



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Speichel als Matrix zum Nachweis
von Drogen und Medikamenten im
Rahmen einer therapeutischen Behandlung“

Band 1 von 1 Bänden

Verfasserin

Mag. pharm. Lydia Halwachs

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

Wien, 2011

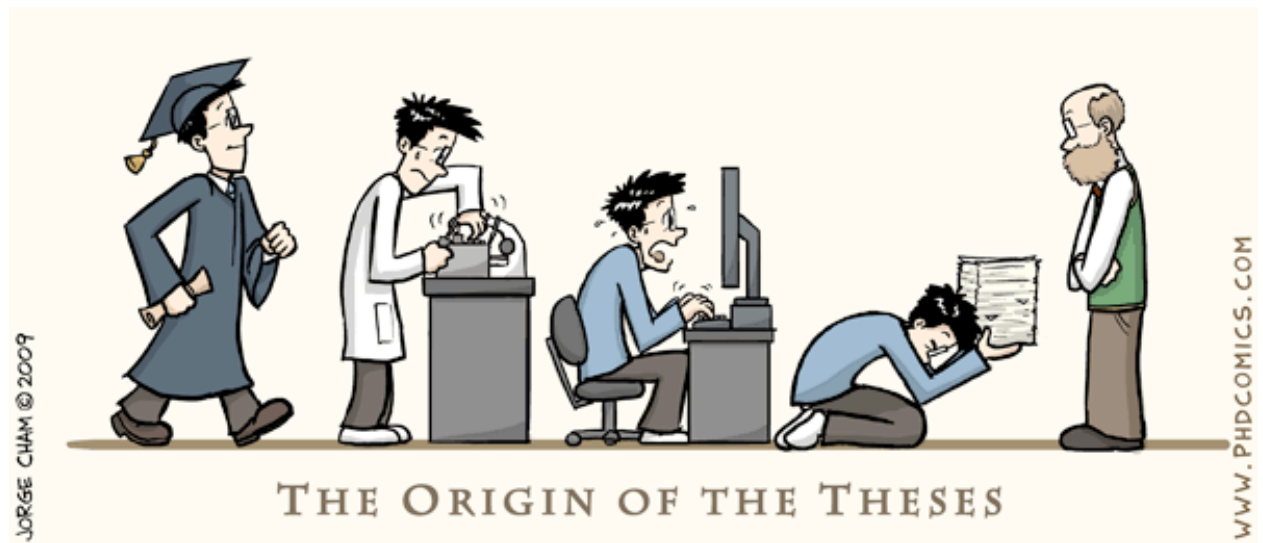
Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 091 449

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: Univ-Prof. Dr. Rainer Schmid

Speichel als Matrix zum Nachweis von Drogen und Medikamenten im Rahmen einer therapeutischen Behandlung

Mag. pharm. Lydia Halwachs



Sedikit demi sedikit lama-lama menjadi bukit.
Indonesisches Sprichwort

Dank

Einen herzlichen Dank möchte ich meinem Betreuer, Herrn Univ. Prof. Dr. Rainer Schmid aussprechen, der mich in den letzten Jahren mit seiner großen Geduld, Freundlichkeit und seinen fachlichen Anregungen bei meiner Arbeit unterstützte. Er nahm sich immer für meine Anliegen Zeit und stand immer mit einem guten Rat bereit.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern vom Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik – Abteilung Toxikologie, AKH Wien, ohne deren Mithilfe das Entstehen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders danke ich Herrn Josef Ebner, der mir bei der Arbeit im Labor mit seiner fachlichen Kompetenz und außergewöhnlichen Freundlichkeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des weiteren danke ich sehr herzlich Frau Dr. Bettina Steyrer und Frau Ing. Gerda Böhm für die unkomplizierte Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung beim Vermessen der Speichel- und Harnproben am Klinischen Analyser.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Lebenslage moralisch sowie finanziell unterstützt und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Terima kasih banyak, Robert!

Muito agradecida, Beatriz Miranda-da-Cruz! Thank you for your continuous encouragement to finish my thesis. Thanks for all the cakes, desserts and chocolate!.

Danke, Bettina, Martin und Mona.

Ein herzliches Dankeschön an alle Raucher, Gelegenheitsraucher, Passivraucher und Nichtraucher, ohne deren Spucke die „Cotinin-Studie“ nicht zustande gekommen wäre. Ein ganz großes Danke auch an die zehn Mohnliebhaber, die durch ihren selbstlosen Einsatz die „Mohn-Studie“ ermöglicht haben.

Der Firma Greiner Bio-One GmbH danke ich für ihr Interesse und die finanzielle Förderung des Projekts. Mein Dank gilt auch der Firma Microgenics für die Unterstützung mit dem CEDIA® Opiate OFT Immunoassay, sowie Herrn Dr. Michael Böttcher für die Unterstützung beim Vermessen der Speichelproben mit dem CEDIA® Opiate OFT Immunoassay.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	19
Allgemeiner Teil	20
1 Speichel	20
1.1 Speicheldrüsen	20
1.1.1 Ohrspeicheldrüse - Glandula parotidea	21
1.1.2 Unterkieferspeicheldrüse - Glandula submandibularis	21
1.1.3 Unterzungendrüse - Glandula sublingualis	21
1.1.4 Aufbau der Speicheldrüsen	21
1.1.5 Erkrankungen mit Beteiligung der Speicheldrüsen	22
1.1.5.1 Sjögren-Syndrom	22
1.2 Bildung des Speichels	22
1.2.1 Transport von Wirkstoffen in den Speichel	23
1.2.1.1 Passive transzelluläre Diffusion	23
1.2.1.2 Ultrafiltration	24
1.2.1.3 Aktiver Transport	24
1.3 Zusammensetzung des Speichels	24
1.3.1 Änderung der Speichelzusammensetzung bei systemischen Erkrankungen	26
1.3.1.1 Chronische Niereninsuffizienz	26
1.3.1.2 Mukoviszidose	26
1.3.1.4 Graft-versus-Host-Erkrankung	26
1.4 Speichelfluß	26
1.4.1 Hyposialie und Xerostomie	27
1.4.2 Einfluß von Medikamenten auf den Speichelfluß	27
1.4.2.1 Tricyclische Antidepressiva	27
1.4.2.2 Muscarin-Rezeptor-Antagonisten	27
1.4.2.3 α_1 -Rezeptorantagonisten	28
1.4.2.4 Antipsychotika	28
1.4.2.5 Diuretika	28
1.4.2.7 Antihypertensiva	28
1.4.2.8 Antidepressiva	28
1.4.2.9 Opioide und Benzodiazepine	28
1.4.2.11 Cytokine	29
1.5 Funktion des Speichels	29
1.5.1 Schutzfunktionen des Speichels	29
1.5.1.1 Schutz der Zähne	29
1.5.1.2 Schutz der Schleimhäute	29
1.5.2 Immunologische Funktionen des Speichels	30
1.5.2.1 Immunglobuline	30
1.5.2.2 Lysozym	30
1.5.2.3 Lactoferrin	30
1.5.2.4 Peroxidasen	30
1.5.2.5 Cystatine	31
1.5.2.6 Histatine	31
1.5.2.7 Agglutinin	31
1.5.3 Speichel als Teil des Verdauungssystems	31
1.6 Speichel als Analysenmedium	32
1.6.1 Speichel als Matrix zur Überwachung des Gesundheitszustandes	33
1.6.1.1 Endokrinologie	33
1.6.1.2 Diagnostik viraler Erkrankungen	33
1.6.1.3 Diagnostik bakterieller Erkrankungen	33
1.6.1.4 Diagnostik von systemischen Erkrankungen	34
1.6.1.5 Nachweis von Tumormarkern	34
1.6.2 Therapeutic Drug Monitoring und Nachweis von Drogen	34

1.6.3	Einflußfaktoren auf die Speichelprobenahme	35
1.6.3.1.	Einfluß der oralen Kontamination	35
1.6.3.2	Einfluß des pH-Wertes und der Speichelstimulation	36
1.6.3.3	Einfluß des Sammelsystems	36
1.6.3.4	Probenstabilität	36
1.6.4	Speichelsammelsysteme	36
1.6.4.1	Anforderungen an Speichelsammelsysteme	36
1.6.4.2.	<i>Cozart DDS</i>	37
1.6.5.3	<i>Das Greiner Bio-One Saliva Collection System</i>	38
1.6.5.4	<i>Intercept Oral Specimen Collection Device</i>	39
1.6.5.5	<i>OraCol Saliva Collection Device</i>	40
1.6.5.6	<i>OnTrak OraTube</i>	40
1.6.5.7	<i>QuantiSal</i>	41
1.6.5.8	<i>Salicule Saliva Collector</i>	42
1.6.5.9	<i>Salivette</i>	42
1.6.5.10	<i>StatSure Saliva Sampler</i>	43
2	Tabak-Alkaloide	44
2.1	Stammpflanzen	44
2.1.1	Habitus	44
2.2	Biosynthese der Nicotiana-Alkaloide	45
2.3	Physikalische und chemische Eigenschaften von Nicotin	45
2.4	Pharmakokinetik	45
2.5	Metabolismus	46
2.5.1	Phase-I-Metabolismus	46
2.5.1.1	Oxidation am alicyclischen Kohlenstoff	46
2.5.1.2	Oxidation am alicyclischen Stickstoff	47
2.5.2	Phase-II-Metabolismus	48
2.5.2.1	Methylierung	48
2.5.2.2	Glucuronidierung	48
2.6.	Pharmakodynamik	48
2.7	Wechselwirkungen von Tabakrauch mit Medikamenten	49
2.8	Die globale Tabak-Epidemie und ihre gesundheitlichen Konsequenzen	50
2.8.1	Gesundheitliche Konsequenzen des Zigaretten-Rauchens	50
2.8.1.1	Hämodynamische Effekte des Rauchens	50
2.8.1.2	Einfluß des Rauchens auf das Endothel	50
2.8.1.3	Einfluß des Rauchens auf die Blutgerinnung	50
2.8.1.4	Einfluß des Rauchens auf entzündliche Prozesse	51
2.8.1.5	Rauchen und Diabetes mellitus	51
2.8.1.6	Rauchen und Blutfettwerte	51
2.8.1.7	Rauchen und das Immunsystem	51
3	Opium-Alkaloide	51
3.1	Stammpflanze	51
3.2.1	Habitus	52
3.2	Biosynthese von Morphinan-Alkaloiden	52
3.3	Pharmakokinetik der Morphinane	53
3.4	Metabolismus	53
3.5	Pharmakodynamik	53
3.6	Wechselwirkungen von Morphin mit Medikamenten	54
3.7	Toleranz, Sucht und Entzug	54
3.7.1	Gesundheitliche Folgen einer Opiat-Sucht	55
3.8	Das „Mohnkuchen-Problem“	55
4	Grundlagen der verwendeten Analysenmethoden	55
4.1	Grundlagen der Festphasenextraktion	56
4.2	Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	56
4.2.1	Grundprinzipien der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	56
4.2.2	Chromatographische Kenngrößen	57
4.2.2.1	Kapazitätsfaktor k	57

4.2.2.2	Trennfaktor α	57
4.2.2.3	Auflösung R_s	57
4.2.2.4	Effizienz der Säule	58
4.2.3	Grundsätzlicher Aufbau einer HPLC-Anlage	59
4.2.3.1	Eluentenvorratsgefäß	59
4.2.3.2	Pumpen	59
4.2.3.4	Säule	59
4.2.3.5	Detektoren	59
4.2.3.5.1	UV-Adsorptions-Detektoren	60
4.2.3.5.2	Massenspektrometer - LC/MS	60
4.2.3.5.3	Weitere Detektor-Typen	60
4.3	Grundlagen der Massenspektrometrie	61
4.3.1	LC/MS-Interfaces	61
4.3.1.1	Atmospheric Pressure Ionization	61
4.3.1.1.1	Elektrospray Ionisation	61
4.3.2	Massenanalysatoren in der LC/MS	61
4.3.2.1	Quadrupol-Systeme	61
4.3.2.2	weitere Massenanalysatoren in der LC/MS	62
4.3.2.2	Tandem-Instrumente	63
4.3.2.2.1	Triple-Quadrupol-Systeme	63
4.3.2.2.1.1	Tandem-Experimente	63
4.3.2.2.1.1.1	Product Ion Scan	63
4.3.2.2.1.1.2	Precursor Ion Scan	63
4.3.2.2.2	Weitere Tandem-Instrumente	63
4.4	Grundlagen der immunchemischen Messverfahren	64
4.4.1	Antigen-Antikörper-Reaktion	64
4.4.2.	wichtige homogene diagnostische Immunoassay-Systeme	64
4.4.2.1	EMIT-Verfahren	64
4.4.2.2	CEDIA® -Verfahren	65
4.4.3	Weitere immunchemische Untersuchungsverfahren	66

Fragestellung der Dissertation

67

Material und Methoden

68

5	Verwendete Materialien	68
5.1	Chemikalien und Lösungsmittel	68
5.2	Materialien für die Festphasenextraktion	68
5.2.1	Geräte	68
5.2.2	Festphasenextraktionssäulchen	69
5.3	Versuche mit Radioaktivität	69
5.3.1	Scintillationszähler	69
5.3.2	Scintillationsröhrchen	69
5.3.3	Scintillator	69
5.3.4	Radioaktiv-markierte Chemikalien	69
5.4	HPLC-System	70
5.4.1	Geräte	70
5.4.2	Trennsäulen	70
5.5	Probenahmesysteme	70
5.6	Klinischer Analyser, Reagentien, Kalibratoren und Kontrollen	71
5.7	Speichelpool	71
5.8	Nativer Humanspeichel	71
5.9	Sonstige Materialien	71
6	Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One <i>Saliva Collection System</i>	73
6.1	Ziel des Versuchs	73
6.2	Berechnung der eingesetzten Menge an radioaktiv-markierten Analyten	73

6.3	Spiken des Speichelpools	73
6.4	Durchführung des Versuchs	73
7	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben mittels Immunoassay	74
7.1	Ziel des Versuchs	74
7.2	Durchführung des Versuchs	74
7.2.1	Kalibration nach der Harnmethode	74
7.2.1.1	Bestimmung der Wiederholpräzision	74
7.2.2	Vermessung von realen Speichelproben	74
7.2.3	Einfluß des Speichelanteils auf die Kalibration	75
7.2.3.1	Probenvolumen 13 µL	75
7.2.3.2	Probevolumen 35 µL	75
7.2.4	Veränderung der spezifischen Testparameter	75
7.2.4.1	Variationen - erster Teil	76
7.2.4.2	Variationen - zweiter Teil	76
7.2.5	Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	76
7.2.6	Bestimmung des zufälligen und systematischen Fehlers	77
7.2.7	Bestimmung der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Speichelanteil	77
8	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben	77
8.1	Ziel des Versuchs	77
8.2	Speichelpool	77
8.3	Berechnung der eingesetzten Menge an radioaktiv-markierten Analyten	77
8.4	Spiken des Speichelpools	78
8.5	Durchführung des Versuchs	78
8.5.1	Getestete Bedingungen	78
8.5.1.1	Vorbereitung der Probe	78
8.5.1.2	Elution der Probe	78
8.5.2	Ablauf einer Festphasenextraktion	78
8.6	Bestimmung der Wiederfindungsrate für Nicotin, Cotinin und Nornicotin	79
9	Entwicklung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben	81
9.1	Fragestellung	81
9.2	Ausgangsbedingungen	81
9.3	Variation des organischen Anteils der mobilen Phase bei konstantem pH-Wert	81
9.4	Auswahl eines geeigneten internen Standards für die UV-VIS-Detektion	81
9.4.1	Bestimmung der Wiederfindungsrate von Octopamin	82
9.5	Änderung des pH-Wertes des Puffers bei konstantem organischen Anteil der mobilen Phase	82
9.6	Änderung der Flußrate	82
9.7	Entwicklung einer Gradiententrennung	83
9.7.1	Variation des Acetonitril-Anteils der mobilen Phase	83
9.7.2	Untersuchte Gradientenbedingungen	83
9.8	Bestimmung der Bestimmungsgrenze	84
9.9	Bestimmung des zufälligen und des systematischen Fehlers	85
10	„Cotinin-Studie“	85
10.1	Ziel der Studie	85
10.2	Gewinnung der Speichel- und Harnproben für die Cotinin-Studie	85
10.3	Analyse der Speichelproben und Harnproben	86
10.3.1	Probenvorbereitung	86
10.3.2	Bestimmung des Speichelanteils am Olympus AU640	86
10.3.3	Bestimmung des Cotinin-Gehalts in den Speichel- und Harnproben am Olympus AU640	87
10.3.3.1	Vermessung der Harnproben	87
10.3.3.2	Vermessung der Speichelproben	87
10.3.3.3	Bestimmung des Cotinin-Gehalts in den Speichelproben mittels LC/MS	88

10.3.3.3.1	Festphasenextraktion	88
10.3.3.3.2	LC/MS-Analyse	88
11	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben	89
11.1	Ziel des Versuchs	89
11.2	Berechnung der eingesetzten Menge an radioaktiv-markierten Analyten	89
11.3	Spiken des Speichelpools	90
11.4	Versuche - Teil 1	90
11.4.1	Vorbereitung der Probe und der Extraktionssäulchen	90
11.4.2	Waschen der Extraktionssäulchen	90
11.4.3	Elution der Analyte vom Extraktionssäulchen	90
11.4.4	Extraktion von gespikten Speichelproben mit anschließender LC/MS-Analyse	91
11.5	Versuche - Teil 2	91
11.5.1	Gekoppelte Festphasenextraktion	91
11.5.1.2	Vorversuch 1	91
11.5.1.2	Vorversuch 2	92
11.5.1.3	Vorversuch 3	92
11.5.1.4	Bestimmung der Extraktionsausbeute	92
11.5.1.4.1	Elution mit 5% Ammoniak in Aceton	92
11.5.1.4.2	Elution mit 5% Ammoniak in Acetonitril	92
11.5.2	Proteinfällung	92
11.5.2.1	Vorversuche zur Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln	92
11.5.2.1.1	Entfernung des Tartrazins aus der Probe	92
11.5.2.2	Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln	93
11.5.2.2.1	Bestimmung der Extraktionsausbeute	93
11.5.2.3	Reduktion des Probenvolumens	93
11.5.2.3.1	Bestimmung der Extraktionsausbeute	94
12	Untersuchung des Retentionsverhalten von Opium-Alkaloiden des Moprhinan-Typs in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen	94
12.1	Ziel des Versuchs	94
12.2	Untersuchung der Retention im ZIC-HILIC-Trennsystem	94
12.2.1	70% organischer Anteil in der mobilen Phase	94
12.2.2	85% organischer Anteil in der mobilen Phase	95
12.3	Untersuchung der Retention in einem Normalphasen-Trennsystem auf einer Reprosil-Silica-Säule	95
12.3.1	Änderung des organischen Anteils der mobilen Phase	95
12.3.2	Änderung der Zusammensetzung des organischen Anteils der mobilen Phase	96
12.3.3	Änderung der Pufferkonzentration	96
12.3.4	Änderung der Säulentemperatur	96
13	„Mohn-Studie“	97
13.1	Ziel der „Mohn-Studie“	97
13.2	Gewinnung der Speichel- und Harnproben für die „Mohn-Studie“	97
13.3	Mohn-Analyse	97
13.4	Ablauf der Studie	97
13.4.1	Vor der Mohn-Aufnahme	97
13.4.2	Mohn-Aufnahme	97
13.4.3	Nach der Mohn-Aufnahme	98
13.5.	Analyse der Speichel- und Harnproben	98
13.5.1	Probenvorbereitung	98
13.5.2	Bestimmung des Speichelanteils	98
13.5.3	Bestimmung der Opiat-Konzentration in den Speichelproben	98
13.5.4	Bestimmung der α -Amylase-Konzentration in den Speichelproben	99
13.5.5	Bestimmung der Opiat-Konzentration im Harn	100

14	Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One <i>Saliva Collection System</i>	101
14.1	[N-Methyl- ³ H]-Cocain	102
14.2	[N-Methyl- ¹⁴ C]-Codeinhydrochlorid	102
14.3	[7- ¹⁴ C]-D-Methamphetaminhydrochlorid	103
14.4	[N-Methyl- ¹⁴ C]-Morphinhydrochlorid	103
14.5	[¹⁴ C]-Mycophenolatnatrium	104
14.6	(-)-[N-Methyl- ³ H]-Nicotin	104
14.7	[³ H]-Tetrahydrocannabinol	105
15	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben mittels Immunoassay	105
15.1	Kalibration nach der Harnmethode	105
15.1.1	Bestimmung der Wiederholpräzision	106
15.1.2	Vermessung von realen Speichelproben	106
15.3	Einfluß des Speichelanteils auf die Kalibration	107
15.3.1	Probevolumen 13 µL	107
15.3.2	Probevolumen 35 µL	108
15.4	Veränderung der spezifischen Testparameter	109
15.4.1	Variationen - erster Teil	109
15.4.2	Variationen - zweiter Teil	109
15.5	Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	110
15.6	Bestimmung der Messgenauigkeit	110
15.7	Bestimmung der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Speichelanteil	111
16	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben	113
16.1	Auftragen der Probe auf das Extraktionssäulchen	113
16.2	Waschen der Extraktionssäulchen	113
16.3	Elution des Analyten vom Extraktionssäulchen	114
16.4	Extraktionen mit gereinigtem (-)-[N-Methyl- ³ H]-Nicotin	115
16.5	Bestimmung der Wiederfindungsrate für Nicotin, Cotinin und Nornicotin	116
17	Entwicklung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben	118
17.1	Variation des organischen Anteils der mobilen Phase bei konstantem pH-Wert	118
17.3	Auswahl eines geeigneten internen Standards für die UV-VIS-Detektion	118
17.3.1	Bestimmung der Wiederfindungsrate von Octopamin	118
17.4	Änderung des pH-Werts des Puffers bei konstantem organischen Anteil der mobilen Phase	119
17.5	Änderung der Flußrate	119
17.6	Entwicklung eines Gradientenprogrammes	120
17.6.1	Variation des Acetonitril-Anteils der mobilen Phase	120
17.6.2	Gradientenprogramme	120
17.7	Bestimmung der Bestimmungsgrenze	121
17.8	Bestimmung der zufälligen und systematischen Fehler	121
18	„Cotinin-Studie“	122
19	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben	130
19.1	Versuche - Teil 1	130
19.1.1	Vorbereitung der Probe und der Extraktionssäulchen	130
19.1.2	Waschen der Extraktionssäulchen	131
19.1.3	Elution vom Extraktionssäulchen	132
19.1.4	Extraktion von gespickten Speichelproben mit anschließender LC/MS- Analyse	132
19.2	Versuche - Teil 2	133
19.2.1	Gekoppelte Festphasenextraktion	133
19.2.1.1	Vorversuch 1	133

19.2.1.2	Vorversuch 2	133
19.2.1.3	Vorversuch 3	133
19.2.1.4	Bestimmung der Extraktionsausbeute	133
19.2.1.4.1	Elution mit 5% Ammoniak in Aceton	133
19.2.1.4.2	Elution mit 5% Ammoniak in Acetonitril	134
19.2.2	Proteinfällung	134
19.2.2.1	Vorversuche zur Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln	134
19.2.2.2	Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln	135
19.2.2.2.1	Bestimmung der Extraktionsausbeute	135
20	Untersuchung des Retentionsverhaltens von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen	136
20.1	Untersuchung der Retention im ZIC-HILIC-Trennsystem	136
20.1.1	70% organischer Anteil in der mobilen Phase	136
19.2.2.3	Reduktion des Probevolumens	136
19.2.2.3.1	Bestimmung der Extraktionsausbeute	136
20.1.2	85% organischer Anteil in der mobilen Phase	138
20.2	Untersuchung der Retention in einem Normalphasen-Trennsystem auf einer Reprosil-Silica-Säule	139
20.2.1	Änderung des organischen Anteil der mobilen Phase	139
20.2.2	Änderung der Zusammensetzung des organischen Anteils der mobilen Phase	140
20.2.3	Änderung der Pufferkonzentration	141
20.2.4	Änderung der Säulentemperatur	141
21	„Mohn-Studie“	142
Diskussion		148
22	Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One <i>Saliva Collection System</i>	148
23	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben mittels Immunoassay	150
24	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben	152
25	Entwicklung einer LC/MS Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben	153
26	„Cotinin-Studie“	155
27	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben	158
28	Untersuchung des Retentionsverhaltens von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs in verschiednen chromatographischen Trennsystemen	160
29	„Mohn-Studie“	162
Schlußfolgerungen		165
Literaturverzeichnis		168
Bildquellen		186
Zusammenfassung		188
Abstract		189
Lebenslauf		190

Einleitung

„Saliva is not one of the popular bodily fluids. It lacks the drama of blood, the sincerity of sweat and the emotional appeal of tears¹ [Mandel, 1990]“.

Dennoch wird Speichel seit der Antike für diagnostische Zwecke verwendet. Antike Kulturen benutzten den so genannten Reis-Test als eine Art Lügendetektor. Der Beschuldigte musste versuchen eine Hand voll Reis zu schlucken. Wenn Angst- und wahrscheinlich auch Schuld- die Speichelbildung hemmten und so der Beschuldigte nicht genug Speichel produzieren konnte um einen ausreichenden Bolus zum Schlucken des Reises formen zu können, wurde dies als Schuldeingeständnis gewertet und der Betroffene enthauptet [Mandel, 1993; Mandel, 1990].

1912 wurde erstmals die Anwendung eines Speicheltests im Rahmen von Dopingkontrollen bei Pferderennen dokumentiert. Ein Pferd namens Bourbon Rose wurde beim Gold Cup in Maison Lafitte (Frankreich) disqualifiziert, da in seinem Speichel Drogen nachgewiesen werden konnten. Ungefähr zur selben Zeit begann der Bostoner Zahnarzt Percy R. Howe, inspiriert durch die Arbeit von Iwan Pavlov, die Ausscheidung von Wirkstoffen über die Speicheldrüsen zu studieren. Die ersten Versuche machte Howe mit Eisen. Er verabreichte seinen Probanden Eisen-Kapseln und zeigte, daß Eisen nach etwa 20 Minuten über die Speicheldrüsen ausgeschieden wird. Weitere Versuche führte er mit Iod, Salicylaten, Benzoaten sowie Menthol durch [Howe, 1913; Mandel, 1993].

Heute erfreut sich Speichel als Analysenmedium zunehmender Beliebtheit, denn die Probenahme ist einfach, nicht-invasiv und kann ohne Eingriff in die Privatsphäre des Probanden unter Aufsicht durchgeführt werden. Weiters birgt Speichel ein geringeres Infektionsrisiko im Vergleich zu Blut bzw. Plasma [Choo und Huestis, 2004; Mandel, 1990].

Die Verwendung von Speichel als Probenmatrix bringt aber auch neue Herausforderungen für die Analytik mit sich. Das Probevolumen ist limitiert und bei der Probenahme mit einem kommerziellen System häufig unbekannt oder nur ungenau bestimmbar. Die Konzentration der Analyten im Speichel ist gering, außer sie wird durch so genannte *oral contamination*, die bei der inhalativen oder oralen Aufnahme von Wirkstoffen auftritt und zu sehr hohen Speichelkonzentrationen führt, verfälscht. Ein weiteres Problem stellt oft auch die (irreversible) Absorption von Analyten an das Sammelsystem dar. Dies ist oft bei trägergebundenen Systemen, wie einem Stäbchen mit integriertem Baumwoll- oder Schaumstoffpad, das bis zur Sättigung mit Speichel in den Mund genommen wird oder einer Watterolle, die gekaut wird bis sie mit Speichel gesättigt ist, der Fall [Choo und Huestis, 2004; Crouch, 2005]

Der allgemeine Teil dieser Arbeit gibt es eine Übersicht über die Produktion, Zusammensetzung und Funktion des Speichels, sowie über den Speichel als Analysenmedium. Weiters sind Informationen über die impraktischen Teile der Arbeit untersucht: Analyte, Tabakalkaloide und Opiumalkaloide, enthalten. Im praktischen Teil der Arbeit wurde die Recovery, also die Wiederfindungsrate, verschiedener Verbindungen aus dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* (Greiner Bio-One, Kremsmünster) mittels radioaktiv-markierter Analyten untersucht. Weiters wurden Methoden zur Extraktion, Trennung und Quantifizierung von Tabak- und Opiumalkaloiden aus Speichelproben entwickelt. Darüber hinaus wurde die entsprechende Alkaloid-Konzentration in tabakalkaloid- und opiumalkaloidhaltige Realspeichelproben mit den entwickelten Methoden bzw. mit einem neuen, noch nicht kommerziell erhältlichen, Immunoassay bestimmt.

¹ Übersetzung: Speichel ist eine nicht gerade sehr populäre Körperflüssigkeit, denn es fehlt ihm das Drama des Blutes, die Aufrichtigkeit des Schweißes und die emotionale Komponente der Tränen.

Allgemeiner Teil

1 Speichel

Der Begriff Speichel (lat./engl. *saliva*) wird häufig für die Mischung von Flüssigkeiten, die in der Mundhöhle des Menschen gebildet werden, verwendet. Bei diesen Flüssigkeiten handelt es sich um die Sekrete der großen und kleinen Speicheldrüsen sowie die gingivale Sulkusflüssigkeit, die in den Zahnfleischtaschen gebildet wird [Crouch, 2005; Gallardo and Queiroz, 2008].

Diese Flüssigkeitsmischung wird in der englischsprachigen Literatur auch häufig als *whole saliva*, *mixed saliva*, *oral fluid* oder *oral fluids* bezeichnet. Der Begriff Speichel bzw. *saliva* dürfte streng genommen nur für die Sekrete der Speicheldrüsen verwendet werden. Der Ausdruck *oral fluid* dagegen beschreibt am besten die Flüssigkeitsmischung aus dem Sekret der Speicheldrüsen und der gingivalen Sulkusflüssigkeit sowie allen anderen Materialien, die noch in der Mundhöhle vorkommen können. Dazu zählen zum Beispiel Speisereste, abgestorbene Zellen der Mundschleimhaut, Bakterien, Pilze, Viren, Sekret aus der Nase und den Bronchien sowie Blut und Blutderivate, die durch kleine Verletzungen der Mundschleimhaut oder durch Zahnfleischbluten in die Mundhöhle gelangen. Die wichtige Unterscheidung zwischen *saliva* und *oral fluid* wird in der Literatur jedoch kaum angewendet [Crouch, 2005], [Gallardo und Queiroz, 2008; Kaufman und Lamster, 2002; Atkinson et al., 1993].

Neben den Begriffen *saliva* und *oral fluid* werden in der Literatur häufig die Begriffe *unstimulated saliva* und *stimulated saliva* verwendet. *Unstimulated saliva* (nicht-stimulierter Speichel) ist jener Speichel, der während der Basalsekretion, das heißt „in Abwesenheit von exogener Geschmacks-, Kau- und mechanischer Stimulation“ [Atkinson et al., 1993] gebildet wird. *Stimulated saliva* (stimulierter Speichel) dagegen wird in Anwesenheit der genannten Stimuli gebildet [Atkinson et al., 1993].

1.1 Speicheldrüsen

Die Speichelbildung erfolgt durch die in der Mundhöhle angesiedelten Speicheldrüsen, *Glandulae salivariae*. Man unterteilt diese in die großen Speicheldrüsen, *Glandulae salivariae majores*, und in die kleinen Speicheldrüsen, *Glandulae salivariae minores* [Schiebler und Korf, 2007].

Zu den großen Speicheldrüsen zählen die Ohrspeicheldrüse (*Glandula parotidea*), die Unterkieferspeicheldrüse (*Glandula submandibularis*) und die Zungenspeicheldrüse (*Glandula sublingualis*). Die paarig angelegten großen Speicheldrüsen produzieren den Großteil des Speichels [Thews et al., 1999; Schiebler und Korf, 2007].

Die kleinen Speicheldrüsen werden nach ihrer Lage in der Mundhöhle bezeichnet. Zu ihnen gehören die Lippenspeicheldrüsen (*Glandulae labiales*), die Wangenspeicheldrüsen (*Glandulae buccales*), die Gaumenspeicheldrüsen (*Glandulae palatinae*), Mahlzahnspeicheldrüsen (*Glandulae molares*), Zungenspeicheldrüsen (*Glandulae linguales*) sowie die Speicheldrüse an der Zungenspitze (*Glandula lingualis anterior*). Die Lippenspeicheldrüsen können weiters in die oberen Lippenspeicheldrüsen (*Glandulae labiales superior*) und in die unteren Lippenspeicheldrüsen (*Glandulae labiales inferior*) unterteilt werden [Schiebler und Korf, 2007; Kohlbach, 2007; Schumacher, 1997].

Die Speicheldrüsen können nach der Zusammensetzung des Sekrets, das sie sezernieren, in seröse, muköse sowie mukoseröse und seromuköse Speicheldrüsen unterteilt werden [Kohlbach, 2007].

Die rein serösen Speicheldrüsen produzieren ein dünnflüssiges Sekret, das reich an Elektrolyten und Eiweißstoffen (Glycoproteine) ist. Dazu zählen die Ohrspeicheldrüse sowie Ausführungsgänge der Zungenspeicheldrüsen, die in den Graben bzw. in die Furchen der am Zungengrund gelegenen Wallpapillen (*Papillae vallatae*) münden [Thews et al., 1999; Kohlbach, 2007; Schumacher, 1997].

Bei den Gaumenspeicheldrüsen und den Ausführungsgängen der Zungenspeicheldrüsen, die am Zungenrücken einmünden, handelt es sich dagegen um rein muköse Speicheldrüsen, welche ein zähflüssiges, kohlehydratreiches Sekret (Muzin) abgeben [Thews et al., 1999; Kohlbach, 2007].

Mukoseröse und seromuköse Speicheldrüsen produzieren eine Mischung der oben genannten Sekretarten, wobei der muköse Anteil (mukoserös) oder der seröse Anteil (seromukös) überwiegen kann. Die Zungenspeicheldrüse produziert ein mukoseröses Sekret. Bei der Unterkieferspeicheldrüse, der Wangenspeicheldrüse, den Lippenspeicheldrüsen (obere und untere), der vorderen Zungenspeicheldrüse und den Molarenspeicheldrüsen handelt es sich um seromuköse Drüsen [Kohlbach, 2007].

1.1.1 Ohrspeicheldrüse - *Glandula parotidea*

Die Ohrspeicheldrüse ist die größte Speicheldrüse in der Mundhöhle. Der Anteil dieser rein serösen Drüse an der Basalsekretion des Speichels beträgt jedoch nur etwa 25%. Nach Stimulation der Speichelsekretion steigt ihr Anteil auf circa 34% an. Die *Glandula parotidea* wiegt zwischen 20 und 30 Gramm und hat ihren Sitz in der Parotisloge vor dem äußeren Ohr. Der Ausführungsgang der Ohrspeicheldrüse (*Ductus parotideus*), auch als *Stenon-Gang* bezeichnet, hat eine Länge zwischen vier und sechs Zentimetern, einen Durchmesser von 1,2 bis 1,4 Millimeter und mündet auf der gegenüberliegenden Seite des zweiten oberen Mahlzahns in die Mundhöhle. Am Parotisausführungsgang befindet sich eine weitere Drüse, nämlich die *Glandula parotidea accessoria*, der zusätzliche Lappen der Ohrspeicheldrüse [Thews et al., 1999; Kohlbach, 2007; Schumacher, 1997; Studer, 2008a; Boehm et al., 2008].

Die Ohrspeicheldrüse wird durch parasymphatische Nervenfasern des *Nervus glossopharyngeus* (N. IX) sowie durch sympathische Nervenfasern, die aus dem *Ganglion cervicale superius* stammen, innerviert. Das Zentrum zur Steuerung der Speichelsekretion liegt in der *Medulla oblongata* beziehungsweise in der *Pons* im Hirnstamm [Thews et al., 1999; Schiebler und Korf, 2007].

Die Blutversorgung der Parotis erfolgt durch die *Arteria transversa faciei* und einigen Ästen der *Arteria temporalis superficialis* sowie durch die *Vena retromandibularis* [Schiebler und Korf, 2007].

Die *Parotitis epidemica* (Mumps) ist eine durch Viren ausgelöste Erkrankung der Ohrspeicheldrüse. Hierbei kommt es zu einer Schwellung der *Glandula parotidea*. Durch diese Schwellung erhöht sich die Spannung auf die undeformable Bindegewebskapsel der Ohrspeicheldrüse. Dadurch kommt es zu heftigen Schmerzen sowie zu einer Reizung des *Nervus auriculotemporalis* [Schiebler und Korf, 2007; Schumacher, 1997].

1.1.2 Unterkieferspeicheldrüse - *Glandula submandibularis*

Die Unterkieferspeicheldrüse ist eine seromuköse Drüse und produziert etwa 70% des Gesamtspeichels, der während der Basalsekretion gebildet wird und 63% des Gesamtspeichels nach Stimulation der Sekretion. Die zwischen 10 und 15 Gramm schwere *Glandula submandibularis* hat ihre Lage zwischen dem Unterkiefer und der Mundbodenmuskulatur. Der *Ductus submandibularis*, der Ausführungsgang der Unterkieferspeicheldrüse oder *Wharton-Gang*, ist relativ lang (5-6 cm), hat einen mittleren Durchmesser von etwa 1,5 Millimeter und mündet gemeinsam mit dem großen Ausführungsgang der Unterzungenspeicheldrüse (*Ductus sublingualis major*) in einer kleinen Erhebung (*Caruncula sublingualis*) am Mundboden unter der Zunge in die Mundhöhle [Thews et al., 1999], [Schumacher, 1997; Studer, 2008a; Boehm et al., 2008].

Die sekretorische Innervation der Unterkieferspeicheldrüse erfolgt durch den *Nervus intermedius*, der den parasymphatischen Anteil des *Nervus facialis* (N. VII) darstellt, sowie über sympathische Nervenfasern, die ihren Ursprung im *Ganglion cervicale superius* haben. Die *Arteria facialis* und die *Arteria submentalis*, sowie die *Vena sublingualis* und die *Vena submentalis* sind für die Versorgung der Speicheldrüse mit Blut zuständig [Schiebler und Korf, 2007].

1.1.3 Unterzungendrüse - *Glandula sublingualis*

Die kleinste der drei großen Speicheldrüsen, die Unterzungenspeicheldrüse, ist für 5% der Basalspeicheldrüseproduktion und für 3% der Speichelsekretion unter stimulierten Bedingungen verantwortlich. Die mukoseröse Drüse ist nur etwa fünf Gramm schwer und liegt unterhalb der Zunge. Sie besitzt einen großen Ausführungsgang, *Ductus sublingualis major*, der gemeinsam mit dem *Ductus submandibularis* an der *Caruncula sublingualis* in die Mundhöhle mündet und zwischen 20 und 40 kleinere Ausführungsgänge, *Ductus sublinguales minores* [Thews et al., 1999; Schumacher, 1997].

Die Erregung und Blutversorgung der Unterzungenspeicheldrüse erfolgt durch die selben Nerven und Blutgefäße, die die Unterkieferspeicheldrüse innervieren und versorgen.

1.1.4 Aufbau der Speicheldrüsen

„Die Speicheldrüsen sind ektodermalen Ursprungs. Sie leiten sich vom Epithel der Mundhöhle ab. Auf dieser entwicklungsgeschichtlichen Grundlage erklärt sich der grundsätzlich gleichartige Bau der Kopfspeicheldrüsen. Aus einem sich in die Tiefe entwickelnden Epithelwachstum, das mit Knospung und Teilung der Anlage einhergeht, entsteht ein Drüsenbäumchen mit einem Gangsystem, an dessen Ende die Azini aufsitzen [Morgenroth et al., 1996]“.

In den Azini, die in seröse und muköse Azini unterschieden werden können, werden die im Speichel enthaltenen Proteine und Muzine (*Proteochyli* und *Mukochyli*) gebildet. Im Gangsystem der Speicheldrüsen findet die Regulation des Wassergehalts und der Elektrolytkonzentration (*Hydrochyl*) statt [Morgenroth et al., 1996].

1.1.5 Erkrankungen mit Beteiligung der Speicheldrüsen

1.1.5.1 Sjögren-Syndrom

Das Sjögren-Syndrom, eine Erkrankung von der auch die Speicheldrüsen betroffen sind, ist nach dem schwedischen Augenarzt Henrik Samuel Sjögren benannt, der diese Erkrankung im Jahr 1933 als Erster im Rahmen seiner Dissertation, an Hand von 19 Fällen, beschrieben hat [Jonsson et al., 2002; Tomiak und Dörner, 2006].

Seit dem Jahr 1965 unterscheidet man zwischen dem primären Sjögren-Syndrom und dem sekundären Sjögren-Syndrom [Jonsson et al., 2002]. Beim primären Sjögren-Syndrom (pSS) liegt keine andere Autoimmunerkrankung vor, beim sekundären Sjögren-Syndrom (sSS) liegt noch eine weitere autoimmunologische Erkrankung vor [Tomiak und Dörner, 2006].

Das Sjögren-Syndrom tritt weltweit auf, stellt nach der Rheumatoidarthritis die zweithäufigste Autoimmunerkrankung dar und kann alle Altersgruppen betreffen. Sie tritt jedoch gehäuft zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf. Bei Frauen wird das Sjögren-Syndrom neun mal häufiger diagnostiziert als bei Männern [Jonsson et al., 2002; Tomiak und Dörner, 2006; Gudziol, 1995]. Nach Schätzungen sind etwa 0.6% der Bevölkerung, also sechs Personen von 1000, vom primären Sjögren-Syndrom betroffen [Jonsson et al., 2002].

Die Entwicklung des Sjögren-Syndroms wird durch genetische Prädisposition begünstigt. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß sowohl HLA-assoziierte (HLA-B8, HLA-DR3, HLA-Dw52, HLA-DQA*0501) als auch nicht-HLA-assoziierte Genpolymorphismen eine Rolle spielen [Tomiak und Dörner, 2006; Jonsson et al., 2002].

Die klinischen Leitsymptome des Sjögren-Syndroms sind *Xerostomie*, *Keratoconjunctivitis sicca*, Trockenheit im Rachen- und Halsbereich sowie wiederkehrende, häufig auch sehr schmerzhaftes Schwellungen der Speicheldrüsen, wobei die *Glandula parotidea* besonders häufig betroffen ist. Weiters treten Trockenheitsgefühle in der Nasenbenhöhlen, auf der Haut und in der Vagina auf. Zu den Allgemeinsymptomen zählen Müdigkeit, Schlafstörungen, Leistungsminderung und Gewichtsverlust. Es sind auch Organmanifestationen möglich wie zum Beispiel eine Infiltration der Lunge oder interstitielle Nephritis möglich [Morgenroth et al., 1996; Tomiak und Dörner, 2006]. Beim Sjögren-Patienten lassen sich Autoantikörper des Typs Ro/SSA und beziehungsweise oder La/SSB nachweisen [Jonsson et al., 2002].

Zur *Xerostomie* kommt es durch den verminderten Speichelfluß, was wiederum zu Konsequenzen für die gesamte Mundhöhle führt. Patienten klagen über ein Brennen auf der Mundschleimhaut und über Veränderungen im Geschmackempfinden. Es kommt auch zu Veränderungen in der Oberflächenstruktur der Zunge und zu erythematösen Veränderungen der Mundschleimhaut. Die Entwicklung von Zahnkaries wird durch den Mangel an Speichel begünstigt, ebenso die Entwicklung einer *Candida-Mykose*. Durch die Unterfunktion der Speicheldrüsen können sich sekundär Speichelsteine (*Sialolithiasis*) beziehungsweise Entzündungen der Speicheldrüsen (*Sialadenitis*) manifestieren [Tyldesley, 1996].

Bei der Diagnose des Sjögren-Syndroms ist es wichtig, daß andere Erkrankungen und Faktoren, die zu *Sicca*-Symptomen führen können ausgeschlossen werden. Dazu zählen zum Beispiel Strahlensialadenitis, Infektionen, *Graft-versus-Host*-Reaktion und verschiedene Medikamente wie Antidepressiva, Beruhigungsmittel, Antihypertensiva, Antihistaminika, u.v.a [Tyldesley, 1996; Tomiak und Dörner, 2006].

1.2 Bildung des Speichels

Die Speichelbildung läuft in der Speicheldrüse in zwei Schritten ab. Im sekretorischen Endstück der Speicheldrüse (*Azini*) wird zuerst der isotone Primärspeichel gebildet, der in seiner Elektrolytzusammensetzung der des Plasmas entspricht. Der Transport der Ionen ins Lumen erfolgt entweder über aktive Transportmechanismen, Ionen-Pumpen oder entlang eines Konzentrationsgradienten.

Auf dem Weg durch den Ausführungsgang der Speicheldrüse wird der Primärspeichel durch selektive Reabsorption von Na^+ und Cl^- , ohne die Rückresorption von Wasser, hypoton. Weiters werden im Gangsystem K^+ und HCO_3^- in den Speichel sezerniert. Der Speichel der schlussendlich in

die Mundhöhle gelangt ist hypoton und die Na⁺- und Cl⁻-Konzentration liegt deutlich unter der des Primärspeichels [Pedersen et al., 2002; Turner und Sugiya, 2002].

Die Bildung der Speichelprotein läuft meist im rauen endoplasmatischen Rediculum der azinösen Zellen ab. Von dort werden sie über eine Reihe von membrangebundenen Zellkompartimenten wie dem Golgi-Apparat und sekretorischen Granuli zu bestimmten Stellen in der Zelle in der Nähe der apikalen Membran transportiert und ins Lumen sezerniert [Turner und Sugiya, 2002].

1.2.1 Transport von Wirkstoffen in den Speichel

Es gibt grundsätzlich vier Möglichkeiten, wie endogene oder exogene Analyten in den Speichel transportiert werden können, nämlich passive transzelluläre Diffusion, Ultrafiltration, aktiver Transport und Pinozytose. Praktisch gibt es jedoch keinen Beweis, daß die Pinozytose eine Rolle spielt [Höld et al., 1995].

1.2.1.1 Passive transzelluläre Diffusion

Die passive transzelluläre Diffusion ist der häufigste Transportweg für Wirkstoffe in den Speichel, obwohl nur nicht proteingebundene, das heißt freie und nicht geladene Moleküle mit einem maximalen Molekulargewicht von 500 Da auf diese Weise transportiert werden können.

Bei der passiven Diffusion werden die Wirkstoffe entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand (im Gegensatz zum aktiven Transport) transportiert. Die Diffusionsrate ist eine Funktion aus dem Konzentrationsgradienten, der Oberfläche über die der Transport abläuft, der Membrandicke und der Diffusionskonstante, die von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten abhängt.

Faktoren, die die passive Diffusion beeinflussen, sind der Speichel- und der Plasma-pH-Wert, der pK_a-Wert des Wirkstoffs, dessen Molekulargewicht, sterische Konfiguration, Lipidlöslichkeit sowie dessen Plasmaproteinbindung [Choo und Huestis, 2004; Crouch, 2005; Höld et al., 1995].

Die Speichel/Plasma-Ratio (S/P-Ratio) eines Analyten ist hilfreich um das Verhältnis zwischen der Speicherkonzentration und der Plasmakonzentration einer Verbindung zu beschreiben und das Ausmaß der Einflußfaktoren auf die Diffusion abzuschätzen. Ein wichtiger Einflußfaktor auf die S/P-Ratio ist der pH-Wert. Im Plasma ist der pH-Wert durch Puffersysteme sehr stark reguliert und liegt beim Gesunden bei pH 7,4. Der pK_a-Wert des Analyten und die pH-Differenz zwischen Speichel und Plasma bestimmen daher die Analytkonzentration im Speichel. Es können nur ungeladene Analyten durch die Membran diffundieren und der pH-Wert des Speichels liegt meist unter dem des Plasmas (pH < 7,4), daher kommt es zu einer Anreicherung von basischen Verbindungen im Speichel, da diese nach der Membranpassage - im saureren Speichel - ionisiert werden und nicht mehr ins (basischere) Plasma zurückdiffundieren können. Das Gegenteil gilt für saure Verbindungen; sie werden im Plasma angereichert und die Speicherkonzentrationen sind gering [Choo und Huestis, 2004; Drummer, 2008; Höld et al., 1995].

Mit einer Zunahme des Speichelflusses - egal aufgrund welcher Ursache - kommt es zu einer vermehrten Sekretion von Bicarbonat (HCO₃⁻) und damit zu einem Anstieg des pH-Werts im Speichel auf bis zu pH 8,0. Auf diese Weise kann es zu einer Abnahme der Analytkonzentration im Speichel mit steigender Speichelflußrate kommen. Verbindungen mit einem pK_a < 5,5 und pK_a > 8,5 werden durch Veränderungen des Speichel-pH-Wertes jedoch nicht beeinflusst, das heißt ihre S/P-Ratio bleibt relativ konstant [Choo und Huestis, 2004; Höld et al., 1995].

Die theoretische S/P-Ratio für eine bestimmte Verbindung kann mit den folgenden Gleichungen berechnet werden [Crouch, 2005; Höld et al., 1995]:

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pH_s - pK_a)} * f_p}{1 + 10^{(pH_p - pK_a)} * f_s} \quad \text{für saure Verbindungen und}$$

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH_s)} * f_p}{1 + 10^{(pK_a - pH_p)} * f_s} \quad \text{für basische Verbindungen, wobei gilt}$$

S ... Konzentration im Speichel

P ... Konzentration im Plasma

pH_s ... pH-Wert im Speichel

pH_p ... pH-Wert im Plasma

f_p ... freie (ungebundene) Fraktion des Analyten im Plasma

f_s ... freie (ungebundene) Fraktion des Analyten im Speichel

Die S/P-Ratio entspricht der Fraktion des freien, das heißt nicht an Proteine gebundenen Wirkstoffes im Plasma. Dies ist von großer Bedeutung, da nur der ungebundene Anteil des Wirkstoffs seine pharmakologische Wirkung entfalten kann. Das bedeutet wiederum, daß die Bestimmung der Speicherkonzentration eines Wirkstoffs Rückschlüsse auf dessen pharmakologische Aktivität zulässt [Choo und Huestis, 2004; Höld et al., 1995].

1.2.1.2 Ultrafiltration

Mittels Ultrafiltration können nur Verbindungen mit einem Molekulargewicht von bis zu 300 Da in den Speichel transportiert werden, wie zum Beispiel Glycerol. Das Ausmaß der Ultrafiltration ist jedoch sehr gering, denn die Speicherkonzentrationen von solchen Verbindungen sind wesentlich geringer als ihre Plasmakonzentrationen [Höld et al., 1995].

1.2.1.3 Aktiver Transport

Elektrolyte und einige Proteine, wie zum Beispiel Immunglobulin A (IgA) werden durch aktive Transportmechanismen in den Speichel transportiert. Ein aktiver Transportmechanismus konnte auch für Wirkstoffe nachgewiesen werden. Lithium, von dem man auf Grund seines Molekulargewichts (7 Da) annehmen würde, daß es durch Ultrafiltration in den Speichel gelangt, weist eine S/P-Ration von über zwei auf, was auf einen aktiven Transportmechanismus hindeutet [Höld et al., 1995].

Auch für Penicillin konnte nachgewiesen werden, daß zumindest ein aktiver Mechanismus an dessen Transport in den Speichel beteiligt ist [Höld et al., 1995].

1.3 Zusammensetzung des Speichels

„Saliva is a clear, slightly acidic mucoserous exocrine secretion. Whole saliva is a complex mix of fluid from major and minor salivary glands and from gingival crevicular fluid, which contains oral bacteria and food debris“ [Humphrey und Williamson, 2001].

Genauer betrachtet, handelt es sich bei Speichel um eine sehr stark verdünnte Flüssigkeit, die zu 97-99% aus Wasser besteht. Die restlichen 1-3% setzen sich aus Elektrolyten, Proteinen und Muzinen zusammen [Thews et al., 1999], [Humphrey und Williamson, 2001], [Höld et al., 1995]. Im Speichel enthaltene Elektrolyte sind Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Calcium (Ca^{2+}), Phosphat (PO_4^{3-}), Bicarbonat (HCO_3^-), Chlorid (Cl^-), Magnesium (Mg^{2+}), Thiocyanat (SCN^-), Ammoniak (NH_3) und Urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) [Thews et al., 1999; Humphrey und Williamson, 2001; Höld et al., 1995], [Bardow et al., 2000; Aps und Martens, 2005].

Der in den sekretorischen Endstücken, Azini, produzierte Primärspeichel ist plasmaisoton, das heißt er besitzt die gleiche Elektrolytzusammensetzung wie das Blutplasma. Im Gangsystem der Speicheldrüsen werden Na^+ und Cl^- aus dem Primärspeichel selektiv rückresorbiert. Im Austausch dazu gelangen kleine Mengen an K^+ und HCO_3^- ins Lumen. Da das Gangsystem eine geringe, aldosteronabhängige Wasserpermeabilität aufweist, ist der Speichel der letztendlich in die Mundhöhle abgegeben wird hypoton [Bardow et al., 2000; Thews et al., 1999; Aps und Martens, 2005].

Die Elektrolytzusammensetzung des Speichels ändert sich in Abhängigkeit von der Sekretionsrate. Die Konzentration von Na^+ , HCO_3^- und Cl^- nehmen mit steigender Speichelsekretionsrate zu, die Konzentrationen von K^+ bleibt jedoch nahezu unverändert. Mit steigender Flußrate nimmt ebenfalls der pH-Wert im Speichel zu; er steigt von 5,5 bis 6,5 auf etwa 7,7 an. Dies ist einerseits auf die erhöhte HCO_3^- -Konzentration zurückzuführen, andererseits nimmt mit steigender Flußrate die Pufferkapazität des Speichels ab, da die PO_4^{3-} -Konzentration sinkt [Bardow et al., 2000; Chauncey et al., 1966; Dawes, 1969; Thews et al., 1999].

Im Speichel konnten bis jetzt mehr als 200 verschiedene Proteine, die man nach ihrer Funktion in zwölf verschiedene Kategorien einteilt, identifiziert werden [Esser et al., 2008; Huang, 2004]. Die größte Gruppe an Proteinen im Speichel setzt sich aus Enzymen, die an Metabolisierungsprozessen, vor allem am Kohlehydratstoffwechsel, beteiligt sind zusammen (19,2%). In diese Gruppe sind zum Beispiel die α -Amylase, die Lactatdehydrogenase, die Malatdehydrogenase und die Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase einzuordnen [Esser et al., 2008]. Die zweitgrößte Gruppe machen Proteine, die in der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, aus (17,9%). Hierzu zählen Immunglobuline wie IgA und IgG, sowie gegen Bakterien gerichtete Peptide wie zum Beispiel Dermcidin [Esser et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

11% der im Speichel vorkommenden Proteine stammen von Bakterien. Daneben finden sich sechs verschiedene Proteasen, darunter Kallikrein, Cathepsin D und Lysozym C, sowie 13 verschiedene Proteaseinhibitoren, wie Cystatine, Alpha-2-Makroglobulin, TIMP-1, die alle am Speichelproteinmetabolismus beteiligt sind [Esser et al., 2008]. Strukturproteine und intrazelluläre Proteine, die aus den Zellen der Mundschleimhaut stammen, konnten ebenso nachgewiesen werden, wie aus dem Serum stammende Transportproteine, nämlich *Albumin*, *Apolipoprotein* und *Ceruloplasmin*. Signaltransduktionsproteine, Zelldifferenzierungs- und Wachstumsfaktoren sowie Enzyme, die an Redox-Reaktionen beteiligt sind, kommen in geringeren Prozentsätzen im Speichel vor [Esser et al., 2008].

Im Speichel können zwei Hauptgruppen von Muzinen nachgewiesen werden, nämlich *MUC5B* oder Muzin-Glycoprotein-1 (MG1) und *MUC7* oder Muzin-Glycoprotein-2 (MG2) [Sonesson et al., 2008]. Darüber hinaus wurden sieben weitere Muzin-exprimierende Gene nachgewiesen (*MUC1* bis *MUC4*, *MUC5A*, *MUC6*, *MUC8*) [Wickström et al., 1998]. Bei Muzinen handelt es sich um relativ große Glycoproteine (M_r 10 bis 30 Millionen). Proteinregionen mit Oligosaccharid-Seitenketten und Regionen ohne Seitenketten (*naked domains*) wechseln sich Apoprotein ab, wobei die Oligosaccharid-reichen Domänen einen hohen Anteil an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin aufweisen und die *naked domains* reich an Cystein sind [Wickström et al., 1998]. *MUC5B* (MG1) wird in allen Speicheldrüsen, mit Ausnahme der *Glandula parotidea*, gebildet und zeigt in Abhängigkeit vom Bildungsort strukturelle Unterschiede [Bolscher et al., 1999]. Bei *MUC7* (MG2) handelt es sich um ein kleineres, als Monomer vorliegendes Molekül, das weniger heterogen glycosyliert ist als *MUC5B*. [Wickström et al., 1998; Bolscher et al., 1999].

Tabelle 1: Elektrolytzusammensetzung des Speichel [Aps und Martens, 2005]

	Basal-speichel	Stimulierter Speichel
Na ⁺ (mmol/L)	5	20-80
K ⁺ (mmol/L)	22	20
Ca ²⁺ (mmol/L)	1-4	1-4
Cl ⁻ (mmol/L)	15	30-100
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	5	15-80
PO ₄ ³⁻ (mmol/L)	6	4
Mg ²⁺ (mmol/L)	0,2	0,2
SCN ⁻ (mmol/L)	2,5	2
NH ₃ (mmol/L)	6	3
Urea (mmol/L)	3,3	2-4

Wie bereits im Kapitel 1.1 erwähnt werden die Speicheldrüsen durch sympathische und parasympathische Nervenfasern innerviert. Je nach dem welcher Teil des vegetativen Nervensystems die Speichelproduktion stimuliert, ist das produzierte Volumen, die Viskosität sowie die Protein- und Schleimkonzentration verändert [Aps und Martens, 2005].

Sympathikus und Parasympathikus innervieren die serösen und seromukösen Speicheldrüsen. Kommt es zu einer gleichzeitigen Stimulation durch beide Systeme, dann steigt der Speichelsekretionsrate synergistisch an. Eine α -Adrenerge Stimulation (Sympathikus) führt über einen Calcium-Ionen-Einstrom in die Azini zur Erhöhung der Proteinkonzentration im Speichel. Das Sekret schäumt nicht und ist weniger viskös. Die β -adrenerge Innervation bewirkt keinen Ioneneinstrom in die Azini, liefert aber einen sehr protein- und muzinreichen, viskösen Speichel, der zur Schaumbildung neigt [Aps und Martens, 2005]. Die mukösen Speicheldrüsen werden ausschließlich cholinerg, also durch den Parasympathikus, innerviert. Diese Stimulation bewirkt Natrium-/Kalium- und Calcium-Ionenströme an der Azinimembran. Dies führt zur Sekretion einer großen Menge an wässrigen und elektrolytreichen Speichel [Aps und Martens, 2005].

Tabelle 2: Einfluß der sympathischen bzw. parasympathischen Stimulation auf die Speichelzusammensetzung [Aps und Martens, 2005]

Parameter	Sympathikus		Parasympathikus
	β -adrenerge Stimulation	α -adrenerge Stimulation	cholinerge Stimulation
Speichelvolumen	gering	gering	hoch
Viskosität	hoch	gering	gering
Proteinkonzentration	hoch	hoch	gering
Muzinkonzentration	sehr hoch	gering	sehr gering

1.3.1 Änderung der Speichelzusammensetzung bei systemischen Erkrankungen

1.3.1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Patienten, die an chronischer Niereninsuffizienz leiden, zeigen erhöhte Urea Konzentrationen im Speichel. Die Na^+ - und K^+ - Speichelkonzentration ist ebenfalls erhöht, die Ca^{2+} -Konzentration ist jedoch verringert. Der pH-Wert des Speichel ist bei niereninsuffizienten Patienten signifikant erhöht. Die Ursache dafür liegt in der erhöhten Urea-Konzentration [Tomás et al., 2008; Peterson et al., 1985; Al Nowaiser et al., 2003; Epstein et al., 1980; Ertugrul et al., 2003; Shasha et al., 1983; Tomás et al., 2008; Bayraktar et al., 2004; Aps und Martens, 2005].

1.3.1.2 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose, auch als cystische Fibrose (CF) bezeichnet, ist eine rezessiv vererbte Erkrankung, die zu einer Störung des cAMP-regulierten Chlorid-Kanals der Flimmerepithelzellen im Respirationstrakt führt [Thews et al., 1999]. Beim Patienten ist die Viskoelastizität des Speichels erhöht. Als Ursache kann der reduzierte Wassergehalt oder die erhöhte Konzentration von anorganischen und organischen Speichelbestandteilen angesehen werden [Aps et al., 2002].

Im Vergleich von CF-homozygoten, CF-heterozygoten und gesunden Individuen sind die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Phosphat sowie die Osmolarität signifikant unterschiedlich [Aps et al., 2002]. Die Calcium- und Proteinkonzentrationen sind bei der cystischen Fibrose erhöht. Dadurch kommt es auch zur Trübung des Speichels, da sich schwer lösliche Calcium-Protein-Komplexe bilden. Diese Calcium-Protein-Komplexe können die Ausführungsgänge der kleinen Speicheldrüsen verlegen, wodurch die Sekretionsrate dieser Drüsen dramatisch reduziert wird [Mandel, 1990].

1.3.1.3 Sjögren-Syndrom

Unterzieht man den Speichel von Sjögren-Syndrom-Patienten (vgl. Kapitel 1.1.5.1) einer sialochemischen Analyse, kann man eine Veränderung der Speichelzusammensetzung beobachten. Im Parotisspeichel von Patienten sind die Konzentrationen von Natrium und Chlorid signifikant höher als beim Gesunden, die Kalium-, Phosphat und Amylase-Konzentration jedoch signifikant geringer [Kalk et al., 2001; Kalk et al., 2002; Mandel, 1990].

Lactoferrin, β -2-Mikroglobulin, Kallikrein und sowie Lysozym, das in der *Glandula parotidea* gebildet wird sind ebenfalls erhöht. Auffällig ist auch, daß die Phospholipidkonzentration um das zwanzigfache höher ist als beim Gesunden [Mandel, 1990].

1.3.1.4 Graft-versus-Host-Erkrankung

Im Rahmen der *Graft-versus-Host-Erkrankung* kommt es zu einer Zerstörung des Speicheldrüsengewebes und damit zu einer Verringerung der Sekretionsrate. Bei der *Graft-versus-Host-Erkrankung* sind die Natrium- und *Lysozym*-Konzentration erhöht, die Phosphat- und IgA-Konzentration verringert [Aps und Martens, 2005].

1.4 Speichelfluß

Pro Tag werden zwischen 0,6 und 1,7 Liter Speichel gebildet, die Speichelflußrate unterliegt jedoch einem circadianen Rhythmus und ist von der Art der Stimulation abhängig. Sie kann von fast 0 mL/min (während des Schlafs) auf bis zu 6 mL/min (stimuliert) ansteigen, die mittlere Sekretionsrate von unstimulierten Speichel liegt bei 0,3 mL/min [Thews et al., 1999; Aps und Martens, 2005; Dawes, 2004].

Die Speicheldrüsen selbst weisen ihren eignen circadianen Rhythmus auf und reagieren auch unterschiedlich auf verschiedene Stimuli. Die *Glandula parotidea* und die *Glandula submandibularis* produzieren den Großteil des täglichen Speichelvolumens. Der Anteil der *Glandula sublingualis* und der kleinen Speicheldrüsen an der Gesamtspeichelproduktion ändert sich im Schlaf, während der Basalsekretion und während einer Stimulation nur gering. Während des Schlafs produziert die Unterkieferspeicheldrüse den meisten Speichel, nämlich 72%, die Ohrspeicheldrüse dagegen stellt die Sekretion fast vollständig ein [Aps und Martens, 2005].

Die Geschwindigkeit, mit der der Speichel durch das Gangsystem der Speicheldrüse fließt, beeinflusst die Elektrolytkonzentration. Je höher die Geschwindigkeit, umso weniger kommt es zu einem Elektrolytaustausch. Daher ist die Natrium-, Chlorid- und Bicarbonatkonzentration im stimulierten Speichel wesentlich höher als im Basalspeichel (siehe Kapitel 1.3). Auch die Protein- und Muzinkonzentration hängt von der Sekretionsrate ab. Zu Beginn einer Stimulation nimmt der

Protein- und Muzingehalt pro Milliliter stark ab. Die Sekretionsrate von Proteinen und Muzinen nimmt aber proportional zur Steigerung der Speichelflußrate zu [Aps und Martens, 2005].

Tabelle 3: Anteil der einzelnen Speicheldrüsen an der Speichelproduktion unter bestimmten Bedingungen [Aps und Martens, 2005]

	während des Schlafs	ohne Stimulation	mechanische Stimulation	Stimulation mit Zitronensäure
Ohrspeicheldrüse	0%	21%	58%	45%
Unterkieferspeicheldrüse	72%	70%	33%	45%
Unterzungenspeicheldrüse	14%	2%	2%	2%
kleine Speicheldrüsen	14%	7%	7%	8%

1.4.1 Hyposialie und Xerostomie

„Xerostomia is the subjective sensation of dry mouth, while hyposalivation is the objective finding of a reduced salivary flow rate¹ [Dawes, 2004].“

Die mittlere unstimulierte Speichelflußrate liegt bei 0,3 mL/min. Die individuelle Schwankungsbreite ist jedoch sehr groß (0,008 bis 1,85 mL/min) und welcher Speichelfluß als ausreichend empfunden wird schwankt ebenfalls individuell sehr stark. Eine Hyposialie ist durch einen Speichelfluß von weniger als 0,1 mL/min (nicht-stimuliert) bzw. weniger als 0,5 mL/min (Stimulation durch Kauen von Paraffinwachs) gekennzeichnet [Dawes, 2004; Sreebny et al., 1992].

Der verminderte Speichelfluß führt zum Gefühl der Mundtrockenheit (Xerostomie), zur Bildung von Zahnkaries an Stellen, die normal nicht von Karies betroffen sind, wie zum Beispiel an den Schneidekanten, und zu einer reduzierten Reinigung der Mundhöhle von Nahrungsresten und Bakterien. All dies führt in weiterer Folge zu Problemen mit der Mundschleimhaut (Scherzempfindlichkeit), Buring-Mouth-Syndrom, Zahnfleischentzündungen (Gingivitis), Lippenentzündungen (Cheilitis), Fissuren auf der Zunge, Infektionen der Speicheldrüsen, wiederkehrende Infektionen der Mundhöhle mit Hefepilzen (Mundsoor), Schwierigkeiten beim Sprechen, Kauen und Schlucken, vermehrter Ablagerung von Speichelsteinen in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen und Schwierigkeiten beim Halt von Zahnprothesen [Dawes, 2004].

1.4.2 Einfluß von Medikamenten auf den Speichelfluß

Neben Rauchen, Alkohol, auch alkoholische Mundwässer, coffeinhaltigen Getränken und einigen Softdrinks können auch Medikamente zu einem Trockenheitsgefühl im Mund führen. In den USA ist Mundtrockenheit (80,5%) gefolgt von Geschmacksstörungen (47,5%) und Entzündungen der Mundschleimhaut die häufigste unerwünschte Arzneimittelwirkung, die den Mund betrifft [Scully, 2003].

Am häufigsten führen tricyclische Antidepressiva, Antipsychotika, Antipara-sympathika, β -Blocker und Antihistaminika zu Mundtrockenheit [Scully, 2003].

Die Ursache für die Wirkung der Medikamente auf die Speichelproduktion ist meist die anticholinerge (Neben)wirkung der genannten Medikamente. Es gibt im Menschen fünf Subtypen von muscarinischen Rezeptoren, davon kommt der M3-Rezeptor (M3R) in den Speichel- und Tränendrüsen vor und ist dort für die parasympathische cholinerge Neurotransmission verantwortlich. Durch deren Blockade (anticholinerge Wirkung) kommt es zu Reduktion der Speichel- und Tränenproduktion. Aber auch andere Rezeptortypen, wie α_{1a} , β_1 , und H_2 -Rezeptoren, kommen in den Speicheldrüsen vor und können die Speichelproduktion ebenfalls beeinflussen [Scully, 2003].

1.4.2.1 Tricyclische Antidepressiva

Tricyclische Antidepressiva, wie zum Beispiel Clomipramin, Imipramin und Amitriptylin bewirken eine Verstärkung der serotonergen und noradrenergen Mechanismen, aber blockieren gleichzeitig Histamin-Rezeptoren, cholinerge und α_1 -Rezeptoren. Neben der Reduktion des Speichelflusses kommt es auch zu einer Veränderung in der Elektrolytzusammensetzung des Speichels; die Na^+ -Konzentration wird verringert, die K^+ -Konzentration wird erhöht [Scully, 2003].

¹ Übersetzung: Xerostomie ist das subjektive Gefühl eines trockenen Mundes, während bei der Hyposialie objektiv eine reduzierte Speichelflußrate festgestellt werden kann.

1.4.2.2 Muscarin-Rezeptor-Antagonisten

Muscarin-Rezeptor-Antagonisten, wie Oxybutinin, Propiverin, Tolerodin und Trosipiumchlorid, werden zur Behandlung der überaktiven Blase eingesetzt. Bei Propiverin ist die Inzidenz und Schwere der Mundtrockenheit geringer als bei Oxybutinin [Scully, 2003].

1.4.2.3 α_1 -Rezeptorantagonisten

Diese Gruppe wird ebenfalls bei einer Hyperaktivität der Blase und bei benigner Prostatahyperplasie eingesetzt. Tamsulosin, ein spezifischer α_{1a} -Rezeptor, führt zu weniger Mundtrockenheit als das weniger spezifische Terazosin [Scully, 2003].

1.4.2.4 Antipsychotika

Die klassischen Antipsychotika vom Phenothiazin-Typ sowie die neueren, höher potenten Antipsychotika mit selektiver, antagonistischer Wirkung auf den Dopamin-D₂-Rezeptor führen als Nebenwirkung zur Mundtrockenheit. Das atypische Antipsychotikum Clozapin dagegen bewirkt eine Stimulation des Speichelflusses. Die neueren, höher potenten Antipsychotika mit selektiver, antagonistischer Wirkung auf den Dopamin-D₂-Rezeptor [Scully, 2003].

1.4.2.5 Diuretika

Diuretika vom Thiazid-Typ führen subjektiv zur Xerostomie. Patienten unter Furosemid-Therapie klagten zehnmal häufiger über Mundtrockenheit als Patienten unter Placebo. Die systematische Analyse des Speichel zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum- und Placebogruppe hinsichtlich Flußrate, Volumen, Protein-, Na⁺-, K⁺- und Cl⁻-Konzentration [Scully, 2003].

1.4.2.6 Antihistaminika

Alte Antihistaminika wie zum Beispiel Clemastin, zeigen eine sehr hohe Inzidenz von Mundtrockenheit (6%). Neuere Wirkstoffe wie Acrivastin, Astemizol, Cetirizin, Ebastin, Fexofenadin, Loratadin, Mizolastin und Terfenadin, weisen insgesamt weniger Nebenwirkungen auf und führen daher auch weniger häufig zur Xerostomie [Scully, 2003].

1.4.2.7 Antihypertensiva

Nicht-selektive und β_1 -selektive Blocker beeinflussen im Vergleich zum Placebo die Speichelzusammensetzung, genauer gesagt die Proteinzusammensetzung, und reduzieren die Amylase-Aktivität, aber nicht den Speichelfluß. Zentralwirksame Antihypertensiva, Sympatholytika, wie Reserpin, Clonidin und Methyldopa, bewirken ein Trockenheitsgefühl im Mund. Bei den neueren Sympatholytika, die gezielt am Imidazolin-I1-Rezeptor angreifen, wie Moxonidin und Rilmenidin, ist die Inzidenz der Mundtrockenheit geringer als in der Clonidin-Gruppe.

Die Gruppe der ACE-Hemmer führen bei 13% der Patienten zu Mundtrockenheit [Scully, 2003].

1.4.2.8 Antidepressiva

Serotonin-Agonisten, Serotonin- und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (Fluoxetin, Venlafaxin, Citalopram, Reboxetin, Duloxetin, Nefazodon, etc.) weisen deutlich weniger anticholinerge Nebenwirkungen auf als die Gruppe der tricyclischen Antidepressiva, jedoch kann es auch hier zur Mundtrockenheit als Nebenwirkung kommen [Scully, 2003].

1.4.2.9 Opioide und Benzodiazepine

Dihydrocodein führt in 80% der Fälle zum Gefühl der Mundtrockenheit, ebenso Tramadol, dieses aber in geringerem Ausmaß [Scully, 2003]. Benzodiazepine, wie Diazepam, führen ebenso zu leichter Mundtrockenheit. Zopiclon, das chemisch gesehen kein Benzodiazepin ist, aber in der Nähe der Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA-Rezeptor angreift, löst ebenfalls ein Mundtrockenheitsgefühl aus [Scully, 2003].

1.4.2.10 Suchtdrogen

Mundtrockenheit wird durch Cannabis, Ecstasy, Methamphetamin und Methadon ausgelöst. Konsumenten von Methamphetamin und Methadon sind auch deutlich anfälliger für Karies [Scully, 2003].

Cocain erzeugt aufgrund seiner sympathomimetischen Wirkung keine Xerostomie [Scully, 2003].

1.4.2.11 Cytokine

Cytokine, wie zum Beispiel Interferone, haben in vitro einen Einfluß auf die Zellen der Speicheldrüsen und können an Erkrankungen der Speicheldrüsen beteiligt sein.

Eine Therapie mit rekombinanten Interleukin-2 (rIL-2) kann die Speichelsekretion beeinträchtigen und auch zu Dysfunktionen der Speicheldrüsen führen. Eine Kombinationstherapie von Interleukin-2 (rIL-2) und rekombinanten Interferon- α (rINF- α) bewirkt eine Reduktion der Speichelsekretion aus der *Glandula parotidea* und der *Glandula submandibularis* unter stimulierten und nicht-stimulierten Bedingungen. Weiters kommt es zu einer Veränderung der Elektrolytzusammensetzung im stimulierten Speichel. Die K^+ -Konzentration ist erhöht und die Na^+ -Konzentration ist verringert. Die Proteinzusammensetzung bleibt jedoch unverändert [Scully, 2003].

1.5 Funktion des Speichels

1.5.1 Schutzfunktionen des Speichels

1.5.1.1 Schutz der Zähne

Der Speichel spielt eine wichtige Rolle beim Erhalt der Zähne. Mit dem Speichel werden alle in der Mundhöhle vorkommenden Substanzen wie Speisereste, Mikroorganismen oder gesundheitsschädliche Verbindungen verdünnt und ausgespült. Durch die Entfernung von Zuckern aus der Mundhöhle wird das Kariesrisiko reduziert und durch die Entfernung von Säuren, die aus der Nahrung stammen, wird der Zahnerosion vorgebeugt. Bei der Entfernung dieser potentiellen Schadstoffe spielt das sezernierte Speichelvolumen eine große Rolle, denn je mehr und je schneller der Speichel produziert wird, umso schneller erfolgt die Elimination der Schadstoffe [De Almeida et al., 2008; Pedersen et al., 2002].

Die Speichelmenge, die nach dem Schlucken in der Mundhöhle zurückbleibt, im Durchschnitt etwa 0,8 mL, wird als Residualspeichel bezeichnet. Dieser Residualspeichel bleibt als dünner Film auf den Zähnen und der Mundschleimhaut zurück und beinhaltet Schleimstoffe (Muzine), Enzyme, antibakteriell wirksame Proteine und Immunglobuline, die die Mundhöhle und Zähne schützen [Pedersen et al., 2002].

Die Pufferfunktion des Speichels durch HCO_3^- , PO_4^{3-} und Proteine stellt einen weiteren Schutzmechanismus für die Zähne dar, da die Demineralisierung reduziert wird. Weiters schützen spezifische Speichelproteine, wie Statherin und Prolin-reiche Proteine, die Zähne vor einer Demineralisierung, da sie Bildung von Calcium-Phosphat-Salzen hemmen. Die hohe Konzentration von Ca^{2+} und PO_4^{3-} eine Remineralisierung des Zahnschmelzes. Andere Speichelproteine hemmen die bakterielle Adhäsion an den Zähnen und beugen so Karies vor [De Almeida et al., 2008; Pedersen et al., 2002].

1.5.1.2 Schutz der Schleimhäute

Speichel trägt durch die Reinigung der Mundhöhle, durch die Befeuchtung und durch sein Puffersystem zur Integrität der Schleimhaut im Mund- und Rachenraum bei.

Muzine, die von der *Glandula submandibularis*, der *Glandula sublingualis* und den kleinen Speicheldrüsen produziert werden, sind hauptverantwortlich für die Befeuchtung der Schleimhäute im Mund- und Rachenraum sowie in der Speiseröhre. Die Schleimstoffe (Glycoproteine) sind hydrophil, das heißt sie binden Wasser und verhindern so eine Austrocknung der Schleimhäute. Weiters können sie auch an Oberflächenantigene von Bakterien binden und so deren Kolonisation auf der Schleimhaut verhindern. Histatine dagegen weisen eine starke antifungale Wirkung auf und verhindern so die Ansiedelung von *Candida albicans*, dem Erreger von Mundsoor [De Almeida et al., 2008; Pedersen et al., 2002].

Der Schutz der Speiseröhrenschleimhaut beruht darauf, daß beim Schlucken etwa 95% der in die Speiseröhre gelangten Magensäure wieder zurück in den Magen gespült wird und die restliche Säure durch den Speichel verdünnt und abgepuffert wird. Je höher der Speichelfluß ist, umso höher ist

auch die HCO_3^- -Konzentration im Speichel und umso schneller wird die in die Speiseröhre gelangte Magensäure neutralisiert [Pedersen et al., 2002].

1.5.2 Immunologische Funktionen des Speichels

Die Mundhöhle des Menschen ist aufgrund der erhöhten Temperatur, der hohen Feuchtigkeit und der regelmäßigen Versorgung mit Nahrung ein Paradies für Mikroorganismen. Der Speichel spielt in diesem System eine Schlüsselrolle zur Aufrechterhaltung des *steady-state*. Erst wenn die Speichelproduktion gestört ist, wird das Ausmaß der Bedeutung des Speichels für das Immunsystem sichtbar. So kommt es zum Beispiel bei Patienten, die sich im künstlichen Tiefschlaf befinden, innerhalb von zwei Wochen zu einer Verschiebung der Normflora in Richtung Gram-negativer Keime, die sich in weiterer Folge in den Atemwegen ausbreiten und so verschiedene Lungenerkrankungen auslösen können [Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

Früher wurde angenommen, daß die im Speichel vorkommenden Immunglobuline eine spezifische Abwehrfunktion gegenüber einem bestimmten Mikroorganismus ausüben. Heute ist darüber hinaus bekannt, daß im Speichel nicht nur ein erworbenes Immunsystem vorkommt, sondern auch ein angeborenes Immunsystem. Das angeborene Immunsystem wird aus protektiven Faktoren aus Peptiden und (Glyco)proteinen gebildet, die die erste Front in der oralen Abwehr darstellen [Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.1 Immunglobuline

Sekretorisches Immunglobulin A (S-IgA) ist im Speichel und in allen Körperflüssigkeiten das dominierende Immunglobulin. S-IgA hemmt die Anheftung von Fremdkeimen an die Schleimhäute bzw. deren Penetration in die Schleimhäute. Weiters hat es die Fähigkeit, Viren und Enzyme zu inaktivieren.

Die anderen Immunglobuline (IgG und IgM) die im Speichel vorkommen, stammen wahrscheinlich aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit und sind mengenmäßig von geringer Bedeutung [De Almeida et al., 2008; Marcotte und Lavoie, 1998; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.2 Lysozym

Lysozym kommt nicht nur im Speichel, sondern auch in allen anderen Körperflüssigkeiten vor. Die antibakterielle Wirkung kommt durch die hydrolytische Wirkung auf die Zellwandpolysaccharide zustande.

Weiters kann es auch bakterielle Autolysine, die ebenfalls bakterielle Zellwände zerstören können, aktivieren. Gram-negative Bakterien sind aufgrund ihrer Lipopolysaccharidhülle wesentlich resistenter gegenüber Lysozym [De Almeida et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.3 Lactoferrin

Lactoferrin ist ein multifunktionelles Protein, da es neben der bakteriostatischen, bakteriziden, fungiziden und antiviralen Aktivität noch antiphlogistische und immunmodulierende Fähigkeiten besitzt.

Lactoferrin kommt in verschiedenen Körperflüssigkeiten vor und bindet freies Eisen, welches bestimmte Bakterienarten, wie zum Beispiel *Streptococcus mutans*, zum Überleben benötigen. Weiters wurde entdeckt, daß durch die Verdauung von Lactoferrin mit Pepsin eine weitere antimikrobiell wirksame Domäne freigesetzt wird [De Almeida et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.4 Peroxidasen

Die im Speichel vorkommenden Peroxidasen oder auch Sialoperoxidasen werden einerseits in den Speicheldrüsen gebildet (humane Speichel-Lactoperoxidase, HS-LPO) und andererseits in den polymorphkernigen Leukozyten (Myeloperoxidase, MPO), die durch die Zahnfleischspalten in die Mundhöhle einwandern. Die antimikrobielle Wirkung kommt durch die Katalyse der Oxidation von Thiocyanat zu Hypothiocyanat, einer sehr potenten antibakteriellen Substanz, zustande [De Almeida et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.5 Cystatine

Ursprünglich wurde angenommen, daß die Cystatine die Mineralisierung der Zähne im Gleichgewicht halten. Darüber hinaus wurde jedoch festgestellt, daß sie auch als Inhibitoren der Cystein-Proteasen fungieren können und so einen Einfluß auf die Kontrolle der proteolytischen Vorgänge haben. Proteolytische Vorgänge können einerseits von Mikroorganismen ausgehen oder andererseits vom Körper selbst, zum Beispiel im Rahmen des Entzündungsprozesses [De Almeida et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.6 Histatine

Die Gruppe der Histatine setzt sich strukturell ähnlichen Proteinen zusammen, deren Gemeinsamkeit das Vorkommen von Arginin-, Histidin- und Lysin-Resten ist. Neben bakteriziden Wirkung auf einige *Streptococcus mutans* Stämme und Gram-negative Bakterien, besitzen sie auch eine fungizide Wirkung auf *Candida albicans*. Die bakterizide und fungizide Wirkung kommt durch die Zerstörung der Zellmembranen bzw. durch Veränderung der Membranpermeabilität zustande [De Almeida et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

1.5.2.7 Agglutinin

Beim Agglutinin handelt es sich um ein stark glycosyliertes Protein, das Blutgruppen-Antigene besitzt. Agglutinin kann eine Vielzahl von Mikroorganismen, darunter *Streptococcus mutans*, *S. salivarius* und *S. sanguis* binden und deren Agglutination fördern [De Almeida et al., 2008; Nieuw Amerongen und Veerman, 2002].

Tabelle 4: Übersicht über die immunologischen Funktionen von Speichelbestandteilen [Nieuw Amerongen und Veerman, 2002]

	Bildungsort	Wirkung
sekretorisches IgA	alle Speicheldrüsen	spezifische Immunreaktion
Histatine	(sero)muköse Speicheldrüsen	mikrobizid
Defensin-2		mikrobizid
Cystatine	<i>Gl. submandibularis</i> , <i>Gl. sublingualis</i>	hemmt Cystein-Proteinasen
VEGh	Ebner-Drüsen	hemmt Cystein-Proteinasen
SLPI		hemmt Serin-Proteinasen
TIMP-1	<i>Gl. parotidea</i> , <i>Gl. submandibularis</i>	hemmt Metalloproteinasen
EP-GP	alle Speicheldrüsen außer <i>Gl. parotidea</i>	bindet an CD4-Zellen
Lactoferrin	<i>Gl. parotidea</i> , <i>Gl. submandibularis</i>	bakteriostatisch, mikrobizid
Lactoperoxidase	<i>Gl. parotidea</i> , <i>Gl. submandibularis</i>	bakteriostatisch
Lysozym	<i>Gl. parotidea</i> , <i>Gl. submandibularis</i>	bakterizid auf Gram-positive Keime
Chitinase	alle Speicheldrüsen	fungizid
Agglutinin	<i>Gl. parotidea</i> , <i>Gl. submandibularis</i> , <i>Gl. sublingualis</i>	Aggregation
Muzine (MUC5B, MUC7)	alle seromukösen Speicheldrüsen	Aggregation, Einkapselung
Calprotectin	<i>Gl. parotidea</i> , Epithel	antimikrobiell
Chromogranin A	<i>Gl. submandibularis</i>	antibakteriell, antifungal

1.5.3 Speichel als Teil des Verdauungssystems

Der Geschmack ist ein wichtiger Stimulus für die Sekretion von Speichel. Andererseits ist das Vorhandensein von Speichel unbedingt erforderlich, damit die Geschmackswahrnehmung stattfinden kann, denn die Geschmacksstoffe müssen zuerst in Lösung gebracht werden, damit sie an den Geschmackspapillen andocken können. Gustatin, ein im Speichel vorkommendes Protein, dürfte für das Wachstum und die Reifung der Geschmackspapillen mitverantwortlich sein [De Almeida et al., 2008; Pedersen et al., 2002].

Während des Kauvorganges vermischt sich der Speichel mit der zerkleinerten Nahrung und bewirkt deren Befeuchtung durch die Bindung von Schleimstoffen an Nahrungsbestandteile. Durch diese Befeuchtung wird die Nahrung weicher und gleitfähiger und kann ohne die Schleimhaut zu beschädigen durch die Speiseröhre transportiert werden [De Almeida et al., 2008; Pedersen et al., 2002].

Während des Kauprozesses beginnt auch die Verdauung von Kohlehydraten und Lipiden. Die im Speichel enthaltene α -Amylase, auch als Ptyalin bezeichnet, spaltet Stärkemoleküle in Glucose auf. Da das pH-Wert-Optimum der Speichelamylase bei pH 6,8 liegt, wird sie zum Großteil im Magen durch die Salzsäure inaktiviert und die Kohlehydratverdauung unterbrochen. Diese wird durch die Pankreasamylase im Dünndarm wieder aufgenommen. Die Speichelamylase wird zum Großteil von der Ohrspeicheldrüse gebildet und macht etwa ein Drittel der Gesamtproteinkonzentration im Speichel aus [Pedersen et al., 2002].

Die Speichellipase, die einen Teil der Nahrungsfette (Triglyceride) bereits im Mund und im Magen hydrolysiert, spielt bei der Fettverdauung nur eine untergeordnete Rolle. Die Bildung der Speichellipase findet in den Ebner-Drüsen statt. Diese serösen Spüldrüsen münden in die Gräben der Wallpapillen (*Papillae vallatae*) der Zunge [Pedersen et al., 2002].

