Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der
Ludwig-Maximilian Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. H.-J. Möller

Speichel als alternatives Untersuchungsmaterial zur Drogenanalytik mittels Immunoassay: Ein Vergleich zu verschiedenen Nachweisverfahren im Urin in drogentherapeutischen Einrichtungen

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Olaf Dierich
aus
Memmingen
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Soyka

Mitberichterstatter: Prof. Dr. L.v. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06 2007

Die Ausarbeitung der Promotionsarbeit: „Speichel als alternatives Untersuchungsmaterial zur Drogenanalytik mittels Immunoassay: ein Vergleich mit konventionellen Nachweisverfahren im Urin“ wurde von 2001 bis 2004 unter Anleitung von Herr Professor Dr. Michael Soyka angefertigt.

Ganz besonderen Dank gilt Herrn Professor Soyka, der mich in allen Fragen betreute und mir wichtige Hinweise in der Ausarbeitung gab. Auch möchte ich hier Herrn Professor von Meyer ganz herzlich danken. Er vermittelte mir fundiertes Hintergrundwissen und tatkräftige Hilfe und gab der gesamten Arbeit die richtige Direktive. Herr Professor Soyka und Herr Professor von Meyer vermittelten mir mit ihrem freundlichen und umsichtigen Wesen ein gutes Gespür für das wissenschaftliche Arbeiten.

Weiter möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Kramer in Geesthacht, insbesondere der toxikologischen Abteilung bedanken. Sie stellten mir Zeit, Material und ihre Einrichtung zur Durchführung dieser Studie zur Verfügung. Mit ihren fundierten Kenntnissen in diesem Bereich begleiteten sie mich während der Studie.

Ferner danke ich Herrn Meyer-Philipi der Firma Compware und Firma Dräger, die mich in technischen Fragen beraten haben und mir in der Anfangsphase der Studie gute Ratschläge gaben.

Diese Arbeit enthält Ergebnisse, die in folgender Veröffentlichung publiziert wurde:

Drogenanalytik im Speichel mit Immunoassay: Ein Vergleich mit konventionellen Nachweisverfahren im Urin, Fortschritte der Neurologie Psychiatrie 2005; 73:401-408 / Druckhaus Götz GmbH

Inhaltsangabe

1. Einführung 3

1.1. Durchführung von Untersuchungen zum Nachweis vorangegangenem Drogenkonsum 3

1.2. Speichelproduktion 5

1.2.1. Anatomie der Speichelorgane 5

1.2.2. Speichelbildung 7

1.2.3. Pharmakokinetische Eigenschaften des Speichels 8

1.3. Zu untersuchende Drogengruppen 10

1.3.1. Amphetamine 10

1.3.2. Barbiturate 13

1.3.3. Benzodiazepine 14

1.3.4. Methadon 16

1.3.5. Opiate 18

1.3.6. Kokain 21

1.3.7. Cannaboide 23

1.4. Problematik bei der Gewinnung von Probenmaterial und praxisorientierter Einsatz der Drogenanalytik 24

2. Geräte und Reagenzien 26

2.1 Drogenschnelltests mittels Urinteststreifen 26

2.2 Immunoassay 27

2.3 Extraktion und Derivatisierung 28

2.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion 28

2.3.2 Festphasenextraktion – solid phase extaction (SPE) 29

2.4 Kalibration 29

2.5 Bestätigungsanalysen 29

2.5.1 GC-MS 29

2.6 Speichelsammelgefäße 30

3. Materialien und Nachweisverfahren 31

3.1. Drogennachweisverfahren 31

3.1.1. Drogenschnelltests mittels Urinteststreifen 31

3.1.2. Immunoassay 32

3.1.3. Extraktion und Derivatisierung 33

3.1.4. Kalibration 36

3.1.5. Bestätigungsanalysen 37

3.2. Probenentnahme 38

3.2.1. Materialien 38

3.2.2. Durchführung 39

4. Ergebnisse 40
4.1. Probenkollektiv 40
4.2. Verfahren 41
4.2.1. Einführung 41
4.2.2. Drogenschnelltests mittels Urinteststäbchen 44
4.2.3. Immunoassay 45
4.2.3.1 Speichel 45
4.2.3.2 Urin 47
4.2.4. Bestätigungsanalysen 48
4.3. Extraktion und Derivatisierung 49
4.4. Kalibration 50
4.5. Nachweisgrenzen 54
4.5.1 Urinstäbchen 54
4.5.2 Speichelprobe 54
4.5.3 Urinprobe mittels CEDIA 55

5. Diskussion 56
5.1. Drogennachweisverfahren 56
5.1.1. Drogenschnelltests mittels Urinteststreifen 56
5.1.2. Immunoassay 57
5.1.2.1 Speichel 58
5.1.2.2 Urin 63
5.1.3. Bestätigungsanalysen 63
5.2. Kalibration 64
5.3. Probenentnahme 66
5.4. Schlussbetrachtung 66

6. Zusammenfassung 69
7. Literatur 71
8. Anhang 76

Speichel als alternatives Untersuchungsmaterial zur Drogenanalytik mittels Immunoassay: ein Vergleich mit konventionellen Nachweisverfahren im Urin

1. Einführung

1.1 Durchführung von Untersuchungen zum Nachweis von Drogenkonsum

Der Nachweis von Drogenkonsum ist in vielen Bereichen notwendig. Er wird zu forensischen Zwecken im Bereich der Rechts- und Arbeitsmedizin und auch zur Kontrolle auf Drogenkonsum in drogentherapeutischen Einrichtungen eingesetzt. Gerade in drogentherapeutischen Einrichtungen ist eine regelmäßige Kontrolle zur erfolgreichen Detoxifikation, zur Drogenabstinenz während der Rehabitilationstherapie zum Erreichen des Clean-Status, sowie zur Überwachung des Beigebrauchs während der Substitutionstherapie opiatabhängiger Patienten notwendig [Staak et al. 1993]. Ein Beigebrauch von Drogen während der Substitution kann allzu leicht zu einer tödlichen Überdosierung führen. Im Jahr 2001 betrug laut Angaben des Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherung die Zahl der Drogentoten 1835. Etwa 20% sind davon an einer Mischintoxikation mit anderen Substanzen wie Methadon, Benzodiazepinen oder anderen gestorben. Dabei handelte es sich fast ausschließlich um Abhängige, die sich nicht in einem Substitutionsprogramm befanden [Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit 2001]. Besonders Kombinationen wie Benzodiazepine, Heroin, Alkohol und Methadon mit der Gefahr einer Atemlähmung, wie auch eine Kombination von Heroin mit Kokain mit Kreislaufversagen sind hierbei zu nennen.
Zum Nachweis von Drogenkonsum im drogentherapeutischen Bereich werden üblicherweise Urin oder Serum herangezogen. Harn wird in der Niere konzentriert und in der Harnblase gesammelt. Im Urin fallen daher im Vergleich zum Serum höhere Konzentrationen der Drogen und deren Metabolite an. Niedrige Serumkonzentrationen, die normalerweise nicht mehr nachweisbar wären, kommen durch die Aufkonzentration des Harn durch die Niere wieder in einen messbaren Bereich. Dadurch verlängert sich der Zeitraum der Nachweisbarkeit [Iten 1994]. Der Nachweis von Drogenkonsum im Urin ist somit labordiagnostisch als Nachweisverfahren gut geeignet. Nachteile hierbei sind die leichte Manipulationsmöglichkeit und die „lag times“ [Schütz 1999]. Als „lag times“ werden die

Zeiten bezeichnet, in dem die Droge kurz zuvor konsumiert wurde und noch nicht in ausreichender Konzentration zum Nachweis vorhanden ist. Es muss erst eine gewisse Zeit vergehen bis die Drogen, beziehungsweise deren Metabolite, über die Niere ausgeschieden werden und sich in der Harnblase anreichern, um eine nachweisbare Konzentration zu erreichen. Diese „lag times“ liegen bei dem Nachweis im Serum nur im geringen Maßen vor. Allerdings ist die Nachweisbarkeitsdauer kürzer als im Urin und umfasst daher ein engeres zeitliches Fenster. Eine Manipulationsmöglichkeit beim Serum existiert nicht. Haarproben werden selten eingesetzt, da hierbei kein aktueller Wert bestimmt wird, sondern vielmehr ein längerer zurückliegender Zeitraum. Haarproben werden eingesetzt, wenn ein Drogenkonsum über einen bestimmten Zeitraum getestet werden soll. Andere Matrices wie Speichel, Nägel, Schweiß, Bronchialsekret, Gallenflüssigkeit, Liquor, Kammerwasser- und Perikardflüssigkeit aus dem Herzen stehen zur Verfügung und wurden und werden bereits eingesetzt [Kidwell 1998, Pichini 1996, Sachs 1998, Palmeri 2000].

Da es sich bei dem Nachweis von Drogen im Urin um eine nicht-invasive Methode handelt und gegenüber anderen Methoden labordiagnostische Vorteile besitzt, wird Urin als bevorzugtes Untersuchungsmaterial im Drogenbereich zum Drogennachweis eingesetzt. Zur schnellen Kontrolle können Urin-Stix eingesetzt werden. Sie sind ein relativ kostengünstiges Testverfahren, das innerhalb von wenigen Minuten ein Ergebnis bringt. Die zuverlässige labortechnische Methode mit Immunoassay und Absicherung über GC/MS wird im Zweifelsfalle herangezogen. Oftmals wird die Kombination von Immunoassays und GC/MS von vornherein als bevorzugte Testmethode herangezogen. Um eine Vertauschung der Probe von seitens des Patienten zu verhindern, muss die Urinprobe unter Sicht abgegeben werden. Das geschieht meistens so, dass eine Person direkt bei der Abgabe der Probe dabei ist, oder dass die Abgabe der Probe unter Videoüberwachung observiert wird. Diese Methode stellt jedoch einen Eingriff in die Intimsphäre oder ethische Integrität des Patienten dar. Trotz Überwachung gelingt es jedoch immer wieder, dass die Probe vom Patienten vertauscht oder manipuliert werden [Hagemann 1990]. Zahlreiche Anregungen, und auch Utensilien zur Manipulation des Testergebnisses sind unter anderem über das Internet erhältlich.

In der Praxis der Drogentherapie ist es daher erstrebenswert einen Weg zu finden eine zuverlässige und praktikable Art des Drogennachweises durchzuführen. Eine gute Methode Untersuchungsmaterial zu gewinnen stellt die Speichelprobe dar, da sie relativ sicher bezüglich Manipulationen ist. Nachteil dieser Methode ist die geringe Konzentration der einzelnen Substanzen. Das Labor Geesthacht hat jahrelange Erfahrung im Bereich des Drogenscreening. Das Labor entspricht den technischen und personellen Voraussetzungen,

der von SAMHSA erstellten Leitlinien (SAMHSA, www.samhsa.gov) In Zusammenarbeit mit diesem Labor wurde die Studie durchgeführt. Die nachfolgende Studie vergleicht die unterschiedlichen Drogennachweisverfahren des Urins, im besonderen die der Urin-Stix, und die des Speichels mittels Immunoassay. Die gesamte Studie wurde auf die Basis einer praxisnahen Vorgehensweise aufgebaut.

1.2. Speichelproduktion

1.2.1. Anatomie der Speichelorgane

Zur Speichelproduktion stehen neben den kleinen Speicheldrüsen hauptsächlich die drei paarigen Hauptspeicheldrüsen zur Verfügung.

Glandula submandibularis
Glandula Parotis
Glandula sublingualis

Die Speichelproduktion beträgt etwa 0,5 bis 1,5 Liter pro Tag [Kidwell 1998]. Dabei wird von der Glandula submandibularis etwa 65%, von der Glandula parotis etwa 23%, von der Glandula sublingualis etwa 4% und von den kleineren Speicheldrüsen etwa 8% des Gesamtspeichels produziert. Der Speichel selbst setzt sich aus einem serösen wie muköse Sekret zusammen. Deren jeweilige Anteile zueinander können je nach Stimulation variieren. Bei Stimulation nimmt er seröse Anteil zu, beim Ruhespeichel überwiegt der muköse Anteil. Der Speichel und andere Bestandteile wie Zellreste, Bakterien, Nasensekret, Reste von Verdauungsflüssigkeit und von oral aufgenommenen wie inhaliert Substanzen bilden die zu testende Matrix, die Mundflüssigkeit, die auch als „gemischter Speichel“ bezeichnet werden kann [Glock 1982].
Zu den Aufgaben des Speichels gehören die Erhöhung der Gleitfähigkeit des Speisebreies, die Befeuchtung des Nasen-Rachenraumes, Infektabwehr durch IgA und Lysozyme und Andauung von Stärke durch Ptyalin (α-Amylase des Speichels).
Die **Ohrspeicheldrüse**, Glandula parotis, ist die größte Speicheldrüse mit einem Gewicht von 14 bis 28 g. Sie befindet sich in der subkutanen Wangenhaut zwischen der Mandibula und dem Ohr. Sie liegt dem Musculus masseter, auf und ist somit von außen tastbar und in ihrer

Exkretion stimulierbar. Der Ausführungsgang (Ductus paroideus) findet seinen Weg durch den Musculus masseter zur Wangeninnenfläche, wo er dann in die Mundhöhle mündet. Der Ausführungsgang befindet sich gegenüber den oberen Molaren und ist deutlich sichtbar. Das Sekret, das die Ohrspeicheldrüse produziert ist fast ausschließlich seröser Natur. Die Ohrspeicheldrüse kann bei Stimulation ihre Produktion enorm steigern und somit etwa die Hälfte des Gesamtspeichels übernehmen [Sas 1997, Ship 1997].

Die **Unterkieferspeicheldrüse**, Glandula submandibularis, ist die zweitgrößte Speicheldrüse mit einem Gewicht von etwa 7 bis 15g. Sie befindet sich unter dem Mundboden nahe dem Kieferwinkel. Der Ausführungsgang (Ductus submandiblaris) mündet unterhalb der Zunge in den Mundboden. Sie produzieren sowohl seröses wie auch muköses Sekret.

Die **Unterzungenspeicheldrüse**, Glandula sublingualis, ist mit ihren 2g die kleinste Hauptspeicheldrüse. Sie befindet sich am seitlichen Zungengrund direkt unter der Mundschleimhaut. Ihr Ausführungsgang (Ductus sublingualis) mündet in den Ductus submandibularis und gelangt somit über den Mundboden in die Mundhöhle. Bei ihr handelt es sich um eine gemischte Drüse mit serösen und mukösen Sekret, wobei der muköse Anteil überwiegt.

Die etwa 750 anderen **kleinen Speicheldrüsen** befinden sich unterhalb der Mucosa gesamten Mund -und Rachenraum, bis hin zum paranasalen Sinus und über den Larynx bis zu der Trachea und den Bronchien. Die höchste Konzentration der kleinen Speicheldrüsen befindet sich jedoch im Mundraum. Über sie wird vornehmlich muköses Sekret abgesondert [Silvers 1998].

Bei den Speicheldrüsen handelt es sich um tubuloazinäre Drüsen. Sie setzen sich aus Azini (Drüsenendstücke), Schaltstücke und Ausführungsgang zusammen. Die Azini haben ein beerenförmiges Aussehen und stehen in Gruppen zusammen. Sie geben somit den Drüsen ein läppchenförmiges Aussehen. Sie werden von spezialisierten einschichtigen Drüsenzellen gebildet. Um sie herum liegt ein dichtes Geflecht von Kapillaren. Die Blutgefäße, die zu den Azini führen, folgen den Ausführungsgängen. Der Blutstrom ist dabei der Richtung des Speichelflusses gegenläufig. Zur Speichelbildung müssen aus dem Blut Substanzen und Flüssigkeit die Kapillarwand, den interstitiellen Raum und das einschichtige Drüsenepithel überwinden [Pötsch 1997]. Somit gelangen Flüssigkeit, Ionen und niedermolekulare Stoffe aus dem Blut direkt in das Lumen der Azini und bilden den Primärspeichel. Über die Schaltstücke, die nach distal ihren Durchmesser vergrößern, gelangt der Primärspeichel in die Ausführungsgänge. Dort werden dem Primärspeichel Elektrolyte entzogen und es bildet sich

ein hypoosmolarer Sekundärspeichel. Der Sekundärspeichel gelangt über die Ausführungsgänge in den Mundraum.

1.2.2. Speichelbildung

Speichel besteht aus ca. 99% Wasser, ca. 0,3% Protein (Ptyalin, Lysozym, IgA) und weiteren 0,7% anderer Substanzen wie Elektrolyte, Mukopolysaccharide, Zellen und Bakterien. Der Speichelfluss in Ruhe beträgt 0,3-0,5 ml/min und bei Stimulation 3-5ml/min. Der pH-Wert liegt normalerweise zwischen 5,6 und 7,0 (pH-Ruhespeichel ca.6,4), kann aber bei Stimulation auf 8 ansteigen [Haeckel 1996].
Die Speichelbildung wird hauptsächlich über das vegetative Nervensystem reguliert. Neben taktilen Reizen wie Kauen, Berührung der Mundschleimhaut und sensorischen Reizen wie Geschmack und Geruch, wird die Speichelabsonderung durch erlernte Prozesse über das limbische System angeregt. Die Speichelabsonderung erfolgt dann reflektorisch über cholinerge, adrenenerge und petiderge (Substanz P) Aktivierung des vegetativen Nervensystems. Cholinerge, α-adrenenerge und petiderge (Substanz P) Aktivierung für zur Absonderung von serösen Sekret. Hierbei kommt es bei adäquater Stimulierung zu einer lokalen Vasodilation der Blutgefäße im Bereich der Speicheldrüse und damit zu einer Mehrdurchblutung mit erhöhter Sekretionsrate in die Azini. Bei β-adrenerger Stimulierung kommt es zu einem gegenteiligen Effekt, zur Vasokonstriktion mit verminderter Sekretionsrate. Es kommt zu Bildung von hochviskösem muzinreichen Sekret [Silvers 1998].

Wie oben erwähnt beträgt die Speichelproduktion etwa 0,5 bis 1,5 Liter pro Tag. Ein Großteil davon wird während der Nahrungsaufnahme gebildet. Speichelbildung verläuft in zwei Schritten. Chlorid gelangt durch aktive Transportmechanismen aus dem Blut in die Azinuszelle. Chloridionen (Cl^-) gelangt dann über einen Chloridkanal in das Lumen der Azini. Durch das intraluminale negative Potential werden Natriumionen ($Na^{+)}$ durch einen Co-Transport ebenfalls ins Lumen befördert. Osmotisch bedingt folgt das Wasser den beiden Ionen ins Lumen der Azini. Der sich im Lumen der Azini befindliche Speichel wird als Primärspeichel bezeichnet. Die Leitfähigkeit der luminalen Chloridkanäle und die exozytotischen Prozesse von Protein ist abhängig von der intrazellulären Ca^{++}-Konzentration. Bei Stimulation erhöht sich die intrazellulären C^{++}-Konzentration. Das bedingt einen erhöhten Einstrom von Cl^- und damit verbundenen Na^+- und Wassereinstrom ins Lumen. Daneben wird bei erhöhter intrazellulärer Ca^{++}-Konzentration vermehrt Protein durch Exozytose ins Lumen

abgegeben. In den Ausführungsgängen wird dann Cl^- und Na^+ im Austausch mit K^+ und HCO_3^- durch aktive Transportmechanismen zurückresorbiert. Durch die ansonsten wasserundurchlässige Struktur der tubulären Membran wird der Sekundärspeichel hypoosmolar (bis zu 50 mosml/kg H_2O). Bei Erhöhung der Speichelflussrate kommt es zu einem gleichzeitigen Anstieg der HCO_3^--Konzentration im Sekundärspeichel und einer damit verbundenen Alkalisierung [Höld 1996].

1.2.3. Pharmakokinetische Eigenschaften des Speichels

Ebenso wie der Speichel gelangen verschiedene Inhaltsstoffe aus dem Blut in den Speichel. Folgender Weg muss vom Blutgefäß bis in den Azinus durchschritten werden [Pötsch 1997]:

- **Kapillarwände**
- **Interstitieller Raum**
- **Drüsenepithelzelle mit basaler und lumenseitiger Zellmembran**

Bei dem Stoffdurchtritt spielen drei Faktoren eine Rolle: die Substanzeigenschaft, Trigger für die Speichelproduktion sowie die physiologischen und anatomisch/histologischen Grundbedingungen [Kidwell 1998, Höld 1996, Haeckel 1996].

Als Transportmechanismen bei der Speichelbildung existieren Sekretion, Filtration oder Diffusion. Die **Sekretion** stellt einen aktiven transzellulären Transportmechanismus dar, bei dem unter Energieverbrauch ein Stoff unabhängig vom Konzentrationsgradienten zur anderen Zellseite befördert werden kann. Es handelt sich hierbei um größere molekulare Stoffe, die sonst nicht die Kapillarwände passieren könnten. Für Elektrolyte in ionisierter Form existieren hierfür Pumpen, die sie auf die andere Seite der Zellmembran transportieren. Ein anderer Transportmechanismus ist die **Transzytose**, bei denen Stoffe durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und durch die Exozytose wieder abgegeben werden. Diese Form trifft für einige Proteine, wie das IG-A und auch für Medikamente, u.a. Methadon zu. Der aktive Transportmechanismus kann dazu führen, dass im Speichel höhere Konzentrationen vorkommen können als im Plasma. Bei der **Filtration** gelangen kleinste Partikel durch die Membranporen vom Plasma in den Speichel. Hierbei spielen Konzentrationsgefälle und onkotischer Druck eine Rolle, inwieweit ein Stofftransport stattfindet. Als häufigster Transportmechanismus wird jedoch die **Diffusion** angesehen [Kidwell 1998, Höld 1996, Haeckel 1996]. Bei der Diffusion spielen neben den Membraneigenschaften die

Substrateigenschaften eine Rolle. Zur Diffusion benötigt man zwei Kompartimente, mit unterschiedlich hohen Konzentrationen eines Stoffes. Die Diffusion bei der Speichelbildung läuft in drei Schritten ab: Kapillar-interstitieller Raum, interstitieller Raum-Drüsenepithelmembran und Drüsenepithelmembran-Azinus. An der Verbindung der Kompartimente befindet sich eine Grenzfläche (Zellmembrane), die man als Austauschfläche bezeichnet. Die pro Zeiteinheit diffundierende Stoffmenge ist proportional zu dem Diffusionskoeffizienten, der Austauschfläche und der Konzentrationsdifferenz beider Stoffe.

$$\mathbf{\Delta Q/\Delta t = (D \cdot F/l) \cdot \Delta C\ [\ mol/s]}$$

ΔQ=diffundierende Stoffmenge; Δt=Zeiteinheit; D=Diffusionskoeffizienten; F=Austauschfläche; ΔC=Konzentrationsdifferenz;

Der Diffusionskoeffizient der einzelnen Drogen wird bestimmt durch deren Molekulargewicht, Molekülgröße, deren räumlichen Konfiguration, deren Lipophilie und deren Ionisationsgrad. Der Diffusionskoeffizient ist umgekehrt proportional zur Molekülgröße. Das heißt, dass kleinere Moleküle leichter und schneller diffundieren, besonders wenn ihre Molekülform oval ist. Als Maß für die **Lipophilie** dient der n-Octanol-Phosphatpuffer-Verteilungskoeffizient. Je größer der Koeffizient ist, desto größer ist die Lipophilie. Umso höher der Koeffizient liegt, umso leichter und schneller kann der Membrandurchtritt erfolgen [Fichtl 1992]. Die Lipophilie der einzelnen Drogen spielt eine wichtige Rolle in der Permeation in den Speichel. Durch **Plasmaproteinbindung** (z.B. Glucuronidierung) und die damit verbundene Hydrophilie kann die Diffusion gehemmt oder gar verhindert werden. So gelangen hauptsächlich die freien, aktiven Ursprungssubstanzen in den Speichel und nicht deren Metabolite in gebundener Form [Haeckel 1989, Kidwell 1996]. Der **Ionisationsgrad** der Drogen wird durch den pH-Wert des Speichels und dem pKa-Wert (Dissoziationskonstante der Substanz) bestimmt [Haeckel 1996, Kidwell 1998]. Um die Lipidschicht zu überwinden muss die Substanz in nicht-ionisierter Form vorliegen. Dazu müssen die Stoffe einen pKa-Wert größer 8,5 oder kleiner 5,5 haben. Dies trifft für die meisten Drogen zu [von Meyer 1993]. Um daraufhin im Speichel zu verbleiben, müssen die Drogen ionisiert werden, da dies eine gewisse Hydrophilie mit sich bringt, was zu einem Verlust der Permeationsfähigkeit durch die Zellmembrane führt. Diese Ionisierung hängt von dem pH-Wert des Speichels ab. Im Ruhespeichel liegen basische Drogen in größeren Konzentrationen vor, wie in dem etwas alkalischeren stimulierten Speichel. Für saure Drogen gilt das genau umgekehrt. Hier findet man im stimulierten Speichel höhere Konzentrationen

wie im Ruhespeichel. Für die Anreicherung von Drogen im Speichel spielt zudem die Konzentration der Drogen im Plasma eine Rolle.

Mit der aus der Henderson-Hasselbachschen Gleichung abgeleitete Rasmussen-Gleichung kann de theoretische Speichel/Plasma (S/P)-Quotienten errechnet werden. Dabei werden für sauren und basischen Speichel zwei unterschiedliche Formeln verwandt:

Sauer	**basisch**
$S/P = \frac{1+10^{(pHs-pKa)}}{1+10^{(pHp-pKa)}} \times \frac{f_p}{f_s}$	$S/P = \frac{1+10^{(pKa-pHs)}}{1+10^{(pHp-pKa)}} \times \frac{f_p}{f_s}$

pHs = pH-Wert des Speichels; pHp = pH-Wert des Plasmas; pKa = pKa-Wert der Substanz; f_s = freier, nicht-proteingebundener Anteil der Substanz im Speichel; f_p = freier, nicht-proteingebundener Anteil der Substanz im Plasma

Bei diesen Gleichungen besteht eine lineare Beziehung zwischen pH-Wert des Speichels und des Speichel/Plasma-Konzentrationenverhältnisses. Die Formel bezieht zudem die Ionisation und Proteinbindung mit ein [Kidwell 1998].

1.3. Zu untersuchende Drogengruppen

1.3.1. Amphetamine

Der Begriff Ampethamine stellt einen Oberbegriff über eine Vielzahl verschiedener Derivate, die sich von dieser Substanz ableiten lassen, dar. Amphetamine werden synthetisch hergestellt, daher auch der Begriff „**Designerdroge**“. Die chemische Struktur kann systematisch entworfen werden und auf synthetischen Weg hergestellt werden. Das hat zufolge, dass eine Vielzahl dieser Substanzen, deren molekulare Struktur immer wieder abgeändert wird, auf den Markt sind. Aufgrund ihrer zentral stimulierenden Wirkung wurden Amphetamin bzw. Metamphetamin z.B. bei Adipositas, Hypotonie und Narkolepsie eingesetzt. Weder Amphetamine noch deren Derivate werden derzeit in Deutschland eingesetzt oder sind in Medikamenten enthalten. In der Schweiz ist eine strukturchemisch

ähnliche Substanz im Appetithemmer Apentinil-Depo® (Ethylamphetamin) enthalten. Nach Anlage III zu §1 Abs. 1 BtMG gehören Amphetamin und Metamphetamin zu den verkehrsfähigen und verschreibungsfähigen Betäubungsmitteln. Designerdrogen und deren zahlreichen Derivate sind nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel der Anlage IA (numerisch geordnete Stoffe) bzw. IB (alphabetisch geordnete Stoffe) zu § 1 Abs. 1 des BtMG. Unerlaubte Herstellung wie auch Anfertigung eines Vor- oder Zwischenproduktes und unerlaubter Vertrieb sind strafbar.

