Universität Ulm
Abteilung Rechtsmedizin
Leiter: Prof. Dr. E. Miltner

Untersuchungen zu postmortalen Veränderungen illegaler Betäubungsmittel in Körperflüssigkeiten und Organen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. biol. hum. der Humanbiologie der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Michaela Sandra Winkler aus Ehingen (Donau)
Ulm 2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Gutachter: Prof. Dr. Erich Miltner

2. Gutachter: PD. Dr. Andreas Essig

Tag der Promotion: 29.04.2005

Meinen Eltern:
Ingeborg und Gerhard Winkler

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **7**
1.1 Allgemeine Grundlagen: Opiate und Opioide **7**
1.1.1 Morphin (4,5α-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6α-diol) 7
1.1.2 Heroin (4,5α-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6α-diyldiacetat) 9
1.1.3 Morphin-3-Glucuronid 11
1.1.4 Codein (4,5α-Epoxy-3-methoxy-17-methyl-7-morphinen-6α-ol) 11
1.1.5 Methadon ((+/-)-6-Dimethylamino-4,4 diphenyl-3heptanon) 13
1.2 Beschreibung der ausgewählten Mikroorganismen **15**
1.2.1 Staphylococcus aureus 15
1.2.2 Pseudomonas putida 16
1.2.3 Serratia marcescens 17
1.2.4 Escherichia coli (E.coli) 17
1.3 Massenspektrometrie **18**
1.4 Elimination von Pharmaka im Organismus **22**
1.5 Leber **25**
1.5.1 Aufbau der Leber 25
1.5.2 Funktion der Leber 26
1.6 Leichenprozesse bzw. -veränderungen **27**
1.7 Zielsetzung **29**
2. Materialien und Methoden **30**
A. Bestimmung von Morphin, Codein und 3ß-Morphinglucuronid **30**
A.2.1. Chemikalien, Geräte, Trennbedingungen, Kulturen **30**
A.2.1.1. Verwendete Chemikalien 30
A.2.1.2. Verwendete Standards 30
A.2.1.3 Festphasenextraktionssäulen und Zubehör 31
A.2.1.4 Weitere Geräte und Hilfsmittel 31
A.2.1.5 Gaschromatograph mit Massenspektrometer 31
A.2.1.6 Mikrobielle Nährboullions 32
A.2.1.7 Verwendete Kulturen 32
B. Bestimmung von Methadon **33**
B.2.2. Chemikalien, Geräte, Trennbedingungen, Kulturen **33**
B.2.2.1 Verwendete Chemikalien 33
B.2.2.2. Verwendete Standards 33
B.2.2.3. Festphasenextraktionssäulen und Zubehör 33
B.2.2.4. Weitere Geräte und Hilfsmittel 33
B.2.2.5 Gaschromatograph mit Massenspektrometer 34
B.2.2.6 Mikrobielle Nährboullions 34
B.2.2.7 Verwendete Kulturen 35
2.3 Probengewinnung **35**
2.4 Verwendetes Untersuchungsmaterial **36**
2.4.1 Herzblut 36
2.4.2 Leber 37
2.5. Vergleichsproben **37**
2.6. Methoden für den chemisch analytischen Bereich **38**
A: Morphin, Codein und Gesamtmorphin Bestimmung 38
B: Methadon-Bestimmung 43
2.7. Methoden für den mikrobiellen Bereich **46**
3. Validierung **48**
3.1.Allgemeine Begriffe zur Validierung **48**
3.1.1 Spezifität 51
3.1.2 Präzision 51
3.1.3 Richtigkeitskontrolle 53
3.1.4 Linearer Bereich 54
3.1.5 Nachweisgrenze 56

3.1.6 Bestimmungsgrenze 57
3.1.7 Wiederfindung (%) 57
3.2 Validierung der angewandten chromatographischen Methoden 58
3.2.1 Validierung der Methode für die Quantifizierung von Morphin 58
3.2.2 Validierung der Methode für die Quantifizierung von Codein 62
3.2.3 Validierung der Methode für die Quantifizierung von Methadon 66
4. Ergebnisse 74
4.1. Auswertung der chemisch-analytischen Ergebnisse 74
4.1.1 Matrix: Herzblut 74
4.1.2 Matrix: Leber 109
4.2. Auswertung der mikrobiellen Ergebnisse 146
4.2.1 Auswertung des mikrobiellen Spektrums des Leichenmaterials: 146
4.2.2 Auswahl des Nährboullion und Ermittlung der Wiederfindung 148
4.2.3 Quantitative Auswertung der mikrobiellen Abbauprozesse 150
5. Diskussion 170
5.1 Methodik 170
5.2 Stabilität von freiem Morphin/gebundenen Morphin in Leber und Herzblut 171
5.3 Stabilität von Codein in Leber und Herzblut 173
5.4 Stabilität von Methadon in Leber und Herzblut 174
6. Zusammenfassung 175
7. Literaturverzeichnis: 178

Abkürzungsverzeichnis

amu	Atomic mass unit
ATCC-Stämme	American Type Culture Collection Stämme
CI	Chemical impact (Chemisch induzierte Ionisation)
EI	Elektron impact (Elektronenstoss-Ionisation)
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Hbl	Herzblut
HED	High Energy Dynode
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
m/z	Verhältnis der Masse eines Molekülfragments zu seiner Ladung
M3G	Morphin-3ß-Glucuronid
M6G	Morphin-6ß-Glucuronid
MH	Müller-Hinton-Bouillion
n.n.	nicht nachweisbar
NADH	Nicotinamiddinucloetid
PFPA	Perfluorpropionsäureanhydrid
PFPOH	2,2,3.3.3-Pentafluorpropanol
RK	Reinheitskontrolle
SIM	Single ion monitorin
SPE	Solid Phase Extraction
TIC	Total Ion Current
UDP	Uridindiphosphat
UDPGA	Uridindiphosphoglucuronsäure
UTP	Uridintriphosphat
Wdf	Wiederfindung
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen: Opiate und Opioide

Unter dem Begriff Opiate versteht man die natürlichen Alkaloide des Opiums, dazu gehören Morphin, Codein, Thebain, Papaverin, Noscapin und geringe Bestandteile unbedeutenderer Alkaloide.
Heroin und Methadon gehören zu den Opioiden. Zu den Opioiden werden alle Stoffe gezählt, die eine morphinanaloge (also eine opioide) Wirkung besitzen, gleichgültig ihrer chemischen Struktur.
Opium gibt es in verschiedenen Formen, wobei man unter dem Begriff Rohopium den frischgeernteten und getrockneten Saft des noch nicht reifen weiss-violetten einjährigen Schlafmohns (Papaver somniferum L.) versteht.

1.1.1 Morphin (4,5α-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6α-diol)

Wichtigstes Alkaloid des Papaver somniferum ist das Morphin, welches im Rohopium zu etwa 8,5-18% enthalten sein kann. Nach Abfall der Blütenblätter wird die noch unreife, etwa walnußgroße Mohnkapsel, die den Samen enthält und in deren Kapselwand der alkaloidhaltige Milchsaft zirkuliert, mit einem Messer teilweise zwei- bis dreimal angeritzt. Aus den Kapselwänden tritt ein weißer Saft aus, welcher durch Luftsauerstoff zu einer bräunlich-klebrigen Masse oxidiert.
Die Hauptwirkung von Morphin ist der starke analgetische Effekt, der eine Hinderung der Schmerzfortleitung sowie eine Veränderung der Schmerzverarbeitung bewirkt. Morphin hemmt die affektive Reaktion auf Schmerzen. Diese komplexe Wirkung ergibt sich wohl aus der Interaktion von Morphin mit den Opioid-Rezeptoren in verschiedenen Bereichen des ZNS.
Die Wirkung von Morphin auf die Schmerzverarbeitung wird im Thalamus und im Limbischen System lokalisiert. In beiden Regionen können Opioid-Rezeptoren in großer Dichte und hohe Konzentrationen von endogenen Opioiden nachgewiesen werden. Nach Einnahme von Morphin kann eine

Veränderung der Stimmungslage des Patienten eintreten. Unlust- und Angstgefühl werden beseitigt.
Eine der beeinträchtigsten Nebenwirkungen des Morphins überhaupt ist die Hemmung des Atemzentrums. Schon nach therapeutischen Dosen kann eine Anhebung der Schwelle für den physiologischen Reiz (CO_2-Partialdruck im Blut) festgestellt werden. Die Hemmung des Atemzentrums ist von der Dosis abhängig. Nach hohen Dosen von Morphin wird es völlig gelähmt. Der Tod tritt bei der Morphin-Vergiftung infolge zentraler Atemlähmung ein. [Seidenberg A. und Honegger U., 1998]

Neben den hemmenden Effekten besitzt Morphin erregende Wirkungen am zentralen Nervensystem. So stimuliert es die Chemorezeptoren in der Area postrema. Dies kann zu einer Erregung des Brechzentrums führen. Nach wiederholter Zufuhr von Morphin bildet sich eine Gewöhnung gegenüber dem emetischen Effekt aus. Parasympathische Zentren werden erregt, was zu einer Tonunssteigerung im Darm, Bradykardie und zu einer Miosis führt. Die Leitsymptome der akuten Morphin-Vergiftung sind das Koma, die Atemlähmung und die diagnostisch wichtige Miosis.
Bei einer längerdauernden Zufuhr von Morphin kann sich eine Toleranz ausbilden, das heißt, es werden höhere Dosen notwendig, um den gleichen Effekt zu erhalten.
Treibende Kräfte bei der Entwicklung einer Sucht nach mehrmaliger Zufuhr sind der euphorisierende Effekt nach Opioid-Zufuhr (Initial-Rausch) sowie die Entzugssymptome nach Unterbrechung der Zufuhr bei bestehender Gewöhnung. Das Ausmass des euphorisierenden Effekts hängt offenbar von der Geschwindigkeit des Anflutens des Opioids im Zentralnervensystem ab und ist dementsprechend bei intravenöser Zufuhr und guter „Liquor-Gängigkeit“ des Opioids besonders ausgeprägt.
Entzugssymptome treten auf, wenn die Opioid bzw. Opiat-Zufuhr unterbrochen wird, und beginnen entsprechend der Eliminationsgeschwindigkeit des betreffenden Opioids einige Stunden nach der letzten Gabe. Anschließend entwickeln sich psychische und vegetative Symptome wie Unruhe, Depression, Reizbarkeit, Schwäche, Diarrhöen,

Kreislaufstörungen, Stenokardie, Erbrechen, Schwitzen und Tränenfluß. [Lüllmann und Mohr, 1999]
Morphin wird hauptsächlich mit dem Urin ausgeschieden, davon ca. 75% als Morphin-3-Glucuronid, ca. 10% als freies Morphin, etwa 5% als Normorphin und ca. 1% als Morphin-6-Glucuronid. Die Plasma-halbwertszeiten für freies Morphin betragen ca. 2-3h. [Peter X. Item, 1994]
Da Morphin-3-Glucuronid bei der Metabolisierung von Morphin den mengenmäßig größten Anteil ausmacht, wird in den mikrobiellen Studien nur mit Morphin-3-Glucuronid als Vertreter für die Abbaustoffe von Morphin gearbeitet.

Tabelle 1: Gemessene Morphin-Konzentrationen bei Drogentoten (mg/ml bzw. mg/kg)

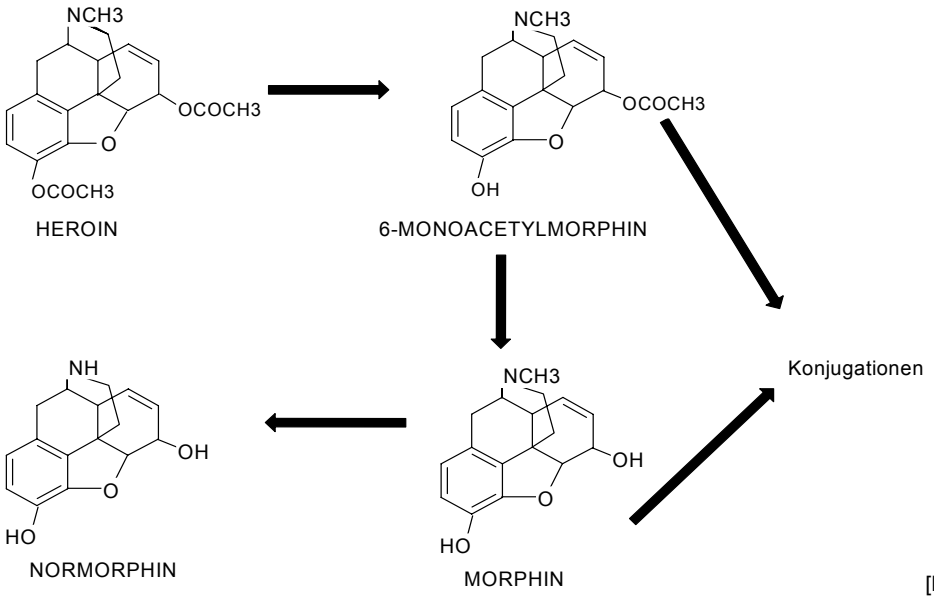
	Blut	**Leber**	**Muskel**	**Urin**
Morphin-Durchschnittswert	0.7	3.0	0.8	52
(Messbereich)	(0.2 – 2.3)	(0.4 – 18)	(0.1 - 2.0)	(14 - 81)

[Baselt, 2000]

1.1.2 Heroin (4,5α-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6α-diyldiacetat)

Heroin wurde erstmals 1874 aus Morphin synthetisiert.
Heroin wird vorwiegend halbsynthetisch durch Acetylierung der aus Rohopium gewonnenen Morphin-Base hergestellt. Nach Einweichung und Filtrierung des Rohopiums unter Hinzufügung von Löschkalk und Ammoniumchlorid besteht der wichtigste Produktionsschritt in einer Acetylierung der so entstandenen Morphin-Base. Dieser wird meist durch Verkochen der Morphin-Base mit Essigsäureanhydrid erreicht. Das nach der Acetylierung erhaltene Zwischenprodukt wird als Heroin-Base (Heroin Nr. 2) bezeichnet. Es folgen noch weitere Aufreinigungsschritte bis letztendlich das Heroin (Diacetylmorphin) durch Natriumcarbonat ausgefällt wird. Der letzte Produktionsschritt besteht im Hinzufügen von Salzsäure zur Salzbildung (Heroin-HCl) und von Kalk während des Trocknens. [Geschwinde, 1996]

Durch die Acetylierung der Hydroxy-Gruppen des Morphins wird die Lipophilie von Morphin erhöht. Je lipophiler ein Stoff ist, desto leichter kann die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden. Die Hauptwirkungen von Heroin beruht jedoch, mit Unterscheid zu Morphin auf der besseren Liquorgängigkeit.
Im Blut wird Heroin über 6-Monoacetylmorphin zu Morphin deacetyliert. Die erste Reaktion wird im Blut durch Esterasen katalysiert, die zweite Reaktion, also die Deacetylierung von 6-Monoacetylmorphin zu Morphin findet in der Leber statt. [Baselt, 2000]
Ebenfalls als ein Metabolit des Heroin ist Normorphin bekannt. Es entsteht jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz (4%).
Neben den schon erwähnten Metaboliten wird oftmals im Blut von Heroinkonsumenten geringe Mengen an Codein nachgewiesen.



[Baselt, 2000]

Abbildung 1: Metabolisierungsschritte von Heroin

Als Plasmahalbwertszeiten für Heroin in 6-Monoacetylmorphin werden in der Literatur ca. 2-9 Minuten nach intravenöser Applikation angegeben. [Peter X. Item, 1994] 6-Monoacetylmorphin wird anschließend durch Cholinesterase und spontaner Hydrolyse zu Morphin deacetyliert. Die Halbwertszeit von 6-Monoacetylmorphin beträgt 5-25 Minuten. [Burt M.J. et al 2001]

1.1.3 Morphin-3-Glucuronid

In der Leber findet eine Konjugation von Morphin mit Glucuronsäure statt. Bei dieser Reaktion einstehen zwei Glucuronide: Das 3-Morphinglucuronid, welches keine analgetische Wirkung besitzt, und das 6-Morphinglucuronid, dessen analgetische Wirkung die von Morphin um den Faktor 3-4 übersteigt. Die Ausscheidung erfolgt größtenteils renal und teilweise billiär. Die Konjugation mit Glucuronsäure erfordert aktivierte Glucuronsäure (UDPGA), die aus Glucose-1-Phosphat aufgebaut werden muss.

α-D-Glucose-1-P + UTP → UDP-α-Glucose (UDPG) + 2P

$UDPG + 2NAD^+ + H_2O \rightarrow$ UDP-α-Glucuronsäure (UDPGA) + 2NADH + $2H^+$

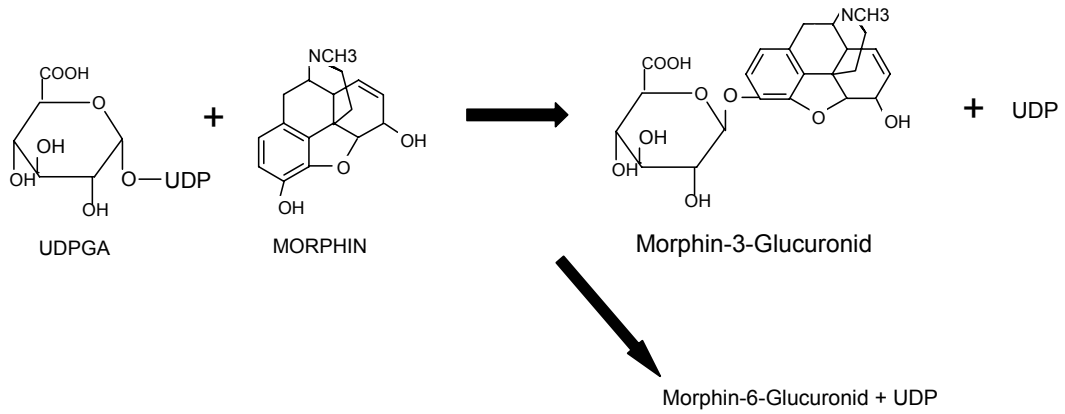
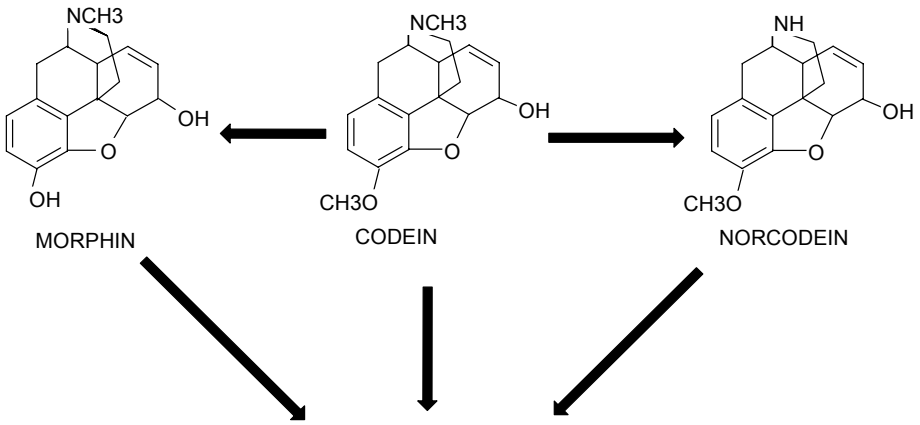


Abbildung 2: Glucuronidierung von Morphin im menschlichen Organismus

1.1.4 Codein (4,5α-Epoxy-3-methoxy-17-methyl-7-morphinen-6α-ol)

Codein ist ebenfalls ein Alkaloid aus dem Rohopium und wurde erstmals 1832 isoliert. Es handelt sich chemisch um Methylmorphin. Die analgetische Wirkung von Codein ist im Vergleich zu Morphin gering. Codein wird enteral gut resorbiert und nach der Resorption zu einem kleinen Teil im Organismus zu Morphin demethyliert. Im menschlichen Körper kann Codein über O-Demethylierung zu Morphin oder über N-Demethylierung zu Norcodein metabolisiert werden.



[Baselt,2000]

Abbildung 3: Metabolismus von Codein im menschlichen Organismus

Codein, Morphin und Norcodein können im Urin als reine Substanzen und konjugiert als Glucuronide nachgewiesen werden.
Über 95% einer Einzeldosis werden innerhalb von 48 Stunden mit dem Urin ausgeschieden. Die prozentuale Verteilung der Ausscheidungsprodukte für die ersten 24h beträgt ca. 50% in Form von Codein, etwa 15% als Nor-Codein und ca. 10% als Morphin. Alle drei Substanzen werden sowohl in freier, hauptsächlich aber in konjugierter Form als Glucuronide ausgeschieden.

Tabelle 2: Gemessene Codein-Konzentrationen bei Drogentoten (mg/l bzw. mg/kg)

	Blut	**Galle**	**Leber**	**Niere**	**Urin**
Codein-Durchschnittswert	2.8	18	6.8	12	104
(Messbereich)	(1.0-8.8)	(5.0-43)	(0.6-45)	(2.3-36)	(29-229)

[Baselt, 2000]

Codein wird neben Morphin ebenfalls durch Papaver somniverum L. produziert und ist somit als Nebenalkaloid nachweisbar. Für die Heroinherstellung wird nur Morphin benötigt, jedoch befindet sich zu einem geringen Prozentsatz ebenfalls Codein im Alkaloidgemisch, so dass bei Heroinkonsumenten im Gegensatz zu Morphinkonsumenten, z.B. Schmerzpatienten, neben dem typischen Abbauprodukt des Heroins, 6-Monoacetylmorphin, ebenfalls Codein in Blut- und Urinproben nachweisbar sind.

Für Codein lassen sich Halbwertszeiten im Bereich von 1,9-3,9 Stunden messen.

1.1.5 Methadon ((+/-)-6-Dimethylamino-4,4 diphenyl-3heptanon)

Bei Methadon handelt es sich um ein vollsynthetisches Opioid mit ausgeprägter analgetische Wirkung. Methadon ist vornehmlich ein μ-Agonist und hat qualitativ dieselben Effekte wie Morphin. Methadon ist im Vergleich zu Heroin hydrophiler, so daß ein rascher Konzentrationsanstieg im Gehirn nicht möglich ist. Die analgetische Wirksamkeit, Abhängigkeitsentwicklung und Atemdepression lässt sich primär auf die L-Form (Levomethadon) zurückführen. D-Methadon besitzt eine ausgeprägte antitussive Aktivität und im Wesentlichen etwa die äquivalente analgetische Wirkung wie Morphin. [Mutschler E., 1991]

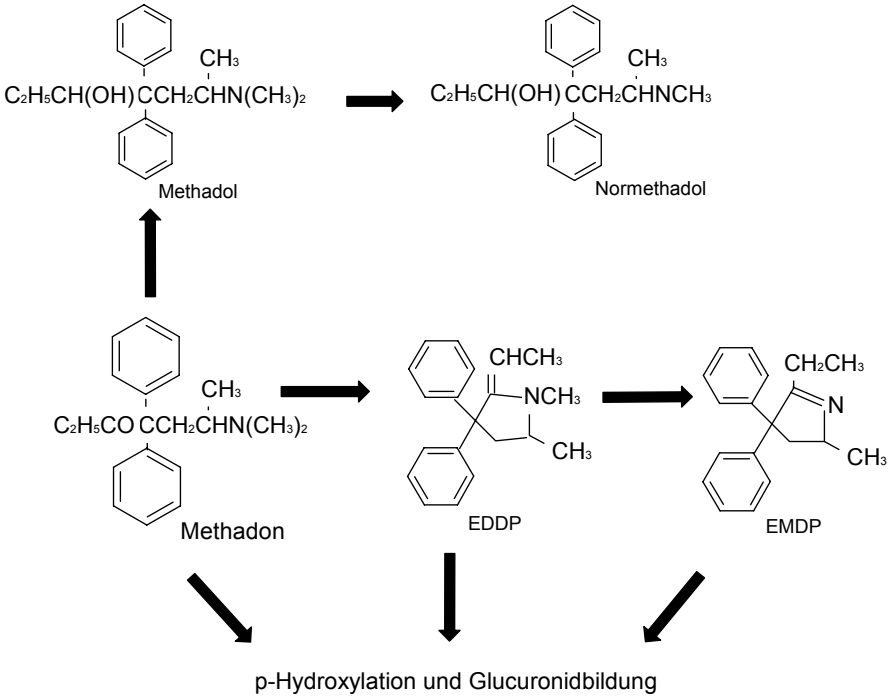
Methadon wird nach oraler Applikation schnell und fast vollständig absorbiert und kann nach ca. einer halben Stunde im Plasma nachgewiesen werden. Maximale Plasmakonzentrationen werden nach vier Stunden bei oraler Applikation gefunden. Die Bioverfügbarkeit beträgt ca. 80%.

Methadon wird an verschiedene Gewebsproteine - insbesondere im Hirn - gebunden. Dies erklärt die kumulativen Effekte und die langsame Elimination von Methadon.

Hauptmetabolisierungsschritte sind die N-Demethylierung und Cyclisierung von Methadon in der Leber unter Bildung von 2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) und 2-Ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrroline (EMDP).

Methadon, EDDP und EMDP können anschließend an einem der Phenylringe para-hydrolisiert werden und sind somit in der Lage eine glucuronide Konjugation auszuführen.

Die Ausscheidung erfolgt vor allem in Form dieser Metaboliten durch Harn und Galle. Neben EDDP und EMDP entstehen zusätzlich jedoch geringe Anteile an Methadol und Normethadol, wobei weder EDDP, EMDP, Methadol noch Normethadol pharmakologische Aktivitäten aufweist. [Baselt]



[Baselt, 2000]

Abbildung 4: Metabolismus von Methadon im menschlichen Organismus

Die Halbwertszeit von Methadon im Körper beträgt zwischen 15-55h. Da die Halbwertszeit unmittelbar von der Gebrauchshäufigkeit abhängt, ergeben sich die relativ hohen Schwankungen, so daß bei chronischen Gebrauch eine sehr geringe Halbwertszeit vorliegen kann.
Patienten, die mit Methadon behandelt werden, erhalten ca. 60-100mg Methadon als Tagesdosis. Eine Überdosis an Methadon kann neben einem Blutdruckabfall zu einer Atemdepression, Miosis, Schock, niedrige Körpertemperatur, Zyanose, Apnoe, Lungenödem, Koma und schließlich zum Tod führen.

Tabelle 3: Gemessene Methadon-Konzentrationen bei Drogentoten (mg/l bzw. mg/kg)

	Blut	**Gehirn**	**Galle**	**Leber**	**Niere**
Methadon-Durchschnittswert	1.0	1.0	7.5	3.8	2.9
(Messbereich)	(0.4-1.8)	(0.5-1.4)	(2.9-18)	(1.8-7.5)	(1.1-6.0)

[Baselt, 2000]

1.2 Beschreibung der ausgewählten Mikroorganismen

1.2.1 Staphylococcus aureus

Bei diesen gram-positiven Organismen handelt es sich um katalasepositive, fakultativ anaerobe, unbewegliche, nichtsporenbildene, haufenbildende Kokken. Staphylococcus aureus stellt sehr hohe Ansprüche an organische Nährstoffe, insbesondere Aminosäuren und B-Vitamine wie Thiamin und Nikotinsäure. Insbesondere ist er in der Lage eine Vielzahl von Enzymen wie Proteasen, Lipasen, Phospholipasen und Esterasen zu bilden. Verschiedene Zuckermoleküle, wie z. B. D-Trehalose, D-Mannose, D-Manitol, D-Turanose, Maltose, Saccharose und α-Lactose, können durch Staphylococcus abgebaut werden. Die Kardinaltemperaturen der Vermehrung liegen in einem Optimum von 35-37°C. Je nach Stamm kann eine Minimaltemperatur von 6,7-10°C erreicht werden. Bei 5°C und tiefer erfolgt langsames Absterben der Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert.
Das natürliche Habitat des Staphylococcus aureus ist die Haut von Mensch und Säugetier. Darüber hinaus kommen Staphylokokken aber auch auf den Schleimhäuten, in der Kehle, im Mund und im Darm vor. Auf der unverletzten Haut leben sie in symbiotischer Einheit mit dem Organismus. Kommt es zu einer Verletzung derer, so kann es zu einem Eindringen des Staphylococcus aureus kommen und zu einer pathogenen Entwicklung.
Da Staphylococcus aureus als Einziger der vier ausgewählten Mikroorganismen ein Vertreter der gram-positiven Bakterien ist, soll an dieser Stelle kurz auf den Unterschied zwischen gram-positiv und gram-negativ eingegangen werden.
Die Eigenschaft, nach dem von GRAM eingeführten Färbeverfahren dunkelviolett gefärbt zu werden oder nicht, ist ein wichtiges taxonomisches Merkmal, mit dem auch andere Eigenschaften der Bakterien korreliert sind. Das Ergebnis der Prozedur der Gram-Färbung unterscheidet sich bei gram-negativen und gram-positiven Bakterien darin, dass ein Farbkomplex, welcher durch bestimmte Reaktionsfolgen mit der Zellwandschicht der Bakterien entstand, sich bei gram-positiven Bakterien nicht durch eine Alkoholbehandlung auswaschen läßt. Der Farbkomplex wird in bzw. an der Zellwand lokalisiert vermutet. Die Zellwand gram-positiver Bakterien unterscheidet sich dadurch, dass ein 30-70%iges Mureinnetz an der

Trockenmasse der Zellwand beteiligt ist. Bei Staphylococcus aureus sind die Tetrapeptidseitenketten der Muraminsäure durch Interpeptidketten (z.B. Pentaglycinketten) miteinander verbunden. Die beteiligen Aminosäuren variieren von Spezies zu Spezies. In der Zellwand der gram-positiven Bakterien sind vorhandene Polysaccharide nur kovalent gebunden. Der Proteingehalt ist sehr gering, charakteristisch ist jedoch das Vorhandensein von Teichonsäuren. Bei gram-negativen Mikroorganismen sind dagegen weniger als 10% Murein an der Trockenmasse der Zellwand beteiligt. Der Aufbau des Mureinsacks ist bei allen gram-negativen Bakterien gleich. Neben diesem Stützskelett liegen große Mengen von Lipoproteinen, Lipopolysacchariden und anderen Lipiden vor. Sie sind kovalent gebunden und machen bis zu 80% der Trockenmasse der Zellwand aus.

1.2.2 Pseudomonas putida

Pseudomonas putida gehört wie Serratia marcescens und E. coli zu den gram-negativen Bakterien. Es handelt sich hier um stäbchenförmige Zellen, die entweder gerade oder leicht gekrümmt sind und polare Geißeln besitzen. Pseudomonas putida gehört zur Gruppe der Pseudomonaden, welche als natürliches Habitat in der Erde, im Frischwasser, in mariner Umgebung und in vielen organischen Materialien bzw. in Verbindung mit Pflanzen und Tieren gefunden werden können. Die Organismen dieser Gruppe sind chemoorganotroph, strikt aerob und können i.a. eine sehr große Zahl von organischen Substraten mit Ausnahme von C1-Verbindungen als C-Quelle und als Elektronendonatoren zur Energiegewinnung verwerten. Andererseits werden sie als im allgemeinen unfähig beschrieben, Polymere in die jeweiligen Bausteine zu zerlegen. Das heißt, Enzyme wie Proteasen, Amylasen usw. sind selten vorhanden. Zucker können allgemein über den Entner-Douderoff-Weg abgebaut werden. Die Pseudomonaden sind sehr potente Organismen im Mineralisierungsprozess von organischen Material. Als mögliche Wachstumstemperatur wird für Pseudomonas putida ein Bereich zwischen 5 – 40°C angegeben. [Schlegel, 1992]

1.2.3 Serratia marcescens

Serratia marcescens wird ebenfalls zur Familie der Enterobacteriaceae gezählt. Die gram-negativen Mikroorganismen sind peritrich begeißelt, und sind in der Lage u.a. Glucose zu fermentieren.

Serratia marcescens ist in der Umwelt weit vertreten. Der natürlicher Standort von Serratia marcescens ist Wasser, Erdboden und Nahrungsmittel. Die Kardinaltemperaturen von Serratia marcescens liegen im Bereich zwischen 5°C (Minimum) bis 50°C (Maximum). Das Optimum liegt bei 30-37°C. Serratia marcescens bildet typisch rote Pigmentierung ihrer Kolonien.

Als bevorzugter Nährstoff verstoffwechselt Serratia marcescens Saccharose und Sorbitol. Verschiedentlich wurde auch die Fermentation anderer Zucker durch S. marcescens beobachtet. [Murray et al,1999]

1.2.4 Escherichia coli (E.coli)

E.coli ein Vertreter aus der Gruppe der Enterobacter gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Alle Mitglieder der Enterobacter verfügen über Hämine. Das natürliche Habitat von E.coli ist der Darm sowohl von warmblütigen Tieren als auch von Menschen. Bei E.coli handelt es sich um ein stäbchenförmiges peritrich begeisseltes, heterofermentatives gram-negatives Bakterium, mit der Eigenschaft neben einer Vielzahl an anderen Zuckern auch Lactose zu verwerten.

Die Kardinaltempteraturen von E. coli befinden sich in einem Bereich von 8°C bis 45°C. Die höchste Vermehrungsrate (Optimum) von E.coli liegt zwischen 32-37°C. [Murray et al,1999]

1.3 Massenspektrometrie

Die Anwendung des Massenspektrometers ist für die Beantwortung vieler analytische Fragestellungen ein unverzichtbares Hilfsmittel, da dadurch die Möglichkeit geschaffen wird, die Massen von Atomen, Molekülen oder Atom-Clustern zu analysieren. Gekoppelt mit einem gaschromatographischen Trennsystem ergibt sich die Möglichkeit der Trennung und Quantifizierung von organischen Verbindungen.

Für die Massenspektrometrie werden eine Ionenquelle, ein massendispersives Element, Hochvakuum und einen Ionendetektor z.B. Channeltron, SE, Faraday-cup oder wie bei diesen Untersuchungen ein HED (High Energy Dynode) benötigt.
Die Ionenquelle dient dazu, die Moleküle, Atome o.ä. durch verschiedene Techniken zu ionisieren. Die entstandenen Ionen werden anschließend beschleunigt und durch Ionenoptiken erfolgt eine Bündelung. Verschiedene Methoden für die Ionisation sind möglich, wobei die Elektronenstoss EI (electron impact) Ionisation zur Detektion von toxikologisch relevanten Verbindungen die am meisten angewandte Methode ist. Das Hochvakuum wird benötigt, damit die erzeugten Ionen ohne Kollisionen und damit verbundenen Energieverlusten zum Detektor gelangen.
Die Ionenerzeugung bei der EI erfolgt durch ein senkrechtes Auftreffen des Molekülstrahls auf einen Elektronenstrahl (erzeugt durch eine Glühkathode). Die Energie der Elektronen kann durch die Wahl der Spannung zwischen Glühkathode und Anode variiert werden (0-300V), wobei in den meisten Fällen, wie auch für die analytischen Daten dieser Arbeit, 70eV verwendet wird. Durch die Wechselwirkungen von Elektronen mit Molekülen entstehen positive Molekül-Ionen in Form von:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$

oder seltener

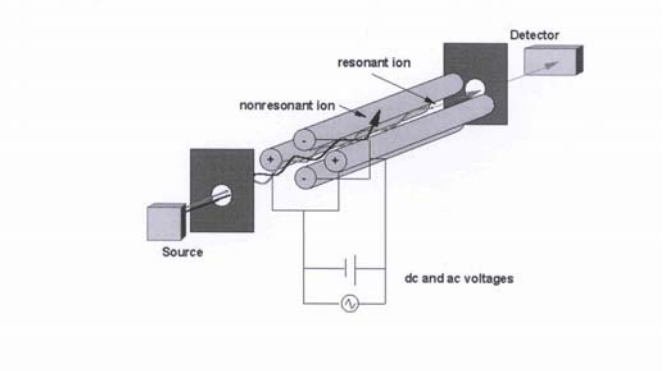
$$M + e^- \rightarrow M^{2+} + 3e^-$$

Die entstandenen Molekül-Ionen werden anschließend mit 2 – 30 keV beschleunigt und von elektrostatischen Feldern gebündelt.

Als massendispersive Elemente kann neben Quadrupol auch ein Magnetsektorfeld etc. dienen.

Das Prinzip eines Massenspektrometers beruht meist auf der Bewegung geladener Teilchen in elektrischen und magnetischen Feldern. Die für eine gegebene spezifische Ladung q/m wohldefinierten Trajektorien werden dabei zur Massenselektion ausgenutzt. Die gebräuchlisten Massenspektrometer sind das Sektormagnet-Massenspektrometer, das Flugzeit-Massenspektrometer, das Quadrupol-Massenspektrometer und das Wien-Filter. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Quadrupol-Massenspektrometer verwendet, weswegen in dieser Arbeit detaillierter auf die Grundlagen dessen eingegangen werden soll.

Ein Quadrupol-Massenspektrometer besteht aus vier parallelen Metallstäben, die wie in der Abbildung angeordnet sind.

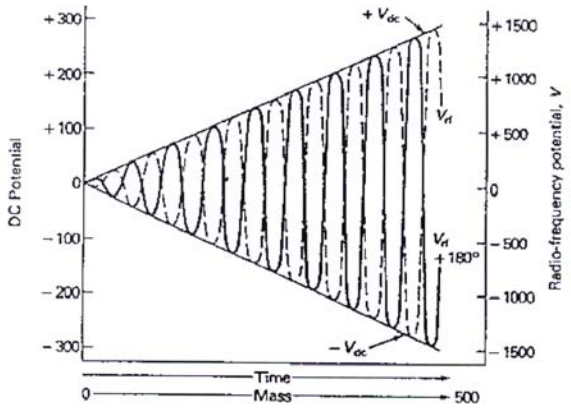


[Hübschmann,1996]

Abbildung 5: Auffbau eines Quadrupol-Massenspektrometers

An zwei entgegengesetzten Stäben liegt eine positive Spannung (U+V*cos(ωt)), an den beiden anderen Stäben die negative Spannung -(U+V*cos(ωt)), wobei U der Gleichspannungsanteil darstellt und V*cos(ωt) den Wechselspannungsanteil angibt. Die angelegten Spannungen bestimmen die Trajektroien der Ionen, die sich entlang der Flugstrecke im Zentrum zwischen den vier Stäben bewegen.
Das elektrische Quadrupolfeld, das sich ausbildet, kann mit den Mathieuschen Differentialgleichungen beschrieben und berechnet werden. Aus den Lösungen dieser Differentialgleichungen folgt, dass man die

Spannungen an den Quadrupolstäben der Art einstellen kann, dass nur Ionen mit einem bestimmenten Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) stabile Bahnen auf ihrem Weg durch den Analysator beschreiben und den Detektor erreichen. Alle anderen Ionen beginnen zu oszillieren, bewegen sich also auf instabilen Bahnen, so dass ihre Amplitude stetig exponentiell wächst, diese dann an die Quadrupolstäbe geraten, dort entladen, und somit nicht mehr erfassbar sind.
Zur Massenselektion variiert man die Gleichspannung U und die Amplitude V der Wechselspannung in einem bestimmten festen Verhältnis U/V=konstant; die Frequenz bleibt konstant.



[Hübschmann, 1996]

Abbildung 6: Spannungsverlauf beim Quadrupolmassenspektrometer

Außer den ionisierten Molekülen (Molekülpeak) können in der Massenspektrometrie auch Fragmente dieser registriert werden. Die Fragmentbildung hängt sehr stark von der gewählten Ionisationsmethode ab. Der Vollständigkeitshalber soll hier auch die Chemische Ionisation CI genannt werden.
Bei der EI ist eine stärkere Fragmentierung gegeben als bei der Chemischen Ionisation.
Die Art der Fragmentierung läßt auch Rückschlüsse auf die Bindungsstärken zwischen funktionellen Gruppen oder Adsorbat-Substrat zu. Indirekt läßt die Fragmentierung sogar Aussagen über die Struktur von Molekülen zu.
Zwei Betriebsarten sind mit dem Massenspektrometer möglich. Zum einem der sogenannte Scan-Mode (TIC Total Ion Current), bei dem eine

kontinuierliche zeitliche Veränderung der Spannungen U bzw. V zum Scannen eines Massenbereichs z.B. 50-550amu durchgeführt wird. Die dadurch erzeugten Massenspektren können anschließend mit der Bibliothek zur Substanzidentifikation bzw. zur manuellen Auswertung verwendet werden. Neben dem Scan-Mode gibt es auch noch die Möglichkeit des SIM-Modes (single ion monitoring). Durch das Anlegen bestimmter Spannungen und damit bestimmter Massen ist eine quantitative Bestimmung der Substanzen möglich. Im SIM-Mode erfolgt eine größere Verweildauer auf den betreffenden Massen, so dass eine höhere Empfindlichkeit als beim Scan-Mode erreicht wird.
Zeigen Molekülgruppen charakteristische Fragmentmassen, so kann das MS im SIM-Modus betrieben werden. Durch die Beschränkung auf eine oder wenige Fragmentmassen kann die Nachweisstärke erheblich gesteigert werden.
Target-Ion: Unter einem Target-Ion versteht man ein Ion, welches charakteristisch für die zu untersuchende Substanz ist. Das resultierende Ionenchromatogramm, basierend auf dem Target-Ion, wird für die Quantifizierung verwendet.
Qualifier-Ion: Ein Qualifier-Ion wird zur Identifizierung einer Substanz verwendet. Das Qualifier-Ion ist für die gesuchte Substanz sehr spezifisch, so dass dadurch die Identifizierung des gesuchten Moleküls stattfinden kann.
Klassisch werden in der massenspektrometrischen Analytik ein Target und zwei Qualifier-Ion im SIM-Modus verwendet.

1.4 Elimination von Pharmaka im Organismus

Nach der Aufnahme (Resorption) verteilt sich das Pharmakon mit dem Blut im Organismus. Dabei ist die an den eigentlichen Wirkort gelangende Menge oft nur gering, erhebliche Anteile können im Plasma und an Körpergeweben gebunden oder gespeichert werden. Die Konzentration am Wirkort resultiert aus dem Zusammenspiel von Resorption, Verteilung und Elimination. Von besonderer Bedeutung dafür, dass z.B. ein Opiat seinen Wirkort erreicht, ist seine Fähigkeit, biologische Membranen zu permeieren, da es sowohl bei der enteralen Resorption, d.h. der Überwindung der Darmschleimhaut, wie auch bei der Verteilung, z.B. beim Verlassen der Blutbahn durch die Kapillarwand, und bei der Elimination, z.B. Sekretion durch die Tubulusepithelien der Niere oder Aufnahme in die Leberzelle, biologische Membranen permeieren muß.

Hauptmerkmal aller biologischen Membranen ist ihre Eigenschaft für lipophile Stoffe gut durchlässig zu sein.

Für die Umsetzung von Pharmaka steht die Aktivität in der Leber ganz im Vordergrund. Die Voraussetzungen für die Biotransformation sind in der Leber im Allgemeinen besonders günstig, denn die Leber gehört zu den am besten durchbluteten Geweben. Das lockere Lückenendothel der Sinusoiden und die porenreiche Membran der Parenchymzellen ermöglichen einen intensiven Stoffaustausch. Das glatte endoplasmatische Retikulum, das aus dem mit Ribosomen besetzten rauhen endoplasmatischen Retikulum entsteht, stellt ein System von Kanälchen und Bläschen dar, das in Verbindung mit den Lamellen des Golgi-Apperates und der Kernmembran steht. Qualitativ unterscheiden sich die Membranen des rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulums nicht, aber bestimmte Enzyme liegen in letzerem in höherer Konzentration vor. Am wichtigsten sind die Monooxygenasen, Epoxidhydrolasen und die Glucuronyltransferasen. Die Funktion der Membran liegt darin, dass lipoidlösliche Stoffe aus der Zelle aufgenommen und in wasserlöslicher Form abgegeben werden, so dass ein Ausscheiden über den Harn möglich wird.

Die Membran zwischen Blut und Leber weist für diesen Zweck einen sehr hohen Porenanteil auf, die zusätzlich die Eigenschaft besitzen eine gewisse Weite zu haben, so dass Makromoleküle ebenfalls durchtreten können. Der Unterschied zwischen der Permeation hydrophiler und lipophiler Teilchen ist in der Leber wesentlich geringer als an biologischen Membranen anderer Organe. Das bedeutet, dass die Leberzelle für die meisten Pharmaka leicht zugänglich ist. [Forth W., et al. 1993] Diese Eigenschaft ist vor allem für die Elimination von Fremdstoffen aus dem Körper wichtig, so dass die Leber darin eine entscheidende Rolle spielt.
Um Fremdstoffe aus dem Organismus zu eliminieren, stehen dem Körper verschiedene Möglichkeiten offen, die in zwei große Reaktionsgruppen eingeteilt werden können: Biotransformation und Ausscheidung.
Bei der Biotransformation lassen sich wiederum zwei Arten von Reaktionen unterscheiden: Funktionalisierungsreaktionen und Konjugationen. Beide werden im Folgenden näher beschrieben.

Funktionalisierungsreaktionen: Bei ihnen werden durch Reaktionen an der Ausgangsverbindung funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt. Sie werden Phase-I-Reaktionen genannt und beeinflussen meistens die Wirkung. z. B. Oxidationen, Reduktionen, Hydrolyse.
Typische Vertreter der Funktionalisierungsreaktionen sind Monooxygenasen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die gemeinsam als Cytochrom P-450 bezeichnet werden. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Sauerstoffatom aus dem molekularen Sauerstoff auf ihr Substrat übertragen. Das Andere wird zu Wasser reduziert. Monooxygenasen gehören zu den in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums gebundenen Enzymen.
Viele dieser Phase-I- Reaktionen finden im hepatischen Gewebe statt, so dass ein Nachweis von Pharmaka bzw. Abbauprodukte von Pharmaka in der Leber gut möglich ist.

Konjugationen: Bei ihnen werden an die (häufig in Phase I geschaffenen) funktionellen Gruppen Reste gekoppelt, die aus dem Intermediärstoffwechsel zur Verfügung gestellt werden müssen. In der

Regel entstehen bei diesen Phase-II-Reaktionen biologisch inaktive und wasserlösliche Produkte. z.B. Konjugation mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Carbonsäuren, Aminosäuren, Glutathion. [Forth W., et al. 1993] Konjugationen bzw. Phase-II Reaktionen mit Glucuronsäure finden bevorzugt im endoplasmatischen Retikulum der Leber aber auch in der Darmschleimhaut statt und erfordern aktivierte Glucuronsäure, die aus Glucose-1-phosphat aufgebaut werden muß. So werden z. B. Morphin, Phenole, Salicylate usw glucuronidiert.

Die Konjugationen, die durch Schwefelsäure, Glutathion oder durch Amidsynthese und Methylierungen entstehen, sind für die Problematik dieser Arbeit nicht wesentlich, so dass auf diese nicht näher eingegangen wird.

Da vor allem Opiatwirkstoffe durch Konjugation mit Glucuronsäure ausgeschieden werden können, soll dieser Stoffwechselvorgang hier besondere Erwähnung erhalten. Am Wichtigsten für den Stoffwechselvorgang sind die membrangebundenen Glucuronyltransferasen der Leber. Sie übertragen aktivierte Glucuronsäure auf verschiedene Substrate, z.B. Opiate. Die aktivierte Glucuronsäure muß unter Aufwendung von Stoffwechselenergie aus Glucose-1-phosphat aufgebaut werden. Dies geschieht im Cytoplasma. Sie kann dann unter anderem auf alkoholische Gruppen übertragen werden.

Gegenspieler zu den Glucuronyltransferasen sind die β-Glucuronidasen, welche als bakterielle Enzyme im Darm eine Rolle spielen, und von denen bekannt ist, dass sie nach dem Tod vom Darm aus in verschiedene Gewebeteile gelangen können.

Diese Enzyme haben die Eigenschaft den Glucuronsäure-Rest hydrolytisch abzuspalten, so dass das freie Pharmakon wieder vorliegt. Dieser Aspekt spielt vor allem bei der Frage eine Rolle, in wieweit die Nachweisbarkeit der Opiate bzw. Opioide mit der Lagerzeit der Leichen zusammenhängt.

