

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Vorstand: Professor Dr. med. W. Eisenmenger

DER STEREOSELEKTIVE NACHWEIS VON
LEVO- UND DEXTROMETHADON IN
BLUTPROBEN VON LEBENDEN UND
VERSTORBENEN DROGENABHÄNGIGEN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Denise Qwitterer
aus
Eggenfelden
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Gustav Drasch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Eisenhans

Prof. Dr. B. Bondy

Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos

Prof. Dr. St. Endres

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Gabriele Roider

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2003

Aufgrund der Aktualität der durchgeführten Untersuchungen wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bereits in der Zeitschrift Rechtsmedizin veröffentlicht:

Drasch G, Quitterer D, Roider G, von Meyer L (2000) Der stereoselektive Nachweis von L- und D-Methadon in Blutproben von lebenden und verstorbenen Drogen-abhängigen. Rechtsmedizin 10: 170-175.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	4
2. MATERIAL UND METHODE	7
2.1. Untersuchungsmaterial	7
2.1.1. Probenmaterial	
2.1.2. Geräte	
2.1.3. Hilfsmittel	
2.1.4. Käufliche Chemikalien	
2.1.5. Lösungen und Kalibratoren	
2.2. Methode	10
2.2.1. Prinzip	
2.2.2. Extraktion	
2.2.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Methode	
2.2.4. Bestimmung des Gesamtmethadons	
3. ERGEBNISSE	13
3.1. Typisches Chromatogramm	13
3.2. Bestimmungsgrenze und Präzision	13
3.3. Verwendbarkeit der gewonnenen Analysen	15
3.4. Prozentualer Anteil an Levomethadon in den Blutproben bei Lebenden	16
3.5. Prozentualer Anteil an Levomethadon in den Blutproben bei Verstorbenen	17
3.6. Verteilung der Methadongruppen im Zeitraum von 1997 bis 1999 in den Blutproben bei Lebenden und Verstorbenen	18
3.7. Univariate Statistiken	20
4. DISKUSSION	21
5. ZUSAMMENFASSUNG	28
6. LITERATURVERZEICHNIS	30

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Methadon ist ein zentral wirksames Analgetikum, das strukturell der Klasse der Diphenylpropylamine zuzuordnen ist (Roth 2000). Stereoselektiv bindet es mit hoher Affinität an spezifische μ -Opioidrezeptoren, welche vor allem im Zentralnervensystem und im Intestinaltrakt lokalisiert sind (Kristensen et al. 1994, Pert und Snyder 1973).

Der Morphinagonist Methadon zählt zu den weltweit am häufigsten eingesetzten synthetischen Opioiden und hat bei der Behandlung von Patienten mit chronischem Schmerzleiden sowie bei der Heroinsubstitutionsbehandlung von Drogenabhängigen eine große Bedeutung erlangt (Kristensen und Angelo 1992, 1994, 1996, Risak et al. 1996, Schmidt et al. 1992).

Die chemische Verbindung besitzt ein chirales Kohlenstoffatom und existiert folglich in zwei optisch aktiven, enantiomeren Formen (Schulz und Schmoltdt 1997). Diese unterscheiden sich besonders hinsichtlich ihrer Rezeptoraffinitäten (Kintz et al. 1997, 1998). In vitro hat das linksdrehende Levomethadon eine 10-fach höhere Affinität zum μ -Opioidrezeptor als sein rechtsdrehendes Gegenstück Dextromethadon (Kreek et al. 1995, Kristensen et al. 1992, 1994, 1996).

Des Weiteren wird uns eine längere Plasmaeliminationshalbwertszeit des Levomethadons beschrieben (Nakamura et al. 1982) und die beiden Enantiomeren gehen unterschiedlich starke Bindungen an die Plasmaproteine ein. Dies beeinflusst erheblich deren Ausscheidung über die Niere (Boulton und Devane 2000, Bowdle et al. 1997, Eap et al. 1990, 1996, 2000, Foster et al. 1999, 2000, Garrido et al. 2000).

Beobachtungen am Menschen können sowohl die therapeutischen Eigenschaften wie auch die Nebenwirkungen eindeutig dem Levoenantiomer zuweisen, welches eine 50-fach höhere analgetische Potenz gegenüber dem inaktiven Dextroenantiomer aufweist (Scott et al. 1948).

Allerdings induziert auch das therapeutisch nicht wirksame Dextromethadon in hohen Dosen verabreicht morphinähnliche subjektive Effekte und schafft so einen milden Grad physischer Abhängigkeit (Chizh et al. 2000, Fraser und Isbell 1962).

Bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte jedoch die Frage, ob dies allein Ergebnis der pharmakodynamischen Unterschiede zwischen den beiden Opioidisomeren ist, oder ob die stereoselektive pharmakokinetische Disposition ebenfalls eine Rolle spielt (Kreek et al. 1993, Misra et al. 1973).

In Deutschland ist seit Januar 1994 neben dem reinen Levomethadon auch das international übliche Racemat, eine Mischung aus der pharmakologisch wirksamen Levoform und der praktisch unwirksamen Dextroform, zur Substitutionsbehandlung von Drogenabhängigen zugelassen. Mit dem Inkrafttreten der zehnten Verordnung zur Änderung des Betäubungsmittelgesetzes wurden die Richtlinien zur Methadonsubstitutionsbehandlung im Februar 1998 entscheidend gelockert. Die Mindestfrist für die beaufsichtigungspflichtige Methadoneinnahme wurde verkürzt und die Höchstmenge der „take home“ Dosis deutlich erhöht (BtMÄndV, BtMG, BtMVV). Der synthetische Opioidagonist Methadon weist jedoch diverse höchst gefährliche Eigenschaften auf, deren Berücksichtigung eine sehr sorgfältige Anwendung erfordert: nach einer ausgedehnten Biotransformation in der Leber werden die Hauptmetaboliten ebenso wie das unveränderte Medikament über die Niere und die Galle ausgeschieden. Innerhalb der ersten 24 Stunden werden zwischen 20% und 60% der peroral verabreichten Methadondosis eliminiert. Nach einer Demethylierung am Stickstoffatom tritt durch intramolekulare Kondensation eine Zyklisierung zu Pyrrolidinen und Pyrrolinen ein. 43% der aufgenommenen Menge werden zu 2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (EDDP) verstoffwechselt. EDDP besitzt ebenso wie Methadon ein chirales Zentrum, hat jedoch keine opiataktiven Eigenschaften (Lanz und Thormann 1996, Leavitt et al. 2000).

Interindividuelle Abweichungen in der Bioverfügbarkeit des Medikamentes sowie der stereoselektive Metabolismus erschweren die Aufstellung genauer Dosierungsschemata. Aus diesem Grund wird von verschiedenen Seiten ein gutes Monitoring insbesondere bei der Verwendung des Racemats gefordert (Beck et al. 1991, Eap et al. 1990, 1996, 2000, Kristensen et al. 1992, 1994, 1996).

Während der Dextro-/Levo-Methadonerhaltungstherapie finden interindividuelle Anpassungsvorgänge in der Methadonpharmakokinetik und im Verhältnis der einzelnen Enantiomeren zueinander statt (Beck et al. 1991). Diese

lassen sich möglicherweise durch eine verstärkte Stickstoffdemethylierung beider Isomeren in der Leber erklären (Bouer et al. 1999, Foster et al. 1999). Wechselwirkungen mit enzyminduzierenden Medikamenten wie beispielsweise Phenobarbital oder Rifampicin im Sinne einer Aktivitätserhöhung des metabolisierenden Enzymsystems sind ebenso ein zentraler Diskussionspunkt wie die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Metabolisierung (de Vos et al. 1995).

Neue Untersuchungsergebnisse bei Patienten in der Langzeittherapie beschreiben darüber hinaus das Phänomen einer Selbstinduktion des Methadonmetabolismus bei individuell differenter Enzymexpression (Wolff et al. 2000).

Die Eliminationshalbwertszeit des Racemates variiert von 19 bis 75 Stunden. Die angegebene Bioverfügbarkeit unterliegt einer Spannbreite von 36% bis 106%. Aus den oben genannten Gründen ist das Risiko einer Kumulation und damit das verzögerte Auftreten toxischer Wirkungen insbesondere bei einem Beigebrauch anderer Pharmaka nicht abschätzbar (de Vos et al. 1995).

Es ist somit unabdingbar, die beiden Enantiomeren in biologischen Flüssigkeiten wie Serumproben, Blut oder Urin getrennt zu bestimmen, um sich der Frage einer Dosis-Wirkungs-Beziehung gerade auch im Hinblick auf genauere Dosierungspläne in der Substitutionstherapie nähern zu können.

Diverse Untersuchungsmethoden erweisen sich als geeignet sowohl mangelnde und unvollständige Compliance der Patienten als auch ein Therapieversagen aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Arzneien und Suchtstoffen aufzudecken (Baumann 1996, Mahler et al. 1998). Bei Leichen können diese im Speziellen zur Aufklärung der Todesursache mit beitragen.

Bislang publizierten stereoselektiven Analysen für die Bestimmung der beiden Methadonenantiomeren aus Speichel- und Haarproben (Kintz et al. 1997) sowie aus dem Serum von Lebenden (Schmoldt et al. 1997), mangelte es entweder an Sensitivität (Beck et al. 1991) oder sie waren finanziell zu aufwendig, da die Lebensdauer der chiralen Alpha-1-Glykoprotein-Säule zu kurz war (Schmidt et al. 1992).

