

Untersuchung zu Ausatemluft und Speichel
als alternative Matrizes in der
Missbrauchsdiagnostik psychoaktiver Substanzen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jasna Catharina Neumann

Dessau 2019

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Herdegen

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 02. April 2020

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund.....	1
1.1.1 Missbrauch	1
1.1.2 Missbrauchsrelevante Substanzen	1
1.2 Missbrauchsdiagnostik	3
1.2.1 Settings.....	3
1.2.2 Analytik.....	4
1.2.3 Probleme in der Missbrauchsdiagnostik	5
1.3 Klassische Matrices in der Missbrauchsdiagnostik	6
1.3.1 Urin	6
1.3.2 Haare	8
1.3.3 Blut.....	9
1.4 Alternative Matrices in der Missbrauchsdiagnostik	11
1.4.1 Allgemeines	11
1.4.2 Speichel.....	11
1.4.3 Atemluft	25
2 Ziel dieser Arbeit	31
3 Studien	32
3.1 Modellsubstanzen	32
3.1.1 Grundsätzliche Überlegungen.....	32
3.1.2 Diphenhydramin	32
3.1.3 Dextromethorphan	33
3.2 Sonstige Substanzen	33
3.3 Perianalytische Parameter im Speichel	35
3.3.1 Referenzbereiche für das Greiner Bio-One Speichelsammelsystem	35
3.3.2 pH-Wert während des Sammelvorgangs und der Lagerung	36
3.4 Vergleichbarkeit unterschiedlicher Sammelsysteme.....	36

3.5 Oral Fluid/Serum-Ratio	38
3.5.1 Analgetika	38
3.5.2 Psychopharmaka	39
3.5.3 Orale Kontamination.....	40
3.6 Nachweis von Substanzen aus der Ausatemluft.....	42
3.6.1 Diphenhydramin-„Kinetik“: Vergleich von Atemluft, Speichel und Kapillarvollblut	42
3.6.2 Dextromethorphan-„Kinetik“: Vergleich von Atemluft, Speichel und Kapillarvollblut	43
3.7 Zusammenfassung der Studien.....	45
4 Material und Methoden	46
4.1 Bestimmung von Amylase- und Speichelkonzentration	46
4.1.1 Amylase	46
4.1.2 Speichelanteil.....	46
4.2 Bestimmung von Cortisol.....	46
4.3 Bestimmung von Tramadol	48
4.4 Bestimmung von Hydromorphon	49
4.5 Bestimmung der Psychopharmaka	51
4.5.1 Allgemeines	51
4.5.2 Gradienten und Massenübergänge.....	54
4.6 Bestimmung von Diphenhydramin.....	58
4.7 Bestimmung von Dextromethorphan und Dextrorphan	60
4.8 Gewinnung von Ultrafiltrat	63
4.9 Aufarbeitung der Atemluftproben	63
4.10 Statistische Auswertung	64
5 Ergebnisse	65
5.1 Validationsdaten	65
5.1.1 Psychopharmaka in Serum und Speichel.....	65
5.1.2 Ultrafiltration	69
5.1.3 Diphenhydramin	70
5.1.4 Dextromethorphan und Dextrorphan	73
5.2 Perianalytische Parameter im Speichel	77
5.2.1 Referenzbereiche für das Speichelsammelsystem	77

5.2.2	pH-Wert während des Sammelvorgangs und der Lagerung	83
5.2.3	Zusammenfassung	86
5.3	Vergleichbarkeit unterschiedlicher Speichelsammelsysteme	86
5.4	Oral Fluid/Serum-Ratio	89
5.4.1	Analgetika	89
5.4.2	Psychopharmaka	94
5.4.3	Zusammenfassung	114
5.5	Orale Kontamination	116
5.6	Nachweis von Substanzen in der Ausatemluft	119
5.6.1	Psychopharmaka	119
5.6.2	Diphenhydramin	120
5.6.3	Dextromethorphan und Dextrorphan	130
5.6.4	Zusammenfassung	142
6	Diskussion	143
6.1	Speichel als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik	143
6.1.1	Die Nachweisbarkeit von Substanzen im Speichel	143
6.1.2	Orale Kontamination	146
6.1.3	Der mögliche Einsatz von Speichel als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik	149
6.1.4	Schlussfolgerung	154
6.2	Atemluft als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik	155
6.2.1	Die Nachweisbarkeit von Substanzen in der Atemluft	155
6.2.2	Theoretische Surfactantmenge auf dem Atemluftfilter	160
6.2.3	Schlussfolgerung	162
7	Zusammenfassung und Ausblick	164
	Literaturverzeichnis	168
	Anhang	179
	Anhang 1: Während der Anfertigung dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen, Kongressbeiträge und Poster	179
	Anhang 1.1: Publikationen	179
	Anhang 1.2: Kongressbeiträge und Workshops	179
	Anhang 1.3: Posterpräsentationen	179
	Anhang 2: Material	181

Anhang 2.1: Lösungsmittel und Chemikalien.....	181
Anhang 2.2: Geräte und Verbrauchsmaterialien	182
Anhang 2.3: Reagenzienkits, Kalibratoren und Kontrollen	183
Danksagung.....	185
Erklärung.....	186
Abstract (deutsch)	187
Abstract (englisch).....	188

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	(a) Art der gemeldeten Substanzen, welche im Jahr 2013/2014 an die Euro-DEN gemeldet wurden (veränderte schematische Darstellung nach EMCDDA, 2016 (1)); (b) Anzahl gemeldeter neuer psychoaktiver Substanzen (y-Achse) zwischen 2005 und 2015 an das EU Early Warning System (veränderte schematische Darstellung nach EMCDDA, 2015)	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung einer Speicheldrüse	12
Abbildung 3:	Übergang von Substanzen aus dem Blut in den Speichel.....	15
Abbildung 4:	Schema einer Ultrafiltrationseinheit	19
Abbildung 5:	Übersicht Speichelentnahmesysteme.....	21
Abbildung 6:	Salivette® Speichelentnahmesystem	22
Abbildung 7:	Quantisal® Speichelentnahmesystem.....	23
Abbildung 8:	Greiner Bio-One Speichelsammelsystem	24
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Atemwege	26
Abbildung 10:	Atemwegsverschluss und Aerosolentstehung.....	28
Abbildung 11:	SensAbues® Atemluftsammlsystem.....	30
Abbildung 12:	Studienablauf "Eignung des Speichelsammelsystems"	37
Abbildung 13:	Studienablauf "Orale Kontamination"	41
Abbildung 14:	Studienablauf "Diphenhydramin-Kinetik“	43
Abbildung 15:	Studienablauf "Dextromethorphan-Kinetik".....	44
Abbildung 16:	Verteilung des Speichelanteils von 22 216 Routineproben	78
Abbildung 17:	Verteilung der Amylasekonzentration in 22 520 Routineproben	80
Abbildung 18:	Verteilung der Cortisol-Konzentration im Speichel in 22 520 Routineproben.....	82
Abbildung 19:	OF/SES-Volumen und pH-Wert Korrelation.....	84
Abbildung 20:	Korrelation zwischen durchschnittlichem pH-Wert und Speichelanteil.....	85
Abbildung 21:	Konsequente Speichel-Probenentnahme mit einem (oben) und mit unterschiedlichen (unten) Speichelentnahmesystemen.....	88
Abbildung 22:	Verteilung der Hydromorphon-Konzentration in Serum und Speichel, des ersten (grün), zweiten (blau) und beider Entnahmezyklen (rot).....	89
Abbildung 23:	Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Hydromorphon in der ersten (a), der zweiten (b) bzw. ersten und zweiten (c) Probenentnahme.....	91
Abbildung 24:	Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Tramadol (oben) und O-Desmethyltramadol (unten)	93
Abbildung 25:	Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Aripiprazol	95

Abbildung 26:	Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Citalopram.....	98
Abbildung 27:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Escitalopram und seine Metaboliten	102
Abbildung 28:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Duloxetin	103
Abbildung 29:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Mirtazapin.....	104
Abbildung 30:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Pipamperon	105
Abbildung 31:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration Pregabalin	106
Abbildung 32:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Promethazin	107
Abbildung 33:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Quetiapin	109
Abbildung 34:	Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Venlafaxin und seinen Metaboliten	112
Abbildung 35:	Orale Kontamination mit Diphenhydramin: Konzentration von Diphenhydramin im Speichel nach den jeweiligen Probenentnahmeintervallen.....	118
Abbildung 36:	Diphenhydramin in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel; Individuum 4	121
Abbildung 37:	Diphenhydramin in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel; (a) Individuum 1, (b) Individuum 3, (c) Individuum 6 und (d) Individuum 7	126
Abbildung 38:	Diphenhydramin in Ausatemluft und Speichel (oben) bzw. in Ausatemluft und Kapillarovollblut (unten).....	128
Abbildung 39:	Dextromethorphan in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel; Gruppe A (Kapseln).....	137
Abbildung 40:	Dextromethorphan in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel; Gruppe B (Lutschpastillen).....	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vergleich klassischer Matrizes in der Missbrauchsdiagnostik	11
Tabelle 2:	Chemische und pharmakokinetische Parameter der Antipsychotika	34
Tabelle 3:	Chemische und pharmakokinetische Parameter der Analgetika	34
Tabelle 4:	Chemische und pharmakokinetische Parameter der Antiepileptika	34
Tabelle 5:	Chemische und pharmakokinetische Parameter der Antidepressiva	34
Tabelle 6:	Dosierungsschema "Analgetika in Serum und Speichel"	38
Tabelle 7:	Patientendaten "Psychopharmaka in Atemluft, Serum und Speichel"	39
Tabelle 8:	Durchgeführte Studien	45
Tabelle 9:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Aripiprazol	65
Tabelle 10:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Citalopram	65
Tabelle 11:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Desmethylycitalopram	66
Tabelle 12:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Duloxetin	66
Tabelle 13:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Mirtazapin	66
Tabelle 14:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit Pipamperon	66
Tabelle 15:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Pregabalin	67
Tabelle 16:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Promethazin	67
Tabelle 17:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Quetiapin	67
Tabelle 18:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit Venlafaxin	67
Tabelle 19:	Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: O- Desmethylvenlafaxin	68
Tabelle 20:	Bestimmungsgrenzen: Psychopharmaka	68
Tabelle 21:	Reproduzierbarkeit der Ultrafiltrationseinheit	69
Tabelle 22:	Genauigkeit von Diphenhydramin im Speichel	71
Tabelle 23:	Genauigkeit von Diphenhydramin im Vollblut	72
Tabelle 24:	Genauigkeit von Dextromethorphan im Speichel	74
Tabelle 25:	Genauigkeit von Dextrophan im Speichel	75
Tabelle 26:	Genauigkeit von Dextromethorphan im Vollblut	75
Tabelle 27:	Genauigkeit von Dextrophan im Vollblut	75
Tabelle 28:	Verteilung des Speichelanteils in 22 216 Routineproben	78
Tabelle 29:	Statistische Verteilung der Amylase-Konzentration in 22 520 Routineproben	79
Tabelle 30:	Statistische Verteilung der Cortisol-Konzentration in 22 520 Routineproben.	83

Tabelle 31:	Statistische Zusammenfassung der Geradengleichung von Hydromorphon und Tramadol sowie der rechnerisch ermittelten Speichel/Serum Ratios (OF/SE).....	93
Tabelle 32:	Statistische Parameter des OF/SE-Ratios von Aripiprazol.....	95
Tabelle 33:	Statistische Parameter des OF/SE-Ratios von Citalopram, Desmethylcitalopram, freiem Citalopram und freiem Desmethylcitalopram ..	98
Tabelle 34:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratios von Escitalopram und seinem Metaboliten sowie von freiem Escitalopram und seinem Metaboliten	102
Tabelle 35:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Duloxetin.....	103
Tabelle 36:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Mirtazapin	104
Tabelle 37:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Pipamperon.....	106
Tabelle 38:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Pregabalin.....	107
Tabelle 39:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Promethazin.....	108
Tabelle 40:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Quetiapin	109
Tabelle 41:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratios von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin	113
Tabelle 42:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratios der Analgetika.....	114
Tabelle 43:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratios der Gesamt-Psychopharmaka	114
Tabelle 44:	Statistische Parameter der OF/SE-Ratios der freien Psychopharmaka.....	115
Tabelle 45:	Therapeutische Bereiche für Serum und Speichel.....	115
Tabelle 46:	Zusammenfassende Ergebnisse Psychopharmaka in der Atemluft	120
Tabelle 47:	Zusammenfassung: Diphenhydramin in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel	122
Tabelle 48:	Speichel/Kapillarovollblut-Ratio für Diphenhydramin mit (0 – 58 h) und ohne (4 – 58 h) Kontamination.....	129

Abkürzungsverzeichnis

A:	Säure
B:	Base
CB:	Kapillarvollblut
C _{max} :	Maximalkonzentration
D:	Droge
DMP:	Diphenhydramin
DXM:	Dextromethorphan
DXP:	Dextrorphan
EB:	Ausatemluft
h:	Stunde
H:	Wasserstoff
Konz.:	Konzentration
LC-MS/MS:	Flüssigkeitschromatographie Tandemmassenspektrometrie
LSD:	Lysergsäurediethylamid
MDMA:	3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin
MDR:	Multidrug resistance
mL:	Milliliter
NaCl:	Natriumchlorid
ng:	Nanogramm
NPS:	neue psychoaktive Substanzen
OF/SE _{frei} -Ratio:	Verhältnis einer Substanz: Speichel- zu freier Serumkonzentration
OF/SE-Ratio:	Verhältnis einer Substanz: Speichel- zu Serumkonzentration
OF:	Speichel
P:	Plasma
PBS:	Phosphatpuffer salin
PPB:	Plasmaproteinbindung
pg:	Pikogramm
rpm:	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SES:	Speichel Extraktions Lösung (saliva extraction solution)
THC:	Tetrahydrocannabinol
t _{max} :	Zeitpunkt der maximalen Konzentration

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

1.1.1 Missbrauch

Das Expertenkomitee für Drug Dependence der Weltgesundheitsorganisation (WHO) definierte 1969 Missbrauch als „*Persistenten oder sporadisch exzessiven Substanzgebrauch inkonsistent mit, oder unabhängig einer akzeptablen medizinischen Praxis.*“ (WHO, 1969) Gleichzeitig wird die Bezeichnung „Psychoactive substance misuse“ als weitere Begrifflichkeit vorgeschlagen, welche den Fall des nicht medizinischen oder auch nicht bestimmungsgemäßen Gebrauchs von verschreibungspflichtigen Medikamenten abdeckt (WHO, 2016a). Der ICD-10 verweist hierbei auf einen „schädlichen Gebrauch“ also einen Substanzgebrauch, der zu Gesundheitsschäden führt, die sowohl physischer als auch psychischer Natur sein können. Damit einher geht oftmals ein Abhängigkeitssyndrom, also eine Sucht. Bei einer Sucht handelt es sich laut ICD-10 um einen Komplex aus physischen und psychischen Phänomenen, der in Verbindung mit dem wiederholten Konsum einer Substanz steht. Kriterien, die zur Diagnose einer Suchterkrankung angewandt werden, beinhalten, unter anderem, wiederholten Konsum, Kontrollverlust über deren Einnahme und die Priorität des Substanzkonsums, beziehungsweise der Beschaffung, über andere Verpflichtungen. Darüber hinaus können eine Toleranzentwicklung sowie körperliche Entzugssyndrome vorhanden sein (Dilling et al., 2000). Zusammengefasst beschreibt der Begriff Missbrauch also den nicht bestimmungsgemäßen Gebrauch einer Substanz im Rahmen einer Suchtproblematik oder im Rahmen einer medizinischen Behandlung. Nicht mit eingeschlossen ist im Rahmen dieser Arbeit eine akute Intoxikation unabhängig davon, ob diese in akzidentieller oder suizidaler Absicht erfolgte.

1.1.2 Missbrauchsrelevante Substanzen

Unter Missbrauchsrelevanten Substanzen werden solche Stoffe verstanden, die im Zusammenhang mit den oben genannten Definitionen eine Rolle spielen. Bei dem überwiegenden Teil der missbrauchsrelevanten Substanzen handelt es sich um psychoaktive oder auch psychotrope Substanzen. Dies sind Stoffe, die bei Einnahme oder Applikation mentale Prozesse wie den Affekt oder die Wahrnehmung beeinflussen (WHO, 2016b).

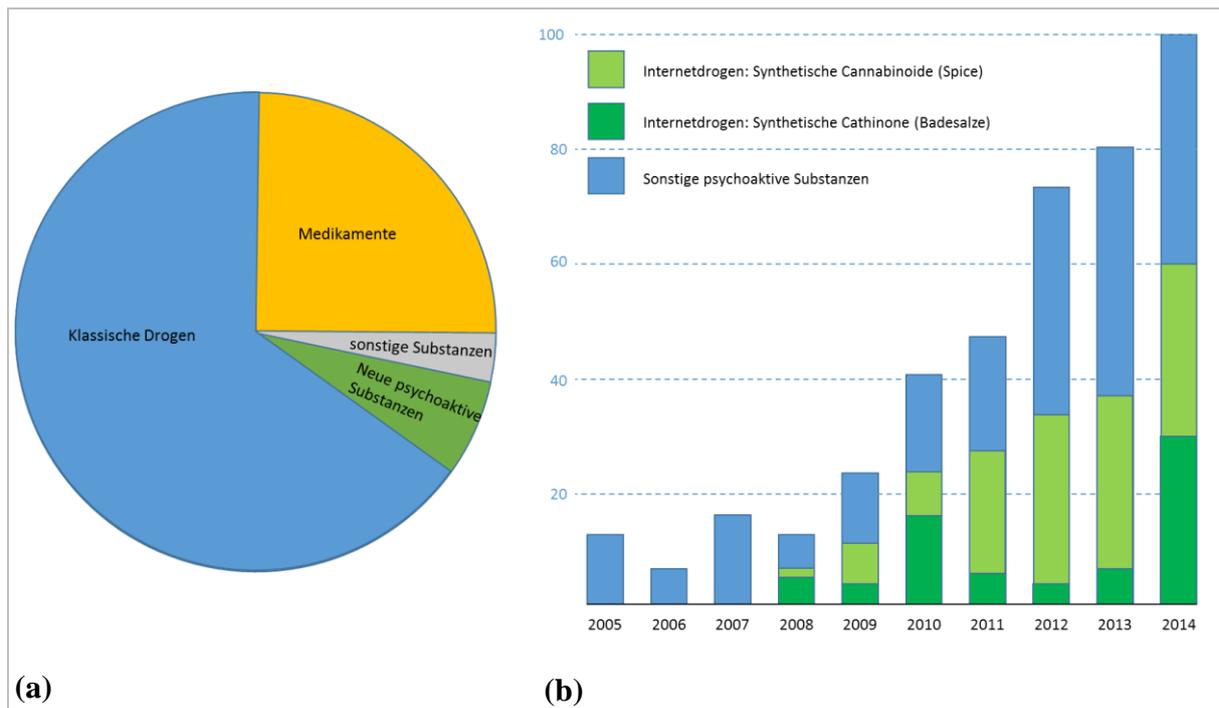


Abbildung 1: (a) Art der gemeldeten Substanzen, welche im Jahr 2013/2014 an die Euro-DEN gemeldet wurden (veränderte schematische Darstellung nach EMCDDA, 2016 (1));
 (b) Anzahl gemeldeter neuer psychoaktiver Substanzen (y-Achse) zwischen 2005 und 2015 an das EU Early Warning System (veränderte schematische Darstellung nach EMCDDA, 2015)

Etwa zwei Drittel der insgesamt von europäischen Krankenhäusern an das European Drug Emergencies Network (Euro-DEN) gemeldeten Fälle zwischen Herbst 2013 und Herbst 2014, die in Zusammenhang mit Intoxikationen mit Drogen und Medikamenten in Verbindung stehen, sind auf klassische Drogen zurückzuführen (EMCDDA, 2016 a). Bei diesen handelt es sich um Substanzen, die in Anlage 1, 2 und Anlage 3 des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG, 1994) aufgeführt sind, also Cannabisprodukte, Heroin, Stimulanzien wie Kokain, Amphetamine und MDMA sowie Halluzinogene, wie zum Beispiel LSD (EMCDDA, 2016 (2)). In den letzten Jahren beginnt eine weitere Gruppe an psychoaktiven Substanzen an Bedeutung zu gewinnen: Die sogenannten „neuen psychoaktiven Substanzen“ (NPS). Der Anteil, der insgesamt von Europäischen Krankenhäusern an das European Drug Emergencies Network (Euro-DEN) gemeldeten Fälle, an denen NPS beteiligt waren, steigerte sich vom Zeitraum Herbst 2013/Herbst 2014 bis zum Zeitraum Herbst 2014/Herbst 2015 von 5,6 % auf 8,5 % (EMCDDA, 2016 (1)). Die beiden bedeutsamsten Substanzgruppen innerhalb dieser Kategorie sind die synthetischen Cannabinoide und synthetische Cathinone. Bei synthetischen Cannabinoiden handelt es sich um synthetische Cannabinomimetika, welche regelhaft unter den Namen „Spice“ oder auch „Kräutermischung“ bekannt geworden sind (EMCDDA, 2009). Synthetische Cathinone bzw. Cathinonderivate werden unter dem Begriff „Badesalz“ gehandelt. Allein im Jahr 2014 wurden etwa 100 neue psychoaktive Substanzen erstmalig an das European Monitoring Centre

for Drugs and Drug Addiction gemeldet (EMCDDA, 2015) und ca. 70 % der gemeldeten NPS wurden in erst den letzten 5 Jahren entdeckt (EMCDDA, 2016 (2)). Problematisch an dieser Substanzgruppe ist, dass sie, im Gegensatz zu den klassischen Drogen, einer hohen Flexibilität unterworfen ist, und damit durch die Arzneimittelgesetzte bzw. Betäubungsmittelgesetze nur unzureichend erfasst wird. Leichte Veränderungen an der Molekülstruktur, und damit eine Veränderung des Marktes, gehen oftmals schneller vonstatten, als eine eindeutige Identifikation und Aufnahme in die entsprechenden Gesetze erfolgen kann. Andere Begriffe, die mit diesen NPS in Verbindung gebracht werden, sind daher auch „legal highs“ oder „research chemicals“ (Brandt et al., 2014) und sind, sofern sie bereits im Betäubungsmittelgesetz erfasst sind, regelmäßig in Anlage 2 des Gesetzes zu finden (BtMG, 2016). Im November 2016 trat allerdings das „Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetz“ in Kraft, welches das Verbot und den Umgang mit diesen Substanzen regeln soll, indem es Kernstrukturen und deren Derivate erfasst, und nicht einzelne Stoffe, wie das BtMG (NpSG, 2016).

Etwa ein Viertel der von Krankenhäusern in Zusammenhang mit Intoxikationen gemeldeten Substanzen (Abb. 1) gehen auf Medikamente zurück, die jedoch nicht genauer definiert sind.

Die meisten missbrauchsrelevanten Medikamente, unabhängig ob es sich dabei um verschreibungspflichtige Medikamente handelt oder nicht, sind ebenfalls psychoaktiv. Weitere Beispiele sind Substitutionsmedikamente wie zum Beispiel Methadon und Buprenorphin, Opiate/Opioide, Narkotika wie Ketamin, Hypnotika und Sedativa wie Benzodiazepine, Stimulanzien sowie Psychopharmaka wie beispielsweise Pregabalin (arznei-telegramm, 2006; Gahr et al., 2012; DHS, 2014).

Missbrauchsrelevant sind darüber hinaus auch nicht psychoaktive Substanzen, unter anderem Analgetika, die nicht zur Gruppe der Opiate und Opioide gehören, sowie anabole Steroide im Sport, Diuretika, Laxanzien und Nasensprays (Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen, 2014).

1.2 Missbrauchsdiagnostik

1.2.1 Settings

Missbrauchsdiagnostik ist ein Bestandteil der meisten Settings, die mit Substanzmissbrauch verknüpft sind. Die Suchtbehandlung ist hierbei als erstes und wichtigstes Setting zu nennen, insbesondere im Hinblick auf die Substitutionstherapie. Die Verschreibung von Substitutionsmitteln ist in der Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung (BtMVV, 1998) geregelt und besagt, dass eine solche Verschreibung nur getätigt werden darf, wenn ausgeschlossen werden

kann, dass die Substitution, bzw. deren Sinn, durch die Einnahme anderer Stoffe gefährdet wird. Darüber hinaus muss eine bestimmungsgemäße Verwendung des Substitutionsmittels durch den Patienten gewährleistet werden (BtMVV, 2016). In diesem Zusammenhang sind also jene zwei Punkte hervorgehoben, welche im Rahmen der Missbrauchsdiagnostik die größte Rolle spielen. Zum einen der Ausschluss des Konsums einer oder mehrerer Substanzen, zum anderen die Sicherstellung eines bestimmungsgemäßen Gebrauchs einer Substanz durch den Patienten, also die Compliance (Ammon, 2004; Mutschler et al., 2008). Obwohl es in psychiatrischen Kliniken und in der Schmerztherapie häufig um eine Compliance-Kontrolle geht, ist insbesondere in der Schmerztherapie hin und wieder auch die Prüfung auf die Einnahme von zusätzlichen Analgetika oder Drogen üblich, welche nicht im Medikationsplan enthalten sind (Trescot et al., 2008).

Der Ausschluss eines Substanzkonsums spielt in der Entzugstherapie, in juristischen und behördlichen Settings, wie zum Beispiel bei Verstößen gegen das Straßenverkehrsgesetz und dem Entzug der Fahrerlaubnis (FeV, 2010; StVG, 2003) und beim Workplace Drug Testing eine Rolle.

1.2.2 Analytik

Die Analytik stellt das neben dem Patientengespräch das einzige Instrument der Missbrauchsdiagnostik dar. Die Art der Analytik ist abhängig von dem Setting, in welchem sie zur Anwendung kommt und die Anforderungen, die erfüllt werden müssen. Die wichtigsten Faktoren, nach denen die Entscheidung über die Art der Analytik fällt, sind:

- Zeit, die zur Probenbearbeitung notwendig ist
- Preis
- Empfindlichkeit
- Selektivität und Spezifität

Die beiden analytischen Hauptbereiche in der Missbrauchsdiagnostik sind der Immunoassay und chromatographische Verfahren wie zum Beispiel Gaschromatographie und Flüssigchromatographie.

Immunoassays erlauben den Nachweis einzelner Substanzen oder ganzer Substanzgruppen und sind regelhaft die schnellere und günstigere Variante. Die Nachteile des Immunoassays liegen in einer möglichen mangelnden Selektivität und/oder Spezifität, resultierend aus Kreuzreaktionen und damit falsch positiven Ergebnissen (Hand und Baldwin, 2013). Darüber hinaus gelten

Immunoassays lediglich als „hinweisgebende Analysen“ und sind demnach nicht gerichtsverwertbar (GTFCh, 2009).

Chromatographische Verfahren wie beispielsweise Gaschromatographie (GC) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gelten laut der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie im Gegensatz dazu als beweisende oder Bestätigungsverfahren, vorausgesetzt sie sind mit einem spektrometrischen Detektor gekoppelt, wie etwa einem Massendetektor oder einem UV-Detektor (GTFCh, 2009).

Diese Verfahren sind aufgrund der notwendigen Probenaufarbeitung regelhaft teurer und aufwendiger. Allerdings sind sie durch die verhältnismäßig sichere Identifikation des Analyten selektiver und spezifischer als der Immunoassay (Musschoff, 2007). Außerdem bieten diese Verfahren die Möglichkeit der sogenannten Multi Target Analyse, also der Analyse vieler Analyten in einer chromatographischen Analyse. Ein weiterer Vorteil chromatographischer Methoden ist ihre größere Flexibilität bezogen auf das Marktgeschehen, da eine chromatographische Methode schneller entwickelt und validiert werden kann als ein immunchemischer Test. Insbesondere im Bereich der Designerdrogen und neuen psychoaktiven Substanzen spielt dieser Umstand eine nicht zu unterschätzende Rolle.

1.2.3 Probleme in der Missbrauchsdiagnostik

Probleme in der Missbrauchsdiagnostik ergeben sich in den meisten Fällen aus zwei verschiedenen Faktoren. Der erste und wichtigste ist der Versuch der Verschleierung eines erfolgten Substanzkonsums. Hierbei hat sich insbesondere bei der Analytik von Urinproben ein großes mitunter sogar kommerzielles Angebot an potenziellen Manipulationsmöglichkeiten etabliert (Scholer, 2004; Allen, 2011).

Dabei kann zwischen vier verschiedenen Möglichkeiten unterschieden werden:

1. Die Verdünnung der Probe, zum Beispiel durch die externe Zugabe von Wasser oder anderen Flüssigkeiten, um die Konzentration des Analyten unter die Entscheidungsgrenze zu drücken (Scholer, 2004; Allen, 2011).
2. Die Zugabe von Substanzen zur Störung des Tests bzw. der Analytik. Hierbei wird durch die Zugabe von zum Beispiel starken Säuren oder Laugen die Enzymfunktion bei Immunoassays gestört oder durch die Zugabe von Tensiden chromatographische Methoden beeinflusst (Scholer, 2004; Allen, 2011).

3. Die Zugabe von Substanzen zur Manipulation des Analyten. Damit sind vor allen Dingen Oxidationsmittel wie Chromate gemeint, aber auch starke Säuren oder Laugen (Scholer, 2004; Allen, 2011). Auch Enzyme wie beispielsweise Glucuronidasen wie Ethylglucuronid, ein Marker für Alkoholkonsum, können die Konzentration des Analyten beeinflussen (Böhnke et al., 2016).
4. Die Abgabe einer fremden Probe (Scholer, 2004; Allen, 2011).

In Folge dieser Möglichkeiten und der vielfach durchgeführten Manipulationsversuchen ist eine Abgabe der Proben unter Aufsicht notwendig (Musshoff, 2007).

Ein weiteres Problem stellt eine mangelnde Kooperation von Patienten bei der Probenentnahme dar. Je nach Matrix kann es zu Unbehagen bei der Probenentnahme kommen, wie im Falle einer Urinprobenentnahme durch die Verletzung der Privatsphäre (Abnahme unter Aufsicht) (Allen, 2011), oder bei der Blutprobenentnahme, wenn eine Angst vor Nadeln oder Spritzen besteht. Darüber hinaus ist dazu medizinisches Fachpersonal notwendig.

1.3 Klassische Matrizes in der Missbrauchsdiagnostik

1.3.1 Urin

Urin gilt nach wie vor als der Standard Matrix in der Drogenanalytik und wird insbesondere für ungerichtete Suchanalysen zum Ausschluss eines Substanzkonsums oder Beikonsums in der Suchtbehandlung (Substitutionstherapie und Entzugstherapie), dem Workplace Drug Testing und forensischen bzw. behördlichen Fragestellungen eingesetzt. Darüber hinaus ist auch eine Compliance Überprüfung nicht unüblich, insbesondere bei Patienten, welche sich in einer Substitutionsbehandlung befinden (Christo et. al., 2011; Casolin, 2016).

Das Nachweisfenster für den überwiegenden Teil der Substanzen liegt im Bereich von Minuten bis Tagen und in einigen Ausnahmefällen (THC-Carbonsäure) sogar Wochen (Caplan und Goldberger, 2001; Yacoubian et al., 2001; Verstraete, 2004; Musshoff und Madea, 2006).

Die Vorteile dieser Matrix sind:

- Jeder Mensch produziert im Laufe eines Tages bis zu 1,8 Liter Urin (Silbernagl, 2014), was bedeutet, dass regelhaft ein hohes Probenvolumen zur Verfügung steht (Allen, 2011).
- Im Gegensatz zu anderen Matrizes sind die Substanzkonzentrationen im Urin relativ hoch (Allen, 2011).

- Die Probenentnahme ist nicht invasiv.
- Es gibt viele publizierte Applikationen für diese Matrix.

Die Nachteile dieser Matrix sind:

- Es bestehen hohe intra-/ und interindividuelle Schwankungen bezüglich der Zusammensetzung des Urins. Ein gutes Beispiel dafür ist der pH-Wert, dessen Referenzbereich im Urin zwischen 4,5 und 8,2 liegt (Silbernagl, 2014). Der Einfluss des pH-Wertes kann sich auf die Analytkonzentration auswirken, sind doch zum einen pH-abhängige Konzentrationen verschiedener Analyten bekannt, wie z. B. Amphetamin und Methadon (Verstraete, 2004; Allen, 2011), zum anderen auch eine verringerte Stabilität einiger Substanzen (Kiszka, 2000).
- Viele Substanzen unterliegen einem ausgeprägten Metabolismus, so dass lediglich ihre Metaboliten im Urin nachweisbar sind (Allen, 2011). Teilweise sind diese Metaboliten jedoch als Referenzsubstanzen nicht käuflich erwerbbar und können damit bei der Analyse nicht berücksichtigt werden, ein Beispiel dafür sind neue psychoaktive Substanzen. Glucuronide spielen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Rolle. Durch Glucuronidasen lassen sich Glucuronide zwar spalten, ziehen damit jedoch eine aufwendigere Probenanalytik nach sich (Shipkova et al., 1999).
- Die Möglichkeiten zur Probenmanipulation sind beim Urin vielfältig, insbesondere da der Proband regelhaft das Bedürfnis hat, seine Privatsphäre zu wahren und beim Toilettengang alleine ist. Mittlerweile gibt es ein vielfältiges Angebot auf diversen Internetseiten, die Möglichkeiten zur Probenmanipulation anpreisen und zum käuflichen Erwerb anbieten (Scholer, 2004). Zusätzlich zu den in Kapitel 1.2.3 aufgeführten Möglichkeiten führt eine vermehrte Flüssigkeitsaufnahme zu einer erhöhten Urinproduktion und damit zu einer natürlichen Verdünnung der Probe (Scholer, 2004). Die Folge ist eine Urinabgabe unter Aufsicht und damit eine Einschränkung der Privatsphäre.

Der Urin wird vor der eigentlichen Analyse einem Prozess unterworfen, der im Labor der Autorin als „Perianalytik“ bezeichnet wird. Perianalytik beschreibt die Überprüfung einer Matrix vor dem eigentlichen Analysevorgang, also eine optische und gegebenenfalls olfaktorische Begutachtung der Probe, eine Überprüfung der ausreichenden Kennzeichnung, der Verdünnung und einer möglichen Probenmanipulation. Das Kreatinin spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. Kreatinin ist ein harnpflichtiges Muskelabbauprodukt, das gewöhnlich in einer konstanten Rate über die Niere ausgeschieden wird (Mutschler, 2008; Drummer und Wong, 2013). Die Referenzbereiche bewegen sich hier zwischen 80 und 190 mg/dl (Musshoff,

2007) je nach Muskelmasse und Geschlecht. Kreatinin dient damit als Authentizitätsmarker für den Urin und gibt gleichzeitig Aufschluss über eine „künstlich“ herbeigeführte Verdünnung. Daneben können Temperatur, pH-Wert und ggf. ein Nitrit-, bzw. ein Chromatetest durchgeführt werden (Scholer, 2004; Musshoff, 2007), bzw. eine Überprüfung der Funktion des Immunoassays an sich.

1.3.2 Haare

Haare haben in der Missbrauchsdiagnostik ihre Nische im Abstinenznachweis rückwirkend über einen langen Zeitraum hinweg, bietet jedoch keine Hilfestellung in der Abklärung akuter Fragestellungen, wie etwa bei Intoxikationen. Regelmäßig findet die Haaranalyse bei juristischen Fragestellungen bzw. in der Fahreignungsdiagnostik Anwendung (Cooper et al., 2011). Das Nachweisfenster erstreckt sich rückwirkend über einige Tage bis hin zu mehreren Jahren, abhängig von der Haarlänge (Cooper et al., 2011; Kintz et al., 2013). Ein Zentimeter Haar entspricht hierbei einem Beobachtungszeitraum von etwa einem Monat (Kerekes et al., 2009; Kintz et al., 2013). Über eine sequenzielle Haaranalytik, also eine Teilung des Haars in unterschiedliche Abschnitte, ist das Konsumverhalten innerhalb eines grob umrissenen Zeitraumes möglich, und damit auch eine Unterscheidung zwischen chronischem und partiellem Substanzkonsum (Cooper et al., 2011; Kintz et al., 2013).

Die Vorteile dieser Matrix sind:

- Ein langes Nachweisfenster, welches sich, abhängig von der Haarlänge, über viele Monate, vielleicht sogar Jahre erstrecken kann (Cooper et al., 2011).
- Probennahme nicht invasiv
- geringes Risiko einer Probenmanipulation (Cooper et al., 2011)
- Targetanalyten sind die Muttersubstanzen (Musshoff, 2007).

Die Nachteile sind:

- Haare bilden eine recht inhomogene Matrix, so hat die Haarfarbe, bzw. der Melaninanteil, beispielsweise einen großen Einfluss auf die Substanzkonzentration. In hellem oder weißem Haar ist die Konzentration des Analyten bei gleichem Konsumverhalten beispielsweise geringer als in melaninreichem, dunklen Haar (Joseph et al., 1996).
- Die Wachstumsphasen des Haares haben einen Einfluss auf das Ergebnis der Analytik. Haarwachstum findet in Zyklen statt. Die eigentliche Wachstumsphase dauert beim Kopfhaar etwa 4 - 8 Jahre, mit einem durchschnittlichen Wachstum von ca. 1 cm pro

Monat auf dem Hinterhaupthöcker (Boumba et al., 2006). Die letzte Phase ist die telogene Phase, oder auch Rastphase. Diese Phase dauert etwa 10 Wochen und betrifft ungefähr 15% der Kopfhaare (Pianta et al., 2013). Diese Haare können noch Substanzrückstände aus der Zeit vor der Abstinenz enthalten (Musshoff, 2007).

- Trotz einer zweiten Probenentnahme zum gleichen Zeitpunkt erhält man durch die Kombination der beiden oben genannten Punkte keine echte B-Probe.
- Bei der Analytik vermischen sich Haarabschnitte, welche den Zielanalyten enthalten, mit negativen Haarabschnitten. Dies kann zur Verdünnung der Analytkonzentration führen, so dass ein einmaliger oder sehr seltener Konsum einer Substanz bei der Analytik untergehen kann, sofern keine sequenzielle Haaranalyse stattfindet (Musshoff, 2007).
- Die Analytik selbst ist relativ aufwendig, sind doch Waschritte, Zerkleinerungsschritte und Extraktionsschritte notwendig (Cooper et al., 2011).
- Eine chemische Behandlung des Haares, wie etwa Färben oder Bleichen, greift die Haarstruktur an und kann zu Veränderungen der Substanzkonzentrationen führen (Joseph et al., 1996, Cooper et al., 2011).
- Zusammen mit einer verhältnismäßig geringen Substanzkonzentration (Angabe erfolgt gewöhnlich in Nanogramm pro Milligramm Haar), und der damit notwendigen empfindlichen Instrumente, ist die Haaranalytik im Gegensatz zum Urin relativ teuer.

1.3.3 Blut

Während Haare oder Urin Matrizes darstellen, die eher im Hinblick auf die Feststellung einer rückwirkende Drogen- oder Medikamenteneinnahme genutzt werden, eignet sich Blut für eine Aussage über eine aktuelle Beeinflussung und damit auch als Matrix der Wahl bei akuten Vergiftungen (Verstraete, 2004; Kirschbaum et. al., 2008; Nazirizadeh et. al., 2010). Eine besondere Rolle spielt Blut als Matrix im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM), also einer Spiegelbestimmung, da die Blutkonzentration einer Substanz definitionsgemäß im Zusammenhang mit ihrer Wirksamkeit steht (Hiemke et. al., 2011). Zum Einsatz kommt das Therapeutische Drug Monitoring bei Substanzen mit einem engen therapeutischen Fenster, wie beispielsweise Immunsuppressiva oder, bei Substanzen mit potenziell toxischen Nebenwirkungen (z. B. Aminoglycosid-Antibiotika). Zudem wird es bei einem ungewöhnlichen Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil, einem verzögerten Wirkungseintritt oder toxischen Nebenwirkungen trotz verhältnismäßig geringer Dosierung, beziehungsweise einem physiologischen Zustand,

der zu Änderungen der Pharmakokinetik führen kann, wie z. B. eine Schwangerschaft (DAIG, 2012; Mutschler et. al., 2008) eingesetzt. Ein zweiter wichtiger Punkt des TDM ist die Compliance Überprüfung, also die Kontrolle ob der Patient ein Medikament entsprechend seinem Therapieplan verwendet, was insbesondere in der Substitutionsbehandlung und in psychiatrischen Settings von besonderer Bedeutung ist (Hiemke et al., 2011). Ein dritter Punkt ist die Bestimmung der Pharmakogenetik, also beispielsweise der Ermittlung des voraussichtlichen metabolischen Status eines Patienten, im Hinblick auf die Funktionalität des metabolisierenden Enzymsystems bzw. einiger Enzyme, die für ihre Heterogenität bekannt sind, wie CYP2D6 (Shams et al., 2006; Hiemke et al., 2011). Auf diese Weise lassen sich sogenannte Schnellmetabolisierer („fast metabolizer“) oder langsame Metabolisierer („slow metabolizer“) identifizieren. Abzugrenzen ist dabei jedoch der Unterschied zwischen Phänotyp und Genotyp, kann das enzymatische System doch durch verschiedene Medikamente beeinflusst werden (Shams et al., 2006).

Die Nachweisfenster für entsprechende Substanzen im Blut reichen durchschnittlich von einigen Minuten bis hin zu zwei bis drei Tagen (Caplan und Goldberger, 2001).

Die Vorteile dieser Matrix sind:

- Einschätzung der aktuellen Beeinflussung bzw. des therapeutischen Status einer Person im Hinblick auf eine entsprechende Substanz
- Blut ist eine recht konstante Matrix im Hinblick auf pH-Wert, Salzanteil und Proteinkonzentration (Walzog und Fandrey, 2014).
- Targetanalyten sind Muttersubstanzen und/oder Metaboliten.
- Blutproben sind bei der Entnahme kaum manipulierbar.

Die Nachteile dieser Matrix sind:

- Das Nachweisfenster für Substanzen ist verhältnismäßig kurz (Caplan und Goldberger, 2001).
- Die Probennahme ist grundsätzlich invasiv und erfordert medizinisches Fachpersonal.
- Bei einigen Patientengruppen (Kinder, psychiatrische Patienten) kann die Probenentnahme nur unzureichend toleriert werden, oder es kommt im Falle von Patienten mit einer langen Abhängigkeitsgeschichte zu physischen Problemen bei der Probennahme.

1.4 Alternative Matrizes in der Missbrauchsdiagnostik

1.4.1 Allgemeines

Tabelle 1: Vergleich klassischer Matrizes in der Missbrauchsdiagnostik

Faktoren	Urin	Haare	Blut
Nachweiszeiträume	Minuten bis Wochen	Monate bis Jahre	Minuten bis Tage
Beeinflussung	Nur eingeschränkt abschätzbar	Nur zurückliegender Konsum	Aktuelle Beeinflussung abschätzbar
Probenvolumen	Hoch	Gering	Variabel
Matrixbeschaffenheit	Variabel	Heterogen/variabel	Konstant
Zielanalyten	Metaboliten	Muttersubstanzen	Muttersubstanzen
Analytik	Einfach (substanzabhängig)	Aufwendig/teuer	Einfach (substanzabhängig)
B-Probe möglich	Ja	Keine echte	ja
Probennahme	Nicht invasiv (Privatsphäre)	Nicht invasiv	Invasiv (medizinisches Fachpersonal)
Probenmanipulation	Einfach	Kaum vorhanden	Kaum vorhanden

Generell gewinnt die Drogenanalytik in unterschiedlichen Settings zunehmend an Bedeutung, wie beispielsweise dem Workplace Drug Testing, und aufgrund der Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Matrizes (siehe Tabelle 1) auch die Suche nach alternativen Probenmatrizes (Caplan und Goldberger, 2001). Dabei spielt die Probenentnahme eine Rolle, die an Fachpersonal oder sanitäre Einrichtungen gebunden sein kann, aber auch die Akzeptanz der Probanden. Darüber hinaus sind natürlich das Setting, die durchschnittlichen Nachweiszeiträume der Analyten, die Manipulierbarkeit der Proben, die Stabilität, der analytische Aufwand im Labor und damit die Kosten, sowie die Ansprüche an die Lagerung der Proben von Bedeutung. Einige alternative Matrizes zu den klassischen bisher bekannten sind zum Beispiel der Dried Bloodspot, Kapillarblut, Schweiß, Fingernägel, Mekonium und selbstverständlich der Speichel und die Ausatemluft (Patteet et al., 2016; Kidwell et al., 1998; Caplan und Goldberger, 2001; Ropero-Miller et al., 2000; Samyn N. und van Haeren, 2000; Lester et al., 2001).

1.4.2 Speichel

Speichel ist definiert als direktes Sekretionsprodukt der Speicheldrüsen und grenzt sich damit von der in der englischsprachigen Literatur als „oral fluid“ bezeichnete Mundhöhlenflüssigkeit ab (Kintz et al., 2008; UNDOC, 2014). Oral fluid setzt sich im Wesentlichen aus Speichel, Gingivum Cervikalflüssigkeit, Blut und anderen Bestandteilen zusammen (Kaufman und

Lamster, 2002; Cone und Huestis, 2007; Kintz et al., 2008). In dieser Arbeit wird der deutsche Begriff Speichel, abweichend von der oben genannten Definition als Synonym für das englische oral fluid verwendet.

Die Speichelproduktion selbst findet überwiegend in den drei großen Hauptspeicheldrüsen statt, in der paarigen Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis), der paarigen Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis), der paarigen Unterzungenspeicheldrüse (Glandula sublingualis), und ein kleiner Teil in den sogenannten „minor glands“. Dies sind kleine Speicheldrüsen, die im Mundraum verteilt sind, und zusammen einen Anteil von unter zehn Prozent der Gesamtspeichelproduktion ausmachen (Aps und Martens, 2005; Whealton, 2012).

Der sezernierte Speichel der einzelnen Speicheldrüsen unterscheidet sich hinsichtlich seiner Zusammensetzung, insbesondere in Bezug auf pH-Wert und Viskosität (Ciba-Geigy, 1977; Aps and Martens, 2005). In der Speichelanalytik wird jedoch, abgesehen von wenigen Ausnahmen, mit dem Gesamtspeichel gearbeitet. Dieser besteht zu 99% aus Wasser und etwa zu 1% aus Proteinen, bei denen Enzyme wie α -Amylase, Lysozyme, Hormone wie zum Beispiel Cortisol, Immunglobuline und Serumproteine den Hauptanteil ausmachen. Kohlenhydrate sind zu etwa 80% in Form von Glykoproteinen vorhanden, den sogenannten Mucinen, die bei der Viskosität des Speichels eine entscheidende Rolle spielen (Ciba-Geigy, 1977; Kidwell et al., 1998; Holsinger und Bui, 2007).

Grundsätzlich ähnelt sich der Aufbau der jeweiligen Speicheldrüsen in ihrer Grundstruktur und besteht aus sekretorischen Endköpfchen, den sogenannten Azini, die den Speichel produzieren, und einem Geflecht aus Ausführungsgängen (Holmberg und Hoffman, 2014; Samyn et al., 1999).

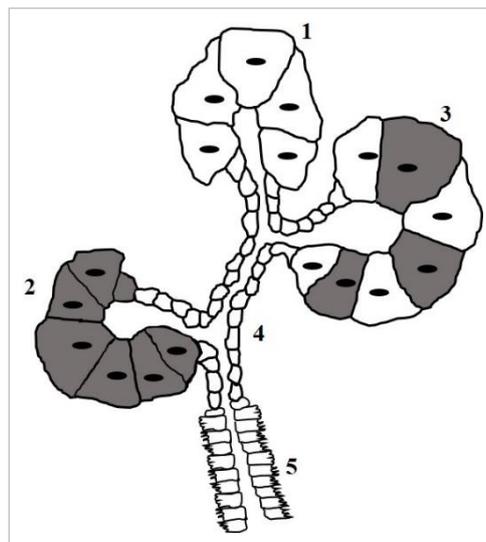


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Speicheldrüse; 1) seröses Azinus (weiß); 2) muköser Azinus (grau); 3) seromuköser Azinus; 4) Schaltstück; 5) Streifenstück

Die Azini unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zellzusammensetzung und damit ihres produzierenden Sekrets in muköse Azini, seröse Azini und eine Mischform, die seromukösen Azini (Holsinger and Bui, 2007; Höld et al., 1999), und führen in die sogenannten Schaltstücke, den ersten Abschnitt der Ausführungsgänge, welche die einzelnen Azini miteinander verbinden. Das gebildete Sekret stellt den plasmaitonen Primärspeichel dar. Im Schaltstück vermischen sich die Sekrete der Endköpfchen verschiedenen Typs und treten in den Ductus striatus, das Streifenstück (Holsinger und Bui, 2007; Holmberg und Hoffman, 2014), ein. In diesem Abschnitt der Ausführungsgänge findet die aktive Rückresorption von Natriumchlorid statt, während Kalium und Hydrogencarbonat aktiv in den Speichel sezerniert werden, allerdings im Vergleich zum Natriumchlorid in geringeren Konzentrationen (Samyn et al., 1999; Turner und Sugiya, 2002; Holsinger und Bui, 2007). Vermutlich findet neben der aktiven Sekretion auch eine Rückresorption von Hydrogencarbonat im Streifenstück statt, die jedoch abhängig von der Durchflussgeschwindigkeit des Primärspeichels ist (Smith, 2012). Schließlich tritt der finale Speichel in den letzten Abschnitt der Ausführungsgänge ein, den Ductus excretorius, und kann in den Mundraum sezerniert werden (Samyn et al., 1999; Holsinger und Bui, 2007). Obgleich die Konzentration von Kaliumhydrogencarbonat im Speichel höher ist als jene im Plasma, ist der Speichel gegenüber dem Plasma hypoton, auch bedingt durch die verhältnismäßig niedrige Natriumchloridkonzentration (Höld et al., 1999; Samyn et al., 1999; Holsinger und Bui, 2007).

Kommt es zu einer Stimulation des Speichelflusses, findet nicht nur eine Stimulation der Azinuszellen, sondern auch der Myoepithelzellen um Azinuszellen und Ausführungsgänge statt. Darüber hinaus verringert sich die Rate der Rückresorption von Natriumchlorid (Smith, 2012; Holsinger und Bui, 2007). Auch die Hydrogencarbonatkonzentration, und mit ihr der pH-Wert, steigen mit steigender Flussrate (Ciba-Geigy, 1977; Whealton, 2012). Die Speichelproduktion unterliegt einem zirkadianen Rhythmus von etwa 24 Stunden, wobei die höchste Flussrate am späten Nachmittag, zwischen 15 und 16 Uhr und die niedrigste Flussrate in den frühen Morgenstunden zwischen 3 und 5 Uhr verzeichnet wurde (Dawes, 1972; Dawes und Ong 1973). Darüber hinaus findet eine Stimulation des Speichelflusses durch physische Reize, wie das Kauen, olfaktorische und gustatorische, sowie psychische Reize statt (Ciba-Geigy, 1977). Dabei können Flussraten entstehen, die um ein Vielfaches höher liegen als der eigentliche, nicht stimulierte Speichelfluss, und somit von unter 0,1 Milliliter pro Minute auf deutlich über einen Milliliter pro Minute ansteigen können (Ciba-Geigy, 1977).

Übergang von Substanzen in den Speichel

Der Übergang von Substanzen aus dem Blut in den Speichel kann auf verschiedene Arten stattfinden. Mögliche Wege sind: die transzelluläre passive Diffusion, der aktive Transport, die Ultrafiltration und die Pinozytose, wobei letztere für Xenobiotika kaum eine Rolle spielt (Höld et al., 1999; Haeckel und Hänecke, 1996; Samyn et al., 1999). Das Konzentrationsverhältnis von Substanzen in Speichel und Blut entspricht grundsätzlich einem Gleichgewichtsverhältnis, das wesentlich durch die unterschiedlichen Formen des Übergangs dieser Substanzen aus dem Blut in den Speichel beeinflusst wird.

Transzelluläre passive Diffusion

Bei der passiven Diffusion, also einer Diffusion aus den Blutkapillaren in das Lumen des sekretorischen Endköpfchens, nehmen verschiedene Faktoren Einfluss auf den Diffusionsprozess. Lipophile Substanzen passieren die Lipiddoppelschichten der Zellmembranen schneller und besser als hydrophile (Haeckel, 1989; Haeckel und Hänecke, 1996; Kidwell et al. 1998), vorausgesetzt ihr Molekulargewicht ist nicht zu hoch. Hochmolekulare Substanzen wie verschiedene Antibiotika, sind nicht dazu in der Lage durch die Zellmembranen zu diffundieren. Molekulargewichte um 400 Dalton können hier als ungefähre Grenze betrachtet werden (Haeckel and Hänecke, 1996). Generell passieren kleine Moleküle Zellmembranen besser als große. (Samyn et al., 1999; Haeckel and Hänecke, 1996). Einer der Haupteinflussfaktoren ist der pKs-Wert einer Substanz und ihr daraus resultierender Ionisierungsgrad. Der pH-Wert des Blutes liegt bei etwa 7,4 also im schwach alkalischen Bereich, während der pH-Wert des Speichels im nicht stimulierten Zustand mit durchschnittlich 6,4 im schwach sauren Bereich liegt (Ciba-Geigy, 1977). Theoretisch sind nur nicht ionisierte Moleküle dazu in der Lage, die Zellmembranen zu passieren. Der Ionisierungsgrad bei einem bestimmten pH-Wert ist jedoch abhängig vom pKs-Wert einer Substanz (Haeckel, 1989; Haeckel und Hänecke, 1996; Samyn et al., 1999). Herrschen im Mundraum saure Verhältnisse, fungiert der Speichel folglich als eine Art Ionenfalle (Haeckel, 1989; Haeckel und Hänecke, 1996).

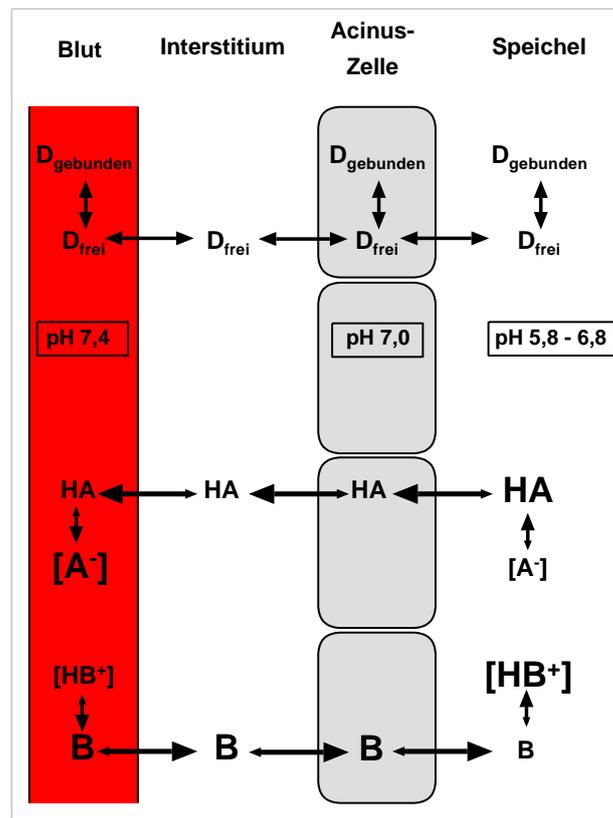


Abbildung 3: Übergang von Substanzen aus dem Blut in den Speichel; D: Substanz; A: Säure; B: Base; HA: protonierte Säure; HB: protonierte Base

Hier greift auch der nächste Einflussfaktor auf die Konzentration einer Substanz im Speichel: Der pH-Wert des Speichels. Wie oben schon erwähnt, steigt die Hydrogencarbonatkonzentration mit steigendem Speichelfluss an, so dass bei Speichelflussstimulation pH-Werte von 7,8 bis 8 erreicht werden können (Ciba-Geigy, 1977). Während der Einfluss auf neutrale, schwach saure oder basische Substanzen mit pKs-Werten zwischen 8,5 und 5,5 geringer ist, führt ein Anstieg des pH-Wertes im Speichel zu stärkeren Gleichgewichtsveränderungen bei starken Säuren oder Basen (Haeckel, 1989; Haeckel and Hänecke, 1996; Höld et al., 1999).

Vereinfacht lässt sich sagen, dass das Konzentrationsverhältnis zwischen Speichel und Plasma bei basischen Substanzen tendenziell über 1 und bei sauren Substanzen eher unter 1 liegt, vorausgesetzt andere Einflussfaktoren sind untergeordnet (Haeckel und Hänecke, 1996). Der letzte, entscheidende Einflussfaktor auf den Übergang einer Substanz in den Speichel, der das Konzentrationsverhältnis zwischen Speichel und Blut beeinflusst, ist die Plasmaproteinbindung, auf die an späterer Stelle noch eingegangen wird. Nur ungebundene Moleküle können in den Speichel diffundieren. Aus diesem Grund wird die Speichelkonzentration einer Substanz auch gerne als Reflexion der freien Blutkonzentration gesehen (Haeckel und Hänecke, 1996; Samyn et al., 1999; Höld et al., 1999; Kidwell et al., 1998).

Aktiver Transport

Der erste der drei untergeordneten Transportmechanismen von Substanzen in den Speichel, auf den hier eingegangen werden soll, ist der aktive Transport. Dabei handelt es sich um einen spezifischen, energieabhängigen Transport über Carrier, wie er auch in der Niere zu finden ist. Ausgehend vom Nierenmodell wird vermutet, dass diese Carrier im Ductus striatus lokalisiert sind (Haeckel and Hänecke, 1996). Beschrieben wurde ein aktiver Transport unter anderem für Lithium, Penizillin, Tetracyclin, einige Antiepileptika, Metoprolol, Pirmenol und sogar Insulin (Haeckel and Hänecke, 1996; Dawes et al., 1978; Johnson et al., 1986; Gröschel, 2008; Höld et al., 1999).

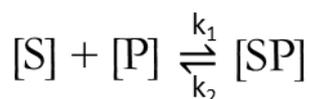
Ultrafiltration

Während der aktive Transport auch für größere Moleküle problemlos möglich ist, ist die Ultrafiltration ein Prozess, der nur mit sehr kleinen polaren bzw. wasserlöslichen Molekülen bis maximal 200 Da stattfinden kann. Diese Substanzen gelangen über „tight junctions“, also kleine mit Wasser gefüllte Poren, in das sekretorische Endköpfchen (Kaufmann und Lamster, 2002; Haeckel and Hänecke, 1996; Höld et al., 1999).

All diese Transportmechanismen führen letztendlich zu der Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichtes zwischen Speichel und Blut bzw. Speichel und Plasma, der sogenannten Speichel/Blut, Speichel/Plasma oder auch Speichel/Serum-Ratio, abhängig von der betrachteten Matrix. Regelmäßig wird von einem Speichel/Plasma- (OF/P-Ratio) oder einem Speichel/Serum-Ratio (OF/S-Ratio) ausgegangen.

Plasmaproteinbindung

Die Plasmaproteinbindung beeinflusst alle Transportmechanismen von Substanzen aus dem Blut in den Speichel und entspricht einer Gleichgewichtsreaktion, die das Verhältnis zwischen frei vorliegender Substanz im Blut, dem ungebundenen Plasmaprotein und dem Substanz-Proteinkomplex beschreibt.



S = Substanz

P = Plasmaprotein

SP = Substanz-Protein-Komplex

k1 = Gleichgewichtskonstante Hinreaktion

k2 = Gleichgewichtskonstante Rückreaktion

Eine solche Bindung ist in der Regel unspezifisch und reversibel (Mutschler, 2008; Burton et al., 2006; Howard et al., 2010). Parameter, welche diesen Gleichgewichtsprozess beeinflussen, sind der pH-Wert, die Temperatur und der Salzgehalt der Matrix.

Innerhalb dieser Gleichgewichtsreaktion spielen unterschiedliche Konstanten eine Rolle, welche entscheidende Parameter des Bindungsprozesses und Ausmaßes beschreiben. Die Affinitätskonstante ($K_A = k_1/k_2$) ermöglicht eine Aussage über die Bindungsstärke, während die Dissoziationskonstante (K_D) gleich der inversen Affinitätskonstante ist ($K_D = 1/K_A$) und der Konzentration ungebundener Substanz entspricht, wenn die Hälfte aller möglichen Bindungsstellen besetzt sind. Die maximale Zahl möglicher Bindungsstellen wird als Kapazitätskonstante oder N_{tot} bezeichnet. Diese Parameter sind substanzspezifisch (Burton et al., 2006).

An der Plasmaproteinbindung sind mehrere Proteine beteiligt, das bedeutendste ist jedoch das Albumin. Mit einem Molekulargewicht von etwa 66-69 kDa und einer Konzentration von 35 bis 55 g pro Liter Serum, stellt es die größte Fraktion der Plasmaproteine. Seine Aufgaben liegen sowohl in der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks als auch des pH-Wertes im Blut (Berde et al., 1979; Burton et al., 2006; Howard et al., 2010). Ungefähr 60% des Gesamtalbumins liegen extravaskulär vor und 40% intravaskulär (Jusko und Gretch, 1976). Darüber hinaus ist Albumin ein wichtiges Transportprotein, nicht nur für Xenobiotika, sondern auch für körpereigene Substanzen wie Bilirubin und Fettsäuren (Berde et al., 1979; Brodersen, 1979; Burton et al., 2006; Howard et al., 2010).

Das saure α -1-Glykoprotein ist das bevorzugte, aber nicht ausschließliche Bindungsprotein für basische Arzneistoffe. Es hat ein Molekulargewicht von im Schnitt 41 kDa mit einem Bereich zwischen 38 und 48 kDa und eine Konzentration von 0,6 bis 1,2 bzw. 1,4 g pro Liter Serum (Burton et al., 2006; Tesseromatis et al., 2011).

Das saure α -1-Glykoprotein ist ein sogenanntes Akute-Phase-Protein und wird unter anderem bei Verbrennungen, Infektionen und Traumata vermehrt gebildet. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz kann dies den Anteil freier Substanz im Blut beeinflussen. Darüber hinaus ist von verschiedenen Varianten dieses Proteins berichtet worden, die unter anderem Unterschiede in ihrer Bindungsfähigkeit mit Xenobiotika und körpereigenen Substanzen aufweisen können (Burton et al., 2006; Tesseromatis et al., 2011).

Wie beim Albumin gibt es auch beim sauren α -1-Glykoprotein Konkurrenzen verschiedener Substanzen um Bindungsstellen. Diese Konkurrenzen verschiedener Stoffe um Bindungsstellen ist proteinunabhängig und folgt denselben Prinzipien. Dabei ist die Verdrängung von

Arzneistoffen oder körpereigenen Stoffen durch eine andere Substanz möglich. Dafür müssen verschiedene Bedingungen erfüllt werden. Zum einen muss die verdrängte Substanz zu einem hohen Anteil an Plasmaproteine gebunden sein, zum anderen müssen beide Substanzen entweder um dieselbe Bindungsstelle (kompetitiv) oder zumindest um das selbe Protein (allosterisch) konkurrieren, und die Bindungsstellen müssen begrenzt sein, sprich die molare Konzentration der beiden Substanzen muss die Anzahl der Bindungsstellen überschreiten. Als letzte Bedingung muss entweder die freie Konzentration der konkurrierenden Substanz höher sein als die der gebundenen Substanz, oder die Bindungsaffinität entsprechend höher sein (MacKichan, 1989, Burton et al., 2006).

Weitreichende Konformitätsänderungen durch allosterische Effekte werden allgemein der Bindung von Fettsäuren an das Albumin zugeschrieben, während Medikamente nur leichte Veränderungen in der Region der Bindungsstelle verursachen. Kompetitive Konkurrenz ist jedoch der häufigere Grund für veränderte Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen. Bindungen können, wie im Falle des Bilirubins, temperaturabhängig sein, abhängig von der Bindungsenthalpie (Berde et al., 1979; Burton et al., 2006).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die freie Arzneistoffkonzentration beziehungsweise die Plasmaproteinbindung einer Substanz, zu bestimmen. Die bekanntesten sind die Gleichgewichtsdialyse, die Ultrazentrifugation und die Ultrafiltration.

Bei der Gleichgewichtsdialyse wird mit zwei, durch eine semipermeable Membran getrennten Zellen gearbeitet. In der ersten Kammer befindet sich das Serum mit der entsprechenden Substanz, in der zweiten Kammer ein Puffergemisch mit physiologischem pH-Wert und Salzgehalt. Nach einer Weile stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht der ungebundenen Substanz zwischen beiden Kammern ein. Über die Bestimmung der Konzentration in der Pufferkammer lässt sich die Plasmaproteinbindung leicht berechnen. Zu beachten ist bei diesem Verfahren der Zeitaufwand (Dialysezeiten von bis zu 24 Stunden sind möglich), die Konzentrationsabhängigkeit der Plasmaproteinbindung, und nicht zuletzt eine mögliche unspezifische Bindung des Analyten an die Membran. Temperatur und pH-Wert sind konstant bei physiologischen Bedingungen zu halten. (Jung et al., 1981; Barré et al., 1985; Vogeser et al., 2007; Burton et al., 2006; Howard et al., 2010).

Die Ultrazentrifugation nutzt keine Membran, sondern trennt die einzelnen Komponenten des Blutes durch die Zentrifugalkraft nach Masse voneinander ab. Diese Methode birgt zwar Vorteile, insbesondere bei sehr hydrophoben Substanzen, da sie nicht mit Membranen arbeitet, bei

denen unspezifische Bindungen die Ergebnisse verfälschen könnten, allerdings ist diese Methode verhältnismäßig teuer und nicht zwingend weniger zeitaufwendig, verglichen mit der Gleichgewichtsdialyse (Barré et al., 1985; Burton et al., 2006; Howard et al., 2010).

Eine dritte Form der Bestimmung freier Substanzkonzentration im Blut bzw. Plasma oder Serum ist die Ultrafiltration. Sie gilt als einfachste und schnellste Methode. Hierbei werden spezielle Filter eingesetzt, die über eine Probenkammer, eine semipermeable Filtermembran mit einer bestimmten Ausschlussgrenze, z.B. 30 kDa (Gebrauchsanleitung Centrifree® Ultrafiltrationseinheiten, 2014), und einen Filtratsammelbehälter verfügen. Anschließend wird die Filtrationseinheit zentrifugiert, regelhaft bei 1000 bis 2000 g (Barré et al., 1985; Gebrauchsanleitung Centrifree® Ultrafiltrationseinheiten, 2014). Über die entstehenden Zentrifugalkräfte gelangen Wasser und Moleküle unterhalb der Ausschlussgrenze durch den Filter in den Filtratsammelbehälter. Auch bei dieser Methode können unspezifische Bindungen an die Filtermembran oder andere Teile der Filtrationseinheit die Ergebnisse beeinflussen (Jung et al., 1981; Barré et al., 1985; Vogeser et al., 2007; Burton et al., 2006; Howard et al., 2010).

