Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Ethylglucuronid und von Cannabinoiden in Haarproben mittels GC-MS/MS

Hiermit erkläre ich, Jeff Paulus, an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt wurde.

Luxemburg, den 3. Februar 2016

Paulus Jeff

Candidat–professeur en chimie

Au Lycée Technique pour Professions de Santé

Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Ethylglucuronid und von Cannabinoiden in Haarproben mittels GC-MS/MS

Luxembourg 2016

Zusammenfassung

Einleitung: Ethylglucuronid (EtG) ist ein Metabolit von Ethanol und wird zum Nachweis eines chronischen Alkoholkonsums in toxikologischen Analysen verwendet. Auch wenn die Schwelle des Nicht-, bzw. des Geringkonsums bei 7 pg/mg von der Society of Hair Testing (SoHT) festgelegt wurde, so ist es von analytischem Interesse Abstinenzler von Leuten mit geringem Konsum zu unterscheiden. Hierzu bedarf es einer performanten Analysenmethode, die EtG möglichst präzise bestimmt.

Cannabiskonsum ist zur Zeit gut mittels GC-MS in Blut und Serum-Proben bestimmbar. Eine zuverlässige, eindeutige Bestimmung in Haarproben scheitert zur Zeit an der mangelnden Empfindlichkeit der verwendeten Analyseverfahren. Mittels GC-MS könnten Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD) und Cannabinol (CBN) bestimmt werden, allerdings die wichtigsten Metaboliten, 11-Hydroxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) und 11-Nor-9-Carboxy-Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) sind nur in Konzentrationen bestimmbar, die weit oberhalb der zuerwartenden Konzentrationen in Haarproben sind. Der Nachweis diese Metabolite ist jedoch für eine zuverlässige Bestimmung wichtig, da so eine Kontamination der Haar ausgeschlossen werden kann.

Ziel: Diese Arbeit hat das Ziel eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht EtG in Haaren mittels GC-MS/MS zu bestimmen, und diese zu validieren. Als weiteres Ziel soll eine zweite Methode entwickelt werden die es erlaubt einen Cannabiskonsum in Haaren nachzuweisen, d.h. THC und mindestens einen Metaboliten mittels GC-MS/MS zu bestimmen.

Methode: Die Suchtstoffe und ihre Metaboliten werden aus den Haarproben herausgelöst und mit Festphasenextraktion auf konzentriert und gereinigt. Anschließend werden die Proben derivatisiert und mittels GC-MS/MS bestimmt.

Ergebnisse: In der vorliegende Arbeit konnte eine GC-MS/MS-Methode entwickelt werden, die es erlaubt in einem Bereich von 0,2 bis 400 pg/mg Haar, EtG mit einer LOD von 0,05 pg/mg und einer LOQ von 0,2 pg/mg zu bestimmen. Der Vergleich der GC-MS mit neuen GC-MS/MS-Methode, zeigt dass Letztere besonders bei kleinen Konzentrationen (< 30 pg/mg) auf Grund des geringeren Rausches einen klaren Vorteil hat und es somit ermöglicht geringere Konzentrationen zu bestimmen.

Es konnte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt THC-COOH•2HFB im GC-MS/MS-NCI zu bestimmen mit einer LOD von 15 fg/mg und einer LOQ von 51 fg/mg. Die Extraktion erfolgt mit einer DRUG II-Kolonne von Macherey-Nagel und die Derivatisierung erfolgt durch HFBA und HFBOH.

Um THC, CBD, CBN und THC-COOH zu bestimmen, wurden 2 Methoden entwickelt. Die erste ermöglicht die gemeinsame Derivatisierung aller Cannabinoide mit MSTFA und anschließender GC-MS/MS-EI. Die LOD betragen 0,31, 0,24, 0,40 und 0,24 pg/mg und die entsprechenden LOQ sind 1,02, 0,81, 1,333 und 0,81 pg/mg. Die Methoden wurde nicht validiert, da der ermittelte LOQ für THC-COOH nicht ausreicht um den von der SoHT cut-off- Wert von 0,2 pg/mg zu bestimmen. Deshalb wurde eine weitere Methode entwickelt welche ebenfalls eine Festphasenextraktion mittels der DRUG II vorsieht. Die Elution erfolgt nun in 2 Schritten: eine erste Fraktion mit THC, CBD und CBN (LOD 0,01, 0,13, 0,01 pg/mg; LOQ: 0,01, 0,13, 0,01 pg/mg) die mittels GC-MS/MS-EI

bestimmt wird und eine zweite Fraktion die mittels GC-MS/MS-NCI bestimmt wird. Die Methode erreicht eine Verbesserung der LOD (140 fg/mg) und LOQ (480 fg/mg) für THC-COOH, doch wurde der cut-off-Wert wieder nicht unterschritten, sodass die Methode ebenfalls nicht validiert wurde.

Danksagungen

Ich möchte mich bei Herrn Dr Michel Yegles bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Laboratoire National de Santé, service de toxicologie médico-légale, durchzuführen. Besonders möchte ich mich bedanken für seinen Vorschlag zum Forschungsthema, seine wissenschaftlichen Diskussionen, sowie seinen Willen alles zur Verfügung zu stellen was zum Abschluss der Arbeit erforderlich war. Des weiteren möchte ich mich Bedanken für die guten Ratschläge sowie die aufmunternden Worte im Laufe der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Gilbert Asselborn und Herrn Luc Kirchen für ihre Tipps und Hilfestellungen bei der Manipulation der GC-MS/MS.

Bedanken möchte ich mich auch beim ganzen Labor für den warmherzigen Empfang und das angenehme Arbeitsklima während meines Aufenthalts.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kindern, Felix und Andy, für ihre Haarspenden im Laufe der Arbeit.

Schlussendlich möchte ich mich auch bei meiner Frau Martine und meinen Eltern bedanken für die Unterstützung während der ganzen Zeit.

Jeff

Abkürzungen

11-OH-THC	11-Hydroxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol, Metabolit von THC
ADH	Alkoholdehydrogenase
APCI	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CB_1 /CB_2	Cannabinoid-Rezeptor im Gehirn
CBD	Cannabidiol
CBD-D3	dreifach deuteriertes Cannabidiol zur Nutzung als IS
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CBN-D3	dreifach deuteriertes Cannabinol zur Nutzung als IS
CEPT	Centre de Prévention des Toxicomanies
CI	Chemische Ionisation
CV	Variationskoeffizient, fr.: Coefficient de variation
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatographie
E_A	Elektronenaffinität
EHIS	European Health Interview Survey
EI	Elektronenstoßionisation
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtG	Ethyl-ß-D-Glucuronid
EtG-D5	fünffach deuteriertes Ethyl-ß-D-Glucuronid zur Nutzung als IS
EtS	Ethylsulfat
eV	Elektronenvolt
FSEE	Fettsäureethylester
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometer gekoppelt
GC-MS/MS	Gaschromatographie mit MS/MS gekoppelt
GC-MS/MS-EI	Gaschromatographie mit MS/MS gekoppelt mit einer Elektronstoßionisation
GC-MS/MS-NCI	Gaschromatographie mit MS/MS gekoppelt mit einer negativen chemischen Ionisation
h	Stunden
•HFB	Heptafluorobutyl-Gruppe
HFBA	Heptafluorobuttersäureanhydrid
HFBOH	Heptafluorobutan-1-ol
HFIP	Hexafluoroisopropan-2-ol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IS	interner Standard, i.a. eine deuterierte Verbindung
LC	Flüssigkeitschromatographie, engl.: Liquid Chromatographie
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion, engl. : Liquide-Liquide Extraction
LNS	Laboratoire National de Santé
LOD	Nachweisgrenze, engl.: Limit of Detection
LOQ	Bestimmungsgrenze, engl.: Limit of Quantification
LSD	Lysergsäurediethylamid

M	Einheit der Stoffmengenkonzentration, Einheit: mol/l
m/z	Masse-Ladungs Verhältnis
MBTFA	N-Methyl-bis(trifluoro-acetamid)
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, Einheit: 10^{-3} mol/l
MRM	MS/MS-Verfahren das es ermöglicht mehrere Fragmentionen zu verfolgen, engl.: multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Triple Quadrupol-Massenspektrometer
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
MTBSTFA	N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid
NCI	negative chemische Ionisation
$-NH_2$	Amino-Gruppe
n.b.	nicht bestimmbar
-OH	Hydoxyl-Gruppe
P_A	Protonenaffinität
PCI	positive chemische Ionisation
PEth	Phosphatidylethanol
•PFP	Pentafluoropropyl-Gruppe
PFPA	Pentafluoropropionsäureanhydrid
PFPOH	Pentafluoropropan-1-ol
pKs	Säurekonstante
PTV	Kaltaufgabeinjektor, engl.: Programmable Temperature Vaporization inlet
SAV	Standardadditionsverfahren
SCAN	Detektion von vollständigen Spektren
SCF	Überkritische Fluidchromatographie
-SH	Sulfanyl-Gruppe
SIM	Einzelmassenregistrierung, engl.: selected ion monitoring
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis, engl.: signal to noise ratio
SoHT	Society of Hair Testing
SPE	Festphasenextraktion, engl. solid phase extraction
TBDMS	tert-Butyldimethylsilyl-Gruppe
TFA	Trifluoroactyl-Gruppe
TFAA	Trifluoroessigsäureanhydrid
THC	Δ^9-Tetrahydrocannabinol
THC-COOH	11-nor-9-Carboxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol, Metabolit von THC
THC-COOH-D3	dreifach deuteriertes 11-Nor-9-Carboxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol zur Nutzung als IS
THC-COOH-glu	11-Nor-9-Carboxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol-Glucuronid
THC-D3	dreifach deuteriertes Δ^9-Tetrahydrocannabinol zur Nutzung als IS
THF	Tetrahydrofuran
•TMS	Trimethylsilyl-Schutzgruppe
u	atomare Masseneinheit
UDP-GT	Uridindiphosphat Glucuronosyltransferase
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime
WHO	World Health Organization
XTC	Ecstasy, Sammelbegriff für eine Vielzahl von Phenylethylaminen

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 13

1.1 Alkoholkonsum 13
1.1.1 Allgemeines 13
1.1.1.1 Alkoholkonsum in Luxemburg 13
1.1.1.2 Kampf gegen den übermäßigen Alkoholkonsum 14

1.2 Cannabiskonsum 15
1.2.1 Allgemeines 15
1.2.2 Beschreibung der Pflanze (Cannabis sativa) 17
1.2.3 Cannabiskonsum in Luxemburg 18
1.2.4 Kampf gegen den Drogenkonsum in Luxemburg 19
1.2.5 Pharmazeutische Wirkung von Cannabinoiden 20

1.3 Toxikologische Analyse 22
1.3.1 Nachweis von Suchtstoffen im menschlichen Körper 22
1.3.2 Die unterschiedlichen Untersuchungsmatrizen 23

1.4 Haaranalytik 24
1.4.1 Aufbau des menschlichen Haars 24
1.4.2 Haarwachstum 25
1.4.3 Einlagerung von Suchtstoffen in die Haarmatrix 26

2 SPEKTROSKOPISCHE ANALYSE 29

2.1 Probenvorbereitung 29

2.2 Festphasenextraktion (SPE) 29
2.2.1 Arbeitsweise 29
2.2.2 Die festen Phasen der SPE 31

2.3 Derivatisierung 32
2.3.1 Überblick und Funktion 32
2.3.2 Ziel der Derivatisierung 32
2.3.2.1 Alkylierung 33
2.3.2.2 Silylierung 33
2.3.2.3 Acetylierung 34
2.3.2.4 Veresterung 35

2.4 Gaschromatographie 36

2.5 Massenspektrometrie 38
2.5.1 Injektionssysteme 38
2.5.2 Massenspektrometer (MS) 39
2.5.3 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) 40
2.5.3.1 Funktionsprinzip der Tandem-Massenspektrometrie 40
2.5.3.2 Die MRM-Methode 40
2.5.3.2.1 Bestimmung der Precursor-Ionen 41

2.5.4 Ionenquellen ... 42
2.5.4.1 Elektronenstoßionisation (EI) ... 42
2.5.4.2 Chemische Ionisation (CI) ... 43
2.5.5 Gegenüberstellung MS vs MS/MS ... 46

2.6 Validierung von Ergebnissen ... 49

2.7 Standardadditionsverfahren (SAV) ... 50

3 ETHANOL, ETG UND HAARANALYTIK ... 51

3.1 Toxikologische Bestimmung des Alkoholkonsums ... 51
3.1.1 Faktoren, welche den Konsum von Ethanol charakterisieren ... 52
3.1.2 Der Stoffwechsel von Ethanol ... 52
3.1.3 Ethylglucuronid ... 52
3.1.4 Stand der Wissenschaft ... 53

4 CANNABINOIDE UND HAARANALYTIK ... 55

4.1 Toxikologische Bestimmung des Cannabiskonsums ... 56
4.1.1 Chemische Bestandteile von Cannabis ... 56
4.1.2 Toxikologisch relevante Cannabinoide ... 58
4.1.3 Stoffwechsel von Tetrahydrocannabinol und seine Metaboliten ... 59
4.1.4 Stand der Wissenschaft ... 60

5 ZIEL DER ARBEIT ... 65

6 CHEMIKALIEN, MATERIAL UND METHODEN ... 67

6.1 Handelsübliche Chemikalien ... 67

6.2 Standardlösungen ... 67

6.3 Instrumente ... 68

6.4 Arbeitsvorschriften ... 69
6.4.1 Bestimmung von EtG in einer Haarprobe ... 69
6.4.1.1 Probenvorbereitung ... 69
6.4.1.2 Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und Derivatisierung ... 69
6.4.1.3 GC-MS/MS-Einstellungen ... 70
6.4.2 Bestimmung von THC-COOH mittels NCI ... 70
6.4.2.1 Probenvorbereitung ... 70
6.4.2.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) ... 71
6.4.2.1.2 Festphasenextraktion und Derivatisierung ... 71
6.4.2.2 GC-MS/MS-Einstellungen ... 72
6.4.3 Bestimmung von THC, CBD, CBN und THC-COOH mittels EI ... 73
6.4.3.1 Probenvorbereitung ... 73
6.4.3.2 Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und Derivatisierung ... 73
6.4.3.3 GC-MS/MS-Einstellungen ... 74
6.4.4 Bestimmung von THC, CBD, CBN mittels EI und THC-COOH mittels NCI ... 75

6.4.4.1 Probenvorbereitung ... 75
6.4.4.2 Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und Derivatisierung ... 75
6.4.4.3 GC-MS/MS-Einstellungen ... 76

7 RESULTATE UND DISKUSSION ... 77

7.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von EtG in Haaren ... 77

7.2 *Validierung* der EtG-Methode ... 79

7.3 Methodenentwicklung zur Extraktion von Cannabinoiden aus Haaren ... 83
7.3.1 Bestimmen der relevanten Ionen der Cannabinoide und ihrer Retentionszeiten ... 83
7.3.2 Probenvorbereitung ... 89
7.3.3 Extraktion ... 90
7.3.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion ... 90
7.3.3.2 Festphasenextraktion ... 91

8 SCHLUSSFOLGERUNG ... 97

9 LITERATURVERZEICHNIS ... 99

10 VERZEICHNISSE ... 107

10.1 Verzeichnis der Abbildungen ... 107

10.2 Verzeichnis derTabellen ... 110

10.3 Publikation ... 111

1 Einleitung

Der Begriff „Droge“ stammt laut Duden (Dudenredaktion, 2003) vom französischen Wort „*drogue*“, bzw. dem niederländischen Wort „*droog*“, welches trocken bedeutet, da früher irrtümlicher Weise die Bezeichnung des Inhalts als Warenbezeichnung verwendet wurde. Unter einer Droge versteht der Duden *einen pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Rohstoff für Heilmittel, Stimulanzien oder Gewürze mit stark schmerzlindernder Wirkung*. Früher stand der Begriff für Arzneimittel, heute bezeichnet er Rauschgifte.