1.5 Leber

1.5.1 Aufbau der Leber

Etwa 1500g wiegt die Leber bei einem ausgewachsenen Menschen [Waldeyer, 1973]. Der größte Teil der Oberfläche wird von Serosa, dem Bauchfell, überzogen. Unter ihm liegt eine bindegewebige Kapsel, Capsula fibrosa perivascularis. Diese ist an jener Stelle, wo das Bauchfell fehlt, besonders stark. Die Leber besteht aus einer sehr großen Zahl von kleinen Läppchen, Lobuli hepatis. Sie haben 1-2mm Durchmesser, abgeplattete Flächen (für Anlagerung von Nachbarläppchen) und besitzen zentral eine Vene, die Venae centralis. Jeder Lobulus besteht aus einer großen Zahl von Leberzellbalken, die von der Peripherie radiär zur Venae centralis ziehen. Diese Zellbalken hängen untereinander zusammen. Zwischen ihnen verläuft ein radiäres Kapillarnetz, das das Blut der Pfortader- der Leberarterienäste zur abführenden V. centralis leitet. Die Blutkapillaren sind durch den spaltförmigen Disséschen Raum von den Leberzellen getrennt. Diese ragen mit zahlreichen Mikrovilli in den Raum, wodurch ein reger Stoffaustausch ermöglicht wird. Die Wand der Kapillaren besteht aus einem feinen Gitterfasernetz und Endothelzellen. Die Endothelien erscheinen im Schnitt teilweise als Sternzellen. Diese können Fremdstoffe speichern, sich ablösen und ins strömende Blut gelangen. [Ehlert, 1982]

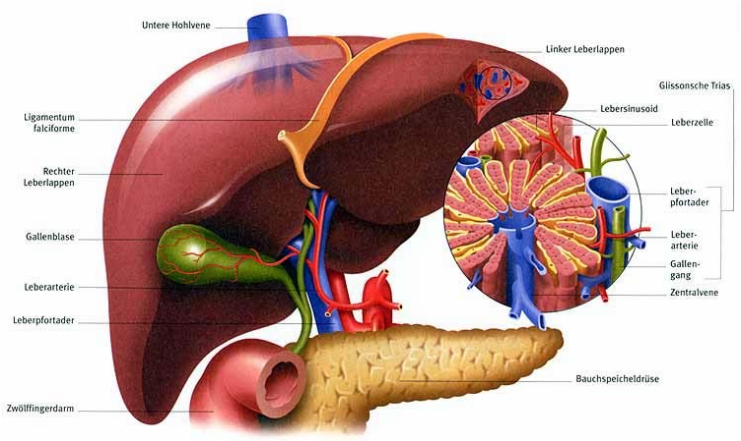
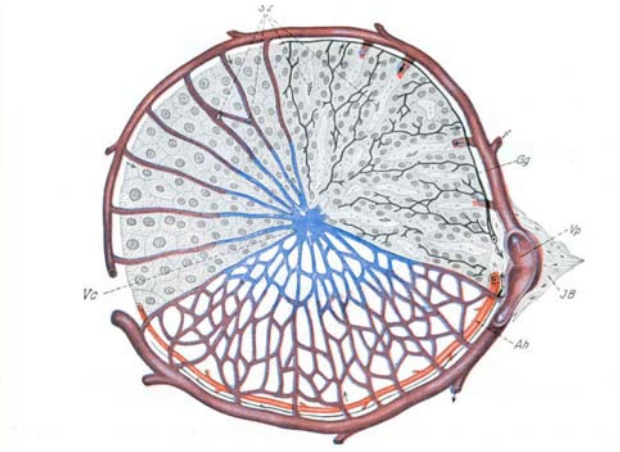


Abbildung 7: Aufbau der menschlichen Leber



[Waldeyer1973]

Im Querschnitt sind besonders hervorgehoben links oben die Leberzellbalken, rechts oben die Gallenkapillaren, unten die Blutkapillaren. Eine Anzahl von Pfeilen soll die Strömungsrichtung betonen.

Ah = A. hepatica	SZ = Sternzellen
Vc = V. centralis	Gg = Gallengang
Vp = Vena portae	JB = interlobuläres Bindegewebe

Abbildung 8: Aufbau einer menschlichen Leberzelle

1.5.2. Funktion der Leber

Das vom Magendarmkanal, Milz und Pankreas kommende Blut wird durch die Pfortader der Leber zugeführt. Es enthält sehr viele aus dem Darmkanal resorbierte oder aus der Milz ausgeschiedene Stoffe, die in der Leber verarbeitet, gespeichert oder ausgeschieden werden. Die Blutmenge der Leber ist großen Schwankungen unterworfen. Ungefähr 20% der Gesamtblutmenge des Körpers können bei starker Arbeit in die Vena cava inferior schubweise abgegeben werden (Blutspeicher). Die Leber wird dabei sichtbar kleiner. [Waldeyer 1973].

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Abbau von Pharmaka. Diese werden von der Leber aufgenommen, abgebaut und ausgeschieden. Die Leber befindet sich zwischen den Darm und dem übrigen Organismus, so dass sie als Filter wirken kann und z.B. verhindert, dass Bakterien aus dem Darm in die Blutbahn gelangen können. [Prof. Dr. med. J. Reichen; Universität Bern, unveröffentlicher Befund]

1.6 Leichenprozesse bzw. -veränderungen

Man unterscheidet in der Systematik herkömmlicherweise die Autolyse, darunter versteht man die mikrobiell noch nicht beeinflußte, also im wesentlichen durch Eigenenzyme des Körpers ausgelöste Prozesse, und die eigentliche Leichenfäulnis. Bei der Leichenfäulnis spielen hauptsächlich die bakteriell ausgelösten Prozesse eine Rolle. In der Spätphase der Leichenzersetzung, nachdem die mehr reduktive, kolliquative Fäulnisperiode mit weitgehendem Flüssigkeitsverlust abgeklungen ist, tritt unter ariden Verhältnissen ein mehr oxidativer Zerfall der trockenen Gewebsreste in den Vordergrund, den man als Verwesung bezeichnet. Da in dieser Arbeit auf die Austrocknung der Asservate verzichtet wurde, spielt diese Art der Leichenveränderung hier keine entscheidende Rolle, so dass auf eventuelle Veränderungen der eingesetzten Drogen ausgelöst durch diesen Prozess nicht näher eingegangen wird.

Autolytische Vorgänge:

Reine autolytische Vorgänge finden in der Praxis nicht statt, es kann eher von einer Mischung der einzelnen oben genannten Prozesse gesprochen werden. Neben der Epidermolyse und allgemeinen Erweichung der inneren Organe fallen als autolytische Vorgänge besonders die Hämolyse, die Entwicklung von Transsudaten und die Flüssigkeitsdurchtränkung der Zwischengewebe auf.

Den primär autolytischen Veränderungen an der Leiche liegt ein frühzeitiges Durchlässigwerden aller Grenzflächen zugrunde. Der Zusammenbruch der Membranpotentiale gibt den Weg für einen Elektrolytausgleich frei. Im Leichenblut finden sich ferner viele Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen gegenüber den Werten lebender gesunder Personen erhöht (z.B. alkalische Phosphatase, Pyruvatkinase, LDH), wofür ebenfalls der postmortale Fortfall der Permeabilitätsschranken in den angrenzenden Geweben verantwortlich gemacht wird. Manche Enzyme zeigen postmortal verstärkte, andere verminderte Aktivität. Die Autolyse ist entsprechend dem Aktionsoptimum der meisten Enzyme bei Temperaturen von 34-40°C am stärksten, so dass abhängig von der Temperatur stärkere oder schwächere Autolysereaktionen auftreten können.

Durch die autolytischen Veränderungen werden die Gefäßwände durchlässig, so dass für Mikroorganismen die Möglichkeit besteht aus dem Darmgewebe auszutreten und in das umliegende Gewebe zu wandern. Die autolytischen Veränderungen spielen somit im Prozess der Fäulnis und der Verwesung eine wesentliche Rolle.

Fäulnis und Verwesung:

Die Fäulnis ist ein im wesentlichen bakterieller Vorgang, wobei die Frage, inwieweit die Stoffwechseltätigkeit der Bakterien selbst den Abbau der Leibessubstanz herbeiführen, und in welchem Umfang während der durch die Bakterientätigkeit bewirkten physikalisch-chemischen Alterationen freigesetzte körpereigene Enzyme mitwirken, noch nicht vollständig geklärt ist.

Die Kenntnis der Fäulnis-Bakteriologie der menschlichen Leiche beruht auf wenige Arbeiten [Mueller 1975]. Wobei hier vor allem Sporenbildner aus der Mesentericus-Subtilisgruppe, Mikrokokken, E.coli und auch B. proteus, S. marcescens, Enterokokken und aerobe Sporenbildner von Bedeutung sind. Als wichtige Keime der Fleischfäulnis sind ferner auch Pseudomonas fluorescens, Bacterium putridus verrucosus, Bacterium amylobacter, Bacterium parasarcphysemator und Clostridium aerofoetidum bekannt.

Des weiteren besteht die Möglichkeit, dass im Verlauf der späteren Fäulnisstadien wechselnde Mikroorganismen dominieren, wobei Untersuchungen hierzu bislang nicht publiziert sind.

Die Bakterien wachsen in den Gefäßen, vielfach vom Bauchraum ausgehend, in die Peripherie. Herzblutuntersuchungen von der Leiche liefern oft nach 12, stets nach 36 Std. positive Kulturen. In der Leber wurde in der Mehrzahl der Fälle nach 10 Std. E.coli nachweisbar. [Melvin et al., 1984]

Über die Beteiligung von Hefen innerhalb der Leichenflora ist wenig bekannt.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Stabilität von Morphin, Codein, Morphinglucuronide und Methadon in Leber und Herzblut bei Drogentoten. Dabei sollten verschiedene Lagerungstemperaturen gewählt werden, so dass sowohl die Stabilität bei Umgebungstemperaturen +/- 20°C als auch bei Kühlschranktemperaturen +/- 6°C erfasst werden konnte. Gerade im Bezug auf Kühlschranktemperaturen sollen so Ergebnisse erhalten werden, die im Laboralltag für die Probenaufbewahrung von Bedeutung sind.

Die Proben wurden dabei luftdicht verschlossen, damit kein Austrocknen bzw. Austausch mit der Umgebung stattfinden kann und dunkel bei den jeweiligen Temperaturen gelagert.

Zu Beginn der Lagerung wurden Wassergehalt und Bakterienstatus erfasst. Die Art der Mikroorganismen sollten erfasst werden, um den möglichen Einfluss der Mikroorganismen zu verifizieren.

Zusätzlich sollten invitro Versuche mit ausgewählten Mikroorganismenstämme und mit Morphin, Codein, Morphinglucuronid bzw. Methadon gespikten Bouillions durchgeführt werden.

2. Materialien und Methoden

A. Bestimmung von Morphin, Codein und 3ß-Morphinglucuronid

A.2.1. Chemikalien, Geräte, Trennbedingungen

A.2.1.1. Verwendete Chemikalien

A.2.1.1.1 Verwendete Chemikalien für den chemisch-analytischen Teil

0,1m Phosphatpuffer pH 6	
Methanol HPLC grade	Merck Darmstadt
Glycinpuffer pH 8,5	
Natriumhydrogencarbonat-Puffer gesättigt pH 8,5	
Salzsäure 25%	Merck Darmstadt
Kaliumhydroxid-Lösung 10 molar	
0,1m Acetatpuffer	
Dichlormethan	Merck Darmstadt
Isopropanol	Merck Darmstadt
Ammoniak p.a. 25%	Merck Darmstadt
Perfluorpropionsäureanhydrid 99%	Sigma-Aldrich Steinheim
2,2,3,3,3,-Pentafluorpropanol	Sigma-Aldrich Steinheim
Essigsäureester	Merck Darmstadt

A.2.1.1.2 Verwendete Chemikalien für den mikrobiellen Teil

0,9% NaCl-Lösung	B. Braun Melsungen AG

A.2.1.2. Verwendete Standards

A.2.1.2.1 Verwendete Standards für den chemisch-analytischen Teil

D_3-Morphin	Cerilliant, Texas
Morphin	Cerilliant, Texas
D_3-Codein	Cerilliant, Texas
Codein	Cerilliant, Texas

A.2.1.2.2 Verwendete Standards für den mikrobiellen Teil

D_3-Morphin	Cerilliant, Texas
Morphin	Cerilliant, Texas
D_3-Codein	Cerilliant, Texas
Codein	Cerilliant, Texas
Morphin-3-Glucuronid	Cerilliant, Texas

A.2.1.3 Festphasenextraktionssäulen und Zubehör

C18-Phase	Bond Elute Certify Varian

A.2.1.4 Weitere Geräte und Hilfsmittel

A.2.1.4.1 Weitere Geräte und Hilfsmittel für den chemisch-analytischen Teil

Festphasenextraktionsstation	J.T. Baker, Deventer
Magnetrührer	IKA Labortechnick, Staufen
Diverse Glasgeräte aus Duranglas	Schott, Mainz

A.2.1.4.2 Weitere Geräte und Hilfsmittel für den mikrobiellen Teil

Densidomat	Biomerieux SA France
Zentrifuge	Multifuge 3L Heraeus
Raumluftbrutschrank	Heraeus Instrument B 6420

A.2.1.5 Gaschromatograph mit Massenspektrometer

A.2.1.5.1 Geräte

HP 6890	Agilent Technology, Waldbronn
Split/Splitless Injektion	Agilent Technology, Waldbronn
Autosampler HP 7683	Agilent Technology, Waldbronn
Detektor HP 5973 MS	Agilent Technology, Waldbronn
Auswertung über HP-Chemstation	
Version Rev. A.09.xx	Agilent Technology, Waldbronn

A.2.1.5.2 Chromatographische Trennbedingungen

Probenaufgabe:	1µl, splitless
Kapillarsäule:	Ultra 2 (Crosslinked 5% Phenyl-Methyl- Siloxane: 30m * 0,2mm * 0,33µm)
Trägergas:	Helium 1ml/min
Temperaturprogramm:	100°C (2min) → 15°C/min →280°C → 280°C (5min)
Transferline:	280°C
Detektor:	280°C

A.2.1.6 Mikrobielle Nährboullions

Hirn-Herz.Boullion	heipha Diagnostika
Thioglycollate-Medium	BBL
Müller-Hinton II Broth	BD Becton, Dickinson and Company

A.2.1.7 Verwendete Kulturen

Staphylococcus aureus	ATCC 29213
Escherichia coli	ATCC 25922
Serratia marcescens	ATCC 13880
Pseudomonas putida	Patientenstamm

B. Bestimmung von Methadon

B.2.2. Chemikalien, Geräte, Trennbedingungen

B.2.2.1 Verwendete Chemikalien

0,1m Phosphatpuffer pH 6	
Methanol HPLC grade	Merck Darmstadt
1 molare Essigsäure	
Ammoniak p.a. 25%	Merck Darmstadt
Essigsäureester	Merck Darmstadt

B.2.2.2. Verwendete Standards

B.2.2.2.1 Verwendete Standards für den chemisch-analytischen Bereich

D_9-Methadon	Cerilliant, Texas
Methadon	Cerilliant, Texas

B.2.2.2.2 Verwendete Standards für den mikrobiellen Bereich

D_9-Methadon	Cerilliant, Texas
Methadon	Cerilliant, Texas

B.2.2.3. Festphasenextraktionssäulen und Zubehör

C18-Phase	Bond Elute Certify Varian

B.2.2.4. Weitere Geräte und Hilfsmittel

B.2.2.4.1 Weitere Geräte und Hilfsmittel für den chemisch-analytischen Bereich

Festphasenextraktionsstation	J.T. Baker, Deventer
Magnetrührer	IKA Labortechnick, Staufen
Diverse Glasgeräte aus Duranglas	Schott, Mainz
Ultraschallgerät	Bandelin Sonorex RK 255

B.2.2.4.2 Weitere Geräte und Hilfsmittel für den mikrobiellen Bereich

Densidomat	Biomerieux SA France
Zentrifuge	Multifuge 3L Heraeus
Raumluftbrutschrank	Heraeus Instrument B 6420

B.2.2.5 Gaschromatograph mit Massenspektrometer

B.2.2.5.1 Geräte

HP 6890	Agilent Technology, Waldbronn
Split/Splitless Injektion	
Autosampler HP 7683	Agilent Technology, Waldbronn
Detektor HP 5973 MS	Agilent Technology, Waldbronn
Auswertung über HP-Chemstation	
Version Rev. A.09.xx	Agilent Technology, Waldbronn

B.2.2.5.2 Chromatographische Trennbedingungen

Probenaufgabe:	1µl, splitless
Kapillarsäule:	Ultra 2 (Crosslinked 5% Phenyl-Methyl- Siloxane: 30m * 0,2mm * 0,33µm)
Trägergas:	Helium 1ml/min
Temperaturprogramm:	100°C (2min) → 15°C/min →280°C → 280° (5min)
Transferline:	280°C
Detektor:	280°C

B.2.2.6 Mikrobielle Nährboullions

Hirn-Herz.Bouillon	heipha Diagnostika
Thioglycollate-Medium	BBL, Decton Dickinson and Company
Müller-Hinton II Broth	BD Becton, Dickinson and Company

B.2.2.7 Verwendete Kulturen

Staphylococcus aureus	ATCC 29213
Escherichia coli	ATCC 25922
Serratia marcescens	ATCC 13880
Pseudomonas putida	Patientenstamm

2.3 Probengewinnung

Tabelle 4: Informationen zu den verwendeten Proben

Proben-Nr.	Auffindezeit	Probenerhebung	Toxikologisches Ergebnis (Matrix: Schenkelvenenblut)
1	27.12.2001	02.01.2002	Methadon, Cannabinoide
7	10.01.2002	10.01.2002	Methadon, Opiate
31	20.02.2002	22.02.2002	Benzodiazepine, Methadon, Cannabinoide
39	01.03.2002	04.03.2002	Methadon
52	25.03.2002	26.03.2002	Methadon
107	23.06.2002	25.06.2002	Methadon, Cannabinoide
136	16.08.2002	20.08.2002	Opiate, Benzodiazepine
142	25.08.2002	27.08.2002	Opiate, Benzodiazepine
145	28.08.2002	29.08.2002	Methadon, Benzodiazepine
148	30.08.2002	02.09.2002	Opiate
149	31.08.2002	03.09.2002	---
165	03.10.2002	04.10.2002	Opiate, Cocain
180	01.11.2002	05.11.2002	Opiate, Cannabinoide
193	17.11.2002	19.11.2002	Opiate, Methadon
196	18.11.2002	21.11.2002	Methadon, Cannabinoide
207	07.12.2002	08.12.2002	Methadon, Benzodiazepine, Cannabinoide
4	12.01.2003	14.01.2003	Opiate
28	25.02.2003	27.02.2003	Opiate, Cocain
46	28.03.2003	31.03.2003	---

---: keine Drogen bzw. Medikamente nachweisbar.

2.4 Verwendetes Untersuchungsmaterial

2.4.1 Herzblut

Das direkt bei der Obduktion asservierte Herzblut wurde sofort bei –20°C gelagert, um es dann später auf zwei Gefäße aufzuteilen. Diese wurden dann bis zu den eigentlichen Messungen bei 20°C +/- 5°C bzw. +6°C +/- 2°C unter Lichtausschluß gelagert.
Zusätzlich wurde drogenfreies Herzblut mit definierten Konzentrationen an Morphin-HCl, Codein-Monohydrat, 3-β-Morphinglucuronid und Levomethadon gespikt, und unter den selben Bedingungen wie oben beschrieben gelagert.
Da der Wassergehalt von Probe zu Probe sehr variieren kann, und sich dadurch die ermittelten Ergebnisse der einzelnen Proben nicht vergleichbar wären, wurde von jeder untersuchten Herzblutprobe einmal der Wassergehalt bestimmt. Die analytisch ermittelten Ergebnisse wurden dann auf die Trockenmasse der zu untersuchenden Substanz berechnet. Die Proben wurden nach der Bestimmung des Wassergehaltes in luftdicht verschlossenen Behältern bei den zwei verschiedenen Temperaturen gelagert. Der Wassergehalt der Proben wurde gravimetrisch ermittelt. Dafür wurden von jeder Herzblutprobe 100µl eingewogen und für 24h im Trockenschrank bei 65°C gelagert. Nach anschließendem Abkühlen wurde die Probe gewogen und die Differenz als % Wassergehalt berechnet.
Da alle Proben in luftdicht verschlossenen Behältern gelagert wurden, konnte der Wassergehalt als eine konstante Größe für die späteren Berechnungen verwendet werden.
Weil ein möglicher mikrobieller Einfluß nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde zu Beginn der Lagerung der Mikroorganismenstatus aller Blutproben bestimmt. Dies erfolgte durch einen 3 Ösenausstrich auf verschiedene für bestimmte Mikroorganismengruppen geeigneten Nährböden(Blut-Agar, Schädler Agar, MCConkey-Agar). Die Auswertung dieser ermittelten Mikroorganismenstämme erfolgt in Kapitel 4.
Die Lagerung der Herzblutproben erfolgte dann über insgesamt 12 Monate. Die analytische Bestimmung wurde zunächst alle 4 Wochen später dann nach ca. 6 Monaten durchgeführt.
Vor jeder Messung wurden die Proben gründlich homogenisiert.

2.4.2 Leber

Die bei der Obduktion asservierten Lebergewebe wurden wie das Herzblut bis zum Beginn der Lagerung bei –20°C tiefgefroren. Zusätzlich wurde drogenfreies Lebergewebe, welches mit einer definierten Menge an Morphin-HCl, Codein-Monohydrat, 3-β Morphinglucuronid und Levomethadon gespikt.

Zur Vorbereitung der Lagerung wurden die Leberasservate aufgetaut und anschließend homogenisiert. Da auch hier der Einfluß der Lagerung auf die Stabilität der Pharmaka geprüft werden sollte, wurde jeweils ein Teil des homogenisierten Lebergewebes in einem entsprechenden luftdicht verschlossenen Behälter unter Lichtausschluss bei 20°C +/- 5°C bzw. +6°C +/- 2°C gelagert (s. 2.3.1)

Auch hier wurde wieder zu Beginn der Lagerungsversuche der Wassergehalt gravimetrisch bestimmt und der Mikroorganismenstatus erhoben.

Vor der Messung wurden die Proben gründlich homogenisiert.

2.5. Vergleichsproben

Pharmaka unterliegen im menschlichen Organismus einer Vielzahl von biochemischen Einflüssen, die durch den Todeseintritt schlagartig unterbrechen bzw. bis zum Verbrauch der Körperenergie (ATP) noch weiter laufen können (siehe Punkt 1.5). Um nähere Kenntnisse über das Abbauverhalten bzw. Stabilität der einzelnen Drogen zu bekommen, wurden auch Herzblut und Leber eines Nicht-Drogentoten entsprechend vorbereitet und mit einer bestimmten Konzentration an Morphin, Codein, 3β-Morphinglucuronid und Methadon versetzt. Die Lagerung dieser Proben erfolgte unter den selben Bedingungen wie das Herzblut und die Leber Drogentoter.

Zusätzlich wie bei den Proben der Drogentoten wurde ebenfalls der mikrobielle Status bestimmt und eine Wassergehaltsbestimmung durchgeführt.

2.6. Methoden für den chemisch analytischen Bereich

A: Morphin, Codein und Gesamtmorphin Bestimmung

A.2.6.1 Probenaufbereitung von Herzblut

Für die analytische Bestimmung von Morphin, Codein, und Morphinglucuronide, wurde das bei den verschiedenen Temperaturen gelagerte Leichenblut nochmals gut homogenisiert und ca. 500mg davon in Schliffgläser eingewogen. Anschließend wurden den Blutproben 150ng Internes Standardgemisch zugesetzt, das aus einer methanolischen Lösungen von D_3-Morphin und D_3-Codein besteht.
Zusätzlich wurden die Proben mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 6), Glycinpuffer und Carbonatpuffer versetzt und anschließend zentrifugiert. Der pH-Wert der Proben betrug 8,5.
Für die Bestimmung von Gesamtmorphin wurden die Proben einer sauren Hydrolyse unterzogen. Durch Zugabe von 25%iger HCl und anschließender Verwahrung im Trockenschrank bei 130°C werden die Glucuronide aufgeschlossen. Nach 45 Minuten Reaktionszeit und anschließendem Abkühlen wurden die Hydrolysate auf pH 8,5 eingestellt. Anschließend erfolgt eine Aufarbeitung wie bei den Proben ohne Hydrolyse.
Die für die Festphasenextraktion verwendeten Säulchen wurden vor der Probenaufgabe jeweils mit Methanol gespült und anschließend mit deionisierten Wasser konditioniert. Danach wurde der Überstand der zentrifugierten Proben auf die Säulchen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Anschließend wurde mit Acetatpuffer und Methanol gespült und die Säulchen 15min unter Vakuum getrocknet.

Die Elution erfolgte mit 2x1ml Lösungsmittelgemisch bestehend aus Dichlormethan/Isopropanol (8/2) versetzt mit 2% Ammoniaklösung (25%ig). Die Eluate wurden danach im Abdampfblock unter N_2 vollständig eingeengt. Zur Derivatisierung wurde jeweils 50µl PFPA und PFPOH auf die getrocknete Probe gegeben und dann im verschlossenen Vial etwa 30min bei 65°C im Trockenschrank belassen. Danach wurden die Derivate im Abdampfblock unter N_2 eingeengt und in jeweils 50µl Essigsäureethylester aufgenommen.

A.2.6.2. Probenaufbereitung von Leber

Für die analytische Bestimmung von Morphin, Codein, und Morphinglucuronid wurden die homogenisierten Leberproben, welche bei den verschiedenen Temperaturen gelagert wurden, nochmals gut homogenisiert und anschließend etwa 0,5g davon in Schliffgläser eingewogen. Anschließend wurden den Leberproben 150ng Internes Standardgemisch zugesetzt, das aus einer methanolischen Lösung von D_3-Morphin und D_3-Codein besteht.

Nach Zugabe von 0,1 molaren Phosphatpuffers (pH 6) wurden die Proben für ca. 30min in ein Ultraschallbad gestellt. Dadurch sollte eine vollständige Zellzerstörung gewährleistet werden, damit das in Zellen gelagerte Pharmakon für die Aufarbeitung frei zugänglich wird.

Anschließend wurden die Proben jeweils mit Glycinpuffer und Carbonatpuffer versetzt und danach zentrifugiert.

Der pH-Wert betrug 8,5. Für die Bestimmung von Gesamtmorphin wurden die Proben einer sauren Hydrolyse unterzogen. Durch Zugabe von 25%iger HCl und anschließender Verwahrung im Trockenschrank bei 130°C wurden die Glucuronide aufgeschlossen. Nach 45 Minuten Reaktionszeit und anschließendem Abkühlen wurden die Hydrolysate auf pH 8,5 eingestellt. Anschließend erfolgt eine Aufarbeitung wie bei den Proben ohne Hydrolyse.

Die für die Festphasenextraktion verwendeten Säulchen wurden vor der Probenaufgabe jeweils mit Methanol gespült und danach mit deionisierten Wasser konditioniert. Anschließend wurde der Überstand der zentrifugierten Proben auf die Säulchen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Danach

wurde mit Acetatpuffer und Methanol gespült und die Säulchen 15min unter Vakuum getrocknet.
Die Elution erfolgte mit 2x1ml Lösungsmittelgemisch bestehend aus Dichlormethan/Isopropanol (8/2) versetzt mit 2% Ammoniaklösung (25%-ig). Die Eluate werden danach im Abdampfblock unter N_2 vollständig eingeengt.

Zur Derivatisierung wurde jeweils 50µl PFPA und PFPOH auf die getrocknete Probe gegeben und dann im verschlossenen Vial etwa 30min bei 65°C im Trockenschrank belassen. Danach wurden die Derivate im Abdampfblock unter N_2 eingeengt und in jeweils 50µl Essigsäureethylester aufgenommen.

<u>Derivatisierungsreaktion:</u>

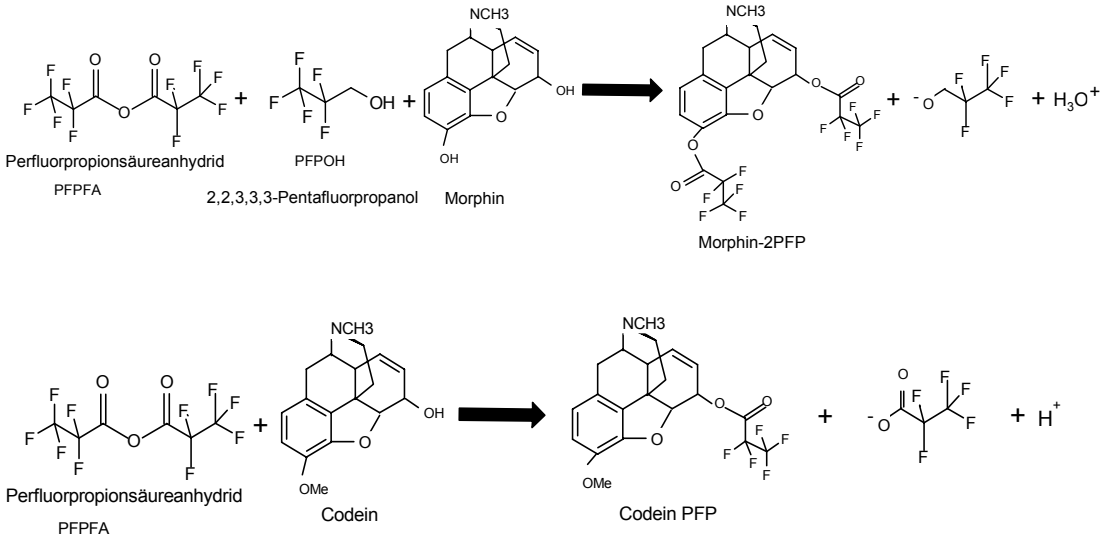


Abbildung 9: Derivatisierungsreaktionen von Morphin und Codein

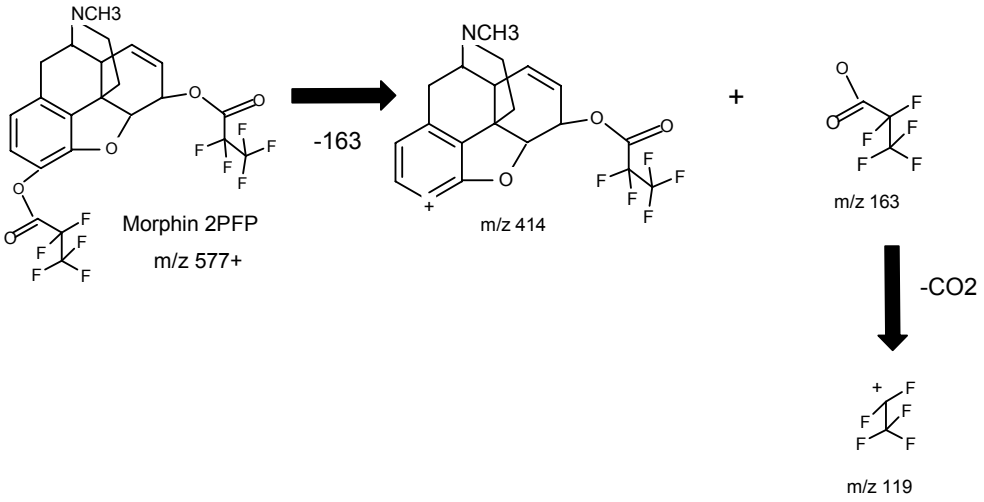


Abbildung 10: Fragmentierungsschema Morphin

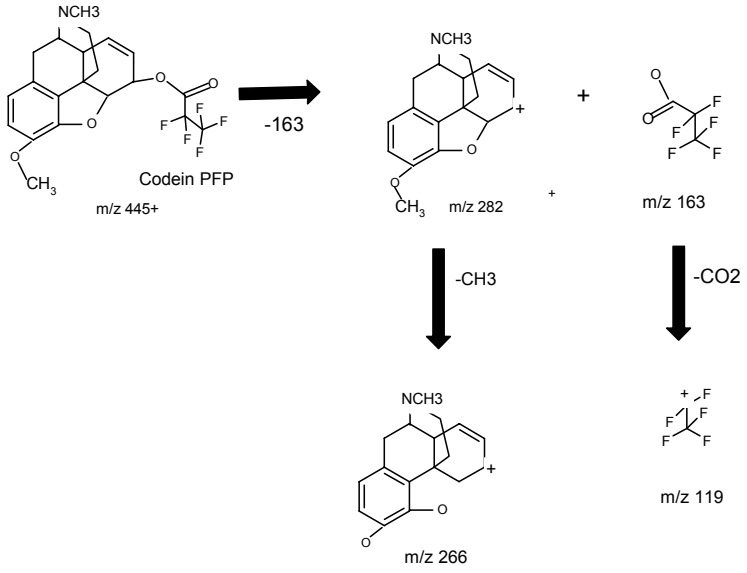


Abbildung 11: Fragmentierungsschema Codein

A 2.6.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Nach Injektion einer Standardlösung von Morphin und D3-Morphin sowie Codein und D3-Codein und Aufzeichnung der Spektren über den gesamten Massenbereich (Scan-modus) wurden die geeigneten Massen zur Identifizierung und Quantifizierung von Morphin und D_3 Morphin bzw. Codein und D_3 Codein ausgewählt. Die quantitativen Bestimmungen wurden im „single ion modus“ (SIM), Einzelionenmodus, durchgeführt.

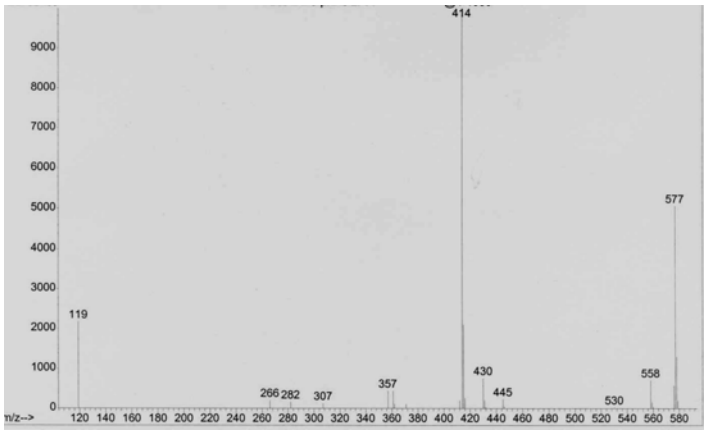


Abbildung 12: Massenspektrum: Totalionenchromatogramm: Morphin-2PFP

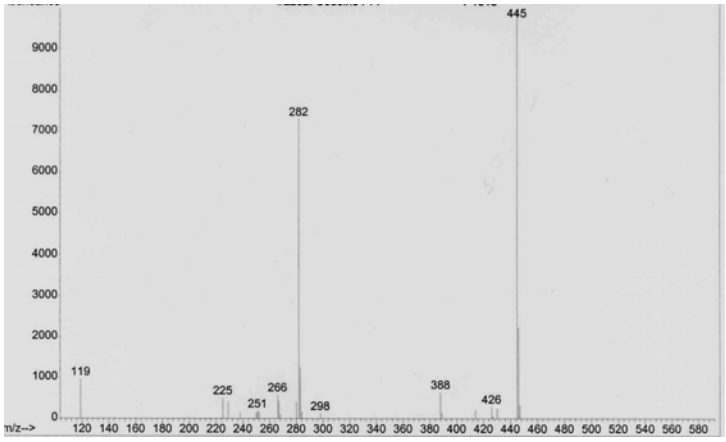


Abbildung 13: Massenspektrum: Totalionenchromatogramm: Codein-PFP

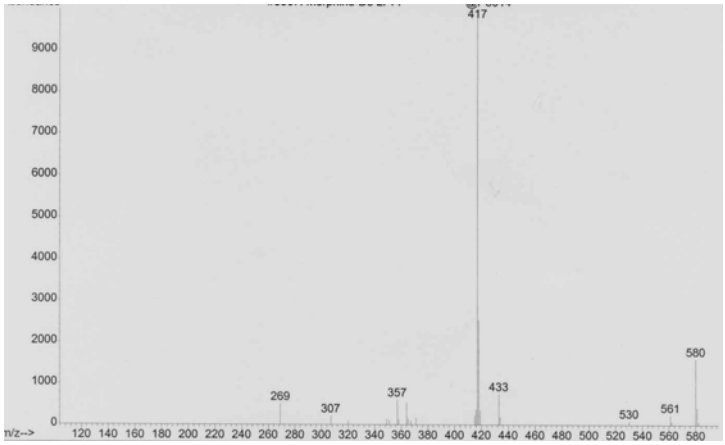


Abbildung 14: Massenspektrum: Totalionenchromatogramm: D_3-Morphin-2PFP

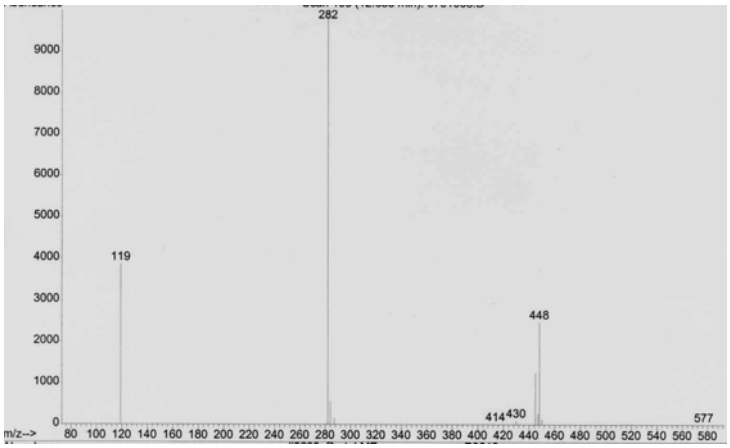


Abbildung 15: Massenspektrum: Totalionenchromatogramm: D_3-Codein-PFP

B: Methadon-Bestimmung

B. 2.6.1 Probenaufbereitung von Herzblut

Für die analytische Bestimmung von Methadon, wurde das bei den verschiedenen Temperaturen gelagerte Leichenblut nochmals gut homogenisiert und ca. 500mg davon in Schliffgläser eingewogen. Anschließend wurden den Blutproben 100ng Interne Standardlösung zugesetzt, welches aus einer methanolischen Lösung von D_9-Methadon besteht.

Zusätzlich wurden die Proben 0,1 molaren Phosphatpuffer (pH 6), versetzt und anschließend zentrifugiert. Der pH-Wert der Proben betrug 8,5.

Die für die Festphasenextraktion verwendeten Säulchen werden vor der Probenaufgabe jeweils mit Methanol gespült und anschließend mit Phosphatpuffer (pH 6) konditioniert. Anschließend wird der Überstand der zentrifugierten Proben auf die Säulchen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Anschließend wird mit 1M Essigsäure und Methanol gespült. Nach 2 Minuten Trockenphase kann dann mit der Elution begonnen werden.

Die Elution erfolgt mit 2x1ml Lösungsmittelgemisch aus Essigsäureethylester mit 2% Ammoniaklösung(25%-ig). Die Eluate werden danach im Abdampfblock unter N_2 vollständig eingeengt.
Nach dem Einengen werden die Rückstände mit jeweils 50µl Essigsäureethylester aufgenommen und in Mikrovials überführt.

B. 2.6.2. Probenaufbereitung von Lebergewebe

Für die analytische Bestimmung von Methadon werden die homogenisierten Leberproben, welche bei den verschiedenen Temperaturen gelagert wurden, nochmals gut homogenisiert und anschließend ca. 500mg davon eingewogen. Anschließend wurden den Leberproben 100ng Interne Standardlösung zugesetzt, welche aus einer methanolischen Lösung von D_9-Methadon besteht.
Nach Zugabe von 0,1 molaren Phosphatpuffers (pH 6) werden die Proben für ca. 30min in ein Ultraschallbad gestellt. Dadurch soll eine vollständige Zellzerstörung gewährleistet werden, damit das in Zellen gelagerte Pharmakon für die Aufarbeitung frei zugänglich wird.
Anschließend werden die Proben zentrifugiert.
Der pH-Wert der Proben betrug 8,5. Die für die Festphasenextraktion verwendeten Säulchen werden vor der Probenaufgabe jeweils mit Methanol gespült und anschließend mit Phosphatpuffer (pH6) konditioniert. Der Überstand der zentrifugierten Proben wird auf die Säulchen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Danach wird mit 1M Essigsäure Methanol gespült bevor die Säulchen unter Vakuum getrocknet werden.
Die Elution erfolgt mit 2x 1ml Lösungsmittelgemisch aus Essigsäureethylester mit 2% Ammoniaklösung (25%-ig). Die Eluate werden danach im Abdampfblock unter N_2 Strom bei 30°C vollständig eingeengt.

Nach dem Einengen werden die Rückstände mit jeweils 50µl Essigsäureethylester aufgenommen und in Mikrovials umgefüllt.

B. 2.6.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Nach Injektion einer Standardlösung von Methadon und D_9-Methadon und Aufzeichnung des Spektrums über den gesamten Massenbereich wurden die geeigneten Massen zur Identifizierung und Quantifizierung von Methadon und D_9-Methadon ausgewählt. Die weiteren Analysen wurden im „single ion modus“ (SIM) durchgeführt.

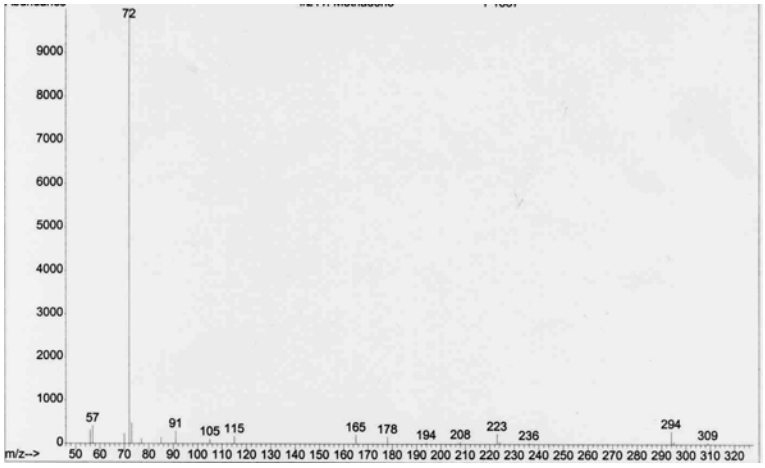


Abbildung 16: Massenspektrum: Totalionenchromatogramm: Methadon

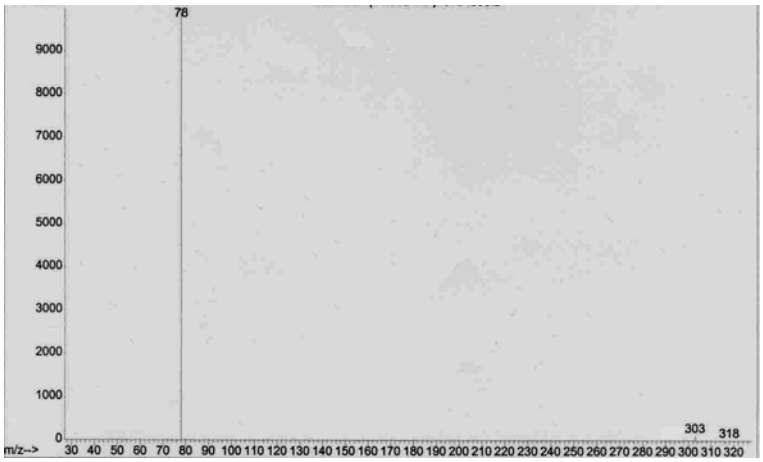


Abbildung 17: Massenspektrum: Totalionenchromatogramm: D_9-Methadon

2.7. Methoden für den mikrobiologischen Bereich

In dem untersuchten Sektionsgut konnte eine Reihe von Mikroorganismen nachgewiesen werden. Vier dieser massen- und zahlenmäßig am häufigsten in Herzblut und Leber bestimmten Spezies wurden nach ihrem Häufigkeitskriterien ausgewählt, und für die späteren Versuche, bei denen es um die Verstoffwechselung bzw. Abbau von Drogen durch Mikroorganismen geht, verwendet.
Ausgewählt wurden: Pseudomonas putida, Serratia marcescens, E.coli und Staphylococcus aureus.
Bis auf Staphylococcus aureus, ein Vertreter aus der Gruppe der gram positiven Mikroorganismen, handelte es sich bei den anderen drei Vertreter ausschließlich um gram negative Spezies, welche bis auf Pseudomonas putida aus der Familie der Enterobacterien stammen.

Für die mikrobiellen Studien wurde für alle zu untersuchenden Mikroorganismen ein gemeinsamer Nährbouillion gesucht. Als geeigneter Nährboullion wurde hierbei der sogenannte Müller-Hinton-Bouillion ausgewählt.
Zusammensetzung des Müller-Hinton-Bouillion II Broth:
Beef Extract 3,0g/l
Caseinhydrolysate 17,5g/l,
Stärke 1,5g/l.
Bei dem Müller-Hinton-Bouillion II Broth handelt es sich um einen Nährbouillion, welcher aufgrund seiner geringen Viskosität und seines breiten Nährstoffspektrums sowohl ein gutes Nährmedium als auch gute Eigenschaften für die analytische Aufarbeitung liefert.
Der Nährboullion wird mit jeweils einem der ausgewählten Mikroorganismen beimpft. Die Menge an zugegebenen Mikroorganismen wird mit einem Densidometer eingestellt. Dabei wird abhängig von den eingesetzten Mikroorganismen eine unterschiedliche optische Dichte gewählt. Zu der Probe wird anschließend eine definierte Konzentration an Morphin-HCl, Codein-Monohydrat, Levomethadon und sowie Morphin-3ß-D-Glucuronid gegeben. Die verschiedenen Substanzen wurden als methanolische Lösungen zugesetzt.

Für jede Substanz (Morphin, Codein, Methadon, Morphin-3ß-D-Glucuronid) wird sowohl ein Blindwert, also Boullion ohne Mikroorganismen, als auch ein Leerwert, nur Mikroorganismen ohne Substanz, vorbereitet. Um einen Einfluss der Mikroorganismen auf die Substanzen zu erkennen, wurden Proben für jeweils 24h und 48h angesetzt.
Für jede Substanz wurde sowohl für 24h als auch für 48h Lagerung ein doppelter Probenansatz verwendet, um mögliche Schwankungen durch mikrobiellen Wachstumsunterschiede auszuschließen.
Die Proben werden anschließend bei 36°C unter Luft bebrütet. Nach 24h können die ersten Proben aus dem Brutschrank geholt werden. Nach dem Messen des Macfarland-Faktors durch Durchleuchten des Boullions mit Licht bestimmter Wellenlänge, werden die Proben in Cryoröhrchen umgefüllt, und anschließend bei 3500U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht eine Trennung der Suspension in Überstand (Boullion) und Pellets (Mikroorganismen). Der Überstand wird umgefüllt und die Pellets mit 3ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Zentrifugation bei 3500U/min für 10 Minuten wiederholt. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal durchgeführt. Der Überstand aus NaCl-Lösung wird jedesmal verworfen.
Die übrigen Proben, welche 48h gelagert wurden, werden nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben aufgearbeitet. Bis zur analytischen Bestimmung werden die Überstände und Pellets bei –20°C tiefgefroren.
Dieser mikrobielle Ansatz wird für alle ausgewählten Bakterien durchgeführt. Wobei nur in der Mikroorganismendichte unterschiedliche Einstellungen vorgenommen wurden, entsprechend den Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Stämme.

3. Validierung

3.1. Allgemeine Begriffe zur Validierung

Mit Hilfe einer Validierung versucht man den Nachweis und die Dokumentation für die Zuverlässigkeit einer Methode zu erbringen. Zugleich erhält man eine Bestätigung, dass eine Analysenmethode die besonderen Forderungen für einen speziellen, vorgesehenen Gebrauch erfüllt. Die Validierung einer Methode entspricht somit einem Nachweis der Eignung für einen bestimmten Zweck, und ermöglicht den Vergleich von Laborergebnissen.
Für die Überprüfung, ob die festgelegten Akzeptanzgrenzen erfüllt worden sind, spielen statistische Verfahren eine wichtige Rolle, da sie eine objektive Erfassung einzelner Parameter ermöglichen. Damit eine Methode als validiert gilt, müssen bestimmte Kenndaten überprüft und bestimmt werden, die im folgenden aufgezählt werden.

a. <u>Prüfung der Homogenität der Varianzen</u> (Normalverteilungstest, Ausreissertest, Trendtest, Varianzenhomogenitätstest bzw. F-Test)
b. <u>Prüfung der Kalibration</u> (Linearitätstest)
c. <u>Prüfung der Wiederfindung</u> (Linearität der Grundkalibrierung bzw. Linearitätstest, Linearität der Wiederfindungsfunktion, Varianzenhomogenitätstest)
d. <u>Prüfung der Richtigkeit</u> (Normalverteilungstest, Ausreissertest, Trendtest, Mittelwertstest)
e. <u>Prüfung der Präzision</u> (Normalverteilungstest, Austeissertest, Trendtest, Varianzenhomogenitätstest)

Für die Quantifizierung von Stoffen kann die mathematische Methode der Linearen Regression verwendet werden. Dabei handelt es sich um eine Methode, die davon ausgeht, dass bei einem Stoff zwei Merkmale in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear von einander abhängen. Dieses Mass für den linearen Zusammenhang wird als Korrelationskoeffizient r bezeichnet. Je näher sich ı r ı an seinen Grenzwert 1 annähert, umso mehr

sind die Merkmalspaare in der Nähe einer Geraden konzentriert. [Schmitt et al. 2003]

Zu a) Prüfung der Homogenität der Varianzen:

Nach der Festlegung einer Arbeitsbereichsmitte, welche sich aus der am häufigsten zu erwartenden Probenkonzentration ergibt, erfolgt die Festlegung der kleinsten und der größten Kalibratorkonzentration (C_{min} und C_{max}). Nach mehrfachem Messen dieser Punkte (mind. 6x) erfolgt die Prüfung auf Normalverteilung, Ausreissertest (Grubbs-Test) und Trend (Neumann-Test) und anschließend die Prüfung auf die Homogenität der Varianzen (F-Test). Sollten signifikante Unterschiede auftreten, so wird der Arbeitsbereich so weit verengt, bis dieser Test erfüllt ist. Anschließend werden die übrigen Kalibratoren, insgesamt mindestens 5 Stück, äquidistant festgelegt.

