

Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Virchow Klinikum  
Institut für Rechtsmedizin  
Abteilung Forensische Toxikologie

**Nachweis von toxikologisch relevanten Wirkstoffen in Nägeln  
und Haaren mittels Flüssigkeitschromatographie –  
Massenspektrometrie – Kopplung (LC – MS/MS)**

Publikationsbasierte Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität  
Berlin



vorgelegt von  
Franziska Krumbiegel  
geboren in Chemnitz

Juli 2016







Die Arbeit wurde in der Zeit von 2012 bis 2016 am Institut für Rechtsmedizin der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Tsokos angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Tsokos
2. Gutachterin: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Disputation am: 12.10.2016



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Michael Tsokos möchte ich sowohl für die Bereitstellung dieses interessanten und anspruchsvollen Themas am Institut für Rechtsmedizin in der Abteilung Forensische Toxikologie danken, als auch für seine unermüdliche Unterstützung bei jeglichen Problemen und Fragstellungen.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Dr. Maria Kristina Parr von der Freien Universität Berlin für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Ihre zielgerichtete Betreuung und die damit verbundenen Anregungen waren immer sehr hilfreich und wertvoll für mich.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin und im Speziellen der Abteilung Forensische Toxikologie, insbesondere Frau Dr. Sieglinde Herre und Herrn Dr. Martin Hastedt für ihre unglaubliche Unterstützung, danken. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte, von ihren Erfahrungen lernen zu können. Herrn Dr. Martin Hastedt danke ich von ganzem Herzen, dass er immer an meiner Seite war, wenn ich ihn gebraucht habe und er auch nach seinem Ausscheiden immer ein offenes Ohr für mich hatte. Ich möchte außerdem Herrn Prof. Dr. Fritz Pragst für seine hilfreichen und vor allem erfahrungsreichen Ratschläge danken.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei Lena Westendorf, Carmen Hoffmann, Isabell Mroske, Sibylle Menzel, Dagmar Simmert, Denise Sonntag, Maximilian Methling, André Niebel, Denise Thurmann und Andrea Handt für ihre großartige Unterstützung und die vielen schönen und lustigen Momente. Selbstverständlich sei an dieser Stelle auch den Praktikanten Susann Eichberg, Marcel Neumann, Simone Kottke und Nathalie Le Bret für die Unterstützung und die schöne Zeit gedankt. Den Oberärzten Herrn PD Dr. Sven Hartwig und Herrn Dr. Lars Oesterhelweg möchte ich ebenfalls für das stets offene Ohr und die vielen Ratschläge danken.

Zu guter Letzt möchte ich Julia Thomas, meinen Eltern (auch den Angeheirateten), meinen Geschwistern, meiner Oma und meinen Freunden für ihre Unterstützung in jeglicher Art danken. Ich möchte Florens und Leander Thomas dafür danken, dass sie zu meinem Leben gehören.





# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG</b>	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 DROGEN- UND ARZNEIMITTELMISSBRAUCH IN DEUTSCHLAND</b>	<b>6</b>
<b>1.2 BEDEUTUNG DER HAARANALYTIK BEI TOXIKOLOGISCHEN FRAGESTELLUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>1.3 ABSCHÄTZUNG DER GEFÄHRDUNG DES KINDESWOHLS MITTELS HAARANALYSE</b>	<b>9</b>
<b>1.4 NOTWENDIGKEIT EINER ALTERNATIVEN MATRIX FÜR DEN RETROSPEKTIVEN SUBSTANZNACHWEIS</b>	<b>9</b>
<b>1.5 VERWENDETE MESSTECHNIKEN</b>	<b>10</b>
1.5.1 FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT TRIPLE – QUADRUPOLE – MASSENSPEKTROMETER	10
1.5.2 FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT QUADRUPOLE – TIME – OF – FLIGHT – MASSENSPEKTROMETER	12
<b>1.6 METHODENVALIDIERUNG NACH DEN RICHTLINIEN DER GESELLSCHAFT FÜR TOXIKOLOGISCHE UND FORENSISCHE CHEMIE</b>	<b>14</b>
<b>1.7 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT</b>	<b>15</b>
<b>2 HINTERGRÜNDE ZUR HAAR- UND NAGELANALYSE</b>	<b>18</b>
<b>2.1 HAARE ALS UNTERSUCHUNGSMATRIX</b>	<b>18</b>
2.1.1 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES HAARES	18
2.1.2 WACHSTUMSZYKLEN DER HAARE	20
2.1.3 EINLAGERUNGSWEGE IN DAS HAAR	21
2.1.4 EINFLUSS AUF DIE ANALYTKONZENTRATION IN HAAREN DURCH DIE HAARKOSMETIK	23
<b>2.2 DER NAGEL ALS UNTERSUCHUNGSMATRIX</b>	<b>24</b>
2.2.1 PHYSIOLOGIE UND ANATOMIE DES NAGELS	24
2.2.2 WACHSTUM DER NÄGEL	25
2.2.3 MÖGLICHE EINLAGERUNGSWEGE IN DEN NAGEL	25
<b>2.3 VERGLEICHENDE BEOBACHTUNGEN DER BEIDEN MATRICES HAAR UND NAGEL</b>	<b>26</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
<b>3.1 MANUSKRIFT I:</b>	<b>28</b>
3.1.1 ZUSAMMENFASSUNG	28
3.1.2 PUBLIKATION	31
<b>3.2 MANUSKRIFT II:</b>	<b>32</b>
3.2.1 ZUSAMMENFASSUNG	32
3.2.2 PUBLIKATION	34
<b>3.3 MANUSKRIFT III:</b>	<b>36</b>
3.3.1 ZUSAMMENFASSUNG	36
3.3.2 PUBLIKATION	38
<b>3.4 MANUSKRIFT IV:</b>	<b>40</b>
3.4.1 ZUSAMMENFASSUNG	40
3.4.2 PUBLIKATION	41
<b>3.5 MANUSKRIFT V:</b>	<b>42</b>
3.5.1 ZUSAMMENFASSUNG	42
3.5.2 PUBLIKATION	44
<b>4 ABGRENZUNG DER EIGENLEISTUNG</b>	<b>46</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>48</b>
<b>5.1 BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE UND EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>48</b>
<b>5.2 AUSBLICK UND ZUKÜNFTIGE FRAGESTELLUNGEN</b>	<b>53</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>54</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>7 SUMMARY</b>	<b>58</b>
<b>8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>62</b>
8.1 VERÖFFENTLICHUNGEN IN INTERNATIONALEN/NATIONALEN FACHZEITSCHRIFTEN MIT PEER-REVIEW-VERFAHREN	62
8.2 VORTRÄGE UND POSTERBEITRÄGE	64
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>10 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>78</b>
<b>11 ANHANG</b>	<b>80</b>
11.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
11.2 TABELLENVERZEICHNIS	80
11.3 MANUSKRIPTE	82

## Abkürzungsverzeichnis

<b>6-MAM</b>	<b>6-Monoacetylmorphin</b> (primärer Heroinmetabolit)
<b>DDD</b>	<b>Defined Daily Dose</b> (angenommene mittlere Tagesdosis)
<b>EDDP</b>	<b>2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin</b>
<b>ESI</b>	<b>Elektrospray Ionisation</b>
<b>FASD</b>	<b>Fetal Alcohol Spectrum Disorder</b>
<b>GTFCh</b>	<b>Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie</b>
<b>GUS</b>	<b>General Unknown Screening</b>
<b>GC-MS</b>	<b>Gaschromatographie mit Massenspektrometer</b>
<b>HILIC</b>	<b>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</b>
<b>HPLC-DAD</b>	<b>High Performance Liquid Chromatography</b> (Hochleistungsflüssigchromatographie) mit <b>Diodenarraydetektor</b>
<b>LC - MS/MS</b>	<b>Liquid Chromatography</b> (Flüssigchromatographie) mit <b>Massenpektrometer/Massenspektrometer</b> (Tandemmassenspektrometrie)
<b>LC-QQQ-MS</b>	<b>Liquid Chromatography</b> (Flüssigchromatographie)-Triple <b>Quadrupol-Massenspektrometrie</b>
<b>LLOQ</b>	Untere Bestimmungsgrenze ( <b>Lower Limit of</b> <b>Quantification</b> )
<b>LOD</b>	Nachweisgrenze ( <b>Limit of Detection</b> )
<b>MDMA</b>	<b>3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin</b>
<b>MDE</b>	<b>3,4-Methylenedioxy-N-ethylamphetamin</b>
<b>Mio.</b>	<b>Millionen</b>
<b>MPU</b>	<b>Medizinisch-Psychologische-Untersuchung</b>
<b>MRM</b>	<b>Multiple-Reaction-Monitoring</b>
<b>m/z</b>	<b>Masse/Ladungszahl</b>
<b>ng/mg</b>	<b>Nanogramm/Milligramm</b>
<b>NSAR</b>	<b>Nichtsteroidales Antirheumatikum</b>
<b>PPI</b>	<b>Protonenpumpeninhibitor</b> (-hemmer)
<b>Q1</b>	<b>Quadrupol 1</b>
<b>Q3</b>	<b>Quadrupol 3</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>QC</b>	<b>Quality Control</b> (Qualitätskontrolle)
<b>QQQ</b>	Triple <b>Q</b> uadropol
<b>QTOF</b>	<b>Q</b> uadropol- <b>T</b> ime- <b>O</b> f- <b>F</b> light
<b>RSD</b>	<b>R</b> elative <b>S</b> tandard <b>D</b> eviation (relative Standardabweichung)
<b>SIDS</b>	<b>S</b> udden <b>I</b> nfant <b>D</b> eath <b>S</b> ndrome (Plötzlicher Kindstod)
<b>SOHT</b>	<b>S</b> ociety of <b>H</b> air <b>T</b> esting
<b>THC</b>	delta-9- <b>T</b> etrahydrocannabinol
<b>TOF</b>	<b>T</b> ime- <b>O</b> f- <b>F</b> light

## 1 Einleitung

### 1.1 Drogen- und Arzneimittelmisbrauch in Deutschland

Laut Drogen- und Suchtbericht aus dem Jahr 2016 [1] sind ca. 2,3 Mio. Menschen in Deutschland medikamentenabhängig, wobei Schmerz-, Beruhigungs- und Schlafmittel im Vordergrund stehen. Neben einer tatsächlichen Abhängigkeit nehmen weitere ca. 4,6 Mio. Menschen Arzneimittel missbräuchlich ein. Das bedeutet, dass die Arzneimittel für eine andere Indikation, in einer anderen Dosierung oder für einen längeren Zeitraum eingenommen werden, als therapeutisch indiziert. Insgesamt haben 61,9% aller der Erwachsenen (18 - 64 jährig) angegeben, dass sie im Jahr 2012 Schmerzmittel eingenommen haben. Antidepressiva nahmen 6,2% ein und Neuroleptika wurden von 1,4% der Bevölkerung konsumiert. Der Anteil der Frauen bei dem Arzneimittelkonsum ist dabei deutlich höher als der Anteil der Männer.

Erfahrungen mit illegalen Rauschmitteln haben 25% der deutschen Bevölkerung schon einmal gemacht. Wie in Abbildung 1 ersichtlich, ist die Anzahl der Drogentoten in Deutschland seit dem Jahr 2009 mit 1331 bis 2012 kontinuierlich gefallen. Im Jahr 2013 stieg die Anzahl der Drogentoten von 944 auf 1001. Im Jahr 2014 ist die Zahl der Drogentote auf 1032 und im Jahr 2015 in Berlin wiederum um knapp 19% gestiegen.

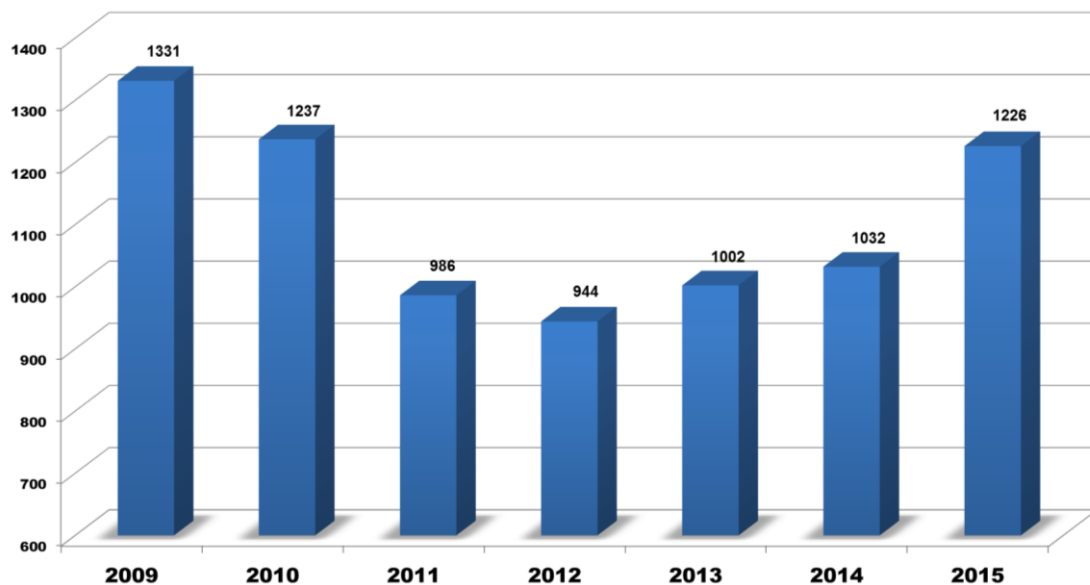


Abbildung 1: Anzahl der Drogentoten in Deutschland nach [1]

Dabei wurde die Aufnahme von Opiaten bei rund 1/3 der Drogentoten, häufig auch in Kombination mit anderen Rauschmitteln, als todesursächlich eingestuft.

In Deutschland sind 319.000 Menschen von Cannabis, Cocain und/oder Amphetaminen abhängig. Männer konsumieren dabei deutlich mehr und/oder häufiger illegale Rauschmittel als Frauen. Die Zahl der erstaufrälligen Konsumenten sogenannter harter Drogen stieg im Jahr 2015 auf 20.890 und somit um 3,8% zum Vorjahr an.

Die Zahlen des Drogen- und Suchtberichtes verdeutlichen die Problematik des weit verbreiteten Konsums von illegalen Rauschmitteln und des Missbrauchs von Arzneimitteln in Deutschland. Der Konsum eines illegalen Rauschmittels hat nicht nur einen Einfluss auf die betreffende Person, sondern zwangsläufig auch auf Personen im Umfeld des Konsumenten. Nimmt eine Person unter dem Einfluss von Rauschmitteln aktiv am Straßenverkehr teil, kann dies neben der Gefahr für andere Verkehrsteilnehmer auch zu einem Entzug des Führerscheins wegen mangelnder Fahreignung führen. Der Rauschmittelkonsum von Eltern hat unter Umständen einen enormen Einfluss auf das Wohl des Kindes. Weiterhin spielt der Missbrauch von Rauschmitteln eine Rolle bei arbeitsrechtlichen Fragestellungen, Sorgerechts-Streitigkeiten und Klärung von Schuldfähigkeit.

### **1.2 Bedeutung der Haaranalytik bei toxikologischen Fragestellungen**

Im Rahmen einer forensisch toxikologischen Untersuchung von Todesfällen dienen verschiedene Asservate dazu, sowohl die Beeinflussung des/der Betroffenen durch Alkohol, Drogen oder Arzneimittel abzuschätzen bzw. eine Intoxikation ausschließen zu können [2]. Um eine akute Beeinflussung oder Intoxikation nachweisen zu können, werden vorrangig Blut- und Urinproben untersucht. Aufgenommene Substanzen können in der Regel im Blut lediglich einige Stunden und im Urin wenige Tage nach dem Eintritt des Todes nachgewiesen werden [3].

Anhand der Konzentration der entsprechenden Substanzen im Blut kann eingeschätzt werden, ob in einem Fall eine Intoxikation vorlag oder nicht. Durch die Gewöhnung an bestimmte Substanzen wie u.a. Opiate oder Alkohol, können sehr hohe Blutkonzentrationen von gewöhnten Personen überlebt werden, die man in einer gutachterlichen Stellungnahme normalerweise schon als letal-komatös einschätzen muss. Eine differenzierte Betrachtungsweise kann mit der Einschätzung einer Substanzgewöhnung durchgeführt werden. Die Einschätzung einer Gewöhnung wird im Rahmen der Leichentoxikologie hauptsächlich mittels Haaranalyse durchgeführt [2, 3]. Die Abschätzung einer möglichen

Gewöhnung spielt so zum Beispiel bei Heroin- und Alkoholintoxikationen eine wichtige Rolle. Hierbei kommt es im Rahmen der Abhängigkeit im Laufe der Zeit zu einem zunehmenden Substanzkonsum. Aufgrund einer Toleranzentwicklung können sehr hohe Blutkonzentrationen der jeweiligen Substanz noch überlebt werden, welche bei einer nicht gewöhnten Person bereits todesursächlich sein können.

Bei einer langen Liegezeit eines Leichnams kommt es häufig vor, dass Blut und Urin für eine toxikologische Untersuchung nicht mehr zur Verfügung stehen. Neben der Analyse von Organen, welche lediglich Hinweise auf eine subakute Beeinflussung geben können, kann die Untersuchung der Haare einen Aufschluss über das Konsumverhalten in den letzten Monaten vor dem Todeseintritt geben.

Mit Hilfe der Haaranalyse ist es möglich, ein deutlich größeres Nachweisfenster als mit der Blut- oder Urinanalyse abzudecken. Je nach Haarlänge kann eine Substanzaufnahme, welche Monate zurückliegt, noch nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung einer Haarprobe macht man es sich somit zu Nutze, dass aufgenommene Substanzen in das Haar eingelagert werden. Je häufiger eine Substanzaufnahme in einer bestimmten Zeitspanne erfolgt, desto größer ist die eingelagerte Substanzmenge im Haar. Eine zeitlich zurückliegende wiederholte Substanzaufnahme oder chronische Substanzaufnahme mit der Folge einer Gewöhnung kann mit Hilfe der Haaranalyse belegt werden [2, 4-7].

Die Untersuchung von Haarproben spielt auch eine sehr wichtige Rolle bei lebenden Personen. Im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung kann man mittels der Haaranalyse eine Abstinenzbehauptung belegen mit dem Ziel der Führerscheinwiedererlangung [8-10]. Aber auch bei anderen Fragestellungen wie u.a. bei Sorgerechtsstreitigkeiten im Rahmen eines Gerichtsverfahrens kann ein Abstinenzbeleg mit Hilfe der Haaranalyse von großer Bedeutung sein [11]. Die Haaranalyse kann auch bei klinisch toxikologischen Fragestellungen ein wichtiges Hilfsmittel darstellen. Unter anderem werden Haaranalysen als Abstinenzkontrolle in der Transplantationsmedizin, vorrangig bei Lebertransplantationen wo eine Alkoholabstinenz essentiell ist, oder als Beleg einer regelmäßigen Substanzaufnahme bei einem Therapeutischen Drug Monitoring z.B. zur Kontrolle einer regelmäßigen Aufnahme von Psychopharmaka im Rahmen einer Behandlung von psychischen Erkrankungen eingesetzt [12].

### **1.3 Abschätzung der Gefährdung des Kindeswohls mittels Haaranalyse**

Durch den Missbrauch oder die Abhängigkeit der Eltern von Drogen, Alkohol oder Arzneimitteln, kann das Kindeswohl auf unterschiedliche Weise gefährdet sein. Durch den Konsum von Rauschmitteln während der Schwangerschaft kann das ungeborene Kind schon im Mutterleib geschädigt werden [13-17].

Ein erhöhter Alkoholkonsum vor der Geburt des Kindes kann zu Fehlentwicklungen, welche unter den Begriff "Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD)" zusammengefasst werden, führen. Drogenkonsum während der Schwangerschaft erhöht deutlich das Risiko für das Auftreten des plötzlichen Kindstodes (sudden infant death syndrome - SIDS) [18, 19].

Wenn häufiger und regelmäßiger Rauschmittelkonsum der Eltern im Umfeld des Kindes stattfindet, besteht die Möglichkeit, dass dies zu Vernachlässigung, Misshandlungen, fehlender Erziehung, Fehlernährung, Armut und sozialer Verwahrlosung des Kindes führt und dass das Kind in direkten Kontakt kommt und damit verbunden ist eine mögliche, unbeabsichtigte Aufnahme von Rauschmitteln. Es besteht die Gefahr einer Intoxikation mit diesen Substanzen. Zur Abschätzung einer Kindeswohlgefährdung, kann die Haaranalyse der Eltern und Kinder ein Hilfsmittel sein [20]. Häufig geben die Eltern einen Umgang oder Missbrauch mit illegalen Rauschmitteln nicht zu, da sie Angst vor den Konsequenzen haben. Mit Hilfe der Haaranalyse, als retrospektive Analysetechnik, kann somit ein Konsum von Drogen der Eltern aufgedeckt und ebenfalls mit der Kinderhaarprobe dessen Umgang mit Drogen abgeschätzt werden [21-24].

