

## **Die Aussagekraft des Emit-dau Systems bei Leichenurinuntersuchungen\***

**S. Szathmary und T. Daldrup**

Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf, Moorenstr. 5, D-4000 Düsseldorf,  
Bundesrepublik Deutschland

### **The Performance of Emit-dau in the Analysis of Postmortem Urine**

**Summary.** Randomly taken postmortem urine samples (170) were analyzed by the Emit-dau system for their barbiturate and benzodiazepine content. Of the samples, 23% and 25% were found positive for barbiturate and benzodiazepine, respectively. The percentages of the positive samples were reduced by a heating process to 9% and 11%, respectively. TLC and Emit-st were used for reference procedures. The relative high percentage (above 30%) of the urine samples analyzed exhibited elevated lysozyme activity and protein value. It was found that the disturbing proteins in the Emit-dau system contained not only endogene lysozyme but other thermolabile fractions with higher molecular weight.

**Key words:** Investigation of postmortem urines, Emit-dau - Emit-dau, disturbances - Toxicology, Emit-dau

**Zusammenfassung.** 170 unausgewählte Leichenurinproben wurden mit dem Emit-dau System auf Barbiturate und Benzodiazepine geprüft. 23% der Proben zeigten für Barbiturate und 25% für Benzodiazepine ein positives Ergebnis. Nach Hitzebehandlung konnte der positive Befundanteil deutlich auf 9 bzw. 11% reduziert werden. Die Kontrolluntersuchungen wurden mit dem Emit-st bzw. mit DC-Methoden durchgeführt. Ein relativ hoher Anteil (über 30%) der untersuchten Leichenurinproben enthielten erhöhte Lysozym- und/oder Proteingehalte. Es wurde festgestellt, daß die Emit-dau Methode nicht nur durch endogenes Lysozym, sondern auch durch andere thermolabile Proteine mit höherem Molekulargewicht gestört wird.

**Schlüsselwörter:** Leichenurinuntersuchungen, Emit-dau - Emit-dau, Störungen - Toxikologie, Emit-dau

Zahlreiche Untersuchungen sind über die Brauchbarkeit enzymimmun-chemischer Verfahren für die toxikologische Analytik erschienen. Wurden als Unter-

\* Herrn Prof. Dr. H. Schweitzer zum 65. Geburtstag gewidmet

Sonderdruckerfragen an: Priv.-Doz. Dr. T. Daldrup (Adresse siehe oben)

suchungsmaterial Körperflüssigkeiten von lebenden Personen eingesetzt, stimmten die mit Emit-Methoden erhaltenen Ergebnisse in der Mehrzahl der Fälle mit den Befunden anderer Analysenmethoden (GC/MS, RIA und DC) überein [1, 4, 5, 7, 10, 11]. Wir stellten uns die Frage, ob die Emit-Verfahren auch für Leichenurine eingesetzt werden können. Hierzu wurden 170 unausgewählte Urinproben mit dem Emit-dau System untersucht.

## Material und Methode

*EIA:* Die Emit-dau (Syva-Merck) Untersuchungen der Urinproben erfolgten nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers mit dem Emit-Lab System II (Gilford). Die Emit-st (Syva-Merck) Messungen wurden mit dem Spektrophotometer 24 (Beckman) durchgeführt.

*Dünnschichtchromatographie:* A) Barbiturate: Die Urinproben wurden bei pH 8 mit Äther-Äthylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden in Methanol aufgenommen und auf Kieselgelplatten (Merck) chromatographiert. Fließmittel: Chloroform/Aceton 4:1, Färbungen: 1% Quecksilbernitrat bzw. 0,2% Diphenylcarbazon in Ethanol.

B) Benzodiazepine: Nach Salzsäurehydrolyse der Urine und Extraktion mit Äther wurden die Benzodiazepinhydrolyseprodukte, wie von Schütz [8] vorgeschlagen, nachgewiesen.

*Proteinbestimmung:* Die Proteinbestimmung erfolgt mit Biuretreakanz nach Gornall et al. [2].

*Lysozymaktivität:* Die Lysozymaktivität wurde nach Shugar [9] bestimmt. Als Bezugssubstanz diente Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma: L-6876) mit einer Aktivität von 37 500 U/mg.