Zu b) Prüfung der Kalibration

Die Messung wird nach Vorgabe der Kalibratoren durchgeführt und die erhaltenen Informationswerte werden gegen die Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen und visuell und statistisch auf Ausreisser (F bzw. t-Test) und Linearität untersucht. Die erhaltenen Werte sollten ausreisserfrei und linear sein. Liegt eine Nichtlinearität vor, so muss der Arbeitsbereich verringert werden.

Anschließend erfolgt eine Berechnung der Nachweisgrenze (NG) und der Bestimmungsgrenze (BG) nach Vorgabe des gewünschten Signifikanzniveaus. Nach Vorgabe des Signifikanzniveaus errechnet sich für jeden Messwert y die Konzentration x mit einem konzentrationsabhängigen Vertrauensbereich VB (Konfidenzintervall):

$$VB = \pm s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

VB	Vertrauensband
s_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung
t	Quantil der t-Verteilung
α	Wahrscheinlichkeit für Fehler 1.Art
m	Anzahl der Wiederholbestimmungen je Konzentration
n	Anzahl der Kalibrationspunkte
x	Gehaltsgröße
$\bar{X}$	Mittelwert aller Gehaltsgrößen
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate

Abbildung 18: Vertrauensbereich nach DIN 32645 .[Schmitt et al., 2003]

Zu c)Prüfung der Wiederfindung (Wiederfindungsrate)

Mit Hilfe der Wiederfindungsrate (WFR) lassen sich Matrixeinflüsse, Spezifität und Richtigkeit prüfen. Bei WFR = 100% ist die Richtigkeit der Ergebnisse anzunehmen. Wiederfindungswerte bis zu 50% sind durchaus zu akzeptieren. Nach Division der Wiederfindungsfunktion durch X_o ergibt sich die auf 100% normierte Wiederfindungsrate.

$WFR\% = (X/X_o)*100$

X Ist-Wert der Probe

X_o Soll-Wert der Probe

Abbildung 19: Wiederfindungsrate

Zu d) Prüfung der Richtigkeit

Die Richtigkeit kann durch Aufarbeitung und Messung von Referenzproben erfolgen. Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch den Vergleich mit den Ergebnissen weiterer Methoden, z.B. Standardaddition. Die Messdaten der Referenzprobe werden bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau auf Normalverteilung, Ausreisser und Trend geprüft. Die Prüfung auf Richtigkeit erfolgt mit dem Sollwert-t-Test.

Zu e) Prüfung der Präzision

Siehe Punkt 3.1.2

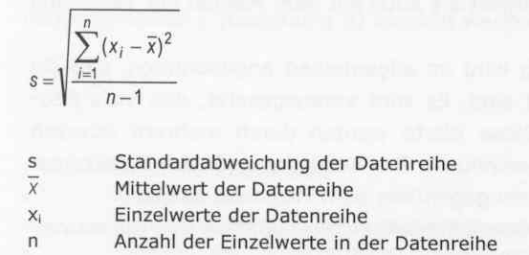
3.1.1 Spezifität

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit des Analysenverfahrens, um den gesuchten Analyten zu erfassen, wobei andere in der Probe anwesende Bestandteile und Merkmale das Analysenergebnis nicht beeinflussen.

3.1.2 Präzision

Die Präzision hängt ab von dem Zufallsfehler des Analysenverfahrens. Je größer der Zufallsfehler ausfällt, desto stärker streuen die Werte bei der Wiederholung der Analyse, und desto geringer ist die Präzision bzw. Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens.
Zur Überprüfung der Präzision können bestimmte Funktionen angewendet werden. Die Überprüfung auf Varianzenhomogenität bzw. Unlinearität, welche beinhaltet, dass die Analysenpräzision über den Arbeitsbereich konstant sein muß, ist von großer Aussagekraft. Liegt eine Varianzeninhomogenität vor, so ist entweder der gewählte Arbeitsbereich so weit zu verkleinern, bis diese Bedingungen erfüllt sind, oder es sind aufwendigere Kalibrierungsmodelle zu wählen, wie z.B.. Regressionsfunkionen höheren Grades oder gewichtete Regression.
Ebenfalls darf die Überprüfung auf Ausreisser (Ausreissertest) nicht fehlen. Unter Ausreisser versteht man Messdaten, die eine sehr grobe Abweichung aufweisen. Dadurch wird das Analysenergebnis verfälscht. Ausreisser können einmalig in Erscheinung treten. Die Hauptursachen hierfür sind Verwechslungen, zufällige Rechenfehler usw.
Für die Beurteilung der Präzision der einzelnen Mess- oder Beobachtungswerte einer Bestimmung können die Streuungsmasse verwendet werden. Als Streuungsmasse verwendet man die Standardabweichung und die Spannweite. Beide Streuungsmasse sind

dem jeweils vorliegenden Zweck entsprechend auszuwählen. Die Standardabweichung einer Stichprobe ist definiert durch:

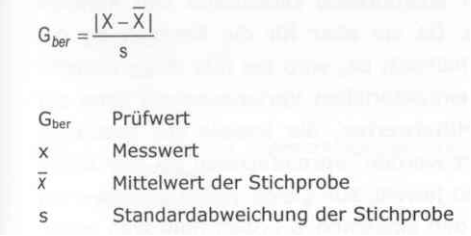


$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

s	Standardabweichung der Datenreihe
$\bar{x}$	Mittelwert der Datenreihe
x_i	Einzelwerte der Datenreihe
n	Anzahl der Einzelwerte in der Datenreihe

Abbildung 20: Standardabweichung der Datenreihe, .[Schmitt et al. 2003]

Für die Berechnung des Mittelwertes wurde das arithmetische Mittel, also die Summe der Werte, deren Mittelwert gesucht wird, geteilt durch die Zahl dieser Werte, verwendet.
Für den Ausreissertest wurde der Ausreissertest nach Grubbs angewendet. Das Vorhandensein eines Ausreissers in den Daten kann die Präzision erheblich beeinflussen. Ausreisser sind Werte, die nicht repräsentativ für den Rest der Daten sind und somit die Ergebnisse der Messungen verfälschen können. Es ist daher wichtig, die Daten auf Ausreisser zu prüfen. Dabei wird der Analysenwert auf Ausreisser geprüft, welcher die größte Differenz zum Mittelwert aufweist. Der Test basiert auf der Annahme, dass die Daten normalverteilt und somit durch den Mittelwert und die Standardabweichung vollständig charakterisiert sind. Beim Grubbs-Test wird eine Prüfvariable nach einer Formel berechnet, die dann mit tabellierten Werten für den Grubbs-Test verglichen werden. Werte, die größer als der Tabellenwert sind, sind signifikant. Der Grubbs-Test wird in der Regel auf dem 95%-Signifikanzniveau durchgeführt.



$$G_{ber} = \frac{|X - \bar{X}|}{s}$$

G_{ber}	Prüfwert
x	Messwert
$\bar{x}$	Mittelwert der Stichprobe
s	Standardabweichung der Stichprobe

Abbildung 21: Prüfwert .[Schmitt et al., 2003]

3.1.3 Richtigkeitskontrolle

Die Genauigkeit der Analysenergebnisse setzt sich aus der Präzision und der Richtigkeit zusammen, so dass auch durch größte Anstrengungen zur Verbesserung der Präzision nicht die erforderliche Genauigkeit erreicht werden kann, wenn das Analysenergebnis eine zu hohe Unrichtigkeit aufweist. Eine Möglichkeit der Richtigkeitskontrolle stellt die Teilnahme an Ringversuchen dar, für die Kontrolle der Methode bei der Analytik können die Verwendung von Blindwerten, die Kontrollproben und die Wiederfindungsrate eingesetzt werden. Hierbei wird zwischen zwei Arten von Blindproben unterscheiden: Reagenzienblindproben; dies sind Proben die anstelle des Probenvolumens destilliertes Wasser oder ein entsprechendes anderes Lösungsmittel und ansonsten nur die im Analysenverfahren benutzten Reagenzien enthalten oder Probenblindproben. Für die Ermittlung der Blindproben wurden bei dieser Validierungen die Probenblindproben eingesetzt, welche anstelle des Analysenprobenvolumens das gleiche Volumen einer matrixgleichen, aber bestimmungsparameterfreien Probe enthalten.
Der Einsatz von Kontrollproben bei der Analyse ermöglicht es, die Spezifität des angewandten Analysenverfahrens zu überprüfen, zusätzlich können so Daten über die Kalibrierung und des Messgerätes gewonnen werden.
Die Wiederfindungsrate dient zur Absicherung der Richtigkeit von Analysenergebnissen unter gleichzeitiger Einbeziehung von Matrixeinflüssen. Da häufig sehr unterschiedliche Matrixtypen analysiert werden, ist es erforderlich, für jeden Matrixtyp eine Wiederfindungsrate zu bestimmen. Mittels Wiederfindungsrate ist allerdings nur eine eingeschränkte Richtigkeitskontrolle möglich, da über die Ermittlung der Wiederfindungsrate lediglich matrixbedingte proportional-systematische, nicht jedoch konstant-systematische Abweichungen erkannt werden können. [Doerffel, 1987]

3.1.4 Linearer Bereich

Zur Bestimmung des linearen Bereichs werden Leerseren mit definierten Konzentrationen an Morphin, Codein und Methadon versetzt und nach der später für die Proben verwendeten Methode aufgearbeitet. Dabei wurde der jeweilige Konzentrationsbereich so gewählt, dass die Konzentrationen erfasst werden, die in Realproben hauptsächlich messbar waren.

Morphin:

Hierfür wurden für jeden Konzentrationspunkt die Quotienten aus den Peakflächen des Ions 414amu (atomic mass unit) für Morphin zu den Peakflächen des Ions 417amu des Internen Standards berechnet, und eine Regressionsgerade erzeugt. Da diesen Berechnungen die Minimierung der Summe der quadrierten Residuen zu Grunde liegt, wird das Verfahren auch die Methode der kleinsten Quadrate genannt. Die Anwendung dieser Methode setzt voraus, dass die Residuen der y-Werte für jedes x normal verteilt sind und daß die Varianzen über den ganzen Bereich homogen sind. Diese Methode wurde ebenfalls für Codein und Methadon jeweils mit deren spezifischen Massen angewandt. Da Morphin-3-glucuronid nach entsprechender Aufarbeitung als Morphin gemessen wurde, wurde hierfür die Validierung nicht durchgeführt.

Codein:

Hierfür wurden für jeden Konzentrationspunkt die Quotienten aus den Peakflächen des Ions 445amu für Codein zu den Peakflächen des Ions 448amu des Internen Standards D3-Codein ermittelt, und eine Regressionsgerade erzeugt.

Methadon:

Wie bei Morphin und Codein schon erwähnt, wurden auch hier für jeden Konzentrationspunkt die Quotienten aus den Peakflächen des Ions 72amu

für Methadon zu den Peakflächen des Ions 78amu des Internen Standards D9-Methadon ermittelt, und eine Regressionsgerade erzeugt.

Tabelle 5: Konzentrationsbereiche für die einzelnen Messparameter

Morphin: Konzentrationsbereich in ng/ml

Leber:	20, 50, 100, 150,200, 300
Herzblut:	20, 50, 100, 150,200, 300

Codein: Konzentrationsbereich in ng/ml

Leber:	20, 50, 100, 150,200, 300
Herzblut:	20, 50, 100, 150,200, 300

Methadon: Konzentrationsbereich in ng/ml

Leber:	50, 100, 200, 400, 500, 700, 1000, 1350, 1500
Herzblut:	50, 100, 200, 400, 500, 700, 1000, 1350, 1500

Durch Verwendung eines Leerwertes, bei welchem es sich um Leerserum, aufgearbeitet wie eine Probe und mit Internen Standard versetzt handelt, kann ausgeschlossen werden, dass es durch die verwendeten Geräte zu Verschleppungen kommt.
Des weiteren können auch die Reinheit der verwendeten Lösungsmittel bzw. Reagenzien überprüft werden, so dass ein Ergebnis ausgelöst durch Verschleppung oder Verunreinigung der verwendeten Chemikalien, ausgeschlossen werden kann.

3.1.5 Nachweisgrenze

Unter der Nachweisgrenze versteht man den kleinsten Analytgehalt, der mit einer vorgegebenen Sicherheit P vom Leerwert zu unterscheiden ist. Besitzt eine Probe genau diesen Gehalt des Analyten, so wird in 50% aller Fälle der konkrete Messwert kleiner sein als die Nachweisgrenze. Erhält man bei einer Analyse Messwerte über der Nachweisgrenze, kann mit einer Sicherheit von P% bzw. Unsicherheit von 100-P% davon ausgegangen werden, dass der Analyt auch tatsächlich vorhanden ist. Die Nachweisgrenze kann über folgende Gleichung bestimmt werden:

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

X_{NG}	Nachweisgrenze nach DIN 32645
S_{Xo}	Verfahrensstandardabweichung
t	Quantil der t-Verteilung
α	Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art
m	Anzahlt der Wiederholbestimmungen je Konzentration
n	Anzahl der Kalibrationspunkte
8	Mittelwert aller Gehaltsgrößen
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate

Abbildung 22: Nachweisgrenze nach DIN 32645

3.1.6 Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist eine rein qualitative Größe, die lediglich eine Aussage über die Identifizierbarkeit eines Analyten bei einer bestimmten Konzentration in der Probe macht. Den Bereich, ab welcher Konzentration eine Quantifizierung des Analyten in der Probe möglich ist, wird durch die Bestimmungsgrenze ausgedrückt. Somit ist die Bestimmungsgrenze diejenige Konzentration nach DIN 32645 definiert, ab der mit einer bestimmten Ergebnisunsicherheit quantifiziert werden kann.
Die Bestimmungsgrenze kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$X_{BG} = k * s_{Xo} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_x}}$$

X_{BG}	Bestimmungsgrenze nach DIN 32645
k	relative Ergebnisunsicherheit
S_{Xo}	Verfahrensstandardabweichung
t	Quantil der t-Verteilung
α	Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art
m	Anzahl der Wiederholbestimmungen je Konzentration
n	Anzahl der Kalibrationspunkte
x	Gehaltsgröße
$\bar{x}$	Mittelwert aller Gehaltsgrößen
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate

Abbildung 23: Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

3.1.7 Wiederfindung (%)

Zur Überprüfung der Wiederfindung können Kontrollproben, bei welchen es sich um mit Substanz gespikte Proben spezieller Matrizes, z. B. Serum, handelt, aufgearbeitet werden. Bei Kenntnis der Daten über die Substratkonzentrationen, können diese nach der Messung für die Berechnung der Wiederfindung rechnerisch verwendet werden, um die Methode hinsichtlich ihrer Spezifität und Genauigkeit so überprüfen. Die Wiederfindung berechnet sich durch den Quotient aus den Messwerten des Substrats (Istwert) zu den vorliegenden theoretischen Daten (Sollwert). Die Dimension der Wiederfindung ist %. [Bosch, 1992]

3.2 Validierung der angewandten chromatographischen Methoden

3.2.1 Validierung der Methode für die Quantifizierung von Morphin

Arbeitsbereich: 20-300ng
Verwendete Matrix: lyophillisiertes Leerserum (Fa. Recipe)

Target-Ion: Messsignal: m/z = 414

Konzentrationen der Standards [ng]: 20, 50, 100, 150, 200, 300

Die einzelnen Konzentrationen wurden 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt werden konnte. Die Berechnung erfolgte durch Ermittlung des Quotienten aus der Fläche des Standards zur Fläche des Internen Standards.

Tabelle 6: Statistische Berechnung für m/z 414

m/z = 414

Standards ng	**Leerwert**	**20**	**50**	**100**	**150**	**200**	**300**
1	0,004	0,133	0,370	0,710	0,944	1,517	2,217
2	0,003	0,140	0,349	0,774	1,120	1,470	2,288
3	0,004	0,120	0,317	0,672	0,944	1,449	2,261
4	0,009	0,076	0,330	0,727	1,029	1,516	2,112
5	0,009	0,130	0,345	0,698	0,920	1,499	2,187
6	0,003	0,081	0,352	0,839	1,011	1,481	2,191

Mittelwert	0,005	0,113	0,344	0,737	0,995	1,489	2,209
Standard-abweichung	0,003	0,028	0,018	0,061	0,075	0,027	0,062

Gruppstest auf Straggler 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,812	1,344	1,459	0,638	1,000	1,471	1,570
Ergebnis größter Prüfwert	1,275	0,960	1,423	1,689	1,679	1,050	1,269
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest auf Ausreisser 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,812	1,344	1,459	0,638	1,000	1,471	1,570
Ergebnis größter Prüfwert	1,275	0,960	1,423	1,689	1,679	1,050	1,269
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauens-bereich 95% +	0,008	0,136	0,359	0,787	1,056	1,511	2,260
Vertrauens-bereich 95% -	0,003	0,090	0,329	0,687	0,933	1,466	2,158
relativer Vertrauens-bereich	0,006	0,054	0,036	0,118	0,145	0,052	0,120
Trend Δ²	0,000 01	0,00154	0,00038	0,00764	0,01786	0,00155	0,00672
Trend-Test erfüllt ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	Ja

NG 95% [ng]	0,108
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r² :

Kalibriergerade 1.	0,9917
Kalibriergerade 2.	0,9991
Kalibriergerade 3.	0,9937
Kalibriergerade 4.	0,9954
Kalibriergerade 5.	0,9910
Kalibriergerade 6.	0,9921

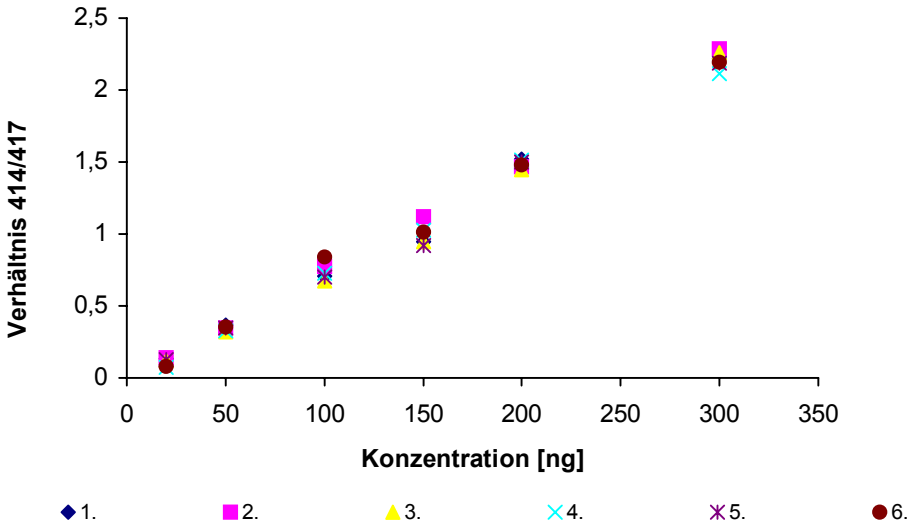


Abbildung 24: Kalibrierungsgeraden für das Target-Ion m/z 414 im Serum

Qualifier-Ion: Messsignal: m/z = 577

Konzentrationen der Standards [ng]: 20, 50, 100, 150, 200, 300

Die einzelnen Konzentrationen wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 7: Statistische Berechnung für m/z 577

m/z = 577

Standards ng	Leerwert	20	50	100	150	200	300
1	0,007	0,245	0,566	1,277	2,000	2,639	3,560
2	0,006	0,210	0,550	1,240	2,010	2,580	3,540
3	0,008	0,222	0,500	1,230	1,998	2,590	3,512
4	0,004	0,190	0,521	1,254	1,985	2,578	3,556
5	0,005	0,200	0,532	1,221	1,960	2,599	3,470
6	0,006	0,211	0,580	1,262	1,975	2,612	3,533
Mittelwert	0,006	0,213	0,542	1,247	1,988	2,600	3,529
Standard-abweichung	0,001	0,019	0,030	0,021	0,018	0,023	0,033

Gruppstest 95% auf Straggler

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	1,414	1,207	1,401	1,259	1,523	0,941	1,749
Ergebnis größter Prüfwert	1,414	1,679	1,300	1,418	1,197	1,709	0,942
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	Nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest 99% auf Ausreisser

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	1,414	1,207	1,401	1,259	1,523	0,941	1,749
Ergebnis größter Prüfwert	1,414	1,679	1,300	1,418	1,197	1,709	0,942
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	Nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n=6

Vertrauens-bereich 95% +	0,007	0,229	0,566	1,265	2,003	2,619	3,556
Vertrauens-bereich 95% -	0,005	0,197	0,517	1,230	1,973	2,581	3,501
relativer Vertrauens-bereich	0,003	0,037	0,057	0,041	0,036	0,045	0,065
Trend Δ²	0,000004	0,000522	0,001124	0,000096	0,000252	0,000067	0,002897
Trend-Test erfüllt	ja	ja	ja	ja	Ja	ja	ja

NG 95% [ng]	0,074
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r² :

Kalibriergerade 1.	0,9912
Kalibriergerade 2.	0,9914
Kalibriergerade 3.	0,9894
Kalibriergerade 4.	0,9922
Kalibriergerade 5.	0,9891
Kalibriergerade 6.	0,9917

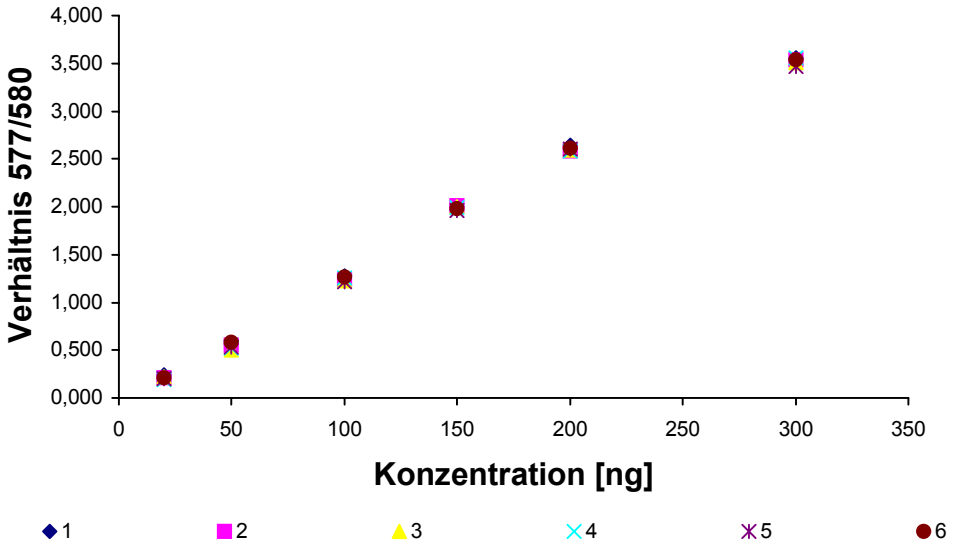


Abbildung 25: Kalibrierungsgeraden für das Qualifier-Ion m/z 577 im Serum

3.2.2 Validierung der Methode für die Quantifizierung von Codein

Arbeitsbereich: 20-300ng

Verwendete Matrix: lyophillisiertes Leerserum (Fa. Recipe)

Target-Ion: Messsignal: m/z = 445

Konzentrationen der Standards [ng]: 20, 50, 100, 150, 200, 300

Die einzelnen Konzentrationen wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 8: Statistische Berechnung für m/z 445

m/z = 445

Standards ng	**Leerwert**	**20**	**50**	**100**	**150**	**200**	**300**
1	0,002	0,085	0,468	0,859	1,209	1,602	2,197
2	0,004	0,151	0,397	0,789	1,246	1,535	2,423
3	0,003	0,143	0,362	0,736	1,025	1,631	2,341
4	0,008	0,079	0,369	0,799	1,194	1,469	2,400
5	0,008	0,144	0,387	0,759	0,995	1,652	2,293
6	0,002	0,094	0,421	0,812	1,187	1,542	2,145

Mittelwert	0,005	0,116	0,401	0,792	1,143	1,572	2,300
Standard-abweichung	0,003	0,033	0,039	0,043	0,105	0,069	0,111

Gruppstest auf Straggler 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,889	1,110	0,989	1,315	1,404	1,495	1,396
Ergebnis größter Prüfwert	1,245	1,050	1,722	1,557	0,982	1,165	1,111
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest auf Ausreisser 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,889	1,110	0,989	1,315	1,404	1,495	1,396
Ergebnis größter Prüfwert	1,245	1,050	1,722	1,557	0,982	1,165	1,111
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauens-bereich 95% +	0,007	0,143	0,433	0,828	1,229	1,629	2,391
Vertrauens-bereich 95% -	0,002	0,089	0,368	0,757	1,056	1,515	2,208
relativer Vertrauens-bereich	0,005	0,065	0,076	0,083	0,204	0,133	0,215
Trend Δ²	0,00001	0,00304	0,00155	0,00321	0,03104	0,01710	0,01892
Trend-Test erfüllt	ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

NG 95% [ng]	0,129
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r² :

Kalibriergerade 1.	0,9891
Kalibriergerade 2.	0,9980
Kalibriergerade 3.	0,9931
Kalibriergerade 4.	0,9960
Kalibriergerade 5.	0,9886
Kalibriergerade 6.	0,9922

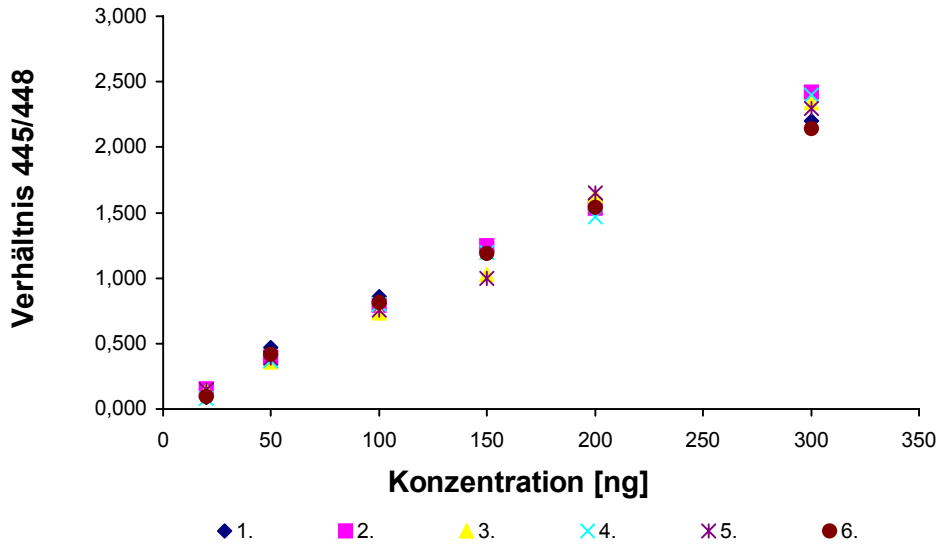


Abbildung 26: Kalibriergeraden für das Target-Ion m/z 445 im Serum

Qualifier-Ion: Messsignal: m/z = 282

Konzentrationen der Standards [ng]: 20, 50, 100, 150, 200, 300

Die einzelnen Konzentrationen wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 9: Statistische Berechnung für m/z 282

m/z = 282

Standards ng	**Leerwert**	**20**	**50**	**100**	**150**	**200**	**300**
1	0,000	0,182	0,449	0,815	1,598	1,861	2,559
2	0,002	0,190	0,432	0,780	1,601	1,820	2,545
3	0,007	0,210	0,422	0,832	1,578	1,816	2,561
4	0,001	0,202	0,398	0,795	1,542	1,884	2,456
5	0,000	0,175	0,388	0,841	1,555	1,799	2,471
6	0,005	0,179	0,420	0,823	1,530	1,801	2,468

Mittelwert	0,003	0,190	0,418	0,814	1,567	1,830	2,510
Standard-abweichung	0,003	0,014	0,022	0,023	0,030	0,035	0,050

Gruppstest 95% auf Straggler

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,868	1,062	1,355	1,491	1,262	0,902	1,083
Ergebnis größter Prüfwert	1,562	1,473	1,385	1,158	1,138	1,557	1,023
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	Nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest 99% auf Ausreisser

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	2,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,868	1,062	1,355	1,491	1,262	0,902	1,083
Ergebnis größter Prüfwert	1,562	1,473	1,385	1,158	1,138	1,557	1,023
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	Nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauens-bereich 95% +	0,005	0,201	0,437	0,833	1,592	1,859	2,551
Vertrauens-bereich 95% -	0,000	0,178	0,400	0,795	1,543	1,802	2,469
relativer Vertrauens-bereich	0,006	0,027	0,043	0,045	0,057	0,067	0,097
Trend Δ²	0,000018	0,000254	0,000417	0,001547	0,000052	0,002710	0,002342
Trend-Test erfüllt ?	ja	ja	ja	ja	Ja	ja	ja

NG 95% [ng]	0,054
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r² :

Kalibriergerade 1.	0,9789
Kalibriergerade 2.	0,9764
Kalibriergerade 3.	0,9824
Kalibriergerade 4.	0,9740
Kalibriergerade 5.	0,9785
Kalibriergerade 6.	0,9814

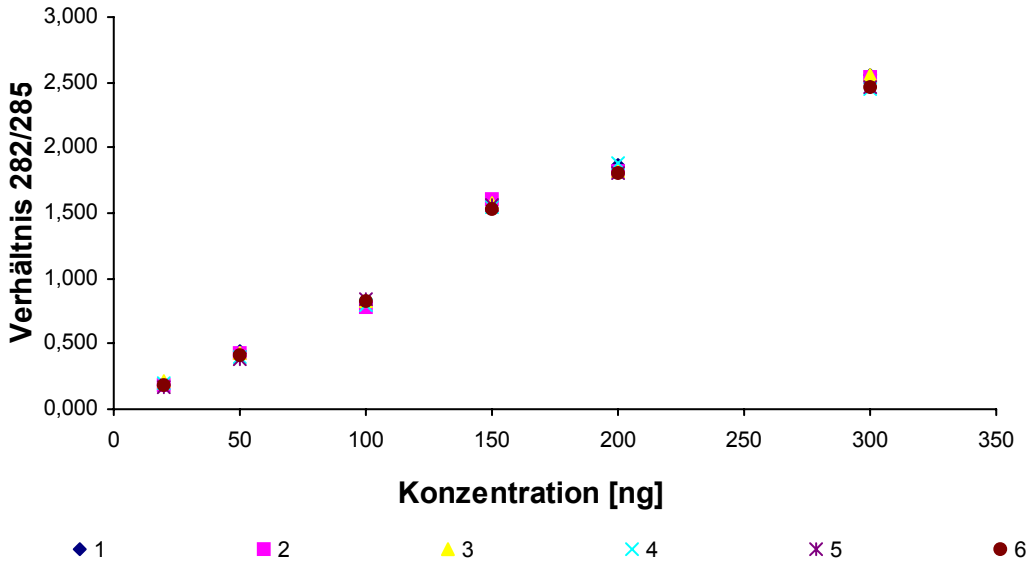


Abbildung 27: Kalibriergeraden für das Qualifier-Ion m/z 282 im Serum

3.2.3 Validierung der Methode für die Quantifizierung von Methadon

Arbeitsbereich: 50-1500ng aufgeteilt auf zwei Kalibriergeraden

Kalibriergerade I: 50-500ng

Kalibriergerade II: 500-1500ng

Verwendete Matrix: lyophillisiertes Leerserum (Fa. Recipe)

a) Target-Ion: Messsignal: m/z = 72

Kalibriergerade I: Konzentrationen der Standards [ng]: 50, 100, 200, 400, 500

Die einzelnen Konzentrationen wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 10: Statistische Berechnung für m/z 72

Standards ng	**Leerwert**	**50**	**100**	**200**	**400**	**500**
1	0,006	0,055	0,107	0,218	0,428	0,554
2	0,000	0,056	0,110	0,214	0,417	0,588
3	0,008	0,056	0,090	0,270	0,415	0,507
4	0,000	0,059	0,122	0,267	0,396	0,542
5	0,007	0,053	0,130	0,294	0,438	0,685
6	0,008	0,048	0,110	0,268	0,452	0,695
Mittelwert	0,005	0,055	0,112	0,255	0,424	0,595
Standard-abweichung	0,004	0,004	0,014	0,032	0,020	0,078

Gruppstest auf Struggler 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	1,266	1,743	1,568	1,288	1,450	1,131
Ergebnis größter Prüfwert	0,830	1,207	1,350	1,215	1,416	1,281
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest auf Ausreisser 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	1,266	1,743	1,568	1,288	1,450	1,131
Ergebnis größter Prüfwert	0,830	1,207	1,350	1,215	1,416	1,281
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauensbereich 95% +	0,008	0,058	0,123	0,282	0,440	0,659
Vertrauensbereich 95% -	0,002	0,051	0,100	0,229	0,408	0,531
relativer Vertrauensbereich	0,007	0,007	0,027	0,062	0,038	0,151
Trend Δ²	0,000042	0,000014	0,000379	0,000913	0,00048	0,005898
Trend-Test erfüllt ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja

NG 95% [ng]	0,014
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r² :

Kalibriergerade 1.	0,9992
Kalibriergerade 2.	0,9912
Kalibriergerade 3.	0,9758
Kalibriergerade 4.	0,9800
Kalibriergerade 5.	0,9645
Kalibriergerade 6.	0,9766

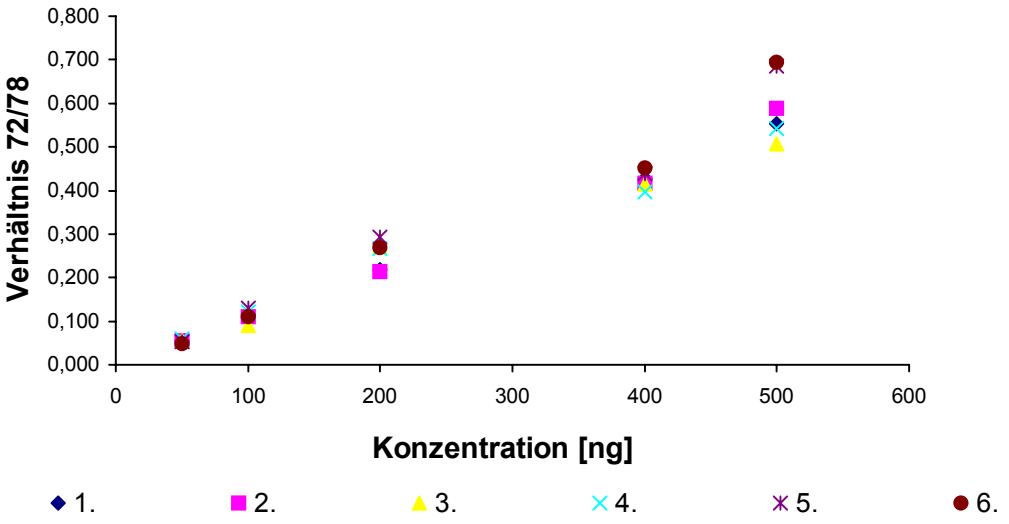


Abbildung 28: Kalibriergeraden für das Target-Ion m/z 72 im Serum

Kalibriergerade II: Konzentrationen der Standards [ng]: 500, 700, 1000, 1300, 1500

Die einzelnen Konzentrationen wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 11: Statistische Berechnung für m/z 72

m/z = 72

Standards ng	**Leerwert**	**500**	**700**	**1000**	**1350**	**1500**
1	0,006	0,554	0,744	1,007	1,360	1,544
2	0,000	0,588	0,724	1,025	1,378	1,580
3	0,008	0,507	0,710	1,020	1,401	1,596
4	0,000	0,542	0,727	1,010	1,351	1,532
5	0,007	0,547	0,791	1,160	1,364	1,510
6	0,008	0,595	0,725	1,119	1,357	1,564
Mittelwert	0,005	0,556	0,737	1,057	1,369	1,554
Standard-abweichung	0,004	0,032	0,029	0,066	0,018	0,032

Gruppstest 95% auf Straggler

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	1,266	1,500	0,936	0,759	0,955	1,394
Ergebnis größter Prüfwert	0,830	1,222	1,890	1,571	1,774	1,310
Ausreisser ?	nein	nein	nein	Nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest 99% auf Ausreisser

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	1,266	1,500	0,936	0,759	0,955	1,394
Ergebnis größter Prüfwert	0,830	1,222	1,890	1,571	1,774	1,310
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauens-bereich 95% +	0,008	0,582	0,760	1,111	1,384	1,581
Vertrauens-bereich 95% -	0,002	0,529	0,713	1,003	1,353	1,528
relativer Vertrauens-bereich	0,007	0,063	0,056	0,127	0,036	0,062
Trend Δ²	0,000041	0,002250	0,001862	0,004920	0,000710	0,001801
Trend-Test erfüllt ?	ja	ja	ja	Ja	ja	ja

NG 95% [ng]	0,125
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r²:

Kalibriergerade 1	0,9978
Kalibriergerade 2	0,9942
Kalibriergerade 3	0,9989
Kalibriergerade 4	0,9988
Kalibriergerade 5	0,9798
Kalibriergerade 6	0,9882

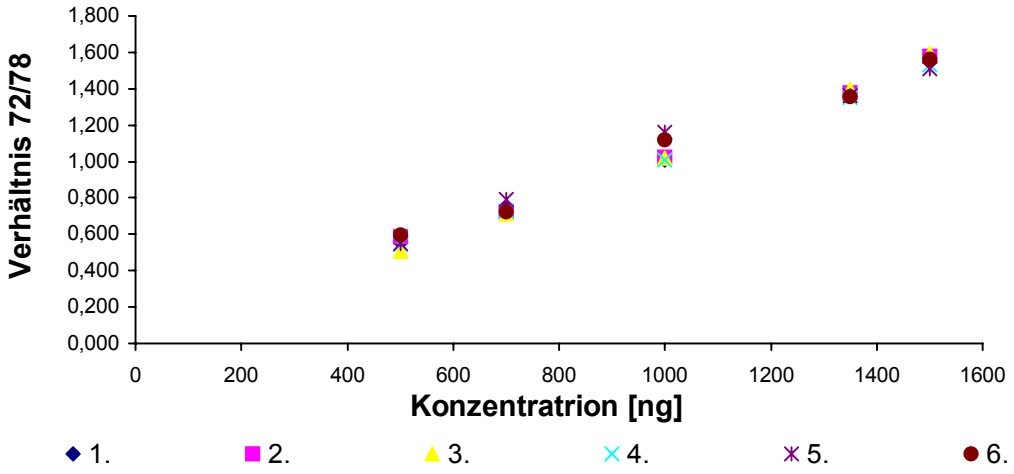


Abbildung 29: Kalibriergeraden für das Target-Ion m/z 72 im Serum

b) Qualifier-Ion: Messsignal: m/z = 294

Kalibriergerade I: Konzentrationen der Standards [ng]: 50, 100, 200, 400, 500

Die einzelnen Kalibrierpunkte wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 12: Statistische Berechnung für m/z 294

Standards ng	**Leerwert**	**50**	**100**	**200**	**400**	**500**
1	0,015	0,088	0,129	0,218	0,701	0,676
2	0,000	0,090	0,256	0,380	0,675	1,020
3	0,007	0,088	0,346	0,383	0,754	1,066
4	0,004	0,094	0,156	0,280	0,652	0,693
5	0,000	0,083	0,268	0,437	0,686	1,097
6	0,000	0,075	0,200	0,490	0,654	1,097

Mittelwert	0,008	0,086	0,226	0,365	0,687	0,942
Standard-abweichung	0,011	0,007	0,080	0,100	0,038	0,201

Gruppstest auf Straggler 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,690	1,719	1,209	1,464	0,926	1,320
Ergebnis größter Prüfwert	1,740	1,163	1,501	1,251	1,773	0,773
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest auf Ausreisser 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,690	1,719	1,209	1,464	0,926	1,320
Ergebnis größter Prüfwert	1,740	1,163	1,501	1,251	1,773	0,773
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauens-bereich 95% +	0,017	0,092	0,292	0,447	0,718	1,107
Vertrauens-bereich 95% -	0,001	0,081	0,160	0,282	0,656	0,776

relativer Vertrauens-bereich	0,022	0,013	0,155	0,194	0,073	0,390
Trend Δ²	0,000291	0,000040	0,015492	0,012861	0,003901	0,084550
Trend-Test erfüllt ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja

NG 95% [ng]	0,026
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r²:

Kalibriergerade 1	0,9389
Kalibriergerade 2	0,9705
Kalibriergerade 3	0,9593
Kalibriergerade 4	0,9807
Kalibriergerade 5	0,9555
Kalibriergerade 6	0,9395

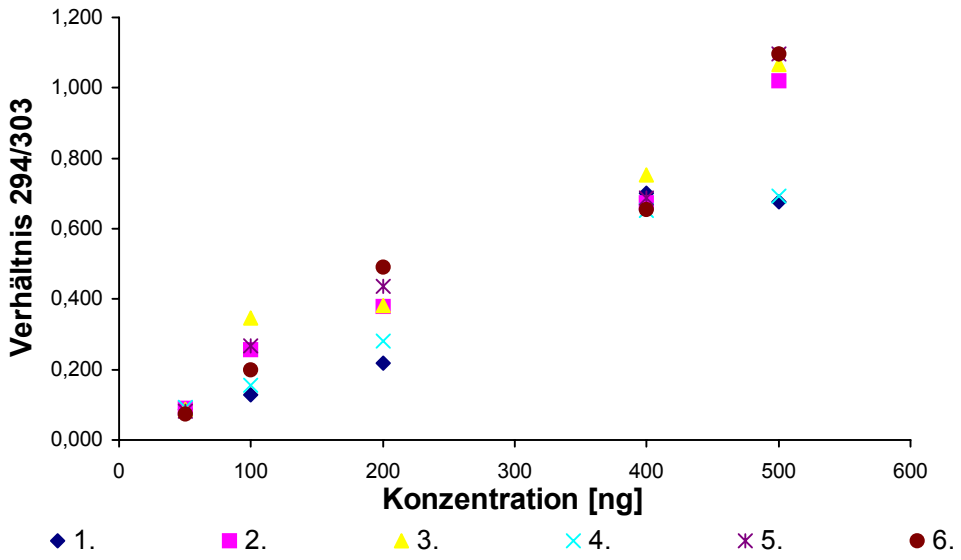


Abbildung 30: Kalibriergeraden für das Qualifier-Ion m/z 294 im Serum

Kalibriergerade II: Konzentrationen der Standards [ng]: 500, 700, 1000, 1300, 1500

Die einzelnen Kalibrierpunkte wurden mindestens 6x aufgearbeitet und gemessen, bevor die statistischen Berechnungen durchgeführt wurden.

Tabelle 13: Statistische Berechnung für m/z 294

m/z = 294

Standards ng	**Leerwert**	**500**	**700**	**1000**	**1350**	**1500**
1	0,015	0,676	1,093	1,372	2,400	2,676
2	0,000	0,666	0,981	1,732	2,240	2,799
3	0,027	1,066	1,659	2,320	2,652	3,087
4	0,004	0,693	1,004	1,429	2,157	2,619
5	0,000	1,097	1,605	2,498	2,700	3,100
6	0,000	1,097	1,545	1,863	2,454	2,862

Mittelwert	0,008	0,883	1,315	1,869	2,434	2,857
Standard-abweichung	0,011	0,224	0,320	0,460	0,216	0,202

Gruppstest auf Straggler 95%

Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,690	0,966	1,041	1,080	1,279	1,177
Ergebnis größter Prüfwert	1,740	0,957	1,076	1,367	1,230	1,200
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Gruppstest auf Ausreisser 99%

Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944
Ergebnis kleinster Prüfwert	0,690	0,966	1,041	1,080	1,279	1,177
Ergebnis größter Prüfwert	1,740	0,957	1,076	1,367	1,230	1,200
Ausreisser ?	nein	nein	nein	nein	nein	nein

„Tabellenwert“ entstammt der Tabelle nach Grupps für n= 6.

Vertrauensbereich 95% +	0,017	1,067	1,579	2,248	2,612	3,024
Vertrauensbereich 95% -	0,001	0,698	1,050	1,490	2,255	2,690
relativer Vertrauensbereich	0,022	0,435	0,621	0,893	0,420	0,393
Trend Δ²	0,00029	0,09248	0,25321	0,56304	0,15914	0,12102
Trend-Test erfüllt ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja

NG 95% [ng]	0,870
BG 95% [ng]	100

Bestimmtheitsmass r²:

Kalibriergerade 1	0,9731
Kalibriergerade 2	0,9864
Kalibriergerade 3	0,9695
Kalibriergerade 4	0,9842
Kalibriergerade 5	0,9482
Kalibriergerade 6	0,9852

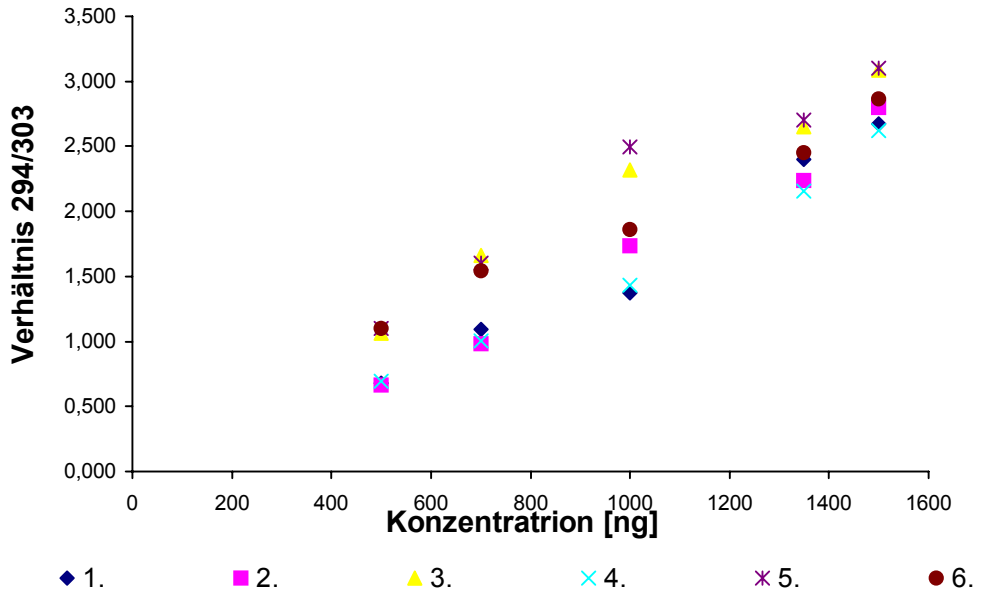


Abbildung 31: Kalibriergeraden für das Qualifier-Ion m/z 294 im Serum

4. Ergebnisse

4.1. Auswertung der chemisch-analytischen Ergebnisse

Die Bezeichnung (-) bzw. (+) steht jeweils für die Art der durchgeführten Analytik. Um Gesamtmorphin zu bestimmen wurde die Probe einer Hydrolyse (+) unterzogen. Freies, unkonjugiertes Morphin erfasst man, indem die Proben ohne weiterer Vorbehandlung (-) extrahiert werden.

