verdünnten Probe ergaben sich diese Fehler, mit

Ausnahme der von der Qualität des Untersuchungsmaterials sehr schlechten Probe 2372 nicht mehr.

Methode	Falschpositives Ergebnis	Falschnegatives Ergebnis
1	0	3
2	2	1
3	0	1
4	4	1
5	0	0

Tabelle 5: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Cocain

6. LSD

Bei der Untersuchung der 25 Leichenblute auf LSD konnte mittels HPLC keine positive Probe gefunden werden. Es traten beim Immunoassay Screening Messungen auf (2446.4; 1803.4; 364.4), die bei einer angegebenen Konzentration von 0,86, 0,30 und 0,26ng/ml über dem cut-off von 0,2ng/ml lagen. Da diese Proben mittels HPLC nicht bestätigt werden konnten, sind sie somit als falsch-positive Ergebnisse zu werten (siehe Tabelle 6):

Methode	Falschpositives Ergebnis	Falschnegatives Ergebnis
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	3	0
5	0	0

Tabelle 6: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf LSD

Bei 17 der Messungen mit Methode 1 mit 12µl eingesetztem Messvolumen traten Fehlermeldungen auf. Bei der Verringerung des Messvolumens auf 4µl (Methode 3) ergaben sich diese Fehlermeldungen nicht mehr. Bei 4 dieser 17 Proben ergaben sich die Fehlermeldungen erneut bei Verwendung der verdünnten Proben mit 12µl Messvolumen (Methode 2); bei der nächsten Messreihe mit verdünntem Material und 4µl (Methode 4) gab es erneut keine Fehlermeldungen.

7. Methadon

Unter den 25 Proben auf Methadon befand sich eine Probe (Tox-Nr. 344), in der 248ng/ml Methadon und 221ng/ml EDDP mittels GC-MS nachgewiesen werden konnten. Bei der Messung 344.1 mit dem Immunoassay wurde diese Probe als drogenfrei gemessen und das Ergebnis ohne Fehlermeldung ausgegeben. Bei den weiteren Messungen ergaben sich Ergebnisse von 612ng/ml (344.2), 438ng/ml (344.3), 730ng/ml (344.4) und 291ng/ml (344.5). Man erhielt somit bei der Messung mit unvorbehandelten Proben ein falsch-negatives Ergebnis, d.h. die einzige positive Probe wurde nicht erkannt.

Bei 6 Proben traten Fehlermeldungen auf, die nach Reduzierung des Messvolumens nicht mehr zu beobachten waren.

8. Morphinderivate

Unter den 25 auf Morphin und Morphinderivate untersuchten Proben befanden sich 19 Proben, die mittels GC-MS als positiv erkannt wurden. Die beste Korrelation zwischen den CEDIA – und den GC-MS – Ergebnissen wurden bei der Verwendung von unbehandeltem Leichenblut mit reduzierten Analysenvolumen (1µl statt 3µl = Methode 3) gefunden. Bei dieser Messreihe hatte der Korrelationskoeffizient den Wert $r = 0,76$. Folgende Ergebnisse wurden bei der Verwendung der übrigen Methoden gefunden: bei Vorbehandlung mit einer $ZnSO_4$ – Fällung $r = 0,69$. bei den unbehandelten Proben mit 3µl Analysenvolumen (Methode 1) $r = 0,58$, bei verdünnter Probe (Methode 2) $r = 0,71$ und $r = 0,6$ bei verdünnter Probe mit 1µl Analysenvolumen (Methode 4).

Bei den Untersuchungen traten zwei Fälle auf, bei denen eine Probe bei den ersten drei Messarten positiv gemessen wurde, bei den Messungen 35.4 und 345.4 jedoch mit 0ng/ml angegeben wurde. Bei der abschließenden Messung nach Fällung wurden wieder Werte ausgegeben, die über dem cut-off von 20ng/ml lagen. Dies dürfte an der Verdünnung und Reduzierung des Analysenvolumens liegen, die die geringe Drogenkonzentration noch weiter senkte. Beide Proben waren in der GC-MS Untersuchung positiv auf Morphinderivate gemessen worden.

Eine Probe (Tox.nr 366) lieferte bei den 5 Messungen Ergebnisse, die weit über dem cut-off lagen. Das niedrigste Ergebnis waren 728ng/ml. Dennoch konnte kein Nachweis auf

Morphinderivate mittels GC-MS erbracht werden. Diese Messungen sind somit als falsch-positiv einzustufen (siehe Tabelle 7).

Methode	Falschpositives Ergebnis	Falschnegatives Ergebnis
1	1	0
2	1	0
3	1	0
4	1	2
5	1	0

Tabelle 7: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Morphinderivate

9. THC

In den 25 auf Cannabinoide untersuchten Leichenblutproben konnten durch die GC-MS - Untersuchung bei 8 Proben Cannabinoide nachgewiesen werden

Bei Verwendung der Methode 1 ergaben sich bei 6 der 8 Messungen der Leichenblute mit dem CEDIA falsch-negative Ergebnisse. Diese traten bei den Methoden 2-5 nicht auf.

Bei 2 Messungen mit reduziertem Probenvolumen (60.2 und 344.2) wurden Konzentrationen von 55,2ng/ml und 27,4ng/ml angezeigt, die sich durch die Nachuntersuchung nicht bestätigen ließen. Messung 60.3 ergab auch ein Ergebnis über dem cut-off von 33,2ng/ml.

Bei den Untersuchungen nach ZnSO₄ – Fällung traten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse auf (siehe Tabelle 8).

Methode	Falschpositives Ergebnis	Falschnegatives Ergebnis
1	0	6
2	2	0
3	1	0
4	1	0
5	0	0

Tabelle 8: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Cannabinoide

10. Diskussion

Amphetamine

Bei der Messung auf Amphetamine ergab sich eine relativ große Anzahl von insgesamt 41 falschpositiven Messungen (33%). Ähnlich hohe Prozentsätze wurden schon früher bei anderen Immunoassays beschrieben (Armbruster et al. 1995), (Gjerde et al. 1990). Als Ursache hierfür wird die Kreuzreaktivität des Immunoassays mit biogenen Aminen vermutet (Armbruster et al. 1995). So kommt es zur Decarboxilierung von Phenylalanin zu Phenylethylamin im Rahmen postmortaler Fäulnisprozesse (Gjerde et al. 1990). Eine Möglichkeit zur Verringerung der falsch-positiven Resultate ist die Oxidation und Elimination der kreuzreagierenden sympathomimetischen Amine mit Natriumperiodat (Armbruster et al. 1995).

Um möglichst wenige Proben fälschlicherweise nachuntersuchen zu müssen, werden im Institut für Rechtsmedizin, München nach Screeninguntersuchung der 1:1 mit Wasser verdünnten Proben auf alle Drogengruppen lediglich die Fälle auf Amphetamine weiter untersucht, die im Verdacht stehen, tatsächlich amphetaminpositiv zu sein. Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, wird dazu eine $ZnSO_4$ – Fällung (Simonick, Watts 1992) durchgeführt.

Barbiturate

Bei den Messungen traten keine falschpositiven Resultate auf. Da aber keine der Proben positiv auf Barbiturate gemessen wurde, lässt sich über die Zuverlässigkeit der Messungen keine Aussage machen.

Benzodiazepine

Bei der Untersuchung auf Benzodiazepine traten keine falsch-negativen Ergebnisse auf, wie dies bei anderen Immunoassays beschrieben wurde (Schütz et al. 1992). Dies liegt an der guten Kreuzreaktivität der gängigen Benzodiazepine mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kalibrationssubstanz Nordiazepam.

Cocain

Beim Screening auf Cocain traten unter 125 Messungen insgesamt 6 falsch-positiv auf (5%). Bei einem Schwellenwert (cut-off) von 100 ng/ml statt 50 ng/ml hätte sich die Anzahl der falsch-positiven auf 0 reduziert, aber sämtliche positiven wären weiterhin als positiv erkannt

worden. Bei Messmethode 1 ergaben sich 4 falschnegative Untersuchungsergebnisse. Dies dürfte durch eine ungenügende Füllung der Probennadeln aufgrund der hohen Viskosität der Probe oder aufgrund von Fibringerinnseln bedingt sein. Diese Überlegung ergibt sich aus den weiteren Untersuchungen dieser Proben, da bei den vier folgenden Untersuchungen mit verändertem Probengut, jeweils weit über dem cut-off liegende Werte gefunden wurden. Ausnahme dazu war eine Probe mit sehr schlechter Materialqualität, bei der die tatsächliche Drogenkonzentration erst bei Fällung für den Immunoassay messbar wurde. Daraus lässt sich folgern, dass für Untersuchungen von Leichenbluten auf Cocain eine einfache Verdünnung 1:1 mit destilliertem Wasser bei zufriedenstellender Qualität des Untersuchungsmaterials genügt, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Bei sehr schlechter Qualität der Probe sollte vor der Messung eine Fällung durchgeführt werden. Durch die o.a. Anpassung des cut-off kann die Anzahl der unnötig nachuntersuchten Proben deutlich vermindert werden.

LSD

Beim Screening auf LSD ergeben sich aus den dargestellten Ergebnissen ähnliche Schlussfolgerungen wie bei den Messungen auf Cocain. Auch in diesen Fällen dürfte die relativ große Probenmenge von 12µl zu einer Verstopfung der Probennadel geführt haben. Bei den Messungen mit verdünnter Probe traten keine falsch-positive Ergebnisse auf: Auch bei den Messungen auf LSD erscheint eine einfache Verdünnung mit Wasser als gutes Mittel um Fehlermeldungen und falschpositive Ergebnisse zu vermeiden

Methadon

Auch hier ergab sich nach Verdünnung der Proben eine Verbesserung des Ergebnisses. Auftretenden Fehlermeldungen konnten durch Reduzierung des Probenvolumens oder Verdünnung beseitigt werden.

Morphinderivate

Bei den Messungen auf Morphinderivate fällt auf, dass bei zwei der Messungen mit verdünnter Probe und reduziertem Messvolumen (Methode 4) eine vorhandene Konzentration nicht mehr erkannt wurde. Das beweist, dass eine Reduktion des Messvolumens und Verdünnung der Probe eine Konzentration in der Probe so senken kann, dass die dann noch vorhandene Konzentration nicht mehr gemessen wird. Auch hier ist die einfache Verdünnung mit Wasser ausreichend.

THC

Auch hier zeigt sich, wie bei der Diskussion der Cocain-Messungen dargelegt, die deutliche Reduzierung der falschnegativen Ergebnisse durch die Verwendung von verdünnten Proben.

Fazit

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Messung von weitgehend flüssigen Leichenbluten mittels CEDIA DAU – Reagenzien nach einer Verdünnung 1:1 mit destilliertem Wasser verlässliche Screeningergebnisse für Benzodiazepine, Cannabinoide, Cocain, Methadon, LSD und Morphinderivate ergibt. Hierdurch können diejenigen Proben aussortiert werden, die nicht nachuntersucht werden müssen.

Beim Assay für Amphetamine ergeben sich wie oben beschrieben einige Probleme. Hier empfehlen wir eine Fällung mit $ZnSO_4$ – Lösung.

Über die Messungen mit Barbituraten kann aufgrund des Fehlens einer positiven Probe kein Aussage gemacht werden.

6. Ergebnisse der quantitativen Messversuche

1. Allgemeines

Um zu überprüfen, ob sich der CEDIA – Test für quantitative oder semiquantitative Aussagen über das Vorhandensein von Drogen eignet, wurden 250 Blutproben von Lebenden aus der Routine des Instituts mit dem Immunoassay untersucht.

Die Messungen erfolgten an 201 Plasmen und 49 Seren.

Die gefundenen Werte für Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Cocain, LSD, Methadon, Morphinderivate und THC wurden mit den chromatographisch ermittelten Werten verglichen. Diese wurden für Barbiturate, Benzodiazepine und LSD durch die HPLC, für die anderen Stoffgruppen durch die GC-MS gemessen.

Diese Nachmessung erfolgte aber im Gegensatz zur Untersuchung der Leichenblute nur bei einem, von Null verschiedenen CEDIA Ergebnis unabhängig vom cut-off und der Höhe des angezeigten Wertes. Alle Proben wurden ohne Vorbereitung zur Messung eingesetzt.