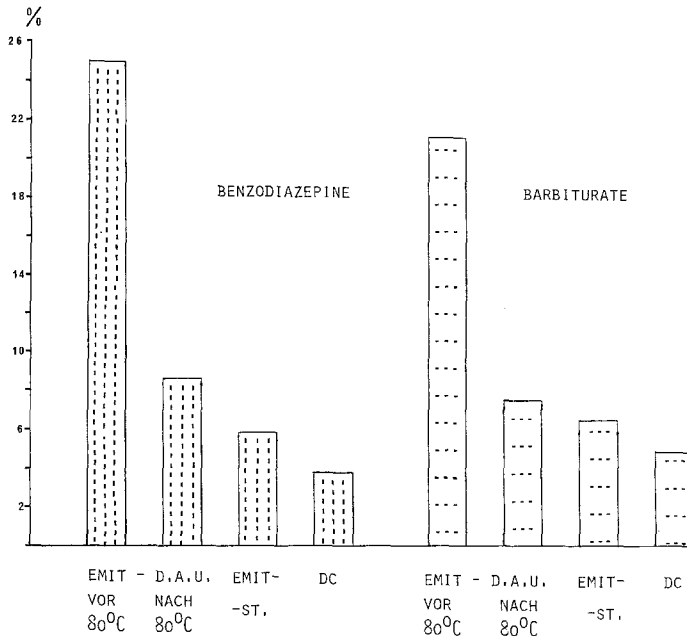
*Ultrafiltration:* Die Ultrafiltration der Urine erfolgte mit dem Druckfiltrationsgerät Typ SM 16524 (Fa. Sartorius). Die asymmetrischen Filter aus Zelluloseacetat hatten eine Ausschlußgrenze von MG 10 000 (SM 145 39-025 N) bzw. MG 20 000 (SM 145 49-025 N).

## Ergebnisse

Von den 170 unausgewählten Leichenurinproben, die mit der Emit-dau Methode untersucht wurden, zeigten 25% bei den Benzodiazepinen und 23% bei den Barbituraten ein positives Ergebnis. Dieser Anteil konnte nach Hitzebehandlung bei 80°C (15 min) wesentlich reduziert werden (Abb. 1). Die Urinproben, die auch nach thermischer Behandlung positive Ergebnisse lieferten, wurden mit der DC und mit dem Emit-single test, bei dem im Unterschied zum Emit-dau Glucose-6-PDH zur Enzymmarkierung verwendet wird, nachuntersucht. Nach dem Ergebnis der Dünnschichtchromatographie wurden die Proben in DC positiv und DC negativ aufgeteilt und von diesen der Proteingehalt, die endogene Lysozymaktivität und der pH-Wert bestimmt.

Zwischen dem pH-Wert und den DC positiv bzw. DC negativ Proben ist kein direkter Zusammenhang feststellbar. Anders beim Proteingehalt und der Lysozymaktivität (Tabelle 1). Hier findet man deutlich erhöhte Lysozymaktivitäten bzw. Proteingehalte bei den Proben, die mit dem Emit-dau positiv waren, aber mit der DC nicht bestätigt werden konnten.

Der Zusammenhang zwischen Proteingehalt und Enzymaktivität wurde, bezogen auf eine größere Anzahl von Proben, näher untersucht (Abb. 2). Abge-



**Abb. 1.** Prozentualer Anteil positiver Emit-dau Befunde der Leichenurinproben und Ergebnisse der Nachuntersuchungen

**Tabelle 1.** Proteingehalt bzw. Lysozymgehalt der trotz Hitzebehandlung Emit-dau positiven Urinproben

	Proben			
	DC-positiv		DC-negativ	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
Proteingehalt (mg/ml)	0.08 (n=12)	0.05-0.25	0.25 (n=11)	0.05- 0.8
Lysozymgehalt (µg/ml)	0 (n=11)	0	4 (n=12)	0 -25

sehen von der großen Streuung wurden 2 charakteristische Merkmale festgestellt:

1. Ein großer Anteil (über 30%) der untersuchten Leichenurinproben lieferten erhöhte endogene Lysozymaktivität.

2. Abgesehen von einigen Ausnahmen kann festgehalten werden, daß die Leichenurinproben, die einen höheren Proteingehalt aufwiesen, auch signifikant höher liegende Enzymgehalte ergaben. In Zahlen ausgedrückt: Die Proben mit Lysozymgehalt unter 5 µg/ml zeigten im Mittel einen Proteingehalt von 0,1 mg/ml, während die Proben mit höherem Lysozymgehalt einen mittleren Proteingehalt von 0,5 mg/ml zeigten. Als Bezugssubstanz zur Ermittlung des Lysozymgehaltes diente Lysozym aus Hühnereiweiß.