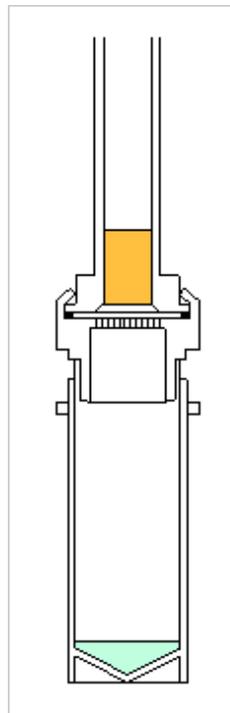


Abbildung 4: Schema einer Ultrafiltrationseinheit

Um unspezifische Bindung als Fehlerquelle bei der Bestimmung der freien Substanzkonzentration auszuschließen, sollte sie sowohl bei der Gleichgewichtsdialyse als auch bei der Ultrafiltration bestimmt und bei der Berechnung der Plasmaproteinbindung, bzw. der freien Substanzkonzentration, berücksichtigt werden (Ballard und Rowland, 2011). Auch die Temperatur

kann bei der Bestimmung der Plasmaproteinbindung eine Rolle spielen, da Temperaturabhängigkeiten bei der Bindung entsprechender Substanzen an die Plasmaproteine bekannt sind (Berde et al., 1979; Jung et al., 1981; Berezhkovskiy, 2008).

Oral fluid/Plasma Ratio

Das Konzentrationsverhältnis zwischen Speichel und Blut erlaubt eine Abschätzung der generellen Nachweisbarkeit einer Substanz im Speichel und darüber hinaus eine Einschätzung über den Nachweiszeitraum. Ein OF/Plasma Ratio (OF/P-Ratio) von 1, wie es zum Beispiel bei Ethanol vorkommt (Hein et al., 1989; Haeckel und Hänecke, 1996), bedeutet nicht nur, dass diese Substanz in beiden Matrices die gleiche Konzentration hat, sondern auch, dass ihr Nachweiszeitraum vergleichbar ist, während eine OF/P-Ratio von weit über 1 auch einen Nachweiszeitraum haben sollte, der entsprechend länger ist als der selbiger Substanz im Blut.

Weiterhin ist über eine bekannte OF/P-Ratio und den bekannten therapeutischen Bereich im Serum die Ermittlung der korrespondierenden Speichelkonzentration möglich und damit auch die Option Speichel als alternative Matrix im TDM zu verwenden.

Unter Einbeziehung von pKs-Wert, Plasmaproteinbindung und Speichelproteinbindung, sowie den pH-Werten von Speichel und Plasma, lässt sich dies Speichel/Plasma-Ratio mit der Rasmussen-Gleichung theoretisch ermitteln. Bei dieser Gleichung handelt es sich um eine Abwandlung der Henderson Hasselbalch Gleichung für Puffersysteme (Kidwell et al., 1998).

Saure Substanzen:

$$\frac{[\text{Speichel}]}{[\text{Plasma}]} = \frac{1 + 10^{(\text{pH}_{\text{Speichel}} - \text{pK}_a)}}{1 + 10^{(\text{pH}_{\text{Plasma}} - \text{pK}_a)}} \times \frac{[\text{frei}_{\text{Plasma}}]}{[\text{frei}_{\text{Speichel}}]}$$

Basische Substanzen:

$$\frac{[\text{Speichel}]}{[\text{Plasma}]} = \frac{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}_{\text{Speichel}}}}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}_{\text{Plasma}}}} \times \frac{[\text{frei}_{\text{Plasma}}]}{[\text{frei}_{\text{Speichel}}]}$$

[Speichel] = Substanzkonzentration im Speichel

[Plasma] = Substanzkonzentration im Plasma

[frei_{Plasma}] = freie Substanzkonzentration im Plasma

[frei_{Speichel}] = freie Substanzkonzentration im Speichel

Ein direkter Zusammenhang zwischen Blut- und Speichelkonzentration ist für ein TDM im Speichel unausweichlich. Dass dieser Zusammenhang existiert, und Speichel durchaus als geeignete Matrix für Therapeutisches Drug Monitoring angesehen werden kann, wurde am

Beispiel von einigen Antiepileptika und anderen Medikamenten wie Lithium und Metoprolol bereits aufgezeigt (Horning et al., 1977; MacKichan et al., 1981; Maldonado et al., 2008; Patsalos et al., 2013). Speichel als Matrix verfügt im Rahmen der Missbrauchsdiagnostik über einige Vorteile, ist es immerhin eine schmerzlose, nicht invasive Matrix, für dessen Abnahme im Gegensatz zu Blut nicht einmal medizinisches Personal notwendig ist, und die theoretisch sogar zu Hause stattfinden könnte (Patsalos et al., 2013). Zudem ist eine Probenentnahme unter Aufsicht einfacher und ohne Verletzung der Privatsphäre durchführbar, anders als bei Urin, noch dazu mit geringerer Manipulationsmöglichkeit (Bosker and Huestis, 2009).

Die Nachteile liegen in der geringeren Substanzkonzentration und dem, im Gegensatz zu Blut oder Urin, geringeren Volumen, insbesondere da viele Medikamente und Substanzen unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufweisen, die mit verminderter Speichelbildung einher gehen (Scully, 2003, Caplan und Goldberger, 2001).

Gewinnung von Speichelproben

Eine entscheidende Rolle spielt im Zusammenhang mit dem ungerichteten Screening und dem TDM die Speichelprobenentnahme. Sie hat Einfluss auf die Substanzkonzentration in der Probe, damit die Nachweis- und Bestimmungsgrenze und das sammelbare Volumen (Langel et al., 2008). Es stehen eine Reihe unterschiedlicher Speichelsammelsysteme zur Verfügung, die sich in drei Hauptkategorien einteilen lassen und deren Funktionsweise jeweils an einem Beispiel erklärt werden soll.

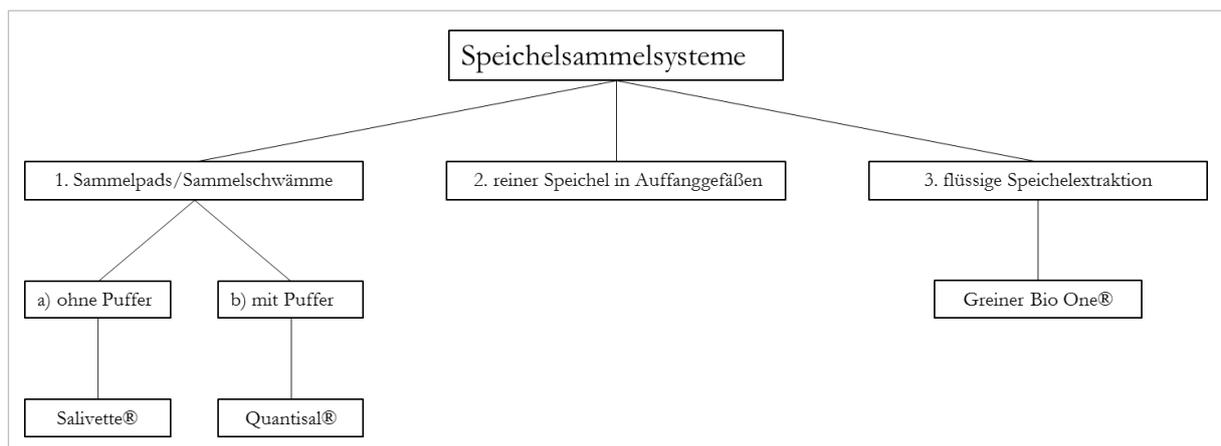


Abbildung 5: Übersicht Speichelentnahmesysteme

Die erste Kategorie nutzt Sammelpads oder Sammelschwämme und wird wiederum in zwei Unterkategorien aufgeteilt, nämlich solche, die den Speichel direkt aus dem Sammelschwamm extrahieren und jene, die eine Pufferlösung zur Lagerung und Konservierung verwenden.

Ein Beispiel für die erste Untergruppe stellt das Salivette® Speichelsammelsystem dar (siehe Abbildung 6).

Es besteht aus einer Vorlage, einem Einhängegefäß, einer Watterolle und einem Stopfen. Die Watterolle wird nach dem Öffnen für etwa eine Minute in den Mund genommen und es wird vorsichtig darauf gekaut. Anschließend wird die Watterolle in das Einhängegefäß gelegt und das ganze System verschlossen. Im Labor wird der Speichel mittels Zentrifugation aus der Watterolle extrahiert und durch die im Einhängegefäß vorhandenen Löcher in der Vorlage aufgefangen (Gebrauchsanleitung Salivette®) Bei dieser oder ähnlicher Form der Speichelentnahme stehen verschiedene Möglichkeiten der Speichelflussstimulation zur Verfügung. Zum einen wirkt das leichte Kauen auf dem Sammelschwamm flussanregend, zum anderen sind auch Varianten mit Zitronensäure erhältlich. Bei einer Anregung des Speichelflusses könnte es allerdings zu einer natürlichen Verdünnung der Probe kommen. Darüber hinaus ist insbesondere im Fall der Xerostomie mit einem geringen Probenvolumen zu rechnen, außerdem kann es zu unspezifischen Bindungen einzelner Substanzen an die Watterolle kommen (Bosker and Huestis, 2009; Shirtcliff et al., 2001).

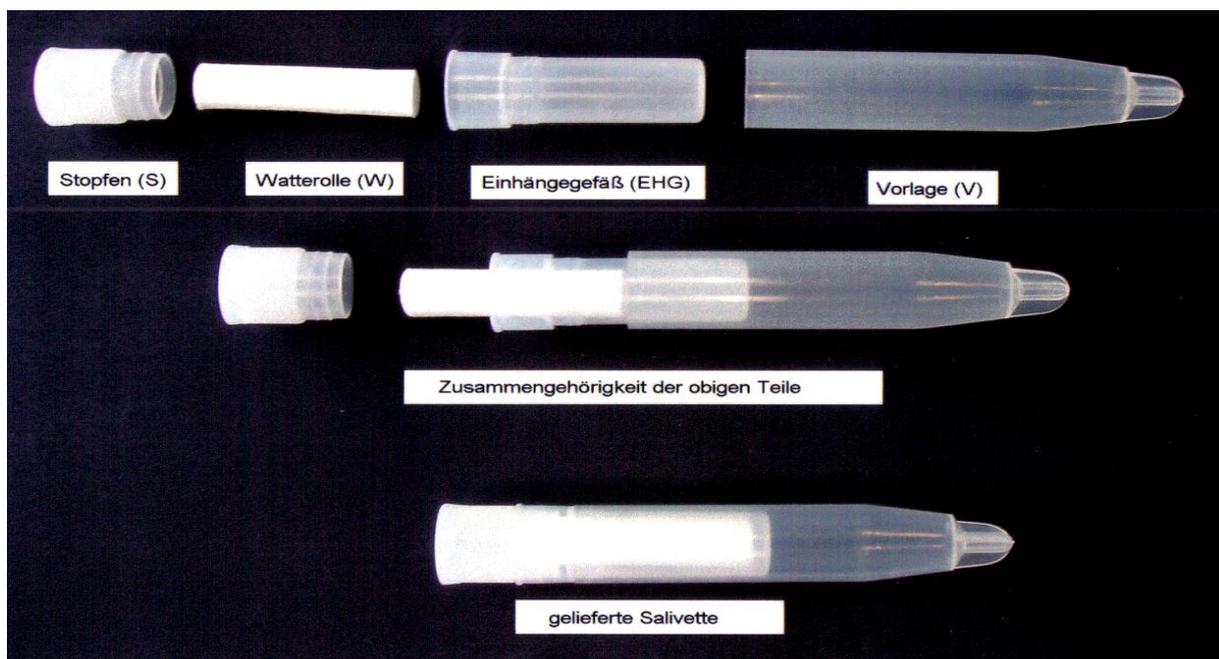


Abbildung 6: Salivette® Speichelentnahmesystem

Ein Beispiel der zweiten Untergruppe der 1. Kategorie stellt das Quantisal® Speichelentnahmesystem dar.

Das Prinzip des Quantisal® Speichelsammelsystem beruht auf einem Zellulosepad, das unter die Zunge gelegt wird und ein definiertes Volumen Speichel aufnehmen kann (1 ml, \pm 10% laut

Hersteller). Ein Indikatorfeld im Trägerstäbchen verfärbt sich blau, sobald das entsprechende Volumen erreicht wurde. Anschließend wird der Cellulosestopfen in das Transportröhrchen gesteckt. In diesem befinden sich exakt 3 ml eines Extraktionspuffers aus PBS, Stabilisatoren, Proclin300 und einem Farbstoff (pH 7,3). Nach Herstellerangaben soll das Sammelpad mindestens 30 min im Extraktionspuffer verbleiben, je nach Analyt sind auch mehrere Stunden notwendig. In dieser Zeit stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Speichel bzw. Pad und dem Extraktionspuffer ein.

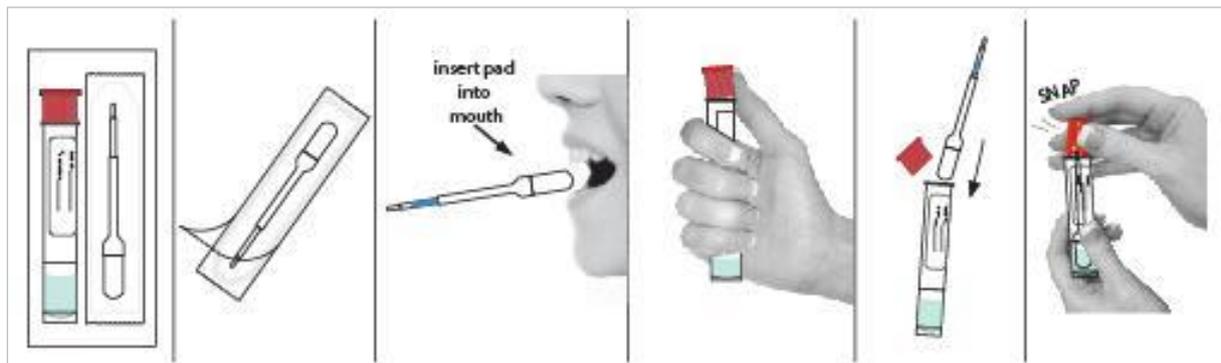


Abbildung 7: Quantisal® Speichelentnahmesystem (Quelle: https://immunanalysis.com/wp-content/uploads/2013/03/Quatisal_5.jpg; Stand: 01.04.2019; 22:49 Uhr)

Sofern keine zusätzlichen Maßnahmen getroffen werden, gilt dieses Speichelsammelsystem als den Speichelfluss nicht stimulierend. Über das bekannte Volumen der Pufferlösung und das bekannte Volumen des Speichels im Sammelpad ergibt sich bei der Analyse nun ein Verdünnungsfaktor von vier, der bei der Konzentrationsermittlung der Zielanalyten zu beachten ist. Um eine Konzentrationsermittlung durchführen zu können, ist ein Volumenindikatorfeld bei Speichelsammelsystemen dieser Art zwingend erforderlich. Mögliche Nachteile dieses Probensammelsystems sind unter Umständen eine lange Probensammelzeit und unspezifische Bindung an das Cellulosepad.

Das Sammeln reinen Speichels ist eine weitere Möglichkeit und kann in jeder Art von Gefäß erfolgen, sowohl mit Speichelflussstimulation durch das Kauen auf Parafilm, sauren Nahrungsmitteln oder Ähnlichem. Auch bei dieser Variante sind eventuell geringe Probenvolumina sowie hohe Sammelzeiten zu erwarten, sofern der Speichelfluss nicht angeregt wird (Langel et al., 2008).

Ein Speichelsammelsystem, das auf einer flüssigen Speichelextraktion beruht, begründet die dritte Kategorie. Das Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem ist bisher das einzige dieser Art auf dem Markt. Es setzt sich aus einer wässrigen Spüllösung, einer Speichelextraktionslösung mit pH 4,2 (enthält einen Zitronensäurepuffer und den Lebensmittelfarbstoff Tartrazin),

einem Sammelbecher und zwei vakuumierten Speicheltransferröhrchen zusammen (siehe Abbildung 8). Zur Speichelentnahme wird der Mund für zwei Minuten mit der Speichelextraktionslösung (SES) gespült und das Speichel/SES Gemisch anschließend mittels des Sammelbechers aufgenommen. Über ein in den Sammelbecher integriertes Ventil ziehen die vakuumierten Speicheltransferröhrchen die Speichellösung auf. Mikrobielles Wachstum in den Speicheltransferröhrchen wird durch eine enthaltene antimikrobielle Substanz (Natriumazid) verhindert. Der Speichelanteil kann im Nachhinein über die optische Dichte des Tartrazins photometrisch ermittelt werden. Dieser individuell bestimmte Speichelanteil wird bei einer Konzentrationsermittlung letztendlich einbezogen.

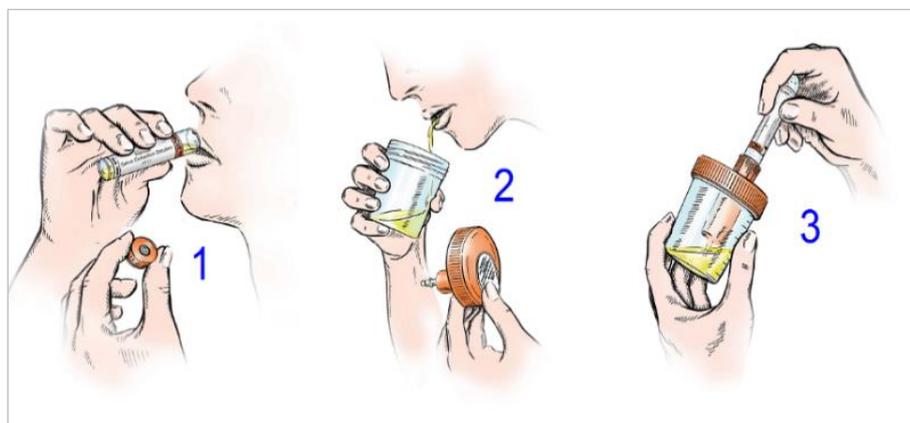


Abbildung 8: Greiner Bio-One Speichelsammelsystem

Das Greiner Bio-One System hat im Gegensatz zu anderen Speichelsammelsystemen einige Vorteile. Es regt den Speichelfluss an und lässt sich daher auch bei Patienten, die unter Xerostomie leiden, gut anwenden. Darüber hinaus ergibt sich bei sachgerechter Anwendung ein ausreichendes Volumen bei einer verhältnismäßig kurzen und standardisierten Sammelzeit. Das Puffergemisch hält den pH-Wert während der Anwendung und bei der Lagerung theoretisch im sauren Bereich, was sowohl der Stabilität einiger Substanzen zuträglich sein kann als auch insbesondere bei basischen Substanzen die Aufkonzentrierung basischer Substanzen im Speichel fördern kann.

Weiterhin ergeben sich aus diesem System zwei Proben aus demselben Probenpool, sodass die Messung bei Unklarheiten bezüglich des Messergebnisses aus einer B-Probe, die demselben Probenpool entstammt, wiederholt werden kann. Die Nachteile liegen auch hier in der Verdünnung der Probe durch die Anregung des Speichelflusses.

1.4.3 Atemluft

Anatomie und Physiologie der Lunge

Verantwortlich für den lebensnotwendigen Gasaustausch und die Sauerstoffversorgung des Körpers ist die Lunge. Im Thorax eingebettet teilt sie sich in zwei Lungenflügel, den linken, der auf Grund der Position des Herzens etwas kleiner ist, und den rechten Lungenflügel.

Die luftleitenden Atemwege, welche nicht am Gasaustausch selbst beteiligt sind, werden auch als „anatomischer Totraum“ bezeichnet, bei einem Erwachsenen beträgt er etwa 150 ml (Ulmer et al., 1991; Florens et al., 2011). Die totale Lungenkapazität liegt bei ca. 6 – 7 l, während das Atemzugvolumen bei Ruheatmung bei ca. einem halben Liter liegt (Ulmer et al., 1991; Mutschler, 2008; Florens et al. 2011; Pape et al., 2014). Zusammen mit dem inspiratorischen Reservevolumen von etwa 2,5 – 3 l kommt man auf eine Inspirationskapazität von 3 – 3,5 l und ein funktionelles Residualvolumen, welches etwa dasselbe Volumen aufweist und sich aus dem expiratorischem Reservevolumen und dem Residualvolumen zusammensetzt. Die Summe aus Inspirationskapazität und funktioneller Residualkapazität abzüglich des Residualvolumens wird als Vitalkapazität bezeichnet. (Ulmer et al., 1991; Mutschler, 2008; Pape et al., 2014).

Während des Atemvorgangs gelangt die Luft durch die Nase bzw. die Mundhöhle über den Pharynx (Rachen) und den Larynx (Kehlkopf) in die Trachea (Luftröhre). Erst am Larynx trennen sich Gastrointestinaltrakt und Respirationstrakt (Campbell und Reece, 2003; Mutschler, 2008). Mit dem Eintritt in die Lunge verzweigt sich die Trachea in zwei Hauptbronchien, die in die jeweiligen Lungenlappen führen. Diese Verzweigungen werden als Generationen oder Verzweigungsgenerationen bezeichnet. Man schätzt, dass es etwa 23 dieser Verzweigungsgenerationen gibt (siehe Abbildung 9). Der Alveolarraum beginnt etwa ab der 17. Generation. Hier findet sich der Bronchiolus respiratorius, von dem vereinzelt bereits kleine, sackähnliche Auswüchse abgehen, in denen Luftaustausch stattfindet, die Alveolen. Der Bronchiolus respiratorius teilt sich weiter in den Ductus alveolaris, der eigentlichen Alveolarregion, erst hier reihen sich die Alveolen unmittelbar hintereinander. (Soong et al., 1979; Ulmer et al., 1991; Tawhai et al., 2004; Pape et al., 2014). Die Durchmesser der Atemwege im Alveolarraum liegen deutlich unter einem Millimeter. (Soong et al., 1979; Florens et al., 2011). Die Zahl der Alveolen wird allgemein auf etwa 300 Millionen geschätzt (Ulmer et al., 1991; Mutschler, 2008; Pape et al., 2014), während Ochs et al. nach ihren Untersuchungen eine weit höhere Zahl von ca. 480 Millionen veranschlagen (Ochs et al., 2004). Dabei haben die Alveolen einen Durchmesser von 75 – 300 μm (Pape et al., 2014), beziehungsweise von durchschnittlich 200 μm (Ochs et al., 2004), und einer Oberfläche von 24 bis 69 m^2 laut Hasleton und anderen Autoren

(Hasleton, 1972), beziehungsweise 50 bis 120 m² (Pape et al., 2014). Der Gasaustausch selbst verläuft über Diffusionsprozesse durch die Alveolarwände in die um die Alveolen führenden Blutgefäße (Pape et al., 2014).

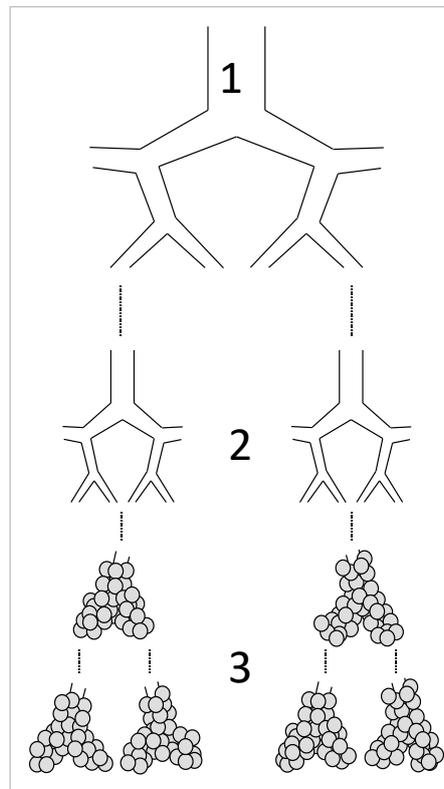


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Atemwege; 1) Hauptbronchien; 2) Generation 4-16; 3) Generation 17-23

Surfactant

Die Alveolen und Atemwege sind mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt, der als Lungen-Surfactant oder kurz Surfactant bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um eine oberflächenaktive Flüssigkeit, die sich zu 80 – 90% aus Phospholipiden zusammensetzt, während die restlichen 10 bis 20% auf Proteine (Surfactant Protein A bis D) und Cholesterol entfallen. Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin stellt dabei eine charakteristische Komponente, jedoch keinen exklusiven Marker dar (Rooney, 1984; Creuwels et al., 1997, Andreeva et al., 2007). Diese Oberflächenaktive Substanz setzt die Oberflächenspannung innerhalb der Alveolen und der kleinen Atemwege herab und dient damit der Stabilisation der Lunge (Burmley et al., 1967; Schürch et al., 1976; Creuwels et al., 1997). Die Verringerung des Surfactants, aber auch die Zusammensetzung desselben, wird unter anderem in Verbindung mit der Lungenreife, aber auch dem Atemnotsyndrom bei Neugeborenen gebracht (Rooney et al., 1977; Nielsen et al., 1981; Creuwels et al., 1997). Die Konzentrationen von Phosphatidylcholin (16:0/14:0),

Phosphatidylcholin (16:0/16:1) und Phosphatidylcholin (16:0/16:0) könnten in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle spielen (Bernhard et al., 2001).

Während 95% der Zelloberfläche der Alveolen mit Alveolarzellen vom Typ I ausgekleidet sind, entfallen die restlichen 5% auf Alveolarzellen vom Typ II, in welchen die Surfactantproduktion stattfindet. Mit der Geburt wird eine massive Produktion von Surfactant ausgelöst, die bis einige Stunden nach der Geburt anhält (Rooney et al., 1977; Andreeva et al., 2007). Nach dieser Periode wird ein Teil des Surfactants wiederverwertet. Dieser Anteil ist sehr variabel und kann zwischen 25 und 95 % ausmachen. Surfactant Protein A (SP-A) scheint an diesem Vorgang über einen SP-A Rezeptor beteiligt zu sein (Andreeva et al., 2007).

Die Produktion von Phosphatidylcholin, einem Hauptbestandteil der Phospholipide des Surfactants, findet am endoplasmatischen Retikulum statt, während andere Phospholipide durchaus auch an anderen Stellen in der Zelle synthetisiert werden. Die Einzelkomponenten werden in den lammellären Granula zusammengeführt und gelagert. (Rooney et al., 1975; Rooney et al., 1984; Andreeva et al., 2007) Die Ausschüttung kann zum einen durch einen physikalischen Reiz bei der Dehnung der Alveolarzellen Typ II während der normalen Atmung angeregt werden, aber auch chemische Reize können hierbei fördernd wirken (Andreeva et al., 2007).

Aerosolproduktion

Es sind unterschiedliche Theorien bekannt, die für die Detektion feiner Surfactant Aerosoltröpfchen in der Ausatemluft verantwortlich sind. Während Papineni und Rosenthal (1997) aus hohen Geschwindigkeiten der Ausatemluft in den Atemwegen resultierende Scherkräfte für die Produktion von Aerosol verantwortlich machen, sehen andere Forscher Verschlüsse kleiner Atemwege als Grundlage für die Produktion von Surfactantaerosol. Für diese Theorie sprechen Experimente mit unterschiedlichen Atemmustern und der daraus folgenden Veränderung der Partikelanzahl in der Ausatemluft. Vorangegangenes tiefes Ausatmen und schnelle Inhalationen führten zu höheren Partikelzahlen als normale Atemvorgänge (Almstrand et al., 2009; Johnson und Morawaska, 2009) (siehe Abbildung 10).

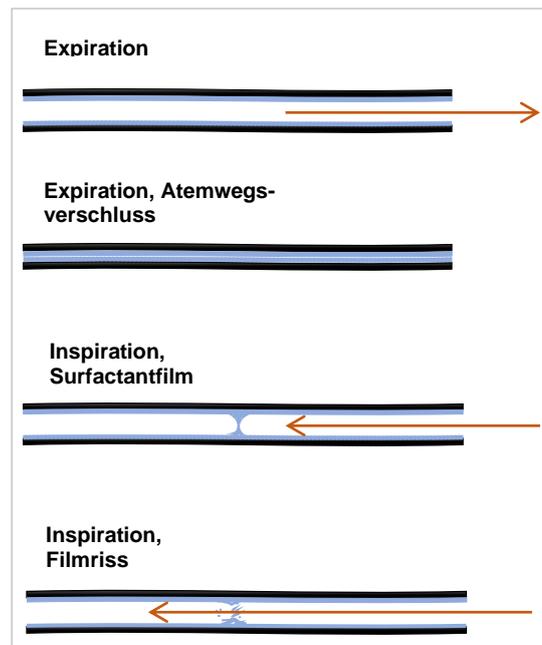


Abbildung 10: Atemwegsverschluss und Aerosolentstehung

In Experimenten von Cassidy et al. (1999) kam es in einer zylinderförmigen Röhre, die mit einem zweischichtigen Flüssigkeitsfilm ausgekleidet wurde, die unterschiedliche Viskositäten aufwies, zu Instabilitäten. Die Präsenz von Surfactant verzögerte hierbei den Verschluss der Röhren. Die Filmdicke spielt bei diesem Mechanismus ebenfalls eine Rolle. Letzten Endes ist laut dieser Theorie der Verschluss der kleinen Atemwege das Resultat der Oberflächenspannung der auskleidenden Flüssigkeiten und der Wandinstabilitäten der flexiblen kleinen Atemwege. Die kritische Filmdicke ist bei flexiblen Wandstrukturen daraus folgend geringer als bei festen Wandstrukturen. Heil et al. (2008) berichteten darüber hinaus, dass die Oberflächenspannung des die Atemwege auskleidenden Flüssigkeitsfilms einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Atemwegsverschlüssen hat. Die entstehenden Instabilitäten im Flüssigkeitsfilm, die letztlich zur Bildung von atemwegsverschließenden Flüssigkeitsfilmen führen, werden als Rayleigh-Plateau Instabilität bezeichnet. Der Inspirationsdruck während des Einatmens führt schließlich zur Zerstörung des Flüssigkeitsfilmes und damit zur Bildung von Aerosoltröpfchen. (Johnson und Morawska, 2009).

Insgesamt liegt die Größenverteilung der Aerosoltröpfchen überwiegend im Submikron-Bereich (Papineni und Rosenthal, 1997; Almstrand et al., 2010). Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass Partikel mit einem Durchmesser $> 10 \mu\text{m}$ vermutlich nicht aus den tiefen Lungenregionen stammen können, da diese sich vor dem Erreichen des Mundraumes in den Atemwegen absetzen würden (Asgharian et al., 2001; Fernández und Casan, 2012).

Probengewinnung

Schon 1972 gab es Versuche von Teranishi et al. (1972) Substanzen in der Ausatemluft mittels Gaschromatographie nachzuweisen. Dabei wurde die Ausatemluft in einer Stahlröhre gesammelt, gekühlt und in den Gaschromatographen eingespeist (Teranishi et al., 1972).

Diese Methode der Nutzbarmachung von Ausatemluft als Matrix zur Drogen- und Medikamentenanalytik wurde über die Zeit weiterentwickelt. Grundsätzlich kann man zwei verschiedene Ansätze unterscheiden. Zum einen die Echtzeitmessung, beispielsweise über Extractive Electrospray Ionisation (EESI) mit Massenspektrometrie. Dabei wird die Kupferröhre, durch die die Atemluftprobe geleitet wird, auf 80°C erhitzt. Die Ausatemluft wird direkt mit dem Trocknungs-Gas zusammengebracht und gelangt direkt in das Massenspektrometer (Gamez et al., 2011; Berchthold et al., 2013).

Die andere große Gruppe ist die so genannte „Off-Line Analyse“. Hier wird die Probenentnahme separat von der Messung durchgeführt. Eine Möglichkeit ist die Sammlung von Atemluftkondensat. Dabei wird die Ausatemluft durch Kühlfallen geleitet und das Kondensat gesammelt. Gemäß den Richtlinien der American Thoracic Society und der European Respiratory Society ist hierbei auf inerte und auf die zu untersuchende Substanz abgestimmte Materialien zu achten (Mutlu et al.; 2001; Horvath et al., 2005; Steeghs et al., 2007; Berchthold et al., 2013). Darüber hinaus gibt es verschiedene käuflich erwerbbar Probensammelsysteme, die nach diesem Prinzip arbeiten, wie beispielsweise der RTube[®] oder der EcoScreen[®] (Marteus et al., 2005; Liu et al., 2007). Die Sammlung von Atemluft in Containern oder Beuteln mit definierten Volumina eignet sich besonders für quantitative Analysen (Berchthold et al., 2013).

Es gibt zahlreiche Berichte über den Nachweis von Xenobiotika, hauptsächlich illegaler Drogen, durch Adsorption der Aerosoltröpfchen an Matrices. Die Probenentnahme fand dabei in den meisten Fällen mit dem Probenentnahmesystem von SensAbues[®] statt, bei welchem Aerosoltröpfchen mittels eines Partikelfilters aus Polymer aufgefangen werden. In das Mundstück ist eine Speichelfalle eingebaut, welche größere Tröpfchen aus dem Mund-Rachenraum abfangen soll. Die Xenobiotika werden im nächsten Schritt aus den Filtern extrahiert und vermessen (Beck et al., 2012; Beck et al., 2013; Berchthold et al., 2013; Beck et al. 2014).

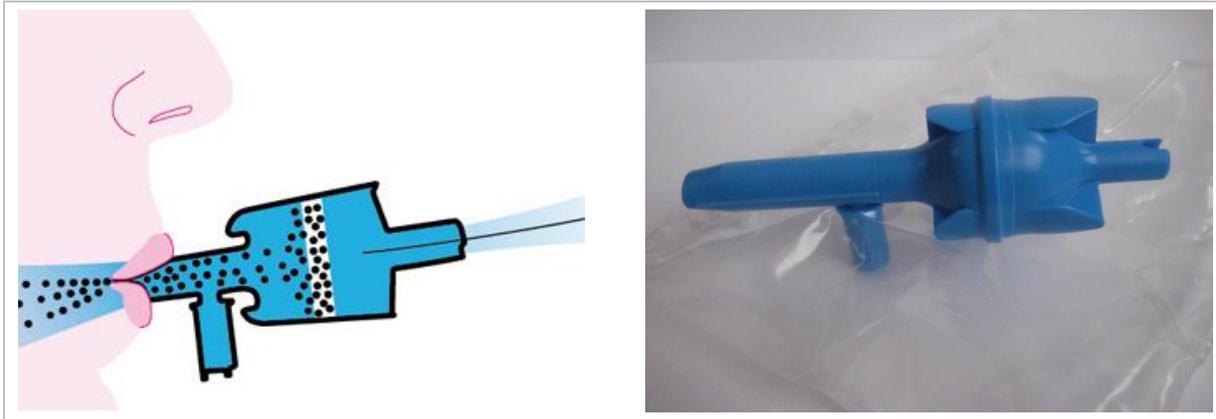


Abbildung 11: SensAbues® Atemluftsammlersystem (aus Beck 2012 mit Erlaubnis des Autors)

Die voraussichtlichen Vorteile dieser Matrix sind:

- Die Matrix ist ständig verfügbar
- Probenentnahme unter Aufsicht ist unproblematisch und je nach Probenentnahmesystem ist auch die Lagerung unproblematisch
- Probenmanipulation ist unwahrscheinlich

Die voraussichtlichen Nachteile dieser Matrix sind:

- Generell sind bei der Bestimmung von Xenobiotika in der Ausatemluft empfindliche Messmethoden notwendig, die regelhaft Massenspektrometrie beinhaltet (Berchthold et al., 2013; Dodig and Cepelak, 2013).
- Kaum Applikationen aus der Literatur vorhanden
- Kontamination der Atemluftproben durch Speichel ist ungeklärt

2 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll es um die Betrachtung von Atemluft und Speichel als alternative Matrizes in der Missbrauchsdiagnostik gehen.

In diesem Zusammenhang soll die genaue Betrachtung eines verhältnismäßig neuen und vielversprechenden Speichelentnahmesystems, des Greiner Bio-One Speichelentnahmesystems, mittels verschiedener Studien Hinweise liefern, inwiefern es zur routinemäßigen Speichelentnahme in unterschiedlichen Settings geeignet ist. Zusätzlich soll ermittelt werden, ob die Bedingungen innerhalb der Proben vergleichbar sind, wie schnell sich die OF/Serum-Ratio (OF/SE-Ratio) einstellt und inwiefern so ein Vergleich unterschiedlicher Speichelentnahmesysteme möglich sein könnte.

Anhand zweier Studien mit gepaarten Speichel- und Serumproben soll nicht nur ein OF/SE-Ratio für zwei Analgetika und verschiedene Psychopharmaka ermittelt werden, sondern auch Hinweise auf den Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf eine eventuelle Nachweisbarkeit dieser Substanzen im Speichel und untersucht werden. Zusätzlich soll erfasst werden, ob diese Speichel/Serum Ratio Rückschlüsse auf die Konzentration der Arzneistoffe im Blut liefern kann, und in welchen Settings der Speichel generell eine denkbare Matrix darstellen könnte. Schließlich soll noch der Einfluss denkbarer Probleme, wie orale Kontamination von Speichel als Matrix in der Missbrauchsdiagnostik beleuchtet werden.

Da eine der Studien auch die Entnahme von Atemluftproben vorgesehen hat, wird nicht nur die generelle Nachweisbarkeit der in die Studie eingeschlossenen Medikamente in der Atemluft geprüft, sondern auch der Vergleich mit den Matrizes Speichel und Serum. Zwei weitere Studien beschäftigen sich nicht nur mit dem Konzentrationsverlauf der Analytkonzentration in der Atemluft über die Zeit, um Hinweise auf die Nachweiszeit der entsprechenden Substanzen im Speichel zu erlangen, sondern auch um den Ursprung der entsprechend gemessenen Analytkonzentrationen.

Letztlich soll aus diesen Daten eine Einschätzung über die sinnvolle Nutzbarkeit dieser Matrizes mit dem entsprechenden Entnahmesystem in der Missbrauchsdiagnostik ermöglicht werden.

3 Studien

3.1 Modellsubstanzen

3.1.1 Grundsätzliche Überlegungen

Wie schon erwähnt wurde, ist es bei der Überprüfung einer Matrix auf ihre Eignung für eine bestimmte Anwendung notwendig, sie mit anderen Matrizes zu vergleichen. Da jede Substanz allerdings andere physikochemische und pharmakologische Eigenschaften aufweist, angefangen mit ihrem pKs-Wert bis hin zu ihrer Darreichungsform, der wirksamen Substanzkonzentration im Blut und der individuellen Metabolisierung, wäre eine solche Einschätzung allerdings für jede Substanz einzeln in Bezug auf die betrachtete Matrix notwendig. Da bei dem Vergleich unterschiedlicher Matrizes immer auf echte Patientenproben zurückgegriffen werden muss, bietet es sich für Studien an, die grundlegende, substanzunabhängige Aussagen treffen sollen, auf Modellsubstanzen zurückzugreifen. Diese Modellsubstanzen sollten in Bezug auf die Matrizes Speichel und Atemluft verschiedene Eigenschaften erfüllen:

- Es sollte sich möglichst um Substanzen handeln, bei denen anhand ihrer Eigenschaften davon ausgegangen werden kann, dass sie aus dem Blut in den Speichel und das Surfactant übergehen können.
- Die Substanzen sollten nicht omnipräsent sein, wie zum Beispiel Koffein oder Nikotin, um Kontaminationen der Proben zu vermeiden und garantieren zu können.
- Die Substanzen sollten ein kalkulierbares Risiko bei der Einnahme haben und rezeptfrei erhältlich sein.
- Gegebenenfalls sollte es sich um eine Substanz handeln, mit der Enzymaktivitäten ermittelt werden können.

3.1.2 Diphenhydramin

Bei Diphenhydramin handelt es sich um einen H₁-Rezeptor-Antagonisten der ersten Generation. Es wird auf Grund seiner sedierenden und antiemetischen Eigenschaften heute hauptsächlich als Schlafmittel oder Antiemetikum eingesetzt. Die Nebenwirkungen belaufen sich auf Müdigkeit, Benommenheit, Mundtrockenheit etc. In Deutschland ist es sowohl als Hydrochlorid-Salz als auch als Chlorthephyllinat-Salz rezeptfrei erhältlich (Herdegen, 2008; Mutschler, 2008; Baselt, 2011). Diphenhydramin ist mit einem pKa-Wert von 8,3 eine schwach basische Substanz, ist zu 82% an Plasmaproteine gebunden und hat eine Halbwertszeit zwischen 3 und

14 Stunden (Baselt, 2011). Diese Eigenschaften machen Diphenhydramin theoretisch zu einer geeigneten Modellsubstanz.

3.1.3 Dextromethorphan

Bei Dextromethorphan handelt es sich um ein synthetisches Opioid, welches als nicht verschreibungspflichtiges Antitussivum in Deutschland zugelassen ist. Es bindet in therapeutischer Dosis nicht an die Opioidrezeptoren und blockiert den NMDA-Rezeptor nicht-kompetitiv (Herdegen, 2008; Mutschler, 2008). Die Nebenwirkungen belaufen sich unter anderem auf Müdigkeit, Benommenheit und Magendarm-Beschwerden.

Dextromethorphan wird über das CYP2D6 Enzym zu seinem aktiven Metaboliten Dextrorphan metabolisiert und wird unter anderem zur Ermittlung CYP2D6 Enzymaktivität genutzt. Die metabolische Ratio von Dextromethorphan und Dextrorphan gilt hier als Indikator für den metabolischen Phänotypen des CYP2D6. Ein Dextromethorphan/Dextrorphan Verhältnis von $> 0,3$ gilt hier als Grenze des normalen metabolischen Status („extensive metabolizer“). Ein erhöhtes Verhältnis liefert Hinweise auf einen „intermediate metabolizer“, also eine Person mit verminderter CYP2D6 Aktivität oder einen „Poor Metabolizer“, bei dem die Enzymaktivität sehr niedrig oder gar nicht vorhanden ist. (Kazis et al. 1996; Chlãdek et al., 2000; Chou et al., 2003; Baselt, 2011), so dass hohe Konzentrationen der Muttersubstanz und geringe Metabolit Konzentrationen zu erwarten sind. Die letzte Gruppe ist die der „Ultra Rapid Metabolizer“, bei denen eine Überexpression des Enzyms zu einer sehr schnellen Verstoffwechslung des jeweiligen Substrats führt (Chou et al., 2000), so dass hohe Konzentrationen des Metaboliten und geringe Konzentrationen der Muttersubstanz zu erwarten sind.

3.2 Sonstige Substanzen

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit relevanten Substanzen aufgeführt, nach ihrer Indikation sortiert, mit den im weiteren Verlauf dieser Arbeit wichtigsten chemischen, pharmakokinetischen und sonstigen Parametern (Baselt, 2011; Rampono et al.; 2000).

Tabelle 2: Chemische und pharmakokinetische Parameter der Antipsychotika

Substanz	PPB [%]	pKs	t _{1/2} [h]	therapeutischer Bereich
Aripiprazol	99	7,6	60 – 90	150 – 500 ng/mL
Pipamperon	n.bek.	8,0	12 – 30	100 – 400 ng/ml
Promethazin	93	9,1	10 – 20	50 – 400 ng/mL
Quetiapin	83	3,3/6,8	2,7 – 9,3	100 – 500 ng/mL

Tabelle 3: Chemische und pharmakokinetische Parameter der Analgetika (* Metabolit)

Substanz	PPB [%]	pKs	t _{1/2} [h]	therapeutischer Bereich
Hydromorphon	< 20	8,2	3 – 9	5 – 15 ng/mL
Tramadol	< 20	9,4	4,3 – 6,7	100 – 1000 ng/mL
O-Desmethyltramadol*	n.bek.	n.bek.	6,3 – 9,5	n.bek.

Tabelle 4: Chemische und pharmakokinetische Parameter der Antiepileptika

Substanz	PPB [%]	pKs	t _{1/2} [h]	therapeutischer Bereich
Pregabalin	0	4,2/10,6	5 - 11	2 – 5 µg/mL

Tabelle 5: Chemische und pharmakokinetische Parameter der Antidepressiva (*Metabolit)

Substanz	PPB [%]	pKs	t _{1/2} [h]	therapeutischer Bereich
Citalopram	50 – 80	9,5	25 – 40	50 – 110 ng/mL
N-Desmethylocitalopram*	68	n.bek.	n.bek.	-
Escitalopram	50 – 80	9,5	18 – 40	15 – 80 ng/mL
(S)-N-Desmethylocitalopram*	n.bek.	n.bek.	n.bek.	-
Duloxetin	>90	9,6	8 – 17	30 – 120 ng/mL
Mirtazapin	85	7,1	20 – 40	30 – 80 ng/mL
Venlafaxin	27	9,4	3 – 7	Summe mit Metabolit 100 – 400 ng/mL
O-Desmethylvenlafaxin*	30	n.bek.	n.bek.	

3.3 Perianalytische Parameter im Speichel

3.3.1 Referenzbereiche für das Greiner Bio-One Speichelsammelsystem

Die Perianalytik ist ein in der Speichelanalytik notwendiger Bestandteil der Gesamtanalytik.

Als perianalytische Parameter gelten im Falle des Speichels:

- der Speichelanteil
- die Konzentration der α -Amylase (Authentizitätsmarker)
- die Konzentration des Cortisols (Authentizitätsmarker)

Da es sich bei dem Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem um ein neues System handelt, ist die Festlegung von Referenzbereichen für diese Parameter erforderlich, nicht zuletzt um eine Probenmanipulation, ob beabsichtigt, zur Verschleierung eines nicht erlaubten Substanzkonsums, oder unbeabsichtigt, durch z. B. fehlerhafte Probengewinnung, erkennen zu können.

Studienablauf:

Um diese Referenzbereiche bestimmen zu können, wurden die Werte aller Routineproben aus sechs Monaten eines Labors herangezogen, insgesamt also 22 520 Proben. Von diesen 22 520 Proben stammen 15 855 Proben von 3 339 Männern und 6 446 Proben von 1 241 Frauen. Bei 219 Proben fanden sich keine Angaben über das Geschlecht. Gemäß der Natur des Probenpools und der hohen Anzahl der Proben kam lediglich eine Probenauswahl „a posteriori“, also eine retrospektive Auswahl, in Betracht. Ansonsten wurden keine weiteren Selektionsparameter festgelegt. Ausgeschlossen wurden parameterspezifisch nur solche Proben, die keine Angabe über den jeweiligen Parameter enthielten.

In der klinischen Chemie und der Hämatologie ist es üblich, das 95% Intervall als Referenzbereich zu nehmen, also den Bereich, in dem 95% der Messergebnisse der Referenzgruppe liegen. Bestimmt wird dieser üblicherweise über die 2,5% und die 97,5% Perzentilen. Voraussetzung ist hier eine Verteilung die annähernd einer Normalverteilung entspricht. Liegt diese nicht vor, können verschiedene mathematische Möglichkeiten genutzt werden, wie etwa eine Logarithmierung, um eine Normalverteilung zu erreichen. Im Anschluss werden die Grenzwerte bestimmt, die Daten zurück transformiert und die entsprechenden Referenzwerte genutzt (IFCC Part 5, 1987; IFCC Part 6, 1987; Greffe et al., 2009; IUPAC 1997).

3.3.2 pH-Wert während des Sammelvorgangs und der Lagerung

Der Übergang von Substanzen aus dem Blut in den Speichel ist unter anderem abhängig vom pH-Wert des Speichels. Um trotz der Anregung des Speichelflusses ein saures Milieu (im Speichel/SES-Gemisch) während des Speichelsammelvorgangs zu erhalten und es über einen ausreichenden Lagerungszeitraum zu garantieren, enthält die Saliva Extraction Solution einen Zitratpuffer mit dem pH-Wert 4,2. Ob dieses Kriterium erfüllt werden konnte, wurde anhand von Routineproben überprüft.

Studienablauf:

Über einen Zeitraum von drei Monaten wurden 122 Speichelsammelbecher von Laboreinsendern, die zusätzlich zu den Speicheltransferröhrchen auch Speichelsammelbecher ins Labor zur Analyse geschickt hatten, gesammelt und noch am selben Tag wurde der pH-Wert des Speichel/SES-Gemisches im Becher gemessen. Der Speichelsammelbecher enthält im Gegensatz zu den Speicheltransferröhrchen keine Bakterizide oder sonstige Zusätze und spiegelt daher den pH-Wert während des Sammelvorgangs im Mund wider. Darüber hinaus wurden 536 Speicheltransferröhrchen aus der täglichen Labor-Routine (zufällig ausgewählte Patientenproben auf ihren pH-Wert, das Volumen und den Speichelanteil hin untersucht. Der pH-Wert wurde mit pH-Teststreifen gemessen (s. Material und Methoden), da das Volumen für eine Vermessung pH-Wertbestimmung mit dem pH-Meter nicht ausreichte.

3.4 Vergleichbarkeit unterschiedlicher Sammelsysteme

Das Greiner Bio-One Speichelsammelsystem setzt insgesamt auf ein neues Konzept in der Speichelprobenentnahme. Um seine Eignung für den Routineeinsatz sowie die folgenden Studien aufzuzeigen, muss die Vergleichbarkeit zu anderen, bereits etablierten Speichelentnahmesystemen festgestellt werden. Ein solcher Vergleich findet am besten „in vivo“, sprich im selben Patienten zum selben Zeitpunkt statt. Für die Durchführung muss zuvor jedoch ermittelt werden, ob eine konsekutive Probenentnahme aus dem Speichel möglich ist, ohne dass die Analytkonzentration maßgeblich beeinflusst wird. Weiterhin wird so die valide Möglichkeit einer zweiten Speichelprobenentnahme geschaffen, sollte ein Patient die Speichlextraktionslösung versehentlich oder absichtlich herunterschlucken oder ausspucken. Gegenübergestellt werden im zweiten Schritt das Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem und das Quantisal® Speichelentnahmesystem. Auf diese Art und Weise kann nicht nur die Vergleichbarkeit zwischen zwei, auf vollkommen verschiedenen Prinzipien beruhenden, Speichelsammelsystemen gezeigt

werden, sondern auch die Möglichkeit des Greiner Bio-One Speichelsammelsystems, die durch die Anregung des Speichelflusses postulierten Verdünnungseffekte auszugleichen.

Studienablauf:

Als Modellsubstanz wurde Diphenhydramin verwendet.

Teilnehmer dieser Studie waren acht gesunde Freiwillige, vier Männer und vier Frauen zwischen 23 und 29 Jahren. In einem Gespräch mit jedem Teilnehmer wurden sowohl Kontraindikationen für die Einnahme von Diphenhydramin als auch potenzielle Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ausgeschlossen. Die Probenentnahme wurde von den Teilnehmern eigenständig durchgeführt.

Die Teilnehmer wurden in zwei Gruppen zu je vier Individuen eingeteilt. Beide Gruppen nahmen eine nicht überzogene Tablette mit 50 mg Diphenhydraminhydrochlorid ein. Gruppe A entnahm nach 12 Stunden unmittelbar hintereinander drei Speichelproben mit dem Quantisal® Speichelentnahmesystem innerhalb von maximal 30 Minuten. Gruppe B nutzte statt des Quantisal® Speichelentnahmesystems das Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem. Vierzehn Stunden nach Tabletteneinnahme entnahm Gruppe A eine Speichelprobe mit dem Greiner Bio-One System und direkt im Anschluss eine weitere Speichelprobe mit dem Quantisal® Speichelentnahmesystem. Gruppe B entnahm ebenfalls zwei Proben mit je einem Speichelentnahmesystem, jedoch in umgekehrter Reihenfolge (Abbildung 12).

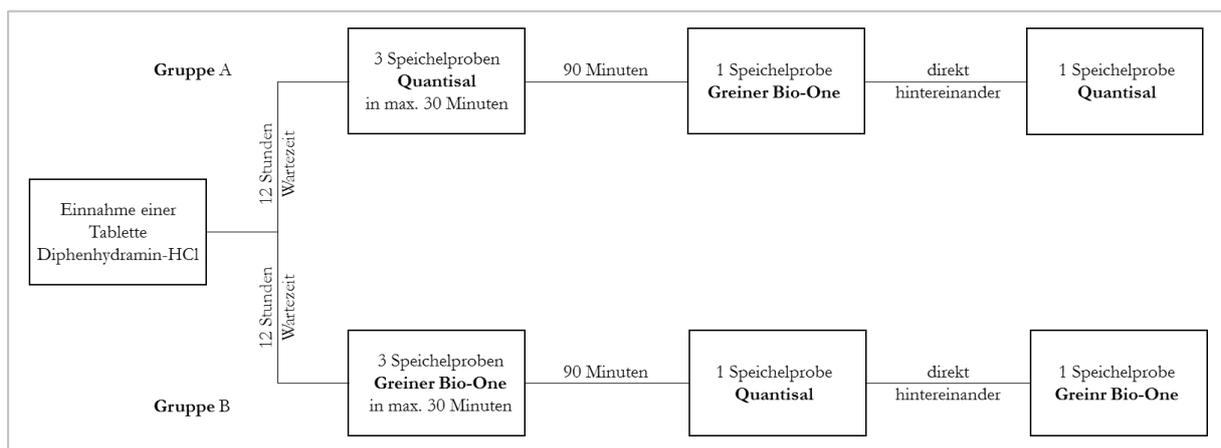


Abbildung 12: Studienablauf "Eignung des Speichelsammelsystems"

3.5 Oral Fluid/Serum-Ratio

3.5.1 Analgetika

Diese Studie diente der Ermittlung der Speichel/Serum-Ratio von Hydromorphon und Tramadol. Sie fand in Zusammenarbeit mit der Christian-Doppler-Klinik und der Rechtsmedizin Salzburg statt und schloss 50 der in der Christian-Doppler-Klinik behandelten Patienten ein. 34 dieser Patienten waren Männer zwischen 28 und 83 Jahren (Durchschnittsalter: 56,2 Jahre) und 16 Frauen zwischen 32 und 79 Jahren (Durchschnittsalter: 53,7). 37 Patienten wurden mit Hydromorphon behandelt, 13 mit Tramadol und zwei Patienten mit beiden Medikamenten.

Tabelle 6: Dosierungsschema "Analgetika in Serum und Speichel"

Medikamenteneinnahme	Hydromorphon (Anzahl Patienten)	Tramadol (Anzahl Patienten)	Dosierung [mg] Hydromorphon	Dosierung [mg] Tramadol
Morgens/abends	24	7	2 – 16	100 – 300
Morgens	14	2	2 – 16	100
Abends	1	-	2 – 8	-
Keine Angabe	-	4	-	-

Je nach Medikationsplan fand morgens und abends, nur morgens oder nur abends eine Medikamenteneinnahme statt. Bei vier Patienten die Tramadol erhielten, war der Zeitpunkt der Einnahme nicht bekannt. Die tägliche Dosis Hydromorphon lag zwischen 2 und 16 mg, bei dem verordneten Medikament handelte es sich um Hydral[®] retard. Im Falle eines akuten Schmerzzustandes wurde zusätzlich zur Standardmedikation schnell freisetzendes Hydral[®] verabreicht. Die tägliche Dosis Tramadol lag zwischen 100 und 300 mg, das verordnete Medikament ist nicht bekannt.

Insgesamt wurden 78 gepaarte Serum- und Speichelproben aus zwei Entnahmezyklen gewonnen. Die erste Medikamentendosis wurde morgens zwischen 6:30 Uhr und 9:00 Uhr verabreicht, zwischen 11:35 Uhr und 13:55 Uhr fand die erste Probenentnahme statt. Die zweite Probenentnahme wurde zwischen 18:00 Uhr und 19:08 Uhr durchgeführt, vor der zweiten Dosis des entsprechenden Medikaments. Verantwortlich für die Entnahme der Proben war ortsansässiges Personal. Die Proben wurden in das kooperierende Labor gesandt und von einem Mitarbeiter vermessen. Die Auswertung und Aufbereitung der Daten wurde von der Autorin durchgeführt. Für diese Studie lag ein bewilligter Ethikantrag der Ethikkommission der Universität in Salzburg vor.

3.5.2 Psychopharmaka

Diese Studie beschäftigt sich mit der Untersuchung der Nachweisbarkeit verschiedener Psychopharmaka in der Atemluft und der Ermittlung eine Speichel/Serum-Ratio. Eingeschlossen waren Patienten der Fachklinik Katzenelnbogen, die mit mindestens einem der folgenden Medikamente behandelt wurden: Aripiprazol, Citalopram, Duloxetin, Escitalopram, Mirtazapin, Pipamperon, Pregabalin, Promethazin, Quetiapin und Venlafaxin. Citalopram und Escitalopram wurden getrennt betrachtet, da es Hinweise auf Unterschiede in Metabolismus und Clearance gibt (von Moltke et al., 2001; Burke et al., 2002).

Insgesamt nahmen 96 Patienten an der Studie teil, davon waren 37 Männer zwischen 21 und 76 Jahren (Durchschnittsalter: 50,4 Jahre) und 59 Frauen zwischen 22 und 81 Jahren (Durchschnittsalter: 48,9 Jahre).

100 gepaarte Proben aus Atemluft, Speichel und Serum wurden abgenommen. Bei vier Patienten wurde ein zweiter Probenentnahmezyklus an einem anderen Tag durchgeführt. 46 Patienten erhielten eines (12 davon ohne Beimedikation), 34 Patienten erhielten zwei, 11 Patienten drei und ein Patient vier der in der Studie eingeschlossenen Medikamente.

Tabelle 7: Patientendaten "Psychopharmaka in Atemluft, Serum und Speichel"

Medikament	Proben	Patienten	Männer	Alter (m)	Frauen	Alter (f)
Aripiprazol	10	10	4	23 – 65	6	23 – 76
Citalopram	12	12	2	44, 64	10	27 – 56
Duloxetin	11	11	1	48	10	43 – 81
Escitalopram	27	26	12	21 – 60	14	33 – 65
Mirtazapin	17	16	8	31 – 76	8	44 – 76
Pipamperon	11	11	2	49, 58	9	22 – 69
Pregabalin	9	9	5	46 – 58	4	27 – 69
Promethazin	7	7	3	47 – 74	4	49 – 64
Quetiapin	20	19	7	35 – 62	12	22 – 81
Venlafaxin	43	40	19	23 – 76	21	22 – 76

Bei vier Patienten fand eine zweite Probenentnahme statt. Bei dreien der vier Patienten änderte sich der Medikationsplan. Patient Nr. 17 wurde zum Zeitpunkt beider Probenentnahmen mit Escitalopram und Quetiapin behandelt. Patient Nr. 24 wurde zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme mit Mirtazapin und Venlafaxin behandelt, zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme jedoch zusätzlich mit Aripiprazol. Patient Nr. 42 wurde zum Zeitpunkt der ersten

Probenentnahme mit Venlafaxin behandelt, zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme jedoch zusätzlich mit Aripiprazol und Patient Nr. 43 wurde bei der ersten Probenentnahme ebenfalls mit Venlafaxin behandelt, zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme jedoch zusätzlich mit Aripiprazol und Pipamperon.

Die Probenentnahme fand in der Regel morgens vor der ersten Tabletteneinnahme durch die ortsansässigen Stationsschwestern statt. Die Patienten verwalteten ihre Medikamente selbstständig, eine kontrollierte Medikamentenausgabe fand nicht statt. Für diese Studie lag ein bewilligter Ethikantrag der Ethikkommission der Universität Mainz vor.

3.5.3 Orale Kontamination

Verschiedenste Gründe können zu einer Kontamination des Speichels mit unterschiedlichen Substanzen führen. Sie reichen von einer absichtlichen Kontamination des Speichels zur Verschleierung einer mangelnden Compliance, über Medikamentenreste eines kürzlich eingenommenen Medikamentes, bis hin zu einer unbeabsichtigten Kontamination der Mundhöhle durch Passivrauchen (z. B. THC) oder dem Küssen einer exponierten Person.

Solche Kontaminationen der Mundhöhle stellen je nach Fragestellung ein großes Problem dar und können zu „falsch positiven“ oder solchen Analyseergebnissen führen, aus denen falsche Rückschlüsse auf die Blutkonzentration gezogen würden. Die sich daraus ergebenden Interpretationsschwierigkeiten erleichtern es Patienten, ein solches Szenario als Erklärung für ein positives Testergebnis heranziehen und damit einen eigenen Konsum abzustreiten.

Diese Studie soll nun eine Einschätzung über das Ausmaß des Einflusses von oraler Kontamination auf die Analysenergebnisse erlauben, unter anderem mit dem Ziel eine Empfehlung aussprechen zu können, wie die Wahrscheinlichkeit einer Verfälschung durch orale Kontamination minimiert werden kann.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Studie eine starke orale Kontamination mit Medikamentenresten simuliert und beobachtet, wie sich die Konzentration im Speichel über die Zeit veränderte. Darüber hinaus sollte der Einfluss des Trinkens von 250 Milliliter Wasser auf die Speichelkonzentration des Medikamentes beobachtet werden. Dieses Flüssigkeitsvolumen wurde als zumutbares Volumen angesehen, das theoretisch vor einer Speichelprobenentnahme getrunken werden könnte, um eventuelle Kontaminationsrückstände aus dem Mund zu spülen.

Teilnehmer dieser Studie waren 20 gesunde Freiwillige, zwölf Männer und acht Frauen zwischen 23 und 37 Jahren. In einem Gespräch mit jedem Teilnehmer wurden sowohl

Kontraindikationen für die Einnahme von Diphenhydramin als auch potenzielle Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ausgeschlossen. Die Speichelprobenentnahme mit dem Greiner Bio-One Speichelsammelsystem wurde von den Teilnehmern eigenständig durchgeführt.

Studienablauf:

Die Studienteilnehmer wurden zufällig in vier verschiedenen Gruppen (Gruppe A – Gruppe D) eingeteilt. Jeder Studienteilnehmer legte eine nicht überzogene Tablette mit 50 mg Diphenhydramin-Hydrochlorid auf die Zunge und spuckte sie nach fünf Sekunden wieder aus. Unmittelbar im Anschluss wurde eine Speichelprobe entnommen, die sogenannte „Time Zero“-Probe (T0 Probe). Anschließend folgte eine Speichelprobenentnahme in einem stündlichen Intervall. Jede Gruppe beendete die Studie nach einer festgelegten Anzahl von Probenentnahmeintervallen.

- Gruppe A: nach einem Probenentnahmeintervall
- Gruppe B: nach zwei Probenentnahmeintervallen
- Gruppe C: nach drei Probenentnahmeintervallen
- Gruppe D: nach acht Probenentnahmeintervallen

Gruppe A bis C tranken unmittelbar nach Beendigung der Probenentnahme ihres letzten Probenentnahmeintervalls 250 Milliliter Wasser und entnahmen danach eine finale Speichelprobe (Abbildung. 13).

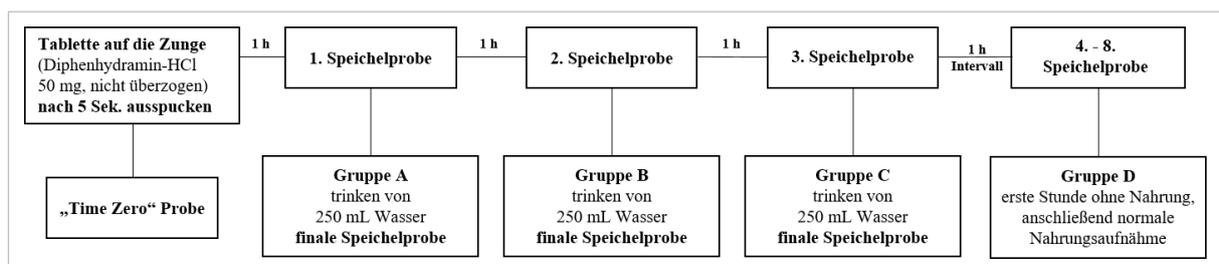


Abbildung 13: Studienablauf "Orale Kontamination"

Nahrungsaufnahme war für Gruppe A bis C während der Dauer der Studie untersagt. Die Teilnehmer aus Gruppe D konnten nach dem ersten Probenentnahmeintervall wieder normal Essen und Trinken, mit Angabe des Zeitpunktes, wann eine Nahrungs- oder Getränkeaufnahme stattfand.

3.6 Nachweis von Substanzen aus der Ausatemluft

3.6.1 Diphenhydramin-„Kinetik“: Vergleich von Atemluft, Speichel und Kapillarovollblut

Die Substanzkonzentration in den Matrizes Atemluft (Surfactant) und Speichel stehen unabhängig voneinander mit der Substanzkonzentration im Blut im Gleichgewicht. Idealerweise wird ein Arzneistoff über den Gastrointestinaltrakt ins Blut aufgenommen und geht von dort in den Speichel und das Surfactant über. Das Blut bildet in diesem Fall also die Ausgangsmatrix.

Um einen Überblick zu bekommen, wie sich die Substanzkonzentrationen in allen drei Matrizes über einen bestimmten Zeitraum hinweg verhalten, wurde diese Studie durchgeführt. Darüber hinaus gibt sie damit möglicherweise auch einen Hinweis auf den Ursprung nachweisbarer Substanzkonzentrationen auf den Atemluftfiltern, da der bloße Nachweis einer Substanz auf den Atemluftfiltern allein nicht ausreichend ist, um auf die Anwesenheit jener Substanz im Surfactant schließen und eine Kontamination der Atemluftfilter durch Speichel ausschließen zu können.

Teilnehmer dieser Studie waren 8 gesunde Freiwillige, 5 Männer und 3 Frauen zwischen 22 und 29 Jahren. In einem Gespräch mit jedem Teilnehmer wurden sowohl Kontraindikationen für die Einnahme von Diphenhydramin als auch potenzielle Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ausgeschlossen. Die Probenentnahme aller drei Matrizes wurde von den Teilnehmern eigenständig durchgeführt.

Probenentnahmesysteme:

Atemluft: SensAbues®
Speichel: Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem
Kapillarovollblut: Sarstedt Kapillarblutentnahmesystem

Studienablauf:

Alle Studienteilnehmer entnahmen vor Beginn der eigentlichen Studie eine Nullprobe aller drei Matrizes. Es folgte die Einnahme einer nicht überzogenen Tablette mit 50 mg Diphenhydramin-Hydrochlorid. Im direkten Anschluss wurde eine Probe aller drei Matrizes entnommen. Danach wurden Mund und Lippen eine Minute mit Wasser gespülte und eine Atemluftprobe sowie eine Speichelprobe entnommen. Es folgte die Probenentnahme von Atemluft, Speichel und Kapillarovollblut nach einer, zwei, vier, acht, zwölf, sechzehn, 24, 32, 40, 48 und 56 Stunden.

Datum und Uhrzeit jeder Probenentnahme wurden festgehalten und Abweichungen vom Zeitplan notiert. Innerhalb der ersten Stunde nach Tabletteneinnahme wurde weder gegessen noch getrunken.

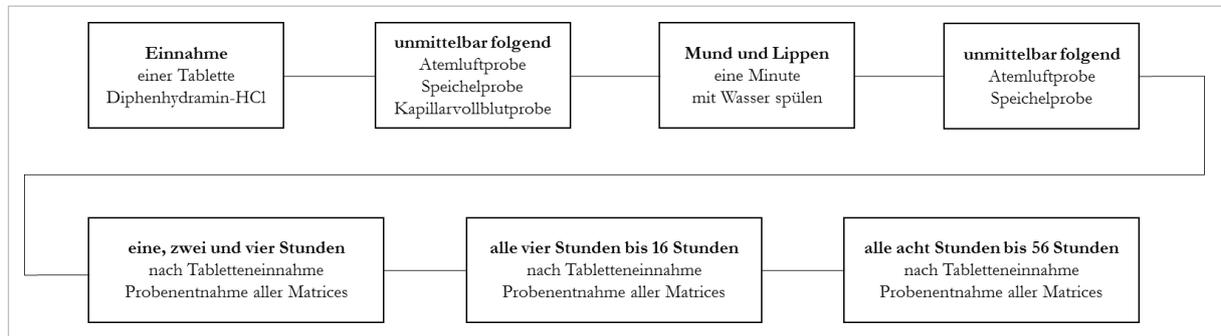


Abbildung 14: Studienablauf "Diphenhydramin-Kinetik"

3.6.2 Dextromethorphan-, „Kinetik“: Vergleich von Atemluft, Speichel und Kapillarovollblut

Mit dieser Studie ließ sich der Ursprung von Substanzen auf den Atemluftfiltern genauer beleuchten. Der Arzneistoff wurde in zwei unterschiedlichen Darreichungsformen verabreicht, nämlich einer Lutschpastille, die den Mundraum mit Arzneistoff kontaminiert und Kapseln, die den Wirkstoff nicht im Mundraum freisetzen sollten. Auf diese Art und Weise konnten Vergleiche zwischen der Anwesenheit von Dextromethorphan auf den Atemluftfiltern gezogen werden. Darüber hinaus wurde das Dextrophan, also der aktive Metabolit des Dextromethorphans, in die Analytik mit einbezogen.