Der Grad der Trübung der Probe, durch Hämolyse oder Verunreinigungen verursacht, wurde durch Augenschein in vier verschiedene Kategorien eingeteilt:

- 0 keine Trübung
- 1 schwache Trübung
- 2 mittelstarke Trübung
- 3 starke Trübung

Aufgrund der großen Messbreite des Photometers (3,2 A) und der Wellenlänge des CEDIA DAU – Tests konnten auch Proben mit starker Trübung gemessen werden. Es sollte überprüft werden, ob eine Trübung die Messung beeinflusst (Slightom et al. 1984) oder daraus Fehlermeldungen des Gerätes resultierten (Simonick, Watts 1992).

Die Ergebnisse werden im Folgenden nach Stoffgruppen getrennt dargestellt.

2. Amphetamine

Unter den 250 gemessenen Blutproben befanden sich 10 Proben, bei denen die CEDIA – Messung einen höheren Wert als der des cut – off von 35ng/ml ergab. Unter diesen 10 Proben waren acht Seren und zwei EDTA-Plasmen. Ein Wert (Tox-Nr. 373) mit 48ng/ml konnte mittels GC/MS nicht bestätigt werden, stellt also ein falsch-positives CEDIA – Ergebnis dar.

Die Korrelation zwischen CEDIA und GC/MS beträgt $r = 0,59$.

Bei einer weiteren Versuchsreihe mit 10 Messungen, bei denen nach der Messung der unbehandelten Seren eine $ZnSO_4$ – Fällung (Simonick, Watts 1992) durchgeführt wurde, untersuchten wir alle 10 Proben mittels GC/MS nach.

Einen Auszug der Ergebnisse zeigt Tabelle 5:

Nr.	Hitachi		GC/MS		
	Serum	ZnSO ₄	Amph.	MDMA	MDEA
	[ng/ml]		[ng/ml]		
1	0	93	32		
2	33	251	200		
3	0	80		148	
4	0	59			602
5	9	122		526	423
6	405	335	16500	80	

Tabelle 9: Auszug aus dem Amphetamin - Screening und den Nachuntersuchungsergebnissen

3. Barbiturate

Bei den Messungen auf Barbiturate ergab sich unter den 250 Proben keine einzige, die über dem cut-off von 1000ng/ml lag. Allerdings wurden drei Proben mit einem von Null verschiedenen Ergebnis ausgegeben. Die Werte waren 21, 58 und 918ng/ml. Alle drei Werte sind als negativ zu werten. Eine dennoch durchgeführte Nachmessung mittels HPLC ergab für

die beiden kleineren Werte keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Barbituraten. Der größere Wert (Tox-Nr. 1680) ergab jedoch 5810ng/ml Phenobarbital, muss also als falschnegativ angesehen werden, die beiden anderen als richtignegativ. Dabei ist zu berücksichtigen, dass als Kalibrationssubstanz Secobarbital verwendet wurde. Phenobarbital weist zu Secobarbital eine Kreuzreaktivität von 83% auf.

4. Benzodiazepine

Bei 250 auf das Vorhandensein von Benzodiazepinen gemessenen Proben, wurden 108 Proben als positiv gewertet, d.h. es ergaben sich Werte, die über dem cut-off von 20ng/ml lagen. Einen Überblick über die Messwerte gibt Abbildung 18:

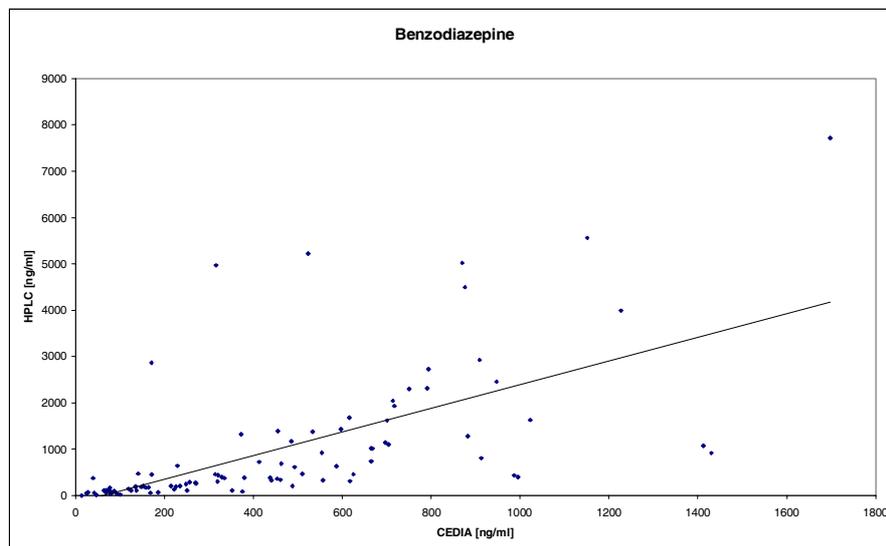


Abb.18: Vergleich des CEDIA Benzodiazepin Assays mit der HPLC

Der Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Tests beträgt $r = 0,64$. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob die beiden Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,5\%$ signifikant miteinander korrelieren, berechnet man t nach folgender Gleichung:

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{1-r^2}$$

mit $n = 98$, da bei 10 Proben der CEDIA Messung das Ergebnis als „high“ ausgegeben wurde und diese zur Berechnung nicht herangezogen werden können. Das Ergebnis ist t -verteilt mit 96 Freiheitsgraden ($n-2$).

Der entsprechende kritische Wert für die t-Verteilung eines zweiseitigen Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,5\%$ beträgt laut Tabelle (Harms 1992):

$$t(0,005) = 3,17.$$

Der errechnete Wert liegt bei $t = 10,886$ und ist damit größer als der kritische Wert. Wir können daher die Aussage treffen, dass die beiden Meßmethoden signifikant miteinander korrelieren.

5. Cocain

Die Messung auf Cocain und seine Abbauprodukte ergab bei 35 Proben ein positives CEDIA – Ergebnis. Vier Ergebnisse lagen unter dem cut-off von 50ng/ml. Drei davon waren in der GC-MS – Messung positiv, sind somit falsch negative Ergebnisse. Diese drei Werte waren 40, 44, und 46ng/ml. Das vierte Ergebnis, das unter dem cut-off lag, wurde mit 19ng/ml gemessen, wobei sich in bei der Nachmessung kein Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Cocain ergab.

Die Korrelation zwischen den CEDIA – und den GC-MS – Werten liegt bei $r = 0,92$. Betrachtet man nur die Messungen betrachtet, bei denen Benzoylcocgonin in der Nachmessung gefunden wurde, dann ergibt sich mit $r = 0,97$ ein noch besserer Zusammenhang. Die Regressionsgerade wurde mit $y = 1,13x - 25,2$ bestimmt. Dieser Zusammenhang gilt aber nur für den Bereich zwischen 40 und 2000ng/ml.

Eine Unterscheidung zwischen den untersuchten Plasmen und Seren ergab keine weitere Verbesserung des Ergebnisses.

Bei einer Probe lag der gemessene CEDIA – Wert bei 2770ng/ml betrug (Tox-Nr. 2172), die gaschromatographische Bestätigung ergab 6630ng/ml.

In Abbildung 19 wurde dieser Wert aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

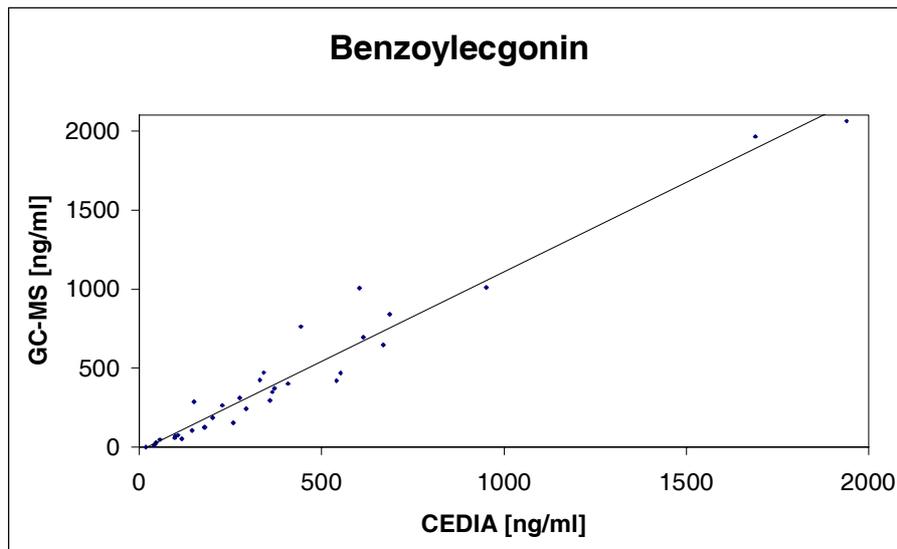


Abb.19: Vergleich des CEDIA Benzoylecgonin Assays mit der GC-MS

6. LSD

Sieben der 250 mittels CEDIA gescreenten Proben wurden mit einem Wert gemessen, der oberhalb des cut-off von 0,2ng/ml lag. Von diesen sieben Messungen konnten fünf mittels HPLC bestätigt werden. Die beiden anderen Proben (Tox-Nr. 2434 und 2754) mit CEDIA – Konzentrationen von 0,3 und 0,57ng/ml wurden als falsch-positiv erkannt, da chromatographisch keine LSD Spuren nachweisbar waren. Die Probe 2434 enthielt 14ng/ml THCCOOH, die Probe 2754 enthielt überhaupt keine der überprüften Drogen.

7. Methadon

Die Messungen auf Methadon und dessen Abbauprodukt EDDP ergaben 15 CEDIA positive Ergebnisse oberhalb des cut-off von 35ng/ml. 14 dieser Messungen konnten mittels GC-MS bestätigt werden. Die Probe 1328 ergab beim Immunoassay 185ng/ml, was nicht bestätigt werden konnte. In der Probe waren Diazepam, Nordiazepam, THC und THCCOOH nachweisbar, die aber selbst in Konzentrationen von 500.000ng/ml laut Hersteller (Boehringer Mannheim 1995) keinen Einfluss auf das Methadon – Screening haben sollten.

8. Morphinderivate

Unter den 93 durch CEDIA von Null verschieden gemessenen Proben war eine, die unterhalb des cut-off von 20ng/ml gemessen wurde. Diese Probe (Tox-Nr.1987) ergab 7ng/ml mittels Immunoassay und 0ng/ml in der gaschromatographischen Nachmessung. Das Ergebnis muss also als richtignegativ gewertet werden.

Die anderen 92 Proben konnten alle mittels GC-MS bestätigt werden.

Einen Überblick über die gemessenen CEDIA – Ergebnisse und die Ergebnisse der chromatographischen Nachmessungen gibt Abbildung 20:

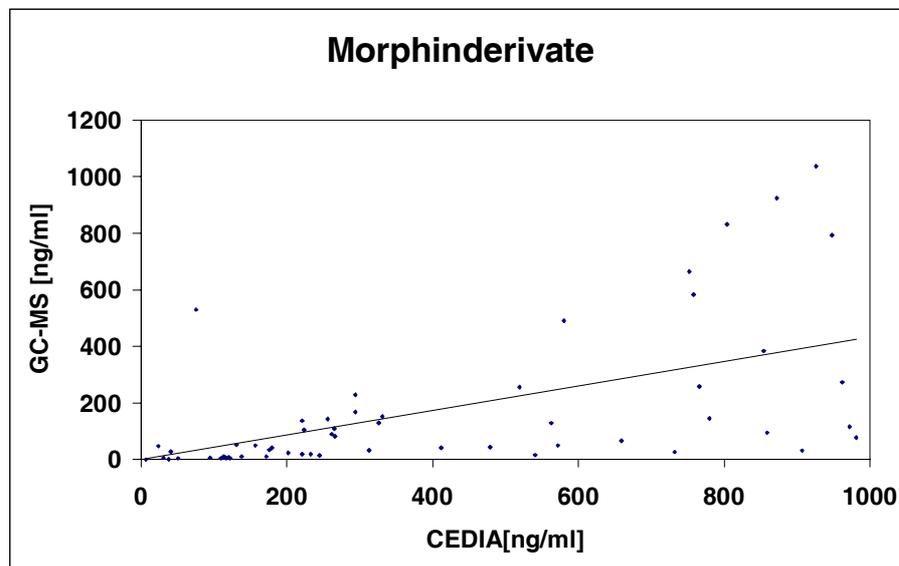


Abb.20: Vergleich des CEDIA Morphinderivate Assays mit der GC-MS

Man erkennt, dass bei allen gemessenen Größenordnungen die GC-MS – Werte von den CEDIA – Ergebnissen stark abweichen. Auch in den höheren Konzentrationsbereichen liegen die chromatographischen Ergebnisse teilweise über, teilweise unter den Werten, die mittels des Immunoassays gefunden wurden.