Unsere Zielsetzung bestand darin, den qualitativen Nachweis von Methadon und dessen Metaboliten 2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (EDDP) sowie die gleichzeitige quantitative Bestimmung von Methadon in

Serum und Vollblut zu ermöglichen. Zum stereoselektiven Nachweis an einer chiralen Säule mit davor geschalteter Cyanosäule wurde eine kürzlich beschriebene Methode (Kristensen et al. 1994) von uns abgewandelt und insbesondere zur Untersuchung von Leichenblut verbessert.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Untersuchungsmaterial

2.1.1. Probenmaterial

Mit der weiter unten beschriebenen Methode untersuchten wir 199 Blutproben. Diese setzten sich zusammen aus Serumproben von 93 lebenden Personen aus dem Jahre 1999 sowie 106 Leichenblutproben aus den Jahren 1997 bis 1999. Alle Blutentnahmen bei Lebenden waren von der Polizei in Fällen veranlasst worden, bei denen der Verdacht einer Straftat bestand. Die Leichenblutentnahmen erfolgten sämtlich im Rahmen gerichtsmedizinischer Sektionen. In beiden Fällen verwendeten wir Proben von männlichen und weiblichen Personen. Im Vorfeld waren keinerlei Ausschlußkriterien wie das Alter oder der Beigebrauch bestimmter Arzneien und Suchtstoffe vorgegeben. Zunächst erfolgte die routinemäßige quantitative Bestimmung der Gesamtmethadonkonzentration ohne chirale Auftrennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Diodenarraydetektor oder Gaschromatographie/Massenspektrometrie.

2.1.2. Geräte

Zur Probenbestimmung benutzen wir:

- eine Zentrifuge (Heraeus Medifuge 200),
- einen Rüttler (Heidolph REAX 2000),
- einen Rotavapor (Büchl RE 111, Schweiz),

- einen Heizblock mit Abdampfaufsatz (ReactiTherm III Heating Modul und ReactiVap III, Pierce, Rockford, USA),
- eine HPLC-DAD Beckmann M 114 Pumpe (Beckmann Instruments, San Remo, USA),
- einen Merck Hitachi L-7200 Probengeber (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland),
- einen Hewlett Packard Diodenarraydetektor Series 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland),
- einen Waters Säulenofen Col. Htr. Mod. TCM (Waters GmbH, Eschborn),
- eine HPLC-UV Merck Hitachi L-7110 Pumpe (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland),
- einen Merck Hitachi L-7200 Probengeber (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland),
- einen Beckmann 160 Absorbance Detektor mit Zinklampe 214 nm (Beckmann Instruments, San Remo, USA),
- einen Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrator (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland).

2.1.3. Hilfsmittel

Als Hilfsmittel dienten uns Reagenzgläser und Meßkölbchen mit einem Volumen von jeweils 10 ml. Sowohl die Rundbodengläser als auch die Spitzbodengläser und der Glashohlstopfen bestanden aus Duran-Glas mit Schliff N 14. Als Pipetten wurden Gilson Pipetman 100 µl und 1000 µl variabel sowie Gilson Microman M 10, Gilson Distriman und Glaspipetten mit einem Volumen von 2,5 ml benutzt. Zusätzlich setzen wir als Probengeberfläschchen Mikroprobenfläschchen aus PP 300 µl, 11 mm, Bauch gerippt (Chromatographiehandel Müller Art.-Nr. 610270) mit Bördelkappen N 11 TB/aA (Butylgummi rot/PTFE) 11 mm (Chromatographiehandel Müller Art.-Nr. 611002) ein.

2.1.4. Käufliche Chemikalien

Zur Durchführung der Analysen verwendeten wir:

- Acetonitril (Fischer Scientific, Far UV HPLC, A/0627),
- Chlorbutan (Fisons, HPLC, C/4756),
- Ethylenglykol (Merk, pro analysi, 9621),
- Methylclonazepam (Hoffmann la Roche, Reinsubstanz),
- Wasser (Braun Melsungen, Aqua ad injectabilia),
- Methanol (Merck, prepsolv, UN 1230),
- Kaliumdihydrogensulfat (Merck, pro analysi, 4873),
- Ortho-Phosphorsäure 85% (Merck, pro analysi, 1.005739),
- Kaliumhydroxid (Merck, pro analysi 5033),
- N, N-Dimethyloctylamin (Fluca, purum, 40995).

2.1.5. Lösungen und Kalibratoren

Als Phosphatpuffer benutzen wir folgende zwei Versionen:

- Zur Herstellung des Phosphatpuffers 0,02 M (pH 2,0) wird 3,0 g KH_2PO_4 in 2,0 l Aqua ad injectabilia gelöst, mit Ortho-Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt und anschließend durch ein säurefestes Filterpapier filtriert.
- Zur Herstellung des Phosphatpuffers 0,01 M (pH 5,0) wird 1,36 g KH_2PO_4 in 1,0 l Aqua ad injectabilia gelöst, mit 1-normaler Kalilauge auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt und anschließend durch säurefestes Filterpapier filtriert.

Beide Puffer können im Kühlschrank bis zu sechs Monate aufbewahrt werden. Zur Herstellung der Stammlösung in einer Konzentration von 1 g/l werden 10 mg der zu untersuchenden Substanz in einem Meßkölbchen in 10 ml Methanol gelöst und anschließend in ein Aufbewahrungsglas mit Teflon-schraubdeckel überführt.

Zur Herstellung der Stammlösungen in Konzentrationen von 10 mg/l und 1 mg/l werden jeweils 100 µl beziehungsweise 10 µl der Stammlösungen (Konzentration 1 g/l) in einem Meßkölbchen mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt

und anschließend in ein Aufbewahrungsgefäß mit Teflonschraubdeckel überführt.

Unsere Stammlösungen bleiben im Kühlschrank bis zu zwei Jahre haltbar. Von den Einzelsubstanzen Levomethadon, Dextro-/Levomethadon, Methylclonazepam (ISTD) bereiten wir die Stammlösungen in Konzentration von 1 g/l und 100 mg/l zu.

Zur Gewinnung der Kalibrationsproben spicken wir leeres Kälberserum mit bekannten Mengen an racemischem Dextro-/Levomethadon.

2.2. Methode

2.2.1. Prinzip

Zum stereoselektiven Nachweis von Dextro- und Levomethadon werden die Substanzen durch flüssig-flüssig Extraktion mit 1-Chlorbutan von der biologischen Matrix getrennt, die organische Phase eingengt und der Extrakt hochdruckflüssigkeitschromatographisch im sauren Milieu bei einem pH-Wert von 5,0 auf einer chiralen Trennsäule mit Cyanovorsäule analysiert. Die Identifikation erfolgt durch einen UV-Festwellendetektor mit einer Zinklampe bei einer Wellenlänge von 214 nm.

Das Anwendungsgebiet umfasst sowohl die qualitative als auch die quantitative Bestimmung von Methadon und dessen Metaboliten 2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (EDDP), sowie im besonderen den stereoselektiven Nachweis von Dextro- und Levomethadon aus Serum und Blut. Dabei wird 1 ml Probenmaterial eingesetzt.

2.2.2. Extraktion

1 ml Blut, die verwendete Menge kann bei zu wenig vorhandenem Probenmaterial gegebenenfalls auch verringert werden, wird in einem Reagenzglas mit Schliff mit 5 ml 1-Chlorbutan eine Minute mechanisch geschüttelt (Heildolph-Rüttler). Das Gemisch wird drei Minuten bei 5000 Rpm

zentrifugiert und die obere Phase möglichst quantitativ mit Hilfe einer Glas-Pasteurpipette abgetrennt.

Den Überstand gibt man zusammen mit 30 µl Ethylenglykol in ein Spitzglas mit Schliff und engt bei 50° C am Rotavapor beziehungsweise im Heizblock unter Luft- oder Stickstoffstrom bis auf das Ethylenglykol ein. Der Rückstand wird in 70 µl eines Acetonitril-Wassergemisches (50/50) aufgenommen, nochmals kurz gerüttelt und in ein Probenglas überführt.

Die jeweils benötigten Kalibratoren und Kontrollen werden in der gleichen Art und Weise aufgearbeitet. Alle diese Vorgänge finden bei einer normalen Umgebungstemperatur von 20 °C bis 22 °C statt.

2.2.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Methode

Der in den Probengebergefäßen befindliche Extrakt wird auf einer Säulenkombination bestehend aus einer Cyanovorsäule Nucleosil 100-5 CN ET 40 x 4 mm (Machery. Nagel, Düren) und einer daran direkt angeschlossener chiraler Alpha-1-Glykoprotein-Säule 100 x 4 mm, 5 µm (ict Handels-GmbH, Bad Homburg) getrennt.

Die mobile Phase besteht aus einem Gemisch von Acetonitril, 0,01 molarem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,0 sowie Dimethyloctylamin (15/85/0,05 v/v/v). Die Flußrate beträgt 0,8 ml/min, die Einspritzmenge 30 µl. Die Spüllösung für die Nadeln der automatischen Probengeber besteht aus einem Methanol-Wasser-Gemisch in einem den Eluenten entsprechenden Verhältnis.