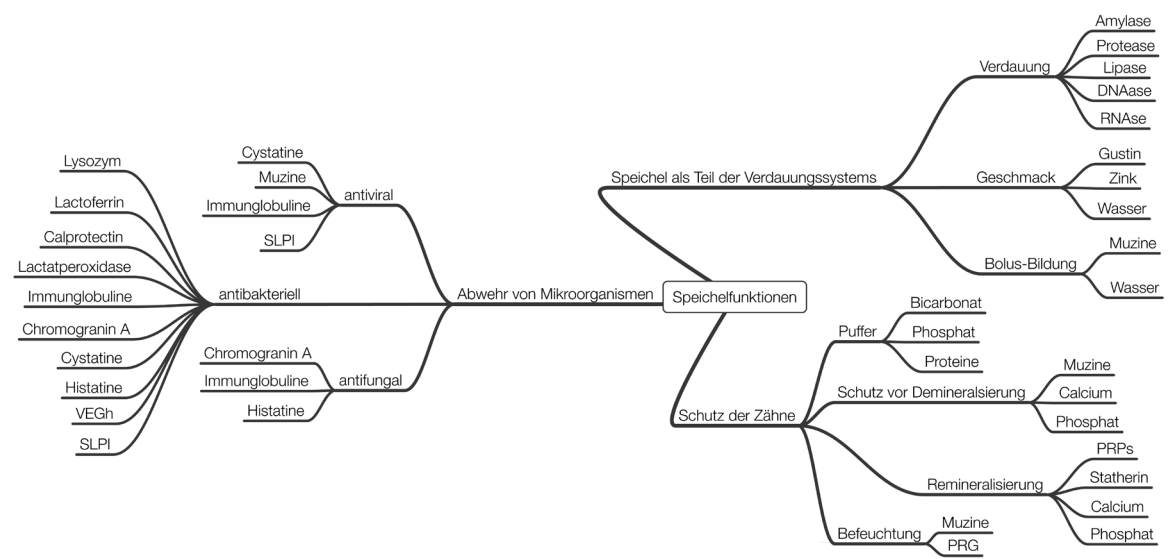


Abbildung 1: Funktionen des Speichels (modifiziert nach [Nieuw Amerongen und Veerman, 2002])

1.6 Speichel als Analysenmedium

Die großen Vorteile von Speichel als Analysenmedium gegenüber von Blut/Plasma sind die nicht-invasive Probenahme und das geringere Infektionsrisiko. Weiters kann die Probenahme einfach und ohne Eingriff in die Privatsphäre (im Gegensatz zur Urinprobe) überwacht werden. Die Speichelabnahme kann auch vom Patienten selbst, sogar zu Hause, zu jedem Zeitpunkt durchgeführt werden. Die einfache, schmerzlose und stressfreie Abnahme der Speichelprobe wiederum erhöht die Compliance der Patienten, vor allem bei Kindern und älteren Personen [Choo und Huestis, 2004; Hofman, 2001; Kadehjian, 2005; Kaufman und Lamster, 2002; Malamud, 1992].

Tabelle 5: Speichel als Analysenmedium; Vor- und Nachteile [Choo und Huestis, 2004; George und Braithwaite, 2002]

Vorteile	Nachteile
nicht invasive Probenahme	geringes und limitiertes Probenvolumen
Probenahme kann ohne Eingriff in die Privatsphäre überwacht werden	niedrige Analytkonzentrationen
geringere Möglichkeit zur Probemanipulation im Vergleich zu Urin	Interferenzen durch Nahrungsbestandteile und/oder Getränke
Speichelkonzentrationen reflektieren freie Plasmakonzentrationen	oral contamination
Möglichkeit zur Abnahme mehrerer Proben	Mangel an standardisierten Tests
kommerzielle Screening-Assays sind bereits vorhanden	bei der Verwendung von Sammelsystem ist die Ausbeute oft unbekannt
Speichel-Assays sind technisch einfacher als Plasma-Assays, da im Speichel weniger Proteine und Lipide enthalten sind	Stimulation des Speichelflusses beeinflusst den pH Wert und damit die Analytkonzentration im Speichel
Probenahme und Screening kann zu Hause durchgeführt werden	viskose Flüssigkeit
geringeres Infektionsrisiko als mit Plasma	
weniger stressige Probenahme (geeignet für Cortisol-Bestimmung)	

1.6.1 Speichel als Matrix zur Überwachung des Gesundheitszustandes

1.6.1.1 Endokrinologie

Die Speichelkonzentrationen von Steroidhormonen repräsentieren den freien, das heißt den aktiven Anteil des Hormons. Daher ist die Bestimmung von diesen Hormonen aus dem Speichel oft besser zur Beurteilung des Hormonstatus geeignet, als die Bestimmung aus dem Blut, bei der nur die totale Konzentration, das heißt die freie Konzentration plus die proteingebundene Konzentration, bestimmt wird. Im Speichel konnte bereits eine Vielzahl von Steroidhormonen nachgewiesen und deren Konzentration bestimmt werden, unter anderem Cortisol, Östrogene, Progesteron, Testosteron sowie Dehydroepiandrosteron [Aardal und Holm, 1995; Brown et al., 2008; Celec et al., 2009; Durante und Li, 2009; Gröschl, 2008; Klebanoff et al., 2008; Kobori et al., 2009; Liening et al., 2009; Marrs et al., 2007; Nomura et al., 2009; Nunez-De La Mora et al., 2007; Shiotsuki et al., 2009; Streckfus und Bigler, 2002; Turpeinen et al., 2009; Van Anders et al., 2007; Wirth et al., 2007; Wood, 2009].

Neben Steroidhormonen kommen auch noch Peptidhormone wie Insulin oder Cytokine (Leptin, Tumornekrosefaktor, *epidermal growth factor* und Ghrelin) im Speichel vor. Insulin wird aktiv in den Speichel transportiert. Der aktive Transport für Insulin in den Speichel läuft hochselektiv ab, da die Insulin-Konzentration im Speichel nach einer Glucose-Aufnahme gleich hoch ist wie im Plasma. Im Gegensatz dazu ist aber im Speichel kein C-Peptid (Spaltprodukt der Insulinbildung) nachweisbar. Die Cytokine werden von den Speicheldrüsen selbst produziert und gelangen durch Exozytose in den Speichel [Gröschl, 2008].

Da es keine Referenzintervalle für die Bestimmung der Peptidhormone aus dem Speichel gibt, werden diese nur als qualitative Marker für bestimmte orale Erkrankungen eingesetzt und nicht als Ersatz für quantitative Messungen aus dem Plasma [Gröschl, 2008].

Die Bestimmung von Hormonen aus dem Speichel erfolgt entweder mit Immunoassays (RIA, ELISA) oder mit chromatografischen Methoden, meist LC/MS [Gröschl, 2008].

1.6.1.2 Diagnostik viraler Erkrankungen

Schnelltests zum Nachweis von HIV im Humanspeichel haben einige Vorteile gegenüber dem Nachweis aus dem Blut, da sie leicht anzuwenden sowie nicht-invasiv sind und die Infektionsgefahr für das Personal reduziert ist. Nach einem Schnelltest mit HIV-positivem Ergebnis wird zur Absicherung eine Bestätigungsanalyse aus dem Blut empfohlen [Branson, 2004; Emmons, 1997; Malamud, 1997; Pai, 2007; Scott et al., 2009; Scully, 1997; Wesolowski et al., 2008; Zelin et al., 2008].

Weiters konnten auch Hepatitis-A-Antikörper sowie Hepatitis-A-Virus-RNA im Speichel nachgewiesen werden [Amado et al., 2008; O'farrell et al., 1997]. Hepatitis-B-Virus-DNA konnte im Speichel und Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) sowie Hepatitis-B-Kern-Antigen (HBcAg) konnte im Gewebe der *Glandula parotidea* nachgewiesen werden. Da die Anzahl der Hepatitis-B-Virus-DNA-Kopien im Speichel sehr hoch war, kann davon ausgegangen werden, daß eine Übertragung des Virus über den Speichel möglich ist [Chen et al., 2009; Kidd-Ljunggren et al., 2006]. Im Speichel von 50% an Hepatitis-C erkrankten Personen konnte Hepatitis-C-Virus-RNA nachgewiesen werden [Kage et al., 1997; Raggam et al., 2008b].

Neben den Hepatitis-Viren konnten auch Herpes-Viren im Speichel nachgewiesen werden, nämlich HSV1 und HSV2, sowie HHV-6, HHV-7 und HHV-8 [Laduca et al., 1998; Lucht et al., 1998; Raggam et al., 2008b].

Auch der Nachweis von Epstein-Barr-Virus- und Cytomegalievirus-DNA sowie die Genotypisierung der Glycoproteine der Hülle des Cytomegalievirus ist aus dem Speichel möglich [Dawson III et al., 2009; Grosjean et al.; Imbronito et al., 2008; Mollbrink et al., 2009; Murata et al., 2009].

1.6.1.3 Diagnostik bakterieller Erkrankungen

Neben dem Nachweis von Bakterien, wie *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* und *Porphyromonas gingivalis*, die Zahnkaries und Zahnfleischerkrankungen auslösen, kann auch die DNA von *Helicobacter pylori*, der mit der Entwicklung von peptischen Ulzern und Magenkrebs assoziiert wird, im Speichel nachgewiesen werden. Weiters ist die Isolierung und Kultivierung von *Helicobacter pylori* aus Speichelproben möglich [Ferguson Jr et al., 1993; Jiang et al., 1998; Li et al., 1996; Li et al., 1995; Mapstone et al., 1993; Streckfus und Bigler, 2002].

1.6.1.4 Diagnostik von systemischen Erkrankungen

Veränderungen in der Speichelzusammensetzung sind häufig mit verschiedenen systemischen Erkrankungen assoziiert, wie zum Beispiel Sjögren-Syndrom, Mukoviszidose, chronischer Niereninsuffizienz oder *Graft-versus-Host*-Erkrankung (siehe Kapitel 1.3.1). Diese Veränderungen der sialochemischen Eigenschaften kann zur (ergänzenden) Diagnostik der genannten Erkrankungen herangezogen werden.

1.6.1.5 Nachweis von Tumormarkern

Beim oralen Plattenepithelkarzinom (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC) können die Proteine Cyfra 21-1 (*intermediate filament protein*), TPS (*tissue polypeptide specific antigen*), und CA125 (Serum-Tumormarker) aufgrund ihrer stark erhöhten Konzentration als Tumormarker herangezogen werden. Weiters sind CA19-9 (*carcino-antigen*), SCC (*squamous cell carcinoma associated antigene*) und CEA (*cacinogenic embryonic carcinogen*) erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant [Nagler, 2009].

Durch oxidativen und nitrativen Stress ist die Speichelzusammensetzung bei OSCC-Patienten ebenfalls verändert. Die Konzentration der reaktiven Stickstoffspezies (NO, NO₂, NO₃) sind erhöht, ebenso die Konzentration von 8-OH-dG, einem Indikator für die DNA-Oxidation [Nagler, 2009].

Weiters ist die totale Proteinkonzentration im Speichel erhöht. Die Spiegel von Albumin, LDH (Laktatdehydrogenase, Marker für Gewebeerstörung), Total-IgG, IGF (Wachstumsfaktor), MMP-2 sowie MMP-9 (Metalloproteasen) sind erhöht, die von sekretorischem IgA und der Amylase sind verringert. Die Natrium-, Calcium-, Magnesium- und anorganischem Phosphat-Konzentration ist erhöht und die Kalium-Konzentration ist reduziert [Nagler, 2009].

Neben Tumormarkern für das OSCC können auch Marker für Brustkrebs im Speichel nachgewiesen werden, nämlich c-erb und CA15-3. Weiters konnten im Speichel 209 Proteine identifiziert werden, mit deren Hilfe man zwischen gesunden Frauen, Frauen mit einem gutartigem Tumor und Frauen mit Brustkrebs unterscheiden kann. Darunter sind auch Proteine die eine Unterscheidung zwischen Brustkrebs mit und ohne Lymphknotenbefall ermöglichen [Bigler et al., 2002; Streckfus, 2009].

1.6.2 Therapeutic Drug Monitoring und Nachweis von Drogen

Speichel kann auch als Analysenmedium zum Nachweis von Medikamenten und Drogen verwendet werden.

Es können viele Medikamente quantitativ im Speichel nachgewiesen werden. Dazu zählen zum Beispiel HIV-Therapeutika wie Indinavir, Lopinavir, Nevirapin, Ritonavir sowie Saquinavir [Burhenne et al., 2003; Estrela et al., 2008; Hugen et al., 2000; L'homme et al., 2008; Rakhmanina et al., 2007; Wintergerst et al., 2000], einige Antibiotika wie Clindamycin, Gentamicin, Metronidazol, Refampicin, Spiramycin und Tobramycin [Berkovitch et al., 2000; Catena et al., 2009; Minchev und Svinarov, 2005; Sagan et al., 2005; Spencer et al., 2005] sowie antifungale Wirkstoffe wie Fluconazol [Koks et al., 2001].

Ebenfalls können Anitpileptika, wie zum Beispiel Carbamazepin, Lamotrigin, Levetiracetam, Topiramat und Valproinsäure [Dordevic et al., 2009; Maldonado et al., 2008; Malone et al., 2006; Mecarelli et al., 2007; Miles et al., 2003; Pulitano et al., 2005] und diverse Psychopharmaka wie Benzodiazepine, Hypnotica, tricyclische Antidepressiva, Lithium, Methylphenidat, Paroxetin und Risperidon [Ashnagar und Sadeghi, 2007; Flarakos et al., 2004; Flarakos et al., 2002; Kintz et al., 2005; Marchei et al., 2009; Ngwa et al., 2007; Quintela et al., 2004; Tsuruta et al., 2007; Uddin et al., 2009] im Speichel nachgewiesen werden. Zu den Chemotherapeutika, die aus dem Speichel bestimmt werden können, zählen Busulfan, 5-Fluorouracil, Irinotecan sowie Docetaxel und Paclitaxel [Farquharson et al., 2005; Mortier et al., 2005; Rauh et al., 2006; Takahashi et al., 1997]. Aus der Gruppe der Immunsuppressiva können Cyclosporin und Mycophenolsäure bestimmt werden [Coates et al., 1988; Mendonza et al., 2004; Mendonza et al., 2006; Shen et al., 2009]. Acetamoniphen (Analgetikum), Digoxin (herzwirksames Glycosid), Propranolol (β-Blocker) und Theophyllin (Antiasthmikum) konnten ebenfalls aus dem Speichel nachgewiesen werden [Chereches-Panta et al., 2007; Hahn et al., 2000; Hold et al., 1995; Panta et al., 1998; Salamzadeh et al., 2008; Tadeusiak et al., 1997].

In der Literatur lassen sich zahlreiche Arbeiten über die Bestimmung von Drogen aus dem Speichel finden. Es können aus der Gruppe der Amphetamine folgende Substanzen aus dem Speichel bestimmt werden:

MDMA (3,4-Methylenedioxyamphetamin), MDEA bzw. MDE (3,4-Methylenedioxyethyl-

amphetamin), MDA (3,4-Methylendioxyamphetamin), MBDB (N-Methyl-1-(1,3)-benzodioxol-5-yl)-2-butanamin), Methamphetamin, Amphetamin, Ephedrin und einige ihrer Metabolite [Concheiro et al., 2005; Gentili et al., 2002; Navarro et al., 2001; Samyn et al., 2002; Scheidweiler und Huestis, 2006; Schepers et al., 2003; Wood et al., 2003; Yonamine et al., 2003]. Weiters können Cocain und dessen Metabolite [Campiglia und Vo-Dinh, 1998; Cognard et al., 2006; Dams et al., 2007; De Jager und Andrews, 2002; Jufer et al., 2006; Niedbala et al., 2001a; Schramm et al., 1993], sowie diverse Verbindungen aus der Gruppe der Opiate und Opioide wie Morphin, Codein, Heroin und 6-Monoacetylmorphin, Dihydrocodein, Papaverin, Methadon sowie EDDP (2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin) im Speichel nachgewiesen werden [Allen et al., 2005; Dams et al., 2007; Dams et al., 2003; Kim et al., 2002; Kopecky et al., 1997; Niedbala et al., 2001b; Ortelli et al., 2000; Pham-Huy et al., 1997; Rodriguez Rosas et al., 2003; Rohrig und Moore, 2003; Skopp et al., 2001].

Aus der Gruppe der Cannabinoide ist eine Bestimmung von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Δ^8 -Tetrahydrocannabinol, Cannabinol, Cannabidiol, 2-Carboxy-Tetrahydrocannabinol möglich [Concheiro et al., 2004; Hall et al., 1998; Kircher und Parlar, 1996; Luo et al., 2009; Moore et al., 2007; Teixeira et al., 2005; Yonamine et al., 2003].

1.6.3 Einflußfaktoren auf die Speichelprobenahme

Bei der Interpretation von Daten wird sehr oft ein wichtiger Aspekt in der Speichelanalytik übersehen, nämlich die Abnahme der Speichelprobe selbst.

Viele Faktoren beeinflussen den Transport von Analyten in den Speichel, die Analytkonzentration im Speichel und die Korrelation der Speichelkonzentration mit der Plasma- bzw. Blut-konzentration. Zu diesen Einflußfaktoren zählen der pK_a -Wert des Analyten, sein Molekulargewicht, das Ausmaß seiner Plasmaproteinbindung, seine Lipophilie und sterische Konfiguration sowie der pH-Wert im Speichel. Meist gelangen nur nicht metabolisierte Ausgangsverbindungen in den Speichel, da diese eine höher Lipophilie als ihre Metaboliten aufweisen und so leichter durch die Zellmembranen diffundieren können. Weiters können nur freie, das heißt nicht an Plasmaproteine gebundene Proteine, durch die Zellmembranen diffundieren. Die Plasmaproteinbindung ist zwischen den einzelnen Analyten verschieden, jedoch für einen bestimmten Analyten zwischen einzelnen Individuen relativ konstant [Crouch, 2005; O'neal et al., 1999].

Aus den bekannten Einflußfaktoren auf den Transport von Analyten in den Speichel konnten Formeln zur Berechnung der erwarteten Saliva/Plasma-Relation von sauren und basischen Verbindungen abgeleitet werden (siehe Kapitel 1.6.3.1) [Crouch, 2005].

1.6.3.1. Einfluß der oralen Kontamination

Werden Drogen oder Medikamente oral eingenommen oder geraucht, dann ist es möglich, daß die im Speichel gemessene Konzentration hoch ist, höher als mit den mathematischen Modellen vorausberechnet werden kann [Crouch, 2005].

So konnte zum Beispiel bei der Bestimmung von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol festgestellt werden, daß die Speichelkonzentration zu Beginn (nach dem Rauchen) deutlich höher war als im Plasma. Weiters konnte Δ^9 -Tetrahydrocannabinol auch im Speichel von Passivrauchern nachgewiesen werden [Niedbala et al., 2004; Thompson und Cone, 1987].

Nach der Einnahme einer oralen Codein-Lösung konnte für einen Zeitraum von circa zwei Stunden eine erhöhte Saliva/Plasma-Ratio bestimmt werden. In den ersten 30 Minuten lagen die Saliva/Plasma-Ratio sogar zwischen 75 und 2580, was einen deutlichen Hinweis auf *oral contamination* liefert. Nach etwa zwei Stunden pendelten sich die Werte auf eine mittlere Saliva/Plasma-Ratio von 3,7 ein [O'Neal et al., 1999].

Der Vergleich zwischen der intravenösen und inhalativen Applikation von Heroin, zeigte eine deutliche Kontamination der Mundhöhle mit gerauchtem Heroin, da die Konzentrationen im Speichel nach dem Rauchen im $\mu\text{g/mL}$ -Bereich lagen und die Konzentrationen nach der intravenösen Applikation im ng/mL -Bereich. Das Speichel-Blut-Verhältnis der Konzentrationen war bei der inhalativen Aufnahme größer fünf und nach der i.v.-Applikation kleiner zwei [Jenkins et al., 1995].

1.6.3.2 Einfluß des pH-Wertes und der Speichelstimulation

Es wurde bereits erwähnt, daß der pH-Wert des Speichels und eine etwaige Stimulation des Speichelflusses einen wesentlichen Einfluß auf die Wirkstoffkonzentration in Speichel hat (siehe Kapitel 1.6.3.1).

Vergleicht man die Konzentration von Cocain und seinen Metaboliten (Benzoylcegonin und Ecgoninmethylester) in nicht-stimulierten Speichelproben (durch Spucken gewonnen) mit stimulierten Speichelproben (Kaugummi oder Zitronen-Bonbon), so fällt auf, daß die Analytkonzentrationen in den nicht-stimulierten Speichelproben höher sind als in den stimulierten. Weiters ist das Zeitfenster für die Detektion der Analyte in den nicht-stimulierten Proben größer als in den stimulierten Proben. Cocain, Benzoylcegonin und Ecgoninmethylester konnten nach zwölf Stunden in allen nicht-stimulierten Speichelproben nachgewiesen werden und nach 24 Stunden noch in 2/3 der Proben. Wurde der Speichelfluß durch das Kauen eines zuckerfreien Kaugummis angeregt, so waren nach zwölf Stunden 60% der Proben positiv und nach 24 Stunden nur noch 40%. Die Stimulation des Speichelflusses mit einem sauren Bonbon führte dazu, daß nach zwölf Stunden nur 40% der Proben positiv getestet werden konnten und nach 24 Stunden keine einzige mehr [Crouch, 2005; Kato et al., 1993].

Wie bereits im Kapitel 1.3 erwähnt, ändert sich mit der Stimulation des Speichelflusses dessen Zusammensetzung, vor allem kommt es zu einer vermehrten Sekretion von Bicarbonat (HCO_3^-). Eine vermehrte Bicarbonat-Sekretion bewirkt eine Erhöhung des pH-Wertes im Speichel. Dies wiederum führt zu einer Abnahme der Speichelkonzentration von basischen Analyten [Choo und Huestis, 2004; Crouch, 2005; Höld et al., 1995; Kato et al., 1993].

1.6.3.3 Einfluß des Sammelsystems

Kommerziell erhältliche Speichelsammelsysteme können die messbare Analytkonzentration im Speichel einerseits durch unterschiedliche Wiederfindungsraten (Absorption der Analyte an eine Komponente des Sammelsystems) und andererseits durch eine Stimulation des Speichelflusses beeinflussen.

Ein weiteres Problem für das Analysenlabor stellt die Tatsache dar, daß bei vielen Sammelssystemen nur sehr geringe oder unbekannte Mengen an Speichel gesammelt werden können. Das limitierte Probenvolumen führt dazu, daß entweder nur ein Screening oder eine Bestätigungsanalyse durchgeführt werden kann. Weiters ist aufgrund des geringen Volumens meist ein *retesting* der Probe durch das Labor, eine Behörde oder den Spender nicht möglich. Ist das Probenvolumen bzw. die Analyt-Recovery aus dem Sammelssystem unbekannt, dann ist ein korrekter Vergleich der Analysenergebnisse und die Berechnung von Saliva/Plasma-Ratios praktisch nicht möglich [Crouch, 2005].

1.6.3.4 Probenstabilität

Viele Speichelsammelsysteme wurden zur *off-site*-Probenahme oder zur Eigenanwendung durch den Spender entwickelt. Das bedeutet aber, daß die Probe bis zur Analyse im Labor diversen Schritten wie Transport und Lagerung ausgesetzt ist. Aus diesem Grund sollte die Stabilität der zu bestimmenden Analyten im Sammelssystem gegeben sein [Crouch, 2005; Kadehjian, 2005].

1.6.4 Speichelsammelsysteme

1.6.4.1 Anforderungen an Speichelsammelsysteme

Speichelproben können auf verschiedene Weise gesammelt werden. Die einfachste Methode zur Probengewinnung ist das Spucken in ein inertes Plastikgefäß. Daneben gibt es aber auch eine Reihe von Speichelsammelsystemen, bei denen die Probe meist durch Absorption des Speichels an ein Baumwollstäbchen gewonnen wird. Daneben gibt es ein Speichelsammelsystem bei dem die Probe durch Spülen der Mundhöhle mit gefärbter Flüssigkeit gesammelt wird (siehe Kapitel 1.6.5.3) [Kadehjian, 2005].

Bei der Verwendung von Speichelsammelsystemen muss sichergestellt werden, daß die Sammeltechnik nicht die Integrität der Probe beeinflusst. In einigen Sammelssystemen werden Salze oder Citratpuffer zur Stimulation des Speichelflusses eingesetzt. Diese dürfen jedoch nicht die Probe und die weitere Analyse, zum Beispiel Immunoassays, stören [Kadehjian, 2005].

Der Einfluß des Sammel-systems auf die Stimulation des Speichelflußes, der damit verbundenen pH-Wert-Erhö-hung und Beeinflussung der Analyt-Konzentration im Speichel (vgl. Kapitel 1.2.1.1 und Kapitel 1.6.3.2) sollte so gering wie möglich gehalten werden [Kadehjian, 2005].

Einige Sammel-systeme enthalten im Transportröhrchen eine Pufferlösung zur Stabilisierung der Probe. Hier muss darauf geachtet werden, daß der eingesetzte Puffer die Probe nicht negativ beeinflusst und die nachfolgenden Analysen nicht stört. Bei der Interpretation von Analyse-ergebnissen muss bedacht werden, daß durch die Zugabe eines Puffers die Speichelprobe verdünnt wird. Daher ist wichtig, das genaue Volumen der nativen Speichelprobe zu kennen, was bei den Sammel-systemen, die mit einem *collection swab* ausgestattet sind, nicht immer gegeben ist [Kadehjian, 2005].

1.6.4.2. Cozart DDS

Das Cozart DDS (*Drug Dection System*) wird von der Firma Cozart plc, Abingdon, UK, hergestellt. Der Speichelnnehmer, *Cozart Oral Swab*, ist ein Wattestäbchen mit integriertem Volumenindikator. Der zweite Teil des Sammel-systems ist ein Fläschchen mit Pufferlösung in den der *Oral Swab* nach der Probennahme eingebracht wird [Cozart; Langel et al., 2008].

Zur Probennahme wird der *Cozart Oral Swab* in den Mund genommen, um das Zahnfleisch, die Wangeninnenseite und die Zunge gestrichen bis sich der integrierte Volumenindikator vollständig blau verfärbt hat. Dies ist der Fall, wenn ein Milliliter Speichel vom Wattepad aufgesaugt wurde [Cozart]. Nach dem der *Cozart Oral Swab* aus dem Mund genommen wurde, wird er mit dem Wattepad voran in das Fläschchen mit der Pufferlösung (2 mL) eingebracht, der Stiel des Wattestäbchens abgebrochen und das Fläschchen gut verschlossen. Anschließend wird dieses für 30 Sekunden aufrecht horizontal hin und her bewegt, damit es zu einer Extraktion der Speichelprobe aus dem Wattepad kommt. In der Pufferlösung sind Salze, Konservierungsmittel und Detergenzien enthalten [Cozart; Langel et al., 2008].

Für die Auswertung der Speichelprobe bietet der Hersteller verschiedene Schnelltests, mit denen bis zu sechs verschiedenen Drogen bestimmt werden können, an. Zum Auslesen der Schnelltests wird ein tragbares Gerät benötigt. Auf diese Weise wird laut Hersteller ein vorläufiges Testergebnis, das, falls es positiv ist, noch bestätigt werden muss, innerhalb von fünf Minuten erhalten [Cozart].



Abbildung 2: Cozart DDS Oral Swab

Tabelle 6: Analyt-Recovery und -Stabilität im Cozart DDS [Langel et al. 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	75,4	5,8	93,4
MDMA	76	6,2	105,1
Δ^9 -THC	75,9	6,2	118,4
Cocain	76,3	4,2	89,4
Morphin	80,8	5,8	101,1
Codein	87,1	3,2	105,1
Diazepam	91,6	13,2	102,4
Alprazolam	66	10,5	---
Ethanol	99	2,7	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

Die Untersuchung der Wiederfindungsrate aus der Speichel-Puffer-Mischung von Drogen und Medikamenten lieferte bei fast allen getesteten Verbindungen Ausbeuten von über 75%. Auch die Stabilität der Analyten bei -18°C war in der Speichel-Puffer-Mischung ausreichend hoch (siehe Tabelle 6) [Langel et al., 2008].

Bessere Wiederfindungsraten wurden für Morphin, Cocain, Amphetamin und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in einer anderen Studie erhalten. Hier betrug die Ausbeute für die genannten Drogen 100% [Speedy et al., 2007]. Im Gegensatz dazu wurden in einer weiteren Studie wieder geringere Recoveries für Cocain (52,1%) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (67,4%) gefunden. In dieser Studie wurden auch die Wiederfindungsraten von 6-MAM (97,7%) und 11-Nor-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (101,2%) bestimmt [Ventura et al., 2009].

1.6.5.3 Das Greiner Bio-One Saliva Collection System

Das *Saliva Collection System* (SCS) wird von der Firma Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich hergestellt und besteht aus einer *Rinsing Solution* (Röhrchen 1), einer *Saliva Extraction Solution* (Röhrchen 2), einem *Saliva Collection Beaker* (Becher 3) und zwei *Saliva Transfer Tubes* (Röhrchen 4 und 5) [Greiner Bio-One GmbH, 2006]. Das Prinzip der Probennahme beruht darauf, daß sich der Speichel und die Speichelsammellösung (*Saliva Extraction Solution*) beim Spülen der Mundhöhle mit einander vermischen. Das auf diese Weise gewonnene Speichelvolumen kann aufgrund des in der Speichelsammellösung enthaltenen internen Standard (gelber Farbstoff Tartrazin) quantifiziert werden [Greiner Bio-One GmbH, 2008].

Vor der eigentlichen Probennahme wird die Mundhöhle mit der *Rinsing Solution* kurz ausgespült, um etwaige Rückstände, die die Probe verunreinigen könnten, wie zum Beispiel Speisereste, zu entfernen. Nach dem Ausspucken der *Rinsing Solution* wird der Mund zwei Minuten mit der gelb gefärbten *Saliva Extraction Solution* gespült. Die gesamte Flüssigkeitsmenge wird danach in den *Saliva Collection Beaker* (Becher) gespuckt und anschliessend in die evakuierten *Saliva Transfer Tubes* aufgesaugt. Die *Saliva Transfer Tubes* enthalten eine Zentrifugierhilfe und Natriumazid als Konservierungsmittel [Greiner Bio-One GmbH, 2006].

Die Bestimmung des in der Probe enthaltenen Speichelanteils erfolgt, nach zehnminütigem Zentrifugieren der Probe bei 2200g, mit dem *Saliva Quantification Kit* (SQK) über die photometrische Bestimmung (Extinktionsdifferenz der Wellenlängen 450 nm und 520 nm) des internen Standards. Über Extinktionsdifferenz und eine entsprechende Kalibrationsgerade kann auf den Speichelanteil in der Probe zurückgerechnet werden [Greiner Bio-One GmbH, 2008].

Die Bestimmung des Speichelanteils über den internen Standard wurde durch die Zugabe eines „zusätzlichen internen Standards“, nämlich Glucose, überprüft. Da Glucose im Humanspeichel nur in Konzentrationen um etwa 0,04 mmol/L vorkommt, ist diese Menge vernachlässigbar und kann als weiterer interner Standard zur Analyse herangezogen werden. Die Bestimmung des Speichelgehalts der Probe über Tartrazin und Glucose lieferte keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse. Daraus kann man schließen, daß die Bestimmung des Speichelanteil über Tartrazin zulässig ist [Raggam et al., 2008a].



Abbildung 3: Greiner Bio-One Saliva Collection System

Tabelle 7: Analyt-Recovery und -Stabilität im Greiner Bio-One Saliva Collection System [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (bei 4°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	86,4	3,5	89,7
MDMA	94,6	2,1	103,2
Δ^9 -THC	73,6	4,3	37,2
Cocain	98	2	108,1
Morphin	98,1	2,4	109,1
Codein	98,5	4	107,7
Diazepam	92,9	2	112
Alprazolam	92,9	2	110
Ethanol	96,2	1,7	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

Langel et al. [Langel et al., 2008] untersuchten die Recovery von neun Drogen bzw. Medikamenten aus verschiedenen Speichelsammelsystemen, darunter auch das Greiner-System. Die Recovery lag bei allen Drogen/Medikamenten über 85%, außer bei Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (73,6%). Die Stabilität der Analyten im Sammelsystem wurde ebenfalls untersucht und lieferte bei allen Analyten außer Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, gute Ergebnisse [Langel et al., 2008].

Ebenfalls gute Ergebnisse fanden Gröschel et al. [Gröschel et al., 2008] für die Recovery von diversen Antikonvulsiva (> 85%), IgA und Amylase (> 90%) und Melatonin (92%). Die Recoveries für Steroide (Cortisol, Cortison, 17 α -Hydroxyprogesteron, Testosteron und Androstendion) lagen nur knapp unter den in der Studie geforderten 85%, dafür waren diese Analyten im Vergleich zu anderen

Sammelsystemen über einen längeren Zeitraum stabil [Gröschel et al., 2008].

Die Bestimmung von viraler DNA und RNA ist ebenfalls aus der mit dem Saliva Collection System gewonnen Probenmatrix möglich. Raggam et al. [Raggam et al., 2008b] konnten die DNA von HSV-1/2 (Herpes Simplex Virus) und VZV (Varizellen-Zoster-Virus) sowie die RNA von HCV (Hepatitis C Virus) aus gespikten Speichelproben und aus Speichelproben von Patienten nachweisen.

Die Vorteile des *Saliva Collection System* liegen darin, daß die Probennahme standardisiert und reproduzierbar ist und immer, auch bei Mundtrockenheit, durch die starke Stimulation des

Speichelflußes genügend Probenmaterial gesammelt werden kann. Weiters wird die Kontamination der Probe durch Bakterien, Epithelzellen und Speiseresten durch das Vorspülen der Mundhöhle mit der *Rinsing Solution* und das Zentrifugieren der Probe in den *Saliva Transfer Tubes* minimiert. Das geschlossene System ermöglicht ein hygienisches Arbeiten und eine direkte Analyse der Speichelprobe im *Saliva Transfer Tube* auf diversen klinischen Analyzern [Greiner Bio-One GmbH; Langel et al., 2008].

Nachteilig am *Saliva Collection System* ist die relativ komplizierte Anwendung des Sammel-systems, die lange Spüldauer (zwei Minuten) und der Geschmack der Vorspül- und Speichelsammellösung. Weiters wird die starke Stimulation des Speichelflußes, die bei Mundtrockenheit von Vorteil ist, als ein möglicher Nachteil des Systems angesehen, da man den Einfluß des verstärkten Speichelflußes auf die Ergebnisse nicht kennt. Es könnte eventuell zu falsch negativen Ergebnissen kommen, da die Probe zu stark verdünnt ist. Der Preis ist im Vergleich zu anderen Sammel-systemen mit 7,60 Euro pro Kit relativ hoch (*Salivette* 40 Cent, *QuantiSal* 1,80 Euro) [Gröschl et al., 2008; Langel et al., 2008; Lillsunde, 2008].

1.6.5.4 Intercept Oral Specimen Collection Device

Das *Intercept Oral Specimen Collection Device*, nachfolgend nur mehr als *Intercept-Device* bezeichnet, wird von der Firma OraSure Technologies Inc., Bethlehem, PA, USA, hergestellt und besteht aus einem Nylon-Stäbchen auf dem ein imprägniertes Baumwollpad, *Oral Specimen Collection Pad*, zur Probennahme angebracht ist und einem Proberöhrchen (*Oral Specimen Vial*) mit Pufferlösung, die ein Konservierungsmittel enthält [Langel et al., 2008; OraSure Technologies Inc, 2008].

Zur Probennahme wird das Stäbchen mit dem mit 3,5% Natriumchlorid imprägnierten Baumwollpad in den Mundgenommen. Das Stäbchen wird zunächst zwischen den Unterkiefer und der Backentasche placiert. Anschliessend wird es mehrmals vorsichtig nach vor und zurück bewegt um eine Befeuchtung des Baumwollpads zu gewährleisten. Danach wird das *Oral Specimen Collection Pad* in dieser Position für mindestens zwei Minuten, aber längstens fünf Minuten belassen. Nach dem Entfernen des Stäbchens aus dem Mund, wird dieses mit dem Baumwollpad nach unten in das Proberöhrchen gesteckt, der Nylon-Stiel abgebrochen und das Röhrchen fest verschlossen. Bevor die Speichel-Puffer-Mischung analysiert werden kann, muss das *Oral Specimen Vial*, im Analysenlabor zentrifugiert werden [Langel et al., 2008; OraSure Technologies Inc, 2003; 2007; 2008].



Abbildung 4:
Intercept Oral Specimen Collection Device

Im Vergleich mit anderen Speichelsammelsystemen wurden beim *Intercept-Device* die schlechteste Wiederfindungsrate für Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (nur 37,6%) ermittelt. Die Recoveries aller anderen getesteten Drogen und Medikamente lag über 88% (siehe Tabelle 8) [Langel et al., 2008].

Ventura et al. [Ventura et al., 2009] fanden ebenfalls für Δ^9 -Tetrahydrocannabinol geringe Wiederfindungsraten im *Intercept-Device*, nämlich 39,2%. Für die Δ^9 -THC-Carbonsäure konnten jedoch wesentlich höhere Recoveries erzielt werden (93,8%). Betreffend der Stabilität von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol gibt es unterschiedliche Ergebnisse: 108,5% Recovery nach 28 Tagen bei -18°C, 79,4% nach sechs Wochen bei -20°C, 13,2% bei 4°C und 13,6% bei 21°C (jeweils nach sechs Wochen) [Crouch, 2005; Langel et al., 2008].

Tabelle 8: Analyt-Recovery und -Stabilität im Intercept-Device [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	103,1	2,7	75,2
MDMA	101,1	4,9	82,5
Δ^9 - THC	37,6	9,0	108,5
Cocain	96,9	2,0	72,3
Morphin	92,4	2,6	85,2
Codein	116,0	3,4	86,6
Diazepam	88,9	2,1	90,7
Alprazolam	91,2	5,2	92,2
Ethanol	94,9	5,3	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

Von Testpersonen wurde das *Intercept-Device* als leicht handhabbar eingestuft. Es konnte auch innerhalb von fünf Minuten genügend Probenmaterial gesammelt werden. Negativ wurde jedoch der salzige Geschmack des Baumwollpads bewertet. [Langel et al., 2008].

1.6.5.5 OraCol Saliva Collection Device

Das von der Firma Malvern Medical Developments Ltd., Worcester, UK, vertriebene *OraCol Saliva Collection Device*, kurz *OraCol-Device*, besteht aus einem Stäbchen auf dem ein Schwämmchen zur Absorption des Speichels angebracht ist und einem Zentrifugenröhrchen [Langel et al., 2008; Malvern Medical Developments Ltd].

Für die Abnahme der Speichelprobe wird das Schwämmchen in den Mund genommen und entlang des Zahnfleisches am Zahnansatz hin und her bewegt bis es nass ist. Dabei soll circa ein Milliliter Speichel aufgenommen werden. Nach etwa einer Minute nimmt man das Stäbchen aus dem Mund und überführt es in das Zentrifugenröhrchen. Im Labor wird vor der eigentlichen Analyse das Röhrchen zentrifugiert um den Speichel aus dem Schwämmchen zu extrahieren [Langel et al., 2008].

Zum Nachweis von Drogen und Medikamenten erscheint das *OraCol-Device* weniger geeignet zu sein, da bei zwei Analyten, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol und Diazepam, die Recovery unter dem Cut-Off von 12,5% liegen. Die höchste Ausbeute konnte für Ethanol (90,7%) und Morphin (81,5%) erzielt werden [Langel et al., 2008]. Speichelproben, die mit dem *OraCol-Device* gesammelt wurden, eignen sich jedoch gut zum Nachweis von Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM), sowie von Rubella-Virus-spezifischem IgG. Ebenso konnten Steroidhormone (Cortisol, Testosteron und DHEA) und Hepatitis-B-Oberflächenantigene (HBsAg) aus *OraCol*-Speichelproben nachgewiesen werden [Atkinson et al., 2008; Vyse et al., 2001] [Hutse et al., 2005].



Abbildung 5:
OraCol Saliva
Collection Device

Tabelle 9: Analyt-Recovery und -Stabilität im *OraCol-Device* [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	69,1	1,2	76,0
MDMA	52	2,5	59,2
Δ^9 -THC	unter Cut-Off von 12,5%		
Cocain	35,1	3,1	78,7
Morphin	81,5	1,3	83,9
Codein	69,8	4,4	92,2
Diazepam	unter Cut-Off von 12,5%		
Alprazolam	19,2	13,0	73,7
Ethanol	90,7	12,1	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

1.6.5.6 OnTrak OraTube

Das *OnTrak OraTube* wird von der Varian Corporation Inc., Alto, CA, USA, hergestellt und besteht aus einem schwammartigem Kollektor, der auf einem Stäbchen angebracht ist und einem Proberöhrchen, in das eine Ausdrückvorrichtung (*expresser*), integriert ist. Die erweiterte Form des *OnTrak OraTube* stellt das *OnSite OraLab+* dar. Beim *OnSite OraLab+* ist ein Schnelltest auf sechs verschiedene Drogen (Amphetamin, Opiate, Cocain, PCP, Methamphetamin und THC) in das Proberöhrchen integriert [Langel et al., 2008; Varian Corporation Inc].

Für die Speichelsammlung wird das Kollektorschwämmchen für drei Minuten im Mund des Probanden placiert bis es sich gut mit Speichel vollgesogen hat. Anschließend wird das Schwämmchen über die ins Proberöhrchen integrierte Ausdrückvorrichtung ausgepresst und der Speichel im Röhrchen aufgesammelt. Der Kollektor und der *expresser* werden entsorgt und das Proberöhrchen mit dem Speichel ins Labor zur Analyse geschickt [Langel et al., 2008; Varian Corporation Inc].



Abbildung 6: *OnTrak OraTube* (links) und *OnSite OraLab+* (rechts)

Tabelle 10: Analyt-Recovery und -Stabilität im OraTube-Device [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	78,1	4,4	86,9
MDMA	76,4	4,7	93,2
Δ^9 -THC	47,5	8,0	84,6
Cocain	86,7	3,2	93,2
Morphin	77,3	5,7	97,8
Codein	84,2	7,8	97,7
Diazepam	39,8	15,3	95,5
Alprazolam	48,3	12,2	88,8
Ethanol	91,3	6,9	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

Die Wiederfindungsraten von einigen Drogen und Medikamenten, sowie deren Stabilität im Sammelsystem, sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die beste Recovery konnte für Ethanol ermittelt werden (91,3%), die schlechteste für Diazepam (39,8%). Die Stabilität für alle untersuchten Analyten in diesem System ist gut (84,6% für Δ^9 -Tetrahydrocannabinol bis 97,8% für Morphin) [Langel et al., 2008].

1.6.5.7 *QuantiSal*

Das Speichelabnahmesystem *QuantiSal* wird von der Immunalysis Corporation, Pomona, CA, USA hergestellt. Das Abnahmesystem besteht aus einem Cellulosepad, das auf einem Polypropylen-Stäbchen angebracht ist. In den Kollektor ist eine Volumenindikator integriert, der sich blau verfärbt, sobald genug Speichel aufgesaugt wurde. Weiters gibt es Transportröhrchen mit einer Pufferlösung, die Konservierungsstoffe enthält. In dieses Röhrchen wird der Kollektor nach der Probennahme überführt [Immunalysis Corporation; Langel et al., 2008]. Zur Probennahme wird der Kollektor mit dem Cellulosepad unter die Zunge des Probanden gelegt und so lange dort belassen bis das Cellulosepad vollständig mit Speichel gesättigt ist und sich der Volumenindikator blau verfärbt hat. Danach wird der Kollektor aus dem Mund genommen und in das Transportröhrchen mit der Pufferlösung eingebracht. Die Speichelprobe wird zur weiteren Analyse ins Analysenlabor geschickt [Immunalysis Corporation; Langel et al., 2008].

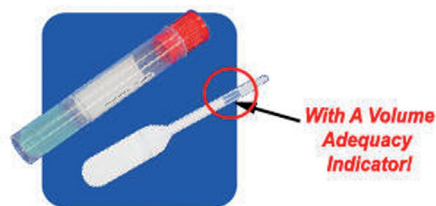


Abbildung 7: *QuantiSal* Speichelsammelsystem

Für alle getesteten Analyten, außer Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, konnte eine Recovery von über 80% ermittelt werden. Am wenigsten stabil in diesem System sind Amphetamin und Alprazolam (69,9% bzw. 68,2% nach 28 Tagen bei -18°C), alle anderen Analyten waren mit über Werten über 77% ziemlich stabil. Das beste Stabilitätsergebnis konnte für Diazepam (96,8%) ermittelt werden [Langel et al., 2008].

In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, daß das *QuantiSal-Device* sehr gut zur Bestimmung von Steroidhormonen, Proteinen und Peptiden geeignet ist. Die Wiederfindungsraten für Steroidhormone lagen im Durchschnitt bei über 85%, ebenso bei den Proteinen und Peptiden. Im Vergleich mit anderen Speichelsammelsysteme konnte die maximale Recovery für 17-Hydroxyprogesteron (91%), Testosteron (84,2%) und Androstendion (85,4%) mit dem *QuantiSal-Device* erzielt werden. Voraussetzung für die guten Ergebnisse war jedoch eine möglichst rasche

Analyse der Speichelproben nach der Abnahme. Werden die Proben über die einen längeren Zeitraum gelagert nimmt die Recovery deutlich ab. Die Ursache dafür könnte eine Adsorption der Analyten an das Cellulosepad sein.

Ebenfalls die besten Recovery-Ergebnisse wurden für Melatonin (85%), Leptin (95,8%), EGF (99,5%) und Desacyl-Ghrelin (103,4%) erzielt [Gröschl et al., 2008].

Testpersonen fanden, daß das *QuantiSal-Device* relativ einfach anzuwenden ist. Die Volumenrecovery wird ebenfalls als gut bewertet. Weiters liefert das *QuantiSal-Device* eine sehr klare Speichelprobe, da sich die schleimigen Mucopolysaccharide am Cellulose-Pad anlagern dürften [Gröschl et al., 2008].

Tabelle 11: Analyt-Recovery und -Stabilität im QuantiSal-Device [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	89,7	9,7	69,9
MDMA	82,3	8	90,2
Δ^9 -THC	55,8	12	90,2
Cocain	81,7	5,1	79,6
Morphin	82,7	5,1	79,6
Codein	99,7	11,9	77,6
Diazepam	81,1	6,4	96,8
Alprazolam	111	23,6	68,2
Ethanol	89,9	4	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

1.6.5.8 *Salicula Saliva Collector*

Der *Salicula Saliva Collector* wird Acro Biotech LLC, Rancho Cucamonga, CA, USA, vertrieben und besteht aus einem Probesammelfläschchen mit abschraub-barem Verschluss und einer Art Strohhalm zur Speichelsammlung [Acro Biotech LLC, 2003; Langel et al., 2008].

Zur Abnahme der Speichelprobe wird zunächst der Verschluss abgeschraubt und der Strohhalm vom Probanden in den Mund genommen. Der Speichel wird dann vom Probanden über den Strohhalm in das Probesammelfläschchen expektoriert. Zur Bestimmung des Probevolumens ist auf dem Fläschchen eine Volumenskala angebracht.

Im Analysenlabor werden der Drehverschluss und der Strohhalm entfernt, damit die Speichelprobe aus dem Sammelfläschchen zur weiteren Verarbeitung entnommen werden kann. [Acro Biotech LLC, 2003; Langel et al., 2008].

Bei der Bestimmung der Extraktionsausbeute konnte für alle untersuchten Analyten, außer Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, eine Wiederfindungsrate von über 92% ermittelt werden. Weiters dürften alle Analyten außer Δ^9 -Tetrahydrocannabinol für 28 Tage stabil sein (Lagerung bei -18°C) [Langel et al., 2008].



Abbildung 8: *Salicula Saliva Collector*

Tabelle 12: Analyt-Recovery und -Stabilität im *Salicula*-Device [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	98,1	3,9	115,2
MDMA	92,2	2,5	111
Δ^9 -THC	45,9	10,9	61,6
Cocain	96,8	2,8	82,4
Morphin	99,6	2,6	99,4
Codein	96,6	9,0	88,7
Diazepam	95,7	3,2	106,4
Alprazolam	95,8	2,6	113,9
Ethanol	96,8	3,4	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

1.6.5.9 *Salivette*

Die *Salivette* wird von der Firma Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland hergestellt und besteht aus einer Watterolle (mit und ohne Zitronensäure-Imprägnierung erhältlich) und einen Aufbewahrungsröhrchen mit einem Einsatz und einem Schnappverschluss. Weiters sind *Salivetten* aus Polyester und Polyethylen erhältlich [Gröschl et al., 2008; Langel et al., 2008; Sarstedt].

Zur Speichelsammlung wird die Watterolle einfach in den Mund genommen und solange darauf gekaut, bis sie mit Speichel vollgesaugt ist. In der Regel dauert die Probenahme etwa 45 Sekunden. Die mit Speichel vollgesogene Watterolle wird anschließend in den Einsatz des Aufbewahrungsröhrchens gesteckt und dieses gut verschlossen. Im Labor wird das Röhrchen zur Rückgewinnung des Speichels zentrifugiert [Langel et al., 2008; Sarstedt].

Die Recovery von allen Analyten, außer Ethanol, liegt bei der Watte-*Salivette* unter 55%, für Δ^9 -Tetrahydrocannabinol liegt sie sogar unter dem Cut-Off von 12,5%. Die Ursache für die geringen Wiederfindungsraten dürfte eine irreversible Anlagerung der Analyten an die Watterolle sein [Langel et al., 2008].



Abbildung 9: *Salivette*

Die Wiederfindungsrate für Ethanol lag bei 105,9%, was darauf hindeutet, daß die Probe durch das

Zentrifugieren etwas aufkonzentriert wird [Langel et al., 2008].

In einer anderen Studie wurden die Wiederfindungsraten von Hormonen und Peptiden untersucht. Die Watte-Salivette lieferte sehr geringe Ausbeuten (< 10%) für IL-8, Leptin, Insulin und Acylghrelin. Im Gegensatz dazu konnten mit der Polyethylen-Salivette, die für die Bestimmung von Cortisol aus dem Speichel entwickelt wurde, gute Wiederfindungsraten für Glucocorticoide (>90%), Androgene (>75%) und einige Peptide sowie Proteine (Insulin, EGF und Amylase) bestimmt werden. Von allen drei Versionen konnten mit der Polyester-Salivette die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Recoveries für Proteine und Peptide lag bei fast allen Analyten, außer Melatonin, über 80%. Die Wiederfindungsrate für Glucocorticoide lag bei über 90%, die der Sexualhormone bei über 75%. Ebenso konnten gute Ergebnisse für die untersuchten Arzneistoffe erzielt werden. Hier lagen die alle Recoveries über 90% [Gröschl et al., 2008].

Die Absorption von Analyten an der Salivette, vor allem Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, konnte auch von anderen Autoren beobachtet werden. Die Bestätigung dieser Annahme erfolgte durch Extraktion der Salivette mit Lösungsmitteln (Hexan/Ethylacetat 90:10 bzw. 1 M NaOH), da die Wiederfindungsraten in den Extrakten deutlich höher waren als im Speichel der durch Zentrifugation aus der Salivette gewonnen wurde. Ähnliche Ergebnisse konnten für Methadon und dessen Metaboliten 2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP) gefunden werden [Choo und Huestis, 2004; Teixeira et al., 2005; Yonamine et al., 2003].

Der Geschmack der Salivette wurde im Vergleich mit anderen Speichelsammelsystemen von Probanden am schlechtesten bewertet („The most negative comments were given on the taste and feel of the pad of Salivette, which was said to taste awful and to feel like cardboard [Langel et al., 2008]“). Die Anwendung der Salivette wurde dagegen als einfach empfunden. Von allen Salivetten-Typen wurde die Watte-Salivette als am angenehmsten beurteilt, die Polyethylen-Salivette dagegen wurde wegen ihrer Härte als eher unangenehm empfunden [Gröschl et al., 2008; Langel et al., 2008].

1.6.5.10 StatSure Saliva Sampler

Der StatSure Saliva Sampler wird von der amerikanischen Firma Diagnostic Systems Inc, Medford, NY, USA, vertrieben und besteht aus einem absorbierenden Cellulose-Pad mit einem integrierten Volumenindikator und aus einem Plastikröhrchen mit Pufferlösung zur Aufbewahrung des Cellulose-Pads [Concheiro et al., 2008; Langel et al., 2008].

Zur Probenahme nimmt der Proband das Cellulose-Pad solange in den Mund, bis 1 mL Speichel aufgesaugt wurde und sich das Kontrollfenster des Volumenindikators am Stiel des Kollektors blau verfärbt hat. Dann wird der Speichelkollektor aus dem Mund des Probanden entfernt und in das Plastikröhrchen übergeführt.

Im Analysenlabor wird der Stiel vom Cellulose-Pad entfernt und ein Filter ins Röhrchen eingesetzt. Über diesen Filter wird die Speichel-Puffer-Mischung aus dem Röhrchen entnommen und anschließend zur weiteren Analyse verwendet [Langel et al., 2008].

In einer Studie von Langel et al. konnten für alle Analyte eine Extraktionsausbeute von über 80% ermittelt werden. Weiters dürften die Analyte im StatSure Saliva Sampler weitgehend stabil sein [Langel et al., 2008].

In einer anderen Studie wurden zehn Suchtdrogen und zwei Metabolite (Morphin, Codein, 6-AM, Methadon, Ampethamin, Methamphetamin, MDA, MDMA, MDEA, Cocain, Benzoylcegonin und

Tabelle 13: Analyt-Recovery und -Stabilität aus der Salivette [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	51,8	9,3	83,9
MDMA	26,5	10,9	109,5
Δ^9 -THC	unter Cut-Off von 12,5%		
Cocain	33,3	8,7	95,6
Morphin	35,2	9,4	105,7
Codein	39,0	9,2	99,2
Diazepam	15,9	17,0	unter Cut-Off von 12,5%
Alprazolam	27,3	13,2	74,0
Ethanol	105,9	1,3	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

Tabelle 14: Analyt-Recovery und -Stabilität im StatSure Saliva Sampler [Langel et al., 2008]

	Recovery		Stabilität (-18°C)
	Mittelwert [%]	RSD [%]	Recovery nach 28 Tagen [%]*
Amphetamin	88,7	5,7	69,4
MDMA	86,3	4,4	87,2
Δ^9 -THC	85,4	7,0	78,8
Cocain	85,6	4,9	82,6
Morphin	88,5	16,8	91,3
Codein	81,3	5,7	94,3
Diazepam	87,4	6,3	74,7
Alprazolam	91,1	7,5	68,7
Ethanol	80,5	1,2	---

* Recovery am Tag 0 ist 100%

THC) sowie ein Antihistamin (Diphenhydramin), ein tricyclisches Antidepressivum (Amitryptilin), sieben Benzodiazepine (Alprazolam, Clonazepam, Oxazepam, Nordiazepam, Lorazepam, Flunitrazepam, Diazepam) und zwei Schlafmittel mit benzodiazepinartiger Wirkung (Zopiclon und Zolpidem) untersucht. Für die Suchtdrogen konnten Recoveries von 24,6% (Morphin) bis 78,7% (MDEA) ermittelt werden, für die Benzodiazepine von 76,2% (Nordiazepam) bis 80,7% (Flunitrazepam), für Zopiclon und Zolpidem 63,5% bzw. 82,6%, für Diphenhydramin 76,2% und für Amitryptilin 67,1% [Concheiro et al., 2008].

Auffällig ist der deutliche Unterschied in der Recovery von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (85,4% vs. 37,9%) und Morphin (88,5% vs. 24,6%) in den beiden Studien. Die Ursache für den große Unterschied in den Ergebnissen könnte durch die verschiedenen Extraktionsmethoden, die in den beiden Studien verwendet wurden, zu suchen sein.

2 Tabak-Alkaloide

2.1 Stammpflanzen

Die Stammpflanzen für die Gruppe *Nicotiana*-Alkaloide stellen verschiedene *Nicotiana*-Arten (*Solanaceae*, Nachtschattengewächse) dar. Darüber hinaus können sie auch noch in *Duboisia*-, *Equisetum*-, *Lycopodium*-, *Lycopersicum*- (Tomaten), und *Solanum*-Arten (Kartoffel), *Erythroxylum coca* (Coca-Stauch), *Withania somnifera* und *Atropa belladonna* (Tollkirsche) nachgewiesen werden [Domino, 1999; Haensel und Pertz, 2007].

In der Ameisenart *Aphaenogaster* und bei der im Meer lebenden Wurmart *Amphiporus* konnte ebenfalls ein *Nicotiana*-Alkaloid, nämlich Anabasin nachgewiesen werden [Domino, 1999].

Die Gattung *Nicotiana* und das Hauptalkaloid sind nach Jean Nicot, dem Botschafter des Französischen Hofes in Lissabon, im Jahr 1559 benannt worden. Dieser schickte Samen und junge Pflanzen dieses pflanzlichen „Allheilmittels“ an den Französischen Hof, wo Catherine de Medici die Kultivierung der Pflanzen in Frankreich veranlasste [Banyasz, 1999].

Für die Tabakgewinnung werden heute jedoch nur zwei *Nicotiana*-Arten verwendet, nämlich *Nicotiana tabacum* L. und *Nicotiana rustica* L., die ausschließlich als Kulturpflanzen vorkommen. *Nicotiana tabacum* ist ein Hybrid aus den in Peru heimischen Arten *Nicotiana sylvestris* SPEG. ET COMES und *Nicotiana tomentosiformis* GOODSPEED. Aus *Nicotiana paniculata* L. und *Nicotiana undulata* RUIZ ET PAVON, ebenfalls in Peru beheimatet, ist die zweite Tabak-Stammpflanze *Nicotiana rustica* L. entstanden.

Der Nicotin-Gehalt beträgt üblicherweise zwischen 2 und 8% des Trockengewichts der Blätter von *Nicotiana tabacum*, daneben kommen auch noch Anabasin, Anatabin und Nornicotin vor, jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen. In einigen Tabak-Arten kann der Nornicotin-Gehalt in den Blättern jedoch wesentlich höher sein, nämlich 15 bis 20% [Domino, 1999; Haensel und Pertz, 2007].

2.1.1 Habitus

Nicotiana tabacum L. ist eine 0,75 bis 3 Meter hohe, einjährige Pflanze. Der Stengel ist einfach oder wenig verästelt und wie die Blätter und Kelche drüsig behaart. Die Blätter sind sitzend oder etwas gestielt, schmal zugespitzt, wechselständig und ganzrandig. Die Blüten sind in Rispen angeordnet, die rotgefärbte Kronröhre ist trompetenförmig und ragt weit aus dem Kelch heraus. Der Schlund ist aufgeblasen und bauchig. Der Kronsaum besteht aus fünf spitzen, dreieckigen, abstehenden Zipfeln [Frohne und Pfänder, 1983].

Die Früchte sind Kapseln, welche länglich bis eiförmig geformt sind und zahlreiche Samen beinhalten [Frohne und Pfänder, 1983].



Abbildung 10: *Nicotiana tabacum* L.

2.2 Biosynthese der Nicotiana-Alkaloide

Die Nicotin-Biosynthese findet in den Wurzeln der Pflanze, genauer gesagt im meristematischen Gewebe, statt. Von dort wird es in die Blätter transportiert, wo es ganz oder auch nur teilweise zum Nornicotin abgebaut wird. Der Alkaloid-Gehalt wird von den Genen Nic1 und Nic2 gesteuert, die hauptsächlich in den Wurzeln exprimiert werden [Bush et al., 1999; Haensel und Pertz, 2007].

Der Pyridin-Ring des Nicotins wird aus Glycerol und Asparaginsäure über die Bildung von Nicotinsäure aufgebaut. Der Pyrrolidin-Ring wird aus Ornithin über Putrescin, das am Stickstoff von der Putrescin-N-methyltransferase methyliert wird aufgebaut. Das Reaktionsprodukt N-Methylaminobutanal liegt im sauren Medium als N-Methylpyrroliniumkation vor. Unter Abspaltung von Kohlendioxid wird aus dem N-Methylpyrroliniumkation und der Dihydronicotinsäure Nicotin gebildet. Hauptsächlich wird (S)-Nicotin gebildet, (R)-Nicotin nur zu 0,1% bis 0,6%. Es sind jedoch beide Enantiomere pharmakologisch aktiv [Bush et al., 1999; Haensel und Pertz, 2007].

Aus dem Nicotin wird durch Desmethylierung Nornicotin gebildet. Das in einigen Nicotiana-Arten vorkommende Alkaloid Anabasin kann als ein Homologes und Konstitutionsisomer von Nicotin angesehen werden. Anabasin enthält statt dem N-Methylpyrrolidin-Ring einen Piperidin-Ring, der aus Lysin aufgebaut wird [Haensel und Pertz, 2007].

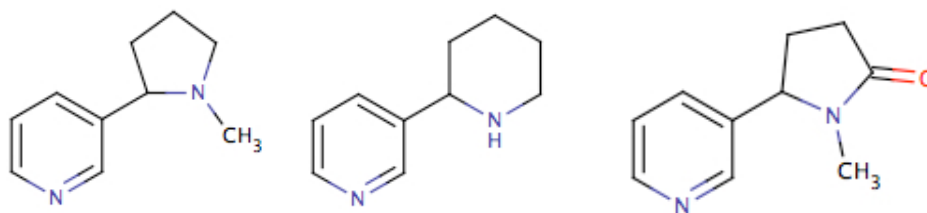


Abbildung 12: Nicotin, Nornicotin und Anabasin (v.l.n.r.)

2.3 Physikalische und chemische Eigenschaften von Nicotin

Nicotin ist eine farblose Flüssigkeit, die einen charakteristisch beißenden Geruch besitzt, zwischen 246 und 247°C siedet und sich beim Stehenlassen unter Luft- und Lichteinfluß oder auch im Dunklen in einer versiegelten Flasche mit der Zeit braun verfärbt. Die Toxizität des Nicotins nimmt durch das Verfärben jedoch nicht ab [Domino, 1999].

Synonyme Bezeichnungen für Nicotin sind 3-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)pyridin, 1-Methyl-2-(3-pyridyl)pyrrolidin und β -Pyridyl- α -N-methylpyrrolidin [Domino, 1999].

Die Summenformel von Nicotin lautet $C_{10}N_2H_{14}$, das Molekulargewicht beträgt 162,23 g/mol und die Elementaranalyse liefert folgendes Ergebnis: 74,03% Kohlenstoff, 8,70% Wasserstoff und 17,27% Stickstoff. Die Dichte von Nicotin beträgt 1,0097 kg/m³ 20°C. Reines Nicotin hat einen spezifischen Drehwinkel $[\alpha]_D^{25} = -169^\circ$ [Domino, 1999].

Für das pharmakologische und toxikologische Verhalten von Nicotin im menschlichen Körper ist die Tatsache, daß durch seinen Pyrrolidin-Stickstoff (pK_a 7,84 bei 15°C) und durch seinen Pyridin-Stickstoff (pK_a 3,04 bei 15°C) zweibasisch ist, von großer Bedeutung. Bei pH 7,4 und einer Temperatur von 37°C, Bedingungen wie sie im menschlichen Körper vorkommen, ist der Pyrrolidin-Stickstoff zu 69% ionisiert, das heißt positiv geladen, der Pyridin-Stickstoff liegt jedoch ungeladen vor. Nicotin liegt bei pH 7,4 in geladener und ungeladener Form vor. Ungeladene organische Basen sind lipophil und können im Gegensatz zu geladenen organischen Basen (hydrophil) durch Lipoproteinmembranen diffundieren. Das Verhältnis von geladenem Nicotin (hydrophil) und ungeladenem Nicotin (lipophil) beträgt bei pH-Wert 7,4 etwa 2 zu 1. Dies ist der Grund, daß Nicotin zu bedeutenden biologischen Interaktionen fähig ist [Domino, 1999].

2.4 Pharmakokinetik

Wie bereits wie oben erwähnt ist die Absorption von Nicotin pH-Wert abhängig. Mit einem pH-Wert von 5,5 ist Zigaretten-Rauch sauer und Nicotin liegt größtenteils ionisiert vor und kann deshalb keine Zellmembranen passieren. Im physiologischen pH-Wert der Lungen wird das Nicotin zur ungeladenen Verbindung abgepuffert, kann auf diese Weise sehr rasch die Zellmembranen passieren und gelangt so in den Blutkreislauf. Die Resorptionsrate in der Lunge ist mit einer intravenösen Gabe durchaus vergleichbar. Durch das Rauchen einer Zigarette wird im Mittel etwa 1 mg Nicotin aufgenommen [Svensson, 1987; Tutkar et al.,

2006; Zevin et al., 1998; Benowitz und Jacob III, 1984; Gori und Lynch, 1985; Russell, 1987]. Das in Kau- und Schnupftabak sowie in Nicotin-Kaugummis enthaltene Nicotin wird über die Mundschleimhaut aufgenommen. Da der Rauch vom Pfeifentabak alkalisch ist, wird das im Rauch enthaltene Nicotin ebenfalls bereits im Mund über die Schleimhäute resorbiert [Benowitz, 2008; Tutkar et al., 2006; Zevin et al., 1998].

Es besteht auch die Möglichkeit, Nicotin - im Rahmen einer Substitutionsbehandlung - in Form eines Nasensprays zu applizieren. Die Resorption über die Nasenschleimhäute erfolgt sehr schnell; bereits nach 5 Minuten ist die maximale Plasmakonzentration erreicht [Zevin et al., 1998].

Unmittelbar nach der Absorption erreicht Nicotin das Gehirn und andere Gewebe, wo es metabolisiert wird. Die Transport durch die Blut-Hirn-Schranke erfolgt einerseits über Diffusion und andererseits über einen aktiven Transportmechanismus durch die *Plexus choroideus* [Benowitz, 1988; Oldendorf, 1974; Spector und Goldberg, 1982].

Die Plasmaproteinbindung (5-20%) ist praktisch vernachlässigbar [Tutkar et al., 2006; Zevin et al., 1998].

2-35% des Nicotins werden unverändert in einem pH-Wert-abhängigen Eliminationsschritt über die Niere ausgeschieden [Svensson, 1987; Tutkar et al., 2006; Zevin et al., 1998].

Tabelle 15: Pharmakokinetische Parameter von (S)-Nicotin, (S)-Cotinin und trans-3'-Hydroxycotinin nach intravenöser Verabreichung [Hukkanen et al., 2005]

	Clearance [mL/min]	Renale Clearance [mL/min]	Nicht-renale Clearance [mL/min]	Verteilungsvolumen im Steady-State [L/kg]	Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) [min]
Nicotin	1110-1500	35-90	1050-1460	2,2-3,3	100-150
Cotinin	42-55	3-9	36-52	0,69-0,93	770-1130
trans-3'- Hydroxycotinin	82	50	32	0,66	396

2.5 Metabolismus

2.5.1 Phase-I-Metabolismus

2.5.1.1 Oxidation am alicyclischen Kohlenstoff

Der bedeutendste Schritt im Nicotin-Metabolismus ist die Bildung von Cotinin durch den Einbau von Sauerstoff in die 5'-Position des Nicotins, wodurch aus dem basischen Pyrrolidin-Ring ein cyclisches Amid gebildet wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen Oxidationsprozessen von körperfremden Substanzen wird nicht molekularer Sauerstoff in das Nicotin-Molekül eingebaut, sondern Sauerstoff, der aus einem Wasser-Molekül stammt [Gorrod und Schepers, 1999].

Dieser NADPH-abhängige Metabolisierungsschritt erfolgt durch Oxidation in zwei Schritten. Im ersten Metabolisierungsschritt wird aus Nicotin ein Nicotin- Δ -1'(5')-imminiumion gebildet. Diese Reaktion wird zum größten Teil durch CYP2A6, einem Isoenzym des Cytochrom P450 Systems der Leber, aber auch durch CYP2B6 und CYP2E1 katalysiert. Variationen im Cytochrom CYP2A6 dürften auch die Ursache für die interindividuellen Unterschiede im Nicotin-Stoffwechsel sein. Das Nicotin- Δ -1'(5')-imminiumion wird durch die Aldehydoxidase weiter zum Cotinin oxidiert [Brandänge und Lindblom, 1979; Murphy, 1973; Peterson et al., 1987; Benowitz, 2008; Messina et al., 1997; Nakajima et al., 1996; Tutkar et al., 2006].

Neuere Untersuchungen zeigen, daß Menschen mit einem CYP2A6*1B-Allel Nicotin schneller verstoffwechseln als Menschen mit einem CYP2A6*1A-Allel. Ebenso konnte gezeigt werden, daß Frauen Nicotin schneller metabolisieren als Männer. Unter den Frauen, zeigen diejenigen, die orale Kontrazeptiva einnehmen, einen schnelleren Nicotin-Stoffwechsel. Daher wird angenommen, daß weibliche Sexualhormone, vor allem Östrogen, den Nicotin-Stoffwechsel beeinflussen [Benowitz et al., 2006a; Mwenifumbo et al., 2008]. Ebenso konnte gezeigt werden, daß in der Schwangerschaft die Nicotin-Verstoffwechselung zum Cotinin, sowie dessen weitere Metabolisierung beschleunigt abläuft [Dempsey et al., 2002]. Durch Demethylierung des Nicotins am Pyrrolidin-Stickstoff entsteht ein weiterer Hauptmetabolit, nämlich Nornicotin. Da Nornicotin auch in Nicotiana-Arten als Alkaloid enthalten ist, kann davon ausgegangen

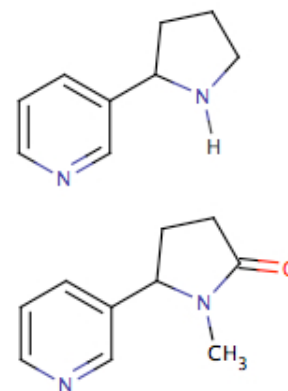


Abbildung 12: Nicotin Stoffwechselprodukte Nornicotin (oben) und Cotinin (unten)

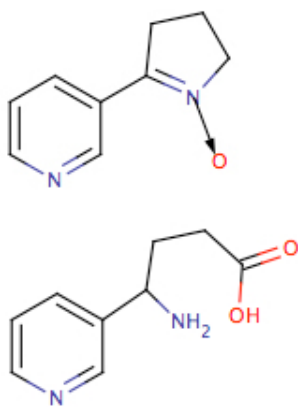


Abbildung 13: Nicotin-Stoffwechselprodukte Nornicotin-Δ-1'(2')-nitron (oben) und 4-(3-Pyridyl)-4-aminobuttersäure (unten)

werden, daß etwa 40% des Nornicotins aus dem Tabak *per se* stammen und nicht durch die Verstoffwechselung von Nicotin entstehen. Die Metabolisierung von Nicotin zum Nornicotin verläuft wie die Cotinin-Bildung über ein Isomer des Nicotin-Δ-1'(5')-imminiumion, nämlich dem Nicotin-Δ-1'(6')-imminiumion [Gorrod und Schepers, 1999; Tutkar et al., 2006].

Der Lactam Norcotinin und dessen korrespondierende Säure 4-(3-Pyridyl)-4-aminobuttersäure stellen die Hauptabbauprodukte des Nornicotins dar. Es wird angenommen, daß dieser Oxidationsschritt analog zur Cotinin-Bildung über ein Δ-1'(5')-Imminiumion als Zwischenprodukt verläuft. Eine andere Möglichkeit des Nornicotin-Metabolismus stellt die Oxidation am Pyrrolidin-Stickstoff dar, was zur Bildung des Nornicotin-Δ-1'(2')-nitron führt [Gorrod und Schepers, 1999].

Cotinin spielt eine zentrale Rolle im Nicotin-Stoffwechsel. Der Hauptmetabolit des Nicotins kann nämlich von den meisten Spezies, so auch vom Menschen, unverändert ausgeschieden werden, es

kann aber auch durch Oxidations- oder Glucuronidierungsreaktionen weiter metabolisiert werden [Benowitz, 2008; Gorrod und Schepers, 1999; Tutkar et al., 2006].

Es besteht hier die Möglichkeit zur Hydroxylierung an der 3'-Position (*cis*- und *trans*-3'-Hydroxycotinin) sowie an der 5'-Position (5'-Hydroxycotinin). 5'-Hydroxycotinin kann zum offenkettigen 4-(3-Pyridyl)-4-oxo-N-methylbutyramid tautomerisieren. Weiters kann aus dem 5'-Hydroxycotinin, sowie aus dem Cotinin selbst, das entsprechende N-oxid durch Oxidation des Pyridyl-Stickstoffes gebildet werden [Gorrod und Schepers, 1999].

Beim Menschen wird Cotinin hauptsächlich zum *trans*-3'-Hydroxycotinin metabolisiert. Diese Reaktion wird beinahe ausschließlich durch CYP2A6 katalysiert. Auf Grund dessen kann aus dem Verhältnis von *trans*-3'-Hydroxycotinin zu Cotinin auf die CYP2A6-Aktivität und damit auf den CYP2A6-Phänotyp sowie die Nicotin-Metabolisierungsrate geschlossen werden. Individuen mit einer geringen CYP2A6-Aktivität weisen eine deutlich verlängerte Nicotin- und Cotinin-Halbwertszeit auf [Benowitz, 2008; Benowitz et al., 2006b; Tutkar et al., 2006].

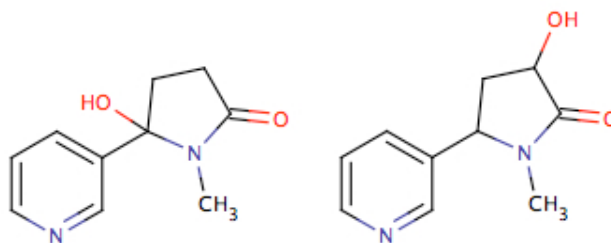


Abbildung 14: Cotinin-Stoffwechselprodukte 5'-Hydroxycotinin (links) und 3'-Hydroxycotinin (rechts)

2.5.1.2 Oxidation am alicyclischen Stickstoff

Obwohl Nicotin zwei Stickstoffzentren besitzt die oxidiert werden könnten, findet in biologischen System nur die Oxidation am Pyrrolidin-Stickstoff statt. Diese Oxidation, katalysiert durch Flavinhaltige Mono-Oxygenasen (beim Menschen die FMO3) an der 1'-N-Position, kann sowohl beim (S)-Enantiomer als auch beim (R)-Enantiomer stattfinden und liefert wiederum jeweils zwei Diastereoisomere. Im Fall des hauptsächlich vorkommenden (-)-(S)-Nicotin entstehen das 1'R,2'S- und 1'S,2'S-Nicotin-1'-N-Oxid, wobei die N-Methylgruppe in *cis*- und *trans*-Position zum Pyridin-Ring stehen kann. Der Mensch bildet fast ausschließlich das *trans*-Stereoisomer, Ratten dagegen fast ausschließlich das *cis*-Stereoisomer aus dem (-)-(S)-Nicotin. Im menschlichen Körper werden etwa 4% des Nicotins auf diese Weise metabolisiert [Gorrod und Schepers, 1999; Zevin et al., 1998].

2.5.2 Phase-II-Metabolismus

Beim Phase-II-Metabolismus werden aus körperfremden Substanzen beziehungsweise deren Stoffwechselprodukte durch die Verknüpfung mit körpereigenen Verbindungen Metabolite mit einem höheren Molekulargewicht, erhöhter Polarität und verbesserter Wasserlöslichkeit gebildet. Diese Phase-II-Metabolite werden hauptsächlich über den Urin ausgeschieden [Gorrod und Schepers, 1999].

2.5.2.1 Methylierung

Im Urin von Rauchern konnte das N-Methylnicotiniumion als Produkt einer Methylierungsreaktion gefunden werden. Bei diversen Säugetierarten konnten auch noch andere N-Methylierungsprodukte gefunden werden, zum Beispiel das N-Methylcotininiumion im Urin von Hunden oder N-Methylnornicotiniumion beim Meerschweinchen nach der Gabe von (-)-(R)-Nicotin. Diese Reaktionen werden von N-Methyltransferasen katalysiert [Gorrod und Schepers, 1999].

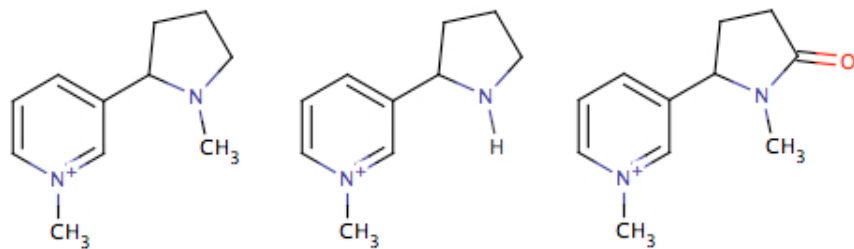


Abbildung 15: Methylierungsprodukte; N-Methylnicotiniumion, N-Methylcotininiumion, N-Methylnornicotiniumion (v.l.n.r.)

2.5.2.2 Glucuronidierung

Cotinin-N-β-D-Glucuronid, Nicotin-N-β-D-Glucuronid sowie *trans*-3'-Hydroxycotinin-O-β-D-Glucuronid sind jene Glucuronsäurekonjugate, die im Urin von Rauchern nachgewiesen werden können. Die Glucuronidierungsreaktion wird durch so genannte UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs), nämlich UGT A4, UGT 1A9 und UGT 2B10 katalysiert [Benowitz, 2008; Gorrod und Schepers, 1999; Hukkanen et al., 2005; Tutkar et al., 2006].

Da normalerweise nur etwa 4% des Nicotins über den Weg der Glucuronidierung verstoffwechselt werden, ist diese Form der Metabolisierung von geringerer Bedeutung. Bei Individuen mit einer geringen CYP2A6-Aktivität nimmt jedoch die Bedeutung der Glucuronidierungsreaktion erheblich zu [Benowitz, 2008; Tutkar et al., 2006].

2.6. Pharmakodynamik

Das Dosis-Wirkungsverhältnis von Nicotin ist relativ komplex, da es in niedrigen Dosen stimulierend auf das Nervensystem wirkt und in hohen Dosen dämpfend. Niedrige Nicotin-Dosen bewirken beispielsweise eine Erhöhung des Blutdrucks und der Herzfrequenz; das zentrale sowie das periphere Nervensystem werden erregt. In hohen Dosen kommt es zu einer Steigerung des Speichelflusses sowie zu Übelkeit und Erbrechen. Symptome einer Nicotin-Intoxikation sind Schwäche der Skelettmuskulatur, Erschöpfung, Tremor, Krämpfe sowie Bradycardie, Blutdruckabfall und Benommenheit. Zum Tod kommt es durch eine periphere neuromuskuläre Blockade [Benowitz, 2008; Domino, 1999].

Gegenüber den Symptomen, die beim Rauchen der ersten Zigarette auftreten - Übelkeit, Erbrechen und Dysphorie - wird sehr rasch eine Toleranz entwickelt. Bei einigen Rauchern kann es sogar innerhalb eines Tages zur Entwicklung einer zumindest partiellen Toleranz gegenüber der Erhöhung der Herzfrequenz kommen. Weiters entwickelt sich auch eine Toleranz gegenüber den subjektiven positiven Effekten des Tabakrauchens. Das Ausmaß der Toleranzentwicklung gegenüber den verschiedenen Nicotin-Wirkungen geht mit dem Ausmaß der Inaktivierung nicotinischer, cholinergischer Rezeptoren einher [Benowitz, 2008].

Die Toleranzentwicklung gegenüber der Nicotin-Wirkung führt auch dazu, daß sich das Motiv des Rauchens vom Erleben der subjektiv positiven Effekte zum Unterdrücken der Entzugserscheinungen hin verschiebt. Obwohl das Nicotin jene Verbindung ist, die zur Abhängigkeit führt, werden Langzeitschäden, die durch Rauchen von Tabak entstehen, durch andere in der Zigarette enthaltene Verbindungen verursacht [Benowitz, 2008].

2.7 Wechselwirkungen von Tabakrauch mit Medikamenten

Das Rauchen von Zigaretten beeinflusst auch die Wirkung von zahlreichen Medikamenten, wobei es einerseits zu pharmakokinetischen Interaktionen (Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung) und andererseits zu pharmakodynamischen Interaktionen (Beeinflussung der Wirkung) kommen kann [Benowitz, 2008; Kroon, 2007].

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), diverse andere Verbrennungsprodukte und auch Nicotin selbst bewirken eine Induktion von Cytochrom P450 Isoenzymen in der Leber, wodurch der Abbau von einigen Wirkstoffen beschleunigt wird. Durch das vermehrt gebildete Isoenzym CYP 1A2 werden zum Beispiel Coffein, Clozapin, Erlotinib, Fluvoxamin, Olanzapin, Tacrin sowie Theophyllin bei Rauchern schneller abgebaut als bei Nichtrauchern, wodurch eventuell eine Anpassung der Dosierung notwendig wird. Darüber hinaus wird die Aktivität des Isoenzym CYP 2E1 (metabolisiert zum Beispiel Paracetamol und Ethanol) sowie der Uridin-5'-Diphosphat-(UDP)-Glucuronosyltransferasen (metabolisieren zum Beispiel Codein, Propranolol sowie Oxazepam) erhöht, was ebenfalls einen beschleunigten Metabolismus von Arzneistoffen und Umweltgiften bewirken kann [Benowitz, 2008; Kroon, 2007; Zevin und Benowitz, 1999].

Zu pharmakodynamischen Interaktionen kommt es zwischen dem Tabakrauchen und Benzodiazepinen (Diazepam, Chlordiazepoxid), Betablockern, inhalativen Corticosteroiden, hormonellen Kontrazeptiva und Opioiden (Propoxyphen, Pentazocin). Der Mechanismus für diese Form der Wechselwirkung ist aber meist unbekannt [Benowitz, 2008; Kroon, 2007; Zevin und Benowitz, 1999].

Tabelle 16: Interaktionen zwischen Tabakrauch und Medikamenten (modifiziert nach [Kroon, 2007; Zevin und Benowitz, 1999])

Wirkstoff	Interaktion	Ursache	Effekt
Benzodiazepine	PD	eventuell ZNS-Stimulation	beruhigende Wirkung ↓, Schläfrigkeit ↓
Betablocker	PD	eventuell durch sympathische Stimulation (Nicotin)	Wirkung auf Blutdruck und Herzfrequenz reduziert
Chlorpromazin	PK		AUC ↓, Serumspiegel ↓; klinische Signifikanz jedoch unklar
Clorazepat	PK		AUC ↓, $t_{1/2}$ von N-Desmethyldiazepam verkürzt ↓
Clozapin	PK	CYP 1A2 ↑	Clearance ↑, $t_{1/2}$ ↓
Codein	PK	UDP-Glucuronosyltransferase ↑	keine Effekte auf AUC, $t_{1/2}$ oder Serumspiegel
Coffein	PK	CYP 1A2 ↑	Clearance ↑
Erlotinib	PK	CYP 1A2 ↑	Clearance ↑, Metabolismus ↑
Ethanol	PK	verzögerte Magenentleerung	Resorption ↓, Serumspiegel ↓
Flecainid	PK		Clearance ↑, Serumspiegel ↓; eventuell Dosisanpassung notwendig
Fluvoxamin	PK	CYP 1A2 ↑	Clearance ↑, AUC ↓, Plasmakonzentrationen ↓
Haloperidol	PK		Clearance ↑, Serumspiegel ↓; klinische Signifikanz jedoch unklar
Heparin	PK	Mechanismus unklar	Clearance ↑, $t_{1/2}$ ↓
Hormonelle Kontrazeptiva	PD		Risiko für kardiovaskuläre Zwischenfälle ↑
Imipramin	PK		Serumspiegel ↓; jedoch ohne klinische Auswirkungen
Insulin	PK	subkutane Resorption verzögert	Dosisanpassung eventuell notwendig
Lidocain	PK	orale Bioverfügbarkeit verzögert	AUC ↓
Mexiletin	PK	Oxidation ↑ & Glucuronidierung ↑	Clearance ↑, $t_{1/2}$ ↓
Olanzapin	PK	CYP 1A2 ↑	Clearance ↑
Opioide	PD	unbekannt	analgetische Wirkung ↓; eventuell Dosisanpassung notwendig
Östrogen	PK	2-Hydroxylierung ↑	eventuell Anti-Östrogen-Effekte
Propranolol	PK	Oxidation ↑ & Glucuronidierung ↑	Clearance ↑
Tacrin	PK	CYP 1A2 ↑	AUC ↓, Plasmaspiegel ↓, $t_{1/2}$ ↓
Theophyllin	PK	CYP 1A2 ↑	Clearance ↑, Verteilungsvolumen ↑, $t_{1/2}$ ↓
Warfarin	PK		Clearance ↑, Plasmaspiegel ↓; kein Einfluß auf Prothrombinzeit

PD ... pharmakodynamische Interaktion; PK ... pharmakokinetische Interaktion; AUC ... area under the curve; $t_{1/2}$... Halbwertszeit;
↑ ... Induktion/Erhöhung/Verstärkung; ↓ ... Hemmung/Reduktion/Verkürzung

2.8 Die globale Tabak-Epidemie und ihre gesundheitlichen Konsequenzen

Das Rauchen von Tabak hat verheerende Auswirkungen auf die Gesundheit, denn es ist ein Risikofaktor für sechs der acht häufigsten Todesursachen, nämlich ischämische Herzerkrankungen, cerebro-vaskuläre Erkrankungen, Infektionen der unteren Atemwege, chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD), Tuberkulose sowie bestimmte Krebsformen (Speiseröhren-, Lungen- und Bronchialkarzinom). Somit stellt der Tabakgebrauch die häufigste, vermeidbare, vorzeitige Todesursache dar [WHO, 2008].

Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, daß im 20. Jahrhundert 100 Millionen Menschen an den Folgen von Tabakrauch gestorben sind und jedes Jahr weitere 5,4 Millionen sterben werden. Basierend auf diesen Berechnungen, geht die Weltgesundheitsorganisation davon aus, daß im Jahr 2030 mehr als acht Millionen Menschen weltweit an den Folgen von Tabakrauch sterben werden und daß 80% dieser Todesfälle in den Entwicklungsländern auftreten werden. Im 21. Jahrhundert werden wahrscheinlich in Summe eine Milliarde Menschen vorzeitig durch das Rauchen von Tabak sterben [WHO, 2008].

2.8.1 Gesundheitliche Konsequenzen des Zigaretten-Rauchens

Daß das Rauchen von Tabak diverse Erkrankungen wie zum Beispiel COPD (chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung), Asthma, koronare Herzkrankheit (KHK), Schlaganfall und andere Gefäßerkrankungen sowie viele Krebsformen verursacht ist weitgehend in der Bevölkerung bekannt [WHO, 2008].

2.8.1.1 Hämodynamische Effekte des Rauchens

Nicotin bewirkt eine Erhöhung der Herzfrequenz, des systolischen Blutdrucks und der Kontraktilität des Myocards, durch seine β_1 -adrenerge Wirkung am Herz. Diese Wirkung wird durch eine verstärkte Catecholamin-Freisetzung (Adrenalin und Noradrenalin) in der Nebenniere und lokal in den adrenergen Neuronen vermittelt [Benowitz, 2003; Czermin und Waldherr, 2003; Quillen et al., 1993].

Das im Rauchenthaltene Kohlenmonoxid (CO) beeinflusst die Hämodynamik. Kohlenmonoxid bindet, wie Sauerstoff, an das Hämoglobin und reduziert auf diese Weise die Sauerstofftransportkapazität der Erythrozyten [Benowitz, 2003].

2.8.1.2 Einfluß des Rauchens auf das Endothel

Rauchen verursacht Endothelschäden bzw. Störungen in der Endothelfunktion sowohl in den Koronararterien als auch in den peripheren Blutgefäßen. Daneben gibt es auch noch andere Faktoren die Endothelschäden bzw. -fehlfunktionen begünstigen können, nämlich Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck [Benowitz, 2003; Puranik und Celermajer, 2003].

