

Untersuchungen zu Applikationswegen von Betäubungsmitteln bei Drogentoten und Drogenkonsumenten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Hilke Jungen
aus Bad Pyrmont

Hamburg 2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis Oktober 2016 im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg (Direktor Prof. Dr. med. Klaus Püschel) angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. S. Iwersen-Bergmann

Datum der Disputation: 15. Dezember 2017

Datum der Druckfreigabe: 15. Dezember 2017

Meinen Eltern gewidmet

Danksagungen

Meiner Doktormutter Frau PD Dr. Stefanie Iwersen-Bergmann, Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg, möchte ich für die Überlassung des Themas sowie die intensive Unterstützung und Geduld ganz herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Duchstein, Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg, danke ich ganz besonders für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Chemie.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Rechtsmedizin danke ich sehr für die stets freundschaftliche, geduldige und motivierende Zusammenarbeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Gerald und meiner Familie für die Unterstützung während der letzten Jahre.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Substitutionstherapie.....	1
1.2 Substitutionsmedikamente	2
1.2.1 Methadon.....	2
1.2.2 Zusammensetzung der im Handel befindlichen Substitute	5
1.3 Konsumformen der Substitute.....	7
1.3.1 Nebenwirkungen des intravenösen Konsums.....	7
1.4 Drogentodesfälle	8
1.5 Kohlenhydrate.....	9
1.5.1 Monosaccharide.....	9
1.5.2 Disaccharide	10
1.5.3 Lactose	10
1.5.4 Saccharose.....	11
1.6 Physiologie und Pathologie der Disaccharidaufnahme.....	12
1.7 Bedeutung von Zuckern in der Diagnostik.....	13
1.8 Fragestellung	14
2 Materialien und Geräte.....	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Geräte.....	16
2.3 Verbrauchsmaterialien	18
2.4 Software.....	18
3 Methoden	19

3.1	HPLC-DAD	19
3.2	LC-MS	20
3.3	Kohlenhydrate.....	23
3.3.1	Interne Standards (IST)	23
3.3.2	Stammlösungen.....	24
3.3.3	Derivatisierung und Extraktion für GC/MS.....	24
3.3.4	Festphasenextraktion (SPE) für GC/MS.....	25
3.3.5	Geräteeinstellungen GC/MS	26
3.3.6	UV-Spektren	27
3.3.7	Extraktion und Derivatisierung für HPLC-DAD	27
3.3.8	SPE für HPLC-DAD	27
3.3.9	Geräteeinstellungen HPLC-DAD.....	28
3.3.10	Lagerungsversuch	28
3.3.11	Extraktion LC-MS.....	28
3.3.12	Einstellungen MS-Tune-Modus	28
3.3.13	Geräteeinstellungen LC-MS.....	29
3.4	Methodenoptimierung	30
3.4.1	Extraktion HPLC-DAD.....	30
3.4.2	Geräteeinstellungen HPLC-DAD.....	30
3.4.3	Extraktion LC-MS.....	31
3.4.4	Geräteeinstellungen LC-MS.....	31
3.5	Patientenproben	33
3.5.1	Kontrollkollektive	33
3.5.2	Patientenkollektiv 1 - Drob Inn 1	34
3.5.3	Patientenkollektiv 2 - Drob Inn 2	34
3.5.4	Patientenkollektiv 3 - Drogentodesfälle	35
4	Ergebnisse.....	36
4.1	GC-MS.....	36
4.1.1	Extraktion.....	36

4.1.2	Derivatisierung	36
4.1.3	Extraktionsausbeute nach Acetylierung.....	38
4.1.4	Zusammenfassung Ergebnisse GC/MS	38
4.2	HPLC-DAD.....	39
4.2.1	UV-Spektren nativer Zuckerlösungen.....	39
4.2.2	Ergebnisse der Methodenentwicklung.....	39
4.2.3	Lagerungsversuch.....	41
4.2.4	Validierung.....	41
4.3	LC-MS.....	43
4.3.1	Methodenoptimierung	43
4.3.2	Validierung.....	44
4.4	Patientenproben.....	48
4.4.1	Kontrollkollektive	48
4.4.2	Patientenkollektiv 1 - Drob Inn 1.....	49
4.4.3	Patientenkollektiv 2 - Drob Inn 2.....	53
4.4.4	Drogentodesfälle	56
5	Diskussion.....	59
5.1	Diskussion der Methoden.....	59
5.1.1	GC/MS	59
5.1.2	HPLC-DAD.....	60
5.1.3	LC-MS.....	61
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	62
5.2.1	Lagerungsversuch.....	62
5.2.2	Kontrollkollektive	63
5.2.3	Drob Inn 1	66
5.2.4	Drob Inn 2.....	67
5.2.5	Drogentodesfälle	72
5.3	Fazit	75
5.4	Ausblick	77

6	Zusammenfassung	77
6.1	Zusammenfassung	77
6.2	Summary	80
	Literaturverzeichnis	83
	Gefahrstoffe	95
	Lebenslauf	97
	Erklärung	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Methadon	3
Abbildung 2: Chemische Struktur von Buprenorphin	4
Abbildung 3: Cyclisierung von D-Glucose.....	10
Abbildung 4: Strukturformel von Lactose	11
Abbildung 5: Strukturformel von Saccharose.....	11
Abbildung 6: Hydrolytische Spaltung und Resorption der Kohlenhydrate	12
Abbildung 7: Abbau von Lactose	12
Abbildung 8: Abbau von Saccharose.....	12
Abbildung 9: Schematischer Aufbau DAD	20
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ionenfalle	22
Abbildung 11: Strukturformel von Xylose.....	23
Abbildung 12: Strukturformel von Trehalose.....	23
Abbildung 13: Benzoylierung von Glucose	37
Abbildung 14: Acetylierung von Glucose	37
Abbildung 15: Chromatogramm der Zuckertrennung mittels HPLC-DAD.....	40
Abbildung 16: Chromatogramm Disaccharide LC/MS.....	43
Abbildung 17: Massenspektrum der Disaccharide als Formiat-Addukte	43
Abbildung 18: Chromatogramm nahe der Bestimmungsgrenze (1mg/L).....	45
Abbildung 19: Patientenprobe nahe der Bestimmungsgrenze (Saccharose positiv)	47
Abbildung 20: negative Patientenprobe	47
Abbildung 21: Oxidation von Lactose als reduzierendes Disaccharid	63
Abbildung 22: Konzentrationsverteilung disaccharidpositiver Urinproben	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Substitutionsmedikamente.....	5
Tabelle 2: Zusammensetzung viskositätserhöhender Zusätze	6
Tabelle 3: Molekülmassen der Zucker vor und nach Benzoylierung	37
Tabelle 4: Molekülmassen der Zucker vor und nach Acetylierung	38
Tabelle 5: Ergebnisse Lagerungsversuch	41
Tabelle 6: Validierungsdaten HPLC Methode.....	42
Tabelle 7: Ionisation der Disaccharide	44
Tabelle 8: Validierungsdaten LCMS	45
Tabelle 9: Ergebnisse für Saccharose im Urin nach oraler Aufnahme von Coca-Cola® oder Schokolade	49
Tabelle 10: Positive immunchemische Ergebnisse der Urinproben - Drob Inn 1.....	50
Tabelle 11: Immunchemische Ergebnisse und Disaccharidkonzentrationen im Urin - Drob Inn 1	51
Tabelle 12: Immunchemische Ergebnisse und Disaccharidkonzentrationen im Urin - Drob Inn 2.....	54
Tabelle 13: Positive immunchemische Ergebnisse der Urinproben - Drob Inn 2.....	56
Tabelle 14: Ergebnisse disaccharidpositiver Drogentodesfälle.....	57

Abkürzungsverzeichnis

arb	arbitrary units (beliebige Einheiten)
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
BtMVV	Betäubungsmittelverschreibungsverordnung
DAD	Diodenarray Detektor
E. coli	Escherichia coli
EDDP	2-Ethyliden-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin
EMDP	2-Ethyl-5-Methyl-3,3-Diphenylpyrrolin
ESI	Elektrospray Ionisation
FAc	Ameisensäure
Glu	Glucose
Glu d7	Glucose d7
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie, High performance liquid chromatography
i.v.	intravenös
IST	Interner Standard
Lac	Lactose
MeOH	Methanol
MRM	Multi reaction monitoring
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid
NSAIDs	nicht-steroidale Antiphlogistika, non-steroidal anti-inflammatory drugs
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
Sac	Saccharose
Sacd2	Saccharose d2
SPE	Festphasenextraktion Solid phase extraction
THF	Tetrahydrofuran
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Substitutionstherapie

Mit Beginn der 1990er Jahre wurde in Deutschland die Heroin-Substitutionstherapie stark ausgeweitet. Dies geschah, um die hohe Zahl der Drogentodesfälle zu verringern und den Drogenabhängigen gesundheitlich und sozial zu stabilisieren und somit bessere Lebens- und Überlebensbedingungen und letztlich einen Ausstieg aus der Heroinsucht zu ermöglichen. Zunächst muss eine manifeste Opiatabhängigkeit festgestellt werden, die mindestens ein Jahr andauert. Festzustellende Kriterien hierfür sind der starke Wunsch, Opiate zu konsumieren und die fehlende Kontrollfähigkeit über das Konsumverhalten, sowie körperliche Toleranz gegenüber Opiaten und das Auftreten eines körperlichen Entzugssyndroms bei Nicht-Konsum und als letzter Punkt die Vernachlässigung des alltäglichen Lebens zugunsten der Drogenbeschaffung und des Konsums (1). Die Heroin-Ersatztherapie sieht neben der medikamentösen Behandlung auch psychosoziale Maßnahmen zur Stabilisierung der Persönlichkeit und zur Verbesserung der Lebensumstände vor. Durch die Vergabe oral gut bioverfügbarer und langwirksamer Opioide wird das Auftreten von Entzugerscheinungen durch fehlende Heroinapplikation verhindert. Ein weiterer Vorteil der oralen Substitutaufnahme ist die Vermeidung des intravenösen Drogenkonsums mit den damit verbundenen Intoxikations- und Infektionsrisiken. Ziel dieser Therapie ist die Stabilisierung der Gesundheit, eine Wiedereingliederung in die Gesellschaft sowie die Entwöhnung von Heroin als Suchtstoff (1; 2). Vor Beginn der Therapie muss der Patient umfassend untersucht, eine Mehrfachsubstitution ausgeschlossen sowie ein Drogenscreening zur Feststellung des akuten Konsums durchgeführt werden. Im Zuge dessen sollte der Patient über Risiken des Beikonsums und der nicht bestimmungsgemäßen Applikationsform der Substitutionsmittel aufgeklärt werden. Abschließend erfolgt eine Meldung über den Beginn der Substitutionstherapie an das BfArm (1).

2014 waren insgesamt 77500 Substitutionspatienten beim BfArm gemeldet. Die Meldepflicht an das Substitutionsregister ist durch § 13 Abs.3 BtmG und § 5a BtMVV geregelt und soll u.a. Doppelverordnungen durch zwei Ärzte verhindern.

Seit 1998 ist auch die sogenannte „take-home-Vergabe“ möglich, d.h. das Überlassen der Substitutionsdosen für maximal sieben Tage zur eigenverantwortlichen Einnahme. Voraussetzungen hierfür sind wie für die Substitutionstherapie allgemein die Freiheit von Beikonsum, die bestimmungsgemäße Einnahme der Substitute und insbesondere die stabile Einstellung auf das Substitutionsmedikament. Daher sollte die „take-home“-

Vergabe auch nicht direkt zu Beginn der Therapie erfolgen. Der substituierte Patient sollte im Zuge der Umstellung auf eine „take-home“-Abgabe explizit auf die Risiken der intravenösen Applikation hingewiesen werden (3).

Mit Einführung der 15. Novelle der BtmVV im Jahr 2006 ist der Zusatz viskositätserhöhender Hilfsstoffe in flüssigen Methadonzubereitungen nicht mehr zwingend erforderlich, dennoch wird dies weiterhin empfohlen, um das Risiko einer parenteralen Anwendung zu vermeiden (4).

1.2 Substitutionsmedikamente

In der Substitutionstherapie kommen verschiedene Opiode zum Einsatz, welche einmal täglich oral eingenommen werden. Die Dosierung erfolgt individuell einschleichend bis zum Ausbleiben der Entzugserscheinungen.

2014 betrug der Anteil von Methadonracemat an den gemeldeten Substitutionsmitteln 46,1 %, Levomethadon hatte einen Anteil von 30,3 %, es folgt Buprenorphin mit 22,6 % Anteil an den Verschreibungen. Diamorphin (0,7%), Dihydrocodein (0,2 %) und Codein (0,1 %) werden nur in Einzelfällen verordnet (5).

1.2.1 Methadon

Methadon ((*RS*)-6-(Dimethylamino)-4,4-diphenylheptan-3-on) (Abbildung 1) ist ein vollsynthetisches Opioid, welches als Racemat vorliegt. Das chirale Zentrum befindet sich am C6-Atom. Methadon wirkt als Agonist an den μ - und κ -Opiatrezeptoren des ZNS und des Plexus myentericus im Gastrointestinaltrakt. Die Wirkdauer der Schmerzstillung scheint der des Morphins vergleichbar zu sein (6). Die Halbwertszeit von Methadon beträgt 15-55 Stunden und die Bioverfügbarkeit 92% nach oraler Aufnahme (7; 8; 9).

In Deutschland sind zur Substitutionstherapie sowohl racemische Methadonzubereitungen (Methaddict[®]-Tabletten 5mg/10 mg/40mg, Methadonlösung 0,5%/ 1% DAC) als auch flüssige Zubereitungen des wirksamen linksdrehenden (R)-(-)-Methadons (Levomethadon, L-Polamidon[®]) zugelassen. Das linksdrehende Enantiomer ist vorrangig pharmakologisch aktiv, hat eine längere Halbwertszeit sowie das größere Verteilungsvolumen als das rechtsdrehende (S)-Methadon, welches nur in höheren Konzentrationen schmerzstillend wirkt (7). Levomethadon ist ca. 50-mal stärker analgetisch wirksam als Dextromethadon und ca. 3-4-mal so stark wirksam wie Morphin. Angstzustände, Diarrhö, Erbrechen, Fieber, erweiterte Pupillen sowie Schläfrigkeit, starkes Schwitzen, Tremor und Unruhe sind häufige Nebenwirkungen zu Beginn der

Substitutionstherapie (8). Diese Opiat-Entzugssymptome treten in niedrigen Dosierungen auf bis die ausreichende Dosis des Substitutionsmedikamentes gefunden ist. Vergiftungen sind wie bei allen Opioiden durch Atemdepression, Miosis und Bewusstlosigkeit bis hin zum Koma gekennzeichnet. Des Weiteren können Hypotonie, Kreislaufversagen und ein Lungenödem auftreten, die bis zum Tode führen können. Therapeutische Methadonkonzentrationen im Blutserum werden mit 0,05-0,5 mg/L angegeben (10). Wie bei allen Opioiden entwickelt sich bei längerfristiger Gabe eine Toleranz gegenüber den Opiatwirkungen. Dies führt zu großen Überschneidungen des therapeutischen und toxischen Bereiches. So können auch therapeutische Konzentrationen bei nicht Opioid-gewöhnten Patienten zu Vergiftungen und auch zum Tode führen (11). Diese Überschneidung therapeutischer und toxischer Konzentrationsbereiche erschwert die Interpretation von Blutspiegeln, wenn keine weiteren Informationen (z.B. über den Substitutionsstatus) vorliegen.

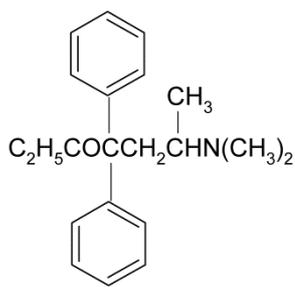


Abbildung 1: Chemische Struktur von Methadon

Methadon wird durch Mono- und Di-Demethylierung und spontane Cyclisierung der instabilen Zwischenstufen vorrangig zu 2-Ethyliden-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin (EDDP) sowie 2-Ethyl-5-Methyl-3,3-Diphenylpyrrolin (EMDP) metabolisiert. Beteiligt an der Metabolisierung ist die Cytochromoxidase P450 der Leber, in diesem Falle die Isoformen CYP3A4 und CYP2D6 (12). Die pharmakologisch wirksamen Metabolite Methadol und Normethadol entstehen nur in sehr geringem Ausmaß und haben keinen Einfluss auf die Wirksamkeit. Im Urin sind hauptsächlich Methadon, EDDP und EMDP nachweisbar, die Ausscheidung der Metaboliten im Urin unterliegt individuellen Unterschieden und ist abhängig vom pH-Wert, der Methadondosis sowie dem Urinvolumen (7).

Buprenorphin

Buprenorphin ((5*R*,6*R*,7*R*,9*R*,13*S*,14*S*) -17-Cyclopropylmethyl-7-[(*S*)-3,3- dimethyl-2-hydroxybutan-2-yl]-6-methoxy -4,5-epoxy-6,14-ethanomorphinan-3-ol) (Abbildung 2) bindet sowohl an μ -als auch an κ -Opioidrezeptoren und ist ein partieller Opioid-Agonist/Antagonist. Buprenorphin ist ca. 25-40-mal potenter als Morphin, die Halbwertszeit nach sublingualer Gabe beträgt 18-49 Stunden (7; 13), nach parenteraler Gabe hingegen nur 2-4 Stunden (7). Die orale Bioverfügbarkeit nach sublingualer Gabe liegt bei 50-55 % (14). Für die Substitutionstherapie sind Präparate mit 0,4, 2 und 8 mg Buprenorphin pro Sublingualtablette im Handel. Eine orale Einnahme ist aufgrund des ausgeprägten First-pass-Metabolismus nicht möglich. Des Weiteren sind transdermale Pflaster gegen mäßig starke bis starke (Tumor-) Schmerzen mit Freisetzungsraten von 35, 52,5 und 70 $\mu\text{g/h}$ Buprenorphin in Deutschland zugelassen (15). Therapeutische Blutspiegel liegen zwischen 0,0005-0,01 mg/L (10). Die Spitzenspiegel nach sublingualer Gabe werden nach ca. 1,5 Stunden erreicht. Bei Dosissteigerungen von Buprenorphin kommt es zum sogenannten „Ceiling- Effekt“, das heißt, dass die Wirksamkeit nicht im gleichen Maße wie die Dosis zu steigern ist und die maximale Wirksamkeit nicht - wie bei vollen Agonisten - erreicht wird (14). Häufige Nebenwirkungen sind Müdigkeit, Schlafstörungen und Benommenheit sowie Hitzegefühl und orthostatischer Blutdruckabfall. Vergiftungen sind durch Verwirrtheit, Schwindel, Halluzinationen, Miosis, Atemdepression und Koma sowie durch Krampfanfälle gekennzeichnet.

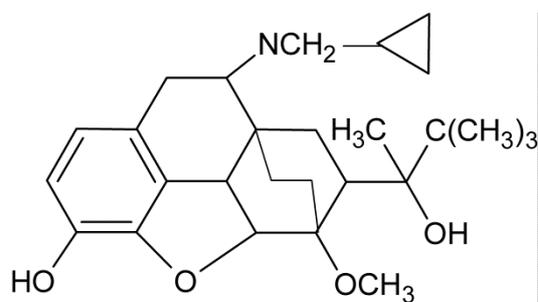


Abbildung 2: Chemische Struktur von Buprenorphin

Buprenorphin wird durch N-Dealkylierung zu seinem ebenfalls pharmakologisch-aktivem Metaboliten Norbuprenorphin abgebaut. Die Dealkylierung findet in den Leberzellen durch die Cytochromoxidase CYP3A4 statt. Sowohl Buprenorphin als auch sein Abbauprodukt werden im weiteren Verlauf (Phase-II-Metabolismus) glukuronidiert, biliär sezerniert und über Fäces und Urin ausgeschieden (7).

1.2.2 Zusammensetzung der im Handel befindlichen Substitute

Die für die Substitution verfügbaren Medikamente sind – mit Ausnahme der Diamorphin-Therapie – Zubereitungen zur oralen Einnahme. Es sind sowohl Tabletten, Schmelztabletten als auch Flüssigkeiten in Deutschland zugelassen.

Neben den Wirkstoffen werden verschiedene Hilfsstoffe in den Zubereitungen verwendet. Eine Übersicht bietet die folgende Tabelle:

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Substitutionsmedikamente

Wirkstoff	Handelsname/ Zubereitung	Hilfsstoffe	
		Zucker	weitere
Methadon-Racemat	Methaddict®	Lactose Saccharose	Cellulose, Magnesiumstearat, Maisstärke
	Methadonlösung 0,5%/ 1% DAC (Rezeptur enthält viskose Grundlösung NRF)	Saccharose	Ger. Wasser, Pfefferminz-Farbmittel-Konzentrat „Blau“ bzw. Aroma-Farbmittel-Konzentrat „Gelb“, Hydroxyethylcellulose 400, Glycerol 85%, wasserfreie Citronensäure, Kaliumsorbat
	Methaliq® 10 mg/mL Lösung zum Einnehmen	keine	Xylitol, Glycerol, Natriumbenzoat (E 211), Citronensäure, Kirscharoma, Hyetellose, Brillantblau FCF (E 133), ger. Wasser
	Misyo® 10 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Lösung zum Einnehmen	keine	Sorbitol 70, Glycerol, Natriumbenzoat, Citronensäure, Brillantblau FCF, ger. Wasser
Levomethadon	L-Polamidon®	keine	Paraben, Betainhydrochlorid, Glycerol 85%, ger. Wasser
	L-Polaflox®	keine	Methyl-4-hydroxybenzoat, Betainhydrochlorid, Glycerol, ger. Wasser
Buprenorphin	Subutex®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Povidon K30, Citronensäure, Natriumcitrat, Magnesiumstearat
	Suboxone®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Povidon K30, Citronensäure, Natriumcitrat, Magnesiumstearat, Acesulfam-Kalium
	Buprenaddict®	Lactose	Citronensäure, Mannitol, Natriumcitrat, Natriumstearylformurat, Maisstärke
	Buprenorphin AbZ®	Lactose	Magnesiumstearat, Natriumcitrat, Povidon K 30, Citronensäure, Maisstärke, Gelborange S (E110), Crospovidon, Mannitol
	Buprenorphin Actavis®	Lactose	Magnesiumstearat, Natriumcitrat, Povidon K 30, Citronensäure, Maisstärke
	Buprenorphin dura®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Citronensäure, Natriumcitrat, Povidon K 30, Magnesiumstearat, Talkum, Siliciumdioxid
	Buprenorphin G.L.®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Povidon K 22,5-27, Citronensäure, Natriumcitrat, Magnesiumstearat
	Buprenorphin-Ethypharm®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Citronensäure, Natriumcitrat, Povidon K 30, Natriumstearylformurat

Wirkstoff	Handelsname/ Zubereitung	Hilfsstoffe	
		Zucker	weitere
	Buprenorphin-neuraxpharm®	Lactose	Magnesiumstearat, Natriumcitrat, Povidon K 29-32, Citronensäure, Maisstärke, Crospovidon Typ A, Mannitol, Gelborange S (E110)
	Buprenorphin-ratiopharm®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Citronensäure, Natriumcitrat, Povidon K 30, Magnesiumstearat, Crospovidon, Gelborange S (E110)
	Buprenorphin-Sanofi®	Lactose	Mannitol, Maisstärke, Povidon K 29-32, Citronensäure, Natriumcitrat, Magnesiumstearat, Edetinsäure, Ascorbinsäure

Lactose wird in allen Tabletten als Hilfsstoff zugesetzt, bei Methaddict® werden zusätzlich geringe Menge Saccharose zur Tablettierung verwendet. Genauere Mengenverhältnisse der Zucker waren durch Nachfrage beim Hersteller nicht zu ermitteln.

Saccharose findet sich als Hilfsstoff in der viskosen Grundlösung NRF und wird gemäß der DAC/NRF Vorschrift bei der Herstellung von Methadonlösung und Levomethadonlösung als viskositätserhöhender Zusatz verwendet (16).

In den fertig hergestellten Substitutionslösungen (z.B. L-Polamidon®, Methaliq®) sind keine Disaccharide enthalten. Allerdings sollten diese Lösungen vor der „take-home“-Abgabe an den Patienten mit viskositätserhöhenden Zusätzen (Tabelle 2) versetzt werden, um einen missbräuchlichen intravenösen Konsum zu verhindern oder zumindest zu erschweren (17).

Tabelle 2: Zusammensetzung viskositätserhöhender Zusätze

viskositätserhöhender Zusatzstoff	Zucker	weitere Bestandteile
Sirupus Simplex	Saccharose	Wasser
Viskose Grundlösung NRF	Saccharose	Ger. Wasser, Hydroxyethylcellulose 400, Glycerol 85%, wasserfreie Citronensäure, Kaliumsorbat

Somit findet sich in nahezu allen Substitutionszubereitungen der Zusatz von Disacchariden, die übrigen verwendeten Hilfsstoffe variieren von Hersteller zu Hersteller.

1.3 Konsumformen der Substitute

Unter dem „bestimmungsgemäßen“ Gebrauch der Substitutionsmittel, wie er in der Substitutionstherapie definiert ist, versteht man die orale Einnahme dieser Substanzen. Ein Ziel der Substitutionsbehandlung ist die Vermeidung des intravenösen und damit risikoreichen Konsums.

Dennoch gibt es bereits seit Ende der 1990er Jahre vermehrt Hinweise auf intravenösen Methadonkonsum. Dies ist sowohl in Deutschland als auch international bekannt (18; 19; 20; 21; 22; 23). Als Gründe hierfür werden beispielsweise das deutlich schnellere Anfluten und der dadurch entstehende Rauschzustand angeführt (24; 25; 26). Des Weiteren ist es für die Patienten nicht einfach, das erlernte Verhalten der intravenösen Injektion auf die orale Einnahme umzustellen (27). In einer randomisierten, doppelblinden Studie zeigten Grochow et al., dass intravenös appliziertes Methadon in der schmerzstillenden Wirkung mit intravenös appliziertem Morphin vergleichbar ist (28).

Bisher gibt es für den substituierenden Arzt keine Möglichkeit, die Konsumform des verordneten Substitutes zu überprüfen, da im Urinscreening lediglich der Nachweis der konsumierten Medikamente und Rauschmittel erfolgt. Wird bei einem substituierten Patienten mit „take-home“-Vergabe Methadon und dessen Abbauprodukt EDDP im Urin nachgewiesen, spricht dies für eine Einnahme des Medikamentes, wobei sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Applikation ein positiver Befund zu erwarten ist.

1.3.1 Nebenwirkungen des intravenösen Konsums

Nach i. v.- Applikation liegen die Substitute sofort zu 100 % bioverfügbar im Blut vor und fluten daher extrem schnell im zentralen Nervensystem an. Hierdurch steigen die Risiken für Atemdepression und Bewusstseinsbeeinträchtigung bis zum Koma. Auch das Infektionsrisiko durch „Needle-Sharing“ steigt erheblich.

Daher sollten den Methadonlösungen viskositätserhöhende Zusätze beigemischt werden, um die Injektion zu erschweren (16).

Durch die Beimengung von z.B. Sirupus Simplex haben die Lösungen eine 10fach höhere Osmolarität gegenüber dem Blutplasma, was zu schmerzhaften Venenreizungen und Entzündungen führen kann. Trotzdem werden die Substitutionsmedikamente aber von Konsumenten gespritzt und teilweise auch vorher behandelt. Dies umfasst beispielsweise das Filtrieren durch Zigarettenfilter, um Partikel zu entfernen, und das Einkochen von Lösungen, um das zu spritzende Volumen zu verringern. Diese Maßnahmen sind allerdings keinesfalls geeignet, um besser verträgliche, venös zu applizierende Zubereitungen zu erhalten.

Durch die parenterale Anwendung von Substitutionsmitteln gelangen auch Hilfsstoffe ins Blut, die zu Schädigungen der Venen und Ablagerungen in den Gefäßen führen können. Talkum, Stärke und Cellulose, welche in der Tablettenherstellung eingesetzt werden, führen nach Injektion zu Embolien, Thrombosen und Granulomen in verschiedenen Geweben wie der Lunge und den Gefäßen (29; 30; 31; 32; 33; 34; 35).

1.4 Drogentodesfälle

Durch Einführung der Opioid-gestützten Substitutionstherapie konnte die Mortalität von intravenös konsumierenden Heroinkonsumenten erheblich gesenkt werden (36). Dennoch sterben jährlich europaweit immer noch schätzungsweise 10 000-20 000 Opioidkonsumenten (36). In Hamburg lag die Zahl der Methadon-Todesfälle zeitweise höher als die Zahl der Heroin-Toten (37; 38; 39). Dies war auch eine Folge der 1998 eingeführten „take-home“-Verschreibung und des damit verbundenen Anstiegs des auf dem Schwarzmarkt verfügbaren Methadons. Des Weiteren kann die „take-home“-Vergabe zu Unfällen und Vergiftungen mit Methadon im Umfeld der substituierten Personen führen (40; 41; 11). Laut Bundeslagebild zur Rauschgiftkriminalität 2014 wurden bundesweit 1032 Drogentodesfälle registriert, wobei in 65 % der Fälle mono- oder polyvalente Vergiftungen mit Opiaten und Opioiden ursächlich waren (42). Risikofaktoren, die zu einer erhöhten Mortalität führen können, sind neben dem intravenösen Konsum auch der Beikonsum anderer, zentral wirksamer Substanzen und die Toleranzentwicklung gegenüber den Opiaten und Opioiden (43). So ist die Spannbreite der nachgewiesenen postmortalen Methadonkonzentrationen sehr groß (44). Hohe Konzentrationen bei opiatgewöhnten Patienten können ohne schwerwiegende Nebenwirkungen toleriert werden, die bei nicht gewöhnten Patienten zum Tode führen (44). Die Untersuchung von Heinemann et al. (39) zeigte, dass im Zeitraum 1990-1999 ein Drittel der methadonassoziierten Drogentodesfälle zu keinem Zeitpunkt in Substitutionsbehandlung waren, im Zeitraumes von 2007-2012 waren 21 % früher einmal im Substitutionsprogramm, 30 % waren nie in Substitutionstherapie (38). Dies unterstreicht die Verbreitung von Substitutionsmitteln auf dem Schwarzmarkt (45) und die damit verbundenen Risiken, wie zum Beispiel eine Opioidintoxikation durch intravenösen Konsum.

1.5 Kohlenhydrate

1.5.1 Monosaccharide

Unter Kohlenhydraten versteht man im weitesten Sinne Verbindungen mit der Summenformel $C_n(H_2O)_m$. Diese große Gruppe kann man weiter in Polysaccharide, Disaccharide und Monosaccharide unterteilen. Im Folgenden soll lediglich auf Di- und Monosaccharide eingegangen werden.

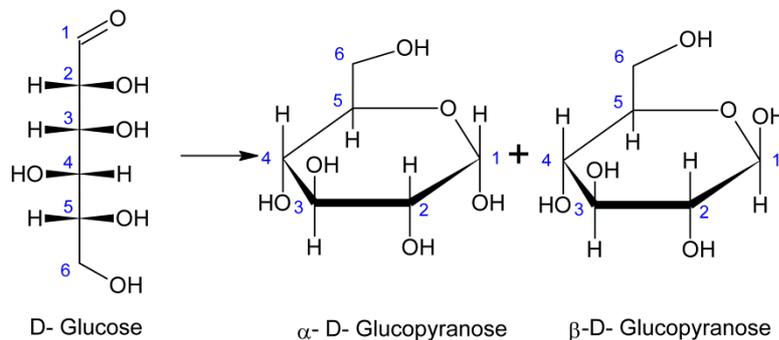
Unter dem Begriff Zucker werden Mono- und Disaccharide zusammengefasst, die sich durch einen süßlichen Geschmack und eine hohe Wasserlöslichkeit auszeichnen. Als Beispiele sind hier z.B. Glucose und Fructose als Vertreter der Monosaccharide sowie Saccharose und Lactose als Disaccharide zu nennen.