Im Alltag unterscheidet man legale von illegalen Drogen. Zur erste Klasse zählen alle Stoffe deren Besitz, Konsum oder Handel ab einem gesetzlichen Mindestalter erlaubt ist, wie u.a. Alkohol, Nikotin (Tabak), Koffein, rezeptfreie Medikamente... Als illegale Drogen werden alle jene Stoffe angesehen deren Besitz, Handel oder Konsum im Betäubungsmittelgesetz geregelt sind, wie u.a. Morphin, Amphetamine, Cannabis…

1.1 Alkoholkonsum

1.1.1 Allgemeines

Alkohol ist nach Tabak die am häufigsten konsumierte legale Droge. Alkohol gilt bei vielen Menschen als ein normales Genussmittel. Allerdings soll man in diesem Zusammenhang nicht die vielen Gefahren des Suchtstoffs Alkohol vergessen. So ist der regelmäßige Alkoholkonsum mitverantwortlich für viele körperliche und psychische Schäden, sowie für Unfälle und Todesfälle. Laut einer Schätzung der WHO aus dem Jahre 2012 sterben jährlich 3,3 Millionen Menschen durch einen übermäßigen Alkoholkonsum, dies entspricht 5,9 % aller in 2012 gestorbenen Menschen. (WHO, Management of substance abuse: Alcohol, 2012)

1.1.1.1 Alkoholkonsum in Luxemburg

Auch wenn der Alkoholkonsum pro Einwohner in den letzten 40 Jahren um ein Drittel zurückgegangen ist, so wird in Luxemburg noch immer viel Alkohol (11,4 Liter reiner Alkohol pro Einwohner der älter als 15 Jahre ist) konsumiert. In Luxemburg wird überwiegend Wein (43 %) getrunken, auch wenn Bier (36 %) sowie andere Spirituosen (21 %) sehr stark vertreten sind.

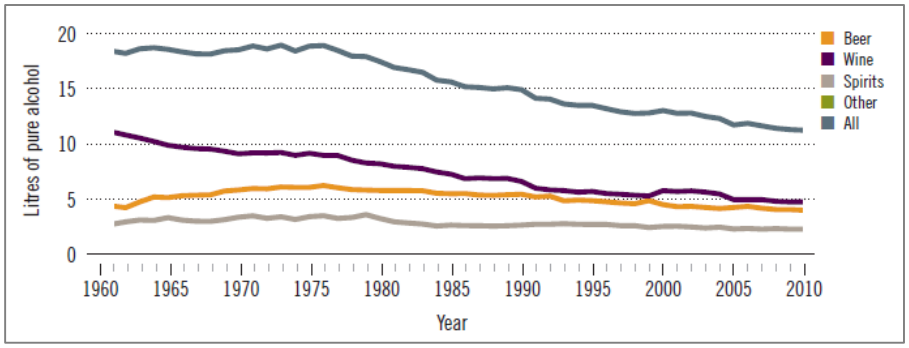


Abbildung 1: Registrierter Alkoholkonsum pro Kopf (15+) in Zeitraum von 1961 bis 2010 (WHO, Global status report an alcohol and health, 2014)

2010 lag der Konsum mit 12,4 Litern reinem Alkohol pro Kopf in Luxemburg weit über dem weltweiten Durchschnitt von 6,2 Litern und auch innerhalb Europas ist der luxemburgische Konsum oberhalb des Mittelwertes von 8,6 Litern, was sicherlich auch der Größe Luxemburgs geschuldet ist und der geringeren Besteuerung der alkoholischen Getränke im Vergleich zu den Nachbarländern. So wird Wein in Luxemburg mit 12% besteuert, in Deutschland mit 19%, in Frankreich mit 20% und in Belgien gar mit 21% (WHO, Global status report an alcohol and health, 2014) (Europäische_Kommission, 2014).

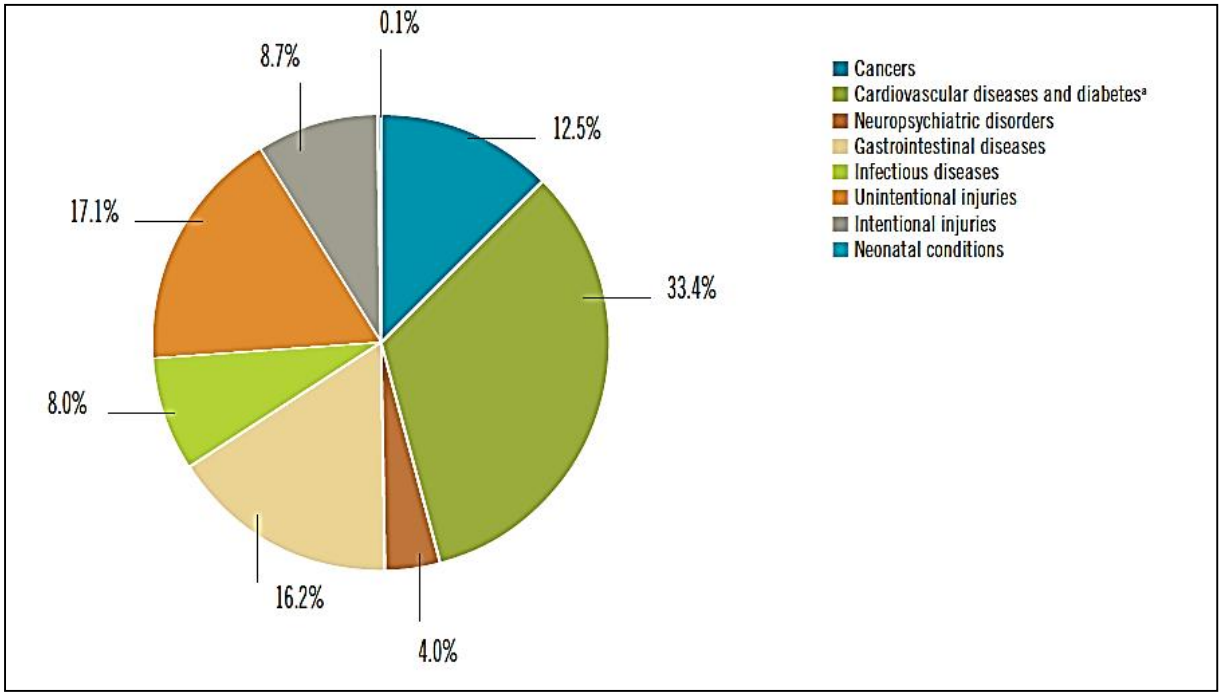


Abbildung 2: Verteilung der alkoholverschuldeten Todesfälle, in % bezogen auf alle durch Alkohol verursachten Todesfälle (WHO, Global status report an alcohol and health, 2014)

1.1.1.2 Kampf gegen den übermäßigen Alkoholkonsum

Laut dem WHO Bericht von 2014 sind im Jahre 2012, 5,9% aller Todesfälle auf den Alkoholkonsum zurückzuführen. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Sterbefälle welche auf Alkoholkonsum zurückzuführen sind. Die häufigsten Todesursachen sind Herz-Kreislauf-Erkrankung (33,4%), Verletzung nach Alkoholkonsum (26,8%) (unbeabsichtigte (17,1%) und beabsichtigte (9,7%)) Magen-Darm-Erkrankung (16,2%), insbesondere durch Leberzirrhose, und durch Krebs (12,5%).

Die Anzahl der durch Alkohol verursachten Todesfälle ist in der Euro-Zone am höchsten. Dieser Sachverhalt verwundert allerdings nicht sonderlich, da es ebenfalls die Euro-Zone ist, welche einen sehr hohen Alkoholkonsum aufweist, wie in Abbildung 3 zu erkennen ist. (WHO, Global status report an alcohol and health, 2014).

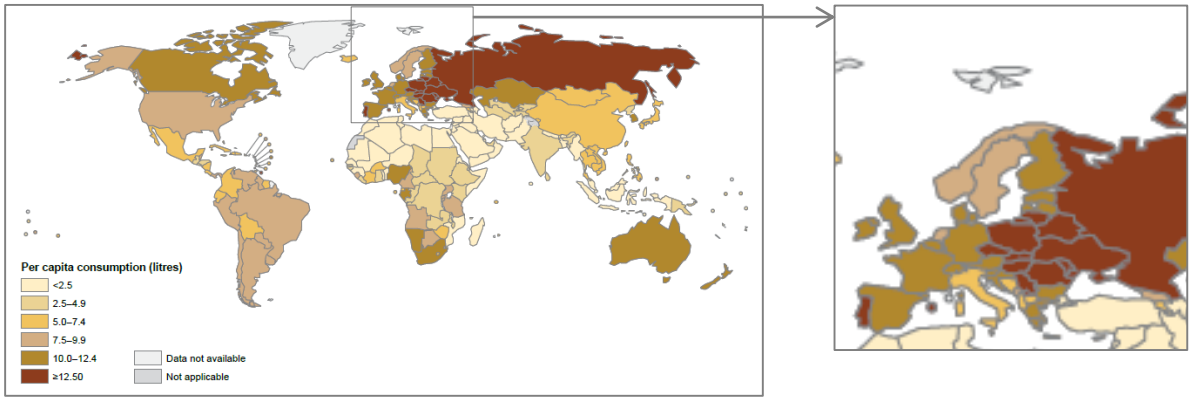


Abbildung 3: Gesamtalkoholkonsum pro Kopf (15+Jahre, in Liter reinem Alkohol) in 2010 (WHO, Global status report an alcohol and health, 2014)

Luxemburg hat, im Gegensatz zu vielen anderen Länder (64%) der europäischen Union, noch keine nationale Richtlinie oder einen nationalen Aktionsplan (WHO, Country Profiles, 2014) verfasst die den übermäßigen Alkoholkonsum reduzieren soll. Im Jahre 2010, wurde in Mondorf-les-Bains im Rahmen der fünften *Conférence Nationale Santé - Vers un plan national alcool* die Ausarbeitung eines *Programme national Alcool* diskutiert, doch wurde der nationale Plan bislang noch nicht finalisiert (Steil, 2010). Folgende Ideen zur Reduktion des übermäßigen Alkoholkonsums wurden in der Konferenz angedacht:

- Vorbeugung durch Änderung des Verhaltens der Menschen (Sensibilisierung in Medien und in den Schulen, auf Festivals, am Arbeitsplatz);
- Maßnahmen ergreifen, welche den Zugang zu alkoholischen Getränken erschwert (Verkaufseinschränkung an Tankstellen oder in Supermärkten, kein Verkauf von hochprozentigem Alkohol an Minderjährige);
- Verbot von Veranstaltungen die übermäßigen Alkoholkonsum fördern („Flat-Rate Drinking“);
- Verbot von Alkoholwerbung in allen Medien;
- Früherkennung von übermäßigem Konsum für medizinischen Fachpersonal.

In diesem Zusammenhang kann die Anhebung der Mehrwertsteuer, zum ersten Januar 2015, auf alkoholischen Getränken auf 17% als ein Teilerfolg angesehen werden. Diese stellt einen ersten Schritt in die Richtung der Prävention des übermäßigen Alkoholkonsums dar, da zumindest den Jugendlichen so der Zugang zu alkoholischen Getränken erschwert wird. (guichet.lu, 2014)

1.2 Cannabiskonsum

1.2.1 Allgemeines

Die ältesten Dokumente über die medizinische Anwendung von Cannabis stammen aus China und Ägypten um 200 n.Chr. Auch in Persien soll 500 v.Chr. Cannabis als Anästhetikum und für andere medizinische Anwendungen verwendet worden sein. Auch die Griechen, etwa 50 n.Chr., nutzten Cannabis, zum einen als Faserlieferant, zum anderen für medizinische Zwecke, wie z.B. bei Ohrenleiden. Im 18. Jahrhundert wurde Hanföl als Heilmittel gegen eine Vielzahl von Erkrankungen

eingesetzt, wie z.B. Masern, Pocken, Tripper, Husten, Seitenstechen, Gelbsucht… Um 1840 nutzen die Psychiater Louis Aubert-Roche und Jacques Joseph Moreau de Tours in der Psychiatrie Cannabis und erforschten die physischen und psychischen Auswirkungen. Die Höhepunkt des Cannabiskonsums und der Forschung wurde aber gegen Ende des 19. Jahrhunderts erreicht, als die Firma E. Merck in Darmstadt Cannabispräparate vermehrt verfügbar machte, um Schmerzzustände (Migräne, Menstruationskrämpfe), Keuchhusten, Asthma, Schafstörungen zu behandeln. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts nahm der Cannabiskonsum stark ab, zum einen da andere Medikamente auf den Markt kamen mit weniger Nebenwirkungen, zum anderen wurde die Beschaffung von hochwertigem Cannabis immer schwieriger und zuletzt wurden die nationalen und internationalen Gesetze immer restriktiver. Einige Jahr vor Beginn des zweiten Weltkriegs wurde Cannabis als Rauschmittel eingestuft und somit verboten. (Grotenhernen, 2004)

Der Begriff Cannabis hat seinen Ursprung im lateinischen Namen für Hanf. Hanf ist eine aus Asien stammende Pflanzengattung aus der Familie der Hanfgewächse. Die Hanffaser wurde lange Zeit verwendet zur Herstellung von Seilen, Textilien und Papier. Allerdings hat die Entdeckung von synthetischen Fasern die Nutzung der Hanffasern stark verringert. Die Samen werden noch als Lebens- und Futtermittel einsetzt, aber auch als Kosmetika und medizinisches und technisches Öl.