Fehlfunktionen im Endothel bewirken Störungen in der flußabhängigen Gefäßerweiterung, die Auslösung eines prothrombotischen Zustandes, die verstärkte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an der Gefäßwand und Förderung eines proinflammatorischen Zustandes. Diese Vorgänge begünstigen einerseits die Entwicklung der Arteriosklerose, andererseits bewirken sie eine Verschlechterung von akuten ischämischen Komplikationen am Herzen [Puranik und Celermajer, 2003].

2.8.1.3 Einfluß des Rauchens auf die Blutgerinnung

Thrombotische Veränderungen können auf verschiedene Weise durch das Zigarettenrauchen ausgelöst werden. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung der Blutplättchen, eventuell in Kombination mit der erwähnten endothelialen Dysfunktion oder durch oxidative Vorgänge [Benowitz, 2003; Ichiki et al., 1996; Newby et al., 2001; Simpson et al., 1997].

Rauchen hat ebenfalls einen Einfluß auf die Thrombosebildung durch arteriosklerotische Ablagerungen in den Blutgefäßen. Die Aktivität des so genannten *tissue factor*, der eine prothrombotische Wirkung auf aufgeplatzte Arteriosklerose-Plaques hat, ist bei Rauchern erhöht [Benowitz, 2003].

Durch die durch Kohlenmonoxid hervorgerufene relative Hypoxämie, werden zur Verbesserung der Sauerstofftransportkapazität mehr Erythrozyten gebildet. Durch die erhöhte Anzahl der Erythrozyten und die erhöhte Fibrinogenaktivität, verursacht durch die chronische Entzündung, die durch das Rauchen hervorgerufen wird, erhöht sich die Viskosität des Blutes. Diese Erhöhung ihrerseits begünstigt die Bildung eines Thrombus [Benowitz, 2003].

2.8.1.4 Einfluß des Rauchens auf entzündliche Prozesse

Es ist unklar, durch welche Ursachen das Rauchen die chronische Entzündung, die bei Rauchern nachweisbar ist, ausgelöst wird. Einerseits dürfte oxidativer Stress eine große Rolle spielen, andererseits könnte auch das Nicotin selbst zur Entzündung beitragen, da es die Migration der neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Oxidiertes LDL (*low density lipoprotein*) sowie Produkte der Lipidperoxidation besitzen proinflammatorisches Potential [Benowitz, 2003].

2.8.1.5 Rauchen und Diabetes mellitus

Verschiedene Studien zeigten, daß Raucher ein höheres Risiko aufweisen an Diabetes mellitus Typ II (nicht insulinabhängig) zu erkranken als Nichtraucher. Typ-I-Diabetiker (insulinpflichtig) die rauchen, benötigen auch wesentlich höhere Insulindosen und zeigen schlechtere HbA1C-Werte als Nichtraucher. Weiters werden Folgeschäden des Diabetes mellitus, wie Nierenschäden, Diabetikerneuropathie oder periphere Gefäßerkrankungen, durch das Rauchen begünstigt und beschleunigt. Auch das kardiovaskuläre Risiko wird durch Diabetes mellitus und Rauchen synergistisch beeinflusst, da sie beide das Endothel schädigen, oxidativen Stress auslösen und zu einem Status der Hyperkoagulation führen [Benowitz, 2003].

2.8.1.6 Rauchen und Blutfettwerte

Rauchen begünstigt die Entwicklung von arteriosklerotischen Veränderungen in den Blutgefäßen, da Raucher eine Veränderung in den Blutfettwerten zeigen. Im Vergleich zu Nichtrauchern, ist der HDL-Spiegel (*high density lipoprotein*) verringert, der LDL- sowie der VLDL-Spiegel (*very low density lipoprotein*) sind erhöht. Ebenfalls erhöht sind die Blutspiegel der Triglyceride und des Apolipoprotein A1 [Benowitz, 2003].

2.8.1.7 Rauchen und das Immunsystem

Weit weniger bekannt als die kardiovaskulären Folgen ist, daß Raucher auch anfälliger für bestimmte bakterielle und virale Infektionskrankheiten sind. So weisen sie zum Beispiel ein erhöhtes Risiko für eine Pneumokokken-Lungenentzündung, verursacht durch *Streptococcus pneumoniae*, für die Legionärskrankheit, für eine Meningokokken-Meningitis und für eine Infektion mit dem Influenza-Virus auf. Darüber hinaus begünstigt Rauchen eine Infektion mit *Mycobakterium tuberculosis*, sowie die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose [Arcavi und Benowitz, 2004; Benowitz, 2008].

3 Opium-Alkaloide

3.1 Stamppflanze

Die Stamppflanze der Opium-Alkaloide ist *Papaver somniferum* L. (*Papaveraceae*), der Schlafmohn. Die Pflanze wächst von den Tropen bis nach Nordeuropa, wobei man beim Mohnanbau zwischen dem Anbau zur Ölsaatgewinnung und zum Anbau zur Opiumgewinnung unterscheiden muss. Große Anbauflächen für die Produktion von Speisemohn befinden sich in Österreich. Zur Opiumgewinnung für medizinische Zwecke oder für die illegale Drogenproduktion wird Mohn in Afghanistan, Nordthailand, Zentralasien, Türkei und Mexiko angebaut [Haensel und Pertz, 2007].

us dem Milchsaft der unreifen Mohnkapseln wird Opium gewonnen. Die wichtigsten Inhaltsstoffe des Opiums sind die Alkaloide, die in einer Konzentration von bis zu 25% enthalten sein können. Im Opium liegen diese an Schwefel-, Milch- oder Meconsäure gebunden vor.

Das wichtigste Alkaloid des Opiums ist das Morphin, wobei noch etwa 40 andere Alkaloide im Opium nachgewiesen werden können. Die Opium-Alkaloide werden in sechs Gruppen eingeteilt: Morphinan-, Benzylisochinolin-, Protoberberin-, Tetrahydroberberin-, Protopin- und Rhoedian-Alkaloide. Aus medizinischer Sicht sind die Alkaloide vom Morphinan- und Benzylisochinolintyp am bedeutsamsten. Zur Gruppe der Morphinane zählen Morphin, Codein, Thebain und Salutaridin. Zu den Benzylisochinolin-Alkaloiden gehören Laudanosin, Noscapin, Papaverin sowie Reticulin [Haensel und Pertz, 2007].

Die Alkaloidzusammensetzung des Rohopiums schwankt je nach Anbauort. So enthält zum Beispiel Opium aus der Monoglei 7% Morphin, Opium aus Japan dagegen fast 18%. Aufgrund der Verhältnisse der Alkaloide Codein/Thebain und Noscapin/Thebain zueinander können Rückschlüsse auf das Herkunftsgebiet gezogen werden [Haensel und Pertz, 2007].

Daneben kommen im Opium noch Kautschuk (5-10%), Fette, Wachse und Schleimstoffe (1-4%)



Abbildung 16: *Papaver somniferum* L.

sowie oxidierende Enzyme, die die Braunfärbung des frischen, weißen Milchsafts bewirken, vor [Haensel und Pertz, 2007].

3.2.1 Habitus

Beim Schlafmohn, *Papaver somniferum* L., handelt es sich um eine 70-120 cm hohe, einjährige, krautige Pflanze. Die Blätter sind länglich eiförmig und durch einen Wachsbelag graugrün gefärbt. Die Blüten sind weiß oder rötlich-violett. Bei der Frucht handelt es sich um eine etwa walnussgroße Kapsel, die mehrere Hundert nierenförmige, blaugrau gefärbte Samen enthält und sich mit Poren öffnet [Haensel und Pertz, 2007].

Alle Pflanzenteile sind mit Milchsafttröhren, die sich untereinander vernetzen, durchzogen. Im Milchsaft werden die Opium-Alkaloide gebildet, gespeichert und metabolisiert. Eine besonders hohe Dichte an Milchsafttröhren weist das Pericarp der Kapsel auf [Haensel und Pertz, 2007].

3.2 Biosynthese von Morphinan-Alkaloiden

Ausgehend vom R-(-)-Reticulin, einem tricyclischen Alkaloid, das seinerseits in mehreren Reaktionsschritten über das Norcoclaurin aus zwei Tyrosin-Molekülen aufgebaut wird, wird Thebain gebildet. Beim Thebain sind alle O-Funktionen methyliert, das heißt, es gibt keine phenolischen und alkoholischen Gruppen. Durch O-Desmethylierungsschritte wird über Neopinon zunächst Codein und in weiterer Folge Morphin (siehe Abbildung 17) gebildet [Haensel und Pertz, 2007].

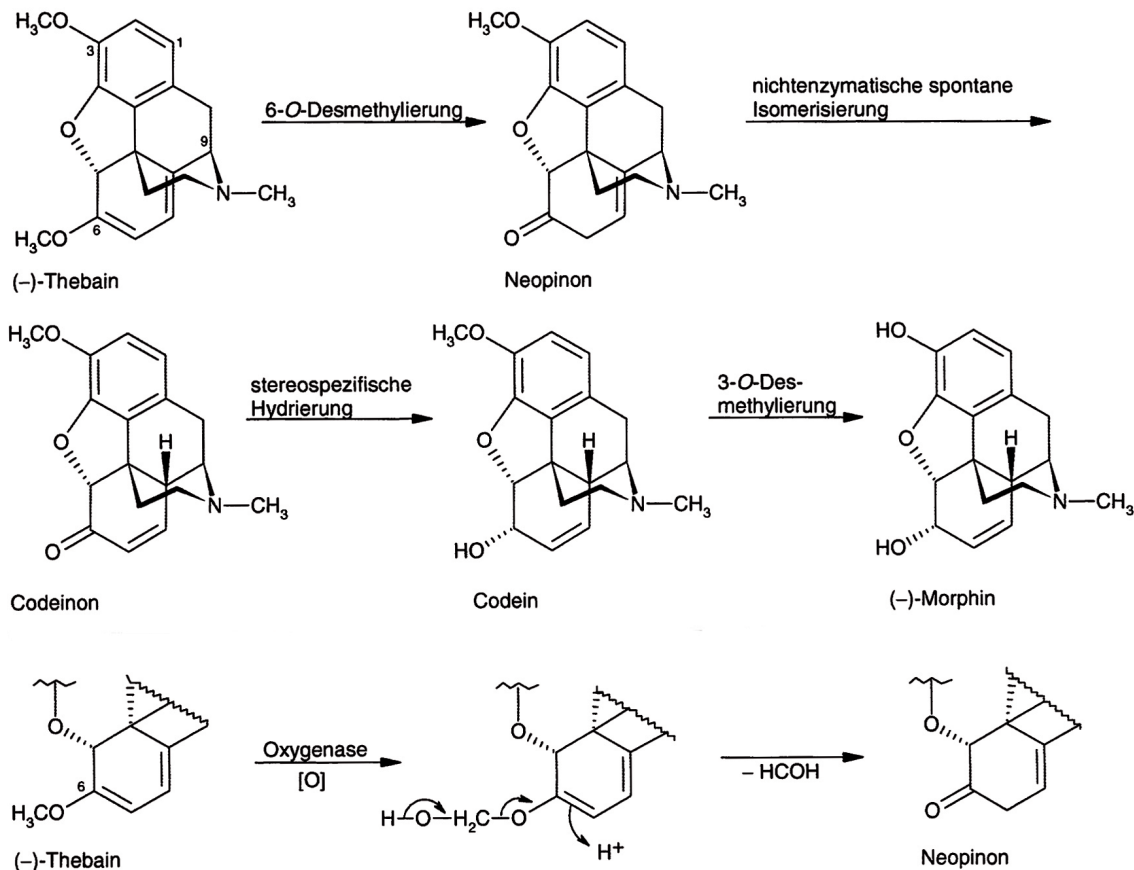


Abbildung 17: Biosynthese von Codein und Morphin ausgehend von Thebain [Haensel und Pertz, 2007]

3.3 Pharmakokinetik der Morphinane

Bei oraler Gabe wird der Großteil des Morphins präsystemisch durch die Leber (*first-pass*-Effekt) eliminiert, so daß nur etwa 15-25% der verabreichten Dosis tatsächlich ins Blut gelangen. Dies muss bei der Umstellung des Patienten von parenteraler Gabe auf orale Gabe berücksichtigt werden, das heißt, die Dosis muss in etwa verdreifacht werden. Eine Dauerbehandlung mit retardiertem Morphin liefert relativ konstante Blutspiegel. Dies gilt auch für die Applikation als Dauerinfusion. Wird Morphin dagegen als Einzelinjektion verabreicht, so kommt es zu stark schwankenden Serum-Spiegeln [Jenkins und Cone, 1998; Lüllmann et al., 2006; Zeilhofer und Sittl, 2007].

Das Wirkungsmaximum von Morphin tritt bei intravenöser Applikation nach 20 Minuten ein, bei intramuskulärer Injektion nach 30 - 60 Minuten und bei subkutaner Applikation nach 45 bis 90 Minuten. Die Plasmaproteinbindung schwankt zwischen 12 und 35%. Morphin bindet hauptsächlich an Albumin, etwa 5% an γ -Globulin und 5% an α_1 -saures Glycoprotein. Das Verteilungsvolumen beträgt 2-5 L/kg. Im Plasma liegt eine zwei- bis zehnmal höhere Konzentration der Metabolite Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid vor [Jenkins und Cone, 1998; Oddb.Org, 1999].

3.4 Metabolismus

In der Leber wird Morphin an Glucuronsäure konjugiert. Die Reaktion wird durch Uridindiphosphat-glucuronosyltransferasen (UGT) katalysiert. Durch die Konjugation werden zwei Metabolite gebildet, nämlich das pharmakologisch inaktive Morphin-3-Glucuronid und das pharmakologisch aktive Morphin-6-Glucuronid (die Wirkungspotenz entspricht etwa der zweifachen von Morphin). Morphin-6-Glucuronid wird ausschließlich durch das Enzym UGT 2B7 gebildet, Morphin-3-Glucuronid dagegen durch mehrere Isoformen des Enzyms: 1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9, 1A10 und B7. Das Verhältnis der Bildung der beiden Glucuronide ist spezieabhängig. Beim Menschen liegt es bei etwa 5:1 zu Gunsten des Morphin-3-Glucuronids [Jenkins und Cone, 1998; Lüllmann et al., 2006; Stone et al., 2003].

Durch den ausgeprägten *first-pass*-Effekt des Morphins ist der Blutspiegel der Glucuronide nach oraler Gabe höher als der der Muttersubstanz. Ungewöhnlich ist auch, daß das Morphin-6-Glucuronid, welches durch die Glucuronidierung eine höhere Wasserlöslichkeit als Morphin besitzt, die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Diese Passage wird vermutlich durch ein spezielles Anionen-Transport-Polypeptid ermöglicht [Lüllmann et al., 2006].

Bezüglich der Verteilung von Morphin und Morphin-6-Glucuronid im Gehirn fällt auf, daß eine höhere Konzentration an Morphin pro Volumeneinheit Gewebe vorhanden ist als Morphin-6-Glucuronid. Morphin kann jedoch in die Gehirnzellen eindringen, das Glucuronid jedoch nicht. Dadurch liegt im Extrazellularraum eine deutlich höhere Konzentration an Morphin-6-Glucuronid vor. Dieses extrazellulär vorliegende Glucuronid kann nun an den Opioidrezeptor an der Zellmembran andocken und die Wirkung auslösen. Das in der Zelle gespeicherte Morphin kann dies nicht und trägt somit nicht zur Wirkung bei [Lüllmann et al., 2006].

Ungefähr 5% des Morphins werden durch Demethylierung am Stickstoff zu Normorphin metabolisiert. Normorphin ist ebenfalls ein pharmakologisch aktiver Metabolit. Seine Wirkung ist jedoch schwächer als die von Morphin und auf Grund der geringen Konzentration dürfte Normorphin nicht signifikant zur Morphin-Wirkung beitragen [Jenkins und Cone, 1998].

Codein wird durch eine Phase-I-Reaktion erst langsam zum Morphin demethyliert. Diese Reaktion wird durch ein Isoenzym aus der Cytochrom-P450-Familie katalysiert, dem CYP2D6. Dieses Enzym unterliegt jedoch einem ausgeprägten genetischen Polymorphismus. Etwa 10% aller Kaukasier fallen in die Kategorie der *poor metabolizers*, da sie dieses Enzym praktisch nicht exprimieren und so eine Umwandlung von Codein zu Morphin nur in Spuren stattfindet. Dieser CYP2D6-Polymorphismus ist auch die Ursache für die großen interindividuellen Schwankungen der analgetischen Wirkung von Codein [Mikus und Weiss, 2005; Zeilhofer und Sittl, 2007].

Die Elimination des Morphins erfolgt über die Niere, wobei 3 bis 10% des Morphins unverändert ausgeschieden werden. Der Großteil des Morphins wird als Morphin-3-Glucuronid und nur ein kleiner Teil als Morphin-6-Glucuronid über die Niere eliminiert. 7-10% des Morphins werden über die Galle und in weiterer Folge über den Stuhl ausgeschieden. Die Halbwertszeit liegt bei zwei bis drei Stunden, die Wirkdauer bei vier bis fünf Stunden. Nach etwa 24 Stunden sind 90% des verabreichten Morphins eliminiert [Lüllmann et al., 2006; Oddb.Org, 1999].

3.5 Pharmakodynamik

Die Wirkung der Morphinane beruht darauf, daß sie Agonisten am Opioidrezeptor sind. Das Andocken von, zum Beispiel Morphin an den Opioidrezeptor, bei dem es sich um G-Proteingekoppelte Rezeptor handelt, löst eine Hemmung der Adenylylcyclasen aus, wodurch die Bildung von cAMP unterdrückt wird. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Öffnung von K⁺-Kanälen sowie zu einer Reduktion der Öffnung von Ca²⁺-Kanälen wodurch die Membrandepolarisation erschwert wird. Dadurch kommt es zu einer verminderten Freisetzung von Neurotransmittern und zu einer erschwerten Reizweiterleitung an der Synapse [Lüllmann et al., 2006; Zeilhofer und Sittl, 2007].

Opioidrezeptoren, von denen es drei Subtypen (μ , κ und δ) gibt, befinden sich in großer Zahl in Regionen des zentralen Nervensystems, die für die Verarbeitung von Schmerzreizen, der Kontrolle von Emotionen und vegetativer Funktionen zuständig sind. Daneben gibt es auch noch Opioidrezeptoren in der Peripherie, wie zum Beispiel in der Darmwand oder in entzündeten Geweben [Zeilhofer und Sittl, 2007].

Die Hauptwirkung von Morphin, die starke analgetische Wirkung, und auch dessen unerwünschte Wirkungen kommen durch die Aktivierung des μ -Rezeptors zu Stande. Durch die Wirkung auf die Rezeptoren im zentralen Nervensystem kommt es zu einer Hemmung der affektiven Reaktion auf Schmerzen. „Der Schmerzreiz wird noch wahrgenommen und kann noch lokalisiert werden, hat aber seinen bedrohlichen Charakter verloren, der Schmerz tut nicht mehr weh“ [Lüllmann et al., 2006].

Im Rückenmark hemmt Morphin die Schmerzleitung, da es wie die endogenen Opiode (Enkephaline, Dynorphine und Endorphin) in der Substantia gelatinosa die Freisetzung der Substanz P aus dem präsynaptischen Nervenende hemmt [Lüllmann et al., 2006].

Zu den unerwünschten Wirkungen des Morphins gehören Atemdepression, Sedierung sowie Übelkeit. Bei unsachgemäßer Anwendung kommt es zu Euphorisierung und zur Abhängigkeit. Die peripheren Wirkungen des Morphins (Obstipation, Blutdruckabfall, Histaminfreisetzung und Miosis) zählen ebenfalls meist zu den unerwünschten Wirkungen [Zeilhofer und Sittl, 2007].

Die zentralen Wirkungen unterliegen einer Toleranzentwicklung, das heißt, daß Morphin in immer höheren Dosen angewendet werden muss um die gleiche Wirkung zu erzielen. Die peripheren Wirkungen Obstipation und Miosis unterliegen nur einer geringen Toleranz. Die Entwicklung einer psychischen und physischen Abhängigkeit sowie die Toleranzentwicklung spielt beim korrekt behandelten Patienten jedoch nur eine untergeordnete Rolle [Zeilhofer und Sittl, 2007].

Codein besitzt eine geringere analgetische Wirkung als Morphin und wird sehr häufig als Antitussivum eingesetzt [Zeilhofer und Sittl, 2007].

Die Symptome einer akuten Morphin-Vergiftung/Überdosis sind Atemdepression, Bewusstlosigkeit und das diagnostisch wichtigste Merkmal die Miosis. Weiter Symptome sind Hypothermie, Hyporeflexie und Zyanose. Die Atemdepression wird durch die Reduktion der Empfindlichkeit des Atemzentrums gegenüber dem CO₂-Partialdruck im Blut hervorgerufen. Als Folge der Atemdepression kann sich Lungenödem und eine Aspirationspneumonie bilden. Weiters kann es auch zur Rhabdomyolyse und zu Nierenversagen kommen [Beubler, 2007b; Lüllmann et al., 2006; Zeilhofer und Sittl, 2007].

Die Behandlung einer Vergiftung/Überdosis erfolgt durch künstliche Beatmung und Verabreichung eines Opioidantagonisten (Naloxon) [Lüllmann et al., 2006; Zeilhofer und Sittl, 2007].

3.6 Wechselwirkungen von Morphin mit Medikamenten

Die gleichzeitige Gabe von Morphin und Benzodiazepinen kann die sedierende Wirkung verstärken und auch zur Atemdepression führen. Eine Kombination mit selektiven Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI, eine Gruppe von Antidepressiva) kann zum Serotonin-Syndrom führen. Symptome des Serotonin-Syndroms sind Fieber, Schüttelfrost, Zittern, Muskelzuckungen, Hyperreflexie, klonische Krämpfe, Agitiertheit, Schweißausbruch, Übelkeit, Durchfall, Unruhe, Verwirrung, Blutdruckanstieg, EKG-Veränderung, Nierenschädigung und Leberschädigung [Beubler, 2007a].

3.7 Toleranz, Sucht und Entzug

Wie bereits erwähnt, kommt es bei der länger andauernden Gabe von Morphin zur Toleranzentwicklung, das heißt, es sind immer höhere Dosen notwendig um die erwünschte „Wirkung zu erzielen ohne daß die Schwere der Grundkrankheit dafür verantwortlich gemacht werden kann“ [Zeilhofer und Sittl, 2007].

Als Ursache für die Toleranzentwicklung kann die Adaption der Opioidrezeptoren an das andauernde Angebot an Agonist angesehen werden. Die Toleranzentwicklung betrifft nicht nur

Morphin, sondern auch alle anderen Opioid-Agonisten, sodaß man hier von einer Kreuztoleranz sprechen kann. Die erreichbare Toleranz bei Morphin ist sehr hoch. Es kann eine Dosissteigerung auf das 100-fache, ein Einzelfällen sogar auf das 1000-fache der oralen Einzeldosis notwendig werden. Darüber hinaus entwickelt sich gleichermaßen eine Toleranz gegenüber der tödlichen Dosis [Beubler, 2007b; Lüllmann et al., 2006].

Die Morphin- bzw. Opiat-Abhängigkeit wird durch *craving*, Toleranzentwicklung und Entzugssyndrom charakterisiert. Die euphorisierende Wirkung des Opiats hängt stark von dessen Anflutgeschwindigkeit im Gehirn ab. Daher ist auch Heroin (Diacetylmorphin) auch bei intravenöser Applikation das „optimale“ Rauschmittel, da es noch vor seiner Metabolisierung (zu 6-Monoacetylmorphin und Morphin) die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Wird die Opiat-Zufuhr unterbrochen so kommt es etwa vier Stunden später zur Entwicklung des Entzugssyndroms. Anfangs kommt es zu einem Verlangen nach der Droge (*craving*) und Ängstlichkeit. Später, nach circa acht Stunden, kommt es zu verstärktem Gähnen, laufender Nase, Tränenfluß, Niesen, Schwitzen sowie Juckreiz. Diese Symptome intensivieren sich im Lauf der Zeit und nach etwa zwölf Stunden kommen geweitete Pupillen, Muskel- und Knochenschmerzen sowie Muskelzuckungen dazu. Nach einem Tag kommt es zu Hypertonie, Fieber, Tachykardie, Tachypnoe sowie Übelkeit. In der darauffolgenden Zeit verstärken sich alle bereits genannten Symptome weiter und nach etwa 36 Stunden erweitert sich das Symptombild um Muskelkrämpfe, Diarrhöe, Erbrechen, Hypoglykämie und Schock. Nach etwa ein bis zwei Wochen verbessern sich und verschwinden die Entzugssymptome [Beubler, 2007b; Lüllmann et al., 2006].

3.7.1 Gesundheitliche Folgen einer Opiat-Sucht

Bei der Opiat-Sucht, in den meisten Fällen Heroin-Sucht, entstehen gesundheitliche Schäden nicht durch die Substanz selbst, sondern durch die intravenöse Applikation. Bakterielle Infektionen, Abszesse, Leber-, Nieren- und Gelenkserkrankungen können sich dadurch entwickeln. Weiters kann es zu Embolien kommen, falls schlecht lösliche Heroinzubereitungen verwendet werden. Die Gefahr einer Infektion mit HIV, Hepatitis B und Hepatitis C ist durch den Austausch des Injektionsbestecks gegeben. Der körperliche Verfall, der bei Opiat-Abhängigen beobachtet werden kann, ist ebenfalls nicht auf die Substanz selbst zurückzuführen sondern auf die Art der Anwendung und der genannten Begleiterkrankungen [Beubler, 2007b; Lüllmann et al., 2006].

3.8 Das „Mohnkuchen-Problem“

Der Verzehr von mohnhaltigen Speisen und Backwaren ist in Mitteleuropa, vor allem in Österreich, sehr beliebt und weit verbreitet. Mohnsamen ist *per se* frei von Opium-Alkaloiden, wird jedoch bei der Ernte mit dem alkaloidhaltigem Milchsafte kontaminiert, wodurch es beim Konsum von Speisemohn auch zu einer Aufnahme von Opium-Alkaloiden kommt. Die Aufnahme von Morphin und anderen Opium-Alkaloiden führt nur selten zu nennenswerten pharmakologischen Wirkungen, da oral aufgenommenes Morphin sehr rasch in der Leber metabolisiert und inaktiviert wird (*first-pass*-Effekt).

Die im Speisemohn enthaltene Alkaloidmenge kann jedoch ausreichen, um bei einer Harnuntersuchung positiv auf Opiate getestet zu werden. Bei einem immunologischen Harntest kann jedoch nicht zwischen einem legalen Mohn-Konsum und einer illegalen Morphin-Einnahme unterschieden werden, was zu falsch positiven Testergebnissen führt [Dejnega et al.; Lachenmeier et al., 2010; Risikobewertung, 2005; Schmid, 2007; Voderholzer et al., 1997].

4 Grundlagen der verwendeten Analysenmethoden

4.1 Grundlagen der Festphasenextraktion

Die Technik der Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) ist vom Grundprinzip her eine „alles-oder-nichts“-Chromatographie. Die flüssige Probe wird durch das Extraktionssäulchen geleitet, wobei die Analyten am Säulchenmaterial adsorbiert werden und so aus der Probe extrahiert werden. Interferenzen, wie Matrixbestandteile, Salze oder störende Verbindungen, können durch die richtige Wahl der Waschlösungen aus der Probe entfernt werden, wobei die Analyten nicht vom Säulchenmaterial gewaschen werden. Im letzten Schritt werden die Zielanalyten selektiv vom Extraktionssäulchen durch das geeignete Lösungsmittel eluiert und man erhält auf diese Weise einen hochreinen Extrakt der Probe, dessen Analytkonzentration meist deutlich höher ist als in der Ausgangsprobe [Separtis].

Als Alternative können die Bedingungen auch so gewählt werden, daß ausschließlich die Interferenzen am Extraktionssäulchen reteniert werden und die Analyten das Säulchen ungehindert passieren. Diese Form liefert zwar eine gereinigte Probe, bewirkt aber keine Aufkonzentrierung der Analyten [Separtis].

Die Analyten können auf Grund von verschiedenen Retentionsmechanismen am SPE-Sorbent adsorbiert werden. Die am häufigsten angewendeten Retentionsmechanismen sind [Separtis]:

- nicht-polare Wechselwirkungen, basierend auf den Van-der-Waals-Kräften,
- polare Wechselwirkungen, durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol- oder π - π -Wechselwirkungen,
- Ionenaustausch,
- *mixed-mode*-Retention durch die Kombination von nicht-polaren Wechselwirkungen und Ionenaustausch.

4.2 Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

4.2.1 Grundprinzipien der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, kurz HPLC (*high performance liquid chromatography*), hat sich aus der Flüssigkeitschromatographie (LC, *liquid chromatography*) entwickelt.

In der Flüssigkeitschromatographie werden Materialien, die adsorbierende Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel Aluminiumoxid oder Kieselgel, in eine Glassäule gepackt. Das zu trennende Flüssigkeitsgemisch wird am Kopf dieser Säule aufgebracht und die Elution der Probe erfolgt mit einem geeigneten Lösungsmittelgemisch oder mit einer Reihe von Lösungsmitteln [Lindsay, 1996].

Die am Säulenkopf aufgebrachte Probe wird durch das Elutionsmittel durch die Säule transportiert und tritt mit der Oberfläche des Säulenmaterials in Wechselwirkung. Wird eine Komponente der Probe nur wenig an der Oberfläche des Säulenmaterials adsorbiert, dann wandert diese schneller durch die Säule, als eine Komponente, die stärker mit der Säulenoberfläche in Wechselwirkung tritt. Auf diese Weise erfolgt eine Trennung der Probe in ihre einzelnen Komponenten.

Beruhet die Trennung der einzelnen Komponenten auf ihrem unterschiedlichen Adsorptionsverhalten an der Oberfläche der stationären Phase, dann spricht man von der Adsorptionschromatographie oder als Flüssig-Fest-Chromatographie (LSC, *liquid solid chromatography*) [Lindsay, 1996].

Bei der Flüssig-Flüssigchromatographie (LLC, *liquid liquid chromatography*) ist die stationäre Phase eine Flüssigkeit, die auf einem fein verteiltem, inertem und festen Grundmaterial aufgebracht ist. Die Trennung der Probe erfolgt durch eine unterschiedliche Verteilung der Komponenten zwischen der flüssigen stationären Phase und der ebenfalls flüssigen mobilen Phase. Hier kann man zwischen der Normalphasen-LLC und der Umkehrphasen-LLC (*reversed phase* LLC) unterscheiden. Bei der Normalphasen-LLC ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, während bei der RP-LLC genau der umgekehrte Fall vorliegt, die mobile Phase ist hier nämlich polarer als die stationäre Phase [Lindsay, 1996].

Daneben gibt es noch die Möglichkeiten, die Probe mittels Ionenaustauschchromatographie oder mittels Ausschußchromatographie zu trennen. Bei der Ionenaustauschchromatographie stellt ein Ionenaustauscherharz die stationäre Phase dar und die Trennung erfolgt auf Grund der unterschiedlichen Wechselwirkung der Ionen in der Probe mit dem Ionenaustauscherharz.

Im Fall der Ausschußchromatographie ist die stationäre Phase ein weitporiges Gel, das die Probe auf Grund der Molekülgröße und -form in die einzelnen Komponenten auftrennen kann [Lindsay, 1996].

Das Problem der Flüssigkeitschromatographie ist, daß viele stationäre Phasen nicht sehr effizient

sind und deshalb für schwierige Trennungen sehr lange Säulen benötigt werden. Dies wiederum führt zu sehr langen Analysenzeiten und einem hohem Lösungsmittelverbrauch [Lindsay, 1996].

Die Entwicklung der HPLC begann in den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts als man effizientere Säulenmaterialien mit kleinerer Partikelgröße herstellen konnte. Diese kleineren Teilchen setzen jedoch der mobilen Phase einen großen Widerstand entgegen, sodaß diese mittels einer Pumpe durch die Säule gepumpt werden muß [Lindsay, 1996].

Die Verbesserung der Geräte ermöglichte im Lauf der Zeit die Partikelgröße weiter zu reduzieren und damit die Effizienz der HPLC noch zu steigern. Heute benutzt man stationäre Phasen die als „Feinkorn-Säulen-Packungen“ bezeichnet werden und meist aus Kieselgelteilchen bestehen. Durch Binden von verschiedenen chemischen Gruppen auf die Oberfläche des Kieselgels können verschiedene stationäre Phasen für die unterschiedlichsten Trennprobleme erzeugt werden. Diese stationären Phasen bezeichnet man als modifizierte Phasen oder als *bonded phases* [Lindsay, 1996].

Wie bereits erwähnt, wird bei der HPLC die mobile Phase durch die Trennsäule gepumpt. Ändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Trennung nicht, so spricht man von einer isokratischen Trennung. Wird die Zusammensetzung der mobilen Phasen während der Trennung verändert, so handelt es sich um eine Gradientenelution.

Eine Gradiententrennung wird dann angewendet, wenn die Retention der Probenmoleküle auf der stationären Phase so groß ist, daß eine Elution innerhalb eines vernünftigen Zeitrahmens nicht möglich ist. In der Normalphasenchromatographie werden unpolare Verbindungen relativ schwach auf der stationären Phase reteniert und können durch ein unpolares Lösungsmittel einfach von der stationären Phase eluiert werden. Polare Verbindungen dagegen zeigen eine wesentlich größere Adsorption an der stationären Phase und deshalb ist ein polareres Lösungsmittel zur Elution notwendig. Sollten in einer Probe Komponenten mit unterschiedlicher Polarität vorhanden sein, kann die Trennung durch Änderung der Polarität der mobilen Phase beschleunigt werden.

Es ist jedoch auch möglich, andere Eigenschaften der mobilen Phase wie zum Beispiel den pH-Wert oder die Ionenstärke, während der Trennung zu verändern [Lindsay, 1996].

4.2.2 Chromatographische Kenngrößen

4.2.2.1 Kapazitätsfaktor k

Der Kapazitätsfaktor, oder Retentionsfaktor, dient zur Identifizierung von Peaks im Chromatogramm. Dieser ist im Gegensatz zur Retentionszeit von der Säulenlänge und der Flußrate der mobilen Phase unabhängig und eignet sich daher besser zum Vergleich von Trennmethoden.

Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode versucht man Kapazitätsfaktoren im Bereich von 1 bis 10 zu erhalten. Ist der k -Wert zu niedrig, sind die Peaks nicht ausreichend aufgelöst, ist er zu hoch, wird die Analysenzeit zu lang [Lindsay, 1996].

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R ... Retentionszeit

t_0 ... Totzeit

4.2.2.2 Trennfaktor α

Der Trennfaktor α oder die Selektivität beschreibt die Trennung zweier Peaks voneinander und wird durch das Verhältnis der beiden k -Werte der Peaks definiert [Lindsay, 1996].

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

k ... Kapazitätsfaktor

4.2.2.3 Auflösung R_s

Das Maß für die Trennung zweier Komponenten voneinander ist die Auflösung R_s . Ist $R_s \geq 1,5$ dann sind die beiden Peaks basisliniengetrennt [Lindsay, 1996].

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(w_1 + w_2)}$$

t_R ... Retentionszeit

w ... Peakbreite an der Basis

4.2.2.4 Effizienz der Säule

Beim Wandern der Probe durch die Trennsäule tritt eine Bandenverbreiterung auf, das heißt je später die Komponente eluiert, umso breiter wird der Peak. Je effizienter die Trennsäule, umso weniger stark tritt dieses Problem auf. Die Säule ist umso effizienter, je schmaler die Peakbreite w bei der Retentionszeit t_R ist. Als Maß für die Effizienz wird die Bodenzahl N oder die Bodenhöhe H benutzt [Lindsay, 1996].

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad \text{oder} \quad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{(1/2)}} \right)^2$$

$$H = \frac{L}{N}$$

t_R ... Retentionszeit

w ... Peakbreite an der Basis

$w_{(1/2)}$... Peakbreite in halber Peakhöhe

L ... Säulenlänge

Die Bodenhöhe wird zur Beschreibung der Effizienz der Säule bevorzugt angewendet, weil sie die Effizienz pro Säulenlänge angibt. So kann sie zum direkten Vergleich von Säulen verwendet werden. Die Anzahl der Böden kann durch die Wahl einer längeren Säule erhöht werden [Lindsay, 1996].

Die Auflösung zweier Peaks hängt von der Selektivität, dem Kapazitätsfaktor und der Bodenzahl ab. Die Zusammenhänge sind in der folgenden Formel, die auch als Schlüsselgleichung zur Optimierung der Trennung bezeichnet werden kann, dargestellt [Lindsay, 1996]:

$$R_s = 0,25 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{\bar{k}}{\bar{k} - 1} \right) \sqrt{N}$$

$\bar{k}$... der durchschnittliche k -Wert der beiden Peaks

N ... die durchschnittliche Bodenzahl der beiden Peaks

„Diese Gleichung zeigt, daß für eine bestimmte gewünschte Auflösung drei Bedingungen erfüllt sein müssen [Lindsay, 1996]:

- Die Peaks müssen voneinander getrennt sein ($\alpha > 1$)
- Die Substanzen müssen auf der Säule retardiert werden ($k > 0$)
- Die Säule muss eine gewisse Bodenzahl besitzen“

4.2.3 Grundsätzlicher Aufbau einer HPLC-Anlage

4.2.3.1 Eluentenvorratsgefäß

Das simpelste Vorratsgefäß für die mobile Phase stellt eine Glasflasche mit einem Verschuß, durch den ein Schlauch geführt wird, der die mobile Phase vom Vorratsgefäß zur Pumpe leitet, dar. Am Ende des Schlauches sollte eine Edelstahlfritte angebracht sein, damit die mobile Phase, bevor sie zur Pumpe gefördert wird, filtriert wird. Dies verhindert, daß Staub, Schwebepartikel oder andere Verunreinigungen auf dem Säulenkopf angereichert werden und so die Trennung negativ beeinflussen (Reproduzierbarkeit) oder die Säule verstopfen [Lindsay, 1996].

Bevor die mobile Phase zur Pumpe gefördert wird, ist es auch wichtig diese zu entgasen, denn in der mobilen Phase gelöste Luft kann sich in der Pumpe oder im Detektor ansammeln und so zu Druckschwankungen oder Störungen bei der Detektion führen. Zum Entgasen der mobilen Phase kann man zum Beispiel das Vorratsgefäß für einige Zeit ins Ultraschallbad stellen oder einen on-line Entgaser ins HPLC-System einbauen [Lindsay, 1996].

4.2.3.2 Pumpen

Durch die Pumpe wird die mobile Phase mit einer bestimmten konstanten Flußrate durch die Trennsäule transportiert. Aufgrund ihrer Arbeitsweise kann man zwischen druckkonstanten oder Flußkonstanten Pumpen unterscheiden, [Lindsay, 1996].

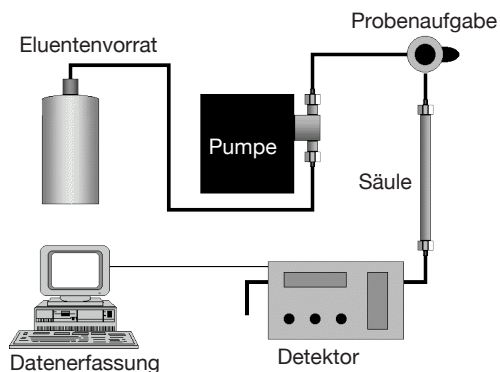


Abbildung 18: Schema einer HPLC-Anlage

Bei druckkonstanten Pumpen wird die mobile Phase stets mit dem gleichen Druck durch das System gepumpt, bei Flußkonstanten Pumpen mit der gleichen Flußrate. Der Strömungswiderstand der Säule kann sich zum Beispiel durch Zusammensacken oder Quellen des Säulenmaterials, durch Änderungen der Temperatur oder durch Ablagerungen am Packungsmaterial verändern. Verwendet man eine druckkonstante Pumpe, so ändert sich bei einer Veränderung des Strömungswiderstandes die Flußrate. Bei einer Flußkonstanten Pumpe dagegen ändert sich der Druck. Eine Veränderung der Flußrate beeinflusst die Reproduzierbarkeit der Trennung und kann zu Schwankungen der Basislinie führen. Daher sollten für die HPLC Flußkonstante Pumpen, die in der Lage sind, die mobile Phase auch bei hohen Druck

durch die Trennsäule zu fördern, verwendet werden. Druckkonstante Pumpen werden eher zum Säulenpacken verwendet, da hier kleine Änderungen im Fluß keinen Einfluß haben [Lindsay, 1996].

4.2.3.3 Probenaufgabe

Die Probe wird, egal ob manuell oder automatisiert, über ein Schutzventil in das System eingebracht. Die Probe wird zunächst über eine Spritze bei Atmosphärendruck in die Probenschleife (Loop) eingebracht, anschließend wird die Loop durch Drehen des Ventils von der load-Position auf die inject-Position in den Hochdruckstrom geschaltet und so der Inhalt der Loop, die Probe, auf die Säule transportiert [Lindsay, 1996].

4.2.3.4 Säule

Auf der Säule wird die Probe in ihre einzelnen Komponenten getrennt. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Trennung kann die Säule mittels eines Säulenofens auf konstanter Temperatur gehalten werden.

4.2.3.5 Detektoren

„Vereinfachend ausgedrückt besteht die Funktion eines Detektor in der HPLC in der ‚Beobachtung‘ der mobilen Phase hinter der Säule. Das Ausgangssignal des Detektors ist ein elektronisches Signal, das proportional zu irgend einer Eigenschaft der mobilen Phase und/oder Probe ist [Lindsay, 1996]“. Die Anforderungen an einen „idealen“ Detektor sind [Lemière, 2001a; Lindsay, 1996]:

- hohe Sensitivität
- vorraussagbare Response

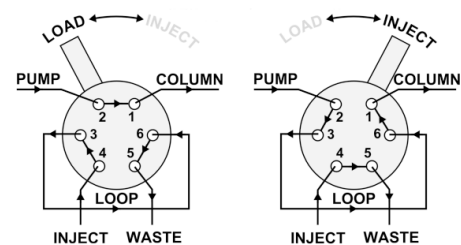


Abbildung 19: 6-Wege-Ventil; links load-Position, rechts inject-Position

- Linearität der *Response*
- Detektion aller Analyten bzw. voraussagbare Spezifität
- *Response* unabhängig von der mobilen Phase
- keine Zerstörung des Analyten
- Lieferung von qualitativen Informationen über den Analyten
- keine Beeinflussung durch veränderte Temperatur oder Flußrate
- kein Beitrag zur *Extra-Column*-Bandenverbreiterung

4.2.3.5.1 UV-Adsorptions-Detektoren

Nach der Säule wird die mobile Phase durch die Durchflußzelle des Detektors, durch die der Strahlengang eines UV/VIS-Photometers verläuft, geleitet. Mit dieser Art von Detektor können nur Moleküle erfaßt werden, die Strahlung im UV- oder sichtbaren Bereich absorbieren. Das Ausmaß der Absorption der Strahlung durch die Probenmoleküle hängt von deren Konzentration ab und ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$A = d \cdot c \cdot \epsilon_{\lambda}$$

A ... Absorption

d ... Schichtdicke

c ... Konzentration des Probenmoleküls

ϵ_{λ} ... molarer Absorptionskoeffizient, abhängig vom Probenmolekül bei gegebener Wellenlänge

Bei dieser Art von Detektor kann man zwischen Festwellenlängen-Detektoren oder Detektoren mit variabler Wellenlänge unterscheiden. Festwellenlängen-Detektoren arbeiten meist mit einer Wellenlänge von 254 nm oder 280 nm, Detektoren mit variabler Wellenlänge können bei Wellenlängen zwischen 190 und 700 nm messen [Lindsay, 1996].

4.2.3.5.2 Massenspektrometer - LC/MS

Die Entwicklung von LC/MS begann bereits in den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts, doch erst zu Beginn der 90er Jahre standen routinefähige Geräte und Ionisierungsarten zu Verfügung. Den Durchbruch im Bereich LC/MS stellte die Entwicklung von Ionisierungstechniken bei Atmosphärendruck dar, für die John Fenn im Jahr 2002 den Nobelpreis für Chemie erhielt [Kromidas, 2003].

Heute wird die Kombination von HPLC und Massenspektrometrie häufig als „Methode der Wahl“ für die Analyse von Proben mit unbekannten Inhaltsstoffen, Analyten in geringen Konzentrationen oder für Vielkomponentengemische angesehen, da sie schnelle Trennungen mit gesteigerter Nachweisempfindlichkeit ermöglicht und auch koeluiierende Peaks detektiert und quantifiziert werden können [Kromidas, 2003; Lemièrre, 2001a].

4.2.3.5.3 Weitere Detektor-Typen

- Diodenarraydetektor (DAD) bzw. *Photodiode Array Detector* (PAD)
- Fluoreszenzdetektor
- elektrochemische Detektion
- Brechungsindex-Detektor

4.3 Grundlagen der Massenspektrometrie

„Ein Massenspektrometer ist ein Apparat, der aus einer Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, diese nach Masse und Ladung trennt und schließlich ein Massenspektrum (MS) liefert, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet worden sind. Massenspektren erlauben bei Einzelsubstanzen Rückschlüsse auf deren Struktur, bei Gemischen überdies auf deren qualitative und quantitative Zusammensetzung. Die in der Zeiteinheit gebildeten Mengen an verschiedenen Ionen werden als Ionenströme, die Summe der Ionenströme als Gesamt- oder Totalionenstrom (TI) bezeichnet [Budzikiewicz, 1998]“.

4.3.1 LC/MS-Interfaces

4.3.1.1 Atmospheric Pressure Ionization

Atmospheric pressure ionization (API) ist der Überbegriff für alle Ionisierungstechniken, die eine Bildung von Ionen bei Atmosphärendruck ermöglichen. Dazu zählen *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) und *atmospheric pressure photoionization* (APPI) [Kromidas, 2003; Lemière, 2001a].

4.3.1.1.1 Elektrospray Ionisation

Die erste Beschreibung des Elektrospray geht bereits auf das Jahr 1917 zurück, erste Experimente dazu wurden bereits 1910 durchgeführt [Lemière, 2001a].

Streng genommen ist der Elektrospray keine Ionisationsmethode, da durch ihn nur die Kationen und Anionen freigesetzt werden, die bereits während der chromatographischen Trennung durch das Puffersystem der mobilen Phase gebildet wurden. Als Grundlage für die Ionisation mit Elektrospray müssen die chromatographischen Bedingungen daher so gewählt werden, daß die zu detektierenden Analyten als Kation oder Anion vorliegen [Kromidas, 2003].

Der HPLC-Eluent wird durch einen Zerstäuber, in ein Aerosol, welches in ein elektrostatisches Feld gesprüht wird, übergeführt. Zur Erzeugung des elektrostatischen Feldes wird eine hohe Spannung (einige Kilovolt) zwischen der Nadel des Zerstäubers und dem *orifice* (Eintrittsöffnung für die Ionen in das Vakuumsystem) angelegt. Die Aerosoltröpfchen tragen in Abhängigkeit des Analyten eine positive oder negative Ladung und werden aufgrund dessen zum *orifice* hingezogen und gelangen so in die Ionenoptik des Massenspektrometers. Zum Verdampfen des Lösungsmittels, wird das Aerosol durch einen beheizten Stickstoffstrom erwärmt. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels erleben die Aerosoltröpfchen „eine Kaskade aus Schrumpfung, Zerplatzen in kleinere Tröpfchen zur Stabilisierung der Oberflächenladung („Coulomb-Explosion“) und spontaner Emission von (Pseudo-)Molekülionen [Kromidas, 2003]“. Diese Molekülionen gelangen dann durch das Orifice in das Massenspektrometer.

Bei der Ionisation mittels Elektrospray können auch mehrfach geladene Molekülionen gebildet werden, je nachdem wieviele funktionelle Gruppen im Molekül vorhanden sind und welches Puffersystem verwendet wird. Da jedes Massenspektrometer einen limitierten Massenbereich mit einer oberen Grenzen zwischen m/z 4000 bis m/z 6000 besitzt, aber bei der Massenspektrometrie immer das Verhältnis von Masse/Ladung (m/z) gemessen wird, wird dieser Effekt zum Beispiel bei der Analyse von Proteinen mit einem Molekulargewicht von über 100 000 Da ausgenutzt [Kromidas, 2003].

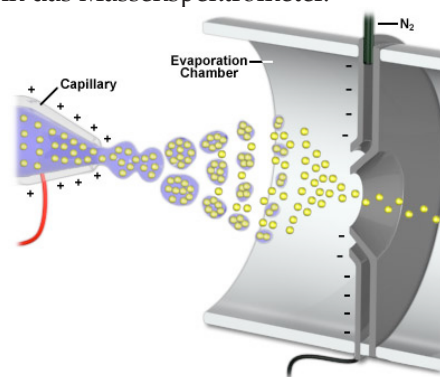


Abbildung 20: Electrospray Ionisation

4.3.2 Massenanalysatoren in der LC/MS

4.3.2.1 Quadrupol-Systeme

Ein Quadrupol-Massenanalysator besteht aus vier parallelen, im Querschnitt eines Quadrates angeordneten Stäben, von denen immer die zwei gegenüberliegenden Stäbe miteinander verbunden sind und an denen eine Wechselspannung angelegt wird. Durch die Wechselspannung bauen sich abwechselnd positive und negative Felder relativ zur Mittelachse auf, die eine Ablenkung der Ionen bewirken. Positiv geladene Ionen werden durch das positive Feld zur Mittelachse gezogen, die negativ geladenen Ionen werden zu den Stäben, nach außen, abgelenkt. Das Ausmaß der Ablenkung

hängt von der angelegten Spannung, deren Frequenz und der Masse des Ionen ab [Budzikiewicz, 1998].

Wird die Wechselspannung von einer positiven Gleichspannung überlagert, dann bewirkt dies eine generelle Ablenkung der Ionen zur Mittelachse. Die Gleichspannung hat einen stärkeren Einfluß auf Ionen mit höherer Masse, das heißt, diese können das Stabsystem passieren, während die Ionen mit geringerer Masse stärker nach außen abgelenkt werden, auf die Stäbe treffen, dort entladen werden und so nicht mehr detektiert werden können [Budzikiewicz, 1998].

An das andere Stabpaar wird eine um π versetzte Wechselspannung und eine negative Gleichspannung angelegt. Diese negative Gleichspannung bewirkt, daß Ionen über einer bestimmten Masse zu den Stäben abgelenkt und entladen werden. Für die Ionen mit niedrigeren Massen reicht das positive Feld der Wechselspannung aus, daß diese auf der Flugbahn durch das Stabsystem bleiben und detektiert werden können [Budzikiewicz, 1998].

Durch passende Kombination der Gleich- und Wechselspannungen kann man den Quadrupol so einstellen, daß ihn nur Ionen mit einer bestimmten Masse passieren können und alle anderen Ionen zur Entladung abgelenkt werden [Budzikiewicz, 1998].

Das elektromagnetische Feld, das durch die Überlagerung der Gleich- und Wechselspannungen entsteht wird durch die Mathieu-Gleichung beschrieben [Lemière, 2001b]:

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \frac{e}{mr_0} (V_{dc} + V_{rf} \cos \omega t) x = 0$$

$$\frac{d^2 y}{dt^2} - \frac{e}{mr_0} (V_{dc} + V_{rf} \cos \omega t) y = 0$$

V_{dc} ... Gleichspannung

V_{rf} ... Wechselspannung

ω ... Frequenz der Wechselspannung ($\omega = 2\pi f$)

r_0 ... Radius des RF-Feldes

m ... Masse

t ... Zeit

Das obere Massenlimit liegt bei Quadrupol-Systemen bei 3000 bis 4000 Da. [Lemière, 2001b; Bittner, 2005].

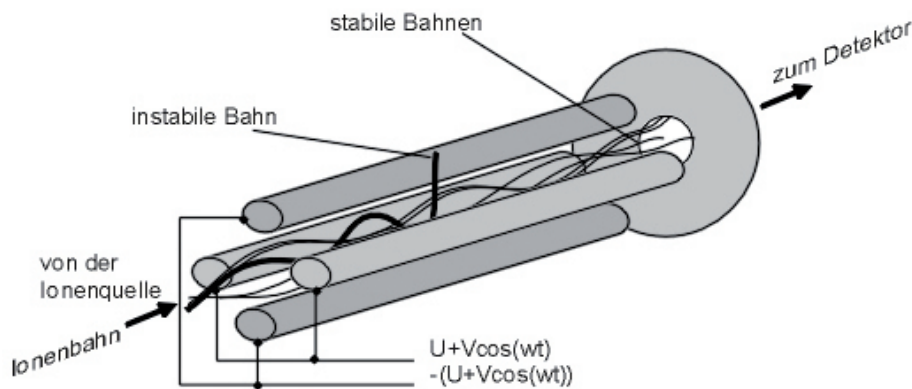


Abbildung 21: Quadrupol-Massenanalysator

4.3.2.2 weitere Massanalysatoren in der LC/MS

- Ionenfallen
- *Time-of-Flight* Analysatoren
- Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometer

4.3.2.2 Tandem-Instrumente

Bei der Tandem-Massenspektrometrie werden zwei oder mehr MS-Experimente hintereinander durchgeführt, wobei die unterschiedlichsten Analysatoren miteinander gekoppelt werden können. Zwischen den MS-Experimenten können die Ionen beispielsweise beschleunigt oder abgebremst werden oder einer Kollision mit neutralen oder reaktiven Gasen oder Oberflächen ausgesetzt werden [Lemière, 2001b].

4.3.2.2.1 Triple-Quadrupol-Systeme

Beim Triple-Quad sind drei Quadrupole hintereinander geschaltet, wobei der erste und der letzte Quadrupol für die MS-Experimente verwendet werden. Der Quadrupol in der Mitte ist für die Transmission der Ionen vom ersten in den letzten Analysator zuständig und wird auch als *collision cell* (Kollision mit einem Gas) für die Fragmentierung der *precursor ions* verwendet [Lemière, 2001b].

4.3.2.2.1.1 Tandem-Experimente

4.3.2.2.1.1.1 Product Ion Scan

Beim *product ion scan* oder *daughter ion scan* wird im ersten Massenanalysator ein sogenanntes *precursor ion* (*parent ion*) extrahiert und dieses zum Beispiel in einer *collision cell* durch Kollision mit einem inerten Gas (meist ein Edelgas) weiter fragmentiert. Die Fragmentation kann auch durch Zufuhr von Energie (mehrere eV) oder durch Kollision mit einer Oberfläche ausgelöst werden. Die *product ions* werden dann im zweiten Massenspektrometer weiter analysiert. Es können entweder alle Produktionen, mehrere Produktionen (*multiple reaction monitoring*, MRM) detektiert werden oder nur ein bestimmtes Fragment (*single reaction monitoring*, SRM) [Lemière, 2001b].

4.3.2.2.1.1.2 Precursor Ion Scan

Der *precursor ion scan* verläuft quasi spiegelverkehrt zum *product ion scan*. Durch das erste MS werden alle Ionen durchgelassen und im zweiten MS wird exakt nach einer bestimmten Masse gescannt. Am Ende wird nur dann ein Signal detektiert, wenn im ersten MS eine *parent ion* vorhanden ist, das genau jenes *product ion* liefert, wonach im zweiten MS gescannt wird. Diese Methode wird meist für die Detektion von Nucleotiden in komplexen Matrices verwendet. In diesem Fall wird das zweite Massenspektrometer auf die Detektion einer Phosphatgruppe (m/z 70 im ESI(-)) eingestellt. Der Scan im ersten Massenspektrometer liefert nur dann ein Signal, wenn das *precursor ion* diese Phosphatgruppe trägt [Lemière, 2001b].

4.3.2.2.1.1.2 Constant Neutral Loss

Beim Scannen nach Ionenpaaren mit *constant neutral loss* werden beide Massenanalysatoren so eingestellt, daß nur Ionenpaare, die sich durch den Verlust einer fixen Massendifferenz ($\Delta m/z$) in der *collision cell* unterscheiden, detektiert werden. Diese Technik wird ebenfalls zur Detektion von Analyten, die bestimmte gemeinsame strukturelle Eigenschaften aufweisen, angewendet. Sie wird zum Beispiel bei der Detektion von Nukleosiden, die durch den Verlust ihrer (2'-Desoxy)-Ribose-Gruppe ($\Delta m/z$ 116) gekennzeichnet sind, verwendet [Lemière, 2001b].

4.3.2.2.2 Weitere Tandem-Instrumente

- Quadrupole-TOF-Systeme
- Ion-Storage-Systeme

4.4 Grundlagen der immunchemischen Messverfahren

„Die breite Einsatzmöglichkeit immunologischer Reaktionen zur quantitativen Bestimmung von z. B. Proteinen, Hormonen oder Medikamenten ergibt sich aus der Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion (Ag-Ak-Reaktion) und der Möglichkeit, diese Reaktion mit verschiedensten Techniken sehr sensitiv nachzuweisen [Hallbach, 2006]“.

4.4.1 Antigen-Antikörper-Reaktion

Antikörper bestehen im Prinzip aus vier Polypeptidketten, nämlich zwei schweren und zwei leichteren Ketten. Diese vier Polypeptidketten sind so angeordnet, daß der Antikörper vom Aussehen her einem „Y“ ähnelt. Der lange Arm des „Y“ wird als Fc-Fragment bezeichnet und die beiden kürzeren Arme werden als Fab-Fragmente bezeichnet [Hallbach, 2006].

An den beiden oberen Enden der Fab-Fragmente liegen die variablen Domänen des Antikörpers. In den variablen Domänen wird durch eine spezielle Sequenz von Aminosäuren die bestimmtes Muster an Aminosäureseitenketten geschaffen, die die determinanten Gruppen des Antikörpers bilden und somit dessen Antigenität bedingen. Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper findet an den determinanten Gruppen des Antikörpers statt. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist hochspezifisch und hochaffin [Hallbach, 2006].

Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch die sogenannte Heidelberger-Kurve beschrieben. Da Antikörper stets zwei Bindungsstellen für Antigene besitzen und Antigene immer mehrere determinante Gruppen aufweisen, kommt es beim Mischen von Antigenen und Antikörpern zu einer Quervernetzung der Antigen-Antikörper-Komplexe und damit zu einer Präzipitatbildung.

Liegt jedochein Antikörper-Überschuss vor, werden die am Antigen liegenden Bindungsstellen so von den Antikörpern besetzt, daß es zu keiner Quervernetzung der Komplexe kommt und so die Präzipitatbildung ausbleibt. Analoges gilt für den Antigen-Überschuss [Hallbach, 2006].

Die Heidelberger-Kurve beschreibt die Abhängigkeit des Streulicht-Messsignals von der Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe bei einer konstanten Antikörper-Konzentration. Diese Kurve stellt die Grundlage für alle immunchemischen Messverfahren dar. Als Messbereich wird der linke aufsteigende Schenkel der Kurve bis zum Äquivalenzbereich verwendet [Hallbach, 2006].

4.4.2 Wichtige homogene diagnostische Immunoassay-Systeme

4.4.2.1 EMIT-Verfahren

Beim EMIT-Verfahren (*enzyme multiplied immunoassay technique*) handelt es sich um einen kompetitiven homogenen Enzymimmunoassay. EMIT-Tests beruhen auf einer Konkurrenz-Reaktion zwischen dem freien Antigen (aus der Probe) und einem Antigen-Enzym-Konjugat um die Bindungsstellen des Antikörpers. Ist in der Probe das Antigen vorhanden, so bindet dies an Stelle des Antigen-Enzym-Konjugats an den Antikörper. Das nun freie Antigen-Enzym-Konjugat kann das Substrat in ein Reaktionsprodukt umwandeln. Diese Umwandlung kann gemessen werden [Hallbach, 2006] (siehe Abbildung 23).

Der in dieser Arbeit verwendete Cotinin-Immunoassay basiert auf dem EMIT-Prinzip. Beim DRI® *Cotinine* Assay läuft die Konkurrenz-Reaktion um die Antikörperbindungsstellen zwischen dem freien Cotinin aus der Probe und dem im Assay enthaltenen Cotinin, das mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) markiert ist, ab. Je mehr Cotinin in der Probe enthalten ist, umso mehr dieses freien Cotinins kann an den Antikörper binden. Das im Assay enthaltene Cotinin-Enzym-Konjugat bleibt dadurch ungebunden und kann so das Substrat (NAD) in das Produkt (NADH) umwandeln. Die Umwandlungsrate von NAD zu NADH wird spektrophotometrisch bei 340 nm gemessen und ist proportional zur Cotinin-Konzentration in der Probe [Microgenics Corporation, 2003].

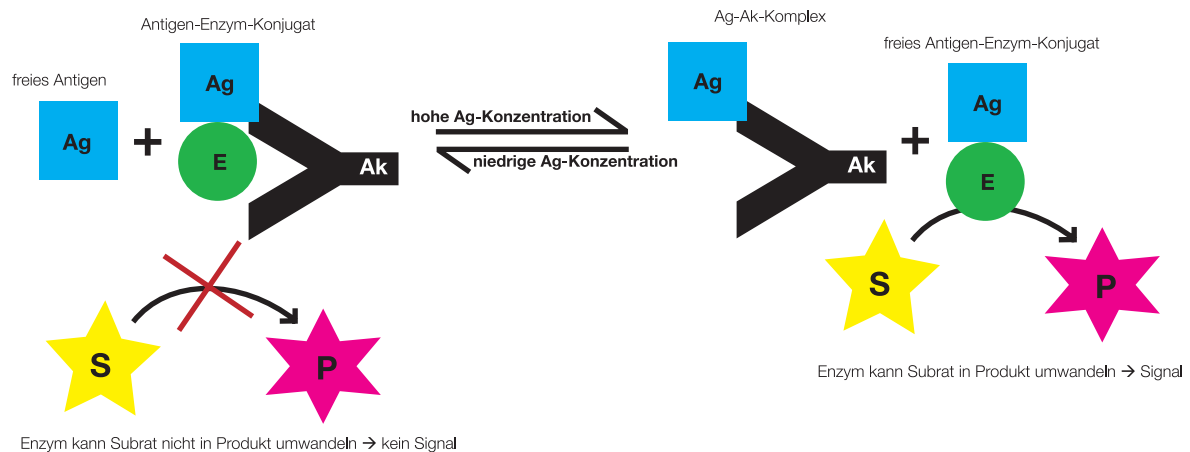


Abbildung 23: Prinzip des EMIT-Verfahrens; nach [Hallbach, 2006]

4.4.2.2 CEDIA®-Verfahren

Im Gegensatz zum EMIT-Verfahren besteht beim CEDIA®-Verfahren (*cloned enzyme donor immunoassay*) das Antigen-Enzym-Konjugat, mit dem das Antigen aus der Probe um die Antikörperbindungsstelle konkurriert aus zwei Fragmenten, nämlich dem Antigen-Enzymdonor-Konjugat und dem Enzymakzeptor-Fragment (beide inaktiv).

Ist in der Probe freies Antigen enthalten, so wird das Antigen-Enzymdonor-Konjugat nicht an den Antikörper gebunden, sondern kann sich mit dem Enzymakzeptor-Fragment zum aktiven Enzym verbinden und das Substrat umwandeln. Diese Umwandlung wird wie beim EMIT-Verfahren gemessen [Hallbach, 2006] (siehe Abbildung 24).

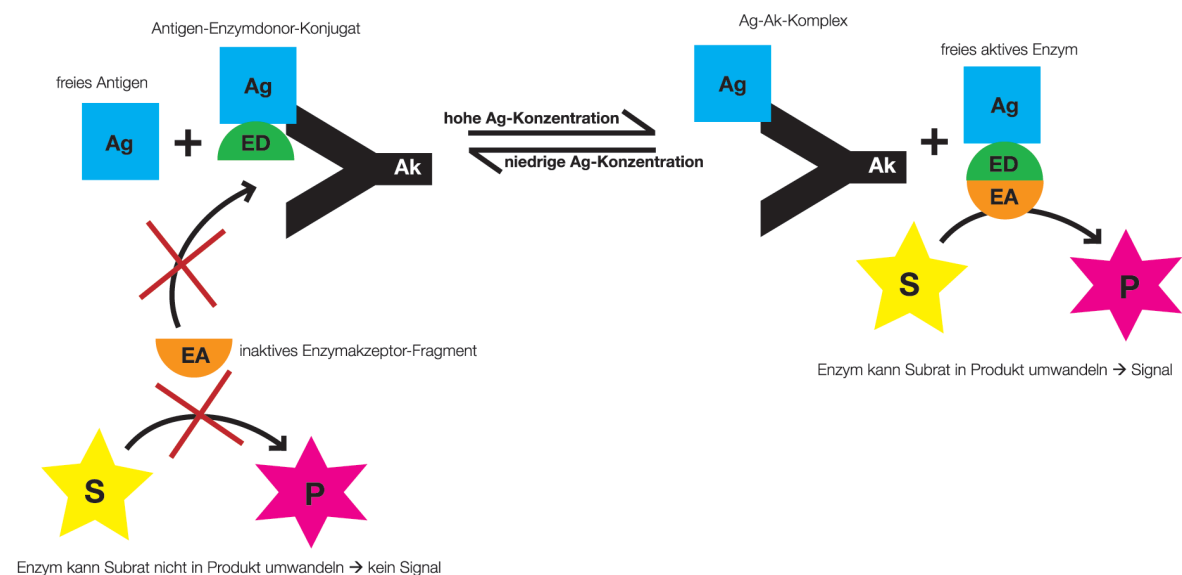


Abbildung 24: Prinzip des CEDIA®-Verfahrens; nach [Hallbach, 2006]

In dieser Arbeit wurde ein CEDIA® zur Bestimmung von Opiaten verwendet. Der CEDIA® Opiate Assay „beruht auf dem bakteriellen Enzym β -Galaktosidase, das gentechnisch in zwei inaktive Fragmente zerlegt wurde. Diese Fragmente verbinden sich spontan wieder unter Bildung des voll aktiven Enzyms, das bei der Durchführung des Tests ein Substrat spaltet und damit eine spektrophotometrisch messbare Farbänderung hervorruft. Opiat, an ein inaktives Fragment der β -Galaktosidase konjugiert, konkurriert im Assay mit Opiat aus der Probe um eine Antikörperbindungsstelle. Enthält die Probe Opiat, so bindet es sich an Antikörper. Die inaktiven Enzymfragmente bilden ein aktives Enzym. Enthält die Probe kein Opiat, so binden sich Antikörper an das mit dem inaktiven Enzymfragment konjugierte Opiat und verhindern sterisch die Rekombination der inaktiven β -Galaktosidase-Fragmente. Es wird kein aktives Enzym gebildet. Die gebildete Menge an aktivem Enzym und die entsprechende Extinktionsänderung sind zur Drogenkonzentration in der Probe proportional [Microgenics Corporation, 2004]“

4.4.3 Andere immunchemische Untersuchungsverfahren

- Immunofluoreszenzverfahren
- Immunturbidimetrie und Immunephelometrie
- Immundiffusion
- Immunfixation (Kombination von Immundiffusion und Elektrophorese)
- kompetitiver Radioimmunassay (RIA)
- nicht-kompetitiver Radioimmunoassay (IRMA)
- ELISA-Verfahren (*enzyme linked immunoabsorbent assay*)
- LIA-Verfahren (Lumineszenzimmunoassay)
- FPIA-Verfahren (Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay) [Hallbach, 2006]

Fragestellung der Dissertation

Den Ausgangspunkt für diese Dissertation stellte die Verfügbarkeit eines neuen Speichelsammelsystems basierend auf einer gefärbten Mundspüllösung zur Abnahme der Speichelproben, das auch eine Quantifizierung der gesammelten Speichelmenge ermöglicht, dar (vgl. Kapitel 1.6.5.3).

Cotinin, der Hauptmetabolit des Nicotins, dem Wirkstoff der Tabakpflanze, wird gegenwärtig routinemäßig mit immunologischen Verfahren im Harn bestimmt. Meist werden die Testergebnisse zur Überwachung des Raucherstatus, also zur Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern herangezogen. Liegt die im Harn gemessene Cotinin-Konzentration über einem bestimmten Grenzwert, dem sogenannten „Cut-Off“-Wert (bei Cotinin über 500 ng/mL im Harn), kann davon ausgegangen werden, dass die Harnprobe von einem Raucher stammt. Aufgrund der gesundheitsschädlichen Wirkungen des Rauchens und den damit verbundenen (Krankheits)kosten ist die Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern ein wichtiger gesundheitspolitischer Faktor. Viele Versicherungsgesellschaften verlangen auch die Vorlage eines ärztlichen Attests zum Nachweis des Nichtraucher-Status der potentiellen Klienten [Bauer].

Eine Alternative für den Nachweis von Cotinin im Harn kann der Nachweis von Cotinin im Speichel darstellen, da Speichelproben verglichen mit Harnproben einige Vorteile besitzen: Sie können unter Aufsicht abgenommen werden ohne in die Privatsphäre des Betroffenen einzugreifen, wodurch eine Manipulation der Probe durch den Spender praktisch ausgeschlossen werden kann. Speichel birgt ein geringeres Infektionsrisiko, die Abnahme der Probe ist nicht invasiv und kann auch von Laien durchgeführt werden [Choo und Huestis, 2004; George und Braithwaite, 2002; Greiner Bio One GmbH].

Der erste Teil der Dissertation befasste sich daher mit der Fragestellung, ob Cotinin mit einem modifizierten Immunassay (DRI® *Cotinine* Immunoassay) aus dem Speichel bestimmt werden kann und ob diese Methode auch praktisch zur Überwachung des Raucherstatus herangezogen werden kann. Weiters war eine LC/MS-Methode mit einfacher Probenvorbereitung zur Bestätigung der Immunassay-Ergebnisse zu entwickeln.

Im Rahmen eines Monitoring auf Suchtdrogen werden zum Nachweis von Morphin und anderen Opium-Alkaloiden derzeit - wie beim Cotinin - meist immunologische Testverfahren verwendet. Der Nachweis der Substanzen erfolgt auch in diesem Fall meist im Harn. Aufgrund der bereits genannten Vorteile könnten auch in diesem Fall Speichelproben eine interessante Alternative zu den Harnproben darstellen.

Der zweite Teil dieser Arbeit war mit der Nachweisbarkeit von Opium-Alkaloiden aus dem Speichel gewidmet. Unter Berücksichtigung des „Mohnkuchen-Problems“ (Kapitel 3.8) und dem Vorteil, dass der Verzehr größerer Mengen alkaloidhaltigen Speisemohns eine einfache und legale Möglichkeit ist, Morphin in den menschlichen Organismus einzubringen, wurde eine „Mohn-Studie“ (Kapitel 13) konzipiert.

Die zentrale Fragestellung der „Mohn-Studie“ war, ob nach dem Verzehr von Speisemohn Opiate im Speichel nachgewiesen werden können und ob eine Unterscheidung zwischen legalem Mohn-Konsum und illegalem Drogenkonsum möglich wäre.

Als Alternative zum immunologischen Verfahren war eine instrumentelle chromatographische Methodik zu entwickeln, wofür eine Extraktionsmethode für Opiate aus Speichelproben entwickelt wurde. Das Verhalten von Opium-Alkaloiden in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen war zu untersuchen.

Material und Methoden

5 Verwendete Materialien

5.1 Chemikalien und Lösungsmittel

- Acetonitril, *far UV, HPLC Gradient Grade*
Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, UK
- Ameisensäure *p.A. 98-100%*
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Ammoniak-Lösung 25%
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Codein
Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
- (-)-Cotinin 1 mg/mL in Methanol
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Cotinin-methyl-d3 D, 98%
Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA
- Essigsäure *p.A. 100%*
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Isopropanol
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Methanol
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Morphin-3- β -Glucuronid.H₂O
Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz
- Morphin-6- β -Glucuronid.H₂O
Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz
- Morphinsulfat
Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
- (-)-Nicotin 1 mg/mL in Methanol
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- n-Propanol
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Tetrahydrofuran
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Thebain
Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
- Triethanolamin
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Wasser, *gereinigt*
hergestellt mittels Milli-Q Water Purification System
Millipore Corporate, Billerica, MA, USAA

5.2 Materialien für die Festphasenextraktion

5.2.1 Geräte

- Speedisk 48 Pressure Processor
Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA
- SpeedVac Concentrator
Savant, Farmingdale, NY, USA
- Edwards E2M8 High Vakuum Pump
Edward High Vakuum Int., Crawley, Sussex, UK

5.2.2 Festphasenextraktionssäulchen

- Oasis® MCX 1cc/30 mg Extraction Cartridges
Waters Corporation, Milford, MA, USA
- Oasis® MCX 3cc/60 mg Extraction Cartridges
Waters Corporation, Milford, MA, USA
- Isolute® NH2 100 mg/3 mL
Biotage AB, Uppsala, Schweden

5.3 Versuche mit Radioaktivität

5.3.1 Scintillationszähler

- Wallac 1414 WinSpectral Liquid Scintillation Counter
Perkin Elmer, Shelton, USA

Einstellungen am Scintillationszähler

Counting Mode	DPM
Quench Index	SQP(E)
Isotopes	H3, C14
	H3 = ,12.43 y
	C14 = ,5730.00
Protocol name	Easy Count
Counting Time	60
Repeats	1
Cycles	1
Replicates	1

5.3.2 Scintillationsröhrchen

- Mini POLY-Q, 6 mL
Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
- HD Polyethylene Scintillation Counter Vial
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

5.3.3 Scintillator

- OptiPhase HiSafe 2
Perkin Elmer, Shelton, USA
- Ultima Gold
Perkin Elmer, Shelton, USA

5.3.4 Radioaktiv-markierte Chemikalien

- [N-Methyl-³H]-Cocain
American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA
Spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol
Konzentration: 1 mCi/mL (gelöst in Ethanol)
- [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid
Amersham International plc, Amersham, Buckinghamshire, UK
Spezifische Aktivität: 0,052 Ci/mmol
Konzentration: 0,1 mCi/mL (gelöst in 2% Ethanol)
- [7-¹⁴C]-D-Methamphetaminhydrochlorid
American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA
Spezifische Aktivität: 50 mCi/mmol
Konzentration: 50 µCi/mL (gelöst in Ethanol)
- [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid
Amersham International plc, Amersham, Buckinghamshire, UK
Spezifische Aktivität: 0,056 Ci/mmol
Konzentration: 0,1 mCi/mL (gelöst in 50% Ethanol)

- [¹⁴C]-Mycophenolatnatrium
Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz
Spezifische Aktivität: 1,114 MBq/mg (381,3 Mbq/mmol)
Aktivität: 0,76 Mbq
Menge: 0,69 mg (fest)
- (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin
Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham, Buckinghamshire, UK
Spezifische Aktivität: 82 Ci/mmol
Konzentration: 1 mCi/mL
- [³H]-Tetrahydrocannabinol
American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA
Spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol
Konzentration: 1 mCi/mL (gelöst in 50% Ethanol)

5.4 HPLC-System

5.4.1 Geräte

Beim verwendeten HPLC-System handelte es sich um eine Standard-HPLC-Anlage bestehend aus einer Kontrolleinheit, zwei Pumpen, einem Degaser, einem Autosampler und einem Säulenofen. Zur Detektion wurde entweder ein UV-VIS-Detektor oder ein Massenspektrometer verwendet.

Beim verwendeten Surveyor MSQ handelt es sich um ein Single-Quad-Massenspektrometer mit beheizter ESI-Quelle, beim API 2000 dagegen handelt es sich um ein Triple-Quad-Massenspektrometer, ebenfalls mit beheizter ESI-Quelle.

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Controller	SCL-10A vp	Shimadzu Corporation, Kyoto Japan
Pumpen	LC-20AD prominence	Shimadzu Corporation, Kyoto Japan
Degaser	DGA-20A5 prominence	Shimadzu Corporation, Kyoto Japan
Autosampler	SIL-20A prominence	Shimadzu Corporation, Kyoto Japan
Säulenofen	CTO-20A prominence	Shimadzu Corporation, Kyoto Japan
UV-VIS-Detektor	Jasco UV-975	Jasco, Tokyo, Japan
Massenspektrometer	Surveyor MSQ	Dionex Corporation, Sunnyvale, USA
	API 2000 LC/MS/MS System	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
Software	Chromeleon 6.80	Dionex Corporation, Sunnyvale, USA
	Analyst 1.4	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA

5.4.2 Trennsäulen

- Reprosil-pur 120 Si 125 x 1,0 mm; 3 µm
Altmann-Analysentechnik-Vertriebs GmbH, Holzkirchen, Deutschland
- Shodex ODP2 HP-2D 150 x 1,0 mm
Showa Denko K.K. Chemicals Division, Kawasaki, Kanagawa, Japan
- ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm; 3,5 µm
Merck SeQuant AB, Umeå, Sweden

5.5 Probenahmesysteme

- Speichelsammelsystem
Saliva Collection System (vgl. Kapitel 1.6.5.3)
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
- Urinsammelsystem
Vacurette® Urine System
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

5.6 Klinischer Analyser, Reagentien, Kalibratoren und Kontrollen

- Olympus AU640 Clinical Chemistry Analyser
Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
- Amylase-Test
Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
- CEDIA® *Opiate OFT* (Speicheltest für Opiate, noch nicht kommerziell erhältlich)
Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA
- CEDIA® *Opiate Assay*
Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA
- DRI® *Cotinine Assay*
Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA
- DRI® *Cotinine Calibrator Kit*
Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA
- DRI® *Cotinine High Control*
Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA
- DRI® *Cotinine Low Control*
Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA
- Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit*
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

5.7 Speichelpool

Der Speichelpool wurde unter Verwendung des Greiner Bio-One *Saliva Collection Systems* (SCS) von Freiwilligen gewonnen. Entsprechend der Anleitung des Herstellers spülten die Freiwilligen ihre Mundhöhle zwei Minuten lang mit der *Saliva Extraction Solution*. Die gesamte in der Mundhöhle enthaltene Flüssigkeit wurde anschließend in einen *Saliva Collection Beaker* übergeführt.

Die auf diese Weise gewonnenen Speichelproben wurden sofort nach der Probennahme zu einem Speichelpool vereinigt und bei +4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.8 Nativer Humanspeichel

Der native Humanspeichel (ohne Zusätze) wurde durch direktes Spucken in einen Kunststoffbecher gesammelt.

5.9 Sonstige Materialien

- Einfrierröhrchen
Cryo.s 4 mL
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 17: Berechnung der eingesetzten Menge radioaktiv-markierter Analyte

Analyt	Cocain	Codein.HCl	Methamphetamin.HCl	Morphin.HCl	Mycophenolat-Na	Nicotin	Tetrahydrocannabinol
Isotop	³ H	¹⁴ C	¹⁴ C	¹⁴ C	¹⁴ C	³ H	³ H
MW [g/mol]	304	300	185,69	286	342,3	168	214,43
Konz [mCi/ml]	1	0,1	0,050	0,1	0,021	1	1
spez Aktivität [Ci/mmol]	80	0,05	0,050	0,06	0,010	82	85
spez Aktivität [Bq/mmol]	2,96 · 10 ¹²	1,924 · 10 ⁹	1,85 · 10 ⁹	2,072 · 10 ⁹	381,3 · 10 ⁶	3,034 · 10 ¹²	3,145 · 10 ¹²
10.000 DPM entsprechen x µl Stock	0,005	0,045		0,045		0,005	0,0045
5.000 DPM entsprechen x µl Stock			0,045		0,109		
Zielvolumen Speichelpool [ml]	50	50	25	50	25	50	150
µl Stock auf Zielvolumen*	2,25	22,52	11,26	22,52	27,20	2,25	6,76
tats. eingesetzte µl Stock auf Zielvolumen	10,00	25,00	15,00	25,00	30,00	10,00	36,75
Konzentration rad. Analyt [ng/ml]	0,76	288,46	111,41	255,36	825,07	0,41	0,62
100 µl Pool ausgezählt [DPM]	10.420	10.425	7.210	9.973	5.907	10.020	10.256
Konzentration nicht rad. Analyt [ng/ml]	10,00	-	-	-	-	10,00	5,00
Konz. der Stocksg. [µg/ml]	2,00	-	-	-	-	20,00	2,00
Stock zu Pool [µl]	250,00	-	-	-	-	25,00	375,00
Summe Analyt rad.+nicht rad. [ng/ml]	10,76	288,46	111,41	255,36	825,07	10,41	5,62

* unter der Annahme, daß in 100 µl fertigem Pool 10.000 bzw. 5.000 DPM ausgezählt werden können

6 Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One Saliva Collection System

6.1 Ziel des Versuchs

Das Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung der Wiederfindungsrate einiger potenzieller Analyte, nämlich Cocain, Codein, Methamphetamin, Morphin, Mycophenolsäure, Nicotin und Tetrahydrocannabinol, im Greiner Bio-One *Saliva Collection System* mittels radioaktiv-markierten Analyten.

6.2 Berechnung der eingesetzten Menge an radioaktiv-markierten Analyten

Die Berechnung der eingesetzten Menge radioaktiv-markierter Analyte ist in Tabelle 17 dargestellt.

6.3 Spiken des Speichelpools

Die in die oben berechnete Menge aufgeteilten Speichelpools wurden mit der entsprechenden Menge des radioaktiv-markierten Analyten gespickt. Die eingesetzte Menge des radioaktiven-markierten Analyten wurde so gewählt, daß in 100 µL gespickten Pool circa 10.000 dpm bzw. 5.000 dpm (bei [¹⁴C]-Mycophenolatnatrium und [7-¹⁴C]-D-Methamphetaminhydrochlorid) gemessen werden konnten. Der [N-Methyl-³H]-Cocain-, (-)-[N-methyl-³H]-Nicotin- und [³H]-Tetrahydrocannabinol-Pool wurde zusätzlich mit einer bestimmten Menge nicht-radioaktiven Analyten versetzt, da die Analytkonzentration im Speichelpool zu gering war um eine reale Probe zu simulieren (siehe Tabelle 17).

6.4 Durchführung des Versuchs

Pro radioaktiv-markiertem Analyt wurden fünf *Saliva Collection Beaker* mit je 9,5 mL (bei [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid, [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid, (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin, [N-Methyl-³H]-Cocain und [³H]-Tetrahydrocannabinol) bzw. je 4,5 mL (bei [¹⁴C]-Mycophenolatnatrium und [7-¹⁴C]-D-Methamphetaminhydrochlorid) radioaktiv-gespicktem Pool befüllt und anschließend bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Multi-Tube-Vortexers für 30 Minuten geschüttelt.

Aus jedem einzelnen *Saliva Collection Beaker* wurden 100 µL Probe entnommen, in ein Scintillationsröhrchen übergeführt und dort mit 4 mL Scintillator versetzt. Die Proben wurden anschließend kräftig geschüttelt und nach fünfminütigem Stehenlassen ausgezählt.

Entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers wurde der im *Saliva Collection Beaker* enthaltene Speichel in die *Saliva Transfer Tubes* aufgesaugt. Dabei konnten jeweils zwei *Saliva Transfer Tubes* befüllt werden.

Die *Saliva Transfer Tubes* wurden anschließend mittels eines Multi-Tube-Vortexers für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Aus jedem *Saliva Transfer Tube* wurden 100 µL Probe entnommen und in einem Scintillationsröhrchen mit 4 mL Scintillator vermischt. Nach kräftigem Schütteln und fünfminütigem Stehenlassen wurden die Proben ausgezählt.

Die Speichelproben wurden anschließend in den *Saliva Transfer Tubes* bei 2200g und Raumtemperatur zehn Minuten lang zentrifugiert. Aus dem Überstand jedes Röhrchens wurden 100 µL Probe entnommen, in ein Scintillationsröhrchen übergeführt und mit 4 mL Scintillator versetzt. Die Proben wurden geschüttelt, fünf Minuten stehengelassen und anschließend ausgezählt.

Im letzten Schritt wurde der Überstand von den *Saliva Transfer Tubes* abgenommen und in Einfrierröhrchen pipettiert. Die Proben wurden in diesem Gefäß nochmals für 30 Minuten mittels eines Multi-Tube-Vortexers bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden aus jedem Einfrierröhrchen 100 µL Probe entnommen und mit 4 mL Scintillator in einem Scintillationsröhrchen versetzt. Die Proben wurden geschüttelt und nach fünfminütigem Stehenlassen ausgezählt.

Das restliche Probenmaterial wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

7 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben mittels Immunoassay

7.1 Ziel des Versuchs

In diesem Versuch sollte eine Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt wurden, mittels eines Immunoassay, dem DRI® *Cotinine Assay*, am klinischen Analyser (Olympus AU640) entwickelt werden.

7.2 Durchführung des Versuchs

Beim DRI® *Cotinine Assay* handelt es sich um einen Immunoassay zur Bestimmung von Cotinin, dem Hauptmetaboliten von Nicotin (siehe Kapitel 2.5), aus dem Harn. Ausgehend von der geringfügig modifizierten Analysenmethode des Assay-Herstellers wurde versucht, eine optimierte Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt wurden, zu entwickeln.

7.2.1 Kalibration nach der Harnmethode

Im ersten Schritt wurde nach der Harnmethode (siehe Tabelle 18) mit den Originalkalibratoren, DRI® *Cotinine Calibrator*, der Firma Microgenics kalibriert. Die Kalibrationspunkte lagen bei 0, 100, 250, 500, 1000 und 2000 ng/mL; jeder Kalibrator wurde doppelt bestimmt.

Die Qualität der Kalibration wurde mit den drei Originalkontrollen (DRI® *Cotinine Control Low* 339 ng/mL, DRI® *Cotinine Control High* 752 ng/mL, DRI® *Cotinine Cut-Off Control* 518 ng/mL) von Microgenics überprüft.

Tabelle 19: Qualitätskontrollen (lt. Hersteller)

Kontrolle	Mittelwert	SD	Bereich	Grenzwerte
DRI® Cotinine Control Low	339	15,6	93,6	292-386
DRI® Cotinine Control High	752	24	144	680-824
DRI® Cotinine Cut-Off Control*	518	22,1	132,6	452-584

* 500 ng/mL Kalibrator aus dem Kalibrator Kit (DRI® Cotinine Calibrator 500 ng/mL)

Tabelle 18: Cotinin-Harnmethode lt. Hersteller (geringfügig modifiziert)

Probenvolumen	13 µL	
Reagensvolumen	R1:	87 µL
	R2:	87 µL
Wellenlänge	Primär:	340 nm
	Sekundär:	410 nm
Methode	Rate1	
Reaktionsverlauf	+	
Messpunkt 1	Erster:	13
	Letzter:	17
Kalibrationsart	6 AB	
Formel	EIA Typ 1	
Anzahl	2	

7.2.1.1 Bestimmung der Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision unter obiger Kalibration wurde durch das zehnmahlige Vermessen der Kalibratoren und Kontrollen als Probe bestimmt.

7.2.2 Vermessung von realen Speichelproben

Es wurden Speichelproben von zwei Rauchern und drei Nichtrauchern mit dem Cotinin-Assay mit der in Tabelle 18 beschriebenen Methode vermessen. Der Speichelanteil in den Proben wurde mit dem Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit* ermittelt (Methode siehe Tabelle 20).

