

**Methoden und Methodenkombination zur forensisch-
toxikologischen Haaranalytik und Anwendung in klinischen
Studien**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katrin Lachenmeier

aus

Bonn-Bad Godesberg

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2006

1. Referent: Prof. Dr. B. Madea
2. Referent: Prof. Dr. K.-J. Steffens

Tag der Promotion: 20.06.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis März 2006 am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Burkhard Madea durchgeführt.

Zusammenfassung

Angesichts des dramatisch zunehmenden Drogen- und Schmerzmittelmissbrauchs ist die Entwicklung und Weiterentwicklung der Haaranalytik als Ergänzung zu Blut- und Urintests eine aktuelle und dringende Aufgabe der forensischen Toxikologie. In diesem Zusammenhang wurde mit der vorliegenden Arbeit eine Methodenkombination aus immunochemischem Vortest (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) und gaschromatographisch-massenspektrometrischer (GC/MS) Bestätigung entwickelt und ihre Leistungsfähigkeit für die forensisch-toxikologische Untersuchung von Opiaten, Cocain und Cocainmetaboliten in Haarproben getestet. Weiterhin wurde eine neue Screeningmethode mittels Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS-MS) zur Bestimmung von Opioidanalgetika erarbeitet. Alle vorgestellten Untersuchungsverfahren wurden nach neuesten Richtlinien validiert und lieferten sehr zufrieden stellende Daten hinsichtlich sämtlicher relevanter Validierungsparameter. Die Methoden sind nachweislich empfindlich und robust genug, um auch in der Routineanalytik Anwendung zu finden und bei Gerichtsverfahren Bestand zu haben.

Die Anwendbarkeit der im Rahmen der Arbeit entwickelten und validierten sowie bereits bestehender Methoden zur Methadon-, Cannabinoid- und Amphetaminbestimmung konnte anhand der Untersuchung von Haarproben mehrerer großer Probandenkollektive eindrucksvoll belegt werden. Es ist ein Glücksfall, dass eine Einbindung der vorliegenden Arbeit in diese umfangreichen Studien möglich war, da die Interpretation der Ergebnisse bei Untersuchungen inkorporierter Fremdstoffe in Haaren in Ermangelung zuverlässiger Daten in der Vergangenheit ein großes Problem darstellte. Aus diesem Grunde umfasst die vorliegende Arbeit auch eine statistische Bewertung und kritische Interpretation der erlangten Analysendaten.

Ausgewertet wurden hierbei Haarproben von großen Patientenkollektiven aus der kontrollierten Vergabe von Heroin (n=48) und Methadon (n=41), Haare von Patienten aus konventionellen Drogenentgiftungsprogrammen (n=51), Haare von im Zusammenhang mit Opiatabusus Verstorbener (n=24), sowie Haare von Patienten aus palliativmedizinischer Behandlung (n=31). Erstmals war damit eine umfangreiche

Basis an Daten verfügbar, deren Auswertung zuverlässige Aussagen über Dosis-Konzentrationsbeziehungen zwischen aufgenommener Drogenmenge und Haarkonzentration ermöglichte.

Korrelationen zwischen aufgenommener Drogendosis und den in Haarproben nachweisbaren Analytkonzentrationen konnten sowohl nach kontrollierter Heroinvergabe ($r=0,66$) als auch innerhalb der Methadonkontrollgruppe ($r=0,91$) ermittelt werden. Bei einem konventionellen Drogenentgiftungsprogramm konnte mit der Haaranalyse eine wesentlich bessere Übereinstimmung zu den Angaben der Patienten bezüglich ihrer Konsumgewohnheiten belegt werden, als dies mit Urintests möglich ist. Im Zusammenhang mit der kontrollierten Heroinvergabe wurde weiterhin die Wertigkeit von Acetylcodein als Marker für einen Konsum von Straßenheroin untersucht. Die Möglichkeiten und Grenzen der Haaranalytik im Hinblick auf Therapiemonitoring und Patienten-Compliance wurden am Beispiel der Gabe von Opioidanalgetika im Rahmen einer palliativmedizinischen Behandlung gezeigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Madea, Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, danke ich sehr für die wissenschaftliche Betreuung und wohlwollende Begleitung dieser Arbeit. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens, Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Zweitbetreuungsverhältnisses.

Herzlichen Dank an Herrn PD Dr. F. Mußhoff, Toxikologische Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin, für die Bereitstellung des Themas, die Förderung dieser Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch meinem Bruder Herrn Dr. D.W. Lachenmeier für die Einführung in die multivariate Statistik, seine stets hilfsbereite Unterstützung mit Rat und Tat, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sowie für die Kooperation mit dem CVUA Karlsruhe, die zu zahlreichen Veröffentlichungen führte.

Frau Dr. H. Wollersen, Herrn J. Trafkowski, Frau U. Küpper und Herrn M. Witte, Toxikologische Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin, danke ich für ihre Anregungen und gute Zusammenarbeit.

Für die entgegengebrachte Kollegialität, Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich allen Mitarbeitern am Bonner Institut für Rechtsmedizin, insbesondere der Toxikologischen Abteilung, danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. H. Sachs und Frau G. Schwarz, FTC München, für ihre Vorarbeiten und ihre Einführung auf dem Gebiet der ELISA-Technologie, sowie Herrn W. Jegutzki, BioRad München, für die technische Unterstützung und die Bereitstellung der ELISA Kits.

Schließlich möchte ich herzlich meinen Eltern, Joachim, Astrid und meinen Freunden danken, die mich zur Durchführung dieser Arbeit ermutigten, sowie für ihre fortwährende Unterstützung, ihr entgegengebrachtes Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft.

Publikationen

Vorveröffentlichungen von Dissertationsteilen

F. Musshoff, K. Lachenmeier, D. Lichtermann, B. Madea, Cocaine and opiate concentrations in hair from subjects in a heroin-maintenance program in comparison to a methadone-substituted group. In Vorbereitung.

F. Musshoff, K. Lachenmeier, J. Trafkowski, U. Stamer, F. F. Nauck, B. Madea, Determination of analgesic opioids in hair samples using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). In Vorbereitung.

K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea, Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic-mass spectrometric (GC/MS) confirmation. *Forensic Science International*. 159 (2006) 189-199.

F. Musshoff, F. Driever, K. Lachenmeier, D.W. Lachenmeier, M. Banger, B. Madea, Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests. *Forensic Science International* 156 (2006) 118-123.

F. Musshoff, K. Lachenmeier, D. W. Lachenmeier, H. Wollersen, B. Madea, Dose-Concentration Relationships of Methadone and EDDP in Hair of Patients on a Methadone-Maintenance Program. *Forensic Science, Medicine and Pathology* 1 (2005) 97-104.

F. Musshoff, K. Lachenmeier, H. Wollersen, D. Lichtermann, B. Madea, Opiate concentrations in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program and from opiate-associated fatalities. *Journal of Analytical Toxicology* 29 (2005) 345-352.

Weitere Publikationen

K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea, D.W. Lachenmeier, Application of experimental design to optimise solid-phase microextraction of orange juice flavour. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. Im Druck.

K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea, H. Reusch, D.W. Lachenmeier, Authentication of Noni (*Morinda citrifolia*) juice. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. Im Druck.

K. Lachenmeier, U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea, H. Reusch, D.W. Lachenmeier, Quality control of Aloe vera beverages. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 4 (2005) 1033-1042.

K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea, E.-M. Sohnius, W. Frank, D.W. Lachenmeier, Bestimmung von Anethol in Spirituosen - Vergleich von Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Festphasenmikroextraktion (HS-SPME). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 101 (2005) 187-192.

K. Lachenmeier, D.W. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea, Bestimmung von Cannabinoiden in hanfhaltigen Lebensmitteln mittels HS-SPME/GC/MS. *Lebensmittelchemie* 58 (2004) 65.

Inhalt

<i>Zusammenfassung</i>	<i>I</i>
<i>Danksagung</i>	<i>III</i>
<i>Publikationen</i>	<i>IV</i>
<i>Inhalt</i>	<i>VI</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>X</i>
1. Einleitung	1
1.1. Problemstellung	1
1.2. Ziel der Arbeit	3
2. Grundlagen und Stand der Technik	4
2.1. Grundlagen der Haaranalytik	4
2.1.1. Aufbau der Haare	4
2.1.2. Einbau von Drogen in Haare	6
2.2. Relevante Analyten in der Haaranalytik	7
2.3. Strukturformeln der Analyten	10
2.4. Stand der Technik der Haaranalytik	15
2.4.1. Probenvorbereitung	15
2.4.1.1. Dekontamination	15
2.4.1.2. Probenaufschluss und -extraktion	16
2.4.1.3. Substanzanreicherung und Reinigung	16
2.4.1.4. Derivatisierung	17
2.4.2. Instrumentelle Analyseverfahren für die Haaranalytik	19
2.4.2.1. Grundlagen der ELISA Tests	20
2.4.2.2. Grundlagen der GC/MS	22
2.4.2.3. Grundlagen der LC/MS-MS	23
2.4.3. Einführung in die Qualitätskontrolle	25
2.4.4. Grundlagen einer Validierung	26

2.4.4.1.	Linearität	26
2.4.4.2.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	26
2.4.4.3.	Genauigkeit	27
2.4.4.4.	Wiederfindung	27
2.4.4.5.	Stabilität	27
2.5.	Grundlagen von Patienten-Monitoring und Therapie-Compliance.....	28
3.	<i>Experimenteller Teil</i>.....	30
3.1.	Chemikalien.....	30
3.2.	Geräte und Materialien.....	31
3.3.	Haar- und Urinproben und Asservierung	32
3.3.1.	ELISA und GC/MS Bestimmung von Opiaten, Cocain und Cocainmetaboliten sowie Urinscreenings	32
3.3.2.	HS-SPME GC/MS Bestimmung von Methadon.....	33
3.3.3.	GC/MS Bestimmung von Opiaten, Cocain, Amphetaminen, Cannabinoiden und Methadon sowie Urinscreenings.....	33
3.3.4.	LC/MS-MS Bestimmung von Opioidanalgetika	34
3.4.	Patienten- und Probandenkollektiv in der Übersicht	35
3.5.	Probenvorbereitung	36
3.5.1.	Opiate, Cocain.....	36
3.5.2.	Amphetamine	37
3.5.3.	Cannabinoide, Methadon.....	37
3.5.4.	Opioidanalgetika	38
3.6.	Methodenentwicklung	39
3.6.1.	ELISA Test Methodik	39
3.6.2.	GC/MS Methodik	48
3.6.3.	LC/MS-MS Methodik	55
3.7.	Auswertung und Statistik	61
4.	<i>Allgemeine Erläuterungen zu Ergebnissen und Diskussion</i>.....	62
5.	<i>Ergebnisse</i>	66

5.1. Ergebnisse der Methodenvalidierungen	66
5.1.1. ELISA Test Validierung	66
5.1.2. GC/MS Validierung	68
5.1.3. LC/MS/MS Validierung.....	77
5.2. Anwendbarkeit der entwickelten Methoden	85
5.2.1. Bestimmung von Opiaten Cocain und Cocainmetaboliten in Haaren mittels Enzymimmunoassay (ELISA) und Bestätigung mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	85
5.2.2. Opiatkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und wegen Opiatmissbrauchs Verstorbener.....	91
5.2.3. Cocainkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms im Vergleich zu der methadonsubstituierten Kontrollgruppe	99
5.2.4. Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit Urintests von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und der methadonsubstituierten Kontrollgruppe.....	105
5.2.5. Dosis-Konzentraionsbeziehungen von Methadon und EDDP in Haaren von Teilnehmern des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms	108
5.2.6. Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit zugegebenem Konsum und Urintests.....	115
5.2.7. Bestimmung von 15 Opioid-Analgetika mittels Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS-MS) und Anwendung auf Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung 118	
6. Diskussion	122
6.1. Methodenvalidierung	122
6.2. Anwendbarkeit der entwickelten Methoden	123
6.2.1. Bestimmung von Opiaten, Cocain und Cocainmetaboliten in Haaren mittels Enzymimmunoassay (ELISA) und Bestätigung mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	123

6.2.2.	Opiatkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und wegen Opiatmissbrauchs Verstorbener.....	125
6.2.3.	Cocainkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms im Vergleich zu der methadonsubstituierten Kontrollgruppe.....	130
6.2.4.	Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit Urintests von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und der methadonsubstituierten Kontrollgruppe.....	131
6.2.5.	Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon und EDDP in Haaren von Teilnehmern des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms.....	132
6.2.6.	Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit zugegebenem Konsum und Urintests.....	138
6.2.7.	Bestimmung von 15 Opioid-Analgetika mittels Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS-MS) und Anwendung auf Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung	142
7.	<i>Ausblick</i>	148
8.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	150
9.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	153
10.	<i>Literatur</i>	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Amphetamin
AC	Acetylcodein
AK	Aktivkohle
b	Achsenabschnitt der Regressionsgeraden
BE	Benzoyllecgonin
BDB	3,4-Methylenedioxyphenyl-2-butanamin
BG	Bestimmungsgrenze
BNTI	Bisnortilidin
BU	Buprenorphin
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CE	Cocaethylen
COC	Cocain
COD	Codein
EDDP	2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray ionisation (Elektrosprayionisierung)
FE	Fentanyl
GC	Gaschromatographie
HS	Headspace (Dampfraum)
HER	Heroin
HM	Hydromorphon
ID	Innendurchmesser
ISTD	Interner Standard
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
m	Steigung der Regressionsgeraden
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MA	Methamphetamin
MAM	6-Monoacetylmorphin
MBDB	N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoracetamid)
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	3,4-Methylendioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
MET	Methadon
MOR	Morphin
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
NFE	Norfentanyl
NG	Nachweisgrenze
NOMO	Normorphin
NTI	Nortilidin
OC	Oxycodon
OXMO	Oxymorphon
p	Wahrscheinlichkeit statistischer Tests
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Piritramid
Q	Quadrupol
R	Korrelation der Regressionsgeraden
r	Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden = \sqrt{R}
SIM	Selected ion monitoring (Selektive Ionendetektion)
SPDE	Solid-phase dynamic extraction (dynamische Festphasenextraktion)
SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SPME	Solid-phase microextraction (Festphasenmikroextraktion)
TFA	Trifluoracetyl-Derivat
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TI	Tilidin
TIC	Total ion current, Totalionenstrom-Chromatogramm
TMS	Trimethylsilyl-Derivat
TRA	Tramadol

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Während sich die Toxikologie im Allgemeinen mit der Erforschung der Wirkungsweise von Giften zur Diagnostik und Therapie von Vergifteten befasst, ist unter forensischer Toxikologie die Vergiftungslehre in ihrer Beziehung zur Rechtsordnung zu verstehen. Das Gebiet der forensischen Toxikologie umfasst Untersuchungen zur Toxikokinetik und -dynamik von toxischen Substanzen, insbesondere von Rauschmitteln. Bei Verdacht auf Intoxikation stellt die Analytik nach Asservierung des Untersuchungsguts die zentrale Aufgabe der forensischen Toxikologie dar. Als Untersuchungsmaterialien in einem forensisch-toxikologischen Labor dienen in der Regel komplexe biologische Matrices wie Blut, Urin, Speichel, Gewebe von Organen sowie Haare.

Die Haaranalytik hat sich in den letzten Jahren als wichtige Ergänzung zu Blut- und Urinuntersuchungen zum Nachweis inkorporierter Fremdstoffe etabliert [1]. Von forensisch-toxikologischem Interesse sind hierbei vor allem häufig verbreitete illegale Drogen wie Opiate (Dihydrocodein, Heroin, sowie die Metabolite 6-Monoacetylmorphin und Morphin, Codein, und Acetylcodein), Cocain (sowie die Metabolite Benzoyllecgonin, Ecgoninmethylester und das bei parallelem Alkoholkonsum gebildete Cocaethylen), Cannabinoide (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol, Cannabinol, sowie Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure), Methadon und der Metabolit 2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP), sowie die Amphetamine und Designeramphetamine (Ecstasy).

Die Matrix Haar stellt ein komplexes Untersuchungsgut dar. Im Gegensatz zu den flüssigen Matrices Blut oder Urin sind die Analyten im Haar fest eingebunden, weiterhin sind Haare äußeren Faktoren wie Kontaminationen und Umwelteinflüssen ausgeliefert. Diese Besonderheiten müssen bei der Aufarbeitung von Haarproben berücksichtigt werden. Der erste wichtige Schritt bei der Probenaufarbeitung ist demzufolge eine Dekontamination der Haarproben, an die sich der Probenaufschluss oder die Probenextraktion anschließt. Je nach Stabilität der zu untersuchenden Analyten wird eine saure (für Cocain und Metabolite), alkalische (für Amphetamine)

oder methanolische Extraktion (für Opiate) durchgeführt. Weiterhin erforderlich sind eine Substanzanreicherung und Reinigung (Clean-up), bevor die Analyten bestimmt werden können.

Als Untersuchungsverfahren in der Haaranalytik werden häufig immunchemische Analyseverfahren verwendet. Aufgrund der nicht spezifisch auf einen Analyten reagierenden Antikörper sind diese Tests nur qualitativ auswertbar, da es zu Kreuzreaktionen mit weiteren Analyten kommen kann. Als quantitative Verfahren werden gaschromatographische oder flüssigchromatographische (Bestätigungs-) Verfahren mit massenspektrometrischer oder tandem-massenspektrometrischer Detektion eingesetzt.

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Haaruntersuchungen einerseits und Blut- sowie Urinuntersuchungen andererseits ist die Tatsache, dass in den Haaren in der Regel die Muttersubstanz oder lipophile Metaboliten in höheren Konzentrationen aufgefunden werden als die (vorzugsweise mit dem Urin ausgeschiedenen) hydrophileren Endmetaboliten. Dies ist bei der Interpretation von Messwerten bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen zu berücksichtigen und schließt einen direkten Vergleich zwischen gemessenen Haarkonzentrationen und Blut- oder Urinuntersuchungen aus (Tabelle 1).

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Urin-, Blut-, und Haaranalysen und Übersicht über die Nachweisbarkeitsdauer von Drogen [2].

Parameter	Urin	Blut	Haare
Cocain	BE > COC	BE > COC	COC > BE
Opiate	MOR > MAM	MOR	MAM > MOR > HER
Cannabinoide	THC-COOH	THC-COOH > THC	THC > THC-COOH
Amphetamine/Ecstasy	Amphetamine/Ecstasy	Amphetamine/Ecstasy	Amphetamine/Ecstasy
Nachweisbarkeitsdauer	2-3 Tage	Stunden	Mehrere Monate

Die Haaranalyse ist Blut- und Urintests in vielen Punkten überlegen. Sie lässt im Gegensatz zu letzteren eine Aussage über einen Konsum von Medikamenten und berauschenden Mitteln noch nach mehreren Wochen oder Monaten zu, während dies mit Blut- oder Urinuntersuchungen nur für einige Tage möglich ist. Das Nachweisfenster zur retrospektiven Einschätzung der Konsumdauer ist abhängig von

der Haarlänge: Bei einer durchschnittlichen Wachstumsrate von 1 cm pro Monat kann bei entsprechender Haarlänge auch das Konsumverhalten über einen längeren Zeitraum durch segmentale Analyse der Haare verfolgt werden. Urin stellt im Gegensatz zu Haaren ein problematisches Untersuchungsmaterial dar, da er septisch bzw. infektiös sein kann, gekühlt oder für längere Aufbewahrung gefroren und oftmals unter Beobachtung gesammelt werden muss. Im Gegensatz dazu können Haarproben nicht invasiv asserviert und bei Raumtemperatur gelagert werden und stellen darüber hinaus keine Infektionsgefahr da. Während das im Vergleich zu Blut- und Urinanalysen große retrospektive Zeitfenster bei der Haaranalytik viele Vorteile bietet ist es von Nachteil, dass die analytischen Anforderungen an den Nachweis toxikologisch relevanter Substanzen in Haarmatrices grundsätzlich höher sind als in anderen üblichen Untersuchungsmaterialien, da nach vergleichbarem Drogenkonsum Analytkonzentrationen in Haaren meist erheblich (oft um mehrere Zehnerpotenzen) geringer sind als in anderen Matrices [2]. Neben der daraus resultierenden Forderung nach einer hohen Sensitivität des Analyseverfahrens ist auch die Abgrenzung von strukturähnlichen endogenen Matrixkomponenten mit hohen Selektivitätsansprüchen der Analytik verbunden. Schließlich stellt auch die Problematik der Anreicherung des inkorporierten Analyten aus den heterogenen Haarproben eine besondere Herausforderung im Vergleich zur Blut- oder Urinanalytik dar.

1.2. Ziel der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit besteht in der systematischen Erarbeitung und Entwicklung neuer Methoden sowie der Weiterentwicklung bereits bestehender Methoden zur forensisch-toxikologischen Drogenanalytik in Haaren. Die Methoden sollen unter besonderer Berücksichtigung der genannten spezifischen Besonderheiten der Haarmatrix sowie ökonomischer Gesichtspunkte (Arbeits- und Zeitaufwand, Kosten) optimiert und weiterhin nach neuesten Erkenntnissen validiert werden. Mithilfe dieser validierten Methoden wird ein eindeutiger Nachweis von Substanzen möglich, der bei Gerichtsverfahren im Gegensatz zu bisherigen nicht validierten Verfahren sicher Bestand hat. Durch die Haaranalyse können neben Blut- und Urinuntersuchungen zusätzliche relevante und gerichtsverwertbare Informationen erhalten werden. Die Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit der Methoden wird an verschiedenen gestalteten klinischen Studien belegt, die Ergebnisse der Studien werden kritisch interpretiert.

2. Grundlagen und Stand der Technik

2.1. Grundlagen der Haaranalytik

2.1.1. Aufbau der Haare

Haare werden als trockene „Hautanhangsgebilde“ bezeichnet. Sie werden vor der Geburt angelegt, ein erwachsener Mensch besitzt ca. 5 Millionen dieser Haaranlagen, davon 1 Million auf dem Kopf und im Gesicht [2]. Das Haar besteht aus frei aus der Haut herausragenden zylindrischen Strukturen oder Schäften (Durchmesser 15-120 μm), die aus stark zusammengedrängten Zellen bestehen [3]. Das menschliche Haar wird in Haarfollikeln gebildet, die ca. 4 mm in die Haut hineinragen und funktionell eng mit der Talgdrüse verbunden sind (Abbildung 1). Haare werden durch Zellteilung im Wachstumsbereich an der Basis des Follikels (Haarpapille) gebildet. Die Zellen nehmen an Volumen zu und verlängern sich. In der Keratinisierungszone synthetisieren die Zellen Pigment (Melanin) und beginnen zu verhornen („keratinisieren“), so dass längere Fasern (sog. Fibrillen) entstehen.

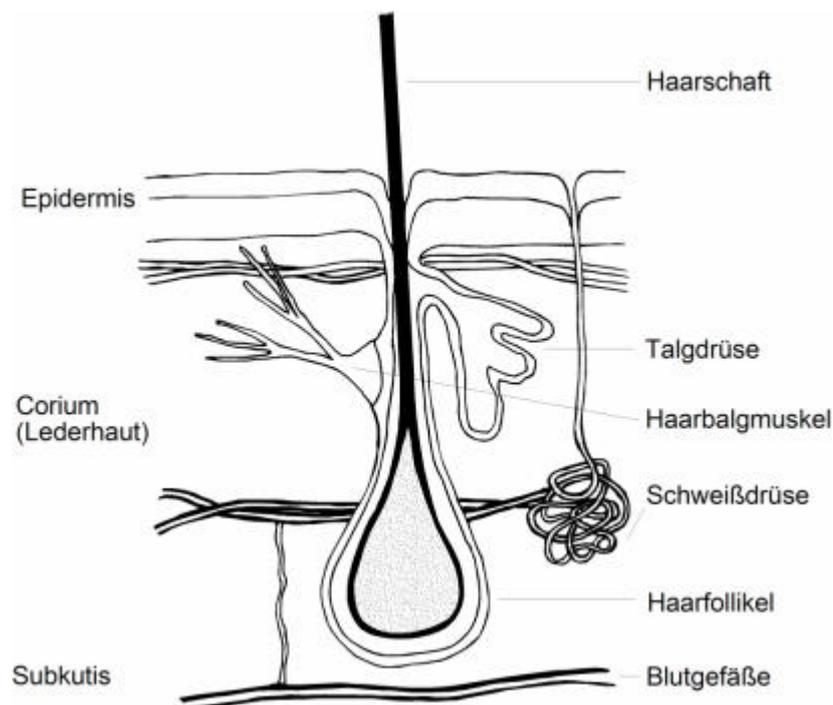


Abbildung 1: Schematischer Schnitt durch die Haut mit Haarfollikel, Haarschaft, Talg- und Schweißdrüsen (Zeichnung W. Lachenmeier).

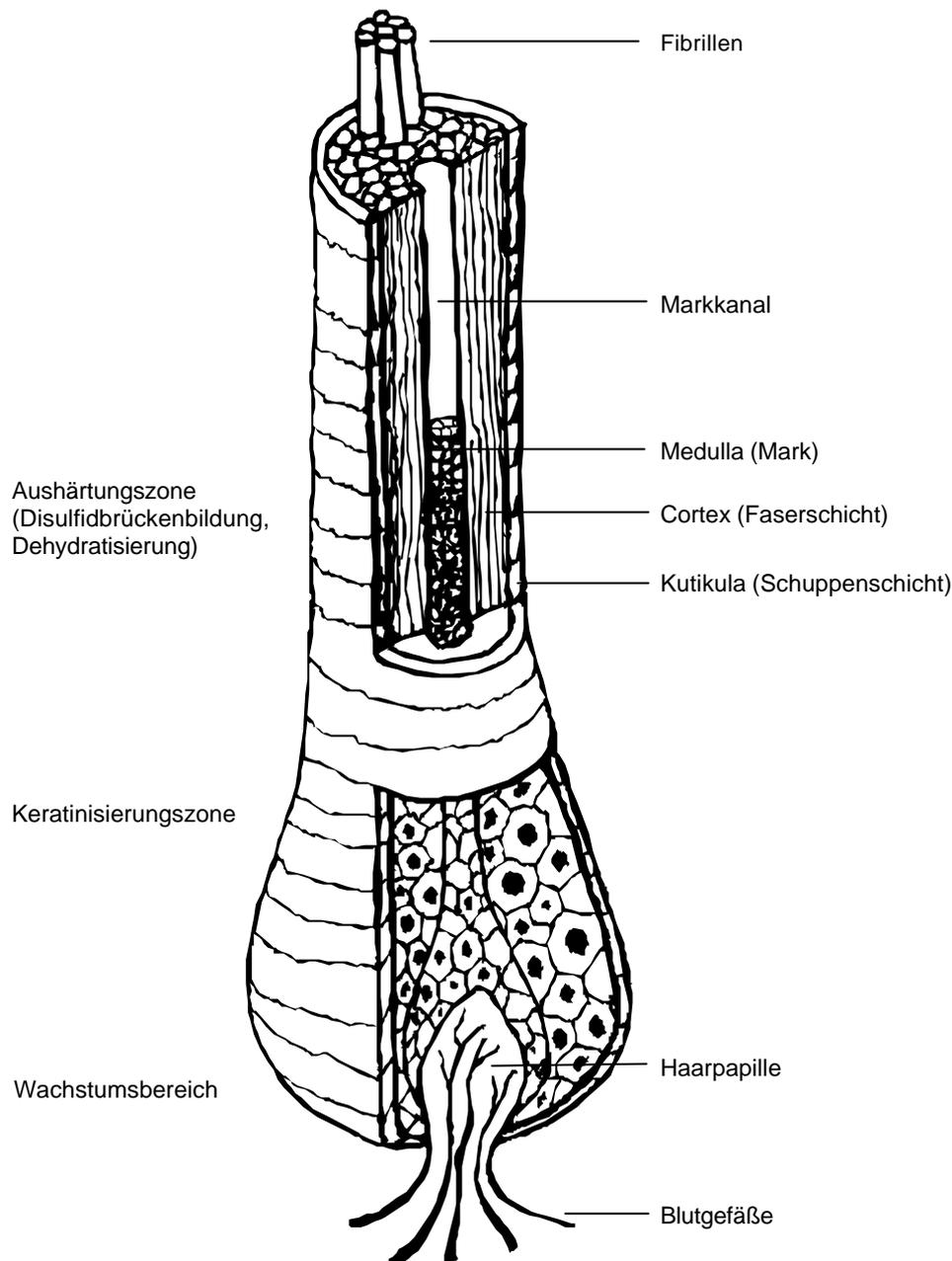


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Haares (Zeichnung W. Lachenmeier).

In der Aushärtungszone sterben die Zellen unter Elimination des Zellkerns und Wasser ab (Abbildung 2). Das eigentliche Haar besteht aus einer kompakten Zusammenlagerung der abgestorbenen Zellen. Bevor das Haar die Hautoberfläche erreicht, wird es mit Sebum aus den Talgdrüsen benetzt.

Der Schaft besteht aus einer äußeren Kutikula (Schuppenschicht), dem zentralen Kortex (Faserschicht) und einer inneren Medulla (Mark). Die Kutikula besteht aus abgeflachten, wie Schuppen dachziegelartig übereinander liegenden, verhornten

Zellen und dient dem Schutz der innen liegenden Fasern. Der Cortex besteht aus langen keratinisierten Zellen, die zu langen Fasern (Fibrillen) von ca. 100 µm Länge angeordnet sind. In diesen kortikalen Zellen befinden sich auch die Pigmente, wie das Melanin, das die Farbe des Haares bestimmt. In der dritten Schicht, der Medulla, sind die Zellen weniger dicht gepackt, der Markstrang kann durch Lufteinschlüsse unterbrochen sein (Abbildung 2).

Das Haar ist als stark vernetztes, teil-kristallines polymeres Netzwerk aufzufassen, das eine Vielzahl von funktionellen Gruppen enthält (Säuren, Basen, Peptide), die kleine Moleküle binden können. Menschliches Haar besteht aus 65-95% Protein (90% Keratin), 15-35% Wasser (in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit) und 1-9% Lipiden. Die Lipide (Sebum) werden von Talgdrüsen produziert.

Als Faustformel gilt, dass Haare 1 cm/Monat wachsen. Es werden jedoch große individuelle Unterschiede berichtet (0,6-3,36 cm/Monat) [4-6].

Der Haarwachstumszyklus besteht aus 3 Stadien: nach einer langen Wachstumsphase (Anagenstadium, bis zu 6 Jahre) folgt ein kurzer Übergangszustand (Katagenstadium, 4-6 Wochen). Danach folgt eine Ruhephase (Telogenstadium), in der das Haarwachstum vollständig aufhört (10 Wochen). Ungefähr 15% der Haare befinden sich im Telogenstadium, 85% im Anagenstadium. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten muss bei der Interpretation von Haaranalysen berücksichtigt werden.

2.1.2. Einbau von Drogen in Haare

In den letzten Jahren sind maßgebliche Erkenntnisse über die Inkorporation von Fremdsubstanzen in Haaren erarbeitet worden. Aufgenommene Fremdsubstanzen gelangen durch Ingestion, Inhalation oder Injektion der Konsumenten über die Haarfollikel umgebenden Blutkapillaren während der anagenen Phase in die Haarwurzel und werden bei der Haarentstehung eingelagert. Auch eine direkte Aufnahme in das keratinisierte Haar über den Kontakt mit (drogenhaltigem)

Emulsionsfilm (Schweiß, Sebum) auf der Haaroberfläche oder über den Kontakt mit „drogenhaltigen“ Stäuben oder Gasen ist möglich [7].

Durch Haarbehandlungen wie Tönen, Bleichen oder Dauerwelle kann es zu einer Verringerung der Substanzkonzentration in den Haaren kommen. Drei Hauptfaktoren beeinflussen die Drogenaufnahme und –retention in Haaren: Melaninaffinität, Lipophilie und Basizität der eingenommenen Substanz [8]. Lipophilere Muttersubstanzen werden oft in höheren Konzentrationen gefunden als ihre hydrophileren Metaboliten [7,9], weil Biomembranen eine geringere Durchlässigkeit für polare Substanzen aufweisen.

2.2. Relevante Analyten in der Haaranalytik

In zahlreichen Arbeiten werden Opiate in Haaren analysiert, um einen illegalen Konsum von Heroin aufzuzeigen und Heroinabusus von Morphin- oder Codeinkonsum zu unterscheiden [10-19]. Der analytische Nachweis eines Heroinkonsums, der ein zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist, erfolgt über den charakteristischen Metaboliten 6-Monoacetylmorphin. Zusätzlich von Bedeutung sind die Muttersubstanz selbst sowie Morphin, bei Konsum von Straßenheroin sind ferner Codein und Acetylcodein von Relevanz. Codein und Acetylcodein werden als Marker für einen Konsum von Straßenheroin vorgeschlagen [20]. Codein ist ein natürlicher Bestandteil bei der Herstellung von Heroin, welches aus *Papaver somniferum* L. durch Acetylierung und Aufreinigung gewonnen wird. Im Hinblick auf morphin- oder codeinhaltige Medikamente oder weitere Quellen von Opioidalkaloiden (z.B. Mohn) wird bei Patienten, die beispielsweise an Heroinvergabeprojekten teilnehmen, jedoch angeordnet, keine dieser Medikamente einzunehmen und keine mohnhaltigen Lebensmittel zu konsumieren. Acetylcodein ist eine durch den Herstellungsprozess bedingte Verunreinigung von Straßenheroin und wird daher in der Literatur [20,21] als der spezifische Marker für einen Konsum von Straßenheroin vorgeschlagen, da pharmazeutisch hergestelltes Heroin diese Komponente nicht enthält. Der Acetylcodeingehalt in Straßenheroin liegt zwischen 0,25 und 10,2% [22], das zur Abgabe in Vergabeprojekten verwendete pharmazeutisch reine Heroin ist

acetylcodeinfrei. Daher lässt die Anwesenheit von Codein und insbesondere von Acetylcodein in Proben von Teilnehmern an Heroinvergabeprojekten darauf schließen, dass sie ihre verschriebenen Heroindosen mit Straßenheroin ergänzen.

Cocain wird als Hauptinhaltsstoff aus den Blättern des Coca-Strauchs *Erythroxylum coca* durch Extraktion mit angeschlossenen aufwändigen Reinigungs- und Fällungsschritten gewonnen [2]. Als stabiles Endprodukt erhält man Cocain-Hydrochlorid. Dieses wird üblicherweise nasal oder intravenös konsumiert, während die freie Cocain-Base durch Rauchen oder Inhalieren aufgenommen wird. Cone et al. [23] weisen in Haaren die Muttersubstanz Cocain im Vergleich zu den Metaboliten Benzoyllecgonin und Cocaethylen in 5-10fach höheren Konzentrationen nach. Cocain kann in den Haaren bzw. bei der Probenaufarbeitung zu Benzoyllecgonin hydrolisieren, was den Hauptanteil dieses Metaboliten in den Haaren ausmacht [24].

Methadon, ein synthetischer Opioidagonist mit einer dem Morphin ähnlichen pharmakologischen Aktivität, ist eines der am meisten eingesetzten Substitutionsmittel bei Opiatabhängigkeit [25]. Eine steigende Methadonsubstitution führt jedoch zu zahlreichen rechtsmedizinischen Fragestellungen wie beispielsweise Fahrtauglichkeit nach Methadonkonsum [26]. Weiterhin konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Informationen von Abhängigen in Substitutionsprogrammen bezüglich ihres bisherigen Drogenkonsums nicht sehr zuverlässig sind [27-29].

Opioid-Analgetika im allgemeinen (Buprenorphin, Codein, Fentanyl, Hydromorphon, Methadon, Morphin, Oxycodon, Oxymorphon, Piritramid, Tilidin, Tramadol, sowie die Metaboliten Bisnortilidin, Nortilidin, Norfentanyl und Normorphin) sind von großem analytischem Interesse, da diese sogenannten „Schmerzkiller“ oft in der Palliativmedizin verwendet werden. In diesen Fällen kann die Haaranalyse zum Therapiemonitoring eingesetzt werden, weil Medikation und stationäre Aufnahme dieser Patienten häufig wechselt. Die Ergebnisse von Haaranalysen liefern Informationen über das Einnahmeverhalten und eine möglicherweise zusätzliche Medikation eines Patienten. Die behandelnden Ärzte erhalten zudem Informationen über vorherige Therapieansätze, um eine adäquate gegenwärtige Medikation zu gewährleisten.

Die Verwendung von Opioid-Analgetika kann auch Missbrauch, Sucht oder Abhängigkeit nach sich ziehen und erlangt in diesem Zusammenhang rechtsmedizinische Bedeutung. So finden z.B. Fentanyl und Fentanylanaloga auch als illegale „Straßendrogen“ Verwendung, Buprenorphin, welches häufig von Drogenabhängigen als Heroinersatz konsumiert wird, spielt darüber hinaus wie Methadon bei Verkehrsunfällen mit drogensubstituierten Fahrern eine zunehmende Rolle.

Die psychotropen Eigenschaften der Cannabisprodukte beruhen auf ihren Inhaltsstoffen, den Cannabinoiden: der Hauptwirkstoff ist Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), weitere Wirkstoffe sind das Cannabidiol (CBD) und das Cannabinol (CBN) [2]. THC wird nach inhalativer Aufnahme rasch zu Hydroxy-THC verstoffwechselt, welches weiter zu THC-Carbonsäure metabolisiert wird. Der Nachweis von Cannabinoiden in Haaren stellt eine Herausforderung an die forensisch-toxikologische Analytik dar. Zum einen ist in Anbetracht der niedrigen Dosierung bei Cannabiskonsum und einer kurzen Plasmahalbwertszeit des Wirkstoffs THC von sehr geringen Substanzkonzentrationen in Haaren auszugehen, zum anderen kann es aufgrund der Konsumart durch entstehenden Cannabisrauch leicht zu (passiven) Kontaminationen von Haaren kommen.

Amphetamin, seine Derivate und Homologe sind vollsynthetische Produkte, die in Pulverform sowie in Kapsel- oder Tablettenform vorliegen [2] und oral konsumiert werden. Mit Amphetamin eng verwandt ist das Methamphetamin (MA), das in Deutschland allerdings nur begrenzt Verbreitung gefunden hat. Neben Amphetamin sind weitere hergestellte Designerdrogen von Bedeutung. Die größte Bedeutung kommt dabei den Methylendioxyamphetaminen zu, die unter dem Sammelbegriff Ecstasy beschrieben werden (3,4-Methylendioxymethamphetamin (MDMA), 3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA), 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA)). Von Bedeutung sind ferner die Methylendioxybutanamine 3,4-Methylendioxyphenyl-2-butanamin (BDB) und N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin (MBDB).

2.3. Strukturformeln der Analyten

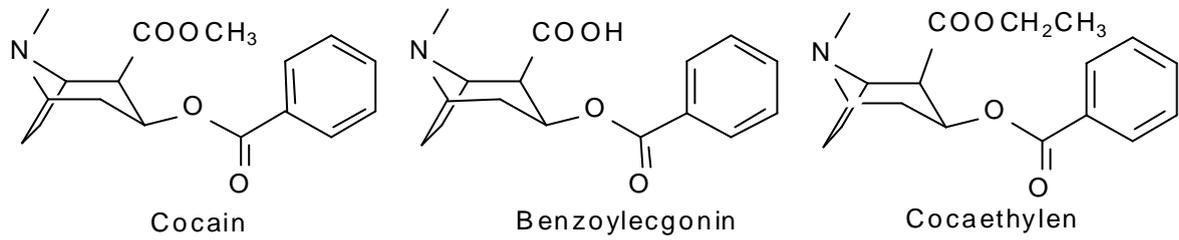


Abbildung 3: Strukturformeln von Cocain und den Metaboliten Benzoyllecgonin und Cocaethylen.

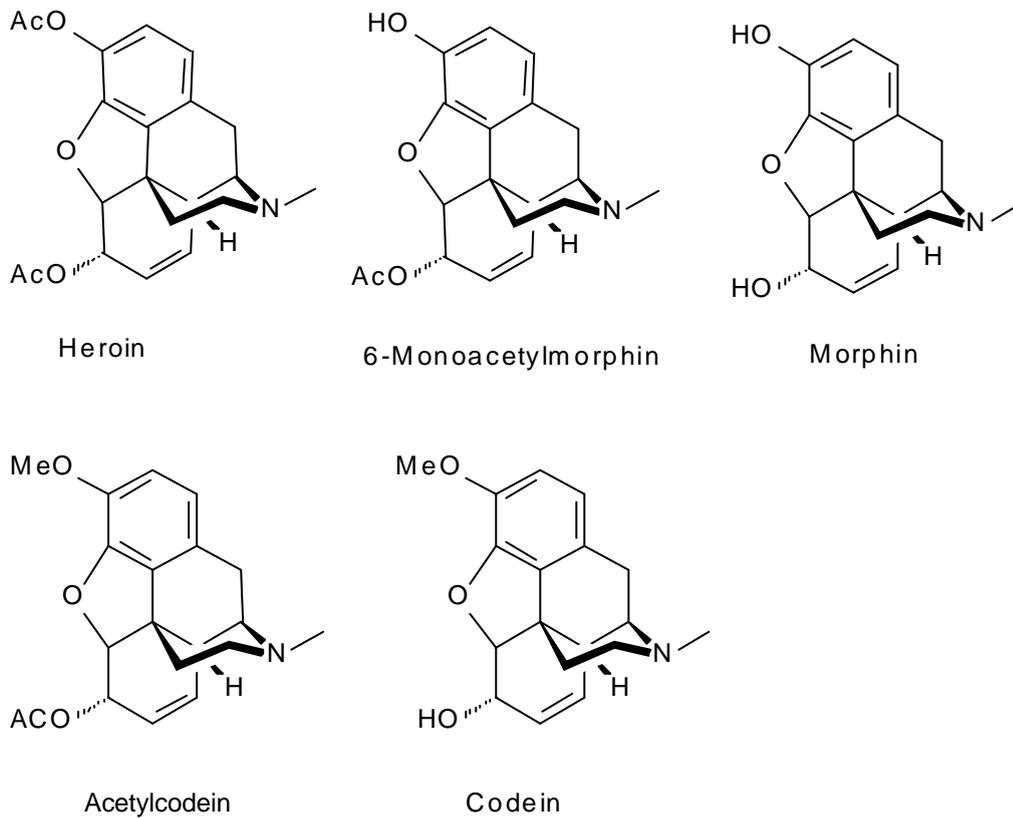
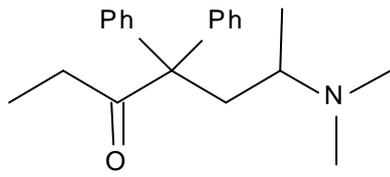
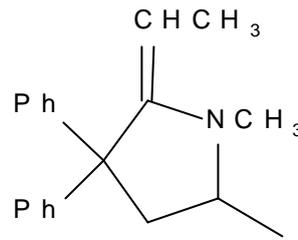


Abbildung 4: Strukturformeln der Opiate Heroin, 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Acetylcodein und Codein.

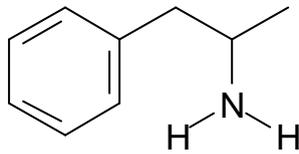


Methadon

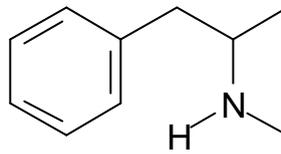


EDDP

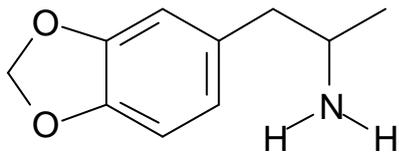
Abbildung 5: Strukturformeln von Methadon und dem Metaboliten EDDP.



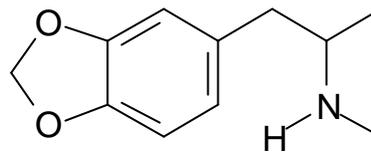
Amphetamin



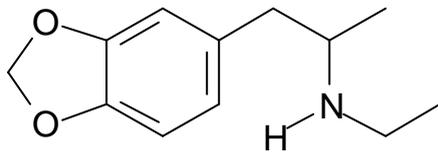
MA



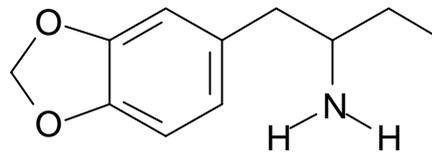
MDA



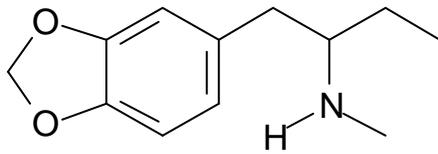
MDMA



MDEA



BDB



MBDB

Abbildung 6: Strukturformeln der Amphetamine Amphetamin, MA, MDA, MDMA, MDEA, BDB und MBDB.

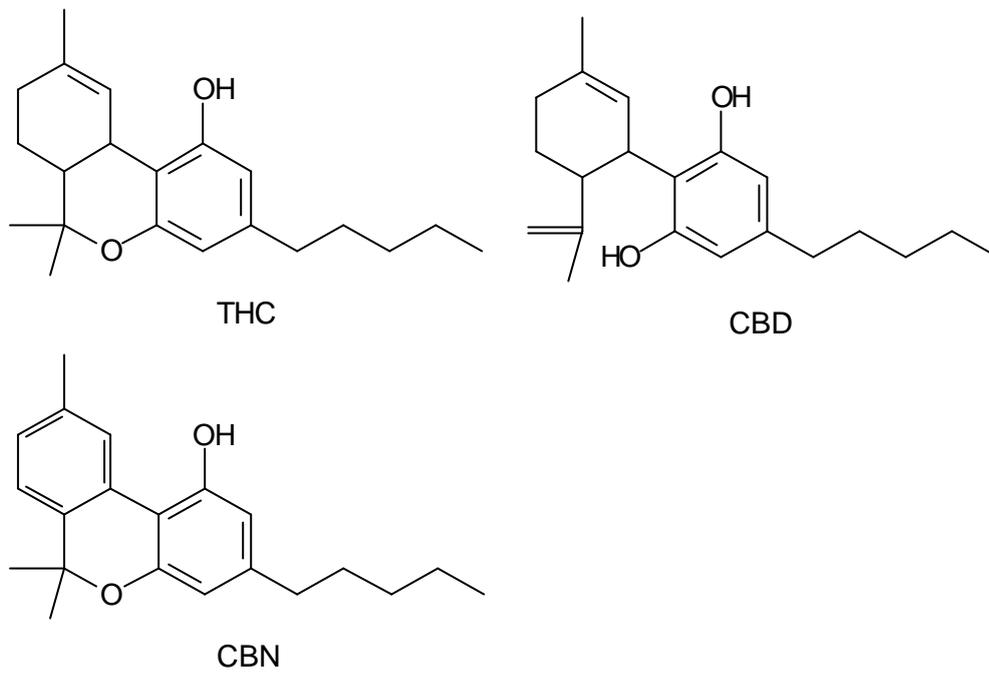
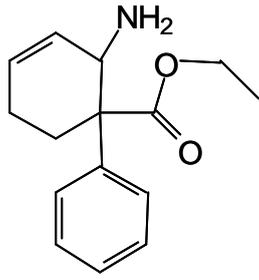
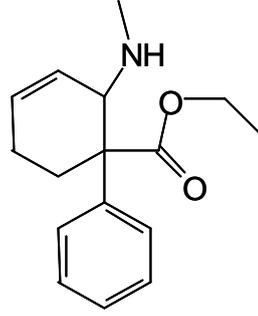


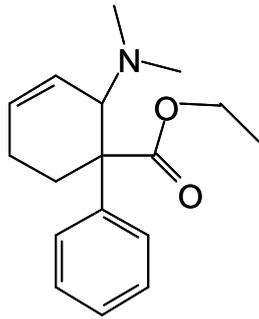
Abbildung 7: Strukturformeln der Cannabinoide THC, CBD und CBN.



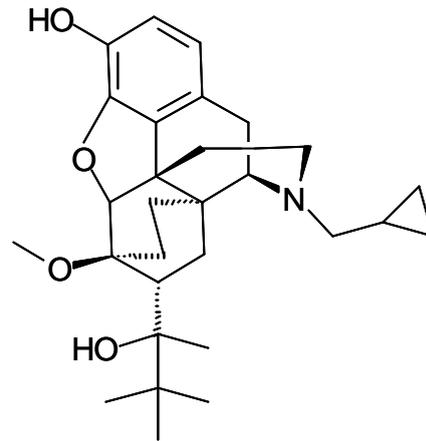
Bisnortilidin



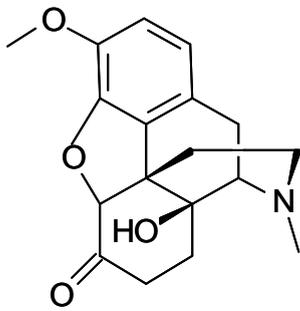
Nortilidin



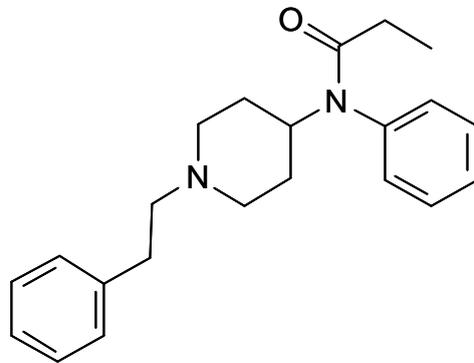
Tilidin



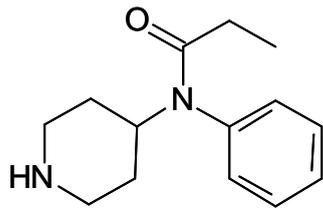
Buprenorphin



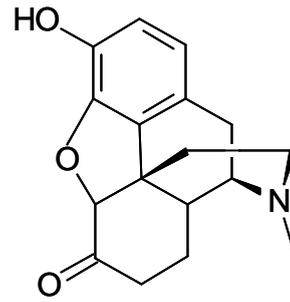
Oxycodon



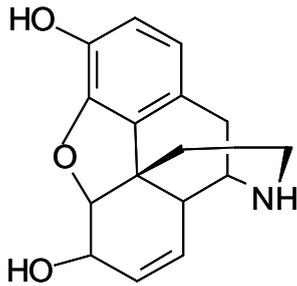
Fentanyl



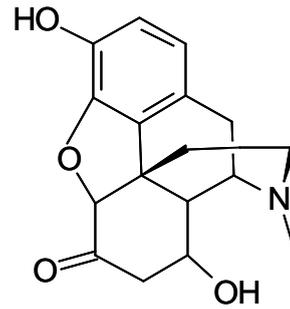
Norfentanyl



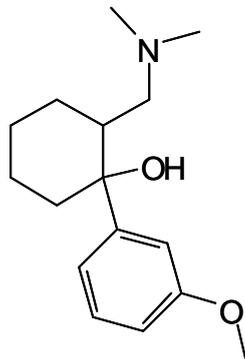
Hydromorphon



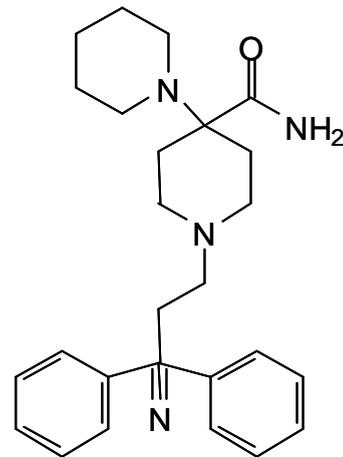
Normorphin



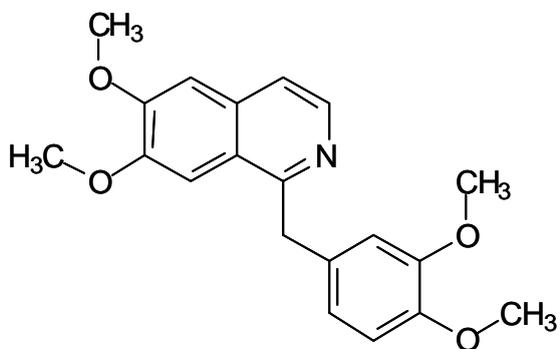
Oxymorphon



Tramadol



Piritramid



Papaverin

Abbildung 8: Strukturformeln der Opiode.

2.4. Stand der Technik der Haaranalytik

Die Untersuchung von Haarproben lässt sich in die folgenden Teilbereiche untergliedern: Probenvorbereitung, die sich daran anschließenden instrumentellen Analyseverfahren sowie die Qualitätskontrolle und Validierung der angewendeten Messverfahren. Zur Probenvorbereitung zählt die Dekontamination der Haarproben, der Probenaufschluss oder -extraktion, die Substanzanreicherung und Reinigung (Clean-up) sowie die Derivatisierung der Proben [2].

2.4.1. Probenvorbereitung

2.4.1.1. Dekontamination

Die Dekontamination der Haarproben ist der erste Schritt der Probenvorbereitung. Die Möglichkeit der externen Kontamination einer Matrix, welche ständigen Umwelteinflüssen ausgesetzt ist und deren großer Oberflächeninhalt eine erhebliche Angriffsfläche für Oberflächenadsorption bietet, ist unstrittig. Das ist in besonderem Maße für Analyten bedeutsam, deren typische Applikationsart eine Verbreitung über die Luft wahrscheinlich erscheinen lässt, z.B. Cannabinoide oder Cocain. Bei der Bewertung von analytischen Befunden im Haar sollten daher grundsätzlich die Metaboliten wie z.B. THC-Carbonsäure oder Norcocain einbezogen werden [30], da diese erst durch Biotransformation im Körper entstehen (können) und exogene Kontaminationsquellen somit nicht plausibel sind. Körpereigene Biotransformationsprodukte sind jedoch oftmals als Indikatoren für die Aufnahme der fraglichen Substanz nicht (in ausreichender Konzentration) verfügbar. Geeignete Dekontaminationsverfahren sind daher zwingend erforderlich. Diese Waschschrte (z.B. Petrolether, wässrige Puffer) verfolgen den Zweck, zwischen einer oberflächlichen Adsorption und einer Inkorporation zu differenzieren [31,32]. Zur Überprüfung der Effektivität der Dekontamination können die Waschlösungen auf Drogenfreiheit untersucht und die Haarproben gegebenenfalls einem weiteren Dekontaminationsschritt unterzogen werden.

2.4.1.2. Probenaufschluss und -extraktion

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Probenvorbereitungstechniken zur Analyse von Haarproben entwickelt, beispielsweise organische Lösungsmittelinkubation [13,14,33-40], enzymatische Hydrolyse [41,42] und saure [43-46] oder alkalische Hydrolyse [47]. Die Optimierung des Probenaufschlussverfahrens richtet sich ausschließlich nach den chemischen Eigenschaften der Analyten. So kann für die Untersuchungen von Opiaten und Cocain beispielsweise die letzte Methode nicht verwendet werden, da in den Proben unter diesen Bedingungen eine alkalische Hydrolyse von Heroin und 6-Monoacetylmorphin zu Morphin stattfindet [17,48]. Auch für den Nachweis von Cocain kommt letztere Methode nicht in Frage, da es zu einer Degradation von Cocain im alkalischen Milieu kommt, für Amphetamine und Cannabinoide hingegen ist die alkalische Hydrolyse die Methode der Wahl. Eine methanolische Extraktion der Opiate führt zu guten Ergebnissen und ist die einzige Methode, mit der eine Identifizierung von Heroin in Haaren möglich ist. Cocain wird am besten mittels saurer oder methanolischer Extraktion aufgearbeitet, da ein Abbau dieses Analyten zu Benzoyllecgonin unter diesen Bedingungen nur in geringem Maße stattfindet.