Chemisch handelt es sich bei Kohlenhydraten um Hydroxyaldehyde oder Hydroxyketone, die mindestens zwei Hydroxygruppen in ihrer Molekülstruktur aufweisen. Alle Monosaccharide haben ein oder mehrere chirale Kohlenstoff-Atome. Es gibt somit Enantiomere, die je nach Stellung der am weitesten von der Carbonylgruppe entfernten OH-Gruppe als D- und L-Konfiguration bezeichnet werden. Diese D- und L-Enantiomere unterscheiden sich nur in den chiralen Eigenschaften, die chemischen und physikalischen Eigenschaften sind identisch. Bei Lebewesen findet sich vor allem die D-Form. Von Diastereomeren spricht man, wenn sich die Substanzen auch in achiralen Eigenschaften unterscheiden, d. h. sie verhalten sich wie unterschiedliche chemische Substanzen. Unterscheiden sich zwei Zucker nur in der Konfiguration eines C-Atoms, spricht man von Epimeren, wie zum Beispiel Glucose und Galactose, diese sind Epimere am C4-Atom.

Zucker sind durch ihre Carbonylfunktion besonders reaktiv, sie können zum Beispiel zu Carbonsäuren oxidiert oder zu Alkoholen reduziert werden.

Der intramolekulare nucleophile Angriff am Carbonylkohlenstoffatom durch eine Hydroxygruppe führt zur Bildung eines Halbacetals. Führt die Cyclisierung im nächsten Schritt zu einem Fünfring, spricht man von einer Furanose, entsteht ein Ringsystem mit sechs Kohlenstoffatomen, spricht man von einer Pyranose. Hierdurch entstehen α - und β -Anomere, das sind Diastereomere, die sich in der Stellung der OH-Gruppe zur Ringebene am neugebildeten chiralen Zentrum C1 unterscheiden, z. B. α -D-Glucose und β -D-Glucose. Diese Cyclisierung zum Halbacetal ist energetisch sehr günstig und führt in wässriger Lösung zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen beiden Anomeren (Mutarotation) (46).

Abbildung 3: Cyclisierung von D-Glucose



1.5.2 Disaccharide

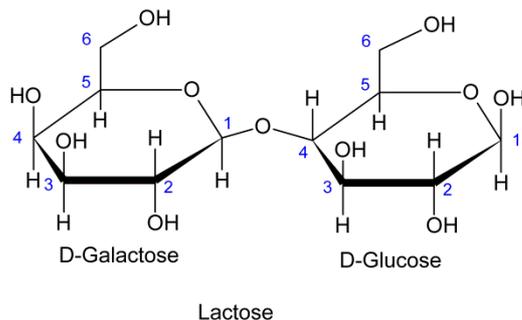
Bei Disacchariden handelt es sich um zwei Monosaccharidbausteine, die miteinander über eine O-glykosidische Bindung verbunden sind. Hierbei lassen sich zwei Untergruppen unterscheiden, die reduzierenden und nicht reduzierenden Zucker. Von reduzierenden Zuckern spricht man, wenn in Lösung eine freie Aldehydgruppe vorliegt, die in Fehlingscher Lösung zur Carboxygruppe reduziert wird. Nicht reduzierende Zucker haben diese Eigenschaft nicht, da hierbei die Verknüpfung beider Monosaccharidbausteine über die beiden anomeren C-Atome erfolgt und somit keine freie Aldehydgruppe vorliegt.

Glykosidische Bindungen sind beim Erhitzen mit Säuren leicht spaltbar, aber stabil gegenüber Basen.

1.5.3 Lactose

Lactose (Milchzucker, β -D-Galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranose) ist ein reduzierendes Disaccharid bestehend aus den Monosaccharidbausteinen D-Glucose und D-Galactose, die über eine β -1,4-glykosidische Bindung verbunden sind. Es handelt sich bei diesem Stoff um eine weiße, kristalline, hygroskopische Substanz mit einem Molekulargewicht von 342,29 g/mol. Die Löslichkeit in Wasser mit 200 g/L Wasser ist gut, aber Lactose löst sich langsam (47). Lactose ist die Hauptkohlenhydratquelle in allen Arten von Säugetiermilch und findet darüber hinaus Verwendung als Hilfsstoff in der Tablettenherstellung, aber auch als Streckmittel von illegalen Rauschmitteln wie Heroin oder Cocain.

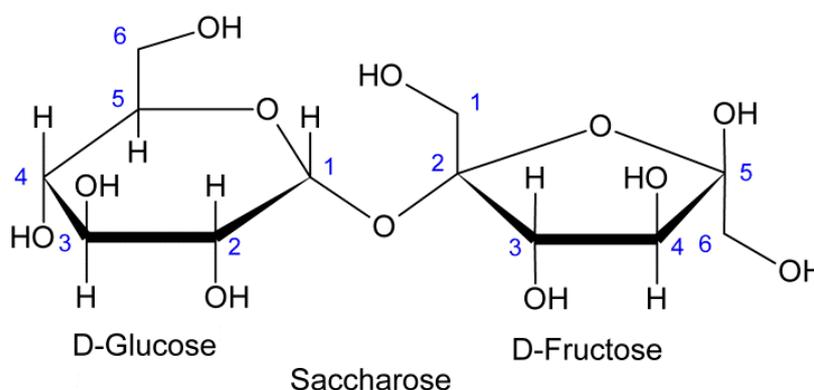
Abbildung 4: Strukturformel von Lactose



1.5.4 Saccharose

Saccharose oder auch Rübenzucker ist ein kristalliner, farbloser Feststoff mit einem Molekulargewicht von 342,30 g/mol. Es handelt sich hierbei um einen nicht reduzierenden Zucker, da bei der Bindung zum Disaccharid beide anomeren C-Atome miteinander reagieren, die Verknüpfung erfolgt somit über eine α,β -1,2- glykosidische Bindung. Saccharose ist aus den Monosacchariden Glucose und Fructose aufgebaut und wird chemisch als α -D-Glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranosid bezeichnet. Saccharose wird vor allem aus der Zuckerrübe und dem Zuckerrohr gewonnen und findet hauptsächlich Verwendung als Süßungsmittel. Die Süßkraft aller Süßungsmittel wird auf Saccharose (Süßkraft = 1) bezogen. Saccharose ist sehr gut wasserlöslich, bei 20 °C können knapp 2 kg Saccharose in einem Liter Wasser gelöst werden. Aufgrund dieser Eigenschaft kann Saccharose gut zur Herstellung von Sirup verwendet werden, der Anwendung als viskositätserhöhender Zusatz in der Arzneimittelherstellung findet.

Abbildung 5: Strukturformel von Saccharose



1.6 Physiologie und Pathologie der Disaccharidaufnahme

Mit der Nahrung werden vor allem die Zweifachzucker Saccharose und Lactose aufgenommen. Physiologisch werden sie durch membrangebundene Bürstensaumenzyme (Disaccharidasen) im Dünndarm in die jeweiligen Monosaccharidbausteine gespalten (Abbildung 6). Saccharose wird in Glucose und Fructose abgebaut, aus Lactose entstehen Glucose und Galactose (Abbildung 7, Abbildung 8).

Abbildung 6: Hydrolytische Spaltung und Resorption der Kohlenhydrate (48)

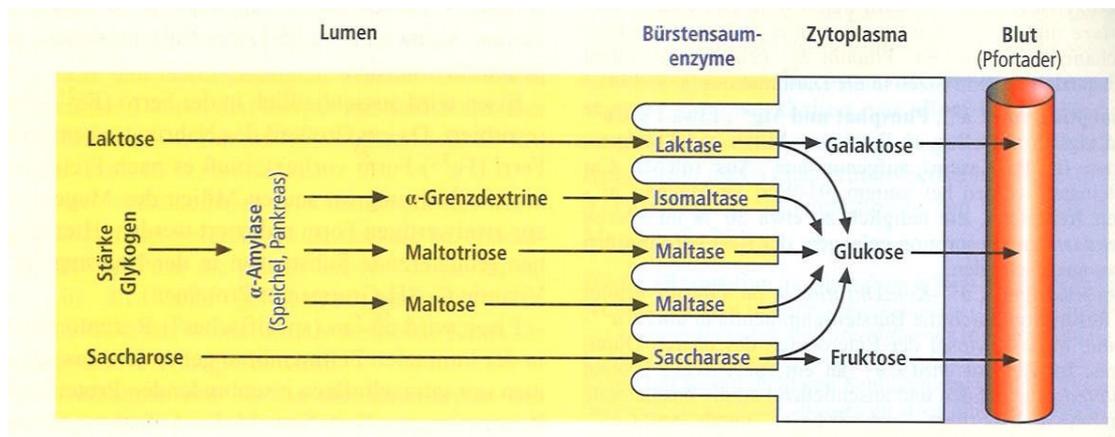


Abbildung 7: Abbau von Lactose

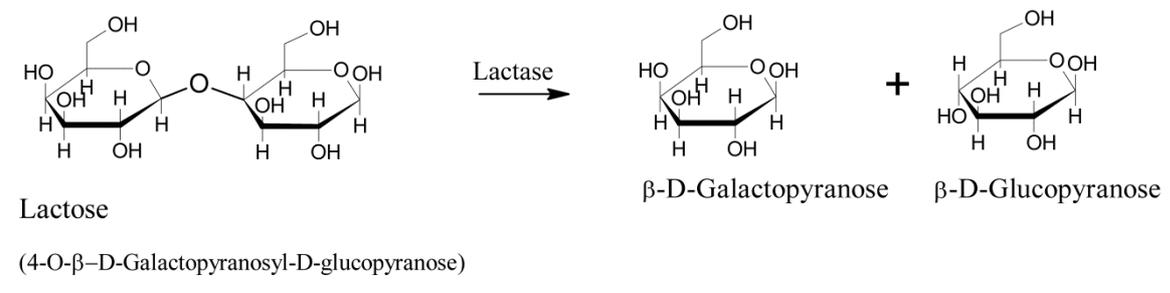
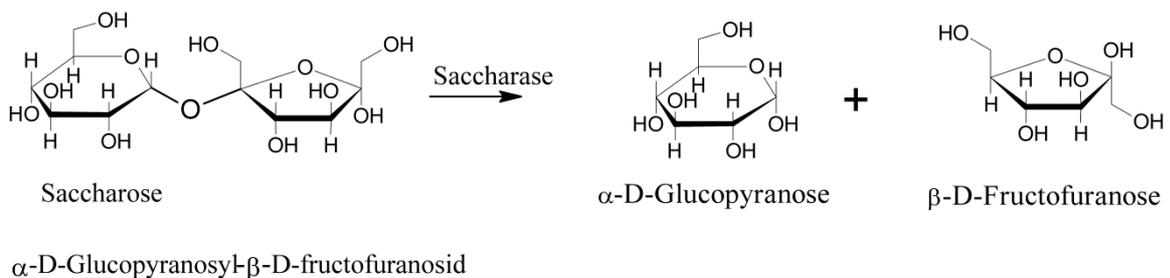


Abbildung 8: Abbau von Saccharose



Glucose und Galactose werden miteinander konkurrierend sekundär aktiv im Symport mit Natriumionen in die Enterozyten resorbiert. Durch Glucosetransporter in der

Basolateralmembran gelangen die Zucker über passiven Transport aus den Enterozyten in die Blutbahn. Fructose gelangt sowohl apikal als auch basolateral über Glucosetransportproteine in die Blutbahn (49; 50). Somit erreichen bei intakter Magen-Darm-Funktion die Disaccharide nicht die Blutbahn, da sie bereits vorher gespalten werden. Glucose wird verstoffwechselt gelangt aber auch unverändert in den Primärharn. Im Verlauf der Nierenpassage wird der Großteil der Glucose zurück resorbiert.

Die Ausscheidung von Glucose in den Urin sollte bei Gesunden unter 15 mg/dL liegen, da auch im proximalen Tubulus der Niere spezifische Glucosetransporter vorhanden sind (51). Bei stark erhöhten Blutzuckerwerten übersteigt die filtrierte Substanzmenge die tubuläre Rückresorptionsrate und Glucose ist in größeren Mengen im Urin nachweisbar, die sog. Nierenschwelle wird überschritten Dies ist beim nicht behandelten Diabetes mellitus der Fall.

Infolge entzündlicher Prozesse im Dünndarm, z. B. bei Zöliakie oder Morbus Crohn, kommt es zu Defekten in der Schleimhaut und somit zu einer erhöhten Permeabilität. Daher können Disaccharide ins Blut gelangen (52; 53) und werden aufgrund fehlender Disaccharidasen unverändert im Urin ausgeschieden (54).

1.7 Bedeutung von Zuckern in der Diagnostik

Kohlenhydrate werden in der klinischen Diagnostik zu verschiedenen Zwecken genutzt. Glucose hat zur Bestimmung des sogenannten Blutzuckers und damit der Diagnose eines Diabetes mellitus sicherlich die größte Bedeutung.

Blutglucosespiegel liegen nüchtern bei <100mg/dL, Werte >126 mg/dL sind als pathologisch anzusehen. Die Bestimmung der Blutglucose erfolgt mittels enzymatischer Testverfahren, in denen z.B. die Extinktionszunahme durch NADH gemessen wird.

Weitere Zucker werden vor allem zur Diagnose von Malabsorptionsstörungen und zur Erkennung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa eingesetzt.

Die Pentose Xylose kann diagnostisch zur Bestimmung von Malabsorptionsstörungen genutzt werden. Diese verminderte Aufnahmefähigkeit von Nahrungsbestandteilen kann z. B. bei entzündlichen oder autoimmunologischen Erkrankungen im Dünndarm auftreten. Xylose wird oral verabreicht und analog zu Glucose und Galactose resorbiert. Die verminderte Xyloseausscheidung im Sammelurin kann ein Hinweis auf oben genannte Erkrankungen sein (55).

Auch Disaccharide wie Saccharose und Lactulose können diagnostisch zur Detektion chronisch entzündlicher Darmerkrankungen genutzt werden, indem man die Zweifachzucker als Marker einer gesteigerten Permeabilität der Dünndarmschleimhaut durch ihren Nachweis im Blut oder Urin nutzt (56; 54; 53; 57). Bei intakter Darmschleimhaut werden Disaccharide gespalten und gelangen nur als Monosaccharide in den Blutkreislauf. Bei Schädigungen der Schleimhaut ist dies nicht mehr gegeben und auch Zweifachzucker gelangen ins Blut. Häufig werden die Disaccharide nach Probengewinnung dann zuerst mittels Disaccharidasen (z.B. Invertase, Lactase) gespalten und die nun freigesetzte Glucose mittels enzymatischer Testverfahren bestimmt. Üblicherweise wird dazu die Extinktionszunahme durch NADH gemessen. Dieses Verfahren ist durch die Blutglucosebestimmung gut etabliert und leicht verfügbar. Auch kann vor der Disaccharidspaltung bereits ein Glucosetest durchgeführt werden, so dass die aufgenommene Disaccharidmenge als Differenz beider Glucosebestimmungen berechenbar ist.

Des Weiteren sind Methoden zur Zuckerbestimmung sowohl bei lebensmittelchemischen Fragestellungen als auch in der Biologie zur Bestimmung von pflanzlichen und tierischen Zuckern beschrieben (58; 59; 60; 61).

1.8 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interpretation der Methadonblutspiegel bei Drogentodesfällen zu erleichtern, indem man durch den Nachweis von Markersubstanzen Hinweise auf den Applikationsweg der Substitutionsmedikamente erhält. Der i.v.-Konsum ist mit einem deutlich höheren Risiko für Nebenwirkungen wie zum Beispiel Atemdepression und Bewusstlosigkeit verbunden.

Auch wäre der Nachweis des Applikationsweges für die Therapiesicherheit in der Substitutionstherapie wichtig und könnte für die behandelnden Ärzte in der Betreuung ihrer Patienten eine wichtige Hilfe bezüglich der Compliance während der „take-home“-Vergabe sein.

Disaccharide erschienen uns hier geeignete Markersubstanzen zu sein, um eine orale von einer intravenösen Substitutaufnahme zu unterscheiden.

Unsere Annahme war es, dass bei intravenöser Aufnahme der Medikamente die enthaltenen Disaccharide unverändert in Blut und Urin nachweisbar sein müssten, da entsprechende Disaccharidasen nur im Darm vorkommen. Bei oraler Einnahme von Substitutionsmedikamenten sollten bei darmgesunden Personen daher keine Zweifachzucker in Blut oder Urin nachweisbar sein.

Die Zuckerbestimmung aus Körperflüssigkeiten wurde bisher vor allem zur Diabetes mellitus-Diagnostik eingesetzt. Dabei werden vor allem immunchemische Verfahren eingesetzt, für die eine Extraktion nicht erforderlich ist. Die indirekte Saccharosebestimmung durch Glucosemessung vor und nach Disaccharidspaltung ist möglich (62), allerdings gibt es bisher keine kommerziell erhältlichen Immunoassays zur direkten Bestimmung der Disaccharide. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Differenzierung und Quantifizierung der in Substitutionsmitteln verwendeten Zweifachzucker zu entwickeln. Auch eine Detektion von Glucose, Galactose und Fructose erschien hilfreich, um gegebenenfalls Hinweise auf mögliche Abbauvorgänge der Disaccharide in der Probe zu erhalten. Der Fokus der Methodenentwicklung lag auf den Disacchariden, da wir annahmen, dass diese nach intravenöser Applikation unverändert im Urin auffindbar sein müssten und der Nachweis von Monosacchariden lediglich als hinweisgebend zu betrachten sei.

Der Zuckernachweis sollte im Urin erfolgen, da dieses Asservat sowohl bei lebenden als auch bei verstorbenen Patienten relativ einfach zu gewinnen und eine hohe Konzentration von Disacchariden anzunehmen ist.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

Lösungsmittel:

- Aceton p.a., J. T. Baker, Griesheim
- Acetonitril LC-MS Chromasolv[®], Fluka, München
- Acetonitril ultragradient HPLC grade, J. T. Baker, Griesheim
- Dichlormethan p.a., Merck, Darmstadt
- Ethylacetat p.a., Merck, Darmstadt
- Methanol p.a., J. T. Baker, Griesheim
- n-Pentan p.a., Merck, Darmstadt
- tert.-Butylmethylether p.a., Merck, Darmstadt

Standardsubstanzen:

- D-Galactose, C. Roth, Karlsruhe
- D-Xylose, Becton, Dickinson and Company, Sparks (USA)
- Glucose (Ph.Eur.6.0), Caelo, Hilden

- Glucose D₇, Omicron, South Bend (USA)
- Lactose Monohydrate (Ph.Eur.6.5), Caelo, Hilden
- Saccharose (Ph.Eur.6.3), Caelo, Hilden
- Saccharose D₂, Omicron, South Bend (USA)
- Trehalose, Merck, Darmstadt
- 1,4-Butandiol, Sigma- Aldrich, Seelze

Sonstige:

- Acetanhydrid p.a., Fluka, München
- Ameisensäure, eluent additive for LC-MS, Fluka, München
- Ammoniak 25 % p.a., Th. Geyer, Renningen
- Ammoniumacetat, for mass spectrometry, eluent additive for LC-MS, Fluka, München
- Benzoylchlorid, Sigma-Aldrich, Seelze
- Essigsäure 100% (Eisessig) p.a., Merck, Darmstadt
- Natriumacetat wasserfrei p.a., Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid p. a., J. T. Baker, Griesheim
- Salzsäure, Tritipur[®], Merck, Darmstadt
- Tetrahydrofuran analytical standard, Sigma-Aldrich, Seelze
- Wasser LiChrosolv[®] for chromatography, Merck, Darmstadt
- Wasser, LC-MS Chromasolv[®], Fluka, München

2.2 Geräte

Zentrifugen

- Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg
- Rotanta 460, Hettich Lab Technology, Tuttlingen
- RVC 2-25 CD plus, Martin Christ GmbH, Osterode
- Kühlfalle CT02-50, Martin Christ GmbH, Osterode

Waagen

- ML 203 E, New Classic MF Mettler-Toledo GmbH, Gießen
- R 160 P, Sartorius AG, Göttingen

Immunchemie

- Hitachi 912 Automatic Analyzer, Krefeld
- AU 480, Beckman Coulter, Krefeld

GC/MS-Anlage

- Autosampler ALS 7683B, Agilent Technologies, Waldbronn
- GC 6890N, Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn
- 5975C Inert XL Mass Selective Detctor, Agilent Technologies, Waldbronn
- Software MSD Chemstation E.01.01.335

HPLC-DAD-Anlage

- Autosampler Merck Hitachi AS 2000
- Pumpe Thermo Spectra System P4000, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
- Detektor Thermo UV 6000
- Interface Spectra Phoresis SN 4000
- Software Chromquest 4.2.32 Version 3.1.6

LC-MS-Anlage

- Autosampler AS 300, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
- Pumpe Finnigan Surveyor quarternary LC pump, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
- Detektor Finnigan LCQ duo, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
- Software Xcalibur 1.4, LCQ Tune, Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Trennsäulen

- Nucleodur[®] HILIC, 125* 2mm, 3 µm, Macherey-Nagel, Düren
- Nucleodur[®] NH₂-RP 250 x 3,0 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, Düren
- Polaris[®] 5 C18 250 x 4,0 mm, 5 µm, Varian, Darmstadt
- RP18 kurz, LiChroCart[®], 125*4 mm,5 µm, Merck, Darmstadt

Mixer

- Mix Mate, Eppendorf, Hamburg
- Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York (USA)

pH- Meter

- pH-Meter 765 Calimatic, Knick GmbH Co KG, Berlin

Photometer

- Varian Photometer Cary 50

2.3 Verbrauchsmaterialien

Immunanalytik

- CEDIA Amphetamine/Ecstasy Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Benzodiazepine Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Buprenorphine Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Cocaine Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA LSD Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Methadone Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Multi Level THC Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Opiate Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- CEDIA Tricyclics Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- DRI Creatinine-Detect, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- DRI Ethyl Alcohol Assay, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA
- DRI pH Detect, Thermo Fisher Scientific, Middletown, USA

SPE

- Bond Elut C18, 100 mg, 1 mL, Agilent Technologies, Waldbronn
- Bond Elut Certify II, 50 mg, 3 mL, Agilent Technologies, Waldbronn
- Bond Elut ENV, 100 mg, 1 mL, Agilent Technologies, Waldbronn
- Bond Elut SAX, 100 mg, 1 mL, Agilent Technologies, Waldbronn
- ExploraSep C Plate 40 mg, Biotage AB, Uppsala, Schweden

Sonstiges

- Whatmann 903 Protein Saver Card, GE Healthcare, Fairfield, USA

2.4 Software

- Valistat-Software for method validation in Forensic Toxicology (63)

3 Methoden

3.1 HPLC-DAD

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit angeschlossenem Diodenarray-Detektor (DAD) gegeben werden. Bei chromatographischen Verfahren wird das unterschiedliche Verteilungsverhalten der Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase, also der Trennsäule und dem Laufmittel, verwendet, um verschiedene Analyten voneinander zu trennen, im Anschluss zu detektieren und ggf. zu quantifizieren. In der HPLC sind vor allem Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge, Umkehrphasen-Adsorption, Ionenaustausch und Bioaffinität für die Retention der Analyten von Bedeutung. Als stationäre Phasen sind vor allem Kieselgele als Umkehr- (RP)-Phasen mit unterschiedlichen Modifikationen von Bedeutung. Normalphasen sind von untergeordneter Bedeutung. HPLC-Anlagen bestehen im Wesentlichen aus folgenden Komponenten: den flüssigen Laufmitteln, der Trennsäule, dem Autosampler mit Probeneinlasssystem, der Pumpe, dem Detektor sowie dem Auswertesystem.

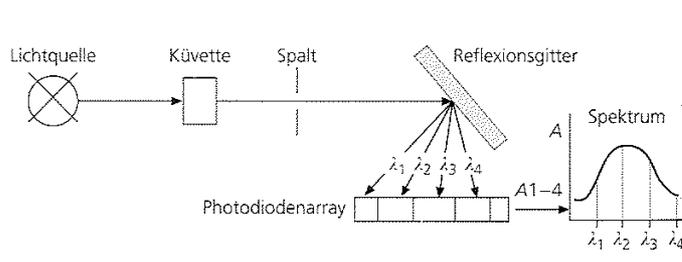
Im hier vorliegenden Fall wurde das Prinzip der Umkehrphasen (RP)-Chromatographie genutzt, d.h. die polaren Endgruppen der Siliciumpartikel werden durch unpolare Endgruppen ersetzt. Das Elutionsverhalten der Analyten wird somit durch Verteilungsvorgänge zwischen stationärer Phase und der gewählten Elutionsstärke der mobilen Phase bestimmt. Als Laufmittel kommen verschiedenste Zusammensetzungen aus Lösemitteln unterschiedlicher Polarität (z.B. Methanol, Acetonitril, Isopropanol, Hexan) und wässrige Phasen mit oder ohne Pufferzusatz zum Einsatz. Bleibt die Zusammensetzung des Laufmittels über die Analysenzeit gleich, spricht man von einer isokratischen Elution, steigert sich die Elutionsstärke über die Laufzeit, so spricht man von einem Elutionsmittelgradienten.

Der Diodenarray-Detektor (DAD) oder auch Photodiodenarray-Detektor (PDA) ist eine Weiterentwicklung des UV/VIS- Detektors mit dem Vorteil, bei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig zu messen und somit ein vollständiges Absorptionsspektrum der betreffenden Substanz aufzuzeichnen (Abbildung 9). Dadurch lassen sich neben der Quantifizierung auch Aussagen zur Reinheit und Identität treffen.

Dazu werden bis zu 1024 einzelne Dioden nebeneinander angeordnet, wobei jede einzelne Diode einen bestimmten kleinen Spektralbereich misst. Der Messbereich erstreckt sich vom ultravioletten bis in den sichtbaren Bereich, also im Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm. Die Photodiode besteht aus einer

Halbleiterschicht, z.B. einem Siliciumchip, welche aus einem positiv und einem negativ leitenden Teil zusammengesetzt ist. Durch eine entgegengesetzte Spannung entsteht eine von Ladungen befreite Verarmungsschicht, welche nahezu keine Leitfähigkeit besitzt. Fällt jedoch Strahlung auf die Photodiode, werden in der Verarmungsschicht Ladungen gebildet, der hieraus resultierende Stromfluss ist proportional zur Intensität der Strahlung und damit zur Lichtdurchlässigkeit der Probe (Transmission).

Abbildung 9: Schematischer Aufbau DAD (64)



3.2 LC-MS

Die Trennung der Analyten über die Säule mittels RP-Phase verläuft analog zur HPLC-DAD.

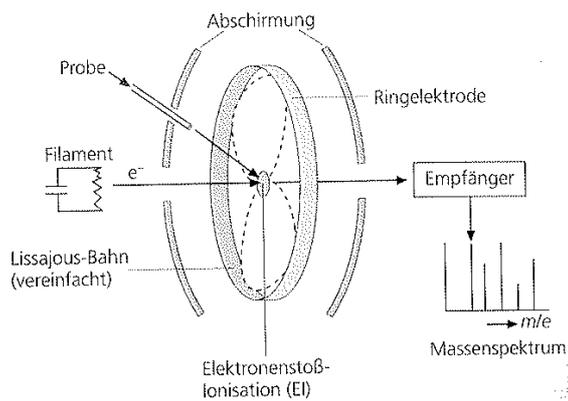
Die Detektion erfolgt über ein Massenspektrometer, die Ionen werden im vorliegenden Fall durch eine Ionenfalle (Ion-Trap-Massenspektrometrie) getrennt.

Um die HPLC-Säule mit dem massenselektiven Detektor zu koppeln, ist ein Sprayverfahren notwendig. Hierbei wird im Elektrospray-Interface an eine Kapillare eine hohe Spannung (3-6 kV) angelegt, die flüssige Phase wird hier mit Hilfe eines Gasstroms zerstäubt. Es entstehen geladene Flüssigkeitströpfchen, die mittels einer beheizten Kapillare („heated capillary“) in das Massenspektrometer geleitet werden. Dieses Verfahren wird als Elektrospray-Ionisation (ESI) bezeichnet. Während im Interface Atmosphärendruck herrscht, wird im Massenspektrometer ein Vakuumgradient erzeugt. Das Vakuum und die Wärme führen zu einer Verkleinerung der geladenen Flüssigkeitströpfchen und schließlich zur Desolvatisierung, so dass nun (mehrfach) positiv oder negativ geladene Quasimolekülonen vorliegen. Die Desolvatisierung kann durch den Einsatz von z. B. Stickstoff als Trocknungsgas beschleunigt werden. Die Ionen der polaren Analyten werden noch in der flüssigen Phase durch Anlagerung oder Abspaltung von Protonen oder Alkalimetallen gebildet. Da im Gegensatz zu den hohen

Flussraten der HPLC-Anlagen die Electrospray-Interfaces mit niedrigen Flussraten im Bereich zwischen wenigen Nanolitern bis einem Milliliter arbeiten, kann hier über nun die Kopplung an den massenselektiven Detektor erfolgen. Mittels ESI-MS können sowohl nieder- als auch hochmolekulare Substanzen bis hin zu Polymeren analysiert werden.

Die Ionen werden nun über eine beheizte Kapillare mittels eines Potential- und Druckgefälles in das Massenspektrometer transferiert. Nach Austritt aus der Kapillare werden die Ionen durch eine Linse („Tube-Lens“) zum Skimmer beschleunigt, dieser verhindert den Eintritt ungeladener Teilchen in den Massenanalysator. Durch Anlegen einer hohen Spannung können hier außerdem Fragmentierungen eingeleitet werden. Es folgt eine Fokussierung des Ionenstrahls über ein Linsensystem und die Weiterleitung in den Massenanalysator. Die Ionen sind nun in der Ionenfalle angelangt (Abbildung 10). Hier erfolgen Ionentrennung und Ionendetektion diskontinuierlich in der gleichen Kammer. Die Ionen werden durch eine variable, an eine Ringelektrode angelegte, Spannung auf einer stabilen Bahn gehalten („Lissajous-Bahn“). Startet man mit einer niedrigen Spannung, werden zunächst Ionen mit einem niedrigen Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z -Wert) auf der Bahn gehalten, wird nun die Spannung erhöht, so fliegen die Ionen aufgrund einer destabilisierten Bahn nach außen, durch ein Loch in der Abschirmung gelangen sie teilweise an den Multiplier. Nun werden Ionen mit einem höheren m/z -Wert auf der Bahn gehalten. So können Ionen aller Massen nacheinander analysiert werden. Bei einfach geladenen Ionen ist eine Unterscheidung des m/z - Wertes um +/- 1 über den Scanbereich möglich. Das Masse-Ladungsverhältnis ist definiert als der Quotient aus der atomaren Masseneinheit amu und der Elementarladung e_0 . 1 amu entspricht einem Zwölftel eines ^{12}C Kohlenstoffatoms, also $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg. Die Elementarladung e_0 ist definiert als $1,6 \cdot 10^{-19}$ Coloumb und die kleinste frei existierende Ladungsmenge. Somit entspricht amu/e_0 $1,04 \cdot 10^{-8}$ $\text{kg} \cdot \text{C}^{-1}$ und wird dann bezeichnet als m/z .