Die Abklärung, ob eine Gefährdung des Kindeswohles besteht, kann auch im Rahmen eines Sorgerechtsstreits relevant sein, bei dem eine Haaranalyse der Eltern richterlich angeordnet werden kann.

### **1.4 Notwendigkeit einer alternativen Matrix für den retrospektiven Substanznachweis**

Die Untersuchung von Haaren bietet sehr viele Möglichkeiten und hat ihre größten Vorteile in dem enormen Nachweisenfenster gegenüber den Matrices Blut, Urin, Speichel und der nicht invasiven Probengewinnung. Ein Nachweis einer chronischen oder länger zurückliegenden Aufnahme von körperfremden Substanzen ist je nach Haarlänge über Monate bis Jahre möglich [2]. Damit wird nicht nur die Möglichkeit gegeben, Gewöhnungen an Substanzen



nachzuweisen, sondern auch Abstinenzbehauptungen zu unterstützen oder ein therapeutisches Drug Monitoring durchzuführen. Im Gegensatz zur Matrix Haar können Blut, Speichel, Schweiß und Urin nur ein kurzes Nachweisfenster von einigen Stunden bis wenigen Tagen abdecken und stellen immer nur Momentaufnahmen dar. Eine kontinuierliche Kontrolle über eine therapeutische Substanzaufnahme oder über ein Abstinenzverhalten kann nur mittels der Haaranalytik gewährleistet werden bzw. durch häufig frequentierte Blut- bzw. Urinanalysen.

Bei Personen mit sehr kurzen Haaren oder wenig Behaarung (häufig bei Männern, älteren Personen, Babys oder bei krankheitsbedingten Ursachen), können gegebenenfalls nur kurze Zeiträume mittels Haaranalyse betrachtet werden. Als Folge der Haarprobenentnahme kann eine kosmetische Beeinträchtigung bei sehr kurzen oder sehr wenigen Haaren nicht vermieden werden, da mindestens 200 mg Haare (zwei bleistiftstarke Strähnen) für die Analyse benötigt werden. Außerdem kann die Haarkosmetik einen großen Einfluss auf die Analytkonzentration im Haar haben. Unter anderem kann die Anwendung von alkoholhaltigen Kosmetika (Haarschaum, Gel, Wachs) zu falsch positiven Ergebnissen für Fettsäureethylester als Alkoholmarker führen [25]. Weiterhin kann häufiges Waschen der Haare die Analytkonzentration im Haar herabsenken. Auch das Bleichen, Färben oder Tönen der Haare kann einen sehr großen Einfluss auf die Analytkonzentration haben [26]. Bei Brandleichen oder Leichen in einem weit fortgeschrittenen Fäulniszustand, stehen unter Umständen keine Haare mehr für eine Analyse zur Verfügung.

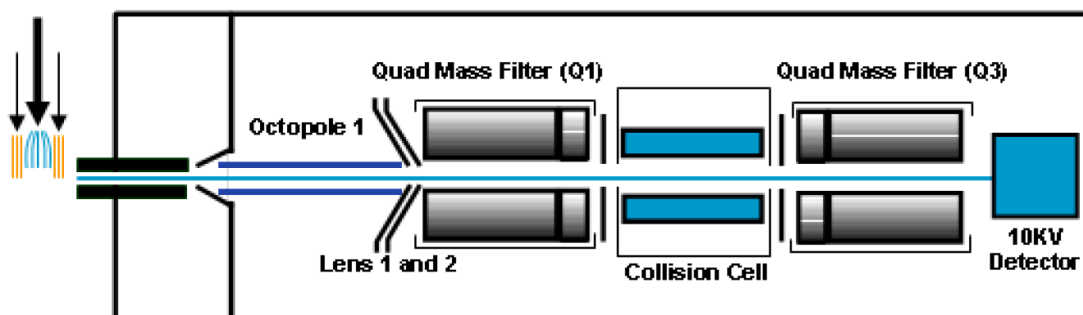
Daher ist es notwendig, alternative Matrices für einen retrospektiven Substanznachweis für den Fall zu etablieren, dass keine Haare oder nur kosmetisch behandelte Haare für eine Untersuchung zur Verfügung stehen [27].

## **1.5 Verwendete Messtechniken**

### **1.5.1 Flüssigchromatographie mit Triple – Quadrupol – Massenspektrometer**

Der quantitative Nachweis der Substanzen in Haar- und Nagelproben erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels LC-QQQ-MS (Flüssigchromatographie mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometer). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Messtechnik mit sehr hoher Empfindlichkeit, meist großem linearem Bereich für die Quantifizierung und guter Massenauflösung. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Umkehrphasen Säule (Reversed Phase) C18. Der Vorteil der Flüssigchromatographie liegt darin, dass Eigenschaften wie Thermostabilität und Verdampfbarkeit der Analyten im Gegensatz zur

Gaschromatographie keine Rolle spielen. Bei der Flüssigchromatographie ist die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und die Trennleistung jedoch in der Regel schlechter als bei der Gaschromatographie.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Triple Quadrupol Massenspektrometers**  
(Die Abbildung wurde von der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.)

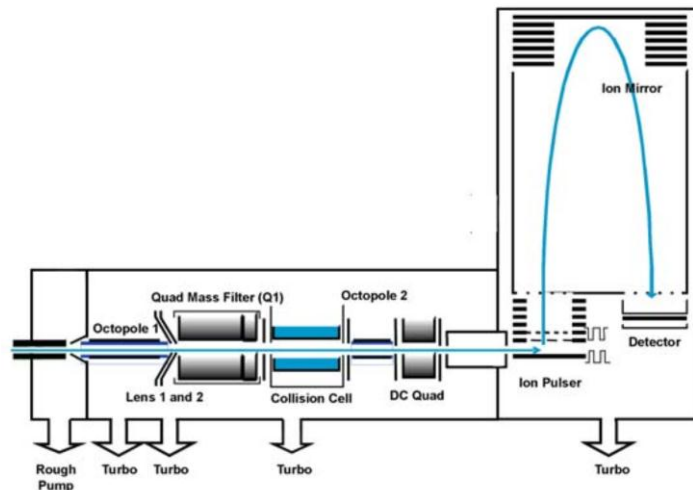
Nach der chromatographischen Trennung des Analytgemisches werden die Analyten zur Ionenquelle transportiert. Hier werden mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) schonend hauptsächlich Molekülionen der Analyten gebildet. Ein Großteil des Lösemittels wird durch hohe Temperaturen in der Quelle verdampft und durch die sogenannten Coulombexplosionen entstehen aus den Analyten, die sich zuvor in mehrfach geladene Mikrotröpfchen befanden, Analytionen. Danach gelangen die entstandenen Analytionen mittels eines elektrischen Feldes durch eine Transferkapillare in das Massenspektrometer. Durch drei hintereinander geschaltete Quadrupole können in der Tandemmassenspektrometrie Analyten im Femtogramm Bereich nachgewiesen werden. Der erste Quadrupol (Q1) kann als Massenfilter dienen (siehe Abbildung 2), der zweite Quadrupol ist die sogenannte Kollisionszelle. In der Kollisionszelle treffen die Vorläuferionen auf ein inertes Gas (z.B. Stickstoff oder Argon) und fragmentieren durch einen Aufprall mit den neutralen Molekülen. Der dritte Quadrupol (Q3) kann die zuvor entstandenen Fragmente bzw. Produktionen (Product-Ions) aus der Kollisionszelle selektieren. Durch das Ein- und Ausschalten der verschiedenen Quadrupole ergeben sich u.a. folgende Messmodi, welche bei unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt werden können: (1) Im Full-Scan-Modus gelangen alle Analyten in einem bestimmten Massenbereich  $m/z$  zum Detektor. In diesem Modus ist die Messempfindlichkeit sehr gering, da keine Einschränkung der detektierten Analyten stattfindet. Daher wird dieser Messmodus häufig im Rahmen der Messmethodenentwicklung verwendet, indem eine Einzelsubstanz in Lösung unter der Umgehung der Säule, direkt in das Massenspektrometer gelangt und ein Precursor-Ion bzw. Vorläuferion für die Einzelsubstanz festgelegt werden kann. (2) Der Product-Ion-Scan dient dazu, alle Fragmente des zuvor festgelegten

Precursor-Ion (Vorläuferion) aufzunehmen. Somit dient der Q1 als Massenfiter und in der Kollisionszelle werden die zuvor festgelegten Vorläuferionen fragmentiert. Der Q3 dient in diesem Modus jedoch nicht als Massenfiter und lässt alle entstandenen Produktionen zum Detektor. Die Fragmentierung des Vorläuferions in bestimmte Produktionen (Product-Ions) stellt einen sogenannten Massenübergang dar. Die bei der Fragmentierung auftretenden Übergänge eines Vorläuferions zu einer Produktion (Product-Ion) werden als Massenübergänge bezeichnet. In diesem Messmodus können die besten und stärksten Massenübergänge für eine Substanz ausgewählt werden. (3) Bei dem Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) handelt es sich um eine zweifache Massenselektion, da sowohl der Q1 als auch der Q3 als Massenfiter fungieren. In dieser Messmethode erreicht man eine sehr hohe Messempfindlichkeit, da nur zuvor ausgewählte Massenübergänge detektiert werden. Je mehr Analyte in einer Messmethode erfasst werden sollen und je mehr Massenübergänge in einem bestimmten Zeitfenster aufgenommen werden, desto geringer wird die Messempfindlichkeit.

Der intensivste Massenübergang wird in der Regel für die Quantifizierung und der zweit- und gegebenenfalls drittstärkste Massenübergang als sogenannter "Qualifier" genutzt. Um eine Substanz valide identifizieren zu können, müssen beide Übergänge in einem bestimmten Verhältnis und zu einer zuvor ermittelten Retentionszeit auftreten.

### **1.5.2 Flüssigchromatographie mit Quadrupol – Time – Of – Flight – Massenspektrometer**

Die Flüssigchromatographie mit Quadrupol-Time-Of-Flight-Massenspektrometer (LC-QTOF-MS) wird vorzugsweise für den qualitativen Nachweis von Substanzen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das LC-QTOF-MS für die gleichzeitige qualitative und quantitative Analyse von NSARs in Haarproben von Todesfällen verwendet. Die Bildung der Molekülonen erfolgt mit Hilfe der schonenden ESI (vgl. 1.5.1). Die entstandenen Molekülonen gelangen über eine Glaskapillare vom Atmosphärendruck aus der Ionenquelle in das Hochvakuum, welches im Massenspektrometer herrscht. Beim LC-QTOF-MS (Abbildung 3) dient der Quadrupol (Q1) als Massenfiter. Hier kann vor der Messung ein bestimmter Massenbereich definiert werden. Alle Ionen, die eine kleinere oder größere Masse aufweisen, werden nicht weiter zur Kollisionszelle geleitet. In der Kollisionszelle (Hexapol), welche mit einem inerten Gas gefüllt ist, entstehen durch den Aufprall der Analytionen auf neutrale Moleküle spezifische Fragmente. In dieser Arbeit wurde als Kollisionsgas Stickstoff verwendet.



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Time-Of-Flight Massenspektrometers**

(Die Abbildung wurde von der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.)

Im TOF-Analysator findet dann schlussendlich die Trennung der Fragmentionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluggeschwindigkeiten statt. Alle Ionen besitzen annähernd die gleiche kinetische Energie, jedoch benötigen sie aufgrund des unterschiedlichen Masse zu Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) unterschiedlich lang um zum Reflektor am höchsten Punkt im Flugturm zu gelangen und von dort aus den Detektor zu erreichen. Kleine und leichtere Ionen benötigen eine kürzere Zeit um zum Detektor zu gelangen als größere und schwerere Ionen. Durch den doppelten Flugweg, einmal zum höchsten Punkt im Flugturm und dann nach der Reflexion zum Detektor am tiefsten Punkt des Flugturms, werden minimale Unterschiede der kinetischen Energie der einzelnen Ionen ausgeglichen und die Massenauflösung wird erhöht. Für die durchgeführten Messungen wurden zwei Messmodi verwendet. Während des MS-Modus ist der Q1 auf Durchlass gestellt und in der Kollisionszelle werden keine Fragmente gebildet. Es gelangen alle Molekülionen aus der Quelle direkt in den Flugturm. Bei einem MS/MS-Experiment lässt der erste Quadrupol nur bestimmte Ionen in einem bestimmten Massenbereich hindurch. In der Kollisionszelle werden diese Ionen substanzspezifisch fragmentiert, so dass ein bestimmtes Spektrum von Fragmenten bzw. Produktionen entsteht. Für den qualitativen Nachweis wurde im Auto-MS/MS Modus gemessen. In diesem Modus werden also datenabhängige hochaufgelöste Full-Scan-Spektren aufgenommen, wobei das Gerät immer zwischen MS- und MS/MS-Modus wechselt. In diesem Modus werden Datenfiles mit spezifischen Produktionenspektren aufgenommen. Diese können zur Identifizierung mit den Spektren der im Hause erstellten Bibliothek verglichen werden [28, 29]. Die Identifizierung von Substanzen erfolgt zusätzlich mittels der Retentionszeit, welche in der Bibliothek verzeichnet ist. Durch die höhere Messempfindlichkeit im MS-Modus, wird dieser für die Quantifizierung verwendet. Hier werden keine Produktionenspektren aufgenommen,

sondern lediglich das Vorläuferion mit der akkuraten Masse und die Retentionszeit für die Identifizierung verwendet.

### **1.6 Methodvalidierung nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie**

Die durchgeführten Methodvalidierungen erfolgten alle nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) [30]. Die Methodvalidierung dient dazu, einen Nachweis und eine Dokumentation der Zuverlässigkeit der Methode zu erbringen. Somit ist sie die Grundvoraussetzung für Qualität und Vergleichbarkeit. Die mit einer validierten Methode gewonnenen Analysenergebnisse sind im Streitfall nur schwer anfechtbar, was vor allem im Rahmen einer toxikologischen Untersuchung unerlässlich ist. Nach den Richtlinien der GTFCh werden folgende Parameter einer Nachweismethode überprüft: Selektivität der Messmethode, Linearität des Kalibrierbereiches, Genauigkeit, Stabilität, Analytische Grenzen, sowie Matrixeffekte und Wiederfindung. Für die Selektivität werden sechs Leerproben ohne internen Standard vermessen sowie zwei Zero-Proben (Leermatrix mit Zusatz von internem Standard). Mit diesen Messungen soll ausgeschlossen werden, dass Signale zu den entsprechenden Retentionszeiten zu sehen sind, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die Kalibrierproben (Leermatrix plus Analyte) werden 6-fach vermessen und mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95%) wird auf Ausreißer getestet. Die Varianzhomogenität wird mittels F-Test zwischen der höchsten und niedrigsten Konzentration oder mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Vorgabe Signifikanz: 99%) bestimmt. Bei gegebener Varianzhomogenität kann die lineare Regression verwendet werden. Ist diese nicht gegeben, kann alternativ ein gewichtetes Kalibrationsmodell verwendet werden (z.B.  $1/x$ ,  $1/x^2$ ). Für die Genauigkeit werden zwei homogene Pools hergestellt (niedrig und hohe Konzentration). An mindestens 5 verschiedenen Tagen werden die beiden Pools doppelt vermessen. Es wird auf Wiederholpräzision (an der Bestimmungsgrenze ist eine relative Standardabweichung (RSD) von 20% erlaubt, sonst 15%) und Laborpräzision (an der Bestimmungsgrenze 20% RSD, sonst 15%) getestet. Weiterhin wird das gemeinsame Akzeptanzintervall als Kombination von Bias und Präzision (95%  $\beta$ -Toleranzintervall) überprüft. Die Stabilität der Analyte wird mittels 6 Qualitätskontrollen (QCs) bei einer niedrigen und hohen Konzentration innerhalb der Routinebearbeitungszeiten untersucht. Es werden nur die absoluten Peakflächen verwendet ohne die Berücksichtigung des internen Standards. Die Abweichungen der absoluten

Peakflächen zwischen den Prüftagen dürfen maximal 25% betragen. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden mit 5 verschiedenen Kalibratoren nach DIN 32645 bestimmt [31]. Bei der Bestimmungsgrenze darf der akzeptierte Bias bei  $\pm 20\%$  liegen sowie die Präzisionsdaten mit einer  $RSD \leq 20\%$  bei einer Signifikanz von 99%. Die Matrixeffekte und die Wiederfindung werden mit Hilfe einer Reinsubstanzlösung, aufgestockten Matrixproben (Analytenzugabe vor Extraktionsschritt) und aufgestockten Leermatrixextrakten (Analytenzugabe nach Extraktionsschritt) bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt. Die Matrixeffekte dürfen zwischen 75 – 125% liegen und die Wiederfindung muss mehr als 50% betragen.

### **1.7 Zielstellung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit hat sich mit dem retrospektiven Nachweis einer chronischen oder mehrfachen zeitlich zurückliegenden Substanzaufnahme beschäftigt. In der Routine werden für diesen Nachweis die Haare herangezogen. Es sollten sowohl neue Fragestellung mit einem retrospektiven Nachweis von Substanzaufnahmen beantwortet, als auch eine alternative Matrix für Haare untersucht und geprüft werden.

Im Detail war es also das Ziel der Arbeit einerseits die Haaranalytik zu nutzen, um auf eine Korrelation zwischen einer Langzeitaufnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und dem Auftreten von gastrointestinalen Läsionen anhand von Todesfällen aus dem Sektionsgut des Instituts zu prüfen. Andererseits sollten Fuß- und Fingernägel als alternative Matrix für die retrospektive Analysentechnik getestet werden.

Die Haaranalytik wird seit vielen Jahren sehr intensiv erforscht. Durch die Möglichkeit der kontinuierlichen Kontrolle einer Substanzaufnahme, wie zum Beispiel von Arzneimitteln, illegalen Rauschmitteln oder von Alkohol, können verschiedene Untersuchungen angestellt werden. Es besteht die Möglichkeit, eine länger zurückliegende eventuell chronische Arzneimittelaufnahme aufzudecken und diese mit organischen Befunden der Obduktion in Korrelation zu setzen. Wie sich in einer Studie zuvor gezeigt hat, konnte mit Hilfe der Blutergebnisse, welche nur einen Überblick über aufgenommene Substanzen in den letzten Stunden vor dem Eintritt des Todes geben können, keine signifikante Korrelation zwischen gastrointestinalen Läsionen und der Aufnahme von NSAR gefunden werden. Es sollte nun untersucht werden, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Langzeiteinnahme von NSAR und gastrointestinalen Läsionen mittels Haaranalyse gezeigt werden kann. Zu

Beginn der Arbeit stand bereits eine validierte Methode für den Nachweis von NSAR in Haaren zur Verfügung. Eine große Anzahl von Haarproben aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin sollte aufgearbeitet, gemessen und ausgewertet werden.

Für den Nachweis des Umgangs bzw. Konsums von Rauschmitteln wurden 2011 bis 2014 Haarproben von Eltern und Kindern untersucht, um eine Kindeswohlgefährdung einschätzen zu können. Es sollte dabei getestet werden, ob Kinder in Kontakt mit Rauschmitteln kommen und eine Gefahr des Kindeswohles durch die Umgebung des Kindes besteht. Die Haarproben sollten in bestimmten Abständen untersucht werden, um eine Entwicklung des Konsumverhalten der Eltern darstellen zu können und im besten Falle die Mitarbeit der Eltern zu belegen und ihnen damit das Sorgerecht für ihre Kinder zu lassen.

Zusätzlich wurde an Konsummarkern in Haaren geforscht, welche es ermöglichen, zwischen verschiedenen Konsumformen von Cocain zu unterscheiden. Hierbei handelte es sich um die Konsumformen des traditionellen Kauens von Cocablättern und dem illegalen Konsum von Cocapaste. Der quantitative Nachweis der Cocaalkaloide sollte einen Aufschluss darüber bringen, wie sich die Konzentrationen der Cocaalkaloide in den einzelnen Herstellungsschritten ändern. Die Untersuchung der einzelnen Zwischenprodukte bei der Herstellung der Cocapaste sollte zeigen, bei welchen Herstellungsschritten die potentiellen Konsummarker verloren gehen und in welchen Konzentrationen sie in der Cocapaste noch nachweisbar sind.