9. THC

Es wurden 113 Proben positiv auf Cannabinoide gemessen. Abbildung 21 zeigt die gemessenen Werte:

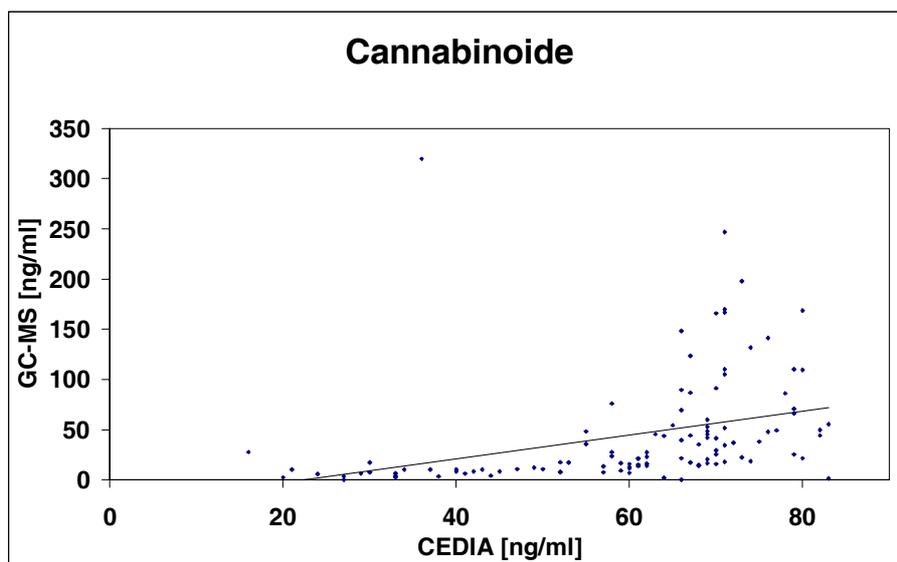


Abb.21: Vergleich des CEDIA THC Assays mit der GC-MS

Unter den 113 Proben befanden sich zwei falsch-positive mit angeblichen Konzentrationen von 27 und 66ng/ml. Alle anderen positiven Ergebnisse konnten bestätigt werden.

10. Diskussion

Amphetamine

Die Korrelation zwischen CEDIA- und GC/MS- Messwerten beim Screening auf Amphetamine ist mit $r = 0,59$ als schlecht einzustufen, d.h. es kann aus einem gemessenen CEDIA – Wert nicht auf die tatsächlich vorhandene Drogenmenge geschlossen werden. Dies lässt sich anhand von 5 Messungen (Tox-Nr. 34, 156, 373, 448 und 1278) sehr gut darstellen. Die Werte des Immunoassay ergaben hier Werte zwischen 47 und 59ng/ml, d.h. der größte Wert war nur 1,25 mal so groß wie der kleinste. Die Ergebnisse der GC/MS – Messung lagen aber zwischen 0 und 536ng/ml. Klammert man das eine falsch – positive Ergebnis aus, so erhält man Werte zwischen 24 und 536ng/ml, d.h. der größte Wert war 22,3 mal so groß wie

der kleinste. Also kann selbst eine Eingrenzung des Konzentrationsbereiches durch die CEDIA – Messung nicht durchgeführt werden.

Aus der zweiten Messreihe mit 10 unbehandelten Seren und durchgeführter $ZnSO_4$ -Fällung lässt sich bei den Amphetaminen ein starker Matrix – Effekt erkennen. Um diese Matrixeffekte zu vermeiden, muss eine Vorbehandlung der Proben durchgeführt werden. Eine Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln wird als sehr problematisch angesehen, da beim Trocknungsvorgang die Konzentration der flüchtigen Amphetamine verringert werden kann (Iwersen-Bergmann et al. 1998). Die Zugabe einer methanolischen Salzsäure – Lösung verhindert diesen Verlust, verursacht aber eine Verminderung der Cannabis – Konzentration um etwa 30% (Cagle et al. 1997) Daher ist eine Proteinfällung mit einer methanolischen $ZnSO_4$ – Lösung (Simonick, Watts 1992) nach unseren Ergebnissen eine gute Alternative.

Barbiturate

Da insgesamt nur drei Proben einen Messwert aufweisen, der von Null verschieden war, kann keine Aussage über die Zuverlässigkeit der Messungen gemacht werden.

Benzodiazepine

Wenn man die Ergebnisse der HPLC - Nachuntersuchungen mit den Werten der CEDIA – Messung vergleicht, so stellt man die große Schwankungsbreite bei allen gemessenen Größenordnungen der Messwerte fest. Trotz des nachgewiesenen signifikanten Zusammenhangs zwischen CEDIA- und HPLC - Messung kann wegen des breiten Spektrums von gebräuchlichen Benzodiazepinen keine quantitative oder semiquantitative Aussage über die verwendete Substanz oder die Stoffkonzentration gemacht werden. So liegen die Kreuzreaktivitäten für die Messung in Urinen bei den Benzodiazepinen, die in den 112 Proben gefundenen wurden, zwischen 107% für Oxazepam und 247% für Diazepam (Boehringer Mannheim 1995). Diesen Kreuzreaktivitäten liegt die normalerweise verwendete Kalibrationssubstanz Nitrazepam zugrunde. Die hier verwendete Kalibrationssubstanz war Nordiazepam mit einer Kreuzreaktivität zu Nitrazepam von 211%.

Da die Kreuzreaktivitäten in dieser Weise differieren, kann aus einem ermittelten CEDIA - Wert nicht auf eine in der Probe tatsächlich vorhandene Stoffkonzentration geschlossen werden. Auch eine ungefähre Abschätzung ist nicht möglich.

Cocain und Abbauprodukte

Drei Proben wurden falschnegativ gemessen. Die Messwerte bei diesen drei Proben lagen mit 40, 44 und 46 ng/ml nur knapp unterhalb des ermittelten cut-off. Um die Anzahl der falschnegativen Ergebnisse zu verringern, sollte man evtl. noch einmal eine erneute Bestimmung der matrixbereinigten Nachweisgrenze durchführen, da diese scheinbar zu hoch gewählt wurde.

Die Messung der Probe mit der Tox-Nr. 2172 ergab für die HPLC - Messung einen Wert von 6630 ng/ml und damit einen 2,4fach höheren Wert im Vergleich zum CEDIA Ergebnis von 2270 ng/ml. Der Grund für diese große Abweichung dürfte wahrscheinlich in der Sättigung des Enzymimmunoassays bei höheren Konzentrationen liegen, da der Hersteller einen Messbereich zwischen 0 und 5000ng/ml angibt (Boehringer Mannheim 1994).

Die gute Korrelation von $r = 0,97$ zwischen CEDIA und GC-MS zeigt, dass auch eine quantitative Bestimmung mittels Immunoassay möglich ist. Dazu muss aber eine der folgenden Voraussetzungen erfüllt sein: In der Probe ist nur eine Substanz enthalten, das Spektrum der kreuzreagierenden Substanzen ist klein oder die Kreuzreaktivitäten sind ähnlich. Die Kreuzreaktivitäten werden für BZE als Kalibrationssubstanz mit 100%, für Cocain mit 57% und für Methylecgonin mit 3% angegeben (Boehringer Mannheim 1995). Cocain und Methylecgonin wurden allerdings jeweils in nur 5 Fällen gefunden. Sowohl in vivo, als auch in vitro ist Benzoylecgonin das Hauptabbauprodukt des Cocain.

LSD

Bei 2 Proben ergab die CEDIA - Messung ein falschpositives Ergebnis. In einer Probe war eine Konzentration von 14 ng/ml THCCOOH enthalten. Dass die Anwesenheit von Cannabinoiden die Messung beeinflusst haben könnte, ist aber unwahrscheinlich, da bei 114 Cannabis positiven Proben kein weiteres falsch-positives LSD – Ergebnis auftrat (siehe unter Kap. 6.9 THC).

Das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen könnte an der Beeinflussung des Immunoassays bei Vorliegen von schleimlösenden Substanzen wie Ambroxol (Mucosolvan[®]) oder Bromhexin (Bisolvon[®]) liegen, wie das für die Verwendung von Urinen als Probenmaterial beschrieben wurde (Roehrich et al. 1998).

Methadon

Bei den Messungen auf Methadon konnten 14 der 15 Messergebnisse, die über dem cut-off lagen mittels GC-MS bestätigt werden.

Morphinderivate

Alle 92 Messergebnisse oberhalb des cut-off konnten bestätigt werden. Eine semiquantitative Abschätzung ist aber anhand des CEDIA – Ergebnisses nicht möglich, da sich eine nur mäßige Korrelation von $r = 0,58$ zwischen CEDIA und GC-MS Ergebnissen ergab.

Cannabinoide

Der zwischen dem cut-off von 20ng/ml und 65ng/ml errechnete Korrelationskoeffizient von $r = 0,02$ beschreibt, dass für Cannabinoide kein Zusammenhang zwischen CEDIA- und den GC-MS – Werten besteht. Die meisten Ergebnisse des Immunoassays in diesem Bereich lagen über den Werten der GC-MS Bestätigung. Bei Konzentrationen oberhalb von 65ng/ml lagen die Werte der CEDIA – Messung meist unterhalb der Bestätigungsmessung. Dies dürfte auf eine Sättigung, des Assays bei höheren Konzentrationen zurückzuführen sein.

Fazit

Die Untersuchung der 250 Blutproben von Lebenden aus der Routine des Instituts durch den CEDIA ergab, dass eine quantitative Aussage über die enthaltene Drogenkonzentration mit Ausnahme der Messung auf Cocain und Abbauprodukte nicht möglich ist. Auch eine semiquantitative Abschätzung des Konzentrationsbereichs kann bei allen anderen Stoffgruppen nicht gemacht werden. Aufgrund der gruppenspezifischen Reaktionen der Immunoassays (Jarausch et al. 1995) konnten wir durch den CEDIA nur qualitative Zusammenhänge beweisen.

Die ausgegebenen Werte stimmen mit den tatsächlichen Konzentrationen sowieso nur für die jeweils verwendete Kalibrationssubstanz überein, für alle anderen Substanzen werden nur Substanzäquivalente ausgegeben, die über die Kreuzreaktivität mit dieser Substanz zusammenhängen. Theoretisch wäre es möglich, die vom Immunoassay gefundenen Werte auf tatsächlich vorhandene Konzentrationen zurück zu rechnen. Dies ist aber nur dann möglich, wenn bekannt ist, dass in der Probe nur eine Substanz oder nur eine Substanz mit einer nennenswerten Kreuzreaktivität vorhanden ist. Dies konnte für das Kokainabbauprodukt Benzoylcegonin gezeigt werden. In den meisten Fällen ist dies jedoch nicht möglich, da entweder mehrere Drogen oder aber auch deren Abbauprodukte enthalten sind. Für diese Überlegungen spielt es natürlich keine Rolle, ob die zu untersuchenden Proben aus Leichenbluten oder Seren bestehen.

Die Probenart bei den Routinebluten, also Serum oder EDTA-Plasma hatte keinen Einfluss auf die Untersuchung. Auch konnten wir keine Beeinträchtigung des Ergebnisses durch

hämolytische Proben feststellen. Da wir aber nur eine kleine Anzahl (n=14) an hämolytischen Proben in der Routine hatten, ist es schwierig hierüber eine genaue Aussage zu treffen. Keine dieser Proben ergab ein falschpositives Ergebnis.

Sehr gut durchführbar ist eine Aussortierung derjenigen Proben, bei denen eine zeitaufwendige und kostenintensive Nachmessung nicht nötig ist. Diese Ergebnisse wurden mit der Verwendung von unvorbehandelten Proben erzielt. Es ergab sich meist nur eine geringe Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen, die dann unnötigerweise nachuntersucht wurden.

Die Ergebnisse für Amphetamine müssen dabei getrennt von denen anderen Drogengruppen betrachtet werden, da hier wenigstens eine Verdünnung 1:1 mit Wasser, besser aber eine Fällung mit methanolischer $ZnSO_4$ - Lösung durchgeführt werden sollte. Dies bestätigten vor allem die Nachuntersuchungen der 2. Versuchsreihe mit 10 Proben.

Auch bei den Messungen auf LSD müssen Abstriche in Kauf genommen werden. Dies liegt vor allem an der oben beschriebenen Kreuzreaktivität des CEDIA DAU LSD – Assays mit häufig verwendeten schleimlösenden Medikamenten wie Ambroxol oder Bromhexin, wie dies für Urine gezeigt werden konnte (Röhrich et al. 1998).