Ziel dieser Studie war es, Hinweise zu erhalten, wieviel des auf den Atemluftfiltern nachgewiesenen Medikamentes tatsächlich aus dem Surfactant und wieviel gegebenenfalls aus dem Speichel stammte.

Die Einbeziehung von Dextrophan in die Analytik, liefert nicht nur ein genaueres Bild über den Einfluss von oraler Kontamination auf die Analytkonzentration auf den Atemluftfiltern zu, sondern darüber hinaus auch eine Bestimmung des Verhältnisses von Dextromethorphan und Dextrophan und damit eine Phänotypisierung der Enzymaktivität von CYP2D6 aus den Matrices Speichel, Kapillarovollblut und gegebenenfalls sogar Atemluft.

Probenentnahmesysteme:

Atemluft: SensAbues®

Speichel: Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem

Kapillarovollblut: Sarstedt Kapillarblutentnahmesystem

Studienablauf:

Die Studienteilnehmer wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, Gruppe A und Gruppe B. Gruppe A nahm zu Beginn des Experimentes eine Kapsel mit 30 Milligramm Dextromethorphan-Hydrobromid ein. Gruppe B schluckte statt einer Kapsel drei Lutschpastillen mit jeweils 10,5 Milligramm Dextromethorphan-Hydrobromid (insgesamt 31,5 Milligramm) innerhalb von 30 Sekunden. Die Teilnehmer beider Gruppen entnahmen direkt im Anschluss eine Probe aller drei Matrices. Weitere Probenentnahmen fanden 0,5 Stunden, eine Stunde, zwei Stunden, und vier Stunden nach der Medikamenteneinnahme statt. Acht Stunden nach der Medikamenteneinnahme legten sich die Teilnehmer beider Gruppen eine nicht überzogene Tablette Diphenhydramin-Hydrochlorid auf die Zunge, spuckten diese nach zwei Sekunden wieder aus und entnahmen wieder Proben aller drei Matrices. 12, 24 und 36 Stunden nach der Medikamenteneinnahme fanden erneut Probenentnahmen aller drei Matrices statt.

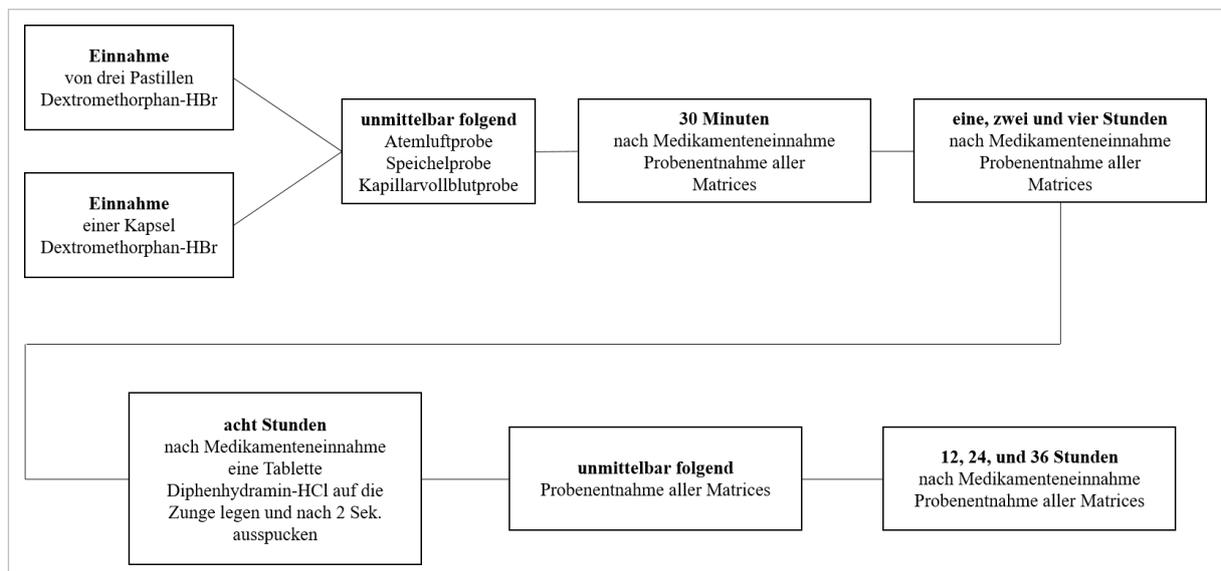


Abbildung 15: Studienablauf "Dextromethorphan-Kinetik"

3.7 Zusammenfassung der Studien

Tabelle 8: Durchgeführte Studien

Kurzbezeichnung der Studie	Matrizes (Entnahmesystem)	Ziel	
Referenzbereiche	Speichel (Greiner Bio-One)	Ermittlung von Referenzbereichen für Perianalytische Parameter	Routine-Proben
pH-Wert-Ermittlung	Speichel (Greiner Bio-One)	Überprüfung des pH-Wertes in den Röhrchen und Bechern zur Abklärung der präanalytischen Bedingungen	Routine-Proben
Vergleichbarkeit unterschiedlicher Speichelentnahmesysteme	Speichel (Greiner Bio-One) Speichel (Quantisal®)	Überprüfung der Vergleichbarkeit verschiedener Speichelentnahmesysteme	eigene Studie mit Freiwilligen
OF/SE-Ratio Analgetika	Speichel (Greiner Bio-One) Serum	Ermittlung des OF/SE-Ratios für Hydromorphon und Tramadol	Klinische Studie mit Ethikantrag
OF/SE-Ratio Psychopharmaka + Atemluftproben	Speichel (Greiner Bio-One), SensAbues® Atemluftsammlsystem, Serum	Ermittlung des OF/SE-Ratios für Psychopharmaka und Überprüfung der Nachweisbarkeit in der Atemluft	Klinische Studie mit Ethikantrag
Orale Kontamination	Speichel (Greiner Bio-One)	Ermittlung des potenziellen Einflusses oraler Kontamination auf die Analytik von Speichelproben	eigene Studie mit Freiwilligen
Diphenhydramin-, „Kinetik“	Speichel (Greiner Bio-One), SensAbues® Atemluftsammlsystem, Sarstedt Minivette POCT	Konzentrationsverlauf des Analyten über die Zeit in verschiedenen Matrizes, Kontamination der Atemluftfilter	eigene Studie mit Freiwilligen
Dextromethorphan-, „Kinetik“	Speichel (Greiner Bio-One), SensAbues® Atemluftsammlsystem, Sarstedt Minivette POCT	Konzentrationsverlauf des Analyten über die Zeit in verschiedenen Matrizes, Kontamination der Atemluftfilter	eigene Studie mit Freiwilligen

4 Material und Methoden

4.1 Bestimmung von Amylase- und Speichelkonzentration

4.1.1 Amylase

Die Bestimmung der α -Amylasekonzentration erfolgt indirekt über die Ermittlung der α -Amylase Enzymaktivität und dient als Authentizitätsmarker für Speichel.

Hierfür wird die zuvor gevortexte und zentrifugierte Speichelprobe ohne weitere Behandlung auf das klinisch-chemische Analysegerät (Olympus AU 680) gestellt. Im Gerät findet automatisch eine 1:100 Verdünnung der Probe mit 0,9 % NaCl-Lösung statt. Mittels des α -Amylase OSR6182 – Bestimmungskits wird schließlich die α -Amylaseaktivität über die photometrische Vermessung des durch enzymatisch katalysierte Reaktionen freiwerdenden para-Nitrophenols bei 420 nm bestimmt.

4.1.2 Speichelanteil

Die Bestimmung des Speichelanteils fand mit dem Olympus AU680 und dem Speichelquantifizierungskit der Firma Greiner Bio-One statt. Über den Lebensmittelfarbstoff Tartrazin, welcher in der Speichel-Extraktionslösung enthalten ist, kann über die photometrische Messung der Extinktion bei 450 nm die Verdünnung des Tartrazins ermittelt werden. Über eine zuvor durchgeführte 5-Punkt-Kalibration kann der Speichelanteil ermittelt werden. Der Kalibrationsbereich erstreckt sich über 20 bis 80 % Speichelanteil.

4.2 Bestimmung von Cortisol

Die Bestimmung des Cortisols im Speichel fand im Rahmen der Routineanalytik statt (Cutoff 0,1 ng/ml).

Probenaufarbeitung: Speichel

Interner Standard: Cortisol-(C¹³)₃ mit 0,1 ng/ml in Methanol

100 μ l Speichel/SES-Gemisch wurden in einem 1 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 10 μ l Interner Standard hinzugegeben und gevortext. Anschließend wurden eventuell vorhandene Proteine mit 50 ml Sulfosalicylsäure (20%) und 600 μ l Acetonitril gefällt. 100 μ l Ammoniumacetat (10 mol/l) wurden hinzugegeben, gevortext und 5 Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert. In einem 1 ml Glaseinsatz wurden 10 ml Ethylenglycol vorgelegt und 550 μ l des organischen

Überstandes in den Glaseinsatz überführt, dies wurde bei 45° C unter Stickstoffstrom eingedampft und mit 80 µl Wasser und 10 µl Methanol wiederaufgenommen, erneut gevortext und dann vermessen.

UPLC-MS/MS

UPLC-System:

Sample Organizer Acquity UPLC, Waters
 Sample Manager Acquity UPLC I-Class FTN, Waters
 Column Manager Acquity UPLC CM-A, Waters
 Column Manager Aux Acquity UPLC, Waters
 Binary Solvent Manager Acquity UPLC I-Class BSM, Waters

Massenspektrometer: Xevo TQ-S, Waters

Software: MassLynx 4.1
 TargetLynx Application Manager Version 4.1

Mobile Phase A: Ammoniumformeat 20 mmolar + 0,028 mol Ameisensäure

Mobile Phase B: Methanol + 0,028 mol Ameisensäure

Fluss: 0,5 ml pro Minute

Säule: ACQUITY UPLC BEH-Phenyl 1,7 µm 2,1 x 150 mm

Säulenofentemperatur: 40°C

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	85	15
3,0	45	55
4,0	45	55
5,0	0	100
6,0	0	100

Nach jeder Probeninjektion findet eine „Blank“-Injektion statt, welche die Säule reäquilibriert.

Blank:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	85	15
0,5	85	15

MS – Bedingungen:

Kapillarspannung:	1 kV
Desolvation Gas:	1000 l/Stunde, 650°C
Gone Gas (Stickstoff):	150 l/Stunde
Kollisions Gas (Argon):	0,15 ml/Minute
Ionisationsmodus:	Elektronenspray Ionisation, positiver Modus

Massenübergänge (MRM):

Cortisol:	363,1 > 121,1 (Quantifier); 363,1 > 327,1; 363,1 > 105,1
Cortisol-(C ¹³) ₃ :	366,1 > 124,1(Quantifier); 366,1 > 330,1

4.3 Bestimmung von Tramadol

Die Bestimmung des Tramadols fand im Rahmen der Routineanalytik mit der voll validierten Routinemethode statt.

Probenaufarbeitung: Serum und Speichel

Interner Standard:	Tramadol-C ₁₃ -D ₃ und O-Desmethyltramadol-D ₆ je 50 ng/mL in Methanol
Verdünnungslösung:	Ammoniumformeat 20 mmol + 0,028 mol Ameisensäure

100 µl Probe wurden mit 20 µl Internem Standard versetzt. Im Anschluss wurden 150 µl Acetonitril hinzugegeben, eine Minute gevortext und schließlich 50 µl Ammoniumacetatlösung (10 mol/l) hinzugefügt und erneut eine Minute gevortext. Die Proben wurden danach für fünf Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert, die gesamte organische Phase abgenommen, in einen 1 ml Glaseinsatz überführt und bei 45° C unter sachtem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Vor dem Messen wurde die Probe mit 50 µl Methanol wiederaufgenommen und mit 450 µl Verdünnungslösung verdünnt.

UPLC-MS/MS

UPLC-System:

Sample Organizer	Acquity Ultra performance LC, Waters
Sample Manager	Acquity Ultra performance LC, Waters
Column Manager	Acquity Ultra performance LC, Waters
Binary Solvent Manager	Acquity Ultra performance LC, Waters

Massenspektrometer: Xevo TQ-MS, Waters

Software: MassLynx 4.1
TargetLynx Application Manager Version 4.1

Mobile Phase A: Ammoniumformeat 20 mmolar + 0,028 mol Ameisensäure

Mobile Phase B: Methanol + 0,028 mol Ameisensäure

Fluss: 0,35 mL pro Minute

Säule: ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 µm 2,1 x 150 mm)

Säulenofentemperatur: 40°C

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	95	5
0,5	95	5
3,5	60	40
5,0	60	40
7,5	10	90
8,5	10	90
8,51	95	5
9,0	95	5

4.4 Bestimmung von Hydromorphon

Die Bestimmung des Hydromorphons fand im Rahmen der Routineanalytik statt.

Probenaufarbeitung: Serum und Speichel

Interner Standard: Hydromorphon-d3, 50 ng/mL in Methanol

Fällungsreagenz: 0,4 molare ZnSO₄-Lösung

Verdünnungslösung: Ammoniumformiat 5 mmol/Methanol (70:30, v/v)
+ 0,028 mol Ameisensäure

100 µl Probe wurden mit 20 µl Internem Standard versetzt, mit 180 µl Fällungsreagenz gefällt und eine Minute auf dem Schüttelmixer gemischt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden mit 130 µl Verdünnungslösung verdünnt und anschließend mit der UPLC-MS/MS vermessen.

UPLC-MS/MS

UPLC-System:

Sample Organizer: Acquity Ultra performance LC, Waters

Sample Manager: Acquity Ultra performance LC, Waters

Column Manager: Acquity Ultra performance LC, Waters

Binary Solvent Manager: Acquity Ultra performance LC, Waters

Massenspektrometer: Xevo TQ-MS, Waters

Software: MassLynx 4.1

TargetLynx Application Manager Version 4.1

Mobile Phase A: Ammoniumformiat 20 mmol + 0,028 mol Ameisensäure

Mobile Phase B: Methanol + 0,028 mol Ameisensäure

Fluss: 0,35 mL pro Minute

Säule: ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 x 150 mm)

Säulenofentemperatur: 35°C

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	95	5
0,75	95	5
6,25	0	100
7,0	0	100
7,01	95	5
7,5	95	5

MS – Bedingungen:

Kapillarspannung:	1 kV
Desolvation Gas:	1000 l/Stunde, 650°C
Cone Gas (Stickstoff):	150 l/Stunde
Kollisions Gas (Argon):	0,15 ml/Minute
Ionisationsmodus:	Elektronenspray Ionisation, positiv Modus
Massenübergänge (MRM):	
Hydromorphon:	286,10 > 185,03 (Quantifier); 286,10 > 128,01; 286,10 > 157,01
Hydromorphon-D3:	289,10 > 185,03 (Quantifier); 289,10 > 128,01; 289,10 > 157,04

4.5 Bestimmung der Psychopharmaka

4.5.1 Allgemeines

Die Vermessung der Psychopharmaka wurde auf Basis der kommerziell erhältlichen MassTox[®] TDM Serie A BASIC Kit Methode für das TDM durchgeführt.

Bei Aufarbeitung und Vermessung werden mit dieser Methode verschiedene Substanzen in Gruppen zusammengefasst. Probenaufarbeitung, mobile Phasen, Trennsäule und Tune-Page Bedingungen sind für alle Gruppen gleich. Unterschieden wird in Bezug auf das Interne Standard Gemisch, die Probenverdünnung, die Gradienten und die Massenübergänge.

Die in dieser Arbeit vermessenen eingeschlossenen Substanzen waren auf folgende Gruppen verteilt:

Antidepressiva 1:	Citalopram und N-Desmethylcitalopram, Escitalopram + (s)-N-Desmethylcitalopram (keine chirale Trennung), Duloxetin, Mirtazapin, Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin
Neuroleptika 1:	Aripiprazol, Quetiapin
Neuroleptika 2-Gruppe 1:	Promethazin
Neuroleptika 2-Gruppe 2:	Pipamperon
Antiepileptika 3:	Pregabalin

Die Interner Standard Gemische für die jeweiligen Gruppen setzen sich aus unterschiedlichen Internen Standard zusammen, die vom Hersteller nicht näher benannt sind. Jedem Arzneistoff

und Metaboliten wird jeweils ein Interner Standard zugeordnet. Einige Internen Standards werden für mehrere Medikamente und Metaboliten verwendet.

Die Gruppen Antidepressiva 1 und Neuroleptika 1 nutzen dasselbe Interne Standard Gemisch (IS: AD1/Neuro1). Neuroleptika 2-Gruppe 1 & - Gruppe 2 nutzen ebenfalls dasselbe Interne Standard Gemisch (IS: Neuroleptika 2 Extended) und die Gruppe Antiepileptika 3 nutzt das Interne Standard Gemisch, welches für alle Antiepileptika Gruppen genutzt wird (IS: AED).

Verdünnungspuffer:

- Dilution Buffer 1
- Dilution Buffer 2

Beide Verdünnungspuffer werden entsprechend der angestrebten Verdünnung eingesetzt.

Probenaufarbeitung für Serum, Speichel und Ultrafiltrat

25µl Probe wurden mit 13 µl Extraktionspuffer versetzt und 2 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden 125 µl des jeweiligen Internen Standards hinzugegeben, die Proben gut vermischt und für fünf Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde in einem 1 ml Glaseinsatz final mit den Verdünnungspuffern verdünnt.

Folgende Verdünnungen sind für die jeweiligen Gruppen vorgesehen:

Antidepressiva 1:	1 : 2,5	(v/v) mit Dilution Buffer 1
Neuroleptika 1:	1 : 10	(v/v) mit Dilution Buffer 2
Neuroleptika 2 Gruppe 1 & 2:	1: 2,5	(v/v) mit Dilution Buffer 1
Antiepileptika 3:	1: 5	(v/v) mit Dilution Buffer 1 & 2 (50:50, v/v)

Probenvorbereitung Atemluft

Zur Vermessung der Atemluftproben musste die bestehende Routinemethode in der Aufarbeitung modifiziert werden, da die Internen Standard Gemische, Kalibratoren und Kontrollen für diese Matrix nicht einsetzbar waren.

Extraktionslösung: Methanol/Acetonitril/Wasser (40:40:20, v/v) + 0,028 mol Ameisensäure und

Aripiprazol-d8:	250 pg/mL
Citalopram-d6:	250 pg/mL
Duloxetin-d3:	250 pg/mL
Pipamperon-d10:	250 pg/mL

Pregabalin-d8:	250 pg/mL
Promethazin-d3:	1000 pg/mL
Quetiapin-d8:	250 pg/mL
Venlafaxin-d6	250 pg/mL
O-Desmethylvenlafaxin-d6:	250 pg/mL

als Interner Standard.

Verdünnungslösung: Mobile Phase A (Chromsystems)

UPLC-MS/MS – Bedingungen Allgemein

UPLC-System:

Sample Organizer	Acquity Ultra performance LC, Waters
Sample Manager	Acquity Ultra performance LC, Waters
Column Manager	Acquity Ultra performance LC, Waters
Binary Solvent Manager	Acquity Ultra performance LC, Waters

Massenspektrometer: Xevo TQ-MS, Waters

Software: MassLynx 4.1
TargetLynx Application Manager Version 4.1

Mobile Phase A:	Mobile Phase 1
Mobile Phase B:	Mobile Phase 2
Fluss:	0,6 ml pro Minute
Säule:	MasterColumn
Säulenofentemperatur:	25°C

MS-Bedingungen:

Kapillarspannung:	3 kV
Desolvation Gas:	650 l/Stunde, 350°C
Cone Gas (Stickstoff):	150 l/Stunde
Kollisions Gas (Argon):	0,25 ml/Minute
Low Mass Auflösung:	3
High Mass Auflösung:	15
Ionisierungs Energie:	0,5
Ionisationsmodus:	Elektronenspray Ionisation, positiv Modus

4.5.2 Gradienten und Massenübergänge

4.5.2.1 Antidepressiva 1

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	100	0
0,2	50	50
0,7	50	50
1,5	80	20
2,4	100	0
3,0	100	0

Massenübergänge (MRM):

Citalopram: → quantifiziert mit Interner Standard 4
 324,97 > 108,95; 324,97 > 262,00

N-Desmethylcitalopram: → quantifiziert mit Interner Standard 4
 310,97 > 108,95; 310,97 > 261,98

Duloxetin: → quantifiziert mit Interner Standard 6
 297,90 > 153,94; 297,90 > 187,99

Mirtazapin: → quantifiziert mit Interner Standard 2
 265,97 > 194,99; 265,97 > 71,96

Venlafaxin: → quantifiziert mit Interner Standard 3
 278,03 > 260,12; 278,03 > 120,94

O-Desmethylvenlafaxin: → quantifiziert mit Interner Standard 2
 263,97 > 246,04; 263,97 > 106,93

Interner Standard 2:
 270,22 > 195,29; 270,22 > 211,21

Interner Standard 3
 288,35 > 270,2; 288,35 > 121,15

Interner Standard 4
 382,22 > 164,94; 382,22 > 122,97

Interner Standard 6

305,26 > 154,1; 305,26 > 195,00

Antidepressiva 1 - Ausatemluftmethode

Citalopram: → quantifiziert mit Citalopram-D6

324,97 > 108,95; 324,97 > 262,00

N-Desmethylcitalopram: → quantifiziert mit Citalopram-D6

310,97 > 108,95; 310,97 > 261,98

Duloxetin: → quantifiziert mit Duloxetin-D3

297,90 > 153,94; 297,90 > 187,99

Mirtazapin: → quantifiziert mit Venlafaxin-D6

265,97 > 194,99; 265,97 > 71,96

Venlafaxin: → quantifiziert mit Venlafaxin-D6

278,03 > 260,12; 278,03 > 120,94

O-Desmethylvenlafaxin: → quantifiziert mit O-DM-Venlafaxin-D6

263,97 > 246,04; 263,97 > 106,93

Citalopram-D6:

331,29 > 108,86; 331,29 > 261,95

Duloxetin-D3:

301,00 > 157,00; 301,00 > 191,00

Venlafaxin-D6:

284,00 > 64,00; 284,00 > 121,00

O-Desmethylvenlafaxin-D6:

270,60 > 64,00; 270,60 > 107,00

4.5.2.2 Neuroleptika 1

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	80	20
0,2	50	50
1,7	30	70
2,3	80	20
3,0	80	20

Massenübergänge (MRM):

Aripiprazol: → quantifiziert mit Interner Standard 7

447,90 > 284,97; 447,90 > 175,95

Quetiapin: → quantifiziert mit Interner Standard 5

383,90 > 252,94; 383,90 > 220,99

Interner Standard 7

382,22 > 164,94; 382,22 > 122,97

Interner Standard 5

335,29 > 274,97; 335,29 > 192,03

Neuroleptika 1 – Atemluftmethode:

Aripiprazol: → quantifiziert mit Aripiprazol-d8

447,90 > 284,97; 447,90 > 175,95

Quetiapin: → quantifiziert mit Quetiapin-d8

383,90 > 252,94; 383,90 > 220,99

Aripiprazol-d8:

456,00 > 293,00; 456,00 > 106,25

Quetiapin-d8:

391,90 > 257,94; 391,90 > 220,99

4.5.2.3 Neuroleptika 2 Gruppe 1&2

Neuroleptika 2 Gruppe 1 und Gruppe 2 unterscheiden sich lediglich in den massenspektrometrisch angefahrenen Substanzen, nicht in ihren chromatographischen Bedingungen.

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	100	0
0,2	100	0
0,21	40	60
0,8	40	60
0,81	0	100
2,4	0	100
2,51	100	0
3,5	100	0

Massenübergänge (MRM):

Gruppe 1

Promethazin: → quantifiziert mit Interner Standard 4

285,10 > 198,00; 285,10 > 86,00

Interner Standard 4:

291,10 > 198,00; 291,1 > 92,00

Gruppe 2

Pipamperon → quantifiziert mit Interner Standard 6

376,10 > 291,00; 376,10 > 165,00

Interner Standard 6

386,10 > 291,00; 335,29 > 386,10 > 165,00

Neuroleptika 2 - Ausatemluftmethode

Gruppe 1

Promethazin: → quantifiziert mit Promethazin-d3

285,10 > 86,00; 285,10 > 198,00

Promethazin-d3:

288,00 > 89,00; 288,00 > 198,00

Gruppe 2

Pipamperon: → quantifiziert mit Pipamperon-d10

376,10 > 291,00; 376,10 > 165,00

Pipamperon-d10:

386,10 > 291,00; 386,10 > 165,00

4.5.2.4 Antiepileptika 3

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	100	0
0,75	0	100
6,25	0	100
7,0	100	0
7,01	100	0

Massenübergänge (MRM):

Pregabalin: → quantifiziert mit Interner Standard 9

160,14 > 55,05; 160,14 > 97,04

Interner Standard 9:

164,14 > 85,00; 164,14 > 56,93

Antiepileptika 3 - Ausatemluftmethode

Pregabalin: → quantifiziert mit Pregabalin-d6

160,14 > 55,05; 160,14 > 97,04

Pregabalin-d6:

166,00 > 103,00; 166,00 > 89,00

4.6 Bestimmung von Diphenhydramin

Bei dem verwendeten Arzneimittel handelte es sich in jeder hier aufgeführten Studie, in der Diphenhydramin gegeben wurde, um das Medikament Dorm Schlaftabletten (Beco-Arzneimittel, Kleve, Deutschland). Die Tablette ist nicht überzogen und enthält 50 mg Diphenhydraminhydrochlorid, was 43 mg reinem Diphenhydramin entspricht.

Probenaufarbeitung: Speichel & Kapillarblut

Interner Standard:	Diphenhydramin-d3 (100 ng/mL in Methanol)
Fällungsreagenz:	Acetonitril/Methanol (50:50, v/v)
Verdünnungslösung:	Methanol/Wasser (60:40, v/v) + 0,028 mol Ameisensäure

20 µl Probe wurden mit 20 µl Internem Standard versetzt, mit 60 µl Fällungsreagenz gefällt und eine Minute auf dem Schüttelmixer gemischt. Die Speichelproben wurden 5 Minuten und die Kapillarblutproben 10 Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden mit 130 µl Verdünnungslösung verdünnt und anschließend mit der UPLC-MS/MS vermessen.

Probenaufarbeitung: Ausatemluft

Extraktionslösung:	Methanol/Wasser (70:30, v/v) + 0,028 mol Ameisensäure, mit 100 pg/mL Diphenhydramin-d3 als Interner Standard
Verdünnungslösung:	Methanol/Wasser (60:40, v/v) + 0,028 mol Ameisensäure

Für die weitere Aufarbeitung siehe Kapitel 5.9 (Aufarbeitung der Atemluftproben).

UPLC-MS/MS

Flüssigkeitschromatographie-System:

Sample Organizer	Acquity UPLC, Waters
Sample Manager	Acquity UPLC I-Class FTN, Waters
Column Manager	Acquity UPLC CM-A, Waters
Column Manager Aux:	Acquity UPLC, Waters
Binary Solvent Manager	Acquity UPLC I-Class BSM, Waters

Massenspektrometer: Xevo TQ-S, Waters

Software: MassLynx 4.1
TargetLynx Application Manager Version 4.1

Mobile Phase A:	Wasser + 0,028 mol Ameisensäure
Mobile Phase B:	Methanol + 0,028 mol Ameisensäure
Fluss:	0,3 mL pro Minute
Säule:	ACQUITY UPLC BEH-Phenyl 1,7 µm 2,1 x 100 mm
Säulenofentemperatur:	40°C
Injektionsvolumen:	5 µl

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	40	60
0,3	40	60
0,9	20	80
1,1	20	80
1,2	5	95
1,6	5	95
1,7	40	60
2,5	40	60

MS-Bedingungen

MS:	Xevo-TQ-S
Kapillarspannung:	1 kV
Desolvation Gas:	1000 l/Stunde, 650°C
Cone Gas (Stickstoff):	150 l/Stunde
Kollisions Gas (Argon):	0,15 ml/Minute
Ionisationsmodus:	Elektronenspray Ionisation, positiv Modus

Massenübergänge (MRM):

Diphenhydramin:	256,1 > 167,1 (Quantifier); 256,1 > 152,0 (Qualifier)
Diphenhydramin-d3:	259,2 > 167,1 (Quantifier); 259,2 > 152,0 (Qualifier)

4.7 Bestimmung von Dextromethorphan und Dextrorphan

Bei den eingesetzten Medikamenten handelt es sich um Silomat[®] DMP Lutschpastillen (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) mit 10,5 mg Dextromethorphanhydrobromid-Monohydrat, was 7,7 mg reinem Dextromethorphan entspricht, sowie Silomat DMP INTENSIV Hartkapseln (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) mit 30 mg Dextromethorphanhydrobromid-Monohydrat, was 22 mg reinem Dextromethorphan entspricht.

Probenaufarbeitung: Kapillarvollblut

Verdünnungslösung: Ammoniumformiat 20 mmol/Methanol (70:30, v/v)
+ 0,028 mol Ameisensäure

Interner Standard: Dextromethorphan-d3 und Dextrorphan-d3, 1 ng/mL in Acetonitril

20 µl Probe wurden in einem Reaktionsgefäß mit 10 µl Internem Standard versetzt, vermischt und die Proteine mit 200 µl Acetonitril gefällt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß ca. eine Minute auf dem Schüttelmischer belassen und schließlich für 10 Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden in einen 1 ml Glaseinsatz gegeben und bei 45 °C unter Stickstoffbegasung abgedampft. Der Rückstand wurde mit 50 µl Verdünnungslösung wiederaufgenommen und vermessen.

Probenaufarbeitung: Speichel

Verdünnungslösung: Ammoniumformiat 20 mmol/Methanol (70:30, v/v)
+ 0,028 mol Ameisensäure)

Interner Standard: Dextromethorphan-d3 und Dextrorphan-d3m 1 ng/mL in Acetonitril

50 µl Probe wurden in einem Reaktionsgefäß mit 25 µl Internem Standard versetzt, vermischt, 50 µl einer 10 molare Ammoniumacetatlösung wurde hinzugegeben und die Proteine wurden mit 200 µl Acetonitril gefällt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß ca. eine Minute auf dem Schüttelmischer belassen und schließlich für 5 Minuten bei 13 400 rpm zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden in einen 1 ml Glaseinsatz gegeben und bei 45 °C unter Stickstoffbegasung abgedampft. Der Rückstand wurde mit 100 µl Verdünnungslösung wiederaufgenommen und vermessen.

Probenaufarbeitung: Ausatemluft

Extraktionslösung: Methanol/Acetonitril/Wasser (40:40:20, v/v) enthält 100 pg/mL
Dextromethorphan-d3 und Dextrorphan-d3 als Interner Standard

Verdünnungslösung: Ammoniumformiat 20 mmol/Methanol (70:30, v/v)
+ 0,028 mol Ameisensäure

Für die weitere Aufarbeitung siehe Kapitel 5.9 (Aufarbeitung der Atemluftproben).

UPLC-MS/MS-Bedingungen

UPLC-System:

Sample Organizer Acquity UPLC, Waters

Sample Manager Acquity UPLC I-Class FTN, Waters

Column Manager	Acquity UPLC CM-A, Waters
Column Manager Aux:	Acquity UPLC, Waters
Binary Solvent Manager	Acquity UPLC I-Class BSM, Waters
Massenspektrometer:	Xevo TQ-S, Waters
Software:	MassLynx 4.1 TargetLynx Application Manager Version 4.1
Mobile Phase A:	Ammoniumformiat 20 mmol + 0,028 mol Ameisensäure
Mobile Phase B:	Methanol + 0,028 mol Ameisensäure
Fluss:	0,3 ml pro Minute
Säule:	ACQUITY UPLC BEH-Phenyl 1,7 µm 2,1 x 100 mm
Säulenofentemperatur:	40°C

Gradient:

Minute	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
Initial	70	30
3,0	20	80
3,1	70	30
4,0	70	30

Massenspektrometer:	Xevo-TQ-S
Kapillarspannung:	1 kV
Desolvation Gas:	650 l/Stunde, 350°C
Cone Gas (Stickstoff):	150 l/Stunde
Kollisions Gas (Argon):	0,25 ml/Minute
Ionisationsmodus:	Elektronenspray Ionisation, positiv Modus

Massenübergänge (MRM):

Dextromethorphan:	272,24 > 171,10 (Quantifier); 272,24 > 147,11; 272,24 > 128,06
Dextromethorphan-d3:	275,30 > 171,10 (Quantifier); 275,30 > 147,11; 275,30 > 128,09
Dextrorphan:	258,24 > 157,08 (Quantifier); 258,24 > 133,08; 258,24 > 128,01
Dextrorphan-d3:	261,24 > 157,05 (Quantifier); 261,24 > 133,06; 261,24 > 128,09

4.8 Gewinnung von Ultrafiltrat

Zur Gewinnung des Ultrafiltrates wurde die Centrifree[®] Ultrafiltrationseinheiten genutzt.

Hierbei wurden, je nach Probenvolumen, 200 oder 300 µl Serum in das Probenreservoir eingefüllt. Anschließend wurde das Serum für eine Stunde bei 37°C equilibriert und die Ultrafiltrationseinheit schließlich für 30 Minuten bei 37°C bei 2000 g zentrifugiert. Das Filtratbecherchen wurde danach von der Filtrationseinheit abgenommen und mit einem separaten Deckelchen verschlossen.

Die Ermittlung der unspezifischen Bindung fand mittels mit Analyten versetzter PBS-Lösung statt. Hierbei wurde saliner Phosphatpuffer (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 mit den jeweils zu bestimmenden Analyten versetzt. Über den Vergleich der Konzentration aus der nativen PBS-Lösung und der ultrafiltrierten PBS-Lösung lässt sich die unspezifische Bindung eines Analyten an die Ultrafiltrationseinheit ermitteln.

4.9 Aufarbeitung der Atemluftproben

Zunächst wurden die Filter aus dem Filterhalter entfernt, anschließend mit einer Metallschere in 10 Stücke geschnitten und in eine leere 1 ml SPE-Kartusche gefüllt. Die befüllten SPE-Kartuschen wurden auf einem Vakuumsaugblock angebracht, die Vakuumpumpe eingeschaltet und auf einen Druck von ca. 850 mbar eingestellt. Im Anschluss wurde 1 ml der der Methode entsprechenden Extraktionslösung auf die Filterstücke in der SPE Kartusche gegeben.

Über eine Minute wurde das Eluat in einem 4 ml Glasgefäß gesammelt und anschließend unter Stickstoffstrom bei 45°C eingedampft. Der Rückstand wurde nach dem Abkühlen mit 100 µl Verdünnungslösung wiederaufgenommen und mit der UPLC-MS/MS vermessen.

Zur Vermeidung von Verschleppungen durch Arbeitswerkzeuge, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen:

- Die Handschuhe wurden bei jedem neuen Filter gewechselt.
- Die Schere wurde nach dem Zerschneiden eines Filters mit einem sauberen Zellstofftuch gereinigt und mit Methanol gespült.
- Für jeden Filter wurde eine neue, saubere Zellstoffunterlage verwendet.
- Um die Filterstücke in die Kartusche zu füllen wurde für jeden Filter eine frische Pipettenspitze verwendet.

4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit XACT (Scilab GmbH, Hamburg) und Valistat 2.0 (ARVECON GmbH, Walldorf) durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Validationsdaten

5.1.1 Psychopharmaka in Serum und Speichel

Um aufzuzeigen, dass Speichelproben mit einer Serumkalibration zuverlässig gemessen werden können, wurde die Negativmatrix (jeweils Serum und Speichel/SES Gemisch) mit einer definierten Menge (Zielwerte in den entsprechenden Tabellen) an Psychopharmakon versetzt.

Die Messungen für jede der Kontrollproben wurden in 6-fach (Tag 1) und 3-fach Bestimmung (Tag 2-8) an verschiedenen Werktagen von derselben Person durchgeführt (n = 27 Proben). Eine Kalibration wurde täglich frisch aufgearbeitet (Tabelle 9-19). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Valistat 2.0 gemäß den Richtlinien der GTFCh (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, 2009) durchgeführt. Angegeben wurde der Zielwert, der Mittelwert, der Variationskoeffizient (VK) für die Richtigkeit, die Wiederholpräzision, die Laborpräzision und den Bias (Systematische Abweichung der Messwerte zum Zielwert und damit den systematischen Fehler).

Tabelle 9: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Aripiprazol

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Laborpräzision	Bias [%]
Serum low	50,0	56,4	2,6	1,5	2,7	12,8
Serum high	200	199	5,0	3,5	5,1	-0,3
Speichel low	50,0	52,0	3,8	3,6	3,8	4,1
Speichel high	200	188	7,2	4,5	7,5	-5,8

Tabelle 10: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Citalopram

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Laborpräzision	Bias [%]
Serum low	15,0	15,4	3,2	2,4	3,2	2,3
Serum high	150	153	3,1	1,5	3,2	1,9
Speichel low	15,0	15,4	4,0	2,2	4,2	2,3
Speichel high	150	153	4,3	2,8	4,4	2,1

Tabelle 11: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Desmethylcitalopram

Matrix und Level	Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	25,0	25,8	4,3	3,4	4,4	3,0
Serum high	250	231	3,1	1,9	3,2	-7,4
Speichel low	25,0	25,6	4,1	3,2	4,2	2,5
Speichel high	250	233	4,8	4,0	4,8	-6,8

Tabelle 12: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Duloxetin

Matrix und Level	Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	10,0	10,4	7,6	6,9	7,6	4,1
Serum high	100	91,2	3,9	3,8	3,9	-8,7
Speichel low	10,0	9,70	8,7	6,7	8,9	-3,0
Speichel high	100	90,1	4,1	3,5	4,2	-9,9

Tabelle 13: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Mirtazapin

Matrix und Level	Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	10,0	10,9	3,3	3,2	3,4	8,5
Serum high	100	106	4,5	2,6	4,7	6,1
Speichel low	10,0	10,8	4,0	3,3	4,1	8,0
Speichel high	100	107	3,4	2,8	3,5	7,6

Tabelle 14: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit Pipamperon

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	15,0	15,1	3,4	2,2	3,5	1,7
Serum high	150	156	2,1	1,4	2,2	3,9
Speichel low	15,0	15,2	5,0	3,6	5,1	1,4
Speichel high	150	162	2,6	1,8	2,7	8,1

Tabelle 15: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Pregabalin

Matrix und Level	Zielwert [µg/mL]	Mittelwert [µg/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	0,500	0,519	5,3	2,5	5,5	3,9
Serum high	8,50	8,81	5,3	1,7	5,5	3,7
Speichel low	0,500	0,502	5,6	2,0	5,9	0,4
Speichel high	8,50	8,80	6,3	1,2	6,7	3,5

Tabelle 16: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Promethazin

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	30,0	29,1	6,9	4,0	7,2	-2,9
Serum high	300	299	3,5	2,4	3,6	-0,3
Speichel low	30,0	24,7	3,3	2,5	3,3	-17,6
Speichel high	300	331	2,5	1,6	2,6	10,3

Tabelle 17: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: Quetiapin

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	40,0	41,4	3,4	2,3	3,5	3,4
Serum high	400	415	3,0	1,9	3,1	3,8
Speichel low	40,0	40,9	4,3	2,9	4,5	2,3
Speichel high	400	407	1,7	1,4	1,8	1,8

Tabelle 18: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit Venlafaxin

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	15,0	14,5	4,7	4,0	4,7	-3,3
Serum high	100	93,6	3,4	2,3	3,5	-6,4
Speichel low	15,0	14,7	5,0	4,3	5,1	-2,1
Speichel high	100	93,7	3,1	2,4	3,2	-6,3

Tabelle 19: Psychopharmaka in Serum und Speichel: Genauigkeit: O-Desmethylvenlafaxin

Matrix und Level	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
Serum low	50,0	48,5	4,8	2,5	5,0	-3,0
Serum high	500	459	3,7	2,0	3,8	-8,3
Speichel low	50,0	49,1	5,2	4,4	5,3	-1,8
Speichel high	500	455	5,1	4,9	5,1	-9,0

Gemäß den Validationskriterien der GTFCh wurden keine Abweichungen sichtbar, die eine Übertragbarkeit der Serumkalibration auf Speichelproben bei gleicher Aufarbeitung ausschließen würden.

Bestimmungsgrenze:

Für alle Medikamente, bei denen Konzentrationen unterhalb des kalibrierten Bereichs gemessen wurden (alle bis auf Duloxetin), wurde eine Selbstkontrolle in 10-fach Bestimmung vermessen, deren Konzentration unterhalb der niedrigsten gemessenen Konzentration des jeweiligen Analyten lag, um die Verwertbarkeit dieser Werte belegen zu können. Hierzu wurde ein Negativpoolserum mit der jeweiligen Substanz versetzt.

Tabelle 20: Bestimmungsgrenzen: Psychopharmaka

Substanz	Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%]	Bias [%]
Aripiprazol	1,00	1,01	5,9	1,3
Citalopram	1,00	1,07	7,9	7,1
Desmethylcitalopram	1,00	0,99	8,2	-1,5
Mirtazapin	1,00	0,89	7,2	-11
Pipamperon	2,00	2,06	8,4	3,1
Pregabalin	50,0	52,0	3,2	3,2
Promethazin	10,0	10,9	5,3	9,5
Quetiapin	2,00	2,08	2,7	4,2
Venlafaxin	5,00	5,08	2,3	1,6
O-Desmethylvenlafaxin	5,00	5,09	6,0	1,7

5.1.2 Ultrafiltration

Um die unspezifische Bindung der betrachteten Analyten final ermitteln zu können, wurde PBS-Lösung (pH 7,4) mit folgenden Analyten in der angegebenen Konzentration versetzt:

Mirtazapin: 60 ng/ml; Citalopram: 70 ng/ml; N-Desmethylocitalopram: 70 ng/ml; Quetiapin: 200 ng/mL; Venlafaxin: 300 ng/mL; O-Desmethyvenlafaxin: 150 ng/mL

Aus dieser Lösung wurden fünf Ultrafiltrate nach Herstellerangaben hergestellt und mit der unter 6.1.1 beschriebenen Methode vermessen. Die native Lösung wurde ebenfalls in einer Fünffachbestimmung vermessen und über die Verhältnisse der Konzentrationen (C) die unspezifische Bindung (NSB) für die jeweiligen Analyten ermittelt.

$$\text{NSB [\%]} = 100 - \left(\frac{C_{\text{PBS Ultrafiltrat}}}{C_{\text{PBS nativ}}} \times 100 \right)$$

Die Reproduzierbarkeit der Ultrafiltrationsmethode wurde für jeden Analyten ermittelt, indem mindestens zehn Patientenserum aus der Labor-Routine mit unterschiedlichen Konzentrationen herausgesucht wurden (einige Seren enthielten mehr als einen Analyten, so dass teilweise mehr als $n = 10$ Proben für einen Analyten vorhanden waren). Aus jedem Serum wurden jeweils fünf Ultrafiltrate nach Gebrauchsanweisung hergestellt und zusammen mit dem nativen Serum vermessen.

Tabelle 21: Reproduzierbarkeit der Ultrafiltrationseinheit (Fu = Fraction unbound)

Medikament	n	VK [%]	Fu[%] Bereich	NSB[%] n = 5
Citalopram	10	6,2	16,9 – 31,9	11
N-Desmethylocitalopram	10	5,5	31,3 – 53,3	14
Mirtazapin	11	5,2	6,0 – 13,2	35
Quetiapin	10	5,6	6,6 – 10,9	18
Venlafaxin	11	3,4	34,9 – 52,3	0
O-Desmethyvenlafaxin	11	1,2	74,6 – 85,4	0

Der Variationskoeffizient bewegte sich bei allen Analyten deutlich unter 10 %, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus durch Ultrafiltration gewonnenen Proben kann damit als gewährleistet angesehen werden.

5.1.3 Diphenhydramin

Für die Validation der Speichelproben wurde als Negativmatrix ein Speichel/SES-Gemisch von Speichelproben verwendet, die mit dem Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem entnommen worden waren. Der Speichelanteil lag bei etwa 60%. Die in den Validationsdaten angegebenen Konzentrationen beziehen sich ausschließlich auf das Speichel/SES-Gemisch und sind nicht auf den Speichelanteil von 60% berechnet. Dies ist bei späteren Messungen zu berücksichtigen. Entsprechendes Negativvollblut wurde aus negativen EDTA-Vollblutproben (VB) gewonnen.

Selektivität/Matrixeinflüsse

Es wurden folgende Proben vermessen, um den Einfluss eventueller Störungen durch Matrixkomponenten oder andere Substanzen festzustellen:

- 6 verschiedene Matrixproben ohne Analyten und ohne Internem Standard (Leerprobe)
- 6 verschiedene Matrixproben ohne Analyten und mit Internem Standard (Nullproben)

Folgende Substanzen wurden in therapeutischen oder Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Bereichs auf Koelutionen mit dem Analyten oder dem Internen Standard getestet, konnten jedoch nicht festgestellt werden:

10-OH-Carbamazepin, Amisulprid, Amitriptylin, Atomoxetin, Carbamazepin, Carbamazepin-Epoxid, Chlorprothixen, Citalopram, Clomipramin, Desipramin, Desmethylfluoxetin, Desmethylsertralin, Doxepin, Duloxetine, Ethosuximid, Fluoxetin, Fluvoxamin, Imipramin, Lamotrigin, Levomepromazin, Maprotilin, Melperon, Methylphenidat, Mianserin, Mirtazapin, N-Desmethylcitalopram, Norclomipramin, Nordoxepin, Normaprotilin, Nortrimipramin, Nortriptylin, O-Desmethylvenlafaxin, Oxcarbazepin, Paroxetin, Perazin, Phenobarbital, Phenytoin, Pipamperon, Primidon, Promethazin, Protriptylin, Reboxetin, Ritalinsäure, Sertindol, Sertralin, Sulpirid, Sultiam, Thioridazin, Trazodon, Trimipramin, Venlafaxin, Ziprasidon, Zotepin, Zuclopenthixol

Die Identifizierung von Diphenhydramin erfolgte über die Retentionszeit sowie das Verhältnis von einem Qualifier Ion zum Target Ion.

Arbeitsbereich, Linearität und Verdünnungsgrenze

Linearität für Diphenhydramin im Speichel: bis 1000 ng/mL

Linearität für Diphenhydramin im Vollblut: bis 1000 ng/mL

Kalibrationsbereich: 1 – 1000 ng/mL

Für Diphenhydramin in Speichel und Vollblut wurde eine 10-Punkt-Kalibration mit Kalibratoren aus versetzter Negativmatrix in 6-fach Bestimmung verwendet.

Konzentration Eichgerade: 1,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 250,0; 500,0; 750,0; 1000,0

IS: Diphenhydramin-d3 100 ng/mL

Genauigkeit:

Für die Bestimmung der Genauigkeit wurde Negativmatrix mit einer definierten Menge Diphenhydramin versetzt.

Zielwert OF Kontrolle 1: 9 ng/mL

Zielwert OF Kontrolle 2: 100 ng/mL

Zielwert OF Kontrolle 3: 800 ng/mL

Zielwert VB Kontrolle 1: 9 ng/mL

Zielwert VB Kontrolle 2: 100 ng/mL

Zielwert VB Kontrolle 3: 800 ng/mL

Die Messungen für jede der drei Kontrollproben wurde in 6-fach (Tag 1) und 3-fach Bestimmung (Tag 2-8) an verschiedenen Werktagen von derselben Person durchgeführt (jeweils n = 27 Proben) und wurde mit der oben angegebenen Kalibration ausgewertet.

Genauigkeit:

Diphenhydramin im Speichel:

Tabelle 22: Genauigkeit von Diphenhydramin im Speichel

Zielwert [ng/ml]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Laborpräzision	Bias [%]
9	8,19	3,7	1,6	3,7	-9
100	98,1	1,7	1,0	1,5	-1,9
800	774	3,2	0,8	3,3	-3,3

Diphenhydramin im Vollblut:

Tabelle 23: Genauigkeit von Diphenhydramin im Vollblut

Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederhol- präzision	VK [%] Labor-präzi- sion	Bias [%]
9	8,9	5,1	4,3	3,7	-0,9
100	109	4,1	4,0	2,4	8,6
800	806	3,4	2,3	2,9	0,8

Analytische Grenzwerte-Bestimmung nach DIN 32646:

Gesetzte Kriterien:

- Target-Ion: (Signifikanzniveau = 99%; k-Wert = 3
- Erstes Qualifier Ion: Signifikanzniveau = 99%; k-Wert = 3

Die Nachweisgrenze wird auf das Qualifier-Ion und die Bestimmungsgrenze auf das Target-Ion bezogen.

Eine Einfachbestimmung wurde durchgeführt. Mit zertifiziertem Referenzmaterial wurde eine Matrixprobe mit Diphenhydramin in äquidistanten Konzentrationen angesetzt.

Konzentration Eichgerade für Diphenhydramin im Speichel: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0

Konzentration Eichgerade für Diphenhydramin im Vollblut: 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4

Nachweisgrenze (LoD):

Diphenhydramin im Speichel: 0,34 ng/mL

Diphenhydramin im Vollblut: 0,40 ng/mL

Bestimmungsgrenze (LoQ):

Diphenhydramin im Speichel: 0,42 ng/mL

Diphenhydramin im Vollblut: 0,52 ng/mL

Wiederfindung und Matrixeffekt:

Zur Bestimmung der analytischen Wiederfindung und des Matrixeffektes wurden 6 Leerproben (Verdünnungslösung) und verschiedene Negativproben der jeweiligen Matrizes mit einer niedrigen Diphenhydramin-Konzentration und einer hohen Diphenhydramin-Konzentration gespiked und als Probe aufgearbeitet. Die gleichen 6 Proben wurden ungespiked aufgearbeitet und nach der Fällung mit der gleichen Menge Diphenhydramin und dem entsprechenden

deutierten Internem Standard versetzt. Dabei zeigten sich Matrixeffekte für die niedrige und die hohe Konzentration von 100% bzw. 86% für Speichel und 87% bzw. 76% für Vollblut. Die Gesamtwiederfindung liegt im Speichel bei 91 bzw. 74% und bei 67 bzw. 66% im Vollblut.

5.1.4 Dextromethorphan und Dextrorphan

Für die Validation der Speichelproben wurde die Negativmatrix entsprechend der Angaben beim Diphenhydramin gewonnen und genutzt.

Selektivität/Matrixeinflüsse

Es wurden folgende Proben vermessen, um den Einfluss eventueller Störungen durch Matrixkomponenten oder andere Substanzen festzustellen:

- 6 verschiedene Matrixproben ohne Analyten und ohne Internem Standard (Leerprobe)
- 6 verschiedene Matrixproben ohne Analyten und mit Internem Standard (Nullproben)

Folgende Substanzen wurden in therapeutischen oder übertherapeutischen Konzentrationen auf Koelutionen mit dem Analyten oder dem Internen Standard getestet, konnten jedoch nicht festgestellt werden:

10-OH-Carbamazepin, Amisulprid, Amitriptylin, Atomoxetin, Carbamazepin, Carbamazepin-Epoxid, Chlorprothixen, Citalopram, Clomipramin, Desipramin, Desmethylfluoxetin, Desmethylsertralin, Diphenhydramin, Doxepin, Duloxetin, Ethosuximid, Fluoxetin, Fluvoxamin, Imipramin, Lamotrigin, Levomepromazin, Maprotilin, Melperon, Methylphenidat, Mianserin, Mirtazapin, N-Desmethylcitalorpan, Norclomipramin, Nordoxepin, Normaprotilin, Nortrimipramin, Nortriptylin, O-Desmethylvenlafaxin, Oxcarbazepin, Paroxetin, Perazin, Phenobarbital, Phenytoin, Pipamperon, Primidon, Promethazin, Protriptylin, Reboxetin, Ritalinsäure, Sertindol, Sertralin, Sulpirid, Sultiam, Thioridazin, Trazodon, Trimipramin, Venlafaxin, Ziprasidon, Zotepin, Zuclopenthixol

Die Identifizierung von Dextromethorphan und Dextrorphan erfolgte über die Retentionszeit sowie das Verhältnis von einem Qualifier Ion zum Target Ion.

Arbeitsbereich, Linearität und Verdünnungsgrenze

Linearität für Dextromethorphan im Speichel: bis 10 ng/mL

Linearität für Dextrorphan im Speichel: bis 10 ng/mL

Linearität für Dextromethorphan im Vollblut: bis 10 ng/mL

Linearität für Dextrophan im Vollblut: bis 10 ng/mL

Kalibrationsbereich: 0,025 – 10 ng/mL

Für Dextromethorphan und Dextrophan in Speichel und Vollblut wurde eine 10-Punkt-Kalibration mit Kalibratoren aus gespiketer Negativmatrix in 6-fach Bestimmung verwendet.

Konzentration Eichgerade: 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0

IS: Dextromethorphan-d3 1 ng/mL, Dextrophan-d3 1 ng/ml

Genauigkeit:

Für die Bestimmung der Genauigkeit wurde Negativmatrix mit einer definierten Menge Dextromethorphan und Dextrophan versetzt.

Zielwert OF Kontrolle 1: Dextromethorphan 0,085 ng/mL; Dextrophan 0,095 ng/mL

Zielwert OF Kontrolle 2: Dextromethorphan 0,85 ng/mL; Dextrophan 0,95 ng/mL

Zielwert OF Kontrolle 3: Dextromethorphan 7,5 ng/mL; Dextrophan 8,5 ng/mL

Zielwert VB Kontrolle 1: Dextromethorphan 0,075 ng/mL; Dextrophan 0,075 ng/mL

Zielwert VB Kontrolle 2: Dextromethorphan 0,85 ng/mL; Dextrophan 0,085 ng/mL

Zielwert VB Kontrolle 3: Dextromethorphan 7,5 ng/mL; Dextrophan 7,5 ng/mL

Die Messungen für jede der drei Kontrollproben wurde in 6-fach Bestimmung (Tag 1-8) an verschiedenen Werktagen von derselben Person durchgeführt (jeweils n = 27 Proben) und wurde mit der oben angegebenen Kalibration ausgewertet.

Genauigkeit:

Dextromethorphan im Speichel:

Tabelle 24: Genauigkeit von Dextromethorphan im Speichel

Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Labor-präzision	Bias [%]
0,085	0,081	8	3,7	7,7	-4,7
0,85	0,85	9,2	2,4	9,4	0,5
7,5	7,55	5,2	3,3	4,7	0,7

Dextrorphan im Speichel:

Tabelle 25: Genauigkeit von Dextrorphan im Speichel

Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Laborpräzision	Bias [%]
0,095	0,089	6,9	3,3	6,6	-5,9
0,95	0,97	8,4	2,0	8,5	2,2
8,5	8,74	6,8	3,8	6,3	2,8

Dextromethorphan im Vollblut:

Tabelle 26: Genauigkeit von Dextromethorphan im Vollblut

Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Laborpräzision	Bias [%]
0,085	0,075	10,3	6,3	9,6	-0,1
0,85	0,84	5,8	3,3	5,3	-1,7
7,5	7,36	4,4	3,1	3,7	-1,9

Dextrorphan im Vollblut:

Tabelle 27: Genauigkeit von Dextrorphan im Vollblut

Zielwert [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	VK [%] Richtigkeit	VK [%] Wiederholpräzision	VK [%] Laborpräzision	Bias [%]
0,075	0,08	3,3	2,1	3,0	6,7
0,85	0,82	3,9	2,1	3,7	-3,3
7,5	7,28	3,6	2,2	3,2	-2,9

Analytische Grenzwerte Bestimmung nach DIN 32646:

Gesetzte Kriterien:

- Target-Ion: Signifikanzniveau = 99%; k-Wert = 3
- Erstes Qualifier Ion: Signifikanzniveau = 99%; k-Wert = 3

Die Nachweisgrenze wird auf das Qualifier-Ion und die Bestimmungsgrenze auf das Target-Ion bezogen.

Eine Einfachbestimmung wurde durchgeführt. Mit zertifiziertem Referenzmaterial wurde eine Matrixprobe mit Dextromethorphan und Dextrorphan in äquidistanten Konzentrationen angesetzt.

Die Konzentrationen der jeweiligen Eichgeraden sind:

Dextromethorphan im Speichel:	0,0125; 0,015; 0,0175; 0,02; 0,0225; 0,025
Dextrorphan im Speichel:	0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125; 0,015; 0,0175
Dextromethorphan im Vollblut:	0,0125; 0,015; 0,0175; 0,02; 0,0225; 0,025
Dextrorphan im Vollblut:	0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125; 0,015; 0,0175; 0,02

Nachweisgrenze (LoD):

Dextromethorphan im Speichel:	0,011 ng/mL
Dextrorphan im Speichel:	0,002 ng/ml
Dextromethorphan im Vollblut:	0,009 ng/mL
Dextrorphan im Vollblut:	0,003 ng/ml

Bestimmungsgrenze (LoQ):

Dextromethorphan im Speichel:	0,011 ng/mL
Dextrorphan im Speichel:	0,004 ng/ml
Dextromethorphan im Vollblut:	0,009 ng/mL
Dextrorphan im Vollblut:	0,006 ng/ml

Wiederfindung und Matrixeffekt:

Zur Bestimmung der analytischen Wiederfindung und des Matrixeffektes wurden 6 Leerproben (Verdünnungslösung) und verschiedene Negativproben der jeweiligen Matrices mit einer niedrigen Dextromethorphan/Dextrorphan Konzentration und einer hohen Dextromethorphan/Dextrorphan Konzentration gespiket und als Probe aufgearbeitet. Die gleichen 6 Proben wurden ungespiket aufgearbeitet und nach der Fällung mit der gleichen Menge Dextromethorphan/Dextrorphan und den jeweiligen deuterierten Internen Standards versetzt. Dabei zeigten sich Matrixeffekte von 96 % bzw. 95 % für Dextromethorphan im Speichel und 88 % bzw. 81 % für Dextrorphan. Im Vollblut liegt der Matrixeffekt für Dextromethorphan bei 124 % in der niedrigen und bei 107 % in der hohen Konzentration. Für Dextrorphan konnten in derselben Matrix Matrixeffekte von 90 bzw. 89 % nachgewiesen werden. Die Gesamtwiederfindung liegt im Speichel bei 91 bzw. 92% für Dextromethorphan und bei 90 bzw. 77 % für Dextrorphan, und 118 bzw. 97,1 % für Dextromethorphan im Vollblut und 93 bzw. 90 % für Dextrorphan im Vollblut.

5.2 Perianalytische Parameter im Speichel

5.2.1 Referenzbereiche für das Speichelsammelsystem

Während des Prozesses der Speichelgewinnung mit dem Greiner Bio-One Speichelsammelsystem findet durch die SES eine Verdünnung des Speichels statt. Diese Variable muss jedoch, um eine Quantifizierung der im Speichel bestimmten Substanzen durchführen zu können, bekannt sein. Dies macht den Speichelanteil zum wichtigsten perianalytischen Parameter im Rahmen der Speichelanalytik mit diesem Speichelsammelsystem, bildet er doch auch die Grundlage zur Konzentrationsbestimmung der Authentizitätsmarker α -Amylase und Cortisol.

Aus einem Probenpool von 22 520 Proben wurden nun die Referenzbereiche für den Speichelanteil sowie α -Amylase und das Cortisol ermittelt. Bei Proben in denen kein Speichelanteil ermittelbar war wurde zur Berechnung der Cortisol-Konzentration ein Speichelanteil von 50% angenommen.

Ausschlusskriterien gab es keine. Als Referenzbereich betrachtet wurden jene Werte, die sich innerhalb des Bereichs zwischen der 2,5 % Perzentile und der 97,5 % Perzentile befanden. Dabei fand sowohl eine geschlechtsspezifische Betrachtung als auch eine Betrachtung aller Proben statt. 219 Proben war kein Geschlecht zuzuordnen, diese flossen jedoch in die Bestimmung des Referenzbereichs aus allen Proben ein. Ein mathematischer Test auf Normalverteilung wurde nicht durchgeführt, sondern lediglich ein optischer ausgehend von den erstellten Histogrammen.

Speichelanteil:

Der Messbereich der α -Amylase erstreckte sich von 10 000 U/l bis 480 000 U/l. Proben, die unterhalb dieses Messbereichs lagen, wurden für die statistische Berechnung der Wert 9 999 U/L zugeordnet, Proben, die oberhalb dieses Messbereichs lagen, der Wert 480 001 U/l.

Von den 22 520 Proben war bei 22 216 Proben der Speichelanteil bestimmbar. Anhand der graphischen Auswertung ließ sich ohne weitere Tests eine Normalverteilung der Werte annehmen (Abb. 16). Eine Bestimmung der 2,5% und der 97,5% Perzentilen war damit ohne weitere Transformation der Werte durchführbar. Geht man von einem Vertrauensbereich von 95% aus, ergibt sich aus der Gesamtbetrachtung aller Werte ein Referenzbereich von 15,1% bis 74,9% Speichelanteil, während sich aus der geschlechtsspezifischen Betrachtung (ebenfalls normalverteilt) Referenzbereiche von 14,8% bis 74,8% Speichelanteil für Frauen und 15,2% bis 74,7% Speichelanteil für Männer ergeben.

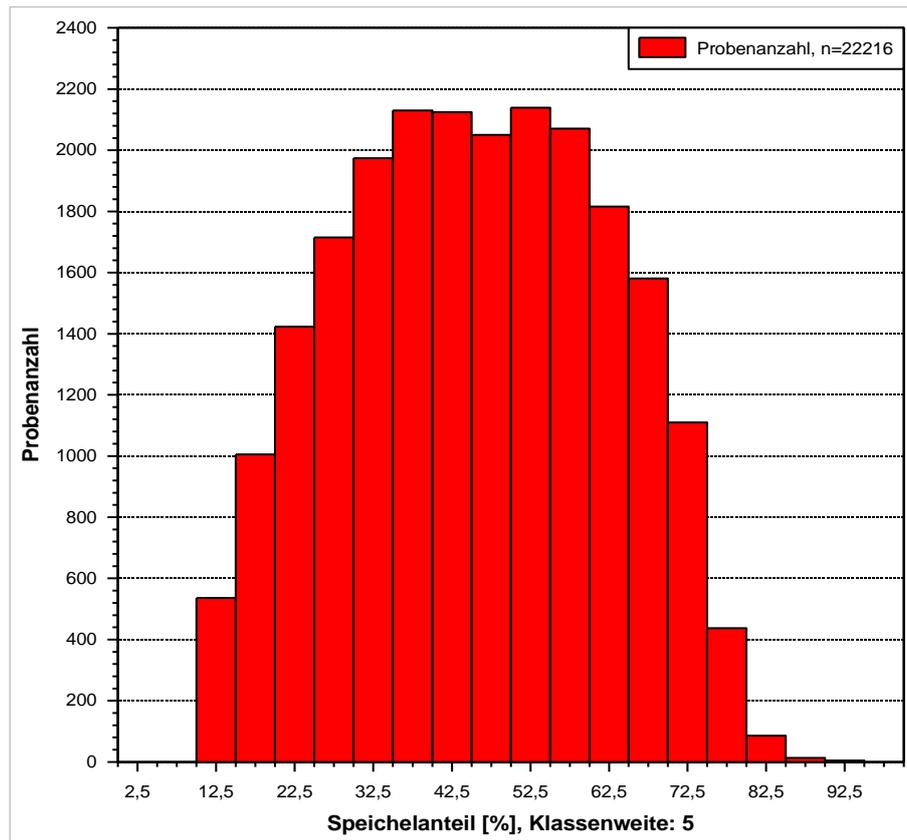


Abbildung 16: Verteilung des Speichelanteils von 22 216 Routineproben

Tabelle 28: Verteilung des Speichelanteils in 22 216 Routineproben

Statistikparameter	Gesamt	Frauen	Männer
Mittelwert	45,4%	44,7%	45,5%
Median	45,4%	44,6%	45,6%
2,5% Perzentile	15,1%	14,8%	15,2%
97,5% Perzentile	74,9%	74,8%	74,7%
n (nicht bestimmbar)	304	104	200
n (gesamt)	22 216	6342	15 655

Der Referenzbereich für den Speichelanteil lässt sich ausgehend von diesen Ergebnissen auf 15 – 75 % festlegen.

α -Amylase:

Bei der Bestimmung der α -Amylase-Konzentration waren von 22 520 Proben 56 Proben nicht bestimmbar und wurden entsprechend ausgeschlossen.

Tabelle 29: Statistische Verteilung der Amylase-Konzentration in 22 520 Routineproben; die Bezeichnung „aus log“ bedeutet, dass die entsprechenden Konzentrationen aus der Verteilung der logarithmierten Werte ermittelt wurden

Statistikparameter	Gesamt	Gesamt aus log	Frauen	Frauen aus log	Männer	Männer aus log
Mittelwert	19 5907	14 5378	184 313	13 5021	201 914	151 252
Median	15 8886	158 886	146 376	14 6376	164 994	164 994
2,5% Perzentile	17 459	17 459	16 271	16 271	18 164	18 164
97,5% Perzentile	>480 000	>480 000	>480 000	>480 000	>480 000	>480 000
n (n.bek.)	56	56	14	14	42	42
n (gesamt)	22 464	22 464	6 432	6 432	15 813	15 813

Die Differenzen zwischen Mittelwert und Median als auch die graphische Darstellung der Werte lassen vermuten, dass keine Normalverteilung der Werte vorliegt, daher wurden die Werte logarithmiert und erneut betrachtet.

Berücksichtigt man, dass insgesamt 1 988 Proben oberhalb des Messbereichs lagen, jedoch nicht mit ihrem wahren Wert, sondern lediglich mit 480 001 U/L in die statistischen Betrachtungen einbezogen wurden, und nur 288 Werte unterhalb des Messbereichs lagen, die mit 9 999 U/L, also einem zu hohen Wert, in die statistischen Berechnungen einbezogen wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass der Einfluss auf die Werte nur von geringer Bedeutung ist.

Die Proben, welche sich außerhalb des Messbereichs befanden, sind jene, die in die erste bzw. letzte Klasse eingeordnet werden und daher verantwortlich für die ungewöhnlich hohen Probenzahlen in diesen beiden Klassen sind (s. Abbildung. 17).