2.4.1.3. Substanzanreicherung und Reinigung

Das wohl älteste und am weitesten verbreitete Verfahren zur Substanzanreicherung ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid-extraction, LLE) [49]. Hierbei wird die zu untersuchende Probe mit einem nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel versetzt und kräftig durchmischt, wodurch die Analyten gemäß ihres Verteilungsgleichgewichts in die organische Phase übergehen. Anschließend wird die Lösemittelphase abgetrennt und eingeeengt, um eine Aufkonzentrierung der Analyten zu erreichen. In der forensischen Analytik ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion weit verbreitet.

Bei der Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE) findet der Extraktionsprozess zwischen einer flüssigen und einer stationären festen Phase statt. Das Probenvolumen wird hierzu durch eine Kartusche aus Polypropylen geleitet,

welche mit einem Adsorbens gefüllt ist. Die Festphasenextraktion ist in fünf Schritte gegliedert: Konditionierung der Kartusche, Probenaufgabe, Waschen der Kartusche, Trocknen der Kartusche und Elution der Analyten. Vorteile gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion sind der geringere Lösungsmittelverbrauch und Zeitaufwand, höhere Wiederfindungen, reinere Extrakte und die Möglichkeit zur Automatisierung. Aus diesen Gründen, insbesondere jedoch wegen der reineren Extrakte und des geringeren Bedarfs an Probenmaterial, wird auch die Festphasenextraktion in der forensischen Analytik häufig eingesetzt.

Bei der Dampfraum Festphasenmikroextraktion (Headspace solid-phase microextraction, HS-SPME), die für flüchtige Analyten gut geeignet ist, wird die Probe in ein Probengefäß gefüllt, mit einer Aluminiumkappe und einem Septum verschlossen und inkubiert [3,49]. Dabei stellt sich sukzessive ein Gleichgewicht der Analyten zwischen Dampfraum und Probe ein. Die Extraktion der Analyten erfolgt durch Exposition einer SPME-Faser, die mit einem Sorbens beschichtet ist, in den Dampfraum über der Probe. Vorteile dieser Methode gegenüber herkömmlichen Extraktionsmethoden sind die volle Automatisierbarkeit, Einfachheit und ein geringer Lösungsmittelverbrauch.

2.4.1.4. Derivatisierung

Das Ziel der Derivatisierung bei GC/MS Bestimmungen besteht darin, die chemischen Eigenschaften des Analyten an die Erfordernisse der Analysenmethode anzupassen [2]. Eine typische Zielsetzung ist die Verringerung der Polarität durch Acylierung, Methylierung oder Silylierung von Hydroxy-, Carboxy-, oder Aminogruppen zur Verbesserung der chromatographischen Trennung. Als Derivatisierungsreagenzien haben sich N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) für Acylierungsreaktionen (geeignet für Amphetamine und synthetische Designerdrogen) und N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) für Silylierungsreaktionen (geeignet für Opiate und Cannabinoide) bewährt (Abbildung 9). Bei herkömmlichen GC/MS Verfahren erfolgt ein manueller Derivatisierungsschritt, während dieser bei HS-SPME GC/MS Methoden automatisiert und direkt nach Extraktion der Analyten auf der SPME-Faser erfolgen kann.

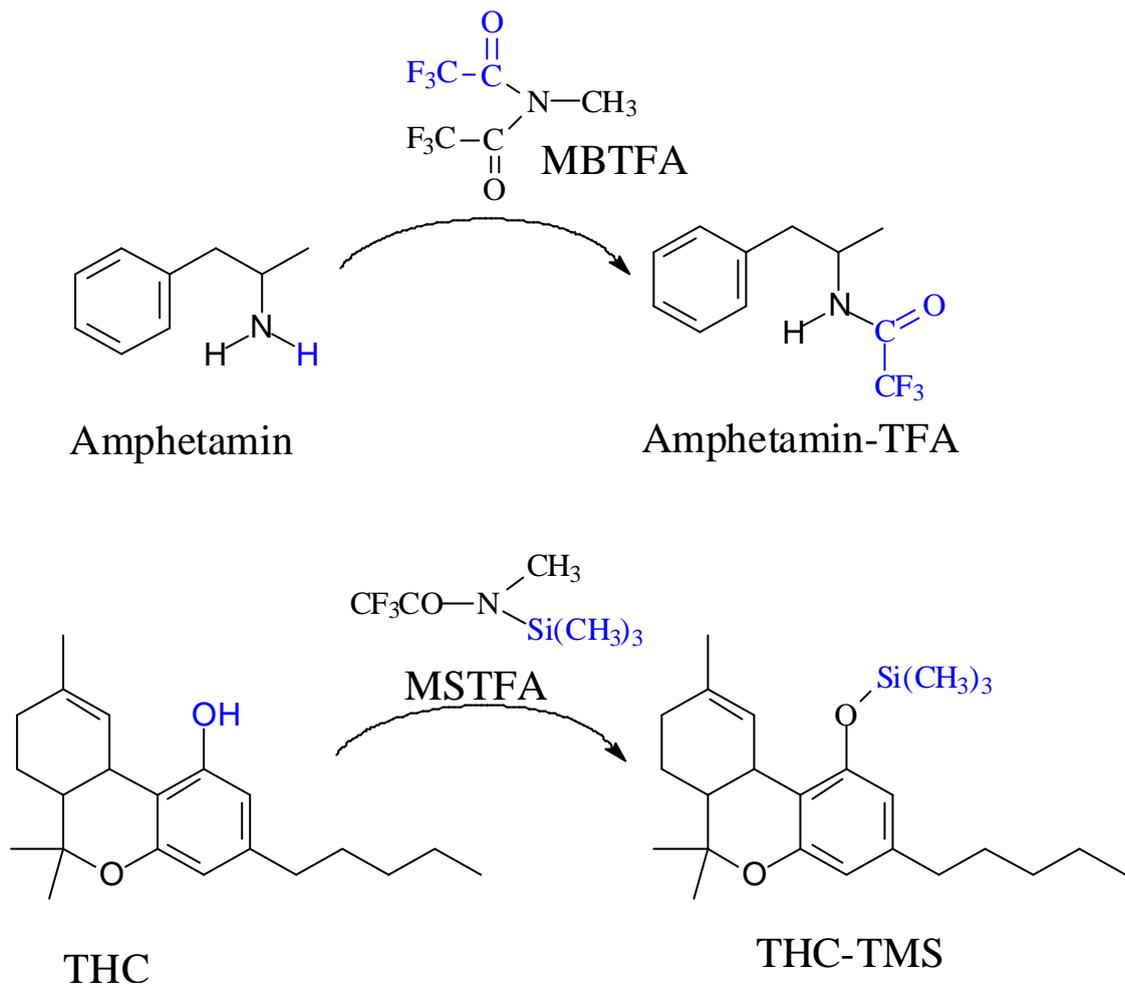


Abbildung 9: Derivatisierungsreaktionen mit MBTFA (geeignet für Amphetamine und synthetische Designerdrogen) und mit MSTFA (geeignet für Opiate und Cannabinoide) [3].

2.4.2. Instrumentelle Analyseverfahren für die Haaranalytik

Die typische Abfolge einer forensisch chemisch-toxikologischen Analyse besteht aus zwei Schritten: einem Screeningverfahren und einer Bestätigungsanalyse. Üblicherweise wird ein immunochemischer Vortest gefolgt von einer chromatographischen Methode durchgeführt. Der erste Schritt erlaubt eine schnelle Kontrolle einer großen Probenzahl, während der zweite Schritt die benötigte Spezifität liefert.

Mehrere Arbeitsgruppen haben Opiate und Cocain mit Radioimmunoassay (RIA) Methoden in Haaren analysiert, um einen illegalen Konsum dieser Drogen nachzuweisen [16,50-52]. RIA ist eine gebräuchliche, sensitive und zuverlässige immunochemische Technik, allerdings schließt die Verwendung von radioaktiv markiertem Material die Anwendung dieses Tests außerhalb gesicherter Räume aus. Aus diesem Grund werden vielfach andere Methoden bevorzugt. Eine gute Alternative sind enzymgebundene, immunochemische Methoden (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), die sicher, einfach, billig und sehr empfindlich sind [53]. Herkömmliche ELISA-Tests zur Urinuntersuchung, die gute Ergebnisse im Nachweis hydrophiler Metaboliten erzielen, erreichen jedoch nicht die für die Haaranalytik notwendigen Sensitivitäten und Spezifitäten. Im Gegensatz dazu sind ELISA-Tests zur Speicheluntersuchung aufgrund der Reaktivität mit den gleichsam im Speichel sowie im Haar enthaltenen Muttersubstanzen und lipophilen Metaboliten zur Haaranalytik gut geeignet.

Die Gaschromatographie in Verbindung mit der Massenspektrometrie (GC/MS) wurde in der Vergangenheit als Referenzmethode der Wahl [14,18,35,38,41,42,44] zur Bestätigung der Screeningergebnisse auf Opiate, Cocain, Methadon, Cannabinoide und Amphetamine verwendet. Weitere in Betracht kommende Verfahren sind Gas- oder Flüssigkeitschromatographie in Verbindung mit der Tandem-Massenspektrometrie (GC/MS-MS [37,54-56] oder LC/MS-MS [57,58]), die zum Nachweis einzelner Substanzklassen eingesetzt werden. Im Hinblick auf steigende Probenaufkommen sowie aus ökonomischen Gesichtspunkten besteht ein großes Interesse an Screening-Methoden, die gleichzeitig auf mehrere Substanzen und Substanzklassen angewendet werden können. Dies wird gegenwärtig durch die empfindliche LC/MS-MS Technik möglich gemacht. Bereits für die Matrices Blut

und Urin etabliert [59-62], existieren bisher nur wenige dieser Screening-Methoden für die Haaranalytik [63].

2.4.2.1. Grundlagen der ELISA Tests

Zum Screening auf Drogen werden vielfach immunochemische Vortests verwendet. Die in der Haaranalytik bereits eingesetzten Enzymimmunoassays basieren zumeist auf der kompetitiven „micro-plate“ Immunoassaytechnologie [64-67]. Die Haarextrakte werden in Kombination mit einem enzymmarkiertem Haptenderivat (Konjugat) in die Vertiefungen (Wells) der ELISA Platte gegeben. Enthält ein ELISA Well eine positive Haarprobe, so findet eine Konkurrenzreaktion zwischen den Analyten und dem enzymmarkierten Hapten um die im ELISA Well fixierten spezifischen Antikörper statt. Die Wells werden nach einer vorgegebenen Zeit gewaschen, um überschüssiges Haptenderivat zu entfernen, danach wird ein Substrat, welches eine Farbreaktion auslöst, hinzugegeben. Das im Anschluss zugegebene Stoppreagenz beendet die Farbreaktion. Das Absorptionsvermögen, das in jedem Well bei einer bestimmten Wellenlänge photometrisch bestimmt wird, ist umgekehrt proportional der in den Proben enthaltenen Analytmenge (Abbildung 10).

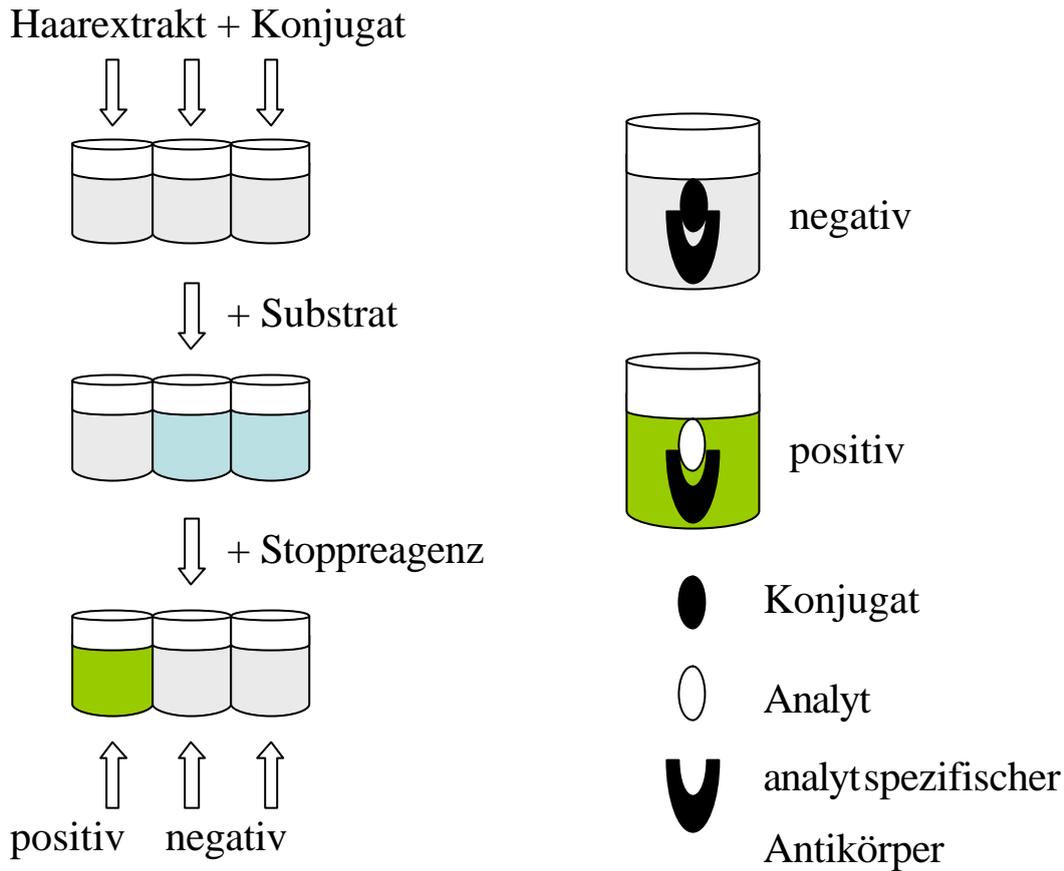


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufs eines kompetitiven ELISA-Tests.

ELISA Tests besitzen aus zwei Gründen nur semiquantitativen Charakter und müssen mit einem weiteren Messverfahren bestätigt werden: Aufgrund des nicht linearen Bindungsvermögens der Analyten in hohen und niedrigen Konzentrationsbereichen sind die Kalibrationskurven bei kompetitiven ELISA Tests „S“-förmig. Die unterschiedliche Kreuzreaktivität einzelner Analyten bestimmter Analytgruppen, die durch die Tests mit erfasst werden können (beispielsweise Morphin 100%, 6-Monoacetylmorphin 65%, Codein > 100% für den Opiate-ELISA, OraSure Technologies, Inc.) schließen ebenfalls eine quantitative Bestimmung aus. Trotzdem sind Screeningmethoden schnelle, günstige und automatisierte Verfahren, die häufig bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen mit großem Probenaufkommen eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Tests können aufgrund der unterschiedlich starken Kreuzreaktivitäten nicht auf einen einzelnen Analyten bezogen angegeben werden. Sie werden daher als Summe in Äquivalenten des Analyten, mit dem die Kalibrierung erstellt wurde, aufgeführt.

Zur Bestimmung der ELISA Test-Güte werden die Parameter Sensitivität und Spezifität herangezogen. Die Sensitivität gibt den Anteil der richtig-positiven Ergebnisse an der Gesamtheit der positiven Ergebnisse an. Sie bezeichnet somit die Wahrscheinlichkeit, ein positives Ergebnis auch als solches zu erkennen. Die Spezifität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, ein negatives Ergebnis auch als solches zu erkennen. Richtig-positive (RP), richtig-negative (RN), falsch-positive (FP) und falsch-negative (FN) Ergebnisse werden ermittelt, indem die Immunoassay-Ergebnisse mit Referenzwerten (ermittelt durch chromatographische Bestätigungsanalyse, zumeist GC/MS) verglichen werden. Eine Probe wird als positiv gewertet, wenn das Analysenergebnis größer oder gleich dem spezifizierten Cutoff Wert (Grenze zwischen positivem und negativem Ergebnis) ist. Die Sensitivität wird errechnet als die richtig-positive Rate, bzw. die Bestätigungsrate chromatographischer Methoden ($RP/(RP+FN)$). Die Spezifität wird errechnet als richtig-negative Rate ($RN/(RN+FP)$). Der Positive Predictive Value (positiver Vorhersagewert, PPV) ist definiert als $RP/(RP+FP)$, während der Negative Predictive Value (negativer Vorhersagewert (NPV) wie folgt errechnet wird: $RN/(RN+FN)$.

2.4.2.2. Grundlagen der GC/MS

In den letzten Jahrzehnten hat sich Kapillar-Gaschromatographie in Verbindung mit Quadrupol-Massenspektrometrie als Routinemethode in allen Bereichen der analytischen Chemie verbreitet und wird für forensisch-toxikologische Untersuchungen am häufigsten eingesetzt.

Der zumeist derivatisierte Haarextrakt wird bei der Gaschromatographie in den Strom einer inerten gasförmigen mobilen Phase (Trägergas, z.B. Helium) eingespritzt oder von einer SPME-Faser desorbiert. Die Probe wird durch eine Kapillarsäule transportiert, in der sich die zu untersuchenden Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase auftrennen.

In der sog. Ionenquelle werden die Analytmoleküle mit energiereichen Elektronen ionisiert (Elektronenionisation, EI). Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und im Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z)

aufgetrennt. Die elektrischen Ladungen werden mit einem Elektronenvervielfacher zu einem meßbaren Strom verstärkt. Der Massenanalysator besteht beim Quadrupol-Massenspektrometer aus vier parallelen Stäben, an die ein elektromagnetisches Feld, bestehend aus einem Gleichspannungs- und Wechselspannungsanteil, angelegt wird. Dieses bewirkt, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis bei einem gegebenen Gleich-/Wechselspannungsverhältnis den Analysator passieren können [68].

Als Messmodi können Fullscan oder SIM (Selected ion monitoring) Experimente verwendet werden. Beim Fullscan-Modus werden alle Ionen eines gewählten Bereiches (z.B. m/z 50-550) fortlaufend aufgenommen. Anschließend bietet sich die Möglichkeit der Suche in einer Spektrenbibliothek. Nachteil ist die geringe Empfindlichkeit des Fullscan-Modus, so dass er für Spurenanalysen ungeeignet ist. Bei SIM-Experimenten werden nur wenige ausgewählte Ionen als Funktion der Zeit detektiert. Durch die längere Meßzeit pro Ion erniedrigt sich die Nachweisgrenze gegenüber dem Fullscan-Modus um den Faktor 10-100 [68]. Zur sicheren Identifizierung der Analyten werden die Retentionszeit und das Intensitätsverhältnis zwischen den ausgewählten SIM-Ionen herangezogen.

2.4.2.3. Grundlagen der LC/MS-MS

Flüssigchromatographie in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie konnte sich in den letzten Jahren ebenfalls als Analysemethode in der analytischen Chemie etablieren und wird zunehmend für forensisch-toxikologische Untersuchungen verwendet.

Hierbei wird die mobile Probenlösung nach flüssigchromatographischer Trennung an einer stationären Phase mit Hilfe einer Ionenquelle in die Gasphase überführt, wobei die Analyten ionisiert werden und der aus der LC austretende Eluentenstrom (mobile Phase und Puffer) verdampft wird. Für forensisch-toxikologische Zwecke sind zum einen die Elektrospray-Ionisation (ESI) und zum anderen die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) gebräuchlich.

Bei der ESI wird der Analyt in der Ionenquelle bei Atmosphärendruck versprüht und in das Hochvakuum des Massenspektrometers geführt [69]. Die Analytlösung wird auf eine Elektrode geleitet, dabei entsteht ein Nebel aus hochgeladenen, feinst verteilten Tröpfchen. Der Sprühvorgang wird dabei durch ein Hilfsgas (Stickstoff) unterstützt, so dass ein konstantes Spray erzeugt werden kann. Die Polarität der anliegenden Hochspannung bestimmt hierbei, ob ein Überschuss positiver oder negativer Ladung erzeugt wird. Die entstandenen Ionen werden durch das anliegende elektrische Feld in Richtung Masseanalysator beschleunigt.

Bei der APCI fungiert die verdampfte Mobilphase nach Ionisation als Reaktandgas und tauscht Ladungen (Protonen) mit dem Analyten aus. Hierfür wird die Mobilphase mit Hilfe eines beheizten Verneblers gegen eine Coronaentladungsnadel geleitet. Die Polarität der Nadelspannung bestimmt, ob positive oder negative Ionisation erfolgt. In tendenzieller Abgrenzung zur ESI ist die Anwendbarkeit auf weniger polare Analyten und die Akzeptanz höherer Flussraten der Mobilphase erwähnenswert.

Die zu Tandem-Massenspektrometrie eingesetzten Triple-Quadrupol MS/MS-Systeme bestehen aus einer Kombination von zwei Quadrupol-Massenfiltern (Quad 1/Quad 3), zwischen denen sich ein weiteres Quadrupol als Kollisionszelle befindet (Quad 2). In dieser Zelle werden die im Quad 1 selektierten Ionen durch Gasmoleküle (Stickstoff) fragmentiert. Die gebildeten Fragmente (Produktionen) werden in das zweite Massenfilter überführt und getrennt.

Als hauptsächlich in der quantitativen Analytik verwendeter Messmodus wird der sehr empfindliche Multiple Reaction Monitoring (MRM) verwendet. Im Quad 1 werden Ionen selektiert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Im Quad 3 wird wiederum nur ein bestimmtes Fragmention selektiert, so dass spezifische Fragmentierungsreaktionen detektiert werden, ein Signal tritt daher nur bei dem speziellen Massenübergang von Quad 1 → Quad 3 auf. Da die Wahrscheinlichkeit, dass Störsubstanzen die gleiche Reaktion eingehen, minimal ist, wird der störende Hintergrund erheblich erniedrigt und die Selektivität des Nachweises erhöht.

2.4.3. Einführung in die Qualitätskontrolle

Forensisch-toxikologische Untersuchungen von Haarproben zum Nachweis und zur Bestimmung von Drogen, Medikamenten oder sonstigen chemischen bzw. körperfremden Stoffen werden insbesondere im Rahmen der Rechtspflege (straf- und verwaltungsrechtlich relevante Sachverhalte), zusätzlich aber auch bei klinischen Fragestellungen ausgeführt; daher sind höchste Anforderungen bezüglich der Qualität zu stellen [2]. Unter Qualitätskontrolle versteht man die Gesamtheit aller Maßnahmen die es erlauben, Aussagen über Qualität und Fehler von Analyseergebnissen zu treffen.

Bei der Analyse von Haarproben und der Interpretation der Ergebnisse sind im Vergleich zur Analyse von anderen biologischen Matrices viele Besonderheiten zu berücksichtigen. Dies ist bedingt durch uneinheitliche Einflüsse wie Heterogenität der Matrix, Stabilität von Analyten und mögliche Einflüsse der Probenvorbereitung. Zur Qualitätskontrolle von Haaranalyseverfahren existieren daher spezielle Bewertungsrichtlinien und Empfehlungen hinsichtlich der Probennahme, -sicherung, -kennzeichnung, -transport und -lagerung, der Mindestanforderungen an das Labor (Personal, Geräte, Unabhängigkeit, Akkreditierung, Teilnahme an Ringversuchen), der Dokumentation und Begutachtung sowie Bewertung der Unsicherheit analytischer Befunde. Diese detaillierten und aktuellen Richtlinien werden von der Food and Drug Administration (FDA [70]), der European Commission (EC [71]), der Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie (GTFCh [72]), der World Anti Doping Agency (WADA [73]), der Society of Hair Testing (SOHT [74]) sowie der Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMSHA [75]) zur Verfügung gestellt.

2.4.4. Grundlagen einer Validierung

Die Validierung von Messmethoden zur Haaranalytik ist im Rahmen der Qualitätskontrolle als Beurteilungsgrundlage für die Bewertung der Güte der angewendeten Verfahren unerlässlich. Als Validierung werden der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode angesehen. Die Validierung eines Analysenverfahrens besteht im Wesentlichen aus der kritischen Untersuchung der einzelnen Analysenschritte auf systematische und statistische Fehler mit dem Ziel, für ein Analysenverfahren Aussagen hinsichtlich der Parameter Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Genauigkeit, Wiederfindung und Stabilität zu machen. Zur Auswertung und Interpretation von Validierungsdaten hat sich das Programm VALISTAT® [76] bewährt, welches sich an den vorgegebenen Richtlinien der GTFCh orientiert. Die einzelnen Validierungsparameter werden im Folgenden definiert.

2.4.4.1. Linearität

Linearität besitzt eine chemisch-analytische Methode, wenn sie innerhalb eines festgelegten Bereiches Meßsignale liefert, deren Werte direkt proportional zur Analytkonzentration in der Probe sind.

2.4.4.2. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist definiert als kleinster Analytgehalt, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Leerwert unterscheidbar ist.

Die Bestimmungsgrenze ist definiert als Konzentration, ab der mit einer bestimmten Ergebnisunsicherheit quantifiziert werden kann.

2.4.4.3. Genauigkeit

Die Genauigkeit ist eine Beschreibung der gesamten (zufälligen und systematischen) Abweichungen einzelner Werte vom Sollwert. Sie beinhaltet die Parameter Richtigkeit und Präzision.

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom Bezugswert (Sollwert). Sie repräsentiert die systematischen Fehler des Analyseverfahrens.

Die Präzision ist ein Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander. Es wird nach Art und Weise der Wiederholung zwischen verschiedenen Arten der Präzision unterschieden (Wiederhol- und Laborpräzision).

2.4.4.4. Wiederfindung

Als Wiederfindung wird das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe definiert.

2.4.4.5. Stabilität

Die Stabilität ist definiert als die Stabilität eines Analyten in einer Matrix unter bestimmten Bedingungen (Lagerungsdauer, Temperatur etc.). In der Literatur wird z.B. das Problem eines Abbaus der Analyten, insbesondere Heroin und Cocain, während langer Standzeiten im Autosampler geschildert.

2.5. Grundlagen von Patienten-Monitoring und Therapie-Compliance

Bei der Haaranalytik auf inkorporierte Fremdstoffe stehen die Feststellung von Ausmaß und Dauer eines missbräuchlichen Konsums von Drogen bzw. einer Exposition gegenüber Fremdstoffen, oder auch der Nachweis einer Abstinenz z.B. zur Wiedererlangung der Fahrerlaubnis bzw. im Rahmen eines „Workplace Drug Testings“ (Einstellungsuntersuchung etc.) im Vordergrund [2]. Klinische Fragestellungen bei der Haaranalytik konzentrierten sich in der Vergangenheit ebenfalls auf die Aufklärung eines Missbrauchs von Substanzen, gleichzeitig bietet die Haaranalytik jedoch die Möglichkeit eines therapeutischen Drug Monitoring bzw. einer Compliance-Analyse [77].

Generell ist Patienten-Compliance ein Problem in der therapeutischen Medizin. Indirekte Methoden zur Bewertung einer Compliance basieren auf Merkmalen wie Fragebögen, Selbstangaben oder dem Zählen von Pillen. Direkte Methoden hingegen verwenden die analytische Bestimmung der Wirkstoffe in biologischen Matrices wie Blut, Urin und Haare [78]. Die Möglichkeit Haaranalytik zum Therapiemonitoring einzusetzen wurde erst in letzter Zeit erkannt [79-81].

Insbesondere das Monitoring von Patienten hinsichtlich eines Konsums verschriebener oder nicht verschriebener Drogen im Verlauf von Substitutionsprogrammen liefert wertvolle Informationen für Diagnose und Führung der Patienten und ist daher von großer Wichtigkeit. Wiederholt wurde gezeigt, dass persönliche Angaben über den eigenen Drogenkonsum nicht sehr aufschlussreich sind [27-29]: Aufgrund befürchteter Konsequenzen neigen die meisten Konsumenten dazu, illegalen Drogenkonsum zu verneinen oder nur geringen Konsum zuzugeben. Urinalysen werden in den meisten offiziellen Substitutionsprogrammen durchgeführt. Allerdings stellt Urin ein problematisches Untersuchungsmaterial dar, da er septisch bzw. infektiös sein kann, gekühlt oder für längere Aufbewahrung gefroren und oftmals unter Beobachtung gesammelt werden muss. Angesichts der Unsicherheit von Selbstangaben bezüglich Drogenkonsum, sind Compliance Untersuchungen jedoch sehr wichtig, zum einen, um den Fortschritt der einzelnen Patienten zu kontrollieren, und zum anderen, um die Effektivität bestimmter Eingriffe in kontrollierten klinischen Tests einzuschätzen. Die gebräuchlichsten

Screeningmethoden von Urinproben beruhen auf Immunoassays. Eine Bestätigung mittels chromatographischer Methoden wird oft nicht durchgeführt. Dennoch ist insbesondere die chromatographische Haaranalyse als vorteilhaft gegenüber Urinassays anzusehen. Als Gründe hierfür sind die nicht invasive Art der Probennahme, die niedrigeren Nachweisgrenzen und die besondere Möglichkeit einer retrospektiven Analyse über einen vergleichbar mit der Urinanalytik längeren Zeitraum zu nennen.

Für die Interpretation der Ergebnisse der Haaranalyse, die zur Klärung forensisch-toxikologischer Fragestellungen und zur Therapie von Drogenkonsumenten hilfreich sind, ist es von Interesse, die Beziehungen zwischen aufgenommener Dosis und der daraus resultierenden Drogenkonzentration im Haar zu untersuchen. Bei der Interpretation von Haaranalysen ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine solche Korrelation nicht immer möglich ist. Als Gründe dafür sind individuell unterschiedliches Haarwachstum, kosmetische Haarbehandlungen und insbesondere unkorrekte und oftmals zu niedrige Dosisangaben im Falle eines zugegebenen Drogenkonsums Drogenabhängiger zu nennen [82]. Neben dem unbekanntem Reinheitsgrad der illegalen Komponenten müssen ebenfalls individuelle Unterschiede bei der Aufnahme der Drogen aus dem Blut in Haare sowie eine unterschiedlich lange Expositionsdauer der Haare durch Kontakt mit Sebum und Schweiß bei den verschiedenen Probanden in Betracht gezogen werden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Chemikalien

Folgende Substanzen wurden von Promochem (Wesel, Deutschland) als Stammlösungen bezogen (Konzentration 1 mg/ml): DL-Amphetamin (A), DL-Amphetamin-d₅ (A-d₅), Benzoylecgonin (BE), Benzoylecgonin-d₃ (BE-d₃), Buprenorphin (BU), Buprenorphin-d₄ (BU-d₄), Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN), Cocaethylen (CE), Cocaethylen-d₈ (CE-d₈), Cocain (COC), Cocain-d₃ (COC-d₃), Codein (COD), Codein-d₃ (COD-d₃), DL-2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolinium Perchlorat (EDDP Perchlorat), DL-2-Ethyl-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolinium-d₃ Perchlorat (EDDP-d₃ Perchlorat), Fentanyl (FE), Fentanyl-d₅ (FE-d₅), Heroin (HER), Heroin-d₉ (HER-d₉), Hydromorphon (HM), Hydromorphon-d₃ (HM-d₃), DL-Methadon (MET), DL-Methadon-d₉ (MET-d₉), DL-Methamphetamin (MA), DL-Methamphetamin-d₁₁ (MA-d₁₁), DL-3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), DL-3,4-Methylendioxyamphetamin-d₅ (MDA-d₅), DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDEA), DL-3,4-Methylendioxyethylamphetamin-d₅ (MDEA-d₅), DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin (MDMA), DL-3,4-Methylendioxymethamphetamin-d₅ (MDMA-d₅), DL-3,4-Methylendioxyphenyl-2-butanamin (BDB), DL-N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin (MBDB), DL-1,2-Dideutero-N-trideuteromethyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin (MBDB-d₅), 6-Monoacetylmorphin (MAM), 6-Monoacetylmorphin-d₃ (MAM-d₃), Morphin (MOR), Morphin-d₃ (MOR-d₃), Norfentanyl (NFE), Norfentanyl-d₅ (NFE-d₅), Normorphin (NOMO), Oxycodon (OC), Oxycodon-d₃ (OC-d₃), Oxymorphon (OXMO), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-d₃ (THC-d₃) und Tramadol (TRA).

Acetylcodein (AC), Acetylcodein-d₃ (AC-d₃) und Papaverin (PA) wurden von Lipomed (Bad Säckingen, Deutschland) erhalten (Konzentration 1 mg/ml). Bisnortilidin (BNTI), Nortilidin (NTI) und Tilidin (TI), wurden als Feststoff von Gödecke (Freiburg i. B., Deutschland) geliefert, Piritramid (PI) von Janssen (Neuss, Deutschland).

Ferner wurden die nachfolgend genannten Substanzen von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen: N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) und N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA).

Weitere Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) in analysenreiner Qualität bezogen.

3.2. Geräte und Materialien

Zum Abdampfen von Lösungsmitteln wurde ein TCS-Metallblock-Thermostat Typ Vapotherm mobil I (Labor Technik Barkey, Leopoldshöhe, Deutschland) eingesetzt. Für das Schütteln beim Waschvorgang der Haarproben wurde ein Vortex Genie 2 Mixer (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) verwendet. Die Zerkleinerung der Haare erfolgte mit handelsüblichen Laborscheren. Die Urinscreenings wurden mit einem Roche Cobas Mira S System von Microgenics (Passau, Deutschland) durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte vollautomatisch mit fertigen Reagenziensätzen der Firma Microgenics nach 200 µl Probenzugabe. Weitere Urinanalysen wurden in den Rheinischen Landeskliniken Bonn mit dem Immunoassaysystem TDxFLx[®] von Abbott Laboratories (Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Die Gerätekopplungen (GC/MS und LC/MS-MS sind in Kapitel 3.6 aufgeführt. Headspace Rollrandflaschen (Vials) 22,5x46 mm, 10 ml Inhalt wurden von Chromtech (Idstein, Deutschland), die magnetischen Bördekkappen (Loch 8 mm) mit Silicon-Septum von CS-Chromatographie (Langerwehe, Deutschland) bezogen. Schraubdeckelgläser, 2 ml Inhalt, die dazugehörigen Micro-Einsätze sowie PTFE/Silicon-Septen und Schraubdeckel wurden von Agilent (Waldbronn, Deutschland) geliefert. Chromabond Drug Festphasenextraktionskartuschen (3 ml, 200 mg) wurden von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Die Verbrauchsmaterialien zur automatisierten ELISA Bestimmung, sowie die ELISA-Kits (Cocaine Met Micro-Plate EIA, Oral Fluid und Opiates Micro-Plate EIA Oral Fluid, Orasure Technologies, Inc.) wurden von BioRad Technologies (München, Deutschland) erhalten.

3.3. Haar- und Urinproben und Asservierung

Die Haare wurden von der Rückseite des Kopfes so nahe wie möglich zur Kopfhaut mit einer Schere abgeschnitten, fixiert, mit Klebestreifen auf einem Blatt Papier befestigt und am kopfnahen Ende gekennzeichnet. Spezielle Haarbehandlungen wie beispielsweise Bleichen, Färben oder Dauerwellenbehandlungen wurden dokumentiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur trocken in Briefumschlägen gelagert, im Rahmen von Obduktionen asservierte Haarproben wurden in Schraubdeckelgläsern gefroren aufbewahrt.

Negative Kontrollproben wurden Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn entnommen. Die lokale Ethik-Kommission gab zu den Studien ihre Zustimmung.

3.3.1. ELISA und GC/MS Bestimmung von Opiaten, Cocain und Cocainmetaboliten sowie Urinscreenings

Die Haarproben zur ELISA-Bestimmung und zur GC/MS-Bestimmung von Opiaten und Cocain wurden Teilnehmern des Bonner Heroingabeprojekts (Heroinambulanz, Medizinische Poliklinik Bonn) sowie Teilnehmern aus der Methadonkontrollgruppe jeweils einen Monat vor Vergabebeginn (Zeitpunkt T-1) und nach einem Jahr (Zeitpunkt T12) anonymisiert entnommen (n=103). Die Patienten des Heroingabeprojekts verabreichten sich selbst unter ärztlich kontrollierten Bedingungen Heroin-Hydrochlorid intravenös (10-1000 mg/Tag, 2 oder 3 Mal täglich), die Patienten des Methadonsubstitutionsprogramms nahmen, ebenfalls ärztlich kontrolliert, orale Dosen von DL-Methadonlösung (15-260 mg/Tag) auf. Es fand eine regelmäßige Abgabe statt, so dass die Patienten auf diese Weise die Möglichkeit hatten, die Substanzen (Heroin bzw. Methadon) ohne Beschaffungskriminalität zu erhalten. Damit hatten die Konsumenten in vielen Fällen die Möglichkeit, trotz ihrer Abhängigkeit einem geregelten Leben nachzugehen. Als Eintrittskriterium der Studie wurde unter anderem ein opiatepositives Urinscreening angesehen. Dies war bei allen untersuchten Proben zum Zeitpunkt T-1 der Fall. Urinproben der Teilnehmer beider Gruppen wurden zum Zeitpunkt T-1 einmal und

zum Zeitpunkt T12 an fünf aufeinanderfolgenden Tagen asserviert. Die Probanden wurden als positiv auf einen Analyten (Opiate, Cocain, Methadon, Cannabinoide, Amphetamine, Benzodiazepine) gewertet, sobald bereits eine der fünf Urinproben positiv getestet wurde. Die Haarproben Verstorbener, deren Tod im Zusammenhang mit Drogenkonsum stand, wurden im Rahmen einer Obduktion entnommen.

3.3.2. HS-SPME GC/MS Bestimmung von Methadon

Haarproben, die mit HS-SPME GC/MS auf Methadon untersucht wurden, stammten ebenfalls aus der Methadonkontrollgruppe. Von 35 Patienten, die gute Therapiecompliance aufwiesen, wurden Haarproben nach einem Jahr (T12) Teilnahme am Methadonsubstitutionsprogramm untersucht. Bei 6 Patienten standen nur Haarproben nach einem halben Jahr (T6) Teilnahme zur Verfügung, da diese Patienten vorzeitig aus dem Programm ausgetreten sind. Patienten, die „Take-home“-Dosen erhielten, wurden hinsichtlich ihrer Compliance besonders kontrolliert und im Falle eines Nichteinhaltens aus der Studie ausgeschlossen.

3.3.3. GC/MS Bestimmung von Opiaten, Cocain, Amphetaminen, Cannabinoiden und Methadon sowie Urinscreenings

Weitere Haarproben zur GC/MS-Bestimmung von Opiaten, Cocain, Amphetaminen, Cannabinoiden und Methadon wurden aktiven Drogenkonsumenten (n=51) während einer Drogenentgiftungsbehandlung unmittelbar nach stationärer Aufnahme in den Rheinischen Kliniken Bonn entnommen. Das Kollektiv bestand aus 39 Männern und 12 Frauen im Alter von 20 bis 53 Jahren (Mittelwert 31,7 Jahre). Schamhaar wurde von 36 Patienten asserviert. Im Verlauf der Studie wurde das Konsumverhalten der Patienten erfragt, wobei das Interviewprotokoll diagnostische Kriterien sowie Fragen zur Intensität des Drogenkonsums in den letzten Monaten beinhaltete. Urinproben für ein begleitendes immunologisches Drogenscreening wurden von allen Patienten am Tag der Aufnahme durch das klinische Personal der Rheinischen Kliniken Bonn entnommen und dort im klinischen Labor mittels Standardimmunoassayscreening auf

die Gegenwart der oben aufgeführten Drogen und zusätzlich Benzodiazepine analysiert. Positive Ergebnisse wurden dort nicht mittels Bestätigungsanalyse abgesichert. Ein Haartest wurde positiv gewertet, wenn eines der Segmente der komplett segmentierten Haarproben zu einem positiven Testergebnis führte. Dieses Vorgehen wurde gewählt, weil die Selbstangaben unterschiedliche Zeitabschnitte eines vergangenen Drogenkonsums umfassten.

3.3.4. LC/MS-MS Bestimmung von Opioidanalgetika

Das Probandenkollektiv zur Untersuchung auf Opioidanalgetika bestand aus an Krebs erkrankten Personen, die im Rahmen einer Schmerztherapie tägliche Dosen verschiedener Opioidkombinationen erhalten haben. Die Haarproben von 31 Patienten (15 Männer, 16 Frauen, zwischen 39 und 84 Jahren, Mittelwert 58,7 Jahre) wurden nach stationärer Aufnahme im Malteser-Krankenhaus in Bonn entnommen, wobei als Aufnahmegründe Schmerz oder Übelkeit bei den Probanden angegeben wurden. Es wurde jeweils die komplette Länge der Haarsträhnen analysiert, um auch Langzeitinformationen über die Opioidbehandlung der Patienten vor der stationären Aufnahme im Malteser-Krankenhaus in Bonn zu erhalten.

3.4. Patienten- und Probandenkollektiv in der Übersicht

Für die Interpretation der in Kapitel 5.2 dargestellten Ergebnisse wurden soweit möglich Haarproben verschiedenster Probandenkollektive herangezogen, wie die Tabelle 2 in der Übersicht zeigt.

Tabelle 2: In den einzelnen Kapiteln untersuchte Probandenkollektive, Fallzahlen (n) und verwendete Segmente.

Probandenkollektiv	n	Segmentlänge analysiert	Kapitel	Seite
Heroinprojekt und Methadonvergabe	103	1 cm	5.2.1	85
Verstorbene (Opiat- und Cocainabusus)	21	1 cm		
Heroinprojekt	46	1 cm	5.2.2	91
	28	2 cm, komplett segmentiert		
Verstorbene (Opiatabusus)	24	1 cm		
Heroinprojekt	48	1 cm	5.2.3	99
Methadonvergabe	35	1 cm	5.2.4	105
Methadonvergabe	41	1-3 cm	5.2.5	108
	15	1 cm, komplett segmentiert		
Entgiftungsprogramm	51	3 cm, komplett segmentiert	5.2.6	115
Palliativmedizinpatienten	31	komplett eingesetzt	5.2.7	118

3.5. Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Haarproben wurde ein Verfahren eingesetzt, das in früheren Untersuchungen [83,84], angelehnt an ein Verfahren von Kauert [36], zum Ausschluss von externen Kontaminationen optimiert wurde. Die Proben wurden jeweils 5 min mit Aqua dest., Petrolether und Dichlormethan unter Zuhilfenahme eines Vortex-Mischers gewaschen und anschließend im Trockenschrank bei 55° C getrocknet. Die Waschlösungen wurden zur Kontrolle des Dekontaminationsverlaufs untersucht. Die Proben wurden zunächst in Segmente aufgeteilt (1-3 cm, je nach Haarlänge und Fragestellung, siehe Tabelle 2), welche im Anschluss in kleine Stücke von ungefähr 1 mm geschnitten wurden.

3.5.1. Opiate, Cocain

Nach Zugabe von 4 ml Methanol zu 50 mg zerkleinerten Haaren wurden die Proben 5 Stunden bei 50° C im Ultraschallbad extrahiert. Danach wurden die Proben in zwei Fraktionen unterteilt (1 ml für den ELISA Test, 3 ml zur GC/MS Bestimmung) und nach Zugabe von 50 µl jedes deuterierten internen Standards (5µg/ml) zum GC/MS Aliquot unter einem Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Proben, bei denen keine ELISA Bestimmung durchgeführt wurde, wurden mit 4 ml Methanol extrahiert und nach Zugabe von 50 µl jedes deuterierten internen Standards (5µg/ml) eingedampft. Zur ELISA Bestimmung wurde die Fraktion in 250 µl Sörensen-Phosphatpufferlösung (pH 7,4) aufgenommen und direkt mit dem Coda Automated EIA Analyzer gemessen. Proben, die außerhalb des Kalibrationsbereiches des ELISA Tests lagen, wurden mit der oben genannten Pufferlösung 1:10 verdünnt und erneut analysiert. Für die Analyse mittels GC/MS wurde die Fraktion in 2 ml 1 M Phosphatpuffer (pH 6) aufgenommen, worauf sich ein SPE Schritt anschloss:

Die SPE Kartuschen wurden nacheinander mit 2 ml Methanol, 2 ml Wasser und 2 ml Phosphatpuffer (pH 6) konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen mit 1 ml Wasser, 1 ml 0,1 M Phosphorsäure (zweimal) und 1 ml Methanol gewaschen. Die Elution der Analyten erfolgte mittels 2 ml Dichlormethan/2-Propanol/Ammoniak (80/20/2).

Die Elutionslösung wurde unter Stickstoff bei 60° C eingedampft und der Extrakt wurde nach Zugabe von 70 µl MSTFA mit 30µl Pyridin und 100 µl Isooctan für 15 min bei 90 °C derivatisiert. Ein 1 µl Aliquot wurde in das GC/MS System injiziert.

3.5.2. Amphetamine

10 mg Haare, 1 ml NaOH-Lösung (10 M) und 100 µl interner Standard-Mix (200 ng der deuterierten Analyte/ml) wurden in ein 10 ml Headspace-Vial gegeben und sofort mit einem Silikon-Septum und einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. Die Haarproben wurden mittels Headspace-Solid-Phase-Microextraction (HS-SPME) mit Derivatisierung auf der Faser und GC/MS vermessen. Die Derivatisierung erfolgte mit 25 µl MBTFA für 2 min bei 50 °C. Die SPME-Methodik ist in Tabelle 3 dargestellt.

3.5.3. Cannabinoide, Methadon

10 mg Haare, 1 ml NaOH-Lösung (1 M), 0,5 g Na₂CO₃ und 100 µl interner Standard-Mix (200 ng der deuterierten Analyte/ml) wurden in ein 10 ml Headspace-Vial gegeben und sofort mit einem Silikon-Septum und einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. Die Haarproben wurden mittels Headspace-Solid-Phase-Microextraction (HS-SPME) mit Derivatisierung auf der Faser und GC/MS vermessen. Die Derivatisierung erfolgte mit 25 µl MSTFA für 8 min bei 90 °C. Die SPME-Methodik wird in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Methodenparameter SPME.

	Amphetamine und Designerdrogen [3,84]	Cannabinoide, Methadon und EDDP [3,83]
Einwaage	10 mg	10 mg
Salzzusatz (Aussalzeffekt)	-	0,5 g Na ₂ CO ₃
Hydrolyse	10 M NaOH	1 M NaOH
Equilibrierung	Schütteln für 5 min bei 50 °C im Agitator (600 U/min, 5 s an, 2 s aus)	Schütteln für 5 min bei 90 °C im Agitator (600 U/min, 5 s an, 2 s aus)
Extraktion (Exposition der SPME Faser)	10 min unter weiterem Schütteln (50 °C)	25 min unter weiterem Schütteln (90 °C)
Derivatisierung	25 µl MBTFA, 2 min (50 °C)	25 µl MSTFA, 8 min (90 °C)
Desorption	4 min (52 mm Eintauchtiefe)	5 min (52 mm Eintauchtiefe)

3.5.4. Opioidanalgetika

Nach Zugabe von 8 ml Methanol und 40 µl internem Standard (1 µg/ml) zu etwa 50 mg Haaren wurden die Proben im Ultraschallbad 5 Stunden lang bei 50 °C extrahiert. Danach wurden die Extrakte im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft, in 100 µl mobiler Phase A (Wasser/Acetonitril 90:10, 5 mM Ammoniumformiat) aufgenommen und davon 10 µl Aliquote in das LC/MS/MS System injiziert.

3.6. Methodenentwicklung

3.6.1. ELISA Test Methodik

Zur Messung der Haarproben wurde ein Coda Automated EIA Analyzer mit der Software Version Coda 4.0 verwendet.

Die Entwicklung der Assays wurde unterstützt von Sachs et al. [85]. Die zum Nachweis für Cocain, Cocainmetabolite und Opiate optimalen Cutoff Werte für die ELISA Tests waren 5 ng/ml (0,1 ng Cocain-Equivalente/mg Haar) und 2,5 ng/ml (0,05 ng Morphin-Equivalente/mg Haar) unter Verwendung einer 50 mg Haarprobe. Die Sensitivitäten und Spezifitäten wurden ermittelt, indem Haarproben von 124 Drogenkonsumenten zunächst mit ELISA analysiert wurden. In einem zweiten Schritt wurden die Immunoassay- mit GC/MS-Ergebnissen verglichen.

Beide ELISA-Tests hatten eine Sensitivität von 100%, die Spezifität lag bei 66% für die Cocain-Equivalente und bei 42% für die Morphin-Equivalente. Der positive Vorhersagewert (PPV) betrug 83% für die Cocain-Equivalente und 84% für die Morphin-Equivalente. Der negative Vorhersagewert (NPV) war 100% für beide Assays (Abbildung 11).

n=124		GC/MS +	GC/MS -			GC/MS +	GC/MS -
ELISA +		77 (62,1%)	16 (12,9%)	ELISA +		93 (75,0%)	18 (14,5%)
ELISA -		0 (0,0%)	31 (25,0%)	ELISA -		0 (0,0%)	13 (10,5%)
Cocain und Metabolite				Opiate			
Sensitivität: 100%				Sensitivität: 100%			
Spezifität: 66%				Spezifität: 42%			
PPV: 83%				PPV: 84%			
NPV: 100%				NPV: 100%			

Abbildung 11: ELISA Sensitivität und Spezifität (Cutoffs: 5 ng/ml für Cocain und 2,5 ng/ml für Opiate).

Ein aussagekräftiger Haar Immunoassay sollte eine Sensitivität und Spezifität größer als 90% haben, zudem sollten die Cutoffs nicht im Bereich der Nachweisgrenze des Assays liegen, da es in diesen Fällen zu vielen falsch-positiven Ergebnissen kommen kann [53]. Die Tests sowohl für Cocain als auch für Opiate ergaben jedoch niedrigere Spezifitäten. Unter Verwendung von höheren Cutoff Werten (10 und 20 ng/ml für Cocain, 5 und 20 ng/ml für Opiate) stiegen die Spezifitäten zunächst von 75% auf 79% für Cocain und von 45% auf 74% für die Opiate. Die Anzahl der falsch-positiven Proben sank bei höheren Cutoff Niveaus, allerdings traten falsch-negative Proben auf (Abbildung 12), die Sensitivitäten bei einem Cutoff von 20 ng/ml lagen bei 92% für den Cocain- und bei 85% für den Opiate-ELISA. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde als Cutoff Wert 5 ng/mg für den Cocain- und 2,5 ng/ml für den Opiatetest gewählt: Wegen der nicht ausreichenden Spezifitäten beider Tests auch bei den hohen Cutoff Werten wurde jeweils der niedrigste Cutoff Wert gewählt, um das Risiko falsch-negativer Proben zu vermeiden, da bei der Anwendung der ELISA Tests als Screeningmethoden der Nachweis aller positiven Proben, nicht jedoch zwingend die Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse im Vordergrund steht.

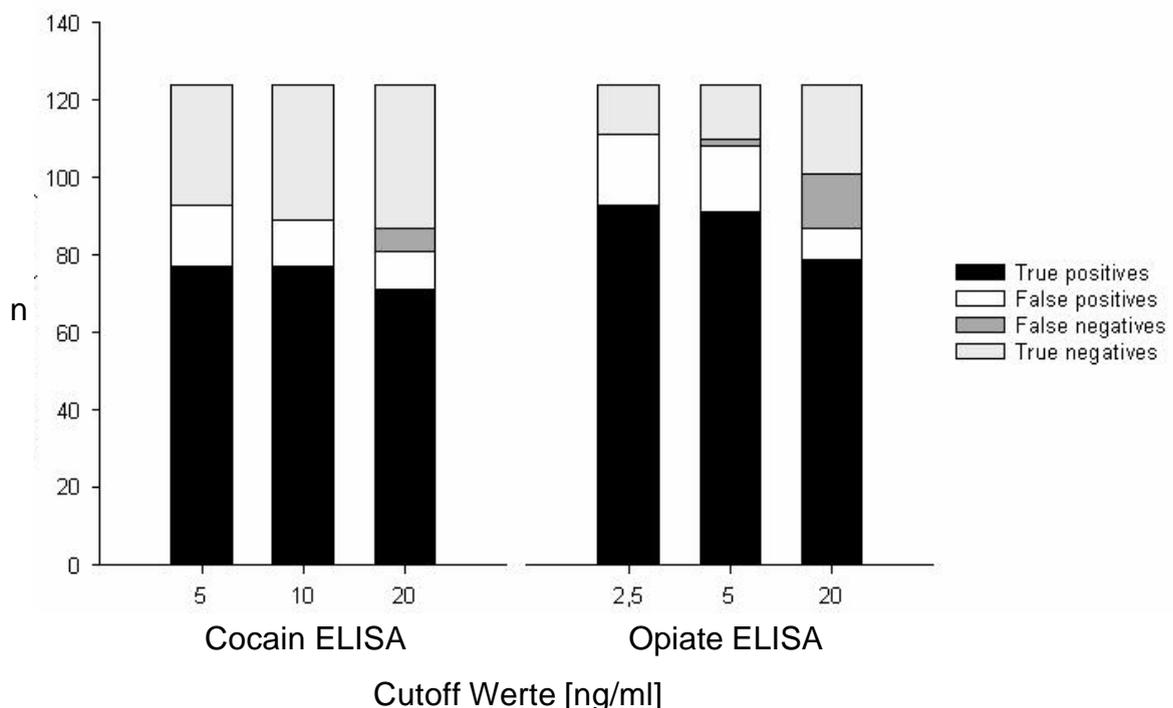


Abbildung 12: Vergleichende Ergebnisse zwischen den Cocain- und Opiate ELISA Tests und GC/MS Analysen bei unterschiedlichen Cutoffs (5-20 ng/ml für Cocain und 2,5-20 ng/ml für Opiate) für 124 Haarproben von Drogenkonsumenten.

Ein weiterer Grund für die Wahl der niedrigen Cutoff Werte sind die bereits publizierten Anforderungen an die Qualitätssicherung bei der forensisch-toxikologischen Untersuchung von Haarproben [72,75], wonach die zur Bestätigung verwendete Methode so empfindlich sein sollte, dass ein Analytgehalt von 0,2 ng/mg für die einzelnen Opiate und Cocain sowie ein Gehalt von 0,1 ng/mg für die Cocainmetaboliten mit dem ELISA nachgewiesen werden kann. Diese Empfehlung konnte mit der Sensitivität von 100% bei den niedrigen Cutoffs für beide ELISA Tests eingehalten werden.

Im Rahmen der Entwicklung der beiden ELISA Methoden (Bestimmung von Opiaten und Bestimmung von Cocain und Cocainmetaboliten) wurden neben der Bestimmung der Cutoff Werte die eingesetzten Probenvolumina (20 µl, 50 µl), Konjugatvolumina (50 µl, 100 µl) und die Vorinkubationszeiten (15 min, 30 min, 45 min zur Cocainbestimmung) optimiert. Die Parameter, die die beste Abgrenzung von Absorptionsvermögen und Konzentrationswerten zeigten sowie den größten Unterschied in den Absorptionswerten zwischen drogenfreiem Haar (Negativkontrolle) und dem niedrigsten Kalibrator (Opiateassay: 2,5 ng/ml, Cocainassay: 5 ng/ml) aufwiesen, wurden zur Analyse verwendet. Zur Bestimmung der Morphin-Equivalente für den Opiateassay stellten sich 20 µl Probenlösung und 100 µl Konjugat, zur Bestimmung der Cocain-Equivalente 50 µl Probenlösung und 50 µl Konjugat bei 30 min Vorinkubation als optimal heraus.

