

# **Anwendungen der HPLC-Triple Quadrupol Massenspektrometrie in der forensischen und klinischen Toxikologie bei der Analytik von Opioiden**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jens Trafkowski

aus

Köln

Bonn 2008



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschluschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

1. Referent: Prof. Dr. B. Madea  
2. Referent: Prof. Dr. K.-J. Steffens  
Tag der Promotion: 22.08.2008  
Erscheinungsjahr: 2009



*Meinen Eltern, Großeltern und allen Menschen in meinem  
Leben, die meinen Namen tragen und noch tragen werden*



**Die Gelegenheit bedarf eines bereiten Geistes.**

*L. Pasteur*



## Zusammenfassung

In der modernen toxikologischen Analytik sind chromatographische Verfahren nicht mehr wegzudenken. Bereits seit über zwei Jahrzehnten spielen dabei die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und die Gaschromatographie (GC), letztere meist mit Massenspektrometern (MS) gekoppelt, die wichtigste Rolle für die qualitative und quantitative Bestimmung kleinster Mengen von unterschiedlichen Wirkstoffen. Durch die Kopplung von HPLC und MS erschließen sich vielfältige neue Möglichkeiten, sowohl in Bezug auf das Spektrum der Analyten, welches mit einem einzigen Gerät erfasst werden kann, als auch auf die Empfindlichkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Vorteile der HPLC-MS/MS gegenüber den herkömmlichen Verfahren der toxikologischen Analytik evaluiert und anhand von verschiedenen Anwendungsgebieten dargestellt. Dafür wurden neue Methoden zur Bestimmung von Opioiden in unterschiedlichen Körpermatrices entwickelt und die Anwendbarkeit durch die Analyse zahlreicher Realproben aus der forensischen und klinischen Toxikologie belegt.

Die Untersuchung von Opiaten in Urin, Blut und Mohnprodukten ermöglichte so die Qualifizierung und Verifizierung von Markersubstanzen für den Konsum von Straßenheroin und pharmazeutischem Heroin, so dass der Konsum derselbigen unterschieden und auch klar von der unbewussten Opiataufnahme durch Mohnprodukte abgegrenzt werden kann. Dafür wurden mehr als 1000 Proben aus dem Bonner Heroinprojekt und einer eigens entwickelten Studie, dem „Mohnkuchenversuch“, aufgearbeitet und untersucht.

Die Bestimmung von analgetisch wirksamen Opioiden erweiterte das Spektrum an Matrices auf Serum und Haare. In etwa 300 Proben wurden verschiedene Analgetika aus der Palliativmedizin, sowie deren Metaboliten bestimmt. Dabei wurden in vielen Fällen von der Literatur abweichende Wirkstoffspiegel festgestellt, und auch die Unterschiede von Einzelmedikation und kombinierter Schmerzmittelgabe bezüglich der eingesetzten Dosis konnten klar belegt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden wurden nach Richtlinien der Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie (GTFCH) validiert und zeichneten sich durch hohe Empfindlichkeiten für die zu untersuchten Analyten aus. Die damit ermittelten Ergebnisse konnten schlüssig interpretiert und so die Vorteile der HPLC-MS/MS gegenüber herkömmlichen Analyseverfahren - die verbesserte

Sensitivität und Selektivität, die breite Anwendungspalette sowie die Einfachheit und Schnelligkeit der Analysen - dargestellt werden.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Februar 2002 bis März 2008 am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn durchgeführt.

Mein besonderer Dank hierfür gilt dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. B. Madea für das Ermöglichen dieser Arbeit, die wissenschaftliche Betreuung und die weitgehenden Freiheiten bei Organisation und Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens vom Institut für Pharmazeutische Technologie für die sehr behilfliche Übernahme des Zweitbetreuungsverhältnisses.

Dem Leiter der Toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin Bonn, Herrn PD Dr. F. Musshoff möchte ich besonders für die Bereitstellung des Themas und der verschiedenen Arbeiten, besonders aber für die engagierte Unterstützung des außerplanmäßigen Mohnkuchenprojektes danken.

Herrn Dr. L. Kröner, Leiter der Toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin in Köln, möchte ich für die hilfreichen Einarbeitung und Zusammenarbeit sowie sein persönliches Engagement als Betreuer und Kollege im Allgemeinen und zum Starten der einzelnen Projekte in den ersten eineinhalb Jahren danken.

Ich danke seiner Nachfolgerin, Frau Dr. H. Wollersen für die Übernahme der praktischen Betreuung für die folgenden 2 Jahre.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Kollegen Herrn J. Bayer für die gemeinsame Zeit der Einarbeitung, des Kennenlernens des für alle neuen Gerätes, die stete Diskussionsbereitschaft sowie seine große Hilfsbereitschaft auf allen erdenklichen Ebenen der praktischen Laborarbeit bedanken, ohne die meine Arbeit sehr viel schwieriger gewesen wäre.

Ich danke des Weiteren meinen ehemaligen Doktoranden-Kollegen Herrn Dr. Dirk Lachenmeier für immer wieder spontane Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Abläufen, Herrn Jens Brockmeyer ganz besonders für die intensiven und sehr ergiebigen Diskussionen während seiner kurzen Zeit am Institut, Frau Dr. Katrin

Lachenmeier für die gute Zusammenarbeit vor allem beim gemeinsamen Schmerzmittel-Projekt und Frau Uta Küpper für die gute Zusammenarbeit und die sehr angenehm auflockernde Atmosphäre während der gemeinsamen Bürozeit.

Meinen beiden Auszubildenden Thomas und Sebastian danke ich für die Unterstützung meiner praktischen Tätigkeiten, die alle beide mit sehr großem Einsatz, hohem Interesse und vorbildlicher Präzision für die vorliegende Arbeit durchgeführt haben.

Des Weiteren möchte ich sehr herzlich meinen Kollegen aus der Abteilung und dem gesamten Institut für die gute Atmosphäre danken, besonders den Kollegen, die sich der Tortur der Mohnkuchenversuche mit dazugehörigen Urinabgaben und Blutentnahmen bereitwillig gestellt haben.

Ich danke meiner Kollegin Frau R. Klemmer für die vielfachen und sensiblen Blutentnahmen an mir, ohne die meine Arbeit nicht durchzuführen gewesen wäre.

Mein Dank gilt auch meinen mittlerweile Kollegen der Firma Applied Biosystems, vor allem den Ingenieuren vom Service Team Herrn Hendrik Siebel, Herrn Kai Holtmann und Herrn Engelbert Wagner, die uns bei verschiedensten Problemen sehr hilfreich zur Seite gestanden haben.

Letztlich danke ich meinen Eltern, die mir durch jahrelange Unterstützung das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben sowie verschiedenen Menschen, die es verdienen namentlich erwähnt zu werden, da sie in der Zeit meiner Promotion auf persönlicher Ebene eine wichtige Rolle gespielt haben: Uwe und Zamarud, Armin und Susa (danke auch für die Korrekturen), Jan, meine Jungs vom Basketball, besonders Big Mac, Uwe, Frank und Ralph, Babsi, meine „große Schwester“ Steffi, Svenja und besonders Ella, die mit viel Geduld die stressige Phase des Schreibens ertragen und mich dabei in kaum wiedergutzumachender Art und Weise in allen Lebenslagen unterstützt hat.

## Publikationen

Publikationen, in denen bereits Auszüge aus der Dissertation veröffentlicht wurden:

**1) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 Nov 5;811(1):47-52.**

Musshoff F., Trafkowski J., Madea B.

“Determination of markers of illicit heroin in urine samples of patients in a heroin maintenance program”

**2) Blutalkohol 2006, 431-441.**

J. Trafkowski, F. Musshoff, B. Madea

“Positive Opiatbefunde nach Aufnahme von Mohnprodukten – Analytische Möglichkeiten zur Differenzierung einer Heroin- oder Mohnaufnahme”

**3) Ther Drug Monit. 2006 Aug;28(4):552-8.**

Trafkowski J., Musshoff F., Madea B.

“The Significance of Urinary Markers of Illicit Heroin Use after Consumption of Poppy Seed Products”

**4) J Mass Spectrom. 2006 May;41(5):633-40.**

Musshoff F.\*, Trafkowski J.\*, Kuepper U., Madea B.

“An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites”

\*Equal authorship

**5) Ther Drug Monit. 2007 Oct;29(5):655-61.**

Musshoff F., Lachenmeier K., Trafkowski J., Madea B., Nauck F., Stamer U.

“Determination of opioid analgesics in hair samples using liquid chromatography/tandem mass spectrometry and application to patients under palliative care.”

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Lebenslauf.....	III
Danksagung.....	V
Publikationen.....	VII
Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Forensisch-toxikologische und klinische Analytik .....	6
1.2 HPLC allgemein.....	7
1.3 HPLC-MS Kopplung.....	10
1.3.1 Electrospray Ionisation (ESI).....	10
1.3.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI).....	12
1.3.3 Weitere Ionisierungstechniken.....	13
1.4 Massenspektrometrie allgemein.....	14
1.4.1 Ionenfallen und Time-of-flight (TOF) Massenspektrometer .....	14
1.4.2 Quadrupol Massenspektrometer.....	16
1.4.3 Triple-Quadrupol-Scanmodi .....	18
1.4.4 Sprachregelung.....	22
1.5 Immunoassay.....	22
1.6 Statistik und Validierung.....	23
1.6.1 Statistische Signifikanz und statistische Tests .....	23
1.6.2 Validierung.....	25
1.7 Opiate und Opioide .....	31
2 Praktische Anwendungen und deren Zielsetzungen .....	40
2.1 Allgemeines.....	40
2.2 Methoden in der Literatur .....	41
2.3 Analytik von Opiaten in Urinproben nach Konsum von pharmazeutischem Heroin und Straßenheroin .....	44
2.4 Analytik von Opiaten in Blut- und Urinproben nach Mohnkuchenverzehr.....	46
2.5 Analytik von Opioiden in Serum- und Haarproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung.....	48
3 Materialien und Methoden.....	50
3.1 Chemikalien und Stammlösungen.....	50
3.2 Standardlösungen für die quantitative Analyse.....	50
3.2.1 Standardlösungen für die Analytik von Opiaten in Blut und Urin nach Heroinkonsum und Mohnkuchenverzehr .....	50
3.2.2 Zusätzliche Materialien zur Untersuchung von Mohnproben und nach Verzehr von Mohnkuchen.....	51
3.2.3 Standardlösungen für die Analytik von Opioiden in Serum- und Haarproben bei Patienten unter dauerhafter Opioid-Gabe.....	51
3.3 Apparative Ausstattung.....	51
3.3.1 Automatisierte Festphasenextraktion .....	51

3.3.2	HPLC-MS/MS System .....	52
3.3.3	Immunoassay Probenautomat .....	52
3.3.4	Biegeschwinger .....	52
3.4	Probenvorbereitung .....	53
3.4.1	Allgemeine Probenvorbereitung von Urin- und Serumproben .....	53
3.4.2	Probenvorbereitung von Haarproben .....	53
3.5	Analytik von Opiaten in Urinproben nach Konsum von pharmazeutischen Heroin und Straßenheroin .....	54
3.5.1	HPLC-MS/MS Methode .....	54
3.5.2	Studiendesign und Probenmaterial .....	55
3.6	Analytik von Opiaten in Blut- und Urinproben nach Mohnkuchenverzehr .....	56
3.6.1	HPLC-MS/MS Methode .....	56
3.6.2	Untersuchung der verschiedenen Mohnprodukte .....	57
3.6.3	Studiendesign und Probenmaterial .....	57
3.6.4	Erweiterung der Methode um 2 Papaverin-Metaboliten .....	60
3.6.5	Ermittlung eines Korrekturfaktors für Urine mittels der relativen Dichte .....	60
3.7	Analytik von Opioiden in Serum- und Haarproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung .....	60
3.7.1	HPLC-MS/MS Methode .....	60
3.7.2	Probenmaterial .....	62
3.8	Methodenvalidierung .....	62
3.8.1	Selektivität und Spezifität .....	63
3.8.2	Linearität und Kalibrationsbereich .....	63
3.8.3	Genauigkeit, Präzisionen und Richtigkeit .....	63
3.8.4	Analytische Grenzwerte .....	64
3.8.5	Absolute Wiederfindung .....	64
3.8.6	Stabilität .....	64
4	Ergebnisse .....	65
4.1	Bestimmung von Opiaten in Urin, Blut und Mohnprodukten .....	65
4.1.1	Methodenentwicklung .....	65
4.1.2	Methodenvalidierung .....	67
4.1.3	Ergebnisse aus dem bundesdeutschen Modellprojekt zur heroingestützten Behandlung Opiatabhängiger .....	72
4.1.4	Ergebnisse aus der Studie zum Nachweis von Opiatalkaloiden nach Verzehr mohnhaltiger Lebensmittel .....	85
4.2	Analytik von Opioiden in Serum und Haaren .....	95
4.2.1	Methodenentwicklung Analytik von Serum .....	95
4.2.2	Methodenvalidierung Analytik von Serum .....	95
4.2.3	Ergebnisse der Untersuchung von Serumproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung .....	101
4.2.4	Methodenvalidierung Analytik von Haaren .....	105
4.2.5	Ergebnisse der Untersuchung von Haarproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung .....	109
5	Diskussion .....	114
5.1.1	Diskussion der Ergebnisse aus dem bundesdeutschen Modellprojekt zur heroingestützten Behandlung Opiatabhängiger .....	114
5.1.2	Diskussion der Ergebnisse aus der Studie zum Nachweis von Opiatalkaloiden nach Verzehr mohnhaltiger Lebensmittel .....	118

5.1.3	Diskussion der Ergebnisse der Untersuchung von Serum von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung.....	120
5.1.4	Diskussion der Ergebnisse der Untersuchung von Haaren von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung.....	124
6	Gesamtergebnisse und Diskussion.....	127
7	Ausblick.....	135
8	Literatur.....	138
9	Anhang.....	150
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	150
9.2	Tabellenverzeichnis.....	153

# Abkürzungsverzeichnis

AC	Acetylcodein
Amph	Amphetamine
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionisation
Benz	Benzodiazepine
BNO	Bis-Nortilidin
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
BUP	Buprenorphin
C6G	Codein-6-Glucuronid
CID	Collisionally Induced Dissociation
COC	Cocain
COD	Codein
DAD	Diodenarraydetektor
DGRM	Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin
DMP	Desmethylpapaverin
DPG	Desmethylpapaverin-Glucuronid
EDDP	Methadon-Metabolit
ESI	Electrospray Ionisation
FEN	Fentanyl
GC	Gaschromatographie
GTFCH	Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie
HER	Heroin
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“ = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HYD	Hydromorphon
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
M3G	Morphin-3-Glucuronid
M6G	Morphin-6-Glucuronid

MAM	6-Monoacetylmorphin
MET	Methdaon
MOR	Morphin
MRM	Multiple Reaction Monitorin
MS	„Mass Spectrometry“ = Massenspektrometrie
NFE	Norfentanyl
NLS	Neutral Loss Scan
NMO	Normorphin
NOS	Noscapin
NTI	Nortilidin
OM	Oxymorphon
Opi	Opiate
OXC	Oxycodon
PAP	Papaverin
PIR	Piritramid
PreIS	Precursor Ion Scan
ProIS	Product Ion Scan
Q0-Q3	Quadrupol 0-3 im Triple Quadrupol
QC	Qualitiy Control
RP-HPLC	"Reversed Phase" HPLC = Umkehrphasen-HPLC
SIM	Selected Ion Monitorin
Str.Her	Straßenheroin
T-1	Zeitpunkt einen Monat vor Beginn der Heroinstudie
T12	Zeitpunkt ein Jahr nach Beginn der Heroinstudie
T6	Zeitpunkt sechs Monate nach Beginn der Heroinstudie
THC	Tetrahydrocannabinol (Cannabis)
TIL	Tilidin
TOF	Time of Flight Massenspektrometer
TRA	Tramadol
UV	Ultraviolettes Licht

# 1 Einleitung

Seit Mitte der 90er Jahre gewinnt die Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-MS) in allen Bereichen der chemischen Analytik immer mehr an Bedeutung, auch in der forensisch- und klinisch-toxikologischen Analytik. Durch immer weitergehende Entwicklungen und kostengünstigere Systeme erhalten fortlaufend mehr Einrichtungen Zugang zu diesem analytischen Bereich. Allen Systemen ist das Grundprinzip gleich, bei dem im Anschluss an eine Trennung der Substanz aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Oberflächeneigenschaften in der HPLC eine Detektion im Massenspektrometer folgt. Je nach Fragestellung variiert die Bedeutung der verschiedenen Techniken in der Massenspektrometrie.

Ziel der gegenständlichen Arbeit ist die Illustration der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten der Kopplung von HPLC mit einem Triple Quadrupol Massenspektrometer in speziellen toxikologischen Fragestellungen. Dabei sollen die breite Palette an verschiedenen Anwendungen in der quantitativen, aber auch qualitativen Analytik von Opioiden überprüft und Vorteile gegenüber traditionell verwendeten Analyseverfahren (HPLC-UV, HPLC-DAD, HPLC mit Fluoreszenz-Detektion, GC-MS) aufgezeigt werden.

Die vorgestellten Methoden wurden entwickelt, validiert und anschließend für die Analytik verschiedener Fragestellungen angewandt. Die Validierungsrichtlinien folgen den Vorgaben der Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie (GTFCH) unter Verwendung des dafür entwickelten Programms Valistat®.

## **1.1 Forensisch-toxikologische und klinische Analytik**

Toxikologie ist die Lehre von Giftstoffen, Vergiftungen und deren Behandlung. Als Teilgebiet der Medizin ist sie der Pharmakologie angegliedert, überschneidet sich aber auch mit der Biochemie, wenn z.B. die molekularen Grundlagen von Vergiftungen aufgeklärt werden. Die Forensik umfasst alle Gebiete, die mit

kriminologischer oder gerichtlicher Arbeit zu tun haben. Dementsprechend versteht man unter dem Begriff der forensischen Toxikologie Fälle von Vergiftungen, welche mit einem Bezug zum Straf-, Zivil- und Verkehrsrechtlichen. Unter klinischen Prüfungen versteht man hingegen an Menschen durchgeführte Untersuchungen, die der Erforschung von Wirkungen und Nebenwirkungen von Arzneistoffen dienen.

Am Anfang von forensisch-toxikologischen Analysestrategien stehen in der Regel die sogenannten hinweisgebenden Verfahren. Dabei werden insbesondere immunochemische Analysen aufgrund möglicher Kreuzreaktivitäten mit anderen Stoffen in komplexen Matrices (Körperflüssigkeiten, v.a. Blut und Urin) lediglich als Vorteste angewandt, können keinen definitiven Beweis für die Anwesenheit einzelner Wirkstoffe liefern, sondern können lediglich positive Hinweise für bestimmte Wirkstoffgruppen wie Ampf, Opiate oder Cannabinoide liefern.

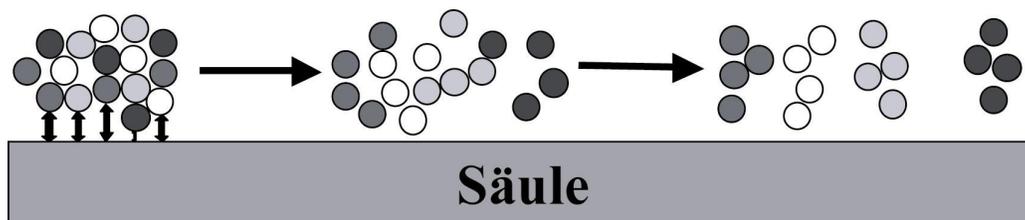
Zum endgültigen Nachweis eines bestimmten Stoffes werden chromatographische Analysemethoden herangezogen. Diese Nachweismethoden werden als beweisende Verfahren bezeichnet und üblicherweise zur Bestätigung eines Verdachtes, welcher durch einen Vortest entstanden ist, verwendet. Etabliert sind dabei im Wesentlichen flüssigkeits- und gaschromatographische Techniken (HPLC und GC) mit entsprechenden Detektoren (UV-, DAD oder MS Detektion). Jedoch gewinnt auch die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) immer mehr an Bedeutung, und es finden sich auch in akkreditierten Laboren eine steigende Anzahl an validierten Methoden für die HPLC-MS.

## **1.2 HPLC allgemein**

Chromatographische Methoden finden aufgrund ihrer Fähigkeit, komplexe Substanzgemische voneinander zu trennen, weite Verbreitung in der analytischen Chemie. Sie beruhen auf der Verteilung der Analyten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase, bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) sind dies die Säule (stationär) und das flüssige Eluentengemisch (mobil).

Die Analyten, die im Eluentenstrom durch die Säule wandern, werden von der Oberfläche der stationären Phase verschieden stark angezogen. Durch die

unterschiedlichen Adsorptionen der zu trennenden Substanzen am Säulenmaterial bewegt sich jeder Analyt mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Säule und benötigt eine substanzspezifische Zeit, um zum Detektor zu gelangen, man spricht von der Retentionszeit. Diese ist umso länger, je stärker die Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase sind (Ionische Wechselwirkungen > Wasserstoffbrücken > Van-der-Waals-Wechselwirkungen). Des Weiteren wird die Retentionszeit von den Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Eluentengemisch beeinflusst - je stärker diese sind, desto kürzer ist die Retentionszeit. Abbildung 1 zeigt das Prinzip der chromatographischen Trennung. Während die Analyte am Anfang der Säule noch zufällig verteilt sind, trennen sie sich aufgrund der Wechselwirkungen mit dem Oberflächenmaterial der Säule immer weiter auf, bis am Ende der Säule die Analytmoleküle separat in ihren Gruppen vorliegen.



**Abbildung 1: Prinzip der chromatographischen Trennung**

In der klassischen Normalphasen-HPLC werden als stationäre Phase Kieselgel und als mobile Phasen unpolare organische Lösemittel verwendet. Mittlerweile wird in sehr viel größerem Maßstab (über 90%) die sogenannte Umkehrphasen-HPLC, auch RP-HPLC (RP = Reversed Phase), verwendet, deren Name sich davon ableitet, dass die Polaritäten von mobiler und stationärer Phase umgekehrt wurden: Als mobile Phasen werden polare und wässrige Laufmittel verwendet (v.a. Wasser, verschiedene Puffer, Acetonitril und Methanol), wohingegen die Oberfläche des Säulenmaterials durch chemische Modifikationen vornehmlich stark unpolare Eigenschaften aufweist. Diese chemischen Modifikationen werden abhängig von den Substanzeigenschaften der zu untersuchenden Analyten eingesetzt.

Tabelle 1 zeigt einen Ausschnitt aus der Produktpalette an verschiedenen Säulenmaterialien einen Ausschnitt aus einer Werbebroschüre eines Herstellers von HPLC-Säulen. Je nach Anwendung können die Säulen an die notwendigen Bedingungen angepasst werden (Gradient, Zielanalyten, HPLC-System).

pH-Stabilität	Partikelgröße	Säulenmaterial	Anwendung	Stärke
1,5 - 7,5	2 $\mu$ , 4 $\mu$ und 10 $\mu$	C18 mit polarem Endcapping	Für hohe Retention sowohl unpolarer als auch extrem polarer Alkylverbindungen	Auflösung hochpolarer Verbindungen unter 100% wässriger mobiler Phase
1.5-10.0	3 $\mu$ , 5 $\mu$ , 10 $\mu$ , 10 $\mu$ -PREP und 15 $\mu$	C18 mit Endcapping	Kleine Moleküle, niedermolekulare Verbindungen	Erweiterte pH-Stabilität, extrem reproduzierbar, robust und langlebig
1.5-10.0	2 $\mu$ , 4 $\mu$ und 10 $\mu$	C12 Umkehrphase	Für hydrophobe, unpolare Verbindungen über einen großen pH-Bereich mit nur wenig oder gänzlich ohne MS-Phasenbluten	Scharfe Peakformen für basische Verbindungen bei neutralem pH.
1.0-12.0	5 $\mu$ und 10 $\mu$	C18	Arzneistoffe, basische Verbindungen, Pflanzenschutzmittel	Große pH-Stabilität und hohe Trennleistung; verbesserte Retention von basischen Verbindungen bei hohem pH; LC/MS-tauglich
2.0-7.5	monolithischer Kieselgel-Stab	C18	für die ultraschnelle Trennung kleiner Moleküle	Erhöhter Probendurchsatz aufgrund hoher Flussraten von 1-9ml/min; Direktinjektion ohne Probenvorbereitung möglich; schnelle Reäquilibration
1.5-10.0	3 $\mu$ , 5 $\mu$ , 10 $\mu$ , 10 $\mu$ -PREP und 15 $\mu$	Phenyl-Ring über C6-Kette gebunden; mit Endcapping	unpolare Verbindungen	Höhere Aromaten-Selektivität aufgrund der größeren Hydrophobizität durch die Hexylkette
1.5-10.0	2 $\mu$ , 4 $\mu$ und 10 $\mu$	polar eingebettete C18	Für eine ausgewogene Retention von polaren und basischen Verbindungen und die mäßige Retention von hydrophoben Verbindungen über einen weiten pH-Bereich	Analyse polarer basischer Verbindungen mit nur wenig oder gänzlich ohne MS-Phasenbluten
1.5-7.0	2 $\mu$ , 4 $\mu$ und 10 $\mu$	Ether-gebundene Phenylphase mit polarem Endcapping	Für hohe Retention von polaren und aromatischen Verbindungen	Bessere Peakform bei sauren und basischen Substanzen sowie höhere aromatische Selektivität bei methanolhaltigen mobilen Phasen
1.5-7.0	3 $\mu$ , 5 $\mu$ und 10 $\mu$	Cyano mit Endcapping	Verbindungen mit polaren Gruppen wie -COOH, -CO sowie primären und sekundären Aminen	Hohe Reproduzierbarkeit von Lauf zu Lauf, Säule zu Säule und Batch zu Batch für konsistente Ergebnisse

**Tabelle 1: Ausschnitt aus Produktangebot für HPLC-Säulen der Firma Phenomenex**

Die HPLC bietet sich als chromatographische Trennmethode dort an, wo andere Techniken wie z.B. die Gaschromatographie an ihre Grenzen stoßen, z.B. thermolabile oder schwerflüchtige Substanzen wie z.B. polare Metabolite von Arzneimitteln.

### **1.3 HPLC-MS Kopplung**

Unter HPLC-MS versteht man allgemein die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie. Dabei werden die Analyten im Flüssigkeitschromatographen getrennt, um anschließend im Massenspektrometer detektiert zu werden.

Im Vergleich zur Kopplung mit einem Gaschromatographen stellt die Kopplung der HPLC mit der MS eine wesentlich größere Herausforderung dar, da die Analyten aus dem Lösemittelstrom bei Atmosphärendruck in eine geeignete geladene Form für das Hochvakuum im Massenspektrometer gebracht werden müssen, wo sie als Ionen detektiert werden. Mittlerweile wurden verschiedene Ionisierungs- und sogenannte Interface-Techniken entwickelt, die diese Probleme abhängig von den individuellen Eigenschaften der Analyten (Ladung, Größe,  $pK_S$ -Wert etc.) zuverlässig lösen. Die beiden wichtigsten Ionisierungstechniken für die Analytik von Drogen, Arzneistoffen und deren Metaboliten, ESI (Electrospray Ionisation) und APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation), werden in den nächsten beiden Kapiteln kurz vorgestellt.

#### **1.3.1 Electrospray Ionisation (ESI)**

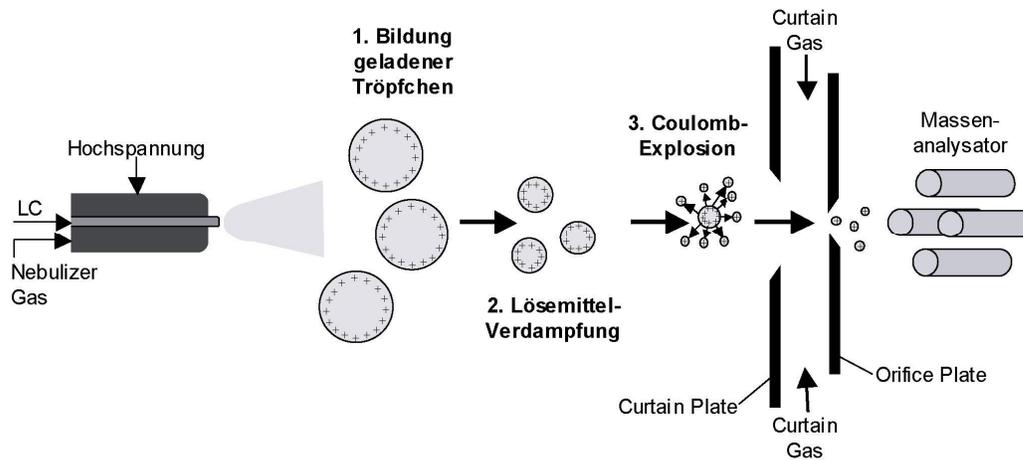
Diese sehr schonende Ionisierungsmethode findet bei Raumtemperatur statt und bildet meist einfach geladene Molekülionen, wenn deren Masse um und unter 500 amu liegt.

Das HPLC-Eluat wird durch eine geladene Metallkapillare in ein elektrisches Feld versprüht. Je nach Polung der Spraykapillare bilden sich positiv oder negativ geladene Tröpfchen - um positiv geladene Ionen zu erhalten, ist sie negativ gepolt, im Negativmodus ist sie positiv geladen. Das entstandene Spray besteht aus sogenannten "Clustern", in denen neutrale Lösemittel-Moleküle zwischen den Ionen eingelagert sind. Die geladenen Cluster werden zu einer entgegen ihrer Ladung gepolten Elektrode durch das elektrische Feld zum Analysator beschleunigt, dabei verdampft das Lösemittel.

Die Verdampfung des Lösemittels verursacht eine Erhöhung der Ladungsdichte bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes, in dem die Abstoßungskraft der Ionen gleich der Oberflächenspannung des Tröpfchens ist. Wird dieser Grenzzustand, das sogenannte Raleigh Stabilitätslimit, überschritten, treten Ionen aus dem Tröpfchen in die Gasphase aus; dabei werden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Nach einem älteren Modell von Dole et al.<sup>1</sup>, bilden sich durch das Verdampfen des Lösemittels sehr kleine Tröpfchen, die jeweils nur ein Ion enthalten. Das mehr diskutierte Modell von Thomsom und Iribane<sup>2</sup> geht von mehreren Zyklen von Lösemittelverdampfungen und sog. Coulomb-Explosionen aus, bei denen nach Unterschreiten des Raleigh-Limits kleine Tröpfchen hinaus emittiert werden, wodurch sich ein feiner Nebel bildet.

Der Vorgang der Tröpfchenverkleinerung durch Verdampfen von Lösemittel kann thermisch unterstützt werden, im verwendeten Gerät beispielsweise durch einen heißen Stickstoffstrom („Turbo Ion Spray®“), wodurch in neueren Geräten splitlose Kopplungen von HPLC und MS mit Flussraten von mittlerweile über 5 ml/min ermöglicht werden.

Um den Vorgang der Tröpfchenverkleinerung zu unterstützen und die im Spray entstandenen Cluster zu zerschlagen, indem die umgebenden Laufmittelmoleküle möglichst quantitativ entfernt werden, und die Analytionen dadurch einzeln in den Massenanalysator einbringen zu können, finden verschiedenen Techniken Anwendung. Beim verwendeten Gerät der Firma Applied Biosystems geschieht dies durch einen Gegenstrom von Stickstoff („Curtain Gas“, Abbildung 2/Abbildung 3) statt, während andere Hersteller ähnliche Techniken unter anderem Namen oder weitere Techniken verwenden („Heated Capillary“ bei Agilent oder Thermo Fischer, „Cone Gas“ bei Waters/Micromass).



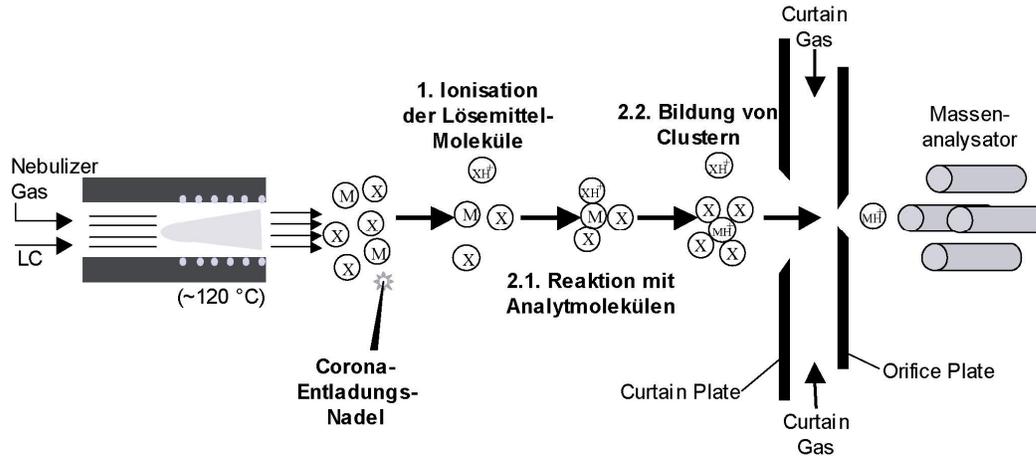
**Abbildung 2: Electro spray Ionisierung beim verwendeten Gerät API 2000**

Electrospray ist eine sehr schonende Ionisierungsmethode, die ihre Hauptanwendung bei polaren, ionischen und bei thermolabilen Komponenten findet. Neben kleinen Molekülen, wie z.B. pharmazeutischen Wirkstoffen, Pestiziden und deren Metabolite, wird ESI auch in der Analytik von Peptiden und Proteinen verwendet. Sie ist bei weitem die verbreitetste Ionisierungsmethode in der HPLC-MS.

### 1.3.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)

Nach dem Verdampfen des Eluentenstroms in einem 400 – 500 °C heißen Rohr wird der Eluent nebst Analyten in einem beheizten, pneumatisch unterstützten Vernebler zerstäubt und über eine unter Hochspannung stehende Metallspitze (Corona-Discharge Needle) geleitet, an der sich je nach Polarität der Corona positiv oder negativ geladene sogenannte Primärionen bilden. Diese Primärionen sind größtenteils Gasionen (z.B.  $N_2^+$ ,  $O_2^+$ ), die ihre Ladung auf weitere Moleküle aus dem Eluenten übertragen, so dass sich sogenannte Reaktandionen bilden, die ihrerseits wiederum die Ladung auf die Analytmoleküle übertragen. Da dieser Reaktion eine chemische Reaktion (z.B. Übertragen eines Protons) zugrunde liegt, spricht man von „chemischer Ionisierung“.

Wie bei der Electro spray Ionisierung erfolgt anschließend die Zerstörung der Lösemittel-Analytionen-Cluster, und auch hier ist die Technik abhängig vom Hersteller.



**Abbildung 3: Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck beim verwendeten Gerät API 2000**

Die im Vergleich zur Electrospray wesentlich aggressivere chemische Ionisierung findet ihre Anwendung ausschließlich für die Ionisierung von Analyten mit geringer Molekülmasse (kleiner als 1000 amu) und kann nicht bei empfindlichen Ionen angewandt werden. Jedoch gelingt mit dieser Technik die Ionisierung unpolarer Moleküle besser, die teilweise nicht im ESI Modus ionisiert werden können. Dadurch ist APCI auch bei Kopplungen von Massenspektrometrie mit Normalphasenchromatographie einsetzbar.

### 1.3.3 Weitere Ionisierungstechniken

Für die Kopplung von HPLC und MS gibt es noch andere Ionisierungstechniken wie APPI (Atmospheric Pressure Photo Ionisation) oder der in den Anfängen angewandte Moving Belt, welche jedoch untergeordnete Rollen spielen. APPI wird in der modernen HPLC-MS Analytik noch für spezielle Anwendungen noch verwandt, während Moving Belts heutzutage nicht mehr zum Einsatz kommen. Da diese (und weitere) Techniken auch in der vorliegenden Arbeit keine Rolle spielten, wird auf sie nicht weiter eingegangen.

## **1.4 Massenspektrometrie allgemein**

Die in der HPLC getrennten Substanzen werden im Massenspektrometer detektiert. Es gibt verschiedene Typen von Massenspektrometern, die alle das gleiche Grundprinzip besitzen: Die zu untersuchenden Analyten werden zusammen mit den Lösungsmitteln verdampft und dabei durch verschiedene Techniken ionisiert. Nach dieser sogenannten Ionenquelle werden die Substanzen im Massenanalysator aufgrund ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses getrennt, wobei für diese Trennung wiederum verschiedene Techniken zur Verfügung stehen. Anschließend werden die elektrischen Ladungen der Analyten im Detektor mit einem Signalverstärker verstärkt, so dass ein messbares Signal entsteht, welches mit einer entsprechenden Software ausgewertet wird.

Abhängig von der Zielsetzung werden verschiedene Techniken der Ionenselektion verwendet, von denen die wichtigsten hier vorgestellt werden:

### **1.4.1 Ionenfallen und Time-of-flight (TOF) Massenspektrometer**

Neben den am häufigsten verwendeten Single und Triple Quadrupol Massenspektrometern werden Flüssigkeitschromatographen meist an Ionenfallen- oder TOF-Massenspektrometer gekoppelt.

#### *1.4.1.1 Ionenfallen Massenspektrometer*

In Ionenfallen (Ion Trap) Massenspektrometern werden die erzeugten Ionen durch elektromagnetische Felder in definierten Bereichen zwischen einer Eingangs- und Ausgangselektrode (Top & Bottom Endcap Elektrode), zwischen der eine Ringelektrode liegt, gehalten („gefangen“) und können sowohl direkt analysiert, als auch ein- oder mehrfach in Bruchstücke gespalten (fragmentiert) und analysiert werden (Abbildung 4). Durch die Möglichkeit, selektierte Molekülionen in immer kleinere Fragmente spalten zu können, haben Ionenfallen ihren Haupteinsatzbereich in der qualitativen Analytik (Strukturaufklärung), während die quantitative Analyse eingeschränkt ist. Ionenfallen Massenspektrometer besitzen jedoch die Möglichkeit,

über einen längeren Zeitraum Ionen ausgesuchter Massen zu fangen und somit anzureichern. Dadurch erreichen sie im Fullscan-Modus (s. Kapitel 1.4.3) hohe Empfindlichkeiten im Vergleich zu TOF und Triple Quadrupol Massenspektrometern, welche jeweils nur eine begrenzte Zeit Ionen selektieren können.

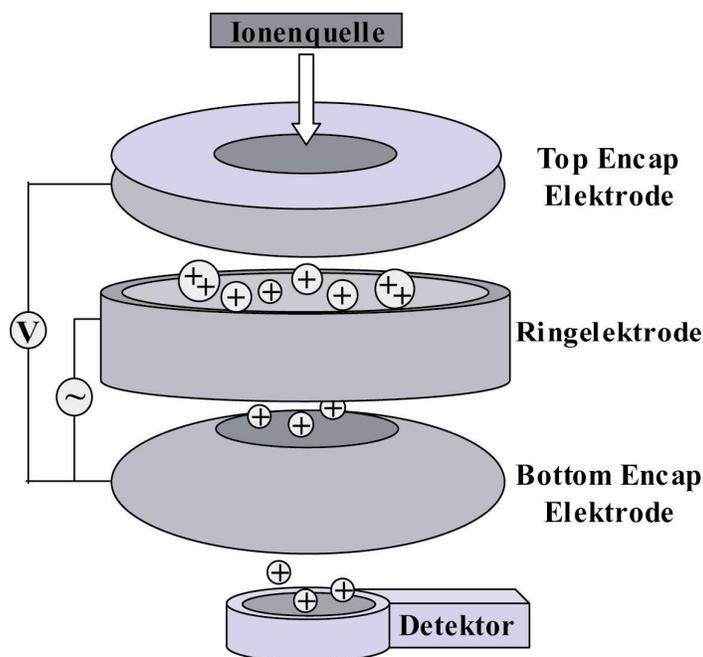


Abbildung 4: Aufbau einer Ionenfalle

#### 1.4.1.2 Time-of-Flight Massenspektrometer

In Time-of-flight (TOF) Massenspektrometern werden Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten, die sie durch Anlegen einer festgelegten Beschleunigungsspannung erhalten, getrennt. Beim Eintritt in den Analysator, einer langen, geraden „Drift-Röhre“, haben alle Ionen die gleiche Energie, was zur Folge hat, dass die schnelleren leichten Ionen den definierten Weg in kürzerer Zeit zurücklegen als die schwereren und langsameren Ionen und somit früher detektiert werden (Abbildung 5). Durch diese Technik ist es möglich, hochauflösend unterschiedliche Massen voneinander zu unterscheiden, da sich die Masse des Ions umgekehrt proportional zur Geschwindigkeit verhält.

Neuere TOF Massenspektrometer haben die Möglichkeit, im linearen Modus oder im Reflectron Modus zu messen. Da die kinetischen Energien der Ionen statistisch

immer leicht schwanken werden, ist es sinnvoll, durch eine zweite Massenselektion die Massenauflösung zu erhöhen, um ein genaueres Ergebnis zu bekommen. Dafür werden im Reflectron Modus die Ionen kurz vor Erreichen des Detektors am Reflectron „elektrisch gespiegelt“, d.h. ihre Flugrichtung wird umgedreht, was zwei Effekte zur Folge hat: Zum Einen wird die Massenauflösung durch einen doppelten Flugweg vergrößert, zum Anderen werden Schwankungen der kinetischen Energien ausgeglichen, wodurch die Auflösung erheblich steigt (Abbildung 5).

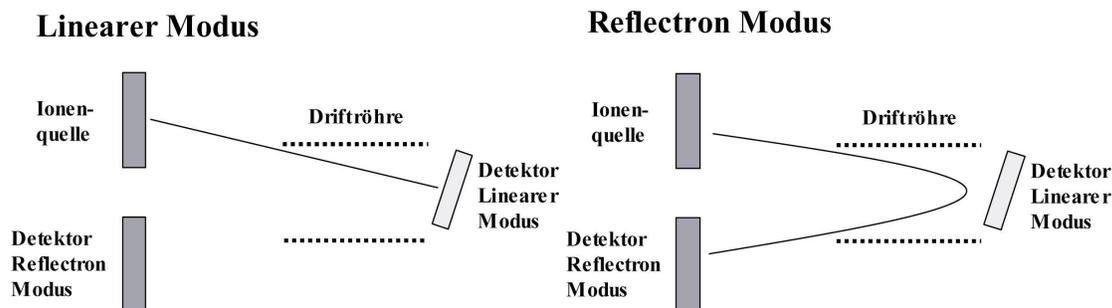


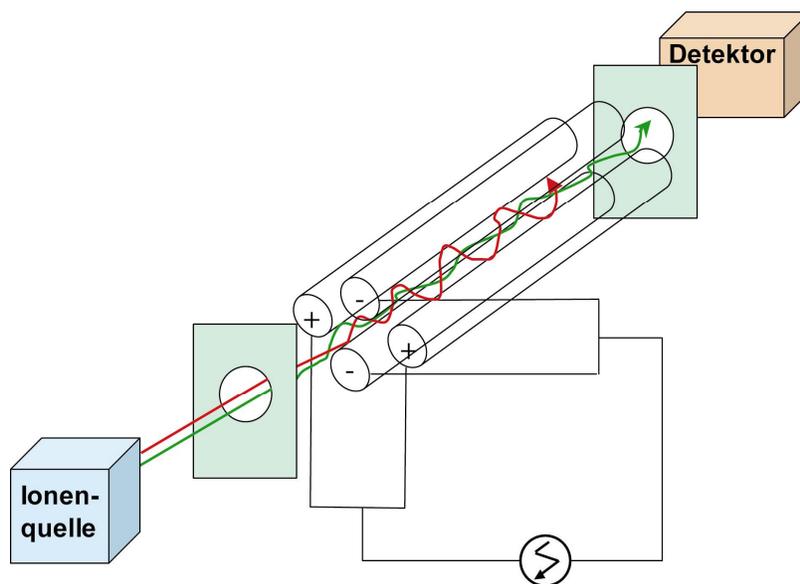
Abbildung 5: Schema eines TOF Analysators im linearen (links) und Reflectron Modus (rechts)

Die „akurate Massenbestimmung“ bei TOF-Geräten ermöglicht eine Trennung von Massen bis hinunter zu 0.001 amu und kann somit wertvolle Beiträge zur Aufklärung von Strukturen liefern. Auch wenn diese Geräte nicht die Linearität von Quadrupol Massenspektrometern erreichen können, sind durch die Linearität in kleineren dynamischen Bereichen (2 Dekaden) durchaus quantitative Analysen möglich.

### 1.4.2 Quadrupol Massenspektrometer

Man unterscheidet zwischen Single und Triple Quadrupol Massenspektrometern. Beiden ist der Massenfilter, die Quadrupolzelle, gleich. Diese besteht aus zwei Paaren von zylinderförmigen Metallstäben (Elektroden), von denen eines ein positives, das andere ein negatives elektrisches Potential besitzt. Es wird eine Kombination von Gleich- und Wechselspannungen bei konstanter Frequenz auf jedes Paar angelegt. Das Verhältnis dieser beiden Spannungen bestimmt, welche Ionen auf einer stabilen Wellenbahn die Zelle passieren können und welche aufgrund zu großer Beschleunigung mit den Elektroden kollidieren oder aus dem elektrischen Quadrupolfeld herausgetragen werden. Dabei werden die höheren Massen

herausgefiltert, indem diese Ionen beim langsamen Spannungswechsel aufgrund größerer Trägheit nicht so schnell ihre Bewegungsrichtung ändern wie Ionen kleinerer Massen und dadurch auf die Metallstäbe treffen oder aus dem elektrischen Feld der Quadrupole herausgetragen werden. Die kleineren Massen werden herausgefiltert, weil Ionen zu geringer Masse aufgrund ihrer geringen Trägheit bei schnelleren Spannungswechseln stärker oszillieren, somit leichter aus der Bahn durch die Quadrupolzelle geworfen werden und auf die Elektroden prallen bzw. das elektrische Feld verlassen (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Einfaches Schema eines Single Quadrupol Massenspektrometers**

Sowohl in Single, als auch in Triple Quadrupol Massenspektrometern findet vor der ersten Massenselektion eine Fokussierung des Ionenstrahls statt. Diese Zelle ist in dem in der Arbeit verwendeten Gerät ein Quadrupol und wird als Q0 bezeichnet und dient neben der Fokussierung auch dem Transport der Ionen. Ein Single Quadrupol Massenspektrometer besitzt im Anschluss lediglich die Funktion der einfachen Massenfilterung im Quadrupol Q1. Hingegen ist ein Triple Quadrupol Massenspektrometer aus zwei Quadrupol Massenfiltern (Q1 und Q3) aufgebaut, zwischen welchen eine sogenannte Kollisionszelle sitzt, die auch als Q2 bezeichnet wird. In dieser können die Molekülionen, die das erste Quadrupol passieren, durch Kollision mit einem inerten Gas (meist Stickstoff oder Argon) in kleinere Bruchstücke gespalten werden, man spricht von Fragmentierung. Triple Quadrupol Massenspektrometer besitzen die Fähigkeit, sowohl vor als auch nach der Fragmentierung

Molekülonen zu selektieren. Diese doppelte Fokussierung ermöglicht unterschiedliche Experimente, die im folgenden Kapitel genauer erläutert werden.

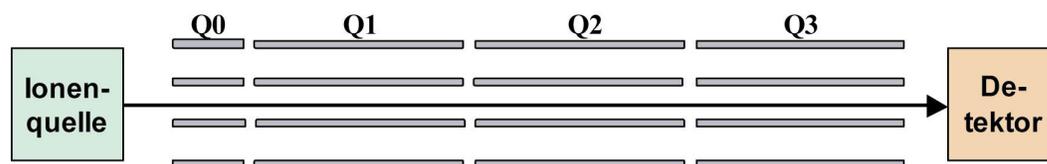


Abbildung 7: Schema eines Triple Quadrupol Massenspektrometers

Quadrupol Massenspektrometer sind die aktuell meist verwendeten Massenspektrometer. Die Gründe hierfür liegen in der einfachen Anwendbarkeit, dem großen Massenbereich, den sie abdecken, der guten Linearität für die quantitative Analyse sowie der guten Qualität von Massenspektren aufgrund einer Massenauflösung von etwa 0,1 bis 0,2 amu.

Weitergehende Entwicklungen der unterschiedlichen Massenspektrometer erlauben mittlerweile Kopplungen und Hybride der einzelnen Techniken. Von wichtiger Bedeutung sind dabei vor allem die Kopplungen von TOF-Massenspektrometern (Quadrupol-TOF oder sogar TOF-TOF Massenspektrometer) sowie die Hybride von Quadrupolen und Ionenfallen (lineare Ion Traps), welche derzeit immer mehr an Bedeutung gewinnen.