Für den stereoselektiven Nachweis von Dextro- und Levomethadon wird das Chromatogramm 30 Minuten lang bei einer UV-Festwellenlänge von 214 nm aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Chromato-Integrators D 2500 (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland).

Die ungefähren Retentionszeiten betragen:

- Levomethadon 15 Minuten,
- Dextromethadon 18 Minuten,
- Levo-2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin 12,5 Minuten
- Dextro-2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin 13,5 Minuten

2.2.4. Bestimmung des Gesamtmethadons

Unter Zugabe eines internen Standards eignet sich diese Methode prinzipiell ebenso zum direkten quantitativen Nachweis von Levo- und Dextromethadon. In der Praxis erweist es sich jedoch als günstiger, zuerst das Gesamtmethadon gesondert mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Diodenarraydetektor beziehungsweise Gaschromatographie/Massenspektrometrie zu bestimmen und danach mit der vorgestellten Methode nur das prozentuale Verhältnis von Levo- und Dextromethadon zu ermitteln.

Eine vorausgehende quantitative Bestimmung des Gesamtmethadons auf einer üblichen Reverse-Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie kann vor der Extraktion leicht in den Ablauf eingebaut werden: dabei wird ein geeigneter Standard wie beispielsweise Methylclonazepam zugegeben, die Extraktion dann in der unter 2.2.2 dargestellten Art durchgeführt und der Ethylenglykol-Extrakt zunächst in das Autosamplergläschen der klassischen Reverse-Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie gegeben. Dabei kann das Gesamtmethadon neben Benzodiazepinen und anderen Arzneistoffen quantifiziert werden. Der Rückstand im Autosamplergläschen wird nun, gegebenenfalls unter Zugabe einer geringen Menge eines Acetonitril-Wassergemisches in einem Verhältnis 50 zu 50, mittels der beschriebenen stereoselektiven Methode aufgetrennt.

2.2.5. Robustheit der Methode

Besonders hervorzuheben ist die Robustheit der Methode, welche sich uneingeschränkt auch zur Untersuchung der schwierigen Matrix Leichenblut eignet. Sogar bei Fäulnis der Blutproben wurden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Keiner der typischen Beigebrauchsstoffe wie exemplarisch Benzodiazepine, Opiate, Cocain, Cannabis, trizyklische Antidepressiva oder Antiepileptika eluiert zu einer ähnlichen Retentionszeit wie die beiden Methadon-isomeren. Sofern Dextro- und Levo-2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (D-EDDP, L-EDDP) über der Bestimmungsgrenze liegen, können sie mit dieser Methode ebenfalls erfasst werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Typisches Chromatogramm

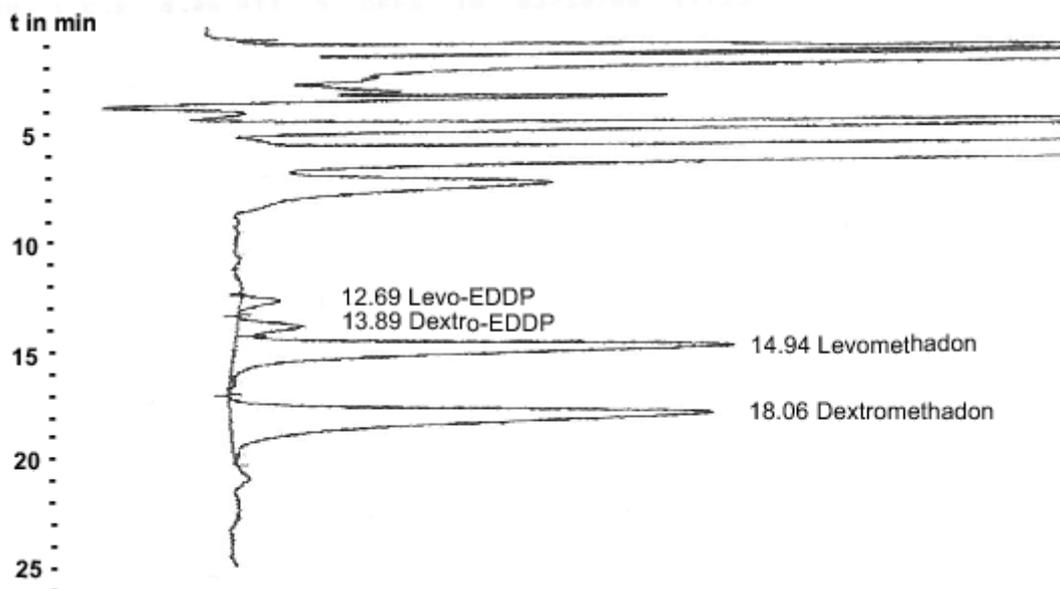


Abbildung 1: typisches Chromatogramm einer aufbereiteten Blutprobe eines Patienten unter Methadontherapie. Man sieht eine deutliche Auftrennung in Levo- und Dextromethadon, sowie in die Metaboliten Levo- und Dextro-2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (D-EDDP, L-EDDP).

3.2. Bestimmungsgrenze und Präzision

Die Grenze für die sichere quantitative Bestimmung lag bei 0,02 mg/l Dextro- beziehungsweise Levomethadon.

Die Abweichung innerhalb der einzelnen Proben wurde bestimmt, indem 1 ml Kälberserum mit einer definierten Menge an racemischem Methadon versetzt wurde.

Bei zehn aufeinanderfolgenden Analysen von Leerseren, die mit einer relativ geringen Konzentration von 0,03 mg/l gespickt waren, wurden folgende Mittelwerte \pm Standardabweichung für den prozentualen Anteil von Levomethadon am Enantiomergemisch erhalten:

- bei Bestimmung über die Peakfläche: $50,17 \pm 3,68\%$ und
- bei Bestimmung über die Peakhöhe: $49,44 \pm 3,62\%$

Die Bestimmung der Präzision zeigte vergleichbare Ergebnisse bei der Auswertung über die Höhe ebenso wie über die Fläche. Wegen der möglichen Überlappung von Levomethadon mit Dextro-2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (Dextro-EDDP) war beim Auftreten von 2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin-Peaks die Auswertung über die Höhe der Auswertung über die Fläche vorzuziehen.

Für die Leichenblutproben wurde die bivariate Verteilung von Levomethadon sowohl über die Höhe als auch über die Fläche berechnet und in einem Scatterdiagramm veranschaulicht.

Der Korrelationskoeffizient lag gemittelt bei 0,9925.

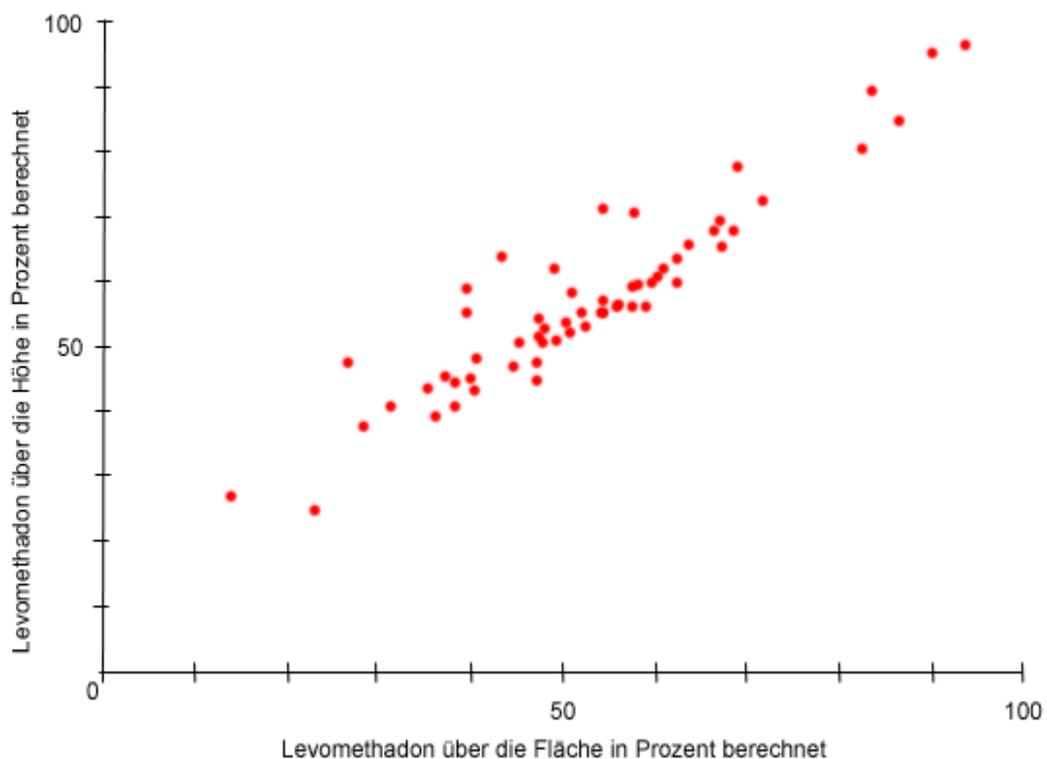


Abbildung 2: Verteilung von Levomethadon über die Höhe und über die Fläche für die Racematfälle berechnet.