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ionenfalle (64)



Ein Nachteil der Ionenfalle ist der begrenzte Raum, da somit die vorhandenen Ionen mit einander in Wechselwirkung treten können, was zu fehlerhaften Massenspektren führen kann. Um dies zu verhindern, wird die sogenannte „Automatic Gain Control“ angewendet. Es wird vor der eigentlich Analyse festgestellt, wie viele Ionen in der Falle sind und daraus berechnet, wie lange die Falle mit Ionen gefüllt werden darf, um eine Überladung zu verhindern.

Im Fullscan-Modus können außerdem Moleküle definierter Masse-Ladungs-Verhältnisse isoliert und durch Kollision mit Heliumatomen zur Fragmentierung gebracht werden. Daraus entsteht dann ein Spektrum von Tochterionen, welches wiederum aufgezeichnet werden kann.

Durch Beschleunigung der Ionen mit +/- 15 kV nach Austritt aus dem Massenanalysator gelangen diese zur Konversionselektrode. Es kommt zur Bildung geladener und ungeladener Sekundärteilchen, welche durch Aufprall am Multiplier Elektronen freisetzen. Diese setzen ihrerseits wiederum über ein Potentialgefälle und Kollisionen Sekundärteilchen frei, welche nun einen Strom erzeugen. Dieser ist proportional zur zu analysierenden Teilchenzahl und ergibt die Größe des Messsignals.

Neben „Fullscan“-Messungen, bei denen kontinuierliche Massenspektren im Bereich m/z 50-2000 durchgeführt werden, ist auch ein MS/MS-Modus möglich. Hier werden ausgehend von den Precursorionen Spektren der Tochterionen aufgezeichnet.

3.3 Kohlenhydrate

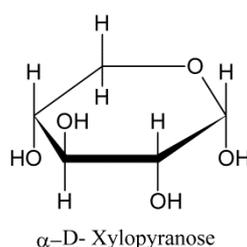
3.3.1 Interne Standards (IST)

3.3.1.1 HPLC-DAD

Als Interne Standards wurden hier Xylose (Abbildung 11) zur Qualifizierung der Monosaccharide und Trehalose zur Quantifizierung der Disaccharide genutzt.

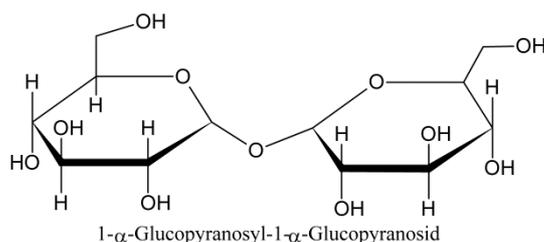
Xylose (α -D- Xylopyranose, Holzzucker) gehört zur Gruppe der Aldopentosen und ist ein wichtiger Nahrungsbestandteil für Pflanzenfresser. Durch die saure Hydrolyse von Xylanen (Holzgummi) wird Xylose gewonnen. Xylane gehören neben der Cellulose zu den am weitesten verbreiteten Pflanzenstoffen. Xylose hat eine molare Masse von 150,13 g/mol, ist gut in Wasser löslich und kann zur Diagnose von Malabsorptionsstörungen verwendet werden.

Abbildung 11: Strukturformel von Xylose



Trehalose (1- α -Glucopyranosyl-1- α -Glucopyranosid) (Abbildung 12) ist ein nicht-reduzierendes, wasserlösliches Disaccharid bestehend aus zwei Glucose-Bausteinen mit einer relativen molaren Masse von 342,30. Trehalose kommt in vielen Algen, Bakterien und Pilzen vor.

Abbildung 12: Strukturformel von Trehalose



3.3.1.2 LC-MS

Zur Quantifizierung der Disaccharide mittels LC-MS wurde Saccharose d2 mit zwei Deuteriumatomen am C6-Kohlenstoffatom der Fructoseuntereinheit verwendet, zur Qualifizierung der Monosaccharide Glucose d7 mit Deuteriumatomen an C1, C2, C3, C4, C5, und zweimal an C6.

Saccharose mit einem höheren Deuterierungsgrad sowie deuterierte Lactose war kommerziell nicht erhältlich.

3.3.2 Stammlösungen

Die Stammlösungen zu 1 mg/mL und 10 mg/mL wurden als wässrige und wässrig-ethanolische (20:80 V:V) Lösungen angesetzt und bei -20 °C gelagert. Dazu wurden Glucose, Galactose, Lactose und Saccharose, die internen Standards Xylose und Trehalose und die deuterierten Zucker Saccharose d2 und Glucose d7 in 10 mL Messkolben eingewogen, mit dem jeweiligen Lösungsmittel aufgefüllt und in 1 mL Aliquoten eingefroren.

3.3.3 Derivatisierung und Extraktion für GC/MS

Zunächst müssen die Zucker für eine Messung mittels GC/MS in flüchtige und weniger polare Derivate überführt werden. Auch können hierdurch eine Verbesserung der Wiederfindung sowie bessere Signal-Rausch-Verhältnisse erzielt werden. Dazu wurden zwei verschiedene Derivatisierungen getestet.

3.3.3.1 Benzoylierung

Dazu wurden 100 µL Urin bzw. Blut mit den jeweiligen Zuckerlösungen (10mg/mL) auf eine Endkonzentration von 1 mg/mL Lactose, Saccharose sowie Glucose gespikkt. Als interner Standard wurden 10 µL 1,4-Butandiol (10 mg/mL) verwendet. Nach Zugabe von 200 µL 5 N NaOH wurde die Probe kurz geschüttelt und nach Addition von 5 µL Benzoylchlorid unter dem Abzug 30 Minuten derivatisiert (Schotten-Baumann-Reaktion). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 600 µL n-Pentan abgestoppt. Nun wurde wiederum 5 Minuten geschüttelt und anschließend 5 Minuten (13 000 U/min) zentrifugiert. Die Pentanphase wurde abgenommen und unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 200 µL Methanol aufgenommen und 100 µL davon in Vials überführt.

Es wurden zu n-Pentan alternative Ausschüttelungen mit Ethylacetat und Chlorbutan getestet.

Kalibrationen von 1mg/L- 100mg/L sowie Leerproben mit und ohne IST wurden aufgearbeitet und bestimmt.

3.3.3.2 Acetylierung

Als weitere Derivatisierung wurde eine Acetylierung mittels Acetanhydrid durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 0,5 mL einer 10%igen Glucoselösung sowie dotierte Urin- und Blutproben in ein Sarstedtröhrchen gegeben und nach Zugabe von 0,7 mL Elutionsgemisch (Dichlormethan:THF 50:50) 3 Minuten geschüttelt und anschließend 3 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. 0,5 mL des Überstandes wurden unter Stickstoff zur Trockne eingedampft und im Anschluss nach Zugabe von 25 µL Pyridin sowie 50 µL Acetanhydrid 6 Minuten bei 400 Watt in der Mikrowelle derivatisiert. Nochmals wurde zur Trockne unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand in 100 µL Ethylacetat gelöst.

Vor der Ausschüttelung mit THF: Dichlormethan wurde die Dichte der wässrigen Phase durch Zugabe von gesättigter Natriumchloridlösung erhöht, damit diese absinkt und die organische Phase abgenommen werden konnte.

Linearität

Kalibrationen von 1mg/L- 100mg/L sowie Leerproben mit und ohne IST wurden aufgearbeitet und analysiert.

Extraktionsausbeute

Die Extraktionsausbeute wurde exemplarisch für Xylose bestimmt. Als Vergleichsprobe (100%) zur Aufarbeitung aus dotierten Blut- und Urinproben wurde 1mL der Xylosetammlösung (10 mg/mL) unter Stickstoffzustrom bei 40 °C zur Trockne eingedampft und anschließend nach Zugabe von 25 µL Pyridin sowie 50 µL Acetanhydrid 6 Minuten bei 400 Watt in der Mikrowelle derivatisiert.

3.3.4 Festphasenextraktion (SPE) für GC/MS

Um sauberere Extrakte zu erzielen und somit die Empfindlichkeit der GC/MS-Methode zu steigern, wurde die Extraktion mittels verschiedener SPE-Materialien überprüft. Hierbei wurden schwache und starke Anionenaustauscher sowie unpolare Säulenmaterialien getestet. Dazu wurden jeweils sechs Blut- und Urinproben je mit 1 mg/mL Xylose, Lactose und Saccharose dotiert.

Bond Elut SAX: starker Anionenaustauscher, konditioniert mit 4mL Methanol und 4 mL Wasser, Proben mit 10 µL 10 M NaOH auf pH 13 eingestellt

Bond Elut Certify II: schwacher Anionenaustauscher, konditioniert mit 2 mL Methanol und 2 mL Natriumacetatlösung+ 5% Methanol, pH 7; Proben mit 10 µL 10 M NaOH auf pH 13 eingestellt

Bond Elut ENV: polymere unpolare Phase, konditioniert mit 2 mL Methanol und 4 mL Wasser

Bond Elut C18: silicabasierte, unpolare Phase, konditioniert mit 2 mL Methanol und 2 mL Wasser

Die Elution erfolgte in Doppelbestimmung mit je 500 µL Methanol, Ethanol 80%ig oder Wasser. Zu den Wasserextrakten wurden nach Elution 800 µL Ethanol absolut gegeben. Alle Proben wurden dann zur Trockne eingedampft und nach Zugabe von 500 µL Pyridin und 50µL Acetanhydrid bei 400 Watt 6 Minuten in der Mikrowelle derivatisiert. Der Rückstand wurde zur Trockne eingedampft und in 100 µL Ethylacetat rekonstituiert.

3.3.5 Geräteeinstellungen GC/MS

3.3.5.1 Benzoylierte Derivate

Trärgas: Helium, konstanter Strömungsdruck 0,88 bar, Laufzeit 70 Minuten

Injektor: 1 µL, 250 °C, Splitless

Temperaturprogramm: 0-2 Minuten: 140 °C

2-60 Minuten: 20 °C/min bis 300 °C

60-70 Minuten: 300 °C

Detektor: *m/z* 70-700; 70 eV EI, transferline 280 °C, Ionsource 230 °C, Quadrupole
150 °C

3.3.5.2 Acetylierte Derivate

Trärgas: Helium, 1,0 mL/min, Laufzeit 30 Minuten

Injektor: 1 µL, 250 °C, Splitless

Temperaturprogramm: 0-4 Minuten 140 °C

4-19 Minuten: 10 °C/min bis 290 °C

19-30 Minuten: 290 °C

Detektor: *m/z* 50-550, 70 eV EI, transferline 280 °C, Ionsource 230 °C, Quadrupole
150 °C

3.3.6 UV-Spektren

Zur Aufnahme von UV-Spektren wurden mittels eines Photometers wässrige Lösungen von Xylose, Glucose, Galactose, Lactose und Saccharose je 1 g/L und 0,1 mg/L vermessen. Hierbei wurde ein Wellenlängenbereich von 200-700 nm abgefahren.

3.3.7 Extraktion und Derivatisierung für HPLC-DAD

100 µL Urin bzw. 100 µL Wasser je dotiert mit 1 mg/mL Glucose, Saccharose und Lactose sowie 10 µL Butandiol (1 mg/mL) als internem Standard wurden mit 200 µL 5 N Pyridin versetzt, geschüttelt und anschließend unter dem Abzug 5 µL Benzoylchlorid zugegeben (basenkatalytische Derivatisierung, Schotten-Baumann-Reaktion). Die Proben wurden 10 Minuten geschüttelt und weitere 10 Minuten ruhen gelassen. Nach Zugabe von 600 µL n-Pentan wurden wiederum 5 Minuten geschüttelt und nachfolgend 5 Minuten zentrifugiert (13 000 U/min). Die Pentanphase wurde abgenommen, unter Stickstoff eingedampft und mit 200 µL Methanol aufgenommen. Analog dazu wurden ebenfalls Leerproben aufgearbeitet.

3.3.8 SPE für HPLC-DAD

Zur Aufreinigung des Probenmaterials wurden verschiedene Festphasen getestet. Dazu wurde eine Explora Sep[®] Screeningplatte Nr. C verwendet, um möglichst viele für Kohlenhydrate geeignete Materialien in einem Schritt testen zu können. Diese 96-Well-Screening Platte bietet 32 verschiedene Materialien empfohlen zur Aufreinigung von Kohlenhydraten, Diolen sowie neutralen und polaren Komponenten unter basischen Bedingungen. Es handelt sich hierbei um Harze mit molekular geprägten Polymerpartikeln (molecularly imprinted polymers (MIPs)) und deren korrespondierenden nicht molekulargeprägten Polymerpartikeln (non-molecularly imprinted polymers (NIPs)) sowie verschiedene Polymerphasen. Sollte ein Treffer mit einem MIP-Material entstehen, ist kein Treffer beim entsprechenden NIP zu erwarten. Die Verteilung der verschiedenen Materialien über die Screeningplatte wird dem Anwender durch den Hersteller nicht mitgeteilt.

Pro Material stehen also drei Plätze zur Verfügung. Es wurde je Material eine wässrige Lösung (Glucose, Xylose, Lactose, Saccharose je 100 mg/L), eine Urinprobe gleicher Konzentration sowie ein Leerurin getestet.

Zunächst wurde die Screeningplatte mit 2* 1mL Regenerationslösung (Methanol: Essigsäure: Wasser 60:30:10), 2 *1mL Methanol sowie 1 mL 1%iger Ammoniaklösung gewaschen. Danach erfolgte die Probenaufgabe von je 1 mL Probenmaterial in 1% Ammoniaklösung (pH= 10). Die Proben sollten zum

Equilibrieren 5 Minuten auf der Säule stehen. Gemäß Herstellerangaben wurde anschließend mit 1mL 1% Ammoniaklösung eluiert und die Säulen 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert, um das Säulenmaterial zu trocknen. In weiteren Versuchsansätzen wurde mit Wasser eluiert sowie zur Überprüfung der Extraktionsausbeute in die Blankproben nach Auffangen des Eluats mit Kohlenhydraten (Konzentration =100 mg/L) dotiert. Anschließend wurden die Eluate analog der optimierten HPLC- Extraktion (s. 3.4.1) aufgearbeitet.

3.3.9 Geräteeinstellungen HPLC-DAD

Injektionsvolumen: 20 µL

Laufmittel: 72 % Methanol p.a., 28 % Wasser, HPLC grade

Säule: RP18 kurz, LiChroCart®, 125*4 mm, Flow 1,5 mL/min

Detektor: 238 nm

Laufzeit: 30 Minuten

3.3.10 Lagerungsversuch

Mit Saccharose und Lactose dotierte Urinproben (Konzentration 100 mg/L) in Doppelbestimmung wurden für 1, 3, 7 und 10 Tage bei -20 °C, 4 °C und 20 °C gelagert und anschließend die Zuckerkonzentrationen mittels HPLC-DAD gemessen.

3.3.11 Extraktion LC-MS

100 µl Urin wurden mit 1 mL 0,1 M Essigsäure versetzt, kurz geschüttelt und zentrifugiert (5 Minuten, 13000 U/min). 500 µL des Überstandes und 500 µL Acetonitril wurden in ein V-Vial gegeben und 20 µL davon eingespritzt.

In einem weiteren Versuch wurde anstatt der Essigsäure der Urin mit 1 mL Acetonitril versetzt.

3.3.12 Einstellungen MS-Tune-Modus

Arbeitslösungen

Es wurden wässrige Lösungen (1 mg/L) von Glucose, Lactose und Saccharose und der deuterierten Zucker hergestellt und bei -20 °C gelagert.

Diese wurden mit Hilfe der Spritzenpumpe infundiert, eine niedrige Flussrate des Laufmittels (0,05 mL/min) wurde hinzugeschaltet. Zunächst wurde nur Laufmittel in die Quelle gepumpt, um das Grundrauschen aufzuzeichnen. Danach wurde die Spritzenpumpe hinzugeschaltet und die Signale beobachtet.

Additiva/ Laufmittel:

- 85 % Acetonitril LCMS grade, 15 % Wasser LCMS grade, 0,2 % Ameisensäure;
pH 6
- 80 % Acetonitril LCMS grade, 20 % Wasser LCMS grade, Natriumacetatpuffer
5 mM, pH 7,4
- 85 % Acetonitril LCMS grade, 15 % Wasser LCMS grade, Ammoniumacetatpuffer
5 mM, pH 6,8
- 80 % Acetonitril LCMS grade, 20 % Wasser LCMS grade, 0,1 % Ameisensäure ,
pH 4,0

Tune-Parameter

Positiv ESI:

Sheath gas: 40 arb

Aux gas: 30 arb

Source voltage 5 kV

capillary voltage 42 V

tube voltage 55 V

Negativ ESI:

Sheath gas: 70 arb

Aux gas: 10 arb

I Spray Voltage: -3,5kV

Capillary temperature: 160 °C

Capillary voltage: -4,0 V

Tube lens offset: -2,0 V

3.3.13 Geräteeinstellungen LC-MS

MS

Elektrospray Ionisation, Negativmodus (ESI). -3,5 kV

heated capillary: 160 °C, - 20 V

sheath gas: 70 arbitrary units

aux gas: 10 arbitrary units

Scanbereich: 100- 400 *m/z*

35% relative Kollisionsenergie

HPLC

Injektionsvolumen: 20 µL

Säule: Nucleodur® HILIC, 125* 2mm, 3 µm

Laufmittel A: Wasser LCMS grade 15-21 %
Laufmittel B: Acetonitril LCMS grade 79-85 % } als isokratisches Laufmittel

Gradient:

Laufmittel A: Acetonitril LCMS grade + 0,1 % FAc

Laufmittel B: Ammoniumacetatpuffer 5mM +0,1 % FAc, pH 3,5

0-19 Minuten: 10-90 % B

19-20 Minuten: 90-10 % B

20-30 Minuten: 10 % B (Äquilibrierungsphase)

Die Nucleodur® HILIC Säule ist geeignet zur Trennung hochpolarer Analyten. Die Endgruppen der Silicafüllung sind modifiziert mit Ammoniumsulfonsäure. Durch Wechselwirkungen des positiv geladenen Stickstoffs mit den Hydroxygruppen der Zucker wird eine Trennung erreicht. Diese Oberflächenstruktur ist hochpolar, aber neutral.

3.4 Methodenoptimierung

3.4.1 Extraktion HPLC-DAD

Die Methodenoptimierung wurde anhand der Methode nach Galensa (65; 66) durchgeführt. 1mL Urin wurde im Spitzbodenröhrchen nach Zugabe von je 20 µL Xylose (Endkonzentration 200 mg/L) und Trehalose (Endkonzentration 20 mg/L) mit 2 mL Aceton gefällt und mittels Vakuumzentrifuge (90 Minuten, 50 °C, 2mbar) zur Trockne eingedampft. Die basenkatalysierte Derivatisierung erfolgt durch Zugabe von 500 µL 5 N NaOH und 50 µL Benzoylchlorid für eine Stunde bei 60 °C im Ultraschallbad. Anschließend wurde mit 2* 1 mL n-Pentan ausgeschüttelt, zentrifugiert (10 Minuten, 3000 U/min), die Pentanphasen vereinigt und unter leichtem Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µL Methanol aufgenommen.

3.4.2 Geräteeinstellungen HPLC-DAD

Injektionsvolumen: 30 µL

Laufmittel: Acetonitril: Wasser: tert.-Butylmethylether 60:24:8

Säule: Varian Polaris® 5 C18 250*4,0 mm, Flow 1,0 mL/min

Detektor: 230 nm

Laufzeit: 25 Minuten

Diese Methode wurde vollständig validiert und zur Untersuchung von Patientenproben angewendet.

3.4.3 Extraktion LC-MS

100 μ L Urin werden mit 20 μ L Saccharose d2 –Lösung (Konz. 0,1 mg/L) dotiert und gemischt. Hieraus ergibt sich eine Endkonzentration von 20 mg/L Saccharose d2. Es können 20 μ L als Mix aus beiden deuterierten Standards (Glu d7 und Sac d2) verwendet werden. Die Proben werden mit 1 mL Aceton gefällt und je 5 Minuten geschüttelt zentrifugiert (13 000 U/min). Der Überstand wird in V-Vials überführt und unter Stickstoff bei 40 °C zur Trockne eingedampft. Alternativ kann die Probe auch in der Vakuumzentrifuge (30 Minuten, 50 °C, 2 mbar) eingedampft werden. Der Rückstand wird in einer Mischung aus 100 μ L Wasser, 80 μ L Acetonitril und 20 μ L Methanol angelöst.

Die Extraktion von hydrophilen Substanzen wie die der verschiedenen Zucker aus wässrigem Material stellte eine große Herausforderung dar. Daher wurde zur Extraktion der Blutproben neben der Fällung mit Aceton auch die Technik der „Dried blood spots“ getestet. Hierzu wurde Vollblutproben von Verstorbenen (ohne Hinweise auf intravenösen Konsum von Drogen und Medikamenten) sowie humanes Leerserum mit Disacchariden (Lac, Sac 50 mg/L) und IST (Sac d2 20mg/L) dotiert und 50 μ L Blut pro Blood Spot auf Filterpapier (Whatman 903) getropft. Diese Spots wurden mehrere Stunden trocknen gelassen, ausgeschnitten und in ein Eppendorf Cup gegeben. Zur Extraktion der Zucker wurde jeweils mit Wasser, Methanol oder einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1) verwendet. Der wässrige Rückstand wurde mit Acetonitril und Methanol versetzt und eingespritzt, die methanolischen Extrakte eingedampft und wie die Fällungsproben mit 100 μ L Wasser, 80 μ L Acetonitril und 20 μ L Methanol angelöst.

3.4.4 Geräteinstellungen LC-MS

Tune-Modus

Um die optimale Sensitivität der MS-Einheit zu erzielen, wurden die zu vermessenden Zucker hinter der Säule mit Hilfe der Spritzenpumpe infundiert. Dabei wurden Konzentrationen von 1 mg/L der jeweiligen Analyten in einem Acetonitril- Wasser-Gemisch (80:20) mit Zusatz von 0,1 % Ameisensäure verwendet. Unter Beobachtung der gebildeten Formiataddukte wurden Sheath-Gas und Aux-Gas sowie die Temperatur der Elektrosprayquelle bis zur maximalen Signalstärke und -stabilität manuell angepasst. Die Ermittlung der weiteren geeigneten Parametereinstellungen für ESI-Quelle und

Methoden

Ionenoptik erfolgte halbautomatisch. Hierbei wurden die Spannungen für Capillary, Needle, Tube Lens (ESI-Quelle) sowie für Multipole und Linse (Ionenoptik) angepasst.

Folgende Einstellungen wurden in der Methode verwendet:

Sheath-Gas: 70 arb

Aux-Gas: 10 arb

I Spray Voltage: -3,5kV

Capillary temperature: 160 °C

Capillary voltage: -4,0 V

Tube lens offset: -2,0 V

MS

Elektrospray Ionisation, Negativmodus (ESI). -3,5 kV

Heated capillary: 160 °C, - 20 V

Sheath-Gas: 70 arb

Aux-Gas: 10 arb

Scanbereich: 100- 400 *m/z*

35% relative Kollisionsenergie

MS-MS-Modus

Monosaccharide: Scan-Event 3- 7,9 Minuten

m/z 225 [Glu+ HCOO⁻]⁻

m/z 232 [Glud7+ HCOO⁻]⁻

Disaccharide: Scan-Event 8-15 Minuten

m/z 387 [Lac+ HCOO⁻]⁻ und [Sac+ HCOO⁻]⁻

m/z 389 [Sacd2+ HCOO⁻]⁻

Kollisionsenergie 35 %

Isolation Width 2, 0 *m/z* für 30 ms

HPLC

Injektionsvolumen: 10 µl

Säule: Nucleodur[®] NH₂-RP 250 x 3,0 mm, 5 µm

Vorsäule: Nucleodur[®] -5 NH₂-RP 4 x 2 mm

Laufmittel A: Ammoniumacetatpuffer 5 mmol/L +0,1 % FAc, pH 3,5

Laufmittel B: Acetonitril LCMS grade, Ameisensäure 0,1%

Gradient: 0,8 mL/min Flussrate

0-15 Min.: 10 %-60 % B

15-16 Min.: 60 %- 10 % B

16-25 Min.: 10 % B (Äquilibrationszeit)

Bei der Nucleodur® NH₂-RP-Säule handelt es sich um eine silicabasierte Säule mit einer Aminopropylmodifizierung der Endgruppen. Sie ist geeignet zur Trennung polarer Analyten in wässrig-organischen Eluenten und somit für RP-Trennung von Zuckern.

Die Zusammensetzung der Laufmittel wurde von der HILIC-Methode übernommen, da die Zucker auch weiterhin als Formiataddukte detektiert werden sollten. Der Gradient aus Ammoniumformiatpuffer und Acetonitril erzielte die besten Ergebnisse.

Diese Methode wurde anschließend validiert und zur Analyse der Patientenproben angewendet.

3.5 Patientenproben

Zur Überprüfung unserer Arbeitshypothese, ob nach i.v.-Konsum von Substituten Disaccharide im Urin nachweisbar seien, wurden Urinproben unterschiedlicher Herkunft - sowohl von Drogentodesfällen als auch von lebenden Probanden - untersucht. Die verschiedenen Patientenkollektive sind im Folgenden aufgeführt.

3.5.1 Kontrollkollektive

3.5.1.1 Kontrollkollektiv 1

Um zu überprüfen, ob auch nach oraler Kohlenhydrataufnahme Disaccharide im Urin nachweisbar sind, wurden zunächst die Urinproben eines Kontrollkollektivs aus 30 gesunden Teilnehmern im Alter zwischen 22 und 54 Jahren (Labormitarbeiter und Studenten) untersucht. Die Teilnehmer gaben an, keine Drogen zu konsumieren. Die gewonnenen Urinproben wurden zusätzlich zur Analyse auf Kohlenhydrate immunochemisch auf illegale Substanzen (Amphetamine, Ecstasy, Cocain, Opiate, Cannabinoide) und ausgewählte Medikamentenwirkstoffe (Buprenorphin, Methadon, Benzodiazepine, Barbiturate, Tricyclische Antidepressiva) untersucht. Die Probanden nahmen jeweils eine Einzeldosis bestehend aus 20 g Lactose oder 20 g Saccharose oral auf, eine erste Urinabgabe erfolgte nach 30-40 Minuten, die zweite Probenabgabe erfolgte 2-3 Stunden nach Zuckeraufnahme. Die Proben wurden bis zur Analyse mittels HPLC-DAD bei -20°C gelagert.

3.5.1.2 Kontrollkollektiv 2

In einem zweiten Versuch wurden zwölf Urinproben nach Aufnahme höherer Disaccharidkonzentrationen untersucht (67). Die zwölf gesunden Teilnehmer (Labormitarbeiter) im Alter zwischen 22 und 50 Jahren nahmen entweder 100 g Schokolade oder Coca-Cola® oral auf. Die Urinproben wurden 30- 120 Minuten nach Aufnahme gewonnen und bis zur Analyse mittels LC-MS bei -20 °C gelagert. 100 g Vollmilchschokolade enthalten ca. 50 g – 60 g Zucker (68; 69), in 1 L Coca-Cola® sind 41 g Saccharose, 31 g Glucose sowie 30 g Fructose enthalten.

3.5.2 Patientenkollektiv 1 - Drob Inn 1

Die Proben des ersten Kollektivs wurden in Zusammenarbeit mit dem Drob Inn in Hamburg gewonnen. Es nahmen 26 Probanden im Alter von 22 bis 54 Jahren teil, pro Teilnehmer wurde eine Urinprobe gewonnen. Das Drob Inn ist eine niedrighschwellig arbeitende Kontakt- und Beratungsstelle mit integrierten Konsumräumen. Bei Zuteilung der separaten Konsumräume werden die Konsumenten von den Mitarbeitern zur Art der konsumierten Droge und zur Konsumform befragt. Bei intravenösem Konsum von Buprenorphin, Methadon oder Heroin wurden die Konsumenten um die Abgabe einer Urinprobe gebeten. Sie wurden über die Studie informiert, die Probenabgabe war gänzlich freiwillig. Die Urinproben wurden 15-30 Minuten nach Drogenkonsum gewonnen und bei 4 °C bis zum Probeneingang im Labor gelagert, danach erfolgte die Aufbewahrung bis zur Analyse mittels HPLC-DAD bei -20 °C.

Das Ziel dieser Untersuchung war, die These zu überprüfen, ob nach intravenösem Konsumzuckerhaltiger Opiat- und Opioidzubereitungen die Zucker im Urin nachweisbar sind.

3.5.3 Patientenkollektiv 2 - Drob Inn 2

Bei der zweiten Untersuchung in Kooperation mit dem Hamburger Drob Inn erfolgten pro Proband jeweils zwei Urinabgaben (67). Zunächst wurden die Konsumenten durch die Mitarbeiter des Drob Inn befragt, ob sie beabsichtigen, Substitute intravenös zu konsumieren und zur Teilnahme bereit seien. Die erste Urinabgabe sollte vor dem intravenösen Konsum, die zweite danach erfolgen. Anschließend wurde ein kleiner Fragebogen ausgefüllt. Dieser beinhaltete Fragen zum Zeitpunkt des letzten zurückliegenden Konsums und zur Art der konsumierten Substanz, zum aktuell konsumierten Substitut sowie zum Zeitpunkt der Urinabgaben.

Ziel dieser Untersuchung war es, nähere Erkenntnisse zum zeitlichen Nachweisfenster der Disaccharide zu erhalten.

Die Probenabgaben erfolgten je 30-60 Minuten vor und nach aktuellem Konsum. Das Alter der 20 Teilnehmer lag zwischen 20 und 46 Jahren, es wurden 40 Urinproben gewonnen. In diesem Setting war es deutlich schwieriger Personen zu rekrutieren, die bereit waren 2 Urinproben abzugeben. Gelagert wurden die Proben im Drob Inn bei 4 °C über maximal 48 Stunden und nach Eingang im Labor bis zur Analyse mittels LC-MS/MS bei -20°C.

3.5.4 Patientenkollektiv 3 - Drogentodesfälle

3.5.4.1 *Urinproben*

Es wurden außerdem Urinproben von Drogentodesfällen auf Disaccharide analysiert. Hierzu wurden retrospektiv die Drogentodesfälle der Jahre 2007-2012 untersucht, die im Hamburger Institut für Rechtsmedizin obduziert wurden, bzw. bei denen eine äußere Leichenschau durchgeführt wurde. Insgesamt gab es in diesem Fünfjahreszeitraum 342 Drogentodesfälle, wobei in 130 Fällen Methadon und in drei Fällen Buprenorphin nachgewiesen wurde. Bei diesem Gesamtkollektiv von 133 Fällen mit positivem Nachweis eines Substitutionsmittels waren in 61 Fällen Urinproben vorhanden, welche auf Disaccharide untersucht wurden.

Ziel der Untersuchung war es, Hinweise zum Applikationsweg der Substitute bei Methadon- und Buprenorphin-assoziierten Todesfällen zu erhalten.