Zu Beginn der Entwicklung wurden für beide Assays 20 µl Probenvolumen und 100 µl Konjugat eingesetzt. Während der Opiateassay bei diesen Ausgangsbedingungen schon sehr gute Ergebnisse lieferte (Abbildung 13) und nicht weiter optimiert werden musste, konnte bei dem Cocainassay unter Verwendung von 100 µl Konjugat keine Differenzierung zwischen niedrigstem Kalibrator und der Negativkontrolle erzielt werden (Abbildung 14). Bei Einsatz von 50 µl Konjugat zeigte die Negativkontrolle eine geringere Absorption als der niedrigste Kalibrator. Der Kurvenverlauf war jedoch sehr flach, so dass die Kalibrierung nur einen geringen linearen Bereich mit guter Korrelation zwischen Absorption und Konzentration aufwies (Abbildung 15). Aus diesem Grund wurde ein Vorinkubationsschritt in die Methode eingefügt, der eine Vorreaktion der Analyten mit den Antikörpern ermöglicht mit dem Ziel, die nachfolgende Konkurrenzreaktion mit dem Konjugat für die Analyten zu

vereinfachen. Es wurden 15, 30 und 45 min Inkubationszeit gewählt, wobei das beste Ergebnis bei 30 min erzielt wurde (Abbildungen 16-18). Die Absorptionswerte zwischen niedrigstem Kalibrator und Negativkontrolle waren hierbei jedoch erneut nicht signifikant unterschiedlich. Das Probenvolumen wurde aus diesem Grunde von 20 µl auf 50 µl erhöht, wobei diese Erhöhung mit niedrigeren Absorptionswerten einherging, so dass eine Differenzierung zwischen niedrigstem Kalibrator und Negativkontrolle möglich war (Abbildung 19). Die einzelnen Absorptionswerte der zur Methodenentwicklung verwendeten Assays sind in Tabelle 4 aufgeführt.

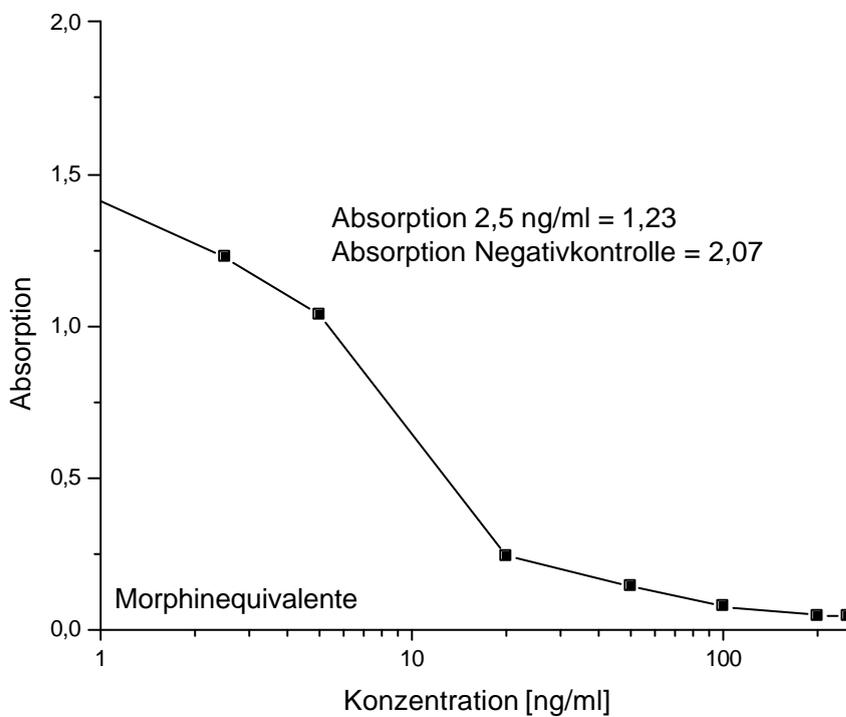


Abbildung 13: Opiateassay, Konjugatvolumen 100 µl, Probenvolumen 20 µl.

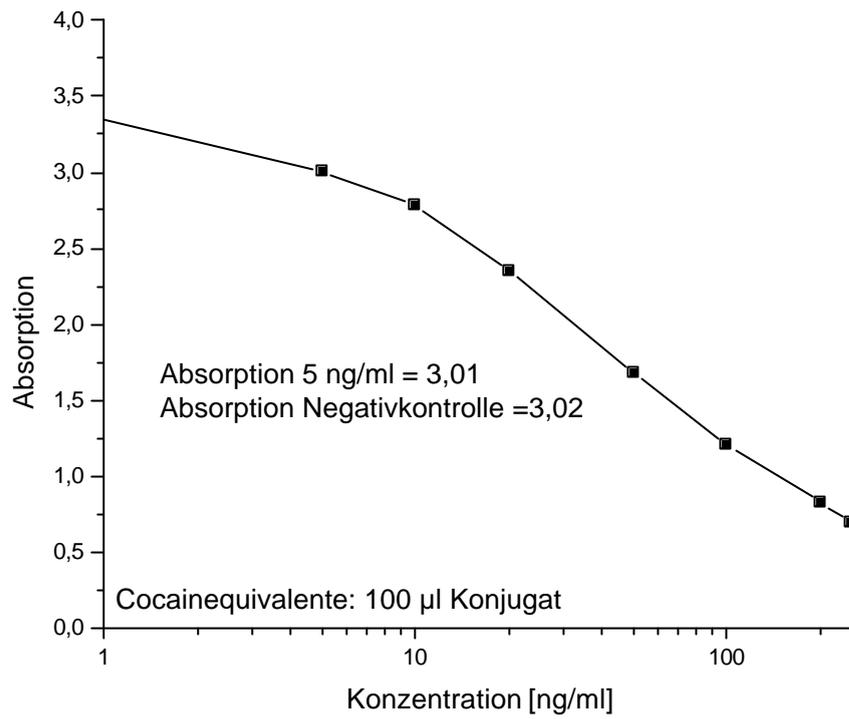


Abbildung 14: Cocainassay, Konjugatvolumen 100 µl, Probevolumen 20 µl.

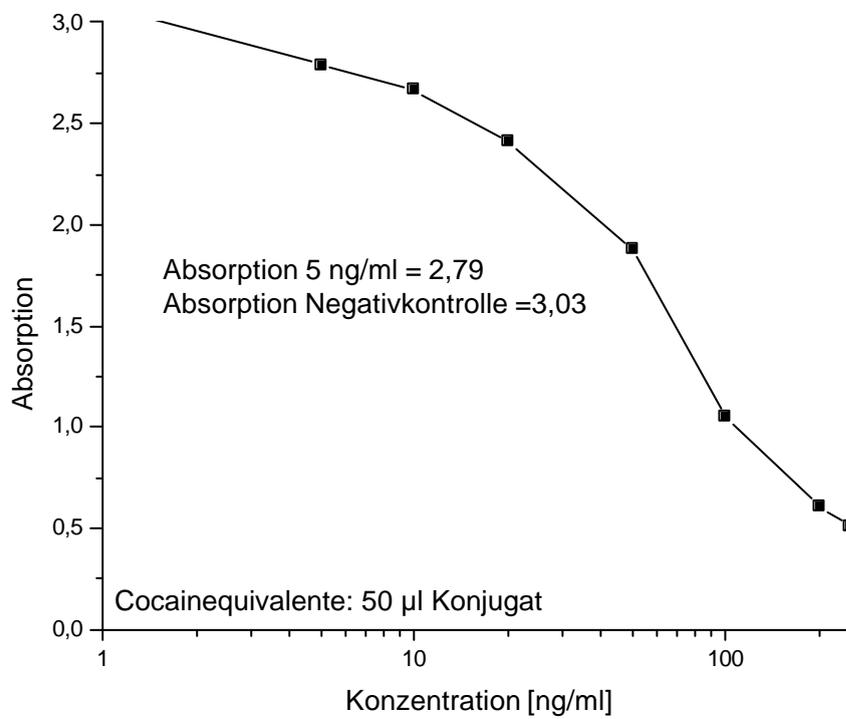


Abbildung 15: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl.

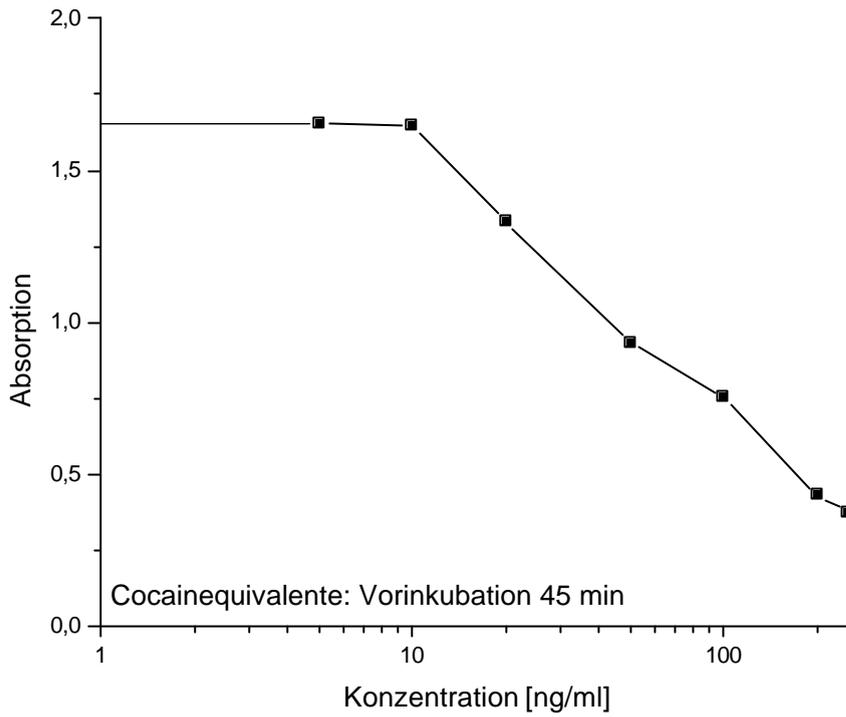


Abbildung 16: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl, Vorinkubation 45min.

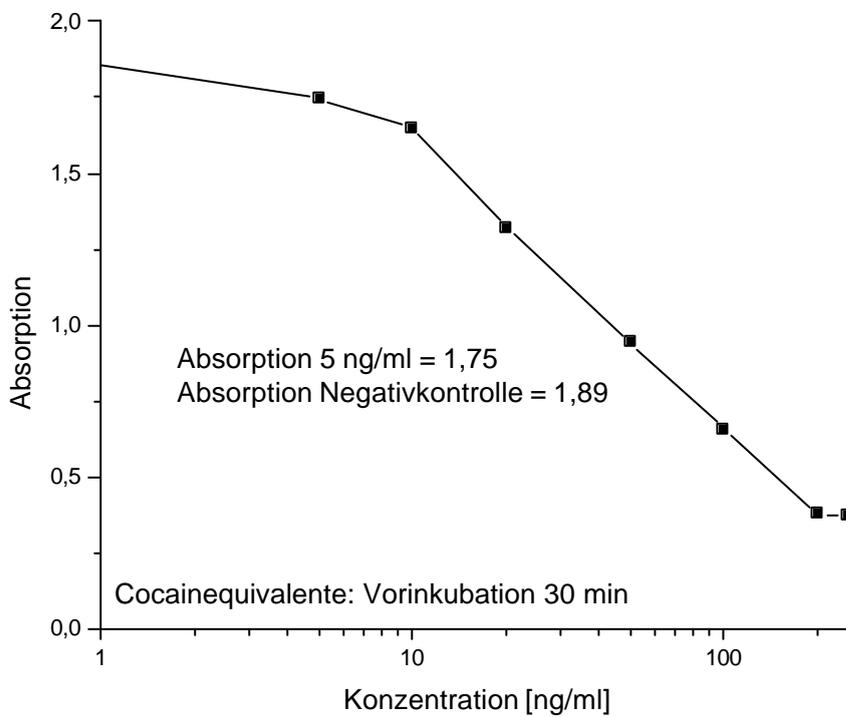


Abbildung 17: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl, Vorinkubation 30min.

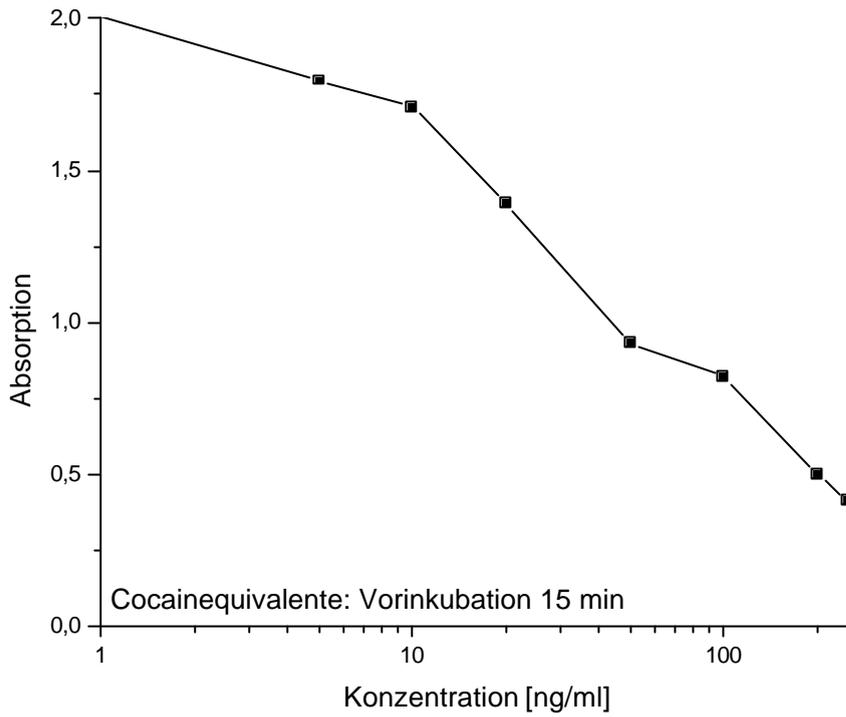


Abbildung 18: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl, Vorinkubation 15min.

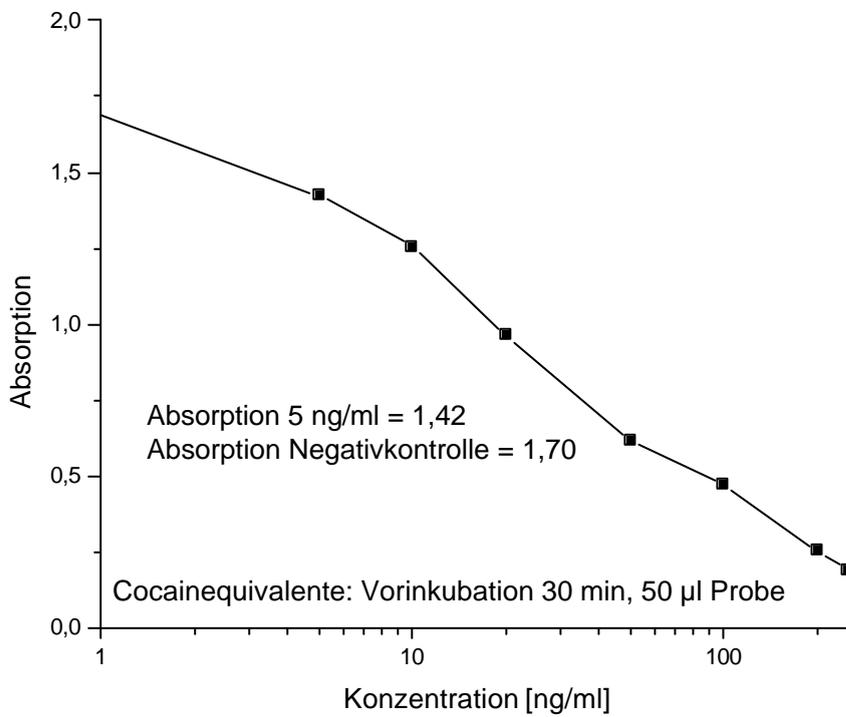


Abbildung 19: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 50 µl, Vorinkubation 30min.

Tabelle 4: Absorptionswerte der zur Methodenentwicklung verwendeten Assays.

Konzentration [ng/ml]	Opiate-assay	Cocain-assay 100 µl Konjugat	Cocain-assay 50 µl Konjugat	Cocain-assay 45 min VI	Cocain-assay 30 min VI	Cocain-assay 15 min VI	Cocain-assay 30 min VI, 50 µl Probe
2,5	1,228	-	-	-	-	-	-
5	1,038	3,010	2,792	1,652	1,745	1,796	1,423
10	-	2,782	2,666	1,648	1,651	1,709	1,255
20	0,243	2,352	2,409	1,331	1,318	1,392	0,961
50	0,141	1,673	1,880	0,932	0,943	0,932	0,617
100	0,075	1,202	1,048	0,751	0,658	0,819	0,470
200	0,046	0,823	0,609	0,430	0,377	0,497	0,252
250	0,042	0,694	0,509	0,375	0,373	0,410	0,191

Zur Bestimmung der Morphin-Equivalente wurden sieben Kalibratoren (Konzentrationen: 2,5, 5, 20, 50, 100, 200 und 250 ng/ml) aus der Morphin-Stammlösung (1 mg/ml, Kapitel 3.1) verdünnt. Zur Verdünnung auf die benötigten Konzentrationen wurde Sörensen-Phosphatpufferlösung (pH 7,4) verwendet, die Kalibratoren wurden jeden Tag frisch hergestellt. Drei negative und eine positive Kontrolle wurden für jeden Lauf verwendet. 20 µl Probe (Standards, Kontrollen oder Realproben) und 100 µl Konjugat wurden in die Wells der Platte pipettiert. Nach 30 min Inkubation wurde die Platte gewaschen (300 µl Wasser) und 100 µl Substrat hinzugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit wurden 100 µl Stoppreagenz zugefügt und die Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm gelesen. Die Durchführung des Assays ist im Einzelnen in Tabelle 5 wiedergegeben.

Die Cocain-Equivalente wurden wie folgt bestimmt: sieben Kalibratoren (Konzentrationen: 5, 10, 20, 50, 100, 200 und 250 ng/ml) wurden aus der Cocain-Stammlösung (1 mg/ml, Kapitel 3.1) hergestellt. Drei negative und eine positive Kontrolle wurden für jeden Lauf verwendet. 50 µl Probe (Standards, Kontrollen, oder Realproben) und das gleiche Volumen an Pufferlösung (pH 7,4) wurden auf die Platte pipettiert und eine 30 minütige Vorinkubation wurde durchgeführt. Danach wurden 50 µl Konjugat zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Nach Waschen der Platte (300 µl Wasser) wurden 100 µl Substrat zugeführt und wiederum 30 min inkubiert.

Danach wurden 100 µl Stoppreagenz pipettiert und die Platte bei 450 nm gelesen. Die einzelnen Schritte zur Durchführungen beider Assays sind detailliert in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt.

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Die Ergebnisse der ELISA Tests werden in Cocain- und Morphin-Equivalenten angegeben, da die einzelnen Analyten, die durch die Tests mit erfasst werden, unterschiedliche Kreuzreaktivitäten aufweisen. Diese sind im Einzelnen: 64% für Cocain, 200% für Cocaethylen, 100% für Benzoylecgonin, 100% für Morphin, 65% für 6-Monoacetylmorphin, > 100% für Codein und 43% für Heroin (nach Herstellerangabe). Für weitere Metaboliten wurden keine Kreuzreaktivitäten aufgeführt.

Tabelle 5: Programmierungsprotokoll der Coda 4.0 Software zur Bestimmung der Morphin-Equivalente.

Step	Command	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3/4/5
1	Dispense Standards	Vol/Chase=20µL/20µl	Needle Wash=2000µL/1	Standard 1 to 7
2	Dispense Standards	Vol/Chase=20µL/20µl	Needle Wash=2000µL/1	Standard 1 to 7
3	Dispense Controls	Vol/Chase=20µL/20µl	Needle Wash=1000µL/1	Control 1 to 1
4	Dispense Samples	Vol/Chase=20µL/20µl	Needle Wash=2000µL/1	
5	Dispense Reagent	Volume=100 µL	Reagent Conjugate 1	/std/cal/cnt/blank
6	Shake Plate	Time=5 sec.		
7	Incubate Plate	Ambient temperature	Time=30 min	
8	Wash Plate	Volume=300 µL	Soak time=1sec.	Cycle=6/Column
9	Dispense Reagent	Volume=100 µL	Reagent Substrate 2	/std/cal/cnt/blank
10	Incubate Plate	Ambient temperature	Time=30 min	
11	Dispense Reagent	Volume=100 µL	Reagent Stop Solution 3	/std/cal/cnt/blank
12	Shake Plate	Time=5 sec.		
13	Read Plate	Measurement=450 nm	Reference=630 nm	Dual
14	End of procedure			

Tabelle 6: Programmierungsprotokoll der Coda 4.0 Software zur Bestimmung der Cocain-Equivalente.

Step	Command	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3/4/5
1	Dispense Standards	Vol/Chase=50µL/50µl	Needle Wash=2000µL/1	Standard 1 to 7
2	Dispense Controls	Vol/Chase=50µL/50µl	Needle Wash=1000µL/1	Control 1 to 1
3	Dispense Samples	Vol/Chase=50µL/50µl	Needle Wash=2000µL/1	
4	Dispense Reagent	Volume=50 µL	Reagent Puffer 4	/std/cal/cnt/blank
5	Incubate Plate	Ambient temperature	Time=30 min	
6	Dispense Reagent	Volume=50 µL	Reagent Conjugate 1	/std/cal/cnt/blank
7	Shake Plate	Time=5 sec.		
8	Incubate Plate	Ambient temperature	Time=30 min	
9	Wash Plate	Volume=300 µL	Soak time=1sec.	Cycle=6/Column
10	Dispense Reagent	Volume=100 µL	Reagent Substrate 2	/std/cal/cnt/blank
11	Incubate Plate	Ambient temperature	Time=30 min	
12	Dispense Reagent	Volume=100 µL	Reagent Stop Solution 3	/std/cal/cnt/blank
13	Shake Plate	Time=5 sec.		
14	Read Plate	Measurement=450 nm	Reference=630 nm	Dual
15	End of procedure			

3.6.2. GC/MS Methodik

Für alle Messungen wurde ein System mit folgenden Konfigurationen verwendet: Ein Agilent 6890 Series plus Gaschromatograph in Verbindung mit einem Agilent 5973 N MSD Massenspektrometer, gesteuert von der Agilent Chemstation Software G1701CA Version C.00.01 (Chromtech, Idstein, Deutschland). Das System war mit einem CTC-CombiPAL-Autosampler, Software (CTC-Cycle Composer 1.5.2) ausgestattet. Die chromatographische Trennung erfolgte an einer 30 m langen Kapillarsäule vom Typ HP-5MS mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Beschichtung von 0,25 µm. Als Trägergas diente Helium mit einem Volumenstrom von 1 ml/min, die Injektionen erfolgten im Splitless-Modus. Die Temperatureinstellungen für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie sind in Tabelle 7, die verwendeten GC-Ofenprogramme in Tabelle 8 angegeben.

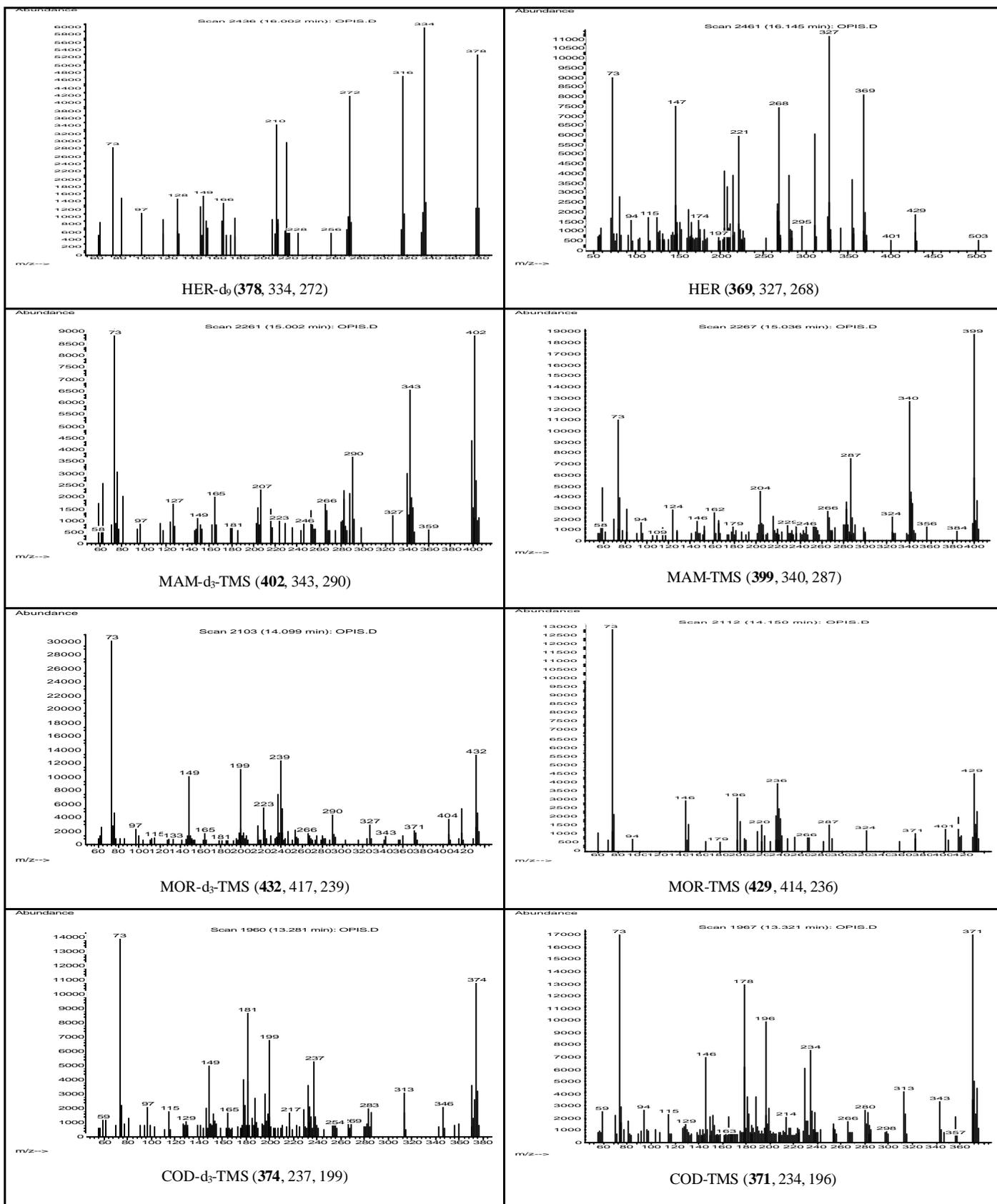
Tabelle 7: Temperatureinstellungen des analytischen Systems.

	Opiate, Cocain/Cocainmetabolite	Amphetamine, Cannabinoide, Methadon
Injektor	280 °C	250 °C
Interface	290 °C	280 °C
Ionenquelle	230 °C	230 °C
Quadrupol	150 °C	150 °C

Tabelle 8: GC-Ofenprogramme.

	GC/MS
Opiate, Cocain, Cocainmetabolite	180 °C für 1 min 15 °C/min bis 190 °C, gehalten für 10 min, 5 °C/min bis 250 °C, gehalten für 2 min, 30 °C/min bis 290 °C, gehalten für 2 min
Amphetamine	90 °C für 1 min, 8 °C/min bis 210 °C, gehalten für 2 min, 30 °C/min bis 280 °C, gehalten für 5 min
Cannabinoide, Methadon	160 °C für 1 min, 15 °C/min bis 190 °C, gehalten für 10 min, 5 °C/min bis 250 °C, gehalten für 3 min, 13 °C/min bis 300 °C, gehalten für 3 min

Zur Bestimmung der charakteristischen Massenfragmente wurden zunächst die Primärmassenspektren für jeden Analyten im Full-Scan Modus (m/z 50-550) aufgenommen. Die Massenspektren für Opiate, Cocain und Cocainmetabolite sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Spektren der weiteren Analyten sind der Arbeit von Junker zu entnehmen [49].



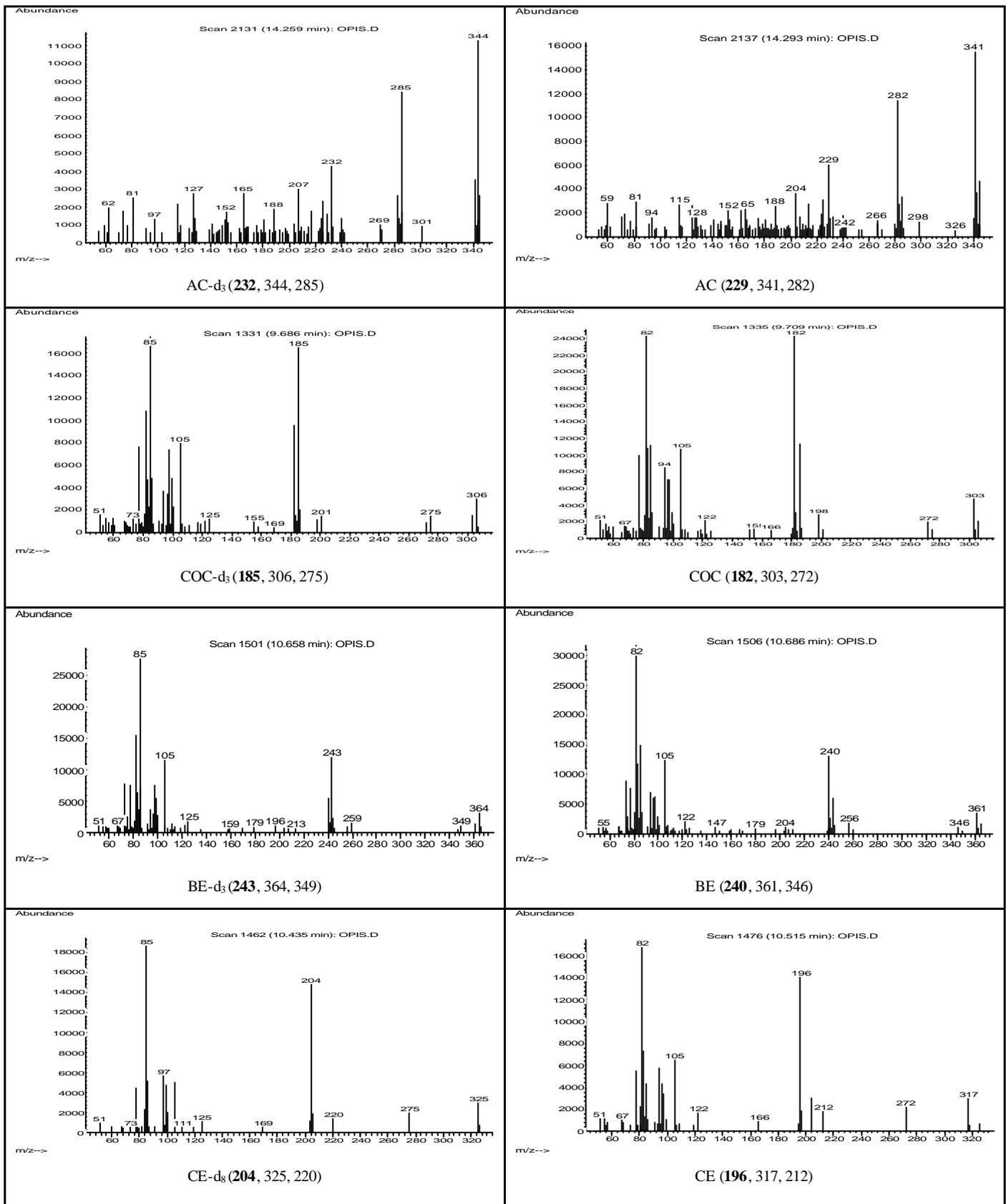


Abbildung 20: Massenspektren der Opiate und Cocain sowie Cocainmetaboliten, die zur Analytik verwendeten Ionenspektren sind in Klammern angegeben.

Drei charakteristische und intensive Ionen wurden im nächsten Schritt für das Selected Ion Monitoring (SIM-Modus) ausgewählt, die SIM Chromatogramme sind in den Abbildungen 21-24 für die jeweiligen Analyten dargestellt:

m/z Opiate, Cocain:

HER (**369**, 327, 268), HER-d₉ (**378**, 334, 272), MAM-TMS (**399**, 340, 287), MAM-d₃-TMS (**402**, 343, 290), MOR-TMS (**429**, 414, 236), MOR-d₃-TMS (**432**, 417, 239), COD-TMS (**371**, 234, 196), COD-d₃-TMS (**374**, 237, 199), AC (**229**, 341, 282), AC-d₃ (**232**, 344, 285), COC (**182**, 303, 272), COC-d₃ (**185**, 306, 275), BE (**240**, 361, 346), BE-d₃ (**243**, 364, 349), CE (**196**, 317, 212) und CE-d₈ (**204**, 325, 220).

m/z Amphetamine:

A-TFA (**140**, 91, 118), A-d₅-TFA (**144**, 92, 123), MA-TFA (**154**, 110, 118), MA-d₁₁-TFA (**160**, 113, 126), MDA-TFA (**135**, 162, 275), MDA-d₅-TFA (**136**, 167, 280), MDMA-TFA (**154**, 110, 135), MDMA-d₅-TFA (**158**, 113, 136), MDEA-TFA (**168**, 140, 303), MDEA-d₅-TFA (**173**, 141, 308), BDB-TFA (**135**, 176, 289), MBDB-TFA (**168**, 176, 303), MBDB-d₅-TFA (**172**, 178, 308).

m/z Cannabinoide, Methadon:

MET (**294**, 223, 295), MET-d₉ (**297**, 226), EDDP (**277**, 262, 276), EDDP-d₃ (**280**, 265, 279), CBD-di-TMS (**390**, 301, 337), CBN-TMS (**367**, 368, 382), THC-TMS (**371**, 303, 386), THC-d₃-TMS (**374**, 389).

Für die Quantifizierung wurden die Massenspuren der durch Fettdruck hervorgehobenen SIM-Ionen zur Flächenberechnung herangezogen. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und der im charakteristischen Peakflächenverhältnis vorliegenden Massenspuren (SIM-Modus). Für die Flächenberechnung wurde das o.g. Standardsoftwareprogramm verwendet. Sämtliche Peakintegrationen wurden nachträglich kontrolliert und bei fehlerhafter Peakerkennung manuell nachintegriert. Zur Auswertung wurde das Flächenverhältnis zwischen Analyten und deuteriertem internem Standard als Funktion der Konzentration herangezogen (Kalibrierfunktion). Für einige Substanzen waren keine deuterierten Analoga erhältlich, so dass CBD und CBN mit THC-d₃ quantifiziert wurden, MDA-d₅ wurde für BDB verwendet.

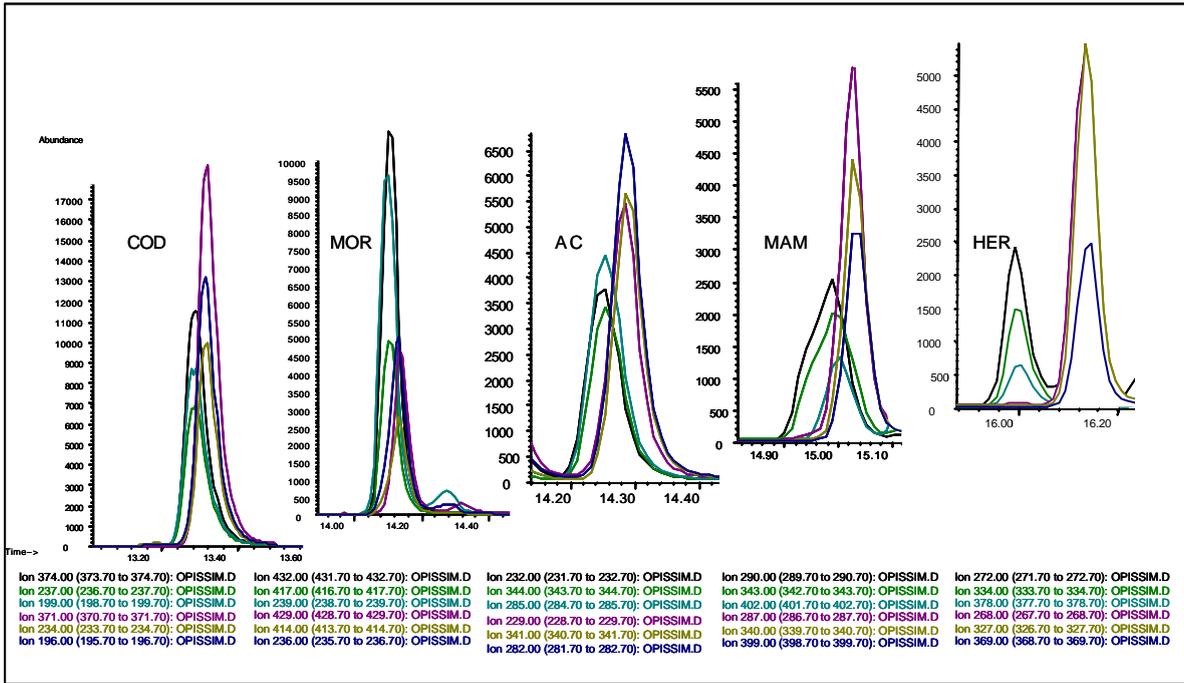


Abbildung 21: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Opiaten sowie den deuterierten Analoga (10 ng/mg).

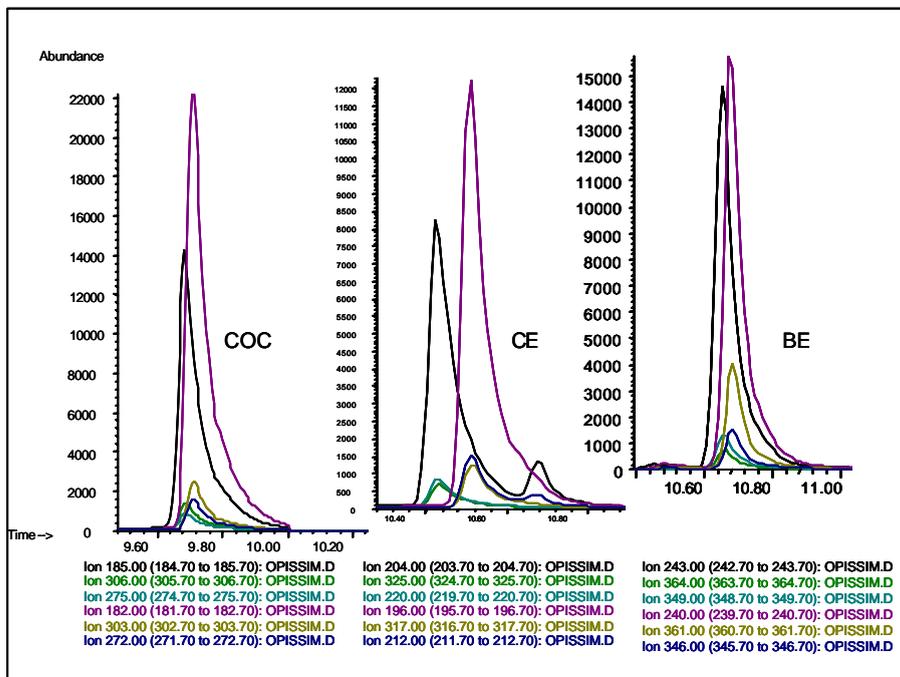


Abbildung 22: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Cocain und Cocainmetaboliten sowie den deuterierten Analoga (10 ng/mg).

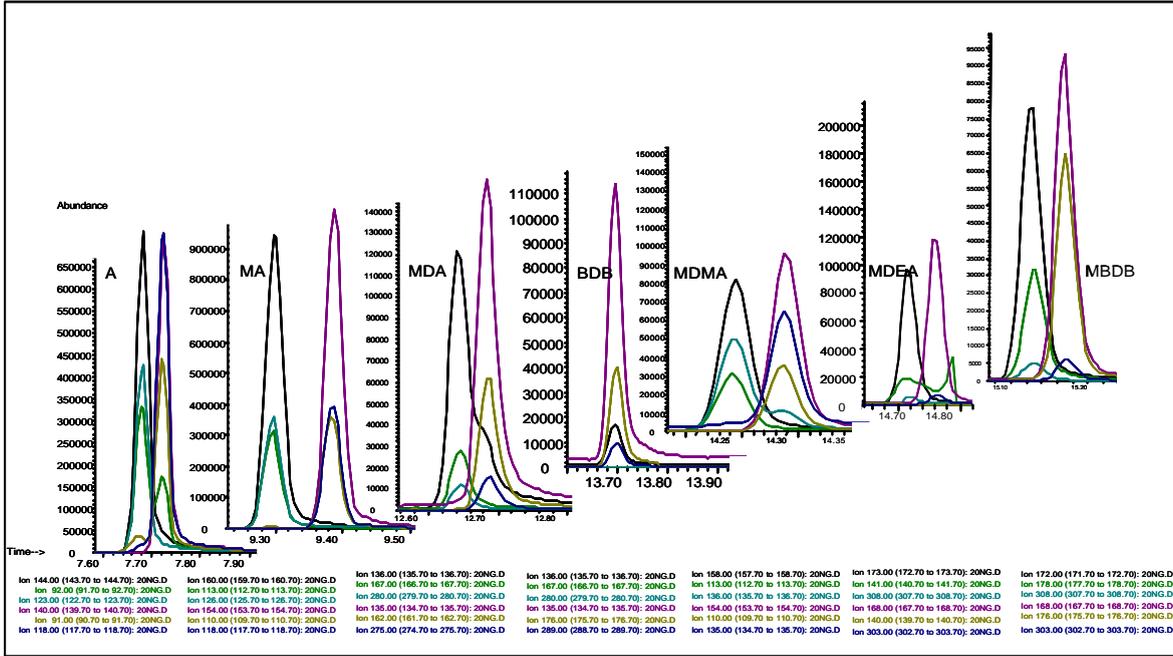


Abbildung 23: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Amphetaminen sowie den deuterierten Analoga (2 ng/mg).

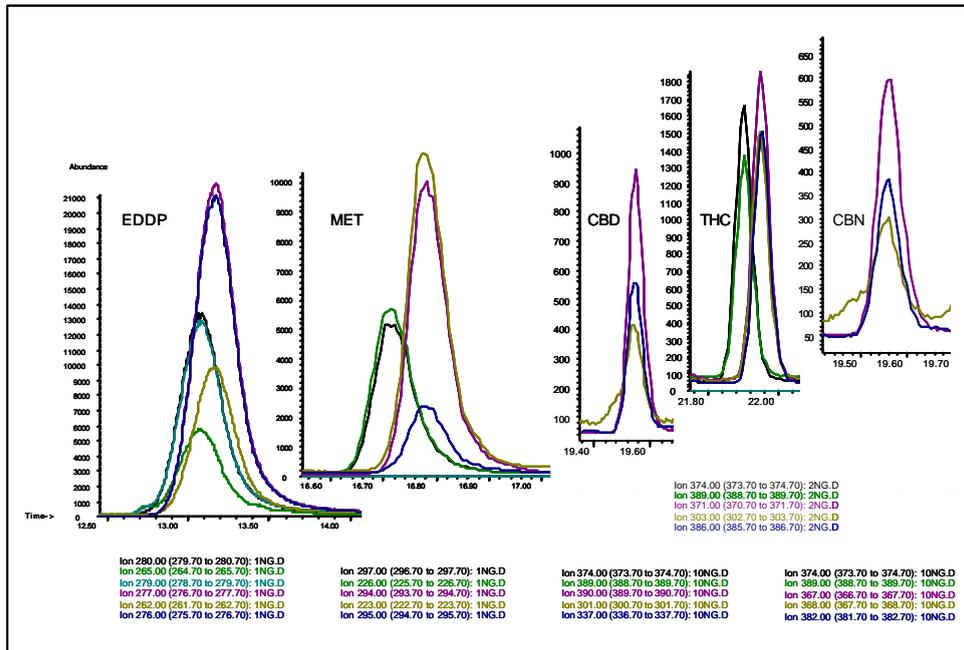


Abbildung 24: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Methadon, EDDP und Cannabinoiden sowie den deuterierten Analoga (2 ng/mg).

3.6.3. LC/MS-MS Methodik

Für die Analysen wurde ein LC/MS-MS System verwendet, welches aus einem 1100 HPLC System (binäre Pumpe, Degasser und Autosampler) von Agilent (Waldbronn, Deutschland) gekoppelt mit einem Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) API 2000 Triple Quadrupol Massenspektrometer bestand. Zur Auswertung wurde die Software Analyst 1.4 Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte an einer Phenomenex C12 Synergi MAX-RP Trennsäule (4µm, 150 x 2 mm). Mobile Phase A (Wasser/Acetonitril 90:10, 5 mM Ammoniumformiat) und mobile Phase B (Wasser/Acetonitril 10:90, 5 mM Ammoniumformiat) wurden in einem Gradientenprogramm mit einem Fluss von 200 µl/min folgendermaßen verwendet: 0-5 min: 100% A, 5-19 min: auf 0% A, 19-26 min: 0% A, 26-29 min: auf 100% A, 29-35 min: 100% A.

Turbo Ion Spray wurde für die ESI/MS-MS im Positive Ion Mode bei einer Temperatur von 350° C und einer Spannung von 5000 V eingesetzt. Multiple Reaction Monitoring (MRM) wurde zur Identifizierung benutzt, die resultierenden LC/MS-MS MRM Chromatogramme sind den Abbildungen 25- 32 zu entnehmen:

BU (468,5 → 55,0; 83,4), COD (300,1 → 165,0; 114,9), FE (337,1 → 188,0; 105,0), HM (286,1 → 185,0; 156,8), ME (310,1 → 265,0; 104,8), MO (286,1 → 151,8; 165,0), OC (316,0 → 241,0; 255,8), OXMO (301,8 → 284,0; 226,8), PI (431,2 → 97,9; 345,9), TI (273,9 → 154,8; 77,0), TRA (263,9 → 58,1; 57,0), BNTI (245,9 → 155,0; 76,9), NTI (259,9 → 154,8; 76,9), NFE (232,9 → 84,0; 56,0), NOMO (272,1 → 165,9; 120,9), BU-d₄ (473,4 → 59,1), COD-d₃ (303,1 → 199,1), FE-d₅ (342,2 → 188,1), HM-d₃ (289,0 → 184,9), ME-d₉ (319,2 → 268,1), MO-d₃ (289,1 → 151,9), OC-d₃ (319,1 → 301,0), PA (340,1 → 202,0).

Die verwendeten Kollisionsenergien sind im Einzelnen:

BU (75 V), COD (49 V), FE (29 V), HM (41 V), ME (19 V), MO (81 V), OC (39 V), OXMO (23 V), PI (39 V), TI (25 V), TRA (33 V), BNTI (21 V), NTI (25 V), NFE (25 V), NOMO (53 V), BU-d₄ (75 V), COD-d₃ (37 V), FE-d₅ (29 V), HM-d₃ (43 V), ME-d₉ (21 V), MO-d₃ (81 V), OC-d₃ (23 V), PA (35 V).

Zur Auswertung wurde das Flächenverhältnis zwischen Analyten und deuteriertem internen Standard als Funktion der Konzentration herangezogen. Für einige Substanzen waren keine deuterierten Analoga erhältlich, so dass TI, TRA, BNTI und NTI über PA quantifiziert wurden, FE-d₅ wurde für NFE und PI und MO-d₃ für NOMO und OXMO verwendet.

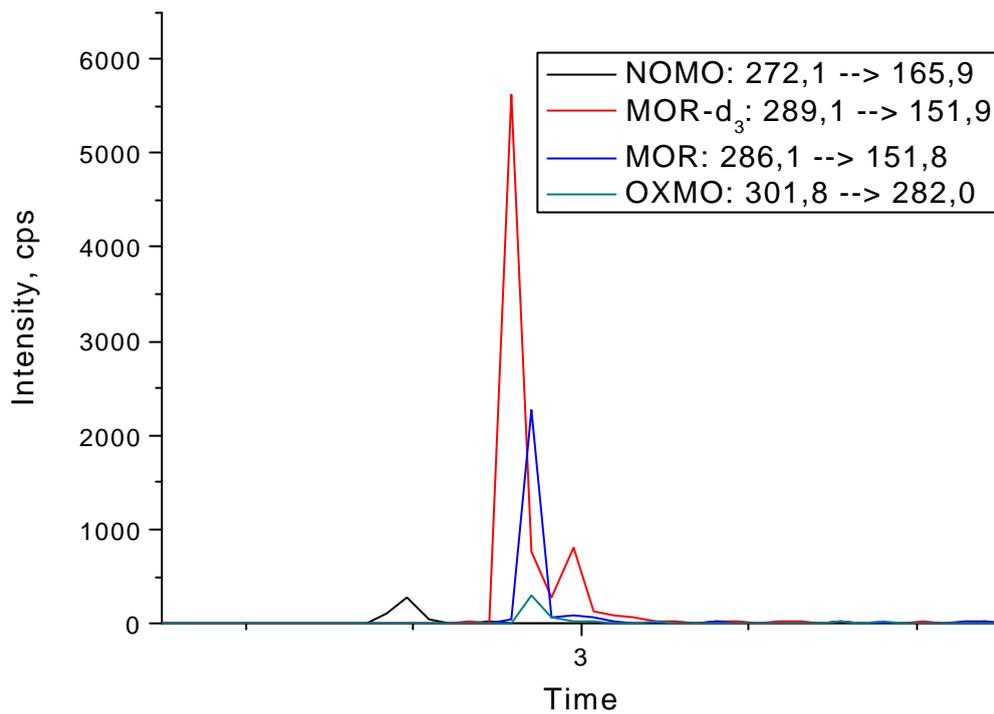


Abbildung 25: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Normorphin (0,1 ng/mg), Oxymorphon (0,1 ng/mg), Morphin (1 ng/mg) und deuteriertem Morphin (1 ng/mg).

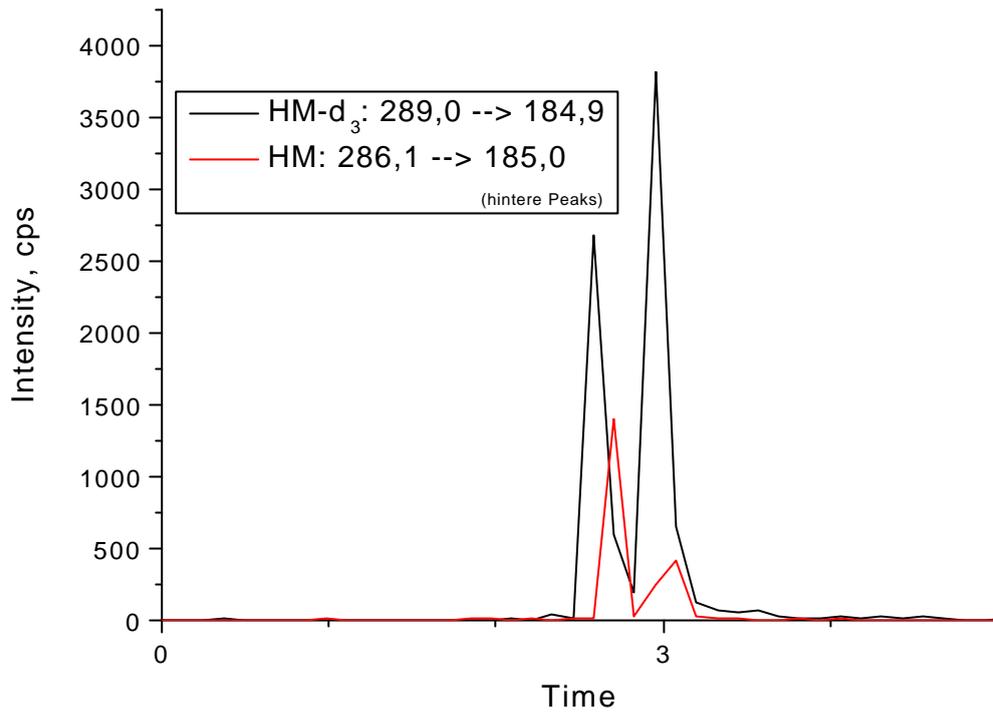


Abbildung 26: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Hydromorphon (0,1 ng/mg) und deuteriertem Hydromorphon (1 ng/mg).

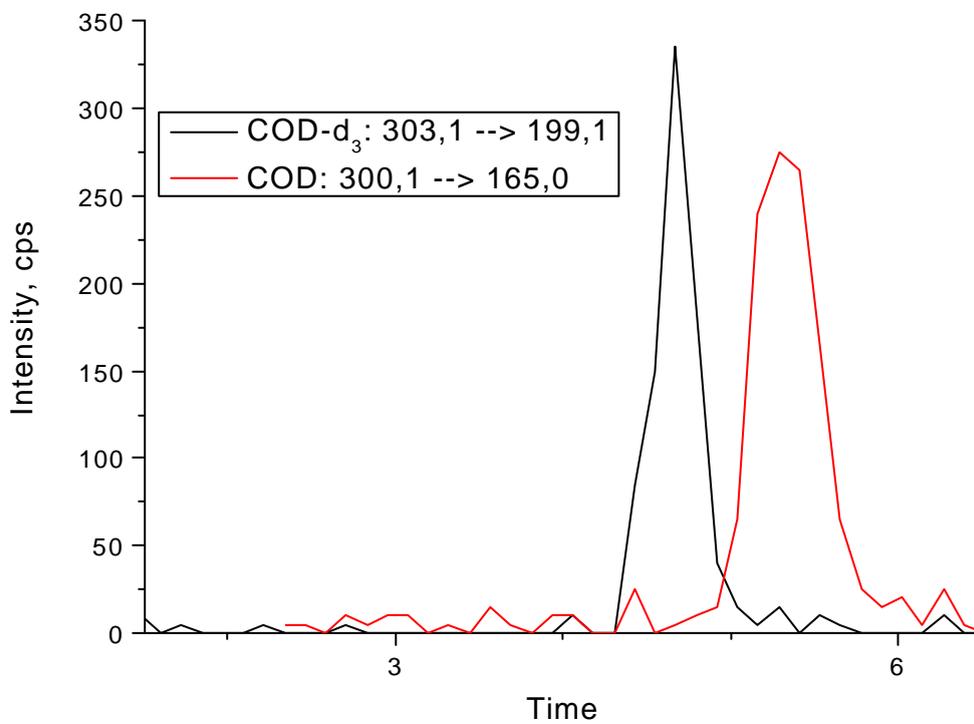


Abbildung 27: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Codein (1 ng/mg) und deuteriertem Codein (1 ng/mg).

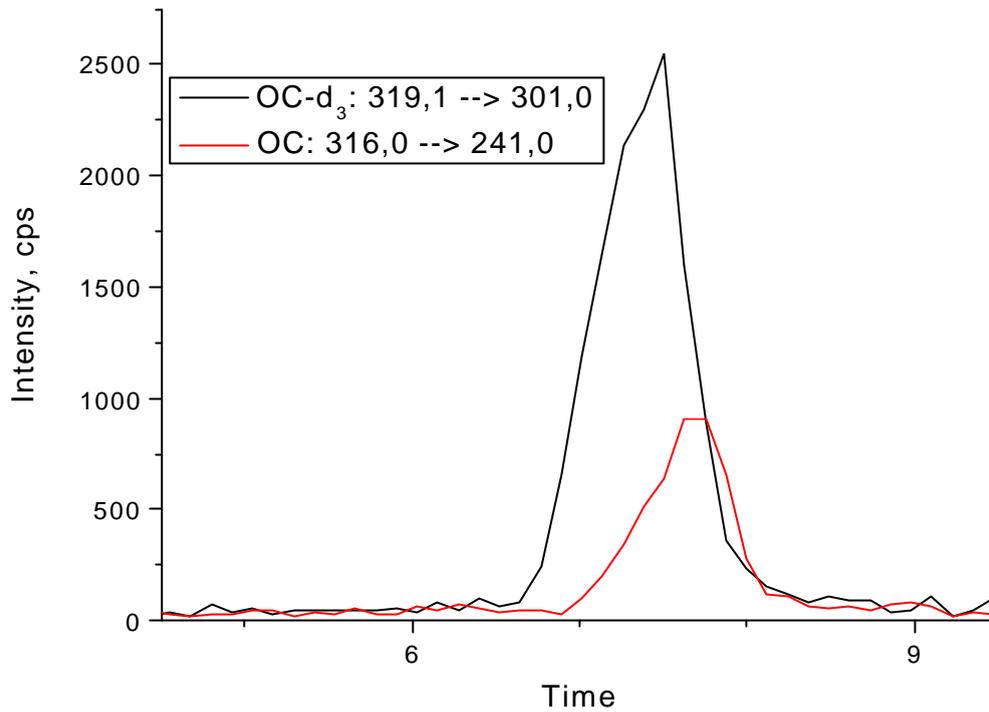


Abbildung 28: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Oxycodon (1 ng/mg) und deuteriertem Oxycodon (1 ng/mg).