Klassische Amphetaminderivate

- ***Amphetamin*** ((±)-α-Methylphenethylamin)
- ***Fenetyllin*** (7-[2-(α-Methylphenethylaminoethyl]theophyllin
- ***Mettamphetamin*** (N,α-Dimethylphenethylamin)

Einzelverbindungen der„Designerdrogen“

- ***MDA*** (Methylendioxyamphetamin; Tenafetamin, α-Methyl-3,4-methylendioxyphenethylamin)
- ***MDE = MDEA*** (Methylendioxyethylamphetamin; N-Ethyl-α-Methyl-3,4-methylendioxyphenethylamin)
- ***MDMA*** (Methylendioxymethamphetamin; N,α-Dimethyl-3,4-methylendioxyphenethylamin)
- ***DOM*** (Dimethoxymethylamphetamin; 2,5-Dimethoxy-4α-dimethylphenethylamin)
- ***DOB*** (Dimethoxybromamphetamin; Bromamfetamin, 4-Brom-2,4-dimethoxy-α-methylphenethylamin)
- ***BOB*** Benzodioxazolylbutanamin
- ***MBDB*** N-Methylbenzodioxazolylbutanamin

Neben den obengenannten Einzelverbindungen stehen noch zahlreiche andere Derivate zur Verfügung: z.B. ***DMA*** (Diethoxyamphetamin), ***DOET*** (Dimethoxylamphetamin), ***DMT*** (Dimethyltryptamin), ***PMA*** (Methoxyamphetamin), ***MPPP*** (Methylphenylpropionoxypiperidin), ***MPTP*** (Methyphenyltetrahydropyridin), **PEPAP** (Phenethylphenylacetoxypiperidin), ***PEPTP*** (Phenethylphenylterahydropyridin) und ***TMA*** (Trimethoxyamphetamin)

Ihrer Wirkung nach werden sie in Stimulantien (z.B. Amphetamin), Halluzinogen (z.B. DOB) und Entactogene (z.B. MDMA) eingeteilt. Sie bewirken eine indirekte präsynaptische Freisetzung von neu synthetisierten Catecholaminen (Noradrenalin und Dopamin) aus, was zu einer Erhöhung der Transmittersubstanzen im synaptischen Spalt führt. Im mesolimbischen System kommt es zu einer Stimulierung der Dopaminrezeptoren. Neben einer Erhöhung der Catecholaminen kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung an Serotonin [Soyka 1998]. Als Langzeitwirkung wird eine irreversible schädigende Wirkung der Amphetamine auf serotonin-produzierende Nervenzellen diskutiert.

Amphetamine werden meist oral aber auch i.v. und selten auch inhalativ appliziert. Es handelt sich um ein weißliches oder rosafarbiges Pulver oder in Tablettenform. Bei gelegentlicher Einnahme beträgt die Dosierung bei Amphetaminen im Mittel 15-25 mg. Bei Toleranzentwicklung bei extremem Gebrauch kann es zu 2-5g! betragen [Iten 1994]. Die mittlere Konsumdosis bei MDMA oder ähnlichen Entactogene beträgt 50-100mg. Bei den halluzinogen wirkenden Designerdrogen wie DOB oder BOB beträgt die Dosierung 0,5-1mg [Schütz 1999].

Es kommt durch die stimulierende Wirkung des noradrenergen Systems zu vermehrtem Rededrang, gesteigerter Spontaneität mit daran gekoppelter, beschleunigter Denk- und Assoziationsvorgängen, aber auch zu Gedankenflucht, vermindertem Reaktionsvermögen und Konzentrationsfähigkeit, Verwirrtheitszustände, Fehleinschätzungen, übersteigertem Selbstwertgefühl und häufig Realitätsverlust. Das Schlafbedürfnis, sowie Hunger und Durst werden unterdrückt. Bei chronischen Gebrauch kommt es häufig zu paranoiden Wahnvorstellungen, gesteigerter Agressivität und stereotypen Verhaltensweisen. Entactogene haben eine schwächere aufhelende Wirkung als die Stimulantien. Die halluzinogen wirkenden Designerdrogen verursachen vor allem visuelle und akustische Halluzinationen. Gerade die halluzinogen wirkenden Amphetamine haben eine geringe „therapeutische“ Breite und führen schnell zur Überdosierung. Ihre Wirkung setzt nach etwa 30-60 Minuten ein und hält für mehrere Stunden an. In der Entzugsphase kommt es zu Depressionen, Müdigkeit, Erschöpfung, Reizbarkeit und Antriebsarmut. Neben der massiven Kreislaufbelastung sind vor allem die Hyperthermie als oftmals auch tödliche Nebenwirkung gerade bei Überdosierung zu nennen. [Julien 1997, Soyka 1998]. Regelmäßiger Konsum führt zur starker psychischer Abhängigkeit.

Die Elimination erfolgt zu Großteil als Amphetamin in glucuronidierter Form im Urin. Ein kleiner Teil wird zu Norephedrin, p-Hydroxynorephedrin und p-Hydroxyamphetamin oxidiert. Zudem kann es über die Zwischenstufe des Phenylaceton zur Benzoesäure

metabolisiert werden. MDMA und MDEA werden zum Großteil unverändert ausgeschieden, zum Teil werden sie zu MDA desalkyliert. Die Elimination ist abhängig vom Urin-pH (sauer – rasche Elimination; alkalisch-langsame Elimination). Die Nachweisbarkeitsdauer im Urin beträgt 1 bis 3 Tage [Iten 1994, Schütz 1999]. Die Nachweisbarkeitsdauer im Blut beträgt ca. 6 Stunden [Bratzke 1993]

1.3.2. Barbiturate

Barbiturate werden heutzutage hauptsächlich als Anticonvulsiva z.B. bei Epilepsie, Eklampsie, Tetanus und bei der Versorgung Schwersttraumatisierter eingesetzt. Die Anwendung als Hypnotika ist weitestgehend obsolet und wurde durch Benzodiazepine ersetzt, die einen höheren therapeutischen Index besitzen. Trotz des geringen medizinischen Einsatzes kommt es in letzter Zeit zu einer steigenden Zahl an Barbituratvergiftungen zu missbräuchlichen Konsum. Barbiturate werden entweder oral eingenommen oder i.v. bzw. i.m. appliziert.
Es gibt folgende Einzelverbindungen:

- *Allobarbital* (5,5-Diallylbarbitursäure)
- *Amobarbital* (5-Ethyl-5-isopropylbarbitursäure)
- *Aprobarbital* (5-Allyl-5-isopropylbarbitursäure)
- *Barbital* (5,5- Diethylbarbitursäure)
- *Brallobarbital* (5-Allyl-5-(2-bromally)barbitursäure)
- *Butobarbital* (5-Butyl-5-ethylbarbitursäure)
- *Cyclobarbital* (5-(1-Cyclohexenyl)-5-ethylbarbitursäure)
- *Methylphenobarbital* (5-Ethyl-1-methyl-5-phenylbarbitursäure)
- *Pentobarbital* (5-Ethyl -5(1-methylbutyl)- barbitursäure)
- *Phenobarbital* (5-Ethyl-5-phenylbarbitursäure)
- *Propallylonal* (5-(2-Bromallyl)-5-isopropylbarbitursäure)
- *Secbutabarbital* (5-sec-Butyl-5-ethylbarbitursäure)
- *Secobarbital* (5-Allyl-5-(1-methylbutyl)- barbitursäure)
- *Vinylbarbital* (5-(1-Methylbutyl)-5-vinylbarbitursäure)

Barbiturate haben eine sedierende, hypnotische und antikonvulsive Wirkung. Als Hypnotika eingesetzt verlängern sie die Schlafdauer, verringern die Aufwachfrequenz und die Dauer der REM-Phasen wie des slow-wave-Schlafes. Wie bei den Benzodiazepinen kann es zu einer

Toleranzentwicklung kommen. Von Drogenabhängigen werden sie hauptsächlich als Ersatz- oder Ausweichdroge eingesetzt oder zusätzlich konsumiert, um eine Wirkungsverstärkung der Drogen zu erreichen.

Barbiturate wirken im gesamten ZNS. Die Nervenbahnung ist verringert und die Inhibition ist erhöht. Der Ansatzort hierfür sind die inhibitorischen $GABA_A$-Rezeptoren mit ihren α und β Untereinheiten und die exzitatorischen AMPA- Rezeptoren. An die $GABA_A$-Rezeptoren wird durch die Barbiturate GABA im verstärktem Maße gebunden aber auch direkt stimuliert, was zu einem verstärktem und verlängertem Cl^- -Fluss führt. Durch Bindung an den AMPA Subtyp der Glutamat-Rezeptoren kann die glutamat-induzierte Depolarisation verringert werden. Diese beide Faktoren können die ZNS-sedierende Wirkung erklären. Durch die Unterdrückung der Übertragung der autonomen Ganglien und der nicotinischen Erregung durch Cholinesterase kann es zu einer Erniedrigung des Blutdruckes kommen. Gerade in hohen Dosen können zu Atemdepression oder zu einem Laryngospasmus führen. Neben einer Tonuserhöhung der gastrointestinalen Muskulatur interferrieren Barbiturate über das Cytochrom P450 kompetitiv mit anderen Medikamenten und körpereigenen Substanzen, wie Steroide, Vitamin K und D. Benommenheit, paradoxe Erregungszustände, erhöhte Schmerzempfindlichkeit sind als weitere Nebenwirkungen zu nennen.

Barbiturate werden entweder oxidativ metabolisiert oder unverändert renal eliminiert. Durch Alkalisierung wird die Eliminierung beschleunigt. Die Nachweisbarkeitsdauer bei den Barbituraten ist abhängig von der Ausgangssubstanz und beträgt im Urin 1-21 Tage und mehrere Stunden bis wenige Tage im Blut [Schütz 1999].

1.3.3. Benzodiazepine

Benzodiazepine gehören nach wie vor zu den weit verbreitetsten Arzneistoffen. Sie sind verkehrsfähige und verschreibungsfähige Betäubungsmittel der Anlage III zu § 1 Abs. 1 BtMG, wobei jeweils Ausnahmen hinsichtlich der maximalen Wirkstoffmenge je abgeteilte Form gelten. Sie wirken anxiolytisch, sedierend, hypnotisch, antikonvulsiv und zentral muskelrelaxierend. Sie führen auch zu übertriebener Lässigkeit, reduzierter Reaktionszeit, Verwirrung, anterograde Amnesie, Vertigo und Störung der mentalen wie auch motorischen Funktionen. Aber auch paradoxe Reaktionen wie Euphorie, Angstzustände, Halluzinationen, gesteigerter Redefluss und Reizbarkeit können auftreten. Chronische Einnahme führt zur körperlichen und psychischen Abhängigkeit, mit zum Teil schweren Entzugssyndromen.

Wie bei den Barbituraten scheinen bei den Benzodiazepinen die $GABA_A$ Rezeptoren hauptverantwortlich für ihre Wirkung zu sein. Die sedative, bzw. hypnotische Wirkung ist wie bei den Barbituraten dosisabhängig. Die Toleranz scheint sich in der enthemmenden Wirkung der Benzodiazapine und deren sedativ-ataxischen Effekten getrennt zu entwickeln. Bis auf zwei Ausnahmen, coronare Vasodilatation und neuromuskuläre Blockaden, die gelegentlich auftreten könnnen, wirken die Benzodiazepine zentral. Auch ist die nervale Depression geringer als die der Barbiturate.

Benzodiazepine binden direkt an den $GABA_A$ Rezeptoren, in den α, β und γ Untereinheiten. Die α und β Untereinheiten haben hierbei den größeren Einfluss auf die pharmakologische Wirkung der Benzodiazepine. Die große Vielzahl der verschiedenen $GABA_A$ Rezeptoren scheint die Ursache der Diversität des Wirkungsspektrums der einzelnen Benzodiazepinen zu sein. Die Aktivierung von Benzodiazepin-Rezeptoren kann je nach Zusammensetzung der Substanz agonistische, antagonistische oder inverse agonistische Wirkung besitzen. Agonisten führen zu einer Erhöhung, inverse Agonisten zu einer Erniedrigung des Chloridflusses. Im Gegensatz zu Barbituraten aktivieren Benzodiazepine nicht direkt die $GABA_A$ Rezeptoren. Benzodiazepine benötigen GABA um ihre Wirkung zu entwickeln. In hypnotischen Dosen haben Benzodiazepine normalerweise, mit Ausnahme von Kindern oder Personen mit Leberfunktionsstörungen und chronisch obstruktiven Lungenfunktionsstörungen, keine Auswirkung auf die Atmung. Gerade in höheren Dosen können sie aber die alveoläre Ventilation, bis hin zur massiven Atemdepression, negativ beeinflussen. Dies wird vor allem durch gleichzeitige Einnahme von Alkohol oder Opiaten gesteigert. Benzodiazepine führen zu einer geringen Blutdrucksenkung mit gleichzeitiger Steigerung der Herzfrequenz. Die große Vielzahl der Substanzen innerhalb der Benzodiazepine unterteilt sich in ultra-kurz-wirkende Benzodiazepine, kurz-wirksame Benzodiazepine (t ½ weniger 6 Stunden), mittellang-wirkende Benzodiazepine (t ½ 6 bis 12 Stunden) und langwirksame Benzodiazepine (t ½ mehr als 24 Stunden). Gerade Benzodiazepine mit langer Eliminationshalbwertszeit neigen zu Kumulation.

Benzodiazepine haben nahezu alle einen hohen n-Octanol-Phosphatpuffer-Verteilungskoeffizient in der nicht ionisierten Form, was gerade für die Permeation in den Speichel gute Voraussetzungen mit sich bringen könnte. Benzodiazepine und deren aktive Metabolite werden jedoch an Proteine gebunden, wodurch die Permeation in den Speichel stark zurückgeht. Diazepam wird zu Beispiel zu fast 99% an Plasmaproteine gebunden. Nach einem initialen schnellen Anfluten der Benzodiazepine nach Aufnahme, kommt es zu einer

Umverteilung in fetthaltige Körperkompartimente, woraus sie langsam wieder abgegeben werden. Die meisten Benzodiazepine werden in wirksame, aber auch in unwirksame Metabolite umgebaut. Teilweise ist erst der Metabolit die hauptsächlich wirkende Substanz. Durch Konjugation als hauptsächlich Glucuronid werden die Substanzen gebunden, inaktiv und werden schließlich renal eliminiert. Die Nachweisdauer ist stark dosis- und substanzabhängig und beträgt bei kurzwirksamen Benzodiazepinen nur wenige Stunden, bei den mittellang-wirkenden etwa 3 Tage und bei langwirkenden und bei chronischer Einnahme v.a. in hohen Dosen sogar mehrere Wochen. Im Blut sind sie meist mehrere Stunden bis wenige Tage nachweisbar [Schütz 1999].

1.3.4. Methadon

Seit dem Anfang der 90er Jahre werden in Deutschland Opiatabhängige substituiert. Grundsätzlich können vier Gruppen der Medikamente zur Substitution opiatabhängiger Patienten benannt werden.

- *Methadon/L-Polamidon®*
- *Levacetylmethadol (LAAM)*
- *Codein/Dihydrocodein*
- *Buprenorphin*

In Deutschland ist bislang Methadon das meist angewandte Substitut [Seidenberg 1998]. *Methadon* ((±)-6-Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-heptanon) ist ein Racemat, also eine optisch aktive Substanz, mit einem Assymetriezentrum am C-6-Atom. Es setzt sich zu gleichen Anteilen aus zwei Isomeren L-Methadon (=R-Methadon=Levomethadon) und D-Methadon (=S- Methadon).

Das L-Methadon ist für die Wirkung bestimmend, da das D-Methadon nahezu wirkungslos ist. *L-Polamidon®* ((-)-(R)-6- Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-heptanon; L-Methadon; R-Methadon) besteht nur aus der linksdrehenden Form. Methadon wird daher meist als 1%ige Lösung hergestellt und L-Polamidon® in der 0,5%igen, damit man rein rechnerisch auf den gleichen Anteil bei gleicher Menge des wirksamen L-Methadon kommt. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass bei Polamidon und v.a. bei Methadon durch die große inter- und intraindividuelle Schwankung der Bioverfügbarkeit und der Eliminationshalbwertzeiten eine individuelle Dosisanpassung erforderlich ist [Schmoldt 1997].

LAAM [(3S,6S)-6- Dimethylamino-4,4-diphenylheptan-3-ylacetat, Levo-α-acetylmethadol] ist ein langwirkender Opoidagonist mit einer Halbwertzeit von 2 ½ Tagen. Aufgrund der langen

Halbwertzeit und der damit verbundenen Risiken (Überdosierung durch Akkumulation) sowie der kardiogenen Nebenwirkungen ist der Einsatz in Deutschland zurückhaltend und wird nicht mehr empfohlen. *Codein* und *Dihydrocodein*, als „alte“ Substitutionsmittel wurden von Methadon abgelöst. Eine sehr hohe Dosierung und eine relativ kurze Wirkdauer lässt Codein und Dihydrocodein im Vergleich zu den anderen Substanzen als Substitut relativ ungeeignet erscheinen. Es war vor der Zeit des Methadon eher eine Notlösung, da es keine geregelte gesetzliche Vorgabe zur Substitution gab. Dadurch dass den Patienten oft die Dosierung, allein schon wegen der Praktikabilität der häufigen Applikation, selbst in die Hand gegeben wurde, mussten zahlreiche Todesfälle durch Überdosierung beklagt werden. *Buprenorphin* ist ein alt bewährtes starkes Analgetikum und steht in Deutschland seit kurzem zur Substitution zur Verfügung. Aufgrund des hohen First-Pass-Effektes wird diese Substanz sublingual verabreicht.

Methadon und L-Polamidon® sind reine µ-Opioid-Rezeptor-Agonisten. Opioid-Rezeptoren sind vor allem im Rückenmark und in der grauen Substanz (v.a. limbische System) zu finden. Direkt oder auch indirekt werden Neurotransmittersysteme und auch Acetylcholin- und Serotoninrezeptoren durch diese Substanzen beeinflusst. Sie greifen ähnlich wie Kokain in das mesolimbische dopaminerge Belohnersystem ein und führen zu einer erhöhten Dopamin-Freisetzung.

Sie bewirken unter anderem eine Analgesie, Euphorie, Obstipation, Miosis, antitussive Wirkung, aber auch Atemdepression, Erbrechen, starkes Schwitzen, Schlafstörungen, Gewichtszunahme und Bradykardie. Methadon und L-Polamidon® besitzen ein starkes Suchtpotential und führen zu einer Toleranzentwicklung und bei Absetzen des Präparates zu Entzugserscheinungen.

Methadon und L-Polamidon® haben eine orale Verfügbarkeit von 70-95%. Sie werden rasch im Körper umverteilt und vornehmlich in Leber, Muskel- und Fettgewebe, Niere Milz und Lunge gespeichert. Bei langer Einnahme kommt es beim Absetzen zu einer protrahierten Freisetzung aus den Speicher, was die Entzugsphase im Vergleich zu Heroin verlängert. Methadon wird an Orsomucoid gebunden und ist daher individuellen Schwankungen unterworfen. Methadon wird im kleinen Teil direkt ausgeschieden oder im Zytochrom –P-450-System erst demethyliert und dann zyklisiert. Es entsteht das pharmakologisch unwirksame 2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP) und 2-Ethyl-5-Methyl-3,3,-diphenyl-1-pyrrolin (EMDP), was renal in glucuronidierter und freier Form ausgeschieden wird. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 20-35 Stunden. Die Nachweisbarkeitsdauer im Urin beträgt 3 Tage [Gorodetzsky 1999]. Die

Nachweisbarkeitsdauer im Blut lässt sich wegen der unterschiedlichen Kinetik schwer abschätzen [Iten 1994].

1.3.5. Opiate

Den Rohstoff, aus dem Opiate hergestellt werden, gewinnt man aus dem Schlafmohn (Papaver somniferum). Die unreifen Kapseln werden angeritzt. Aus ihnen tritt ein milchiges Sekret heraus, das einige Stunden an den Kapseln gelassen wird. Der Milchsaft wird durch enzymatische Prozesse umgewandelt und erhält ein bräunliches Aussehen. Die zähflüssige Masse, die man jetzt als *Opium* bezeichnet, lässt sich leicht abschaben. Opium enthält ca. 20% Alkaloide, wovon nur ca. 10% *Morphin* und 1% *Codein* sind. *Heroin* (Diacetylmorphinbase= Diamorphin; 4,5α-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6α-diol) wird durch Azetylierung des aus Opium gewonnenen Morphins hergestellt. Das feinkörnige, bräunliche Pulver der Heroinbase wird dann zum Verkauf meist noch mit Koffein, Paracetamol, Codein und Zuckern (Glucose, Mannose, Laktose) gestreckt. Dieses Pulver wird dann entweder geraucht, auf erhitzter Folie inhaliert oder durch Zugabe von einer Säure (z.B. Ascorbinsäure) und Erhitzen in Wasser gelöst und i.v. injiziert. Oftmals wird auch Heroin mit anderen Drogen (z.B. Kokain, Flunitrazepam) zu einem „Coktail“ gemischt, was durch ihre additiven Nebeneffekte leicht zu einer tödlichen Überdosierung führen kann.
Codein (4,5α-Epoxy-3-methoxy-17-methyl-7-morphinen-6α-ol) und ***Dihydrocodein*** (4,5α-Epoxy-3-methoxy-17-methyl-6α-morphinanol) werden als Antitussiva oder allein wie auch in Kombination mit Paracetamol als Analgetikum verwandt. Die Verwendung als Substitutionsmittel ist heutzutage obsolet, da weitaus besser geeignete Substitute zur Verfügung stehen. Dihydrocodein darf nur noch in nicht anders behandelbaren Fällen verschrieben werden [Soyka 1998, Drasch 1999, Ulmer 1999]. *Morphin* (4,5α-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6α-diyldiacetat) wie auch weitere *Opiate* (z.B. Ethylmorphin, Hydrocodon, Hydromorphon, Levallorphan, Levorphanol, Pholcodin, Thebacon) werden als starke Analgetika eingesetzt. Codein, Dihydrocodein und die als Analgetika eingesetzten Opiate sind verkehrsfähige und verschreibungsfähige Betäubungsmittel der Anlage III zu § 1 Abs. 1 BtMG.
Opiate werden nur langsam und mit Ausnahme von Codein, Dihydrocodein, LAAM, Methadon und Polamidon unvollständig über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen. Dabei unterliegen sie einem umfangreichen First-Pass- Effekt. Die wirksamen Substanzen werden metabolisiert, glucuronidiert und sind damit unwirksam.

Bei Methadon, Polamidon und LAAM entstehen durch die Metabolisierung weitere wirksame Substanzen. Daher ist bei ihnen eine orale Applikationsform möglich. Codein und Dihydrocodein haben nur eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 20%. Nur ca. 10% des Codeins bzw. des Dihydrocodeins werden zu Norcodein und Morphin bzw. zu Dihydromorphin, Norhydrocodein und Norhydromorphin verstoffwechselt. Die Eliminationshalbwertszeit im Plasma beträgt bei Codein ca. 2-4 Strunden bei Dihyrocodein ca.3-5 Stunden [Iten 1994].

Bei Injektion, Inhalation oder sublingualen Einnahme wird dieser First-Pass-Effekt umgangen und es kommt zu einer hohen Konzentration im Körper. Durch Inhalation und Injektion kommt es zur raschen Anflutung im Körper und die Wirkstoffe erreichen in Sekunden bis Minuten das Gehirn. *Heroin* wird im Körper schnell zu 6-Monoacetylmorphin (MAM) und Morphin umgebaut. Heroin und 6-Monoacetylmorphin überwinden aufgrund ihrer höheren Lipophilie schneller die Blut/Hirn-Schranke als Morphin und lösen bei den Drogenabhängigen den gewünschten Effekt aus. Heroin hat eine Eliminationshalbwertszeit im Plasma von 2-9min, 6-Monoacetylmorphin ca. 40min, und Morphin von ca. 2-3 Stunden [Iten 1994].

Auch bei Verzehr von mohnsamenhaltigen Nahrungsmitteln (z.B. Mohnstrudel, Mohnbrötchen) kommt es zu Aufnahme von Opiaten. Es kann bis zu einigen Stunden danach zu einem positiven Opiatnachweis führen [Struempler 1987, ElSohly et al. 1990].

Ursprungssubstanz	**Metabolite**
Morphin	Morphinkonjugate
Codein	Norcodein, Morphin, Morphinkonjugate
Dehydrocodein	Dihydromorphin, Norhydrocodein, Norhydromorphin
Heroin	6-Monoacetylmorphin (MAM), Morphin, Morphinkonjugate
mohnsamenhaltigen Nahrungsmitteln	Morphin, Morphinkonjugate

Tab. 1.3.5.1: Übersicht über die Biotransformation der Opiate [Schütz 1999]

Die Wirkung der Opioide kommt durch die Bindung an die körpereigenen Opioidrezeptoren zustande. Ihre Wirkung wird durch Bindung an einen, oder auch an mehrere Opioidrezeptoren zugleich erklärt. Das pharmakologische Profil ist dosisabhängig, da durch unterschiedliche Konzentrationen verschiedene Wirkungen, Wirkorte und Wirkortkombinationen resultieren können [Goodman 2001]. Sie finden sich hauptsächlich im schmerzhemmenden System des Rückenmarkes und des Stammhirns, wie auch im limbischen System, wo körpereigene

Opioide (z.B. Endorphine, Enkephaline) eingreifen. Gerade de Nucleus accumbens scheint bei der Beeinflussung der Befindlichkeit eine herausragende Rolle zu spielen, da hier verschiedenartige Neurotransmittersysteme zusammenfließen. Zudem finden ich Opioidrezeptoren im Magen-Darm-Trakt und anderen vegetativ beeinflussten Organen. Es gibt verschiedene Typen von Opioidrezeptoren, denen unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben werden [Goodman 2001] :

Rezeptor-Typ	**Agonisten**	**Wirkung**
μ	β-Endorphin Morphin Pethidin Methadon Fentanyl Buprenorphin (partial)	Analgesie Euphorie, Sedation Miosis Atemdepression Antitussive Wirkung Erbrechen Bradykardie Obstipation
κ	Buprenorphin	Analgesie Sedation Dysphorie
δ	Leu- und Met-Enkephalin β-Endorphin	Analgesie Verhaltensänderung

Tab. 1.3.5.2: Übersicht über die verschiednen Rezeptor-Typen, deren Agonisten und deren Wirkung

Sie führen zu einer Beeinflussung der Ausschüttung von Acetylcholin, Dopamin und Noradrenalin. Daneben wird die Depolarisation von Nervenzellen unterdrückt, Acetylcholin- und Serotonin-Rezeptoren beeinflusst, Kalzium-Ionen werden antagonisiert und vermutlich die Adenylat-Aktivität gehemmt [Julien 1997, Soyka 1998, Goodman 2001].

Ihre Wirkung zeichnet sich durch Analgesie, Sedation, Euphorie bzw. Dysphorie, Miosis, Narkose, antitussive Eigenschaft, Erregung des Vagus und Tonuserhöhung der glatten Muskulatur. Daneben kommt es zur Beeinflussung des Hypothalamus (Regulierung der Körpertemperatur), Nausea, emetische Effekte, Auswirkungen auf den Blutdruck und die periphere Durchblutung, Verminderung der Darmtätigkeit, des Immunsystems und gelegentlich zu Convulsionen [Goodman 2001].

Die Nachweisbarkeitsdauer im Urin beträgt bei Codein (Nachweisgrenze 200ng/ml) ca. 2-3 Tage, Dihydrocodein (Nachweisgrenze 200ng/ml) ca. 2-3 Tage, Morphin (Nachweisgrenze

200ng/ml) ca. 2-3 Tage, Heroin (Nachweisgrenze 200ng/ml) ca. 2-3 Tage. Die Nachweisbarkeitsdauer im Blut ist bei Codein, Dihydrocodein, Morphin, Heroin stark dosisabhängig und beträgt mehrere Stunden bis wenige Tage [Iten1994].