Weiterhin war es Ziel der Arbeit, eine alternative Matrix zu Haaren für einen retrospektiven Nachweis einer Substanzaufnahme zu testen. Es sollten zunächst mehrere Haar- und Nagelproben von Todesfällen mit einer ungerichteten Suchanalyse untersucht und die qualitativen Ergebnisse der beiden Matrices miteinander verglichen werden. Da sich in dieser Studie zeigte, dass die Ergebnisse der Haar- und der Nagelanalyse vergleichbar waren, stellte sich die Aufgabe, eine sensitive Quantifizierungsmethode zu entwickeln und nach den Richtlinien der GTFCh zu validieren. Ziel war es hierbei Methoden für den gerichteten Nachweis von verschiedenen illegalen Rauschmitteln und Psychopharmaka für gemahlene Haar- und Nagelproben zu etablieren. Für die Anwendung der Methoden an Realproben standen Haar- und Nagelproben aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin zur Verfügung. Mittels Substanzkonzentrationen in Haaren und Nägeln, sowie die Segmentierung dieser beiden, sollten weitere Hinweise auf die Einlagerungswege der Substanzen in die Nagelmatrix gefunden werden.



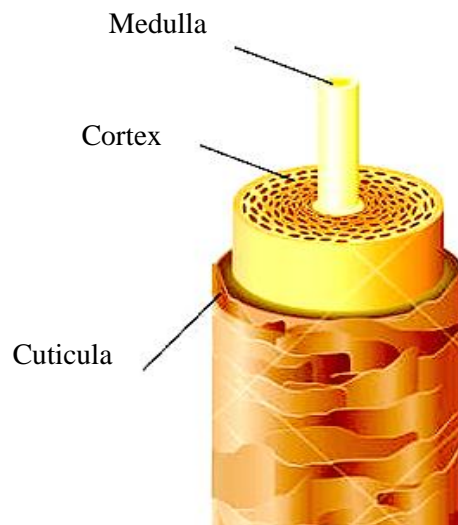


## 2 Hintergründe zur Haar- und Nagelanalyse

### 2.1 Haare als Untersuchungsmatrix

#### 2.1.1 Anatomie und Physiologie des Haares

Haare befinden sich fast überall an unserem Körper und dienen hauptsächlich zum Schutz der Haut und zur Temperaturkontrolle. Oberhalb der Haut befindet sich der Haarschaft, welcher aus keratinisierten Zellen besteht. Der Haarschaft lässt sich in drei Schichten einteilen: Medulla, Cortex und Cuticula (Abbildung 4). Die Medulla bildet den Markkanal und ist aus unregelmäßig angeordneten Zellen aufgebaut. Der Cortex bildet die Schicht um den Markkanal und besteht hauptsächlich aus längs angeordneten Fasern und macht den Großteil des Haarschaftes aus. Die äußerste Schicht wird auch als Schuppenschicht (Cuticula) bezeichnet und besteht aus den verhornten und abgestorbenen Zellen [32].

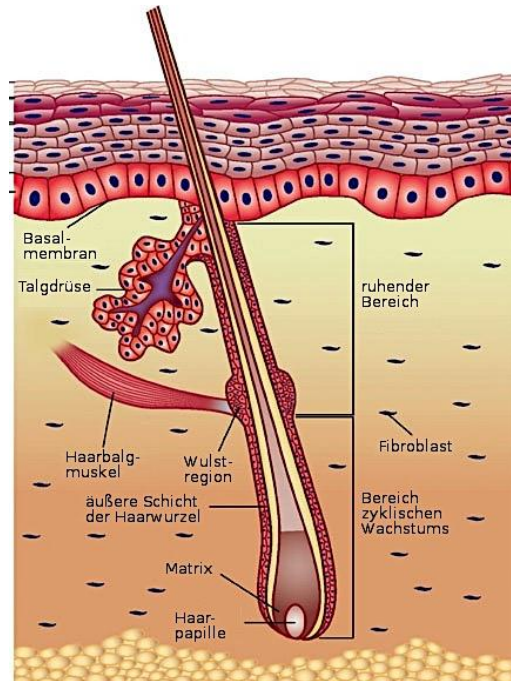


**Abbildung 4: Aufbau des Haarschaftes**

Quelle: <http://thumbs.dreamstime.com/x/diagramm-eines-balgs-einem-querschnitt-von-s-35012099.jpg>; letzter Zugriff: 17.06.2016

In der Dermis befindet sich die Haarwurzel, welche aus lebenden Zellen besteht und mit dem Blutkreislauf verbunden ist. In der Papille befinden sich die teilungsaktiven Matrixzellen, die durch die Blutbahn mit wichtigen Nährstoffen versorgt werden. Durch die ständige Teilung der Matrixzellen schieben sich die neu gebildeten verhornten Zellen nach oben, bis sie schließlich aus der Haut herausgeschoben werden.

Die neu gebildeten Zellen bestehen hauptsächlich aus Keratin und Melanin, welche durch die Keratinozyten und Melanozyten produziert werden. Bei der Substanz Melanin handelt es sich um ein schwarzes, braunes oder rötliches Pigment, das sowohl die Haare, als auch die Haut und Augen färbt. Das wasserunlösliche Faserprotein Keratin bildet die Grundsubstanz für Haare und Nägel beim Menschen. Die Biegsamkeit und Festigkeit wird hauptsächlich durch die Anzahl der Disulfidbrücken zwischen den Polypeptid-Ketten bestimmt.



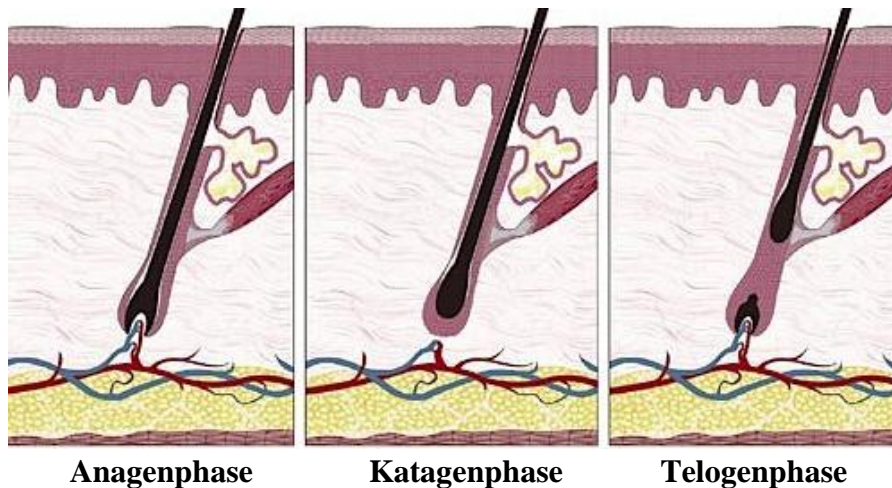
**Abbildung 5: Aufbau des Haares in seiner physiologischen Umgebung**

Quelle: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/94/Anatomy\\_of\\_the\\_skin\\_de.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/94/Anatomy_of_the_skin_de.jpg); letzter Zugriff: 17.06.2016

Jedes einzelne Haar besitzt an der Wulstregion einen Haarbalgmuskel, der für das Aufstellen der Haare verantwortlich ist und eine Talgdrüse, welche das Sebum bildet (Abbildung 5). Durch das Sebum werden nicht nur die verhornten Zellen geschmeidig gehalten, sondern die Sebumschicht dient ebenfalls als Schutz vor Krankheitserregern und anderen Umwelteinflüssen [33, 34].

### 2.1.2 Wachstumszyklen der Haare

Haare haben insgesamt drei Wachstumsstadien. Eingeteilt werden diese Stadien in die Anagen-, Katagen-, und Telogenphase (Abbildung 6). Während der Anagenphase befindet sich das Haar im Wachstum. Die Haarpapille wird mit Nährstoffen über die Blutbahn versorgt und Melanin und Keratin werden produziert. Danach folgt die Katagenphase, in der keine Zellteilung mehr stattfindet. In dieser Zeit wird das zuvor entstandene Haar von der Haarwurzel abgetrennt. Nach der Katagenphase folgt die Telogenphase, welche auch als Ruhephase bezeichnet wird. In dieser Phase ist das Haar nicht mehr mit der Wurzel und somit auch nicht mehr mit der Blutbahn verbunden [35, 36]. Etwa 5 – 20% der Kopfhaare befinden sich in diesem Zustand, der bis zu 6 Monate andauern kann, bevor das Haar ausfällt. Je nach Körperregion kann die Länge der Phasen sehr unterschiedlich sein und der Anteil der telogenen Haare kann über 50% betragen. Bei Haaren aus der Kopfregion geht man von einer Wachstumsgeschwindigkeit von 0,8 bis 1,2 cm pro Monat aus [2]. Beinhaare wachsen zum Beispiel deutlich langsamer, mit einer mittleren Wachstumsrate von 0,6 cm pro Monat. Dieses liegt daran, dass sich die Haare aus der Beinregion deutlich kürzer in der Anagenphase und länger in der Telogenphase befinden. Es muss also im Hinblick auf das mögliche Nachweisfenster differenziert werden, aus welcher Körperregion die Haare für eine Untersuchung stammen.



**Abbildung 6: Wachstumszyklen des Haares**

Quelle: <http://www.haar-ausfall.com/service/haarlexikon/wachstumszyklus/index.jsp>; letzter Zugriff: 17.06.2016

Die zu untersuchende Haarsträhne enthält je nach Entstehungsort bis zu 5 – 20% telogene Haare, also Haare, die 6 Monate im Wachstumsstillstand waren [37]. Diese Haare repräsentieren somit einen anderen Zeitraum als die Haare, welche sich zur Zeit der

Probengewinnung in der Anagenphase befanden. Bei der Untersuchung einer 6 cm langen Kopfhhaarsträhne werden somit nicht nur die letzten 6 Monate sondern maximal bis zu 12 Monate vor der Probenentnahme betrachtet. Werden die Haare jedoch bis auf Hauthöhe herunter rasiert und ausschließlich die nachgewachsenen Haare für die Analyse herangezogen, dann kann der Anteil der telogenen Haare gegen 0% gehen [2, 37].

### **2.1.3 Einlagerungswege in das Haar**

Im folgenden Abschnitt werden unterschiedliche Einlagerungswege in die Haarmatrix betrachtet und das Problem der äußeren Kontamination erläutert. Die meisten basischen Drogen und Arzneimittel gelangen vermutlich durch passive Diffusion aus dem Blut und den umliegenden Geweben in die Haarwurzel [34]. Die gemessene Konzentration einer Substanz in Haaren und die damit abgeschätzte Konsumhäufigkeit ist von der chemischen Struktur und den pharmakokinetischen Eigenschaften des Analyten abhängig. Das Pigment Melanin kann in vier unterschiedlichen Formen vorkommen. In dunklen Haaren ist hauptsächlich Eumelanin und Oxyeumelanin vorhanden, wobei in roten und blonden Haaren Phäomelanin und Oxyphäomelanin dominieren. Die gemessenen Analytkonzentrationen in dunklen Haaren sind höher als in blonden oder weißen Haaren [38]. Die Haarfarbe hat also einen wesentlichen Einfluss auf die Analytkonzentration, da die Art und Menge des Melanins bei verschiedenen Haarfarben variieren. Vor allem basische Substanzen wie Cocain, Amphetamine oder Opiate, haben eine höhere Einlagerungsrate in dunkle Haare. Es wird angenommen, dass die basischen Substanzen durch die sauren Bedingungen in den Melanozyten (pH 3 – 6) protoniert werden und somit eine Rückdiffusion deutlich erschwert wird. Saure und neutrale Substanzen werden aus diesem Grund nicht in dem Maße ins Haar eingelagert [34]. Nach der Aufnahme von Substanzen zirkulieren diese im Blutkreislauf und werden in die Wurzel der Haare, welche sich im Anagenstadium befinden, eingelagert [34]. Eine punktuelle Einlagerung ins Haar nach der Substanzaufnahme ist daher für basische Substanzen anzunehmen und das Haar kann als eine Art Zeitschreiber fungieren. Durch die Segmentierung einer Haarsträhne in z.B. 1 cm lange Abschnitte wäre es somit möglich, dass kurze Konsumphasen und Abstinenzphasen differenziert werden könnten [39-41].

Eine große Herausforderung stellt ein zeitaufgelöster Nachweis von Cannabinoiden im Haar dar. Der Analyt delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) wird fast ausschließlich über den Rauch in das Haar eingelagert und nicht von innen aus dem Körper. Dadurch kann keine

punktueller Einlagerung durch das Blut in die Haarwurzel stattfinden, da der Rauch der Cannabisprodukte (darunter fallen Haschisch oder Marihuana) sowohl auf die kopffernen als auch kopfnahen Haare gelangen kann. Der Metabolit 11-nor-9-carboxy-THC (THC-COOH) wird vermutlich über das Sebum in das Haar eingelagert, so dass nach Konsum auch nur die kopfnahen Haare der Metabolit zu finden sein sollte. Eine punktueller Einlagerung ist jedoch ebenfalls unwahrscheinlich, da das Sebum auf dem Haar spreitet [42]. Als Konsummarker hat sich der THC Metabolit bisher nicht durchgesetzt, da die meisten Routinelabors keine Messgeräte mit ausreichender Messempfindlichkeit besitzen, welche für die niedrigen Konzentrationen zwingend erforderlich sind [2, 43-46].

Analog besteht die Gefahr einer äußeren Kontamination der Haare durch Stäube (z.B. von Cocainpulver, pulverige Amphetaminzubereitungen), kontaminierte Hände mit Stäuben, durch Schweiß oder durch kontaminierte Oberflächen [47, 48]. Durch geeignete Metaboliten kann eine Körperpassage bei einigen Substanzen mittels der Haaranalyse sicher belegt werden. Wenn eine Substanzübertragung über den Schweiß z.B. bei engem Kontakt mit einem Konsumenten stattfindet, können jedoch unter Umständen auch Metabolite in den Haaren des Nicht-Konsumenten nachgewiesen werden. Weiterhin gibt es für Amphetamin bisher keine etablierten Metabolite, die eine Körperpassage belegen könnten. Für den Analyten Cocain kann der Nachweis des Metaboliten Benzoyllecgonin nicht zwangsläufig als Beweis für einen Konsum gewertet werden, da die Hydrolyse von Cocain zu Benzoyllecgonin auch außerhalb des Körpers stattfinden kann. Eine Differenzierung zwischen Umgang oder Konsum kann mit dem Nachweis von Benzoyllecgonin in Haaren also nicht erfolgen [48-50]. Der Nachweis von Norcocain in Haaren ist meist erst nach einem intensiven und regelmäßigen Cocainkonsum möglich, belegt aber mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit die Körperpassage. Als weiterer Cocainmetabolit kann Cocaethylen herangezogen werden, jedoch entsteht Cocaethylen nur, wenn Cocain gleichzeitig mit Alkohol konsumiert wird [51-53].

Ein Heroinkonsum wiederum kann gut durch den Nachweis der Stoffwechselprodukte 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) und Morphin mittels Haaranalyse belegt werden. Wird jedoch Morphin allein im Haar nachgewiesen, dann sollte von einer Aufnahme von Morphin, zum Beispiel als Schmerzmittel, ausgegangen werden [54].

Um eine bessere Abgrenzung zwischen Konsum und Umgang zu belegen, können die Konzentrationsverhältnisse des Metaboliten zur Muttersubstanz herangezogen werden. Es sind viele Untersuchungen diesbezüglich gemacht worden, um valide Konzentrationsverhältnisse zu etablieren, die eine bessere Unterscheidung zwischen Konsum und Umgang mit illegalen Rauschmitteln erlauben [55-58].

Bei einigen Analyten wie zum Beispiel THC oder Amphetamin besteht somit das Problem, dass zwischen Umgang und Konsum mittels der Haaranalyse nicht mit Sicherheit unterschieden werden kann. Es muss jedoch angemerkt werden, dass in vielen Fällen der Nachweis eines bloßen Umgangs mit illegalen Rauschmitteln, wie zum Beispiel bei der Kindeswohlgefährdung, ausreichend ist, um weitere Maßnahmen einzuleiten mit dem Ziel, dass das Kind in Zukunft keinen Umgang mehr mit illegalen Betäubungsmitteln hat. In vielen anderen Fällen sollte das Ziel sein, dass die Person ihre Lebensgewohnheiten ändert und nicht mehr selbst illegale Rauschmittel aufnimmt, sich aber auch nicht mehr in dem gewohnten Umfeld aufhält, in dem konsumiert wird.

Eine Konsumhäufigkeit kann mit Hilfe der Analytkonzentrationen in Haaren abgeschätzt werden. Die Häufigkeit wird auf der Grundlage von einer sehr großen Anzahl von Haarproben eingeschätzt [59]. In dieser Studie wurden Analytkonzentrationen in mehreren 1000 Haarproben von verschiedenen Konsumentengruppen untersucht und in verschiedene Perzentile eingeordnet. Diese Werte dürfen jedoch nur als Richtwerte angesehen werden, da die eingelagerte Substanzmenge von den intraindividuellen und interindividuellen Faktoren abhängt [2]. Weiterhin muss bei solchen Untersuchungen immer in Betracht gezogen werden, dass nicht sichergestellt werden kann, dass man leichte, mittelstarke und starke Konsumenten zu gleichen Anteilen in die Studie mit eingeschlossen hat.

### **2.1.4 Einfluss auf die Analytkonzentration in Haaren durch die Haarkosmetik**

Beim Bleichen der Haare wird Wasserstoffperoxid meist in Kombination im Ammoniak verwendet. Auch beim Färben der Haaren (von dunkel nach hell) werden Peroxide eingesetzt. Bei einer Behandlung der Haare mit Wasserstoffperoxid erzielt man den größten Substanzverlust, da die Haarstruktur durch das Bleichen enorm geschädigt wird und die Analyte chemisch abgebaut werden. Durch das Aufbrechen der Haarstruktur, vorrangig durch den Einsatz von Ammoniak, kann bei häufigem Waschen der Haare die Analytkonzentration durch Auswascheffekte deutlich erniedrigt werden [60, 61].

Es ist daher zwingend notwendig, die Haarkosmetik bei der Probenentnahme im Detail zu dokumentieren [62]. Bei aggressiver Haarkosmetik kann je nach Fragestellung auf Körperhaare ausgewichen werden, sofern diese in einem ausreichenden Maße vorhanden sind.

## 2.2 Der Nagel als Untersuchungsmatrix

### 2.2.1 Physiologie und Anatomie des Nagels

Nägel werden als Hautanhangsgebilde bezeichnet. An jedem Finger, wie auch an jedem Zeh befindet sich ein Nagel. Er dient hauptsächlich als Schutz und unterstützt das Gefühl in den Finger- bzw. Fußspitzen. Der Nagel besteht aus keratinisierten verhornten Zellen, welche die Nagelplatte formen. Die farblose Nagelplatte ist der sichtbare Teil des Nagels und ist mit dem Nagelbett verbunden. Im Nagelbett befinden sich die Blutbahnen, die dem Nagel die leicht rötliche Farbe geben. Das Nagelbett reicht von der Lunula bis hin zum Hyponychium, das den Übergang zwischen Nagelbett zur normalen Epidermis bildet (Abbildung 7 [63]).

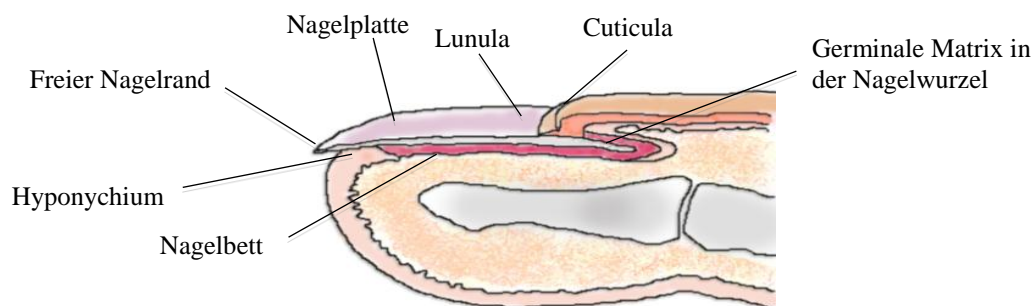


Abbildung 7: Aufbau des Nagels

Am Ende des Nagels befindet sich der freie Nagelrand, der nicht mehr in Kontakt mit dem Nagelbett steht und aus diesem Grund weißlich ist. Ebenfalls weißlich erscheint die Lunula, der Teil des Nagels, welcher sich nah an der Wurzel befindet.