4.1.1 Matrix: Herzblut

4.1.1.1 Quantitative Auswertung der Messergebnisse von Morphin in Herzblut

Tabelle 14: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Sektions Nr.	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	624,8	5285,7
Hbl 142	10273,7	17375,7
Hbl 148	449,6	7346,0
Hbl 165	1429,3	46124,2
Hbl 180	1420,6	5609,7
Hbl 193	3607,2	8805,2
Hbl 4	1530,7	2257,8
Hbl 28	16170,6	12315,1
Hbl 46	8361,4	7858,4

Tabelle 15: 30 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	414,3	4448,8	360,4	2905,1
Hbl 142	8533,7	9247,7	8888,5	9247,5
Hbl 148	206,3	2444,9	307,9	1459,1
Hbl 165	2356,5	4088,1	1791,8	2580,3
Hbl 180	1652,7	4379,0	1585,2	4314,8
Hbl 193	4284,7	7618,2	4443,0	7763,3
Hbl 4	1524,8	2828,7	849,1	3807,5
Hbl 28	16686,4	16167,3	15696,1	13708,5
Hbl 46	8182,3	6587,3	7398,4	8057,8

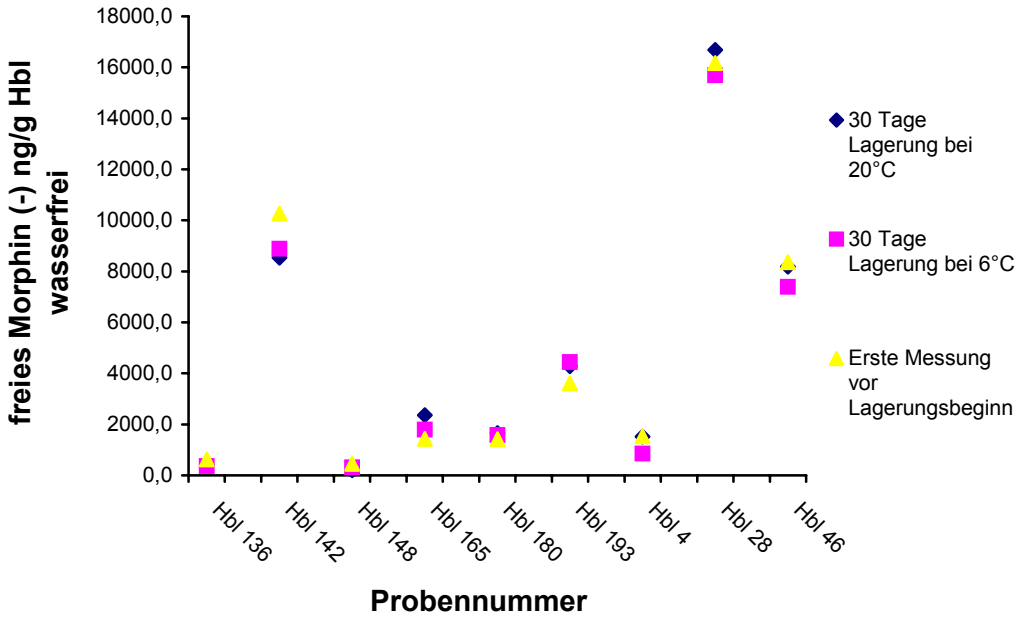


Abbildung 32: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) bei 30 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 16: 55 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	547,2	3656,9	420,3	5639,8
Hbl 142	7705,2	9014,2	7251,4	10109,4
Hbl 148	287,6	2152,0	356,8	2225,0
Hbl 165	2596,7	4016,4	1797,8	3892,3
Hbl 180	2247,7	4933,9	1551,5	3869,3
Hbl 193	4330,5	8472,0	4577,8	7080,6
Hbl 4	1842,0	3244,9	998,1	2522,2
Hbl 28	15879,0	16032,1	19129,7	20359,4
Hbl 46	7293,4	7702,9	8325,0	7640,8

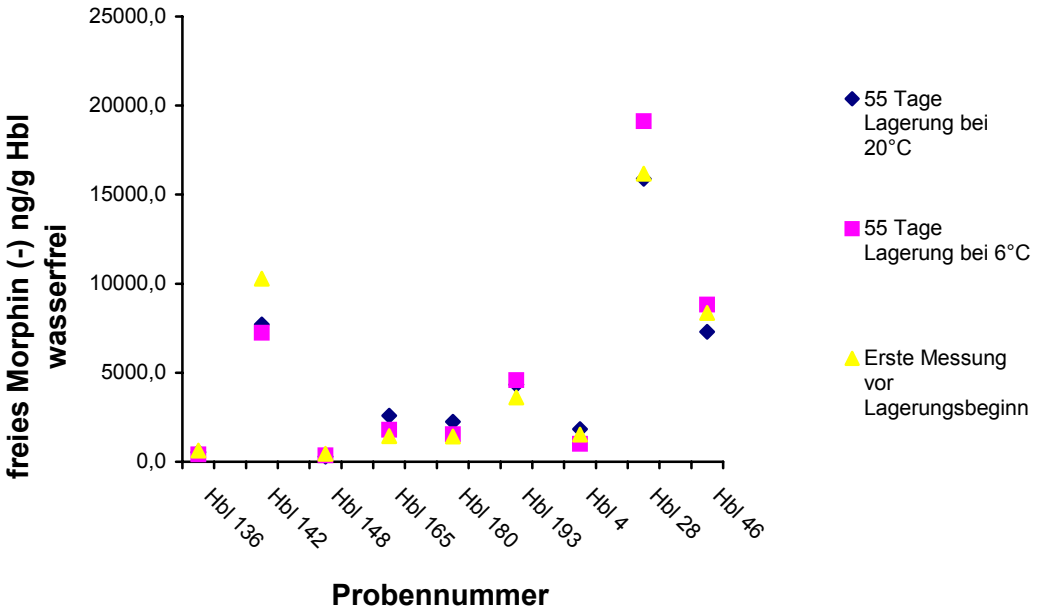


Abbildung 33: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) bei 55 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 17: 119 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	299,3	3625,0	290,4	4782,8
Hbl 142	8300,6	8610,6	7284,6	8048,9
Hbl 148	313,1	795,6	206,8	1058,6
Hbl 165	2852,5	3916,2	1876,6	2688,9
Hbl 180	1588,4	3309,4	1933,9	4320,5
Hbl 193	4133,5	8954,6	4182,5	7243,5
Hbl 4	1193,8	2391,2	1342,8	2264,6
Hbl 28	14027,3	14585,9	18554,6	17155,7
Hbl 46	8973,2	8718,6	8187,0	7405,0

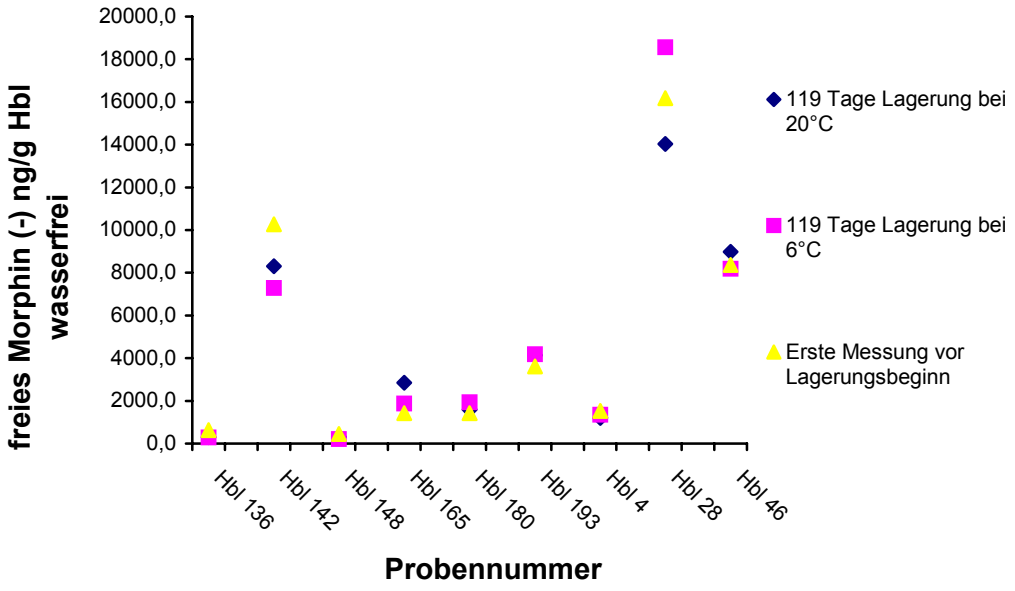


Abbildung 34: Vergleichder Messergebnisse von freiem Morphin bei 119 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 18: 188 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	450,2	3092,5	351,2	4843,5
Hbl 142	7854,2	10965,2	8457,2	10041,8
Hbl 148	379,5	2327,3	347,5	3379,8
Hbl 165	2432,0	4354,8	2384,3	4523,2
Hbl 180	1228,6	2730,4	1692,6	3875,8
Hbl 193	3875,5	7668,2	4444,8	7070,0
Hbl 4	1205,3	1707,6	1428,9	3174,8
Hbl 28	12859,2	12174,3	17563,5	18846,8
Hbl 46	8929,7	7425,2	9966,0	9884,6

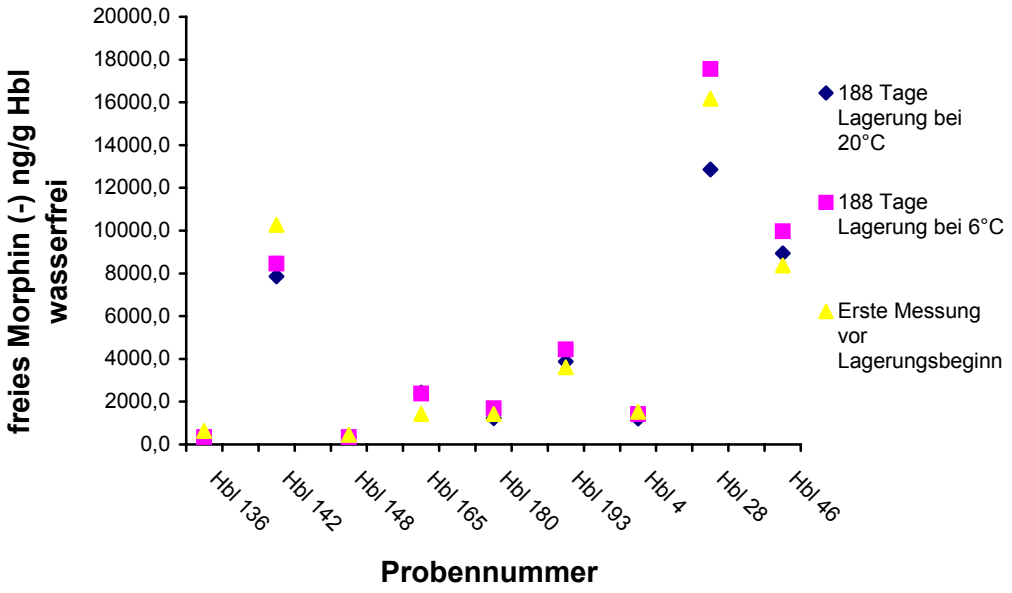


Abbildung 35: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) bei 188 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 19: 337 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Freies Morphin (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtmorphin (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	401,2	3832,9	399,4	4026,8
Hbl 142	6196,2	8166,3	9132,0	10,478
Hbl 148	265,6	2095,3	278,7	2447,3
Hbl 165	2473,4	3147,4	1858,5	4554,5
Hbl 180	1888,3	4881,6	2413,4	4935,1
Hbl 193	4146,5	7203,4	4746,7	7977,9
Hbl 4	2041,0	3713,0	0,0	2426,2
Hbl 28	12854,3	11193,9	0,0	13114,8
Hbl 46	8393,7	7639,3	9238,2	10111,4

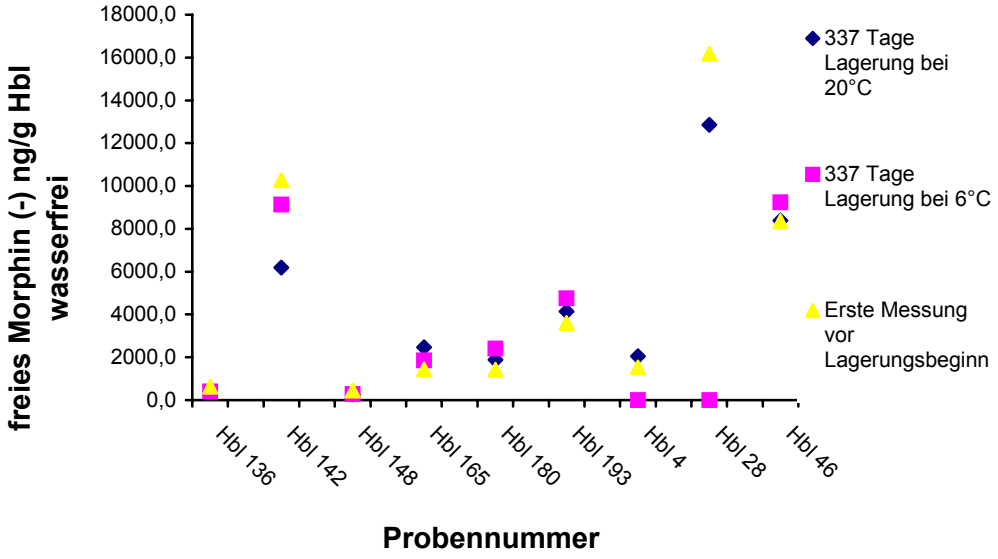


Abbildung 36: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 337 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

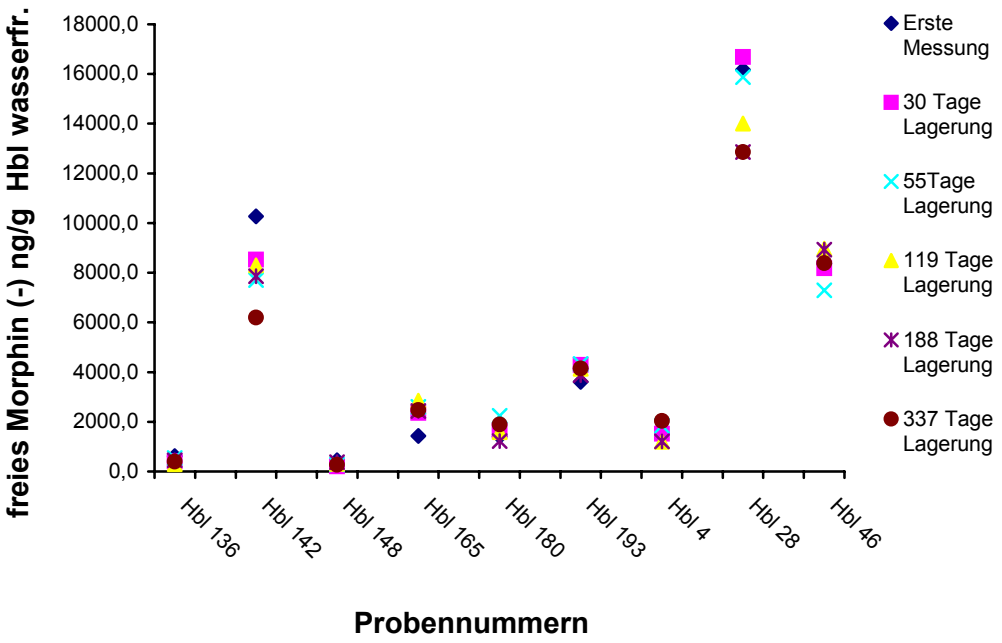


Abbildung 37: Vergleich der einzelnen Messergebnisse von freiem Morphin (-) bei 20°C gelagerten Proben (ohne Hydrolyse)

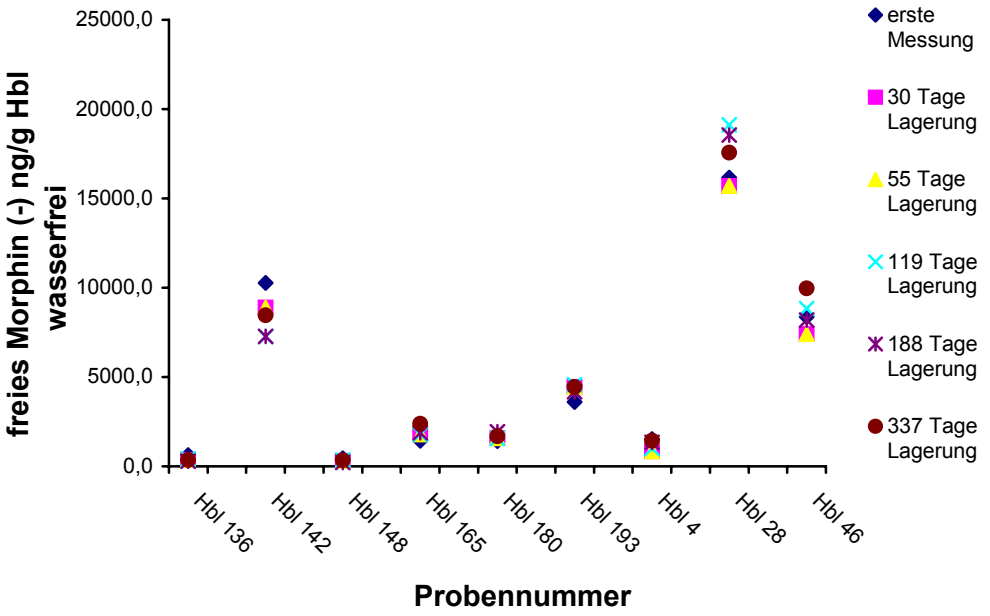


Abbildung 38: Vergleich der einzelnen Messergebnisse von freiem Morphin (-) bei 6°C gelagerten Proben (ohne Hydrolyse)

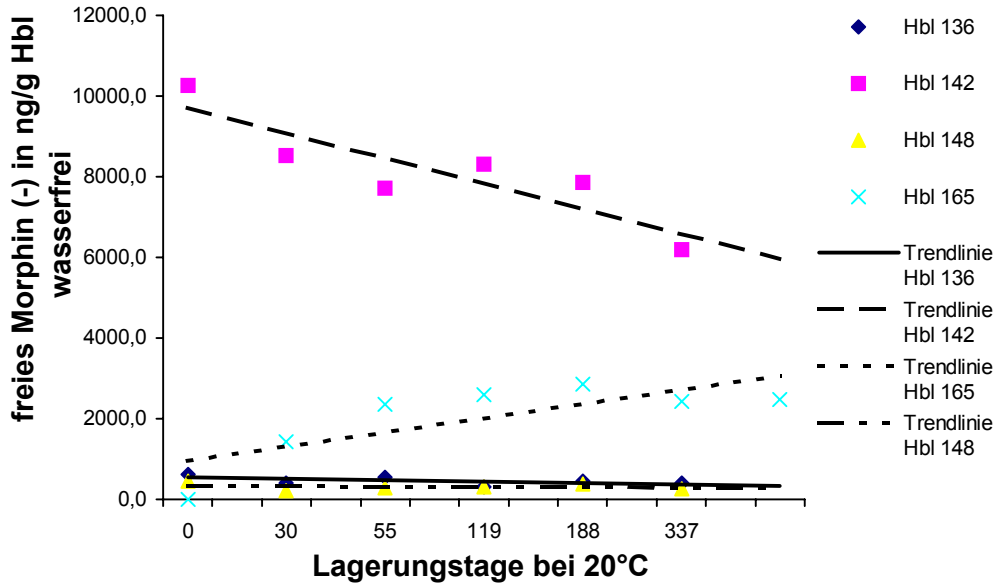


Abbildung 39: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Hbl über den gesamten Zeitraum: Hbl 136, Hbl 142, Hbl 148, Hbl 165

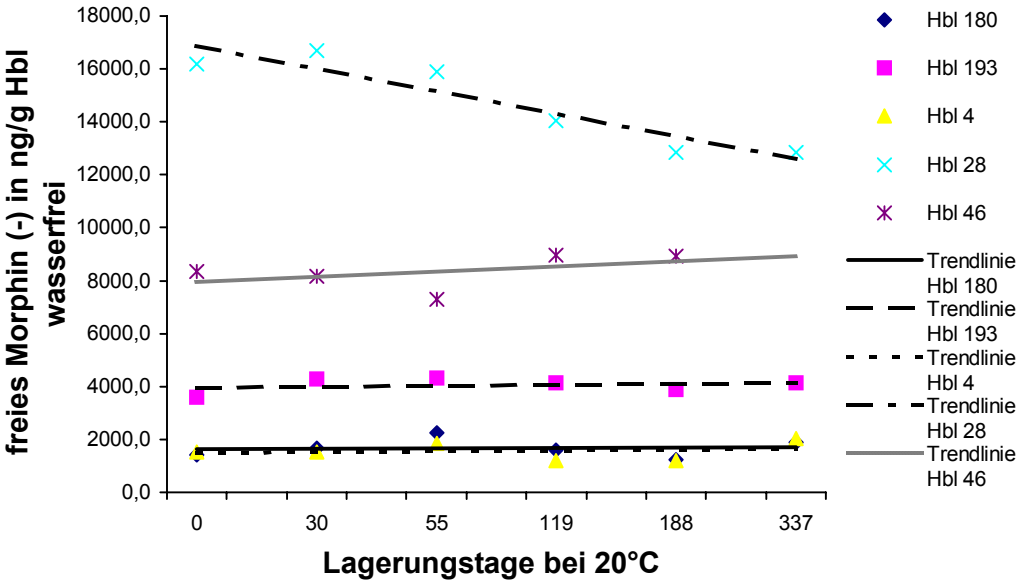


Abbildung 40: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Hbl über den gesamten Zeitraum: Hbl 180, Hbl 193, Hbl 4, Hbl 128, Hbl 46

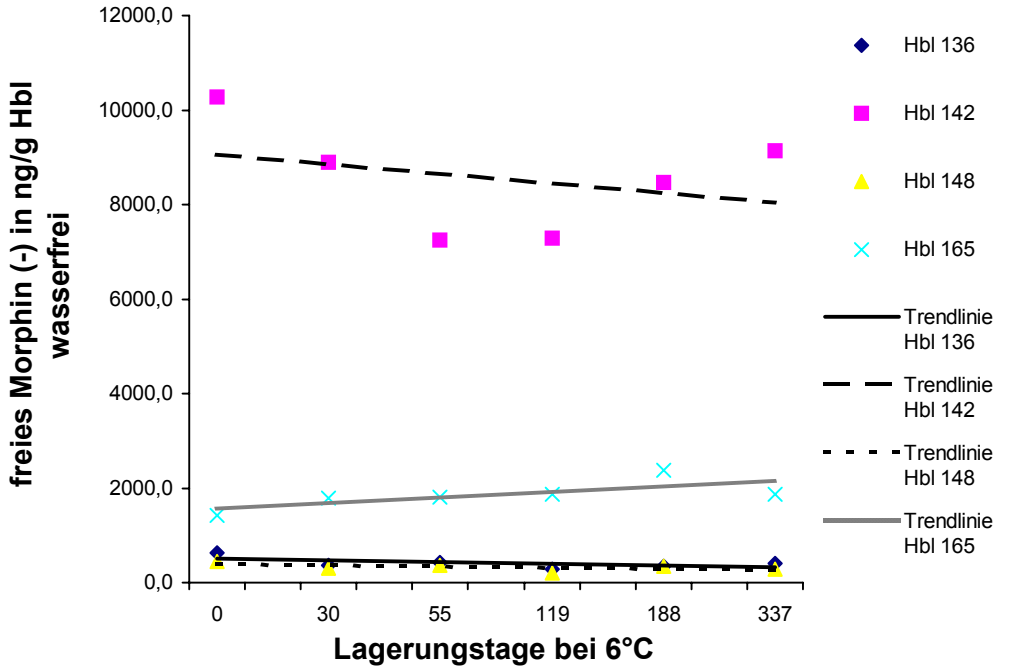


Abbildung 41: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Hbl über den gesamten Zeitraum: Hbl 136, Hbl 142, Hbl 148, Hbl 165

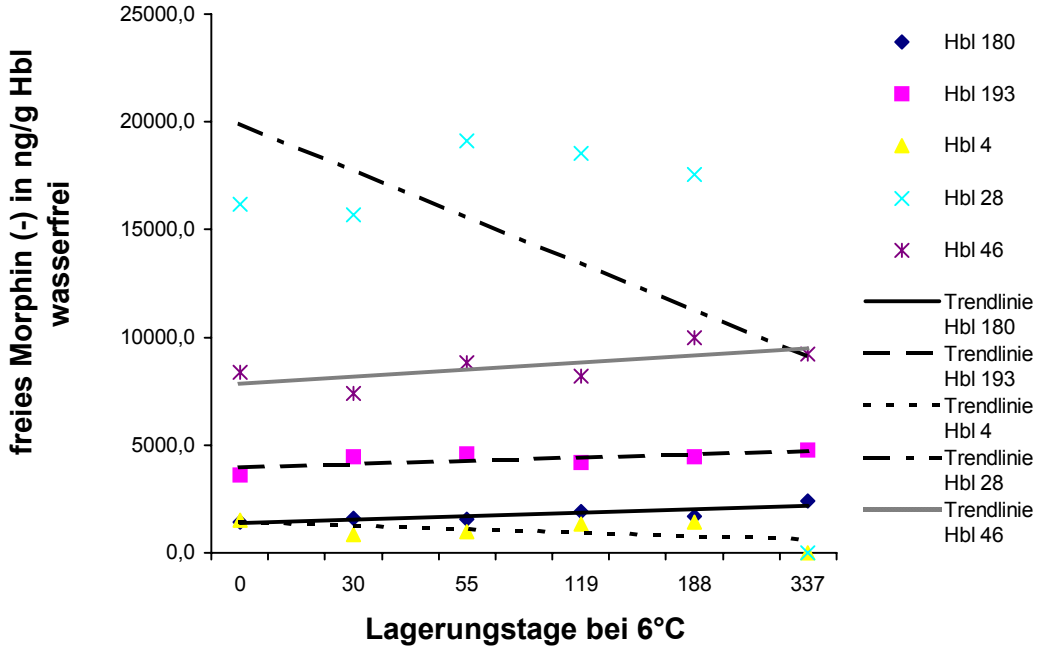


Abbildung 42: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Hbl über den gesamten Zeitraum: Hbl 180, Hbl 193, Hbl 4, Hbl 128, Hbl 46

4.1.1.2 Quantitative Auswertung: Gebundenes Morphin in Herzblut

Die durchgeführte Methode zur Bestimmung von gebundenen Morphin läßt keine Unterscheidung der einzelnen Morphinverbindungen zu. Das Ergebnis kann somit nur in allgemeiner Form als „gebundenes Morphin“ angegeben werden.

Tabelle 20: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Proben Nr.	Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)
Hbl 136	4660,9
Hbl 142	7102,0
Hbl 148	6896,3
Hbl 165	3183,0
Hbl 180	4189,0
Hbl 193	5198,0
Hbl 4	727,0
Hbl 28	n.n.
Hbl 46	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 21: 30 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)
Hbl 136	4034,5	2544,6
Hbl 142	713,9	359,0
Hbl 148	2238,5	1151,2
Hbl 165	1731,6	0788,4
Hbl 180	2726,3	2729,5
Hbl 193	3333,5	3320,2
Hbl 4	1303,9	2958,4
Hbl 28	n.n.	n.n.
Hbl 46	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

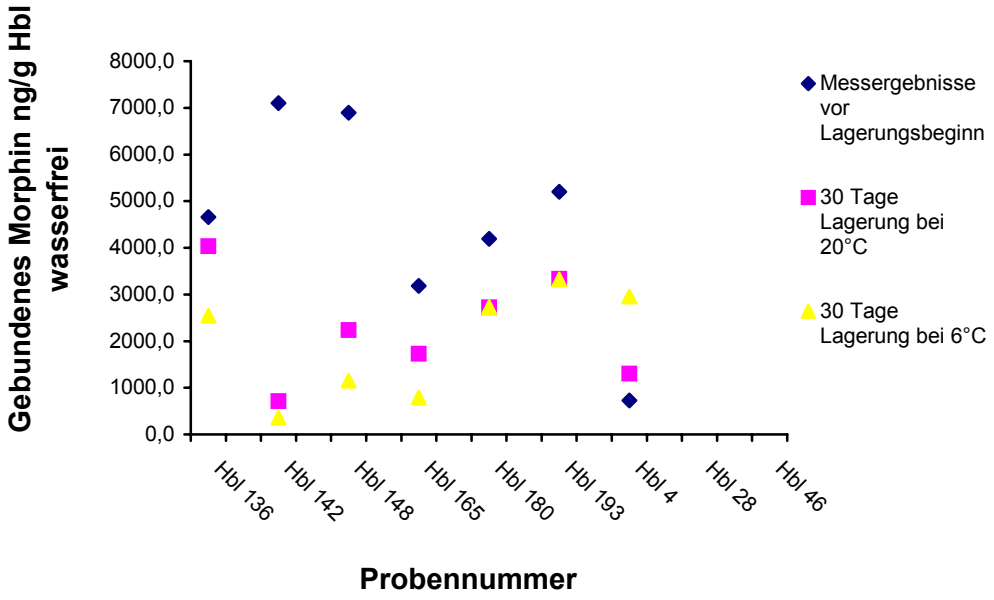


Abbildung 43: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin bei 30 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 22: 55 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)
Hbl 136	3109,7	5219,4
Hbl 142	1308,9	2858,0
Hbl 148	1864,5	1867,0
Hbl 165	1419,6	2094,7
Hbl 180	2686,2	2317,7
Hbl 193	4,141,4	2502,8
Hbl 4	1402,9	1524,1
Hbl 28	n.n.	n.n.
Hbl 46	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

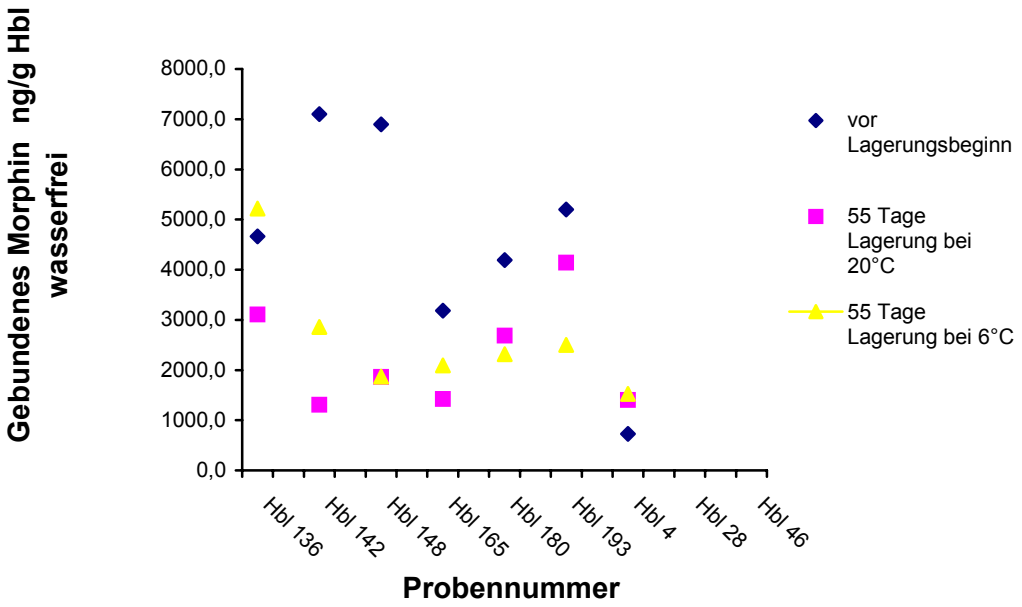


Abbildung 44: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin bei 55 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 23: 119 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)
Hbl 136	3325,6	4492,3
Hbl 142	309,9	764,3
Hbl 148	482,5	851,7
Hbl 165	1063,7	812,3
Hbl 180	1721,0	2386,5
Hbl 193	4821,0	3060,9
Hbl 4	1197,3	921,7
Hbl 28	558,6	n.n.
Hbl 46	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

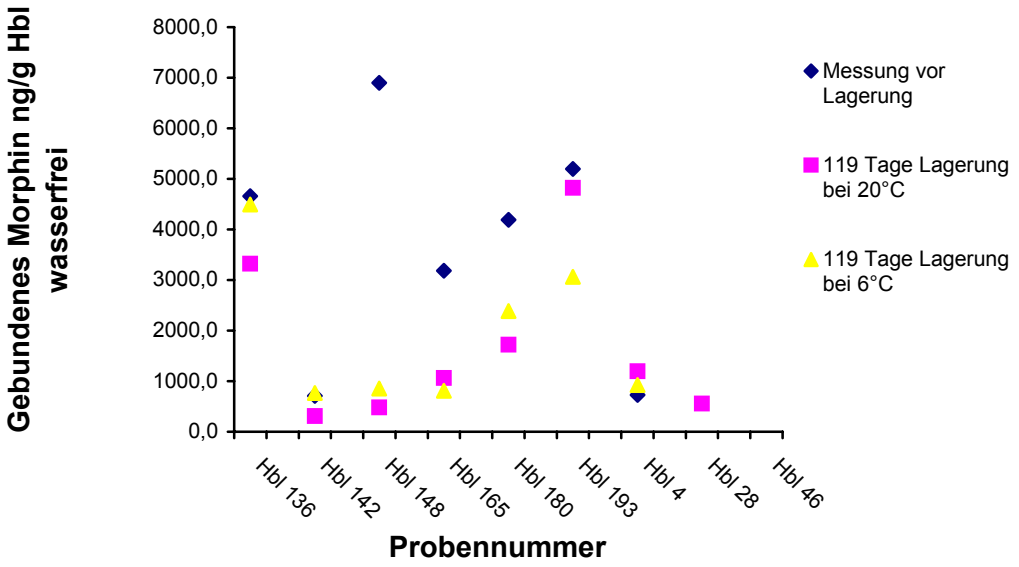


Abbildung 45: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin bei 119 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 24: 188 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)
Hbl 136	2642,3	4492,3
Hbl 142	3111,0	1584,5
Hbl 148	1947,7	3032,3
Hbl 165	1922,7	2138,8
Hbl 180	1501,8	2183,2
Hbl 193	3792,6	2625,2
Hbl 4	502,2	1745,8
Hbl 28	n.n.	1282,9
Hbl 46	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

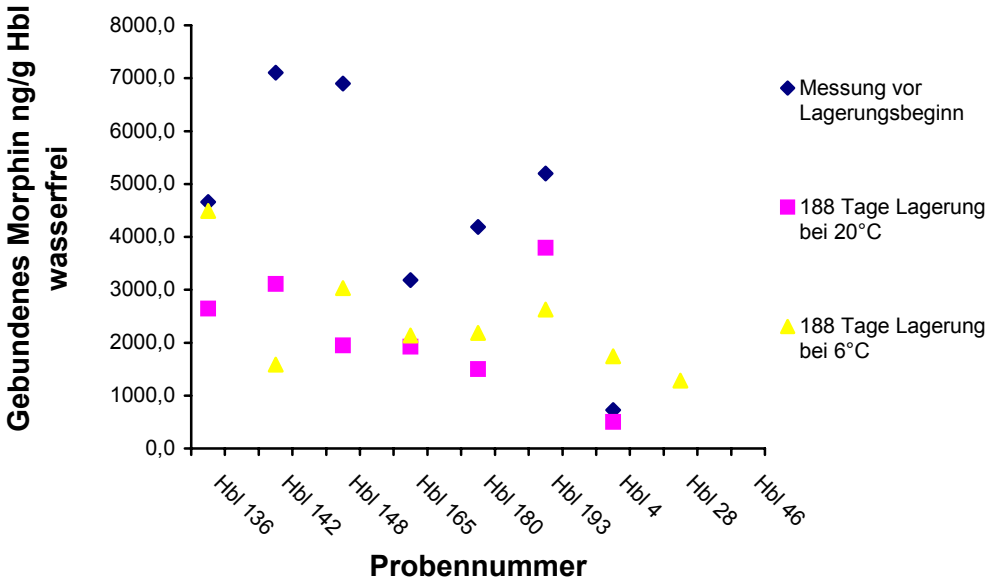


Abbildung 46: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin bei 188 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 25: 337 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Hbl (ng/g)
Hbl 136	3431,6	3627,3
Hbl 142	1970,0	1347,6
Hbl 148	1829,6	2168,5
Hbl 165	674,0	2695,9
Hbl 180	2993,3	2521,7
Hbl 193	3056,9	3231,1
Hbl 4	1672,0	n.n.
Hbl 28	1660,3	n.n.
Hbl 46	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

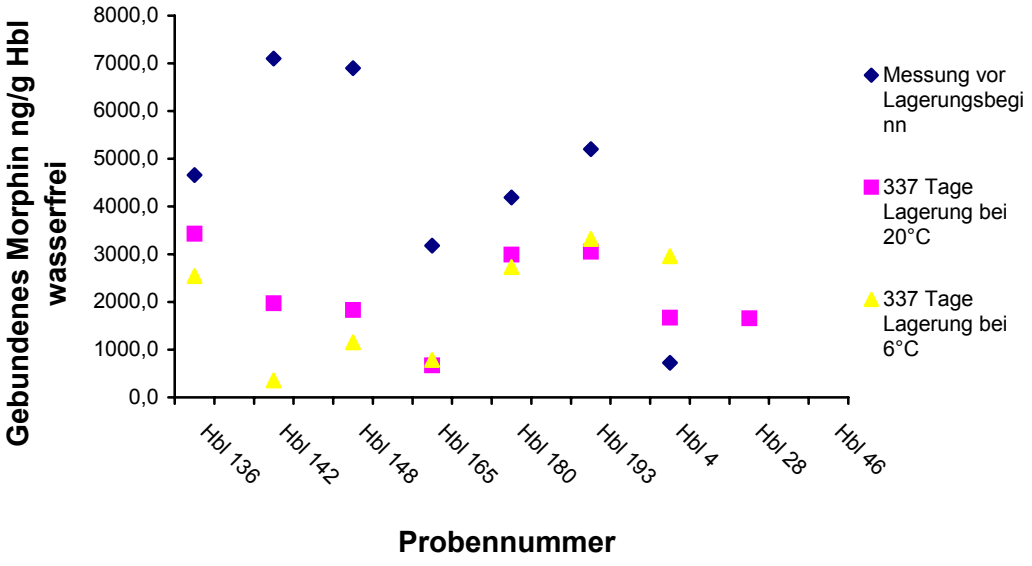


Abbildung 47: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin bei 337 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

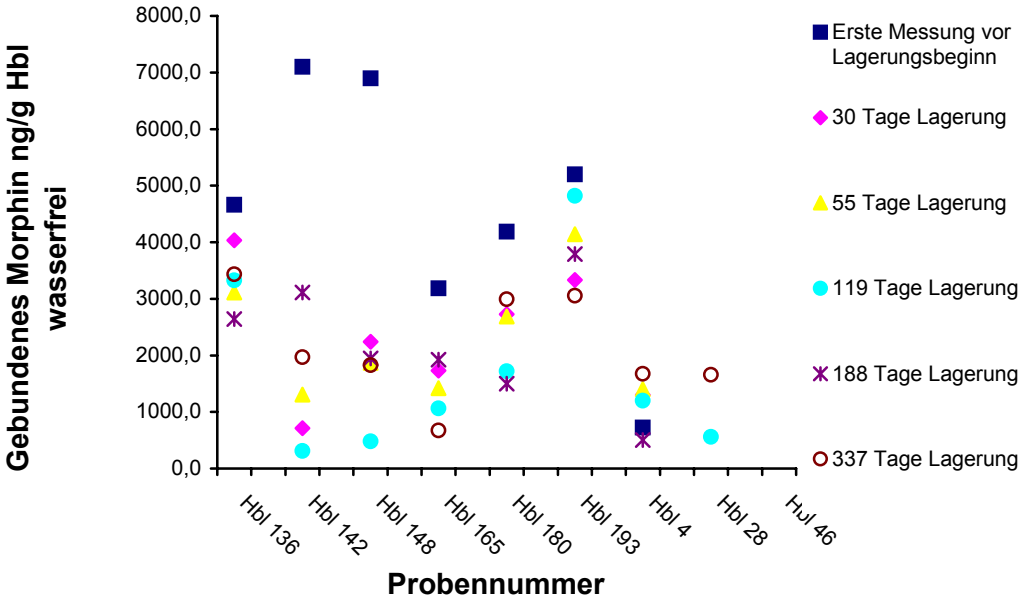


Abbildung 48: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin über den gesamten Lagerungszeitraum bei 20°C

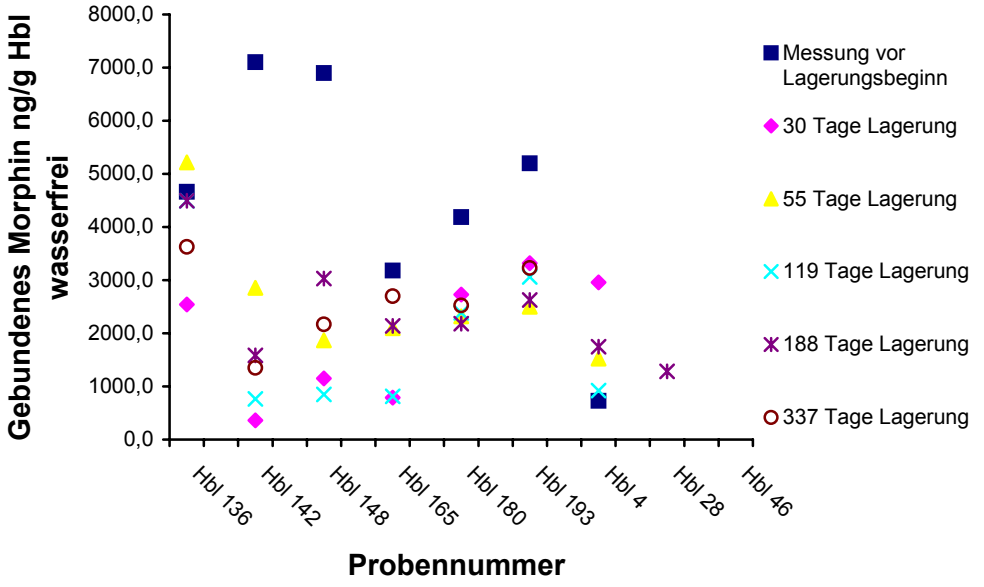


Abbildung 49: Vergleich der Messergebnisse von gebundenen Morphin über den gesamten Lagerungszeitraum bei 6°C

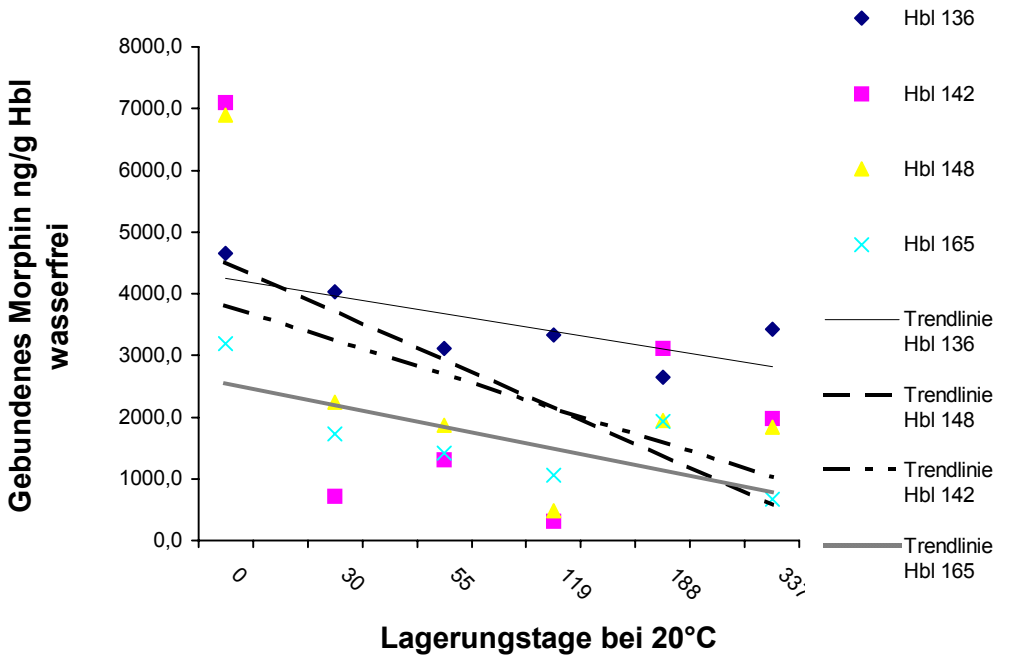


Abbildung 50: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin bei 20°C
Lagerung: Hbl 136, Hbl 142, Hbl 148, Hbl 165

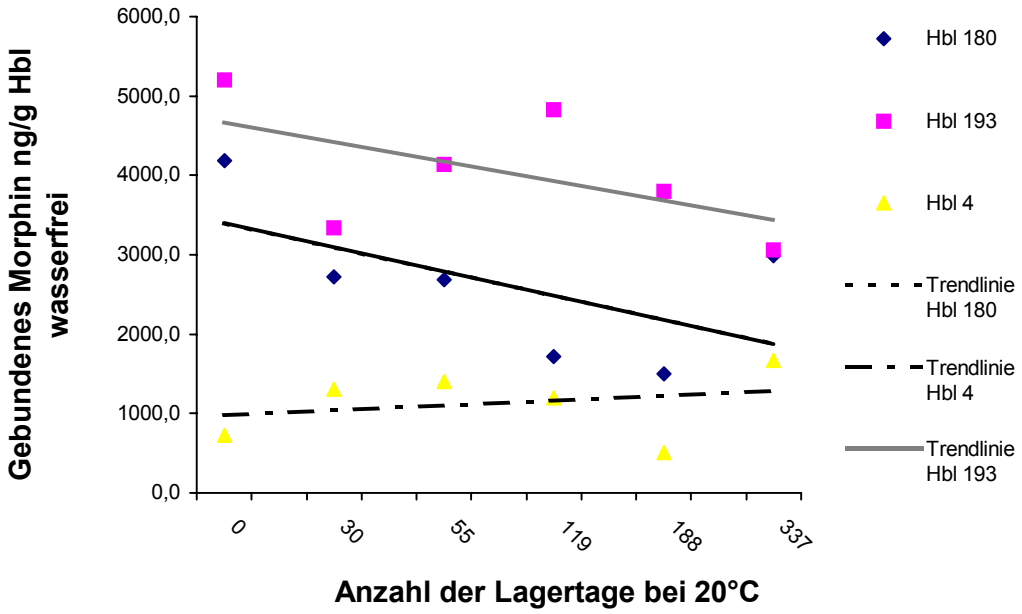


Abbildung 51: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin bei 20°C
Lagerung: Hbl 180, Hbl 193, Hbl 4

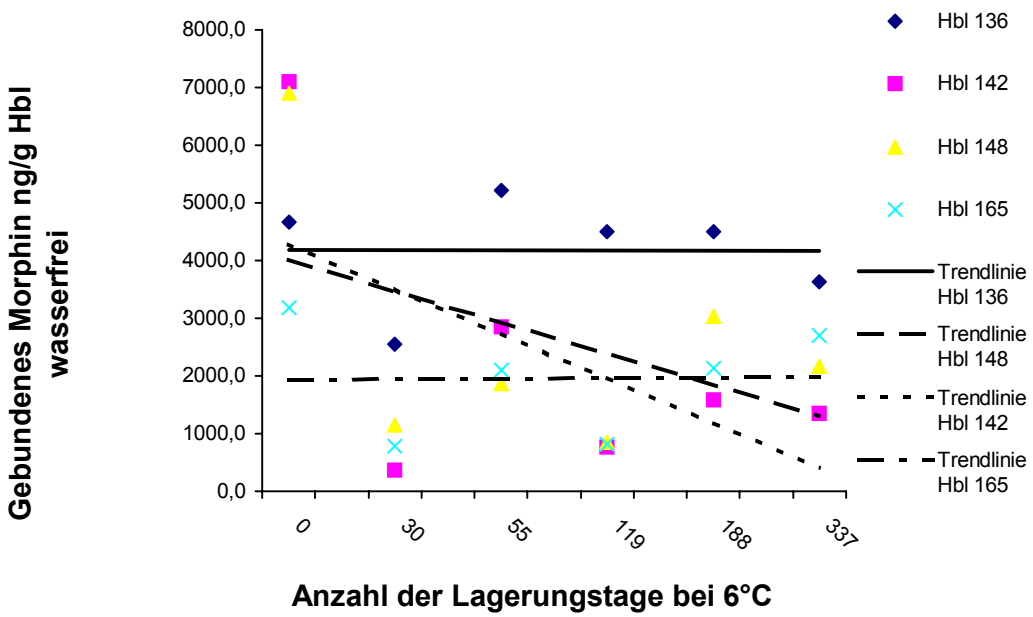


Abbildung 52: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin bei 6°C Lagerung: Hbl 136, Hbl 142, Hbl 148, Hbl 165

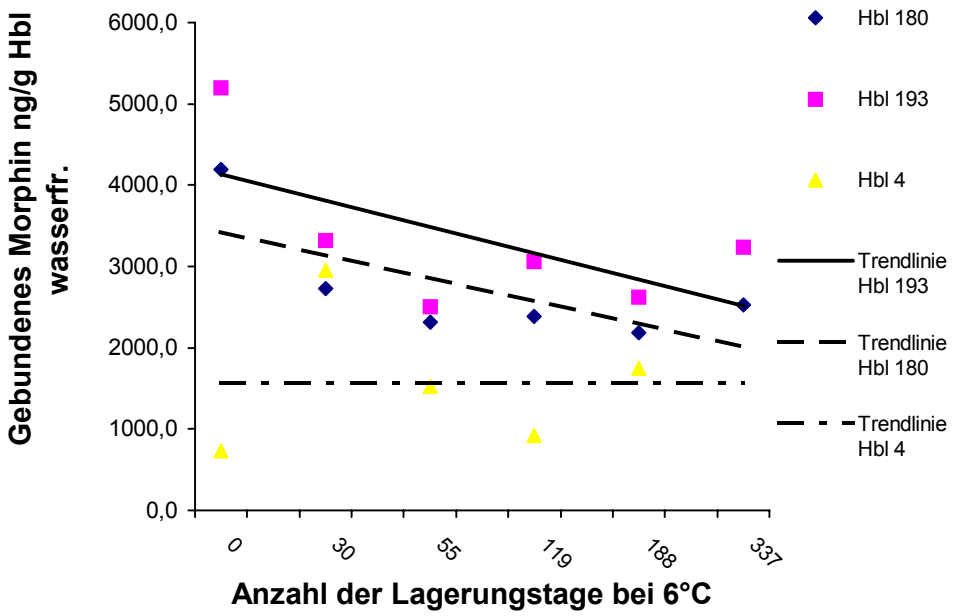


Abbildung 53: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin bei 6°C Lagerung: Hbl 180, Hbl 193, Hbl 4