1.3.6. Kokain

Der Rohstoff für das Kokain sind Blätter des südamerikanischen Kokastrauches (Erythroxylon coca). Die Blätter enthalten ca. 1% Kokain. Die Kokapaste, die durch Zerkleinerung und Einweichung entsteht, wird zu Kokain-Hydrochlorid weiterverarbeitet. Für den Markt wird es meist mit Lidocain, Glucose, Maltose oder Laktose gestreckt. Kokain-Hydrochlorid stellt sowohl eine konsumierfähige Droge (geschnupft, i.v.), aber auch die Grundsubstanz der weiteren Verarbeitungsformen (Crack, Free Base) dar. Crack ist ein Gemisch von Kokainhydrochlorid einer anorganischen Base (z.B. Backpulver) und einem geringen Wasseranteil. Der chemische Prozeß, deren Resultat die Kokain-Base ist, wird durch Erhitzen eingeleitet. Dabei entsteht ein Knistern („to crack“). Crack wird getrocknet und ist somit konsumfähig (Rauchen). Eine andere Methode die Kokain-Base, die die wirksamste Form des Kokain darstellt, zu gewinnen ist die Aufschwemmung des Kokain-Hydrochlorids mit einer alkalischen Lösung mit anschließender Extraktion mit einem Lösungsmittel. Durch Trocknung entsteht somit die pulverförmige Kokain-Base. Die Kokain-Base ist chemisch weniger stabil und kann daher nicht so lange gelagert werden [Glaeske 1997, Caplan 1994]. Kokain((-)-Methyl-[3β-benzoyloxy-2β(1αH,5αH)-tropancarboxylat]) ist nach Anlage III zu § 1 Abs. 1 BtMG ein verkehrsfähiges und verschreibungsfähiges Betäubungsmittel. D-Kokain((-)-Methyl-[3β-benzoyloxy-2α (1αH,5αH)-tropancarboxylat]) ist nach Anlage II zu § 1 Abs. 1 BtMG ein verkehrsfähiges, aber nicht verschreibungsfähiges Betäubungsmittel.
Kokain hemmt die aktive Wiederaufnahme von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin in die präsynaptischen Nervenendigungen. Für die psychotrope Wirkung sind hauptsächlich dopaminerge Areale des Mittelhirns verantwortlich. Dort werden vor allem D2-Rezeptoren (positiver Effekt auf Verhalten und Bewegungsaktivität) beeinflusst. Gerade der zentral inhibierende Effekt des Dopamins sind für die die Symptome des euphorischen Stadiums verantwortlich. Kokain hemmt die Wiederaufnahme von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. Durch Bindung von Kokain an das Transportproteins des Dopamins, sinkt die Affinität der Bindungs- und Erkennungsstellen des Dopamins. Es resultiert eine erhöhte Konzentration an Dopamin im synaptischen Spalt und eine erhöhte inhibitorische Wirkung.

Es dominieren positive Empfindungen, Antriebssteigerung ohne Ermüdung, Mydriasis, Distanzlosigkeit, Mut, taktile oder optische Halluzinationen und gesteigertes Selbstwertgefühl. Dieses Stadium kann einige Minuten bis Stunden dauern. Diesem Stadium folgt das dysphorische Stadium mit Müdigkeit, Antriebsarmut, Depressionen, Erschöpfung und Reizbarkeit. Bei Crack ist die euphorische Phase intensiver und kürzer, ebenso ist aber die dysphorische Phase intensiver und länger.

Bei Überdosierung kann es zu Hypertonus, Angstgefühl, Atemnot, tonisch-klonische Krämpfe und Kreislaufversagen und Tod durch Atemdepression kommen. Gerade bei Langzeitgebrauch kommt es zu einer Toleranzentwicklung. Diese Toleranzentwicklung kommt durch eine abnehmende Empfindlichkeit der postsynaptischen Dopaminrezeptoren, verursacht durch eine Abnahme der postsynaptischen Dopaminrezeptoren. Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Konzentration von Dopamin-Transportproteinen [Soyka 1998, Julien 1997]. Durch Unterdrückung verschiedener „immidiate early gens“ (IEG), die für Areale des activated-Protein-1 (AP1) codieren, kommt es zu einer verminderten Gen-Expression in der AP1-Transkription. Der AP1-Komplex reguliert eine Vielzahl von Genen, die für neuronale Funktionen zuständig sind [Hope 1998].

Kokain erreicht gerade durch inhalative oder intravenöse Aufnahme kurzeitig hohe Konzentrationen. Es durchdringt rasch die Blut-Hirn-Schranke und erreicht im Gehirn höhere Konzentrationen als im Plasma. Darauf folgt eine rasche Umverteilung im Körper. Gerade bei chronischen Gebrauch kann es sich in fettreichen Körperkompartimenten anreichern. Kokain wird durch Hydrolyse im Körper schnell zu Benzoylecgonin (inaktiv), Methylecgonin (inaktiv) und wenig Ecgonin (aktiv) und Norkokain (aktiv) metabolisiert. Kokain und deren Metabolite werden renal eliminiert. Die Nachweisbarkeitsdauer im Harn beträgt für Kokain 6-12 Stunden bei chronischen Konsum bis zu 2 Wochen, für Benzoylecgonin 3 Tage, bei chronischen Konsum ebenso bis zu 2 Wochen. Die Nachweisbarkeitsdauer im Blut beträgt für Kokain 6 Stunden und für Benzoylecgonin mehrere Tage [Bratzke 1993, Iten 1994, Julien 1997].

1.3.7. Cannabinoide

Cannabisprodukte werden aus der Hanfpflanze Cannabis sativa L. hergestellt. Haschisch ist ein von der Hanfpflanze abgesondertes Harz. Marihuana, Marijuana sind luftgetrocknete

Blatt-, Blüten- und Stengelteile. Haschischöl ist ein dickflüssiges Cannabis-Konzentrat. Der durchschnittliche THC-Gehalt beträgt bei Haschisch ca. 2-10%, bei Marijuana 0,5-7% und bei Haschischöl 10-30% [Iten 1994]. Cannabisprodukte werden meist in Kombination mit Tabak geraucht, pur oder aber auch in Form von Plätzchen bzw. Tee. eingenommen. Cannabisharz (Haschisch), Cannabis (Marijuana) sowie Tetrahydrocannabiol sind nach Anlage I B zu § 1 Abs. 1 BtMG nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel. Δ-9-Tetrahydrocannabiol ist nach Anlage II zu § 1 Abs 1 BtMG ein verkehrsfähiges aber nicht verschreibungsfähiges Betäubungsmittel.

An der Zellmembran befindet sich eine pharmakologisch eigenständige Rezeptorklasse. Der natürliche Ligand Anandamin, der spezifisch an den B-1-Cannabinoidrezeptor bindet, wirkt hypothermisch, analgetisch und hat eine Wirkung auf das Verhalten. Durch die Bindung an die Rezeptoren wird das G-Protein an der Membraninnenseite aktiviert, was zu einer Hemmung der Andenylatcyclase und damit zu einer Unterdrückung der Transduktion führt. Die Rezeptoren für Cannabinoide finden sich vor allem in den Basalganglien der Hirnrinde und im Kleinhirn. Nach der Einnahme kann es zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Sinneswahrnehmungen (Geruch, Gehör und Tastempfinden), einer Erhöhung der Pulsfrequenz, einer durch Vasodilatation bedingte Rötung der Cornea, Esslust, Bewegungsunruhe, Mundtrockenheit, Euphorie, Entspannung aber auch Schwindel und Übelkeit kommen. Die Wirksamkeit hängt von der innerlichen Befindlichkeit und den äußeren Gegebenheiten ab. Gerade bei hohen Dosen kann es zu akustischen und optischen Halluzinationen und starken körperlichen Missempfindungen führen. Paranoide Psychosen können bei zuvor bestehender Disposition ausbrechen. Bei chronischen Konsum kann es zu einer Beeinträchtigung der intellektuellen Leistungsfähigkeit und verlangsamten Lern- und Gedächtnisvorgängen kommen. [Soyka 1998, Julien 1997, Glaeske 1997].

Gerade beim Rauchen von Cannabisprodukten kommt es zu einem raschen THC-Konzentrationsanstieg, dem ein rascher Abfall des THC-Blutspiegel folgt, der durch die Verteilung im Körper bedingt ist. In der zweiten Eliminationsphase folgt aufgrund der hohen Lipophilie der Cannabinoide eine Depotbildung im schwächer durchbluteten Fettgewebe. Die minimal psychoaktive Konzentration ist 4-8mg THC. Die wirksame Rauschdosis beträgt beim Rauchen etwa 15mg und etwa das dreifache bei oraler Einnahme [Poehlke 2000]. Die Dosismenge lässt sich bei oraler Menge besser steuern. Der Wirkungseintritt bei Rauchen ist rascher wie bei der oralen Einnahme. Die Dosierung bei der inhalativen Applikation liegen zwischen 5 – 40mg, bei der oralen zwischen 1 – 20mg pro Einzeldosis [Iten, 1994]. Die durchschnittliche Wirkdauer beträgt 5-6 Stunden [Kielholz et al., 1972]. Die wirksame

Substanz ist Δ-9-Tetrahydrocannabiol (THC). Weitere Bestandteile von Cannabisprodukten sind Cannabidol (CBD) und Cannabiol (CBN). Als Metabolite entstehen das aktive 11-Hydroxy-THC und daraus sehr schnell die inaktive Tetrahydrocannabiol- Carbonsäure (= Nor-9-carboxy-Δ-9-Terahydrocannabiol; THC-COOH). THC-COOH wird entweder als Glucuronid oder in freier Form renal eliminiert.

Die Eliminationshalbwertszeiten im Plasma beträgt vom THC ca. 14-38 Stunden [Baselt 1995] vom THC-COOH ca. 25-37 Stunden. Die Nachweisbarkeitsdauer im Harn beträgt bei einmaligen Konsum 24-36 Stunden, bei 4maligen Konsum pro Woche 5 Tage, bei täglichen Konsum 10 Tage und bei chronischen Konsum 20 Tage [Dackies et al. 1982] oder länger (90 Tage) [Lafolie et al. 1991]. Die Nachweisbarkeitsdauer im Blut beträgt beim THC 5-12 Stunden [Ohlsson et al. 1982, Bratzke 1993] beim THC-COOH mehrere Tage bis wenige Wochen [Daldrup 1985, Iten 1994].

1.4. Problematik bei der Gewinnung von Probenmaterial und praxisorientierter Einsatz der Drogenanalytik

Die Kontrolle über einen Beigebrauch von Drogen im Bereich von suchttherapeutischen Einrichtungen opiatabhängiger Patienten ist unerlässlich. Zum einem sollte die Selbstgefährdung des Patienten durch unkontrollierten Konsum von Drogen neben einem Substitut wie aber auch die Gefährdung des therapeutischen Zieles vermieden werden.

In Praxen in denen opiatabhängige Patienten substituiert werden, wie auch in Kliniken in denen eine Entzugstherapie durchgeführt wird, sieht man sich mit der Problematik konfrontiert, inwieweit die Angaben des Patienten oder auch die Ergebnisse der durchgeführten Drogentests glaubhaft sind. Da oftmals die Patienten von dem Erhalt der ihnen notwendig erscheinenden Opiatdosis getrieben werden oder lediglich ein juristischer Druck hinter dem Aufsuchen einer suchttherapeutischen Einrichtung steht, ist nicht bei allen der Ausstieg aus dem Drogenleben im Vordergrund. Täuschungsversuche sind daher an der Tagesordnung [Skopp G 1998]. Diese Täuschungsversuche gehen sogar soweit, dass Fremdurin, der käuflich erwerbbar ist, selbst in die Harnblase via Katheter eingeführt wird. Damit ist sogar die direkte Überwachung der Urinabgabe für eine Aussage über den Drogenkonsum in Zweifel zu ziehen. Eine Serumprobe bedarf als invasive Probenentnahme stets einer Zustimmung des Patienten und ist teilweise aufgrund des schlechten Gefäßstatus

eine aufwendige Angelegenheit. Auf der anderen Seite muss die Integrität des Patienten und auch der Wunsch des Patienten auf einen Weg ins drogenfreie Leben respektiert und gewahrt werden. Allzu leicht bezichtigt man aus der grundsätzlich misstrauischen Haltung einen Patienten zu unrecht. Dieser „Spagat“ stellt den Therapeuten oftmals vor eine, für den Patienten bedeutende, Entscheidung, ob die Therapie weitergeführt wird oder nicht. Daher ist es für den Therapeuten unerlässlich eine möglichst zuverlässige Vorgehensweise zu haben, um Drogenkonsum bzw. Täuschungsmanöver nachzuweisen.

Die übliche Vorgehensweise zum Nachweis von Drogenkonsum ist die Testung des Urins auf Drogen. Der Urin wird unter direkter Aufsicht oder mittels Videoüberwachung abgegeben. Der Nachweis wird mit immunchemischen Nachweisverfahren in der Praxis oder im Labor durchgeführt. Positive Testergebnisse werden in der Regel mittels GC-MS bestätigt. In der Praxis werden häufig Urinteststreifen eingesetzt, um schnell einen aussagekräftigen Befund zu erhalten. Zudem werden sie auch gerne aus ökonomischen Zwecken herangezogen, da sie das Praxisbudget weniger belasten. Da Speichel ein relativ täuschungssicheres Medium zum Drogennachweis ist, bietet es sich an den Drogennachweis damit durchzuführen, oder zweifelhafte Urinproben direkt gegenzu- prüfen. Die Rate der Täuschungsmanöver könnte somit reduziert werden, wobei die Therapie zielgerichteter verlaufen könnte und sich das Therapeut-Patienten-Verhältnis klarer strukturieren ließe.

2. Geräte und Reagenzien

Abb.2.1.: Übersicht über die Entnahmegefäße

2.1. Drogenschnelltests mittels Urinteststreifen

Die Teststreifen, die zum Einsatz kamen, stammten von der Firma DRG. Es handelt sich hierbei um Teststreifen, die den Qualitätsstandards von ISO 9001 und FDA entsprechen.
Gold Labelled Optical-read Rapid Immuno Assay (GLORIA) zum qualitativen Nachweis im Urin

QuickScreen™

- Amphetamine Test RAP-2834
- Barbiturates Test RAP-3005
- Benzodiazepines Test RAP-3004
- Cocaine Test RAP-2838
- Methadone Test RAP-3006

- Opiates Test RAP-2830
- THC Test RAP- 2841

2.2. Immunoassay

Cloned-Enzyme-Donor-Immuno-Assay (CEDIA) zum qualitativen Nachweis im Humanurin und –speichel:

CEDIA®DAU, Microgenics

- Barbiturate
- Amphetamine
- Benzodiazepine
- Kokain
- Methadon
- Opiate
- THC (nur Urin)

Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) zum qualitativen Nachweis im Humanspeichel:

EMIT II+Cannaboide, Dade Behring

- THC (nur Speichel)

Gerät: Hitachi 917

Abb.2.2.1: Hitachi 917

Die Testmethoden entsprechen Qualitätsstandarts von ISO 9001 und FDA.

2.3. Extraktion

2.3.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Toxitube A, DRG Instruments, Freiburg

Reagenzien:

Acetanhydrid , Pyridin, Methanol, (HPLC gradient grade), Ethylacetat (Lichrosolv), Stickstoff

Hilfsmittel:

Eppendorfpipetten (10 – 100 und 100 – 1000 µl, mit entsprechenden Spitzen), Autosamplergläser (2 ml) mit 150µl Einsätzen und Septen, 1,5 ml Reaktionsgefäße, Toxi-Tube-A, GC-Säule: DB5MS, 25m * 0.2mm ID, 0.33µm Film,

2.3.2. Solidphase extraction (SPE) - Festphasenextraktion

SPE: mixed Phase, Ansys

SPEC-3ML-C18AR/MP3

Reagenzien:

pH-Papier Acilit (pH 0-6), NaOH-Plätzchen, KOH-Plätzchen, Dichlormethan Lichrosolv Ethylacetat Lichrosolv, i-Propanol Lichrosolv, Methanol Lichrosolv, n-Hexan Lichrosolv, Bidest, Eisessig, Na-Acetat p.A., Ammoniak 32% p.a., Sylon BFT (Silylierungsreagenz)

Hilfsmittel:

SPEC-3ML-C18AR/MP3; DB-5MS 25m/0.2µm/0.33µm; Autosamplergefäße mit Microvials, Deckel und Septum; 1.5 ml Reaktionsgefäß (verschraubbar); 100 - 1000 µl und 10 - 100 µl Varipette; Multipette; Glaspipette 10ml graduiert; Peleusball

2.4. Kalibration

Standards, Firma Promochem

Lorazepam-d4, 7-Aminoflunitrazepam-d3, Morphin, Morphin-d_3, Codein, 6-Acetylmorphin, Cocain, Benzoylecgonin, Benzoylecgonin- d_3, Methylecgonin, Methadon, EDDP, THC-COOH, THC-COOH-d_3

2.5. Bestätigungsanalysen

GC/MS-Geräte, Firma Shimadzu

- GC/17A
- Auto-Injector AOC 17 + AOC 1400
- QP 5000
- Vakuumpumpe GDH 60

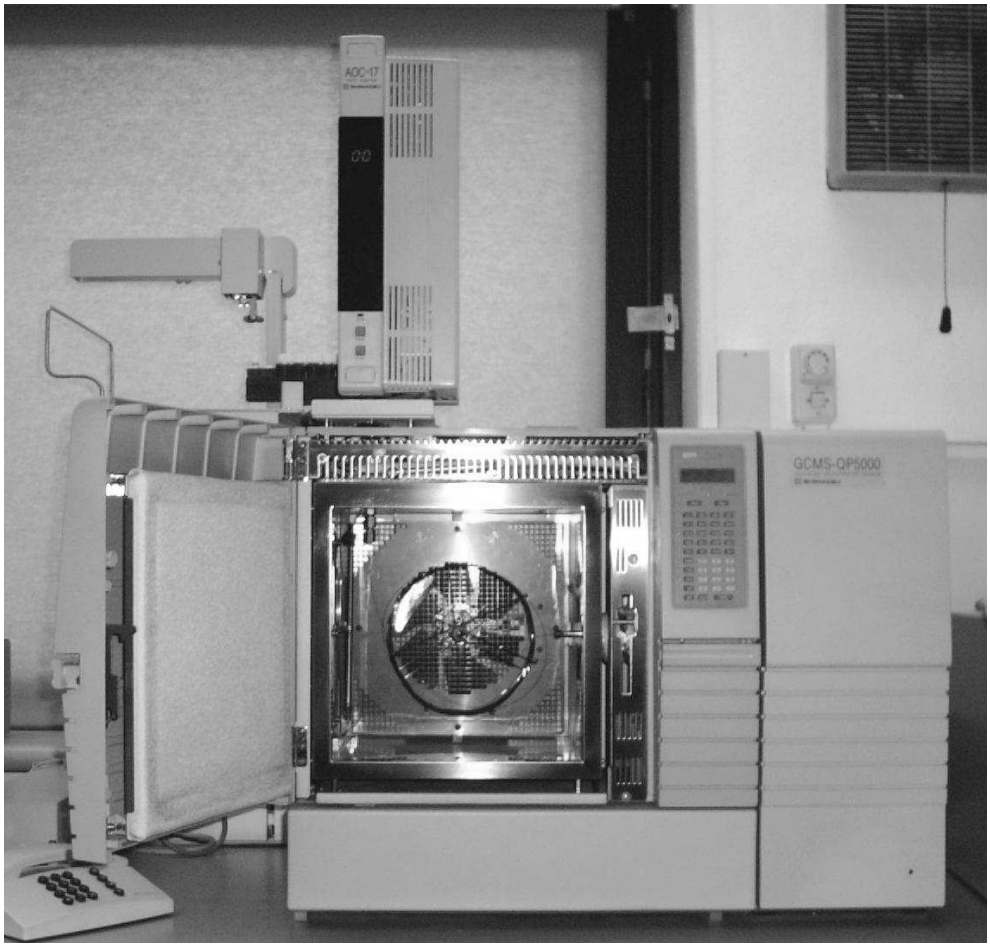


Abb.2.5.1: GC/MS-Gerät

sonstige Geräte:	Vortexer, Heizblock mit Spinne, Rollmischer, Zentrifuge, TurboVap LV Evaporator
Lösungsmittel:	Ethylacetat/Methanol (1:1)
Derivatisierungsreagenz:	Acetanhydrid/Pyridin (2:1) bei Benzodiazepinen Sylon BFT bei Opiaten, Methadon, Kokain, Cannabinoiden, PYAC bei Amphetaminen und Barbituraten
Standardlösungen:	Sigma, Lipomed, Promochem
Spektrenbibliothek:	PMW TOX3 Pfleger-Maurer-Weber

2.6. Speichelsammelgefäß

Salivette: Firma Sarstedt

Polyesterrolle in Zentrifugengefäß mit Einhängeeinsatz

3. Materialien und Nachweisverfahren

3.1. Drogennachweisverfahren

3.1.1. Drogenschnelltests mittels Urinteststreifen

Urinproben wurden in der Praxis sofort nach ihrer Gewinnung mittels Urinteststreifen auf Drogen analysiert. Bei den zu analysierenden Drogen handelte es sich um Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Methadon, Opiate, Kokain und Cannabis.
Grundlage hierfür ist die GLORIA- *Technologie (Gold Labelled Optical-read Rapid Immuno Assay)*. Die Teststreifen werden aus mehreren Vliesschichten aufgebaut, die auf einer Trägerfolie aufliegen und von einer Folie abgedeckt werden. Auf der Folie, die sich an der Oberseite befindet, ist eine Markierung angegeben, die anzeigt wie tief das Stäbchen eingetaucht werden soll. Ebenso befindet sich dort eine Bezeichnung der zu bestimmenden Testsubstanz. Das unterste Vlies dient als Speicher für die Testflüssigkeit für den darauf folgenden chromatographischen Prozess. Im darüber liegenden Vlies befinden sich die gold-markierten monoklonalen Antikörper. Diese Antikörper sind spezifisch für das jeweilige Analyt. Reagiert das Analyt mit den gold-gebundenen Antikörpern bilden sich bewegliche rot-gefärbte Komplexe. Im nächsten Vlies werden die nichtgebunden Antikörper von sich dort befindlichen Analyt-Analoga abgefangen. Die beweglichen Antigen-Antikörper-Komplexe durchwandern dieses Vlies und gelangen zur Detektionszone. Dort zeigt sich, je nach Konzentration der Testsubstanz, eine mehr oder weniger intensive Färbung in Form eines Streifens innerhalb dieses Testfeldes. Ein darüber liegender Streifen als Testfeld zeigt an, dass in dem Teststreifen gold-markierte Antikörper in ausreichender Form und Aktivität vorhanden waren, um ein Aussage über Testsubstanz machen zu können. Eine schwache oder fehlende Färbung dieser Zone zeigt an, dass dieser Teststreifen zuwenig aktive Antikörper besitzt. Das kann durch Produktionsfehler, Überschreiten der Haltbarkeit oder durch falsche Lagerung hervorgerufen werden. Dieses Vergleichsfarbfeld dient zugleich als etwaiger Richtwert für die Konzentration des Analyt, da ausgehend von dieser Färbung Rückschlüsse über die Konzentration gegeben werden können. Je höher die Annäherung

beider Farbintensitäten ist, desto höher ist die Konzentration der gemessenen Substanz. Je schwächer die Anfärbung, desto geringer ist die Konzentration des Analyts. Ein Fehlen der Anfärbung in der Detektionszone spricht für einen negativen Befund. Somit kann vorläufig eine semiquantitative Aussage gemacht werden [Schütz 1999].

3.1.2. Immunoassay

Speichel wie auch Urin wurden immunchemisch mittels Enzymimmunoassay (EIA) auf Drogen analysiert. Die Grundlage bei Immunoassays ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Drogenscreening fungieren bei immunchemischen Verfahren die Drogen als Antigen. Da es sich bei den Drogen um niedermolekulare Substanzen handelt, die selbst nicht zu einer Antikörperbildung führen, muß man sich bei der Herstellung der Antikörper großer Trägermoleküle (z.B. Bovine Serum Albumin, BSA) bedienen. Sind die Antikörper erst einmal gebildet, reagieren sie auch auf die niedermolekularen Substanzen, auf sogenannte Haptene. Zu den bestimmenden Drogen gehörten Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Methadon, Opiate, Kokain und Cannabis.
Urinproben wurden ohne vorhergehende Probenvorbereitungen analysiert.
Bei unserem Messverfahren handelte es sich bis auf den THC-Test (Dade-Behring) um ein homogenes Immunoassay nach dem CEDIA-Verfahren *(Cloned-Enzyme-Donor-Immuno-Assay)*. Bei diesem semiquantitativen Verfahren wird die rekombinante DNA-Technik verwandt. Das Enzym β-Galaktosidase wird gentechnologisch in zwei inaktive Fragmente gespalten. Werden beide Fragmente in einer Lösung zusammengebracht, rekombinieren beide Fragmente zu einem intakten Enzym. Das Fragment, das dieser Lösung hinzugegeben wird, fungiert als Enzymdonor, das in der Lösung befindliche Fragment als Enzymakzeptor. Freie Antigene konkurrieren mit dem an einen Enzymdonor gekoppelten Antigen um den Antikörper. Enzymdonor-Antigen-Komplexe, die eine Verbindung mit einem Antikörper eingehen, können nicht zu einem intakten Enzym rekombinieren. Dieses intakte Enzym spaltet ein Substrat, dessen Farbänderung spektral-photometrisch gemessen wird. Je höher die Konzentration an Antigen ist, das die Antikörper bindet, desto höher ist die Konzentration an freien Enzymdonor und damit an β-Galaktosidase. Daher korreliert die gebildete Menge an β-Galaktosidase mit den in der Probe befindlichen freien Antigenen (Drogen). Bei dem später eigesetzten Dade-Behring THC-Test handelt es sich um ein Immunoassay nach dem EMIT-Verfahren. Das EMIT (*Enzym Multiplied Immunoassay Technique*)-Verfahren ist ein homogenes Testverfahren. Das Enzym, das an das Antigen gebunden ist, verliert durch seine

Komplexbildung mit dem Antikörper nahezu seine Aktivität und kann damit nicht die Lichtabsorptionseigenschaft der Lösung verändern. Nur das freie Enzym-markierte Antigen katalysiert die Reaktion, die die Lichtabsorption der Lösung verändert. Die Farbänderung der Lösung ist daher proportional zur Konzentration des Antigens [Kaplan 1995].

3.1.3. Extraktion und Derivatisierung

Zur Festlegung des besten Testverfahrens wurden von einer Messflüssigkeit, die zuvor mit den oben angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen versetzt wurde, verschiedene Proben angefertigt. Es wurde eine Nativprobe, eine Probe mit Flüssig/Flüssigextraktion (Toxitube A) und eine Probe mit Festphasenextraktion (SPE) getestet. Wie auch anderen Autoren [Santos Lucas, dos 2000] schien uns die SPE die bessere Extraktionsmethode zu sein und wurde später verwandt. Die Substanzanalyse wurde mittels CEDIA durchgeführt.
Die Flüssig/Flüssigextraktion mit der Toxitube A der Firma DRG Instruments ist eine Zweiphasenextraktion mit zusätzlichem Aussalzungseffekt.
Das Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion ist, dass die Matrix von störenden Elementen gereinigt und anschließend konzentriert wird. Zur Probenaufarbeitung mittels **Toxi Tube A** wurde 3 ml Urin (hydrolysiert) bzw. 1ml Speichel in ein Toxi Tube A gefüllt, 50 µl Interner Standard zugegeben und 5 min auf dem Rollmischer gemischt. Die Probe wurde für 1 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Danach wurde die organische Phase in ein Reaktionsgefäß übergeführt und mit Stickstoff bei 55°C abgedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl Derivatisierungsmischung (Acetanhydrid/Pyridin im Verhältnis 2:1) aufgenommen und gevortextet. Für 5 min wurde die Lösung bei 600 W in der Mikrowelle derivatisiert. Überschüssiges Reagenz wurde mit Stickstoff bei 55°C vertrieben (Evaporator). Der Rückstand wurde dann in 75 µl Methanol/Ethylacetat (1:1) aufgenommen, die Lösung in ein Autosamplergefäß gegeben und dieses in den Autosampler gestellt. Anschließend wurde 1µl in die GC/MS injiziert.