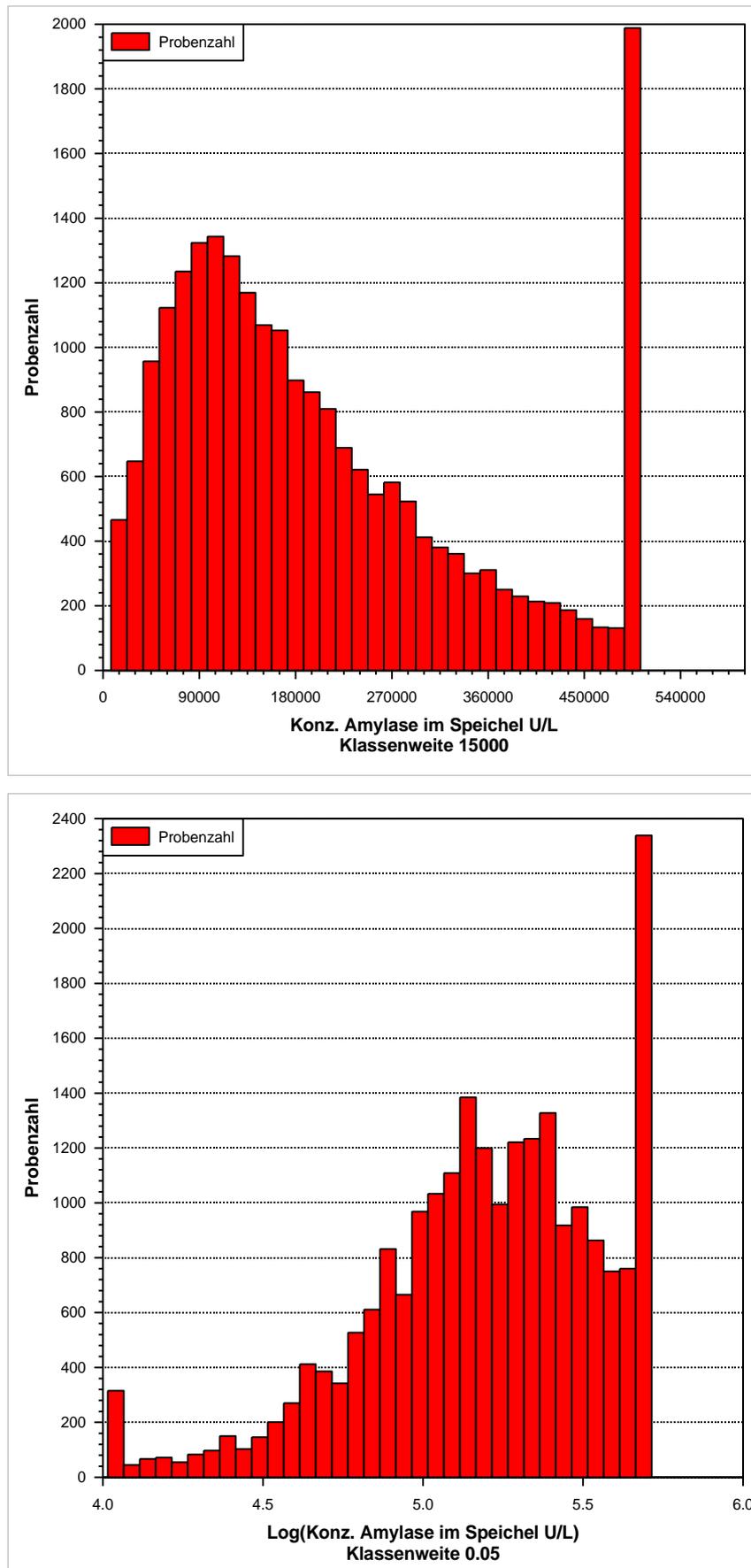


Abbildung 17: Verteilung der Amylasekonzentration in 22 520 Routineproben; oben normale Verteilung, unten logarithmierte Amylasekonzentration

Davon ausgehend, dass es sich um normalverteilte Werte handelt, ergeben sich für die α -Amylase-Konzentration Untergrenzen des Referenzbereichs von 17 459 U/L bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung des gesamten Probenpools, 16 271 U/l für weibliche Patienten und 18 164 U/l für männliche Patienten. Die obere Grenze des Referenzbereichs befindet sich außerhalb des Messbereichs und entspricht daher $> 480\,000$ U/L.

Da es sich bei der α -Amylase um einen Authentizitätsmarker handelt, welcher in diesem Fall nicht zu diagnostischem Zwecken verwendet wird, kann der Referenzbereich mit $> 16\,000$ U/l angegeben werden.

Cortisol:

Von der Gesamtanzahl der Proben, die auf ihre Cortisol-Konzentration untersucht wurden, waren 18 Proben ohne Angabe.

Der Unterschied zwischen Mittelwert und Median lässt, zusammen mit der graphischen Betrachtung, den Schluss zu, dass eine Transformation der Daten zwingend erforderlich ist, um bestimmen zu können, ob eine Normalverteilung vorliegt. In diesem Fall lagen 26 Proben unterhalb und 45 Proben oberhalb des Messbereichs.

Eine Normalverteilung der Werte ist wahrscheinlich. Ermittelt man die Referenzbereiche, liegen sie zwischen 0,1 bis 7,2 ng/ml in der Gesamtbetrachtung, 0,1 bis 6,5 ng/ml für Frauen und 0,1 bis 7,4 ng/ml für Männer. Da es sich auch beim Cortisol lediglich um einen Authentizitätsmarker und in diesem Fall nicht um einen diagnostisch relevanten Parameter handelt, muss kein geschlechtsspezifischer Referenzbereich angegeben werden.

Der Referenzbereich für Cortisol als Authentizitätsmarker liegt folglich bei 0,1 – 7,4 ng/mL.

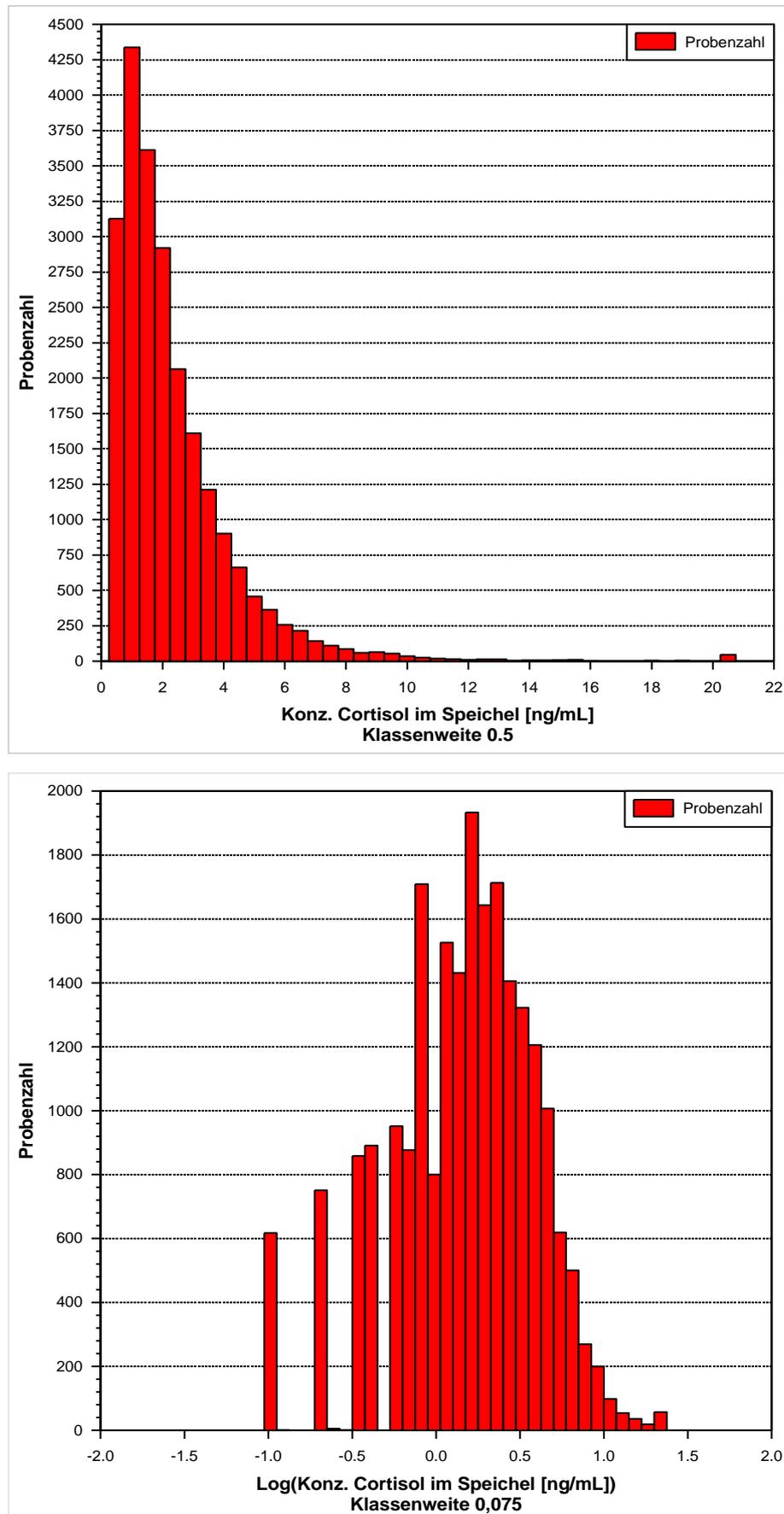


Abbildung 18: Verteilung der Cortisol-Konzentration im Speichel in 22 520 Routineproben, oben untransformiert, unten nach Logarithmierung der Werte

Tabelle 30: Statistische Verteilung der Cortisol-Konzentration in 22 520 Routineproben; die Bezeichnung „aus log“ bedeutet, dass die entsprechenden Konzentrationen aus der Verteilung der logarithmierten Werte ermittelt wurden

Statistikparameter	Gesamt	Gesamt aus log	Frauen	Frauen aus log	Männer	Männer aus log
Mittelwert	2,0	1,3	1,8	1,2	2,2	1,4
Median	1,5	1,5	1,3	1,3	1,6	1,6
2,5% Perzentile	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
97,5% Perzentile	7,2	7,2	6,5	6,5	7,4	7,4
n (n.bek.)	18	18	2	2	16	16
n (gesamt)	22 502	22 502	6 444	6 444	15 839	15 839

5.2.2 pH-Wert während des Sammelvorgangs und der Lagerung

Um den im Mundraum herrschenden pH-Wert während der Sammelzeit zu ermitteln, wurden über einen Zeitraum von drei Monaten Probenbecher gesammelt, die von Einsendern zusammen mit den Speicheltransferröhrchen ins Labor eingeschickt wurden. Der pH-Wert wurde noch am selben Tag gemessen, die Proben vier Wochen bei 4° C bis 8° C gelagert und der pH-Wert erneut vermessen. Eine erneute Vermessung der Proben war bei 78 der 122 Proben möglich. Bei den übrigen Proben verhinderte Schimmelbildung im Becher eine zweite Vermessung des Speichel/SES Gemisches im Becher, ein Problem welches durch das im Speicheltransferröhrchen enthaltende Natriumazid in selbigen verhindert wird. Der durchschnittliche pH-Wert des Speichel/SES-Gemisches im Sammelbecher lag bei 4,4, ebenso der Median, mit einem Variationskoeffizienten von 5,5%. Auch nach vier Wochen zeigte sich keine Veränderungen von Mittelwert und Median mit einem Variationskoeffizienten von 5,4%. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Pufferlösung während des Sammelvorgangs einen sauren pH-Wert garantiert und damit eine Reproduzierbarkeit dieser Variablen schafft.

Bei der Überprüfung von 536 Routineproben in den Speicheltransferröhrchen ergab sich ein mittlerer pH-Wert von 5,2 mit einem Variationskoeffizienten von 10% bei einem mittleren Probenvolumen von 1,64 mL und einem Variationskoeffizienten von 45%.

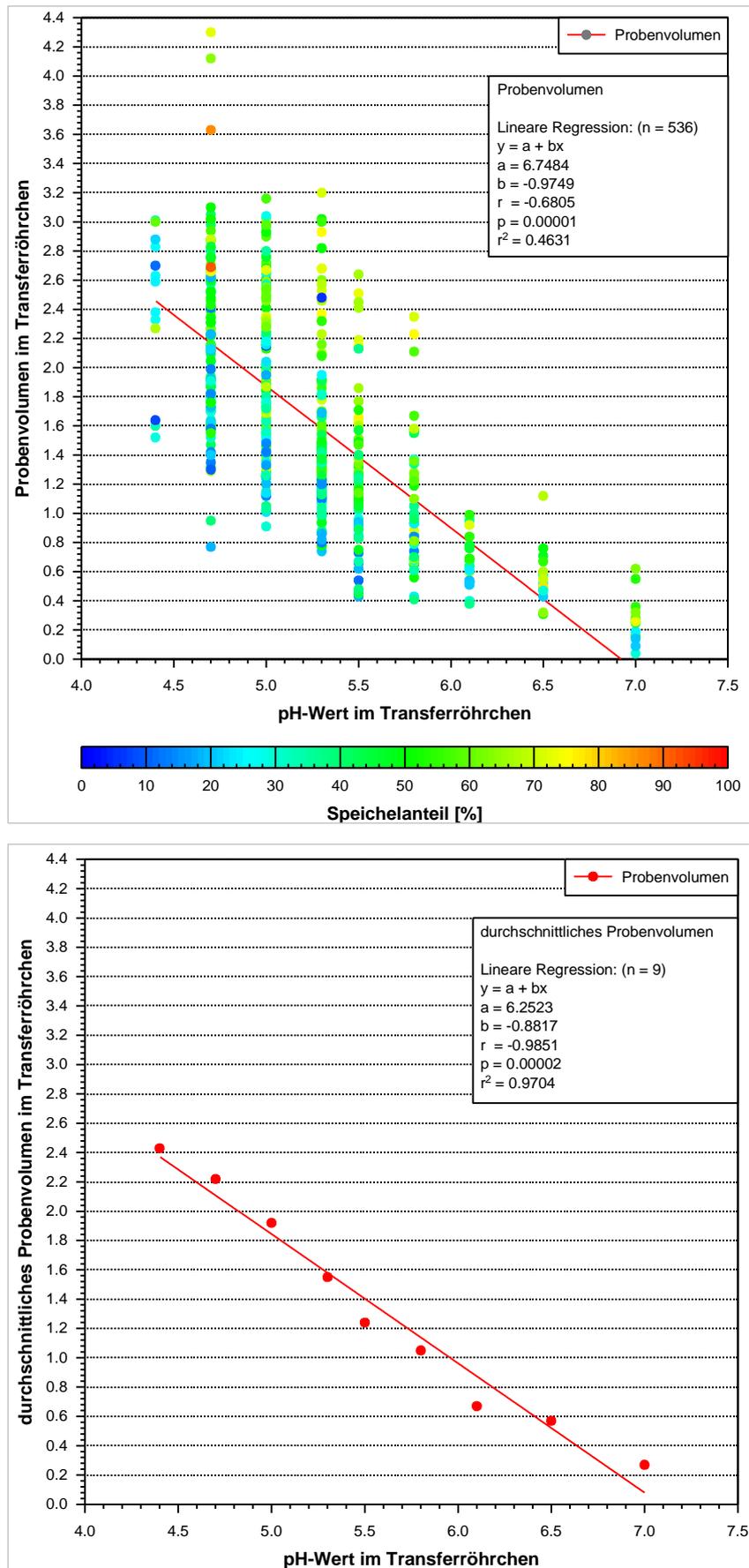


Abbildung 19: OF/SES-Volumen und pH-Wert Korrelation; oben: Auftragung aller Werte gegeneinander; unten: durchschnittliches Volumen und pH-Wert gegeneinander aufgetragen

Trägt man Probenvolumen und pH-Wert gegeneinander auf, so ergibt sich eine signifikante Abhängigkeit der Parameter voneinander, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,68 und einem Signifikanzwert $> 0,001$. Berechnet man das durchschnittliche Volumen der jeweiligen pH-Wert Klassen und trägt es gegen den pH-Wert auf, so steigt die Korrelation sogar auf 0,99 und einem Bestimmungsmaß von 0,97 (siehe Abbildung 20). Werden pH-Wert und durchschnittliches Probenvolumen gegen den Speichelanteil aufgetragen, wird die Abhängigkeit der Werte voneinander, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98 für beide Proben und einem Bestimmungsmaß von 0,96 beziehungsweise 0,97 sowie Signifikanzwerten $< 0,001$ deutlich.

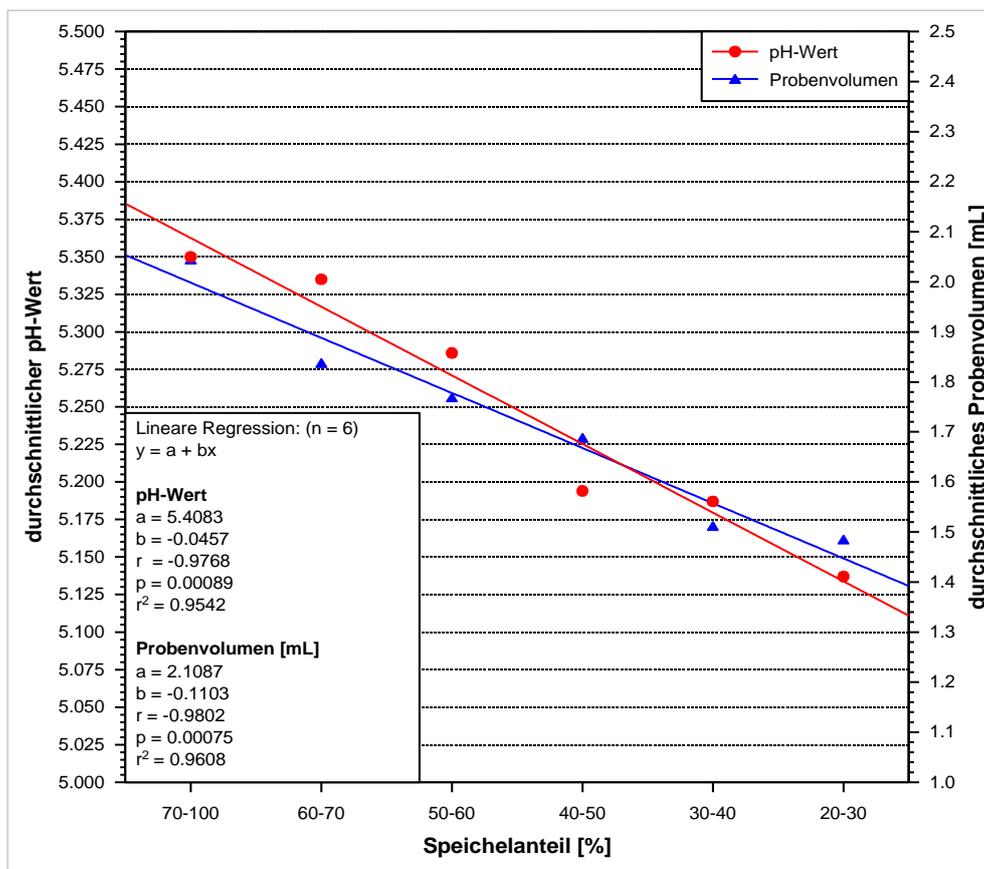


Abbildung 20: Korrelation zwischen durchschnittlichem pH-Wert und Speichelanteil

Ausgenommen ist hier die Klasse zwischen 0 und 20% Speichelanteil, die bei dieser Betrachtung als Ausreißer eliminiert werden musste. Die verzerrten Werte ergaben sich höchstwahrscheinlich aus einem Nichteinhalten der Sammelzeit. Der Effekt des geringen Volumens und eines daraus resultierenden erhöhten pH-Wertes hatte einen höheren Einfluss auf die Proben als der Speichelanteil.

Das maximal erreichbare Volumen in den Speicheltransferröhrchen liegt bei 3,5 ml (Eichstrich). Höhere Volumenangaben ergeben sich regelhaft nur dann, wenn das Transferröhrchen aufgeschraubt und das Speichel/SES-Gemisch per Hand in das Transferröhrchen gegeben wird.

5.2.3 Zusammenfassung

Die Referenzbereiche der perianalytischen Parameter entsprechen:

Speichelanteil im SES/Speichel-Gemisch (OF %):	15 – 75 %
α -Amylase im Speichel:	> 16 000 U/L
Cortisol im Speichel:	0,1 – 7,4 ng/mL

Zur Beurteilung der Normalverteilung wurde der Vergleich zwischen Mittelwert und Median sowie eine graphische Darstellung der Verteilung in Form eines Histogramms herangezogen. Da hier keine pathophysiologischen Vorgänge diagnostiziert werden sollen, sondern lediglich Bereiche ermittelt werden, um eine Aussage über den Zustand der Speichelprobe zu liefern, ist eine Zusammenfassung der Referenzbereiche bei geschlechtsspezifischen Unterschieden legitimierbar.

Weiterhin lässt sich feststellen, dass das Volumen des Speichel/SES-Gemisches im Speicheltransferröhrchen einen Einfluss auf den pH-Wert der Probe während der Lagerung haben kann. Darüber hinaus scheint ein Zusammenhang zwischen Volumen und Speichelanteil, sowie zwischen pH-Wert und Speichelanteil in der Probe zu bestehen.

5.3 Vergleichbarkeit unterschiedlicher Speichelsammelsysteme

Um die Eignung eines neuen Speichelsammelsystems für zukünftige Studien zu testen, musste nicht nur seine Vergleichbarkeit mit anderen Speichelentnahmesystemen, sondern auch die Möglichkeit einer konsekutiven Probenentnahme überprüft werden.

Die Zeitpläne wurden in allen Fällen eingehalten und alle Proben gemäß des Studienprotokolls entnommen.

Nach der konsekutiven Probenentnahme von Speichel mit dem gleichen Speichelsammelsystem lagen die durchschnittlichen Variationskoeffizienten der Diphenhydramin-Konzentration innerhalb eines Individuums mit 15,2% für die Gruppe, die das Quantisal[®]-Speichelentnahmesystem nutzte, und 16,4% für die Gruppe, die das Greiner-Speichelentnahmesystem nutzte, relativ nah beieinander. Allerdings war der Bereich, in dem sich die Variationskoeffizienten

bewegten, in der Quantisal[®] Gruppe größer (8,2%; 24%; 27%; 1,6%) als in der Greiner Gruppe (13%; 8,9%; 11%; 33%). Dabei war die Substanzkonzentration in der ersten Probe etwas höher als in den folgenden.

Bei der konsekutiven Probenentnahme mit zwei unterschiedlichen Speichelentnahmesystemen war die Diphenhydramin-Konzentration in den mit dem Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem abgenommenen Proben in sieben von acht Fällen höher als die Konzentration in den Proben, die mit dem Quantisal[®] Speichelentnahmesystem abgenommen wurden.

Die Konzentrationsunterschiede des Diphenhydramins aus einer mit dem Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem abgenommenen Probe zu der mit dem Quantisal[®] Speichelentnahmesystem abgenommenen Probe betragen:

- Individuum 1: + 6,9%
- Individuum 2: + 20,0%
- Individuum 3: + 41,5%
- Individuum 4: + 51,3%
- Individuum 5: + 27,8%
- Individuum 6: - 24,7%
- Individuum 7: + 97,5%
- Individuum 8: + 39,4%

Individuum 1 bis 4 begannen diesen zweiten Studienschritt mit einer Speichelprobenentnahme mit dem Greiner Bio-One System, Individuum 5 bis 8 begannen mit dem Quantisal[®] Speichelentnahmesystem. Eine Beeinflussung über die Reihenfolge der Entnahme ist durch die festgelegte Reihenfolge und der wechselseitigen Entnahme unwahrscheinlich.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine konsekutive Speichelprobenentnahme möglich zu sein scheint und dass das Greiner Bio-One System ebenso geeignet für die Speichelprobenentnahme ist wie das Quantisal[®] Speichelprobenentnahmesystem.

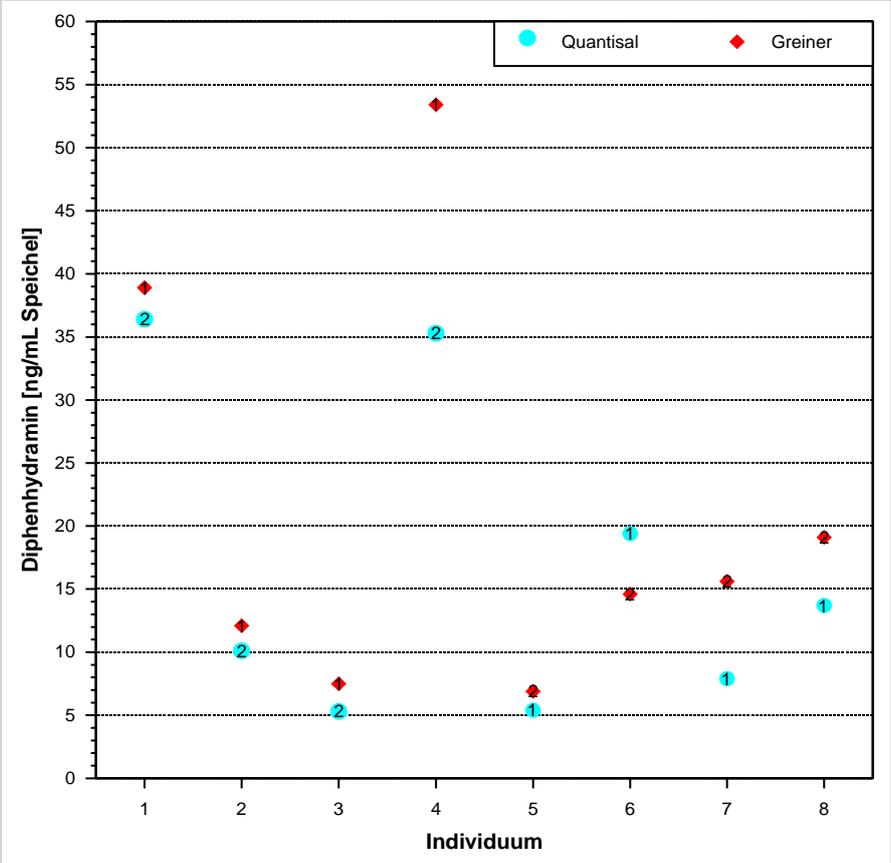
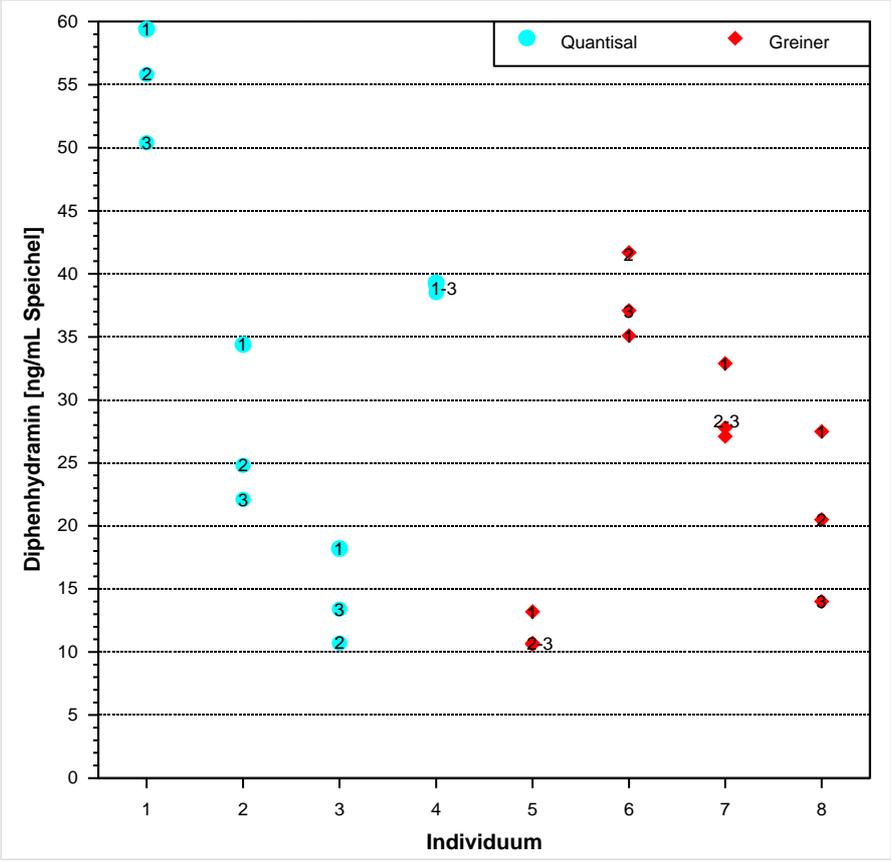


Abbildung 21: Konsekutive Speichel-Probenentnahme mit einem (oben) und mit unterschiedlichen (unten) Speichelentnahmesystemen; die Zahlen repräsentieren die Reihenfolge der Probenentnahme

5.4 Oral Fluid/Serum-Ratio

5.4.1 Analgetika

5.4.1.1 Hydromorphon

Von den 39 Patienten, die mit Hydromorphon behandelt wurden, konnten insgesamt 61 gepaarte Serum- und Speichelproben gesammelt werden. Davon entstammten 33 gepaarte Proben dem ersten und 28 gepaarte Proben dem zweiten Entnahmezyklus. Die Konzentrationsbereiche im Serum lagen zwischen 0,2 ng/mL und 4,2 ng/mL, der Konzentrationsbereich im Speichel lag zwischen 0,1 ng/ml und 5,9 ng/ml.

Bei der Betrachtung aller Proben wurden drei der 61 Proben als Ausreißer eliminiert. Betrachtet man die Entnahmezyklen einzeln, wurde im ersten Entnahmezyklus eine Probe als Ausreißer eliminiert, ebenso wie im zweiten Entnahmezyklus. Darüber hinaus wurden theoretische OF/SE-Ratios für drei pH-Werte berechnet.

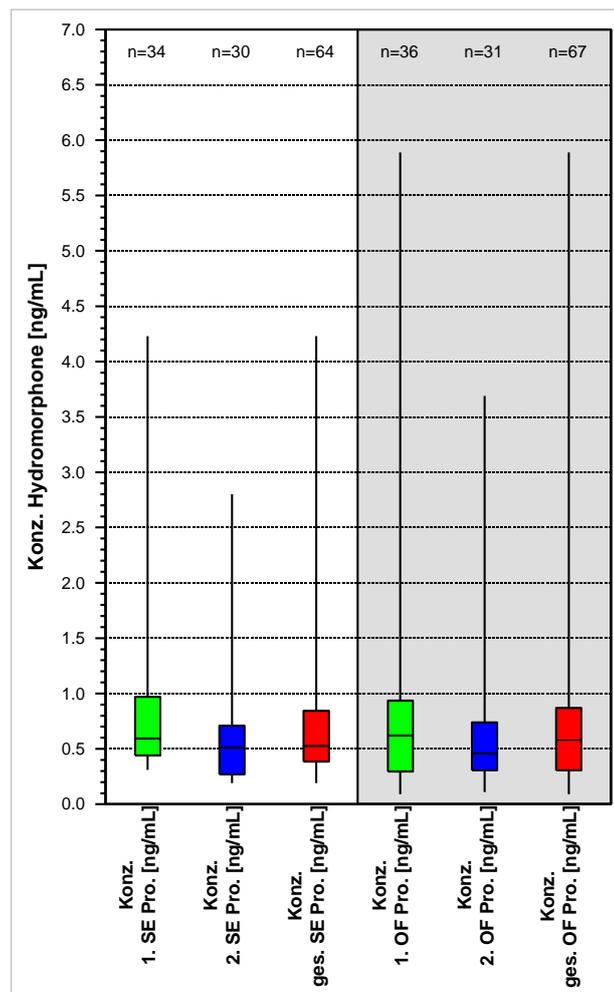
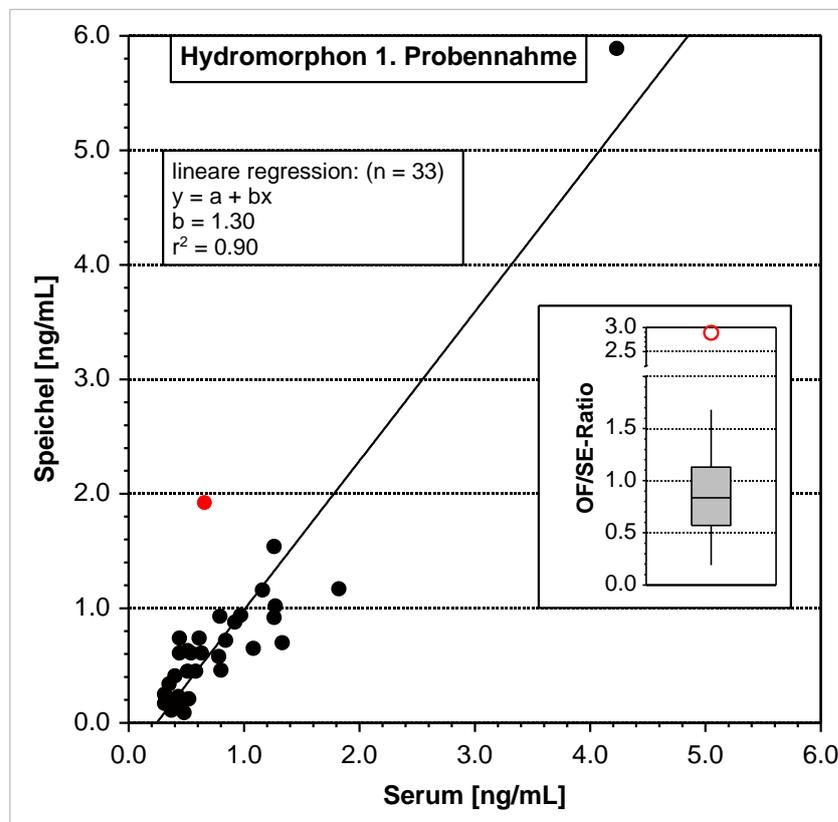


Abbildung 22: Verteilung der Hydromorphon-Konzentration in Serum und Speichel, des ersten (grün), zweiten (blau) und beider Entnahmezyklen (rot)

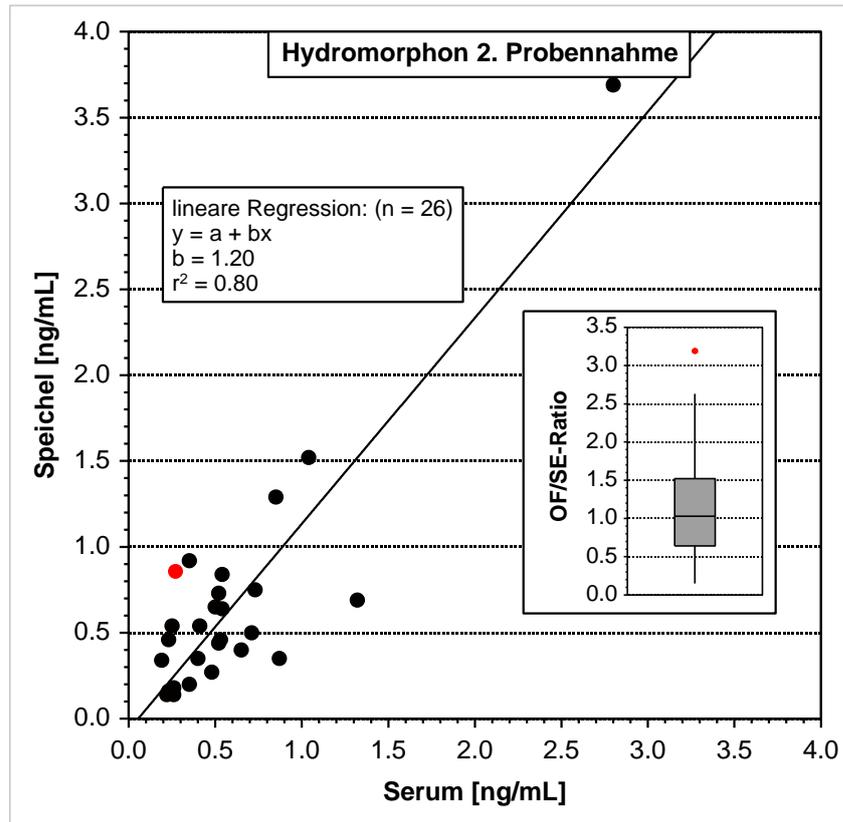
Der erste der angegebenen Werte entspricht der theoretischen Ratio bei pH 4,4, was dem durchschnittlichen pH-Wert in der Mundhöhle während des Sammelvorgangs entspricht. Der zweite berechnete Wert entspricht der theoretischen OF/SE-Ratio bei pH 6,4, was dem durchschnittlichen pH-Wert in der Mundhöhle bei nicht stimuliertem Speichelfluss entspricht und der dritte Wert entspricht dem theoretischen OF/SE-Ratio bei pH 7,4, was dem pH-Wert des Blutes entspricht und durch seinen leicht alkalischen Charakter durchaus einem pH-Wert bei stimuliertem Speichelfluss entspricht. Geht man von der theoretisch berechneten OF/SE-Ratio für Hydromorphon bei unterschiedlichen pH-Werten aus, so ergeben sich nach einer Berechnung mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung folgende Werte: 706 (pH-Wert 4,4), 7,17 (pH-Wert 6,4) und 0,82 (pH-Wert 7,4).

Der aus dem Mittelwert und Median -Ratio berechnete therapeutische Bereich liegt bei 4,7 – 14 und 4,4 – 13 ng/ml Hydromorphon im Speichel. Trägt man Speichel- und Serumkonzentration gegeneinander auf, so liefert die Steigung der Regressionsgeraden Hinweise auf das zu erwartende OF/SE-Ratio. Es bietet sich für eine direkte graphische Erfassung des zu erwartenden Verhältnisses daher an, die Skalierung von X und Y-Achse anzugleichen.

(a)



(b)



(c)

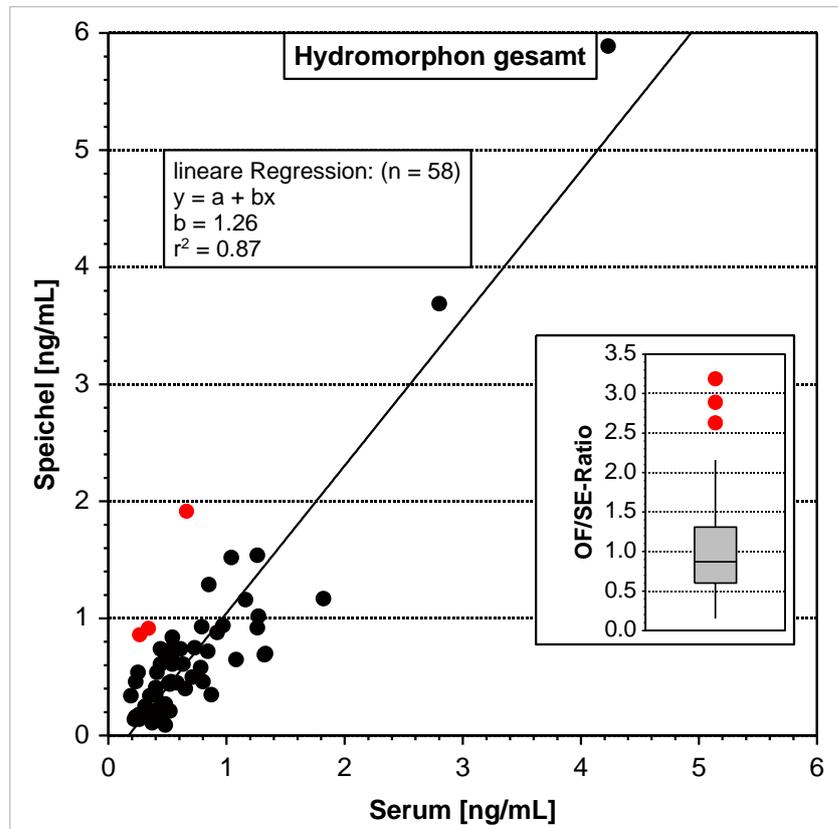
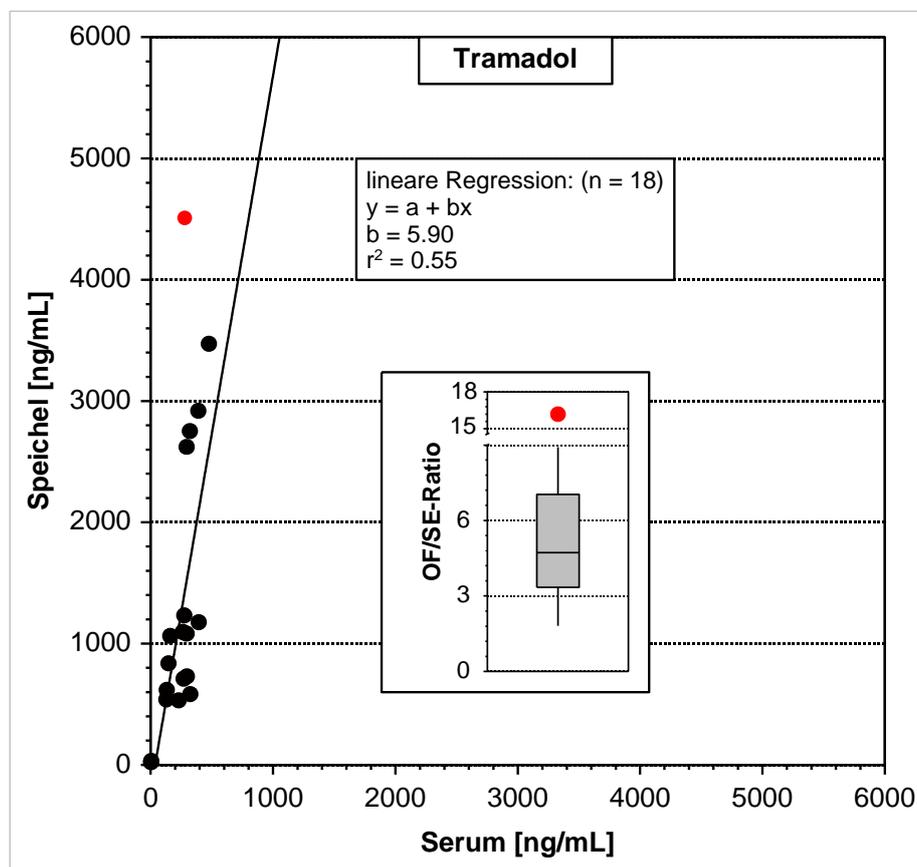


Abbildung 23: Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Hydromorphon in der ersten (a), der zweiten (b) bzw. ersten und zweiten (c) Probenentnahme

5.4.1.2 Tramadol

Von den insgesamt 13 Patienten, die Tramadol als Medikation erhielten, konnten 19 gepaarte Serum und Speichelproben gesammelt werden. Die Ergebnisse eines Probenpaares mussten wegen einer vermuteten oralen Kontamination mit Medikamentenresten aus der Einnahme eliminiert werden. Die Konzentrationsbereiche lagen zwischen 3,4 und 476 ng/mL im Serum und 23 und 12 565 ng/ml im Speichel. Die jeweiligen Konzentrationsbereiche des O-Desmethyltramadol entsprachen 1,5 – 61,7 ng/ml für das Serum und 1,9 bis 398 ng/mL für den Speichel. Hier wurden drei Proben als Ausreißer eliminiert. Die theoretisch ermittelten OF/SE-Ratios lagen bei: 990 (pH 4,4), 9,1 (pH 6,4) und bei 1 (pH 7,4).



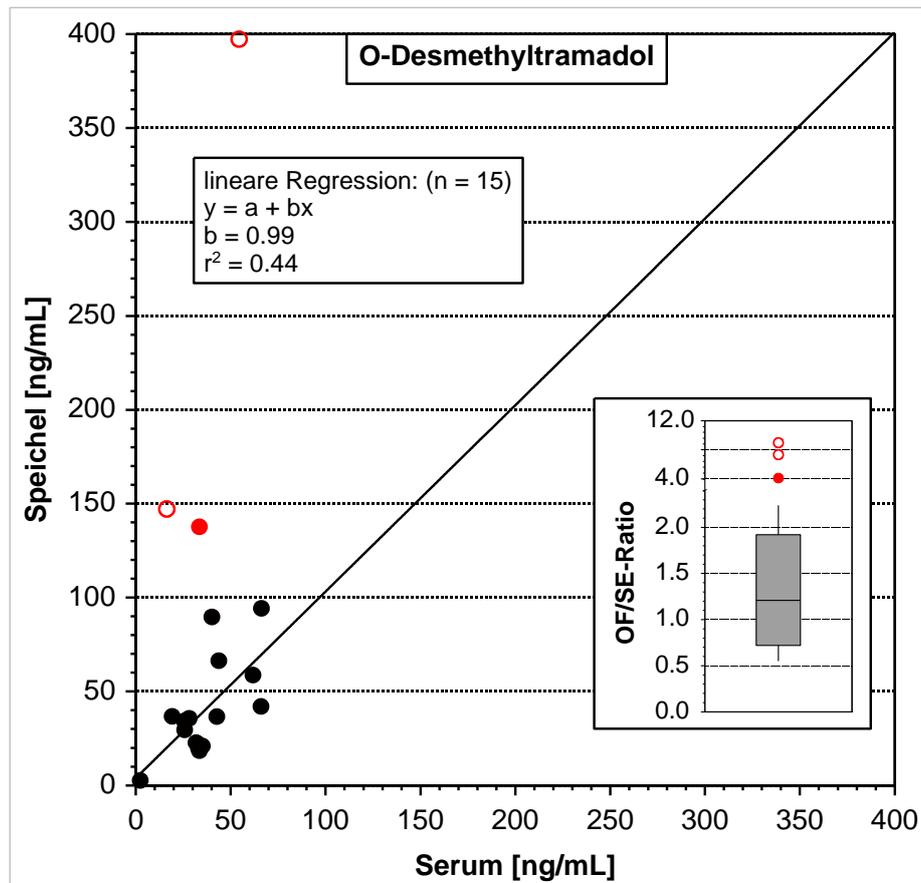


Abbildung 24: Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Tramadol (oben) und O-Desmethyltramadol (unten)

5.4.1.3 Statistik

Tabelle 31: Statistische Zusammenfassung der Geradengleichung von Hydromorphon und Tramadol sowie der rechnerisch ermittelten Speichel/Serum Ratios (OF/SE)

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Hydromorphon gesamt	61	3	1,26	0,93	0,87	0,001	0,94	0,87	54
Hydromorphon Entnahme 1	33	1	1,30	0,95	0,90	0,001	0,83	0,81	41
Hydromorphon Entnahme 2	28	1	1,20	0,90	0,80	0,001	1,11	0,95	43
Tramadol	19	1	5,90	0,74	0,55	0,001	5,07	4,61	44
O-DM-Tramadol	18	3	0,99	0,67	0,44	0,004	1,13	1,08	45

5.4.2 Psychopharmaka

5.4.2.1 Allgemeines

Von den 96 Patienten, die an der Studie teilnahmen, konnten insgesamt 100 getripelte Proben von Serum, Speichel und Ausatemluft gesammelt werden. Aus dem Serum wurden wie beschrieben Ultrafiltrate gewonnen, um die freie Arzneistoffkonzentration für Citalopram, N-Desmethylcitalopram, Escitalopram, (s)-N-Desmethylcitalopram, Mirtazapin, Quetiapin, Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin zu ermitteln. Serum, Ultrafiltrat und Speichel einer Probe wurden unmittelbar hintereinander vermessen und mit derselben Kalibrationsgerade ausgewertet. Trägt man Speichel- und Serumkonzentration gegeneinander auf, so liefert die Steigung der Regressionsgeraden Hinweise auf das zu erwartende OF/SE-Ratio. Es bietet sich für eine direkte graphische Erfassung des zu erwartenden Verhältnisses daher an, die Skalierung von X und Y-Achse anzugleichen. Um einen therapeutischen Bereich der jeweiligen Medikamente analog zu jenen im Serum für den Speichel ermitteln zu können, wird der therapeutische Bereich des Serums für das jeweilige Medikament mit der durchschnittlichen OF/SE-Ratio (Mittelwert-Bereich) und mit dem Median (Median-Bereich) der OF/SE-Ratio verglichen. Die Analyten werden hier nicht nach Substanzklassen unterteilt, sondern in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Statistische Ausreißer (im Rahmen des Boxplots ermittelt) wurden eliminiert und kamen regelhaft durch orale Kontamination der Mundhöhle durch Medikamentenreste oder durch eine vermutete fehlerhafte Anwendung des Speichelentnahmesystems zustande.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden in unter anderem in Neumann et al. 2018 veröffentlicht.

5.4.2.2 Aripiprazol

Aripiprazol konnte in allen zehn Proben sowohl im Speichel als auch im Serum nachgewiesen werden. Die Serumkonzentration bewegte sich zwischen 67,7 und 825 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 3,9 und 33,1 ng/mL. Die theoretisch ermittelten OF/SE-Ratios lagen bei: 6,2 (pH 4,4), 0,066 (pH 6,4) und bei 0,008 (pH 7,4). Damit entspricht dies ermittelte OF/SE-Ratio von Aripiprazol am ehesten der bei nicht stimuliertem Speichelfluss (Abbildung 25).

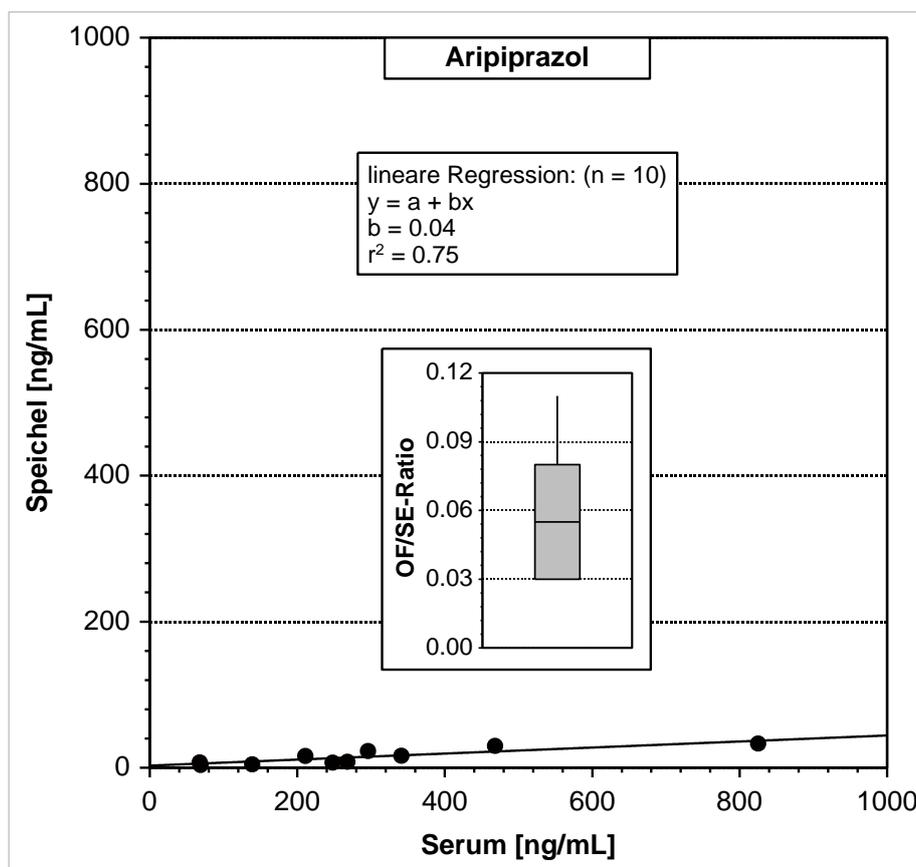


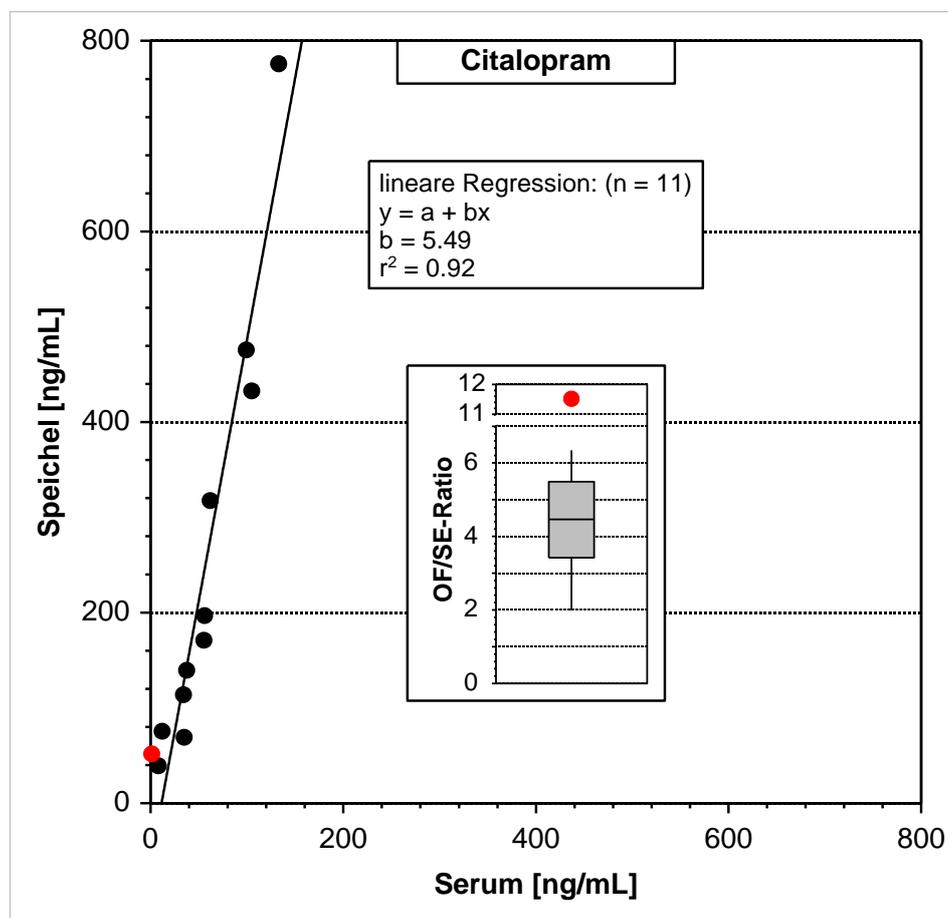
Abbildung 25: Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Aripiprazol

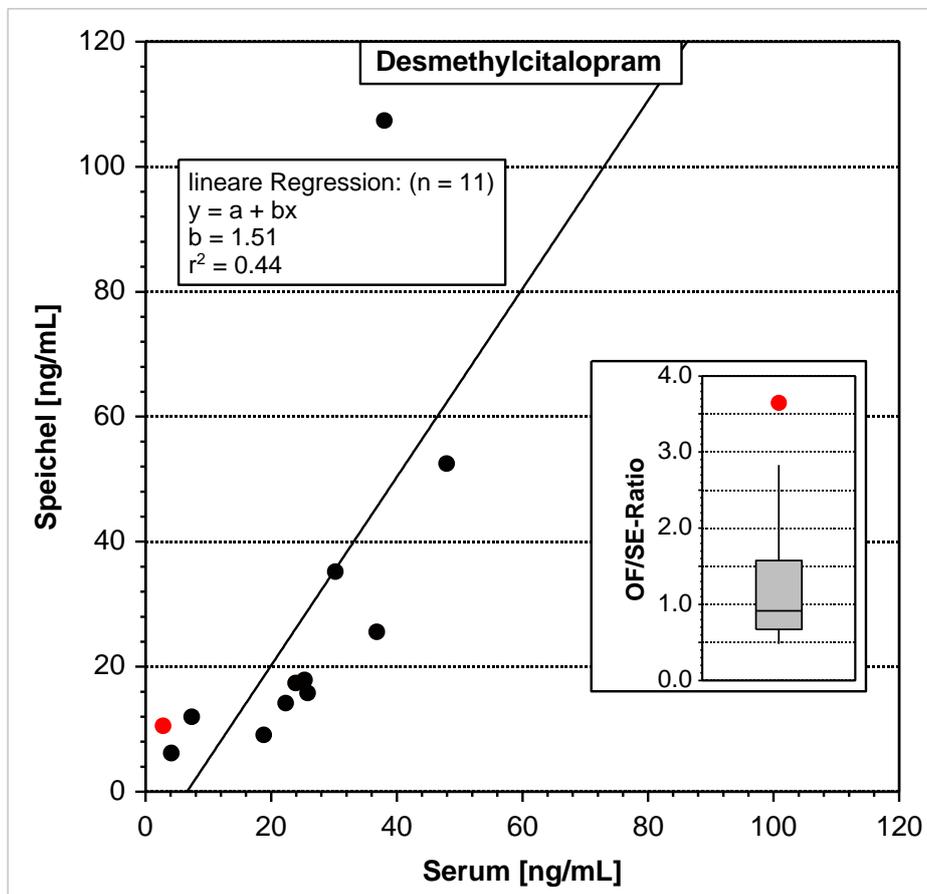
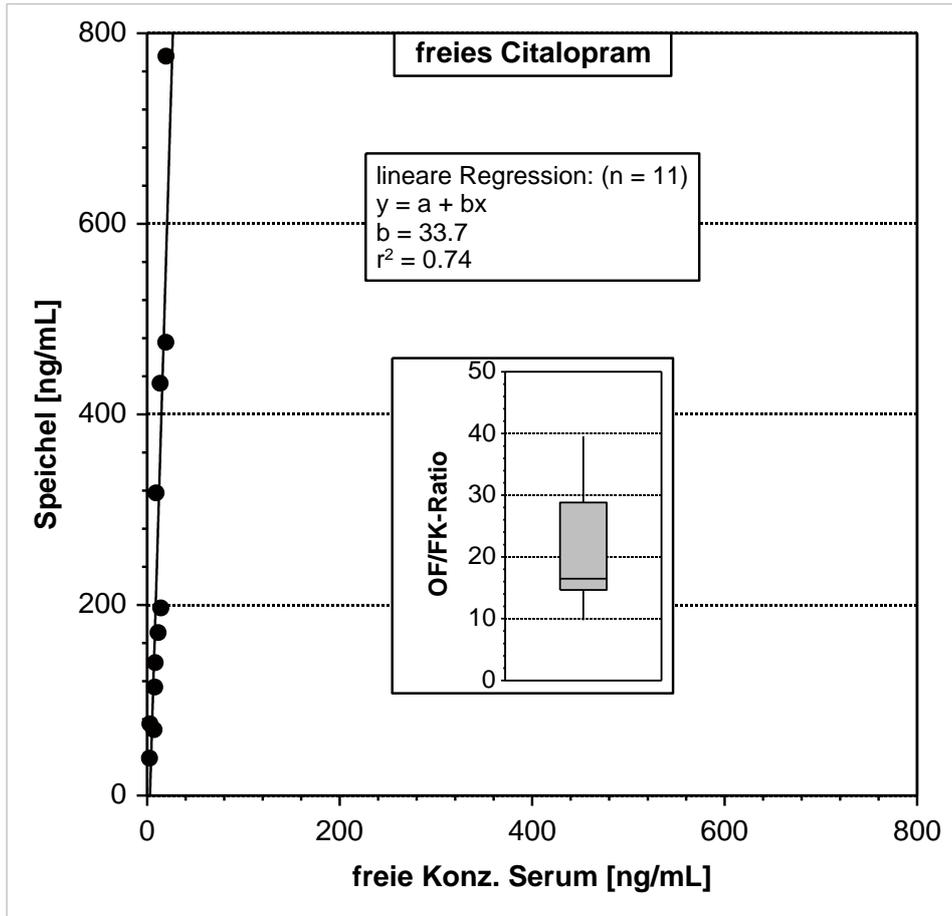
Tabelle 32: Statistische Parameter des OF/SE-Ratios von Aripiprazol

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Aripiprazol	10	0	0,04	0,87	0,75	0,001	0,057	0,055	47

5.4.2.3 Citalopram

Citalopram konnte in allen 12 Proben, sowohl im Serum als auch im Speichel, nachgewiesen werden. Die Serumkonzentration bewegte sich zwischen 4,3 und 133 ng/ml, die Speichelkonzentration zwischen 50 und 476 ng/ml. Ein Wert musste als Ausreißer eliminiert werden. Die Ermittlung der freien Serumkonzentration war in elf der zwölf Proben möglich, lediglich in Probe Nr. 16 war kein Citalopram mehr im Ultrafiltrat nachweisbar, was jedoch durch die Plasmaproteinbindung und die unspezifische Bindung zu erklären ist. Wie erwartet, war die OF/SE-frei-Ratio deutlich höher als die OF/SE-Ratio, da die Substanzkonzentrationen im Ultrafiltrat, bedingt durch die Plasmaproteinbindung, deutlich geringer sind. Mittelwert und Median lagen darüber hinaus auch deutlich weiter auseinander, was eine Normalverteilung der Werte fraglich macht. Die stärkere Streuung der Werte spiegelte sich auch im Korrelationskoeffizienten wider. Über die Bestimmung der freien Citalopram-Konzentration im Serum konnte darüber hinaus die Plasmaproteinbindung des Arzneistoffs ermittelt werden, die mit einem VK von 7% bei 79,2 % liegt. Die theoretisch ermittelten OF/SE-Ratios liegen bei: 208 (pH 4,4), 2,1 (pH 6,4) und 0,21 (pH 7,4). Auch hier entsprach die ermittelte OF/SE-Ratio am ehesten dem von nicht stimuliertem Speichelfluss.





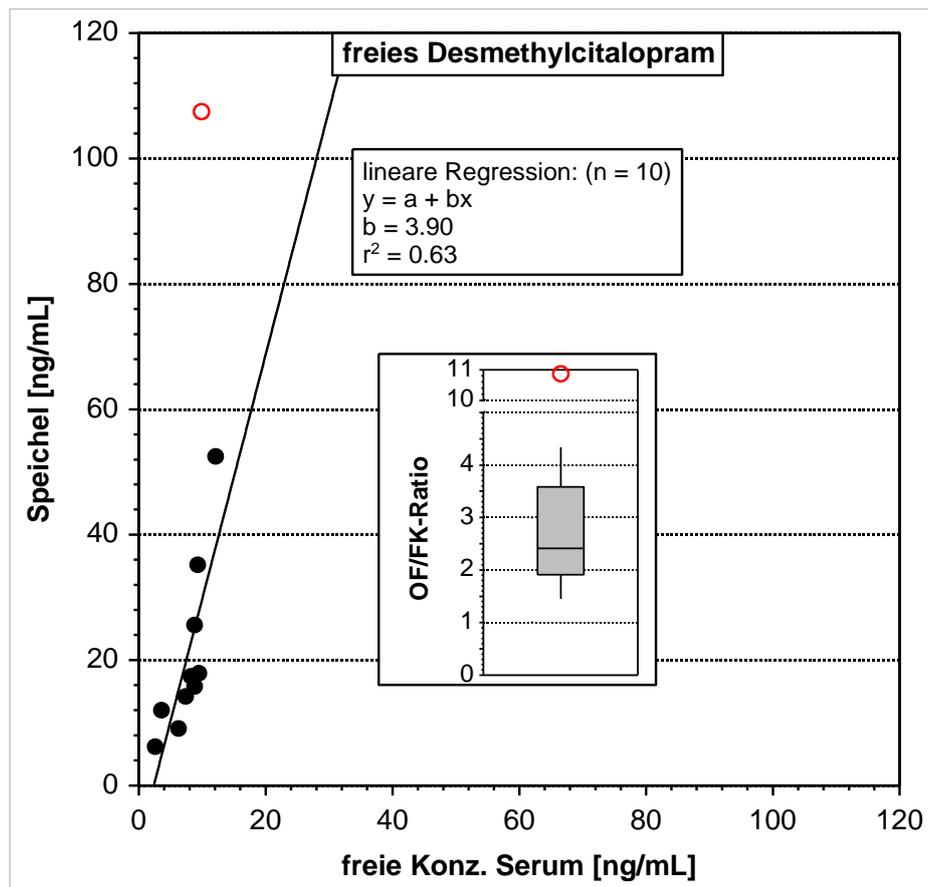


Abbildung 26: Korrelation der Speichel und Serumkonzentration von Citalopram auch verwendet in Neumann et al. 2018

Der nicht aktive Metabolit des Citaloprams, das N-Desmethylcitalopram, war ebenfalls in allen zwölf gepaarten Serum- und Speichel-Proben nachweisbar, wovon ebenfalls eine Probe als Ausreißer eliminiert werden musste, da sie eine stark erhöhte OF/SE-Ratio aufwies. Die freie Desmethylcitalopram-Konzentration konnte in elf von zwölf Fällen ermittelt werden, eine Probe wurde auch hier als statistisch ermittelte Ausreißer eliminiert. Die ermittelte Plasmaproteinbindung entsprach 64,6 %. Theoretische OF/SE-Ratios konnten wegen fehlender pKs-Werte für N-Desmethylcitalopram nicht ermittelt werden (Abb. 26).

Tabelle 33: Statistische Parameter des OF/SE-Ratios von Citalopram, Desmethylcitalopram, freiem Citalopram und freiem Desmethylcitalopram

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Citalopram	12	1	5,49	0,92	0,92	0,001	4,25	4,12	30
DM-Citalopram	12	1	1,51	0,66	0,44	0,015	1,10	0,73	63
Citalopram (frei)	11	0	33,7	0,86	0,74	0,001	22,0	16,5	45
DM-Citalopram (frei)	11	1	3,90	0,80	0,63	0,004	2,60	2,27	37

5.4.2.4 Escitalopram

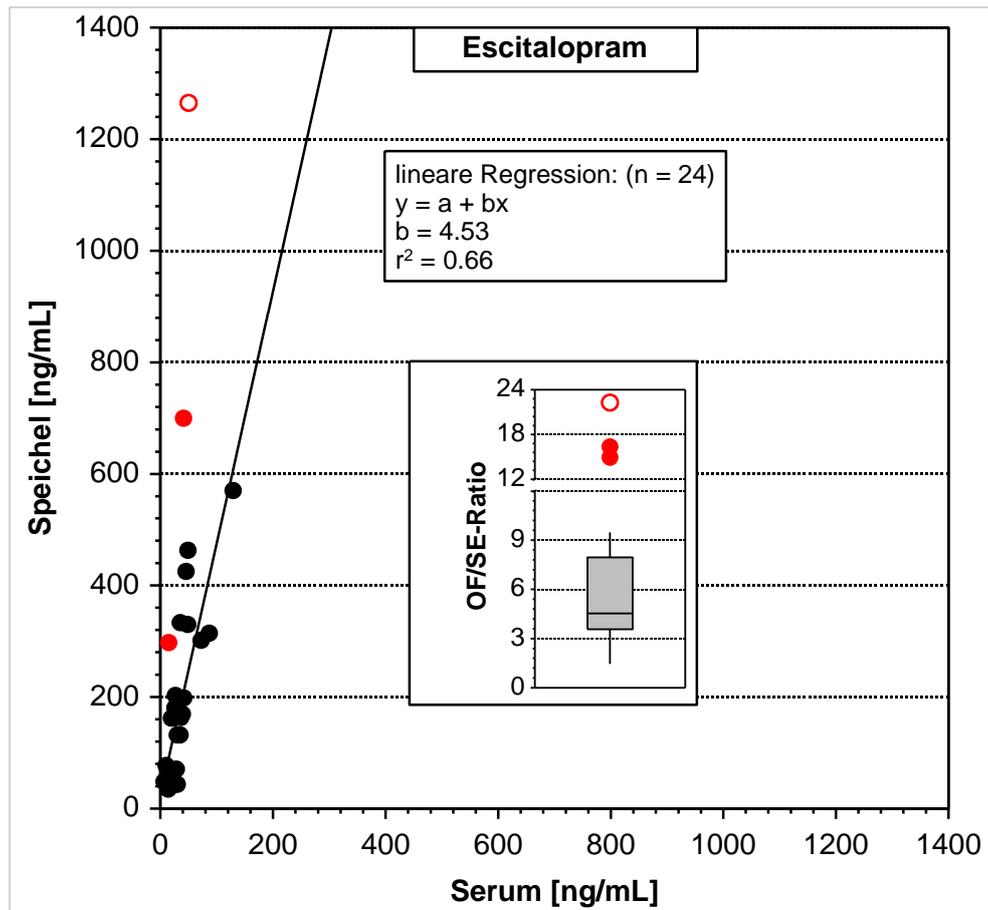
Escitalopram, das S-Enantiomer des Citaloprams, konnte in 27 gepaarten Serum und Speichelproben, von denen drei als Ausreißer eliminiert werden mussten (wegen vermuteter oraler Kontamination), nachgewiesen werden. Die Steigung der Ausgleichsgeraden, welche sich aus Speichel- und Serumkonzentration ergibt, lag bei 4,53, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,81 und einem Bestimmungsmaß von 0,66. Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio lag bei 5,17, der Median bei 4,41 mit einem VK von 49 %. Diese Werteverteilung spricht gegen eine Normalverteilung der Werte, wobei die Steigung der Ausgleichsgeraden recht gut mit dem Medianwert übereinstimmt. Die Bestimmung der freien Serumkonzentration des Escitaloprams war wegen der geringen Serumkonzentration des Arzneimittels nur in 23 von 27 Proben möglich. Es ergab sich eine Steigung der Ausgleichsgeraden von Speichel- und freier Escitalopramkonzentration von 26,5 während dies mathematisch ermittelte OF/SE_{frei}-Ratio bei 42,0 lag und der entsprechende Median bei 24,5, bei einem VK von 85 %. Der Korrelationskoeffizient lag mit 0,42 deutlich niedriger als bei der Betrachtung der Gesamt-Escitalopram-Konzentration. Die deutlich erhöhte Streuung der Werte resultierte vermutlich unter anderem aus der geringen Analytkonzentration im Ultrafiltrat. Der therapeutische Bereich im Serum lag zwischen 15 und 80 ng/mL und davon ausgehend bei 77,6 bis 414 ng/mL für den Speichel, ausgehend von einer mittleren OF/SE-Ratio, und 66,2 bis 353 ng/mL, ausgehend vom Median. Die Plasmaproteinbindung von Escitalopram, ermittelt aus 23 Werten, betrug im Mittel 81,1 % bei einem VK von 7%.