4.1.1.3 Quantitative Auswertung der Messergebnisse von Codein in Herzblut

Tabelle 26: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Proben Nr.	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	412,8	--
Hbl 142	997,8	964,2
Hbl 148	381,8	470,6
Hbl 165	368,1	386,7
Hbl 180	123,5	215,0
Hbl 193	467,7	482,2
Hbl 4	299,2	325,6
Hbl 28	571,1	709,6
Hbl 46	503,4	482,6

--: Kein Interner Standard nachweisbar, Daten nicht auswertbar

Tabelle 27: 30 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	212,7	330,2	187,0	546,6
Hbl 142	502,3	522,2	528,8	521,9
Hbl 148	150,0	225,5	178,4	--
Hbl 165	225,5	342,8	290,1	385,6
Hbl 180	279,8	266,5	286,7	286,8
Hbl 193	482,2	418,2	487,4	459,5
Hbl 4	187,1	221,1	236,1	250,0
Hbl 28	409,1	550,7	557,0	701,8
Hbl 46	504,8	668,8	408,1	533,0

--: Kein Interner Standard nachweisbar, Daten nicht auswertbar

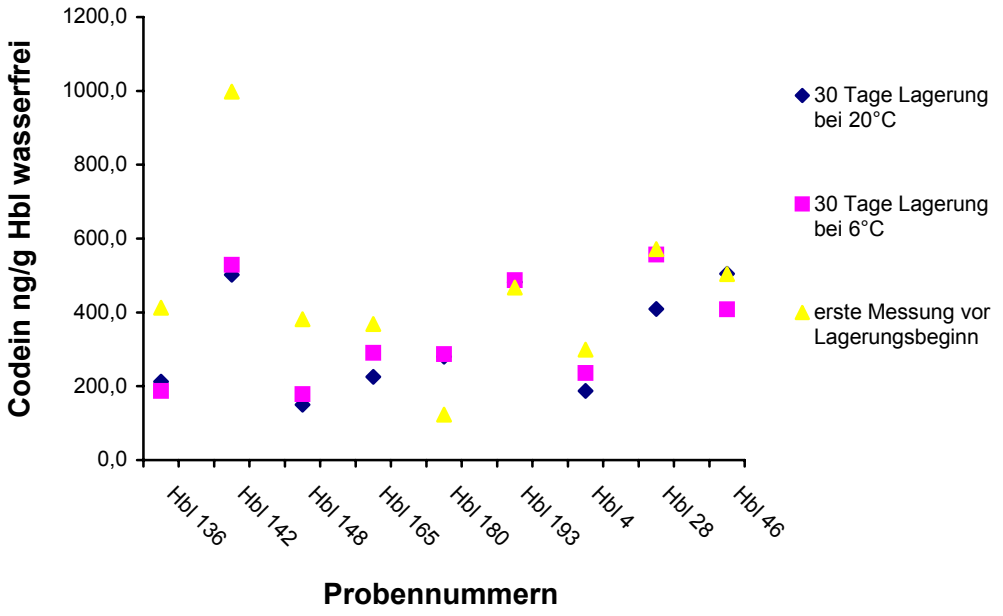


Abbildung 54: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 30 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 28: 55 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	123,0	179,4	137,14	216,9
Hbl 142	438,8	480,5	386,1	634,2
Hbl 148	88,1	165,4	94,4	109,7
Hbl 165	185,3	243,5	178,2	247,1
Hbl 180	128,8	311,4	186,6	293,9
Hbl 193	442,1	502,3	534,4	496,4
Hbl 4	240,9	206,1	162,9	182,8
Hbl 28	581,9	642,1	626,8	642,0
Hbl 46	444,4	526,1	409,1	401,7

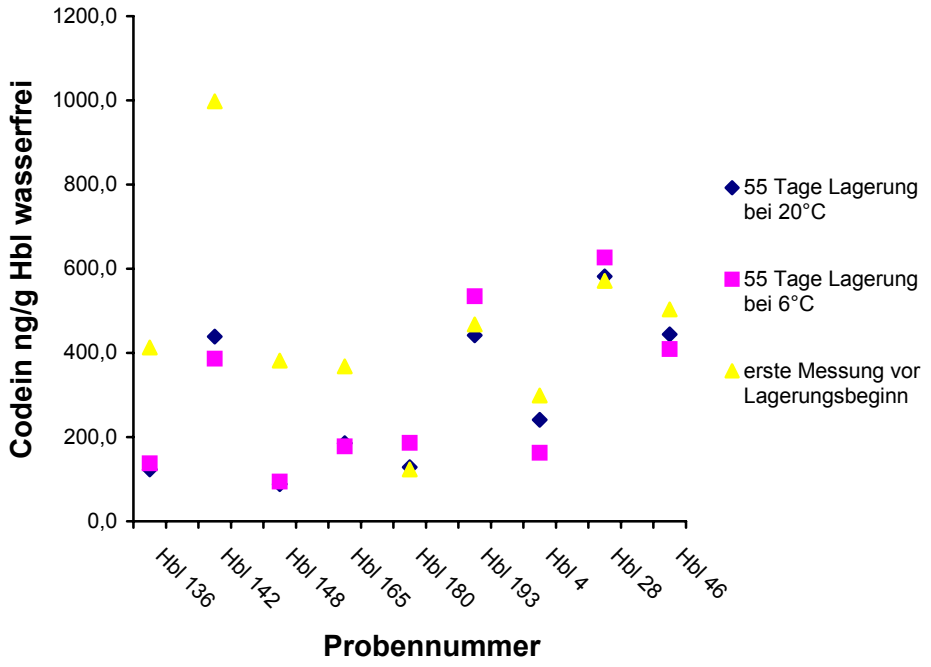


Abbildung 55: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 55 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 29: 119 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben-Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	102,2	124,1	106,1	110,4
Hbl 142	304,1	308,8	426,6	406,9
Hbl 148	134,5	148,4	126,5	136,7
Hbl 165	131,0	150,4	113,5	251,5
Hbl 180	72,6	153,0	205,6	271,1
Hbl 193	310,0	3442,6	355,1	465,3
Hbl 4	161,0	173,9	148,5	270,6
Hbl 28	525,9	631,8	567,9	673,5
Hbl 46	504,9	450,6	446,9	473,9

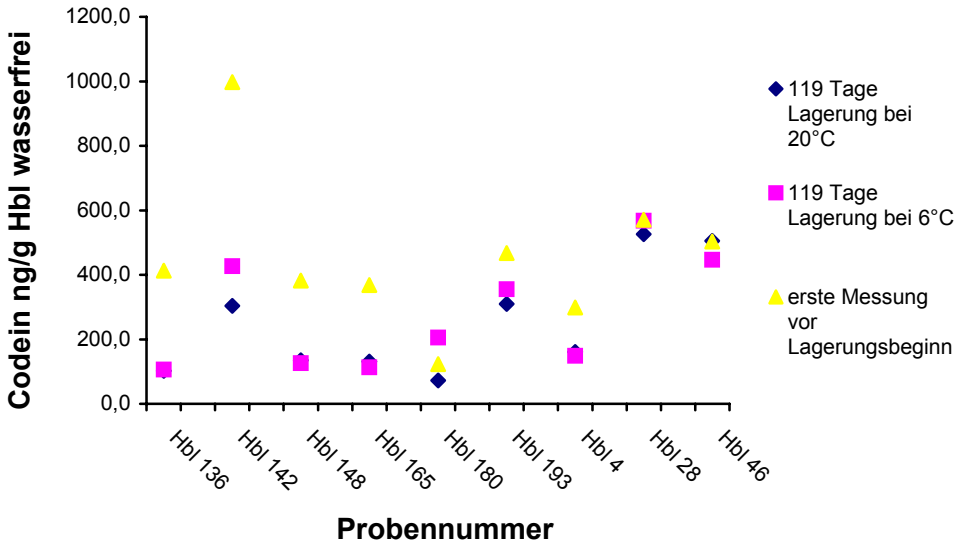


Abbildung 56: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 119 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 30: 188 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	123,9	197,9	106,2	167,9
Hbl 142	486,4	571,8	389,2	658,3
Hbl 148	111,2	157,4	126,7	158,6
Hbl 165	296,2	291,4	167,2	257,1
Hbl 180	154,2	335,4	222,9	368,5
Hbl 193	505,0	582,1	542,8	579,3
Hbl 4	191,0	223,9	178,9	196,1
Hbl 28	676,5	675,0	678,8	658,2
Hbl 46	469,4	535,4	567,1	471,6

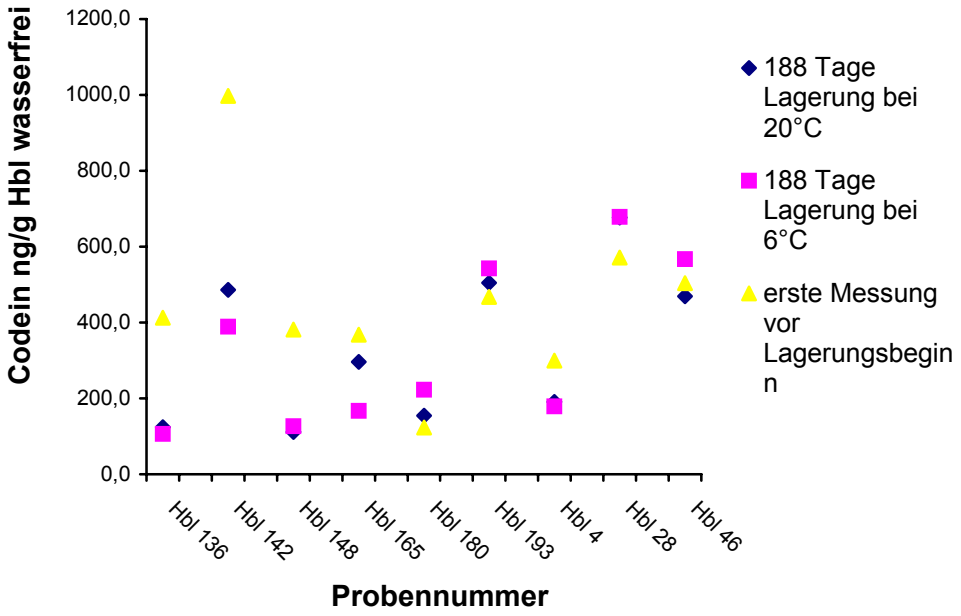


Abbildung 57: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 188 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 31: 337 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)	Codein (-) ng/g Hbl (wasserf.)	Gesamtcodein (+) ng/g Hbl (wasserf.)
Hbl 136	73,7	88,4	46,8	75,3
Hbl 142	395,2	333,7	423,3	485,4
Hbl 148	72,2	87,0	67,0	57,9
Hbl 165	126,3	162,0	106,5	148,1
Hbl 180	213,0	202,9	154,1	189,6
Hbl 193	416,3	386,3	393,2	392,8
Hbl 4	113,3	147,5	111,7	114,6
Hbl 28	515,6	704,2	687,5	672,2
Hbl 46	468,7	565,9	470,1	527,9

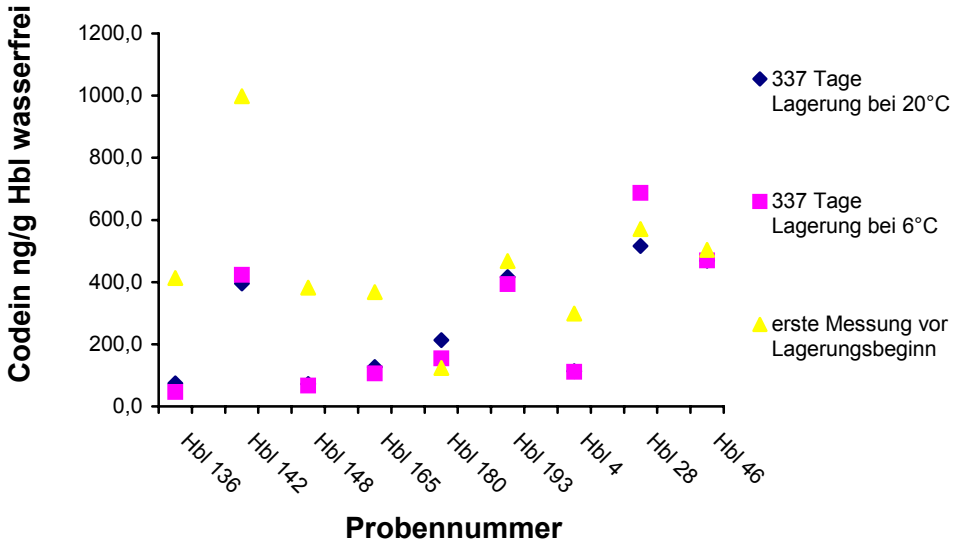


Abbildung 58: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 337 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

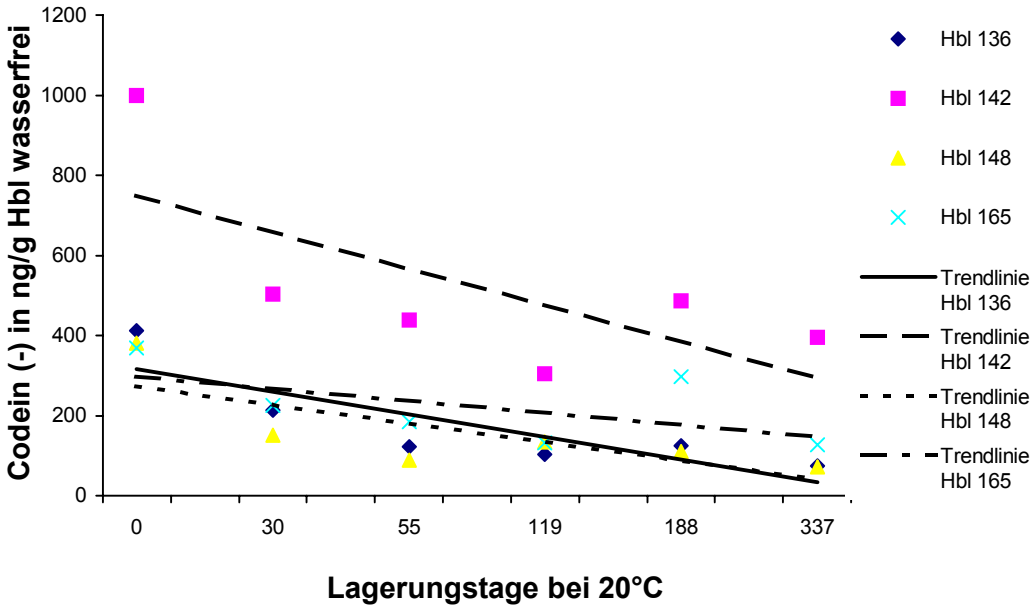


Abbildung 59: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Codein über die gesamte Lagerzeit Hbl 136, Hbl 142, Hbl 148, Hbl 165

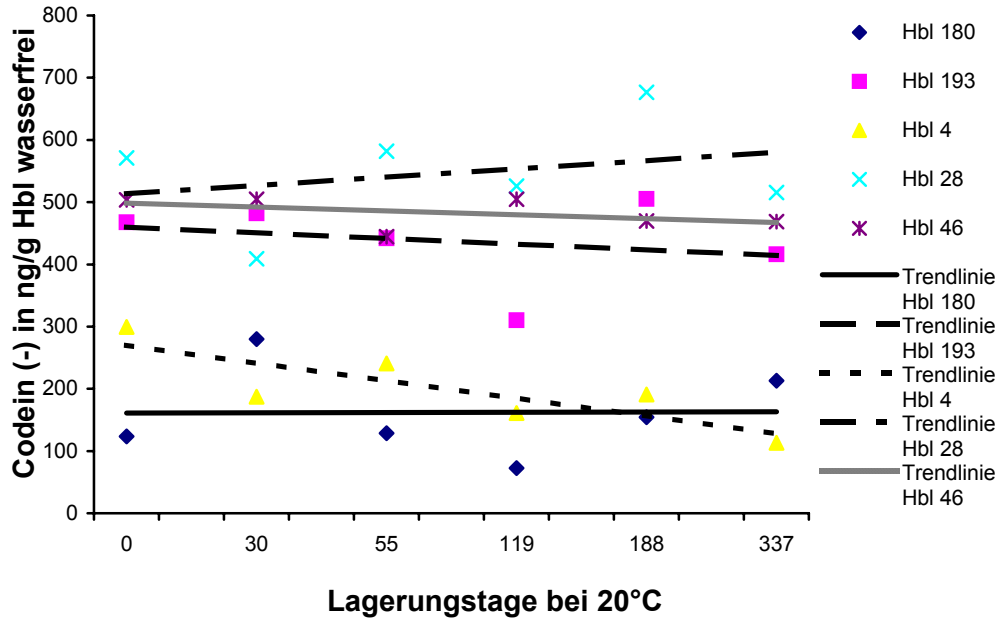


Abbildung 60: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Codein über die gesamte Lagerzeit Hbl 180, Hbl 193, Hbl 4, Hbl 28, Hbl 46

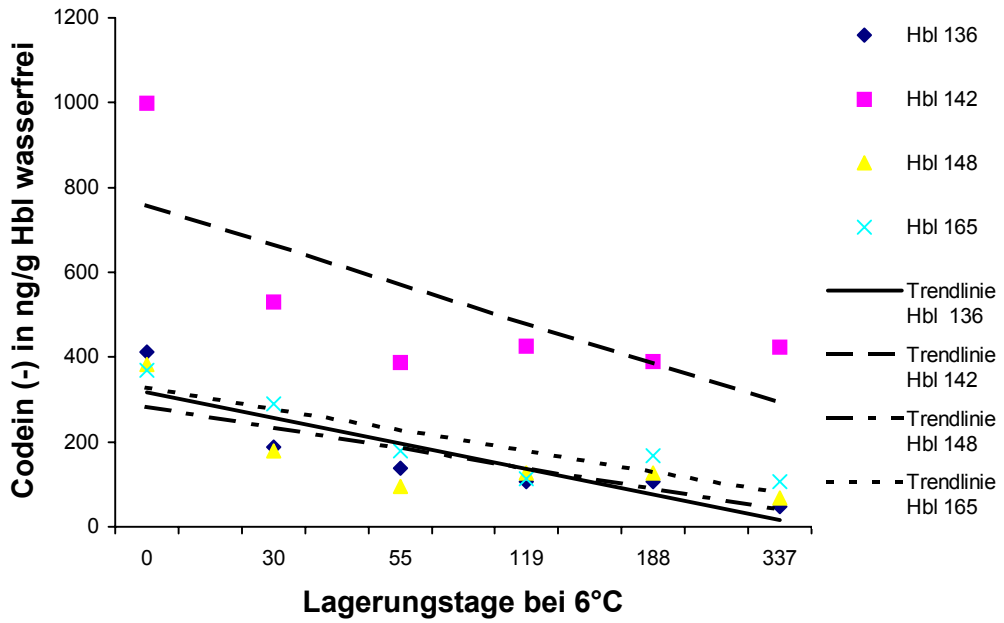


Abbildung 61: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Codein über die gesamte Lagerzeit Hbl 136, Hbl 142, Hbl 148, Hbl 165

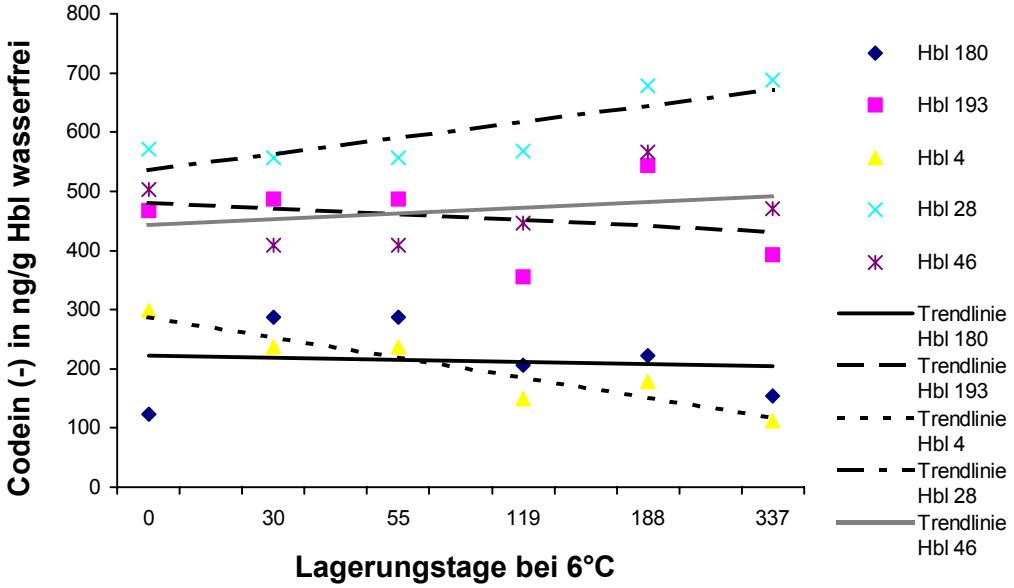


Abbildung 62: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Codein über die gesamte Lagerzeit Hbl 180, Hbl 193, Hbl 4, Hbl 28, Hbl 46

4.1.1.4 Quantitative Auswertung der Messergebnisse von Methadon in Herzblut

Tabelle 32: erste Messung bevor Lagerung beginnt

Proben Nr.	Methadon µg/g Hbl (wasserf.)
1 Hbl	3,0238
7 Hbl	6,5576
31 Hbl	9,8315
39 Hbl	10,0480
107 Hbl	3,6209
145 Hbl	11,8927
149 Hbl	16,8384
196 Hbl	11,6623
207 Hbl	7,0233

Tabelle 33: 27 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)	Lagerung bei 6°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)
1 Hbl	3,1690	2,5359
7 Hbl	5,4290	6,7923
31 Hbl	7,0703	8,8709
39 Hbl	11,3281	9,5793
107 Hbl	2,5558	2,7880
145 Hbl	9,7792	8,6405
149 Hbl	12,1292	13,1550
196 Hbl	10,8418	12,3659
207 Hbl	7,1686	7,4048

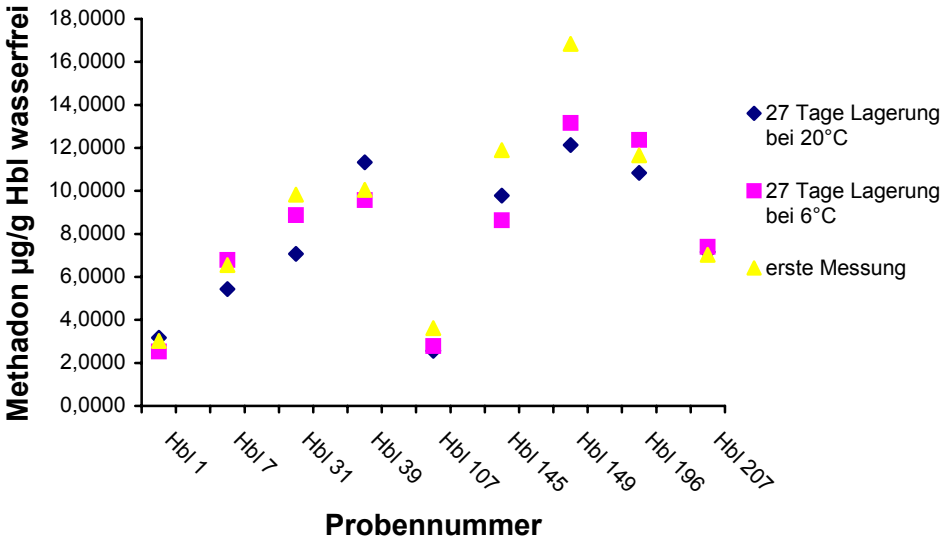


Abbildung 63: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 27 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 34: 83 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)	Lagerung bei 6°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)
1 Hbl	2,0317	2,1623
7 Hbl	6,4949	7,3713
31 Hbl	9,2369	8,0657
39 Hbl	10,7924	11,4928
107 Hbl	3,2436	3,5162
145 Hbl	9,9600	11,8850
149 Hbl	14,4769	13,4328
196 Hbl	11,9639	13,2027
207 Hbl	7,7916	6,0273

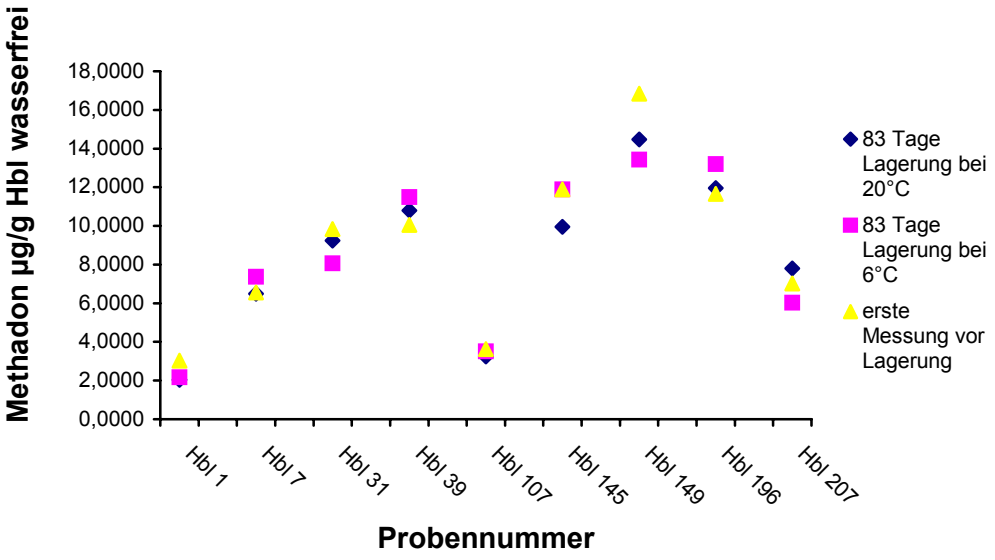


Abbildung 64: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 83 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 35: 154 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)	Lagerung bei 6°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)
1 Hbl	2,4337	2,5657
7 Hbl	6,5789	6,3658
31 Hbl	9,5220	7,2948
39 Hbl	10,6108	10,5203
107 Hbl	3,2794	3,4319
145 Hbl	9,7152	10,0976
149 Hbl	14,4301	16,1216
196 Hbl	10,8343	11,3219
207 Hbl	7,6833	7,5816

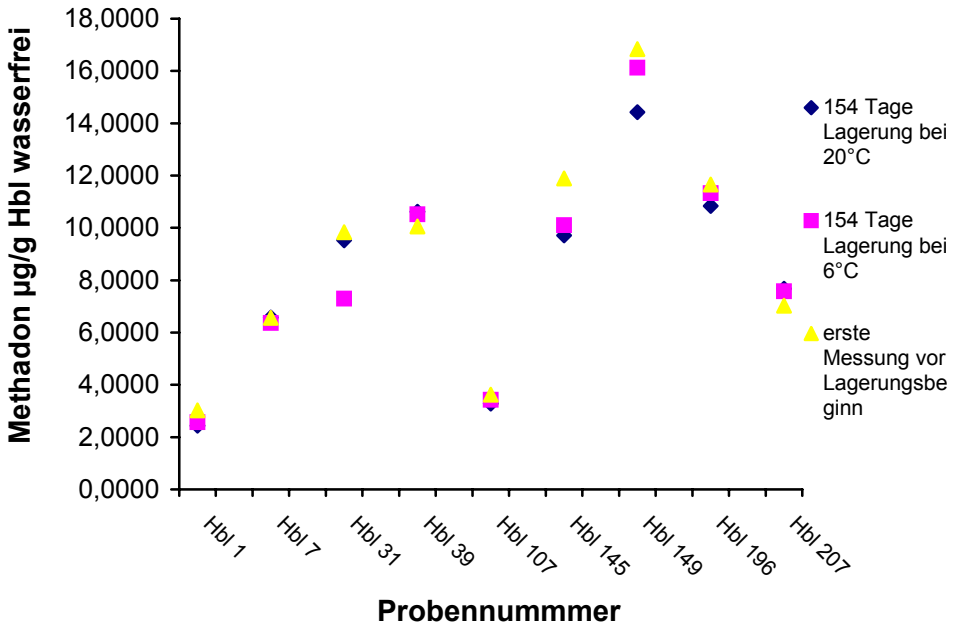


Abbildung 65: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 154 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 36: 216 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben- Nr.	Lagerung bei 20°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)	Lagerung bei 6°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)
1 Hbl	2,5423	2,4933
7 Hbl	5,4971	6,1786
31 Hbl	8,0625	7,1408
39 Hbl	8,9844	10,3020
107 Hbl	2,4799	2,8862
145 Hbl	9,2163	10,6302
149 Hbl	15,0205	15,2502
196 Hbl	9,6841	11,1389
207 Hbl	7,5319	5,9927

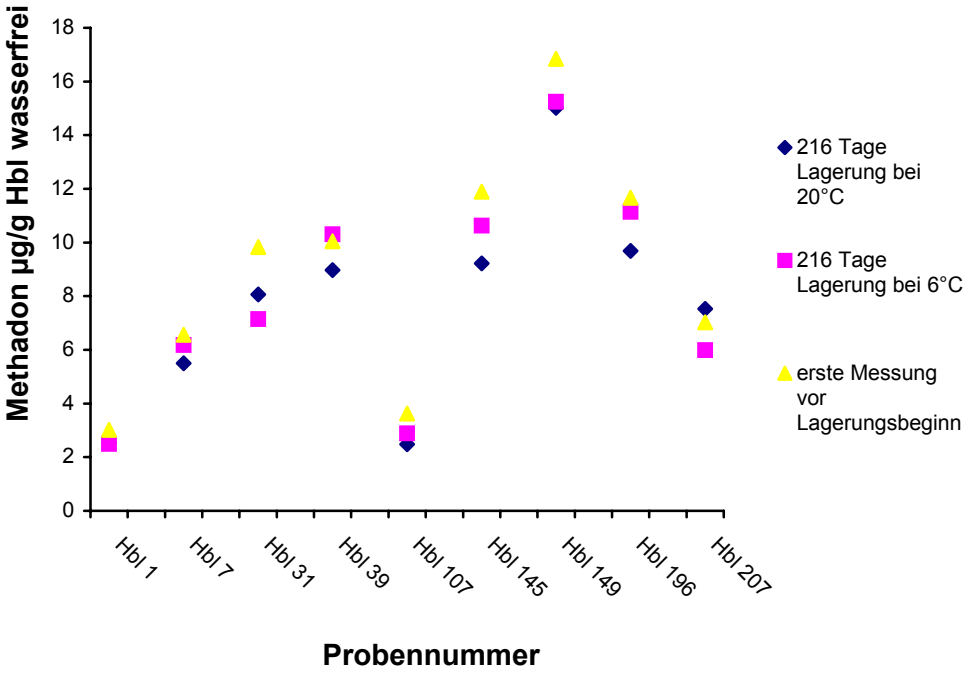


Abbildung 66: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 216 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 37: 326 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)	Lagerung bei 6°C Methadon µg/g Hbl (wasserf.)
1 Hbl	2,1670	2,4763
7 Hbl	6,4023	6,8090
31 Hbl	9,2709	8,0825
39 Hbl	10,2860	9,8050
107 Hbl	3,0354	3,3945
145 Hbl	10,0323	10,6193
149 Hbl	14,5162	14,4944
196 Hbl	11,9356	12,4239
207 Hbl	6,1123	5,9415

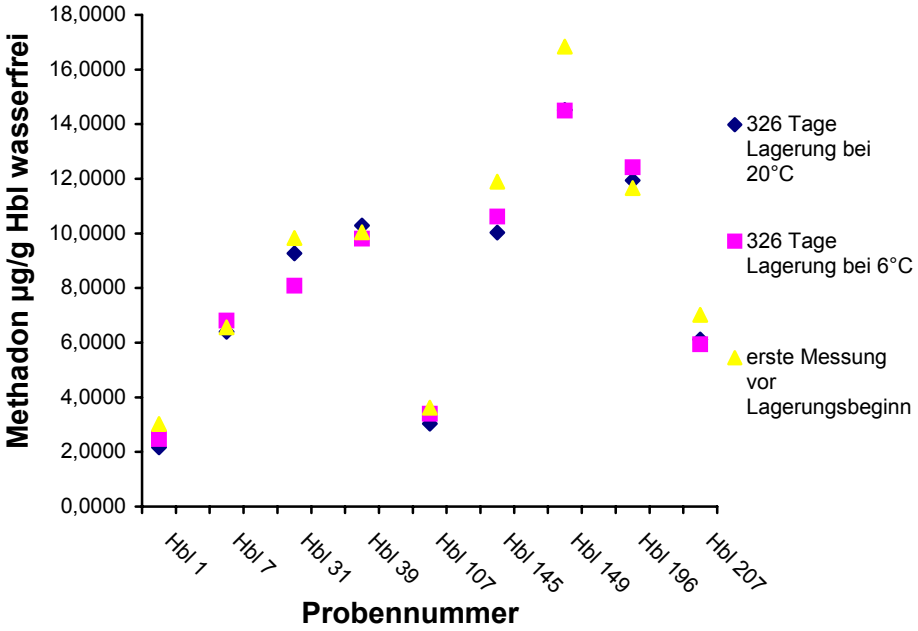


Abbildung 67: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 326 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

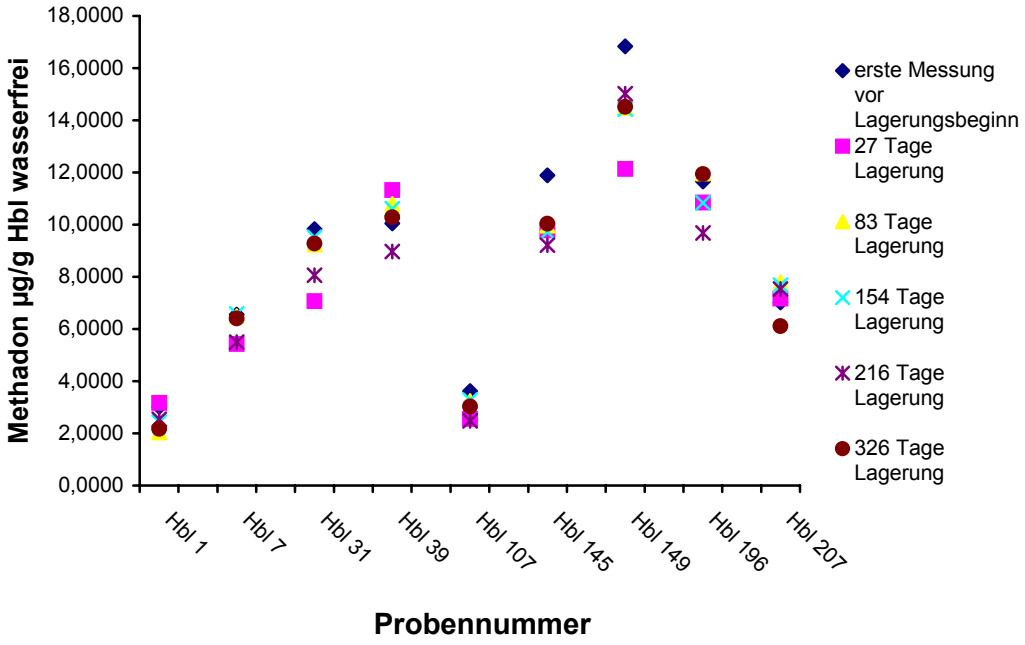


Abbildung 68: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 20°C gelagerten Proben

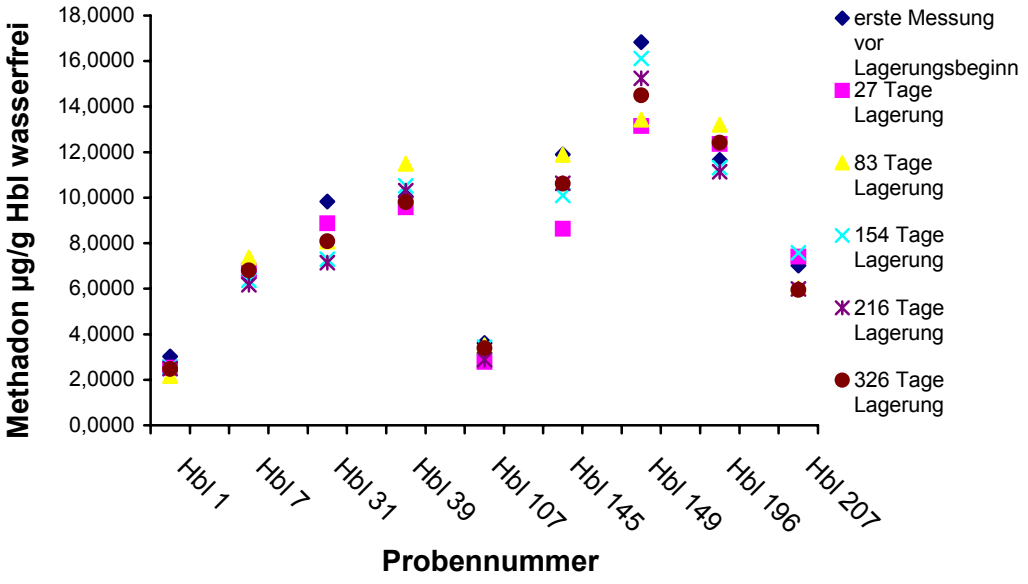


Abbildung 69: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 6°C gelagerten Proben

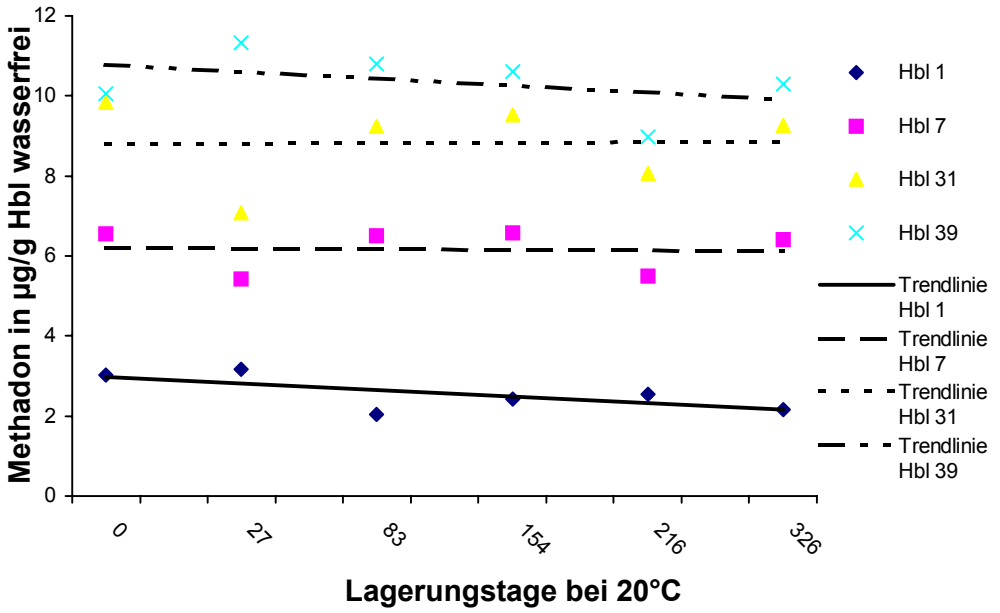


Abbildung 70: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 20°C gelagerten Proben über den gesamten Zeitraum Hbl 1, Hbl 7, Hbl 31, Hbl 39

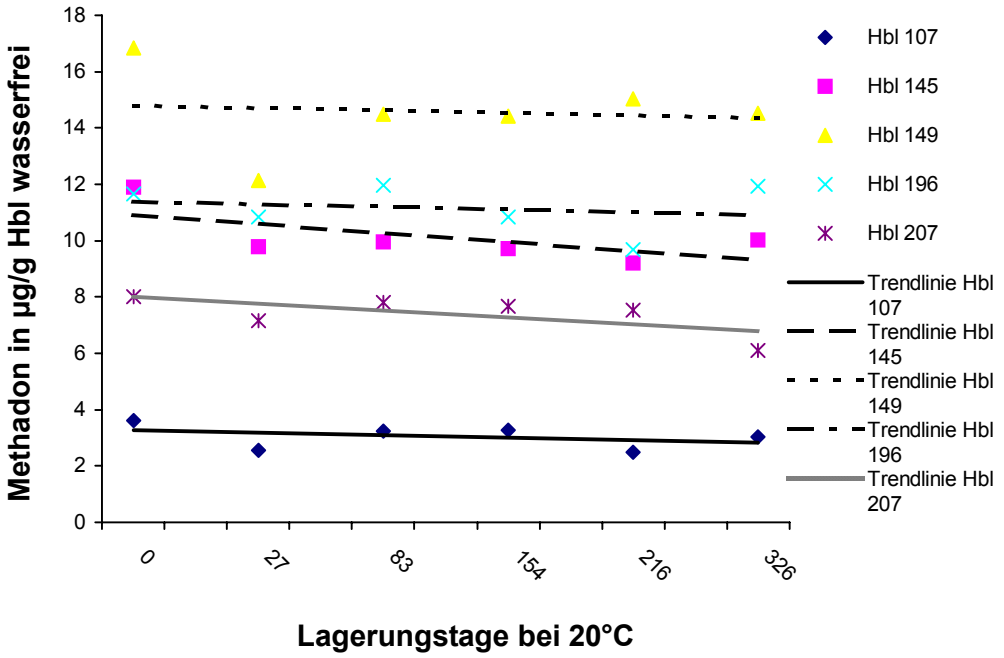


Abbildung 71: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 20°C gelagerten Proben über den gesamten Zeitraum Hbl 107, Hbl 145, Hbl 149, Hbl 196, Hbl 207

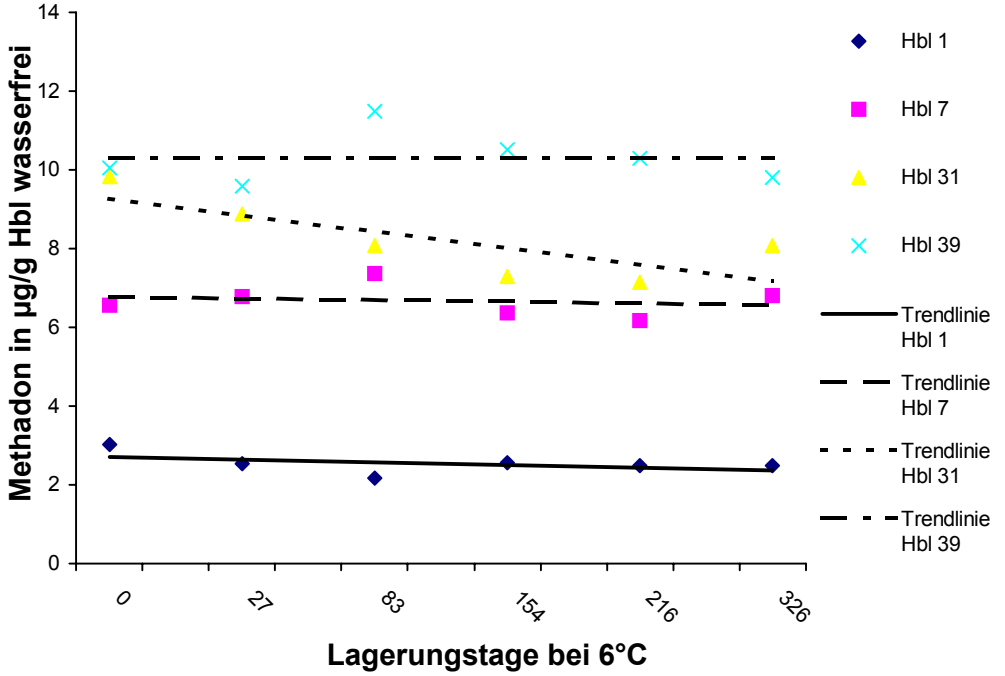


Abbildung 72: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 6°C gelagerten Proben über den gesamten Zeitraum Hbl 1, Hbl 7, Hbl 31, Hbl 39

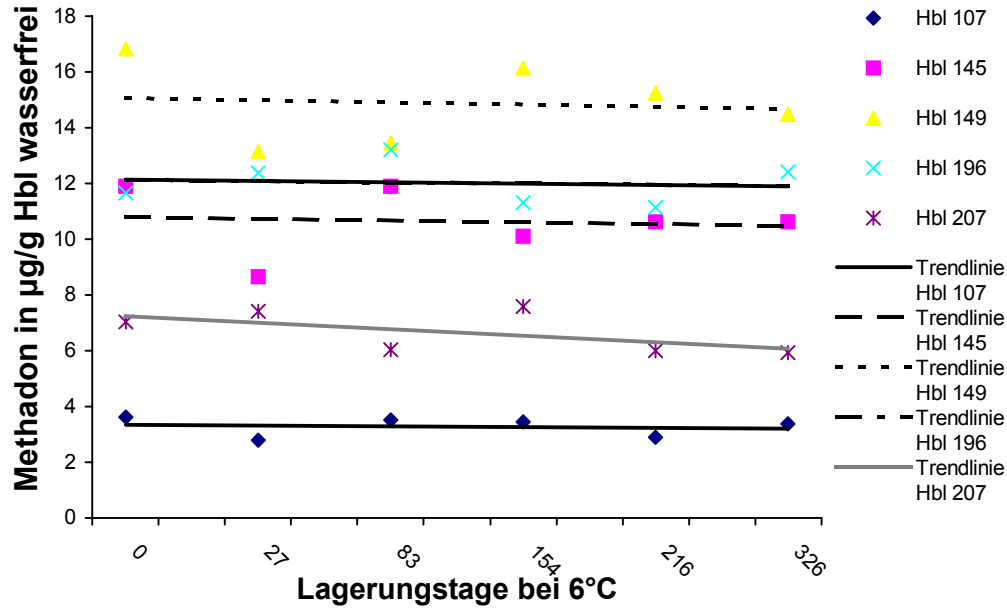


Abbildung 73: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 6°C gelagerten Proben über den gesamten Zeitraum Hbl 107, Hbl 145, Hbl 149, Hbl 196, Hbl 207

4.1.2 Matrix: Leber

4.1.2.1 Quantitative Auswertung der Messergebnisse von freiem Morphin in Leber

Tabelle 38: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Proben Nr.	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtmorphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	856,4	1098,5
Leber 142	3997,8	3964,2
Leber 148	1381,8	2470,6
Leber 165	3608,1	7386,7
Leber 180	5123,5	7215,0
Leber 193	2670,7	4820,2
Leber 4	2299,2	5325,6
Leber 28	5571,1	7709,6
Leber 46	1036,4	945,2

Tabelle 39: 30 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	868,1	1095,4	921,5	958,2
Leber 142	3657,1	2944,5	3140,8	2724,1
Leber 148	1687,7	2763,9	1682,5	2463,7
Leber 165	3098,3	7669,2	5267,5	7236,5
Leber 180	6245,2	7482,5	4172,0	6192,7
Leber 193	3867,1	3690,5	1333,4	3577,6
Leber 4	1824,2	5535,1	1869,8	7881,5
Leber 28	6146,8	4191,9	5808,5	4046,0
Leber 46	1080,9	932,9	1045,3	1102,3

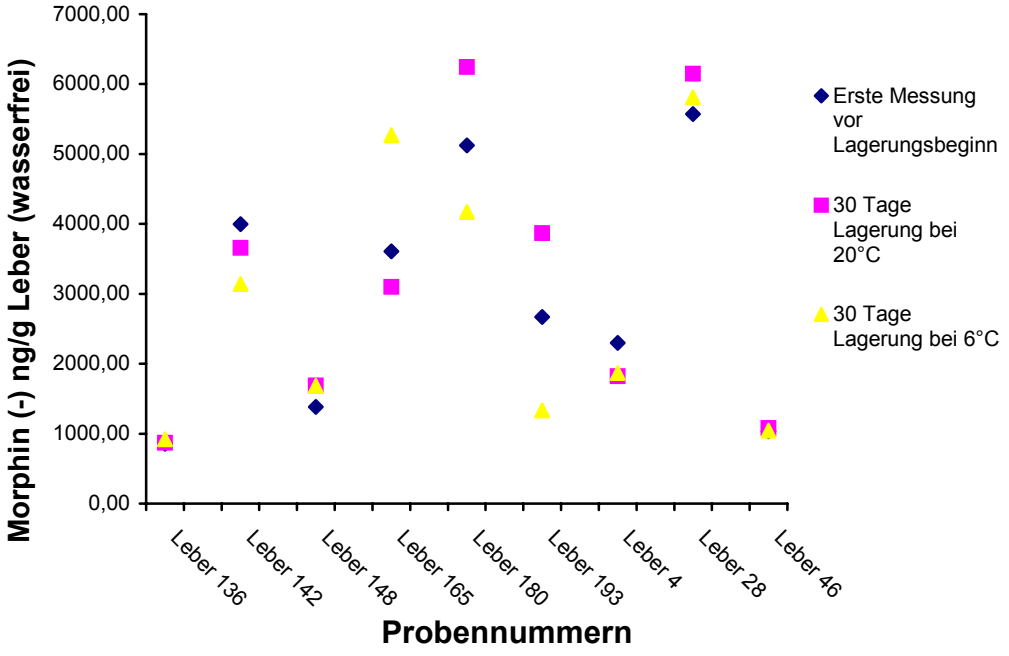


Abbildung 74: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 30 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 40: 58 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	1317,1	1375,1	700,5	1671,8
Leber 142	4074,4	3460,2	3062,7	3661,5
Leber 148	1551,5	2577,6	1162,6	2490,8
Leber 165	3378,6	7002,4	4201,5	8084,7
Leber 180	5473,7	7819,4	5195,8	7372,7
Leber 193	5381,2	8749,3	3265,7	9122,0
Leber 4	2674,0	6590,2	2067,3	7351,6
Leber 28	5478,6	4308,0	5868,7	6070,2
Leber 46	1595,3	1192,8	1010,8	1621,4