Bei der **SPE** der Firma DRG Instruments handelt es sich um eine mixed Phase Festphasenextraktion. Das Prinzip der Flüssig-Festphasenextraktion ist eine gleichzeitige

Reinigung von Störsubstanzen und Aufkonzentrierung der Analyten. In einem Filter wird der Analyt gebunden, danach wird der Filter gewaschen und getrocknet. Durch ein spezielles Lösungsgemisch wird der Analyt aus dem Filter herausgewaschen und anschließen eingedampft um das Lösungsmittel wieder zu eliminieren. Es liegt nun ein fester Rückstand vor, der relativ frei von störenden Substanzen ist, wie sie im Ausgangssubstrat (Urin, Speichel) vorhanden sind.

Abb. 3.1.3.1: SPE –Festphasenextraktion

Probenaufarbeitung	**Ansetzen der Gebrauchslösungen**
1M Essigsäure,Stammlösung*	60ml Eisessig + 940ml Aqua bidest
0.1M Essigsäure*	100ml 1M Essigsäure + 900ml Aqua bidest
Methanol/Bidest 4/6*	400ml Methanol + 600ml Aqua bidest
Acetat-Puffer pH 4.8	500ml Aqua bidest + 232g Na-Acetat + 124ml Essigsäure ad 1000ml mit Aqua bidest => pH 4.8
Pufferlösung für OP CO THC	75 ml Acetatpuffer pH 4.8 + 150 ml Aqua bidest
konzentrierte KOH-Lösung	33.1g + 50ml Aqua bidest
verdünnte Essigsäure	50ml Eisessig + 50ml Aqua bidest
Elutionslösung 1 – für Cocain und Metabolite*	800ml Ethylacetat + 200ml Methanol – auf 5ml Elutionslösung wird unmittelbar vor der Extraktion 100µl 32%ige Ammoniaklösung zugegeben.
Elutionslösung 2 - für Opiate*	800ml Dichlormethan + 200ml i-Propanol – auf 5ml Elutionslösung wird unmittelbar vor der Extraktion 100µl 32%ige Ammoniaklösung zugegeben.
Elutionslösung 3 – THC-COOH*	250ml Ethylacetat + 750ml n-Hexan
Elutionslösung 3 – Ampehtamine ?	
Elutionslösung 3 – Barbiturate ?	
Elutionslösung 3 – Methadon ?	
Elutionslösung 3 – Benzo ?	
Waschlösung	3ml 32% Ammoniaklösung auf 50ml MeOH

* -wird geschlossen im Labor bei RT aufbewahrt

Konditionierung der Kartusche

Der SPEC-3ML-C18AR/MP3 wurde auf den Extraktionsblock gesetzt. Danach wurde 0.5 ml Methanol aufgegeben und abgesaugt. Anschließend wurde 0.5 ml 0.1M Essigsäure aufgegeben und abgesaugt.

Probenaufgabe und Waschen der Kartusche

Die vorbereitete Probe wurde aufgegeben und langsam durch die Kartusche laufen gelassen. Daraufhin wurde 1ml 0.1M Essigsäure aufgegeben und abgesaugt. Anschließend wurde 0.5ml Methanol/ Aqua bidest (4:6) aufgegeben und abgesaugt Zum Schluss wurde 5 min trockengesaugt.

Elution und Derivatisierung

1,5 ml Reaktionsgefäße wurden in den Extraktionsblock gegeben. 0.3ml Elutionslösung Cocain (auf 5ml + 100µl NH_3) wurden langsam ohne Unterdruck im Extraktionsblock durchlaufen gelassen und danach kurz abgesaugt. Ebenso wurde mit Opiaten, Barbituraten, Methadon, Amphetaminen, Benzodiazepinen und THC-COOH verfahren. Das Eluat im Evaporator wurde unter Stickstoff mit einem Druck von 0.3 bar bei 65°C in 15 min zum Trocknen eingedampft. Zur Derivatisierung wurde in 75µl Sylon BFT aufgenommen. Danach wurde 5 min bei ca. 600W in der Mikrowelle inkubiert. Die Lösung wurde anschließend in die Autosamplergefäße überführt und 1 µl in die GC/MS injiziert. Die aufgearbeiteten Proben müssen zügig gemessen werden, um Fehler durch Zersetzung der Trimethylsilanderivate zu vermeiden

3.1.4. Kalibration

Vor dem eigentlichen Sammeln und Messen der Proben wurde ein Vorversuch gestartet. Zweck und Ziel dieses Vorversuches war es herauszufinden, inwieweit bei den Testsubstanzen sich reproduzierbar und verlässlichst messen ließen. Zudem sollte die Methode zum Einsatz kommen, die für diese Testreihe am geeignetesten erschien.

Zuerst wurde drogenfreier Speichel, der direkt in die Teströhrchen abgegeben wurde, mit der jeweiligen Testsubstanz versetzt. Der Speichel stammte von 20 verschiedenen Mitarbeitern des Labors und der Praxis, an der die Studie durchgeführt wurde. Zu 400µl Speichel wurde 1000µg/ml der Testsubstanzen (Barbiturate, Benzodiazepine, Amphetamine, Kokain, Opiate, Methadon) zugesetzt. Bei der THC-Testsubstanz wurde 400µl Speichel 100µg/ml Testsubstanz zugesetzt. Parallel dazu wurde THC neben dem Microgenics-Test mit dem Dade Behring THC-Test gemessen.

Die Proben wurden in drei Schritten jeweils um den Faktor 10 (100µg/ml, 10µg/ml und1µg/ml, bzw. 10µg/ml, 1µg/ml und 0,1µg/ml bei THC) verdünnt. Als Gegenprobe wurde bei gleicher Konzentration der Testproben der Speichel mit einer neutralen Testsubstanz (PBS) ersetzt, um Reaktionen von Bestandteilen des Speichels auf das Messergebnis zu detektieren. PBS ruft weniger Störgeräusche als Speichel hervor. PBS wie auch Speichel wurde auf die Salivette zur Probenentnahme in selbiger Abfolge gemessen, um auch hier abweichende Reaktionen durch die Salivette auf die Messergebnisse zu erkennen. Die Gesamtmenge der Messflüssigkeit in den einzelnen Proben betrug jeweils 0,4ml.

Die oben genannte Versuchsreihe wurde nach drei Tagen mit den Proben, die diese Zeit bei Raumtemperatur gelagert wurden, erneut durchgeführt. Hierbei sollte getestet werden, ob die Proben bei einer Lagerungsdauer, die im normalen Praxisalltag vorkommen kann, stabil bleiben.

Zur Festlegung der Obergrenze des Grundrauschens wurden Nullproben (Speichel ohne Zusatz der Testsubstanz) verwandt. Die Auswertung der Nullproben wurde nativ, ohne Filtration der Testflüssigkeit, vorgenommen. Zur Rauschunterdrückung wurden die Proben am Folgetag mit einer Puffersubstanz (“Intercept TM-Dräger oral Specime Collection Device“) versetzt, die auch bei handelsüblichen Teströhrchen für Speichelproben eingesetzt wird.

Zudem wurden 5 Proben entnommen, die mit dem Testergebnis, die mittels Teststreifen von Urinproben verglichen wurden. Dabei handelte es sich um 3 Proben der Praxismitarbeiter und 2 Proben von substituierten Patienten.

3.1.5. Bestätigungsanalysen

Als Bestätigungsanalyse wurde die GC/MS (Gaschromatographie/Massenspektrometrie) bevorzugt. Das Grundprinzip der GC/MS ist das Trennen von Substanzen in der Galphase

(mobile Phase), bei dem es in einer stationären Phase zu einer unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit der gelösten Substanzen in der Lösung kommt. Bei der GC/MS ist die stationäre Phase eine Flüssigkeit, die erhitzbar ist und die nicht mit den Substanzen reagiert. Sie kleidet die Säule aus, in die die Substanzen dann eingegeben werden. Die mobile Phase ist ein Inertgas, welches die verdampften Substanzen zum Detektor in der Säule befördert. Die Wandergeschwindigkeit der Substanzen hängt zum einen von dem Siedepunkt, zum anderen von der Löslichkeit ab. Bei der Eingabe wird die Substanz durch die rasche Erhitzung verdampft und in der mobilen Phase weitergetragen. Die Temperatur wird während der ganzen Prozedur konstant gehalten. Im Detektor werden die Substanzen erfasst. Wird eine Substanz erfasst wird diese graphisch als „peak“ dargestellt. Die horizontale x-Achse ist für das Molekulargewicht der Substanz, die vertikale y-Achse ist für das Auslössignal, die Abundance, vorgesehen. Für jede Substanz ist ein spezifisches Molekulargewicht typisch. Die Stärke des Auslösesignals zeigt die Quantität der Substanz an. Die Gaschromatographie wird durch die Ergänzung der Massenspektometrie verbessert. Die Lösung aus der Säule gelangt in eine Vakuumkammer und wird dort mit Elektronen bombardiert. Durch Abspaltung eines Elektrons aus der nachzuweisenden Substanz wird diese positiv ionisiert und zerfällt schnell in eine Ansammlung von positiv geladenen Tochterionen mit geringerer Masse. Diese geladenen Partikel passieren ein elektrisches und/oder ein magnetisches Feld. Dort werden sie je nach Molekulargewicht ausgelesen. Sie stossen auf einen Sekundärelektronenvervielfacher und werden somit gezählt. Die x-Achse zeigt die Massenzahl der Bruchstücke an, das für die jeweilige Substanz spezifisch ist. Die y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen geladenen Partikel an. Somit kann sowohl die Substanz identifiziert werden, indem man das die Messwerte der x-Achse mit entsprechenden Bibliotheken vergleicht, als auch die Menge der Substanz, die sich in der Fläche der graphisch dargestellten Zacke ausdrückt [Kaplan 1995].

3.2. Probenentnahme

3.2.1. Materialien

Die Urinabgabe erfolgte in praxisübliche Plastiktrinkbecher. Die Urinversandröhrchen entsprechen den handelsüblichen Versandröhrchen für Urin zum Drogennachweis.
Zur Speichelaasservierung wurden Salivetten der Firma Sarstedt benützt. Es handelte sich um ein Polyesterröllchen. Das Polyesterröllchen befand sich in Zentrifugengefäß mit Einhängeeinsatz. Nach der Zentrifugation entfernt man den Einhängeeinsatz samt Salivette

und gelangt so leicht an den zu testenden Speichel. Die Speichelmenge scheint mit Watteröllchen zwar höher zu liegen als mit den Polyesterröllchen [Speckl 2000], jedoch scheinen die Polyesterröllchen anwendungsfreundlicher zu sein. Das subjektive Empfinden mit den Polyesterröllchen mehr Speichel abgegeben zu haben wurde positiv aufgenommen. Bei den Watteröllchen benötigt man lange Kauzeiten, um ein „nasses“ Watteröllchen zu haben. Wenn das Watteröllchen noch nicht richtig durchfeuchtet ist, hat man kein Anhalt über die Menge des Speichels. Bei den Polyesterröllchen hingegen hat man sehr schnell das Empfinden „Speichel abgegeben zu haben“. Die Polyesterröllchen durchfeuchten relativ schnell. Das Speichelmaß ist subjektiv leichter nachzuempfinden, was die Compliance erhöht, da man „schneller“ zum Erfolg kommt und man bezüglich der Kaudauer die Testperson besser anleiten kann.

3.2.2. Durchführung

Alle Testmaterialien wurden vor der Methadonvergabe in der Medizinischen Ambulanz, Oldenburg, gesammelt. Die Probenentnahme von Urin erfolgte in der Medizinischen Ambulanz einer Drogenberatungsstelle. Die Urinabgabe erfolgt nach Aufforderung des Patienten in der dortigen Toilette in einen Plastikbecher. Um Täuschungsmanöver sowie Vertauschen der Urinproben zu vermeiden wird der Raum Video-überwacht. Die Urinabgabe erfolgt mit Blickrichtung zur Video-Kamera, um die Abgabe des Urin direkt mitzuverfolgen. Taschen wie auch Jacken, müssen vor dem Betreten der Toilette abgegeben. Nach Abgabe der Urinprobe wurde sofort ein Drogenscreening auf die zu untersuchenden Substanzen mittels Urinteststreifen durchgeführt. Nach Durchführung dieses Test wurde der Urin in ein Urinversandröhrchen abgefüllt.

Zur Speichelentnahme wurden die Patienten aufgefordert, vor Einnahme des Substitutes die Salivette gut durchzukauen. Die Salivette wurde direkt aus dem Versandröhrchen in den Mund eingeführt. Es wurden immer zwei Salivetten verwandt um auf eine ausreichende Speichelmenge zu kommen. Die durchweichten Salivette wurden direkt aus den Mund in das Zentrifugengefäß gegeben. Danach wurde das Zentrifugengefäß verschlossen.

Plastikbecher, Urinversandgefäß und Zentrifugengefäße der Speichelprobe wurden umgehend nach Erhalt der Testsubstanz mit einem praxisinternen ID-Code beschriftet und versandfertig gemacht. Ein ID-Code wurde für alle Verfahren eines Testdurchlaufes mit Urin (Immunoassay/GCMS, Teststreifen) und Speichelprobe verwandt. Somit konnten die einzelnen Methoden untereinander verglichen werden. Die Proben wurden dann an das Labor

gesandt. Zur Gewinnung des Speichel aus den Salivette wurde dort die Zentrifugengefäße zentrifugiert. Der Speichel konnte dann im immunchemischen Verfahren analysiert werden.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

Es handelte sich bei den Probanden um opiatabhängige Patienten einer Substitutionspraxis im Alter von 24 bis 56 Jahren. Es waren insgesamt 31 Freiwillige, davon 5 weibliche und 26 männliche Probanden.

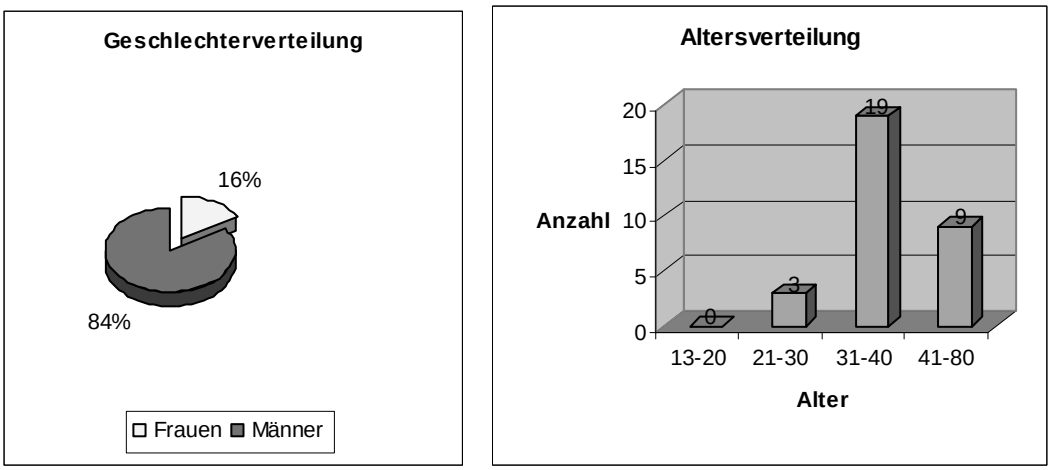


Abb.4.1.1: Geschlechter- und Altersverteilung des Patientenkollektives

Bei diesen Probanden, handelte es sich um ein sehr gemischtes Kollektiv bezüglich ihrer Vorgeschichte. Die Drogenabhängigkeit, zum Großteil polytoxikoman, variierte von 2 bis über 25 Jahre. Bei den meisten Patienten bestand schon eine lange Vorgeschichte in der Drogenabhängigkeit, oftmals verbunden mit verschiedenartiger Therapieerfahrung, mehrfachen Entzügen, Gefängniserfahrung und schwersten Lebenskrisen. Der Zeitpunkt der Aufnahme in das Substitutionsprogramm war entweder nach Rückfälligkeit einer abstinenten Phase, nach Übernahme aus einer anderen Praxis bzw. Therapieeinrichtung, im Anschluss einer Haft oder wie am häufigsten direkt aus dem Drogenalltag heraus. Teilweise wurden Patienten zur ambulanten Entgiftung oder auch zur Überbrückung für eine spätere

Entzugstherapie aufgenommen. Auch bezüglich der Dauer der Substitution im Zeitraum der Studie gab es große Unterschiede. Einige Probanden befanden sich das erste Mal in einem Substitutionsprogramm, andere wiederum wurden schon sehr lange substituiert. Als Substitut wurde Methadon, Polamidon und Buprenorphin eingesetzt. In der Studie wurden ein Proband mit Polamidon, drei Probanden mit Buprenorphin und der Rest mit Methadon substituiert.

3.3. Verfahren

3.3.1. Einführung

Die Ergebnisse wurden im Microsoft Excel Format erstellt. Die Auswertung der Resultate wurde in verschieden Kategorien unterteilt:

- **TP**: true positive / richtig positiv: Übereinstimmung des positiven Testergebnis mit dem positiven CEDIA – Urintest (durch GC/MS bestätigt)
- **TN**: true negative / richtig negativ: Übereinstimmung des negativen Testergebnis mit dem negativen CEDIA – Urintest
- **FP**: false positiv / falsch positiv: keine Übereinstimmung des positiven Testergebnis mit dem negativen CEDIA – Urintest
- **FN**: false negative /falsch negativ: keine Übereinstimmung des negativen Testergebnis mit dem positiven CEDIA – Urintest (durch GC/MS bestätigt)

Aus diesen Kategorien wurden folgende Eigenschaften ausgearbeitet:

- **Sensitivität** = TP/(TP+FN); richtig Positive von allen Positiven in Prozent
- **Spezifität** = TN/(TN+FP); richtig Negative von allen Negativen in Prozent
- **Positive prädiktive Wert (PPV = positiv predictive value)** = TP/(TP+FP); Prozent der richtig Positiven von allen positiven Testergebnissen
- **Negative prädiktive Wert (NPV = negativ predictive value)** = TN/(TN+FN); Prozent der richtig Negativen von allen negativen Testergebnissen
- **Genauigkeit (Accuracy)** = (TP+TN)/Anzahl aller Resultate; Prozentanzahl aller richtigen Resultate

Die Voraussetzung für die Einsetzbarkeit einer Testmethode wurde angelehnt an die Mandatory Guidelines for Federal Drug Testing Programs (SAMHSA, www.samhsa). Dies

beinhaltet keine falsch positiven Ergebnisse, 80% der gesamten Testdurchläufe dürfen nicht mehr als 20% von der durchschnittlichen Referenzgruppe abweichen, kein Testwert darf 50% von der errechneten durchschnittlichen Referenzgruppe abweichen, mindestens 50% innerhalb einer einzelnen Testklasse muss bestimmt werden können und eine Testgenauigkeit von 90%. Methoden, die diese Kriterien erfüllen sind als Screeningmethoden einsetzbar, sollten allerdings mittels GC/MS bestätigt werden. Ergebnisse, die darunter liegen in, sind in Ausnahmefällen ausreichend und können als vorläufiges grobes Screening hergenommen werden, müssen mit Urinproben mittels GC/MS oder gegebenenfalls mittels GC/MS im Speichel verifiziert werden. Wie andere Autoren beschreiben, ist der Drogennachweis im Speichel mittels GC/MS auch eine gangbare Methode [Speckl 1999, Niedbala 2001, Samyn 1999].

Als Referenzergebnis wurden die Ergebnisse aus dem CEDIA-Urintest hergenommen, die bei positiven Ergebnis fast ausschließlich mit der GC-MS, bei Bedarf auch mit HPLC und Dünnschichtchromatographie, bestätigt worden sind. Diese Vorgehensweise ist relativ zuverlässig und kosteneffizient und wird deswegen vielerorts in der Praxis verwandt. Eine ausschließliche Testung mit GC-MS ist zeitaufwendig und kostenintensiv und daher meist nur in Krankenhäusern praktikabel. Da bei Immunoassays falsch negative Ergebnisse äußerst selten sind, jedoch gelegentlich falsch positive Ergebnisse auftreten [Schütz 1999], wurden alle positive nicht aber die negativen Ergebnisse gegengeprüft. Als Resultat, das als Referenzergebnis angesehen werden kann, der insgesamt 103 Proben, bei denen eine Urinprobe mit einer Bestätigungsanalyse gegengeprüft wurde, kam es bei den folgenden Analyten zu folgendem Ergebnis:

	A	Ba	Be	K	M	O	T
Positiv	0	0	30	5	91	33	67
Negativ	103	103	73	98	12	70	35

Tab. 4.2.1.1.: Verteilung der positiven und negativen Referenzergebnisse; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide

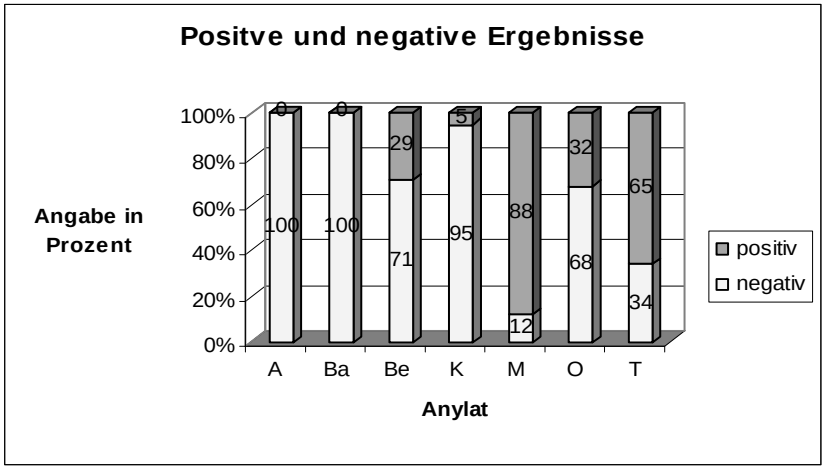


Abb. 4.2.1.1.: Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide

Die Gesamtzahl der getesteten Durchläufe betrug 108. Bei einigen wurden jedoch nur einer der Matrices gewonnen, Speichel bzw. Urin, oder es war bei den Urinproben zu wenig Material für eine weitere Untersuchung mittels CEDIA und/oder Bestätigungsanalysen vorhanden. Alle gesammelten Daten wurden in die Bewertung miteinbezogen. Die fehlenden korrespondierenden Proben wurden in der Gesamtbewertung berücksichtigt.

Über die Aussagekraft bei Amphetaminen und Barbituraten kann bei allen Testreihen nur bedingt eine Aussage gemacht werden, da mit Ausnahme einer falsch Positiven bei den Urin-Sticks keine positive Ergebnisse vorlagen. Über die Sensitivität kann daher keine Aussage gemacht werden. Einzig und allein kann gesagt werden, dass die Testreihen sehr spezifisch für die Amphetamine und Barbiturate sind, da keine falsch positiven Ergebnisse aufgetreten sind. Der prädiktive Wert für die negativen Ergebnisse ist daher sehr hoch.

3.3.2. Drogenschnelltests mittels Unrinteststreifen

U-Stix

	A	Ba	Be	K	M	O	T
GESAMT	108	108	108	108	108	108	108
n=	104	104	104	104	104	104	104
FEHLT	4	4	4	4	4	4	4
z.w.M	0	0	0	0	0	0	0
TP	0	0	27	3	90	28	62
TN	103	104	68	98	12	67	36
FP	1	0	5	1	1	4	1
FN	0	0	4	2	1	5	5
Sensitivity	**-**	**-**	**88%**	**60%**	**99%**	**85%**	**93%**
Specifity	**99%**	**100%**	**93%**	**99%**	**92%**	**93%**	**97%**
PPV	**-**	**-**	**84%**	**75%**	**99%**	**87%**	**98%**
NPV	**100%**	**100%**	**94%**	**98%**	**92%**	**93%**	**88%**
Accuracy	**99%**	**100%**	**91%**	**97%**	**98%**	**91%**	**94%**

Abb. 4.2.1.-1: Ergebnisse – Urinstreifen; TP=True Positive, TN=True Negative, FP=False Positive, FN=False Negative; PPV=Positive Predictive Value, NPV=Negative Predective Value; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide, z.w.M.= zu wenig Material

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Testverfahren mit guter Spezifität. Bei Benzodiazepinen, Opiaten und gerade Kokain treten Erfassungslücken der positiven Ergebnisse auf. Die Sensitivität lag hierbei bei den Benzodiazepinen bei 88%, bei den Opiaten 83% und bei Kokain nur bei 60%. Die Aussagekraft über die positiven Ergebnisse ist gerade bei Kokain daher eingeschränkt, was durch die positive prädiktiven Wert von Benzodiazepinen 84%, Kokain 75% und Opiaten 87% unterstrichen wird. Die Sensitivität bei Methadon mit 99% und Cannabinoiden mit 93% war gut. Bei den Cannabinoiden kam es durch die falsch negativen Ergebnissen zu einem relativ geringen negativen prädiktiven Wert, was die Aussagekraft der negativen Ergebnisse schmälert. Bei allen anderen zeigte sich eine gute negative prädiktiven Wert. Bezüglich der Genauigkeit dieser Testmethode ist aber allen Analyten ein gutes Ergebnis erzielt worden.

Diese Methode kann sehr wohl zum groben Drogenscreening herangezogen werden. Als alleinige Methode ist sie wegen der möglichen falsch negativen und positiven Ergebnisse nicht zu verwenden, sondern bedarf einer Bestätigungsanalyse wie der GC/MS bzw.

Dünnschichtchromatographie. Gerade zweifelhafte negative Befunde müssen mittel einer Bestätigungsanalyse gegengeprüft werden.

3.3.3. Immunoassay

3.3.3.1. Speichel

Speichel							
	A	**Ba**	**Be**	**K**	**M**	**O**	**T**
GESAMT	108	108	108	108	108	108	108
n=	96	96	96	96	96	96	96
FEHLT	5	5	5	5	5	5	5
z.w.M	7	7	7	7	7	7	7
TP	0	0	20	2	86	23	28
TN	96	96	31	91	9	59	24
FP	0	0	35	0	1	6	15
FN	0	0	10	3	0	8	29
Sensitivity	**-**	**-**	**67%**	**40%**	**100%**	**74%**	**49%**
Specifity	**100%**	**100%**	**47%**	**100%**	**90%**	**91%**	**62%**
PPV	**-**	**-**	**36%**	**100%**	**99%**	**88%**	**65%**
NPV	**100%**	**100%**	**76%**	**97%**	**100%**	**79%**	**54%**
Accuracy	**100%**	**100%**	**53%**	**97%**	**99%**	**85%**	**65%**

Abb. 4.2.2.-1: Ergebnisse – Speichel; TP=True Positive, TN=True Negative, FP=False Positive, FN=False Negative; PPV=Positive Predictive Value, NPV=Negative Predective Value; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide, z.w.M.=zu wenig Material

Die oben angegebenen Ergebnisse der Positiven und Negativen ergeben sich aus einem selbst festgelegten Cut-off Wert (siehe Kap. 4.4. Kalibration).

Bei 7 Proben war zur Bestimmung zu wenig Material gewonnen worden. Bei 5 Urinproben lagen keine Speichelproben vor. Generell kann gesagt werden, dass sich diese Testmethode bei allen Matrices, bis auf Methadon, eine geringe Sensitivität besitzt. Die Ergebnisse bei **Benzodiazepinen** und **Cannabinoiden** war bezüglich der Spezifität (47% und 62%), der Sensitivität (67% und 49%) und der Genauigkeit (53% und 65%) der Testmethode unbefriedigend. Bis auf die geringe Sensitivität (40%) zeigte die Testung auf **Kokain** gute Resultate. Neben der unbefriedigenden Sensitivität (74%), bei guter Spezifität (91%), ist die Genauigkeit (85%) der Testmethode bei **Opiaten** befriedigend. Die Testmethode bei **Methadon** zeigt bezüglich der Spezifität (90%), der Sensitivität (100%) und der Genauigkeit (99%) gute Ergebnisse.