### 1.4.3 Triple-Quadrupol-Scanmodi

Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich an einem Triple Quadrupol Massenspektrometer durchgeführt. Es gibt verschiedene Modi, mit denen Analysen in doppelt fokussierenden Massenspektrometern durchgeführt werden können. Je nach Fragestellung finden die unterschiedlichen Modi Anwendung und es gilt vor allem zwischen den Scan- und den Einzelionenmodi zu unterscheiden:

1. Full Scan/ Q1-Scan: Alle Ionen eines gewählten  $m/z$ -Bereiches werden im Q1 gemessen, dadurch besteht die Möglichkeit eine Spektrenbibliothek zur Identifizierung zu verwenden. Die Fragmentierung der einzelnen Analyten kann durch Variation verschiedener Potentiale vor dem Q1 (auch mehrere Experimente mit unterschiedlichen Potentialen gleichzeitig möglich) verändert werden. Da die

Fragmentierung der Molekülonen hier in der Ionenquelle durch Kollision untereinander und mit dem Curtain Gas stattfindet, bezeichnet man diesen Vorgang als „in source collision induced dissociation“ (in source-CID). Der große Nachteil dieses Modus ist die geringe Empfindlichkeit, da pro Massenspur nur sehr wenig Messzeit verwendet wird.

2. SIM (Selected Ion Monitoring): Im Q1 werden nur ausgewählte Ionen detektiert. Durch die längere Messzeit pro Massenspur ist dieser Modus empfindlicher als ein Q1 Scan.



Abbildung 8: Schema für Full Scan und Selected Ion Monitoring

Diese beiden Modi können sowohl in Single als auch in Triple Quadrupol Massenspektrometern eingesetzt werden. Verschiedene Massenspektrometer bieten zudem die Technik, die Ionen in diesen beiden Modi ausschließlich im zweiten Massenfilter Q3 zu messen. Da der Weg von der Massenselektion bis zum Detektor in diesem Fall kürzer ist, wird dem Q3 Scan eine höhere Genauigkeit zugeschrieben. Diese äußert sich jedoch nur in geringem Maße und kann auch in geringem Maße zu Lasten der Empfindlichkeit gehen.

Zusätzlich gibt es bei Triple-Quadrupol-Geräten noch weitere Detektionsmöglichkeiten:

3. ProIS (Product Ion Scan): Alle Fragmentationen (Product Ions) eines bestimmten Ausgangsions (Precursor Ion) aus Q1 werden in Q2, der Kollisionszelle (Collision Cell), durch Einbringen eines Kollisionsgases (im verwendeten Gerät Stickstoff, aber auch andere inerte Gase, v.a. Argon, werden verwendet) fragmentiert und in Q3 nochmals aufgetrennt und anschließend detektiert. Das sich ergebende

Massenspektrum kann bereits wichtige Strukturinformationen liefern und eine sichere Identifizierung der Substanz ermöglichen. Durch Verändern der Kollisionsenergie in der Zelle verändert sich auch das Fragmentierungsmuster - auch hier besteht die Möglichkeit, diese Unterschiede durch mehrere Experimente in einem Lauf zu erfassen. Hier zeigen sich deutliche struktur-spezifische Unterschiede - manche, vor allem recht kompakt gebaute Moleküle, bilden uncharakteristische Muster mit vielen kleinen Fragmenten, während andere Analyten hervorragend „zerbrechen“ und in wenige umso stabilere und charakteristischere Bruchstücke zerfallen.

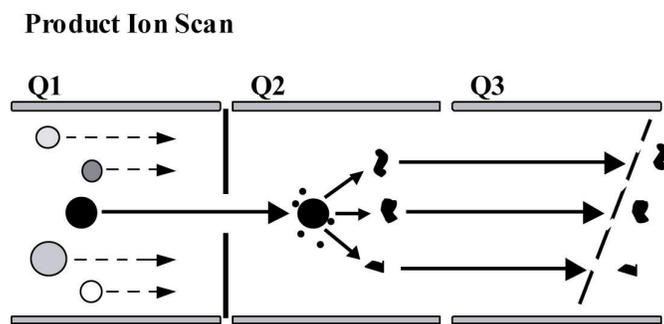
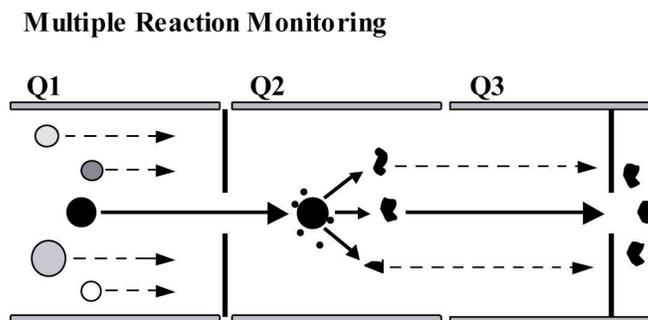


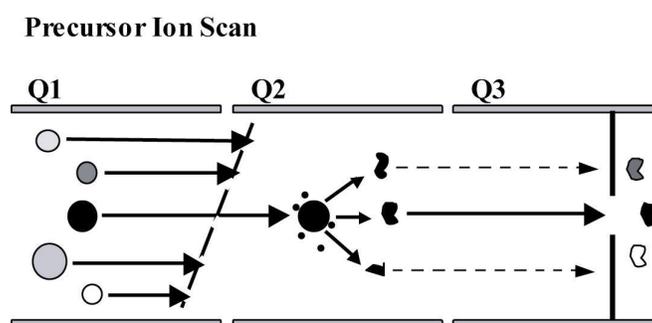
Abbildung 9: Schema für Product Ion Scan

4. MRM (Multiple Reaction Monitoring): Bestimmte Ionenpaare, bestehend aus Precursor Ion (aus Q1) und Product Ion, welches sich nach Kollision mit dem Kollisionsgas in Q2 bildet, werden herausgesucht und detektiert. Durch diese zweifache Massenfokussierung können Störungen aus der Matrix fast komplett eliminiert werden und die analytischen Grenzwerte solcher Analysen sind trotz der geringeren Ionenausbeute sehr niedrig, da auch die Messzeit pro Ionenspur bedeutend länger ist. Analyten mit guten Fragmentierungsmustern weisen in der Regel wesentlich bessere Empfindlichkeiten in Bezug auf die analytischen Grenzwerte auf.



**Abbildung 10: Schema für Multiple Reaction Monitoring**

5. PreIS (Precursor Ion Scan): Im Q1 werden Ionen über einen bestimmten m/z-Bereich gescannt und bei definierten Spannungsbedingungen im Q2 fragmentiert. Im Q3 wird ein Ion eines bestimmten m/z-Verhältnisses selektiert und es kann nach Detektion der Massen dem entsprechenden Precursor Ion zugeordnet werden, so dass wie beim Product Ion Scan Mutter-Tochterionen-Paare ermittelt werden können. Dieser Modus findet Anwendung zur Detektion von Substanzen, die strukturell ähnliche oder gleiche Fragmente bilden, z.B. verschiedene Metabolite eines einzelnen Wirkstoffes oder ganze Wirkstoffgruppen (z.B. Benzodiazepine oder Opiate).



**Abbildung 11: Schema für Precursor Ion Scan**

6. NLS (Neutral Loss Scan): In diesem Modus werden Ionen über zwei parallel festgelegte Massenbereiche im Q1 und Q3 gescannt, im Q2 erfolgt bei definierten Bedingungen eine Fragmentierung. Herausselektiert werden bei diesem Scanverfahren Ionenpaare, bei denen sich das m/z-Verhältnis des Mutterions von dem des Tochterions durch eine bestimmte Masse unterscheidet, es werden also Massendifferenzen analysiert - nur Ionenpaare, die neutrale Gruppen abspalten können, werden detektiert. Diese Technik kann zur Bestimmung von Substanzen mit ähnlichen Strukturmerkmalen (z.B. Analyten mit bestimmten funktionellen Gruppen oder Metabolitengruppen wie Glucuronide) verwendet werden.

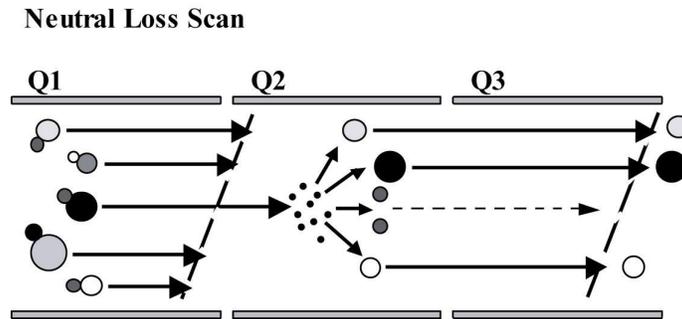


Abbildung 12: Schema für Neutral Loss Scan

#### 1.4.4 Sprachregelung

In der massenspektrometrischen Analytik werden ausschließlich Ionen auf Basis ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) detektiert. Es hat sich jedoch eingebürgert, der Einfachheit halber bei einfach geladenen Teilchen von der (molekularen) Ionenmasse zu sprechen, welche in diesen Fällen dem  $m/z$  Wert entspricht. Hingegen verwendet man bei mehrfach geladenen Molekülionen ausschließlich den exakt richtigen Begriff  $m/z$  Wert.

Da es sich bei den Analyten in der vorliegenden Arbeit ausschließlich um einfach geladene Ionen handelt, werden beide Bezeichnungen synonym verwendet; die Begründung hierfür ist, dass der Begriff „Ionenmasse“ für Leser greifbarer erscheint. Die Tatsache, dass dieser Ausdruck dinglicher ist, erleichtert neben dem Schreiben vor allem das Lesen dieser Arbeit. Daher ist im gesamten Text vornehmlich von „Ionen“ und „Massen“ die Rede, wobei es dem Leser bewusst sein sollte, dass es sich immer um Masse-zu-Ladungsverhältnisse handelt.

### 1.5 Immunoassay

Immunochemische Methoden sind wichtige einfache bioanalytische Verfahren, welche auf Grundlage einer Antikörper-Antigen-Reaktion funktionieren. In der toxiologischen Analytik fungieren dabei die verschiedenen Drogen und Medikamente sowie deren Metaboliten aufgrund bestimmter Strukturmerkmale als Antigene, welche mit bestimmten Antikörpern aus den Immunoassay Reagenzien eine

Reaktion eingehen, deren Umsatz meist photometrisch, aber auch anderweitig bestimmt werden kann. Somit kann man zwischen diesen Wirkstoffgruppen (z.B. Ampf, Benz oder Opiate) unterscheiden, jedoch nicht zwischen den einzelnen Analyten innerhalb einer Gruppe und es lässt sich nur eine semiquantitative Bestimmung eines bestimmten Zielanalyten, auf welche diese Teste normiert sind, durchführen.

Aufgrund von möglichen Kreuzreaktivitäten mit Stoffen mit ähnlichen Strukturmerkmalen, welche aus verschiedensten Quellen, z.B. der Matrix stammen können, dürfen positive Nachweise jedoch niemals als eindeutig und endgültig angesehen werden. Trotz der hohen und spezifischen Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen bedarf es gerade bei forensischen Fragestellungen immer einer zusätzlichen Bestätigungsanalyse mit selektiveren (in der Regel chromatographischen) Verfahren.

## ***1.6 Statistik und Validierung***

### **1.6.1 Statistische Signifikanz und statistische Tests**

Die einzelnen Ergebnisse von großen Messreihen unterschiedlicher Gruppen unterscheiden sich in bestimmten Wertebereichen, diese Unterschiede können zufällig oder statistisch signifikant sein. Eine statistische Signifikanz bezieht sich auf das Ergebnis eines Hypothesentests für Stichproben in einer Grundgesamtheit. Wenn die Unterschiede zwischen zwei Gruppen nicht durch Unschärfen (z.B. Messunsicherheiten) erklärt werden können, kann die Hypothese mit einer vorab festzulegenden Wahrscheinlichkeit belegt werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese immer sein, dass ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit positiver Ergebnisse in zwei Gruppen existiert. Diese Hypothese wird der sogenannten Nullhypothese gegenübergestellt, welche besagt, dass kein Zusammenhang zwischen diesen Gruppen vorliegt und sie damit unterschiedlich sind.

Unterschiede werden als statistisch signifikant bezeichnet, wenn sie nur mit einer sehr geringen definierten Wahrscheinlichkeit durch Zufall zustande kommen. Man überprüft dies mittels eines statistischen Signifikanztests und erhält einen Prüfwert  $p$

(p-Wert), mit dem man die vorher aufgestellte Nullhypothese („Es liegt kein Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen vor.“) überprüft. Ist der p-Wert kleiner als der Wert des vorher festgelegten Signifikanzniveaus  $\alpha$ , so liegt ein statistisch nachgewiesener Unterschied vor. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 spricht man von einem statistisch „wahrscheinlichen Unterschied“, bei einem Signifikanzniveau von 0,01 von einem statistisch „signifikanten Unterschied“, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, bzw. 1% (von 100 Untersuchungen ist nur bei einer die Nullhypothese zufällig nicht erfüllt).

Die Tests, die der Unterscheidung von Konzentrationswerten der beiden Gruppen zugrunde liegen, sind der F-Test zur Varianzanalyse und der t-Test zur statistischen Hypothesenüberprüfung. Im F-Test werden die Streuungen um die Mittelwerte der beiden Gruppen miteinander verglichen. Sind diese zu groß, so können die Mittelwerte der beiden Gruppen nicht im t-Test miteinander verglichen und keine Nullhypothese aufgestellt werden. Ist der Vergleich der Mittelwerte möglich, kann mittels t-Test die Nullhypothese überprüft werden und die Testprüfgröße wird mit dem Signifikanzniveau  $\alpha$  verglichen. Die beiden Prüfgrößen von F-Test und t-Test werden folgendermaßen errechnet:

**F-Test:**

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Dabei sind definiert:

F Prüfgröße des F-Tests

$s_{1/2}^2$  Varianz (Quadrat der Standardabweichung) der beiden Stichprobengruppen

**t-Test:**

$$t = \sqrt{n} \cdot \frac{\bar{x} - \mu_0}{s}$$

Hier sind definiert:

t Testgröße t-Test

n Anzahl Stichproben

$\bar{x}$  Stichprobenmittelwert

$\mu_0$  Erwartungswert der Stichproben

S Stichprobenstandardabweichung

Will man bestimmen, wie ähnlich zwei Messgruppen einander sind und ob sie voneinander abhängen bzw. sich beeinflussen, so verwendet man die Kovarianz - sie ist also eine Maßzahl für den Zusammenhang zweier Gruppen. Mittels der Kovarianz kann man nur die Richtung des Zusammenhangs angeben, jedoch keine Aussage über die Stärke desselben geben. Man bestimmt sie mittels folgender Formel:

**Kovarianz:**

$$\text{cov}_{xy} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

Je kleiner die Kovarianz, desto geringer ist der Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen. Ist der Wert nahe der Null, so besteht überhaupt kein Zusammenhang, ist er negativ, so zeigt dies ein gegensätzliches Verhalten der beiden Gruppen.

In Verbindung mit der Kovarianzanalyse wird der Chi<sup>2</sup>-Test eingesetzt. Auch hier wird eine Nullhypothese  $H_0$  aufgestellt, die mittels des Tests überprüft wird. Als Ergebnis erhält man den Chi<sup>2</sup>-Wert, der mittels Tabellen direkt einer Wahrscheinlichkeit zugeordnet werden kann, ob die Nullhypothese  $H_0$  oder die Hypothese  $H_1$  wahr ist. In der vorliegenden Arbeit wird mittels des Test überprüft werden, ob eine statistisch signifikante Veränderung des Konsumverhaltens von Opiatabhängigen vor und während ihrer Behandlungszeit beobachtet werden kann oder ob diese Veränderung zufällig ist.

## 1.6.2 Validierung

Der Nachweis, dass eine (bio)analytische Methode zuverlässig angewandt werden kann, wird erbracht, indem die Methode nach einer vorgeschriebenen Richtlinie unter Verwendung verschiedener Parameter validiert wird. Es existieren zahlreiche Richtlinien für den Ablauf dieses Validierungsprozesses, und auch der Begriff Validierung ist in den verschiedenen Vorschriften nicht einheitlich definiert. Die

Validierung von bioanalytischen Methoden wird von Shah et al.<sup>3</sup> folgendermaßen definiert (übersetzt aus dem Englischen):

„Die Validierung bioanalytischer Methoden beinhaltet alle Maßnahmen, die für den Nachweis erforderlich sind, dass eine bestimmte bioanalytische Methode zur quantitativen Bestimmung der Konzentration eines Analyten (oder einer Serie von Analyten) in einer bestimmten biologischen Matrix für die beabsichtigte Anwendung zuverlässig ist.“

Unter dem Begriff der Validierung versteht man demnach allgemein den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer analytischen Messmethode. Diese Zuverlässigkeit muss durch verschiedene Leistungsmerkmale ratifiziert werden, welche, basierend auf internationalen Gepflogenheiten, nach Vorgaben der GTFCh folgendermaßen definiert werden<sup>4-6</sup>:

#### *1.6.2.1 Selektivität und Spezifität*

„Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störung oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen (Metaboliten, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.“

„Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, einen Analyten oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten (s.o.) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.“

Eine analytische Methode soll ein qualitativ richtiges Ergebnis liefern. Dies kann sowohl ein negativer als auch ein positiver Befund sein. Es muss bei der Validierung der Methode nachgewiesen werden, dass es weder zu falsch positiven Ergebnissen (z.B. durch Matrixpeaks) noch zu falsch negativen Ergebnissen (durch Matrixeffekte wie Ionensuppression oder Methodenfehler) kommen kann. Dazu werden vollständige Analysen mit dotierter und undotierter Matrix durchgeführt und dokumentiert.

### 1.6.2.2 Lineare Regression und Kalibration

„Die Linearität einer analytischen Methode ist ihre Fähigkeit, innerhalb eines gegebenen Bereiches Testergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe sind.“

„Der Kalibrationsbereich einer analytischen Methode ist das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe (einschließlich dieser Konzentrationen), für das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt werden konnte.“

Funktionelle Zusammenhänge zwischen festgelegten unabhängigen Variablen und davon abhängigen Ergebnisvariablen werden mit Regressionsanalysen beschrieben. Als unabhängige Variablen werden in der Analytik die erhaltenen Messwerte (Peakflächen), als Ergebnisvariablen die Konzentrationswerte von Kalibrierlösungen verwendet. Durch die Regressionsanalyse wird eine Funktion ermittelt, die diese Zusammenhänge mathematisch beschreibt.

Am einfachsten und häufigsten eingesetzt ist die funktionelle Abhängigkeit, die durch eine Gerade beschrieben wird, man spricht dabei von linearer Regression. Diese wird für Kalibrationen eingesetzt, die zur Berechnung unbekannter Konzentrationen aus ermittelten Messwerten herangezogen werden. Der Konzentrationsbereich der Kalibration sollte dabei so gewählt werden, dass er den Konzentrationsbereich der zu erwartenden Probenkonzentrationen weitgehend abdeckt, bestenfalls sogar über-, notfalls auch unterschreitet.

Die Güte einer Kalibrierfunktion wird als Zahlenwert durch den Korrelationskoeffizienten angegeben. Dieser ist bei Funktionen erster Ordnung, also Geraden, ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen den intervallskalierten Messwerten.

### 1.6.2.3 Analytische Grenzwerte

„Die Nachweisgrenze stellt den kleinsten Analytgehalt dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit (95 oder 99%,entsprechend einem  $\alpha$ -Fehler von 5 bzw.

1%) vom Leerwert unterscheidbar ist. Besitzt eine Probe genau diesen Gehalt des Analyten, so wird in 50% aller Fälle der konkrete Messwert kleiner sein als die Nachweisgrenze.“

„Die Bestimmungsgrenze ist der kleinste Gehalt, der mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit (33%, Signifikanz: 95 oder 99%) bestimmt werden kann.“

Die analytischen Grenzwerte sind keine Absolutwerte (ja/nein-Entscheidungen), sondern sie beschreiben die Konzentrationen, in denen qualitative und quantitative Analysen gerade noch möglich sind. Sie sind rein qualitative Größen, welche die Empfindlichkeit einer Analysenmethode für einen oder mehrere bestimmte Analyten beschreibt.

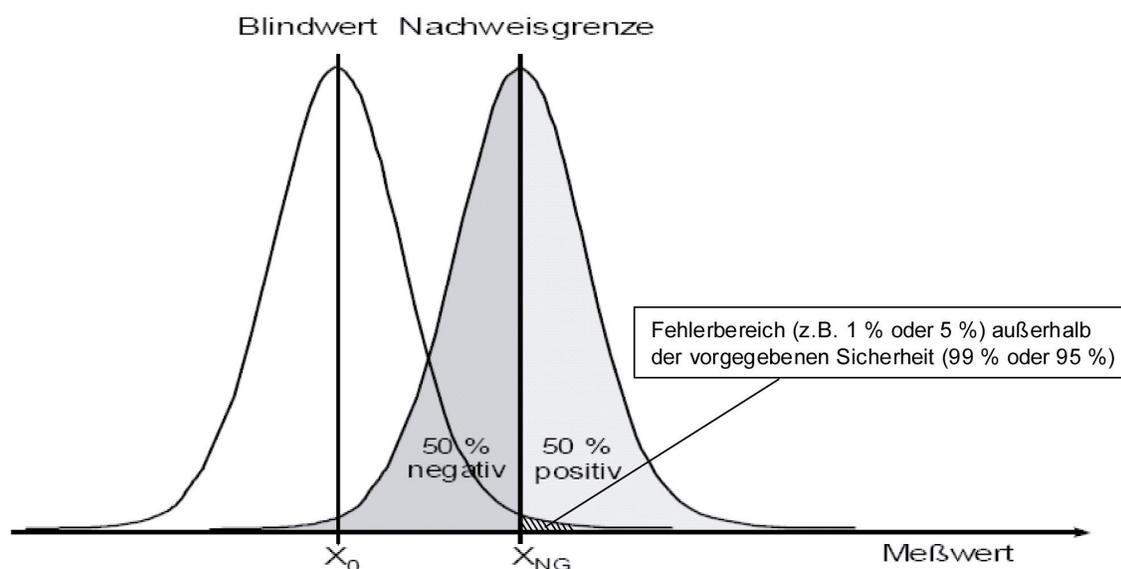


Abbildung 13: Sicherheits- und Fehlerbereich für die Nachweisgrenze

Während manche Vorschriften die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dort ansiedeln, wo das Signal-Rausch-Verhältnis 3:1 bzw. 9:1 ist, verwendet die GTFCh für ihre Validierungsrichtlinien ein mathematisches Modell nach DIN 32645<sup>7</sup>, bei dem aus Kalibriergeraden im Bereich der analytischen Grenzwerte dieselben errechnet werden<sup>8</sup>. Dabei werden Nachweis- und Bestimmungsgrenze folgendermaßen aus der Kalibriergeraden errechnet:

### Nachweisgrenze:

$$X_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f, \alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^{-2}}{Q_x}}$$

### Bestimmungsgrenze:

$$X_{BG} = k \cdot s_{x0} \cdot t_{f, \alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{NG} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

Dabei sind definiert:

$s_{x0}$  Verfahrensstandardabweichung

n Anzahl der Kalibrationspunkte

m Anzahl der Messungen

$Q_x$  Summe der Abweichungsquadrate

$\bar{X}$  Mittelwert der Kalibrationskonzentrationen

$\bar{Y}$  Mittelwert der Messwerte

t Quantil der t-Verteilung

$\alpha$  Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art (falsch positiv)

#### 1.6.2.4 Genauigkeit, Richtigkeit und Präzision

„Unter Genauigkeit versteht man den Abstand eines einzelnen Wertes vom Sollwert, hervorgerufen durch systematische und zufällige Fehler.“

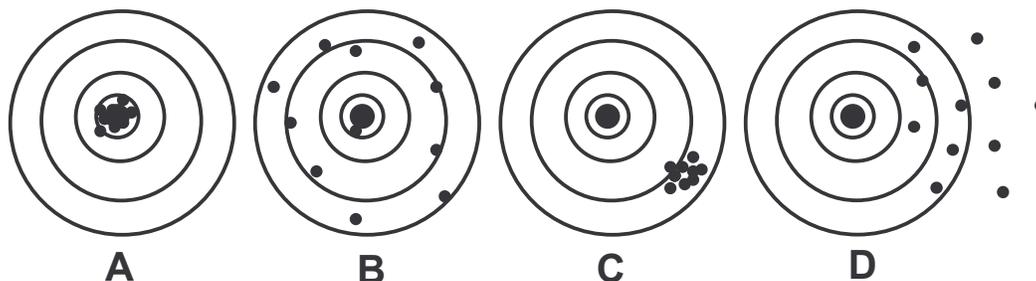
„Unter Richtigkeit versteht man den Abstand des Mittelwertes vom Sollwert. Das Ausmaß wird gewöhnlich in Form eines systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt. Zur Bestimmung der Richtigkeit muss eine ausreichend große Anzahl von Messwerten berücksichtigt werden (z.B. Kontrollwerte aus der Routine).“

„Unter Präzision versteht man den Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Das Maß für die Präzision wird gewöhnlich in Form der Impräzision ausgedrückt und als Standardabweichung der Messergebnisse berechnet. Höhere Impräzision wird durch eine höhere Standardabweichung ausgedrückt.“

„Unter Wiederholpräzision (Intradaypräzision) versteht man die Präzision unter Bedingungen, bei denen unabhängige Messergebnisse mittels derselben Methode mit identischem Probenmaterial im selben Labor von derselben Person mit derselben Gerätschaft innerhalb kurzer Zeitintervalle erhalten werden.“

„Unter Laborpräzision (Interdaypräzision) versteht man die Präzision bei der Bestimmung derselben Probe innerhalb eines Labors bei bewusster Änderung *eines* Parameters (z.B. Person, Gerätschaft oder Zeit).“

Systematische und zufällige Fehler können das Analysenergebnis verschlechtern. Systematische Fehler sind dafür verantwortlich, dass das ermittelte Ergebnis vom wahren Wert abweicht, z.B. immer größer oder immer kleiner ist, sie beeinflussen somit die Richtigkeit der Methode. Zufällige Fehler hingegen verschlechtern die Präzision des Ergebnisses, d.h. je größer der zufällige Fehler, desto wahrscheinlicher ist es, dass die Messwerte in bestimmten Grenzen um den wahren Wert gestreut sind (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Beispiele für Messergebnisse mit hoher Präzision und guter Richtigkeit (A), mit geringer Präzision und guter Richtigkeit (B), hoher Präzision und schlechter Richtigkeit, geringer Präzision und schlechter Richtigkeit**

Beim Verfahren der Validierung geht es darum, diese Fehler durch wiederholte Messungen von Kontrollproben bekannter Konzentrationen zu bestimmen. Diese Kontrollproben (Quality Control-/ QC-Proben) sind teilweise kommerziell erhältlich, werden jedoch meist selbst angesetzt und in mindestens zwei, besser drei verschiedenen Konzentrationsbereichen vermessen. Durch die mehrfache Analyse (mindestens 2 Doppelbestimmungen an 8 Tagen) lassen sich die Wiederholpräzision, Laborpräzision und die Richtigkeit der Methode ermitteln.

#### 1.6.2.5 Wiederfindung

„Die absolute Wiederfindung ist definiert als kompletter Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessende Lösung. Sie wird bestimmt aus einem Verhältnis der Signale einer gleich zugesetzten Menge Analyt bzw. Standard zu einer biologischen Probe und einer nicht extrahierten Originallösung.“

Die Wiederfindung eines Analyten gibt das Verhältnis des Signals einer vollständig aufgearbeiteten Probe zum Signal eines reinen Standards wieder. Die Konzentration im Standard und der aufgearbeiteten Probe sollten bei einer Wiederfindung von 100% gleich sein.

Anhand des Prozentwertes der Wiederfindung lässt sich die Effizienz der Aufarbeitung (in der vorliegenden Arbeit immer Festphasenextraktionen) ersehen. Wichtiger als ein hoher Wert (die GTFCH fordert mindestens 50%<sup>8</sup>) ist eine gute Reproduzierbarkeit, also eine gute Konstanz für den Wert der Wiederfindung.

#### 1.6.2.6 Stabilität

„Unter der Stabilität versteht man die chemische Stabilität eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen für gegebene Zeitintervalle (z.B. Lagerungsbedingungen).“

Es muss gewährleistet sein, dass die zu untersuchenden Analyten während der Lagerung - in der vorliegenden Arbeit immer im Eisfach - keinem Abbau unterliegen. Dafür werden Standardlösungen in verschiedenen Zeitabständen nach Einfrieren und späterem Auftauen vermessen und die Peakflächen miteinander verglichen. Gerade bei der HPLC-MS müssen dabei mögliche Matrixeffekte, wie sie bekannt sind und bereits berichtet wurden<sup>9</sup>, ausgeschlossen werden.

### 1.7 Opiate und Opioide

Als Opiate werden im Allgemeinen Alkaloide bezeichnet, welche aus dem Opium, dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns *Papaver somniferum* gewonnen werden können. Zu den Opiaten gehören die bekannten Schmerz- und Hustenmittel Morphin und Codein sowie die Alkaloide Noscapin und Papaverin. Die Gruppe der Opioide umfasst die Gruppe aller Substanzen, die sich als Liganden an die Opioidrezeptoren im Körper anlagern und somit eine ähnliche pharmakologische

Wirkung haben wie die natürlich vorkommenden Opiate. Neben diesen umfasst die Gruppe noch verschiedene halb- und vollsynthetische Wirkstoffe, wobei die halbsynthetischen Wirkstoffe chemisch auf dem Morphin-Grundgerüst aufbauen und durch gezielte Modifikationen unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Rezeptortypen und somit Unterschiede in der Wirkung aufweisen. Zu dieser Gruppe gehören die weit verbreiteten Wirkstoffe Buprenorphin, Fentanyl, Methadon und Tramadol sowie die seltener eingesetzten Substanzen, Hydromorphon, Oxycodon, Oxymorphon, Piritramid und Tilidin, aber auch das Begleitprodukt Acetylcodein, welches bei der Heroinherstellung entsteht.

Die meisten Opioide wirken als  $\mu$ -Agonisten (Morphin ist ein reiner  $\mu$ -Agonist) und wechselwirken somit mit dem häufigsten Rezeptortyp, der im zentralen und peripheren Nervengewebe vorkommt, vornehmlich im Gehirn (Thalamus), jedoch auch in der Wirbelsäule sowie auf der Körperoberfläche. Des Weiteren sind noch  $\kappa$ -Rezeptoren (Gehirn, Wirbelsäule) und  $\delta$ -Rezeptoren (vornehmlich Wirbelsäule, aber auch Gehirn) bekannt. Neben den externen  $\mu$ -Agonisten besitzt der Organismus auch körpereigene Substanzen, die bei Bedarf eine ähnliche Wirkung verursachen können. Die bekanntesten sind Endorphin und Enkephalin.

Die Wirkungsweise der  $\mu$ -Agonisten beruht auf der Hemmung der präsynaptischen  $\mu_1$ - und der postsynaptischen  $\mu_2$ -Rezeptoren. Die Anlagerung an die  $\mu_1$ -Rezeptoren verursacht eine Hemmung des Enzyms Adenylatcyclase, welches die Synthese des Schmerzboten cAMP katalysiert, den Einstrom von Calciumionen in die Zelle, und somit die Freisetzung von Transmittern reduziert. Die Wechselwirkung der postsynaptischen  $\mu_2$ -Rezeptoren hingegen verursacht eine Hyperpolarisation der Kalium-Kanäle, die ebenfalls eine Kaskade von biochemischen Abläufen hervorruft, welche zur Unterdrückung des Schmerzreizes führt. Die Hemmung der schmerzleitenden Neuronen geschieht also durch das Verhindern der Schmerzweiterleitung im zentralen Nervensystem.

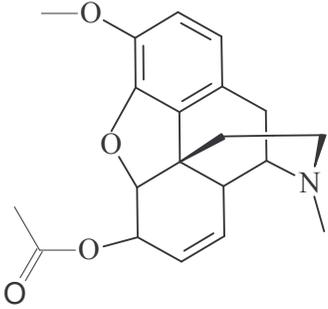
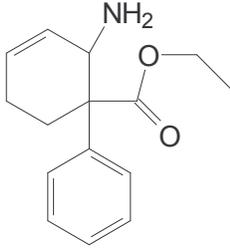
Die ebenfalls präsynaptischen  $\delta$ -Rezeptoren werden vornehmlich von endogenen Substanzen (v.a. Enkephalin) und weniger von zugeführten Wirkstoffen aktiviert.

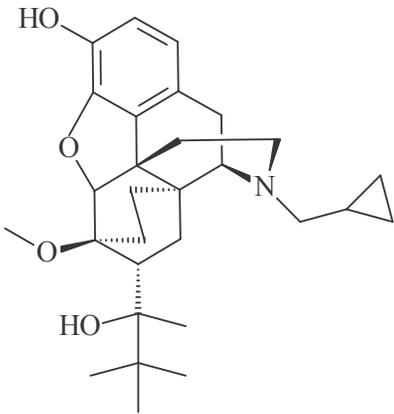
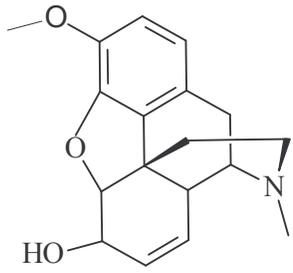
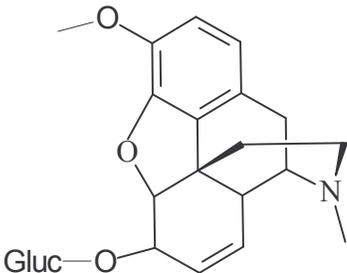
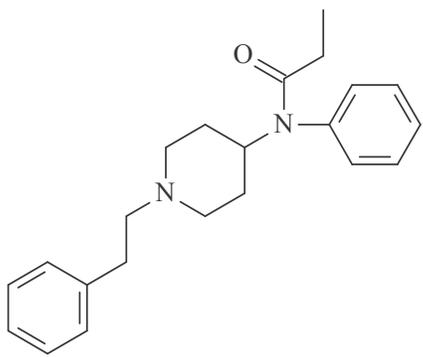
Ebenfalls von Opiaten ansprechbar sind die  $\kappa$ -Rezeptoren im Rückenmark. Das Suchtpotential bei der Aktivierung von  $\kappa$ -Rezeptoren ist zwar wesentlich geringer als

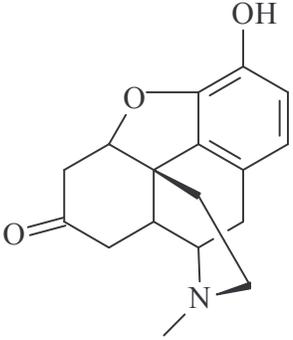
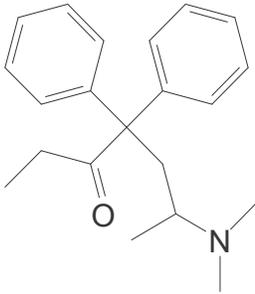
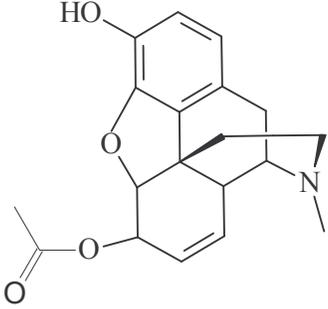
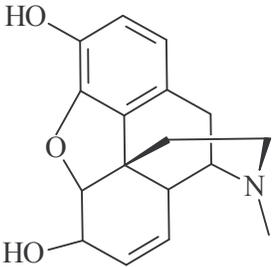
bei den anderen Rezeptoren (v.a. als bei  $\mu$ -Rezeptoren), jedoch sind Nebenwirkungen oftmals größer, was zu symptomatisch depressiven Stimmungen führen kann. Deswegen werden  $\kappa$ -Agonisten in der Schmerztherapie seltener eingesetzt. Neben der analgetischen Wirkung ist nur die gezielte Unterdrückung des Hustenreizes (Codein findet häufig Verwendung in Antitussiva) eine positive Wirkung, während andere Effekte wie Übelkeit und Erbrechen, Atemdepression und Verstopfung Probleme bei der Behandlung mit diesen Medikamenten verursachen können.

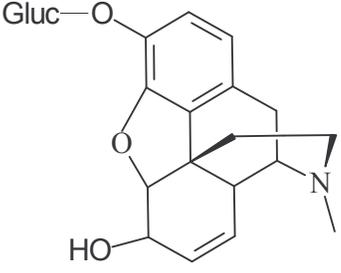
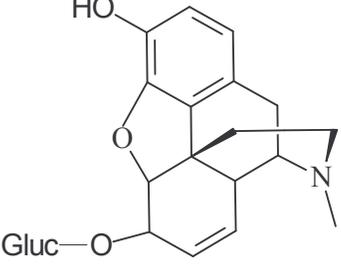
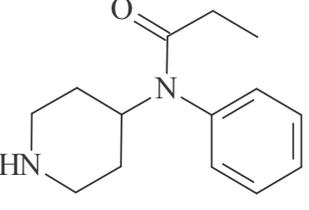
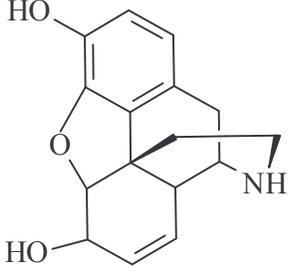
Opioide sind die am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe zur Behandlung von starken und stärksten Schmerzen. Sie werden je nach Wirkstoff, therapeutischem Zweck und notwendiger Dosierung vor allem in Form von Tabletten, Injektionslösungen und Kapseln, jedoch auch als Saft, Tropfen und Zäpfchen verabreicht. Aufgrund der möglichen Entwicklung von Abhängigkeiten (v.a. bei Heroin) ist Vorsicht bei der Anwendung geboten und es wird versucht, die Medikamente in möglichst geringen Dosen zum Einsatz zu bringen.

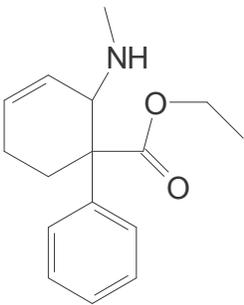
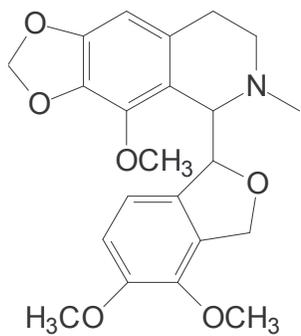
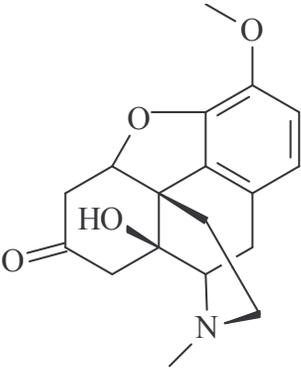
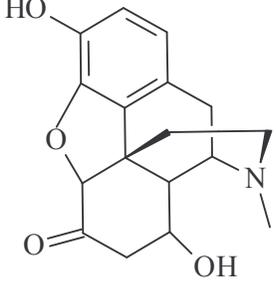
Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Opioide werden kurz vorgestellt:

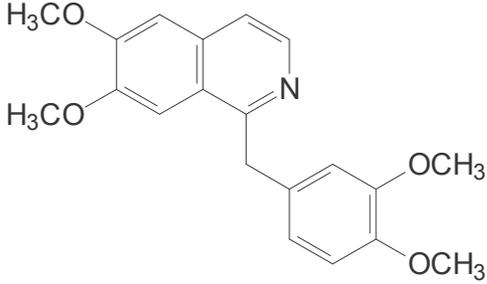
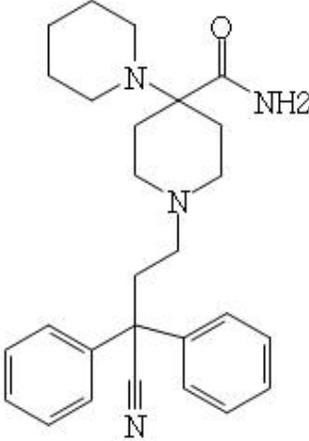
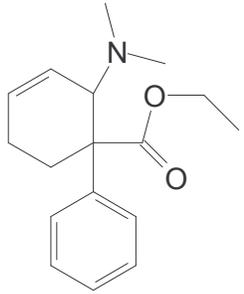
	<p><b><u>Acetylcodein (AC):</u></b> Dieses Nebenprodukt entsteht ausschließlich während der Heroinherstellung beim Kochen des Rohopiums mit Essigsäure durch Acetylierung der freien OH-Gruppe. Da es nur in der nicht aufgereinigten Droge zu finden ist, gilt es als guter Marker für den Konsum von Straßenheroin.</p>
	<p><b><u>Bis-Nortilidin (BNO):</u></b> Der Metabolit des Tilidin entsteht durch zweifache Demethylierung. Die analgetische Wirkung ist viel geringer als die des Nortilidin (s.u.).</p>

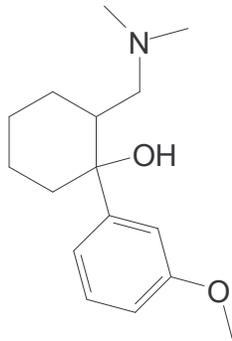
	<p><b><u>Buprenorphin (BUP):</u></b> Die Anwendung von Buprenorphin erfolgt bei starken und stärksten Schmerzen. Das Analgetikum kann sowohl oral als auch per Injektion verabreicht werden. Es hat eine 40-fach höhere Wirkstärke als Morphin und auch eine längere Wirkungsdauer.</p>
	<p><b><u>Codein (COD):</u></b> Codein ist das 3-Methoxyderivat von Morphin und wird im Körper zu diesem metabolisiert. Durch diesen Zwischenschritt tritt seine Wirkung langsamer und weniger intensiv ein. Es wird häufig als Antitussivum und als Analgetikum eingesetzt.</p>
	<p><b><u>Codein-6-Glucuronid:</u></b> Der Hauptmetabolit wird vornehmlich in der Leber gebildet, um den Wirkstoff durch eine bessere Wasserlöslichkeit mit dem Urin ausscheiden zu können.</p>
	<p><b><u>Fentanyl (FEN):</u></b> Dieser stark lipidlösliche Wirkstoff wird über Pflaster verabreicht und hat die gleichen analgetischen Eigenschaften wie Morphin; die Wirkungsweise beruht auf einem Angriff auf die <math>\mu</math>-Rezeptoren. Aufgrund der hohen Lipophilie ist teilweise nur ein Fünfzigstel bis ein Hundertstel der Morphindosis nötig, weswegen Fentanyl auch in viel geringeren Konzentrationen als Morphin angewandt wird.</p>

	<p><b><u>Hydromorphon (HYD):</u></b> Das dem Morphin sehr ähnliche Hydromorphon ist etwa sieben mal stärker analgetisch wirksam als Morphin, sein Hauptmetabolit Hydromorphon-3-Glucuronid ist sehr wenig wirksam. Ein großer Vorteil ist die Tatsache, dass über 50% weniger Nebenwirkungen als bei Morphin auftreten</p>
	<p><b><u>Methadon (MET):</u></b> Dieses Racemat, welches unter dem Namen Polamidon im Handel erhältlich ist, kann per Injektion oder oral verabreicht werden. Methadon bzw. Levomethadon bindet an die Opioidrezeptoren, genauer an den <math>\mu</math>-Rezeptor, und löst damit ähnliche Wirkungen aus wie Morphin und Heroin. Im Projekt wird nicht zwischen den beiden Stereoisomeren unterschieden, obwohl allein die L-Form pharmakologisch wirksam ist.</p>
	<p><b><u>6-Monoacetylmorphin (MAM):</u></b> Heroin (Diacetylmorphin) wird im Körper sehr schnell deacetyliert und bildet diesen typischen Metaboliten. Der Nachweis von 6-MAM gilt daher als sicheres Zeichen eines Heroinkonsums.</p>
	<p><b><u>Morphin (MOR):</u></b> Morphin ist weiterhin das meist verwendete Schmerzmittel bei starken Schmerzen. Durch Acetylierung der beiden OH-Gruppen entsteht Heroin, welches aufgrund der größeren Lipophilie schneller die Blut-Hirn-Schranke überwindet und so letztlich für das wesentlich höhere Abhängigkeits-</p>

	<p>potential verantwortlich ist. Morphin ist auch das Grundgerüst vieler natürlicher und halbsynthetischer Opioide.</p>
	<p><b><u>Morphin-3-Glucuronid (M3G):</u></b> Knapp 90% des in den Körper gelangenden Morphins wird in diesen Hauptmetaboliten umgewandelt. M3G hat keine physiologische Wirkung mehr und wird aufgrund der höheren Hydrophilie schneller mit dem Urin ausgeschieden, wo er in großen Konzentrationen detektiert ist.</p>
	<p><b><u>Morphin-6-Glucuronid (M6G):</u></b> Dieser Metabolit wird zu weniger als 10% aus dem Wirkstoff gebildet. Das Stoffwechselprodukt ist allerdings physiologisch ähnlich wirksam wie Morphin selbst und kann die Wirkung von daher deutlich verlängern.</p>
	<p><b><u>Norfentanyl (NFE):</u></b> Der wichtigste Metabolit des hochwirksamen Opioids scheint selbst keine analgetische Wirkung mehr zu besitzen.</p>
	<p><b><u>Normorphin (NMO):</u></b> Dieses oxidative Abbauprodukt wird im Opiatstoffwechsel in geringem Maße gebildet.</p>

	<p><b><u>Nortilidin (NTI):</u></b> Der Metabolit des Tilidin ist der eigentlich wirksame Stoff und bindet sich an die Opioidrezeptoren. Im Gegensatz zu anderen Opioiden wirken weder Tilidin noch Nortilidin dämpfend auf das Hustenzentrum, können aber wie diese zu Gewöhnung und Abhängigkeit führen</p>
	<p><b><u>Noscapin (NOS):</u></b> Noscapin ist ein typischer Begleitstoff aus dem Rohopium und kann in (teilweise sehr großen) Anteilen im Straßenheroin und nach dessen Konsum nachgewiesen werden. Wegen seiner hustenstillenden und schmerzbetäubenden Wirkung wird es zudem noch in seltenen Medikamenten eingesetzt.</p>
	<p><b><u>Oxycodon (OXC):</u></b> Dieses Analgetikum besitzt eine etwa doppelt so große Wirkstärke wie Morphin, wird jedoch aufgrund des deutlich höheren Abhängigkeitspotentials nicht so häufig in der Schmerztherapie verwendet. Wenn, dann als retardierte Formulierung mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung. Das Nebenwirkungsprofil entspricht dem des Morphins, allerdings wurden keine zentralnervösen Nebenwirkungen (z.B. Halluzinationen) beobachtet.</p>
	<p><b><u>Oxymorphon (OM):</u></b> Oxymorphon hat ebenfalls eine größere Wirkstärke als Morphin und wird meist subcutan appliziert, kommt jedoch wesentlich seltener zum Einsatz.</p>

	<p><b>Papaverin (PAP):</b> Wie der Name es schon herleiten lässt, ist auch dieses Alkaloid im Schlafmohn (<i>Papaver somniferum</i>) enthalten. Es kann auch im Straßenheroin und im Urin von Straßenheroinkonsumenten detektiert werden. In der Medizin findet der Wirkstoff gelegentlich Anwendung bei der Behandlung von Impotenz.</p>
	<p><b>Piritramid (PIR):</b> Bei starken bis stärksten Schmerzen wird dieses Opioid eingesetzt. Es ist chemisch mit dem Levomethadon verwandt und ist in der Wirkung etwa mit Morphin vergleichbar.</p>
	<p><b>Tilidin (TIL):</b> Das opioide Schmerzmittel Tilidin (ohne Kombination mit Naloxon) wird im Betäubungsmittelgesetz (BtMG) als Betäubungsmittel eingestuft und als solches Schmerzmittel in der Therapie nur selten verwendet. Eine weitaus häufigere Verwendung findet Tilidin in festen Kombinationen mit der Substanz Naloxon, weil Tilidin in dieser Form nicht dem BtMG unterliegt.</p>



**Tramadol (TRA):** Dieses häufig verwendete Opioid wird bei mäßig starken bis starken Schmerzen angewandt. Die Darreichungsform ist meist oral, kann aber auch parenteral erfolgen.