Vor allem bei den Drogen, die häufig in den Proben vorhanden sind, wie Benzodiazepine, Cocain, Opiate und Cannabinoide, konnten gute Ergebnisse des CEDIA – Assays auch ohne Vorbehandlung festgestellt werden.

7. Zusammenfassung

Es wurden 25 Leichenblutproben auf das Vorhandensein von Amphetaminen, Barbituraten, Benzodiazepinen, Cocain, LSD, Methadon, Morphinderivate und Cannabinoiden mittels CEDIA-DAU Reagenzien auf einem Hitachi 911 bei Wellenlängen von 660/570 nm gemessen.

Hierbei wurden unbehandelte und 1:1 mit Wasser verdünnte Proben gemessen. Dazu wurden Messungen mit reduziertem Messvolumen, mit verdünnter Probe und reduziertem Messvolumen und nach Fällung mit Zinksulfat durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden mit gaschromatographischen Nachmessungen verglichen.

Es ergab sich, dass die Messung von weitgehend flüssigen Leichenbluten mittels CEDIA-DAU –Reagenzien nach einer Verdünnung 1:1 mit destilliertem Wasser verlässliche Screeningergebnisse für Benzodiazepine, Cannabinoide, Cocain, Methadon, LSD und Morphinderivate ergibt. Hierdurch können diejenigen Proben aussortiert werden, die nicht nachuntersucht werden.

Beim Assay für Amphetamine ergeben sich einige Probleme. Hier wird eine Zinksulfat-Fällung empfohlen.

Über die Verlässlichkeit der Messungen bei Barbituraten kann aufgrund des Fehlens einer positiven Probe keine Aussage gemacht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde 201 EDTA-Plasmen und 49 Seren von Lebenden aus der Routine des Labors auf das Vorhandensein von o.a. Drogen mittels CEDIA-DAU gescreent.

Die Konfirmation der Ergebnisse erfolgte wiederum mit HPLC oder GC-MS je nach Stoffgruppe.

Hierbei ergab sich, dass mit Ausnahme der Messung auf Benzoyllecgonin eine quantitative Aussage über die enthaltene Drogenkonzentration nicht möglich ist. Auch eine semiquantitative Abschätzung des Konzentrationsbereiches kann nicht gemacht werden.

Sehr gut durchführbar ist allerdings ein Aussortierung derjenigen Proben, bei denen eine zeitaufwendige und kostenintensive Nachmessung nicht nötig ist. Diese Ergebnisse werden bei der Verwendung von unbehandelten Proben erzielt. Es ergab sich eine nur geringe Anzahl an falschpositiven Ergebnissen, die dann unnötigerweise nachuntersucht wurden.

Der CEDIA DAU[®] ist somit eine verlässliche Methode, um diejenigen Proben herauszufiltern, bei denen eine zeitaufwendige, quantitative Nachmessung angebracht ist.

8. Anhang

1. Tabellen - und Abbildungsverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Matrixbereinigte Nachweisgrenzen des CEDIA DAU®</i>	18
<i>Tabelle 2: Substituenten einiger wichtiger Barbiturate</i>	23
<i>Tabelle 3: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Amphetamine</i>	36
<i>Tabelle 4: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Benzodiazepine</i>	38
<i>Tabelle 5: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Cocain</i> .	39
<i>Tabelle 6: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf LSD</i>	39
<i>Tabelle 7: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Morphinderivate</i>	41
<i>Tabelle 8: Anzahl der falschpositiven und falschnegativen Ergebnisse beim Leichenblutscreening auf Cannabinoide</i>	41
<i>Tabelle 9: Auszug aus dem Amphetamin - Screening und den Nachuntersuchungsergebnissen</i>	46
<i>Abb.1: Anteil der Blutuntersuchungen an den Blut- und Urinuntersuchungen</i>	4
<i>Abb.2: EA und ED rekombinieren spontan zum aktiven Enzym</i>	10
<i>Abb.3: Ein Analyt wird an den ED angelagert ohne die spontane Rekombination zu behindern</i>	10
<i>Abb.4: Die Anlagerung des Ak an das ED – Analyt Konjugat behindert sterisch die Rekombination</i>	11
<i>Abb.5: Das Analyt konkurriert um die Bindung an den Antikörper</i>	11
<i>Abb.6: Allgemeiner Extinktionsverlauf in Abhängigkeit von der Reaktionszeit</i>	13
<i>Abb.7: Baugruppen des Hitachi 911</i>	14
<i>Abb.8: Strukturformel Amphetamine</i>	21
<i>Abb.9: Strukturformel des Barbiturate-Grundgerüsts</i>	23
<i>Abb.10: Strukturformel Diazepam</i>	24
<i>Abb.11: Abbauwege wichtiger Benzodiazepine</i>	25
<i>Abb.12: Strukturformel THC</i>	26
<i>Abb.13: Strukturformel Cocain</i>	28
<i>Abb.14: Strukturformel LSD</i>	30
<i>Abb.15: Strukturformel Methadon</i>	32
<i>Abb.16: Strukturformel Morphin</i>	33
<i>Abb.17: Vergleich der verschiedenen Vorbereitungsmethoden</i>	37
<i>Abb.18: Vergleich des CEDIA Benzodiazepin Assays mit der HPLC</i>	47
<i>Abb.19: Vergleich des CEDIA Benzoyllecgonin Assays mit der GC-MS</i>	49
<i>Abb.20: Vergleich des CEDIA Morphinderivate Assays mit der GC-MS</i>	50
<i>Abb.21: Vergleich des CEDIA THC Assays mit der GC-MS</i>	51

2. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSTFA	Bis-trimethyl-silyl-tri-fluor-acetamid
BuOH	Butanol
BZE	Benzoylecgonin
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CEDIA	cloned enzyme donor immunoassay
DHC	Dihydrocodein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	Dimethylformamid
EA	Enzymakzeptor
ED	Enzymdonor
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin
ELISA	enzyme linked sorbent immunoassay
EtAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
ESA	Essigsäureanhydrid
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique
FPIA	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay
GC-MS	Gaschromatographie - Massenspektrometrie
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LD	Limit of Detection
LSD	Lysergsäure-di-ethyl-amid
I.S.	Interner Standard
MAM	Mono-acetyl-morphin
MDA	Methylen-dioxy-amphetamin
MDMA	3,4-Methylen-dioxy-methamphetamin
MetOH	Methanol
MW	Mittelwert
PSA	Propionsäureanhydrid
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
s	Standardabweichung
StPO	Strafprozeßordnung
THC	Tetra-hydro-cannabiol
THC-COOH	THC-Carbonsäure
Tol	Toluol
Tox-Nr.	Probennummer in der Toxikologie
Toxnummer	Probennummer in der Toxikologie
ZnSO ₄	Zinksulfat

3. Verwendete Materialien und Reagenzien

Aceton (Merck p.a. 00014)
Acetonitril (Fisher Scientific, Far UV HPLC, A/0627)
Aqua ad injectabile (H₂O Braun Melsungen)
Bistrimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA Macherey-Nagel Art.-Nr. 701 220 201)
Butanol (BuOH Merck p.a. 01990)
Chlorbutan (1-Chlorbutan Fisons, HPLC, C/4756)
Chloroform (Merck p.a. 02445)
Diethylether (Merck Uvasol 00930)
Ethylenglykol (Merck pro analysi, 9621)
Essigsäureanhydrid (ESA Merck p.a. 00042)
Essigsäure (0,1M Merck Titrisol 0994)
Ethanol (EtOH Merck p.a. 00983)
KH₂PO₄ (Merck p.a. 04873)
Methanol (Merck, prepsolv 13351)
Methylclonazepam (Hoffmann la Roche, Reinsubstanz)
n-Hexan (Merck p.a. 04374)
ortho-Phosphorsäure (85 % Merck p.a. 00573.)
Propanol (Merck p.a. 13386)
Propionsäureanhydrid (PSA Sigma EEC-No. 204-638-2)
Salzsäure (HCl Merck p.a. 13386)
Toluol (Merck p.a. 08325)
Triethylammoniumphosphat-Puffer 1,0M (FLUKA-Artikel Nr. 90362)

Desweiteren wurden folgende Lösungen verwendet:

Phosphat Puffer 0,02 M, pH 2,0 : 3,0 g KH₂PO₄ in 2,0 l Aqua ad injectabile gelöst, mit ortho-Phosphorsäure ersetzt und auf einen pH von 2,0 eingestellt und anschließend durch ein säurefestes Filterpapier filtriert

Phosphatpuffer pH 2,5

Methohexital in EtOH

Elutionsgemisch: Laufmittel/Acetonitril 80/20, pH 3,30

Reinigungsgemisch: Acetonitril/H₂O 90/10

4. Methoden der HPLC – Messungen

4.1 Benzodiazepine (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Stammlösungen:	7-Aminoflunitrazepam
je 0,1 mg%	7-Acetaminoflunitrazepam
	Norflunitrazepam
	Flunitrazepam
je 1mg%	Oxazepam
	Desmethyldiazepam
	Temazepam
	Diazepam
	Methylclonazepam
Vergleiche:	Flunitrazepam + Metaboliten je 0,06 mg/l (60µl 0,1 mg%ige Lösung)
	Diazepam + Nordiazepam je 0,3 mg/l (30µl 0,1 mg%ige Lösung)
	Temazepam + Oxazepam je 0,1 mg/l (10µl 0,1mg%ige Lösung)
Interner Standard:	Methylclonazepam 0,3 mg/l
	30 µl 1mg%ige Lösung auf 1ml Serum (Aufarbeitung s.u.)
Probenvorbereitung/Extraktion:	
	1 ml Serum/Blut
	+ 30 µl Methylclonazepam 0,3mg/l
	+ 5 ml Chlorbutan
	1 min mechanisch schütteln und 3 min bei 5000rpm zentrifugieren
	obere organische Phase mit Pasteurpipette abnehmen
	+ 30µl Ethylenglykol
	am Rotavapor bei 50 ⁰ C bis auf das Ethylenglykol eindampfen
	aufnehmen in 70µl 50/50 Acetonitril/H ₂ O
	kurz rütteln
	in Autosampler-Cups abfüllen
HPLC Analyse.	30µl bei 254nm (Nebenwellenlänge 230nm) mit einer Flußrate von 0,9ml/min bei Raumtemperatur (23°C) auf einer RP-Select B Säule 250 x 4mm ID (E.Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer mobilen Phase aus einem Gemisch von Acetonitril und 0,02M Phosphat Puffer pH 2,0 (36/36 v/v)

Auswertung: Quantifizierung über Quotienten der Vergleiche

Barbiturate (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Stammlösungen: Phenobarbital

je 2 mg% Cyclobarbital

Pentobarbital

Secobarbital

10 mg% Methohexital in EtOH

Vergleiche: 0,5ml Rinderserumalbumin

+ zu erwartende Konz. an Barbituraten

+ interner Standard (= Methohexital oder Camazepam)

Probenvorbereitung/Extraktion:

0,5 ml Serum bzw. Blut

+ I.S. (s.o.)

+ 5 ml Chloroform

schütteln, zentrifugieren

organische Phase abrotieren

in 100-200 µl Eluens (Phosphatpuffer pH 2,5 / Acetonitril (55/45))

aufnehmen

HPLC Analyse. Säule: Nucleosil C18 (Fa. Bischoff)

Detektion: UV 220nm mit DAD

Auswertung: Quantifizierung über Quotientenbildung mit I.S.

LSD (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Stammlösungen: 25ng/ml LSD in MeOH

25ng/ml LSD in Acetonitril

LSD-Puffer: KH_2PO_4 6,8g, K_2HPO_4 14,9g, NaCl 8,77g, auf 1l H_2O

auffüllen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

Vergleiche: 0,5ng/ml LSD

Innerer Standard: Lampa: (Plasma/Vollblut 0,75ng)

Probenvorbereitung/Extraktion:

2ml Sarstedt-Röhrchen +8ml MeOH

vortexen und zentrifugieren, in 2ml Eppendorf-Cups abnehmen und zentrifugieren (12000rpm)

in Schlifgläser überführen und auf 1/2ml einrotieren

+ 5ml LSD-Puffer

Konditionierung der Extraktionssäule mit 2 x 2ml Methanol

Aktivierung durch 1 x 2ml Elutionsgemisch

Aufziehen des Untersuchungsmaterials in 2ml Elutionsgemisch und 1ml I.S.