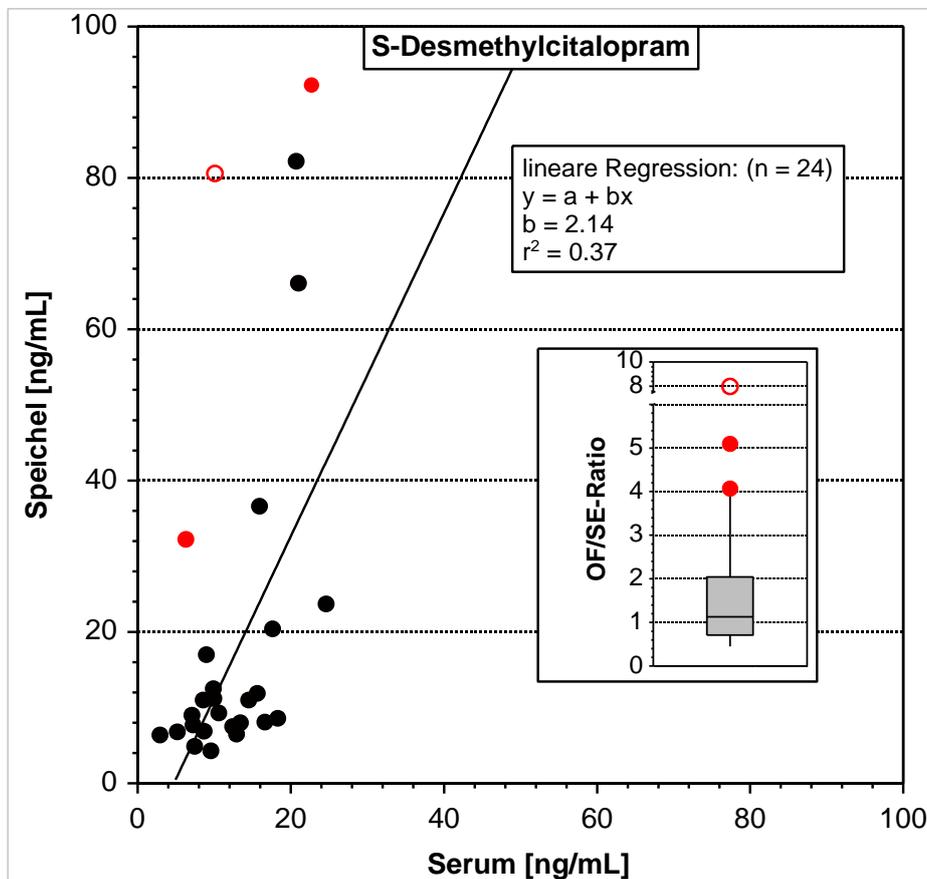
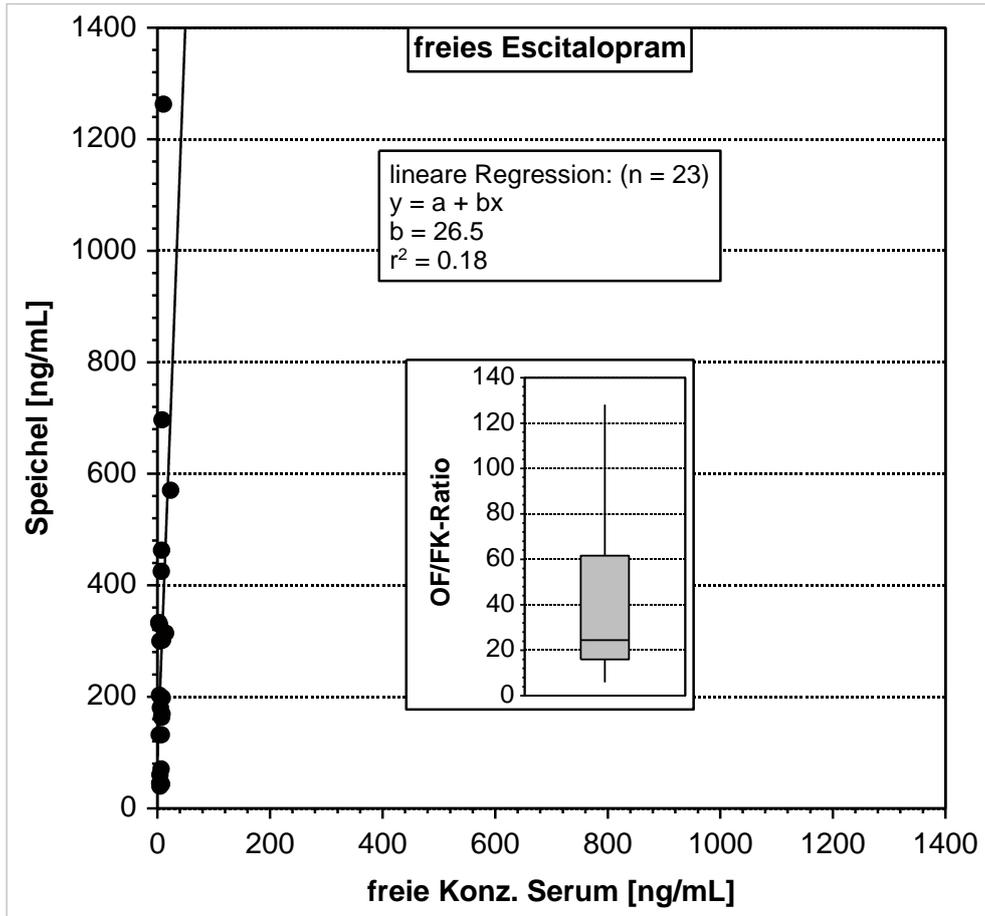
Ein Metabolit des Escitaloprams, das (s)-N-Desmethylocitalopram, konnte in allen Proben detektiert werden, in denen die Muttersubstanz detektiert werden konnte. Es mussten dieselben Proben als Ausreißer eliminiert werden wie bei der Muttersubstanz. Die Serumkonzentration bewegte sich in einem Bereich zwischen 2,9 und 22,7 ng/ml und die Speichelkonzentration zwischen 4,3 und 93,3 ng/ml. Die Steigung der Ausgleichsgeraden aus Serum und Speichelkonzentration lag bei 2,13, mit einem signifikanten Korrelationskoeffizienten von 0,61 und einem Bestimmungsmaß von 0,37.

Die mittlere, mathematisch ermittelte Ratio lag bei 1,25 und damit nur halb so hoch wie die Steigung der Ausgleichsgeraden. Der Median lag bei 1,0, bei einem hohen Variationskoeffizienten von 70 %. Eine Normalverteilung der Werte ist nicht ausgeschlossen, doch in Verbindung mit der sehr hohen Streuung unwahrscheinlich. Eine Bestimmung der freien (s)-N-Desmethylocitalopram-Konzentration war in 25 der 27 Proben möglich, es mussten dieselben drei Proben eliminiert werden, wobei eine der Proben wegen vermutlicher oraler Kontamination

einen Ausreißer darstellte. Die mittlere OF/SE_{frei}-Ratio für (s)-N-Desmethylocitalopram war mit 4,89 etwa vierfach höher als bei der Gesamtkonzentration des (s)-N-Desmethylocitaloprams im Serum, der Median war mit 2,93 nur etwa halb so hoch wie der Mittelwert. Eine Normalverteilung der Werte ist damit sehr unwahrscheinlich und der VK von 81 % bestätigt dies. Der Korrelationskoeffizient zwischen Speichel und freier Serumkonzentration lag bei 0,46.

Die Plasmaproteinbindung für (s)-N-Desmethylocitalopram, ermittelt aus 25 Werten, liegt bei 66 % mit einem Variationskoeffizienten von 24 %.





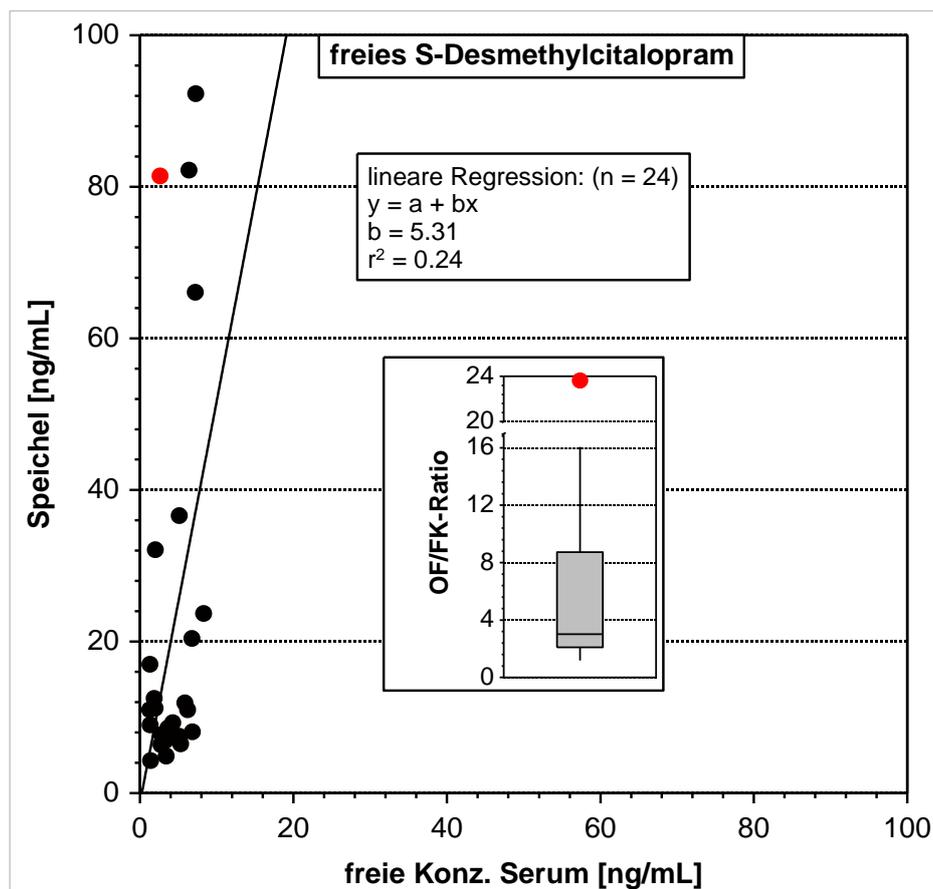


Abbildung 27: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Escitalopram und seine Metaboliten

Tabelle 34: Statistische Parameter der OF/SE-Ratios von Escitalopram und seinem Metaboliten sowie von freiem Escitalopram und seinem Metaboliten

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Escitalopram	27	3	4,53	0,81	0,66	0,001	5,17	4,41	49
S-DM-Citalopram	27	3	2,14	0,61	0,37	0,002	1,25	1,01	70
Escitalopram (frei)	24	0	26,5	0,42	0,18	0,025	42,0	24,5	83
S-DM-Citalopram (frei)	25	1	5,31	0,49	0,24	0,008	5,36	2,93	81

5.4.2.5 Duloxetine

Duloxetine konnte in elf gepaarten Serum- und Speichelproben nachgewiesen werden, von denen eine wegen stark erhöhter OF/SE-Ratio als Ausreißer eliminiert wurde. Die Serumkonzentrationen lagen zwischen 8,7 und 183 ng/ml, die korrespondierenden Speichelkonzentrationen lagen zwischen 7,4 und 117 ng/mL. Eine freie Duloxetine-Konzentration konnte wegen hoher

Plasmaproteinbindung und einer hohen unspezifischen Bindung nicht ermittelt werden. Die theoretischen Ratios des Duloxetins liegen bei 100 (pH-Wert: 4,4), bei 1,0 (pH-Wert: 6,4) und bei 0,1 (pH-Wert: 7,4). Der therapeutische Bereich des Duloxetins im Serum liegt zwischen 30 und 120 ng/mL, der Mittelwert-Bereich des Speichels dementsprechend bei 19,5 und 78,0 ng/mL, der Medianbereich zwischen 18,0 bis 72,0 ng/mL.

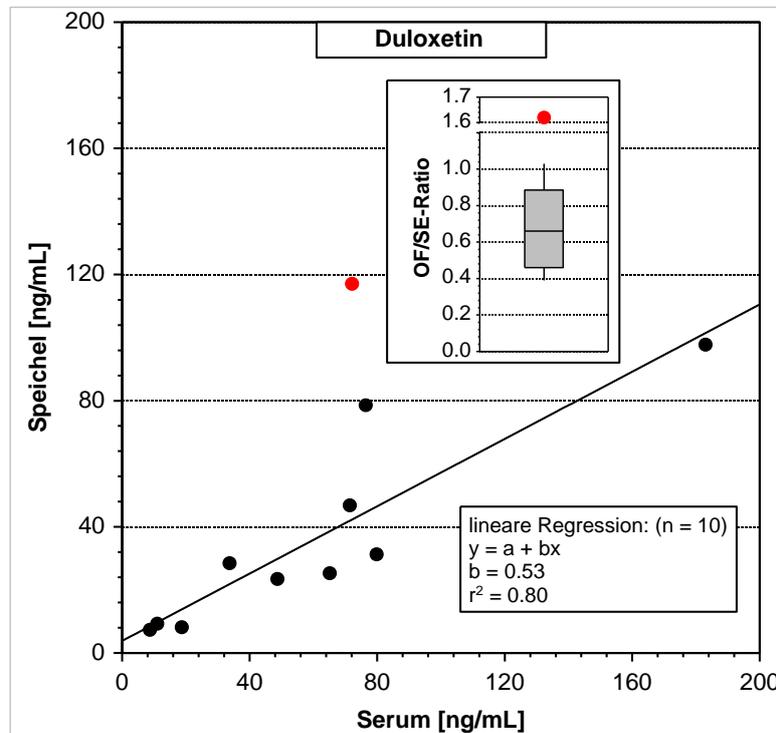


Abbildung 28: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Duloxetin

Tabelle 35: Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Duloxetin

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Duloxetin	11	1	0,53	0,89	0,80	0,001	0,65	0,60	37

5.4.2.6 Mirtazapin

Mirtazapin konnte in siebzehn Proben sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen werden. Die Serumkonzentration bewegte sich zwischen 5,6 und 84,1 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 10,9 und 276 ng/mL. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich eine Steigung von 3,47 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,90 mit einem Bestimmungsmaß von 0,81. Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio liegt bei 4,09 und der Median bei 3,82, bei einem VK von 38 %, was für eine Normalverteilung der Werte spricht. Die theoretisch ermittelten OF/SE-Ratios liegen bei: 51,9 (pH-Wert 4,4), 0,62 (pH-Wert 6,4) und 0,14 (pH-Wert 7,4). Eine Ermittlung der freien

Serumkonzentration von Mirtazapin war in zwölf der siebzehn Proben möglich, eine der Proben wurde als Ausreißer eliminiert. Die Steigung der Ausgleichsgeraden von Speichel- und freier Serumkonzentration lag bei 46,0, der Korrelationskoeffizient bei 0,89, die mittlere OF/SE_{frei}-Ratio bei 27,6 und einem Median von 26,2, bei einem Variationskoeffizienten von 48 %. Auch hier nimmt die Streuung der Werte mit Bestimmung der freien Serumkonzentration deutlich zu und die Korrelation zur Speichelkonzentration ab. Der therapeutische Bereich für Mirtazapin im Serum liegt zwischen 30 und 80 ng/mL, daraus ergibt sich ein Mittelwert-Bereich im Speichel von 123 bis 328 ng/mL und ein Median-Bereich von 115 und 306 ng/mL. Es ergab sich eine Plasmaproteinbindung für Mirtazapin aus zwölf Proben von 84,6 % (siehe Abbildung 29).

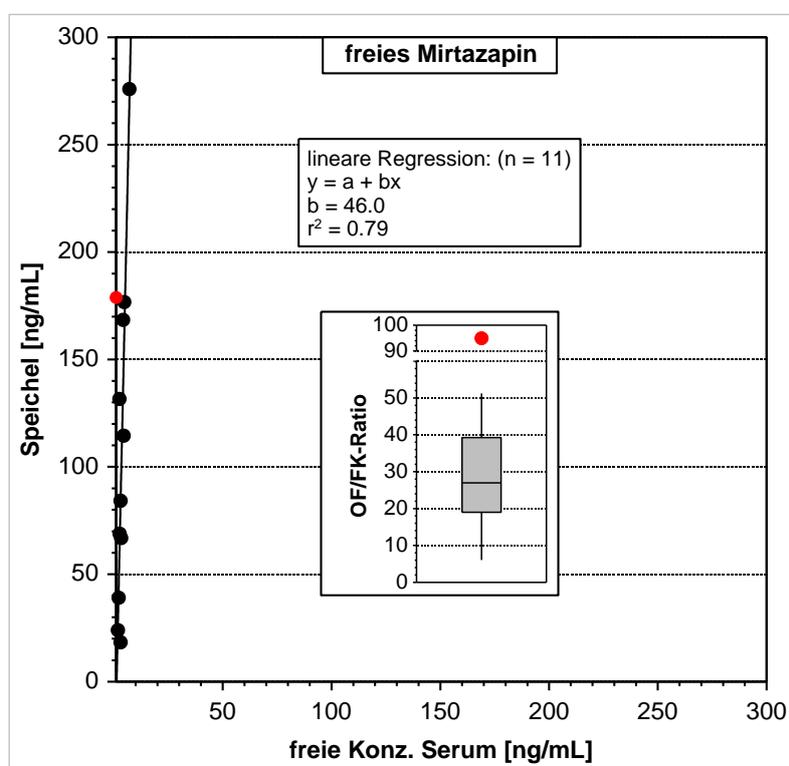


Abbildung 29: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Mirtazapin

Tabelle 36: Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Mirtazapin

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Mirtazapin	17	0	3,47	0,90	0,81	0,001	4,09	3,82	38

5.4.2.7 Pipamperon

Pipamperon konnte in elf Proben sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen werden. Die Serumkonzentration bewegt sich zwischen 4,9 und 173 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 2,3 und 648 ng/mL. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so

ergibt sich eine Steigung von 5,95 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,71 mit einem Bestimmungsmaß von 0,51. Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio lag bei 6,50 und der Median bei 5,31 bei einem VK von 62 %, was gegen eine Normalverteilung der Werte spricht. Die Streuung der Werte ist verhältnismäßig hoch und einige OF/SE-Ratios hoch, allerdings ließ sich keiner der Werte als Ausreißer eliminieren. Die Bestimmung der freien Pipamperon-Konzentration im Serum war erst nach der eigentlichen Messreihe separat im Nachhinein möglich, allerdings fand zuvor keine Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Ultrafiltrationsmethode mit echten Patientenserum statt, da nicht genügend Patientenproben vorhanden waren. In neun der insgesamt 11 Proben war noch genügend Material für eine Bestimmung der freien Pipamperon-Konzentration vorhanden. Die unspezifische Bindung wurde wie oben beschrieben bestimmt. Daraus ergab sich eine Plasmaproteinbindung von 67 % bei einem Variationskoeffizienten von 6,4 %.

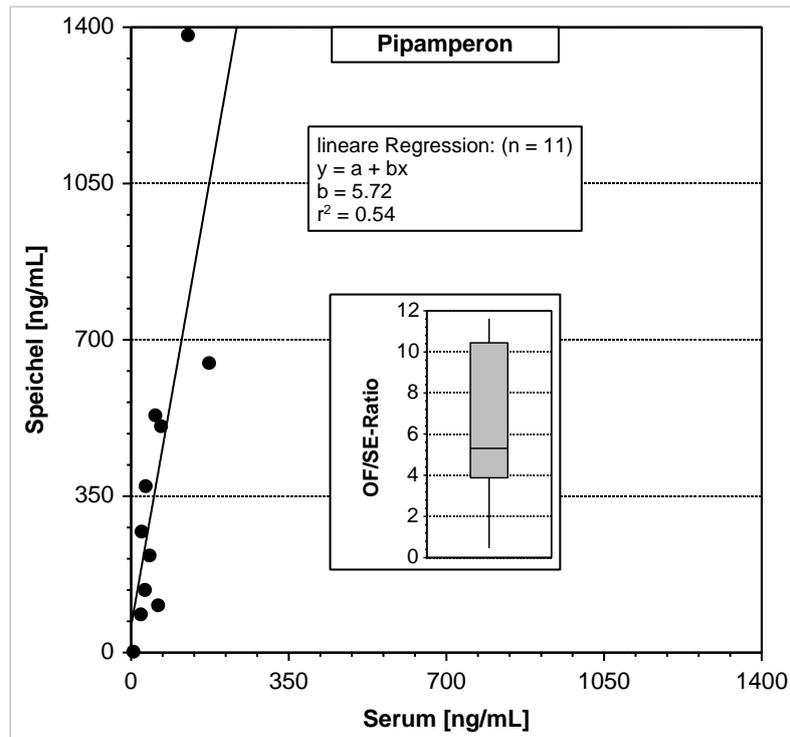


Abbildung 30: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Pipamperon

Ausgehend von dieser Plasmaproteinbindung, ergaben sich theoretische OF/SE-Ratios von 264 (pH-Wert 4,4), 2,7 (pH-Wert 6,4), 0,3 (pH-Wert 7,4). Dies theoretische OF/SE-Ratio entspricht also ungefähr der bei nicht stimuliertem Speichelfluss.

Tabelle 37: Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Pipamperon

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Pipamperon	11	0	5072	0,73	0,54	0,005	6,50	5,31	62

5.4.2.8 Pregabalin

Pregabalin konnte in neun Proben sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen werden. Die Serumkonzentration bewegte sich zwischen 361 und 3219 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 58 und 335 ng/mL. Zwei Proben mussten als statistische Ausreißer eliminiert werden. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich eine Steigung von 0,09 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,92, mit einem Bestimmungsmaß von 0,84. Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio liegt bei 0,11 und der Median bei 0,10, bei einem VK von 18 %, was für eine Normalverteilung der Werte spricht. Der therapeutische Bereich des Pregabalins im Serum liegt zwischen 2000 und 5000 ng/mL, während der therapeutische Bereich im Speichel, bezogen auf den Mittelwert, zwischen 220 und 550 ng/ml liegt und, bezogen auf den Median, zwischen 200 und 500 ng/mL.

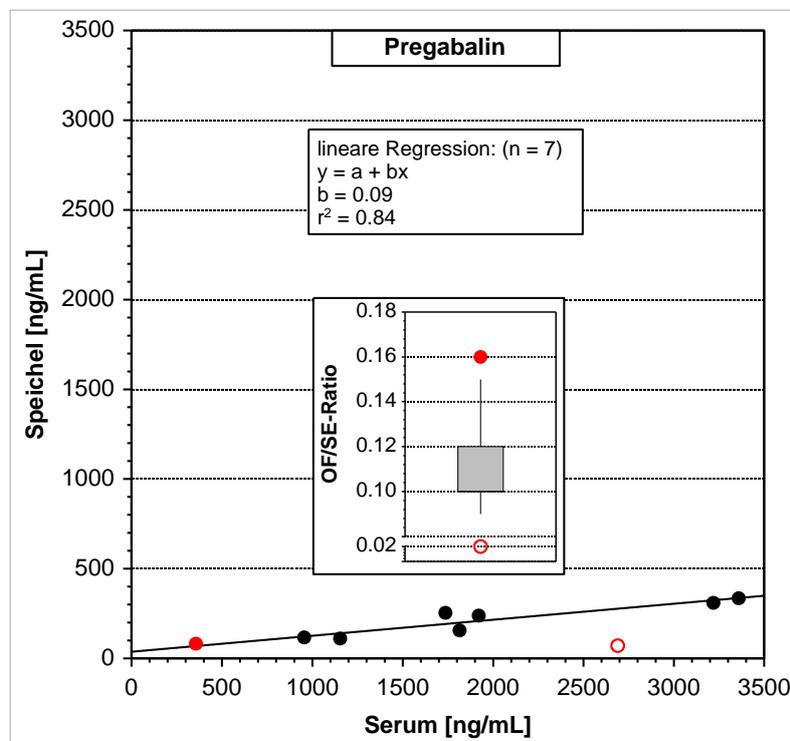
**Abbildung 31:** Korrelation von Speichel und Serumkonzentration Pregabalin

Tabelle 38: Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Pregabalin

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Pregabalin	9	2	0,09	0,92	0,84	0,003	0,11	0,10	18

5.4.2.9 Promethazin

Promethazin konnte in sieben Proben sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen werden. Die Serumkonzentration bewegte sich zwischen 10,4 und 74,4 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 15,5 und 231 ng/mL. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich eine Steigung von 3,13 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,97 mit einem Bestimmungsmaß von 0,95. Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio lag bei 3,02 und der Median bei 3,11, bei einem VK von 38 %, was für eine Normalverteilung der Werte spricht.

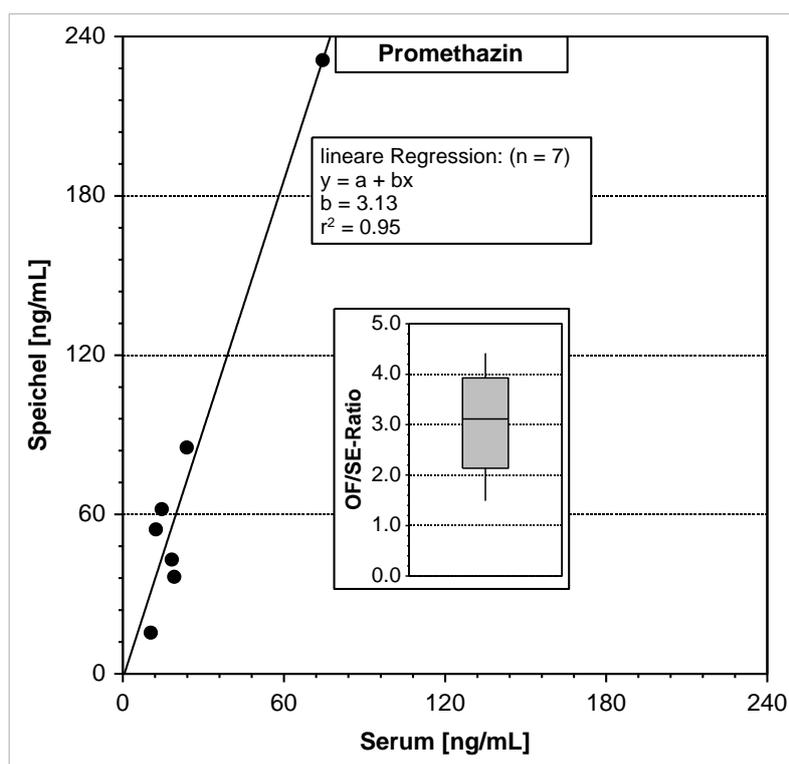


Abbildung 32: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Promethazin auch verwendet in Neumann et al. 2018

Die theoretisch ermittelten OF/SE-Ratios lagen bei: 69,3 (pH 4,4), 0,69 (pH 6,4) und 0,07 (pH 7,4). Damit entsprach die ermittelte OF/SE-Ratio von Promethazin am ehesten der bei nicht stimuliertem Speichelfluss. Der therapeutische Bereich für Promethazin im Serum lag zwischen 50 und 400 ng/mL, der therapeutische Bereich des Medikaments im Speichel ausgehend vom

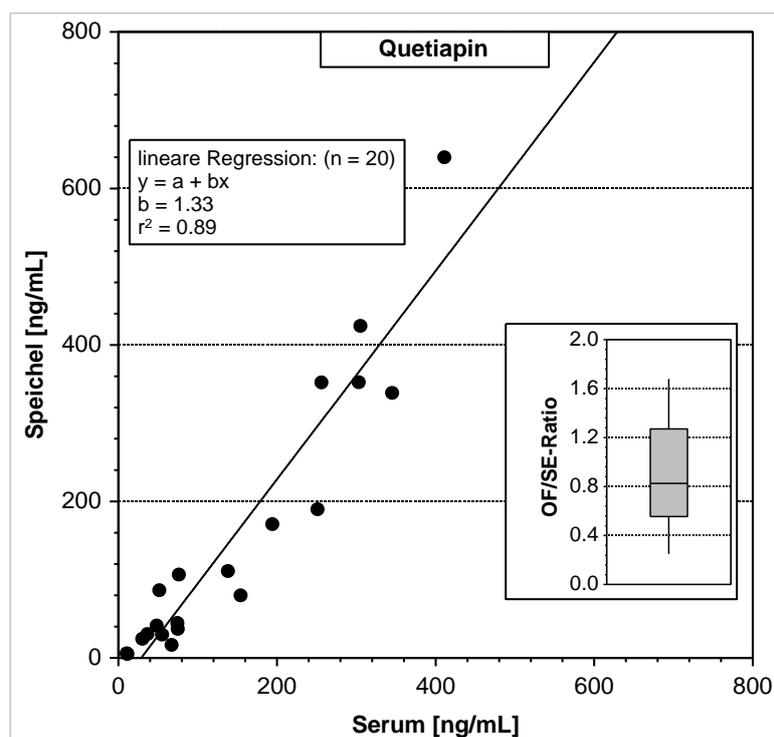
mittleren OF/SE-Ratio zwischen 151 und 1208 ng/mL, ausgehend vom Median zwischen 156 und 1244 ng/mL.

Tabelle 39: Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Promethazin

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Promethazin	7	0	3,13	0,97	0,95	0,001	3,02	3,11	38

5.4.2.10 Quetiapin

Quetiapin konnte in zwanzig Proben sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen werden. Die Serumkonzentration bewegte sich zwischen 10,3 und 411 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 5,3 und 640 ng/mL. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich eine Steigung von 1,33 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,95 mit einem Bestimmungsmaß von 0,89. Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio lag bei 0,89 und der Median bei 0,83, bei einem VK von 46 %, was für eine Normalverteilung der Werte spricht. Die Ermittlung der freien Serumkonzentration von Quetiapin war in neunzehn der zwanzig Proben möglich. Die Steigung der Ausgleichsgeraden von Speichel- und freier Serumkonzentration lag bei 16,7, der Korrelationskoeffizient bei 0,94, die mittlere OF/SE_{frei}-Ratio bei 9,48 und der Median bei 8,39, bei einem Variationskoeffizienten von 49 %.



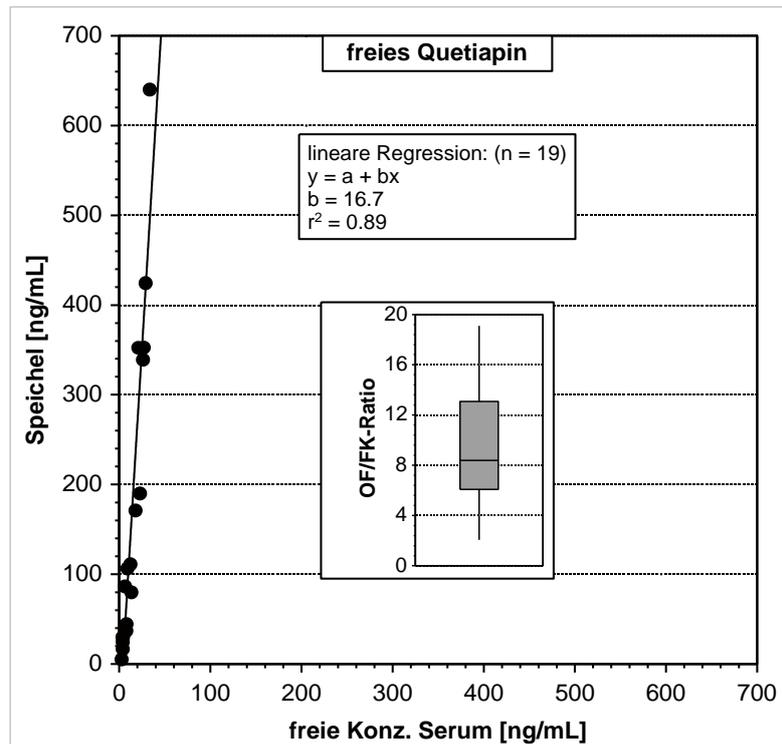


Abbildung 33: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Quetiapin

Der therapeutische Bereich im Serum für Quetiapin lag zwischen 100 und 500 ng/ml, der Mittelwert-Bereich des Speichels zwischen 89 und 445 ng/ml und der Median-Bereich zwischen 83 und 415 ng/mL.

Tabelle 40: Statistische Parameter der OF/SE-Ratio von Quetiapin

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Quetiapin	20	0	1,33	0,95	0,89	0,001	0,89	0,83	46

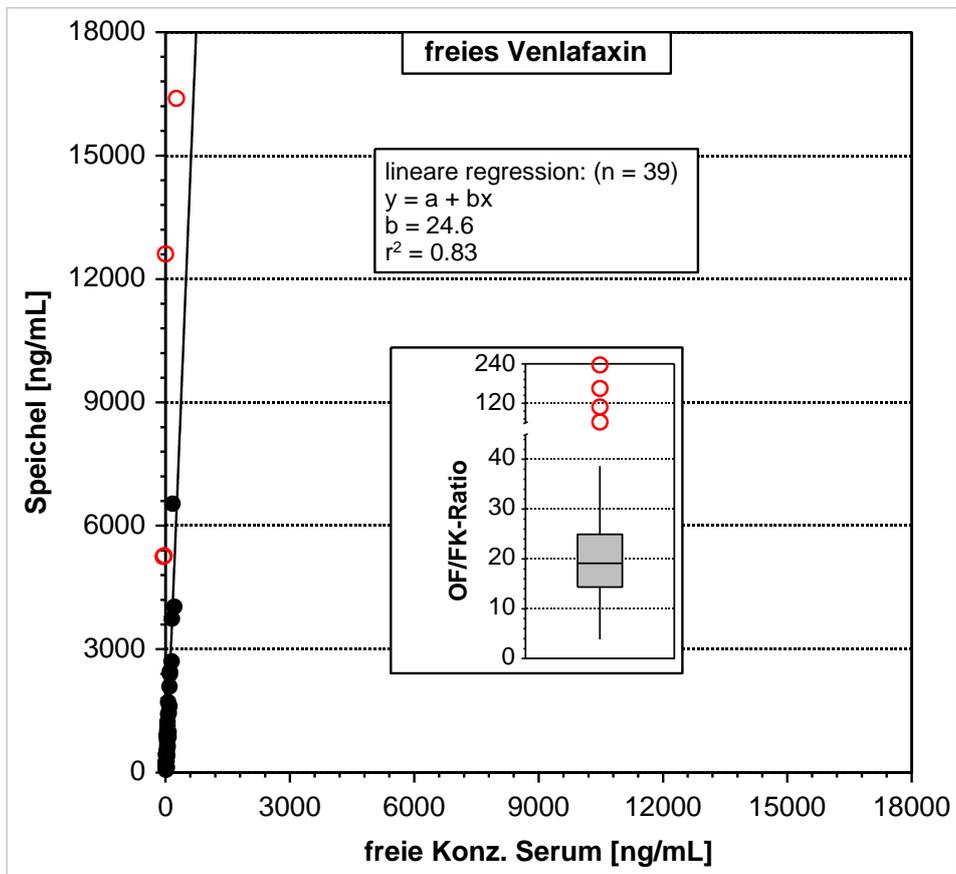
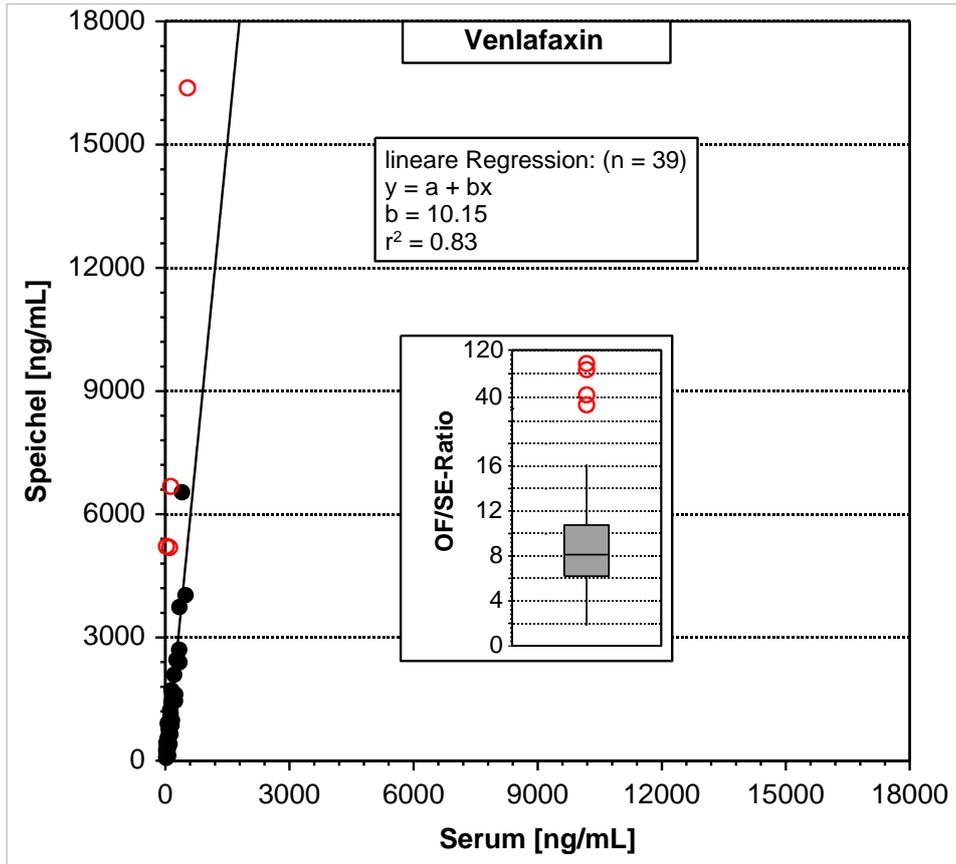
5.4.2.11 Venlafaxin

Venlafaxin konnte in 43 Proben sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen werden. Die Serumkonzentration lag zwischen 20,6 und 595 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 69,5 und 16384 ng/mL. Vier der 43 Proben mussten wegen extrem hoher Speichelkonzentrationen, die vermutlich aus oraler Kontamination mit Venlafaxinresten aus einer vorangegangenen Einnahme stammen, eliminiert werden. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich eine Steigung von 10,2 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,90 mit einem Bestimmungsmaß von 0,83. Das mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio lag bei 8,12 und der Median bei 7,71, bei einem VK von 42 %, was für eine annähernde Normalverteilung der Werte spricht. Ermittlung der freien Serumkonzentration von Venlafaxin war in allen Proben möglich. Es wurden dieselben Proben eliminiert wie bei der Betrachtung der Gesamt-Venlafaxin-Konzentration. Die Steigung der Ausgleichsgeraden von Speichel- und freier Serumkonzentration lag bei 24,6, der Korrelationskoeffizient bei 0,91, die mittlere OF/SE_{frei}-Ratio bei 18,8 und der Median bei 18,3, bei einem Variationskoeffizienten von 41 %. Damit blieb die Streuung der Werte unverändert. Aus den vorhandenen Werten konnte eine Plasmaproteinbindung von 56,1 % ermittelt werden, mit einem VK von 10 %.

Die theoretisch ermittelten OF/SE-Ratios lagen, bezogen auf die ermittelte Plasmaproteinbindung, bei: 439 (pH 4,4), 4,39 (pH 6,4) und 0,44 (pH 7,4). Damit entsprach die ermittelte OF/SE-Ratio von Venlafaxin am ehesten der bei nicht stimuliertem Speichelfluss.

Der aktive Metabolit des Venlafaxins, O-Desmethylvenlafaxin, konnte in allen 43 Proben, in denen auch die Muttersubstanz detektiert werden konnte, sowohl im Speichel als auch im Serum nachgewiesen werden. Die Serumkonzentration lag zwischen 38,8 und 823 ng/mL, die Speichelkonzentration zwischen 95,6 und 14421 ng/mL. Es mussten dieselben vier Proben als Ausreißer eliminiert werden wie bei der Muttersubstanz. Trägt man Speichel und Serumkonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich eine Steigung von 4,38 und ein signifikanter Korrelationskoeffizient von 0,84 mit einem Bestimmungsmaß von 0,70.

Die mathematisch ermittelte mittlere OF/SE-Ratio lag bei 2,95 und der Median bei 2,52, bei einem VK von 52 %, was für eine annähernde Normalverteilung der Werte spricht. Die Ermittlung der freien Serumkonzentration von O-Desmethylvenlafaxin war in allen Proben möglich. Es wurden dieselben Proben eliminiert wie bei der Betrachtung der Gesamt-O-Desmethylvenlafaxin-Konzentration. Aus den vorhandenen Werten konnte eine Plasmaproteinbindung von 24,4 % bei einem VK 22 % von ermittelt werden.



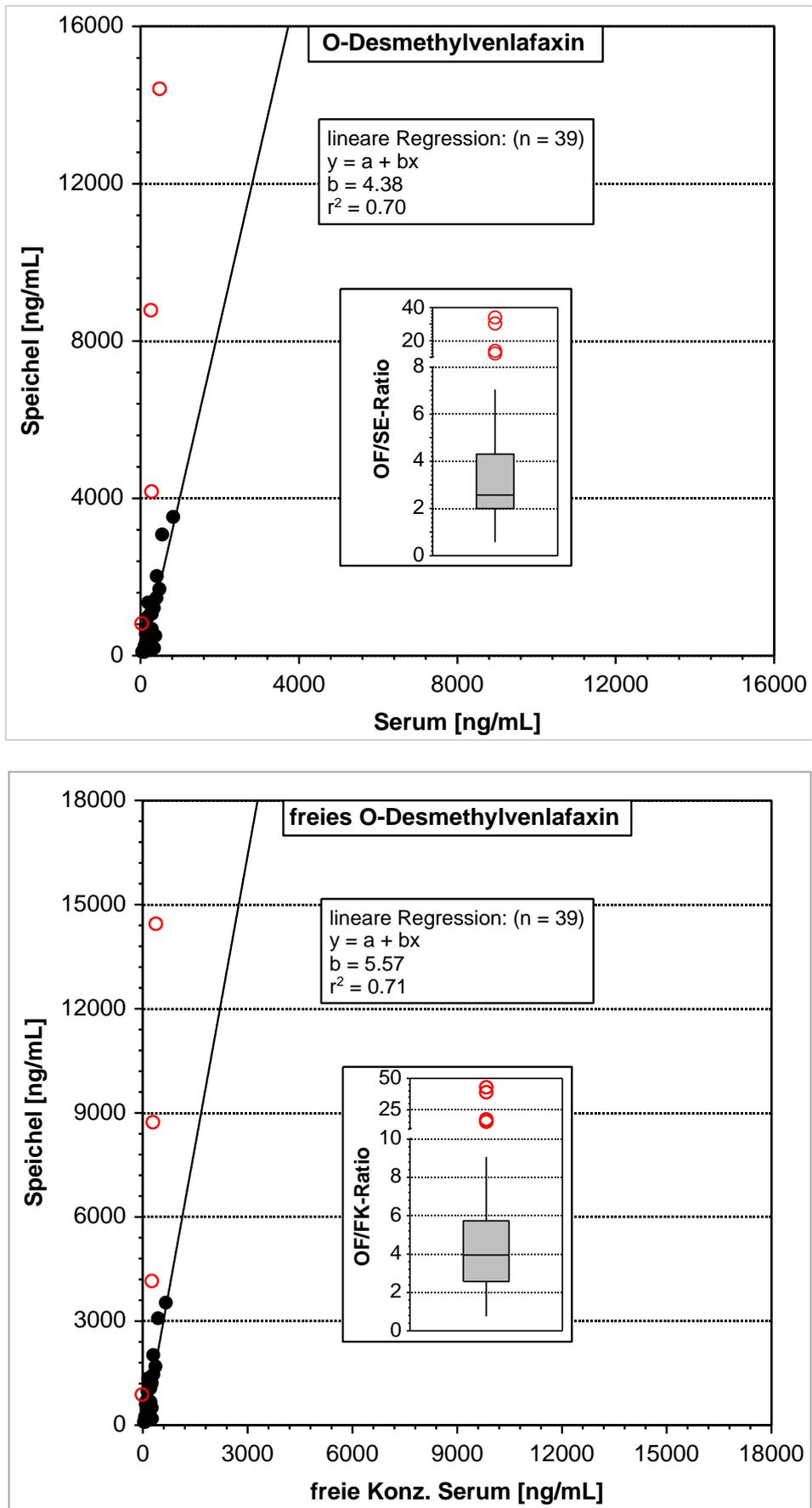


Abbildung 34: Korrelation von Speichel und Serumkonzentration für Venlafaxin und seinen Metaboliten

Der therapeutische Bereich für Venlafaxin wird als Summe von Venlafaxin und seinem aktiven Metaboliten, dem O-Desmethylvenlafaxin, angegeben und liegt zwischen 100 und 400 ng/mL. Da sich die OF/SE-Ratios für Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin deutlich unterschieden, wurde der therapeutische Bereich nicht direkt übertragen. Um ihn trotzdem bestimmen zu können, ist es möglich, sich des Verhältnisses von O-Desmethylvenlafaxins zu Venlafaxin im Blut bedienen, welches laut Hiemke et al. (2011) 0,3 bis 5,2 für extensive und intermediäre Metabolisierer beträgt.

Wendet man diese Verhältnisse auf die OF/SE-Ratios der beiden Substanzen an und addiert die sich daraus ergebenden OF/SE-Ratios, ergeben sich zwei unterschiedliche Bereiche, welche zu einer gemeinsamen OF/SE-Ratio addiert werden können.

Mittelwert:

$$8,12 \times 0,7 + 2,95 \times 0,3 = 6,57 \rightarrow 657 - 2628 \text{ ng/mL}$$

$$8,12 \times 0,19 + 2,95 \times 0,81 = 2,30 \rightarrow 230 - 920 \text{ ng/mL}$$

Median:

$$7,71 \times 0,7 + 2,52 \times 0,3 = 6,16 \rightarrow 616 - 2464 \text{ ng/mL}$$

$$7,71 \times 0,19 + 2,52 \times 0,81 = 3,50 \rightarrow 350 - 1400 \text{ ng/mL}$$

Daraus ergab sich ein Mittelwertbereich von 230 bis 2628 ng/mL, ein therapeutischer Bereich von 230 bis 2628 ng/mL und ein Medianbereich von 350 bis 2464 ng/mL.

Tabelle 41: Statistische Parameter der OF/SE-Ratios von Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Venlafaxin	43	4	10,2	0,90	0,83	0,001	8,12	7,71	42
O-DM-Venlafaxin	43	4	4,38	0,84	0,70	0,001	2,95	2,52	52

5.4.3 Zusammenfassung

Tabelle 42: Statistische Parameter der OF/SE-Ratios der Analgetika

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Hydromorphon gesamt	61	3	1,26	0,93	0,87	0,001	0,94	0,87	54
Hydromorphon Entnahme 1	33	1	1,30	0,95	0,90	0,001	0,83	0,81	41
Hydromorphon Entnahme 2	28	1	1,20	0,90	0,80	0,001	1,11	0,95	43
Tramadol	19	1	5,90	0,74	0,55	0,001	5,07	4,61	44
O-DM-Tramadol	18	3	0,99	0,67	0,44	0,004	1,13	1,08	45

Tabelle 43: Statistische Parameter der OF/SE-Ratios der Gesamt-Psychopharmaka

Substanz	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Aripiprazol	10	0	0,04	0,87	0,75	0,001	0,057	0,055	47
Citalopram	12	1	5,49	0,92	0,92	0,001	4,25	4,12	30
DM-Citalopram	12	1	1,51	0,66	0,44	0,015	1,10	0,73	63
Escitalopram	27	3	4,53	0,81	0,66	0,001	5,17	4,41	49
S-DM-Citalopram	27	3	2,14	0,61	0,37	0,002	1,25	1,01	70
Duloxetin	11	1	0,53	0,89	0,80	0,001	0,65	0,60	37
Mirtazapin	17	0	3,47	0,90	0,81	0,001	4,09	3,82	38
Pipamperon	11	0	5072	0,73	0,54	0,005	6,50	5,31	62
Pregabalin	9	2	0,09	0,92	0,84	0,003	0,11	0,10	18
Promethazin	7	0	3,13	0,97	0,95	0,001	3,02	3,11	38
Quetiapin	20	0	1,33	0,95	0,89	0,001	0,89	0,83	46
Venlafaxin	43	4	10,2	0,90	0,83	0,001	8,12	7,71	42
O-DM-Venlafaxin	43	4	4,38	0,84	0,70	0,001	2,95	2,52	52

Tabelle 44: Statistische Parameter der OF/SE-Ratios der freien Psychopharmaka

Substanz (frei)	n	elim. Proben	Steigung	r	r ²	p <	Ratio [OF/SE] Mittelwert	Ratio [OF/SE] Median	CV [%]
Citalopram	11	0	33,7	0,86	0,74	0,001	22,0	16,5	45
DM-Citalopram	11	1	3,90	0,80	0,63	0,004	2,60	2,27	37
Escitalopram	24	0	26,5	0,42	0,18	0,025	42,0	24,5	83
S-DM-Citalopram	25	1	5,31	0,49	0,24	0,008	5,36	2,93	81
Mirtazapin	12	1	46,0	0,89	0,79	0,001	27,6	26,2	48
Quetiapin	19	0	16,7	0,94	0,89	0,001	9,48	8,39	49
Venlafaxin	43	4	24,6	0,91	0,83	0,001	18,8	18,3	41
O-DM-Venlafaxin	43	4	5,57	0,84	0,71	0,001	3,93	3,42	51

Tabelle 45: Therapeutische Bereiche für Serum und Speichel

Substanz	Therap. Bereich Serum [ng/mL]	Therap. Bereich Speichel [ng/mL] Mittelwert	Therap. Bereich Speichel [ng/mL] Median
Aripiprazol	150 – 500	8,6 – 28,5	8,25 – 27,5
Citalopram	50 – 110	213 - 467	206 - 453
Duloxetin	30 – 120	19 – 78	18 - 72
Escitalopram	15 – 80	78 - 417	66 - 353
Hydromorphon	5 – 15	4,7 - 14	4,4 - 13
Mirtazapin	30 - 80	123 - 327	115 - 306
Pipamperon	100 – 400	650 - 2600	531 - 2124
Pregabalin	2000 - 5000	220 - 550	200 - 500
Promethazin	50 – 400	151 - 1208	156 - 1244
Quetiapin	100 - 500	89 - 445	83 - 415
Tramadol	100 - 1000	507 - 5070	461 - 4610
Venlafaxin + O-DM-Venlafaxin	100 - 400	230 - 2628	350 - 2464

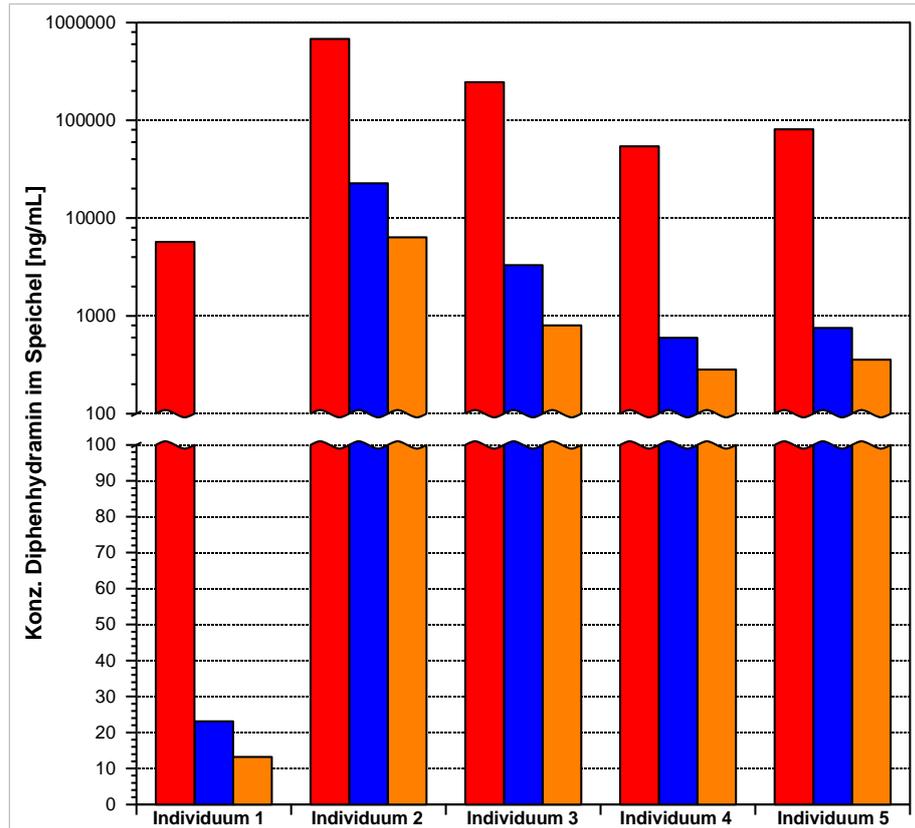
Grundsätzlich ließen sich für alle in die beiden Studien eingeschlossenen Substanzen OF/SE-Ratios ermitteln und aus diesen wiederum therapeutische Bereiche für den Speichel. Ausgehend von den theoretischen Ratios konnte für die Mehrzahl der Substanzen, abgesehen vom Hydromorphon, eine Tendenz hin zu pH-Werten, die dem nicht stimulierten Speichelfluss entsprechen, gefunden werden. Bei einigen dieser Substanzen, nämlich beispielsweise dem

Venlafaxin, dem Promethazin oder auch dem Pipamperon. konnten deutlich höhere OF/SE-Ratios ermittelt werden als es der theoretische Wert annehmen ließ.

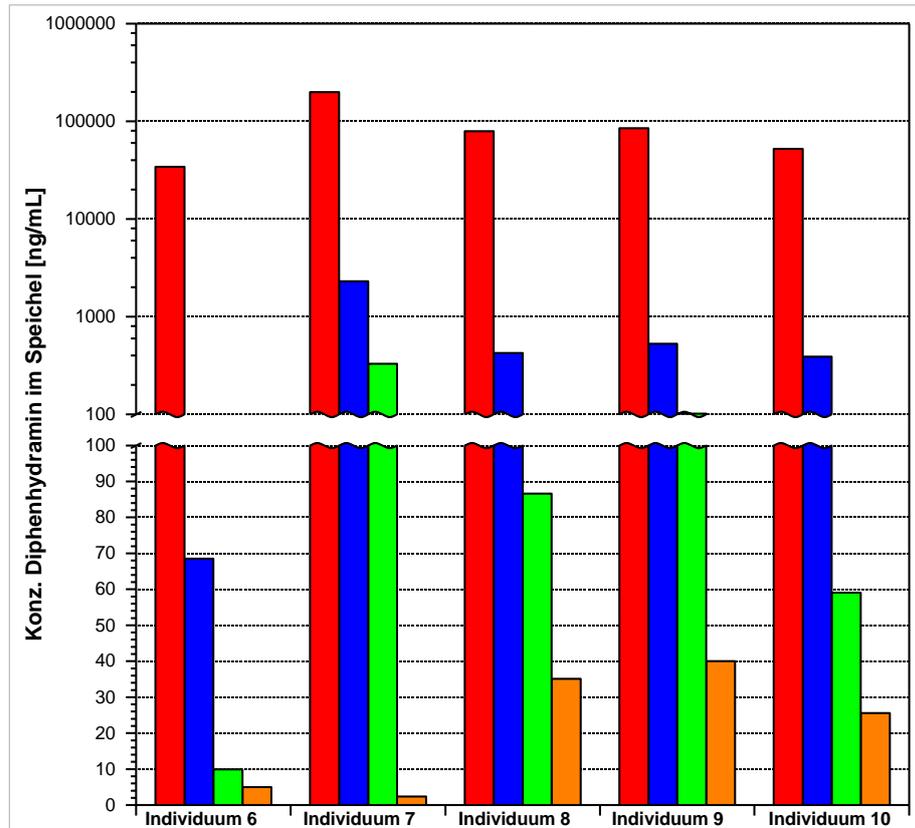
5.5 Orale Kontamination

Die Kontamination der Mundhöhle mit Diphenhydramin, nach einem fünf Sekunden Kontakt der nicht überzogenen Tablette mit der Mundhöhle, war nicht nur sehr hoch, sondern auch mit einem Konzentrationsbereich zwischen 5,6 und 679 $\mu\text{g/ml}$ Speichel auch sehr verschieden (Zeitpunkt T0). Die mittlere Abnahme der Konzentration innerhalb des ersten Probenentnahmeintervalls (T1) betrug 99% (VK: 1%, $n = 20$), mit einem Konzentrationsbereich zwischen 23,1 und 22763 ng/ml, was 0,2 bis 4,0 % der ursprünglichen Diphenhydramin-Konzentration entsprach (siehe Abbildung 35). Für die ersten fünf Teilnehmer war die Studie damit beendet. Bei den verbleibenden 15 Teilnehmern konnte zwei Stunden nach der Kontamination ein Konzentrationsbereich von 9,9 bis 396 ng/ml im Speichel gemessen werden, was 0,03 bis 0,94% der Diphenhydramin-Konzentration, bezogen auf die Konzentration bei T0, entsprach. Bezogen auf den Zeitpunkt T1 konnte damit ein Konzentrationsrückgang von 81,3% (VK: 9%) verzeichnet werden. Innerhalb der nächsten Stunde verringerte sich die Analyt-Konzentration im Mittel um weitere 74,7% (VK: 14%; $n = 10$) auf 2,7 bis 59,9 ng/mL, was einen Anteil von 0,009 bzw. 0,13% der Konzentration bezogen auf T0, ausmachte. In Gruppe A bis C war Diphenhydramin in allen Individuen über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar. Das Trinken von 250 ml Wasser nach der jeweils letzten Probenentnahme führte zwar zu einem mittleren Konzentrationsverlust von 59 % (VK: 27%; $n = 15$), dennoch war auch im Anschluss bei allen Individuen noch Analyt im Speichel nachweisbar.

Gruppe A

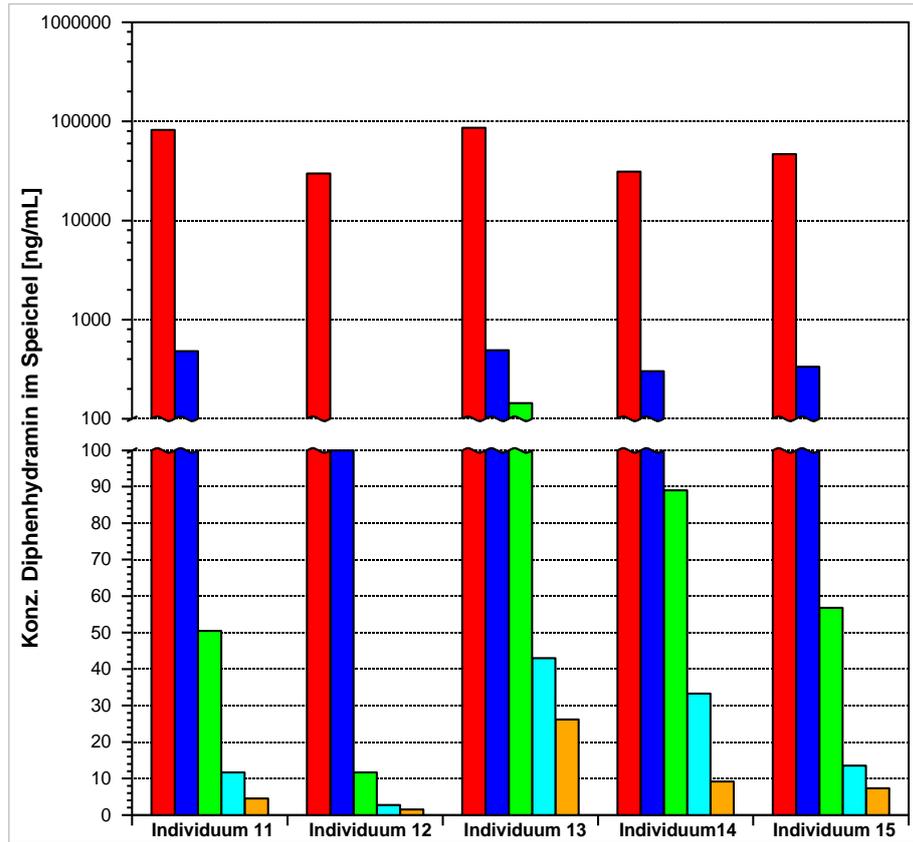


Gruppe B

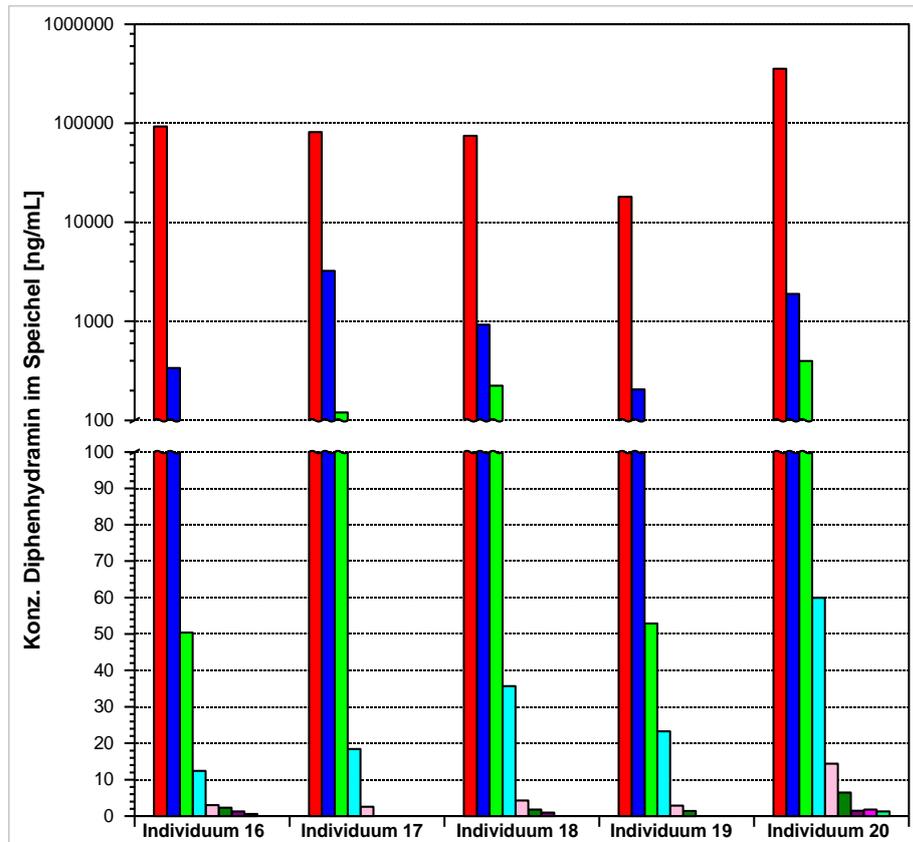


■ 0 Stunden nach Kontamination
 ■ 1 Stunde nach Kontamination
 ■ 2 Stunden nach Kontamination
 ■ nach 250 mL Wasser

Gruppe C



Gruppe D



■ 0 Stunden nach Kontamination
 ■ 1 Stunde nach Kontamination
 ■ 2 Stunden nach Kontamination
 ■ 3 Stunden nach Kontamination
 ■ 4 Stunden nach Kontamination
■ 5 Stunden nach Kontamination
 ■ 6 Stunden nach Kontamination
 ■ 7 Stunden nach Kontamination
 ■ 8 Stunden nach Kontamination
 ■ nach 250 mL Wasser

Abbildung 35: Orale Kontamination mit Diphenhydramin: Konzentration von Diphenhydramin im Speichel nach den jeweiligen Probenentnahmeintervallen

In Gruppe D, in welcher über acht Stunden hinweg in regelmäßigen Abständen Proben entnommen wurden, war Diphenhydramin in einem Individuum (Individuum 20) über die vollen acht Stunden hinweg nachweisbar, während bei Individuum 16 nach sieben Stunden, bei Individuum 18 nach sechs Stunden, bei Individuum 19 nach fünf Stunden und bei Individuum 17 nach vier Stunden die letzte Speichelprobe entnommen wurde, in der Diphenhydramin nachweisbar war. Bei Individuum 17 muss allerdings angemerkt werden, dass fünf und sechs Stunden nach der oralen Kontamination keine Probe entnommen wurde und der Nachweiszeitraum von Diphenhydramin auch bei diesem Teilnehmer länger als vier Stunden sein könnte. Alle Teilnehmer aus Gruppe D hatten über den gesamten Versuchszeitraum die Einnahme von Mahlzeiten oder Getränken notiert. In den Speichelproben, die nach einer Mahlzeit oder einem Getränk entnommen wurden, konnte zwar ein leicht erhöhter Konzentrationsverlust im Gegensatz zur Vorprobe verzeichnet werden, allerdings führte Essen oder Trinken in keinem der Fälle zu einer negativen Speichelprobe in der im Anschluss entnommenen Speichelprobe.

Zusammengefasst kann also festgestellt werden, dass die orale Kontamination nach einem fünf sekundigem Kontakt der Mundhöhle mit einer nicht überzogenen Tablette mit Diphenhydramin zu einer sehr hohen und interindividuell verschiedenen Kontamination des Speichels mit Medikamentenresten aus dem Mund führte. Darüber hinaus konnte es auch mehrere Stunden nach der Kontamination noch problemlos im Speichel nachgewiesen werden, und selbst das Trinken von 250 ml Wasser konnte den Analyten nicht vollständig aus der Mundhöhle entfernen.

5.6 Nachweis von Substanzen in der Ausatemluft

5.6.1 Psychopharmaka

Die Konzentrationsangaben für die Atemluftproben wurde in der Einheit pg/Filter gewählt, da die genaue Menge an Luft lediglich geschätzt werden kann und immer der gesamte Filter extrahiert wird. Als nachgewiesen galt eine Substanz in diesem Fall, wenn die ermittelte Konzentration auf den Atemluftfiltern oberhalb der Nachweisgrenze (LoD) lag. Die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der jeweiligen Substanz wurde nach DIN 32646 ermittelt.