**Tabelle 2: Vorstellung der Opioide für die vorliegende Arbeit**

## **2 Praktische Anwendungen und deren Zielsetzungen**

### **2.1 Allgemeines**

Die Analytik von Opioiden spielt eine große Rolle in der modernen Analytik. Gerade im Bereich der Forensik ist die Bestimmung dieser Wirkstoffe bei Verkehrsdelikten (Drogennachweis oder Drogenfreiheitskontrolle) oder Vergiftungsfällen (z.B. Heroinmissbrauch) neben der Blutalkoholbestimmung und der Analytik von Cannabinoiden eines der Hauptaufgabenfelder von toxikologischen Labors. Die zentrale Bedeutung nimmt dabei die GC-MS Analytik ein, für die bereits seit langer Zeit etablierte Methoden eingesetzt werden. Jedoch basieren auch zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Opioiden auf der HPLC mit elektrochemischer, Fluoreszenz- oder UV-Detektion. Nachteile dieser Methoden sind meist die geringere Empfindlichkeit, vor allem bei HPLC-Methoden, oder auch analytische Einschränkungen der GC-MS, bei der oftmals lange Analysenzeiten und Derivatisierungsschritte notwendig sind. Viele Analyten, speziell thermolabile oder polare Substanzen (wie z.B. Metabolite) lassen sich gaschromatographisch gar nicht oder nicht direkt (z.B. Bestimmung von Glucuroniden) bestimmen. Dort bietet sich HPLC-MS als Kopplungstechnik der Wahl an, die eine schnelle, selektive und sensitive Bestimmung verschiedenster Analyten über einen wesentlich größeren Bereich ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit soll die analytische Leistungsfähigkeit eines HPLC-Triple Quadrupol Systems gegenüber alternativen Analysesystemen anhand von verschiedenen Einsatzbereichen in der Analytik von Opiaten und Opioiden überprüft werden. Dabei steht neben der Methodenentwicklung und Validierung insbesondere der Beleg der Anwendbarkeit für die Analytik von verschiedensten biologischen Matrices im Vordergrund.

## 2.2 Methoden in der Literatur

Es wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Methoden für die Bestimmung von Opiaten und Opioiden in unterschiedlichen Körpermatrices mittels HPLC-MS publiziert.

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über diese Methoden. Es wird ersichtlich, dass die meisten Publikationen sich auf MOR und seine Metaboliten beziehen, aber auch die Heroin- und Straßenheroinmarker sowie einzelne Opioid-Analgetika nebst ihrer Metaboliten waren von Interesse.

Analyte	Matrix	Extraktion	HPLC	MS	LOQs [ng/ml]	Wiederfindungen [%]	Präzisionen [%]	Literatur
MAM, MOR, M3G, M6G	Blut, Liquor, Glaskörperflüssigkeit, Urin	C18 SPE	RP	APCI-MS	0.1 - 1	82 - 89	k.A.	10
AC, COD, C6G, PAP, NOS, HER, MAM	Urin	C18 SPE	RP18	APCI-MS in SIM	0.5 - 2	89 - 95	k.A.	11
MOR, M3G, M6G, MAM, COD, C6G, DHC, DHM, BUP, MET, TRA, IOBGAINE, LSD	Serum, Blut, Urin, weitere Körperflüssigkeiten	C18 SPE	RP18	APCI-MS	0.1 - 2.5 (-100 C6G)	41-98	k.A.	12
BUP, NBUP	Blut	enzym. Hydrolse, Proteinfällung, Extrelut SPE	RP 18	MS	0.05	56 - 60	< 4	13
BUP, NBUP	Körperflüssigkeiten, Haare	LLE	RP 18	ESI-MS	0.05 - 0.1			14
Amph & COC + Metabolite, MAM, MOR, M3G, M6G	Urin	C18 SPE	RP	ESI-MS in SIM	k.A.	k.A.	k.A.	15
MOR, COD, LSD, BE	Serum	Mischphasen-SPE	keine: Flow Injection	MS/MS (QQQ)				16
MOR, M3G, M6G	Serum	Ethyl-SPE	RP	ESI-MS in SIM	10 - 100	70 - >95	k.A.	17
HER, MAM, MOR, M3G, M6G, COD	Serum	Ethyl-SPE	RP	APCI-MS in SIM	0.5 - 4	44 - 100	0.9 - 6.7	18
MAM, MOR, M3G, M6G, COD, C6G	Blut	C8 SPE (kein 18!)	RP18	ESI-MS in SIM	0.5 - 5	70 - 84	6 - 11	19
MOR, M3G, M6G, NMOR	Serum	C2 SPE	RP Phenyl	(APCI?)-MS/MS	4 - 12	64 - 100	-11	20
MAM, MOR, M3G, M6G, COD, C6G	Serum, Blut, Urin, Liquor, Glaskörperflüssigkeit	C18 SPE	RP 18	APCI-MS in SIM	0.5 - 100	85 - 98	nicht lesbar!	21
MOR, M3G, M6G	Serum	SPE	Normal-Phase	ESI-MS/MS	0.5 - 10	70 - 93	<20	22

MOR, M3G, M6G	Serum	C18 SPE	RP 18	ESI-MS in Pseudo-MRM	1 - 5	98 - 108	2.2 - 15.2	23
MOR, M3G, M6G	Serum	C18 SPE	RP 18	ESI-MS	0.4 ng/ml		2 - 9	24
MOR, M3G, M6G, NMOR	Serum, Urin	C2 SPE	RP 18	ESI-MS/MS	k.A.	65 - 88	<15	25
HYD + Metabolite	Serum	C2 SPE	RP Phenyl	ESI-MS/MS	2 - 5	>76	<12	26
HER, MAM, MOR, NMOR, COD, NCOD, NOS, PAP, MET + COC + Metabolite	Oral fluid	Proteinfällung mit ACN	Synergy Polar RP	APCI-MS/MS	0.25 - 5	86 - 115	2.3 - 21.9	27
COC-Metabolite, NM, MOR, NCOD, MAM, HER, AC, PAP, MET, EDDP, Methadol	Urin	Direktinjektion	Synergi Polar RP	APCI-MS/MS (Ion Trap)	10 - 100	KEINE	3.1 - 17.5	28
BUP + Metabolite	Urin	SPE Bond Elute Certify	RP Phenyl	ESI-MS/MS	1 ng/ml cut-off	77 - 98	1 - 23	29
BUP, MET, EDDP, TIL, MOR, DHC, COD, MAM, weitere Opioide)	Haare	MeOH in Ultraschall	C8 Zorbax	KA-MS/MS	k.A.	k.A.	k.A.	30
BUP + NBUP	Serum	C8 SPE	RP18	APCI-MS/MS	0.01 - 0.05	83 - 92	2 - 5	31
FEN + 5 weitere	Blut	Proteinfällung, LLE, SPE	RP und NP ?!?	ESI-MS/MS	~0.05 ng/ml	29 - 98	k.A.	32
BUP + Metabolite	Serum	C18 SPE	RP18	ESI-MS/MS	0,1	77 - 88	0.6 - 7.2	33
HYC + HYD	Serum	SPE Mixed Mode	NP	ESI-MS/MS	0,1	78 - 86	<4.7	34
Cannabinoide, Opioide, COCe + Metabolite		C 18 SPE	RP 18	TIS-MS/MS	0.2 - 4.0	n.s.	0.5 - 16.7	35
Opiate, Ampf, COCe + BE	Speichel	SPE mixed mode	RP Phenyl	ESI-TOF-MS	0.2 - 1.1	52 - 99	1.8 - 16.8	36
Enantiomerentrennung von Methadon	Serum		Chirale AGP Säule				< 8.0	37
MOR, M3G, OC, NOC	Rattenserum	ACN-Proteinfällung	RP18	ESI-MS/MS	k.A.	k.A.	0.4 - 9.3	38
BUP, NBUP, Naloxone	Blut, Serum	LLE	RP18	ESI-MS/MS	2.8 - 8.4	54 - 81	<15	39
BUP, BUP	Blut	ACN-Proteinfällung + SPE	RP 18	ESI-MS in SIM	0,1	57 - 59	<4	40
BUP	Serum	LLE	RP8	ESI-MS/MS	0,1	70 - 87	<14	41
OX, OM, NOC	Rattenserum, Rattenhirn	C18 SPE	RP (SB-CN)	(ESI?)-MS/MS	4 - 20	86 - 127	< 14.9	42
HER, MET, COC, AC + Metabolite	Serum	Mischphasen-SPE	RP	ESI-MS/MS	~ 5	76 - 104	0.0 - 11.2	43
MET + Metabolite, enantioselektiv	Serum	Mischphasen-Kationentauscher-SPE	Chirale Säule	ESI-SIM	0.1 - 1	n.s.	<5.3	44
FEN + NF	Primatenserum	LLE	RP	ESI-SIM	0.025 - 0.05	40 - 92	0.3 - 12.8	45

BUP + NBUP	Rattengehirn, Rattenserum	Mischphasen-SPE	RP8	ESI-SIM	5 - 7	n.s.	± 15	46
COD, MAM, MOR Metabolite, HYM, OC, OM	Urin	Nur Zentrifugieren	RP-Phenyl	ESI-MS/MS	~ 0.25	n.s.	1.1 - 16.7	47
MET enantioselektiv	Serum	LLE	Chirale Säule	ESI-MS				48
FEN, NF	Serum	LLE	RP 18	ESI-MS/MS	0.05	67 - 90	2.1 - 18	49
FEN, NF	Urin, Serum	LLE	RP 18	ESI-MS/MS	0.02 - 0.1	81 - 96	1.4 - 8.1	50
PIR	Serum	LLE	RP 18	APCI-MS/MS	0.3	85	6.1 - 12.8	51
BUP, nor-BUP	Serum	C18 SPE	RP 18	ESI-MS	0.1	n.s.	3.7 - 14.7	52

**Tabelle 3: HPLC-MS Methoden zur Analytik von Opioiden**

Je nach Zielsetzung kamen sehr unterschiedliche Techniken für jeden Bereich der Komplettanalyse zur Anwendung. So werden in verschiedenen Methoden für die gleichen Analyten in teilweise unterschiedlichen Matrices verschiedene Aufarbeitungstechniken angewandt - neben der am häufigsten verwendeten Festphasenextraktion mit unterschiedlichsten Säulenmaterialien spielen die einfache Proteinfällung, die Flüssig-Flüssig-Extraktion und auch die Direktinjektion wichtige Rollen (Tabelle 3). Ebenso wurden verschiedene chromatographische Trennsäulen verwendet, von denen die modifizierten und nicht modifizierten C18-Oberflächenmaterialien die größte Bedeutung hatten. Auch hier gibt es jedoch Variationen, je nach Anwendung bis hin zu „exotischen“ Normalphasensäulen und chiralen (Normalphasen-) Säulen zur Bestimmung von Enantiomeren. Die Ionisierungstechniken beschränken sich auf die beiden wichtigsten APCI und vor allem ESI, als MS-Modi kommen aufgrund der Fragestellung der quantitativen Analyse ausschließlich SIM als MS- und MRM als MS/MS-Modi in Frage.

Die Methoden wurden größtenteils einer Validierung unterzogen, in den meisten Fällen jedoch ohne festgelegten Vorschriften zu folgen. Dennoch geben die Werte gute Hinweise auf die methodischen Kenndaten. Die Nachweisgrenzen schwanken stark und bewegen sich, abhängig vom Analyten im Bereich von 0.01 bis 100 ng/ml, während die Labor- und Wiederholpräzisionen sowie die Richtigkeiten Werte bis etwa 23% erreichten.

In der vorliegenden Arbeit soll die Leistungsfähigkeit der HPLC Triple Quadrupol Massenspektrometrie anhand verschiedener MS Techniken und Anwendungen im

Bereich der forensisch-toxikologischen und klinischen Analytik von Opioiden untersucht werden. Dafür müssen entsprechend der Fragestellung entsprechende Untersuchungsmethoden entwickelt, geprüft und statistisch abgesichert (validiert) werden. Das Ziel ist die Beantwortung verschiedener Fragestellungen in den unterschiedlichen analytischen Einsatzbereichen, welche in den anschließenden Kapiteln kurz vorgestellt werden:

1. Qualitative und quantitative Analytik von Heroinmarkern in Urinproben im Rahmen des bundesdeutschen Modellprojekts zur heroingestützten Behandlung Opiatabhängiger zur Differenzierung eines Konsums von Heroin oder Straßenheroin
2. Analytik von Markersubstanzen in Urin und Serum zur Unterscheidung eines Heroinkonsums und dem Verzehr von mohnhaltigen Lebensmitteln
3. Analytik von natürlichen und synthetischen Opioiden im Einsatz der Palliativmedizin zur Ermittlung der wirksamen Konzentrationen im Serum und der Compliance mittels Haaranalysen

### ***2.3 Analytik von Opiaten in Urinproben nach Konsum von pharmazeutischem Heroin und Straßenheroin***

Der Missbrauch von Heroin ist ein weit verbreitetes gesellschaftliches Problem, welches in allen Kulturen bekannt ist und schwerwiegende soziale und wirtschaftliche Konsequenzen mit sich bringt. Zur Eindämmung des Heroinmissbrauchs und damit seiner Folgeprobleme wie sozialer Verelendung, erhöhter Kriminalität, aber auch Infektionskrankheiten und Tod wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Drogensatz- und –entzugsprogramme entwickelt und durchgeführt. In verschiedenen europäischen Ländern gibt oder gab es bereits Programme, bei denen Abhängige kostenlos Heroin zur Injektion oder Inhalation erhalten, so in der Schweiz<sup>53</sup>, in den Niederlanden<sup>54</sup>, Spanien<sup>55</sup> oder Großbritannien<sup>56</sup>. Im März 2002 startete das „Modellprojekt heroingestützte Behandlung“, bei dem schwerst Opiatabhängige injizierbares Heroin als Medikament bekommen, mit der Eröffnung

der ersten Heroinambulanz in Deutschland<sup>57,58</sup>. Parallel zur Gruppe der heroinbehandelten Probanden erhält eine Kontrollgruppe unter gleichen Behandlungsbedingungen die Ersatzdroge Methadon zur oralen Aufnahme. Alle Probanden der Studie sind Abhängige mit längerer Drogenvergangenheit und gescheiterten Methadontherapien<sup>57</sup>.

Sowohl die Teilnehmer der Heroin- als auch die Teilnehmer der Methadongruppe müssen zu bestimmten Zeitpunkten Urin- und Haarproben abgeben. Durch Analyse dieser Proben soll neben verschiedenen soziologischen und kriminologischen Aspekten die Frage geklärt werden, ob die Probanden zusätzlich zum verabreichten Heroin bzw. Methadon noch weitere Drogen, vor allem Straßenheroin, konsumieren und damit ob die Medikation mit dem reinen Wirkstoff Diacetylmorphin erfolgreicher ist als die bisher übliche Substitution mit Methadon. Dafür muss eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt werden, mittels derer auf Basis von Urinanalysen zwischen dem Konsum von pharmazeutischem Heroin und Straßenheroin unterschieden werden kann.

In der Literatur sind viele Methoden zur Untersuchung von Opiaten beschrieben, die unter anderem eine Unterscheidung eines Straßenheroinkonsums vom Konsum der Opiate COD oder MOR ermöglichen<sup>59-62</sup>. Jedoch gelingt erst durch die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie eine gleichzeitige Bestimmung der freien Wirkstoffe sowie ihrer Glucuronide<sup>10,17,18,21,24</sup>.

Der Metabolit MAM wird trotz eines geringen Nachweisbarkeitsfensters in zahlreichen Arbeiten als der spezifische Marker für den Konsum von Heroin verwendet, weil er ausschließlich aus dem Abbau von Diacetylmorphin resultiert<sup>62</sup>.

Als Straßenheroinmarker werden COD und vor allem AC vorgeschlagen<sup>11,63-65</sup>. COD wird als natürliches Begleitalkaloid zusammen mit MOR aus dem Schlafmohn mitextrahiert und bei der Heroinsynthese ebenfalls acetyliert. Daher ist das halbsynthetische Derivat AC ausschließlich in Straßenheroin zu finden und gilt als der spezifische Marker für den Straßenheroinkonsum. Die Gehalte im Straßenheroin schwanken zwischen 0,25 und 10,2%<sup>64</sup>. Die natürlichen Alkaloide NOS und PAP werden von verschiedenen Arbeitsgruppen als Marker für den Konsum von Straßenheroin vorgeschlagen<sup>11,56,66</sup>. Mit Gehalten von 0 - 61% (NOS) bzw. 0,1 -

19,7% (PAP) können sie zwar in höheren Konzentrationen im Straßenheroin vorkommen<sup>68,69</sup>, jedoch können sie ebenfalls Wirkstoffe seltener Medikamente sein oder auch in mohnhaltigen Lebensmitteln nachgewiesen werden<sup>70-82</sup>. Auch müssen positive Nachweise von COD, MOR und deren Glucuroniden nicht unbedingt die Folge eines Missbrauchs von Opiaten sein, da auch sie nicht selten in Medikamenten (v.a. Antitussiva) und in Mohnprodukten sowie nach deren Konsum nachweisbar sind.

Da das in der Studie verabreichte Heroin ausschließlich den Wirkstoff Diacetylmorphin enthält, beweist ein Nachweis von COD, seinem Glucuronid, vor allem aber AC sowie NOS und PAP einen Beikonsum von Straßenheroin. Mittels der Urinanalysen soll geklärt werden, ob ein unterschiedliches Konsumverhalten der beiden Behandlungsgruppen in Bezug auf Straßenheroin und weitere Drogen festgestellt werden kann und wie sich dies anhand von Analysendaten belegen lässt.

## ***2.4 Analytik von Opiaten in Blut- und Urinproben nach Mohnkuchenverzehr***

Verschiedene Studien der letzten Jahre belegen die These, dass es nach Verzehr mohnhaltiger Lebensmittel zu positiven Opiatbefunden kommen kann. Positive Befunde gibt es vornehmlich in Urinproben<sup>61,70-78,80-82,82-88</sup> aber auch in Blut bzw. Serum<sup>70,76,84,86</sup>, Haaren<sup>86</sup> und Speichel<sup>61</sup>. Dabei werden im Urin zum Teil sehr hohe Gesamtmorphinkonzentrationen bis 27,5 µg/ml erreicht<sup>70</sup>, jedoch auch im Blut bzw. Serum kann Gesamt-MOR (MOR + MOR-Glucuronide) in Konzentrationen bis 135 ng/ml und selbst freies MOR in Konzentrationen bis 13,5 ng/ml nachgewiesen werden<sup>70,76,84</sup>. Des Weiteren wird in zahlreichen Studien auch das Alkaloid COD nachgewiesen<sup>73,76-78,80,84,86</sup>. Die Konzentrationen in Körperflüssigkeiten sind dabei stark abhängig von den Opiatgehalten in den Mohnprodukten selbst. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in den verschiedenen Studien ermittelten Konzentrationen der einzelnen Opiate in Mohnsamen und Mohnprodukten.

Produkt	Konzentrationsbereiche [ $\mu\text{g/g}$ ]					Literatur
	MOR	COD	NOS	PAP	Thebain	
Mohnsamen	0.6 - 206	0 - 5.6	n.b.	n.b.	n.b.	70
Weißer Mohnsamen	450	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	71
Mohnsamen	107-164	17.7-31.8	n.b.	n.b.	8.2-20.7	72
Mohnsamen	108	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	74
Mohnsamen	5.1-106	0.1-3.8	n.b.	0-3.6	0.3-14	73
Mohnsamen	4-200	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	75
Schwarzer Mohnsamen	17-294	3 -14	n.b.	n.b.	n.b.	76
Weißer Mohnsamen	58.4-62.2	28.4-54.1	n.b.	n.b.	n.b.	77
Blaue und weißer Mohnsamen	0.1-11.9	0.1-0.7	n.b.	n.b.	n.b.	78
Mohnsamen	39-167	1.80-44	0.84-230	0.17-67	1.0-41	79
Mohnsamen	2-251	0.4-57.1	n.b.	n.b.	n.b.	80
Mohnfüllung in Backwaren	17.4-18.6	2.3-2.5	n.b.	n.b.	n.b.	81
Mohnsamen und Backmischung	0.6 - 151.6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	82

n.b. = nicht bestimmt

**Tabelle 4: Opiatgehalte in verschiedenen Mohnprodukten**

Da sowohl der Heroinmarker 6-Monoacetylmorphin, der zur Unterscheidung eines Mohnkuchen- und eines Heroinkonsums herangezogen werden kann<sup>85</sup>, wie auch der Marker für den Konsum von Straßenheroin AC<sup>11,63,67</sup> nur über einen kurzen Zeitraum nachweisbar sind (üblicherweise weniger als 8 Stunden), MOR und COD (und ihre Glucuronide) jedoch nach Verzehr von Mohnprodukten detektiert werden können, stellt sich die Frage nach weiteren charakteristischen Begleitsubstanzen, die zur Unterscheidung einer unbewussten Opiataufnahme durch mohnhaltige Lebensmittel von einem bewussten/beabsichtigtem Konsum von Heroin herangezogen werden können.

In einer Ingestionsstudie sollen daher verschiedene Fragen geklärt werden:

1. Welche Opiatalkaloide sind in handelsüblichen Mohnsamen und Mohnprodukten enthalten und wie sind ihre Konzentrationen?
2. Sind die verschiedenen Opiate nach Verzehr von Lebensmitteln mit handelsüblichem Mohn bei Probanden nachweisbar? Wie hoch sind dabei die Konzentrationen und wie lange sind die einzelnen Opiate nachweisbar?

3. Welche Markersubstanzen können zur Unterscheidung eines Verzehrs von Mohnprodukten und eines Konsums von pharmazeutischen Heroin oder Straßenheroin herangezogen werden?

Die Methode wird dafür um die beiden PAP-Metaboliten Desmethylpapaverin und Desmethylpapaverin glucuronid erweitert. Diese beiden Stoffwechselprodukte werden auch als Marker für den Konsum von Straßenheroin verwendet<sup>56</sup> - von daher sollte untersucht werden, inwieweit sie auch nach Konsum von mohnhaltigen Lebensmitteln nachweisbar sind und ihre Anwendbarkeit als Straßenheroinmarker bestätigt werden kann.

## ***2.5 Analytik von Opioiden in Serum- und Haarproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung***

Opioide sind die potentesten und daher meist verwendeten Medikamente zur Behandlung von starken Schmerzen. Verschiedene Faktoren spielen für die Auswahl der geeigneten Analgetika eine Rolle. Diese sind neben der schmerzlindernden Potenz die Schnelligkeit und Dauer der Wirkung, die unterschiedlichen Darreichungsformen, mögliche Toleranzentwicklungen bei längerer Gabe sowie eventuelle Nebenwirkungen.

Zur Verbesserung der Wirkung bei gleichzeitiger Minderung der Nebenwirkungen werden Schmerzmittel in der Palliativmedizin oftmals als Kombinationen und im Gegenzug in geringerer Dosis appliziert. Andererseits werden bei einer symptomatischen Dosierung zum Teil sehr große Mengen an Opioiden verabreicht. Inwieweit dann die in gängigen Datensammlungen<sup>89-92</sup> propagierten therapeutischen Konzentrationsbereiche gelten, ist nicht abzusehen. Ziele der gegenständlichen Studien war die Entwicklung einer Untersuchungsmethode, mit der gängige Opioide in relevanten Konzentrationsbereichen quantitativ bestimmt werden können, und die quantitative Bestimmung dieser Wirkstoffe in Serum- und Haarproben von Patienten aus palliativer Behandlung.

Viele ältere Methoden für immunchemische Bestimmungen, HPLC mit unterschiedlichen Detektionsarten<sup>93-101</sup> und auch GC-MS<sup>102-107</sup> sind in der Literatur

beschrieben, können jedoch nicht immer zufriedenstellende Resultate in Bezug auf Empfindlichkeit (v.a. in der HPLC), Analysendauer (v.a. GC-MS Methoden) und Anwendungsbreite liefern- in der GC-MS können polare Moleküle (z.B. Metaboliten) nicht direkt erfasst werden und in der HPLC können Detektionsprobleme bei Analyten mit ähnlichen Strukturen, vor allem aber Probleme aufgrund nicht ausreichender Empfindlichkeit auftreten. Mittlerweile existieren auch zahlreiche HPLC-MS-Methoden zur Untersuchung von Drogen und Arzneistoffen in Blut, Serum, Urin und Haaren, davon auch einige Methoden, die zum Screening bestimmter Substanzklassen eingesetzt werden. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Untersuchung von Opioiden beschränken sich meist auf einzelne Wirkstoffe und ihre Metaboliten, vornehmlich MOR und COD<sup>10,17-25,38</sup> und das MOR-Derivat BUP<sup>13,14,29,31,33,39-41,46,52</sup> und ihre Metaboliten, aber auch weitere Wirkstoffe wie FEN<sup>32,45,49,50</sup>, MET<sup>37,44,48,108</sup>, HYD<sup>26,34,109</sup> oder OC<sup>42,110</sup>. Methoden zur Bestimmung neuerer und seltener eingesetzter Opioiden wie OM<sup>42</sup>, PIR<sup>51</sup>, TIL und TRA<sup>111</sup> sind hingegen selten beschrieben. Des Weiteren werden Screening-Methoden zur simultanen Bestimmung verschiedener Opioiden selten beschrieben, weswegen das vorrangige Ziel die qualitative und quantitative Bestimmung der bei den Patienten eingesetzten Wirkstoffe in nur einer einzigen Analyse ist. Somit ist es möglich, mit einer einzigen Methode, aktuelle Spiegelkonzentrationen von Wirkstoffen im Serum und die Medikation über einen längeren Zeitraum mittels Haaranalyse zu bestimmen.

## **3 Materialien und Methoden**

### **3.1 Chemikalien und Stammlösungen**

MAM, BUP, COD, FEN, HYD, MET, M3G, MOR, OC und ihre deuterierten Analoga sowie M6G, NF, OM und TRA werden von der Firma LGC Promochem™ (Wesel, Deutschland) bezogen, AC, NOS, PAP und C6G von der Firma Lipomed AG GmbH (Bad Säckingen, Deutschland), BIS, NT, PIR und TIL von der Firma Goedecke (Freiburg i.B.). AC-D3 wird durch Acetylierung von COD-D3 unter Verwendung von Essigsäureanhydrid/ Pyridin (3:2 v/v), Reagenzien von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), bei einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 80 °C synthetisiert.

CertiPur® pH 9 und pH 4 Borsäure Puffer, HPLC-Wasser, Acetonitril, Methanol, Essigsäure und Ammoniumacetat werden von der Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) erworben und haben die Reinheitsstufen „p.A.“ oder „HPLC Grade“.

### **3.2 Standardlösungen für die quantitative Analyse**

#### **3.2.1 Standardlösungen für die Analytik von Opiaten in Blut und Urin nach Heroinkonsum und Mohnkuchenverzehr**

Es werden zwei Stammlösungen angesetzt. Der Standard-Mix von COD, C6G, MOR, M3G, M6G, NOS und PAP wird in Methanol gelöst, aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit werden MAM und AC in Acetonitril gelöst. Es werden vier Konzentrationsbereiche zur Kalibrierung angesetzt, abhängig von der erwarteten Konzentration der Analyten im Urin: 1 – 100 ng/ml (PAP), 5 – 500 ng/ml (AC, NOS), 10 – 1000 ng/ml (COD) und 25 – 2500 ng/ml (C6G, MAM, MOR, M3G, M6G).

Als interne Standards werden eine Lösung in Methanol von COD-D3, MOR-D3 und M3G-D3 sowie eine Lösung in Acetonitril von MAM-D3 und AC-D3 mit einer jeweiligen Konzentration von 1 µg/ml hergestellt.

### **3.2.2 Zusätzliche Materialien zur Untersuchung von Mohnproben und nach Verzehr von Mohnkuchen**

Zur Untersuchung der einzelnen Mohnprodukte werden CHROMAFIL® Membran-Einmalfilter von der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet.

Es werden Opiat-Schnelltests auf Schweißbasis „DrugWipe“ der Firma Securetec (München) eingesetzt. Die Anwendung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers durch mehrmaliges Wischen auf der Stirn des entsprechenden Probanden.

### **3.2.3 Standardlösungen für die Analytik von Opioiden in Serum- und Haarproben bei Patienten unter dauerhafter Opioid-Gabe**

Es wird eine Stammlösung mit allen Analyten angesetzt. Daraus werden Standardlösungen hergestellt, mit denen Leerseren in den erwarteten therapeutischen Konzentrationen dotiert und für die Kalibrierung aufgearbeitet werden: 0,5 – 100 ng/ml (BUP, FEN, HYD, NF, NMO, OM), 2,5 – 500 (M6G), 5 – 1000 ng/ml (BIS, COD, C6G, MET, M3G, MOR, NTI, PIR, TIL) und 25 – 10000 ng/ml (TRA).

Des Weiteren wird eine Lösung folgender interner Standards, jeweils in der Konzentration 1 µg/ml, hergestellt: BUP-D4, COD-D3, FEN-D5, HYD-D3, MET-D9, MOR-D3, M3G-D3, OM-D3 und PAP.

Alle Stamm- und Standardlösungen werden im Gefrierschrank bei – 18 °C gelagert.

## **3.3 Apparative Ausstattung**

### **3.3.1 Automatisierte Festphasenextraktion**

Für die automatisierte Festphasenextraktion steht eine Caliper Life Sciences (ehemals Zymark, Rüsselsheim, Deutschland) Rapid Trace SPE Workstation Systeme zur Verfügung. Diese besteht aus zwei einzelnen gekoppelten Einheiten, die an dieselben Lösemittelbehälter angeschlossen sind.

### **3.3.2 HPLC-MS/MS System**

Für die Analysen wird ein HPLC-MS/MS System der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Dieses besteht aus einer Agilent 1100 HPLC-Anlage (Waldbronn, Deutschland) mit binärer Pumpe, Degasser und Autosampler in Kombination mit einem PE Sciex (Toronto, Kanada) API 2000 Triple Quadrupol Massenspektrometer. Die analytische Trennsäule wird während der Methodenoptimierung zusammen mit den mobilen Phasen an die jeweilige analytische Fragestellung angepasst.

Verwendet werden folgende Säulen der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland):

- Analytik von Opiaten nach Heroinkonsum und Verzehr von mohnhaltigen Lebensmitteln: Phenomenex Aqua C18 (150 × 2 mm, 4 µm Partikelgröße) und Phenomenex Synergy Hydro RP C18 (150 × 2 mm, 4 µm Partikelgröße)
- Analytik von Opioiden zur Bestimmung der Konzentrationen im Serum und in Haaren: Phenomenex Synergy Max RP C12 (150 × 2 mm, 4 µm Partikelgröße)

### **3.3.3 Immunoassay Probenautomat**

Die Proben werden mittels des kommerziell erwerblichen Opiat Immunoassay CEDIA DAU der Firma Microgenics (Passau, Bayern) auf einem Cobas Mira S der Firma Roche (Mannheim, Baden) analysiert. Die Cut-Off Level für Opiate, den wichtigsten Test in dieser Arbeit, betragen 300 ng/ml für Urin und 25 ng/ml für Serum. Die weiteren Cut-Off Level für Urin betragen 500 ng/ml für Ampf, 300 ng/ml für Benz, 200 ng/ml für COC, 25 ng/ml für THC und 100 ng/ml für EDDP (MET-Metabolit).

### **3.3.4 Biegeschwinger**

Die Dichten der Urine werden mittels eines Biegeschwingers, Modell DMA 55 der Firma Paar (Ostfildern, Deutschland), bei einer Temperatur von 20 °C bestimmt.

### 3.4 Probenvorbereitung

#### 3.4.1 Allgemeine Probenvorbereitung von Urin- und Serumproben

Alle Proben werden nach dem Auftauen einer automatisierten Festphasenextraktion unterzogen. Nach zahlreichen Extraktionsversuchen mit insgesamt 12 verschiedenen Säulenmaterialien verschiedener Hersteller stellt sich eine einzelne Methode für alle 3 Projekte als die beste dar. Dabei werden 1 ml Probe mit 2 ml Puffer pH9 (s. Kapitel 3.1) und 40 l interner Standard Lösung (s. Kapitel 3.2) versetzt und die Extraktion auf C18ec Säulen der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Quelle	ml	ml/min
Konditionierung	Methanol	2	1
Konditionierung	Water bidest.	2	1
Konditionierung	Puffer pH 9,0	2	1
Probenaufgabe	Sample	3	1,2
Waschen	Puffer pH 9,0	2	6
Kanüle spülen	Water bidest.	5	30
Trocknen (3 min)	Luft		
Elution 1. Fraktion	Methanol	1,2	1,2
Elution 2. Fraktion	Methanol/ HOAc (9:1)	1,2	1,2
Kanüle spülen	Water bidest.	5	30
Kanüle spülen	Water bidest.	5	30
Kanüle spülen	Water bidest.	5	30

Tabelle 5: Ablauf der Festphasenextraktion

#### 3.4.2 Probenvorbereitung von Haarproben

Etwa 50 mg Haare werden nach Zugabe von 8 ml Methanol und 40 µl internem Standard im Ultraschallbad 5 Stunden lang bei 50 °C extrahiert. Anschließend werden die Extrakte im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 µl mobiler Phase A (s.u.) aufgenommen.

### 3.5 Analytik von Opiaten in Urinproben nach Konsum von pharmazeutischen Heroin und Straßenheroin

#### 3.5.1 HPLC-MS/MS Methode

Die chromatographische Trennung erfolgt in einem 19-minütigen Gradienten auf einer Phenomenex C18 AQUA Säule (s.o.). Als Laufmittel werden Gemische aus Ammoniumacetatpuffer (c= 5 mM, pH 6, eingestellt mit Essigsäure) und Acetonitril verwendet (LM A:98/2, LM B: 10/90). Das Gradientenprogramm bei einem Fluss von 200 µl/ml ist in Tabelle 6 wiedergegeben:

Zeit [min]	% A	% B
0	95	5
6	0	100
10	0	100
13	95	5
19	95	5

Tabelle 6: Gradientenprogramm für die HPLC Methode für das Heroinprojekt

Die massenspektrometrische Detektion erfolgt im positiven ESI-MRM-Modus nach Turbo Ion Spray Ionisierung bei einer Stickstofftemperatur von 380 °C und einer Kapillarspannung von 5000 V. Die Massenübergänge sind in Tabelle 7 dargestellt. Produkt Ion 1 wird zur Quantifizierung der Analyten, Produkt Ion 2 zur qualitativen Absicherung eines positiven Ergebnisses verwendet.

Analyt	Mutterion m/z [amu]	Tochterion 1 m/z [amu]	Tochterion 2 m/z 2 [amu]	Interner Standard	Mutterion m/z [amu]	Tochterion 1 m/z [amu]
AC	342.1	225.2	58.0	COD-D3	303.1	199.1
COD	300.0	165.0	114.9	MAM-D3	331.1	164.9
MAM	328.1	164.9	211.0	MOR-D3	289.1	151.9
MOR	286.1	151.8	165.2	AC-D3	344.9	224.9
NOS	414.2	220.0	353.0	M3G-D3	465.3	289.0
PAP	340.1	202.0	324.0			
C6G	476.3	300.0	73.0			
M3G	462.3	286.0	165.1			
M6G	462.2	286.1	165.1			

Tabelle 7: Massenübergänge im MRM Modus

Zur Sicherung der Genauigkeit werden die Kalibriergeraden in zwei Segmente eingeteilt, die sich jeweils über einen Konzentrationsbereich einer Dekade erstrecken (z.B. AC: 10-100 ng/ml und 1-10 ng/ml). Dieses Vorgehen scheint vorteilhaft gegenüber einer gewichteten Kalibrierung.

Für Analyten, für die keine deuterierten Standards zur Verfügung stehen, wurden folgende interne Standards verwendet:

- AC-D3 als interner Standard für PAP
- COD-D3 als interner Standard für C6G und NOS
- M3G-D3 als interner Standard für M6G

### **3.5.2 Studiendesign und Probenmaterial**

Das Bonner Heroinprojekt und die damit verbundene Laboranalytik ist in Abbildung 15 skizziert. 100 Probanden nehmen an der Studie teil, von denen 99 der Studie bis zum Ende beiwohnen und von denen insgesamt 93 Probanden Proben zu allen 3 Zeitpunkten abgeben. Die Probanden werden in zwei Gruppen à 50 Personen eingeteilt, von denen die eine Gruppe die Medikation mit Diacetylmorphin (Heroin) erhält, während die andere Gruppe mit Methadon substituiert wird.

Die Probanden müssen einen Monat vor Teilnahme am Programm eine Urinprobe abgeben (Probe T-1), nach 6 und 12 Monaten jeweils 5 Urinproben (Proben T6 I-V und T12 I-V in den Studienwochen 22-26 bzw. 48-52<sup>58</sup>). Somit stehen im Idealfall 11 Urinproben zur Verfügung. Insgesamt werden 848 Proben abgegeben, die nach Erhalt sofort im Gefrierschrank bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und später durch zwei verschiedene Analysetechniken untersucht werden: Mittels einfacher Immunoassays soll der Konsum verschiedener Drogen (Amph, Benz, COC, Opiate, Cannabis, Methadon) bestimmt werden, während die empfindlichere HPLC-MS/MS Untersuchung zur Bestimmung der einzelnen Marker und dadurch zur Unterscheidung eines Konsums von reinem Heroin oder Straßenheroin herangezogen wird (Abbildung 15).

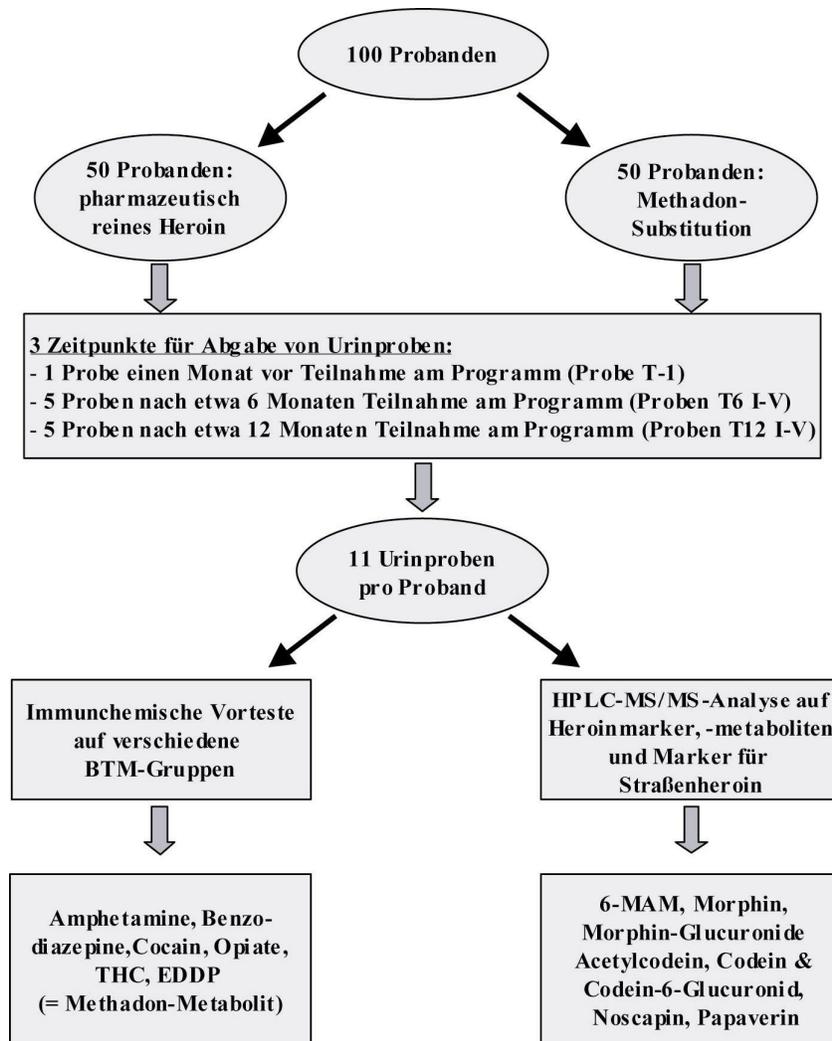


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Heroinprojektes in Bonn

### 3.6 Analytik von Opiaten in Blut- und Urinproben nach Mohnkuchenverzehr

#### 3.6.1 HPLC-MS/MS Methode

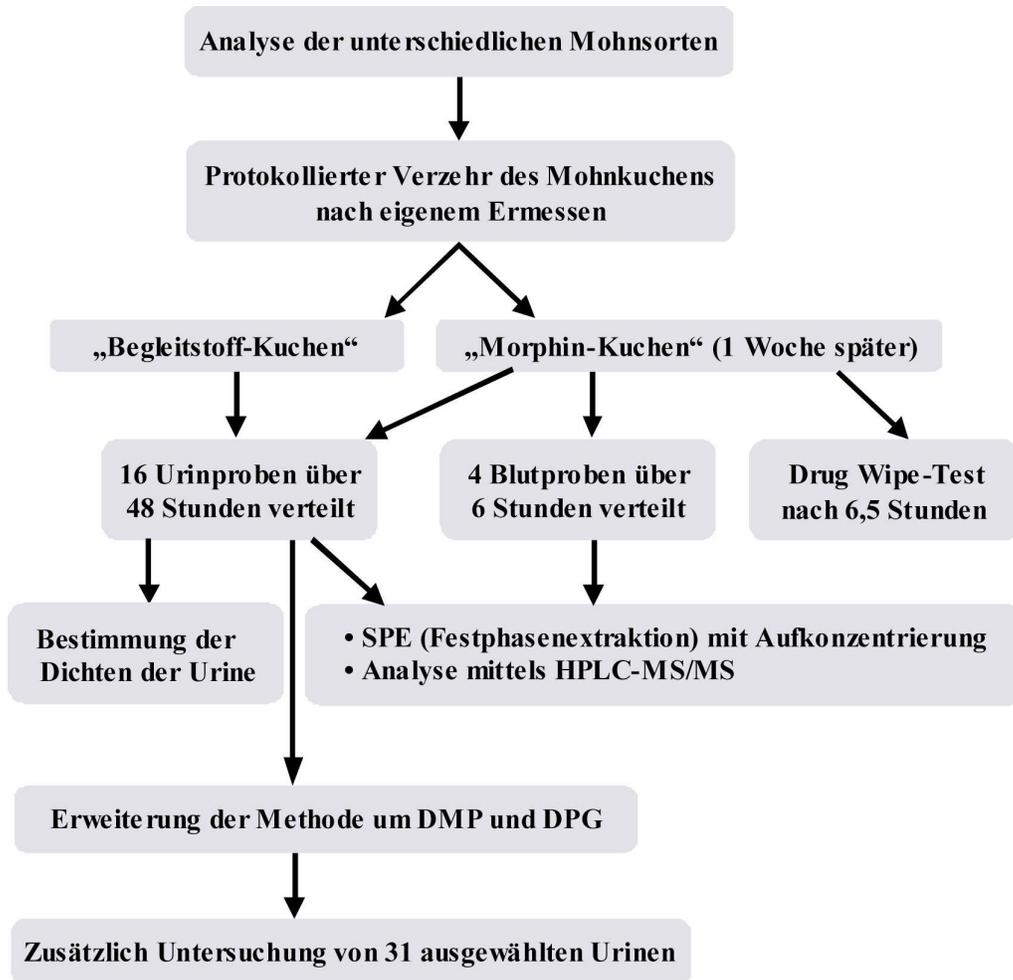
Die komplette Analysenmethode des Heroinprojektes wird auch für das Mohnkuchenprojekt verwendet. Später erfolgt die Erweiterung der Methode zum Nachweis der zwei PAP-Metabolite Desmethylpapaverin und Desmethylpapaverin-glucuronid (s. Kapitel 4.1.4.5).

### **3.6.2 Untersuchung der verschiedenen Mohnprodukte**

Jeweils 5 g eines Mohnproduktes werden im Mörser zermahlen, mit 10 ml Puffer pH 4 aufgeschlämmt, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend membranfiltriert. Das Filtrat wird direkt für die HPLC-MS/MS Analyse verwendet.

### **3.6.3 Studiendesign und Probenmaterial**

Nach der Untersuchung von 11 verschiedenen in der Region Bonn erhältlichen Mohnprodukten (7 Blaumohne verschiedenen Ursprungs sowie 4 Mohnbackmischungen) werden 2 Mohn für Ingestionsversuche ausgewählt, die für eine selbst hergestellte Mohntorte verwendet werden. Der Mohn der ersten Torte zeichnet sich durch erhöhte Gehalte an den Straßenheroinbegleitstoffen NOS (1560 ng/g) und PAP (57 ng/g) aus, eine Woche später enthält der verwendete Mohn hohe Konzentrationen an COD (7,7 µg/g) und MOR (87,5 µg/g) (Tabelle 26). Das Studiendesign ist in der folgenden Abbildung 16 skizziert.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Mohnkuchenstudie**

An beiden Tagen essen die Probanden  $\frac{1}{2}$  - 3 Stücke Kuchen, entsprechend aufgenommenen Mohnmengen von 10 – 60 g, bzw. 16 – 94  $\mu\text{g}$  NOS, 0,6 – 3,3  $\mu\text{g}$  PAP, 77- 461 mg COD und 875 – 5247  $\mu\text{g}$  MOR. Die einzelnen Aufnahmemengen, bezogen auf Geschlecht und Körpergewicht der Probanden sind in der unten aufgeführten Tabelle aufgelistet.

### Begleitstoffkuchen

	Geschlecht	Gewicht [kg]	COD [ $\mu\text{g/kg}$ ]	MOR [ $\mu\text{g/kg}$ ]	NOS [ng/kg]	PAP [ng/kg]
1	M	62	1,02	3,23	1517	55
2	W	61	0,35	1,10	514	19
3	M	89	0,24	0,75	352	13
4	M	67	0,95	2,99	1404	51
5	M	75	0,28	0,89	418	15
6	M	67	0,63	1,99	936	34
7	W	63	0,34	1,06	498	18
8	M	k.A.				
9	W	60	0,53	1,67	784	28
10	M	92	0,23	0,73	340	12

k.A. = keine Angabe

**Tabelle 8: Probanden und Verzehr im Mohnkuchenversuch, 1. Versuchstag**

### Morphinkuchen

	Geschlecht	Gewicht [kg]	COD [ $\mu\text{g/kg}$ ]	MOR [ $\mu\text{g/kg}$ ]	NOS [ng/kg]	PAP [ng/kg]
1	W	60	2,56	29,15	47	14
2	M	62	4,96	56,42	92	28
3	W	61	2,52	28,67	47	14
4	M	89	2,59	29,48	48	15
5	M	67	6,88	78,31	127	39
6	M	75	2,05	23,32	38	12
7	W	63	3,05	34,70	56	17
8	M	92	1,67	19,01	31	9
9	M	72	4,27	48,58	79	24
10	W	65	2,37	26,91	44	13
11	M	80	3,84	43,73	71	22
12	M	70	4,39	49,97	81	25

**Tabelle 9: Probanden und Verzehr im Mohnkuchenversuch, 2. Versuchstag**

Im weiteren Verlauf der Ingestionsstudien entnehmen die Probanden 1 und 2 Stunden nach dem Verzehr sowie anschließend alle 2 Stunden selbstständig Urinproben (mit einer Nachtruhe von 10-12 Stunden). Die letzte Urinprobe wird 48 Stunden nach dem Verzehr des Mohnkuchens genommen. Zusätzlich geben noch 9 Probanden Blutproben 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Ingestion des „Morphinkuchen“ ab. Weiterhin wird bei 6 Probanden dieser Versuchsreihe nach 6,5 Stunden ein bei

der Polizei bei Verdacht auf Drogenkonsum Verwendung findender Drogenschnelltest für Opiate auf Schweißbasis durchgeführt, der sog. „DrugWipe“.

Die gewonnenen Urin- und Serumproben (Blut wurde direkt abgesert) werden bis zur Analyse bei –18 °C gelagert.

### **3.6.4 Erweiterung der Methode um 2 Papaverin-Metaboliten**

Die Methode zur Analytik des Heroinprojektes wird um 2 Metaboliten des natürlichen Alkaloids PAP, Desmethylpapaverin (DMP) und Desmethylpapaveringlucuronid (DPG), erweitert (s. Kapitel 4.1.4.5). Anschließend werden 31 Urinproben aus dem Mohnkuchenprojekt neu aufgearbeitet und vermessen.

### **3.6.5 Ermittlung eines Korrekturfaktors für Urine mittels der relativen Dichte**

Da Wirkstoffkonzentrationen im Urin sehr stark von der aktuellen Verdünnung des Urins abhängen, werden die Dichten der Proben mittels Biegeschwinger bestimmt und daraus ein Korrekturfaktor für jede einzelne Probe ermittelt.