Nachwaschen 2 x 2ml Elutionsgemisch und

Reinigung des gebundenen Anteils mit 1 x 1ml Reinigungsgemisch

eluieren mit 2x1ml Methanol

Aufbereitung mit 25µl Ethylenglykol

schonend im Rotationsverdampfer verdampfen

300 µl Methanol zum Spülen der Gefäßwand dazugeben

schonend verdampfen

25µl Elutionsgemisch dazugeben

HPLC Analyse. Einsetzen von 20 µl zu Analyse

Auswertung: Quantifizierung über Quotientenbildung mit I.S.

5. Methoden der GC – MS Messungen

5.1 Amphetamin (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Interner Standard: 200ng/ml Carbamazepin

Aufarbeitung: 1ml Blut + 200ng/ml Carbamazepin (I.S.)

+ 5ml Carbonatpuffer pH 9

vortesten, 1 min stehen lassen, 5 min bei 5000 rpm. zentrifugieren

XAD-Säulchen konditionieren

Blute durchsaugen

waschen mit 5ml Puffer und 5ml H₂O

1 Stunde trockensaugen

mit 2 x 1ml Ether/Ethylacetat (1:1) eluieren

bei 40°Celsius mit etwas konzentrierter Essigsäure abdampfen

+ 100µl ESA

30min bei 100°C derivatisieren
abdampfen und in 50µl EtAc aufnehmen

GC-MS – Bedingungen:

100-300°C, 20°C/min

SIM-Methode: m/z 86;118(Amphetamin)

m/z 58;100 (Methamphetamin)

m/z 135;162;221 (MDA)

m/z 58;100;162 (MDMA)

Quantifizierung:

über den Vergleich mittels Quotientenbildung mit I.S.(m/z 236 Carbamazepin))

Morphinderivate (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Stammlösung: Dihydrocodein (DHC) 1mg%=10ng/µl

Codein 1mg%=10ng/µl

Monoacetylmorphin (MAM) 1mg%=10ng/µl

Morphin 1mg%=10ng/µl

Interner Standard: Methaqualon 1mg%=10ng/µl

Vergleich: 500ng/ml Dihydrocodein

100ng/ml Codein

100ng/ml Morphin

in 1ml Vollblut

Probenvorbereitung:

1ml Blut

+ 100ng/ml Methaqualon (I.S.)

+ 5ml Carbonatpuffer pH 8,9

15min stehen lassen

5min bei 5000 rpm zentrifugieren

XAD-Säulchen konditionieren

Blut aufbringen

waschen mit 5ml Puffer pH 8,9

5ml H₂O

50µl Aceton

1 Stunde trocken saugen

mit 3 x 0,5ml Tol/BuOH 9:1 eluieren
abdampfen
+ 50µl PSA 45 min, bei 100°C abdampfen
in 50µl 1% PSA/EAC aufnehmen

GC-MS – Bedingungen:

GC 140-300°C; 20°C/min

SIM-Methode: m/z 300; 357 (Dihydrocodein)

m/z 282; 355 (Codein)

m/z 327; 383 (Monoacetylmorphin)

m/z 341; 397 (Morphin)

Quantifizierung:

über den Vergleich mittels Quotientenbildung mit I.S.(m/z 250 (Methaqualon))

Kalibration: Quantifizierung über beide Massen → Mittelwert

Kontrolle: Sollwert Morphin: 0,056 mg/l

Cocain (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Stammlösungen:

Cocain 10mg%

Benzoyllecgonin 10mg%

Methylecgonin 7,8 mg%

Vergleich: Cocain 100ng

Benzoyllecgonin 250ng

Methylecgonin 257ng

Interner Standard:

d³-Cocain 10µg/ml

d³-Benzoyllecgonin 10µg/ml

Probenvorbereitung:

1ml Serum bzw. Vollblut

+ I.S.

+ 5ml Carbonatpuffer pH 9,0

1 min. rütteln, 15 min stehen lassen

5 min. bei 5000rpm zentrifugieren

Oasis-Säulchen (300mg) konditionieren

Probe aufgeben (max. 1ml/min)
waschen mit 5ml Carbonatpuffer pH9
waschen mit 5ml H₂O
mind. 1h trocknen lassen
eluiieren mit 3 mal 1ml Cocain-Eluens
(Acetonitril 125ml, MeOH 25ml, Chlorbutan 100ml)
derivatisieren mit 30µl Acetonitril + 30µl BSTFA
30 min. bei 100°C
1µl dieser Mischung direkt in GC-MS

GC-MS-Bedingungen:

100°C → 300°C mit 20°C/min (splitless injection)

SIM-Methode: m/z 306 (d³-Cocain)

m/z 364 (d³-Benzoylecgonin)

m/z 182; 303 (Cocain)

m/z 240; 361 (Benzoylecgonin)

m/z 155, 182, 240 (Methylecgonin)

Quantifizierung:

mittels Quotientenbildung mit I.S. und Berechnung über den Vergleich

Cannabis (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Interner Standard:

d³-THC 10µg/ml

d³-THC-COOH 10µg/ml

Stammlösungen:

THC 10mg% (1:100 verdünnt)

THC-COOH 10mg% (1:10 verdünnt)

THC-OH 10mg% (1:10 verdünnt)

Vergleiche: 5ng THC

20ng THC-COOH

10ng THC-OH

Kontrolle: Aktuelle Plasmakontrolle der Firma MediChem[®], Waldbrück, Deutschland

Probenvorbereitung:

1ml Serum bzw. Vollblut

+ I.S. (je 2µl d³-THC und d³-THC-COOH)
+ 5ml Acetatpuffer pH 4,5
1 min. rütteln; 15 min. stehen lassen
5 min. bei 5000rpm zentrifugieren
Certify-Säulchen (300 mg) HCX aktivieren mit:
(5ml MeOH, 5ml H₂O, 5ml Acetatpuffer pH 4,5)
Probe aufgeben (max. 1ml/min.)
waschen mit 5ml Acetatpuffer pH 4,5
1ml 40% Acetonitril in H₂O
mind. 1h trocknen
eluieren mit 3 mal 1ml Isoprop/Chlorbutan (15:85)
in silylierte Gläschen
derivatisieren mit Methyljodid
organische Phase abdampfen
+ 150µl DMSO/TBAH (98:2)
30s vortexen
+ 50µl Methyljodid
15min. bei Raumtemperatur stehen lassen
+ 350 µl 0,1 N HCl
+ 1ml Isooctan
1min. vortexen, zentrifugieren
organische Phase abnehmen und eindampfen
in 50µl EtAc aufnehmen
1µl in GC-MS einsetzen

GC-MS – Bedingungen:

140-300°C mit 20°C/min, splitless injection

SIM-Methode: m/z 316 (d³-THC und d³-THC-COOH)

m/z 313; 328 (THC)

m/z 313; 357; 372 (THC-COOH)

m/z 313, 314, 344 (THC-OH)

Quantifizierung:

mittels Quotientenbildung mit I.S. und Berechnung über den Vergleich

Methadon (Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung)

Innerer Standard: 250ng/ml Diphenhydramin

Vergleiche: 100-500ng/ml Methadon je nach Fragestellung

Probenvorbereitung:

1ml Blut bzw. Serum
+ 250ng Diphenhydramin (I.S.)
+ 1ml Puffer pH 8,9
+ 5ml Ether/EtAc (1:1)
schütteln, zentrifugieren
organische Phase in 1ml 0,1M HCl
schütteln, zentrifugieren
organische Phase verwerfen
+ 1ml Puffer pH 8,9
+ 5ml Ether/EtAc (1:1)
schütteln/zentrifugieren
organische Phase abrotieren
in 50µl EtAc aufnehmen

GC-MS – Bedingungen:

100-300°C; 20°C/min

SIM-Methode: m/z 72; 294; 309 (Methadon)

m/z 277; 276; 262 (Methadon-M.)

Quantifizierung:

über den Vergleich mittels Quotientenbildung mit I.S.

6. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Leichenblutuntersuchung

Tox-Nr.	28	35	60	183	196	256	302	344	345	364	366	367	411	457	471	534	594	601	607	1058	1795	1803	2358	2372	2446	
Amphetamine	0	0	338	11	0	0	0	286	0	310	0	146	18	0	0	487	0	0	0	0	0	0	0	0	512	0
Amphetamine reduziert	0	0	626	71	131	0	0	477	0	509	0	251	35	0	0	567	0	0	0	0	0	0	0	0	2236	0
Amphetamine verdünnt	0	0	620	108	0	0	0	554	33	522	0	242	40	0	0	824	0	0	0	0	0	0	0	0	1700	0
Amphetamine verd-red	0	0	798	152	430	0	0	630	52	668	0	450	28	0	0	860	0	0	0	0	0	0	0	0	3052	0
Amphetamine ZNSO4	0	0	652	176	102	0	0	862	55	349	0	510	90	3	0	1422	0	0	0	0	0	0	0	0	1927	0
MDA																										
Kokain+ Derivate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	571	0	0	13	17
Kokain reduziert	0	5	480	1382	0	0	49	0	50	26	0	9408	15	0	35	7	0	0	0	26	1051	30	0	16	64	
Kokain verdünnt	0	0	376	1072	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	686	5	0	0	32	
Kokain verd/red	58	62	614	1880	0	6	118	42	132	100	36	9706	70	46	82	40	42	32	10	84	1148	112	28	34	112	
Kokain ZNSO4	0	10	267	733	17	10	0	10	3	0	14	high	17	11	0	19	8	8	12	0	483	0	6	64	0	
Kokain												621														
Benzoyl-ecgonin			80	439								9089									591			15		
Methylecgonin												4040														
Tetrahydro-cannabiol	0	0	0	0	0	0	34,4	0	25,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15,6	0	0	0	0
THC reduziert	0	61,6	55,2	43,6	0	0	47,6	27,4	52,6	0	231	0	109	126	0	0	213	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetrahydrocannabiol verdünnt	0	35	33	40	0	0	53	0	53	0	147	0	73	110	0	0	147	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THC ver-red	0	76	0	86	0	0	82	0	155	0	302	0	197	200	0	0	231	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THC ZNSO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THC		+		+			+		+		+		+	+			+									
Methadon+ Derivate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methadon reduziert	0	0	0	0	0	0	0	612	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methadon verdünnt	0	0	0	0	0	0	0	438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methadon verd-red	0	0	0	0	0	0	0	730	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methadon ZNSO4	0	0	0	0	0	0	0	291	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methadon								248																		
EDDP								221																		
LSD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LSD red.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LSD verd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LSD verd-red	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0,26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,86	0
LSD ZNSO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LSD quant.																										

Tox.-Nr.	28	35	60	183	196	256	302	344	345	364	366	367	411	457	471	534	594	601	607	1058	1795	1803	2358	2372	2446
Benzo-dia-zepine	363	0	0	216	116	139	1080	45	0	0	442	130	29	583	363	0	519	376	0	310	0	60	156	240	120
Benzos reduziert	842	0	0	236	1381	202	2254	59	0	0	526	1688	0	645	299	0	719	326	0	298	0	0	1521	656	284
Benzos verdünnt	732	0	0	226	1032	180	2638	58	0	0	504	1324	26	716	472	0	814	330	0	318	0	36	1228	570	176
Benzos verd/red	1424	0	0	298	1300	86	3392	0	0	0	594	1976	0	714	516	0	738	366	0	322	0	0	1328	710	246
Benzos ZNSO4	245	0	0	22	138	64	745	0	0	0	69	190	0	192	196	0	115	66	0	50	0	0	263	49	71
Oxazepam							160																		
Desmethyldiazepam				12	45		1740				130	320		327	206		343	163		288			308	198	
Temazepam	196																								
Diazepam					36		1190				150	690		345			318	209					466	42	
Bromazepam						113																			820
Aminoflu-nitrazepam															84										221
Flunitra-zepam																									
Trazodon																									
Opiate	high	161	493	352	high	0	high	high	189	0	high	high	1024	857	high	high	537	688	546	651	0	0	793	high	0
Opiate reduziert	1688	84	471	313	high	0	2813	2549	132	0	1845	high	2190	752	high	high	606	575	564	472	0	0	1333	high	0
Opiate verdünnt	1824	96	482	334	2270	0	high	high	136	0	1441	high	1774	872	high	high	712	622	712	598	0	0	1148	high	0
Opiate verd-red	1562	0	384	180	high	0	4072	3040	0	0	1456	high	2284	736	high	5958	618	496	574	362	0	0	1332	high	0
Opiate ZNSO4	995	122	321	209	high	0	high	high	131	0	high	high	high	608	high	high	407	357	363	330	0	0	921	high	0
Dihydro-codein					3706		8780	7750				85740	963		16434	1117	164							842	
Dihydro-morphin									6					4		11				11					
Codein	445	4	14	7					12			511	13	13		144		5	14						20
Morphin	5	72	449	136					65			105	169	37	21	76	49	37	14	45					2190
Tramadol																									1510
Barbiturate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barbiturate red	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barbiturate verd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barbiturate verd-red	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barbiturate ZNSO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barbiturate																									

7. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Plasma- und Serenmessungen

Tox.-Nr.	33	34	91	100	120	121	129	133	135	156	159	211	308	311	328	348	347	348	350	351	352	353	357	373	447
Benzo-dia-zepine				high		1412		625	454	high	868			high			1430	987		352			137	376	
Oxazepam				130		92				45				86			38	13							
Desmethyldiazepam				2100		980		59	230	520	290			1710			350	210						35	
Temazepam																									
Diazepam				1210				400	130	880	190			1200			530	210			52			89	82
Bromazepam																									
Aminoflu-nitrazepam										30											30				
Acetamidofunitrazepam																									
Norflu-nitrazepam																									
Flunitra-zepam																									
Zolpidem																									
Trazodon																									
Lorazepam																									
Opiate				high				114					786	high		221		202				131	172		
Dihydro-codein				3257									258	2002		137									
Dihydro-morphin																									
Codein																		4				5			
Morphin								9										19				47	11		
Tramadol																									
Barbitu-rate																									
Pheno-barbital																									
Tricycl Anti-depressiva																									
Nortrip-tylin																									
Amitriptylin																									
Doxepin																									
Amphetamine		58								59									109					48	
MDA										536									287					0	
MDMA		195																	132						
Kokain+ Derivate		552	98				99			293		117										541			689
Kokain																									
Benzoyl-ecgonin		470	58				67			241		53										420			648
Methyl-ecgonin																									
Tetrahydro-cannabiol	21				34								89		70										55
THC					0,88								0,88		6,63										4,08
THCCOOH	10,31				9,12								44,65		148										26,17
THCOH															11,21										17,24
Methadon+ Derivate																									
Methadon																									
EDDP																									
LSD																									
LSD quant.																									
Art der Probe	P	P	P	P	P	P	S	P	P	S	P	P	S	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tox.-Nr.	448	449	453	481	482	485	488	489	504	507	508	508	510	514	546	567	568	569	571	572	573	576	603	619	600	
Benzo-dia-zepine					226			high	882			high		high			149		618		463		high		84	
Oxazepam								42						43			170									
Desmethyldiazepam					120			2080	260				33	950			13		81		28		32			
Temazepam																										
Diazepam					74			880	530				19	510					130		42		180			
Bromazepam									490													620				
Aminoflunitrazepam												24	42						48							18
Acetamido-flunitra-zepam																										18
Norflu-nitrazepam																										
Flunitra-zepam														46					50							30
Zolpidem																										
Trazodon																										
Lorazepam																										
Opiate			121	907	high		51			high	541			high		872	266					117	41		high	
Dihydro-codein					1038									2736		924	62						28			1400
Dihydro-morphin																										
Codein			1	7			1			16	2															
Morphin			7	25			3			158	14											5				27
Tramadol																										
Barbitu-rate																										
Pheno-barbital																										
Tricycl Anti-depressiva																										
Nortrip-tylin																										
Amitrip-tylin																										
Doxepin																										
Amphetamine	47																									
MDA																										
MDMA	227																									
Kokain+ Derivate			46	687						952	44												259			
Kokain																										
Benzoyl-ecgonin			28	842						1010	17												153			
Methyl-ecgonin																										
Tetrahydro-cannabiol	80	77	58			76					53		59	61	79			60	79	69					50	80
THC	5,84	1,41	12,83			1,16					1,63		1,8	0,38	4,79			0,18	3,33	1,36					0,34	4,69
THCCOOH	134,7	47,98	44,38			38,28					15,58		14,88	14,83	57,06			11,41	80,86	35,05					10,35	73,07
THCOH	28,1		18,98			8,46									8,86					25,93	5,43					31,59
Methadon+ Derivate											323	149								462	186					
Methadon											147	100								167	138					
EDDP											18									24	24					
LSD																										
LSD quant.																										
Art der Probe	P	P	S	P	P	P	S	P	P	P	S	P	S	S	P	P	P	P	S	P	P	P	S	P	P	P
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tox.-Nr.	697	699	700	702	704	713	714	715	737	738	739	740	741	742	751	788	789	837	838	839	840	844	851	877	878
Benzo-dia-zepine	316			251					93											215	80	185	high		
Oxazepam																				11			15		
Desmethyldiazepam				80																140			190		
Temazepam																									
Diazepam	4970			20																53			1310		
Bromazepam									40													600			
Aminoflu-nitrazepam																					40				
Acetamidoflunitrazepam																									
Noflu-nitrazepam																									
Flunitra-zepam																									
Zolpidem																									
Trazodon																									
Lorazepam																									
Opiate	high		138												732	326			224	580	256		752		
Dihydro-codein																				488	2		648		
Dihydro-morphin																									
Codein	371		11													8			5	4	129				
Morphin	9														26	124			99		12		19		
Tramadol																									
Barbitu-rate																									
Pheno-barbital																									
Tricycl Anti-depressiva																									
Nortrip-tylin																									
Amitrip-tylin																									
Doxepin																									
Amphetamine																									
MDA																									
MDMA																									
Kokain+ Derivate																									
Kokain																									
Benzoyl-ecgonin																									
Methyl-ecgonin																									
Tetrahydro-cannabiol		42	69	71	70	243	67	67		71	70	66	62	66		70	71			71	208			71	73
THC		0,16		2,74	1,28	0,89	0,75	2,04		1,73	2,42	2,98		0,67		1,6	2,59			5,32	0,65			10,09	2,26
THCCOOH		8,18	16,43	44,43	17,53	132,6	16,53	84,81		245,2	88,89	86,35	14,08	20,64		27,78	164,2			104,7	90,88			159,9	195,5
THCOH				4,28	6,51																				
Methadon+ Derivate				436						537											375		239		
Methadon				156						138											171		131		
EDDP				19						22											31		18		
LSD																				1,33					
LSD quant.																				1,59					
Art der Probe	P	P	S	S	P	P	P	P	S	S	P	P	P	P	P	S	P	P	S	P	S	P	P	P	P
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tox.-Nr.	879	884	885	913	914	915	916	917	935	937	970	998	998	999	1000	1001	1002	1004	1005	1007	1014	1015	1019	1020	1021
Benzo-dia-zepine		high	47	373		995		high		165	701														
Oxazepam		30				20		11			28														
Desmethyldiazepam		960		110		190		1880		120	780														
Temazepam			16																						
Diazepam		940		41		180		5010		51	810														
Bromazepam																									
Aminoflu-nitrazepam																									
Acetamidoflunitrazepam																									
Norflu-nitrazepam																									
Flunitra-zepam																									
Zolpidem																									
Trazodon																									
Lorazepam				1170																					
Opiate		758	331	high		176		high	38				294						926					650	
Dihydro-codein		583	152	2650				929					168						1037						
Dihydro-morphin																									
Codein						6																		6	
Morphin						28			1															60	
Tramadol																									
Barbitu-rate																									
Pheno-barbital																									
Tricycl Anti-depressiva																									
Nortrip-tylin																									
Amitrip-tylin																									
Doxepin																									
Amphetamine																			149						
MDA																			2154						
MDMA																			116						
Kokain+ Derivate						615													0		181				
Kokain																									
Benzoyl-ecgonin						694															127				
Methyl-ecgonin																									
Tetrahydro-cannabiol	24	71			68		68					66	60	33		75	16	83	80	37	65	66		69	
THC	0,58	1,75			0,5		2,17					8,9	0,81			1,64	0,6	1,42	0,78	0,58	3,17	3,58		3,9	
THCCOOH	4,99	103,5			14,16		33,2					139,5	15,03	4,28		36,47	26,9	54,13	18,85	9,68	51,13	35,96		55,77	
THCOH												5,66								1,83					
Methadon+ Derivate						220				445															103
Methadon						180				230															130
EDDIP						20				36															11
LSD												0,77							1,86						
LSD quant.												0,96							1,68						
Art der Probe	P	S	P	P	S	S	P	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	S	P	S	S	P	P	P	P
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tox.-Nr.	1030	1031	1046	1047	1049	1050	1060	1070	1071	1081	1084	1107	1108	1154	1157	1162	1183	1164	1238	1239	1258	1259	1260	1281	1277
Benzo-dia-zepine	87		119	141	461	153		79	870		486		616	79		413	235	523	483	455				101	
Oxazepam									17		34		64					98		78					
Desmethyldiazepam			140		73	81		8	2930		890		850			280	140	3170	190	670					
Temazepam																									
Diazepam					260	68		22	2030		240		770			430	57	1950	420	440					
Bromazepam				470		54																			
Aminoflunitrazepam	52								41					50											
Acetamido-flunitra-zepar	10													10											
Norflu-nitrazepam														11											
Flunitra-zepam	29													12											
Zolpidem																									
Trazodon																									
Lorazepam																								20	
Opiate					high			780	high				294	high	412			804			high	972			
Dihydro-codein					3810				13610				229	10240				831							
Dihydro-morphin																									
Codein															5						11	16			
Morphin								145							36						78	100			
Tramadol																									
Barbitu-rate																									
Pheno-barbital																									
Tricycl Anti-depressiva																									
Nortrip-tylin																									
Amitrip-tylin																									
Doxepin																									
Amphetamine			258																						
MDA																									
MDMA			843																						
Kokain+ Derivate								365																	
Kokain																									
Benzoyl-ecgonin								350																	
Methyl-ecgonin																									
Tetrahydro-cannabiol	52				36	82	27	83	69		66	67						71	76					82	
THC	0,43				7,03	3,25			1,97			1,92								5,54				4,67	
THCCOOH	17,21				312,8	46,26		1,59	50,96			121,5						17,8	130					39,21	
THCOH																				6,06					
Methadon+ Derivate																	607								
Methadon																	551								
EDDP																	371								
LSD		1,78																							
LSD quant.		1,09																							
Art der Probe	P	S	P	P	S	P	P	S	P	P	P	S	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	P
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tox-Nr.	1278	1279	1280	1308	1309	1325	1327	1328	1408	1654	1655	1656	1659	1680	1708	1710	1711	1712	1737	1739	1740	1741	1742	1744	1748	
Benzo-dia-zepine			533	229				257		1023	913	704	125	665			1698		335	14				42		
Oxazepam										97	56	32		69			270		22	0						
Desmethyldiazepam				95				150		630	280	560	68	790			3600		70					25		
Temazepam																										
Diazepam			1380	80				140		900	470	510	38	160			3850		140					38		
Bromazepam				460															140							
Aminoflunitrazepam																										
Acetamido-flunitra-zepar																										
Norflu-nitrazepam																										
Flunitra-zepam																										
Zolpidem																										
Trazodon																										
Lorazepam																										
Opiate					high		479		962	948	high	high	233	high	245		high			981						
Dihydro-codein				987					246	792	2747	2004		1175			8658			66						
Dihydro-morphin																										
Codein													4													
Morphin							43		27				15		14					11						
Tramadol																										
Barbitu-rate														918												
Pheno-barbital														5810												
Tricycl Anti-depressiva																									208	
Nortrip-tylin																									110	
Amitrip-tylin																									170	
Doxepin																										
Amphetamine	48																							169		
MDA	24																							72		
MDMA																								1084		
Kokain+ Derivate										372			409		342	359									106	
Kokain																										
Benzoyl-ecgonin										372			401		471	296									75	
Methyl-ecgonin																										
Tetrahydro-cannabiol	72	33				60		78		40	59							45					44		69	
THC	7,95	0,67				1,64		4,42																	6,9	
THCCOOH	29	5,95				5,05		81,73		10,53	9,27							8,43					4,3		39,4	
THCOH																									2,26	
Methadon+ Derivate								185						201												
Methadon														215												
EDDP														94												
LSD																										
LSD quant.																										
Art der Probe	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S	S	P	S	P	P	P	S	S	P	P	P	P	P	P	P	
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	