Neben dem illegalen Konsum von Cannabis als Rauschgift, wird in einigen Länder (u.a. Belgien, Niederlande, Spanien, Italien, Finnland, Portugal, Tschechien, Großbritannien…) die Nutzung von Cannabinoiden zu medizinischen Zwecken erlaubt. (Wikipedia, 2015)

In Luxemburg allerdings ist der Besitz, Konsum und Verkauf von Cannabis illegal. Allerdings ist möglicherweise in Luxemburg ein Wechsel in der aktuellen Drogenpolitik in Bezug auf Cannabis in Aussicht. Die aktuelle Regierung (Blau-Rot-Grün) sieht in der repressiven Drogenpolitik keine Zukunft, da der Konsum trotz Verbots immer weiter ansteigt. Justizminister Felix Braz sagte diesbezüglich allerdings, dass der Koalitionsvertrag weder eine Legalisierung von eine Strafbefreiung von Cannabis und Cannabisprodukten vorsieht, sodass das letzte Wort hier noch nicht gesprochen ist. (Bumb, Thiel, & Remesch, Auf dem Weg zur Entkriminalisierung, 2014)

In den Kreisen der Ärztevereinigung AMMD, wird Cannabis wohl als ein sehr interessantes Medikament angesehen, das man aber nicht verharmlosen darf. Besonders in der Schmerztherapie und zur Behandlung chronischer Krankheiten wie Asthma, Glaukom oder Multipler Sklerose können Cannabinoide vielversprechende Resultate erzielen. (Bumb, Mit Vorsicht genießen, 2014)

Wie der Bericht der HBSC von 2010 belegt ist Cannabis zurzeit die meist konsumierte illegale Droge bei Jugendlichen (Abbildung 4).

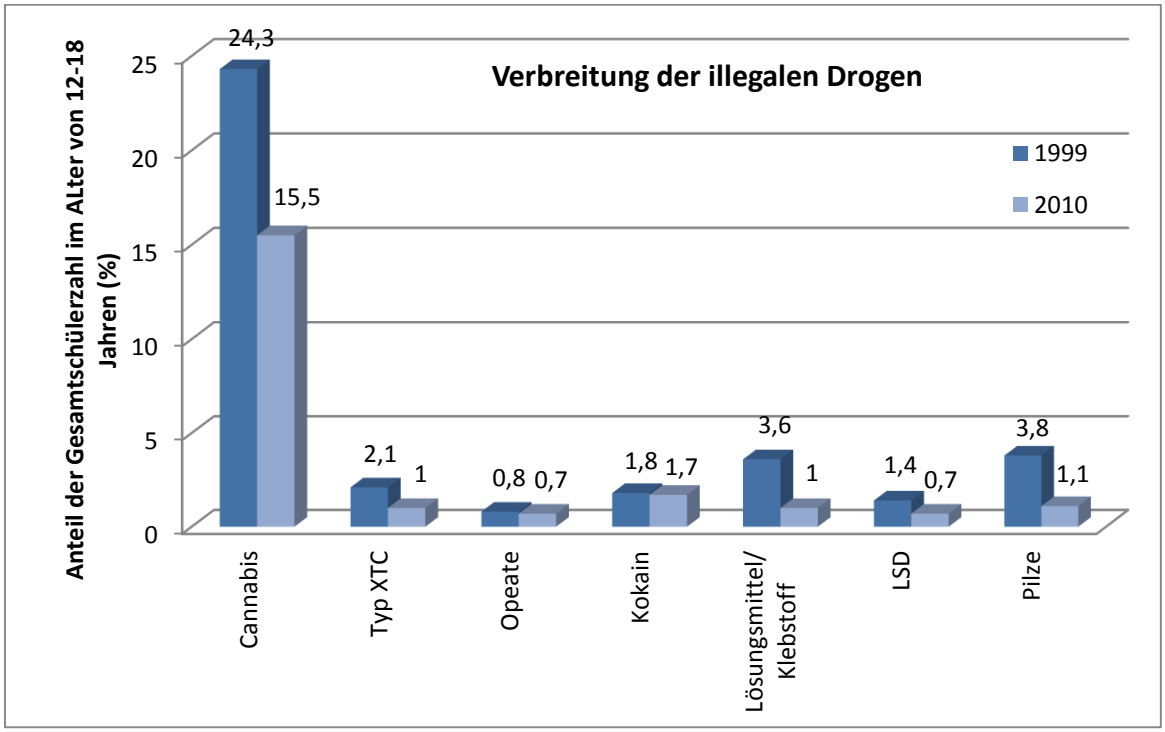


Abbildung 4: Verbreitung der illegalen Drogen. Anteil an der Gesamtschüleranzahl (in %) (Origer, 2014)

Wie der Drogenkonsum der luxemburgischen Gesamtbevölkerung aussieht, kann auf Grund des Fehlens von repräsentativen Umfragen kein Rückschluss gezogen werden. Allerdings soll eine nationale Umfrage über die Gesundheit (European health interview survey, EHIS) bis Ende 2015 hierüber Aufschluss geben.

1.2.2 Beschreibung der Pflanze (Cannabis sativa)

Vermutlich stammt die Hanfpflanze aus Zentralasien. Da die Menschen die Pflanzen aber als Nutzpflanzen gebraucht und angepflanzt haben, so ist ihr natürliches Verbreitungsgebiet nicht mehr sicher einzugrenzen. Heute findet man Hanfpflanzen weltweit, sowohl in verwilderter Form als auch angepflanzt.

Die meisten Wissenschaftlern unterschieden beim Hanf zwei Sorten von Cannabis (Grotenhernen, 2004) (Drogenberatung_Berlin, 2014):

- *Cannabis sativa* stammt aus dem asiatischen Raum. Die Pflanze wächst kegelförmig und kann Aussehen wie ein Tannenbaum. Die Blätter weisen lange, schmal gezackte Finger auf. Der Abstand zwischen den Blättern ist recht groß im Vergleich zur *Cannabis Indica* Sorte. Die Pflanzen können bis zu 7 m hoch werden. Die Reifezeit beträgt 8 bis 15 Wochen und ist somit ebenfalls länger als bei *Cannabis Indica.*
- *Cannabis Indica* stammt ebenfalls aus dem asiatischen Raum. Sie reifen früh und haben eine Blütedauer von 6 bis 9 Wochen. Die Pflanze hat kompakte und kurze Äste und breite, kurze, dunkelgrüne bis lilafarbene Blätter. Die Blüten sind nicht besonders lang, sondern eher von dichtem, schwerem, dickem und die Breite gehendem Wuchs. Sie haben einen beißenden Geruch. Die *Cannabis Indica* Sorte wird überwiegend zur Haschischproduktion genutzt, da die Pflanzen mehr Harz enthalten.

Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Verwendung der jeweiligen Sorten und über ihren Gehalt an den Wirkstoffen THC und CBD. (Clarke, 2004)

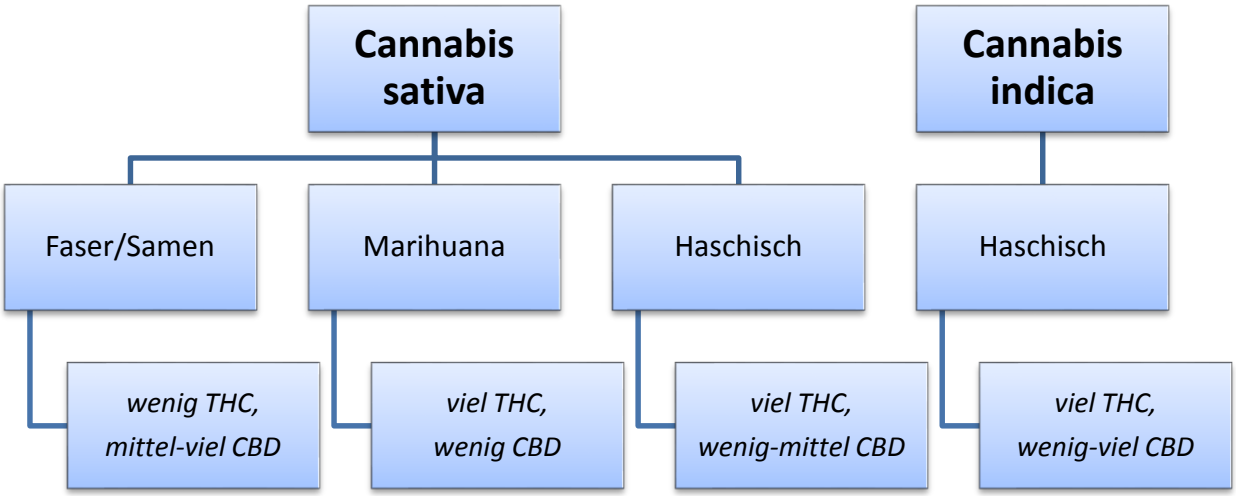


Abbildung 5: Die vier wichtigsten Cannabispools ausgehend von Cannabis sativa und Cannabis indica

In Hinsicht einer medizinischen Verwendung von Cannabinoiden sind Wissenschaftler in den Niederlanden damit beschäftigt Cannabiskulturen zu züchten mit einem bekannten Cannabinoidprofil. Ziel der Forschung ist es Varianten zu schaffen, die nur eine der wichtigsten Cannabinoidverbindungen (THC, CBD, CBD, CBG) enthält sowie Varianten mit voraussagbaren Cannabinoid-Mischprofilen.

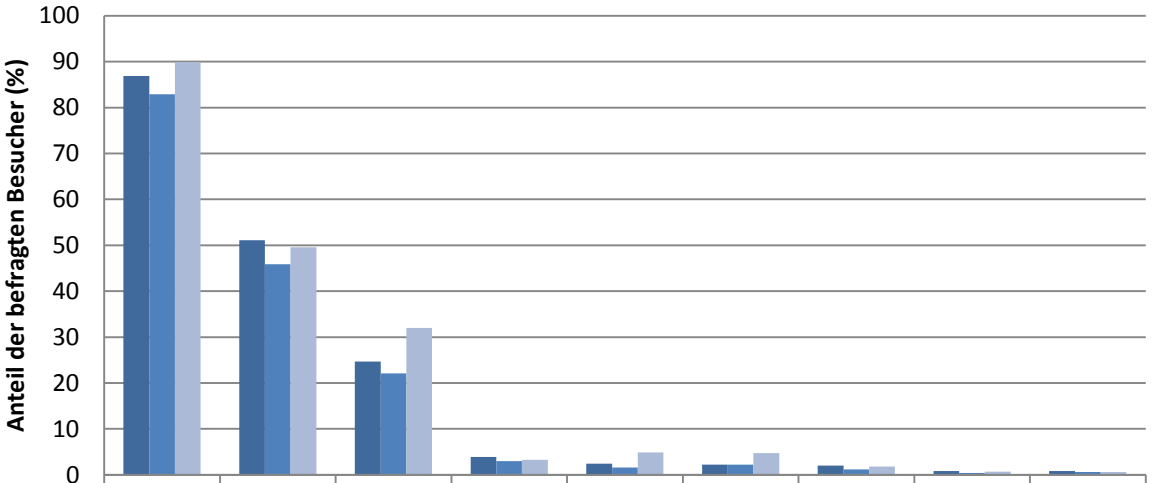
Der Konsum von Cannabis kann auf verschiedene Weisen erfolgen:

- Cannabis kann als **Gras (Marihuana)** konsumiert werden. Marihuana sind die getrockneten, weiblichen unbefruchteten Blütenstände, mit oder ohne anhängende Blätter. Der THC-Gehalt liegt zwischen 1 und 14 %. Marihuana wird zerkleinert geraucht, entweder pur oder mit Tabak vermischt. (DHS, 2012) (Mura & Piriou, 1998)
- **Haschisch (oder Shit)** ist das gepresste Harz der Hanfpflanze, das durch Zerstampfen der getrockneten Blätter und Blütenstände gewonnen wird. Je nach Qualität enthält Haschisch zwischen 10 % (nordafrikanische Variante) und 25 % THC (aus Nepal, bzw. Afghanistan). Haschisch kann geraucht werden oder zur Herstellung von THC-haltigen Speisen und Getränken genutzt werden. (Mura & Piriou, 1998)
- **Haschischöl** ist eine dunkelbraune, zähe Flüssigkeit, welche durch alkoholische Extraktion des Harzes hergestellt wird. Nach Verdampfen des Alkohols bleibt das Öl zurück, welches THC-Gehalte von 60 % aufweisen kann. Konsumiert man Haschischöl in reiner Form, so kann es eine halluzinogene Wirkung aufweisen. (Mura & Piriou, 1998)

1.2.3 Cannabiskonsum in Luxemburg

Der Centre de Prévention des Toxicomanies (CEPT) hat die letzten Jahre Besucher von luxemburgischen Festivals zu ihrem Konsum von Suchtstoffen befragt. Die Umfragen (Abbildung 6) zeigen, dass Alkohol und Cannabis sehr großen Zuspruch bei den jugendlichen Besuchern,

(Durchschnittsalter 2012: 22,6 Jahren, 2013: 21,1 Jahre, 2014: 22,6) des Festivals aufweisen. Alkohol ist bei der CEPT-Umfrage der unangefochtene Favorit der Jugendlichen. 2012 gaben erst ein Viertel der Jugendlichen an, in den letzten 14 Tagen Cannabis konsumiert zu haben, 2014 war es schon fast ein Drittel der Besucher. Alle anderen illegalen Drogen überschreiten die 5 % Hürde nicht.



	Alkohol	Tabak	Cannabis	Amphe-tamine	Typ XTC	Kokain	LSD	Ketamin	Heroin
2012	86,9	51,1	24,7	3,9	2,4	2,2	2	0,8	0,8
2013	82,9	45,9	22,1	3	1,6	2,2	1,2	0,4	0,6
2014	89,9	49,6	32	3,3	4,9	4,7	1,8	0,7	0,6

Abbildung 6: Zusammenfassung der Befragung "Welche Suchtstoffe hast du in den letzten 14 Tagen konsumiert?" von Festivalbesuchern durch CEPT [2012 (Origer, 2014), 2013 (Duscherer & Paulos, 2014), 2014 (Duscherer & Paulos, 2015)]

Da 2012 immerhin 74 % der Jugendlichen das eigene Auto als bevorzugtes Fortbewegungsmittel angegeben haben, so drängt sich hier die Frage nach der Fahrtauglichkeit der Jugendlichen auf, sowie der Kontrolle derselben.