Der Korrekturfaktor errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$F = \frac{\text{Dichte} - 1}{\text{Normdichte} [= 1,2] - 1}$$

## ***3.7 Analytik von Opioiden in Serum- und Haarproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung***

### **3.7.1 HPLC-MS/MS Methode**

Die chromatographische Trennung der 11 Opiate und ihrer 5 Metabolite erfolgt in 35 Minuten Gesamtlaufzeit auf einer Phenomenex C12 Max-RP Säule. Als Laufmittel werden Gemische aus Ammoniumformiatpuffer (jeweils c= 5 mM, pH 3.5, eingestellt

mit Ameisensäure) und Acetonitril verwendet (LM A:90/10, LM B: 10/90). Das Gradientenprogramm bei einem Fluss von 200 µl/ml ist in Tabelle 10 wiedergegeben:

Zeit [min]	% A	% B
0	100	0
5	100	0
19	0	100
26	0	100
29	100	0
35	100	0

**Tabelle 10: Gradientenprogramm für die HPLC Methode aus dem Schmerzmittelprojekt**

Die Detektion im Massenspektrometer erfolgt im positiven ESI-MRM Modus mit Turbo Ion Spray Ionisierung bei einer Stickstofftemperatur von 350 °C und einer Kapillarspannung von 5000 V. Die verwendeten MRM-Übergänge sind in Tabelle 11 dargestellt, das erste (empfindlichere) Produktion wird für die Quantifizierung der Analyten verwendet, das zweite für die qualitative Absicherung des positiven Befundes.

Analyt	Precursor Ion m/z [amu]	Product Ion 1 m/z [amu]	Product Ion 2 m/z 2 [amu]	Interner Standard	Precursor Ion m/z [amu]	Product Ion 1 m/z [amu]
BIS	245.9	155	76.9	BUP-D4	473.4	59.1
BUP	468.5	55	83.4	COD-D3	303.1	199.1
COD	300.1	165	114.9	FEN-D5	342.2	188.1
FEN	337.1	188	105	HYD-D3	289	184.9
HYD	286.1	185	156.8	MET-D9	319.2	268.1
M3G	462.3	286.1	164.9	MOR-D3	289.1	151.9
M6G	462.2	286	164.9	M3G-D3	465.3	289
MET	310.1	265	104.8	OC-D3	319	301
MOR	286.1	151.8	165	PAP	340.1	202
NFE	232.9	84	56			
NTI	259.9	154.8	76.9			
OC	316	241	255.8			
OM	301.8	284	226.8			
PIR	431.2	97.9	345.9			
TIL	273.9	154.8	77			
TRA	263.9	58.1	57			

**Tabelle 11: Massenübergänge im MRM Modus**

Für die Analyten, für die keine deuterierten Standards zur Verfügung stehen, werden folgende interne Standards verwendet:

- PAP als interner Standard für BIS, NT, TIL und TRA
- FEN-D5 als interner Standard für NF und PIR
- M3G-D3 als interner Standard für M6G
- MOR-D3 als interner Standard für OM

### **3.7.2 Probenmaterial**

#### *3.7.2.1 Serumproben*

251 Serumproben von Patienten aus palliativer Behandlung stehen zur Verfügung, davon ist von 215 Proben die Medikation bekannt. Für die weiteren (statistischen) Auswertungen werden nur diese 215 Proben der Patienten verwendet. Die Proben stammen aus 2 verschiedenen Kliniken von Patienten unterschiedlichen Geschlechts und Alters.

#### *3.7.2.2 Haarproben*

Das Kollektiv besteht aus 31 Haarproben von Patienten mit täglicher Opioidmedikation. Auch hier gibt es Unterschiede in Medikation, Alter und Geschlecht der Probanden. Es wird jeweils die komplette Länge der Haarsträhnen für die Untersuchung verwendet.

### **3.8 Methodenvalidierung**

Die vorgestellten Methoden werden nach Richtlinien der GTFCh mittels des Programms VALISTAT®<sup>8</sup> validiert. Im Rahmen der Validierung werden unterschiedliche Methodenparameter wie in den folgenden Kapiteln beschrieben bestimmt:

### **3.8.1 Selektivität und Spezifität**

Zur Bestimmung der Selektivität werden Leermatrixproben (Urin bzw. Serum) unterschiedlicher Quellen mit und ohne internen Standard versetzt, komplett aufgearbeitet und analysiert. Dabei sollen keine falsch positiven Peaks auftreten, die auf Interferenzen mit der Matrix oder den internen Standards hindeuten.

Im Gegenzug sollen bei einer mit Standardlösung(en) dotierten Probe alle Analyten wiedergefunden und möglichst gut chromatographisch getrennt werden.

### **3.8.2 Linearität und Kalibrationsbereich**

Zur Kalibration werden Leermatrixproben mit den Standardgemischen in möglichst äquidistanter Konzentration dotiert und vollständig analysiert. Pro Standard werden Proben für Wiederholungen komplett aufgearbeitet und vermessen, mittels Grubbs-Test auf Ausreißer geprüft und die Mittelwerte gebildet. Aus den gemittelten Werten werden die Varianzhomogenität (F-Test) sowie die Linearität (Mandel-Test) der Kalibrierfunktion überprüft.

Im Heroin- und Mohnkuchenprojekt werden die Kalibriergeraden in zwei Segmente eingeteilt, um Varianzhomogenität über den gesamten jeweiligen Kalibrierbereich zu gewährleisten. Die Ermittlung der Kalibriergeraden für das Schmerzmittelprojekt hingegen erfolgt mittels eines Wichtungsfaktors, der speziell für größere Kalibrierbereiche vorteilhaft erscheint.

### **3.8.3 Genauigkeit, Präzisionen und Richtigkeit**

Die Ermittlung von Wiederhol-, Laborpräzision und Richtigkeit der Methode erfolgt durch Analyse von mindestens 2 Quality Control (QC) Proben in mindestens 2 oder 3 Konzentrationsbereichen (hoch und niedrig oder hoch, mittel und niedrig). Diese dotierten Proben bekannter Konzentration werden an 8 oder mehr Tagen mindestens doppelt bestimmt und aus den Streuungen die einzelnen Präzisionen und die Abweichung vom wahren Wert ermittelt.

Zur Bestimmung der Präzisionsdaten und der Richtigkeiten für die Methode im Heroin- und Mohnkuchenprojekt werden QC Proben in 2, für die Methode im Schmerzmittelprojekt werden QC Proben in 3 verschiedenen Konzentrationsbereichen verwendet.

### **3.8.4 Analytische Grenzwerte**

In Abhängigkeit vom Analyten werden 4 – 10 Leermatrixproben im Konzentrationsbereich der erwarteten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dotiert und doppelt bestimmt. Aus den erhaltenen Kalibriergeraden werden diese beiden analytischen Grenzwerte berechnet.

### **3.8.5 Absolute Wiederfindung**

Zur Bestimmung der Wiederfindung werden jeweils 6 QC-Proben im hohen und im niedrigen Konzentrationsbereich analysiert und die Flächenwerte der Peaks mit den Flächenwerten von Standardlösungen der entsprechenden Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt.

### **3.8.6 Stabilität**

Zur Bestimmung der Stabilität werden 6 Standardlösungen jeweils vor und nach 2 Einfrier-/Auftauzyklen vermessen. Für jeden Zyklus wird der Standard 21 Stunden bei –18 °C eingefroren und zum Auftauen 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Diese Zyklen werden nach 4, 7, 14, 28, 56 und 84 Tagen wiederholt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung von Opiaten in Urin, Blut und Mohnprodukten

#### 4.1.1 Methodenentwicklung

Für die Entwicklung der HPLC-Methode wurden 5 verschiedenen Säulen mit 4 verschiedenen Laufmittelkombinationen und 11 verschiedenen Gradienten getestet.

Als Säulen wurden eingesetzt:

- Machery-Nagel NUCLEOSIL C18 (125x3 mm, 4µm Partikelgröße)
- Phenomenex Luna C18 (150 x 1 mm, 3µm Partikelgröße)
- Phenomenex Luna C18 (150 x 2 mm, 4µm Partikelgröße)
- Phenomenex Aqua C18, (150 x 2 mm, 4µm Partikelgröße)
- Phenomenex Synergy Max RP C12 (150 × 2 mm, 4 µm Partikelgröße)

Die verschiedenen getesteten Laufmittelkombinationen waren:

- Wasser/Acetonitril mit jeweils 5 mM Ammoniumacetat
- Wasser/Acetonitril mit jeweils 5 mM Ammoniumacetat, mit Essigsäure eingestellt auf pH6
- Wasser/Acetonitril mit jeweils 5 mM Ammoniumformiat
- Wasser/Acetonitril mit jeweils 5 mM Ammoniumformiat, mit Ameisensäure eingestellt auf pH 3,5

Als beste Kombination erwies sich wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben die Phenomenex Aqua Säule mit einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril, jeweils mit 5 mM Ammoniumacetat, eingestellt auf pH 6.

Für die Extraktion der Analyten wurden insgesamt 11 verschiedene SPE-Säulen mit 2 verschiedenen Basis-Extraktionsmethoden (jeweils eine für Phasen mit bzw. ohne Kationentauscher) getestet. Folgende SPE-Phasen wurden eingesetzt:

- Phenomenex Strata C18-E
- Phenomenex Strata C18-U
- Phenomenex Strata X-C (Dibenzoylharz-Polymer mit Kationentauscher)
- Separtis Isolute MF18 (C18 Material, modifiziert)
- Separtis Isolute C18 (C18 Material, nicht endcapped)

- Separtis Isolute C18ec (C18 Material, polar endcapped)
- Separtis Isolute 101 (Polymermaterial)
- Macherey-Nagel CHROMABOND® C18ec (C18 Material, polar endcapped)
- Macherey-Nagel CHROMABOND® C18 Hydra (C18 Material, für polare/wässrige Laufmittel)
- Macherey-Nagel CHROMABOND® C18ec (C18 Material)
- Bakerbon C18 (C18 Material)

Des Weiteren wurde noch die Direktinjektion, eine einfache Membranfiltration sowie eine eingedampfte Membranfiltration, die in Laufmittel aufgenommen wurde, untersucht (Tabelle 14).

#### Extraktionsmethode für Mischphasen-Säulen mit Kationenaustauscher

Konditionierung	Methanol
Konditionierung	Wasser bidest
Konditionierung	Puffer pH 4,0
Probenaufgabe	Probe
Waschen	Wasser bidest
Kanüle spülen	Wasser bidest
Trocknen	Luft
Elution	Isopropanol/ Dichlormethan/Ammoniak (25%) 80/20/1
Kanüle spülen	Wasser bidest

**Tabelle 12: Generelle Extraktionsmethode für Mischphasen-Säulen**

#### Extraktionsmethode für Mischphasen-Säulen mit Kationenaustauscher

Konditionierung	Methanol
Konditionierung	Wasser bidest
Konditionierung	Puffer pH 9,0
Probenaufgabe	Probe
Waschen	Wasser bidest
Kanüle spülen	Wasser bidest
Trocknen	Luft
Elution	Methanol/Essigsäure 9/1
Kanüle spülen	Wasser bidest

**Tabelle 13: Generelle Extraktionsmethode für C18-Säulen**

Auf den Kationenaustauscher-Säulen ließen sich in Vortesten die Glucuronide nur in unzureichendem Maße extrahieren, so dass sich für die große Bandbreite der

Analyten letztlich die universellste Säule Machery-Nagel C18ec als die beste erwies (Tabelle 14). Die Extraktionsmethode wurde anschließend noch für das Material optimiert, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

	BUP	HYD	MET	MOR	M3G	M6G	NFE	NTI	OC	OM	TIL	TRA	FEN
Strata C18-E	27.4%	51.9%	26.4%	60.2%	32.6%	60.9%	54.3%	112.7%	77.9%	54.5%	110.1%	86.3%	59.3%
Strata C18-U	52.5%	19.2%	2.7%	66.2%	24.0%	18.2%	4.5%	88.9%	66.0%	36.1%	24.4%	58.5%	78.3%
Membranfiltration	16.3%	8.0%	6.8%	4.7%	3.2%	4.1%	6.5%	7.2%	25.8%	8.7%	12.9%	18.3%	5.9%
Membranfiltration eingedampft	29.2%	44.8%	16.0%	27.8%	9.0%	17.2%	28.7%	12.9%	94.0%	29.1%	42.1%	54.1%	25.4%
Direktinjektion	5.2%	4.6%	3.6%	5.3%	3.3%	7.0%	6.5%	7.6%	8.0%	3.2%	10.8%	10.3%	3.0%
Strata X	16.3%	77.1%	35.3%	69.2%	64.9%	52.6%	29.6%	128.5%	170.0%	74.4%	94.2%	64.1%	79.3%
Isolute MF C18	40.8%	0.0%	2.0%	74.5%	31.7%	61.1%	1.9%	52.2%	48.9%	35.9%	34.3%	56.7%	61.2%
Isolute C18	30.4%	48.7%	3.9%	54.1%	48.2%	105.5%	16.6%	0.0%	89.7%	40.7%	54.9%	61.6%	19.4%
Isolute C18ec	64.2%	69.4%	19.0%	59.6%	42.6%	68.6%	28.0%	110.0%	100.2%	61.8%	138.3%	55.7%	40.0%
Isolute 101	18.7%	50.0%	12.0%	70.4%	45.1%	90.3%	26.8%	68.0%	58.9%	61.1%	13.3%	50.8%	14.2%
Chromabond C18ec	46.1%	68.2%	47.8%	58.0%	46.9%	55.3%	79.1%	90.4%	89.5%	52.1%	86.3%	90.2%	88.7%
Bakerbond C18	8.3%	0.0%	0.1%	29.7%	44.8%	79.8%	0.0%	38.2%	2.1%	5.4%	7.7%	17.3%	37.1%
Chromabond C18 Hydra	74.1%	25.2%	6.5%	74.5%	48.2%	90.8%	17.7%	51.7%	42.0%	32.0%	30.6%	60.6%	100.6%
Chromabond C18	44.4%	17.8%	0.1%	46.2%	52.9%	40.6%	2.0%	70.6%	53.2%	25.4%	37.2%	53.3%	110.2%

Tabelle 14: Wiederfindungen verschiedener Analyten bei unterschiedlichen SPE-Säulen und Aufarbeitungen in den Vortesten

#### 4.1.2 Methodvalidierung

Die kompletten Validierungsdaten sind in den Tabelle 15 -Tabelle 17 wiedergegeben.

	Konzentration [ng/ml]		Intraday Präzision [%]		Interday Präzision [%]		Richtigkeit [%]		Anal. Grenzw. [ng/ml]	
	HOCH	TIEF	HOCH	TIEF	HOCH	TIEF	HOCH	TIEF	NG	BG
AC	50	2,5	4,67	7,38	4,67	8,23	-8,95	5,9	0,35	1,16
COD	500	25	3,9	7,01	5,54	7,01	-3,27	6,23	1,74	5,5
C6G	1250	62,5	8,77	6,65	10,15	7,36	-8,23	2,05	3,04	10
MAM	1250	62,5	11,65	6,57	11,65	10,57	1,42	-10,71	2,83	9,86
MOR	1250	62,5	6,27	8,43	6,49	8,43	-3,05	-2,5	3,4	12,38
M3G	1250	62,5	7,52	8,07	7,52	8,07	4,37	-8,46	5	17,82
M6G	1250	62,5	5,57	6,35	10,19	5,63	11,46	8,09	7,4	26,1
NOS	250	12,5	6,57	7,41	7,56	10,1	10,7	5,15	0,48	1,56
PAP	50	2,5	6,96	6,47	8,33	6,36	3,56	4,37	0,1	0,33

Tabelle 15: QC-Konzentrationen, Wiederhol- und Laborpräzisionen, Richtigkeiten und analytische Grenzwerte der Heroinprojekt-Methode

	HOHE KONZENTRATION		TIEFE KONZENTRATION	
	Konz. [ng/ml]	Wiederf. (%)	Konz. [ng/ml]	Wiederf. (%)
<b>AC</b>	50	52,28 ± 3,60	2,5	55,09 ± 17,3
<b>COD</b>	500	90,96 ± 9,61	25	92,43 ± 11,34
<b>C6G</b>	1250	96,45 ± 9,21	62,5	80,11 ± 10,27
<b>MAM</b>	1250	59,44 ± 6,09	62,5	59,44 ± 7,08
<b>MOR</b>	1250	98,28 ± 15,70	62,5	97,41 ± 11,37
<b>M3G</b>	1250	39,75 ± 7,58	62,5	45,5 ± 5,81
<b>M6G</b>	1250	46,76 ± 6,83	62,5	52,78 ± 5,48
<b>NOS</b>	250	84,61 ± 6,64	12,5	70,06 ± 3,14
<b>PAP</b>	50	59,75 ± 3,31	2,5	50,28 ± 1,88

Tabelle 16: Wiederfindungen der Heroinprojekt-Methode

	HOHE KONZENTRATION				TIEFE KONZENTRATION			
	Linearer Bereich [ng/ml]	Korrelationskoeff.	Steigung	Achsenabschnitt	Linearer Bereich [ng/ml]	Korrelationskoeff.	Steigung	Achsenabschnitt
<b>AC</b>	10 - 100	0,999	26,9	0,89	1 - 10	0,999	27,5	-7,4
<b>COD</b>	100 - 1000	0,999	29,7	72,2	10 - 100	0,999	36,6	9,88
<b>C6G</b>	250 - 2500	0,998	0,17	-0,01	25 - 250	0,999	0,192	0,017
<b>MAM</b>	250 - 2500	0,998	1,2	1,4	25 - 250	0,999	1,17	0,12
<b>MOR</b>	250 - 2500	0,996	0,6	0,057	25 - 250	0,998	0,72	0,088
<b>M3G</b>	250 - 2500	0,998	0,17	0,017	25 - 250	0,998	0,19	0,0027
<b>M6G</b>	250 - 2500	0,998	0,528	0,01	25 - 250	0,998	0,61	0,016
<b>NOS</b>	50 - 500	0,999	3,41	0,98	5 - 50	0,999	2,31	1
<b>PAP</b>	10 - 100	0,998	1,51	0,6	1 - 10	0,998	1,78	0,02

Tabelle 17: Daten der Kalibrierfunktionen der Heroinprojekt-Methode

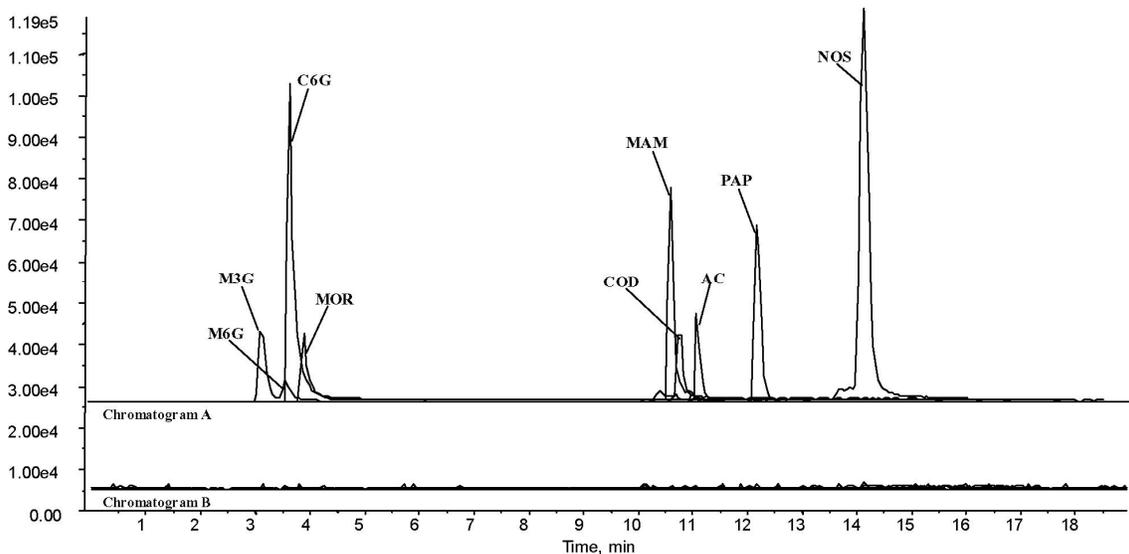
#### 4.1.2.1 Festphasenextraktion

Der Einsatz der automatisierten Festphasenextraktion lieferte zufriedenstellende Ergebnisse. Die absoluten Wiederfindungen lagen im Bereich von 45% (M3G) bis 98% (MOR), wobei lediglich die beiden MOR-Glucuronide (M3G und M6G) geringere Wiederfindungen als 50% hatten. Aufgrund der großen Polaritätsunterschiede der Analyten und der Tatsache, dass die Glucuronide im Urin in der höchsten Konzentration vorliegen, ist dieses Ergebnis akzeptabel.

#### 4.1.2.2 Selektivität und Spezifität

Die chromatographische Trennung erfolgte in einem 19-minütigen Gradientenprogramm inklusive 6 Minuten Konditionierung der HPLC-Säule. Abbildung 17 zeigt ein Chromatogramm mit allen 9 Analyten; M6G und C6G sowie MAM und COD konnten chromatographisch nicht vollständig getrennt werden, jedoch aufgrund unterschiedlicher Mutter-Tochterionenpaare unterschieden werden.

Bei der Analyse von 4 komplett aufgearbeiteten Leerurinen zeigten sich keine Interferenzen. Ebenso zeigten sich keine Analytpeaks bei Dotierung von Leerurinen mit den deuterierten Standards. Auch konnte kein Crosstalk zwischen den verschiedenen Analyten festgestellt werden, wie es z.B. bei MOR und MAM durch Deacetylierung von MAM geschehen könnte.



**Abbildung 17: Vergleich von dotiertem und undotiertem Leerurin**  
**A:** Chromatogramm eines dotierten Leerurins mit folgenden Konzentrationen: 250 ng/ml (C6G, MAM, MOR, M3G), 100 ng/ml (COD, M6G), 50 ng/ml (NOS), 10 ng/ml (AC, PAP)  
**B:** Chromatogramm eines nicht dotierten Leerurins

#### 4.1.2.3 Kalibrierung

Der Vergleich zwischen Lösemittelkalibrierung und Kalibrierung mittels dotierter Urine zeigte bei 6 Kalibriergeraden mit jeweils 5 Punkten nur Abweichungen kleiner als 9%. Daher wurden fortan Lösemittelkalibrierungen verwendet.

Die in zwei Segmente geteilten Kalibriergerade erreichten Korrelationskoeffizienten von 0,996 oder höher.

#### *4.1.2.4 Präzisionsdaten, Richtigkeit und analytische Grenzwerte*

Zur Ermittlung der Präzisionen und der Richtigkeiten der Methode wurden jeweils zwei QC-Proben über 8 Tage doppelt bestimmt. Die Wiederholpräzisionen reichten von 4% (COD) bis 12% (MAM), die Laborpräzisionen lagen im Bereich von 5% (AC) bis 12% (MAM) und die Richtigkeiten im Bereich von 1% (MAM) bis 11% (M6G), 90% dieser Werte sind kleiner als 9%.

Die analytischen Grenzwerte wurden bei einem Signifikanzniveau von 95% und einer Ergebnisunsicherheit von 33% ermittelt und liegen im zufriedenstellenden Bereich. Die Nachweisgrenzen reichten von 0,1 ng/ml (PAP) bis 7,4 ng/ml (M6G), die Bestimmungsgrenzen von 0,33 ng/ml (PAP) bis 26,1 ng/ml (M6G).

#### *4.1.2.5 Stabilität*

Die Konzentration der Standards variierte nach mehrmaligen Einfrier- und Auftauzyklen bei AC um 8%, bei MAM um 9%. Auch sämtliche Variationen in der methanolischen Standardlösung waren kleiner als 10%.

#### *4.1.2.6 Anwendbarkeit*

Die Methode wurde zur Analytik von über 800 Urinproben aus dem Bonner Heroinprojekt angewandt. Die Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen zwei Chromatogramme des gleichen Probanden - die Probe des ersten Chromatogrammes in Abbildung 18 wurde während des Programms entnommen (T6 Probe), als der Proband ausschließlich das in der Studie verabreichte Heroin einnahm, während die Probe des zweiten Chromatogrammes (Abbildung 19) einen Monat vor Beginn des Programmes entnommen wurde (T-1 Probe), als der Proband noch Straßenheroin konsumierte. Während im ersten Chromatogramm ausschließlich die Metaboliten von

Diacetylmorphin detektiert wurden, können im Chromatogramm des Straßenheroinkonsumenten zusätzlich alle 5 Straßenheroinmarker nachgewiesen werden.

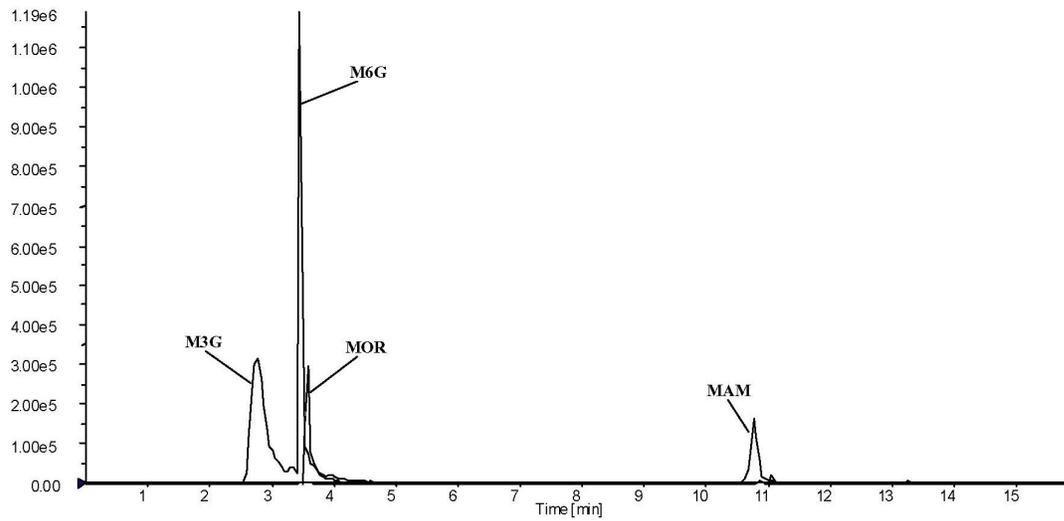


Abbildung 18: Chromatogramm einer Urinprobe eines Heroinkonsumenten

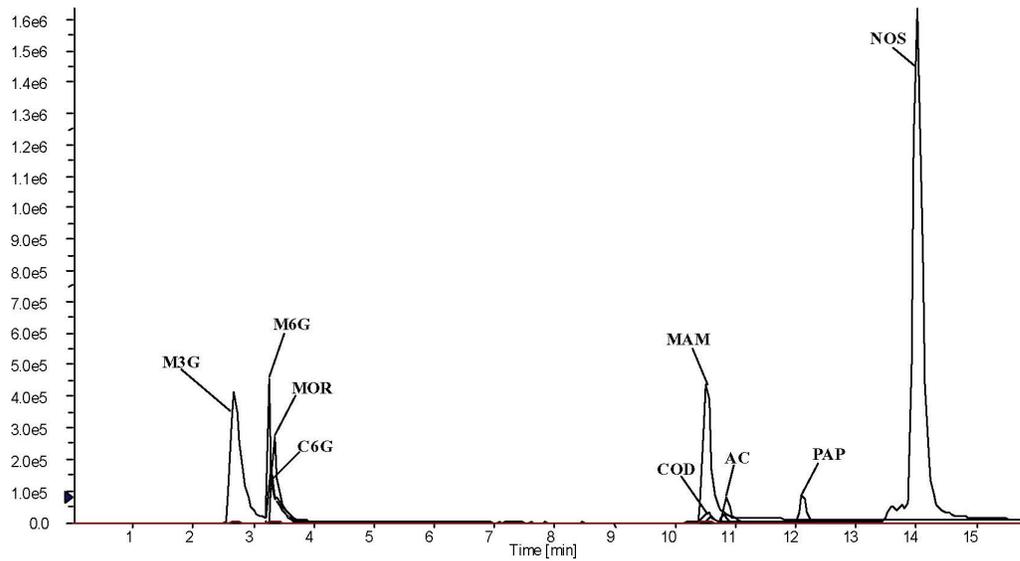


Abbildung 19: Chromatogramm einer Urinprobe eines Straßenheroinkonsumenten

### **4.1.3 Ergebnisse aus dem bundesdeutschen Modellprojekt zur heroingestützten Behandlung Opiatabhängiger**

#### *4.1.3.1 Probenkollektiv*

Von 100 möglichen Probanden (50 in der Heroin- und 50 in der Methadongruppe) gingen von 47 Probanden aus der Heroingruppe und 45 Probanden aus der Methadongruppe Proben an allen drei Zeitpunkten (T-1, T6 und T12) ein.

Insgesamt 848 Urinproben aus dem Heroinprojekt wurden untersucht, die sich auf 506 Proben aus der Heroingruppe (47 T-1 Proben, 459 T6- und T12-Proben) und 342 Proben aus der Methadongruppe (47 T-1 Proben, 295 T6- und T12-Proben) verteilten. Während des laufenden Projektes lieferten die Probanden der Heroingruppe bei annähernd gleicher Probandenzahl demnach fast 50 Prozent mehr Proben ab. Die Anzahl der in der Studie verbliebenen Probanden war bei beiden fast 100%, umso mehr fällt dieser Unterschied an weniger abgegebenen Urinproben auf.

#### *4.1.3.2 Häufigkeit der Heroin- und Straßenheroinmarker vor Studienbeginn*

Die Häufigkeit positiver Nachweise der Heroin- und Straßenheroinmarker aus den HPLC-MS-Untersuchungen der 94 T-1 Proben ist in Abbildung 20 dargestellt und den Ergebnissen der Immunoassay-Vorteste für Opiate und Methadon gegenübergestellt. Da diese Proben von den Probanden einen Monat vor Teilnahme am Heroinvergabeprojekt abgegeben wurden und die Opiatabhängigen demnach noch keine Behandlung mit Heroin oder Methadon erhielten, ist davon auszugehen, dass eigentlich sämtliche Probanden zu diesem Zeitpunkt Straßenheroin konsumiert haben, was jedoch analytisch nicht nachgewiesen werden konnte.

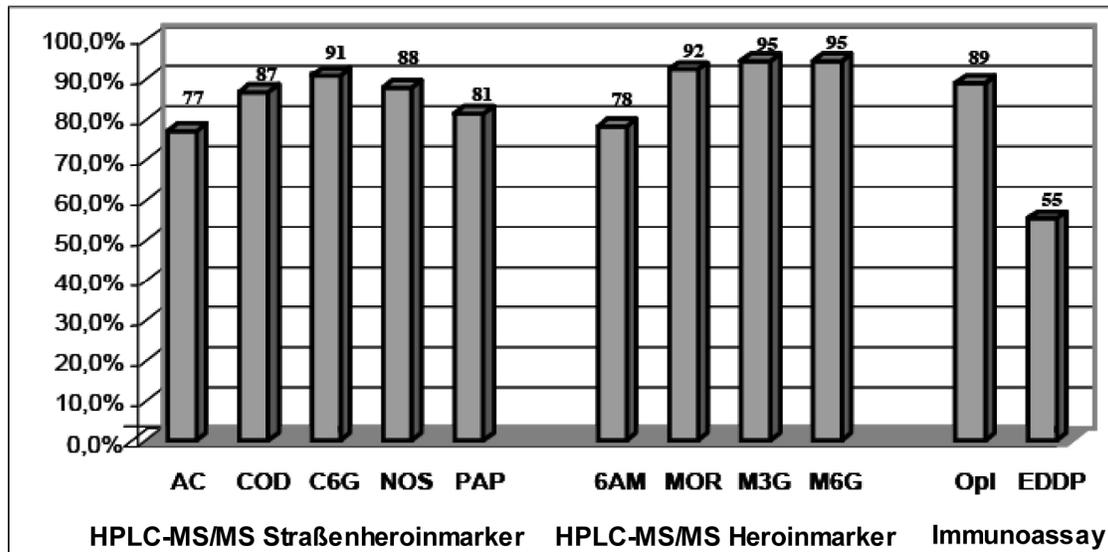


Abbildung 20: Nachweishäufigkeiten der einzelnen Marker in den T-1 Proben

Während für 89% der Proben positive Immunoassay-Ergebnisse für Opiate erhalten wurden, konnten die beiden MOR-Glucuronide in 95% aller T-1 Proben nachgewiesen werden. Ebenso konnte MOR mit einer Nachweishäufigkeit von 92% öfter nachgewiesen werden. Dies zeigt die höhere Empfindlichkeit der LC-MS Analyse im Vergleich zum Immunoassay, der jedoch nur als Vortest in toxikologischen Analysen Verwendung findet.

Hohe Nachweishäufigkeiten wurden ebenfalls für die Straßeneroinmarker COD (87%), C6G (91%) und NOS (88%) ermittelt. Die beiden spezifischen Marker für den Konsum von Heroin, MAM, und Straßeneroin, AC erreichten mit 78% bzw. 77% die geringsten Nachweishäufigkeiten, aber auch PAP wurde nur in 81% der Proben nachgewiesen.

#### 4.1.3.3 Beikonsum an Straßeneroin bei einzelnen Probanden während der Studie

Die Abbildung 21 zeigt die Häufigkeitsverteilungen von Straßeneroinbeikonsum bei den beiden Gruppen. Ein Beikonsum von Straßeneroin wurde als solcher gewertet, sobald mindestens ein Straßeneroinmarker detektiert wurde.

Von den 48 Probanden aus der Heroingruppe konnte bei 24 Probanden (50%) ein Beikonsum von Straßeneroin im Laufe der Studie festgestellt werden, davon bei 17 Probanden (35%) 2 Mal oder öfter. Hingegen wurden bei der Methadongruppe

signifikant höhere Werte festgestellt. Dort konnte im Kollektiv von 45 Probanden bei 32 Probanden (71%) ein Konsum von Straßenheroin festgestellt werden, welcher bei 23 Probanden (51%) mindestens in einer weiteren Probe bestätigt wurde.

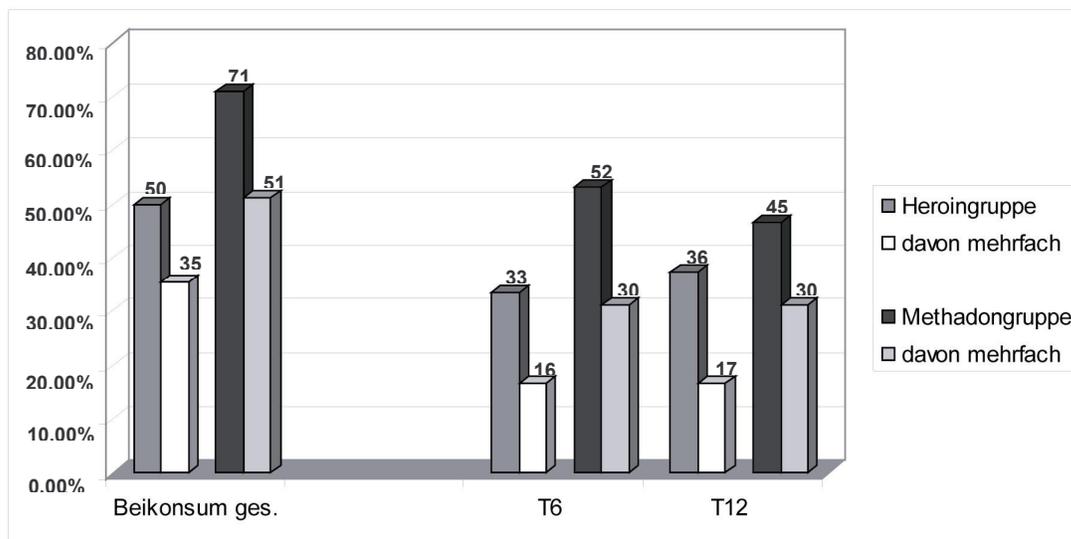


Abbildung 21: Straßenheroinbeikonsum in der Heroin- und der Methadongruppe

Innerhalb der beiden Gruppen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben, die nach 6 und 12 Monaten abgegeben wurden, festzustellen. Ebenso waren die Zahlen von Probanden, die ihr Straßenheroinbeikonsumverhalten verbesserten (positiver Nachweis nach 6 Monaten, aber negativer Nachweis nach 12 Monaten), annähernd gleich mit der Zahl der Probanden, die ihr Beikonsumverhalten verschlechterten (negativer Nachweis nach 6 Monaten, aber positiver Nachweis nach 12 Monaten).

#### 4.1.3.4 Beikonsum an Straßenheroin der beiden Gruppen im Gesamtkollektiv

Der Verlauf des Beikonsums beider Gruppen lässt sich noch weiter aufschlüsseln, wenn man alle Proben einzeln betrachtet. Dabei fällt auf, dass es signifikante Abnahmen von T-1 zu T12 für alle Marker in der Methadongruppe (s. Tabelle 19) sowie für alle Straßenheroinmarker in der Heroingruppe gibt. In Anlehnung an den Abschlussbericht zur sogenannten „Heroinstudie“ werden dabei nur T-1 und T12 verglichen<sup>58</sup>.

## Heroingruppe

n	T-1	44	Chi <sup>2</sup> -Wert T-1 → T12	Signifikanz (zweiseitig)	
	T6	221			
	T12	226			
<b>AC</b>	T-1	77.3%	81.39	<0,001	sehr signifikant
	T6	10.0%			
	T12	13.7%			
<b>COD</b>	T-1	86.4%	84.53	<0,001	sehr signifikant
	T6	14.5%			
	T12	17.7%			
<b>C6G</b>	T-1	93.2%	92.77	<0,001	sehr signifikant
	T6	18.1%			
	T12	19.5%			
<b>NOS</b>	T-1	88.6%	86.06	<0,001	sehr signifikant
	T6	16.3%			
	T12	18.6%			
<b>PAP</b>	T-1	84.1%	83.09	<0,001	sehr signifikant
	T6	13.1%			
	T12	16.8%			
<b>6AM</b>	T-1	81.8%	0.00	1.000	nicht signifikant
	T6	81.9%			
	T12	81.9%			
<b>MOR</b>	T-1	97.7%	0.91	0.341	nicht verwertbar
	T6	97.3%			
	T12	94.2%			
<b>M3G</b>	T-1	97.7%	0.02	0.884	nicht verwertbar
	T6	98.6%			
	T12	97.3%			
<b>M6G</b>	T-1	97.7%	0.02	0.884	nicht verwertbar
	T6	98.6%			
	T12	97.3%			

Tabelle 18: Verlauf der Positivwerte der einzelnen Marker in der Heroingruppe

### Methadongruppe

n	T-1	46	Chi <sup>2</sup> -Wert T-1 → T12	Signifikanz (zweiseitig)	
	T6	161			
	T12	161			
<b>AC</b>	T-1	73.9%	52.81	<0,001	sehr signifikant
	T6	16.2%			
	T12	18.0%			
<b>COD</b>	T-1	84.8%	55.06	<0,001	sehr signifikant
	T6	27.3%			
	T12	23.0%			
<b>C6G</b>	T-1	84.8%	59.20	<0,001	sehr signifikant
	T6	29.8%			
	T12	26.1%			
<b>NOS</b>	T-1	84.8%	58.81	<0,001	sehr signifikant
	T6	28.6%			
	T12	23.0%			
<b>PAP</b>	T-1	76.1%	55.86	<0,001	sehr signifikant
	T6	24.2%			
	T12	21.1%			
<b>6AM</b>	T-1	71.2%	55.29	<0,001	sehr signifikant
	T6	25.5%			
	T12	19.9%			
<b>MOR</b>	T-1	84.8%	58.42	<0,001	sehr signifikant
	T6	35.4%			
	T12	26.7%			
<b>M3G</b>	T-1	87.0%	46.64	<0,001	sehr signifikant
	T6	41.0%			
	T12	30.4%			
<b>M6G</b>	T-1	87.0%	47.80	<0,001	sehr signifikant
	T6	41.0%			
	T12	29.8%			

Tabelle 19: Verlauf der Positivwerte der einzelnen Marker in der Methadongruppe

Vergleicht man die beiden Medikationsgruppen untereinander, so stellt man fest, dass sich teilweise Unterschiede in den beiden Gruppen zeigen. Die HER-Metaboliten 6AM, MOR, M3G und M6G wurden bei der HER-Gruppe selbstverständlich in signifikant höherer Anzahl nachgewiesen. Hingegen konnten einige Straßenheroinmarker (COD, C6G, NOS, PAP) im Verlauf der Studie signifikant häufiger bei der MET-Gruppe nachgewiesen werden, was auf einen häufigeren Konsum von Straßenheroin in dieser Gruppe hindeutet (Tabelle 20).

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden in dieser Darstellung die signifikanten und sehr signifikanten Unterschiede mit fetter Schrift deutlich gemacht.

		HER	MET	Gesamt			
n	T-1	44	46	90	Chi <sup>2</sup> -Wert HER-MET	Signifikanz (zweiseitig) HER-MET	
	T6	221	161	382			
	T12	226	161	387			
<b>AC</b>	T-1	77.3%	73.9%	75.6%	0.14	0.71	nicht signifikant
	T6	10.0%	16.2%	12.6%	3.253	0.07	grenzw. signifikant
	T12	13.7%	18.0%	15.5%	1.32	0.25	nicht signifikant
<b>COD</b>	T-1	86.4%	84.8%	85.6%	0.24	0.62	nicht signifikant
	T6	14.5%	27.3%	19.9%	9.650	0.00	<b>sehr signifikant</b>
	T12	17.7%	23.0%	19.9%	1.65	0.20	<b>signifikant</b>
<b>C6G</b>	T-1	93.2%	84.8%	88.9%	0.50	0.46	nicht signifikant
	T6	18.1%	29.8%	23.0%	7.209	0.01	<b>sehr signifikant</b>
	T12	19.5%	26.1%	22.2%	2.38	0.12	nicht signifikant
<b>NOS</b>	T-1	88.6%	84.8%	86.7%	0.29	0.59	nicht signifikant
	T6	16.3%	28.6%	21.5%	8.334	0.00	<b>sehr signifikant</b>
	T12	18.6%	23.0%	20.4%	1.12	0.29	nicht signifikant
<b>PAP</b>	T-1	84.1%	76.1%	80.0%	0.21	0.65	nicht signifikant
	T6	13.1%	24.2%	17.8%	7.845	0.01	<b>signifikant</b>
	T12	16.8%	21.1%	18.6%	1.15	0.28	nicht signifikant
<b>6AM</b>	T-1	81.8%	71.2%	76.7%	0.178	0.67	nicht signifikant
	T6	81.9%	25.5%	58.1%	<0,001	121.87	<b>sehr signifikant</b>
	T12	81.9%	19.9%	56.1%	<0,001	146.65	<b>sehr signifikant</b>
<b>MOR</b>	T-1	97.7%	84.8%	91.1%	4.65	0.03	nicht verwertbar
	T6	97.3%	35.4%	71.2%	<0,001	176.80	<b>sehr signifikant</b>
	T12	94.2%	26.7%	66.1%	<0,001	191.54	<b>sehr signifikant</b>
<b>M3G</b>	T-1	97.7%	87.0%	92.2%	3.64	0.06	nicht verwertbar
	T6	98.6%	41.0%	74.3%	<0,001	162.30	<b>sehr signifikant</b>
	T12	97.3%	30.4%	69.5%	<0,001	198.61	<b>sehr signifikant</b>
<b>M6G</b>	T-1	97.7%	87.0%	92.2%	3.64	0.06	nicht verwertbar
	T6	98.6%	41.0%	74.3%	<0,001	201.36	<b>sehr signifikant</b>
	T12	97.3%	29.8%	69.3%	<0,001	24.67	<b>sehr signifikant</b>

Tabelle 20: Direkter Vergleich HER-MET-Gruppe in Bezug auf die Anzahl der Positivbefunde an Heroin- und Straßenheroinmarkern

#### 4.1.3.5 Konzentrationen der Heroin- und Straßenheroinmarker in Urinproben

Die Boxplots in Abbildung 22 illustrieren die Konzentrationsverteilungen der einzelnen Analyten, die per LC-MS Analyse ermittelt wurden. Die Ergebnisse der Straßenheroinmarker sind in „kalten“ Blautönen dargestellt, die Ergebnisse der Heroinmarker in „warmen“ roten Farben. Es wurden ausschließlich die Werte von positiven Befunden einbezogen, so dass keine Nullwerte die Abbildungen verzerren.

Jedem Analyten sind jeweils zwei Wertegruppen zugeordnet, links die Werte der Heroingruppe, rechts die der Methadongruppe. Es wurden dabei nur die Konzentrationen der Proben verwendet, für die ein positiver Nachweis von Heroin bzw. Straßenheroin vorlag. Aufgrund besserer Anschaulichkeit sind die Ergebnisse zudem in Tabelle 21 in Zahlenwerten wiedergegeben.

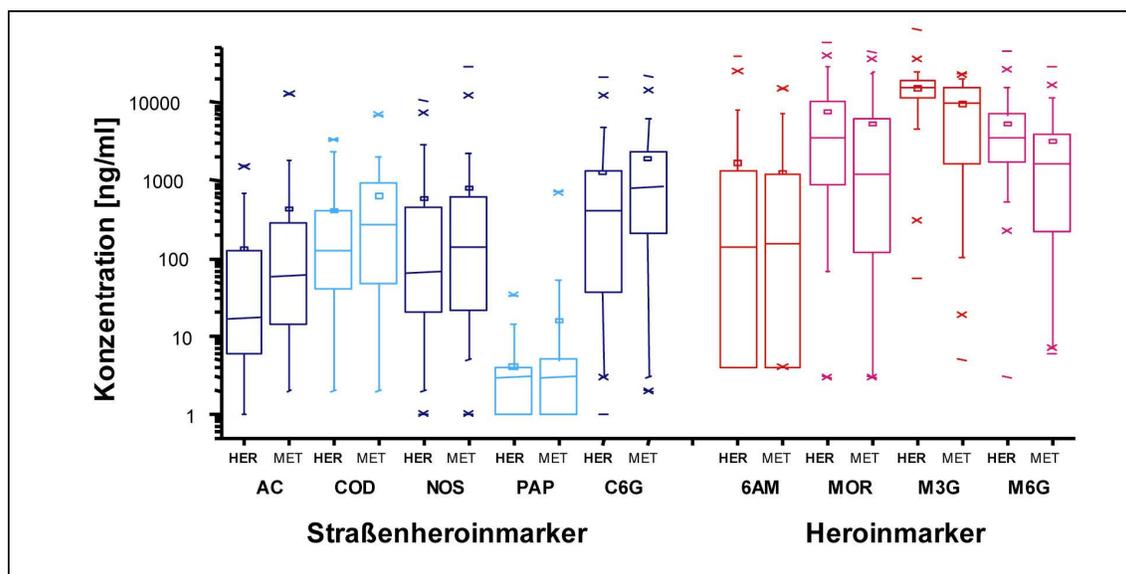


Abbildung 22: Konzentrationsbereiche der einzelnen Analyten in der Heroingruppe (immer links) und der Methadongruppe (immer rechts)

Heroingruppe									
	AC	COD	NOS	PAP	C6G	MAM	MOR	M3G	M6G
Median	17,5	128,0	67,0	3,0	435,0	140,0	3485,0	15300,0	3475,0
Mittelwert	136,5	406,7	585,8	4,0	1268,8	1685,4	7454,1	15153,0	5335,9
Maximum	1520,0	3330,0	10500,0	34,0	20700,0	38900,0	56700,0	85400,0	45500,0
Minimum	0,4	1,7	0,5	0,1	3,0	2,8	3,4	55,0	7,4
unt. Quartil	7,0	42,8	20,8	1,0	40,0	4,0	879,8	11100,0	1700,5
ob. Quartil	125,0	398,5	460,5	4,0	1310,0	1390,0	10500,0	18700,0	6962,5
Methadongruppe									
	AC	COD	NOS	PAP	C6G	MAM	MOR	M3G	M6G
Median	63,5	273,0	143,0	3,0	851,0	159,0	1280,0	9660,0	1654,0
Mittelwert	443,2	638,6	813,1	15,7	1896,8	1276,1	5187,4	9509,3	3223,9
Maximum	12700,0	6770,0	28100,0	711,0	21500,0	14900,0	43800,0	23100,0	29000,0
Minimum	0,4	1,7	0,5	0,1	3,0	2,8	3,4	5,0	7,4
unt. Quartil	13,3	49,3	21,0	1,0	211,0	4,0	122,8	1620,0	223,5
ob. Quartil	285,5	897,0	621,3	5,8	2297,5	770,5	6020,0	15400,0	3787,5

Tabelle 21: Konzentrationsbereiche der Straßenheroin- und Heroinmarker in den untersuchten Urinproben

Wie bei Ergebnissen von Urinanalysen zu erwarten ist, variierten die Konzentrationen der einzelnen Analyten über weite Bereiche. Die höchsten Werte wurden für die Heroinmarker MOR und seine beiden Glucuronide mit Konzentrationen bis über 100 µg/ml ermittelt, aber auch die beiden Straßenheroinmarker NOS und vor allem C6G erreichten Werte von deutlich über 10 µg/ml. Da es sich hierbei in allen Fällen um Werte handelt, die aus extrapolierten Kalibriergeraden ermittelt wurden, ist bei der exakten Betrachtung jedoch Vorsicht geboten.

Zwischen den beiden Probandengruppen werden deutliche Unterschiede ersichtlich. Bereits in der Abbildung 22 lässt sich erkennen, dass die Maximal- und Durchschnittskonzentrationen sowie die Mediane der Straßenheroinmarker bei den Probanden der Methadongruppe signifikant höher sind, während sich dies für die Heroinmarker genau umgekehrt verhält (s. Tabelle 21).