3.3. Verwendbarkeit der gewonnenen Analysen

Wir führten bei insgesamt 256 Blutproben routinemäßig eine quantitative Bestimmung der Gesamtmethadonkonzentration durch, von denen wir 199 verwenden konnten. Bei den Lebenden fanden von 133 gemessenen Proben 93 Eingang in die statistische Auswertung, was 69,9% entspricht. Für die verbleibenden 40 Blutproben ergab die Analyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Diodenarraydetektor beziehungsweise Gaschromatographie/Massenspektrometrie vorab kein Nachweis von Methadon, so dass sich hier die Frage einer chiralen Auftrennung nicht stellte.

Bei den Leichen ließen sich von 113 erhaltenen Werten 106 benutzen. Hier lag die prozentuale Ausbeute bei 93,8%. Lediglich sieben Leichenblutproben zeigten bei der flüssig-flüssig Extraktion mit 1-Chlorbutan eine nicht näher untersuchte Fällungsreaktion, die eine quantitative Separation der organischen Phase auch nach suffizienter Zentrifugation unmöglich machte.

Wie bereits weiter oben beschrieben wurden 10 Kontrollproben aufbereitet, die alle der Präzisionsverifizierung dienten.

3.4. Prozentualer Anteil an Levomethadon in den Blutproben bei Lebenden

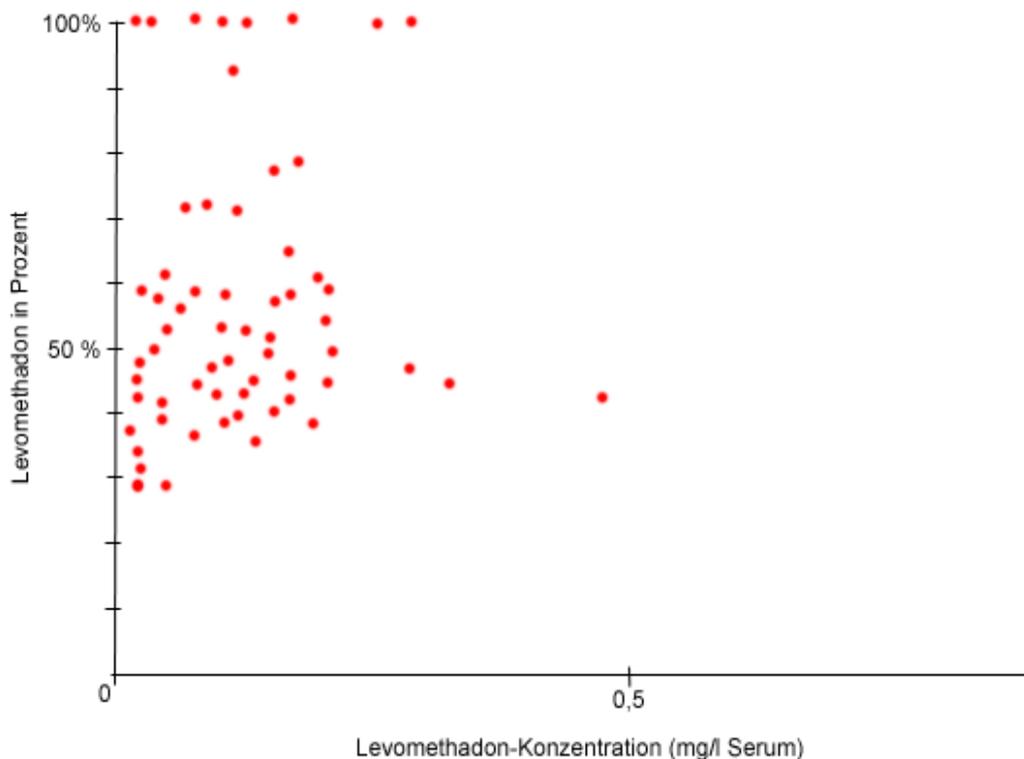


Abbildung 3: graphische Verteilung des prozentualen Anteils an Levomethadon bei den Blutproben der Lebenden mit steigenden Levomethadonkonzentrationen.

Aus den Messungen und den Auswertungen, dargestellt in den Abbildungen 3 und 4, geht hervor, dass bei alleiniger Aufnahme von Racemat das mittlere Verhältnis von Levomethadon zu Dextromethadon etwa bei 50% lag und sich mit steigenden Levomethadonkonzentrationen nicht veränderte. Dieselben Verhältnisse lagen im unteren Konzentrationsbereich bei dem Leichenblutkollektiv vor. Bei Verstorbenen mit höheren Konzentrationen an Levomethadon (über 1,0 mg/l) konnte ein Levo-/Dextromethadon-Verhältnis von über 50% festgestellt werden (siehe Abbildung 4).

Bei unserer Analyse haben sich folgende Einzelfälle deutlich von der Gesamtheit abgehoben: bei den Lebenden existierten zwei Blutproben mit einem

Levomethadonanteil von 92,0% beziehungsweise 92,2%, bei denen sich ein sicher nachweisbarer Anteil an Dextromethadon zeigte.

Bei den Leichenblutanalysen fand sich fünf von 106 Fällen nachweislich ein Levomethadonanteil von über 80% mit einem deutlichen Dextromethadonanteil.

3.5. Prozentualer Anteil an Levomethadon in den Blutproben bei Verstorbenen

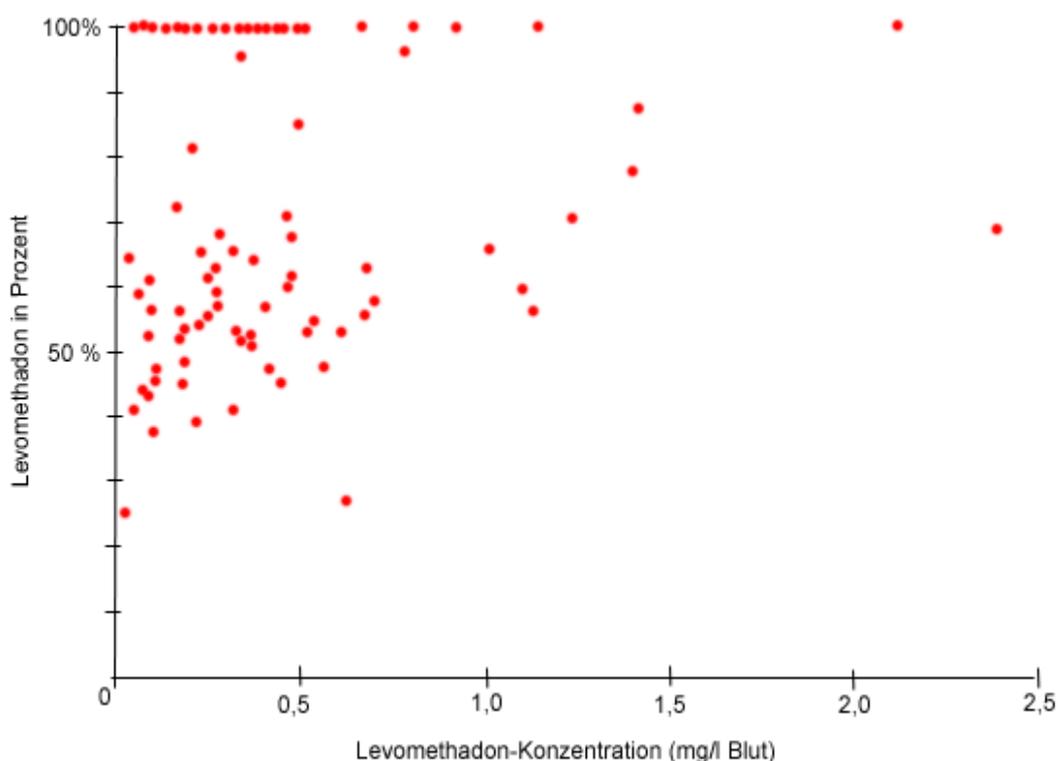


Abbildung 4: graphische Verteilung des prozentualen Anteils an Levomethadon bei den Blutproben der Verstorbenen mit steigenden Levomethadonkonzentrationen.

Bei den Lebenden wurde nur in einem der 93 untersuchten Fälle die Levomethadonkonzentration von 0,3 mg/l im Serum überschritten, wohingegen nahezu die Hälfte der analysierten Proben von den Verstorbenen deutlich über dieser Konzentration lag.

In den Abbildungen 3 und 4 sind die Gruppen mit Racemataufnahme und reiner Levomethadonaufnahme jeweils deutlich unterschieden. Die Mittelwerte und Streuungen der Levomethadongehalte im Blut unterschieden sich bei diesen beiden Gruppen nicht signifikant.

Bei den Lebenden errechnete sich der Mittelwert für Levomethadon auf 49,67%, bei einer Standardabweichung von 10,25.

Bei den Verstorbenen ergab sich ein Mittelwert für Levomethadon von 54,43%, bei einer Standardabweichung von 10,41. In beiden Kollektiven zeigte sich nach der Racemataufnahme eine individuelle Schwankung des Levo-/Dextromethadon Verhältnisses von 25/75 bis 75/25.