3.5.4.2 *Blutproben*

Es wurden in 25 Fällen Blutproben untersucht, bei denen im Urin positive Disaccharidbefunde vorlagen. Dazu wurde die Urinmethode mittels HPLC-DAD auf Blut übertragen. Ein Kontrollpool wurde aus 15 post-mortem-Venenblutproben hergestellt, bei denen ein intravenöser Drogenkonsum in der Vorgeschichte ausgeschlossen werden konnte. Es wurden Kalibrations- und Qualitätskontrollproben analog zu den Urinproben dotiert und mittels HPLC-DAD analysiert. Im Rahmen einer Teilvalidierung wurden die Linearität der Kalibration anhand von vier Kalibrationen, die Genauigkeit anhand von je zwei verschiedenen QCs an sechs verschiedenen Tagen sowie die Extraktionsausbeute mit je vier Kontrollproben einer hohen und niedrigen Konzentration und die Selektivität bestimmt.

Die Blut- und Urinproben wurden im Rahmen der Obduktion bzw. der äußerlichen Untersuchung des Verstorbenen entnommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden nach der Aufarbeitung mittels HPLC-DAD untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 GC-MS

4.1.1 Extraktion

Um die Kohlenhydrate möglichst ohne Verunreinigungen aus den biologischen Matrices analysieren und zu können, ist eine Aufreinigung sowie die Probenaufgabe aus nicht wässrigen Lösungsmitteln notwendig. Es wurden zu den beschriebenen flüssig-flüssig Extraktionen (3.3.3.1, 3.3.5.2) SPE-Materialien getestet (3.3.4).

Die getesteten SPE- Materialien brachten keinen Vorteil gegenüber der flüssig-flüssig Extraktion. Die saubersten Extrakte wurden nach Aufreinigung mit SAX und Bond ELUT ENV Säulen nach Elution mit Ethanol und Wasser erzielt, allerdings waren die erreichten Signalstärken der acetylierten Zucker bei der massenspektrometrischen Analyse nicht ausreichend hoch.

4.1.2 Derivatisierung

Um die zu untersuchenden Zucker mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie untersuchen zu können, müssen diese mittels Derivatisierungsreaktionen in flüchtige Komponenten überführt werden. Diese Derivate können dann im Einlasssystem des GC/MS verdampft werden und mit dem Trägergas über die Trennsäule gespült werden.

4.1.2.1 Benzoylierung

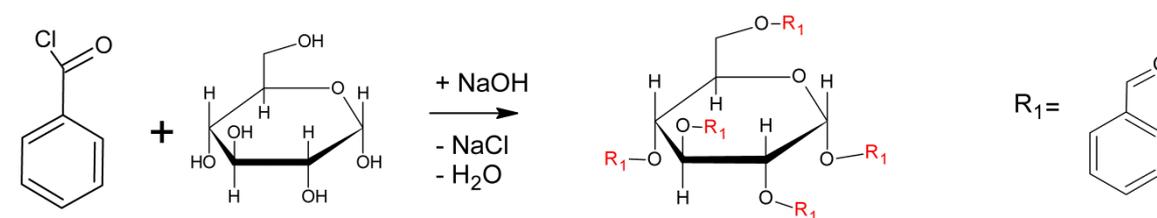
Zunächst wurden Glucose, Lactose und Saccharose als benzoylierte Derivate analysiert. Bei vollständig benzoylierten Zuckern werden sehr hohe Molekulargewichte erreicht, die oberhalb des Scanbereiches der GC/MS-Geräte liegen.

Bei vollständiger Derivatisierung aller endständigen OH-Gruppen und einer molaren Masse des Benzoylrestes von 105 g/mol ist von einer ca. 3,5fach höheren Masse der Zucker auszugehen. Der optimale Scanbereich der im Labor vorhandenen Massenspektrometer liegt zwischen 70-700 m/z , so dass lediglich Xylose und ggf. Glucose als Molekülonen detektiert werden könnten. Der zu erreichende Benzoylierungsgrad der Zucker war vor Beginn der Versuche jedoch noch nicht bekannt, so dass sich erst im Laufe der Versuche zeigte, dass eine Detektion mittels GC/MS ungeeignet ist.

Tabelle 3: Molekülmassen der Zucker vor und nach Benzoylierung

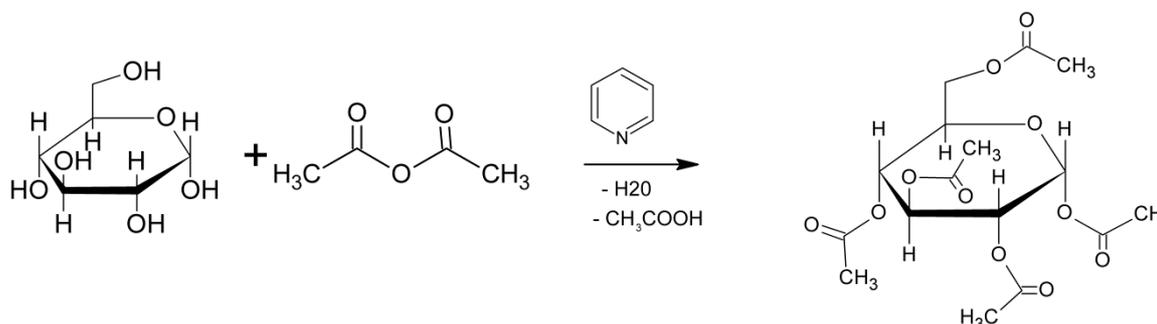
Zucker	Molare Masse [g/mol]	Molare Masse nach Benzoylierung [g/mol]
Glucose	180,16	700,91
Lactose	342,30	1175,5
Saccharose	342,31	1175,51
Xylose	150,13	570,13

Die Benzoylierung läuft nach der Schotten-Baumann-Reaktion (Abbildung 13) ab, bei der Benzoylchlorid in wässrigen Alkalilösungen zur Einführung der Benzoylfunktion in Alkohole, Phenole oder Amine dient. Nach Addition der primären Hydroxygruppe an das Benzoylchlorid (Carbonsäurechlorid) entsteht durch Protonentransfer ein Halbacetal. Durch Deprotonierung und Abspaltung des Chloridanions entsteht der benzoylierte Zucker (Esterbildung).

Abbildung 13: Benzoylierung von Glucose

4.1.2.2 Acetylierung

Des Weiteren wurde eine Acetylierung (Abbildung 14) mit Acetanhydrid und Pyridin durchgeführt. Je eine Hydroxygruppe der Kohlenhydrate reagiert mit Acetanhydrid zu einer acetylierten Endgruppe und einem Molekül Essigsäure.

Abbildung 14: Acetylierung von Glucose

Der Acetylrest hat eine molare Masse von 59,05 g/mol, was zu ca. doppelt so hohen Massen nach dem Derivatisierungsschritt führt.

Auch hier fand eine vollständige Umsetzung aller Hydroxygruppen statt, so dass für die GC/MS-Analytik zu hohe Massen entstanden, die außerhalb des Scanbereiches lagen. Für eine selektive Derivatisierung nur einer Hydroxygruppe war die Acetylierung nicht geeignet.

Tabelle 4: Molekülmassen der Zucker vor und nach Acetylierung

Zucker	Molare Masse [g/mol]	Molare Masse nach Acetylierung [g/mol]
Glucose	180,16	390,22
Lactose	342,30	678,4
Saccharose	342,31	678,41
Xylose	150,13	318,18

Glucose aus Reinsubstanzlösung konnte als fünffach acetyliertes Derivat (Glucose 5 AC) detektiert werden.

4.1.3 Extraktionsausbeute nach Acetylierung

Xylose wurde zur Überprüfung der Extraktionsausbeute verwendet, da diese physiologisch nicht im menschlichen Stoffwechsel vorkommt und somit nicht von Verfälschungen der Ergebnisse auszugehen ist. Die Extraktionsausbeute der derivatisierten Xylose betrug mit Urin als Matrix 2,2 % und mit Blut als Matrix 1,3 %. Die nach Derivatisierung erhaltenen Extrakte zeigten eine bräunliche Verfärbung. Damit liegt die Extraktionsausbeute weit unterhalb des angestrebten Wertes von >50 %. Die als Vergleichslösung aufgearbeitete Xylosestammlösung zeigte deutlich höhere Xylose-Signale, die Extrakte nach Derivatisierung waren farblos.

4.1.4 Zusammenfassung Ergebnisse GC/MS

Die Entwicklung einer gaschromatisch-massenspektrometrischen Methode wurde nicht weiter verfolgt, da sich diese Analysetechnik als nicht geeignet herausstellte. Zum einen gestaltete sich die Extraktion der hydrophilen Zucker aus wässriger Matrix als sehr schwierig. Nach flüssig-flüssig Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wird nur ein geringer Anteil der Zucker aus der wässrigen Matrix in die organische Phase überführt. Die Derivatisierung vor Extraktion im wässrigen Medium führt aufgrund des fehlenden Aufreinigungsschrittes zu stark verschmutzten Extrakten. Zum anderen war eine gaschromatographisch-massenspektrometrische Messung der benzylierten und

acetylierten Disaccharide aufgrund zu hoher Massen gar nicht möglich. Nach Acetylierung des Monosaccharides Xylose konnte zudem, bedingt durch die niedrige Extraktionsausbeute, keine ausreichende Empfindlichkeit bei der Detektion erzielt werden.

Durch diese beiden ersten Versuche zeigte sich aber, dass alle OH-Gruppen der Mono- und Disaccharide für Benzoylierungs- und Acetylierungsreaktionen zugänglich sind. Es ist also von einer vollständigen Derivatisierung auszugehen und nicht vom parallelen Vorhandensein unterschiedlich stark derivatisierter Zucker. Dieser Aspekt machte es interessant einen Nachweis mittels HPLC-DAD zu erproben, wenn davon auszugehen ist, dass jeder der Zucker nur ein einzelnes Signal, nämlich das des vollständig derivatisierten Zuckers, erzeugt.

4.2 HPLC-DAD

4.2.1 UV-Spektren nativer Zuckerlösungen

Da Zuckerlösungen keine aussagekräftigen UV-Spektren zeigen und bei den Versuchen für die GC/MS gezeigt wurde, dass von einer vollständigen Derivatisierung der Zucker auszugehen ist, kam für die weitere Methodenentwicklung nur ein Derivatisierungsschritt mit anschließender Detektion per Diodenarraydetektor (DAD) in Frage.

4.2.2 Ergebnisse der Methodenentwicklung

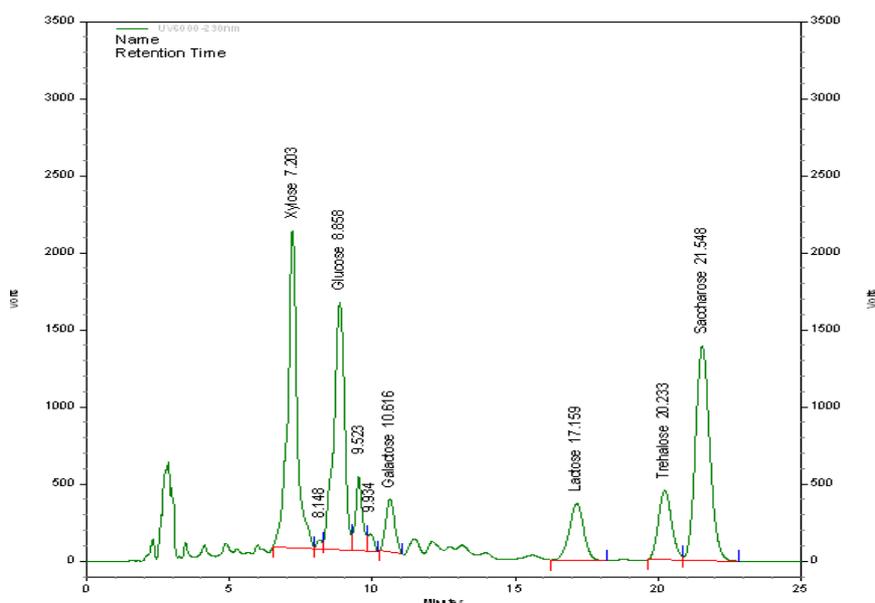
Der schwierigste Schritt bei der Methodenentwicklung war die möglichst quantitative Extraktion der sehr hydrophilen Zucker aus hydrophiler Matrix. Die direkte Benzoylierung der Zucker mit anschließender Ausschüttelung in n-Pentan ohne Aufreinigungsschritt führte zu sehr unsauberen Extrakten mit vielen Störpeaks im Chromatogramm. Im Folgenden wurde daher versucht, die hydrophilen Zucker erst zu extrahieren und anschließend zu derivatisieren. Es erschien vielversprechend, verschiedene für Kohlenhydrate geeignete Festphasen zu testen. Dazu wurde die ExploraSep® Screeningplatte verwendet. Allerdings zeigten sich bei der Auswertung der aufgearbeiteten Proben keine Treffer und auch eine Modifizierung des vom Hersteller vorgegebenen Extraktionsschemas war nur bedingt möglich, da der Anwender von der Herstellerfirma keine Hinweise über die Zusammensetzung der einzelnen Festphasen erhält. Ein daraufhin mit dem Hersteller geführtes Gespräch ergab, dass diese Platte vor allem für präparative und nicht analytische Fragestellungen entwickelt wurde. Daher wurde der Ansatz einer Festphasenextraktion nicht weiter verfolgt.

Schließlich gelang eine zufriedenstellende Aufreinigung durch eine Proteinfällung mittels Aceton und anschließendem Eindampfen des Überstandes. Nun konnte die Derivatisierung der Zucker unter Zugabe von Natriumhydroxidlösung und Benzoylchlorid und anschließender Behandlung im Ultraschallbad durchgeführt werden. Im Folgenden wurden die benzoylierten Zucker mittels n-Pentan extrahiert und nach erneutem Eindampfen und Anlösen in Methanol per HPLC-DAD analysiert. Durch die Benzoylierung weisen alle Zucker das gleiche UV-Maximum bei 230 nm auf, allerdings ist eine chromatographische Trennung der einzelnen Analyten über eine C18-Säule mit polarer Modifizierung möglich (Abbildung 15).

Die Umstellung des Laufmittels von Methanol zu Acetonitril und der Zusatz von tert.-Butylmethylether ergab eine bessere Trennung der einzelnen Saccharide. Da die Derivatisierung mit Pyridin zu unsauberen Extrakten führte und Pyridin aufgrund seines Geruchs auch unangenehm zu handhaben ist, wurde Pyridin durch Natriumhydroxid ersetzt. Dies verbesserte die Sauberkeit der Extrakte und führte zu einer störungsfreieren chromatographischen Trennung.

1,4-Butandiol wurde durch das Monosaccharid Xylose und das Disaccharid Trehalose ersetzt, die ein ähnliches Elutionsverhalten wie die zu analysierenden Zucker zeigten und ebenfalls vollständig benzoyliert wurden.

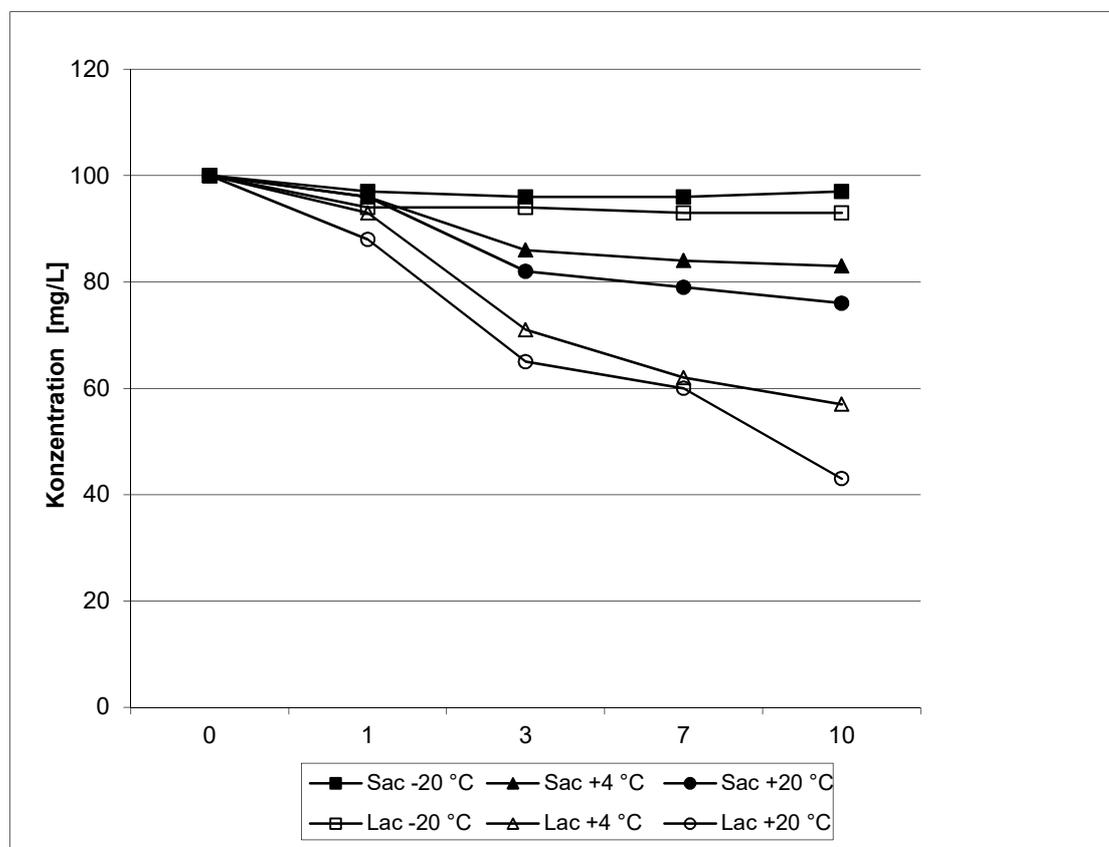
Abbildung 15: Chromatogramm der Zuckertrennung mittels HPLC-DAD



4.2.3 Lagerungsversuch

Aus den Ergebnissen des Lagerungsversuchs (Tabelle 5) lässt sich zeigen, dass eine Lagerung der Urinproben bei -20 °C empfehlenswert ist. Lactose scheint deutlich anfälliger für einen Abbau zu sein als Saccharose. Bei Raumtemperatur nahm die Lactosekonzentration um 57 % ab, bei + 4 °C betrug der Verlust immerhin noch 43 %. Bei Saccharose konnte hingegen auch nach zehntägiger Lagerung bei + 20 °C 76 % des ursprünglichen Gehaltes gemessen werden.

Tabelle 5: Ergebnisse Lagerungsversuch



4.2.4 Validierung

Die Methode wurde gemäß der Richtlinien der GTFCh (70) unter Verwendung der Valistat 2.0 Statistik Software (63) vollständig validiert. Die Kalibrationskurven erfüllten die lineare Regression mit $R^2 > 0,99$. Die Impräzision (Wiederholpräzision und tagesverschiedene Laborpräzision) betrug $< \pm 15 \%$. Die Nachweisgrenze wurde über das Signal-Rausch-Verhältnis $\geq 3:1$, die Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit fünf

Ergebnisse

von Null verschiedenen Konzentrationen im Bereich der zu erwartenden Nachweisgrenze ermittelt. Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Eine Validierung der Monosaccharide Glucose und Galactose wurde nicht durchgeführt, diese können zur Plausibilitätskontrolle aber qualitativ nachgewiesen werden. Der qualitative Nachweis von Fructose war nicht möglich.

Tabelle 6: Validierungsdaten HPLC Methode

Sollkonzentration [mg/L]	QC1 8,0		QC2 40,0		QC3 80,0	
	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose
Kenndaten						
Mittelwert	7,93	8,48	39,46	40,18	79,19	80,71
SD	0,75	0,87	4,65	4,68	8,34	9,48
RSD [%]	9,5	10,2	11,79	11,66	10,53	11,75
Genauigkeit						
Varianz	-0,07	0,48	-0,54	0,18	-0,81	0,7
Bias [%]	-0,9	6,0	-1,4	0,5	-1,0	0,9
Wiederholpräzision						
SD	0,51	0,96	3,78	3,05	7,46	10,08
RSD [%]	6,5	11,4	9,6	7,6	9,4	12,49
Laborpräzision						
SD	0,76	0,96	4,65	4,78	8,1	10,08
RSD [%]	9,6	11,4	11,8	11,9	10,62	12,49
Extraktionsausbeute [%]	62,8	60,5	62,2	65,6		
Stabilität aufgearbeiteter Proben, Abnahme in [%]	9,3	2,7	2,8	3,1		
	Lactose		Saccharose			
Nachweisgrenze [mg/L]	0,3		0,3			
Bestimmungsgrenze [mg/L]	0,6		0,5			

4.3 LC-MS

4.3.1 Methodenoptimierung

Die Nucleodur® HILIC zeigte kein ausreichendes Trennungsvermögen der einzelnen Disaccharide, trotz der Austestung unterschiedlicher Laufmittelzusammensetzungen.

Als geeignete Säule zeigte sich die Nucleodur® NH₂-RP, eine suffiziente Trennung von Lactose und Saccharose war möglich (Abbildung 16).

Abbildung 16: Chromatogramm Disaccharide LC/MS

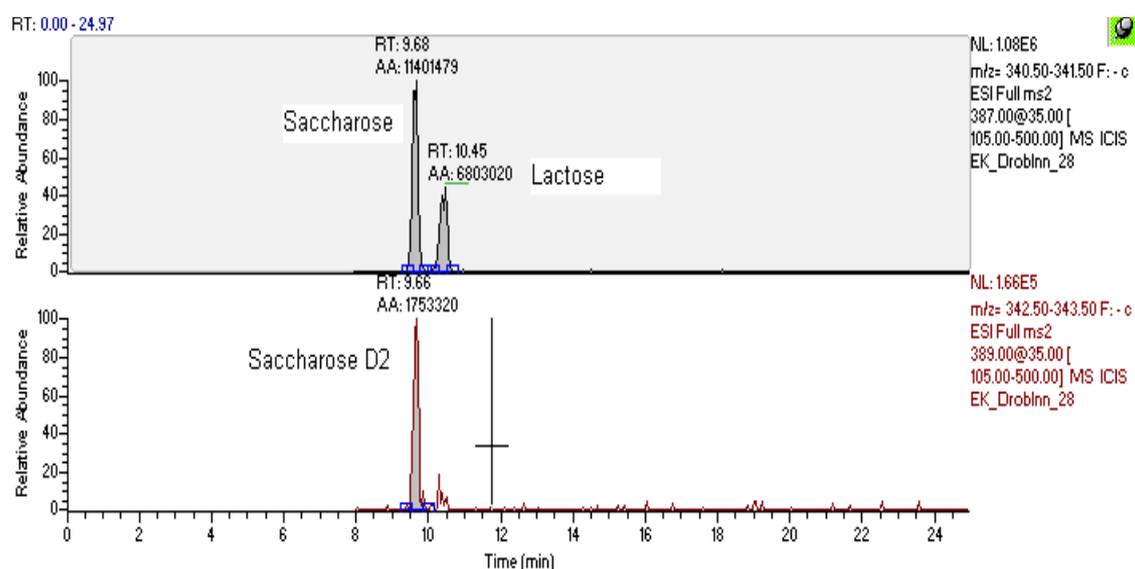
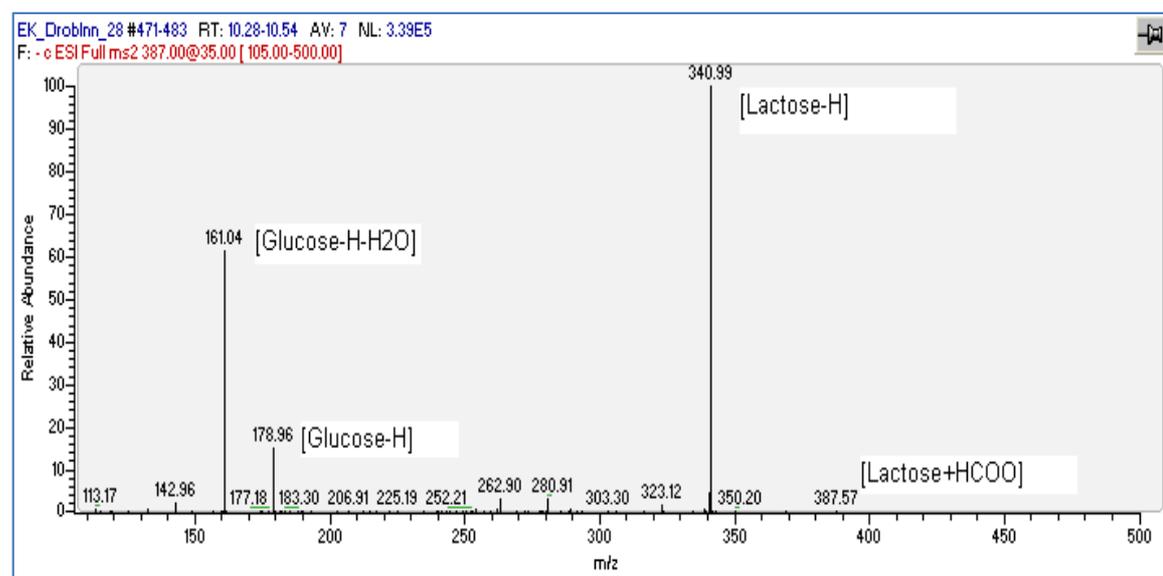


Abbildung 17: Massenspektrum der Disaccharide als Formiat-Addukte



Die positive Ionisation mittels Zusatz von Natrium erbrachte keine verwertbaren Spektren, es waren neben den jeweiligen Natriumaddukten keine Zerfallsprodukte messbar. Die Detektion im Negativ ESI Modus war zur Messung der Zucker am besten geeignet. Die Disaccharide sind hier als Formiataddukte messbar (Abbildung 17). Folgende Ionen wurden im MS/MS -Modus detektiert (Tabelle 7):

Tabelle 7: Ionisation der Disaccharide

Analyt	Parent Ion [m/z]	Daughter Ion [m/z]
Lactose	387	341, 161, 179, 143
Saccharose	387	341, 179, 143
Saccharose d2	389	343, 179
Glucose	225	179, 161
Glucose d7	232	186, 168

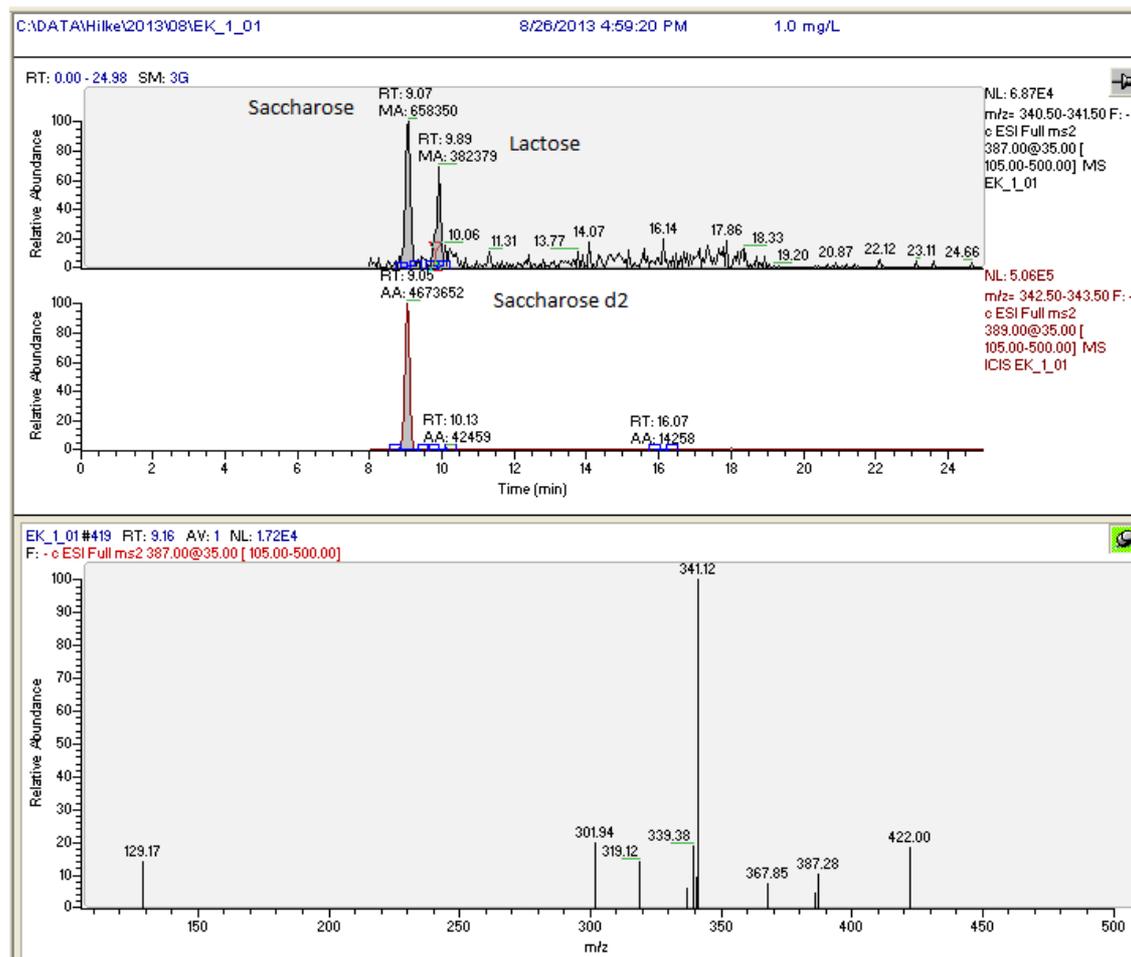
Lactose bildet ein Formiataddukt m/z 388 [Lac+ HCOO]⁻ sowie unter Abspaltung des Formiats [Lac-H]⁻ m/z 341. Als weitere Tochterionen entstehen [Glu-H]⁻ m/z 179, [Glu-H-H₂O]⁻ m/z 161 und [Glu-H-2H₂O]⁻ m/z 143.

Saccharose bildet ein Formiataddukt m/z 388 [Sac+ HCOO]⁻ sowie unter Abspaltung des Formiats [Sac-H]⁻ m/z 341. Als weitere Tochterionen entstehen [Glu-H]⁻ m/z 179 und [Glu-H-2H₂O]⁻ m/z 143. Das Fragment m/z 161 kommt bei dem Zerfall von Saccharose nicht vor und ist typisch für Lactose.

4.3.2 Validierung

Auch die Validierung der LC-MS-Methode erfolgte gemäß der Richtlinien der GTFCh (70) sowie unter Zuhilfenahme der Valistat 2.0 Statistik Software (63). Der Kalibrationsbereich erfüllte die Anforderungen an die Linearität mit $R^2 > 0,99$. Die Impräzision betrug sowohl für die Wiederholpräzision als auch für die tagesverschiedene Präzision < 15 %. Matrixeffekte wurden für die Analyten und den internen Standard bestimmt und lagen im Akzeptanzbereich von 75-125 %. Ein typisches Chromatogramm nahe der Bestimmungsgrenze zeigt Abbildung 18.

Abbildung 18: Chromatogramm nahe der Bestimmungsgrenze (1mg/L)



Die Stabilität der Analyten wurde bereits im Rahmen der HPLC-Methodenvalidierung nachgewiesen(Tabelle 5: Ergebnisse Lagerungsversuch).