#### *4.1.3.6 Beikonsum weiterer Drogen*

In den folgenden beiden Grafiken sind die Häufigkeiten eines Beikonsums weiterer Drogen, ermittelt mittels Immunassay, nebst den Häufigkeiten eines Straßenheroinkonsum, bestimmt mittels HPLC-MS/MS, dargestellt. Verwendet wurden dafür die Daten aus dem gesamten Kollektiv an Urinproben, unterteilt nach Behandlungsgruppe und Abgabezeitpunkt.

In der Abbildung 23 verwundert es nicht, dass über die beiden Messzeitpunkte T6 und T12 der Anteil der positiven Messungen auf Opiate in der Heroingruppe bei 100% liegen. Hingegen sinkt die Anzahl straßenheroin-positiver Befunde von T-1 auf T6 und T12 von 100% auf deutlich unter 20%, dieser Rückgang ist statistisch signifikant. Ebenso konnte ein statistisch wahrscheinlicher Rückgang beim Beikonsum an Benz und ein statistisch signifikanter Rückgang beim Beikonsum an COC festgestellt werden.

In der Methadongruppe (Abbildung 23) lassen sich neben dem signifikanten Ansteigen von positiven Methadonbefunden von T-1 nach T6 und T12 signifikante Unterscheidungen im Rückgang von positiven Opiatbefunden und Straßenheroin feststellen, während die Rückgänge bei den Benz und bei COC für die ersten 6 Monate (T-1 nach T6) nur wahrscheinlich, für den gesamten Studienzeitraum (T-1

nach T12) jedoch statistisch signifikant sind. Auffällig ist, dass die Anzahl der positiven MET-Befunde im Verlauf der Studie nur bei 75 bzw. 78% liegt.

Diese Werte wurden nochmals in den Tabelle 22 -Tabelle 24 zusammengefasst und die Signifikanz der Unterschiede von T-1 zu T12 (Tabelle 22 undTabelle 23), bzw. die Signifikanz der Unterschiede zwischen der HER- und der Methadongruppe berechnet (Tabelle 24). Dabei fallen neben der erwarteten signifikanten Abnahme des Opiatkonsums in der MET-Gruppe und des MET-Konsums in der HER-Gruppe vor allem die Abnahme des COC- und des Benzodiazepin-Konsums in beiden Gruppen auf. Vergleicht man nun die beiden Gruppen untereinander, so fällt der signifikant höhere Konsum an Benzn bei T6 und T12 und der signifikant höhere Konsum an THC bei T12 bei der HER-Gruppe auf. Die Unterschiede bei T6 und T12 bezüglich des Opiat- und MET-Konsums hingegen waren durch die Medikation bedingt.

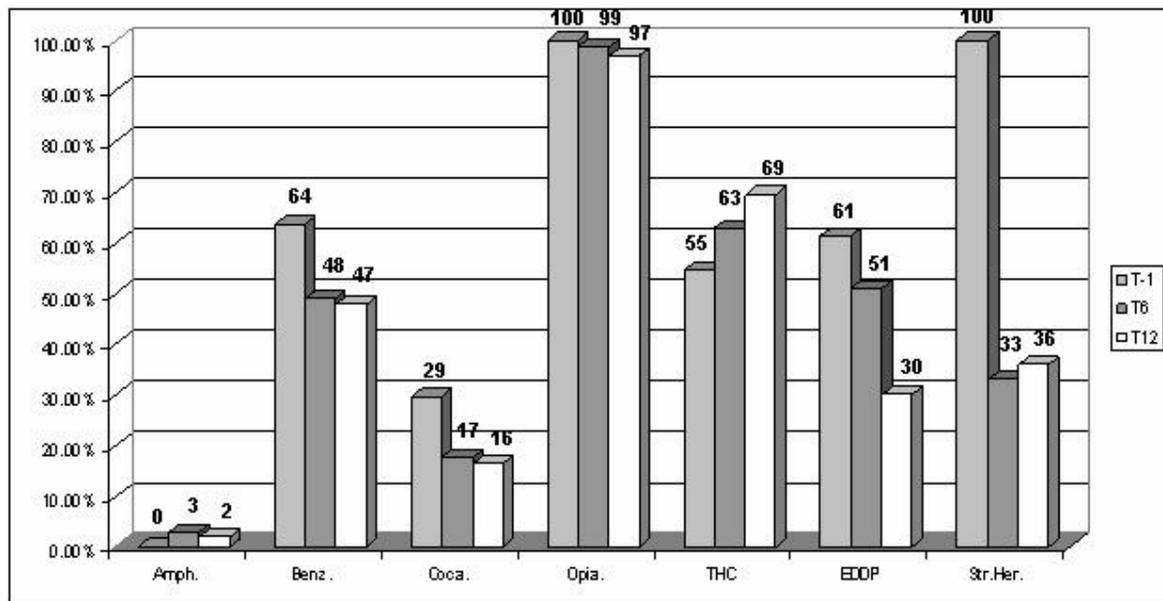


Abbildung 23: Beikonsum weiterer Drogen in der Heroingruppe in%, bezogen auf das gesamte Probenkollektiv

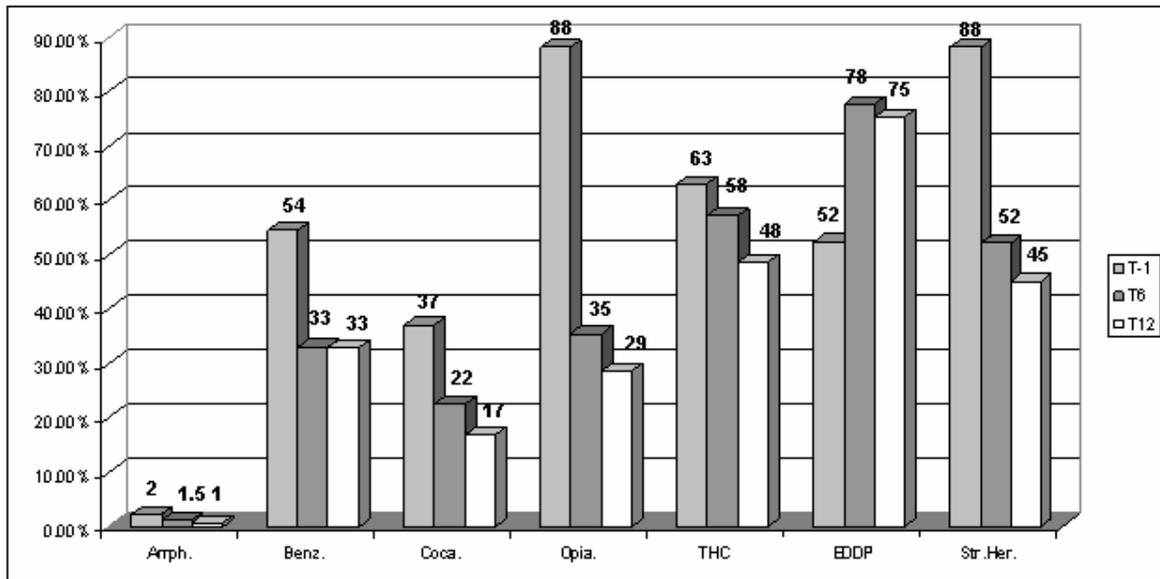


Abbildung 24: Beikonsum weiterer Drogen in der Methadongruppe in%, bezogen auf das gesamte Probenkollektiv

n	T-1		Chi <sup>2</sup> -Wert T-1 → T12	Signifikanz (zweiseitig)	
	T6	T12			
Amph.	0.0%	2.7%	0.78	0.378	nicht verwertbar (da ein Wert 0 oder 100%)
Benz.	63.6%	48.9%	3.70	0.054	grenzwertig signifikant
Coca.	29.6%	17.7%	4.24	0.040	signifikant
Opia.	100.0%	98.6%	1.40	0.237	nicht verwertbar (da ein Wert 0 oder 100%)
THC	54.6%	62.9%	3.79	0.052	grenzwertig signifikant
EDDP	61.4%	51.0%	15.80	<0,001	sehr signifikant

Tabelle 22: Verlauf des Beikonsums weiterer Drogen in der Heroingruppe

n	T-1	46	Chi <sup>2</sup> -Wert T-1 → T12	Signifikanz (zweiseitig)	
	T6	161			
	T12	161			
<b>Amph.</b>	T-1	2.2%	0.90	0.342	nicht verwertbar (da ein Wert 0 oder 100%)
	T6	1.2%			
	T12	0.6%			
<b>Benz.</b>	T-1	54.4%	7.00	0.008	sehr signifikant
	T6	33.0%			
	T12	32.9%			
<b>Coca.</b>	T-1	37.0%	8.71	0.003	sehr signifikant
	T6	22.4%			
	T12	16.8%			
<b>Opia.</b>	T-1	87.0%	50.22	<0,001	sehr signifikant
	T6	35.4%			
	T12	28.6%			
<b>THC</b>	T-1	63.0%	3.05	0.081	grenzwertig signifikant
	T6	57.1%			
	T12	48.5%			
<b>EDDP</b>	T-1	52.2%	9.01	0.003	sehr signifikant
	T6	77.6%			
	T12	75.2%			

Tabelle 23: Verlauf des Beikonsums weiterer Drogen in der Methadongruppe

		HER	MET	Gesamt			
n	T-1	44	46	90	Chi <sup>2</sup> -Wert HER-MET	Signifikanz (zweiseitig) HER-MET	
	T6	221	161	382			
	T12	226	161	387			
<b>Amph.</b>	T-1	0.0%	2.17%	1.1%	0.97	0.325	nicht signifikant
	T6	2.7%	1.24%	2.1%	0.985	0.321	nicht signifikant
	T12	1.8%	0.62%	1.3%	18.75	<0,001	nicht signifikant
<b>Benz.</b>	T-1	63.6%	54.35%	58.9%	0.80	0.371	nicht signifikant
	T6	48.9%	32.92%	42.1%	9.718	0.002	<b>signifikant</b>
	T12	47.8%	32.92%	41.6%	8.56	0.003	<b>signifikant</b>
<b>Coca.</b>	T-1	29.5%	36.96%	33.3%	0.56	0.456	nicht signifikant
	T6	17.6%	22.36%	19.6%	1.311	0.252	nicht signifikant
	T12	16.4%	16.77%	16.5%	0.92	0.011	nicht signifikant
<b>Opia.</b>	T-1	100.0%	86.96%	93.3%	6.15	0.013	nicht signifikant
	T6	98.6%	35.40%	72.0%	184.728	<0,001	<b>sehr signifikant</b>
	T12	96.9%	28.57%	68.5%	203.37	<0,001	<b>sehr signifikant</b>
<b>THC</b>	T-1	54.5%	63.04%	58.9%	0.67	0.413	nicht signifikant
	T6	62.9%	57.14%	60.5%	1.290	0.256	nicht signifikant
	T12	69.5%	48.45%	60.7%	17.421	<0,001	<b>sehr signifikant</b>
<b>EDDP</b>	T-1	61.4%	52.17%	56.7%	0.773	0.379	nicht signifikant
	T6	23.1%	77.64%	46.1%	111.608	<0,001	<b>sehr signifikant</b>
	T12	30.1%	75.16%	48.8%	76.42	<0,001	<b>sehr signifikant</b>

Tabelle 24: Direkter Vergleich HER-MET-Gruppe in Bezug auf den Beikonsum weiterer Drogen

#### 4.1.3.7 Kombinationsbereitschaft weiterer Drogen

Die Kombinationsbereitschaft gibt die Häufigkeit wieder, mit der bei Konsum eines bestimmten Wirkstoffes noch weitere Drogen konsumiert werden. Vergleicht man die beiden Gruppen zum Zeitpunkt T-1 und T12, so fällt bei beiden Gruppen die Abnahme für den jeweiligen Wirkstoff auf. Während in der Heroingruppe die Zahl von 193% auf 164% sinkt, fällt sie in der Methadongruppe sogar von 215% auf 155%. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch die Probanden der Heroingruppe auf Anfrage Methadon bekamen, so dass die Zahl der positiven Ergebnisse für diesen Wirkstoff mit Vorsicht zu genießen ist. Zur Verdeutlichung wurden die Werte für Hauptdrogen in den Tabellen fett dargestellt - bei T-1 die Opiate für beide Gruppen, bei T12 die Opiate für die HER-Gruppe und EDDP für die

MET-Gruppe. Es fällt jedoch auf, dass für die MET-Gruppe die Kombinationsbereitschaft bei allen Drogen außer den Opiaten wesentlich geringer ist.

Bei der Bestimmung der Werte wurden die Ergebnisse für positive Amphetaminproben herausgenommen, da diese aufgrund der geringen Stückzahl von maximal 6 positiven Proben keine sinnvolle statistische Aussage zulassen.

HER T-1	Benz.	Coca.	Opia.	THC	EDDP	Kombi.*
<b>Benz. (n=28)</b>		39.29%	92.86%	50.00%	60.71%	242.86%
<b>Coca. (n=13)</b>	84.62%		100.00%	53.85%	61.54%	300.00%
<b>Opia. (n=44)</b>	<b>59.09%</b>	<b>29.55%</b>		<b>50.00%</b>	<b>54.55%</b>	<b>193.18%</b>
<b>THC (n=24)</b>	58.33%	29.17%	91.67%		58.33%	237.50%
<b>EDDP (n=27)</b>	62.96%	29.63%	88.89%	51.85%		233.33%

A

HER T12	Benz.	Coca.	Opia.	THC	EDDP	Kombi.*
<b>Benz. (n=108)</b>		20.37%	99.07%	72.22%	37.04%	228.70%
<b>Coca. (n=37)</b>	59.46%		100.00%	83.78%	48.65%	291.89%
<b>Opia. (n=219)</b>	<b>48.86%</b>	<b>16.89%</b>		<b>69.86%</b>	<b>28.31%</b>	<b>163.93%</b>
<b>THC (n=157)</b>	49.68%	19.75%	97.45%		35.67%	202.55%
<b>EDDP (n=68)</b>	58.82%	26.47%	91.18%	82.35%		258.82%

B

MET T-1	Benz.	Coca.	Opia.	THC	EDDP	Kombi.*
<b>Benz. (n=25)</b>		44.00%	88.00%	80.00%	64.00%	276.00%
<b>Coca. (n=17)</b>	64.71%		100.00%	58.82%	58.82%	282.35%
<b>Opia. (n=40)</b>	<b>55.00%</b>	<b>42.50%</b>		<b>70.00%</b>	<b>47.50%</b>	<b>215.00%</b>
<b>THC (n=29)</b>	68.97%	34.48%	96.55%		51.72%	251.72%
<b>EDDP (n=24)</b>	66.67%	41.67%	79.17%	62.50%		250.00%

C

MET T12	Benz.	Coca.	Opia.	THC	EDDP	Kombi.*
<b>Benz. (n=53)</b>		13.21%	30.19%	67.92%	98.11%	209.43%
<b>Coca. (n=27)</b>	25.93%		77.78%	48.15%	100.00%	251.85%
<b>Opia. (n=46)</b>	34.78%	45.65%		67.39%	84.78%	232.61%
<b>THC (n=78)</b>	46.15%	16.67%	39.74%		88.46%	191.03%
<b>EDDP (n=121)</b>	<b>42.98%</b>	<b>22.31%</b>	<b>32.23%</b>	<b>57.02%</b>		<b>154.55%</b>

D

\*Kombinationsbereitschaft

Tabelle 25 A-D: Kombinationsbereitschaft weitere Drogen

A: HER-Gruppe bei T-1; B: HER-Gruppe bei T12; C: MET-Gruppe bei T-1, D: MET-Gruppe bei T12

## 4.1.4 Ergebnisse aus der Studie zum Nachweis von Opiatalkaloiden nach Verzehr mohnhaltiger Lebensmittel

### 4.1.4.1 Alkaloidgehalte der unterschiedlichen Mohnprodukte

11 verschiedene Mohnprodukte, die im März 2004 im Raum Bonn erworben wurden, wurden auf ihre Alkaloidgehalte hin untersucht. Die Konzentrationen der einzelnen Alkaloide schwankte in den unterschiedlichen Mohnprodukten sehr stark, jedoch gab es nur in einer Probe negative Befunde für MOR, NOS und PAP. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt.

Produkt	Konzentration im Mohn [ $\mu\text{g/g}$ ]			
	COD	MOR	NOS	PAP
Blaumohn Fa. ATCO	7,69	87,45	0,13	0,043
Blaumohn Fa. Neuform	positiv	0	0	0
Blaumohn Fa. Backstube	1,06	3,34	1,42	0,057
Blaumohn Fa. Märsch Import	0,82	3,65	1,57	0,057
Blaumohn Fa. Müller's Mühle	16	60,6	0,14	0,043
Blaumohn Fa. Davert	1,08	3,78	0,5	0,053
Blaumohn Rio Bravo	6,02	18,3	0,13	0,043
Mohn-Back Fa. Schwartau	0,29	2,61	0,00	0,000
Mohn-Fix Fa. Pichard-Dekor	0,27	2,69	0,00	0,000
Mohn Füllung Fa. Gold Puder	2,99	14,37	0,12	0,032
Mohn-Fix Fa. Backstube	0,22	1,51	0,08	0,000

**Tabelle 26: Alkaloidgehalte in den untersuchten Mohnprodukten**

### 4.1.4.2 Urinproben

Wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben gaben die 10 bzw. 12 Probanden in den beiden jeweils 48-stündigen Versuchsperioden über 300 Urinproben ab, die später mittels HPLC-MS und Immunoassay untersucht wurden.

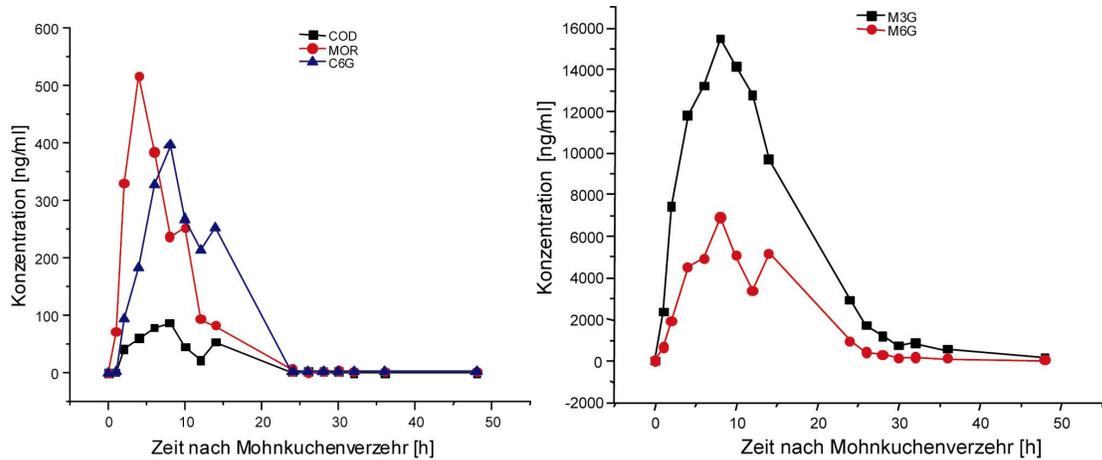
Es konnten sowohl in den immunchemischen Untersuchungen auf Opiate 100% positive Befunde erhalten werden als auch 100% positive Ergebnisse auf M3G und M6G bei der HPLC-MS/MS Bestätigungsanalyse (Tabelle 27). Selbst freies MOR wurde zu jedem Zeitpunkt in mindestens 82% der Urinproben nachgewiesen, zwischen 6 und 10 Stunden nach Verzehr der unterschiedlichen Kuchen sogar in 100%, mit einer Maximalkonzentration von 0,77  $\mu\text{g/ml}$  nach 4 Stunden.

Auch freies COD wurde nach 8 und 10 Stunden in allen Urinproben mit einer Höchstkonzentration von 0.16 µg/ml nachgewiesen, während sein Glucuronid zwischen 6 und 28 Stunden nach Verzehr in allen Urinproben detektiert werden konnte. Die höchsten Gesamtmorphin- und Gesamtcodeinkonzentrationen (Summe aus freiem MOR sowie seiner beiden Glucuronide) wurden nach 4 bis 6 Stunden und Verzehrsmengen von 60 bzw. 40 Gramm Kuchen mit Werten bis zu 17 µg/ml (MOR) bzw. 5,7 µg/ml (COD) ermittelt (Tabelle 27).

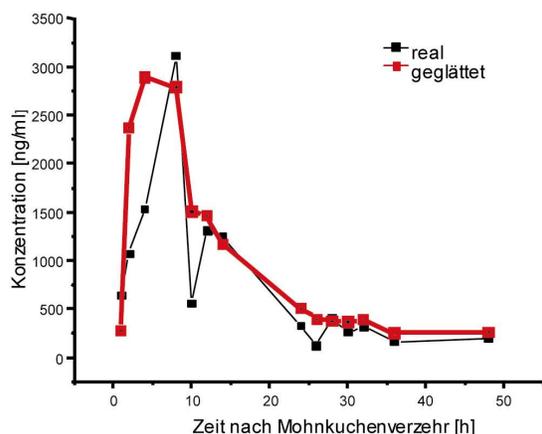
h	MOR [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	M3G [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	M6G [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	COD [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	C6G [%]	Konz.Bereich [ng/ml]
1	83	< 12,4 - 453	100	157 - 9950	100	49 - 202,00	67	< 5,5 – 42,5	83	< 3,0 - 697
2	92	< 12,4 - 478	100	2450 - 10900	100	802 - 4040	83	< 5,5 – 45,5	83	< 3,0 - 1610
4	92	< 12,4 - 772	100	887 - 17700	100	105 - 6780	92	< 5,5 - 106	92	< 3,0 - 3710
6	100	< 12,4 - 542	100	1950 - 19500	100	452 - 5230	92	< 5,5 - 110	100	< 3,0 - 6510
8	100	< 12,4 - 481	100	2370 - 20300	100	824 - 10100	100	< 5,5 - 161	100	< 3,0 - 8900
10	100	< 12,4 - 284	100	1560 - 16400	100	1134 - 4720	100	< 5,5 – 96	100	< 3,0 - 6010
12	91	< 12,4 - 261	100	858 - 14500	100	514 - 6320	82	< 5,5 – 66,6	100	< 3,0 - 4170
14	91	< 12,4 - 118	100	1130 - 14000	100	188 - 7440	73	< 5,5 – 78,5	100	< 3,0 - 688
24	91	< 12,4 - 272	100	275 - 6180	100	208 - 2060	55	< 5,5 – 33,4	100	< 3,0 - 1350
26	91	< 12,4 – 81	100	529 - 4220	100	67 - 1354	55	< 5,5 – 81,1	100	< 3,0 - 470
28	91	< 12,4 – 88	100	599 - 4360	100	222 - 1224	28	< 5,5 – 25,4	100	< 3,0 - 371
30	91	< 12,4 – 67	100	213 - 3320	100	111 - 1262	17	< 5,5 – 43,3	92	< 3,0 - 406
32	91	< 12,4 – 61	100	286 - 2280	100	165 - 1018	8	< 5,5	92	< 3,0 - 283
34	92	< 12,4 – 37,1	100	47 - 3780	100	< 26,1 - 1670	8	< 5,5	92	< 3,0 - 177
36	91	< 12,4 – 15,4	100	34 - 3240	100	< 26,1 - 534	8	< 5,5	92	< 3,0 - 354
48	82	< 12,4 – 45,6	100	196 - 2520	100	36 - 1880	8	< 5,5	92	< 3,0 - 101

**Tabelle 27: Relative Nachweishäufigkeiten und Konzentrationsbereiche von MOR, COD und deren Glucuroniden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme in Urinproben**

Typische Verläufe der Konzentrationen für MOR, COD und ihre Glucuronide sind in der Abbildung 25 wiedergegeben. Durch Verwendung eines Korrekturfaktors, der mittels der Dichte jedes einzelnen Urins bestimmt wurde, lassen sich die starken Konzentrationsschwankungen im Urin ausgleichen und die Kurve lässt sich glätten. Als Beispiel dafür ist der Verlauf der Gesamtmorphinkonzentration (freies MOR + M3G + M6G, berechnet auf MOR) in Abbildung 26 wiedergegeben. Während der Verlauf der realen Konzentration sehr zackig verläuft (graue Kurve), ähnelt die korrigierte Kurve (rot) einem erwarteten Verlauf der Wirkstoffkonzentration.



**Abbildung 25: Verlauf der Konzentrationen von COD, MOR und C6G (links) sowie von M3G und M6G nach Aufnahme von 60 g Mohn, entsprechend einer auf das Körpergewicht bezogenen Menge von 78,3 µg/kg MOR und 6,9 µg/kg COD**



**Abbildung 26: Verlauf der Gesamtmorphinkonzentration: reale Konzentration (grau), mittels Urindichte korrigierte Kurve (rot)**

Es wurde in keiner einzigen Probe NOS oder PAP nachgewiesen, auch wenn durch Verzehr des „Begleitstoffkuchens“ bis zu 94 µg NOS bzw. 3,3 µg PAP aufgenommen wurden.

#### 4.1.4.3 Blutproben

Insgesamt 36 Blutproben wurden entnommen, die letzten Proben 6 Stunden nach Verzehr des Kuchens. In der immunchemischen Analyse auf Opiate lagen 31 Proben im Bereich der Entscheidungsgrenze von 25 ng/ml (18 – 27 ng/ml), während beide MOR-Glucuronide in der HPLC-MS/MS Analyse in allen Proben mit Konzentrationen bis zu 362 ng/ml für M3G und 97 ng/ml für M6G nachgewiesen konnten. Freies MOR konnte in insgesamt einem Viertel der Blutproben, vornehmlich in den ersten beiden

Stunden nach Verzehr des Kuchens, nachgewiesen werden, jedoch lagen die ermittelten Konzentrationen im Bereich zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Freies COD konnte ebenso wie NOS und PAP in keiner Probe nachgewiesen werden, C6G eine Stunde nach Verzehr in 67% der Proben und später in allen Proben.

h	MOR [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	M3G [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	M6G [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	COD [%]	Konz.Bereich [ng/ml]	C6G [%]	Konz.Bereich [ng/ml]
1	33	< 3,0	100	< 7,5 - 163	100	< 8,4 - 42	0	n.b. *	67	< 3,3
2	44	< 3,0	100	58 - 130	100	< 8,4 - 81	0	n.b. *	100	< 3,3
4	11	< 3,0	100	93,6 - 306	100	< 8,4 - 83	0	n.b. *	100	< 3,3
6	11	< 3,0	100	22,7 - 362	100	< 8,4 - 97	0	n.b. *	100	< 3,3

**Tabelle 28: Relative Nachweishäufigkeiten und Konzentrationsbereiche von MOR, COD und deren Glucuroniden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme in Blutproben**

\*n.b. = nicht bestimmbar

#### 4.1.4.4 Schweißtest

3 von 6 Schnelltesten „DrugWipe Opiates“ auf Schweißbasis, die 6,5 Stunden nach Verzehr des „Morphinkuchens“ durchgeführt wurden, ergaben einen positiven Befund. Auf dem untenstehenden Foto sind ein negativer (links) und ein positiver Test (rechts) aus dem Mohnkuchenversuch abgebildet. Während im negativen Test nur der Kontrollstreifen zu sehen ist, erkennt man im positiven Test zusätzlich einen Streifen, der den positiven Befund anzeigt.

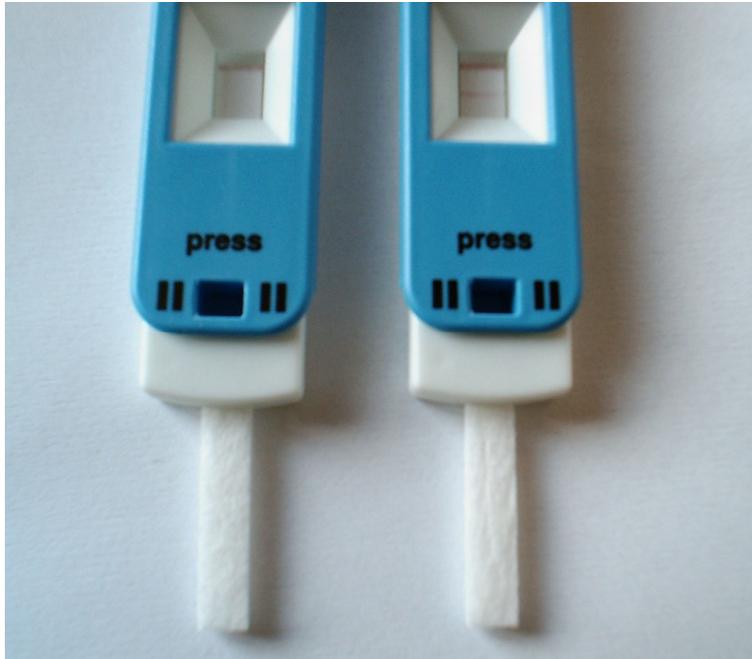
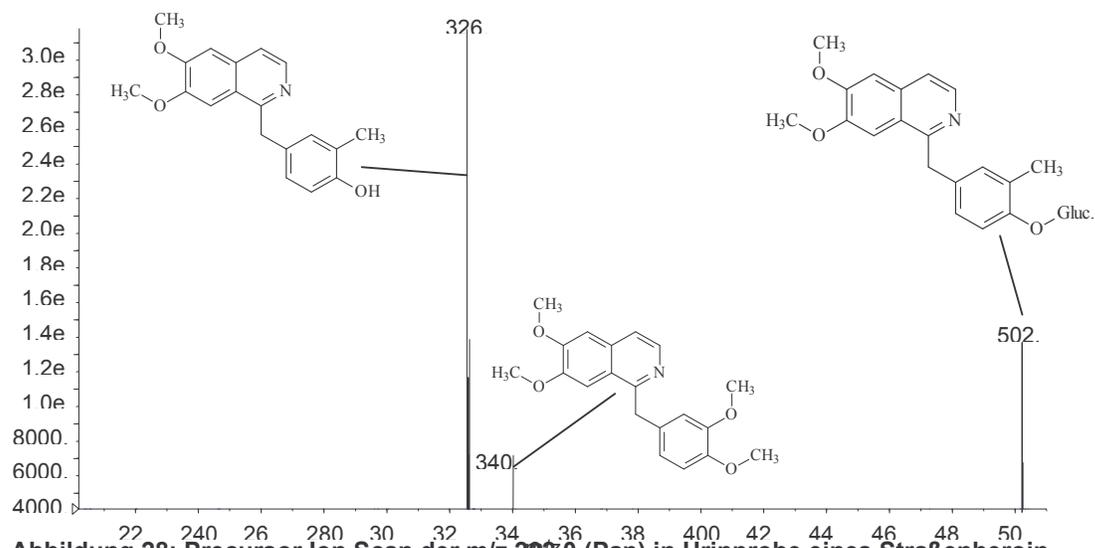


Abbildung 27: Positiver Drug Wipe Test auf Opiate (rechts) im Vergleich zu negativem Test (links)

#### 4.1.4.5 Erweiterung der Methode um zwei Alkaloidmetaboliten und Ergebnisse aus den neuen Messungen

##### 4.1.4.5.1 Detektion der erwarteten Metaboliten

Zur Optimierung der MS-Bedingungen für die beiden PAP-Metaboliten wurde die Urinprobe eines Straßenheroinkonsumenten, bei dem bereits eine hohe Konzentration an PAP bestimmt wurde, neu extrahiert. In dieser Probe konnten im Precursor Ion Scan des stärksten Fragmentions von PAP ( $m/z = 202,0$ ), neben der Masse von PAP ( $m/z = 340,0$ ), die Massen von Desmethylpapaverin (DMP,  $m/z = 326,1$ ) und Desmethylpapaverin-Glucuronid (DPG,  $m/z = 502,0$ ) detektiert werden (Abbildung 28). Die Signalintensität für die beiden Metaboliten war dabei um den Faktor 2-5 größer als von PAP selbst.



**Abbildung 28: Precursor Ion Scan der m/z 202,0 (Pap) in Urinprobe eines Straßenheroin-konsumenten**

#### 4.1.4.5.2 Überprüfung der chromatographischen Bedingungen

Im Anschluss an die Detektion der erwarteten Metaboliten wurden die chromatographischen Bedingungen der HPLC-Methode überprüft und für die Detektion im Massenspektrometer ein Multiple Ion Experiment für die drei Molekülionenmassen verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass eine gute chromatographische Trennung unter Verwendung des vorgegebenen Gradienten und einer neuen Säule vorliegt (Abbildung 29). Im MI-Chromatogramm sind jeweils ein deutlicher Peak auf den Ionenspuren von PAP ( $m/z = 340,0$ ) und DPG ( $m/z = 502,0$ ) zu sehen, hingegen hat DMP ( $m/z = 326,1$ ) zwei zusätzliche Peaks, die von den beiden anderen Analyten stammen, erkennbar an der gleichen Retentionszeit. DMP wird in diesen Fällen durch Fragmentierung in der Ionenquelle („Collisionally Induced Dissociation“, CID) durch Desmethylierung von PAP oder Deglucuronidierung von DPG gebildet.

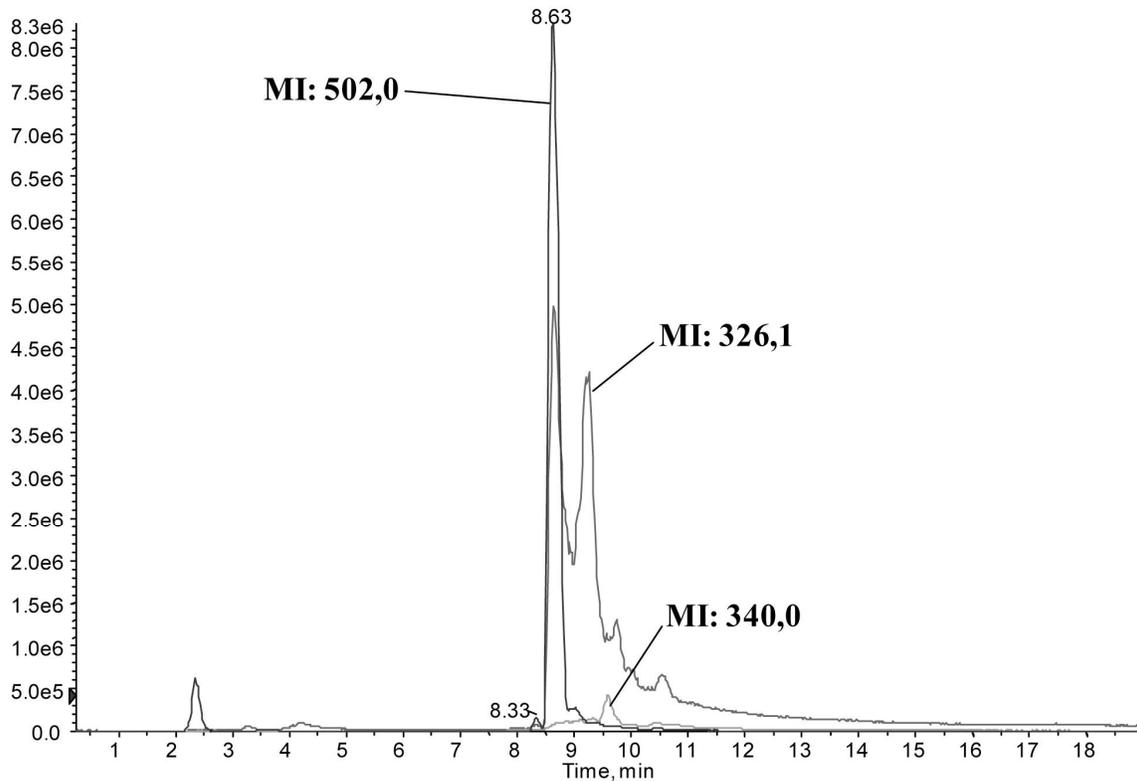


Abbildung 29: Chromatogram der Multiple Ion Ionenspuren von PAP (340,0), DMP (326,1) und DPG (502,0)

#### 4.1.4.5.3 Optimierung der MS/MS Parameter

Nach Überprüfung der HPLC Parameter wurden die Einstellung für die MRM-Detektion entwickelt und optimiert. Hierfür wurden die MRM-Übergänge zum Fragment mit der  $m/z$  202,0 unter standardisierten MS-Bedingungen vermessen und jeder Parameter einzeln durch Verwendung unterschiedlicher Werte optimiert. Abbildung 30 zeigt die übereinanderliegenden Chromatogramme, welche die Optimierung der Kollisionsenergie von DPG verdeutlicht. Die Peakintensität verbesserte sich in diesem Beispiel von der Standardeinstellung (kleines Chromatogramm oben) zur optimierten Einstellung (kleines Chromatogramm unten) um über 50%.

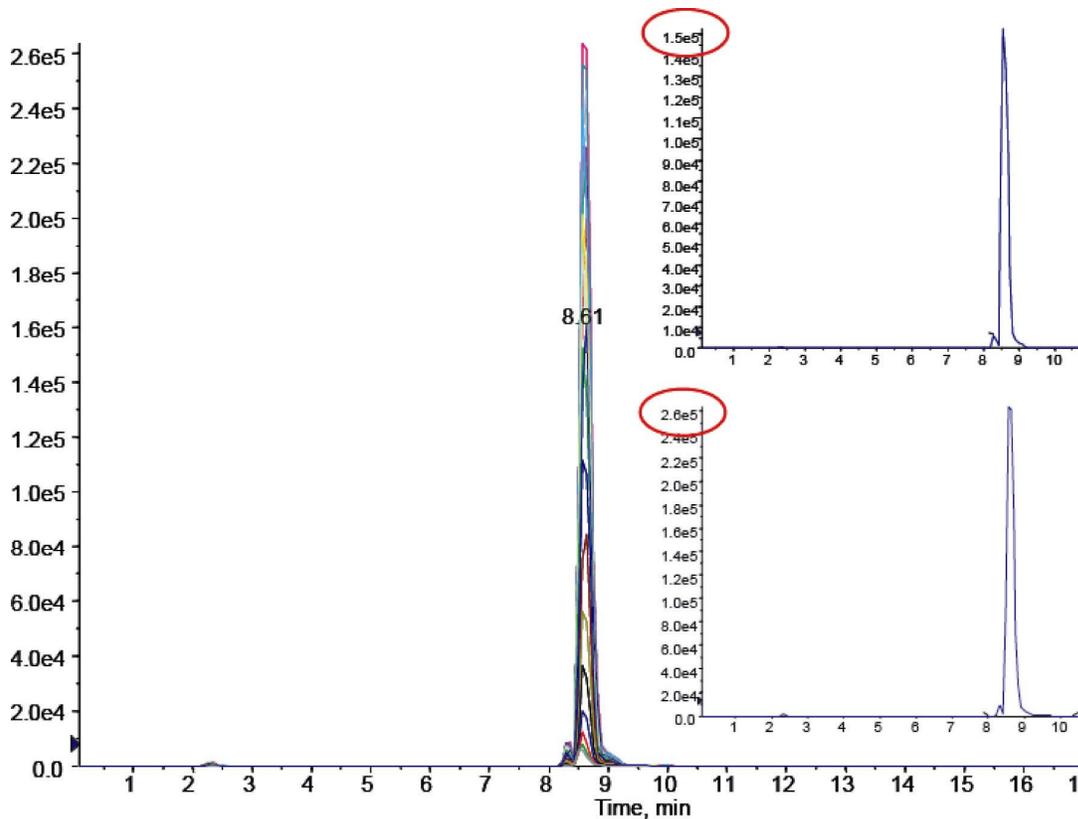


Abbildung 30: Chromatogramm zur Optimierung der Collision Energy von DPG

Abbildung 31 zeigt die MRM Chromatogramme der 3 einzelnen Ionenspuren. Es wird deutlich, dass die Substanzen chromatographisch basisliniengetreunt werden und dabei ihrer Polarität folgen. Das polarste Molekül DPG wird erwartungsgemäß als erstes von der Säule eluiert, das unpolarste, PAP, als letztes.

Des Weiteren wird durch die Peakintensitäten ersichtlich, dass DPG der Hauptmetabolit des PAP ist. Zwar lassen sich die Peakintensitäten bei verschiedenen MRM Experimenten nicht direkt miteinander vergleichen, jedoch geben sie bei strukturell ähnlichen Molekülen einen guten Hinweis auf die Konzentrationsverhältnisse. Die Peakhöhe von DPG ist 10 Mal so groß wie von DMP und sogar 20 Mal so groß wie von PAP.

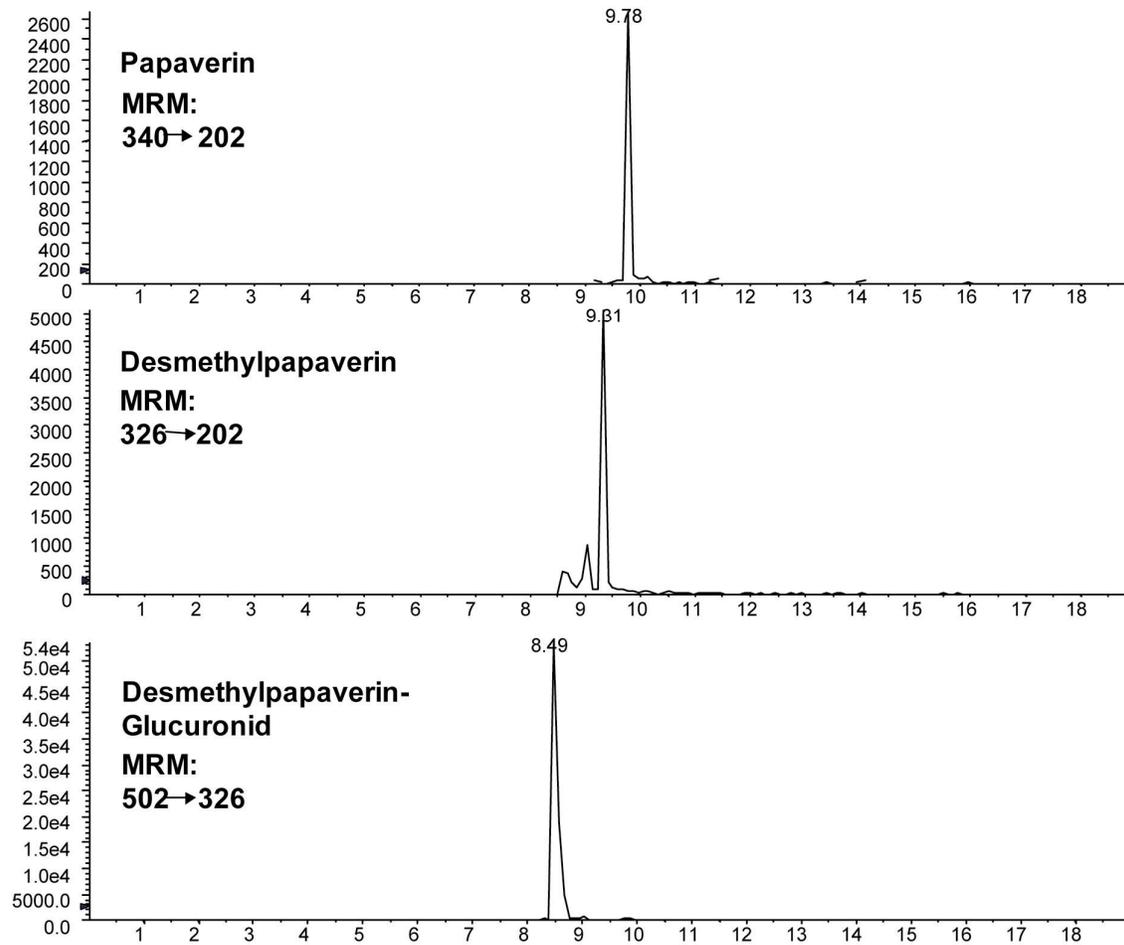
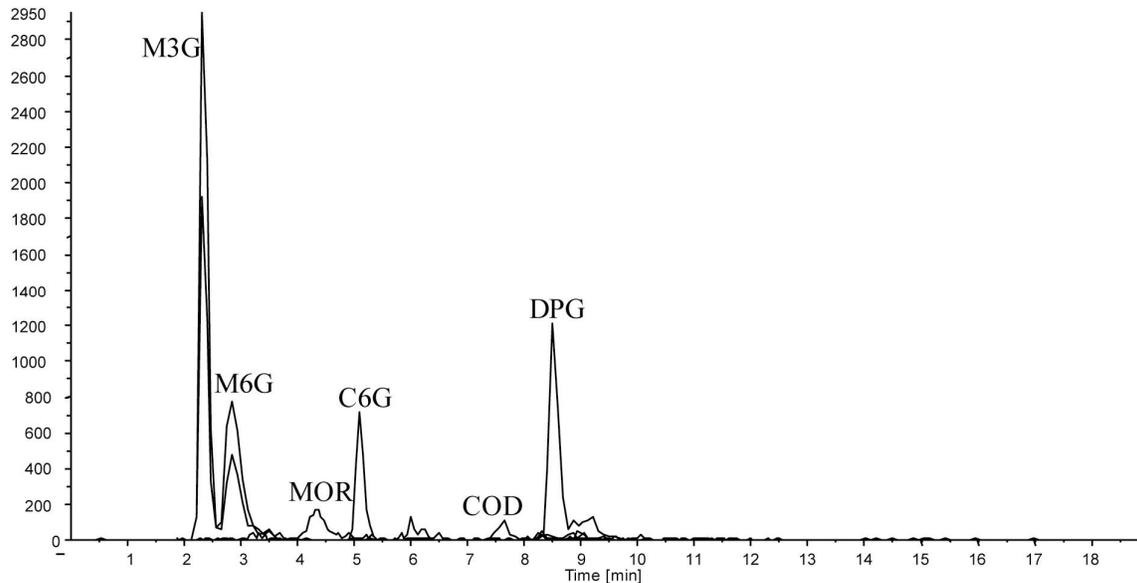


Abbildung 31: Chromatographische Trennung von PAP, DMP und DPG

#### 4.1.4.5.4 Ergebnisse aus den neu vermessenen Proben

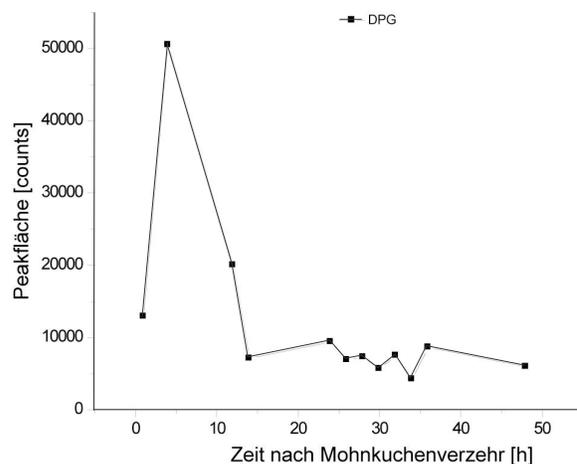
In 7 von 31 neu untersuchten Urinproben aus dem Mohnkuchenprojekt konnte DMP detektiert werden, sogar in allen war DPG zu finden.

Abbildung 32 zeigt ein Chromatogramm einer neu analysierten Urinprobe aus dem Mohnkuchenprojekt. Neben MOR, COD und ihren Glucuroniden ist ein deutlicher Peak von DPG zu erkennen.



**Abbildung 32: Chromatogramm einer realen Urinprobe eines Mohnkuchenkonsumenten mit MOR, COD, ihren Glucuroniden und DPG**

Der Verlauf der DPG Konzentration ist in Abbildung 33 wiedergegeben. Da keine Standards für diesen Analyten vorliegen, ist eine Quantifizierung nicht möglich. Jedoch lässt sich der relative Verlauf anhand der ermittelten Peakflächen darstellen. Der Verlauf ähnelt dem Verlauf der anderen Glucuronide, jedoch wird aus der Kurve für DMP ersichtlich, dass der Abbau von PAP sehr viel schneller erfolgt und die Konzentration nach 12 Stunden bereits fast konstant ist.



**Abbildung 33: Relativer Verlauf der DPG Konzentration nach Aufnahme von 60 g Mohn, entsprechend einer auf das Körpergewicht bezogenen Menge von 50,7 ng/kg PAP**

## **4.2 Analytik von Opioiden in Serum und Haaren**

### **4.2.1 Methodenentwicklung Analytik von Serum**

Für die HPLC Methodenentwicklung wurde auf die gleichen Säulen und Laufmittelkombinationen zurückgegriffen wie für die Opiatanalytik in Urin (Kap. 4.1.1). Statt der Phenomenex Luna C18 (150 x 1 mm, 3µm Partikelgröße) Säule kam eine weitere Säule zum Einsatz: Phenomenex Synergy Hydro RP (150 x 2 mm, 3µm Partikelgröße). Es stellte sich heraus, dass Phenomenex Max RP (150 x 2 mm, 4µm Partikelgröße) mit der Laufmittelkombination Wasser/Acetonitril mit 5 mM Ammoniumformiat, eingestellt auf pH 6 mit Ameisensäure, die beste Trennung ermöglichte.