Generell ließen sich trotz nachweisbarer Substanzkonzentrationen in Blut und Speichel nur ein in einem Bruchteil der Atemluftproben eines der in die Studie eingeschlossenen Psychopharmaka nachweisen. In insgesamt fünfzehn Proben von 100 Proben ließ sich eines der Psychopharmaka nachweisen. Im Falle des Escitaloprams wurden Muttersubstanz und Metabolit aus derselben Probe nachgewiesen. Ebenso beim O-Desmethylvenlafaxin (Konzentration: < LoQ),

auch in dieser Probe ließ sich die Muttersubstanz auf dem Atemluftfilter nachweisen. In diesen beiden Proben, genau wie im Falle des nachgewiesenen Desmethylcitaloprams, ließ sich die nachgewiesene Substanz nicht mit einer stark erhöhten Speichelkonzentration der Substanz in Verbindung bringen. In den drei Proben mit den höchsten Venlafaxin-Konzentrationen im Speichel (> 6000 ng/mL) war jeweils Venlafaxin in der Atemluft detektierbar. Ansonsten war keine Korrelation zwischen Speichel- und Atemluftkonzentration ermittelbar. Generell lag die nachgewiesene Substanzkonzentration bei drei der Venlafaxin Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze, jedoch oberhalb der Nachweisgrenze.

Tabelle 46: Zusammenfassende Ergebnisse Psychopharmaka in der Atemluft

Substanz	n	LoD [pg/Filter] DIN 32646	LoQ [pg/Filter] DIN 32646	n Proben (positiv)	Bereich [pg/Filter]
Aripiprazol	10	8,9	15,3	0	-
Citalopram	12	5,2	9,1	0	-
DM-Citalopram	12	7,7	12,7	1	25
Escitalopram	27	5,2	9,1	1	12,2
S-DM-Citalopram	27	7,7	12,7	1	13,2
Duloxetin	11	24,1	24,1	0	-
Mirtazapin	17	6,0	12,8	0	-
Pipamperon	11	2,2	5,1	0	-
Pregabalin	9	27,7	30	0	-
Promethazin	7	5,9	14,0	0	-
Quetiapin	20	5,6	11,0	0	-
Venlafaxin	43	6,6	12,7	11	6,9 – 67,1
O-DM-Venlafaxin	43	7,9	16,0	1	11,8

5.6.2 Diphenhydramin

Der Vergleich des Konzentrationsverlaufs einer Substanz, über die Zeit in unterschiedlichen Matrices, kann Aufschluss über die Zusammenhänge und gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Matrices untereinander geben. Alle acht Teilnehmer dieser Studie hatten diese nach der vorgegebenen Anzahl der Probennahmen beendet. Abweichungen vom vorgegebenen Zeitplan der Probenentnahme wurden notiert und bei der Auswertung berücksichtigt.

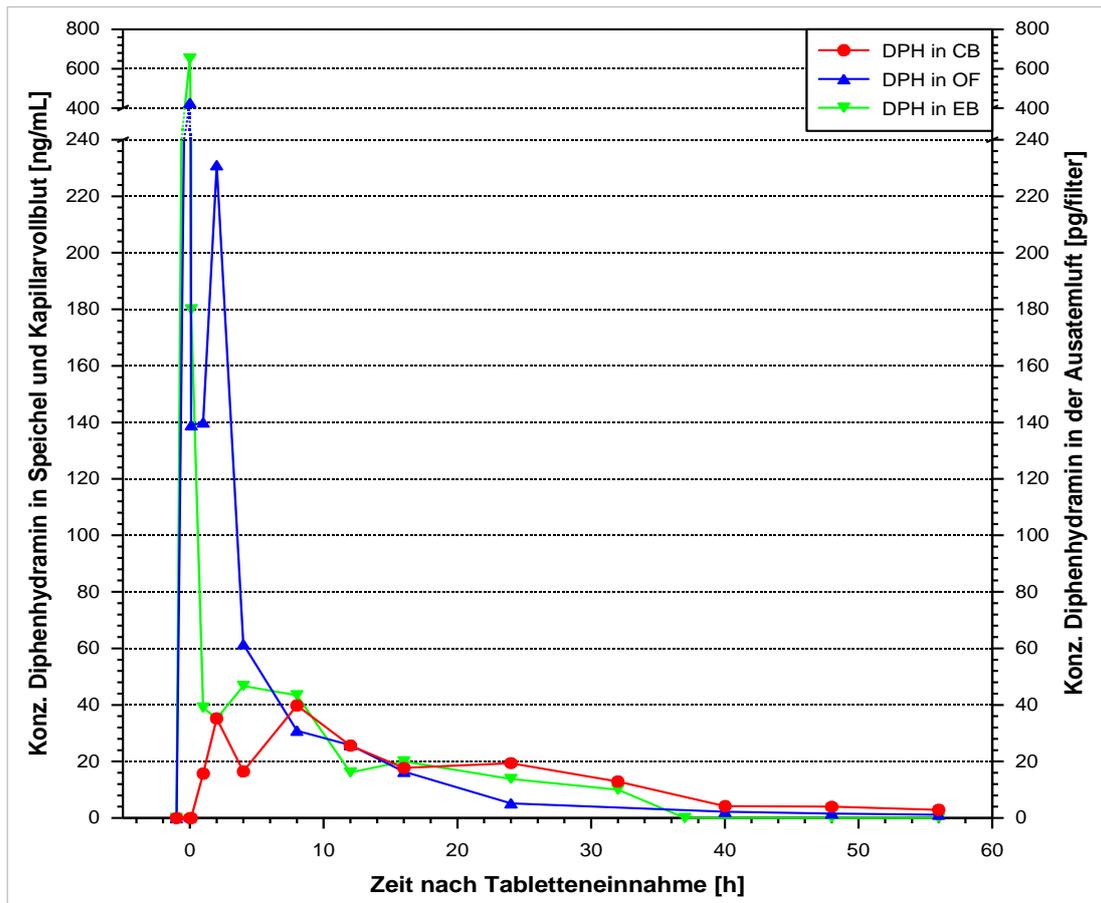


Abbildung 36: Diphenhydramin in Atemluft, Kapillarvollblut und Speichel; Individuum 4

Diphenhydramin konnte bei allen Teilnehmern in allen Matrices nachgewiesen werden. Konzentrationen unterhalb des Reportinglimits und vollständig negative Proben wurden mit „< 1ng/mL“ bzw. „< 5pg/Filter“ angegeben. Der Detektionszeitraum von Diphenhydramin betrug beim Kapillarvollblut mindestens 37 und maximal 58 Stunden, mit einem Mittelwert von 48,5 Stunden. Detektionszeitraum wurde hier definiert als der Zeitpunkt von der Medikamenteneinnahme bis zur letzten entnommenen Probe, bei der der Analyt mit einer Konzentration oberhalb des Reportinglimits nachweisbar war. Im Speichel lag dieser Detektionszeitraum zwischen 47 und 58 Stunden mit einem Mittelwert von 54 Stunden und in der Ausatemluft zwischen 12 und 36 Stunden, mit einem Mittelwert von 22,5 Stunden. Die Aufschlüsselung der Einzelwerte ist in Tabelle 47 zusammengefasst.

Individuum	1	2	3	4	5	6	7	8
Detekionszeitraum:								
Kapillarovollblut [h]	58	56	37	56	37	56	48	40
Speichel [h]	58	47	56	56	48	56	56	56
Ausatemluft [h]	16	12	16	36	16	24	36	24
t_{max} :								
Kapillarovollblut [h]	2	2	2	8	1	2	1	2
Speichel [h]	0/2	0/2	0/4	0/2	0/2	0/4	0/2	0/1
Ausatemluft [h]	0/4	0/8	0/2	0/4	0	0	0/x	0/x
C_{max} :								
Kapillarovollblut [ng/mL]	85,2	49,5	100	39,8	52,6	75,6	107	44,2
Speichel [ng/mL]	5 007/161	675/66,0	2 970/66,0	427/231	24 226/877	43 402/170	6857/257	3 681/302

Tabelle 47: Zusammenfassung: Diphenhydramin in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel -: keine weiteren Maxima vorhanden waren; x: mehrere Maxima

Der Zeitpunkt der maximal gemessenen Konzentration lag im Kapillarvollblut zwischen einer und acht Stunden. Dabei ist jedoch anzumerken, dass ein Maximalspiegel von acht Stunden, wie er bei Individuum 4 festgestellt wurde, nicht plausibel ist und vermutlich bei zwischen zwei und sechs Stunden liegt. Der Konzentrationsverlauf der einzelnen Kapillarvollblut Proben betrug:

2 Stunden: 35,2 ng/mL

4 Stunden: 16,5 ng/mL

8 Stunden: 39,8 ng/mL

12 Stunden: 25,6 ng/mL

Der Konzentrationseinbruch nach vier Stunden ist wahrscheinlich mit einer ungenügenden Menge Probenmaterial im Reaktionsgefäß oder einem Messfehler erklärbar.

Die Maximalkonzentrationen im Kapillarvollblut lagen zwischen 39,8 und 107 ng/mL.

Die Maximalkonzentration im Speichel wurde grundsätzlich unmittelbar nach der Tabletteneinnahme gemessen und lag zwischen 427 und 43402 ng/ml. Proben, die oberhalb des Kalibrationsbereichs lagen, wurden mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und erneut vermessen. Die Studienteilnehmer spülten sich unmittelbar nach der Tabletteneinnahme für eine Minute Mund und Lippen (Zeitpunkt T1), was eine Konzentrationsabnahme von durchschnittlich 84% (Bereich: 67,5% – 93,8%; VK: 11,7%) im Speichel zur Folge hatte. Die hohen Konzentrationen zum Zeitpunkt T0 stammen damit vermutlich von einer oralen Kontamination mit Diphenhydramin, welche von Tablettenrückständen in der Mundhöhle von der Einnahme herührte.

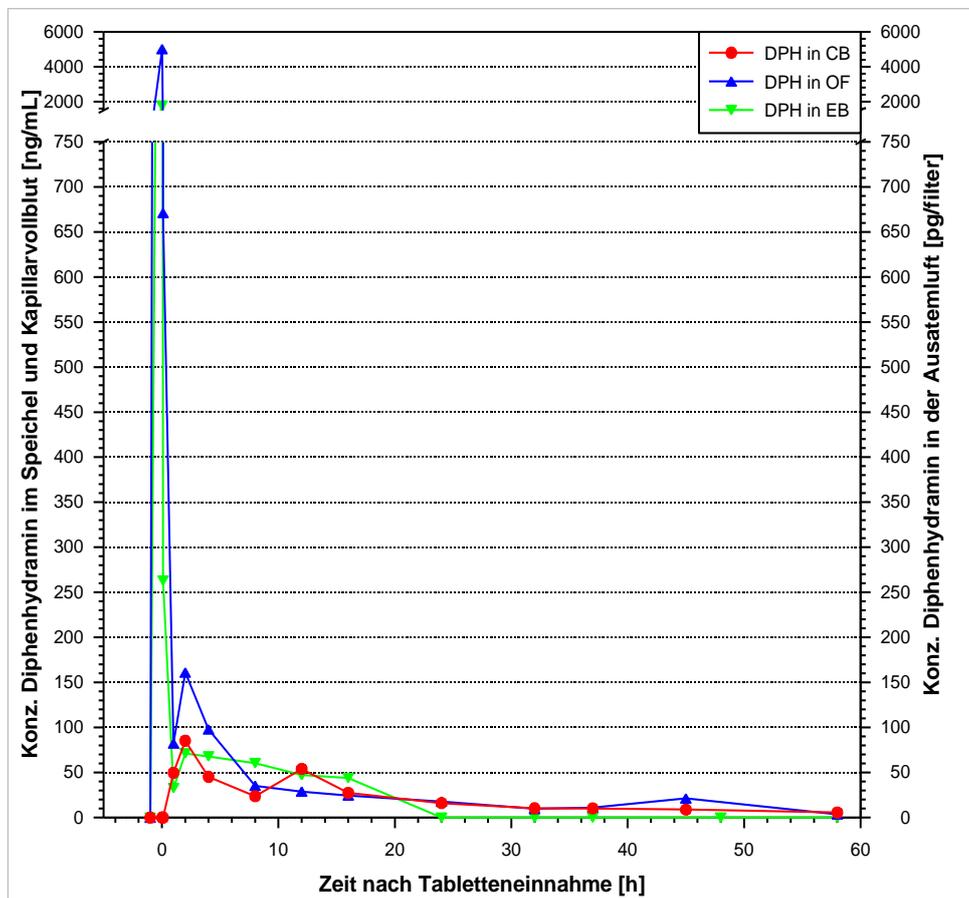
Im weiteren Verlauf ließ sich ein zweites Konzentrationsmaximum im Speichel beobachten, welches zwischen einer und vier Stunden auftrat, mit Konzentrationen zwischen 66 ng/ml und 877 ng/mL.

Ein ähnlicher Verlauf ließ sich bei der Betrachtung der Atemluftproben feststellen. Bei Individuum 1 bis 5 lag die Maximalkonzentration auf dem Atemluftfilter, wie beim Speichel unmittelbar nach der Tabletteneinnahme, mit Konzentrationen zwischen 2 941 und 307 pg/Filter. Der mittlere Konzentrationsverlust zwischen T0 und T1 betrug bei Individuen 1 bis 5 78%, mit einem VK von 9%. Bei Individuum 6 lag die Diphenhydramin-Konzentration unmittelbar nach der Tabletteneinnahme bei 29,4 pg/Filter, und erst nach vier Stunden wurde die Maximalkonzentration mit 726 pg/Filter gemessen. Bei Individuum 7 wurden zum Zeitpunkt T0 (direkt nach Tabletteneinnahme) 149 pg/Filter gemessen. Die Konzentration erhöhte sich im weiteren

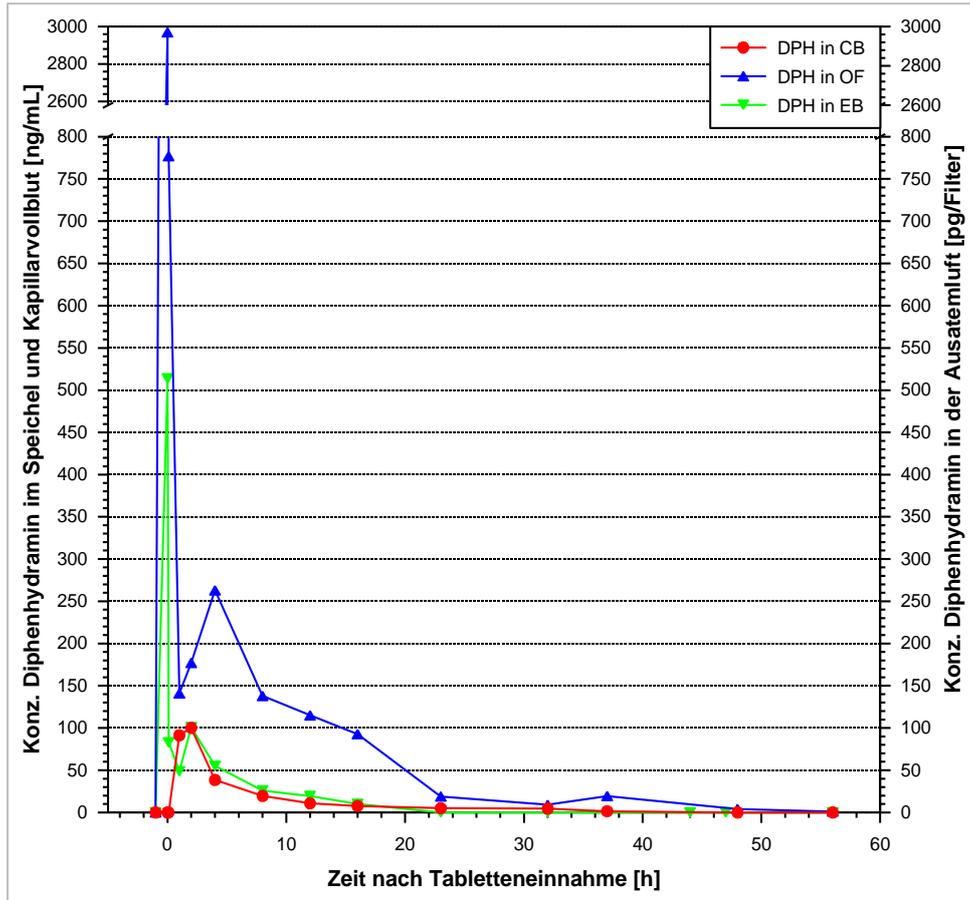
Verlauf und zeigte mehrere Maxima: T1 (178 pg/Filter), zwei Stunden (174 pg/Filter) und sechzehn Stunden (126 pg/Filter) nach der Tabletteneinnahme. Einen ähnlichen Verlauf zeigte Individuum 8 (T0: 8,1 pg/Filter; 1 Stunde: 56,6 pg/Filter; 4 Stunden; 34,3 pg/Filter; 12 Stunden: 22,1 pg/Filter). Individuum 5 zeigte im Konzentrationsverlauf keinen zweiten Anstieg der Konzentration, während bei Individuum 1 bis 4 eine zweite Maximalkonzentration zwischen zwei und acht Stunden festgestellt werden konnte.

Trägt man die Diphenhydramin-Konzentrationen der jeweiligen Matrizes gegen die Zeit auf, lässt sich beobachten, dass der Kurvenverlauf im Kapillarblut weitgehend dem Verlauf der klassischen Bateman-Kurve entspricht, während beim Speichel die orale Kontamination den Kurvenverlauf stört.

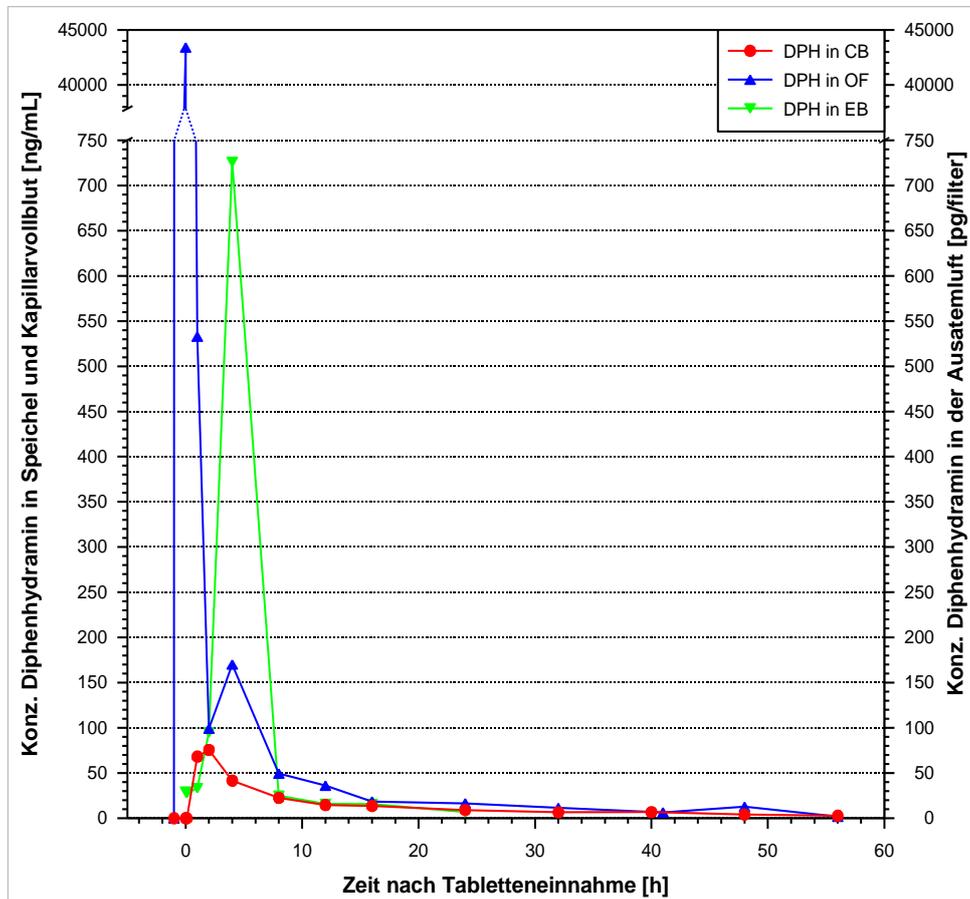
(a)



(b)



(c)



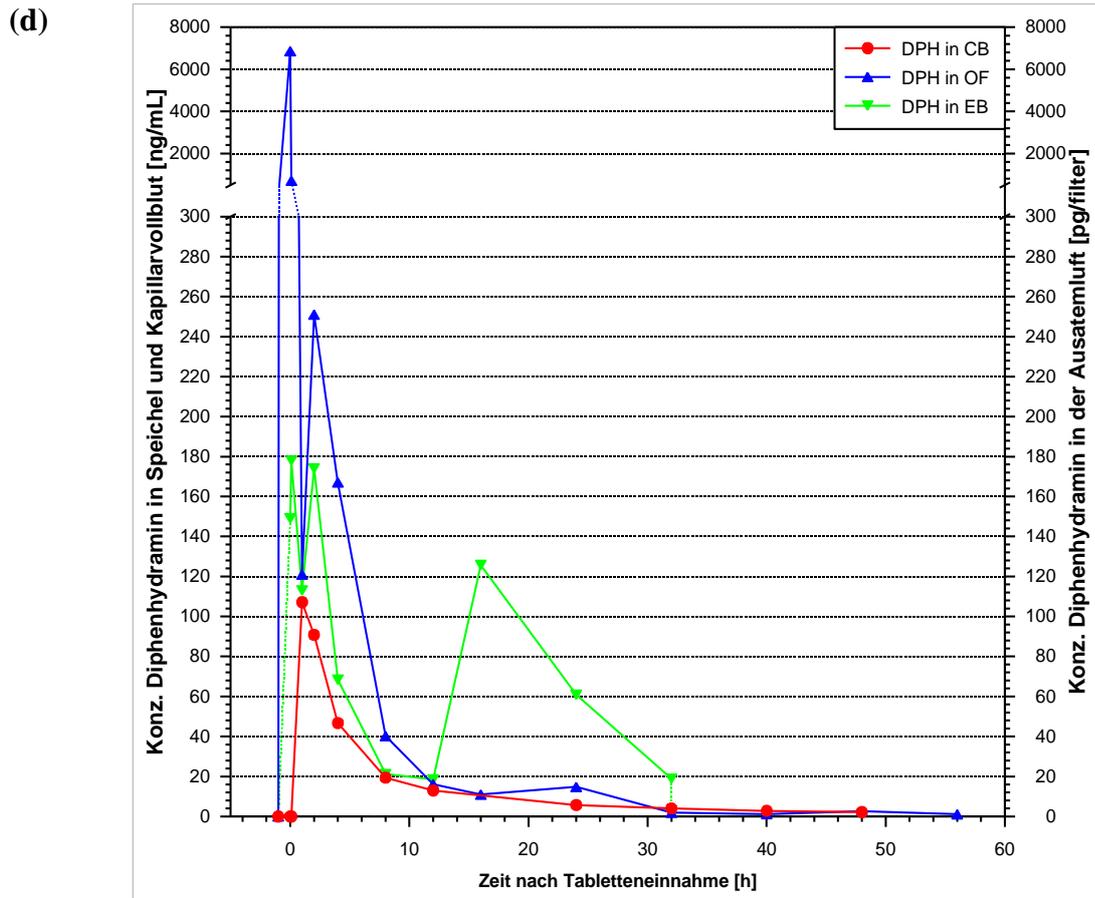


Abbildung 37: Diphenhydramin in Atemluft, Kapillarvollblut und Speichel; (a) Individuum 1, (b) Individuum 3, (c) Individuum 6 und (d) Individuum 7

Auffällig ist weiterhin, dass bei allen Individuen zum Zeitpunkt T0 Diphenhydramin in der Atemluft nachgewiesen werden konnte, obwohl das Kapillarblut erstmals eine Stunde nach Tabletteneinnahme positiv auf Diphenhydramin getestet wurde. Wirkstoff, der also zum Zeitpunkt T0 oder nach dem Ausspülen des Mundes auf dem Atemluftfilter detektiert wurde, kann folglich nicht aus dem Surfactant, sondern nur aus der Mundhöhle bzw. aus dem Speichel stammen. Geht man davon aus, dass sämtlicher Wirkstoff auf den Atemluftfilter zum Zeitpunkt T0 aus dem Speichel selbst stammt, lässt sich die theoretische Speichelmenge auf dem Atemluftfilter folgendermaßen berechnen:

$$C_{\text{OF auf Filter}} [\mu\text{L/Filter}] = \frac{C_{\text{DPH in EB}} [\text{pg/Filter}]}{C_{\text{DPH im OF}} [\text{pg}/\mu\text{L}]}$$

$C_{\text{OF auf Filter}}$ = Speichelkonzentration auf Atemluftfilter in μl pro Filter

$C_{\text{DPH in EB}}$ = Konzentration Diphenhydramin auf Atemluftfilter in pg/Filter

$C_{\text{DPH im OF}}$ = Konzentration Diphenhydramin im Speichel in $\text{pg}/\mu\text{l}$

Daraus ergeben sich folgende theoretischen Speichelkonzentrationen auf den Atemluftfiltern zum Zeitpunkt T0:

- Individuum 1: 0,354 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 354 pl/Filter
- Individuum 2: 0,455 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 455 pl/Filter
- Individuum 3: 0,173 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 173 pl/Filter
- Individuum 4: 1,525 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 1525 pl/Filter
- Individuum 5: 0,121 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 121 pl/Filter
- Individuum 6: 0,001 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 1 pl/Filter
- Individuum 7: 0,022 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 22 pl/Filter
- Individuum 8: 0,002 $\mu\text{L}/\text{Filter}$, folglich 2 pl/Filter

Die Speichelmenge auf den Atemluftfiltern variieren stark.

Insbesondere bei Individuum 1 bis 4 waren die Kurvenverläufe der Diphenhydramin-Konzentration in Speichel und Atemluft recht ähnlich. Im weiteren Verlauf ließen sich jedoch auch Annäherungen an die Kapillarovollblutkurve feststellen, insbesondere bei Individuum 4. Der Einfluss der Blutkonzentration auf die auf den Atemluftfiltern gemessenen Konzentrationen scheint sich also im Laufe der Zeit zu erhöhen. Trug man die Diphenhydramin-Konzentration in der Ausatemluft und im Speichel gegeneinander auf (Speichelkonzentration auf die X-Achse und Atemluftkonzentration auf die Y-Achse), ergaben sich für Individuum 1 bis 5 signifikante Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,8630 und 0,9998 mit $p < 0,01$ über den Zeitraum T0 bis zum Ende der Probenentnahme. Bei Individuum 7 und 8 ergab sich erst eine signifikante Korrelation, wenn die Werte zum Zeitpunkt T0 und T1 eliminiert wurden (0,6857 und 0,8960 mit $p < 0,05$). Wurden die Konzentration in der Ausatemluft und im Kapillarovollblut gegeneinander aufgetragen (Kapillarovollblutkonzentration auf die X-Achse und Atemluftkonzentration auf die Y-Achse), ergaben sich nur für Individuum 3, 5 und 7 signifikante Korrelationen (0,8616; 0,9511; 0,8598) mit einem Signifikanzwert $p < 0,05$. Wichtig dabei anzumerken ist, dass hier die Einheiten der Konzentrationen von Atemluft und Speichel nicht übereinstimmen.

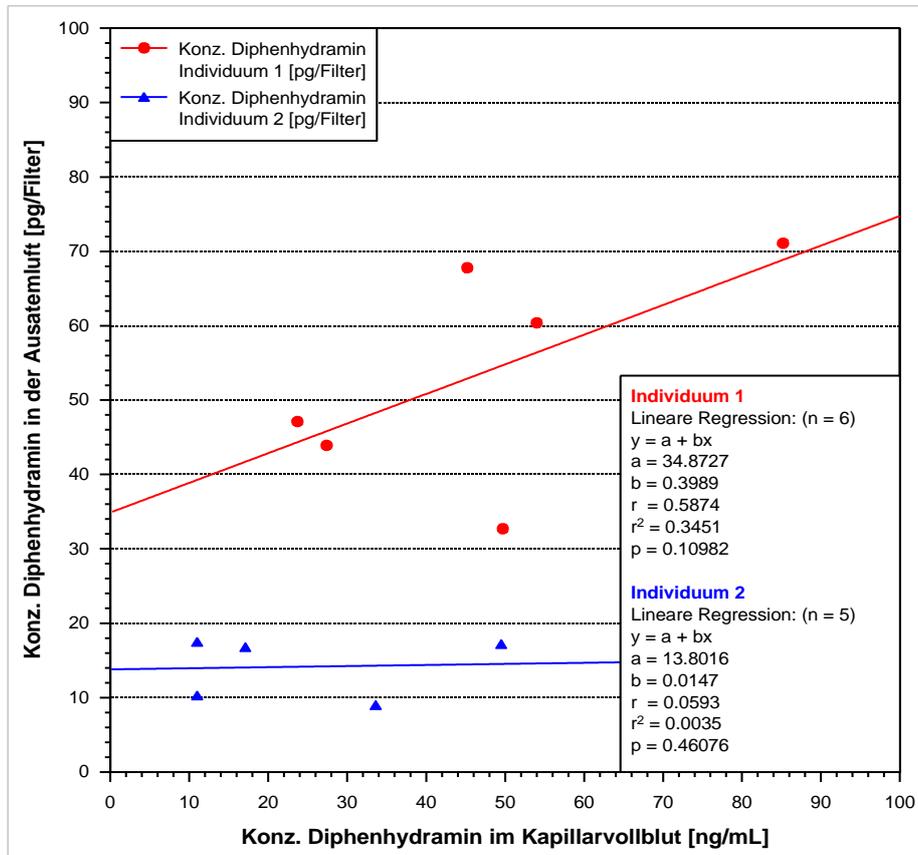
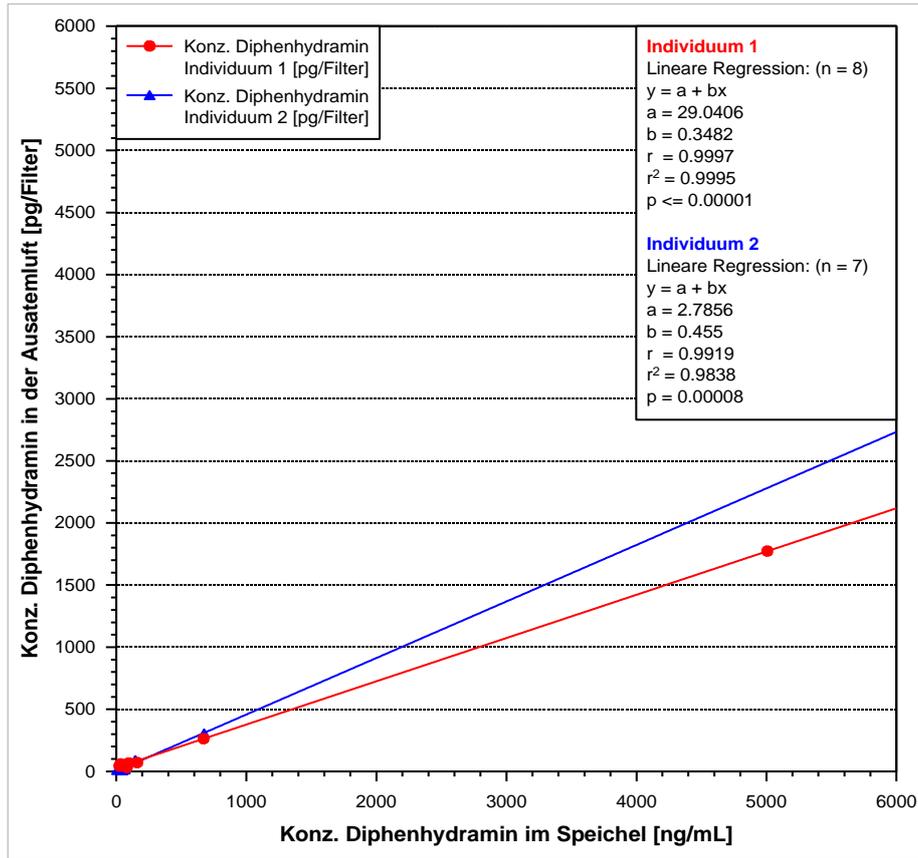


Abbildung 38: Diphenhydramin in Ausatemluft und Speichel (oben) bzw. in Ausatemluft und Kapillervollblut (unten)

Betrachtet man mathematisch ermittelte Verhältnisse zwischen der Konzentration in Ausatemluft und Speichel, der EB/OF-Ratio, sowie zwischen der Konzentration in Ausatemluft und Kapillarvollblut, der EB/CB-Ratio, scheint die EB/CB-Ratio mit einem Wert von 1,30 und einem VK von 44% etwas konstanter zu sein, als die EB/OF-Ratio mit einem Wert von 0,61 und einem VK von 68%. Für die EB/CB-Ratio wurden bei Individuum 6 ein Wert und bei Individuum 7 drei Werte als Ausreißer eliminiert. Die EB/OF-Ratios, welche sich zum entsprechenden Probenentnahmezeitpunkt ergaben, wurden somit nicht in die Berechnung mit einbezogen. Bei den Individuen 4, 7 und 8 wurde jeweils noch ein zusätzlicher Wert eliminiert. Wegen der im Verhältnis höheren Diphenhydramin-Konzentration im Speichel, verglichen mit dem Kapillarvollblut, war die EB/CB-Ratio höher als die EB/OF-Ratio.

Das Konzentrationsverhältnis des Analyten von Speichel und Kapillarvollblut war > 1 , was bei einem schwach basischen Molekül wie dem Diphenhydramin und moderater Plasmaproteinbindung zu erwarten war.

Tabelle 48: Speichel/Kapillarvollblut-Ratio für Diphenhydramin mit (0 – 58 h) und ohne (4 – 58 h) Kontamination

Individuum	OF/CB-Ratio 0 – 58 h	n	VK [%]	OF/CB-Ratio 4 – 58 h	n	VK [%]
1	1,3	11	46	1,3	9	52
2	1,5	9	40	1,25	7	46
3	7,0	9	84	8,5	7	69
4	2,4	10	130	1,0	8	118
5	5,8	9	129	2,3	7	15
6	3,0	11	76	2,7	9	66
7	2,7	10	117	2,8	8	123
8	4,7	9	107	3,3	7	42

Betrachtet man die Gesamtwerte, errechnet sich aus allen verfügbaren gepaarten Proben eine mittlere OF/CB-Ratio von 3,5 mit $n = 76$ und einem VK von 125 %. Nimmt man die Werte der ersten vier Stunden nach Tabletteneinnahme aus, um den Einfluss oraler Kontamination zu minimieren, erhält man eine OF/CB-Ratio von 2,8 mit $n = 62$ gepaarten Proben und einem VK von 114 %. Auffällig ist, dass Individuum 3 mit 7,0 bzw. 8,5 eine auffällig hohe OF/CB-Ratio hatte (siehe Tabelle 48). Eliminiert man die Werte von Individuum 3 als Ausreißer, ergibt sich eine OF/CB-Ratio von 3,0 ($n = 69$, VK = 130%) für alle Werte von 0 bis 58 Stunden nach

Tabletteneinnahme und eine OF/CB-Ratio von 2,1 ($n = 55$, VK = 85%) für die Werte 4 bis 58 Stunden nach Tabletteneinnahme.

Zusammengefasst lässt sich also feststellen, dass Diphenhydramin bei jedem Individuum in jeder der untersuchten Matrices nachgewiesen werden konnte. Der mittlere Detektionszeitraum im Speichel war etwas höher als der im Kapillarvollblut und mehr als doppelt so hoch wie der in der Ausatemluft. Die Konzentrationsmaxima lagen im Kapillarblut grundsätzlich ein bis vier Stunden nach der Tabletteneinnahme, im Speichel direkt nach der Tabletteneinnahme, wobei ein zweites Maximum verzeichnet wurde, das regelhaft zwei bis vier Stunden nach dem Zeitpunkt T₀ verzeichnet werden konnte. Die Konzentrationsverläufe der Atemluft ähnelten oftmals denen des Speichels und lieferten Hinweise darauf, dass eine Kontamination der Atemluft mit Speichel vorliegen könnte. Die OF/CB-Ratio lag durchschnittlich über 1, was auf einen sehr guten Übergang des Diphenhydramins in den Speichel schließen ließ.

5.6.3 Dextromethorphan und Dextrorphan

Ziel dieser Studie war die Bestätigung der Ergebnisse der Studie zum Verhalten eines Analyten in unterschiedlichen Analysematrices über die Zeit, mit Diphenhydramin als Modellsubstanz.

Zu diesem Zweck wurde die vorhergehende Studie etwas abgeändert und mit einer anderen Substanz aus einer anderen Substanzklasse wiederholt, nämlich dem Dextromethorphan und seinem aktiven Metaboliten, dem Dextrorphan (O-Desmethyl-Dextromethorphan). Die zehn Studienteilnehmer wurden dafür in zwei unterschiedliche Gruppen mit je fünf Individuen eingeteilt. Gruppe A nahm den Wirkstoff als Kapsel zu sich, um eine Kontamination der Mundhöhle mit Medikamentenresten weitestgehend zu vermeiden. Gruppe B nahm eine etwa äquivalente Menge an Wirkstoff in Form von Lutschpastillen zu sich, um eine orale Kontamination mit Medikamentenrückständen zu induzieren.

Alle Teilnehmer aus Gruppe A führten die Probenentnahme gemäß dem Zeitplan aus, von Abweichungen wurde nicht berichtet, und alle Proben waren vorhanden, mit Ausnahme derer von Individuum 5 welches entgegen der Vorschrift keine Diphenhydramintablette auf die Zunge legte.

Die Kapillarblutproben vor (Zeitpunkt: T-1) und unmittelbar nach der Medikamenteneinnahme (Zeitpunkt: T₀) waren bei allen Teilnehmern der Gruppe A negativ auf Dextromethorphan und Dextrorphan, mit Ausnahme der Kapillarblutprobe von Individuum 4, unmittelbar nach der Kapseleinnahme (T₀). Hier konnten 0,12 ng/ml Dextromethorphan festgestellt werden.

Von den Speichelproben waren nur die T0 und T-1 Proben von Individuum 1 negativ für Dextromethorphan und Dextrorphan, während bei Individuum 3 auch in der T-1 Probe 0,03 ng/ml Dextromethorphan nachgewiesen werden konnte. Die Dextromethorphan-Konzentration der Speichelproben zum Zeitpunkt T0 für Individuum 2 bis 5 bewegten sich zwischen 0,43 und 2,07 ng/ml Dextromethorphan. Dextrorphan war in keinem der fünf Individuen bei den Proben von T0 oder T1 nachweisbar. Da zum Zeitpunkt T0 in keiner der Speichelproben von Individuum 1 bis 5 Dextrorphan nachweisbar war, handelte es sich bei positiven Dextromethorphan-Resultaten zum Zeitpunkt T0 vermutlich um eine geringe orale Kontamination aus den Kapseln. Vermutet wurde das Vorhandensein von Wirkstoff an der Kapseloberfläche. Dies könnte wiederum die positive Kapillarblutprobe von Individuum 4 bei T0 erklären. Individuum 4 hatte zum Zeitpunkt T0 mit 2,07 ng/mL auch die höchste Speichelkonzentration aller vier positiven Proben. Wenn sich Wirkstoffreste auf der Kapseloberfläche befanden, konnten diese bei der Entnahme und Einnahme der Kapsel auf die Haut gelangen und so die Kapillarblutprobe kontaminieren.

Die Konzentrationen C_{\max} -Werte des Dextromethorphans im Kapillarovollblut lagen bei Individuum 1, 2, 4 und 5 zwischen 0,54 und 4,86 ng/mL, und wurden zwischen einer und zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahme gemessen. Die C_{\max} -Werte des Dextrorphans im Kapillarovollblut lagen im Bereich zwischen 2,91 bis 7,91 ng/ml, und wurden ebenfalls ein bis zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahme gemessen. Der t_{\max} -Wert von Dextromethorphan und Dextrorphan war intraindividuell für beide Substanzen der gleiche bei den oben genannten Individuen.

Individuum 3 wies mit 39,5 ng/ml mit Abstand die höchste Maximalkonzentration an Dextromethorphan auf, während die korrespondierende Dextrorphan-Konzentration mit 0,23 ng/ml sehr viel niedriger lag als erwartet. Bei den anderen Individuen war die Dextrorphan-Konzentration spätestens 1 Stunde nach der Medikamenteneinnahme höher als die korrespondierende Dextromethorphan-Konzentration. Darüber hinaus unterschieden sich die t_{\max} -Werte der beiden Analyten stark voneinander. Der t_{\max} -Wert von Dextromethorphan (39,5 ng/mL) wurde eindeutig bei 8 Stunden gemessen, während der t_{\max} -Wert von Dextrorphan (3,27 ng/mL) bei 2 Stunden gemessen wurde. Auch im Speichel war die C_{\max} -Konzentration von Dextromethorphan bei Individuum 3 wesentlich höher als bei den anderen Individuen aus Gruppe A (47,9 ng/mL; t_{\max} : 4 Stunden), während der C_{\max} -Wert des Dextrorphans mit 0,21 ng/mL bei 2 Stunden im Verhältnis sehr viel niedriger war. Die C_{\max} -Werte des Dextromethorphans der anderen Individuen lagen zwischen 0,38 und 10,2 ng/mL und wurden zwischen zwei und vier Stunden nach

Medikamenteneinnahme gemessen. Die C_{\max} -Werte des Dextrorphan lagen zwischen 2,45 und 9,57 ng/mL und wurden ein bis zwei Stunden nach der Medikamenteneinnahme detektiert. Im Gegensatz zum Blut, wo die Konzentrationsmaxima der beiden Analyten zur selben Zeit detektiert wurden (ausgenommen Individuum 3), lag das Konzentrationsmaximum des Metaboliten im Speichel vor dem Konzentrationsmaximum der Muttersubstanz.

In der Ausatemluft konnten bei den Individuen 1, 2 und I 3 positive Atemluftproben auf Dextromethorphan registriert werden. Während hier bei Individuum 1 und 2 nur drei bzw. zwei positive Proben zwischen 0,37 und 1,31 pg/Filter gemessen werden konnten, fanden sich bei Individuum 3 sechs positive Proben zwischen 2,48 und 461 pg/Filter. Bei Individuum 4 und 5 ließ sich in keiner der abgegebenen Ausatemluftproben Dextromethorphan nachweisen. Bei Individuum 1 und 2 ließ sich in allen auf Dextromethorphan positiven Proben auch Dextrorphan nachweisen. Bei Individuum 3 fand sich nur auf einem der Atemluftfilter Dextrorphan (3,37 pg/Filter). Die verhältnismäßig hohen Dextromethorphan-Konzentrationen in den Ausatemluftproben von Individuum 3 und die, im Vergleich zu den anderen Teilnehmern, niedrigen Konzentrationen von Dextrorphan, passen zu den Ergebnissen der Kapillarovollblut- und Speichelproben.

Von den fünf Individuen der Gruppe B wurde die Probenentnahme bei Individuum 2 der Gruppe B nicht vollständig ausgeführt. Für dieses Individuum fehlen die Kapillarblutproben 12, 24 und 36 Stunden nach der Medikamenteneinnahme.

Generell waren alle Kapillarblutproben vor der Probenentnahme und zum Zeitpunkt T0 negativ für Dextromethorphan und Dextrorphan. Eine Ausnahme stellte die Kapillarblutprobe von Individuum 2 zum Zeitpunkt T0 dar, bei der Spuren von Dextromethorphan nachgewiesen werden konnten, was jedoch ebenfalls mit Wirkstoffrückständen auf der Haut erklärbar wäre. Darüber hinaus waren in keiner Speichel- oder Atemluftprobe vor der Medikamentengabe Dextromethorphan oder Dextrorphan nachweisbar.

Die C_{\max} Werte für Dextromethorphan wurden zwischen einer und vier Stunden nach der Medikamenteneinnahme im Kapillarovollblut gemessen und deckten einen Bereich zwischen 2,37 und 31,4 ng/ml ab. Bei den Individuen 1 und 3 der Gruppe B wurde t_{\max} für das Dextrorphan eine Stunde eher verzeichnet als t_{\max} des Dextromethorphan (jeweils zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme) und ansonsten entsprach es dem des Dextromethorphan. Die entsprechenden Konzentrationen bewegten sich zwischen 0,38 und 14,1 ng/ml Kapillarovollblut.

Sowohl Dextromethorphan als auch Dextrorphan ließen sich bei allen Individuen (außer Individuum 2) mindestens 36 Stunden im Kapillarvollblut nachweisen.

Die C_{\max} Werte des Dextromethorphans im Speichel wurden wie erwartet ausnahmslos zum Zeitpunkt T0 gemessen (7206 – 30469 ng/mL) und fielen durchgehend bis zum Ende der Probenentnahme ab. Lediglich bei Individuum 5 der Gruppe B ließ sich ein zweites Konzentrationsmaximum nach acht Stunden mit 201 ng/ml verzeichnen.

Die maximalen Dextrorphan-Konzentrationen lagen zwischen 0,65 und 27,9 ng/ml und wurden eine bis acht Stunden nach der Medikamenteneinnahme gemessen. Das zweite Konzentrationsmaximum des Dextromethorphans bei Individuum 2 fiel zeitlich mit dem Zeitpunkt t_{\max} des Dextrorphans zusammen (0,65 ng/ml). Auffällig war hierbei, dass zum Zeitpunkt T0 bei allen fünf Mitgliedern der Gruppe B zwischen 0,3 und 0,81 ng/ml Dextrorphan im Speichel nachweisbar waren, also zu einem Zeitpunkt, an dem theoretisch noch kein Metabolismus in der Leber hätte stattfinden können.

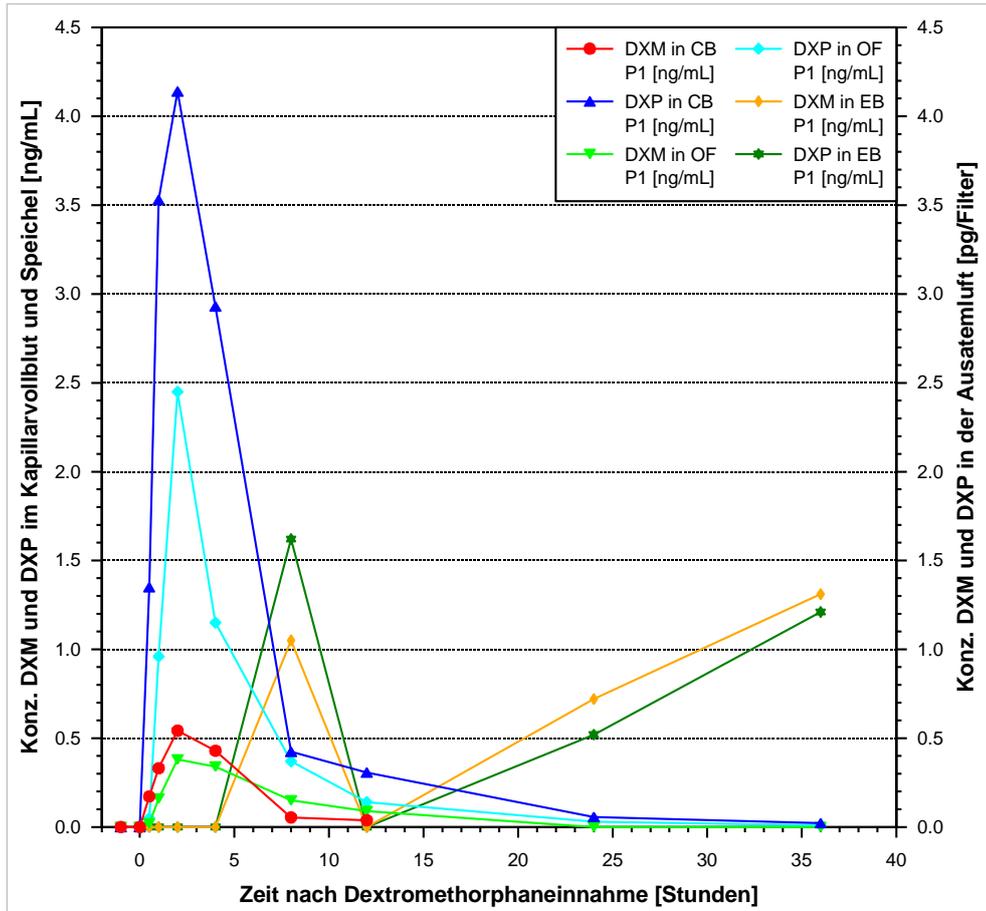
Insgesamt waren Dextromethorphan und Dextrorphan bei allen fünf Individuum dieser Gruppe bis mindestens 36 Stunden nach Medikamenteneinnahme im Speichel nachweisbar.

Bei Individuum 5 war Dextromethorphan in der Atemluft über die gesamte Studiendauer (36 Stunden) möglich, und auch in Individuum 1 und 4 lag die Dextromethorphan-Konzentration lediglich in einer Probe unterhalb der Nachweisgrenze (beide 12 Stunden nach der Medikamenteneinnahme). Bei Individuum 2 konnte acht Stunden nach der Medikamenteneinnahme die letzte positive Dextromethorphan-Probe registriert werden, während bei Individuum 3 vier Stunden nach der Medikamenteneinnahme kein Dextromethorphan nachgewiesen werden konnte, weitere vier Stunden später die Muttersubstanz jedoch noch einmal mit 0,64 pg/Filter nachgewiesen werden konnte. Dextrorphan hingegen konnte bei Individuum 1 bis 5 während des gesamten Entnahmezeitraumes, bei Individuum 1 - 3 nur einmal (nach vier beziehungsweise acht Stunden) und bei Individuum 4 zweimal (nach zwei und vier Stunden) und bei Individuum 5 dreimal (T0, eine und zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme), nachgewiesen werden. Allerdings wurde es grundsätzlich nur in sehr geringen Konzentrationen ≤ 1 pg/Filter detektiert. Die C_{\max} -Werte in der Ausatemluft wurden alle zum Zeitpunkt T0 detektiert und lagen zwischen 140 und 4 674 pg/Filter. Lediglich bei Individuum 5 ließ sich nach 12 Stunden erneut ein leichter Anstieg der Dextromethorphan-Konzentration verzeichnen (von 1,35 pg/Filter nach 8 Stunden über 8,76 pg/Filter nach 12 Stunden auf 22,3 pg/Filter nach 24 Stunden).

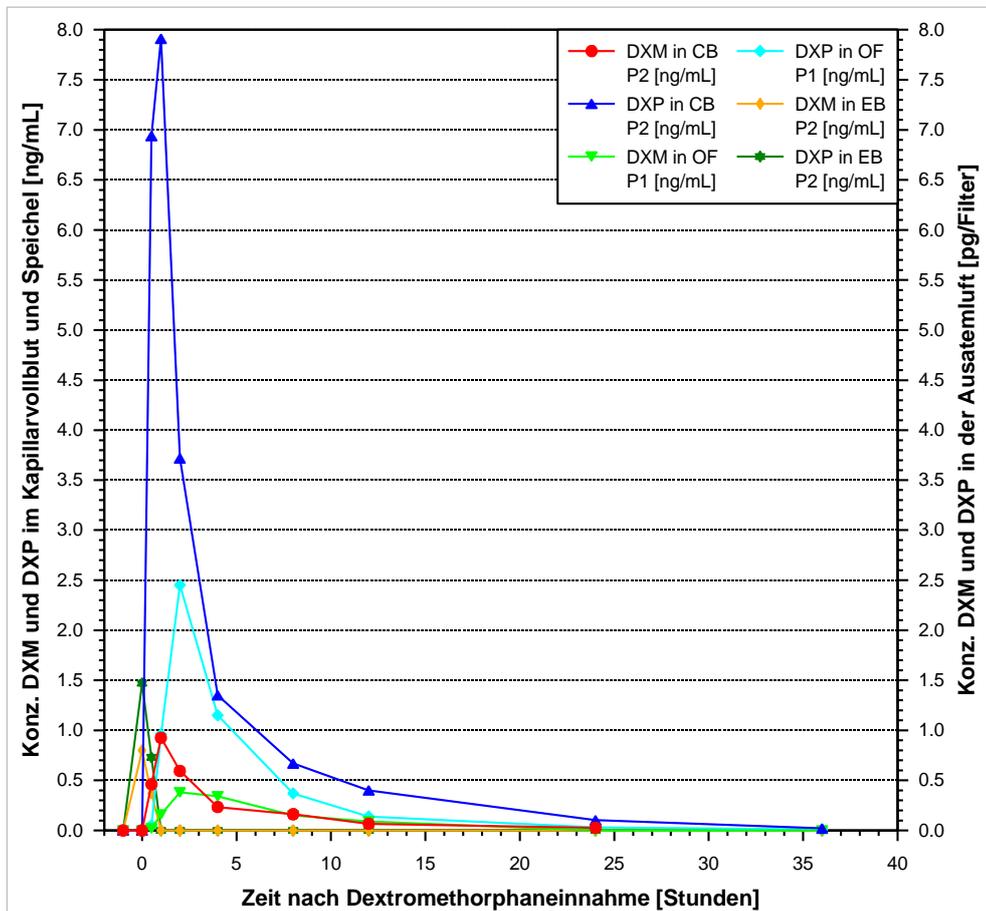
Die Speichel/Kapillarovollblut-Ratios für Dextromethorphan bei Gruppe A lagen zwischen 1,21 (Individuum 1) und 5,55 (Individuum 2), mit einem Mittelwert von 2,80 und Variationskoeffizienten zwischen 51% und 91%. Die OF/CB-Ratio zum Zeitpunkt T0 bei Individuum 4 der Gruppe A musste wegen einer wahrscheinlichen Verunreinigung des Kapillarovollbluts durch Rückstände auf der Haut eliminiert werden. Auch bei Individuum 3 musste die OF/CB-Ratio 30 Minuten nach der Medikamenteneinnahme als Ausreißer eliminiert werden. Die Korrelationen zwischen der Kapillarovollblut- und Speichelkonzentration des Dextromethorphans lagen mit Ausnahme von Individuum 4 zwischen 0,81 und 0,91, bei einem Signifikanzwert von $p < 0,05$. Lediglich bei Individuum 4 ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen Kapillarovollblut und Speichel feststellen. Betrachtete man die zugehörigen Dextromethorphan-Konzentrationen, so war bei Individuum 4 eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen beiden Matrizes festzustellen, wengleich diese mit 0,59 im Gegensatz zu den anderen Individuen verhältnismäßig gering war. Bei ihnen ließen sich auch bei dem aktiven Metaboliten des Dextromethorphans signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen 0,76 und 0,93 feststellen.

Die jeweiligen OF/CB-Ratios lagen zwischen 0,43 und 1,97, bei einem Mittelwert von 0,97 mit Variationskoeffizienten zwischen 45% und 69%. Mögliche Gründe für die verhältnismäßig schlechten Korrelationen zwischen Kapillarovollblut und Speichelkonzentration von Dextromethorphan und seinem Metaboliten bei Individuum 4 könnten Fehler in der Probenentnahme sein, insbesondere da sowohl Muttersubstanz als auch Metabolit betroffen waren. Bei Gruppe B ließ sich die OF/CB Ratio nur für das Dextromethorphan sinnvoll bestimmen, da die orale Kontamination der Speichelproben mit Dextromethorphan die OF/CB-Ratio verhältnismäßig lange, stark beeinflussen könnte.

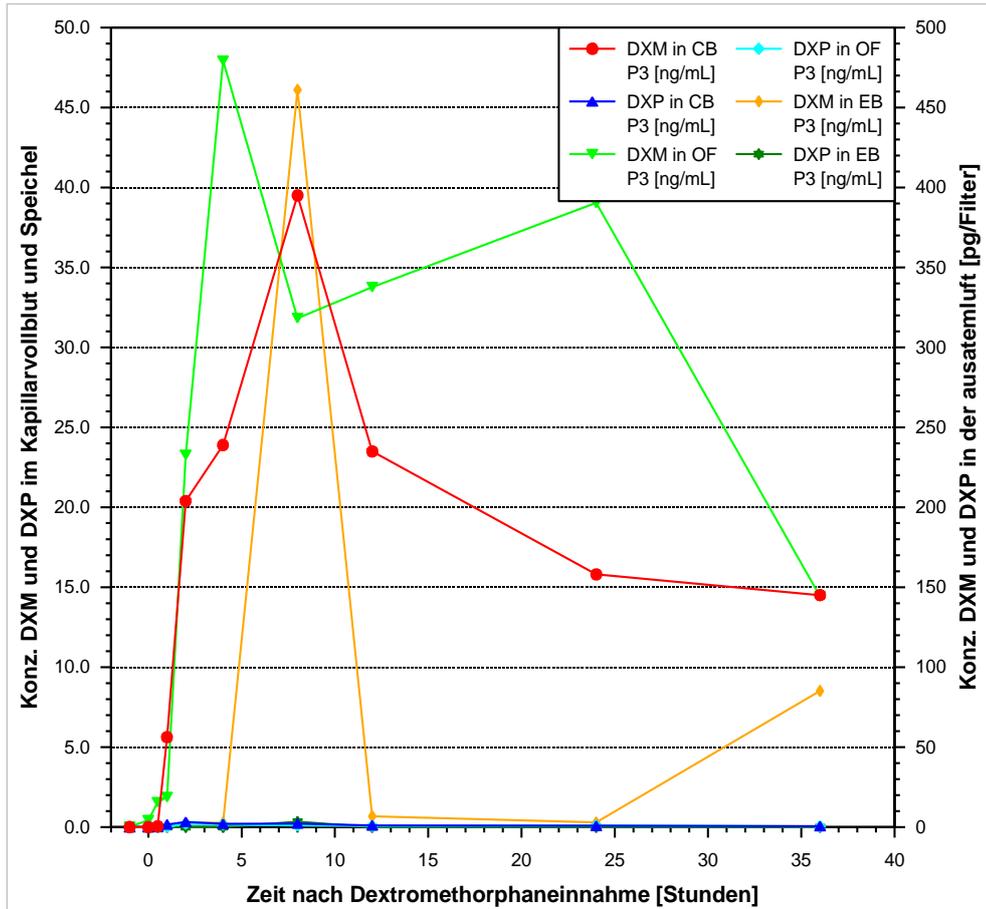
(a)



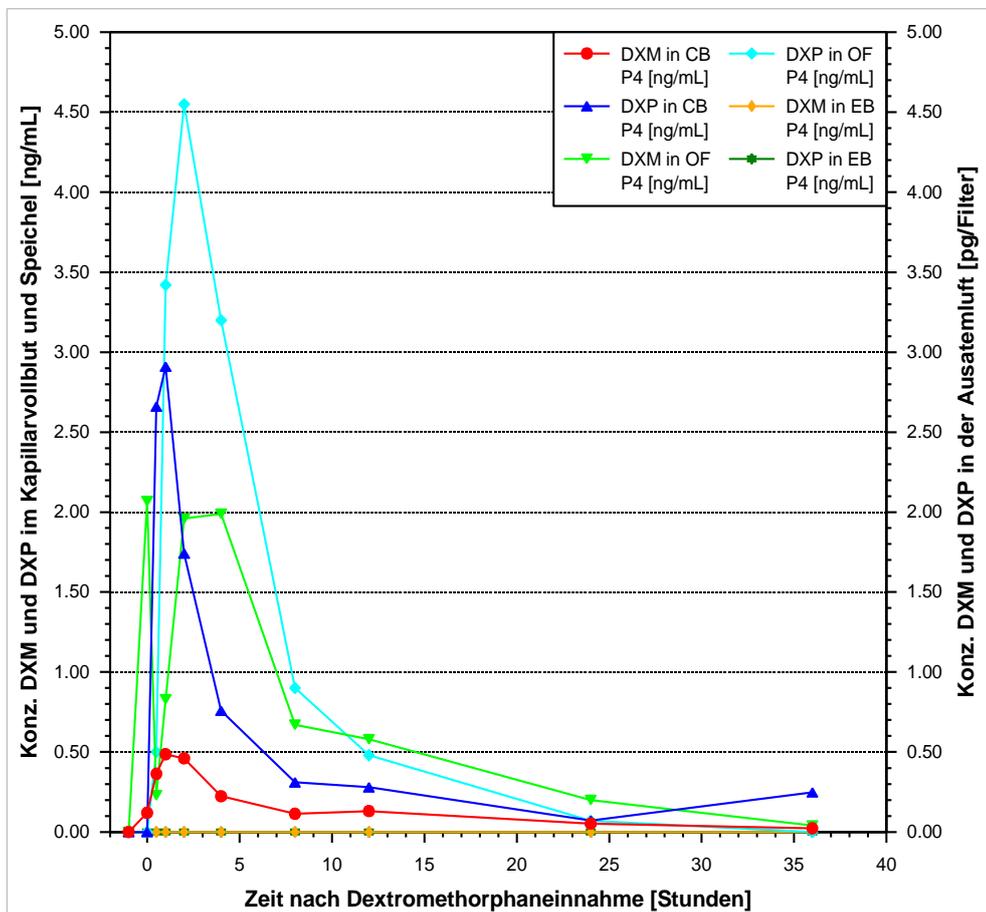
(b)



(c)



(d)



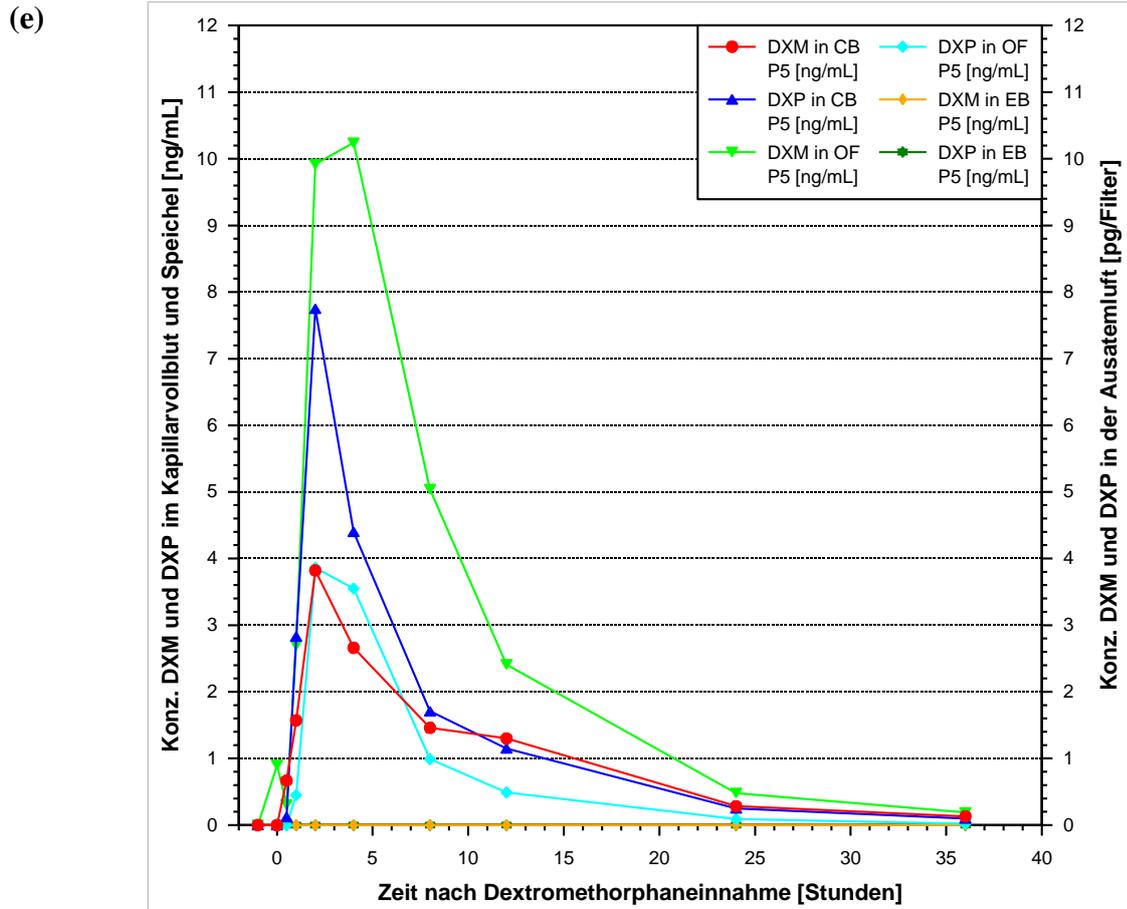
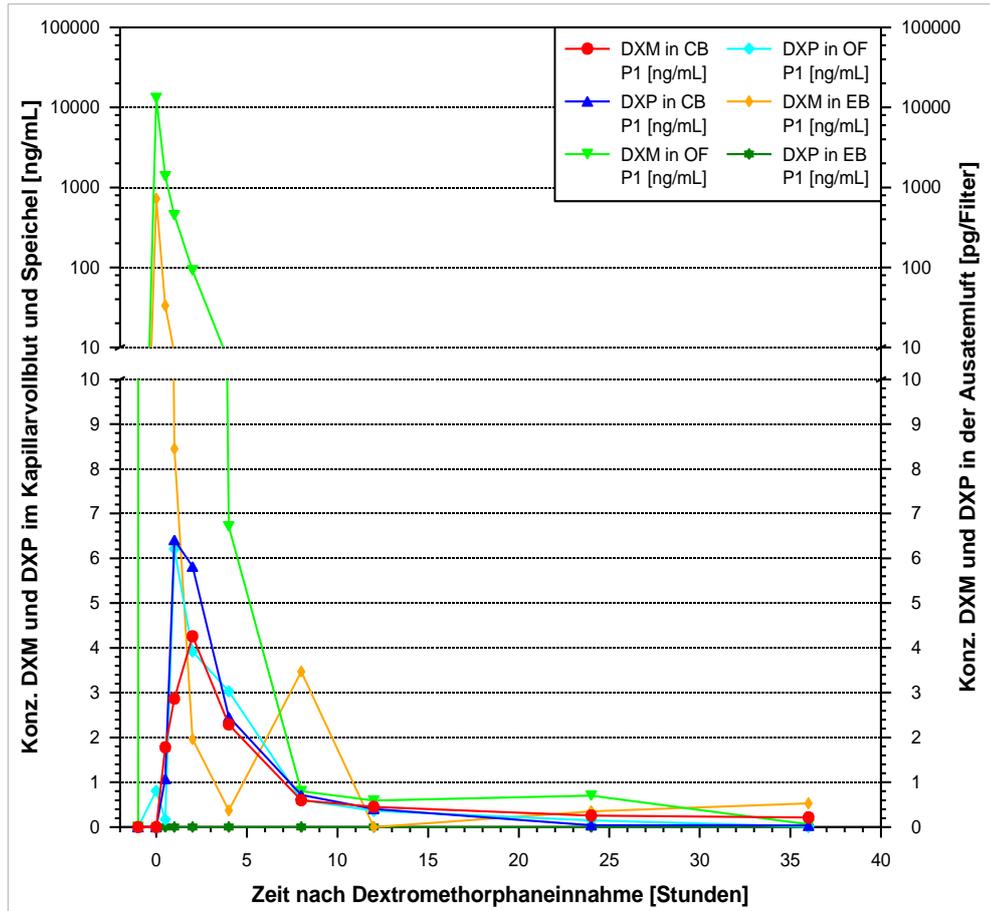


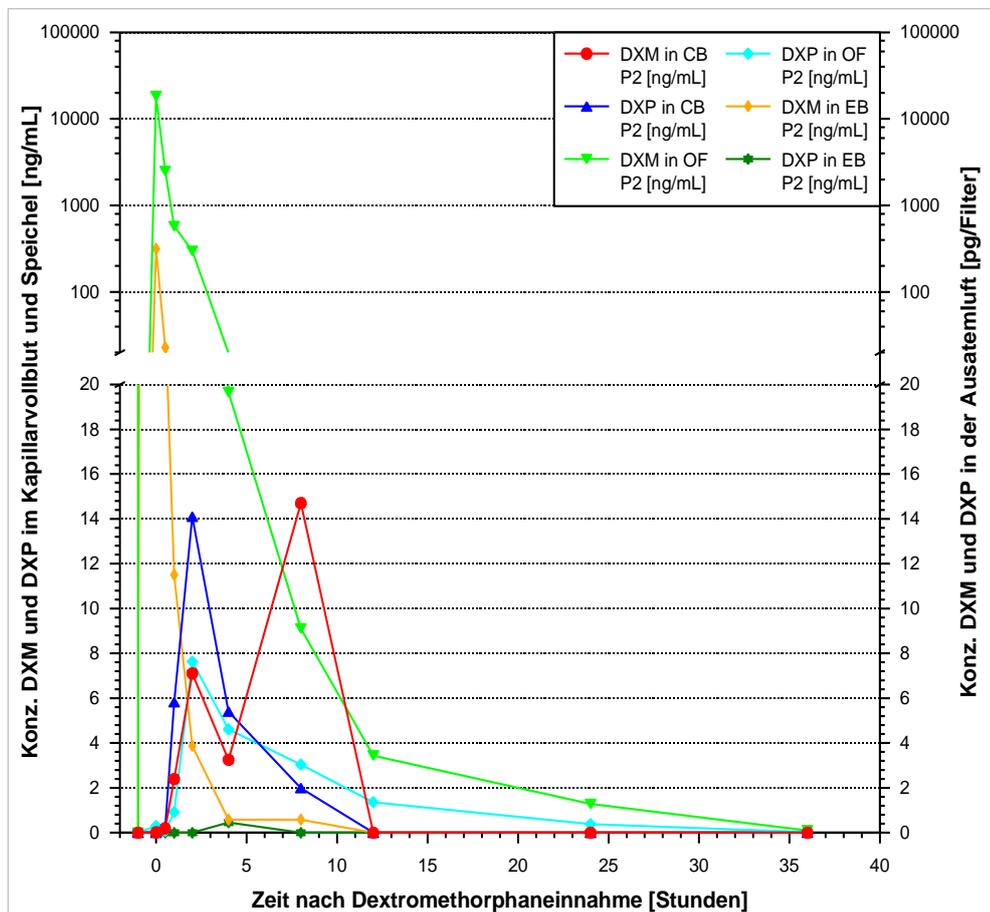
Abbildung 39: Dextromethorphan in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel; Gruppe A (Kapseln)
 (a) Individuum 1 (P1), (b) Individuum 2 (P2), (c) Individuum 3 (P3), (d) Individuum 4 (P4),
 (e) Individuum 5 (P5)

Die ermittelten OF/CB-Ratios für Gruppe B bewegten sich, ähnlich wie bei Gruppe A, zwischen 0,75 und 1,74, mit einem Mittelwert von 1,14 und Variationskoeffizienten von 56% bis 99%. Die Korrelation zwischen Speichel- und Kapillarovollblutkonzentration des Dextropropriethorphan war für Individuum 1 bis 4 signifikant ($p < 0,05$), bei Werten zwischen 0,64 und 0,96, bei Individuum 5 war sie nicht signifikant und lag bei 0,50.