Weitere Ergebnisse finden sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: Validierungsdaten LCMS

	Lactose		Saccharose			
Nachweisgrenze [mg/L]	0,3		0,2			
Bestimmungsgrenze [mg/L]	0,6		0,5			
Sollkonzentration [mg/L]	QC1 5,0		QC2 30,0		QC3 90,0	
	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose
Kenngrößen						
Mittelwert	4,82	4,73	30,8	30,27	91,75	90,39
SD	0,48	0,57	3,04	3,16	8,84	9,71
RSD [%]	10,07	12,11	10,02	10,44	9,63	10,74
Genauigkeit						

Ergebnisse

Sollkonzentration [mg/L]	QC1 5,0		QC2 30,0		QC3 90,0	
	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose	Lactose	Saccharose
Varianz	-0,18	-0,27	0,38	0,27	1,75	0,39
Bias [%]	-3,5	-5,3	1,25	0,9	1,95	0,43
Wiederholpräzision						
SD	0,18	0,32	0,28	0,76	4,85	0,86
RSD [%]	3,63	6,79	0,9	2,5	5,28	0,96
Laborpräzision						
SD	0,50	0,58	3,15	3,26	9,05	10,05
RSD [%]	10,38	12,40	10,37	10,79	9,87	11,12
Extraktionsausbeute [%]			59,8	51,1	54,0	51,8
Stabilität aufgearbeiteter Proben, Abnahme in [%]	17	17			12	14
Matrixeffekte [%]			124,8	115,8	112,0	98,7

Zusätzlich wurden die bereits mit HPLC-DAD analysierten Patientenproben des Kollektivs Drob Inn 1 mittels LC-MS reanalysiert. Die Abweichung zwischen beiden Bestimmungsmethoden betrug < 15 %. In Abbildung 19 ist ein positiver Saccharosebefund in niedriger Konzentration zu sehen, in Abbildung 20 eine negative Patientenprobe.

Abbildung 19: Patientenprobe nahe der Bestimmungsgrenze (Saccharose positiv)

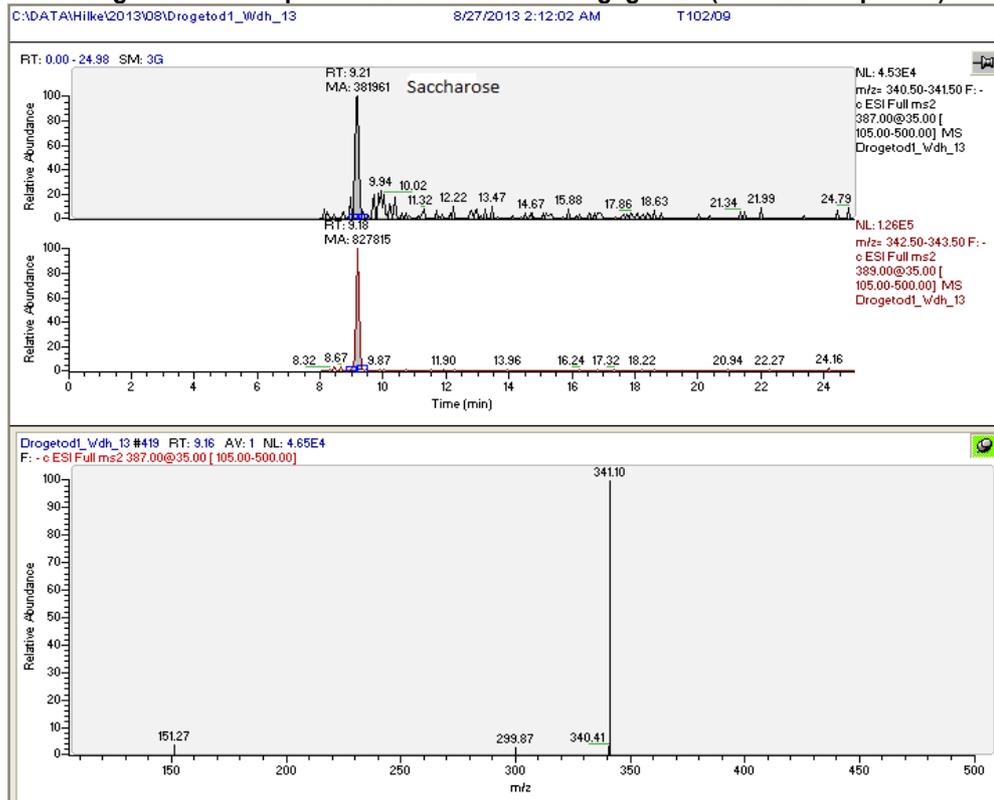
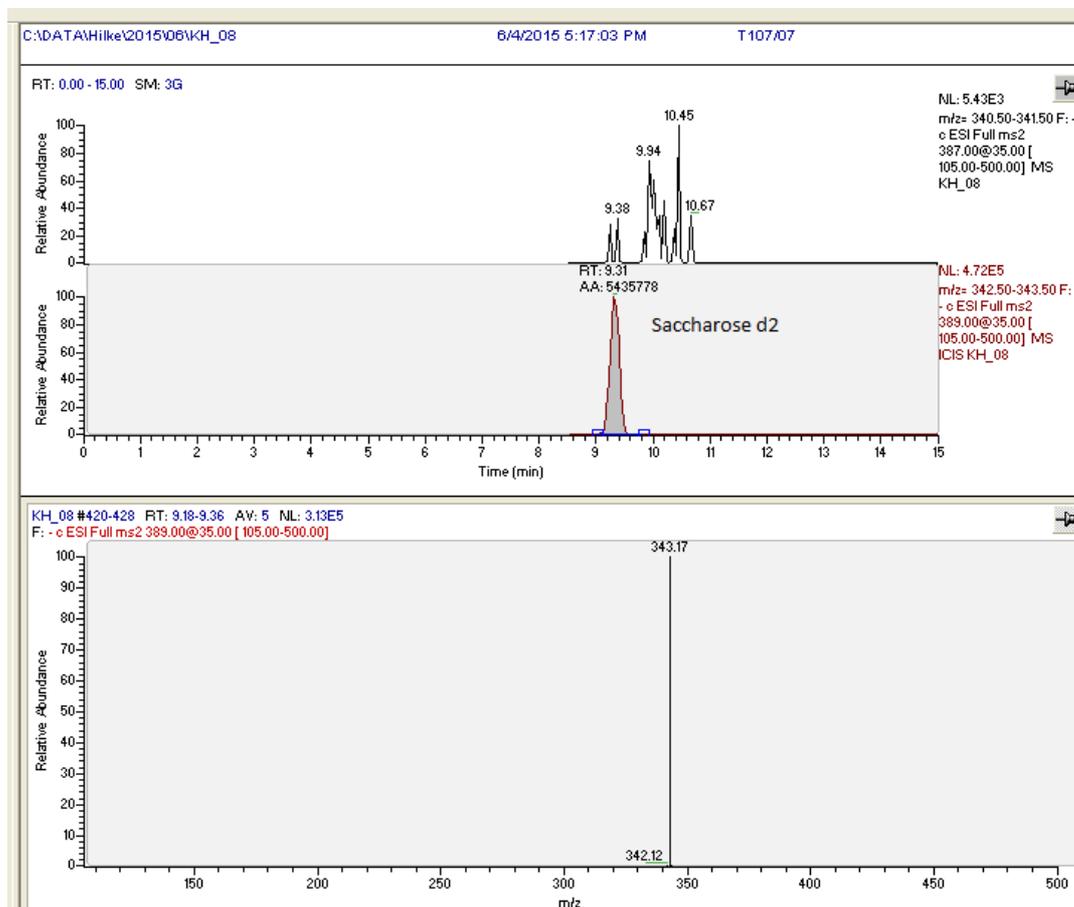


Abbildung 20: negative Patientenprobe



4.4 Patientenproben

4.4.1 Kontrollkollektive

4.4.1.1 Kontrollkollektiv 1

Im ersten Kontrollkollektiv (n=30) nahmen freiwillige, gesunde Labormitarbeiter und Studenten entweder 20 g Lactose oder 20 g Saccharose oral auf und gaben eine Urinprobe 30-40 Minuten nach Zuckeraufnahme ab. Die Proben wurden mittels HPLC-DAD untersucht und waren sämtlich negativ für Di- und Monosaccharide. Die immunchemischen Untersuchungen auf illegale Substanzen (Amphetamine/Ecstasy, Cocain, Opiate, THC) sowie ausgewählte Medikamentenwirkstoffe (Benzodiazepine, Barbiturate, Methadon, Buprenorphin, tricyclische Antidepressiva) verliefen ebenfalls in allen Proben negativ.

4.4.1.2 Kontrollkollektiv 2

Das zweite Kontrollkollektiv (n=12), bestehend aus Labormitarbeitern, setzte sich aus drei Männern und neun Frauen im Alter von 22 bis 50 Jahren zusammen. Es wurden entweder 100 g Schokolade oder 0,2- 0,5 L Coca-Cola® oral aufgenommen. Die Zuckerbelastung war damit in der „Schokoladengruppe“ ungefähr doppelt so hoch wie im Kontrollkollektiv 1. Coca-Cola® wurde verabreicht, um das Zusammenwirken der Zuckeraufnahme mit der in Coca-Cola® enthaltenen Phosphorsäure zu überprüfen. Die Urinprobenabgabe erfolgte eine halbe bis zwei Stunden nach Aufnahme. 100 g Vollmilchschokolade entsprechen einer Aufnahme ca. 50 g-60 g Zucker, durch Coca-Cola® wurden zwischen ca. 10-25 g Saccharose aufgenommen.

In fünf Fällen wurden gar keine Disaccharide nachgewiesen. Bei den positiven Fällen lagen die gemessenen Saccharosekonzentrationen zwischen 8-37 mg/L (Tabelle 9). Nach der Aufnahme von Coca-Cola® wurden die höchsten Saccharosewerte erreicht. (67).

Tabelle 9: Ergebnisse für Saccharose im Urin nach oraler Aufnahme von Coca-Cola® oder Schokolade

Geschlecht, Alter	Aufgenommene Menge	Zeit* [h]	Saccharose im Urin [mg/L]
F 23	0,4 L Coca-Cola®	1	-
M 32	0,5 L Coca-Cola®	1	-
M 22	0,4 L Coca-Cola®	1	36,7
M 31	0,2 L Coca-Cola®	1,2	35,7
F 42	0,3 L Coca-Cola®	1,3	8,5
F 49	0,3 L Coca-Cola®	1,5	8,8
F 33	0,4 L Coca-Cola®	0,5	-
F 50	0,3 L Coca-Cola®	1,5	12
F 35	100 g Schokolade	0,5	15,2
F 27	100 g Schokolade	1,5	11
F 50	100 g Schokolade	1	-
F 50	100 g Schokolade	2	-

*Zeit zwischen oraler Aufnahme und Probenabgabe

4.4.2 Patientenkollektiv 1 - Drob Inn 1

Die validierte HPLC-DAD-Methode wurde zum quantitativen Nachweis von Lactose und Saccharose in Urinproben von Drogenabhängigen angewendet, die Substitutionsmittel oder Drogen intravenös konsumiert hatten. Das Ziel dieser Untersuchung war die Überprüfung der These, dass nach intravenösem Konsum von disaccharidhaltigen Präparaten die Disaccharide unverändert im Urin nachweisbar sein müssten.

Die Probanden gaben im Drob Inn 15-30 Minuten nach i.v.-Konsum Urinproben ab. Das Drob Inn in Hamburg St. Georg ist eine niederschwellige Hilfeinrichtung mit einem Café, Drogenkonsumräumen und der Möglichkeit einer medizinischen und psychosozialen Betreuung. Welche Substanzen intravenös konsumiert wurden, wurde nicht erfasst.

Die Proben wurden zunächst immunochemisch auf Drogen und ausgewählte Medikamentenwirkstoffe untersucht. Dabei zeigten sich in allen Proben immunochemisch positive Ergebnisse, in 76,9 % waren zwei oder mehr Parameter positiv. Methadon und Opiate fanden sich in je 53,8% der Fälle, Buprenorphin war in 38,5 % positiv, Benzodiazepine in der Hälfte aller Proben und Cocain in 76,9 % der untersuchten Urine.

Creatinin- und pH-Werte lagen im physiologischen Bereich. Eine detaillierte Aufstellung findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Positive immunochemische Ergebnisse der Urinproben - Drob Inn 1

Positive immunochemische Ergebnisse	
n= 26	
Methadon gesamt	14
Methadon	0
+ Benzodiazepine	4
+ Opiate	3
+ Buprenorphin+ Benzodiazepine	1
+ Benzodiazepine+ Opiate	6
Buprenorphin gesamt	10
Buprenorphin	4
+ Benzodiazepine	3
+ Opiate	1
+ Methadon + Benzodiazepine	1
+ Benzodiazepine + Opiat	1
Opiate gesamt	14
Opiate	2
Opiate + Benzodiazepine	1

Mittels HPLC-DAD konnten in allen Urinproben Disaccharide nachgewiesen werden. In der Hälfte der Proben wurden Lactose und Saccharose nachgewiesen, nur Saccharose fand sich in 23,1 % der Fälle, ausschließlich Lactose fand sich in 26,9 % der Urine. Die Konzentration der nachgewiesenen Zucker lag im Bereich von 1,5 mg/L bis > 100 mg/L. Im Großteil (81 %) der Fälle fanden sich Konzentrationen > 50 mg/L. Eine umfassende Zusammenstellung der immunochemischen und chromatographischen Befunde zeigt Tabelle 11.

Nach abgeschlossener Methodenentwicklung und Validierung der LC-MS-Methode wurden alle Urine mit dieser zweiten Methode nachuntersucht. Die Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen der HPLC-DAD- Methode überein (Abweichung <15 %).

Tabelle 11: Immunchemische Ergebnisse und Disaccharidkonzentrationen im Urin - Drob Inn 1

			Immunchemische Ergebnisse [ng/mL]*				Disaccharide [mg/L]	
Probe	Geschlecht	Alter	Buprenorphin	Methadon	Benzodiazepine	Opiate	Lactose	Saccharose
1	f	26				>2000	13	
2	f	26				>2000	25	
3	m	41		322	1301	>2000		122
4	m	32		487		>2000		143
5	f	30		561	710	>2000	94	61
6	m	35			>5000	>2000	462	133
7	m	50	>200				27	
8	m	43		>600	4835		572	47
9	f	43	37		>5000	>2000	61	62
10	m	25	>200		>5000		102	109
11	f	23	>200				132	457
12	f	35	>200		1324		630	
13	f	23		358	>5000	>2000	543	311
14	f	35		375		>2000	350	73
15	m	37		>600	>5000			217
16	k. A.	k. A.	87			1020	1040	
17	k. A.	k. A.	>200				13	
18	k. A.	k. A.	>200				389	326
19	m	35		406	>5000	>2000	560	219
20	m	27		411		1592	133	26
21	m	53		489	>5000			358

Ergebnisse

			Immunochemische Ergebnisse [ng/mL]*				Disaccharide [mg/L]	
Probe	Geschlecht	Alter	Buprenorphin	Methadon	Benzodiazepine	Opiate	Lactose	Saccharose
22	f	35		409	>5000			181
23	m	29	8	366	1017			380
24	f	33		430	920	1099	300	212
25	k. A.	k. A.		519	>5000	>2000	358	422
26	k. A.	k. A.	>200		2397		47	

*Cut-off Konzentrationen: Buprenorphin 5 ng/mL, Methadon 200 ng/mL, Opiate 200 ng/mL, Benzodiazepine 200 ng/mL.

k. A. keine Angaben

4.4.3 Patientenkollektiv 2 - Drob Inn 2

Es wurden 40 Urinproben von 20 freiwilligen Probanden untersucht. Diese Proben wurden ebenfalls im Drob Inn, Hamburg-St. Georg gewonnen. Einschlusskriterium für dieses Kollektiv war der von den Probanden angegebene i.v.-Konsum der Substitutionsmedikamente Methadon oder Buprenorphin. Zunächst wurden die Teilnehmer mit Hilfe eines kurzen Fragebogens durch die Mitarbeiter des Drob Inn nach Art (Methadonlösung oder Tabletten) der zuletzt und akut konsumierten Substitutionsmittel befragt sowie die zeitlichen Abstände zu den erhaltenen Urinproben erfasst. Die Konsumenten gaben je eine Urinprobe vor und nach i.v.-Konsum im Drob Inn ab. Ziel dieser Untersuchung war es, genauere Kenntnisse zum zeitlichen Nachweisfenster der Disaccharide zu erhalten. Alle Urinproben wurden mittels LC-MS-MS sowie immunchemisch untersucht. Die Ergebnisse der Zuckeranalytik sowie die zeitlichen Abstände zu den Urinabgaben finden sich in Tabelle 12, detaillierte Informationen zur Immunchemie in Tabelle 13.

17 Teilnehmer gaben den Konsum von Methadonzubereitungen an, wobei dreizehn Mal Methaddict[®]-Tabletten, dreimal Methadon in flüssiger Form sowie einmal Flüssigkeit und Tabletten im Wechsel konsumiert wurden. Drei Konsumenten gaben den intravenösen Konsum von Buprenorphin an. Die immunchemischen Ergebnisse bestätigten in allen Fällen die Angaben zu den konsumierten Substituten. Bei 16 Probanden fanden sich neben den angegebenen Substituten weitere Substanzen. Creatinin- und pH-Werte aller Proben lagen im physiologischen Bereich.

Die zweite Urinprobe wurde 30-70 Minuten nach intravenösem Konsum abgegeben, während der zeitliche Abstand zwischen der ersten Probenabgabe und dem vorangegangenen Konsum individuell sehr unterschiedlich war (1-92 Stunden).

In allen Urinproben, die unmittelbar nach i.v.-Konsum gewonnen wurden, ließen sich Disaccharide nachweisen. Die Saccharose-positiven Proben lagen in einem Konzentrationsbereich von 34,2- 743,8 mg/L, die Lactose-positiven Proben im Bereich von 69,9- 3992,1 mg/L.

In den vor dem i.v.-Konsum gewonnen Urinproben waren 18 von 20 Proben positiv für Disaccharide. Saccharose wurde hier in einem Konzentrationsbereich von 20,4- 373,5 mg/l und Lactose von 15,8- 2976,6 mg/L gemessen (67).

Tabelle 12: Immunchemische Ergebnisse und Disaccharidkonzentrationen im Urin - Drob Inn 2

Probe	Positive immunchemische Ergebnisse	Fragebogen		LC-MSMS [mg/L]	
		Letzter i.v.-Konsum in der Vergangenheit vor [h]	Substitut	Lactose	Saccharose
1-1	Met, Benz, Coc	1.5	Methaddict [®]	102.7	146.7
1-2	Met, Benz, Coc	akut. Konsum	Methaddict [®]	474.3	310.2
2-1	Met, Opi	4	Methaddict [®]	1331.5	194.5
2-2	Met, Opi	akut. Konsum	Methaddict [®]	3992.1	673.9
3-1	Met, Benz, Coc, Opi	5	Methaddict [®]	1355.6	373.5
3-2	Met, Benz, Coc, Opi	akut. Konsum	Methaddict [®]	1616.0	422.2
4-1	Met	92	Methadon liq	-	120.3
4-2	Met	akut. Konsum	Methadon liq	-	392.0
5-1	Met, Benz	1	Methaddict [®]	148.1	187.4
5-2	Met	akut. Konsum	Methaddict [®]	1412.2	299.7
6-1	Met	48	Methaddict [®]	-	93.1
6-2	Met	akut. Konsum	Methaddict [®]	144.9	34.2
7-1	Met, Benz	20	Methaddict [®]	86.3	23.3
7-2	Met, Benz	akut. Konsum	Methaddict [®]	2235.5	230.1
8-1	Met, Benz	4.5	Methaddict [®]	706.2	237.6
8-2	Met, Benz	akut. Konsum	Methaddict [®]	754.4	277.5
10-1	Met, Benz, Coc, Opi	1	Methaddict [®]	2976.6	346.6
10-2	Met, Benz, Coc, Opi	akut. Konsum	Methaddict [®]	3225.7	636.0
11-1	Met	22	Levomethadon liq	15.8	20.4
11-2	Met	akut. Konsum	Methaddict [®]	69.6	50.3
12-1	Met, Benz, Coc	24	Methaddict [®]	-	254.8
12-2	Met, Benz, Coc	akut. Konsum	Methaddict [®]	-	296.8
14-1	Met, Benz, Coc, Opi	24	Methaddict [®]	230.4	261.7
14-2	Met, Benz, Coc, Opi	akut. Konsum	Methaddict [®]	634.2	569.1

Probe	Positive immunchemische Ergebnisse	Fragebogen		LC-MSMS [mg/L]	
		Letzter i.v.-Konsum in der Vergangenheit vor [h]	Substitut	Lactose	Saccharose
15-1	Met, Benz, Coc, Opi	3	Methadon liq	-	-
15-2	Met, Benz, Coc, Opi	akut. Konsum	Methadon liq*	-	140.4
16-1	Met, Benz, Coc	2	Methaddict®	639.7	166.6
16-2	Met, Benz, Coc	akut. Konsum	Methaddict®	1002.3	221.0
17-1	Met, Benz, Coc, Opi	12	Methaddict®	-	-
17-2	Met, Benz, Coc, Opi	akut. Konsum	Methaddict®	923.2	122.0
18-1	Met, Coc	12	Methaddict®	23.3	29.9
18-2	Met, Coc	akut. Konsum	Methaddict®	428.0	54.3
19-1	Met, Benz, Coc, Opi	8	Levomethadon liq	-	441.2
19-2	Met, Benz, Coc, Opi	akut. Konsum	Methadone liq	-	743.8
9-1	Bup, Benz, Coc	4	Subutex®	-	63.9
9-2	Bup, Benz, Coc	akut. Konsum	Subutex®	115.5	38.9
13-1	Bup	24	Subutex®	44.8	-
13-2	Bup	akut. Konsum	Subutex®	236.6	-
20-1	Bup	12	Subutex®	44.2	36.1
20-2	Bup	akut. Konsum	Subutex®	105.1	43.8

Akuter Konsum: 30-70 Minuten nach i.v. Konsum

Cut-off Konzentrationen: Buprenorphin (Bup) 5 ng/mL, Methadon (Met) 200 ng/mL, Benzodiazepine (Benz) 200ng/mL, Cocain (Coc) 200 ng/mL, Opiate (Opi) 200 ng/mL

*liq: liquid, (Levo-)Methadonlösung

Tabelle 13: Positive immunchemische Ergebnisse der Urinproben - Drob Inn 2

Positive immunchemische Ergebnisse n= 20	
Methadon gesamt	17
Methadon	3
+ Benzodiazepine	3
+ Opiate	1
+ Cocain	1
+ Benzodiazepine + Cocain	4
+ Benzodiazepine + Cocain + Opiate	6
Buprenorphin gesamt	3
Buprenorphin	2
+ Benzodiazepine + Cocain	1

4.4.4 Drogentodesfälle

4.4.4.1 Urinproben

Von 133 Drogentodesfällen mit Substitutionsmittelnachweis in den Jahren 2007-2012 waren in 61 Fällen Urinproben verfügbar, die retrospektiv untersucht werden konnten. In allen drei buprenorphinpositiven Fällen wurde Lactose nachgewiesen. 58 Fälle waren methadonpositiv, hier konnten in 64 % der untersuchten Proben Disaccharide nachgewiesen werden. Der alleinige Nachweis von Saccharose gelang in 22 Fällen, sechsmal wurden Lactose und Saccharose kombiniert und neunmal Lactose alleine nachgewiesen (Tabelle 14). Saccharose wurde im Konzentrationsbereich von 2 - >1000 mg/L nachgewiesen, Lactose war im Bereich von 22-382 mg/L nachweisbar.

Tabelle 14: Ergebnisse disaccharidpositiver Drogentodesfälle

Fall	Alter	Geschlecht	[mg/L] im Venenblut ^{1,2}	Disaccharide [mg/L]	
				im Urin	
				Lactose	Saccharose
1	26	m	Methadon: 0,26	27	
2	34	m	Methadon: 0,35		56
3	17	w	Methadon: 0,35		114
4	26	m	Methadon: 0,40		300
5	42	m	Methadon: 0,58		210
6	40	w	Methadon: 0,3	32	
7	60	m	Methadon: 0,21	27	
8	24	w	Methadon: 0,1	54	
9	37	m	Methadon: 2,5	28	
10	29	w	Methadon: 0,37		2
11	51	m	Methadon: 0,41		2
12	43	m	Methadon: 1,4		500
13	38	w	Methadon: 0,22		256

¹ Die Bestimmung der **Methadonspiegel** im Blut erfolgte mittels unserer hauseigenen, gemäß GTFCh-Richtlinie vollständig validierten GC/MS-Methode. Dazu wurden 1 mL Venenblut mit alkalischem Puffer auf pH 7,5 eingestellt, Extraktion über Bond Elut Certify-Säulen 3 mL, Waschschrift mit Wasser, Essigsäure und Methanol. Danach Elution mit 1,2 mL Dichlormethan/Isopropanol/Ammoniak 78:20:2. Lösung wird zur Trockne unter Stickstoff bei 40 °C eingedampft, Rückstand aufgenommen in 25 µL Ethylacetat und nach Zugabe von 25 µL PFP und 25 µL PFPA bei 400 W 5 Minuten in der Mikrowelle derivatisiert. Der Rückstand wird wiederum zur Trockne eingedampft und in 75 µL Ethylacetat aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels GC/MS am Agilent MSD 5975 mit EI-Quelle (70 eV) über eine Factor four CP 8444 Kapillarsäule der Fa. Varian (5 % Phenyl, 30 m * 0,25 mm, DF 0,25 µm). Es wurden jeweils ein Quantifier und zwei Qualifier detektiert (Methadon *m/z* 294, 72, 223; Methadon-d9 *m/z* 303, 78, 226). Helium 1 mL/min, initial Pressure 0,772 bar, Inlet 250 °C, splitless 1 Minute, Oven: init. Temperatur 100 °C für 4 Minuten, ramp 30 °C/min bis 220 °C, 9 Minuten isotherm, 50 °C/min bis 300 °C, 6 Minuten isotherm.

² Die Bestimmung der **Buprenorphinspiegel** im Blut erfolgte mit unserer laborinternen, gemäß GTFCh-Richtlinie vollständig validierten LC/MS-MS-Methode. 0,5 mL Blut werden mit IST (Buprenorphin d4 100 ng/µL) und alkalischem Puffer pH 9,5 versetzt, mit 1 mL Chlorbutan ausgeschüttelt. Die Chlorbutanphase wird nach Zentrifugation abgenommen und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol und Wasser (1:1) angelöst. Der Extrakt wird am Xevo[®] TQ MS, Triplequadrupole-MS mit Elektrospray-Konfiguration und Waters Acquity[®] UPLC mit einer Waters Acquity[®] BEH-Säule (1,7 µm C18, 2,1 * 5 mm) analysiert. Der Gradient aus Mobilphase A (90 % 10 mM NH₄CO₃/NH₄OH pH 9,0 und 10 % MeOH) und Mobilphase B (100 % MeOH) läuft 5,5 Minuten mit einer Säulentemperatur von 40 °C und einer Proben temperatur von 10 °C. Pro Analyt werden zwei Übergänge im MRM-Modus bestimmt:
 Buprenorphin: *m/z* 468,36 und 396, 29
 Nor-Buprenorphin: *m/z* 414, 35 und 82,85
 Buprenorphin d4: *m/z* 472, 36 und 101,16

Ergebnisse

Fall	Alter	Geschlecht	[mg/L] im Venenblut	Disaccharide [mg/L] im Urin	
				Lactose	Saccharose
14	33	m	Methadon: 3,13		588
15	19	w	Methadon: 0,74		1,8
16	23	m	Methadon: 0,31		163
17	24	w	Methadon: 0,57		91
18	49	m	Methadon: 0,56		>1000
19	40	m	Methadon: 0,67	65	241
20	48	m	Methadon: 0,33	55	
21	36	m	Methadon: 0,31	54	
22	25	m	Methadon: 0,39	70	
23	29	m	Methadon: 0,38	298	
24	19	m	Methadon: 0,53	306	55
25	22	w	Methadon: 0,79	382	78
26	40	m	Methadon: 0,55	188	
27	46	m	Methadon: 0,99		251
28	45	m	Methadon: 11,58	22	31
29	57	m	Methadon: 0,92		3
30	45	m	Methadon: 0,3	90	50
31	38	w	Methadon: 0,3		>1000
32	27	m	Methadon: 0,06		17
33	36	m	Methadon: 0,14		69
34	49	m	Methadon: 0,06		2
35	27	m	Methadon: 0,35		280
36	52	w	Methadon: 0,47	35	60
37	32	m	Methadon: 1,08	95	760
38	33	m	Buprenorphin: 0,0025 Norbuprenorphin: 0,02	42	
39	27	m	Buprenorphin: 0,0009 Norbuprenorphin: 0,001	58	
40	50	m	Buprenorphin: 0,0023 Norbuprenorphin: 0,009	40	

4.4.4.2 Blutproben

Die Urinmethode konnte erfolgreich auf die Analyse von Blutproben übertragen werden. Während allerdings die Messung von Disacchariden in gespikten Blutproben problemlos möglich war konnten in keiner der untersuchten Blutproben (n=25) Disaccharide nachgewiesen werden, obwohl die jeweils korrespondierenden Urinproben Disaccharid-positiv waren und in vielen der Fälle die Auffindsituation oder auch die Angaben aus der Vorgeschichte auf einen intravenösen Methadonkonsum deutlich hinwiesen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 GC/MS

Bei dem Versuch der Entwicklung einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode zeigte sich, dass diese Art der Auftrennung und Detektion für derivatisierte Zucker nicht geeignet ist. Zunächst war bereits eine suffiziente und saubere Extraktion der Disaccharide sehr schwierig. Eine Extraktion der underivatisierten Zucker aus wässriger Matrix war nicht möglich, die Derivatisierung ohne vorherige Probenaufreinigung führte zu sehr schmutzigen Extrakten - vermutlich durch Derivatisierung weiterer in der Probe befindlicher Stoffe. Die Verwendung von SPE-Phasen führte zu einem höheren Arbeitsaufwand, jedoch nicht zu einer verbesserten Empfindlichkeit der Methode. Da Benzoylierung und Acetylierung vollständig abliefen, waren die so entstandenen Massen zu hoch, um sie in dem mittels unserer GC/MS-Geräte noch erfassbaren Massenbereich detektieren zu können. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Extraktionsausbeute nach Acetylierung könnten Veränderungen der Zuckerstruktur durch die Zufuhr von Wärme/ Energie (400 W, Mikrowelle) sein. Werden Zucker karamellisiert, d.h. über ihren Schmelzpunkt erhitzt, entstehen verschiedene Zersetzungsprodukte. Es kommt unter anderem zur Maillard-Reaktion, diese kann ab 140 °C ablaufen. Hierbei reagieren reduzierende Zucker wie Glucose und Lactose mit Aminogruppen aus Proteinen, die ebenfalls in biologischen Matrices vorkommen können. Das Blutplasma hat einen Proteinanteil von 65-80 g/L (14). Physiologisch werden bis zu 150 mg Protein am Tag ausgeschieden (71). Es kommt in Folge der Maillard-Reaktion zu diversen Umlagerungsreaktionen, sowie daraus resultierend zur Bildung von Heterozyklen und zur Braunfärbung der Extrakte (72; 73). Möglicherweise wird durch die Energie der Mikrowelle somit der Gehalt an unverändert vorliegenden Zuckern herabgesetzt, weshalb eine Acetylierung der gesamten

vorliegenden Saccharide nicht mehr möglich ist und die Extraktionsausbeute absinkt. In Reinsubstanzlösung ist nicht von einer Maillard-Reaktion auszugehen, da hier keine Aminosäuren vorliegen dürften. Die untersuchten Xylose-Reinsubstanzlösungen zeigten eine ausreichende Extraktionsausbeute, die Extrakte waren farblos.