Der Nagel wird in der Nagelwurzel durch die Zellen der germinalen Matrix gebildet [64]. Die Nagelwurzel befindet sich wie die Haarwurzel unter der Haut und ist nicht sichtbar. Dort werden ständig neue Zellen produziert, welche durch den Zusatz von Keratin verhornen. Die neu gebildeten Zellen schieben die alten Zellen sowohl nach vorne als auch nach oben durch die Cuticula (Nagelhaut). Es findet somit nicht nur ein Wachstum in die Länge, sondern auch in die Höhe statt. Je länger die Nagelwurzel ist, desto mehr Zellen können produziert werden und desto dicker wird die Nagelplatte [27, 64].

### **2.2.2 Wachstum der Nägel**

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Nägel an den Fingern und den Zehen ist unterschiedlich. Die Fingernägel wachsen im Durchschnitt 0,1 mm pro Tag und somit zwischen 1,9 – 4,4 mm pro Monat. Bis der komplette Fingernagel ersetzt wird, dauert es ungefähr 6 Monate. Fußnägel wachsen ca. 1/3 langsamer als Fingernägel und es dauert es zwischen 12 und 18 Monaten bis zum kompletten Ersatz [64]. Das Wachstum ist von individuellen Faktoren, wie Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand abhängig. Studien konnten belegen, dass die Nägel an unterschiedlichen Fingern bzw. Zehen in ihrer Wachstumsrate variieren. Ebenfalls wurde festgestellt, dass Nägel bei Kälte langsamer wachsen als bei Wärme. Man geht davon aus, dass 80% des Nagels durch die germinale Matrix gebildet werden und ca. 20% während der Zeit, in der sich der Nagel durch die Haut schiebt und sich mit dem Nagelbett verbindet [27, 64].

### **2.2.3 Mögliche Einlagerungswege in den Nagel**

Die Einlagerung von Substanzen in den Nagel ist bisher nur in Ansätzen geklärt [27]. Es wird jedoch vermutet, dass es drei mögliche Einlagerungswege gibt: Über die Blutbahnen, während der Nagel in der germinalen Matrix gebildet wird und während der Nagel in Kontakt mit dem gut durchbluteten Nagelbett steht oder durch den Schweiß, der sich vorrangig unter dem freien Nagelrand sammelt. Es besteht zusätzlich die Gefahr der äußeren Kontamination, welche bei den Fingernägeln höher ist, als bei Haaren. Beim Rauschmittelkonsum kann eine äußere Kontamination der Fingernägel nicht vermieden werden, da die Hände zwangsläufig in den Kontakt mit pulvrigen Zubereitungen, Tabletten, Tabakerzeugnissen oder flüssigen Zubereitungen kommen. Die Fußnägel sind dieser Kontamination nicht in dem Maße ausgesetzt, jedoch ist die Schweißproduktion höher [65-67].



### **2.3 Vergleichende Beobachtungen der beiden Matrices Haar und Nagel**

Da das Ausmaß der Speicherung in den Haaren von der Pigmentierung abhängig ist, hat die Haarfarbe einen großen Einfluss auf die Analytkonzentration im Haar [38]. Der Vorteil der Nagelanalyse besteht darin, dass in den Nägeln kein oder nur sehr wenig Melanin zu finden ist [64]. Allerdings haben bei dunkelhäutigen Menschen auch die Nägel einen höheren Melaninanteil. Durch aggressive Haarkosmetik wie Bleichen oder Färben der Haare kann die Analytkonzentration deutlich herabgesenkt werden [60]. Diese Einflussnahme ist bei Nägeln kaum gegeben. Somit ist der Proband bei der Analyse der Nägel nicht in seiner Haarkosmetik eingeschränkt. Es müssen jedoch Auswascheffekte der Analyte aus der Nagelmatrix durch häufiges Händewaschen sowie die Anwendung von Nagellack und Nagellackentferner als Einflussgrößen auf die Analytkonzentration im Nagel in Betracht gezogen und kritisch bewertet werden [27]. Bei der Probenentnahme von z.B. Fußnägeln ist eine kosmetische Beeinflussung vernachlässigbar. Bei sehr kurzen, feinen Haaren muss eine höhere Anzahl an Haaren entnommen werden, um auf ca. 200 mg Haarmaterial für die Analyse zu kommen. Dadurch kann die kosmetische Beeinträchtigung hier deutlich größer sein, als bei Personen mit langen, dichten Haaren, wo eine unauffällige Probenentnahme unterhalb des Deckhaares möglich ist. Außerdem gibt es Menschen, die krankheitsbedingt z.B. durch Alopezie, keine Haare an ihrem Körper aufweisen. Die Untersuchung der Nägel kann in diesem Fall eine nützliche Alternative sein.

Die Substanzeinlagerung ins Haar wird seit vielen Jahren intensiv erforscht und ist zu einem großen Teil aufgeklärt [2]. Weiterhin konnten Studien dazu beitragen, dass die gemessene Analytkonzentration in Haaren Hinweise auf das Konsumverhalten geben kann und man grob eine Abschätzung über einen seltenen, regelmäßigen oder häufigen Konsum vornehmen kann [59]. Dieses ist mittels Nagelanalyse aufgrund der fehlenden Datenbasis noch nicht möglich. Weiterhin ist je nach Analyt teilweise ein zeitaufgelöster Nachweis von Substanzen in Haaren durchführbar [39-41]. Eine Substanzeinlagerung über den Schweiß in den Nagel macht einen zeitaufgelösten Nachweis schwierig. Daher bedarf es weiterer Forschungsarbeit, um die Einlagerungswege und möglichen Nachweisfenster in Nägeln besser zu verstehen.



## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Manuskript I:**

**Hair analysis in the detection of long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and its relation to gastrointestinal hemorrhage: an examination of 268 hair and blood samples from autopsy cases.**

#### **3.1.1 Zusammenfassung**

Der Einsatz von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) als Analgetika, Antirheumatika, Antiphlogistika und Antipyretika ist weltweit verbreitet. Im Jahr 2011 wurden 915 Millionen Defined Daily Doses bzw. angenommene mittlere Tagesdosen (DDD) von NSAR in Deutschland verschrieben. Zusätzlich sind viele NSAR in geringer Dosierung, wie zum Beispiel Ibuprofen mit bis zu 400 mg, ohne Rezept erhältlich. In Deutschland sind NSAR apothekenpflichtig bzw. ab einer bestimmten Dosierung auch verschreibungspflichtig. Man kann jedoch unter anderem in den USA viele NSAR frei im Handel (z.B. im Supermarkt) in sehr großen Mengen zu einem sehr geringen Preis erhalten. Aufgrund dieser leichten Verfügbarkeit von nicht verschreibungspflichtigen NSAR steigt die Gefahr einer, vom Arzt nicht kontrollierten, regelmäßigen und langen Anwendung, welche wiederum das Risiko für das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen erhöhen kann. Als Nebenwirkungen sind u.a. Magenblutungen beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, zu bestätigen, dass die Langzeiteinnahme von NSAR und anderen Arzneimitteln, wie u.a. Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, Thrombozytenaggregationshemmer die Gefahr von gastrointestinalen Läsionen erhöht. Die weiteren Arzneimittel wurden ausgewählt, da diese auch in der Diskussion stehen gastrointestinale Läsionen zu begünstigen. Weiterhin wurden die Proben auf mehrere Protonenpumpenhemmer untersucht, da diese häufig in Kombination mit NSARs verschrieben werden. Mit Hilfe von Sektionsbefunden und Informationen zu der bestehenden Medikation aus der Ermittlungsakte, wurden im Vorfeld Fälle ausgewählt, wo die Einnahme von NSAR gesichert ist.

In dieser retrospektiven Untersuchung wurden Haar- und Blutproben von insgesamt 268 Todesfällen untersucht. In der Fallgruppe befanden sich 132 Todesfälle, bei denen während der Obduktion gastrointestinale Läsionen, wie unter anderem Läsionen der Speiseröhre, Läsionen der Magenschleimhaut und Läsionen im unteren Verdauungstrakt festgestellt worden sind. Als Kontrollgruppe (n = 136) wurden Todesfälle ausgewählt, bei denen während der Obduktion keine Hinweise auf gastrointestinale Läsionen gefunden wurden. Untersucht wurden die Haarproben mit einer Methode, die nach den aktuellen Richtlinien der GTFCh validiert wurde. Die Haare wurden nach dem Kleinschneiden mittels Schere für 2 x 18 Stunden in einem Puffer extrahiert und die Extrakte mittels LC-QTOF-MS im MS-Modus gemessen. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Fließmittelgradienten auf einer Umkehrphasensäule. Für die Substanzen Citalopram, Clopidogrel, Diclofenac, Fluoxetin, Lansoprazol, Omeprazol, Pantoprazol, Paroxetin, Piroxicam, Sertralin, Ticlopidin, Tirofiban und Tropiclidil lag der lineare Kalibrationsbereich zwischen 0,05 – 2,5 ng/mg Haar und für die restlichen Analyten zwischen 0,1 – 100 ng/mg Haar.

Die Blutproben wurden mit einer basisvalidierten Screeningmethode mittels HPLC-Diodenarraydetector (DAD) untersucht. Die erhaltenen Extrakte der Blutproben wurden nach Proteinfällung mittels HPLC-DAD vermessen. Die Ergebnisse der Blutanalyse dienten dazu einen Überblick darüber zu bekommen, welche Arzneimittel aktuell und zeitnah zum Todeseintritt von der entsprechenden Person eingenommen wurden. Im Gegensatz dazu ist es mittels einer 6 cm langen Haarsträhne möglich, Hinweise auf eine Arzneimitteleinnahme der letzten 6 bis 12 Monaten zu bekommen. Mit Hilfe der Blutanalysen wurden 23% der Proben in der Fallgruppe und 18% der Proben in der Kontrollgruppe positiv auf mindestens 1 NSAR getestet. Anhand der Blutproben konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen gezeigt werden. Mittels Haaranalyse konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Fallgruppe ermittelt werden, da in der Fallgruppe 67% der Haarproben auf mindestens 1 NSAR und lediglich 38% der Haarproben in der Kontrollgruppe positiv auf mindestens 1 NSAR getestet wurden (Abbildung 8). Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Haarproben mit positivem Nachweis aus der Kontrollgruppe auch aufgrund einer seltenen und kurzen NSAR-Aufnahme in den letzten 6 Monaten zurückgeführt werden können.

## Ergebnisse

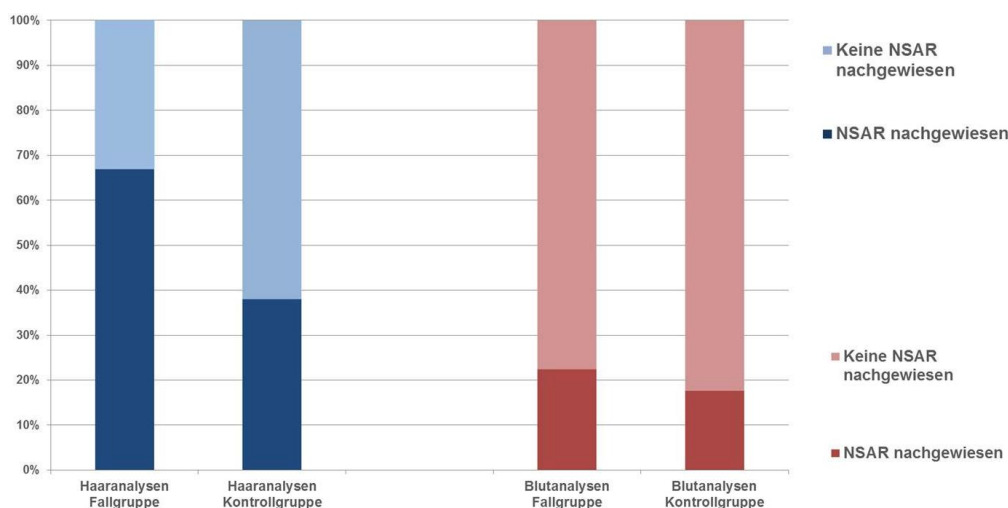


Abbildung 8: Ergebnisse der Haar- und Blutanalysen

Die Analytkonzentrationen in den positiv getesteten Haarproben lag bei 94 % über einen Grenzwert von 2 ng/mg und 64% der positiven Haarproben über einen Grenzwert von 10 ng/mg. Bei Konzentrationen über 2 ng/mg kann eine mehrmalige Substanzaufnahme vermutet werden und bei über 10 ng/mg ist von einer regelmäßigen Substanzaufnahme auszugehen. Die am häufigsten nachgewiesenen Analyten waren Salicylsäure (n = 42), Diclofenac (n = 18) und Ibuprofen (n = 13) in den Haarproben der Fallgruppe. Fälle, bei denen Salicylsäure in den Haaren nachgewiesen wurde, zeigten bei der Obduktion eine gleichmäßige Verteilung der gastrointestinalen Läsionen im Magen-Darm-Trakt. Der obere gastrointestinale Trakt war bei Fällen mit positiven Diclofenac und Ibuprofen Befund am häufigsten von gastrointestinalen Läsionen betroffenen. Insgesamt umfasste die Studie 50 Fälle, bei denen gastrointestinale Blutungen als todesursächlich eingestuft wurden. In 8 Fällen wurde Ibuprofen in den Haaren nachgewiesen, in 19 Fällen Salicylsäure und in 5 Fällen wurde in den Haaren Diclofenac nachgewiesen, bei denen die gastrointestinalen Blutungen als todesursächlich eingestuft wurden. Einen deutlichen Unterschied zwischen der Fall- und Kontrollgruppe konnte vor allem mit Hilfe des Nachweises von Diclofenac zeigen. Dieser Analyt wurde insgesamt in beiden Gruppen 23-mal in Haaren nachgewiesen. Davon gehörten 18 Haarproben der Fallgruppe an und nur lediglich 5 Haarproben der Kontrollgruppe. Die Analyten Salicylsäure und Diclofenac wurden insgesamt 78 bzw. 28-mal in den Haaren der beiden Gruppen nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Fallgruppe mit dem Nachweis der beiden Analyten konnte nicht gezeigt werden.

Anhand dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Langzeiteinnahme von NSAR die Gefahr des Auftretens von gastrointestinalen Läsionen signifikant erhöht. Die Haaranalyse machte es möglich, eine zurückliegende Aufnahme von NSAR vor dem Eintritt des Todes zu ermitteln und in einen Zusammenhang mit den Obduktionsergebnissen zu bringen.

### **3.1.2 Publikation**

**Krumbiegel F, Hastedt M, Eichberg S, Correns N, Gapert R, Hartwig S, Herre S, Tsokos M**

**Hair analysis in the detection of long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and its relation to gastrointestinal hemorrhage: an examination of 268 hair and blood samples from autopsy cases.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Mar;10(1):18-28. doi: 10.1007/s12024-013-9507-6. Epub 2013 Nov 13.

### 3.2 Manuskript II:

**Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.**

#### 3.2.1 Zusammenfassung

Der traditionelle Konsum von Bestandteilen der Cocapflanze (*Erythroxylum coca*) in Form des Kauens der Cocablätter oder als Teezubereitung, gehört für viele Menschen hauptsächlich in Südamerika, zum Alltag und ist gesellschaftlich akzeptiert. Der Konsum von Cocain als Rauschmittel ist jedoch auch in diesen Regionen illegal. Daher ist es zwingend notwendig differenzieren zu können, ob eine Person traditionell und legal Cocablätter gekaut oder das Rauschmittel Cocain als illegale pulverige Zubereitung konsumiert hat. Ziel dieser Untersuchung war es, geeignete Marker zur Differenzierung der Konsumform zu finden.

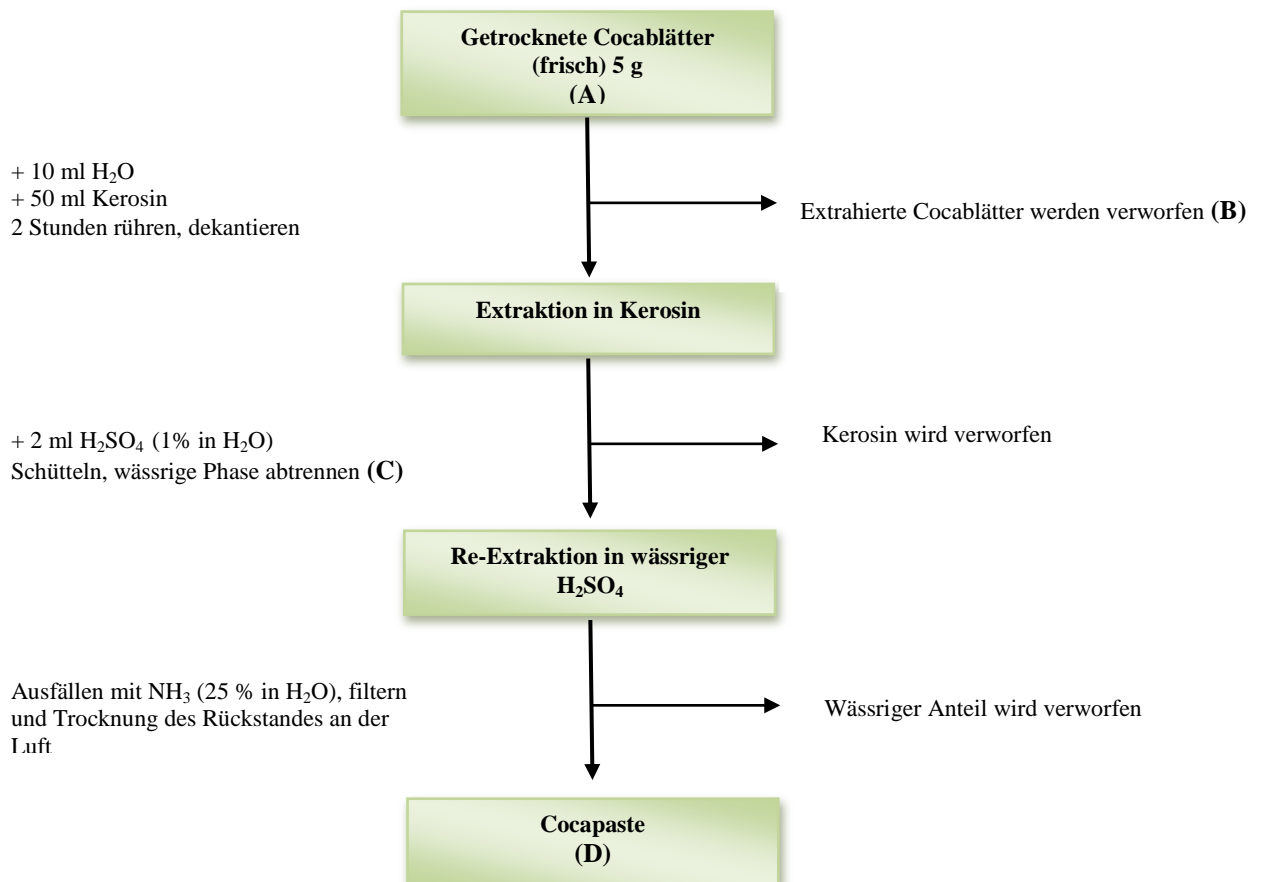
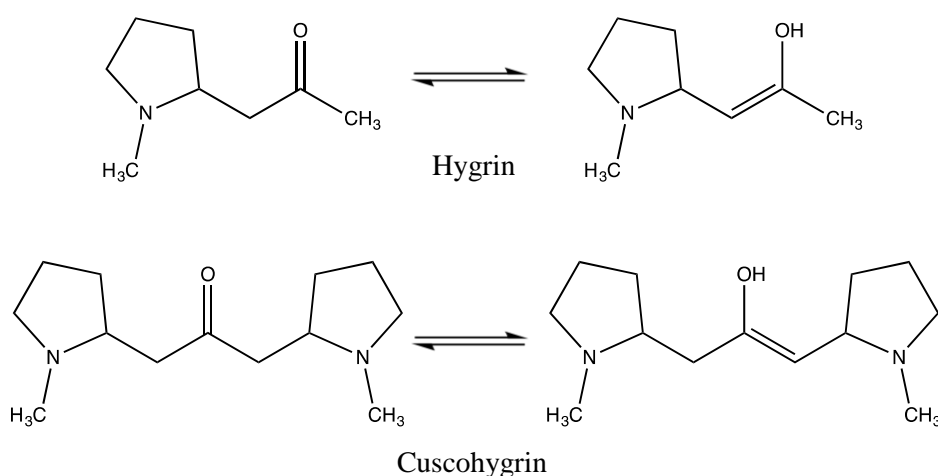


Abbildung 9: Herstellung der Cocapaste

Im Vorfeld wurden mehrere Haarproben von Cocakauern aus Argentinien und Cocainkonsumenten aus Deutschland mittels LC-QTOF-MS, LC-QQQ-MS und GC-MS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Substanzen Hygrin und Cuscohygrin nur in den Proben der Cocakauer nachgewiesen werden konnten und somit diese beiden Substanzen sich als Marker für die Differenzierung zwischen Cocakauern und Cocainkonsumenten eignen. Es galt somit nun zu klären, bei welchen Herstellungsschritten der illegalen Cocainherstellung die Alkaloide Hygrin und Cuscohygrin verloren gehen (Abbildung 9). Im Folgenden wurden (A) frische Cocablätter aus Argentinien, (B) Extrakte von Cocablättern, welche zuvor mit Wasser, Kerosin und Calciumcarbonat behandelt wurden, (C) der wässrige Extrakt nachdem Schwefelsäure hinzugegeben wurde und (D) die gewonnene Cocapaste selbst auf Cocain, Ecgoninmethylester, Cinnamoylcocain, Hygrin und Cuscohygrin mittels LC-MS/MS und analysiert.