Die Speichelproben wurden mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt, nach der Sammlung entsprechend der Vorschrift des Sammel-systemherstellers aufgearbeitet (zentrifugiert) und bis zur Analyse im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

Tabelle 20: Methode zur Bestimmung des Speichelanteils mit dem Greiner Bio-One Saliva Quantification Kit

Probenvolumen	20 µL	
Reagensvolumen	R1:	140 µL
	R2:	0 µL
Wellenlänge	Primär:	450 nm
	Sekundär:	520 nm
Methode	END	
Reaktionsverlauf	+	
Messpunkt 1	Erster	0
	Letzter	27
Kalibrationsart	5AB	
Formel	Spline	
Anzahl	2	

7.2.3 Einfluß des Speichelanteils auf die Kalibration

7.2.3.1 Probenvolumen 13 µL

Zur Untersuchung des Einflusses des Speichelanteils auf die Kalibration wurden Kalibratoren (0, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/mL Cotinin) mit drei verschiedenen Speichelanteilen, nämlich 25%, 50% und 75%, hergestellt. Dazu wurde eine 2000 ng/mL Cotinin-Stammlösung in Wasser mit den entsprechenden Mengen an nativen Humanspeichel und *Saliva Extraction Solution* pH 4,2 (SES) vermischt (siehe Tabelle 21).

Kalibriert wurde nach der in Tabelle 18 angegebenen Methode, der Speichelanteil wurde mit der Methode, die in Tabelle 20 angegeben ist, bestimmt. Im Anschluß an die Kalibrationen wurden die einzelnen Kalibratoren als Proben vermessen (Dreifachbestimmungen) und der Speichelanteil und die Cotinin-Konzentration bestimmt. Aus den Meßwerten wurden der Mittelwert und die relative Standardabweichung (RSD) ermittelt.

Tabelle 21: Schema zur Herstellung der Kalibratoren bei verschiedenen Speichelanteilen

Speichelanteil 25%

Zielwert Cotinin [ng/mL]	0	50	100	250	500	1000
Cotinin-Stammlösung [µL]	0	12,5	25	62,5	125	250
nativer Humanspeichel [µL]	125	112,5	100	62,5	0	0
SES [µL]	375	375	375	375	375	250

Speichelanteil 50%

Zielwert Cotinin [ng/mL]	0	50	100	250	500	1000
Cotinin-Stammlösung [µL]	0	12,5	25	62,5	125	250
nativer Humanspeichel [µL]	250	237,5	225	187,5	125	0
SES [µL]	250	250	250	250	1250	250

Speichelanteil 75%

Zielwert Cotinin [ng/mL]	0	50	100	250	500	1000
Cotinin-Stammlösung [µL]	0	12,5	25	62,5	125	250
nativer Humanspeichel [µL]	375	362,5	350	312,5	250	125
SES [µL]	125	125	125	125	125	125

Anmerkung: Aufgrund der hohen Konzentration des letzten Kalibrators (1000 ng/mL) ist der Speichelanteil dieses Kalibrators bei 25% Speichelanteil nicht exakt (grau dargestellt).

7.2.3.2 Probevolumen 35 µL

Es wurden die gleichen Kalibratoren wie beim obigen Versuch verwendet. Im Gegensatz zum obigen Versuch wurde jedoch das Probevolumen auf 35 µL erhöht, alle anderen Testparameter wurden nicht verändert.

Im Anschluß an die Kalibration wurden wieder alle Kalibratoren als Probe vermessen (Dreifachbestimmung) und der Speichelanteil und die Cotinin-Konzentration mit der modifizierten Methode (Probevolumen 35 µL) bestimmt. Aus den erhaltenen Meßwerten wurde der Mittelwert und die relative Standardabweichung (RSD) ermittelt.

7.2.4 Veränderung der spezifischen Testparameter

In diesen Versuchen wurde untersucht, ob sich die Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel durch die Veränderung des Reagenzien-Verhältnisses bzw. durch die Veränderung des Messzeitpunktes optimieren lässt.

Zur Kalibration wurden sieben Kalibratoren (0, 50, 100, 200, 350, 500 und 100 ng/mL Cotinin) in 50% Humanspeichel/SES-Mischung hergestellt. Kalibriert wurde nach der Ausgangsmethode (siehe Tabelle 18), mit Probevolumen 35 µL und sieben Kalibrationspunkten an Stelle von sechs.

Nach der Kalibration wurde das Reagenzenvolumen und/oder der Messzeitpunkt entsprechend verändert, die Kalibratoren unter den geänderten Bedingungen als Probe vermessen und die OD¹-Werte der einzelnen Proben ermittelt.

Tabelle 22: Testparameter spezifisch; die Werte für vv, xx, yy und zz werden bei den einzelnen Versuchen definiert

Probevolumen	35 µL	
Reagensvolumen	R1:	vv
	R2:	xx
Wellenlänge	Primär:	340 nm
	Sekundär:	410 nm
Methode	Rate1	
Reaktionsverlauf	+	yy
Messpunkt 1	Erster	zz

7.2.4.1 Variationen - erster Teil

Im ersten Versuchsteil wurde das Volumen von jeweils einem Reagens um ein Viertel verringert und/oder ein späterer Messpunkt gewählt (siehe Tabelle 23).

7.2.4.2 Variationen - zweiter Teil

Im zweiten Versuchsteil wurde eine systematische Änderung des Volumens von Reagens 2 (Enzym-Cotinin-Konjugat) ohne Veränderung der Messzeitpunkte untersucht (siehe Tabelle 24).

Tabelle 23: Variationen - erster Teil

Variation	Reagensvolumen		Messpunkt		Beschreibung
	R1	R2	Erster	Letzer	
Variation 0	87	87	13	17	Ausgangsmethode
Variation 1	87	87	20	25	späterer Messpunkt
Variation 2	65	87	13	17	ein Viertel weniger R1
Variation 3	65	87	20	25	ein Viertel weniger R1, späterer Messpunkt
Variation 4	87	65	13	17	ein Viertel weniger R2

Tabelle 24: Variationen - zweiter Teil

Variation	Reagensvolumen		Messpunkt		Beschreibung
	R1	R2	Erster	Letzer	
Variation 0	87	87	13	17	Ausgangsmethode
Variation 5	87	76	13	17	
Variation 6	87	65	13	17	ein Viertel weniger R2 (= Variation 4)
Variation 7	87	44	13	17	die Hälfte von R2
Variation 8	87	109	13	17	ein Viertel mehr R2

7.2.5 Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Zur Bestimmung der Grenzwerte wurden Speichelproben in verschiedenen Konzentrationen in 50% Humanspeichel/SES-Lösung hergestellt und jeweils drei Mal mit der optimierten Methode (Variation 4 bzw. 6, siehe Tabelle 25) vermessen. Kalibriert wurde mit sieben Kalibrationspunkten (0, 50, 100, 200, 350, 500 und 100 ng/mL Cotinin) in 50% Humanspeichel/SES-Mischung.

Die Mittelwert der entsprechenden OD-Werte der einzelnen Proben wurden mit dem Programm VALISTAT® ausgewertet und die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze ermittelt.

Tabelle 25: optimierte Methode zur Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel (Variation 4 bzw. 6)

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	13 µL		Kalibrationsart	7AB
Reagensvolumen	R1:	87 µL	Formel	EIA TYP 1
	R2:	65 µL	Anzahl	2
Wellenlänge	Primär:	340	Verfahren	KONZ
	Sekundär:	410	Steigungsprüfung	+
Methode	RATE1			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt 1	Erster:	13		
	Letzter:	17		

Tabelle 26: Schema zur Herstellung der gespikten Speichelproben zur Bestimmung der Grenzwerte; Cotinin-Stammlösung: 400 ng/mL

Zielwert [ng/mL]	0	4,8	10,4	15,2	20	24,8	30,4	35,2	40	44,8	50,4
Cotinin-Stammlsg. [µL]	0	6	13	19	25	31	38	44	50	56	63
Speichel [µL]	250	244	238	231	225	219	213	206	200	194	188
SES [µL]	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

7.2.6 Bestimmung des zufälligen und systematischen Fehlers

Der zufällige (Präzision) und systematische (Bias, Abweichung des Meßwertes vom „wahren Wert“) Fehler der Methode wurde durch das wiederholte Messen (Dreifachbestimmungen) zweier Qualitätskontrollen mit den Sollwerten 30 ng/mL und 150 ng/mL an sechs verschiedenen Arbeitstagen ermittelt.

Die Kalibration erfolgte täglich mit sieben Kalibrationspunkten (0, 50, 100, 200, 350, 500 und 100 ng/mL Cotinin) in 50% Humanspeichel/SES-Mischung.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm VALISTAT®.

7.2.7 Bestimmung der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Speichelanteil

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (Recovery) von Cotinin wurden sieben Speichelproben mit verschiedenen Speichelanteilen, nämlich 0%, 25%, 38%, 50%, 75% und 100%, mit 150 ng/mL Cotinin gespickt.

Zur Vermessung der gespickten Proben wurde auf zwei Olympus-Kanälen für die Cotinin-Messung mit zwei verschiedenen DRI® *Cotinine* Assays (unterschiedliche Chargen) mit sieben Kalibratoren (0, 50, 100, 200, 350, 500 und 1000 ng/mL Cotinin) kalibriert (Methode siehe Tabelle 25). Die Proben wurden pro Kalibration drei Mal gemessen.

Der Speichelanteil wurde mit dem Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit* bestimmt. Die Testparameter sind in Tabelle 20 (siehe Kapitel 3.2.2) zusammengefasst.

Tabelle 27: Schema zur Herstellung der gespickten Speichelproben zur Bestimmung der Wiederfindungsrate bei verschiedenen Speichelanteilen; Cotinin-Stammlösung: 4000 ng/mL

SA [%]	0	25	38	50	75	100
Zielwert Cotinin [ng/mL]	150	150	150	150	150	150
Cotinin-Stammlsg. [µL]	38	38	38	38	38	38
Humanspeichel [µL]	0	213	343	463	713	963
SES [µL]	963	750	620	500	250	0

8 Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

8.1 Ziel des Versuchs

Die Fragestellung dieses Versuches war die Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode zur Probenvorbereitung für die LC/MS-Analyse von Nicotin-, Cotinin- sowie Nornicotin-hältigen Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt wurden.

Die Methodenentwicklung erfolgte mit radioaktiv-markiertem Nicotin als Modellsubstanz für diese Analytgruppe.

8.2 Speichelpool

Der Speichelpool wurde unter Verwendung des *Saliva Collection Systems* (SCS) von 30 Freiwilligen gewonnen. Entsprechend der Anleitung des Herstellers spülten die Freiwilligen ihre Mundhöhle zwei Minuten lang mit der *Saliva Extraction Solution*. Die gesamte in der Mundhöhle enthaltene Flüssigkeit wurde anschließend in einen *Saliva Collection Beaker* übergeführt.

Die auf diese Weise gewonnenen Speichelproben wurde sofort nach der Probennahme zu einem Speichelpool vereinigt und bei +4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.3 Berechnung der eingesetzten Menge an radioaktiv-markierten Analyten

Die Berechnung der eingesetzten Menge des radioaktivmarkiertem Nicotin ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Berechnung der eingesetzten Menge an (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin

	(-)-[N-Methyl- ³ H]-Nicotin
Isotop	³ H
MW [g/mol]	168
Konzentration [mCi/mL]	1
spezifische Aktivität [Ci/mmol]	82
spezifische Aktivität [Bq/mmol]	3,034 · 10¹²
10.000 dpm entsprechen x µL Stammlösung	0,005
Zielvolumen Speichelpool [mL]	50
berechnete x µL Stammlösung auf Zielvolumen *	2,25
tatsächlich eingesetzte x µL Stammlösung auf Zielvolumen	10
Konzentration des radioaktiven Analyten [ng/mL]	0,41
x dpm in 100 µL ausgezähltem Pool	10.020
Konzentration nicht radioaktiver Analyt im Pool [ng/mL]	10
Konzentration der Stammlösung [µg/mL]	20
x µL Stammlösung zu Speichelpool	25
Summe Analyt (radioaktiv + nicht radioaktiv) [ng/mL]	10,41

* unter der Annahme, daß in 100 µL fertigem Speichelpool 10.000 dpm ausgezählt werden können

8.4 Spiken des Speichelpools

Das Spiken des Speichelpools ist in Kapitel 6.3 beschrieben. Es wurden das restliche Probenmaterial des Versuchs aus Kapitel 6 verwendet.

8.5 Durchführung des Versuchs

Ausgehend von der empfohlenen Methode des SPE-Säulchen-Herstellers wurden mehrere Festphasenextraktionen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um eine optimale Wiederfindung der Analyten zu gewährleisten.

8.5.1 Getestete Bedingungen

8.5.1.1 Vorbereitung der Probe

Pro Extraktion wurde 1 mL radioaktiv-gespikte Speichelprobe aus dem Einfrierröhrchen entnommen und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ameisensäure versetzt (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Vorbereitung der Probe (vor dem Auftragen)

Bedingung	Ameisensäuregehalt in der Probe
Pre 1	0%
Pre 2	1% (0,27 mmol)
Pre 3	2% (0,53 mmol)
Pre 4	5% (1,33 mmol)

8.5.1.2 Elution der Probe

Die Elution der Probe vom SPE-Säulchen erfolgte jeweils in 100 µL Schritten, um nachvollziehen zu können zu welchem Zeitpunkt der Hauptteil des Analyten eluiert wird. Es wurden unterschiedliche Elutionsmittelgemische untersucht

Tabelle 30: Zur Elution von (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin vom Extraktionssäulchen verwendete Lösungsmittelgemische

Bedingung	Zusammensetzung des Elutionsmittels
Elu 1	5% Ammoniak in 10% Acetonitril
Elu 2	5% Ammoniak in 20% Acetonitril
Elu 3	5% Ammoniak in 40% Acetonitril
Elu 4	5% Ammoniak in 80% Acetonitril
Elu 5	5% Ammoniak in 100% Acetonitril

8.5.2 Ablauf einer Festphasenextraktion

Alle Extraktionen unter den zu untersuchenden Bedingungen wurden nach unten angeführten Schema abgearbeitet.

- Vorbereitung der Probe
- Konditionieren der Extraktionssäulchen
Die stationäre Phase muss vor dem Beginn der Extraktion durch ein geeignetes Lösungsmittel benetzt werden, damit sie mit den Analyten in Wechselwirkung treten kann. Diese Konditionierung wurde in allen Versuchen mit 1 mL 1% Ameisensäure in Acetonitril durchgeführt.

- Äquilibrieren der Extraktionssäulchen
Bevor die Probe aufgetragen wird, muss die stationäre Phase mit einem Lösungsmittel äquilibriert werden. Das Lösungsmittel sollte in seinen Eigenschaften ähnlich der Probenmatrix sein und sollte die Retention der Analyte am Säulenmaterial günstig beeinflussen. Bei allen Versuchen wurden die Säulchen mit 1 mL 1% Ameisensäure in Wasser äquilibriert.
- Auftragen der entsprechend vorbereiteten Probe (1 mL)
- Waschen der Extraktionssäulchen
Nachdem die Probe aufgetragen wurde, müssen die Säulchen mit geeigneten Lösungsmittel gewaschen werden. Das Waschen der Säulchen mit je 1 mL 1% Ameisensäure in Wasser und je 1 mL 1% Ameisensäure in Acetonitril entfernt restliche Matrixbestandteile und nicht-basische Verbindungen.
- Elution der Analyte von den Extraktionssäulchen
Im letzten Schritt der Festphasenextraktion werden die Analyten mit einem geeigneten Lösungsmittel vom Extraktionssäulchen gewaschen. Das Lösungsmittel muss so gewählt werden, daß es eine möglichst vollständige Elution des Analyten vom Säulchen in einem möglichst kleinem Volumen bewirkt.
Die Elution wurde bei allen Versuchen in fünf 100-µL-Schritten mit den zu untersuchenden Lösungsmittelgemischen durchgeführt.
- Die einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion wurden in jeweils einem Scintillationsröhrchen aufgefangen, mit 4 mL Scintillator vermischt, geschüttelt und nach circa fünfminütigem Stehenlassen ausgezählt.

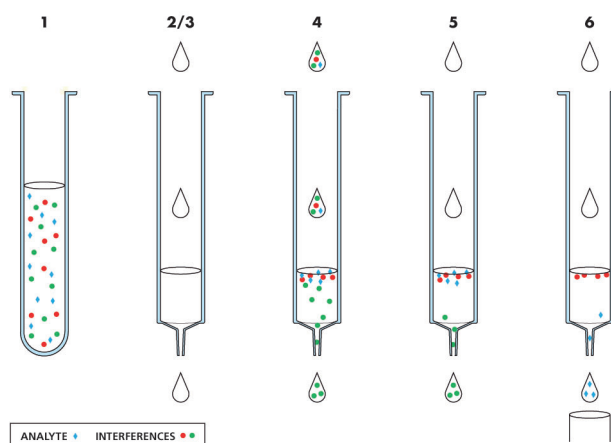


Abbildung 25: Schema einer Festphasenextraktion [Separtis]

- 1 ... Vorbereitung der Probe
2/3 ... Konditionieren und äquilibrieren der Extraktionssäulchen
4 ... Auftragen der Probe
5 ... Waschen - Entfernung der Interferenzen aus der Probe
6 ... Elution der Analyten vom Extraktionssäulchen

8.6 Bestimmung der Wiederfindungsrate für Nicotin, Cotinin und Nornicotin

Die Wiederfindungsrate (Extraktionsausbeute) für Nicotin, Cotinin und Nornicotin wurde mit der für Nicotin, Cotinin und Nornicotin optimierten LC/MS-Methode (Methode siehe Kapitel 9.8) nach den Richtlinien der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)* bestimmt. Dazu ist es notwendig bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen „mindestens sechs Wiederholbestimmungen nach Extraktion aus Matrix und direkt aus Lösemittel - ohne Extraktion -“ durchzuführen [Schmitt et al., 2003].

Zur Bestimmung der Extraktionsausbeute wurde gepoolte, analytfreie SES/Speichelmischung (Matrix) mit Cotinin, Nicotin und Nornicotin in zwei Konzentrationen, nämlich 20 ng/mL und 75 ng/mL, gespikt, in jeweils zehn 1-mL-Aliquote aufgeteilt, mit 50 µL iSt¹-Lösung (Cotinin-d₃ 1 µg/mL in Wasser) versetzt, gevortext und nach dem in Tabelle 31 angegebenen Festphasenextraktionsschema extrahiert.

Tabelle 31: Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin

	Volumen	Lösungsmittel
Konditionieren der SPE-Säulchen	1 mL	1% Ameisensäure in Acetonitril
Äquilibrieren der SPE-Säulchen	1 mL	1% Ameisensäure in Wasser
Auftragen der Probe Waschen	1 mL	Probe
	700 µL	1% Ameisensäure in Wasser
	700 µL	1% Ameisensäure in Acetonitril
Elution	500 µL	5% Ammoniak in 80% Acetonitril

Die Eluate der Festphasenextraktion wurden in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 1 mL Wasser aufgenommen und gevortext, davon wurden 100 µL ins LC/MS-System injiziert (LC/MS-Bedingungen siehe Tabelle 32).

Parallel dazu wurden Lösemittelproben (Wasser) in den Konzentrationen, 20 ng/mL und 75 ng/mL, hergestellt und in jeweils zehn 1-mL-Aliquote aufgeteilt. Von jedem Aliquot wurden 100 µL direkt ins LC/MS-System injiziert.

Die gemessenen Konzentrationen aus den Lösemittelproben und aus den Matrixproben wurden anschließend miteinander verglichen und die Extraktionsausbeute berechnet.

Tabelle 32: LC/MS-Methode zur Bestimmung von Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

Säule	Shodex ODP2 HP-2D (RP-Säule aus Polymer-Säulenmaterial)						
mobile Phase A	Acetonitril						
mobile Phase B	20 mM Ammoniumacetat pH 9,50						
Gradientenprogramm	von 13% Acetonitril (bei 0 min) auf 90% Acetonitril (bei 12 min), dann äquilibrieren bei 13% Acetonitril (bis 17 min)						
Injektionsvolumen	100 µL						
Säulentemperatur	50°C						
Flußrate	240 µL/min						
Detektion	Surveyor MSQ (Single Quad), SIM (single ion monitoring)						
	Ionisation Mode				ESI		
	Probe Temperature				400 °C		
		Mass (amu)	Span (amu)	Time Range (min)	Dwell Time (sec)	Polarity	Cone (volts)
	Cotinin	177,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70
	Cotinin-d ₃	180,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70
	Nicotin	163,3	0,5	5,00 - 10,00	1	+ve	60
	Nornicotin	149,2	0,5	8,00 - 17,00	1	+ve	60
Kalibratoren (Doppelbestimmung)	S1	10 ng/mL			je Analyt, gelöst in Wasser, + 50 µL iSt-Lösung (Cotinin-d ₃ 1 µg/mL in Wasser)		
	S2	50 ng/mL					
	S3	100 ng/mL					

9 Entwicklung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben

9.1 Fragestellung

Die Fragestellung dieses Versuchs war, die Entwicklung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt wurden.

9.2 Ausgangsbedingungen

Die Ausgangsbedingungen für die Methodenoptimierung zur Bestimmung von Cotinin und Nicotin aus Speichelproben ist in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Ausgangsbedingungen zur Entwicklung einer LC/MS zur Bestimmung von Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

Säule	Shodex ODP2 HP-2D x 1,0 mm (RP-Säule aus Polymer-Säulenmaterial)		
mobile Phase	30% Acetonitril		
	70% 20 mM Ammoniumacetat pH 10,10		
Injektionsvolumen	10 µL		
Säulentemperatur	50°C		
Flußrate	150 µL/min		
Detektion	UV, 260 nm		
Konzentration der Analyte	Cotinin	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Nicotin	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Nornicotin	zu diesem Zeitpunkt war Nornicotin noch nicht zur Analyse vorhanden	

Die Herstellung der mobilen Phase erfolgte bei allen Versuchen nach dem selben Prinzip. Nachdem Herstellen des entsprechenden Puffers wurden die benötigte Menge des Puffers und des organischen Lösungsmittel getrennt voneinander abgemessen und dann miteinander vermischt, um Fehler durch Volumenkontraktion beim Mischen zu vermeiden. Sofern nicht anders angegeben, ist die Zusammensetzung der mobilen Phase immer in Volumsprozent beschrieben.

9.3 Variation des organischen Anteils der mobilen Phase bei konstantem pH-Wert

Im Unterschied zu den Startbedingungen wurde der Acetonitril-Anteil reduziert, damit die Retention von Cotinin und Nicotin eventuell gesteigert werden kann (siehe Tabelle 34). Alle anderen Bedingungen wurden nicht verändert.

Tabelle 34: Variation des organischen Anteils der mobilen Phase

	Acetonitril [%]	Puffer [%]
Bedingung 1	30	70
Bedingung 2	18	82
Bedingung 3	13	87

Puffer ... 20 mM Ammoniumacetat pH 10,10

9.4 Auswahl eines geeigneten internen Standards für die UV-VIS-Detektion

Es wurden verschiedene (im Labor bereits vorhandene) Verbindungen, die aufgrund ihrer Struktur oder Polarität als potentieller interner Standard in Betracht gezogen werden konnten, in das in Tabelle 35 beschriebenen Trennsystem eingebracht und die Retentionszeit im Vergleich zu den Analyten bestimmt.

Tabelle 35: Chromatographische Bedingungen für die Auswahl eines geeigneten internen Standards

Säule	Shodex ODP2 HP-2D x 1,0 mm		
mobile Phase	13% Acetonitril		
	87% 20 mM Ammoniumacetat pH 10,10		
Injektionsvolumen	10 µL		
Säulentemperatur	50°C		
Flußrate	150 µL/min		
Detektion	UV-VIS-Detektor @ 260 nm		
Konzentration der Analyte	Cotinin	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Nicotin	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Nornicotin	25 ng/µL (in Wasser)	250 ng on column

Die untersuchten Verbindungen sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Tabelle 36: Getestete Verbindungen

Piperazine	1-Piperonylpiperazin N-Benzylpiperazin (1-Benzylpiperazin) 4-Benzylpiperidin N-Phenylpiperazin (1-Phenylpiperazin)
Lokalanästhetika	Lidocain Procain Benzocain
Amphetamin-Derivate bzw. amphetaminartige Verbindungen	MDMA p-Hydroxyamphetamin Cathinon Cathin Ephedrin
diverse	Coumarilsäure Thymol Chinolin Ketamin 2-Phenylimidazol Pyrazol 4'-Piperazinoacetophenon 1-Phenyl-3-Pyrazolidinon 1-Phenylpyrazol Octopamin Terbutalin 3-Hydroxy-4-Methoxyphenethylamin DL-Glutethimid

9.4.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate von Octopamin

Die im vorangehenden Versuch (Kapitel 9.4) gewonnenen Daten (siehe Kapitel 17.3) ergaben, daß von den untersuchten Verbindungen Octopamin am besten als interner Standard im gegebenen Trennsystem geeignet ist.

Da ein interner Standard bereits vor der Probenvorbereitung, also vor der Festphasenextraktion, zur Probe zugegeben wird, muss die Wiederfindungsrate des internen Standards aus der Probenmatrix bestimmt werden. Dazu wurden gepoolter, Nicotin-, Cotinin- und Octopamin-freier Speichel von Freiwilligen, der mit dem Greiner Bio-One Saliva Collection System gesammelt wurde, mit Octopamin (10 µg/mL) gespickt. Der gespickte Speichelpool wurde in 1-mL-Äquivalente portioniert. Parallel dazu wurde eine Vergleichslösung von Octopamin in Wasser (10 µg/mL) hergestellt und ebenfalls in 1-mL-Äquivalente aufgeteilt.

Die mit Octopamin gespickten Speichelproben wurden entsprechend der für Nicotin optimierten Festphasenextraktionsmethode extrahiert, in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft, der Rückstand wurde anschließend in 1 mL Wasser aufgenommen und davon wurden 10 µL ins Trennsystem injiziert. Die wässrige Octopamin-Vergleichslösung wurde direkt ins Trennsystem injiziert. Das Injektionsvolumen betrug hier ebenfalls 10 µL.

Die Octopamin-Wiederfindungsrate nach Extraktion aus der Speichelprobe wurde durch den Vergleich der Peakflächen von extrahierter Octopamin-Speichellösung und wässriger Octopamin-Referenzlösung bestimmt.

9.5 Änderung des pH-Wertes des Puffers bei konstantem organischen Anteil der mobilen Phase

Zur Untersuchung des Retentionsverhaltens der Analyte Nicotin, Cotinin, Nornicotin, Octopamin (iSt) und Coffein, unter verschiedenen pH-Wert-Bedingungen, wurde im folgenden Versuch der pH-Wert des Puffers, innerhalb seines Pufferbereiches (pH 8,3 bis 10,3), variiert.

Alle anderen chromatographischen Bedingungen (siehe Tabelle 37) wurden nicht verändert. Die Puffer mit den entsprechenden pH-Werten wurden vor dem Versuch einzeln hergestellt.

9.6 Änderung der Flußrate

Zur weiteren Beschleunigung der Trennung wurde die Möglichkeit der Erhöhung der Flußrate untersucht. Dabei wurde diese von 150 µL/min in 30 µL-Schritten bis auf 240 µL/min erhöht. Alle weiteren chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 38 aufgelistet.

Tabelle 37: Chromatographische Bedingungen - Änderung des pH-Wertes der mobilen Phase

Säule	Shodex ODP2 HP-2D x 1,0 mm (RP-Säule mit Polymer-Säulenmaterial)		
mobile Phase	13% Acetonitril		
	87% 20 mM Ammoniumacetat, auf verschiedenen pH-Werte zw. pH 8,3 und 10,3 eingestellt		
Injektionsvolumen	20 µL		
Säulentemperatur	50°C		
Flußrate	150 µL/min		
Detektion	UV, 260 nm		
Konzentration der Analyte	Cotinin	10 ng/µL (in Wasser)	200 ng on column
	Nicotin	10 ng/µL (in Wasser)	200 ng on column
	Nornicotin	25 ng/µL (in Wasser)	500 ng on column
	Octopamin (iSt)	10 ng/µL (in Wasser)	200 ng on column
	Coffein	10 ng/µL (in Wasser)	200 ng on column

Tabelle 38: Chromatographische Bedingungen - Änderung der Flußrate

Säule	Shodex ODP2 HP-2D (RP-Säule mit Polymer-Säulenmaterial)		
mobile Phase	13% Acetonitril		
	87% 20 mM Ammoniumacetat pH 9,10		
Injektionsvolumen	10 µL		
Säulentemperatur	50°C		
Flußrate	150 µL/min - 240 µL/min		
Detektion	UV, 260 nm		
Konzentration der Analyte	Cotinin	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Nicotin	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Nornicotin	25 ng/µL (in Wasser)	250 ng on column
	Octopamin (iSt)	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column
	Coffein	10 ng/µL (in Wasser)	100 ng on column

9.7 Entwicklung einer Gradiententrennung

9.7.1 Variation des Acetonitril-Anteils der mobilen Phase

Als Vorversuche zur Entwicklung einer Gradiententrennung wurde die Retentionszeit von Cotinin, Cotinin-d₃ (interner Standard), Nicotin und Nornicotin bei verschiedenen Acetonitril-Anteilen in der mobilen Phase bestimmt. Der pH-Wert des Puffers wurde nicht verändert (pH 9,50). Die Mischung der jeweiligen mobilen Phase erfolgte mit dem Gradientenmischsystem des HPLC-Systems.

9.7.2 Untersuchte Gradientenbedingungen

Die in Tabelle 39 aufgelisteten chromatographischen Bedingungen wurden - außer der mobilen Phase - nicht verändert. Die getesteten Gradientenbedingungen sind in Tabelle 40 angeführt.

Tabelle 39: Chromatographische Bedingungen - Vorversuche zur Gradiententrennung

Säule	Shodex ODP2 HP-2D x 1,0 mm (RP-Säule mit Polymer-Säulenmaterial)					
mobile Phase A	Acetonitril					
mobile Phase B	20 mM Ammoniumacetat pH 9,50					
Injektionsvolumen	1 µL					
Säulentemperatur	50°C					
Flußrate	240 µL/min					
Detektion	Surveyor MSQ (Single Quad), SIM (single ion monitoring)					
	Ionisation Mode			ESI		
	Probe Temperature			400 °C		
		Mass (amu)	Span (amu)	Time Range (min)	Dwell Time (sec)	Polarity
						Cone (volts)
	Cotinin	177,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve
	Cotinin-d3	180,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve
	Nicotin	163,3	0,5	5,00 - 10,00	1	+ve
	Nornicotin	149,2	0,5	8,00 - 17,00	1	+ve
Konzentration der Analyte	Cotinin	1 µg/mL (in Wasser)			1 ng on column	
	Cotinin-d ₃ (iSt)	1 µg/mL (in Wasser)			1 ng on column	
	Nicotin	1 µg/mL (in Wasser)			1 ng on column	
	Nornicotin	25 µg/mL (in Wasser)			2,5 ng on column	

Tabelle 40: Getestete Gradientenbedingungen

	Startzeitpunkt des Gradienten nach der Injektion [min]	Dauer des Gradienten [min]	Acetonitril-Anteil [%] am Beginn	Acetonitril-Anteil [%] am Ende	Äquilibrationszeit [min] unter Startbedingungen	Totale Laufzeit [min]
Gradient 1	0	13	13	60	10	25
Gradient 2	2	5	13	60	10	17
Gradient 3	2	5	13	70	10	17
Gradient 4	2	5	13	80	10	17
Gradient 5	1	6	13	80	10	17
Gradient 6	0	7	13	80	10	17
Gradient 7	0	12	13	80	5	17
Gradient 8	0	12	13	90	5	17

9.8 Bestimmung der Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden gepoolte, analytfreie Speichel-SES-Lösung mit Nicotin und Cotinin in den Konzentrationen 1 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL und 125 ng/mL gespickt, in 1-mL-Aliquote aufgeteilt, mit 50 µL iSt-Lösung (Cotinin-d₃, 1 µg/mL in Wasser) versetzt, gevortext und wie eine „normale“ Speichelprobe nach dem optimierten Festphasenextraktionsprotokoll (siehe Tabelle 41) extrahiert. Die Eluate der Festphasenextraktion wurden in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft, die Rückstände in 20 µL Wasser aufgenommen und gevortext, davon wurden anschließend 15 µL ins LC/MS-System injiziert (Bedingungen siehe Tabelle 42).

Die Kalibration erfolgte in der Matrix mit fünf Kalibratoren (5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL Nicotin und Cotinin), die jeweils doppelt bestimmt wurden. Die Kalibratoren wurden wie normale Speichelproben behandelt.

Tabelle 41: Festphasenextraktion von Cotinin, Nicotin und Nornicotin aus Speichelproben

	Volumen	Lösungsmittel
Konditionieren der SPE-Säulchen	1 mL	1% Ameisensäure in Acetonitril
Äquilibrieren der SPE-Säulchen	1 mL	1% Ameisensäure in Wasser
Auftragen der Probe	1 mL	Probe
Waschen	700 µL	1% Ameisensäure in Wasser
	700 µL	1% Ameisensäure in Acetonitril
Elution	500 µL	5% Ammoniak in 80% Acetonitril

Tabelle 42: LC/MS-Bedingungen

Säule	Shodex ODP2 HP-2D x 1,0 mm (RP-Säule mit Polymer-Säulenmaterial)						
mobile Phase A	Acetonitril						
mobile Phase B	20 mM Ammoniumacetat pH 9,50						
Gradientenprogramm	von 13% Acetonitril (bei 0 min) auf 90% Acetonitril (bei 12 min), dann äquilibrieren bei 13% Acetonitril (bis 17 min)						
Injektionsvolumen	15 µL						
Säulentemperatur	50°C						
Flußrate	240 µL/min						
Detektion	Surveyor MSQ (Single Quad), SIM (single ion monitoring)						
	Ionisation Mode				ESI		
	Probe Temperature				400 °C		
		Mass (amu)	Span (amu)	Time Range (min)	Dwell Time (sec)	Polarity	Cone (volts)
	Cotinin	177,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70
	Cotinin-d ₃	180,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70
	Nicotin	163,3	0,5	5,00 - 10,00	1	+ve	60
	Nornicotin	149,2	0,5	8,00 - 17,00	1	+ve	60
Kalibratoren (Doppelbestimmung)	S1	5 ng/mL				je Analyt (Cotnin und Nicotin), gelöst in Wasser, + 50 µL iSt-Lösung (Cotinin-d ₃ 1 µg/mL in Wasser)	
	S2	10 ng/mL					
	S3	50 ng /mL					
	S4	100 ng/mL					
	S5	200 ng/mL					

9.9 Bestimmung des zufälligen und des systematischen Fehlers

Zur Bestimmung des systemischen und zufälliges Fehlers wurden Vierfachbestimmungen von zwei Qualitätskontrollen mit den Sollwerten 20 ng/mL und 125 ng/mL Nicotin bzw. Cotinin an sechs verschiedenen Arbeitstagen durchgeführt.

Die Qualitätskontrollen wurden wie normale Speichelproben extrahiert. Vor der Festphasenextraktion (Bedingungen siehe Kapitel 9.8, Tabelle 41) wurden die 1-mL-Aliquote mit 50 µL iSt-Lösung (Cotinin-d₃, 1 µg/mL in Wasser) versetzt und gevortext. Die Eluate der Festphasenextraktion wurden in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft, die Rückstände in 20 µL Wasser aufgenommen und gevortext, davon wurden anschließend 15 µL ins LC/MS-System injiziert (Bedingungen siehe Kapitel 9.8, Tabelle 42).

Die Kalibration erfolgte in der Matrix mit fünf Kalibratoren (5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL Nicotin und Cotnin), die jeweils doppelt bestimmt wurden. Die Kalibratoren wurden nach dem selben Schema behandelt wie normale Speichelproben.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm VALISTAT®.

10 „Cotinin-Studie“

10.1 Ziel der Studie

Die Zielsetzung der „Cotinin-Studie“ war die Vermessung von Speichelproben von Rauchern und Nichtrauchern mit der in Kapitel 7 entwickelten Immunoassay-Methode und mit der in Kapitel 8 und 9 entwickelten Bestätigungsanalyse (SPE mit anschließender LC/MS-Analyse). Aus den gewonnen Daten sollte auch ein Cut-Off-Wert zur Abgrenzung zwischen Rauchern und Nichtrauchern abgeleitet werden.

10.2 Gewinnung der Speichel- und Harnproben für die Cotinin-Studie

Die Sammlung der Speichel- und Harnproben der im Rahmen der „Cotinin-Studie“ analysierten Speichelproben erfolgte mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) beziehungsweise dem Vacuette® *Urine Collection System* (ebenfalls Greiner Bio-One GmbH).

Die Auswahl der Probanden erfolgte anonym und nach keinen bestimmten Kriterien. Personen, die unter einer bekannten Überempfindlichkeit gegenüber Tartrazin (Bestandteil der Mundspüllösung)

sowie Acetylsalicyl- und/oder Benzoesäure litten, wurde geraten, nicht an der Studie teilzunehmen. Ebenso wurde Asthmatikern der Verzicht an der Studienteilnahme empfohlen. Ausgeschlossen von der Studienteilnahme waren Personen, bei denen eine freie Nasenatmung nicht gegeben war, sowie Personen mit Verletzungen im Bereich der Mundhöhle. Die Bereitschaft zur Abgabe einer Speichelprobe war Voraussetzung für die Studienteilnahme. Die Abgabe einer zusätzlichen Harnprobe war freiwillig.

Vor der Probennahme wurden die Probanden über mögliche Risiken und die Anwendung des *Saliva Collection Systems* und des *Vacurette® Urine Collection System* aufgeklärt.

Die Abnahme der Speichel- und Harnproben erfolgte durch die Probanden selbst, entsprechend der Anwendungsvorschriften des Herstellers der Sammelsysteme.

Nach der Probennahme wurde von den Probanden ein Datenblatt ausgefüllt. Von einem Teil der Raucher wurde zusätzlich die Anzahl der durchschnittlich pro Tag konsumierten Zigaretten erhoben, um die durchschnittliche tägliche Nicotin-Dosis abschätzen zu können.

Die Proben selbst wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

10.3 Analyse der Speichelproben und Harnproben

10.3.1 Probenvorbereitung

Die eingefrorenen Speichel- und Harnproben wurden vor der Analyse aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht, aufgeschüttelt und anschließend entsprechend des Protokoll des Sammelsystemherstellers für zehn Minuten bei 2200g zentrifugiert [Greiner Bio-One GmbH, 2008].

10.3.2 Bestimmung des Speichelanteils am Olympus AU640

Der Speichelanteil in den Speichelproben wurde mit dem Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit* entsprechend dem Protokoll des Testkit-Herstellers am klinischen Analyser, Olympus AU640, vermessen (vgl. Kapitel 1.6.5.3 und Tabelle 43).

Zur Kalibration wurden die fünf im Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit* enthaltenen Kalibratoren (siehe Tabelle 44) verwendet. Diese wurde anschließend an Hand von zwei internen Qualitätskontrollen (siehe Tabelle 44) überprüft [Greiner Bio-One GmbH, 2008].

Tabelle 43: Testparameter zur Bestimmung des Speichelanteils mit dem Greiner Bio-One Saliva Quantification Kit am Olympus AU640 [Greiner Bio-One GmbH]

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	50 µL		Kalibrationsart	5AB
Reagensvolumen	R1:	120 µL	Formel	POLYGONAL
	R2:	0 µL	Anzahl	2
Wellenlänge	Primär:	450	Verfahren	KONZ
	Sekundär:	520	Steigungsprüfung	keine
Methode	END			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt	Erster:	0		
	Letzter:	27		

Reagens (R1): gereinigtes Wasser

Tabelle 44: Kalibratoren und Kontrollen im Greiner Bio-One Saliva Quantification Kit [Greiner Bio-One GmbH, 2008]

Kalibrator	Konzentration [%]	Kontrolle	Sollwertintervall [%]
Cal 1	11	Control 1	28 - 32
Cal 2	27	Control 2	68 - 72
Cal 3	46		
Cal 4	66		
Cal 5	85		

10.3.3 Bestimmung des Cotinin-Gehalts in den Speichel- und Harnproben am Olympus AU640

Die Speichel- und Harnproben wurden mit dem DRI® *Cotinine* Assay am Olympus AU640 vermessen. Bei diesem Test handelt es sich um einen Immunoassay vom EMIT-Typ (vgl. Kapitel 4.4.2).

10.3.3.1 Vermessung der Harnproben

Die Harnproben wurden mit dem DRI® *Cotinine* Assay entsprechend eines modifizierten Testprotokoll (siehe Tabelle 45) am Olympus AU640 vermessen.

Zur Kalibration wurden die vom Testkit-Hersteller empfohlenen Kalibratoren und Kontrollen verwendet (siehe Tabelle 46).

Tabelle 45: spezifische Testparameter zur Bestimmung von Cotinin aus dem Harn mit dem DRI® *Cotinine* Assay am Olympus AU640

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	13 µL		Kalibrationsart	7AB
Reagensvolumen	R1	87 µL	Formel	EIA TYP 1
	R2	87 µL	Anzahl	2
Wellenlänge	Primär:	340	Verfahren	KONZ
	Sekundär:	410	Steigungsprüfung	+
Methode	RATE1			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt 1	Erster:	13		
	Letzter:	17		

Tabelle 46: Kalibratoren und Kontrollen DRI® *Cotinine* Assay für die Bestimmung von Cotinin aus dem Harn [Microgenics Corporation, 2003; 2007]

Kalibrator	Konzentration [ng/mL]	Kontrolle	Konzentration [ng/mL]
Cal Cot 1	0	Control Cot 1	300
Cal Cot 2	100	Control Cot 2	500
Cal Cot 3	250	Control Cot 3	700
Cal Cot 4	500		
Cal Cot 5	1000		
Cal Cot 6	2000		

Cut-Off-Wert: 500 ng/mL

10.3.3.2 Vermessung der Speichelproben

Die Speichelproben wurden mit dem DRI® *Cotinine* Assay entsprechend eines für Speichelproben optimierten Testprotokolls am Olympus AU640 vermessen (siehe Tabelle 47).

Die verwendeten Kalibratoren und internen Qualitätskontrollen (siehe Tabelle 48) wurden aus

Tabelle 47: spezifische Testparameter zur Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel mit dem DRI® *Cotinine* Assay am Olympus AU640

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	13 µL		Kalibrationsart	7AB
Reagensvolumen	R1	87 µL	Formel	EIA TYP 1
	R2	65 µL	Anzahl	2
Wellenlänge	Primär:	340	Verfahren	KONZ
	Sekundär:	410	Steigungsprüfung	+
Methode	RATE1			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt 1	Erster:	13		
	Letzter:	17		

zwei unterschiedlichen Cotinin-Stammlösungen durch Verdünnung mit einer konservierten Humanspeichel-SES-Mischung (Speichelanteil 50%) hergestellt.

Tabelle 48: Kalibratoren und Kontrollen DRI® Cotinine Assay für die Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel

Kalibrator	Konzentration [ng/mL]	Kontrolle	Konzentration [ng/mL]
Cal Cot Sal 1	0	Control Cot Sal 1	40
Cal Cot Sal 2	50	Control Cot 2	150
Cal Cot Sal 3	100		
Cal Cot Sal 4	200		
Cal Cot Sal 5	350		
Cal Cot Sal 6	500		
Cal Cot Sal 7	1000		

10.3.3.3 Bestimmung des Cotinin-Gehalts in den Speichelproben mittels LC/MS

10.3.3.3.1 Festphasenextraktion

Vor der LC/MS-Analyse wurden die Speichelproben mittels Festphasenextraktion gereinigt und aufkonzentriert. Dazu wurde aus jedem zentrifugierten *Saliva Transfer Tube* 1 mL Speichelprobe entnommen und in jeweils ein Reaktionsgefäß übergeführt. Die einzelnen Proben-Aliquote wurden jeweils mit 50 µL der Lösung des deuterierten internen Standards, Cotinin-methyl-d₃ (1 µg/mL in Wasser), versetzt und für zehn Sekunden gevortext.

Anschließend wurde die Festphasenextraktion entsprechend dem in Tabelle 49 dargestellten Extraktionsprotokoll durchgeführt.

Im Anschluß an die Festphasenextraktion wurden die Eluate in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft, die Rückstände in 20 µL Wasser wiederaufgenommen und gevortext.

Tabelle 49: Schema der Festphasenextraktion für Speichelproben zur Bestimmung von Cotinin, Nicotin und Nornicotin

	Volumen	Lösungsmittel
Konditionieren der SPE-Säulchen	1 mL	1% Ameisensäure/Acetonitril
Äquilibrieren der SPE-Säulchen	1 mL	1% Ameisensäure/Wasser
Auftragen der Probe	1 mL	Probe
Waschen	700 µL	1% Ameisensäure/Wasser
	700 µL	1% Ameisensäure/Acetonitril
Elution	500 µL	5% Ammoniak/80% Acetonitril

10.3.3.3.2 LC/MS-Analyse

Die in 20 µL Wasser rekonstituierten Extrakte der Speichelproben wurden mittels LC/MS-Analyse gemessen (Analysen-Bedingungen siehe Tabelle 50).

Die Kalibration erfolgte in der Matrix mit fünf Kalibratoren (5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL Nicotin und Cotinin), als Doppelbestimmung. Die Kalibratoren wurden analog normaler Speichelproben behandelt.

Die Qualitätskontrollen (20 ng/mL und 125 ng/mL) wurden wie normale Speichelproben behandelt. Jede Kontrolle wurde viermal gemessen.

Tabelle 50: LC/MS-Bedingungen

Säule	Shodex ODP2 HP-2D x 1,0 mm (RP-Säule mit Polymer-Säulenmaterial)
mobile Phase A	Acetonitril
mobile Phase B	20 mM Ammoniumacetat pH 9,50
Gradientenprogramm	von 13% Acetonitril (bei 0 min) auf 90% Acetonitril (bei 12 min), dann äquilibrieren bei 13% Acetonitril (bis 17 min)
Injektionsvolumen	15 µL
Säulentemperatur	50°C
Flußrate	240 µL/min

Tabelle 50 (Fortsetzung)

Detektion	Surveyor MSQ (Single Quad), SIM (single ion monitoring)						
	Ionisation Mode				ESI		
	Probe Temperature				400 °C		
		Mass (amu)	Span (amu)	Time Range (min)	Dwell Time (sec)	Polarity	Cone (volts)
	Cotinin	177,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70
	Cotinin-d3	180,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70
	Nicotin	163,3	0,5	5,00 - 10,00	1	+ve	60
	Nornicotin	149,2	0,5	8,00 - 17,00	1	+ve	60
Kalibratoren (Doppelbestimmung)	S1	5 ng/mL			je Analyt (Cotnin und Nicotin), gelöst in Wasser, + 50 µL iSt-Lösung (Cotinin-d3 1 µg/mL in Wasser)		
	S2	10 ng/mL					
	S3	50 ng /mL					
	S4	100 ng/mL					
	S5	200 ng/mL					
Kontrollen (Vierfachbestimmung)	Control Low	20 ng/mL					
	Control High	125 ng/mL					

11 Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben

11.1 Ziel des Versuchs

Das Ziel dieses Versuches war die Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode zur Probenvorbereitung für die LC/MS-Analyse von Opiat-hältigen Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt wurden.

Die Methodenentwicklung erfolgte mit radioaktiv-markiertem Morphin und Codein als Modellsubstanzen für diese Analytgruppe.

11.2 Berechnung der eingesetzten Menge an radioaktiv-markierten Analyten

Die Berechnung der eingesetzten Menge des radioaktiv-markierten Morphins und Codeins ist in Tabelle 51 dargestellt.

Tabelle 51: Berechnung der eingesetzten Menge des radioaktiv-markierten Morphins und Codeins

	<i>[N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid</i>	<i>[N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid</i>
Isotop	¹⁴ C	¹⁴ C
MW [g/mol]	286	300
Konzentration [Ci/mL]	0,1	0,1
spezifische Aktivität [Ci/mmol]	0,056	0,052
spezifische Aktivität [Bq/mmol]	2,070 · 10 ⁹	1,92 · 10 ⁹
10.000 dpm entsprechen x µL Stammlösung	0,045	0,045
Zielvolumen Speichelpool [mL]	50	50
berechnete x µL Stammlösung auf Zielvolumen *	22,52	22,52
tatsächlich eingesetzte x µL Stammlösung auf Zielvolumen	25	25
Konzentration des radioaktiven Analyten [ng/mL]	255,36	288,46
x dpm in 100 µL ausgezähltem Pool	9.973	10.425

* unter der Annahme, daß in 100 µL fertigem Speichelpool 10.000 dpm ausgezählt werden können

11.3 Spiken des Speichelpools

Das Spiken des Speichelpools ist in Kapitel 6.3 beschrieben. Es wurden das verbliebene Probenmaterial des Versuchs aus Kapitel 6 verwendet.

11.4 Versuche - Teil 1

11.4.1 Vorbereitung der Probe und der Extraktionssäulchen

Am Beginn der Methodenentwicklung wurden verschiedene Bedingungen zum Auftragen der Probe getestet. Dazu wurde jeweils ein 1-mL-Aliquot aus der gepoolten, mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespikten Speichelprobe entnommen und entsprechend der in Tabelle 52 zusammengefassten Bedingungen behandelt und auf das vorbereitete Extraktionssäulchen aufgetragen.

Die einzelnen Eluate wurden in einem Scintillationsröhrchen aufgefangen und mit 4 mL Scintillator versetzt. Nach kräftigem Schütteln und fünfminütigem Stehenlassen wurde die Probe im Scintillationszähler ausgezählt und so der Durchbruch des Analyten beim Auftragen der Probe bestimmt.

Tabelle 52: Bedingungen beim Auftragen der Probe auf das Extraktionssäulchen

Bedingung	Vorbehandlung der Speichelprobe	Säulchen	
		konditioniert mit	äquilibriert mit
Pre 1	keine Vorbehandlung	Methanol	Wasser
Pre 2	0,1 % Ameisensäure in der Probe	Methanol	Wasser
Pre 3	1% Ameisensäure in der Probe	Methanol	Wasser
Pre 4	1% Ameisensäure in der Probe, Proteinfällung mit 1:1 ACN, Überstand zur Extraktion verwendet	Methanol	Wasser
Pre 5	1% Ameisensäure in der Probe, Proteinfällung mit 1:1 ACN, Überstand 1:1 mit 0,1% Ameisensäure/Wasser verdünnt → Extraktion	Acetonitril	Wasser
Pre 6	1% Ameisensäure in der Probe, Proteinfällung mit 1:1 ACN, Überstand 1:2 mit 0,1% Ameisensäure/Wasser verdünnt → Extraktion	Acetonitril	Wasser
Pre 7	1% Ameisensäure in der Probe, Proteinfällung mit 1:1 ACN, Überstand 1:4 mit 0,1% Ameisensäure/Wasser verdünnt → Extraktion	Acetonitril	Wasser
Pre 8	1% Ameisensäure in der Probe, Proteinfällung mit 1:1 ACN, Überstand 1:9 mit 0,1% Ameisensäure/Wasser verdünnt → Extraktion	Acetonitril	Wasser
Pre 9	1% Ameisensäure in der Probe	Aceton	Wasser

11.4.2 Waschen der Extraktionssäulchen

In diesem Teil des Versuchs wurde das Durchbrechen des Analyten beim Waschen der Extraktionssäulchen untersucht. Zum Waschen wurden verschiedene Lösungsmittelmischungen verwendet (siehe Tabelle 53). Die Eluate wurden jeweils einem Scintillationsröhrchen gesammelt und mit 4 mL Scintillator versetzt. Die Proben wurden intensiv geschüttelt, nach fünf Minuten Wartezeit im Scintillationszähler ausgezählt und der Verlust an radioaktiv-markiertem Morphin beim Waschen ermittelt.

Tabelle 53: Bedingungen beim Waschen der Extraktionssäulchen

Bedingung	Waschlösung 1	Waschlösung 2
Wash 1	Wasser	Methanol
Wash 2	0,1% Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisensäure in Methanol
Wash 3	0,1% Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisensäure in Acetonitril
Wash 4	0,1% Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisensäure in Aceton

11.4.3 Elution der Analyte vom Extraktionssäulchen

Zur Bestimmung der Ausbeute der Festphasenextraktion wurde der radioaktiv-markierte Analyt unter verschiedenen Bedingungen vom Extraktionssäulchen eluiert (siehe Tabelle 54). Die Elution wurde in fünf 500-µL-Schritten durchgeführt und die einzelnen Fraktionen wurden in jeweils einem Scintillationsröhrchen aufgefangen.

Tabelle 54: Elutionsbedingungen

Bedingung	Elutionslösung
Elu 1	2% Ammoniak in Methanol
Elu 2	5% Ammoniak in Methanol
Elu 3	5% Ammoniak in Acetonitril
Elu 4	5% Ammoniak in Aceton

Die einzelnen Fraktionen wurden mit 4 mL Scintillator verestzt, kräftig geschüttelt und nach fünfminütigem Stehenlassen ausgezählt. Anschließend wurde die Recovery des [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid bestimmt.

11.4.4 Extraktion von gespikten Speichelproben mit anschließender LC/MS-Analyse

Reale Speichelproben wurden mit Morphin, Codein, Thebain, Morphin-3- β -Glucuronid und Morphin-6- β -Glucuronid in den Konzentrationen 1 μ g/mL, 10 ng/mL und 1 ng/mL (je Analyt) gespickt und nach folgendem Extraktionsprotokoll extrahiert:

- Vorbereitung der Probe
- 1 mL Probe wurde mit Ameisensäure so angesäuert, daß sich danach 1% Ameisensäure in der Probe befanden.
- Vorbereitung der Extraktionssäulchen
- Die SPE-Säulchen wurden zuerst mit Aceton konditioniert und anschließend mit Wasser äquilibriert.
- Auftragen der Probe (1 mL)
- Waschen der Extraktionssäulchen
- Die Säulchen wurden zuerst mit 1 mL 0,1% Ameisensäure in Wasser gewaschen, dann mit 1 mL 0,1% Ameisensäure in Aceton.
- Elution der Probe
- Die Probe wurde mit 500 μ L 5% Ammoniak in Aceton vom Extraktionssäulchen eluiert.

Die Eluate der Speichelproben wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 μ L 90% Acetonitril aufgenommen, gevortext und zur weiteren LC/MS-Analyse verwendet.

Die Trennsäule war eine ZIC-HILIC-Säule (150 x 1,0 mm, zwitterionische stationäre Phase für HILIC-Trennungen) und die mobile Phase setzte sich aus 70% Acetonitril und 30% 5 mM Ammonium-Formiat pH 3,75 zusammen. Die Flußrate betrug 50 μ L/min, die Säulentemperatur war 35°C und das Injektionsvolumen betrug 50 μ L. Zur Detektion wurde ein Triple-Quad-Massenspektrometer (API 2000) verwendet. Die MS-Bedingungen sind in Tabelle 55 zusammengefasst.

Tabelle 55: MS-Bedingungen (API2000)

Analyt	Q1 Mass	Q3 Mass	Collision Energy
Thebain	312,70	251,10	40
Codein	300,60	165,00	75
Morphin	286,45	165	57
Morphin-3-Glucuronid	463,10	285,90	50
Morphin-6-Glucuronid	463,10	285,0	50

11.5 Versuche - Teil 2

Im ersten Teil der Versuche wurde festgestellt, daß der gelbe Farbstoff (Tartrazin, interner Standard des Greiner-Bio One *Saliva Collection System*) die LC/MS-Analyse stört (Verschmutzung der Ionenquelle des Massenspektrometers). Daher wurde im zweiten Teil der Versuche eine Methode gesucht, mit der der gelbe Farbstoff aus der Probe möglichst vollständig entfernt wird und bei der eine maximale Extraktionsausbeute gegeben ist.

11.5.1 Gekoppelte Festphasenextraktion

In diesem Versuch wurde untersucht, ob sich das Tartrazin durch einen weiteren Extraktionsschritt über einen Anionenaustauscher aus der Probe entfernen lässt.

11.5.1.2 Vorversuch 1

Ein Isolute®-NH₂-SPE-Säulchen wurde mit Wasser konditioniert, anschließend wurde 1 mL SES/ Speichelmischung auf das Säulchen aufgetragen, das Eluat aufgefangen und dessen Farbe optisch bestimmt (farblos oder gelb).

11.5.1.2 Vorversuch 2

Ein Isolute®-NH₂-Säulchen wurde mit 1% Ameisensäure konditioniert und im Anschluß wurde eine angesäuerte SES/Speichelprobe (1% Ameisensäure in der Probe) aufgetragen. Das Eluat wurde aufgefangen und dessen Farbe optisch bestimmt (farblos oder gelb).

11.5.1.3 Vorversuch 3

Mit radioaktiv-markiertem Morphin gespikte Speichelproben (1 mL) wurden mit Ameisensäure angesäuert (1% Ameisensäure in der Probe) und auf ein mit 1% Ameisensäure konditioniertes Isolute®-NH₂-Säulchen aufgetragen. Das Eluat wurde in eine Scintillationsröhrchen aufgefangen und dessen Farbe optisch bestimmt (farblos oder gelb).

Anschließend wurden 4 mL Scintillator zugesetzt, die Probe gut geschüttelt, nach fünfminütigem Stehenlassen im Scintillationszähler ausgezählt und die Analyt-Recovery bestimmt.

11.5.1.4 Bestimmung der Extraktionsausbeute

11.5.1.4.1 Elution mit 5% Ammoniak in Aceton

Speichelproben, die mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespikt wurden, wurden mit Ameisensäure angesäuert (1% Ameisensäure in der Probe) und auf ein mit 1% Ameisensäure in Wasser aktiviertes Isolute®-NH₂-SPE-Säulchen aufgetragen. Das farblose Eluat wurde direkt auf ein Oasis® MCX Säulchen aufgebracht. Dieses wurde zuvor mit 0,1% Ameisensäure in Aceton konditioniert und mit 1% Ameisensäure in Wasser äquilibriert.

Gewaschen wurde mit jeweils 1 mL 0,1% Ameisensäure in Wasser und 0,1% Ameisensäure in Aceton. Die Elution erfolgte mit 200 µL 5% Ammoniak in Aceton. Die Elution wurde 7-fach durchgeführt. Alle Fraktionen wurden in einem Scintillationsröhrchen aufgefangen, mit 4 mL Scintillator versetzt, kräftig geschüttelt und nach fünfminütigem Stehenlassen ausgezählt. Anschließend wurde die Extraktionsausbeute von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid berechnet.

11.5.1.4.2 Elution mit 5% Ammoniak in Acetonitril

Die Versuchsanordnung war identisch dem Versuch in Kapitel 11.5.1.4.1. Anstelle von Aceton wurde jedoch Acetonitril verwendet.

11.5.2 Proteinfällung

In diesem Versuch wurde untersucht, ob der gelbe Farbstoff Tartrazin, mittels Proteinfällung und anschließender Festphasenextraktion aus der Speichelprobe entfernt werden kann.

11.5.2.1 Vorversuche zur Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln

Tabelle 56: Extraktionsbedingungen bei den Vorversuchen - Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln

Konditionieren*	0,1% Ameisensäure in Aceton bzw. 0,1% Ameisensäure in Acetonitril bzw. 0,1% Ameisensäure in Methanol
Probe auftragen	
Äquilibrieren	2% Ameisensäure in Wasser
Waschen	0,1% Ameisensäure in Wasser 0,1% Ameisensäure in Acetonitril
Elution	5% Ammoniak in Acetonitril

* Die Konditionierung des SPE-Säulchen erfolgte mit dem gleichen Lösungsmittel, das auch zur Fällung verwendet wurde.

11.5.2.1.1 Entfernung des Tartrazins aus der Probe

Jeweils 500 µL ungespikte Speichelproben wurden mit Aceton, Acetonitril und Methanol in verschiedenen Verhältnissen, nämlich 1+1, 1+1,5 und 1+2, gefällt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit fünf Teilen 1% Ameisensäure verdünnt. Der verdünnte Überstand wurde zur Festphasenextraktion verwendet und die Farbe der einzelnen Fraktionen optisch bewertet (farblos oder gelb).

11.5.2.2 Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (vgl. Kapitel 19.2.2.1) wurden die Proteinfällungsversuche mit Aceton in den Verhältnissen 1+2 und 1+1,5 mit radioaktiv-gespikten Speichelproben wiederholt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Verdünnung des Überstandes mit fünf Teilen 1% Ameisensäure in Wasser ausreichend ist, oder ob der Überstand stärker verdünnt werden muss (elf Teile 1% Ameisensäure in Wasser) um eine ausreichende Retention des Morphins am Säulchen zu gewährleisten.

500 µL, der mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespikten, Speichelprobe wurden mit 1 mL (1+2) bzw. 750 µL Aceton (1+1,5) versetzt, gevortext und danach zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und entsprechend den Verdünnungsstufen 1+5 und 1+11 mit 1% Ameisensäure in Wasser verdünnt (siehe Tabelle 57). Die verdünnten Überstände wurden anschließend zur Festphasenextraktion verwendet.

Tabelle 57: Schema der Proteinfällung und der Verdünnung

Proteinfällung			Verdünnung			Überstand	
Verhältnis	Probe	Aceton	Verhältnis	Überstand	1% Ameisensäure in Wasser	auf Säulchen aufgetragenes Volumen	org. Anteil vor dem Auftragen
1+1,5	500 µL	750 µL	1+5	1.250 µL	6.250 µL (6,25 mL)	7.500 µL (7,5 mL)	10% Aceton
			1+11	1.250 µL	13.750 µL (13,75 mL)	15.000 µL (15 mL)	5% Aceton
1+2	500 µL	1000 µL	1+5	1500 µL	7.500 µL (7,50 mL)	9.000 µL (9 mL)	11% Aceton
			1+11	1500 µL	16.500 µL (16,5 mL)	18.000 µL (18 mL)	5,5% Aceton

Die Festphasenextraktionen wurden aufgrund des großen Probenvolumens mit größeren Extraktionsäulchen, Oasis® MCX 3 cc/60 mg, durchgeführt. Die Säulchen wurden mit je 3 mL 0,1% Ameisensäure in Aceton konditioniert und mit 2% Ameisensäure in Wasser äquilibriert. Anschließend wurde die Probe in 3-mL-Schritten aufgetragen. Nach dem Waschen mit je 3 mL 0,1% Ameisensäure in Wasser und 0,1% Ameisensäure in Acetonitril, wurde in vier 400-µL-Schritten mit 5% Ammoniak in Acetonitril eluiert.

Die einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion wurden in Scintillationsröhrchen aufgefangen und mit 4 mL Scintillator vermischt. Nach kräftigem Schütteln und fünfminütigem Stehenlassen wurden die Fraktionen ausgezählt und die Extraktionsausbeute bestimmt.

11.5.2.2.1 Bestimmung der Extraktionsausbeute

Die Extraktionsausbeute wurde durch wiederholtes Extrahieren einer gepoolten, mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespikten Speichelprobe untersucht. Fünf 500-µL-Aliquote wurden mit 1.000 µL Aceton (1+2) gefällt. Im Anschluß an das Zentrifugieren wurden die Überstände mit 7.500 µL 1% Ameisensäure in Wasser verdünnt und zur Extraktion verwendet.

Zum Vergleich wurden parallel fünf 500-µL-Aliquote der gleichen Speichelprobe mit 1.000 µL Acetonitril (1+2) gefällt, die Überstände nach dem Zentrifugieren mit 7.500 µL 1% Ameisensäure in Wasser verdünnt und extrahiert.

Die Extraktion wurde nach dem in Kapitel 11.5.2.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

11.5.2.3 Reduktion des Probenvolumens

Gegenstand dieses Versuchs war es, das Probenvolumen, das zur Festphasenextraktion verwendet wird, bei konstantem organischen Anteil auf ein kleineres Volumen zu reduzieren und gleichzeitig dabei das Tartrazin aus der Probe zu entfernen.

Es wurde eine ungespikte, gepoolte Speichelprobe in 500-µL-Aliquote aufgeteilt, mit Aceton bzw. Acetonitril sowie 1% Ameisensäure in Wasser verdünnt (siehe Tabelle 58). Nach dem Vortexen und Zentrifugieren wurde die Festphasenextraktion durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und deren Farbe wurde optisch bewertet (farblos oder gelb).

Tabelle 58: Verdünnungsschema vor der Festphasenextraktion

Speichelprobe [μL]	Aceton bzw. Acetonitril [μL]	1% Ameisensäure in Wasser [μL]	Probenvolumen vor Festphasenextraktion [μL]	org. Anteil in Probe vor Festphasenextraktion
500	650	5850	7000	9,30%
500	350	2650	3500	10,00%
500	200	1300	2000	10,00%
500	100	400	1000	10,00%

11.5.2.3.1 Bestimmung der Extraktionsausbeute

Die Extraktionsausbeute wurde durch wiederholtes Extrahieren einer gepoolten, mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespickten Speichelprobe untersucht. 500 mL Speichelprobe wurden mit 100 μL Acetonitril und 400 mL 1% Ameisensäure in Wasser versetzt, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand (1 mL) wurde zu Festphasenextraktion verwendet.

Die Extraktionssäulen wurden mit 1 mL 1% Ameisensäure in Acetonitril konditioniert und mit 1 mL 1% Ameisensäure in Wasser äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe (1 mL) wurde mit 1 mL 0,1% Ameisensäure in Wasser und 1 mL 0,1% Ameisensäure in Acetonitril gewaschen. Die Probe wurde mit 500 μL 5% Ammoniak in Acetonitril eluiert.

Zur Bestimmung der Extraktionsausbeute wurden die einzelnen Fraktionen in einem Scintillationsröhrchen gesammelt, mit 4 mL Scintillator vermischt und kräftig geschüttelt. Nach fünf Minuten wurden die Fraktionen im Scintillationszähler ausgezählt.

12 Untersuchung des Retentionsverhalten von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen

12.1 Ziel des Versuchs

Das Ziel dieses Versuchs war die Untersuchung des Retentionsverhaltens von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs und Morphin-Metaboliten (Morphin, Codein, Thebain sowie Morphin-3-β-Glucuronid und Morphin-6-β-Glucuronid) in einem *zwitter ionic - hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) Trennsystem und in einem Normalphasen-Trennsystem.

12.2 Untersuchung der Retention im ZIC-HILIC-Trennsystem

12.2.1 70% organischer Anteil in der mobilen Phase

Die Beeinflussung des Retentionsverhaltens von Morphin, Codein, Morphin-3-β-Glucuronid und Morphin-6-β-Glucuronid unter Verwendung von verschiedenen mobilen Phasen mit einem organischen Anteil von 70% und 30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75 wurde untersucht.

Ausgehend von 70% Acetonitril in der mobilen Phase wurde schrittweise ein anderes Lösungsmittel (Methanol, Tetrahydrofuran, Ethanol, Isopropanol sowie n-Propanol) in verschiedenen Verhältnissen zum Acetonitril zugesetzt (siehe Tabelle 59) und die Retentionszeit der Analyte bestimmt.

Tabelle 59: Übersicht über die untersuchten chromatographische Bedingungen

Säule	ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm; 3,5 μm		
mobile Phase	70% Acetonitril (mit und ohne Zusatz von anderen org. Lösungsmitteln, siehe Tabelle 60)		
	30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75 (Gesamtkonzentration 1,5 mM)		
Injektionsvolumen	20 μL		
Säulentemperatur	35°C		
Flußrate	50 μL/min		
Detektion	UV, 212 nm		
Analyte	Morphin	10 ng/μL (in Acetonitril)	200 ng on column
	Codein	10 ng/μL (in in Acetonitril)	200 ng column
	Morphin-3-β-Glucuronid	10 ng/μL (in Acetonitril)	200 nn column
	Morphin-6-β-Glucuronid	10 ng/mL (in Acetonitril)	200 ng on column

Tabelle 60: Zusatz von anderen Lösungsmitteln zum organischen Anteil der mobilen Phase

zugesetztes Lösungsmittel	Verhältnis Acetonitril zu zuges. Lösungsmittel				
Methanol	100 : 0	98 : 2	95 : 5	90 : 10	60 : 40
Tetrahydrofuran	100 : 0	98 : 2	95 : 5	90 : 10	--
Ethanol	100 : 0	98 : 2	--	--	--
Isopropanol	100 : 0	98 : 2	--	--	--
n-Propanol	100 : 0	98 : 2	--	--	--

durch Volumenkontraktion beim Mischen zu vermeiden. Sofern nicht anders angegeben, ist die Zusammensetzung der mobilen Phase immer in Volumsprozent beschrieben.

Die Herstellung der mobilen Phase erfolgte bei allen Versuchen nach dem selben Prinzip. Nachdem Herstellen des entsprechenden Puffers wurden die benötigte Menge des Puffers und der organischen Lösungsmittel getrennt voneinander abgemessen und dann miteinander vermischt, um Fehler

12.2.2 85% organischer Anteil in der mobilen Phase

Die Beeinflussung des Retentionsverhaltens von Morphin, Codein, Morphin-3- β -Glucuronid und Morphin-6- β -Glucuronid unter Verwendung von verschiedenen mobilen Phasen mit einem organischen Anteil von 85% und 15% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75 wurde untersucht. Ausgehend von 85% Acetonitril in der mobilen Phase wurde schrittweise ein anderes, stärker eluierendes Lösungsmittel (Methanol, Ethanol sowie Isopropanol) in verschiedenen Verhältnissen zum Acetonitril zugesetzt (siehe Tabelle 61) und die Retentionszeit der Analyte bestimmt.

Tabelle 61: Übersicht über die untersuchten chromatographische Bedingungen

Säule	ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm; 3,5 μ m		
mobile Phase	85% Acetonitril (mit und ohne Zusatz von anderen org. Lösungsmitteln, siehe Tabelle 62)		
	15% 10 mM Ammoniumformiat pH 3,75 (Gesamtkonzentration 1,5 mM)		
Injektionsvolumen	20 μ L		
Säulentemperatur	35°C		
Flußrate	50 μ L/min		
Detektion	UV, 285 nm		
Analyte	Morphin	10 ng/ μ L (in Acetonitril)	200 ng on column
	Codein	10 ng/ μ L (in in Acetonitril)	200 ng column
	Morphin-3- β -Glucuronid	10 ng/ μ L (in Acetonitril)	200 nn column
	Morphin-6- β -Glucuronid	10 ng/mL (in Acetonitril)	200 ng on column

Tabelle 62: Zusatz von anderen Lösungsmitteln zum organischen Anteil der mobilen Phase

zugesetztes Lösungsmittel	Verhältnis Acetonitril zu zuges. Lösungsmittel		
Methanol	100 : 0	90 : 10	60 : 40
Tetrahydrofuran	100 : 0	90 : 10	60 : 40
Isopropanol	100 : 0	90 : 10	60 : 40

12.3 Untersuchung der Retention in einem Normalphasen-Trennsystem auf einer Reprosil-Silica-Säule

12.3.1 Änderung des organischen Anteils der mobilen Phase

Als Ausgangsbedingung für die Versuche auf der Reprosil-Silica-Säule wurde eine mobile Phase aus 70% Acetonitril und 30% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 gewählt. Der organische Anteil wurde in weiterer Folge auf 80%, 82% und 85% Acetonitril erhöht.

Die Herstellung der mobilen Phase erfolgte bei allen Versuchen nach dem selben Prinzip. Nachdem Herstellen des entsprechenden Puffers wurden die benötigte Menge des Puffers und des organischen Lösungsmittel getrennt voneinander abgemessen und dann miteinander vermischt, um Fehler durch Volumenkontraktion beim Mischen zu vermeiden. Sofern nicht anders angegeben, ist die Zusammensetzung der mobilen Phase immer in Volumsprozent beschrieben.

Tabelle 63: Übersicht über die getesteten chromatographische Bedingungen

Säule	Reposil-pur 120 Si; 125 x 1,0 mm; 3,5 µm		
mobile Phase	70% - 85% Acetonitril		
	30 - 15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80		
Injektionsvolumen	20 µL		
Säulentemperatur	35°C		
Flußrate	60 µL/min		
Detektion	UV, 285 nm		
Analyte	Thebain	10 ng/µL (in Acetonitril)	200 ng on column
	Codein	10 ng/µL (in Acetonitril)	200 ng on column
	Morphin	10 ng/µL (in in Acetonitril)	200 ng column
	Morphin-6-β-Glucuronid	10 ng/µL (in Acetonitril)	200 nn column
	Morphin-3-β-Glucuronid	10 ng/mL (in Acetonitril)	200 ng on column

12.3.2 Änderung der Zusammensetzung des organischen Anteils der mobilen Phase

Die Morphin-Glucuronide wiesen unter 85% Acetonitril/15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 eine sehr starke Retention auf. Aus diesem Grund wurde das Retentionsverhalten der Analyte unter geänderten Bedingungen untersucht. Ein Teil des Acetonitril wurde durch ein anderes, stärker eluierendes Lösungsmittel (Methanol und Isopropanol) ersetzt (siehe Tabelle 64) und so die Retention der Analyte im geänderten Trennsystem bestimmt.

Tabelle 64: Zusatz von anderen Lösungsmitteln zum organischen Anteil der mobilen Phase

zugesetztes Lösungsmittel	Verhältnis Acetonitril zu zuges. Lösungsmittel	
Methanol	90:10	80:20
Isopropanol	90:10	80:20

12.3.3 Änderung der Pufferkonzentration

Im nächsten Schritt wurde der Einfluß der Pufferkonzentration auf das Retentionsverhalten der Analyte untersucht. Die mobile Phase setzte sich in diesem Versuch aus 85% Acetonitril/Isopropanol 80:20 und 15% Ammoniumacetat pH 3,80 in den Pufferkonzentrationen 20 mM, 40 mM, 80 mM, 160 mM und 240 mM zusammen. Die übrigen chromatographischen Bedingungen wurden nicht verändert und sind in Tabelle 63 zusammengefasst.

12.3.4 Änderung der Säulentemperatur

Die Beeinflussung der Trennung durch die Temperatur wurde im letzten Versuchsteil untersucht. Als mobile Phase wurde 82% Acetonitril und 18% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 verwendet. Die Säulentemperatur wurde ausgehend von 35°C über 55°C auf 75°C erhöht. Alle anderen chromatographischen Bedingungen wurden nicht verändert und sind in Tabelle 63 dargestellt.

13 „Mohn-Studie“

13.1 Ziel der „Mohn-Studie“

Das Ziel der „Mohn-Studie“ war der Nachweis von Opium-Alkaloiden vom Morphinan-Type aus dem Speichel nach der Aufnahme größerer Mengen alkaloidhaltigen Speisemohns mit einem neu entwickelten Immunassay.

13.2 Gewinnung der Speichel- und Harnproben für die Mohnstudie-Studie

Die Sammlung der Speichel- und Harnproben der im Rahmen der „Mohn-Studie“ analysierten Speichelproben erfolgte mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) beziehungsweise dem Vacuette® *Urine Collection System* (ebenfalls Greiner Bio-One GmbH).

Die Auswahl der zehn Probanden erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Mindestalter 18 Jahre
- keine Einnahme von opiathaltigen Medikamenten und/oder Drogen
- keine Einnahme von mohnhaltigen Speisen für die Dauer von einer Woche vor dem Studientag
- Geschlechtsverteilung: fünf Frauen, fünf Männer

Personen, die unter einer bekannten Überempfindlichkeit gegenüber Tartrazin (Bestandteil der Mundspüllösung) sowie Acetylsalicyl- und/oder Benzoesäure litten, wurde geraten nicht an der Studie teilzunehmen. Ebenso wurde Asthmatikern der Verzicht an der Studienteilnahme empfohlen. Ausgeschlossen von der Studienteilnahme waren Personen, bei denen eine freie Nasenatmung nicht gegeben war sowie Personen mit Verletzungen im Bereich der Mundhöhle.

Vor der Probennahme wurden die Probanden über mögliche Risiken und die Anwendung des *Saliva Collection Systems* und des Vacuette® *Urine Collection System* aufgeklärt. Die Abnahme der Speichel- und Harnproben erfolgte durch die Probanden selbst, entsprechend der Anwendungsvorschriften des Herstellers der Sammelsysteme.

13.3 Mohn-Analyse

Zur Bestimmung des Morphin-Gehalts des im Rahmen der „Mohn-Studie“ verzehrten Speisemohn wurden zehn Gramm des Mohns mit 30 mL Extraktionsmittel (Methanol mit 0,1% Eisessig) in einem verschlossenen Zentrifugenröhrchen für circa eine Stunde im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden die Mohnproben für zehn Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen (Extraktionsmethode modifiziert nach [Sproll, 2005; Sproll et al., 2006]).

Der Überstand wurde 1:30 mit Acetonitril verdünnt und ins HPLC-System injiziert.

Zur Trennung wurde eine Reprosil-pur 120 Si Säule (125 x 1,0 mm) und eine mobile Phase aus 85% Acetonitril und 15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 verwendet. Die Flußrate betrug 120 µL/min und die Säulentemperatur 50°C. Zur Detektion wurde ein UV-VIS-Detektor verwendet, die Detektionswellenlänge betrug 285 nm.

13.4 Ablauf der Studie

13.4.1 Vor der Mohn-Aufnahme

Jeder Proband gab vor der Mohn-Aufnahme zwei Speichelproben (SES pH 4,2 und SES pH 8,0) und eine Harnprobe ab. Die Spüldauer bei der Speichelsammlung betrug pro Spüllösung zwei Minuten. Die Probanden 1 bis 5 spülten zuerst mit SES pH 4,2 und dann mit SES pH 8,0. Die Probanden 6 bis 10 spülten zuerst mit SES pH 8,0 und anschließend mit SES pH 4,2. Vor und zwischen der Probennahme mussten die Probanden ihre Mundhöhle mit Mineralwasser ausspülen.

13.4.2 Mohn-Aufnahme

Die verzehrte Mohn-Menge richtete sich nach dem Körpergewicht des Probanden und war so gewählt, daß pro Kilogramm Körpergewicht etwa 0,17 mg Morphin mit dem Mohn aufgenommen wurden. Bei einem Körpergewicht von beispielsweise 70 kg betrug die Mohnmenge etwa 100 g und die Morphin-Dosis etwa 12 mg.

13.4.3 Nach der Mohnaufnahme

Nach dem Verzehr des Mohns musste sich jeder Proband die Zähne putzen, die Zahnzwischenräume mit Zahnseide reinigen und den Mund drei Mal für zwei Minuten mit Mineralwasser spülen, um eine mögliche Kontamination der Speichelproben durch Mohnsamen zu vermeiden.

Die Abgabe der Speichelproben erfolgte nach dem in Tabelle 65 dargestellten Zeitplan. Pro Sammelzeitpunkt wurden zwei Speichelproben (SES pH 4,2 und SES pH 8,0) gesammelt. Die Spüldauer betrug zwei Minuten. Proband 1 bis 5 spülten zuerst sauer (SES pH 4,2), dann basisch (SES pH 8,0). Die Probanden 6 bis 10 spülten zuerst mit SES pH 8,0 und anschließend mit SES pH 4,2. Vor und zwischen der Probenabgabe mussten die Probanden den Mund mit Mineralwasser spülen. Die Harnproben wurden stündlich nach der Mohnaufnahme abgegeben.

Tabelle 65: Zeitplan zur Abgabe der Speichel- und Harnproben

Abnahmezeitpunkt	Speichel	Harn
0	vor der Mohnaufnahme	vor der Mohnaufnahme
Mohnaufnahme		
1	+ 25 min	+ 1 Stunde
2	+ 45 min	+ 2 Stunden
3	+ 75 min	+ 3 Stunden
4	+ 2 Stunden	+ 4 Stunden
5	+ 3 Stunden	+ 5 Stunden
6	+ 4 Stunden	+ 6 Stunden
7	+ 6 Stunden	+ 7 Stunden
8	+ 8 Stunden	+ 8 Stunden

Die Speichelproben wurden vor dem Aufsaugen ins *Saliva Transfer Tube* im *Saliva Collection Beaker* gewogen um die Probenmenge zu bestimmen. Nach dem Aufsaugen wurde der Proben ins *Saliva Transfer Tube* wurden diese kräftig geschüttelt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Die Harnproben wurde vom *Urine Collection Beaker* in ein Transferröhrchen aufgesaugt und ebenfalls bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

13.5. Analyse der Speichel- und Harnproben

13.5.1 Probenvorbereitung

Die eingefrorenen Speichel- und Harnproben wurden vor der Analyse aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht, aufgeschüttelt und anschließend entsprechend des Protokolles des Sammelstherstellers für zehn Minuten bei 2200g zentrifugiert [Greiner Bio-One GmbH, 2008]. Ein Aliquot der zentrifugierten Harnprobe wurde vor der Analyse 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

13.5.2 Bestimmung des Speichelanteils

Der Speichelanteil in den Speichelproben wurde mit dem Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit* entsprechend dem Protokoll des Testkit-Herstellers am klinischen Analyser, Olympus AU640, vermessen (vgl. Kapitel 1.6.5.3 und Kaptiel 10.3.2, Tabelle 43).

Zur Kalibration wurden die fünf im Greiner Bio-One *Saliva Quantification Kit* enthaltenen Kalibratoren verwendet. Diese wurde anschließend an Hand von zwei internen Qualitätskontrollen (vgl. Kapitel 10.3.2, Tabelle 44) überprüft [Greiner Bio-One GmbH, 2008].

13.5.3 Bestimmung der Opiat-Konzentration in den Speichelproben

Die Opiat-Konzentration in den Speichelproben wurde mit dem neu entwickelten Microgenics CEDIA® *Opiate OFT* (Prototyp, noch nicht am Markt erhältlich), am Olympus AU640 bestimmt. Zur Kalibration wurden sieben Kalibratoren und zwei interne Qualitätskontrollen verwendet (siehe

Tabelle 66).

Die Testparameter der Methode sind in Tabelle 67 dargestellt.

Tabelle 66: Kalibratoren und Kontrollen zur Bestimmung von Opiaten aus dem Speichel mit dem neuen Immunoassay

Kalibrator	Konzentration [ng/mL]	Kontrolle	Sollkonzentration [ng/mL]
OpiS-Cal 1	0 (negativ)	OpiS-Control Low	5
OpiS-Cal 2	2,5	OpiS-Control High	16
OpiS-Cal 3	5		
OpiS-Cal 4	7		
OpiS-Cal 5	10		
OpiS-Cal 6	13		
OpiS-Cal 7	18		

Tabelle 67: Testparameter zur Bestimmung der Opiat-Konzentration im Speichel mit dem Microgenics CEDIA® Opiate OFT (Prototyp)

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	30 µL		Kalibrationsart	7AB
Reagensvolumen	R1:	90 µL	Formel	EIA TYP1
	R2:	90 µL	Anzahl	1
Wellenlänge	Primär:	570	Verfahren	KONZ
	Sekundär:	660	Steigungsprüfung	keine
Methode	RATE1			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt	Erster:	24		
	Letzter;	27		

13.5.4 Bestimmung der α -Amylase-Konzentration in den Speichelproben

Die Bestimmung der α -Amylase, als Parameter zur Überprüfung der Echtheit der Speichelmatrix, in den gesammelten Speichelproben erfolgte mit dem Olympus α -Amylase-Test. Die Testparameter sind in Tabelle 68 dargestellt.

Vor der Kalibration mit der Kalibration MB (Einpunkt-Kalibration) musste ein gerätespezifischer Faktor bestimmt werden. Dazu wurde zuerst eine Zweipunkt-Kalibration (Kalibrationsart AB, siehe Tabelle 69), mit Reagenzienleerwert und einem Kalibrator, durchgeführt und aus dem gemessenen OD-Wert und der bekannten Kalibratorkonzentration der MB-Faktor berechnet. Der entgültige MB-Faktor wurde durch Bildung des Mittelwerts aus drei Kalibrationen mit dem entsprechenden Kalibrator aus drei unterschiedlichen Chargen berechnet.

Tabelle 68: Testparameter zur Bestimmung der Amylase-Konzentration im Speichel mit dem Olympus α -Amylase-Test

Testparameter spezifisch (allgemein)					Kalibration spezifisch (allgemein)		
Probevolumen	2 µL		Vorverdünnungsverh.	100		Kalibrationsart	MB
Reagensvolumen	R1:	150 µL				Formel	Y=AX+B
	R2:	38 µL				Anzahl	3
Wellenlänge	Primär:	410				Erweiterte Kalibration	CHARGE
	Sekundär:	480				Faktor bei MB-Typ*	10339
Methode	RATE						
Reaktionsverlauf	+						
Messpunkt	Erster:	20					
	Letzter;	27					
Linearitätsgrenze	15%		Korrelationsfaktor	A	100		
				B	0		

* der MB-Faktor wird vor der eigentlichen Kalibration durch eine Zweipunkt-Kalibration (Reagenzienleerwert & Kalibrator) bestimmt (siehe auch Tabelle 69)

Tabelle 69: Amylase im Speichel - Testparameter zur Bestimmung des Faktors bei MB-Typ-Kalibration

Testparameter spezifisch (allgemein)						Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	2 µL		Vorverdünnungsverh.	1		Kalibrationsart	AB
Reagensvolumen	R1:	150 µL				Formel	Y=AX+B
	R2:	38 µL				Anzahl	1
Wellenlänge	Primär:	410					
	Sekundär:	480					
Methode	RATE						
Reaktionsverlauf	+						
Messpunkt	Erster:	20					
	Letzter;	27					
Linearitätsgrenze	15%		Korrelationsfaktor	A	1		
				B	0		

Tabelle 70: Amylase im Speichel - Kalibratoren und Kontrollen

Kalibrator	Konzentration [U/mL]	Kontrolle	Mittelwert [U/L]	Sollwertintervall [U/mL]
Olympus Urine Calibrator	1270	BioRad Liquicheck Urine Chemistry Control 1	61,5	49,2 - 73,8
		BioRad Liquicheck Urine Chemistry Control 1	172	138 - 206

13.5.5 Bestimmung der Opiat-Konzentration im Harn

Die Opiat-Konzentration in den Harnproben wurde ebenfalls am Olympus AU640 mit dem CEDIA® *Opiate* Assay nach dem empfohlenen Protokoll des Assay-Herstellers bestimmt. Bei der Kalibration handelte es sich um eine Vierpunkt-Kalibration mit zwei internen Qualitätskontrollen zur Überprüfung (siehe Tabelle 71 und Tabelle 72).

Tabelle 71: Testparameter zur Bestimmung der Opiat-Konzentration im Harn mit dem Microgenics CEDIA® *Opiate* Assay [Microgenics Corporation, 2007]

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probevolumen	2 µL		Kalibrationsart	4AB
Reagensvolumen	R1: 87 µL		Formel	EIA TYP1
	R2: 87 µL		Anzahl	2
Wellenlänge	Primär: 570		Verfahren	KONZ
	Sekundär: 660		Steigungsprüfung	+
Methode	RATE			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt	Erster: 24			
	Letzter: 27			

Tabelle 72: Opiate im Harn - Kalibratoren und Kontrollen [Microgenics Corporation, 2007]

Kalibrator	Konzentration [ng/mL]	Kontrolle	Sollkonzentration [ng/mL]
negative Calibrator	0 (negativ)	MGC Clinical DAU Control Low	225
Multi-Drug Secondary Cut-Off Calibrator	300	MGC Clinical DAU Control High	375
Multi-Drug Intermediate Calibrator	800		
Multi-Drug High Calibrator	2000		

Ergebnisse

14 Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One Saliva Collection System

Die Wiederfindung einiger potenzieller Analyte aus dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* wurde mittels radioaktiv-markierten Analyten untersucht. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 73 dargestellt (vgl. Kapitel 6).

Für alle untersuchten Verbindungen, außer [³H]-Tetrahydrocannabinol, konnte eine Wiederfindungsrate von über 96% bestimmt werden. Die Ausbeute für [³H]-Tetrahydrocannabinol dagegen betrug nur 31%.