1.2.4 Kampf gegen den Drogenkonsum in Luxemburg

Im Mai 2015 (Santé, 2015) wurde von Gesundheitsministerin Lydia Mutsch der neue Aktionsplan im Kampf gegen den Drogenkonsum vorgestellt. Das Ziel ist es die Gesundheit aller zu gewährleisten.

Die Antidrogenstrategie für die Jahre 2015–2019 hat zwei Prioritäten:

- Herabsetzen der Nachfrage nach Drogen
- Herabsetzen des Drogenangebots

Zudem werden noch folgende vier transversale Achsen beobachtet:

- Herabsetzen der Risiken und schädlichen Wirkungen,
- Informieren, Forschung und Evaluation,

- internationale Relationen fördern,
- Kommunikationsmechanismus.

Erste Schritte sind die Dezentralisation der Auffangstrukturen für Drogenabhängige, die Entwicklung von Substitutionstherapien und die Bekämpfung von hochansteckenden Krankheiten.

1.2.5 Pharmazeutische Wirkung von Cannabinoiden

Wird Cannabis über Inhalation im Körper aufgenommen, dann werden etwa 15 bis 20 % des im Rauch enthalten THC (Abbildung 7) und etwa 38 % des im Rauch enthalten CBD resorbiert. THC ist bereits Sekunden nach dem ersten Zug im Plasma nachweisebar. Die maximalen Blutwerte (zwischen 50 und 400 ng/ml) werden bereits 7 bis 10 Minuten nach Beginn der Inhalation erreicht wohingegen das Wirkungsmaximum erst nach 30 Minuten erreicht wird. Durch die hohe Fettlöslichkeit von THC verteilt es sich schnell im ganzen Körper, vor allem im fettreichen Gewebe - wie Muskeln, Gehirn und Lunge - sind die Konzentrationen von THC und Cannabidiol sehr hoch.

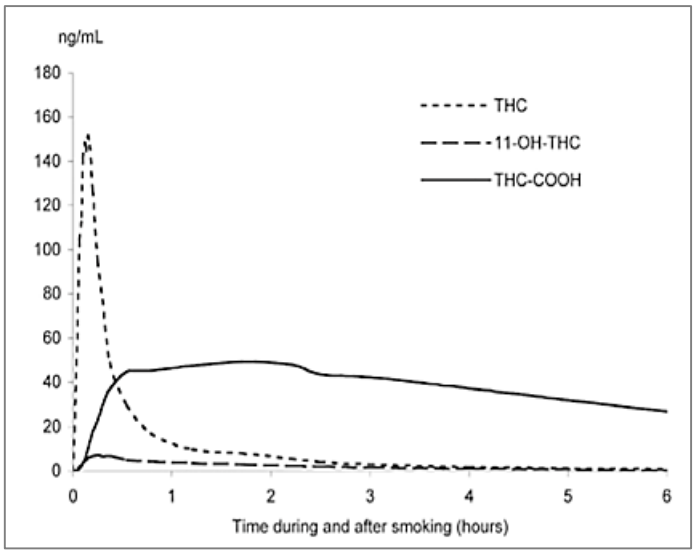


Abbildung 7: mittlere (6 Probanden, Abstinenzler) Plasmakonzentration von THC und Metaboliten (11-OH-THC und THC-COOH) nach Rauchen eines Joints mit 34 mg THC (Huestis e. a., 1992)

Wird THC oral aufgenommen, dann erfolgt die Absorption im Körper wesentlich langsamer, sodass eine Wirkung oft erst nach 30 bis 120 Minuten einsetzt. Dies bedingt, dass die orale Aufnahme wesentlich schlechter vorsehbarer ist als die Inhalation. Eine beschleunigende Wirkung auf die Aufnahme von THC haben fetthaltige Lebensmittel, die als lipophiles Trägermedium fungieren, wie z.B. Milch. (Grotenhernen, 2004) (Kintz, 2012)

Kurz nach der Aufnahme der Droge werden hohe Konzentration in den Hauptverteilungsorten wie Körperfett, Leber, Herz, Lunge, Darm, Nieren, Milz, Brustdrüsen, Plazenta, Nebennierenrinde, Schilddrüse und der Hypophyse gefunden. Nur etwa 3 % des THC befindet sich im Blutplasma in einer nicht gebundenen Form. Die Metaboliten von THC sind nahezu vollständig an Plasmaproteine gebunden. (Grotenhernen, 2004)

Der Metabolismus der Cannabinoide verläuft sehr komplex. Allein von THC sind mehr als 100 Metaboliten bekannt. Das wichtigste Stoffwechselorgan ist die Leber, allerdings sind auch andere Gewebe wie die Lunge und der Darm in geringem Umfang zur Biotransformation fähig.

Die Biotransformation von THC führt zuerst zu Hydroxy-Abkömmlingen von THC, vor allem zu 11-Hydroxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), durch Oxidation durch das P-450-Isoenzym CYP2C9 am allylen Kohlenstoffatom (C^{11}) vom A-Ring. (Abbildung 8) 11-OH-THC ist der wichtigste pharmakologische aktive Metabolit von THC. Die Lebenszeit dieses Metaboliten ist allerdings so klein und die Konzentration im Plasma so gering ist, dass seine Wirkung sehr gering ist. Durch Cytochrom P-450-Isoenzym wird 11-OH-THC zum nicht psychoaktiven 11-Nor-9-Carboxy-Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) oxidiert. Ob und welche Wirkung genau durch THC-COOH in Körper verursacht wird ist zurzeit noch nicht ausreichend erforscht. Bekannt ist lediglich, dass THC-COOH keine physiologische oder psychoaktive Wirkung aufweist. (Ujváry & Grotenhermen, 2014)

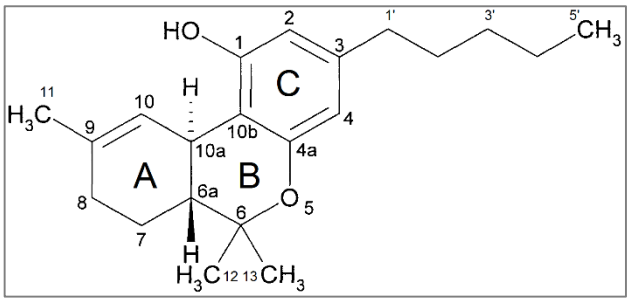


Abbildung 8 : Δ^9-Tetrahydrocannabinol (Dibenzopyran-Nummerierung)

Anschließend wird THC-COOH in das O-Ester-Glucuronid überführt und man nimmt an, dass THC in dieser Form in Geweben gespeichert wird.

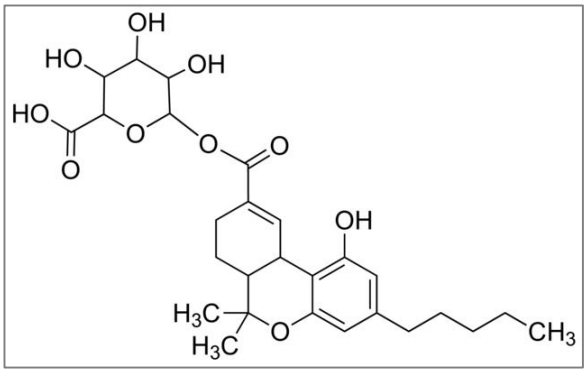


Abbildung 9: Glucuronid von 11-Nor-Δ9-Tetrahydrocannabinol-9-Carbonsäure (THC-COOH-glu)

Die Cannabinoide werden über verschiedene Wege (Kot, Urin und Schweiß) aus dem Körper ausgeschieden:

- 15-30% des THC werden in Form von THC-COOH über den Urin ausgeschieden
- 30-65% in Form von 11-OH-THC und THC-COOH mit dem Kot ausgeschieden.

Durch die starke Bindung der Cannabinoide im Fettgewebe ist die Eliminierung allerdings ein langwieriger Prozess. Bei Menschen, die regelmäßig, große Mengen Cannabis konsumieren, kann noch 27 Tage nach dem letzten Konsum THC-COOH im Urin nachgewiesen werden. (Kintz, Traité de Toxicologie Médico-Judiciaire, 2012)

Ein Großteil der Wirkungen von Cannabis ist auf die körpereigenen Cannabinoid-Rezeptoren (CB_1-Rezeptoren im Gehirn und CB_2-Rezeptoren im Immunsystem) zurückzuführen. THC verdrängt die körpereigenen Endocannabinoide von den CB_1-Rezeptoren. Dies führt zu einem Gefühl von Euphorie, zu Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und des Zeitgefühls. Weitere Wirkungen sind ein Gefühl von innerer Ruhe und Gelassenheit, welche einhergehen mit vermindertem Antrieb und der Tendenz zur Passivität. Die körperlichen Effekte des Cannabiskonsums sind u.a. Herzrasen,

Erweiterung der Blutgefäße, Schwindel, Rötung der Augen, verminderter Tränenfluss, verminderte Speichelproduktion. (Grotenhernen, 2004)

Die Wahrnehmung der psychischen Effekte hängt allerdings von einer Reihe von Faktoren ab. Konsumform und THC-Gehalt des konsumierten Produkts, sowie die psychische Verfassung des Konsumenten spielen eine wichtige Rolle. Je nach psychischer Verfassung des Konsumenten kann es aber zu Angstgefühlen, Panikattacken, Verwirrtheit und Verfolgungswahn kommen. Allerdings treten diese Wirkungen selten auf. (Grotenhernen, 2004)

1.3 Toxikologische Analyse

In der toxikologischen Analyse ist der Nachweis von Suchtstoffen im menschlichen Körper unverzichtbar. Untersuchungen zur Beurteilung von Verkehrsdelikten und zur Klärung der Schuldfähigkeit von Straftätern bei Verstößen gegen das Betäubungsmittelgesetz erfolgen in Luxemburg ausschließlich aus Blut- oder Urinproben (Di Bartolomeo, Junker, Lux, Wiseler, & Frieden, 2009). Allerdings ist das Zeitfenster für den Nachweis in Blut und in Urin stark abhängig von der Eliminationshalbwertszeit des in Frage kommenden Suchtstoffes.

1.3.1 Nachweis von Suchtstoffen im menschlichen Körper

Toxikologische Analysen zur Bestimmung des Konsums von Suchtstoffen können ausgehend von verschiedenen Körpermatrizen durchgeführt werden. Die Wahl der Körpermatrix wird durch die Zeit zwischen der Aufnahme des Suchtstoffs und dem Zeitpunkt der Analyse bestimmt.

Speichel- und Blutproben geben Aufschluss über einen kurz zurückliegenden Konsum. Urin- und Schweißproben haben den Vorteil, dass sie das Zeitfenster zwar verlängern, aber dass der kurzzeitige Konsum nicht nachweisbar ist. Haar- und Nagelproben sind wie ein Fahrtenschreiber. Sie geben Aufschluss über das Konsumverhalten über einen längeren Zeitraum.

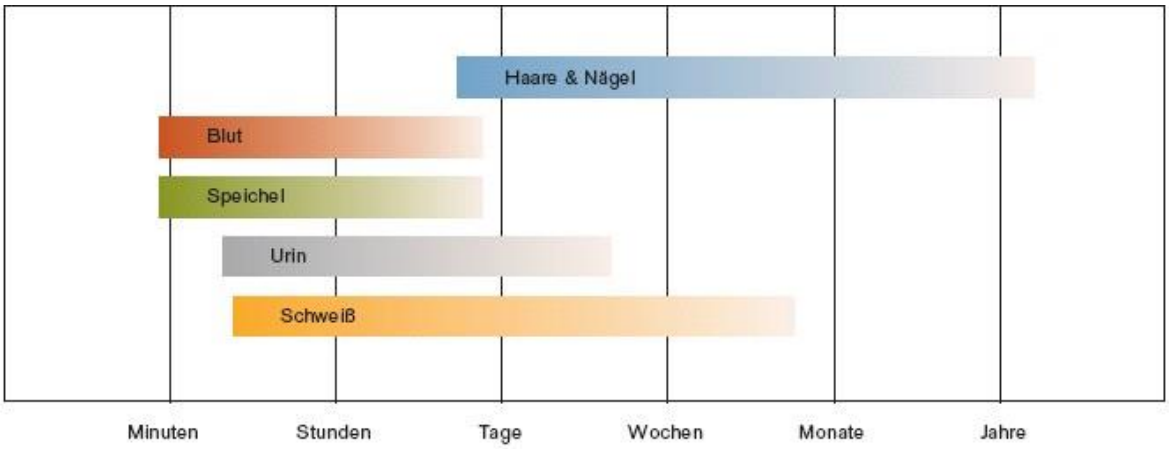


Abbildung 10: Vergleich der Nachweisfenster je nach Untersuchungsmatrix (Wikipedia, 2015)

1.3.2 Die unterschiedlichen Untersuchungsmatrizen

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Untersuchungsmatrizen hinsichtlich des nutzbaren Zeitfensters, sowie ein Beispiel für einen möglichen Anwendungsbereich.

Tabelle 1: Nachweis von Stoffen in biologischen Matrizen (Kintz, Traité de Toxicologie Médico-Judiciaire, 2012)

Probenart	Zeitfenster nach dem Konsum	Anwendungsbereich
Speichel	2-10 h	Rezenter Drogen- oder Medikamentenkonsum
Blut/Serum	2-10 h	Bestätigung des Konsums, Identifizierung und Dosierung von Drogen und Medikamenten
Urin	6 h – 7 d	Nachweis von Drogen und Medikamenten
Schweiß	Variabel (einige Tage)	Schnelltest auf Drogen und Medikamente, wenig zuverlässig.
Haare	> 1 Monat (hängt von der Länge der Haare ab)	Chronischer Konsum von Drogen und Medikamenten

Die Wahl der Untersuchungsmethode ist abhängig vom Ziel der Analyse und der Suchtstoffaufnahme. So werden bei Kontrollen im Straßenverkehr Speichel– und Urinproben bevorzugt um einen Cannabiskonsum festzustellen. Blut- und Speichelproben erlauben einen rezenten Drogenkonsum nachzuweisen, wogegen Urinproben schon einen länger zurückliegenden Zeitraum von einigen Tagen erfassen. So hat man eine größere Zeitspanne überprüft und muss für die Kontrolle nicht einmal auf invasive Verfahren zurückgreifen.