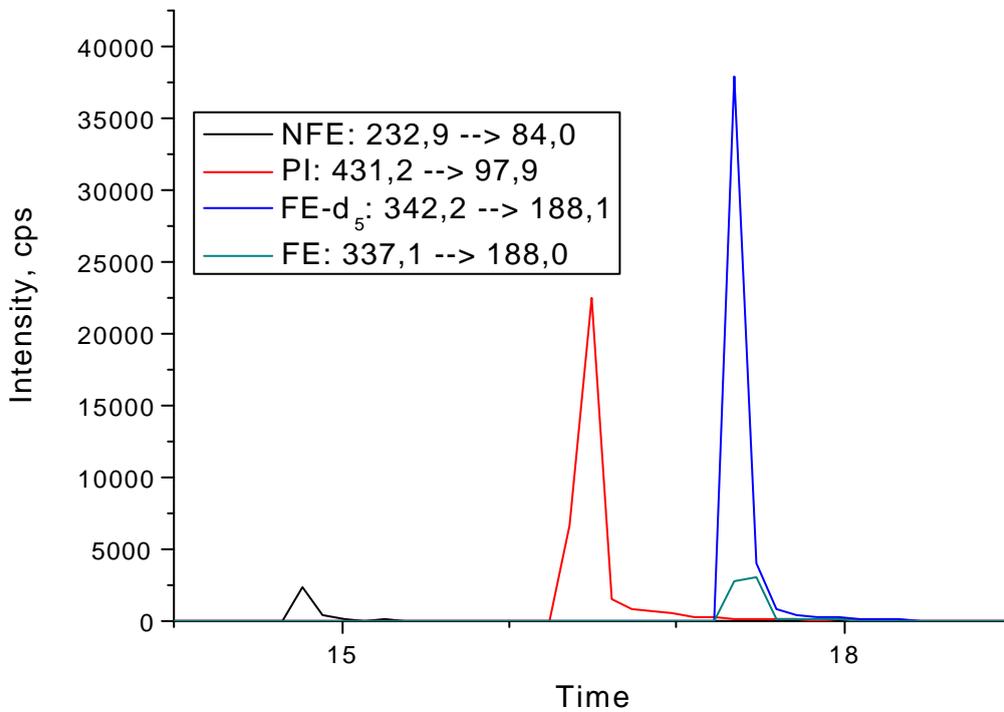


Abbildung 29: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Piracetam (1 ng/mg), Norfentanyl (0,1 ng/mg), Fentanyl (0,1 ng/mg) und deuteriertem Fentanyl (1 ng/mg).

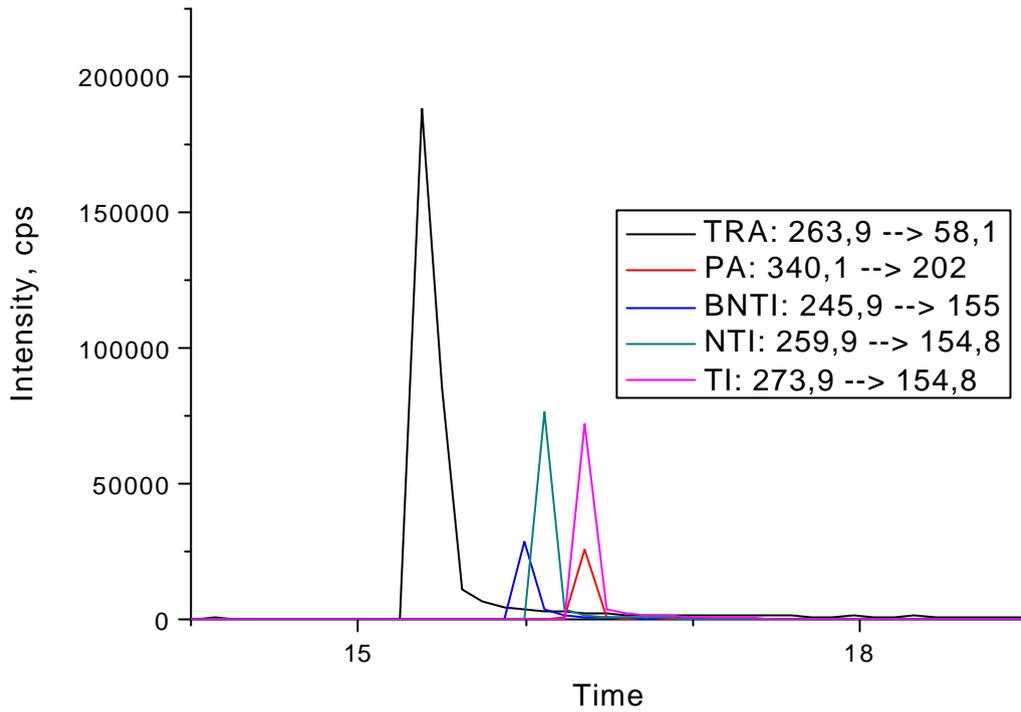


Abbildung 30: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Tramadol (5 ng/mg), Bisnortilidin (1 ng/mg), Nortilidin (1 ng/mg), Tilidin (1 ng/mg) und Papaverin (1 ng/mg).

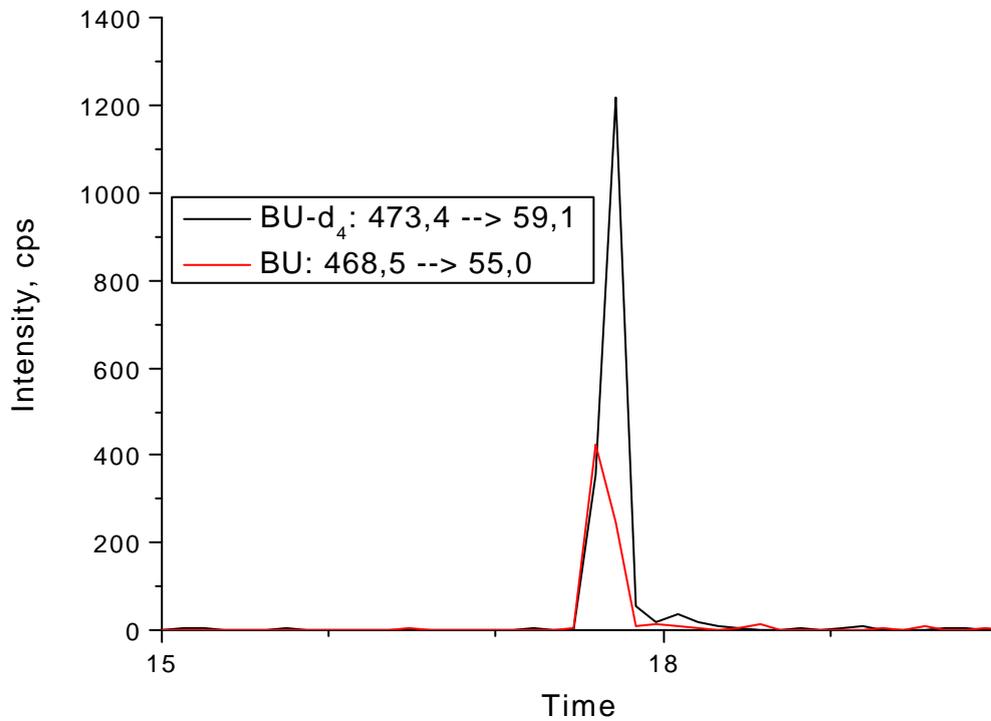


Abbildung 31: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Buprenorphin (0,1 ng/mg) und deuteriertem Buprenorphin (1 ng/mg).

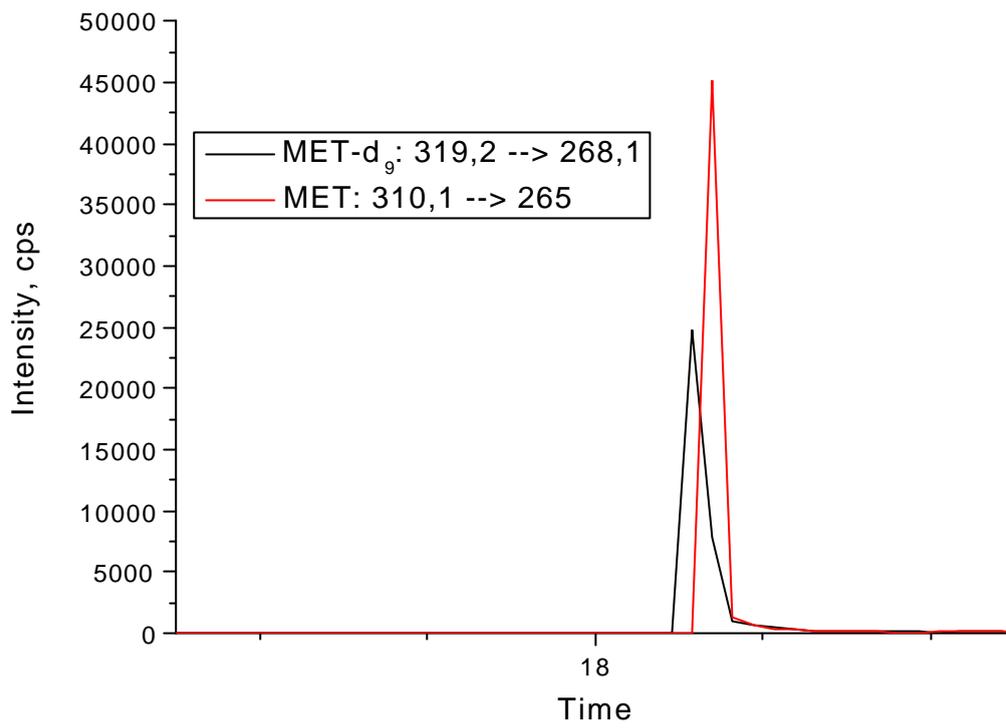


Abbildung 32: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Methadon (1 ng/mg) und deuteriertem Methadon (1 ng/mg).

3.7. Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurden die Analysenergebnisse (Flächenwerte) aus der Agilent Chemstation- und aus der Applied Biosystems Analyst 1.4- Software zu Microsoft Excel (2003) exportiert (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland). Alle Daten wurden mit dem Computerprogramm SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) evaluiert.

Die Korrelationen wurden mit dem Pearson-Korrelationstest auf lineare Abhängigkeit überprüft (WinSTAT für Microsoft Excel, Version 2003.1, R.Fitch Software, Staufen, Deutschland). Eine statistische Signifikanz wurde unterhalb des 0,05 Wahrscheinlichkeitsniveaus angenommen. Unterschiedliche Fallgruppen wurden mittels T- und Wilcoxon- Tests sowie ANOVA (Analysis of Variance) verglichen.

Die graphische Datenauswertung erfolgte mit dem Softwarepaket Origin 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Zur multivariaten Auswertung wurden die quantitativen Daten der ELISA und GC/MS Analysen in die Software Unscrambler v9.0 (CAMO Process AS, Oslo, Norwegen) exportiert. Das Datenset wurde zunächst vorbereitet, indem eine Standardisierung durch Multiplikation jedes Elements mit dem Kehrwert der Standardabweichung durchgeführt wurde, um allen Variablen die gleiche Varianz zu geben. Auf diese Weise werden alle Varianzen der Variablen vergleichbar und der Einfluss der unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten bei den ELISA Tests wurde aufgehoben. Partial Least Squares (PLS) Regression wurde verwendet, um die Ergebnisse der GC/MS Analysen und der ELISA Tests zu korrelieren. Zur Ermittlung der Anzahl der benötigten Principal Components (PCs) wurde die Technik der Cross-Validation (Kreuzvalidierung) angewendet. Während der Cross-Validation wird jede Probe (von n Proben) einmal ausgelassen, um die Vorhersagefähigkeit bei der ausgelassenen Probe zu testen. Diese Prozedur wird n Mal wiederholt, was zu n Modellen führt und eine Einschätzung der durchschnittlichen Vorhersagefähigkeit dieser n Modelle ermöglicht [86,87].

4. Allgemeine Erläuterungen zu Ergebnissen und Diskussion

Im Folgenden sind dem Ergebnis- und Diskussionsteil zu Übersichtszwecken nochmals knapp die im Rahmen der Anwendbarkeitsprüfungen der Methoden zur Verfügung gestellten Datenbasen, Untersuchungsmaterialien, Analyten und Fragestellungen der Teilbereiche beider Kapitel vorangestellt.

Nach Methodenentwicklung und -validierung der ELISA Screenings und der GC/MS Bestätigungsanalytik zur Opiate- (Heroin, 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Codein, Acetylcodein) und Cocainbestimmung (Cocain, Benzoylcegonin, Cocaethylen) wurden mit dieser effizienten Methodenkombination große Probenzahlen analysiert und die Analyseergebnisse miteinander verglichen. Hierfür wurden Kopfhhaarproben Verstorbener, deren Tod im Zusammenhang mit Opiat-bzw. Cocainabusus stand (n=21) sowie Kopfhhaarproben von Teilnehmern des Bonner Heroinvergabeprojekts (n=103) untersucht (Kapitel 5.2.1 und 6.2.1).

Gegenstand der Kapitel 5.2.2 und 6.2.2 war die Überprüfung möglicher Dosis-Konzentrationsbeziehungen, insbesondere im Hinblick auf variierende Dosen bei den einzelnen Individuen. Hierfür wurden die proximalen Haarsegmente aller Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts (n=46) mit der GC/MS Methode untersucht. In allen Fällen (n=28), bei denen die Länge der Haarprobe eine segmentale Analyse zuließ (Länge zwischen 10 und 22 cm), wurden die Proben in Segmente unterteilt, um Aufschluss über das Dosis-Konzentrationsverhältnis über den gesamten Behandlungszeitraum zu erhalten (T12 Haare).

Weiterhin wurden Differenzierungsmöglichkeiten zwischen ärztlich abgegebenem Heroin und Straßenheroin erarbeitet, um einen Straßenheroinbeikonsum zusätzlich zu abgegebenem Heroin nachweisen zu können. Diese Fragestellung ist bei Heroinvergabeprogrammen von besonderer Relevanz. In diesem Zusammenhang wurde die Wertigkeit von Acetylcodein als Marker für einen Konsum von Straßenheroin untersucht.

Schließlich wurden die Opiatgehalte in den Haaren der Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts mit Haaranalysen opiatassoziierter Todesfälle (n=24) im Hinblick auf Konzentrationsunterschiede in den beiden Gruppen untersucht.

Mittels Haarproben des Heroinvergabeprojekts (n=48) und des parallel stattfindenden Methadonsubstitutionsprogramms (n=35) wurde mit der entwickelten GC/MS Methode im gleichen Analysengang ein möglicher Cocainbeikonsum detektiert. Der Nachweis erfolgte anhand der Bestimmung von Cocain und den Metaboliten zum Zeitpunkt T1 und T12. Im Mittelpunkt der Kapitel 5.2.3 und 6.2.3 steht die Frage, inwiefern die heroingestützte Behandlung zu einer Änderung des Beikonsumverhaltens von Cocain gegenüber Methadonsubstituierten führt [88].

In den Kapiteln 5.2.4 und 6.2.4 ist der weitere Beikonsum der Teilnehmer beider Vergabeprogramme dargestellt. Zu diesem Zweck wurden qualitative Urinscreenings auf Amphetamine, Benzodiazepine, Cocain, Opiate, Cannabinoide und Methadon zum Zeitpunkt T-1 und T12 durchgeführt.

In den Kapiteln 5.2.5 und 6.2.5 sind die mittels HS-SPME GC/MS bestimmten Konzentrationen von Methadon und dem Hauptmetabolit EDDP im Kopfhhaar von Patienten (n=41) des vorgestellten Methadonsubstitutionsprogramms dargestellt. Ziel dieser Untersuchung war es, Beweise möglicher Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon und EDDP in Haaren zu erbringen. Haarproben von ausreichender Länge wurden zusätzlich komplett segmentiert, um die Beziehungen auch retrospektiv für den gesamten Behandlungszeitraum aufstellen zu können.

Die Kapitel 5.2.6 und 6.2.6 zeigen die Sammlung von positiven Haarbefunden, um die Robustheit und Anwendbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteten sowie der bereits im Institut für Rechtsmedizin Bonn etablierten Methoden aufzuzeigen. Segmentationsdaten von Kopfhhaarproben und Schamhaarkonzentrationen wurden verglichen und zusätzlich Dosis-Konzentrationsbeziehungen aufgestellt. Des Weiteren wurden die Möglichkeiten und Grenzen unterschiedlicher Methoden zur Drogenanalytik wie Urin- und Haartests aufgezeigt. Urinproben sowie Kopf- und Schamhaarproben von Drogenkonsumenten, die an einem Entgiftungsprogramm teilnahmen, wurden mit GC/MS auf Opiate, Cocain und Cocainmetaboliten, Amphetamine, Methadon und Cannabinoide analysiert. Die Ergebnisse der

Urinimmunoassays und der mit GC/MS gemessenen Haarkonzentrationen wurden mit den in einem Interviewprotokoll selbst zugegebenen Konsumdaten der Patienten verglichen (Patienten Compliance).

Die Bestimmung von Opioid-Analgetika mittels GC/MS [89-91] oder GC/MS-MS [54] beschränkte sich bisher auf einzelne Analyten oder Analytgruppen. Mittels LC/MS konnte Buprenorphin in Haaren und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden [92,93], LC/MS-MS wurde zur Bestimmung von einzelnen Analyten in biologischen Matrices eingesetzt [94-97], jedoch existieren bisher nur wenige Screening-Methoden zum Nachweis von Opioid-Analgetika in Haaren [63]. Mit der entwickelten und validierten LC/MS-MS Methode konnten die Opioide Buprenorphin, Codein, Fentanyl, Hydromorphon, Methadon, Morphin, Oxycodon, Oxymorphon, Piritramid, Tilidin, Tramadol und ihre Metaboliten Bisnortilidin, Nortilidin, Norfentanyl und Normorphen erstmals simultan bestimmt werden. Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung wurden hinsichtlich einer Therapie-Compliance und eines Patienten-Monitorings mittels dieser LC/MS-MS Methode auf Opioidanalgetika untersucht, um die Anwendbarkeit der Methode zu belegen (Kapitel 5.2.7 und 6.2.7).

Die Tabelle 9 zeigt die bearbeiteten Fragestellungen und die jeweils eingesetzten Methoden im Überblick.

Tabelle 9: Übersicht über die Datenbasis, Material, Methoden, Analyten und Fragestellungen der Teilbereiche der vorliegenden Arbeit

Datenbasis	Material	Methoden	Analyten	Fragestellung	Seite
Verstorbene	Haare	ELISA GC/MS	Opiate Cocain	1. Methodenentwicklung	39
				2. Dosis - Konzentrationsbeziehungen 3. Wertigkeit von AC als Straßenheroinmarker	91
Heroin- vergabe Projekt	Haare	ELISA GC/MS	Opiate Cocain	1. Methodenentwicklung	39
				2. Dosis - Konzentrationsbeziehungen	91
				3. Wertigkeit von AC als Straßenheroinmarker	
				4. Beikonsum Cocain	99
				5. Beikonsum weiterer Substanzen	105
Methadon- vergabe Projekt	Haare	GC/MS	Methadon Cocain	1. Beikonsum Cocain	99
				2. Beikonsum weiterer Substanzen	105
				3. Dosis - Konzentrationsbeziehungen	108
Entgiftungs- programm	Haare Schamhaare	GC/MS	Opiate Cocain Cannabinoide Methadon Amphetamine	1. Anwendbarkeit bereits bestehender Methoden	115
				2. Vergleich zwischen Urintests und Patientenangaben (Patienten-Compliance)	
				3. Dosis - Konzentrationsbeziehungen	
Opioid- analgetika	Haare	LC/MS/MS	Opioid- analgetika	1. Methodenentwicklung	55
				2. Therapie-Compliance und Patienten-Monitoring	118

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Methodvalidierungen

5.1.1. ELISA Test Validierung

Die Präzisionen der ELISA Methodik wurden durch die Analyse dotierter und mit internem Standard versetzter Haarproben ermittelt: Zwei Qualitätskontrollproben (Konzentrationen: 0,4 ng/mg für Cocain-Equivalente und 0,3 ng/mg für Morphin-Equivalente) wurden vorbereitet und in Doppelbestimmung an acht aufeinanderfolgenden Tagen analysiert. Die Konzentrationswerte sind auf eine Einwaage von 50 mg Haaren bezogen, entsprechend 20 ng/ml für Cocain-Equivalente und 15 ng/ml für Morphin-Equivalente. Die erhaltenen Meßergebnisse wurden verwendet, um die Präzisionen und Genauigkeiten zu ermitteln. Die Wiederholpräzision war 11% für den Cocain- und 3% für den Opiate-ELISA, die Laborpräzision betrug 12% für den Cocain- und 4% für den Opiate-ELISA Test. Die Richtigkeit lag bei 9% für den Cocain- und 10% für den Opiate-Test (Tabelle 10). Die Konzentrationen der Kontrollproben wurden so gewählt, dass sie in dem Bereich der „S“-förmigen Kalibrierkurve lagen, in dem die beste Linearität der Kurven gegeben war (Abbildungen 33 und 34). Weitere Validierungsparameter wurden aufgrund des semiquantitativen Charakters der ELISA Methodik nicht ermittelt.

Tabelle 10: Validierungsparameter der ELISA Tests.

Validierungsparameter	Cocainassay	Opiateassay
Wiederholpräzision	11%	3%
Laborpräzision	12%	4%
Richtigkeit	9%	10%

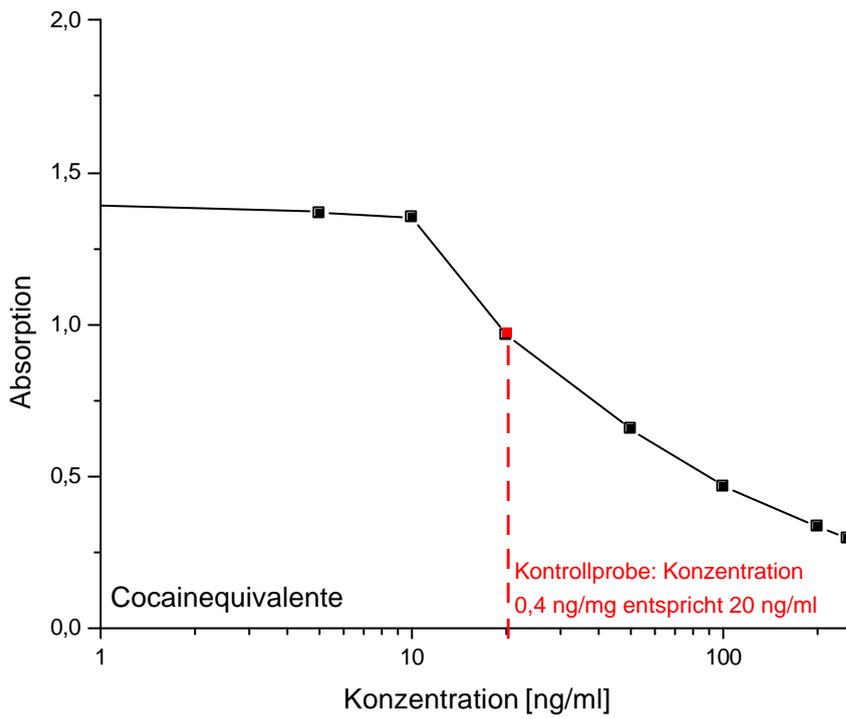


Abbildung 33: Cocainassay, Konzentration der Kontrollprobe 0,4 ng/mg.

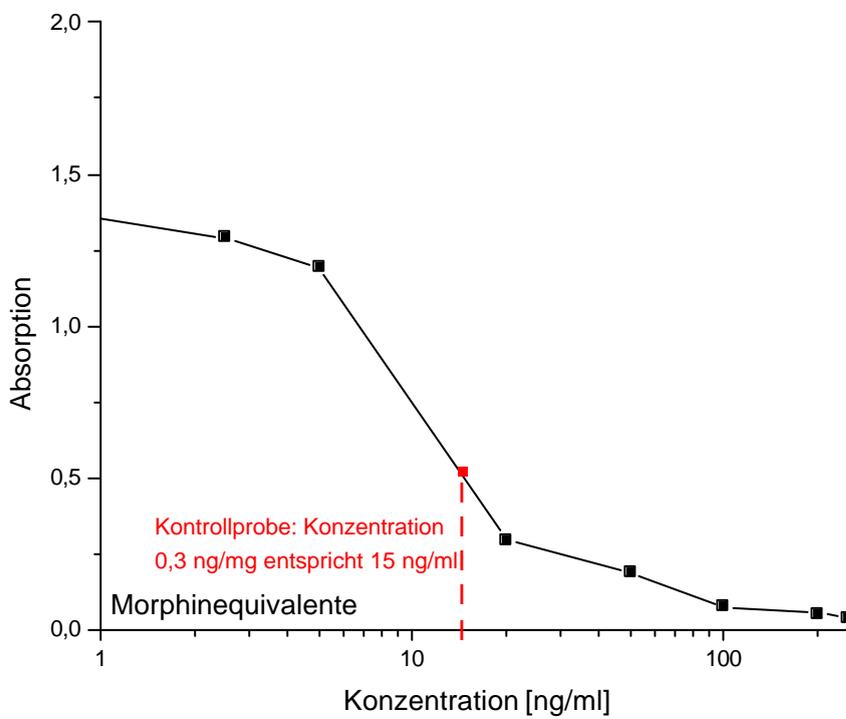


Abbildung 34: Cocainassay, Konzentration der Kontrollprobe 0,3 ng/mg.

5.1.2. GC/MS Validierung

Die GC/MS Methode zur Bestimmung der Opiate und Cocain wurde vollständig nach Maßgabe internationaler Richtlinien mit dem Programm VALISTAT[®] zur statistischen Auswertung [76] validiert. Zur Bestimmung der Selektivität der Methode wurden Leerhaarproben (n=6) verschiedener Personen ohne Zugabe von Analyten oder internem Standard routinemässig aufgearbeitet und analysiert, um Störpeaks anstelle der Peaks der internen Standards sowie der Analytpeaks auszuschließen. In diesem Fall wurden keine interferierenden Peaks der Haarmatrix beobachtet. Peakreinheit und Selektivität sind damit sichergestellt (Abbildung 35).

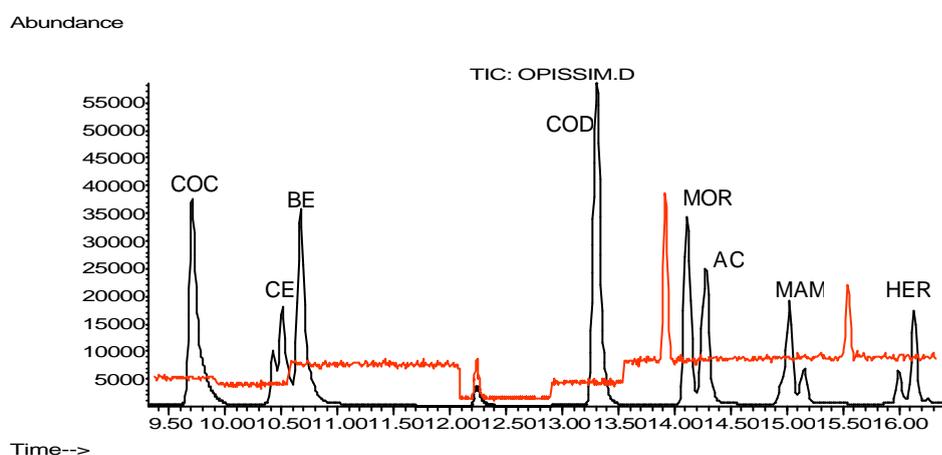


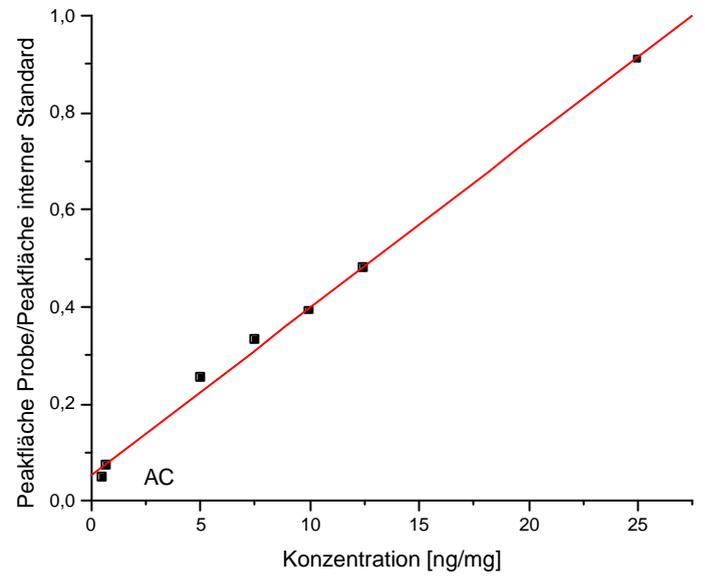
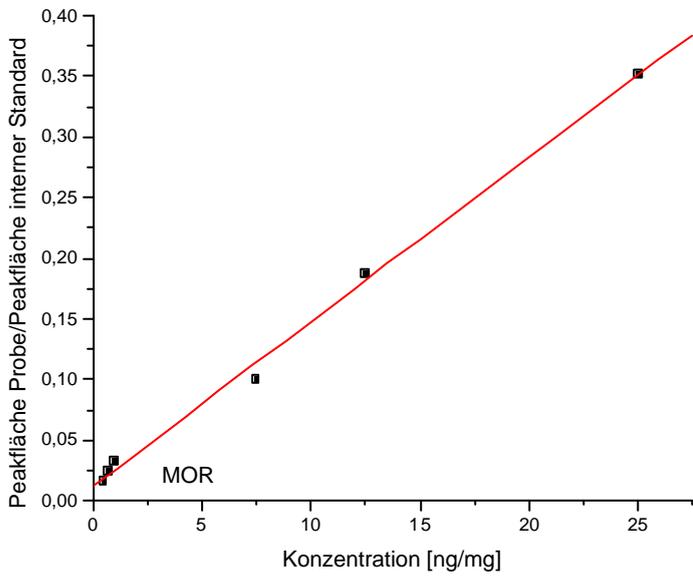
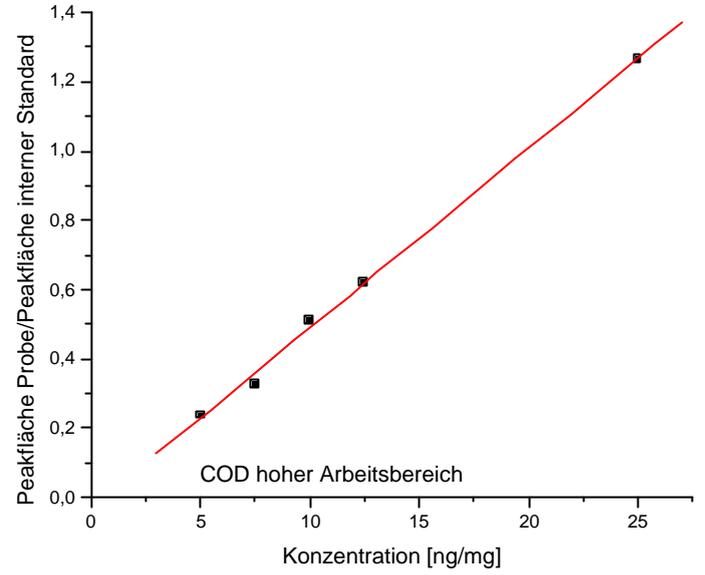
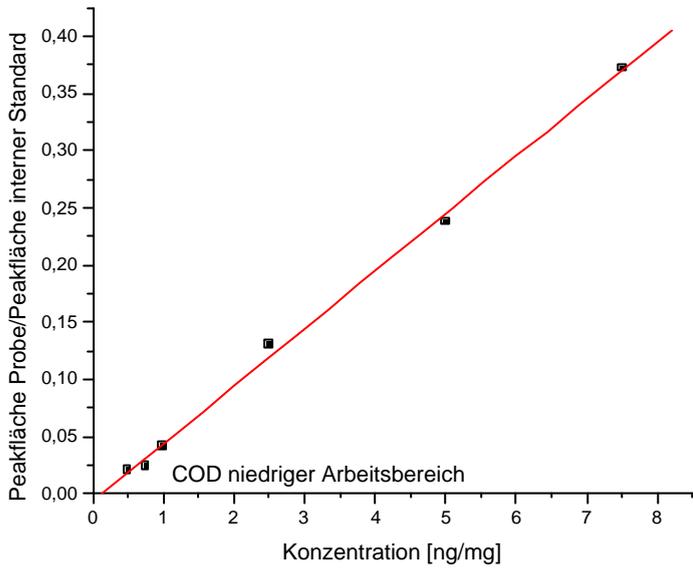
Abbildung 35: GC/MS SIM Chromatogramm einer dotierten Haarprobe (20 ng/mg) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (rote Linie).

Zur Bestimmung der Linearität wurden dotierte Leerwertproben (n=8) mit äquidistant über den Arbeitsbereich verteilten Konzentrationen hergestellt. Die Proben wurden sechs Mal aufgearbeitet, analysiert, auf Ausreißer überprüft (Grubbs-Test) und die Mittelwerte gebildet. Anhand der Mittelwerte wurden die Kalibriergeraden auf Varianzhomogenität (F-Test) und auf Linearität (Mandel-Test) überprüft. Für die Analyten Acetylcodein, Heroin und Morphin konnte gezeigt werden, dass diese linear im gesamten Arbeitsbereich (0,5-25 ng/mg) waren. Für die weiteren Analyten (6-Monoacetylmorphin, Codein, Cocain, Benzoyllecgonin und Cocaethylen) wurden zwei Kalibriergeraden (für einen hohen und einen niedrigen Arbeitsbereich) erstellt. Die Kalibrierungen wurden im SIM Modus für das Target-Ion (Fettdruck) durchgeführt. In Tabelle 11 und Abbildung 36 und Abbildung 37 sind die Regressionsgeraden und die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten dargestellt.

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden Leerwertproben mit internem Standard sowie je einem von zehn unterschiedlich konzentrierten Kalibratoren im unteren Kalibrationsbereich, d.h. in der Nähe der zu erwartenden Nachweisgrenze, versetzt. Diese Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung analysiert. Anhand dieser Messwerte wurden die Grenzen mit VALISTAT® mit mathematischen Algorithmen berechnet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen beziehen sich auf eine Einwaage von 50 mg Haaren und sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Lineare Regression (m=Steigung, b=Achsenabschnitt, r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenze (BG) und Wiederfindung der Opiate und Cocain sowie der Cocainmetaboliten.

	Linearität [ng/mg]	m	b	r	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]	WF [%]	
							1 ng/mg	10 ng/mg
COD	0,5-7,5; 5-25	0,052; 0,051	-0,010; -0,016	0,999; 0,999	0,02	0,04	80,3	84,7
MOR	0,5-25	0,014	0,023	0,992	0,03	0,11	92,3	95,1
AC	0,5-25	0,035	0,043	0,992	0,02	0,13	61,8	86,1
HER	0,5-25	0,049	0,002	0,999	0,04	0,21	78,8	95,3
MAM	0,5-10; 5-25	0,073; 0,081	-0,001; -0,016	0,993; 0,993	0,02	0,15	90,5	96,5
COC	0,5-5; 2,5-25	0,034; 0,030	-0,007; 0,008	0,998; 0,998	0,01	0,11	69,5	81,8
BE	0,5-7,5; 5-25	0,035; 0,039	0,011; -0,009	0,997; 0,997	0,03	0,26	61,5	91,5
CE	0,5-10; 5-25	0,034; 0,031	-0,007; 0,008	0,995; 0,996	0,05	0,21	57,5	97,6



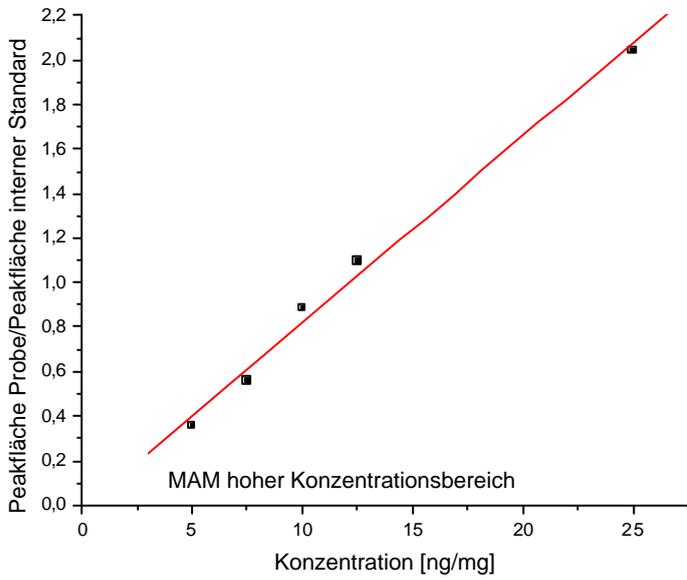
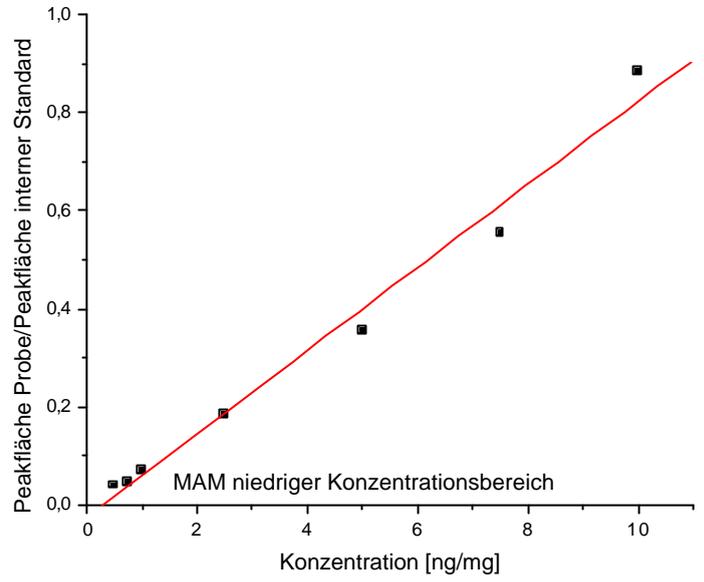
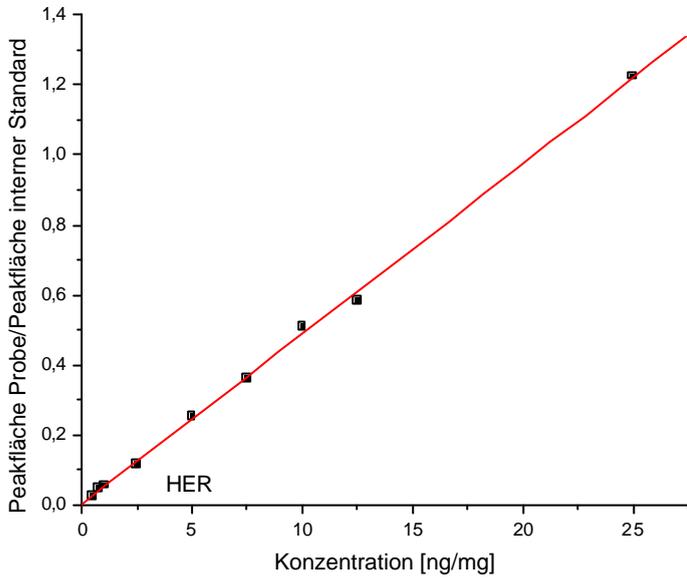
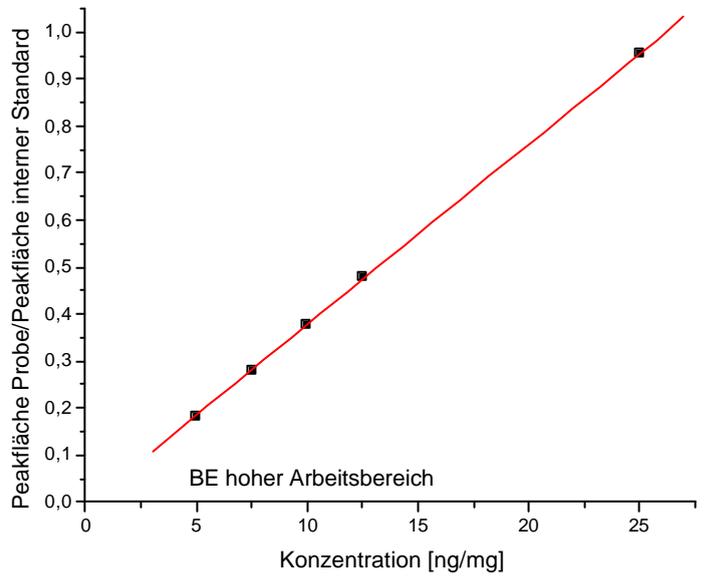
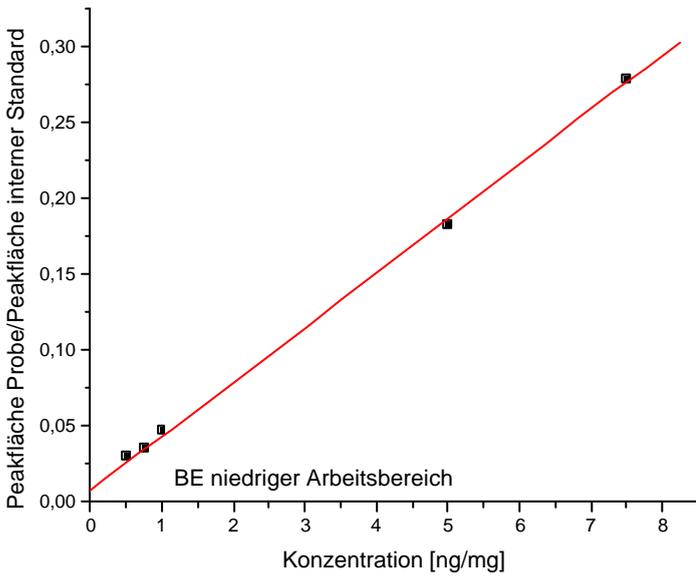
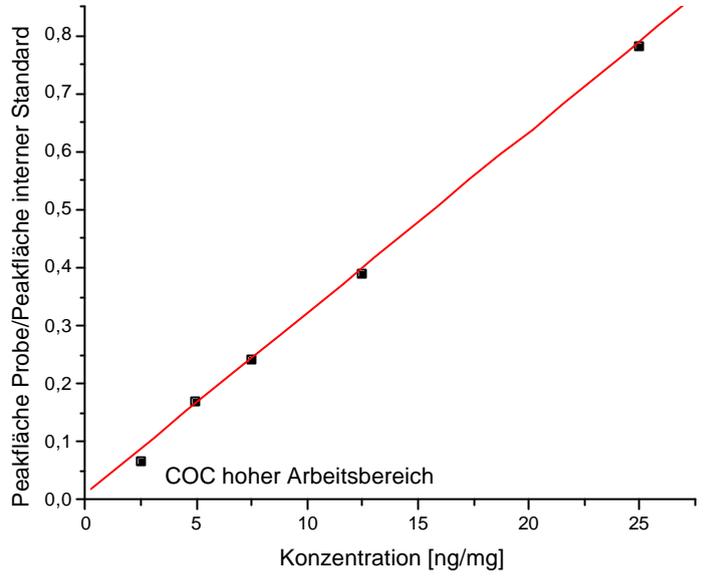
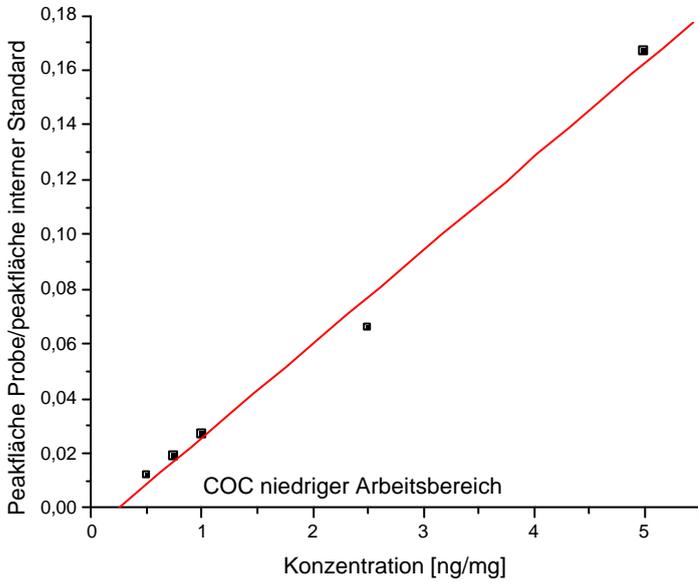


Abbildung 36: Kalibriergeraden der Opiate.



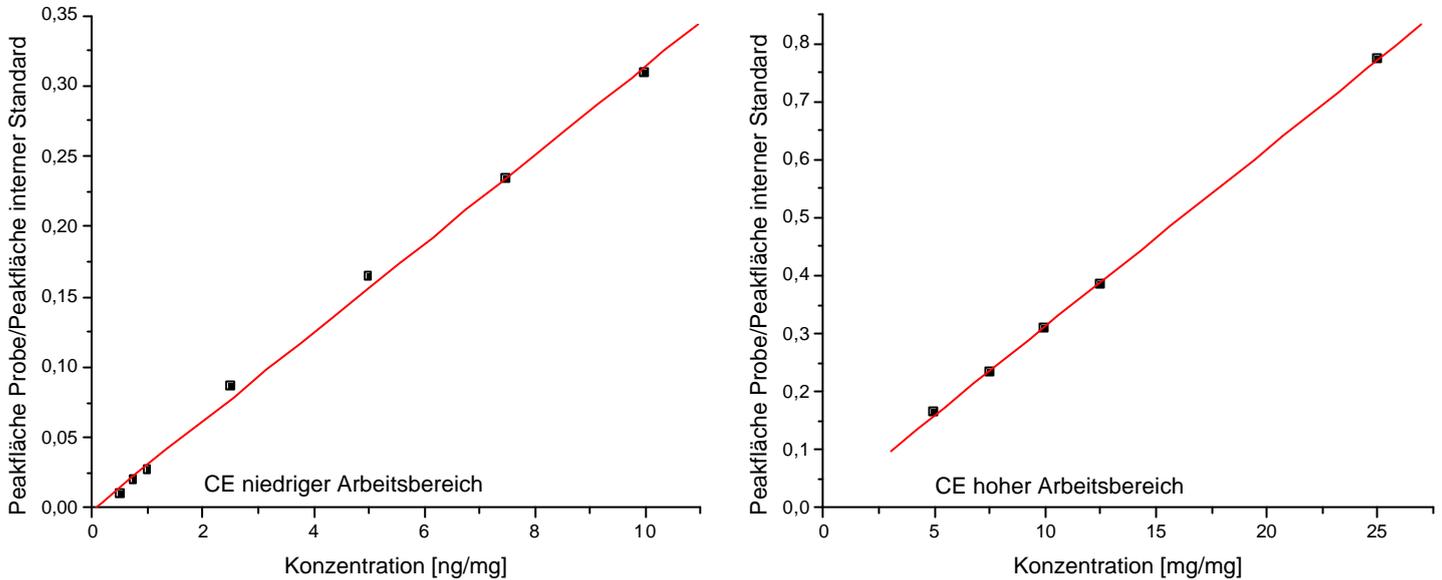


Abbildung 37: Kalibriergeraden von Cocain sowie den Cocainmetaboliten.

Zusätzlich wurden drei Proben in hoher, mittlerer und niedriger Konzentration (25 ng/mg, 5 ng/mg, 0,5 ng/mg) an acht Tagen jeweils doppelt bestimmt. Aus den erhaltenen Werten wurde die Wiederholpräzision (WP), Laborpräzision (LP) und Richtigkeit (R) ermittelt (Tabelle 12).

Zur Bestimmung der Wiederfindung (WF) wurden sechs dotierte Leerwertproben jeweils in hoher und niedriger Konzentration extrahiert. Die Wiederfindung wurde dann anhand dotierter jedoch nicht extrahierter Leerwertproben errechnet (Tabelle 11).

Tabelle 12: Mittelwerte (MW), Reststandardabweichungen (RSD) Wiederholpräzision (WP), Laborpräzision (LP) und Richtigkeit (R) bei den Konzentrationen 0,5 ng/mg, 5 ng/mg und 25 ng/mg der Opiate und Cocain sowie der Cocainmetaboliten.

	0,5 ng/mg					5 ng/mg					25 ng/mg				
	MW	RSD [%]	WP [%]	LP [%]	R [%]	MW	RSD [%]	WP [%]	LP [%]	R [%]	MW	RSD [%]	WP [%]	LP [%]	R [%]
COD	0,531	2,15	2,25	2,25	6,16	4,883	1,78	1,34	1,81	2,35	25,332	1,25	0,54	1,28	1,33
MOR	0,513	8,21	6,48	8,31	2,52	5,210	6,55	4,11	6,69	4,21	24,939	1,17	1,29	1,29	0,24
AC	0,534	6,36	4,11	6,49	6,78	4,981	2,50	2,33	2,52	0,39	24,924	1,18	0,92	1,20	0,30
HER	0,488	4,94	5,68	5,68	2,42	5,109	8,11	2,53	8,37	2,17	25,190	1,00	1,05	1,05	0,76
MAM	0,552	5,44	4,03	5,53	10,43	4,792	4,45	4,37	4,46	4,16	24,688	1,14	0,78	1,16	1,25
COC	0,560	3,08	3,69	3,69	11,94	5,152	2,37	2,05	2,40	3,05	25,350	1,77	0,86	1,82	1,40
BE	0,516	6,77	3,59	6,94	3,11	4,858	4,67	3,28	4,75	2,85	24,978	0,85	0,62	0,86	0,09
CE	0,539	5,42	5,54	5,54	7,88	5,008	4,01	2,91	4,08	0,15	24,757	1,89	0,96	1,94	0,97

In früheren Studien [15,17] wurde das Problem eines möglichen Abbaus von Heroin zu 6-Monoacetylmorphin und letztlich zu Morphin diskutiert. Der Abbau kann während der Probenvorbereitung auftreten oder wenn lange Standzeiten im Autosampler nicht vermieden werden können. Um einen möglichen Abbau zu überprüfen, wurden dotierte Leerhaarproben (5 ng/mg) nach 0, 1, 3, 12, 18, und 24 Stunden Standzeit im Autosampler bei Raumtemperatur analysiert. Es konnte innerhalb von 24 Stunden keine statistisch signifikante Abnahme der Analytkonzentration festgestellt werden (Abbildung 38).

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Abbau von Heroin und 6-Monoacetylmorphin zu Morphin während der Probenvorbereitung (insbesondere der Extraktion im Ultraschallbad) auftritt und ob zudem ein Abbau der deuterierten Analoga stattfindet. Zu diesem Zweck wurden vier Leerhaarproben einzeln mit jedem zu untersuchenden Analyten dotiert (Heroin, Heroin-d₉, 6-Monoacetylmorphin, 6-Monoacetylmorphin-d₃). Diese Proben wurden doppelt bestimmt, sie wurden wie oben dargestellt

vorbereitet, eine zweite Messreihe wurde ebenso durchgeführt, allerdings nicht im Ultraschallbad extrahiert. Es zeigte sich, dass ein Abbau von Heroin und 6-Monoacetylmorphin zu Morphin, sowie von Heroin-d₉ und 6Monoacetylmorphin-d₃ zu Morphin-d₃ zu weniger als 5% stattfand. Die Anwendbarkeit der Methode zur Opiatanalytik ist somit belegt und wurde zudem durch die erfolgreiche Teilnahme an Ringversuchen und bei der Routineanalyse von Standardreferenzmaterial unter Beweis gestellt.

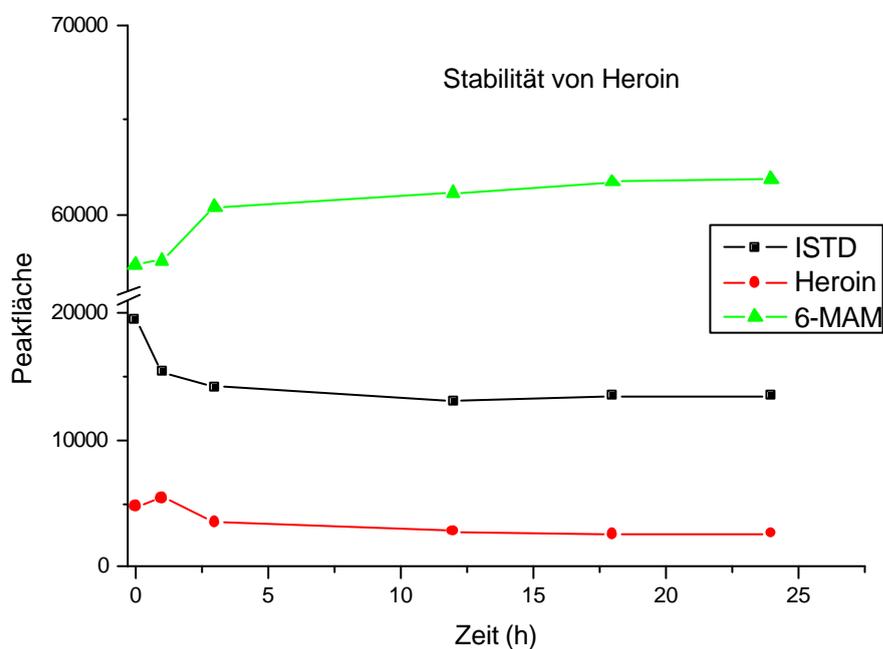


Abbildung 38: Stabilität von Heroin und Heroin-d₉ (ISTD) in einer Probe während 24 Stunden Standzeit im Autosampler bei Raumtemperatur.

Die Validierungsergebnisse zur Bestimmung von Amphetaminen, Cannabinoiden und Methadon wurden im Zusammenhang mit der Entwicklung der entsprechenden HS-SPME/GC/MS Methoden bereits in früheren Untersuchungen ermittelt und sind in der Übersicht in den Tabellen 13 und 14 dargestellt [83,84].

Tabelle 13: Lineare Regression (r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenze (BG), Wiederholpräzision (WP) und Laborpräzision (LP) bei den Konzentrationen 0,5 ng/mg, 2 ng/mg und 40 ng/mg der Amphetamine [84].