Tabelle 73: Mittelwerte (aus fünf Messwerten; in DPM), Standardabweichung (in DPM) und relative Standardabweichung (in Prozent) der einzelnen Schritte der Probengewinnung mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System*, sowie der Verlust an Radioaktivität (in Prozent) im Vergleich zum vorhergehenden Schritt.

		Ausgangs- wert	SCB	STT vor dem Zentrifugieren	STT nach dem Zentrifugieren	Einfrier- röhrchen	Verlust gesamt	Recovery gesamt
[N-Methyl- ³ H]-Cocain	MW	10.420	10343	10352	10415	10341		
	SD		156	103	113	107		
	RSD		1,5%	1,0%	1,1%	1,0%		
	Verlust		-0,7%	0,1%	0,6%	-0,7%	-0,8%	99,2%
[N-Methyl- ¹⁴ C]- Codeinhydrochlorid	MW	10.425	10280	10279	10179	10152		
	SD		70	102	120	117		
	RSD		0,7%	1,0%	1,2%	1,2%		
	Verlust		-1,4%	0,0%	-1,0%	-0,3%	-2,6%	97,4%
[7- ¹⁴ C]-D- Methamphetamin- hydrochlorid	MW	7.210	6854	7160	7095	7104		
	SSD		73	227	183	201		
	RSD		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%		
	Verlust		-4,9%	4,5%	-0,9%	0,1%	-1,5%	98,5%
[N-Methyl- ¹⁴ C]- Morphinhydrochlorid	MW	9.973	9972	10058	9860	9837		
	SD		26	127	93	153		
	RSD		0,3%	1,3%	0,9%	1,6%		
	Verlust		5,3%	0,9%	-2,0%	-0,2%	-1,4%	98,6%
[¹⁴ C]- Mycophenolatnatrium	MW	5.907	5679	5683	5670	5691		
	SD		90	137	142	147		
	RSD		1,6%	2,4%	2,5%	2,6%		
	Verlust		-3,9%	0,1%	-0,2%	0,4%	-3,7%	96,3%
(-)-[N-Methyl- ³ H]- Nicotin	MW	10.020	9799	9892	9767	9770		
	SD		168	89	106	161		
	RSD		1,7%	0,9%	1,1%	1,7%		
	Verlust		-2,2%	1,0%	-1,3%	0,0%	-2,5%	97,5%
[³ H]-Tetrahydro- cannabinol	MW	10.256	9838	9393	3598	3182		
	SD		239	251	267	148		
	RSD		2,4%	2,7%	7,4%	4,7%		
	Verlust		-4,1%	-4,5%	-61,7%	-11,6%	-69,0%	31,0%

RSD ... relative Standardabweichung
SCB ... Saliva Collection Beaker
STT ... Saliva Transfer Tube

14.1 [N-Methyl-³H]-Cocain

Der Verlust an Radioaktivität zwischen dem Ausgangswert und dem letzten Schritt, der Lagerung der Proben im Einfrierröhrchen beträgt 0,8% beziehungsweise 79 dpm. Die Wiederfindung für [N-Methyl-³H]-Cocain betrug insgesamt 99,2%.

Das Verhalten von [N-Methyl-³H]-Cocain auf dem Weg durch das Speichelsammelsystem ist in Abbilung 26 dargestellt.

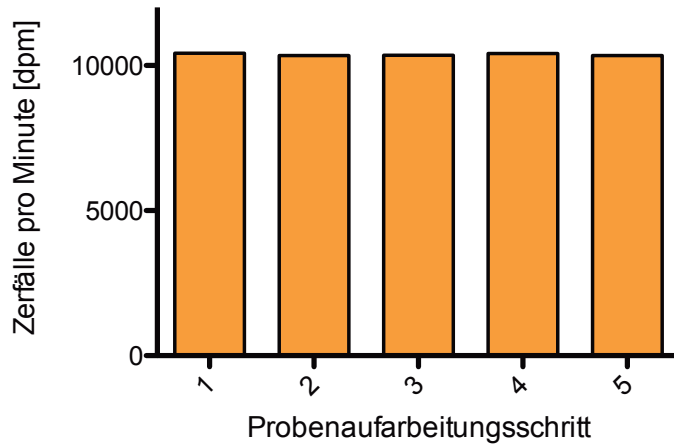


Abbildung 26:
Verhalten von [N-Methyl-³H]-Cocain im Greiner Bio-One Saliva Collection System;
1 ... Ausgangswert;
2 ... Saliva Collection Beaker;
3 ... Saliva Transfer Tube vor dem Zentrifugieren;
4 ... Saliva Transfer Tube nach dem Zentrifugieren;
5 ... Einfrierröhrchen (Cryo.s)

14.2 [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid

2,61% beziehungsweise 272 dpm betrug der Verlust an Radioaktivität zwischen dem Ausgangswert und der Lagerung der Probe im Einfrierröhrchen. Die gesamte Wiederfindungsrate betrug hier 97,4%.

Das Verhalten von [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid im Speichelsammelsystem ist in Abbilung 27 dargestellt.

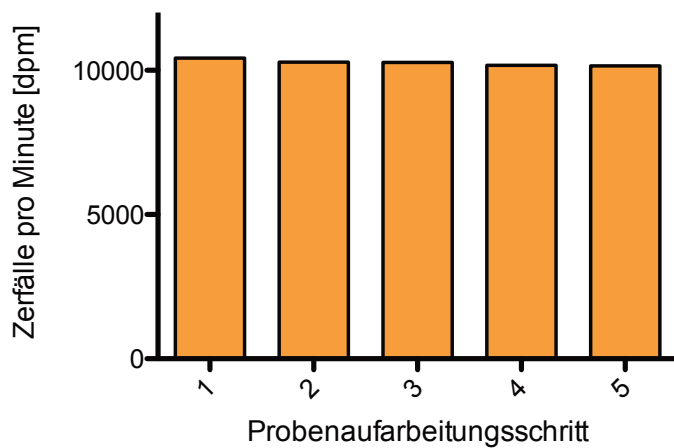


Abbildung 27:
Verhalten von [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid im Greiner Bio-One Saliva Collection System;
1 ... Ausgangswert;
2 ... Saliva Collection Beaker;
3 ... Saliva Transfer Tube vor dem Zentrifugieren;
4 ... Saliva Transfer Tube nach dem Zentrifugieren;
5 ... Einfrierröhrchen (Cryo.s)

14.3 [7-¹⁴C]-D-Methamphetaminhydrochlorid

Der Verlust an radioaktiv-markiertem Methamphetamin betrug 1,5% beziehungsweise 106 dpm zwischen dem ersten und dem letzten Schritt des Probenaufarbeitungsprozesses. Die Wiederfindung für [7-¹⁴C]-D-Methamphetaminhydrochlorid betrug insgesamt 98,5%.

Das Verhalten von [7-¹⁴C]-D-Methamphetaminhydrochlorid auf dem Weg durch das Sammelsystem ist in Abbildung 28 dargestellt.

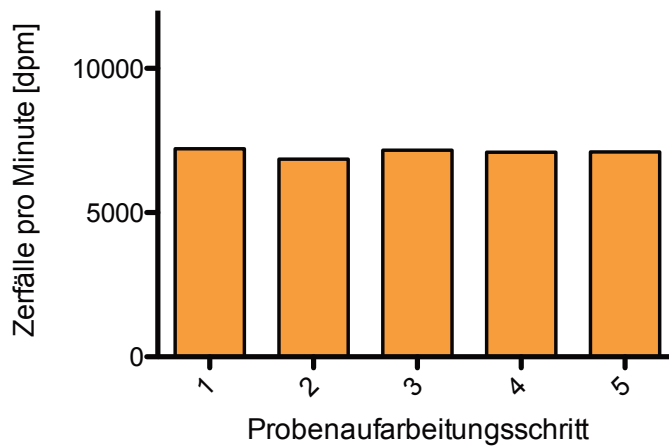


Abbildung 28:
Verhalten von [7-¹⁴C]-D-Methamphetamin im Greiner Bio-One Saliva Collection System;

- 1 ... Ausgangswert;
- 2 ... Saliva Collection Beaker;
- 3 ... Saliva Transfer Tube vor dem Zentrifugieren;
- 4 ... Saliva Transfer Tube nach dem Zentrifugieren;
- 5 ... Einfrierröhrchen (Cryo.s)

14.4 [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid

1,37% (136 dpm) Verlust an [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid wurden zwischen dem Ausgangswert und der Lagerung im Einfrierröhrchen gemessen. Die Wiederfindungsrate für [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid betrug insgesamt

Der Weg von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid durch das Speichelsammelsystem ist in Abbildung 29 dargestellt.

14.5 [¹⁴C]-Mycophenolatnatrium

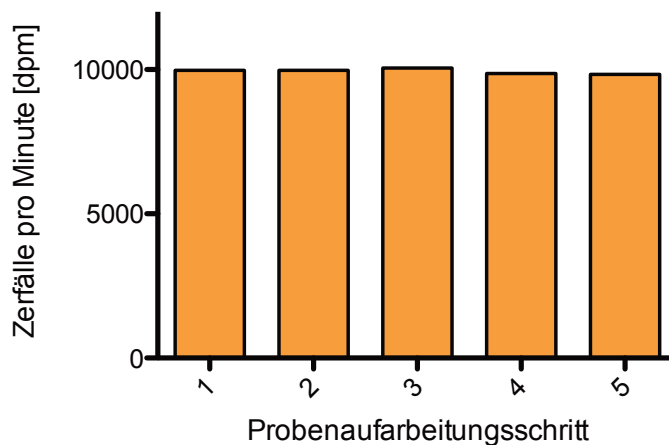
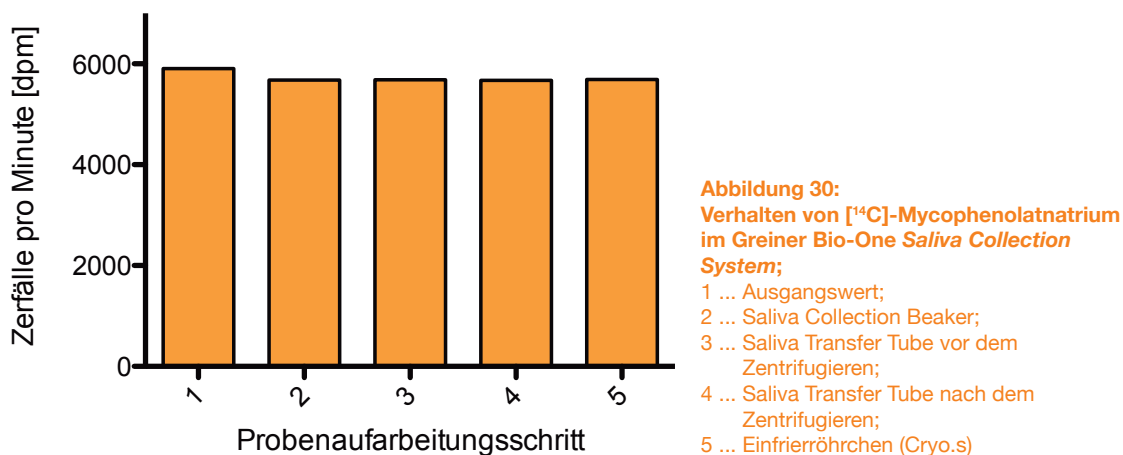


Abbildung 29:
Verhalten von [7-¹⁴C]-D-Methamphetamin im Greiner Bio-One Saliva Collection System;

- 1 ... Ausgangswert;
- 2 ... Saliva Collection Beaker;
- 3 ... Saliva Transfer Tube vor dem Zentrifugieren;
- 4 ... Saliva Transfer Tube nach dem Zentrifugieren;
- 5 ... Einfrierröhrchen (Cryo.s)

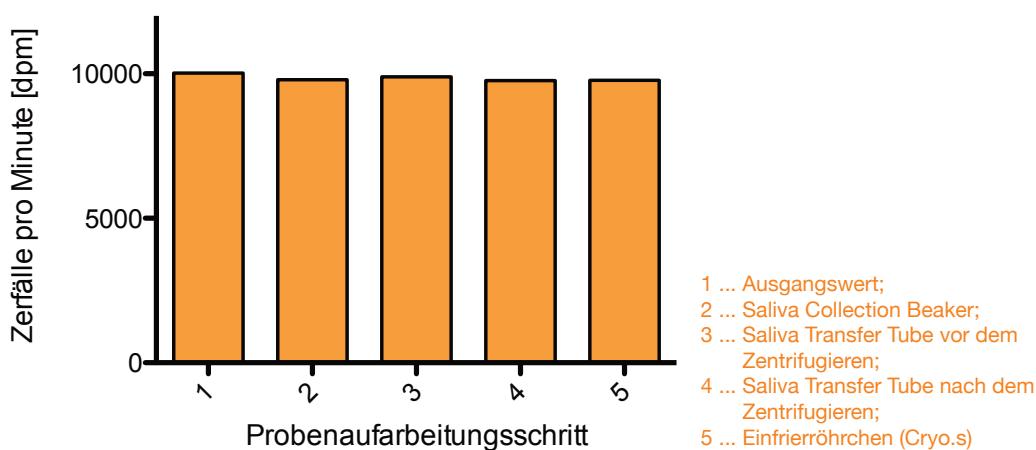
In diesem Fall betrug der Verlust an Radioaktivität zwischem dem ersten und letzten Schritt der Probennahme 3,67% beziehungsweise 216 dpm. Die Wiederfindungsrate für [^{14}C]-Mycophenolatnatrium aus dem Speichelsammelsystem betrug insgesamt 96,3%. Das Verhalten von [^{14}C]-Mycophenolatnatrium im Speichelsammelsystem ist in Abbildung 30 dargestellt.



14.6 (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin

2,49% (249 dpm) des radioaktiv-markierten Nicotins gingen im Speichelsammelsystem zwischem den Ausgangswert und der Lagerung der Probe im Einfrierröhrchen verloren. Die gesamte Wiederfindungsrate für (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin betrug 97,5%.

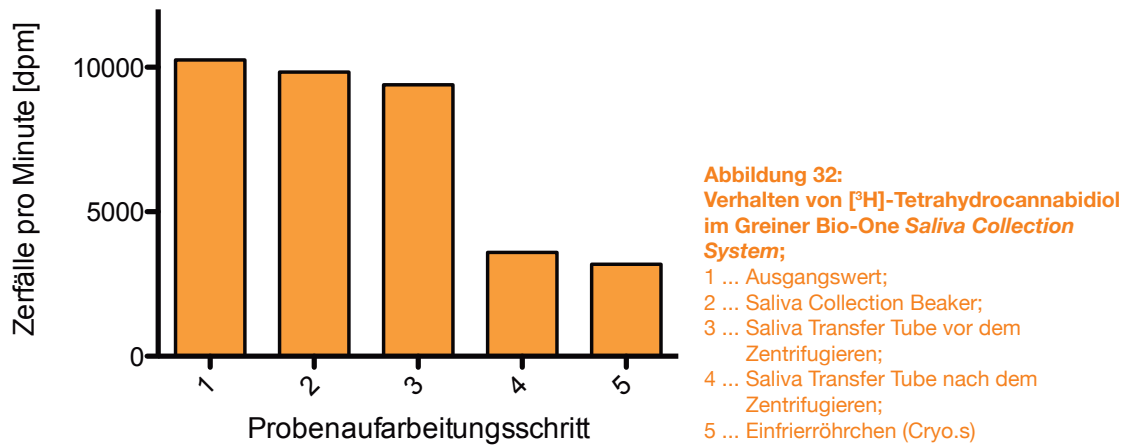
Das Verhalten von (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin im Speichelsammelsystem ist in Abbildung 31 dargestellt.



14.7 ^{[3]H}-Tetrahydrocannabinidiol

Zwischen dem Ausgangswert und der Lagerung der Probe im Einfrierröhrchen gingen 68,97% (7073 dpm) verloren. Der Großteil des ^{[3]H}-Tetrahydrocannabinidiol ging beim Zentrifugieren verloren (-61,80% zwischen Schritt 3 und Schritt 4). Weitere 11,56% des Analyten gingen bei der Lagerung im Einfrierröhrchen (Cryo.s, Schritt 5) verloren. Die Wiederfindungsrate für ^{[3]H}-Tetrahydrocannabinidiol betrug insgesamt 31,0%.

Das Verhalten von ^{[3]H}-Tetrahydrocannabinidiol im Speichelsammelsystem ist in Abbilung 32 dargestellt



15 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben mittels Immunoassay

15.1 Kalibration nach der Harnmethode

Im ersten Schritt der Methodenentwicklung wurde nach der Harnmethode kalibriert. Die Kalibrationskurve der Harnmethode ist sehr flach. Dies bedeutet, daß es bei der einer geringen Änderung des OD¹-Wertes zu großen Änderungen im Analysenergebnis kommt. Das kann zur schlechteren Reproduzierbarkeit einer Methode beitragen.

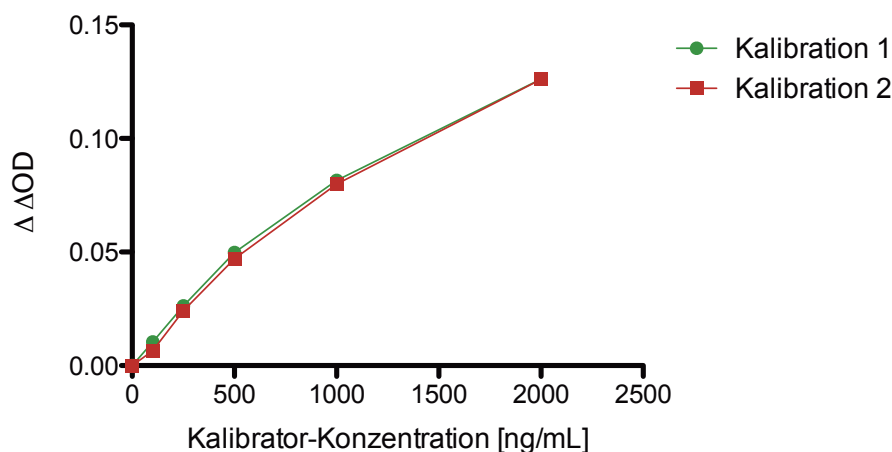


Abbildung 33: Cotinin-Immunoassay: Kalibrationskurve nach der Harnmethode.
Die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit durch den Ursprung verschoben.

15.1.1 Bestimmung der Wiederholpräzision

Für die Bestimmung der Wiederholpräzision wurden alle Kalibratoren und Kontrollen als Probe mit zehnmaler Wiederholung vermessen.

Im unteren Bereich der Kalibration (100 ng/mL und 200 ng/mL) schwankten die Ergebnisse stärker als im oberen Bereich. Die relative Standardabweichung (RSD) lag bei 15,2% (100 ng/mL) bzw. 8,1% (200 ng/mL).

Tabelle 74: Kalibration nach der Harnmethode - Wiederholpräzision

	Sollwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD	RSD [%]	Bias [%]
Cal 100	100	91,9	13,9	15,2	-8,1
Cal 250	250	241,5	19,6	8,1	-3,4
Cal 500	500	526,7	25,2	4,6	5,3
Cal 1000	1000	1018,2	36,3	3,6	1,8
Cal 2000	2000	2122,2	80,5	3,8	6,1
QC Low	339	368,4	12,5	3,9	8,7
QC High	752	697,6	14,6	2,1	-7,2
QC 500 (Cut-Off)	518	518,3	24,4	4,7	0,1

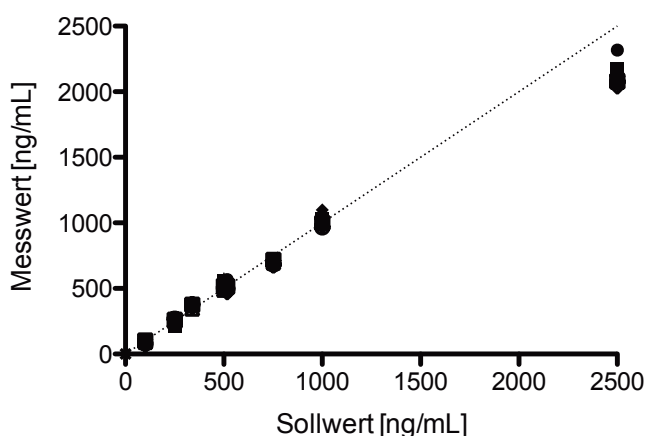


Abbildung 34: Kalibration nach der Harnmethode - Wiederholpräzision

15.1.2 Vermessung von realen Speichelproben

Die Vermessung der Proben ergab, daß bereits mit der nicht optimierten Harnmethode zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterschieden werden kann (vgl. Kapitel 7.2.2).

Tabelle 75: Ergebnisse der Vermessung von realen Speichelproben mit der nicht optimierten Harnmethode

Proband	Status	Speichelanteil [%]	Cotinin in Probe [ng/mL]	Cotinin in Speichel [ng/mL]
1/1	Raucher	73,7	193,2	262,1
1/2	Raucher	71,7	139,7	194,9
1/3	Raucher	66,6	135	202,8
1/4	Raucher	65,3	130,7	200
1/5	Raucher	58,9	111,1	188,6
2	Nichtraucher	79,6	0	0
3	Nichtraucher	50,9	0	0
4	Nichtraucher	77,6	0	0
5/1	Raucher	73,0	80,0	109,7
5/2	Raucher	73,7	80,3	109,0

von Proband 1 und 5 wurden mehrere Proben zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt

15.3 Einfluß des Speichelanteils auf die Kalibration

15.3.1 Probevolumen 13 µL

Der Vergleich der Kalibrationskurven (Abbildung 35) zeigt, daß die Kalibration unter diesen Bedingungen vom Speichelanteil nicht beeinflusst wird, da die drei Kurven einen praktisch identen Verlauf zeigen.

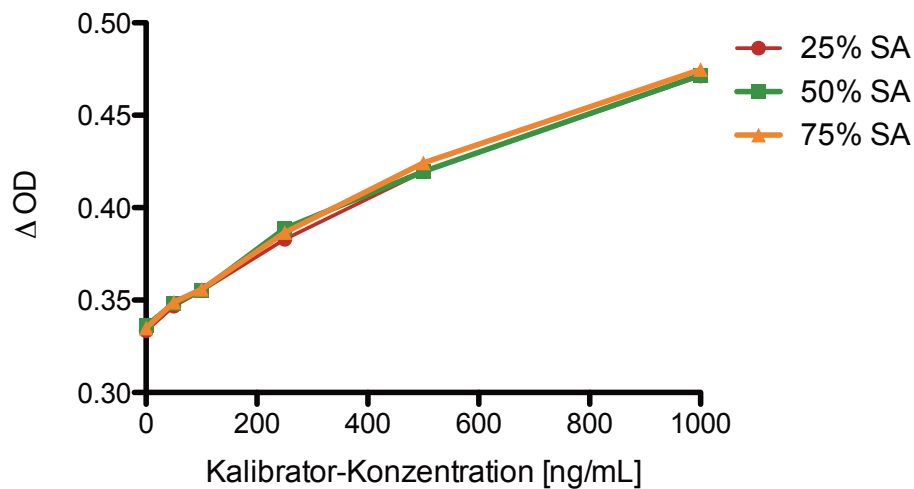


Abbildung 35: Vergleich der Kalibrationskurven bei verschiedenen Speichelanteilen in der Probe

Die Vermessung der Kalibratoren als Probe zeigt auch, daß der Speichelanteil unter diesen Bedingungen fast keinen Einfluß auf die Cotinin-Konzentration ausübt. Lediglich beim Negativ-Kalibrator (kein Cotinin) schwankt die relative Standardabweichung stark (siehe Tabelle 76), diese Schwankungen dürften aber auf den Immunoassay zurückzuführen sein, da diese bei allen drei Speichelanteilen auftreten.

Tabelle 76: Ergebnisse der Vermessung der Kalibratoren als Probe (Dreifachbestimmung); Probevolumen 13 µL; SA ... Speichelanteil

Sollwert [%] bzw. [ng/m]		Mittelwerte (3fachbest.) [%] bzw. [ng/m]				MW alle [%] bzw. [ng/m]		RSD alle [%] bzw. [ng/m]	
SA	Cotinin	SA	Cot25	Cot50	Cot75	SA	Cotinin	SA	Cotinin
25	0	25,9	2,8	0	0	26,0	0,9	1,6	226,2
	50	26	59,2	40,8	43,3		47,8		25,4
	100	25,6	106,7	96,8	93,4		99,0		9,5
	250	25,9	265,2	246,2	237,5		249,6		5,3
	500	26,5	525,9	497,1	478,4		500,5		4,6
	1000		1006,8	998,8	969,9		991,8		2,1
50	0	48,5	1,4	0,0	1,6	49	1,0	1,1	161,0
	50	48,7	63,0	47	54,3		54,7		20,78
	100	48,7	115,8	99,6	408,3		107,9		8,4
	250	49,1	275,1	248,6	249,2		257,7		5,7
	500	48,9	535,8	501,4	495,6		510,9		4,1
	1000	50,0	1016,5	1005,0	962,2		994,5		3,3
75	0	75,7	10,6	0	0	76,2	3,5	0,8	204,0
	50	75,9	64,7	48,1	49,8		54,2		18,8
	100	76,1	106,9	93,0	97,5		99,1		9,6
	250	76,3	285,7	264,7	248,7		266,3		6,9
	500	75,9	550,7	543,6	510,5		534,9		3,8
	1000	77,4	1022,0	1037,3	975,6		1011,6		3,3

15.3.2 Probevolumen 35 µL

Die einzelnen Kalibrationskurven (verschiedene Speichelanteile) unterscheiden sich auch beim erhöhten Probenvolumen kaum voneinander. Vergleicht man jedoch die Kalibrationskurven der Methode mit Probevolumen 35 µL mit der Kalibration bei Probevolumen 13 µL, so fällt auf daß die Kalibrationskurve beim erhöhten Probevolumen vor allem im unteren Konzentrationsbereich steiler wird (siehe Abbildung 36). Dies hat den Vorteil, daß die Meßgenauigkeit im unteren Konzentrationsbereich zunimmt. Daher wird das erhöhte Probevolumen für die weiteren Versuche beibehalten.

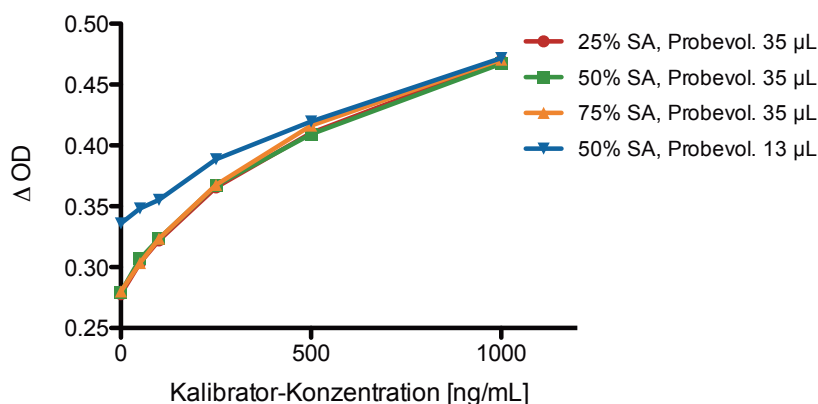


Abbildung 36: Vergleich der Kalibrationskurven unter drei verschiedenen Speichelanteilen (SA) und Vergleich der Kalibrationskurven mit Probevolumen 35 µL und Kalibration bei Probevolumen 13 µL (50% Speichelanteil)

Die Ergebnisse der Vermessung der Kalibratoren als Probe sind in Tabelle 76 dargestellt. Aus den Daten kann geschlossen werden, daß die gemessene Cotinin-Konzentration unter diesen Testbedingungen auch bei einem erhöhten Probevolumen nicht vom Speichelanteil beeinflusst wird.

Tabelle 76: Ergebnisse der Vermessung der Kalibratoren als Probe (Dreifachbestimmung);
Probevolumen 35 µL; SA ... Speichelanteil

Sollwert [%] bzw. [ng/m]		Mittelwerte (3fachbest.) [%] bzw. [ng/m]				MW alle [%] bzw. [ng/m]		RSD alle [%] bzw. [ng/m]	
SA	Cotinin	SA	Cot25	Cot50	Cot75	SA	Cotinin	SA	Cotinin
25	0	24,7	2,7	0,1	0,0	24,6	1,0	2,9	159,6
	50	25,3	53	45	49,4		49,2		9,2
	100	23,7	103,9	94,4	100,4		99,4		5,1
	250	24,4	260,4	251	242,7		251,4		3,6
	500	24,8	4950,7	496	465,2		485,7		3,8
	1000		991,1	1028,1	983,7		100		2,4
50	0	48,8	10,8	3,4	1,9	48,6	5,3	2,7	104,7
	50	49,7	60,5	50	58,1		56,2		10,1
	100	46,8	105,1	98,4	103,9		102,5		4,9
	250	49	273,2	262,1	252,7		262,7		3,5
	500	46,9	503,7	504,7	466,4		491,6		4,4
	1000	50,1	1007	1022,3	974,0		1001,2		3
75	0	75,9	70	4,2	2,5	76,4	5,5	0,7	74,9
	50	76,2	65,1	53	57,8		58,6		9,9
	100	76,1	114,3	102,1	103,8		106,7		6
	250	76,2	276,6	270,4	251,9		266,3		4,5
	500	76,6	550,2	550,7	511,8		537,6		4,1
	1000	77,4	1049	1102	1042,6		1064,8		2,9

15.4 Veränderung der spezifischen Testparameter

Zur Optimierung der Cotinin-Bestimmung aus dem Speichel wurden die spezifischen Testparameter (Reagensvolumen und/oder Messpunkt) verändert. Ziel der Variationen war es eine steilere Kalibrationskurve, die in weiterer Folge zu einer Verbesserung der Messgenauigkeit und Wiederholpräzision führen würde.

15.4.1 Variationen - erster Teil

Die Ergebnisse des ersten Versuchsteils sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit durch den Nullpunkt normiert. Im Vergleich zur Ausgangsmethode (Variation 0, im Diagramm rot dargestellt), liefert nur die Variation 4 (R^2 um ein Viertel reduziert, Messpunkt unverändert, im Diagramm braun dargestellt) eine steilere Kalibrationsgerade. Das Messen zu einem späteren Zeitpunkt bringt keine Verbesserung.

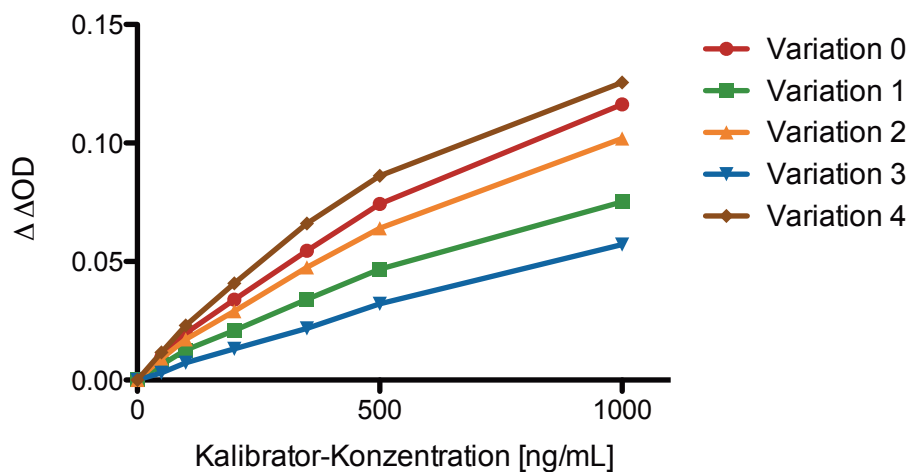


Abbildung 37: Vergleich der Kalibrationsgeraden unter verschiedenen Testbedingungen (veränderte Reagensvolumina und/oder veränderte Messpunkte); vgl. Tabelle 23, Kapitel 7.2.4.1

15.4.2 Variationen - zweiter Teil

Im zweiten Teil des Versuchs konnte wiederum für die Variation 6 (entspricht Variation 4) die steilste Kurve ermittelt werden (orange Linie im Diagramm in der Abbildung 38).

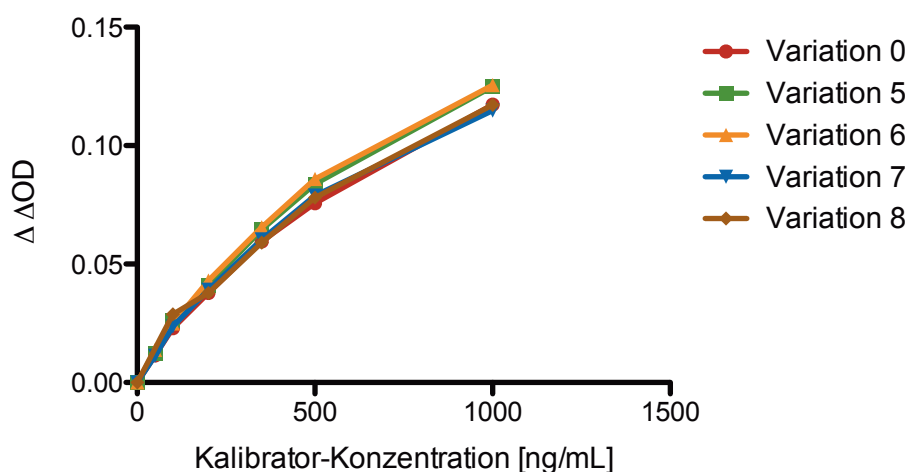


Abbildung 38: Vergleich der Kalibrationsgeraden unter verschiedenen Testbedingungen (veränderte Reagensvolumina und/oder veränderte Messpunkte); vgl. Tabelle 24, Kapitel 7.2.4.2

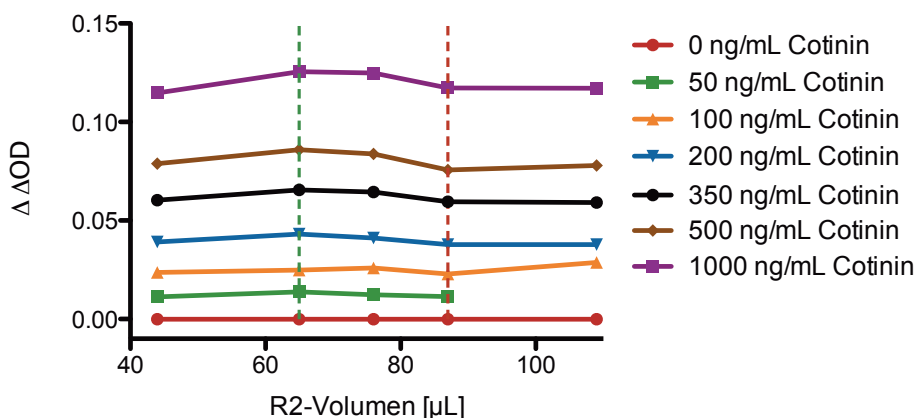


Abbildung 39: Änderung der ΔAOD -Werte vs. Änderung des R2-Volumens bei unterschiedlichen Cotinin-Konzentrationen

rote gestrichelte Linie: Ausgangsmethode (Variation 0); grüne gestrichelte Linie: Variation 6 (entspricht Variation 4) → maximale Steigung der Kalibrationsgerade

Aus den obigen Versuchen hat sich gezeigt, daß die Methode, die in Tabelle 77 dargestellt ist, am besten für die Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel geeignet ist. Daher wird diese Methode für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Tabelle 77: optimierte Methode zur Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel (Variation 4 bzw. 6)

Testparameter spezifisch (allgemein)			Kalibration spezifisch (allgemein)	
Probenvolumen	13 μ L		Kalibrationsart	7AB
Reagensvolumen	R1:	87 μ L	Formel	EIA TYP 1
	R2:	65 μ L	Anzahl	2
Wellenlänge	Primär:	340	Verfahren	KONZ
	Sekundär:	410	Steigungsprüfung	+
Methode	RATE1			
Reaktionsverlauf	+			
Messpunkt 1	Erster:	13		
	Letzter:	17		

15.5. Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Grenzwerte zur Bestimmung von Cotinin aus dem Speichel wurden mit dem Programm VALISTAT®, nach dreimaligem Wiederholen errechnet.

Die Nachweisgrenze beträgt 7,2 ng/mL, die Erfassungsgrenze 14,3 ng/mL und die Bestimmungsgrenze bei 20,1 ng/mL (Ergebnisunsicherheit 33,3%).

Tabelle 78: Grenzwerte (Ergebnisunsicherheit 33,3%)

Nachweisgrenze	7,2 ng/mL Cotinin in der Probe
Erfassungsgrenze	14,3 ng/mL Cotinin in der Probe
Bestimmungsgrenze	20,1 ng/mL Cotinin in der Probe

15.6 Bestimmung der Messgenauigkeit

Es wurden zur Bestimmung der zufälligen (Präzision) und systematischen (Bias, Abweichung des Meßwertes vom „wahren Wert“) Fehler zwei Qualitätskontrollen (30 ng/mL und 150 ng/mL) an sechs verschiedenen Arbeitstagen je dreimal bestimmt.

Die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (zufälliger Fehler innerhalb der Tage) für Cotinin betrug 13,7% (30 ng/mL) und 5,1% (150 ng/mL), die relative Standardabweichung der Laborpräzision (zufälliger Fehler zwischen den Tagen) betrug 16,5% bzw. 5,1% und die Richtigkeit (Bias) -8,2% und -6,0% (siehe Tabelle 79).

Tabelle 79: zufälliger und systematischer Fehler

Kontrolle	30 ng/mL	150 ng/mL
Mittelwert gesamt	27,4	142,0
Standardabweichung	4,4	7,2
relative Standardabweichung (RSD)	16,2%	5,0%
Wiederholbarkeit (Kriterium < 15%, am LOQ <20%)		
Standardabweichung	3,8	7,2
relative Standardabweichung (RSD)	13,7%	5,1%
Laborpräzision (Kriterium < 15%, am LOQ <20%)		
Standardabweichung	4,5	7,2
relative Standardabweichung (RSD)	16,5%*	5,1%
Richtigkeit (Kriterium Bias < 15%, am LOQ <20%)		
Abweichung	-2,6	-9,0
Bias	-8,7	-6,0

* strenggenommen ist das Kriterium < 15% nicht erfüllt; da die Kontrolle aber in der Nähe der Bestimmungsgrenze (20 ng/mL) liegt, wurde in diesem Fall das erweiterte Kriterium <20% angewendet.

15.7 Bestimmung der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Speichelanteil

Die gespikten Speichelp Proben (150 ng/mL Cotinin) mit unterschiedlichen Speichelanteil (0%, 25%, 38%, 50%, 75% und 100%) wurden unter Verwendung von zwei verschiedenen Kalibrationskurven je drei mal gemessen.

Es wurden die Mittelwerte der drei Einzelmessungen pro Kalibration und die Mittelwerte von beiden Kalibrationen bestimmt. Die Ergebnisse der Cotinin-Bestimmung und die Mittelwerte der gemessenen Speichelanteile sind in Tabelle 80 dargestellt.

Beim Auftragen des Speichelanteils gegen die gemessene Cotinin-Konzentration (siehe Abbildung 40) fällt auf, daß im unteren Bereich des Speichelanteils (0% bis 38%) die gemessene Konzentration stark vom Sollwert abweicht, nämlich um -84,56% bei 0% Speichelanteil, -38,12% bei 25% Speichelanteil und -24,3% bei 38% Speichelanteil (siehe auch Tabelle 80, Bias).

Das Anlegen von einer Regressionsgeraden im vorderen und hinteren Teil der Kurve liefert einen Schnittpunkt bei etwa 48% Speichelanteil (berechnet bei 48,91%). Ausgehend von diesen Daten kann man annehmen das die Recovery für Cotinin im Speichelanteil-Bereich von 48% bis 100% ausreichend hoch ist, nämlich größer 80%. Für Proben mit einem geringeren Speichelanteil müssen die Cotinin-Werte entsprechend der nachstehenden Formel korrigiert werden, da die gemessene Cotinin-Konzentration im Extremfall (0% Speichelanteil) nur 60% der Konzentration, die in Proben mit Speichelanteil größer 48% gemessen werden kann, ausmacht (vgl. Abbildung 41: 81,6 ng/mL vs. 133,7 ng/mL bei 0% SA, Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der y-Achse).

$$\text{Cotinin}_{\text{kor}} = [\text{Cotinin}] \frac{100 - [\text{SA}]}{60} \quad \text{gilt nur wenn der Speichelanteil} < 48\% \text{ (SA} < 48\%)$$

In Tabelle 81 sind die Messwerte um den Cotinin-Korrekturfaktor (vom Speichelanteil abhängig) korrigiert dargestellt. Nach der Korrektur entspricht auch die Wiederfindungsrate im unteren Speichelanteilsbereich den Werten im oberen Speichelanteilsbereich (Recovery > 80%).

Tabelle 80: Mittelwerte der Bestimmung des Speichelanteils und der Cotinin-Konzentration ohne Korrektur der Cotinin-Konzentration

Zielwert SA [%]	Zielwert Cotinin [ng/mL]	MW SA [%]	Mittelwert Messung A [ng/mL]	Mittelwert Messung B [ng/mL]	Mittelwert Messung A & B [ng/mL]	Recovery [%]	Bias [%]
0	150	4,2	75,7	86,9	81,3	54,2	-84,6
25	150	26,3	106,5	110,7	108,6	72,4	-38,1
38	150	39,0	119,2	122,2	120,7	80,5	-24,3
50	150	50,1	125,4	133,9	129,6	86,4	-15,7
75	150	75,8	130,3	136,4	133,4	88,9	-12,5
100	150	102,8	124,3	130,8	127,5	85,0	-17,6

Tabelle 81: Mittelwerte der Bestimmung des Speichelanteils und der in Abhängigkeit vom Speichelanteil korrigierten Cotinin-Konzentration; die korrigierten Cotinin-Konzentrationen sind grün markiert

Zielwert SA [%]	Zielwert Cotinin [ng/mL]	MW SA [%]	Mittelwert Messung A [ng/mL]	Mittelwert Messung B [ng/mL]	Mittelwert Messung A & B [ng/mL]	Recovery [%]	Bias [%]
0	150	4,2	120,8	138,8	129,8	86,5	-15,6
25	150	26,3	130,8	136,0	133,4	88,9	-12,5
38	150	39,0	121,3	124,8	122,8	81,9	-22,2
50	150	50,1	125,4	133,9	129,6	86,4	-15,7
75	150	75,8	130,3	136,4	133,4	88,9	-12,5
100	150	102,8	124,3	130,8	127,5	85,0	-17,6

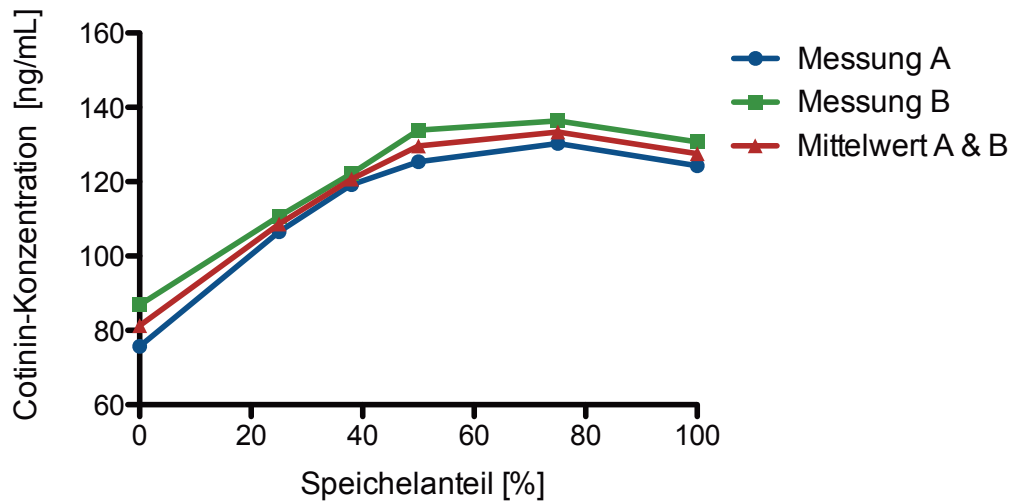


Abbildung 40: mittlere gemessene Cotinin-Konzentration (Zielwert 150 ng/mL) in der Probe bei unterschiedlichen Speichelanteilen

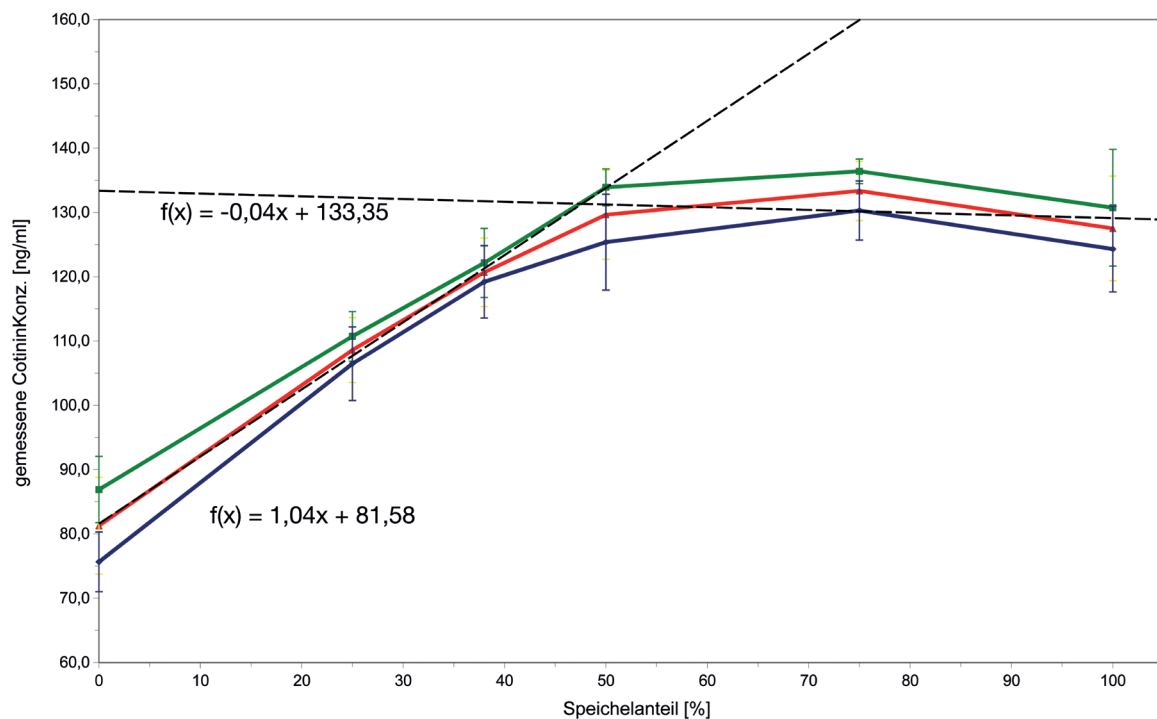


Abbildung 41: graphische Ermittlung des Schnittpunktes der beiden Regressionsgeraden

16 Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

16.1 Auftragen der Probe auf das Extraktionssäulchen

Die Extraktionssäulchen wurden vor dem Auftragen der Probe mit 1 mL 1% Ameisensäure in Acetonitril konditioniert und mit 1 mL 1% Ameisensäure in Wasser äquilibriert, um die Oberfläche des SPE-Sorbens zu benetzen sowie die Kationenaustauscherfunktion (SO_3^- -Gruppe) aufzuladen, um eine optimale Wechselwirkung mit dem Analyten, (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin, zu ermöglichen.

Basierend auf der Annahme, daß die Zugabe von Ameisensäure zur Probe, die Wechselwirkung zwischen Nicotin und der Kationenaustauscherfunktion des Sorbens verstärkt werden würde da mehr Nicotin geladen vorliegt, wurde im ersten Teil des Versuchs Ameisensäure in verschiedenen Konzentrationen zur Probe zugesetzt (siehe Tabelle 29, Kapitel 8.5.11)

Tabelle 82: Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung der Bestimmung des beim Auftragen unter verschiedenen Bedingungen durchgebrochenen (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin

Bedingung	Ameisensäure-Zusatz	Mittelwert [%]	SD	RSD [%]
Pre 1	kein Zusatz	25,1	0,11	0,42
Pre 2	1%	22,3	0,23	1,05
Pre 3	2%	23,2	0,17	0,73
Pre 4	5%	23,3	0,45	1,94

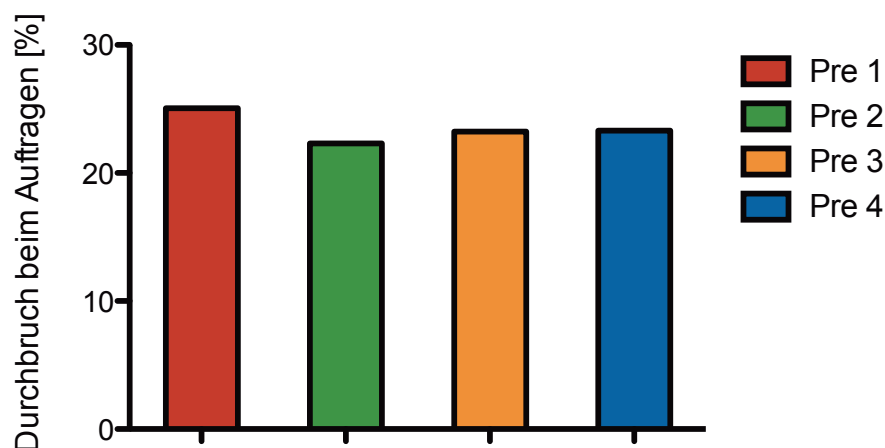


Abbildung 42: Durchbruch beim Auftragen von (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin beim Auftragen auf die Extraktionssäulchen unter verschiedenen Bedingungen

Obwohl bei der Bedingung *Pre 1* (kein Säurezusatz) geringfügig mehr Nicotin beim Auftragen durchbricht, wurde für die weiteren Versuche diese Bedingung gewählt, da die Reproduzierbarkeit innerhalb dieser Bedingung am größten ist.

Ein Vorteil dieser Variante ist, daß ein zusätzlicher Pipettierschritt entfällt. Dies wiederum führt zu einer Reduktion der Fehlerquote.

16.2 Waschen der Extraktionssäulchen

Nach dem Auftragen der Probe auf die Extraktionssäulchen, werden im nächsten Schritt die Extraktionssäulchen gewaschen, um Matrixbestandteile und andere Störfaktoren aus der Probe zu entfernen. Dabei muss darauf geachtet werden, daß möglichst wenig der Analyte vom Extraktionssäulchen eluiert wird.

In allen Versuchen wurden die Extraktionssäulchen zuerst mit 1 mL 1% Ameisensäure in Wasser, anschließend mit 1 mL 1% Ameisensäure in Acetonitril gewaschen. Im ersten Waschschrift wurden saure und neutrale wasserlösliche Matrixbestandteile entfernt, im zweiten Schritt saure und neutrale nicht-wasserlösliche Matrixbestandteile und Störfaktoren entfernt.

Da beim Waschen im Mittel nur 2,6% (SD 0,11%, RSD 4,39% bei 1% Ameisensäure in Wasser) beziehungsweise 1,5% (SD 0,13%, RSD 8,83% bei 1% Ameisensäure in Acetonitril) (-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin vom Extraktionssäulchen eluiert wurden, wurde keine weitere Optimierung des Waschschriftes vorgenommen.

16.3 Elution des Analyten vom Extraktionssäulchen

Bei der Elution von (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin vom Extraktionssäulchen wurden verschiedene Zusammensetzungen des Elutionsmittels getestet (siehe Tabelle 30, Kapitel 8.5.1.2). Das Ziel des Versuchs war, den Analyten in einem möglichst kleinem Lösungsmittelvolumen quantitativ vom Extraktionssäulchen zu eluieren.

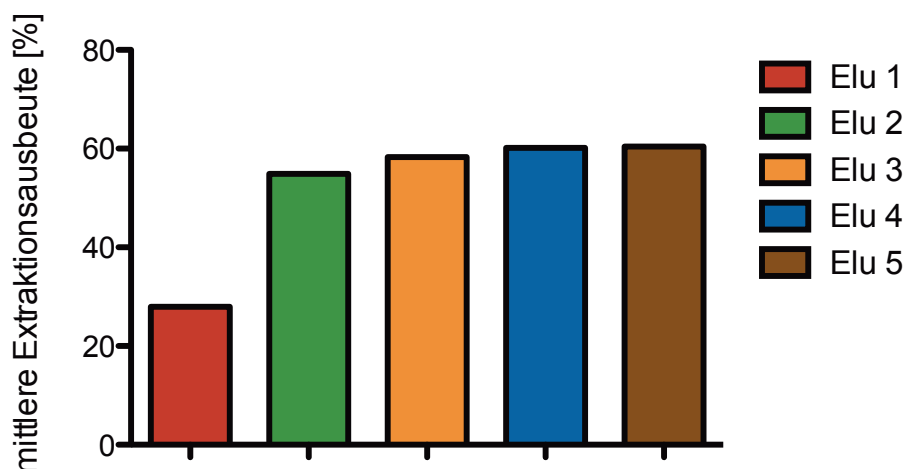


Abbildung 43: mittlere Extraktionsausbeute von (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin beim Eluieren mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen

Tabelle 83: mittlere Extraktionsausbeute, Standardabweichung und relative Standardabweichung des (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin beim Eluieren mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen

Bedingung	Zusammensetzung des Elutionsmittels	Mittelwert [%]	SD	RSD [%]
Elu 1	5% Ammoniak in 10% Acetonitril	27,9	1,43	5,11
Elu 2	5% Ammoniak in 20% Acetonitril	54,9	0,16	0,28
Elu 3	5% Ammoniak in 40% Acetonitril	58,3	0,55	0,95
Elu 4	5% Ammoniak in 80% Acetonitril	60,2	0,61	1,52
Elu 5	5% Ammoniak in 100% Acetonitril	60,4	3,23	5,35

Die Wiederfindungsrate des (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin nimmt mit steigendem organischem Anteil (Acetonitril) im Elutionsmittel zu. Die Erhöhung des Acetonitril-Anteils von 80% (Elu 4) auf 100% (Elu 5) steigert die Wiederfindungsrate nur geringfügig (0,2%), da aber die Reproduzierbarkeit unter der Bedingung Elu 4 deutlich höher war als unter Elu 5 wurde 5% Ammoniak

in 80% Acetonitril als geeignetstes Elutionsmittel ausgewählt.

Der Vergleich der Wiederfindungsraten in den einzelnen 100- μ L-Fractionen zeigt, daß unter allen Elutionsbedingungen der Großteil des (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin in der 1. Fraktion vom Extraktionssäulchen eluiert wird. Analog zur Gesamt-recovery steigt auch hier die Recovery von (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin mit dem organischen Anteil des Elutionsmittels an (vgl. Abbildung 44).

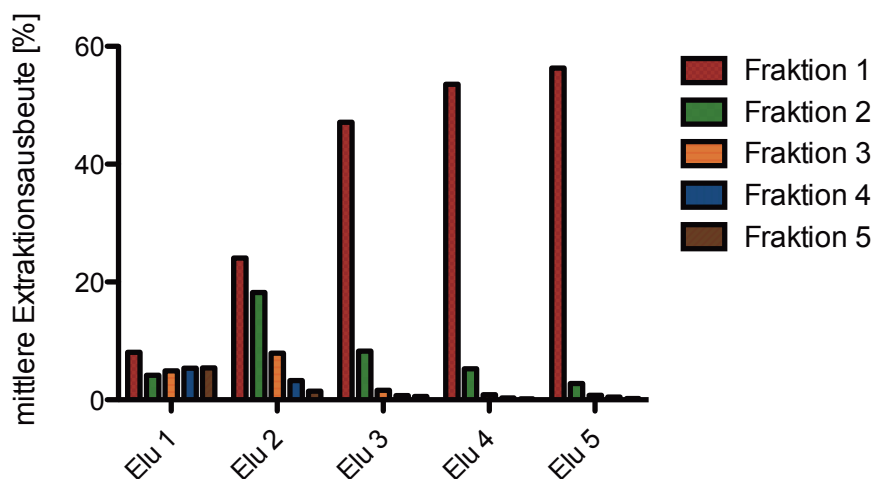


Abbildung 44: mittlere Wiederfindungsrate von (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin in den einzelnen 100- μ L-Fractionen beim Eluieren mit unterschiedlichen Lösungsmitteln

16.4 Extraktionen mit gereinigtem (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin

Aufgrund des Alters des radioaktiv-markierten Nicotins (synthetisiert am 14. 1. 2002) und dessen Halbwertszeit (12,43 Jahre) wurde (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin aus dem radioaktiv-gespikten Speichelpool mittels Festphasenextraktion nach dem oben entwickelten Protokoll extrahiert und wieder in einen ungespikten Speichelpool eingebracht, um etwaige radioaktive Zerfallsprodukte zu entfernen. Diese können unter Umständen beim Auftragen vermehrt durchbrechen oder aufgrund von irreversibler Bindung an das Säulenmaterial nicht mehr vollständig eluiert werden und so die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung beeinflussen.

Durch die Entfernung von etwaigen radioaktiven Zerfallsprodukten aus dem mit (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin gepikten Speichelpool konnte die Extraktionsausbeute von 60,2% auf 94,6% gesteigert werden (Elution mit 5% Ammoniak in 80% Acetonitril). Die Verluste beim Auftragen sowie beim Waschen konnten von 25,1% auf 1,2% beziehungsweise von 4,1% auf 0,4% reduziert werden. In der 1. Fraktion des Eluat wurden 91,8% des gesamten eluierten (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin wiedergefunden, in den folgenden Fraktionen 5,1%, 2,4%, 0,4% und 0,3%.

Tabelle 84: Übersicht der Verluste an (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin beim Auftragen und Waschen sowie die Extraktionsausbeute

	Mittelwert [%]	SD [%]	RSD [%]
Verlust beim Auftragen (Durchbruch)	1,18	0,11	9,66
Σ Verluste beim Waschen	0,4	0,04	10,74
Σ Extraktionsausbeute	94,63	4,39	4,64

Bei der Verwendung von MCX-Extraktionssäulen und dem unter Kapitel 8.6 (Tabelle 31) angeführtem Extraktionsschema können mehr als 94% des Zielanalyten, (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin, aus der Speichelmatrix extrahiert werden.

Tabelle 85: (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin-Extraktionsausbeute in den einzelnen Fraktionen des Eluats (100 -µL-Fraktionen)

	mittlere Recovery bezogen auf aufgetragene Menge (-)-[N-Methyl- ³ H]-Nicotin [%]	mittlere Recovery bezogen auf gesamte eluierte Menge (-)-[N-Methyl- ³ H]-Nicotin [%]
Eluat 1	86,86	91,80
Eluat 2	4,85	5,12
Eluat 3	2,24	2,37
Eluat 4	0,42	0,44
Eluat 5	0,26	0,25
Summe	94,63	100

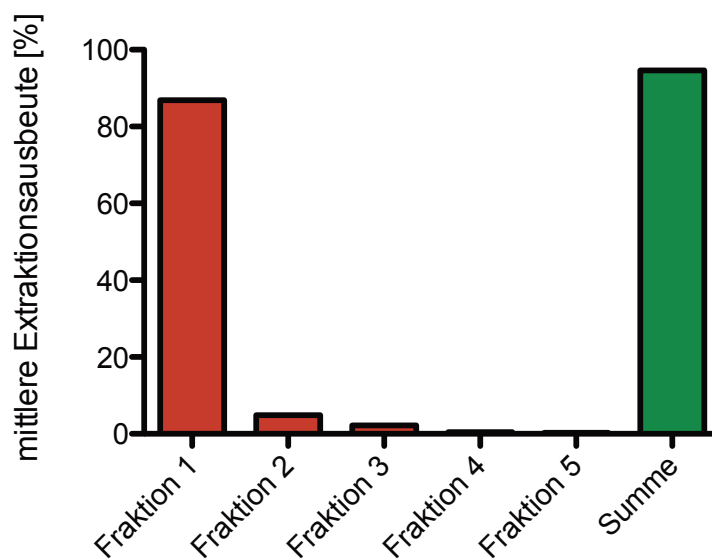


Abbildung 45: (-)-[N-Methyl-³H]-Nicotin-Extraktionsausbeute in den einzelnen Fraktionen (je 100 µL) des Eluats bezogen auf die aufgetragene Menge

16.5 Bestimmung der Wiederfindungsrate für Nicotin, Cotinin und Nornicotin

Die Extraktionsausbeute wurde nach den Richtlinien der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie* (GTFCh) bestimmt. Für die Auswertung wurde das Programm VALISTAT® verwendet.

Für Cotinin beträgt die Wiederfindungsrate von zehn Messungen aus der Speichelmatrix 104,4% bei 20 ng/mL und 101,2% bei 75 ng/mL im Vergleich zur Wiederfindung aus dem Lösemittel. Die Extraktionsausbeute für Nicotin konnte mit 89,4% (20 ng/mL) bzw. 84,5% (75 ng/mL) berechnet werden und für Nornicotin 94,1% (20 ng/mL) bzw. 86,2% (75 ng/mL).

Da alle Extraktionsausbeuten über 50% liegen, sind die empfohlenen Richtlinien der GTFCh erfüllt.

Tabelle 86: Extraktionsausbeute Cotinin

	20 ng/mL		75 ng/mL	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
1	19,1	20	75,9	73,2
2	18,8	19,82	73,9	75,2
3	19,1	0,7	73,1	75,9
4	19	20,4	73,4	75,7
5	19,1	20,4	73,6	74,9
6	19,3	20,1	73,9	75,5
7	19,2	19,4	75	75
8	19	19,5	73,8	74,4
9	19	20,3	73,2	74,9
10	19,7	20,1	74,3	74,6
Mittelwert	19,130	19,970	74,010	74,930
SD	0,241	0,359	0,865	0,769
Varianz	0,001	0,129	0,007	0,591
Wiederfindung	104,4%		101,2%	
SD	2,19%		2,06%	

Tabelle 87: Extraktionsausbeute Nicotin

	20 ng/mL		75 ng/mL	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
1	18,2	17,4	68	64,7
2	18,1	15,8	70,7	58,5
3	17,8	14,2	69,6	64,4
4	18,6	1704	68,8	55,3
5	18	16,6	72,2	57,6
6	18,3	15,8	71	61,4
7	17,1	15,25	72,9	60
8	17,7	16,9	69,8	62
9	17,8	16,4	71,6	54,7
10	18,2	14,8	71,8	58,1
Mittelwert	17,980	16,080	70,640	59,670
SD	0,410	1,064	1,566	3,466
Varianz	0,168	1,133	2,454	12,013
Wiederfindung	89,4%		84,5%	
SD	5,59%		6,02%	

Tabelle 88: Extraktionsausbeute Nornicotin

	20 ng/mL		75 ng/mL	
	Lösemittel	Matrix	Lösemittel	Matrix
1	20,3	19,3	74,3	75,6
2	20	17,8	75	66,1
3	20,7	14,7	74,3	59,6
4	20,5	19,4	73,7	53,8
5	20,5	19	74,2	70,7
6	20,5	20,2	73,1	66,4
7	20,3	20,4	75	50,5
8	20,6	20,5	72,2	69,9
9	20,3	20,4	75,2	5,4
10	20,4	20,2	73,7	50,5
Mittelwert	20,400	19,190	74,070	63,850
SD	0,194	1,791	0,933	9,673
Varianz	0,038	3,208	0,871	93,563
Wiederfindung	94,1%		86,2%	
SD	8,93%		13,08%	

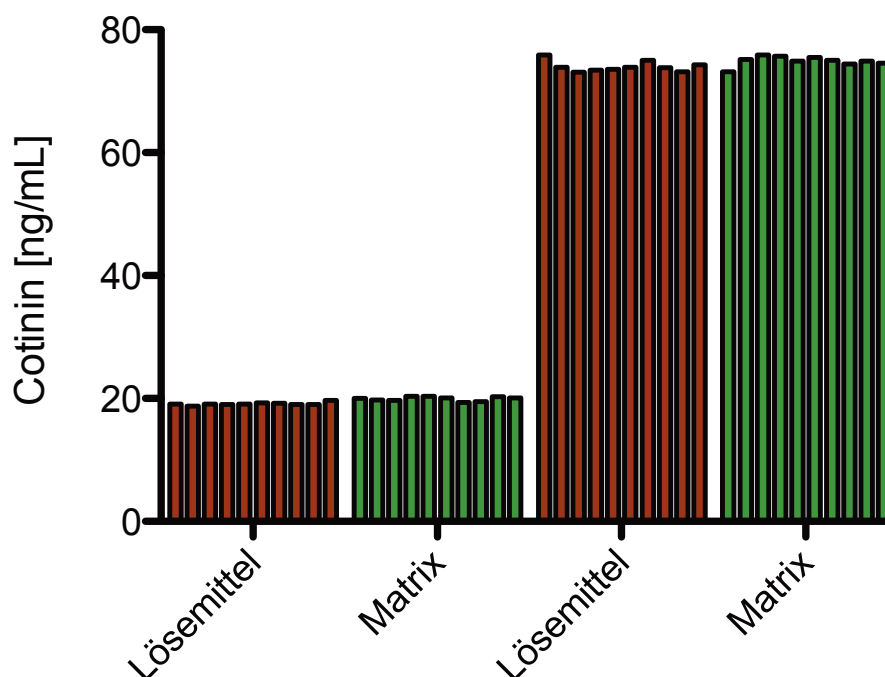


Abbildung 46: Vergleich der Extraktionsausbeute von Cotinin aus dem Lösemittel und aus der Matrix
links Zielwert 20 ng/mL, rechts Zielwert 75 ng/mL

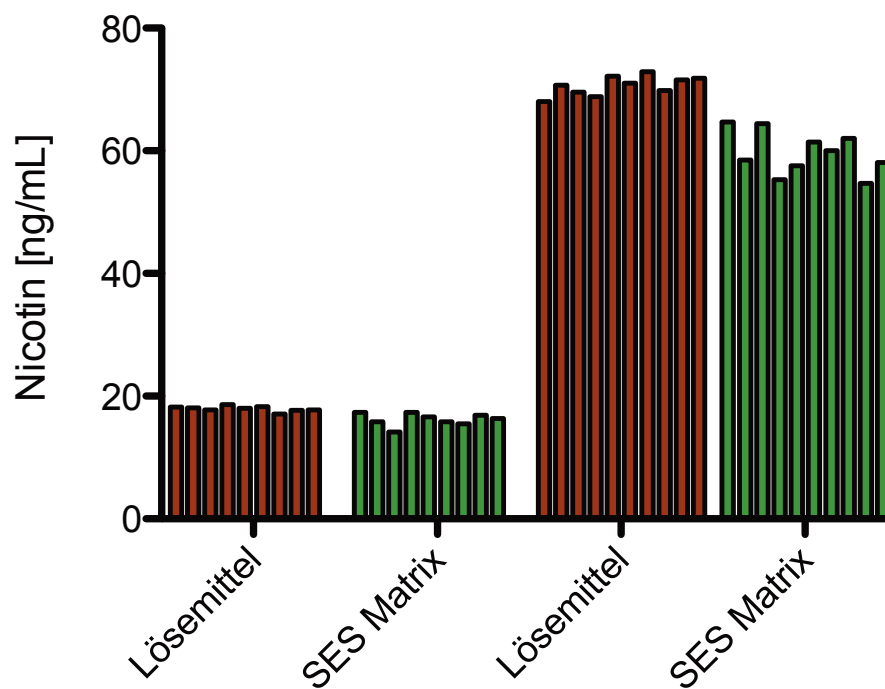


Abbildung 47: Vergleich der Extraktionsausbeute von Nicotin aus dem Lösemittel und aus der Matrix
links Zielwert 20 ng/mL, rechts Zielwert 75 ng/mL

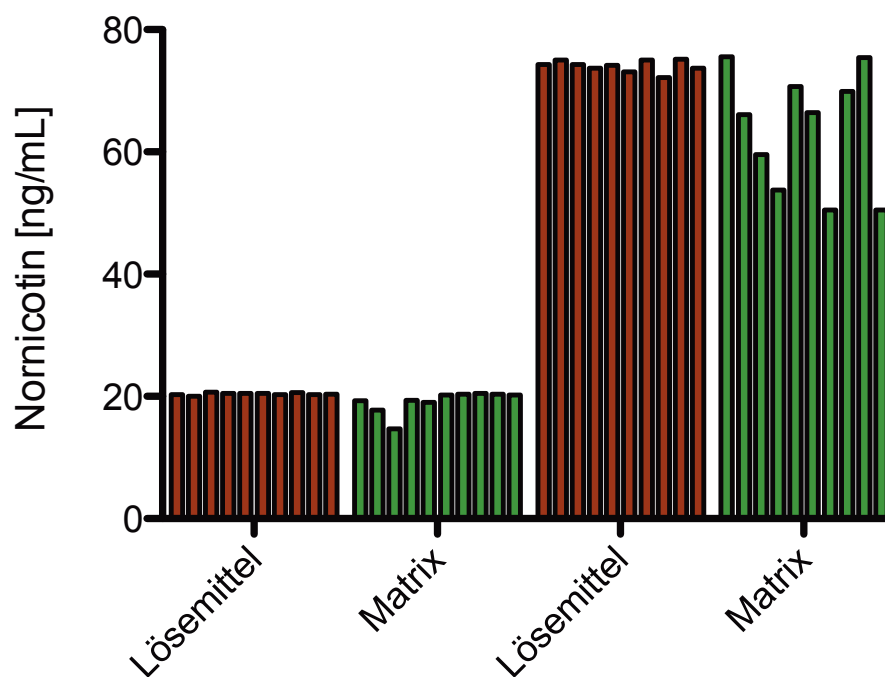


Abbildung 48: Vergleich der Extraktionsausbeute von Nor Nicotin aus dem Lösemittel und aus der Matrix
links Zielwert 20 ng/mL, rechts Zielwert 75 ng/mL

17 Entwicklung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben

17.1 Variation des organischen Anteils der mobilen Phase bei konstantem pH-Wert

Mit der mobilen Phase der Ausgangsbedingungen (30% Acetonitril, 70% 20 mM Ammoniumacetat pH 10,10) für die Methodenentwicklung konnte für Cotinin praktisch keine Retention ($k' 0,36$) erzielt werden. Nicotin zeigte unter diesen Bedingungen jedoch bereits eine gute mittlere Retention ($k' 2,83$). Durch die Reduktion des Acetonitril-Gehalts in der mobilen Phase konnte die Retention von Cotinin deutlich verbessert werden, ebenso konnte die Retention von Nicotin weiter erhöht werden. Bei 13% Acetonitril-Gehalt in der mobilen Phase hatte Cotinin einen k' -Wert von 1,02 und Nicotin einen k' -Wert von 4,2.

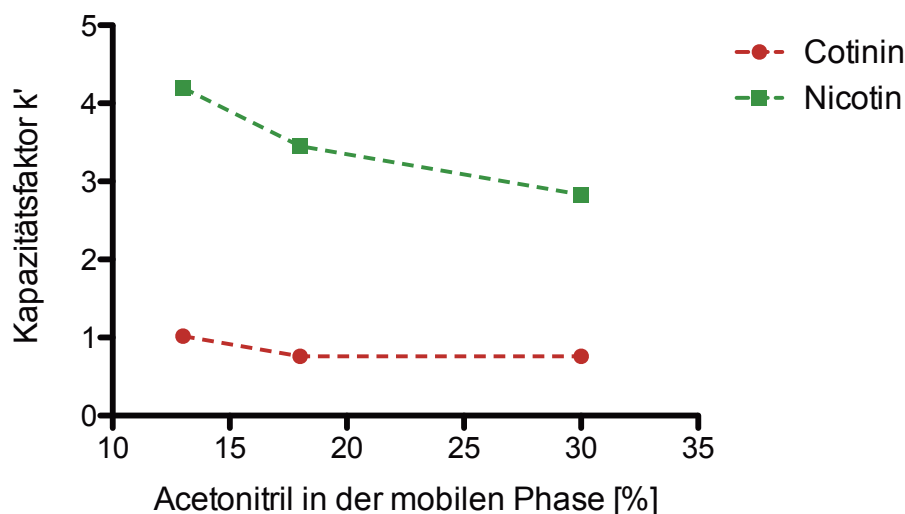


Abbildung 49: Abhängigkeit der Retention von Cotinin und Nicotin vom Acetonitril-Gehalt [%] der mobilen Phase;
Mobile Phase: Acetonitril-Anteil variabel, Puffer 20 mM Ammoniumacetat pH 10,10; Säule: Shodex ODP2 HP-2D 150 x 1,0 mm (RP-Polymersäule)

17.3 Auswahl eines geeigneten internen Standards für die UV-VIS-Detektion

Bevor weitere Versuche zur Methodenoptimierung unternommen wurden, wurde nach einem geeigneten internen Standard für die Quantifizierung von Nicotin, Cotinin und Nornicotin gesucht, falls eine UV-VIS-Detektion möglich wäre.

Von allen untersuchten Verbindungen erschien Octopamin, mit einer Retentionszeit von 16,3 min am geeignetsten, da dieses genau im Retentionszeitfenster zwischen Nicotin und Nornicotin eluierte. Bei den meisten anderen Verbindungen war entweder die Retentionszeit länger als 35 Minuten, was die Trennung unnötig verlängert hätte, oder sie eluierten gleichzeitig mit einem der Analyten. So eluierte zum Beispiel die Coumarilsäure gleichzeitig mit Cotinin, ebenso 1-Phenyl-3-Pyrazolidinon. Catinon (Retentionszeit 18,151 min) und 2-Phenylimidazol (Retentionszeit 21,093 min) eluierten wie Octopamin zwischen Nicotin und Nornicotin, zeigten aber eine schlechtere Peakperformance.

17.3.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate von Octopamin

Da der interne Standard bereits vor der Festphasenextraktion zur Probe zugesetzt wird, ist es notwendig auch dessen Wiederfindungsrate aus der Probe im Vergleich zum Lösemittel zu kennen. Sollte die Extraktionsausbeute zu niedrig sein, könnte der interne Standard nicht für die Quantifizierung verwendet werden, da der Fehler bei der Berechnung der Analytkonzentrationen dann zu groß werden würde.

Die Wiederfindungsrate bzw. Extraktionsausbeute von Octopamin wurde durch den Vergleich der Peakflächen von extrahierten Octopamin-hältigen Speichelproben und wässrigen, nicht extrahierten Referenzproben bestimmt. Die Extraktionsausbeute für Octopamin war 73,2% (SD 7,53; RSD 10,3%).

17.4 Änderung des pH-Werts des Puffers bei konstantem organischen Anteil der mobilen Phase

Zur weiteren Optimierung der Trennmethode wurde der pH-Wert des Puffers innerhalb des Pufferbereichs (pH 8,3 bis pH 10,3) variiert. Zusätzlich wurde die Retentionszeit von Coffein bestimmt, da dies in den meisten Speichelpuben zu erwarten ist und eine vollständige Trennung des Coffeins von den Analyten Cotinin, Nicotin und Nornicotin zur korrekten Quantifizierung dieser unbedingt notwendig ist.

Der Vergleich der Retentionszeiten der Verbindungen unter den geänderten pH-Wert-Bedingungen zeigen, daß es mit der Abnahme des Puffer-pH-Wertes zur Beschleunigung der Trennung in hinteren Bereich, das heißt zur rascheren Elution von Octopamin und Nornicotin kommt. Nicotin wird durch die pH-Wert-Abnahme nur geringfügig beschleunigt. Cotinin und Coffein werden praktisch überhaupt nicht beeinflusst.

Bei pH-Wert 8,70 überlappen sich die Peaks von Octopamin und Nornicotin, bei pH-Wert 9,10 sind diese gerade noch getrennt. Die optimale Trennung aller Verbindungen konnte bei pH-Wert 9,50 erreicht werden. Daher wurde dieser Puffer-pH-Wert für die weiteren Versuche gewählt.

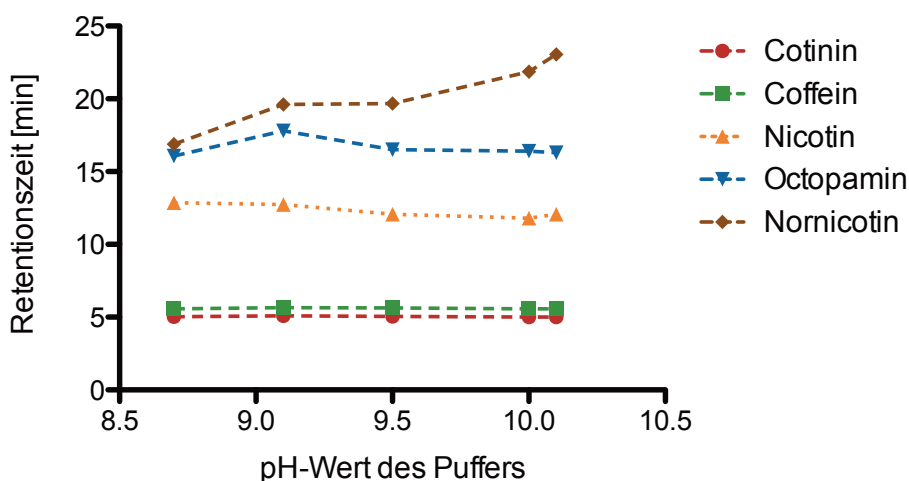


Abbildung 50: pH-Wert vs. Retentionszeit bei variablen pH-Wert des Puffers;
Mobile Phase: 13% Acetonitril, 87% 20 mM Ammoniumacetat-Puffer pH-Wert von 8,7 bis 10,10;
Säule: Shodex ODP2 HP-2D 150 x 1,0 mm (RP-Polymersäule)

17.5 Änderung der Flußrate

Durch die Erhöhung der Flußrate kommt es zu einer Beschleunigung des Trennsystems im Ganzen, die Selektivität des Trennsystems wird nicht verändert. Eine Erhöhung der Flußrate führt auch zur Zunahme des Säulendrucks. Da bei einer Flußrate von 240 $\mu\text{L}/\text{min}$ der Rückdruck 81 bar beträgt, ist eine Beibehaltung der erhöhten Flußrate möglich, da der maximale Säulendruck bei der Shodex ODP2 HP-2D Säule laut Hersteller bei 150 bar liegt.

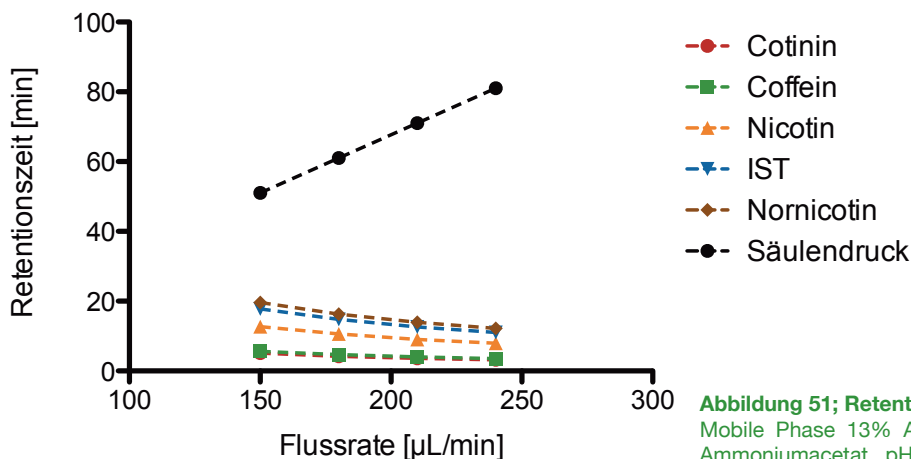


Abbildung 51; Retentionszeit vs. Flußrate;
Mobile Phase 13% Acetonitril, 87% 20 mM Ammoniumacetat pH 9,10; Säule: Shodex ODP2 HP-2D 150 x 1,0 mm (RP-Polymersäule)

17.6 Entwicklung eines Gradientenprogrammes

17.6.1 Variation des Acetonitril-Anteils der mobilen Phase

Bevor mit der Entwicklung des Gradientenprogrammes begonnen wurde, wurde das Retentionsverhalten der Analyte unter geänderten Acetonitril-Anteilen in der mobilen Phase untersucht.

Durch die Erhöhung des Acetonitril-Anteils werden die Analyten im hinteren Bereich des Chromatogrammes, also jene die eine stärkere Retention (Nicotin und Nornicotin) zeigen, stark beschleunigt. Die rascher eluierenden Analyte, Cotinin und Cotinin-d₃ (iSt) werden weniger stark beschleunigt.

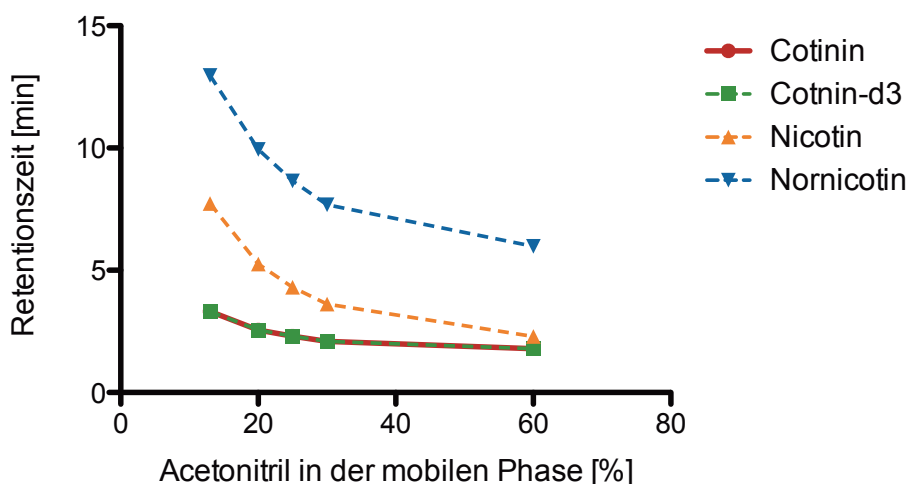


Abbildung 52: Einfluß des Acetonitril-Anteils in der mobilen Phase auf die Retention;

Mobile Phase: Acetonitril-Anteil [%] variabel, 20 mM Ammoniumacetat pH 9,50; Säule: Shodex ODP2 HP-2D 150 x 1,0 mm (RP-Polymersäule)

17.6.2 Gradientenprogramme

Die Erkenntnisse aus dem oben gezeigten Daten wurden für die Entwicklung eines geeigneten Gradientenprogramms herangezogen. In mehreren Versuchen wurde der Acetonitril-Anteil in der mobilen Phase kontinuierlich von 13% auf 60%, 70%, 80% bzw. 90% Acetonitril erhöht, dabei wurde auch die Steilheit des Gradienten mehrmals modifiziert (siehe Tabelle 89).

Durch das Gradientenprogramm konnten die später eluierenden Analyten, Nicotin und Nornicotin beschleunigt werden und so die Laufzeit der Analyse verkürzt werden. Die Retention von Cotinin, sowie von Cotinin-d₃ wurden nur sehr wenig verkürzt, sodaß dieses noch immer ausreichend lange auf der Säule reteniert werden.

In den Gradientenbedingungen 7 und 8 wurde die Steilheit des Gradienten reduziert, das heißt die Zeitspanne in der der Acetonitril-Anteil von 13% auf 80% bzw. 90% Acetonitril erhöht wurde, wurde von ursprünglich fünf Minuten auf zwölf Minuten verlängert. Diese Änderung bewirkte eine starke Erhöhung der Retentionszeit von Nornicotin. Nicotin eluierte ebenfalls wieder verzögert, aber dessen Peakperformance verbesserte sich. Die Trennung insgesamt wurde unter den flacheren Gradientenbedingungen besser reproduzierbar. Daher wurde die Gradientenbedingung 8 als Methode der Wahl zur Trennung von Nicotin, Cotnin und Nornicotin angenommen.

Tabelle 89: Getestete Gradientenbedingungen (vgl. Kapitel 9.7.2)

	Startzeitpunkt des Gradienten nach der Injektion [min]	Dauer des Gradienten [min]	Acetonitril-Anteil [%] am Beginn	Acetonitril-Anteil [%] am Ende	Äquilibrierungszeit [min] unter Startbedingungen	Totale Laufzeit [min]
Gradient 1	0	13	13	60	10	25
Gradient 2	2	5	13	60	10	17
Gradient 3	2	5	13	70	10	17
Gradient 4	2	5	13	80	10	17
Gradient 5	1	6	13	80	10	17
Gradient 6	0	7	13	80	10	17
Gradient 7	0	12	13	80	5	17
Gradient 8	0	12	13	90	5	17

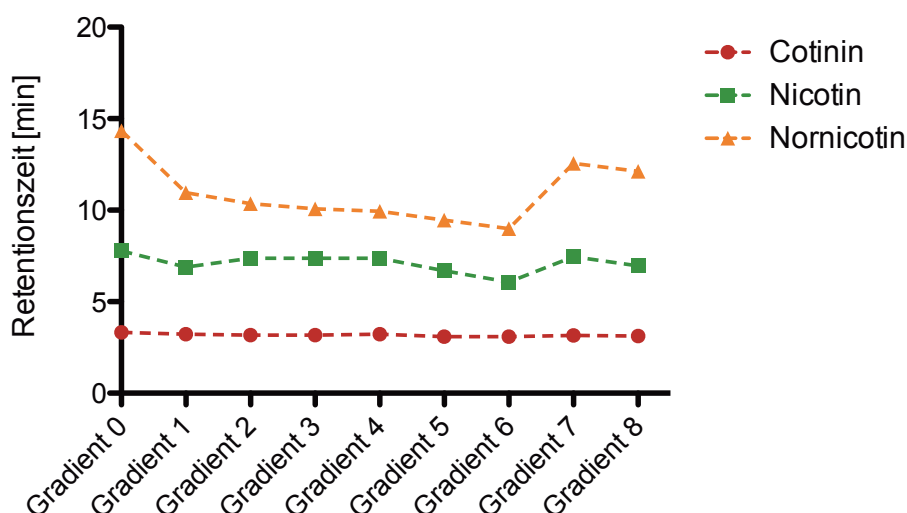


Abbildung 53: Retention von Cotinin, Nicotin und Nornicotin unter verschiedenen Gradientenbedingungen;
 Gradient 0 entspricht den Ausgangsbedingungen (13%ACN, 87% 20 mM Ammoniumacetat pH 9,51);
 Gradient 1 bis Gradient 8 sind in Tabelle 89 zusammengefasst

17.7 Bestimmung der Bestimmungsgrenze

Gespikte Speichelproben mit bekannter Konzentration (1 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL und 125 ng/mL Cotinin und Nicotin) wurden wie normale Speichelproben mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert und anschließend mittel LC/MS vermessen.

Aus den Messwerten wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) berechnet. Die relative Standardabweichung wurde gegen die Konzentration aufgetragen und die Bestimmungsgrenze bei RSD = 20% graphisch bestimmt. Die Bestimmungsgrenze für Nicotin beträgt 1,5 ng/mL und für Cotinin 2,2 ng/mL.