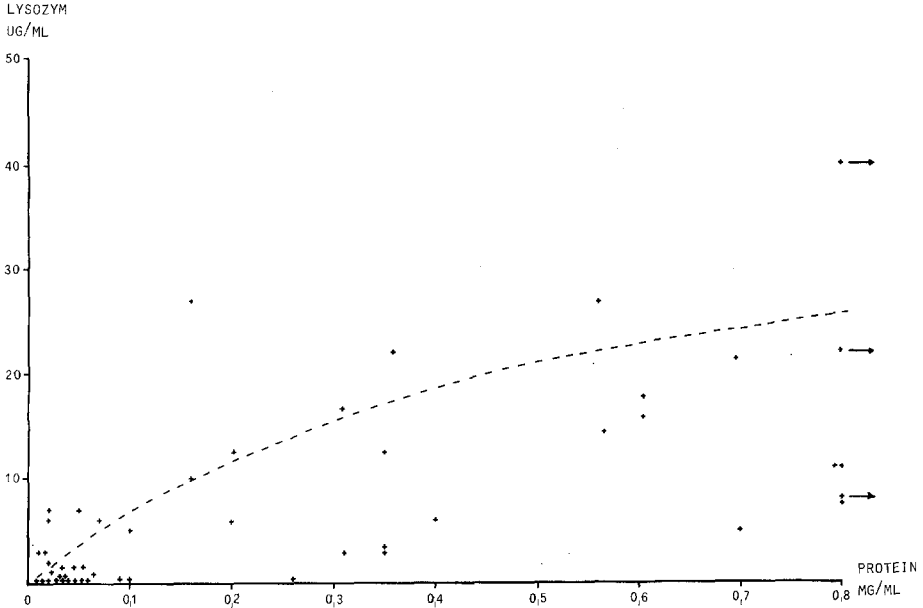


Abb. 2. Zusammenhang zwischen Lysozym- und Proteingehalt in unausgewählten Leichenurinproben

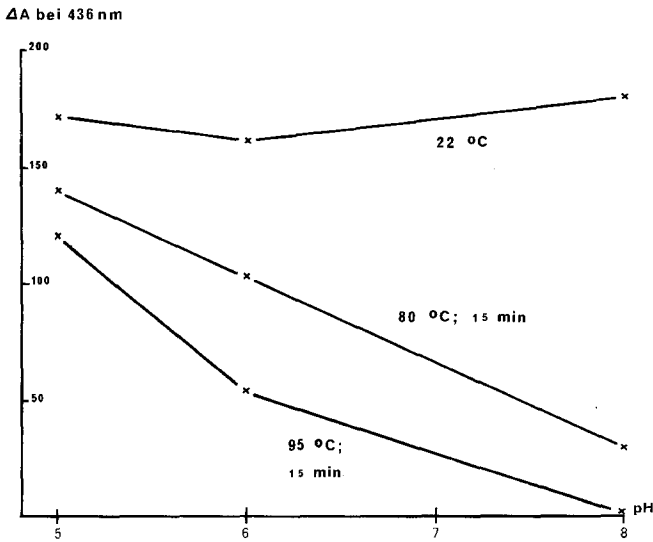
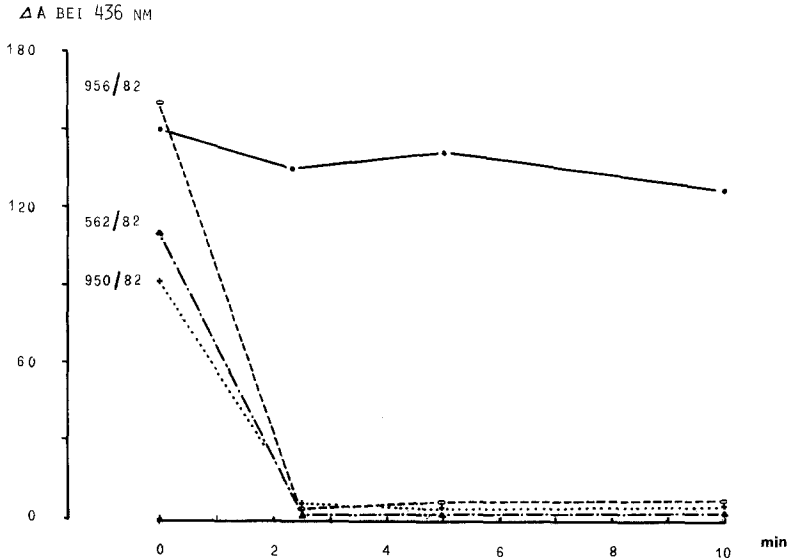