Auch für die Festphasenextraktion wurden die gleichen Materialien verwendet wie für die Opiat-Analytik von Urin. Aufgrund der besten Extraktionsausbeute für die polaren Metaboliten stellte sich wieder Macherey-Nagel C18ec als bestmögliche Festphase für die Probenaufarbeitung dar (Tabelle 14).

### **4.2.2 Methodvalidierung Analytik von Serum**

Die Validierungsdaten sind in den Tabelle 29 und Tabelle 30 wiedergegeben.

	Konzentration [ng/ml]			Wiederhol- präzision [%]			Laborpräzision [%]			Richtigkeit [%]		
	Hoch	Mittel	Tief	Hoch	Mittel	Tief	Hoch	Mittel	Tief	Hoch	Mittel	Tief
<b>BIS</b>	500,0	75,0	10,0	7,4	6,5	14,9	8,4	6,8	14,9	0,4	2,0	-4,9
<b>BUP</b>	50,0	7,5	1,0	6,4	9,4	12,8	6,4	9,4	14,7	4,0	4,9	11,1
<b>COD</b>	500,0	75,0	10,0	3,2	4,6	4,0	4,0	4,6	4,5	-1,7	-1,9	3,3
<b>FEN</b>	50,0	7,5	1,0	8,9	9,4	11,4	8,9	10,1	11,4	5,2	4,2	1,6
<b>HYD</b>	50,0	7,5	1,0	4,2	8,8	12,9	4,7	8,8	18,4	7,6	6,6	-7,0
<b>MET</b>	500,0	75,0	10,0	7,9	7,4	9,7	10,2	10,8	11,6	2,1	-5,8	0,5
<b>MOR</b>	500,0	75,0	10,0	10,6	11,8	24,7	13,9	12,3	27,8	6,1	6,5	-13,1
<b>M3G</b>	500,0	75,0	10,0	12,7	7,3	14,8	12,7	9,8	18,5	14,0	8,4	3,9
<b>M6G</b>	250,0	37,5	5,0	11,5	11,6	15,0	11,5	11,6	16,8	8,0	13,2	8,0
<b>NFE</b>	50,0	7,5	1,0	7,7	7,1	18,6	7,8	7,1	18,6	3,3	5,8	2,4
<b>NTI</b>	500,0	75,0	10,0	13,8	13,5	13,2	13,8	13,5	13,2	-5,4	-4,3	-9,2
<b>OC</b>	50,0	7,5	1,0	4,8	4,5	5,0	6,1	4,8	5,9	-6,0	-5,9	-6,2
<b>OM</b>	500,0	75,0	10,0	10,1	9,3	16,4	12,9	12,0	17,1	4,6	6,6	13,5
<b>PIR</b>	500,0	75,0	10,0	7,0	9,0	10,9	7,0	11,9	11,2	5,1	8,6	26,3
<b>TIL</b>	500,0	75,0	10,0	14,1	11,5	7,0	14,7	11,5	11,0	-11,2	-1,9	-7,7
<b>TRA</b>	2500,0	375,0	50,0	9,2	8,9	10,6	9,4	8,9	10,6	1,4	5,5	10,7

Tabelle 29: Konzentrationen der QC-Proben, Präzisionen und Richtigkeiten der Schmerzmittel-Methode für die Analyse von Serum

	Linearer Bereich [ng/ml]	Korrelationskoeffizient R	Steigung	Achsenabschnitt	Grenzwerte [ng/ml]		Wiederfindung [%]	
					NG	BG	Hoch	Tief
<b>BIS</b>	5 - 1000	0,999	0,002	0,14	0,3	0,9	65,8	90,3
<b>BUP</b>	0,5 - 100	0,999	0,109	0,215	0,5	1,7	40,8	64,2
<b>COD</b>	5 - 1000	0,999	0,047	0,068	1,4	4,9	56,6	96,8
<b>FEN</b>	0,5 - 100	0,999	0,018	0	0,1	0,2	89,2	92,2
<b>HYD</b>	0,5 - 100	0,999	0,009	0,017	0,5	1,6	70,0	92,1
<b>MET</b>	5 - 1000	0,999	0,005	0,004	0,8	2,3	43,2	74,5
<b>MOR</b>	5 - 1000	0,997	0,001	0,019	1,3	4,8	54,8	56,5
<b>M3G</b>	5 - 1000	0,999	0,01	0,02	1,9	6,7	47,3	40,5
<b>M6G</b>	2,5 - 500	0,999	0,043	0	2,5	8,5	57,1	58,7
<b>NFE</b>	0,5 - 100	0,999	0,007	0,004	0,1	0,2	76,9	80,9
<b>NTI</b>	5 - 1000	0,998	0,028	0,08	0,4	1,1	89,8	99,6
<b>OC</b>	0,5 - 100	0,999	0,007	0,008	0,8	2,8	92,1	86,0
<b>OM</b>	5 - 1000	0,999	0,005	0	1,5	5,4	50,4	69,2
<b>PIR</b>	5 - 1000	0,998	0,006	-0,014	0,2	0,6	78,6	63,5
<b>TIL</b>	5 - 1000	0,998	0,031	0,1	0,2	0,8	88,7	84,9
<b>TRA</b>	25 - 5000	0,998	0,031	0,17	0,8	3,1	88,0	75,6

Tabelle 30: Daten der Kalibrierfunktionen, analytische Grenzwerte und Wiederfindungen der Schmerzmittel-Methode für die Analyse von Serum

#### *4.2.2.1 Festphasenextraktion*

Die Verwendung der automatisierten Festphasenextraktion zur Probenaufarbeitung zeigte zufriedenstellende Ergebnisse. Die absoluten Wiederfindungen lagen im Bereich von 40.5% (BUP) bis 99.6% (NT). Lediglich für 3 Analyten (BUP, MET, M3G, nur 4 von 32 Werten) wurden Wiederfindungen von unter 50% ermittelt, jedoch alle über 40% (Tabelle 30). Auch hier konnten durch die Automatisierung der Extraktion menschliche Bearbeitungsfehler größtenteils eingeschränkt und so eine gute Reproduzierbarkeit erhalten werden.

#### *4.2.2.2 Selektivität und Spezifität*

Im 35-minütigen HPLC-Lauf (Gesamtzeit inklusive Säulenconditionierung) konnten die Analyten größtenteils basisliniengetreunt werden. Lediglich MOR und OM wurden chromatographisch nicht getrennt, konnten jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen Detektion im Massenspektrometer gut voneinander unterschieden werden (Tabelle 11). HYD und MOR hingegen konnten nicht aufgrund ihrer MRM-Übergänge unterschieden werden - beide besitzen eine Mutterionenmasse von 286 und beide bilden aufgrund ihrer unselektiven Fragmentierung noch Tochterionen, die zur Detektion des jeweils anderen Moleküls herangezogen werden (Abbildung 34). Bei diesen beiden Analyten gelingt jedoch die chromatographische Trennung (Abbildung 34), ebenso bei M3G und M6G (Abbildung 35), die sowohl die gleichen m/z für die Mutter-, als auch die Tochterionen besitzen.

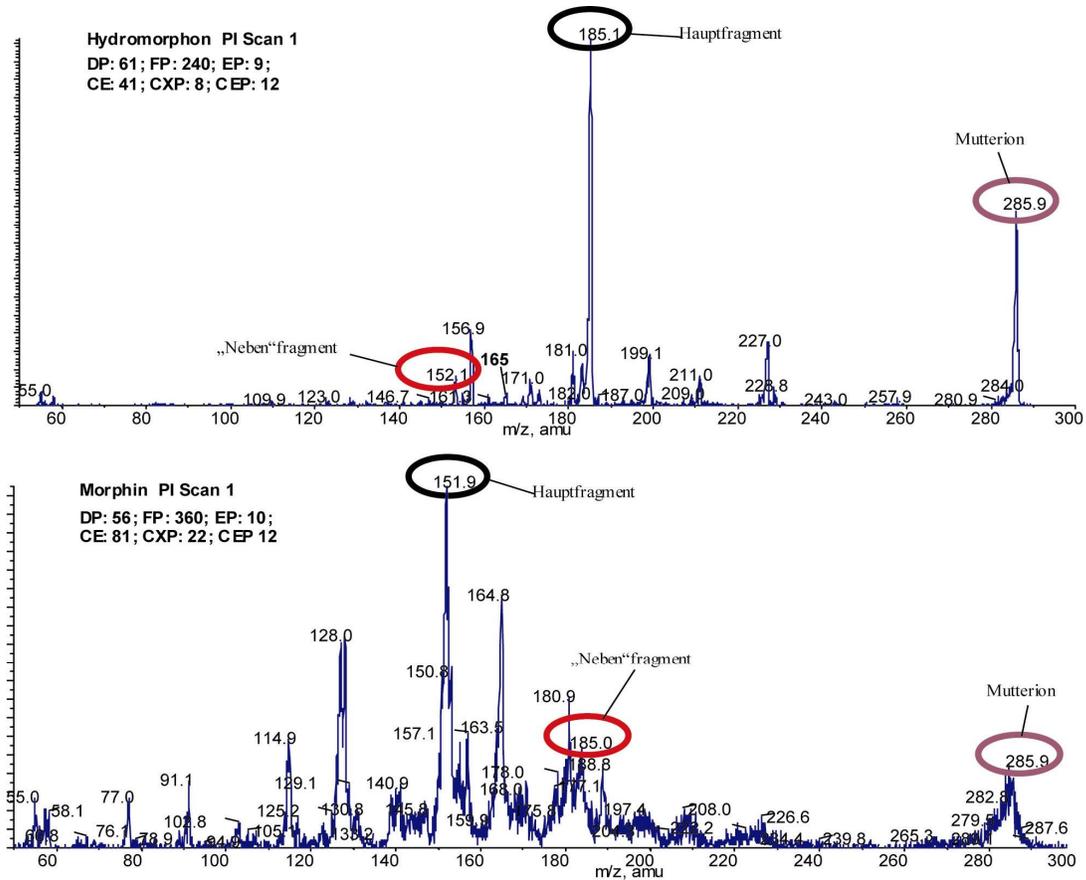
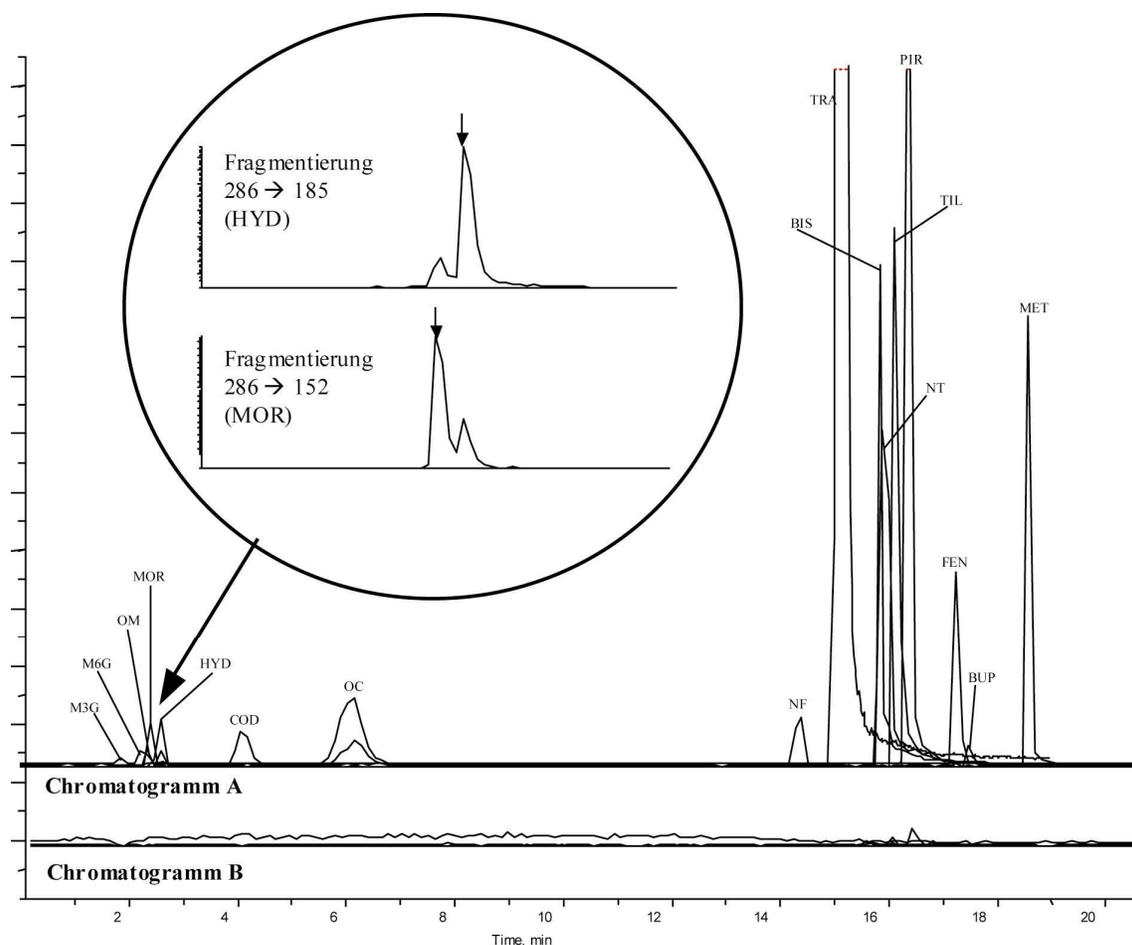


Abbildung 34: Product Ion Scans von HYD (oben) und MOR (unten)

Zur Überprüfung von Matrixeffekten wurden Leerseren 4 verschiedener Quellen undotiert und mit einem Standardgemisch dotiert vollständig aufgearbeitet und analysiert. Dabei zeigten sich keine Interferenzen mit den unterschiedlichen Matrices - während im dotierten Serum alle Analyten detektiert werden konnten (Abbildung 35 Chromatogramm A), finden sich keine Peaks in der undotierten Probe (Abbildung 35 Chromatogramm B).



**Abbildung 35:**  
**A:** Chromatogramm einer dotierten Serumprobe mit folgenden Konzentrationen: 2500 ng/ml (TRA), 500 ng/ml (BIS, COD, M3G, MET, MOR, NT, OC, PIR, TIL), 250 ng/ml (M6G) und 50 ng/ml (BUP, FEN, HYD, NF, OM)  
**B:** Chromatogramm einer Leerserumprobe

#### 4.2.2.3 Kalibrierung

Zur Ermittlung von Kalibriergeraden wurden Leerserumproben mit Standardlösungen in annähernd äquidistanten Konzentrationen dotiert. Die Kalibration erstreckte sich über einen Bereich von 2,5 Dekaden und wurde an die jeweils zu erwartenden Konzentrationsbereiche der Analyten im Serum angepasst. Die dotierten Seren wurden wie die Proben mittels automatisierter Festphasenextraktion aufgearbeitet und nach dem Eindampfen im Stickstoffstrom in Laufmittel aufgenommen und injiziert.

Es wurde eine gewichtete lineare Regression verwendet, alle Kalibriergeraden hatten Korrelationskoeffizienten von 0,997 und höher.

#### *4.2.2.4 Präzisionsdaten, Richtigkeit und analytische Grenzwerte*

2 bis 4 Quality Control (QC) Proben in jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen (hoch, mittel, niedrig) wurden an 8 Tagen aufgearbeitet und doppelt bestimmt. Aus den erhaltenen Messergebnissen wurden Wiederhol-, Laborpräzision und die Richtigkeit der Methode bestimmt. Die ermittelten Werte überschritten in 3 Fällen (dies entspricht 2,1% aller Werte) die geforderten Höchstwerte nach Richtlinien der GTFCh (Labor und Wiederholpräzision bei MOR, Richtigkeit bei PIR; QC-Proben jeweils in der niedrigsten Konzentration von 10 ng/ml). Die Gründe liegen zum Einen in der schlechten Fragmentierung des Morphins, zum Anderen im Fehlen eines deuterierten internen Standards bei PIR (Tabelle 11). Insgesamt 9 Werte (6,3%) lagen über 15% Abweichung, sie alle wurden im niedrigen Konzentrationsbereich der QC-Proben ermittelt und erfüllen somit noch die Akzeptanzkriterien der GTFCh für den niedrigen Konzentrationsbereich der Kalibrierung (20%).

Die Methode zeichnet sich durch sehr gute analytische Grenzwerte aus - 11 von 16 Werten (69%) für die Nachweisgrenzen liegen niedriger als 1 ng/ml. Die höchsten analytischen Grenzwerte sind bei den MOR-Glucuroniden zu finden (M6G: NG: 2,5 ng/ml, BG: 8,5 ng/ml), die niedrigsten Werte bei FEN und seinem Metaboliten NF (NG: 0,05 ng/ml, BG: 0,2 ng/ml).

#### *4.2.2.5 Stabilität*

Die Konzentrationen der Standards variierten nach mehrmaligen Einfrier- und Auftauzyklen bei allen Analyten um weniger als 10%.

#### *4.2.2.6 Anwendbarkeit der Methode*

Die Methode wurde zur Untersuchung von knapp 250 Serumproben von Patienten und palliativer Behandlung angewandt. Abbildung 36 zeigt ein Chromatogramm einer realen Probe.

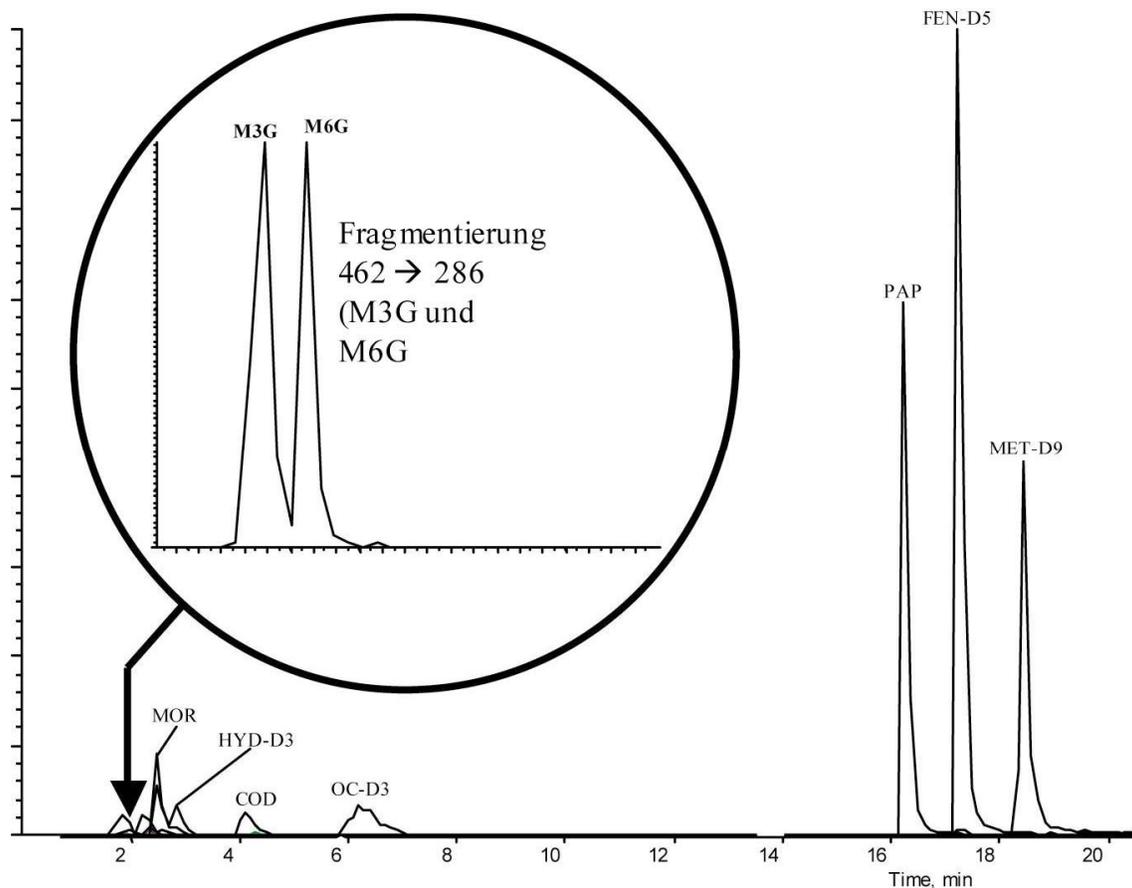


Abbildung 36: Chromatogramm einer realen Serumprobe aus dem Schmerzmittelprojekt (Medikation MOR + OC, zusätzlich COD detektiert)

## 4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung von Serumproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung

### 4.2.3.1 Nachweishäufigkeit der Opiode und ihrer Metaboliten

Das im Untersuchungskollektiv meist verwendete Schmerzmittel war MOR selbst, der Grundbaustein vieler weiterer Opiode. In 121 (56%) der untersuchten 215 Patientenproben lag eine einfache oder kombinierte MOR-Medikation zugrunde. In großem Abstand, jedoch ebenfalls noch häufig verwendet, kam der vollsynthetische Wirkstoff FEN (75) zum Einsatz, wiederum mit Abstand gefolgt von OC (25), HYD (20), TRA (17) und MET (14).

Die Einzelmedikation hatte mit 168 Proben den wesentlich größeren Anteil gegenüber der kombinierten Medikation (47 Proben). Die häufigste Kombination bestand aus den beiden meist verwendeten Schmerzmitteln MOR und FEN (24

Proben), nur die Kombinationen MOR + OC (6 Proben) und MOR + HYD (3 Proben) wurden ansonsten öfter als 2 Mal eingesetzt. Angaben zur Dosierung der einzelnen Schmerzmittel lagen nicht vor.

Hohe Nachweisraten (Vergleich Verschreibung-Nachweis) konnten vor allem für MET (92%), MOR (92%) und FEN (90%) festgestellt werden, während die Nachweise von BUP (57%) und PIR (40%) deutlich seltener gelangen. In den meisten Fällen gelang der Nachweis von Wirkstoffen oder ihrer Metaboliten häufiger bei der Einzelmedikation. Tabelle 31 gibt eine Übersicht über die Häufigkeiten der Nachweise.

	Tagesdosis [mg/Tag]	Gesamt*	Nachweise*	Nachweis-häufigkeit	Einzel	Nachweise*	Nachweis-häufigkeit	Kombi	Nachweise*	Nachweis-häufigkeit
BUP	0,6-1,6	7	4	57%	5	2	40%	2	2	100%
COD	k.A.	1	0	0%	0	0	0%	1	0	0%
FEN	0,6-10,8	77	69	90%	41	40	98%	36	29	81%
HYD	8-120	21	18	86%	15	13	87%	6	5	83%
MET	11-225	13	12	92%	11	11	100%	2	1	50%
MOR	15-1800	109	100	92%	70	68	97%	39	32	82%
OC	10-320	23	18	78%	12	10	83%	11	8	73%
OM	0	0	0	0%	0	0	0%	0	0	0%
PIR	30	5	2	40%	1	1	100%	4	2	50%
TIL	100-600	3	2	67%	1	1	100%	2	1	50%
TRA	50-900	15	13	87%	11	11	100%	4	2	50%

\* angegebene Medikation

\*\* Übereinstimmung, wenn entweder der Wirkstoff oder ein Metabolit mittels HPLC-MS/MS nachgewiesen wurde

**Tabelle 31: Häufigkeit der Medikationen und übereinstimmend nachgewiesenen Wirkstoffe im Schmerzmittelprojekt**

#### 4.2.3.2 Probenkonzentrationen

Abbildung 37 stellt die ermittelten Konzentrationsbereiche der einzelnen Analyten für die untersuchten Serumproben in Boxplots dar. Die Werte wurden in Analytpaare gleicher Farbe eingeteilt - links die Konzentrationen der Proben, bei denen nur ein Opioid verabreicht wurde, rechts die entsprechenden Werte, wenn das Schmerzmittel in Kombination mit einem anderen Opioid angewandt wurde.

In den Tabelle 32 A und B werden die Zahlenwerte nochmals aufgelistet, die ermittelten Konzentrationsbereiche der Proben mit den therapeutischen

Konzentrationsbereichen aus der Literatur verglichen und die relative Anzahl der ermittelten Werte wiedergegeben, die über den Literaturwerten liegen.

	Mittelwert	Median	unteres Quartil	oberes Quartil	Ther. Konz. bereich <sup>89</sup>	eigener Konz. bereich	% Werte > ther. Dosis
BIS	1,1	1,1	0,8	1,5	k.A.	0,42 - 1,8	0
BUP	1,0	1,0	0,8	1,0	0,5-10	0,65 - 2,0	0
COD	4,0	3,9	3,3	4,7	30-250	2,7 - 5,5	0
FEN	3,7	1,4	0,6	2,6	3-300	0,02 - 123	0
HYD	39,6	10,0	6,2	51,0	5.0-15	0,47 – 302	26
MET	382,3	133,6	45,0	432,4	100 - 500	1,3 – 2649	30
MOR	125,2	52,9	2,5	167,3	10-100	1,7 – 929	38
M3G	3072,6	1167,0	518,1	3327,2	k.A.	5,9 – 35196	0
M6G	310,3	98,3	43,0	312,2	k.A.	4,7 – 3733	0
NF	45,4	0,8	0,1	2,4	k.A.	0,02 – 1587	0
NT	2,6	2,6	2,6	2,6	k.A.	2,6	0
OC	28,1	13,1	9,9	31,1	5,0-20	3,7 – 130	29
OM	16,6	16,6	16,6	16,6	k.A.	16,6	0
PIR	16,1	11,3	5,5	22,7	3,5-14,1	3,4 - 60,6	32
TIL	1,4	1,4	1,4	1,4	50-120	1,4	0
TRA	242,4	145,8	340,0,6	116,1	100-1000	3,1 - 1077	7

Tabelle A: Einzelmedikation

	Mittelwert	Median	unt. Quartil	ob. Quartil	Ther. Konz. bereich <sup>89</sup>	eigener Konz. bereich	% Werte > ther. Dosis
BIS	467,6	467,6	234,7	700,4	k.A.	1,8 – 933	0
BUP	1,3	1,0	1,0	1,5	0,5-10	1,0 - 2,0	0
COD	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	30-250	k.A.	0
FEN	2,6	1,7	1,1	3,1	3-300	0,02 - 11,1	0
HYD	24,5	12,8	8,5	41,3	5.0-15	2,3 - 57,6	40
MET	376,2	373,3	86,3	663,2	100 - 500	6,2 – 752	50
MOR	26,2	5,1	2,5	27,3	10-100	1,7 – 210	9
M3G	1072,1	805,0	336,2	1430,4	k.A.	73,7 – 4500	0
M6G	131,7	64,5	47,2	153,4	k.A.	15,2 – 609	0
NF	2,5	0,6	0,2	2,8	k.A.	0,07 - 25,9	0
NT	81,2	81,2	81,2	81,2	k.A.	81,2	0
OC	17,1	17,5	7,3	26,3	5,0-20	2,5 - 32,0	33
OM	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0
PIR	18,3	14,3	10,7	23,4	3,5-14,1	3,6 - 42,3	50
TIL	5,7	5,7	5,7	5,7	50-120	5,7	0
TRA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	100-1000	k.A.	0

Tabelle B: Kombimedikation

Tabelle 32 A+B: Konzentrationsbereiche der bestimmten Schmerzmittel-Proben in Einzel- (Tabelle A) und Kombimedikation (Tabelle B)

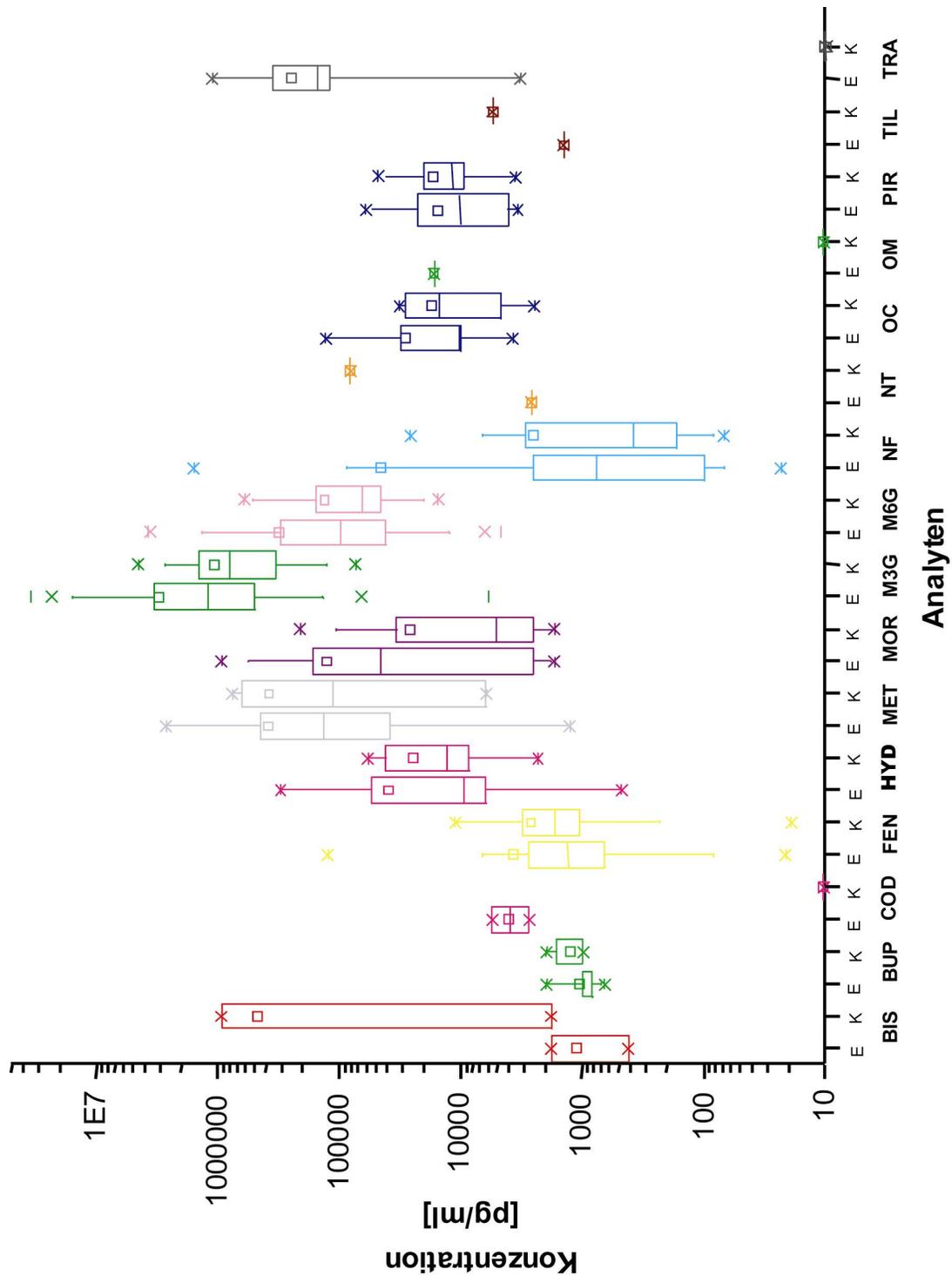


Abbildung 37: Konzentrationsbereiche der einzelnen Opiode des Schmerzmittelprojekts in den Serumproben

Es wird in verschiedenen Fällen deutlich, dass es Unterschiede in den Konzentrationsbereichen zwischen Einzel- und kombinierter Medikation des gleichen Wirkstoffes gibt. So fällt bei MOR und seinen beiden Glucuroniden sofort auf, dass sich die Konzentrationswerte in der Einzelmedikation deutlich von denen unterscheiden, in denen das Opioid zusammen mit einem anderen Opioid verabreicht wurde. Mittelwerte, Mediane und obere Quartile sind signifikant größer bei der Einzelmedikation. Bei FEN, dem zweithäufigst eingesetzten Schmerzmittel, ist dies nicht der Fall.

Auffällig ist des Weiteren die Tatsache, dass die in der Literatur beschriebenen therapeutischen Dosen in vielen Fällen überschritten werden, teilweise um ein Vielfaches. Speziell bei den Einzelmedikationen wurden sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen gefunden. Für HYD, MET, OC und PIR wurden diese Werte ähnlich oft in beiden Medikationsarten überschritten, für MOR vor allem in den Fällen der Einzelmedikation.

#### 4.2.4 Methodvalidierung Analytik von Haaren

Die Validierungsdaten sind in Tabelle 33 und Tabelle 34 wiedergegeben.

	Linearer Bereich [pg/mg]	Korrelationskoeffizient R	Steigung	Achsenabschnitt	Grenzwerte [pg/mg]		Wiederfindung [%]	
					NG	BG	Hoch	Tief
<b>BIS</b>	10 - 1500	0,998	19,57	0,16	17,4	59,1	63,5	60,6
<b>BUP</b>	1 - 150	0,996	77,71	0,01	1,6	5,3	81,2	74,3
<b>COD</b>	10 - 1500	0,997	19,35	0,69	12,7	50,8	83,0	78,6
<b>FEN</b>	1 - 150	0,997	10,92	0,02	0,8	2,6	59,6	57,5
<b>HYD</b>	1 - 150	0,998	8,50	0,01	2,0	6,6	74,6	53,2
<b>MET</b>	10 - 1500	0,998	2,44	0,01	8,9	30,0	88,5	62,1
<b>MOR</b>	10 - 1500	0,995	1,54	0,02	6,1	21,9	74,1	72,5
<b>NF</b>	1 - 150	0,993	4,61	0,03	0,9	3,5	67,2	64,9
<b>NT</b>	10 - 1500	0,998	95,06	1,89	9,3	32,2	76,2	63,6
<b>OC</b>	10 - 1500	0,997	23,17	1,33	12,0	42,7	64,3	54,1
<b>OM</b>	1 - 150	0,998	8,04	-0,01	1,2	4,7	85,5	52,6
<b>PIR</b>	10 - 1500	0,999	3,86	-0,05	2,2	9,1	81,0	73,8
<b>TIL</b>	10 - 1500	0,993	96,62	2,12	2,4	8,7	89,7	82,4
<b>TRA</b>	50 - 7500	0,993	34,09	7,64	15,2	57,8	88,9	83,8

**Tabelle 33: Daten der Kalibrierfunktionen, analytische Grenzwerte und Wiederfindungen für die einzelnen Analyten**

	Konzentration [pg/mg]		Wiederholpräzision [%]		Laborpräzision [%]		Richtigkeit [%]	
	Hoch	Tief	Hoch	Tief	Hoch	Tief	Hoch	Tief
<b>BIS</b>	500,0	100,0	3,2	3,3	3,2	3,3	0,7	0,9
<b>BUP</b>	50,0	10,0	4,8	6,7	4,8	6,7	1,2	8,4
<b>COD</b>	500,0	100,0	3,9	6,1	4,1	6,1	0,5	1,9
<b>FEN</b>	50,0	10,0	3,1	7,9	3,7	8,9	-0,1	3,0
<b>HYD</b>	50,0	10,0	3,1	6,0	3,4	9,4	0,6	4,6
<b>MET</b>	500,0	100,0	3,1	3,3	3,2	3,6	-0,1	-0,1
<b>MOR</b>	500,0	100,0	3,1	3,3	3,1	4,4	0,6	1,4
<b>NF</b>	50,0	10,0	3,1	9,8	3,5	9,8	0,9	2,3
<b>NT</b>	500,0	100,0	3,1	3,1	3,1	5,2	1,3	1,6
<b>OC</b>	500,0	100,0	3,3	4,6	3,3	4,6	0,4	1,4
<b>OM</b>	50,0	10,0	7,3	11,4	7,3	11,4	0,7	-0,9
<b>PIR</b>	500,0	100,0	3,3	4,8	3,3	6,2	0,8	1,4
<b>TIL</b>	500,0	100,0	3,1	5,0	3,2	4,9	0,7	0,1
<b>TRA</b>	2500,0	500,0	3,4	4,5	3,4	4,5	0,1	0,2

**Tabelle 34: Konzentrationen der QC-Proben, Präzisionen und Richtigkeiten der Schmerzmittel-Methode für die Haaranalyse**

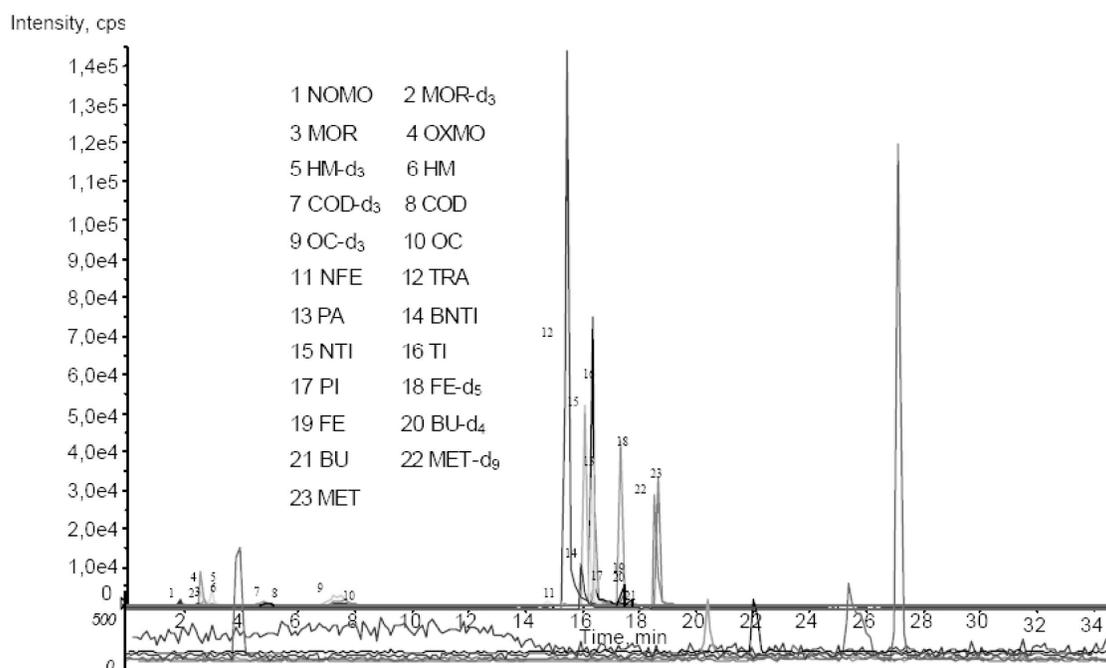
#### 4.2.4.1 Wiederfindung

Die verwendete methanolische Extraktion liefert zufriedene Ausbeuten, welche im Bereich von 53.2% (HYD) bis 89.7% (TIL) liegen. Dabei können auch nur geringe Unterschiede zwischen den Extraktionen höherer und niedrigerer Konzentration festgestellt werden.

#### 4.2.4.2 Selektivität und Spezifität

Wie in Abbildung 35 und Abbildung 36 ersichtlich konnten im 35-minütigen Gradienten die Substanzen voneinander getrennt werden. Nur FEN und BUP eluierten zur gleichen Zeit von der Säule, konnten jedoch aufgrund ihrer großen strukturellen Unterschiede gut im MRM Modus voneinander unterschieden werden. Zudem konnte TIL nicht vollständig von seinen Metaboliten NT und BIS getrennt werden und eluierte zeitgleich mit dem internen Standard PAP. Abbildung 38 zeigt den Vergleich einer extrahierten Leerhaarprobe (unten) mit einer mit allen Standards und internen Standards dotierten komplett aufgearbeiteten Leerhaarprobe. Während

in der Leermatrixprobe keine falsch positiven Signale gefunden werden konnten, zeigten alle zugebenen Analyten in der dotierten Proben Peaks zur korrekten Retentionszeit.



**Abbildung 38: Chromatogramm einer dotierten Haarprobe (1 ng/mg für jeden Analyten)**

#### 4.2.4.3 Kalibrierung

Für die Bestimmung der Kalibriergeraden wurden abhängig vom jeweiligen Analyten verschiedene Konzentrationsbereiche eingesetzt, die sich jeweils über 2.5 Dekaden erstreckten. Wegen des großen Konzentrationsbereiches wurden gewichtete Kalibrierfunktionen verwendet, welche sich mit sehr guten Korrelationskoeffizienten von 0.993 und höher auszeichneten (Tabelle 33).

#### 4.2.4.4 Präzisionsdaten, Richtigkeit und analytische Grenzwerte

Jeweils 2 dotierte Proben in hoher und niedriger Konzentration wurden an 8 Tagen komplett aufgearbeitet und zur Bestimmung der Präzisionsdaten sowie der Richtigkeiten untersucht. Die Konzentrationen der einzelnen Analyten lehnte sich an die zu erwartenden Konzentrationen in Haarproben an.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden Leermatrixproben in 6 Konzentrationsbereichen nahe den zu erwartenden Grenzwerten dotiert und untersucht. Aus den erhaltenen Kalibriergeraden wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen berechnet.

#### 4.2.4.5 Stabilität

Die Konzentrationen der Standards variierten nach mehrmaligen Einfrier- und Auftauzyklen bei allen Analyten um weniger als 10%.

#### 4.2.4.6 Anwendbarkeit der Methode

Die Methode wurde zur Untersuchung von 31 Haarproben von Patienten aus palliativer Behandlung eingesetzt. Abbildung 39 zeigt ein Chromatogramm einer realen Probe.

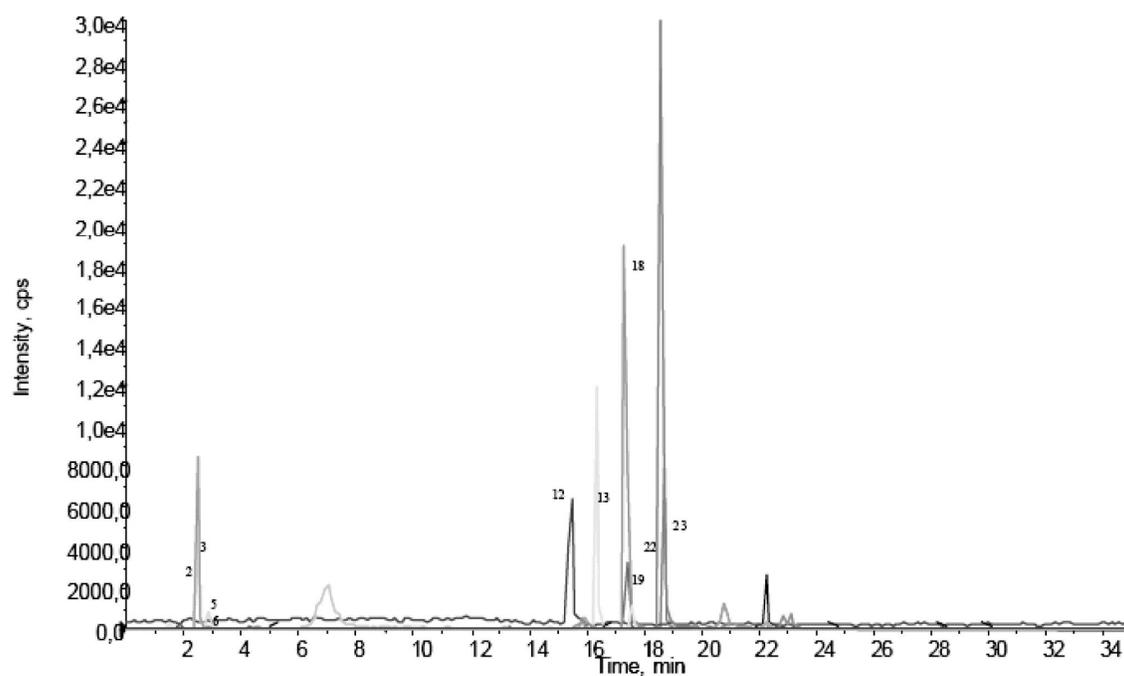


Abbildung 39: Chromatogramm einer realen Haarprobe aus dem Schmerzmittelprojekt (Medikation: MOR und FEN, zusätzlich nachgewiesen: TRA und MET)

## 4.2.5 Ergebnisse der Untersuchung von Haarproben von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung

### 4.2.5.1 Probenkollektiv und Medikation der Probanden

Tabelle 35 gibt einen Überblick über das Probenkollektiv, die zugehörige Medikation sowie die Darreichungsform des Medikaments. In 21 Fällen war die Medikation bekannt, in 10 Fällen nicht. Das meist verwendete Schmerzmittel dieses Probenkollektivs ist auch hier MOR, welches in 12 von 21 Fällen zum Einsatz kam (ohne Vortherapie). Ähnlich häufig wurden HYD (10) und FEN (8) eingesetzt, während alle weiteren Opioide deutlich seltener zum Einsatz kamen (max. 2 Proben, Vortherapie bei allen ausgenommen).

No.	Farbe	Länge (cm)	Opioid 1 (mg)					Opioid 2 (mg)						
			HYM	MOR	FEN	TIL	App*	HYM	MOR	FEN	BUP	OC	MET	App*
1	Grau	2	12	—	—	—	or *	—	—	—	—	—	—	—
2	Braun	5	—	60	—	—	iv *	—	—	—	—	—	—	—
3	Braun	5	12	—	—	—	or *	—	—	—	—	—	—	—
4	Schwarz	6	—	30	—	—	iv *	—	—	—	—	—	—	—
5	Schwarz	5	—	120	—	—	or *	—	—	—	—	—	—	—
6	Grau	6	25	—	—	—	or *	—	—	—	—	—	—	—
7	Rot g	5	16	—	—	—	or *	—	—	—	—	—	—	—
8	Braun	6	8	—	—	—	or *	—	—	—	—	—	—	—
9	Grau	4	—	—	1.8	—	td *	—	60	—	—	—	—	iv *
10	Black	3	—	—	—	200	or *	—	—	—	—	—	—	—
11	Grey	5	—	—	3	—	td *	—	45	—	—	—	—	or *
12	Schwarz	5	—	—	7.2	—	td *	—	40	—	—	—	—	iv *
13	Rot g*	5	32	—	—	—	ub *	—	—	—	—	—	—	—
14	Grau	8	—	20	—	—	or *	—	—	—	1.7	—	—	td *
15	Blond g*	5	48	—	—	—	or *	—	20	3.6	—	—	—	or/td*
16	Braun	3	48	—	—	—	or *	—	20	—	—	140	—	or *
17	Braun	10	—	—	2.4	—	td *	—	—	—	—	—	—	—
18	Braun	5	—	—	6.1	—	td *	56	100	—	—	—	—	or *
19	Schwarz	7	—	—	1.2	—	td *	—	90	—	—	—	—	or *
20	Schwarz	2	—	—	1.2	—	td *	—	30	—	—	—	—	iv *
21	Braun	12	0	—	—	—	iv *	—	—	—	—	—	16	or *
22	Grau	5												
23	Rot g*	7												
24	Braun	10												
25	Grau	7												
26	Grau	10												
27	Schwarz	8												
28	Schwarz	9												
29	Schwarz	8												
30	Grau	4												
31	Grau	7												

\* g: gefärbt App: Applikation; or: oral; td: transdermal; iv: intravenös; ub: unbekannt 0: unbekannte Dosis

**Tabelle 35: Haarfarbe, -länge, Opioidkombinationen und -darreichungsformen**

#### 4.2.5.2 Nachweishäufigkeiten der Opioide und deren Metaboliten

Die Häufigkeiten der Nachweise sind in Tabelle 36 dargestellt. Dabei wird unterschieden, ob ein Opioid als erstes oder zweites Schmerzmittel verwendet wird oder ob es noch aus der Zeit der Vortherapie stammt - gerade diese länger zurückliegenden Zeiträume können nur bei Haarproben erfasst werden.

Auffällig ist der fehlende Nachweis von NF in den Haarproben, während die anderen Analyten (wenn Probenzahl inklusive Vortherapie mindestens 3 war) alle Nachweishäufigkeiten von größer als 65% zeigen. Des Weiteren fallen die zusätzlich positiven Nachweise für MET und TRA ins Auge (Tabelle 36).