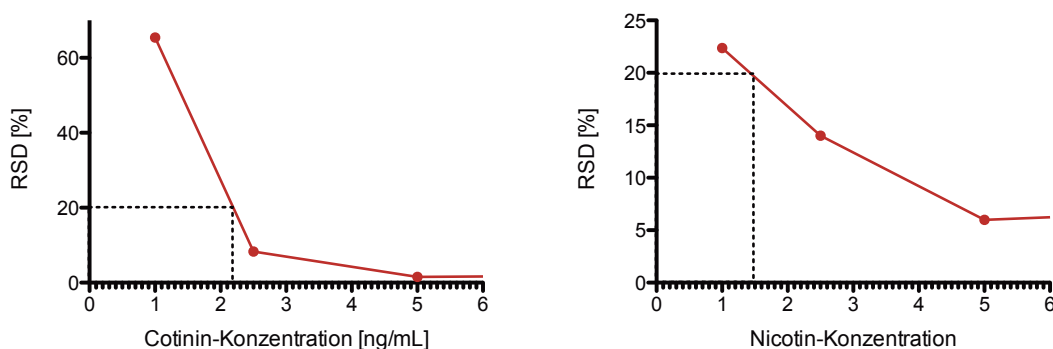


Abbildung 54: Ermittlung der Bestimmungsgrenze für Cotinin (links) und Nicotin (rechts)

Für Nornicotin wurde keine Bestimmungsgrenze ermittelt, da aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Extraktionsausbeute (Standardabweichung 13,08% bei 75 ng/mL) auf eine Quantifizierung dieses Metaboliten verzichtet wurde (siehe auch Kapitel 16.5, Tabelle 88).

17.8 Bestimmung der zufälligen und systematischen Fehler

Es wurden zur Bestimmung der zufälligen (Präzision) und systematischen (Bias, Abweichung des Meßwertes vom „wahren Wert“) Fehler zwei Qualitätskontrollen (20 ng/mL und 125 ng/mL) an sechs verschiedenen Arbeitstagen je viermal bestimmt.

Die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit (zufälliger Fehler innerhalb der Tage) für Cotinin betrug 2,58% (20 ng/mL) und 0,34% (125 ng/mL), die relative Standardabweichung der Laborpräzision (zufälliger Fehler zwischen den Tagen) betrug 3,9% bzw. 0,3% und die Richtigkeit (Bias) -4,2% und 0,03%.

Für Nicotin betrug die relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit 5,7% und 3,7%, die

relative Standardabweichung der Laborpräzision 10,1% bzw. 6,9% und die Richtigkeit (Bias) -8,2% und -0,4%.

Da alle Werte unter den von der von der GTFCh geforderten 15%-Grenze liegen, sind die Bedingungen der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie* erfüllt.

Da Nornicotin beim Vermessen der Proben nicht quantifiziert wird, wurde auf eine Bestimmung der zufälligen und systematischen Fehler bei diesem Analyten verzichtet.

Tabelle 90: Cotinin - zufälliger und systematischer Fehler

Kontrolle	20 ng/mL	125 ng/mL
Mittelwert gesamt	19,167	125,043
Standardabweichung	0,725	0,421
relative Standardabweichung (RSD)	3,78%	0,34%
Wiederholbarkeit (Kriterium < 15%)		
Standardabweichung	0,495	0,43
relative Standardabweichung (RSD)	2,58%	0,34%
Laborpräzision (Kriterium < 15%)		
Standardabweichung	0,753	0,428
relative Standardabweichung (RSD)	3,93%	0,34%
Richtigkeit (Kriterium Bias < 15%)		
Abweichung	-0,833	0,043
Bias	-4,17%	0,03%

Tabelle 91: Nicotin - zufälliger und systematischer Fehler

Kontrolle	20 ng/mL	125 ng/mL
Mittelwert gesamt	18,352	119,513
Standardabweichung	1,803	7,904
relative Standardabweichung (RSD)	9,83	6,61
Wiederholbarkeit (Kriterium < 15%)		
Standardabweichung	1,037	4,378
relative Standardabweichung (RSD)	5,65%	3,66%
Laborpräzision (Kriterium < 15%)		
Standardabweichung	1,891	8,305
relative Standardabweichung (RSD)	10,31%	6,95%
Richtigkeit (Kriterium Bias < 15%)		
Abweichung	-1,648	-0,487
Bias	-8,024%	-0,41%

18 „Cotinin-Studie“

Für die „Cotinin-Studie“ wurden insgesamt 199 Personen zu ihrem Rauchverhalten befragt und 199 Speichelproben von diesen Personen gesammelt. 94 Testpersonen gaben zusätzlich zur Speichelprobe eine Harnprobe ab und gaben detaillierte Auskunft über ihren Raucherstatus (Nichtraucher, Passivraucher, Nicotin-Ersatzmittel, Gelegenheitsraucher, Raucher) und die Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Tag.

Nach Auskunft der Probanden nahmen 86 Nichtraucher (43,22%), 14 Passivraucher (7,04%), eine Person, die ein Nicotin-Ersatzmittel benutzte (0,50%), neun Gelegenheitsraucher (4,52%) und 89 Raucher (44,72%) an der Studie teil. Somit war das Verhältnis zwischen den Personen, mit freiwilliger Nicotin-Aufnahme (Nicotin-Ersatzmittel, Gelegenheitsraucher, Raucher) und Personen, die kein Nicotin oder dieses nur unfreiwillig aufnahmen (Nichtraucher und Passivraucher) ziemlich ausgeglichen (49,75% vs. 50,25%).

Unter den 94 genauer befragten Probanden befanden sich 53 Raucher (56,38%), neun Gelegenheitsraucher (9,57%), eine Person, die ein Nicotin-Ersatzmittel benutzte (1,06%), 14 Passivraucher (14,89%) und 17 Nichtraucher (18,09%). Von den 53 Rauchern wurde die durchschnittliche Anzahl der pro Tag konsumierten Zigaretten erhoben, um die durchschnittliche tägliche Nicotin-Dosis abschätzen zu können.

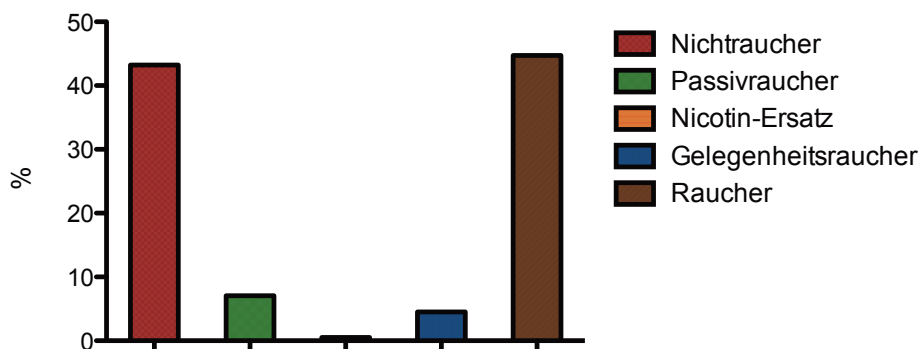


Abbildung 55: Selbstdeklariierter Raucher-Status der Probanden

Der mittlere Speichelanteil in den 199 Speichelproben betrug 77,9% (SD 10,81%). Der Mittelwert der Speichelanteile betrug bei den selbst deklarierten Nichtrauchern 81,8% (SD 10,26), bei den Passivrauchern 71,3% (SD 10,15), bei den Gelegenheitsrauchern 68,96% (SD 14,07) und bei den Rauchern 76,2% (SD 9,72). Der Speichelanteil in der Probe des Probanden, der ein Nicotin-Ersatzmittel benutzte betrug 66% (siehe auch Tabelle 92).

Der niedrigste gemessene Speichelanteil betrug 44,5% und der höchste gemessene Speichelanteil betrug 98,1%. Die Verteilung des Speichelanteils ist in Abbildung 56 dargestellt.

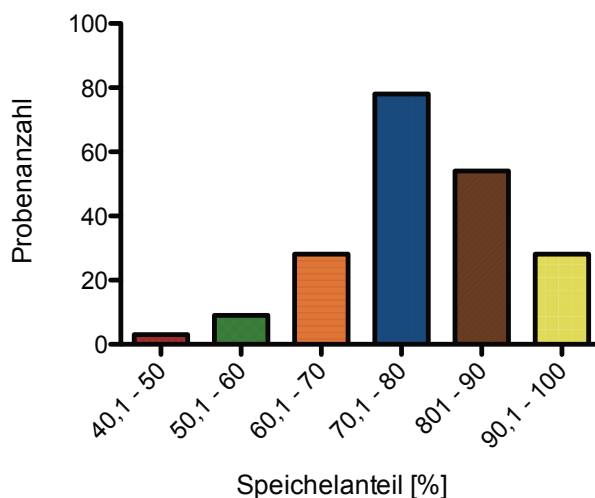


Abbildung 56: Verteilung des Speichelanteils

Tabelle 92: Übersicht des Speichelanteils nach selbstdeklariertem Raucher-Status der Probanden

	Mittelwert	Standardabweichung	geringster Speichelanteil	höchster Speichelanteil
Nichtraucher	81,8	10,26	44,5	97
Passivraucher	71,8	10,15	52,4	85,6
Nicotin-Ersatz*	66	--	--	--
Gelegenheitsraucher	68,9	14,07	45,4	81,6
Raucher	76,2	9,72	51,2	98,1

* Daten nicht repräsentativ, da nur eine Probe

Tabelle 93: Cotinin-Konzentration in den mit dem modifiziertem Immunoassay (EMIT) und der LC/MS vermessenen Speichelproben

	Mittelwert Cotinin in Probe [ng/mL]		Standardabweichung		Spannweite Cotinin in Probe [ng/mL]	
	EMIT	LC/MS	EMIT	LC/MS	EMIT	LC/MS
Nichtraucher	19,3	6,8	17,39	24,61	0 - 84,4	0 - 166,7
Passivraucher	6,5	4,6	18,06	12,65	0 - 63,9	0 - 46,13
Nicotin-Ersatz *	175,2	152,1				
Gelegenheitsraucher	24,4	14,5	53,62	33,87	0 - 163,8	0 - 104,1
Raucher	166,5	148,2	101,01	90,02	0 - 461,1	0 - 451,3

* Daten nicht repräsentativ, da nur eine Probe

Die mittlere Cotinin-Konzentration in den Speichelproben der selbst-deklarierten Rauchern betrug 166,5 ng/mL (gemessen mit dem Immunoassay am Olympus AU640) bzw. 148,2 ng/mL (LC/MS-Methode). Für die Gelegenheitsraucher betragen die Mittelwerte 24,4 ng/mL bzw. 14,5 ng/mL, für die Passivraucher 6,5 ng/mL bzw. 4,6 ng/mL sowie für die Nichtraucher 19,3 ng/mL und 6,8 ng/mL (siehe auch Tabelle 93).

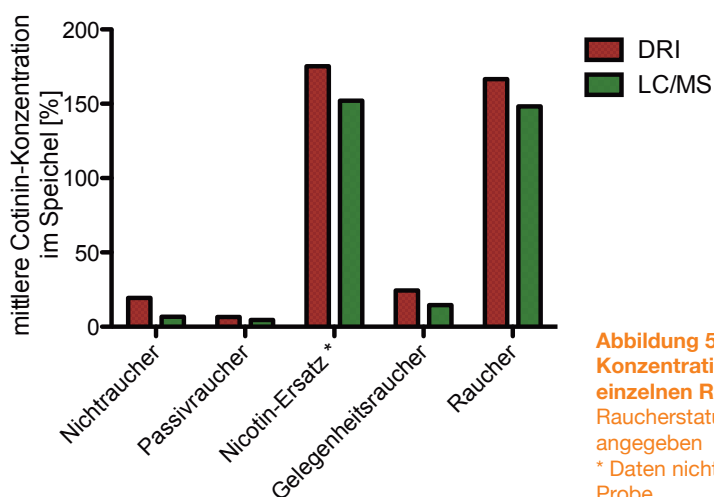


Abbildung 57: mittlere Cotinin-Konzentration in den Speichelproben der einzelnen Raucher-Status-Gruppen; Raucherstatus von den Probanden selbst angegeben

* Daten nicht repräsentativ, da nur eine Probe

Tabelle 94: Cotinin-Konzentration in den mit dem Immunassay (EMIT) vermessenen Harnproben

	Mittelwert Cotinin im Harn [ng/mL]	Standardabweichung	Spannweite Cotinin im Harn [ng/mL]
Nichtraucher	25,4	97,67	0 - 404
Passivraucher	56,4	188,42	0 - 708
Nicotin-Ersatz *	2204,1		
Gelegenheitsraucher	230,1	552,41	0 - 1692
Raucher	1938,4	1258,15	213 - 4996

* Daten nicht repräsentativ, da nur eine Probe

In den Harnproben der Raucher betrug die mittlere gemessene Cotinin-Konzentration 1.938,4 ng/mL, bei den Gelegenheitsrauchern 230,1 ng/mL, bei den Passivrauchern 56,3 ng/mL und bei den Nichtrauchern 25,3 ng/mL. In der Harnprobe des Probanden, der ein Nicotin-Ersatzmittel benutzte, konnten 2.204,1 ng/nL Cotnin nachgewiesen werden (siehe Tabelle 94).

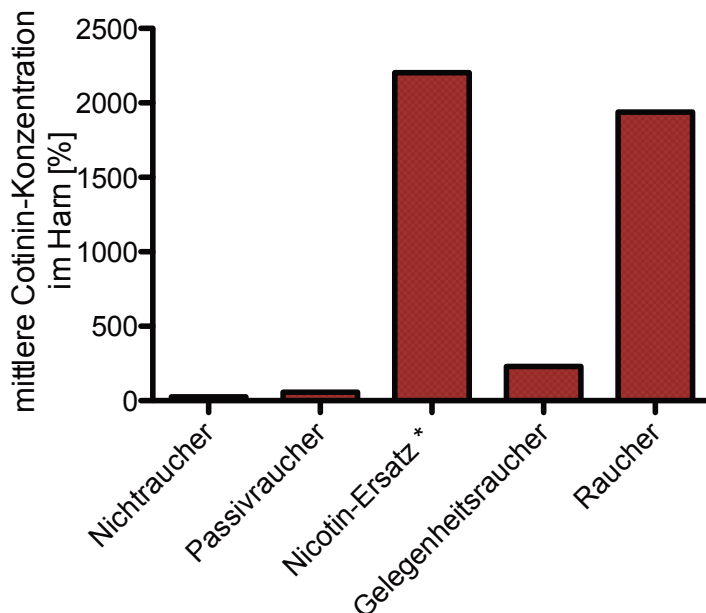


Abbildung 57: mittlere Cotinin-Konzentration in den Harnproben der einzelnen Raucher-Status-Gruppen; Raucherstatus von den Probanden selbst angegeben
* Daten nicht repräsentativ, da nur eine Probe

Eine Übersicht der Ergebnisse der vermessenen Speichel- und Harnproben mittels dem modifizierten Immunoassay (EMIT) am Olympus AU640 und auf der LC/MS ist in Tabelle 95 dargestellt. Aus den Speichelpuben von 53 Rauchern wurde mittels LC/MS zusätzlich zur Cotinin-

Tabelle 95: Ergebnisse der „Cotinin-Studie“: Speichelanteil, Cotinin-Konzentration in 100% Speichel (berechnet) und Cotinin-Konzentration im Harn

Status: 1 ... Nichtraucher, 2 ... Passivraucher, 3 ... Nicotin-Ersatzmittel, 4 Gelegenheitsraucher, 5 ... Raucher (Status von den Probanden selbst angegeben)

SANT ... Speichelanteil

Probe	Status	Zigaretten/Tag	SANT [%]	Cotinin im Speichel [ng/mL]		Cotinin im Harn [ng/mL]
				DRI	LC/MS	DRI
1	1		76,7	0,0	0,0	0,0
2	2		63,2	0,0	0,0	0,0
3	5	15	78,7	250,4	231,2	2212,0
4	5	15	75,0	253,2	196,3	1083,0
5	5	20	76,7	177,2	136,6	2252,0
6	5	30	82,4	251,2	248,8	3632,0
7	1		82,1	0,0	0,0	10,0
8	5	5	82,9	48,0	31,4	710,0
9	4		81,5	28,3	9,6	62,0
10	5	20	71,0	145,9	149,4	2571,0
11	5	20	79,9	316,6	300,7	4286,0
12	5	25	80,7	126,9	162,9	2279,0
13	1		79,6	0,0	0,0	0,0

				Cotinin im Speichel [ng/mL]		Cotinin im Harn [ng/mL]
Probe	Status	Zigaretten/Tag	SANT [%]	EMIT	LC/MS	EMIT
14	5	10	71,9	80,7	48,9	825,0
15	1		78,8	23,1	0,0	0,0
16	5	15	51,7	75,0	85,0	2060,0
17	5	30	75,8	53,0	26,4	213,0
18	2		85,6	0,0	0,0	6,0
19	5	25	84,7	224,0	217,4	3330,0
20	5	10	72,7	339,1	235,1	3259,0
21	5	20	63,9	161,5	136,8	1139,0
22	3		66,0	175,2	152,1	2204,0
23	5	25	66,1	183,8	161,7	1733,0
24	4		69,7	0,0	0,0	0,0
25	5	20	72,7	296,6	242,3	987,0
26	5	40	78,7	298,0	272,2	4811,0
27	5	30	67,2	191,5	163,8	2690,0
28	1		72,3	0,0	7,4	0,0
29	2		52,4	0,0	0,0	7,0
30	4		76,9	28,0	0,0	215,0
31	5	40	62,5	147,7	135,7	1306,0
32	5	20	77,5	93,0	64,1	645,0
33	5	30	74,3	123,4	103,3	576,0
34	4		68,3	0,0	0,0	0,0
35	1		76,0	0,0	0,0	0,0
36	1		73,7	0,0	0,0	0,0
37	2		71,3	0,0	0,0	0,0
38	1		81,0	0,0	0,0	0,0
39	5	5	74,7	33,5	21,1	328,0
40	5	15	76,0	173,7	140,0	1036,0
41	5	20	70,3	444,1	355,4	3384,0
42	1		78,0	0,0	0,0	0,0
43	5	15	77,5	127,9	111,3	742,0
44	2		75,8	0,0	0,0	0,0
45	1		77,3	0,0	0,0	0,0
46	5	30	61,0	180,0	181,9	1475,0
47	5	20	83,2	204,8	172,8	687,0
48	5	30	70,4	192,5	201,3	1414,0
49	5	7	72,4	49,0	41,2	563,0
50	2		79,9	64,0	46,1	708,0
51	5	40	78,1	258,3	252,3	3727,0
52	4		45,4	0,0	0,0	0,0
53	1		79,7	0,0	0,0	0,0
54	5	8	71,9	0,0	23,4	257,0
55	2		78,9	0,0	0,0	0,0
56	5	30	80,8	173,1	181,4	2034,0
57	5	25	61,4	249,8	251,5	3081,0
58	5	20	78,9	368,3	349,3	3126,0
59	5	20	80,6	210,0	213,6	1850,0
60	1		74,5	0,0	0,0	0,0
61	5	10	80,8	87,1	61,6	221,0
62	5	20	78,4	442,5	451,3	3893,0
63	2		77,9	0,0	0,0	0,0
64	5	20	82,3	212,8	194,3	2083,0
65	5	20	69,8	315,0	201,1	2215,0

				Cotinin im Speichel [ng/mL]		Cotinin im Harn [ng/mL]
Probe	Status	Zigaretten/Tag	SANT [%]	EMIT	LC/MS	EMIT
66	5	40	78,3	296,6	279,0	2750,0
67	1		68,8	0,0	0,0	0,0
68	5	30	68,1	242,6	231,9	1805,0
69	5	15	67,9	45,5	54,4	701,0
70	5	20	78,8	120,1	105,5	345,0
71	5	15	75,6	73,4	53,6	426,0
72	2		53,6	0,0	0,0	0,0
73	2		79,6	0,0	2,9	0,0
74	2		70,3	27,3	15,6	68,0
75	4		79,3	163,7	104,1	1692,0
76	4		45,9	0,0	7,0	25,0
77	5	15	51,2	167,2	159,6	1663,0
78	2		73,5	0,0	0,0	0,0
79	1		63,5	0,0	0,0	1,0
80	2		63,2	0,0	0,0	0,0
81	4		72,0	0,0	0,0	13,0
82	5	6	62,5	61,0	51,6	1042,0
83	4		81,6	0,0	10,0	64,0
84	5	25	55,7	150,4	134,8	1780,0
85	5	40	76,1	221,9	196,9	1370,0
86	2		79,4	0,0	0,0	0,0
87	5	40	78,3	461,2	386,8	4996,0
88	5	20	73,0	130,1	122,4	2012,0
89	1		71,8	0,0	0,0	16,0
90	5	25	73,9	204,5	185,3	2569,0
91	5	20	75,5	296,6	264,6	2716,0
92	1		73,6	63,9	57,4	404,0
93	5	20	77,1	133,1	129,2	3846,0
94	1		44,5	0,0	0,0	0,0
95	5		57,9	156	131,9	
96	5		82,4	327,5	269,9	
97	5		72,7	131,9	108,7	
98	5		58,5	135,2	97,3	
99	5		77,3	233,9	179,5	
100	5		81,4	210,4	148,5	
101	5		77,1	204,5	138,5	
102	5		74,8	188,0	138,1	
103	5		74,5	22,9	6,4	
104	5		59,6	241,3	200,2	
105	5		80,4	242,9	210,0	
106	5		65,1	306,8	228,9	
107	5		84,4	107,9	114,3	
108	5		77,3	155,8	100,6	
109	5		88,6	133,5	192,4	
110	5		89,7	49,4	48,4	
111	5		81,8	150,1	159,5	
112	5		76,9	152,5	130,3	
113	5		71,9	123,5	68,4	
114	5		68,4	86,8	79,8	
115	5		76,5	194,8	167,3	
116	1		71,9	0,0	0,0	
117	1		77,1	0,0	0,0	

				Cotinin im Speichel [ng/mL]	
Probe	Status	Zigaretten/Tag	SANT [%]	DRI	LC/MS
119	1		86,6	23,4	0,0
120	1		72,2	0,0	0,0
121	1		62,2	0,0	0,0
122	1		52,1	0,0	0,0
123	1		76,4	0,0	34,4
124	1		66,8	31,1	9,1
125	1		84,3	27,0	0,0
126	1		78,4	0,0	0,0
127	1		77,8	26,2	4,6
128	1		66,6	0,0	0,0
129	1		68,7	0,0	0,0
130	1		81,4	0,0	0,0
131	1		80,5	20,7	0,0
132	1		86,4	27,5	0,0
133	1		66,7	0,0	0,0
134	1		75,5	0,0	0,0
135	1		63,6	23,7	10,6
136	1		88,8	20,3	0,0
137	1		76,0	84,4	106,6
138	1		83,4	26,9	0,0
139	1		78,7	0,0	0,0
140	1		85,8	23,8	2,3
141	1		88,2	0,0	0,0
142	1		78,8	28,0	0,0
143	1		85,3	26,7	0,0
144	1		95,4	36,5	16,7
145	1		88,6	31,5	0,0
146	1		92,2	28,9	0,0
147	1		93,6	27,1	0,0
148	5		92,3	43,3	45,6
149	1		94,9	31,4	0,0
150	1		79,5	33,8	0,0
151	1		89,7	35,2	0,0
152	5		89,0	80,6	105,6
153	5		90,6	58,5	84,8
154	1		95,4	29,5	0,0
155	1		90,7	33,3	0,0
156	5		61,0	84,8	92,4
157	5		85,8	107,7	99,4
158	5		86,5	48,8	24,8
159	1		87,9	29,7	0,0
160	1		93,1	28,8	0,0
161	1		93,2	29,4	0,0
162	1		91,3	25,6	0,0
163	1		90,4	33,5	0,0
164	1		96,2	27,2	0,0
165	5		89,4	43,5	25,3
166	1		90,7	29,2	0,0
167	1		94,6	35,5	0,0
168	1		95,2	24,4	0,0
169	5		91,5	78,9	71,9
170	1		87,9	0,0	0,0

				Cotinin im Speichel [ng/mL]	
Probe	Status	Zigaretten/Tag	SANT [%]	DRI	LC/MS
171	1		87,4	30,3	0,0
172	5		80,3	53,5	49,9
173	5		90,3	79,1	64,3
174	5		89,7	130,5	169,5
175	1		85,7	23,8	0,0
176	1		91,8	25,7	0,0
177	1		97,0	25,2	0,0
178	1		94,9	28,5	0,0
179	5		96,2	89,0	147,7
180	1		86,3	26,7	0,0
181	5		87,0	65,5	42,4
182	5		91,1	113,1	139,4
183	1		85,9	25,3	0,0
184	1		67,1	0,0	30,2
185	5		98,1	25,5	0,0
186	1		91,1	30,0	0,0
187	1		79,0	19,0	84,7
188	1		84,1	25,2	0,0
189	1		89,7	30,4	0,0
190	1		90,9	29,3	0,0
191	1		91,7	30,2	0,0
192	1		82,5	29,8	166,7
193	1		86,2	29,0	0,0
194	1		87,5	29,0	0,0
195	1		87,1	31,8	0,0
196	1		79,4	37,4	0,0
197	1		91,3	0,0	0,0
198	1		89,2	31,4	0,0
199	1		82,5	28,0	0,0
Mittelwert			77,93	85,28	70,99
Standardabweichung			10,81	101,51	94,22

Konzentration auch die Nicotin-Konzentration bestimmt. Für diese 53 Proben betrug die mittlere Cotinin-Konzentration im Speichel 171,89 ng/mL (SD 97,49) und die mittlere Nicotin-Konzentration 440,41 ng/mL (SD 604,69). Im Harn betrug die mittlere Cotinin-Konzentration 1.938,42 ng/nL (SD 1258,15).

Die mittlere Cotinin- bzw. Nicotin-Konzentration im Speichel und Harn aufgeschlüsselt nach der Anzahl der Zigaretten, die von den Probanden durchschnittlich geraucht wurden, ist in Tabelle 96 und Abbildung 60 dargestellt.

Tabelle 96: mittlere Cotinin- bzw. Nicotin-Konzentration in den 53 Speichel- und Harnproben aufgeschlüsselt nach der täglichen Zigaretten-Zufuhr der Probanden

Zigaretten/Tag	MW Cotinin/Speichel [ng/mL]	SD Cotinin/Speichel	MW Nicotin/Speichel [ng/mL]	SD Nicotin/Speichel	MW Cotinin/Harn [ng/mL]	SD Cotinin/Harn
bis 10	33,74	12,72	159,8	266,2	580	315,62
10	115,19	104,01	641,86	724,32	1435	1608,24
15	128,92	64,93	197,08	282,67	1240,38	661,55
20	211,14	104,16	360,63	1297,33	2237,47	1211,56
25	185,6	42,48	950,96	1336,03	2462	660,01
30	167,36	72,06	338,68	249,63	1729,88	1097,73
40	253,81	84,68	749,1	682,83	3160	1626,51

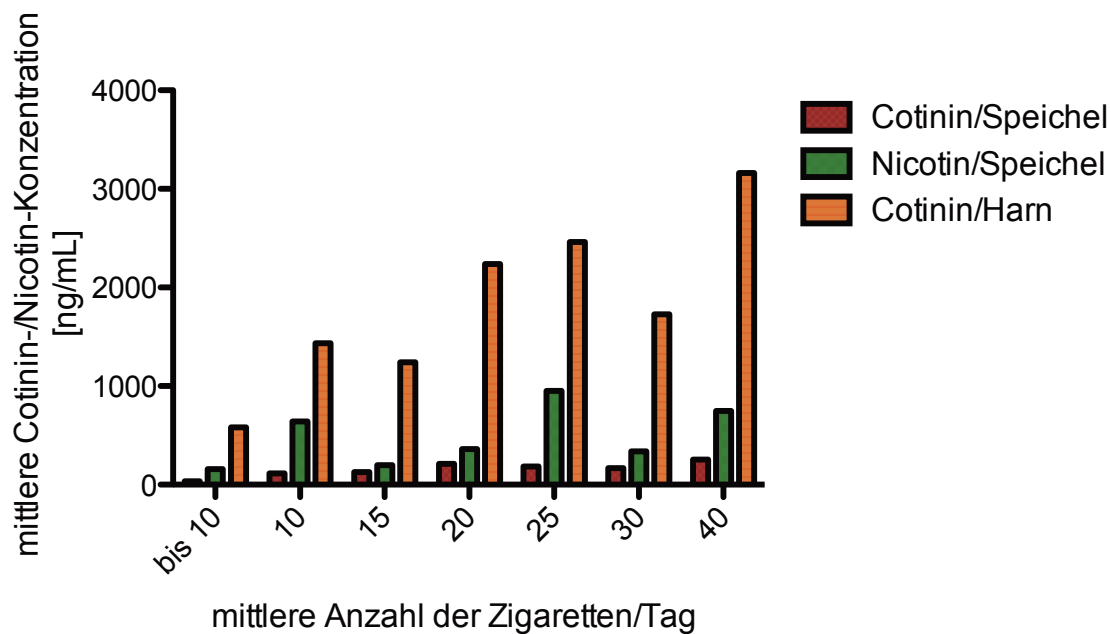


Abbildung 60: mittlere Cotinin- bzw. Nicotin-Konzentration in den 53 Speichel- und Harnproben aufgeschlüsselt nach der täglichen Zigaretten-Zufuhr der Probanden

Tabelle 97: Cotinin- und Nicotin-Konzentration in Speichel und Harnproben.

Die Speichelproben wurden mittels LC/MS vermessen, die Harnproben mittels Immunoassay. Die Cotinin-/Nicotin-Konzentration im Speichel ist auf 100% Speichelanteil berechnet.

SANT ... Speichelanteil

Probe	Zigaretten/Tag	SANT [%]	Cotinin [ng/mL]		Nicotin [ng/mL]		Cotinin [ng/mL]
			in der Probe	im Speichel	in der Probe	im Speichel	im Harn
39	5	74,7	15,8	21,1	11,7	15,72	328,0
8	5	82,9	26,0	31,4	0,0	0	710,0
82	6	62,5	32,3	51,6	99,0	158,37	1042,0
49	7	72,4	29,8	41,2	2,7	3,78	563,0
54	8	71,9	16,8	23,4	446,6	621,11	257,0
20	10	72,7	170,9	235,1	1037,6	1427,17	3259,0
61	10	80,8	49,7	61,6	402,7	498,42	221,0
14	10	71,9	35,2	48,9	0,0	0	825,0
4	15	75,0	147,2	196,3	527,2	702,89	701,0
69	15	67,9	37,0	54,4	9,4	13,78	1083,0
16	15	51,7	44,0	85,0	48,7	94,24	2060,0
43	15	77,5	86,2	111,3	77,7	100,31	1036,0
3	15	78,7	181,9	231,2	36,1	45,88	2212,0
77	15	51,2	81,7	159,6	304,7	595,1	742,0
71	15	75,6	40,5	53,6	18,5	24,44	426,0
40	15	76,0	106,4	140,0	0,0	0	1663,0
25	20	72,7	176,1	242,3	239,7	329,64	2012,0
88	20	73,0	89,3	122,4	178,9	245,08	687,0
41	20	70,3	249,9	355,4	0,0	0	3384,0
32	20	77,5	49,7	64,1	186,2	240,21	2252,0
5	20	76,7	104,7	136,6	138,3	180,26	1139,0
70	20	78,8	83,1	105,5	77,8	98,72	345,0
93	20	77,1	99,6	129,2	342,7	444,5	4286,0
47	20	83,2	143,8	172,8	76,3	91,72	2571,0
65	20	69,8	140,3	201,1	555,1	795,29	2215,0
59	20	80,6	172,2	213,6	290,8	360,79	1850,0
10	20	71,0	106,1	149,4	108,6	152,93	3126,0
62	20	78,4	353,8	451,3	1006,0	1283,13	645,0

Probe	Zigaretten/Tag	SANT [%]	Cotinin [ng/mL]		Nicotin [ng/mL]		Cotinin [ng/mL]
			in der Probe	im Speichel	in der Probe	im Speichel	im Harn
64	20	82,3	159,9	194,3	53,5	65,05	987,0
58	20	78,9	275,6	349,3	835,6	1059,1	3893,0
11	20	79,9	240,3	300,7	48,5	60,65	2083,0
21	20	63,9	87,4	136,8	304,4	476,31	3846,0
91	20	75,5	199,7	264,6	186,8	247,38	2716,0
57	25	61,4	154,4	251,5	2239,8	3647,92	1733,0
19	25	84,7	184,2	217,4	297,1	350,73	2279,0
90	25	73,9	137,0	185,3	62,6	84,7	3330,0
23	25	66,1	106,9	161,7	459,8	695,6	2569,0
12	25	80,7	131,4	162,9	371,2	459,94	3081,0
84	25	55,7	75,1	134,8	260,1	466,89	1780,0
48	30	70,4	141,7	201,3	79,4	112,78	576,0
27	30	67,2	110,1	163,8	176,6	262,75	1805,0
46	30	61,0	111,0	181,9	200,0	327,82	1414,0
6	30	82,4	205,0	248,8	515,9	626,08	2034,0
68	30	68,1	158,0	231,9	109,3	160,53	3632,0
17	30	75,8	20,0	26,4	87,6	115,61	2690,0
33	30	74,3	76,8	103,3	595,3	801,17	1475,0
56	30	80,8	146,6	181,4	244,6	302,67	213,0
51	40	78,1	197,1	252,3	544,8	697,62	1370,0
31	40	62,5	84,8	135,7	621,4	994,16	4996,0
66	40	78,3	218,5	279,0	281,1	358,98	1306,0
85	40	76,1	149,8	196,9	70,1	92,05	2750,0
26	40	78,7	214,2	272,2	286,0	363,37	4811,0
87	40	78,3	302,9	386,8	1556,9	1988,42	3727,0

19 Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben

19.1 Versuche - Teil 1

19.1.1 Vorbereitung der Probe und der Extraktionssäulchen

Vor dem Auftragen der Probe wurden die Extraktionssäulchen mit verschiedenen Lösungsmitteln konditioniert und anschließend mit Wasser äquilibriert, um die Oberfläche des Sorbens zu benetzen und auf des Auftragen der Probe vorzubereiten.

Die mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespikten Speichelproben wurden unter verschiedenen Bedingungen auf die vorbereiteten Extraktionssäulchen aufgetragen (siehe Tabelle 52, Kapitel 11.4.1). Am wenigsten [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid ging beim Auftragen verloren, wenn in der Probe 1% Ameisensäure (Pre 3) enthalten waren und das Extraktionssäulchen mit Methanol und Wasser konditioniert bzw. äquilibriert wurde. Der mittlere Verlust an [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid betrug hier nur 2,97% (SD 0,45; RSD 8,48%).

Tabelle 98: Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung der Bestimmung des beim Auftragen unter verschiedenen Bedingungen durchgebrochenen [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid

(vgl. Tabelle 52, Kapitel 11.4.1)

Bedingung	Mittelwert [%]	SD	RSD [%]
Pre 1	16,30	0,36	2,21
Pre 2	4,67	0,45	9,66
Pre 3	2,97	0,25	8,48
Pre 4	7,63	0,64	8,42
Pre 5	11,37	0,80	7,06
Pre 6	5,20	1,11	21,41
Pre 7	3,33	0,45	13,53
Pre 8	3,47	0,40	11,66
Pre 9	3,57	0,45	12,64

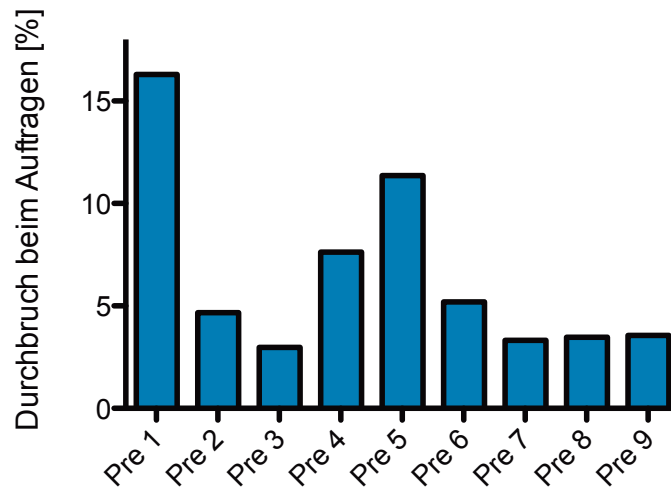


Abbildung 61: mittlerer Durchbruch von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid beim Auftragen der Speichelprobe unter verschiedenen Bedingungen (vgl. Tabelle 52, Kapitel 11.4.1)

19.1.2 Waschen der Extraktionssäulchen

Nach dem Auftragen der Probe wurden die Extraktionssäulchen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen gewaschen, um störende Matrixbestandteile zu entfernen. Beim Waschen ist es wichtig, daß möglichst wenig Analyt vom Säulchen eluiert wird.

Die Kombination von 0,1% Ameisensäure in Wasser (Waschlösung 1) und 0,1% Ameisensäure in Aceton (Waschlösung 2) hat sich in den Versuche als am geeignetsten zum Waschen der Extraktionssäulchen erwiesen, denn der Verlust an radioaktiv-markiertem Morphin betrug hier 0,93% (SD 0,25; RSD 26,96%).

Tabelle 99: Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung der Bestimmung des beim Waschen unter verschiedenen Bedingungen durchgebrochenen radioaktiv-markiertem Morphin

Bedingung			Mittelwert [%]	SD	RSD [%]
Wash 1	Wasser	Methanol	5,47	0,74	13,48
Wash 2	0,1% Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisensäure in Methanol	1,13	0,42	36,74
Wash 3	0,1% Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisensäure in Acetonitril	2,29	0,32	13,76
Wash 4	0,1% Ameisensäure in Wasser	0,1% Ameisensäure in Aceton	0,93	0,25	26,96

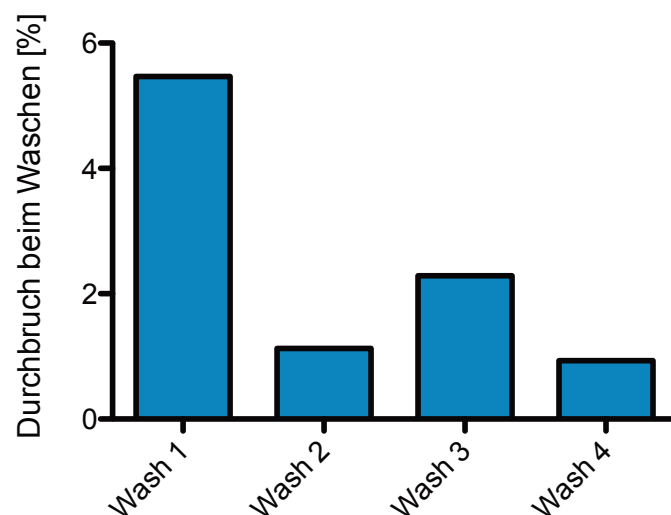


Abbildung 62: mittlerer Durchbruch von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid beim Waschen der Extraktionssäulchen unter verschiedenen Bedingungen

19.1.3 Elution vom Extraktionssäulchen

Zur Elution von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid vom SPE-Säulchen wurden vier verschiedenen Lösungsmittelgemische untersucht. Die höchste Extraktionsausbeute konnte bei der Verwendung von 5% Ammoniak in Aceton erzielt werden. Es konnten hier 95,53% [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid und 94,46% [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid wiedergefunden werden.

Tabelle 100: mittlere Wiederfindungsrate, Standardabweichung und relative Standardabweichung des [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid und [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid beim Eluieren mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen

	Bedingung	Mittelwert [%]	SD	RSD [%]
Elu 1	2% Ammoniak in Methanol	78,4	0,66	0,84
Elu 2	5% Ammoniak in Methanol	93,6	1,09	1,17
Elu 3	5% Ammoniak in Acetonitril	93,01	2,72	2,92
Elu 4	5% Ammoniak in Aceton	95,53 (Codein 94,46)	1,17 (Codein 1,26)	1,23 (Codein 1,34)

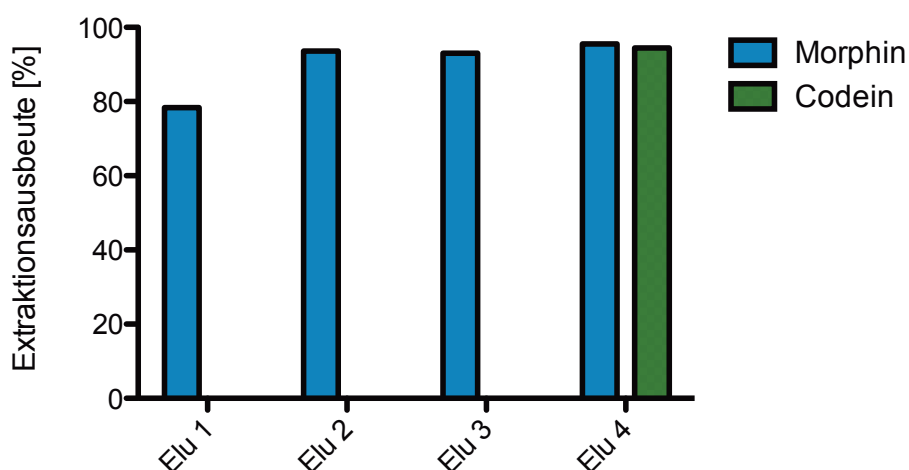


Abbildung 63: mittlere Wiederfindungsrate von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid und [N-Methyl-¹⁴C]-Codeinhydrochlorid beim Eluieren mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen

19.1.4 Extraktion von gespickten Speichelproben mit anschließender LC/MS-Analyse

Zur Überprüfung, ob sich die Extraktionsmethode auch auf Speichelproben, die mehrere Analyte aus der Opiat-Gruppe enthalten, anwenden lässt, wurden Speichelproben mit Morphin, Codein, Thebain, Morphin-3-β-Glucuronid und Morphin-6-β-Glucuronid in verschiedenen Konzentrationen (1 µg/mL, 10 ng/mL und 1 ng/mL je Analyt) gespickt. Nach der Festphasenextraktion (siehe Kapitel 11.4.4) wurden die einzelnen Proben in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingedampft, in 100 µL 90% Acetonitril wiederaufgenommen und zur LC/MS verwendet.

Nach dem Eindampfen und Wiederauflösen der Proben in 90% Acetonitril wurde festgestellt, daß alle Proben intensiv gelb gefärbt waren, das heißt daß Tartrazin in der Probe enthalten war. Weiters konnte bei der LC-MS-Analyse beobachtet werden, daß beim wiederholten Injizieren der Speichelprobe die Empfindlichkeit des Massenspektrometers abnahm, sodaß nach einigen Proben kein Signal detektiert werden konnte, obwohl die Analytkonzentration in der Probe hoch war (1 µg/mL).

Beim anschließenden Reinigen des Massenspektrometers konnte festgestellt werden, daß es zu einer Ablagerung des Tartrazin an der *Curtain*- sowie an der *Orifice-Plate* kommt. Diese Ablagerungen stellen die Ursache für die Abnahme der Empfindlichkeit und den Signalverlust dar.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die nächste Versuchsreihe, nämlich die Entfernung des Tartrazins aus der Speichel/SES-Mischung, angelegt.

19.2 Versuche - Teil 2

Im zweiten Versuchsteil wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Entfernung des Tartrazin und zur Aufkonzentrierung der Analyten untersucht. Im ersten Teil wurde die Möglichkeit von zwei Festphasenextraktionen hintereinander untersucht. Im zweiten Teil wurde ermittelt, ob Tartrazin durch das Ausfällen der Speichelproteine aus der Probe entfernt werden kann.

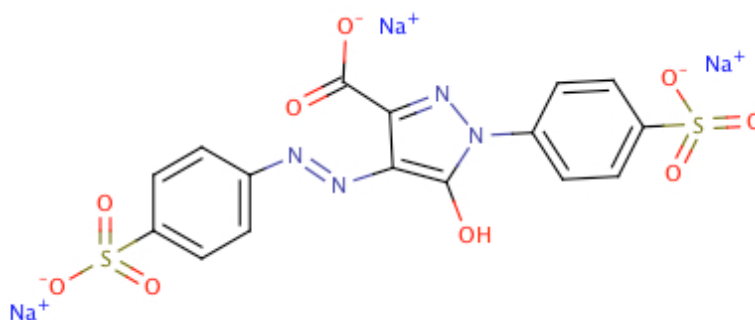


Abbildung 64: Tartrazin

19.2.1 Gekoppelte Festphasenextraktion

Für die gekoppelte Festphasenextraktion wurden zwei unterschiedliche Extraktionssäulen verwendet, nämlich ein schwaches Anionenaustauscher-Säulchen (Isolute® NH2) und ein Mixed-Mode-Cation-Exchange-Säulchen (Oasis® MCX).

Das Säulenmaterial des Isolute®-NH2-Extraktionssäulchen besitzt eine Aminopropylfunktion (pKa 9,8), das eine hohe Affinität zu stark sauren Verbindungen mit Sulfonsäuregruppen aufweist. Da Tartrazin (siehe Abbildung 64) mehrere Sulfonsäuregruppen besitzt sollte es am Isolute®-NH2-Säulchen retiniert und so aus der Speichelprobe entfernt werden.

19.2.1.1 Vorversuch 1

Das Isolute®-NH2-Säulchen wurde nur mit Wasser konditioniert und die Speichelprobe wurde nicht angesäuert. Das Eluat der Extraktion war gelb gefärbt, das heißt Tartrazin wurde nicht am Anionenaustauscher gebunden.

19.2.1.2 Vorversuch 2

Das Anionenaustauschersäulchen wurde mit 1% Ameisensäure in Wasser konditioniert. Die Speichelprobe wurde ebenfalls mit Ameisensäure angesäuert, sodaß sich 1% Ameisensäure in der Probe befanden. Alle Eluate waren farblos, das heißt daß der gelbe Farbstoff wurde an der Anionenaustauscherfunktion retiniert.

19.2.1.3 Vorversuch 3

Im dritten Vorversuch wurde die [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid-Ausbeute der ersten Festphasenextraktion ermittelt. Gespikte Speichelproben wurden angesäuert und auf das vorbereitete Isolute®-NH2-Säulchen (siehe Vorversuch 2) aufgebracht.

Alle Eluate waren farblos und die Ausbeute an Morphin betrug 93,96% (SD 2,16; RSD 2,30%).

19.2.1.4 Bestimmung der Extraktionsausbeute

19.2.1.4.1 Elution mit 5% Ammoniak in Aceton

Zur Bestimmung der Extraktionsausbeute wurden mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespikte, angesäuerte Speichelproben zuerst über das mit 1% Ameisensäure in Wasser konditionierte Isolute®-NH2-Säulchen extrahiert. Die Eluate wurden direkt auf die bereits vorbereiteten Oasis® MCX Extraktionssäulchen aufgebracht und entsprechend dem in Kapitel 11.5.1.4.1 beschriebenen Extraktions-Protokoll extrahiert.

Die mittlere Extraktionsausbeute betrug für [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid 88,52% (SD 3,51 und RSD 3,96%).

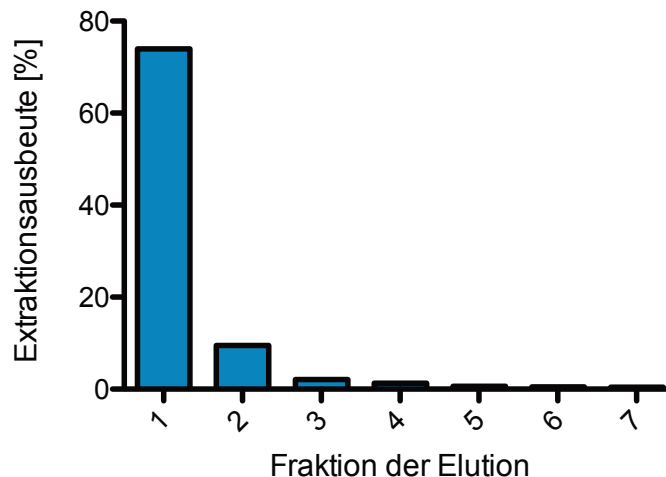


Abbildung 65: [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid-Recovery in den einzelnen Fraktionen bei der Elution vom Oasis® MCX Säulchen mit 5% Ammoniak in Aceton

19.2.1.4.2 Elution mit 5% Ammoniak in Acetonitril

Der Versuchsablauf war analog zum Ablauf in Kapitel 11.5.1.4.1. Anstelle von 5% Ammoniak in Aceton wurde jedoch 5% Ammoniak in Acetonitril verwendet.

Die mittlere Extraktionsausbeute betrug hier 83,85% (SD 0,73; RSD 0,87%).

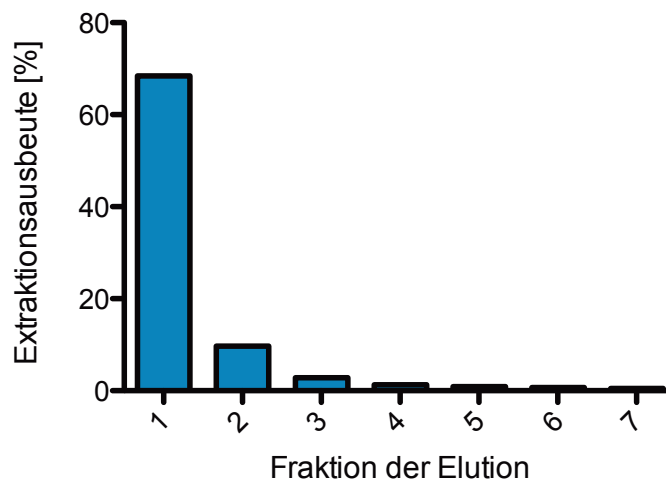


Abbildung 66: [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid-Recovery in den einzelnen Fraktionen bei der Elution vom Oasis® MCX Säulchen mit 5% Ammoniak in Acetonitril

19.2.2 Proteinfällung

19.2.2.1 Vorversuche zur Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln

Ungespikete Speichelproben wurden mit drei verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Aceton, Acetonitril und Methanol, in verschiedenen Verhältnissen versetzt um die Speichelproteine auszufällen. Von den zentrifugierten Proben wurde der Überstand abgenommen, mit 1% Ameisensäure in Wasser verdünnt und zur Extraktion verwendet (Bedingungen siehe Kapitel 11.5.2.1, Tabelle 50).

Beim Fällern mit Methanol konnte in keinem Verhältnis eine Entfernung des Tartrazins erreicht werden, da nach der Festphasenextraktion alle Fraktionen gelb gefärbt waren. Dagegen konnte beim Fällern mit Aceton und Acetonitril in den Verhältnissen 1+2 und 1+1,5 eine Entfärbung der Probe nach

der Extraktion erreicht werden. Da bei den Versuchen mit Aceton optisch ein größeres Präzipitat ausgemacht werden konnte, wurden die weiteren Versuche mit Aceton durchgeführt.

19.2.2.2 Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln

Speichelproben, die mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespickt wurden, wurden zur Proteinfällung mit Aceton versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Überstände abgezogen und mit 1% Ameisensäure in Wasser entsprechend dem Schema in Tabelle 57 (Kapitel 11.5.2.2) verdünnt. Diese verdünnten Proben wurden zur Festphasenextraktion verwendet.

Die beste Extraktionsausbeute wurde beim Fällern mit zwei Teilen Aceton und anschließendem Verdünnen des Überstandes mit fünf Teilen 1% Ameisensäure in Wasser erzielt. Die Wiederfindungsrate für [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid betrug unter diesen Bedingungen 76,58% (SD 0,64; RSD 0,84%).

Tabelle 101: Proteinfällung mit Aceton und verschiedenen Verhältnissen; mittlere Extraktionsausbeute, SD und RSD von [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid

Proteinfällung (Teile Probe + Teile Aceton)	Verdünnung (Teile Überstand + Teile 1% Ameisensäure in Wasser)	org. Anteil in der Probe beim Auftragen	Extraktionsausbeute		
			Mittelwert [%]	SD	RSD [%]
1+1,5	1+5	10% Aceton	76,15	0,88	1,16
1+1,5	1+11	5% Aceton	73,36	0,64	0,87
1+2	1+5	11% Aceton	76,58	0,64	0,84
1+2	1+11	5,5% Aceton	74,01	0,33	0,44

19.2.2.2.1 Bestimmung der Extraktionsausbeute

Aufgrund der Ergebnisse des obigen Versuchs wurde die Extraktionsausbeute aus fünf Aliquoten einer gepoolten und mit [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid gespickten Speichelprobe unter den oben ermittelten Bedingungen bestimmt.

Im Vergleich dazu wurden weitere fünf Aliquote der selben gepoolten Speichelprobe mit Acetonitril im Verhältnis 1+2 gefällt und der Überstand mit 1% Ameisensäure in Wasser (1+5) verdünnt, so daß beim Auftragen der Probe auf das Extraktionssäulchen 11% Acetonitril in der Probe enthalten waren.

Die Extraktionsausbeute für [N-Methyl-¹⁴C]-Morphinhydrochlorid konnte beim Fällern mit Aceton mit 76,83% (SD 1,11; RSD 1,45%) ermittelt werden. Beim Fällern mit Acetonitril betrug die Wiederfindungsrate dagegen 74,72% (SD 1,86; RSD 2,49%).

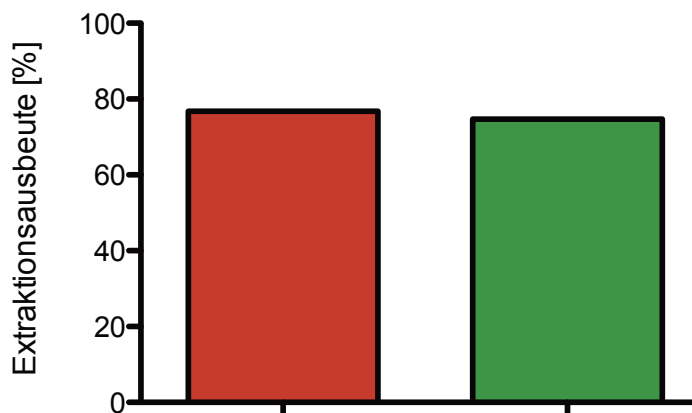


Abbildung 67: Vergleich der mittleren Extraktionsausbeute von Morphin bei der Proteinfällung mit Aceton (links, rot) und Acetonitril (rechts, grün)

19.2.2.3 Reduktion des Probevolumens

Das Probevolumen, das auf die Extraktionssäulchen aufgebracht wurde, wurde schrittweise von 9.000 μL auf 1.000 μL reduziert. Die Verdünnungsschemata der Proben in den einzelnen Schritten sind in Tabelle 58 (Kapitel 11.5.2.3) zusammengefasst. Der organische Anteil der Probe betrug vor dem Auftragen immer circa 10%.

Die optische Bewertung der Eluate der Festphasenextraktion ergab, daß auch bei einer Reduktion des Probevolumens auf 1.000 μL , Tartrazin durch den den Zusatz von 10% Aceton bzw. Acetonitril aus der Probe entfernt wird.

19.2.2.3.1 Bestimmung der Extraktionsausbeute

Die Extraktionsausbeute unter den neuen Bedingungen des verkleinerten Probevolumens betrug nur 51,3% (SD 6,29; RSD 12,26%) im Vergleich zu 76,83% (Proteinfällung mit Aceton) und 74,72% (Proteinfällung mit Acetonitril).

20 Untersuchung des Retentionsverhaltens von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen

20.1 Untersuchung der Retention im ZIC-HILIC-Trennsystem

20.1.1 70% organischer Anteil in der mobilen Phase

Die stärkste Retention für alle vier Analyte konnte mit 70% Acetonitril/30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75 erzielt werden. Die Elutionsreihenfolge unter diesen Bedingungen war Codein (k' 0,62) < Morphin (k' 0,9), Morphin-6- β -Glucuronid (k' 1,15) < Morphin-3- β -Glucuronid (k' 1,68).

Durch die Zugabe von Methanol zum organischen Anteil der mobilen Phase wurde die Retention der polareren Analyte, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid, reduziert und die Retention der apolareren Analyte, Codein und Thebain, erhöht. Bereits ab einem Acetonitril-Methanol-Verhältnis von 95:5 kam es zu einer Änderung der Elutionsreihenfolge (Codein < Morphin-6- β -Glucuronid < Morphin < Morphin-3- β -Glucuronid) und bei einem Acetonitril-Methanol-Verhältnis von 60:40 eluierten die beiden Glucuronide vor Codein und Morphin (siehe Abbildung 68).

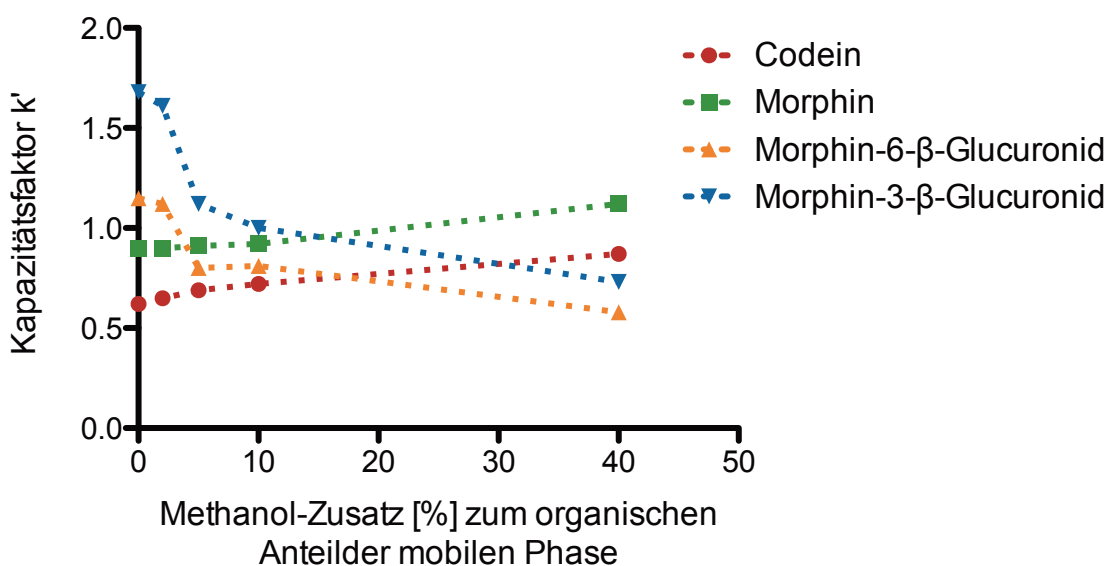


Abbildung 68: Änderung des Retentionsverhaltens von Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
Mobile Phase: 70% Acetonitril/Methanol (in versch. Verhältnissen) 30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75; Säule: Sequant ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm

Der Zusatz von Tetrahydrofuran zum organischen Anteil der mobilen Phase führte zu einer allgemeinen Beschleunigung des Trennsystems, wobei Codein und Morphin am geringsten beeinflusst wurden. Die Elutionsreihenfolge (Codein < Morphin < Morphin-6- β -Glucuronid < Morphin-3- β -Glucuronid) wurde im Gegensatz zum Methanol-Zusatz unter den untersuchten Bedingungen nicht verändert (siehe Abbildung 69).

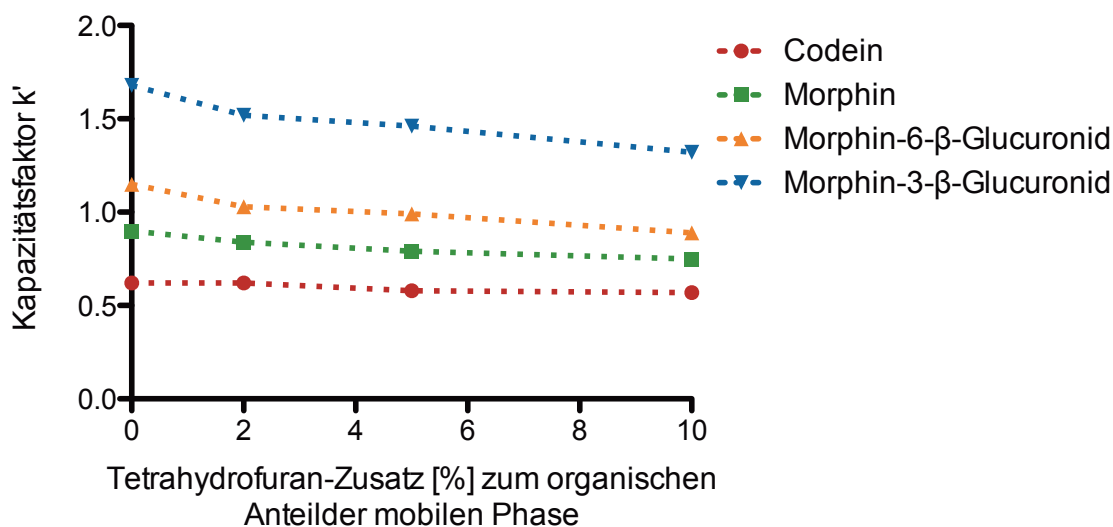


Abbildung 69: Änderung des Retentionsverhaltens von Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
Mobile Phase: 70% Acetonitril/Tetrahydrofuran (in versch. Verhältnissen) 30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75; Säule: Sequant ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm

Die Retention von Codein wurde durch den Zusatz von 2% eines anderen Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Propanol und Tetrahydrofuran) praktisch nicht beeinflusst. Morphin eluierte nach Zugabe von 2% Ethanol, 2% Isopropanol, 2% n-Propanol und 2% Tetrahydrofuran etwas früher verglichen mit den Ausgangsbedingungen (organischer Anteil der mobilen Phase 100% Acetonitril). Den größten Einfluß hatte die Zugabe von 2% Tetrahydrofuran auf die Retention von Morphin-3- β -Glucuronid und Morphin-6- β -Glucuronid (siehe Abbildung 70).

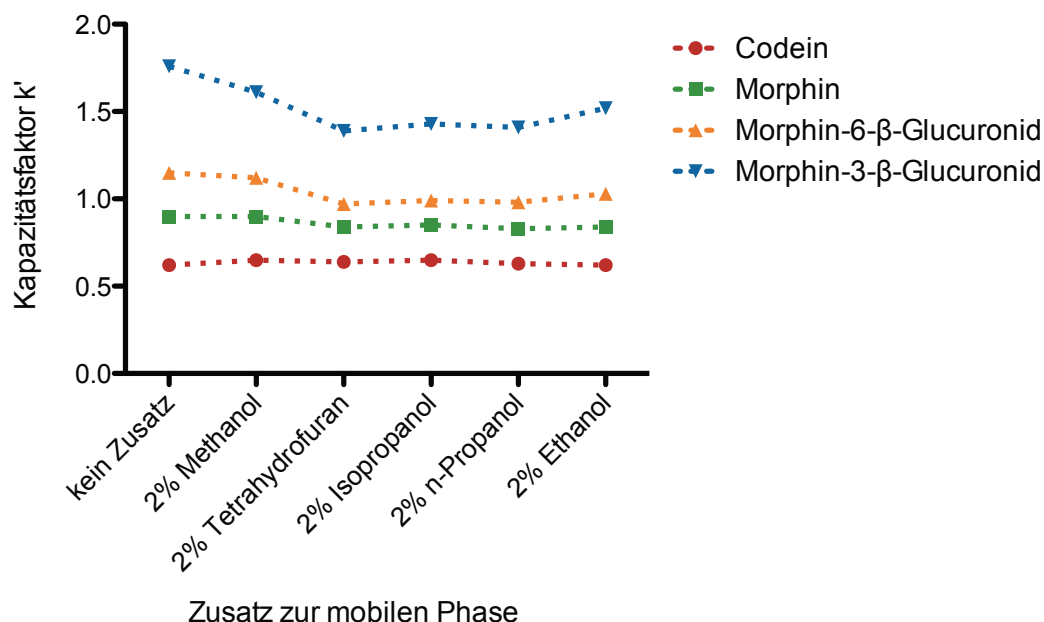


Abbildung 70: Änderung des Retentionsverhaltens von Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
Mobile Phase: 70% Acetonitril/org. Lösungsmittel * (98:2) 30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75; Säule: Sequant ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm
(* Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Propanol oder Tetrahydrofuran)

20.1.2 85% organischer Anteil in der mobilen Phase

Die Erhöhung des organischen Anteils der mobilen Phase von 70% auf 85% bei gleichbleibender Gesamtionenstärke (1,5 mM) führte zu einer sehr starken Zunahme der Retention aller Analyte. Am stärksten fiel die Retentionszunahme bei den Morphin-Glucuroniden aus, denn diese eluierten erst nach Ende der Laufzeit des Chromatogramms ($k' > 11$; siehe Abbildung 71).

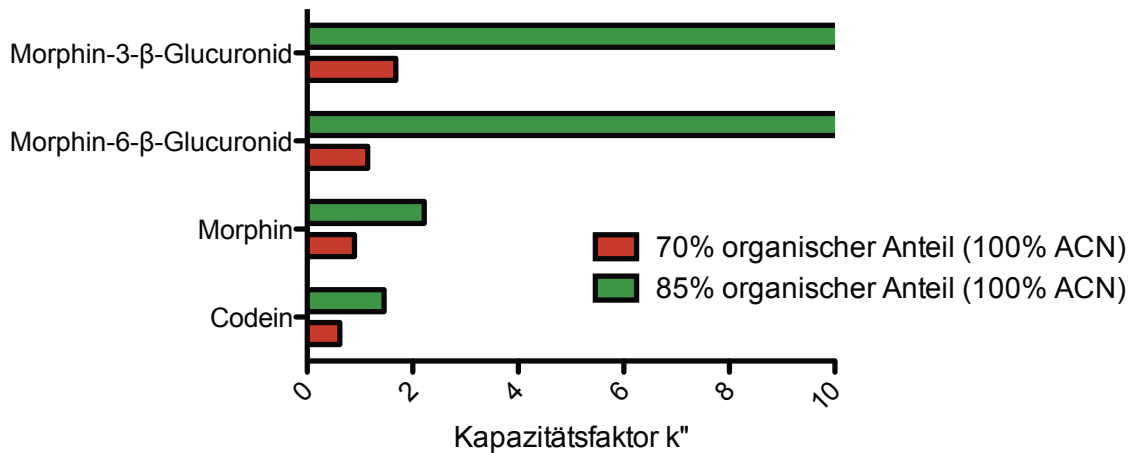


Abbildung 71: Änderung des Retentionsverhaltens von Codein, Morphin, Morphin-6-β-Glucuronid und Morphin-3-β-Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
Mobile Phase: 70% Acetonitril 30% 5 mM Ammoniumformiat pH 3,75 bzw. 85% Acetonitril 15% 10 mM Ammoniumformiat pH 3,75; Säule: Sequant ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm

Die Zugabe von 10% eines anderen organischen Lösungsmittels zur mobilen Phase führte zu einer Abnahme der Retention. Von den untersuchten Lösungsmitteln wurden die Trennung am stärksten durch Methanol beschleunigt, da alle Analyte innerhalb von 22 Minuten eluierten ($k'_{\text{Mor-3-β-Gluc}} 7,47$). Der Zusatz von 10% Isopropanol zum organischen Anteil hatte den geringsten Einfluß auf die Retention. Unter diesen Bedingungen eluierten die Morphin-Glucuronide noch immer außerhalb der Laufzeit des Chromatogramms ($k' > 11$).

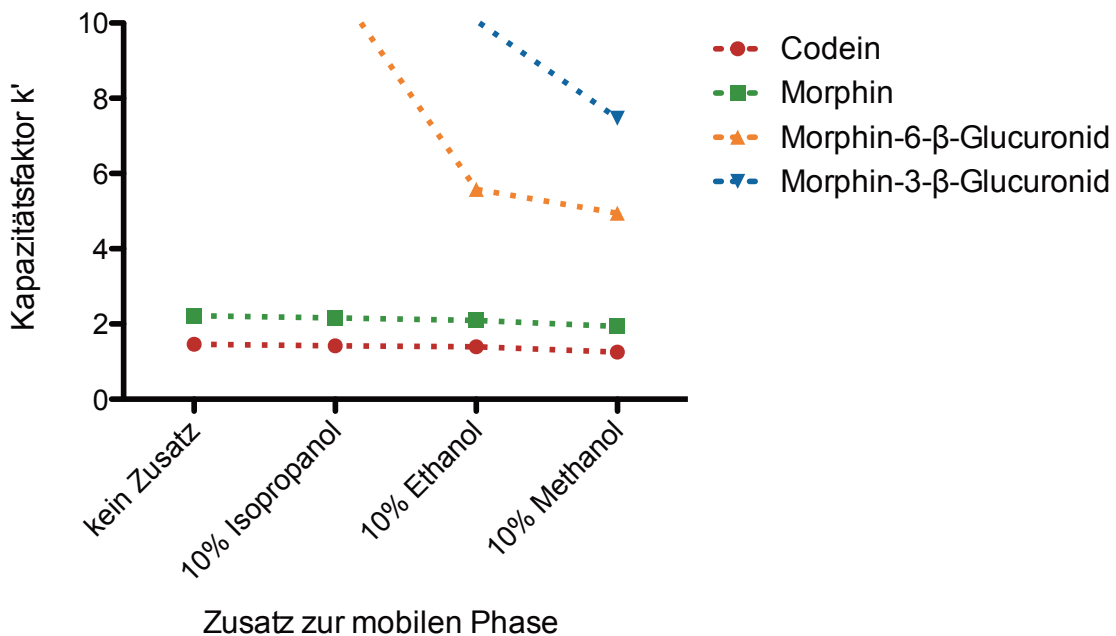


Abbildung 72: Änderung des Retentionsverhaltens von Codein, Morphin, Morphin-6-β-Glucuronid und Morphin-3-β-Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
Mobile Phase: 85% Acetonitril/org. Lösungsmittel* (90:10) 15% 10 mM Ammoniumformiat pH 3,75; Säule: Sequant ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm
(* Ethanol, Isopropanol, Methanol)

Eine weitere Erhöhung des Anteils des zum organischen Anteil der mobilen Phase zugesetzten Lösungsmittels von 10% auf 40% hatte eine weitere Beschleunigung der Trennung zur Folge. Den geringsten Einfluß auf die Retention zeigte auch hier der Zusatz von Isopropanol, den stärksten Einfluß hatte der Zusatz von Methanol. Durch den Zusatz 40% Methanol konnte die Laufzeit des Chromatogramms auf unter 10 Minuten verkürzt werden ($k'_{\text{Mor-3-}\beta\text{-Gluc}} 2,69$).

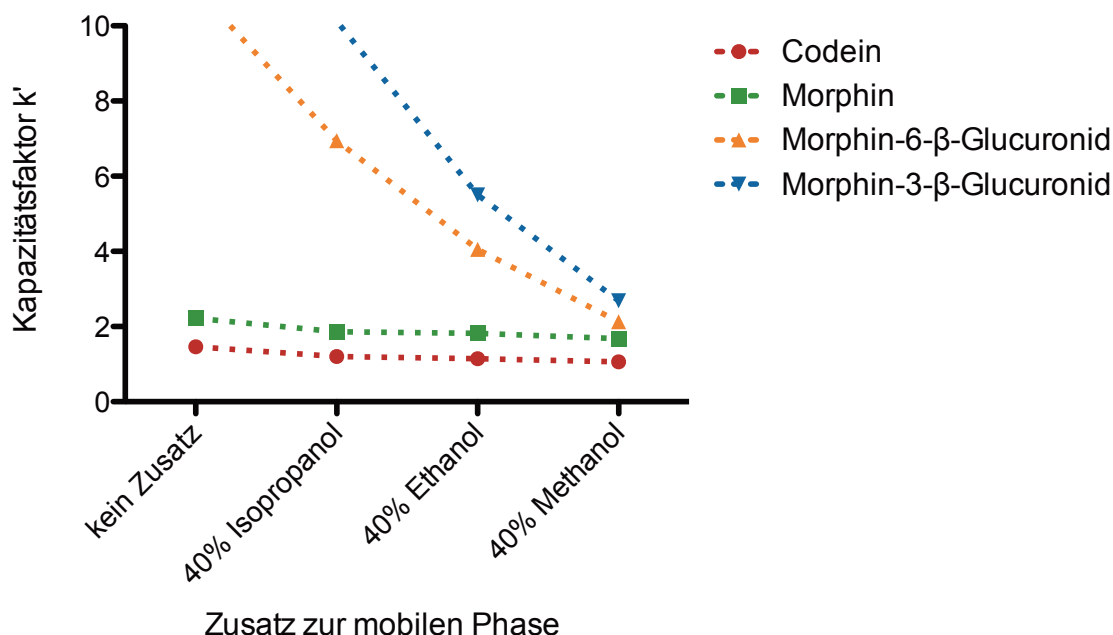


Abbildung 73: Änderung des Retentionsverhaltens von Codein, Morphin, Morphin-6-β-Glucuronid und Morphin-3-β-Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
 Mobile Phase: 85% Acetonitril/org. Lösungsmittel * (60:40) 15% 10 mM Ammoniumformiat pH 3,75; Säule: Sequant ZIC-HILIC 150 x 1,0 mm
 (* Ethanol, Isopropanol, Methanol)

20.2 Untersuchung der Retention in einem Normalphasen-Trennsystem auf einer Reprosil-Silica-Säule

20.2.1 Änderung des organischen Anteil der mobilen Phase

Unter den Ausgangsbedingungen des Versuchs, 70% Acetonitril und 30% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80, ist die Retention aller Analyte gering (k' 1,53 bis 1,95) und eine Trennung nicht möglich. Die Erhöhung des organischen Anteil auf 80% bringt nur wenig Verbesserung der Retention. Erst bei 82%

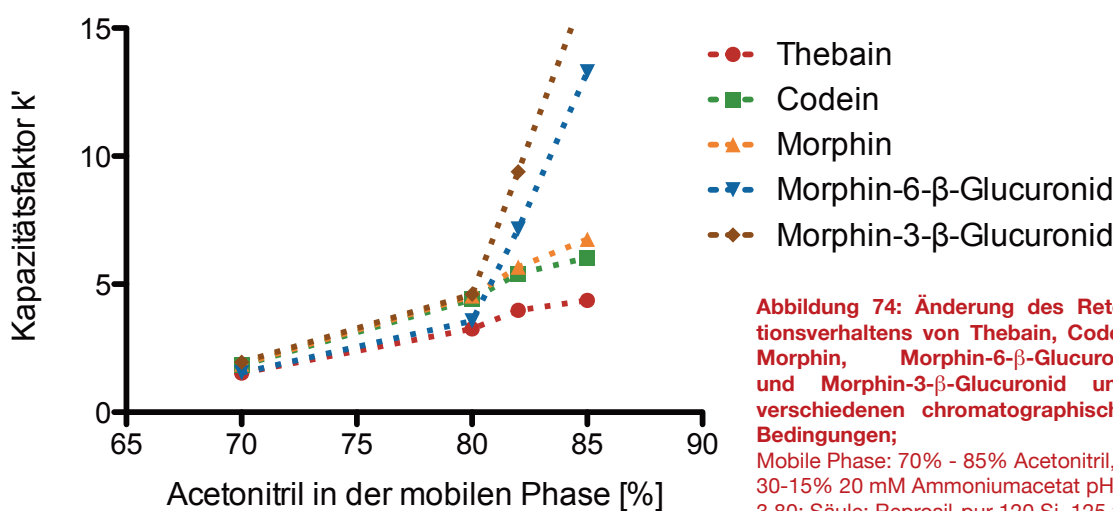


Abbildung 74: Änderung des Retentionsverhaltens von Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6-β-Glucuronid und Morphin-3-β-Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;
 Mobile Phase: 70% - 85% Acetonitril, 30-15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80; Säule: Reprosil-pur 120 Si, 125 x 1,0 mm; 3,5 µm

Acetonitril in der mobilen Phase findet eine Auftrennung der Analyte statt. Die Elutionsreihenfolge unter diesen Bedingungen ist Thebain < Codein < Morphin < Morphin-6- β -Glucuronid < Morphin-3- β -Glucuronid. Erhöht man den organischen Anteil weiter, auf 85% Acetonitril, so nimmt die Retention der polarsten Analyte, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid sehr stark zu. Morphin-3- β -Glucuronid eluiert sogar erst nach mehr als 30 Minuten (außerhalb der Laufzeit des Chromatogramms, $k' > 15$).

20.2.2 Änderung der Zusammensetzung des organischen Anteils der mobilen Phase

Da die Morphin-Glucuronide bei der Verwendung von 85% Acetonitril/15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 als mobile Phase eine sehr starke Retention auswiesen, wurde zum organischen Anteil der mobilen Phase ein anderes, stärker eluierendes Lösungsmittel in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (siehe Tabelle 102).

Den stärksten Einfluß auf das Retentionsverhalten der Analyte hatte der Zusatz von Methanol im Verhältnis 8:2 (Acetonitril zu Methanol, Bedingung *MoPha* 5). Diese Bedingung führte dazu, daß alle Analyten fast gleichzeitig eluierten (k' 3,31 bis k' 3,93). Den stärksten Einfluß hatte die Zugabe von Methanol auf die Retention der Morphin-Glucuronide, den geringsten Einfluß auf Thebain.

Auch die Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 9:1 (Acetonitril zu Isopropanol, Bedingung *MoPha* 2) beeinflusst die Retention der Morphin-Glucuronide so stark, daß eine Elution von Morphin-3- β -Glucuronid innerhalb von 17 Minuten (k' 8,44) möglich ist.

Die Retention der unpolareren Analyte Thebain, Codein und Morphin wird durch den Zusatz der stärker eluierenden Lösungsmittel weniger stark beeinflusst, als die der polareren Morphin-Glucuronide.

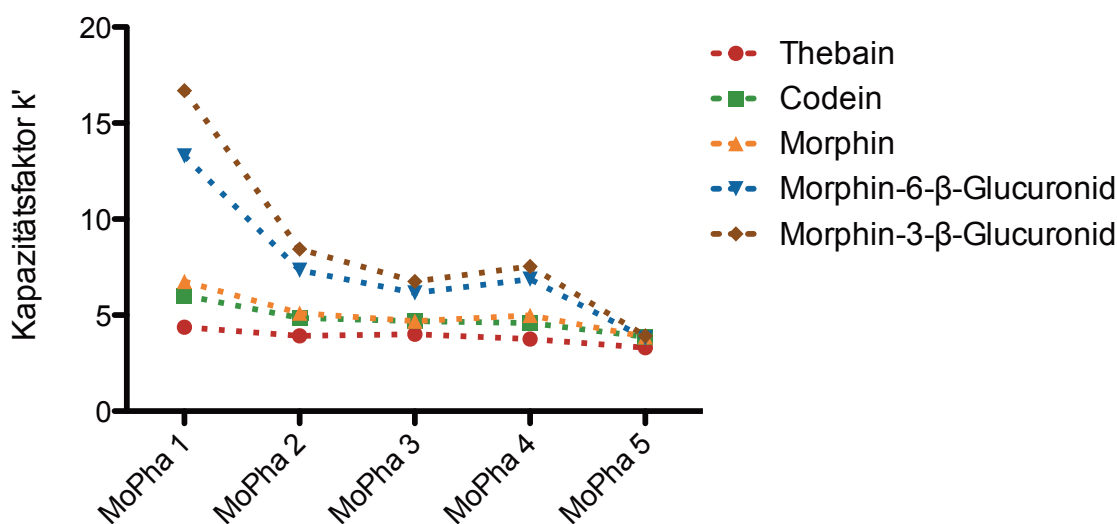


Abbildung 75: Änderung des Retentionsverhaltens von Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;

Mobile Phase: 85% Acetonitril/org. Lösungsmittel*, 15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80; Säule: Reprosil-pur 120 Si, 125 x 1,0 mm; 3,5 μ m

(* Isopropanol, Methanol in verschiedenen Verhältnissen, vgl. Tabelle 102)

Tabelle 102: Zusatz von anderen Lösungsmitteln zum org. Anteil der mobilen Phase

Bedingung	zugesetztes Lösungsmittel	Verhältnis Acetonitril zu zuges. Lösungsmittel
MoPha 1	kein Zusatz	
MoPha 2	Isopropanol	9:1
MoPha 3	Isopropanol	8:2
MoPha 4	Methanol	9:1
MoPha 5	Methanol	8:2

20.2.3 Änderung der Pufferkonzentration

Die schrittweise Erhöhung der Pufferkonzentration von 20 mM auf 160 mM bewirkte eine starke Zunahme der Retention der Morphin-Glucuronide ($k'_{\text{Mor-3-}\beta\text{-Gluc}} 6,76 \rightarrow k'_{\text{Mor-3-}\beta\text{-Gluc}} 11,07$). Die weitere Erhöhung der Pufferkonzentration von 160 mM auf 240 mM verursachte wiederum eine geringfügige Abnahme der Retention (siehe Abbildung 76).

Die unpolaren Analyte Thebain, Codein, Morphin wurden durch die erhöhte Pufferkonzentration beschleunigt, das heißt es kommt zu einer geringfügigen Abnahme der Retention ($k'_{\text{Thebain}} 4 \rightarrow k'_{\text{Thebain}} 2,45$).

Die Elutionsreihenfolge wird durch die Veränderung der Pufferkonzentration nicht beeinflusst.

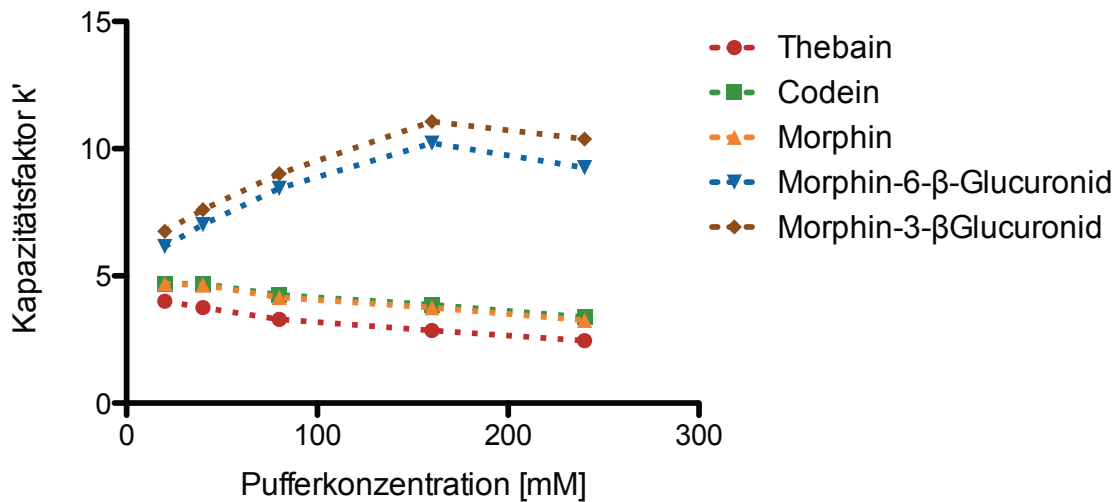


Abbildung 76: Änderung des Retentionsverhaltens von Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6-β-Glucuronid und Morphin-3-β-Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;

Mobile Phase: 85% Acetonitril/Isopropanol (8:2), 15% 20-240 mM Ammoniumacetat pH 3,80; Säule: Reprosil-pur 120 Si, 125 x 1,0 mm; 3,5 μm

20.2.4 Änderung der Säulentemperatur

Die Erhöhung der Säulentemperatur von 35°C auf 55°C ermöglichte eine bessere Auftrennung von Codein und Morphin. Die Retention Morphin-3-β-Glucuronid wurde durch die erhöhte Säulentemperatur leicht reduziert. Eine weitere Steigerung der Säulentemperatur auf 75°C hatte eine Verschlechterung der Auftrennung der Analyte zur Folge. Die Morphin-Glucuronide eluierten unter diesen Bedingungen fast gleichzeitig. Die Trennung von Thebain und Codein wurde ebenfalls schlechter (siehe Abbildung 77).

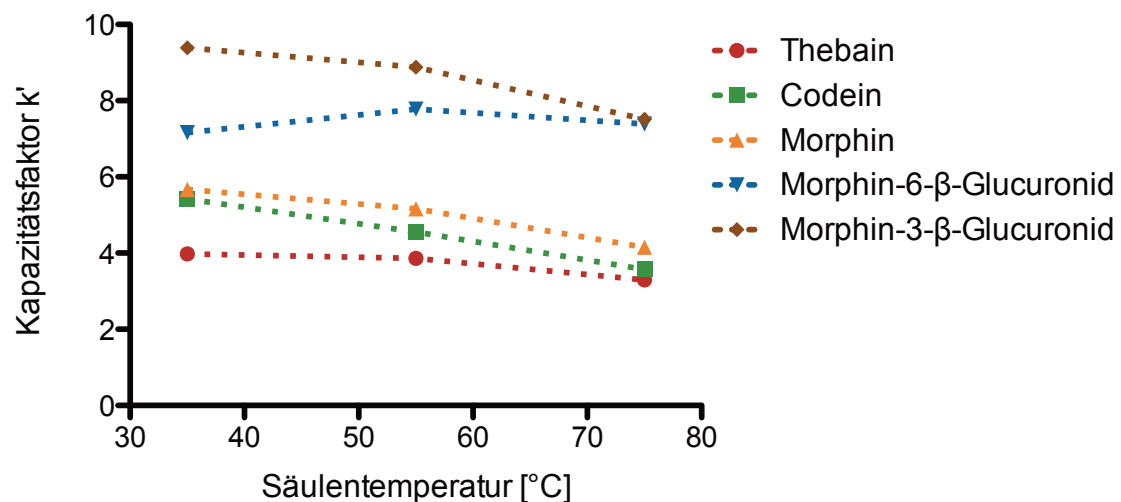


Abbildung 77: Änderung des Retentionsverhaltens von Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6-β-Glucuronid und Morphin-3-β-Glucuronid unter verschiedenen Säulentemperaturen;

Mobile Phase: 82% Acetonitril, 18% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80; Säule: Reprosil-pur 120 Si, 125 x 1,0 mm; 3,5 μm

21 „Mohn-Studie“

Im Rahmen der „Mohn-Studie“ wurden Speichel und Harnproben von zehn Probanden vor und nach der Aufnahme einer definierten Menge an Speisemohn mit einem Opiatgehalt von 120,97 mg/kg Morphin gesammelt. Die zehn Probanden, fünf Frauen und fünf Männer lieferten insgesamt 180 Speichelproben und 89 Harnproben ab.

Von jedem Probanden konnten 18 Speichelproben, davon neun durch Spülen der Mundhöhle mit SES pH 4,2 und neun durch Spülen mit SES pH 8,0, gewonnen werden. Eine Speichelprobe pro Spüllösung (pH 4,2 und pH 8,0) wurde vor der Mohnaufnahme gezogen (Zeitpunkt 0), die restlichen acht Speichelproben pro Spüllösung nach der Mohnaufnahme (Zeitpunkt 1 bis 8, siehe auch Tabelle 65, Kapitel 13.4.3).

Bevor die Speichelproben in die *Saliva Transfer Tubes* übergeführt wurden, wurde die Probemenge durch Abwiegen des *Saliva Collection Beaker* bestimmt (Differenzbestimmung voller Becher minus leerer Becher). Das mittlere Probengewicht betrug 6,16 g (SD 1,48) bei den Speichelproben, die mit SES pH 4,2 gesammelt wurden und 5,27 g (SD 1,09) bei Speichelproben die mit SES 8,0 gesammelt wurden.