Die chromatographische Trennung fand auf einer HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) Säule statt, welche aus hochreinem, vollständig porösem Kieselgel besteht. Der Vorteil einer HILIC Säule ist unter anderem der, dass eine Trennung von polaren Substanzen möglich ist.



**Abbildung 10: Strukturformeln von Hygrin (oben) und Cuscohygrin (unten)**

Es konnte gezeigt werden, dass die Analyten Hygrin und Cuscohygrin nur in sehr geringen Anteilen mit Kerosin extrahiert werden. Bei Kerosin handelt es sich um eine lipophile und unpolare Flüssigkeit. Die Substanzen Hygrin und Cuscohygrin sind im Verhältnis zu Kerosin hydrophiler, was durch die Stickstoffatome und der Ketogruppe (Keto-Enol-Tautomerie) begründet ist (Abbildung 10). Daher haben Hygrin und Cuscohygrin eine schlechte Löslichkeit in Kerosin. Im letzten Herstellungsschritt wird durch eine basische Fällung die Cocapaste erhalten, in der die beiden Alkaloide Hygrin und Cuscohygrin nicht



mehr nachweisbar sind. Die Gehalte an Cocain, Cinnamoylecocain, und Ecgoninmethylester in den frischen Cocablättern bis hin zur Cocapaste nimmt sehr deutlich zu. Der Anteil an Hygrin und Cuscohygrin nimmt deutlich ab, so dass nur noch in Spuren in der Cocapaste nachweisbar sind.

Anhand dieser Untersuchungen kann belegt werden, dass eine Unterscheidung zwischen legalen Cocakauen und illegalem Cocainkonsum anhand der beiden Marker Hygrin und Cuscohygrin sinnvoll und zukünftig ein wichtiger Bestandteil in der Haaranalytik und ggf. auch in anderen Matrices wie Urin sein sollte.

### **3.2.2 Publikation**

**Rubio NC, Thurmann D, Krumbiegel F, Pragst F**

**Behaviour of hygrine and cuscohydrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.**

*Drug Test Anal. 2016 Mar 22. doi: 10.1002/dta. 1972. [Epub ahead of print]*



### **3.3 Manuskript III:**

#### **Hair Analysis as a Diagnostic and Forensic Tool in a Social Support System for Families with Underage Children and Drug Abusing Parents: Four Year Experience.**

##### **3.3.1 Zusammenfassung**

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Senat für Soziales, Kinder, Jugend und Frauen der Hansestadt Bremen wurden zwischen 2011 und 2014 insgesamt 982 Haarproben auf klassische Betäubungsmittel untersucht. Davon waren 388 Haarproben von Kindern im Alter zwischen 1 – 14 Jahren, 22 Proben von Jugendlichen (zwischen 15 – 17 Jahren) und 572 Haarproben von Eltern oder verantwortlichen Bezugspersonen. Die Teilnehmer dieser Studie waren dem Jugendamt oder anderen sozialen Einrichtungen im Vorfeld durch Umgang oder Konsum von Drogen bekannt. Im Vordergrund der Untersuchungen stand es eine mögliche Gefährdung des Kindeswohls mittels der Haaranalyse auf Drogen einschätzen zu können. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich die Kinder in einem Umfeld aufhalten, in dem regelmäßig Drogen wie u.a. Methadon, Opiate, Cocain, Amphetamin, Ecstasy, Benzodiazepine oder Cannabisprodukte konsumiert werden.

Zu Beginn der Studie wurden lediglich die Haarproben der Eltern untersucht. In dem Fall, dass die Haarproben positiv auf illegale Betäubungsmittel, Substitutionsmittel und/oder Benzodiazepine getestet wurden, wurden dann ebenfalls die Haarproben der im Haushalt lebenden Kinder analysiert. Weiterhin wurden in regelmäßigen Abständen (nach 6 oder 12 Monaten) erneut Haarproben der zuvor positiv getesteten Eltern untersucht, um eine Veränderung des Umganges mit Drogen abschätzen zu können.

Die Haarproben wurden mittels LC-QTOF-MS, LC-QQQ-MS und GC-MS auf Drogen und deren Metabolite untersucht. Es konnten 31 unterschiedliche Betäubungsmittel in den Haarproben nachgewiesen werden. Insgesamt konnten in 296 Haarproben der minderjährigen Kinder mindestens 1 illegales Betäubungsmittel und/oder 1 Benzodiazepin nachgewiesen werden (Tabelle 1). Am häufigsten wurden die Analyten Cocain und THC in den Haarproben der Kinder nachgewiesen. In den Haarproben der Erwachsenen (Eltern oder verantwortliche Bezugsperson) wurden ebenfalls am häufigsten Cocain und THC nachgewiesen.

## Ergebnisse

**Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der positiv getesteten Haarproben von Kindern und Erwachsenen**

<b>Analyt</b>	<b>Positiv getestete Haarproben der Kinder [%]</b>	<b>Positiv getestete Haarproben der Erwachsenen [%]</b>
<b>6-MAM</b>	19,6	13,1
<b>Amphetamin</b>	4,7	7,8
<b>Benzodiazepine</b>	4,1	6,9
<b>Cocain</b>	50,0	43,5
<b>MDMA</b>	1,7	4,9
<b>MDE</b>	-	0,7
<b>Methadon</b>	14,5	12,6
<b>Methamphetamin</b>	-	0,2
<b>THC</b>	37,5	43,5

Die Häufigkeitsverteilung ist bei Eltern und Kinder annähernd vergleichbar. In den Haarproben der Eltern wurden additiv noch MDE und Methamphetamin in wenigen Fällen nachgewiesen.

Weiterhin wurde eine Auswertung der positiven Haarproben für die Jahre 2011, 2012, 2013 und 2014 durchgeführt, wovon im Folgenden die Maximalkonzentrationen der positiven Proben auf den jeweiligen Analyten pro Jahr dargestellt werden. Im Jahr 2011 wurden Methadon (24,6%) und Heroin (27,9%) am häufigsten in den Kinderhaarproben im Begutachtungszeitraum nachgewiesen. Im Jahr 2012 wurde der Ecstasywirkstoff MDMA mit 2,5% am häufigsten in den vier Jahren nachgewiesen. Die Analyten Cocain (56,4%) und THC (48,7%) wurden im Jahr 2013 am häufigsten im Vergleich zu den anderen Jahren nachgewiesen. Die maximale Anzahl der positiv getesteten Kinderhaarproben auf Amphetamin (7,0%) und Benzodiazepine (5,2%) war im Jahr 2014. Ebenfalls wurden gar keine Drogen in den Kinderhaarproben am häufigsten im Jahr 2014 detektiert.

Ein Großteil der Kinder, welche im selben Haushalt leben wie Drogenkonsumenten, wurde auch positiv auf diese Drogen getestet. Häufig zeigten die Kinder das gleiche Muster der verschiedenen Drogen wie die dazugehörigen Eltern. Die Analytkonzentrationen in den Kinderhaarproben waren oft deutlich geringer, als die Analytkonzentration in den Erwachsenenhaarproben. Bei einigen Analyten wie u.a. Cocain, Amphetamin und THC ist es bei einer geringen Analytkonzentration nicht möglich, zwischen Umgang und Konsum zu unterscheiden. Bei Cocain werden bestimmte Stoffwechselprodukte, welche eine Körperpassage belegen, erst bei Konzentrationen ab ca. 2 ng/mg im Haar nachgewiesen. Der Nachweis von THC oberhalb der Entscheidungsgrenze von 0,02 ng/mg Haar ist kein sicherer Beleg für eine Aufnahme von Cannabisprodukten, da die Einlagerung von THC

und THC-Säure A hauptsächlich über den Rauch bzw. über kontaminierte Finger durch das Rollen eines Joints von außen basiert, ohne dass eine tatsächliche Inkorporation stattgefunden haben muss [43]. Es steht in der Diskussion, ob der Metabolit 11-nor-9-carboxy-THC (THC-COOH) als Beleg für eine Körperpassage ausreicht, obwohl dieser Analyt vermutlich über das Sebum in das Haar gelangt, so dass eine Übertragung über das Sebum eines Konsumenten auf Kinderhaar möglich ist [43].

Anhand der Studie wurde ebenfalls deutlich, dass die jüngeren Kinder in einer Familie häufig höhere Analytkonzentrationen in ihren Haarproben aufwiesen. Hier ist darauf hinzuweisen, dass jüngere Kinder in einem viel engeren Kontakt mit den Eltern stehen und auch eine Substanzübertragung über kontaminierte Hände oder über den Schweiß der Eltern möglich ist.

Diese Studie konnte zeigen, dass die Haaranalytik eine sehr effiziente Methode ist, um einen Umgang mit Drogen in dem Umfeld von minderjährigen Kindern abschätzen zu können. Die Haaranalyse hat den enormen Vorteil eines sehr großen zeitlichen Nachweisfensters gegenüber den von Blutanalysen, welche als invasive Probenentnahme zusätzlich als sehr unangenehm von den Betroffenen empfunden wird. Aufgrund der hoch empfindlichen Messtechnik war es möglich, auch Ultraspuren der Analyten in den Haarproben nachzuweisen und damit auch einen seltenen Konsum der Eltern belegen zu können.

### **3.3.2 Publikation**

**Pragst F, Hastedt M, Krumbiegel F, Herre S**

**Hair Analysis as a Diagnostic and Forensic Tool in a Social Support System for Families with Underage Children and Drug Abusing Parents: Four Year Experience.**

*Arab Journal of Forensic Science and Forensic Medicine 2015, Volume 1 Issue (1), 130-133.*



### **3.4 Manuskript IV:**

**Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry.**

#### **3.4.1 Zusammenfassung**

Im Rahmen einer forensisch toxikologischen Untersuchung bei Todesfällen werden vorrangig Blut, Urin, Mageninhalt, Organe und in speziellen Fragestellungen auch Haare analysiert. Mittels Blutanalyse können Aussagen über eine akute Beeinflussung bis hin zu einer letalen Intoxikation getroffen werden. In der forensischen Toxikologie spielen der chronische Substanzgebrauch und die Gewöhnung eine wichtige zusätzliche Rolle. Bei einigen Todesfällen kann eine Untersuchung der Haare einen Hinweis auf eine mögliche Gewöhnung an bestimmte Substanzen, wie zum Beispiel Heroin, geben. Mit Hilfe der zusätzlichen Haaranalyse ist meist eine bessere und individuellere Einschätzung der Substanzkonzentrationen im Blut möglich und kann hinsichtlich einer möglichen Heroinintoxikation eine sehr entscheidende Rolle spielen.

Es ist jedoch möglich, dass Personen zu Lebzeiten wenig und eine nur sehr spärliche Behaarung aufweisen oder dass im Rahmen des Fäulnisprozesses die Haare nicht mehr für die forensisch toxikologische Untersuchung zur Verfügung stehen. Auch bei Brandgeschehen ist es häufig der Fall, dass der Leichnam keine Haare mehr aufweist. Für diese Fälle ist eine alternative Matrix notwendig, um den Langzeitgebrauch von Substanzen nachweisen zu können. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob sich Nägel als alternative Matrix eignen, wenn keine Haare für eine Untersuchung zur Verfügung stehen.

In dieser Studie wurden Haar- und Nagelproben von insgesamt 70 Todesfällen im Rahmen einer qualitativen ungerichteten Suchanalyse (general unknown screening, GUS) mittels hochauflösender Massenspektrometrie (LC-QTOF-MS) untersucht. Ausgewählt wurden Todesfälle von Personen, welche laut Ermittlungsakte der Polizei in der Vergangenheit Drogen- und/oder Medikamentenmissbrauch betrieben haben. Zum Vergleich wurden Haare und Nägel als Untersuchungsmaterial verwendet und die Ergebnisse verglichen. Die Aufarbeitung der Haar- und Nagelproben erfolgte gleichermaßen: Zerkleinerung der Proben mittels Kugelmühle und 2-tägige Extraktion.

In den Haar- und Nagelproben konnten insgesamt 89 verschiedene Analyte mittels GUS nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass sich die Ergebnisse der Haaranalyse nur in ca. 10% der Fälle grundsätzlich von den Ergebnissen der Nagelanalyse unterschieden. In den

meisten Fällen basierten die Unterschiede vor allem im Metabolitenmuster. Es muss angemerkt werden, dass teilweise unterschiedliche Zeitfenster mittels Haaruntersuchung und der Nageluntersuchung abgedeckt werden konnten. Es stand nicht in jedem Fall ein kompletter Nagel zur Verfügung, so dass vielmals nur der Nagelrand herangezogen werden konnte, welcher vor ca. 3 – 5 Monaten aus dem Nagelbett herausgewachsen ist [64]. Die Untersuchung einer 6 cm langen Haarsträhne repräsentiert jedoch mindestens die letzten 6 Monate vor dem Todeseintritt.

Eine starke Korrelation zwischen der Haar- und Nageluntersuchung konnte gezeigt und in einen plausiblen Zusammenhang mit der Vorgeschichte gebracht werden. Anhand der Ergebnisse kann somit davon ausgegangen werden, dass sich die Substanzen sowohl in die Haare als auch in die Nägel gleichermaßen einlagern.

### 3.4.2 Publikation

**Krumbiegel F, Hastedt M, Tsokos M**

**Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupol time-of-flight mass spectrometry.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Dec;10(4):496-503. doi: 10.1007/s12024-014-9588-x. Epub 2014 Jul 19.



### 3.5 Manuskript V:

**The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples.**

#### 3.5.1 Zusammenfassung

Die Notwendigkeit eine alternative Untersuchungsmatrix für Haare zu etablieren wurde bereits in der Zusammenfassung 3.4.2 zu dem Manuskript IV "Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry" detailliert beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, quantitative Messmethoden für insgesamt 76 unterschiedliche Substanzen, hauptsächlich für illegale Betäubungsmittel und Psychopharmaka, mit einer hoch sensitiven Nachweistechnik (LC-QQQ-MS) nach den Richtlinien der GTFCh zu validieren. Weiterhin sollten Haare und Nägel von Todesfällen segmentiert und die gemessenen Substanzkonzentrationen in den Matrices verglichen werden.

Insgesamt wurden zwei Nachweismethoden für die illegalen Betäubungsmittel und andere toxikologisch relevanten Wirkstoffe, sowie für Psychopharmaka am LC-QQQ-MS erfolgreich für die Matrices Nagel und Haar validiert. Mittels dieser Methoden können 76 Substanzen mit einer hohen Empfindlichkeit nachgewiesen werden.

Es wurden Haar- und Nagelproben von 7 Todesfällen mit Hilfe der validierten Methoden untersucht. Die Segmentierung der Haar- und Nagelproben konnte verdeutlichen, dass die Substanzkonzentrationen in Haaren und Nägeln in den einzelnen Segmenten nicht vergleichbar sind. Vor allem im Nagelrand konnten in einigen Fällen deutlich höhere Konzentrationen als in den anderen Segmenten nachgewiesen werden. Eine Einlagerung der Substanzen über den Schweiß oder durch äußere Kontamination sind mögliche Erklärungsansätze. Eine Substanzeinlagerung während der Bildung des Nagels in der germinalen Matrix muss ebenfalls als ein wichtiger Einlagerungsweg angesehen werden. Unterschiedliche Substanzkonzentrationen konnten in den einzelnen Nagelsegmenten nachgewiesen werden, was für eine punktuelle Einlagerung nach einer Substanzaufnahme während der Bildung des Nagels spricht. In Fall 1 konnte in einem Nagelsegment der primäre Heroinmetabolit 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) und der sekundäre Heroinmetabolit Morphin nachgewiesen werden. Im Nagelrand konnte eine deutlich geringere Konzentration (ca. 10%) der beiden Substanzen nachgewiesen werden. Dies

spricht für eine Substanzeinlagerung während der Nagelbildung. Im zweiten Fall konnten im Nagelrand deutlich höherer Konzentrationen von 6-MAM, Codein und Morphin nachgewiesen werden als in den restlichen Nagelsegmenten. Durch den Nachweis dieser Substanzen im Urin des Verstorbenen, ist eine zeitnahe Heroinaufnahme zum Todeszeitpunkt anzunehmen. Hier erscheint eine Einlagerung über den Schweiß und teilweise durch äußere Kontamination der Heroinzubereitung als wahrscheinlichster Erklärungsansatz für die hohen Substanzkonzentrationen im Nagelrand.

Weiterhin wurden Konzentrationsverhältnisse von Metaboliten zur jeweiligen Muttersubstanz bestimmt. Für MDA/MDMA, 2-Ethylidin-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP)/Methadon und Nortilidin/Bisnortilidin konnten in 5 verschiedenen Fällen annähernd gleiche Konzentrationsverhältnisse im Haar und im Nagel bestimmt werden, was für eine vergleichbare Substanzeinlagerung, vermutlich über das Blut während der Bildung der jeweiligen Matrix, spricht. Für den Analyten Methadon und seinen Metaboliten EDDP wurden in einem Fall deutlich andere Konzentrationsverhältnisse zwischen Nagel und Haaren nachgewiesen. Im Rahmen einer Substitutionsbehandlung mit Methadon kommt es als Nebenwirkung häufig zu starkem Schwitzen der Patienten. Da das Ausmaß des Schwitzens individuell sein kann, ist eine unterschiedliche Einlagerungsrate des Methadons und EDDP aus dem Schweiß in den Nagel denkbar. Eine vermehrte Substanzeinlagerung durch den Schweiß wäre eine Erklärung für die nicht vergleichbaren Konzentrationsverhältnisse. Weiterhin kann eine höhere Substanzkonzentration im Nagelrand durch eine externe Kontamination begründet sein.

Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse von anderen Analyten können u.a. durch die Hydrolyse einiger Substanzen wie z.B. 6-MAM oder Cocain durch die Probenaufarbeitung erklärt werden. Im Fall 5 konnten die Substanzkonzentrationen in gemahlene Haaren und klein geschnittenen Haaren verglichen werden. Die Konzentration von 6-MAM in den geschnittenen Haaren war deutlich höher als in der gemahlene Haarprobe. Anhand dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass durch das Mahlen der Proben ein Substanzverlust einhergehen kann.

Anhand der Studie war es möglich zu zeigen, dass in den Segmenten der Haare und Nägel keine vergleichbaren Substanzkonzentrationen in den beiden Matrices gemessen wurden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Substanzeinlagerungswege in Haaren und Nägeln vergleichbar sind, da ähnliche Konzentrationsverhältnisse für einige Substanzen ermittelt werden konnten. Die Substanzeinlagerung in Haare basiert vermutlich auf einer Ionisierung der Analyte in dem sauren Milieu der Melanozyten nach einer passiven Diffusion der Substanzen aus dem Blut. Die Ionisierung der Substanzen verhindert eine Rückdiffusion

und eine Akkumulation der Substanzen im Haar während der Anagenphase findet statt [2]. Da in den Nägeln so gut wie kein Melanin vorhanden ist, stellt sich die Frage wie eine Akkumulation der Substanzen im Nagel stattfinden kann.

### **3.5.2 Publikation**

**Krumbiegel F, Hastedt M, Westendorf L, Methling M, Niebel A, Parr MK, Tsokos M**

**The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples.**

*Forensic Sci Med Pathol. 2016; Manuskript am 13.07.2016 vom Editor akzeptiert. doi: 10.1007/s12024-016-9801-1.*



## 4 Abgrenzung der Eigenleistung

Im Folgenden sollen die Eigenleistungen des Autors an den einzelnen Publikationen, welche die Grundlage für diese kumulative Arbeit sind, im Detail dargestellt werden.