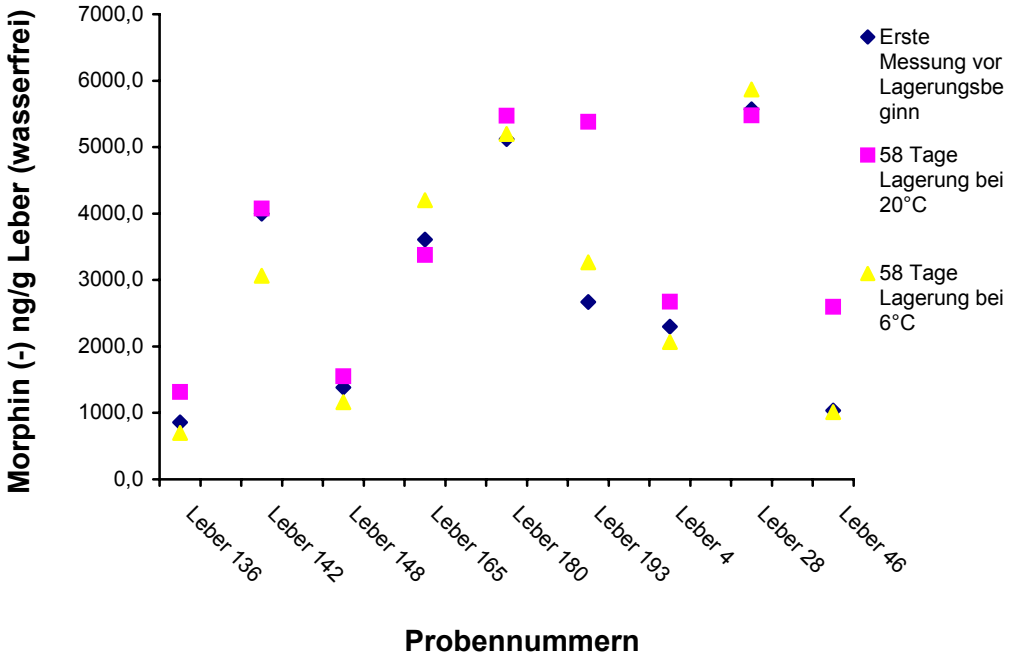


Abbildung 75: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 58 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 41: 133 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	1087,6	1245,8	875,6	1520,4
Leber 142	4543,1	4635,6	3977,2	4611,7
Leber 148	1897,3	3260,9	1856,9	2958,0
Leber 165	5153,9	5005,5	5138,4	6754,5
Leber 180	4712,5	6892,4	4126,5	5880,1
Leber 193	6512,0	5690,7	5475,2	6433,1
Leber 4	1356,2	7753,4	1627,5	5724,8
Leber 28	3151,2	4158,3	8350,0	7707,2
Leber 46	1414,1	1083,3	1043,7	1345,8

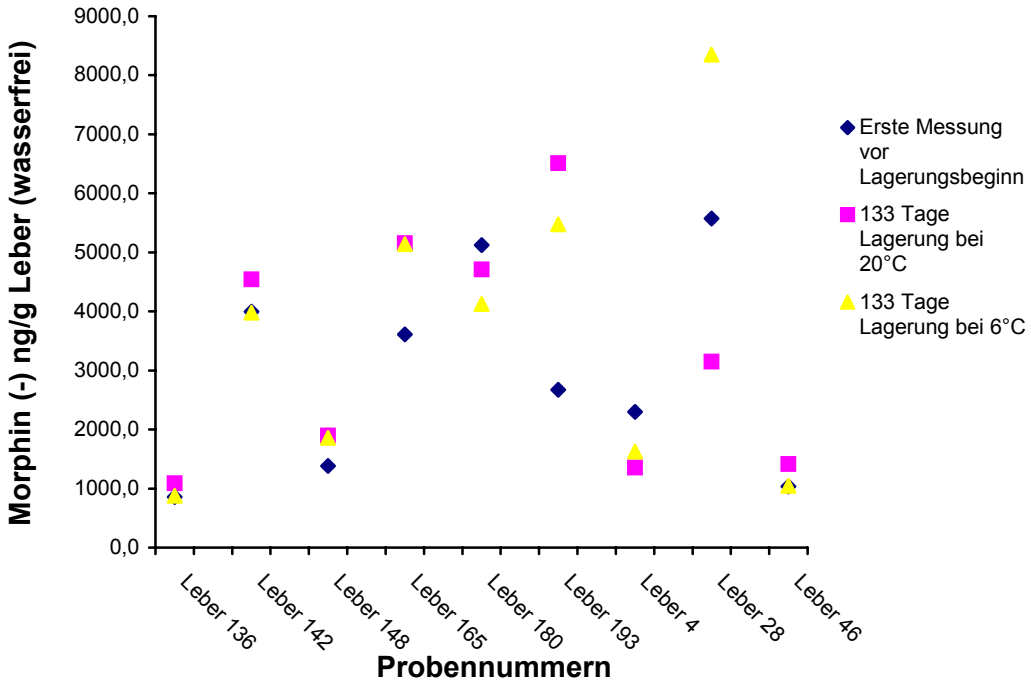


Abbildung 76: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 133 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 42: 201 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	1112,6	1487,6	902,3	1687,2
Leber 142	2035,7	2953,1	3807,1	6142,2
Leber 148	1542,9	3037,2	1498,6	3024,3
Leber 165	3392,7	5541,3	3422,9	7766,40
Leber 180	4879,0	6291,5	5899,0	8702,9
Leber 193	2638,7	5090,3	2015,4	7330,8
Leber 4	1946,1	6612,4	1690,1	6502,3
Leber 28	3255,9	5783,9	3510,4	5149,5
Leber 46	1332,2	1393,2	1532,7	1152,5

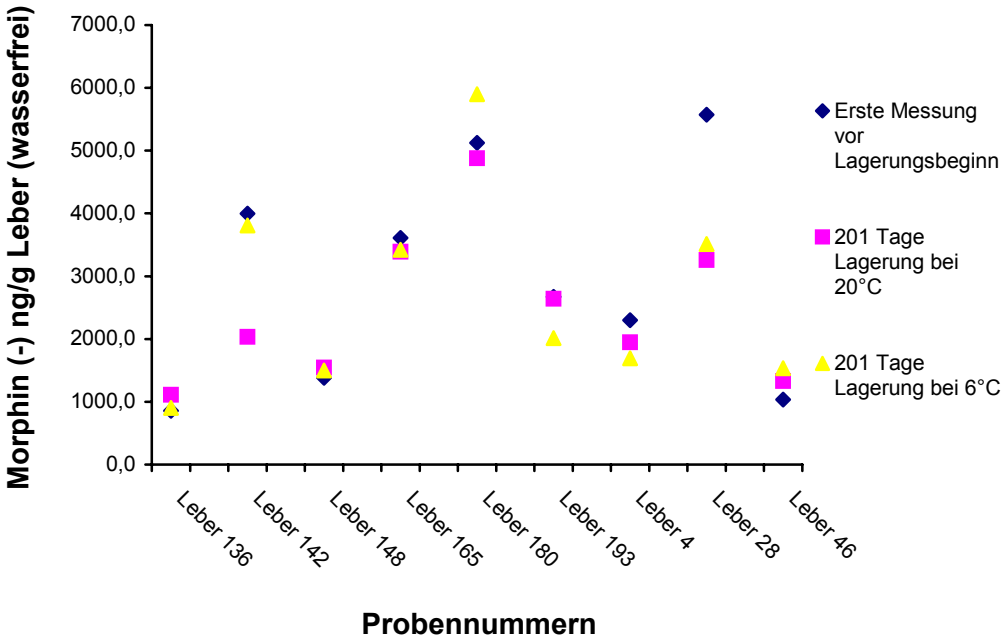


Abbildung 77: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 201 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 43: 385 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Freies Morphin (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamt-morphin (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	--	1754,3	--	--
Leber 142	3095,3	3872,3	--	--
Leber 148	1698,7	--	2897,6	--
Leber 165	3014,8	4999,5	3014,5	8769,3
Leber 180	--	--	4785,3	7854,3
Leber 193	--	6024,3	2456,1	--
Leber 4	--	--	--	--
Leber 28	55549,2	--	3784,9	5463,8
Leber 46	1554,7	1324,8	1101,8	1465,1

--: Da kein Interner Standard nachweisbar war, konnte keine Quantifizierung der Ergebnisse vorgenommen werden.

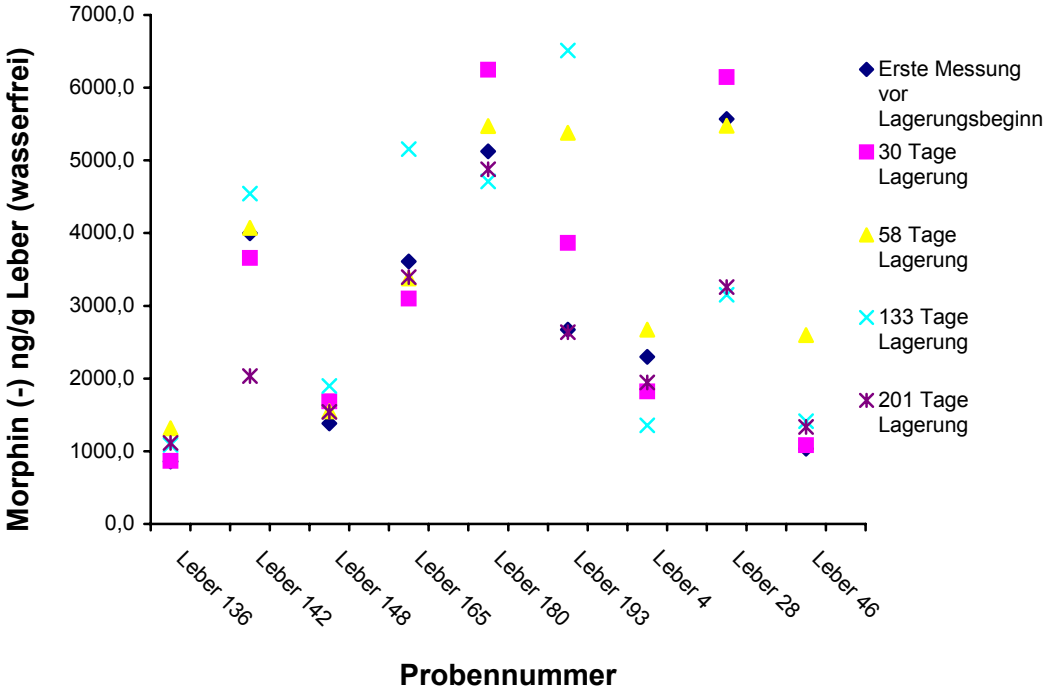


Abbildung 78: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 20°C Lagertemperaturen

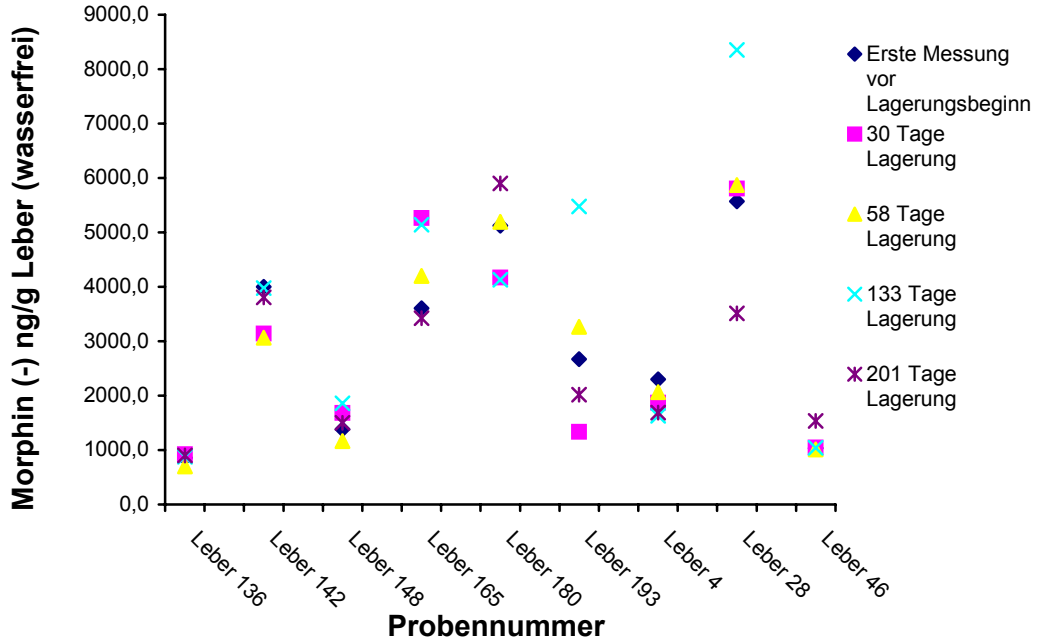


Abbildung 79: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin bei 6°C Lagertemperaturen

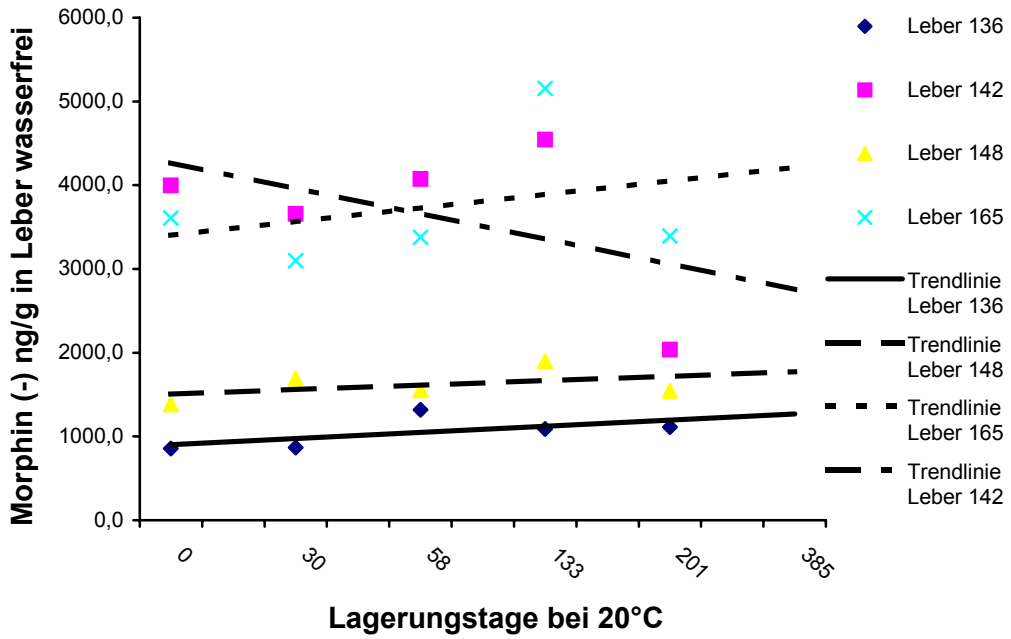


Abbildung 80: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Leber: Leber 136, Leber 142, Leber 148, Leber 165

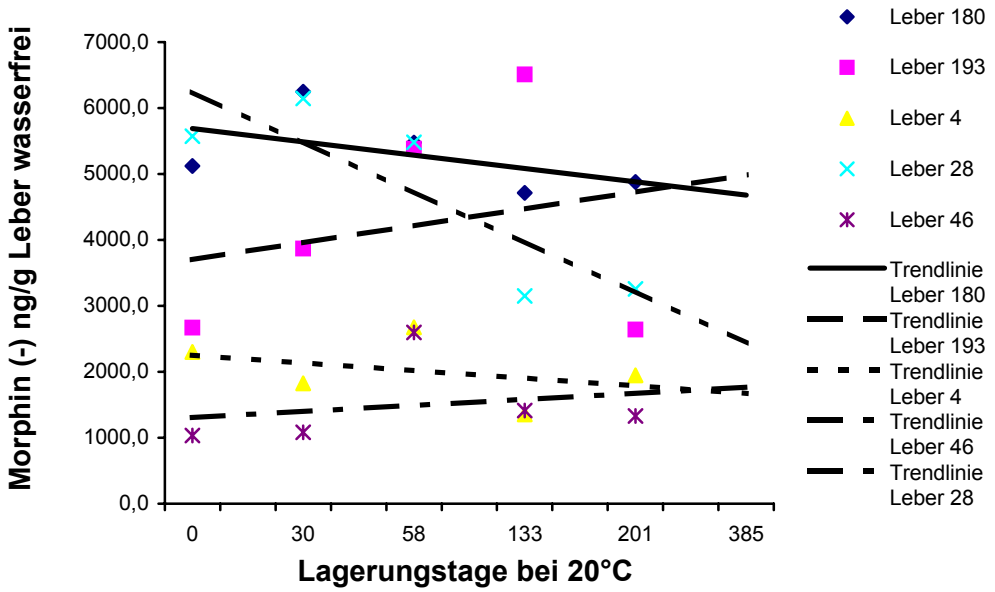


Abbildung 81: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Leber: Leber 180, Leber 193, Leber 4, Leber 28, Leber 46

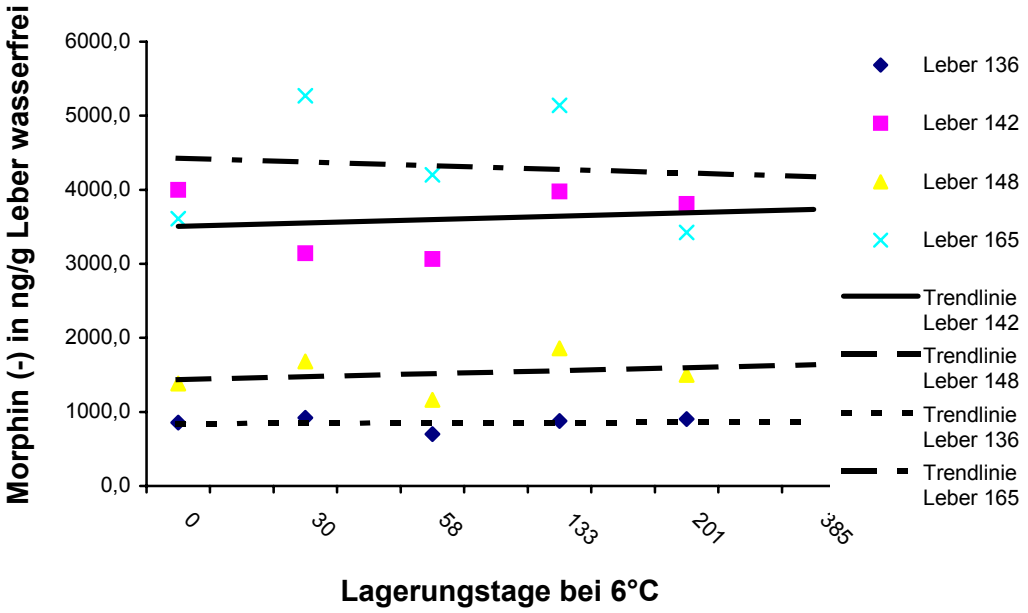


Abbildung 82: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Leber: Leber 136, Leber 142, Leber 148, Leber 165

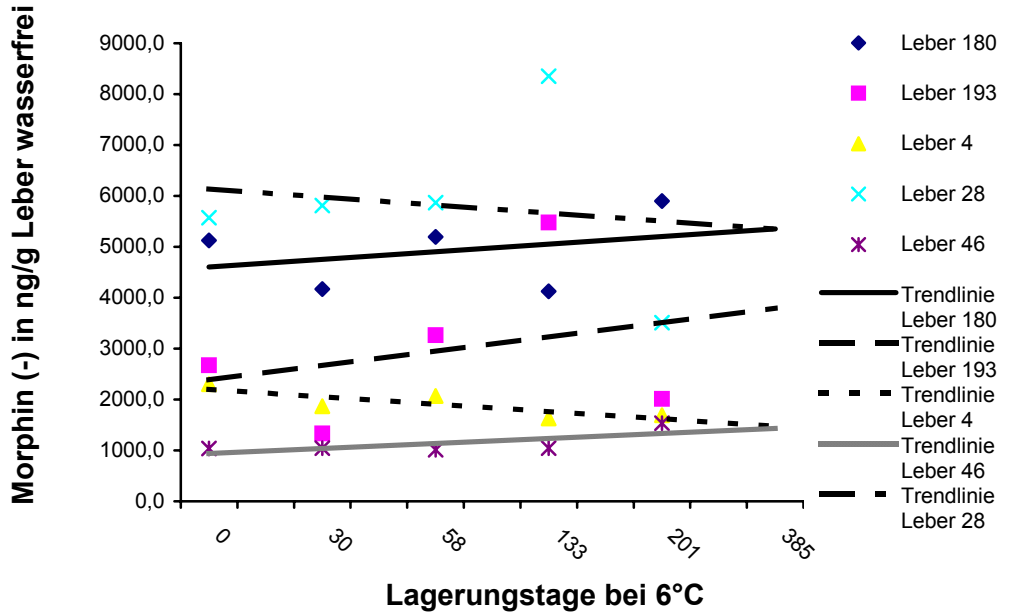


Abbildung 83: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von freiem Morphin (-) in Leber: Leber 180, Leber 193, Leber 4, Leber 28, Leber 46

4.1.2.2 Quantitative Auswertung: Gebundenes Morphin in Leber

Die durchgeführte Methode zur Bestimmung von gebundenen Morphin läßt keine Unterscheidung der einzelnen Morphinverbindungen zu. Das Ergebnis kann somit nur in allgemeiner Form als „gebundenes Morphin“ angegeben werden.

Tabelle 44: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Proben Nr.	Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)
Leber 136	685,7
Leber 142	336,5
Leber 148	1088,8
Leber 165	3778,6
Leber 180	2091,5
Leber 193	2149,5
Leber 4	3026,4
Leber 28	2138,5
Leber 46	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 45: 30 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)
Leber 136	227,2	35,7
Leber 142	n.n.	n.n.
Leber 148	1076,1	781,2
Leber 165	4570,8	1969,0
Leber 180	1237,2	2020,6
Leber 193	176,6	2244,2
Leber 4	3710,9	6011,7
Leber 28	n.n.	n.n.
Leber 46	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

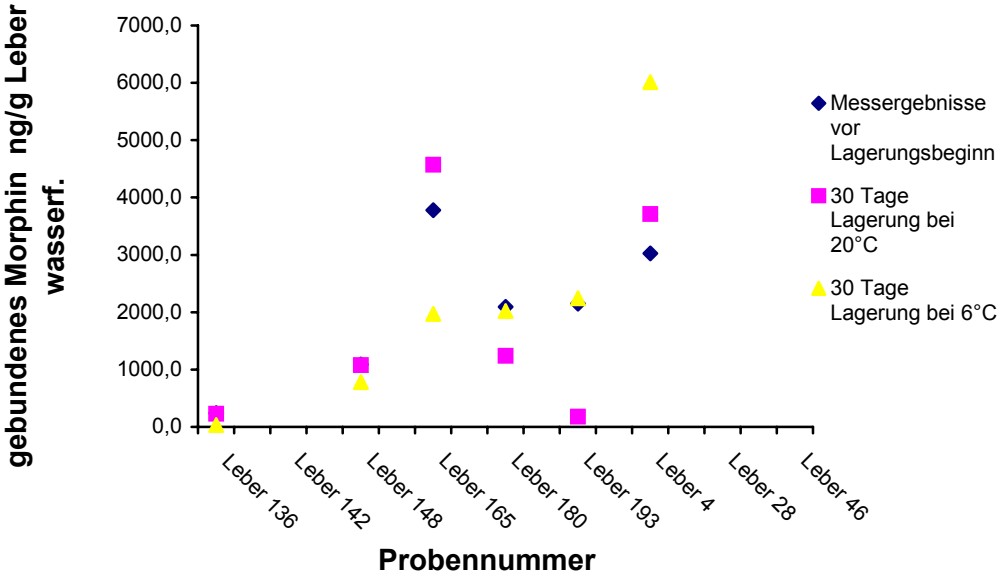


Abbildung 84: Vergleich der Messergebnisse nach 30 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 46: 58 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)
Leber 136	57,9	971,2
Leber 142	n.n.	598,7
Leber 148	1026,1	1328,2
Leber 165	3623,8	3883,2
Leber 180	2345,6	2176,8
Leber 193	3368,0	5856,2
Leber 4	3916,2	5284,3
Leber 28	n.n.	201,5
Leber 46	n.n.	610,6

n.n.: nicht nachweisbar

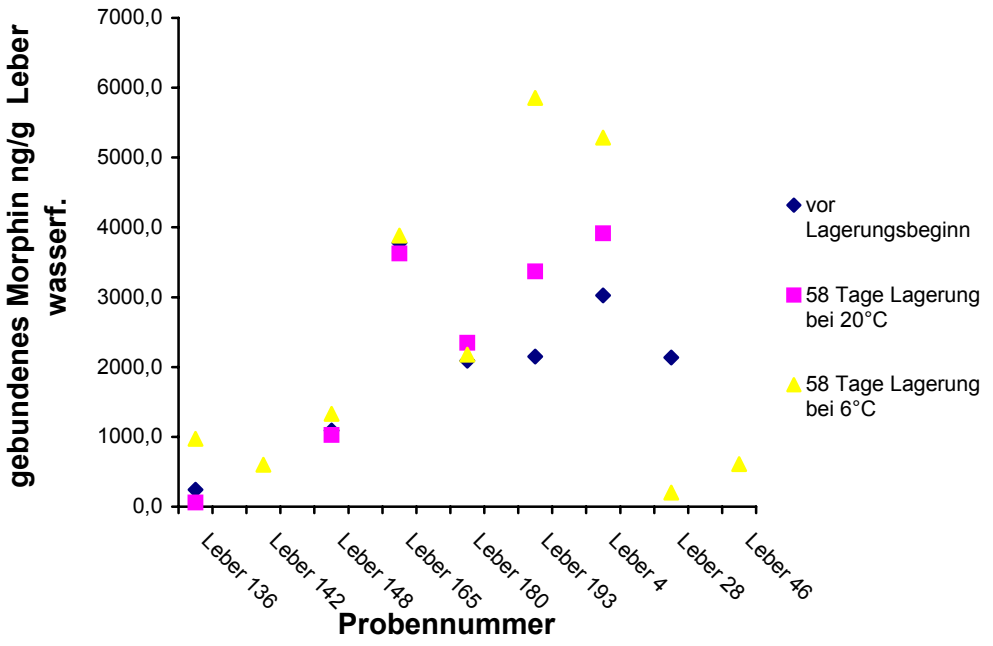


Abbildung 85: Vergleich der Messergebnisse nach 58 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 47: 133 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)
Leber 136	158,2	644,7
Leber 142	92,	634,5
Leber 148	1363,6	1101,0
Leber 165	n.n.	1616,0
Leber 180	2179,9	1753,6
Leber 193	n.n.	957,9
Leber 4	6397,1	4097,3
Leber 28	1007,1	n.n.
Leber 46	n.n.	302,0

n.n.: nicht nachweisbar

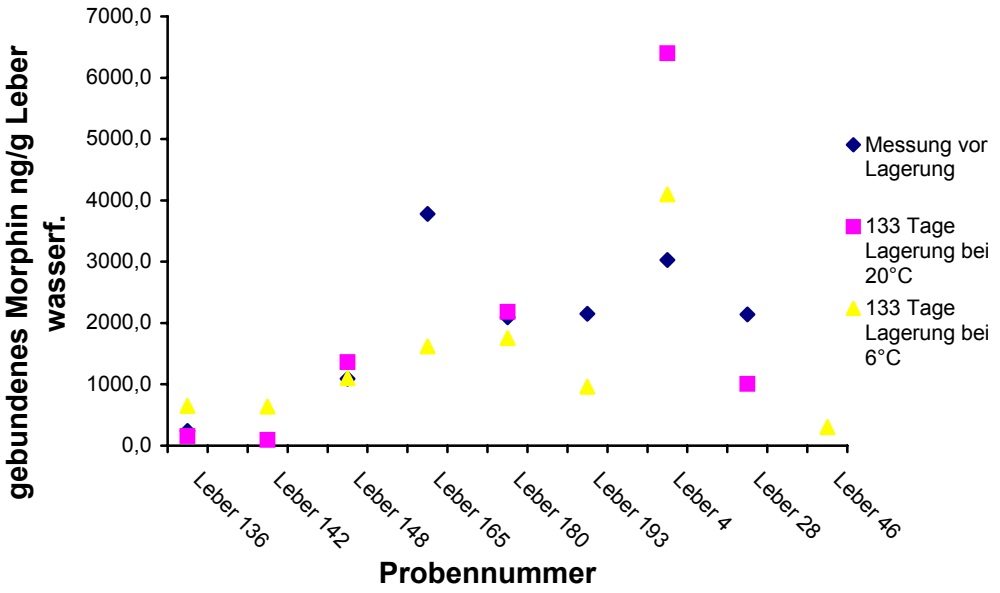


Abbildung 86: Vergleich der Messergebnisse nach 133 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 48: 201 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)
Leber 136	375,0	784,8
Leber 142	0917,3	2335,1
Leber 148	1494,3	1525,7
Leber 165	2148,6	4343,4
Leber 180	1412,4	2803,9
Leber 193	2451,6	5315,3
Leber 4	4666,2	4812,1
Leber 28	2528,0	1639,1
Leber 46	61,0	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

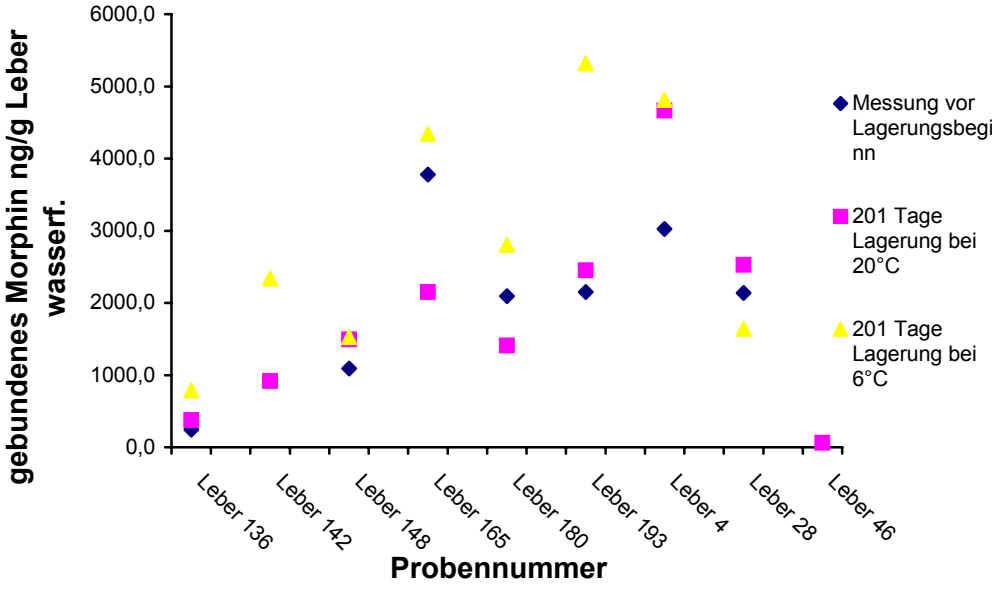


Abbildung 87: Vergleich der Messergebnisse nach 201 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 49: 385 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)	Lagerung bei 6°C Gebundenes Morphin in wasserfr. Leber (ng/g)
Leber 136	--	35,7
Leber 142	--	--
Leber 148	--	781,2
Leber 165	--	1969,0
Leber 180	--	2020,6
Leber 193	--	2244,2
Leber 4	--	6011,7
Leber 28-	--	--
Leber 46-	--	--

--: nicht auswertbar (kein Interner Standard)

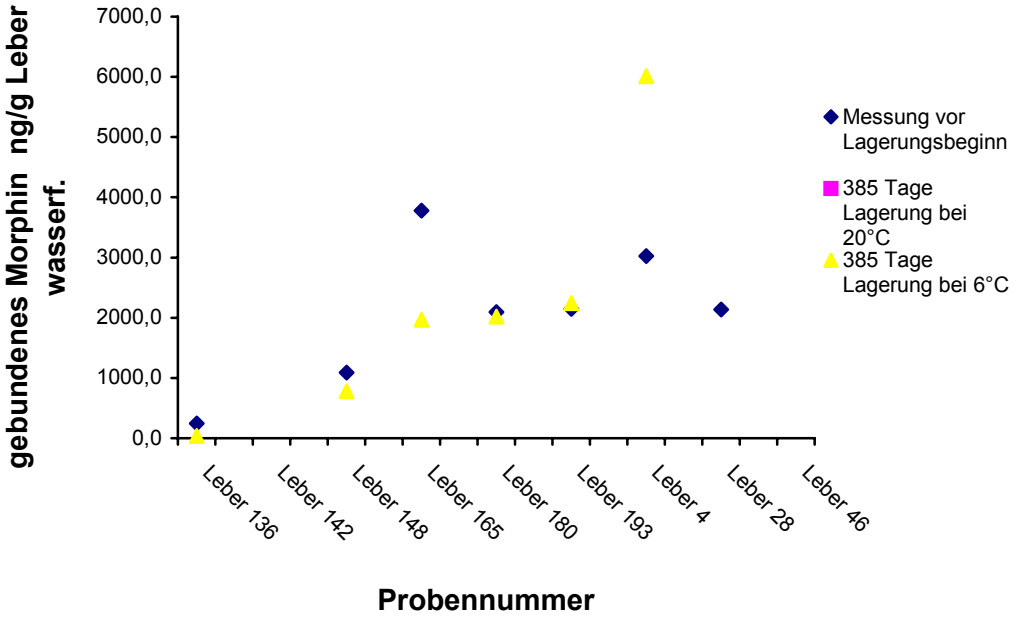


Abbildung 88: Vergleich der Messergebnisse nach 385 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

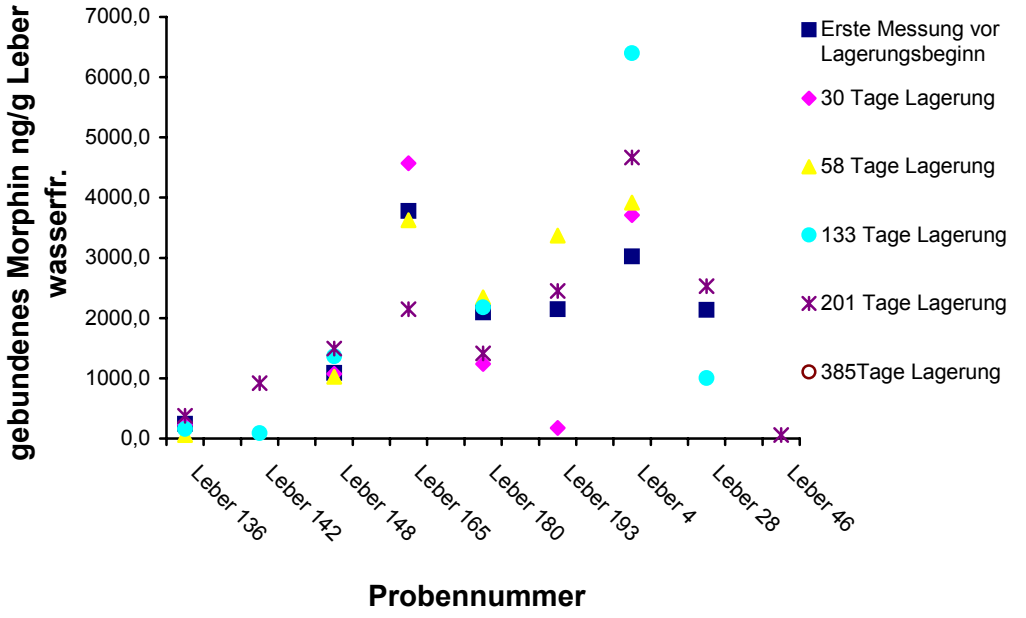


Abbildung 89: Vergleich der Messergebnisse über den gesamten Lagerungszeitraum bei 20°C

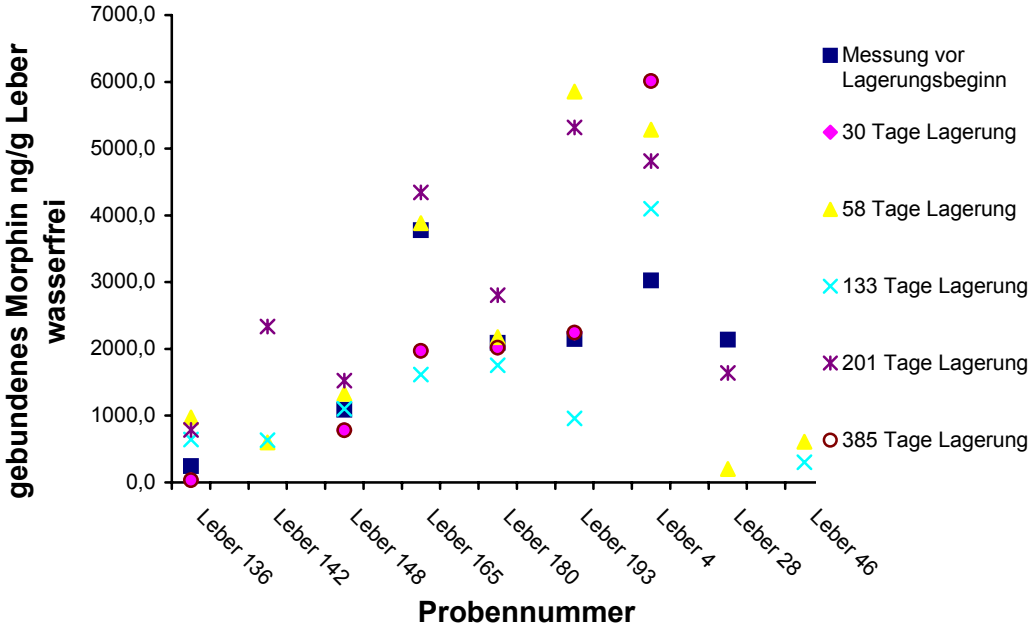


Abbildung 90: Vergleich der Messergebnisse über den gesamten Lagerungszeitraum bei 6°C

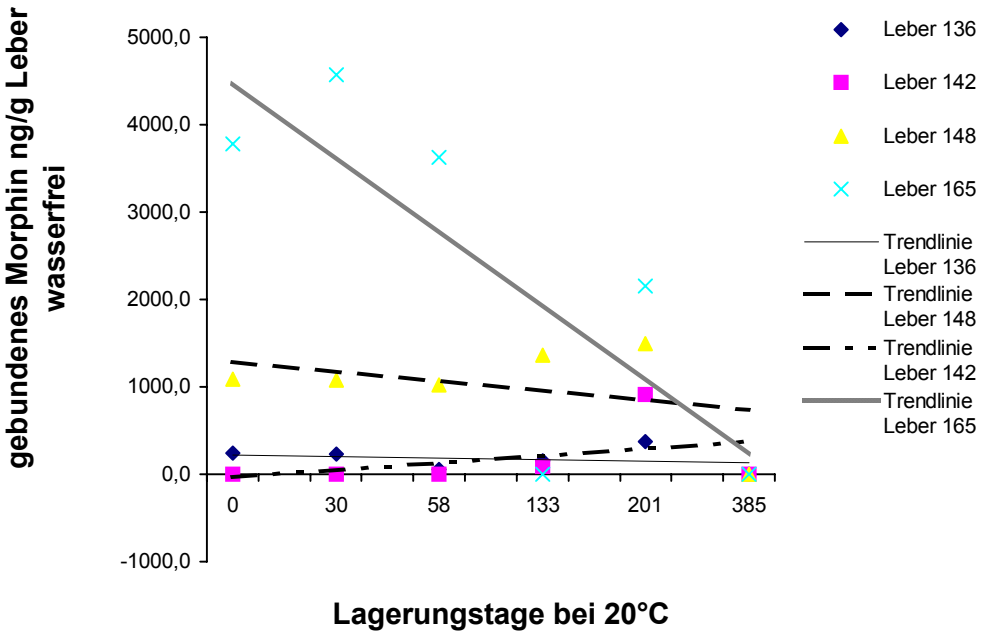


Abbildung 91: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin in Leber bei 20°C Lagerung: Leber 136, Leber 142, Leber 148, Leber 165

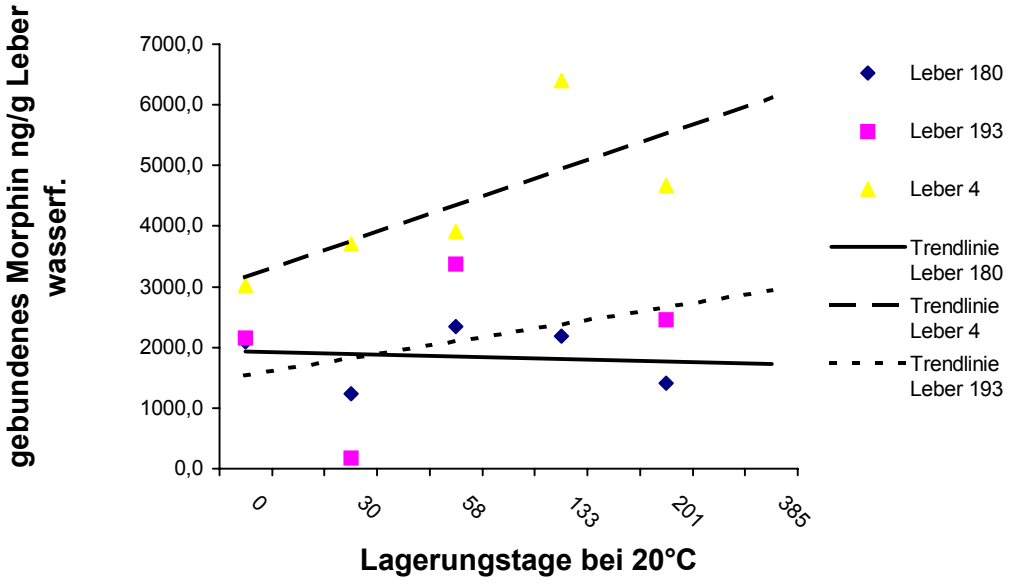


Abbildung 92: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin in Leber bei 20°C Lagerung: Leber 180, Leber 193, Leber 4

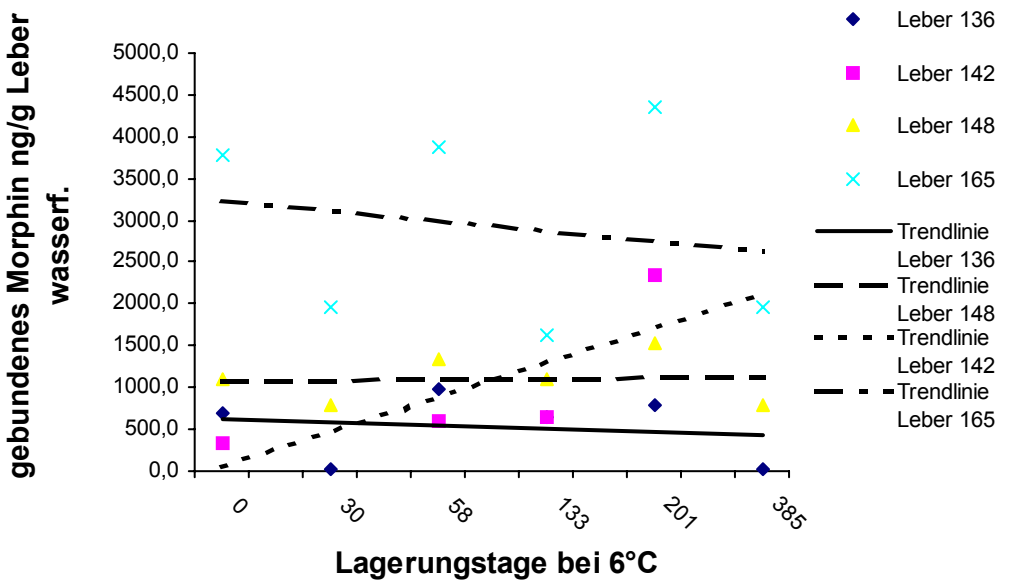


Abbildung 93: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin in Leber bei 6°C Lagerung: Leber 136, Leber 142, Leber 148, Leber 165

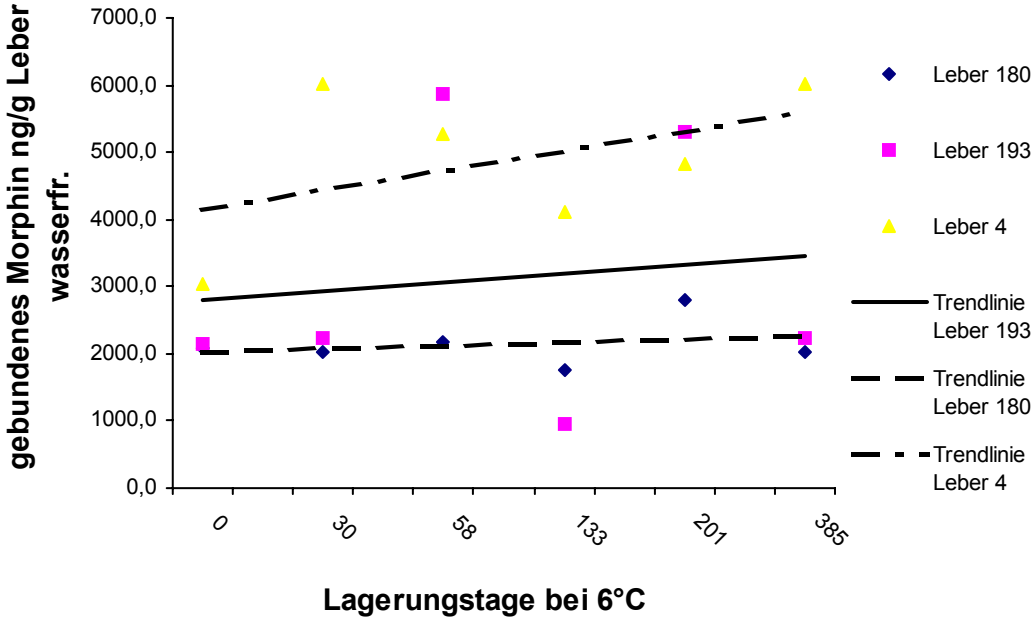


Abbildung 94: Zeitdiagramm: Stabilität von gebundenen Morphin in Leber bei 6°C Lagerung: Leber 180, Leber 193, Leber 4

4.1.2.3 Quantitative Auswertung der Messergebnisse von Codein in Leber

Tabelle 50: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Proben Nr.	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	137,9	188,1
Leber 142	262,4	387,2
Leber 148	152,5	340,3
Leber 165	258,4	361,5
Leber 180	218,5	508,5
Leber 193	275,9	372,1
Leber 4	425,7	938,7
Leber 28	637,8	1473,1
Leber 46	239,2	235,8

Tabelle 51: 30 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	99,5	151,0	114,6	191,8
Leber 142	188,7	368,5	179,0	399,0
Leber 148	116,7	182,8	80,2	227,2
Leber 165	144,7	410,8	83,5	418,0
Leber 180	297,0	857,9	231,7	425,4
Leber 193	376,3	303,7	172,6	359,1
Leber 4	388,0	847,1	373,2	514,3
Leber 28	879,5	1306,8	1015,0	922,3
Leber 46	230,9	227,5	234,9	225,7