3.6. Verteilung der Methadongruppen im Zeitraum von 1997 bis 1999 in den Blutproben bei Lebenden und Verstorbenen

Bezogen auf die Leichenblutproben aus den Jahren 1997 bis 1999 ergab sich eine Versorgung ausschließlich mit Levomethadon von 39,6%, bei den Lebenden betrug dieser Anteil nur 18,3%. Allerdings standen von Lebenden nur Proben aus dem Jahre 1999 zur Verfügung. In diesem Kollektiv lag die Anzahl der rein mit Levomethadon substituierten Personen bei 17 und unterschied sich nur geringfügig von der Anzahl der 1999 unter Levomethadon Verstorbenen, die bei acht lag.

Tabelle 1: Verteilung von Levomethadon, Mischung und Racemat in den Blutproben bei Lebenden und Verstorbenen.

	Lebende	Verstorbene	Gesamt
Fallzahl	93	106	199
Levomethadon	17 (18,3%)	42 (39,6%)	59 (29,6%)
Mischung	2 (2,2%)	5 (4,7%)	7 (3,5%)
Racemat	74 (79,6%)	59 (55,7%)	133 (66,8%)

Tabelle 2: Verteilung von Levomethadon, Mischung und Racemat in den Blutproben in den Leichenblutproben aus den Jahren 1997 bis 1999.

	1997	1998	1999	Gesamt
Fallzahl	15	57	34	106
Levomethadon	12 (80,0%)	22 (38,6%)	8 (23,5%)	42 (39,6%)
Mischung	0 (0,0%)	2 (3,5%)	3 (8,8%)	5 (4,7%)
Racemat	3 (20,0%)	33 (57,9%)	23 (67,6%)	59 (55,7%)

Bei den Methadon-assoziierten Todesfällen sank der Anteil der Levomethadonsubstituierten von 1997 bis 1999 kontinuierlich von 80,0% auf 23,5% ab. Gleichzeitig nahm der Anteil der mit Racemat Substituierten entsprechend von 20,0% auf 67,6% zu.

3.7. Univariate Statistiken

Tabelle 3: Gesamtmethadonkonzentration (mg/l) bestimmt mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie in Blutproben von Lebenden und Verstorbenen.

	Lebende	Verstorbene
Fallzahl	93	106
<u>Gesamtmethadon</u>		
Median	0,16 mg/l Serum	0,46 mg/l Blut
Mittelwert ± Standardabweichung	0,18 ± 0,025 mg/l	0,57 ± 0,56 mg/l
Maximalwert	1,06 mg/l	3,44 mg/l
<u>Levomethadon</u>		
Median	0,086 mg/l Serum	0,29 mg/l Blut
Mittelwert ± Standardabweichung	0,097 ± 0,075 mg/l	0,39 ± 0,39 mg/l
Maximalwert	0,45 mg/l	2,38 mg/l
<u>L/D-Verhältnis bei Racemataufnahme</u>	49,7% ± 10,3 % (28,7% - 78,4%)	54,4% ± 10,4% (24,8% - 77,7%)
Alleinige Versorgung	1999: 17 von 93 (18,3%)	1997: 12 von 15 (80,0%) 1998 22 von 57 (38,6%) 1999: 8 von 34 (23,5%)
Nachweis einer parallelen Versorgung mit Levomethadon und DL-Methadon	2	5

4. DISKUSSION

Die Entwicklung stabiler chiraler Hochdruckflüssigkeitschromatographiesäulen in den letzten Jahren (ChromTech User's Guide 1998) konnte die komplizierten Gaschromatographie Verfahren (Kristensen und Angelo 1992) zum analytischen Nachweis der enantiomeren Formen von Methadon und dessen Metaboliten verdrängen (Angelo et al. 1999, Beck et al. 1991, Kristensen et al. 1994, Rudaz und Veuthy 1999, Rudaz et al. 1999, Schmidt et al. 1994, Schmoldt et al. 1997).

Das heute verwendete chirale Trennmateriale basiert auf einem an Silicagel gebundenen Alpha-1-Glycoprotein und kann daher sehr universell zur Separation von Dextro- und Levomethadon eingesetzt werden (ChromTech User's Guide 1998).

In der forensischen Praxis hat sich der Vorschlag von Kristensen et al. (1994,1996), vor die chirale Trennsäule eine kurze analytische Cyano-Säule zu schalten, unter anderem auch deshalb bestens bewährt, weil die analytische Cyano-Vorsäule die Lebensdauer der chiralen Alpha-1-Glykoprotein-Säule verlängert.

In einer Studie zum Beikonsum zu Methadon an unserem Institut wurde ein erheblicher Beigebrauch folgender Arzneien und Suchtstoffe nachgewiesen: Heroin 43%, Dihydrocodein 39%, Cannabis 61%, Cocain 29%, Amphetamine 6%, Barbiturate 10%, Benzodiazepine 81%, trizyklische Antidepressiva 9%, sowie Ethanol 50%. Ferner werden in letzter Zeit zusätzlich vermehrt Antiepileptika wie zum Beispiel Carbamazepin oder Clonazepam verordnet (Roeder et al. 1996).

Dieser hohe Grad an Medikamentenbeikonsum der Methadonsubstituierten Personen erforderte eine Säulenkombination, die es ermöglichte, die beiden Methadonenantiomeren voneinander zu trennen, ohne dass es jedoch zu einer Überlagerung der Methadonpeaks insbesondere mit oben dargestellten Substanzen aus dem Beikonsum kam.

Unsere Methode lieferte in allen 199 forensischen Fällen ein eindeutiges Ergebnis, da alle in der Praxis vorkommenden Beigebrauchsstoffe in der

Hochdruckflüssigkeitschromatographie deutlich andere Retentionszeiten aufwiesen als die beiden zu bestimmenden Methadonenantiomeren.

Die Trennleistung der chiralen Säule war nicht so hoch, wie man das heute von optimalem Reverse-Phase Material gewohnt ist, weshalb uns das Vorschalten einer analytischen Cyano-Säule sowie das gelegentliche Durchspülen der Säulenkombination mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 50 zu 50 empfehlenswert erschien.

Nach unseren Erfahrungen war auch bei der Anwesenheit mehrerer Beigebrauchsstoffe und/oder schwieriger Matrix – in unserem Fall Leichenblut – ein einfacher UV-Festwelledetektor von 214 nm zu einer sicheren Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses völlig ausreichend.

Der zyklische Hauptmetabolit des Methadons 2-ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (EDDP) weist ebenfalls noch ein asymmetrisches Kohlenstoffatom auf und besitzt damit ein Chiralitätszentrum (Angelo et al. 1999, Kintz et al. 1998, Olsen et al. 1977). Daher erscheinen im Hochdruckflüssigkeitschromatogramm nach chiraler Trennung zwei getrennte EDDP-Peaks, einer für Levo-EDDP und einer für Dextro-EDDP. Die EDDP-Peaks liegen allerdings nur bei hohen Methadonkonzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze.

In der Regel fanden wir EDDP-Konzentrationen, die unter 5% derer des Methadons lagen. In unseren Chromatogrammen zeigten sich die EDDP-Peaks zeitlich immer vor denen der Methadonenantiomeren. Eine Überlappung der Peaks von Levomethadon und Dextro-EDDP ist denkbar. Dextro-EDDP beeinflusst jedoch die Quantifizierung des prozentualen Levomethadonanteils, insbesondere bei der Auswertung über die Peakhöhe, nicht, da die Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Substanzen zu groß sind.

Andere Untersuchungen konnten kürzlich aufzeigen, dass die vorwiegend in der älteren Literatur gemessenen höheren EDDP-Konzentrationen wohl eher auf eine artifizielle thermische Umwandlung des Methadons im heißen Einspritzblock bei der Gaschromatographie/Massenspektrometrie Analyse zurückzuführen waren (Galloway und Bellet 1999).

Statistisch betrachtet führte die Auswertung des prozentualen Levomethadonanteils über die Peakhöhe oder über die Peakfläche zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe dazu auch Abbildung 2). Wegen der oben angesprochenen

möglichen Verfälschung der Levomethadonwerte durch das Auftreten störender Dextro-EDDP-Peaks ist die Auswertung über die Höhe zu favorisieren.

Für den Metaboliten EDDP konnte bislang keine eigene analgetische Aktivität nachgewiesen werden. Es wäre jedoch voreilig, jegliche psychopharmakologische Potenz ausschließen zu wollen (Kreek et al. 1995). Das kontinuierliche Auftreten von EDDP-Peaks bei Patienten unter Langzeit-Methadonsubstitution und die enge strukturelle chemische Verwandtschaft zu Methadon lassen weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sinnvoll erscheinen.

Die von uns vorgestellte Methode erwies sich als sehr unempfindlich gegenüber Störfaktoren und ist ohne jede Einschränkung zur Analyse von Leichenblut geeignet. Die Trennungen einschließlich der beschriebenen Vorversuche und Kalibrierungen zur Optimierung der Methode konnten an einem Säulenpaar durchgeführt werden.