**Tabelle 2: Darstellung der Eigenleistung an den Manuskripten für die kumulative Arbeit in %.**

<b>Manuskript</b>	<b>Konzeption</b>	<b>Durchführung (Datenerhebung)</b>	<b>Datenauswertung</b>	<b>Manuskripterstellung</b>
<b>I</b>	20	80	90	90
<b>II</b>	30	50	70	20
<b>III</b>	10	50	80	20
<b>IV</b>	20	20	90	90
<b>V</b>	90	50	70	90



## 5 Diskussion

### 5.1 Bedeutung der Ergebnisse und Einschränkungen

Die Zahlen des Drogen- und Suchtberichtes 2016 bestätigen die Problematik des weitverbreiteten illegalen Rauschmittelkonsums und des Arzneimittelmissbrauchs [1]. Wenn das Konsumverhalten einen Einfluss auf die eigenen Kinder, auf den Straßenverkehr oder das Begehen von Straftaten hat, dann ist es notwendig, diese Suchtproblematik aufzudecken. Im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung sind Haaranalysen für den Beleg einer Abstinenzbehauptung gängig [8, 10]. Die Analyse von Haaren auf illegale Betäubungsmittel und ausgewählte Arzneimittel mittels LC-MS/MS hat sich im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung und bei der Abschätzung einer Gefährdung des Kindeswohls in der Routine etabliert [28]. Weiterhin kann die Haaranalyse als retrospektive Analysetechnik Daten für das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen durch die Langzeiteinnahme von Arzneimitteln liefern.

Diese Arbeit hat einen Beitrag dazu geleistet, einzuschätzen, inwieweit die Langzeiteinnahme von NSAR einen Einfluss auf das Auftreten von gastrointestinalen Läsionen hat. Die Korrelation aus Obduktionsergebnissen und Ergebnissen der Haaranalytik auf der Basis einer großen Anzahl von Todesfällen ( $n = 268$ ) ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Als todesursächliche eingestufte gastrointestinale Läsionen, welche aufgrund einer nachgewiesenen Langzeiteinnahme von NSAR entstanden sein könnten, sind somit in der Literatur sehr selten zu finden. Der Nachweis einer Langzeiteinnahme von NSAR wurde in diesen Fällen nur anhand von Patientendaten erfasst werden [68-72]. Der Vorteil der vorgelegten Studie mit Todesfällen ist es, das man während der Sektion im Gegensatz zur Untersuchung beim lebenden Probanden, einzelne Organe im Detail betrachten und präparieren kann. Dadurch ist das Erkennen von kleinsten Blutungen durch die Sektion möglich. In dieser Studie lagen die ermittelten NSAR Konzentration in den Haaren bei 94% der positiv getesteten Proben über 2 ng/mg und 64% über 10 ng/mg. Da NSAR eine heterogene Gruppe von Substanzen ist mit sehr verschiedenen chemischen Eigenschaften, können diese beiden Grenzwerte nur als Richtwerte angesehen werden. Es gibt damit nur Hinweise, dass bei einer Konzentration  $> 2$  ng/mg eine mehrfache Substanz-aufnahme und bei  $> 10$  ng/mg eine häufige Substanzaufnahme stattgefunden hat. Es fehlen hier weitere Daten aus anderen Studien, in denen eine chronische Einnahme von NSAR mittels Haaranalyse belegt ist. Anhand des untersuchten Kollektivs konnte festgestellt werden, dass bei Fällen, bei denen Salicylsäure in der Haarprobe nachgewiesen wurden, keine auffällige

Verteilung der gastrointestinalen Läsionen im Magen-Darm-Trakt aufwiesen. Die Läsionen waren gleichmäßig in ihrer Häufigkeit über den gesamten Magen-Darm-Trakt verteilt. In anderen Studien wurde bei lebenden Probanden nach der Aufnahme von Aspirin (Acetylsalicylsäure, nachgewiesen als Salicylsäure) gezeigt, dass sich die Läsionen eher auf den oberen Magen-Darm-Trakt konzentrieren [73, 74].

Weiterhin sollte in der Studie überprüft werden, ob die gleichzeitige Aufnahme von Protonenpumpeninhibitoren (PPI) das Risiko für das Auftreten von gastrointestinalen Läsionen verringern kann [75, 76]. Es konnten jedoch nur in 3 Haarproben PPIs nachgewiesen werden. Eine nicht seltene Aufnahme von PPIs konnte jedoch mit Hilfe der Blutproben nachgewiesen, da in 16 Blutproben mindestens ein PPI detektiert wurde. In der Literatur ist nur eine Studie bekannt, in der über mehrere Wochen einem Pferd Omeprazol verabreicht worden ist, jedoch diese Substanz nicht den in Pferdehaaren nachgewiesen werden konnten [77]. Für den seltenen Nachweis von PPIs in den Haarproben in der vorliegenden Studie kann eine schlechte Einlagerungsrate als Erklärungsansatz herangezogen werden. Mögliche Einflussfaktoren auf die Einlagerungsrate ins Haar können die Molekülgröße, Plasma-Eiweiß-Bindung und der pKa-Wert der Substanzen sein [2, 34].

Mit Hilfe der Konsummarker Cuscohygrin und Hygrin soll eine Differenzierung zwischen dem traditionellen Kauen von Cocablättern und der illegale Konsum der Cocapaste möglich gemacht werden. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Cuscohygrin und Hygrin nicht in illegalen Cocainzubereitungen nachgewiesen werden konnten und ebenso nicht in Urinproben von Konsumenten des illegalen Rauschmittels [78, 79]. Nachgewiesen werden konnten die beiden Pyrrolidin-Alkaloide jedoch zuvor schon in Cocablättern [80]. Mittels einer vorherigen Untersuchung von Haarproben von Cocainkonsumenten und Cocakauern, wurden Hygrin und Cuscohygrin als geeignete Marker auch für die Untersuchung von Haarproben, zur Unterscheidung zwischen Cocakauern und Cocainkonsumenten, identifiziert [81]. In der aktuellen Studie sollte nachgewiesen werden, wann diese beiden Marker bei der illegalen Cocainherstellung verloren gehen.

Es wurden für die Studie nur Pflanzenmaterialien aus dem Norden von Argentinien untersucht. Die Verteilung der einzelnen Analyte kann in Pflanzen aus anderen Regionen verschieden sein. Die Herstellung der Cocapaste aus der Pflanze wurde im Labor durchgeführt und repräsentiert daher nicht exakt die Bedingungen bei der illegalen Cocainherstellung. Die vorliegende Studie konnte weitere Informationen darüber geben, wann Cuscohygrin und Hygrin in den einzelnen Herstellungsschritten der Cocapaste nahezu verloren gehen.



In einer Kooperation mit dem Senat für Soziales, Kinder, Jugend und Frauen der Hansestadt Bremen, die seit dem Jahr 2011 und dem Institut für Rechtsmedizin der Charité besteht, konnten anhand von knapp 1000 Haarproben von Eltern und deren Kindern gezeigt werden, dass die Haaranalyse als empfindliche und objektive Technik für die Abschätzung einer Gefährdung des Kindeswohls sehr wertvoll ist. Die Studie zeigt, dass eine Selbstausskunft der Eltern meist unverlässlich ist und erst durch die Haaranalyse ein Umgang oder Konsum von Rauschmitteln aufgedeckt wurde. Es zeigt sich, dass die nachgewiesenen Substanzen in den Haarproben der Eltern und Kinder häufig ein ähnliches Muster aufweisen. Die hierbei gemessenen Substanzkonzentrationen in den Kinderhaaren waren jedoch häufig deutlich niedriger als bei den Eltern. Externe Kontaminationen spielen im Rahmen der Analyse von Kinderhaarproben eine große Rolle [22, 23]. Dadurch ist es in nur in wenigen Fällen möglich, eine tatsächliche Substanzaufnahme mittels Haaranalyse zu belegen. Durch die Anonymisierung der Haarproben ist den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Charité nicht bekannt, welche Haarproben zu einer gemeinsamen Familie gehören. Lediglich die Nummerierung lässt auf das Geburtsdatum schließen und die Buchstabenkombination kann Hinweise auf die Familienzugehörigkeit geben.

Es müssen weitere Untersuchungen für mögliche Übertragungswege zwischen Mutter und Kind wie zum Beispiel eine Substanzübertragung über den Schweiß in das Kinderhaar durchgeführt werden, um eine sichere Differenzierung zwischen Umgang und Konsum zu ermöglichen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die aufgenommenen Substanzen auch mit dem Schweiß ausgeschieden werden [82-84]. Es ist jedoch noch nicht geklärt, in welchem Maße eine Substanzübertragung über den Schweiß bei einem engen Kontakt zwischen Mutter und Kind geschieht. Anhand eines Falles in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, die Konzentrationen von Cocain und THC in den Haaren des jüngeren Kindes (Cocain mit einer Konzentration von 0,27 ng/mg; THC-Konzentration von 1,36 ng/mg) deutlich höher waren als bei dem älteren Geschwisterkind (Cocainkonzentration von 0,08 ng/mg; THC-Konzentration von 0,39 ng/mg). Hier kann angenommen werden, dass das jüngere Kind in einem engeren körperlichen Kontakt zu der Mutter stand und somit auch ein größerer Anteil der Drogen, welche die Mutter konsumiert hat, übertragen werden konnten [22, 59]. Die Aufklärung zur Einlagerung von Cannabinoiden in Haaren spielt ebenfalls eine wichtige Rolle [43, 49, 82, 85]. Der Beleg einer Körperpassage durch die Haaranalyse vor allem bei Kinderhaarproben stellt eine große Herausforderung dar, da selbst der zusätzliche Nachweis von Stoffwechselprodukten nicht zwangsläufig eine eigene Körperpassage belegt, sondern eine Substanzübertragung über den Schweiß der Mutter auf das Kinderhaar nicht ausgeschlossen werden kann [86].

Die Eignung der Finger- und Fußnägel als alternative Matrix zu Haaren als retrospektive Analysetechnik wurde untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mittels ungerichteter Suchanalyse insgesamt 89 verschiedene Analyte in den beiden Matrices qualitativ nachgewiesen wurden. Es konnte eine gute Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse zwischen Haaren und Nägeln gezeigt werden. Als kritisch sind die unterschiedlichen Zeitfenster anzumerken, welche durch Nagelränder, sprich der älteste Teil des Nagels und der proximale Haarabschnitt wie z.B. 0 – 6 cm, welcher den neusten Anteil des Haares repräsentiert, untersucht wurden [64]. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse lässt sich dadurch erklären, dass in vielen der untersuchten Fälle ein chronischer Substanzkonsum anzunehmen ist und deshalb die exakt passenden Zeitfenster zwischen Haaren und Nägeln vernachlässigbar sind, da eine Substanzaufnahme durchgängig stattgefunden hat.

Die Einlagerungswege in den Nagel sind nicht hinreichend aufgeklärt. Es wurde publiziert, dass nach einer Einmalaufnahme von Zolpidem bereits nach wenigen Tagen im Fingernagelclipping Zolpidem nachweisbar war [66, 67]. Eine vorherige Einnahme von Zolpidem war nicht der Fall, so dass der Nachweis von Zolpidem im Fingernagelrand nur von dieser Einnahme stammen kann. Die Zolpidemkonzentrationen in den Haaren der Probanden waren durchgehend höher als im untersuchten Nagelrand. Der Nachweis von Einzelsubstanzen in Nägeln konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [66, 67, 87-93]. Ein Multi-Analyt-Screening in Nägeln und Haaren wurde bisher nicht veröffentlicht. Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass viele verschiedene Analyte in Haaren und ebenso in Nägeln nachgewiesen werden kann.

Aufbauend auf diese Untersuchungen wurden Methoden zur Quantifizierung der häufigsten Analyten entwickelt und eine Segmentierung der Haar- und Nagelproben durchgeführt. Mittels LC-QQQ-MS wurden erfolgreich sehr empfindliche Nachweismethoden für insgesamt 76 Analyte in den beiden Matrices Haar und Nagel nach den Richtlinien der GTFCh validiert. Es wurden insgesamt 7 Untersuchungen von Todesfällen im Detail veröffentlicht. Anhand der Analysen konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Konzentrationen in Haaren und Nägeln schwer zu vergleichen sind. Das konnte auch in anderen Studien gezeigt werden, wo Konzentrationen von einzelnen Analyten in Haaren und Nagelrändern verglichen wurden [91, 94, 95]. Hier zeigten sich jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse, so dass man nicht abschließend schlussfolgern kann, ob in Haaren oder Nägeln die Substanzkonzentrationen höher sind.

Da man in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen in den Haar- und Nagelsegmenten nicht miteinander vergleichen konnte, wurden Konzentrationsverhältnisse für bestimmte Analyte und deren Metabolite herangezogen, um weitere Hinweise auf Einlagerungswege

zu erlangen. Madry et al. wiesen in Nagelrändern und Haarsegmenten annähernd gleiche Konzentrationsverhältnisse von MDA zu MDMA nach [87]. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Untersuchung zeigte weiterhin, dass auch für andere Analyte gleiche Konzentrationsverhältnisse zwischen Haaren und Nägeln ermittelt werden konnten. Das untermauert die Annahme, dass die Einlagerung der Substanzen in Haaren und Nägeln ähnlich zu sein scheint.

Es zeigte sich, dass bei der Segmentierung des Nagels ein Substanznachweis in einzelnen Segmenten möglich war, welcher in den restlichen Nagel- und Haarsegmenten nicht detektierbar war. Dieses kann als Hinweis einer phasenweisen Einlagerung bei der Bildung des Nagels gewertet werden. Bisher wurden keine anderen Studien veröffentlicht, die ganze Nagelproben segmentiert haben und die Konzentrationen zwischen den einzelnen Nagelsegmenten und zwischen den Nägeln und Haaren miteinander verglichen haben. Es muss jedoch angemerkt werden, dass in der vorliegenden Arbeit kein Vergleich der Substanzkonzentrationen in Finger- und Fußnägel möglich war, da nicht zu jedem Fall ein Finger- und Fußnägel zur Verfügung standen. Engelhart et al. konnten zeigen, dass die Konzentrationen zwischen Fuß- und Fingernägeln unterschiedlich sein können [93].

Es wurde deutlich, dass das Mahlen der Haarproben mit einer ungekühlten Kugelmühle einen Einfluss auf die gemessene Analytkonzentration haben kann. Der Vergleich der Substanzkonzentrationen in den kleingeschnittenen Haaren wie in der Routine verwendet und den gemahlene Haaren aus der Studie zeigt, dass vorrangig bei den Analyten 6-MAM, Cocain und Benzoylcegonin ein Verlust durch das Mahlen entsteht. Es konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass ein Konzentrationsverlust der Analyten durch das Mahlen beobachtet wurde [2]. Eine Möglichkeit könnte die Anwendung von gekühlten Kugelmühlen sein oder man könnte zukünftig gefrorene Proben verwenden [65]. Ein Vergleich der Extraktionsausbeute von kleingeschnittenen Nägeln und gemahlene Nägeln ist bisher nicht veröffentlicht worden. Da aber sowohl die Nägel als auch die Haare für die Studie gemahlen wurden, war ein sinnvoller Vergleich der Konzentrationsverhältnisse der Analyte möglich. Man kann annehmen, dass der Analytverlust durch das Mahlen der Matrix für Nägel und Haare vergleichbar ist. Weiterhin wäre es auch möglich, die Proben durch die Zugabe von Basen oder Säuren aufzulösen und zu testen ob dadurch der Analytverlust vermieden werden kann. Basische Hydrolyse der Haarmatrix hat sich vor allem für Amphetamine bewährt [34]. Andere Analyten sind jedoch zu instabil und der Verlust der Analyten ist zu erwarten. Bei einer enzymatischen Hydrolyse, sollen auch instabile Analyte nicht verloren gehen, jedoch sind diese enzymatischen Aufarbeitungen sehr teuer [34].

### **5.2 Ausblick und zukünftige Fragstellungen**

Um den Einfluss einer gleichzeitigen Aufnahme von PPIs und NSAR zu überprüfen, wäre eine optimierte Nachweismethode mit einer höheren Empfindlichkeit für PPIs erforderlich. Somit wäre es möglich zu überprüfen, ob eine regelmäßige NSAR Einnahme mit PPIs das Risiko für das Auftreten von gastrointestinalen Läsionen vermindert [75]. Weiterhin wäre eine Untersuchung von niedrigdosierten Einnahmen von Acetylsalicylsäure (ASS) als Thromboseprophylaxe und ihre Korrelation zur Entstehung von gastrointestinaler Läsion sehr interessant [71]. Anhand von Obduktionsergebnissen könnte überprüft werden, ob die Langzeiteinnahme von Acetylsalicylsäure (nachgewiesen als Salicylsäure) todesursächliche Blutungen begünstigt oder welche Lokalisationen der gastrointestinalen Läsionen durch die Einnahme von niedrigdosierten ASS häufig auftreten.

Konsummarker werden auch zukünftig eine zentrale Rolle in der Haaranalyse spielen. Zum einen sollte bei der Einschätzung der Kindeswohlgefährdung durch Rauschmittel im Umfeld des Kindes verlässlich differenziert werden, ob das Kind selbst in Kontakt mit den Rauschmitteln kommt oder der Nachweis der Substanzen durch eine Kontamination der Haare durch den Schweiß der Eltern kommt. Für wichtige Analyte wie Cocain und THC müssen zukünftig Marker etabliert werden, die eine Körperpassage mit den gängigen Messmethoden mit einer hinreichenden Sicherheit belegen können. Zum anderen zum Beispiel bei der Differenzierung der Cocakauer und der Cocainkonsumenten, welche in ersten Ansätzen bereits durchgeführt wurden. In dieser Arbeit wurden jedoch Haarproben von bekannten Konsumenten aus Deutschland mit Haarproben von bekannten Cocakauern aus Argentinien miteinander verglichen [81]. Eine Untersuchung der Haarproben von Cocakauern und Konsumenten aus verschiedenen Regionen in Südamerika muss durchgeführt werden, um die beiden Konsummarker Cuscohygrin und Hygrin zu etablieren. Für den Einsatz von Nägeln als alternative Matrix zu Haaren sollten mehr Realproben untersucht werden. Das Mahlen der Proben sollte dahingehend optimiert werden, dass der Analytverlust so gering wie möglich gehalten wird. Das Risiko der externen Kontamination sollte genauer untersucht und abgeklärt werden.

### 6 Zusammenfassung

Der Genuss von illegalen Rauschmitteln in unserer Gesellschaft ist weit verbreitet. Der Konsum von Rauschmitteln kann nicht nur Auswirkungen auf die Konsumenten selbst haben, sondern er kann auch eine Gefährdung von anderen Personen darstellen. Gefährdet sind zum Beispiel andere Verkehrsteilnehmer oder die eigenen Kinder. Weiterhin ist der Einsatz von Schmerzmitteln, vor allem als frei verkäufliche Arzneimittel, weit verbreitet und birgt aufgrund von auftretenden Nebenwirkungen etliche Gefahren.

Mit Hilfe der Haaranalyse können Abstinenzbelegungen im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung oder bei Sorgerechtsstreitigkeiten rückwirkend belegt werden. Ein retrospektiver Nachweis über die regelmäßige Aufnahme von Arzneimitteln, wie zum Beispiel im Rahmen des Drug Monitoring ist ebenfalls mit Hilfe der Haaranalyse möglich. Im Rahmen einer forensisch toxikologischen Untersuchung kann mit der Analyse der Haare die Gewöhnung an toxikologisch relevante Substanzen abgeschätzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Haaranalyse mehrere Fragestellungen zu bearbeiten. Dabei sollte eine Langzeiteinnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) nachgewiesen und anhand von Todesfällen untersucht werden, ob die Langzeiteinnahme von NSAR mit dem Auftreten von gastrointestinalen Läsionen korreliert. Eine weitere Aufgabe war, ob mit der Haaranalyse auf illegale Rauschmittel die Abschätzung einer Kindeswohlgefährdung getroffen werden kann. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Konsummarker Cuscohygrin und Hygrin für die Unterscheidung von Cocakauen und illegalem Cocainkonsum geeignet sind.

Die Untersuchung, ob Nägel als alternative Matrix zu Haaren war die letzte Fragestellung für den Fall, dass für einige Untersuchungen keine Haare für einen retrospektiven Nachweis einer Substanzaufnahme zur Verfügung stehen.

Für den Nachweis von NSAR wurde eine Nachweismethode nach den Richtlinien der Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie (GTFCh) mittels LC-Time of Flight-MS (LC-QTOF-MS) erfolgreich validiert. Der Fallgruppe (n = 132) wurden Todesfälle zugeordnet, die gastrointestinale Läsionen aufwiesen und der Kontrollgruppe (n = 136) Todesfälle, bei denen keine gastrointestinalen Läsionen während der Obduktion festgestellt werden konnten. Weiterhin wurden die zugehörigen Blutproben mittels HPLC-DAD auf NSAR untersucht. Die Ergebnisse der Blutanalyse konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Fall- und Kontrollgruppe zeigen. Mit Hilfe der Haaranalyse

konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Fall- und Kontrollgruppe mit dem Nachweis von NSAR gezeigt werden. In der Fallgruppe wurden 67% der Haarproben positiv auf mindestens ein NSAR getestet und im Gegensatz dazu, wurden in der Kontrollgruppe nur 38% der Haarproben positiv auf mindestens ein NSAR getestet. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei tödlichen gastrointestinalen Blutungen der Analyt Ibuprofen mit 62% am häufigsten nachgewiesen werden konnte. Protonenpumpenhemmer konnten nur in 3 Haarproben nachgewiesen werden, wobei in 19% der Blutproben mindestens ein Protonenpumpenhemmer nachgewiesen werden konnte. Hier dient als Erklärungsansatz, dass offenbar die Protonenpumpenhemmer schlecht in das Haar eingelagert werden [77]. Anhand des Studienkollektives konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Langzeiteinnahme von NSAR und dem Auftreten von gastrointestinalen Läsionen besteht.