	Linearität [ng/mg]	r	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]	0,5 ng/mg		2 ng/mg		40 ng/mg	
					WP [%]	LP [%]	WP [%]	LP [%]	WP [%]	LP [%]
A	0,1-50	0,9991	0,01	0,03	2,1	9,9	1,6	4,7	0,9	2,4
MA	0,1-50	0,9998	0,01	0,05	6,8	3,7	5,7	3,3	2,6	2,0
MDA	0,1-50	0,9968	0,10	0,33	13,2	7,0	6,8	2,7	6,0	7,6
MDMA	0,1-50	0,9992	0,06	0,20	2,3	5,1	3,5	3,1	1,8	7,0
MDEA	0,1-50	1,0000	0,04	0,14	3,3	9,6	1,7	1,5	1,8	4,3
BDB	0,1-50	0,9988	0,17	0,54	8,1	22,4	6,2	8,1	4,1	6,7
MBDB	0,1-50	0,9999	0,10	0,31	9,8	11,1	4,5	14,0	2,9	8,2

Tabelle 14: Lineare Regression (r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenze (BG), Wiederholpräzision (WP) und Laborpräzision (LP) bei den Konzentrationen 0,5 ng/mg und 20 ng/mg der Cannabinoide und Methadon [83].

	Linearität [ng/mg]	r	NG [ng/mg]	BG [ng/mg]	0,5 ng/mg		20 ng/mg	
					WP [%]	LP [%]	WP [%]	LP [%]
CBD	0,1-20	0,999	0,08	0,27	7,2	12,6	6,1	9,9
THC	0,1-20	0,999	0,05	0,27	5,1	5,5	1,9	3,3
CBN	0,1-20	0,998	0,14	0,51	6,8	7,2	3,3	6,7
EDDP	0,05-20	0,994	0,01	0,06	2,4	4,6	0,5	1,8
MET	0,3-20	0,998	0,59	2,34	4,3	5,5	0,9	4,7

5.1.3. LC/MS/MS Validierung

Die Methode wurde nach internationalen Richtlinien mittels der Software VALISTAT[®] komplett validiert [76].

Wie oben beschrieben wurden zur Bestimmung der Selektivität der Methode Leerhaarproben (n=6) verschiedener Personen ohne Zugabe von Analyten oder internem Standard aufgearbeitet. Die Leerhaarproben wurden untersucht, um Störpeaks anstelle der Peaks des internen Standard Mixes sowie der Analytpeaks auszuschließen (Abbildung 39).

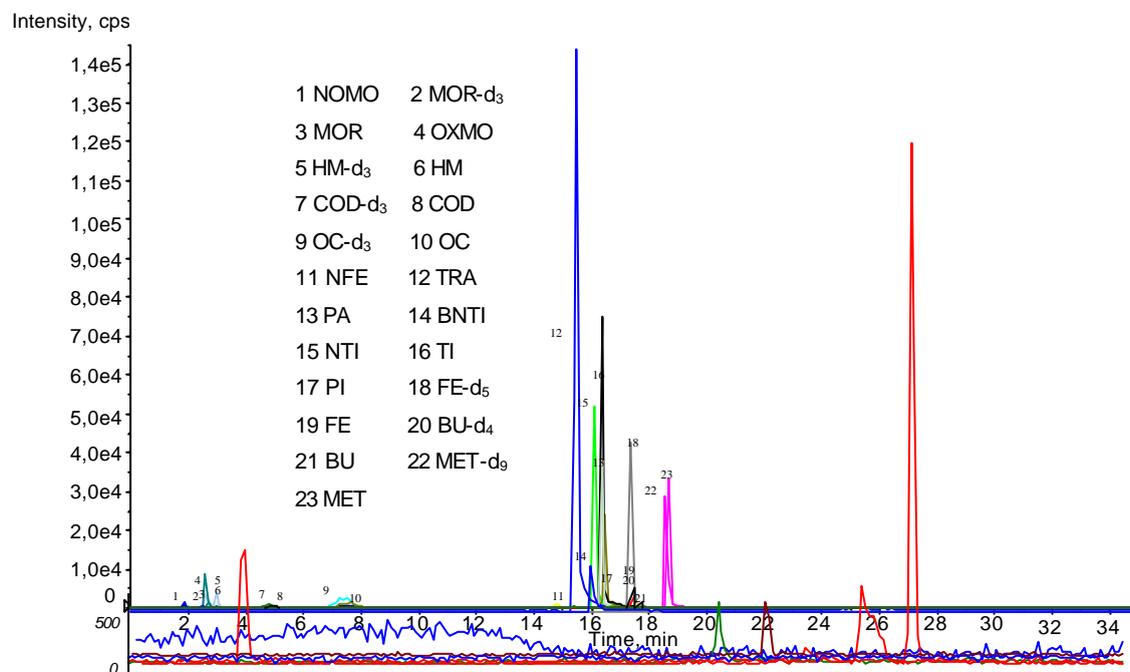


Abbildung 39: LC/MS-MS MRM Chromatogramm einer mit Standard und internem Standard dotierten extrahierten Leerhaarprobe (0,1 ng/mg für BU, FE, HM, NFE, NOMO, OXMO; 1 ng/mg für BNTI, COD, MET, MOR, NTI, OC, PI, PA, deuterierte Analoga; 5 ng/mg für TRA) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (Linien unterhalb der Zeitachse).

Für die Kalibrierung wurden Leerhaarproben mit äquidistant verteilten Analyt-Kalibratoren versetzt. Es wurde jeweils eine Sechsfachbestimmung durchgeführt, diese auf Ausreißer geprüft (Grubbs-Test) und der Mittelwert gebildet. Unter Verwendung der Mittelwerte wurden die Kalibriergeraden auf Varianzhomogenität (F-Test) und auf Linearität (Mandel-Test) geprüft. Es zeigte sich, dass Linearität nicht im gesamten Kalibrierbereich gegeben war (0,01-1,5 ng/mg für Bisnortilidin, Codein, Methadon, Morphin, Nortilidin, Oxycodon, Piritramid; 0,001-0,15 ng/mg für Buprenorphin, Fentanyl, Hydromorphon, Norfentanyl, Normorphin, Oxymorphon; 0,05-7,5 ng/mg für Tramadol), daher wurden zur Quantifizierung gewichtete Kalibrationsmodelle verwendet. In Tabelle 15 und Abbildung 40 sind die Kalibriergeraden und die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten dargestellt.

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden Leerhaarproben mit internem Standard Mix und Analytkalibratoren in Konzentrationen nahe der zu erwarteten Nachweisgrenzen versetzt. Diese Proben wurden aufgearbeitet und wie oben beschrieben doppelt analysiert (Tabelle 15).

Zwei Qualitätskontrollproben in hoher und niedriger Konzentration wurden in Doppelbestimmung über einen Zeitraum von acht Tagen untersucht. Mit den erhaltenen Messwerten wurden die Wiederhol- und Laborpräzisionen sowie die Genauigkeit bestimmt (Tabelle 16).

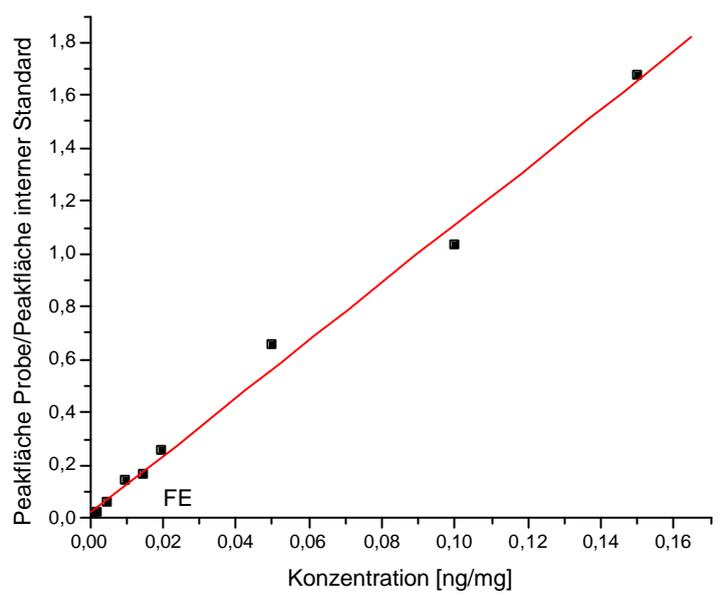
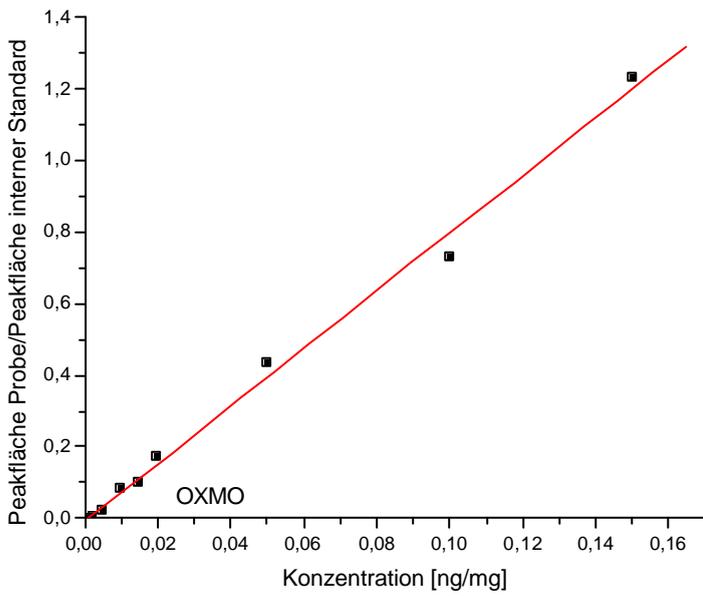
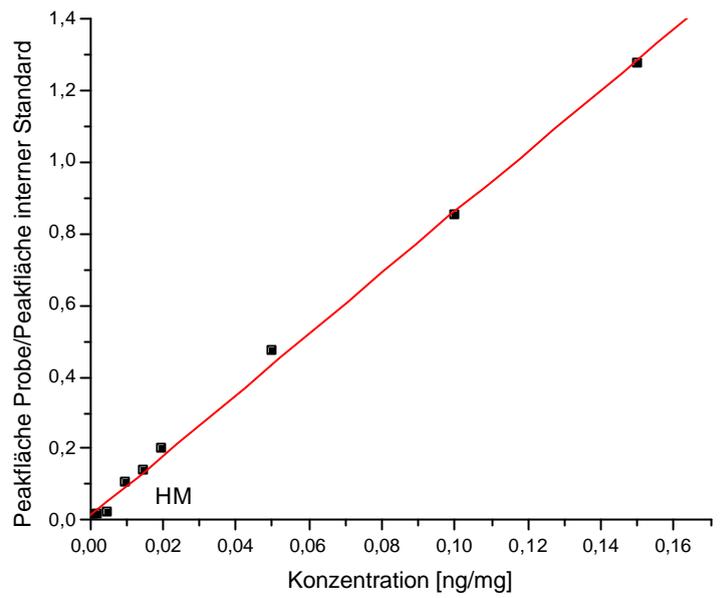
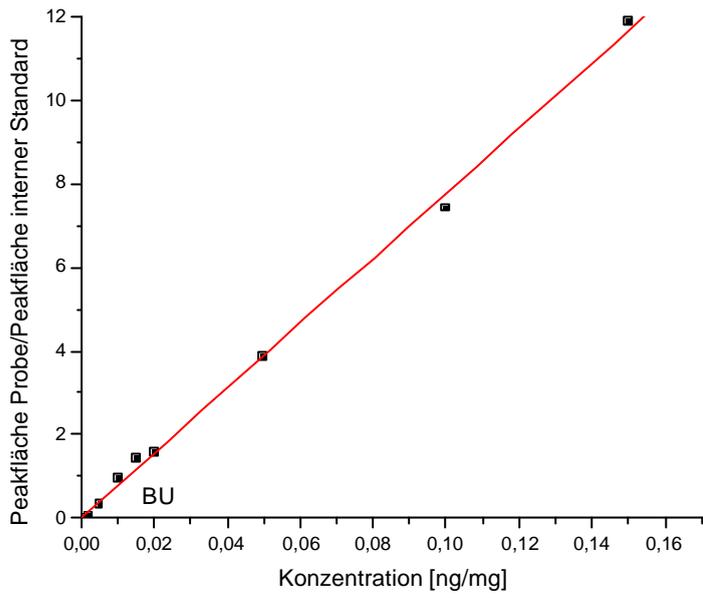
Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden jeweils sechs Proben in hoher und niedriger Konzentration wie oben beschrieben extrahiert. Die Wiederfindungen wurden anhand der entsprechenden nicht extrahierten Proben gleicher Konzentrationen errechnet (Tabelle 15).

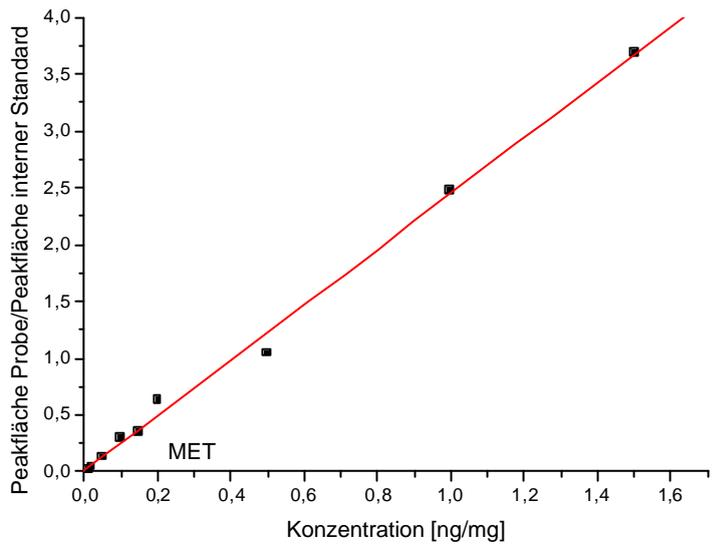
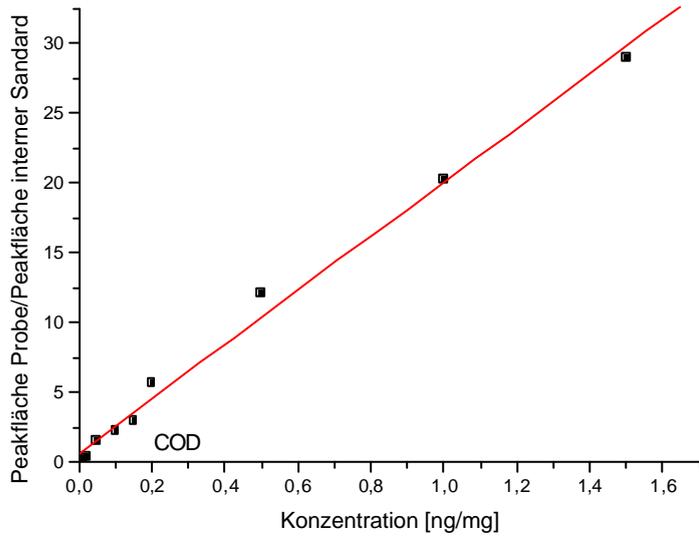
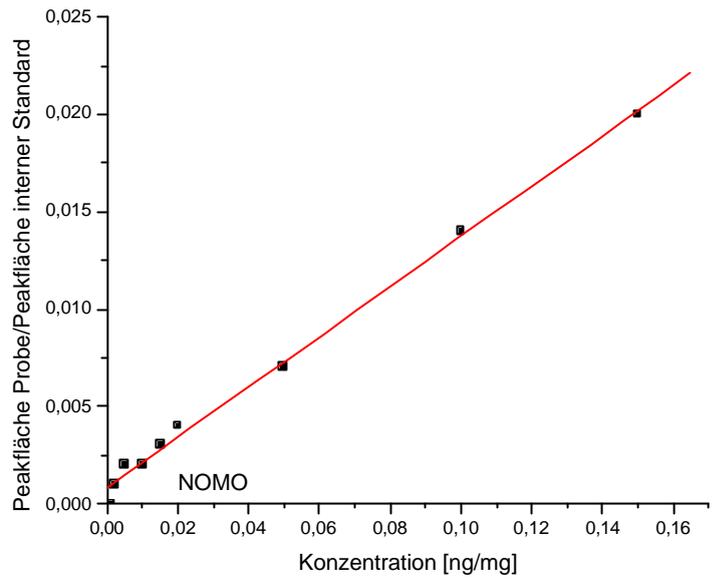
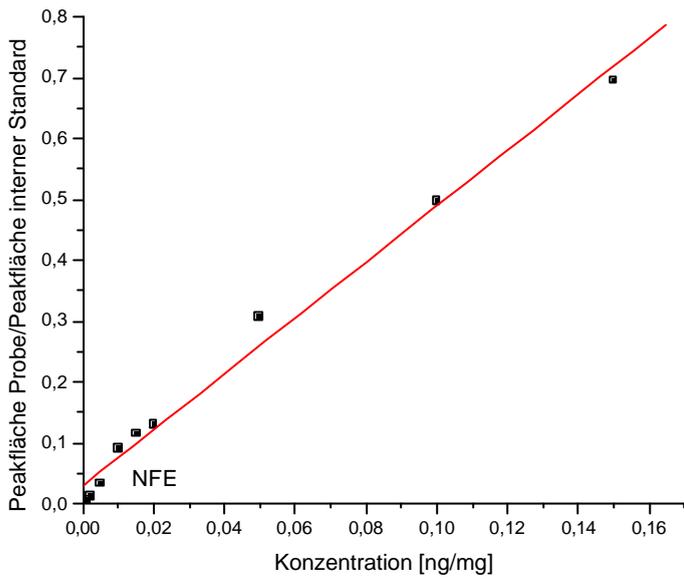
Tabelle 15: Lineare Regression (m=Steigung, b=Achsenabschnitt, r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenzen (BG) und Wiederfindungen (WF) bei niedrigen (100, 10, 500 pg/mg) und hohen (500, 50, 2500 pg/mg) Konzentrationen der Opioidanalgetika.

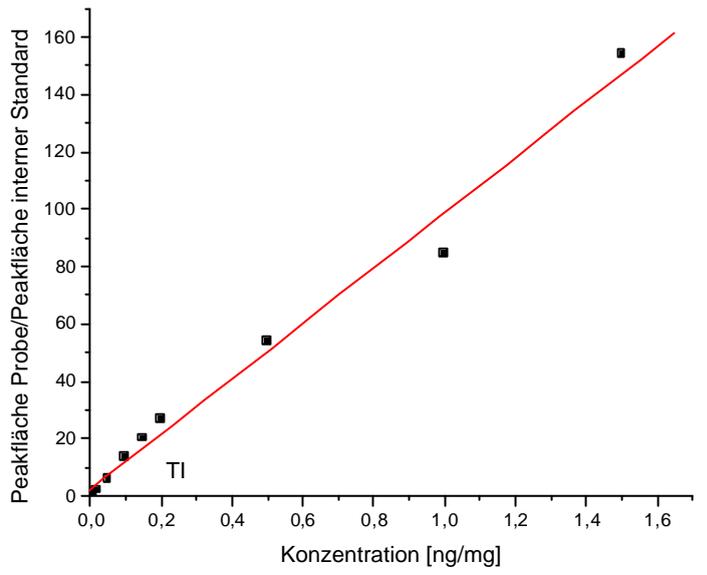
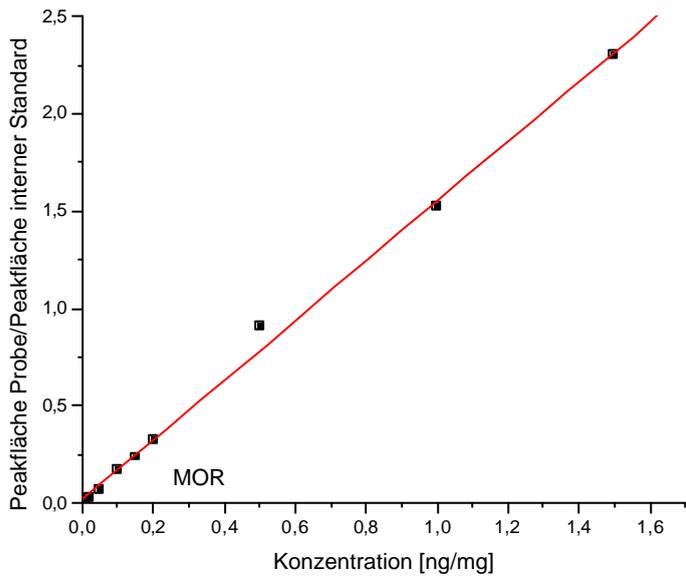
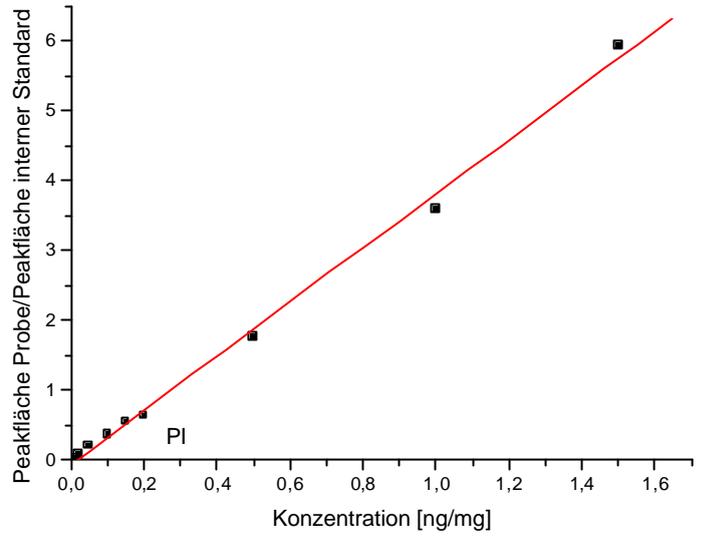
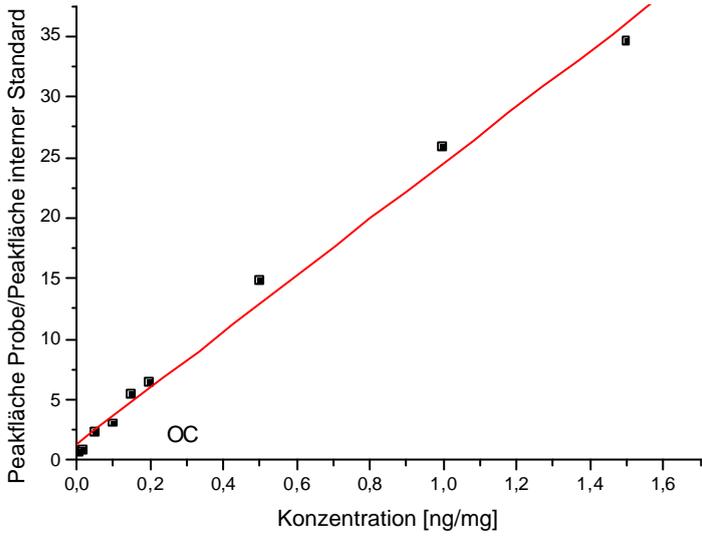
	m	b	r	NG [pg/mg]	BG [pg/mg]	WF 100 pg/mg ¹ 10 pg/mg ² 500 pg/mg ³	WF 500 pg/mg ¹ 50 pg/mg ² 2500 pg/mg ³
BU²	77,708	0,005	0,996	1,6	5,3	74,3	81,2
COD¹	19,353	0,689	0,997	12,7	50,8	78,6	83,0
HM²	8,503	0,010	0,998	2,0	6,6	53,2	74,6
MET¹	2,443	0,005	0,998	8,9	30,0	62,1	88,5
OC¹	23,167	1,329	0,997	12,0	42,7	54,1	64,3
OXMO²	8,039	-0,008	0,998	1,2	4,7	52,6	85,5
PI¹	3,864	-0,054	0,999	2,2	9,1	73,8	81,0
TRA³	34,093	7,640	0,993	15,2	57,8	83,8	88,9
FE²	10,915	0,017	0,997	0,8	2,6	57,5	59,6
NFE²	4,606	0,029	0,993	0,9	3,5	64,9	67,2
MOR¹	1,537	0,015	0,995	6,1	21,9	72,5	74,1
NOMO²	0,129	0,001	0,993	3,4	9,5	54,6	72,4
TI¹	96,618	2,122	0,993	2,4	8,7	82,4	89,7
BNTI¹	19,572	0,160	0,998	17,4	59,1	60,6	63,5
NTI¹	95,063	1,887	0,998	9,3	32,2	63,6	76,2

Tabelle 16: Mittelwerte (MW), Reststandardabweichungen (RSD), Wiederholpräzision (WP), Laborpräzision (LP) und Richtigkeit (R) bei niedrigen (100, 10, 500 pg/mg) und hohen (500, 50, 2500 pg/mg) Konzentrationen der Opioidanalgetika.

	100 pg/mg ¹ , 10 pg/mg ² , 500 pg/mg ³					500 pg/mg ¹ , 50 pg/mg ² , 2500 pg/mg ³				
	MW	RSD [%]	WP [%]	LP [%]	R [%]	MW	RSD [%]	WP [%]	LP [%]	R [%]
BU²	10,8	5,8	6,7	6,7	8,4	50,1	2,6	4,8	4,8	1,2
COD¹	100,5	5,2	6,1	6,1	1,9	502,6	4,0	3,9	4,1	0,5
HM²	10,1	9,2	6,0	9,4	4,6	49,8	4,2	3,1	3,4	0,6
MET¹	99,9	3,6	3,3	3,6	-0,1	499,7	3,2	3,1	3,2	-0,1
OC¹	101,4	4,5	4,6	4,6	1,4	502,1	2,6	3,3	3,3	0,4
OXMO²	9,9	10,1	11,4	11,4	-0,9	50,3	5,4	7,3	7,3	0,7
PI¹	101,4	6,1	4,8	6,2	1,4	504,2	2,9	3,3	3,3	0,8
TRA³	500,8	4,4	4,5	4,5	0,2	2500,9	2,1	3,4	3,4	0,1
FE²	10,3	8,8	7,9	8,9	3,0	49,9	3,7	3,1	3,7	-0,1
NFE²	10,1	4,3	9,8	9,8	2,3	50,3	3,1	3,1	3,5	0,9
MOR¹	101,4	4,5	3,3	4,4	1,4	50,5	3,3	3,1	3,1	0,6
NOMO²	10,2	11,2	14,9	14,9	1,6	48,9	10,47	13,6	13,6	-2,0
TI¹	100,1	4,3	5,0	4,9	0,1	50,1	3,17	3,1	3,2	0,3
BNTI¹	100,9	3,4	3,3	3,4	0,9	50,4	2,7	3,2	3,2	0,7
NTI¹	101,6	5,1	3,1	5,2	1,6	50,6	2,8	3,1	3,1	1,3







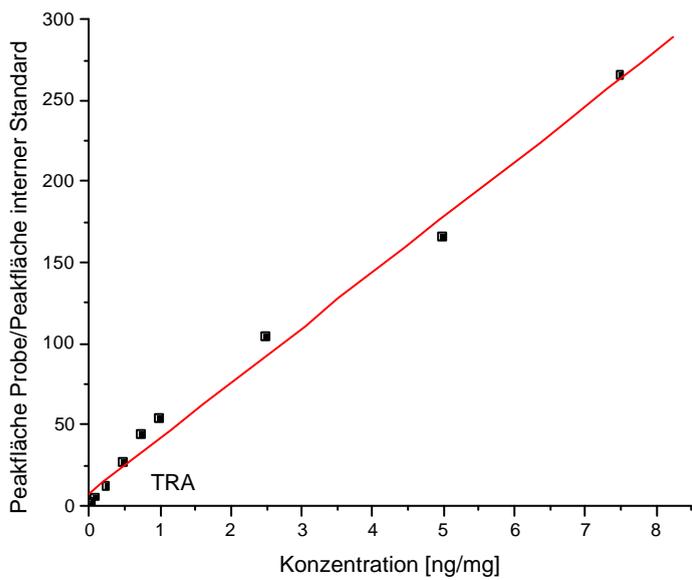
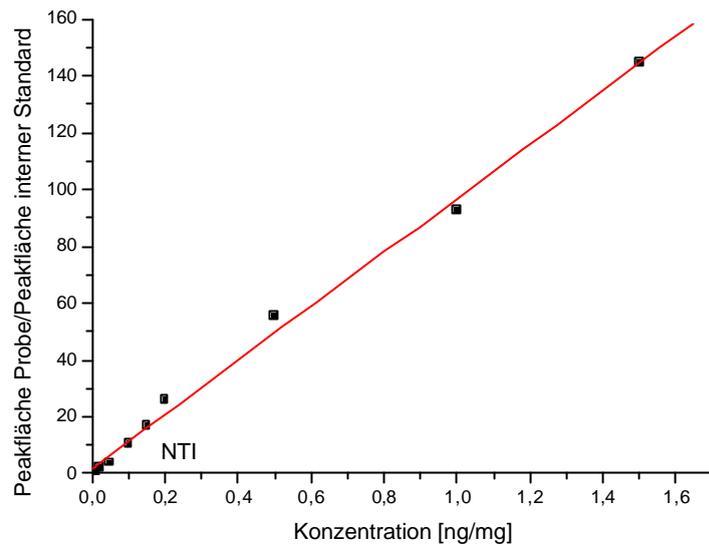
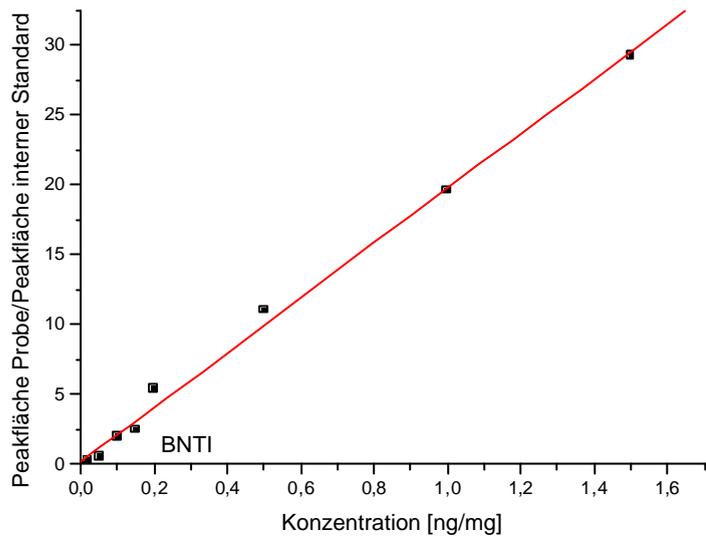


Abbildung 40: Gewichtete Kalibriergeraden der Opioidanalgetika.

5.2. Anwendbarkeit der entwickelten Methoden

5.2.1. Bestimmung von Opiaten Cocain und Cocainmetaboliten in Haaren mittels Enzymimmunoassay (ELISA) und Bestätigung mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

In Tabelle 17 sind die ELISA- und GC/MS Ergebnisse für Cocain und Cocainmetaboliten sowie für Opiate in 124 Haarproben dargestellt. Die mit der GC/MS erhaltenen Analytkonzentrationen in den Proben lagen zwischen 0,04 und 5,20 ng/mg für Heroin, zwischen 0,04 und 30,01 ng/mg für 6-Monoacetylmorphin, zwischen 0,03 und 11,87 ng/mg für Morphin, zwischen 0,02 und 1,84 ng/mg für Codein, zwischen 0,02 und 2,48 ng/mg für Acetylcodein, zwischen 0,01 und 21,37 ng/mg für Cocain, zwischen 0,03 und 10,51 ng/mg für Benzoylcegonin und zwischen 0,05 und 1,26 ng/mg für Cocaethylen. Cocain wurde mittels GC/MS in 74, Cocaethylen in 10 und Benzoylcegonin in 66 der Proben nachgewiesen, Codein wurde in 25, Morphin in 77, Acetylcodein in 15, Heroin in 13 und 6-Monoacetylmorphin in 92 der Proben detektiert. Negative Proben waren das Resultat einer erfolgreichen Entgiftung der Patienten.

Cocain-Equivalente konnten in 93 von 124 Fällen mittels ELISA nachgewiesen werden (Bereich zwischen 0,01 und 21,37 ng/mg), Morphin-Equivalente in 110 von 124 Fällen (Bereich zwischen 0,03 und 28,71 ng/mg).

Tabelle 17: Haarfarbe und Konzentrationen der Opiate und Cocain sowie der Cocainmetaboliten in Haaren mittels ELISA und GC/MS.

Fall- zahl	Haar- farbe	ELISA	GC/MS				ELISA	GC/MS					
		[ng/mg] Cocain-Eq.	[ng/mg]				[ng/mg] Morphin-Eq.	[ng/mg]					
			COC	CE	BE	Summe		COD	MO	AC	HE	MAM	Summe
1	braun	1,16	0,63	0,00	0,45	1,08	2,31	0,37	3,91	0,08	0,00	0,89	5,25
2	schwarz	0,11	0,00	0,00	0,06	0,06	0,94	0,04	0,75	0,05	0,00	0,48	1,32
3	blond g	0,09	0,06	0,00	0,05	0,11	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	schwarz	0,23	0,00	0,00	0,04	0,04	0,80	0,02	0,00	0,00	0,00	0,06	0,08
5	braun	0,55	0,33	0,00	0,32	0,65	0,80	0,00	0,49	0,00	0,00	1,11	1,60
6	braun	0,19	0,13	0,00	0,00	0,13	0,37	0,00	0,12	0,00	0,00	0,84	0,96
7	schwarz	1,47	0,37	0,14	0,36	0,87	0,45	0,00	0,26	0,00	0,00	0,13	0,39
8	braun	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,25
9	blond g	0,20	0,02	0,10	0,03	0,15	0,08	0,00	0,13	0,00	0,00	0,04	0,17
10	schwarz g	0,09	0,00	0,00	0,32	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,07	0,00	0,00	0,30	0,37
12	schwarz	22,59	21,37	0,77	8,58	30,72	3,71	0,84	1,85	0,23	1,55	10,23	14,70
13	rot g	6,33	3,90	0,00	1,52	5,42	0,35	0,13	0,05	0,00	0,00	0,19	0,37
14	schwarz	0,31	0,48	0,00	0,06	0,54	0,28	0,00	0,36	0,00	0,00	0,36	0,72
15	schwarz g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,19	0,06	0,00	0,00	0,33	0,58
16	schwarz	0,19	0,85	0,00	0,00	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	blond	8,19	5,69	0,00	10,51	16,20	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,09	0,22
18	braun	8,58	15,45	0,07	0,80	16,32	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,16	0,27
19	braun	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,52	0,00	0,00	0,99	1,51
20	braun	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	11,12	1,84	11,87	2,48	5,20	30,01	51,40
21	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,03	0,00	0,00	0,22	0,25
22	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,66	0,00	0,62	0,00	0,00	2,38	3,00
23	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	0,56	0,00	0,00	1,94	2,50
24	braun	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	braun	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	braun	4,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,91	0,91
27	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31	braun	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Fall-	Haar-	ELISA	GC/MS				ELISA	GC/MS					
		[ng/mg]	[ng/mg]				[ng/mg]	[ng/mg]					
zahl	farbe	Cocain-Eq.	COC	CE	BE	Summe	Morphin-Eq.	COD	MO	AC	HE	MAM	Summe
32	braun	1,17	0,07	0,00	0,03	0,10	1,38	0,00	0,25	0,00	0,00	0,65	0,90
33	blond g	2,31	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
34	blond g	3,64	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,09
35	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	schwarz	7,84	1,48	0,00	0,72	2,20	2,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,60
37	schwarz	18,31	6,32	0,00	3,58	9,90	5,90	0,00	0,97	0,00	0,00	4,04	5,01
38	schwarz	31,78	4,48	0,00	1,25	5,73	6,44	0,00	1,06	0,00	0,00	6,09	7,15
39	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,26
40	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,41
41	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,56
42	braun	4,11	0,51	0,00	0,45	0,96	1,42	0,00	0,44	0,00	0,00	0,84	1,28
43	braun	37,65	3,86	0,00	0,91	4,77	3,77	0,00	0,39	0,00	0,00	1,25	1,64
44	braun	26,32	2,89	0,00	0,89	3,78	3,18	0,00	0,30	0,00	0,00	1,21	1,51
45	braun	24,12	2,82	0,00	0,99	3,81	2,98	0,00	0,25	0,00	0,00	1,01	1,26
46	braun	2,43	0,32	0,00	0,00	0,32	9,71	0,00	0,62	0,00	0,00	1,97	2,59
47	braun	3,63	1,87	0,00	0,45	2,32	18,38	0,00	2,44	0,54	0,98	5,18	9,14
48	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
49	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
50	braun	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	3,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
51	braun	1,38	0,54	0,00	0,00	0,54	4,00	0,00	1,01	0,00	0,00	1,17	2,18
52	braun	4,00	1,44	0,00	0,85	2,29	6,86	0,00	2,37	0,00	0,00	5,04	7,41
53	blond	24,11	5,84	0,00	1,68	7,52	7,77	0,14	1,99	0,08	0,05	2,47	4,73
54	blond	31,78	7,95	0,00	2,02	9,97	13,94	0,27	2,73	0,14	0,09	5,53	8,76
55	blond	41,40	8,74	0,00	1,99	10,73	13,00	0,29	3,25	0,17	0,13	9,60	13,44
56	schwarz	11,18	4,43	0,00	0,53	4,96	18,29	0,00	3,12	0,00	0,00	8,82	11,94
57	schwarz	3,99	0,46	0,00	0,00	0,46	9,28	0,00	0,09	0,00	0,00	0,67	0,76
58	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
59	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
61	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,23	0,00	0,00	0,27	0,50
62	braun	11,03	0,59	0,00	0,00	0,59	1,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
63	braun	8,30	0,77	0,00	0,00	0,77	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
64	braun	22,47	2,51	0,00	0,00	2,51	3,32	0,00	0,08	0,00	0,00	1,73	1,81
65	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Fall-	Haar-	ELISA	GC/MS				ELISA	GC/MS					
		[ng/mg]	[ng/mg]				[ng/mg]	[ng/mg]					
zahl	farbe	Cocain-Eq.	COC	CE	BE	Summe	Morphin-Eq.	COD	MO	AC	HE	MAM	Summe
66	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
67	braun	7,32	1,35	0,00	1,24	2,59	12,20	0,66	1,42	0,00	0,00	7,16	9,24
68	braun	8,58	1,67	0,00	1,66	3,33	12,50	0,42	1,43	0,00	0,00	14,15	16,00
69	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
70	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
72	braun	25,84	5,32	0,00	2,32	7,64	4,95	0,00	1,02	0,00	0,00	2,07	3,09
73	braun	13,85	1,12	0,00	0,32	1,44	6,55	0,00	0,72	0,00	0,00	6,71	7,43
74	braun	17,50	1,43	0,00	0,63	2,06	8,08	0,03	0,96	0,09	0,07	12,20	13,35
75	schwarz	21,73	3,86	0,00	1,07	4,93	3,32	0,00	0,53	0,00	0,00	2,53	3,06
76	schwarz	48,14	3,24	0,00	0,91	4,15	5,38	0,00	0,47	0,00	0,00	2,34	2,81
77	braun	38,93	4,44	0,00	1,75	6,19	7,58	0,50	1,30	0,00	0,00	6,73	8,53
78	braun	45,42	4,56	0,00	1,65	6,21	9,80	0,00	1,22	0,00	0,00	6,37	7,59
79	braun	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
80	braun	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
81	braun	5,18	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,46
82	braun	8,44	0,42	0,00	0,00	0,42	1,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,87
83	braun	13,30	1,46	0,00	0,31	1,77	2,69	0,00	0,00	0,00	0,00	1,92	1,92
84	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
85	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
86	braun	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
87	braun	50,25	0,85	0,00	0,58	1,43	1,60	0,00	0,47	0,00	0,00	0,73	1,20
88	braun	3,69	1,24	0,00	0,97	2,21	2,78	0,00	1,00	0,00	0,00	1,93	2,93
89	schwarz	9,72	4,12	0,15	1,01	5,28	4,71	0,23	0,87	0,08	0,00	6,53	7,71
90	braun	50,77	3,98	0,00	0,48	4,46	9,34	0,65	2,08	0,00	0,00	5,53	8,26
91	braun	15,53	3,21	0,00	0,71	3,92	21,19	0,00	2,14	0,02	0,00	3,14	5,30
92	braun	29,63	5,84	0,00	0,91	6,75	28,71	0,00	3,31	0,09	0,11	6,26	9,77
93	braun	4,62	0,74	0,00	0,16	0,90	2,45	0,00	0,78	0,00	0,00	1,02	1,80
94	blond g	3,96	0,98	0,00	0,11	1,09	1,67	0,00	0,54	0,00	0,00	1,99	2,53
95	blond g	8,50	1,36	0,00	0,08	1,44	2,00	0,00	0,37	0,00	0,00	2,73	3,10
96	braun	7,02	2,36	0,00	1,29	3,65	14,86	0,00	2,32	0,00	0,00	5,55	7,87
97	braun	10,11	1,00	0,00	0,05	1,05	16,90	0,00	2,24	0,00	0,00	4,10	6,34
98	braun	0,38	0,98	0,00	0,09	1,07	5,67	0,00	0,11	0,00	0,00	0,47	0,58
99	braun	0,50	0,74	0,00	0,00	0,74	5,45	0,00	0,09	0,00	0,00	0,32	0,41

Fall-	Haar-	ELISA	GC/MS				ELISA	GC/MS					
		[ng/mg]	[ng/mg]				[ng/mg]	[ng/mg]					
zahl	farbe	Cocain-Eq.	COC	CE	BE	Summe	Morphin-Eq.	COD	MO	AC	HE	MAM	Summe
100	braun	3,72	2,14	0,00	0,79	2,93	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,78
101	braun	14,24	1,92	0,00	0,77	2,69	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	0,93
102	braun	26,59	6,26	0,00	2,24	8,50	2,52	0,00	0,00	0,00	0,00	3,23	3,32
103	braun	0,64	0,12	0,06	0,11	0,29	4,12	0,30	0,76	0,00	0,10	2,10	3,26
104	braun	110,09	8,37	1,26	3,77	13,42	10,04	0,10	0,40	0,00	0,00	1,32	1,82
105	braun	0,60	0,01	0,00	0,05	0,06	0,31	0,02	0,17	0,00	0,00	0,10	0,29
106	braun	11,93	0,69	0,00	1,00	1,69	0,56	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,10
107	braun	0,63	0,18	0,05	0,10	0,33	0,77	0,10	0,21	0,00	0,00	0,64	0,95
108	braun	0,18	0,03	0,00	0,00	0,03	1,45	0,00	0,13	0,00	0,00	0,22	0,35
109	schwarz	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,04	0,02	0,18	0,00	0,00	0,12	0,32
110	schwarz	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	0,00	0,29	0,00	0,00	0,39	0,68
111	rot g	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00	1,54	0,00	0,00	0,76	2,30
112	schwarz	11,43	2,69	0,05	1,65	0,00	0,12	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,07
113	schwarz	3,80	0,18	0,00	0,19	0,37	0,50	0,00	0,26	0,00	0,00	0,32	0,58
114	grau	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,75	0,42	1,46	0,11	0,23	2,35	4,57
115	grau	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
116	schwarz	1,91	0,39	0,00	0,62	1,01	0,57	0,00	0,03	0,00	0,00	0,21	0,24
117	schwarz	0,57	0,03	0,00	0,07	0,10	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,16
118	blond	1,49	0,13	0,00	0,08	0,21	1,69	0,00	2,60	0,00	0,00	2,09	4,69
119	braun	7,57	5,81	0,00	2,97	8,78	1,07	0,16	0,39	0,00	0,00	0,43	0,98
120	schwarz	0,82	0,21	0,00	0,29	0,50	0,80	0,02	0,18	0,02	0,05	0,84	1,11
121	schwarz	1,02	0,48	0,00	0,28	0,76	0,09	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,07
122	blond g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06
123	braun	1,13	0,28	0,05	0,39	0,72	0,47	0,00	0,05	0,02	0,04	0,25	0,36
124	braun	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,96	0,00	0,07	0,88	1,91
Positiv		93	74	10	66	76	110	25	77	15	13	92	93
%		89,4	59,7	8,1	53,2	61,3	88,7	20,2	62,1	12,1	10,5	74,2	75,00
Mittelwert		11,08	2,61	0,27	1,11	3,48	3,76	0,32	1,02	0,28	0,67	2,54	3,6
±		1,73	0,41	0,13	0,21	0,56	0,49	0,08	0,18	0,16	0,40	0,43	0,65
Median		4,00	1,36	0,09	0,67	1,57	1,43	0,19	0,52	0,09	0,10	0,92	1,51
Minimum		0,04	0,01	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,04	0,04	0,06
Maximum		110,09	21,37	1,26	10,51	30,72	28,71	1,84	11,87	2,48	5,20	30,01	51,40

g gefärbt Eq. Equivalente

Es wurde überprüft, ob sich Korrelationen zwischen den ELISA- und GC/MS Messwerten aufstellen lassen. Bei einem univariaten Ansatz, einen GC/MS Analyten mit den entsprechenden ELISA Werten zu korrelieren, ergaben sich relativ kleine Korrelationskoeffizienten ($r=0,56$ (Cocain), $r=0,41$ (Benzoyllecgonin), $r=0,54$ (Cocaethylen), $r=0,24$ (Acetylcodein), $r=0,27$ (Codein), $r=0,20$ (Heroin), $r=0,59$ (6-Monoacetylmorphin), $r=0,59$ (Morphin)). Mit multivariater Datenanalyse wurde es möglich, alle GC/MS Analyten simultan mit den ELISA Werten zu korrelieren.

Die multivariate Korrelation zwischen ELISA Daten und den GC/MS Bestätigungswerten wurde mittels Partial Least Squares (PLS) Regression errechnet (Abbildung 41). Eine gute Korrelation wurde mittels Cross-Validation für die Morphin-Equivalente ($r=0,797$) aber auch für die Cocain-Equivalente ($r=0,818$) gefunden.

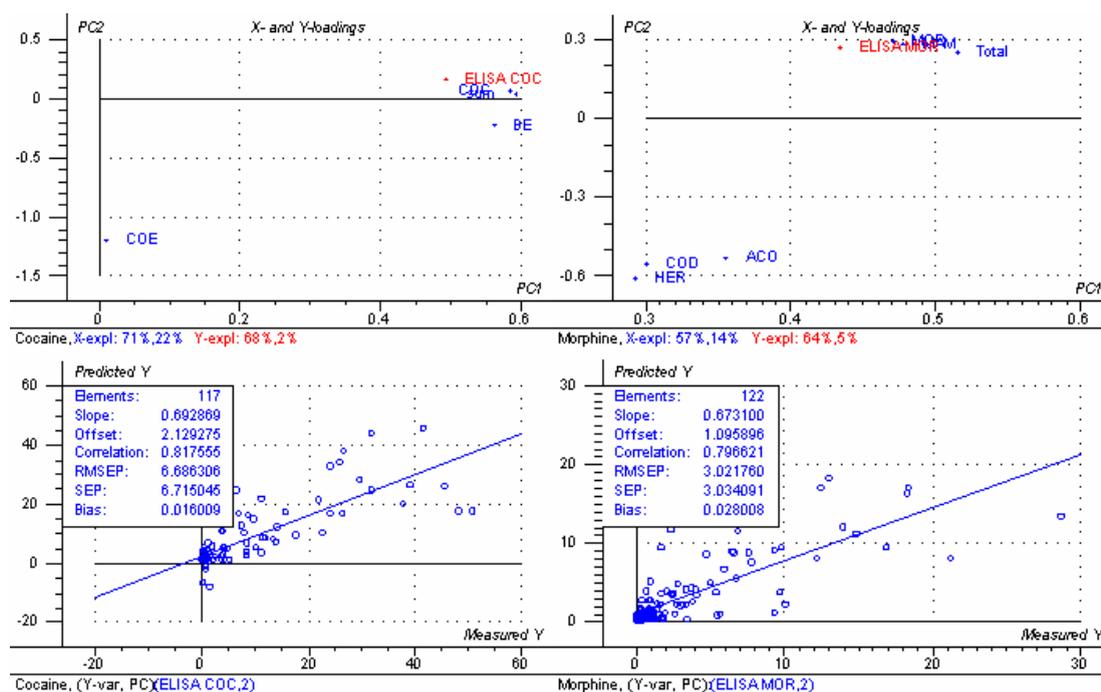


Abbildung 41: PLS Regression zwischen ELISA COC-Equivalenten (links), ELISA MOR-Equivalenten (rechts) und GC/MS Werten.

5.2.2. Opiatkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und wegen Opiatmissbrauchs Verstorbener

Die ermittelten Konzentrationen im proximalen Segment (1 cm) der Teilnehmer des Bonner Heroinvergabeprojekts einen Monat vor Vergabebeginn und nach einem Jahr Teilnahme an diesem Projekt (Zeitpunkt T-1 und Zeitpunkt T12) lagen für Heroin zwischen 0,04 und 1,16 ng/mg, für 6-Monoacetylmorphin zwischen 0,02 und 32,41 ng/mg und für Morphin zwischen 0,03 und 11,79 ng/mg (Tabelle 18).

Für keine der untersuchten Drogen ergaben die Messungen statistisch signifikante Unterschiede in den Mittelwerten der Analytkonzentrationen zwischen T-1 und T12 Haarproben aller Probanden. Bis auf 23 Fälle (25%, 6 T-1, 17 T12) war 6-Monoacetylmorphin der im Haar detektierte Hauptanalyt. In diesen Fällen hat möglicherweise eine Hydrolyse (vor der Probenvorbereitung) stattgefunden. In allen anderen Fällen war Morphin der Analyt, der in den höchsten Konzentrationen nachgewiesen wurde. In keinem Fall war Heroin der Hauptanalyt. Zusammenfassend wurden 30,4% und 39,1% der Proben bei T-1 und T12 positiv auf Heroin getestet.

Tabelle 18: Durchschnittliche Heroindosis (zum Zeitpunkt T12), Haarfarbe und Konzentrationen der Opiate bei T-1 und T12 in Haaren von Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts.

Fall-zahl	MW Dosis (mg/Tag)	Haar-farbe	HER T-1 (ng/mg)	HER T 12 (ng/mg)	MAM T-1 (ng/mg)	MAM T 12 (ng/mg)	MOR T-1 (ng/mg)	MOR T12 (ng/mg)	COD T-1 (ng/mg)	COD T12 (ng/mg)	AC T-1 (ng/mg)	AC T12 (ng/mg)
1	371,76	schwarz	0,00	0,00	0,12	0,39	0,18	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
2	456,70	rot g	0,00	0,00	0,07	0,76	0,00	1,54	0,00	0,00	0,00	0,00
3	330,99	schwarz	0,00	0,00	0,04	0,32	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00
4	670,00	grau	0,23	0,00	2,35	0,23	1,46	0,00	0,42	0,00	0,11	0,00
5	780,00	blond	0,11	0,00	5,24	2,09	1,56	2,60	0,33	0,00	0,18	0,00
6	732,25	blond g	0,00	0,00	0,06	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	619,78	braun	0,00	0,07	0,25	0,88	0,05	0,96	0,00	0,00	0,00	0,00
8	574,18	schwarz	0,00	0,11	0,44	0,47	0,37	0,97	0,02	0,00	0,00	0,00
9	456,88	braun	0,04	0,05	0,38	0,62	0,48	1,77	0,05	0,00	0,02	0,02
10	220,00	schwarz	0,05	0,06	0,40	0,53	0,34	0,50	0,06	0,00	0,02	0,00
11	533,55	braun	0,05	0,21	0,33	3,14	0,04	1,87	0,00	0,00	0,04	0,13
12	635,20	schwarz	0,06	0,04	0,68	0,33	0,24	1,69	0,00	0,00	0,03	0,00
13	436,45	braun	0,11	0,16	0,36	1,55	0,50	2,03	0,18	0,05	0,02	0,00
14	510,32	braun	0,00	0,00	0,15	0,62	0,00	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00
15	508,06	rot g	0,04	0,08	1,01	3,57	0,62	2,62	0,13	0,17	0,02	0,03
16	585,16	schwarz	0,16	0,06	0,69	1,49	0,54	1,05	0,00	0,00	0,03	0,00
17	0,00 ^a	braun	0,00	0,00	0,20	0,18	0,00	0,03	0,11	0,00	0,00	0,00
18	412,90	blond g	0,00	0,00	0,13	0,31	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	575,94	braun	1,16	0,07	32,41	4,24	11,79	2,50	2,14	0,02	1,78	0,00
20	956,77	braun	0,00	0,04	0,02	2,73	0,00	2,19	0,00	0,00	0,00	0,00
21	12,50	braun	0,00	0,04	0,43	0,32	0,16	0,38	0,09	0,00	0,02	0,02
22	460,63	braun	0,00	0,00	1,31	0,26	0,68	0,50	0,00	0,00	0,04	0,00
23	615,00	braun	0,00	0,06	0,69	1,16	0,36	1,33	0,12	0,00	0,02	0,00
24	416,56	blond g	0,00	0,00	0,15	0,39	0,14	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00 ^a	braun	0,00	0,00	1,32	0,08	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	496,88	braun	0,00	0,00	1,23	1,51	0,42	1,01	0,15	0,00	0,03	0,00
27	428,75	braun	0,08	0,00	2,33	0,97	0,65	0,72	0,22	0,00	0,04	0,00
28	560,32	braun	0,00	0,07	0,74	3,52	0,19	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00
29	308,75	rot g	0,00	0,00	0,21	0,62	0,09	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00
30	702,42	schwarz	0,00	0,00	0,80	0,49	0,17	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00
31	309,35	braun	0,00	0,00	0,54	0,50	0,22	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
32	246,88	blond c	0,00	0,00	0,89	1,95	0,32	1,92	0,00	0,00	0,00	0,00
33	365,81	blond	0,00	0,00	1,02	1,21	0,44	1,02	0,02	0,00	0,00	0,00
34	469,03	schwarz	0,00	0,00	2,33	1,62	0,54	0,54	0,12	0,00	0,03	0,00
35	685,48	braun	0,00	0,07	0,40	2,54	0,07	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
36	319,68	braun	0,15	0,05	1,85	1,04	0,77	1,11	0,07	0,02	0,05	0,00
37	705,94	schwarz g	0,00	0,06	0,76	2,89	0,16	2,91	0,03	0,02	0,00	0,00
38	210,00	braun	0,27	0,00	3,32	2,70	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
39	210,31	braun	0,00	0,06	1,22	1,17	0,26	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
40	402,33	braun	0,00	0,00	2,26	2,09	1,28	1,17	0,19	0,00	0,00	0,00

Fall- zahl	MW Dosis (mg/Tag)	Haar- farbe	HER T-1 (ng/mg)	HER T 12 (ng/mg)	MAM T-1 (ng/mg)	MAM T 12 (ng/mg)	MOR T-1 (ng/mg)	MOR T12 (ng/mg)	COD T-1 (ng/mg)	COD T12 (ng/mg)	AC T-1 (ng/mg)	AC T12 (ng/mg)
41	461,25	blond	0,00	0,00	0,81	1,32	0,48	0,84	0,13	0,00	0,00	0,00
42	580,66	braun	0,00	0,00	2,52	0,43	0,97	0,58	0,09	0,00	0,11	0,00
43	719,35	braun	0,18	0,00	3,74	1,67	2,34	5,59	0,45	0,02	0,28	0,02
44	532,58	schwarz g	0,00	0,00	0,45	1,44	2,49	8,37	0,22	0,00	0,00	0,00
45	440,00	braun	0,00	0,00	0,10	0,57	0,22	2,67	0,00	0,00	0,00	0,00
46	0,00 ^a	braun	0,00	0,00	2,73	0,17	3,60	0,08	0,20	0,00	0,07	0,00
Positiv			14	18	46	46	40	41	23	6	20	5
%			30,4	39,1	100	100	87	89,1	50	13	43,5	10,9
Mittelwert			0,19	0,08	1,72	1,24	0,91	1,46	0,24	0,05	0,15	0,04
±			0,08	0,01	0,70	0,16	0,30	0,24	0,09	0,02	0,09	0,02
Median			0,11	0,06	0,69	0,93	0,41	1,02	0,13	0,02	0,04	0,02
Minimum			0,04	0,04	0,02	0,05	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
Maximum			1,16	0,21	32,41	4,24	11,79	8,37	2,14	0,17	1,78	0,13

g gefärbt

^a Patienten wurden im durch die Haarprobe abgedeckten Behandlungszeitraum mit Methadon behandelt

Nach kontrollierter Heroingabe ergab die vorliegende Untersuchung eine Korrelation zwischen der aufgenommenen Dosis und dem Gesamtopiatgehalt in den Haaren zum Zeitpunkt T12 ($r=0,66$, $p=0,003$, Abbildung 42). Bei Betrachtung der Einzelanalyten wurden mit der jeweiligen Plasmahalbwertszeit ansteigende Korrelationskoeffizienten ermittelt ($r=0,42$, $0,59$ und $0,69$, $p=0,262$, $0,081$ und $0,001$ für Heroin, 6-Monoacetylmorphin und Morphin). Fälle, bei denen ein paralleler Beikonsum von Straßenheroin nicht ausgeschlossen werden konnte (Nachweis von Codein oder Acetylcodein bei 13% und 10,9% der Patienten, siehe unten) wurden für die Erstellung erster Dosis-Konzentrationsbestimmungen zunächst nicht berücksichtigt. Letztere zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den mit dem gesamten Datenmaterial erhaltenen Beziehungen, daher wurde die finale Statistik mit allen Patientendaten aufgestellt.