Unter Verwendung eines geeigneten internen Standards ist eine direkte Quantifizierung von Dextro- und Levomethadon auf der chiralen Säulenkombination möglich (Kristensen et al. 1994). Allerdings bewährte sich in der forensischen Praxis die Zweiteilung der Analyse mit vorangestellter Quantifizierung des Gesamtmethadons auf einer Reverse-Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Anschließend erst erachten wir die stereoselektive Trennung auf der chiralen Säule als sinnvoll, da in nahezu allen Fällen ein Beikonsum von Benzodiazepinen oder Antidepressiva erwartet werden kann (Roider et al. 1996). Diese Substanzen können dann bereits im Vorfeld zusammen mit dem Gesamtmethadon mittels einer klassischen Reverse-Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie getrennt und quantifiziert werden.

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zum besseren Verständnis der Pharmakokinetik des Methadons durchgeführt, wobei viele Fragen ungeklärt blieben und kein gemeinsamer Konsens hinsichtlich einer sicheren kontrollierten Methadontherapie gefunden werden konnte (Beck et al. 1991, Kristensen et al. 1994, Schmidt et al. 1994, Schmoldt et al. 1997).

Daher bestehen noch immer große Unsicherheiten bei der Dosierung des Substitutionsmittels und die Todesfälle unter Methadontherapie sind in den letzten Jahren mit Zunahme der methadonsubstituierten Personen erwartungsgemäß stark angestiegen. Nachdem es sich meist um Vergiftungen aus einer Kombination mehrerer Arzneien und Suchtmittel handelt (Roider et al. 1996), ist schwer abzuschätzen, inwieweit Methadon den Tod ursächlich herbeiführt.

Unser Bestreben lag darin, eine unkomplizierte stereoselektive Bestimmung von Dextro- und Levomethadon im Blut zu etablieren, um Wirkungen und Nebenwirkung von Methadon besser beurteilen zu können.

Schulz und Schmoldt (1997) gaben als Obergrenze des therapeutischen Bereiches eine Levomethadonkonzentration von 0,3 mg/l im Serum an, was unsere Analysen belegen konnten. Bei Lebenden wurde lediglich in einem Fall eine höhere Levomethadonkonzentration festgestellt (siehe Abbildung 3), wohingegen in 52 von 106 Todesfällen mit positivem Methadonnachweis diese therapeutisch tolerierbare Konzentration von 0,3 mg/l deutlich überschritten wurde (siehe Abbildung 4). Die genauen Ursachen für die Überdosierung in den konkreten Einzelfällen sind uns nicht bekannt, jedoch sind folgende Ursachen denkbar:

von dem in Deutschland mittlerweile zur Substitution zugelassenen Racemat ist bekannt, dass nur die Levo-Form für die therapeutischen Wirkungen verantwortlich ist (Kintz et al. 1997, 1998, Risak et al. 1996, Scott et al. 1948). Doch auch der Metabolismus der beiden Enantiomeren verläuft definitiv unterschiedlich (Boulton und Devane 2000, Eap et al. 1990,1996, 2000, Foster et al.1999,2000, Garrido et al. 2000, Nakamura et al. 1982).

Methadon wird in der Leber von den bis zu fünf Isoformen des Enzyms p 450 nicht stereospezifisch verstoffwechselt. Der variable Abbau des synthetischen Opioids liegt in einer unterschiedlichen Enzymexpression und Enzymaktivität begründet (Leavitt et al. 2000). So würde sich erklären lassen, weshalb Patienten zwar die identische Dosis Dextro-Levomethadon oral verabreicht bekommen, aber dennoch nicht die gleichen Blutkonzentrationen der aktiven Levo-Form aufweisen.

Eap et al. (1990, 1996) beschäftigte die Frage, ob der Therapieerfolg in einen direkten Zusammenhang mit der Methadonkonzentration im Patientenblut zu bringen sei. Seine Untersuchungen veranschaulichten, dass sich ein Therapieerfolg nur bei Vorhandensein von Levomethadon, beziehungsweise in höheren Konzentrationen ebenso beim Racemat einstellt. Erhielten die Patienten das Racemat, sprachen 19% nicht darauf an. Verabreichte man das wirksame Levomethadon alleine, kam es zu einer Versagerquote von 9%. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung einer individuellen Methadonbehandlung. Eine Studie von Risack et al. (1996) an Krebspatienten kam zu dem Ergebnis, dass die Plasmakonzentration von Levomethadon weder zur analgetischen

Wirkung noch zu den Nebenwirkungen in einem direkten Verhältnis steht. Dies belegte auch eine Untersuchung von Torrens et al. (1998).

Wolff und Mitarbeiter (2000) diskutierten eine mögliche Selbstinduktion des Methadonmetabolismus und eine geringere Ausscheidung des Methadons zu Beginn einer Substitutionsbehandlung.

Ob die stereoselektive Ausscheidung von Levomethadon doppelt so hoch ist, wie die von Dextromethadon, weil es zwischen den Enantiomeren zu Interaktionen kommt, konnte die Arbeitsgruppe um Bowdle et al. (1997) nicht beweisen.

Um also die Dosierung individuell an die jeweiligen Ausscheidungsvorgänge im Körper angleichen zu können, sollten die Konzentrationsspiegel der wirksamen Komponente in regelmäßigen Abständen stereoselektiv bestimmt werden, um eine Entzugssymptomatik mit verstärktem Beigebrauch toxischer Substanzen oder andererseits eine toxische Überdosierung verhindern zu können.

Aus unseren, in den Abbildungen dargestellten Untersuchungen, ergab sich für Probanden mit alleiniger Aufnahme von Racemat bei den Lebenden ein mittleres Verhältnis Levo-/Dextromethadon von 50%, das auch bei einer steigenden Levomethadonkonzentration konstant blieb (siehe Abbildung 3). Bei Leichen lagen im unteren Konzentrationsbereich ähnliche Verhältnisse vor. Interessanterweise zeigte sich bei hohen Konzentrationen an Levomethadon (über 1,0 mg/l) bei Verstorbenen regelmäßig ein Verhältnis Levo-/Dextromethadon von deutlich über 50% (siehe Abbildung 4).

Bei der Verordnung von racemischem Methadon ist nachweislich der individuell unterschiedliche Metabolismus von Methadon und die daraus resultierende Gefahr einer schleichenden Kumulation des wirksamen Levomethadonanteils im Blut zu berücksichtigen.

Rudaz und Mitarbeiter (1999) fordern aus diesen Gründen eine stereoselektive Bestimmung der Methadonkonzentrationen im Patientenblut den ersten Tagen der Neueinstellung, um abzuschätzen, ob die gemessenen Wirkspiegel im therapeutisch gewünschten Bereich liegen. Zwar konnte in ihrer Untersuchung eine Korrelation der verabreichten Methadondosis mit der wirksamen Levomethadonkonzentration im Blut heraus gearbeitet werden, jedoch unter dem Vorbehalt interindividueller Unterschiede. Die stereoselektive Analyse zeigte bei mehr als 50% der Personen ein nicht racemisches Verhältnis der einzelnen Enantiomeren. 25% der Untersuchten verstoffwechselten bevorzugt Levo-

methadon. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wären schwere Intoxikationserscheinungen bis hin zum Tode möglicherweise zu vermeiden.

Über den zellulären Wirkmechanismus der Opiode ist bekannt, dass nach der Besetzung der Opiodrezeptoren durch agonistische Opiode die Kaliumpermeabilität der präsynaptischen Nervenendigung G-Protein-vermittelt erhöht wird. Gleichzeitig wird die Kalziumpermeabilität aufgrund einer verminderten Zahl an Kalziumrezeptoren herabgesetzt (Yang et al. 2000), so dass eine Membrandepolarisation deutlich erschwert wird. Somit sinkt die Neigung zur Freisetzung von Transmittersubstanz an der Synapse, was konsekutiv die Erregungsübertragung beeinflusst und die afferente Impulsleitung im Rückenmark bremst.

Liu et al. (1999) erörtern die unterschiedlichen funktionellen opiat-induzierten Anpassungsvorgänge der G-Proteine als einen nicht unwesentlichen Mechanismus in der Ausbildung einer Opiattoleranz und Abhängigkeit. Die Studie an Neuroblastomzellen zeigt wie es nach einer chronischen Behandlung mit Methadon zu einer verstärkten Reduktion der Bindung der GTP-Untereinheit an G-Proteine kommt. Methadon desensibilisiert demzufolge den Delta-Opiodrezeptor durch eine Entkopplung der G-Proteine vom Opiodrezeptor.

Des Weiteren sollte erwähnt werden, dass diejenigen Neuroblastomzellen, welche mit Methadon vorbehandelt wurden, später nicht mehr auf Heroin ansprachen, das bedeutet Heroin zeigte an diesen Zellen keine pharmakologische Aktivität mehr (Liu et al. 1999).

Um die Opiodrezeptorbindung bei Patienten unter Langzeit-Methadonsubstitution darzustellen, führten Kling und Mitarbeiter (2000) PET-Untersuchungen durch, die sich mit der Bindungskapazität der μ -Opiodrezeptoren in sechs verschiedenen Gehirnregionen befassten. In ausgewählten Zentren, die für die Entstehung einer Abhängigkeit verantwortlich gemacht werden, waren zwischen 20%- 30% mehr Rezeptoren dauerhaft mit Methadon besetzt als bei einer normalen Kontrollgruppe, wobei die Zahl der besetzten Rezeptoren mit der Methadonkonzentration im Serum korrelierte.