Die Aussagekraft bezüglich der positiven Ergebnisse (PPV) ist bei den **Benzodiazepinen** (36%) und bei den **Cannabinoiden** (65%) sehr gering. Der positive prädiktive Wert ist bei **Kokain** (100%), **Methadon** (99%) gut mit guter Aussagekraft über die positiven Ergebnissen und **Opiaten** (88%) befriedigend mit eingeschränkter Aussagekraft über die positiven Ergebnisse. Der negative prädiktive Wert bei den **Cannabinoiden** (54%) lässt keine Aussage über die negativen Ergebnisse zu. Der negative prediktive Wert von **Benzodiazepinen** (76%) und **Opiaten** (79%) schmälert die Aussagekraft über negative Ergebnisse drastisch. Bei den **Amphetaminen** (100%), den **Barbituraten** (100%), **Kokain** (97%) und **Methadon** (100%) liegt ein guter negativer prädiktiver Wert vor.

Bei der näheren Betrachtung der Ergebnisse der **Benzodiazepinen** ließ sich keine Korrelation bezüglich der Konzentration [ng/mg Creatinin] des Urins und den Ergebnissen bzw. Messdaten im Speichel feststellen (siehe Anhang Tab.: 8.1.). Da es bei vermehrter Diurese zu einem Verdünnungseffekt kommen kann, ist dieser Quotient ein üblicher Parameter für die etwaige Konzentration. Bei Kreatininwerten unter 4 mmol/L sollten negative Ergebnisse als ungültig betrachtet werden [Lafolie 1993]. Ebenso gab es keinen Zusammenhang zwischen den Einzelstoffen und dem Ergebnis. Jedoch ließ sich eine Häufung in der Verteilung der Ergebnisse bei den einzelnen Probanden erkennen (siehe Anhang Tab.: 8.1.). Auch bei den Ergebnissen der **Cannabinoide** konnte keine Korrelation bezüglich der Konzentrationen [ng/mg Creatinin] des Urins und der Ergebnisse bzw. Messdaten im Speichel festgestellt werden. Auch hier ließ sich eine gewisse Häufung in der Verteilung der Ergebnisse bei den einzelnen Probanden erkennen (siehe Anhang Tab.: 8.2. und Tab.: 8.6.). Bei **Kokain** waren von 5 positiven Testergebnissen 3 falsch negativ und 2 richtig positiv (siehe Anhang 8.3.). Bei den beiden Positiven handelte es sich um einen kombinierten Missbrauch mit Heroin (sog. „Coctail“) mit 6-Monoacetylmorphin-Nachweis, was auf einen frischen Missbrauch hindeutet. Bei den restlichen drei falsch Negativen war die Konzentration im Urin nur schwach positiv nachweisbar, was bedeutet, dass der Missbrauch vermutlich länger zurück liegt und der Zeitraum zwischen Drogenkonsum und Nachweis zu groß war. Bei **Heroin** waren alle positiven Ergebnisse, bei denen 6-Monoacetylmorphin (n = 8) nachgewiesen wurde, richtig positiv. War bei dem Ergebnis ausschließlich Codein bzw. Dihydrocodein (n = 12) in Kombination mit Morphin nachweisbar, überwogen im Verhältnis 8:4 die richtig Positiven gegenüber den falsch Negativen. Die richtig Positiven überwogen vor allem in den Proben, bei dem in Urin höhere Konzentrationen vorhanden waren. Bei den Ergebnissen mit ausschließlich Morphin (n = 11) war nur zwei Ergebnisse positiv. Bei einem war die

Konzentration des Urins unbekannt und bei dem anderen lag sie mit 183ng/mg Creatinin relativ hoch (siehe Anhang 8.4.).

Gesamt gesehen ist diese Testmethode als alleiniges verlässliches Nachweisverfahren im drogentherapeutischen Bereich nicht geeignet. Es kann jedoch ergänzend eingesetzt werden, vor allem wenn Verdacht auf Manipulation bei einem aktuellen Drogenmissbrauch besteht. Ähnlich wie beim Blut kommt es nach dem Drogenkonsum zu einem schnellen Abfall der Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Die höhere Empfindlichkeit der GC/MS – Methode im Drogenscreening mit Speichel als Matrix hingegen gestattet, bedingt durch eine längere Nachweisdauer und höhere Testgenauigkeit, eine etwas breitere Einsatzfähigkeit gegenüber den Immunoassays.

3.3.3.2. Urin

Urin-CEDIA

	A	B	B	K	M	O	T
GESAMT	108	108	108	108	108	108	108
FEHLT	5	5	5	5	5	5	5
z.w.M	0	0	0	0	0	0	0
TP	0	0	30	5	91	33	67
TN	103	103	73	98	12	70	35
FP	0	0	0	0	0	0	1
FN	0	0	0	0	0	0	0
Sensitivity	**-**	**-**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**
Specifity	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**97%**
PPV	**-**	**-**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**99%**
NPV	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**
Accuracy	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**99%**

Abb. 4.2.2.-2: Ergebnisse – Urin-CEDIA; TP=True Positive, TN=True Negative, FP=False Positive, FN=False Negative; PPV=Positive Predictive Value, NPV=Negative Predective Value; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide, z.w.M.= zu wenig Material

Diese Methode wurde gewählt, um die Referenzergebnisse festzulegen. Nur positive Ergebnisse wurden mittels GC-MS gegengeprüft. Bis auf ein falsch positives Testergebnis bei den Cannabinoiden stimmen die positiven Ergebnisse mit den der Bestätigungsanalysen

überein. Dieses falsch positive Ergebnis wurde als Referenzergebnis korrigiert und bei der Gesamtbewertung berücksichtigt. Diese Testmethode in Kombination mit den Bestätigungsanalysen ist, wie auch weiterführende Literatur beschreibt [Naumer 1997, Gibitz 1996], die Methode der Wahl.

3.3.4. Bestätigungsanalysen

Die Bestätigungsanalysen vor allem die GC-MS-Methoden werden als Bestätigungsanalysen der Wahl bezeichnet [Naumer 1997, Gibitz 1996]. Bei dem Nachweis von Cannabinoiden war die Dünnschichtchromatographie die Methode der Wahl. Beide zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität und Sensivität aus. Ihre Aussagekraft wird am höchsten eingeschätzt und daher als Maßstab angesetzt. Da, mit Ausnahme der Testergebnisse bei den Benzodiazepinen, bei immunchemischen Verfahren im Harn falsch negative Ergebnisse nicht oder im vernachlässigbaren Maßen bekannt sind, wurden nur bei positiven Ergebnisse diese Bestätigungsanalysen durchgeführt [Schütz 1999].

Testsubstanz		**Anzahl**
Benzodiazepine		**30**
	Diazepam	15
	Oxazepam	26
	Nitrazepam	3
	Nordiazepam	23
	Temazepam	20
	Flunitrazepam-Metabolite	11
Kokain und Metabolite		**5**
Methadon und Metabolite		**90**
Opiate		**30**
	Morphin	30
	Monoacetylmorphin	8
	Codein	19
	Dihydrocodein	1
Cannabis- Metabolit (THC-COOH)		**54**

Tab. 4.2.4.1.: Positive Testergebnisse der Testsubstanzen und deren Metabolite mittles GC/MS die eine korrespondierende Speichelproben hatten

Der gruppenspezifische Immunoassay erfasst sowohl die Muttersubstanz als auch die Abbauprodukte. Bei den Benzodiazepinen ist Diazepam Muttersubstanz mit den Metabolite Nordiazepam, Temazepam und Oxazepam. Flunitrazepam wird häufig in sogenannten Cocktails zusammen mit Heroin konsumiert. Im Falle von Heroin ist Monoacetylmorphin das erste Abbauprodukt, Morphin das Hauptabbauprodukt. Codein ist der Bestandteil der zur Herstellung von Heroin benutzten Rohmorphinbase. Daher können Einzelmetabolite in ihrer Gesamtzahl in einer größeren Anzahl vorliegen.
Für 8 Bestätigungstests von Cannabinoiden mittels Dünnschichtchromatographie, bei denen die Urinprobe mittels CEDIA positiv anzeigte, war nicht ausreichend genug Material vorhanden. Es handelte sich hierbei um 7 falsch negative Speichelproben und 1 richtig Positive.

3.4. Extraktion und Derivatisierung

Im Vorversuch für die Speicheltests mittels Immunoassay wurden gespikte Proben einmal nativ einmal nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion und einmal nach der SPE bestimmt. Dabei war im Speichel bei allen Analyten, bis auf THC (0,1µg/ml) eine Konzentration 1µg/ml vorhanden. In der nativen Speichelprobe kam es zu falsch hohen Testergebnissen durch Matrixeffekte. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion zeigte sich zu störanfällig und durch große Schwankungen innerhalb der der Testsubstanz zu unzuverlässig. Gerade Kokain reagierte empfindlich auf dieses Verfahren. Die SPE zeigte mit labortechnisch üblichen geringen Schwankungen die beste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die SPE stellte sich auch bei anderen Autoren z.B. bei Hall und dos Santos Lucas [Hall 1998, dos Santos Lucas 2000] als präzise und genaue Methode heraus.

	A	**Ba**	**Be**	**K**	**M**	**O**	**T_M**	**T_D**
Nativ	1634	1718	2268	3715	1624	15041	281	129
F-F	737	597	1027	321	633	1716	107	99
SPE	1019	791	1081	1230	1438	1864	138	131

Tab 4.3.-1.: Übersicht über die Ergebnisse bei Untersuchungen der Probe im nativen Zustand, nach F-F (= Flüssig-Flüssigextraktion) und SPE (= Solid phase extraction); A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T_M =Cannabinoide Microgenics-Test, T_D=Cannabinoide Dade-Behring-Test

3.5. Kalibration

Für die Kalibration bei dem Nachweis im Urin mittels CEDIA und Bestätigungsanalysen wurde das im Labor übliche Procedere zugrundegelegt, was dem Standard der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCH) entspricht.
Zur Festlegung der unteren Nachweisgrenze (**LOD**) bei der Bestimmung der Speichelproben mittels CEDIA bzw. EMIT wurden drogenfreie Proben (n=28) von 20 verschiedenen Personen ausgewertet. Der LOD wurde mit dem Durchschnittswert der Leerwerte bei den jeweiligen Analyten errechnet, zu dem die 3-fache Standardabweichung (3s) addiert wurde [Dawson 2001]. Um ein relativ sicheres Ergebnis zu erreichen, sollte der Cut-off so angesetzt, dass er ein Vielfaches des Durchschnittswertes betrug und zugleich über dem maximalen Wert liegt. Alle Analyte bis auf die Benzodiazepine erfüllten diese Kriterien. Der Cannabinoid Microgenic-Test (T_M) wurde später nicht eingesetzt, und wurde daher nicht weiter berücksichtigt.

	A	**Ba**	**Be**	**K**	**M**	**O**	**T_M**	**T_D**
Durchschnitt	100,7	8,0	34,7	5,1	21,6	11,9	7,3	0
Maximum	268	19	97	17	69	23	27	0
Minimum	0	0	16	0	0	0	0	0
LOD	409	25	126	21	106	36	8	0
Cut-off*	700	60	70	35	140	65	25	17

Tab. 4.4.-1: Durchschnitt der Leerwerte, Maxima und Minima der Nachweisgrenzen, LOC und Cut-off der einzelnen Analyte; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T_M =Cannabinoide Microgenics-Test, T_D=Cannabinoide Dade-Behring-Test; *anhand der ROC-Kurven bestimmt

Der Cut-off Wert wurde nach der Auswertung der ROC-Kurve (receiver operating characteristic curve) bestimmt, bei dem Spezifität und Sensitivität bei verschiedenen Cut-offs gegenübergestellt und graphisch dargestellt wird. Die gesamte Kurve zeichnet die Leistung dieses Tests ab. Die x-Achse beschreibt die Spezifität mit den falsch positiven Ergebnissen und die y-Achse die Sensitivität mit den richtig positiven Ergebnissen. Die Kurve oberhalb der Diagonalen von der linken unteren Ecke zur rechten oberen Ecke zeigt ein überzufälliges Ergebnis an. Das diskriminative Ergebnis wird um so besser, je weiter sich die Kurve bzw.

einzelne Punkte in der linken oberen Ecke ansiedeln. Die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) wird als Maß der Leistung herangezogen und sollte größer 0,9 im Bezug auf die Gesamtfläche sein [Zweig 1987, 1993]. Allerdings ist für uns nur der Anteil der Kurve ausschlaggebend, in der der ausgewählte Cut-off liegt. Wichtiges Kriterium war bei der Auswahl des Cut-off-Wertes die Sensitivität, da es bei dieser Testmethode primär um das Aufspüren eines vermutlichen Missbrauch von Drogen geht. Es handelt sich somit um ein „aggressives" Testverfahren, nicht um ein „konservatives" Testverfahren, bei dem die Spezifität mehr Gewichtung bekommt (ROC-Kurven siehe Anhang Abb. 8.2).

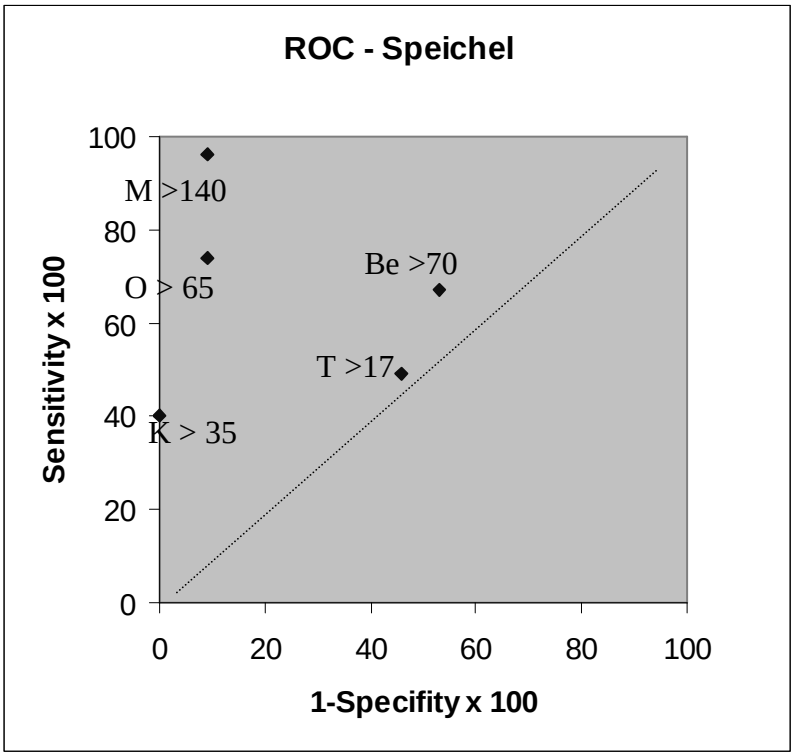


Abb. 4.4.1.: Ausgewählte Cut-offs der Analyte aus den jeweiligen ROC-Kurven und deren Lokalisation; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide

Zusätzlich zu den 28 drogenfreien Proben wurden 5 weitere (2 von Mitarbeitern und 3 von Probanden) getestet, bei denen bis auf ein falsch positives Ergebnis bei Methadon und zwei falsch negativen THC-Ergebnissen die Speichelproben mit den Uriproben übereinstimmten. Sowohl der Microgenics- und der Dade-Behring-Test führten zu falsch negativen Ergebnissen von THC zweier Probanden.

Ausgenommen der THC-Tests gab es weder bei der Verwendung von Speichel mit oder ohne Watte noch bei der Verwendung von PBS mit oder ohne Watte signifikante Unterschiede in

den Testergebnissen der Vorversuche. Die THC-Test neigten gerade bei dem Testdurchlauf, bei dem der Speichel direkt analysiert wurde, zu großen Schwankungen innerhalb der Messergebnisse. Eine Rauschunterdrückung mit einem Puffer, wie er in handelsüblichen Teströhrchen für Speichelproben (Intercept TM-Dräger oral specime collection device) zu finden ist, führte zu keinem nennenswerten verändertem Ergebnis (n=10) bei den Leerwerten. Eine Wiederfindung war bei allen Testdurchläufen gegeben.

Testsubstanz	**Korrelationsfaktor r^2 Speichel**				**Korrelationsfaktor r^2 PBS**			
	Watte		**Ohne Watte**		**Watte**		**Ohne Watte**	
	t_0	**t_{3d}**	**t_0**	**t_{3d}**	**t_0**	**t_{3d}**	**t_0**	**t_{3d}**
A	0,95	0,79	0,98	0,94	0,99	0,97	0,99	0,99
Ba	1	1	1	1	1	1	1	1
Be	0,96	0,91	0,95	0,97	0,99	0,99	0,98	0,99
K	0,96	0,91	0,95	0,94	0,93	0,89	0,95	0,93
M	0,96	0,94	0,92	0,90	0,97	0,95	0,95	0,95
O	0,88	0,76	0,87	0,84	0,89	0,77	0,85	0,83
T_M	0,99	0,99	0,56	0,56	0,65	0,87	1	0,99
T_D	0,91	0,87	0,57	0,60	0,99	0,99	0,98	0,99

Tab. 4.3.-1: Korrelationsfaktoren der einzelnen Analyte bezüglich der zugesetzen Menge der Testsubstanz und der Ergebnisse; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T_M =Cannabinoide Microgenics, T_D = Cannabinoide Dade-Behring; t_0= Messung nach Entnahme, t_{3d}= Messung nach 3 Tage Lagerung

	Korrelationsfaktor r^2							
	A	**Ba**	**Be**	**K**	**M**	**O**	**T_M**	**T_D**
Sp/t	0,96	0,91	1	0,99	1	0,96	1	0,99
PBS/t	1	0,98	1	0,96	1	0,97	1	0,99
SP/PBS	0,09	0,17	0,07	0,06	0,06	0,09	0,07	0,19
SP/SPW	0,97	0,94	1	1	0,99	0,92	0,26	0,73
PBS/PBSW	1	0,99	1	1	1	0,98	0,73	0,97

Tab. 4.3.-2: Korrelationsfaktoren der einzelnen Analyte bezüglich der zeitliche Stabilität (Sp/t und PBS/t), der gesamten Ergebnisse mit oder ohne Watte bei Speichel und PBS (SP/SPW und PBS/PBSW) und der Matrices untereinander (Speichel und PBS - SP/PBS); A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T_M =Cannabinoide Microgenics, T_D = Cannabinoide Dade-Behring

Wie zu erwarten gab es zwischen Speichel und PBS nur eine geringe Korrelation, da im Gegensatz zu PBS Speichel Störeffekte in der Matrix hat, die bei der Messung zum Tragen kommen.

Bei dem Dade-Behring Cannabinoid-Test kam es im Gegensatz zu dem Microgenics Cannabinoid-Test zu wesentlich geringeren Grundrauschen und Schwankungen innerhalb der Testergebnisse und damit zu einer höheren Selektivität. Auch bei der Betrachtung der Korrelationsfaktoren bei den Analyten und den verschiedenen Kritierien zeigte sich der Dade-Behring Cannabinoid-Test gegenüber dem Microgenics Cannabinoid-Test stabiler. Dieser Test wurde daher später bevorzugt. Bei beiden Cannabinoid-Tests mit Speichel kam es zu einer Abnahme der Korrelation zwischen Speichel direkt und nach der Zentrifugation aus der Salivette. Das spricht dafür, dass ein Teil der Substanzen in der Salivette verbleibt und damit nicht nachgewiesen werden kann.

3.6. Nachweisgrenzen

3.6.1. Urinteststäbchen

Analyt	Cut-off ng/mL
Amphetamine	1000
Barbiturate	200
Benzodiazepine	200
Kokain	300
Methadon	300
Heroin	300
Cannabinoide	50

Tab.4.5.1.1.: Cut-off bei der Untersuchung von Urin mittels Urinsteststäbchen QuickScreen™ der Firma DRG

3.6.2. Speichelproben

Analyt	LOD	Cut-off ng/mL
Amphetamine	409	700
Barbiturate	25	60
Benzodiazepine	126	70
Kokain	21	35
Opiate	106	140
Heroin	36	65
Cannabinoide	0	17

Tab.4.5.2.1.: LOD und Cut-off bei der Untersuchung von Speichel mittels Immunoassay

3.6.3. Urinproben mittels CEDIA

Analyt	Cut-off ng/mL
Amphetamine	500
Barbiturate	200
Benzodiazepine	100
Kokain	300
Methadon	300
Heroin	300
Cannabinoide*	20

Tab.4.5.3.1.: Cut-off bei der Untersuchung von Urin mittels Immunoassay CEDIA®DAU der Firma Microgenics, * bzw. Immunoassay EMIT II+ Cannabinoide der Firma Dade Behring

5. Diskussion

5.1. Drogennachweisverfahren

5.1.1. Drogenschnelltests mittels Urinteststreifen

Urinteststäbchen werden in vielen medizinischen Bereichen eingesetzt um ein schnelles Testergebnis zu erhalten. Zudem handelt es sich um ein sehr kostengünstiges Verfahren. Meist liegt das Testergebnis in wenigen Minuten vor Ort vor. Bei dem Verfahren handelt es sich heutzutage um eine relativ sichere Methode. Verglichen mit anderen Testmethoden besitzt diese Methode meist eine geringer Spezifität und Sensitivität. Ebenso verhält es bei den Urinstäbchen, die bei Drogenscreening eingesetzt werden. Es ist eine gängige Methode, die aus Zeit- und Kostengründen in vielen Praxen eingesetzt wird.

Dies wird in dem Ergebnis dieser Studie noch einmal unterstrichen. Gerade bei Kokain zeigte diese Methode ihre Schwäche. Bei Zweifeln oder bei positiven Ergebnissen sollte auf jeden Fall eine zuverlässigere Testmethode wie der apperativen Immunoassay oder die GC/MS herangezogen werden.

Bezüglich der Handhabung ist diese Methode recht gut anwendbar. Durch die Vielzahl verschiedener Hersteller und Produkte kann man sich für seine Anforderungen das passende heraussuchen. Es gibt Kombi-Packungen, bei denen mehrere Analyte gleichzeitig getestet werden können oder aber auch einzelne Teststreifen für die jeweilige Analyte. In der Praxis in der die Studie lief wurden hauptsächlich Einzelteststreifen verwandt, da oftmals nur gezielt nach speziellen Analyten, wie Opiate, Kokain und Benzodiazepinen untersucht wurde.

Die Durchführung des Testes ist einfach. Bei der Durchführung müssen die Teststreifen bis zu einer Markierung in den Urin eingetaucht werden. Ist zu viel oder zu wenig Untersuchungsmaterial vorhanden, wird diese Durchführung ein wenig aufwendiger, da der Urin umgefüllt werden muss oder die Urinteststäbchen, während des Zeitraumes in dem sich das Vlies voll saugen, gehalten werden müssen. Da es sich jedoch nur um einen sehr kurzen Zeitraum handelt ist das durchaus vertretbar. Wird das Urinteststäbchen zu tief, also über die Markierung heraus eingetaucht, wird es unbrauchbar, da die Kapillarwirkung des Vlies dadurch außer Kraft gesetzt wird und das gesamte Nachweisverfahren kann nicht mehr ablaufen.

Beim Ablesen der Ergebnisse kann es gerade bei schwach positiven Ergebnissen zu Schwierigkeiten kommen, da das Markierungsfeld sich nur schwach anfärbt. Bei einem solchen Fall muss das Ergebnis im Labor gegengeprüft werden. Prinzipiell sollten aber nur Teststäbchen verwandt werden, die einen hohen qualitativen Standard haben. Die Haltbarkeitsdauer und die Lagerungsvorschriften müssen strikt eingehalten werden. Auch gibt

es Unterschiede in der Qualität der Teststäbchen ausgehend von verschiedenen Herstellern. Einige Produkte schnitten in der europaweit breit angelegten Studie über On-site-Tests ROSITA schlecht ab [Verstraete 2000]. Bei der Auswahl der Teststreifen ist daher auf eine hohe Qualität zu achten. Nur bei Einhaltung dieser Kriterien kann von einer Zuverlässigkeit dieser Methode ausgegangen werden.
Wie bei anderen Testmethoden im Urin ist die häufige Manipulation der Probe durch die Patienten als Schwäche zu nennen.

Im Allgemeinen kann aber gesagt werden, dass diese Testmethode unter der Berücksichtigung ihrer Schwächen gut eingesetzt werden kann.

5.1.2. Immunoassay

Generell gesagt zeichnen sich immunchemische Verfahren heutzutage durch eine hohe Sensitivität aus. Jedoch treten bei diesen sogenannten Gruppentest Kreuzreaktivitäten [Schütz 1999] auf. Je größer die Kreuzreaktivität desto geringer die Spezifität und die Konfidenz. Einerseits sind diese Kreuzreaktivitäten gewünscht, um ein breiteres Spektrum ähnlicher Substanzen abzudecken und damit die Sensitivität für diese Stoffgruppe zu erhöhen, andererseits führt das zu eine geringeren Spezifität und damit zum Auftreten falsch positiver Ergebnisse. Gerade bei den Benzodiazepinen und Amphetaminen gibt es eine Vielzahl von Einzelverbindungen die erfasst werden sollen, was die Kreuzreaktivität erhöht.
Ein wichtiger Parameter bei der Bewertung der Testergebnisse ist der „Cut-off-Wert“. Dieser Cut-off-Wert stellt die Entscheidungsgrenze über ein positives und negatives Testergebnis dar. Der Cut-off-Wert ist eine definierte Zahlengröße, die entweder mit einer Einheit versehen oder aber auch dimensionslos bestehen kann. Bei Überschreiten dieses Wertes wird der Test als positiv bewertet. Die Auswahl dieser Grenze spielt für die Aussagekraft des Testes eine große Rolle. Ist der Wert zu niedrig angesetzt erhöht sich zwar die Sensitivität, gleichzeitig kommt es aber zu einer Abnahme der Konfidenz. Ist der Wert zu hoch, erniedrigt sich die Sensitivität. Der Cut-off-Wert liegt meist weit über der unteren Nachweisgrenze, um die Anzahl der falsch Positiven gering zu halten, da sie zu juristischen oder therapeutischen Fehlentscheidungen führen können. Jedoch aber liegt er noch in dem Bereich, in dem eine relativ sichere Aussage über missbräuchliche Einnahme von Drogen gemacht werden kann, ohne dass ein zu großes diagnostisches Fenster entsteht und ein Drogeneinnahme nicht festgestellt wird. Eine verlässliche Aussage kann nur mit einer Bestätigungsuntersuchung

mittels GC/MS getroffen werden, gerade weil auch durch Kreuzreaktivität ein falsch positives Ergebnis auftreten kann, oder wie z.B. bei dem sogenannten „poppy-seed-problem“ ein Opiatnachweis stattgefunden hat, ohne das ein Opiat konsumiert wurde. Hierbei kann es nach Verzehr von mohnsamenhaltigen Nahrungsmitteln (z.B. Mohnstrudel, Mohnbrötchen) kurzfristig zu einem positiven Opiatnachweis kommen [Struempler 1987, ElSohly et al. 1990]. Da positive Testergebnisse meist Folgen für die Testperson nach sich zieht, wird ein moderater Cut-off-Wert angesetzt, um die Spezifität zu erhöhen und die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse zu verringern. Die Cut-off-Wert werden von den Herstellern der Testverfahren meist an die Empfehlung der National Institute on Drug Abuse (NIDA, USA) angelehnt und richten sich nach den Interessen der Anwender.