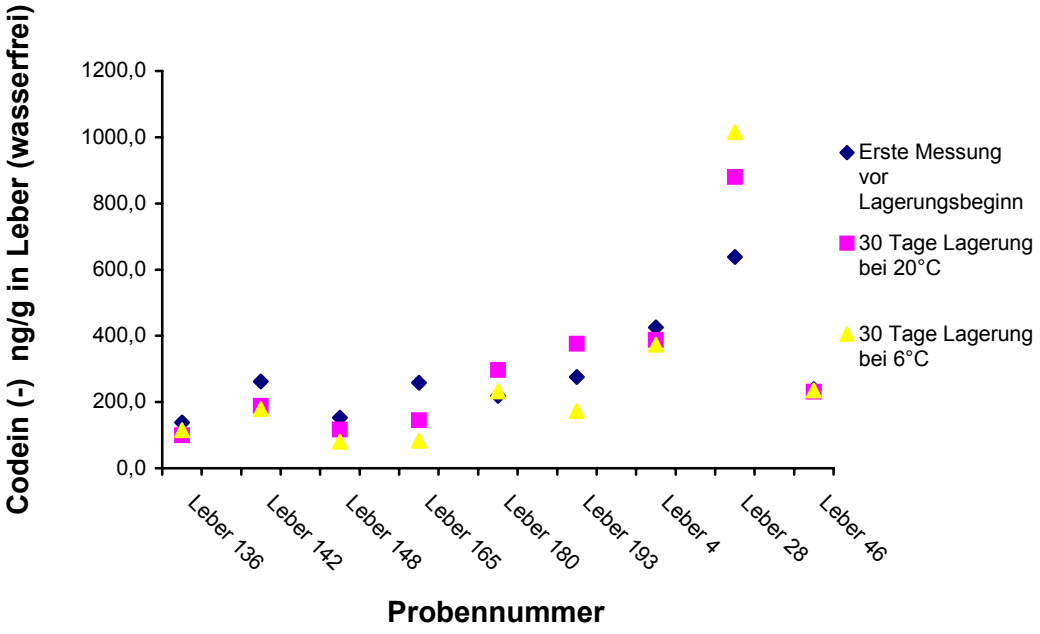


Abbildung 95: Vergleich der Messergebnisse nach 30 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 52: 58 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	140,1	237,2	173,0	174,9
Leber 142	154,4	292,1	168,9	242,6
Leber 148	153,8	307,1	118,9	304,8
Leber 165	274,3	414,2	242,8	470,5
Leber 180	362,4	517,3	372,8	408,5
Leber 193	238,8	257,1	190,6	398,6
Leber 4	321,3	552,2	357,8	591,5
Leber 28	1235,3	1164,8	1132,2	1323,2
Leber 46	257,7	328,9	218,6	256,3

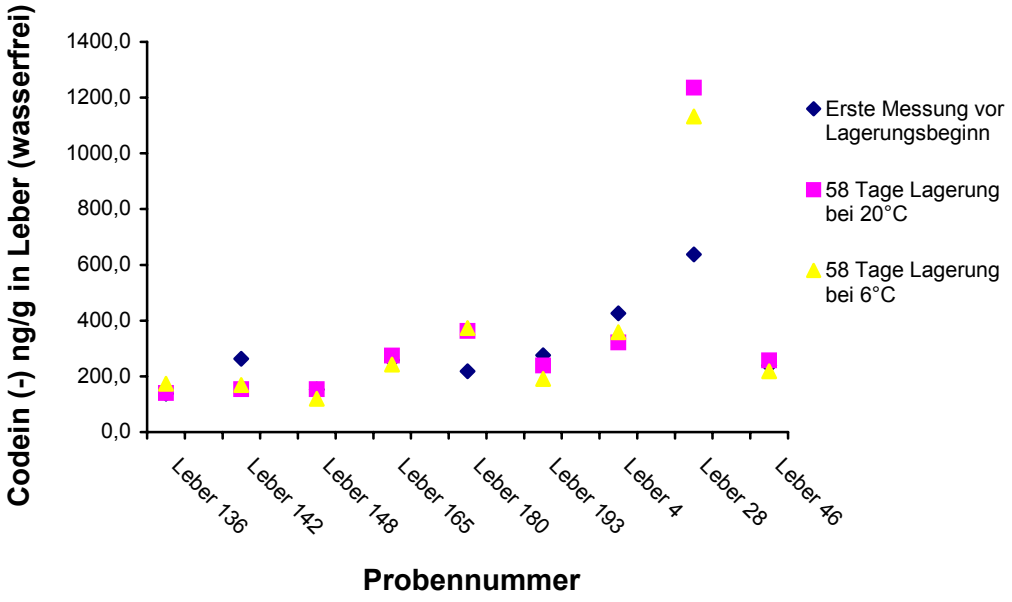


Abbildung 96: Vergleich der Messergebnisse nach 58 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 53: 133 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	194,2	119,3	158,9	187,4
Leber 142	210,0	181,4	218,9	250,0
Leber 148	79,1	109,1	140,4	144,7
Leber 165	102,4	257,4	189,6	296,1
Leber 180	342,0	579,8	364,1	403,4
Leber 193	158,62	254,0	351,3	358,0
Leber 4	334,9	875,4	253,6	454,7
Leber 28	1314,7	1246,7	540,5	1108,8
Leber 46	320,9	308,4	275,8	333,2

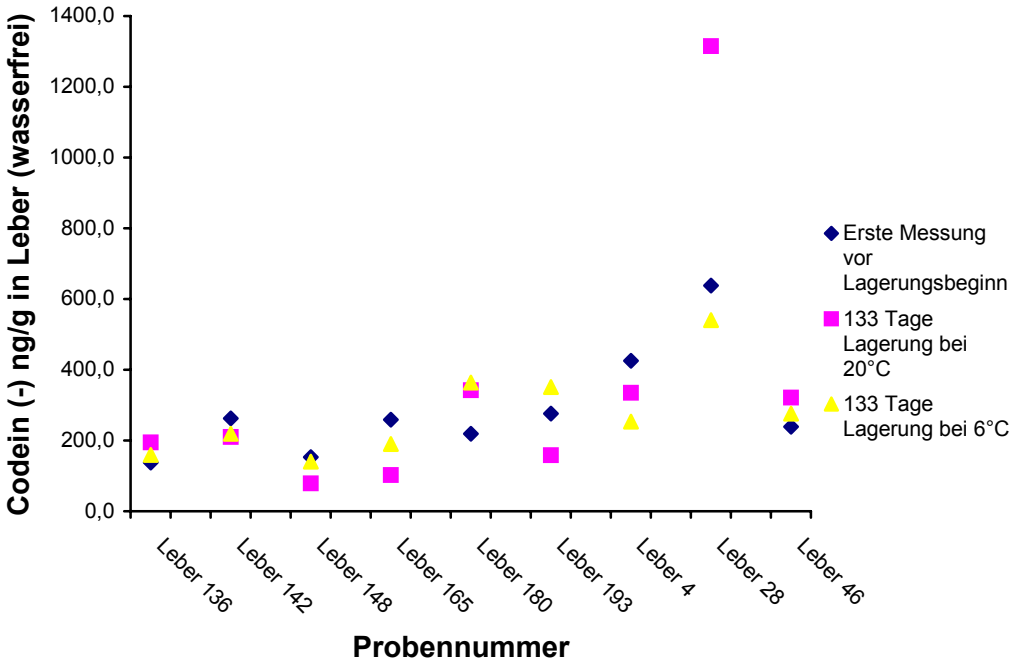


Abbildung 97: Vergleich der Messergebnisse nach 133 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 54: 201 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	K.M.	K.M.	K.M.	K.M.
Leber 142	156,5	166,1	212,1	229,6
Leber 148	122,0	163,4	99,6	182,3
Leber 165	155,8	312,0	160,8	341,3
Leber 180	213,6	520,8	320,5	577,5
Leber 193	250,6	295,5	178,8	387,1
Leber 4	406,8	509,2	252,7	493,7
Leber 28	829,8	1140,3	554,7	993,5
Leber 46	256,3	289,8	262,1	273,0

K.M.: Aufgrund von Materialmangel kein Nachweis möglich

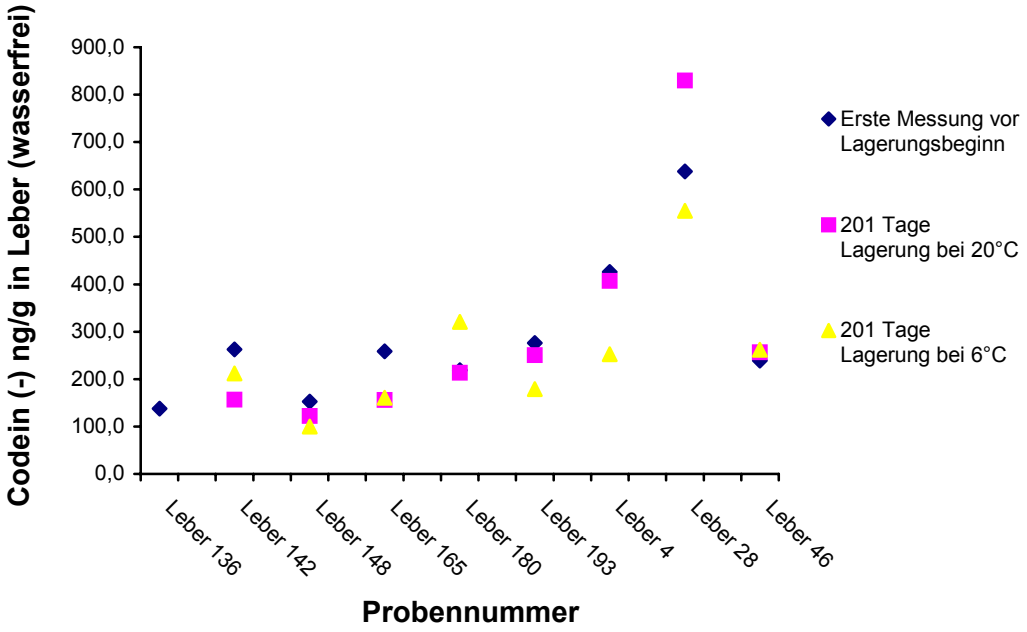


Abbildung 98: Vergleich der Messergebnisse nach 201 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 55: 385 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C		Lagerung bei 6°C	
	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)	Codein (-) in wasserf. Leber (ng/g)	Gesamtcodein (+) in wasserf. Leber (ng/g)
Leber 136	K.M.	K.M.	K.M.	K.M.
Leber 142	147,2	204,8	199,5	384,5
Leber 148	156,1	195,8	155,6	210,8
Leber 165	233,7	293,5	98,4	354,3
Leber 180	299,4	402,2	--	501,3
Leber 193	240,8	360,0	240,3	328,2
Leber 4	362,21	521,6	265,3	499,7
Leber 28	0,0	1324,2	570,6	1768,6
Leber 46	244,5	251,3	217,1	251,1

K.M.: Aufgrund von Materialmangel kein Nachweis möglich

--: nicht auswertbar

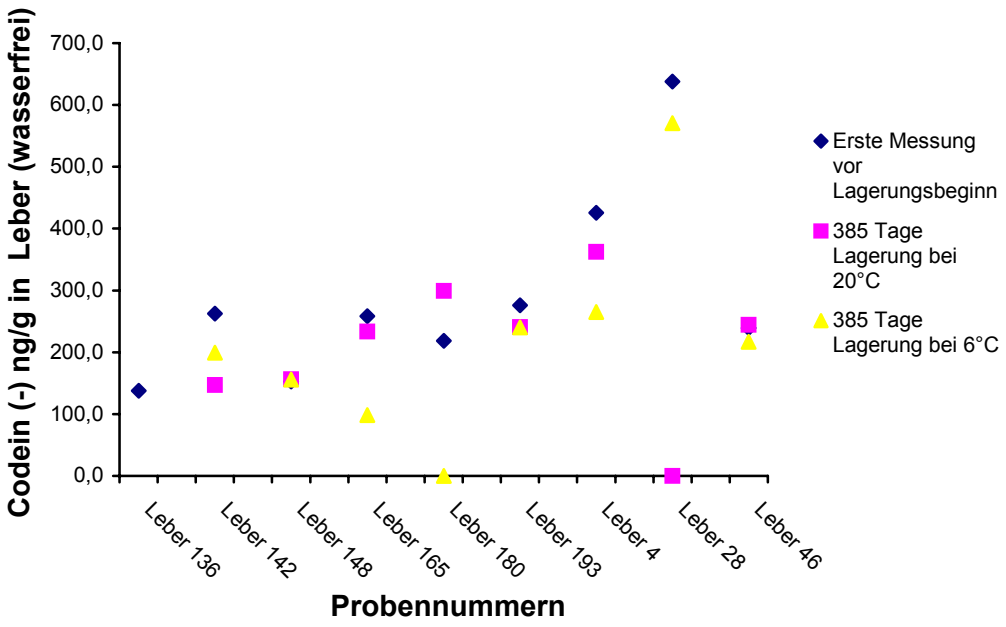


Abbildung 99: Vergleich der Messergebnisse nach 385 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

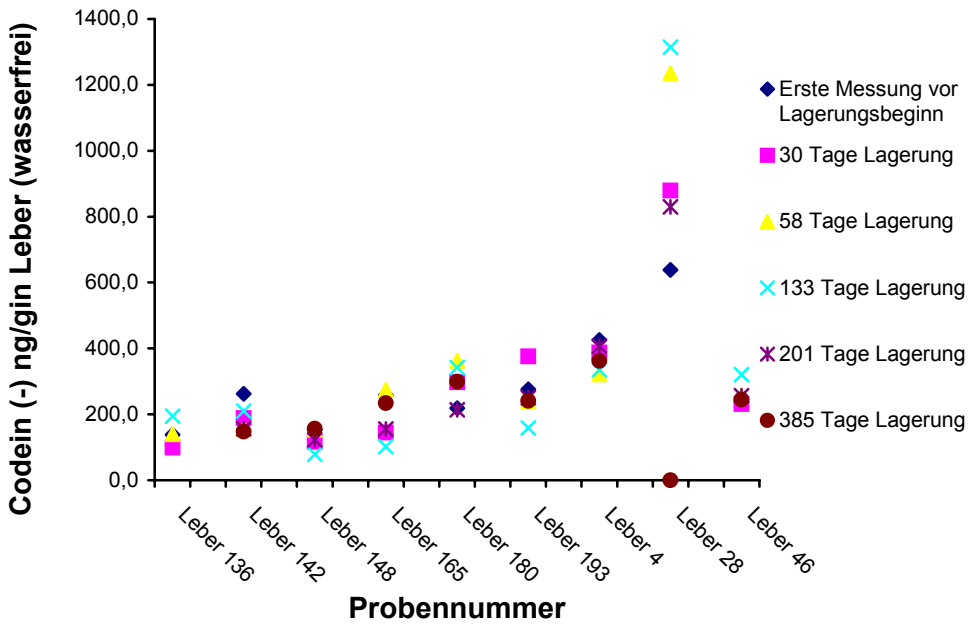


Abbildung 100: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 20°C gelagerten Proben

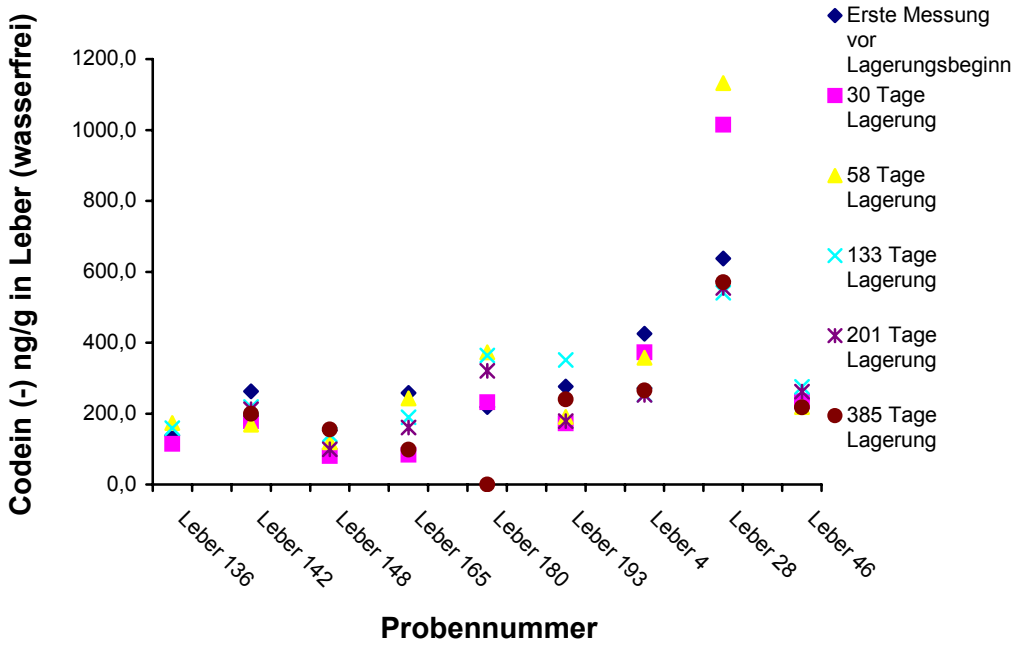


Abbildung 101: Vergleich der Messergebnisse von Codein bei 6°C gelagerten Proben

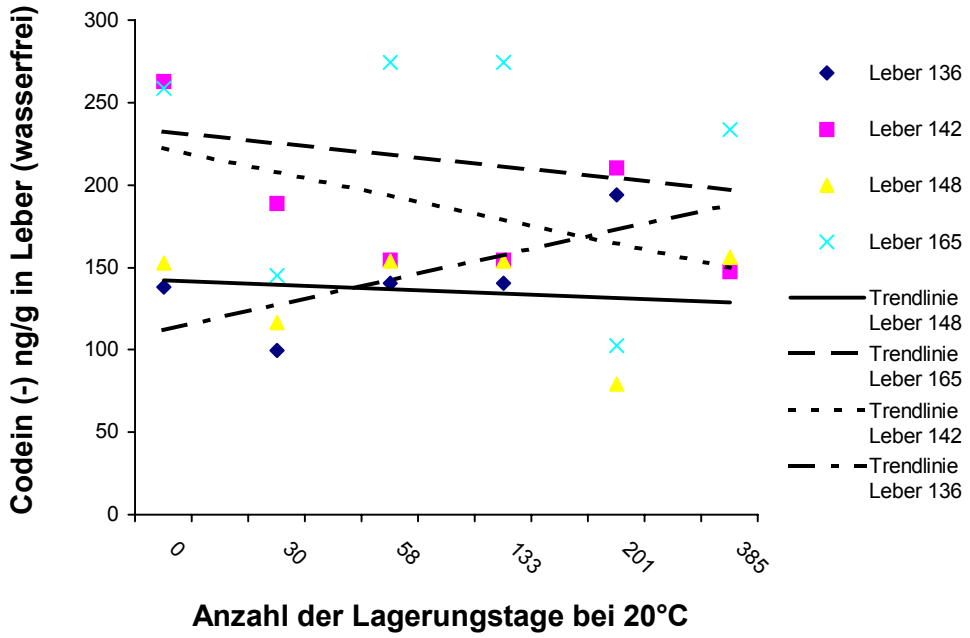


Abbildung 102: Zeitdiagramm Vergleich der Messergebnisse von Codein (-) bei 20°C gelagerten Leberproben: Leber 136, Leber 142, Leber 148, Leber 165

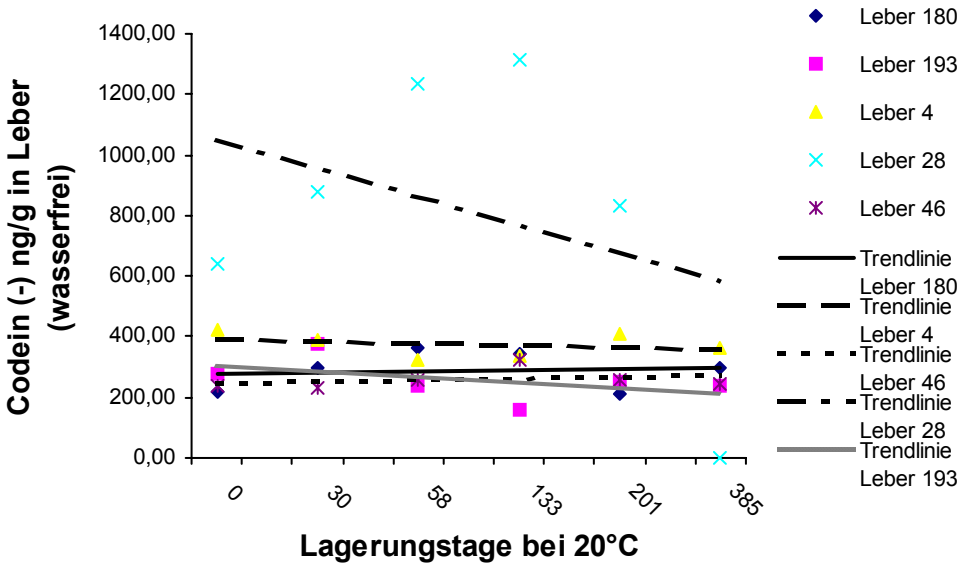


Abbildung 103: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Codein (-) bei 20°C gelagerten Leberproben: Leber 180, Leber 193, Leber 4, Leber 28, Leber 46

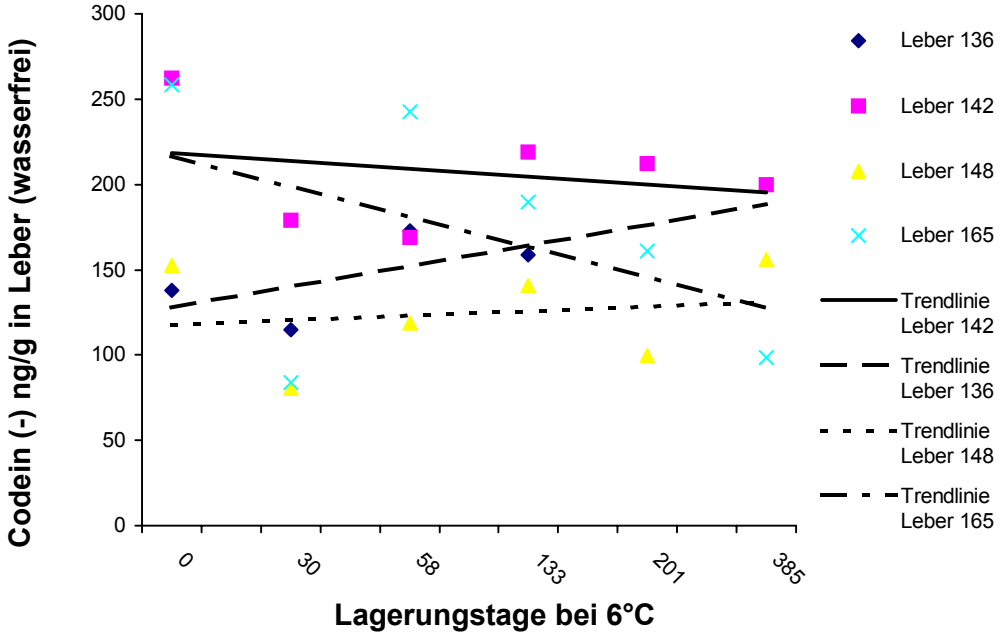


Abbildung 104: Zeitdiagramm Vergleich der Messergebnisse von Codein (-) bei 6°C gelagerten Leberproben: Leber 136, Leber 142, Leber 148, Leber 165

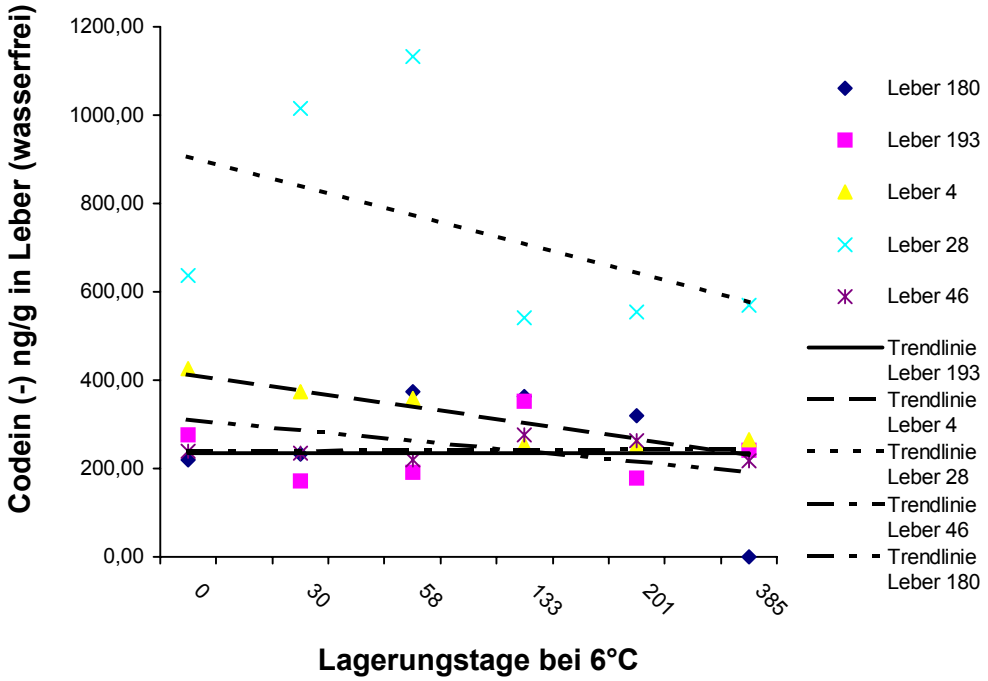


Abbildung 105: Zeitdiagramm Vergleich der Messergebnisse von Codein (-) bei 20°C gelagerten Leberproben: Leber 180, Leber 193, Leber 4, Leber 28, Leber 46

4.1.2.4 Quantitative Auswertung der Messergebnisse von Methadon in Leber

Tabelle 56: erste Messung vor Lagerungsbeginn

Proben Nr.	Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	4,9046
7 Leber	2,8822
31 Leber	1,4836
39 Leber	13,7148
52 Leber	5,8348
107 Leber	10,3351
149 Leber	10,6250
196 Leber	4,9528
207 Leber	4,5215

Tabelle 57: 28Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g	Lagerung bei 6°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	4,0988	1,8794
7 Leber	1,0652	1,6137
31 Leber	1,5621	1,2273
39 Leber	12,1785	16,8158
52 Leber	4,1279	4,4238
107 Leber	5,6315	5,9115
149 Leber	9,34443	8,1919
196 Leber	3,3095	2,2216
207 Leber	4,2404	3,2944

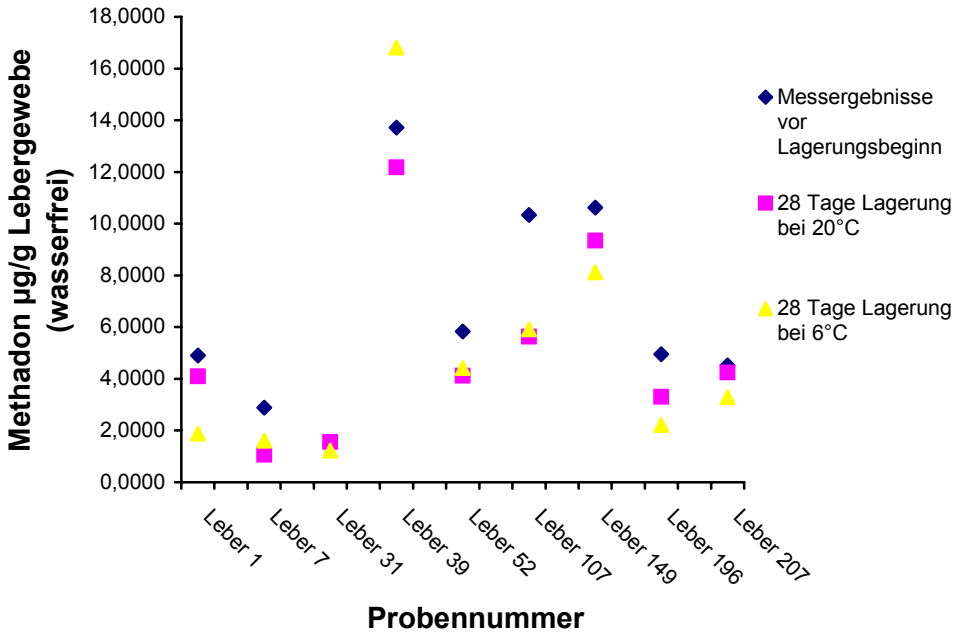


Abbildung 106: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber nach 30 Tagen Lagerung (“0°C bzw. 6°C)

Tabelle 58: 67 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g	Lagerung bei 6°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	3,2339	1,9739
7 Leber	1,9134	1,4995
31 Leber	1,9218	1,4704
39 Leber	11,7072	14,7480
52 Leber	4,3933	4,0857
107 Leber	6,7282	6,2232
149 Leber	9,6695	10,5361
196 Leber	3,1538	7,9516
207 Leber	4,7980	4,5735

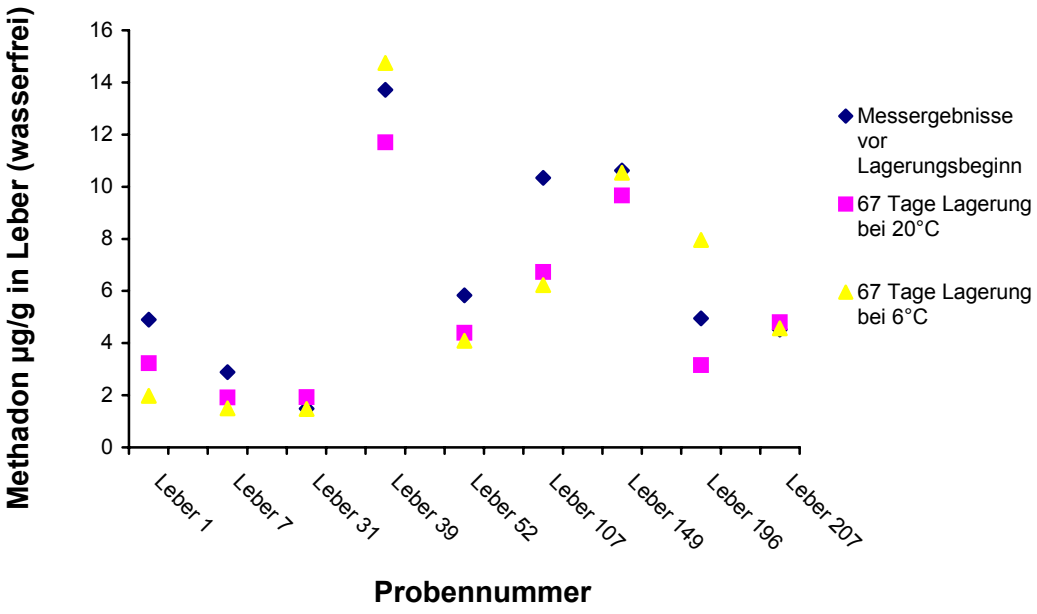


Abbildung 107: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber nach 67 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 59: 97 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g	Lagerung bei 6°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	4,1122	2,1433
7 Leber	1,4523	1,8573
31 Leber	1,4216	1,3875
39 Leber	11,8088	15,6450
52 Leber	6,1929	6,1589
107 Leber	--	2,6996
149 Leber	9,1991	8,1085
196 Leber	2,2808	2,5322
207 Leber	4,3098	5,2173

--: nicht auswertbar

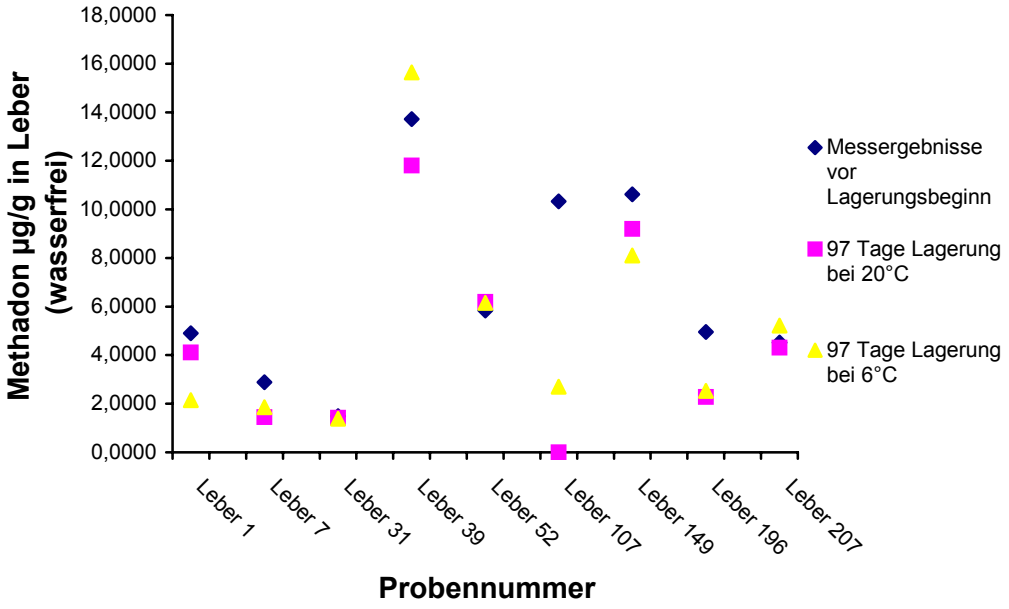


Abbildung 108: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber nach 97 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 60: 165 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g	Lagerung bei 6°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	2,8066	1,2486
7 Leber	1,0530	1,2282
31 Leber	1,4292	1,4561
39 Leber	10,6433	14,1545
52 Leber	7,9488	4,9585
107 Leber	--	3,1056
149 Leber	9,4405	8,1488
196 Leber	3,3253	4,0462
207 Leber	6,4450	5,3083

--: nicht auswertbar

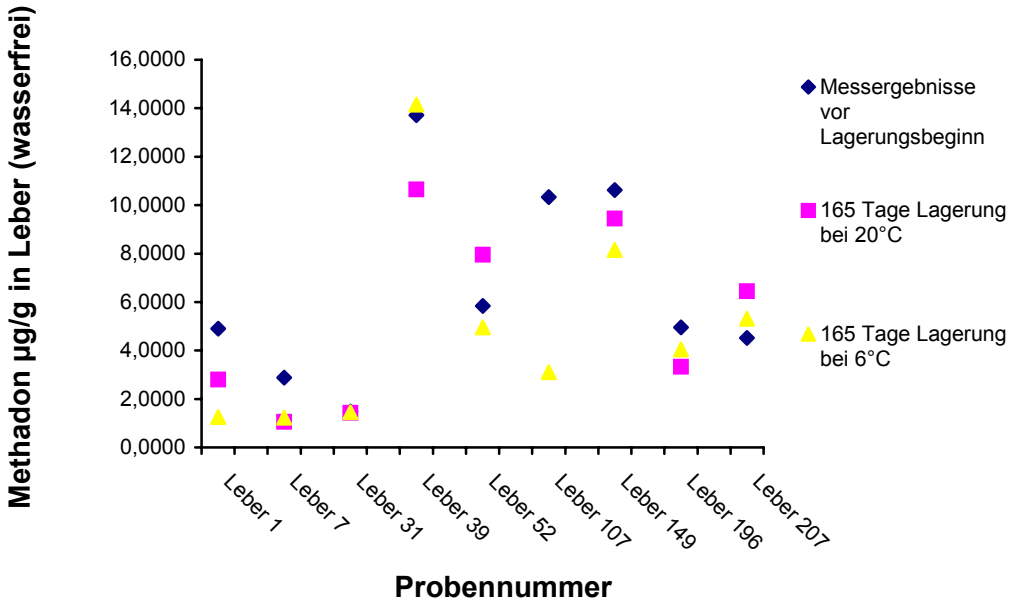


Abbildung 109: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber nach 165 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 61: 243 Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g	Lagerung bei 6°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	3,8609	1,7892
7 Leber	2,0364	1,9739
31 Leber	1,5740	1,6083
39 Leber	12,3601	15,2848
52 Leber	6,1658	6,9742
107 Leber	-	-
149 Leber	10,3921	8,6167
196 Leber	5,9484	4,4124
207 Leber	3,3335	5,9060

--: nicht auswertbar

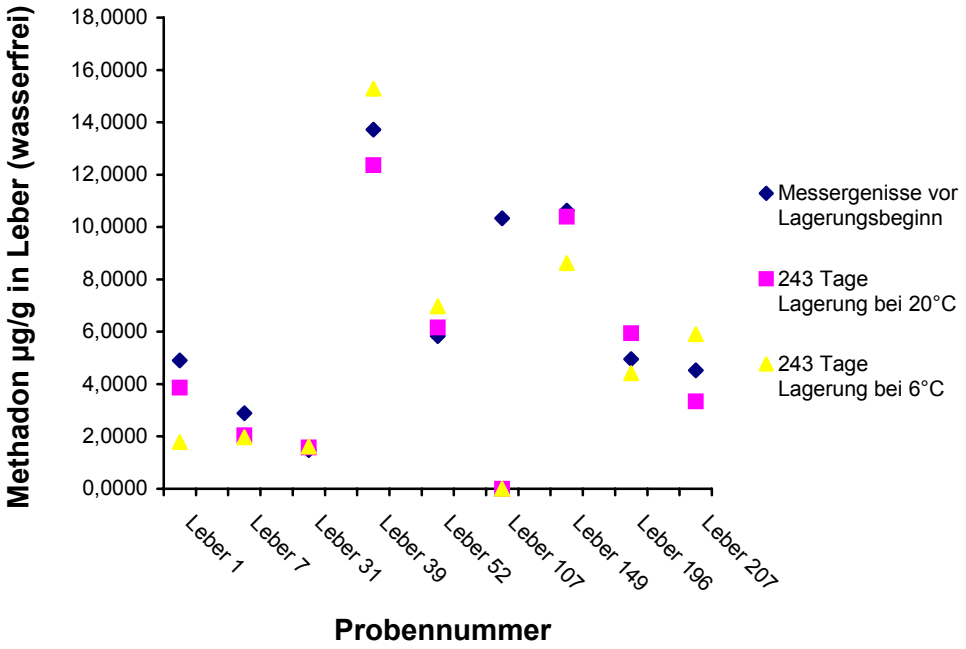


Abbildung 110: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber nach 243 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

Tabelle 62: 348Tage Lagerung bei 6°C bzw. 20°C

Proben Nr.	Lagerung bei 20°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g	Lagerung bei 6°C Methadongehalt in wasserf. Leber in µg/g
1 Leber	2,3902	1,4274
7 Leber	1,5048	1,7508
31 Leber	1,9866	1,9603
39 Leber	12,2757	15,9133
52 Leber	7,8174	6,3424
107 Leber	-	-
149 Leber	9,6689	8,5351
196 Leber	2,6849	4,2286
207 Leber	7,0579	4,7833

--: nicht auswertbar

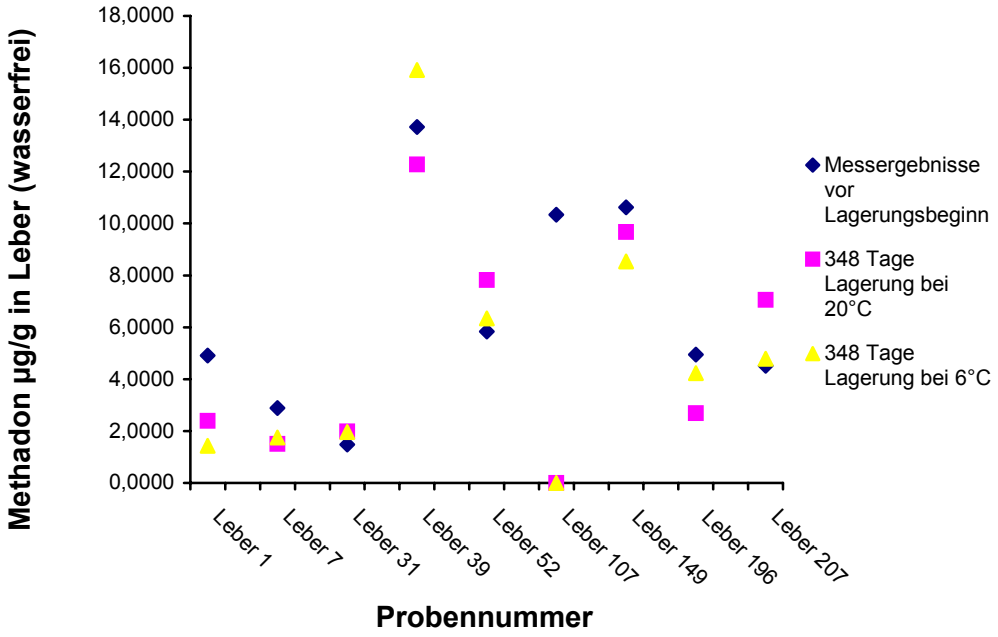


Abbildung 111: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber nach 348 Tagen Lagerung (20°C bzw. 6°C)

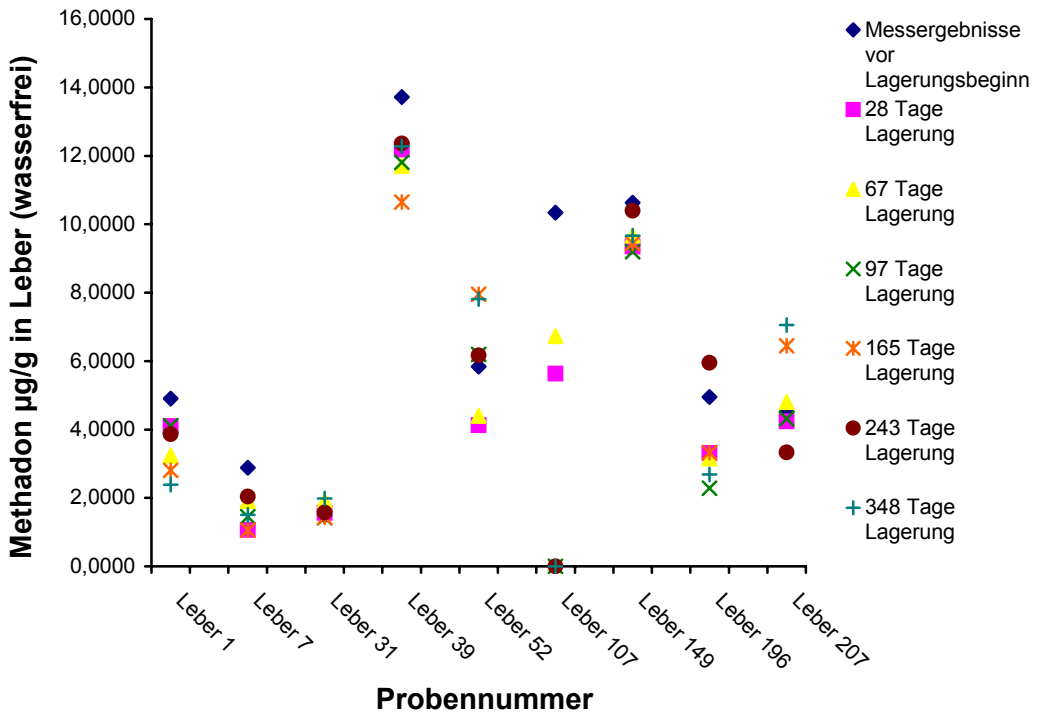


Abbildung 112: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 20°C gelagerten Leberproben

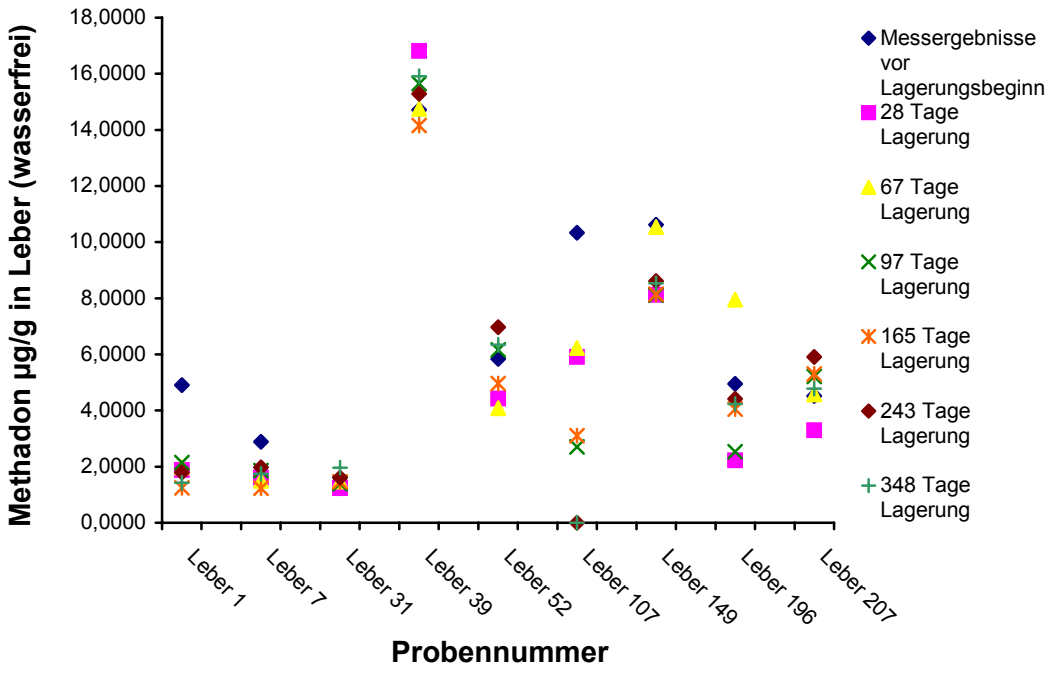


Abbildung 113: Vergleich der Messergebnisse von Methadon bei 6°C gelagerten Leberproben

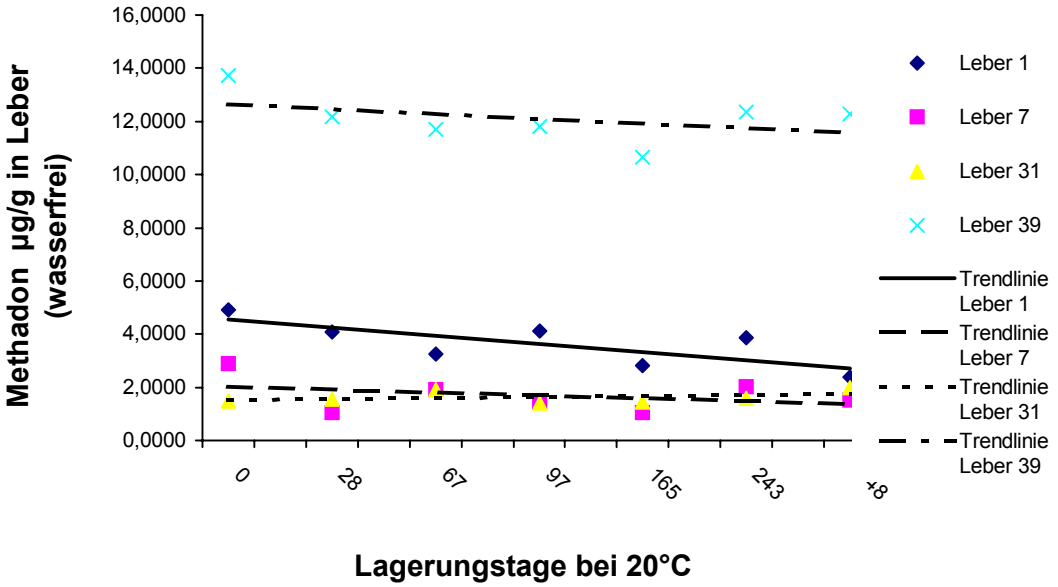


Abbildung 114: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber bei 20°C Lagerungstemperatur über den gesamten Zeitraum: Leber 1, Leber 7, Leber 31, Leber 39

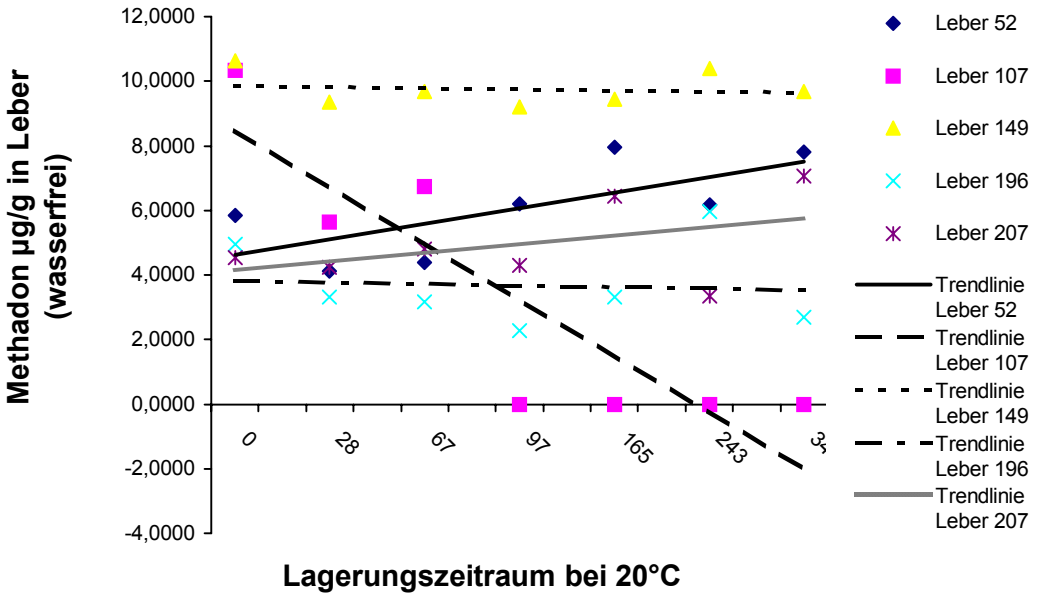


Abbildung 115: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber bei 20°C Lagerungstemperatur über den gesamten Zeitraum: Leber 52, Leber 107, Leber 149, Leber 207

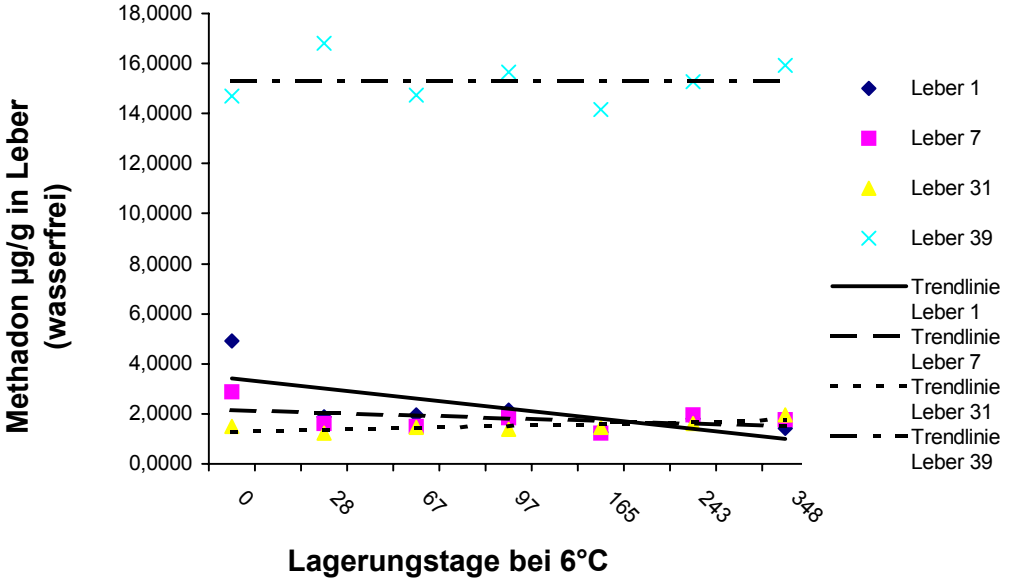


Abbildung 116: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber bei 6°C Lagerungstemperatur über den gesamten Zeitraum: Leber 1, Leber 7, Leber 31, Leber 39

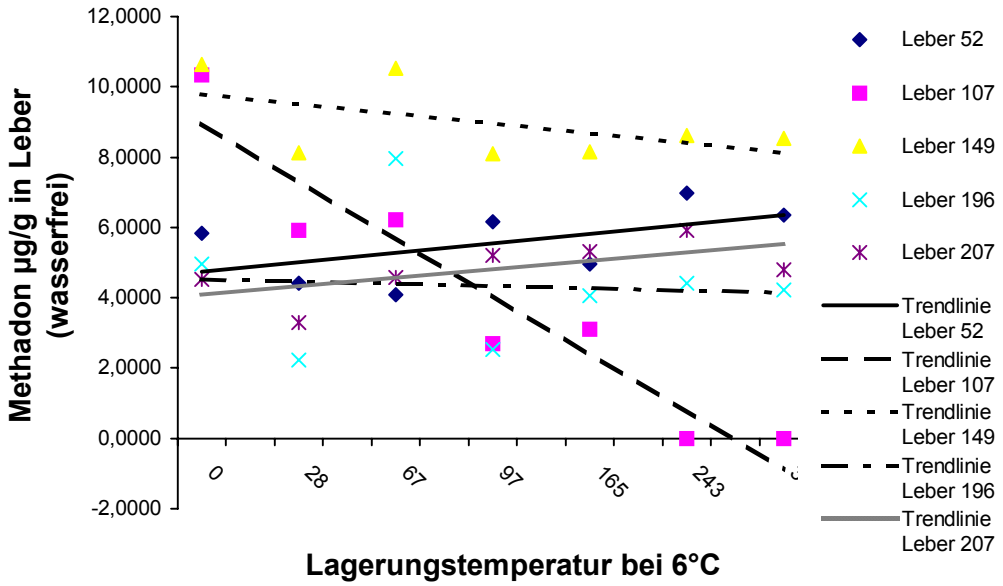


Abbildung 117: Zeitdiagramm: Vergleich der Messergebnisse von Methadon in Leber bei 6°C Lagerungstemperatur über den gesamten Zeitraum: Leber 52, Leber 107, Leber 149, Leber 207

4.2. Auswertung der mikrobiellen Ergebnisse

4.2.1 Qualitative Auswertung des mikrobiellen Spektrums des untersuchten Leichenmaterials:

Das Leichenmaterial (Herzblut und homogenisierte Leber) wurde nach Anreicherung in einem Boullion auf spezifische Agarplatten, Schafblutagar, MacConkey Agar und Schaedler´s-Agar, mittels 3-Ösenausstrich aufgebracht und anschließend im Brutschrank bei 36°C gelagert. Nach 24h und 48 h wurde das Ergebnis abgelesen, und bei Bedarf durch einen Api-Test (Biomerieux) differenziert.