5.1.2 HPLC-DAD

Zur Bestimmung von Zucker und Zuckeralkoholen aus biologischen Matrices sind diverse HPLC-Methoden bekannt. Allerdings waren die beschriebenen Methoden für die vorliegende Fragestellung aufgrund der im Urin und Blut deutlich niedrigeren Konzentrationsbereiche nicht geeignet (74; 75). Die Detektion mittels eines gepulsten, amperometrischen Detektors (PAD) (76) oder eines Differential- Refraktometers (77) war in unserem Labor nicht möglich. Auch die Detektion mit nur einer Wellenlänge mittels eines Fluoreszenz-Detektors (75) erschien nicht geeignet, da hierbei keine Überprüfung der Spektren auf Verunreinigungen möglich ist. Mit dem uns zur Verfügung stehenden Fluoreszenzdetektor war nur die Messung bei einer Wellenlänge möglich, Spektren konnten damit nicht aufgezeichnet werden. Unterschiedliche Derivatisierungen (Umsetzung mit Nitrobenzoat, Benzoylchlorid, Benzoylamin) und Messung der Zucker mittels UV-VIS-Detektoren wurden ebenfalls beschrieben (78; 79; 80). Hierbei schien die Benzoylierung der Disaccharide für den zur Verfügung stehenden Dioden-Array-Detektor am geeignetsten zu sein, da bei benzoylierten Derivaten ein Absorptionsmaximum bei 230 nm zu erwarten ist. Die Derivatisierung von Reinsubstanzlösungen zeigte, dass die Benzoylierung vollständig ablief, Pro Analyt war je ein Peak zuzuordnen.

Die Extraktion der hydrophilen Zucker aus wässriger Matrix stellte das größte Problem der Methodenentwicklung dar. Durch die Derivatisierung der Zucker in der noch nicht aufgereinigten Urinprobe konnten sie in lipophile Derivate überführt werden und somit mit organischen Lösungsmitteln quantitativ in den zu vermessenden Extrakt überführt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Benzoylierung bei den hier vorliegenden Zuckern vollständig abläuft, d.h. alle Hydroxylgruppen werden umgesetzt (66). Wurden die Zucker direkt in der Probenmatrix derivatisiert, entstanden relativ schmutzige Extrakte. Es ist davon auszugehen dass die Benzoylierung nicht selektiv nur für Kohlenhydrate abläuft sondern auch eine Benzoylierung anderer Probenbestandteile erfolgt. Eine Verbesserung der Reinheit und somit der Empfindlichkeit konnte durch eine Acetonfällung und Eindampfen des Überstandes mit anschließendem Derivatisierungsschritt erzielt werden. Galensa (65; 66) setzte eine ähnliche Methode ein, die zur Detektion in Lebensmitteln entwickelt wurde. Auch hier wurde bereits die Schwierigkeit der Fructose-Detektion beschrieben. Diese beruht auf dem Vorliegen von

α - und β - Konfiguration sowie der pyranosoiden (als Fünfring) und furanosoiden (als Sechsring) Form (66).

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde Pyridin durch das saubere Natriumhydroxid ersetzt. 1,4-Butandiol wurde durch die den Analyten ähnlicheren Standards Xylose und Trehalose ersetzt.

5.1.3 LC-MS

Die recht aufwendige Probenvorbereitung mit Derivatisierungsschritt und anschließender Auftrennung der benzylierten Zucker sollte durch ein MS-basiertes Verfahren vereinfacht werden. Zur Aufreinigung der Urine war eine Fällung mit Aceton ausreichend, die Auftrennung der underivatisierten Zucker mittels HPLC und anschließender massenspektrometrischer Detektion war möglich. Dadurch konnte der aufwendige Derivatisierungsschritt entfallen. Das eingesetzte Probenvolumen wurde auf ein Zehntel reduziert.

Letztendlich lieferten der Zusatz von Ameisensäure (zum Laufmittel) und die daraus resultierenden negativ geladenen Formiataddukte die besten Ergebnisse. Die Vermessung als Natriumaddukt im positiv-ESI-Modus war nicht geeignet, da hierfür ein niedriger pH-Wert nötig ist, um die Hydroxygruppen zu deprotonieren. Disaccharide sind jedoch bei niedrigen pH-Werten instabil und anfällig für eine Spaltung in die Monosaccharidbausteine. Die Messung als Natriumaddukte im positiv-ESI-Modus scheint vor allem für Monosaccharide (81) und auch zur Bestimmung von Oligosacchariden mittels Tandem-MS geeignet zu sein (82). Außerdem führte der Zusatz von Natriumionen zur starken Kontamination der Ionenfalle, die Natriumaddukte fragmentieren darüber hinaus schlecht, was aber für die Identifizierung und Quantifizierung der Zucker notwendig ist.

Antonio et al. (83) und Fusch et al. (61) beschreiben hingegen die Detektion von Disacchariden als Formiat-Addukte. Die Formiataddukte wurden im negativ-ESI-Modus nach Extraktion aus pflanzlichem Material bzw. aus Milch bestimmt.

Mittels Zusatz von Ammoniumacetatpuffer war die Detektion von Zucker-Formiataddukten auch aus Urin möglich und damit eine Quantifizierung im MS-MS-Modus.

Die Massenspektren der Disaccharide unterscheiden sich nur in der Bildung eines Fragmentes. m/z 161 entsteht nur beim Zerfall des Lactose-Moleküliions. Es ist daher eine gute chromatographische Trennung von Saccharose erforderlich, die auch erreicht wurde.

Die Trennung der Disaccharide über die HILIC-Säule, die besonders für Zucker geeignet sein sollte, war insuffizient und konnte auch durch verschiedene Gradientenzusammensetzungen nicht wesentlich verbessert werden. Die Peaks waren recht flach und Lactose und Saccharose schlecht zu trennen. Der Einsatz der Aminopropyl-modifizierten RP-Säule erbrachte hingegen mittels eines Lösungsmittelgradienten eine suffiziente Trennung der Disaccharide. Glucose und Glucose d7 waren ebenfalls detektierbar, wurden aber nicht validiert, sondern nur qualitativ mit erfasst.

Deuterierte Lactose war kommerziell nicht erhältlich, so dass die Quantifizierung analog zu Saccharose über Saccharose d2 erfolgte.

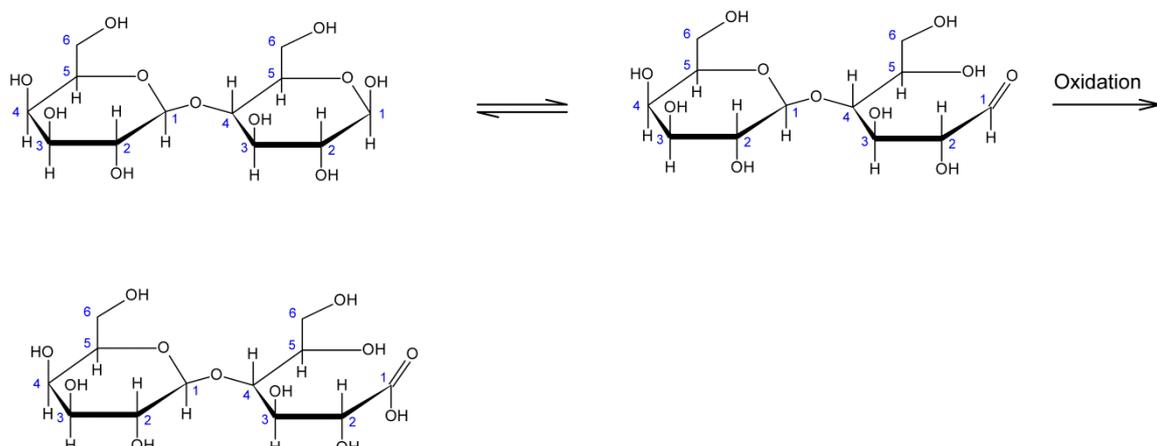
5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Lagerungsversuch

Der Lagerungsversuch zeigt, dass die Disaccharide über einen Zeitraum von zehn Tagen bei -20 °C stabil waren. Die Proben, die bei 4 °C und 20 °C gelagert wurden, zeigten einen verminderten Disaccharidgehalt, entsprechend ließen sich hier Monosaccharide als Abbauprodukte nachweisen

Als Grund für den schnelleren Lactoseabbau im Vergleich zur Saccharose kommen die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften in Frage. Lactose gehört zur Gruppe der reduzierenden Zucker, diese weisen eine freie Aldehydgruppe auf, da die Bindung der beiden Monosaccharidbausteine über ein anomeres C-Atom und eine nicht anomere Hydroxygruppe erfolgt. In Lösung liegt somit ein Gleichgewicht zwischen zyklischer und offenkettiger Form vor. Die offenkettige Form besitzt eine freie Aldehydfunktion, die durch verschiedene Reaktionen zur Carboxygruppe oxidiert werden kann (Abbildung 21). Möglicherweise kann durch diese oxidativen Reaktionen Lactose soweit strukturell verändert werden, dass ein Nachweis nicht mehr möglich ist.

Eine mögliche Ursache für den Kohlenhydratabbau ist der Prozess der alkoholischen Gärung. Darunter versteht man den Abbau von Kohlenhydraten durch Bakterien. Auch Lactose kann zum Beispiel durch das Bakterium *Escherichia coli* verstoffwechselt werden. *E. coli* besiedelt den Darm, ist also bei jedem Menschen vorhanden. Gerade bei Todesfällen ist durch die postmortale Ausbreitung von Bakterien z.B. die Neubildung von Alkohol beschrieben (84). Daher ist bei Drogentodesfällen eine rasche Probenentnahme nach Todeseintritt wünschenswert.

Abbildung 21: Oxidation von Lactose als reduzierendes Disaccharid

5.2.2 Kontrollkollektive

5.2.2.1 Kontrollkollektiv 1

Laut Methaddict[®]-Fachinformation (Information für Diabetiker) (8) enthalten die 40 mg Tabletten 0,02 Broteinheiten. Eine Broteinheit (BE) entspricht 12 g Kohlenhydraten. 0,02 BE entsprechen somit 0,24 g (240 mg) Kohlenhydraten. Somit ist bei oraler Aufnahme von Methaddict[®]-Tabletten von einer deutlich geringeren Saccharosezufuhr als im Kontrollkollektiv auszugehen.

Bei flüssigen Methadonzubereitungen und Beimengung von Sirupus Simplex oder viskoser Grundlösung NRF ist auch eine höhere Saccharoseaufnahme denkbar. Viskose Grundlösung NRF enthält 19 g Saccharose in 100 g Lösung. Sirupus Simplex enthält sogar 64 % Saccharose. Geht man von einer Aufnahme von ungefähr 20 mL dieser viskositätserhöhenden Zusätze aus, kommt man auf Saccharosemengen von bis zu 13 g pro Methadondosis.

Es ergaben sich aus der Untersuchung der gesunden Probanden keine Anhaltspunkte dafür, dass nach oraler Disaccharidaufnahme diese unverändert im Darm resorbiert und in die Blutbahn aufgenommen werden. Sie können daher auch nicht im Urin zur Ausscheidung kommen. Alle untersuchten Urinproben waren negativ für die untersuchten Zucker. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass nach oraler Aufnahme keine Disaccharide im Urin nachweisbar sind und daher eine Unterscheidung zwischen oralem und intravenösem Konsum möglich sein müsste.

Zu beachten sind allerdings chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Bei diesen Erkrankungen sind durch die Entzündungsherde an der Darmschleimhaut die zellulären Barrieren geschwächt und Disaccharide können in relevanten Konzentrationen resorbiert werden und in die Blutbahn gelangen (52; 49). Somit können dann Disaccharide, zum Beispiel Lactose und Saccharose aus der Nahrung, im Urin nachweisbar sein und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher wird auch eben dieser Nachweis von Disacchariden im Urin diagnostisch genutzt, um die Intaktheit der Darmschleimhaut zu überprüfen und oben genannte Erkrankungen zu diagnostizieren (57; 62). Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen der Darmschleimhaut können somit nicht mit dieser Methode auf intravenös konsumierte Substitutionsmittel überprüft werden, da in jedem Fall mit einem positiven Zuckernachweis im Urin zu rechnen ist.

Auch nach der Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), die als peripher wirksame Schmerzmittel eingesetzt werden, können durch Schädigungen des Magen-Darm-Traktes falsch positive Befunde erzeugt werden. Smecuol et.al. (85) überprüften nach Einnahme von NSAIDs die Durchlässigkeit der Darmbarriere mit Hilfe von Disacchariden (u.a. auch Saccharose). Hierbei zeigte sich, dass insbesondere der Dünndarm für die Schädigung anfällig ist und die Saccharosekonzentrationen im Urin durch die Einnahme von NSAIDs gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant erhöht waren. Das Ausmaß der Schädigung ist dosisabhängig und korreliert mit der ausgeschiedenen Saccharosemenge (85). Der genaue Pathomechanismus ist bisher noch unklar, diskutiert wird aber eine Veränderung der Prostaglandinsynthese und der topischen Schädigung der Schleimhaut durch die NSAIDs

Somit ist die Beurteilung positiver Urinbefunde schwierig, falls vorher NSAIDs eingenommen wurden. Die Untersuchung von Patientenkollektiven mit Schmerzmitteleinnahme auf Zuckerbefunde im Urin wäre daher grundsätzlich wünschenswert um konkrete Daten zu diesem Problempunkt zu erheben. Die Beurteilung des Zuckernachweises in solchen Fällen wird jedoch schwierig bleiben, da ja nicht nur das Ausmaß der Schädigung im Darm eine wichtige Rolle spielt, sondern auch, die absolute Menge an Zucker der über Nahrungsmittel und Getränke aufgenommen wird.

5.2.2.2 Kontrollkollektiv 2

Da einige Labors, die ebenfalls Untersuchungen auf Disaccharide im Urin durchführen, von falsch positiven Befunden bei substituierten Patienten berichteten, wurde ein weiteres Kontrollkollektiv mit höherer Disaccharidbelastung untersucht. Diese

Untersuchung sollte den Einfluss von disaccharidhaltigen Lebensmitteln zeigen Während im ersten Kollektiv keine positiven Befunde im Urin erhalten wurden, ergaben sich nach oraler Aufnahme höherer Dosen Saccharose positive Befunde im Urin. Die erreichten Werte lagen alle unterhalb von 40 mg/ L. Acht Probanden nahmen Coca-Cola® auf und in fünf Urinproben waren niedrige Konzentrationen Saccharose im Urin nachweisbar. Nach dem Konsum von Schokolade war Saccharose in zwei von vier Proben positiv. In einer Tafel Vollmilchschokolade sind je nach Hersteller zwischen 50 g und 60 g Zucker enthalten (68; 69), eine genaue Aufschlüsselung in Saccharose, Lactose und Glucose ist auf den Packungen nicht zu finden. In 100 mL Coca-Cola® sind gemäß Hersteller 10,6 g Zucker (4,1 g Saccharose, 3,1 g Glucose, 3,0 g Fructose) sowie Phosphorsäure als Säuerungsmittel und Kohlensäure enthalten.

Unmittelbar nach der Aufnahme größerer Mengen von Süßgetränken oder Süßigkeiten ist also auch mit einem positiven Saccharosenachweis in niedrigen Konzentrationen im Urin zu rechnen. Die hier überprüften Proben wurden maximal 2 Stunden nach Zuckeraufnahme gewonnen. Welche Konzentrationen bei einer über den gesamten Tag verteilten, mehrfachen Aufnahme stark zuckerhaltiger Lebensmittel erreicht werden können, konnten wir mit diesem Kontrollkollektiv nicht überprüfen. Darüber hinaus ist bei substituierten Patienten in vielen Fällen nicht davon auszugehen, dass eine gesunde Ernährung im Vordergrund steht und auch vielfach zuckerhaltige Limonaden getrunken werden. Die darin enthaltenen Säuren Kohlensäure und Phosphorsäure können zu einer Herabsetzung des pH-Wertes im Dünndarm (86) und somit theoretisch zu einer erleichterten Passage der Disaccharide in die Blutbahn führen.

Es zeigte sich, dass nach der Aufnahme größerer Zuckermengen durch gesüßte Lebensmittel Disaccharide im Urin nachweisbar sind und zu falsch positiven Befunden im Hinblick auf die Fragestellung führen können. Bei einmaliger Belastung mit größeren Mengen Saccharose, wurden jedoch 40 mg/L Saccharose im Urin nicht überschritten. Allerdings fehlen bisher Untersuchungen, die über den Tag verteilt mehrere Portionen Süßigkeiten oder gesüßte Getränke aufnehmen. Denkbar sowohl höhere Werte als im Kontrollkollektiv, aber andererseits muss auch bedacht werden, dass in den Stunden ohne Nahrungsaufnahme Disaccharide wieder über den Urin ausgeschieden werden. Hier sind also weitere Untersuchungen mit gesunden, nicht intravenös konsumierenden Probanden nötig, um validere Aussagen zur Disaccharidausscheidung nach Nahrungsaufnahme zu gewinnen und gegebenenfalls im weiteren Schritt Konzentrationsbereiche im Vergleich zu Werten nach intravenöser Substitutaufnahme abgrenzen zu können.

5.2.3 Drob Inn 1

In allen untersuchten Proben der intravenösen Konsumenten ließen sich Disaccharide nachweisen. In 81 % der Fälle betrug die Konzentration der Zucker mehr als 50 mg/L. Monosaccharide waren hingegen nicht nachzuweisen. Dies spricht dafür, dass es keine relevanten Abbauvorgänge in den untersuchten Proben gab. Wie im Lagerungsversuch gezeigt wurde, war nach drei Tagen +4 °C noch mehr als 80 % der Saccharose nachweisbar, bei Lactose waren nach drei Tagen noch ca. 70 % nachweisbar. Die Proben wurden nach Gewinnung bei 4 °C aufbewahrt und dann nach 8-48 Stunden ins Labor verbracht und dort bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Für den Zeitraum von 48 Stunden scheint also eine Lagerung im Kühlschrank ausreichend zu sein, um relevanten Einbußen der Disaccharide im Urin zu verhindern. Ob die Teilnehmer dieses Kollektivs aktuell, länger zurückliegend oder zu keinem Zeitpunkt in Substitutionsbehandlung waren, wurde nicht erfragt. Einschlusskriterium war lediglich der intravenöse Konsum von Methadon, Buprenorphin und /oder Heroin. Daher sind die Bezugsquellen für die konsumierten Substitute unklar. Neben dem intravenösen Konsum ärztlich verordneter Substitute werden auch „take-home“-Dosen verkauft und gelangen so auf den Schwarzmarkt (41; 37; 87). Aber auch bei der Vergabe von Methadonzubereitungen unter Sicht wird beschrieben dass Patienten die Dosis nicht herunterschlucken, sondern später wieder ausspucken und das Methadon anschließend intravenös konsumieren. Des Weiteren sind Einzelfälle bekannt, bei denen auch Ärzte mit Substitutionsmitteln gehandelt haben (88; 89).

In 42,9 % der Methadon-positiven Fälle war Saccharose nachweisbar. Dies spricht für einen intravenösen Konsum von flüssigen Methadonzubereitungen, bei denen z. B. Sirupus Simplex als Viskositätserhöhender Zusatzstoff verwendet wird. Der Nachweis von größeren Mengen Lactose in Kombination mit geringeren Mengen Saccharose (Probe 8, 20) spricht für einen i.v.-Konsum von Methadict®-Tabletten, da hier beide Hilfsstoffe in der Herstellung verpresst werden. Einige Konsumenten bevorzugen den Konsum von Tabletten aufgrund des definierten Wirkstoffgehaltes (25).

In 23 von 26 Fällen war Buprenorphin und/oder Methadon positiv, somit fanden sich in nur drei Fällen keine Substitutionsmittel. Insgesamt zeigte sich anhand der immunchemischen Ergebnisse, dass die Probanden mehr als eine Substanz konsumieren. Daher können die nachgewiesenen Disaccharide auch aus dem intravenösen Konsum anderer Substanzen stammen. Beispielsweise lässt sich die in Probe 6 nachgewiesene Lactose auch durch die i.v.-Applikation von Heroin oder von Benzodiazepinen erklären. Heroin wird häufig mit Lactose gestreckt und Benzodiazepintabletten enthalten ebenfalls Lactose. Da aber auch der intravenöse

Beikonsum in der Substitutionstherapie generell nicht gewünscht ist. spricht der Nachweis von Disacchariden im Urin auch in dem Fall, dass andere Substanzen als Methadon intravenös konsumiert wurden für eine fehlende Compliance der Therapie.

Die nachgewiesenen Konzentrationen der Disaccharide lagen zum größten Teil deutlich über 50 mg/L, so dass zu erwarten ist, dass ein Nachweis auch mehrere Stunden nach Konsum möglich sein sollte.

5.2.4 Drob Inn 2

5.2.4.1 Flüssige Methadonzubereitungen

Viskositätserhöhende Zusätze wie Sirupus Simplex oder viskose Grundlösung NRF, die Methadon- oder L-Polamidonlösung beigemischt werden, enthalten Saccharose, jedoch keine Lactose. Die Probanden 4,15 und 19 gaben den intravenösen Konsum von flüssigen Methadonzubereitungen an und zeigten positive Ergebnisse ausschließlich für Saccharose. In Probe 15-1 ließ sich keine Saccharose nachweisen, obwohl der letzte i.v.-Konsum als drei Stunden zurückliegend angegeben wurde. Im Fragebogen wurde nicht erfasst, ob ein viskositätserhöhender Zusatz in der konsumierten Methadonlösung enthalten war. Dieser Zusatz wird in Deutschland zwar empfohlen, aber nicht vorgeschrieben (9; 4). Die Vergabe ohne viskositätserhöhenden Zusatz würde den fehlenden Zuckernachweis zwanglos erklären.

5.2.4.2 Methadon-Tabletten

Methaddict® sind die einzigen in Deutschland zugelassenen methadonhaltigen Tabletten (Stand Juli 2016). Ihre Zusammensetzung stellt eine Besonderheit dar, da nicht, wie sonst üblich, ausschließlich Lactose als Hilfsstoff verpresst wird, sondern auch Saccharose Verwendung findet. Laut der Herstellerfirma Sandoz ist der Lactoseanteil höher als der Saccharoseanteil, nähere Angaben wurden bei der Nachfrage allerdings nicht gemacht. Daher spricht der Nachweis höherer Lactose- und niedrigerer Saccharosekonzentrationen für i.v.-Applikation von Methaddict®.

Teilnehmer 1,2,3,5,7,8,10,14,16 und 18 gaben für den aktuellen und zurückliegenden Konsum die Applikation von Methaddict®-Tabletten an. In den Urinproben, die unmittelbar nach i.v.-Konsum gewonnen wurden, ließen sich höhere Lactose- als Saccharosekonzentrationen nachweisen (Lactose: 428-3992 mg/L; Saccharose: 54,3-673,9 mg/L). In den Urinproben 1-1, 5-1 und 14-1 finden sich annähernd gleiche Konzentrationen von Lactose und Saccharose. Diese Proben wurden 1,5, eine bzw. 24 Stunden nach dem letztmaligen Konsum gewonnen. Zu einer Verschiebung der

Konzentrationsverhältnisse kann beispielweise der zusätzliche intravenöse Konsum anderer Substanzen führen. Heroin und Cocain werden häufig mit Lactose gestreckt, Benzodiazepine enthalten Lactose als Hilfsstoff, aber auch ein Abbau von Lactose durch längere Lagerung der Urinprobe bei Zimmertemperatur ist denkbar. Untersuchungen der Stabilität zeigten, dass Saccharose bei Zimmertemperatur deutlich stabiler ist als Lactose (90).

5.2.4.3 Buprenorphin-Tabletten

Die in Deutschland zugelassenen Buprenorphin-Tabletten (z. B. Subutex[®], Buprenorphin-ratiopharm[®]) enthalten alle Lactose, jedoch keine weiteren Disaccharide als Hilfsstoffe (s. a. Tabelle 1). Die Personen 9,13 und 20 konsumierten vor beiden Urinprobenabgaben Subutex[®], der letzte Konsum lag vier, 24, bzw. zwölf Stunden zurück. Bei Person 13 war in beiden Urinproben ausschließlich Lactose nachweisbar, bei Person 20 wurden neben der Lactose auch in beiden Proben geringere Konzentrationen Saccharose nachgewiesen. In Probe 9-1 war trotz eines vier Stunden zurückliegenden Konsums keine Lactose nachweisbar, in den Proben 9-1 und 9-2 war zudem Saccharose nachweisbar.

Diese Proben waren immunochemisch negativ für Methadon, um aber falsch-negative Befunde auszuschließen, wurden diese Proben nachträglich mit der laboreigenen Methode zur Bestimmung von Drogen im Urin mittels LC-MS-MS untersucht³. Diese Untersuchung bestätigte das negative immunochemische Ergebnis für Methadon. Aus diesem Grund kann die nachgewiesene Saccharose daher nur durch eine orale Aufnahme erklärt werden. Neben den positiven Urinergebnissen aus dem Kontrollkollektiv, das höhere Saccharosemengen aufgenommen hatte, legen auch die nicht erklärlichen schwach positiven Befunde bei intravenös konsumierenden Personen die Notwendigkeit der Etablierung eines Cut-offs für beide Disaccharide nahe.

5.2.4.4 Cut-off für Disaccharide

Die orale Aufnahme von je 20 g Lactose und Saccharose hatte nicht zu positiven Disaccharidbefunden im Urin geführt. Die orale Aufnahme größerer Zuckermengen aus Schokolade(50-60 g Saccharose)oder Coca-Cola[®] führte in einigen Proben zu Befunden zwischen 15 mg/L-36 mg/L.

³ Untersuchung der Proben 9-1, 9-2, 20-1, 20-2 mit der laboreigenen, nach GTFCh-Richtlinie Anhang B voll validierten Methode zum Nachweis von Drogen (inkl. Methadon, EDDP) im Urin mittels LC-MSMS: 1mL Urin wurde mit den entsprechenden deuterierten Standards gespikt, mit Puffer und β -Glucuronidase versetzt. Der Extrakt wurde mittels eines Waters XEVO TQ MS, Triple Quadrupol Massenspektrometers im ESI-Modus untersucht. Die MS Einheit war gekoppelt mit einer Waters Acquity HPLC und einer Waters Acquity BEH Säule (1,7 μ m, C18 2,1* 50mm). Im MRM-Modus wurde pro Analyt ein Übergang detektiert.

Sutherland et al. (56) untersuchten bei 189 Probanden die gastrointestinale Permeabilität für Saccharose bei endoskopisch gastrointestinalen Schädigungen. Das gesunde Kontrollkollektiv (n=59) zeigte nach oraler Aufnahme von 100 g Saccharose im nüchternen Zustand danach im Sammelurin von fünf Stunden im Mittel eine absolute Ausscheidungsmenge von 100 mg Saccharose. Es wurden also unter diesen Extrembedingungen 0,01-0,12 % der aufgenommenen Dosis über den Urin ausgeschieden.

Bei substituierten Personen ist die Saccharosebelastung durch die orale Aufnahme des Substitutionsmittels deutlich geringer. Bei einer angenommenen Aufnahmemenge von 8-15 mL Methadonlösung versetzt mit Sirupus Simplex gelangen zwischen 5,1-9,6 g Saccharose in den Gastrointestinaltrakt. Werden die Daten von Sutherland et al. zugrunde gelegt, ist eine maximale absolute Saccharoseausscheidung von 0,5-11,5 mg zu erwarten (0,01-0,12 % der aufgenommenen Dosis). Innerhalb von 5 Stunden werden ca. 300 mL Urin produziert, es wäre demnach also von maximalen Saccharosekonzentrationen zwischen 1,6 und 38 mg/L auszugehen.

Bei Wyatt et. al (54) wurde nach oraler Aufnahme von 20 g Saccharose bei gesunden Vergleichsprobanden 0,094 % der verabreichten Dosis im Sechs-Stunden-Sammelurin wieder ausgeschieden, was 8,8 mg Saccharose entspricht. Die absolute Menge bei Morbus Crohn-Patienten lag in dieser Studie hingegen bei 60 mg Saccharose im Sammelurin.

Die bei Subutex[®]-Konsumenten gemessenen Saccharosekonzentrationen (36,1, 38,9, 43,8 und 63,9 mg/L) deuten darauf hin, dass auch durchaus Werte oberhalb von 40 mg/L erreicht werden. Subutex[®] enthält keine Saccharose, daher ist die nachgewiesene Saccharose-Konzentration nicht durch den intravenösen Buprenorphin-Konsum erklärlich. (85).

Zusammenfassend scheint die Einführung eines Cut-offs empfehlenswert, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Die Ermittlung von Cut-offs kann jedoch nicht allein auf der Grundlage von Daten von Gesunden oder i.v.-Konsumenten erfolgen. Vielmehr sollten Messungen bei einer größeren Anzahl von substituierten Patienten durchgeführt werden. Entsprechend einer mündlichen Mitteilung aus dem MVZ Dessau, das in großem Umfang bei Substituierten Complianceuntersuchungen durchführt, ist bei Substitutionspatienten z.B. von anderen Ernährungsbedingungen auszugehen. Diese ernähren sich vorwiegend von Brot und wenig Gemüse oder Fleisch. Der Urin-pH-Wert ist daher eher schwach basisch. Auch werden viele kohlenensäurehaltige Süßgetränke, wie Cola oder Limonade getrunken, die zu hohen Aufnahmemengen von Saccharose

führen. Es erscheint daher für die Festlegung eines verbindlichen Cut-off-Wertes unerlässlich in dem Zielkollektiv Messungen durchzuführen.

Wie auch schon für Saccharose kann ein verlässlicher Cut-off für Lactose derzeit ebenfalls nicht angegeben werden, da auch hierfür weitere Untersuchungen bei Substitutionspatienten notwendig wären.

Aus praktischen Gründen empfehlen wir die Anwendung eines vorläufigen 40 mg/L Cut-offs als Arbeitsgrundlage. Eine Interpretation der Messwerte oberhalb des Cut-offs sollte daher nur sehr vorsichtig und unter Berücksichtigung der Begleitumstände erfolgen. Messwerte deutlich oberhalb des von uns empfohlenen Grenzwertes sind ein guter Anhaltspunkt für die substituierenden Ärzte, um die Patienten auf die Risiken eines intravenösen Substitutkonsums aufmerksam zu machen und sie einer körperlichen Untersuchung auf das Vorhandensein von Einstichstellen zu unterziehen.

5.2.4.5 Nachweisfenster der Disaccharide

Zucker waren in allen Urinproben nachweisbar, die kurz nach intravenösem Konsum im Drob Inn gewonnen wurden. Die Probengewinnung erfolgte 30-70 Minuten nach Konsum. In allen untersuchten Proben lagen die gemessenen Proben deutlich oberhalb unseres Cut-offs.