5.1.2.1. Speichel

Speichel stellt als Testmedium ein sehr gutes in-vivo- Modell für die Permeation von Drogen durch biologische Membrane. Speichel spiegelt bei vielen Substanzen hierbei sogar eine bessere Konzentration/Wirkungs-Korrelation wieder, als die des Blutes, da um eine Wirkung im Organismus zu erzielen auch die Membrane der Effektorzellen permeiert werden muss [Haeckel 1989, 1996]. Aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Drogen und deren Metabolite gelangen aber nicht alle von ihnen im gleichen Maße in den Speichel. Es gelangen vor allem die freien, aktiven Substanzen und nicht deren Metabolite in den Speichel. Das hat zu Folge, das das zeitliche diagnostische Fenster kleiner ist, da diese primären Substanzen oftmals schnell metabolisieren und somit nur kurz im Plasma in dieser Form existieren. Anders ist es mit den Metaboliten, deren Halbwertszeiten länger sind als die der Ausgangssubstanz. Sie sind länger im Plasma nachweisbar, durchdringen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften aber meist schlechter die Plasma/Speichel- Barriere [Haeckel 1996, Kidwell 1998].

All diese Eigenschaften machen dieses Medium gerade für den juristischen und forensischen Bereich interessant. Bei der Road Onsite Testing Assesment – ROSITA wurden verschiedene Methoden untersucht. Dabei zeigte sich, mit Ausnahme der Benzodiazepine, eine relativ gute Übereinstimmung der Ergebnisse von Speichel (GC/MS) und Blut (GC/MS). Die Ergebnisse im Speichel von immunchemischen Verfahren und der GC/MS zeigten jedoch deutliche Schwankungen innerhalb der Testeigenschaften. Bei dem Vergleich von Speichel mit Urin als Matrix divergierten teilweise die Ergebnisse zum Teil aufgrund der unterschiedlichen

Eigenschaften der Matrices [Verstraete 2000]. Die Schwierigkeit mit Speichel als Matrix ist die geringe Konzentration und die relativ kurze Nachweisbarkeit der Drogen. Durch die stetige Neuproduktion des Speichels kommt es zu keinem Anreicherungseffekt in der Mundflüssigkeit. Eine Aufkonzentration wie im Urin fehlt.

In diese Studie kann man zusammenfassen:

Bezüglich der *Sensitivität* lag der Wert der einzelnen Analyte bei dem Nachweis im Speichel tendenziell etwa 20%, bis auf die Cannaboide mit ca. 30%, unter dem des Nachweis durch Urinteststreifen. Bezüglich der *Spezifität* und *Genauigkeit* bei den Amphetaminen, Barbituraten, Kokain, Methadon und Opiaten kam es bei beiden Testverfahren zu einem guten bis sehr guten Testergebnis. Es traten bei diesen Analyten keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Testmethoden auf. Bei den Benzodiazepinen liegt der Prozentsatz der Genauigkeit des Speicheltests um 38%, bei THC um 29 % niedriger als bei der Nachweismethode mit den Urinstix.

Die *Spezifität* der Speicheltests gegenüber der Urinstix bei den **Benzodiazepinen** und den **Cannabinoiden** war deutlichgeringer. Bei den Benzodiazepinen betrug die Differenz 46% und bei den Cannabinoiden 35%. Die Cut-off-Werte beider Substanzen sind bewusst sehr niedrig angesetzt, da primär die Sensitivität der Methode im Vordergrund stand. Der Nachteil dieses niedrigen Cut-off-Wertes ist, dass durch Matrixeffekte im Speichel das „Grundrauschen“ verstärkt wird und es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Zusätzlich können gerade bei den Benzodiazepinen Kreuzreaktivitäten mit eine Rolle spielen. Bei einer Studie von Hart konnte keine Korrelation von Nitrazepam-Werten in Speichel und Serum finden [Hart 1987]. Ebenso fanden sich Instabilitäten von Nitrazepam und Clonazepam bei der Lagerung in Raumtemperatur [Hart 1988]. Carbamazepin scheint jedoch eine gute Übereinstimmung der Nachweisbarkeit in Serum und Speichel zu haben [Miles 1991]. Dies zeigt die Schwierigkeit gerade bei den Benzodiazepinen auf, da hier eine Vielzahl von Substanzen erfasst werden müssen, die unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften besitzen. Bei den Cannabinoiden gibt es widersprüchliche Aussagen bezüglich der Anreicherung im Speichel. Die Immunoassays zeigen in der Regel nur eine geringe Kreuzreaktivität zu THC, das im Speichel vorliegt. Hawks beschreibt, dass sich bei Applikation von radioaktiv markiertes THC über die intravenöse Route keine Evidenz in der Speichelexkretion zeigt. Er geht von einer Anreicherung von THC in der Mundhöhle durch Inhalation aus, weniger als durch eine Exkretion über den Speichel [Hawks 1983]. Just jedoch wies bei Tierversuchen an Affen (Hapale jacchus spezies) sehr wohl eine THC-Exkretion nach [Just 1975]. Niebdala stellte eine hohe Übereinstimmung der Plasma- und

Speichel-THC-Werte fest. Er hält zudem eine Wiederaufnahme von THC von der Mundflüssigkeit in die stark perfundierte Mukosa für möglich [Niedbala 2001]. Eine mögliche Ursache, dass so viele falsch positive Ergebnisse in dieser Studie aufgetreten sind, wäre, dass es sich um einen frischen Cannabiskonsum handelt der, aufgrund der lag-time noch nicht im Urin nachweisbar wäre. In der Studie von Niebdala ist ersichtlich, dass es gerade in den ersten 1-2 Stunden nur bis zu ca. ¼ der im Speichel mit EIA und GC/MS nachgewiesenen THC-positiven-Ergebnissen im Urin nachweisbar waren. In unserer Studie wurden jedoch die positiven THC-Ergebnisse des Speicheltests mittels Immunoassay nicht mit der GC/MS - Methode gegengeprüft. Somit kann über die Verlässlichkeit keine Aussage getroffen werden. Andere Möglichkeiten für die falschen Ergebnisse, die in Betracht kommen, sind eventuell die kurze Nachweisbarkeitsdauer von THC im Speichel in Korrelation zum Urin und der niedrige Cut-off Wert sowie die niedrigen Konzentrationen von THC im Speichel, der nur einen geringen Spielraum im Nachweis zulässt.

Bei der Betrachtung der ROC-Kurven von Benzodiazepinen und Cannabinoiden (siehe Diskussion Abb. 5.1.2.1.1 und Anhang Abb. 8.2.), bei dem die optimalen Cut-off-Werte herangezogen wurden und der Testeigenschaften (Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit, PPV, NPV) wird ersichtlich, dass diese beiden Substanzgruppen zur Testung mittels Immunoassay (CEDIA bzw. EMIT) nicht geeignet sind.

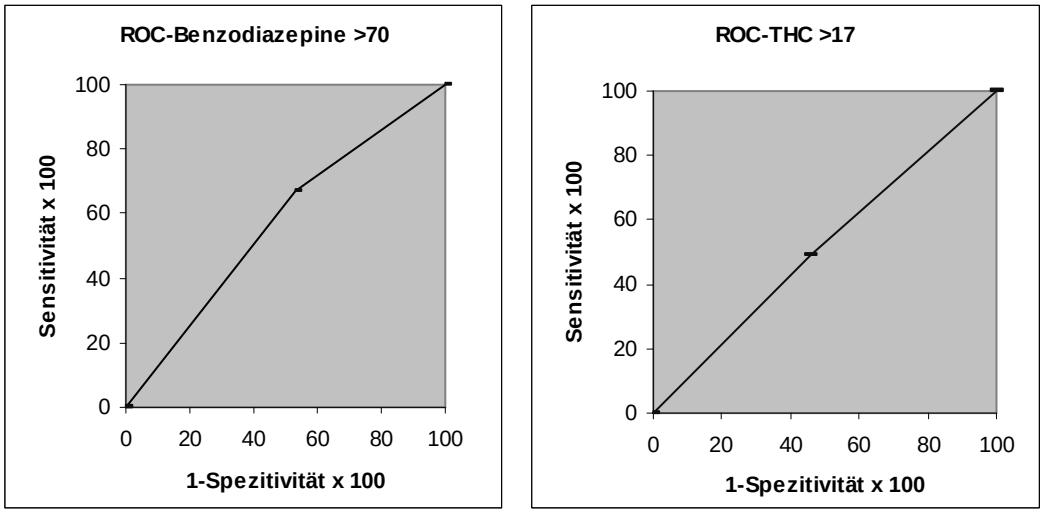


Abb. 5.1.2.1.1: ROC bei dem ausgewählten Cut-off von Benzodiazepinen (70) und Cannabinoiden (17)

Die geringe Sensitivität bei **Kokain** mit 40% und bei den **Opiaten** mit 68% lässt sich mit aller Wahrscheinlichkeit auf die kurze Nachweisbarkeitsdauer der Analyte im Speichel

zurückführen. Beim Speichel kommt es im Gegensatz zum Urin nicht zu einer Aufkonzentrierung und somit zu einer ausreichend hohen Menge des Analytes in dieser Matrix. Im Urin können durch Aufkonzentrierung auch noch geringere Mengen von Substanzen detektiert werden. Bei Proben im Urin, bei den **Kokain** nur schwach positiv nachweisbar war, waren die korrespondierenden Speichelproben falsch negativ. Bei Betrachtung der anderen positiven Resultate wurde gleichzeitig Opiate mit 6-Monoacetylmorphin nachgewiesen, was für einen frischen Konsum von Heroin spricht. Vermutlich wurde eine Kombination verschiedener Drogen konsumiert. Wenn man die in dieser Studie gewonnen Daten mit der Studie von Schramm vergleicht [Schramm 1993], unterstreich dies die gute Aussagefähigkeit über einen nicht allzu lang herliegenden Konsum von etwa einen Tag. Ähnlich verhält es sich bei den **Opiaten**. Alle Proben, bei denen 6-Monoacetylmorphin im Urin festgestellt wurde, wurden auch in der Speichelprobe Opiate nachgewiesen. Dies spricht für eine sehr gute Sensitivität bei frischen Konsum von Heroin. Diese Ergebnisse decken sich auf mit denen der Studie von Samyn über on-site Tests mit Drugwipe, einem immunchemische Verfahren, der bei Speichel und Schweiß Anwendung fand. Auch hier waren nur 2 von 5 Ergebnissen Opiat-positiv. Nur die beiden mit den höchsten MAM Werten im Speichel waren mit der immunchemischen Methode nachweisbar [Samyn 2000]. Über die Wirkstoffspiegelbestimmungen von Codein im Speichel im bezug auf die des Plasmas gibt es unterschiedliche Angaben. Einige Autoren geben an, dass im Speichel höhere Konzentrationen von Codein auffindbar sind als im Plasma, die jedoch starke interindividuelle Schwankungen aufweisen können [Oyler 1998, Sharp 1983]. Cone berichtete hingegen von korrelierenden Speichel-Plasma-Konzentrationen [Cone 1990]. Kommt es zum Nachweis von Morphin und Codein kann dieses Ergebnis auch von einer alleinigen Codeineinnahme herrühren, da Codein zu etwa 10% zu Morphin verstoffwechselt wird. Anders ist das bei Dihydrocodein, bei dem Morphin nicht als Stoffwechselprodukt anfällt (siehe Einführung, Tab.:1.3.5.1.). Wurde zusätzlich zu Morphin, Codein und Dihydrocodein im Urin nachgewiesen (n=12) scheint sich tendenziell eine leichte Abhängigkeit der richtig Positiven zur Konzentration [ng/mg Creatinin] des Urins zu zeigen. Die geringe Anzahl der Ergebnisse bei den Morphin und Codein bzw. Dihydrocodein nachgewiesen wurde zeigt zwar eine Tendenz, reicht aber nicht aus, um eine gesicherte Abhängigkeit von der Substanzkonzentration darzulegen. Bei dem alleinigen Nachweis von Morphin fiel der Nachweis von Opiaten im Speichel am schlechtesten aus. Hier überwogen deutlich die falsch negativen Ergebnisse. Eine fortschreitenden Proteinbindung, die den Übertritt in den Speichel verhindert, und eine Konzentrationsabnahme im Plasma könnte

hierbei eine Erklärung sein. Bei Heroin scheinen es eher die Einzelsubstanzen ausschlaggebend zu sein. In dieser Studie zeigte sich eine gute Nachweisbarkeit von MAM, unabhängig von der Konzentration und eine konzentrationsabhängige Nachweisbarkeit von Codein, bzw. Dihydrocodein. Die Nachweisbarkeit von Morphin schien konzentrationsunabhängig zu sein.

Aus den ROC-Kurven (siehe Abb. 5.1.2.1.2) kann abgeleitet werden, dass bei diesen Werten keine optimale Testmethode vorliegt. Aber unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der kürzeren Nachweisbarkeitsdauer und der geringeren Substanzkonzentration und der damit verbundenen geringeren Sensitivität kann abgeleitet werden, dass sie als alternative Testmethode durchaus einsetzbar ist, gerade wenn es sich um einen frischen Konsum handelt. Dies wird durch die Testeigenschaften wie Spezifität, Sensitivität, Genauigkeit, PPV und NPV sowie mit der guten Korrelation zwischen Testmethode und Substanzkonzentration (siehe Ergebnisse-Kalibration 4.4) unterstrichen. Beim Nachweis von Kokain scheint die Konzentration im Vordergrund zu stehen. In einer Studie von Samyn zeigte sich eine gute Nachweisbarkeit von Kokain mittels Immunoassay im Speichel. Bei den positiven Ergebnissen handelte sich ausschließlich um hohe Messwerte [Samyn 2000]. Dieses Ergebnis spiegelt sich in dieser Studie wieder.

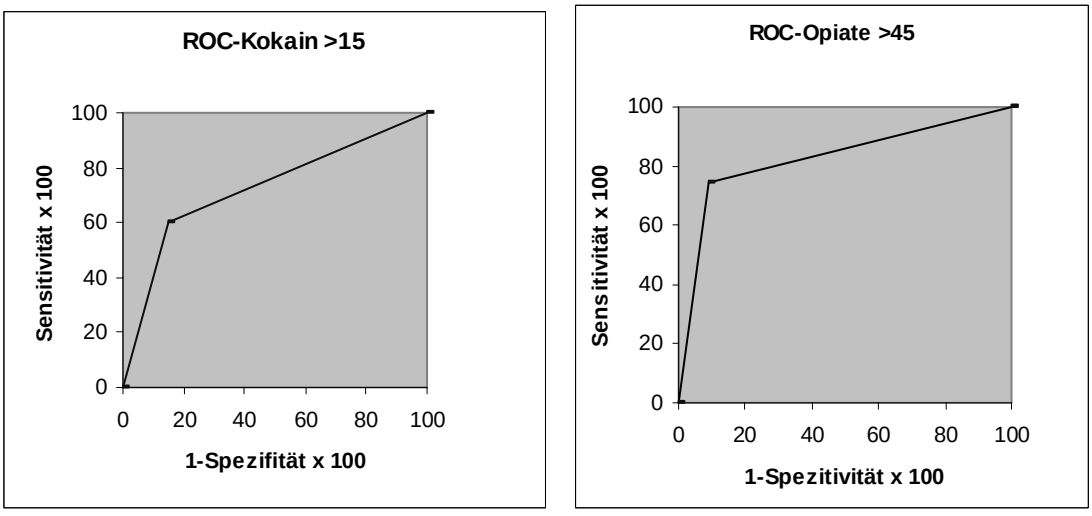


Abb.5.1.2.1.2.: ROC bei dem ausgewählten Cut-off von Kokain (15) und Opiaten (45)

Da bei den **Amphetaminen** und **Barbituraten** keine positiven Ergebnisse in dieser Studie auftraten, ist eine Aussage nur bedingt möglich. Betrachtet man NPV, Spezifität und Genauigkeit hat man ausgehend von unseren Daten ein sehr gutes Ergebnis.

Anhand von der ROSITA-Studie kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Methode mittels Immunoassay bei den Amphetaminen nur unbefriedigende Ergebnisse liefert. Eine Testung des Speichels mittels GC/MS hat hingegen eine gute Übereinstimmung mit den im Blut festgesellten Werten, aufgezeigt. Ein Vergleich von den Ergebnissen von Speichel GC/MS und Immunoassay zeigte jedoch nur eine ungenügende Übereinstimmung. Eine Aussage, vor allem bei frischem Konsum, wäre damit nur mit der GC/MS-Methode oder einer adäquaten Methode wie LC/MS und nicht mittels Immunoassay möglich und aufgrund der längeren lag-time gleichzeitig der Bestimmung mittels Urin GC/MS überlegen [Verstraete 2000, Samyn 2002]. In einer zuvorigen Studie von Samyn schienen jedoch bei den Amphetaminen die Ergebnisse im Speichel mittels Immunoassay denen der GC/MS zu entsprechen [Samyn 2000]. Bei den Barbituraten scheint es eine gute Übereinstimmung der Blut- und Speichelwerten mittels GC/MS zu geben [Herkes 1990, Miles 1991]. Zu einer differenzierten Betrachtung der Übertragbarkeit auf Immunoassays lässt die geringe Anzahl der dazu zur Verfügung stehenden Literatur nicht zu.

5.1.2.2. Urin

Die Ergebnisse der CEDIA-Analysen in den Urinproben scheinen bei allen Analyten sehr gut zu sein. Die Beurteilung der Spezifität und der Aussagekraft der positiven Ergebnisse ist bei den Barbituraten und den Amphetaminen nicht möglich gewesen, da keine positiven Testergebnisse vorlagen. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass auch hier eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse vorliegt, da dieses Verfahren ein etabliertes Verfahren ist um in einem „Screening des ersten Zugriffes“ zwischen negativen und positiven Fällen zu unterscheiden [Schütz 1999]. Bis auf ein falsch Positives wurden alle positiven Testergebnisse mit den Bestätigungsanalysen verifiziert.

5.1.3. Bestätigungsanalysen

Die GC/MS-Methode wird bei der Drogenanalytik als Goldstandard betrachtet [Hübschmann 1996, Pfleger 1992]. Es handelt sich hierbei um eine sehr spezifische und sensitive Methode zum Drogennachweis, die weltweit im klinischen und forensischen Bereich eingesetzt wird. In der Praxis wird die GC/MS-Methode im außerklinischen Bereich erst als Bestätigungsprobe hergenommen, da die Durchführung von immunchemischen Verfahren schneller und kostengünstiger ist. Durch die hohe Sensitivität immunchemischer Verfahren sind, mit Ausnahme der Benzodiazepine [Schütz 1990, Schütz 1992], falsch negative Ergebnisse relativ unwahrscheinlich, wobei es gelegentlich zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann (siehe 5.1.2. Immunoassays). Um die allgemein gängige Vorgehensweise des Drogenscreenings in der täglichen Praxis im Substitutionsbereich zu reflektieren, wurden auch bei dieser Studie alle positiven Ergebnisse der Immunoassays mit der GC/MS-Methode gegengeprüft und validiert.

5.2. Kalibration

Die Festlegung des Cut-off-Wertes wird bestimmt von drogenpolitischen, juristischen und therapeutischen Faktoren. Klassisches Beispiel hierfür ist der empfohlene Cut-off-Wert für Optiate von 2000ng/ml [Cone 1998], der zuvor bei 300ng/ml lag, bei einer Nachweisgrenze von 100ng/ml [Hallbach 1991]. Das Überschreiten eines Cut-offs sollte in der Regel für ein relativ sicheren Nachweis der entsprechenden Droge sprechen. Nachweisgrenzen werden in der Regel so festgelegt, dass zu dem durchschnittlichen Grundrausche deren 3-fache Standardabweichung hinzugefügt wird. Sie weisen bei zunehmenden Überschreiten dieses Wertes mit steigender Wahrscheinlichkeit ein positives Ergebnis an. Befindet sich der Wert zwischen Nachweisgrenze und Cut-off-Wert, ist jedoch ebenfalls von einer Drogeneinnahme auszugehen, jedoch steigt hier die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse.
Die Nachweisgrenze (LOD = limit of detection) bei dieser Studie wurde errechnet, indem zum Durchschnitt des „Grundrauschens“ deren 3-fache Standardabweichung addiert wurde. Da die Konzentrationen der Analyte im Speichel wesentlich geringer sind, kommt es zu niedrigeren Messwerten und damit verbundenen niedrigen LOD und Cut-off-Werten. Die Differenz zwischen LOD und Cut-off ist demzufolge geringer. Um einen Cut-off-Wert festzulegen, bei dem ein relativ sicheres positives Ergebnis vorliegen soll, wurde der etwa 7fachen Wert des durchschnittlichen Grundrauschens als Cut-off angestrebt. Der Cut-off lag aber auf jeden Fall über dem maximalen Wert des Grundrauschens. Bei der Festlegung des

Cut-offs nach der ROC- Kurve bei den Benzodiazepinen war dies nicht möglich, da bei der Auswertung eine Sensitivität unter 20% daraus resultieren würde. Ohnehin ist diese Testmethode bei den Benzodiazepinen aufgrund der schlechten Resultate nicht möglich. Es erübrigt sich also die Frage nach einem adäquaten Cut-off. Bei der Erniedrigung des Cut-offs bei Kokain, Methadon und Opiaten würde sich zwar eine Verbesserung der Sensitivität erreichen, gleichzeitig würde aber die Spezifität, die Konfidenz und gerade die Prädiktivität der positiven Ergebnisse unter Umständen drastisch abnehmen (siehe Tab. 8.7. und Abb. 8.2.).

Bis auf die Opiaten ließ sich bei den Vorversuchen eine gute Korrelation bezüglich der Messwerte und der Konzentrationen nachweisen. Dies war auch unabhängig zu der Lagerungszeit von 3 Tagen bei Raumtemperatur, im Vergleich zu der Testung direkt aus dem Speichel oder nach Zentrifugation aus der Salivette oder im Vergleich Speichel und PBS. Tendenziell ließ sich eine geringe Abnahme der Korrelation bezüglich der Lagerungszeit feststellen. Die Instabilitäten von Nitrazepam und Clonazepam, die Hart festgestellt hatte, kam in dieser Studie nicht zum Tragen [Hart 1988]. Gerade die Benzodiazepine zeigten auch noch nach Lagerung eine gute Übereinstimmung der Messwerten mit den ursprünglichen Werten. Die Opiate schnitten bei der Ermittlung der Korrelation bezüglich der Messwerte und der Konzentrationen am schwächsten ab. Bei der Betrachtung der linearen Darstellung (siehe Anhang Abb. 8.3) sieht man, dass es zu einer guten Übereinstimmung der Wert zu einer bestimmten Konzentration kommt. Bei den Cannabinoiden kam es zu einer Abnahme der Korrelation bezüglich der Messwerte und der Konzentrationen im Vergleich zu der Testung direkt aus dem Speichel oder nach Zentrifugation aus der Salivette. Dies spricht dafür, dass ein Teil der Testsubstanzen in der Salivette verbleiben und sich somit dem Nachweis entziehen (siehe Tab. 8.8. und Abb. 8.3.).

Bei einem frischen Konsum von Heroin und Kokain sind diese Werte durchaus ausreichend um die Substanzen nachzuweisen und haben somit ein relative gute Aussagekraft bezüglich der positiven Ergebnisse. Bei Methadon könnte eventuell der Speichelnachweis eine Kontrollmöglichkeit über die individuelle Dosierung darstellen, da Speichel einen guten Hinweis auf die etwaige aktuelle Serumkonzentration geben könnte. Durch diese semiquantitative Methode, könnte möglicherweise die individuelle Anpassung der Dosismenge oder Dosierungsform (Splittung) eine quantitativ nachvollziehbare labortechnische und nicht patientenabhängige, subjektive Grundlage haben. Dies bedarf aber einer gesonderten Betrachtung.

5.3. Probenentnahme

Da die Nachweisgrenzen von den einzelnen Substanzen sehr niedrig sind, handelt es sich bei dem Drogenscreening im Speichel um ein sehr sensitives Testverfahren. Jegliche Kontamination ist daher zu vermeiden. Schon geringste Spuren würden zu einem positiven Ergebnis führen. Bei den Vorversuchen reichte der Fingerkontakt eines Mitarbeiters, der zuvor Methadon zur Trinkvorbereitung eines Patienten im normalen Praxisbetrieb vorbereitete aus, um ein positives Ergebnis hervorzurufen. Ein Fingerkontakt mit der Salivette ist daher zu vermeiden. Die von uns verwandt Salivette stellte sich als günstig heraus, da die Polyesterrolle direkt vom Mund in das Versandröhrchen gegeben werden kann, das gleichzeitig als Zentrifugengefäß dient. Somit wird die Möglichkeit einer Kontamination nach dem Einspeicheln durch das Personal, durch den Probanden selbst und auch durch das Personal im Labor stark minimiert. Auch wird Speichelkontakt als potentielles Infektionsrisiko für das Personal vermieden. Nach Öffnen des Versandgefäßes kann die Polyesterrolle direkt von dort in den Mund eingebracht werden. Auch hier wird Fingerkontakt vermieden. Wird die standardisierte Anwendung lückenlos eingehalten, ist eine gute Probenqualität zu erwarten. Von den Probanden wurde die Salivette selbst und deren Anwendung problemlos toleriert und eingehalten. Die durchschnittliche Speichelmenge pro Probe von jeweils 2 Salivetten betrug 1,5ml. Die Spanne reichte von 0,1ml und 5 ml. Die Speichelmenge, sofern sie ausreichend war (Volumen $\geq$ 0,1ml), hat kein Einfluss auf das Testergebnis genommen.
Die von uns verwandte Salivette der Firma Sarstedt stellte sich daher als sehr anwenderfreundlich dar, bot einen guten Schutz vor Speichelkontakt für die Untersucher und Fremdkontamination der Probe.

5.4. Schlussbetrachtung

In dieser Studie wurden der Drogennachweis im Speichel mittels Immunoassay mit den Nachweis im Urin mittels Urinteststäbchen und Immunoassay verglichen. In das Drogenscreening wurden Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Kokain, Methadon, Opiate und Cannabinoide mit einbezogen. Positive Immunoassays im Urin wurden mittels GC/MS, Dünnschichtgaschromatographie und HPLC gegengeprüft und validiert. Bei allen Analyten, bis auf die Cannabinoide, wurde das CEDIA-Verfahren eingesetzt. Bei den

aCannabinoiden wurde das EMIT-Verfahren verwandt. Alle immunchemische und chromatographische Verfahren wurden mit SPE vorbereitet. Die einzelnen Testmethoden wurden bei allen Analyten auf ihre Testeigenschaften untersucht. Die einzelnen Daten wurden separat erhoben, einzeln bewertet und dann gegenübergestellt. Im Vordergrund dieser Studie stand die Analyse der Speichelproben.
Die Daten wurden in einem Zeitraum von 3 Monaten in einer Substitutionspraxis im norddeutschen Raum gesammelt. Sie umfasste 96 Speichelproben und 103 Urinproben von insgesamt 31 freiwilligen Probanden. Bei den positiven Ergebnissen, bei denen Speichelproben vorlagen, wurde das Ergebnis bezüglich der Einzelsubstanzen und deren Konzentrationen im Urin in Abhängigkeit des Creatininwertes genauer betrachtet.

In Vorversuchen zeigte sich, dass eine gute Korrelation zwischen Analytkonzentration, Lagerung bei Raumtemperatur und zwischen Messungen aus dem Speichel direkt oder nach Zentrifugation aus der Salivette. Etwas schwächer im Vergleich zu den anderen Analyten zeigten der lineare Verlauf von Konzentration und Messdaten bei den Opiaten, vor allem nach Lagerung, und die Korrelation von den Messdaten von Speichel direkt und nach Zentrifugation aus der Salivette bei dem Cannabinoid-Test nach dem EMIT-Verfahren, der in der Studie zum Einsatz kam. Der Cut-off lag bei den Amphetaminen bei 700, bei den Barbituraten bei 60, bei den Benzodiazepinen bei 70, bei Kokain bei 35, bei Methadon bei 140, bei den Opiaten bei 65 und bei den Cannabinoiden bei 17.