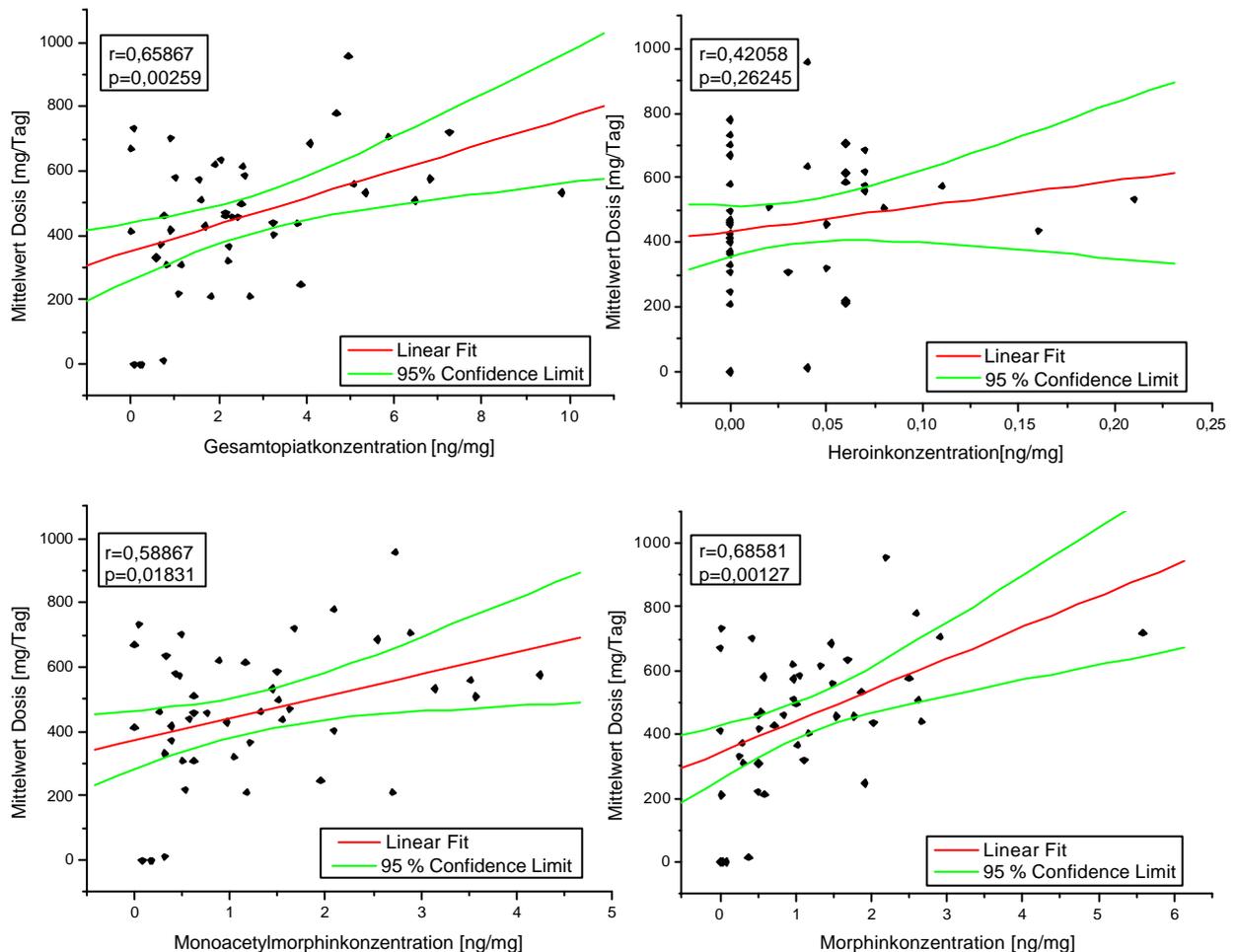


Abbildung 42: Dosis-Konzentrationsbeziehungen für Gesamtopiat-, Heroin-, 6-Monoacetylmorphin-, und Morphin-Gehalt (Abkürzungen: r =Korrelationskoeffizient, p =Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).

In Abbildung 43 sind beispielhaft zwei segmentale Haaranalysen aus der Gruppe der Heroinkonsumenten dargestellt. Die Gesamtopiatkonzentrationen in den einzelnen Segmenten wurden mit der Drogenvergangenheit der Patienten, die unterschiedliche Heroindosen erhielten, korreliert. Die durchschnittlichen Herointagesdosen wurden auf ein Haarwachstum von 1 cm pro Monat bezogen. Die Haarlänge betrug in beiden Fällen 12 cm, kein Acetylcodein oder Codein (Indiz für einen zusätzlichen Beikonsum von Straßenheroin) wurde nachgewiesen.

Das Fehlen einer Korrelation zwischen Heroinaufnahme und den im Haar detektierten Opiatkonzentrationen, welches in dieser Abbildung dargestellt ist, ist repräsentativ für alle untersuchten Fälle. Weder führte die kontinuierliche Abgabe ansteigender Dosen

zu einem kontinuierlichen Anstieg der Analytkonzentration im Haar, noch war es möglich eine gleich bleibende Konzentration bei einer über den gesamten Behandlungszeitraum gleich bleibenden Dosierung nachzuweisen. Eine mögliche Konzentrationsabnahme bei gleich bleibender Dosierung bedingt durch Witterungseinflüsse oder Auswaschung konnte ebenfalls nicht bestätigt werden.

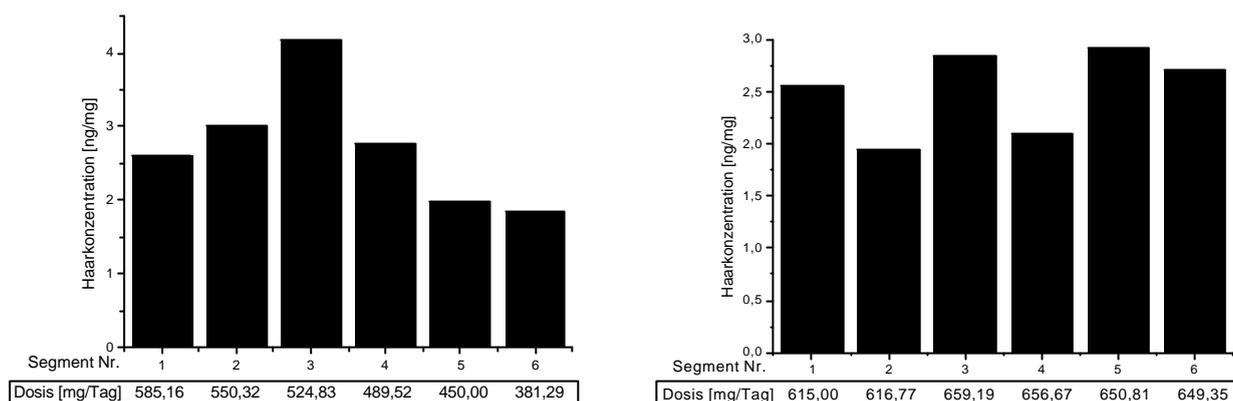


Abbildung 43: Dosis-Konzentrationsbeziehungen (Gesamtopiatkonzentrationen) während des gesamten Behandlungszeitraums bei ansteigender und gleich bleibender Dosierung zweier Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den Haaren der Teilnehmer Codein und Aceylcodein in 50% und 43,5% der Fälle zum Zeitpunkt T-1 nachgewiesen werden (einen Monat bevor das pharmazeutisch reine Heroin vergeben wurde, und bei denen daher von einem ausschließlichen Konsum von Straßenheroin ausgegangen werden kann). Nach einem Jahr Laufzeit des Bonner Heroinprojekts (T12) wurde Codein und Acetylcodein nur noch in 13% bzw. 10,9% der Proben nachgewiesen.

In Abbildung 44 sind Chromatogramme von zwei Haarproben desselben Patienten zum Zeitpunkt T-1 und T12 dargestellt. Zum Zeitpunkt T-1 waren Heroin, 6-Monoacetylmorphin und Morphin, sowie Codein und Acetylcodein nachweisbar. Zum Zeitpunkt T12 wurden nur noch Heroin, 6-Monoacetylmorphin und Morphin detektiert, es wurde also kein zusätzliches Straßenheroin konsumiert, eine Patienten-Compliance wurde bestätigt.

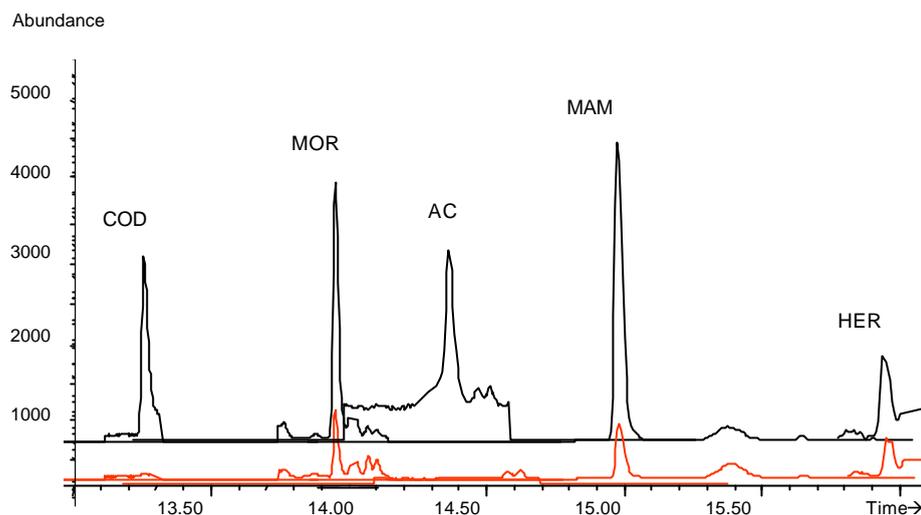


Abbildung 44: GC/MS SIM Chromatogramme von zwei Haarproben desselben Patienten (schwarze Linie: T-1, rote Linie: T12), die zur Quantifizierung verwendeten Massenspuren sind manuell übereinander gelegt worden.

Der Vergleich der mittleren Opiatkonzentrationen in Haaren der Teilnehmer des Bonner Heroinvergabeprojekts mit den Ergebnissen der Untersuchungen eines Kollektivs opiatassoziierter Todesfälle zeigte bis auf den Analyten Heroin keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 19). Heroin wurde allerdings nur in Haaren zweier Verstorbener (1. Fall: Tod durch Überdosierung, 2. Fall: Todesursache unklar) in, verglichen mit den Proben des Heroinprojekts, hohen Konzentrationen gefunden. Heroinkonzentrationen, ähnlich denen des Heroinprojekts, konnten in den Haaren der Verstorbenen nicht nachgewiesen werden, die Nachweisrate war zudem mit 8,3% viel geringer.

Die Nachweisraten von Codein und Acetylcodein in den Haaren der Verstorbenen (33,3% und 16,7%) lagen in gleichen Bereichen wie die in den Proben des Heroinvergabeprojekts zum Zeitpunkt T-1 (50% und 13%).

Tabelle 19: Haarfarbe und Konzentrationen der Opiate in Haaren opiatassoziierter Todesfälle.

Fallzahl	Haarfarbe	HER (ng/mg)	MAM (ng/mg)	MOR (ng/mg)	COD (ng/mg)	AC (ng/mg)
1	braun	0,00	0,89	3,91	0,37	0,08
2	schwarz	0,00	0,48	0,75	0,04	0,05
3	schwarz	0,00	0,06	0,00	0,02	0,00
4	braun	0,00	1,11	0,49	0,00	0,00
5	braun	0,00	0,84	0,12	0,00	0,00
6	schwarz	0,00	0,13	0,26	0,00	0,00
7	braun	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
8	blond g	0,00	0,04	0,13	0,00	0,00
9	braun	0,00	0,30	0,07	0,00	0,00
10	schwarz	1,55	10,23	1,85	0,84	0,23
11	schwarz	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
12	rot g	0,00	0,19	0,05	0,13	0,00
13	schwarz	0,00	0,36	0,36	0,00	0,00
14	schwarz	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
15	schwarz g	0,00	0,33	0,06	0,19	0,00
16	schwarz g	0,00	0,09	0,03	0,00	0,00
17	rot g	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
18	braun	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00
19	blond	0,00	0,09	0,00	0,13	0,00
20	schwarz	0,00	0,05	0,85	0,00	0,00
21	braun	0,00	0,16	0,11	0,00	0,00
22	braun	0,00	0,99	0,52	0,00	0,00
23	braun	5,20	30,01	11,87	1,84	2,48
24	braun	0,00	0,22	0,03	0,00	0,00
Positiv		2	22	19	8	4
%		8,3	91,7	79,2	33,3	16,7
Mittelwert		3,38	2,14	1,15	0,45	0,71
±		1,83	1,40	0,63	0,22	0,59
Median		3,38	0,26	0,25	0,16	0,16
Minimum		1,55	0,04	0,03	0,02	0,05
Maximum		5,20	30,01	11,87	1,84	2,48

g gefärbt

In Abbildung 45 sind die Beziehungen zwischen den Konzentrationen von Codein und Acetylcodein mit 6-Monoacetylmorphin und Morphin in den Haaren der Patienten der Heroinvergabe zum Zeitpunkt T-1 zusammen mit den opiatassozierten Todesfällen dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten stiegen von $r=0,78$ auf $r=0,82$ und $r=0,89$ und verblieben bei $r=0,89$ bei einem Vergleich von Acetylcodein mit Morphin, Codein mit Morphin, Acetylcodein mit 6-Monoacetylmorphin und Codein mit 6-Monoacetylmorphin.

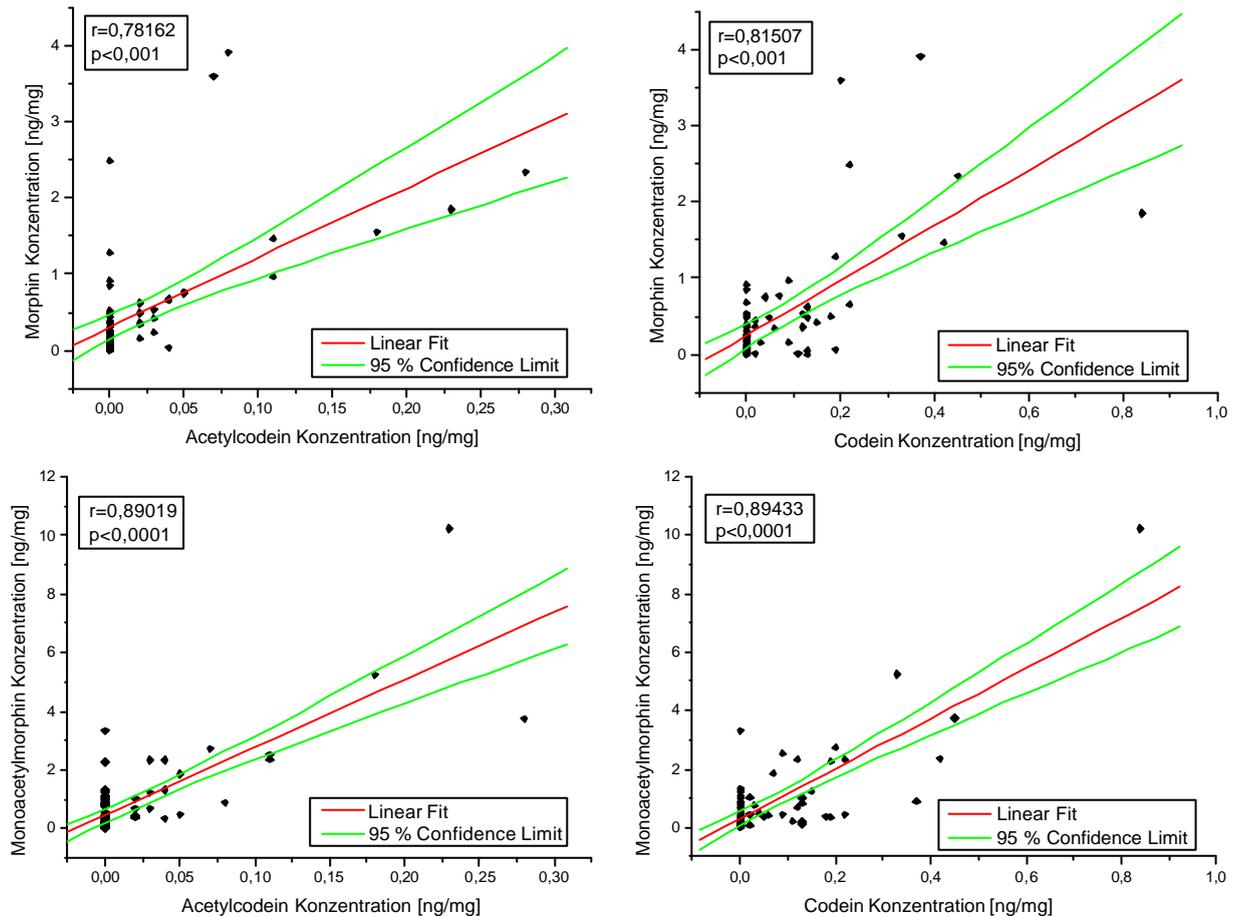


Abbildung 45: Beziehungen zwischen Codein- und Acetylcodeinkonzentrationen mit 6-Monoacetylmorphin- und Morphinkonzentrationen in den Haaren der Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts (T-1) und der Verstorbenen (Abkürzungen: r =Korrelationskoeffizient, p =Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).

Die höchsten Konzentrationen von 6-Monoacetylmorphin und Morphin in den Haaren (32,41, 30,01 ng/mg und 11,79, 11,87 ng/mg) wurden zur Auswertung nicht herangezogen, da diese Datenpunkte ein übermäßiges Gewicht in der statistischen Analyse aufwiesen.

5.2.3. Cocainkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms im Vergleich zu der methadonsubstituierten Kontrollgruppe

Die ermittelten Konzentrationen in den Haaren aller Teilnehmer lagen zwischen 0,01 und 22,80 ng/mg für die Analyten Cocain, Benzoyllecgonin und Cocaethylen zum Zeitpunkt T-1 sowie zwischen 0,01 und 10,50 ng/mg zum Zeitpunkt T12 (Tabelle 20 und Tabelle 21). Nach einem Jahr Teilnahme zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Analytkonzentrationen zwischen den Patienten des Heroinvergabeprogramms im Vergleich zu den methadonsubstituierten Personen. Aus diesem Grund kann bei beiden Gruppen von größenordnungsmäßig gleichen konsumierten Cocaindosen ausgegangen werden.

Zum Zeitpunkt T-1 wurde bei 64,6% der Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts und bei 71,4% der methadonsubstituierten Personen ein Beikonsum von Cocain festgestellt (Abbildung 46). Von einem Beikonsum von Cocain wurde ausgegangen, wenn die Haarproben positiv auf Cocain und/oder Benzoyllecgonin getestet waren. Die Inzidenz eines Cocainbeikonsums verringerte sich während des Behandlungszeitraums auf 45,8% (Heroinvergabeprojekt) und auf 60,0% (Methadonsubstitution).

Tabelle 20: Konzentrationen von Cocain sowie den Cocainmetaboliten bei T-1 und T12 in Haaren von Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts.

Fallzahl	COC T-1 (ng/mg)	COC T12 (ng/mg)	BE T-1 (ng/mg)	BE T12 (ng/mg)	CE T-1 (ng/mg)	CE T12 (ng/mg)
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	2,69	0,18	1,65	0,19	0,05	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,21	0,13	1,15	0,08	0,18	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,28	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00
8	0,20	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00
9	0,05	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
10	0,00	2,22	0,00	0,84	0,00	0,00
11	1,46	1,61	0,91	2,42	0,00	0,18
12	0,05	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
13	0,25	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,09	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	1,25	0,01	1,53	0,09	0,28	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	3,55	0,00	2,97	0,00	0,39	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,15	0,02	0,04	0,00	0,06	0,00
22	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00
23	0,00	10,50	0,00	3,32	0,00	1,19
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	3,03	0,00	4,09	0,00	0,00	0,00
26	0,97	0,58	0,50	0,08	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,56	0,12	0,48	0,00	0,49
31	0,10	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	0,71	0,00	0,45	0,00	0,00	0,00
34	1,39	4,78	1,53	1,80	0,00	0,00
35	0,35	0,07	0,15	0,00	0,11	0,00
36	0,12	0,13	0,04	0,05	0,12	0,00
37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
38	0,38	1,57	0,15	0,89	0,00	0,07
39	1,86	0,04	1,13	0,14	0,00	0,00
40	0,17	0,50	0,10	0,06	0,07	0,09
41	5,09	2,01	8,26	1,69	0,00	0,00
42	0,04	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00

Fallzahl	COC T-1 (ng/mg)	COC T12 (ng/mg)	BE T-1 (ng/mg)	BE T12 (ng/mg)	CE T-1 (ng/mg)	CE T12 (ng/mg)
43	0,08	0,00	0,24	0,00	0,08	0,00
44	0,12	2,73	0,26	2,14	0,00	0,05
45	0,31	0,00	1,77	0,10	0,00	0,00
46	0,00	0,07	0,06	0,12	0,00	0,00
47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48	0,60	0,24	3,70	0,25	0,00	0,00
Positiv	28	21	31	19	9	6
%	58,3	43,8	64,6	39,6	18,8	12,5
Mittelwert	0,98	1,33	1,03	0,78	0,15	0,35
±	0,24	0,53	0,31	0,23	0,04	0,18
Median	0,33	0,24	0,26	0,19	0,11	0,14
Minimum	0,04	0,01	0,03	0,03	0,05	0,05
Maximum	5,09	10,5	8,26	3,32	0,39	1,19

Tabelle 21: Konzentrationen von Cocain sowie den Cocainmetaboliten bei T-1 und T12 in Haaren von Teilnehmern des Methadonsubstitutionsprogramms.

Fallzahl	COC T-1 (ng/mg)	COC T12 (ng/mg)	BE T-1 (ng/mg)	BE T12 (ng/mg)	CE T-1 (ng/mg)	CE T12 (ng/mg)
1	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,12	8,37	0,11	3,77	0,06	1,26
3	0,01	0,69	0,05	1,00	0,00	0,00
4	0,18	0,00	0,10	0,00	0,05	0,00
5	0,39	0,03	0,62	0,07	0,00	0,00
6	5,81	0,00	2,97	0,00	0,00	0,00
7	0,21	0,48	0,29	0,28	0,00	0,00
8	0,83	2,68	4,55	2,04	0,06	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	1,48	0,00	1,99	0,30	0,00	0,00
11	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	5,39	0,00	0,95	0,00	0,05
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,47	1,02	0,34	0,00	0,00	0,06
16	1,17	0,25	0,37	0,33	0,00	0,00
17	0,55	1,06	0,35	0,36	0,00	0,00
18	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,85	0,23	0,82	0,04	0,00	0,00
21	0,31	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00
22	0,70	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00
23	0,42	0,00	0,32	0,00	0,19	0,00
24	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	22,80	0,00	9,19	0,04	0,00	0,00
26	4,69	4,60	2,12	1,38	0,07	0,14
27	0,00	5,12	0,00	4,37	0,00	0,00
28	0,14	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	1,21	3,05	0,75	1,59	0,00	0,00
31	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
32	0,58	0,04	0,73	0,20	0,00	0,00
33	0,44	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00
34	0,00	0,02	0,00	0,18	0,00	0,00
35	2,10	0,46	1,93	0,39	0,17	0,00
Positiv %	24 68,6	19 54,3	23 65,7	17 48,6	6 17,1	4 11,4
Mittelwert ±	1,90 0,95	1,78 0,56	1,26 0,43	1,02 0,31	0,10 0,03	0,38 0,29
Median	0,51	0,48	0,37	0,36	0,07	0,10
Minimum	0,01	0,02	0,05	0,04	0,05	0,05
Maximum	22,8	8,37	9,19	4,37	0,19	1,26

Eine signifikante Verminderung des Cocainbeikonsums wurde angenommen, wenn zwischen T-1 und T12 eine mindestens 30%ige Reduzierung der Analytkonzentration im Haar nachgewiesen werden konnte. In der Heroingruppe nahm der Cocaingehalt in den Haaren bei 45,8% der zunächst (T-1) cocainpositiven Patienten innerhalb des Behandlungszeitraums um durchschnittlich 90,8% ab, eine analoge Reduktion von Benzoylcegonin um 89,8% ergab sich bei 50,0% der Patienten. In der Methadonkontrollgruppe nahm der Cocaingehalt in den Haaren bei 48,6% der Patienten innerhalb des Behandlungszeitraums um durchschnittlich 89,2% ab, analog verringerte sich der Benzoylcegoningehalt bei 54,3% der Patienten um 80,3% (Abbildung 46).

Bei 22,9% der analysierten Haare des Heroinvergabeprojekts wurde ein Anstieg des Cocaingehalts verzeichnet, der Benzoylcegoningehalt stieg in 18,7% der Fälle an. Bei den Teilnehmern der Metadonsubstitution wurde in 37,1% der analysierten Haare ein höherer Cocaingehalts verzeichnet, der Benzoylcegoningehalt stieg in 20,0% der Fälle an. Da in mehreren Fällen ein erster Konsum dieser Droge innerhalb der Therapiedauer erfolgt ist, wird an dieser Stelle von prozentualen Angaben des Analytanstiegs in Haaren abgesehen.

In 31,3% der analysierten Haare (Heroinvergabe) waren sowohl Cocain als auch Benzoylcegonin nach einem Jahr nicht mehr nachweisbar. Bei den methadonsubstituierten Patienten war Cocain in 11,4% der analysierten Haare nicht mehr nachweisbar, frei von Benzoylcegonin waren 25,7% der Probanden. Die Patienten, in deren Haaren weder Cocain noch Benzoylcegonin detektiert werden konnte, wurden als frei von Cocainbeikonsum betrachtet.

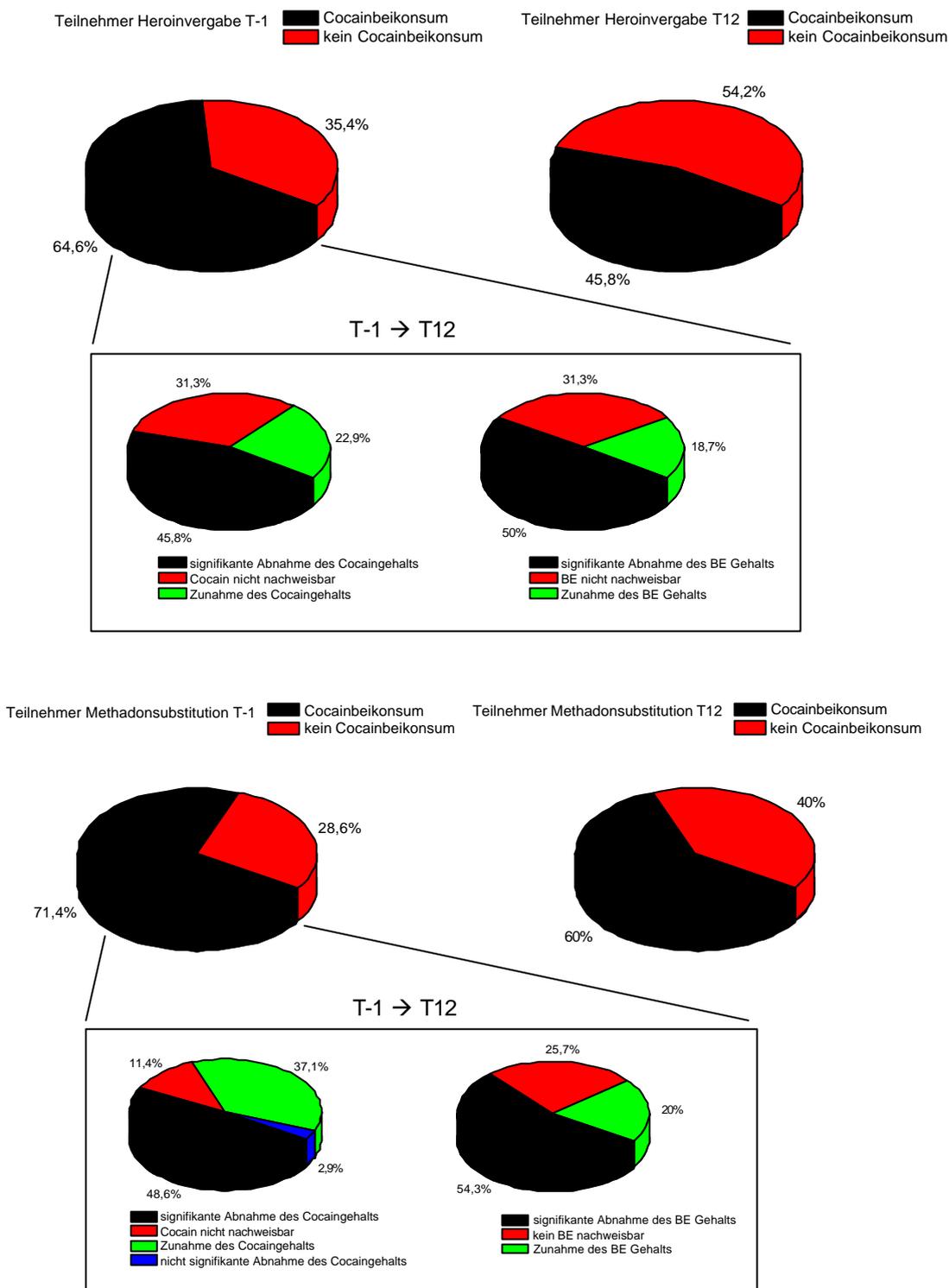


Abbildung 46: Inzidenzen eines Cocainbeikonsums bei den Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts (n=48) im Vergleich zur methadonsubstituierten Kontrollgruppe (n=35) im Verlauf von einem Jahr.

5.2.4. Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit Urintests von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und der methadonsubstituierten Kontrollgruppe

In Tabelle 22 sind die mittels Urinscreening bestimmten Inzidenzen eines Beikonsums weiterer Substanzen für die Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts und der methadonsubstituierten Kontrollgruppe aufgeführt. Zum Zeitpunkt T12 wurden nur 42 von 48 (87,5%) der Patienten der Heroingruppe positiv auf Opiate getestet, wobei zwei der opiatenegativen Patienten zu diesem Zeitpunkt nachweislich mit Methadon substituiert wurden. Der Opiatekonsum der verbleibenden vier Patienten konnte mittels des Urinscreenings nicht erfasst werden, die jeweiligen Cutoff Werte der Urintests sind zur Veranschaulichung in Tabelle 23 angegeben. Nach einem Jahr Methadonsubstitution wurde mittels Urinscreening nur bei 26 von 35 Patienten (74,3%) der Konsum von Methadon nachgewiesen. Anhand dieser Ergebnisse zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der quantitativen Haaranalytik gegenüber den Urinscreenings. Die Nachweisraten für einen Opiatekonsum in der Heroingruppe (Kapitel 5.2.2) und einen Methadonkonsum in der Methadongruppe (Kapitel 5.2.5) lagen mittels Haaranalytik jeweils bei 100%. Darüber hinaus konnte mittels Haaranalytik ein signifikant größerer Cocainbeikonsum in beiden Gruppen nachgewiesen werden (Kapitel 5.2.3, Tabelle 24).

Tabelle 22: Mittels Urinscreening bestimmte Inzidenzen eines Beikonsums weiterer Drogen bei Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts (n=48) im Vergleich zur methadonsubstituierten Kontrollgruppe (n=35) zum Zeitpunkt T-1 und T12.

	Heroinvergabe				Methadonsubstitution			
	T-1		T12		T-1		T12	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Opiate	48	100,0	42	87,5	31	88,6	19	54,3
Cocain	14	29,2	15	31,3	13	37,1	8	22,9
Methadon	20	41,7	17	35,4	21	60,0	26	74,3
Cannabinoide	24	50,0	33	68,8	24	68,6	21	60,0
Amphetamine	0	0,0	1	2,1	1	2,8	2	5,7
Benzodiazepine	29	60,4	26	54,2	18	51,4	14	40,0

Tabelle 23: Cutoff Werte für die im Heroinvergabeprojekt und Methadonsubstitutionsprogramm verwendeten Urintests.

	Opiate	Cocain	Methadon	Cann.	Amph.	Benzod.
Urintest [ng/ml]	300	200	100	25	500	300

Tabelle 24: Nachweisraten eines Cocainbeikonsums mittels Haaranalytik im Vergleich zu Urinscreenings.

	Heroinvergabe		Methadonsubstitution	
	T-1	T12	T-1	T12
Haaranalytik %	64,6	45,8	71,4	60,0
Urinscreening %	29,2	31,3	37,1	22,9

Zum Zeitpunkt T-1 wiesen alle Teilnehmer der Heroinvergabegruppe bis auf sieben (14,6%) einen Beikonsum von mindestens einer weiteren Substanz neben Heroin bzw. Opiaten auf, zum Zeitpunkt T12 zeigten nur zwei Teilnehmer (4,2%) keinen weiteren Beikonsum. In der Methadongruppe konsumierten alle Probanden bis auf zwei (5,7%) mindestens eine weitere Substanz neben Heroin zum Zeitpunkt T-1. Nach einem Jahr konsumierten alle Teilnehmer weitere Drogen zusätzlich zu dem vergebenen Methadon. Die Anzahl weiterer Substanzen, die zusätzlich konsumiert wurden, ist in Abbildung 47 dargestellt. Es zeigte sich, dass der Beikonsum weiterer Substanzen in beiden Gruppen stark ausgeprägt ist. Eine signifikante Reduktion der Anzahl der zusätzlich konsumierten Substanzen nach einem Jahr Therapie war in beiden Gruppen nicht erkennbar.

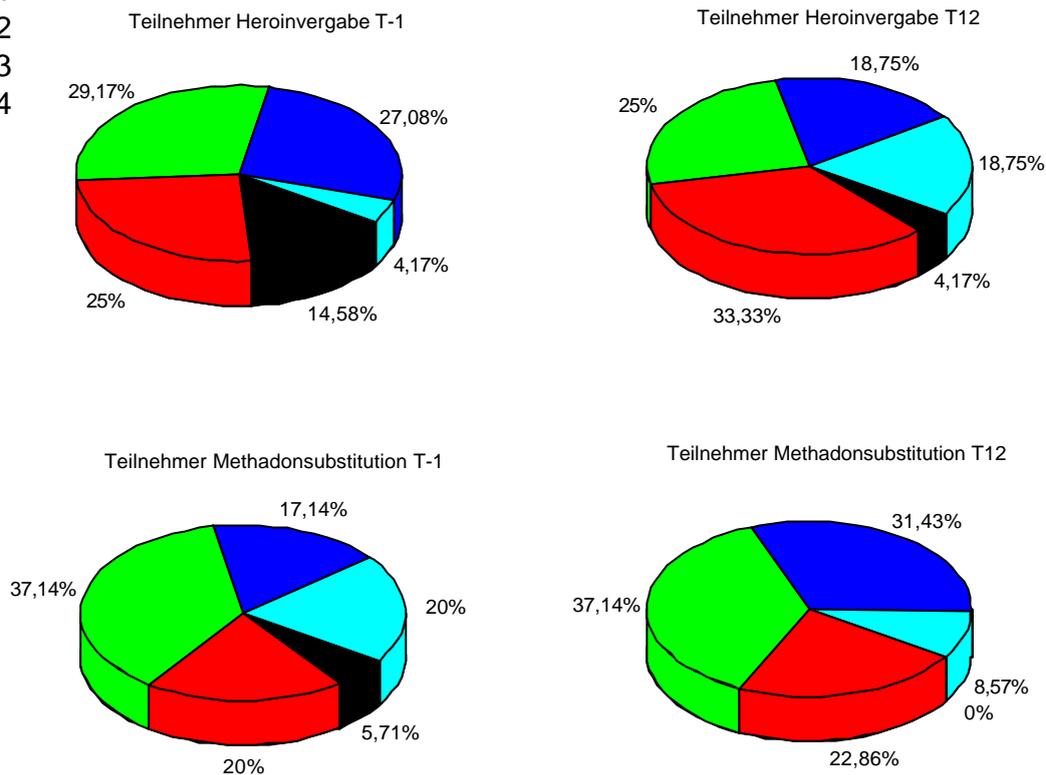
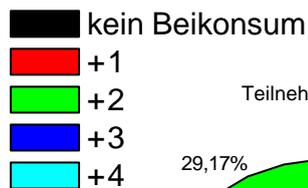


Abbildung 47: Prozentuale Verteilung des zusätzlichen Beikonsums von keiner, einer oder mehrerer Substanzen der Teilnehmer der Heroinvergabe (n=48) und der Methadonsubstitution (n=35).

Die Abbildung zeigt, dass bis zu vier Substanzen gleichzeitig beikonsumiert wurden. Die Auswertung der Patientendaten ergab keine ausgeprägte Präferenz für eine bestimmte Rauschmittelkombination. Aufgrund vielfältiger Kombinationsmöglichkeiten (n=18) bei vergleichsweise niedrigen Fallzahlen ist die Aussagekraft der statistischen Auswertung allerdings begrenzt.

5.2.5. Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon und EDDP in Haaren von Teilnehmern des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms

Die quantitativen Ergebnisse der Haaranalysen auf Methadon und EDDP für die proximalen Segmente von Teilnehmern des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms (n=41) sind in Tabelle 25 aufgeführt. In Abbildung 48 ist zudem ein HS-SPME GC/MS SIM Chromatogramm einer Haarprobe eines Teilnehmers der Methadonsubstitution dargestellt. Methadon wurde in allen Proben (n=131) in Konzentrationen zwischen 0,25 und 13,29 ng/mg nachgewiesen (Mittelwert $2,69 \pm 0,45$ ng/mg). EDDP wurde ebenfalls in allen Proben detektiert, die Konzentrationen lagen zwischen 0,05 und 2,17 ng/mg (Mittelwert $0,43 \pm 0,08$ ng/mg). In allen Fällen war Methadon der in den Haaren vorhandene Hauptanalyt und wies eine signifikante Korrelation zu den EDDP Konzentrationen auf (Abbildung 49).

Tabelle 25: Durchschnittliche Methadondosis, Haarfarbe und Konzentrationen von Methadon und EDDP in Haaren (proximale Segmente) von Teilnehmern des Methadonsubstitutionsprogramms.

Fallzahl	MW Dosis (mg/Tag)	Haar- farbe	MET (ng/mg)	EDDP (ng/mg)
1	101,7	braun	1,84	0,20
2	40,0	braun	1,46	0,12
3	80,1	braun	4,95	0,15
4	90,0	braun	3,56	0,25
5	41,0	braun	2,24	0,10
6	65,0	braun	3,13	0,32
7	108,7	schwarz	1,30	0,17
8	85,6	schwarz	1,02	0,35
9	118,1	schwarz	1,21	0,13
10	50,8	schwarz	0,52	0,08
11	50,0	braun	0,82	0,08
12	60,1	braun	0,53	0,05
13	130,0	braun	1,94	0,25
14	240,0	schwarz g	13,29	2,12
15	260,9	schwarz g	10,88	2,17
16	150,0	braun	1,10	0,17
17	128,0	schwarz g	5,55	0,80
18	40,6	rot g	2,30	0,34
19	68,3	rot g	2,83	0,20
20	166,9	blond g	6,44	1,37
21	74,4	blond	0,29	0,09
22	100,0	braun	2,85	0,38
23	100,0	braun	2,09	0,52
24	110,1	blond g	1,98	0,36
25	120,0	blond g	0,83	0,34
26	120,0	braun	2,02	0,69

Fallzahl	MW Dosis (mg/Tag)	Haar- farbe	MET (ng/mg)	EDDP (ng/mg)
27	200,0	blond	9,27	0,88
28	134,7	blond	0,75	0,09
29	110,0	rot g	0,82	0,17
30	80,0	braun	4,14	0,57
31	90,0	braun	0,85	0,20
32	22,9	braun	0,38	0,26
33	20,0	braun	0,25	0,11
34	95,0	schwarz	1,42	0,30
35	64,4	schwarz	1,54	0,34
36	90,0	schwarz g	0,88	0,34
37	90,0	schwarz g	0,32	0,12
38	70,0	braun	3,56	0,88
39	70,0	braun	1,05	0,19
40	130,0	braun	5,33	0,92
41	130,0	braun	2,57	0,41
Positiv			41	41
%			100	100
Mittelwert			2,69	0,43
±			0,45	0,08
Median			1,84	0,26
Minimum			0,25	0,05
Maximum			13,29	2,17

g gefärbt

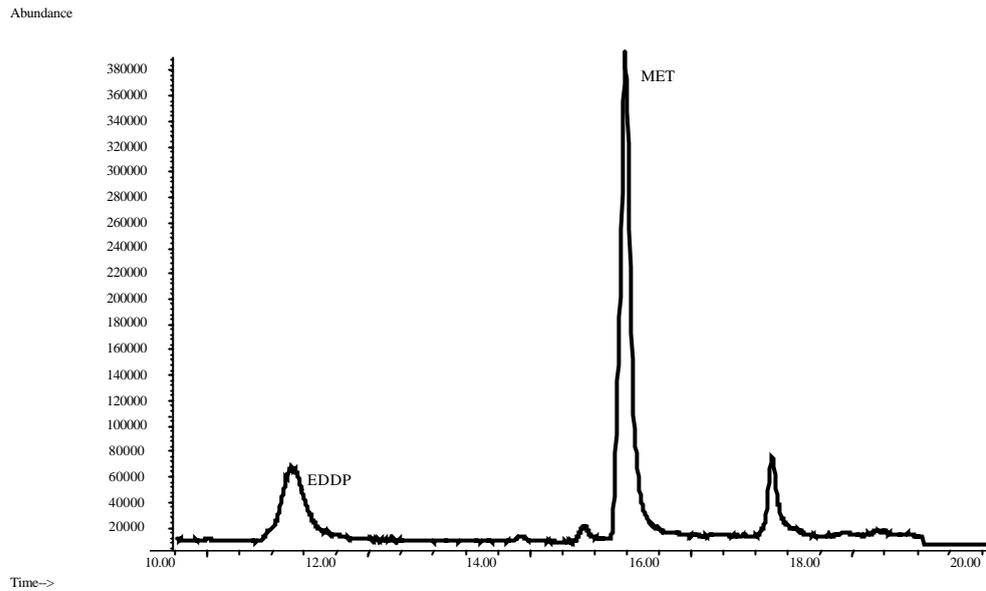


Abbildung 48: HS-SPME GC/MS SIM Chromatogramm einer authentischen Haarprobe eines Teilnehmers der Methadonsubstitutionstherapie. Methadon wurde in einer Konzentration von 4,95 ng/mg, EDDP in einer Konzentration von 0,15 ng/mg nachgewiesen.

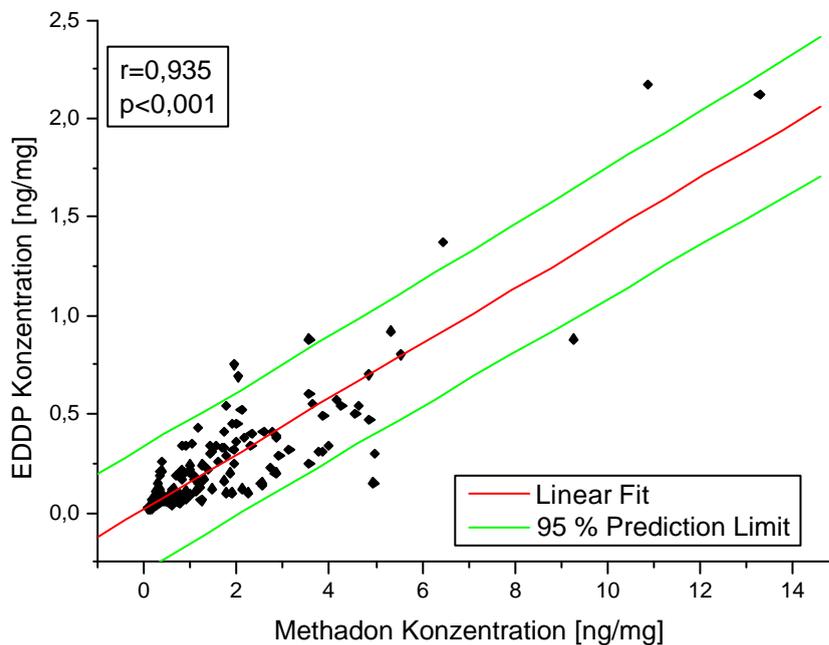


Abbildung 49: Beziehung zwischen Methadon- und EDDP-Konzentration in 131 Haarproben von Teilnehmern der Methadonsubstitution. (Abkürzungen: r=Korrelationskoeffizient, p=Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).

Das Konzentrationsverhältnis von Methadon/EDDP betrug $7,5 \pm 5,7$ in den proximalen Segmenten und nahm in den distalen Segmenten auf $4,8 \pm 1,4$ ab. Mittels ANOVA (Analysis of Variance) konnte ein signifikanter Unterschied des Verhältnisses zwischen den distalen und den ersten vier proximalen Segmenten, aber nicht zwischen allen anderen Segmenten, gezeigt werden.

Tabelle 26: Dosis-Konzentrationsbeziehungen und Verhältnis von Methadon und EDDP in Haarproben von Teilnehmern des Methadonsubstitutionsprogramms (41 Haarproben von denen 15 komplett in Abschnitte von 1cm segmentiert wurden).

Proben	n	Methadon		EDDP		Verhältnis Methadon/EDDP
		r	p	r	p	
Proximale Segmente *	41	0,869	<0,001	0,880	<0,001	$7,5 \pm 5,7$
Segment 1	15	0,913	<0,001	0,901	<0,001	$9,1 \pm 8,3$
Segment 2	15	0,675	0,088	0,713	0,053	$8,8 \pm 4,6$
Segment 3	15	0,717	0,050	0,551	0,272	$9,3 \pm 5,1$
Segment 4	15	0,868	0,001	0,846	0,003	$8,4 \pm 4,6$
Segment 5	15	0,793	0,012	0,728	0,042	$7,7 \pm 4,3$
Segment 6	15	0,608	0,175	0,623	0,153	$6,6 \pm 3,3$
Distale Segmente	15	0,640	0,129	0,477	0,415	$4,8 \pm 1,4$
Alle Segmente	131	0,760	<0,001	0,738	<0,001	$7,6 \pm 4,7$

* Proximale Segmente aller Patienten beinhalten auch Proben von einer Länge bis zu 3 cm, diese wurden eingesetzt, wenn die Probenmenge zu gering war

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen aufgenommener Dosis und Methadon- und EDDP-Konzentrationen in den Haaren der Patienten konnte nur für die proximalen und nicht für die distalen Segmente aufgestellt werden. Die Korrelationskoeffizienten und Wahrscheinlichkeiten für eine lineare Beziehung sind in Tabelle 26 sowohl für das gesamte Studienkollektiv als auch für die einzelnen Haarsegmente aufgeführt.

Abbildung 50 zeigt die Beziehung zwischen der täglichen oral aufgenommenen Dosis und der Konzentration in den 131 analysierten Haarsegmenten.

Zwischen Gruppen verschiedener Haarfarbe, sowie zwischen Gruppen gefärbten und ungefärbten Haars konnten keine signifikanten Unterschiede in Methadon- oder EDDP-Konzentrationen festgestellt werden.

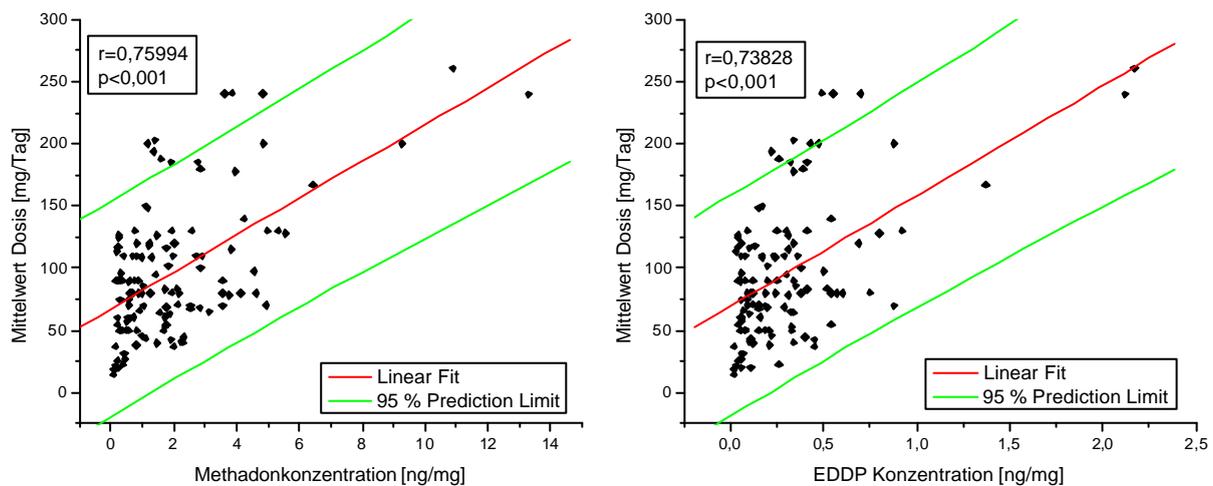


Abbildung 50: Dosis-Konzentrationsbeziehungen für Methadon- und EDDP-Gehalt in 131 Haarproben. (Abkürzungen: r=Korrelationskoeffizient, p=Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).

In allen Fällen, bei denen die Haarlänge eine segmentale Analyse zuließ, wurden die Haare am Wurzelende beginnend in 1 cm lange Abschnitte geschnitten. Die Drogenkonzentrationen in den einzelnen Segmenten wurden mit der im Zeitfenster des Segmentwachstums aufgenommenen Methadondosis verglichen. Mit dieser feinsegmentalen Herangehensweise zur Aufstellung von Dosis-Konzentrationsbeziehungen konnten Korrelationskoeffizienten bis zu 0,913 (Methadon) und 0,901 (EDDP) in den proximalen 1 cm Segmenten von 15 Patienten, mit einer hohen signifikanten Wahrscheinlichkeit auf lineare Abhängigkeit, aufgestellt werden. Mit Ausnahme der zweiten Segmente wurde eine signifikante Dosis-Konzentrationsbeziehung bis zu den fünften Segmenten beobachtet. In den folgenden distalen Segmenten konnte aber keine signifikante Korrelation auf dem 5% Signifikanzlevel nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der proximalen Segmente aller Patienten (Haarlänge bis zu 3 cm), führte zu einer signifikanten Korrelation mit etwas geringeren Korrelationskoeffizienten von 0,869 (Methadon) und 0,880 (EDDP) als in den proximalen 1 cm Segmenten. In allen 131 analysierten Segmenten betrug die Korrelationskoeffizienten 0,760 (Methadon) und 0,738 (EDDP).

5.2.6. Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit zugegebenem Konsum und Urintests

Die vom Hersteller angegebenen Cutoff Level des immunologischen Drogenscreenings der Urinproben sind in Tabelle 27 zur Veranschaulichung angegeben. In Tabelle 28 sind die Prävalenzraten der missbräuchlich konsumierten Drogen gemäß der toxikologischen Analysen bzw. der Selbstangaben der 47 Probanden aufgeführt.

Tabelle 27: Cutoff Werte für die im Drogenentgiftungsprogramm verwendeten Urintests.

	Opiate	Cocain	Methadon	Cannabinoide	Amphetamine
Urintest [ng/ml]	200	300	250	25	300

Tabelle 28: Vergleich der Prävalenzraten eines Drogenkonsums zwischen Urinscreening und Haaranalyse (n=47) mit Konsumangaben.

	Opiate		Cocain		Methadon		Cannabinoide		Amphetamine	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Konsumangabe	42	89	18	38	15	32	26	55	1	2
Urinscreening	33	70	13	28	14	30	21	45	0	0
Haaranalyse	38	81	26	55	23	49	15	32	1	2

Die Ergebnisse der Kopfhaaruntersuchungen der Drogenkonsumenten sind in Tabelle 29 dargestellt. 6-Monoacetylmorphin wurde in allen opiatpositiven Proben in höheren Konzentrationen gefunden als Morphin. Eine wie in Kapitel 5.2.2 beschriebene Hydrolyse von 6-Monoacetylmorphin in 25% der Fälle kann somit ausgeschlossen werden. Die Muttersubstanzen wurden häufiger als ihre Metaboliten nachgewiesen.

Die Schamhaarkonzentrationen der untersuchten Analyten sind in Tabelle 30 aufgeführt. Die Drogenkonzentrationen in den Schamhaarproben wiesen höhere oder gleiche Konzentrationen im Vergleich zu den proximalen oder mittleren Kopfhaarsegmenten auf. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kopfhaaruntersuchungen wurde Morphin in den Schamhaaren in höheren

Konzentrationen als 6-Monoacetylmorphin und der Metabolit Benzoylcegonin in höheren Konzentrationen als Cocain nachgewiesen.

Tabelle 29: Konzentrationen der Drogen in den Kopfharsegmenten (ng/mg).

	Opiate *			Methadon		Cocain *		Cannabinoide			Amph
	MAM	MOR	COD	MET	EDDP	COC	BE	THC	CBN	CBD	A
n	54	40	16	45	45	45	30	20	9	10	2
Min	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
Max	41,2	16,8	0,8	211,6	14,6	35,3	7,5	2,3	0,9	9,7	0,5
MW	3,4	1,3	0,3	13,8	1,7	3,8	2,0	1,2	0,3	2,6	0,4
Med	1,6	0,8	0,3	2,9	0,8	2,0	1,2	1,4	0,1	1,3	0,4

* Die Analyten Cocaethylen, Heroin und Acetylcodein waren in der Opiate- und Cocainmethode nicht enthalten, da sie für die in diesem Kapitel untersuchten Fragestellungen nicht von Relevanz waren

Tabelle 30: Konzentrationen der Drogen in Schamhaaren (ng/mg).