Tabelle 103: Verteilung der Probenmenge

Probenmenge [g]	Anzahl der Proben	
	SES pH 4,2	SES pH 8,0
0 - 1	0	0
1,1 - 2	0	0
2,1 - 3	0	0
3,1 - 4	1	0
4,1 - 4	11	46
5,1 - 6	39	30
6,1 - 7	23	6
7,1 - 8	6	5
8,1 - 9	4	1
9,1 - 10	1	1
> 10	5	1

SES ... Saliva Extraction Solution

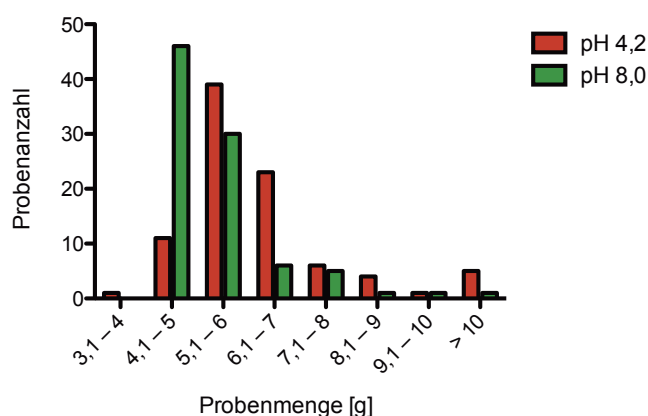


Abbildung 78: Verteilung der Probenmenge [g] - Vergleich zwischen SES pH 4,2 und SES pH 8,0

Die Bestimmung des Speichelanteils wurde mit dem Greiner Bio-One *Saliva Quantifikation Kit* am Olympus AU640 durchgeführt. Der mittlere Speichelanteil betrug bei den sauren Speichelproben (SES pH 4,2) 65,77% (SD 11,12) und bei den basischen Speichelproben 27,27% (SD 14,33).

Tabelle 104: Verteilung des Speichelanteils

Speichelanteil [%]	Anzahl der Proben	
	SES pH 4,2	SES pH 8,0
0 - 10	0	0
10,1 - 20	1	31
20,1 - 30	0	29
30,1 - 40	3	12
40,1 - 50	4	13
50,1 - 60	10	2
60,1 - 70	38	1
70,1 - 80	32	1
80,1 - 90	2	1
> 90	0	0

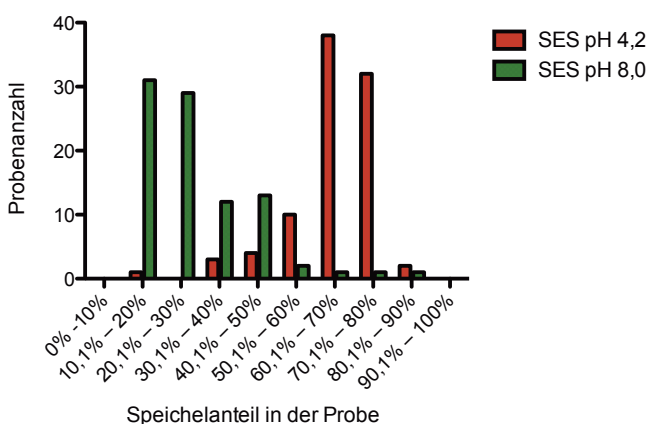


Abbildung 79: Verteilung des Speichelanteils - Vergleich zwischen SES pH 4,2 und SES pH 8,0

Die Messung der Opiat-Konzentration im Speichel wurde mit dem CEDIA® *Opiates OFT* (Prototyp) am Olympus AU640 vermessen.

Parallel zur Opiat-Konzentration wird zur Überprüfung der Matrix-Identität (Speichel) die Konzentration der α -Amylase bestimmt.

Tabelle 105 bis Tabelle 114: Ergebnisse der Mohnstudie für Proband 1 bis Proband 10

Proband 1									
Geschlecht					weiblich				
Körpergewicht					56 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					55,94 g (179 g)				
Morphin-Dosis					6,77 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeitpunkt	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	5,84	61,2	n.n.		5,16	22,3	n.n.		n.n.
1	5,77	49,9	n.n.		4,68	21	n.n.		970
2	4,83	35,8	n.n.		4,22	11,9	1,8	15,13	2055
3	5,03	39	1,2	3,08	4,74	30,8	n.n.		3695
4	5,56	50,1	n.n.		4,76	23,1	n.n.		4255
5	5,04	38,8	n.n.		4,57	19,2	1,1	5,73	5085
6	5,06	47,2	n.n.		4,88	20,6	n.n.		4525
7	5,35	48,3	n.n.		4,2	16,9	0,7	4,14	4120
8	5,12	46,1	0,4	0,87	4,86	21,3	n.n.		4750
MW	5,29	46,27			4,65	20,79			
SD	0,36	7,7			0,3	5,06			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 2									
Geschlecht					männlich				
Körpergewicht					62 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					60,88 g (194,81 g)				
Morphin-Dosis					7,36 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeitpunkt	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	4,58	65,2	n.n.		4,35	11,4	n.n.		n.n.
1	4,97	65,3	n.n.		4,76	20,3	4,9	24,14	1780
2	5,25	63,1	3,5	5,55	4,3	11,2	1,8	16,07	22675
3	5,55	62,5	3,3	5,28	4,85	12,3	n.n.		26340
4	4,88	62,3	n.n.		4,26	11,4	3,3	28,95	27065
5	5,18	63,5	n.n.		4,72	13	3,5	26,92	27655
6	6,16	65,2	n.n.		5,19	18,5	n.n.		18510
7	4,47	61	2,7	4,43	4,26	12,4	1,8	14,52	17780
8	4,52	54,2	1,6	2,95	4,65	12,2			14855
MW	5,29	62,48			4,59	13,63			
SD	0,36	3,45			0,32	3,35			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 3									
Geschlecht					männlich				
Körpergewicht					70 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					69,06 g (221 g)				
Morphin-Dosis					8,35 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeit- punkt	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	9,48	69,7	n.n.		9,27	70,8	n.n.		n.n.
1	11,79	72,2	n.n.		10,07	62,1	7,7	12,4	5235
2	10,79	70,5	n.n.		8,41	47	4,5	9,57	17120
3	10,05	72,2	n.n.		7,51	42,9	n.n.		27500
4	8,95	70,9	10,2	14,39	7,64	43,2	7	16,2	81445
5	10,08	72,2	9,3	12,88	7,11	40,4	n.n.		62905
6	10,02	72,3	n.n.		7,35	39,8	5,8	14,57	24695
7	7,41	60,9	4,1	6,73	7,06	42,6	3,5	8,22	fehlt
8	8,75	70,3	4,2	5,97	6,95	42,5	n.n.		23425
MW	9,7	70,13			7,93	47,92			
SD	1,26	3,6			1,1	10,91			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 4									
Geschlecht					weiblich				
Körpergewicht					54 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					53,59 g (171,5 g)				
Morphin-Dosis					6,48 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeit- punkt	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	6,06	79,1	n.n.		5,2	22,7	n.n.		n.n.
1	8,05	72,4	n.n.		4,53	16,8	n.n.		550
2	7,5	73,0	5	6,85	4,37	11,2	3,9	34,82	6060
3	6,88	74,1	5,1	6,88	4,27	27,7	3,5	12,64	8100
4	6,16	73,0	n.n.		4,12	12,1	3,6	29,75	14845
5	6,69	77,5	7,2	9,29	4,68	12	n.n.		14550
6	7,45	76,2	n.n.		4,46	41,4	1,9	4,59	8655
7	6,78	77,3	3,8	4,92	4,42	57,6	n.n.		5250
8	6,65	79,9	2,5	3,13	4,55	51,3	n.n.		1385
MW	6,91	75,83			4,51	28,09			
SD	0,65	2,81			0,31	17,83			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 5									
Geschlecht					weiblich				
Körpergewicht					75 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					74,38 g (238 g)				
Morphin-Dosis					9 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeit-punkt	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	5,84	69,6	n.n.		5,34	11,1	n.n.		n.n.
1	6,47	72,1	6,7	9,29	5,46	25,7	5,4	21,01	945
2	5,78	70,0	n.n.		5,01	15,2	n.n.		9785
3	5,22	59,1	n.n.		4,93	16	n.n.		16720
4	5,75	55,7	3,9	7	5,26	14,7	n.n.		16895
5	5,35	62,4	4,6	7,37	4,96	11	n.n.		18265
6	6,96	71,6	n.n.		6	21,7	3,2	14,75	20680
7	6,08	66,0	2,5	3,79	5,66	21	n.n.		19935
8	5,81	16,8	1,7	10,12	6,4	27,2	n.n.		10280
MW	5,92	60,37			5,45	18,18			
SD	0,54	17,32			0,5	5,98			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 6									
Geschlecht					weiblich				
Körpergewicht					71 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					70,26 g (224,83 g)				
Morphin-Dosis					8,5 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeit-punkt	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	6,61	77,8	n.n.		5,08	30,4	n.n.		n.n.
1	6,32	69,1	n.n.		5,61	33,2	6	18,07	1355
2	5,6	66,4	7,3	10,99	6,05	20,7	n.n.		4320
3	5,87	64,7	7,3	11,28	5,41	22,7	8,4	37	13205
4	4,87	63,0	n.n.		5,06	18,4	10,8	58,7	9745
5	5,93	68,4	7,1	10,38	5,2	29,2	8,2	28,08	9950
6	6,35	67,5	n.n.		5,9	33,2	n.n.		7300
7	5,49	66,3	n.n.		5,46	25,3	n.n.		8760
8	5,36	64,0	1,9	2,97	5,32	27,5	n.n.		4640
MW	5,82	67,47			5,45	26,73			
SD	0,55	4,37			0,35	5,34			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 7									
Geschlecht					männlich				
Körpergewicht					110 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					108.,18 g (346,18 g)				
Morphin-Dosis					13,09 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeitpunkt	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	5,39	78,0	n.n.		5,36	37,3	n.n.		n.n.
1	5,8	67,3	n.n.		5,56	36,9	25,4	68,83	1050
2	7,04	77,2	6,2	8,03	5,18	15,4	n.n.		12555
3	6,36	70,9	n.n.		5,05	23,1	n.n.		25845
4	6,27	73,4	n.n.		5,42	19	n.n.		35715
5	5,63	69,1	4,7	6,8	5,18	29,3	n.n.		27290
6	6,9	74,9	2,8	3,74	5,49	33,4	n.n.		23255
7	5,73	75,1	n.n.		5,01	29,6	n.n.		18875
8	4,98	74,8	n.n.		5,03	14,5	4,2	28,97	13115
MW	6,01	73,41			5,45	26,5			
SD	0,69	3,62			0,35	8,84			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 8									
Geschlecht					männlich				
Körpergewicht					48 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					47,38 g (151,6 g)				
Morphin-Dosis					5,73 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeitpunkt	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben-gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	5,24	56,1	n.n.		4,43	26,1	n.n.		n.n.
1	4,55	61,3	n.n.		4,18	14,7	34,8	236,73	525
2	6,16	59,6	n.n.		4,78	21	16,1	76,67	6300
3	6,04	69,7	n.n.		4,74	26,6	n.n.		3620
4	6,33	68,6	3,7	5,39	4,58	11,2	n.n.		6070
5	5,66	60,0	4,5	7,5	4,91	29,2	n.n.		13630
6	5,46	61,1	n.n.		4,73	35,9	5,2	14,48	14650
7	5,18	62,1	n.n.		4,44	20,7	5,1	24,64	16405
8	3,97	57,8	n.n.		4,27	19	2,4	12,63	19745
MW	5,4	61,81			4,56	22,71			
SD	0,77	4,56			0,25	7,58			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 9									
Geschlecht					weiblich				
Körpergewicht					74 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					72,87 g (233,19 g)				
Morphin-Dosis					8,82 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeit- punkt	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat in Harn [ng/mL]
0	6,66	77,7	n.n.		5,55	44,7	n.n.		n.n.
1	7,41	86,6	3	3,46	6,29	45,8	n.n.		425
2	6,79	69,3	n.n.		5,83	38,9	n.n.		2920
3	6,28	79,3	n.n.		6,18	41,6	n.n.		6100
4	7,52	79,5	4,9	6,16	5,65	41,5	n.n.		17325
5	6,13	80,3	n.n.		5,3	40,7	n.n.		19671
6	8,22	77,7	4,6	5,92	6,59	44,7	n.n.		28800
7	5	78,7	n.n.		4,57	20,1	n.n.		30870
8	5,21	78,2	3,1	3,96	4,37	18,3	7,2	39,34	25800
MW	6,58	78,59			5,59	37,37			
SD	1,06	4,42			0,75	10,54			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Proband 10									
Geschlecht					männlich				
Körpergewicht					73 kg				
Mohnmenge (Mohnfülle)					71,67 g (229,33 g)				
Morphin-Dosis					8,67 mg				
Speichelprobe mit SES pH 4,2					Speichelprobe mit SES pH 8,0				Harn
Zeit- punkt	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Proben- gewicht [g]	SANT [%]	Opiat in Probe [ng/mL]	Opiat im Speichel [ng/mL]	Opiat im Harn [ng/mL]
0	5,01	60,3	n.n.		4,84	26,6	n.n.		n.n.
1	5,19	67,5	n.n.		4,85	33,9	n.n.		2150
2	4,96	61,4	n.n.		4,58	20,5	n.n.		5625
3	5,26	62,2	n.n.		4,55	11,7	n.n.		14770
4	5,26	63,1	6,9	10,94	4,74	14,4	10,3	71,53	24810
5	5,86	62	n.n.		4,57	28,9	n.n.		70475
6	5,01	56,7	n.n.		4,8	35,7	n.n.		42030
7	5,1	57,5	n.n.		4,44	18,1	n.n.		10270
8	5,2	61,2	1,5	2,45	4,68	26,9	3,1	11,52	7185
MW	5,21	61,32			4,67	24,08			
SD	0,27	3,15			0,15	8,4			

SANT ... Speichelanteil [%]

n.n. ... nicht nachweisbar bzw. Wert unter dem Cut-Off-Wert

MW ... Mittelwert

SD ... Standardabweichung

Diskussion

22 Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One Saliva Collection System

Bei der Analyse von Speichelproben ist sehr häufig mit Problemen zu rechnen: Es besteht die Möglichkeit einer Adsorption der zu untersuchenden Analyte an Bestandteile des Sammelsystems kommen. Dies tritt besonders häufig zu beobachten, wenn der Speichel durch das Kauen von Baumwoll-Röllchen oder Parafilm gesammelt wird. Eine Zentrifugation des Sammelmediums reicht oft nicht aus, um den Analyten vollständig aus dem Sammelmedium zurückzugewinnen. Gerade bei der Analyse von Speichelproben auf Δ^9 -Tetrahydrocannabinol ist häufig eine Extraktion der Proben notwendig, da es zu einer sehr starken Adsorption des Analyten an Bestandteile des Speichelsammelsystems kommt [Choo and Huestis, 2004; Crouch, 2005; Kauert, 2000].

Aus diesem Grund wurde das Verhalten von verschiedenen untersuchten Verbindungen im Greiner Bio-One Saliva Collection System getestet. Das Greiner-System besteht aus einer Speichelsammellösung (Saliva Extraction Solution), einem Becher (Saliva Collection Beaker) und zwei Vakuum-Röhrchen (Saliva Transfer Tubes), in denen die Probe verschickt, gelagert und zentrifugiert wird. Alle Gefäße des Sammelmediums sind aus Kunststoff hergestellt, das heißt, daß eine Anlagerung von Analyten nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann. Weiters ist in den Saliva Transfer Tubes eine Zentrifugierhilfe (Ammoniumsulfat) enthalten, damit die im Speichel enthaltenen Schleimstoffe bei der Zentrifugation möglichst vollständig abgetrennt werden können. Bei diesem Schritt besteht die Möglichkeit, daß Analyte mit den Schleimstoffen und Proteinen ausgefällt werden und sich im Präzipitat anlagern und so nicht mehr für die Analyse zurückgewonnen werden können.



Abbildung 80: Greiner Bio-One Saliva Collection System

Die Untersuchung des Verhaltens der Analyte im Greiner-System wurde mit radioaktiv-markierten Analyten (^{14}C und ^3H) durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß durch direktes Auszählen der Zerfälle pro Minute (dpm) sehr rasch ein Verlust (Adsorption an Gefäß oder an das Präzipitat) zwischen den einzelnen Schritten in der Probenaufarbeitung sichtbar wird.

Tabelle 115: Verlust an radioaktiv-markierten Analyt zwischen dem Ausgangswert und der Lagerung im Einfrierröhrchen

	Verlust	Recovery
[N-Methyl- ^3H]-Cocain	-0,8%	99,2%
[N-Methyl- ^{14}C]-Codeinhydrochlorid	-2,6%	97,4%
[7- ^{14}C]-D-Methamphetaminhydrochlorid	-1,5%	98,5%
[N-Methyl- ^{14}C]-Morphinhydrochlorid	-1,4%	98,6%
[^{14}C]-Mycophenolatnatrium	-3,7%	96,3%
(-)-[N-Methyl- ^3H]-Nicotin	-2,5%	97,5%
[^3H]-Tetrahydrocannabinol	-69,0%	31,0%

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß bei den untersuchten Analyten, außer bei [^3H]-Tetrahydrocannabinol, nur geringe Verluste an Analyt bei der Probenaufarbeitung auftreten (-0,76% bis -3,67%). Das heißt, die getesteten Verbindungen werden nur in geringem Ausmaß an die Kunststoff-Gefäßwände adsorbiert bzw. lagern sich praktisch nicht während der Zentrifugation an das Präzipitat an.

Beim [^3H]-Tetrahydrocannabinol¹ gehen jedoch 61,70% des eingesetzten radioaktiven Materials beim Zentrifugieren der Probe (Abtrennung der Speichelproteine und Schleimstoffe) verloren (insgesamt -68,97%). Der Grund für die hohen Verluste dürfte in der höheren Lipophilie und der starken Proteinbindung des [^3H]-Tetrahydrocannabinols im Präzipitat zu suchen sein. Das Präzipitat besteht aus Speichelproteinen, Schleimstoffen, abgeschleierten Zellen der Mundschleimhaut und eventuell auch aus Nahrungsresten. Daher dürfte sich [^3H]-Tetrahydrocannabinol bevorzugt in dieser lipophileren Phase der Probe anreichern als im rein wässrigen Überstand, der für die weiteren Analysen verwendet wird.

¹ Für die Versuche wurde [^3H]-Tetrahydrocannabinol anstelle von radioaktiv-markierten Δ^9 -Tetrahydrocannabinol verwendet, da dieses nicht erhältlich war.

Aus dem Verhalten von [^3H]-Tetrahydrocannabidiol im Sammelsystem kann darauf geschlossen werden, daß Δ^9 -Tetrahydrocannabinol im Greiner-System ein ähnliches Verhalten zeigt und mit ähnlich hohen Verlusten gerechnet werden kann.

In den Untersuchungen von Langel et al. konnten ähnliche Ergebnisse für Cocain (-2%), Codein (-1,5%) und Morphin (-1,9%) im Greiner-System erzielt werden. Die Recovery für Δ^9 -Tetrahydrocannabinol betrug allerdings 73,6%, und der Verlust somit nur 26,4% [Langel et al., 2008].

Dieser Unterschied beim THC könnte daran liegen, daß Langel et al. die Recovery mittels GC/MS nach Extraktion der Speichelproben mit Ethylacetat bestimmt haben. Es ist aber nicht klar ob in dieser Studie der gesamte Inhalt das *Saliva Transfer Tube*, also auch das Präzipitat, extrahiert wurde, oder ob nur der klare Überstand zur Extraktion verwendet wurde.

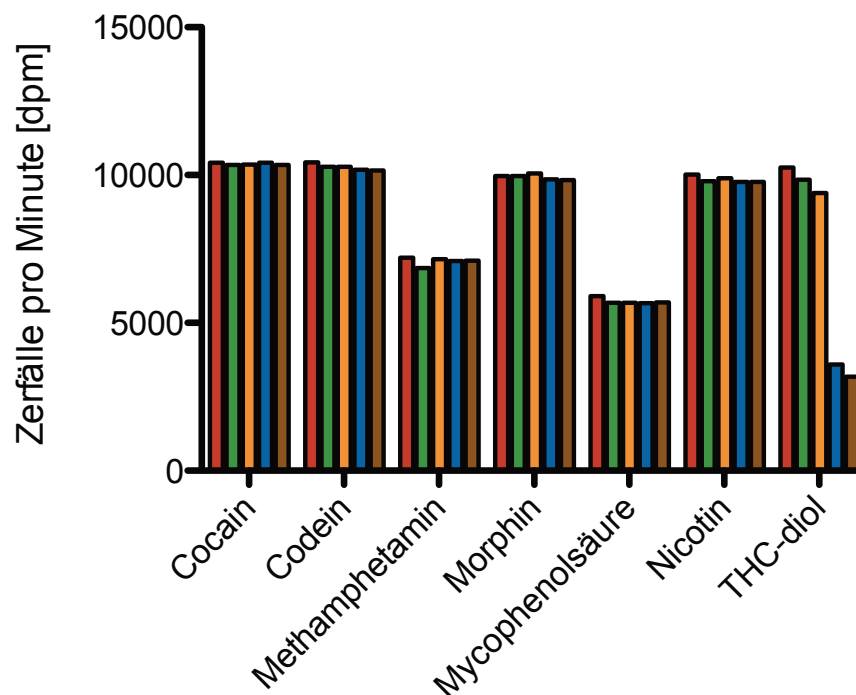


Abbildung 81: Verhalten untersuchter radioaktiv-markierter Drogen im Greiner Bio-One Saliva Collection System

rot ... Ausgangswert;
 grün ... Saliva Collection Beaker;
 orange ... Saliva Transfer Tube vor dem Zentrifugieren;
 blau ... Saliva Transfer Tube nach dem Zentrifugieren;
 braun ... Lagerung im Einfrierröhrchen

23 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Cotinin aus Speichelproben mittels Immunoassay

Der DRI® *Cotinine* Assay wurde zur Bestimmung von Cotinin im Harn entwickelt. Im Gegensatz zum Harn sind die im Speichel zu erwartenden Cotinin-Konzentrationen deutlich geringer. Daher war eine Optimierung des Immunoassay notwendig um damit Speichelproben vermessen zu können. Ausgehend von der Kalibration für die Bestimmung von Cotinin im Harn („Harnmethode“) wurde schrittweise der Assay modifiziert.

Eine Erhöhung des Probenvolumens von 13 µL auf 35 µL liefert eine Verbesserung der Messgenauigkeit im unteren Konzentrationsbereich, da die Kalibrationsgerade im unteren Bereich steiler wird. Wird mehr Probe eingesetzt, so konkurriert mehr freies Cotinin (aus der Probe) mit dem Enzym-Cotinin-Konjugat (Reagens 2) um den Antikörper.

Verändert man das Verhältnis von Reagens 1 (Substrat und Antikörper) und Reagens 2 (Enzym-Cotinin-Konjugat) zueinander, so hat auch dies einen Einfluß auf die Steilheit der Kalibrationsgerade und damit auf die Messgenauigkeit im unteren Konzentrationsbereich. Eine Reduktion des Reagens-1-Volumens führt zu einer Abflachung der Kalibrationsgerade.

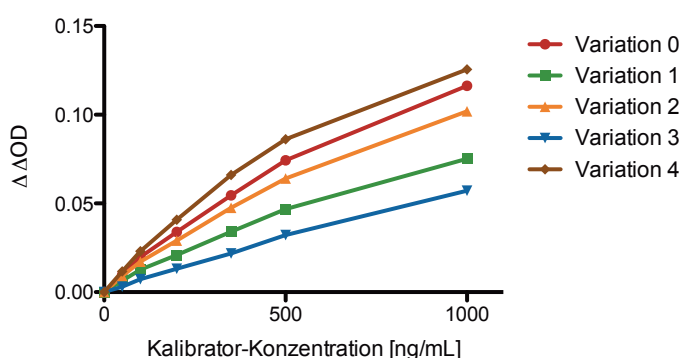


Abbildung 82: Vergleich der Kalibrationsgeraden unter verschiedenen Testbedingungen (veränderte Reagensvolumina und/oder veränderte Messpunkte); vgl. Tabelle 116 sowie Kapitel 7.2.4.1 und Kapitel 15.4.1

Im Reagens 1 ist der Antikörper enthalten, der neben Cotinin auch das Enzym-Cotinin-Konjugat bindet, welches dann das Substrat nicht umwandeln kann. Setzt man weniger Antikörper ein (durch Reduktion des Reagens-1-Volumens) sollte theoretisch das Signal stärker werden, da auch weniger Enzym-Cotinin-Konjugat gebunden werden kann und somit mehr NAD zu NADH umwandeln kann. Da im Reagens 1 aber auch das Substrat (NAD) enthalten ist, führt eine Reduktion dessen Volumens auf jeden Fall zu einer Abnahme des messbaren Signals und damit zu einer flacheren Kalibrationskurve.

In einem Fall wurde das Volumen von Reagens 2 (Enzym-Cotinin-Konjugat) von 87 µL auf 65 µL reduziert (Variation 4). Bei dieser Variation wurde die maximale Steigung für die Kalibrationsgerade erhalten. Eine weitere Reduktion des Reagens-2-Volumen führte wieder zu einer Verschlechterung der Signalintensität und damit zu einer flacheren Kalibrationsgeraden. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß durch die Reduktion des Reagens-2-Volumens (weniger Enzym-Cotinin-Konjugat in der Probe) weniger Substrat umgewandelt werden kann, wodurch es zu einer Abnahme des Signals kommt. Weniger Reagens 2 in der Probe hat aber auch zur Folge, daß geringe freie Cotinin-Konzentrationen (aus der Probe) weniger Konkurrenz um die Antikörperbindungsstellen haben und somit leichter an diesen binden können, wodurch mehr Enzym-Cotinin-Konjugat zur Substratumwandlung zur Verfügung steht. Dies könnte die Erklärung dafür sein, daß bei der Variation 4 die maximale Steigung der Kalibrationsgerade erreicht wird.

Tabelle 116: Variationen Reagensvolumina und Messpunkte

Variation	Reagensvolumen		Messpunkt		Beschreibung
	R1	R2	Erster	Letzer	
Variation 0	87	87	13	17	Ausgangsmethode
Variation 1	87	87	20	25	späterer Messpunkt
Variation 2	65	87	13	17	ein Viertel weniger R1
Variation 3	65	87	20	25	ein Viertel weniger R1, späterer Messpunkt
Variation 4	87	65	13	17	ein Viertel weniger R2

Bei der Ermittlung der Cotinin-Wiederfindungsrate aus der Speichelmatrix wurde festgestellt, daß die gemessene Cotinin-Konzentraion vom Speichelanteil der Probe abhängt. Je geringer der Speichelanteil (SA) umso schlechter ist die Wiederfindungsrate für Cotinin. Im Extremfall (0% SA) werden nur 60% der Cotinin-Konzentration, die bei Proben mit Speichelanteil größer 48% gemessen wird, wiedergefunden (81,58 ng/mL statt 133,65 ng/mL; siehe Abbildung 83). Dies macht die Einführung eines Korrekturfaktor notwendig, falls der Speichelanteil der Probe unter 48% liegt (siehe Formel).

$$\text{Cotinin}_{\text{korrr}} = [\text{Cotinin}] \frac{100 - [\text{SA}]}{60} \quad \text{wenn Speichelanteil} < 48\%$$

Nach der Korrektur der Cotinin-Konzentrationen liegen die Werte im Bereich der Cotinin-Konzentrationen von Speichelproben mit einem Speichelanteil von über 48%.

Die Wiederfindungsrate liegt für die Speichelmethode dann bei über 80% der eingesetzten Zielkonzentration (150 ng/mL, Bias < 25%). Die Bestimmungsgrenze wurde für die Speichelmethode mit 20 ng/mL ermittelt.

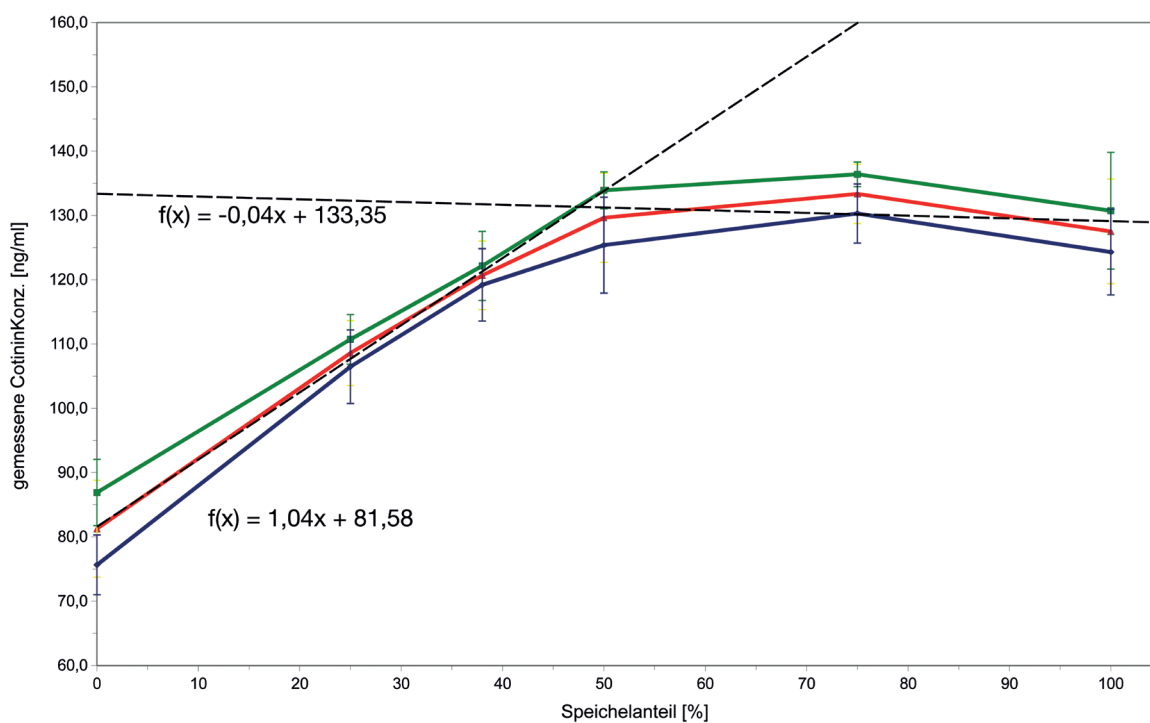


Abbildung 83: graphische Ermittlung des Schnittpunktes der beiden Regressionsgeraden

Die Ursache für die Verzerrung der Messergebnisse ist vermutlich beim Tartrazin (interner Standard des Speichelsammelsystems) zu suchen. Ist der Speichelanteil in der Probe gering, das heißt die *Saliva Extraction Solution* wurde beim Spülen der Mundhöhle nur wenig mit Speichel verdünnt, ist die Probe intensiver gelb gefärbt und die Tartrazin-Konzentration in der Probe höher. Ab einer bestimmten Konzentration des Farbstoffs wird vermutlich die spektrophotometrische Messung der Enzymaktivität (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) des Cotinin-Assays gestört, wodurch nur eine geringere als tatsächlich in der Probe vorhandene Cotinin-Konzentration ermittelt werden kann. Um diese Annahme zu bestätigen, wären weitere Untersuchungen notwendig. Auf diese Untersuchungen wurde jedoch aus zeit- und kostentechnischen Gründen verzichtet.

24 Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

Bevor Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gewonnen wurden, mittels LC/MS analysiert werden können, müssen sie gereinigt, das heißt störende Matrixbestandteile entfernt werden. Weiters ist eine Aufkonzentrierung der Analyten notwendig, da die Analytkonzentration im Speichel gering ist [Cone, 1993].

Die Festphasenextraktion, *solid phase extraction* (SPE), ist in diesem Fall die geeignetste Methode die Speichelproben zu reinigen und die Zielanalyten vor der Analyse aufzukonzentrieren.

Bei der Entwicklung einer SPE-Methode sind folgende Kriterien zu beachten:

- die Zielanalyten sollen selektiv und quantitativ aus der Probenmatrix isoliert werden,
- Matrixbestandteile und andere Störfaktoren sollen möglichst vollständig aus der Probe entfernt werden,
- die Zielanalyten sollen im Eluat möglichst konzentriert vorliegen [Bittner, 2005; Majors, 2007; Waters Corporation, 2006].

Aufgrund der pK_a -Werte von Nicotin (pK_a 9,13 am Pyrrolidin-Stickstoff und pK_a 4,23 am Pyridin-Stickstoff), Cotinin (pK_a 4,72 am Pyridin-Stickstoff) und Nornicotin (pK_a 9,83 am Pyrrolidin-Stickstoff und pK_a 4,23 am Pyridin-Stickstoff), wurden sogenannte MCX-Säulchen (Mixed-mode Cation-eXchange) für die Probenextraktion verwendet. Bei diesen Extraktionssäulchen wirken zwei Retentionsmechanismen, Kationenaustausch und Umkehrphase, zusammen. Diese Kombination sollte eine optimale Retention für Analyten mit einem pK_a -Wert zwischen 2 und 10 erlauben [Waters Corporation, 2006].

Zur Entwicklung der Extraktionsmethode wurde radioaktiv markiertes Nicotin, (-)-[N-Methyl- 3H]-Nicotin, verwendet, da auf diese Weise sehr einfach durch Auszählen der radioaktiven Zerfälle in den Eluat die Verluste an Analyt beim Auftragen und beim Waschen sowie die Extraktionsausbeute bestimmt werden konnten. Weiters ist auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Nicotin, Cotinin und Nornicotin ein Schluß auf das Verhalten von Cotinin und Nornicotin im Extraktionssystem möglich.

Für das radioaktive (-)-[N-Methyl- 3H]-Nicotin wurde mit folgendem Extraktionsschema die maximale Extraktionsausbeute von 94,63% (SD 4,39, RSD 4,64%) erzielt:

- Konditionierung der SPE-Säulchen mit 1% Ameisensäure in 100% Acetonitril, anschließend
- äquilibrieren mit 1% Ameisensäure in Wasser
- Probe auftragen (1 mL)
- Waschen mit 700 μ L 1% Ameisensäure in Wasser und 700 μ L 1% Ameisensäure/100% Acetonitril
- Elution mit 500 μ L 5% Ammoniak in 80% Acetonitril

Für alle drei Analyten, Nicotin, Cotinin und Nornicotin, wurde nach den Richtlinien der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie* (GTFCh) die Extraktionsausbeute aus der Speichelmatrix im Vergleich zu ohne Speichelmatrix ermittelt. Die Anforderungen der GTFCh für die Extraktionsausbeute aus der Matrix liegen bei 50%.

Für Nicotin konnte die Extraktionsausbeute mit 89,4% (20 ng/mL) bzw. 84,5% (75 ng/mL) bestimmt werden. Die Wiederfindungsrate für Cotinin aus der Speichelmatrix wurde mit 104,39% (20 ng/mL) bzw. 101,2% (75 ng/mL) im Vergleich zu ohne Speichelmatrix ermittelt. Die Ausbeute für Nornicotin lag bei 94,1% (20 ng/mL) bzw. 86,2% (75 ng/mL).

Für Nornicotin schwankten die Extraktionsausbeuten der einzelnen Proben im höheren Konzentrationsbereich (75 ng/mL) zwischen 50,5 ng/mL (67,3%) und 75,6 ng/mL (100,8%) (Mittelwert 63,8 ng/mL; SD 9,7; RSD 15,1%), sodaß man darauf schließen kann, daß die Extraktion in diesem Fall nicht exakt reproduzierbar ist und somit eine korrekte Quantifizierung des Analyten wahrscheinlich nicht möglich ist. Daher wurde beim Vermessen der Speichelproben auf eine Quantifizierung von Nornicotin verzichtet.

Tabelle 117: Extraktionsausbeute aus der Matrix

	20 ng/mL	75 ng/mL
Nicotin	89,4%	84,55
Cotinin	104,4%	101,2%
Nornicotin	94,1%	86,20%

25 Entwicklung einer LC/MS Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelprouben

Zur Bestimmung von Nicotin und dessen Metaboliten k6nnen verschiedene chromatographische Trennsysteme angewendet werden, wie zum Beispiel *reversed-phase*-Chromatographie [Kuo et al., 2002; Nakajima et al., 2000; Oddo et al., 1998; Page-Sharp et al., 2003; Tuomi et al., 1999], HILIC [Shou and Naidong, 2005] und Ionenaustauschchromatographie [Ghosheh et al., 2000].

Bei der in dieser Arbeit verwendete Trennsäule handelt es sich um eine *reversed-phase*-Polymersäule (Shodex OP2 HP-2D, Säulenmaterial: Polyhydroxymethacrylat), die eine gute Retention für polare basische Verbindungen erlaubt und über einen großen pH-Bereich (pH 3 bis 12) einsetzbar ist [Showa Denko Europe GmbH, 2010].

Im ersten Teil der Methodenentwicklung wurde eine HPLC-Methode mit UV-Detektion zur Bestimmung von Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelprouben entwickelt. Der Einsatz eines UV-Detektors erforderte die vollständige Abtrennung von Coffein, dessen Anwesenheit in fast allen Speichelprouben zu erwarten ist, sowie den Einsatz eines internen Standards, der sich im Trennsystem und vor allem in der vorangehenden Festphasenextraktion ähnlich verhält wie die Zielanalyten. Als interner Standard wurde Octopamin ausgewählt, da es im Chromatogramm zwischen Nicotin und Nornicotin eluiert. Die Extraktionsausbeute ist mit 73,15% aus der Matrix im Vergleich zum Lösemittel ausreichend hoch.

Die optimale Trennung aller Analyte wurde auf der Shodex-Säule mit einer mobilen Phase aus 13% Acetonitril und 87% 20 mM Ammoniumacetat pH 9,50 erreicht. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch die lange Analysenzeit von fast 20 Minuten. Die Laufzeit kann durch eine Erhöhung des Acetonitril-Anteils der mobilen Phase oder durch eine Verringerung des Puffer-pH-Wertes verkürzt werden. Dies ist jedoch nicht zu empfehlen, da dann eine Trennung von Cotinin und Coffein nicht mehr möglich wird und Cotinin zu nahe am Totvolumen eluiert ($k' < 1$). Die einzige Möglichkeit dieses Trennsystems zu beschleunigen ist die Erhöhung der Flußrate. Aufgrund des Säulenmaterials kann die Flußrate auf maximal 300 µL/min wegen des maximalen Säulendrucks von 150 bar erhöht werden [Showa Denko Europe GmbH, 2010]. Eine Erhöhung der Flußrate auf 240 µL/min konnte die Trennung auf eine Analysenzeit von 13 Minuten reduzieren.

Da die Empfindlichkeit der UV-Methode begrenzt ist, wurde im zweiten Teil des Versuchs sowie später zur Vermessung der Speichelprouben ein Single-Quad-Massenspektrometer (Surveyor MSQ) zur Detektion verwendet. Die Verwendung des Massenspektrometers machte der Einsatz eines deuterierten internen Standards (Cotinin-methyl- d_3 ¹) möglich. Cotinin-methyl- d_3 besitzt das gleiche chromatographische Verhalten wie Cotinin, das heißt es eluiert zur selben Zeit. Es kann jedoch durch das veränderte Molekulargewicht vom Cotinin massenspektrometrisch unterschieden werden. In der Festphasenextraktion verhält es sich ebenfalls analog zum Cotinin, sodaß man davon ausgehen kann, daß die Extraktionsausbeute von Cotinin-methyl- d_3 der des Cotinin entspricht.

Ein weiterer Vorteil der Detektion mit dem Massenspektrometer ist, daß eine Beschleunigung der Trennung durch einen Acetonitril-Gradienten möglich wird. Durch die kontinuierliche Erhöhung des Acetonitril-Gehalts von 13% auf 90%, können die später eluierenden Analyten, Nicotin und Nornicotin, beschleunigt werden. Ein Zusammenfallen der einzelnen Peaks ist in diesem Fall nicht mehr problematisch, da die einzelnen Analyten aufgrund ihrer verschiedenen Molekulargewichte unterschieden werden können. Daher ist auch eine vollständige Trennung von Cotinin und Coffein nicht mehr notwendig, sodaß auf die Abtrennung von Coffein vollständig verzichtet wurde.

Als Methode der Wahl zur Bestimmung von Nicotin und dessen Metaboliten aus dem Speichel wurde daher die in Tabelle 118 zusammengefasste Methode ermittelt. Die Bestimmungsgrenze für Nicotin liegt hier bei 1,5 ng/mL und für Cotinin bei 2,2 ng/mL. Die Grenzwerte für den zufälligen und systematischen Fehler der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie* (GTFCh) werden bei dieser Methode eingehalten (siehe Tabelle 90 und 91, Kapitel 17.8)

Auf die Quantifizierung von Nornicotin wurde verzichtet, da dessen Extraktion aus der Speichelproube im Gegensatz zu Nicotin und Cotinin schlechter reproduzierbar war (vgl. Kapitel 16.5).

¹ Cotinin-methyl- d_3 unterscheidet sich von Cotinin dahingehend, daß die Wasserstoffe der Methylgruppe am Pyrrolidin-Stickstoff durch Deuterium (schwerer Wasserstoff) ersetzt wurden.

Tabelle 118: Zusammenfassung - Methode zur Bestimmung von Nicotin und Cotinin aus Speichelproben mittels LC/MS

Säule	Shodex ODP2 HP-2D 150 x 1,0 mm (RP-Säule mit Polymer-Säulenmaterial)						
mobile Phase A	Acetonitril						
mobile Phase B	20 mM Ammoniumacetat pH 9,50						
Gradientenprogramm	von 13% Acetonitril (bei 0 min) auf 90% Acetonitril (bei 12 min), dann äquilibrieren bei 13% Acetonitril (bis 17 min)						
Injektionsvolumen	15 µL						
Säulentemperatur	50°C						
Flußrate	240 µL/min						
Detektion	MS (Surveyor MSQ), SIM						
Ionisation Mode				ESI			
Probe Temperature				400 °C			
	Mass (amu)	Span (amu)	Time Range (min)	Dwell Time (sec)	Polarity	Cone (volts)	
Cotinin	177,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70	
Cotinin-d ₃	180,2	0,5	0,00 - 5,00	1	+ve	70	
Nicotin	163,3	0,5	5,00 - 10,00	1	+ve	60	
Normicotin	149,2	0,5	8,00 - 17,00	1	+ve	60	

„A cigarette is the only consumer product which used as desired kills its consumer [Brundtland, 1999]“. Die Aussage von Dr. Brundtland ist nicht von der Hand zu weisen. Im 20. Jahrhundert starben 100 Millionen Menschen an den Folgen von Tabakrauch. Die Weltgesundheitsorganisation geht davon aus, daß pro Jahr weitere 5,4 Millionen Menschen sterben werden und die Zahl bis zum Jahr 2030 auf etwa acht Millionen ansteigen wird. Rauchen stellt einen Risikofaktor für sechs der acht häufigsten Todesursachen dar, nämlich ischämische Herzerkrankungen, cerebro-vaskuläre Erkrankungen, Infektionen der unteren Atemwege, chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD), Tuberkulose, sowie bestimmte Krebsformen (Speiseröhren-, Lungen- und Bronchialkrebs) [Who, 2008].

Diese Erkrankungen stellen auch eine erhebliche Belastung für staatliche Gesundheitssysteme und Krankenversicherungen dar. Raucher müssen daher damit rechnen, daß sie beim Abschluß einer privaten Kranken- oder Lebensversicherung mit erhöhten Versicherungsprämien oder Deckungsausschlüssen konfrontiert werden. Viele Versicherungen verlangen daher auch ein ärztliches Attest zum Nachweis des Nichtraucher-Status. Diese Atteste werden auf der Basis eines Cotinin-Tests im Harn erstellt [Bauer].

Aus diesem Zusammenhang hat sich auch die zentrale Fragestellung der „Cotinin-Studie“ entwickelt: Kann mit dem Nachweis von Cotinin aus dem Speichel als Alternative zum Harntest eine Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern getroffen werden?

Um diese Fragestellung beantworten zu können wurden 199 Speichelproben gepaart mit 94 Harnproben von 199 Freiwilligen gesammelt. Parallel zur Probensammlung wurde der Raucherstatus der Probanden erhoben. Bei den 94 Probanden, die zusätzlich zur Speichelprobe eine Harnprobe abgaben, wurde das Rauchverhalten genauer analysiert. In dieser Gruppe wurde zwischen Nichtrauchern, Passivrauchern, Personen, die ein Nicotin-Ersatzmittel benutzten, Gelegenheitsrauchern und Rauchern unterschieden. Bei den Rauchern in dieser Gruppe wurde zusätzlich die mittlere Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten erhoben, um die tägliche Nicotin-Dosis abschätzen zu können. Diese Abschätzung ist möglich, da pro gerauchter Zigarette (unabhängig von der Marke) etwa 1,2 mg Nicotin aufgenommen werden [Benowitz and Jacob III, 1984; Gori and Lynch, 1985; Pérez-Stable et al., 1998; Russell, 1987].

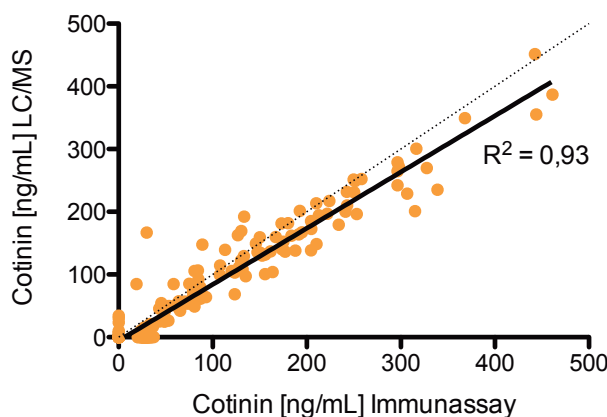


Abbildung 84: gemessene Cotinin-Konzentration [ng/mL] im Speichel; modifizierter Immunassay vs. LC/MS

Die Speichelproben wurden mit dem modifizierten DRI® Cotinine Immunassay am Olympus AU640 vermessen, parallel dazu wurde der Speichelanteil in den Proben bestimmt. Anschließend wurden die Proben mittels der LC/MS-Methode vermessen. Vergleicht man die Messwerte des Immunoassays mit den Messergebnissen der LC/MS, so lässt sich für die beiden Datenmengen ein Bestimmtheitsmaß von R^2 0,93 ($p < ,0001$) berechnen. Dies zeigt einen sehr guten linearen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des modifizierten Immunoassays und der Referenzmethode (LC/MS).

Der Vergleich der Cotinin-Konzentrationen im Speichel und im Harn (gemessen mit dem Immunassay) liefert ebenfalls einen relativ guten linearen Zusammenhang der Messwerte (R^2 0,78, $p < 0,0001$; vgl. Abbildung 85)

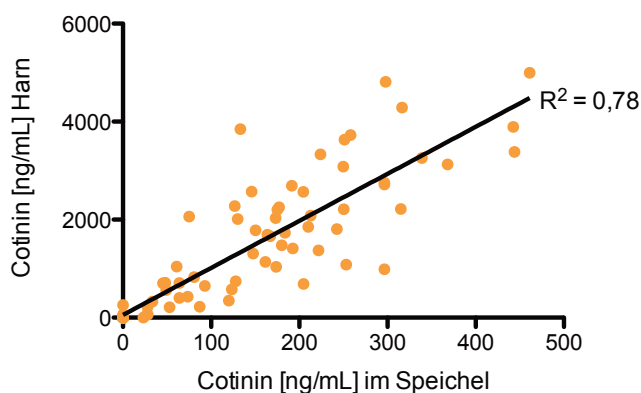


Abbildung 84: gemessene Cotinin-Konzentration [ng/mL] im Speichel vs. im Harn (gemessen mit Immunassay)

Sortiert man die Messwerte des Immunoassays aufsteigend und stellt dies in einem Balkendiagramm dar (vgl. Abbildung 86, oben), so lässt sich aus diesem Diagramm sehr leicht ein Cut-Off-Wert zur Unterscheidung zwischen Nichtrauchern (Messwert < 40 ng/mL) und Rauchern (Messwert > 40 ng/mL) ersehen.

Auf Basis des 40 ng/mL-Cut-Off-Wertes stimmt der ermittelte Raucherstatus mit dem selbst-deklarierten Raucherstatus bei 91,96% der Probanden überein. Im Detail wurden drei der 86 Nichtraucher als Raucher enttarnt und vier der 85 Raucher als Nichtraucher klassifiziert. Die Passivraucher wurden gemäß des neuen Cut-Off-Werts bis auf eine Ausnahme als Nichtraucher eingeordnet. Die Probe des Probanden, der ein Nicotin-Ersatzmittel benutzte, konnte richtigerweise in die Gruppe der Raucher eingeordnet werden. Von den neun Speichelproben der Gelegenheitsraucher konnte eine der Gruppe der Raucher zugeordnet werden, die restlichen acht Proben lagen unter dem Grenzwert.

Im Vergleich dazu stimmte bei den Harnproben in 85,11% der Fälle der ermittelte Raucherstatus mit dem selbst-deklarierten Raucherstatus der Probanden überein (80 von 94 Proben, Cut-Off-Wert 500 ng/mL). In der Gruppe der Passivraucher war wiederum eine Harnprobe positiv auf Cotinin. Diese Harnprobe stammte vom selben Probanden wie die positive Speichelprobe. Bei den Gelegenheitsrauchern wurde das gleiche Ergebnis wie bei den Speichelproben erzielt: acht negative Harnproben, die Spender stimmen mit den negativen Speichelproben überein. Fünf Harnproben von Rauchern lagen unter dem Cut-Off-Wert, wobei vier der fünf Probanden auch beim Speicheltest eine negative Probe ablieferten.

Im Speichel und Harn von Nichtrauchern konnte Cotinin nachgewiesen werden. Die Konzentrationen lagen jedoch in den meisten Fällen unter dem Cut-Off-Wert der jeweiligen Testmethode. Eine Erklärung für den Nachweis von Cotinin in Nichtrauchern kann einerseits von (nicht deklariertem) Passivrauch stammen oder andererseits auch aus Nahrungsmitteln, wie Erdäpfel, Tomaten, Auberginen und Tee. Die mittlere Aufnahme von Nicotin über Nahrungsmittel liegt bei etwa 1,4 µg pro Tag. Im Vergleich zur täglichen Nicotin-Dosis von Rauchern bzw. Personen, die sehr stark dem Passivrauch ausgesetzt sind, ist diese Zufuhr zwar nicht signifikant, dennoch können diese Mengen bei Nichtrauchern, die dem Passivrauch äußerst geringfügig ausgesetzt sind, dazu beitragen das Cotinin vor allem in ihren Speichelproben nachgewiesen werden kann [Siegmund et al., 1999; Siegmund et al., 2001].

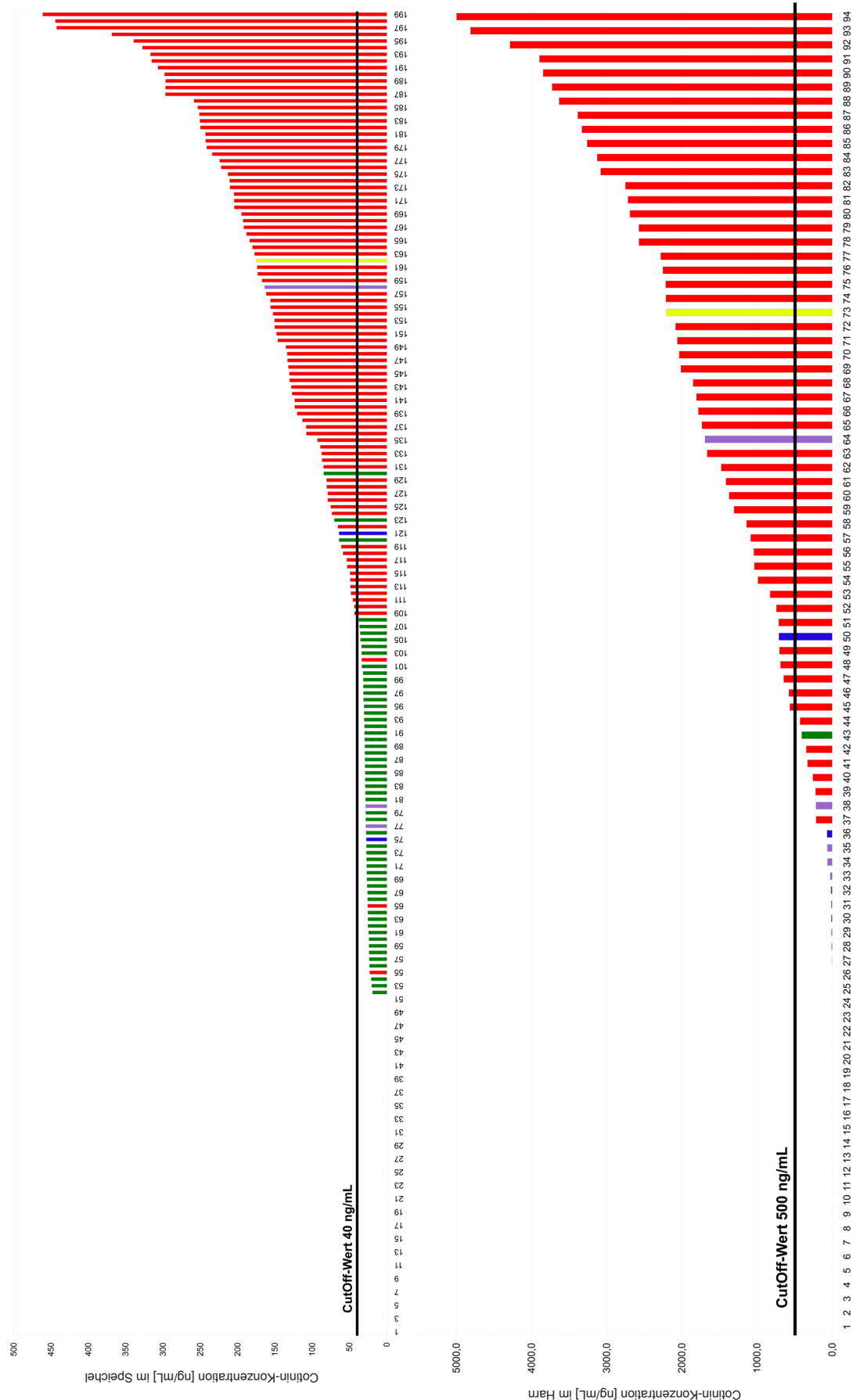


Abbildung 86: Cotinin-Konzentration im Speichel der Probanden gemessen mit dem modifizierten DRI® Cotinine Assay (oben); Cotinin-Konzentration im Harn der Probanden gemessen mit dem DRI® Cotinine Assay (unten); grün ... Nichtraucher; blau ... Passivraucher; gelb ... Nicotin-Ersatzmittel; lila ... Gelegenheitsraucher; rot ... Raucher

27 Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben

Aufgrund der geringen Analytkonzentration im Speichel, müssen die Opiate in der Probe aufkonzentriert werden und störende Matrixbestandteile entfernt werden. Die Anforderungen an eine Festphasenextraktionsmethode wurden in Kapitel 24 beschrieben.

Im Fall der Opiate wurden *Mixed-mode Cation-eXchange* (MCX) Extraktionssäulchen verwendet, da die Opiate aufgrund ihres pK_a -Wertes (pK_a 8 bis 10) auf diesen Säulchen eine gute Retention zeigen müssten. Die MCX-Säulchen erlauben eine Retention für Analyten mit einem pK_a -Wert zwischen 2 und 10 durch zwei Mechanismen, nämlich Kationenaustausch und Umkehrphase [Waters Corporation, 2006].

Die maximale Ausbeute für Morphin und Codein konnte unter folgenden Extraktionsbedingungen erzielt werden:

- Konditionieren und Äquilibrieren der Extraktionssäulchen mit Methanol und Wasser,
- Zusatz von 1% Ameisensäure zur Probe,
- Waschen mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und 0,1% Ameisensäure in Aceton,
- Elution mit 5% Ammoniak in Aceton.

Die Extraktionsausbeute betrug in diesem Fall 95,5% für Morphin und 94,5% für Codein. Der Nachteil dieses Extraktionsschemas ist jedoch, daß Tartrazin, der interne Standard des Greiner Bio-One *Saliva Collection System*, nicht wie andere störende Matrixbestandteile aus der Speichelprobe entfernt wird. Dies führt dazu, daß bei den nachfolgenden LC/MS-Analysen die Empfindlichkeit der MS-Messung durch Ablagerung des Tartrazins an der *Curtain-* bzw. *Orifice-Plate* mit der Anzahl der gemessenen Speichelproben abnimmt.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Möglichkeiten zur Entfernung des Tartrazins aus den Speichelproben untersucht. Eine einfache Möglichkeit zur Entfernung des Tartrazins stellte eine zusätzliche Festphasenextraktion über ein Anionenaustauscher-Säulchen dar. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften wurde Tartrazin vollständig an den Anionenaustauscher gebunden und somit aus der Speichelprobe entfernt. Das Eluat dieser ersten Extraktion wurde dann zur Extraktion auf das MCX-Säulchen aufgetragen, wo alle weiteren störenden Matrixbestandteile entfernt wurden und die Probe aufkonzentriert wurde. Die maximale Extraktionsausbeute für Morphin betrug bei dieser gekoppelten Festphasenextraktion 88,5% (SD 3,51, RSD 3,96%) und lag deutlich über der von der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie* (GTFCh) geforderten Mindestextraktionsausbeute von 50% [Schmitt et al., 2003].

In diesem Fall wurde zur Elution eine Mischung aus 5% Ammoniak in Aceton verwendet. Verwendet man jedoch statt Aceton ein etwas schwächeres Elutionsmittel wie Acetonitril, dann ist die Extraktionsausbeute für Morphin etwas geringer, nämlich 83,9%.

Eine andere Möglichkeit das Tartrazin aus der Speichelprobe zu entfernen, stellt die Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln dar. Beim Ausfällen der Schleimstoffe und Speichelproteine reichert sich das Tartrazin bevorzugt im Präzipitat an, sodaß bei der nachfolgenden Festphasenextraktion farblose Eluate gewonnen werden können.

Durch die Zugabe von Aceton als Proteinfällungsreagens wird es notwendig, die Probe vor dem Auftragen auf das Extraktionssäulchen wieder mit einer Mischung aus 1% Ameisensäure in Wasser zu verdünnen, damit der organische Anteil in der Probe auf etwa 10% reduziert wird, da sonst keine Retention der Analyten auf der stationären Phase erfolgt. Unter diesen Bedingungen konnte eine Extraktionsausbeute von 76,8% erzielt werden.

Ein Nachteil dieser Variante ist, daß durch das Verdünnen der Probe mit 1% Ameisensäure in Wasser sehr große Probenvolumina (bis zu 18 mL) entstehen. Das Auftragen dieser großen Probenmengen auf die Extraktionssäulchen ist fehleranfällig und zeitaufwendig. Daher wurde versucht - unter Beibehaltung des Probe-Fällungsreagens-Wasser-Verhältnisses - das Probenvolumen auf 1 mL zu reduzieren. Dies führte jedoch zu einer drastischen Abnahme der Extraktionsausbeute (51,3%), die nur knapp über den Anforderungen der GTFCh-Richtlinien (> 50%) lag.

Die Variante der gekoppelten Festphasenextraktion ist vom Materialaufwand her gesehen die teurere Variante, da zwei verschiedene Extraktionssäulchen benötigt werden. Vorteile dieser Variante sind jedoch die höhere Extraktionsausbeute (88,5%), die geringere Anzahl der Arbeitsschritte

und damit die geringere Fehleranfälligkeit der Methode. Daher ist die Methode der gekoppelten Festphasenextraktion (in Tabelle 119 noch einmal zusammengefasst) als Methode der Wahl zur Extraktion von Opiat-hältigen Speichelproben, die mit dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* gesammelt wurden, anzusehen.

Tabelle 119: Methode der Wahl zur Extraktion von Opiat-hältigen Speichelproben (gekoppelte Festphasenextraktion)

Vorbereitung der Speichelprobe	
ansäuern mit	Ameisensäure → 1% Ameisensäure in der Probe
1. Extraktion	
Säulchen	Isolute® NH ₂ (1 mL, Anionenaustauscher)
aktiviert mit	1% Ameisensäure/Wasser
Probe auftragen (1 mL)	
2. Extraktion	
Säulchen	Oasis® MCX (30 mg/1 cc, <i>Mixed Mode Cation-Exchange</i>)
konditioniert mit	0,1% Ameisensäure in Aceton (1 mL)
äquilibriert mit	1% Ameisensäure in Wasser (1 mL)
Probe (Eluat aus 1. Extraktion) auftragen	
waschen mit	0,1% Ameisensäure in Wasser (1 mL)
	0,1% Ameisensäure in Aceton (1 mL)
eluieren mit	5% Ammoniak in Aceton (500 µL)

28 Untersuchung des Retentionsverhaltens von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen

Aufgrund der Polarität der Analyte, vor allem die der Morphin-Glucuronide wurde zur Trennung dieser ein HILIC-Trennsystem gewählt. In einem *reversed-phase*-Trennsystem würden die Morphin-Glucuronide praktisch keine Retention zeigen und sehr nahe am oder im Totvolumen eluieren. Verwendet man jedoch Silica-Säulen oder andere polare Säulenmaterialien und wässrig-organische mobile Phasen, so können diverse Opiate, Opioide und deren Metabolite mit ausreichender Retention gut von einander getrennt werden [Bengtsson et al., 2005; Naidong et al., 1999; Shou et al., 2002; Vikingsson et al., 2008; Zuccaro et al., 1997]

Der Begriff HILIC (*hydrophilic-interaction liquid chromatography*) wurde erstmals von Andrew J. Alpert im Jahr 1990 verwendet und beschreibt eine Variante der Normalphasen-Chromatographie. Unter HILIC-Bedingungen werden polare stationäre Phasen und wässrig-organische mobile Phasen verwendet. Das Prinzip des HILIC-Mechanismus beruht auf der Verteilung der Analyten zwischen einem Wasserfilm auf der Oberfläche der stationären Phase und dem Wasser in der mobilen Phase. Daher zeigen polare Verbindungen eine deutlich stärkere Retention als unpolare Verbindungen, da sie sich bevorzugt im Wasserfilm an der Oberfläche der stationären Phase aufhalten [Alpert, 1990; Hemström and Irgum, 2006; Olsen, 2001].

Bei der Entwicklung einer Trennmethode für Opiate wurden zwei verschiedene stationäre Phasen - eine zwitterionische Phase (ZIC-HILIC) und eine nicht modifizierte Silica-Phase (Reposil pur) - untersucht. Auf beiden Säulen konnte eine gute Trennung der Analyte (Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid) erzielt werden.

Eine gute Retention aller Analyte erhält man, wenn der organische Anteil der mobilen Phase zwischen 70% (ZIC-HILIC) und 80% (Reposil pur) Acetonitril liegt. Wird unter HILIC-Bedingungen der organische Anteil weiter erhöht, so nimmt die Retention zu. In diesem Fall gilt: je höher die Polarität der Analyte, umso stärker ist die Zunahme der Retention. Dies führt zum Beispiel dazu, daß die Morphin-Glucuronide bei einem organischen Anteil von 85% Acetonitril erst nach über 30 Minuten detektiert werden können.

Setzt man zum organischen Anteil der mobilen Phase jedoch ein anderes, polareres Lösungsmittel wie Isopropanol, Ethanol oder Methanol zu, kommt es zu einer Beschleunigung der polaren Verbindungen und eventuell zu einer Änderung der Elutionsreihenfolge. Der Effekt ist umso ausgeprägter, je polarer das zugesetzte Elutionsmittel ist und je höher dessen Konzentration ist. So reagierten die Morphin-Glucuronide am stärksten auf den Zusatz von Methanol.

Auf der ZIC-HILIC Säule bewirkte bereits der Zusatz von 10% Methanol (Acetonitril:Methanol 9:1, 70% organischer Anteil) zum organischen Anteil der mobilen Phase eine Veränderung der Retentionsreihenfolge. Eine weitere Erhöhung des Methanol-Zusatzes auf 40% (Acetonitril:Methanol 6:4, 70% organischer Anteil) führte dazu, daß die Morphin-Glucuronide vor Codein und Morphin eluierten.

Bei den Analysen auf der Reposil pur Säule zeigte ebenfalls Methanol als polarstes zugesetztes Lösungsmittel den stärksten Effekt. Mischt man Acetonitril mit Methanol im Verhältnis 8:2

(85% organischer Anteil) so eluieren Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid praktisch gleichzeitig. In diesem Fall werden die Morphin-Glucuronide wieder sehr stark beschleunigt, die weniger polaren Verbindungen Codein und Morphin nur wenig beschleunigt. Das am wenigsten polare Thebain wird praktisch nicht beeinflusst.

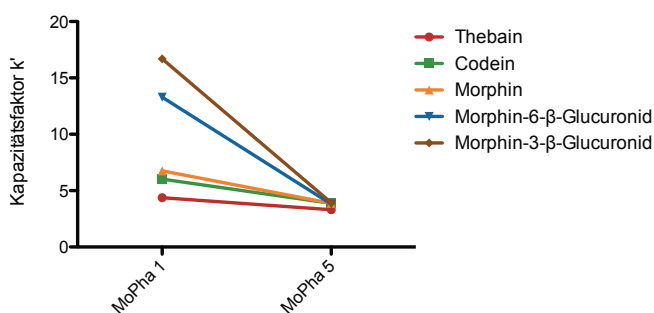


Abbildung XXX: Änderung des Retentionsverhaltens von Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6- β -Glucuronid und Morphin-3- β -Glucuronid unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen;

Mobile Phase: 85% Acetonitril, 15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 (MoPha1) bzw. 85% Acetonitril/Methanol (8:2), 15% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 (MoPha5); Säule: Reposil-pur 120 Si, 125 x 1,0 mm; 3,5 μ m

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Vikingsson et al. [Vikingsson et al., 2008] in ihren Untersuchungen zur Trennung von Opiaten und Opoiden auf der ZIC-HILIC-Säule. Chung et al. [Chung et al., 2007]

sowie Vikingsson et al. [Vikingsson et al., 2008] führen die Beschleunigung der Trennung durch den Zusatz von Methanol bzw. Austausch von Acetonitril durch Methanol auf die Möglichkeit von Methanol Wasserstoffbrückenbindungen zu den Analyten aufzubauen zurück. Diese Wasserstoffbrückenbindungen dürften die Wechselwirkung der Analyten (Ionenaustausch und hydrophile Wechselwirkungen) mit der stationären Phase reduzieren und so zu einer Abnahme der Retention führen. Der Zuckerrest der Morphin-Glucuronide besitzt im Gegensatz zum Morphinan-Grundgerüst die Möglichkeit viele Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Daher liegt es nahe, daß die Retention der Morphin-Glucuronide am stärksten durch die Zugabe von Methanol reduziert wird [Chung et al., 2007; Vikingsson et al., 2008].

Die beste Trennung aller Analyte konnte auf der nicht modifizierten Reprosil-Silica-Säule unter Verwendung von 82% Acetonitril und 18% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 bei 55°C Säulentemperatur und einer Flußrate von 60 µL/min erzielt werden.

Die Kapazitätsfaktoren der Analyte liegen unter diesen Bedingungen zwischen 3,86 (Thebain) und 8,88 (Morphin-3-Glucuronid). Die Trennung ist mit knapp 20 Minuten zwar relativ lang, jedoch sind unter den gewählten Bedingungen alle Analyte gut getrennt. Weiters liegen zwischen der Totzeit und der Elution des ersten Analyten mehr als fünf Minuten, sodaß bei der Verwendung eines Massenspektrometers zur Detektion alle Analyte außerhalb einer etwaigen *ion suppression* Zone liegen. In der *ion suppression* Zone ist die Ionisation durch Matrixinterferenzen nur unvollständig, wodurch es zu einem schlechteren *signal-to-noise*-Verhältnis kommt.

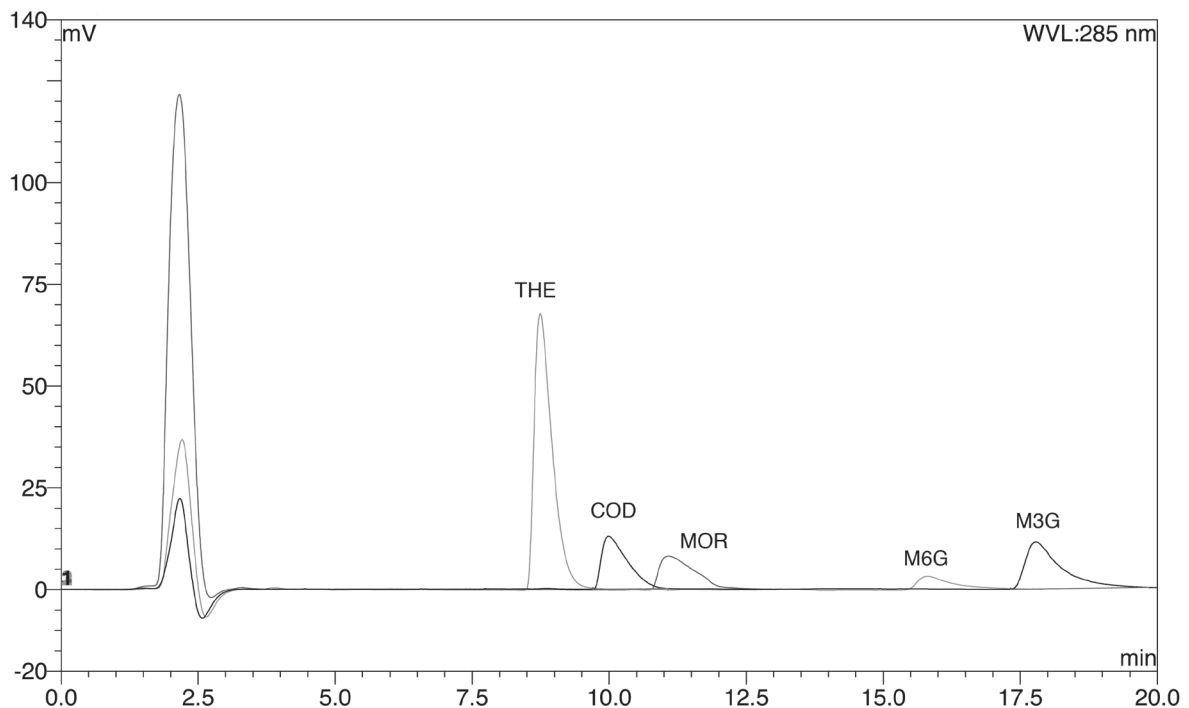


Abbildung 88: Chromatogramm, Elutionsreihenfolge: Thebain < Codein < Morphin < Morphin-6-β-Glucuronid < Morphin-3-β-Glucuronid

Mobile Phase: 82% Acetonitril/18% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80; Säule: Reprosil-pur 120 Si, 125 x 1,0 mm; 3,5 µm @ 55°C; Flußrate: 60 µL/min, Detektion: UV @ 285 nm

29 „Mohn-Studie“

Im mitteleuropäischen Raum, vor allem in Österreich, ist der Konsum von Mohnsamen beliebt und weit verbreitet. Durch den Genuss von Mohnsamen in Lebensmitteln gelangen jedoch auch Opium-Alkaloide in den Organismus. Mohnsamen sind per se frei von Opium-Alkaloiden, wird jedoch bei der Ernte häufig mit dem alkaloidhaltigem Milchsafte, der für die Gewinnung von Opium benötigt wird, kontaminiert.

Die Aufnahme von Speisemohn und dem darin enthaltenen Morphin führt selten zu nennenswerten pharmakologischen Wirkungen, da Morphin nach oraler Aufnahme sehr rasch in der Leber verstoffwechselt wird (*first-pass*-Effekt). Es ist jedoch möglich, daß die im Mohn enthaltene Alkaloidmenge ausreicht, um bei einem immunologischen Harntest positiv auf Opiate getestet zu werden. Leider ist es bei diesen Tests nicht möglich zwischen der „legalen Mohn-Einnahme“ und einer „illegalen Morphin-Einnahme“ zu unterscheiden.

Aus diesem Zusammenhang hat sich auch die Fragestellung der „Mohn-Studie“ entwickelt: Ist nach der Einnahme von großen Mengen Speisemohn mit einem relativ hohen Gehalt an Morphin ein Nachweis von Opiaten im Speichel möglich? [Dejnega et al.; Risikobewertung, 2005; Schmid, 2007; Voderholzer et al., 1997]

Im Rahmen der „Mohn-Studie“ konsumierten zehn Probanden abhängig von ihrem Körpergewicht eine bestimmte Menge an Speisemohn mit einem natürlichen Morphin-Gehalt von circa 120 mg/kg. Die mit dem Mohn aufgenommene Morphin-Dosis betrug circa 0,12 mg/kg Körpergewicht.

Diese Morphin-Dosis war hoch genug, daß alle Probanden bereits eine Stunde nach der Mohnaufnahme im Harn positiv auf Opiate getestet werden konnten. Die Harn-Spiegel erreichten im Mittel nach fünf Stunden das Maximum und fielen anschließend wieder ab. Die höchste im Harn gemessene Konzentration betrug 81,445 µg/mL Opiat (Proband 4, vier Stunden nach der Mohnaufnahme).

Tabelle 120: Menge an konsumierten Speisemohn und Morphin-Dosis

Proband	Körpergewicht [kg]	Mohn-Menge [g]	Morphin-Dosis gesamt [mg]	Morphin-Dosis pro kg Körpergewicht (mg/kg)
1	56	55,94	6,77	0,12
2	62	60,88	7,36	0,12
3	70	69,06	8,35	0,12
4	54	53,59	6,48	0,12
5	75	74,38	9	0,12
6	71	70,26	8,5	0,12
7	110	108,18	13,09	0,12
8	48	47,38	5,73	0,12
9	74	72,87	8,82	0,12
10	73	71,67	8,67	0,12

Im Gegensatz zu den Harnproben waren sehr viele Speichelproben Opiat-negativ. Beim genaueren Betrachten der Speichel-Ergebnisse fällt auf, daß es kein bestimmtes Muster für das Auftreten der Opiat-positiven Speichelproben gibt. Jeder Proband lieferte zu irgendeinem Zeitpunkt oder zu mehreren Zeitpunkten, die oft nicht hintereinander lagen, Opiat-positive Speichelproben ab.

Die Ursache, daß in dieser Studie nur einige Speichelproben positiv auf Opiate getestet werden konnten, könnte daran liegen, daß im Gegensatz zu anderen Studien, bei denen Opiat-positive Speichelproben wenige Stunden nach der Mohnaufnahme gefunden wurden [Rohrig and Moore, 2003], sich alle Probanden nach der Mohnaufnahme möglichst gründlich Zähne putzen mussten um eine Kontamination der Speichelproben mit Mohnsamen zu vermeiden.

Eine weitere wichtige Rolle dürfte auch der ausgeprägte *first-pass*-Effekt des Morphins spielen. Der Großteil des Morphins wird präsystemisch in der Leber zu Morphin-6-Glucuronid und Morphin-3-Glucuronid metabolisiert (75 bis 85% der Dosis) [Jenkins and Cone, 1998; Lüllmann et al., 2006; Zeilhofer and Sittl, 2007]. Die Plasmaproteinbindung von Morphin schwankt zwischen 12 und 35% [Jenkins and Cone, 1998; Oddb.Org, 1999]. Es kann jedoch nur freies, nicht an Plasmaproteine gebundenes Morphin in den Speichel diffundieren. Aus diesem Grund dürften die Morphin-Speichel-Konzentrationen nur sehr gering sein und wahrscheinlich in den meisten Fällen unter der Nachweisgrenze des getesteten Immunoassays liegen.

Daß in einigen Speichelproben dennoch Opiate nachgewiesen werden konnten, könnte daran liegen, daß trotz gründlicher Zahnreinigung eine Kontamination der Speichelproben durch Mohnsamen

stattgefunden hat. Dies ließe sich durch Vergleich der Opiat-Konzentrationen im Speichel und Plasma verifizieren, da bei Vorliegen einer oralen Kontamination die Konzentration im Speichel um ein Vielfaches höher sein müsste als im Plasma. Aus ethischen Gründen war jedoch die Abnahme von Blutproben nicht möglich, sodaß dieser Vergleich nicht möglich war.

Das deutsche Bundesinstitut für Risikobewertung empfiehlt einen vorläufigen Richtwert für die maximale Morphin-Konzentration im Speisemohn von 4 µg/g (4 mg/kg) und eine maximale täglich Zufuhr von 6,3 µg Morphin pro Kilogramm Körpergewicht [Risikobewertung, 2005]. Auf Basis der Daten der „Mohn-Studie“ (Morphin-Dosis 120 µg/kg Körpergewicht) kann davon ausgegangen werden, daß beim Konsum von Mohnsamen, die den Anforderungen des genannten Richtwertes entsprechen und sofern der Faktor der *oral contamination* weitgehend ausgeschlossen ist, mit ziemlicher Sicherheit keine Opiate im Speichel nachgewiesen werden können.

Ob auf diese Weise auch zwischen einer „legalen Speisemohn-Einnahme“ und einem „illegalen Morphin-Konsum“ unterschieden werden kann - was ja beim Urintest nicht möglich ist - kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

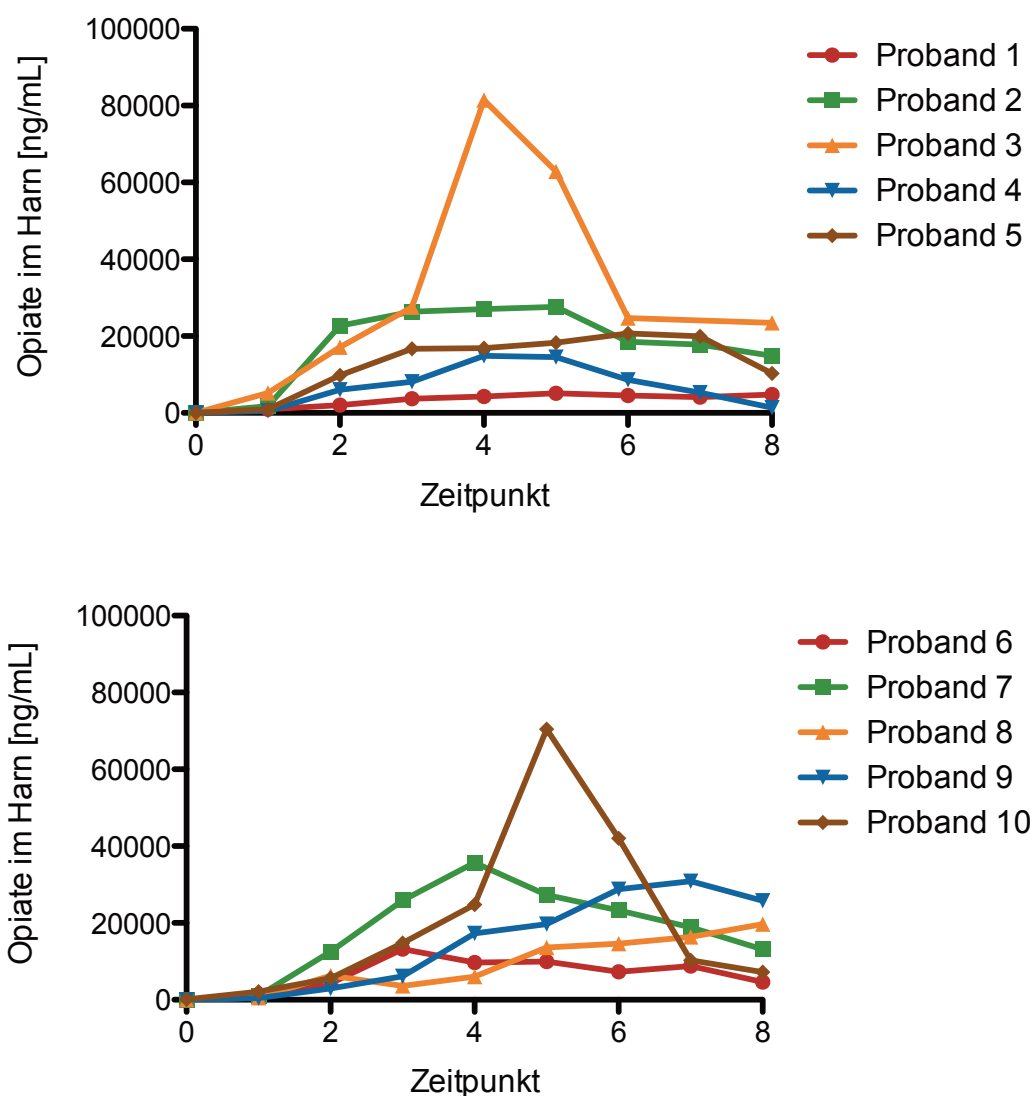


Abbildung 89: Opiatkonzentration [ng/mL] im Harn gemessen mit CEDIA® Opiate Assay am Olympus A640
oben: Proband 1 bis Proband 5
unten: Proband 6 bis Proband 10

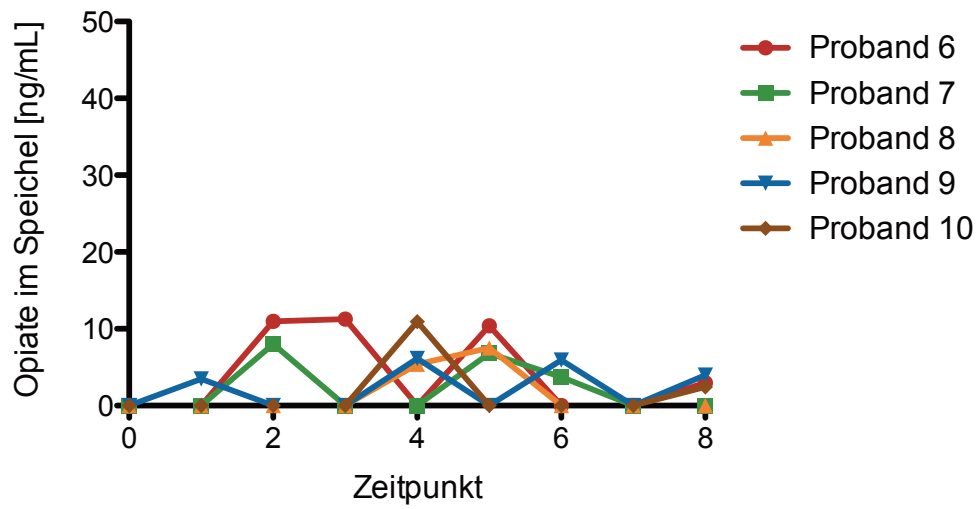
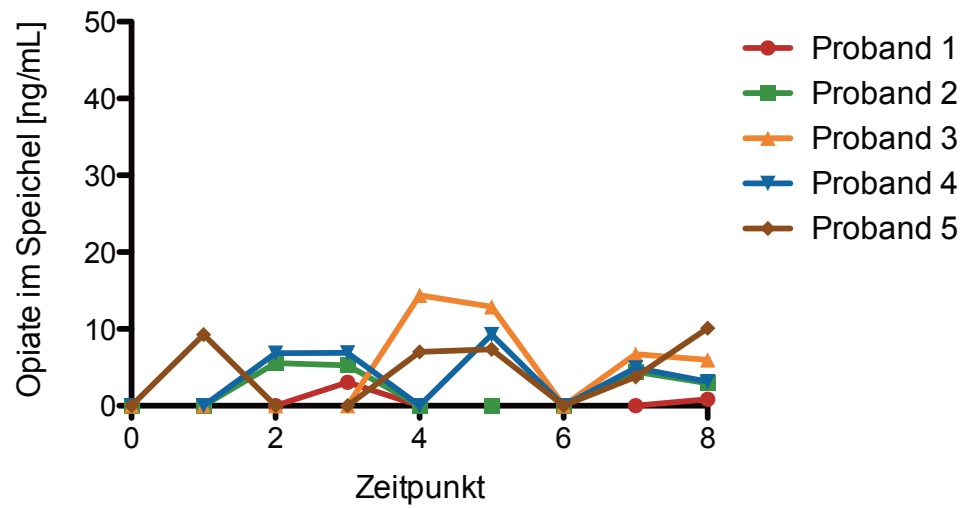


Abbildung 90: Opiatkonzentration [ng/mL] im Speichel gemessen mit dem CEDIA® Opiate OFT Assay (Prototyp); Konzentration auf 100% Speichelanteil berechnet
 oben: Proband 1 bis Proband 5
 unten: Proband 6 bis Proband 10

Schlußfolgerungen

Die Untersuchung des Verhaltens ausgewählter radioaktiv-markierter Drogen (Cocain, Codein, Methamphetamin, Morphin, Nicotin und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol) und Medikamente (Mycophenolatnatrium) zeigte mit der Ausnahme von Tetrahydrocannabinol, dass das Greiner Bio-One *Saliva Collection System* sehr gut für die Abnahme von Speichelproben, die die untersuchten Verbindungen enthalten könnten, geeignet ist. Es kommt zu keiner Adsorption der Analyten an die einzelnen Komponenten des Speichelsammelsystems. Die Wiederfindungsraten der radioaktiv-markierten Analyten, Cocain, Codein, Methamphetamin, Morphin, Mycophenolatnatrium und Nicotin lagen in allen Fällen – mit Ausnahme von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol – über 95% (vgl. Kapitel 14).

Beim Δ^9 -Tetrahydrocannabinol liegt die Wiederfindungsrate bei circa 30% (vgl. Kapitel 14.7). Zu diesem drastischen Verlust an Δ^9 -Tetrahydrocannabinol kommt es beim Zentrifugieren in den *Saliva Transfer Tubes*. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kommt es auf Grund der erhöhten Lipophilie und der starken Plasmaproteinbindung zu einer Anreicherung des Δ^9 -Tetrahydrocannabinol im Präzipitat, das aus Speichelproteinen, Schleimstoffen, abgeschiedenen Zellen der Mundschleimhaut und eventuelle auch aus Speiseresten besteht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol kann geschlossen werden, dass auch Speichelproben, die Δ^9 -Tetrahydrocannabinol enthalten, mit ähnlich hohen Verlusten beim Zentrifugieren der Probe gerechnet werden kann. Da der Hersteller des Speichelsammelsystems die Zentrifugation der Speichelprobe unbedingt empfiehlt und nur der klare Überstand der Probe zur weiteren Analyse verwendet werden soll, ist nach der derzeitigen Datenlage eine Verwendung des Greiner Bio-One *Saliva Collection System* zur Sammlung von Speichelproben die Δ^9 -Tetrahydrocannabinol und dessen Metabolite enthalten könnten nicht empfehlenswert.

Durch eine alternative Probenaufarbeitung, wie zum Beispiel eine direkte Extraktion der Speichelprobe mit Ethylacetat [Langel et al., 2008], könnte eventuell die Ausbeute für Δ^9 -Tetrahydrocannabinol erhöht werden. Eine genauere Untersuchung dieser Möglichkeit und weiterer Alternativen ist jedoch sehr zeitaufwendig und geht über die Fragestellung dieser Arbeit hinaus.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Immunoassay zur Bestimmung von Cotinin aus dem Harn (DRI® *Cotinine Assay*) angepasst, dass dieser zur Bestimmung von Cotinin im Speichel anwendbar ist. Die gemessenen Cotinin-Konzentration ist zwar vom Speichelanteil abhängig, kann jedoch mit einer einfachen Korrekturfomel behoben werden (vgl. Kapitel 15.7 und 23). In 199 Speichelproben von Nichtrauchern, Passivrauchern, Gelgenheitsrauchern und Rauchern wurde mit dem modifizierten Immunoassay die Cotinin-Konzentration bestimmt. Auf Basis dieser praktischen Daten wurde ein Cut-Off-Wert bei 40 ng/mL zur Unterscheidung zwischen Nichtrauchern und Rauchern festgesetzt. Die zur Bestätigung der Immunassay-Ergebnisse entwickelte LC/MS-Methode mit vorangehender Festphasenextraktion der Speichelprobe ist präzise und gut reproduzierbar; alle Fehlergrenzen entsprechen den Anforderungen der *Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie* (GTFCh). Die Bestimmungsgrenze der LC/MS-Methode liegt für Nicotin bei 1,5 ng/mL und für Cotinin bei 2,2 ng/mL in der Speichelprobe (vgl. Kapitel 17.7).