Abb. 3. Veränderung der Aktivität des Lysozyms in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Art der Hitzebehandlung

Aufgrund der abwesenden Linearität zwischen der Lysozymaktivität und dem entsprechenden Proteingehalt liegt die Vermutung nahe, daß außer endogenem Lysozym auch andere zytolytisch wirksame Proteine die Emit-dau Messung stören. Dieser Verdacht konnte durch Untersuchungen zur Thermostabilität bzw. durch Molekulargewichtsbestimmungen erhärtet werden.



**Abb. 4.** Veränderung der zytolytischen Aktivität von Leichenurinen in Abhängigkeit vom pH-Wert (siehe Text) und der Dauer der Hitzebehandlung bei 80° C. Durchgezogene Linie: Mit Lysozym (20 µg/ml) versetzter Leerurin

Ausschlußgrenze MG	20 µg/ml reines Lysozym im inaktiven Urin	Leichenurinproben		
		956/82	562/82	950/82
20 000	90%	26%	22%	17%
10 000	29%	14%	7%	8%

**Tabelle 2.** Vergleich der zytolytischen Restaktivität im Ultrafiltrat von mit Lysozym versetztem Urin bzw. Leichenurinen

Hierzu wurden Urinproben auf pH-Werte zwischen 5 und 8 eingestellt, mit Lysozym versetzt und 15 min bei 22° C, 80° C bzw. 95° C inkubiert. Es zeigte sich die bekannte thermische Stabilität des Lysozyms bei sauren pH-Verhältnissen (Abb. 3) [3, 6]. Die drei Leichenurinproben, die alle erhöhte Lysozymaktivität sowie Proteingehalte aufwiesen und die aufgrund ihrer unterschiedlichen pH-Werte (950/82: pH 5,18, 562/82: pH 6,41, 956/82: pH 8,43) ausgewählt wurden, verloren dagegen unabhängig vom pH-Wert innerhalb von wenigen Minuten jegliche meßbare zytolytische Aktivität (Abb. 4).

Sowohl der mit Lysozym versetzte Urin, als auch die drei ausgewählten Leichenurinproben wurden einer Ultrafiltration mit einer Ausschlußgrenze von 20 000 bzw. 10 000 unterworfen. Bei dem mit Lysozym (MG 14 000) versetzten Urin zeigte das Ultrafiltrat bei 20 000 Ausschlußgrenze noch 90% der ursprünglichen Aktivität, während bei den Leichenurinen die Aktivität bereits bei dieser Ausschlußgrenze auf 17% bis 26% abgefallen war (Tabelle 2).

## Diskussion

Die hier erhobenen Befunde zeigen eindeutig, daß Leichenurine für eine direkte Emit-dau Messung ungeeignet sind. Der Anteil offensichtlich falsch-positiver Ergebnisse ist bei diesem Untersuchungsmaterial unvertretbar hoch. Die bisherigen in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen über die Anwendung des Emit-dau wurden fast ausnahmslos mit Urinproben, die von lebenden Personen stammten, durchgeführt [1, 4, 7, 10, 11]. Hierher weiß man, daß der Gehalt an endogenem Lysozym eine Höhe erreichen kann, die zu einer Störung im Sinne einer falsch-positiven Messung führt. Als weitere mögliche Fehlerursache kommen kreuzreagierende Substanzen in Frage. In den von uns untersuchten Leichenurinen scheinen kreuzreagierende Substanzen nicht die Ursache für den hohen positiv-Befundanteil zu sein, da dieser durch einfaches Erhitzen der Probe deutlich zurückgedrängt werden konnte. Auch sprechen die nur geringen Übereinstimmungen der Emit-st Befunde mit den Emit-dau Befunden gegen das Vorliegen derartiger Störsubstanzen. Die Ursache für die Fehler muß also im Meßprinzip des Emit-dau Systems liegen. Hier wird, wie bekannt, die Restaktivität zugesetzten Lysozyms gemessen. Stärkere pH-bedingte Aktivitätsverschiebungen, verursacht durch die unterschiedlichen pH-Werte der Urine, wurden als Fehlerursache ausgeschlossen.