	Opioide 1	Opioide 2	Vortherapie (VT)	Nachgewiesen	Nicht nachgewiesen	Zusätzlich nachgewiesen
BIS	1	0	2	1 (+1)	1	2
BUP	0	1	2	1 (+1)/ 1 VT	0	0
COD	0	0	0	0	0	0
FEN	7	1	10	6 (+5)/ 3 VT	2 (+1)/ 1 VT	3
HYD	9	1	4	5 (+4)	5	1
MET	0	1	0	1	0	7
MOR	4	8	6	9 (+2)/ 1 VT	3 (+2)/ 1 VT	0
NF	7	1	10	0	8 (+6)/ 4 VT	0
NT	1	0	2	1 VT	1 (+1)	2
OC	0	1	1	0	1/ 1 VT	0
OM	0	0	0	0	0	0
PIR	0	0	0	0	0	0
TIL	1	0	2	1 (+1)	1 VT	2
TRA	0	0	1	0	1 VT	9

Tabelle 36: Häufigkeit der Gaben der einzelnen Opioide in Therapie und Vortherapie und Inzidenz von Nachweis und Nicht-Nachweis der Wirkstoffe und deren Metaboliten

#### 4.2.5.3 Probenkonzentrationen

Aufgrund der geringen Probenzahl und der Tatsache, dass oftmals noch eine Vortherapie mit einem anderen Wirkstoff stattfand, wurde für die Auswertung der Konzentrationen keine Unterscheidung zwischen der Medikation mit einem oder zwei Opioiden gemacht. Alle verabreichten Opioide konnten in den Haarproben nachgewiesen werden, die jeweiligen Konzentrationen variierten jedoch sehr stark, abhängig vom Wirkstoff und der Haarprobe. Die ermittelten Analytkonzentrationen in

den Haarproben lagen zwischen 0.018 ng/mg für NFE und HM und 10.731 ng/mg für MET (Tabelle 37). Die Konzentrationsbereiche, Mittelwerte und Mediane der positiven Proben sind in Tabelle 38 und Abbildung 40 wiedergegeben. Da in manchen Fällen die höchste Konzentration der Kalibriergerade überschritten wurde, mussten diese Werte mit einer extrapolierten Gerade ermittelt werden. Lediglich die nicht verabreichten Opioide COD, PIR, OC und OM konnten in keiner Probe detektiert werden.

No.	Therapie vor Krankenhausaufenthalt (mg)										Konzentration im Haar (ng/mg)									
	HM	MO	FE	BU	OC	TI	TRA	Tage	HM	MO	FE	NFE	BU	TI	NTI	BNTI	TRA	ME		
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.7	0.193	0.165	0.69	—		
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.612	0.594	0.241	1.172	—		
3	—	—	—	1.7	—	—	ub*	—	—	—	—	—	0.18	—	—	—	0.25	—		
4	—	30	0.6	—	—	—	ub*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.843	—		
5	—	—	—	—	—	—	—	—	0.13	—	—	—	—	—	—	—	19.655	—		
6	—	—	2.4	—	—	—	10	0.078	—	0.527	—	—	—	—	—	—	—	—		
7	—	10	2.4	—	—	—	60	—	—	0.461	—	—	—	—	—	—	—	—		
8	—	20	—	—	—	—	ub*	—	0.179	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
9	—	0	—	—	—	—	120	—	0.389	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
10	—	—	—	—	—	200	365	—	—	—	—	—	—	2.132	0.814	0.119	1.500	—		
11	—	—	2.4	—	—	—	28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.609	—		
12	—	—	3.6	—	—	—	ub*	—	0.238	0.911	—	—	—	—	—	—	—	0.234		
13	0	—	—	—	0	0	ub*	0.034	—	0.292	—	—	—	—	—	—	0.612	—		
14	—	—	—	2.4	—	—	ub*	0.035	0.127	—	—	0.041	—	—	—	—	—	1.955		
15	—	20	3.6	—	—	—	ub*	—	—	1.397	—	—	—	—	—	—	—	—		
16	24	—	—	—	—	—	75	0.305	0.403	0.013	—	—	—	—	—	—	—	2.974		
17	—	—	2.4	—	—	—	ub*	—	—	0.046	—	—	—	—	—	—	11.679	1.342		
18	0	—	—	—	—	—	ub*	0.187	0.152	0.345	—	—	—	—	—	—	11.846	2.176		
19	—	—	1.2	—	—	—	730	—	0.203	0.205	—	—	—	—	—	—	—	1.832		
20	—	66	1.2	—	—	—	25	—	1.275	0.23	—	—	—	—	—	—	—	10.73		
21	16	—	0.6	—	—	—	ub*	0.018	—	0.022	—	—	—	—	—	—	—	1.788		
22	—	—	—	—	—	—	—	—	0.141	0.408	—	—	—	0.791	0.093	0.057	3.245	—		
23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.787	0.018	—	—	0.69	0.043	—	—	—		
24	—	—	—	—	—	—	—	—	0.218	—	—	—	—	0.745	0.108	—	2.315	—		
25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.322	—		
26	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.128	—	—	—	—	—	—	—	—		
27	—	—	—	—	—	—	—	0.072	—	1.181	—	—	—	—	—	—	—	—		
28	—	—	—	—	—	—	—	—	0.158	0.159	—	—	—	—	—	—	0.812	0.043		
29	—	—	—	—	—	—	—	—	0.026	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.282	—	—	—	—		
																	34.628	—		

Tabelle 37: Therapie der einzelnen Patienten und ermittelte Analytkonzentrationen in den zugehörigen Haarproben

	HM	MO	FE	NFE	BU	TI	NTI	BNTI	TRA	ME
Positiv [Anzahl]	7	14	17	1	2	6	7	4	15	9
Positiv [%]	22.6	45.2	54.8	3.2	6.5	19.4	22.6	12.9	48.4	29
Mittelwert [ng/mg]	0.104	0.265	0.481	0.018	0.111	1.112	0.304	0.146	6.612	2.564
Standardabw. [ng/mg]	0.105	0.309	0.527	—	0.098	0.613	0.291	0.078	9.728	3.198
Median	0.072	0.169	0.292	0.018	0.111	0.768	0.193	0.142	1.500	1.832
Minimum	0.018	0.026	0.013	0.018	0.041	0.613	0.043	0.057	0.25	0.043
Maximum	0.305	1.275	1.787	0.018	0.18	2.132	0.814	0.241	34.628	10.731

Tabelle 38: Nachweishäufigkeiten und Konzentrationsbereiche der bestimmten Schmerzmittel-Proben

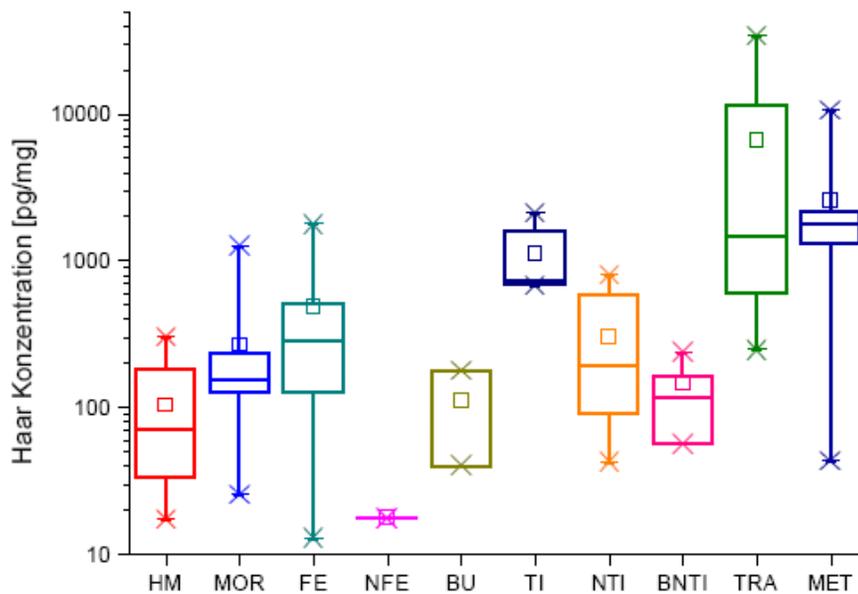


Abbildung 40: Konzentrationsbereiche der einzelnen Opioiden des Schmerzmittelprojekts in den Haarproben

## 5 Diskussion

### 5.1.1 Diskussion der Ergebnisse aus dem bundesdeutschen Modellprojekt zur heroingestützten Behandlung Opiatabhängiger

#### 5.1.1.1 Methodvalidierung

Die verwendete Analysenmethode inklusive der Probenaufarbeitung mittels SPE ermöglicht die simultane Bestimmung von 4 Heroin- und 5 Straßenheroinmarkern.

Die Festphasenextraktion erreichte zufriedenstellende Ausbeuten, lediglich die polaren MOR-Glucuronide erreichten Wiederfindungen im Bereich von nur 40 - 50%. Diesen Kompromiss muss man aufgrund großer Polaritätsunterschiede der Analyten eingehen. Zudem ist der Verlust durch die hohen Konzentrationen der Glucuronide im Urin akzeptabel und die Richtigkeit der Werte wird durch die Verwendung des deuterierten internen Standards M3G-D3 gewährleistet. Die Verwendung eines automatisierten Extraktionssystems ermöglichte die Minimierung menschlicher Fehler bei der Probenaufarbeitung und führte zu guten Präzisionsdaten. Der Vergleich von voll aufgearbeiteten Leerurinen mit dotierten Urinen zeigte, dass keine Interferenzen mit der Matrix nach Extraktion zu beobachten waren.

Auch die Validierungsdaten für die Präzisionen, Richtigkeiten und Linearitäten zeigten gute Ergebnisse, so dass die Methode nicht nur sehr gut zur qualitativen Bestimmung und Unterscheidung eines Konsums von pharmazeutischem Heroin (reines Diamorphin) und Straßenheroin herangezogen werden kann, sondern die Analyten auch gut quantifiziert werden können. Die Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die Chromatogramme von aufgearbeiteten Urinproben eines Heroin- (Abbildung 18) und eines Straßenheroinkonsumenten (Abbildung 19). Während man im zweiten Chromatogramm neben den reinen Heroinmarkern MAM, MOR, M3G und M6G noch die Straßenheroinmarker AC, COD, C6G, NOS und PAP erkennt, findet man im ersten ausschließlich die Marker für den Konsum von reinem Heroin. Dies zeigt die gute Anwendbarkeit dieser Analyten als Straßenheroinmarker.

Da COD jedoch ein häufig verwendetes Antitussivum ist und auch NOS und PAP u.a. in mohnhaltigen Lebensmitteln nachgewiesen werden kann<sup>73,79</sup> (s. auch Mohnkuchenstudie), müssen diese Marker sowie C6G mit Vorsicht verwendet werden.

Einzig AC, welches als Nebenprodukt bei der Herstellung von (Straßen)Heroin als Begleitstoff synthetisiert wird, kann als absoluter Marker für den Konsum von Straßenheroin bezeichnet werden. Für eine sichere Unterscheidung eines Straßenheroinkonsums von einer Aufnahme von pharmazeutischem Heroin sollten mehrere Marker herangezogen werden, im Idealfall AC.

#### *5.1.1.2 Probenmessungen*

Die Nachweishäufigkeiten von AC, PAP und MAM (Abbildung 20) in den T-1 Proben zeigen Werte im Bereich von 77 – 81%. Da PAP nur in geringen Konzentrationen im Milchsaft des Schlafmohn und zudem sehr schnell in hohem Umfang im Körper metabolisiert wird<sup>56</sup>, lässt sich dieser Straßenheroinmarker seltener, vor allem aber in geringerer Konzentration als die anderen nachweisen. Hingegen resultiert die geringere Nachweishäufigkeit von MAM und AC ausschließlich aus der sehr kurzen Halbwertszeit der beiden Analyten im Körper. Diese beiden Marker sind zwar hochspezifisch für den Konsum von Heroin (MAM) bzw. Straßenheroin (AC), jedoch sind sie aufgrund ihres kleinen Nachweiszeitfensters nicht generell anwendbar. Die höchsten Nachweishäufigkeiten zeigten die beiden MOR-Glucuronide M3G und M6G (95%) sowie MOR (92%) selbst. Die Tatsache, dass auch diese Analyten nicht in allen Proben nachgewiesen werden konnten, könnte an einem längeren Zeitpunkt zwischen dem letzten HER-Konsum und der Urinabgabe liegen. Im Immunoassay wurden die Opiate mit 89% noch weniger nachgewiesen. Dies zeigt die höhere Sensitivität der HPLC-MS/MS.

Die Probanden der Heroingruppe gaben wesentlich häufiger Urinproben ab (Kapitel 4.1.3.1), es wurde in signifikant weniger Urinproben von Probanden aus dem Heroinprojekt ein Straßenheroinbeikonsum sowie ein Beikonsum von COC festgestellt. Die Konzentration an Straßenheroinmarkern in positiven Proben war in der Methadongruppe signifikant höher, die der reinen Heroinmarker jedoch signifikant niedriger. Gründe für die häufigere Abgabe von Urinproben könnten in der höheren Bereitschaft liegen, vollständig bis zum Ende des Programmes teilzunehmen bzw. mit der Leitung zu kooperieren. Auch im Abschlussbericht der bundesweiten Heroinstudie wird festgehalten, dass die Probanden aus der Methadongruppe die

Therapie deutlich häufiger abbrechen<sup>58</sup>, was den Erfolg der heroingestützten Behandlung unterstreicht.

Ebenso passen zu diesem Gesamtergebnis der bundesweiten Studie die größere Anzahl an Straßenheroinkonsumenten sowie der häufigere Nachweis von Straßenheroinmarkern im gesamten Probenkollektiv der Methadongruppe. Zwar wurden bei beiden Gruppen signifikante Abnahmen der entscheidenden Marker-substanzen im Verlauf der Studie festgestellt (Tabelle 18 und Tabelle 19). Vergleicht man jedoch die beiden Medikationsgruppen untereinander, so zeigen sich teilweise signifikant höhere Nachweisraten für die Straßenheroinmarker bei der MET-Gruppe (Tabelle 20). Auch die Anzahl der einzelnen Probanden, bei denen mindestens ein einfacher oder mehrfacher Konsum von Straßenheroin nachgewiesen werden konnte, ist bei der MET-Gruppe signifikant höher (Abbildung 21) - dies kann mit sehr ähnlichen Werten durch die Ergebnisse der Studie bestätigt werden. Diese Ergebnisse stützen die These der Studienleitung, dass es durch die Verschreibung und die kontrollierte Abgabe von pharmazeutischem Diamorphin an Heroinabhängige zu signifikanten Verbesserungen der Gesundheit, zur Rückgewinnung eines sozialen Status und eine deutliche Senkung der Beschaffungskriminalität kommen kann. Diese Schlüsse allein aus den Analyseergebnissen zu ziehen, wäre sehr spekulativ, jedoch können die gewonnenen Ergebnisse zur Bestätigung der gezogenen positiven Bewertungen, welche auch von ähnlichen Studien in anderen Ländern berichtet werden<sup>53,54,112</sup>, beitragen.

Die Tatsache, dass die Konzentrationen der Heroinmarker bei den Probanden der Heroingruppe im Schnitt höher und die Konzentrationen der Straßenheroinmarker bei den Probanden der MET-Gruppe im Schnitt niedriger (Abbildung 22) sind, lässt auf einen Konsum höherer Dosen oder eines häufigeren (weil dadurch im Mittel zeitnäher zu den Zeitpunkten der Urinabgabe) Konsum schließen, sobald neben dem in der Therapie verordneten MET noch Straßenheroin beikonsumiert wurde. Hingegen konsumierten die Probanden mit HER-Medikation entweder seltener oder in geringeren Dosen zusätzliches Straßenheroin, welches ebenfalls wieder in Übereinstimmung mit den Gesamtergebnissen der Studienleitung liegt<sup>58</sup>.

In Bezug auf den Konsum weiterer Drogen wird ersichtlich, dass für alle untersuchten Drogenklassen die Abnahme von T-1 zu T12 signifikant ist oder im Grenzbereich liegt (Tabelle 22 und Tabelle 23). Hier zeigt sich die Wirksamkeit beider

Therapieformen. Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, so zeigen sich signifikante Unterschiede im Konsum von Benzpn, Cannabis sowie von Opiaten und MET. Da HER (Opiate) und MET die jeweiligen Medikationen sind, ist dieses Ergebnis erwartet. Auffällig ist die Tatsache, dass in der MET-Gruppe die Anzahl der Positivbefunde für den MET-Metaboliten EDDP nicht nahe bei 100%, sondern unter 80% lag. Da in den meisten Fällen gleichzeitig ein positiver Opiatbefund vorlag, könnte der Konsum von Straßenheroinkonsum, der die Einnahme der Ersatzdroge überflüssig macht, die Erklärung sein. Des Weiteren ist auch ein nicht mitgeteilter Wechsel in die HER-Gruppe möglich, wie er in der Studie beschrieben wird<sup>58</sup>.

Vergleicht man den Beikonsum weiterer Drogen mit den in der Studie beschriebenen Werten, so zeigt sich, dass diese gut miteinander übereinstimmen. Die wichtigste Ausnahme bilden COC-Metaboliten, welches in der vorliegenden Arbeit in deutlich geringerer Häufigkeit nachgewiesen wurde - während die Werte in der Studie über 32% liegen<sup>58</sup>, konnten COC-Metaboliten während der Studie in maximal 22% der Urinproben festgestellt werden (Abbildung 23 und Abbildung 24). Allerdings muss hierzu gesagt werden, dass bereits die Werte für den COC-Konsum vor der Studie (Zeitpunkt T-1) deutlich unter den Werten der Studie lagen (29% in der Bonner HER-Gruppe im Vergleich zu 56% bundesweit und 37% in der Bonner MET-Gruppe im Vergleich zu 56% bundesweit). Erklärungen hierfür wären ein generell anderes Konsumverhalten oder Unterschiede in der Analytik (z.B. geringere Cut-Off Level oder instrumentelle Unterschiede). Als weitere Ausnahme gilt es den Konsum von Cannabis zu nennen, der bei der HER-Gruppe im Studienverlauf signifikant ansteigt, während er in der MET-Gruppe signifikant abfällt (Tabelle 22 und Tabelle 23) und so eine signifikante Unterscheidung der Häufigkeit zum Zeitpunkt T12 verursacht (Tabelle 24). Dieser Verlauf steht für die MET-Gruppe im Einklang mit der bundesweiten Studie, für die HER-Gruppe nicht, und auch eine Erklärung für diese Tatsache ist schwer zu finden. Sie hat jedoch eine Auswirkung auf die Kombinationsbereitschaft der Probanden im Bezug auf den Konsum mehrerer Drogen in kurzen Zeitabständen (Tabelle 25) - diese fällt im Studienverlauf (Vergleich T-1 und T12) bei der HER-Gruppe nicht ganz so stark ab wie bei der MET-Gruppe. Insgesamt sind die Werte für die Kombinationsbereitschaft bei beiden Gruppen jedoch recht ähnlich.

## **5.1.2 Diskussion der Ergebnisse aus der Studie zum Nachweis von Opiatalkaloiden nach Verzehr mohnhaltiger Lebensmittel**

### *5.1.2.1 Methodvalidierung*

Da die gleiche Analytik verwendet wurde wie beim bundesdeutschen Modellprojekt zur heroingestützten Behandlung Opiatabhängiger, war die Methodvalidierung bereits erfolgt (s. Kapitel 5.1.1.1).

### *5.1.2.2 Probenmessungen*

Wie bereits in Studien von anderen Arbeitsgruppen konnten in der durchgeführten Studie Opiatalkaloide in handelsüblichen Mohnprodukten festgestellt werden. Lediglich eines von 11 untersuchten Produkten hatte negative Befunde für MOR, NOS und PAP, und auch COD konnte in diesem Produkt nur in Spuren nachgewiesen werden. Auch die teilweise sehr hohen Konzentrationen der unterschiedlichen Alkaloide lagen im Bereich von vorher durchgeführten Studien. Als ein Hauptanliegen der vorliegenden Studie sollte vor allem herausgefunden werden, inwieweit diese Opiate sowie ihre Metabolite nach Verzehr von moderaten Mengen Mohn in Urin und Blut/ Serum nachweisbar sind und welche Analyte als Marker zur Unterscheidung eines Konsums von mohnhaltigen Lebensmitteln und einer bewussten Aufnahme von Heroin herangezogen werden können.

Als klassische Marker für den Konsum von pharmazeutischem Heroin im Urin, wie es im Heroinvergabeprojekt ausgegeben wird, werden seine Metabolite MAM, MOR, M3G und M6G verwendet. Werden zusätzlich noch die Alkaloide NOS, PAP, AC, COD oder ihre Metaboliten (DMP, DPG, C6G) nachgewiesen, wird dies üblicherweise als Nachweis für den Konsum von Straßenheroin gewertet<sup>11,43,56,63-65,67,113</sup>. Wie in der untersuchten Studie gezeigt wurde, ist hierbei jedoch Vorsicht geboten. Nur MAM, welches beim Abbau von Diacetylmorphin als Zwischenprodukt entsteht, kann als eindeutiger Beweis für die Aufnahme von Heroin in den Körper angesehen werden. Als definitiver Beleg für den Konsum von Straßenheroin kann ausschließlich das bei der Heroinherstellung anfallende Begleitprodukt AC angesehen werden. MAM und AC besitzen im Körper jedoch eine sehr kurze Halbwertszeit<sup>63</sup>. MOR, COD sowie ihre Glucuronide konnten in der durchgeführten Studie im Urin in teilweise sehr

hohen Konzentrationen nach dem Verzehr von 0,5 – 3 Stücken Mohnorte nachgewiesen werden, weswegen sie nicht als absolute Marker für den beabsichtigten Konsum von Opiaten Anwendung finden können. Dies wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, die teilweise sehr hohe Konzentrationen an MOR und COD, meist nach Hydrolyse, feststellen konnten<sup>70,73-76,81,82,84,86,88</sup>. NOS und PAP hingegen konnten zwar, wie ebenfalls in anderen Studien, in den unterschiedlichen Mohnprodukten selbst, jedoch nicht nach Verzehr derselben detektiert werden<sup>73,79</sup>. Gleichwohl wurden in der vorliegenden Studie die PAP Metabolite DMP und DPG, welche ebenfalls als Marker für den Konsum von Straßenheroin verwendet werden<sup>56</sup>, in ausgesuchten Urinproben nachgewiesen. Der Verlauf der DPG Konzentration über 48 Stunden entspricht dabei dem erwarteten Verlauf und gibt einen Hinweis auf die kurze Halbwertszeit von PAP im Körper (0,8 – 1,5 Stunden). Auch NOS wird im Körper stark verstoffwechselt, hat mit 4.5 Stunden jedoch eine deutlich längere Halbwertszeit<sup>11,56</sup>. Trotz der negativen Nachweise in der vorliegenden Studie kann dennoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass auch NOS und PAP nach dem Verzehr mohnhaltiger Lebensmittel detektierbar sind. Sie können auch weiterhin, jedoch mit größerer Achtsamkeit als Marker für den Konsum von Straßenheroin verwandt werden. Für die beiden Metaboliten DMP und DPG konnte hingegen gezeigt werden, dass sie nicht als definitive Straßenheroinmarker verwendet werden dürfen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten MOR und COD sowie ihre Glucuronide nach Verzehr von mohnhaltigen Lebensmitteln auch im Blut in teilweise sehr hohen Konzentrationen nachweisen<sup>70,76,84</sup>. Bisher gilt ein Nachweis von freiem MOR mit einer Konzentration von 10 ng/ml als Beleg für die beabsichtigte Aufnahme von Opiaten, in einigen Fällen war sogar ein Nachweis von freiem MOR bis zu einer Konzentration von 13,5 ng/ml möglich, was in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte, wenn auch nicht in den hohen Konzentrationen wie in der Arbeit von Andresen et al.<sup>70</sup>. Insofern ist auch bei der Beurteilung eines möglichen Opiatkonsums für diese niedrigen Konzentrationsbereiche Vorsicht geboten, auch wenn es sich in diesen Fällen um sehr hohe Aufnahmemengen von Mohn handelt.

Die positiven Nachweise in den Schnelltesten auf Schweißbasis („Drug Wipe“) zeigen die Empfindlichkeit dieser Teste aber auch die Notwendigkeit von Bestätigungsanalysen. Erst die gezielte Suche nach den einzelnen Analyten kann

positive Befunde aufklären, welche jedoch die Leistungsfähigkeit und Anwendbarkeit der eingesetzten Methode demonstriert.

### **5.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Untersuchung von Serum von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung**

#### *5.1.3.1 Methodvalidierung*

Die Methode für die Analyse von 16 Opioiden und Opioid-Metaboliten zeigt zufriedenstellende bis sehr gute Daten für die Analysenparameter Wiederfindung, Selektivität, Sensitivität, Linearität, Richtigkeit und Präzisionen (Wiederhol- und Laborpräzision). Größere Abweichungen für die Präzisionsdaten gab es nur vereinzelt in den QC Proben im niedrigen Konzentrationsbereich.

Die Selektivität der Methode wurde durch den Vergleich von dotierten und undotierten Serumproben nachgewiesen (Abbildung 34). Es traten zwar keine Interferenz-Peaks durch die unterschiedlichen Leermatrices auf, jedoch waren Interferenzen zwischen den Analyten HYD und MOR sowie M3G und M6G auf zu beobachten. Diese beiden Paare von Strukturisomeren haben gleiche Molekülionmassen und bilden zusätzlich noch Fragmentationen, die als Quantifizier- und Qualifizierungen des jeweils anderen Analyten verwendet werden. Im Product Ion Scan in Abbildung 33 ist gut zu erkennen, dass MOR neben seinem wichtigsten Fragment mit der Masse 151,9 zusätzlich ein Fragment der Masse 185,0 bildet. Im MRM Modus erhält man daher auch einen Peak auf der Ionenspur von HYD, und umgekehrt. Die Gründe für diese Komplikationen liegen in der kompakten Struktur der beiden Analyten. Man benötigt eine hohe Kollisionsenergie, um die beiden Isomere zu fragmentieren. Jedoch entstehen dadurch viele verschiedene Bruchstücke, und diese „Nebenfragmente“ können dann die Masse des Hauptfragments des jeweils anderen Analyten besitzen. Bei den beiden MOR-Glucuroniden entsteht durch Abspaltung der Glucuronsäure sogar das gleiche Fragment, MOR selbst, als protoniertes Molekülion.

Trotz struktureller Ähnlichkeit gelingt jedoch die wichtige chromatographische Trennung von M3G und M6G sowie von MOR und HYD und es existieren deuterierte interne Standards für HYD, MOR und M3G, welche die Möglichkeit zum Vergleich

der Retentionszeiten bieten, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse auf ein Minimum reduzierten. Da die Substanzen jedoch nicht komplett basisliniengetrennt sind, lassen sich die etwas schlechteren Präzisionsdaten für MOR und HYD, speziell in den niedrigen Konzentrationsbereichen, sinnvoll erklären. Trotzdem sind auch diese Ergebnisse zufriedenstellend, was sich unter anderem in sehr guten Werten für die Linearität der einzelnen Kalibrierungen über 2,5 Dekaden äußert.

Die teilweise sehr niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermöglichen qualitative und quantitative Analysen auch bei Opioiden, die in sehr geringen Dosen verabreicht werden, z.B. FEN, HYD oder PIR. Für BUP liegen BG und NG im kritischen Bereich nahe der therapeutischen Konzentrationsbereiche. Polletini et al. beschrieben jedoch bereits Schwierigkeiten für diesen Analyten aufgrund seiner sehr kompakten Struktur und einer entsprechend als Folge uncharakteristischen Fragmentierung<sup>33</sup>. Zur Verbesserung dieses Problemes könnten längere Messzeiten auf der Ionenspur selbst (dwell time) oder eine verbesserte Ionisierung (z.B. APCI bei HPLC-MS/MS oder EI bei GC-MS) verwendet werden. Dies war in der verwendeten Methode jedoch nicht möglich, da zum Einen eine HPLC-MS Methode entwickelt werden sollte, um auch polare Metaboliten erfassen zu können, zum Anderen mit M3G und M6G zwei Analyten vorlagen, die sich als wenig stabil im APCI Modus erwiesen hatten. Ein weiterer Ansatz wäre der Einsatz einer „Pseudo-MRM“ Detektion - unter Verwendung einer geringeren CE würde als „Tochterion“ wieder das Mutterion detektiert. Eine bessere Quantifizierung wäre so möglich, jedoch sollten in diesem Falle beide Fragmentationen aus der derzeitigen Methode als Qualifier eingesetzt werden.

### *5.1.3.2 Probenmessungen*

Es gab hohe Nachweisraten für MET, FEN, MOR und HYD, während PIR und BUP in weniger als 50% der angegebenen Fälle detektiert werden konnten. FEN, MOR und vor allem MET werden jedoch in vergleichsweise hohen Konzentrationen angewandt und für FEN und MOR konnten für einen positiven Nachweis zusätzlich noch Metaboliten in Betracht gezogen werden, welche oftmals, wie in den Fällen von M3G und M6G sehr deutlich wird, in wesentlich höherer Konzentration im Serum vorliegen

als die Wirkstoffe selbst. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises deutlich.

Hingegen sind die Nachweisraten für BUP und PIR trotz niedriger analytischer Grenzwerte sehr gering. Hauptverantwortlich dafür sind die in beiden Fällen sehr geringen therapeutischen Dosen, welche nicht wesentlich höher als die analytischen Grenzwerte liegen. Jedoch war eine vollständig valide statistische Auswertung über die Nachweishäufigkeiten von BUP und PIR sowie von COD und TIL aufgrund der sehr geringen Probenzahl (maximal 7 Proben) nicht möglich. Daher sollten die Ergebnisse für diese Analyten nicht in Betracht gezogen werden.

Allgemein zeigt sich bei den Wirkstoffkonzentrationen sehr deutlich, dass die therapeutische Dosis (nach Review von Schulz und Schmoltd<sup>89</sup>) in vielen Fällen überschritten wird, z.B. bei MOR, MET oder OC. Die höchste ermittelte MOR-Konzentration war gar 9 Mal höher als die Höchstdosis, wie sie in der Literatur beschrieben wird. Für die 70 Fälle der Einzelmedikation liegt selbst die Durchschnittskonzentration von MOR höher als die angegebene therapeutische Dosis. Bezüglich der Durchschnittskonzentration wirken sich hier einzelne Fälle von sehr hohen Konzentrationen (bis zu 9 Mal höher als die angegebene therapeutische Dosis) sehr stark aus, auch wenn der Großteil der Werte im erwarteten Konzentrationsbereich (10 – 100 ng/ml) zu finden ist. Dies lässt sich anschaulich am Median für die MOR-Konzentrationen (52,9 ng/ml bei Einzel- und 26,2 ng/ml bei Kombimedikation) zeigen (Tabelle 32).

Hingegen liegen die Konzentrationen von FEN in den meisten Fällen in den tieferen Bereichen der therapeutischen Dosis (3 – 300 ng/ml). Oftmals konnte der Analyt nur qualitativ nachgewiesen werden, was sich in sehr geringen durchschnittlichen Konzentrationen (3,7 ng/ml bzw. 2,6 ng/ml) äußert.

Auch bei den weniger eingesetzten Opioiden konnten teilweise sehr große Unterschiede zwischen therapeutischer Dosis und einzelnen sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen festgestellt werden. Es handelt sich bei Überschreitungen um das 4-fache (PIR), 5-fache (MET), 6-fache (OC) oder gar 20-fache (HYD) zwar um Einzelfälle, jedoch werden gerade Medikamente wie HYD oder OC nicht zu selten eingesetzt und es wird deutlich, dass die in oben genannter Literatur beschriebenen therapeutischen Konzentrationen aufgrund der vielen

„Überschreitungen“ in authentischen Patientenproben überprüft und dementsprechend angepasst werden könnten.

Vergleicht man die Wirkstoffkonzentrationen zwischen Einzel- und kombinierter Medikation für das meistverwendete Opioid MOR, so wird ersichtlich, dass es für diesen Analyten statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwertkonzentrationen und Mediane gibt. Diese deutlichen Unterschiede zeigen sich sowohl beim Wirkstoff selbst als auch seinen beiden mit erfassten Metaboliten, M3G und M6G - alle 3 lagen in der Einzelmedikation in deutlich höheren Konzentrationen vor. Offensichtlich reicht durch die kombinierte Gabe mit anderen Analgetika eine geringere Wirkstoffdosis dieses sehr potenten Schmerzmittels aus, was sich gut mit der kumulativen Wirkung mit anderen Schmerzmitteln erklären lässt.

Auch für FEN lagen genügend Proben vor, um die Einzelmedikation und die kombinierte Wirkstoffgabe zu vergleichen. Bei den anderen Schmerzmitteln hingegen gab es zu wenige Fälle kombinierter Medikation für eine statistisch signifikante Auswertung. NF, der Hauptmetabolit von FEN, zeigte nur einen deutlich höheren Durchschnittswert für die Konzentration, was jedoch durch wenige einzelne Fälle mit hoher Konzentration verursacht wird. Betrachtet man den Median, so zeigt sich weder bei NF noch bei FEN ein nachweisbarer Unterschied zwischen den beiden Medikationsarten. Auch für OC zeigte sich zwar ein signifikanter Unterschied im Mittelwert der Probenkonzentrationen, jedoch ist die Signifikanz aufgrund der geringen Probenzahl (11 Proben in kombinierter Medikation) nicht als eindeutig statistisch belegbar anzusehen, und auch die Mediane der beiden Medikationsarten, welche ein realistisches Bild der häufigsten Werte geben, zeigen keine signifikanten Unterschiede.

Die höheren Anteile an Proben mit Konzentrationen über der therapeutischen Dosis für HYD, MET, OC und PIR bei den kombinierten Medikationen sind aufgrund der geringen Probenzahl ebenfalls nicht repräsentativ und belegen keine höhere Dosierung bei kombinierter Medikation.

## **5.1.4 Diskussion der Ergebnisse der Untersuchung von Haaren von Patienten unter dauerhafter Schmerzmittelbehandlung**

### *5.1.4.1 Methodvalidierung*

Die Methode für die Analyse von 14 Opioiden und Opioid-Metaboliten zeigt gute bis sehr gute Daten für alle Validierungsparameter (Wiederfindung, Selektivität, Sensitivität, Linearität, Richtigkeit und Präzisionen (Wiederhol- und Laborpräzision)). Diese Analysenparameter sind im Vergleich zu den vergleichbaren Werten der Methode zu Analyse von Opioiden in Serum deutlich besser, vor allem die Präzisionen und Richtigkeiten. Dies liegt mit Sicherheit an der wesentlich einfacheren Aufarbeitung, welche - trotz Automatisierung der Serumextraktion - eine größere Reproduzierbarkeit liefert.

Für die Analytik von Haaren wurden die MOR-Glucuronide nicht verwendet, da sie gewöhnlicherweise nicht in Haaren detektiert werden können. Somit wurden zwei Analyte weniger in der Methode aufgenommen.

Durch Verwendung der gleichen HPLC-MS-Methode konnten die gleichen massenspektrometrischen Probleme (s. Kapitel 4.2.2.2) bezüglich der Strukturisomere HYD und MOR sowie M3G und M6G gelöst werden, da beide Isomerenpaare getrennt werden.

Die Methode zeichnet sich des Weiteren durch gute analytische Grenzwerte aus, so dass sämtliche Wirkstoffe und ihre Metaboliten in den für Haare relevanten Konzentrationsbereichen qualitativ und quantitativ bestimmt werden können.

### *5.1.4.2 Probenmessungen*

Während keine vollständigen Daten über die aktuelle Medikation der Patienten für die Serumproben vorlagen, waren diese Informationen für die Probanden, denen Haarproben entnommen wurden, größtenteils verfügbar. Alle angegebenen Wirkstoffe konnten in diesen Proben nachgewiesen werden, wenn auch nicht in allen Proben. Der FEN-Metabolit NF konnte in keiner einzigen Probe nachgewiesen werden, jedoch wird FEN in sehr geringen Dosen appliziert und der Metabolit kann auch im Serum nur in geringerer Konzentration als der Wirkstoff selbst nachgewiesen werden (Tabelle 32, Tabelle 38 und Tabelle 36). Des Weiteren lagern sich eher unpolare Ver-bindungen im Haar an, NF ist jedoch deutlich polarer als seine

Muttersubstanz. Auch HYD konnte nicht in allen Proben nachgewiesen werden. Dies galt jedoch nur für Proben, bei denen die Patienten geringere Dosen von 8-16 mg verabreicht bekamen, während bei allen Proben mit einer Dosis von mehr als 25 mg der Wirkstoff nachzuweisen war - Ausnahme ist eine gebleichte Haarprobe, bei welcher der Analyt möglicherweise durch Oxidation bereits zerstört wurde. Die Nachweishäufigkeiten können bei der Haaranalytik nicht mit denen der Analytik im Serum verglichen werden, da zum Einen der Transfer in die Haarmatrix vollkommen anders geschieht, zum Anderen Serumproben nur den aktuellen Wirkstoffspiegel wiedergeben, während die Einlagerung ins Haar über mehrere Wochen bis Monate geschieht.

Die ermittelten Konzentrationen in den Haarproben entsprachen den in der Literatur angegebenen Konzentrationen. Dies galt vor allem für MOR (25.6 bis 1274.4 pg/mg, Literatur: 0 - 1400 pg/mg) und MET (43.4 – 10730.5 pg/mg, Literatur: 700 – 43000 pg/mg), während FEN in deutlich höheren Konzentrationen bestimmt wurde (13.1 – 1787.4 pg/mg, Literatur: bis 100 pg/mg). In den vorliegenden Fällen war die Dauer der Medikation mit Fentanyl jedoch schon sehr lang, so dass es eher zu einer Anreicherung dieses sehr lipophilen Wirkstoffes in die Haare kommen kann. Diese Fälle einer dauerhaften Einnahme über einen längeren Zeitraum sind jedoch in keiner Literaturstelle beschrieben. Die beschriebenen Konzentrationen von MOR und MET hingegen wurden bei opiatabhängigen und methadonsubstituierten Probanden ermittelt und konnten durch die neuen Untersuchungen bestätigt werden.

Während TRA und MET nur in jeweils einem einzigen Fall verschrieben wurden, konnten sie mehrfach nachgewiesen werden (TRA 9 Fälle, MET 7 Fälle). Vermutlich wurden diese beiden Schmerzmittel vor der stationären Aufnahme der Patienten von anderen Ärzten verschrieben und nicht in den Daten erfasst. Da die Schmerzmedikation bei Krebspatienten häufiger wechselt, ist dies nicht unwahrscheinlich. Da diese Medikation in diesen Fällen schon länger zurückliegt, erfolgt in der Folgezeit eine relative Verdünnung der Konzentration durch das nachwachsende Haar, und daher ist die zu erwartende Konzentration in den Haaren geringer.

Die ermittelten Ergebnisse zeigen die Anwendbarkeit der Haaranalytik zur Überprüfung der Einhaltung von Medikationsvorgaben. Dies wird auch als „Compliance“ bezeichnet und ist selbstverständlich nur möglich, wenn die Möglichkeit besteht, Proben über einen längeren Medikationszeitraum zu sammeln oder mit

wenigen Proben einen größeren Zeitraum zu überblicken - letzteres bietet nur die Haaranalytik.

Die Tatsache, dass nicht jede Medikation vollständig und dokumentiert ist und es in manchen Fällen zu einer zusätzlichen Wirkstoffgabe durch andere Ärzte kommen kann, zeigt die Notwendigkeit von Screeningmethoden, mit denen verschiedene Analyten in einem einzigen Analysengang gleichzeitig erfasst werden können. Hier bietet sich der Einsatz der HPLC-MS/MS an, da - wie oben gezeigt - mit einfachen Aufarbeitungen und ohne selektive Derivatisierungsschritte die verschiedenen Wirkstoffe und teilweise auch ihre Metaboliten in einer Analyse simultan erfasst werden.

## 6 Gesamtergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Ergebnisse aus 3 unterschiedlichen analytischen Anwendungen, anhand welcher die Anwendungsbreite eines HPLC-Triple Quadrupol Systems im Bereich der klinischen und toxikologischen Analytik demonstriert werden sollte.

Das Heroinprojekt war Teil einer deutschlandweit durchgeführten Studie, bei der mittels moderner analytischer Methoden unter anderem die Frage geklärt werden sollte, in welchem Maße Probanden aus zwei unterschiedlich therapierten Gruppen (Heroinmedikation und Methadonsubstitution) von Opiatabhängigen zusätzlich nicht verschriebenes Heroin aus der Straßendrogenszene konsumieren. Dazu wurde eine komplette Analysenmethode zur Analytik von Urinproben entwickelt, validiert und über 800 Proben auf Marker für den Konsum von pharmazeutischem Heroin und von Straßenheroin untersucht. Hier bot die HPLC-MS/MS die Möglichkeit, diesen Konsum von nicht verschriebenem Heroin von einem Konsum von verschriebenem reinen Heroin mittels 5 Markersubstanzen sicher und empfindlicher als mit herkömmlichen Analysenmethoden zu unterscheiden. Durch die Analysen auf die verschiedenen Marker sowie durch weitere immunchemische Analysen konnten gruppenspezifische Unterschiede zwischen der sogenannten Heroingruppe und der sogenannten Methadongruppe festgestellt werden, die sich in signifikant höheren Beikonsumraten weiterer Drogen, vor allem Straßenheroin, in der Methadongruppe äußerten. Diese Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ließen sich durch die unterschiedlichen Konzentrationen der untersuchten Heroin- und Straßenheroinmarker bestätigen und unterstützen die deutschlandweiten Gesamtergebnisse der Studienleitung, welche besagen, dass die heroingestützte Behandlung der schwerst Opiatabhängigen der Methadonbehandlung deutlich überlegen ist, belegt an den beiden Hauptkriterien „Verbesserung des Gesundheitszustandes“ und vor allem „Rückgang des illegalen Drogenkonsums“<sup>58</sup>.

Im Mohnkuchenprojekt konnte die für das Heroinprojekt entwickelte Methode zur Bestimmung von Opiatgehalten in Mohnprodukten, zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Aufnahme von Opiaten in den Körper und zur Ermittlung von deren Konzentrationsverläufen nach Verzehr von mohnhaltigen Lebensmitteln

eingesetzt werden. Dabei wurden Ergebnisse früherer Studien, die teilweise sehr hohe Konzentrationen in Blut, Serum und vor allem in Urin ermittelten, bestätigt und auch die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderung dargestellt. So gelang es, die Methode als gut geeignetes Mittel zur Unterscheidung eines bewussten Heroinkonsums von einer unbewussten Aufnahme von Opiaten durch mohnhaltige Lebensmittel zu verifizieren. Durch Ausreizen des Analysensystems und Verwendung von verschiedenen MS Scan-Techniken konnte die Methode um 2 weitere Opiatmetaboliten erweitert werden, welche nicht kommerziell erhältlich sind und für die keine zufriedenstellenden Synthesevorschriften vorliegen, weswegen ein normales Tuning der Substanzen nicht möglich ist. Es gelang der Nachweis dieser beiden Analyten, die als Marker für den Konsum von Straßenheroin eingesetzt werden, auch nach Verzehr von Mohnkuchen. Somit konnten diese beiden Analyten als definitive/absolute Marker für den Konsum von Straßenheroin ausgeschlossen werden.

Für das Schmerzmittelprojekt bot sich mit der Entwicklung einer Screeningmethode für 11 Opioide sowie 5 ihrer Metaboliten, die Möglichkeit zur simultanen Analyse von Analgetika, die vermehrt in unterschiedlichen Kombinationen und teilweise sehr geringen Konzentrationen zum Einsatz kommen, für die jedoch hauptsächlich Methoden zur Bestimmung nur einzelner Wirkstoffe und/oder ihrer Metaboliten vorliegen. Mittels dieser Methode konnten die therapeutischen Konzentrationen, wie sie in Datenbanken und früherer Literatur beschrieben werden, anhand von Serumproben von Patienten aus palliativer Behandlung überprüft werden. Dabei wurde zum Einen festgestellt, dass Schmerzmittel, welche in Kombination verabreicht werden, zum Teil in signifikant niedrigeren Konzentrationen angewandt werden als die einzeln verabreichten Wirkstoffe. Zum Anderen wurden teilweise deutlich höhere Konzentrationen an Opioiden festgestellt, als sie in der Literatur beschrieben sind. Die vorhandenen Daten über therapeutische Wirkstoffkonzentrationen könnten demnach überprüft und mit neuen Werten erweitert werden.

Die Möglichkeit, diese Projekte in der vorgestellten Art und Weise durchzuführen, bot sich nur aufgrund der guten Instrumentarisierung im Labor. Dabei konnte sich gerade die Kopplung von HPLC mit einem Massenspektrometer gegenüber herkömmlichen

Analysetechniken (v.a. HPLC-DAD oder GC-EI-MS) durch verschiedene Kriterien auszeichnen:

## 1. Einfachheit

HPLC-MS/MS hat den allgemeinen Vorteil gegenüber GC-MS, dass sie keine Derivatisierung polarer und schwerflüchtiger Substanzen benötigt, sondern diese Substanzen in gelöster Form direkt injiziert werden können. Somit bietet sich auch die Möglichkeit, die gewöhnlicherweise polareren Metaboliten eines pharmazeutischen Wirkstoffes direkt zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit war dies besonders wichtig für die beiden MOR-Glucuronide, die in der GC-MS nur indirekt (Messung von freiem MOR und Gesamtmorphin nach Hydrolyse) bestimmt werden können. Ein wichtiger Fakt dabei ist, dass die beiden Metaboliten mittels HPLC-MS/MS sogar einzeln erfasst werden können, welches von wichtiger Bedeutung sein kann, da M6G eine ähnlich pharmakologische Wirkung wie MOR zugeschrieben wird, was für M3G nicht der Fall ist.

Gegenüber HPLC-UV/-DAD oder HPLC mit Fluoreszenzdetektoren ist es ein großer Vorteil, dass in den Analytmolekülen weder in bestimmten Bereichen elektromagnetischer Strahlung absorbierende Gruppen noch fluoreszierende Gruppen vorhanden sein müssen. Durch die Einfachheit der massenspektrometrischen Detektion lässt sich somit das Spektrum der möglichen Analyten deutlich erweitern. Auch sind matrixbedingte Störungen bei der Detektion nur in sehr geringem Maßstab zu beobachten, eine Folge der hohen Selektivität der MRM-Detektion .

Je weiter die Entwicklung der Geräte geht, desto weniger Aufarbeitung wird bei nicht zu komplexen Matrices notwendig sein. Neuere Massenspektrometer verwenden keine linearen Anordnungen von Interface und der Eingangsöffnung. Somit richtet sich das Spray nicht mehr direkt auf diese Öffnung, wodurch die Verschmutzung und damit verbundene Matrixeffekte deutlich reduziert werden. Dams<sup>28</sup> und Edinboro<sup>47</sup> beschreiben bereits die Direktinjektion für Urin als gute Alternative zu längeren Probenaufarbeitungen. Die Direktinjektion vereinfacht auch die Methodenentwicklung, wenn speziell bei komplexen Analytgemischen Substanzen unterschiedlicher Polaritäten keine aufwändige Entwicklung der Extraktion stattfinden muss. Des

Weiteren wird es keine Verluste geben, wie sie bei sehr unterschiedlichen Analyten vorkommen können (s. MOR-Glucuronide in Heroin- und Schmerzmittelprojekt). Zu bedenken sind hier jedoch die Sensitivitätseinbußen durch Ionensuppression, wie sie vielfach in der Literatur beschrieben werden<sup>9,114-119</sup>. Dams et al. unterscheiden jedoch die Notwendigkeiten einer intensiven Aufarbeitung, welche abhängig von der zu untersuchenden Matrix sind<sup>9</sup>, während Müller et al.<sup>119</sup> ausschließlich polare unretardierte Substanzen aus der Matrix für die unterschiedlichen Suppressionseffekte verantwortlich macht, die demnach durch Wahl eines geeigneten Gradientenprogrammes minimiert werden können. Edinboro et al. beschreiben eine zufriedenstellende Methode zur Urinanalytik von verschiedenen Opiaten mittels Direktinjektion<sup>47</sup>. Diese Matrixeffekte, welche sowohl die Ionisierung eines Analyten verringern, aber auch erhöhen können, verdeutlichen die Notwendigkeit einer chromatographischen Trennung der Analyten von der Matrix noch vor der MS-Detektion.

## **2. Schnelligkeit**

Die Schnelligkeit einer kompletten Analyse ist natürlich auch abhängig von der Einfachheit, z.B. bei der Aufarbeitung. Die Zeit einer Gesamtanalyse verkürzt sich, wenn die Aufarbeitung weniger Schritte wie z.B. die Derivatisierung oder Extraktionen beinhaltet.

Auch in Bezug auf die Analysengeschwindigkeit der Methode selbst, gerade bei starker Matrixbelastung in den Proben, kann die Analysenzeit deutlich kürzer als bei GC-MS Methoden ausfallen, wo es oftmals des Durchheizens der analytischen Säule bedarf, um störende Matrixbestandteile vollständig zu entfernen, bevor die Säule wieder auf die Anfangstemperatur heruntergekühlt werden muss. Im Gegensatz zu üblichen HPLC-Analysen ist die chromatographische Trennung der Analyten durch die selektive Detektion von etwas geringerer Bedeutung und kann dadurch kürzere Analysenzeiten ermöglichen. Mit einer Analysendauer von 19 Minuten (HPLC-Lauf inklusive Säulenconditionierung) zeichnet sich in der vorliegenden Arbeit vor allem die Methode für das Heroin- und Mohnkuchenprojekt aus.