Eine Analyse des Schweißes ist immer mit Vorsicht zu behandeln, denn hier ist das Ergebnis stark abhängig von vielen Faktoren, wie z.B. einer passiven Kontamination, Waschen…

Möchte man feststellen, ob eine Person regelmäßig Cannabis oder Alkohol konsumiert, so ist die Haaranalyse erste Wahl. Die Haare unterscheiden sich von den anderen Möglichkeiten vor allem durch das sehr große Zeitfenster zur Bestimmung der gesuchten Stoffe. Eine Substanz bleibt, nach Einlagerung in den Haaren dort erhalten bis das Haar ausfällt. Im Gegensatz zu Urinproben ist es hier fast unmöglich Resultate zu fälschen. Außerdem sind die Proben leicht zu entnehmen und es besteht dabei kein Infektionsrisiko. Haare wachsen im Durchschnitt etwa 1 cm/Monat und sind deshalb ungeeignet für den momentanen Nachweis eines Drogenkonsums. Sie eignen sich allerdings sehr gut um über einen längeren Zeitraum (je nach Haarlänge) den Konsum eines Menschen widerzuspiegeln. Segmentiert, durch unterteilen des ganzen Haares in Segmente einer bestimmten Länge, man die Haarprobe kann man das Konsumverhalten Monat für Monat zuordnen. Der große Nachteil bei Haaranalysen ist allerdings die geringe Menge, die in den Haaren eingelagert werden. Man benötigt daher sehr empfindliche und spezifische Nachweismethoden. Außerdem muss man sehr vorsichtig bei der Interpretation der Ergebnisse bei segmentierten

Proben sein, da das Haarwachstum kein kontinuierlicher Prozess ist und die Umlagerung der Stoffe innerhalb des Haares nicht ausgeschlossen werden kann.

1.4 Haaranalytik

1.4.1 Aufbau des menschlichen Haars

Biologen nennen Haare trocken „Hautanhangsgebilde“ (Bach & Bayer, 1997). Somit sind sie mit Reptilschuppen und Vogelfedern verwandt, die ebenfalls aus Hornmaterial bestehen und von der Haut produziert werden. Die Haare werden in der 22. Schwangerschaftswoche angelegt. Ein erwachsener Mensch besitzt etwa 5 Millionen, davon etwa 1 Million auf dem Kopf. Das menschliche Haar wird in Haarfollikeln gebildet, die etwa 4 mm in die Haut hineinragen (Abbildung 11) und funktionell eng mit einer Talgdrüse verbunden sind. (Madea & Mußhoff, 2004)

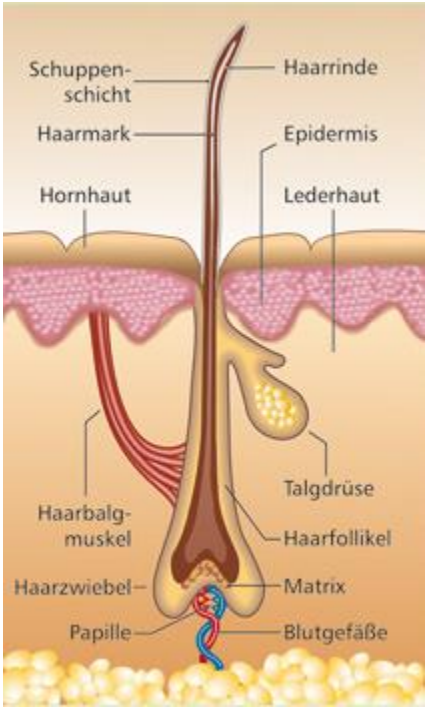


Abbildung 11: Schematischer Schnitt durch die Haut mit Haarfollikel, Haarschaft, Haarbalgmuskel und Talgdrüse (Der Aufbau des Haares, 2015)

Am tiefsten Punkt des Haares befindet sich die Haarzwiebel, die mit dem darüber liegendem Haarschaft von zwei Hautschichten umhüllt wird. Haare werden durch Zellteilung im Wachstumsbereich an der Basis des Follikels, der Haarpapille, gebildet. Die Haarpapille ist umgeben von Matrixzellen, welche sich schnell teilen und eine wichtige Rolle bei der Haarbildung spielen. Die Haarpapille wird über zahlreiche Blutkapillargefäße mit Nährstoffen, die zum Wachstum notwendig sind, versorgt.

Die Zellen nehmen an Volumen zu und verlängern sich. In der Keratinisierungszone synthetisieren die Zellen Pigment (Melanin) und beginnen zu verhornen (keratinisieren), so dass lange Fasern (Fibrillen) entstehen. Die Zellen sterben anschließend unter Abgabe des Zellkerns und von Wasser

ab. Das eigentliche Haar besteht also aus einer Zusammenlagerung von abgestorbenen Zellen. Bevor das Haar an die Oberfläche gelangt wird es noch mit Sebum (Hauttalg) aus den Talgdrüsen benetzt. (Madea & Mußhoff, 2004) Das voll ausgereifte Haar, das an der Hautoberfläche erscheint, ist in der Regel zwischen 15 und 120 µm dick (Harkey, 1993) und besteht aus drei Schichten: der Cuticula, dem Cortex, und der Medulla.

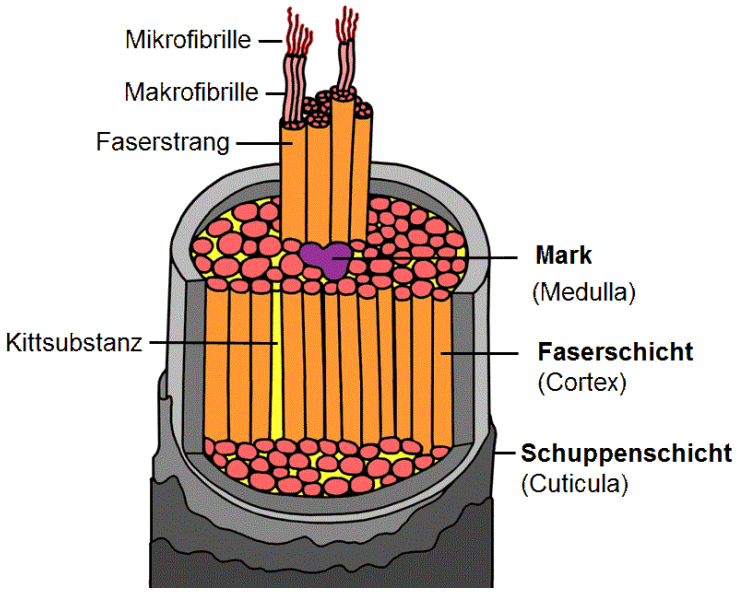


Abbildung 12: Schematischer Darstellung des Aufbaus eines Haares (Biologie, 2013)

Die **Cuticula**, auch Schuppenschicht genannt, setzt sich aus flachen keratinisierten Zellen zusammen, die wie Dachziegel übereinander liegen. Die Schicht ist 4-5 µm dick und dient als Schutzschicht vor physikalischen und chemischen Einflüssen und verleiht dem Haar seine optischen Eigenschaften, wie z.B. seinen Glanz.

Der **Cortex** besteht aus langen, parallel liegenden Proteinfasern von etwa 100 µm Länge, den Makrofibrillen, die selbst aus Keratinfasern bestehen. Der Cortex enthält die Pigmente und ist somit verantwortlich für die Haarfarbe.

Die **Medulla** wird von Cortexzellen umschlossen und enthält, nachdem es während des Wachstums ausgetrocknet ist, neben Lufteinschlüssen weniger dicht gepackte Zellen. Auch im Mark sind Pigmente enthalten. (Madea & Mußhoff, 2004).

1.4.2 Haarwachstum

Das mittlere Wachstum der Haare liegt zwischen 0,8 und 1,3 cm pro Monat (Harkey, 1993).

Jedes Haar besitzt seinen eigenen Wachstumszyklus, wobei jedoch während der 10 jährigen Entwicklung drei Wachstumsphasen (siehe Abbildung 13) durchlaufen werden (Sporkert, 2001):

2-6 jährige Anagenphase
Ein Haarfollikel entsteht und das Haar wächst. 85 bis 90 % der Haare befinden sich in der anagenen Wachstumsphase.

2-3 wöchige Katagenphase

Am Ende der Anagenphase schmelzen die Blutkapillaren ein und die Haarzwiebel degeneriert, da die Nährstoffversorgung und somit das Wachstum unterbrochen wird. Dies dauert etwa 2 bis 3 Wochen. 1 bis 3 % der Haare befinden sich in dieser Phase.

Bis zu 6 monatige Telogenphase

Das Haar, welches nach der Katagenphase nicht mehr wächst, bleibt noch weitere sechs Monate in der Kopfhaut, bis ein neues Haar gebildet wird und das alte Haar herausgeschoben wird. 7 bis 9 % der Haare befinden sich in diesem Stadium.

Abbildung 13: Haarzyklus : a) Anagenphase; b) Katagenphase; c) Telogenphase

Die Dauer der einzelnen Phasen ist je nach Körperregion sehr unterschiedlich und beeinflusst somit auch die Haarlängen der jeweiligen Körperregionen.

1.4.3 Einlagerung von Suchtstoffen in die Haarmatrix

Für die Bewertung von Haarproben ist zum einen die Wachstumsgeschwindigkeit der Haare von Bedeutung und zum anderen spielt der Einlagerungsmechanismus eine entscheidende Rolle. Denn eine Bewertung der Ergebnisse einer Haarprobe ist nur sinnvoll, wenn die Einlagerung des Suchtstoffs über den Blutkreislauf in die Haarwurzel stattgefunden hat.

Im Jahre 1989 stellen Baumgartner et al. ein erstes Modell, **Entrapment-Model**, vor, welches die Einlagerung von Substanzen und deren Metaboliten in so genannte „inaccessible regions“ in Haaren über die Blutversorgung erklärte. Allerdings wurde ihr Modell entkräftet durch Analysen, welche eine Einlagerung von Suchtstoffen von außen in das Haar als möglichen Weg in Betracht zogen. Im Modell von Baumgartner wurde diese Option nicht in Betracht gezogen, da sie glaubten durch eine gründliche Probenaufbereitung, Waschen der Haarprobe, sei eine Kontamination von außen auszuschließen. (Baumgartner & Hill, 1989)

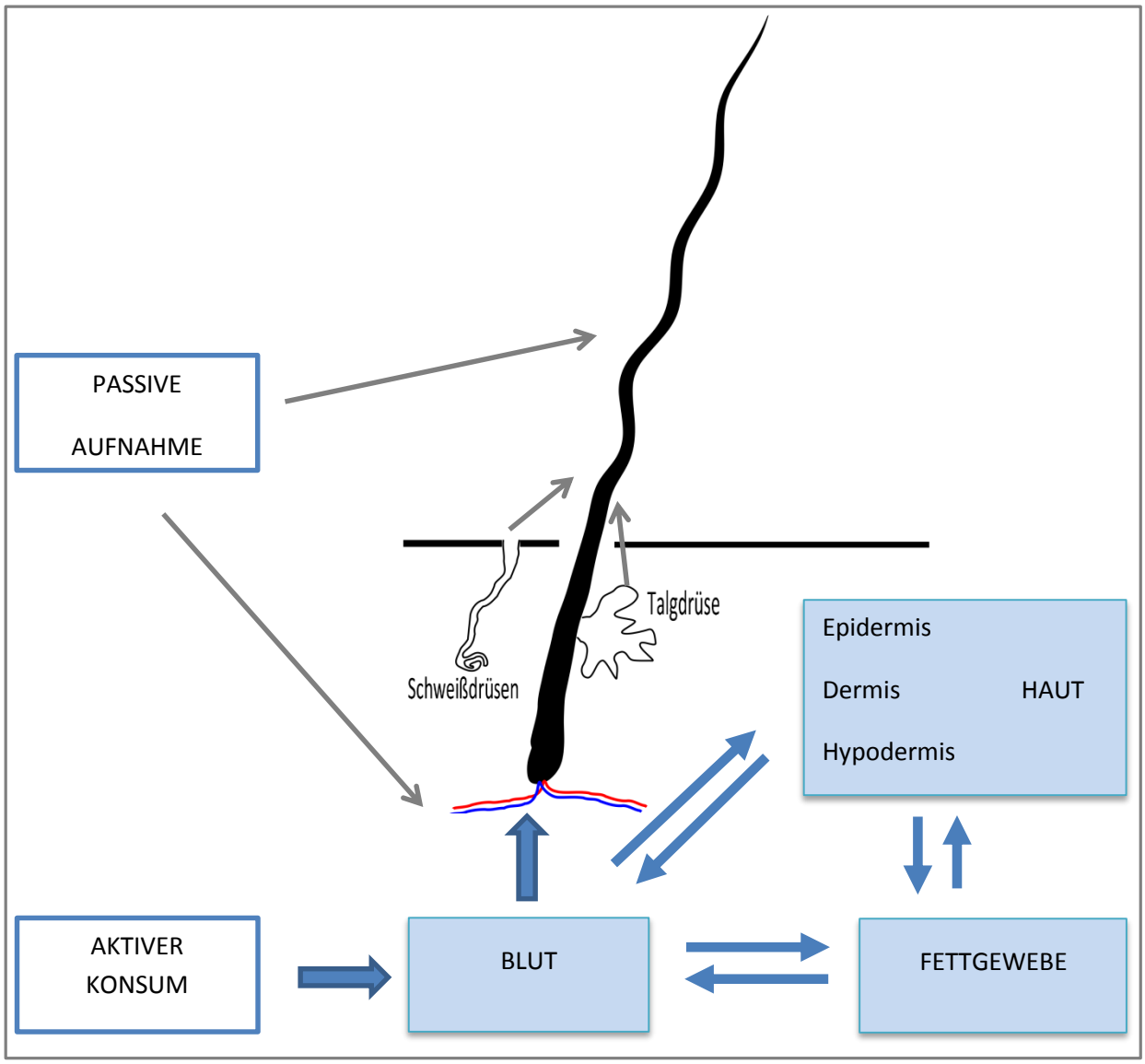


Abbildung 14: Aufnahmewege von Drogen in Haarproben

Im Jahre 1993 entwickelte Henderson das **Multikompartimenten-Modell.** Dieses Modell geht von einem komplexeren Mechanismus der Aufnahme von Suchtstoffen in Haaren aus. Er unterteilt den Aufnahmeweg in mehrere Kompartimente: Blut, Schweiß, Talg, angrenzende Hautschichten sowie die externe Kontamination. (Henderson, 1993).

Diese Wege werden im Folgenden kurz besprochen.