Die zeitlichen Abstände zwischen vorangegangenem Konsum und der ersten Urinabgabe wurden mit 1-92 Stunden angegeben. Saccharose wurde in 17 Fällen nachgewiesen, der Konzentrationsbereich lag zwischen 20,4 mg/L -373,5 mg/L. Lactose war in 13 Fällen nachweisbar im Bereich von 15,8 mg/L-2976,6 mg/L. In zwei der 20 Proben waren keine Disaccharide mehr nachweisbar. Wird ein Cut-off von 40 mg/L zugrunde gelegt, müssen vier Proben als negativ gewertet werden. Schränkt man das Kollektiv weiter ein, indem man nur die Proben betrachtet, bei denen der letzte Konsum innerhalb der letzten 24 Stunden stattfand, waren in 81% der Fälle Disaccharide nachweisbar. Bei den Teilnehmern 9-1, 17-1 und 19-1 konnten schon nach vier bzw. je zwölf Stunden keine Disaccharide mehr nachgewiesen werden. Bei Person 4 und 6 lag der letzte angegebene Konsum 92 bzw. 48 Stunden zurück, in beiden Fällen waren aber Disaccharide nachweisbar. Person 12 gab den Konsum von Methadict®-Tabletten an, allerdings ließ sich in den Proben lediglich Saccharose, aber keine Lactose nachweisen.

Es lässt sich feststellen, dass nach intravenösem Konsum disaccharidhaltiger Zubereitungen ein Nachweis dieser Substanzen im Urin über mehrere Stunden möglich ist.

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die

Angaben der Probanden nicht immer verlässlich sind. Auch eine veränderte zeitliche Wahrnehmung durch Rauschzustände hat Einfluss auf den Wahrheitsgehalt der Angaben.

Der intravenöse Beikonsum anderer lactosehaltiger Tabletten oder Drogen führt ebenfalls zu positiven Befunden für Lactose im Urin. Die immunchemischen Ergebnisse bestätigen, dass der Konsum anderer berauschender Mittel sowohl bei substituierten als auch nicht substituierten Konsumenten weit verbreitet ist (91; 36) Dies ist daher eine mögliche Erklärung für die in einigen Fällen fehlende Übereinstimmung zwischen den Angaben der Fragebögen und den analytischen Ergebnissen.

5.2.4.6 Schlussfolgerung Drob Inn 2

Trotz des recht kleinen Kollektivs mit 20 Teilnehmern sind die Ergebnisse eine gute Ergänzung zum ersten Drob Inn-Kollektiv. Insbesondere für das zweite Kollektiv war es recht schwierig, freiwillige Teilnehmer zu finden, die trotz des Wunsches nach einem erneuten Konsum bereit sind vorher noch Urinproben abzugeben. Die Untersuchungsergebnisse des zweiten Kollektivs aus dem Drob Inn ergänzen die Ergebnisse der ersten Drob Inn Kollektivs gut.

Kontrollierte Studien an Patienten zur intravenösen Aufnahme von Zuckerlösungen sind jedoch nicht durchführbar, da Lösungen mit so hohem Zuckergehalt durch die hohe Osmolarität zu einer Schädigung der Venen führen können. Es gab für das gewählte Modell daher keine Alternative.

Bei Patienten mit degenerativ-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ist die hier vorgestellte Methode nicht anwendbar, da die entzündlichen Prozesse der Darmschleimhaut zu einer erhöhten Permeabilität der Disaccharide führen können. Dies führt zu falsch-positiven Ergebnissen im Urin, da auch in diesem Fall intakte Disaccharide resorbiert werden. (51; 56). Cox et. al. beschreiben sowohl die Aktivitätsabnahme der Bürstensaumenzyme als auch die gesteigerte Permeabilität der Darmschleimhaut als Gründe für eine Disaccharidaufnahme in die Blutbahn (52). Auch die mögliche Einnahme von Schmerzmitteln oder die hochdosierte orale Aufnahme von Zuckern kann als Erklärung, in Betracht kommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass unsere Methode für substituierende Ärzte geeignet ist, um für ihre Substitutionspatienten Hinweise auf eine missbräuchliche intravenöse der Substitute zu bekommen. Bei „take-home“- Verschreibungen hat der Arzt keine Informationen über den Applikationsweg und es kann bekanntermaßen für die

substituierten Patienten sehr schwierig sein, mit alten Verhaltensmustern wie dem risikoreichen i.v.-Konsum zu brechen (27).

5.2.5 Drogentodesfälle

5.2.5.1 Urinproben

Bei der Bewertung der Frage, ob eine ob eine Methadonaufnahme todesursächlich war, können die in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten – insbesondere im Blut und in den Haaren - gemessenen Methadonkonzentrationen Hinweise auf den Toleranzgrad des Verstorbenen liefern.

Die Untersuchung der Drogentodesfälle auf Disaccharide wurde mit dem Ziel durchgeführt, ergänzende Informationen zum Applikationsweg zu erhalten. Nicht in allen Fällen ergeben sich eindeutige Hinweise durch die Auffindsituation des Verstorbenen, wie z. B. das Vorhandensein benutzter Spritzen. Auch frische Einstichstellen können nicht in jedem Fall festgestellt werden (21). Die Kenntnis des Applikationsweges ist wichtig, da der intravenöse Konsum durch die schnelle Anflutung des Methadons an den Opiatrezeptoren die Toxizität erhöht. Die Konzentrationen im Blut, die eine tödliche Atemdepression auslösen können, sind interindividuell sehr unterschiedlich und hauptsächlich der Toleranzentwicklung gegenüber Opioiden abhängig (44; 92). Auch führt der Abbau über das Cytochrom-P450- System bei der ersten Leberpassage nach oraler Aufnahme zu einer verminderten Bioverfügbarkeit im Vergleich zu der intravenösen Applikation (24).

Durch den Todeseintritt kommen Stoffwechselfvorgänge zum Erliegen und die Barrieren zwischen verschiedenen Gewebetypen können nicht aufrechterhalten werden. Methadon hat mit 4-7 L/kg (7) ein hohes Verteilungsvolumen, durch die postmortale Rückverteilung kann es zu einer Umverteilung des Methadons aus den umliegenden Gewebe in die Blutbahn kommen und infolgedessen zu einem Anstieg der Konzentrationen im Blut. Dies ist ein weiterer Grund für die eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen postmortalen Blutspiegeln und Serumkonzentrationen bei Lebenden (93).

Der Nachweis von Disacchariden kann somit einen wichtigen Baustein bei der Bewertung der Methadonbefunde bei Todesfällen darstellen. Obwohl der intravenöse Substitutkonsum sowohl bei Methadon (26; 94; 19; 18; 95) als auch bei Buprenorphin (96; 97; 98) weit verbreitet ist, war ein chemisch-toxikologischer Nachweis des Applikationsweges bisher nicht möglich. Wie durch die Urin-Untersuchungen lebender Probanden gezeigt werden konnte, ist der Nachweis von Disacchariden im Urin als Marker für einen i.v.-Konsum geeignet, wenn die entsprechenden Einschränkungen

beachtet werden. Da im Blut keine Disaccharidasen vorhanden sind, werden die injizierten Disaccharide in Folge dessen über den Urin ausgeschieden und können darin nachgewiesen. Der Nachweis in 66 % der untersuchten Proben unterstreicht die Bedeutung des intravenösen Konsums bei Konsumenten von Substitutionsmitteln.

Der alleinige Saccharosenachweis spricht für den Konsum von flüssigen Methadonzubereitungen, da diese Saccharose als Viskositätserhöhenden Zusatz enthalten. Ist Lactose nachweisbar, kann dies für die intravenöse Aufnahme unterschiedlicher Substanzen sprechen. Sowohl Buprenorphin- als auch Methadontabletten enthalten Lactose, diese kommt außerdem als Streckmittel von Heroin vor und als Hilfsstoff vieler weiterer Tabletten, wie z. B. bei benzodiazepinhaltigen Präparaten.

Bei sechs der 61 untersuchten postmortalen Proben waren Lactose und Saccharose nachweisbar. Dies kann ein Hinweis auf die Injektion von Methaddict[®]-Tabletten sein, da diese laut Fachinformation beide Disaccharide enthalten (8). Besonders der Nachweis von höheren Mengen Lactose und geringeren Mengen von Saccharose deutet auf Methaddict[®]-Tabletten hin, da in der Herstellung mehr Lactose als Saccharose verwendet wird (lt. tel. Nachfrage beim Hersteller). Allerdings zeigte sich in vier Fällen (Tabelle 14, Nr. 19, 28, 36, 37) ein anderes Lactose-Saccharose-Verhältnis als es nach Methaddict[®]-Injektion zu erwarten wäre. Ein Abbau von Lactose in den post-mortem-Proben ist eine mögliche Ursache. Wie der Lagerungsversuch (s.S.41) zeigte, wird Lactose bei Raumtemperatur deutlich schneller als Saccharose abgebaut. Auch die Injektion weiterer disaccharidhaltiger Substanzen (z.B. Heroin, Cocain oder Benzodiazepine) kann das Verhältnis der nachgewiesenen Zucker verändern.

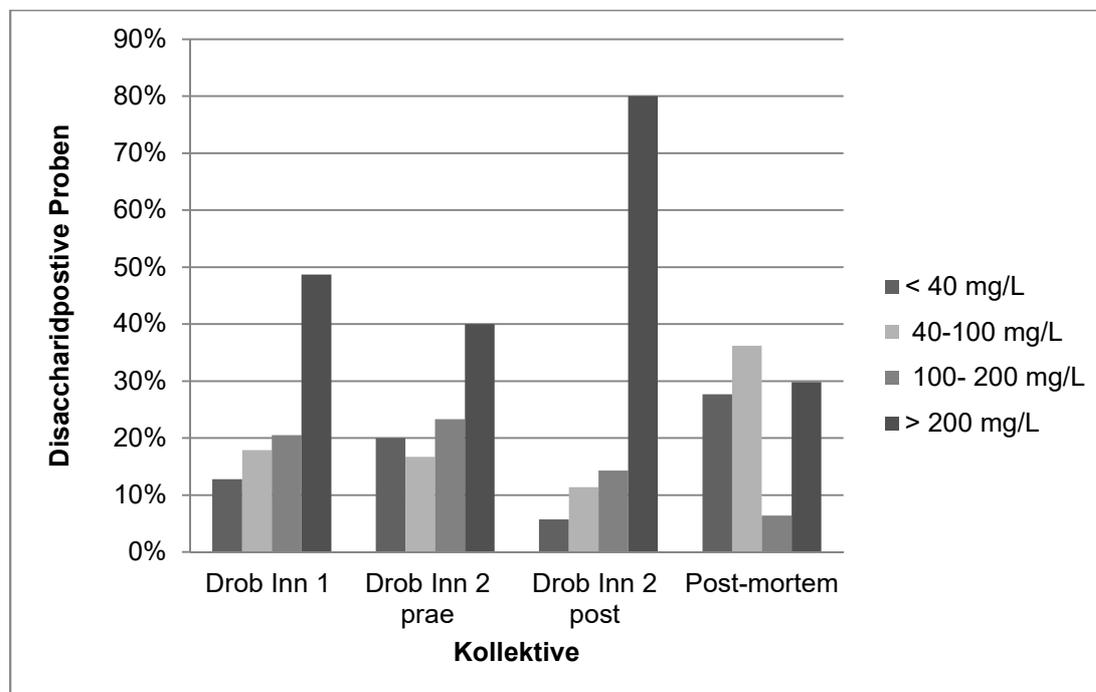
Teilt man die Proben aller Kollektive entsprechend der nachgewiesenen Disaccharidmenge in verschiedene Konzentrationsbereiche ein (Abbildung 22), so zeigt sich, dass bei lebenden Patienten größtenteils Konzentrationen > 200 mg/L nachweisbar waren. Bei zeitlich engem Abstand zur Probenabgabe lagen die nachgewiesenen Zuckerkonzentrationen im hohen Konzentrationsbereich, bei länger zurückliegendem Konsum sind meist noch niedrigere Zuckerkonzentrationen nachweisbar.

Durchschnittlich 13 % lagen unterhalb des vorgeschlagenen Arbeits-Cutoffs von 40 mg/L.

Hingegen waren im größten Anteil der post-mortem-Proben (36 %) Zuckerkonzentrationen im mittleren Konzentrationsbereich zwischen 40 und 100 mg/L nachweisbar. Dies spricht für Abbauprozesse der Zucker im Leichnam, aber auch eine längere Überlebenszeit nach intravenöser Substitutaufnahme könnte eine mögliche

Ursache sein, wenngleich es durch die Therapie mit Opioiden vermehrt zu Harnverhalt kommt. Insgesamt waren bei den post-mortem-Proben die nachgewiesenen Zuckerkonzentrationen etwas niedriger als bei den lebenden Patienten. 28 % der untersuchten Drogentodesfälle lagen unterhalb des Arbeits-Cut-offs von 40 mg/L.

Abbildung 22: Konzentrationsverteilung disaccharidpositiver Urinproben



Drob Inn prae: Urinprobenabgabe 1-92 Stunden nach letztem Konsum
 Drob Inn post: Urinprobenabgabe 30-70 Minuten nach akutem Konsum

Weiterhin gelten auch für die Bewertung der Drogentodesfälle die bereits oben genannten einschränkenden Faktoren wie zum Beispiel degenerativ-entzündliche Darmerkrankungen. Bei obduzierten Fällen kann anhand des Sektionsprotokolles überprüft werden, ob Veränderungen am Darm vorgelegen haben. Auch die Verwendung des vorläufigen Cut-offs von 40 mg/L wird empfohlen, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Dies gilt insbesondere für die Todesfälle, bei denen sich aus der Vorgeschichte keine Hinweise auf einen intravenösen Drogenkonsum ergeben und bei denen auch bei der Sektion keine frischen Einstichstellen dokumentiert wurden.

5.2.5.2 Blutproben

In keiner der untersuchten Blutproben waren Disaccharide nachweisbar, Ursache könnte auch hier der postmortale bakterielle Abbau der Disaccharide in seine Monosaccharidbausteine sein, dies würde dann insbesondere den Nachweis von Lactose betreffen, da dies bei Raumtemperatur ohnehin schneller abgebaut wird als

Saccharose. Der qualitative Nachweis der Spaltprodukte Glucose und Galactose wäre mittels der etablierten HPLC-DAD-Methode möglich. Galactose und Glucose sind Abbauprodukte von Lactose, während Saccharose in Glucose und Fructose zerfällt. Der chromatographische Nachweis von Fructose ist mit der vorliegenden Methode nicht möglich. Allerdings ist auch der Glucosenachweis im Blut schlecht möglich, da physiologisch bereits Glucose in großen Mengen im Blut vorliegt. Der Normwert für Nüchternblutzucker im Vollblut beträgt 70-110 mg/dL (entspricht 0,7- 1,1 g/L) (99), diese Konzentrationen liegen bereits deutlich oberhalb des kalibrierten Bereichs (bis 100 mg/L). Eine Unterscheidung von endogener und exogener Glucose ist nicht möglich.

Bei Injektion disaccharidhaltiger Zubereitungen entspricht die Bioverfügbarkeit 100 %, aufgrund der hohen Hydrophilie der Zucker sowie fehlenden Transportsysteme in den Gefäßen werden sich die Disaccharide lediglich intravasal verteilen.

30-45 Minuten nach oraler Aufnahme von 8 g Saccharose bei Patienten mit Zölliakie fanden Cox et al. Serum-Saccharosekonzentrationen von 0,46- 3,74 $\mu\text{mol/L}$ (0,16-1,28 mg/L), nach Gabe von 50 g Saccharose oral bei gesunden Probanden ließ sich keine Saccharose im Blut nachweisen (52).

Auch Abbauvorgänge bei längerer Liegezeit des Verstorbenen können eine Ursache für den fehlenden Nachweis im Blut sein. Insgesamt wären zur Beurteilung des Sachverhaltes weitere umfassende Untersuchungen nötig. Wegen der ausgeführten Einschränkungen ergibt sich für die Analyse im Blut keinerlei Vorteil im Vergleich zur Bestimmung im Urin, so dass ein weiterer Aufwand in dieser Richtung nicht zielführend erscheint.

5.3 Fazit

Bekanntermaßen werden Substitutionsmedikamente aus verschiedenen Gründen missbräuchlich intravenös verwendet. Dies ist sowohl bei substituierten als auch bei nicht substituierten Patienten der Fall. Durch den intravenösen Konsum steigen die Risiken für Nebenwirkungen deutlich. Dabei sind vor allem die potentiell lebensbedrohliche Atemdepression und Infektionskrankheiten durch „Needle-Sharing“ zu nennen. Bisher stand für die substituierenden Ärzte keine Untersuchungsmethode zur Verfügung, um den Applikationsweg des Substitutionsmittels und somit die Compliance zu überprüfen. Auch bei der Bewertung methadon-assoziiertes Drogentodesfälle können Hinweise zum Applikationsweg eine wichtige Information bei der Bewertung der erhobenen Blutspiegel sein.

Disaccharide finden in der Herstellung von Arzneimitteln breite Verwendung und werden sowohl in flüssigen als auch in festen Methadon- und Buprenorphinzubereitungen eingesetzt. Da diese Zucker nur bei oraler Aufnahme im Darm gespalten werden, bei intravenösem Konsum aber intakt bleiben und renal ausgeschieden werden, erschien der Nachweis der Zucker als Markersubstanz für einen intravenösen Konsum grundsätzlich möglich.

Ziel der Arbeit war es diese These zu überprüfen und eine Methode zu erarbeiten, die einen schnellen und einfachen Nachweis der Zucker im Urin erlaubt. Bei der Untersuchung lebender Patienten zeigte sich, dass Saccharose und Lactose über mehrere Stunden nach intravenöser Aufnahme über den Urin ausgeschieden werden und intravenösen Konsum belegen können. Über den Nachweis von Disacchariden im Urin ist somit eine Unterscheidung zwischen oraler und intravenöser Aufnahme möglich. Der Nachweis dieser Markersubstanzen kann als zusätzlicher Test die Routineuntersuchung im Rahmen einer Substitutionsbehandlung dienen, um dem behandelnden Arzt Informationen zur Compliance zu liefern.

Die verschiedenen erarbeiteten Methoden erlauben den Nachweis der Disaccharide, was Hinweise auf die Art des applizierten Substituts gibt. So spricht zum Beispiel der kombinierte Nachweis von großen Mengen Lactose und geringeren Konzentrationen Saccharose für einen Konsum von Methadict[®]-Tabletten. Die Glucosebestimmung nach Invertasespaltung und die Subtraktion der freien Glucose, wie sie bei immunchemischen Methoden zur Diagnostik von entzündlich-degenerativen Darmerkrankungen angewendet wird (57; 62), ist somit nicht notwendig. Die Disaccharide können direkt nachgewiesen werden.

Die erhobenen Ergebnisse führen zu der Empfehlung eines vorläufigen Arbeits-Cut-offs von 40 mg/ L für Lactose und Saccharose, um damit falsch-positive Befunde zu verhindern. Auch Faktoren, wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder die Einnahme nicht-steroidaler Antirheumatika können "falsch-positive" Ergebnisse hervorrufen. Unsere Versuche zeigten, dass auch die Nahrung einen Einfluss auf die Ausscheidung von Disacchariden im Urin haben kann. So war in einigen Fällen nach Aufnahme von Coca-Cola[®] Saccharose im Urin nachweisbar. Gemäß den mündlich mitgeteilten Erkenntnissen aus dem MVZ Dessau kann der Urin-pH-Wert bei substituierten Patienten leicht basisch sein, da sich die Ernährung z. T. stark auf Brot und gesüßten Lebensmitteln beruht. Bei der Aufnahme größerer Zuckermengen über den ganzen Tag durch stark gesüßte Lebensmittel sind falsch-positive Befunde für Saccharose im Urin nicht auszuschließen. Bis weitere Ergebnisse aus einem größeren

Kollektiv substituierter Patienten vorliegen, sollte der vorgeschlagene Cut off nur mit großer Vorsicht verwendet werden und allenfalls Anlass für ein Gespräch zwischen Arzt und Patient sowie einer ärztlichen Untersuchung auf Nadeleinstichstellen sein. Der Nachweis von Disacchariden im Blut gelang bei Drogentodesfällen nicht, wenn auch methodisch grundsätzlich möglich. Insgesamt scheint der Nachweis der Markersubstanzen im Urin eine gute Möglichkeit zur Überprüfung des Aufnahmeweges von Substitutionsmedikamenten zu sein. Dies kann zur verbesserten Therapiesicherheit beitragen, da der behandelnde Arzt konkrete Anhaltspunkte für die intravenösen Applikation von Substituten bekommt.

Die Kombination eines Zuckernachweises mit den postmortal festgestellten Methadonkonzentrationen erlaubt bei toxikologisch-chemischer Bewertung eine bessere Einordnung der gemessenen Konzentration im Blut der Verstorbenen.

5.4 Ausblick

Sollte der Nachweis von Disacchariden als Marker für einen intravenösen Konsum verbindlichen Eingang in die Praxis finden sind zur Absicherung eines verlässlichen Cut-offs für Lactose und Saccharose weitere Untersuchungen notwendig. Hierbei sind der Einfluss verschiedener Nahrungsmittel und Getränke sowie die Beeinflussung der Aufnahme und Ausscheidung durch verschiedene Erkrankungen und Medikamenteneinnahme interessant.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Die Substitutionstherapie bei opiatabhängigen Patienten wird mit dem Ziel der Entwöhnung vom intravenösen Suchtmittel-Konsum sowie der Verbesserung des Gesundheitszustandes und der Lebensumstände durchgeführt. Neben psychosozialer Betreuung sind Methadon und Buprenorphin für die Opiatentwöhnung und Vermeidung des Auftretens von Entzugssymptomen wichtige Pfeiler der Substitutionstherapie. Der intravenöse und damit risikoreiche Konsum der Medikamente soll in der Therapie vermieden werden. Daher wäre es für den substituierenden Arzt hilfreich, wenn er im Zweifelsfall überprüfen könnte, ob der Patient das Methadon wie vorgesehen auch tatsächlich oral einnimmt.

Leider ist nach wie vor aber auch eine relevante Anzahl Methadon-assoziierter Drogentodesfälle festzustellen. Hierbei besteht bei Todesfällen die Schwierigkeit darin, aufgrund der gemessenen Methadonkonzentrationen in den verschiedenen

Körperflüssigkeiten und Geweben, und der sonstigen Anknüpfungspunkte zu entscheiden, ob das nachgewiesene Methadon tatsächlich todesursächlich war. Ein Hinweis auf den Applikationsweg würde die Interpretation der Befunde erleichtern, da der intravenöse Konsum deutlich höhere Risiken für die tödlichen Nebenwirkungen der Atemdepression birgt.

Aus diesen Gründen waren die Ziele der Arbeit, erstens die These zu prüfen, ob die in Methadonzubereitungen enthaltenen Disaccharide nach intravenöser Aufnahme im Urin ausgeschieden werden, zweitens eine Methode zum Nachweis der Zucker zu entwickeln und zu validieren und drittens somit eine Markersubstanz zu finden, mit deren Hilfe eine orale von einer intravenösen Substitutaufnahme unterschieden werden kann.

Die Entwicklung einer analytischen Methode gestaltete sich schwierig, da die Extraktion der hydrophilen Zucker aus der wässrigen Matrix Urin nicht zufriedenstellend möglich war. Nach Benzoylierung und anschließender flüssig-flüssig Extraktion der derivatisierten Zucker gelang ein quantitativer Nachweis der Disaccharide Lactose und Saccharose und ein qualitativer Nachweis der Abbauprodukte Glucose und Galactose mittels HPLC-DAD. Die Methode wurde für Disaccharide im Konzentrationsbereich von 1-100 mg/L vollständig validiert und die Arbeitshypothese durch die Untersuchung von Patientenproben überprüft. Die Analyse von Urinproben gesunder Probanden nach oraler Aufnahme von Lactose und Saccharose erbrachte keinen positiven Disaccharidnachweis im Urin. Anschließend wurden Urinproben von Patienten des Hamburger „Drob Inn“ untersucht, die in kurzem zeitlichen Abstand vor der Urinprobenabgabe Substitutionsmittel und /oder Heroin intravenös gespritzt hatten. In diesem Kollektiv konnten in allen Fällen Disaccharide im Urin nachgewiesen werden. Somit erschien die Arbeitshypothese bestätigt, dass der Nachweis von Lactose und Saccharose als Marker für einen intravenösen Konsum von Substitutionsmitteln geeignet sein könnte. Daher wurden im Anschluss Lagerungsversuche zur Stabilität der Disaccharide in den Urinproben durchgeführt. Für diese Versuche erwies es sich als Vorteil, dass mit der Methode neben den Disacchariden auch Monosaccharide analytisch erfasst werden konnten, die als Abbauprodukte der Disaccharide entstehen. Die Lagerungsversuche zeigten, dass selbst bei Lagerung der Urinproben über wenige Tage bei Raumtemperatur eine akzeptable Stabilität der Disaccharide gegeben war.

Nach der Bestätigung der Arbeitshypothese und den Lagerungsversuchen galt es, die zeitaufwendige HPLC-Methode zu vereinfachen und eine schnellere und empfindlichere Analytik der Zucker zu erreichen, mit dem Ziel die Methode auch in Routinelabors einsetzen zu können. Daher wurde eine weitere Methode zum Disaccharidnachweis im

Urin mit LC/MS-MS Detektion entwickelt. Hierbei konnte das eingesetzte Probenvolumen um den Faktor 10 reduziert werden und zur Aufreinigung der Urine zeigte sich eine Proteinfällung mit Aceton als ausreichend. Die Disaccharide Lactose und Saccharose wurden im MS-MS-Modus als Formiataddukte detektiert und über Saccharose d2 als internem Standard quantifiziert. Diese Methode wurde ebenfalls für Konzentrationen zwischen 1 und 100 mg/L vollständig validiert.

Weitere Urinproben von Besuchern des „Drob Inn“ wurden untersucht, diesmal mit der Fragestellung, wie lange nach i.v.- Konsum Disaccharide im Urin nachweisbar sind. Dazu gaben die Probanden je eine Urinprobe vor und nach dem intravenösen Konsum ab. Mittels eines Fragebogens wurden die zeitlichen Abstände der Urinabgaben zum letzten und aktuellen Konsum sowie die intravenös konsumierten Substanzen erfragt. Hierbei zeigte sich, dass der Disaccharidnachweis bis zu mehreren Stunden nach i.v.- Konsum möglich ist.

Ebenfalls wurden Urinproben eines weiteren Kontrollkollektivs untersucht. Hierbei sollte überprüft werden, ob nach oraler Aufnahme größerer Mengen von Disacchariden aus der Nahrung (Schokolade, Coca-Cola®) diese im Urin nachweisbar sind. Hierbei wurde insbesondere nach dem Genuss von Coca-Cola® Saccharose bis zu einer Konzentration von knapp 40 mg/L im Urin nachgewiesen. Daher wird die Anwendung eines vorläufigen Arbeits-Cut-offs für Disaccharide im Urin von 40 mg/L empfohlen, um falsch- positive Ergebnisse zu verhindern. Auch bei entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sind „falsch-positive“ Disaccharidbefunde im Urin zu erwarten, so dass für diesen Personenkreis diese Untersuchungsmethode nicht durchgeführt werden darf. Da der empfohlene vorläufige Cut-off noch nicht ausreichend über große Kollektive von substituierten Patienten untersucht wurde, gelten die eben genannten Einschränkungen auch für Patienten, die nicht-steroidale Antiphlogistika einnehmen. Die Therapie mit diesen Wirkstoffen kann ebenfalls zu einer Schädigung der Dünndarmmukosa und somit zu erhöhter Durchlässigkeit für Disaccharide führen.

Neben den Urinproben lebender Drogenkonsumenten wurden Urin- und Blutproben Methadon- und Buprenorphin-assoziiierter Drogentodesfälle der Jahre 2007-2012 untersucht. Bei den untersuchten Urinproben waren in 70 % der Fälle Disaccharide oberhalb des vorgeschlagenen Cut-offs nachweisbar. In den untersuchten Blutproben konnten hingegen keine Disaccharide nachgewiesen werden. Auch hier wären in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig, um Erkenntnisse über Nachweisbarkeitsdauer und Abbauvorgänge bei längeren Leichenliegezeiten zu erlangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Nachweis von Disacchariden im Urin grundsätzlich geeignet erscheint, Hinweise auf den Applikationsweg von Substitutionsmedikamenten zu liefern. Bei den Untersuchungen lebender Drogenkonsumenten war der Nachweis der Zucker mehrere Stunden nach intravenöser Aufnahme möglich. Einschränkungen der Anwendbarkeit bei chronisch gastrointestinal erkrankten Personen sind dabei dringend zu beachten. Bei Drogentodesfällen kann der erhobene Disaccharidbefund im Kontext mit weiteren Informationen wie der Auffindsituation des Verstorbenen, Opiatabhängigkeit und -Gewöhnung die Bewertung der Methadon- oder Buprenorphin-Konzentration im Blut erleichtern.

6.2 Summary

The baseline goal for opiate maintenance treatment (OMT) is weaning patients off their intravenous misuse, as well as improving their health and living conditions. In addition to psycho-social care, other pillars of the substitution therapy are the use of methadone and buprenorphine to wean patients off opiates and pre-empt withdrawal symptoms.

Intravenous and therefore risky consumption of the substitution medicines should be avoided. Therefore, it would be helpful if the methadone-prescribing physicians could verify – in case of doubt – whether the patient is consuming the methadone orally, as required.

Unfortunately, still a large number of methadone-associated deaths occur. In many cases, it is difficult to determine based on the measured concentration of methadone in body fluids and tissues if the methadone was cause of death or other factors. An indication of how the methadone was applied could make it easier to interpret the measured results since intravenous consumption bears much higher risks of lethal side effects (such as respiratory depression) than oral consumption.

Therefore, the aim of my doctor thesis was to 1) examine the hypothesis that intravenously injected disaccharides in methadone preparations are excreted in the urine; 2) develop a method to detect and validate the sugars; and 3) to verify, if carbohydrates are applicable as marker substance to distinguish oral from intravenous consumption of substitution drugs.

Developing an analytical method proved difficult as it was not possible to extract the hydrophilic sugars from the hydrophilic matrix urine in a satisfactory manner. But benzoylisation and subsequent liquid/liquid extraction of the derivatised sugars led to quantitative evidence of the disaccharides lactose and sucrose and to qualitative evidence of the by-products glucose and galactose via HPLC-DAD. The method was

completely validated for disaccharides of the concentration 1 to 100mg/L, and the working hypothesis was verified by examining patient samples.

The analysis of urine samples given by healthy test persons after they had orally consumed lactose and sucrose did not result in any positive evidence of disaccharides in their urine. Subsequently, urine samples were examined that belonged to patients of Hamburg's „Drob Inn“ who had injected substitution drugs or heroine intravenously shortly before giving the urine sample. In all of these cases, disaccharides could be found in the urine, which appeared to confirm the working hypothesis that the evidence of lactose and sucrose could serve as a marker for intravenous consumption of substitution substances. Storage tests were then conducted to examine the stability of disaccharides in urine samples. It proved to be an advantage that this method analytically captures not only disaccharides but also monosaccharides, which emerge as a by-product of disaccharides. The storage tests demonstrated that even when stored for several days at room temperature, the disaccharides were acceptably stable.

After confirming the working hypothesis and conducting storage tests, the next step was to simplify the time-consuming HPLC-method and develop a faster and more sensitive analysis for sugars so that the method could be applied in routine laboratories, too. Thus, an additional method was developed to find evidence of disaccharides in urine using LC/MS-MS detection. For this method, the sample volume used could be reduced by the factor 10, and a protein precipitation using acetone proved sufficient for the urine purification. The disaccharides lactose and sucrose were detected as formiate adducts using the MS-MS-mode and quantified using sucrose d2 as internal standard. This method was also validated for concentrations between 1 and 100mg/L.