Die große Spannweite der individuellen Plasmahalbwertszeit der Stereoisomeren des Methadons betreffend wurden in den letzten Jahren einige neue Erkenntnisse publiziert.

Zunächst ist die Absorption des synthetischen Opioids an biologischen Membranen definitiv ein passiver Diffusionsvorgang und somit nicht stereoselektiv (Schmidt et al. 1992, 1994).

De Vos und Mitarbeiter (1995) negieren den großen Einfluss des Urin-pH-Wertes auf die gesteigerte Ausscheidung des Medikamentes und dessen Metaboliten über die Niere. Vielmehr wird heute die unterschiedliche Plasmaproteinbindung der beiden Enantiomeren für Differenzen in der Pharmakokinetik verantwortlich gemacht.

Die Arbeitsgruppe um Kristensen et al. (1992, 1994, 1996) beschreibt für das inaktive Dextromethadon eine deutlich stärkere Bindung an Plasmaproteine. Somit kann sich das aktive Levomethadon besser im Körper – speziell in Gehirn, Leber und Lunge – verteilen und wird konsequenterweise vermehrt renal eliminiert. Diese Ergebnisse bestätigen die Versuche von Boulton et al. (2000) sowie von Foster et al. (1999, 2000). Die Bindung von Methadon an die Erythrozyten im Blut wird dagegen für nicht stereoselektiv befunden (Kristensen et al. 1992, 1994, 1996).

Die Plasmakonzentration des Levomethadons ist niedriger als die des Dextromethadons. Auch der Metabolismus zu Levo-EDDP ist geringer als der zu Dextro-EDDP. Dies bedeutet eine Mehrausscheidung von Levomethadon und Dextro-EDDP der Patienten über die Niere. Foster et al. (1999, 2000) bewiesen damit die stereoselektive Pharmakokinetik der ungebundenen Methadonfraktion im Blutplasma.

Einen nicht zu vernachlässigenden Faktor in der Methadonkinetik hält die Arbeitsgruppe um de Vos (1995) fest. Der Metabolismus von Methadon kann durch die gleichzeitige Einnahme enzyminduzierender Medikamente wie beispielsweise Isoniacid, Rifampicin oder auch Azidothymidin erheblich beschleunigt werden, so dass in einem konkreten Fall die Plasmahalbwertszeit auf 13 Stunden herabgesetzt war.

Die in der gleichen Studie beschriebene unterschiedliche Elimination des Substitutionsmittels bei männlichen und weiblichen Personen ist unabhängig von Parametern wie Gewicht, Komedikation und Verteilungsvolumen.

Ob man sich hinsichtlich der Verteilung des Medikamentes im Körper mit dem Ein- oder Zwei-Kompartimentmodell anfreunden soll, bleibt umstritten (de Vos et al. 1995, Wolff et al. 2000).

Als erwiesen angesehen werden kann aber in jedem Fall die Tatsache, dass der Plasmaspiegel im Verlauf einer Langzeitbehandlung mit Methadon abnimmt.

Betrachtet man alle diskutierten Ergebnisse, kristallisiert sich keine eindeutige Richtlinie im Umgang mit der racemischen Darreichungsform des Methadons zur Substitutionsbehandlung Drogenabhängiger heraus. Die übereinstimmenden Informationen, die man aus den besprochenen Untersuchungen hinsichtlich der komplexen Pharmakokinetik der Methadonenantiomeren definitiv ableiten kann, erfordern aber mit Sicherheit eine stereoselektive Analyse des wirksamen Anteils an Levomethadon. Nur so kann in der Zukunft eine Optimierung der Dosierung des Medikamentes erfolgen und einer möglichen Kumulation mit letalem Ausgang entgegengewirkt werden. Wünschenswert wäre darüber hinaus eine Reduktion der oft nicht minder toxischen Beigebrauchsstoffe, was durch einen gut eingestellten Wirkspiegel des Methadons im Blut zu erreichen sein sollte.

Mit unserer Arbeit haben wir eine robuste, einfache stereoselektive Methode zur chiralen Separation der beiden Methadonenantiomeren und deren Metaboliten eingeführt, die zur Routineuntersuchung in Methadonprogrammen eingesetzt werden kann und sollte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Deutschland wird Methadon sowohl als Racemat (Dextro-Levomethadon) als auch in der allein wirksamen Form (Levomethadon) als Substitutionsmittel angewandt. Die Wirkung und der Metabolismus von Methadon sind stereoselektiv. Wenn man sich daher insbesondere aus forensischer Sicht der Frage einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von Methadon nähern will, ist eine stereoselektive Analytik Voraussetzung.

Eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Methode wurde hierfür insbesondere zur routinemäßigen Anwendung an Leichenblutproben optimiert: nach flüssig-flüssig Extraktion mit 1-Chlorbutan wurde der Extrakt auf einer Säulenkombination aus 4 cm Cyano- und 10 cm chiraler Alpha-1-Glykoprotein-

Phase mit Acetonitril, 0,01 molarem Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 5,0 Dimethyloctylamin (15/85/0,05) aufgetrennt.

Die Methadon-Enantiomeren eluieren Basislinien-getrennt bei 15 min (Levo-Form) beziehungsweise 18 min (Dextro-Form). Die beiden Metaboliten Levo- und Dextro-EDDP und typische Beigebrauchsstoffe wie beispielsweise Heroin, Kokain, Benzodiazepine, trizyklische Antidepressiva, Antiepileptika stören nicht. Mit dieser Methode wurde das Verhältnis von Levo- und Dextromethadon in 93 Serumproben von lebenden Probanden und 106 Leichenblutproben bestimmt und aus der mit anderen Methoden wie Gaschromatographie/Massenspektrometrie beziehungsweise Reverse Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie ermittelten Gesamtmethadonkonzentration die Levomethadonkonzentration berechnet.

In etwa der Hälfte der Todesfälle lag die Levomethadonkonzentration über 0,3 mg/l, ein Wert, der bei den Lebenden nur in einem Fall überschritten wurde. Bei Racemataufnahme lag das Verhältnis von Levo- und Dextromethadon im Blut bei Lebenden ebenso bei Leichen etwa zwischen 25/75 und 75/25, im Mittel bei 50/50. In Proben aus 1999 wurden in circa 20% der Fälle sowohl bei lebenden als auch bei verstorbenen Drogenabhängigen ausschließlich Levomethadon gefunden. In einigen Fällen war auffallend, dass offensichtlich eine gemischte Versorgung mit Levomethadon plus Racemat erfolgt ist. Anlass zu Bedenken geben Todesfälle mit hohen Levomethadonkonzentrationen (> 1 mg/l), bei denen das Levo-/Dextro-Racematverhältnis ausnahmslos deutlich über 50/50 lag. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass in diesen Fällen eine besonders langsame Metabolisierung von Levomethadon zu einer tödlichen Kumulation des wirksamen Levomethadonanteils geführt hat. Unsere Fälle zeigen die Notwendigkeit einer stereoselektiven Quantifizierung von Levomethadon sowohl zum therapeutischen drug monitoring als auch zur forensischen Diagnostik.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Angelo- HR, Beck- N, Kristensen- K (1999): Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of methadone and its main metabolite in urine using an AGP and a C8 column coupled serially. J Chromatogr B 724: 35-40

Baumann- P (1996): Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the selective serotonin reuptake inhibitors. Clin Pharmacokinet 31: 444-469

Beck- O, Boreus- LO, Lafolie- P, Jacobson- G (1991): Chiral analysis of methadone in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr Biomed Appl 570: 198-202

Bouer- R, Barthe- L, Philibert- C, Tournaire- C, Woodley- J, Houin- G (1999): The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. Clin Pharmacol 13: 494-500

Boulton- DW, Devane- CK (2000): Development and application of a chiral high performance liquid chromatography assay for pharmacokinetic studies of methadone. Chirality 12: 681-687

Bowdle- TA, Kharasch- ED, Mautz- DS, Lakshminarayanan- S, Hussey- JD, Schoene- RB (1997): Methadone undergoes stereospecific clearance. Anaesth Anal 71st Clin Scient Congr Int Anaesth Res Soc, San Francisco, USA

BtMÄndV: Fünfte Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften (Fünfte Betäubungsmittelrechtsänderungsverordnung)

BtMG: Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz)

BtMVV: Verordnung über das Verschreiben, die Abgabe und den Nachweis des Verbleibs von Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelverschreibungsverordnung)

Chizh- BA, Schlutz- H, Scheede- M, Englberger- W (2000): The N-methyl-D-aspartate antagonistic and opioid components of d-methadone antinociception in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 296: 117-120

ChromTech User's Guide (1998): Separation of chiral compounds on CHIRAL-AGP, CHIRAL-CBH, CHIRAL-HSA. 2nd ed. Chrom Tech Application not no. 17, Hägersten, Schweden

Eap- CB, Bourquin- M, Martin- J, Spagnoli- J, Livoti- S, Powell- K, Baumann- P, Deglon- J (2000): Plasma concentrations of the enantiomers of methadone and therapeutic response in methadone maintenance treatments. *Drug Alcohol Depend* 61: 47-54

Eap- CB, Cuendet- C, Baumann- P (1990): Binding of d-methadone, l-methadone and dl-methadone to protein in plasma of healthy volunteers: role of the variants of α 1-acid glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 47: 338-346