	Opiate			Methadon		Cocain		Cannabinoide		
	MAM	MOR	COD	MET	EDDP	COC	BE	THC	CBN	CBD
n	24	25	16	12	12	16	14	9	5	5
Min	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,6
Max	6,1	18,6	1,9	44,8	6,5	8,5	14,2	4,0	0,4	19
MW	1,9	3,1	0,5	6,5	1,5	2,9	3,1	1,4	0,2	4,8
Med	1,7	1,5	0,3	0,6	0,6	1,8	1,7	1,0	0,2	1,4

In den meisten Fällen zeigten die Ergebnisse der Haarsegmentation einen Anstieg der Drogenkonzentration von den proximalen zu den distalen Segmenten (Abbildung 51). Dennoch konnten nach Heroinkonsum unter Berücksichtigung aller Segmente signifikante Dosis-Konzentrationsbeziehungen für 6-Monoacetylmorphin ($r = 0,80$; $p < 0,001$) und Morphin ($r = 0,82$; $p < 0,001$) aufgestellt werden. Für die weiteren untersuchten Analyten konnte keine Korrelation zwischen aufgenommener Dosis und Haarkonzentration der Drogen oder Metaboliten gefunden werden.

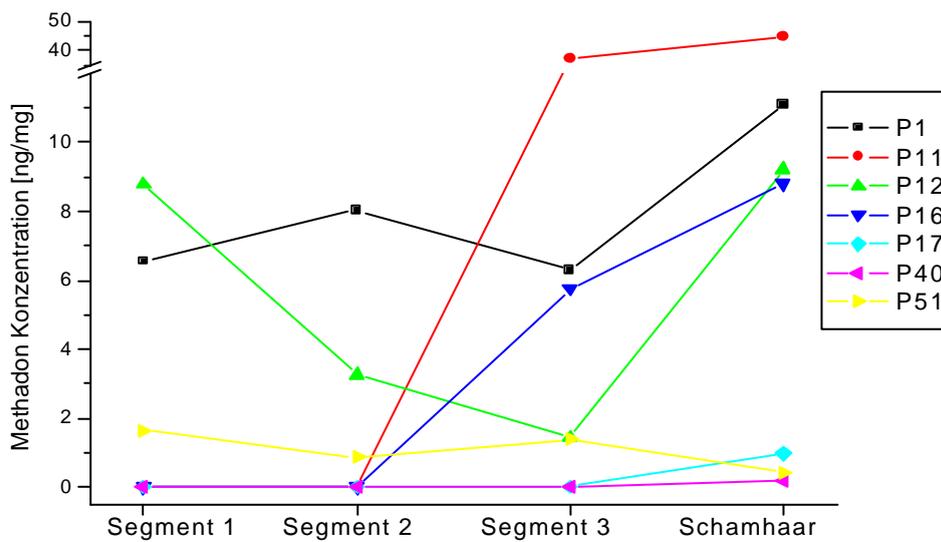
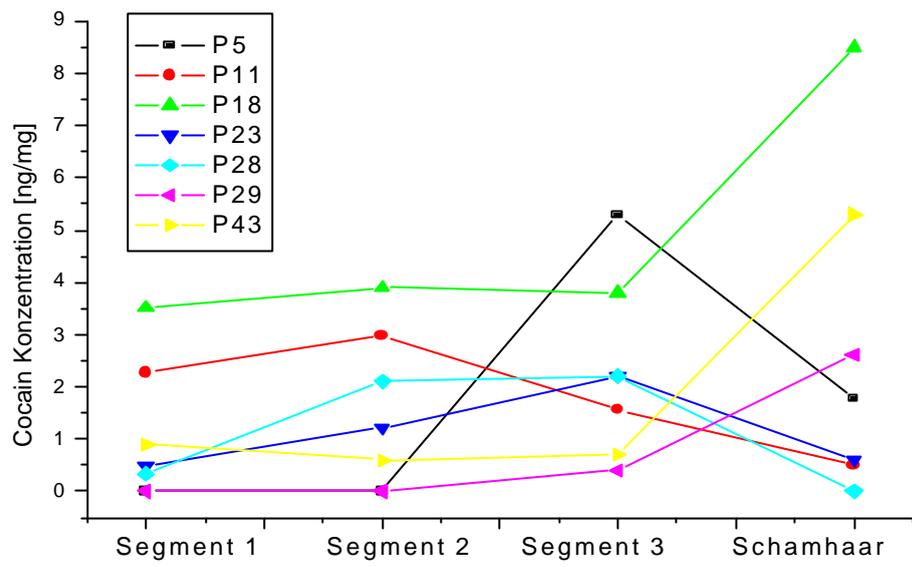


Abbildung 51: Haarsegmentationsdaten nach Cocain- und Methadonkonsum.

5.2.7. Bestimmung von 15 Opioid-Analgetika mittels Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS-MS) und Anwendung auf Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung

In Abbildung 52 und Abbildung 53 sind Chromatogramme einer mit Standard und internem Standard versetzten extrahierten Leerhaarprobe und einer Realprobe dargestellt. Die in den gesamten Haarproben ermittelten Konzentrationen lagen zwischen 17,5 und 304,6 pg/mg für Hydromorphon, zwischen 25,6 und 1274,4 pg/mg für Morphin, zwischen 13,1 und 1787,4 pg/mg für Fentanyl, bei 17,8 pg/mg für Norfentanyl (nur einmal detektiert), zwischen 40,7 und 180,0 pg/mg für Buprenorphin, zwischen 690,2 und 2132,1 pg/mg für Tilidin, zwischen 43,0 und 814,3 pg/mg für Nortilidin, zwischen 57,1 und 241,3 pg/mg für Bisnortilidin, zwischen 249,6 und 34627,9 pg/mg für Tramadol und zwischen 43,4 und 10730,5 pg/mg für Methadon (Tabelle 31, Abbildung 54). Codein, Piritramid und Oxymorphon konnten in den Haarproben nicht nachgewiesen werden, diese Opioide wurden jedoch auch in keinem Fall verabreicht. Normorphin als Metabolit von Morphin konnte ebenfalls nicht in den Proben nachgewiesen werden.

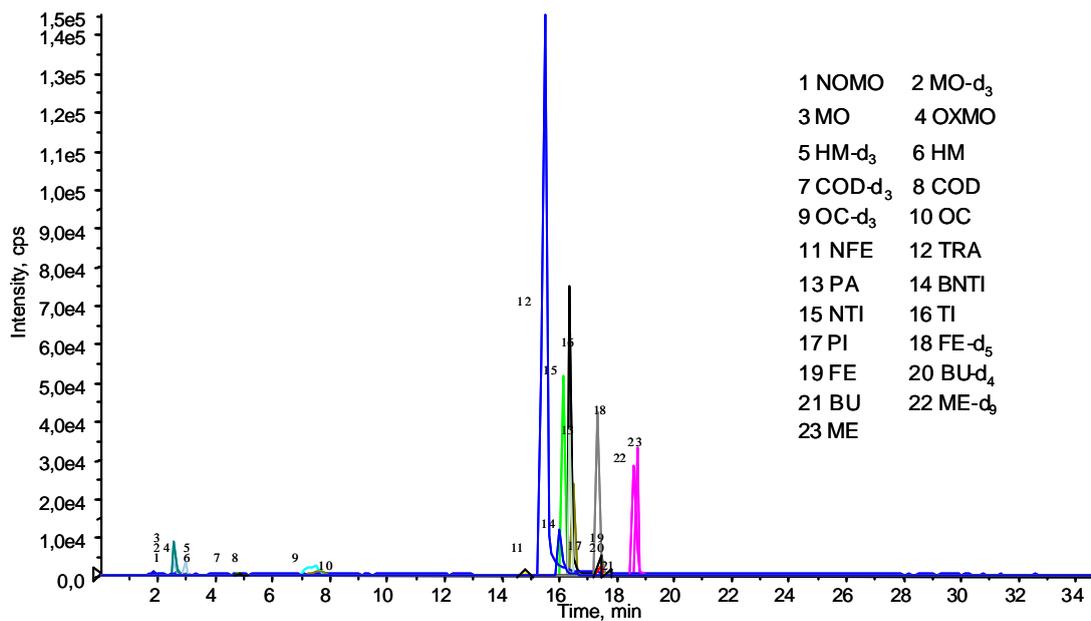


Abbildung 52: LC/MS-MS MRM Chromatogramm einer mit Standard und internem Standard versetzten extrahierten Leerhaarprobe.

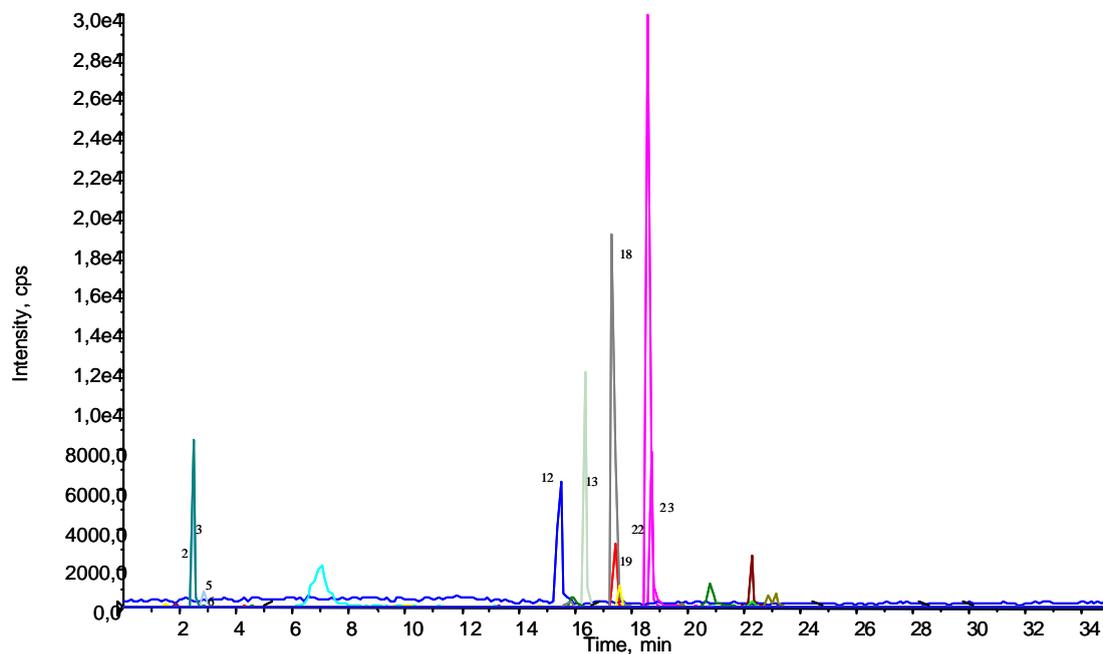


Abbildung 53: LC/MS-MS MRM Chromatogramm einer Realprobe (186,5 pg/mg HM, 151,6 pg/mg MOR, 344,9 pg/mg FE, 11846,1 pg/mg TRA, 2175,6 pg/ng MET).

Tabelle 31: Haarfarbe, Haarlänge und Konzentrationen der Opioiden in Haaren von Patienten nach Gabe von Opioid-Analgetika zur Schmerztherapie.

Fall- zahl	Haar- farbe	Länge [cm]	Konzentration im Haar [pg/mg]									
			HM	MOR	FE	NFE	BU	TI	NTI	BNTI	TRA	MET
1	grau	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	699,6	193,8	165,2	690,3	0,0
2	braun	5	0,0	77,0	60,5	0,0	0,0	1612,2	593,7	241,3	1171,9	0,0
3	braun	5	0,0	0,0	0,0	0,0	180,0	0,0	0,0	0,0	249,6	0,0
4	schwarz	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9842,9	0,0
5	schwarz	5	0,0	130,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19654,5	0,0
6	grau	6	78,4	0,0	526,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	rot g	5	0,0	0,0	461,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	braun	6	0,0	178,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	grau	4	0,0	388,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	schwarz	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2132,1	814,3	119,2	1499,6	0,0
11	grau	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	609,3	0,0
12	schwarz	5	0,0	237,9	911,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	233,9
13	rot g	5	33,8	0,0	292,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	612,0	0,0
14	grau	8	35,1	127,2	0,0	0,0	40,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1954,5
15	blond g	5	0,0	0,0	1397,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	braun	3	304,6	402,5	13,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2973,7
17	braun	10	0,0	0,0	46,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11679,3	1342,1
18	braun	5	186,5	151,6	344,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11846,1	2175,6
19	schwarz	7	0,0	203,3	204,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1832,4
20	schwarz	2	0,0	1274,4	229,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10730,5
21	braun	12	17,5	0,0	22,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1787,5
22	grau	5	0,0	140,7	408,4	0,0	0,0	791,4	92,7	57,1	3244,8	0,0
23	rot g	7	0,0	0,0	1787,4	17,8	0,0	690,2	43,0	0,0	0,0	0,0
24	braun	10	0,0	218,7	0,0	0,0	0,0	745,0	107,9	0,0	2315,2	0,0
25	grau	7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	322,3	0,0
26	grau	10	0,0	0,0	128,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
27	schwarz	8	71,6	0,0	1181,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28	schwarz	9	0,0	158,4	159,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	811,6	43,4
29	schwarz	8	0,0	25,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	grau	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	281,9	0,0	0,0	0,0
31	grau	7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34627,9	0,0

	HM	MOR	FE	NFE	BU	TI	NTI	BNTI	TRA	MET
Positiv	7	14	17	1	2	6	7	4	15	9
%	22,6	45,2	54,8	3,2	6,5	19,4	22,6	12,9	48,4	29,0
Mittelwert	103,9	265,4	480,8	17,8	110,4	1111,8	303,9	145,7	6611,8	2563,7
±	39,6	82,4	127,8	0,0	69,7	250,1	110,0	38,8	2511,7	1065,9
Median	71,6	168,4	292,4	17,8	110,4	768,2	193,8	142,2	1499,6	1832,4
Minimum	17,5	25,6	13,1	17,8	40,7	690,2	43,0	57,1	249,6	43,4
Maximum	304,6	1274,4	1787,4	17,8	180,0	2132,1	814,3	241,3	34627,9	10730,5

g gefärbt

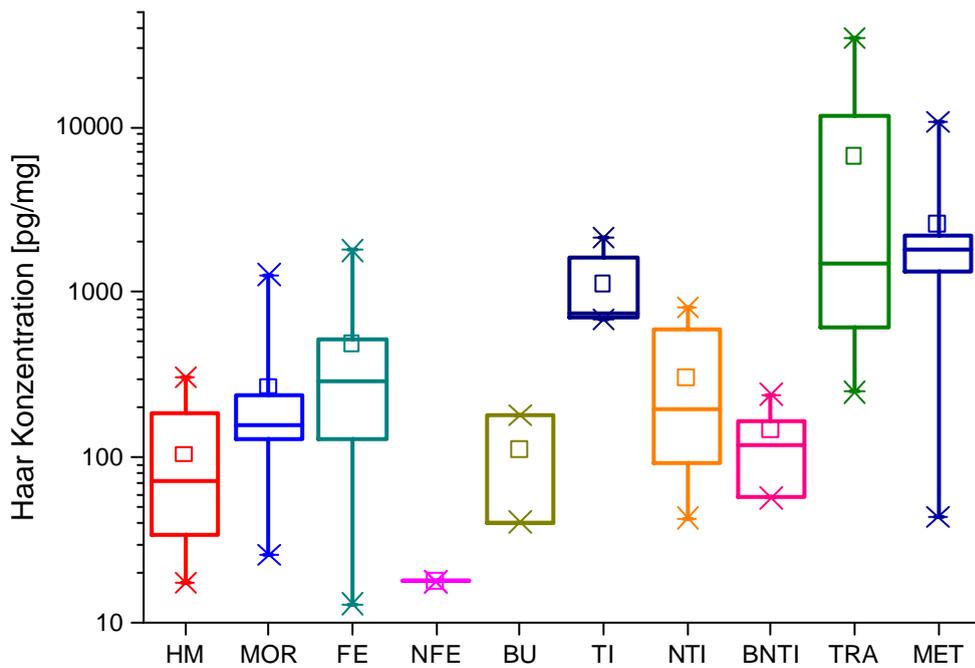


Abbildung 54: Haarkonzentrationen der Opiode in Boxplotdarstellung.

6. Diskussion

6.1. Methodenvalidierung

Die im Rahmen der gegenständlichen Arbeit entwickelten Methoden (Kapitel 3.6) wurden nach dem neuesten Stand der Wissenschaft sowie aktuellen Standards und Vorgaben validiert [72]. Mittels der vorgestellten Analysemethoden wurde eine eindeutige Identifizierung der vorgestellten Analyten (Opiate, Cocain, Cocainmetabolite, Amphetamine, Cannabinoide, Methadon und Opioidanalgetika) in Haarproben möglich. Somit können nun mit diesen Methoden sichere, gerichtsverwertbare Befunde erlangt werden. Dies war in der Vergangenheit bisher nur bedingt möglich, da viele Publikationen keine Angaben zu Validierungsdaten enthalten bzw. die gestellten Anforderungen nicht erfüllt wurden. Aufgrund der komplexen Haarmatrix und der damit einhergehenden vielfältigen Probenaufarbeitungsmethoden können Untersuchungsergebnisse verschiedener Laboratorien nur eingeschränkt miteinander verglichen werden. Dies wird jedoch möglich, wenn die Richtlinien allgemein eingehalten und einheitliche Analysemethoden verwendet werden. Die Teilnahme an Ringversuchen sowie die Untersuchung von Standardreferenzmaterial, die bereits mit den erarbeiteten Analysemethoden (Opiate, Cocain, Cocainmetabolite, Amphetamine) erfolgreich durchgeführt wurden, können ebenfalls zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien beitragen.

6.2. Anwendbarkeit der entwickelten Methoden

6.2.1. Bestimmung von Opiaten, Cocain und Cocainmetaboliten in Haaren mittels Enzymimmunoassay (ELISA) und Bestätigung mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Anhand der Ergebnisse (Kapitel 5.2.1) wurde deutlich, dass die im Rahmen der Arbeit entwickelten ELISA Tests valide, semiquantitative Screeningmethoden zum Nachweis von Cocain und Cocainmetaboliten sowie von Opiaten in Haaren darstellen. Selbstverständlich zeigte sich im zweiten Schritt beim Vergleich der Konzentrationen der ELISA-Methoden mit den GC/MS-Methoden (Tabelle 17), dass sich die Ergebnisse insbesondere bei hohen und niedrigen Konzentrationen (an den Enden und damit im nicht linearen Bereichen der „S“-förmigen Kalibrierkurven der ELISA-Tests) stark unterscheiden. Ein weiterer Grund für den semiquantitativen Charakter der ELISA-Tests sind die unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten der Einzelanalyten: diese betragen (laut Herstellerangabe) 64% für Cocain, 200% für Cocaethylen, 100% für Benzoylcegonin, 100% für Morphin, 65% für 6-Monoacetylmorphin, >100% für Codein und 43% für Heroin, ein Wert für Acetylcodein war nicht angegeben. Eine mögliche Ursache für die Abweichungen der Ergebnisse mit der GC/MS kann auch darin bestehen, dass weitere Metaboliten von Cocain und Heroin, die von der GC/MS Methode nicht erfasst werden, ebenfalls mit den Antikörpern der ELISA Platten reagieren können.

Trotz dieser Abweichungen wurde überprüft, ob sich Korrelationen zwischen den ELISA- und GC/MS-Messwerten aufstellen lassen. Aufgrund der unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten ergaben sich bei einem univariaten Ansatz, die GC/MS Daten eines Analyten mit den entsprechenden ELISA Werten zu korrelieren, relativ kleine Korrelationskoeffizienten. Im Gegensatz dazu ist es mit multivariater Datenanalyse gelungen, die GC/MS Daten aller Analyten simultan mit ihren ELISA Werten zu korrelieren. Es wurde eine gute Korrelation mittels Cross-Validation für die Morphin-Equivalente, aber auch für die Cocain-Equivalente gefunden.

Zur weiteren Interpretation der Beziehungen zwischen den Daten wurde der Loadings Plot verwendet. Variablen, die nah beieinander liegen, besitzen eine sehr ähnliche

Varianz, die dem Grad der Entfernung vom Ursprung der Hauptkomponenten proportional ist. Liegen die Variablen auf der gleichen Seite des Ursprungs so kovariieren sie im positiven Sinne, d.h. sie haben eine positive Korrelation [86]. Bei Betrachtung des PC1/PC2 x-/y-Loading Plot (Abbildung 41) wurde deutlich, dass eine sehr hohe Korrelation zwischen den ELISA Morphin-Equivalenten und Morphin, 6-Monoacetylmorphin, sowie der Summe aller Opiate besteht. Eine gleichsam hohe Korrelation findet sich zwischen den ELISA Cocain-Equivalenten und Cocain, Benzoylcegonin und dem Gesamtcocain. Die GC/MS Werte von Heroin, Codein und Acetylcodein unterscheiden sich dagegen von den ELISA Morphin-Equivalenten, ebenfalls unterscheidet sich Cocaethylen von den ELISA Cocain-Equivalenten. Die Erklärung für dieses Phänomen besteht darin, dass diese Substanzen eine signifikant niedrigere Inkooperationsrate ins Haar aufweisen [2] und dadurch in niedrigeren Konzentrationsbereichen nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurde deutlich, dass die automatisierten ELISA Tests valide, semiquantitative Screeningmethoden zum Nachweis von Cocain und Cocainmetaboliten, sowie von Opiaten in Haaren darstellen. Der ursprünglich zur Speichelanalytik verwendete Test wurde so modifiziert, dass die Analyse von Haarproben möglich wurde. Für forensisch-toxikologische Zwecke stellt die vorgestellte Screeningmethode eine ideale Ergänzung zu routinemäßig angewendeten GC/MS Bestimmungen dar, da sie im Gegensatz zu Radioimmunoassays schnell, preisgünstig und sicher ist. Die Anwendbarkeit beider entwickelter Methoden wurde mittels der Analyse von Realproben belegt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mithilfe multivariater Datenanalyse Korrelationen zwischen ELISA- und GC/MS-Daten aufgestellt werden können.

6.2.2. Opiatkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und wegen Opiatmissbrauchs Verstorbener

Die mittels der entwickelten GC/MS Methode erhaltenen Ergebnisse (Kapitel 5.2.2) zeigten, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der Opiatkonzentrationen in den Haarproben der Probanden zum Zeitpunkt T-1 verglichen mit den Haarproben zum Zeitpunkt T12 vorlagen: Dosen, die die Patienten nach einem Jahr Teilnahme am Heroinvergabeprogramm (Zeitpunkt T12) erhielten, lagen demzufolge in ähnlichen Bereichen wie die Dosen, die die Patienten vor Eintritt in das Heroinvergabeprogramm (Zeitpunkt T-1) konsumiert haben. Dieses Ergebnis ist schlüssig, da das Heroinprojekt nicht die Entgiftung oder Herunterdosierung der Patienten zum Ziel hatte, sondern vielmehr der gesundheitlichen Stabilisierung und psychischen Betreuung der Patienten diente.

Zusammenfassend wurden 30,4% der Proben bei T-1 und 39,1% der Proben bei T12 positiv auf Heroin getestet, ein Ergebnis, welches tendenziell auch von anderen Autoren mit Nachweisraten von 14% [14], 27% [36], 35% [13] und 50% [98] beobachtet wurde. In nur einem Artikel wurden 90% der Proben positiv auf Heroin getestet [82]. In der vorliegenden Arbeit wurde 6-Monoacetylmorphin in allen Haarproben der Heroinkonsumenten nachgewiesen, Morphin in 87,0% (T-1) bzw. 89,1% (T12) der Fälle.

Nach kontrollierter Heroingabe ergab die vorliegende Untersuchung eine Korrelation zwischen der aufgenommenen Dosis des letzten Monats und dem Gesamtopiatgehalt in den Haaren zum Zeitpunkt T12 ($r=0,66$, $p=0,003$). Bei Betrachtung der Einzelanalyten wurden mit der jeweiligen Plasmahalbwertszeit ansteigende Korrelationskoeffizienten ermittelt ($r=0,42$, $0,59$ und $0,69$, $p=0,262$, $0,081$ und $0,001$ für Heroin, 6-Monoacetylmorphin und Morphin). Im Vergleich mit Ergebnissen von Kintz et al. [82] ($r=0,12$, $0,25$ und $0,64$ für Heroin, 6-Monoacetylmorphin und Morphin, bei Haarproben von 20 Teilnehmern eines Heroinvergabeprogramms) wurden in dieser Arbeit höhere Korrelationskoeffizienten gefunden, es konnte weiterhin bestätigt werden, dass Morphin mit der höchsten Plasmahalbwertszeit (Morphin ca. 150 min > 6-Monoacetylmorphin ca. 20 min > Heroin ca. 2 min), den höchsten Korrelationskoeffizienten aufwies.

Das Fehlen schlüssiger Resultate bei kompletter Segmentation von Haarproben der Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts erlaubt die Schlussfolgerung, dass die segmentale Haaranalyse nicht zur Bestimmung zeitlicher Dosis-Konzentrationsbeziehungen über einen längeren Zeitraum, in diesem Fall ein Jahr, geeignet ist. Anzeichen von Dosis-Konzentrationsbeziehungen waren nur bei Morphin feststellbar, weil es eine deutlich längere Plasmahalbwertszeit in Plasma und Gewebe als Heroin aufweist und sich in signifikanten Mengen im Haar akkumuliert. Weitere Parameter wie individuell unterschiedliche Haarwachstumsraten und die Stabilität der Drogen im Haar dürfen nicht außer Acht gelassen werden: Beispielsweise konnte der Analyt Heroin in keiner gefärbten Haarprobe nachgewiesen werden, was als Hinweis auf eine mögliche Hydrolyse des Heroins während der kosmetischen Behandlung angesehen werden kann. Weiterhin können die Unterschiede in der Aufnahme der Drogen aus dem Blut ins Haar, sowie unterschiedlich starke Absonderung von Schweiß und Sebum der einzelnen Individuen als Gründe für die geringe Korrelation zwischen Dosis und Konzentration angesehen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den Haaren der Teilnehmer Codein und Acetylcodein in 50% und 43,5% der Fälle bei T-1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit ersten Beobachtungen überein, wonach bei der Analyse von Haaren opiatassoziiertes Todesfälle Codein in 66% und Acetylcodein in 44% der Fälle detektiert wurde [20]. Hingegen konnte in Haaren von Teilnehmern des Schweizer Heroinvergabeprojekts in Bern weder Codein noch Acetylcodein nachgewiesen werden [20]. Nach einem Jahr Laufzeit des Bonner Heroinprojekts (T12) wurde Codein und Acetylcodein nur noch in 13% bzw. 10,9% der Proben nachgewiesen. In einer ähnlichen Studie, bei der die Opiatkonzentrationen in Haaren von Teilnehmern des Schweizer Heroinvergabeprojekts in Genf bestimmt wurden, wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit Codein in 32,6% und Acetylcodein in 11,6% der Proben detektiert [21]. Die ebenfalls untersuchten Haare von Straßenheroinkonsumenten wiesen im Vergleich zu den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen bei T-1 extrem hohe Detektionsraten auf: Codein wurde in 94,5% und Acetylcodein in 91,8% der Fälle nachgewiesen, die Nachweisgrenze der verwendeten Methode betrug 0,09 ng/mg [21].

Der Vergleich der Opiatkonzentrationen in Haaren der Teilnehmer des Bonner Heroinvergabeprojekts mit den Ergebnissen der Untersuchungen eines Kollektivs opiatassoziiertes Todesfälle zeigte, dass Heroinkonzentrationen, die in ähnlichen Bereichen wie die des Heroinprojekts lagen, in den Haaren der Verstorbenen nicht nachgewiesen werden konnten (Tabelle 18 und 19). Die Nachweisrate für Heroin war zudem mit 8,3% viel geringer. Als mögliche Ursache hierfür kann eine Hydrolyse während der Lagerung der Haare, die während einer Autopsie asserviert werden und dadurch häufig feucht sind, in Betracht gezogen werden.

Die Nachweisraten von Codein und Acetylcodein (33,3% und 16,7%) waren vergleichbar mit denen des Heroinvergabeprojekts (50% und 13%) zum Zeitpunkt T-1. Andere Arbeitsgruppen [99] fanden im Gegensatz zu dieser Arbeit signifikant niedrigere Morphinkonzentrationen bei Todesfällen infolge von Opiatabusus als bei aktiven Drogenkonsumenten oder bei seit mehreren Monaten abstinenten Konsumenten. Daher stellt sich die Frage, ob eine durch Abstinenz verminderte Toleranz einen Hauptgrund für derartige Todesfälle darstellt. Das Risiko einer Überdosierung ist bei unregelmäßigem Konsum als höher einzuschätzen, da die Konsumenten wegen des nur gelegentlichen Abusus geringe Toleranzlevel aufweisen. In dieser Studie wurden keine Befunde über die 6-Monoacetylmorphinkonzentrationen aufgeführt.

Nach einer anderen Studie [100] liegt der Median der Morphinkonzentrationen in Haaren gegenwärtiger Heroinkonsumenten vier Mal höher als der an Überdosierung Verstorbener. Dies wurde als Zeichen für einen wesentlich stärkeren aktuellen Konsum angesehen. Es wurde zudem vermutet, dass bei den Verstorbenen das Risiko aufgrund geringerer Toleranz gegenüber Opiaten und eines stärkeren Alkoholkonsums erhöht war. Die jeweiligen Medianwerte für Morphin, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden, lagen bei 0,25 ng/mg bei den opiatassoziierten Todesfällen, im Vergleich zu 0,41 ng/mg bei den Teilnehmern des Heroinvergabeprogramms. Im Gegensatz zu der dargestellten Morphin Konzentrationsbeziehung von 1:4 zwischen Verstorbenen und aktiven Konsumenten [100], wurde in dieser Arbeit nur eine nicht signifikante Änderung (Quotient 1:1,33) ermittelt. Diese mangelnde Signifikanz wird noch deutlicher, wenn die Mittelwerte der Morphinkonzentrationen verglichen werden: bei den Verstorbenen wurde ein

Mittelwert von 1,15 ng/mg im Gegensatz zu 1,46 ng/mg bei den Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts errechnet (Quotient 1:1,26). Die Schlussfolgerung, dass die Todesfälle nicht die Konsequenz einer unfallursächlichen Überdosierung aufgrund eines Mangels an Toleranz darstellen, liegt daher sehr nahe.

Im Vergleich zu Kronstrand et al. [101], der in 6 von 19 opiatassoziierten Todesfällen keine Opiate in Haaren nachweisen konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine entsprechende Opiatabstinenz vor der tödlichen Überdosis nicht beobachtet. Diese Ergebnisse stellen die Schlussfolgerung von Tagliaro et al. [99] in Frage, wonach eine plötzliche Wiederaufnahme des Heroinkonsums nach totaler Abstinenz als ausschlaggebender Faktor eines Todes durch Überdosierung angesehen werden muss. Einschränkend ist aber festzustellen, dass die diskutierten Ergebnisse nur auf der Opiatebestimmung in Haaren basieren und die Gegebenheiten in anderen Matrices nicht berücksichtigt wurden.

In der Literatur wurde beschrieben, dass bei einer 6-Monoacetylmorphinkonzentration von 0,3 ng/mg dazugehörige Acetylcodeinkonzentrationen von bis zu 0,2 ng/mg gemessen werden konnten [21]. In einem Fall stimmte diese Angabe mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein: bei einer 6-Monoacetylmorphinkonzentration von 0,33 ng/mg konnte Acetylcodein nachgewiesen werden (ca. 0,04 ng/mg), wenngleich diese Konzentration unter der Bestimmungsgrenze lag. Die niedrigste Acetylcodeinkonzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze betrug 0,18 ng/mg bei einer 6-Monoacetylmorphinkonzentration von 5,24 ng/mg. Verglichen mit den Untersuchungen von Kintz et al. [20] wurde Acetylcodein im Rahmen dieser Arbeit in viel geringeren Konzentrationen nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Acetylcodein, im Gegensatz zu 6-Monoacetylmorphin, aufgrund seiner geringen Konzentration und der Abwesenheit in 50-60 % der positiv auf 6-Monoacetylmorphin getesteten Proben, nicht als geeigneter Heroin-Biomarker in der Haaranalytik angesehen werden kann. Dennoch ist Acetylcodein ein interessanter Biomarker für einen Straßenheroinkonsum im Rahmen von Heroinvergabeprojekten.

Zusammenfassung

Es zeigte sich, dass Dosis-Konzentrationsbeziehungen bei Haaranalysen nach Heroinabusus aufgestellt werden können und am ehesten die ermittelten Morphinkonzentrationen mit der aufgenommenen Menge an Heroin korrelieren. Die Resultate stimmen nicht mit den Beobachtungen von Kintz et al. [82] überein, da diese Arbeitsgruppe nur sehr limitierte Dosis-Konzentrationsbeziehungen im Haar nach Heroinkonsum aufzeigen konnte. Die Korrelationen sind durch die Plasmahalbwertszeit der Analyten beeinflusst. Die vorliegende Arbeit zeigt Übereinstimmungen zwischen den ermittelten Opiatkonzentrationen, insbesondere den Morphinkonzentrationen, in den Haaren von Teilnehmern an einem kontrollierten Heroinvergabeprojekt und denen Verstorbener mit opiatassoziertem Exitus auf. Dieser Befund unterstützt nicht die von Tagliaro et al. aufgestellte Hypothese, dass eine verminderte Toleranz als haupttodesursächlich angesehen werden kann. Zudem wird bei nicht nachweisbarem Acetylcodein bei der Mehrzahl der Verstorbenen dessen Eignung als charakteristischer Marker eines vorausgegangenen Konsums von Straßenheroin in Frage gestellt.

6.2.3. Cocainkonzentrationen in Haaren von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms im Vergleich zu der methadonsubstituierten Kontrollgruppe

Mittels GC/MS wurden die Haarproben der Probanden des Bonner Heroinvergabeprojekts und der Methadonkontrollgruppe auf einen Cocainbeikonsum hin untersucht. Die Analyten Cocain, Benzoyllecgonin und Cocaethylen wurden bestimmt. Es wurde deutlich (Kapitel 5.2.3), dass sowohl innerhalb des Heroinvergabeprojekts als auch der Methadonsubstitution eine vergleichbar große Teilnehmerzahl einen Beikonsum von Cocain praktizierte. In der Heroingruppe fand eine stärker ausgeprägte Reduktion des Beikonsums nach einem Jahr statt als in der Methadongruppe (Heroinvergabe: von 64,6% auf 45,8%, Methadonvergabe: von 71,4% auf 60,0%). Die von Backmund aufgestellte Hypothese [88], die diese stärkere Reduktion in Heroinvergabeprogrammen postuliert, wurde somit bestätigt. Der häufigere Gebrauch illegaler Drogen während der Methadonsubstitution wurde anhand des Vergleichs von Methadon- und Heroinverschreibungen in der Schweiz mit einem höheren Ausmaß an szenennahen Aktivitäten in dieser Gruppe erklärt [102].

Weiterhin wurde deutlich, dass die Teilnehmer beider Gruppen im Mittel vergleichbare Cocaindosen konsumierten, da die nachgewiesenen Konzentrationen von Cocain und Benzoyllecgonin in den Haaren der Teilnehmer sich nicht statistisch signifikant unterschieden. Signifikante Abnahmen des Cocain- und Benzoyllecgoningehalts (Reduktion definitionsgemäss > 30%) im Verlauf eines Jahres waren in beiden Gruppen in gleichen prozentualen Größenordnungen zu beobachten.

Der Anstieg des Cocaingehalts in den Haaren der Kontrollgruppe in 37,1% der Fälle (im Vergleich: Zunahme in der Heroingruppe 22,9%) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Methadon im Gegensatz zum Heroin den Patienten nicht den gewünschten „Kick“ vermittelt, und dieser durch den Konsum höherer Cocaindosen herbeigeführt werden soll. Dies scheint jedoch kein grundsätzliches Problem der Methadonsubstitution darzustellen, da die Erhöhung der jeweiligen Cocainkonzentration in diesen Fällen nicht statistisch signifikant erfolgt ist. Der nach einem Jahr noch immer deutlich ausgeprägte Beikonsum von Cocain in beiden Gruppen spricht ebenfalls gegen die Hypothese, dass der fehlende „Kick“ als Hauptgrund eines Cocainbeikonsums in der Methadongruppe anzusehen ist.

Anhand des illegalen Beigebrauchs von Cocain während der Behandlung lässt sich also abschliessend keine eindeutige Überlegenheit eines der beiden Therapieansätze feststellen. Die Bedeutung des Heroins dürfte vor allem in der größeren Akzeptanz und damit in der höheren Behandlungsmotivation der Patienten liegen [102].

6.2.4. Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit Urintests von Patienten des Bonner Heroinvergabeprogramms und der methadonsubstituierten Kontrollgruppe

Urinscreenings werden in den meisten Substitutionsprogrammen routinemäßig verwendet, jedoch bietet die Haaranalyse mittels GC/MS gegenüber den Urintests viele Vorteile. Anhand der ermittelten Opiatekonsumhäufigkeit beider Vergabegruppen zum Zeitpunkt T-1 sowie der Opiate- bzw. Methadonkonsumhäufigkeit zum Zeitpunkt T12 zeigte sich diese Überlegenheit der quantitativen Haaranalytik gegenüber den Urinscreenings (Tabelle 22) wie in Kapitel 5.2.4 dargestellt. Die Nachweisraten für einen Opiatekonsum in der Heroingruppe und in der Methadongruppe lagen mittels Haaranalytik jeweils bei 100%, während mittels Urinscreening trotz des regelmäßig erfolgten Konsums nicht alle Proben positiv getestet werden konnten. Mittels Haaranalytik wurde zudem ein signifikant größerer Cocainbeikonsum in beiden Gruppen nachgewiesen. Als Erklärung hierfür kann die geringere Empfindlichkeit der Urinscreenings angesehen werden. Die Tatsache, dass die Probanden den Cocainbeikonsum einige Tage vor der ihnen bekanntgegebenen Urinabgabe eingestellt haben könnten, ist ein weiterer Grund für die geringeren Nachweisraten mittels Urinscreening. Durch die Analyse des proximalen Haarsegments (1cm) konnte der Cocainbeikonsum des vergangenen letzten Monats erfasst werden, hingegen ist mittels Urinscreening retrospektiv nur das Konsumverhalten weniger Tagen nachweisbar.

Anhand des Beikonsums weiterer Substanzen (Cannabinoide, Amphetamine) während der Heroinvergabe und Methadonsubstitution lässt sich, wie in Kapitel 5.2.3 für Cocain bereits dargestellt, ebenfalls keine Überlegenheit eines der beiden Therapieansätze feststellen. Der mittels Urinscreening bestimmte Beikonsum dieser Substanzen war in beiden Gruppen ähnlich stark ausgeprägt (Tabelle 22).

6.2.5. Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon und EDDP in Haaren von Teilnehmern des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms

In den Haaren von Teilnehmern von Methadonsubstitutionsprogrammen wurde Methadon und EDDP üblicherweise nachgewiesen (Tabelle 32). Methadon wurde hierbei in höheren Konzentrationen nachgewiesen als der Metabolit. Weitere Metaboliten wie 2-Ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pyrrolin (EMDP) konnten nur in wenigen Fällen und nur in Spuren detektiert werden [103-105].

Tabelle 32: Methadon- und EDDP- Konzentrationen in Haarproben aus der Literatur.

Autor	n	analysierte Konzentrationsbereiche (ng/mg)	Mittelwert (ng/mg)	Referenz
Moeller et al.	91	0 - 42 METH 0 - 2,4 EDDP	10,9 METH 1,2 EDDP	[41]
Wilkins et al.	2	10,1 – 21,0 METH 0,5 – 2,6 EDDP	- -	[103]
Goldberger et al.	20	0 - 15 METH 0 – Spuren EDDP	3,93 METH 0 EDDP	[104]
Sporkert und Pragst	19	0,36 – 11,8 METH 0,19 – 10,9 EDDP	- -	[105]
Marsh et al.	19	0,2 - 10,63 METH	-	[106]
Lucas et al.	8	2,45 - 78,1 METH 0 - 7,76 EDDP	23,84 METH 3,21 EDDP	[107]
Girod und Staub	26	0,7 - 43 METH 0 - 5 EDDP	8,2 METH 0,85 EDDP	[108]
Paterson et al.	60	2,6 - 63,2 METH oral 18 - 127,5, METH i.v.	16,0 METH oral 41,6 METH i.v.	[109]

Für die Beziehung von Dosis und Konzentration von Methadon sind in der Literatur sehr widersprüchliche Daten angegeben. Einige Autoren fanden keine Korrelation zwischen verabreichter Dosis und Drogenkonzentration im Haar [104,108,109], andere Autoren eine geringe Korrelation [110], weitere Artikel berichten aber auch von einer signifikanten Korrelation [41,106,107]. Allerdings wurde in letzteren nur eine geringe Fallzahl untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 5.2.5) stand im Vergleich dazu erstmals ein sehr großes Kollektiv von Probanden zur Verfügung, deren Haarproben mittels automatisierter HS-SPME GC/MS untersucht wurden.

Wie die mit HS-SPME GC/MS erhaltenen Ergebnisse deutlich werden lassen, stellt die Haaranalyse zur Kontrolle der Compliance in Methadonsubstitutionsprogrammen eine wertvolle Alternative zu einem konventionellen Urinscreening dar. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die Selbstangaben von Drogenkonsumenten häufig nur schlechte Näherungen der wirklich konsumierten Drogenmenge darstellen [27-29]. In der Literatur sind sehr widersprüchliche Daten in Bezug auf Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon angegeben, auch wenn nur kontrollierte Methadonsubstitutionsprogramme betrachtet wurden. Die Teilnehmer des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms konsumierten ihre tägliche Methadondosis unter der Überwachung von medizinischem Personal, so dass die angegebenen Dosen fundierte Größen darstellen. Patienten, die „Take-home“ Dosen erhielten, wurden hinsichtlich ihrer Compliance besonders kontrolliert und im Falle eines Nichteinhaltens aus der Studie ausgeschlossen. Damit konnte offensichtlich eine bessere Korrelation zwischen genau dokumentierten Dosierungen und den Daten einer kompletten segmentalen Haaranalyse für Methadon und EDDP erreicht werden.

Die gemessenen Konzentrationen stimmten mit denen aus früheren Studien überein, in denen Konzentrationen bis zu 15 ng/mg für Methadon angegeben wurden [104,106,111]. In Einzelfällen wurden höhere Konzentrationen bis zu 63,2 ng/mg und 78,1 ng/mg bestimmt [107,109]. Girod und Staub [108] berichteten, dass Konzentrationen bis zu 43 ng/mg für Methadon detektiert wurden und EDDP nur in 50% der Fälle mit GC/MS nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte EDDP jedoch in allen methadonpositiven Fällen detektiert werden, offensichtlich wegen der hohen Sensitivität der HS-SPME GC/MS Methodik. Methadon zeigte in dieser Arbeit eine hochsignifikante Korrelation zu dem

Metaboliten EDDP. Auch in der Gegenwart hoher Methadonkonzentrationen, verminderte sich die EDDP Konzentration nicht verhältnismäßig. Folglich wird die Kapazität von Haaren, EDDP einzulagern, nicht durch hohe Methadonkonzentrationen verringert, wie von anderen Gruppen postuliert wurde [41]. Für die Abnahme des Methadon/EDDP Konzentrationsverhältnisses in den distalen Segmenten können kosmetische Behandlung sowie weitere externe Faktoren wie beispielsweise der Einfluss von UV-Strahlung als Ursachen angesehen werden.

Im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Dosis-Konzentrationsbeziehungen (Tabelle 33) wurden im Rahmen dieser Arbeit bessere Korrelationen mit höheren Korrelationskoeffizienten, insbesondere in den proximalen Segmenten, ermittelt. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, weil an anderer Stelle nur eine schwache Korrelation zwischen der Methadondosis und dem zugehörigen Plasmalevel gefunden werden konnte [104,112]. Wie in Kapitel 5.2.2 dargestellt, wurde auch eine Korrelation zwischen aufgenommener Dosis und der Gesamtopiatkonzentration in den Haaren der Patienten, die ärztlich verschriebenes Heroin erhielten, nachgewiesen. Mit steigender Plasmahalbwertszeit der einzelnen Analyten konnten steigende Korrelationskoeffizienten verzeichnet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch an anderer Stelle erhalten [82]. Methadon weist im Vergleich zu den Opiaten eine viel längere Halbwertszeit (24-36 Stunden) in Plasma und Geweben sowie eine starke Akkumulation auf. Signifikante Dosis-Konzentrationsbeziehungen im Vergleich zu anderen Substanzen sind offensichtlich darauf zurückzuführen.

Weitere Parameter wie individuell unterschiedliches Haarwachstum dürfen aber nicht außer Acht gelassen werden. Weiterhin sind auch eine unterschiedliche Aufnahme des Analyten Methadon aus dem Blut in die Haare sowie individuelle Unterschiede in der Transpiration als limitierende Faktoren für Dosis-Konzentrationsbeziehungen zu berücksichtigen.

Tabelle 33: Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon in Haarproben aus der Literatur.

Autor	n	Haarsegment	Korrelation Methadon	Ref.
Moeller et al.	5	Segmente von 2 cm Länge	r=0,63	[41]
Goldberger et al.	20	Haarabschnitte	“nicht signifikant“, p>0,05	[104]
Marsh et al.	19	Haar komplett segmentiert (2 cm Segmente)	„Beleg für Dosisbeziehung“	[106]
Lucas et al.	8	komplette Haarsträhne	“signifikant“, p<0,02	[107]
Girod und Staub	26	erste 3 cm, bei zu wenig Material für 50 mg Einwaage, wurden längere Segmente verwendet	“keine Relation“, r=0,1022	[108]
Paterson et al.	60	erste 3 cm	“keine Korrelation“, r ² =0,136 (r=0,369)	[109]
Pötsch et al.	18	in 4 Wochen individuell gewachsenes Haarsegment	“schwach“, r=0,602 (MET), r=0,488 (EDDP)	[110]

Goldberger et al. [104], fanden keine Dosis-Konzentrationsbeziehungen für Methadon. Der anders lautende Befund der vorliegenden Arbeit ist darauf zurückzuführen, dass Haarsegmente und nicht ganze Strähnen untersucht wurden. Wie beim Bonner Studiendesign wurden Haarsegmente, die das individuelle Haarwachstum in vier Wochen repräsentierten, von Pötsch et al. untersucht [110]. Allerdings fanden diese Autoren niedrigere Korrelationen von 0,602 (Methadon) und 0,488 (EDDP) in den proximalen Segmenten. Nur für Patienten mit Dosen unter 29 mg/kg wurde eine höhere Korrelation von 0,896 für Methadon festgestellt. Die oral aufgenommenen Dosen der Bonner Teilnehmer des Methadonsubstitutionsprogramms wurden in drei Bereiche aufgeteilt, niedrig (15-70 mg/Tag), mittel (75-110 mg/Tag) und hoch (115-260 mg/Tag). Zwischen diesen

Gruppen konnten keine Unterschiede in den Korrelationskoeffizienten für die Dosis-Konzentrationsbeziehungen oder in den Methadon/EDDP Konzentrationsverhältnissen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Einlagerung von Methadon in die Haare keinen kapazitätslimitierten Prozess darstellt.

Als Grund für die geringe Korrelation, diskutierten Pötsch et al. [110] pharmakokinetische Aspekte einer unterschiedlichen individuellen Bindung von Methadon an Proteine, sowie Methadoneinlagerung durch Schwitzen und weiteren Beikonsum von Drogen. Insbesondere die Tatsache, dass der missbräuchliche Konsum weiterer Drogen innerhalb des Probandenkollektivs bis zu 30% betrug, wurde für die geringe Korrelation verantwortlich gemacht. Die Studie von Tennant und Shannon [113], in der dargestellt wurde, dass Cocain die Elimination von Methadon beschleunigt, unterstützt diese These. Bei den Teilnehmern des Bonner Methadonsubstitutionsprogramms wurde ein deutlich größerer Cocainbeikonsum festgestellt (Kapitel 5.2.3). Die in dieser Arbeit eingesetzte Methodenkombination ließ aber dennoch die Aufstellung von Korrelationen zu.

Im Unterschied zu dieser Arbeit fanden Girod und Staub [108] und Paterson et al. [109] in ihren Studien außergewöhnlich geringe Korrelationskoeffizienten. Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. In diesen Studien wurden viele Gründe für einen Mangel von Dosis-Konzentrationsbeziehungen postuliert, beispielsweise die Adsorption von anderen Drogen oder Arzneimitteln und der Einfluss der Haarpigmentierung oder das Geschlecht der Probanden. Geringere Korrelationen für Frauen wurden auf Bleichen oder Farbbehandlung der Haare zurückgeführt [109]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in den Methadon- oder EDDP-Konzentrationen zwischen Gruppen unterschiedlicher Haarfarbe, sowie zwischen Gruppen von farbbehandeltem und unbehandeltem Haar ermittelt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Pötsch et al. überein [110], die ebenfalls keine Unterschiede zwischen Methadon- oder EDDP-Konzentrationen durch den Einfluss von Haarfarbe, Haarbehandlung oder UV-Exposition nachweisen konnten.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Bestimmung von Methadon und EDDP in Haaren Aufschluss über einen vorangegangenen Methadonkonsum gibt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration einer Droge im Haar durch die Plasmahalbwertszeit der Analyten beeinflusst wird. Wegen der breiten Streuung in der Korrelation zwischen Dosis und Konzentration liefert die Haaranalyse dennoch nur beschränkt Informationen über Methadonkonsum hinsichtlich einer Patienten-Compliance in Substitutionsprogrammen.

6.2.6. Ergebnisse von Haaranalysen auf Drogen im Vergleich mit zugegebenem Konsum und Urintests

Kopf- und Schamhaarproben von Teilnehmern eines Drogenentgiftungsprogramms wurden mittels GC/MS Methoden auf Drogen untersucht (Kapitel 5.2.6). Von der Mehrheit der Probanden wurde ein Opiatekonsum zugegeben (89%), gefolgt von Cannabinoid- (55%), Cocain- (38%) und Methadonkonsum (32%). Amphetaminkonsum war in diesem Studienkollektiv nicht ausgeprägt. Der Vergleich zwischen zugegebenem Drogenkonsum und dem zu Beginn der Studie durchgeführten Urinscreening zeigte mit Ausnahme der Opiate nur eine geringe Übereinstimmung. Mit Haaranalysen konnte einer größeren Zahl von Probanden ein Konsum bewiesen werden als mit Urinscreenings. Die gute Übereinstimmung zwischen zugegebenem Konsum und den Urinscreenings bei Methadon kann durch die Tatsache erklärt werden, dass diese Patienten an einem offiziellen Methadonsubstitutionsprogramm teilgenommen hatten. Der Vergleich des zugegebenen Konsums und der Ergebnisse der Haaranalyse für Methadon zeigt, dass Methadonkonsum allgemein seltener zugegeben wurde, insbesondere von Probanden, die im Vorfeld nicht an Substitutionsprogrammen teilgenommen hatten. Nachdem die Vorschriften zu den sogenannten „Take-home“ Verschreibungen gelockert wurden, konnte eine Zunahme des auf dem Schwarzmarkt erhältlichen Methadons beobachtet werden [26].

Der Vergleich von zugegebenem Konsum und den Ergebnissen der Haaranalysen für Cocain lässt deutlich erkennen, dass der Konsum von Cocain dramatisch untertrieben wurde. Cocain-Haartests erwiesen sich als hoch sensitive und spezifische Methoden, um einen vergangenen Cocainkonsum auch bei bereits negativen Urintests zu identifizieren. Diese Ergebnisse stimmen mit ähnlichen Studien überein [27,29,114-118]. Nach Magura und Kang [116] kann die mangelnde Angabe eines Cocainkonsums mehreren Faktoren zuschreibbar sein: die Patienten waren möglicherweise gegenüber den befragenden Ärzten misstrauisch oder furchtsam, Cocainkonsum gilt als gebrandmarkt und ist häufig unregelmäßig, so dass sich die Patienten selbst nicht als Konsumenten ansehen. Insgesamt wird ein Drogenkonsum, insbesondere ein Cocainkonsum, in unterschiedlichen Konsumentengruppen bei ausschließlicher Betrachtung von Selbstangabe und Urintest leicht übersehen

[114,119-124]. Mittels Haartests wird die Nachweismöglichkeit eines Konsums stark verbessert, auf diese Weise können viele Bestimmungen, beispielsweise die Untersuchung der Effekte einer pränatalen Cocainaufnahme auf Fötus- und Kindentwicklung, besser durchgeführt werden [125-127].

Die relativ hohe Anzahl von “paradoxen” Fällen mit negativem Haarbefund und positivem Urinbefund für Cannabinoide deutet auf eine Problematik bei der Erfassung von Cannabiskonsumenten mittels Haaranalyse hin. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Gruppen beschrieben [29,128] und kann durch die begrenzte Sensitivität der Methode erklärt werden. Der Nachweis eines Cannabiskonsums mittels Haaranalysen sollte die empfindliche Detektion des THC Metaboliten THC-Carbonsäure (THC-COOH) im unteren pg/mg Bereich zur Absicherung mit einschließen [129,130].

Die Drogenkonzentrationen in den Schamhaarproben wiesen höhere oder gleiche Konzentrationen im Vergleich zu den proximalen oder mittleren Kopfharsegmenten auf. Diese bekannte Tatsache kann zur Plausibilitätskontrolle in forensischen Fragestellungen verwendet werden [131-136]. Aufgrund der Unterschiede im Wachstumszyklus befindet sich eine größere Anzahl von Schamhaaren in katagener und telogener Wachstumsphase, daher können höhere Drogenkonzentrationen erwartet werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass hohe Analytenkonzentrationen der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten das Schamhaar kontaminieren können. Weiterhin müssen zusätzlich stattfindende hydrolytische Prozesse in Schamhaarproben in Betracht gezogen werden. Trotz der Tatsache, dass Schamhaar wegen der unterschiedlichen Wachstumszyklen kürzer als Kopfhaar ist, repräsentiert es wahrscheinlich den gleichen Zeitabschnitt wie Kopfhaar [2]. In wenigen Fällen wurden höhere Konzentrationen im distalen Kopfharsegment als im Schamhaar gefunden. In diesen Fällen wurde das Nachweisfenster in der Kopfhaarprobe als größer als in der Schamhaarprobe betrachtet.

Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten kann die Untersuchung von Schamhaarproben eine Alternative darstellen, wenn Kopfhaarproben nicht zur Verfügung stehen. Ein länger zurückliegender Drogenkonsum ist jedoch mittels Schamhaaranalyse nicht möglich. Grundsätzlich sollte Körperbehaarung nicht für

Eignungstests (z.B. Fahreignungsprüfungen) verwendet werden, weil kein direkter Vergleich mit Kopfhaarergebnissen möglich ist [130].

In den meisten Fällen zeigten die Ergebnisse der Haarsegmentation einen Anstieg der Drogenkonzentration von den proximalen zu den distalen Segmenten (Abbildung 51). Unter Berücksichtigung des Studienkollektivs kann dieses Phänomen durch einen häufigeren Drogenkonsum in der Vergangenheit erklärt werden. Dennoch müssen Diffusion und insbesondere Drogeneinlagerung via Schweiß und Sebum in die Betrachtung mit einbezogen werden. Generell beeinträchtigt diese Diffusion in das Haar nicht die Möglichkeit, einen Drogenkonsumenten zu identifizieren. Allerdings wird die segmentale Regression der im Haar erwarteten Drogenlevel pro Dosis Einheit erschwert. Drogenkonzentrationen in den distalen Segmenten, die von den Selbstangaben abweichen, können so erklärt werden.