Einlagerung über die Blutversorgung

Der Einlagerungsweg über das Blutgefäßsystem spielt für viele Drogen und Pharmaka die größte Rolle. Handelt es sich um basische, nicht proteingebundene, nicht dissoziierte und lipophile Stoffe, so können diese in die Haarwurzel des anagenen Haares gelangen. Weitere wichtige Faktoren, die den Transport der Substanzen durch Biomembranen beeinflussen, sind lipophile Eigenschaften sowie die Größe und Geometrie des Moleküls. Eine besondere Bedeutung für die Einlagerung von Substanzen kommt dabei den Melanozyten zu. Sie weisen im Unterschied zum keratinisierten Haar,

das einen intrazellulären pH-Wert von ca. 6 besitzt (Robbins, 1994), einen pH-Werte zwischen 3 und 5 auf (Bhatnagar, Anjaiah, Prui, & Ramaihah, 1993). Auch das Zytoplasma der Matrixzellen besitzt einen niedrigeren pH-Wert als das Blutplasma. Dadurch kommt es entsprechend dem pH-Gradienten zu einer Anreicherung von basischen Substanzen in Melanozyten und Matrixzellen (Pötsch, Skopp, & Möller, Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation, 1997), von wo sie dann in die Melaningranula, in die Haarproteine und Haarlipide eingelagert werden. (Auwärter, 2006)

Einlagerung über Schweiß und Talg

Auch durch Schweiß und Talg können Suchtstoffe in das Haar gelangen:

- lipophile Moleküle diffundieren dabei entlang des Zellmembrankomplexes,
- hydrophile Substanzen werden während des Quellvorgangs eingeschleust.

Da die Talg- und die Schweißdrüsen in der Kopfhaut sehr eng beieinander liegen, kann sich eine Emulsion bilden, die das Haar benetzt. Daher ist es nicht möglich durch eine Haaranalyse zu entscheiden, aus welchem Sekret die Einlagerung einer Substanz ins Haar erfolgte. Allerdings stammen lipophile Substanzen eher aus dem Talg wohingegen hydrophile eher im Schweiß wiederzufinden sind. Bei der Beurteilung von Ergebnissen der Haaranalyse muss daher berücksichtigt werden, dass Substanzen bei starker Schweiß-/Talgsekretion zu einem positiven Nachweis auch an Stellen im Haar führen können, die lange vor der Einnahme gewachsen sind. Dies kann zur zeitlichen Fehlinterpretationen führen. (Pragst, Rothe, Spiegel, & Sporkert, 1998) (Auwärter, 2006)

Einlagerung aus angrenzendem Hautgewebe

Vor allem stark lipophile Substanzen können aus dem Blut in tiefere Hautschichten gelangen, dort häufen sie sich an und können verzögert in das Haar eingelagert werden. Auch eine Aufnahme von Substanzen aus externen Quellen in die Haut, mit nachfolgender Einlagerung ins Haar, ist denkbar (Henderson, 1993) (Pötsch, Skopp, & Möller, Zum Suchtmittelnachweis in Haaren, 1997) (Auwärter, 2006)

Einlagerung aus externen Quellen

Auch Verunreinigungen der Haare durch Rauch (z.B.: Cannabis, Nikotin…), sowie durch Stäube oder durch kontaminierte Haarkosmetika wurde beobachtet. So wies Mieczkowski Cocain im Waschwasser der Haare von mehreren nicht drogenabhängigen Drogenfahndern nach, die häufig mit Cocain in Berührung kamen (Mieczkowski, 1997). Die Gefahr von falschen positiven Haaranalysen ist aber bei gründlicher Probenvorbehandlung (geeignete Waschschritte vor der Probenextraktion) und differenzierter Beurteilung positiver Haaranalysen, als sehr gering einzustufen, da nach äußerer Kontamination in der Regel keine Metaboliten der entsprechenden Ausgangssubstanzen nachgewiesen werden. (Auwärter, 2006)

2 Spektroskopische Analyse

2.1 Probenvorbereitung

Die Haarprobe, ein in etwa Bleistift dickes Haarbüschel, wird am Hinterkopf entnommen und wird möglichst dicht an der Kopfhaut abgetrennt. Die Haarsträhne wird in Alufolie verpackt und ist so bei Raumtemperatur über lange Zeit haltbar. Bei den Probenahmen werden die Haare markiert, damit später das hautnahe Ende der Haarprobe analysiert werden kann, welches zuletzt gewachsen ist. Die Proben werden in Wasser und in Aceton je eine Minute gewaschen. Dieser Waschvorgang soll eine Kontamination der Haarprobe durch anhaftende hydrophile und hydrophobe Substanzen verhindern. Die Probe wird getrocknet und pulverisiert. Hierzu werden die Haare in einem Metallgefäß mit einer Schere zerkleinert und anschließend, nach Hinzufügen einer Metallkugel, in einer Schwingmühle (Abbildung 15) zu Pulver gemahlen.

Abbildung 15: Schwingmühle (retsch.de, 2015)

Um die in der Probe enthaltenen Substanzen zu bestimmen, müssen diese erst aus der Haarmatrix herausgelöst werden. Manche Stoffe lösen sich leichter aus der Matrix, wie z.B. EtG, andere Substanzen sind stärker gebunden und bedürfen drastischer Mittel. Die Proben werden zentrifugiert und dann mittel Festphasenextraktion oder mittels Flüssig-Flüssig-Extraktionen gereinigt. Hierbei muss der pH der Probe unter Umständen angepasst werden.

2.2 Festphasenextraktion (SPE)

2.2.1 Arbeitsweise

Die SPE hat zwei Aufgaben. Zum einem soll die Haarprobe von den Verunreinigungen der Haarmatrix befreit werden, zu anderen soll der Analyt in der Haarprobe angereichert werden.

Konditionierung des Sorbens

Die Konditionierung der Säule ist der erste Schritt der SPE. Er ist notwendig um zu gewährleisten, dass der Analyt reproduzierbare Wechselwirkungen eingehen kann. Die Konditionierung wird auch noch Solvatisierung genannt und ist an sich lediglich eine Benetzung des Sorbens mit einem Lösungsmittel.

Für unpolare Analyten konditioniert man üblicherweise mit Lösemitteln die mit Wasser mischbar sind, wie z.B.: Methanol, Tetrahydrofuran, 2-Propanol… gefolgt von dem Lösungsmittel in dem der Analyt gelöst ist.

Nach der Konditionierung darf das Säulenbett nicht trockenlaufen, da sonst die Benetzung zunichte gemacht wird.

Probenaufgabe

Auf die konditionierte Säule gibt man nun die Probe nicht zu schnell auf (ca. 3 ml/min). Hier kann mit Überdruck und Unterdruck gearbeitet werden. Der Analyt haftet in diesem Schritt auf dem Trägermaterial der SPE-Säule.

Waschen

Durch Aufbringen einer Waschlösung wird das Säulenbett von Verunreinigungen befreit. Ist die Polarität des Elutionsmittels zu verschieden von der Waschlösung, so ist ein Trocknen des Säulenbetts zu empfehlen, um die Elution und die Extraktionsausbeute zu erhöhen. Allerdings ist der Waschschritt nicht immer notwendig. (vgl. Abbildung 16)

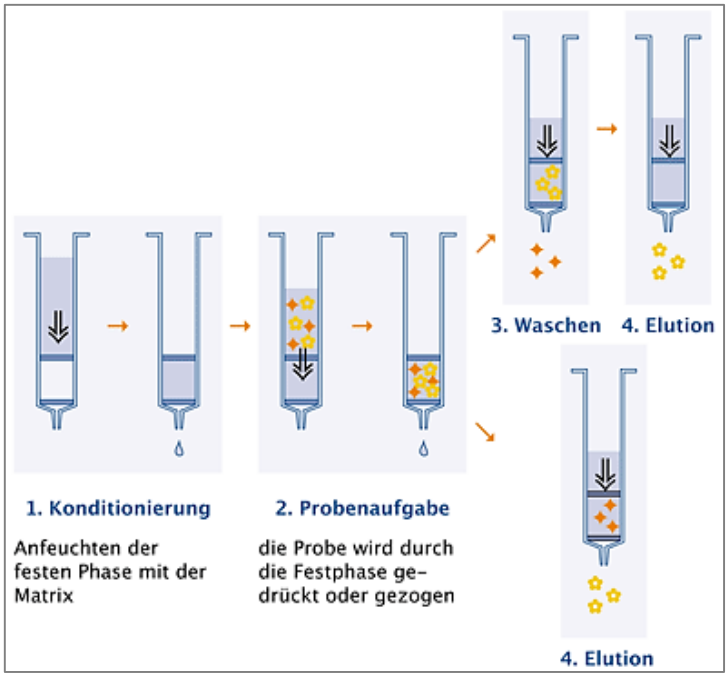


Abbildung 16: Festphasenextraktion (Macherey-Nagel, 2015)

Elution

Die Elution sollte nicht zu schnell erfolgen, ca. 1 ml/min.

Die vier Arbeitsschritte sind in Abbildung 16 nochmals grafisch dargestellt. (Macherey-Nagel, 2015)

2.2.2 Die festen Phasen der SPE

Bei der Extraktion von EtG und der Cannabinoide wurden unterschiedliche feste Phasen getestet, da die Moleküle unterschiedliche funktionelle Gruppe aufweisen.

Ethylglucuronid (Abbildung 18) weist eine Carboxyl-Gruppe, sowie drei Hydroxyl-Gruppen auf. EtG kann somit je nach pH der Lösung als Säure oder als geladenes Carboxylat-Anion vorliegen. Diese Eigenschaft wird bei der SPE ausgenutzt. Als feste Phase wird eine Mischphase, bestehend aus einer unpolaren Umkehrphase (engl. „reversed phase“) und einem Anionenaustauscher gewählt (Abbildung 17) Der Vorteil der Mischphase von Oasis ist es zudem, dass das Trägermaterial auf Polymerbasis aufgebaut ist und nicht so schnell austrocknet, wie ein Trägermaterial auf Silikatbasis.

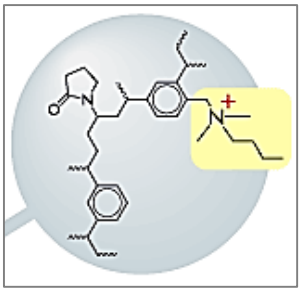


Abbildung 17: Struktur der festen Phase der OASIS®MAX Säule

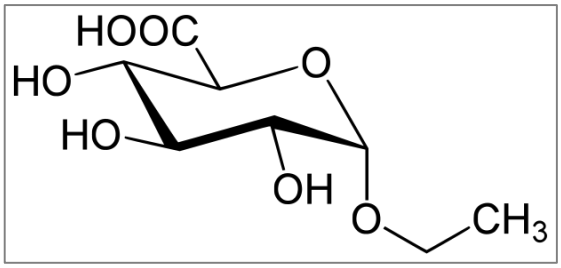


Abbildung 18: Ethylglucuronid (EtG)

Für die *Trennung der Cannabinoide* wurden feste Phasen verschiedener Hersteller getestet um die bestmögliche Trennung zu erzielen. Ich möchte in diesem Kapitel aber lediglich auf die zurückbehaltene Phase eingehen.

Die Chromabond DRUG II Phase von Macherey-Nagel hat sich bewährt, auch wenn diese Phase eine Silikatbasis besitzt. Die DRUG II Phase ist konzipiert für die Trennung von Cannabinoiden wie man unschwer an der aufgebrachten Mischphase erkennen kann. Die Mischphase enthält sowohl ein C_8-Umkehrphase als auch starke Anionenaustauscher-Gruppen in Form von quartären Ammonium-Gruppen (Abbildung 19). So ist es möglich sowohl die Carboxylat-Anionen von THC-COOH als auch die Alkyl-Gruppen der restlichen Cannabinoide, welche nicht in der Lage sind Anionen zu bilden, zu binden. Die Strukturen der Cannabinoide werden in Kapitel 4.1.1 genauer beschrieben.

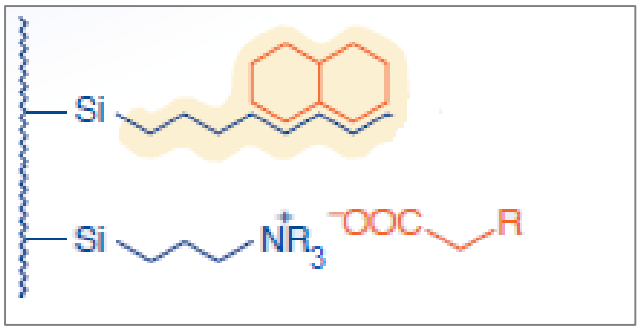


Abbildung 19: Struktur der festen Phase der DRUG II-Säule von (Macherey-Nagel, 2015)

2.3 Derivatisierung

2.3.1 Überblick und Funktion

Unter dem Begriff „Derivatisierung" von funktionellen Gruppen in der analytischen Chemie versteht man die Umsetzung einer Probe mit Derivatisierungsreagenzien mit dem Ziel bestimmte funktionelle Gruppe in andere Gruppen umzuwandeln, welche leichter zu trennen und nachzuweisen sind. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Anwendungsgebiete der Derivatisierungsreagenzien.

Tabelle 2: Übersicht der Derivatisierungsmittel und ihre Anwendungsbereiche

Prinzip	Derivatisierung von: –OH	–NH_2	–COOH	–SH	Derivatisierungsreagenz
Alkylierung	Ja	Ja	Ja	Nein	Diazomethan, Methyliodid, Methylbromid, …
Acylierung	Ja	Ja	Nein	Ja	Acetanhydrid
Silylierung	Ja	Ja	Ja	Nein	Silierungsreagenzien

2.3.2 Ziel der Derivatisierung

Das Ziel der Derivatisierung ist es, die chemischen Eigenschaften des Analyten so zu verändern, dass er für eine bestimmte Analysenmethode optimiert wird. Hierzu wird das durch SPE gereinigte Eluat im Stickstoffstrom bei 38°C im Heizblock getrocknet.

Die Derivatisierung bringt einige wesentliche Vorteile: (Madea & Mußhoff, 2004)

- Umwandlung von polaren, schwerflüchtigen Substanzen in flüchtige für die GC einsetzbare Stoffe;
- Einbringen von elektronenziehenden Atomen, was die Detektionssensibilität im NCI Modus erhöht;

- Verminderung der polaren Wechselwirkungen von polaren Gruppen wie Amino-, Hydroxyl- oder Carbxyl-Gruppen an der stationären Phase, was eine Verbesserung der Peak Symmetrie zur Folge hat.