Tabelle 63: Herzblut (Hbl)

Proben-Nr.	Mikroorganismen
1 Hbl	Escherichia coli, Serratia marcescens
7 Hbl	Escherichia coli, Pseudomonas putida, Hafnia alvei
31 Hbl	Serratia marcescens
39 Hbl	Serratia marcescens, Hafnia alvei, Pseudomonas putida
107 Hbl	Pseudomonas putida, Serratia species
136 Hbl	Vergrünende Streptokokken, Moellerella wisconsensis, Hafnia alvei, Proteus vulgaris
142 Hbl	Serratia liquefaciens, Enterococcus hirae, vergrünende Streptokokken
145 Hbl	Serratia marcescens, Hafnia alvei, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Enterococcus spezies
148 Hbl	Serratia liquefaciens
149 Hbl	Serratia marcescens, Candida lipolytica
165 Hbl	Enterococcus gallinarium, Enterococcus species, Serratia liquefaciens, Clostridium befermentans
180 Hbl	Serratia liquefaciens, Enterococcus gallinarum
193 Hbl	Vergrünende Streptokokken Stamm I, vergrünende Streptokokken Stamm II, Serratia liquefaciens
196 Hbl	Proteus vulbaris, Klebsiella oxytoca
207 Hbl	Acinetobacter species, Candida glabrata, Serratia species
4 Hbl	Serratia liquefaciens
28 Hbl	Enterococcus durans, Serratia liquefaciens, Enterobacter cloacae
46 Hbl	Enterococcus faecalis, koagluase-negative Staphylokokken

Anmerkung: Abnahme der Anzahl an Mikroorganismen innerhalb einer Reihe, d.h. erstgenannter Mikroorganismus ist am zahlreichsten in einer Probe vertreten.

Tabelle 64: Leber (homogenisiert)

Proben-Nr.	Mikroorganismen
1 Leber	Pseudomonas putida, Serratia species,
7 Leber	Enterococcus species, Hafnia alvei, Gram-negative Stäbchenbakterien, Acinetobacter species
31 Leber	vergrünende Streptokokken, Pseudomonas putida, Hafnia alvei, Serratia species, Enterococcus species,
39 Leber	Pseudomonas putida, Serratia species, Klebsiella pneumoniae
52 Leber	Serratia species, Pseudomonas putida
107 Leber	Pseudomonas putida, Serratia species
136 Leber	Streptococcus agalactiae
142 Leber	Enterococcus durans, Escherichia coli, koagluase-negative Staphylokokken, Candida lipolytica
148 Leber	Serratia marcescens
149 Leber	Enterococcus species Stamm I, Enterococcus species Stamm II, Serratia species, Klebsiella oxytoca
165 Leber	Clostridium sordellii
180 Leber	Serratia marcescens, Streptococcus agalactiae, koagluase-negative Staphylokokken
193 Leber	Enterococcus species, Bacteroides vulgatus
196 Leber	Proteus mirabilis, Escherichia coli, Enterococcus species
207 Leber	Escherichia coli
4 Leber	Vergrünende Streptokokken
28 Leber	Vergrünende Streptokokken, Enterococcus species
46 Leber	Keine Mikroorganismen nachgewiesen

Anmerkung: Abnahme der Anzahl an Mikroorganismen innerhalb einer Reihe, d.h. erst genannter Mikroorganismus ist am zahlreichsten in einer Probe vertreten.

Basierend auf einer rein quantitativen Auswahl wurden aus den gewonnenen mikrobiellen Ergebnissen vier verschiedene Mikroorganismen-Stämme ausgewählt: Pseudomonas putida, E. coli, Serratia marcescens und Staphylococcus aureus.

Staphylococcus aureus wurde auf Grund seines taxonomischen Merkmals (Gram Reaktion positiv, durch das 30-70%ige dicke Mureinnetz in der Zellwand) ausgewählt.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, wurden ATCC-Stämme von Staphylococcus aureus, E. coli und Serratia marcescens für die weiteren Versuche verwendet. Für Pseudomonas putida wurde ein durch Sequenzierung eindeutig identifizierter Labor-Stamm ausgewählt.

4.2.2 Auswahl des Nährboullion und Ermittlung der Wiederfindung

Ziel war es ein Nährboullion zu finden, der sowohl für alle ausgewählten Mikroorganismen ausreichend Nährstoffe liefert, als auch bei der anschließenden Festphasenanalytik in der Aufarbeitung durch hohe Viskosität keine Schwierigkeiten verursacht und zusätzlich für die Analytik eine ausreichende Wiederfindung garantiert, d. h. geringe adsorbtive Prozesse mit der zu untersuchenden Substanz. Der Nährboullion diente nur dazu, die erste Grundversorgung der Mikroorganismen zugewährleisten, d. h. so reich wie nötig, so arm wie möglich an Nährstoffen. Für die längerfristige Vorsorgung sollten die Mikroorganismen dazu gezwungen werden eventuell schwierigeres Material in Form von z.B. Morphin, Codein, Morphinglucuronid bzw. Methadon zu verstoffwechseln.

Als für die getroffene Auswahl an Mikroorganismen geeignete Nährlösung wurden Hirn-Herz-Boullion, Müller Hinton-Boullion und Thioglycolate Medium ausgewählt.

Hirn-Herz-Boullion ist für die Anzüchtung von anspruchsvollen Keimen verwendbar. In seiner Zusammensetzung besteht er aus 12,5% Kalbshirninfusion, 5% Rinderherzinfusion, 10% Pepton, 5% NaCl, 2,5% Phosphatpuffer und 2% Glucose.

Müller-Hinton-Bouillion bestehend aus 0,3% Rinderextrakt, 1,75% Caseinhydrolysat und 0,15% Stärke.

Thioglycolate Medium angereichert mit Vitamin K und Hemin, besteht laut Hersteller aus 17% pankreatischabgebautem Casein, 3% papainisch abgebautem Sojamehl, 6% Dextrose, 2,5% NaCl, 0,5% Nartriumthioglykolat, 0,7% Agar, 0,1% Natriumsulfit, 0,005% Hämin und 0,001% Vitamin K gelöst in 100ml destiliertem Wasser.

Für jede der zu untersuchenden Substanzen wurden jeweils 2*5ml der verschiedenen Boullions verwendet und mit folgenden Wirkstoffkonzentrationen (gelöst in Methanol) versetzt:

Morphin-3ßGlucuronid: 0,8µg (absolut)

Morphin-Hydrochlorid:0,8µg (absolut)

Codein-Monohydrat: 0,8µg (absolut)

Levomethadon: 0,912µg (absolut)

Um die Werte nicht nur untereinander, sondern auch im Bezug auf die verwendete Methode vergleichen zu können, wurden zusätzlich für jede

Substanz anstelle von Boullion 5ml Phosphatpuffer pH 6,5 angesetzt. Auch hier wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.
Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend den in Punkt 2.5 beschriebenen Methoden.
Infolge der hohen Viskosität der Thioglycollat-Proben, konnte keine Festphasenextraktion mit den für die Methode optimierten Säulchen durchgeführt werden. Alle zu untersuchenden Thioglycolat-Proben wurden verworfen, so dass die Proben der Müller-Hinton-Bollions, des Hirn-Herz-Bollions und der Phopshatpuffer übrigblieben, und mit denen nach den verschiedenen Aufarbeitungen GC/MS Messungen durchgeführt werden konnten.

Tabelle 65: Wiederfindung von Morphin-HCl in verschiedenen Boullions

Morphin-HCl:

Art des Boullion	IST 1. [µg]	IST 2. [µg]	Soll 1. [µg]	Soll 2. [µg]	WF 1. [%]	WF 2. [%]
Hirn-Herz Boullion	0,421	0,455	0,800	0,800	52,6	56,8
Müller-Hinton-Boullion	0,480	0,510	0,800	0,800	60,0	63,7
Phosphatpuffer pH 6,5	0,573	0,540	0,800	0,800	71,6	67,5

Tabelle 66: Wiederfindung von Codein-Monohydrat in verschiedenen Boullions

Codein-Monohydrat:

Art des Boullion	IST 1. [µg]	IST 2. [µg]	Soll 1. [µg]	Soll 2. [µg]	WF 1. [%]	WF 2. [%]
Hirn-Herz Boullion	0,636	0,559	0,800	0,800	79,5	69,8
Müller-Hinton-Boullion	0,760	0,754	0,800	0,800	95,0	94,3
Phosphatpuffer pH 6,5	0,625	0,699	0,800	0,800	78,1	87,4

Tabelle 67: Wiederfindung von M3G in verschiedenen Boullions

Morphin-3ß-glucuronid:

Art des Boullion	IST 1. [µg]	IST 2. [µg]	Soll 1. [µg]	Soll 2. [µg]	WF 1. [%]	WF 2. [%]
Hirn-Herz Boullion	0,220	0,275	0,800	0,800	27,5	34,4
Müller-Hinton-Boullion	0,386	0,420	0,800	0,800	48,2	52,5
Phosphatpuffer pH 6,5	0,159	0,245	0,800	0,800	19,9	30,6

Tabelle 68: Wiederfindung von Levomethadon in verschiedenen Boullions

Levomethadon:

Art des Boullion	IST 1. [µg]	IST 2. [µg]	Soll 1. [µg]	Soll 2. [µg]	WF 1. [%]	WF 2. [%]
Hirn-Herz Boullion	0,658	0,687	0,912	0,912	72,2	75,3
Müller-Hinton-Boullion	0,684	0,655	0,912	0,912	75,0	71,8
Phosphatpuffer pH 6,5	0,644	0,699	0,912	0,912	70,6	76,6

Diese Vorversuche zeigten, dass sich der Müller-Hinton-Boullion auf Grund der Nährstoffzusammensetzung und der guten bis sehr guten Wiederfindungsrate als am besten geeignet erwies.

4.2.3 Quantitative Auswertung der mikrobiellen Abbauprozesse

Mit Hilfe eines Densidometers wurde in 5ml Müller-Hinton-Bouillion eine bestimmte optische Dichte an Mikroorganismen eingebracht. Danach wurde eine genau definierte Menge an Morphin, Codein, 3-ß Morphinglucuronid bzw. Levomethadon dazugegeben. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zusammen mit einer Blindprobe, bei der es sich lediglich um 5ml Müller-Hinton-Bouillion mit entsprechender Bakteriendichte handelte, und für jede zu untersuchende Substanz eine Reinheitskontrollprobe (Müller-Hinton-Bouillion mit jeweils der zu untersuchenden Substanz ohne Mikroorganismen), wurden die Probenkulturen für 24h bzw 48h in einen Brutschrank bei 36°C Raumluft gestellt.

Nach 24h wurden die ersten Proben entnommen und mit Hilfe eines Densidometers die Dichte gemessen. Wurde eine höhere Dichte als die 24h zuvor eingestellte gemessen, so wurde dies als Wachstum gewertet.
Bei den Reinheitskontrollproben war ein gleichbleibender MacFarland zu erwarten. Der MacFarland der Blindproben war im selben Bereich wie die der mit Substanz versetzte Proben, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass das Methanol, im welchen die zu untersuchenden Pharmaka gelöst waren bzw. das Pharmakon selbst, keinen entscheidend hemmenden Einfluss auf die Mikroorganismen ausgeübt haben.
Nach Ende der Bebrütungszeit wurden alle Proben zentrifugiert und der Überstand von den Pellets getrennt. Die Pellets wurden anschließend 3x mit je 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Die Waschlösung wurde nach dem Zentrifugieren verworfen. Durch das Waschen der Pellets sollten mögliche Rückstände der zugesetzten Wirkstoffe (Pharmaka) entfernt werden.

Bestimmung von Morphin, Codein und 3-ß-Morphinglucuronid:
Die Überstände und Pellets von Morphin, Codein und 3ß-Morphinglucuronid werden mit Phosphatpuffer pH 6,5 versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150ng der Internen Standardlösung (gelöst in Methanol, D3-Morphin, D3-Codein). Die Überstände von Morphin und Codein können nun nach Zugabe von Glycinpuffer und Carbonatpuffer (pH 8,5) auf die mit Methanol gespülten und Wasser konditionierten Bond Elut Certify Säulchen aufgegeben werden. Die Probenlösung läßt man kurz einwirken bevor Vakuum angelegt wird. Nach dem Spülen der Säulchen mit Acetatpuffer und Methanol werden diese 15min lang unter Vakuum getrocknet. Die Elution der Proben erfolgt anschließend mit 2x1ml Dichlormethan/Isopropanol (8/2) mit 2% Ammoniaklösung (25%ig). Die Eluate werden in Elutionsröhrchen aufgefangen in GC-Vials überführt und im Abdampfblock unter N2 eingeengt. Anschließend erfolgt die Derivatisierung mit je 50µl PFPA und PFPOH die auf die getrockneten Proben gegeben werden. Die Vials werden verschlossen und 30min im Trockenschrank bei 65°C der Reaktion überlassen. Danach werden die Extrakte im Abdampfblock bis zur Trockne unter N2 eingeengt,

anschließend in 50µl Ethylacetat aufgenommen und mittels GC/MS vermessen.
Für die Überstände, welche mit 3ß-Morphinglucuronid versetzt wurden, genauso wie für die Pellets muss eine gesonderte Aufarbeitung erfolgen. Die Pellets bestehen aus abgesondertem Zellmaterial spezieller Mikroorganismen. Dabei handelt es sich sowohl um unzerstörte tote und lebende Bakterienzellen, als auch um Zellfragmente. Um Zellinhalt mit dieser Methode analytisch zu erfassen, müssen die Zellen der Mikroorganismen aufgebrochen werden. Dies erfolgt durch Zugabe von 2ml 25%iger HCl und einem anschließenden 45minütigem Lagern der Proben bei 130°C in den Trockenschrank.
Nach vollständiger Hydrolyse werden die abgekühlten Proben mit KOH auf pH 8,5 eingestellt. Die anschließende Aufarbeitung erfolgt nun nach der oben beschriebenen Methode.

Bestimmung von Methadon:
Die Überstände und Pellets der mit Methadon versetzten Proben werden mit jeweils 5ml Phosphatpuffer (pH 6,5) versetzt. Danach erfolgt die Zugabe von 100ng Internen Standards (D9-Methadon methanolische Lösung). Anschließend werden die Überstände am Vortex gemischt und 15min beschallt. Die Extraktion erfolgt mit Bond Elut Certify Säulchen, welche mit Methanol gespült und mit Phosphatpuffer (pH6,5) konditioniert wurden. Die Probelösungen werden auf die Säulen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Gespült wird anschließend mit Essigsäure und nach 5minütigem Trocknen mit Methanol. Nach 2minütigem Trocknen erfolgt die Elution mit 2x1ml Ethylacetat gemischt mit 2% Ammoniaklösung (25%). Die Eluate werden im Abdampfblock unter Stickstoff zur Trockne eingeengt. Nach dem Einengen werden die Extrakte in 50µl Ethylacetat aufgenommen in Mikroeinsätze überführt und am GC/MS vermessen.
Für die Pellets erfolgt eine gesonderte Aufarbeitung. Bei den Pellets handelt es sich um tote oder lebende Bakterienzellen, bzw. Zellfragmente. Um mögliche Methadoneinlagerungen in den Zellen nachzuweisen müssen die Zellwände der Mikroorganismen zerstört werden. Dabei ist darauf zu

achten, dass das eventuell eingelagerte Methadon nicht zerstört wird. Dafür werden die Probenpellets zusätzlich mit 2ml 1M NaOH versetzt und anschließend 30min bei 90° C im Trockenschrank inkubiert. Nachdem das Zellmaterial vollständig aufgeschlossen ist, werden die Proben mit HCl neutralisiert und wie die Proben-Überstände aufgearbeitet.

4.2.3.1 Staphylococcus aureus, OD 0,2; MH Boullion

Tabelle 69: Nachweis von Morphin nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,426	53,3
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,495	61,9
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,433	54,1
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,328	41,0
2. RK	0,354	44,3
3. RK	0,311	38,9

Tabelle 70: Nachweis von Morphin nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,452	56,5
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,440	55,0
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,456	57,0
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,211	26,4
2. RK	0,215	26,8
3. RK	0,229	28,6

Tabelle 71: Nachweis von Codein nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,528	66,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,543	67,9
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,446	55,8
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,366	45,8
2. RK	0,650	81,3
3. RK	0,487	60,9

Tabelle 72: Nachweis von Codein nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,568	71,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,540	67,5
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,459	57,4
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,553	69,1
2. RK	0,458	57,2
3. RK	0,548	68,4

Tabelle 73: Nachweis von M3G nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	M3G µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,207	25,9
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,212	26,5
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,197	24,6
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,204	25,5
2. RK	0,191	23,9
3. RK	0,255	29,4

Tabelle 74: Nachweis von M3G nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	M3G µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,204	25,5
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,240	30,0
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,212	26,5
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,217	27,1
2. RK	0,263	32,8
3. RK	0,236	29,5

Tabelle 75: Nachweis von Methadon nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,576	63,2
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,583	63,9
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,525	57,6
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,573	62,8
2. RK	0,622	68,2
3. RK	0,538	59,0

Tabelle 76: Nachweis von Methadon nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,511	56,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,536	58,8
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,551	60,4
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,597	65,5
2. RK	0,639	70,1
3. RK	0,517	56,7

4.2.3.2 Escherichia coli, OD 0,1; MH-Boullion

Tabelle 77: Nachweis von Morphin nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,561	70,1
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,594	74,3
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,532	66,5
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,414	51,8
2. RK	0,470	58,7
3. RK	0,501	62,6

Tabelle 78: Nachweis von Morphin nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
Überstand	0,523	65,4
Pellets	n.n.	
Überstand	0,552	69,0
Pellets	n.n.	
Überstand	0,518	64,8
Pellets	n.n.	
1. RK	0,448	56,0
2. RK	0,421	52,6
3. RK	0,490	61,2

Tabelle 79: Nachweis von Codein nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,555	69,4
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,472	59,0
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,710	88,8
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,571	71,4
2. RK	0,589	73,6
3. RK	0,555	69,3

Tabelle 80: Nachweis von Codein nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,475	59,4
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,653	81,6
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,583	72,9
3. Pellets	n.n	
1. RK	0,641	80,1
2. RK	0,534	66,8
3. RK	0,568	71,0

Tabelle 81: Nachweis von M3G nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	MG µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,387	48,4
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,414	51,8
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,240	30,0
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,548	68,5
2. RK	0,359	44,9
3. RK	0,459	57,4

Tabelle 82: Nachweis von M3G nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	MG µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,365	45,6
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,146	18,3
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,218	27,3
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,533	66,6
2. RK	0,501	61,6
3. RK	0,480	60,1

Tabelle 83: Nachweis von Methadon nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,606	66,4
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,552	60,5
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,528	57,9
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,631	69,2
2. RK	0,622	68,2
3. RK	0,538	59,0

Tabelle 84: Nachweis von Methadon nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,392	43,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,477	52,3
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,460	50,4
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,639	70,1
2. RK	0,518	56,8
3. RK	0,555	60,8

4.2.3.3 Pseudomonas putida; OD 0,1, MH Boullion

Tabelle 85: Nachweis von Morphin nach 24h Bebrütung
n.n.= nicht nachweisbar

24h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,466	58,3
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,543	67,9
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,487	60,9
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,283	35,4
2. RK	0,450	56,3
3. RK	0,456	57,0

Tabelle 86: Nachweis von Morphin nach 48h Bebrütung
n.n.= nicht nachweisbar

48h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,439	54,9
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,532	66,5
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,473	59,1
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,497	62,1
2. RK	0,448	56,0
3. RK	0,437	54,6

Tabelle 87: Nachweis von Codein nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,494	61,8
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,713	89,1
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,651	81,4
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,619	77,4
2. RK	0,639	79,9
3. RK	0,596	74,5

Tabelle 88: Nachweis von Codein nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,540	67,5
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,552	69,0
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,560	70,0
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,588	73,5
2. RK	0,662	82,8
3. RK	0,562	70,3

Tabelle 89: Nachweis von M3G nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	MG µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,236	29,5
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,151	18,9
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,140	17,5
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,299	37,4
2. RK	0,154	19,3
3. RK	0,196	24,5

Tabelle 90: Nachweis von M3G nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	MG µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,220	27,5
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,153	19,1
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,172	21,5
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,300	37,5
2. RK	0,163	20,4
3. RK	0,278	34,8

Tabelle 91: Nachweis von Methadon nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,576	81,5
1. Pellets	0,167	
2. Überstand	0,562	78,9
2. Pellets	0,158	
3. Überstand	0,591	71,8
3. Pellets	0,064	
1. RK	0,557	61,1
2. RK	0,587	64,4
3. RK	0,592	64,9

Tabelle 92: Nachweis von Methadon nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,454	62,8
1. Pellets	0,119	
2. Überstand	0,607	71,8
2. Pellets	0,048	
3. Überstand	0,590	69,8
3. Pellets	0,047	
1. RK	0,537	58,9
2. RK	0,494	54,2
3. RK	0,576	63,2

4.2.3.4 Serratia marcescens, OD 0,1; MH-Boullion

Tabelle 93: Nachweis von Morphin nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,632	79,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,469	58,6
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,462	57,8
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,360	45,0
2. RK	0,420	52,5
3. RK	0,400	50,0

Tabelle 94: Nachweis von Morphin nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Morphin µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,492	61,5
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,543	67,9
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,394	49,3
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,340	42,5
2. RK	0,423	52,8
3. RK	0,455	56,8

Tabelle 95: Nachweis von Codein nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,333	41,6
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,529	66,1
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,578	72,3
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,366	45,8
2. RK	0,522	65,3
3. RK	0,503	62,8

Tabelle 96: Nachweis von Codein nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Codein µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,344	43,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,561	70,1
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,520	65,0
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,558	69,8
2. RK	0,531	66,3
3. RK	0,501	62,6

Tabelle 97: Nachweis von M3G nach 24h Bebrütung
n.n = nicht nachweisbar

24h	MG µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,223	27,9
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,236	29,5
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,283	35,4
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,246	30,8
2. RK	0,306	38,3
3. RK	0,280	35,0

Tabelle 98: Nachweis von M3G nach 48h Bebrütung
n.n = nicht nachweisbar

48h	MG µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,288	36,0
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,216	27,0
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,342	42,8
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,259	32,4
2. RK	0,311	38,8
3. RK	0,274	34,2

Tabelle 99: Nachweis von Methadon nach 24h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

24h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,590	64,7
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,585	64,1
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,538	59,0
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,660	72,4
2. RK	0,641	70,3
3. RK	0,623	68,3

Tabelle 100: Nachweis von Methadon nach 48h Bebrütung
n.n. = nicht nachweisbar

48h	Methadon µg	Wdf % (Überstand + Pellets)
1. Überstand	0,407	44,6
1. Pellets	n.n.	
2. Überstand	0,503	55,2
2. Pellets	n.n.	
3. Überstand	0,530	58,1
3. Pellets	n.n.	
1. RK	0,608	66,7
2. RK	0,621	68,1
3. RK	0,578	63,4

5. Diskussion

Oft sind Todeszeitpunkt und Auffindezeitpunkt einer Leiche nicht identisch. Dabei ist dann die Frage von Bedeutung, ob die analytisch gemessene Konzentration eines Pharmakons entsprechend bzw. vergleichbar ist mit der zur Todeszeit im Organismus befindlichen Konzentration. Sollten Abnahmen des Pharmakons während den verschiedenen Lagerbedingungen beobachtet werden, ist die Ursache hierfür zu klären. Um Abbaumöglichkeiten bestimmter Mikroorganismen zu überprüfen folgten zahlreiche Tests mit einer ausgesuchten Gruppe an Bakterien. Durch Hydrolyse der Zellwand sollte ausgeschlossen werden, dass die Mikroorganismen das zu untersuchende Pharmakon in die Zelle bzw. Zellwände einlagern und dadurch eine Verstoffwechselung vorgetäuscht wird.

Da nicht immer Herzblut gewonnen werden kann, vor allem bei Leichen mit längerer Liegezeit, muß die Analytik oft auf die Untersuchung von Organen bzw. Muskulatur beschränkt werden. Repräsentativ für diese Problematik, wurde als Probenmatrix die Leber gewählt.

5.1. Methodik

Da jeder Mensch einen variierenden Wassergehalt hat, müssen die einzelnen Ergebnisse, um Proben verschiedener Leichen vergleichen zu können, auf deren Trockengewicht bezogen werden.

Je länger bestimmte Leberproben gelagert wurden, umso schwieriger gestaltete sich deren Aufarbeitung für die analytische Bestimmung. So konnten Probleme wie eine, auch durch Zentrifugation nicht trennbare Suspension beobachtet werden, die nur durch ein Abfiltrieren der Probe den Einsatz für die Festphasenextraktion möglich machte. Dieses Phänomen trat vor allem bei der Probe Leber 107 mit fortschreitender Lagerungszeit auf. Daß dadurch starke Schwankungen bei der quantitativ zu bestimmenden Pharmakonkonzentration entstehen, ist nicht vermeidbar. Für die Fragestellungen in dieser Untersuchung sind die ermittelten Werte dieser Probe nicht repräsentativ und können somit nicht für eine

Interpretation bezüglich der Stabilität des Pharmakons in Leberproben herangezogen werden. Diese Werte sind als „nicht auswertbar“ in den einzelnen Tabellen gekennzeichnet.
Allgemein konnten hauptsächlich, bedingt durch die Lagerung, Probleme bei der Analytik von Morphin in Leberproben beobachtet werden. Leberproben, die 385 Tage gelagert wurden, konnten, unabhängig von den Lagerungsbedingungen, auf Grund des nicht nachweisbaren, vor der Aufarbeitung zugesetzten Internen Standards, nicht ausgewertet werden. Dieses Problem konnte trotz wiederholter Aufarbeitung nicht gelöst werden. Ob adsorptive Prozesse dafür verantwortlich sind konnte letztendlich nicht geklärt werden.
Problematisch bei längeren Leichenliegezeiten scheint somit die Analyse von Morphin in Leberproben zu sein.
Für Codein traten auch nach 385 Tagen Lagerung kaum Probleme in dem Nachweis des Pharmakons bzw. des Internen Standards auf. In den dazugehörigen Herzblutproben konnten auch nach 337 Tagen Lagerung sowohl Codein als auch Morphin bzw. gebundenes Morphin nachgewiesen werden.
Methadon konnte sowohl in Herzblut- als auch in Leberproben auch nach 326 bzw. 348Tagen unterschiedlicher Lagerungsbedingungen nachgewiesen werden.

5.2 Stabilität von freiem Morphin und gebundenem Morphin in Lebergewebe und Herzblut

Leberproben von Drogentoten wurden hinsichtlich der Stabilität von Morphin und Morphinglucuronide in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerbedingungen von Morjya et al 1997 untersucht. Deren Studien wurden jedoch nur über einen Zeitraum von 10 Tagen geführt. Bei dem verwendeten Probenmaterial handelte es sich um Leber, Herzblut und Urin eines an Heroinüberdosis verstorbenen Drogentoten. Die Proben wurden bei 4°C, bei 18-22°C und bei 37°C gelagert. Für die Leberprobe wurde berichtet, dass nach 10 Tagen Lagerung bei 18-22°C bzw. 37°C konjugiertes Morphin teilweise bzw. komplett als freies Morphin vorlag.

Weitere Versuche mit Blut Drogentoter über die Stabilität von Morphin und gebundenem Morphin, z. T. auch über einen Zeitraum von 12 Monaten wurden sowohl von Skopp et. al 2001 als auch von Hadidi et. al 1997 beschrieben. Der Untersuchungsumfang in der von Skopp et al 2001 veröffentlichten Arbeit umfaßte 4 Drogentote, bei der Arbeit von Hadidi et al 1997 2 Drogentote. Als Matrix wurde in diesen Studien jedoch Vollblut verwendet, so dass Ergebnisse über die Stabilität in Lebergewebe nicht vorliegen.
In den von uns durchgeführten Untersuchungen an Herzblutproben ergaben sich sowohl für die qualitativen als auch quantitativen Vergleiche zwischen den bei 20°C und 6°C gelagerten Proben, dass für die Stabilität von freiem Morphin die Lagerungsbedingungen während 337 Tagen keinen Einfluss haben. Dieses Ergebnis für postmortales Vollblut bestätigt die von Hadidi et al 1997 gemachten Beobachtungen. Die Ergebnisse von Skopp et al 2001 und Moriya F et al 1997 über eine Abnahme von M3G und M6G bzw. konjugiertem Morphin und Zunahme von freiem Morphin in postmortalem Vollblut können somit nicht bestätigt werden.
Ein Abfall der Konzentration von Morphinglucuroniden wurde auch von Klingmann et. al 2000 beschrieben. Die damals beobachteten Abnahmen wurden u.a. durch die „bevorzugte Spaltung von M3G durch mikrobielle ß-Glucuronidase“ und damit Bildung eines resonanz-stabilisierten Phenolations erklärt. Da eine geringfügig abnehmende Tendenz an gebundenen Morphin beobachtbar war, könnte diese durch den Einfluss von „mikrobieller ß-Glucuronidase“ erklärt werden. Über den gesamten Lagerungszeitraum betrachtet können diese mikrobiellen Enzyme jedoch nur eine sehr geringe, vernachlässigbare Rolle spielen und keineswegs zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen.

Die auf freies und gebundenes Morphin untersuchten Leberproben ergaben ein ähnliches Ergebnis wie bei Herzblut. Einzelne Herzblutproben, bei denen eine geringe Abnahme an gebundenem Morphin zu beobachten war, zeigten dies ebenfalls bei den dazugehörigen Leberproben. Eine korrelierende Zunahme an freiem Morphin konnte hier ebenfalls nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse über die Stabilität von freiem Morphin und gebundenem Morphin konnten sowohl bei gewonnenen Asservaten von Drogentoten als auch bei gespiktem Material Nicht-Drogentoter festgestellt werden.

Die Auswahl an Mikroorganismen basierte auf dem nachgewiesenen Spektrum der zuvor bei mikrobiellen Untersuchungen ermittelten Ergebnissen. Die vier verschiedenen Mikroorganismen, welche u.a. mit Morphin bzw. M3G gespikt wurden, ergaben im wesentlichen die in den Realstudien erbrachten Ergebnisse. Weder Pseudomonas putida, Staphylococcus aureus, Serratia marcescens noch Escherichia coli verstoffwechselten bzw. lagerten Morphin und oder M3G in ihre Zellen ein. Von Studien, welches das Abbauverhalten von Morphin durch Pseudomonas putida beschreiben, berichtete bereits 1990 Bruce NC et al. Diese Arbeitsgruppe verwendete damals einen Mikroorganismen-Stamm, welcher als Pseudomonas putida M10 bezeichnet wurde. In wieweit sich dieser von den herkömmlichen Pseudomonas putida ATCC Stämmen unterscheidet, wurde in diesem Bericht nicht näher erläutert. Unsere Studien zeigten, dass ein Abbau von Morphin durch Pseudomonas putida nicht nachzuweisen war.

5.3 Stabilität von Codein in Lebergewebe und Herzblut

Heroin und 6-Monoacetylmorphin können auf Grund kleiner Halbwertszeiten im Blut nur relativ kurze Zeit nachgewiesen werden. Der qualitative wie auch quantitative Nachweis von Codein, neben Morphin, ist für die Bestätigung eines vorliegenden Heroinkonsums daher von großer Bedeutung. Ähnlich wie das Verhalten von Morphin in Blut ist es wichtig, die Stabilität von Codein im Blut zu untersuchen.
Allgemein konnten für die Herzblut- und Leberproben keine relevanten Konzentrationsänderungen an Codein festgestellt werden, die zu einer Fehlinterpretation analytischer Ergebnisse führen könnten.

5.4 Stabilität von Methadon in Lebergewebe und Herzblut

Untersuchungen bezüglich der Stabilität von Methadon in Lebergewebe und Herzblut sind bislang nicht dokumentiert. Die hier durchgeführten Studien haben gezeigt, dass über einen Zeitraum von 326 Tagen in den Proben keine relevanten Konzentrationsänderungen feststellbar sind. Die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der einzelnen Leberproben wirkten sich ebenfalls nicht auf die Stabilität von Methadon in Lebergewebe aus.

Mikrobielle Untersuchungen von Pseudomonas putida im Müller-Hinton Boullion ergaben, dass ein Einschluss von Methadon in die Mikroorganismenzelle durchaus möglich ist. Mehrfache Bestätigungsanalysen ergaben einen messbaren Methadongehalt in den Pellets (Bakterienzellen bzw. Zellfragmente). Wie in den Tabellen 63 und 64 aufgelistet, konnte in zahlreichen Herzblut- bzw. Leberproben von Methadontoten in mehr oder weniger großer Zahl Pseudomonas putida nachgewiesen werden.

Da Pseudomonas putida als ein Mitglied der Familie der Pseudomonaden strikt aerob lebt und metabolisiert, kann ein Abbau von Methadon längerfristig im anaeroben Raum durch Pseudomonas putida nicht quantitativ durchgeführt werden. Im Ergebnis werden somit keine relevanten Veränderung der Methadonkonzentrationen, auch bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, in den Herzblutproben und Leberproben sichtbar.

6. Zusammenfassung

Grundlage für die Beurteilung einer Intoxikation ist die Kenntnis der Konzentration an toxischen Substanzen im Körper. Da jedoch nicht selten auch längere Zeitintervalle bis zur exakten Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen verstreichen können, stellt sich die Frage, ob die gemessenen Konzentrationen auch zum Zeitpunkt des Todes vorgelegen haben. Um dies zu klären wurden Herzblut- und Leberproben von Drogentoten ca. ein Jahr lang bei verschiedenen Umgebungsbedingungen gelagert.

Insgesamt wurden von neun Heroin- und Methadontoten jeweils neun Leber- und neun Herzblutproben untersucht. Von jeder Herzblut- und Leberprobe wurden Untersuchungen nach einer bestimmten Lagerungszeit bei 6°C (+/- 2°C) und 20°C (+/- 2°C) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine drogenfreie Herzblut- und Leberprobe mit Morphin, M3G bzw. Methadon gespikt.

Wichtig für einen Vergleich der aus Herzblut und Leber gewonnenen Daten ist, auf Grund des individuellen Wassergehaltes der Proben, der Bezug der ermittelten Ergebnisse auf die Trockenmasse.

Um genaue Aussagen über die Stabilität von Pharmaka in Lebergewebe und Herzblut zu treffen, sollte eine repräsentative Menge an Proben untersucht werden.

Die Studie zeigte, dass innerhalb von 337 Tagen unabhängig von den Lagerungstemperaturen es praktisch zu keiner Abnahme der Morphin-Konzentrationen bei den untersuchten Herzblutproben kam. Dies bedeutet, dass Morphinspiegel, die bis nahezu ein Jahr nach Todeseintritt erhoben werden, noch sichere Aussagen über die Verhältnisse zum Zeitpunkt des Todes erlauben.

Ähnliches gilt auch für die Untersuchungen an Leberproben, wobei hier vor allem bei längeren Lagerungszeiten Probleme im Nachweis des Internen Standards D_3-Morphin auftraten.

Sowohl bei Herzblut- und Leberproben, gelagert bei 20°C als auch bei 6°C, konnte eine geringe Abnahme von Morphinglucuronidverbindungen beobachtet werden. Die ermittelten Werte sind im Verhältnis zur letalen

Dosis an freiem Morphin zu vernachlässigen, so dass diese eine Interpretation der Befunde kaum beeinflussen.
Die Bestimmung von Codein in Lebergewebe erwies sich im Vergleich zur Morphinbestimmung als weniger problematisch, so dass auch nach 385 Tagen Lagerung Codein in Leber qualitativ und quantitativ noch sehr gut nachweisbar war. Der Gehalt an Codein in Leber- wie in Herzblutproben über einen Zeitraum von 385 Tagen bzw. 337 Tagen erwies sich sowohl bei einer Lagerung bei 6°C bzw. 20°C als praktisch oder nahezu konstant.
Die Bestimmung von Methadon war weder in Herzblut- noch in Leberproben auch nach längerer Lagerungszeit problematisch. Auch hier waren nach einem Jahr Lagerung keine relevanten Abnahmen zu verzeichnen.
Um die erbrachten Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine ausgewählte Gruppe von 4 Mikroorganismen in Nährboullions angereichert und mit den einzelnen Pharmaka versetzt. Nach jeweils 24 Stunden bzw. 48 Stunden wurden die Proben in Mikroorganismenzellen bzw. –fragmente und Überstand getrennt. Die anschließende Analytik der mikrobiellen Studien konnte die chemisch-analytischen Ergebnisse der Herzblut- und Leberproben bestätigen. Ein möglicher Einfluss von Serratia marcescens, Staphylococcus aureus und Escherichia coli auf die eingebrachten Pharmaka war nicht zu beobachten.
Bei den Versuchen mit Pseudomonas putida konnte eine Abnahme der Methadonkonzentration nachgewiesen werden. Ob die Abnahme von möglichen Zelleinlagerungen stammt, war nicht eindeutig zu klären. Da die Mikroorganismenzellen und -zellfragmente nur mit 0,9%iger NaCl gewaschen wurden, ist der Ausschluss einer Adsorbtion von Methadon an die Zellwand nicht erbracht. Die geringen Verluste an Methadon, die durch Pseudomonas putida entstehen können, sind aber im Rahmen der toxikologischen Begutachtung vernachlässigbar.
Ein mikrobieller Einfluss durch Staphylococcus aureus, Pseudomonas putida, Escherichia coli und Serratia marcescens auf die Höhe der in Herzblut- und Leberproben vorliegenden Opiat- und Methadonkonzentration, kann auf Grund dieser Untersuchungen, ausgeschlossen werden.

Danksagung:

Allgemein möchte ich mich hier bei all denen ganz herzlich bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit zu erstellen.

Besonderen Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. E. Miltner, vor allem für sein Vertrauen welches er in mich gesetzt hat.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Kollegen und Leiter des toxikologischen Labors Dr. A. Alt. Er stand mir mit Rat bei und gab mir Zeit und Raum um diese Arbeit zu vollbringen.
Vielen Dank auch an das Laborpersonal Frau Undine Scharpf, Frau Melanie Baumann, Frau Silke Prinzecke und Frau Susann Dietzsch für die Zusammenarbeit.

Dafür dass ich ohne große Probleme im Institut für Mikrobiologie und Immunologie meiner Arbeit nachgehen durfte, bin ich Herrn Professor Dr. Marre, dem Leiter dieses Instituts und vor allem seinem Oberarzt PD Dr. A. Essig, Leiter des Mikrobiellen Labors, sehr dankbar. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Evelyn Strutz bedanken, die mir in mikrobiellen Alltäglichkeiten sehr hilfreich zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund Ralf, der mir auch bei Schwierigkeiten zur Seite stand und mich in meiner Arbeit unterstützte.

Zwei Personen bin ich ebenfalls zu größtem Dank verpflichtet: Meinen Eltern. Vielen Dank dafür, dass Ihr mich immer bei meinen Vorhaben in jeglicher Weise unterstützt habt.

7. Literaturverzeichnis:

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 4. Auflage, 1983, Wissenschaftsverlag

Baselt R.C., Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 5. Edition, 2000, Seiten 205-211

Bosch K., Statistik-Taschenbuch, 1992, R. Oldenbourg Verlag, Seite 55

Bruce N.C., Willey D. L., Coulson A. F., Jeffery J., Bacterial morphine dehydrogenase further defines a distinct superfamily of oxidoreductases with diverse functional activities. Biochem J. 299: 805-11 (1994)

Bruce N.C., Wilmot C.J., Jordan K.N., Stephens L.D., Lowe C.R., Microbial degradation of the morphine alkaloids. Purification and characterization of morphine dehydrogenase from pseudomonas putida M10, Biochem J. 274: 875-80 (1991)

Bruce N.C., Wilmot C.J., Jordan K.N., Trebilcock A.E., Gray Stephens L.D., Lowe C.R., Microbial degradation of the morphine alkaloids: Identification of morphine as an intermediate in the metabolism of morphine by pseudomonas putida M10, Arch Microbiol. 154: 465-70 (1990)

Burt M. J., Kloss J., Apple F.S., Postmortem blood free and total morphine concentrations in medical examiner cases, J Forensic Sci. 46: 1138-42, 2001

Doerffel K., Statistik in der analytischen Chemie 1987, 4. Auflage, VCH Verlag, Seite 11

Ehlert C. P., Lehrbuch der Chirugie 1982, Kapitel 22.111-22.113 Leber und Gallenwege, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York

Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 6. Auflage, Wissenschaftsverlag Mannheim/Leipzig/Wien, 1993, S. 38-44

Funk W., Dammann V., Donnevert G., Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, 1992, VCH Verlag, Seiten 21, 33

Gale E.F., Effects of diacetylmorphine and related morphinans on some biochemical activities of Staphylococcus aureus. Mol Pharmacol. 6: 128-33, (1970)

Gerostamoulos J., Drummer O. H., Postmortem redistribution of morphine and its metabolites, J Forensic Sci 45: 843-5 (2000)

Goldberger B. A., Cone E.J., Grant T.M., Caplan Y.H., Levine B.S., Smialek J.E., Disposition of heroin and ist metabolites in heroin-related deaths. J Anal Toxicol 18: 22-28 (1994)

Gschwinde Th., Rauschdrogen Marktformen und Wirkungsweisen, 3. Auflage, 1996, Springer Verlag, Seiten 423-456

Hadidi K. A., Oliver J. S., Stability of morphine and buprenorphine in whole blood, Int J Legal Med 111:165-167 (1998)

Hübschmann H.J., Handbuch der GC/MS Grundlagen und Anwendungen, 1996, VCH Verlag Weinheim, Seiten 142-146

Iten, Peter X., Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluss-Forensisische Interpretation und Begutachtung, Verlag: Institut für Rechtsmedizin der Universität Zürich, 1994, Seiten 186-202

Klingmann A., Skopp G., Pedal I., Potsch L., Aderjan R., Distribution of morphine and morphine glucuronides in body tissue and fluids-postmortem findings in brief survival, Arch Kriminol. 206: 38-49 (2000)

Lüllmann H., Mohr K., Pharmakologie und Toxikologie 1999, Kapitel 1.9 Pharmakokinetik, Kapitel 11.3 Opiate/Opioide

Melvin J.R., Cronholm L.S., Simson L.R. Isaacs A.M., Bacterial transmigration as an indicator of time of death. J. Forensic Science 29: 412-417 (1984)

Moriya F., Hashimoto Y., Distribution of free and conjugated morphine in body fluids and tissues in a fatal heroin overdose: is conjugated morphine stable in postmortem specimens ?, J Forensic Sci 42: 736-740 (1997)

Mueller B., Gerichtliche Medizin, Kapitel C III Leichenzersetzung und Leichenzerstärung, 1975, Springer Verlag Berlin Heidelberg New-York Seiten 265-278

Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Yolken R. H., Manual of Clinical Microbiology, 7. Auflage, 1999, ASM PRESS Washington D.C.

Mutschler E., Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage, 1991, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Seiten 166-175

Rop P.P., Fornaris M., Salmon T., Burle J., Bresson M., Concentrations of heroin , 6-monoacetylmorphine and morphine in a lethal case following an oral heroin overdose. J Anal Toxicol. 21: 232-5 (1997)

Schmitt G., Herbold M., Peters F., Methodenvalidierung im forensich-toxikologischen Labor, 2003, ARVECON GmbH, Seite 10-15

Seidenberg A., Honegger U., Heroin, pharma-kritik Jahrgang 19, Nr. 9

Skopp G., Einflüsse auf Fremdstoffkonzentrationen im Leichenblut, Rechtsmedizin 4:V-59, (2002)

Skopp G., Klinder K., Potsch L., Zimmer G., Lutz R., Aderjan R., Mattern R., Postmortem distribution of dihydrocodeine and methabolites in a fatal case of dihydrocodeine intoxication, Forensic Sci Int. 95: 99-107 (1998)

Skopp G., Lutz R., Ganssmann B., Mattern R., Aderjan R., Postmortem distribution pattern of morphine and morphine glucuronides in heroin overdose, Int J Legal Med 109: 118-24 (1996)

Skopp G., Potsch L., Klingmann A., Mattern R., Stability of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in fresh blood and plasma and postmortem blood samples, J Anal Toxicol. 25: 2-7 (2001)

Staub C., Jeanmonod R., Fryc O., Morphine in postmortem blood: its importance for the diagnosis of deaths associated with opiate addiction. Int J Legal Med 104: 39-42 (1990)

Steentoft A., Worm K., Christensen H., Morphine concentrations in autopsy material from fatal cases after intake of morphine and/or heroin. J Forensic Sci Soc. 28: 87-94 (1988)

Waldeyer A., Anatomie des Menschen, Erster Teil, 8. Auflage, 1973, de Gruyter Verlag, Seiten 175-199