Unter Berücksichtigung einiger Faktoren kann prinzipiell das CEDIA-Verfahren im Speichel bei **Kokain**, **Methadon** und **Opiaten** eingesetzt werden. Kokain besaß eine Sensitivität von 40%, Spezifität von 100% und Genauigkeit von 97%, Opiate besaßen eine Sensitivität von 68%, Spezifität von 97% und Genauigkeit von 87% und Methadon besaß eine Sensitivität von 96%, Spezifität von 91% und Genauigkeit von 96%. Die geringere Sensitivität bei Opiaten und Kokain im Speichel ist hauptsächlich auf den kürzeren Zeitraum der Nachweisbarkeit züruckzuführen. Bei den Opiaten zeigte sich zusatzlich eine Abhängigkeit der Nachweisbarkeit im Bezug auf die einzelnen Metabolite. Am besten ließ sich MAM nachweisen. Codein, bzw. Dihydrocodein zeigten tendenziell eine Konzentrationsabhängigkeit beim Nachweis. Am schlechtesten waren die Ergebnisse, bei denen ausschließlich Morphin vorlag. Auch bei Kokain zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit. Bei den Amphetaminen und den Barbituraten konnte aufgrund fehlender positiven Ergebnisse nur bedingt eine Aussage gemacht werden. Bei den

Amphetaminen und den **Barbituraten** betrug die Spezifität 100% und die Genauigkeit 100%. Unter der Betrachtung von anderen Studien sind Nachweisverfahren im Speichel von Amphetamin nur bedingt einsetzbar. Das GC/MS-Verfahren scheint anderen Matrices überlegen zu sein. Laut den Ergebnissen von Verstraete kann bei allen Testverfahren für Amphetamine von einer befriedigenden bis guten Sensitivität ausgegangen werden [Verstraete 2000]. Bei dem Nachweis von Barbituraten konnte in der Literatur nur Hinweise auf einen Nachweis mittels chromatographischer, nicht aber immunchemischer Verfahren gefunden werden. Auch hier müssten mehr Daten gesammelt werden, um eine gesicherte Aussage treffen zu können. Laut Miles findet sich eine gute Übereinstimmung von Serum und Speichel mittels FPIA der Barbiturate. Er hält diese Methode für das therapeutische Monitoring geeignet [Miles 1991]. Aufgrund der schlechten Ergebnisse scheint der Nachweis von **Benzodiazepinen** und gerade von **Cannabinoiden** im Speichel nicht möglich zu sein. Bei den Benzodiazepinen lag die Sensitivität bei 67%, die Spezifität bei 47% und die Genauigkeit bei 53%. Bei den Cannabinoiden lag die Sensitivität bei 49%, die Spezifität bei 54% und die Genauigkeit bei 51%. Die Ergebnisse lagen hier nur unwesentlich über einer zufälligen Verteilung. Die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanzen, bzw. derer Metabolite, scheinen für dieses Ergebnis verantwortlich zu sein.

Vergleicht man Speicheltests mittels Immunoassay mit Urinteststäbchen, findet man eine Übereinstimmung der Messdaten bei Opiaten, Kokain und Methadon. Die Sensitivität der Speicheltests liegt nur bei den Opiaten etwas niedriger. Bei all diesen Substanzen kann alternativ auf das Nachweisverfahren im Speichel zurückgegriffen werden. Unter Berücksichtigung der fehlenden positiven Ergebnisse bei den Amphetaminen und Barbituraten sind auch hier die Daten vergleichbar. In der Literatur gibt es einige Hinweise auf eine gute Nachweismethode beider Substanzgruppen im Speichel. Über die Zuverlässigkeit immunchemischer Verfahren, gibt es noch nicht ausreichend Daten, um eine gesicherte Aussage darüber zu treffen. Ausgehend davon, dass das CEDIA-Verfahren bei Amphetaminen und Barbituraten eine gute Aussagekraft auch bei positiven Ergebnissen besitzt, könnte dies eine alternative Testmethode zu den Urinteststäbchen zu sein.

6. Zusammenfassung

Die Substanzen Amphetamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Kokain, Methadon, Opiate und Cannabinoide wurden mittels Urinteststäbchen und mittels Immunoassay in Speichel und Urin getestet. Die positiven Ergebnisse, die im Urin mittels Immunoassay festgestellt wurden, wurden mittels GC/MS, HPLC oder Dünnschichtgaschromatographie gegengeprüft und validiert. Diese Werte dienten als Referenzwerte für die gesamte Untersuchung. Später wurden die unterschiedlichen Testmethode, im speziellen die der Urinteststäbchen und der Speichelproben mittels Immunoassay untereinander verglichen. Untersucht wurde, in wie weit die Speichelproben mittels Immunoassay im Vergleich zu den anderen Methoden im Urin eingesetzt werden kann. Es wurden insgesamt 103 Proben an 31 Probanden durchgeführt.

Laut den Ergebnissen dieser Studie haben Immunoassays verfahrensbedingte Schwächen und können daher nicht als alternatives Testverfahren im Drogenscreening hergenommen werden. **Kokain, Methadon** und **Opiaten** im Speichel mittels Immunoassay könnten eventuell zum Drogenscreening unterstützend herangezogen werden, um bei Verdacht einer Manipulation der Urinprobe, bzw. bei einer Verweigerung der Urinabgabe auf eine andere Methode ausweichen zu können. Bei dem Nachweis von Opiaten und Kokain muss jedoch die kürzere Nachweisbarkeitsdauer berücksichtigt werden. Kokain besaß eine Sensitivität von 40%, Spezifität von 100% und Genauigkeit von 97%. Die Ergebnisse bei den Opiaten zeigten einen sehr zuverlässigen Nachweis von 6-MAM, der bei frischen Heroinkonsum als erster Metabolit kurzfristig anfällt. Codein und Dihydrocodein zeigen eine bessere Tendenz in der Nachweisbarkeit als Morphin als alleinige Substanz. Opiate besaßen eine Sensitivität von 68%, Spezifität von 97% und Genauigkeit von 87% und Methadon besaß eine Sensitivität von 96%, Spezifität von 91% und Genauigkeit von 96%. Bei ausreichender Speichelmenge kann zudem ein Drogenscreening mittels GC/MS durchgeführt werden, was bei den oben genannten Substanzen gut durchführbar ist. Bei den **Benzodiazepinen** und den **Cannabinoiden** sind Testverfahren mit Urin als Matrix dem Immunoassay mit Speichel als Matrix weit überlegen. In den Immunoassays mit Speichel als Matrix bei den Benzodiazepinen lag die Sensitivität bei 67%, die Spezifität bei 47% und die Genauigkeit bei 53%. Bei den Cannabinoiden lag die Sensitivität bei 49%, die Spezifität bei 54% und die Genauigkeit bei 51%. Bei diesen beiden Substanzklassen ist der Nachweis im Speichel mittels

Immunoassays nicht möglich. Die Spezifität und die Genauigkeit bei **Amphetaminen** und **Barbituraten** betrug 100%. In dieser Studie lagen bei beiden keine positiven Ergebnisse vor. Daher kann bei diesen Substanzklassen über die Einsetzbarkeit keine zuverlässige Aussage gemacht werden.

Die Ergebnisse dieses Testverfahren deuten darauf hin, dass diese Methode beim Drogenscreening herangezogen werden kann. Weiterhin bleibt jedoch die Kombination von immunchemischer Verfahren mit Bestätigung der positiven Testergebnisse mittels GC/MS oder ähnlichen Testverfahren im Urin die zuverlässigste und praktikabelste Methode der Wahl. Die Ergänzung mit einem Drogenscreening mittels Immunoassay im Speichel als alternative Methode stellt einen zusätzlichen Gewinn dar, um Lücken oder Zweifel auszuräumen. Allerdings sollte die Realibilität von Drogennachweis mittels Immunoassay zurückhalten bewertet werden. Im Verkehrs- und Arbeitsmedizinischen Bereich ist deren Anwendung, wegen der geringen Beweiskraft und Zuverlässigkeit äußerst kritisch zu betrachten. Gesamt gesehen ist die Einsetzbarkeit von Immunoassays im Speichel sehr begrenzt. Der Drogennachweis mittels GC/MS scheint hingegen gangbar zu sein, da bei verschieden Testdurchläufen eine gute Übereinstimmung der Substanzen im Blut und Speichel nachweisen ließen [ROSITA 1999-2001, Speckl 1999].

7. Literatur

(1) Baselt RC, Cravey RH (1995): Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Fourth Edition, Chemical Toxicology Institute, Forster City, CA

(2) Bratzke H (1993): Drogen und Sicherheit des Straßenverkehrs - Nachweis und Wirkungen – Tatsächliche Verbreitung und Verdachtsbild – Straf - und verwaltungsrechtliche Reaktion (31. Deuscher Verkehrsgerichtstag 1993, S. 47-60). Deutsche Akademie für Verkehrswissenschaft e.V. /Deutsches Verkehrswissenschaftliches Seminar, Hamburg

(3) Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit 2001, www.bmgesundheit.de

(4) Caplan YH (1994): Cocaine. Abused Drugs Monograph Series (Y.H. Caplan, Ed.). Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Irving, Texas

(5) Cone EJ, Wedington WW (1989): Prolonged occurence of cocaine in human saliva an urine after chrinic use. J Anal Toxicol 12, 200-206

(6) Cone EJ (1990): Testing human hair for drugs of abuse I. individual dose and time profiles of morphine and codein in plasma, saliva, urine and beard compared to drug-induced effects on pupils and behaviour. J Anal Toxicol 14, 1-7

(7) Cone EJ, Oyler J, Darwin WD (1997): Cocaine disposition in saliva following intravenouse, intranasal and smoked administration. J anal Toxicol 21, 465-475

(8) Cook CE, Jeffcoat AR, Hill JM, Pugh DE, Patetta PK, Sadler BM, Withe WR, Perez-Reyes M (1993): Pharmakokinetics of metamphetamine selfadministered to human subjects by smokin S-(+)-methamphetaminehydrochloride. Drug Metab Dispos 21, 717-723

(9) Dackies CA et al. (1982): Persistance of urinary marijuana levels after supervised abstinence. Am. J. Psychatry 139, 1196-1197

(10) Daldrup T (1985): Zur Bewertung der THC- bzw. THC-Metabolite-Spiegel in Blut und Urin. Proceedings „Symposium Forensische Probleme des Drogenmissbrauchs“ der GTFCh, 56-66

(11) Dawson B, Trapp RG (2001): Basic & clinical biostatistics. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York

(12) ElSohly HN, ElSohly MA, Stanford DF(1990): Poppy seed ingestion and opiates urine-analysis: A closer look. J.Anal.Tox. 14, 308-310

(13) Fichtl B, Füllgraff G, Neumann HG, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W (1992): Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag Mannheim

(14) Gibitz HJ, König (1996): Strategie der klinisch-toxikologischen Analytik. DG Klinische Chemie Mitt.27, 121-123

(15) Glaeske G, Günther J, Keller S(1997): Nebenwirkung: Sucht. Verlag Antje Kustermann, München

(16) Glock MH, Heller PA, Malamud D (1982): Saliva as diagnostic fluid. NLM Bibliography 92-5: 1-102

(17) Goodmann LS, Gilman A, Hardman J (2001): The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.. McGraw-Hill

(18) Gorodetzky CW, Kullberg MP (1974): Validity of screening methods for drugs of abuse in biological fluids II. Heroin in plasma and saliva. Clin. Pharmacol Ther 15, 570-587

(19) Gorodetzky CW (1977): Detection of drugs of abuse in biological fluids. Handbook EXP.Pharm 45, 319-409

(20) Haeckel R (1989): Interpretation of salivary drug concentrations. J Clin Chem Clin Biochem 27, 223-226

(21) Haeckel R, Hänecke P (1996): Application of saliva for drug monitoring an in vivo model for transmembrane transport. J Clin Biochem 34, 171-191
(22) Hagemann P., M. Siegrist (1990): Verfälschungsstoffe beim Drogennachweis. Lab.med. 14, 116-120
(23) Hall BJ, Satterfield-Doerr M, Parikh AR, Brodbelt JS (1998): Determination of cannaboids in water and human saliva by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap gas chromatography/mass spectrometry. Anal Chem. 70, 1788-1796
(24) Hawks RI, Agurell S, Dewey W, Willette R (1983): Developments in cannaboid analyses of body fluids: implication for forensic applications. In The Cannaboids: Chemical, Pharmacologic, and Therapeutic Aspects. , EDS. Academic Press, Rockville, MD, pp 1-12
(25) Herkes GK, Eadie MJ (1990): Possible roles for frequent salivary antiepileptic drug monitoring in management of epilepsy. Epilepsy Res., 146-54
(26) Höld KM, de Boer D, Zuidema J, Maes RA (1996): Saliva as an analytical tool in toxicology. Int J Drug Test 1, (http://www.stpt.usf.edu/journal) 1-36
(27) Hope BT (1996): Novel transcription factors are induced by chronic cocaine treatment. In: Cellular and molecular mechanismus of drugs of abuse. Annals of the New York Academy of Sciences Volume 801
(28) Hübschmann HJ (1996): Handbuch der GC/MS. VCH-Verlag, Weinheim
(29) Huestis MA, Dickerson S, Cone EJ (1992): Can saliva THC levels be correlated to behaviour? American Acemedy of Forensic Sciences, Abstract, AAFS Publication 92-2, Fittje Brothers, Colorado Springs, CO, p 190
(30) Iten PX (1994): Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluß, Zürich
(31) Jenkins AJ, Cone EJ (1998): Disposition of heroin an metabolites in multiple bological matrices after low dose oral heroin administration in humans, Soft-TIAFT-Meeting Albuquerque
(32) Julien RM (1997): Drogen und Psychopharmaka. Spektrum Akadem. Verlag, Heidelberg
(33) Just WW, Werner G, Wiechmann M (1972) : Bestimmung von Δ^1- $\Delta^{1(6)}$ – tetrahydrocannabinol im Blut, Urin und Speichel von Haschisch-Rauchern. Dier Naturwissenschaften 59, 222
(34) Just WW, Werner G, Erdmann G, Wiechmann M (1975): Detection and identification of delta-8- and delta-9-terahydrocannabinol in saliva of man and autoradiographic investigation of their distribution in different organs in monkey. Strahlentherapie 74: 90-97
(35) Kang GI, Abbott FS (1982): Analysis of methadone and metabolites in biological fluids with gas chromatography.mass spectrometry. J Chromatogr 231, 311-319
(36) Kaplan A, Jack R, Opheim KE, Toivola B, Lyon AW (1995): Clinical Chemistry Interpretations and Techniques, 4th ed., Williams&Wilkins, Malvern,
(37) Kidwell DA, Blancho MA, Holland JC (1998): Testing for illicit drugs in sweat and saliva of drivers: SOFT-TIAFT-Meeting Albuquerque
(38) Kidwell DA, Holland JC, Athanaselis S (1998): Testing for drugs of abuse in sweat and saliva. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 21, 111-135
(39) Kielholz P, Goldberg L, Hobbi V, Ladewig D, Reggiani G (1972): Haschisch und Fahrverhalten; eine experimentelle Untersuchung. Deutsche Med. Wschr. 97, 789 . 794
(40) Kolb M et al. (1993): Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit Hilfe eines Programms. Acta hydrochim. hydrobiol. 21

(41) Lafolie P, Beck O, Blennow G, Boreús L, Borg S, Elwin CE, Karlsson L, Odelius G, Hjemdahl P (1991): Importance of Creatinine Analyses of Urin When Screening for Abused Drugs. Clin. Chem. 37, 1927-1931
(42) Meyer, von L (1993): Drogennachweis im Speichel und Blut mit Immunoassays. Abbott Satelliten-Symposium Mosbach
(43) Miles MV, Tennison MB, Greenwod RS (1991): Intraindividual variability of carbamezepine, phenobarbital, and phenytoin concentration in saliva. Ther Drug Monit; 13(2):166-71
(44) Moffat AC (Ed.) (1986): Clarke`s Isolation and Identification of Drugs. Pharmac.Press, London
(45) Naumer, Heller W (Hrsg.) (1997) Einführung in die moderne Analytik, 3. erweiterte und neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
(46) Niebdala SR, Kardos KW, Fritch D, Kardos S, Fries T, Waga J (2001): Detection of Marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral Marijuana. J Anal Toxicol, Vol. 25, 289-303
(47) Niebdala SR, Kardos KW, Waga J, Fritch D, Yeager L, Doddamane S Schoener E (2001): Laboratory analysis of remotely collected oral fluid specimens for opiates by immunoassay. J Anal Toxicol, Vol. 25, 310-315
(48) Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK(1982): Single dose kinetics of deuterium labelled delta-1-tetrahydrocannabiol in heavy and light cannabis users. Biomed. Mass Spec. 9, 6-10
(49) Oyler JM, Wtsadik AT, Cone EJ, Joseph R(1998): Saliva an plasma testing disposition of codein. SOFT-TIAFT-Meeting Albuquerque
(50) Palmeri A, Pichini S, Pacifici R, Zuccaro P, Lopez A(2000): Drugs in nails: physiology, pharmkokinetics and forensic toxikology. Clin Pharmacokinet 38(2): 95-110
(51) Pfleger K, Maurer HH, Weber A (1992): Mass spectral an GC data of drugs, poison, pesticides, pollutant and their metabolites. VCH-Verlag, Weinheim
(52) Pichini S, Altrieri I (1996): Drug monitoring in nonconvencional biological fluids and matrices. Clin. Pharmakokinet , 211-28. Review
(53) Poehlke T, Flenker I, Schlüter HJ, Busch H (2000): Drogen, 2 Suchtmedizinische Versorgung. Springer Verlag Heidelberg
(54) Pötsch L, Scopp G (1997): Zu Möglichkeiten und Grenzen chemisch-toxikologischer Untersuchungen an nicht konventionellen Asservaten. Tagungsband GTFCh-Symposium Mosbach, 70-88
(55) ROSITA – RoadSide Testing Assesment. http://www.rosita.org, 1999-2001
(56) Sachs H, Kinz P (1998): Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992, J Chromatogr B BiomedSci Appl. 1998 Aug 21; 713 (1): 147-61
(57) SAMHSA, Substance Abuse and Mental Health services Administration, http:/www.samhsa.gov
(58) Samyn N, Verstraete A, van Haeren A, Kintz P (1999): Analysis of drugs of abuse in saliva. Forensic Sci. Rev. 11(1): 1-19
(59) Samyn N, van Haeren C (2000): On-site testing of saliva an sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users, Int J Legal Med 113: 150-154
(60) Samyn N, De Boeck G, Wood M, Lamers C, De Waard D, Brookhuis K, Verstraete A, Riedel W. (2002): Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. Forensic Sci Int 2002 Aug 14;128(1-2):90

(61) Santos Lucas, dos AC, Bermejo A, Fernández P, Tabernero MJ (2000): Solid-Phase Microextraction in determination of methadone in human saliva by gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Analytical Toxicology, Vol. 24: 93-96
(62) Sas R, Dawes C (1997): The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva. Archs Oral Biol 42, 469-474
(63) Schmoldt A, Iwersen S, Chorzeleski G (1997): Enantioselektive Analyse von d,1-Methadon bei 35 Substituierten nach Umstellung von 1-Methadon auf d,1-Methadon. In Pragst F (Hrsg) Moderne Messverfahren im Rahmen der toxikologischen-forensichen Begutachtung. Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim
(64) Schramm W, Craig PA, Smith RH, Berger GE (1993): Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum, and urine. Clin. Chem. 39: 481-487
(65) Schütz H (1990): Screening und nachweis der Benzodiazepine.Schwierigkeiten und Abhilfe. GIT Fachz. Lab. 4/90, 441-454
(66) Schütz H, Rochholz G, Weiler G (1992): Zur Problematik der falsch negativen Benzodiazepam-Immunoassays, Klin.Lab. 38, 150-142
(67) Schütz H (1999): Screening von Drogen und Arzneimittel mit Immunoassays. Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott, Wiesbaden
(68) Seidenberg A, Honegger U(1998): Methadon, Heroin und andere Opioide. Verlag Hans Huber, Bern
(69) Sharp ME, Wallace SM, Hindmarsh KW(1983): Monitoring saliva concentration of mathaqualone, codein, secobarbital, diphenhydramine and diazepam after single oral doses. J Anal Toxicol 7, 11-14
(70) Ship JA, Fischer DJ (1997): The relationship between dehydration and parotid salivary gland function in young and older adults. J Gerontol Med Sci 52A, M 310-M319
(71) Silvers AR, Som PM (1998): Salivary glands. Radiologic Clinics of North America 36, 941-966
(72) Skopp G, Pötsch L, Becker J, Röhrich J, Mattern R (1998): Zur präanalytischen Phase chemisch-toxikologischer Untersuchungen. – I. Immunchemisches Drogenscreening im Urin – Erkennbarkeit von Manipulationen und Strategien bei rechtsmedizinischer Fragestellung. Rechtsmedizin 8, 163-167
(73) Smith FP, Kidwell DA (1996): Cocaine in hair saliva, skin swabs, and urine of cocain users´children. Forensic Sci Int 27, 179-189
(74) Soyka M(1998): Drogen- und Medikamentenabhängigkeit. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
(75) Speckl I (1999): Speichel ein alternatives Untersuchungmaterial ind der Drogenanalytik-Nachweis von Amphetaminen, Cannabis, Cocain, Designerdrogen, Methadon und Opiaten in Speichel und Urin, München
(76) Staak M, Kaferstein H, Schumacher B, Sticht G, Iffland R (1993): Plasma levomethadone level and conmitant use of sedatives in a methadone test program: Blutalkohol. 1993 Jul; 30(4): 232-9
(77) Struempler RE (1987): Excretion of codein and morphine following ingestion of poppy seeds. J.Anal.Tox. 11, 97-99
(78) Suzuki S, Inoue T (1989): Analysis of metamphetamin in hair, nail, sweat and saliva by mass frequentography. J Anal Toxicol 13, 16-178
(79) Verstraete A, Puddu M: Evaluation of different roadside drug tests, Status P, ROSITA; http://www.rosita.org, 2000
(80) Walsh SL, Preston ML et al. (1998): Clinical pharmacology of Buprenorphine: ceiling effects at high doses. Clin Pharmacol Ther 55: 569-580

(81) Wan SH, Matin S, Azarnoff DL (1978): Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH. Clin Pharmacol Ther 23, 585-590
(82) Zweig MH (1987): Assessment of clinical sensivity and specifity of labratory tests. NCCLS Document 7
(83) Zweig MH, Campell G (1993): Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem; 39: 561-577

8. Anhang

Patient	Metabolite	TP	FN	Referenz-bereich ng/mg Creatinin	Speichel-Meßdaten
1	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam, Flunitrazepam-Metabolite	x		> 46	113
2	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam		x	SP	12
	Diazepam, Flunitrazepam- Metabolite	X		?	83
3	Oxazepam		x	SP	26
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		>36	89
	Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam		x	SP	46
4	Oxazepam, Nordiazepam	x		>198	170
	Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam		x	853	38
	Oxazepam, Nordiazepam		x	>145	50
5	Oxazepam, Nordiazepam		x	>33	59
6	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam		x	>30	0
	Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam		x	>18	35
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam		x	>73	4
7	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		>94	103
8	Oxazepam, Nordiazepam	x		SP	98
	Oxazepam	x		SP	75
	Flunitrazepam- Metabolite	x		SP	108
9	Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam, Flunitrazepam- Metabolite	x		>28	102
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam, Flunitrazepam-Metabolite	x		211	80
	Oxazepam, Temazepam, Flunitrazepam- Metabolite	x		>77	70
	Flunitrazepam- Metabolite	x		>26	106
	Nitrazepam, Flunitrazepam- Metabolite		x	>39	45
10	Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		543	121
11	Nitrazepam, Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam, Flunitrazepam- Metabolite	x		>85	217
	Nitrazepam, Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam, Flunitrazepam- Metabolite	x		>68	194
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam, Flunitrazepam-Metabolite	x		>73	192
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		>118	295
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		>75	512
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		>94	229
	Diazepam, Oxazepam, Temazepam, Nordiazepam	x		>42	228
	Gesamt	**20**	**10**		

Tab.8.1.: Vergleich der Ergebnisse der Speichelproben (n=30) zu den positiven Ergebnissen der Referenzmethode (n=30) bei Benzodiazepinen und deren Metabolite; Messdaten und der Creatininwerte der jeweiligen Urinprobe wurde zum Vergleich angehängt; Daten sind nach Probanden geordnet und mit Querbalken abgetrennt; SP = Creatinin <2ng/mg; ? = kein Creatininwert vorliegend

Referenzbereich ng/mg Creatinin	TP	FN	ZWM
>100	1	0	
>30-99	2	3	
>20-29	1	6	
>11-19	2	5	
>7-10	6	7	
>2-6	8	18	
SP	0	2	
?	0	1	
Gesamt	**20**	**42**	**5**

Tab. 8.2.: Vergleich der Ergebnisse der Speichelproben (n=62) zu den positiven Ergebnissen der Referenzmethode (n=67) bei Cannabinoide bezüglich Messdaten und der Creatininwerten, ZWM = zu wenig Material; SP = Creatinin <2ng/mg; ? = kein Creatininwert vorliegend

Referenzbereich ng/mg Creatinin	TP	FN
schwach positiv	0	3
>29	1	0
?	1	0
Gesamt	**2**	**3**

Tab. 8.3.: Vergleich der positiven Ergebnisse mit den falsch Negativen der Speichelproben (n=5) zu den positiven Ergebnissen der Referenzmethode (n=5) bei Kokain und deren Metabolite bezüglich Messdaten und der Creatininwerten; ? = kein Creatininwert vorliegend

Patient	Substanzen	Referenzbereich ng/mg Creatinin	TP	FN	ZWM
1	Morphin, Codein, 6-Monoacteylmorphin	>18-30 >31	4 4	0 0	
2	Morphin, Codein	>32-50 >51	2 5	2 2	
3	Morphin, Dehydrocodein	> 46	1	0	
4	Morphin	>43 ?	1 1	7 2	
	Gesamt		**18**	**13**	**2**

Tab.8.4.: Vergleich der Ergebnisse Speichelproben (n=31) zu den positiven Ergebnissen der Referenzmethode (n=33) bei Opiate und bezüglich der nachgewiesenen Metabolite und der Messdaten und der Creatininwerten; ? = kein Creatininwert vorliegend; Daten sind nach Probanden geordnet und mit Querbalken abgetrennt

Speichel -EIA

	A	Ba	Be	K	M	O	T
GESAMT	108	108	108	108	108	108	108
n=	96	96	96	96	96	96	96
FEHLT	5	5	5	5	5	5	5
z.w.M	7	7	7	7	7	7	7
TP	0	0	20	2	82	23	30
TN	96	96	31	77	10	59	19
FP	0	0	37	14	1	6	16
FN	0	0	10	3	3	8	31
Sensitivity	-	-	67%	40%	96%	68%	49%
Specifity	100%	100%	47%	100%	91%	97%	54%
PPV	-	-	36%	100%	99%	91%	65%
NPV	100%	100%	76%	97%	77%	86%	38%
Accuracy	100%	100%	53%	97%	96%	87%	51%

U-Stix

	A	Ba	Be	K	M	O	T
GESAMT	108	108	108	108	108	108	108
n=	103	103	103	103	103	103	103
FEHLT	5	5	5	5	5	5	5
z.w.M	0	0	0	0	0	0	0
TP	0	0	27	2	89	28	61
TN	102	103	67	97	12	66	36
FP	1	0	5	0	1	4	1
FN	0	0	4	3	1	5	5
Sensitivity	-	-	87%	40%	99%	85%	93%
Specifity	99%	100%	93%	100%	92%	94%	97%
PPV	-	-	84%	100%	99%	87%	98%
NPV	100%	100%	97%	99%	92%	93%	88%
Accuracy	99%	100%	91%	97%	98%	91%	94%

Urin-EIA

	A	Ba	Be	K	M	O	T
GESAMT	108	108	108	108	108	108	108
n=	103	103	103	103	103	103	103
FEHLT	5	5	5	5	5	5	5
z.w.M	0	0	0	0	0	0	0
TP	0	0	30	5	91	33	67
TN	103	103	73	98	12	70	35
FP	0	0	0	0	0	0	1
FN	0	0	0	0	0	0	0
Sensitivity	-	-	100%	100%	100%	100%	100%
Specifity	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%
PPV	-	-	100%	100%	100%	100%	99%
NPV	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Accuracy	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%