2.3.2.1 Alkylierung

Die Methylierung hat den Nachteil, dass die eingesetzten Substanzen überwiegend giftig und krebserzeugend (u.a. Diazomethan, Methyliodid) sind und zudem nur eine geringe Erhöhung der Masse bewirken. Zudem verlaufen die Reaktionen häufig unter extremen Bedingungen. Diese Gründe haben mich dazu bewegt, diese Stoffe nicht zu verwenden, sodass ich sie hier auch nur der Vollständigkeit halber erwähne.

2.3.2.2 Silylierung

Bei der Silylierung erfolgt der Austausch eines austauschbaren Wasserstoffatoms, z.B. bei Hydroxyl-, Carboxyl- oder Amino-Funktionen, gegen eine Silylgruppe, meist Trimethylsilyl (TMS, $-Si-(CH_3)_3$).

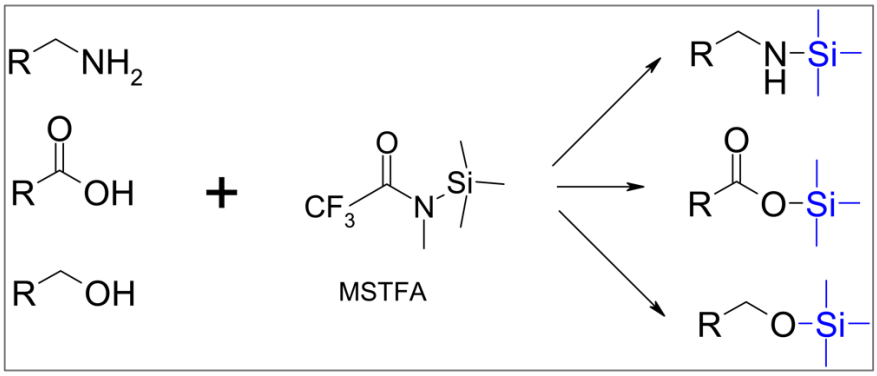


Abbildung 20: allgemeine Silylierungsreaktionen mit MSTFA (Villas-Bôas, Smart, Sivakumaran, & Lane, 2011)

Im Allgemeinen verlaufen diese Reaktion bei recht angenehmen Reaktionsbedingungen (20 – 60°C), sodass die meisten Analyten nicht denaturieren.

Die häufigsten Silylierungsmittel sind:

- BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) in Abbildung 21
- MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) in Abbildung 22
- MBDSTFA (N-methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamid) in Abbildung 23

Die beide ersten erlauben den Austausch des ursprünglichen Wasserstoffatoms gegen eine Trimethylsilyl-Gruppe (TMS), letzteres gegen eine tert-Butyldimethylsilyl-Gruppe (TBDMS). In der organischen Chemie, insbesondere der Naturstoffsynthese, wird diese Art der Reaktion hauptsächlich dazu verwendet eine Schutzgruppe einzufügen, d.h. um eine Hydroxyl- oder Carboxyl- oder Amino-Gruppe zu schützen, dass sie nicht durch eine Reaktion aus dem Molekül entfernt wird. Die Schutzgruppen werden im Anschluss an die beabsichtigte Reaktion wieder entfernt.

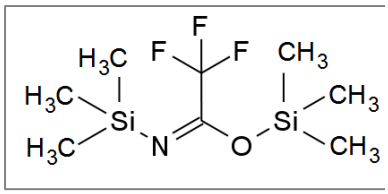


Abbildung 21: Strukturformel von BSTFA

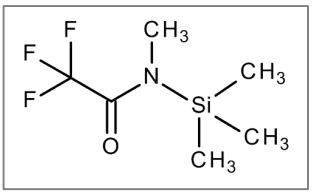


Abbildung 22: Strukturformel von MSTFA

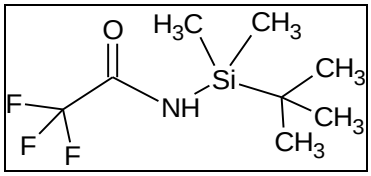


Abbildung 23: Strukturformel von MBDSTFA

Der Vorteil der Silylierung gegenüber der Acetylierung liegt sicherlich darin, dass:

- das Silierungsmittel ebenfalls als Lösungsmittel für die GC verwendet werden kann, da diese Verbindungen leicht flüchtig sind und somit weit vor den Analyten eluieren;
- es eine große Anzahl von Silylierungsmitteln gibt;
- die Reaktionen leicht erfolgen, d.h. unter angenehmen Reaktionsbedingungen

Ein Nachteil ist, dass:

- sie es nicht erlauben die Analyten so zu verändern, dass sie mittels chemischer Ionisation ionisiert werden können; (Siehe Kapitel 2.5.4.2 – NCI)
- die silylierten Analyten meist feuchtigkeitsempfindlich sind.

2.3.2.3 Acetylierung

Als Acetylierung wird in der organischen Chemie der Austausch von einem austauschbarem Wasserstoffatom durch eine Acetylgruppe bezeichnet. Der Austausch kann an den funktionellen Gruppen −OH, −SH und $-NH_2$ erfolgen. Wichtig zu bemerken ist, dass Carbonsäuren nicht acetyliert werden können. Diese werden meist verestert. (Siehe 2.3.2.4.)

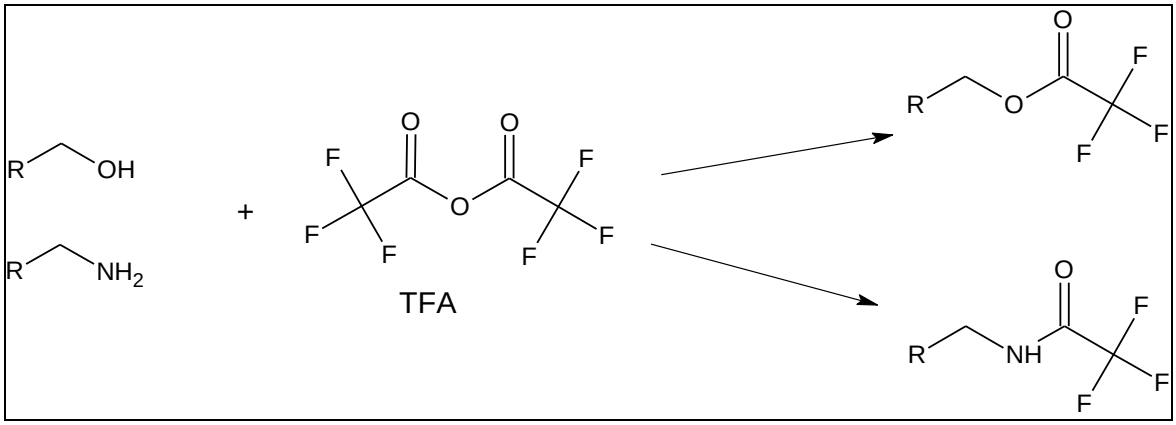


Abbildung 24: allgemeine Acetylierungsreaktion mit Trifluoracetanhydrid (TFA)

Häufig werden in der analytischen Chemie die Anhydride der Carbonsäuren zur Acetylierung verwendet, da diese eine ausreichende Reaktivität aufweisen und nicht zu gesundheitsschädlich sind. Die entsprechenden Carbonsäuren weisen meist eine zu geringe Reaktivität auf. Die

Carbonsäure-Halogenide sind meist zu reaktiv und gesundheitsschädlich, weshalb auf diese in der analytischen Chemie häufig verzichtet wird.

Bei der Derivatisierung von Hydroxyl- und Amino-Gruppe werden meist folgende Anhydride verwendet:

- TFA (Trifluoracetanhydrid) in Abbildung 24
- PFPA (Pentafluoropropionsäureanhydrid) in Abbildung 25
- HFBA (Heptafluorobuttersäureanhydrid) in Abbildung 26

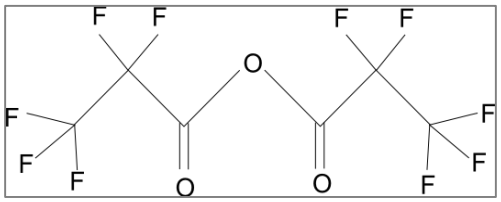


Abbildung 25: Strukturformel von PFPA

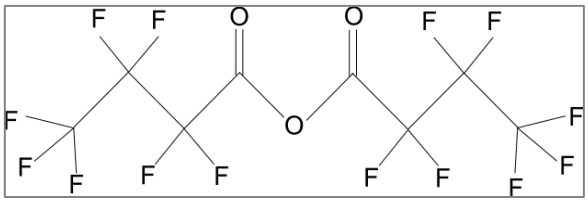


Abbildung 26: Strukturformel von HFBA

Vorteile der Acetylierung sind, dass:

- die Acetylierung es ermöglicht Halogenidatome in die Struktur des Analyten einzubringen. Die Halogenide sorgen für die notwendige Nachweisempfindlichkeit der Derivate, wenn sie mittels negativer chemischer Ionisation (NCI) ionisiert werden;
- die eingesetzten Reagenzien eine erhebliche Massenerhöhung verursachen. So erhöht PFPA die Masse des Analyten um 146 u und HFBA um 196 u pro eingebauter Einheit;
- die Derivate nicht Hydrolyse empfindlich sind.

Nachteile sind, dass:

- die Derivate schwierig herzustellen sein können, da die Anhydride kondensierte Carbonsäuren sind und somit nach der Reaktion Carbonsäuren entstehen. Diese können zu Problemen mit den Analyten führen (siehe Kapitel 7.3);
- eine Acetylierung zeitaufwendiger ist als ein Silylierung, da das Anhydrid nicht als Lösungsmittel verwendet werden kann und somit vor der Analyse aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden muss;
- die Acylierungsreagenzien feuchtigkeitsempfindlich sind, da die Anydride mit Wasser zu Carbonsäuren reagieren;
- die Acylierungsreagenzien gesundheitsschädlich sind und übel riechen.

2.3.2.4 Veresterung

Die Veresterung wird in der toxikologischen Analytik hauptsächlich dazu verwendet Carboxyl-Gruppen der Analyten in eine stabilere Form zu überführen, da Carbonsäuren bei hoher Temperatur dazu neigen Kohlenstoffdioxid abzuspalten. (Abbildung 27)

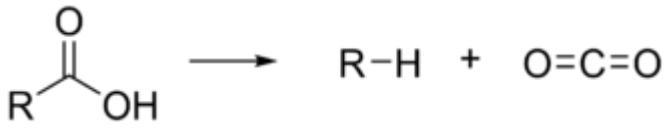


Abbildung 27: allgemeine Reaktionsgleichung der Decarboxylierung

Carbonsäureester sind die Ester einer Carbonsäure, meistens die Analyten, und eines Alkohols. Diese verlaufen im Sauren sodass in der Praxis die Veresterung gleichzeitig mit der Acetylierung stattfindet. (siehe 6.4.2.1.2)

Hier werden meist folgende Alkohole verwendet:

- PFPOH, Pentafluoropropan-1-ol (Abbildung 28)
- HFIP, Hexafluoroisopropan-2-ol (Abbildung 29)
- HFBOH, Heptafluorobutan-1-ol (Abbildung 30)

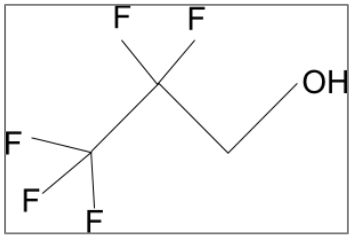


Abbildung 28: Strukturformel von PFPOH

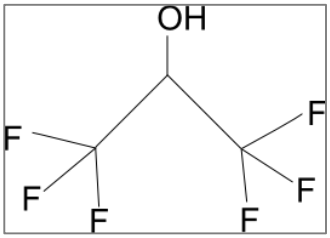


Abbildung 29: Strukturformel von HFIP

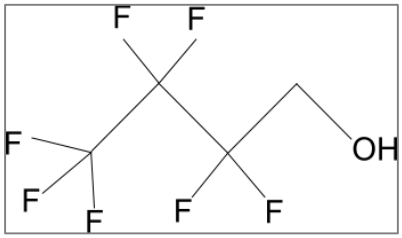


Abbildung 30: Strukturformel von HFBOH

Der Vorteil der Veresterung ist sicherlich, dass saubere Peaks im Chromatogramm nach der Veresterung zu beobachten sind, da die Carbonsäuren stark mit der Chromatographiesäule in Wechselwirkung treten und somit zu unsymmetrischen Peaks führen. Zudem bewirkt das Verwenden von halogenierten Alkoholen einen erheblichen Anstieg der Masse.

2.4 Gaschromatographie

Der Begriff „Chromatographie“ stammt von den griechischen Wortstämmen „chroma“, das Farbe bedeutet und vom Begriff „graphie“ welcher Schreiben bedeutet. Es gibt viele Arten der Chromatographie:

- Die Säulenchromatographie, die ursprüngliche Varianten mit beladenen Säulen,
- Die Dünnschichtchromatographie (DC), auf Papier oder beschichteten Folien,
- Bei der Flüssigkeitschromatographie (LC), ist die mobile Phase flüssig, hier unterscheidet man die:
    - HPLC, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
    - UHPLC, Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
- Die Gaschromatographie (GC), mit einer gasförmigen mobilen Phase,
- Die überkritische Fluidchromatographie (SCF), mit einem überkritischen Fluid als mobiler Phase. (Skoog & Leary, 1996)

Zur Trennung und Bestimmung von Analyten wird heute häufig die Gaschromatographie (GC) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Ich werde in der Folge genauer auf die GC eingehen. Die GC ist in Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) (siehe 2.5) die Methode der Wahl, bei der Bestimmung und der Quantifizierung von Suchtstoffen in geringen Konzentrationen.

Die Aufgabe der Chromatographie ist es, das Probengemenge zu trennen, sodass die Bestandteile qualifiziert und quantifiziert werden können. Hierzu sind eine Reihe von Parametern wichtig auf die ich nun eingehen möchte.