Es konnte keine Korrelation zwischen pH-Wert des Urins und fehlerhaften Emit-dau Befunden festgestellt werden. Dies ist auch durch den sehr flachen Verlauf der Aktivitäts-/pH-Wert-Kurve des Lysozyms zu erklären.

Als Ursache verbleibt die erhöhte Lysozymkonzentration in postmortalen Urinen, die laut den Untersuchungen von Fenton et al. [2] im Mittel um den Faktor 6 höher liegt, als in Urinen von Lebenden. Im vorliegenden Kollektiv konnte in über 30% der Leichenurinproben eine erhöhte zytolytische Aktivität festgestellt werden, die aber aufgrund der fehlenden engen Linearität zum Gesamtproteingehalt nicht allein durch Lysozym bedingt sein konnte. Diese Vermutung wurde durch weitere Ergebnisse erhärtet. Lysozym ist, insbesondere im sauren Medium, vergleichsweise thermostabil. Die Untersuchungen mit Urinproben unterschiedlichster pH-Werte, denen Lysozym aus Hühnereiweiß zugesetzt wurde, bestätigen diese pH-abhängige Thermostabilität, die dazu führt, daß eine 15minütige Behandlung bei 80°C nicht in jedem Fall ausreichen kann, um alles Enzym zu inaktivieren. Die Leichenurine waren aber, unabhängig vom pH-Wert, bereits nach 2 bis 3 min inaktiviert. Dies bedeutet, daß andere Proteine mit Molekulargewichten über 20 000 im Leichenurin vorhanden sind, wie die Ultrafiltrationsbefunde zeigen, die thermisch labiler sind als das Lysozym, die aber ebenfalls zytolytisch wirksam sind und zu einer Störung der Emit-dau Messung führen.

## Schlußbetrachtung

Die Untersuchungen haben demnach zeigen können, daß eine Prüfung von Leichenurinen mit dem Emit-dau ohne vorherige Hitzebehandlung wenig sinnvoll ist. Für Leichenurinuntersuchungen sind möglicherweise die Enzymimmu-

noassays, die ohne Lysozym als Markierungsenzym arbeiten, wesentlich vorteilhafter einsetzbar.

## Literatur

1. Fenton J, Schaffer M, Wu Chen N, Bermes EW (1980) A comparison of enzyme immunoassay and GC/MS in forensic toxicology. *J Forensic Sci* 25 : 314-319
2. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J Biol Chem* 177 : 751-766
3. Jollès P (1960) Lysozyme. In: Boyer PD, Lardy H, Myrbäck K (eds) *The enzymes*, vol 4. Academic Press, New York London, pp 431-445
4. Mulé SJ, Bastos ML, Jukofsky D (1974) Evaluation of immunoassay methods for detection, in urine, of drugs subject to abuse. *Clin Chem* 20 : 243-248
5. Poklis A (1981) An evaluation of EMIT®-dau benzodiazepine metabolite assay for urine drug screening. *J Anal Toxicol* 5 : 174-176
6. Salton MRJ (1957) The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bact Rev* 21 : 82-99
7. Schneider RS, Lindquist P, Tong-in Wong E, Rubenstein KE, Ullman EF (1973) Homogeneous enzyme immunoassay for opiates in urine. *Clin Chem* 19 : 821-825
8. Schütz H (1981) Screening von Benzodiazepinen. *Dtsch Apoth Ztg* 121 : 1816-1823
9. Shugar D (1952) The measurement of lysozyme activity and the UV inactivation of lysozyme. *Biochem Biophys Acta* 8 : 302-309
10. Slooten EJP van der, van der Helm HJ (1976) Comparison of the EMIT opiate assay and a GC-MS determination of morphine and codeine in urine. *Clin Chem* 22 : 1110-1111
11. Spiehler VR, Reed D, Cravey RH, Wilcox WP, Shaw RF, Holland S (1975) Comparison of results for quantitative determination of morphine by RIA, EIA and spectrofluorometry. *J Forensic Sci* 20 : 647-655

Eingegangen am 14. Oktober 1983