Tox.-Nr.	1771	1772	1788	1796	1830	1831	1834	1846	1888	1887	1887	1888	1902	1903	1907	1939	1940	1984	1987	2020	2022	2022	2023
Benzo-dia-zepine	27			189				159		40						510	438				665	665	
Oxazepam										160						17	18						
Desmethyldiazepam										54						160	140				64	64	
Temazepam				60																			
Diazepam										160						290	230				670	670	
Bromazepam	44																						
Aminoflu-nitrazepam								90															
Acetamidoflunitrazepam								13															
Norflu-nitrazepam								24															
Flunitra-zepam								41															
Zolpidem																							
Trazodon																							
Lorazepam																							
Opiate					high	122		high		859		95							7		high	high	
Dihydro-codein					270			1047											0		1010	1010	
Dihydro-morfin					269																		
Codein								6		17													
Morfin					3891	4				78		6									6	6	
Tramadol																							
Barbitu-rate																			58				
Pheno-barbital																			0				
Tricycl Anti-depressiva																							
Nortrip-tylin																							
Amitrip-tylin																							
Doxepin																							
Amphetamine																							
MDA																							
MDMA																							
Kokain+ Derivate								443						40	19				57				
Kokain								83						0,245	0				48				
Benzoyl-ecgonin								679						10,25									
Methyl-ecgonin																							
Tetrahydro-cannabiol		64	40			61	52	43	60			30				29	61	61		55			30
THC			0,3									2,38				0,58	0,97	0,33		7,73			
THCCOOH		2,11	7,96			13,66	7,8	10,16	12,82			8,75				5,7	18,55	20,95		23,63			7,36
THCOH												6,11					1,24			4,3			
Methadon+ Derivate																							
Methadon																							
EDDP																							
LSD																							
LSD quant.																							
Art der Probe	P	P	P	P	P	S	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P
Hämolyse	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tox.-Nr.	2024	2026	2027	2033	2052	2068	2080	2081	2098	2099	2100	2168	2167	2189	2170	2172	2210	2212	2216	2236	2237	2260	2261	2277	2278	
Benzo-dia-zepine	135	314		24		68				587	876	791	751	69		64	320					380	249	270	78	
Oxazepam	195	270								19	840	75	110													
Desmethyldiazepam		120								200	2170	1610	1340	63			66					120				
Temazepam																										
Diazepam		69		44		100				160	1450	830	850				83					260				
Bromazepam																110										
Aminoflu-nitrazepam										117	31						90					155	137	110		
Acetamidofunitrazepar										12							6					6	6	6		
Norflu-nitrazepam										23							13					26	27	17		
Flunitra-zepam										99	6						37					58	96	34		
Zolpidem																										
Trazodon																										
Lorazepam																										
Opiate			572		563				933			24	high	high									high	high	110	
Dihydro-codein		44		129					1886			44	1130	1575									166	240		
Dihydro-morphin												3														
Codein																										
Morphin		5																					6		4	
Tramadol																										
Barbitu-rate																										
Pheno-barbital																										
Tricycl Anti-depressiva																										
Nortrip-tylin																										
Amitrip-tylin																										
Doxepin																										
Amphetarnine																										
MDA																										
MDMA																										
Kokain+ Derivate												151			228	2771										
Kokain																										
Benzoyl-ecgonin												287			285	6632										
Methyl-ecgonin																										
Tetrahydro-cannabioli	62						58	62										62	63	67	58	36	27			
THC	0,82						1,46											0,86	1,88	5,26	0,49					
THCCOOH	15,21						26,29	22,9										26,61	42,81	33,13	23,02	3,55	3,55			
THCOH																			0,74	5,77						
Methadon+ Derivate																		316								
Methadon																										
EDDP																										
LSD																										
LSD quant.																										
Art der Probe	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S	S	P	P
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tox.-Nr.	2279	2280	2283	2284	2292	2315	2320	2324	2330	2347	2368	2408	2434	2435	2436	2453	2467	2487	2488	2487	2537	2538	2556	2583	2619	
Benzo-dia-zepine	909		271	714					488					1151	947		1227		28	186	329	222	171		321	
Oxazepam				60										110			240									
Desmethyldiazepam	320		130	1070					130					2510	1880		2320			24	170	20	140		90	
Temazepam														50	53		70									
Diazepam	2170		130	910					70					2890	520		1360			24	10	110	70		210	
Bromazepam																						220				
Aminoflu-nitrazepam	326																		43	14						
Acetamidoflunitrazepar	18																		9							
Norflu-nitrazepam	38																		21							
Flunitra-zepam	53																									
Zolpidem																									2650	
Trazodon																										140
Lorazepam																										
Opiate			313	high					high	112				265			high			180		high				
Dihydro-codein									440					108			2910			41		1965				
Dihydro-morphin																										
Codein			6						5																	
Morphin			27	20					42	8																
Tramadol																										
Barbitu-rate								21																		
Pheno-barbital								0																		
Tricycl Antidepressiva																									43	
Nortrip-tylin																									0	
Amitrip-tylin																									0	
Doxepin																									0	
Amphetamine																	137									
MDA																	47									
MDMA																	537									
Kokain+ Derivate									1689		202						604				276	179		148		
Kokain																						124		105		
Benzoyl-ecgonin									1598		134						615					288				
Methyl-ecgonin									370		50						390					25				
Tetrahydrocannabinol	41			57	64	70					71	74	68					52		20		57				
THC				1,9	1,08	2,5					2,14															
THCCOOH	6,38			11,36	42,73	37,32					30,95	18,45	14,04					7,94		2,43		7,31				
THCOH						1,81					1,26															
Methadon+ Derivate																										
Methadon																										
EDDP																										
LSD														0,3												
LSD quant.														0												
Art der Probe	P	P	P	P	P	P	P	P	S	P	P	S	P	P	P	P	P	P	P	P	S	S	S	P	P	P
Hämolyse	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0

Tox.-Nr.	2620	2621	2622	2623	2624	2681	2685	2686	2707	2710	2711	2713	2723	2750	2752	2754	2766	2767	2771	2823	2824	2858	2877	2878	2881	
Benzo-dia-zepine			554							794	172			717	441		73	556	697		597					
Oxazepam			30							84																
Desmethyldiazepam			890							1850				630	190			120	120		780					
Temazepam										42				30					30		19					
Diazepam										740				1270	140				210	990		830				
Bromazepam																										
Aminoflu-nitrazepam																		56								
Acetamido-flunitra-zepam																										
Norflu-nitrazepam																		11								
Flunitra-zepam																		52								
Zolpidem																										
Trazodon																										
Lorazepam											450															
Opiate		115					76	854	high						262		high	157				519	221	31	high	
Dihydro-codein							530	374	4147						90		2072	50				256				
Dihydro-morphin																										
Codein		+																							133	
Morphin		7						9															19	6		
Tramadol																										
Barbitu-rate																										
Pheno-barbital																										
Tricycl Anti-depressiva		132									78															
Nortrip-tylin											0															
Amitrip-tylin											0															
Doxepin		380									0															
Amphetamine																										
MDA																										
MDMA																										
Kokain+ Derivate													1939								331					
Kokain																										
Benzoyl-ecgonin													1814								424					
Methyl-ecgonin													250													
Tetrahydro-cannabiol	47			69	70	79	74	49						73				68	79						33	
THC	0,67			0,64	0,74	0,14	4,85	0,58						0,79						3,62						
THCCOOH	9,91			16,23	15,05	22,84	126,7	6,95						19,87				69,39	58,42						2,37	
THCOH				3,89		2,24		4,78						1,7						4,06						
Methadon+ Derivate																										
Methadon																										
EDDP																										
LSD							0,53										0,57									
LSD quant.							0,26										0									
Art der Probe	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	S	P	S	P	
Hämolyse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0

9. Referenzen

Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung am Institut für Rechtsmedizin München für Amphetamine in Urin, Blut und Organen mittels GC-MS

Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung am Institut für Rechtsmedizin München für Drogen in Urin, Serum, Vollblut mittels CEDIA-DAU Reagenz

Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung am Institut für Rechtsmedizin München für Drogen in Plasma/Blut mittels HPLC

Arbeitsvorschrift der Toxikologischen Abteilung am Institut für Rechtsmedizin München für Drogen in Serum, Vollblut und Urin mittels GC-MS

Armbruster David A., Hubster Edward C., Kaufman Melvin S., Ramon Monika K.; Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA) for Drugs-of-Abuse Screening; Clin.Chem. 41/1 (1995); 92-98

Armbruster David A., Schwarzhoff Robert H., Hubster Edward C., Liserio Monica K.; Enzyme Immunoassay, Kinetic Microparticle Immunassay, Radioimmunoassay and Fluorescence Polarization Immunoassay Compared for Drugs-of-Abuse Screening; Clin.Chem. 39/10 (1993); 2137-2146

Armbruster David A., Schwarzhoff Robert H., Pierce Barbara L., Hubster Edward C.; Method Comparison of EMIT II and OnLine with RIA for Drug Screening; J. Forensic Sci. 38 (1993); 1326-1341

Asselin W.M., Leslie J.M., McKinley B.; Direct detection of drugs in whole hemolyzed blood using the EMIT dau urine assays; J.Anal.Toxicol. 12 (1988); 207-215

Becker J., Correll A., Koepf W., Rittner C.; Comparative Studies on the Detection of Benzodiazepines in Serum by Means of Immunassay (FPIA); J.Anal.Toxicol. 17 (1993); 103-108

Blum Lee M., Klinger Robert A., Rieders Fredric; Direct Automated EMIT® d.a.u. Analysis of N,N-Dimethylformamide-modified Serum, Plasma and Postmortem Blood for Benzodiazepines, Benzoylcegonin, Cannabinoids and Opiates; J.Anal.Toxicol. 13 (1989); 285-288

Boehringer Mannheim corporation; Drugs of Abuse - Cross Reactivity Performance Guide; Microgenics Corporation (1995)

Boehringer Mannheim corporation; Drugs of Abuse - Summary report of the performance of the CEDIA DAU assays for amphetamines, barbiturates, benzodiazepines, cocaine metabolite, opiates, PCP and THC; Microgenics Corporation (1994)

Boehringer Mannheim; Bedienungsanleitung BM/Hitachi 911 Version 2.0 (1994)

Bogusz M., Schmitt G., Wu M., Aderjan R.; Anwendung des FPIA-Abbott TDx für Blutuntersuchungen auf BTM – Bericht nach einjähriger Erfahrung; Zentralblatt Rechtsmedizin 34 (1990); 421

Bogusz M., Aderjan R., Schmitt G., Nadler E., Neureither B.; The determination of drugs of abuse in whole blood by means of FPIA and Emit-dau Immunoassays- a comparative study; Forensic.Sci.Int. 48 (1990); 27-37

Budgett W.T., Levine B., Xu A., Smith M.L.; Comparison of Abbott Polarization Immunassay (FPIA) and Roche Radio immunoassay for Analysis of Cannabinoids in Urine Specimens; J.Forensic.Sci. 37(2) (1992); 632-635

Cagle Joan C., McCurdy Horton H., Pan Y. Mary, Ayton K.J., Wall W.H., Solomons E.T.; Evaluation of the CEDIATM DAU assays and the AxSymTM system for the analysis of Cannabinoide in whole blood; J.Anal.Toxicol. 21 (1997); 213-217

Caplan Yale H., Levine Barry; Abbott Phencyclidine and Barbiturates Abused Drug Assays: Evaluation and Comparison of ADx FPIA, TDx FPIA, EMIT and GC/MS Methods; J.Anal.Toxicol. 13 (1989); 289-292

Caplan Yale H., Levine Barry; Application of the Abbott TDx Lidocaine, Phenytoin and Phenobarbital Assays to Postmortem Blood Specimens; *J.Anal.Toxicol.* 12 (1988); 265-267

Classen M., Diehl V., Kochsiek K.; *Innere Medizin*; Urban und Schwarzenberg München; 3.Auflage 1994

Collison I.B., Spiehler V.R., Guluzian S., Sedgwick P.R.; Setting cutoff concentrations for immunoassay screening of postmortem blood; *J.Forensic Services*, 43(2) (1998); 390-394

Coty W.A., Loor R., Bellet N., Khanna P.L., Kaspar P., Baier M.; CEDIA - homogenous immunoassay for the 1990s and beyond; *Wien.Klin.Wochenschr.Suppl.*191 (1992); 5-11

Daldrup T.; Zur Bewertung der THC- bzw. THC-Metaboliten-Spiegel im Blut und Urin. Proceedings "Symposium Forensische Probleme des Drogenmißbrauchs" der GTFCh, Moosbach 26.-27. April 1985; 56-66