Daher war es umso erstaunlicher, dass nach Heroinkonsum signifikante Dosis-Konzentrationsbeziehungen (unter Berücksichtigung aller Segmente) für 6-Monoacetylmorphin ($r = 0,80$; $p < 0,001$) und Morphin ($r = 0,82$; $p < 0,001$) gefunden wurden. Wie in Kapitel 5.2.2 bereits gezeigt, stiegen auch hier die Korrelationskoeffizienten mit Anstieg der Plasmahalbwertszeit. Für die weiteren untersuchten Substanzgruppen konnte keine Korrelation zwischen aufgenommener Dosis und Haarkonzentration der Drogen oder Metaboliten gefunden werden. Eine Erklärung hierfür sind unkonkrete Patientenangaben sowie der variierende Reinheitsgrad der Drogen.

Cocain- und Cannabistests sind typische Beispiele, dass die Ergebnisse unterschiedlicher Bioassays wie Urin- und Haartests nicht vergleichbar sind, da sie unterschiedliche Zeitfenster repräsentieren. Mittels Haaranalyse ist ein Cocainkonsum zwei bis sechs Monate nach einer einmaligen intravenösen 25-35 mg Dosis nachweisbar [137]. Ein positiver Urintest hingegen kann nur zwei bis drei Tage nach Konsum der Droge erzielt werden. Werden Haar- und Urintests für Cocain verglichen, können unter Betrachtung der Nachweisfenster haarpositive und urinnegative Ergebnisse erwartet werden. Im Gegensatz dazu werden die Cannabinoide sehr langsam via Urin ausgeschieden. Als Konsequenz daraus besitzt die Urinanalyse ein größeres Nachweisfenster für Cannabinoide als für Cocain und Cocainmetaboliten. Weiterhin ist bekannt, dass THC und insbesondere THC-COOH

eine sehr geringe Inkorporationsrate ins Haar aufweisen. Cocain hat eine 3600 Mal größere Inkorporationsrate als THC-COOH, der Analyt mit der bisher niedrigsten untersuchten Inkorporationsrate [138]. Im Gegensatz zu Cocain, weist Haar eine zu geringe Sensitivität auf, um ein Detektor für Cannabinoide darzustellen [29,128].

Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass biologische Matrices (wie Urin und Haar und für andere Untersuchungen Speichel, Atem, Blut etc.) sehr nützlich als objektive Indikatoren eines Drogenmissbrauchs sind. Dennoch hängt das gewählte Untersuchungsmaterial von den Umständen und speziellen analytischen Fragestellungen ab, da alle Matrices unterschiedliche Begrenzungen zum Nachweis der Zeitdauer, Häufigkeit und Intensität eines Drogenkonsums haben. Die Anwendbarkeit der GC/MS Methoden konnte anhand der Analysen des großen Probenkollektivs belegt werden.

6.2.7. Bestimmung von 15 Opioid-Analgetika mittels Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS-MS) und Anwendung auf Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung

Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung wurden mittels der erarbeiteten LC/MS-MS Methodik auf Opioid-Analgetika analysiert. Die in den Haarproben detektierten Analytkonzentrationen waren vergleichbar mit den in der Literatur angegebenen Daten (Kapitel 5.2.7, Tabelle 34). Insbesondere die Morphin- und Methadonkonzentrationen lagen in ähnlichen Größenordnungen wie bei Opiateabhängigen oder substituierten Patienten: Zwischen 0 und 1300 pg/mg [35] und 0 und 1400 pg/mg [42] für Morphin (im Vergleich zwischen 25,6 und 1274,4 pg/mg in dieser Arbeit) sowie zwischen 700 und 43000 pg/mg [108] für Methadon (im Vergleich zwischen 43,4 und 10730,5 pg/mg in dieser Arbeit). Fentanyl wurde vermutlich aufgrund höherer Dosen und länger andauernder Opioidaufnahme bei Krebspatienten im Gegensatz zu früheren Untersuchungen in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Es wurden Konzentrationen von 20 pg/mg [89] und 100 pg/mg [54] angegeben, im Vergleich zu 480,8 pg/mg (Mittelwert) in dieser Arbeit.

Tabelle 34: Analyisierte Opioidkonzentrationen in Haarproben aus der Literatur.

Autor	n	Analyisierte Konzentrationenbereiche [pg/mg]	Mittelwert [pg/mg]	Ref.
Wang et al.	19	MOR 0 - 1300 COD 0 - 600	189,5 89,5	[35]
Hoeld et al.	10	MOR unterhalb BG - 1400 NOMO unterhalb BG COD unterhalb BG	230 - -	[42]
Sachs et al.	1	FE 100	-	[54]
Selavka et al.	1	FE 20	-	[89]
Hadidi et al.	11	TRA 176 - 16300	4410	[91]
Tracqui et al.	6	BU 4 - 140	70,3	[92]
Girod & Staub	26	MET 700 - 43000	8200	[108]

Codein, Piritramid und Oxymorphon konnten in den Haarproben nicht nachgewiesen werden, diese Opioide wurden jedoch auch in keinem Fall verabreicht. Die Dosen der kombinierten Opioide, die die Patienten nach Aufnahme in die Klinik erhielten, sowie die vorhergegangene Therapie sind in Tabelle 35 aufgeführt. Leider konnte mangels Dokumentation bei zehn Patienten (Fallzahl 22-31) die Medikation nicht nachvollzogen werden. In diesen Fällen konnten die drei genannten Analyten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Normorphin als Metabolit von Morphin konnte ebenfalls nicht in den Proben detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass Morphin hauptsächlich zu Morphin-3-Glucuronid gefolgt von Morphin-6-Glucuronid metabolisiert wird und nur kleine Mengen zu Normorphin verstoffwechselt werden. Diese geringen Konzentrationen sind im Haar schwer nachweisbar. Eine weitere

mögliche Erklärung ist, dass die Einlagerung von Normorphin in Haar für einen Nachweis zu gering ist.

Oxycodon wurde in einem Fall verabreicht, konnte aber nicht nachgewiesen werden (Tabelle 36). In diesem Fall wurde die Haarprobe bereits einen Tag nach der stationären Aufnahme des Patienten entnommen, so dass der Analyt noch nicht im Haar eingelagert werden konnte. In einem weiteren Fall wurde Oxycodon bei der Vortherapie verwendet, jedoch konnte der Patient keine konkrete Auskunft über Dosis und Behandlungszeitraum geben.

Tabelle 35: Dosen der kombinierten Opiode (Opioid 1 und 2) und Vortherapie der Patienten in stationärer palliativmedizinischer Behandlung.

Fall- zahl	Opioid 1 [mg]					Opioid 2 [mg]							Vortherapie [mg]							
	HM	MOR	FE	TI	Appl	HM	MOR	FE	BU	OC	MET	Appl	HM	MOR	FE	BU	OC	TI	TRA	Tage
1	12	0	0	0	or	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	60	0	0	iv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	12	0	0	0	or	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	?
4	0	30	0	0	iv	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0,6	0	0	0	0	?
5	0	120	0	0	or	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	25	0	0	0	or	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	0	0	0	10
7	16	0	0	0	or	0	0	0	0	0	0	0	0	10	2,4	0	0	0	0	60
8	8	0	0	0	or	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	?
9	0	0	1,8	0	td	0	60	0	0	0	0	iv	0	?	0	0	0	0	0	120
10	0	0	0	200	or	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	365
11	0	0	3,0	0	td	0	45	0	0	0	0	or	0	0	2,4	0	0	0	0	28
12	0	0	7,2	0	td	0	40	0	0	0	0	iv	0	0	3,6	0	0	0	0	?
13	32	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	?	?	?	?
14	0	20	0	0	or	0	0	0	1,7	0	0	td	0	0	0	2,4	0	0	0	?
15	48	0	0	0	or	0	20	3,6	0	0	0	or/td	0	20	3,6	0	0	0	0	?
16	48	0	0	0	or	0	20	0	0	140	0	or	24	0	0	0	0	0	0	75
17	0	0	2,4	0	Td	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	0	0	0	?
18	0	0	6,1	0	Td	56	100	0	0	0	0	or	?	0	0	0	0	0	0	?
19	0	0	1,2	0	Td	0	90	0	0	0	0	or	0	0	1,2	0	0	0	0	730
20	0	0	1,2	0	Td	0	30	0	0	0	0	iv	0	66	1,2	0	0	0	0	25
21	?	0	0	0	Iv	0	0	0	0	0	16	or	16	0	0,6	0	0	0	0	?

Appl Applikation: or = oral, td = transdermal, iv = intravenös

? unbekannt

Tabelle 36: Häufigkeit der Gabe von Opioid 1 und 2, Vortherapie und Inzidenz des Nachweises und Nicht-Nachweises der Analyten (n=21).

	Opioid 1	Opioid 2	Vortherapie (VT)	nicht nachgewiesen	nachgewiesen	zusätzlich nachgewiesen, ohne Angabe
HM	9	1	4	5	5 (+4)	1
MOR	4	8	6	3 (+2) / 1 VT	9 (+2) / 1 VT	0
FE	7	1	10	2 (+1) / 1 VT	6 (+5) / 3 VT	3
NFE	7	1	10	8 (+6) / 4 VT	0	0
TI	1	0	2	1 VT	1 (+1)	2
NTI	1	0	2	1 VT	1 (+1)	2
BNTI	1	0	2	1 VT	1 (+1)	2
BU	0	1	2	0	1 (+1) / 1 VT	0
TRA	0	0	1	0	1 VT	9
MET	0	1	0	0	1	7
OC	0	1	1	1 / 1 VT	0	0

Die Zahl der doppelten Angaben (Opioid 1 und Vortherapie sowie Opioid 2 und Vortherapie) ist in den Klammern angegeben.

Die Vortherapie ist getrennt aufgeführt, da die Patienten häufig keine schlüssigen Angaben bezüglich der Dosis oder Dauer der Vortherapie machen konnten.

Hydromorphon konnte bei Patienten, die niedrige Dosen erhielten (8-16 mg) nicht nachgewiesen werden. Dagegen war es möglich, Dosen zwischen 25 und 56 mg in den Haarproben, außer in einer gebleichten Probe (48 mg), zu detektieren. Ebenfalls war bei zwei grauen Haarproben Fentanyl nicht zu detektieren. Färben oder andere Haarbehandlungen, insbesondere Bleichen, können zu einer Abnahme der Analytkonzentrationen im Haar führen, so dass diese nicht mehr nachweisbar sind. Es ist bekannt, dass einige Analyten eine hohe Melaninaffinität aufweisen. Melanin ist in grauen Haaren nur noch in geringen Mengen enthalten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu überprüfen, ob Fentanyl durch Bindung an Melanin in Haare eingelagert wird und ob eine Beziehung zwischen Haarfarbe und Fentanylkonzentration besteht. Norfentanyl konnte in diesen Proben nicht nachgewiesen werden, lediglich die Haarprobe eines Patienten mit unbekannter

Opioiddosis war positiv. Im Haar dieses Patienten wurden die höchsten Fentanyl Konzentrationen aller Proben nachgewiesen.

Tramadol und Methadon wurden nur in Einzelfällen verschrieben (Tabelle 35). Es ist auffällig, dass beide Analyten in vielen Fällen zusätzlich, ohne bekannte Medikation, nachweisbar waren (9 Tramadol, 7 Methadon). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben Hydromorphon, Morphin und Fentanyl, Tramadol und Methadon häufig gegen Schmerzen eingenommen werden. Es ist anzunehmen, dass die Patienten Tramadol und Methadon vor der stationären Aufnahme von anderen Ärzten erhalten haben, ohne es dem aktuell behandelnden Arzt anzugeben. Die Annahme liegt daher nahe, dass die Patienten neben dem behandelnden Arzt noch weitere Quellen für Schmerzmittel nutzen. Subjektives Empfinden von Unterdosierung oder beginnende Abhängigkeit sind mögliche Gründe dafür. In vielen Fällen wechselt die Opioidmedikation bei Krebspatienten sehr häufig, so dass die Patienten zudem oft nicht in der Lage sind, sich an die vergangenen Medikationen in allen Details zu erinnern.

Die bei den Patienten (n=21) hauptsächlich eingesetzte Medikation bestand aus Hydromorphon allein (n=6), Hydromorphon in Kombination mit Morphin (n=2), Morphin allein (n=3) und Morphin in Kombination mit Fentanyl (n=6). Signifikante Unterschiede in den Haarkonzentrationen im Vergleich Einzelgabe versus Kombination waren nicht feststellbar. Angesichts der geringen Fallzahl ist die Aussagekraft der statistischen Tests allerdings begrenzt.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Haaranalyse in der Schmerztherapie mit Opioid-Analgetika zur Überprüfung der Therapie-Compliance herangezogen werden kann. Daher besteht ein großer Bedarf an Screeningmethoden für Opioid-Analgetika. Neben dem Nachweis nicht verschriebener Medikamente können damit aktuelle Therapien kontrolliert und Nebenwirkungen abgeschätzt werden [139]. Die Wichtigkeit einer Therapie-Compliance wurde auch von Berndt et al. [77] unterstrichen und insbesondere die Haaranalyse wegen der damit möglichen Langzeitinformationen zum therapeutischen Monitoring als geeignet herausgestellt [79,140-142]. Es ist jedoch schwierig den Nachweis zu führen, ob ein Patient seine Medikation genau wie verschrieben einnimmt, da Voraussetzung dafür ist, dass eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen aufgenommenem Medikament und der

gemessenen Haarkonzentration aufgestellt werden kann [143]. Die in diesem Kapitel vorgestellten Patientenangaben waren in den meisten Fällen sehr vage. Daher konnten keine Dosis-Konzentrationsbeziehungen untersucht werden. Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in den Beziehungen, individuellen Unterschieden im Haarwachstum und unterschiedlichen Haarkonzentrationen aufgrund von Haarbehandlungen, ist die Haaranalyse für therapeutisches Compliance-Monitoring als nicht praktikabel anzusehen und sollte nur als „Alles-oder-Nichts“-Compliance-Test verwendet werden [144-146].

Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die entwickelte Methode zum simultanen Nachweis von 15 Opioiden in Haaren zu zufriedenstellenden Validierungsdaten führt. Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch die Analyse von 31 Haarproben von Patienten in palliativmedizinischer Behandlung unter Beweis gestellt. Es zeigte sich, dass der Konsum von Tramadol und Methadon häufig nicht angegeben wurde, Haaranalysen können daher auch zum qualitativen Monitoring von Patienten, die Opioid-Analgetika zur Schmerzbehandlung einnehmen, verwendet werden.

7. Ausblick

In der gegenständlichen Arbeit wurden Screeningmethoden zur Bestimmung von Cocain, Cocainmetaboliten, Opiaten und Opioiden entwickelt und validiert. Immer größere Probenzahlen in der forensisch-toxikologischen Routinetätigkeit und die Vielfalt der Analyten und Analytgruppen werden auch in der Zukunft neue und verbesserte Screeningverfahren erforderlich machen. Die entwickelten und anhand klinischer Studien auf Anwendbarkeit getesteten immunchemischen, aber auch die GC/MS- und LC/MS-MS-Methoden, können zur Analyse authentischer Fälle im Routinebetrieb eingesetzt werden. Die Analyseverfahren wurden nach aktuellen Standards validiert, so dass mit ihnen in Zukunft rechtsverwertbare Befunde erlangt werden können.

Nicht abschließend geklärte Fragestellungen waren zum einen die nur eingeschränkte Verwendbarkeit von Acetylcodein als Straßenheroinmarker, zum anderen der wenig sensitive, kritisch zu betrachtende Nachweis von THC in Haarproben. Weitere mögliche Straßenheroinmarker sollten daher zukünftig im Haar evaluiert, sowie Nachweismethoden für den THC-Metaboliten THC-COOH, der eine Körperpassage von THC sicher beweist, entwickelt werden. Der Nachweis von THC-COOH in Haaren kann mittels der im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen sensitiven LC/MS-MS Methodik möglich gemacht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es in Zukunft möglich ist, mittels der empfindlichen LC/MS-MS Technik bereits einmalige Gaben von Drogen oder Medikamenten nachweisen zu können. Die in dieser Arbeit vorgestellte HS-SPME GC/MS-Methodik zeichnete sich durch Zeitersparnis aufgrund der Automatisierung des Verfahrens aus. Aus diesem Grund ist HS-SPME GC/MS eine wertvolle Alternative zu herkömmlichen Analysemethoden, die auch zukünftig für weitere Analytgruppen Anwendung finden wird.

Es wurde gezeigt, dass Dosis-Konzentrationsbeziehungen mittels Haaranalytik aufstellbar sind. Diese erlauben hinsichtlich einer Patienten-Compliance wegen individueller Unterschiede im Haarwachstum und in der Einlagerung von Drogen ins Haar sowie Haarbehandlungen bisher nur qualitative Ja/Nein-Aussagen, die dennoch bei einem Patienten-Monitoring von großem Nutzen sind. Auf weitere Analyten

ausgeweitete Untersuchungen über mögliche Dosis-Konzentrationsbeziehungen mit großen Probandenkollektiven sind notwendig, die in Zukunft auch quantitative Aussagen möglich machen könnten.

Die vorliegende Arbeit stellte anhand der durchgeführten klinischen Studien dar, dass die Haaranalytik wertvolle Informationen hinsichtlich eines zugegebenen Drogenkonsums liefert. Mittels Haaranalyse können, um nur eines der weiteren Gebiete der Haaranalytik zu nennen, Befunde einer Drogenfreiheit erbracht werden, die gegenwärtig in zunehmendem Maße im Rahmen eines „Workplace Drug Testings“ (Einstellungsuntersuchung etc.) Bedeutung erlangen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Haaruntersuchungen mit Hilfe sensitiver und valider Methoden in der forensisch-toxikologischen Analytik auch in Zukunft ein großes Entwicklungspotential zur Untersuchung einer Vielzahl von Substanzen sowie für ein Patienten-Monitoring und für Suchttherapien bieten.

8. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Unterschiede zwischen Urin-, Blut-, und Haaranalysen und Übersicht über die Nachweisbarkeitsdauer von Drogen [2].....</i>	<i>2</i>
<i>Tabelle 2: In den einzelnen Kapiteln untersuchte Probandenkollektive, Fallzahlen (n) und verwendete Segmente.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 3: Methodenparameter SPME.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 4: Absorptionswerte der zur Methodenentwicklung verwendeten Assays.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 5: Programmierungsprotokoll der Coda 4.0 Software zur Bestimmung der Morphin-Equivalente.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 6: Programmierungsprotokoll der Coda 4.0 Software zur Bestimmung der Cocain-Equivalente.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 7: Temperatureinstellungen des analytischen Systems.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 8: GC-Ofenprogramme.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 9: Übersicht über die Datenbasis, Material, Methoden, Analyten und Fragestellungen der Teilbereiche der vorliegenden Arbeit.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 10: Validierungsparameter der ELISA Tests.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 11: Lineare Regression (m=Steigung, b=Achsenabschnitt, r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenze (BG) und Wiederfindung der Opiate und Cocain sowie der Cocainmetaboliten.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 12: Mittelwerte (MW), Reststandardabweichungen (RSD) Wiederholpräzision (WP), Laborpräzision (LP) und Richtigkeit (R) bei den Konzentrationen 0,5 ng/mg, 5 ng/mg und 25 ng/mg der Opiate und Cocain sowie der Cocainmetaboliten.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabelle 13: Lineare Regression (r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenze (BG), Wiederholpräzision (WP) und Laborpräzision (LP) bei den Konzentrationen 0,5 ng/mg, 2 ng/mg und 40 ng/mg der Amphetamine [84].....</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 14: Lineare Regression (r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenze (BG), Wiederholpräzision (WP) und Laborpräzision (LP) bei den Konzentrationen 0,5 ng/mg und 20 ng/mg der Cannabinoide und Methadon [83]... </i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 15: Lineare Regression (m=Steigung, b=Achsenabschnitt, r=Korrelationskoeffizient), Nachweis (NG)- und Bestimmungsgrenzen (BG) und Wiederfindungen (WF) bei niedrigen (100, 10, 500 pg/mg) und hohen (500, 50, 2500 pg/mg) Konzentrationen der Opioidanalgetika.....</i>	<i>79</i>

<i>Tabelle 16: Mittelwerte (MW), Reststandardabweichungen (RSD), Wiederholpräzision (WP), Laborpräzision (LP) und Richtigkeit (R) bei niedrigen (100, 10, 500 pg/mg) und hohen (500, 50, 2500 pg/mg) Konzentrationen der Opioidanalgetika.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabelle 17: Haarfarbe und Konzentrationen der Opiate und Cocain sowie der Cocainmetaboliten in Haaren mittels ELISA und GC/MS.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 18: Durchschnittliche Heroindosis (zum Zeitpunkt T12), Haarfarbe und Konzentrationen der Opiate bei T-1 und T12 in Haaren von Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 19: Haarfarbe und Konzentrationen der Opiate in Haaren opiatassoziierter Todesfälle.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabelle 20: Konzentrationen von Cocain sowie den Cocainmetaboliten bei T-1 und T12 in Haaren von Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabelle 21: Konzentrationen von Cocain sowie den Cocainmetaboliten bei T-1 und T12 in Haaren von Teilnehmern des Methadonsubstitutionsprogramms.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabelle 22: Mittels Urinscreening bestimmte Inzidenzen eines Beikonsums weiterer Drogen bei Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts (n=48) im Vergleich zur methadonsubstituierten Kontrollgruppe (n=35) zum Zeitpunkt T-1 und T12.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabelle 23: Cutoff Werte für die im Heroinvergabeprojekt und Methadonsubstitutionsprogramm verwendeten Urintests.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 24: Nachweisraten eines Cocainbeikonsums mittels Haaranalytik im Vergleich zu Urinscreenings.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 25: Durchschnittliche Methadondosis, Haarfarbe und Konzentrationen von Methadon und EDDP in Haaren (proximale Segmente) von Teilnehmern des Methadonsubstitutions-programms.....</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 26: Dosis-Konzentrationsbeziehungen und Verhältnis von Methadon und EDDP in Haarproben von Teilnehmern des Methadonsubstitutionsprogramms (41 Haarproben von denen 15 komplett in Abschnitte von 1cm segmentiert wurden)...</i>	<i>112</i>
<i>Tabelle 27: Cutoff Werte für die im Drogenentgiftungsprogramm verwendeten Urintests.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabelle 28: Vergleich der Prävalenzraten eines Drogenkonsums zwischen Urinscreening und Haaranalyse (n=47) mit Konsumangaben.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabelle 29: Konzentrationen der Drogen in den Kopfhaarsegmenten (ng/mg).....</i>	<i>116</i>
<i>Tabelle 30: Konzentrationen der Drogen in Schamhaaren (ng/mg).....</i>	<i>116</i>

<i>Tabelle 31: Haarfarbe, Haarlänge und Konzentrationen der Opioide in Haaren von Patienten nach Gabe von Opioid-Analgetika zur Schmerztherapie.</i>	<i>120</i>
<i>Tabelle 32: Methadon- und EDDP- Konzentrationen in Haarproben aus der Literatur.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabelle 33: Dosis-Konzentrationsbeziehungen von Methadon in Haarproben aus der Literatur.....</i>	<i>135</i>
<i>Tabelle 34: Analysierte Opioidkonzentrationen in Haarproben aus der Literatur. .</i>	<i>143</i>
<i>Tabelle 35: Dosen der kombinierten Opioide (Opioid 1 und 2) und Vortherapie der Patienten in stationärer palliativmedizinischer Behandlung.</i>	<i>144</i>
<i>Tabelle 36: Häufigkeit der Gabe von Opioid 1 und 2, Vortherapie und Inzidenz des Nachweises und Nicht-Nachweises der Analyten (n=21).</i>	<i>145</i>

9. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematischer Schnitt durch die Haut mit Haarfollikel, Haarschaft, Talg- und Schweißdrüsen (Zeichnung W. Lachenmeier).</i>	4
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Haares (Zeichnung W. Lachenmeier).</i>	5
<i>Abbildung 3: Strukturformeln von Cocain und den Metaboliten Benzoyllecgonin und Cocaethylen.</i>	10
<i>Abbildung 4: Strukturformeln der Opiate Heroin, 6-Monoacetylmorphin, Morphin, Acetylcodein und Codein.</i>	10
<i>Abbildung 5: Strukturformeln von Methadon und dem Metaboliten EDDP.</i>	11
<i>Abbildung 6: Strukturformeln der Amphetamine Amphetamin, MA, MDA, MDMA, MDEA, BDB und MBDB.</i>	11
<i>Abbildung 7: Strukturformeln der Cannabinoide THC, CBD und CBN.</i>	12
<i>Abbildung 8: Strukturformeln der Opioide.</i>	14
<i>Abbildung 9: Derivatisierungsreaktionen mit MBTFA (geeignet für Amphetamine und synthetische Designerdrogen) und mit MSTFA (geeignet für Opiate und Cannabinoide) [3].</i>	18
<i>Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufs eines kompetitiven ELISA-Tests.</i>	21
<i>Abbildung 11: ELISA Sensitivität und Spezifität (Cutoffs: 5 ng/ml für Cocain und 2,5 ng/ml für Opiate).</i>	39
<i>Abbildung 12: Vergleichende Ergebnisse zwischen den Cocain- und Opiate ELISA Tests und GC/MS Analysen bei unterschiedlichen Cutoffs (5-20 ng/ml für Cocain und 2,5-20 ng/ml für Opiate) für 124 Haarproben von Drogenkonsumenten.</i>	40
<i>Abbildung 13: Opiateassay, Konjugatvolumen 100 µl, Probevolumen 20 µl.</i>	42
<i>Abbildung 14: Cocainassay, Konjugatvolumen 100 µl, Probevolumen 20 µl.</i>	43
<i>Abbildung 15: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl.</i>	43
<i>Abbildung 16: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl, Vorinkubation 45min.</i>	44
<i>Abbildung 17: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl, Vorinkubation 30min.</i>	44
<i>Abbildung 18: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 20 µl, Vorinkubation 15min.</i>	45

<i>Abbildung 19: Cocainassay, Konjugatvolumen 50 µl, Probevolumen 50 µl, Vorinkubation 30min.</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 20: Massenspektren der Opiate und Cocain sowie Cocainmetaboliten, die zur Analytik verwendeten Ionenspuren sind in Klammern angegeben.</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 21: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Opiaten sowie den deuterierten Analoga (10 ng/mg).</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 22: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Cocain und Cocainmetaboliten sowie den deuterierten Analoga (10 ng/mg).</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 23: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Amphetaminen sowie den deuterierten Analoga (2 ng/mg).</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 24: Extrahierte GC/MS SIM Chromatogramme von Methadon, EDDP und Cannabinoiden sowie den deuterierten Analoga (2 ng/mg).</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 25: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Normorphin (0,1 ng/mg), Oxymorphon (0,1 ng/mg), Morphin (1 ng/mg) und deuteriertem Morphin (1 ng/mg).</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 26: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Hydromorphon (0,1 ng/mg) und deuteriertem Hydromorphon (1 ng/mg).</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 27: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Codein (1 ng/mg) und deuteriertem Codein (1 ng/mg).</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 28: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Oxycodon (1 ng/mg) und deuteriertem Oxycodon (1 ng/mg).</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 29: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Piritramid (1 ng/mg), Norfentanyl (0,1 ng/mg), Fentanyl (0,1 ng/mg) und deuteriertem Fentanyl (1 ng/mg).</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 30: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Tramadol (5 ng/mg), Bisnortilidin (1 ng/mg), Nortilidin (1 ng/mg), Tilidin (1 ng/mg) und Papaverin (1 ng/mg).</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 31: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Buprenorphin (0,1 ng/mg) und deuteriertem Buprenorphin (1 ng/mg).</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 32: Extrahiertes LC/MS-MS MRM Chromatogramm von Methadon (1 ng/mg) und deuteriertem Methadon (1 ng/mg).</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 33: Cocainassay, Konzentration der Kontrollprobe 0,4 ng/mg.</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 34: Cocainassay, Konzentration der Kontrollprobe 0,3 ng/mg.</i>	<i>67</i>

<i>Abbildung 35: GC/MS SIM Chromatogramm einer dotierten Haarprobe (20 ng/mg) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (rote Linie).....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 36: Kalibriergeraden der Opiate.</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 37: Kalibriergeraden von Cocain sowie den Cocainmetaboliten.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 38: Stabilität von Heroin und Heroin-d₉ (ISTD) in einer Probe wähen 24 Stunden Standzeit im Autosampler bei Raumtemperatur.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 39: LC/MS-MS MRM Chromatogramm einer mit Standard und internem Standard dotierten extrahierten Leerhaarprobe (0,1 ng/mg für BU, FE, HM, NFE, NOMO, OXMO; 1 ng/mg für BNTI, COD, MET, MOR, NTI, OC, PI, PA, deuterierte Analoga; 5 ng/mg für TRA) im Vergleich zu einer negativen Haarprobe (Linien unterhalb der Zeitachse).</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 40: Gewichtete Kalibriergeraden der Opioidanalgetika.</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 41: PLS Regression zwischen ELISA COC-Equivalenten (links), ELISA MOR-Equivalenten (rechts) und GC/MS Werten.</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 42: Dosis-Konzentrationsbeziehungen für Gesamtopiat-, Heroin-, 6-Monoacetylmorphin-, und Morphin-Gehalt (Abkürzungen: r=Korrelationskoeffizient, p=Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 43: Dosis-Konzentrationsbeziehungen (Gesamtopiatkonzentrationen) während des gesamten Behandlungszeitraums bei ansteigender und gleich bleibender Dosierung zweier Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts.....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 44: GC/MS SIM Chromatogramme von zwei Haarproben desselben Patienten (schwarze Linie: T-1, rote Linie: T12), die zur Quantifizierung verwendeten Massenspuren sind manuell übereinander gelegt worden.....</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 45: Beziehungen zwischen Codein- und Acetylcodeinkonzentrationen mit 6-Monoacetylmorphin- und Morphinkonzentrationen in den Haaren der Teilnehmer des Heroinvergabeprojekts (T-1) und der Verstorbenen (Abkürzungen: r=Korrelationskoeffizient, p=Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 46: Inzidenzen eines Cocainbeikonsums bei den Teilnehmern des Heroinvergabeprojekts (n=48) im Vergleich zur methadonsubstituierten Kontrollgruppe (n=35) im Verlauf von einem Jahr.....</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 47: Prozentuale Verteilung des zusätzlichen Beikonsums von keiner, einer oder mehrerer Substanzen der Teilnehmer der Heroinvergabe (n=48) und der Methadonsubstitution (n=35).</i>	<i>107</i>

<i>Abbildung 48: HS-SPME GC/MS SIM Chromatogramm einer authentischen Haarprobe eines Teilnehmers der Methadonsubstitutionstherapie. Methadon wurde in einer Konzentration von 4,95 ng/mg, EDDP in einer Konzentration von 0,15 ng/mg nachgewiesen.</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 49: Beziehung zwischen Methadon- und EDDP-Konzentration in 131 Haarproben von Teilnehmern der Methadonsubstitution. (Abkürzungen: r=Korrelationskoeffizient, p=Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).....</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 50: Dosis-Konzentrationsbeziehungen für Methadon- und EDDP-Gehalt in 131 Haarproben. (Abkürzungen: r=Korrelationskoeffizient, p=Signifikanz des Pearson-Korrelationstests auf lineare Abhängigkeit).</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 51: Haarsegmentationsdaten nach Cocain- und Methadonkonsum.</i>	<i>117</i>
<i>Abbildung 52: LC/MS-MS MRM Chromatogramm einer mit Standard und internem Standard versetzten extrahierten Leerhaarprobe.</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 53: LC/MS-MS MRM Chromatogramm einer Realprobe (186,5 pg/mg HM, 151,6 pg/mg MOR, 344,9 pg/mg FE, 11846,1 pg/mg TRA, 2175,6 pg/ng MET).</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 54: Haarkonzentrationen der Opioide in Boxplotdarstellung.</i>	<i>121</i>

10.Literatur

- [1] H. Sachs, P. Kintz, Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 713 (1998) 147-161.
- [2] B. Madea, F. Musshoff, *Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzte-Verlag, 2004.
- [3] D.W. Lachenmeier, Neue Methodenkombination aus dynamischer Festphasenextraktion, Gaschromatographie und Massenspektrometrie für den Einsatz in der forensisch-toxikologischen Haaranalytik. (2003)
- [4] M.R. Harkey, Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 9-18.
- [5] P. Busch, D. Hollenberg, *Kosmetik*, 1995, pp. 46-57.
- [6] H. Fey, I. Otte, *Wörterbuch der Kosmetik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1991.
- [7] L. Pötsch, G. Skopp, M.R. Moeller, Zum Suchtmittelnachweis in Haaren VI. Mögliche Einflüsse der Hautfunktionen. *Rechtsmedizin.* 8 (1997) 2-6.
- [8] Y. Nakahara, R. Kikura, Hair analysis for drugs of abuse. XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Arch. Toxicol.* 70 (1996) 841-849.
- [9] P. Kintz, P. Mangin, What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 3-11.
- [10] A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner, C.T. Black, Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J. Nucl. Med.* 20 (1979) 748-752.
- [11] E. Klug, [Determination of morphine in human hair (author's transl)]. *Z. Rechtsmed.* 84 (1980) 189-193.
- [12] E.J. Cone, Testing human hair for drugs of abuse. I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug-induced effects on pupils and behavior. *J. Anal. Toxicol.* 14 (1990) 1-7.
- [13] B.A. Goldberger, Y.H. Caplan, T. Maguire, E.J. Cone, Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators of heroin use. *J. Anal. Toxicol.* 15 (1991) 226-231.
- [14] E.J. Cone, W.D. Darwin, W.L. Wang, The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 55-68.

- [15] Y. Nakahara, R. Kikura, K. Takahashi, Hair analysis for drugs of abuse. VIII. Effective extraction and determination of 6-acetylmorphine and morphine in hair with trifluoroacetic acid-methanol for the confirmation of retrospective heroin use by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 657 (1994) 93-101.
- [16] S. Strano-Rossi, A. Bermejo-Barrera, M. Chiarotti, Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 211-216.
- [17] A. Polettini, C. Stramesi, C. Vignali, M. Montagna, Determination of opiates in hair. Effects of extraction methods on recovery and on stability of analytes. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 259-269.
- [18] Y. Gaillard, G. Pepin, Simultaneous solid-phase extraction on C18 cartridges of opiates and cocaine for an improved quantitation in human hair by GC-MS: one year of forensic applications. *Forensic Sci. Int.* 86 (1997) 49-59.
- [19] S. George, R.A. Braithwaite, The measurement of morphine in the hair of heroin abusers. *Ann. Clin. Biochem.* 34 (1997) 375-383.
- [20] P. Kintz, C. Jamey, V. Cirimele, R. Brenneisen, B. Ludes, Evaluation of acetylcodeine as a specific marker of illicit heroin in human hair. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 425-429.
- [21] C. Girod, C. Staub, Acetylcodeine as a marker of illicit heroin in human hair: method validation and results of a pilot study. *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 106-111.
- [22] C.L. O'Neal, A. Poklis, The detection of acetylcodeine and 6-acetylmorphine in opiate positive urines. *Forensic Sci. Int.* 95 (1998) 1-10.
- [23] E.J. Cone, D. Yousefnejad, W.D. Darwin, T. Maguire, Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J. Anal. Toxicol.* 15 (1991) 250-255.
- [24] Y. Nakahara, R. Kikura, Hair analysis for drugs of abuse. VII. The incorporation rates of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester into rat hair and hydrolysis of cocaine in rat hair. *Arch. Toxicol.* 68 (1994) 54-59.
- [25] Goodman & Gilman, *The pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, 1996.
- [26] F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, B. Madea, Methadone substitution: medicolegal problems in Germany. *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 118-124.
- [27] T. Feucht, R. Stevens, M. Walker, Drug use among juvenile arrestees: A comparison of self-report, urinalysis, and hair assays. *J. Drug Issues.* 24 (1994) 99-116.

- [28] L. Harrison, A. Hughes, Introduction--the validity of self-reported drug use: improving the accuracy of survey estimates. *NIDA Res. Monogr.* 167:1-16. (1997) 1-16.
- [29] T. Mieczkowski, R. Newel, B. Wraight, Using hair analysis, urinalysis, and self-reports to estimate drug use in a sample of detained juveniles. *Subst. Use. Misuse.* 33 (1998) 1547-1567.
- [30] R. Wennig, Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 5-12.
- [31] G. Romano, N. Barbera, I. Lombardo, Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Sci. Int.* 123 (2001) 119-129.
- [32] M.I. Schaffer, W.L. Wang, J. Irving, An evaluation of two wash procedures for the differentiation of external contamination versus ingestion in the analysis of human hair samples for cocaine. *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 485-488.
- [33] Y. Nakahara, K. Takahashi, M. Shimamine, A. Saitoh, Hair analysis for drugs of abuse. IV. Determination of total morphine and confirmation of 6-acetylmorphine in monkey and human hair by GC/MS. *Arch. Toxicol.* 66 (1992) 669-674.
- [34] A. Poletini, A. Groppi, M. Montagna, Rapid and highly selective GC/MS/MS detection of heroin and its metabolites in hair. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 217-225.
- [35] W.L. Wang, W.D. Darwin, E.J. Cone, Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 660 (1994) 279-290.
- [36] G. Kauert, J. Rohrich, Concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *Int. J. Legal Med.* 108 (1996) 294-299.
- [37] M. Uhl, Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 281-294.
- [38] S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, P. Zuccaro, Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 343-348.
- [39] B.K. Charles, J.E. Day, D.E. Rollins, D. Andrenyak, W. Ling, D.G. Wilkins, Opiate recidivism in a drug-treatment program: comparison of hair and urine data. *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 412-428.
- [40] O. Sabzevari, K. Abdi, M. Amini, A. Shafiee, Application of a simple and sensitive GC-MS method for determination of morphine in the hair of opium abusers. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 120-124.

- [41] M.R. Moeller, P. Fey, R. Wennig, Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 185-206.
- [42] Hoeld K.M., Wilkins D.G., Rollins D.E., Simultaneous Quantitation of Cocaine, Opiates, and Their Metabolites in Human Hair by Positive Ion Chemical Ionization Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 125-130.
- [43] C. Jurado, M.P. Gimenez, M. Menendez, M. Repetto, Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 165-174.
- [44] P. Kintz, P. Mangin, Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci. Int.* 73 (1995) 93-100.
- [45] M. Montagna, C. Stramesi, C. Vignali, A. Groppi, A. Poletti, Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 157-167.
- [46] C. Girod, C. Staub, Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 261-271.
- [47] D. Wilkins, D.E. Rollins, J. Seaman, H. Haughey, G. Krueger, R. Foltz, Quantitative determination of codeine and its major metabolites in human hair by gas chromatography-positive ion chemical ionization mass spectrometry: a clinical application. *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 269-274.
- [48] Y. Nakahara, Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 733 (1999) 161-180.
- [49] H.P. Junker, Einsatzmöglichkeiten der Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) zum Nachweis von forensisch-toxikologisch relevanten Verbindungen in biologischen Matrices. (2004)
- [50] H. Sachs, W. Arnold, Results of comparative determination of morphine in human hair using RIA and GC/MS. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27 (1989) 873-877.
- [51] M. Cassani, V. Spiehler, Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 175-184.
- [52] F. Tagliaro, R. Valentini, G. Manetto, F. Crivellente, G. Carli, M. Marigo, Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licences. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 121-128.

- [53] V. Spiehler, Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 249-259.
- [54] H. Sachs, M. Uhl, G. Hege-Scheuing, E. Schneider, Analysis of fentanyl and sufentanil in hair by GC/MS/MS. *Int. J. Legal Med.* 109 (1996) 213-215.
- [55] M. Uhl, Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 169-179.
- [56] D.W. Lachenmeier, L. Kroener, F. Musshoff, B. Madea, Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 472-478.
- [57] K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. *Anal. Chem.* 76 (2004) 4358-4363.
- [58] R. Kronstrand, I. Nystrom, J. Strandberg, H. Druid, Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 183-190.
- [59] T.Y. Wu, M.R. Fuh, Determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine by online solid-phase extraction and ion-pairing liquid chromatography with detection by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 775-780.
- [60] H.H. Maurer, Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS). *Clin. Biochem.* 38 (2005) 310-318.
- [61] M. Wood, M. Laloup, M. Ramirez Fernandez Mdel, K.M. Jenkins, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 227-238.
- [62] M. Thevis, H. Geyer, D. Bahr, W. Schanzer, Identification of fentanyl, alfentanil, sufentanil, remifentanil and their major metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Eur. J. Mass. Spectrom.* 11 (2005) 419-427.
- [63] H. Sachs, D. Thieme, P. Anielski, LC-MS-MS Screening auf Piritramid und andere Opioide in Haaren. *Tagungsband, XIII. GTFCh-Symposium, Ausgewählte Aspekte der Forensischen Toxikologie.* (2003).
- [64] N. Gamaleya, F. Tagliaro, A. Parshin, A. Vrublevskii, G. Bugari, R. Dorizzi, S. Ghielmi, M. Marigo, Immune response to opiates: new findings in heroin

- addicts investigated by means of an original enzyme immunoassay and morphine determination in hair. *Life Sci.* 53 (1993) 99-105.
- [65] S.A. Sweeney, R.C. Kelly, J.A. Bourland, T. Johnson, W.C. Brown, H. Lee, E. Lewis, Amphetamines in hair by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 418-424.
- [66] J. Segura, C. Stramesi, A. Redon, M. Ventura, C.J. Sanchez, G. Gonzalez, L. San, M. Montagna, Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 724 (1999) 9-21.
- [67] C. Moore, D. Deitermann, D. Lewis, B. Feeley, R.S. Niedbala, The detection of cocaine in hair specimens using micro-plate enzyme immunoassay. *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 609-612.
- [68] M. Oehme, *Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen*, Hüthig, Heidelberg, 1996.
- [69] B. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley, Chichester, West Sussex, 2003.
- [70] Food and Drug Administration and Center for Veterinary Medicine, Guidance for Industry 118: Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues. <http://www.fda.gov/cvm/guidance/dguide118.doc>. (2003).
- [71] European Commission, Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Community* L221. (2002) 8-36.
- [72] F. Musshoff, H. Sachs, D. Thieme, Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyte, 2. Untersuchung von Haarproben. *Toxichem & Krimtech.* 71 (2004) 140-145.
- [73] World Anti Doping Agency, Standard for Laboratories. <http://www.wada-ama.org/en/t1.asp>. (2003).
- [74] Society of Hair Testing, <http://www.soht.org>. (2005).
- [75] SAMSHA, Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. <http://workplace.samsha.gov>. (2005).
- [76] G. Schmitt, M. Herbold, F. Peters, *Methodenvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor*, Arvecon GmbH, 2003.
- [77] S. Berndt, C. Maier, H.W. Schutz, Polymedication and medication compliance in patients with chronic non-malignant pain. *Pain.* 52 (1993) 331-339.
- [78] J. Williams, P.N. Patsalos, Z. Mei, G. Schapel, J.F. Wilson, A. Richens, Relation between dosage of carbamazepine and concentration in hair and

- plasma samples from a compliant inpatient epileptic population. *Ther. Drug Monit.* 23 (2001) 15-20.
- [79] S. Pichini, I. Altieri, P. Zuccaro, R. Pacifici, Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin. Pharmacokinet.* 30 (1996) 211-228.
- [80] K. Wolff, J. Strang, Therapeutic drug monitoring for methadone: scanning the horizon. *Eur. Addict. Res.* 5 (1999) 36-42.
- [81] H.H. Maurer, Role of gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization in clinical and forensic toxicology, doping control, and biomonitoring. *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 247-254.
- [82] P. Kintz, P. Bundeli, R. Brenneisen, B. Ludes, Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 231-236.
- [83] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 554-560.
- [84] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 359-364.
- [85] H. Sachs, G. Schwarz, ELISA - pre-test in Hair analysis for illicit drugs. Workshop 2002 of the Society of Hair Testing (SoHT), Berlin, Germany. (2005).
- [86] K. Esbensen, *Multivariate Data Analysis in Practice*, 5th edition ed., CAMO Process AS, Oslo, Norway, 2001.
- [87] R.G. Brereton, Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst.* 125 (2000) 2125-2154.
- [88] M. Backmund, Substitution und Heroin-Substitutionsbehandlung - eine kurze Übersicht. *Suchtmed.* 3 (2001) 225-228.
- [89] C.M. Selavka, A.P. Mason, C.D. Riker, S. Crookham, Determination of fentanyl in hair: the case of the crooked criminalist. *J. Forensic Sci.* 40 (1995) 681-685.
- [90] J. Jones, K. Tomlinson, C. Moore, The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine, and oxycodone in hair and oral fluid. *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 171-175.
- [91] K.A. Hadidi, J.K. Almasad, T. Al Nsour, S. Abu-Ragheib, Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC-MS. *Forensic Sci. Int.* 135 (2003) 129-136.

- [92] A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin, HPLC/MS determination of buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids and hair samples. *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 111-114.
- [93] H. Hoja, P. Marquet, B. Verneuil, H. Lotfi, J.L. Dupuy, G. Lachatre, Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 160-165.
- [94] W. Naidong, X. Jiang, K. Newland, R. Coe, P. Lin, J. Lee, Development and validation of a sensitive method for hydromorphone in human plasma by normal phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 697-704.
- [95] M. Dawson, B. Fryirs, T. Kelly, J. Keegan, L.E. Mather, A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry method for the quantitation of oxycodone in human plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 40-44.
- [96] J. Martens-Lobenhoffer, W. Romhild, Quantitative determination of piritramide in human serum applying liquid chromatography-two-stage mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 783 (2003) 53-59.
- [97] J. Day, M. Slawson, R.A. Lugo, D. Wilkins, Analysis of fentanyl and norfentanyl in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using electrospray ionization. *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 513-516.
- [98] M. Rothe, F. Pragst, Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples. *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 236-240.
- [99] F. Tagliaro, Z. De Battisti, F.P. Smith, M. Marigo, Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *Lancet.* 351 (1998) 1923-1925.
- [100] S. Darke, W. Hall, S. Kaye, J. Ross, J. Duflou, Hair morphine concentrations of fatal heroin overdose cases and living heroin users. *Addiction.* 97 (2002) 977-984.
- [101] R. Kronstrand, R. Grundin, J. Jonsson, Incidence of opiates, amphetamines, and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose. *Forensic Sci. Int.* 92 (1998) 29-38.
- [102] A. Dobler-Mikola, S. Pfeifer, V. Müller, A. Uchtenhagen, Vergleich Methadon- und Heroinverschreibungen in der Schweiz. *Suchttherapie.* 1 (2000) 63-66.
- [103] D.G. Wilkins, P.R. Nagasawa, S.P. Gygi, R.L. Foltz, D.E. Rollins, Quantitative analysis of methadone and two major metabolites in hair by positive chemical ionization ion trap mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 355-361.

- [104] B.A. Goldberger, A.G. Darraj, Y.H. Caplan, E.J. Cone, Detection of methadone, methadone metabolites, and other illicit drugs of abuse in hair of methadone-treatment subjects. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 526-530.
- [105] F. Sporkert, F. Pragst, Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 746 (2000) 255-264.
- [106] A. Marsh, M.B. Evans, J. Strang, Radioimmunoassay of drugs of abuse in hair. Part 2: The determination of methadone in the hair of known drug users. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 829-839.
- [107] A.C. Lucas, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, P. Fernandez, S. Strano-Rossi, Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 225-232.
- [108] C. Girod, C. Staub, Methadone and EDDP in hair from human subjects following a maintenance program: results of a pilot study. *Forensic Sci. Int.* 117 (2001) 175-184.
- [109] S. Paterson, R. Cordero, M. McPhillips, S. Carman, Interindividual dose/concentration relationship for methadone in hair. *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 20-23.
- [110] L. Pötsch, H.P. Eser, G. Skopp, M.R. Moeller, Zum Suchtmittelnachweis in Haaren. VII. Untersuchungen bei Methadonpatienten unter konstanter Wirkstoffaufnahme. *Rechtsmed.* 8 (1998) 47-50.
- [111] P. Kintz, H.P. Eser, A. Tracqui, M. Moeller, V. Cirimele, P. Mangin, Enantioselective separation of methadone and its main metabolite in human hair by liquid chromatography/ion spray-mass spectrometry. *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 291-295.
- [112] J.W. de Vos, P.J. Geerlings, B.W. van den, J.G. Ufkes, W.H. van, Pharmacokinetics of methadone and its primary metabolite in 20 opiate addicts. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 48 (1995) 361-366.
- [113] F. Tennant, J. Shannon, Cocaine abuse in methadone maintenance patients is associated with low serum methadone concentrations. *J. Addict. Dis.* 14 (1995) 67-74.
- [114] T. Mieczkowski, D. Barzelay, B. Gropper, E. Wish, Concordance of three measures of cocaine use in an arrestee population: hair, urine, and self-report. *J. Psychoactive Drugs.* 23 (1991) 241-249.
- [115] R.L. DuPont, W.A. Baumgartner, Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 63-76.

- [116] S. Magura, S.Y. Kang, The validity of self-reported cocaine use in two high-risk populations. *NIDA Res. Monogr.* 167:227-46. (1997) 227-246.
- [117] F. Ursitti, J. Klein, E. Sellers, G. Koren, Use of hair analysis for confirmation of self-reported cocaine use in users with negative urine tests. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 39 (2001) 361-366.
- [118] H. Myrick, S. Henderson, B. Dansky, C. Pelic, K.T. Brady, Clinical characteristics of under-reporters on urine drug screens in a cocaine treatment study. *Am. J. Addict.* 11 (2002) 255-261.
- [119] S. Magura, R.C. Freeman, Q. Siddiqi, D.S. Lipton, The validity of hair analysis for detecting cocaine and heroin use among addicts. *Int. J. Addict.* 27 (1992) 51-69.
- [120] S. Magura, S.Y. Kang, Validity of self-reported drug use in high risk populations: a meta-analytical review. *Subst. Use. Misuse.* 31 (1996) 1131-1153.
- [121] M. Fendrich, T.P. Johnson, S. Sudman, J.S. Wislar, V. Spiehler, Validity of drug use reporting in a high-risk community sample: a comparison of cocaine and heroin survey reports with hair tests. *Am. J. Epidemiol.* 149 (1999) 955-962.
- [122] P.W. Appel, J.H. Hoffman, H.T. Blane, B. Frank, R. Oldak, M. Burke, Comparison of self-report and hair analysis in detecting cocaine use in a homeless/transient sample. *J. Psychoactive Drugs.* 33 (2001) 47-55.
- [123] A. Nyamathi, B. Leake, D. Longshore, L. Gelberg, Reliability of homeless women's reports: concordance between hair assay and self report of cocaine use. *Nurs. Res.* 50 (2001) 165-171.
- [124] H.M. Colon, R.R. Robles, H. Sahai, The validity of drug use self-reports among hard core drug users in a household survey in Puerto Rico: comparison of survey responses of cocaine and heroin use with hair tests. *Drug Alcohol Depend.* 67 (2002) 269-279.
- [125] J. Kline, S.K. Ng, M. Schittini, B. Levin, M. Susser, Cocaine use during pregnancy: sensitive detection by hair assay. *Am. J. Public Health.* 87 (1997) 352-358.
- [126] T. Grant, Z. Brown, C. Callahan, H. Barr, A.P. Streissguth, Cocaine exposure during pregnancy: improving assessment with radioimmunoassay of maternal hair. *Obstet. Gynecol.* 83 (1994) 524-531.
- [127] C.M. Callahan, T.M. Grant, P. Phipps, G. Clark, A.H. Novack, A.P. Streissguth, V.A. Raisys, Measurement of gestational cocaine exposure: sensitivity of infants' hair, meconium, and urine. *J. Pediatr.* 120 (1992) 763-768.
- [128] T. Mieczkowski, R. Newel, Comparing hair and urine assays for cocaine and marijuana. *Fed. Probat.* 57 (1993) 59-67.

- [129] H. Sachs, U. Dressler, Detection of THCCOOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up. *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 239-247.
- [130] H. Sachs, F. Musshoff, D. Thieme, Proposal for hair analysis guidelines in forensic toxicology. 3rd European Meeting of the Society of Hair Testing, Heraklion, Crete, October 6-8. (2003).
- [131] S. Balabanova, P.J. Arnold, V. Luckow, H. Brunner, H.U. Wolf, [Tetrahydrocannabinols in hair of hashish smokers]. *Z. Rechtsmed.* 102 (1989) 503-508.
- [132] S. Balabanova, H.U. Wolf, Methadone concentrations in human hair of the head, axillary and pubic hair. *Z. Rechtsmed.* 102 (1989) 293-296.
- [133] C. Offidani, R.S. Strano, M. Chiarotti, Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 105-108.
- [134] P. Mangin, P. Kintz, Variability of opiates concentrations in human hair according to their anatomical origin: head, axillary and pubic regions. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 77-83.
- [135] P. Kintz, P. Mangin, Opiate concentrations in human head, axillary, and pubic hair. *J. Forensic Sci.* 38 (1993) 657-662.
- [136] V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 175-182.
- [137] G.L. Henderson, M.R. Harkey, C. Zhou, R.T. Jones, P. Jacob, III, Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. dose-response relationships. *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 1-12.
- [138] Y. Nakahara, K. Takahashi, R. Kikura, Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol. Pharm. Bull.* 18 (1995) 1223-1227.
- [139] S. Schulzeck, C. Maier, G. Rochholz, H.W. Schutz, [Value of "medication screening" in therapy for chronic pain]. *Schmerz.* 13 (1999) 133-137.
- [140] T. Uematsu, Utilization of hair analysis for therapeutic drug monitoring with a special reference to ofloxacin and to nicotine. *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 261-268.
- [141] T. Uematsu, M. Nakashima, M. Fujii, K. Hamano, M. Yasutomi, S. Kodaira, T. Kato, K. Kotake, H. Oka, T. Masuike, Measurement of 5-fluorouracil in scalp hair: a possible index of patient compliance with oral adjuvant chemotherapy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 50 (1996) 109-113.
- [142] J. Williams, P.N. Patsalos, J.F. Wilson, Hair analysis as a potential index of therapeutic compliance in the treatment of epilepsy. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 113-122.

- [143] J.H. Beumer, I.J. Bosman, R.A. Maes, Hair as a biological specimen for therapeutic drug monitoring. *Int. J. Clin. Pract.* 55 (2001) 353-357.
- [144] A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin, Hair analysis: a worthless tool for therapeutic compliance monitoring. *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 183-189.
- [145] P. Kintz, C. Marescaux, P. Mangin, Testing human hair for carbamazepine in epileptic patients: is hair investigation suitable for drug monitoring? *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 812-815.
- [146] Y. Gaillard, G. Pepin, Testing hair for pharmaceuticals. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 733 (1999) 231-246.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katrin Lachenmeier
Geburtsdatum: 15.5.1978
Geburtsort: Bonn-Bad Godesberg
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1984-1988 Grundschule Sankt Augustin
1988-1997 Albert-Einstein-Gymnasium Sankt Augustin, Abitur

Ausbildung zur Lebensmittelchemikerin

1997-2001 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Bonn,
Erstes Staatsexamen
2002-2003 Praktika
• Fachlabor zur Qualitätssicherung und Kontrolle von Lebensmitteln,
Aachen
• Amt für Umweltschutz und Lebensmittelüberwachung, Köln
• Amt für Umweltschutz und Lebensmitteluntersuchung, Bonn
• Chemisches Untersuchungsinstitut, Leverkusen
• Institut für Lebensmittel- und Umweltuntersuchungen, Köln
16.4.2003 Zweites Staatsexamen

Wissenschaftliche Arbeit

2001 Studentische Hilfskraft am Institut für Lebensmittelwissenschaften und
Lebensmittelchemie der Universität Bonn, Anfertigung einer
wissenschaftlichen Arbeit mit dem Thema: „Untersuchung und Optimierung
der Festphasenextraktion polyphenolischer Verbindungen für die
Bieranalytik“
2003-2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Rechtsmedizin der Universität
Bonn, Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema: „Methoden und
Methodenkombination zur forensisch-toxikologischen Haaranalytik und
Anwendung in klinischen Studien“

Sankt Augustin, 21. März 2006