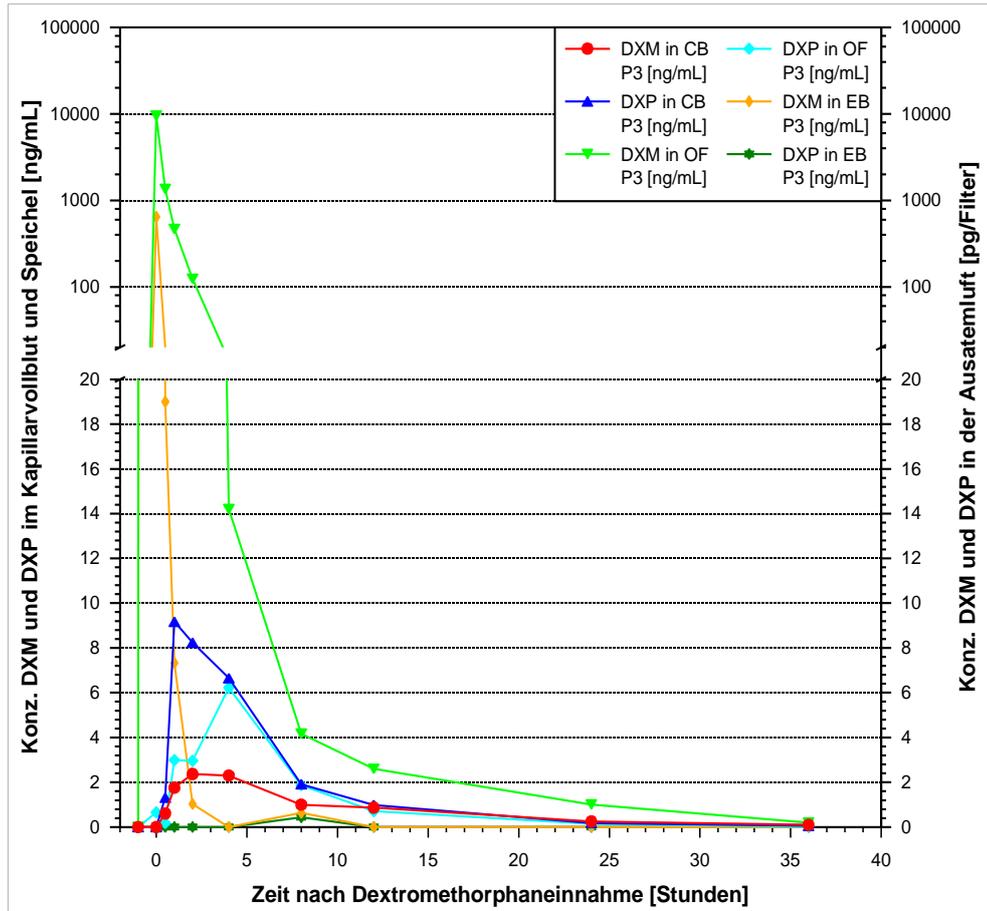
(a)



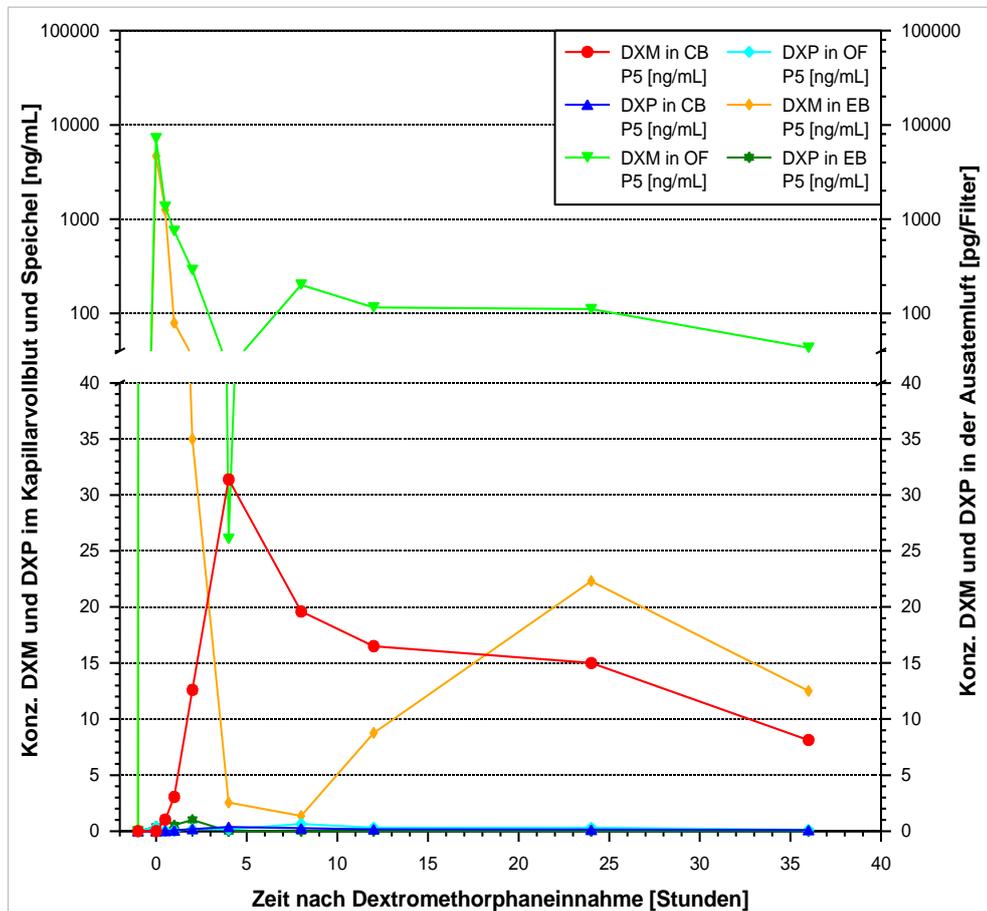
(b)



(c)



(d)



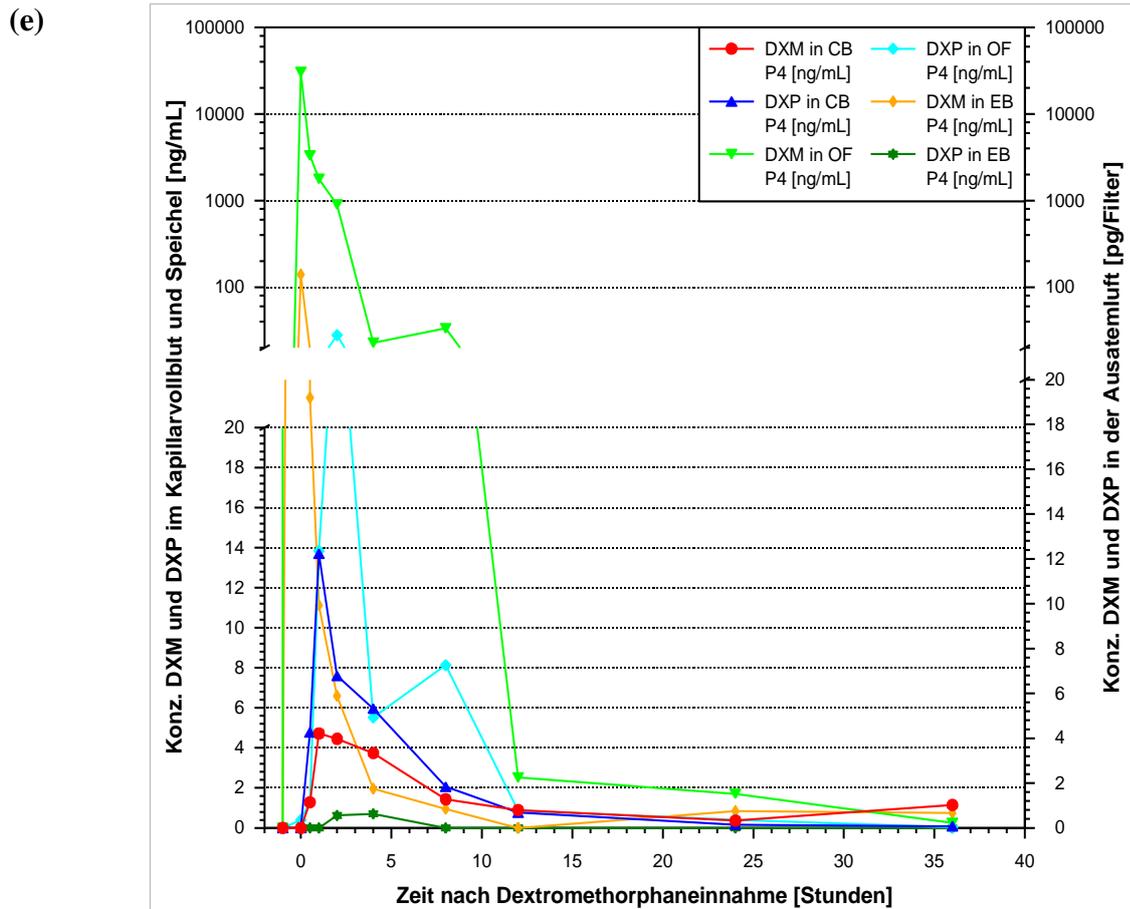


Abbildung 40: Dextromethorphan in Atemluft, Kapillarovollblut und Speichel; Gruppe B (Lutschpastillen), (a) Individuum 1 (P1), (b) Individuum 2 (P2), (c) Individuum 3 (P3), (d) Individuum 4 (P4), (e) Individuum 5 (P5)

Betrachtete man final das Verhältnis von Kapillarovollblut- und Ausatemluftkonzentration für das Dextromethorphan, ergab sich bei Gruppe A schon auf Grund der geringen Positivrate keine signifikante Korrelation, während sich bei Gruppe B Korrelationen von durchschnittlich 0,99 ergaben, bei einem Signifikanzwert von $< 0,001$. Immerhin zeigten sich auch hier zum Zeitpunkt T0 verhältnismäßig hohe Dextromethorphan-Konzentrationen auf den Atemluftfiltern, obgleich sie nicht dem Surfactant selbst entstammen konnten.

Die Berechnung erfolgte genauso wie beim Diphenhydramin (siehe 6.6.2).

Bei Gruppe B ergaben sich zum Zeitpunkt T0 folgende Werte:

Individuum 1: 0,055 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 55 pl/Filter

Individuum 2: 0,017 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 17 pl/Filter

Individuum 3: 0,068 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 68 pl/Filter

Individuum 4: 0,005 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 5 pl/Filter

Individuum 5: 0,649 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 649 pl/Filter

Berechnete man die Speichelmenge auf dem Filter acht Stunden nach der Medikamenteneinnahme über das Diphenhydramin, welches eine orale Kontamination induzieren sollte, ergaben sich folgende Speichelkonzentrationen:

- Individuum 1: 4,08 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 4080 pl/Filter
- Individuum 2: 0,909 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 909 pl/Filter
- Individuum 3: 2,91 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 2910 pl/Filter
- Individuum 4: 25,63 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 25630 pl/Filter
- Individuum 5: 1,717 $\mu\text{l}/\text{Filter}$, folglich 1717 pl/Filter

Außer bei Individuum 1, wurde über dieselbe Berechnung anhand des Dextromethorphans zum selben Zeitpunkt durchgeführt und es konnten geringere Mengen Speichel auf den Filtern berechnet werden (7 pl/Filter bis 153 pL/Filter). Über das Verhältnis der jeweiligen Speichelvolumina ließ sich für Individuum 1 nun errechnen, dass theoretisch 94 % des Dextromethorphans auf dem Atemluftfilter zu diesem Zeitpunkt eigentlich aus dem Speichel stammen müssten, bei Individuum 4 waren es sogar 99,9 %.

Wandte man dasselbe Verfahren auf Gruppe A an, so ergaben sich nach acht Stunden folgende Speichelmengen auf dem Filter:

- Individuum 1: 1,82 $\mu\text{l}/\text{Filter}$ folglich 1820 pl/Filter
- Individuum 2: 0,120 $\mu\text{l}/\text{Filter}$ folglich 120 pl/Filter
- Individuum 3: 0,018 $\mu\text{l}/\text{Filter}$ folglich 18 pl/Filter
- Individuum 4: 1,178 $\mu\text{l}/\text{Filter}$ folglich 1178 pl/Filter
- Individuum 5: keine Errechnung möglich

Zu dem Zeitpunkt 8 Stunden nach Medikamenteneinnahme war nur bei Individuum 1 und Individuum 3 Dextromethorphan auf den Atemluftfiltern detektierbar. Für Individuum 1 aus Gruppe A ergab sich, ausgehend von der Dextromethorphan-Konzentration, eine Menge von 7 μl Speichel auf dem Atemluftfilter. Demnach entstammen 26% des auf dem Atemluftfilter detektierten Dextromethorphans dem Speichel und 74 % dem Surfactant. Bei Individuum 3 ergab sich, trotz geringerer theoretischer Speichelmenge auf dem Filter, derselbe prozentuale Anteil.

5.6.4 Zusammenfassung

Grundsätzlich war ein Nachweis der in die Studie eingeschlossenen Substanzen in der Atemluft mit dem SensAbues® System, bezogen auf die Psychopharmakastudie, teilweise möglich, allerdings im Verhältnis zu Speichel oder Serum sehr unzuverlässig.

Bei den gezielten Studien mit Diphenhydramin und Dextromethorphan über die Konzentrationsveränderungen der Substanzen über die Zeit, konnte ein geringer Zusammenhang zwischen der gemessenen Konzentration von Diphenhydramin im Speichel und in der Atemluft festgestellt werden allerdings mit einer sehr hohen Streuung. Insbesondere die Betrachtung des Dextrophan, also des Metaboliten von Dextromethorphan, und der Gruppe, welche Kapseln mit dem Arzneistoff einnahm, konnten die entsprechenden Analyten bestenfalls sporadisch in der Atemluft festgestellt werden. Eine Berechnung der theoretischen Speichelmenge auf den Filtern war lediglich in dieser Gruppe nur für zwei Individuen möglich. In den Fällen, in denen kurz nach Einnahme der Substanz eine orale Kontamination mit Tablettenresten oder Resten der Lutschpastillen im Mund vorlag, war zu diesem Zeitpunkt auch der Analyt in der Atemluft nachweisbar. Außerdem ergaben sich Zusammenhänge zwischen dem Verlauf der Speichelkonzentration, dem Verlauf der Atemluftkonzentration der Analyten in der Diphenhydramin-studie und der Gruppe B der Dextromethorphan Studie.

6 Diskussion

6.1 Speichel als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik

6.1.1 Die Nachweisbarkeit von Substanzen im Speichel

OF/SE-Ratio

Die Nachweisbarkeit einer Substanz im Speichel ist von vielen Faktoren abhängig. Einer der wichtigsten ist das OF/SE-Ratio. Da die passive Diffusion durch die Zellmembranen hierbei den Haupttransportweg zwischen Speichel und Blut darstellt, sind Faktoren, die diese Prozesse beeinflussen, wie die Plasmaproteinbindung, der pKs-Wert und die Lipophilie des Moleküls, von entsprechend großer Bedeutung. Die ermittelten OF/SE-Ratios von Pregabalin und Aripiprazol unterstreichen den Einfluss von pKs-Wert und Plasmaproteinbindung. Trotz nicht vorhandener Plasmaproteinbindung lag die beobachtete OF/SE-Ratio von Pregabalin deutlich unter 1. Die pKs-Werte legten nahe, dass es sich beim Pregabalin um ein Zwitterion handelt, welches nur zu einem geringen Anteil ungeladen im Blut vorliegt und die Zellmembran durchdringen kann. Das Aripiprazol hingegen legte mit einem pKs-Wert von 7,6 und einer OF/SE-Ratio $< 0,1$ den Einfluss der Plasmaproteinbindung nahe, welche beim Aripiprazol bei mindestens 99 % lag, verglichen mit dem Mirtazapin, welches über einen ähnlichen pKs-Wert verfügte, dessen OF/SE-Ratio jedoch etwa 100-fach höher war. Vergleicht man die OF/SE-Ratios von Duloxetin und Venlafaxin, welche sich ebenfalls deutlich unterscheiden ($>$ Faktor 10), wird dies ebenfalls deutlich, da beide Substanzen einen ähnlichen pKs-Wert haben und sich lediglich in der Plasmaproteinbindung unterscheiden.

Aktive Transportprozesse, wie beispielsweise für das Tramadol angenommen (Ardakani and Rouini, 2009), sollten jedoch ebenfalls in die Betrachtung einbezogen werden. Duloxetin und Promethazin unterscheiden sich kaum in Plasmaproteinbindung, pKs-Wert oder Lipophilie und wiesen doch eine sehr unterschiedliche OF/SE-Ratio auf, so dass aktive Transportprozesse durchaus angenommen werden konnten, darauf soll jedoch in Kapitel 6.1.2 genauer eingegangen werden.

Der Einfluss der Lipophilie kann vermutlich bei der Betrachtung der OF/SE-Ratios der untersuchten Metaboliten O-Desmethylvenlafaxin und Desmethylcitalopram beobachtet werden, welche beide bei geringerer Lipophilie auch eine weit geringere OF/SE-Ratio aufweisen als die Muttersubstanzen.

In der Literatur wird vermehrt beschrieben, dass Speichel die freie Fraktion des Blutes repräsentiert (Stephen et al., 1980; MacKichan et al., 1981; Al Za`Abi et al., 2003), dies konnte jedoch anhand der Ergebnisse dieser Studie nur eingeschränkt beobachtet werden. Kleinere Schwankungen der Plasmaproteinbindung schienen keinen Einfluss auf die Korrelation zwischen der Speichel- und der Serumkonzentration zu haben, im Gegensatz zur Gesamtserumkonzentration (Neumann et al., 2018). Dabei sind jedoch die teilweise geringen Analytkonzentrationen im Ultrafiltrat zu berücksichtigen, welche sich mitunter an den Bestimmungsgrenzen bewegten, und daher eine größere Streuung aufweisen können. Beim Venlafaxin, das durch seine geringe Plasmaproteinbindung entsprechend hohe Konzentrationen im Ultrafiltrat aufwies, waren die Variationskoeffizienten beispielsweise vergleichbar zur Gesamtserumkonzentration. Insgesamt ließen sich jedoch gute Korrelationen zwischen Serum- und Speichelkonzentration feststellen, so dass die Speichelkonzentration durchaus Hinweise auf die Höhe der Serumkonzentration einer Substanz liefern kann. Die ermittelte Plasmaproteinbindung in der Studie deckte sich, außer im Falle des Venlafaxins, mit den in der Literatur verzeichneten Werten. Die Plasmaproteinbindung des Venlafaxins ist laut den Messungen dieser Studie etwa doppelt so hoch wie in der Literatur angegeben nämlich 56,1 % statt 27 %.

Weitere Faktoren, die die Nachweisbarkeit beeinflussen

Anhand des Beispiels von Pregabalin und Aripiprazol wurde deutlich, dass neben der OF/SE-Ratio auch Faktoren wie die Halbwertszeit und die Serumkonzentrationen bei der Nachweisbarkeit einer Substanz eine Rolle spielen können. Trotz einer sehr geringen OF/SE-Ratio sorgte die lange Halbwertszeit für eine ausreichend lange Detektierbarkeit des Aripiprazols, genauso wie die hohen therapeutischen Konzentrationen im Serum beim Pregabalin. Insbesondere bei der Detektion eines Substanzmissbrauchs sind die Missbrauchskonzentrationen oftmals höher als bei einer Einnahme aus rein therapeutischen Gründen (Dilling et al., 2000; WHO, 2016a).

Abhängig davon wie lange der Zeitraum sein soll, den man rückwirkend auf einen Substanzkonsum überprüfen möchte, muss die Nachweisgrenze, beziehungsweise die Entscheidungsgrenze, entsprechend der jeweiligen Substanz angepasst werden, um einerseits eine ausreichend lange, beziehungsweise eine der Fragestellung angemessen lange, Nachweisbarkeit zu garantieren (Böttcher et al. 2013). Insbesondere bei suchttherapeutischen Fragestellungen, in denen Substitutionstherapeutika wie Buprenorphin und sein Metabolit, das Norbuprenorphin, oder auch Opioide wie das Fentanyl, eine Rolle spielen, sind recht empfindliche Methoden gefragt oder eine entsprechende Probenmenge, die im Zweifelsfall aufkonzentriert werden kann (Böttcher et al., 2013).

Ein Analyt für den dieses Aufkonzentrieren im Rahmen dieser Arbeit notwendig war, war das Dextromethorphan.

Nachweisbarkeit von Dextromethorphan und Dextrorphan

Die Konzentrationen von Dextromethorphan und Dextrorphan im Kapillarovollblut nach Einnahme von 30 mg Dextromethorphan-HBr entsprachen in ihrer Größenordnung etwa den Konzentrationen, die Manap et al. (1999) im Plasma als C_{\max} ermittelten, ungeachtet des Verhältnisses von Serum- bzw. Plasmakonzentration zur Kapillarovollblutkonzentration. Die ermittelten Speichelkonzentrationen können durch Rodrigues et al. (2008) untermauert werden. Eine Bestimmung der OF/CB-Ratios für Dextromethorphan war nur in Gruppe A sinnvoll möglich, da die Speichelkonzentrationen in Gruppe B durch die orale Kontamination zu diesem Zwecke nicht verwendet werden konnten. Die Variationskoeffizienten waren allerdings recht hoch. Auch fürs Dextrorphan, für das die OF/CB-Ratio in beiden Gruppen bestimmt werden konnte, ergaben sich hohe Variationskoeffizienten und mittlere OF/CB-Ratios von 0,43 bis 1,97, was einen sehr weiten Bereich darstellt. Inwiefern die OF/CB-Ratios sich mit den Ratios zu Serum vergleichen lassen, ist jedoch fragwürdig, da alleine das Verhältnis von Serum zu Vollblut in diesem Falle zusätzlichen Einfluss hätte. Im Falle des Kapillarovollbluts wäre der Hämatokrit als Einflussgröße ebenfalls einzurechnen (Coombes et al., 1984) und zusätzlich die Füllmenge der Kapillaren, da im Transportgefäß keine Kontrolle bestand ob die Studienteilnehmer die Kapillarblutentnahme korrekt durchgeführt haben. Unabhängig davon ist ein Nachweis im Kapillarblut jedoch sowohl für das Dextromethorphan als auch seinen aktiven Metaboliten problemlos möglich.

Nachweisbarkeit von Diphenhydramin

Die Diphenhydramin-Konzentration im Kapillarovollblut sowie die Nachweiszeit entsprachen in ihren Größenordnungen etwa den Ergebnissen von Albert et al. (1975) nach einer oralen Aufnahme von 50 mg Diphenhydramin-HCl. Auch Sharp et al. (1983) fanden ähnliche Plasmakonzentrationen nach einer einmaligen Einnahme von 50 mg Diphenhydramin-HCl. Allerdings wurden hier wesentlich geringere Speichelkonzentrationen festgestellt und eine OF/Plasma-Ratio von deutlich unter 1, nämlich etwa 0,3 (Sharp et al., 1983), während die OF/CB-Ratio in der vorliegenden Arbeit um einen Faktor 10 höher lag. Verantwortlich hierfür können unter anderem das Speichelsammelsystem und der damit verbundene pH-Wert im Mund sein. Betrachtet man Plasmaproteinbindung und pKs-Wert der Substanz, erscheint die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte OF/CB-Ratio allerdings sinnvoll.

Einfluss des Speichelsammelsystems

Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse wird der Einfluss des Speichelsammelsystems auf die Nachweisbarkeit einer Substanz im Speichel deutlich. Die Stimulation des Speichelflusses wurde in der Literatur als möglicherweise nachteilsbehaftet betrachtet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da die Konzentrationsverteilung bei konsekutiver Probenentnahme mit dem Quantisal[®] und dem Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem nicht zum Nachteil des Greiner Systems war. Ähnliches ließ sich auch bei einer ähnlichen Untersuchung mit Cotinin und Cortisol feststellen, in der das Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem mit der Salivette[®] und dem Quantisal[®]-System bzw. das Cortisol mit der Salivette[®] verglichen wurde (Boettcher M., Peschel A., 2011). Auch hier erwies sich das Greiner System als zumindest vergleichbar. Das Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem weist im Gegensatz zu anderen Speichelentnahmesystemen, wie beispielsweise dem Quantisal[®] Speichelentnahmesystem, durch die genaue Bestimmung des Speichelanteils mitunter eine bessere Korrelation zwischen Serum und Speichel auf, wie Coucke et al. (2016) in einer Studie mit Codein zeigen konnten. Bei entsprechend sachgemäßer Anwendung sorgt das Greiner Bio-One System darüber hinaus auch für ein ausreichend großes Probenvolumen, was mit anderen Entnahmesystemen nicht zwingend sichergestellt werden kann, insbesondere mit an Xerostomie leidenden Patienten. Patteet et al. (2016) hatten im Rahmen einer ähnlich angelegten Studie, welche mit Psychopharmaka und dem Quantisal[®]-Entnahmesystem durchgeführt wurde, beispielsweise Schwierigkeiten ein für dieses Entnahmesystem ausreichendes Probenvolumen sammeln zu können.

6.1.2 Orale Kontamination

Aus den Ergebnissen der hiesigen Studie zur oralen Kontamination ergab sich eine mögliche Beeinflussung der Substanzkonzentrationen im Speichel von mehreren Stunden. Abhängig vom Ziel der Konzentrationsbestimmung im Speichel, sollte also sichergestellt werden, dass eine Medikamenteneinnahme des zu bestimmenden Medikamentes grundsätzlich nach der Probeneinnahme stattfindet, da die Ergebnisse hier nachhaltig verändert werden können. Wird die Konzentrationsbestimmung zum Ausschluss einer Substanzeinnahme durchgeführt, sollte der letzte mögliche Kontakt des Probanden mit einer entsprechenden, missbrauchsrelevanten Substanz mindestens zwei Stunden zurückliegen, da sich nach dieser Zeit lediglich noch ca. 1 % der ursprünglichen Substanzkonzentration in der Mundhöhle befinden. Sollte ein Patient vor einer Speichelprobenentnahme also durch einen Kuss oder andere Prozesse oral in Kontakt mit Körperflüssigkeiten kommen, die eine entsprechend relevante Substanz enthalten, kann nach

dem Ablauf dieser Zeitspanne davon ausgegangen werden, dass die verbliebene Substanzkonzentration unterhalb der Entscheidungsgrenze liegen sollte. Dabei ist zu beachten, dass die induzierte orale Kontamination in dieser Studie extrem hoch war und nicht zu vergleichen ist mit einer akzidentiellen Kontamination des Speichels mit fremden Körperflüssigkeiten, deren Substanzkonzentrationen wesentlich geringer sein sollte. Das Trinken von 250 ml Wasser führte durchschnittlich zu einer Abnahme der Substanzkonzentration von etwa 60 % und kann als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme angeboten werden. Auf diese Weise kann gleichzeitig sichergestellt werden, dass keine Flüssigkeit im Mund zurückgehalten wurde, um die Speichelprobe eventuell zu verdünnen. Wie aus der Studie zur Vergleichbarkeit der Speichelprobenentnahmesysteme hervorging, war eine konsekutive Probenentnahme problemlos möglich und führte nicht zu verfälschten Ergebnissen, so dass sich sogar eine intensive Mundspülung vermutlich nicht negativ auf die Ergebnisse auswirken wird.

Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil des Arzneistoffes, trotz des Ausspuckens der Tablette, über die Mundschleimhaut oder auch durch das Verschlucken des hoch kontaminierten Speichels in die Blutbahn aufgenommen wurde und eine dann erfolgte Rückverteilung in den Speichel zu einer längeren Nachweiszeit führen könnte. Um dies ausschließen zu können, hätten zum Zeitpunkt der Speichelprobenentnahme auch Blutproben entnommen werden müssen. Dies wird in weiterführenden Studien überprüft werden müssen.

Um eine absichtliche orale Kontamination erkennen zu können, die zur Verschleierung einer Non-Compliance hervorgerufen wurde, bietet sich die Bestimmung eines Metaboliten zusätzlich zur Muttersubstanz an, sofern möglich.

Auffällig bei der notwendigen Elimination der Proben bei der Bestimmung der OF/SE-Ratios war die Tatsache, dass in jeder der Proben beim Tramadol, Citalopram, Escitalopram und Venlafaxin, die auf Grund einer stark erhöhten Speichelkonzentration des Medikamentes eliminiert werden mussten, die Konzentration des gemessenen Metaboliten ebenfalls stark erhöht war. Normalerweise wäre eine starke Abweichung zwischen dem Verhältnis von Muttersubstanz zum Metaboliten zugunsten der Muttersubstanz ein Indikator für eine orale Kontamination, tatsächlich konnte diese jedoch in keiner der eliminierten Proben beobachtet werden.

Speichelkonzentrationen von über 16 µg/ml Venlafaxin im Speichel lagen auch im Konzentrationsbereich der Initialkonzentration bei der Studie zur oralen Kontamination. Orale Kontamination wäre hier eine mögliche Erklärung dieses Phänomens.

Eine gleichzeitige Konzentrationserhöhung des Metaboliten in der entsprechenden Probe könnte hierbei das Ergebnis eines oder des Zusammenspiels mehrerer Faktoren sein. Eine Möglichkeit ist eventuell ein extrahepatischer Metabolismus in der Mundschleimhaut. Rao berichtete im Jahre 1983 über einen vorstellbaren, extrahepatischen Metabolismus von oral eingenommenen Substanzen im Mundraum. Zhou et al. (1996) fanden in einer Studie zum Metabolismus von Phenytoin im Zahnfleisch Hinweise auf ein aktives Cytochrom P450 System in der Mundschleimhaut, wenn auch keine Hinweise auf eine CYP 2D6 Aktivität, die im Falle des Venlafaxins von Relevanz wäre. Vondracek et al. (2000) untersuchten ebenfalls Mundgewebe auf mRNA von Cytochrom-P450-Enzymen und konnten die Möglichkeit eines Metabolismus unterschiedlicher Substanzen im Mundraum aufzeigen. Auch Yang und Raner (2005) konnten die Expression von CYP Enzymen im Mundraum, nämlich in der Zunge, bestätigen, doch auch sie fanden keine oder nur geringe Hinweise auf einen CYP 2D6 Aktivität. Dass die hiesige Beobachtung kein Einzelfall ist, ergibt sich aus einer Studie von Concheiro et al. aus dem Jahr 2011. In dieser Studie konnten kurz nach der Einnahme von Buprenorphin sehr variable und auch hohe Speichel-Plasma-Ratios für Norbuprenorphin nachgewiesen werden.

Bei allen in dieser Arbeit befindlichen Fällen handelte es sich um eine Demethylierung der jeweiligen Muttersubstanz. Im Falle von Tramadol und Venlafaxin um eine O-Demethylierung, im Falle des Citaloprams um eine N-Demethylierung. Möglicherweise sind noch andere Mechanismen als eine Cytochrom P450 Metabolisierung beteiligt.

Ein zweiter Punkt ist der aktive Transport von Substanzen in den Speichel. Es gibt Hinweise auf einen zumindest anteilmäßig aktiven Transport von beispielsweise Digoxin in den Speichel (Haeckel und Hänecke, 1996). Bartnicka et al. (2007) fanden darüber hinaus Hinweise auf einen Einfluss von P-Glycoproteinen und der Expression des MDR 1 Gens bei dem Übergang dieser Substanz in den Speichel. Auch Uematsu et al. berichteten 2001 vom P-Glycoprotein in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen. Das MDR1 Gen unterliegt innerhalb der Bevölkerung einem gewissen Polymorphismus (Ambudkar et al. 2003; Singh et al. 2012). Es ist folglich denkbar, dass auch die Sekretion anderer Substanzen durch die Expression oder Überexpression von P-Glycoproteinen beeinflusst wurde, und aktiver Transport zumindest teilweise Einfluss auf die OF/SE-Ratio hat. Möglicherweise sind durch diesen Umstand auch die Unterschiede im Verhältnis von der theoretischen zur praktischen OF/SE-Ratio zu erklären. Ein mögliches Beispiel dafür stellen die Substanzen Promethazin und Duloxetine dar. Die theoretisch ermittelten Ratios waren bei beiden Substanzen bei den entsprechend betrachteten pH-Werten ähnlich

(0,69 für das Promethazin und 1 für das Duloxetin, bei pH-6,4 und nicht stimuliertem Speichelfluss), bzw. für das Promethazin sogar etwas geringer als für das Duloxetin. Der ermittelte Wert für das Duloxetin entsprach jedoch mit etwa 0,6 wesentlich eher diesem theoretischen Wert, als das Promethazin mit einer OF/SE-Ratio über 3. Darüber hinaus nehmen neben den genetischen Faktoren auch Arzneistoffe Einfluss auf die Aktivität des P-Glycoproteins wie beispielsweise Verapamil, Chinin, aber auch Sertralin, sein Metabolit Desmethylsertralin und Paroxetin (Weiss et al. 2003). Die Beimedikation der in die Studie zur Ermittlung des OF/SE-Ratios von Psychopharmaka eingeschlossenen Patienten wurde auf Induktoren und Inhibitoren des P-Glycoproteins überprüft (Linardi & Natalini, 2006; Zagermann-Muncke, 2006). In den Fällen in denen ein solches Medikament als Beimedikation festgestellt wurde die OF/SE-Ratios der detektierten in die Studie eingeschlossenen Medikamente auf Auffälligkeiten überprüft, es konnten jedoch keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

Da der Einfluss der Speichelsammellösung an den entsprechenden Arealen der Speicheldrüsen, also der Azini und der Ausführungsgänge, nicht bekannt, und der genaue pH-Wert vor diesem Hintergrund nicht ermittelbar ist, können diese Werte bestenfalls hinweisgebend sein und bedürfen einer genaueren Überprüfung, möglicherweise in einer weiterführenden Studie.

6.1.3 Der mögliche Einsatz von Speichel als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik

Um Speichel als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik einsetzen zu können, sind abhängig vom Setting drei Punkte wesentlich: Der Ausschluss einer falschen Probenentnahme, der Ausschluss einer Probenmanipulation und ein entsprechendes Nachweisfenster.

Ausschluss einer falschen Probenentnahme und von Probenmanipulation

In der Perianalytik erfüllen Speichelanteil, Amylase- und ggf. die Cortisol-Konzentration die Funktion des Kreatinins im Urin. Referenzwerte für diese Parameter waren problemlos ermittelbar. Der Speichelanteil wurde mit einem Referenzbereich von 15 – 75 % ermittelt. Der Mittelwert lag geschlechtsunabhängig bei etwa 45 %. Dies war geringer als bei Raggam et al. (2008), wo der Mittelwert mit 65 % etwas höher lag, allerdings wurde hier nur ein Probandenkollektiv aus 25 Individuen betrachtet. Weiterhin ist das betrachtete Patientenkollektiv ein anderes. Da es sich in der vorliegenden Arbeit um Routineproben handelte, wurden Patienten mit unbekanntem Gesundheitszustand und weitgehend unbekannter Medikation betrachtet. Der überwiegende Anteil dieser Patienten befand sich allerdings in einer Suchtbehandlung und

wurde mit Medikamenten behandelt. Die eingesetzten Substitutionstherapeutika waren innerhalb dieses Kollektives hauptsächlich Methadon, Buprenorphin und Substitol, welche unter anderem zu einer verminderten Speichelproduktion und Mundtrockenheit führen kann (Ventafriidda et al., 1987, De Conno et al., 1996). Dies wirkte sich vermutlich auf den Mittelwert und den Referenzbereich aus. Dieses Patientenkollektiv war jedoch repräsentativ für das Patientenkollektiv, welches in der Missbrauchsdiagnostik betrachtet wird, da auch Patienten in der Schmerzbehandlung oder bei der Behandlung mit Psychopharmaka mit Medikamenten therapiert werden, welche Xerostomie auslösen können.

Die α -Amylase war als leicht zu bestimmender Authentizitätsmarker gut nutzbar. Die geringen Unterschiede zwischen Männern und Frauen in der α -Amylase Konzentration waren zwar auffällig für die α -Amylase als Authentizitätsmarker, jedoch nicht relevant, da es sich nur um einen Hilfsparameter handelt, der zur Beurteilung des Probenzustandes genutzt wird und nicht, um pathologische Vorgänge zu beurteilen. Die geringste Untergrenze der drei betrachteten Gruppen war jene der Frauen mit 16 271 U/l. Eine Festlegung des Referenzbereiches auf $> 16\ 000$ U/l ist für einen Authentizitätsmarker vollkommen ausreichend.

Für das Cortisol ergaben sich geschlechterspezifische Unterschiede. Die Untergrenze belief sich bei beiden Geschlechtern auf 0,1 ng/ml, die Obergrenze bei den Männern auf 7,4 ng/ml und bei den Frauen auf 6,5 ng/ml. In der Studie von Aardal und Holm (1995) wurde der Referenzbereich im Speichel auf 1,3 bis 9,8 ng/ml, geschlechts- und tageszeitunabhängig festgesetzt. Die auch von Aardal und Holm festgestellte zirkadiane Rhythmik des Cortisols wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beachtet. Die im Vergleich geringere Cortisol-Konzentration können wie im Falle des Speichelanteils durch das Probekollektiv bedingt sein. Es gibt Hinweise auf eine Inhibition der Cortisol-Produktion unter Opiattherapie (Ballatyne und Mao, 2003; Policola et al., 2014). Auch wenn vermutlich keine Normalverteilung der Cortisol-Werte vorlag, konnte der Referenzbereich durchaus festgelegt werden, da er, wie im Fall der Amylase, nicht zur Aufklärung pathologischer Vorgänge, sondern lediglich als Orientierungshilfe zur Probenbeurteilung diente. Die geschlechterspezifischen Unterschiede wurden insofern in den Referenzbereich eingerechnet, als dass der kleinste und der größte Grenzwert für den Referenzbereich genutzt wurden, und nicht die Werte des Gesamtkollektivs. Der Referenzbereich wurde folglich auf 0,1 ng/mL bis 7,4 ng/ml festgelegt. Böttcher et al. (2010) führten eine ähnliche Studie mit geringerer Patientenzahl durch, wo unter anderem Patientengruppen mit einer „Normal-Gruppe“ verglichen wurden. Dort wurden die 5 % Perzentile und die 95 % Perzentile gewählt, doch unter Einbeziehung dieses Faktors verhielten sich die Werte in der vorliegenden

Studie ähnlich. Auch hier ließ sich die Erniedrigung des Cortisol-Wertes in der Patientengruppe beobachten.

Unter Zuhilfenahme dieser Grenzwerte ließen sich nun grobe Abweichungen vom Entnahmeprozedere bzw. eine Probenmanipulation feststellen.

Lagerung und Handhabung

Da mit dem Greiner Bio-One Speichelsammelsystem eine Stimulation des Speichelflusses stattfindet, ist eine ausreichende Speichelproduktion bei xerostomen Patienten garantiert. Darüber hinaus ist der pH-Wert der im Mund befindlichen Flüssigkeit während des Sammelvorgangs relativ konstant und sauer, was anhand der pH-Wert Messung in den Bechern gezeigt werden konnte. Damit fungiert dieses saure Speichel/SES-Gemisch als Ionenfalle für basische Substanzen und führt zu einer Anreicherung im Speichel/SES-Gemisch. Allerdings ist über den Vorgang und den Einfluss des Puffergemisches im Mund auf die Speicheldrüsen und den dort vorherrschenden pH-Wert nichts bekannt. Der saure pH-Wert des Speichel/SES-Gemisches blieb auch über eine mehrwöchige Lagerungsperiode konstant, was der Stabilität einiger Substanzen dienlich ist (Cone und Menchen, 1988). Ein Zusammenhang zwischen Speichelanteil und pH-Wert konnte ebenfalls festgestellt werden. Dieser ergab sich aus dem Verhältnis Puffer/Speichel. Die Anregung des Speichelflusses führte zu einem erhöhten Hydrogencarbonatanteil im Speichel und damit zu höheren pH-Werten. Allerdings ergab sich zusätzlich dazu ein Zusammenhang zwischen dem im Transferröhrchen enthaltenen Volumen und dem pH-Wert. Dieser Zusammenhang ergab sich vermutlich durch das Natriumazid, welches im Röhrchen als Bakterizid enthalten ist (Greiner Bio-One Speichelsammelsystem, Gebrauchsanleitung, 12/2014 und Herstellerangaben). Löst es sich im wässrigen Milieu, kommt es möglicherweise zu einer alkalischen Reaktion von Nebenprodukten der Synthese (Ströhle und Schweda, 2002), die, wenn das Volumen im Röhrchen gering ist, die Pufferkapazität des Citratpuffers übersteigt. Um die Bedingungen in A- und B-Probe möglichst gleich zu halten, und damit eine vergleichbare Substanzstabilität im Röhrchen gewährleisten zu können, sollte darauf geachtet werden, dass A- und B-Probe eines Patienten etwa ein vergleichbares Speichel/SES-Gemisch Volumen enthalten und die Röhrchen möglichst gut gefüllt sind.

Einsatzmöglichkeiten von Speichel in der Missbrauchsdiagnostik

Die gute Korrelation zwischen Serum und Speichel zeigte, dass die Speichelkonzentration zumindest eingeschränkt Rückschlüsse auf die Serumkonzentration zulässt. Da die Anwesenheit einer Substanz im Blut mit seiner Wirksamkeit assoziiert wird, eignet sich Speichel als Matrix zur Feststellung einer akuten Beeinflussung. Eine orale Kontamination kann in einem solchen Fall sogar hilfreich sein, da die Konzentration von möglicherweise schwer nachweisbaren Substanzen erhöht wird. Die akute Beeinflussung, bzw. der nur kurz zurückliegende Konsum, spielt im Straßenverkehr eine große Rolle (Toennes et al., 2005). Abhängig wie lange das Nachweisfenster sein soll, sollte man die Cutoffs entsprechend setzen, um zu verhindern, dass ein einmaliger Konsum zu zwei unterschiedlichen Gelegenheiten detektiert wird und es zur „doppelten“ Sanktionierung eines einmaligen Konsums kommt. Der zweite große Bereich, in dem aktuelle Beeinflussung eine Rolle spielen kann, ist das Therapeutische Drug Monitoring. Der therapeutische Bereich ist jedoch nur ein Orientierungsbereich, abhängig von den Autoren und der durchgeführten Studien. Allerdings ist die Varianz der Speichelkonzentration im Verhältnis zur Serumkonzentration zu hoch, als dass Speichel das Serum zur Spiegelbestimmung im Rahmen einer Dosisfindung ersetzen könnte. Der Speichel scheint jedoch zumindest großes Potenzial für die Compliance-Überprüfung der Patienten zu haben und könnte die Möglichkeit auf Orientierungsbereiche bezüglich der therapeutischen Serumkonzentration liefern. Bei zweifelhaft hohen oder niedrigen Ergebnissen außerhalb des Orientierungsbereichs oder außergewöhnlichen Befunden sollte jedoch nicht auf eine Serum-Spiegelbestimmung verzichtet werden.

Des Weiteren ergaben sich in dieser Arbeit Hinweise auf die Möglichkeit, den metabolischen Phänotypen aus dem Speichel ermitteln zu können. In der Dextromethorphanstudie wurden die metabolischen Ratios, sprich Dextromethorphan-Konzentration/Dextromethorphan-Konzentration (DXM/DXP) ermittelt, um Aufschlüsse über die Enzymaktivität des CYP 2D6 zu erhalten. In Gruppe A kristallisierte sich heraus, dass Individuum 3 eine stark erhöhte DXM/DXP-Ratio aufweist, welche sowohl im Kapillarvollblut als auch im Speichel etwa um den Faktor 1000 höher war als bei den anderen Individuen der Gruppe. Die gleiche Beobachtung im Speichel führte dazu, dass dieses Individuum als Slow-Metabolizer eingeordnet werden konnte. Obgleich die durch die Kontamination verfälschten Dextromethorphan-Konzentrationen im Speichel die Bestimmung einer zuverlässigen DXM/DXP-Ratio nicht erlaubten, ließ sich beim Vergleich der Ratios innerhalb dieser Gruppe feststellen, dass Individuum 5 ebenfalls eine etwa um den Faktor 1000 erhöhte metabolische Ratio sowohl im Kapillarvollblut als auch im Speichel

besaß. Um die genauen Grenzwerte zwischen den einzelnen Metabolisierungstypen ermitteln zu können, sind in jedem Fall weitere Studien mit wesentlich mehr Teilnehmern notwendig. Eine grobe Richtlinie für den Speichel und für das Kapillarvollblut scheinen jedoch eine metabolische Ratio ≤ 1 für das Kapillarblut und $\leq 1,5$ für den Speichel bei normalen Metabolisierern und ≥ 50 bei Slow-Metabolizern zu sein, die zwischen zwei und acht Stunden nach Medikamenteneinnahme Anwendung findet. Dabei sollte eine Einzelprobe ausreichend sein. Hu et al. (1998) stellten ebenfalls fest, dass eine Einzeldosis Dextromethorphan und eine Bestimmung des metabolischen Phänotyps von CYP2D6 aus Speichel eine Alternative zur Bestimmung aus Sammelurin darstellt, obgleich sie die Bestimmung der metabolischen Ratio im Speichel sechs Stunden nach der Substanzeinnahme empfehlen.

Unabhängig davon, häufen sich die Empfehlungen, Speichel als alternative Matrix im Therapeutischen Drug Monitoring bei unterschiedlichen Substanzklassen in Erwägung zu ziehen. Marchei et al. (2010) beschäftigten sich mit der Korrelation von Methylphenidat und Ritalinsäure in Verbindung mit der Behandlung von Kindern. Auch die Analyse von Immunsuppressiva im Speichel zeigte vielversprechende Resultate (Ghareeb und Akhlaghi, 2015), ebenso wie die von Antiepileptika (Al Za`Abi et al., 2003; Maldonado et al., 2008), Betablockern (Dawes und Kendall, 1978) oder Schmerzmedikamenten (Heltsley et al., 2011; Heltsley et al., 2012; Conermann et al., 2014). Bei der Behandlung mit Immunsuppressiva und Antiepileptika kann eine Speichelprobe, nach einem entsprechenden Training, von den Patienten selbst abgenommen werden und zur Analyse ins Labor geschickt werden und damit einen eine invasive Blutentnahme ersparen. Gleiches gilt für schwierige Patientengruppen wie Kindern oder psychiatrischen Patienten, bietet die Speichelprobenentnahme enorme Vorteile.

Bereiche, in denen dies zur Anwendung kommen könnte, sind zum Beispiel die Psychiatrie und die Schmerztherapie sowie zum Ausschluss eines Beikonsums ist der Speichel eine adäquate Matrix, der hierbei nicht nur Blutentnahmen, sondern auch speziell in der Drogenanalytik Urinproben welche unter Aufsicht abgegeben werden müssen ersetzen könnte.

Es gibt mittlerweile viele Beispiele, welche ein Drogen- und Medikamentenscreening im Speichel aufzeigen. Neben den bereits im Text erwähnten, gibt es noch Vergleiche zwischen Speichel und Vollblut (Langel et al., 2014) oder andere Multitargetanalysen, beispielsweise im Bereich der Schmerztherapie (Wood et al., 2005; Heltsley et al., 2011; Heltsley et al., 2012).

Nachweisfenster

Die unter Umständen geringeren Nachweiszeiträume im Speichel werden durch andere Vorteile wieder relativiert. So ist die Möglichkeit einer Probenmanipulation bei einer Speichelprobe wesentlich geringer als bei der Urinabgabe, und selbst ein Ausspülen des Mundes führt, wie anhand des Tests auf die Eignung des Speichelsammelsystems deutlich wurde, nicht zu einer gravierenden Veränderung der Probenkonzentration, so die entsprechende Person eine Substanz konsumiert hat. Eine unmittelbar auf die erste Probenentnahme folgende zweite Probenentnahme ist möglich, so dass selbst bei Problemen (wie dem Herunterschlucken oder Ausspucken der SES-Lösung) eine zweite Probe genommen werden kann, was beispielsweise beim Urin nicht möglich ist. Darüber hinaus besteht im Falle einer massenspektrometrischen Methode die Möglichkeit der Methodenanpassung, so dass kürzere Nachweiszeiten durch das Absenken des Cutoffs, also der Entscheidungsgrenze, ausgeglichen werden können.

Insbesondere bei OF/SE-Ratios über 1 wie z. B. das Diphenhydramin sind die Nachweisfenster der in dieser Arbeit für die Studien verwandten Substanzen unproblematisch und erstreckt sich beim Diphenhydramin wie die Studie zur Diphenhydramin-„Kinetik“ zum Teil deutlich über 48 Stunden. Der Mittelwert der maximalen Nachweisbarkeit lag für Speichel bei 54 Stunden, im Blut bei etwa 48 Stunden.

Unter den Voraussetzungen einer entsprechenden Anpassung der massenspektrometrischen Methode kann die Nachweisbarkeit missbrauchsrelevanter Substanzen im Speichel dem Serum mindestens ebenbürtig, oder sogar überlegen sein.

6.1.4 Schlussfolgerung

Der Speichel ist, unter Verwendung des in dieser Arbeit genutzten Greiner Bio-One Speichelentnahmesystems, eine echte Alternative zum Urin in der Missbrauchsdiagnostik für die meisten Substanzen. Durch die Nutzung von Authentizitätsmarkern und der exakten Ermittlung des Speichelanteils, also der Verdünnung, können Manipulationsversuche und Fehler in der Probenentnahme relativ gut nachvollzogen werden. Durch die Art der Probenentnahme ist jene problemlos unter Aufsicht möglich und wird erfahrungsgemäß gut von den Patienten akzeptiert. Die Variabilität der Matrix im pH-Wert ist gering, was eine Abschätzung der Substanzstabilität und damit auch der Nachweisbarkeit vereinfacht.

Allerdings ist die Standardisierung eines Entnahmeverfahrens für den Speichel auf lange Sicht notwendig, wie beispielsweise das Sammelprinzip, eine Validation der Wiederfindung

entsprechender Substanzen, oder die Einigung der Anwendung eines bestimmten Entnahmesystems für eine bestimmte Applikation.

Durch die relativ gute Korrelation zum Blut ist Speichel eine bedingte Alternative. Im Gegensatz zum Urin lässt sich die Blutkonzentration aus der Speichelkonzentration abschätzen und bietet damit die Möglichkeit, eine akute Beeinflussung des Probanden einzuschätzen.

Im Therapeutischen Drug Monitoring bietet der Speichel die Möglichkeit einer Compliance-Überprüfung des Patienten inklusive einer Abschätzung, ob das verordnete Arzneimittel regelmäßig eingenommen wird. Auch in der Überprüfung des metabolischen Phänotyps bei entsprechenden Cytochrom-P450-Enzymen sind weitere Studien über die Nutzung des Speichels denkbar. Abzugrenzen ist in diesem Setting jedoch die DosisEinstellung. Speichel stellt keine Alternative zu Fällen dar, in denen eine Blutspiegelermittlung notwendig ist. In allen Fällen, in denen Urin eine Alternative zu Haaren ist, kann auch der Speichel eine alternative zu Haaren sein, er bietet jedoch nicht die Möglichkeit der wirklich langfristig rückwirkenden Ermittlung eines Substanzkonsums wie die Haare.

6.2 Atemluft als alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik

6.2.1 Die Nachweisbarkeit von Substanzen in der Atemluft

Nachweisbarkeit auf den Atemluftfiltern

Ein Nachweis von psychoaktiven Substanzen in der Ausatemluft mittels des SensAbues® Atemluftentnahmesystem scheint prinzipiell möglich zu sein. Von insgesamt 43 Venlafaxin enthaltenden, gepaarten Proben (Serum, Speichel, Ausatemluft) konnte auf 11 Atemluftfiltern Venlafaxin nachgewiesen werden, jedoch nur auf einem der 11 Filter zusätzlich der aktive Metabolit des Venlafaxins. Lediglich auf einem von 27 möglichen Atemluftfiltern waren tatsächlich Escitalopram und sein Metabolit nachweisbar, und auf einem von 12 möglichen Atemluftfiltern konnte N-Desmethylocitalopram detektiert werden, jedoch ohne die Anwesenheit der Muttersubstanz. Keines der anderen Psychopharmaka war auf den Atemluftfiltern oberhalb der Nachweisgrenze messbar. Verglichen mit anderen Substanzklassen war die Positivrate der Atemluftfilter, trotz zum Teil hoher Speichel- und Blutkonzentrationen einzelner Psychopharmaka, sehr gering.

In einer Studie von Beck et al. (2013) mit 47 Drogenkonsumenten (laut eigener Angabe), in der die Substanzen Amphetamin, Methamphetamin, Morphin, 6-Acetylmorphin, Kokain, Benzoylecgonin, Methadon, Buprenorphin, Diazepam, Oxazepam, Alprazolam und

Tetrahydrocannabinol (THC) eingeschlossen waren, wurden die Ergebnisse der Atemluftanalyse mit zusätzlich entnommenem Serum und Urin bestätigt. Hier konnten für Methadon und Amphetamin Positivraten von 100 % der vorhandenen Proben festgestellt werden, teilweise sogar in Proben, in denen die entsprechende Substanz im Serum nicht nachweisbar war. In insgesamt 87% der Proben konnte mindestens eine der eingeschlossenen Substanzen nachgewiesen werden (Beck et al., 2013). In einer zweiten Studie, in welcher Urin und Atemluftproben von Gefängnisinsassen analysiert wurden, konnten Amphetamin (n = 18; 13 – 81 000 pg/Filter), Methamphetamin (n = 4; 21 – 63 pg/Filter), THC (n = 10; 2 – 173 pg/Filter), Methylphenidat (n = 8; 1 – 556 pg/Filter), Buprenorphin (n = 3; 8 – 42 pg/Filter), 6-Acetylmorphin (n = 1; 11 pg/Filter), Kokain (n = 1; 12 pg/Filter), Benzoylcegonin (n = 1; 3 pg/Filter), Diazepam (n = 1; 29 pg/Filter) und Tramadol (n = 1; 226 pg/Filter) in der Atemluft nachgewiesen werden (Beck, 2014). Insbesondere beim Amphetamin sind die hohen Konzentrationen auf den Atemluftfiltern auffällig. Keine der in der vorliegenden Arbeit betrachteten Psychopharmaka konnte in einer annähernd hohen Konzentration in den Proben nachgewiesen werden. Betrachtete man die positiven Psychopharmakaproben genauer, so ließ sich zumindest für das Venlafaxin feststellen, dass in 9 von 11 Proben auch die Speichelkonzentration der zugehörigen Speichelprobe größer 2 000 ng/ml gemessen wurde und sich damit deutlich im oberen Konzentrationsbereich der Proben befand. Beim Citalopram, bzw. dem Escitalopram und den Metaboliten, ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht feststellen. Vergleichsweise hohe Substanz-Konzentrationen auf den Atemluftfiltern konnten auch in einer weiteren Studie von Kintz et al. (2016) mit 11 – 1470 pg/Filter für Methadon bestätigt werden. In dieser Studie wurden 18 annähernd gleichzeitig gewonnene Urin- und Atemluftproben (SensAbues® System) von Patienten, welche mit Methadon behandelt wurden, auf unterschiedliche Substanzen hin untersucht. Während im Urin eine Vielzahl von Substanzen nachweisbar war (unter anderem auch Venlafaxin und verschiedene andere Psychopharmaka), konnte in der Ausatemluft lediglich Methadon und sein Metabolit EDDP, sowie Nicotin nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in der Arbeit von Kintz et al. (2016), wie auch in einer Arbeit von Beck et al. (2012) von einer möglichen Kontamination der Atemluftfilter durch Speichel gesprochen.

Zusammenhang Speichel- und Atemluftkonzentration

Wie stark der Zusammenhang zwischen Speichel- und Atemluftkonzentration tatsächlich ist, zeigte sich in der für diese Arbeit durchgeführten Studie zur Diphenhydramin-„Kinetik“ mit n = 8 Teilnehmern, in der eine Tablette Diphenhydramin eingenommen und über einen Zeitraum von 56 Stunden Atemluft-, Speichel- und Kapillarovollblutproben entnommen wurden. In den

Ergebnissen zeigte sich deutlich ein Zusammenhang zwischen Speichel- und Atemluftkonzentration, wobei diese Korrelationen aber nicht gut reproduzierbar zu sein schienen. Allerdings ließen sich hier bei Individuum 1 bis 5 sehr ähnliche Konzentrationsverläufe von Atemluft- und Speichelkonzentration, gemessen an der Zeit, beobachten. Darüber hinaus konnte bei jedem der 8 Studienteilnehmern zum Zeitpunkt T₀, also unmittelbar nach der Tabletteneinnahme, Diphenhydramin auf den Ausatemluftfiltern nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren nicht nur sehr interindividuell, sondern darüber hinaus fand sich zu diesem Zeitpunkt bei Individuen 1 bis 5 auch die maximale Atemluftkonzentration an Diphenhydramin. Zum gleichen Zeitpunkt wurde auch die Maximalkonzentration Diphenhydramin im Speichel detektiert, wohingegen im Kapillarvollblut keine Hinweise auf Diphenhydramin zu finden waren. Surfactant soll als Träger für nicht flüchtige Substanzen dienen (Beck et al., 2012), Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Substanz, welche sich im Surfactant befindet, nur über die Blutbahn in die tiefen Bereiche der Lunge, in der die Aerosolentstehung stattfindet, gelangen kann. Dies wäre somit die naheliegendste Erklärung der teils recht hohen Diphenhydramin-Konzentrationen unmittelbar nach der Substanzeinnahme eine Kontamination der Atemluftfilter mit Speichel. Bei allen Teilnehmern dieser Studie zeigte sich im weiteren Verlauf, nach einem Abfall der Konzentration (der genauso im Speichel stattfand), mindestens ein zweites Konzentrationsmaximum in der Atemluft zwischen zwei und acht Stunden.

Bestätigen ließ sich die Beobachtungen der ersten Studie durch eine zweite Studie mit Dextromethorphan als Modellsubstanz. Hier wurden die Studienteilnehmer in zwei Gruppen aufgeteilt. Während Gruppe A eine Kapsel mit Dextromethorphan erhielt, um die Kontamination des Mund-Rachenraumes mit Speichel möglichst gering zu halten, erhielt Gruppe B Lutschpastillen mit einer vergleichbaren Dextromethorphan-Konzentration. In Gruppe A waren keine, oder nur vereinzelte, Proben positiv auf Dextromethorphan bzw. Dextrophan getestet worden. Eine Ausnahme bildete hier Individuum 3, wobei bei diesem Studienteilnehmer generell sehr viel höhere Speichel- und Blutkonzentrationen nachgewiesen werden konnten. Bei Individuum 2 konnte unmittelbar nach der Einnahme der Kapsel Dextromethorphan und Dextrophan auf dem Atemluftfilter nachgewiesen werden, allerdings konnte die Substanz zum selben Zeitpunkt auch in niedriger Konzentration im Speichel, nicht jedoch im Kapillarvollblut nachgewiesen werden. Möglicherweise handelte es sich hier um eine leichte Kontamination der Mundschleimhaut. In Gruppe B dagegen konnten die C_{\max} -Werte grundsätzlich unmittelbar nach der Medikamenteneinnahme mit Werten zwischen 140 und 4 674 pg/Filter gemessen werden, während Dextrophan nur vereinzelt nachweisbar war. Anhand des Konzentrationskurven-Verlaufs über die Zeit

ließ sich der Zusammenhang zwischen Speichel- und Ausatemluftkonzentration hier sehr gut aufzeigen. Auffällig war der starke Gegensatz der beiden Gruppen. In Gruppe B, in welcher eine Kontamination des Mundraumes induziert wurde, ergab sich ein ähnlicher Konzentrationskurvenverlauf für Ausatemluft und Speichel, vergleichbar dem der Diphenhydramin-Kinetikstudie, wo ebenfalls eine Kontamination des Mundraumes mit Medikamentenresten der Tablette stattfand, da es sich um eine nicht überzogene Tablette handelte. Das Nachweisfenster für Diphenhydramin in der Ausatemluft war mit zwölf bis 36 Stunden verhältnismäßig lang, im Speichel konnte in derselben Studie bis zu 56 Stunden Diphenhydramin nachgewiesen werden. Beim Dextromethorphan richtete sich die Nachweisbarkeit nach der Gruppe, erreichte jedoch in der Gruppe mit Kontamination des Mundraumes vergleichbare Nachweiszeiten wie in der Diphenhydramin-Studie, während in Gruppe A ohne Kontamination nur in sehr wenigen Proben überhaupt Dextromethorphan nachgewiesen werden konnte. Läge der Hauptursprung der Substanzen auf den Atemluftfiltern in den Atemaerosolen, müsste sich ein stärkerer Zusammenhang zwischen dem Konzentrations-Zeit-Verlauf von Diphenhydramin und Dextromethorphan von Atemluft- und Blutkonzentration finden.

Ein ähnlicher Versuch, allerdings mit Tramadol als Modellsubstanz, wurde von Mayer et al. (2015) durchgeführt. Hier wurde eine Kapsel mit Tramadol eingenommen und über einen Zeitraum von 48 Stunden immer wieder Atemluft-, Speichel-, und Blutproben entnommen. Eine Kontamination der Mundschleimhaut schien hier unwahrscheinlich, ließ sich jedoch, da die erste Probe erst 30 Minuten nach der Medikamenteneinnahme erfolgte, nicht feststellen. Der Metabolit des Tramadols, das O-Desmethyltramadol war nur in 38 % aller genommenen Atemluftproben und nicht länger als 24 Stunden nachweisbar, das Tramadol selbst über 48 Stunden, mit Ausnahme eines Probanden. Die Area Under The Curve (AUC) für Tramadol in der Ausatemluft korrelierte bei keinem der Patienten mit der AUC des Speichels oder des Blutes. Obgleich die AUC in der vorliegenden Diphenhydramin-Studie nicht bestimmt worden war, konnte hier zumindest eine Korrelation zwischen Speichel- und Atemluftkonzentration festgestellt werden. Bei zwei Studienteilnehmern mussten die Werte zum Zeitpunkt T0 und T1, unmittelbar nach der Tabletteneinnahme und nach dem Ausspülen des Mundes, eliminiert werden. Dabei handelte es sich um jene Individuen, bei denen die Atemluftproben zum Zeitpunkt T0 nur verhältnismäßig geringe Diphenhydramin-Konzentrationen aufwiesen. Allerdings ließ sich die Ursache dieser Korrelation nicht feststellen, da eine Korrelation zwischen Atemluft- und Speichelkonzentration besteht, die Speichel-Konzentration jedoch auch mit der Blutkonzentration korreliert, und die Abhängigkeitsverhältnisse nicht eindeutig sind. Eine Korrelation

zwischen Atemluft und Speichel ließ sich in Gruppe B der Dextromethorphan-Studie bei allen fünf Teilnehmern bestätigen. Wegen der hohen Bereichsspanne müssen diese Werte mit Vorsicht betrachtet werden, sie liefern jedoch zumindest Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Atemluft- und Speichelkonzentration.