Die natürlichen Cocaalkaloide Cuscohygrin und Hygrin kommen in den Blättern der Cocapflanze vor, sind jedoch nicht in illegalen Cocainzubereitungen nachweisbar. Aus diesem Grund eignen sich die beiden Pyrrolidin-Alkaloide als Konsummarker, um zwischen dem traditionellen und legalen Kauen der Cocablätter in Südamerika und den Cocainkonsumenten zu unterscheiden. In der Arbeit wurden die Blätter der Cocapflanze und verschiedene Zwischenprodukte bei der Herstellung der Cocapaste auf Cocaalkaloide mit Hilfe einer basisvalidierten Methode untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, bei welchen Herstellungsschritten die Cocaalkaloide Cuscohygrin und Hygrin verloren gehen und sich die Konzentrationen der anderen Cocaalkaloide wie Cocain, Cinnamoylcocain, Tropacocain und Methylecgonin erhöhen. Da Cuscohygrin und Hygrin nur in einem sehr geringen Maße mittels Kerosin aus den Cocablättern extrahiert werden und ebenfalls nicht unter sauren Bedingungen ausfallen, sind die beiden Alkaloide vielversprechende Marker für die Unterscheidung zwischen dem legalen Cocakauen in Südamerika und dem illegalen Cocainkonsum.

Zwischen 2011 und 2014 wurden insgesamt 388 Haarproben von Kindern und 594 Haarproben von Eltern und verantwortlichen Bezugspersonen gesammelt. Die Haarproben wurden auf die gängigen Betäubungsmittel wie Cocain, Methadon, Opiate, Amphetamine, Ecstasywirkstoffe, Cannabinoide sowie Benzodiazepine mittels LC-MS/MS und GC-MS untersucht. Wenn Haarproben der Erwachsenen positiv auf die oben genannten Betäubungsmittel getestet wurden, dann fand ebenfalls eine Haaranalyse der Kinder statt. Haaranalysen in verschiedenen zeitlichen Abständen (meist nach 6 und 12 Monaten) sollte zeigen, ob die Erwachsenen den Konsum von Rauschmitteln einstellen und die Kinder

keinen Umgang mehr mit illegalen Rauschmitteln haben. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass in den Kinderhaaren ein gleiches Analytenmuster wie bei den im gleichen Haushalt lebenden Erwachsenen nachgewiesen werden konnten. In den Kinderhaarproben (n = 296) aus den Jahren 2011-2014 konnten verschiedene illegale Betäubungsmittel wie u.a. Methadon, Heroinmetabolite, Cocain und THC nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in 80 Kinderhaarproben keine illegalen Betäubungsmittel nachgewiesen. Anhand der Studie konnte gezeigt werden, dass Kinderhaare eine empfindliche Methode für den Nachweis eines Betäubungsmittelumganges ist. Dieser Aspekt kann bei der Einschätzung einer Kindeswohlgefährdung eine wichtige Rolle spielen.

Für den retrospektiven Nachweis einer zurückliegenden Substanzaufnahme, sollte eine potentielle alternative Matrix zu Haaren gefunden werden. Es wurden 70 Haar- und Nagelproben von Todesfällen mittels ungerichteter Suchanalyse untersucht. Die Messungen wurden mittels LC-QTOF-MS durchgeführt. Für den quantitativen Nachweis von 76 toxikologisch relevanten Substanzen in Nägeln und Haaren wurden zwei empfindliche und schnelle Methoden nach den Richtlinien der GTFCh mittels LC-QQQ-MS validiert.

Die Proben wurden mittels einer Kugelmühle gemahlen und für 2 x 18 Stunden extrahiert. Für die beiden Studien wurden Fälle ausgewählt, in deren Vorgeschichte ein Drogenmissbrauch, eine Polymedikation oder eine psychische Vorerkrankung mit entsprechender Medikation ermittelt werden konnte.

Insgesamt wurden 89 unterschiedliche toxikologisch relevante Substanzen mittels LC-QTOF-MS nachgewiesen. Häufig wurden die Analyte Metoprolol, Paracetamol und Metoclopramid in den Haar- und Nagelproben nachgewiesen.

In der zweiten Studie wurden Haar- und Nagelproben von 7 Todesfällen untersucht und die Analytkonzentrationen bestimmt. In 5 Fällen konnten die Nägel und Haarproben segmentiert werden und in 2 Fällen konnten nur Nagelclippings für die Untersuchung herangezogen werden. Anhand der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Analytkonzentrationen in den Haar- und Nagelproben nicht miteinander vergleichbar sind. Daraufhin wurden Konzentrationsverhältnisse von Substanzen und ihren Metaboliten bestimmt. Ähnliche Konzentrationsverhältnisse zwischen Haaren und Nägeln wurden für MDA/MDMA, EDDP/Methadon und Bisnortilidin/Nortilidin ermittelt. Anhand von gleichen Konzentrationsverhältnissen kann eine ähnliche Substanzeinlagerung in Haaren und Nägeln vermutet werden. Durch das Mahlen der Proben während der Probenvorbereitung, konnte ein Analytverlust anhand eines Falles gezeigt werden. In diesem Fall wurden die Haare wie in der Routine auch üblich nur in kleine Stückchen geschnitten (ca. 1-2 mm groß) bzw. im Rahmen der Studie gemahlen. Besonders bei dem

primären Heroinmetaboliten 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) konnte ein deutlicher Konzentrationsverlust durch das Mahlen der Haarprobe gezeigt werden. Eine alternative Probenaufarbeitung für die Matrix Nagel sollte somit Teil zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

Im Rahmen der beiden Studien konnte sowohl gezeigt werden, dass Nägel als potenzielle alternative Matrix zu Haaren in Frage kommen und die qualitativen Ergebnisse der beiden Matrices sehr gut vergleichbar sind. Weiterhin zeigte sich anhand von Realfällen, dass sich für einige Substanzen und deren Metabolite ähnliche Konzentrationsverhältnisse nachweisen ließen, die ein Hinweis für eine ähnliche Einlagerung in die beiden Matrices sein können. Haupteinlagerungswege in den Nagel scheinen während der Bildung des Nagels in der germinalen Matrix, über den Schweiß und aufgrund externer Kontamination zu sein.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Haaranalytik für verschiedene Fragestellungen erfolgreich eingesetzt werden kann. Ein retrospektiver Nachweis einer Substanzaufnahme konnte ebenfalls für Fuß- und Fingernägel gezeigt werden und Nägel können auf der Grundlage der Ergebnisse als alternative Matrix genutzt werden, wenn keine Haare für eine Analyse zur Verfügung stehen.



### 7 Summary

According to the present Drug Report of Germany, it is apparent, that the addiction to illicit drugs and pharmaceuticals is a major problem in western society. Drug abuse was not only result in consequences for the person themselves; there could also be other people affected. Their own children or traffic participants are at risk of drug users. Furthermore, pain killers that are commonly used and easily available over the counter add to an increased risk of side effects.

Hair analysis has become a routine technique for the retrospective detection of contact to illicit drugs in driving ability examination or for example in the context of a custody case. Hair analysis has been proven to be particularly suitable for these tasks due to the long time window of drug detection for up to 6 month. The detection of prior drug intake could also be helpful for therapeutic drug monitoring. Hair samples are often analyzed as part of a postmortem investigation, as their analysis could reveal further information to blood analysis about potential drug addiction.

The aim of this research project was to use hair analysis in different fields of application. The first study investigated the correlation between chronic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and gastrointestinal lesions by analyzing blood and hair samples from postmortem cases. In addition, hair analysis was used for the retrospective detection of illicit drugs in hair samples from parents/caregivers and children.

Furthermore, markers of coca chewing are desired for the discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine. The two natural coca alkaloids hygrine and cuscohygrine were tested and it could be shown, that they might be suitable markers for this task. By analyzing material of different steps of cocaine production, it was investigated in which steps the two alkaloids are separated from cocaine.

A further research project was done to verify the usefulness of nails as an alternative technique to hair analysis. This alternative technique may be used for toxicological investigations in cases where no hair is available.

Method validation was performed according to the guidelines of the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh) for the detection of NSAID by the use of LC-quadrupole time of flight-MS (LC-QTOF-MS). Corpses with gastrointestinal lesions were selected for the case group (n = 132) and those without any lesions were placed into the control group (n = 136). Blood samples from all cases were analyzed by HPLC-DAD.

## Summary

---

No significant discrimination between case and control group could be achieved by the blood analysis. In contrast, the hair analysis showed a significant difference between the case and the control group. Out of the case group 76% were tested positive for one or more NSAIDs while only 38% of the hair samples from the control group included one or more NSAIDs. Results from blood analysis indicated that most of the deceased with gastrointestinal lesions, which were discovered by autopsy, did not consume NSAIDs near to the time of death. In contrast, hair analysis showed the influence of long-term use of NSAIDs on gastrointestinal lesions in hair samples from postmortem cases. Proton pump inhibitors were rarely detected in hair samples. Rare incorporation into hair may be the reason for this.

For the discrimination between traditional chewing of coca leaves and illegal cocaine use two potential markers were established. The aim of this study was to clarify in which steps of the illegal cocaine production hygrine and cuscohygrine are lost. Analyses of the coca leaves, different extraction steps and cocapaste were done by LC-triple quadrupole-MS (LC-QQQ-MS). It could be shown, that hygrine and cuscohygrine are lost in the first steps of the illegal cocaine production due to poor extraction with kerosene. In addition to this, the concentration changes of cocaine, cinnamoylcocaine, tropacocaine and ecgonine methylester were also estimated by analyzing the different extraction steps of the cocaine production. Based on these results, hygrine and cuscohygrine fulfill the conditions as markers for coca chewing.

Between 2011 and 2014 hair samples from parents/caregivers and children were collected for the detection of the use or ambulatory with illicit drugs. In summary, 388 hair samples from children and 594 hair samples from parents/caregivers were analyzed by GC-MS and LC-MS/MS. Hair samples from children were only tested in case of positive hair samples from the parents/caregivers. The hair samples were for cocaine, methadone, opiates, amphetamines, ecstasy, cannabinoids and benzodiazepines. Cannabinoids were analyzed by GC-MS and all the other drugs by LC-MS/MS. To clarify the cooperation from the parents/caregivers, a follow-up hair tests were done after 6 or 12 month. This study could estimate, that the hair samples of the children often showed a similar or the same drug profile as their parents. Hair analysis of children is a sensitive indicator of the handling of drugs in their environment and to estimate the best interests of the child.

Between 2011-2014 hair samples from children (n = 296) were tested positive for different illicit drugs, e.g. methadone, heroin, cocaine and delta-9-tetrahydrocannabinol (THC).

## Summary

---

The hair testing of the children revealed no drugs in 80 hair samples. Finally, hair analysis was proven to be a very efficient working instrument for the estimation of the best interests of the child.

The usefulness of nails as an alternative technique to hair was tested in two further projects. In the first study, 70 hair and nail samples from postmortem cases were analyzed by LC-QTOF-MS. In the second study hair and nail segments from corpses were analyzed by LC-QQQ-MS after method validation according to the GTFCh guidelines.

The extraction of hair and nail samples was done for 2 x 18 hours. Deceased with a promising case history, e.g. known drug addiction were selected for this work. The samples were measured in auto MS/MS mode for the qualitative screening by LC-QTOF-MS after the extraction steps. In summary, 89 substances were detected by the general unknown screening. Most frequently detected substances were metoprolol, acetaminophen and metoclopramide in hair and nail samples in the first study.

In the second study, nail and hair samples from 7 corpses were segmented and the concentration of drugs were determined by LC-QQQ-MS. Based on the results of this work, concentrations of drugs are not comparable in hair and nail segments. Due to this, concentration ratios of selected analytes and their metabolites were calculated. Similar concentration ratios for MDA/MDMA, EDDP/methadone and bisnortilidine/nortilidine were estimated. Similar concentration ratios may indicate equal incorporation ways into hair and nail matrix. By milling hair and nail samples, concentration loss could be explained. In addition, analyte losses could be observed due to sample preparation. Routinely, hair samples are only cut into small pieces before extraction. Case 5 showed increased concentration of 6-MAM in milled hair sample in contrast to the hair sample, which further research is needed concerning nail sample preparation.

Nail analysis was confirmed as a useful retrospective technique for the detection of previous drug intake. The analyses of nail and hair samples showed strong correlation to the case history and the drug incorporation in hair and nail samples seem to be comparable. The qualitative results from the general unknown screening showed only slight differences between hair and nail analysis. Based on the findings from the second study, main mechanisms of drug incorporation into nails may be via blood during the formation of the nail plate by the germinal matrix, via sweat and by external contamination.

In conclusion, the results of this research work could show the usefulness of hair analysis for different fields of application. Furthermore, nails could be proven to incorporate

## Summary

---

substances similar to hair and therefore be used as an alternative technique in the retrospective detection of drug intake in cases where no hair is available.

## 8 Publikationsverzeichnis

### 8.1 Veröffentlichungen in internationalen/nationalen Fachzeitschriften mit Peer-Review-Verfahren

**Krumbiegel F, Hastedt M, Westendorf L, Methling M, Niebel A, Parr MK, Tsokos M**  
**The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples.**  
*Forensic Sci Med Pathol.* 2016 Aug 11. doi: 10.1007/s12024-016-9801-1. [Epub ahead of print]

**Methling M, Krumbiegel F, Hastedt M, Buschmann CT, Tsokos M**  
**Extrem hohe postmortale Blutalkoholkonzentration bei letaler Speisebreiaspiration bei Mischintoxikation mit Alkohol und Cocain – eine Kasuistik**  
*Blutalkohol* 2016. BA.MS 201/15. Manuskript akzeptiert am 21.032016.

**Rubio NC, Thurmann D, Krumbiegel F, Pragst F**  
**Behaviour of hygrine and cuscohydrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.**  
*Drug Test Anal.* 2016 Mar 22. doi: 10.1002/dta. 1972. [Epub ahead of print]

**Pragst F, Hastedt M, Krumbiegel F, Herre S**  
**Hair Analysis as a Diagnostic and Forensic Tool in a Social Support System for Families with Underage Children and Drug Abusing Parents: Four Year Experience.**  
*Arab Journal of Forensic Science and Forensic Medicine* 2015, Volume 1 Issue (1), 180-193.

**Pragst F**, Hastedt M, Krumbiegel F, Herre S, Tsokos M

**Anwendungen der Haaranalyse zur Klärung von Drogen- und Alkoholmissbrauch in der Schwangerschaft und in Haushalten mit minderjährigen Kindern.**

*Trauma-Zeitschrift* ISBN: 978-3-89334-585-4; 2014.

**Krumbiegel F**, Hastedt M, Tsokos M

**Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupol time-of-flight mass spectrometry.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Dec;10(4):496-503. doi: 10.1007/s12024-014-9588-x. Epub 2014 Jul 19.

**Krumbiegel F**, Hastedt M, Eichberg S, Correns N, Gapert R, Hartwig S, Herre S, Tsokos M  
**Hair analysis in the detection of long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and its relation to gastrointestinal hemorrhage: an examination of 268 hair and blood samples from autopsy cases.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Mar;10(1):18-28. doi: 10.1007/s12024-013-9507-6. Epub 2013 Nov 13.

**Hastedt M**, Büchner M, Rothe M, Gapert R, Herre S, Krumbiegel F, Tsokos M, Kienast T, Heinz A, Hartwig S

**Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2013 Dec;9(4):471-7. doi: 10.1007/s12024-013-9416-8. Epub 2013 Mar 17.

**Hastedt M**, Bossers L, Krumbiegel F, Herre S, Hartwig S

**Fatty acid ethyl esters in hair as alcohol markers: estimating a reliable cut-off point by evaluating of 1,057 autopsy cases.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2013 Jun;9(2):184-93. doi: 10.1007/s12024-013-9425-7. Epub 2013 Mar 26.

**Hastedt M, Krumbiegel F, Gapert R, Tsokos M, Hartwig S**

**Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure.**

*Forensic Sci Med Pathol.* 2013 Sep;9(3):287-95. doi: 10.1007/s12024-012-9385-3. Epub 2012 Nov 5.

## **8.2 Vorträge und Posterbeiträge**

**Krumbiegel F, Scherer B, Hastedt M, Tsokos M**

**Erweiterung der Datenlage für den Alkoholmarker Ethylglucuronid in Haaren.**

25. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Rostock Mai 2016.

**Methling M, Neumann M, Krumbiegel F, Tsokos M**

**Nachweis des Alkoholmarkers Ethylglucuronid in Nägeln.**

25. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Rostock Mai 2016.

**Niebel A, Westendorf L, Hastedt M, Krumbiegel F, Tsokos M**

**Vergleich von verschiedenen Betäubungsmitteln und toxikologisch relevanten Wirkstoffen in Nägeln und Haaren mittels UPLC-MS/MS.**

25. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Rostock Mai 2016.

**Krumbiegel F**

**Neuerungen in den Beurteilungskriterien für die Fahreignungsbegutachtung - Überblick über die wissenschaftlichen Hintergründe.**

*Haarsymposium 2016 im Institut für Rechtsmedizin der Charité, Berlin, April 2016.*

**Krumbiegel F**

**Finger- und Fußnägel als Matrix zum Nachweis einer chronischen oder länger zurückliegenden Wirkstoffaufnahme.**

*Ärztkeammerfortbildung im Institut für Rechtsmedizin der Charité, Berlin, September 2015.*

**Krumbiegel F, Hastedt M, Tsokos M**

**Nägel - Eine alternative Untersuchungsmatrix?**

*Treffen der Toxikologen in Berlin und Brandenburg (GTFCh Veranstaltung) im Institut für Rechtsmedizin der Charité, Berlin, März 2015.*

**Krumbiegel F, Hastedt M, Tsokos M**

**Are nails a useful alternative matrix for the detection of chronic drug intake?**

*Institut für Pharmazie in Moskau, Russland, November 2014.*

**Hastedt M, Krumbiegel F, Rubio NC, Gonzalez J, Krumbiegel F, Pragst F**

**Development of a method for determination of coca alkaloids in hair by hydrophilic interaction LC-MS/MS and application to real samples to distinguish coca chewers from cocaine abusers.**

*Institut für Pharmazie in Moskau, Russland, November 2014.*

**Krumbiegel F, Hastedt M, Tsokos M**

**Are nails a useful alternative matrix for the detection of chronic drug intake?**

*9th International Symposium on ADVANCES IN LEGAL MEDICINE - ISALM, Japan, Juni 2014. (Unterstützt von: Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD). Posterbeitrag.*

**Hastedt M, Rubio NC, Gonzalez J, Krumbiegel F, Pragst F**

**Development of a method for determination of coca alkaloids in hair by hydrophilic interaction LC-MS/MS and application to real samples to distinguish coca chewers from cocaine abusers.**

*9th International Symposium on ADVANCES IN LEGAL MEDICINE - ISALM, Japan, Juni 2014. (Unterstützt von: Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD). Posterbeitrag.*



**Pragst F, Hastedt M, Krumbiegel F, Herre S**

**Role of Hair Analysis in a Social Support System for Families with Underage Children and Drug Addicted Parents in a German Federal City State.**

*5st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, Portugal, September 2013. Posterbeitrag.*

**Krumbiegel F, Hastedt M, Eichberg S, Correns N, Hartwig S, Herre S, Tsokos M**

**Einfluss einer Langzeiteinnahme von NSAR auf gastrointestinale Läsionen.**

*22. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Hannover, Mai 2013.*

**Krumbiegel F**

**Wissenschaftliche Hintergründe des Rausch- und Betäubungsmittels GHB ("Liquid Ecstasy") und anderen K.O. Mitteln.**

*Veranstaltung von MANEO "Augen auf! - K.O. Tropfen", Berlin, Februar 2013.*

**Hastedt M, Krumbiegel F, Herre S**

**Haaranalytik mit hochauflösender Massenspektrometrie.**

*16. Tagung der sächsischen Institute für Rechtsmedizin und des Landeskriminalamtes Sachsen, Dresden 2012.*

**Hastedt M, Hartwig S, Krumbiegel F, Herre S, Tsokos M**

**Fettsäureethylester und Ethylglucuronid in Haaren als Marker für chronisch exzessiven Alkoholkonsum im Rahmen eines arbeitsplatzbezogenen Drogentestprogramms.**

*Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Münster, 2011.*



## 9 Literaturverzeichnis

1. Mortler M. Drogen- und Suchtbericht 2016. Die Drogenbeauftragte Berlin. 2016.
2. Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta.* 2006;370(1-2):17-49. doi:10.1016/j.cca.2006.02.019.
3. Madea B. *Praxis Rechtsmedizin.* 2003;332-478.
4. Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Toxicological investigations on unusual materials (hair and vitreous humor): interest and limitations. *Arch Toxicol Suppl.* 1992;15:282-5.
5. Cooper GA, Kronstrand R, Kintz P, Society of Hair T. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* 2012;218(1-3):20-4. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.024.
6. Society of Hair T, Cooper G, Moeller M, Kronstrand R. Current status of accreditation for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* 2008;176(1):9-12. doi:10.1016/j.forsciint.2007.07.019.
7. Kintz P. Value of the concept of minimal detectable dosage in human hair. *Forensic Sci Int.* 2012;218(1-3):28-30. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.018.
8. Polla M, Stramesi C, Pichini S, Palmi I, Vignali C, Dall'Olio G. Hair testing is superior to urine to disclose cocaine consumption in driver's licence regranting. *Forensic Sci Int.* 2009;189(1-3):e41-3. doi:10.1016/j.forsciint.2009.04.020.
9. Tagliaro F, De Battisti Z, Lubli G, Neri C, Manetto G, Marigo M. Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving licence: a casework study. *Forensic Sci Int.* 1997;84(1-3):129-35.
10. Kronstrand R, Nystrom I, Forsman M, Kall K. Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. *Forensic Sci Int.* 2010;196(1-3):55-8. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.036.
11. Klein J, Karaskov T, Koren G. Clinical applications of hair testing for drugs of abuse--the Canadian experience. *Forensic Sci Int.* 2000;107(1-3):281-8.
12. Patteet L, Cappelle D, Maudens KE, Crunelle CL, Sabbe B, Neels H. Advances in detection of antipsychotics in biological matrices. *Clin Chim Acta.* 2015;441:11-22. doi:10.1016/j.cca.2014.12.008.