### 3. Selektivität

Durch die Möglichkeit zur Trennung und der gleichzeitigen Detektion der einzelnen Analyten im Massenspektrometer auf zwei verschiedenen Ionenspuren im MRM Modus lassen sich die Komponenten anhand von 4 verschiedenen Kriterien eindeutig unterscheiden bzw. verifizieren. Neben der Retentionszeit stehen als Unterscheidungskriterien sowohl die Mutterionenmasse als auch die beiden Fragmentionenmassen zur Verfügung. Vorgaben der EU<sup>120</sup> verlangen exakt diese 4 Punkte zur sicheren Identifizierung eines Analyten. Im Gegensatz zur GC-MS mit Elektronenstoßionisation, wo jeweils 3 Fragmente ausschließlich den Bezug zur Retentionszeit haben, sind bei doppelt fokussierenden Massenspektrometern wie Triple Quadrupol Geräten 3 Punkte untrennbar miteinander verbunden (Retentionszeit, Mutterionenmasse und Fragmentionenmasse), weswegen man mit hoher Sicherheit von einem validen qualitativen Ergebnis ausgehen kann. Verwendet man zudem das Flächenverhältnis der Peaks beider Übergänge, welches immer gleich sein sollte, so wird auch die Quantifizierung in der Methode abgesichert.

Dass auch die Verwendung einer chromatographischen Kenngröße, der Retentionszeit, von Bedeutung sein kann, zeigen die Beispiele der beiden MOR-Glucuronide sowie von HYD und MOR, welche als Strukturisomere nicht nur jeweils die gleiche Molekularmasse besitzen und somit auch protonierte Molekülionen gleicher Massen bilden, sondern ebenfalls charakteristische Fragmentionen gleicher Masse bilden (s. Kapitel 4.2.2.2). Diese Konstellation ist auch für andere Stoffe und Stoffklassen denkbar, ein weiterer Grund für die Verwendung der chromatographischen Trennung vor der Detektion im Massenspektrometer. Aufgrund dieser möglichen Einflüsse durch die Matrix oder andere Stoffe im Untersuchungsgut werden im Rahmen der Validierung Untersuchungen durchgeführt, die falsch positive Detektion aufgrund von Matrixeffekten ausschließen<sup>5</sup>.

Der Einsatz deuterierter Standards gewährleistet eine gute Selektivität auch bei chromatographischen Problemen, da sich die deuterierten Standards exakt wie die nicht deuterierten Analoga verhalten. Der Identifizierungspunkt Retentionszeit in der HPLC-MS gewinnt in diesen Fällen an Gewicht gegenüber der gewöhnlichen HPLC mit DAD Detektion, bei der nur eine zusätzliche Bestätigungsanalyse mit

Standardaddition für endgültige Klarheit sorgen kann, was wiederum mit mehr Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist (s. Einfachheit und Schnelligkeit).

#### **4. Sensitivität**

In den beiden entwickelten Methoden zeichnete sich die HPLC-MS/MS Technik durch gute Nachweisempfindlichkeiten aus. Diese ist für Stoffe, die in geringer Konzentration in den Proben vorkommen (allgemein Serumproben, in anderen Matrices auch Begleitstoffe wie PAP etc.), von großer Bedeutung. Die Sensitivität wird durch verschiedene Aspekte sehr positiv beeinflusst:

Durch die vorangehende chromatographische Trennung erfolgt auch eine Aufkonzentrierung der Analyten bis zur Elution von der Säule, wodurch sich das Signal deutlich erhöht. Des Weiteren verringern sich durch die Selektion einzelner Massen Störungen aus der Matrix, dem Lösemittel etc. und damit auch das Rauschen. Auch wenn im MRM Modus die Gesamtionenkonzentration deutlich geringer ist, verbessert sich das Signal-zu-Rauschen Verhältnis und damit auch die Empfindlichkeit der Detektion deutlich. Dies liegt an der hohen Selektivität, sobald der Bezug zwischen Mutter- und Tochterionenmasse gegeben ist.

Weder UV- noch die bereits sehr selektive Fluoreszenz-Detektion können an diese Sensitivität heranreichen. Auch die Detektion in der GC-MS besitzt für viele Analyten aufgrund der nur einfachen Massenfokussierung nicht die gleiche Empfindlichkeit und ist zudem anfälliger für Störungen aus der Matrix. Die aufgrund ihres Preises seltener eingesetzte GC-MS/MS Analytik liefert zwar Ergebnisse ähnlicher Empfindlichkeit, hat jedoch den Nachteil eines eingeschränkten Analytspektrums der Gaschromatographie im Vergleich zur Flüssigchromatographie.

#### **5. Reproduzierbarkeit**

Eine gute Quantifizierung auch in den tiefen Konzentrationsbereichen, die gerade bei der Analytik von niedrig dosierten Wirkstoffen in Serum notwendig ist (s. Schmerzmittelprojekt), wird durch die Verwendung deuterierter Standards sicher-

gestellt. Diese verhalten sich chromatographisch wie ihre nicht deuterierten Analoga, werden jedoch im Massenspektrometer aufgrund ihrer höheren Masse leicht unterschieden.

Als zusätzliches Qualitätskriterium einer quantitativen Analyse bietet sich die Bestimmung des Signalverhältnisses der beiden Ionenspuren an (Vergleich der Flächenwerte der Peaks). Dieses ist eine analytenspezifische Größe und sollte in unterschiedlichsten Konzentrationsbereichen eines Analyten nur statistisch bedingt schwanken. Weicht ein Wert stark nach oben oder unten ab, so können diesen Schwankungen Effekte von außerhalb zu Grunde liegen. Dies kann auf Matrixeffekte zurückzuführen sein, aber auch auf Probleme der Geräte selber hindeuten, womit die Reproduzierbarkeit nicht mehr im erforderlichen Maße gegeben wäre. Wird jedoch ein konstantes Signalverhältnis über einen großen Konzentrationsbereich festgestellt, so ist die Analysenmethode über diesen Bereich gut quantitativ reproduzierbar.

Diese Detektionsparameter beziehen sich ausschließlich auf den Massenspektrometer. Eine hohe Reproduzierbarkeit der Trennung und damit vor allem der qualitativen Analyse ist mit der etablierten Trennungsmethode HPLC bereits gegeben. Die gute Reproduzierbarkeit des gesamten System zeigte sich in beiden vollständig validierten Methoden dieser Arbeit.

## **6. Breite Anwendungspalette**

Triple Quadrupol Massenspektrometer bieten eine Auswahl von verschiedenen Scan-Möglichkeiten, welche verschiedenste Analysen ermöglichen. Die quantitative Analyse war eine der wichtigsten Fragestellungen und die meisten Analyten waren zudem als Reinsubstanzen erhältlich. Daher war in der vorliegenden Arbeit nach einem Tuning der einzelnen Substanzen MRM der meist verwendete Modus. Er ermöglicht eine sichere Identifizierung der Zielanalyten und eine gute Quantifizierung bis in sehr tiefe Konzentrationsbereiche.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Scan-Möglichkeiten angewandt, um die Methode auf 2 zusätzliche Opiat-Metaboliten zu erweitern (s. Kapitel 4.1.4.5). Da die Massen der beiden Analyten bekannt waren, genügten

Precursor Ion Scan und Selected Ion Monitoring für das Auffinden und die Identifizierung der beiden Substanzen.

Im MRM Modus hingegen gelingt eine gute Quantifizierung der zu bestimmenden Analyten. In der vorliegenden Arbeit ermöglichte dies die Bestimmung der Haar- und Serumkonzentration von Schmerzmitteln und die Konzentrationen von Opiaten in Urin und Serum nach Mohnkuchenkonsum und Heroineinnahme. Auch die sichere Unterscheidung der beiden Letztgenannten gelang aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität, die in diesem Maße nur durch die Kopplung von chromatographischer Trennung und Detektion im Massenspektrometer gegeben sind. Mit der Analytik von Haaren, Urin und Blut oder Serum werden die wichtigsten Probenmatrices in der forensisch-toxikologischen und der klinischen Analytik abgedeckt. Jedoch kann das Spektrum an Untersuchungsmatrices je nach Bedarf noch erweitert werden. In der Literatur wird diesbezüglich von Liquor<sup>10,21</sup>, Glaskörperflüssigkeit<sup>10,21</sup> oder Speichel<sup>9,27,36,61,121</sup> berichtet.

Die Ergebnisse der Urinuntersuchungen aus dem Heroinprojekt stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten aus dem Abschlussbericht<sup>58</sup> der gesamtdeutschen Heroinstudie - es gibt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen, die anhand der Häufigkeiten eines zusätzlichen Straßenheroinkonsums, weiterer Drogen und auch der Analytkonzentrationen im Urin nachweisbar sind. Hier zeigt sich, dass die Ergebnisse einer medizinisch-soziologischen Untersuchung hervorragend mit naturwissenschaftlichen Analysen gestützt werden können. Aufgrund der Möglichkeit, auf mehrere Marker für den Heroin- und Straßenheroinkonsum zurückgreifen zu können, sind diese Ergebnisse sehr valide und finden durch die Resultate der quantitativen Analysen eine Bestätigung (höhere Konzentrationen der Straßenheroinmarker in der Methadongruppe → Straßenheroinkonsum zeitnaher).

## 7 Ausblick

Zahlreiche Methoden für eine begrenzte Zahl von Analyten sind bereits publiziert worden und die Zahl der vorgestellten Screening-Techniken für verschiedenste Analyten in diversen Matrices wächst stetig<sup>16,30,122-127</sup>. In diesem Feld der „general unknown“ Analysen spielen HPLC-MS Geräte, vor allem HPLC-Triple Quadrupol MS Systeme, derzeit ihre Stärken aus und werden auch in Zukunft vermehrt Einzug in den Bereich der toxikologischen Analytik erhalten. Die Entwicklung von Datenbanken für zahlreiche Wirkstoffe und ihrer Metaboliten ist dafür die Grundlage und wird derzeit vor allem intensiv von Weinmann et al. vorangetrieben<sup>35,119,126,128-130</sup>. Die größte Schwierigkeit in der Zukunft liegt nun darin, die Datenbanken auf Bedingungen zu standardisieren, so dass die Verwendung in Geräten verschiedenen Typs und verschiedener Hersteller möglich ist<sup>131</sup>.

Derzeit sind die Geräte im Vergleich zu GC-MS Systemen oder Geräten für Immunoassays noch zu teuer, jedoch könnten sinkende Preise durch neuere Entwicklungen und durch höheren Wettbewerb den Einzug in Routinebereiche ermöglichen. Die Entwicklung der HPLC-MS/MS Systeme läuft derzeit auch auf eine möglichst einfache Handhabung hin. Dies betrifft sowohl die Software, als auch die Hardware. Kann zusätzlich die Analyse noch vereinfacht werden (z.B. durch Verringerung der Probenaufarbeitung), können Screenings als Vortests und gesamte Bestätigungsanalysen noch wesentlich schneller durchgeführt werden. Allen<sup>121</sup> berichtet gar von der Möglichkeit, immunchemische Vortests für Speichel durch Routine-Screenings mittels HPLC-MS/MS zu ersetzen, und auch Vogeser sieht neben dem Entwicklungsbedarf vor allem das große Potential dieser Technik im „Therapeutischen Drug Monitoring“<sup>132</sup>. Vorteile liegen in der Vielseitigkeit der Systeme und den geringeren Kostenaufwand für Verbrauchsmaterialien verglichen mit teuren Immunoassays.

Mit der neusten Entwicklung von zuverlässigen Hochdruck-HPLC-Anlagen werden deutliche Verbesserungen der Analysengeschwindigkeit, der chromatographischen Trennschärfe und der Empfindlichkeit möglich<sup>133,134</sup>. Die Schnelligkeit dieser HPLC-Systeme bedarf jedoch guter Massenspektrometer, die in wesentlich höheren Geschwindigkeiten noch sensitive Scanexperimente durchzuführen vermögen. In der

neuen Generation Massenspektrometer gelingt dieses sehr gut. Auch weisen die neuen Geräte wesentlich höhere Empfindlichkeiten als das in der vorliegenden Arbeit verwendete Massenspektrometer auf - dem Modell, welches Mitte der 90er Jahre entwickelt wurde, fehlen viele technische Entwicklungen der letzten Jahre. In Bezug auf die Sensitivität gibt es dementsprechend schon große Verbesserungen, welchen sicherlich noch weitere folgen werden.

Auch die Möglichkeiten qualitativer Analysen entwickeln sich fortlaufend weiter, speziell in den populär werdenden linearen Quadrupol-Ionenfallen steckt ein großes Potential, welches noch ausgeschöpft werden kann<sup>123,126</sup>. Zum bisherigen Zeitpunkt wurden noch wenige Anwendungen dieser Technik publiziert, jedoch bietet die Möglichkeit einer guten Quantifizierung aufgrund der Vorteile des linearen Aufbaus des Gerätes nun auch noch die Möglichkeiten von sensitiven qualitativen Analysen durch die Ionenfallen-Funktion bis zu einer dreifachen Massenfokussierung. Und es ist abzusehen, dass auf diesem Gebiet in Zukunft viele Arbeiten durchgeführt werden, auch weil die Sensitivität durch die Möglichkeit der Aufkonzentrierung ausgewählter Ionen in der Falle weiter gesteigert werden konnte.

Weiter in das Feld der qualitativen Analysen reichen andere Massenspektrometer wie reine Ionenfallen, welche die Möglichkeiten der vielfachen Massenfokussierung („MS<sup>n</sup>“) bieten sowie Time-of-Flight-Geräte, welche durch die akkurate Massenbestimmung sehr gute Strukturanalysen ermöglichen. Letztere sind auch in Kopplung mit einem Quadrupol erhältlich, so dass neben der guten Qualifizierung aufgrund der Bestimmung der Masse bis hinunter zu 0,001 amu auch noch MS<sup>2</sup>-Analysen möglich sind. Auch die Kombination von Ionenfallen- und TOF-Massenspektrometern wurde bereits verwirklicht, hat aufgrund des hohen Preises jedoch noch keine starke Verbreitung gefunden. Diese Geräte bieten sich aufgrund dieser hervorragenden Eigenschaften als Erweiterung, jedoch nicht als Ersatz für Triple Quadrupol Geräte an.

Jedoch bieten auch weitere Anwendungen der HPLC zusätzliche Möglichkeiten. In jüngster Zeit war die enantioselektive Bestimmung von Wirkstoffen und deren Metaboliten von wichtiger Bedeutung. Diese stereoselektive Bestimmung ermöglicht die Bestimmung von unterschiedlichen Stereoisomeren, welche im Bereich der

Pharmakogenetik eine wichtige Rolle spielen können<sup>43,44,48,108,111</sup>. Auch aus diesem Bereich kann in Zukunft einiges erwartet werden.

All dies sind Entwicklungen, die zum Teil bereits in der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit stattgefunden haben, zum Teil aber noch anstehen werden. Für den erfolgreichen Routine-Einsatz in der forensisch-toxikologischen Analytik verweisen Drummer<sup>122</sup> und vor allem Maurer<sup>135</sup> jedoch zu Recht auf die Notwendigkeit einer fundierten und gründlichen Validierung neu entwickelter Methoden, vor allem wenn neben den qualitativen Aspekten auch die quantitativen Bestimmungen eine Rolle spielen<sup>5</sup>. Dabei bleibt festzuhalten, dass ein fundiertes Wissen über HPLC und Massenspektrometrie sowie über das vielfältige System an sich eine unbedingt notwendige Bedingung ist und die beste Basis sowohl für die Entwicklung neuer Anwendungen als auch für den erfolgreichen Einsatz in der Routine bietet. Sind diese Voraussetzungen gegeben, wird die HPLC-Triple Quadrupol Massenspektrometrie in der forensisch-toxikologischen Analytik ebenso wie in anderen Bereichen der Analytik (klinische und pharmakologische Analytik, Dopingkontrolle, Umwelt- und Rückstandsanalytik, Qualitätskontrolle und viele mehr) weiter an Bedeutung gewinnen und zu einem der wichtigsten Standards in analytischen Labors werden<sup>135-138</sup>.

## 8 Literatur

1. Dole, M., Dole, M., Mack, L. L. et al.: Molecular Beams of Macroions. J Chem Phys, **49**: 2240, 1968
2. Thomson, B. A., Thomson, B. A., Iribarne, J., V et al.: Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. J Chem Phys, **71**: 4451, 1979
3. Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W. et al.: Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. Pharm Res, **17**: 1551, 2000
4. Peters, F. T., Hartung, M., Herbold, M. et al.: Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Toxichem + Krimtech, **71**: 146, 2004
5. Peters, F. T. and Maurer, H. H.: Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, **7**: 441, 2002
6. U.S.Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Bioanalytical Method Validation. 2001.
7. Gottwald, W.: Statistik für Anwender. WILEY-VCH Weinsheim, 2006
8. Schmidt, G., Herbold, M., and Peters, F. Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor. 2003. ARVECON GmbH.
9. Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E. et al.: Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. J Am Soc Mass Spectrom 2003 Nov ;14(11):1290 -4, **14**: 1290, 2003
10. Bogusz, M. J., Maier, R. D., and Driessen, S.: Morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide, and 6-monoacetylmorphine determined by means of atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry-liquid chromatography in body fluids of heroin victims. J Anal Toxicol, **21**: 346, 1997
11. Bogusz, M. J., Maier, R. D., Erkens, M. et al.: Detection of non-prescription heroin markers in urine with liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J Anal Toxicol, **25**: 431, 2001
12. Bogusz, M. J., Maier, R. D., Kruger, K. D. et al.: Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography--atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectromery. J Anal Toxicol, **22**: 549, 1998

13. Hoja, H., Marquet, P., Verneuil, B. et al.: Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **21**: 160, 1997
14. Tracqui, A., Kintz, P., and Mangin, P.: HPLC/MS determination of buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids and hair samples. *J Forensic Sci*, **42**: 111, 1997
15. Tatsuno, M., Nishikawa, M., Katagi, M. et al.: Simultaneous determination of illicit drugs in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **20**: 281, 1996
16. Weinmann, W. and Svoboda, M.: Fast screening for drugs of abuse by solid-phase extraction combined with flow-injection ionspray-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **22**: 319, 1998
17. Pacifici, R., Pichini, S., Altieri, I. et al.: High-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides: application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **664**: 329, 1995
18. Zuccaro, P., Ricciarello, R., Pichini, S. et al.: Simultaneous determination of heroin 6-monoacetylmorphine, morphine, and its glucuronides by liquid chromatography--atmospheric pressure ionspray-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **21**: 268, 1997
19. Dienes-Nagy, A., Rivier, L., Giroud, C. et al.: Method for quantification of morphine and its 3- and 6- glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in human blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for routine analysis in forensic toxicology. *J Chromatogr A*, **854**: 109, 1999
20. Zheng, M., McErlane, K. M., and Ong, M. C.: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry analysis of morphine and morphine metabolites and its application to a pharmacokinetic study in male Sprague-Dawley rats. *J Pharm Biomed Anal*, **16**: 971, 1998
21. Bogusz, M. J., Maier, R. D., Erkens, M. et al.: Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **703**: 115, 1997
22. Naidong, W., Lee, J. W., Jiang, X. et al.: Simultaneous assay of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma using normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a silica column and an aqueous organic mobile phase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **735**: 255, 1999
23. Blanchet, M., Bru, G., Guerret, M. et al.: Routine determination of morphine, morphine 3-beta-D-glucuronide and morphine 6-beta-D-glucuronide in

human serum by liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **854**: 93, 1999

24. Tyrefors, N., Hyllbrant, B., Ekman, L. et al.: Determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human serum by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. *J Chromatogr A*, **729**: 279, 1996
25. Schanzle, G., Li, S., Mikus, G. et al.: Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **721**: 55, 1999
26. Zheng, M., McErlane, K. M., and Ong, M. C.: LC-MS-MS analysis of hydromorphone and hydromorphone metabolites with application to a pharmacokinetic study in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotica*, **32**: 141, 2002
27. Dams, R., Murphy, C. M., Choo, R. E. et al.: LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation. *Anal Chem*, **75**: 798, 2003
28. Dams, R., Murphy, C. M., Lambert, W. E. et al.: Urine drug testing for opioids, COCe, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **17**: 1665, 2003
29. Kronstrand, R., Selden, T. G., and Josefsson, M.: Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2003 Oct ;27 (7 ):464 -70, **27**: 464, 2003
30. Sachs, Hans, Thieme, Detlef, and Anielski, Patricia. LC-MS-MS Screening auf Piritratmid und andere Opiode in Haaren. Tagungsband XIII Mosbacher Symposium der GTFCh: 392-396. 2003.
31. Ceccato, A., Klinkenberg, R., Hubert, P. et al.: Sensitive determination of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2003 Aug 8 ;32 (4-5):619 -31, **32**: 619, 2003
32. Naidong, W., Bu, H., Chen, Y. L. et al.: Simultaneous development of six LC-MS-MS methods for the determination of multiple analytes in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2002 Jun 15 ;28 (6 ):1115 -26, **28**: 1115, 2002
33. Poletini, A. and Huestis, M. A.: Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphine, and buprenorphine-glucuronide in plasma by liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001 Apr 25 ;754 (2):447 -59, **754**: 447, 2001

34. Chen, Y. L., Hanson, G. D., Jiang, X. et al.: Simultaneous determination of hydrocodone and hydromorphone in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002 Mar 25 ;769 (1):55 -64, **769**: 55, 2002
35. Maralikova, B. and Weinmann, W.: Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004 Nov 5;811 (1):21-30, **811**: 21, 2004
36. Mortier, K. A., Maudens, K. E., Lambert, W. E. et al.: Simultaneous, quantitative determination of opiates, Ampfs, COCe and benzoylcegonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002 Nov 5;779 (2):321 -30, **779**: 321, 2002
37. Liang, H. R., Foltz, R. L., Meng, M. et al.: Method development and validation for quantitative determination of methadone enantiomers in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004 Jul 5;806 (2):191 -8, **806**: 191, 2004
38. Edwards, S. R. and Smith, M. T.: Simultaneous determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide, and noroxycodone concentrations in rat serum by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005 Jan 25 ;814 (2):241 -9, **814**: 241, 2005
39. Moody, D. E., Slawson, M. H., Strain, E. C. et al.: A liquid chromatographic-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies. *Anal Biochem* 2002 Jul 1;306 (1):31 -9, **306**: 31, 2002
40. Tracqui, A., Kintz, P., and Mangin, P.: HPLC/MS determination of buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids and hair samples. *J Forensic Sci*, **42**: 111, 1997
41. Hoja, H., Marquet, P., Verneuil, B. et al.: Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **21**: 160, 1997
42. Bostrom, E., Jansson, B., Hammarlund-Udenaes, M. et al.: The use of liquid chromatography/mass spectrometry for quantitative analysis of oxycodone, oxymorphone and noroxycodone in Ringer solution, rat

plasma and rat brain tissue. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004 ;18 (21):2565 -76, **18**: 2565, 2004

43. Rook, E. J., Hillebrand, M. J., Rosing, H. et al.: The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of COCe, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **824**: 213, 2005
44. Rodriguez-Rosas, M. E., Medrano, J. G., Epstein, D. H. et al.: Determination of total and free concentrations of the enantiomers of methadone and its metabolite (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidine) in human plasma by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, **1073**: 237, 2005
45. Koch, D. E., Isaza, R., Carpenter, J. W. et al.: Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from primate plasma with LC/MS detection. *J Pharm Biomed Anal*, **34**: 577, 2004
46. Yue, H., Borenstein, M. R., Jansen, S. A. et al.: Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in rat brain tissue and plasma. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **52**: 314, 2005
47. Edinboro, L. E., Backer, R. C., and Poklis, A.: Direct analysis of opiates in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **29**: 704, 2005
48. Souverain, S., Eap, C., Veuthey, J. L. et al.: Automated LC-MS method for the fast stereoselective determination of methadone in plasma. *Clin Chem Lab Med*, **41**: 1615, 2003
49. Day, J., Slawson, M., Lugo, R. A. et al.: Analysis of fentanyl and norfentanyl in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using electrospray ionization. *J Anal Toxicol*, **27**: 513, 2003
50. Huynh, N. H., Tyrefors, N., Ekman, L. et al.: Determination of fentanyl in human plasma and fentanyl and norfentanyl in human urine using LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, **37**: 1095, 2005
51. Martens-Lobenhoffer, J. and Romhild, W.: Quantitative determination of piritramide in human serum applying liquid chromatography-two-stage mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **783**: 53, 2003
52. Scislowski, M., Piekoszewski, W., Kamenczak, A. et al.: Simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in serum by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, **29**: 249, 2005

53. Uchtenhagen, A., Dobler-Mikola, A., Steffen, T. et al.:  
Betäubungsmittelverschreibung an Heroinabhängige. Karger AG,  
Basel, 2000
54. van den, B. W., Hendriks, V. M., Blanken, P. et al.: [Dutch research on the  
effectiveness of medical prescription of heroin; background, research  
design and preliminary results]. Ned Tijdschr Geneeskd, **144**: 108,  
2000
55. March, J. C., Oviedo-Joekes, E., Romero, M. et al.: [The experimental drug  
prescription program in Andalusia [PEPSA]: procedure for recruiting  
participants]. Gac Sanit, **18**: 245, 2004
56. McLachlan-Troup, N., Taylor, G. W., and Trathen, B. C.: Diamorphine  
treatment for opiate dependence: putative markers of concomitant  
heroin misuse. Addict Biol 2001 Jul ;6 (3):223 -231, **6**: 223, 2001
57. [www.heroinstudie.de](http://www.heroinstudie.de). 2006.
58. Naber and Haasen. Das bundesdeutsche Modellprojekt zur heroingestützten  
Behandlung Opiatabhängiger- eine multizentrische, randomisierte,  
kontrollierte Therapiestudie. Abschlussbericht der klinischen  
Vergleichsstudie zur Heroin- und Methadonbehandlung. 2006.
59. Ceder, G. and Jones, A. W.: Concentrations of unconjugated morphine,  
codeine and 6-acetylmorphine in urine specimens from suspected  
drugged drivers. J Forensic Sci, **47**: 366, 2002
60. Low, A. S. and Taylor, R. B.: Analysis of common opiates and heroin  
metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. J  
Chromatogr B Biomed Appl, **20**; **663**: 225, 1995
61. Rohrig, T. P. and Moore, C.: The determination of morphine in urine and oral  
fluid following ingestion of poppy seeds. J Anal Toxicol, **27**: 449, 2003
62. von Euler, M., Villen, T., Svensson, J. O. et al.: Interpretation of the presence  
of 6-monoacetylmorphine in the absence of morphine-3-glucuronide in  
urine samples: evidence of heroin abuse. Ther Drug Monit, **25**: 645,  
2003
63. Brenneisen, R., Hasler, F., and Wursch, D.: Acetylcodeine as a urinary marker  
to differentiate the use of street heroin and pharmaceutical heroin. J  
Anal Toxicol, **26**: 561, 2002
64. O'Neal, C. L. and Poklis, A.: The detection of acetylcodeine and 6-  
acetylmorphine in opiate positive urines. Forensic Sci Int, **95**: 1, 1998
65. Staub, C., Marset, M., Mino, A. et al.: Detection of acetylcodeine in urine as an  
indicator of illicit heroin use: method validation and results of a pilot  
study. Clin Chem, **47**: 301, 2001
66. Bertol, E., Mari, F., and Di Milia, M. G.: Programmable temperature vaporizer  
applications in an high-resolution gas chromatographic method for the

- quantitation of impurities in illicit heroin. *J Chromatogr*, **19**:466:384-9.: 384, 1989
68. Kaa, E.: Impurities, adulterants and diluents of illicit heroin. Changes during a 12-year period. *Forensic Sci Int*, **64**: 171, 1994
  69. Klemenc, S.: Noscapine as an adulterant in illicit heroin samples. *Forensic Sci Int*, **108**: 45, 2000
  70. Andresen, H. and Schmoltdt, A.: Führt der Verzehr von Mohnsamen zu positiven Opiat-Befunden in Urin, Blut und Haaren? *Blutalkohol*, **41/2004**: 191, 2004
  71. Beck, O., Vitols, S., and Stensio, M.: Positive urine screening for opiates after consumption of sandwich bread with poppy seed flavoring. *Ther Drug Monit*, **12**: 585, 1990
  72. Cassella, G., Wu, A. H., Shaw, B. R. et al.: The analysis of thebaine in urine for the detection of poppy seed consumption. *J Anal Toxicol*, **21**: 376, 1997
  73. elSohly, H. N., Stanford, D. F., Jones, A. B. et al.: Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of morphine and codeine in human urine of poppy seed eaters. *J Forensic Sci*, **33**: 347, 1988
  74. elSohly, H. N., ElSohly, M. A., and Stanford, D. F.: Poppy seed ingestion and opiates urinalysis: a closer look. *J Anal Toxicol*, **14**: 308, 1990
  75. Fritschi, G. and Prescott, W. R., Jr.: Morphine levels in urine subsequent to poppy seed consumption. *Forensic Sci Int*, **27**: 111, 1985
  76. Hayes, L. W., Krasselt, W. G., and Mueggler, P. A.: Concentrations of morphine and codeine in serum and urine after ingestion of poppy seeds. *Clin Chem*, **33**: 806, 1987
  77. Lo, D. S. and Chua, T. H.: Poppy seeds: implications of consumption. *Med Sci Law*, **32**: 296, 1992
  78. Meadway, C., George, S., and Braithwaite, R.: Opiate concentrations following the ingestion of poppy seed products--evidence for 'the poppy seed defence'. *Forensic Sci Int*, **96**: 29, 1998
  79. Paul, B. D., Dreka, C., Knight, E. S. et al.: Gas chromatographic/mass spectrometric detection of narcotine, papaverine, and thebaine in seeds of *Papaver somniferum*. *Planta Med*, **62**: 544, 1996
  80. Pelders, M. G. and Ros, J. J.: Poppy seeds: differences in morphine and codeine content and variation in inter- and intra-individual excretion. *J Forensic Sci*, **41**: 209, 1996
  81. Pettitt, B. C., Jr., Dyszel, S. M., and Hood, L. V.: Opiates in poppy seed: effect on urinalysis results after consumption of poppy seed cake-filling. *Clin Chem*, **33**: 1251, 1987

82. Thevis, M., Opfermann, G., and Schanzer, W.: Urinary concentrations of morphine and codeine after consumption of poppy seeds. *J Anal Toxicol*, **27**: 53, 2003
83. Meneely, K. D.: Poppy seed ingestion: the Oregon perspective. *J Forensic Sci*, **37**: 1158, 1992
84. Moeller, M. R., Hammer, K., and Engel, O.: Poppy seed consumption and toxicological analysis of blood and urine samples. *Forensic Sci Int* 2004 Jul 16 ;143 (2-3):183 -6, **143**: 183, 2004
85. Mule, S. J. and Casella, G. A.: Rendering the "poppy-seed defense" defenseless: identification of 6-monoacetylmorphine in urine by gas chromatography/mass spectroscopy. *Clin Chem*, **34**: 1427, 1988
86. Rochholz, G., Westphal, F., Wiesbrock, U. O. et al.: Opiat-Nachweis in Urin, Blut und Haaren nach Verzehr mohnsamenhaltiger Backwaren. *Blutalkohol*, **41/ 2004**: 319, 2004
87. Selavka, C. M.: Poppy seed ingestion as a contributing factor to opiate-positive urinalysis results: the Pacific perspective. *J Forensic Sci*, **36**: 685, 1991
88. Struempler, R. E.: Excretion of morphine in urine following the ingestion of poppy seeds. *Mil Med*, **153**: 468, 1988
89. Schulz, M. and Schmoldt, A.: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* 2003 Jul ;58 (7 ):447 -74, **58**: 447, 2003
90. <http://www.tiaft.org>: Reference blood level list of therapeutic an toxic substances. 2005.
91. Schulz, M. and Schmoldt, A.: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs. *Pharmazie*, **52**: 895, 1997
92. Uges, R. Orientierende Angaben zu therapeutischen und toxischen Konzentrationen von Arzneimitteln und Giften in Blut, Serum oder Urin. 1990. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
93. Bouquillon, A. I., Freeman, D., and Moulin, D. E.: Simultaneous solid-phase extraction and chromatographic analysis of morphine and hydromorphone in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr*, **577**: 354, 1992
94. Cheremina, O., Bachmakov, I., Neubert, A. et al.: Simultaneous determination of oxycodone and its major metabolite, noroxycodone, in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, **19**: 777, 2005
95. He, H., Shay, S. D., Caraco, Y. et al.: Simultaneous determination of codeine and its seven metabolites in plasma and urine by high-performance

liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **708**: 185, 1998

96. Ho, S. T., Wang, J. J., Ho, W. et al.: Determination of buprenorphine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *J Chromatogr*, **570**: 339, 1991
97. Kokubun, H., Ouki, M., Matoba, M. et al.: Determination of oxycodone and hydrocotarnine in cancer patient serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Sci*, **21**: 337, 2005
98. Lagrange, F., Pehourcq, F., Baumevieille, M. et al.: Determination of buprenorphine in plasma by liquid chromatography: application to heroin-dependent subjects. *J Pharm Biomed Anal*, **16**: 1295, 1998
99. Pascual, J. A. and Sanagustin, J.: Fully automated analytical method for codeine quantification in human plasma using on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **19**; **724**: 295, 1999
100. Wright, A. W., Watt, J. A., Kennedy, M. et al.: Quantitation of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Ther Drug Monit*, **16**: 200, 1994
101. Wright, A. W., Lawrence, J. A., Lu, M. et al.: Solid-phase extraction method with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection for the quantitative analysis of oxycodone in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **712**: 169, 1998
102. Brooks, K. E. and Smith, N. B.: Lack of hydrocodone and hydromorphone interference in the GC-MS detection of morphine and codeine. *J Anal Toxicol*, **20**: 269, 1996
103. Fenton, J., Mummert, J., and Childers, M.: Hydromorphone and hydrocodone interference in GC/MS assays for morphine and codeine. *J Anal Toxicol*, **18**: 159, 1994
104. George, S., George, C., and Chauhan, M.: The development and application of a rapid gas chromatography-mass spectrometry method to monitor buprenorphine withdrawal protocols. *Forensic Sci Int*, **143**: 121, 2004
105. Gopal, S., Tzeng, T. B., and Cowan, A.: Development and validation of a sensitive analytical method for the simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in human plasma. *Eur J Pharm Biopharm*, **51**: 147, 2001
106. Lewis, R. J., Johnson, R. D., and Hattrup, R. A.: Simultaneous analysis of thebaine, 6-MAM and six abused opiates in postmortem fluids and tissues using Zymark automated solid-phase extraction and gas

chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **822**: 137, 2005

107. Ropero-Miller, J. D., Lambing, M. K., and Winecker, R. E.: Simultaneous quantitation of opioids in blood by GC-EI-MS analysis following deproteination, deautomerization of keto analytes, solid-phase extraction, and trimethylsilyl derivatization. *J Anal Toxicol*, **26**: 524, 2002
108. Kelly, T., Doble, P., and Dawson, M.: Chiral analysis of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **814**: 315, 2005
109. Naidong, W., Jiang, X., Newland, K. et al.: Development and validation of a sensitive method for hydromorphone in human plasma by normal phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, **23**: 697, 2000
110. Dawson, M., Fryirs, B., Kelly, T. et al.: A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry method for the quantitation of oxycodone in human plasma. *J Chromatogr Sci*, **40**: 40, 2002
111. Ceccato, A., Vanderbist, F., Pabst, J. Y. et al.: Enantiomeric determination of tramadol and its main metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000 Oct 1;748 (1):65 -76, **748**: 65, 2000
112. Gschwend, P., Eschmann, S., Guttinger, F. et al.: [8 years experience with heroin-assisted treatment in Switzerland--current results and future improvements]. *Ther Umsch*, **60**: 355, 2003
113. Girod, C. and Staub, C.: Acetylcodeine as a marker of illicit heroin in human hair: method validation and results of a pilot study. *J Anal Toxicol*, **25**: 106, 2001
114. Annesley, T. M.: Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem*, **49**: 1041, 2003
115. King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C. et al.: Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, **11**: 942, 2000
116. Liang, H. R., Foltz, R. L., Meng, M. et al.: Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **17**: 2815, 2003

117. Mallet, C. R., Lu, Z., and Mazzeo, J. R.: A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**: 49, 2004
118. Mortier, K. A., Clauwaert, K. M., Lambert, W. E. et al.: Pitfalls associated with liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry in quantitative bioanalysis of drugs of abuse in saliva. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **15**: 1773, 2001
119. Muller, C., Schafer, P., Stortzel, M. et al.: Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002 Jun 15 ;773 (1):47 -52, **773**: 47, 2002
120. : Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EU des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, **L 221**: 8, 2002
121. Allen, K. R., Azad, R., Field, H. P. et al.: Replacement of immunoassay by LC tandem mass spectrometry for the routine measurement of drugs of abuse in oral fluid. *Ann Clin Biochem*, **42**: 277, 2005
122. Drummer, O. H.: Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **733**: 27, 1999
123. Herrin, G. L., McCurdy, H. H., and Wall, W. H.: Investigation of an LC-MS-MS (QTrap) method for the rapid screening and identification of drugs in postmortem toxicology whole blood samples. *J Anal Toxicol*, **29**: 599, 2005
124. Hopfgartner, G., Husser, C., and Zell, M.: Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, **38**: 138, 2003
125. Kronstrand, R., Nystrom, I., Strandberg, J. et al.: Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci Int*, **145**: 183, 2004
126. Müller, C. Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS. 2004.
127. Olah, T. V., McLoughlin, D. A., and Gilbert, J. D.: The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an in vivo drug screening procedure. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **11**: 17, 1997

128. Muller, C., Vogt, S., Goerke, R. et al.: Identification of selected psychopharmaceuticals and their metabolites in hair by LC/ESI-CID/MS and LC/MS/MS. *Forensic Sci Int*, **113**: 415, 2000
129. Weinmann, W., Lehmann, N., Muller, C. et al.: Identification of lorazepam and sildenafil as examples for the application of LC/ionspray-MS and MS-MS with mass spectra library searching in forensic toxicology. *Forensic Sci Int*, **113**: 339, 2000
130. Weinmann, W., Wiedemann, A., Eppinger, B. et al.: Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *J Am Soc Mass Spectrom*, **10**: 1028, 1999
131. Jansen, R., Lachatre, G., and Marquet, P.: LC-MS/MS systematic toxicological analysis: comparison of MS/MS spectra obtained with different instruments and settings. *Clin Biochem*, **38**: 362, 2005
132. Vogeser, M. Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring. *J Lab Med* 29(4), 278-286. 2005.
133. Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Meeker, L. R. et al.: Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **825**: 134, 2005
134. Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J. et al.: Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **20;1103**: 94, 2006
135. Maurer, H. H.: Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem* 2005 Apr;38 (4):310 -8, **38**: 310, 2005
136. Bogusz, M. J.: Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **748**: 3, 2000
137. Hoja, H., Marquet, P., Verneuil, B. et al.: Applications of liquid chromatography--mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J Anal Toxicol*, **21**: 116, 1997
138. Marquet, P.: Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther Drug Monit* 2002 Apr;24 (2):255 -76, **24**: 255, 2002

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Prinzip der chromatographischen Trennung</i> .....	8
<i>Abbildung 2: Electrospray Ionisierung beim verwendeten Gerät API 2000</i> .....	12
<i>Abbildung 3: Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck beim verwendeten Gerät API 2000</i> .....	13
<i>Abbildung 4: Aufbau einer Ionenfalle</i> .....	15
<i>Abbildung 5: Schema eines TOF Analysators im linearen (links) und Reflectron Modus (rechts)</i> .....	16
<i>Abbildung 6: Einfaches Schema eines Single Quadrupol Massenspektrometers</i> .....	17
<i>Abbildung 7: Schema eines Triple Quadrupol Massenspektrometers</i> .....	18
<i>Abbildung 8: Schema für Full Scan und Selected Ion Monitoring</i> .....	19
<i>Abbildung 9: Schema für Product Ion Scan</i> .....	20
<i>Abbildung 10: Schema für Multiple Reaction Monitoring</i> .....	21
<i>Abbildung 11: Schema für Precursor Ion Scan</i> .....	21
<i>Abbildung 12: Schema für Neutral Loss Scan</i> .....	22
<i>Abbildung 13: Sicherheits- und Fehlerbereich für die Nachweisgrenze</i> .....	28
<i>Abbildung 14: Beispiele für Messergebnisse mit hoher Präzision und guter Richtigkeit (A), mit geringer Präzision und guter Richtigkeit (B), hoher Präzision und schlechter Richtigkeit, geringer Präzision und schlechter Richtigkeit</i> .....	30
<i>Abbildung 15: Schematische Darstellung des Heroinprojektes in Bonn</i> .....	56
<i>Abbildung 16: Schematische Darstellung der Mohnkuchenstudie</i> .....	58
<i>Abbildung 17: Vergleich von dotiertem und undotiertem Leerurin</i> .....	69
<i>Abbildung 18: Chromatogramm einer Urinprobe eines Heroinkonsumenten</i> .....	71
<i>Abbildung 19: Chromatogramm einer Urinprobe eines Straßenheroinkonsumenten</i> .....	71
<i>Abbildung 20: Nachweishäufigkeiten der einzelnen Marker in den T-1 Proben</i> .....	73
<i>Abbildung 21: Straßenheroinbeikonsum in der Heroin- und der Methadongruppe</i> ...	74

Abbildung 22: Konzentrationsbereiche der einzelnen Analyten in der Heroingruppe (immer links) und der Methadongruppe (immer rechts).....	78
Abbildung 23: Beikonsum weiterer Drogen in der Heroingruppe in%, bezogen auf das gesamte Probenkollektiv .....	80
Abbildung 24: Beikonsum weiterer Drogen in der Methadongruppe in%, bezogen auf das gesamte Probenkollektiv.....	81
Abbildung 25: Verlauf der Konzentrationen von COD, MOR und C6G (links) sowie von M3G und M6G nach Aufnahme von 60 g Mohn, entsprechend einer auf das Körpergewicht bezogenen Menge von 78,3 µg/kg MOR und 6,9 µg/kg COD .....	87
Abbildung 26: Verlauf der Gesamtmorphinkonzentration: reale Konzentration (grau), mittels Urindichte korrigierte Kurve (rot).....	87
Abbildung 27: Positiver Drug Wipe Test auf Opiate (rechts) im Vergleich zu negativem Test (links) .....	89
Abbildung 28: Precursor Ion Scan der m/z 202,0 (Pap) in Urinprobe eines Straßenheroin-konsumenten .....	90
Abbildung 29: Chromatogramm der Multiple Ion Ionenspuren von PAP (340,0), DMP (326,1) und DPG (502,0) .....	91
Abbildung 30: Chromatogramm zur Optimierung der Collision Energy von DPG .....	92
Abbildung 31: Chromatographische Trennung von PAP, DMP und DPG .....	93
Abbildung 32: Chromatogramm einer realen Urinprobe eines Mohnkuchenkonsumenten mit MOR, COD, ihren Glucuroniden und DPG .....	94
Abbildung 33: Relativer Verlauf der DPG Konzentration nach Aufnahme von 60 g Mohn, entsprechend einer auf das Körpergewicht bezogenen Menge von 50,7 ng/kg PAP .....	94
Abbildung 34: Product Ion Scans von HYD (oben) und MOR (unten).....	98
Abbildung 35:.....	99
Abbildung 36: Chromatogramm einer realen Serumprobe aus dem Schmerzmittelprojekt (Medikation MOR + OC, zusätzlich COD detektiert).....	101
Abbildung 37: Konzentrationsbereiche der einzelnen Opioide des Schmerzmittelprojekts in den Serumproben .....	104
Abbildung 38: Chromatogramm einer dotierten Haarprobe (1 ng/mg für jeden Analyten).....	107

<i>Abbildung 39: Chromatogramm einer realen Haarprobe aus dem Schmerzmittelprojekt (Medikation: MOR und FEN, zusätzlich nachgewiesen: TRA und MET) .....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 40: Konzentrationsbereiche der einzelnen Opioide des Schmerzmittelprojekts in den Haarproben .....</i>	<i>113</i>

## 9.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Ausschnitt aus Produktangebot für HPLC-Säulen der Firma Phenomenex</i>	9
<i>Tabelle 2: Vorstellung der Opioide für die vorliegende Arbeit</i>	39
<i>Tabelle 3: HPLC-MS Methoden zur Analytik von Opioiden</i>	43
<i>Tabelle 4: Opiatgehalte in verschiedenen Mohnprodukten</i>	47
<i>Tabelle 5: Ablauf der Festphasenextraktion</i>	53
<i>Tabelle 6: Gradientenprogramm für die HPLC Methode für das Heroinprojekt</i>	54
<i>Tabelle 7: Massenübergänge im MRM Modus</i>	54
<i>Tabelle 8: Probanden und Verzehr im Mohnkuchenversuch, 1. Versuchstag</i>	59
<i>Tabelle 9: Probanden und Verzehr im Mohnkuchenversuch, 2. Versuchstag</i>	59
<i>Tabelle 10: Gradientenprogramm für die HPLC Methode aus dem Schmerzmittelprojekt</i>	61
<i>Tabelle 11: Massenübergänge im MRM Modus</i>	61
<i>Tabelle 12: Generelle Extraktionsmethode für Mischphasen-Säulen</i>	66
<i>Tabelle 13: Generelle Extraktionsmethode für C18-Säulen</i>	66
<i>Tabelle 14: Wiederfindungen verschiedener Analyten bei unterschiedlichen SPE-Säulen und Aufarbeitungen in den Vortesten</i>	67
<i>Tabelle 15: QC-Konzentrationen, Wiederhol- und Laborpräzisionen, Richtigkeiten und analytische Grenzwerte der Heroinprojekt-Methode</i>	67
<i>Tabelle 16: Wiederfindungen der Heroinprojekt-Methode</i>	68
<i>Tabelle 17: Daten der Kalibrierfunktionen der Heroinprojekt-Methode</i>	68
<i>Tabelle 18: Verlauf der Positivwerte der einzelnen Marker in der Heroingruppe</i>	75
<i>Tabelle 19: Verlauf der Positivwerte der einzelnen Marker in der Methadongruppe</i>	76
<i>Tabelle 20: Direkter Vergleich HER-MET-Gruppe in Bezug auf die Anzahl der Positivbefunde an Heroin- und Straßenheroinmarkern</i>	77
<i>Tabelle 21: Konzentrationsbereiche der Straßenheroin- und Heroinmarker in den untersuchten Urinproben</i>	78
<i>Tabelle 22: Verlauf des Beikonsums weiterer Drogen in der Heroingruppe</i>	81
<i>Tabelle 23: Verlauf des Beikonsums weiterer Drogen in der Methadongruppe</i>	82

<i>Tabelle 24: Direkter Vergleich HER-MET-Gruppe in Bezug auf den Beikonsum weiterer Drogen .....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 25 A-D: Kombinationsbereitschaft weitere Drogen .....</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 26: Alkaloidgehalte in den untersuchten Mohnprodukten .....</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 27: Relative Nachweishäufigkeiten und Konzentrationsbereiche von MOR, COD und deren Glucuroniden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme in Urinproben .....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 28: Relative Nachweishäufigkeiten und Konzentrationsbereiche von MOR, COD und deren Glucuroniden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme in Blutproben.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 29: Konzentrationen der QC-Proben, Präzisionen und Richtigkeiten der Schmerzmittel-Methode für die Analyse von Serum.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabelle 30: Daten der Kalibrierfunktionen, analytische Grenzwerte und Wiederfindungen der Schmerzmittel-Methode für die Analyse von Serum .....</i>	<i>96</i>
<i>Tabelle 31: Häufigkeit der Medikationen und übereinstimmend nachgewiesenen Wirkstoffe im Schmerzmittelprojekt.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabelle 32 A+B: Konzentrationsbereiche der bestimmten Schmerzmittel-Proben in Einzel- (Tabelle A) und Kombimedikation (Tabelle B) .....</i>	<i>103</i>
<i>Tabelle 33: Daten der Kalibrierfunktionen, analytische Grenzwerte und Wiederfindungen für die einzelnen Analyten.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabelle 34: Konzentrationen der QC-Proben, Präzisionen und Richtigkeiten der Schmerzmittel-Methode für die Haaranalyse .....</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 35: Haarfarbe, -länge, Opioidkombinationen und -darreichungsformen .....</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 36: Häufigkeit der Gaben der einzelnen Opiode in Therapie und Vortherapie und Inzidenz von Nachweis und Nicht-Nachweis der Wirkstoffe und deren Metaboliten .....</i>	<i>110</i>
<i>Tabelle 37: Therapie der einzelnen Patienten und ermittelte Analytkonzentrationen in den zugehörigen Haarproben.....</i>	<i>112</i>
<i>Tabelle 38: Nachweishäufigkeiten und Konzentrationsbereiche der bestimmten Schmerzmittel-Proben .....</i>	<i>113</i>