Eap- CB, Finkbeiner- T, Gastpar- M, Scherbaum- N, Powell- K, Baumann- P (1996): Replacement of (R)-methadone by a double dose of (R, S)-methadone in addicts: interindividual variability of the (R)/(S) ratios and evidence of adaptive changes in methadone pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 50: 385-389

Fraser- HF, Isbell- H (1962): Human pharmacology and addictiveness of certain dextroisomers of synthetic analgesics: I. d-3-hydroxy-N-phenethylmorphinan. II. d-3-methoxy-N-phenethylmorphinan. III. d-methadone. *Bull Narc* XIV: 25-35

Foster- DJ, Somogyi- AA, Bochner- F (1999): Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br J Clin Pharmacol* 47: 403-412

Foster- DJ, Somogyi- AA, Dyer- KR, White- JM, Bochner- F (2000): Steady-state pharmacokinetics of (R)- and (S)-methadone in methadone maintenance patients. *Br J Clin Pharmacol* 50: 427-440

Galloway- FR, Bellet- NF (1999): Methadone conversion to EDDP during GC-MS analysis of urine samples. *J Anal Toxicol* 23: 615-619

Garrido- MJ, Aguirre- C, Troconiz- IF, Marot- M, Valle- M, Zamacona- MK, Calvo- R (2000): Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) and serum protein binding of methadone in heroin addicts with abstinence syndrome. *Int J Clin Pharmacol* 38: 35-40

Kintz- P, Eser- HP, Traqui- A, Moeller- M, Cirimele- V, Mangin- P (1997): Enantioselective separation of methadone and its main metabolite in human hair by liquid chromatography/ion spray-mass spectrometry. *J Forensic Sci* 42: 291-295

Kintz- P et al. (1998): Enantioselective analysis of methadone in sweat as monitored by liquid chromatography ion spray-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 20: 35-40

Kling- MA, Carson- RE, Borg- L, Zametkin- A, Matochik- JA, Schluger- J, Herscovitch- P, Rice- KC, Ho- A, Eckelman- WC, Kreek- MJ (2000): Opioid receptor imaging with positron emission tomography and [(18) F] cyclofoxy in long-term, methadone-treated former heroin addicts. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1070-1076

Kreek- MJ, Hachey- DL, Klein- PD (1995): Stereoselective disposition of methadone in man. *Life Sci* 24: 925-932

Kristensen- K, Angelo- HR (1992): Stereoselective determination of the enantiomers of methadone in plasma using high-performance liquid chromatography. *Chirality* 4: 263-267

Kristensen- K, Angelo- HR, Blemmer- T (1994): Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of methadone in serum using an AGP and a CN column as chiral and analytical column, respectively. *J Chromatogr A* 666: 283-287

Kristensen- K, Blemmer- T, Angelo- HR, Christrup- LL, Drenck- NE, Rasmussen- SN, Sjogren- P (1996): Stereoselective pharmacokinetics of methadone in chronic pain patients. *Ther Drug Monit* 18: 221-227

Lanz- M, Thormann- W (1996): Characterisation of the stereoselective metabolism of methadone and its primary metabolite via cyclodextrin capillary electrophoretic determination of their urinary enantiomers. *Electrophoresis* 17: 1945-1949

Leavitt- SB, Shinderman- M, Maxwell- S, Eap- CB, Paris- P (2000): When “enough” is not enough: new perspectives on optimal methadone maintenance dose. *Mt Sinai J Med* 67 : 404-411

Liu- JG, Gong- ZH, Qin- BY (1999): Effects of low-pH treatment on camp second messenger system regulated by different opioid agonists. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20: 500-504

Liu- JG, Liao- XP, Gong- ZH, Qin- BY (1998): Methadone-induced desensitisation of the delta-opioid receptor is mediated by uncoupling of receptor from G protein. *Eur J Pharmacol* 324: 301-308

Mahler- H, Pasi- A, Daldrup- T (1998): Letale Methadonintoxikation ohne Beteiligung weiterer Pharmaka. *Rechtsmedizin* 8 (Suppl I) V-41

Misra- AL, Mulé- SJ, Bloch- R (1973): Stereoselectivity and differential metabolism in vivo of dextro- and levo-methadone-1-3H. *Nature* 241: 281-283

Nakamura- K, Hachey- DL, Kreek- MJ, Irving- CS, Klein- PD (1982): Quantitation of methadone enantiomers in humans using stable isotope-labeled [2H3]-, [2H5]-, and [2H8] methadone. J Pharm Sci 71: 41-43

Olsen- GD, Wendel- HA, Livermore- JD, Leger- LM, Lynn- RK, Gerber- N (1977): Clinical effects and pharmacokinetics of racemic methadone and its optical isomers. Clin Pharmacol Ther 21: 147-157

Pert- CB, Snyder- SH (1973): Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science 179: 1011-1014

Risak- D, Keil- I, Sittl- R (1996): Plasma concentration (Pharmacokinetic) controlled application of cancer pain patients. 8th World Congress on pain, Int Assoc for study of pain Vancouver, Brit Col, Canada

Roider- G, Drasch- G, Meyer- L von, Sachs- H, Bahle- H (1996): Der Drogenbeikonsum zu Methadon. Poster zur 75. Tagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Zürich

Roth- HJ (2000): Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

Rudaz- S, Veuthy- JL (1996): Stereoselective determination of methadone in serum by HPLC following solid-phase extraction on disk. J Pharm Biomed Anal 14: 1271-1279

Rudaz- S, Ortelli- D, Gex- Fabry- M, Deglon- JJ, Balant- L, Veuthy- JL (1999): Development of validated stereoselective methods for methadone determination in clinical samples. Chirality 11: 487-494

Schmidt- N, Brune- K, Geisslinger- G (1992): Stereoselective determination of the enantiomers of methadone in plasma using high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 583: 195-200

Schmidt- N, Brune- K, Williams- KM, Geisslinger- G (1994): Stereoselective pharmacokinetics of methadone in beagle dogs. *Chirality* 6: 492-495

Schmoldt- A, Iwersen- S, Chorzelski- G (1997): Enantioselektive Analyse von d, l-Methadon bei 35 Substituierten nach Umstellung von l-Methadon auf d, l-Methadon. In: Pragst- F (Hrsg.) Beiträge zum X. Symposium der GTFCh, Mosbach

Schulz- M, Schmoldt- A (1997): Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs. *Pharmazie* 52: 895-912

Scott- CC, Robbins- EB, Chen- KK (1948): Pharmacological comparison of the optical isomers of methadone. *J Pharmacol Exp Ther* 92: 282-286

Torrens- M, Castillo- C, San- L, Moral- E del, Gonzales- ML, Torre- R de la (1998): Plasma methadone concentrations as an indicator of opioid withdrawal symptoms and heroin use in a methadone maintenance program. *Drug Alcohol Depend* 52: 193-200

Vos- JW de, Geerlings- PJ, Brink- W van den, Ufkes- JG, Wilgenburg- H van (1995): Pharmacokinetics of methadone in 20 opiate addicts. *Eur J Clin Pharmacol* 48: 361-366

Wolff- K, Rostami- Hodjegan- A, Hay- AW, Raistrick- D, Tucker- G (2000): Population-based pharmacokinetics approach for methadone monitoring of opiate addicts: potential clinical utility. *Addiction* 95: 1771-1783

Yang- JC, Shan- J, Ng- KF, Pang- P (2000): Morphine and methadone have different effects on calcium channel currents in neuroblastoma cells. *Brain Res* 870: 199-203

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. W. Eisenmenger, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München, danke ich für die Ermöglichung dieser Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med habil. G. Drasch für seine ständige Betreuung und hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit. Mit seiner konstruktiven Kritik sowie seinen zahlreichen fachlichen Anregungen hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. rer. biol. hum. G. Roider sowie allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Assistenten der toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr Verständnis während der Arbeitsphase im Labor.

Herzlich bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei meinen Eltern, die mir mein Medizinstudium und diese Arbeit ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Denise Beate Quitterer

Geburtsdatum: 08.08.1975

Geburtsort: Eggenfelden

Nationalität: deutsch

Eltern: Dr. Gerald und Irmgard Quitterer

Familienstand: verheiratet mit Olaf Ralf Schukai

Kind: Paul Vincent Schukai

Schulbildung

1981-1985 Grundschule Eggenfelden

1985-1994 Karl-von-Closen Gymnasium Eggenfelden

Hochschulbildung

1994-1996 Studium der Chemie, Leopold-Franzens Universität Innsbruck

1996-2002 Studium der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München

Praktisches Jahr

1. Terial: Chirurgische Abteilung, Akademisches Lehrkrankenhaus Traunstein,
Ltd. Ärzte: Prof. Dr. Ketterl, Dr. Klein, Dr. Kohl
2. Terial: Innere Abteilung, Akademisches Lehrkrankenhaus Augsburg,
Chefarzt: Prof. Dr. von Scheidt
3. Terial: Dermatologische Abteilung, Akademisches Lehrkrankenhaus
München-Schwabing, Chefarzt: Prof. Dr. Stolz

Ärztin im Praktikum

Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie,

Bezirkskrankenhaus Landshut

Chefarzt Dr. von Aster