13. Klein J, Chan D, Koren G. Neonatal hair analysis as a biomarker for in utero alcohol exposure. *N Engl J Med.* 2002;347(25):2086. doi:10.1056/NEJM200212193472523.
14. Klein J, Forman R, Eliopoulos C, Koren G. A method for simultaneous measurement of cocaine and nicotine in neonatal hair. *Ther Drug Monit.* 1994;16(1):67-70.
15. Burns L, Conroy E, Mattick RP. Infant mortality among women on a methadone program during pregnancy. *Drug Alcohol Rev.* 2010;29(5):551-6. doi:10.1111/j.1465-3362.2010.00176.x.
16. Garcia-Bournissen F, Rokach B, Karaskov T, Koren G. Cocaine detection in maternal and neonatal hair: implications to fetal toxicology. *Ther Drug Monit.* 2007;29(1):71-6. doi:10.1097/ftd.0b013e3180310ddd.
17. Iwersen S, Schmoldt A, Schulz F, Puschel K. Evidence of gestational heroin exposure by comparative analysis of fetal and maternal body fluids, tissues, and hair in a heroin-related death. *J Anal Toxicol.* 1998;22(4):296-8.
18. Bailey BA, Sokol RJ. Prenatal alcohol exposure and miscarriage, stillbirth, preterm delivery, and sudden infant death syndrome. *Alcohol Res Health.* 2011;34(1):86-91.
19. Caprara DL, Klein J, Koren G. Diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): fatty acid ethyl esters and neonatal hair analysis. *Ann Ist Super Sanita.* 2006;42(1):39-45.
20. Moller M, Gareri J, Koren G. A review of substance abuse monitoring in a social services context: a primer for child protection workers. *Can J Clin Pharmacol.* 2010;17(1):e177-93.
21. Behnke M, Smith VC, Committee on Substance A, Committee on F, Newborn. Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics.* 2013;131(3):e1009-24. doi:10.1542/peds.2012-3931.
22. Bassindale T. Quantitative analysis of methamphetamine in hair of children removed from clandestine laboratories--evidence of passive exposure? *Forensic Sci Int.* 2012;219(1-3):179-82. doi:10.1016/j.forsciint.2012.01.003.
23. Garcia-Bournissen F, Nesterenko M, Karaskov T, Koren G. Passive environmental exposure to cocaine in Canadian children. *Paediatr Drugs.* 2009;11(1):30-2.

24. Pichini S, Garcia-Algar O, Alvarez AT, Mercadal M, Mortali C, Gottardi M et al. Pediatric exposure to drugs of abuse by hair testing: monitoring 15 years of evolution in Spain. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(8):8267-75. doi:10.3390/ijerph110808267.
25. Hartwig S, Auwarter V, Pragst F. Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int*. 2003;131(2-3):90-7.
26. Crunelle CL, Yegles M, De Doncker M, Dom G, Cappelle D, Maudens KE et al. Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic Sci Int*. 2015;247:18-22. doi:10.1016/j.forsciint.2014.11.023.
27. Baumgartner MR. Nails: an adequate alternative matrix in forensic toxicology for drug analysis? *Bioanalysis*. 2014;6(17):2189-91. doi:10.4155/bio.14.165.
28. Broecker S, Herre S, Pragst F. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci Int*. 2012;218(1-3):68-81. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.004.
29. Broecker S, Herre S, Wust B, Zweigenbaum J, Pragst F. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400(1):101-17. doi:10.1007/s00216-010-4450-9.
30. Peters FT HM, Schmitt G, Hartung M et. al. Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh), Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden. *Toxichem Krimtech*. 2009:185-208.
31. DIN 32645. Chemical analysis-decision limit and determination limit under repeatability conditions-terms, methods, evaluation. Berlin: Beuth Verlag; 2008.
32. Buffoli B, Rinaldi F, Labanca M, Sorbellini E, Trink A, Guanziroli E et al. The human hair: from anatomy to physiology. *Int J Dermatol*. 2014;53(3):331-41. doi:10.1111/ijd.12362.
33. Montagana W VSE. The anatomy of the hair follicle. The biology of hair growth New York, NY: Academic Press; 1958.39-64.
34. Kintz P, Salomone A, Vincenti M. Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology. 2015:1-65.

35. Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int.* 1993;63(1-3):9-18.
36. Krause K, Foitzik K. Biology of the hair follicle: the basics. *Semin Cutan Med Surg.* 2006;25(1):2-10. doi:10.1016/j.sder.2006.01.002.
37. Pianta A, Liniger B, Baumgartner MR. Ethyl glucuronide in scalp and non-head hair: an intra-individual comparison. *Alcohol Alcohol.* 2013;48(3):295-302. doi:10.1093/alcalc/agt012.
38. Rothe M, Pragst F, Thor S, Hunger J. Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. *Forensic Sci Int.* 1997;84(1-3):53-60.
39. Jakobsson G, Kronstrand R. Segmental analysis of amphetamines in hair using a sensitive UHPLC-MS/MS method. *Drug Test Anal.* 2014;6 Suppl 1:22-9. doi:10.1002/dta.1637.
40. Joya X, Mazarico E, Ramis J, Pacifici R, Salat-Battle J, Mortali C et al. Segmental hair analysis to assess effectiveness of single-session motivational intervention to stop ethanol use during pregnancy. *Drug Alcohol Depend.* 2016;158:45-51. doi:10.1016/j.drugalcdep.2015.10.028.
41. Stramesi C, Polla M, Vignali C, Zucchella A, Groppi A. Segmental hair analysis in order to evaluate driving performance. *Forensic Sci Int.* 2008;176(1):34-7. doi:10.1016/j.forsciint.2007.08.010.
42. Pragst F. Pitfalls in hair analysis. *Toxichem Krimtech.* 2004:69-83.
43. Moosmann B, Roth N, Auwarter V. Hair analysis for Delta(9) - tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A) and Delta(9) -tetrahydrocannabinol (THC) after handling cannabis plant material. *Drug Test Anal.* 2016;8(1):128-32. doi:10.1002/dta.1830.
44. Raikos N, Schmid H, Nussbaumer S, Ambach L, Lanz S, Langin A et al. Determination of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A (Delta9-THCA-A) in whole blood and plasma by LC-MS/MS and application in authentic samples from drivers suspected of driving under the influence of cannabis. *Forensic Sci Int.* 2014;243:130-6. doi:10.1016/j.forsciint.2014.07.026.
45. Moosmann B, Roth N, Auwarter V. Hair analysis for THCA-A, THC and CBN after passive in vivo exposure to marijuana smoke. *Drug Test Anal.* 2014;6(1-2):119-25. doi:10.1002/dta.1474.

46. Thorspecken J, Skopp G, Potsch L. In vitro contamination of hair by marijuana smoke. *Clin Chem*. 2004;50(3):596-602. doi:10.1373/clinchem.2003.026120.
47. Joya X, Papaseit E, Civit E, Pellegrini M, Vall O, Garcia-Algar O et al. Unsuspected exposure to cocaine in preschool children from a Mediterranean city detected by hair analysis. *Ther Drug Monit*. 2009;31(3):391-5. doi:10.1097/FTD.0b013e31819c3f2b.
48. Romano G, Barbera N, Lombardo I. Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Sci Int*. 2001;123(2-3):119-29.
49. Tsanaclis L, Nutt J, Bagley K, Bevan S, Wicks J. Differentiation between consumption and external contamination when testing for cocaine and cannabis in hair samples. *Drug Test Anal*. 2014;6 Suppl 1:37-41. doi:10.1002/dta.1623.
50. Koren G, Klein J, Forman R, Graham K. Hair analysis of cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J Clin Pharmacol*. 1992;32(7):671-5.
51. Poon S, Gareri J, Walasek P, Koren G. Norcocaine in human hair as a biomarker of heavy cocaine use in a high risk population. *Forensic Sci Int*. 2014;241:150-4. doi:10.1016/j.forsciint.2014.05.019.
52. Moore C, Coulter C, Crompton K. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;859(2):208-12. doi:10.1016/j.jchromb.2007.09.037.
53. Gambelungho C, Rossi R, Aroni K, Gili A, Bacci M, Pascali V et al. Norcocaine and cocaethylene distribution patterns in hair samples from light, moderate, and heavy cocaine users. *Drug Test Anal*. 2015. doi:10.1002/dta.1903.
54. George S, Braithwaite RA. The measurement of morphine in the hair of heroin abusers. *Ann Clin Biochem*. 1997;34 ( Pt 4):375-83.
55. Verri P, Rustichelli C, Palazzoli F, Vandelli D, Marchesi F, Ferrari A et al. Tramadol chronic abuse: an evidence from hair analysis by LC tandem MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;102:450-8. doi:10.1016/j.jpba.2014.10.002.
56. Madry MM, Rust KY, Guglielmello R, Baumgartner MR, Kraemer T. Metabolite to parent drug concentration ratios in hair for the differentiation of

- tramadol intake from external contamination and passive exposure. *Forensic Sci Int.* 2012;223(1-3):330-4. doi:10.1016/j.forsciint.2012.10.012.
57. Ropero-Miller JD, Huestis MA, Stout PR. Cocaine analytes in human hair: evaluation of concentration ratios in different cocaine sources, drug-user populations and surface-contaminated specimens. *J Anal Toxicol.* 2012;36(6):390-8. doi:10.1093/jat/bks050.
58. Skopp G, Kniest A, Haisser J, Mann K, Hermann D. Buprenorphine and norbuprenorphine findings in hair during constant maintenance dosage. *Int J Legal Med.* 2011;125(2):277-81. doi:10.1007/s00414-011-0555-8.
59. Tsanaclis L, Wicks JF. Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample. *Forensic Sci Int.* 2007;170(2-3):121-8. doi:10.1016/j.forsciint.2007.03.033.
60. Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Drug concentrations in human hair after bleaching. *J Anal Toxicol.* 1995;19(5):331-2.
61. Jurado C, Kintz P, Menendez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int J Legal Med.* 1997;110(3):159-63.
62. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009. *Forensic Sci Int.* 2010;196(1-3):2. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.031.
63. Krumbiegel F, Hastedt M, Tsokos M. Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Sci Med Pathol.* 2014;10(4):496-503. doi:10.1007/s12024-014-9588-x.
64. Garside D. Drug-of-abuse in nails. *Drug Testing in Alternate Biological Specimens*, Henkins AJ (Ed) Humana Press, Totowa NJ, USA.43-65.
65. Chen H, Xiang P, Shen M. Determination of clozapine in hair and nail: the role of keratinous biological materials in the identification of a bloated cadaver case. *J Forensic Leg Med.* 2014;22:62-7. doi:10.1016/j.jflm.2013.12.009.
66. Hang C, Ping X, Min S. Long-term follow-up analysis of zolpidem in fingernails after a single oral dose. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(23):7281-9. doi:10.1007/s00216-013-7188-3.



67. Madry MM, Steuer AE, Binz TM, Baumgartner MR, Kraemer T. Systematic investigation of the incorporation mechanisms of zolpidem in fingernails. *Drug Test Anal.* 2014;6(6):533-41. doi:10.1002/dta.1558.
68. Tenenbaum J. The epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Can J Gastroenterol.* 1999;13(2):119-22.
69. Russell RI. Defining patients at risk of non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:S14-8.
70. Roth SH. From peptic ulcer disease to NSAID gastropathy. An evolving nosology. *Drugs Aging.* 1995;6(5):358-67.
71. Valkhoff VE, Sturkenboom MC, Kuipers EJ. Risk factors for gastrointestinal bleeding associated with low-dose aspirin. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26(2):125-40. doi:10.1016/j.bpg.2012.01.011.
72. Gupta S, McQuaid K. Management of nonsteroidal, anti-inflammatory, drug-associated dyspepsia. *Gastroenterology.* 2005;129(5):1711-9. doi:10.1053/j.gastro.2005.09.033.
73. de Abajo FJ, Garcia Rodriguez LA. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with low-dose aspirin as plain and enteric-coated formulations. *BMC Clin Pharmacol.* 2001;1:1.
74. Iwamoto J, Saito Y, Honda A, Matsuzaki Y. Clinical features of gastroduodenal injury associated with long-term low-dose aspirin therapy. *World J Gastroenterol.* 2013;19(11):1673-82. doi:10.3748/wjg.v19.i11.1673.
75. Stedman CA, Barclay ML. Review article: comparison of the pharmacokinetics, acid suppression and efficacy of proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;14(8):963-78.
76. Vaduganathan M, Bhatt DL, Cryer BL, Liu Y, Hsieh WH, Doros G et al. Proton-Pump Inhibitors Reduce Gastrointestinal Events Regardless of Aspirin Dose in Patients Requiring Dual Antiplatelet Therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(14):1661-71. doi:10.1016/j.jacc.2015.12.068.
77. Dunnett M, Lees P. Hair analysis as a novel investigative tool for the detection of historical drug use/misuse in the horse: a pilot study. *Equine Vet J.* 2004;36(2):113-7.
78. Rubio C, Strano-Rossi S, Taberner MJ, Anzillotti L, Chiarotti M, Bermejo AM. Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from

- cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci Int.* 2013;227(1-3):60-3. doi:10.1016/j.forsciint.2012.09.005.
79. Rubio NC, Strano-Rossi S, Tabernero MJ, Gonzalez JL, Anzillotti L, Chiarotti M et al. Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci Int.* 2014;243:30-4. doi:10.1016/j.forsciint.2014.02.024.
80. Moore JM, Casale JF. In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves. *J Chromatogr A.* 1994;674(1-2):165-205. doi:10.1016/0021-9673(94)85224-3.
81. Rubio NC, Hastedt M, Gonzalez J, Pragst F. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *Int J Legal Med.* 2015;129(1):69-84. doi:10.1007/s00414-014-1061-6.
82. Moosmann B, Roth N, Auwarter V. Finding cannabinoids in hair does not prove cannabis consumption. *Sci Rep.* 2015;5:14906. doi:10.1038/srep14906.
83. Poetzsch M, Baumgartner MR, Steuer AE, Kraemer T. Segmental hair analysis for differentiation of tilidine intake from external contamination using LC-ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS imaging. *Drug Test Anal.* 2015;7(2):143-9. doi:10.1002/dta.1674.
84. Kintz P. Interpretation of hair findings in children: about a case involving carbamazepine. *Drug Test Anal.* 2014;6 Suppl 1:2-4. doi:10.1002/dta.1596.
85. Auwarter V, Wohlfarth A, Traber J, Thieme D, Weinmann W. Hair analysis for Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A--new insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. *Forensic Sci Int.* 2010;196(1-3):10-3. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.023.
86. Pragst F, Broecker S, Hastedt M, Herre S, Andresen-Streichert H, Sachs H et al. Methadone and illegal drugs in hair from children with parents in maintenance treatment or suspected for drug abuse in a German community. *Ther Drug Monit.* 2013;35(6):737-52. doi:10.1097/FTD.0b013e31829a78c3.
87. Madry MM, Steuer AE, Hysek CM, Liechti ME, Baumgartner MR, Kraemer T. Evaluation of drug incorporation into hair segments and nails by enantiomeric analysis following controlled single MDMA intakes. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(2):545-56. doi:10.1007/s00216-015-9130-3.

88. Suzuki O, Hattori H, Asano M. Nails as useful materials for detection of methamphetamine or amphetamine abuse. *Forensic Sci Int.* 1984;24(1):9-16.
89. Valente-Campos S, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA. Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2006;159(2-3):218-22. doi:10.1016/j.forsciint.2005.07.021.
90. Lemos NP, Anderson RA, Robertson JR. Nail analysis for drugs of abuse: extraction and determination of cannabis in fingernails by RIA and GC-MS. *J Anal Toxicol.* 1999;23(3):147-52.
91. Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Detection of amphetamines in fingernails: an alternative to hair analysis. *Arch Toxicol.* 1995;70(1):68-9.
92. Lemos NP, Anderson RA, Robertson JR. The analysis of methadone in nail clippings from patients in a methadone-maintenance program. *J Anal Toxicol.* 2000;24(7):656-60.
93. Engelhart DA, Jenkins AJ. Detection of cocaine analytes and opiates in nails from postmortem cases. *J Anal Toxicol.* 2002;26(7):489-92.
94. Garside D, Ropero-Miller JD, Goldberger BA, Hamilton WF, Maples WR. Identification of cocaine analytes in fingernail and toenail specimens. *J Forensic Sci.* 1998;43(5):974-9.
95. Ropero-Miller JD, Goldberger BA, Cone EJ, Joseph RE, Jr. The disposition of cocaine and opiate analytes in hair and fingernails of humans following cocaine and codeine administration. *J Anal Toxicol.* 2000;24(7):496-508.



## **10 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende kumulative Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, 18. Juli 2016

Franziska Krumbiegel



## 11 Anhang

### 11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der Drogentoten in Deutschland nach [1]	6
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Triple Quadrupol Massenspektrometers	11
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Time OF Flight Massenspektrometers	13
Abbildung 4: Aufbau des Haarschaftes	18
Abbildung 5: Aufbau des Haares in seiner physiologischen Umgebung	19
Abbildung 6: Wachstumszyklen des Haares	20
Abbildung 7: Aufbau des Nagels	24
Abbildung 8: Ergebnisse der Haar- und Blutanalysen	30
Abbildung 9: Herstellung der Cocapaste	32
Abbildung 10: Strukturformeln von Hygrin (oben) und Cuscohygrin (unten)	33

### 11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der positiv getesteten Haarproben von Kindern und Erwachsenen	37
Tabelle 2: Darstellung der Eigenleistung an den Manuskripten für die kumulative Arbeit in %.	46





### 11.3 Manuskripte

- a) Manuskript I: Hair analysis in the detection of long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and its relation to gastrointestinal hemorrhage: an examination of 268 hair and blood samples from autopsy cases. <http://dx.doi.org/10.1007/s12024-013-9507-6>
  
- b) Manuskript II: Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.1972>
  
- c) Manuskript III: Hair Analysis as a Diagnostic and Forensic Tool in a Social Support System for Families with Underage Children and Drug Abusing Parents: Four Year Experience. <http://dx.doi.org/10.12816/0017698>
  
- d) Manuskript IV: Nails are a potential alternative matrix to hair for drug analysis in general unknown screenings by liquid-chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. <http://dx.doi.org/10.1007/s12024-014-9588-x>
  
- e) Manuskript V: The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples. <http://dx.doi.org/10.1007/s12024-016-9801-1>