Further urine samples of „Drob Inn“-patients were examined to find out how long after intravenous consumption, disaccharides are still measurable in the urine. The test persons gave one urine sample before and one after intravenously consuming substitution drugs. A questionnaire was used to record the substances consumed intravenously as well as the time lag between the urine sample and the consumption immediately beforehand and the consumption prior to giving the sample. It became clear that evidence of disaccharides can be found up to several hours after the intravenous drug consumption.

The urine samples of a control group were examined in order to verify whether disaccharides that had been consumed orally through food or beverages (chocolate, Coca Cola) could be detected in the urine. Sucrose could be found up to a concentration

of nearly 40mg/L in the urine, particularly after the test persons had consumed Coca Cola. It is recommendable to use a preliminary cut-off of 40mg/L for disaccharides in urine to make sure that false-positive results are avoided.

For persons suffering from an inflammatory disorder of the gastrointestinal tract, such „false-positive results” related to disaccharides in the urine are to be expected, too. Thus, the method should not be used for them. As the recommended cut-off has not yet been tested sufficiently on large groups of substituting patients, the above-mentioned restrictions apply also for patients taking non-steroidal anti-rheumatic drugs. A therapy using these substances could harm the small intestine mucosa and thereby lead to an increased penetrability of disaccharides.

In addition to testing the urine samples of living drug consumers, urine and blood samples belonging to people whose death had been associated with methadone and buprenorphine in the years 2007 to 2012 were examined, too. In 70% of the urine samples, there was evidence of disaccharides above the recommended cut-off. No evidence of disaccharides could be found in the examined blood samples, though. It will be necessary to conduct additional tests in the future to gain a better understanding of the degradation of substances and of how long they remain verifiable in the cadaver.

As a summary, it can be said that the evidence of disaccharides in the urine seems principally suitable to yield an indication of how the substitution drug was applied. For living drug consumers, evidence of sugars could still be found several hours after their intravenous consumption. It is important to note that the method may not be applicable for patients with a chronic gastrointestinal disorder due to the restrictions explained above. For drug related deaths, examining disaccharides can help to interpret methadone or buprenorphine concentration in their blood, always taking into account other possible elements, such as conditions when the corpse found or the degree to which the person had been dependent on or accustomed to opiates.

Literaturverzeichnis

1. **Bundesärztekammer.** Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der substituionsgestützten Behandlung Opiatabhängiger. 2010.
2. **Ward, J., Hall, W. und Mattick, R.** Role of maintenance treatment in opioid dependence. *The Lancet*. 1999, Bd. 353, S. 221-226.
3. **Musshoff, F., Lachenmeier, D.W. und Madea, B.** Methadone substitution: medicolegal problems in Germany. *Forensic Science International*. 2003, Bd. 133, S. 118-124.
4. **Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker.** Viskositätserhöhung bei Methadon-Rezepturen zur Heroinsubstitution, Information 99/12/2006. *Pharmazeutische Zeitung* . 2006, Bd. 151, S. 1067.
5. **Bundesregierung, Die Drogenbeauftragte der.** *Drogen- und Suchtbericht*. 2015. S. 241-244.
6. **Grochow, L., Sheidler, V., Grossman, S., Green, L., Enterline, J.** Does intravenous methadone provide longer lasting analgesia than intravenous morphine? A randomized, double-blind study. *Pain*. 1989, Bd. 38, S. 151-157.
7. **Baselt, R. C.** *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 10. s.l. : Biomedical Publications, 2014. S. 298-300; 1257-1261. Buprenorphin, Methadon.
8. **Hexal AG.** *Fachinformation Methaddict*. 2013.
9. **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH.** *Fachinformation L-Polamidon Lösung zur Substitution*. 2014.
10. **Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., Schmoldt, A.** Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*. 2012, Bd. 16, R136.
11. **Hein, H., Püschel, K., Schaper, A., Iwersen-Bergmann, S.** Akzidentelle Methadoneinnahme durch Kinder - Gedanken zur Verbesserung der Prävention. *Archiv für Kriminologie*. 2016, Bd. 237, S. 38-46.
12. **Eap, C.B, Broly, F., Mino, A., Hämmig, R., Déglon, JJ., Uehlinger, C., Meili, D., Chevalley, AF., Bertschy, G., Zullino, D.; Kosel, M., Preisig, M., Baumann, P.**

Cytochrom P450 2D6 genotype and methadone steady-state concentrations. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2001, Bd. 21, 2, S. 229-234.

13. **Indivior UK Limited**. *Fachinformation Subutex*. 2015.

14. **Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Ruth, P., Schäfer-Korting, M.** *Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2008. S. 232.

15. **Rote Liste Service, GmbH**. Rote Liste online. www.rote-liste.de. [Online] [Zitat vom: 04. 10 2016.] <http://online.rote-liste.de/suche/buprenorphin>.

16. **ABDA - Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände**.

Methadonhydrochloridlösung 5mg/ml / 10 mg/ml (NRF 29.1) & Levomethadonhydrochloridlösung 2,5 mg/ml (NRF 29.4). *Deutscher Arzneimittelcodex / Neues Rezeptur-Formularium*. Eschborn : Govi-Verlag, 2014, Mittel zur Opiatsubstitution 29.1 & 29.4.

17. **Servais, D**. Methadontrinklösung- Problematik der intravenösen Applikation. *Deutsches Ärzteblatt*. 1999, Bd. 96, Heft 15, S. A988-992.

18. **Darke, S., Ross, J. und Hall, W.** Prevalence and correlates of the injection of methadone syrup in Sydney, Australia. *Drug and Alcohol Dependence*. 1996, Bd. 43, S. 191-198.

19. **Humeniuk, R., Ali, R., McGregor, C., Darke, S.** Prevalence and correlates of intravenous methadone syrup administration in Adelaide, Australia. *Addiction*. 2003, Bd. 98, S. 413-418.

20. **Scheidegger, C., Pietrzak, J. und Frei, R.** Disseminated Candidiasis after intravenous use of oral methadone. *Annals of Internal Medicine*. 1991, Bd. 115, 7, S. 576.

21. **Jensen, S. und Gregersen, M.** Fatal poisoning with intravenously injected methadone and no fresh injection marks found. *International Journal of Legal Medicine*. 1991, Bd. 104, S. 299-301.

22. **Waldvogel, D., Figner, B. und Eich, D.** Illicit methadone injecting during methadone maintenance treatment in a specialised out-patient clinic. *Swiss Medical Weekly*. 2005, Bd. 135, S. 644-646.

-
23. **Iwersen-Bergamnn, S., Toennes, S.W. und Kauert, G.F.** Entgegen dem bundesweiten Trend - Die Frankfurter Drogentodesfälle 2003- 2006. *Hessisches Ärzteblatt*. 2007, Bd. 6, S. 363-367.
24. **Eap, C.B., Felder, C., Powell Golay, K., Uehlinger, C.** Increase of oral methadone dose in methadone injecting patients: A pilot study. *Journal of Addictive Diseases*. 2003, Bd. 22, 3, S. 7-17.
25. **Reimer, J., Schulte, B., Thane, K., Wickert, C.** http://www.zis-hamburg.de/fileadmin/ZIS_HH-SuMi-Folgestudie-Kurzzusammenfassung.pdf. [Online] 2009. [Zitat vom: 20. 07 2016.] www.zis-hamburg.de.
26. **Judson, G., Bird, R., O`Connor, P., Bevin, T., Loan, R., Schroder, M., McGrath, R., Weatherall, M., Moriarty, H., Robinson, G** Drug injecting in patients in New Zealand Methadone Maintenance Treatment programs: An anonymos survey. *Drug and Alcohol Review*. 2010, Bd. 29, S. 41-46.
27. **Bezant, E. M.** Use of intramuscularmethadone in managing intravenous drug abuse. *BMJ Case Rep*. 2014, Bd. Nov 20.
28. **Grochow, L., Sheidler, V., Grossman, S., Green, L., Enterline, J.** Does intravenous methadone provide longer lasting analgesia than intravenous morphine? A randomized, double-blind study. *Pain*. August 1989, Bd. 38, 2, S. 151-157.
29. **Zeltner, T. B., Nussbaumer, U., Rudin, O., Zimmermann, A.** Unusual pulmonary vascular lesions after intravenous injections of microcrystalline cellulose - A complication of pentazocine tablet abuse. *Virchows Archiv. European Journal of Pathology*. 1982, Bd. 395, S. 207-216.
30. **Lamb, D. und Roberts, G.** Starch and talc amboli in drug addicts' lungs. *Journal of Clinical Pathology*. 1972, Bd. 25, S. 876-881.
31. **Vevaina, J. R., Civantos, F., Viamonte, M., Avery, W. G.** Emphysema associated with talcum granulomatosis in a drug addict. *Southern Medical Journal*. 1974, Bd. 67, 1, S. 113-115.
32. **Low, S. U. und Nicol, A.** Talc induced pulmonary granulomatosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2006, Bd. 59, S. 223.
33. **Tomashefski Jr., J. F. und Felo, J. A.** The pulmonary pathology of illicit drug and substance abuse. *Current Diagnostic Pathology*. 2004, Bd. 10, S. 413-426.

34. **Püschel, K. und Schoof, W.** Zur Morphogenese hämatogen entstandener Fremdkörpergranulome im Lungengewebe. *Beiträge zur gerichtlichen Medizin*. 1987, Bd. 45, S. 121-128.
35. **Püschel, K.** Fremdkörpergranulome nach i.v. Drogenapplikation. *Beiträge zur Pathologie*. 1986, Bd. 102, S. 400-401.
36. **European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.** *European Drug report 2013, Trends and developments*. 2013. S. 51-52.
37. **Heinemann, A., Ribbat, J., Püschel, K., Iwersen, S., Schmoldt, A.** Methadone-related fatalities in Hamburg 1990-1999: implications for quality standards in maintenance treatment? *Forensic Science International*. 2000, Bd. 113, S. 449-455.
38. **Iwersen-Bergmann, S., Jungen, H., Andresen-Streichert, H., Müller, A., Elakkary, S., Püschel, K., Heinemann, A.** Intravenous methadone application as a serious risk factor for an overdose death: methadone-related fatalities in Hamburg from 2007 to 2012. *International Journal of Legal Medicine*. 2014, Bd. 128, S. 751-764.
39. **Heinemann, A., Ribbat, J., Püschel, K., Iwersen, S., Schmoldt, A.** Rauschgifttodesfälle mit Methadonbeteiligung (Hamburg 1990-1996). *Rechtsmedizin*. 1998, Bd. 8, S. 55-60.
40. **Aronow, R., Shashi, D.P. und Woolley, P.V.** Childhood Poisoning An Unfortunately Consequence of Methadone Availability. *The Journal of the American Medical Association*. 1972, Bd. 219, 3, S. 321-324.
41. **Iwersen-Bergmann, S., Schmoldt, A., Püschel, K., Schulz, M.** Vergiftungs- und Todesfälle durch Substitutionsmittel im Umfeld von substituierten Drogenabhängigen. *Rechtsmedizin*. 1999, 9, S. 90-93.
42. **Bundeskriminalamt.** *Rauschgiftkriminalität Bundeslagebild 2014*. 2014.
43. **Pilgrim, J.L., McDonough, M. und Drummer, O.H.** A review of methadone deaths between 2001-2005 in Victoria, Australia. *Forensic Science International*. 2013, Bd. 226, S. 216-222.
44. **Milroy, C.M. und Forrest, A. R. W.** Methadone deaths: a toxicological analysis. *Journal of Clinical Pathology*. 2000, Bd. 53, S. 277-281.
45. **Launonen, E., Alho, H., Kotovirta, E., Wallace, I., Simojoki, K.** Diversion of opioid maintenance treatment medications and predictors for diversion among Finnish

- maintenance treatment patients. *International Journal of Drug Policy*. 2015, Bd. 26, S. 875-882.
46. **Nelson, D. und Cox, M.** Lehninger Biochemie. 3. Auflage. Berlin : Springer- Verlag, 2005, S. 309-317.
47. Pharmazeutische Stoffliste. 19. Eschborn : ABDATA Pharma-Daten-Service, 2015.
48. **Thews, G., Mutschler, E. und Vaupel, P.** Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart : wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999, S. 378.
49. **Drozdowski, Laurie A und Thomson, Alan BR.** Intestinal sugar transport. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, Bd. 12, S. 1657-1670.
50. **Gray, G. und Ingelfinger, F.J.** Intestinal Absorption of Sucrose in Man: Interrelation of Hydrolysis and Monosaccharide Product Absorption. *Journal of Clinical Investigation*. 1966, Bd. 45, 3, S. 388-398.
51. **Wright, E. M., A., Hirayama B. und Loo, D. F.** Active sugar transport in health and disease. *Journal of Internal Medicine*. 2007, 261, S. 32-43.
52. **Cox, M. A., Lewis, K.O. und Cooper, B.T.** Sucroseemia in Untreated Celiac Disease- A Potential Screening Test. *Digestive Diseases and Sciences*. 1998, Bd. 43, 5, S. 1096-1101.
53. **Kawabata, H., Meddings, J.B., Uchida, Y., Matsuda, K., Sasahara, K., Nishioka, M.** Sucrose permeability as a means of detecting diseases of the upper digestive tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1998, 13, S. 1002-1006.
54. **Wyatt, J., Oberhuber, G., Pongratz, S., Puspok, A., Moser, G., Novacek, G., Lochs, H., Vogelsang, H.** Increased Gastric and Intestinal Permeability in Patients with Crohn´s Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 1997, Bd. 92, 10, S. 1891-1897.
55. **Dörner, K.** Gastrointestinale Labordiagnostik. *Klinische Chemie und Hämatologie*. 5. Auflage. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2003.
56. **Sutherland, L.R., Verhoef, M., Wallace, J.L., Van Rosendaal, G., Crutcher, R., Meddings, J.B.** A simple, non-invasive marker of gastric damage: sucrose permeability. *The Lancet*. 1994, Bd. 343, S. 998- 1000.

57. **Hessels, J., Eidhof, H. H.M., Steggink, J., Roeloffzen, W. W.H., Wu, K., Tan, G., van de Stadt, J., van Bergeijk, L.** Assessment of Hypolactasia and Site- Specific Intestinal Permeability by Differential Sugar Absorption of raffinose, Lactose, Sucrose and Mannitol. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2003, Bd. 41, 8, S. 1056-1063.
58. **Sanz, M.L. und Martinez-Castro, I.** Recent development in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1153, S. 74-89.
59. **Davison, P.K. und Young, R.** Gas chromatography of carbohydrates The quantitative determination of the free sugars of plants as thier trimethyl sliyl ethers. *Journal of chromatography*. 41, 1969, S. 12-21.
60. **Sassak, G. L., Souza, L.M., Serrato, R.V., Cipriani, T. R** Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. *Journal of chromatography A*. 1208, 2008, S. 215-222.
61. **Fusch, G., Choi, A., Rochow, N., Fusch, C.** Quantification of lactose content in human and cow´s milk using UPLC-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011, 879, S. 3759-3762.
62. **Hessels, J., Snoeyink, E.J.M., Platenkamp, A.J., Voortman, G., Steggink, J., Eidhof, H.H.M** Assessment of Intestinal Permeability: Enzymatic Determination of Urinary Mannitol, Raffinose, Sucrose and Lactose on Hitachi Analyzer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2003, Bd. 41, 1, S. 33-38.
63. **Schmitt, G., Herbold, M und Peters, F.** VALISTAT-Software for method validation in Forensic Toxikology. *Toxichem Krimtech*. 78, 2011, S. 392-395.
64. **Rücker, G.** UV-VIS-Spektroskopie. [Buchverf.] G. Rücker, M, Neugebauer und G. Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 4. Auflage. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2008, S. 124.
65. **Galensa, R.** Hochleistungs-flüssigchromatographische Bestimmung von Zuckeralkoholen mit UV-Detektion im ppm- Bereich in Lebensmitteln. I. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung*. 1983, 176, S. 417-420.

- 66.. **Galensa, R.** Hochleistungs-flüssigchromatographische Bestimmung von Kohlenhydraten mit UV-Detektion im ppm-Bereich in Lebensmitteln II. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 178, 1984, S. 199-202.
67. **Jungen, H., Andresen-Streichert, H., Müller, A., Iwersen-Bergmann, S.** Monitoring Intravenous Abuse of Methadone or Buprenorphine in Opiat Maintenance Treatment (OMT): A Simple and Fast LC-MS-MS Method for the Detection of Disaccharides in Urine Samples. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016, Bd. 1, 10, S. 1-10.
68. Milka-Schokolade. [Online] [Zitat vom: 06. 10 2016.]
<https://www.milka.de/produkte/Milka%20Tafeln%2087g%20%e2%80%93%20100g/Milka%20Alpenmilch?p=128&provider={D193998A-4A6D-4EA5-BAA8-209357B27A09}&categoryId=1395>.
69. Rittersport Schokolade. [Online] [Zitat vom: 06. 10 2016.] <http://www.rittersport.de/de/produkte/detail/Edel-Vollmilch-00001>.
70. **Peters, F.T., Hartung, M., Herbold, M., Schmitt, G.** Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang B. *Toxichem Krimtech*. 2009, 76, S. 185-208.
71. **Dörner, K.** Niere, Urinstatus. [Buchverf.] Klaus Dörner. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2003, S. 421.
72. **Ledl, F und Schleicher, E.** Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angewandte Chemie*. 1990, Bd. 102, S. 597- 626.
73. **Sengl, M., Ledl, F und Severin, T.** Maillardreaktion von Rinderserumalbumin mit Glucose Hochleistungsflüssigkeit- chromatographischer Nachweis des 2-Formyl-5-(Hydroxymethyl)Pyrrolo-1-Norleucins nach alkalischer Hydrolyse. *Journal of Chromatography*. 1989, Bd. 463, S. 119-125.
74. **Wei, Y. und Ding, M.-Y.** Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 2000, Bd. 904, S. 113-117.
75. **Katayama, M., Matsuda, Y., Kobayashi, K., Kaneko, S., Ishikawa, H.** Simultaneous determination of glucose, 1,5-anhydro-D-glucitol and related sugar

alcohols in serum by high-performance liquid chromatography with benzoic acid derivatization. *Biomedical Chromatography*. 2006, Bd. 20, S. 440-445.

76. **Cox, Mark A., Iqbal, T. H., Cooper, B. T., Lewis, K. O.** An analytical method for the quantitation of mannitol and disaccharides in serum: a potentially useful technique in measuring small intestine permeability in vivo. *Clinica Chimica Acta*. 1997, Bd. 263, S. 197-205.

77. **Yoa-Pu Hu, O., Hu, T.-M. und Tang, H.-S.** Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: Comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995, Bd. 84, 2, S. 231-235.

78. **White, C.A., Kennedy, J.F. und Golding, B.T.** Analysis of derivatives of carbohydrates by high-pressure liquid chromatography. *Carbohydrate Research*. 1979, Bd. 76, S. 1-10.

79. **Thompson, R. M.** Analysis of mono- and disaccharides by high-performance liquid chromatography of the benzyloxime-perbenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography*. 1978, Bd. 166, S. 201-212.

80. **Petchey, M.I und Crabbe, M. James C.** Analysis of carbohydrate in lens, erythrocytes, and plasma by high-performance liquid chromatography of nitrobenzoate derivatives. *Journal of Chromatography*. 1984, Bd. 307, S. 180-184.

81. **Zhu, X. und Sato, T.** The distinction of underivatized monosaccharides using electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007, Bd. 21.

82. **Si, D., Zhong, D. und Liu, C.** Screening for in vivo metabolites of isovalertatin family oligosaccharides in rats by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, 20, S. 3385-3392.

83. **Antonio, C., Larson, T., Gilday, A., Graham, I., Bergström, E., Thomas-Oates, J.** Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis Thaliana* leaf tissue. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2008, 22, S. 1399-1407.

84. **Huckenbeck, W. und Bonte, W.** Alkoholologie- bakterielle Genese der Fäulnis. [Buchverf.] B. Madea und B. Brinkmann. *Handbuch gerichtliche Medizin 2*. Berlin : Springer Verlag, S. 475- 477.
85. **Smecuol, E., Bai, J.C., Vazquez, H., Niveloni, S., Pedreira, S., Maurino, C., Meddings, J.** Acute gastrointestinal permeability responses to different non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut*. 2001, Bd. 49, S. 650-655.
86. **McCloy, R.F., Greenberg, G.R. und Baron, J.H.** Duodenal pH in health and duodenal ulcer disease: effect of a meal, Coca.Cola, smoking, and cimetidine. *Gut*. 1984, Bd. 25, S. 386-392.
87. **Johnson, B. und Richert, T.** Diversion of Methadone and Buprenorphine from opioid substitution treatment: The importance of patients´attitudes and norms. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2015, Bd. 54, S. 50-55.
88. www.welt.de. [Online] 07. 08 2008. [Zitat vom: 22. 12 2016.]
https://www.welt.de/welt_print/article2281187/Handel-mit-Methadon-Arzt-zu-drei-Jahren-Haft-verurteilt.html.
89. www.deutsche-apotheker-zeitung.de. [Online] 18. 03 2013. [Zitat vom: 22. 12 2016.]
<https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2013/az-12-2013/wenn-ein-arzt-methadon-mitgibt-kann-er-die-approbation-verlieren>.
90. **Jungen, H., Andresen-Streichert, H., Mueller, A., Iwersen-Bergmann, S** Disaccharides in urine samples as markers for intravenous abuse of methadone and buprenorphine. *Journal of Analytical Toxikology*. 2013, Bd. 37, S. 652-658.
91. **Musshoff, F., Trafkowski, J., Lichtermann, D., Madea, B.** Comparison of urine results concerning co-consumption of illicit heroin and other drugs in heroin and other drugs in heroin and methadone maintenance programs. *International Journal of Legal Medicine*. 2010, Bd. 124, S. 499-503.
92. **Laberke, P.J. und Bartsch, C.** Trends in methadone-related deaths in Zurich. *International Journal of Legal Medicine*. 2010, Bd. 124, S. 381-385.
93. **Caplehorn, J.R.M. und Drummer, O.H.** Methadone dose and post-mortem blood concentrations. *Drug and Alcohol Review*. 2002, Bd. 21, S. 329-333.

94. **Waldvogel, D. und Uehlinger, C.** Zur Häufigkeit der Injektion von Methadon-
Trinklösungen an einem Behandlungszentrum für Opiatabhängige. *Fortschritte der
Neurologie - Psychiatrie*. 1999, Bd. 67, S. 281-283.
95. **Tucker, D., Milloy, M.-J., Hayashi, K., Nguyen, P., Kerr, T., Wood, E.** Factors
associated with illicit methadone injecting in a Canadian setting. *The American Journal
on Addictions*. 2015, Bd. 24, S. 532-537.
96. **Videl-Trecan, G., Varescon, I., Nabet, N., Boissonnas, A.** Intravenous use of
prescribed sublingual buprenorphine tablets by drug users receiving maintenance
therapy in France. *Drug and Alcohol Dependence*. 2003, Bd. 69, S. 175-181.
97. **Cicero, T.J., Ellis, M.S., Surratt, H.L., Kurtz, S.P.** Factors contributing to the rise of
buprenorphine misuse: 2008-2013. *Drug and Alcohol Dependence*. 142, 2014, S. 98-
104.
98. **Aalto, M., Halme, J., Visapää, J.-P., Salaspuro, M.** Buprenorphine Misuse in
Finland. *Substance Use & Misuse*. 42, 2007, S. 1027-1028.
99. **Dörner, K., Battista, H.-J., Deufel, T., Dörner, R., Gibitz, H.J., Klingmüller, D.,
Löffler, H., Sommer, R., Witt, I.** Kohlenhydratstoffwechsel, Glucose im Blut. [Buchverf.]
K. Dörner. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2003,
S. 135-139.

weitere Quellen

100. **Jungen, H, Andresen-Streichert, H., Mueller, A., Iwersen-Bergmann, S.**
Disaccharidnachweis im Urin: geeignete Markersubstanzen für den intravenösen
Substitutkonsum? *ToxichemKrimtech*. 2013, Bd. 80 (Special Issue), S. 270-274.
101. **Reimer, J.** www.zis.hamburg.de. *Zentrum für interdisziplinäre Suchtforschung der
Universität Hamburg*. [Online] 2011. [http://www.zis-hamburg.de/fileadmin/ZIS_HH-SuMi-
Folgestudie-Kurzzusammenfassung.pdf](http://www.zis-hamburg.de/fileadmin/ZIS_HH-SuMi-Folgestudie-Kurzzusammenfassung.pdf).
102. **Stuhlfauth, K., Hofmann, E. und Heinz, F.** Lactosämie und Lactosurie vor und
nach Lactosebelastung. *Klinische Wochenschrift*. 1962, Bd. 40, 22, S. 1151-1153.
103. **Weicker, H., Schönthal, H. und Renschler, H.E.** Über physiologische Glucose-
Ausscheidung im Urin von Stoffwechsel-Gesunden. *Klinische Wochenschrift*. 1963, Bd.
41, 4, S. 201.

104. **Bundeskriminalamt.** www.bka.de. [Online] 2010. [Zitat vom: 22. 07 2016.]
http://www.bka.de/nn_193372/SharedDocs/Downloads/DE/Publikationen/JahresberichteUndLagebilder/Rauschgiftkriminalitaet/2010RauschgiftJahreskurzlageZ,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/2010RauschgiftJahreskurzlageZ.pdf.
105. **Iwersen-Bergmann, S., Schmoldt, A., Püschel, K., Schulz, M.** Vergiftungs-und Todesfälle durch Substitutionsmittel im Umfeld von substituierten Drogenabhängigen. *Rechtsmedizin.* 1999, Bd. 9, S. 90-93.
106. **Pirnay, S., Borron, S.W., Giudicelli, C.P., Tourneau, J., Baud, F.J., Ricordel, I.** A critical review of the causes of death among post-mortem toxicological investigations: analysis of 34 buprenorphine-associated and 35 methadone-associated deaths. *Addiction.* 2004, Bd. 99, S. 978-988.
107. **Soyka, M., Apelt, S.M., Lieb, M., Wittchen, H.-U.** One-year mortality rates of patients receiving methadone and buprenorphine maintenance therapy - a nationally representative cohort study in 2694 patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology.* 2006, Bd. 26, 6, S. 657-660.
108. **Wittchen, Apelt, S.M., Soyka, M., Gastpar, M., Backmund, M., Gölz, J., Kraus, M.R., Tretter, F., Schäfer, M., Siegert, J., Scherbaum, N., Rehm, J., Bühringer, G.** Feasibility and outcome of substitution treatment of heroin-dependent patients in specialized substitution centers and primary care facilities in Germany: A naturalistic study in 2694 patients. *Drug and Alcohol Dependence.* 2008, Bd. 95, S. 245-257.
109. **Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung.** Drogen-und Suchtbericht der Drogenbeauftragten der Bundesregierung. <http://www.drogenbeauftragte.de>. [Online] Mai 2012. http://drogenbeauftragte.de/fileadmin/dateien-dba/Presse/Downloads/12-05.22_DrogensuchtBericht_2012.pdf.
110. **ABDA - Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (eds).** Viskose Grundlösung (NRF S.20.). *Deutscher Arzneimittel-Codex/Neues Rezeptur- Formularium.* Eschborn : Govi- Verlag, 2009, Stammzubereitungen S.20., S. 1-6.
111. **Richert, T. und Johnson, B.** Illicit use of methadone and buprenorphine among adolescents and young adults in Sweden. *Harm Reduction Journal.* 2013, Bd. 10, 27.
112. **Bundeskriminalamt.** *Rauschgiftkriminalität Bundeslagebild 2014- Tabellenanhang.* 2014.

-
113. **Bezant, E.M.** Use of intramuscular methadone in managing intravenous drug abuse. *BMJ Case Report*. 2014.
114. **Thews, G., Mutschler, E. und Vaupel, P.** Blut. *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999, S. 109.
115. **Koehler, A.E., Rapp, I. und Hill, E.** The Nutritive Value of Lactose in Man. *The Journal of Nutrition*. 1935, Bd. 9, 6, S. 715-724.
116. **Gauchel, G., Huppertz, B.; Feiertag, H.; Keller, R.** Clinical use of polyethylene glycols as marker substances and determination in Urine by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2002, Bd. 787, S. 271-279.
117. **Huppertz, B., Feiertag, H., Keller, R.** Urine labeling with orally applied marker substances in drug substitution therapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2004, Bd. 42, 6, S. 621-626.
118. **Somogyi, M.** A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *The Journal of Biological Chemistry*. 1930, Bd. 86, 2, S. 655-663.
119. **Musshoff, F., Lachenmeier, K., Lichtermann, D., Medea, B.** Cocaine and opiate concentrations in hair from subjects in a heroin maintenance program in comparison to a methadone substituted group. *International Journal of Legal Medicine*. 2009, Bd. 123, S. 363-369.

Gefahrstoffe

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel wurden für die vorliegende Arbeit verwendet und waren nach der GHS (EG-CLP-Verordnung Nr. 1272/2008) gekennzeichnet:

Substanz	Gefahren-Piktogramme*	H-Sätze	P-Sätze
Acetanhydrid	GHS02, GHS05, GHS07	226, 302, 332, 314	210, 280, 303, 361, 353, 305, 351, 338, 310
Aceton	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233, 305, 351, 338
Acetonitril	GHS02, GHS07	225, 302, 312, 332, 319	210, 305, 351, 338, 403, 235
Ameisensäure	GHS02, GHS05	226, 314	260, 280, 301, 330, 331, 305, 351, 338, 309, 310
Ammoniak 25 %	GHS05, GHS07, GHS09	314, 335, 400	280, 273, 301, 330, 331, 305, 351, 338, 309, 310
Benzoylchlorid	GHS05, GHS07	302, 312, 332, 314, 317	280, 301, 330, 331, 302, 352, 305, 351, 338, 309, 310
1,4-Butandiol	GHS07	302, 336	261
Dichlormethan	GHS08	351	281, 308, 313
Essigsäure 100% (Eisessig)	GHS02, GHS05	226, 314	280, 301, 330, 331, 307, 310, 305, 351, 338
Ethylacetat	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 240, 305, 351, 338
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 301, 370	210, 233, 280, 302, 352, 309, 310
Natriumhydroxid	GHS05	290, 314	280, 301, 330, 331, 305, 351, 338, 309, 310
n-Pentan	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	225, 304, 336, 411	273, 301, 310, 331, 403, 253
Salzsäure	GHS05, GHS07	314, 335, 290	280, 301, 330, 331, 309, 310, 305, 351, 338
tert.-Butylmethylether	GHS02, GHS07	225, 315	210, 302, 352
Tetrahydrofuran	GHS02, GHS07, GHS08	225, 319, 335, 351	210, 305, 351, 338, 308, 313, 403, 233

*Die verwendeten Abkürzungen stehen für folgende Piktogramme:



Explodierende Bombe
GHS01



Gasflasche
GHS04



Ausrufezeichen
GHS07



Flamme
GHS02



Ätzwirkung
GHS05



Gesundheitsgefahr
GHS08



Flamme über einem Kreis
GHS03



Totenkopf mit
gekreuzten Knochen
GHS06



Umwelt
GHS09

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 10. Oktober 2016

(Hilke Jungen)