Auf Basis dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus dem Greiner Bio-One *Saliva Collection System* zur Sammlung der Speichelprobe und den neu entwickelten Analysenmethoden sehr gut zur Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern geeignet ist.

Das Greiner Bio-One *Saliva Collection System* ist auch für die Abnahme von Opiat-hältige Speichelproben gut geeignet. Wiederfindungsraten von radioaktiv-markierten Morphin und Codein aus dem Speichelsammelsystem betrug mehr als 97%.

Die entwickelte gekoppelte Festphasenextraktionsmethode über ein Anionenaustauschersorbens und anschließender Extraktion über ein *Mixed-Mode-Cation-Exchange*-Säulchen ist gut reproduzierbar und liefert eine hohe Extraktionsausbeute für Opiate (>88%, vgl. Kapitel 19.2.1). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch der interne Standard (gelber Farbstoff Tartrazin) des Speichelsammelsystems aus der Probe entfernt wird. Dieser Farbstoff führt nämlich in der nachfolgenden LC/MS-Analyse zu einer Abnahme der Empfindlichkeit der MS-Messungen, da er sich auf der *Curtain*- bzw. *Orifice-Plate* der Ionenquelle des Massenspektrometers abgelagert.

Die Untersuchung des Retentionsverhaltens der Morphinan-Alkaloide in verschiedenen chromatographischen HILIC- und Normalphasen-Trennsystemen zeigte, dass eine sehr gute

Trennung mit ausreichender Retention der Alkaloide und der beiden Morphin-Glucuronide auf einer nicht modifizierten Silica-Säule (Reprosil-pur 120 Si 125 x 1,0; 3,5 µm) unter Verwendung von 82% Acetonitril und 18% 29 mM Ammoniumacetat (pH 3,80) als mobile Phase erzielt werden konnte (vgl. Kapitel 20.2 und 28). Ob diese Trennmethode auch zur Analyse von Opiat-hältigen Speichelproben praktisch angewendet werden kann, müssten weiterführende Untersuchungen zeigen.

Die Ergebnisse der „Mohn-Studie“ deuten darauf hin, dass mit der Einführung eines Richtwerts für die maximale Morphin-Konzentration im Speisemohn [Risikobewertung, 2005] und der Bestimmung der Opiat-Konzentration aus dem Speichel eine Möglichkeit zur Lösung des „Mohnkuchen-Problem“ besteht.

In sehr vielen Speichelproben der „Mohn-Studie“, die mit dem neuem Microgenics CEDIA® *Opiate OFT* Immunassay vermessen wurden, konnten keine Opiate nachgewiesen werden, einige Speichelproben wurden positiv auf Opiate getestet. Beim Auswerten der Ergebnisse fällt auf, dass es kein bestimmtes Muster für das Auftreten der positiven Speichelproben gibt. Jeder Proband lieferte zu einem oder mehreren Zeitpunkten, eine positive Speichelprobe ab. Die Zeitpunkte liegen jedoch nicht wie man es bei einer Pharmakokinetik-Kurve erwarten würde hintereinander, sondern sind willkürlich verteilt. Daher ist anzunehmen, dass es - trotz gründlicher Reinigung der Mundhöhle um die sog. *oral contamination* auszuschließen - zu einer Verunreinigung der Probe mit Mohnsamen gekommen ist. Eine Überprüfung dieser Annahme wäre durch den Vergleich von Speichel- und Plasma-Opiat-Konzentration sehr einfach möglich gewesen, da beim Vorliegen einer *oral contamination* die Opiat-Konzentration im Speichel um ein Vielfaches höher wäre als im Plasma. Dieser Vergleich war jedoch nicht möglich, das aus ethischen Gründen bei der „Mohn-Studie“ den Betroffenen kein Blut abgenommen werden konnte.

Die Mohnsamen, die in der „Mohn-Studie“ verzehrt wurden, lagen mit 120 mg/kg Morphin-Gehalt deutlich über dem empfohlenen Richtwert von 4 mg/kg. Da in der „Mohn-Studie“ nur wenige Speichelproben positiv auf Opiate getestet werden konnten und diese wahrscheinlich durch eine Kontamination der Probe mit Mohnsamen verursacht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass beim Verzehr von Speisemohn, dessen Morphin-Gehalt dem geforderten Richtwert entspricht, Speichelproben mit hoher Wahrscheinlichkeit negativ auf Opiate getestet werden können.

Ob auf diese Weise eine endgültige Lösung des „Mohnkuchen-Problems“, also die Unterscheidung zwischen legalem Speisemohnverzehr und illegalem Opiat-Konsum möglich ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

Allgemeiner Teil

Speichel

Aardal, E. and Holm, A. (1995) *Cortisol in saliva - Reference ranges and relation to cortisol in serum.* European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 33, 927-932.

Abrams, A.M., Melrose, R.J. and Howell, F.V. (1973) *Necrotizing sialometaplasia. A disease simulating malignancy.* Cancer, 32, 130-135.

Acro Biotech LLC Salicula Saliva Collector <http://acrobiotech.com/devices/salicula/> 30.9.2009 9:29 Uhr

Al Nowaiser, A., Roberts, G.J., Trompeter, R.S., Wilson, M. and Lucas, V.S. (2003) *Oral health in children with chronic renal failure.* Pediatric Nephrology, 18, 39-45.

Allen, K.R., Azad, R., Field, H.P. and Blake, D.K. (2005) *Replacement of immunoassay by LC tandem mass spectrometry for the routine measurement of drugs of abuse in oral fluid.* Annals of Clinical Biochemistry, 42, 277-284.

Amado, L., Villar, L., De Paula, V. and Gaspar, A. (2008) *Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA.* Journal of Virological Methods, 148, 74-80.

Angiero, F., Benedicenti, S., Romanos, G.E. and Crippa, R. (2008) *Sialolithiasis of the submandibular salivary gland treated with the 810- to 830-nm diode laser.* Photomedicine and Laser Surgery, 26, 517-521.

Aps, J.K.M., Belanghe, J. and Martens, L.C. (2002) *Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 40, 345-350.

Aps, J.K.M. and Martens, L.C. (2005) *Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva.* Forensic Science International, 150, 119-131.

Ashnagar, A. and Sadeghi, N. (2007) *Study of lithium concentration in saliva and plasma of Bipolar (mania) patients hospitalized at Psychiatric ward of Ahwaz Golestan Hospital (Iran).* Biosciences Biotechnology Research Asia, 4, 105-110.

Atkinson, J.C., Dawes, C., Ericson, T., Fox, P.C., Gandara, B.K., Malamud, D., Mandel, I.D., Navazesh, M. and Tabak, L.A. (1993) *Guidelines for saliva nomenclature and collection.* Annals of the New York Academy of Sciences, 694.

Atkinson, K., Lo, K., Payne, S., Mitchell, J. and Ingram, J. (2008) *Rapid Saliva Processing Techniques for Near Real-Time Analysis of Salivary Steroids and Protein* Journal of Clinical Laboratory Analysis, 22, 395-402.

Bardow, A., Madsen, J. and Nauntofte, B. (2000) *The bicarbonate concentration in human saliva does not exceed the plasma level under normal physiological conditions.* Clinical oral investigations, 4, 245-253.

Bayraktar, G., Kazancioglu, R., Bozfakioglu, S., Yildiz, A. and Ark, E. (2004) *Evaluation of salivary parameters and dental status in adult hemodialysis patients.* Clinical Nephrology, 62, 380-383.

Berkovitch, M., Goldman, M., Silverman, R., Chen-Levi, Z., Greenberg, R., Marcus, O. and Lahat, E. (2000) *Therapeutic drug monitoring of once daily gentamicin in serum and saliva of children.* European Journal of Pediatrics, 159, 697-698.

Bigler, L.R., Streckfus, C.F., Copeland, L., Burns, R., Dai, X., Kuhn, M., Martin, P. and Bigler, S.A. (2002) *The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma.* Journal of Oral Pathology and Medicine, 31, 421-431.

Boehm, A., Faure, F. and Dietz, A. (2008) *Sialendoskopie: Diagnostische Möglichkeiten und Therapeutische Optionen.* Laryngo-Rhino-Otologie, 87, 317-321.

Bolscher, J.G.M., Groenink, J., van der Kwaak, J.S., van den Keijbus, P.A.M., van't Hof, W., Veerman, E.C.I. and Nieuw Amerongen, A.V. (1999) *Detection and Quantification of MUC7 in Submandibular, Sublingual, Palatine, and Labial Saliva by Anti-peptide Antiserum.* Journal of Dental Research, 78, 1362-1369.

Branson, B.M. (2004) *FDA approves OraQuick for use in saliva. On March 25, the FDA approved the first rapid test for HIV in oral fluids.* AIDS clinical care, 16, 39.

Brown, G., McGarvey, E., Shirtcliff, E., Keller, A., Granger, D. and Flavin, K. (2008) *Salivary cortisol, dehydroepiandrosterone and testosterone interrelationships in healthy young males: A pilot study with implication for studies of aggressive behavior.* *Psychiatry Research*, 2008, 67-76.

Burhenne, J., Riedel, K.D., Martin-Facklam, M., Mikus, G. and Haefeli, W.E. (2003) *Highly sensitive determination of saquinavir in biological samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 784, 233-242.

Campiglia, A. and Vo-Dinh, T. (1998) *Rapid screening method for cocaine and benzoylecgonine in saliva samples.* *Analytica Chimica Acta*, 372, 349-355.

Catena, E., Perez, G., Sadaba, B., Azanza, J.R. and Campanero, M.A. (2009) *A fast reverse-phase high performance liquid chromatographic tandem mass spectrometry assay for the quantification of clindamycin in plasma and saliva using a rapid resolution package.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50, 649-654.

Celec, P., Ostatnikova, D., Skoknova, M., Hodosy, J., Putz, Z. and Kudela, M. (2009) *Salivary Sex Hormones during the Menstrual Cycle.* *Endocrine Journal*, 56, 521-523.

Chauncey, H.H., Feller, R.P. and Henriques, B.L. (1966) *Comparative Electrolyte Composition of Parotid, Submandibular, and Sublingual Secretions.* *Journal of Dental Research*, 45, 1230-.

Chen, L., Liu, F., Fan, X., Gao, J., Chen, N., Wong, T., Wu, J. and Wen, S.W. (2009) *Detection of hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, and hepatitis B virus DNA in parotid tissues.* *International Journal of Infectious Diseases*, 13, 20-23.

Chereches-Panta, P., Nanulescu, M.V., Culea, M. and Palibroda, N. (2007) *Reliability of salivary theophylline in monitoring the treatment for apnoea of prematurity.* *Journal of Perinatology*, 27, 709-712.

Cheuk, W. and Chan, J. (2007) *Advances in salivary gland pathology.* *Histopathology*, 51, 1-20.

Chilla, R. (1978) *Die Sialadenose der Kopfspeicheldrüsen.* *Fortschritte der Medizin*, 96, 2289-2291.

Choo, R.E. and Huestis, M.A. (2004) *Oral fluid as a diagnostic tool.* *Clin Chem Lab Med*, 42, 1273-1287.

Chow, T., Chan, T.T., Choi, C. and Lam, S. (2008) *Kuttner's tumor (chronic sclerosing sialadenitis) of the submandibular gland: a clinical perspective.* *Hong Kong Medical Journal*, 14, 46-49.

Coates, J.E., Lam, S.F. and McGaw, W.T. (1988) *Radioimmunoassay of Salivary Cyclosporine with Use of 125I-Labeled Cyclosporine.* *Clinical Chemistry*, 34, 1545-1551.

Cognard, E., Bouchonnet, S. and Staub, C. (2006) *Validation of a gas chromatography - ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 925-934.

Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, O., Cruz, A. and Lopez-Rivadulla, M. (2004) *Development and validation of a method for the quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry.* *Journal of Chromatography B*, 810, 319-324.

Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, O., Cruz, A. and Lopez-Rivadulla, M. (2008) *Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 2329-2338.

Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, O., Lopez-Rivadulla, M. and Cruz, A. (2005) *Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection.* *Forensic Science International*, 159, 221-226.

Cozart Cozart DDS - Bedienungsanleitung <http://www.cozartgroup.com/download/CozartDDSInstructions.pdf> 30.9.2009 8:31 Uhr

Cozart Cozart DDS Brochure <http://www.cozartgroup.com/download/CozartDDSbrochure.pdf> 30.9.2009 8:29 Uhr

Crouch, D.J. (2005) *Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing.* *Forensic Science International*, 150, 165-173.

Dams, R., Choo, R.E., Lambert, W.E., Jones, H. and Huestis, M.A. (2007) *Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients.* *Drug and Alcohol Dependence*, 87, 258-267.

Dams, R., Murphy, C.M., Choo, R.E., Lambert, W.E., De Leenheer, A.P. and Huestis, M.A. (2003) LC - Atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation. *Analytical Chemistry*, 75, 798-804.

Dawes, C. (1969) The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Archives of Oral Biology*, 14, 277-294.

Dawes, C. (2004) How much saliva is enough for avoidance of xerostomia? *Caries Research*, 38, 236-240.

Dawson III, D.R., Wang, C., Danaher, R.J., Lin, Y., Kryscio, R.J., Jacob, R.J. and Miller, C.S. (2009) Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Diseases*, 15, 554-559.

De Almeida, P.D.V., Grégio, A.M.T., Machado, M.A.N., De Lima, A.A.S. and Azevedo, L.R. (2008) Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 9, 072-080.

De Jager, L. and Andrews, A.R. (2002) Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent micro-extraction. *Analytica Chimica Acta*, 458, 311-320.

Dordevic, S., Kilibarda, V. and Stojanovic, T. (2009) Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Vojnosanitetski Pregled*, 66, 347-352.

Drummer, O.H. (2008) Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*, 30, 203-206.

Durante, K. and LI, N. (2009) Oestradiol level and opportunistic mating in women. *Biology Letters*, 5, 179-182.

Emmons, W. (1997) Accuracy of oral specimen testing for human immunodeficiency virus. *American Journal of Medicine*, 102, 15-20.

Epstein, S.R., Mandel, I. and Scopp, I.W. (1980) Salivary composition and calculus formation in patients undergoing hemodialysis. *Journal of Periodontology*, 51, 336-338.

Ertugrul, F., Elbek-Cubukcu, C., Sabah, E. and Mir, S. (2003) The oral health status of children undergoing hemodialysis treatment. *Turkish Journal of Pediatrics*, 45, 108-113.

Esser, D., Alvarez-Llamas, G., de Vries, M., Weening, D., Vonk, R.J. and Roelofsen, H. (2008) Sample stability and protein composition of saliva: Implications for its use as a diagnostic fluid. *Biomarker Insights*, 2008, 25-37.

Estrela, R.C.E., Ribeiro, F.S., Seixas, B.V. and Suarez-Kurtz, G. (2008) Determination of lopinavir and ritonavir in blood plasma, seminal plasma, saliva and plasma ultra-filtrate by liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 657-664.

Farquharson, S., Shende, C., Inscore, F.E., Maksymiuk, P. and Gift, A. (2005) Analysis of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, 208-212.

Ferguson Jr, D.A., Li, C., Patel, N.R., Mayberry, W.R., Chi, D.S. and Thomas, E. (1993) Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2802-2804.

Flarakos, J., Luo, W., Aman, M., Svinarov, D., Gerber, N. and Vouros, P. (2004) Quantification of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma and saliva from adult and pediatric patients by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1026, 175-183.

Flarakos, J., Luo, W., Fang, A., Aman, M.G., Gerber, M. and Vouros, P. (2002) Quantification of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma and saliva by LC/LC-Q-TOF analysis. *Proceedings 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, pp. 507-508.

Gallardo, E. and Queiroz, J. (2008) The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomedical Chromatography*, 22, 795-821.

Gentili, S., Torresi, A., Marsili, R., Chiarotti, M. and Macchia, T. (2002) Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 780, 183-192.

George, S. and Braithwaite, R.A. (2002) Use of On-Site Testing for Drugs of Abuse. *Clinical Chemistry*, 48, 1639-1646.

Greiner Bio-One GmbH Saliva Collection System Brochure http://www.gbo.com/documents/980161_SalivaCollectionSystem_030308_e_internet.pdf 29.9.2009 17:45 Uhr

Greiner Bio-One GmbH Greiner Bio-One Speichelsammelsystem - Gebrauchsanweisung http://www.gbo.com/documents/980216_IFU_SCS_Eigenanwendung_Rev01_DE.pdf 29.9.2009 17:33 Uhr

Greiner Bio-One GmbH Greiner Bio-One Speichelquantifizierungsskit - Gebrauchsanweisung http://www.gbo.com/documents/980217_IFU_SQK_Rev01_DE.pdf 28.7.2009 8:17 Uhr

Gröschl, M. (2008) *Current Status of Salivary Hormone Analysis*. Clinical Chemistry, 54, 1759-1769.

Gröschl, M., Köhler, H., Topf, H.-G., Rupprecht, T. and Rauh, M. (2008) *Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 47, 478-486.

Grosjean, J., Hantz, S., Cotin, S., Baclet, M.C., Mengelle, C., Trapes, L., Virey, B., Undreiner, F., Brosset, P., Pasquier, C., Denis, F. and Alain, S. *Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples*. Journal of Clinical Virology.

Gudziol, H. (1995) *Speicheldrüsenerkrankungen*. Therapeutische Umschau, 52, 774-779.

Hahn, T.W., Mogensen, T., Lund, C., Schouenborg, L. and Rasmussen, M. (2000) *High-dose rectal and oral acetaminophen in postoperative patients - Serum and saliva concentrations*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 44, 302-306.

Hall, B.J., Satterfield-Doerr, M., Parikh, A. and Brodbeld, J.S. (1998) *Determination of Cannabinoids in Water and Human Saliva by Solid-Phase Microextraction and Quadrupole Ion Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 70, 1788-1796.

Hofman, L.F. (2001) *Human saliva as a diagnostic specimen*. Journal of Nutrition, 131.

Hold, K.M., De Boer, D., Zuidema, J. and Maes, R.A.A. (1995) *Evaluation of the Salivette as sampling device for monitoring α -adrenoceptor blocking drugs in saliva*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 663, 103-110.

Höld, K.M., De Boer, D., Zuidema, J. and Maes, R.A.A. (1995) *Saliva as an analytical tool in toxicology*. Int. J. Drug Testing, 1, 1-36.

Huang, C.-M. (2004) *Comparative proteomic analysis of human whole saliva*. Archives of Oral Biology, 49, 951-962.

Hugen, P.W.H., Burger, D.M., Graaff, M., Ter Hofstede, H.J.M., Hoetelmans, R.M.W., Brinkman, K., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Koopmans, P.P. and Hekster, Y.A. (2000) *Saliva as a specimen for monitoring compliance but not for predicting plasma concentrations in patients with HIV treated with indinavir*. Therapeutic Drug Monitoring, 22, 437-445.

Humphrey, S.P. and Williamson, R.T. (2001) *A review of saliva: Normal composition, flow, and function*. Journal of Prosthetic Dentistry, 85, 162-169.

Hutse, V., Verhaegen, E., De Cock, L., Quoilin, S., Vandenbergh, H., Horsmans, Y., Michiels, P., Van Damme, P., Van Vlierberghe, H., Claeys, F., Vranckx, R. and Van Oyen, H. (2005) *Oral Fluid as a Medium for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen* Journal of Medical Virology, 77, 53-56.

Imbronito, A.V., Grande, S.R., Freitas, N.M., Okuda, O., Lotufo, R.F. and Nunes, F.D. (2008) *Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods*. Journal of oral science, 50, 25-31.

Immunalysis Corporation Quantisal Saliva Sampler <http://www.immunalysis.com/quntisal.htm> 29.9.2009 17:45 Uhr

Jenkins, A.J., Oyler, J.M. and Cone, E.J. (1995) *Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma*. Journal of Analytical Toxicology, 19, 359-374.

Jiang, C., Li, C., Ha, T., Ferguson Jr, D.A., Chi, D.S., Laffan, J.J. and Thomas, E. (1998) *Identification of H. pylori in saliva by a nested PCR assay derived from a newly cloned DNA probe*. Digestive Diseases and Sciences, 43, 1211-1218.

Jonsson, R., Moen, K., Vestrheim, D. and Szodoray, P. (2002) *Current issues in Sjögren's syndrome*. Oral Diseases, 8, 130-140.

Jufer, R., Walsh, S.L., Cone, E.J. and Sampson-Cone, A. (2006) *Effect of Repeated Cocaine Administration on Detection Times in Oral Fluid and Urine*. Journal of Analytical Toxicology, 30, 458-462.

Kadehjian, L. (2005) *Legal issues in oral fluid testing*. Forensic Science International, 150, 151-160.

Kage, M., Ogasawara, S., Kosai, K.I., Nakashima, E., Shimamatsu, K., Kojiro, M., Kimura, A., Fujisawa, T., Matsukuma, Y., Ito, Y., Kondo, S., Kawano, K. and Sata, M. (1997) *Hepatitis C virus RNA present in saliva but absent in breast-milk of the hepatitis C carrier mother*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 12, 518-521.

Kalk, W.W.I., Vissink, A., Spijkervet, F.K.L., Bootsma, H., Kallenberg, C.G.M. and Nieuw Amerongen, A.V. (2001) *Sialometry and sialochemistry: Diagnostic tools for Sjögren's syndrome*. Annals of the Rheumatic Diseases, 60, 1110-1116.

Kalk, W.W.I., Vissink, A., Stegenga, B., Bootsma, H., Nieuw Amerongen, A.V. and Kallenberg, C.G.M. (2002) *Sialometry and sialochemistry: A non-invasive approach for diagnosing Sjögren's syndrome*. Annals of the Rheumatic Diseases, 61, 137-144.

Kamisawa, T. and Okamoto, A. (2008) *IgG4-related sclerosing disease*. World Journal of Gastroenterology, 14, 3948-3955.

Kato, K., Hillsgrave, M., Weinhold, L., Gorelick, D.A., Darwin, W.D. and Cone, E.J. (1993) *Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and nonstimulated conditions*. Journal of Analytical Toxicology, 17, 338-341.

Kaufman, E. and Lamster, I.B. (2002) *The diagnostic applications of saliva - a review*. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 13, 197-212.

Kayser, F.H., Böttger, E.C., Zinkernagel, R.M., Haller, O., Eckert, J. and Deplazes, P. (2005) *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kidd-Ljunggren, K., Holmberg, A., Bläckberg, J. and Lindqvist, B. (2006) *High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers*. Journal of Hospital Infection, 64, 352-357.

Kim, I., Barnes, A.J., Oyler, J.M., Schepers, R.J.F., Joseph, R.E., Cone, E.J., Lafko, D., Moolchan, E.T. and Huestis, M.A. (2002) *Plasma and Oral Fluid Pharmacokinetics and Pharmacodynamics after Oral Codeine Administration*. Clinical Chemistry, 48, 1486-1496.

Kintz, P., Villain, M., Concheiro, M. and Cirimele, V. (2005) *Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS*. Forensic Science International, 150, 213-220.

Kircher, V. and Parlar, H. (1996) *Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol from human saliva by tandem immunoaffinity chromatography-high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B, 677, 245-255.

Kitagawa, S., Zen, Y., Harada, K., Sasaki, M., Sato, Y., Minato, H., Watanabe, K., Kurumaya, H., Katayanagi, K., Masuda, S., Niwa, H., Tsuneyama, K., Saito, K., Haratake, J., Takagawa, K. and Nakanuma, Y. (2005) *Abundant IgG4-positive plasma cell infiltration characterizes chronic sclerosing sialadenitis (Küttner's tumor)*. American Journal of Surgical Pathology, 29, 783-791.

Klebanoff, M.A., Meis, P.J., Dombrowski, M.P., Zhao, Y., Moawad, A.H., Northen, A., Sibai, B.M., Iams, J.D., Varner, M.W., Caritis, S.N., O'Sullivan, M.J., Leveno, K.J., Miodovnik, M., Conway, D., Wapner, R.J., Carpenter, M., Mercer, B.M., Ramin, S.M., Thorp, J.M. and Peaceman, A.M. (2008) *Salivary progesterone and estriol among pregnant women treated with 17- α -hydroxyprogesterone caproate or placebo*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 199.

Kobori, Y., Koh, E., Sugimoto, K., Izumi, K., Narimoto, K., Maeda, Y., Konaka, H., Mizokami, A., Matsushita, T., Iwamoto, T. and Namiki, M. (2009) *The relationship of serum and salivary cortisol levels to male sexual dysfunction as measured by the international index of erectile function*. International Journal of Impotence Research, 21, 207-212.

Kohlbach, W. (2007) *Deskriptive Anatomie der Zähne und des kraniofazialen Systems*. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin.

Koks, C.H.W., Crommentuyn, K.M.L., Hoetelmans, R.M.W., Mathôt, R.A.A. and Beijnen, J.H. (2001) *Can fluconazole concentrations in saliva be used for therapeutic drug monitoring?* Therapeutic Drug Monitoring, 23, 449-453.

Kopecky, E.A., Jacobson, S., Klein, J., Kapur, B. and Koren, G. (1997) *Correlation of Morphine Sulfate in Blood Plasma and Saliva in Pediatric Patients*. Therapeutic Drug Monitoring, 19, 530-534.

Körber, E., Rotgans, J., Schmelzle, R. and Schwenzer, N. (1994) *Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde für Mediziner*. Thieme, Stuttgart, New York.

L'Homme, R.F.A., Muro, E.P., Droste, J.A.H., Wolters, L.R., Van Ewijk-Beneken Kolmer, N.W.J., Schimana, W. and Burger, D.M. (2008) *Therapeutic drug monitoring of nevirapine in resource-limited settings*. Clinical Infectious Diseases, 47, 1339-1344.

- LaDuca, J.R., Love, J.L., Abbott, L.Z., Dube, S., Freidman-Kien, A.E. and Poiesz, B.J.** (1998) *Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids*. *Journal of Infectious Diseases*, 178, 1610-1615.
- Langel, K., Engblom, C., Pehrsson, A., Gunnar, T., Ariniemi, K. and Lillsunde, P.** (2008) *Drug Testing in Oral Fluid - Evaluation of Sample Collection Devices*. *Journal of Analytical Toxicology*, 32, 393-401.
- Li, C., Ha, T., Ferguson Jr, D.A., Chi, D.S., Zhao, R., Patel, N.R., Krishnaswamy, G. and Thomas, E.** (1996) *A newly developed PCR assay of H. pylori in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of H. pylori in saliva supports oral transmission*. *Digestive Diseases and Sciences*, 41, 2142-2149.
- Li, C., Musich, P.R., Ha, T., Ferguson Jr, D.A., Patel, N.R., Chi, D.S. and Thomas, E.** (1995) *High prevalence of Helicobacter pylori in saliva demonstrated by a novel PCR assay*. *Journal of Clinical Pathology*, 48, 662-666.
- Liening, S., Stanton, S., Saini, E. and Schultheiss, O.** (2009) *Salivary testosterone, cortisol, and progesterone: Two-week stability, interhormone correlations, and effects of time of day, menstrual cycle, and oral contraceptive use on steroid hormone levels*. *Physiology and Behavior*.
- Lillsunde, P.** (2008) *Analytical Techniques for Drug Detection in Oral Fluid*. *Therapeutic Drug Monitoring*, 30, 181-187.
- Lucht, E., Brytting, M., Bjerregaard, L., Julander, I. and Linde, A.** (1998) *Shedding of cytomegalovirus and herpesviruses 6, 7, and 8 in saliva of human immunodeficiency virus type 1-infected patients and healthy controls*. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 137-141.
- Luo, D., Chen, F., Xiao, K. and Feng, Y.Q.** (2009) *Rapid determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in saliva by polymer monolith microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry*. *Talanta*, 77, 1701-1706.
- Malamud, D.** (1992) *Saliva as a diagnostic fluid*. *British Medical Journal*, 305, 207-208.
- Malamud, D.** (1997) *Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: A technology whose time has come*. *American Journal of Medicine*, 102, 9-14.
- Maldonado, C., Fagiolino, P., Vazquez, M., Rey, A., Olano, I., Eiraldi, R. and Scavone, C.** (2008) *Therapeutic carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VPA) monitoring in children using saliva as a biologic fluid*. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 14, 55-58.
- Malone, S.A., Eadie, M.J., Addison, R.S., Wright, A.W.E. and Dickinson, R.G.** (2006) *Monitoring salivary lamotrigine concentrations*. *Journal of Clinical Neuroscience*, 13, 902-907.
- Malvern Medical Developments Ltd** *OraCol Saliva Collection Device* <http://www.malvernmedical.uk.com/oracol.htm>
- Mandel, I.D.** (1990) *The diagnostic uses of saliva*. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 19, 119-125.
- Mapstone, N.P., Lynch, D.A.F., Lewis, F.A., Axon, A.T.R., Tompkins, D.S., Dixon, M.F. and Quirke, P.** (1993) *Identification of Helicobacter pylori DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR*. *Journal of Clinical Pathology*, 46, 540-543.
- Marchei, E., Farre, M., Pellegrini, M., Rossi, S., Garcia-Algar, O., Vall, O. and Pichini, S.** (2009) *Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry determination of methylphenidate and ritalinic acid in conventional and non-conventional biological matrices*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 434-439.
- Marcotte, H. and Lavoie, M.C.** (1998) *Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 71-109.
- Marrs, C.R., Ferraro, D.P. and Cross, C.L.** (2007) *Salivary hormones and parturition in healthy, primigravid women*. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 99, 59-60.
- Mecarelli, O., Voti, P.L., Pro, S., Romolo, F.S., Rotolo, M., Pulitano, P., Accornero, N. and Vanacore, N.** (2007) *Saliva and serum levetiracetam concentrations in patients with epilepsy*. *Therapeutic Drug Monitoring*, 29, 313-318.
- Mendonza, A., Gohh, R. and Akhlaghi, F.** (2004) *Determination of cyclosporine in saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26, 569-575.

- Mendonza, A.E., Gohh, R.Y. and Akhlaghi, F.** (2006) *Analysis of mycophenolic acid in saliva using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Therapeutic Drug Monitoring, 28, 402-406.
- Mertens, T., Haller, O. and Klenk, H.-D.** (2004) Diagnostik und Therapie von Viruserkrankungen: Leitlinien der Gesellschaft für Virologie. Elsevier GmbH, München.
- Miles, M.V., Tang, P.H., Glauser, T.A., Ryan, M.A., Grim, S.A., Strawsburg, R.H., DeGrauw, T.J. and Baumann, R.J.** (2003) *Topiramate concentration in saliva: An alternative to serum monitoring*. Pediatric Neurology, 29, 143-147.
- Minchev, P. and Svinarov, D.** (2005) *Monitoring Tubocin (Rifampicin) treatment in children with tuberculosis*. Acta Medica Bulgarica, 32, 3-9.
- Mollbrink, A., Falk, K.I., Linde, A. and Barkholt, L.** (2009) *Monitoring EBV DNA in saliva for early diagnosis of EBV reactivation in solid tumour patients after allogeneic haematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplantation, 44, 259-261.
- Moore, C., Rana, S. and Coulter, C.** (2007) *Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabidiol in oral fluid*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 852, 459-464.
- Morgenroth, K., Bremerich, A. and Lange, D.E.** (1996) Pathologie der Mundhöhle. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- Mortier, K.A., Renard, V., Verstraete, A.G., Van Gussem, A., Van Belle, S. and Lambert, W.E.** (2005) *Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of docetaxel and paclitaxel in human plasma and oral fluid*. Analytical Chemistry, 77, 4677-4683.
- Murata, H., Nii, R., Ito, M., Ihara, T. and Komada, Y.** (2009) *Quantitative detection of HCMV-DNA in saliva from infants and breast milk on real-time polymerase chain reaction*. Pediatrics International, 51, 530-534.
- Nagler, R.** (2002) *The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands*. Oral Diseases, 8, 141-146.
- Nagler, R.M.** (2009) *Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis*. Oral Oncology, 45, 1006-1010.
- Navarro, M., Pichini, S., Farre, M., Ortuno, J., Roset, P.N., Segura, J. and De La Torre, R.** (2001) *Usefulness of Saliva for Measurement of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and Its Metabolites: Correlation with Plasma Drug Concentrations and Effect of Salivary pH*. Clinical Chemistry, 47, 1788-1795.
- Ngwa, G., Fritch, D., Blum, K. and Newland, G.** (2007) *Simultaneous analysis of 14 benzodiazepines in oral fluid by solid-phase extraction and LC-MS-MS*. Journal of Analytical Toxicology, 31, 369-376.
- Niedbala, R.S., Kardos, K., Fries, T., Cannon, A. and Davis, A.** (2001a) *Immunoassay for Detection of Cocaine/Metabolites in Oral Fluids*. Journal of Analytical Toxicology, 25, 62-68.
- Niedbala, R.S., Kardos, K., Waga, J., Fritch, D., Yeager, L., Doddamane, S. and Schoener, E.** (2001b) *Laboratory Analysis of Remotely Controlled Oral Fluid Specimens for Opiates by Immunassay*. Journal of Analytical Toxicology, 25, 310-315.
- Niedbala, S., Kardos, K., Salamone, S., Fritch, D., Bronsgeest, M. and Cone, E.J.** (2004) *Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing*. Journal of Analytical Toxicology, 28, 546-552.
- Nieuw Amerongen, A. and Veerman, E.** (2002) *Saliva - the defender of the oral cavity*. Oral Diseases, 8, 12-22.
- Nomura, S., Mizuno, T., A, N., Asano, H. and Ide, H.** (2009) *Salivary Cortisol as a New Biomarker for a Mild Mental Workload*. Biometrics and Kansei Engineering. ICBAKE 2009, 127-131.
- Nunez-de la Mora, A., Chatterton, R., Choudhury, O., Napolitano, D. and Bentley, G.** (2007) *Childhood conditions influence adult progesterone levels*. PLOS Medicine, 4, 0813-0821.
- O'Farrell, B.J., Rajan, E., Albloushi, S.S., Courtney, M.G., Fielding, J. and Shattock, A.G.** (1997) *The reliability of saliva as a sample for the detection of hepatitis A immunoglobulins under various sampling conditions*. Clinical and Diagnostic Virology, 7, 153-157.
- O'Neal, C.L., Crouch, D.J., Rollins, D.E., Fatah, A. and Cheever, M.L.** (1999) *Correlation of saliva codeine concentrations with plasma concentrations after oral codeine administration*. Journal of Analytical Toxicology, 23, 452-459.

Orasure Technologies Inc Intercept Treated Collection Pad - Material Safety Data Sheet <http://www.orasure.com/docs/pdfs/products/intercept/Intercept-MSDS-Treated-Collection-Pad.pdf> 30.9.2009

Orasure Technologies Inc Intercept Collection Procedure <http://www.orasure.com/docs/pdfs/products/intercept/Intercept-Collection-Procedure.pdf> 30.9.2009

Orasure Technologies Inc Intercept Oral Specimen Collection Device - Package Insert <http://www.orasure.com/docs/pdfs/products/intercept/Intercept-Package-Insert-English.pdf> 30.9.2009

Ortelli, D., Rudaz, S., Chevalley, A.F., Mino, A., Deglon, J.J., Balant, L. and Veuthey, J.L. (2000) *Enantioselective analysis of methadone in saliva by liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of chromatography A, 871, 163-172.

Pai, N.P. (2007) *Oral fluid-based rapid HIV testing: Issues, challenges and research directions*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 7, 325-328.

Panta, P., Nanulescu, M.V., Culea, M. and Palibroda, N. (1998) *The monitoring of delayed-release theophylline therapy in bronchial asthma in children by determining the salivary concentration (abstract)*. Pneumoftiziologia : revista Societatii Romane de Pneumoftiziologie, 47, 15-19.

Pedersen, A., Bardow, A., Beier-Jensen, S. and Nauntofte, B. (2002) *Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastification, swallowing and digestion*. Oral Diseases, 8, 117-129.

Peterson, S., Woodhead, J. and Crall, J. (1985) *Caries resistance in children with chronic renal failure: Plaque pH, salivary pH, and salivary composition*. Pediatric Research, 19, 796-799.

Pham-Huy, C., Chikhi-Chorfi, N., Galons, H., Sadeg, N., Laqueille, X., Aymard, N., Massicot, F., Warnet, J.M. and Claude, J.R. (1997) *Enantioselective high-performance liquid chromatography determination of methadone enantiomers and its major metabolite in human biological fluids using a new derivatized cyclodextrin-bonded phase* Journal of Chromatography B, 700, 155-163.

Pulitano, P., Bombelli, F., Romolo, F.S., Rotolo, M., Lopez, A., Accornero, N. and Mecarelli, O. (2005) *Levetiracetam concentration in plasma and saliva in epileptic patients*. Correlazione tra dosaggio plasmatico e salivare del Levetiracetam in pazienti con epilessia, 229-231.

Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A. and Lopez-Rivadulla, M. (2004) *A sensitive, rapid and specific determination of midazolam in human plasma and saliva by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 18, 2976-2982.

Raggam, R.B., Santner, B.I., Kollroser, M., Gössler, W., Schmied, B., Schmitt, U., Stelzl, E., Lackner, A., Wagner, J., Marth, E. and Kessler, H.H. (2008a) *Evaluation of a novel standardized system for collection and quantification of oral fluid*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 46, 287-291.

Raggam, R.B., Wagner, J., Michelin, B.D.A., Putz-Bankuti, C., Lackner, A., Bozic, M., Stauber, R.E., Santner, B.I., Marth, E. and Kessler, H.H. (2008b) *Reliable Detection and Quantification of Viral Nucleic Acids in Oral Fluid: Liquid Phase-Based Sample Collection in Conjunction with Automated and Standardized Molecular Assays*. Journal of Medical Virology, 80, 1684-1688.

Rakhmanina, N.Y., Capparelli, E.V., Van Den Anker, J.N., Williams, K., Sever, J.L., Spiegel, H.M.L. and Soldin, S.J. (2007) *Nevirapine concentration in nonstimulated saliva: An alternative to plasma sampling in children with human immunodeficiency virus infection*. Therapeutic Drug Monitoring, 29, 110-117.

Rauh, M., Stachel, D., Kuhlen, M., Gröschl, M., Holter, W. and Rascher, W. (2006) *Quantification of busulfan in saliva and plasma in haematopoietic stem cell transplantation in children: Validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method*. Clinical Pharmacokinetics, 45, 305-316.

Rodriguez Rosas, M.E., Preston, K.L., Epstein, D.H., Moolchan, E.T. and Wainer, I.W. (2003) *Quantitative determination of the enantiomers of methadone and its metabolite (EDDP) in human saliva by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 796, 355-370.

Rohrig, T.P. and Moore, C. (2003) *The Determination of Morphine in Urine and Oral Fluid Following Ingestion of Poppy Seeds*. Journal of Analytical Toxicology, 27, 449-452.

Sagan, C., Salvador, A., Dubreuil, D., Poulet, P.P., Duffaut, D. and Brumpt, I. (2005) *Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin I in human plasma, saliva and gingival crevicular fluid by LC-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38, 298-306.

Salamzadeh, J., Dadashzadeh, S., Habibi, M. and Estifaie, S. (2008) *Serum and saliva theophylline levels in adult outpatients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A cross-sectional study.* Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 7, 83-87.

Samyn, N., De Boeck, G., Wood, M., Lamers, C.T.J., De Waard, D., Brookhuis, K.A., Verstraete, A.G. and Riedel, W.J. (2002) *Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions.* Forensic Science International, 128, 90-97.

Sarstedt Salivette - Produktinformation http://www.sarstedt.com/pdf/katalog/de/SARSTEDT_D_0807%2042.pdf 30.9.2009 9:20 Uhr

Scheidweiler, K.B. and Huestis, M.A. (2006) *A validated gas chromatographic-electron impact ionization mass spectrometric method for methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid.* Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 835, 90-99.

Schepers, R.J.F., Oyler, J.M., Joseph, R.E., Cone, E.J., Moolchan, E.T. and Huestis, M.A. (2003) *Methamphetamine and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid and Plasma after Controlled Oral Methamphetamine Administration to Human Volunteers.* Clinical Chemistry, 49, 121-132.

Schiebler, T.H. and Korf, H.-W. (2007) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs.* Steinkopff Verlag, Darmstadt.

Schramm, W., Craig, P., Smith, R. and Berger, G. (1993) *Cocaine and Benzoylcegonine in Saliva, Serum and Urine.* Clinical Chemistry, 39, 481-487.

Schumacher, G.-H. (1997) *Anatomie für Zahnmediziner.* Hüthig GmbH, Heidelberg.

Scott, L.E., Noble, L.D., Langeveldt, M., Jentsch, U., Francois Venter, Venter, W. and Stevens, W. (2009) *Can Oral Fluid Testing Be Used to Replace Blood-Based HIV Rapid Testing to Improve Access to Diagnosis in South Africa? [Letter].* JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 51, 646-648.

Scully, C. (1997) *HIV topic update: Salivary testing for antibodies.* Oral Diseases, 3, 212-215.

Scully, C. (2003) *Drug effects on salivary glands: dry mouth.* Oral Diseases, 9, 165-176.

Scully, C. and Epstein, J.B. (1996) *Oral health care for the cancer patient.* European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology, 32B, 281-292.

Seifert, G. (1971) *Klinische Pathologie der Sialadenitis und Sialadenose.* HNO, 19, 1-9.

Seifert, G. (1987) *Nicht-tumoröse Speicheldrüsenkrankheiten - Sialadenose, Speicheldrüsenzysten, Speicheldrüseninfarkt, Sialadenitis.* Der Pathologe, 8, 141-151.

Shasha, S.M., Ben Aryeh, H., Angel, A. and Gutman, D. (1983) *Salivary content in hemodialysed patients.* Journal of Oral Medicine, 38, 67-70.

Shen, B., Li, S., Zhang, Y., Yuan, X., Fan, Y., Liu, Z., Hu, Q. and Yu, C. (2009) *Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50, 515-521.

Ship, J. (2002) *Diagnosing, managing, and preventing salivary gland disorders.* Oral Diseases, 8, 77-89.

Shiotsuki, K., Izawa, S., Sugaya, N., Yamada, K., N, O., Ouchi, Y., Nagano, Y. and Nomura, S. (2009) *Salivary cortisol and DHEA reactivity to psychosocial stress in socially anxious males.* International Journal of Psychophysiology, 72, 198-203.

Skopp, G., Pötsch, L., Klinder, K., Richter, B., Aderjan, R. and Mattern, R. (2001) *Saliva testing after single and chronic administration of dihydrocodeine.* Int J Legal Med, 114, 133-140.

Sonesson, M., Wickström, C., Kinnby, B., Ericson, D. and Matsson, L. (2008) *Mucins MUC5B and MUC7 in minor salivary gland secretion of children and adults.* Archives of Oral Biology, 53, 523-527.

Speedy, T., Baldwin, D., Jowett, G., Gallina, M. and Jehanli, A. (2007) *Development and validation of the Cozart DDS oral fluid collection device.* Forensic Science International, 170, 117-120.

Spencer, H., Kozłowska, W., Davies, J.C., Webber, P., Chadwick, M., Kerr, J. and Makhecha, S. (2005) *Measurement of tobramycin and gentamicin in saliva is not suitable for therapeutic drug monitoring of patients with cystic fibrosis.* Journal of Cystic Fibrosis, 4, 209.

- Sreebny, L., Banoczy, J., Baum, B., Edgar, W. and Epstein, J.** (1992) *Saliva: Its role in health and disease*. International Dental Journal, 42, 287-304.
- Streckfus, C. and Bigler, L.** (2002) *Saliva as a diagnostic fluid*. Oral Diseases, 8, 69-76.
- Streckfus, C.F.** (2009) *Salivary diagnostics: A new solution for an old problem breast cancer detection*. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, Orlando, FL.
- Studer, R.** (2008a) *Klinik und Sonographie der Speicheldrüsenkrankheiten - Teil 1*. Schweizerische Rundschau für Medizin - Praxis, 97, 25-29.
- Studer, R.** (2008b) *Klinik und Sonographie der Speicheldrüsenkrankheiten - Teil 2*. Schweizerische Rundschau für Medizin - Praxis, 97, 69-72.
- Tadeusiak, W., Marcinowska-Suchowierska, E., Podleśny, J. and Andrzejewski, A.** (1997) *Possibility of using saliva for therapeutic monitoring of digoxin (abstract)*. Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, 2, 116-119.
- Takahashi, T., Fujiwara, Y., Sumiyoshi, H., Isobe, T., Yamaoka, N. and Yamakido, M.** (1997) *Salivary drug monitoring of irinotecan and its active metabolite in cancer patients*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 40, 449-452.
- Teixeira, H., Proenca, P., Verstraete, A.G., Corte-Real, F. and Vieira, D.N.** (2005) *Analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Forensic Science International, 150, 205-211.
- Thews, G., Mutschler, E. and Vaupel, P.** (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Thompson, L.K. and Cone, E.J.** (1987) *Determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human blood and saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric detection*. Journal of Chromatography - Biomedical Applications, 421, 91-97.
- Tomás, I., Marinho, J.S., Limeres, J., Santos, M.J., Araújo, L. and Diz, P.** (2008) *Changes in salivary composition in patients with renal failure*. Archives of Oral Biology, 53, 528-532.
- Tomiak, C. and Dörner, T.** (2006) *Sjögren-Syndrom*. Zeitschrift für Rheumatologie, 65, 505-519.
- Tsuruta, T., Yang, C., Ueki, H., Li, G., Maekawa, A., Kamikawa, H., Oku, E., Somehara, T., Fujito, H., Tatebayashi, H. and Yamada, S.** (2007) *Determination of paroxetine in human saliva by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection*. Japanese Journal of Neuropsychopharmacology, 27, 9-12.
- Turner, R. and Sugiya, H.** (2002) *Understanding salivary fluid and protein secretion*. Oral Diseases, 8, 3-11.
- Turpeinen, U., Välimäki, M. and Hämäläinen, E.** (2009) *Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 69, 592-597.
- Tyldesley, W.R.** (1996) *Atlas der Mundschleimhauterkrankungen*. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden.
- Uddin, M.N., Samanidou, V.F. and Papadoyannis, I.N.** (2009) *HPLC method for simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and saliva: a useful tool in medicinal chemistry*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 32, 1475-1504.
- Van Anders, S.M., Hamilton, L.D., Schmidt, N. and Watson, N.V.** (2007) *Associations between testosterone secretion and sexual activity in women*. Zusammenhang zwischen testosteronproduktion und sexueller aktivität bei frauen, 14, 86-94.
- Varian Corporation Inc** OraTube - Product insert http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/dat/shared/OraTube_Insert_1.pdf 30.9.2009 9:05 Uhr
- Ventura, M., Pichini, S., Ventura, R., Leal, S., Zuccaro, P., Pacifici, R. and De La Torre, R.** (2009) *Stability of Drugs of Abuse in Oral Fluid Collection Devices With Purpose of External Quality Assessment Schemes*. Therapeutic Drug Monitoring, 31, 277-280.
- Vyse, A., Cohen, B. and Ramsay, M.** (2001) *A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children (abstract)*. Public Health, 115, 201-207.
- Wesolowski, L.G., MacKellar, D.A., Ethridge, S.F., Zhu, J.H., Owen, S.M. and Sullivan, P.S.** (2008) *Repeat confirmatory testing for persons with discordant whole blood and oral fluid rapid HIV test results: Findings from post marketing surveillance*. PLoS ONE, 3.

Wickström, C., Davies, J.R., Eriksen, G.V., Veerman, E.C.I. and Carlstedt, I. (1998) *MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: Identification of glycoforms and C-terminal cleavage.* *Biochemical Journal*, 334, 685-693.

Wintergerst, U., Kurowski, M., Rolinski, B., Muller, M., Wolf, E., Jaeger, H. and Belohradsky, B.H. (2000) *Use of saliva specimens for monitoring indinavir therapy in human immunodeficiency virus-infected patients.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2572-2574.

Wirth, M., Meier, E., Fredrickson, B. and Schultheiss, O. (2007) *Relationship between salivary cortisol and progesterone levels in humans.* *Biological Psychology*, 74, 104-107.

Wood, M., De Boeck, G., Samyn, N., Morris, M., Cooper, D.P., Maes, R.A.A. and De Bruijn, E.A. (2003) *Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS.* *Journal of Analytical Toxicology*, 27, 78-87.

Wood, P. (2009) *Salivary steroid assays - Research or routine?* *Annals of Clinical Biochemistry*, 46, 183-196.

Yamada, K., Kawano, M., Inoue, R., Hamano, R., Kakuchi, Y., Fujii, H., Matsumura, M., Zen, Y., Takahira, M., Yachie, A. and Yamagishi, M. (2008) *Clonal relationship between infiltrating immunoglobulin G4 (IgG4)-positive plasma cells in lacrimal glands and circulating IgG4-positive lymphocytes in Mikulicz's disease.* *Clinical & Experimental Immunology*, 152, 432-439.

Yamamoto, M., Harada, S., Ohara, M., Suzuki, C., Naishiro, Y., Yamamoto, H., Takahashi, H. and Imai, K. (2005) *Clinical and pathological differences between Mikulicz's disease and Sjögren's syndrome.* *Rheumatology*, 44, 227-234.

Yonamine, M., Tawil, N., De Moraes Moreau, R.L. and Alves Silva, O. (2003) *Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples.* *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 789, 73-78.

Zelin, J., Garrett, N., Saunders, J., Warburton, F., Anderson, J., Moir, K., Symonds, M. and Estcourt, C. (2008) *An evaluation of the performance of OraQuick(R) ADVANCE Rapid HIV-1/2 Test in a high-risk population attending genitourinary medicine clinics in East London, UK (on behalf of the North East London Sexual Health Network Research Consortium).* *Int J STD AIDS*, 19, 665-667.

Tabak-Alkaloide

Arcavi, L. and Benowitz, N.L. (2004) *Cigarette Smoking and Infection.* *Arch Intern Med*, 164, 2206-2216.

Banyasz, J.L. (1999) *The physical chemistry of nicotine.* In Gorrod, J.W. and Jacob III, P. (eds.), *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites.* Elsevier, Amsterdam, pp. 149-190.

Benowitz, N.L. (1988) *Pharmacological aspects of cigarette smoking and nicotine addiction.* *New England Journal of Medicine*, 319, 1318-1330.

Benowitz, N.L. (2003) *Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease: Pathophysiology and Implications for Treatment.* *Progress in Cardiovascular Diseases*, 46, 91-111.

Benowitz, N.L. (2008) *Clinical Pharmacology of Nicotine: Implications for Understanding, Preventing, and Treating Tobacco Addiction.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83, 531-541.

Benowitz, N.L. and Jacob III, P. (1984) *Daily intake of nicotine during cigarette smoking.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 35, 499-504.

Benowitz, N.L., Lessov-Schlaggar, C.N., Swan, G.E. and Jacob III, P. (2006a) *Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 79, 480-488.

Benowitz, N.L., Swan, G.E., Jacob III, P., Lessov-Schlaggar, C.N. and Tyndale, R.F. (2006b) *CYP2A6 genotype and the metabolism and disposition kinetics of nicotine.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 80, 457-467.

Brandänge, S. and Lindblom, L. (1979) *The enzyme "aldehyde oxidase" is an iminium oxidase. Reaction with nicotine $\Delta^1(5')$ iminium ion.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91, 991-996.

Bush, L., Hempfling, W.P. and Burton, H. (1999) *Biosynthesis of nicotine and related compounds.* In Gorrod, J.W. and Jacob III, P. (eds.), *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites.* Elsevier, Amsterdam, pp. 13-44.

Czermin, J. and Waldherr, C. (2003) *Cigarette Smoking and Coronary Blood Flow*. Progress in Cardiovascular Diseases, 45, 395-404.

Dempsey, D., Jacob III, P. and Benowitz, N.L. (2002) *Accelerated Metabolism of Nicotine and Cotinine in Pregnant Smokers*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 301, 594-598.

Domino, E.F. (1999) *Pharmacological significance of nicotine*. In Gorrod, J.W. and Jacob III, P. (eds.), Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-11.

Frohne, D. and Pfänder, H.J. (1983) *Giftpflanzen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Gori, G.B. and Lynch, C.J. (1985) *Analytical cigarette yields as predictors of smoke bioavailability*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 5, 314-326.

Gorrod, J.W. and Schepers, G. (1999) *Biotransformation of nicotine in mammalian systems*. In Gorrod, J.W. and Jacob III, P. (eds.), Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites. Elsevier, Amsterdam, pp. 45-67.

Haensel, R. and Pertz, H. (2007) *Alkaloide*. In Haensel, R. and Sticher, O. (eds.), Pharmakognosie - Phytopharmazie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, pp. 1318-1492.

Heitzer, T., Just, H. and Münzel, T. (1996a) *Antioxidant Vitamin C improves endothelial Dysfunction in chronic smokers*. Circulation, 94, 6-9.

Heitzer, T., Ylä-Herttuala, S., Luoma, J., Kurz, S., Münzel, T., Just, H., Olschewski, M. and Drexler, H. (1996b) *Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia*. Circulation, 93, 1346-1353.

Hukkanen, J., Jacob III, P. and Benowitz, N.L. (2005) *Metabolism and disposition kinetics of nicotine*. Pharmacol. Rev., 57, 79-115.

Ichiki, K., Ikeda, H., Haramaki, N., Ueno, T. and Imaizumi, T. (1996) *Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release*. Circulation, 94, 3109.

Jensen, E.J., Pedersen, B., Frederiksen, R. and Dahl, R. (1998) *Prospective study on the effect of smoking and nicotine substitution on leucocyte blood counts and relation between blood leucocytes and lung function* Thorax, 53, 784-789.

Kroon, L.A. (2007) *Drug interactions with smoking*. Am J Health Syst Pharm, 64, 1917-1921.

Libby, P., Ridker, P.M. and Maseri, A. (2002) *Inflammation and Arteriosclerosis*. Circulation, 105, 1135-1143.

Messina, E.S., Tyndale, R.F. and Sellers, E.M. (1997) *A major role for CYP2A6 in nicotine c-oxidation by human liver microsomes*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 282, 1608-1614.

Murphy, P.J. (1973) *Enzymatic Oxidation of nicotine to nicotine $\Delta 1'(5')$ iminium ion - a newly discovered intermediate in the metabolism of nicotine*. The Journal of Biological Chemistry, 248, 2796-2800.

Mwenifumbo, J.C., Lessov-Schlaggar, C.N., Zhou, Q., Krasnow, R.E., Swan, G.E., Benowitz, N.L. and Tyndale, R.F. (2008) *Identification of novel CYP2A6*1B variants: The CYP2A6*1B allele is associated with faster in vivo nicotine metabolism*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 83, 115-121.

Nakajima, M., Yamamoto, T., Nunoya, K.-I., Yokoi, T., Nagashima, K., Inoue, K., Funae, Y., Shimada, N., Kamataki, T. and Kuroiwa, Y. (1996) *Role of human cytochrome P450A6 in C-oxidation of nicotine*. Drug Metabolism and Disposition, 24, 1212-1217.

Newby, D.E., McLeod, A.L., Uren, N.G., Flint, L., Ludlam, C.A., Webb, D.J., Fox, K.A.A. and Boon, N.A. (2001) *Impaired Coronary Tissue Plasminogen Activator Release Is Associated With Coronary Atherosclerosis and Cigarette Smoking: Direct Link Between Endothelial Dysfunction and Atherothrombosis* Circulation, 103, 1936.

Nitenberg, A., Antony, I. and Foul, J.-M. (1993) *Acetylcholin-induced coronary vasoconstriction in young, heavy smokers with normal coronary arteriographic findings (abstract)*. The American Journal of Medicine, 95, 71-77.

Oldendorf, W. (1974) *Lipid solubility and drug penetration in blood brain barrier*. Proc Soc Exp Biol Med, 147, 813-815.

Peterson, L.A., Trevor, A. and Castagnoli Jr., N. (1987) *Stereochemical studies on the cytochrome P-450 catalyzed oxidation of (S)-nicotine to the (S)-nicotine Δ 1'(5') iminium species.* Journal of Medical Chemistry, 30, 249-254.

Puranik, R. and Celermajer, D.S. (2003) *Smoking and Endothelial Function.* Progress in Cardiovascular Diseases, 45, 443-458.

Quillen, J., Rossen, J. and Oskarsson, H. (1993) *Acute effect of cigarette smoking on the coronary circulation: constriction of epicardial and resistance vessels.* Journal of the American College of Cardiology, 22, 642-647.

Russell, M.A.H. (1987) *Estimation of smoke dosage and mortality of non-smokers from environmental tobacco smoke.* Toxicology Letters, 35, 9-18.

Simpson, A.J., Gray, R.S., Moore, N.R. and Booth, N.A. (1997) *The effects of chronic smoking on the fibrinolytic potential of plasma and platelets.* British Journal of Haematology, 97, 208-213.

Spector, R. and Goldberg, M. (1982) *Active transport of nicotine by the isolated choroids plexus in vitro.* J Neurochem, 38, 594-596.

Svensson, C.K. (1987) *Clinical pharmacokinetics of nicotine.* Clin. Pharmacokin., 12, 30-40.

Thews, G., Mutschler, E. and Vaupel, P. (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Tracy, R.P., Psaty, B.M., Macy, E., Bovill, E.G., Cushman, M., Cornell, E.S. and Kuller, L.H. (1997) *Lifetime Smoking Exposure Affects the Association of C- Reactive Protein with Cardiovascular Disease Risk Factors and Subclinical Disease in Healthy Elderly Subjects* Services Arteriosklerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 17, 2167-2176.

Tutkar, P., Mosiewics, J. and Wielosz, M. (2006) *Pharmacokinetics and metabolism of nicotine.* Pharmacological Reports, 57, 143-153.

WHO (2008) *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package.* World Health Organisation, Geneva.

Zevin, S. and Benowitz, N.L. (1999) *Drug Interactions with Tobacco Smoking: An Update.* Clinical Pharmacokinetics, 36, 425-438.

Zevin, S., Gourlay, S.G. and Benowitz, N.L. (1998) *Clinical pharmacology of nicotine.* Clin. Dermatol., 16, 557-564.

Opium-Alkaloide

Beubler, E. (2007a) *Kompodium der Pharmakologie.* Springer Verlag, Wien.

Beubler, E. (2007b) *Pharmakologie psychotroper Substanzen.* In Beubler, E., Halmayer, H. und Springer, A. (Hrsg.), *Opiatabhängigkeit.* Springer-Verlag, Wien.

Dejneg, D., Girsch, L. and Kramberger, I. *Betrachtungen zur Saatgutproduktion und zu Saatgutregelungen bei Mohn (Papaver somniferum L.).* AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Saatgut.

Haensel, R. und Pertz, H. (2007) *Alkaloide.* In Haensel, R. und Sticher, O. (Hrsg.), *Pharmakognosie - Phytopharmazie.* Springer Medizin Verlag, Heidelberg, pp. 1318-1492.

Jenkins, A.J. and Cone, E.J. (1998) *Pharmacokinetics: Drug Absorption, distribution and elimination.* In Karch, S.B. (ed.), *Drug Abuse Handbook.* CRC Press, Boca Raton, Boston, London, New York, Washington D.C., pp. 151-201.

Lachenmeier, D.W., Sproll, C. and Musshoff, F. (2010) *Poppy Seed Foods and Opiate Drug Testing - Where are we today?* Therapeutic Drug Monitoring, 32, 11-18.

Lüllmann, H., Mohr, K. und Hein, L. (2006) *Pharmakologie und Toxikologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Mikus, G. and Weiss, J. (2005) *Influence of CYP2D6 genetics on opioid kinetics, metabolism and response.* Current Pharmacogenomics, 3, 43-52.

ODDB.org *ODDB.org: Open Drug Duatabase - Fachinformation zu Spasmosol* www.ch.oddb.org 20.01.2010 13:21 Uhr

Risikobewertung, B.f. (2005) *BfR empfiehlt vorläufige tägliche Aufnahmemenge und einen Richtwert für Morphin im Mohnsamen - Gesundheitliche Bewertung Nr. 012/2006 des BfR vom 27. Dezember 2005.* Bundesinstitut für Risikobewertung.

Schmid, R. (2007) *Dorgentests: Möglichkeiten und Grenzen.* In Beubler, E., Haltmayer, H. and Springer, A. (eds.), *Opiatabhängigkeit - Interdisziplinäre Aspekte für die Praxis.* Springer-Verlag, Wien, pp. 281-295.

Stone, A.N., Mackenzie, P.I., Galetin, A., Houston, J.B. and Miners, J.O. (2003) *Isoform Selectivity and Kinetics of Morphine-3- and -6-Glucuronidation by Human UDP-Glucuronosyltransferases: Evidence for Atypical Glucuronidation Kinetics by UGT2B/.* *Drug Metabolism and Disposition*, 31, 1086-1089.

Voderholzer, U., Hronyak, M., Riemann, D., Backhaus, J. and Hohagen, F. (1997) *“Opiate positiv” im Drogenscreening-Test des Urins nach Genuß von Mohnkuchen.* *Nervenarzt*, 68, 926.

Zeilhofer, H.U. und Sittl, R. (2007) *Therapie mit Analgetika und Lokalanästhetika.* In Brune, K. und Lemmer, B. (Hrsg.), *Pharmakotherapie.* Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Grundlagen der verwendeten Analysenmethoden

Grundlagen der Festphasenextraktion

Separtis QuickStart Guide to SPE <http://www.biotage.com/Download.aspx?id=2835> 6.10.2009 15:53 Uhr

Grundlagen der Hochleistungsflüssigchromatographie und Massenspektrometrie

Bittner, C. (2005) *Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) bei der Suche nach potentiellen Pheromonen in human Schweißproben und in der Analyse von Di-(ethylhexyl)phthalat (DEHP) in biologischen Matrices.* Universität Wien, Wien, p. 150.

Budzikiewicz, H. (1998) *Massenspektrometrie - Eine Einführung.* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Kromidas, S. (2003) *HPLC-Tipps Band 2.* Hoppenstedt Bonnier Zeitschriften GmbH, Darmstadt.

Lemière, F. (2001a) *Interfaces for LC-MS.* *LCGC*, 2-8.

Lemière, F. (2001b) *Mass Analysers for LC-MS.* *LCGC*, 2-8.

Lindsay, S. (1996) *Einführung in die HPLC.* Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig.

Grundlagen der immunchemischen Verfahren

Hallbach, J. (2006) *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Microgenics Corporation *DRI Cotinine Assay* http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_6263.pdf 28.7.2009

Microgenics Corporation *CEDIA Opiate Assay* https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_10171.pdf 28.9.2009

Fragestellung der Dissertation

Bauer, S. *Versicherung: Raucher zahlen das Doppelte* <http://www.top-versicherungen.info/versicherung-raucher-zahlen-das-doppelte> 10.2.2010 11:36 Uhr

Choo, R.E. and Huestis, M.A. (2004) *Oral fluid as a diagnostic tool.* *Clin Chem Lab Med*, 42, 1273-1287.

George, S. and Braithwaite, R.A. (2002) *Use of On-Site Testing for Drugs of Abuse.* *Clinical Chemistry*, 48, 1639-1646.

Greiner Bio-One GmbH *Saliva Collection System Brochure* http://www.gbo.com/documents/980161_SalivaCollectionSystem_030308_e_internet.pdf 29.9.2009 17:45 Uhr

Material und Methoden

Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

Schmitt, G., Herbold, M. and Peters, F. (2003) Methodenvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor - Auswertung von Validierungsdaten nach den Richtlinien der GTFCh mit VALISTAT. ARVECON GmbH, Walldorf.

Separtis *QuickStart Guide to SPE* <http://www.biotage.com/Download.aspx?id=2835> 6.10.2009 15:53 Uhr

Cotinin-Studie

Greiner Bio-One GmbH *Greiner Bio-One Saliva Quantification Kit - Application for Olympus AU400 & AU640* http://www.gbo.com/documents/Olympus_AU400_640_Application_SQK_english_.pdf 28.7.2009 8:34 Uhr

Greiner Bio-One GmbH *Greiner Bio-One Speichelquantifizierungskit - Gebrauchsanweisung* http://www.gbo.com/documents/980217_IFU_SQK_Rev01_DE.pdf 28.7.2009 8:17 Uhr

Microgenics Corporation *DRI Cotinine Assay* http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_6263.pdf 28.7.2009

Microgenics Corporation *DRI Cotinine Application - Olympus AU400, AU600, AU640, AU2700 and AU5400* http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_6844.doc 28.7.2009 11:00 Uhr

Mohn-Studie

Greiner Bio-One GmbH *Greiner Bio-One Saliva Quantification Kit - Application for Olympus AU400 & AU640* http://www.gbo.com/documents/Olympus_AU400_640_Application_SQK_english_.pdf 28.7.2009 8:34 Uhr

Greiner Bio-One GmbH *Greiner Bio-One Speichelquantifizierungskit - Gebrauchsanweisung* http://www.gbo.com/documents/980217_IFU_SQK_Rev01_DE.pdf 28.7.2009 8:17 Uhr

Microgenics Corporation *CEDIA Opiate Assay* https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_10171.pdf 28.9.2009

Microgenics Corporation *CEDIA Opiate Application - Olympus AU400, AU600, AU640, AU2700, AND AU5400* https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_7013.doc 29.9.2009 12:31 Uhr

Sproll, C. (2005) *Kein Rausch durch Mohnkuchen*. CLB - Chemie in Labor und Biotechnik, 56, 348-352.

Sproll, C., Perz, R.C. and Lachenmeier, D.W. (2006) *Optimized LC/MS/MS Analysis of Morphine and Codeine in Poppy Seed and Evaluation of Their Fate during Food Processing as a Basis for Risk Analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 5292-5298.

Diskussion

Bestimmung der Analyt-Recovery aus dem Greiner Bio-One Saliva Collection System

Choo, R.E. and Huestis, M.A. (2004) *Oral fluid as a diagnostic tool*. Clin Chem Lab Med, 42, 1273-1287.

Crouch, D.J. (2005) *Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing*. Forensic Science International, 150, 165-173.

Kauert, G.F. (2000) *Drogennachweis in Speichel vs. Blut*. Blutalkohol, 37, 76-83.

Langel, K., Engblom, C., Pehrsson, A., Gunnar, T., Ariniemi, K. and Lillsunde, P. (2008) *Drug Testing in Oral Fluid - Evaluation of Sample Collection Devices*. Journal of Analytical Toxicology, 32, 393-401.

Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Nicotin, Cotinin und Nornicotin aus Speichelproben

Bittner, C. (2005) *Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) bei der Suche nach potentiellen Pheromonen in human Schweißproben und in der Analyse von Di-(ethylhexyl)phthalat (DEHP) in biologischen Matrices*. Universität Wien, Wien, p. 150.

Cone, E.J. (1993) *Saliva Testing for Drugs of Abuse*. Annals of the New York Academy of Sciences, 694, 91-127.

Majors, R.E. (2007) *Advanced Topics in Solid-Phase Extraction: Chemistries*. LCGC North America, 25.
Waters Corporation (2006) Hoher Reinheitsgrad durch Festphasenextraktion - Oasis-Produkte für die Probenextraktion (Produktinformation). Waters Corporation, Milford, USA.

Entwicklung einer LC/MS-Methode für Nicotin, Cotinin aus Speichelproben

Ghosheh, O.A., Browne, D., Rogers, T., De Leon, J., Dwoskin, L.P. and Crooks, P.A. (2000) *A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3'-hydroxycotinine and caffeine in the plasma of smoker*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23, 543-549.

Kuo, H., Yang, J. and Chiu, M. (2002) *Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay*. Journal of Chromatography B, 768, 297-303.

Nakajima, M., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y. and Yokoi, T. (2000) *Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B, 742, 211-215.

Oddoze, C., Pauli, A. and Pastor, J. (1998) *Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in nonsmoker human and rat urines*. Journal of Chromatography B, 708, 95-101.

Page-Sharp, M., Hale, T.W., Hackett, L.P., Kristensen, J.H. and Ilett, K.F. (2003) *Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection*. Journal of Chromatography B, 796, 173-180.

Shou, W.Z. and Naidong, W. (2005) *Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (HILIC-ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds*. Journal of Chromatography B, 825, 186-192.

Showa Denko Europe GmbH <http://www.shodex.de/index.php?seitenid=1&prodcats=138>
03.9.2010, 15:20 Uhr

Tuomi, T., Johnsson, T. and Reijula, K. (1999) *Analysis of Nicotine, 3-Hydroxycotinine, Cotinine, and Caffeine in the Urine of Passive Smokers by HPLC-Tandem Mass Spectrometry*. Clinical Chemistry, 45, 2164-2172.

Cotinin-Studie

Bauer, S. *Versicherung: Raucher zahlen das Doppelte* <http://www.top-versicherungen.info/versicherung-raucher-zahlen-das-doppelte> 10.2.2010 11:36 Uhr

Benowitz, N.L. and Jacob III, P. (1984) *Daily intake of nicotine during cigarette smoking*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 35, 499-504.

Brundtland, G.H. (1999) *Eröffnungsrede*. WHO International Conference on Tobacco and Health. World Health Organisation, Kobe, Japan.

Gori, G.B. and Lynch, C.J. (1985) *Analytical cigarette yields as predictors of smoke bioavailability*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 5, 314-326.

Pérez-Stable, E., Herrera, B., Jacob III, P. and Benowitz, N.L. (1998) *Nicotine metabolism and intake in black and white smokers*. The Journal of the American Medical Association, 280, 152-156.

Russell, M.A.H. (1987) *Estimation of smoke dosage and mortality of non-smokers from environmental tobacco smoke*. Toxicology Letters, 35, 9-18.

Siegmund, B., Leitner, E. and Pfannhauser, W. (1999) *Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3113-3120.

Siegmund, B., Leyden, D.E., Zikulnig, E., Erich, L., Murkovic, M., Pfannhauser, W. and Reif, H. (2001) *The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker.* Food Chemistry, 74, 259-265.

WHO (2008) WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. World Health Organisation, Geneva.

Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode für Opiat-hältige Speichelproben

Schmitt, G., Herbold, M. and Peters, F. (2003) Methodenvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor - Auswertung von Validierungsdaten nach den Richtlinien der GTFCh mit VALISTAT. ARVECON GmbH, Walldorf.

WatersCorporation (2006) Hoher Reinheitsgrad durch Festphasenextraktion - Oasis-Produkte für die Probenextraktion (Produktinformation). Waters Corporation, Milford, USA.

Untersuchung des Retentionsverhalten von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen

Alpert, A.J. (1990) *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds.* Journal of Chromatography, 499, 177-196.

Bengtsson, J., Jansson, B. and Hammarlund-Udenaes, M. (2005) *On-line desalting and determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in microdialysis and plasma samples using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19, 2116-2122.

Chung, W.C., Tso, S.C. and Sze, S.T. (2007) *Separation of polar mushroom toxins by mixed-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry.* Journal of Chromatographic Science, 45, 104-111.

Hemström, P. and Irgum, K. (2006) *Review: Hydrophilic interaction chromatography.* Journal of Separation Science, 29, 1784-1821.

Naidong, W., Lee, J.W., Jiang, X., Wehling, M., Hulse, J.D. and Lin, P.P. (1999) *Simultaneous assay of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma using normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a silica column and an aqueous organic mobile phase.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 735, 255-269.

Olsen, B.A. (2001) *Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities.* Journal of chromatography A, 913, 113-122.

Shou, W.Z., Pelzer, M., Addison, T., Jiang, X. and Naidong, W. (2002) *An automatic 96-well solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27, 143-152.

Vikingsson, S., Kronstrand, R. and Josefsson, M. (2008) *Retention of opioids and their glucuronides on a combined zwitterion and hydrophilic interaction stationary phase.* Journal of chromatography A, 1187, 46-52.

Zuccaro, P., Ricciarello, R., Pichini, S., Pacifici, R., Altieri, I., Pellegrini, M. and D'Ascenzo, G. (1997) *Simultaneous determination of heroin, 6-monoacetylmorphine, morphine, and its glucuronides by liquid chromatography-atmospheric pressure ionspray- mass spectrometry.* Journal of Analytical Toxicology, 21, 268-277.

Mohn-Studie

Dejnega, D., Girsch, L. and Kramberger, I. *Betrachtungen zur Saatgutproduktion und zu Saatgutregelungen bei Mohn (Papaver somniferum L.).* AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH Institut für Saatgut.

Jenkins, A.J. and Cone, E.J. (1998) *Pharmacokinetics: Drug Absorption, distribution and elimination*. In Karch, S.B. (ed.), *Drug Abuse Handbook*. CRC Press, Boca Raton, Boston, London, New York, Washington D.C., pp. 151-201.

Lüllmann, H., Mohr, K. and Hein, L. (2006) *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

ODDB.org ODDDB.org: Open Drug Duatabase - Fachinformation zu Spasmosol www.ch.oddb.org
20.01.2010 13:21 Uhr

Risikobewertung, B.f. (2005) *BfR empfiehlt vorläufige tägliche Aufnahmemenge und einen Richtwert für Morphin im Mohnsamen - Gesundheitliche Bewertung Nr. 012/2006 des BfR vom 27. Dezember 2005*. Bundesinstitut für Risikobewertung.

Rohrig, T.P. and Moore, C. (2003) *The Determination of Morphine in Urine and Oral Fluid Following Ingestion of Poppy Seeds*. *Journal of Analytical Toxicology*, 27, 449-452.

Schmid, R. (2007) *Dorgentests: Möglichkeiten und Grenzen*. In Beubler, E., Haltmayer, H. and Springer, A. (eds.), *Opiatabhängigkeit - Interdisziplinäre Aspekte für die Praxis*. Springer-Verlag, Wien, pp. 281-295.

Voderholzer, U., Hronyak, M., Riemann, D., Backhaus, J. and Hohagen, F. (1997) *"Opiate positiv" im Drogenscreening-Test des Urins nach Genuß von Mohnkuchen*. *Nervenarzt*, 68, 926.

Zeilhofer, H.U. and Sittl, R. (2007) *Therapie mit Analgetika und Lokalanästhetika*. In Brune, K. and Lemmer, B. (eds.), *Pharmakotherapie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Bildquellen

Abbildung 1: *Funktionen des Speichels*
(modifiziert nach [Nieuw Amerongen und Veerman, 2002])

Abbildung 2: *Cozart DDS Oral Swab*
<http://www.cozartgroup.com/images/swab.jpg>, 1.10.2009, 22:10 Uhr

Abbildung 3: *Greiner Bio-One Saliva Collection System*
http://www.gbo.com/images/homepageSCS_prod0017.jpg, 27.3.2010, 22:50 Uhr

Abbildung 4: *Intercept Oral Specimen Collection Device*
http://www.orasure.com/i/img_product_land_intercept2.jpg, 1.10.2009, 22:06 Uhr

Abbildung 5: *OraCol Saliva Collection Device*
<http://www.malvernmedical.uk.com/Library/oracol.jpg>, 1.10.2009, 22:20 Uhr

Abbildung 6: *OnTrak OraTube (links) und OnSite OraLab+ (rechts)*
<http://big5.varianinc.com.cn/products/dat/images/oratube-product.jpg> 1.10.2009, 23:17 Uhr
und http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/dat/shared/oralab_plus.jpg,
1.10.2009, 23:18 Uhr

Abbildung 7: *QuantiSal Speichelsammelsystem*
<http://www.immunalysis.com/Quantisal%20tube.jpg>, 7.10.2009, 12:26 Uhr

Abbildung 8: *Salicule Saliva Collector*
<http://acrobiotech.com/devices/salicule/straw%20extended.jpg>, 10.11.2009, 16:17 Uhr

Abbildung 9: *Salivette*
<http://scimart.com/productimages/511534.jpg>, 10.11.2009, 17:25 Uhr

Abbildung 10: *Nicotiana tabacum L.*
<http://www.biolib.de/>, 20.1.2010, 09:28 Uhr; Originale Buchquelle: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé:
Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885), Gera, Deutschland

Abbildung 16: *Papaver somniferum L.*
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/18/Illustration_Papaver_somniferum0.jpg,
20.1.2010 09:23 Uhr; Originale Buchquelle: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé: Flora von Deutschland,
Österreich und der Schweiz (1885), Gera, Deutschland

Abbildung 17: *Biosynthese von Codein und Morphin ausgehend von Thebain*
siehe Literaturverzeichnis: [Haensel und Pertz, 2007], Seite 1382

Abbildung 18: *Schema einer HPLC-Anlage*
<http://www2.ulg.ac.be/lcfi/licence/interros/interro1706.gif>, 21.7.2010 8:30 Uhr

Abbildung 19: *6-Wege-Ventil*
http://www.ecomsro.cz/images/products/5/596/Valve_B-Schema-big.png, 21.7.2010 8:43 Uhr

Abbildung 20: *Electrospray Ionisation*
http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/images/ionization_esi.jpg, 21.7.2010 9:20
Uhr

Abbildung 21: *Quadrupol*
[http://www.uni-muenster.de/Chemie.oc/service/mass/Methoden/Quadrupol/Quadrupol_
Zeichnung_opt.jpg](http://www.uni-muenster.de/Chemie.oc/service/mass/Methoden/Quadrupol/Quadrupol_Zeichnung_opt.jpg), geladen am 21.7.2010, 9:38 Uhr

Abbildung 23: *Prinzip des EMIT-Verfahrens*
nach [Hallbach, 2006], siehe Literaturverzeichnis

Abbildung 24: *Prinzip des CEDIA-Verfahrens*
nach [Hallbach, 2006], siehe Literaturverzeichnis

Abbildung 25: *Schema einer Festphasenextraktion*
siehe Literaturverzeichnis: [Separtis], p. 143

Abbildung 80: *Greiner Bio-One Saliva Collection System*
http://www.gbo.com/images/homepageSCS_prod0017.jpg, 27.3.2010, 22:50 Uhr

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wiederfindungsrate von Drogen und Medikamenten aus einem neuen Speichelsammelsystem mit über 96% für ^3H -Cocain, ^{14}C -Codein, ^{14}C -Methamphetamin, ^{14}C -Morphin, ^{14}C -Mycophenolatnatrium und ^3H -Nicotin ermittelt. Die Wiederfindungsrate für ^3H - Δ^9 -Tetrahydrocannabinol betrug 31%.

Der DRI® Cotinine Immonoassay zur Messung von Cotinin im Harn wurde so modifiziert, dass die Cotinin-Konzentration im Speichel bestimmt werden konnte. Als Bestätigungsanalyse wurde eine LC/MS-Methode mit vorangehender Festphasenextraktion entwickelt. Die Speichelproben wurden über ein mixed-mode-cation-exchange-Säulchen extrahiert. Die Analyten wurden anschließend in einem reversed-phase-Trennsystem auf einer Polymersäule mit einem Eluenten aus Acetonitril und 20 mM Ammoniumacetat pH 9,50 getrennt und massenspektrometrisch detektiert. 199 Speichelproben von Rauchern und Nichtrauchern wurden mit dem modifizierten Immunoassay und der LC/MS-Methode vermessen. Der Cut-Off-Wert zur Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern wurde bei 40 ng/mL Cotinin im Speichel ermittelt.

Weiters wurden Speichelproben von zehn Probanden nach dem Verzehr von Speisemohn einem neuen Immunoassay vermessen. Im Gegensatz zu den parallel abgenommenen Harnproben konnten in den meisten Speichelproben keine Opiate nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich daran, dass bei der Probenahme darauf geachtet wurde, dass keine Mohnsamen die Speichelproben verunreinigen, die sonst zu falsch positiven Ergebnissen führen würden.

Zur Extraktion von Opiat-hältigen Speichelproben wurde eine gekoppelte Festphasen-extraktionsmethode über ein Anionenaustauschersorbens und über ein *mixed-mode-cation-exchange*-Säulchen entwickelt. Das Retentionsverhalten von Opium-Alkaloiden des Morphinan-Typs wurde in verschiedenen chromatographischen Trennsystemen untersucht. Die beste Trennung von Thebain, Codein, Morphin, Morphin-6-Glucuronid und Morphin-3-Glucuronid wurde auf einer nicht modifizierten Silica-Säule mit 82% Acetonitril und 18% 20 mM Ammoniumacetat pH 3,80 als Eluenten erzielt.

Abstract

In this work, a new saliva collection system was investigated and the recovery of some radioactive-labelled drugs of abuse and therapeutic drugs was determined. The recovery for ^3H -cocaine, ^{14}C -codeine, ^{14}C -methamphetamine, ^{14}C -morphine, ^{14}C -myocphenolate-sodium and ^3H -nicotine was more than 96%. For ^3H - Δ^9 -tetrahydrocannabinidole it was 31%.

The DRI® Cotinine immunoassay for detection of cotinine in urine was modified to be used for measuring cotinine-concentrations in saliva samples. A solid-phase-extraction- and LC/MS-method for reconfirmation was also developed. Saliva samples were extracted using mixed-mode-cation-exchange-columns. The analytes were separated on a reversed-phase-polymer-column using a mobile phase consisting of acetonitrile and 20 mM ammonium acetate pH 9,50. Using the newly established methods, 199 saliva samples of smokers and non-smokers were analysed. The cut-off-value to distinguish between smokers and non-smokers was set at 40 ng/mL cotinine in saliva.

Furthermore, saliva samples of ten persons after consumption of large amounts of poppy seed were analysed using a new immunoassay. Compared to parallel drawn urine samples the results for most saliva samples were opiate-negative. The reason for this was presumably the elimination of sample contamination with poppy seeds, which would cause false positive results.

A coupled solid-phase-extraction method using an anion-exchange-sorbent and a mixed-mode-cation-exchange-column for opiates in saliva was also developed. The retention of morphinan-type-alkaloids in different chromatographic systems was investigated. The best separation of thebaine, codeine, morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide was achieved on a non-modified silica-column using 82% acetonitrile and 18% 20 mM ammonium acetate pH 3,80 for elution.

Lebenslauf

Personalien

Name	Lydia Halwachs
Akademischer Grad	Mag. pharm.
Geburtsdatum	13. Mai 1982
Geburtsort	Hartberg
Wohnort	Walkürengasse 13 1150 Wien
Staatsbürgerschaft	Österreich

Ausbildung

seit März 2006	Dissertation Universität Wien
10/2000 bis 11/2004	Studium der Pharmazie Universität Wien
1992 bis 2000	Bundesrealgymnasium Hartberg
1988 bis 1992	Volksschule Lafnitz

Publikationen

Reproducible saliva collection as basis for cotinine testing in oral fluid

Schmid, R.; Halwachs, L.; Steyrer, B.

Wissenschaftliche Tagung der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, 2009, Wien

Reproducible saliva collection as basis for cotinine testing in oral fluid

Schmid, R.; Halwachs, L.; Steyrer, B.

AACC Annual Meeting, 2008, Washington, DC, USA

Bestimmung von Opiaten im Speichel unter Verwendung eines neuen Sammelprinzips

Halwachs, L.; Schmid, R.; Türk, B.; Leichtfried, D.; Böttcher, M.

GTFCh-Symposium, 2007, Mosbach, Deutschland

Modern LC-ESI-MS/MS in biological analysis: Can we now forget chromatography?

Schmid, R.; Halwachs, L.

Igler MS Tage, 2007, Obergurgl

Choosing selective separation mechanisms in LC/MS for a straightforward analysis of opiate drugs in biological fluids

Halwachs, L.; Türk, B.; Schmid, R.

International Congress of IATDMCT, 2007, Nizza, Frankreich

Reproducible standardized saliva collection as basis for reliable drug testing in oral fluid

Schmid, R.; Halwachs, L.; Türk, B.; Leichtfried, D.

International Congress of IATDMCT, 2007, Nizza, Frankreich

Standardized saliva collection as basis for reproducible testing in oral fluid

Schmid, R.; Halwachs, L.; Türk, B.; Kemptner, M.; Leichtfried, D.; Kirchmeir, F.

ICADTS - TIAFT, 2007, Seattle, WA, USA

Speichelflüssigkeit zur therapeutischen Bestimmung von Medikamenten und Drogen unter Verwendung eines neuen Sammelprinzips

Halwachs, L.; Schmid, R.; Türk, B.; Leichtfried, D.

Wissenschaftliche Tagung der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, 2006, Innsbruck

Routine drug of abuse monitoring in saliva with a new collection device and a modified homogenous immunoassay

Türk, B.; Leichtfried, D.; Halwachs, L.; Schmid, R.

TIAFT, 2006, Ljubljana, Slowenien

Effects of scents on airborne microbes, part I: thymol, eugenol, trans-cinnamaldehyde and linalool.

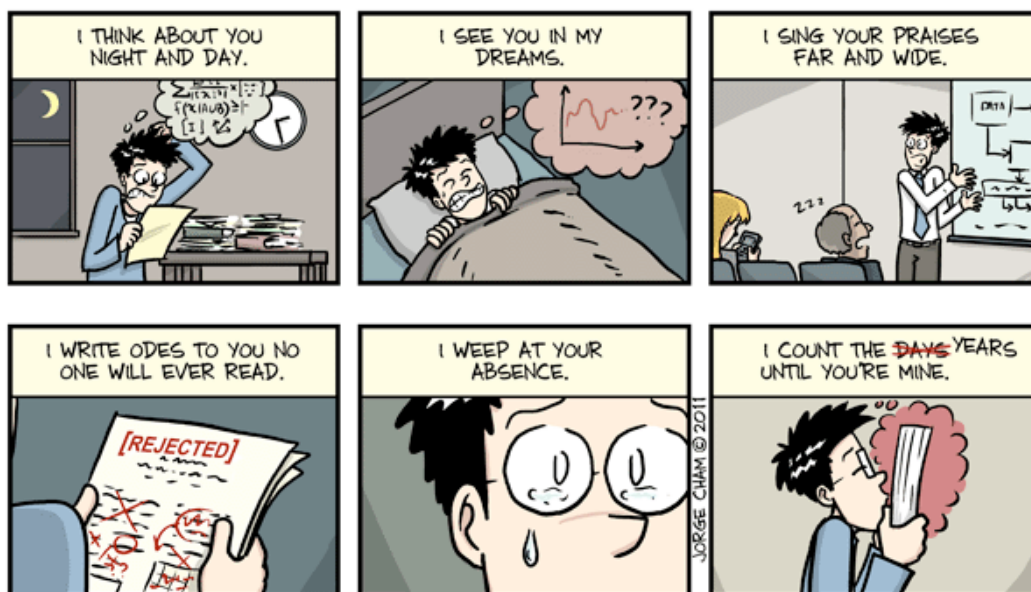
Krist, S.; Halwachs, L.; Sallaberger, G.; Buchbauer, G.

Flavour and Fragrance Journal (2007), 22(1), 44-48.

Berufliche Tätigkeiten

seit 06/2010	Technisch-wissenschaftliche Angestellte enviro-chem gmbh, Wilhelmsburg
seit 06/2007	Vertretungsberechtigte Apothekerin Apotheke zur Mariahilf, Wilhelmsburg
12/2006 bis 06/2007	Vertretungsberechtigte Apothekerin Maria Schutz Apotheke, Wien
01/2006 bis 12/2006	Vertretungsberechtigte Apothekerin Salvator-Apotheke, Stegersbach
01/2005 bis 12/2005	Aspirantin Salvator-Apotheke, Stegersbach

HOW DO I LOVE YOU, THESIS? LET ME COUNT THE WAYS...



WWW.PHDCOMICS.COM