Sensitivity	**TPx100/TP+FN**
Specifity	**TNx100/TN+FP**
PPV	**TPx100/TP+FP**
NPV	**TNx100/TN+FN**
Accuracy	**TP+TN/Gesamt**

Tab. 8.5.: Übersicht der unterschiedlichen Ergebnisse; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannabinoide; Speichel-EIA : Speichelprobe mittels EIA; U-Stix: Urinteststäbchen; U-EIA: Urinproben mittels EIA; EIA = Enzymimmunoassay; TP = true positive; TN = true negative; FP = false positive; FN = false negative; PPV = positive predictive value, NPV = negative predictive value

Patient		Amphetamine				Barbiturate				Benzodiazepine				Kokain				Methadon				Opiate				Cannaboide			
	Volumen	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN
1	0,2		421				6				217				10				653				29						
	0,3		239				14				194				15				966				21						
	0,8		359				19				192				18				???				36						
	0,5		285				8				295				15				???				40						
	0,5		523				8				512				12				???				43						
	1		374				13				229				12				???				45						
	1		290				10				228				8				1493				9				16		
2	0,2		117				8				7				10				411				21				17		
	0,8		153				9				56				7				446				30						0
	0,8		77				28				42				20							79	35						0
	?		138				12					74			7				215				0						11
	?		226				12					113			11							124	14				21		
3	0,1		327				5				61				10				???				13						0
	0,1		649				15					177			15				3379				54				27		
	0,2		338				10					115					(15)		1731				44	( )			25		
	?		360				11					127			12				1468				44				19		
4	1		254				9					110			14				???				24					27	
	0,4		136				8					75			11				???				16				0		
	0,4		479				12					162			13				502				23					34	
	0,8		61				7				34				10				???				13				0		
	0,2		488				14					178			12				???				34					30	
	1,5		0				12				25								256				0				9		
5	0,8		395				11					153			14				445				38				33		
	0,1		572				15					170			18				438				59				42		
	1		306				13				121				11				2622				24				27		
6	0,9		79				7						45		8				649				231						0
	1,5		241	( )			6				106				7				509				1878				27		
	2		100				11				70				8				???				2440			( )			0
	1		86				11				80				10				???				359						0
	1		145				6				102				8				448				2264						12
7	3		0				3				24				4					0			0				0		
	1		0				4				0				9					68			0				0		
8	3		0				3				21						(10)					(104)				18		0	
9	3		252				12					144			20					74						36	26		
10	0,5		115				5				62				6				???					(90)			0		
	0,2		123				4				60				6				228				71				0		
	0,8		92				5				58				8				???				67				0		
	0,2		228				13					100			11				???				74				0		
	0,2		348				14					82			14				???				629				0		
	3		482				14					183			13				301				401					32	
			459				11					166			13				343				???					25	
11	0,1		445				5				108				11				1112				30					34	
	0,2		207				10				75				14				437				0				16		
	1		194				12				98				16				???				51				15		
	0,5		550				13					194			9				1564				11					35	
12	3		58				5				103				10				146				14						(0)
13	3		40				7				37				11				326				15						0
			103				10				47	( )			8				???				13						0
	3,5		204				8					78			8						(2447)		0						15
			12				9				50				12				326				0						10
14	1,5		401				0					112			0				1100				12					28	
	?		91				8				34				7				1497				25				0		
15	1		131				6					(100)			6				320				14				22		
	0,5		159				14					116			13				2100				31						0
16	1		215				6				69				14				???				17				29		
	3		135				7				47				12				???				18				25		
	1		184				9				36				8				2340				0				35		
	3		104				7				42				8				190				0				28		
	?		244				8				61				19				1457				0				21		
17	0,5		153				3				44				9					0			21						0
	3		402				8					85			12					64			29				43		
	2		551				18					112			14					54			4				39		
18	1,5		403				19					119		79					381				502				29		
	0,8		487				17					160			17				???				114				31		
	0,4		463				6				39				10				394				422						15
19	2		0				0						4		0					0			0					0	
	3		45				4						35		5					0			21						0
	?		0				25						0		0					0			0	( )				0	( )
20	4		38				11				43				12				???				21						0
21	0,7		103				10						(59)		11				1231				22						0
22	3		36				7						50		9				???						22				0
	0,5		130				8						38		8				1394				602				26		
	?		435				14				170				11				1161				67				51		
23	0,8		210				14					85			14				???				23				17		
	1		444				19					(140)			15				657				32				33		
	0,4		493				32					(193)			24				???				62				35		
	1		226				22					141			17				???				25	( )			23		
24	5		103				10				59				11				1231				22						0
	4		62				4						(46)		9				???				28						0
	3		135				10				89		( )		7				474				20						0
	4		0				7						(26)		7				679				0		( )				(0)
25	3		211				10				83				11				???						(0)				12
	4		0				5						(22)		11				194				0		0		0		
	0,4		463				16					149			13				836				396					28	
26	3		340				10				47				12					0						(59)			15
27	0,7		256				10				113				12				???				1539					19	
28	2		368				6				23				8				747				150						(0)
	3		289				8				35				8				???				86						0
	2,5		382				4					82			8				???						33		15		
	3		365				15					73			9				2610						31				0
	2		581				13				33				13				1735						(24)				0
	?		85				0				28				0				1049					89					(0)
29	3		90				50				20						(12)		566						46		21		( )
	1		263				15					92			13				1347				30				24		
	?		658				14					148		66						73			72				24		
30	1		548				13					147				15			???				37				47		
	Mittleres Volumen																												
	1,5	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN
	Anzahl		96				96			20	31	35	10	2	91	0	3	82	10	1	3	21	63	2	10	30	19	16	31
LOD			700				60				70				35					140				65				17		

Tab. 8.6: Übersicht der Messwerte der einzelnen Analyte von den Speichelproben geordnet und abgehoben nach einzelnen Probanden; ( ) = falsch positive oder negative Ergebnisse mittels Urinteststäbchen

Benzodiazepine						THC					
Cut-off	**Sens**	**Spez**	**Accu**	**PPV**	**NPV**	**Cut-off**	**Sens**	**Spez**	**Accu**	**PPV**	**NPV**
40	80	9	31	28	50	10	61	43	54	65	39
45	80	15	35	30	62	15	54	43	50	62	35
50	73	20	36	29	62	16	49	49	49	62	35
55	70	33	45	32	71	**17**	**49**	**54**	**51**	**65**	**38**
60	67	39	48	33	72	18	46	54	49	64	37
65	67	45	52	36	75	19	44	54	48	63	36
70	**67**	**47**	**53**	**36**	**76**	20	44	57	49	64	37
75	60	48	52	35	73	21	44	57	49	64	37
80	57	51	53	35	72	22	39	57	46	62	35
85	50	54	53	33	71	23	39	60	47	63	6
100	43	59	54	32	70	24	38	66	48	66	38
110	30	62	52	26	66	25	34	69	47	66	38
120	27	73	58	31	69	30	21	83	44	68	38
150	23	82	64	37	70	40	13	100	45	100	40

Kokain						Opiate					
Cut-off	**Sens**	**Spez**	**Accu**	**PPV**	**NPV**	**Cut-off**	**Sens**	**Spez**	**Accu**	**PPV**	**NPV**
10	100	40	43	8	100	15	94	38	56	42	93
12	100	59	61	12	100	25	84	61	69	51	89
15	60	85	83	18	97	30	84	69	74	57	90
35	**40**	**100**	**97**	**100**	**97**	35	77	78	78	63	88
						45	74	91	85	79	88
						50	71	92	85	81	87
						55	71	95	87	88	87
						60	68	97	87	91	86
						65	**68**	**97**	**87**	**91**	**86**
						70	61	97	85	90	84
						75	52	97	82	89	81
						100	48	100	83	100	80

Methadon					
Cut-off	**Sens**	**Spez**	**Accu**	**PPV**	**NPV**
70	100	75	97	97	100
75	100	83	98	98	100
100	99	83	97	98	91
120	98	83	96	98	83
140	**96**	**91**	**96**	**99**	**77**

Tab. 8.7.: Übersicht über die Testeigenschaften zu den unterschiedlichen Cut-off-Werten der unterschiedlichen Analyten im Immunoassy / Speichel; der ausgewählte Cut-off ist fett hervorgehoben

Matrix mit Konzentration des jeweiligen Anylates in [µg/ml]	A	Ba	Be	K	M	O	T_M	T_D
SP 10	???	20414	???	???	???	1284	???	125
***SP 10**	*???*	*7899*	*???*	*???*	*???*	*1262*	*???*	*138*
SPW 10	???	10112	???	???	???	1389	???	131
***SPW 10**	*???*	*6704*	*???*	*???*	*???*	*1111*	*???*	*132*
SP 1	833	796	939	996	1177	630	???	124
***SP 1**	*1108*	*809*	*831*	*1061*	*1309*	*671*	*???*	*129*
SPW 1	1089	679	908	934	915	649	59	55
***SPW 1**	*1768*	*867*	*846*	*1229*	*1038*	*740*	*75*	*65*
SP 0,1	247	65	217	121	156	96	29	0
***SP 0,1**	*296*	*66*	*225*	*117*	*157*	*108*	*27*	*0*
SPW 0,1?	404	61	259	116	157	102	32	0
***SPW 0,1**	*571*	*64*	*324*	*136*	*148*	*112*	*33*	*0*
PBS 10	???	15068	???	???	???	1322	???	139
***PBS 10**	*???*	*5839*	*???*	*???*	*???*	*1175*	*???*	*156*
PBSW 10	???	16769	???	???	???	1434	36	30
***PBSW 10**	*???*	*8138*	*???*	*???*	*???*	*1111*	*37*	*38*
PBS 1	622	742	769	1017	971	697	134	31
***PBS 1**	*667*	*794*	*631*	*1120*	*1018*	*645*	*21*	*23*
PBSW 1	782	800	615	1113	783	657	12	0
***PBSW 1**	*989*	*913*	*631*	*1336*	*988*	*726*	*0*	*0*
PBS 0,1	19	53	160	120	132	101	0	0
***PBS 0,1**	*22*	*51*	*147*	*119*	*123*	*107*	*0*	*0*
PBSW 0,1	321	67	205	129	130	106	24	0
***PBSW 0,1**	*361*	*67*	*213*	*144*	*136*	*114*	*12*	*0*
SP 0	97	9	44	5	22	12	7	0
SPW 0	120	16	130	8	66	19	29	0
PBS 0	193	7	61	5	0	30	0	0
PBSW 0	156	16	71	6	60	0	7	0

Tab. 8.8.: Ergebnisse der Vorversuche, Kalibration und der Leerwerte; A=Amphetamine, Ba=Barbiturate, Be=Benzodiazepine, K=Kokain, M=Methadon, O=Opiate, T=Cannaboide,; ??? = außerhalb des Messbereiches, SP = Speichel, SPW = Speichel auf Watte, PBSW = PBS auf Watte, **SP* = Speichel 3 Tage später, **SPW* = Speichel auf Watte3 Tage später, **PBSW* = PBS auf Watte3 Tage später mit Lagerung bei Raumtemperatur

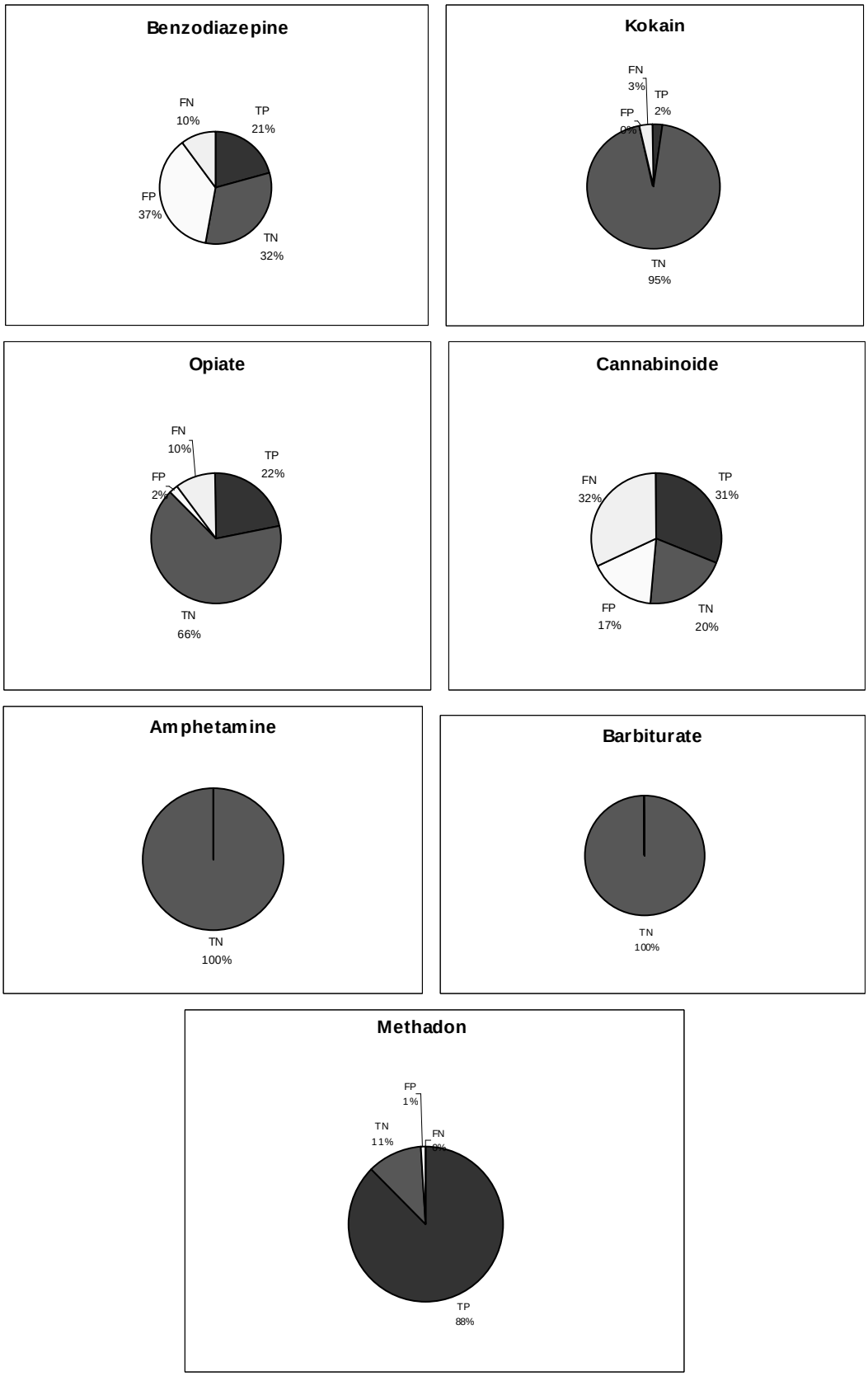


Abb. 8.1: Darstellung der Kategorien der einzelnen Analyten im Immunoassay / Speichel

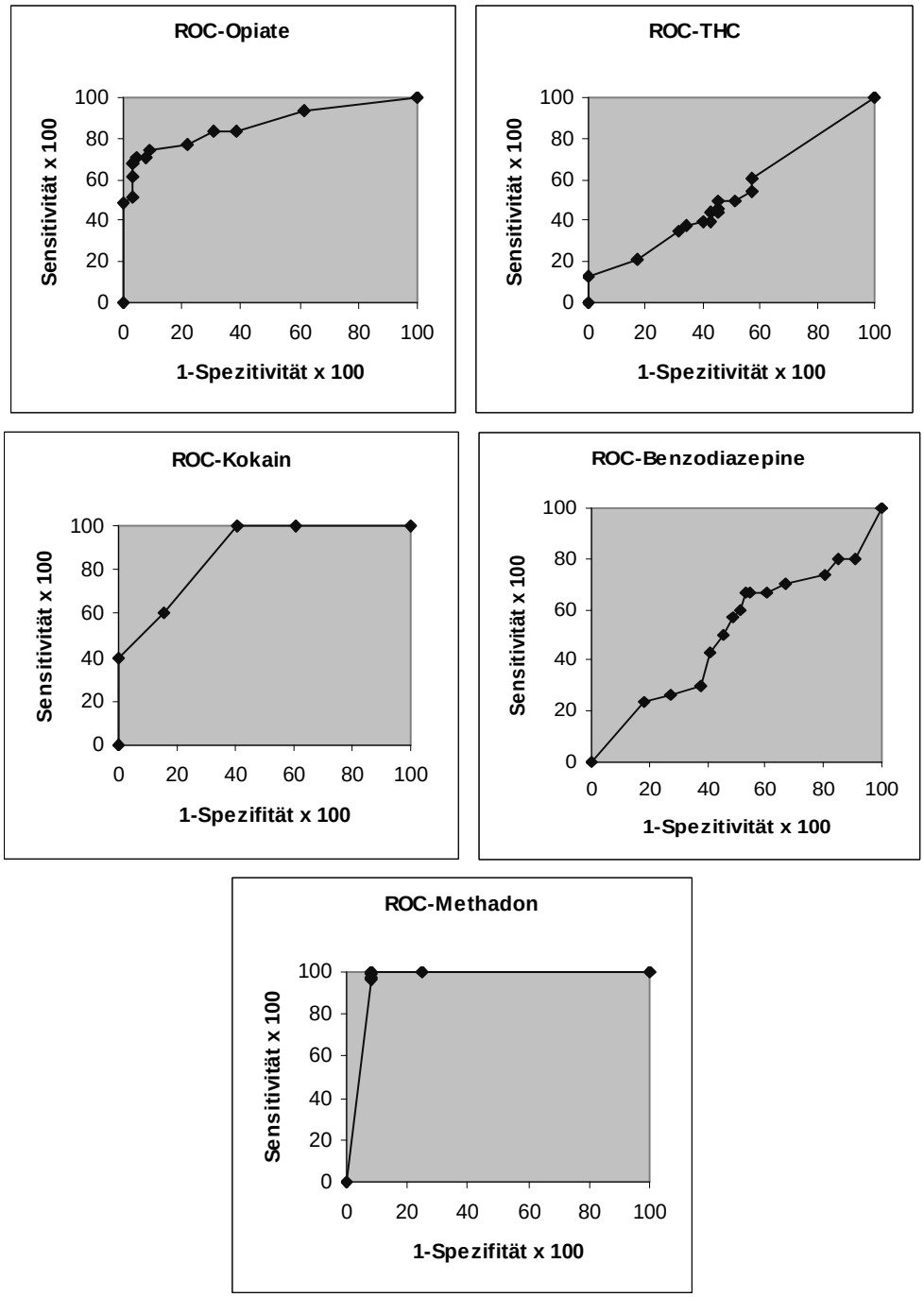
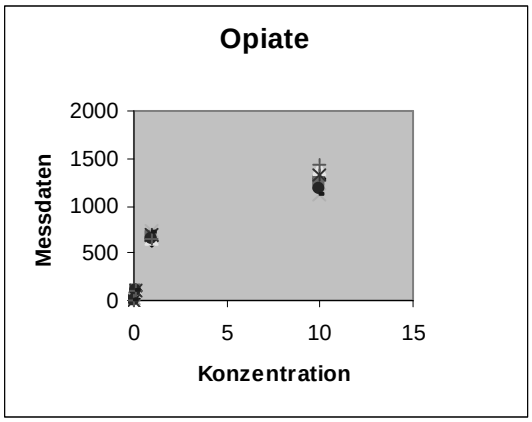
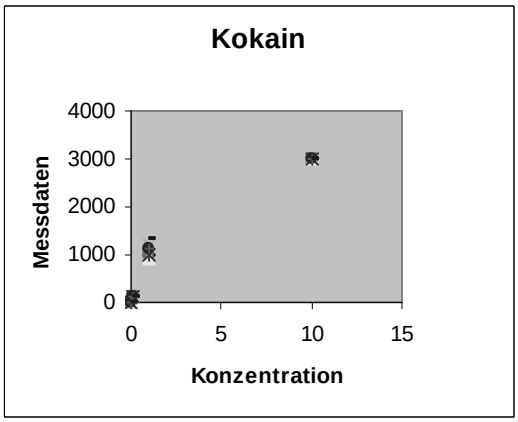
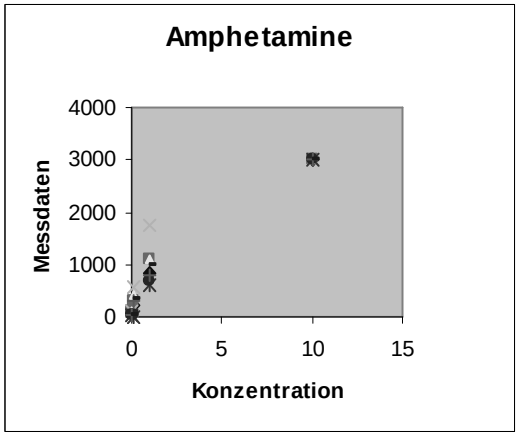
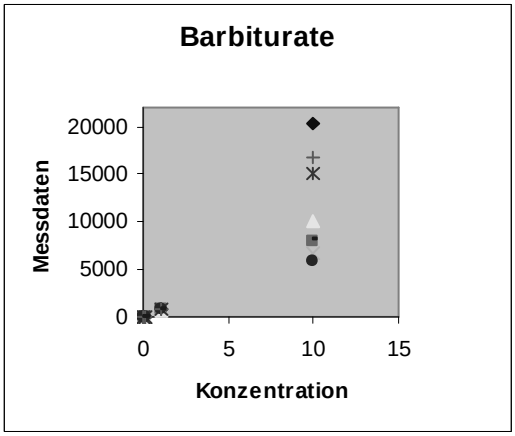


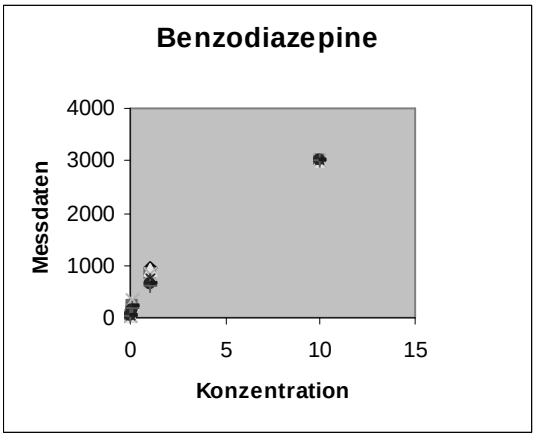
Abb. 8.2.: ROC- Kurven für Benzodiazepine (n= 10), Kokain (n=4), Methadon (n=5), Opiate (n=12), THC (n=14); n= Anzahl

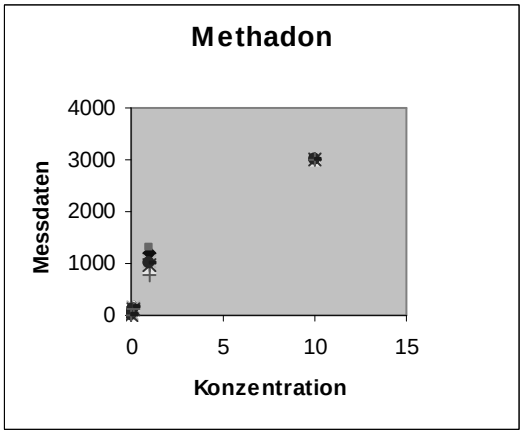

Opiate
Messdaten
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
Konzentration


Kokain
Messdaten
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
Konzentration


Amphetamine
Messdaten
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
Konzentration


Barbiturate
Messdaten
20000
15000
10000
5000
0
0
5
10
15
Konzentration


Benzodiazepine
Messdaten
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
Konzentration


Methadon
Messdaten
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
Konzentration

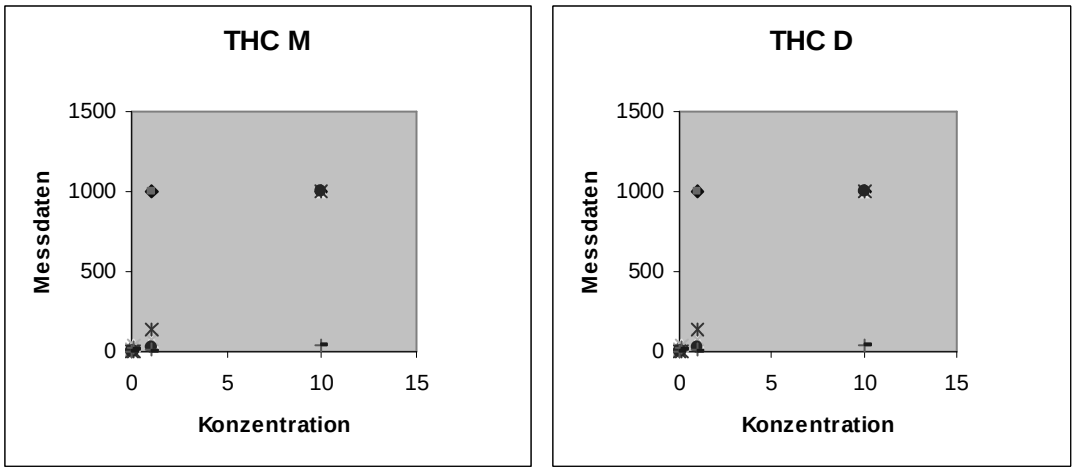


Abb. 8.3.: Darstellung der Konzentrationen der Analyte in Korrelation zu den Messdaten; THC M = THC Microgenics-Test, THC D = THC-Dade-Behring-Test; Konzentration in µl; Messdaten in ml/L

Curriculum Vitae

Name	Olaf Dierich	
Geburtstag	5. März 1968	
Geburtsort	Memmingen	
Nationalität	deutsch	
Familienstand	verheiratet	
Schule	1974 - 1978	Volksschule Buxheim
	1978 - 1980	Volksschule Wittmund
	1980 - 1988	Bernhard-Striegel Gymnasium Memmingen
	1988	Abitur
Zivildienst	1988 - 1990	Müller Privatkrankenhaus / Innere Medizin
Hochschule	1990	Ludwig- Maximilian – Universität, München
	1992	Physikum, LMU München
	1993	Praktikum, Hospital II. Orden, Innere Medizin, München
	1993	I. Staatsexamen, LMU München
	1994	Praktikum, Charité, Neurologie, Berlin
	1996	II. Staatsexamen, FU Berlin
	1997	III. Staatsexamen FU Berlin
	2000	Approbation
	2007	Promotionsarbeit: *Speichel als alternatives Untersuchungsmaterial zur Drogenanalytik mittels Immunoassay im Vergleich zu verschiedenen Nachweisverfahren im Urin in drogentherapeutischen Einrichtungen,* LMU München
Laufbahn	1996-2001	Dozent in der Paracelsus-Schule für Heilpraktiker (klinische Medizin)
	1998-2000	Arzt im Praktikum, „ZETÜM GmbH“ (Zentrum für Tauch- und Überdruck Medizin), Bremen
	2000-2000	Vertretung des ärztlichen Leiters der Druckkammer Hamburg-Barmbeck
	2000-2001	Ärztlicher Leiter, Medizinische Ambulanz/Suchttherapie, Oldenburg
	2003-2005	Notfallaufnahme, Caboolture, Australien
	2005-2005	Innere Medizin, Caboolture, Australien
	2005-2006	Notfallaufnahme, Noosa, Australien
	2007-	Allgemeinärztliche Praxis, Glasshouse Mountains, Australien

Veröffentlichungen

- Kapitel Physiologie für „Taucherhandbuch“, ecomed /Landsberg, 14.Hrsg. 6/95
- Kapitel Tauchmedizin für „Taucherhandbuch“, ecomed/Landsberg, 23. bis 28. Hrsg. 1997-1999
- Gefahren durch Meerestiere, Books on Demand, 2004
- Drogenanalytik im Speichel mit Immunoassay: Ein Vergleich mit konventionellen Nachweisverfahren im Urin, Fortschr. Neurol. Psychiat. 2005; 73:401-408 / Druckhaus Götz GmbH