Ursprung nicht-flüchtiger Substanzen auf den Atemluftfiltern

Unterstützt wird die These, dass nicht-flüchtige Substanzen auf den Atemluftfiltern ihren Ursprung nicht allein aus dem Surfactant haben, von einer Arbeit von Himes et al. (2013), in welcher Zigaretten mit einer definierten Menge Tetrahydrocannabinol geraucht, und anschließend Atemluftproben mit dem SensAbues® Atemluftsammlersystem genommen wurden. Eine Probennahme unmittelbar nach dem Cannabiskonsum fand nicht statt, sondern frühestens nach 30 Minuten. Das Nachweisfenster für THC war auch hier eher gering und betrug, mit Ausnahme eines Patienten, 30 Minuten bis zwei Stunden, bei chronischen Cannabiskonsumern. Bei Gelegenheitskonsumenten war sogar nur maximal eine Stunde nach dem Konsum THC nachweisbar. Obgleich der Rauch natürlich auch die tiefen Ebenen der Lunge erreicht, spricht das kurze Nachweisfenster doch eher für ein Kontaminationsartefakt. Über einen Zusammenhang zur Speichelkonzentration werden in dieser Arbeit leider keine Angaben gemacht. In einer Studie von Ellefsen et al. (2014), in der Kokain intravenös gegeben und im Anschluss regelmäßig Atemluftproben abgenommen wurden (10 Minuten bis 22 Stunden), konnte nur auf 2,6 % der Atemluftfilter innerhalb der ersten 9,5 Stunden Kokain nachgewiesen werden. Die Kokainmetaboliten Benzoyllecgonin und Ecgoninmethylester konnten lediglich auf zwei Filtern (0,76 %) nachgewiesen werden. Ausgehend von der Vermutung, dass nicht nur Lungenaerosol, sondern auch Speichel für die Positivrate auf den Filtern verantwortlich ist, wurde das Entnahmesystem bzw. der Filterhalter zusätzlich zum Filter selbst analysiert, was zu einigen zusätzlichen positiven Resultaten führte. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Analysetechnik, die Beck et al. (2013) in ihrer oben aufgeführten Arbeit nutzten, und bei der die Filter nicht aus den Filterblomben entfernt werden, sondern im Ganzen auf eine Glasröhre gestellt und mit einer methanolischen Lösung extrahiert wurden, auch Speichelkontamination miterfassten. Bei Ellefsen et al. (2014) wird davon ausgegangen, dass die Filter selbst die Lungenpartikelfraktion repräsentieren. Da bei sämtlichen Analysen in der vorliegenden Arbeit die Filter aus den Filterblomben entnommen wurden, konnte zu diesem Schluss allerdings keine Aussage getroffen werden, da die Filterblomben nicht untersucht wurden. Allerdings passen die Ergebnisse von Ellefsen et al. (2014) eher zu der hier vorliegenden Studie mit Psychopharmaka, bei der die Positivrate verhältnismäßig gering war. Gaber et al. (2006) kamen in ihrer Studie zum

Nachweis von Leukotrien B4 im Atemluftkondensat ebenfalls zu dem Schluss, dass das nachgewiesene Leukotrien B4 seinen Hauptursprung in der Speichelkontamination hatte.

Ein weiterer analytischer Faktor in diesem Zusammenhang stellt jedoch auch eine mögliche Ionensuppression durch Bestandteile des Filters des entsprechenden Entnahmesystems dar.

Prinzipiell scheinen nicht Flüchtige Substanzen auf den Atemluftfiltern detektierbar zu sein, allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden wie hoch der Anteil der aus dem Surfactant stammenden Substanzen ist und wie hoch der Anteil, der aus dem Speichel stammenden Substanzen. Weitere Studien und Vergleiche unterschiedlicher Atemluftsysteme können in der Zukunft vielleicht Aufschluss darüber geben.

6.2.2 Theoretische Surfactantmenge auf dem Atemluftfilter

Ein weiterer Punkt, den es genauer zu betrachten galt, stellte zum einen die Höhe der gefundenen Substanzkonzentration auf den Atemluftfiltern und die damit verbundene Menge an Surfactant auf den Atemluftfiltern dar. Bei dem verwendeten Atemluftsammlersystem wurden auch in den oben aufgeführten Studien immer die Konzentration pg/Filter angegeben. Dies ergab sich aus der Tatsache, dass sich die genaue Menge an Atemluft, welche durch das System geleitet wird, nicht ermitteln lässt. Laut den Angaben des Herstellers handelt es sich um ungefähr 20 l Atemluft.

Es gibt verschiedene Arbeiten, welche sich mit der Partikelkonzentration in der Ausatemluft beschäftigen. Almstrand et al. (2009) beschäftigten sich hierbei unter anderem mit der Anzahl der entstehenden Partikel (Größenspektrum zwischen 0,3 und 2 μm im Durchmesser). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Atemmechanik auf die Partikelanzahl deutlich aufgezeigt. Tiefes Ausatmen und Einatmen erzeugte hierbei deutlich höhere Partikelzahlen (durchschnittlich 8 500 Partikel pro l Luft zwischen 0,3 und 2 μm Durchmesser) als eine Normalatmung (durchschnittlich 230 Partikel pro l Luft zwischen 0,3 und 2 μm Durchmesser). Damit scheint die Substanzkonzentration über die Partikelzahlen auf den Atemluftfiltern allein durch die Atemmechanik manipulierbar zu sein. Aus der dort aufgeschlüsselten Verteilung der Partikelzahlen auf den Durchmesser der Partikel, ergab sich zum einen, dass nahezu 100 % der Partikel in der dort betrachteten Größenverteilung einen Durchmesser unter 1 μm aufwiesen. Aus der statistischen Aufschlüsselung ließ sich über das theoretische Volumen der Partikel eine ungefähre Menge Surfactant errechnen, die auf dem Atemluftfilter verbleiben müsste. Nutzt man

den mittleren Durchmesser der Größenklasse und den Mittelwert der Partikelzahlen, so ergäbe sich aus den Partikeln, die sich bei einer Atmung, welche die gesamte Vitalkapazität ausnutzt, ein Gesamtvolumen von $12\,657\ \mu\text{m}^3$, was einem Volumen von $12,7\ \text{pl}/20\ \text{l}$ Luft entspricht. Bei normaler Atmung beträgt das Volumen sogar nur $2,7\ \text{pl}/20\ \text{l}$ Ausatemluft. Aus der Berechnung der theoretischen Speichelmenge auf den Atemluftfiltern zum Zeitpunkt T0 ergaben sich beim Diphenhydramin Volumina von $1\ \text{pl}/\text{Filter}$ bis $1\,525\ \text{pl}/\text{Filter}$. Bei Gruppe B der Dextromethorphan-Studie ergaben sich aus demselben Verfahren Mengen von $5 - 649\ \text{pl}$ Speichel pro Filter.

Um die Menge Dextromethorphan zu ermitteln, die tatsächlich aus dem Surfactant stammt, wurde eine orale Kontamination mit Diphenhydramin hervorgerufen, die theoretische Speichelmenge auf dem Filter berechnet, und mit der theoretischen Speichelmenge auf dem Filter verglichen, welche sich aus der Dextromethorphan-Konzentration ergäbe.

Dabei ergaben sich Volumina von 909 bis $25\,630\ \text{pl}$ Speichel auf den Filtern, ausgehend vom Diphenhydramin, während über das Dextromethorphan lediglich 7 bis $153\ \text{pl}$ ermittelt werden konnten. Eine Bestimmung über das Dextromethorphan war mangels positiver Proben nicht möglich. Bei Gruppe A waren die theoretischen Speichelvolumina, ausgehend vom Diphenhydramin, wesentlich geringer. Die große Differenz zwischen den theoretischen Speichelmengen auf den Atemluftfiltern, ermittelt aus den Dextromethorphan-Konzentrationen und den Diphenhydramin-Konzentrationen, zeigte keine Reproduzierbarkeit, allerdings lagen einige Diphenhydramin-Konzentrationen auf den Atemluftfiltern oberhalb des kalibrierten Bereichs ($5\,000\ \text{pg}/\text{Filter}$). Eine Verdünnung in den Kalibrationsbereich war nicht möglich, was bedeutet, dass diese Werte nur eine bedingte Aussagekraft besaßen und damit auch die theoretischen Speichelkonzentrationen, welche aus diesen Werten ermittelt wurden nur ungefähre Orientierungspunkte liefern konnten, jedoch keine exakten Konzentrationen. Darüber hinaus konnten keine aussagekräftigen Hinweise auf die Natur einer solchen Kontamination in der Mundhöhle gefunden werden. Die Verteilung der Substanz im Speichel und im Mundraum spielte wahrscheinlich eine Rolle, ebenso wie eine mögliche Partikelformation im Mund-Rachenraum. Ebenso wie Almstrand et al. (2009) und Papineni et al. (1997), berichten auch Wan et al., (2014), dass der weitaus größte Anteil der Partikelgröße im Lungenaerosol im Submikron-Bereich liegt. Insbesondere in der Arbeit von Wan et al. (2014) ließ sich dies gut herausstellen, da hier die Partikelgrößen und Zahlen von beatmeten Patienten gemessen wurden. Darüber hinaus gelangen Partikel mit einem Durchmesser von über $10\ \mu\text{m}$ nicht mehr in die tiefen Lungenregionen (Yeh et al., 1976) und werden, so sie in den tiefen Lungenregionen geformt werden, im

Umkehrschluss nicht aus der Lunge ausgeatmet werden können, sondern sich auf ihrem Weg an den Wänden der Atemwege absetzen.

Zu ähnlichen Schlüssen kamen Asgharian et al. (2001), während Tena und Clarà in ihrem Review von 2012 sogar noch einen Schritt weitergehen und postulieren, dass Partikel zwischen 0,5 und 5 μm Durchmesser am optimalsten in die tiefen Lungenregionen vordringen.

Larsson et al. (2012) und Bredberg et al. (2012) berichteten beide über das Vorhandensein von Lungenproteinen in der Ausatemluft. Bredberg et al. (2012) führte eine genauere Analyse des Atemluftkondensates durch, führte die α -Amylase, welche ein guter Marker für eine Speichelkontamination wäre, jedoch nicht mit auf. Allerdings sind keine Informationen darüber vorhanden, ob eine theoretische Bestimmung möglich wäre, zusätzlich wurden die Atemluftproben auf andere Art und Weise gewonnen. Si et al. (2013) arbeiteten mit Modellen des Laryngopharynx bezüglich des Luftstroms und des Verhaltens ausgeatmeter Partikel. Interessanterweise berichteten sie nicht nur von starken, turbulenten Strömungen in Mundrachenraum, sondern auch von der Möglichkeit einer starken Abscheidung ausgeatmeter Partikel in diesem Bereich. Rahimi-Gorji et al. (2016) berichten ebenfalls von Turbulenzen zwischen Larynx und Pharynx. Bei diesen turbulenten Luftströmen entstehende Partikel könnten bei der Inspiration theoretisch in die tieferen Atemwege geraten und damit auch einen Substanzeintrag in die Lunge hervorrufen, selbst wenn keine direkten Speichelreste auf den Atemluftfiltern nachgewiesen werden können (Gaber et al., 2006).

Vor diesem Hintergrund kann es durchaus fraglich sein, wie hoch der Anteil des echten unkontaminierten Surfactants auf den Atemluftfiltern wirklich war. Im Patent des Herstellers wird von einer Maschenweite des Filters gesprochen, die Partikel zwischen 0,2 und 0,7 μm auffangen kann, allerdings sind hier keine genauen Testdaten vermerkt (Palmskog, Beck, 2012). Gemessen an der Tatsache, dass ein guter Anteil der Surfactant-Tröpfchen eine Größe unterhalb von 1 μm im Durchmesser hat (Almstrand et al., 2010) ist fraglich ob der Filter Teilchen aus den tiefen Lungenregionen aufhalten kann.

6.2.3 Schlussfolgerung

Die Ausatemluft mit dem SensAbues® System erwies sich nicht als sinnvolle Alternative zu den bisherigen Matrices. Trotz Steady State und konstanter Blutkonzentration, waren kaum Psychopharmaka in der Ausatemluft nachweisbar. Darüber hinaus war eine Quantifizierung der Werte nicht sinnvoll. Die Zuverlässigkeit der Matrix scheint, ebenso wie das Nachweisfenster, geringer im Vergleich zum Speichel oder sogar zum Blut. Darüber hinaus ist ein extrem

empfindliches Messsystem notwendig. Durch die Notwendigkeit der Verwendung des ganzen Filters ist keine Wiederholung der Probe möglich, ebenso wenig wie die Entnahme einer echten B-Probe.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Drogen- und Medikamentenanalytik gewinnt im Rahmen der Missbrauchsdiagnostik immer mehr an Bedeutung. Herkömmlich genutzte Matrizes wie Urin, Haare oder Blut sind je nach Setting jedoch nachteilsbehaftet. Dies betrifft unter anderem die Probennahme, aber auch die Probenaufbereitung und die Analytik. Daher werden alternative Probenmatrizes, die jene Probleme kompensieren können benötigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Betrachtung von Speichel und Atemluft als alternative Matrizes in der therapeutischen Diagnostik und insbesondere in der Missbrauchsdiagnostik von Neuro- und Psychopharmaka wie Antidepressiva, Neuroleptika sowie Opioiden und Hypnotika. Hierzu wurde ein spezielles Speichelentnahmesystem genutzt (Greiner Bio-One Speichelentnahmesystem), welches theoretisch ein hohes Maß an Standardisierbarkeit in der Speichelsammlung bietet und durch die individuelle Bestimmung des Speichelanteils eine gute Reproduzierbarkeit bei der Konzentrationsbestimmung enthaltener Substanzen aufweist. Die Standardisierbarkeit wurde anhand verschiedener Studien überprüft. So wurden anhand von etwa 10.000 Proben aus der täglichen Laborroutine Referenzbereiche für den Speichelanteil in der Probe und die Amylase- und Cortisolkonzentration welche als Authentizitätsmarker im Speichel dienen ermittelt. Weiterhin wurde der durch den Hersteller versprochene saure pH-Wert in der Probe anhand von 500 Proben überprüft und bestätigt, so dass in diesem Zusammenhang zusätzliche Empfehlungen zur Probennahme gegeben werden können, um die Vergleichbarkeit von A- und B-Probe und die Stabilität enthaltener Substanzen zu verbessern. Darüber hinaus wurde die Reproduzierbarkeit bei wiederholter Probennahme und die Vergleichbarkeit der gemessenen Substanzkonzentrationen mit einem anderen etablierten Speichelentnahmesystem eines anderen Entnahmepinzips in einer Studie mit Diphenhydramin als Modellschubstanz verglichen und bestätigt.

Die Nutzbarkeit von Speichel im Verhältnis zum Serum im klinischen Setting wurde in zwei Studien mit gepaarten Proben aus Serum und Speichel aus Psychiatrischen Kliniken untersucht. Hierbei wurden zunächst die Konzentrationen der Psychopharmaka Aripiprazol, Citalopram, Escitalopram (keine racemische Trennung bei der Messung möglich), Duloxetin, Mirtazapin, Pipamperon, Pregabalin, Promethazin, Quetiapin und Venlafaxin in der ersten Studie, sowie der Opioid-Analgetika Hydromorphon und Tramadol in der zweiten Studie ermittelt. Aus diesen Werten wurde das Konzentrationsverhältnis aus Serum und Speichel errechnet (OF/SE-Ratio) mit dem Ziel, eine Aussage über die Nachweisbarkeit und Nachweisfenster dieser Substanzen im Speichel treffen zu können. Weiterhin wurde untersucht ob sich die therapeutischen Bereiche der Medikamente, die für Serum bzw. Plasma bekannt sind, auch auf den Speichel zu

übertragen lassen um den Patienten damit eine invasive Blutprobenentnahme ersparen zu können. Alle Substanzen in die Studie eingeschlossenen Substanzen ließen sich problemlos im Speichel nachweisen. Die Streuung der Werte des OF/SE-Ratios lag bei Variationskoeffizienten von 44-54 und einem Durchschnitt von 47 % für die Opioid-Analgetika und 18 -70 % und einem Durchschnitt von 45% für die Psychopharmaka. Diese breite Streuung der OF/SE-Ratios lässt es nicht zu, die Spiegelbestimmung der Medikamente aus dem Blut durch Speichelproben beispielsweise zur Dosisfindung im Rahmen eines therapeutischen Drug Monitorings zu ersetzen. Eine Ermittlung der freien Analyt-Konzentration im Serum durch Ultrafiltration für einige der untersuchten Substanzen erbrachte keine Verbesserung der Streuung oder Korrelation im Verhältnis zur Speichelkonzentration. Auch wenn der Speichel nicht als Ersatz für Serum in der Spiegelbestimmung der Psychopharmaka bzw. der beiden Analgetika zum Zweck z.B. einer Dosisfindung eingesetzt werden sollte, ist er eine gute Alternative bei der Compliance-Überprüfung nicht nur in der Psychopharmakotherapie sondern auch in der Schmerztherapie. Die aus den OF/SE-Ratios ermittelten therapeutischen Bereiche dieser Substanzen im Speichel, welche aus den therapeutischen Bereichen des Serums abgeleitet wurden, können hier durchaus als Orientierungshilfe dienen ob eine Therapiecompliance vorliegt. Weiterführende Studien in diesem Bereich könnten diese Orientierungsbereiche verifizieren, seine Limitationen ermitteln, für mehr Medikamente zur Verfügung stellen und damit eine zu diesem Zweck bestimmte Blutentnahme in Zukunft ablösen.

Ein beobachtetes Problem bei diesen Studien war die Kontamination der Speichelproben mit Substanzresten aus einer kürzlich vorangegangenen Medikamenteneinnahme, die sogenannte orale Kontamination. Diese wurde in einer weiteren Studie mit Diphenhydramin als Modellsubstanz untersucht. Ziel war es, den möglichen Einfluss auf die Ergebnisse zu ermitteln und eine Empfehlung zur Vermeidung in der routinierten Probenentnahme zu geben. Notwendig kann dies bei empfindlichen Entscheidungsgrenzen im Speichel in der Drogenanalytik sein. Relevant ist diese Latenzzeit bei empfindlichen Cutoffs, in von Patienten konstruierten Settings (wie etwa dem Küssen einer Person mit einem kürzlich zurückliegenden Konsum), was zu „falsch positiven“ Ergebnissen führen kann, obwohl keine intentionelle Einnahme der Substanz stattfand. Auch hierfür konnten aus dieser Studie konkrete Empfehlungen zur Vermeidung oraler Kontamination durch verschiedenartige Gründe abgeleitet werden.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass Speichel als gute alternative Matrix in der Missbrauchsdiagnostik eignet. Dies gilt sowohl zur Überprüfung der Compliance in der therapeutischen Routine wie z.B. in der Psychopharmakotherapie, als

auch zur Überprüfung eines möglichen Beikonsums von Drogen in der Suchttherapie und anderen Settings.

Zusätzlich zum Speichel wurde auch die Atemluft mit dem SenseAbues System entnommen auf ihre Eignung als Analysematrix untersucht. Die Nachweisbarkeit unterschiedlicher Psychopharmaka in der Ausatemluft wurde in Zusammenhang mit der Psychopharmakastudie zur Ermittlung des OF/SE-Ratios in der Studie überprüft, da gleichzeitig auch Atemluftproben mit dem SenseAbues System entnommen wurden. Allerdings konnte hier nur im Fall des Venlafaxins, in nur etwa einem Viertel der Proben in denen Blut und Speichel dieses Medikament enthielten auch Venlafaxin auf den Atemluftfiltern nachgewiesen werden, und nur in einem Fall der Metabolit des Venlafaxins, das O-Desmethylvenlafaxin. Citalopram und Escitalopram waren nur in jeweils einem Fall nachweisbar, genauso wie ihr Metabolit das Desmethylcitalopram. Andere in die Studie eingeschlossene Substanzen konnten nicht detektiert werden. Daher wurde in einer „Kinetik“-Studie mit Diphenhydramin als Modellsubstanz die Konzentrationsverläufe des Analyten in der Atemluft parallel zu denen des Speichels und Kapillarovollblutes über 48 – 56 Stunden ermittelt. Unmittelbar nach der Einnahme der Substanz konnten sehr hohe Konzentrationen auf den Atemluftfiltern nachgewiesen werden; dies überrascht, weil laut Hersteller keine Speicheltröpfchen auf das Entnahmesystem gelangen sollten und die Resorption in die Blutbahn noch nicht vollzogen sein dürfte. Auch ansonsten war der Konzentrationsverlauf in der Atemluft größtenteils vergleichbar mit dem des Speichels. Ein ähnliches Ergebnis zeigte eine zweite Studie mit Dextromethorphan als Modellsubstanz die nach dem gleichen Prinzip verlief, in der jedoch zusätzlich zwei verschiedene Darreichungsformen (Kapsel und Lutschpastille) verglichen wurden um den Vergleich zwischen oraler Kontamination (Lutschpastille) und fehlender oraler Kontamination (Kapsel) zu beobachten. Darüber hinaus wurde der Metabolit des Dextromethorphans, das Dextrorphan ebenfalls mitgemessen. Bei der Einnahme der Kapsel war kaum ein Nachweis von Dextromethorphan in der Ausatemluft möglich, und auch der Metabolit nur sporadisch nachgewiesen werden konnte. Bei der Einnahme der Lutschpastillen und einer damit absichtlich herbeigeführten oralen Kontamination der Mundhöhle war der Konzentrationsverlauf entsprechend dem des Diphenhydramins in Atemluft und Speichel.

Im Vergleich zum Speichel scheint die Ausatemluft als Alternative wohl lediglich in den Settings mit kurzen Nachweiszeiträumen und hohen Substanzkonzentrationen nutzbar. Denkbar wären hier das Workplace Drug Testing, doch wäre der Speichel ist hier ebenso nutzbar, reproduzierbarer und zuverlässiger, da in ihm möglicherweise auch Substanzen mit geringer

Konzentration erfasst werden können, wie etwa viele neue Designerdrogen. Andere Atemluftentnahmesysteme könnten hier gegebenenfalls bessere Ergebnisse liefern, doch die Ausatemluft ist dem Speichel und anderen alternativen Matrices wie etwa dem Kapillarblut unterlegen, das in einem Teil der Studien als Alternative zum Serum genutzt wurde da dieses Entnahmesystem zur Eigenanwendung zugelassen ist. Das Kapillarovollblut wurde unter anderem in der Dextromethorphan-Studie verwendet an der, wie sich herausstellte auch zwei CYP2D6 Slow-Metabolizer teilnahmen, so dass sich hier sogar beobachten ließ, dass sowohl das Kapillarovollblut als auch der Speichel hilfreiche Matrices bei einer Phänotypisierung der Enzymaktivität darstellen können, was in weiteren Studien untersucht werden sollte.

Literaturverzeichnis

- Aardal, E., Holm, A. C. (1995): Cortisol in saliva – reference values and relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33, 927-932.
- Al Za`Abi, M., Deleu, D., Batchelor, C. (2003): Salivary free concentrations of anti-epileptic drugs: an evaluation in a routine clinical setting. *Acta neurol belg* 103, 19-23.
- Albert, K. S., Hallmark, M. R., Sakmar, E., Weidler, D. J., Wagner, J. G. (1975): Pharmacokinetics of diphenhydramine in man. *J Pharmacokinet Biop* 3, 159-170.
- Allen, K. R. (2011): Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? *Ann Clin Biochem*, 40, 531-54. DOI: 10.1258/acb.2011.011116
- Almstrand, A. C., Ljungström, E., Lausmaa, J., Bake, B., Sjövall, P., Olin, A. C. (2009): Airway monitoring by collection and mass spectrometric analysis of exhaled particles. *Anal Chem* 81, 662-668. DOI: 10.1021/ac802055k
- Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., Gottesmann, M. M. (2003): P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468-7485.
- Ammon, H. P. T. (Hrsg.) (2004): *Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch*. 9. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co.KG, Berlin.
- Aps, J. K., Martens, L. C. (2005): Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 150, 119-31.
- Ardakani, Y. H., Rouini, M.R. (2009): Pharmacokinetic study of tramadol and its three metabolites in plasma, saliva and urine. *DARU* 17, 245 – 255.
- arznei-telegramm (2006): Zum Missbrauchspotenzial von Pregabalin (Lyrica) *arznei-telegramm* 37, 52.
- Asgharian, B., Hofmann, W., Bergmann, R. (2001): Particle deposition in a multiple-path model of the human lung. *Aerosol Sci Technol* 34, 332-339.
- Ballantyne, J. C., Mao, J. (2003): Opioid therapy for chronic pain. *N Engl J Med* 349, 1943-1953.
- Bartnicka, L., Kurzawski, M., Drozdziak, A., Plonska-Gosciniak, E., Górnik, W., Drozdziak, M. (2007): Effect of ABCB1 (MDR1) 3435C >T and 2677G >A,T polymorphisms and P-glycoprotein inhibitors on salivary digoxin secretion in congestive heart failure patients. *Pharmacol Rep* 59, 323-329.
- Baselt, R. C. (2011): *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. 9. Auflage, Biomedical Publications, Seal Beach.
- Beck, O. (2014): Exhaled breath for drugs of abuse testing - evaluation in criminal justice settings. *Sci Justice* 54, 57-60. DOI: 10.1016/j.scijus.2013.09.007

- Beck, O., Stephanson, N., Sandqvist, S., Franck, J. (2012): Detection of drugs of abuse in exhaled breath from users following recovery from intoxication. *J Anal Toxicol* 36, 638-646. DOI: 10.1093/jat/bks079
- Beck, O., Stephanson, N., Sandqvist, S., Franck, J. (2013): Detection of drugs of abuse in exhaled breath using a device for rapid collection: comparison with plasma, urin and self-reporting in 47 drug users. *J Breath Res* 7, 1-11. DOI: 10.1088/1752-7155/7/2/026006
- Böhnke, R., Bigas, D., Vindus, D., Böttcher, M. (2016): Manipulationsmöglichkeiten bei unbeaufsichtigter Abgabe einer Urinprobe, 12. Symposium DGVM u. DGVP, Rostock, 30.09-01.10.16 [Poster].
- Böhnke, R., Bigas, D., Vindus, D., Böttcher, M. (2016): Manipulationsmöglichkeiten bei unbeaufsichtigter Abgabe einer Urinprobe, 12. Symposium DGVM u. DGVP, Rostock, 30.09-01.10.16, Blutalkohol 53, Sup III 18.
- Böttcher, M., Günther, N., Lierheimer, S., Beck, O. (2013): UPLCMS/MS multitarget screening of 55 commonly abused drugs at different Cutoffs in oral fluid from patients in addiction treatment. TIAFT, Madeira [Poster].
- Böttcher, M., Peschel, A. (2011): Oral fluid levels of nicotine and metabolites in smokers as a function of collection device. *Ther Drug Monit* 33, 488 [Abstract für Poster].
- Böttcher, M., Preidel, A., Beck, O. (2010): "Peri-analytics" reference ranges for drug screening in oral fluid using the Greiner-Bio-One collection device. TIAFT, Bonn [Poster]
- Brand, S. D., King, L. A., Evans-Brown, M. (2014): The new drug phenomenon. *Drug Test Anal* 6, 587-597. DOI: 10.1002/dta.1686.
- Bredberg, A., Gobom, J., Almstrand, A. C., Larsson, P., Blennow, K., Olin, A.C., Mirgorodskaya, E. (2012): Exhaled endogenous particles contain lung proteins. *Clin Chem* 58, 431-40. DOI: 10.1373/clinchem.2011.169235.
- BtMG (1994): Betäubungsmittelgesetz vom 28.07.1981 (RGBl. I S. 358) mit allen späteren Änderungen, einschließlich der Änderung durch Artikel 1 der Verordnung vom 02. 07. 2018, in: BGBl I S. 1078. http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/btmg_1981/gesamt.pdf Stand: 27.03.2019, 16:51 Uhr.
- BtMVV (1998): Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung vom 20.01.1998 (BGBl. I S. 74,80) mit allen späteren Änderungen, einschließlich der Änderung durch Artikel 2 der Verordnung vom 02.07.2018, in: BGBl. I S. 1078. https://www.gesetze-im-internet.de/btmvv_1998/BtMVV.pdf . Stand: 27.03.2019, 16:52 Uhr.
- Burton, M. E., Shaw, L. M., Schentag, J. J., Evans, W. E. (2006): Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics. Principles of therapeutic drug monitoring. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore/Philadelphia.
- Caplan, Y. H., Goldberger, B. A. (2001): Alternative specimens for workplace drug testing. *J Anal Toxicol* 25, 396-399.
- Casolin, A. (2016): Comparison of urine and oral fluid for workplace drug testing. *J Anal Toxicol* 40, 479-485. DOI: 10.1093/jat/bkw055.

- Ciba-Geigy AG (Hrsg.) (1977): *Wissenschaftliche Tabellen Geigy*. 8. Auflage, Ciba-Geigy Limited, Basel.
- Concheiro, M., Jones, H. E., Johnson, R. E., Choo, R., Huestis, M. A. (2011): Preliminary buprenorphine sublingual tablet pharmacokinetic data in plasma, oral fluid, and sweat during treatment of opioid-dependent pregnant women. *Ther Drug Monit* 33, 619-26. DOI: 10.1097/FTD.0b013e318228bb2a.
- Cone, E. J., Huestis, M. A. (2007): Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1098, 51-103.
- Cone, E. J., Menchen, S. L. (1988): Stability of cocaine in saliva. *Clin Chem* 34,1508.
- Conermann, T., Gosalia, A. R., Kabazie, A. J., Moore, C., Miller, K., Fetsch, M., Irvan, D. (2014): Utility of oral fluid in compliance monitoring of opioid medications. *Pain Physician* 17, 63-70.
- Coombes, E. J., Gamben, T.R., Batstone, G. F., Leigh, P. N. (1984): A phenytoin assay using dried blood spot samples suitable for domiciliary therapeutic drug monitoring. *Ann Clin Biochem* 21, 519-522. DOI: <https://doi.org/10.1177/000456328402100615>.
- Cooper, G. A. A., Kronstrand, R., Kintz, P. (2012): Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* 218, 20-24. DOI:10.1016/j.forsciint.2011.10.024.
- Coucke, L. D., De Smet, L., Verstraete, A. G. (2016): Influence of sampling procedure on codeine concentrations in oral fluid. *J Anal Toxicol* 40, 148–152. DOI: 10.1093/jat/bkv123.
- DAIG (2012): *Therapeutisches Drug Monitoring der HIV Therapie – Anhang zu den Therapieleitlinien Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, Version 04_2012.2 vom 22.02.2012.*
- Dawes, C. (1972): Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 220, 529-545.
- Dawes, C., Kendall, M. J., John, V. A. (1978): Comparison of plasma and saliva levels of metoprolol and oxprenolol. *Br J Clin Pharmacol* 5, 217-221.
- Dawes, C., Ong, B. Y. (1973): Circadian rhythms in the concentrations of protein and the main electrolytes in human unstimulated parotid saliva. *Arch Oral Biol* 18, 1233-1242.
- De Conno, F., Groff, L., Brunelli, C., Zecca, E., Ventafridda, V., Ripamonti, C. (1996): Clinical experience with oral methadone administration in the treatment of pain in 196 advanced cancer patients. *J Clin Oncol* 14, 2836-2842.
- Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) e. V. (2014): *Medikamente Basisinformationen*. 2. Auflage, Rasch Verlag, Bramsche.
- Dilling, H., Mombour, W., Schmidt, M. H. (2000): *Internationale Klassifikation psychischer Störungen, ICD-10*. 4 Auflage, Huber Verlag, Bern.

- Drummer, O. H., Wong, S. H. Y. (2013): Pharmacokinetics and metabolism. in: Negrusz, A., Cooper, G. (Hrsg.): Clarke's analytical forensic toxicology, 2. Auflage, Pharmaceutical Press, Cornwall: 11-38.
- Ellefsen, K. N., Concheiro, M., Beck, O., Gorelick, D. A., Pirard, S., Huestis, M. A. (2014): Quantification of cocaine and metabolites in exhaled breath by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry following controlled administration of intravenous cocaine. *Anal Bioanal Chem* 406, 6213-6223. DOI: 10.1007/s00216-014-8051-x.
- Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (2016b): Europäischer Drogenbericht 2016: Trends und Entwicklungen. Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Union, Luxemburg.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2009): Thematic paper - understanding the 'Spice' phenomenon. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2015): New psychoactive substances in Europe - an update from the EU Early Warning System (March 2015). Publications office of the European Union, Luxembourg.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2016a): Hospital emergency presentations and acute drug toxicity in Europe: update from the Euro-DEN Plus research group and the EMCDDA. Publications office of the European Union, Luxembourg.
- FeV (2010): Fahrerlaubnis-Verordnung vom 13. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1980), mit allen späteren Änderungen, einschließlich der Änderung durch Artikel 2 der Verordnung vom 11.03.2019, in: BGBl. I S. 218. https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/fev_2010/gesamt.pdf, Stand: 27.03.2019, 21:16 Uhr.
- Gaber, F., Acevedo, F., Delin, I., Sundblad, B-M., Palmberg, L., Larsson, K., Mumlin, M., Dahlén, S-E. (2006): Saliva is one likely source of leukotriene B₄ in exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 28, 1229-1235.
- Gahr, M., Freudenmann, W., Hiemke, C., Kölle, M. A., Schönfeldt-Lecuona, C. (2012): Pregabalin abuse and dependence in Germany: results from a database query. *Eur J Clin Pharmacol* 69, 1335-42. DOI: 10.1007/s00228-012-1464-6.
- Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) (2009): Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. *Toxichem Krimtech* 76, 142-176. https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh_Richtlinie_For-Tox_Version%201.pdf, Stand: 27.03.2019 21:20 Uhr.
- Ghareeb, M., Akhlaghi, F. (2015): Alternative matrices for therapeutic drug monitoring of immunosuppressive agents using LC-MS/MS. *Bioanalysis* 7, 1037-5108. DOI: 10.4155/bio.15.35.
- Gröschl, M. (2008): Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem* 54, 1759-1769.
- Haeckel, R. (1988): Interpretation of salivary drug concentration. *J Clin Chem Clin Biochem* 27, 223-226.

- Haeckel, R., Hänecke, P. (1996): Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34, 171-191.
- Hand, C., Baldwin, D. (2013): Immunoassays, in: Negrusz, A., Cooper, G. (Hrsg.): *Clarke's analytical forensic toxicology*, 2. Auflage, Pharmaceutical Press, Cornwall: 409-424.
- Heltsley, R., Depriest, A., Black, D. L., Crouch, D. J., Robert, T., Marshall, L., Meadors, V. M., Caplan, Y. H., Cone, E. J. (2012): Oral fluid drug testing of chronic pain patients. II. Comparison of paired oral fluid and urine specimens. *J Anal Toxicol* 36, 75-80. DOI: 10.1093/jat/bkr019.
- Heltsley, R., DePriest, A., Black, D. L., Robert, T., Marshall, L., Meadors, V. M., Caplan, Y. H., Cone, E. J. (2011): Oral fluid drug testing of chronic pain patients. I. Proximate prevalence rates of licit and illicit drugs. *J Anal Toxicol* 35, 529-539.
- Herdegen, T., Böhm, R., Cimin-Brede, N., Culman, J., Gohlke, P., Ley, L., Luippold, G., Ufer, M., Wätzig, V. (2008) *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Calbe: S. 277, S. 329
- Hiemke, C., Baumann, P., Bergemann, N., Conca, A., Dietmaier, O., Egberts, K., Fric, M., Gerlach, M., Greiner, C., Gründer, G., Haen, E., Havemann-Reinecke, U., Jaquenoud Sirot, E., Kirchherr, H., Laux, G., Lutz, U. C., Messer, T., Müller, M. J., Pfuhlmann, B., Rambeck, B., Riederer, P., Schoppek, B., Stingl, J., Uhr, M., Ulrich, S., Waschgler, R., Zernig, G. (2011): AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 44; 195-235.
- Himes, S. K., Scheidweiler, K. B., Beck, O., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Huestis, M. A. (2013): Cannabinoids in exhaled breath following controlled administration of smoked cannabis. *Clin Chem* 59, 1780-1789. DOI: 10.1373/clinchem.2013.207407.
- Höld, K. M., de Boer, D., Zuidema, J., Maes, R. A. A. (1999): Saliva as an analytical tool in toxicology. *Int J Drug Test* 1, 1-36.
- Holmberg, K. V., Hoffman, M. P. (2014): Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. In: Lightenberg, A. J. M., Meerman, E. C. I. (Hrsg.): *Saliva: secretion and functions*. Karger Publishers, Basel. DOI: 10.1159/000358776.
- Holsinger, F. C., Bui, D. T. (2007): Anatomy, function, and evaluation of salivary glands In: Myers, E. N., Ferris, R. L. (Hrsg.): *Salivary gland disorders*. Springer, New York: 1-16.
- Howard, M. L., Hill, J. J., Galuppi, G. R., McLean, M. A. (2010): Plasma protein binding in drug discovery and development. *Comb Chem High Throughput Screen* 13, 170-87.
- Hu, O. Y., Tang, H. S., Lane, H. Y., Chang, W. H., Hu, T. M. (1998): Novel single-point plasma or saliva dextromethorphan method for determining CYP2D6 activity. *J Pharmacol Exp Ther* 285, 955-960.
- Johnson, B. F., Shekar, V., Woodman, T., Canada, A. T. (1986): Salivary concentration of pirfenolol as a possible cause of unpleasant taste. *Br J Pharmacol* 22, 613-615.

- Joseph, R. E., Su, T.-S., Cone, E. (1996): In vitro binding studies of drugs to hair: Influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and africoid hair. *J Anal Toxicol* 20, 398-344.
- Kaufman, E., Lamster, I. B. (2002): The diagnostic applications of saliva - a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 197-212.
- Kerekes, I., Yegles, M., Grimm, U., Wennig, R. (2009): Assessment and detection - Ethyl glucuronide determination: Head hair versus non-head hair. *Alcohol & Alcoholism* 44, 62-66.
- Kidwell, D. A., Holland, J. C., Athanaselis, S. (1998): Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 713, 111-135.
- Kintz, P. (1996): Drug testing in addicts: a comparison between urine, sweat, and hair. *Ther Drug Monit* 18, 450-455.
- Kintz, P., Mathiaux, F., Villéger, P., Gaulier, J. M. (2016): Testing for drugs in exhaled breath collected with ExaBreath in a drug dependence population: Comparison with data obtained in urine after liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analyses. *Ther Drug Monit* 38, 135-9. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000228.
- Kintz, P., Spiehler, V., Negrusz, A., Cooper, G. A. A. (2013): Alternative specimens. in: Negrusz, A., Cooper, G. (Hrsg.): *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. 2. Auflage, Pharmaceutical Press, Cornwall: 153-187.
- Kirschbaum, K. M., Müller, M. J., Malevani, J., Mobascher, A., Burchardt, C., Piel, M., Hiemke, C. (2008): Serum levels of aripiprazole and dehydroaripiprazole, clinical response and side effects. *World J Biol Psychiatry* 9, 212-218.
- Kiszka, M., Buszewicz, G., Madro, R. (2000): Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine. *Problems of Forensic Science* 46,7-23.
- Langel, K., Gjerde, H., Favretto, D., Lillsunde, P., Øiestad, E. L., Ferrara, S. D., Verstraete, A. (2014): Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test Analysis* 6, 461-471.
- Larsson, P., Mirgorodskaya, E., Samuelsson, L., Bake, B., Almstrand, A. C., Bredberg, A., Olin, A. C. (2012): Surfactant protein A and albumin in particles in exhaled air. *Respir Med* 106, 197-204. DOI: 10.1016/j.rmed.2011.10.008. Epub 2011 Nov 18.
- Lester, B.M., El Sohly, M., Wright, L.L., Smeriglio, V.L., Verter, J., Bauer, C.R., Shankaran, S., Bada, H.S., Walls, H.H., Huestis, M.A., Finnegan, L.P., Maza, P.L. (2001): The maternal lifestyle study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 107, 309-317.
- Linardi, L. R., Natalini, C. C (2006) Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Ciencia Rural* 36:336-341 106, 197-204.

- MacKichan, J. J., Duffner, P. K., Cohen, M. E. (1981): Salivary concentrations and plasma protein binding of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* 12, 31-37.
- Maldonado, C., Fagiolino, P., Vázquez, M., Rey, A., Olano, I., Eiraldi, R., Scavone, C. (2008): Therapeutic carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VPA) monitoring in children using saliva as a biologic fluid. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 14, 55-58.
- Manap, R. A., Wright, C. E., Gregory, A., Rostami-Hodegan, A., Meller, S. T., Kelm, G. R., Lennard, M. S., Tucker, G. T., Morice, A. H. (1999): The antitussive effect of dextromethorphan in relation to CYP2D6 activity. *Br J Clin Pharmacol* 48, 382-387.
- Marchei, E., Farrè, M., Pellegrini, M., García-Algar, O., Vall, O., Pacifici, R., Pichini, S. (2010): Pharmacokinetics of methylphenidate in oral fluid and sweat of a pediatric subject. *Forensic Sci Int* 196, 59-63. DOI: 10.1016/j.forsciint.2009.12.038.
- Meyer, M. R., Rosenborg, S., Stenberg, M., Beck, O. (2015): First report on the pharmacokinetics of tramadol and O-desmethyltramadol in exhaled breath compared to plasma and oral fluid after a single oral dose. *Biochem Pharmacol* 98, 502-510. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.09.008.
- Musshoff, F. (2007): Beurteilungskriterien zur Fahreignungsdiagnostik aus toxikologischer Sicht. Tagungsband zum XV GTFCh-Symposium: 34-43. <https://www.gtfch.org/cms/images/stories/media/tb/tb2007/s034-043.pdf> Stand: 28.03.2019 07:23 Uhr.
- Musshoff, F., Madea, B. (2006): Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit* 28, 155-163.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008): *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: Kapitel 1: 5-61, Kapitel 5: 106-112, Kapitel 6: 114-117.
- Nazirizadeh, Y., Vogel, F., Bader, W., Haen, E., Pfuhlmann, B., Gründer, G., Paulzen, M., Schwarz, M., Zernig, G., Hiemke, C. (2010): Serum concentrations of paliperidone versus risperidone and clinical effects. *Eur J Clin Pharmacol* 66, 797-803. DOI 10.1007/s00228-010-0812-7.
- Neumann, J., Beck, O., Dahmen, N., Böttcher, M. (2018): Potential of oral fluid as a clinical specimen for compliance monitoring of psychopharmacotherapy. *Ther Drug Monit* 40, 245-251.
- NpSG (2016): Neue-Psychoaktive-Stoffe-Gesetz vom 21. 11 (BGBl I S. 2615) mit allen Änderungen, einschließlich der Änderung durch Artikel 6 Absatz 8 des Gesetzes vom 13.04.2017, in: BGBl I S. 872. www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/npsg/gesamt.pdf; Stand: 28.03.2019, 07:29 Uhr.
- Palmkog, G., Beck, O. (inventors), SENSEA BUES AB (assignee): System and method for drug detection in exhaled breath. United States Patent US 2012/0302907, 9. September, 2010.
- Papineni, R. S., Rosenthal, F. S. (1997): The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J Aerosol Med* 10, 105-116.

- Patteet, L., Maudens, K. E., Morrens, M., Sabbe, B., Dom, G., Neels, H. (2016): Determination of common antipsychotics in Quantisal-collected oral fluid by UHPLC-MS/MS: method validation and applicability for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 38, 87-97. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000242.
- Pianta, A., Liniger, B., Baumgartner, M. R. (2013): Ethyl glucuronide in scalp and non-head hair: an intra-individual comparison. *Alcohol Alcohol* 48, 295-302.
- Policola, C., Stokes, V., Karavitaki, N., Grossman, A. (2014): Adrenal insufficiency in acute oral opiate therapy. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2014:130071. DOI: 10.1530/EDM-13-0071.
- Pragst, F., Sachs, H. (2007): Die Haarprobe als Untersuchungsmatrix zur toxikologischen Fahr-eignungsdiagnostik. Tagungsband zum XV. GTFCh-Symposium: 84–99.
- Raggam, R. B., Santner, B. I., Kollroser, M., Gössler, W., Schmied, B., Schmitt, U., Stelzl, E., Lackner, A., Wagner, J., Marth, E., Kessler, H. H. (2008): Evaluation of a novel standardized system for collection and quantification of oral fluid. *Clin Chem Lab Med* 46, 287-291.
- Rahimi-Gorji, M., Gorji, T. B., Gorji-Bandpy, M. (2016): Details of regional particle deposition and airflow structures in a realistic model of human tracheobronchial airways: two-phase flow simulation. *Comput Biol Med* 74, 1-17. DOI: 10.1016/j.combiomed.2016.04.017.
- Rao, G. S. (1983): Drug metabolism in oral soft tissues. *Pharm Int* 5, 103-108.
- Rodrigues, W. C., Wang, G., Morre, C., Agrawal, A., Vincent, M. J., Soares, J. R. (2008): Development and validation of ELISA and GC-MS procedures for the quantification of dextromethorphan and its main metabolite dextrorphan in urine and oral fluid. *J Anal Toxicol* 32, 220-226.
- Ropero-Miller, J.D., Goldberger, B.A., Cone, E.J., Joseph, R.E. Jr. (2000): The disposition of cocaine and opiate analytes in hair and fingernails of humans following cocaine and codeine administration. *J Anal Toxicol* 24, 496-508.
- Samyn, N., Verstraete, A., van Haeren, C., Kintz, P. (1999): Analysis of drugs of abuse in saliva. *Forensic Sci Rev* 11, 1-19.
- Samyn, N., van Haeren, C. (2000): On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *Int J Legal Med* 113, 150-154.
- Scholer, A. (2004): The effect of urine manipulation on substance abuse testing. *Toxicchem Krimtech* 71, 127-137.
- Scully, C. (2003): Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis* 9, 165-176.
- Shams, M. E. E., Arneth, B., Hiemke, C., Dragicevic, A., Müller, M. J., Kaiser, R., Lackner, K., Härtter, S. (2006): CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 31, 493 – 502.

- Sharp, M. E., Wallace, S. M., Hindmarsh, K. W., Peel, H. W. (1983): Monitoring saliva concentrations of methaqualone, codeine, secobarbital, diphenhydramine and diazepam after single oral doses. *J Anal Toxicol* 7, 11-14.
- Shipkova, M., Armstrong, V. W., Wieland, E., Niedmann, P. D., Schütz, E., Brenner-Weiß, G., Voihsel, M., Braun, F., Oellerich, M. (1999): Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 126, 1075 – 1082.
- Shirtcliff, E. A., Granger, D. A., Schwartz, E., Curran, M. J. (2001): Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 26, 165-173.
- Si, X., Xi, J., Kim, J. (2013): Effect of laryngopharyngeal anatomy on expiratory airflow and submicrometer particle deposition in human extrathoracic airways. *OJFD* 3, 286-301. DOI: 10.4236/ojfd.2013.34036.
- Silbernagl, S. (2014): Die Funktion der Nieren. In: Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S. (Hrsg.): *Physiologie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart: 387.
- Singh, A. B., Bousman, C. A., Ng, C. H., Byron, K., Berk, M. (2012): ABCB1 Polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression. *Transl Psychiatry* 2, e198. DOI: 10.1038/tp.2012.115
- Smith, P. M. (2012): Mechanisms of salivary secretion. In: Egar, M., O'Mullane, D. M. (Hrsg.): *Saliva and oral health*. 2. Auflage, The British Dental Association, London.
- Stephen, K.W., McCrossan, J., Mackenzie, D. (1980): Factors determining the passage of drugs from blood into saliva. *Br J Clin Pharmacol* 9, 51-55.
- Strähle, J., und Schweda, E. (2002): Jander Blasius, Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. 15. Auflage. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig. Seite 201-202
- StVG (2003): Straßenverkehrsgesetz vom 05. 03. 2003 (BGBl. I S. 310, 919) mit allen späteren Änderungen, einschließlich der Änderung durch Artikel 3 des Gesetzes vom 04.12.2018, in: BGBl I S. 2251. <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/stvg/gesamt.pdf> Stand: 28.03.2019, 08:11 Uhr.
- Tena, A. F., Cara, P. C. (2012): Deposition of inhaled particles in the lungs. *Arch Bronconeumol* 48, 240–246.
- Teranishi, R., Mon T. R., Robinson A. B., Cary P., Pauling L. (1972): Gas Chromatography of Volatiles from Breath and Urine. *Anal. Chem.* 44, 18-20.
- Toennes, S. W., Kauert, G. F., Steinmeyer, S., Moeller, M. R. (2005): Driving under the influence of drugs – evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Sci Internat* 152, 149-155.

- Trescot, A. M., Helm, S., Hansen, H., Benyamin, R., Glaser, S. E., Adlaka, R., Patel, S., Manchikanti, L. (2008): Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) guidelines. *Pain Physician* 11 (2 suppl), 5-62.
- Turner, J. R., Sugiya, H (2002): Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis* 8, 3-11.
- Uematsu, T., Yamaoka, M., Matsuura, T., Doto, R., Hotomi, H., Yamada, A-S., Hasumi-Nakayama, Y., Kayamoto, D. (2001): P-glycoprotein expression in human major and minor salivary glands. *Arch Oral Biol* 46, 521-527.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2014): Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid. Publishing and Library Section, United Nations, Vienna.
- Ventafridda, V., Tamburini, M., Caraceni, A., De Conno, F., Naldi, F. (1987): A validation study of the WHO method for cancer pain relief. *Cancer* 59, 850-856.
- Verstraete, A. G. (2004): Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Ther Drug Monit* 26, 200-205.
- Vondracek, M., Xi, Z., Larsson, P., Baker, V., Mace, K., Pfeifer, A., Tjälve, H., Donato, M. T., Gomez-Lechon, M. J., Grafström, R. C. (2001): Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis* 22, 481-488.
- Walzog, B., Fandrey, J. (2014): Blut: Ein flüssiges Organsystem. in: Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S. (Hrsg.): *Physiologie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 267-302.
- Wan, G. H., Wu, C. L., Chen, Y. F., Huang, S. H., Wang, Y. L., Chen, C. W. (2014): Particle size concentration distribution and influences on exhaled breath particles in mechanically ventilated patients. *PLoS ONE* 9:e87088. DOI: 10.1371/journal.pone.0087088.
- Weiss, J., Dormann, S.-M. G., Martin-Facklam, M., Kerpen, C., Ketabi-Kiyanvash N., Haefeli, W. E. (2003): Inhibition of P-Glycoprotein by Newer Antidepressants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305:198-204.
- Whelton, H. (2012): Introduction: the anatomy and physiology of salivary glands. In: Egar, M., Dawes, C., O'Mullane, D. (Hrsg.): *Saliva and oral health*. 4. Ausgabe, Stephen Hancocks Limited, Orleton.
- WHO (1969): WHO expert committee on drug dependence, sixteenth report, World Health Organization technical report series No. 407, Genf 1969 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40710/WHO_TRS_407.pdf;jsessionid=9904899F0CA597E22F57E37AB323239F?sequence=1 Stand: 23.06.2019, 15:46 Uhr.
- WHO (2019a): Abuse (drug, alcohol, chemical, substance or psychoactive substance) www.who.int/substance_abuse/terminology/abuse/en. Stand: 28.03.2019, 08:33 Uhr.

- WHO (2019b): Psychoactive substances. www.who.int/substance_abuse/terminology/psychoactive_substances/en/ Stand: 28.03.2019, 08:34 Uhr.
- Wood, M., Laloup, M., Ramirez Fernandez Mdel, M., Jenkins, K. M., Young, M. S., Ramaekers, J. G., De Boeck, G., Samyn, N. (2005): Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 150, 227-238.
- Yacouian, G. S., Wish, E. D., Perez, D. M. (2001): A Comparison of saliva testing to urinalysis in an arrestee Population. *J Psychoactive Drugs* 33, 289-294.
- Yang, S. P., Raner, G. M. (2005): Cytochrome P450 expression and activities in human tongue cells and their modulation by green tea extract. *Toxicol Appl Pharmacol* 202, 140-150.
- Yeh, H. C., Phalen, R. F., Raabe, O. G. (1976): Factors influencing the deposition of inhaled particles. *Environ Health Persp* 15, 147-156.
- Zagermann-Muncke, P. (2006): Wenn Arzneistoffe Transportproteine beeinflussen. *Pharmazeutische Zeitung* 50, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-502006/>, Stand: 30.07.2019 19:59 Uhr
- Zhou, L. X., Pihlstorm, B., Hardwick, J. P., Park, S. S., Wrighton S. A., Holtzman, J. L. (1996): Metabolism of phenytoin by the gingiva of normal humans: The possible role of reactive metabolites of phenytoin in the initiation of gingival hyperplasia. *Clin Pharmacol Ther.* 60, 191-198.

Anhang

Anhang 1: Während der Anfertigung dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen, Kongressbeiträge und Poster

Anhang 1.1: Publikationen

Neumann, J., Beck, O., Dahmen, N., Böttcher, M. (2018): Potential of oral fluid as a clinical specimen for compliance monitoring of psychopharmacotherapy. *Ther Drug Monit* 40, 245-251, 2018 (Teil dieser Dissertation).

Anhang 1.2: Kongressbeiträge und Workshops

Neumann, J., Böttcher, M. (2019): Studien zu Phosphatidylethanol (PEth) als Marker eines akuten und chronischen Alkoholkonsums., 15. Gemeinsames Symposium Deutsche Gesellschaft für Verkehrspsychologie und Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin, 11./12.10.19, Bonn.

Neumann, J., Keller, T., Böttcher, M. (2018): Ethanol und Ethylglucuronid Konzentrationen in post mortem Femoralblut, Urin und Glaskörperflüssigkeit, 27. Frühjahrstagung DGRM Nord, 25./26.5.18, Kiel.

Picht, F., Beck, O., Neumann, J., Böttcher, M. (2018): Phosphatidylethanol (PEth) compared with other direct (EtG) and indirect (GGT/MCV, CDT) alcohol biomarkers to assess the risk of drinking status. TIAFT Kongress, 07.01.-11.01.2018, Boca Raton.

Neumann, J., Böttcher, M. (2015): Untersuchungen zum Nachweis zentral wirksamer Medikamente im Speichel (Oral Fluid). Microgenics Workshop, 05./06.11.2015, Hanau (Teil dieser Dissertation).

Anhang 1.3: Posterpräsentationen

Neumann, J., Keller, T., Beck, O., Böttcher, M. (2018): Ethanol and ethyl glucuronide concentrations in post mortem femoral blood (FB), urine and vitreous humor (VH). TIAFT Kongress, 07.01.-11.01.2018, Boca Raton.

Neumann, J., Picht, F., Beck, O., Böttcher, M. (2017): Ethylglucuronid im Serum im Vergleich zu direkten (Phosphatidylethanol, Ethanol) und indirekten (gamma-GT + MCV, CDT) Alkoholmarkern bei Personen mit Verdacht auf gewohnheitsmäßigen Alkoholkonsum. 13. Symposium DGVM u. DGVP, 06.10-07.10.2017, Leipzig. *Blutalkohol* 54, Sup III 30.

Neumann, J., Böttcher, M. (2016): Oral fluid as an alternative matrix for compliance testing in psychopharmacotherapy. 12. AGNP Symposium, 01.-03.06.16, Bremen, *Pharmacopsychiatry* 26, DOI: 10.1055/s-0036-1582040 (Teil dieser Dissertation).

Neumann, J., Böttcher, M. (2015): First results from standardized oral fluid contamination experiments using diphenhydramine as a model substance. IATDMCT Kongress, 11.10.-14.10.2015, Rotterdam (Teil dieser Dissertation).

- Neumann, J., Böttcher, M. (2014): First experiments on the possible use of diphenhydramine as a model substance for the evaluation of oral fluid sample collection. IATDMCT satellite meeting Alternative Sampling Strategies in Toxicology and TDM, 18./19.09.14, Ghent (Teil dieser Dissertation).
- Neumann, J., Keller, T., Peschel, A., Beck, O., Brandtner, H., Monticelli, F., Böttcher, M. (2014): Hydromorphone, tramadol and O-desmethyltramadol in serum and oral fluid from patients in chronic pain treatment. IATDMCT Europ Conf Personalized Pharmacotherapy, 28.-30.08.14, Prag (Teil dieser Dissertation).
- Boettcher, M., Peschel, A., Neumann, J., Beck, O., Brandtner, H., Luthringshausen, G., Monticelli, F., Keller, T. (2013): Determination of hydromorphone in simultaneously collected serum, oral fluid and exhaled breath samples from patients in chronic pain treatment. TIAFT Kongress, 02.09.-06.09.13, Madeira (Teil dieser Dissertation).
- Neumann, J., Beck, O., Dahmen, N., Boettcher, M. (2013): Oral fluid/serum ratio of pregabalin and ten other psychoactive therapeutic drugs. TIAFT Kongress, 02.09.-06.09.13, Madeira (Teil dieser Dissertation).

Anhang 2: Material

Anhang 2.1: Lösungsmittel und Chemikalien

- Wasser: *UPLC/MS Optigrade, LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Methanol: *Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland*
- Acetonitril: *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Ameisensäure: *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Ammoniak: *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- n-Hexan: *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- Aripiprazol: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Aripiprazol-D₈: *SIGMA ALDERICH, St. Luis, USA*
- Citalopram: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Citalopram-D₆: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- N-Desmethylocitalopram: *H. Lundbeck A/S, Valby, Dänemark*
- Dextromethorphan: *SIGMA ALDERICH, St. Luis, USA*
- Dextrorphan: *SIGMA ALDERICH, St. Luis, USA*
- Dextromethorphan-D₃: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Dextrorphan-D₃: *SIGMA ALDERICH, St. Luis, USA*
- Diphenhydramin: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Diphenhydramin-D₃: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Duloxetine: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Duloxetine-D₃: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Hydromorphon: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Hydromorphon-D₃: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Mirtazapin: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Pipamperon: *Toronto Research Chemicals, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Pipamperon-D₁₀: *Toronto Research Chemicals, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Pregabalin: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Pregabalin-D₆: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Promethazin: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Promethazin-D₃: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*

- Quetiapin: *Cerilliant Corporation via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Quetiapin-D₈: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Tramadol: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Tramadol-C₁₃-D₃: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- O-Desmethyltramadol: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- O-Desmethyltramadol-D₆: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Venlafaxin: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- Venlafaxin-D₆: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- O-Desmethylvenlafaxin: *LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*
- O-Desmethylvenlafaxin-D₆: *Cerilliant Corporation, via LGC Standards, Luckenwalde, Deutschland*

Anhang 2.2: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zentrifugen:

- MiniSpin, *Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*
- Centrifuge 5810R, *Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*
- UNIVERSAL 30 F, *Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland*

Saugblock:

- Mikrofestphasenextraktionsblock mit Vakuumpumpe, *Waters, Milford, USA*

Eindampfblöcke:

- Thermoblock mit Stickstoffspinne: *Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld, Deutschland*

Waage:

- Präzisionswaage: *Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland*
- Feinwaage: *Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland*

Analysegeräte:

- UPLC-MS/MS Systeme: *Waters GmbH, Eschborn, Deutschland*
- Klinisch-Chemisches Analysesystem Olympus AU680: *Olympus GmbH, Krefeld, Deutschland*

Sonstige Materialien:

- SPE-Leerkartuschen, 1 ml: *CS Chromatographieservice GmbH, Langerwehe, Deutschland*
- Centrifree Ultrafilter: *Merck Millipore, Tullagreen, Irland*

- Amicon Ultra 0,5 ml Ultrafilter: *Merck Millipore, Tullagreen, Irland*
- pH 4,0 – 7,0 Special Indicator: *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
- pH 5,0 – 10,0 Neutralit: *Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*

Anhang 2.3: Reagenzienkits, Kalibratoren und Kontrollen

MassTox[®] TDM BASIC-Kit A, *Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing/München, Deutschland*

- Mobile Phase 1
- Mobile Phase 2
- Precipitation Reagent
- Extraction Buffer
- Dilution Buffer 1
- Dilution Buffer 2
- Rinsing Solution
- Reaktionsgefäße, transparent

MassTox[®] TDM MasterColumn[®] Series A, *Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing/München, Deutschland*

3PLUS 1[®] Multilevel Plasma Calibrator Set Antidepressants 1 (lyoph.)

MassCheck[®] Antidepressants 1 Plasma Control, Bi-Level (I + II)

3PLUS 1[®] Multilevel Plasma Calibrator Set Neuroleptics 1 (lyoph.)

MassCheck[®] Neuroleptics 1 Plasma Control, Bi-Level (I + II)

Internal Standard Set Antidepressants 1 and Neuroleptics 1

- Internal Standard Mix (lyoph.)
- Reconstitution Buffer

3PLUS 1[®] Multilevel Plasma Calibrator Set Neuroleptics 2/EXTENDED (lyoph.)

MassCheck[®] Neuroleptics 2/EXTENDED Plasma Control, Bi-Level (I + II)

Internal Standard Set Neuroleptics 2/EXTENDED

- Internal Standard Mix (lyoph.)
- Reconstitution Buffer

3PLUS 1[®] Multilevel Plasma Calibrator Set Neuroleptics 2/EXTENDED (lyoph.)

MassCheck[®] Neuroleptics 2/EXTENDED Plasma Control, Bi-Level (I + II)

Internal Standard Set Neuroleptics 2/EXTENDED

- Internal Standard Mix (lyoph.)
- Reconstitution Buffer

3PLUS 1[®] Multilevel Plasma Calibrator Set Antiepileptic Drugs (lyoph.)

MassCheck[®] Antiepileptic Drugs Plasma Control, Bi-Level (I + II)

Internal Standard Mix Antiepileptic Drugs

Greiner Bio-One Speichelquantifizierungskit, Greiner Bio-One, *Kremsmünster, Österreich*

- Greiner Bio-One Speichelkalibrator 1 – 5
- Greiner Bio-One Speichelkontrolle 1 und 2

Beckman Coulter Ireland Inc., *Lismeehan, Ireland*

- α -Amylase OSR6182
- Urine Calibrator, ODC0025
- CONTROL SERUM 1, ODC0003
- CONTROL SERUM 2, ODC0004

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Abteilungsleiter der Toxikologie im MVZ Labor Dessau, Dr. Michael Böttcher, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus gilt mein Dank selbstverständlich auch Herrn Prof. Dr. Herdegen, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die tatkräftige Hilfe im praktischen Laboralltag möchte ich mich bei den Kollegen der Abteilung Toxikologie, insbesondere Herrn Peschel, Herrn Picht, Frau Rönitz, Herrn Preidel und Herrn Lierheimer bedanken, dank derer ich durch den Dschungel der Analysegeräte zu navigieren lernte und die mir bei kleineren praktischen Problemen immer zur Seite standen. Nicht aussparen möchte ich in diesem Zusammenhang natürlich die Geschäftsführerin des MVZ Labors Dessau, Frau Dr. Juliane Böttcher-Lorenz, für die Möglichkeit, diese Arbeit in diesem Unternehmen anfertigen zu dürfen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Studienteilnehmern für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Realisierung dieses Projektes.

Zu guter Letzt sei meine Familie natürlich nicht vergessen, die mich stets mit aufmunternden und mahnenden Worten auf diesem langen Weg begleitet haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation abgesehen von der Beratung der zuständigen Betreuer selbstständig verfasst habe und sie mit keinen anderen als den genannten Quellen und Hilfsmitteln nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Diese Arbeit wurde weder ganz, noch in Teilen im Rahmen eines Prüfverfahrens an einer anderen Stelle vorgelegt.

Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde mir kein wissenschaftlicher Grad entzogen und es wurde weder an dieser noch an einer anderen Fakultät ein früherer Promotionsversuch unternommen.

Dessau-Roßlau, den 30.11.2019

(Jasna Catharina Neumann)

Abstract (deutsch)

Die Drogen- und Medikamentenanalytik gewinnt im Rahmen der Missbrauchsdiagnostik immer mehr an Bedeutung. Herkömmlich genutzte Matrizes wie Urin, Haare oder Blut sind je nach Setting nachteilig behaftet. Dies betrifft unter anderem die Probennahme, aber auch die Probenaufbereitung und die Analytik. Daher werden alternative Probenmatrizes, die jene Probleme kompensieren können benötigt. In dieser Arbeit wurden Speichel und Ausatemluft als mögliche alternative Matrizes anhand verschiedener Studien untersucht. Die Standardisierbarkeit der Speichel Probennahme wurde anhand von verschiedenen Faktoren wie dem pH-Wert in den Proben und Referenzbereichen für die Authentizitätsmarkersubstanzen Amylase und Cortisol, sowie den Speichelanteil in der Probe ermittelt. Weiterhin wurden in zwei Studien mit gepaarten Proben aus Serum und Speichel die Konzentrationsverhältnisse einiger Psychopharmaka (Aripiprazol, Citalopram, Escitalopram, Duloxetin, Mirtazapin, Pipamperon, Pregabalin, Promethazin, Quetiapin und Venlafaxin) und Opioid-Analgetika (Tramadol, Hydromorphon) für diese Matrizes ermittelt. Ziel war es dabei, herauszufinden ob die therapeutischen Bereiche der Medikamente auf den Speichel übertragen werden können. Es zeigte sich, dass die Streuung für eine Dosiseinstellung zu groß war, dieses Verfahren jedoch als Compliance-Kontrolle durchaus Anwendung finden kann. Anhand einer Modellsubstanz (Diphenhydramin), wurde weiterhin der Einfluss oraler Kontamination durch orale Medikamenteneinnahme ermittelt um eine Empfehlung zur Vermeidung geben zu können.

In der Studie zur Ermittlung des Konzentrationsverhältnisses der Psychopharmaka in Blut und Speichel wurden auch Ausatemluftproben gewonnen. Die in den anderen Matrizes detektierten Analyten konnten jedoch nur in Bruchteilen in der Ausatemluft nachgewiesen werden. Die Konzentrationsverläufe der Modellsubstanzen Diphenhydramin, Dextromethorphan und seines Metaboliten Dextrophan, wurden in einer Kinetik über 48 bis 56 Stunden in Ausatemluft, Speichel und Kapillarovollblut beobachtet. Im Falle des Dextromethorphans wurde darüber hinaus der Vergleich zwei unterschiedlicher Darreichungsformen (Kapsel und Lutschpastille) angestellt. Dabei hat sich herausgestellt, dass ein erheblicher jedoch nicht genau bestimmbarer Anteil der Konzentration eines Analyten auf eine Kontamination der Mundhöhle, eventuell durch Speichel zurückzuführen ist. Ausatemluft scheint daher in der Missbrauchsdiagnostik nur in sehr begrenztem Maße als Matrix nutzbar zu sein, der Speichel hingegen stellt eine sinnvolle alternative Matrix dar und ist den herkömmlichen Matrizes in einigen Settings sogar überlegen.

Abstract (englisch)

Drug analysis is gaining in importance in addiction medicine. Conventional matrices like urine, hair and blood have a lot of disadvantages in sample collection (i.e. urine sampling under supervision), sample preparation and the analysis itself. Therefore, the determination of alternative matrices is of increasing interest. In this thesis oral fluid and exhaled breath were investigated in different studies. For oral fluid the possibility of standardisation of the sampling procedure was evaluated via pH-values in oral fluid samples as well as the reference ranges for the oral fluid fraction and the markers of authenticity amylase and cortisol was investigated.

In two studies with paired samples of oral fluid and serum the concentration ratios of some psychopharmaceutical drugs (aripiprazole, citalopram, escitalopram, duloxetine, mirtazapine, pipamperon, pregabalin, promethazin, quetiapine and venlafaxine) and opioids (tramadol, hydromorphone) were determined. One aim of the study was, to get an idea about the detection window of these drugs compared to serum, and to find out if the therapeutic ranges in serum can be transferred to oral fluid. However, the scattering of these ratios was too high for a proper usage in adjustment of dosage but useful in compliance monitoring. The influence of oral contamination in the sampling procedure was investigated in a study with diphenhydramine as a model substance, to give recommendations on how to prevent this problem in clinical practice. Detectability of psychopharmaceutical drugs in exhaled breath was determined in the same study with the concentration ratios for oral fluid and serum. Only in a few samples, the in oral fluid and blood detected drugs could also be detected in exhaled breath.

The concentration profile of the model substances diphenhydramine, dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in exhaled breath, oral fluid and capillary whole blood was investigated in two kinetics studies for about 48 to 56 hours. Furthermore, in the dextromethorphan/dextrorphan study two different pharmaceutical forms were compared (capsules and lozenges). These two studies have shown that a substantial portion of the analyte concentration in exhaled breath is due to contamination with fluid from the oral cavity. In contrast to oral fluid, exhaled breath seems to be a less useful matrix except for very special settings. Oral fluid seems to be a proper alternative matrix in addiction medicine and comparable settings because it compensates for a lot of problems of the conventional sample matrices.