Daldrup T., Reudenbach G., Kimm K., Cannabis und Alkohol im Straßenverkehr; *Blutalkohol* 24 (1987); 144-156

Diosi David T., Harvey Dennis C.; Analysis of whole blood for drugs of abuse using EMIT d.a.u. Reagents and a Monarch 1000 Chemistry Analyzer; *J.Anal.Toxicol.* 17 (1993); 133-137

Drummer Olaf H., *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, Arnold Group, Edition 2001

Ferrara S.D., Tedeschi L., Frison G., Brusini G., Castagna F.; Drugs-of-Abuse Testing in Urine: Statistical Approach and Experimental Comparison of Immunochemical and Chromatographic Techniques; *J.Anal.Toxicol.* 18 (1994); 278-291

Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K.; *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; BI-Wiss.-Verlag; 6.Auflage 1992

Fritze Jürgen; Modedrogen ohne therapeutischen Nutzen; *Dt.Ärzteblatt Heft28/29C* (1997); 1427-1428

Gjerde Hallvard, Christophersen Asbjørg S., Skuterud Bjørn, Klemetsen Kate, Mørland Jørg; Screening for Drugs in Forensic blood samples using EMIT® urine assays; *Forensic.Sci.Int* 44 (1990); 179-185

Goldfrank Lewis R., Hoffmann Robert S.; The Cardiovascular Effects of Cocaine; *Ann.Ermeg.Med* 20 (1991); 165-175

Goodall C.R., Basteyns B.J.; A reliable method for the detection, confirmation and quantitation of Cannabinoids in blood. *J.Anal.Toxicol.* 19 (1995); 419-426

Grehn Franz, Leydecker Wolfgang; *Augenheilkunde*; Springer Verlag; 26. überarbeitete und aktualisierte Auflage 1995

Hailer M.; Evaluation und Modifikation eines neueren immunologischen Verfahrens zum Drogennachweis im Urin; Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der LMU München; Inst. F. Rechtsmedizin Prof. Dr. med. W. Eisenmenger; 1996

Hallbach J., Guder W.G. Determination of the Detection Limits as cut-off for group specific immunoassay in urine; *Forensic Toxicology*; Proceedings of the 29th International Meeting T.I.A.F.T., June 24th-27th 1991 Ed. by B.Kaempe; Printing Mackeenzie, Copenhagen

Harms V.; *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*; Harms Verlag Kiel; 16. Neubearbeitete Auflage 1992

Heinz Th.W.; Grundsatzurteil des Bundesgerichtshofs; *Dt.Ärzteblatt Heft 28/29C* (1997); 1428

Henderson Daniel R., Friedman Stephen B., Harris Jeffrey D., Manning Wayne B., Zoccoli Michael A.; CEDIATM, a New Homogenous Immunoassay System; *Clin.Chem.* 32/9 (1986); 1637-1641

Hoppe S.; *Drogenkunde*; De Gruyter; 8.Auflage 1985

- Huang W., Moody D.E.; Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood; *J.Anal.Toxicol.* 19 (1995); 333-342
- Isenschmid D.S., Caplan Y.H.; Incidence of Cannabinoids in Medical Examiner Urine Specimens; *J.Forens.Sci.* 33(6) (1988); 421-31
- Iten, Peter X.; *Fahren unter Drogen oder Medikamenteneinfluss, Forensische Interpretation und Begutachtung*, modifiziert von L. von Meyer, Inst. Für Rechtsmedizin der Universität Zürich, 1994
- Iwersen S., Schmoltdt A., Knüferman S.; Erfahrungen mit dem CEDIA DAU-System auf dem Analysenautomaten Hitachi 904. 75.DGRM-Jahrestagung, 24.-28.09.1996 Universität Zürich
- Iwersen S., Schmoltdt A.; One fatal and one nonfatal intoxication with tranlycypromine, Absence of amphetamines as metabolites. *J.Anal.Toxicol.* 20 (1996); 301-304
- Iwersen. S, Schmoltdt A.; Schulz F., Püschel K.; Evidence of gestational heroin exposure by comparative analysis of fetal and maternal body fluids, tissues and hair in a heroin related death; *J.Anal.Toxicol.* 22 (1998); 296-298
- Iwersen-Bergmann S., Schmoltdt A.; Direct semi-quantitative screening of drugs of abuse in serum and whole blood by means of CEDIA® DAU urine immunoassays; *J.Anal.Toxicol.* 23 (1999); 247-256
- Jarausch Jochen, Lehmann Paul; Multicenter Evaluation of six CEDIA® assays for drugs of abuse screening in urine; *Clin.Lab.* 41 (1995); 897-901
- Klinger R.A., Blum Lee M., Rieders Fredric; Direct Automated EMIT (r) d.a.u. Analysis of N,N-Dimethylformamide-Modified Serum, Plasma and Postmortem Blood for Amphetamines, Barbiturates, Methadone, Methaqualone, Phencyclidine and Propoxyphene; *J.Anal.Toxicol.* 14 (1990); 288-91
- Kopetzki E., Lehnert K., Buckel P.; Enzymes in diagnostics: achievements and possibilities of recombinant DNA technology; *Clin.Chem* 40(5) (1994); 688-704
- Kuschinsky G., Lüllmann H., Mohr K.; *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; Georg Thieme Verlag Stuttgart; 13. Auflage 1992
- Law B., Mason P.A., Moffat A.C., Gleadle R.I, King L.J.; Forensic Aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin; *J.Pharm.Pharmacol.*36(5) (1994); 289-294
- Lee C.W., Lee H.M.; Evaluation of the Abbott TDx Analyzer; *J.Anal.Toxicol.* 13 (1989); 50-56
- Lewellen V.L.J., McCurdy H.; A novel procedure for the analysis of drugs in whole blood by homogenous enzyme immunoassay; *J.Anal.Toxicol.* 12 (1988); 260-267
- Maier R.D., Erkens M., Hoenen H., Bogusz M.; The screening for common drugs of abuse in whole blood by means of EMIT-ETS and FPIA-ADx urine immunoassays; *Int.J.Leg.Med.* 105 (1992); 115-119
- Marker Elizabeth K., Krasselt Wendell G., Mueggler Paul A.; Evaluation of the Abbott TDx for Determination of Phenobarbital in Forensic Blood Specimens; *J.Anal.Toxicol.* 11 (1987); 257-259
- McCord Cathy E., McCutcheon J. Rod; Preliminary Evaluation of the Abbott TDx for Benzoylcegonin and Opiate Screening in Whole Blood; *J.Anal.Toxicol.* 12 (1988); 295-297
- Meatherall R.; GC-MS Confirmation of Urinary Benzodiazepine Metabolites; *J.Anal.Toxicol.* 18 (1994); 369-381
- Meyer von L.; Drasch G., Kauert G.; Zur quantitativen Morphin-Bestimmung im Blut mittels Enzymimmunoanalyse; *Beitr.gerichtl.Med.* 38 (1980); 63-66
- Meyer von L.; Zum enzymatisch-immunochemischen Nachweis des Haschischkonsums und seiner dünn-schichtchromatographischen Absicherung; *Z.Rechtsmed* 94 (1985); 219-225

- Meyer von, L.; Kauert G., Drasch G.; Vergleich der enzym-immunochemischen und gaschromatographischen Morphinbestimmung im Blut; Beitr.gerichtl.Med. 39 (1981); 39
- Meyer von, L.; Kauert G., Drasch G.; Vergleich des Benzodiazepin-Screenings mittels FPIA (ABBOTT TDX(r)) und DC im Bereich niedriger Konzentrationen; Beitr.gerichtl.Med. 46 (1988); 143-47
- Peel H.W., Perrigo B.J.; Detection of cannabinoids in blood using EMIT; J.Anal.Toxicol. 5 (1981); 165-167
- Penning R.; Alkohol, Drogen und Verkehrssicherheit; UNI-MED Verlag AG ; 2.Aufl. 1992
- Perrigo B.J., Joynt B.P.; Optimization of the EMIT Immunoassay Procedure for the Analysis of Cannabinoids in Methanolic Blood Extracts; J.Anal.Toxicol. 13 (1989); 235-237
- Poklis Alphonse; Edinboro Leslie E.; Discordant Benzodiazepine Results by Immunoassay; J.Anal.Toxicol. 18 (1994); 425-26
- Rauschgiftstatistik des Bundeskriminalamtes in Wiesbaden 2001
- Rich John A., Singer Daniel E.; Cocaine Related Symptoms in Patients Presenting to an Urban Emergency Department; Ann.Emerg.Med. 20 (1991); 616-621
- Rodbard D.; Statistical Estimation of the minimal detectable Concentration for Radioligand Assay, Anal.Biochem. 20 (1990); 1-12
- Röhrich J., Zörntlein S., Lotz J.,Becker J., Kern T., Rittner C., False-positive LSD testing in urine samples from intensive care patients; J Anal Toxicol 22 (1998); 393-395
- Ruangyuttikarn Werewan; Moody David E.; Comparison of Three Commercial Amphetamine Immunassay for Detection of Methamphetamine, Methylenedioxyamphetamine, Methylenedioxymethamphetamine and Methylenedioxyethylamphetamine; J.Anal.Toxicol. 12 (1988); 229-233
- Ruß A.; Arzneimittel - pocket 1998; Börm Bruckmeier Verlag Grünwald; 3.Auflage 1998
- Schulz M., Schmoltdt A.; Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs; Pharmazie 52 (1997); 895-911
- Schütz H., Rochholz G., Weiler G.; Zur Problematik der falsch-negativen Benzodiazepin-Immunoassay; Klin.Lab. 38 (1992); 150-152
- Schütz H.W., THC-Carbonsäurebestimmung im Serum mit Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay (FPIA,TDx) und GCMS; Beitr.gerichtl.Med. 47 (1989); 95-96
- Schütz Harald; Screening von Drogen und Arzneimitteln mit Immunoassays – Ein Leitfaden für die Praxis, Abbott; 2. Auflage 1993
- Simonick T.F.,Watts V.W.; Preliminary evaluation of the Abbott TDx for screening of D-methamphetamine in whole blood specimens; J.Anal.Toxicol. 16 (1992); 115-118
- Slightom E.L.; The analysis of drugs in whole blood, bile and tissue with an indirect homogenous enzyme immunoassay; J.Forensic.Sci. 23 (1978); 292-303
- Slightom E.L., McCurdy H.H.;Enzyme immunoassay: Novel approaches to tissue and fluid analysis; Advances in Analytical Toxicology (1984); 9-40
- Spiehler Vina R., O'Donnell C.M., Gokhale D.V.; Confirmation and Certainty in Toxicology Screening; Clin.Chem. 34/8 (1988); 1535-1539
- Wagner H.; Pharmazeutische Biologie; Gustav Fischer Verlag Stuttgart; 4.Aufl. 1988
- Way Barbara A, Walton Kim G., Koenig John W., Eveland Barbara J., Scott Mitchell G.; Comparison between the CEDIA and EMIT II immunoassay for the determination of benzodiazepine; Clin.Chim.Acta 271 (1998); 1-9

Wirth W., Gloxhuber C.; Toxikologie; Georg Thieme Verlag Stuttgart; 4.Aufl. 1985

Wu A.H.B., Forte E., Casella G., Sun K., Hemphill G., Foery R., Schanzenbach H.; CEDIA for Screening drugs of abuse in urine and the effect of adulterants; J.Forensic.Sci. 40 (1995); 614-618

Zimmermann Janice L., Dellinger Phillip R., Majid Pirzada A.; Cocaine Associated Chest Pain; Ann.Emerg.Med. 20 (1991); 611-615

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Eisenmenger, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München, danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation an seinem Institut, durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. von Meyer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die stets freundliche, ausdauernde und engagierte Betreuung meiner Arbeit.

Frau Gerlinde Schwarz danke ich für ihre große Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die mir die Arbeit stark erleichtert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bernd Ernst Erwin Kottenhahn
Geburtsdatum: 20. Dezember 1973
Geburtsort: München
Eltern: Dipl. Ing. Volker Kottenhahn, Maschinenbauingenieur
Dr. med. Anneliese Kottenhahn, Ärztin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1993 Abitur am mathematisch – naturwissenschaftlichem
Gymnasium Puchheim
7/93 – 6/94 Grundwehrdienst bei den Gebirgsjägern in Mittenwald
1994 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Technischen
Universität München
8/96 Ärztliche Vorprüfung
8/97 Ärztliche Prüfung 1. Teil
8/99 Ärztliche Prüfung 2. Teil
5/01 Ärztliche Prüfung 3. Teil