Abbildung 31: GC Agilent 7890A

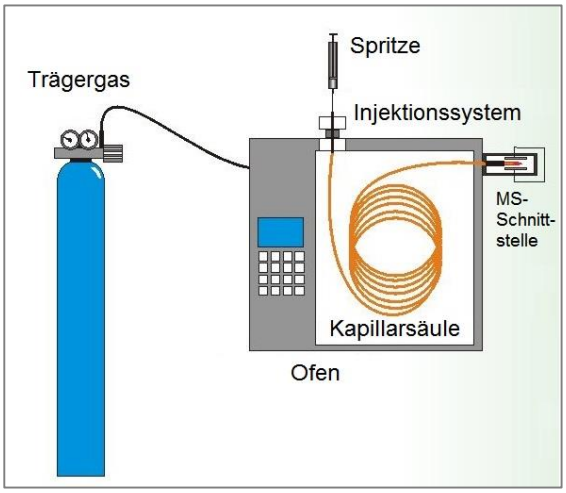


Abbildung 32: Schema Gaschromatograph

Die Gaschromatographie (GC) ist für Gase und Stoffe, welche sich leicht, ohne sich zu zersetzen, verdampfen lassen, anwendbar. Die Probe wird ins erhitzte Injektionsystem (Inlet) injiziert, wo sie verdampft. Die Probe wird dann mit Hilfe eines Trägergases, Helium oder Wasserstoff, in eine Kapillarkolonne geleitet. Die Kolonne, die im Inneren mit einer stationären Phase beschichtet ist, wird während der Trennung in einem Ofen, nach einem Temperaturprogramm, erhitzt. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase wird das injizierte Gemisch in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt und über die MS-Schnittstelle ins MS geleitet.

Comprehensive GC (GCxGC)

Diese Form der Gaschromatographie ist auch als 2D-GC bekannt und wird verwendet wenn traditionell GCs keine zufriedenstellende Trennung mehr erzeugen. Die am häufigsten eingesetzte Variante fängt den eluierten Analyten in regelmäßigen Intervallen von einigen Sekunden. Die gefangenen Fraktionen werden dann mittels der zweiten, wesentlich kürzeren Kolonne nochmals getrennt.

Die erste Kolonne ist in der Regel eine klassische unpolare Kolonne, die zweite ist sehr kurz, meist nur ein Meter, damit die Elutionszeiten einer gegebenen Fraktion nicht zu unterschiedlich sind. Die zweite Kolonne ist in der Regel polarer als die erste. (Buchonnet, 2013)

Die Chromatogramme sind nicht vergleichbar mit klassischen Chromatogrammen. Es werden keine Peaks mehr erhalten sondern Flecken, deren Position von der Retention in jeder der beiden Kolonnen abhängt. (vgl. Abbildung 34) (Buchonnet, 2013)

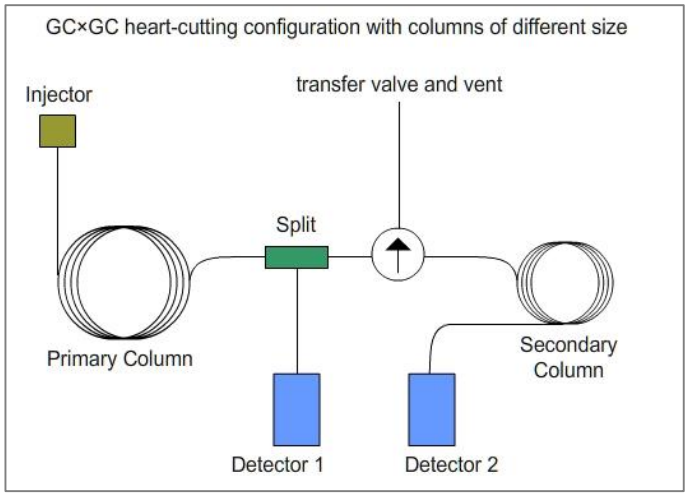


Abbildung 33: klasischer Aufbau einer GCxGC

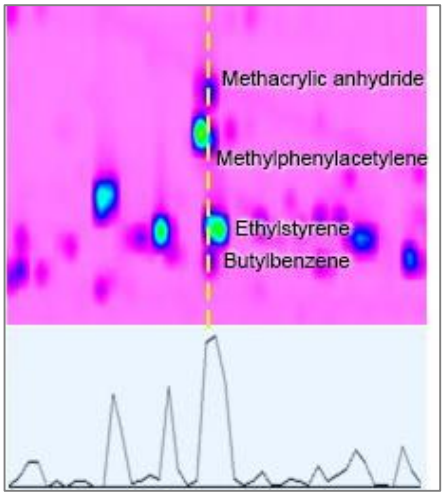


Abbildung 34: Chromatogramm GCxGC

2.5 Massenspektrometrie

2.5.1 Injektionssysteme

Bei den Injektionssystemen wird üblicherweise eine *split/splitless-Injektor* verwendet. Er erlaubt es sowohl hochkonzentrierte Lösung im split-Modus auf die GC-Kolonne aufzugeben, als auch verdünnte Proben im splitless-Modus. Die Vorteile dieses Injektors sind, dass er robust und einfach einzubauen ist. Im splitless-Modus werden in etwa 75–80% der Probe aufgebracht. (Buchonnet, 2013) Allerdings können in den meisten split/splitless-Injektoren nur bis zu 5 µl auf die Kapillarsäule aufgegeben werden.

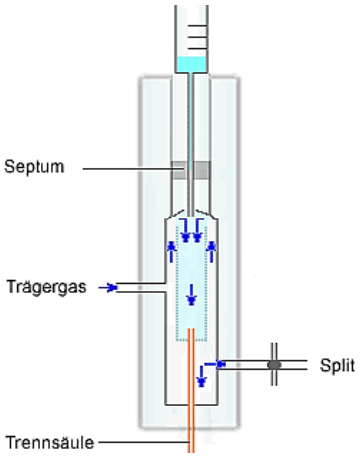


Abbildung 35: split/splitless Injektor

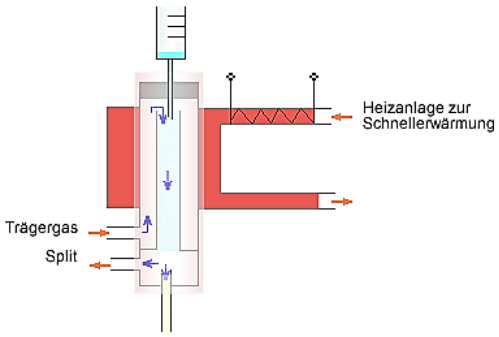


Abbildung 36: Kaltaufgabeinjektor (PTV)

Bei *Kaltaufgabesystemen (PTV, engl.: programmed temperature vaporization)* wird die Probe kalt in die Injektionskammer gegeben und anschließend mit einem definiertem Temperaturprogramm verdampft. PTV-Systeme haben den Vorteil, dass größere Volumina (bis zu 50 µl) Analyt aufgeben werden können ohne dass die Kapillarsäule überladen wird. Außerdem werden die Analyten auch nicht thermisch zersetzt, da die Temperatur kontinuierlich gesteigert wird, sodass ein Stoff nach dem Anderen verdampfen kann. Allerdings ist die Technik aufwendig und kostenintensiv und bedarf etwas mehr Erfahrung bei der Entwicklung der Methode.

2.5.2 Massenspektrometer (MS)

Die mittels GC getrennten Analyte gelangen am Ende der Kapillarkolonne der GC in eine Ionisierungskammer, in der eine Bombardierung mit geladenen Teilchen zu einem Aufbrechen der kovalenten Bindungen in den Molekülen führt. Die somit entstandene Fragmentierung der Moleküle wird in einem Massenspektrum aufgezeichnet und ist mehr oder weniger charakteristisch für die Stoffe.

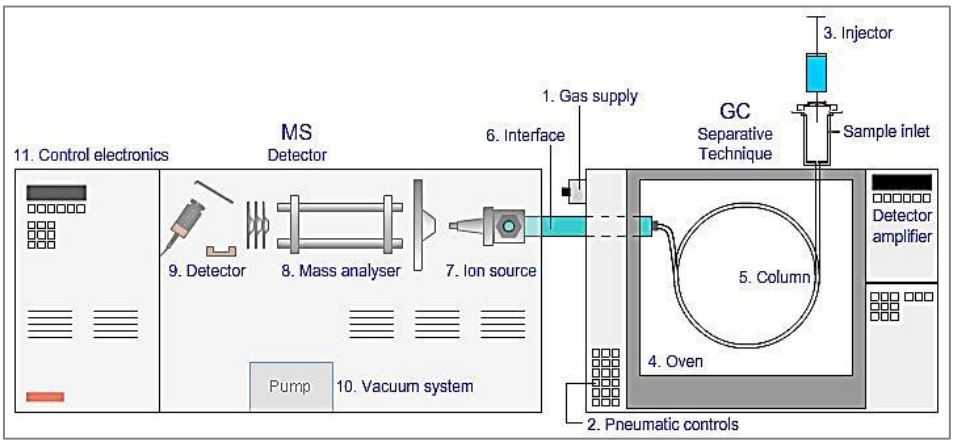


Abbildung 37: Schema eines Gaschromatographen mit Massenspektrometer (GC-MS) (chromacademy.com, 2015)

Zwei verschiedene Messmethoden stehen zu Auswahl:

In der *SCAN-Methode* werden vollständige Spektren zwischen zwei festgelegten Massen aufgenommen. Mit Hilfe der Massenspektren und den erfassten Retentionszeiten können die Analyten durch Vergleich mit Massenspektren-Bibliotheken ermittelt werden. Diese Methode dient also hauptsächlich dazu bei neuen unbekannten Stoffen die stoffspezifischen Fragmente zu bestimmen.

Die *Einzelmassenregistrierung (engl.: „Selekten Ion Monitoring“, SIM*) ermöglicht die Fokussierung auf wenige bekannte Zielmassen und deren Bestimmung mit der höchstmöglichen Empfindlichkeit. Die Möglichkeit sich auf zwei bis drei für eine Substanz charakteristische Masse zu Ladung-Verhältnissen (m/z) zu beschränken, ermöglicht eine enorme Steigerung der Empfindlichkeit. Dem Analysator steht hier, im Gegensatz zur SCAN Methode, die gleiche Zeit für nur einige ausgewählte Ionen zur Verfügung. Die SIM Methode wird daher zur Quantifizierung von bekannten Verbindungen eingesetzt. (Buchonnet, 2013)

2.5.3 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS)

Die Tandem-Massenspektrometrie reduziert deutlich die falschen Befunde die im SIM Verfahren möglich sind, da hier nur zwei bis drei m/z-Verhältnis berücksichtigt werden, diese aber sowohl vom Analyten als auch von einer Verunreinigung stammen können, welche zufällig das gleiche Fragment erzeugt. Das MS/MS-Verfahren ist äußerst selektiv, empfindlich und spezifisch und erlaubt es somit Analyten zu charakterisieren und zu bestimmen die eine ausreichende Menge an Ionen erzeugen. Es ist die beste Methode zur Spurenbestimmung in Matrizen. (Buchonnet, 2013)

2.5.3.1 Funktionsprinzip der Tandem-Massenspektrometrie

Nach der Trennung der Analyten in der GC werden die Analyten ins Massenspektrometer überführt. Zuerst werden die Analyt-Moleküle mittel CI oder EI in Ionen überführt. Im MS ist das Masse zu Ladung-Verhältnis (m/z) relevant, da dieses bestimmt welche Ionen das erste MS (Q_1) durchqueren und welche nicht. Im zweiten MS (q_2) befindet sich die Kollisionszelle (engl.: collision cell) die eine Fragmentierung der Analyt-Moleküle mittels eines Inertgases (He, Ne, N_2) ermöglicht. Das Ion das in die Kollisionszelle eingelassen wird, bezeichnet man als „Precursor“- oder als „Parent“-Ion. Die Ionen, welche man nach der Fragmentierung erhält, sind die „Tochter-, Fragment-„ oder „Produkt-Ionen“. Die Tochter-Ionen werden dann mit dem dritten MS (Q_3) je nach m/z getrennt und im Detektor bestimmt. In Abbildung 38 ist der Aufbau eines Triple Quadrupol Massenspektrometer wiedergegeben.

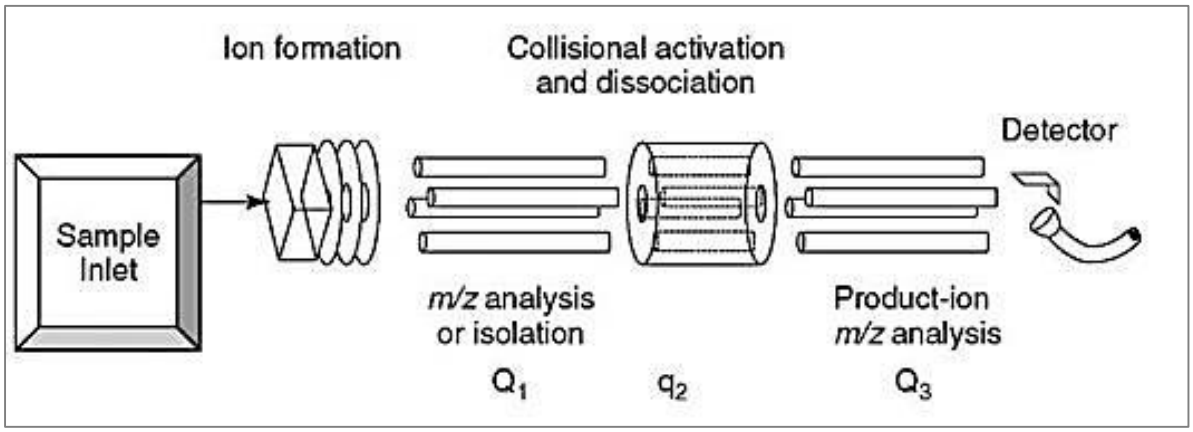


Abbildung 38: Schema Triple Quadrupol Massenspektrometer (Wageningenur, 2015)

2.5.3.2 Die MRM-Methode

Abbildung 39 gibt den schematischen Ablauf einer MRM wieder. Das Ziel des „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) ist es die Quantität an Analyten in einer Probe zu bestimmen.

Bei der Entwicklung einer MRM-Methode müssen die Precursor-Ionen bestimmt werden und mit der notwendigen Kollisionsenergie fragmentiert werden um die Produkt-Ionen zu erhalten. Abschnitt 2.5.3.2.1 erklärt wie man die Produkt- und Precursor-Ionen von Analyten bestimmt. (Buchonnet, 2013)

Zur Quantifizierung des Gehalts einer Probe benötigt man zwei Zerfallsreaktion (Transitionen). Eine Reaktion dient als Quantifier die andere als Qualifier zur Bestätigung der Substanz. (Buchonnet, 2013)

Für jeden Stoff benötigt nach man zwei Transitionen, d.h. zwei Massen und die dazugehörenden Massen die nach der Ionisation entsteht. Das höchste Signal dient als *Quantifier*, d.h. um die enthaltene Masse zu bestimmen, das zweite Signal wird als *Qualifier* verwendet, d.h. um sicher zu stellen, dass es sich nicht um ein anderes Molekül handelt. Qualifier und Quantifier haben die gleiche Retentionszeit, da sie von einer Verbindung stammen.

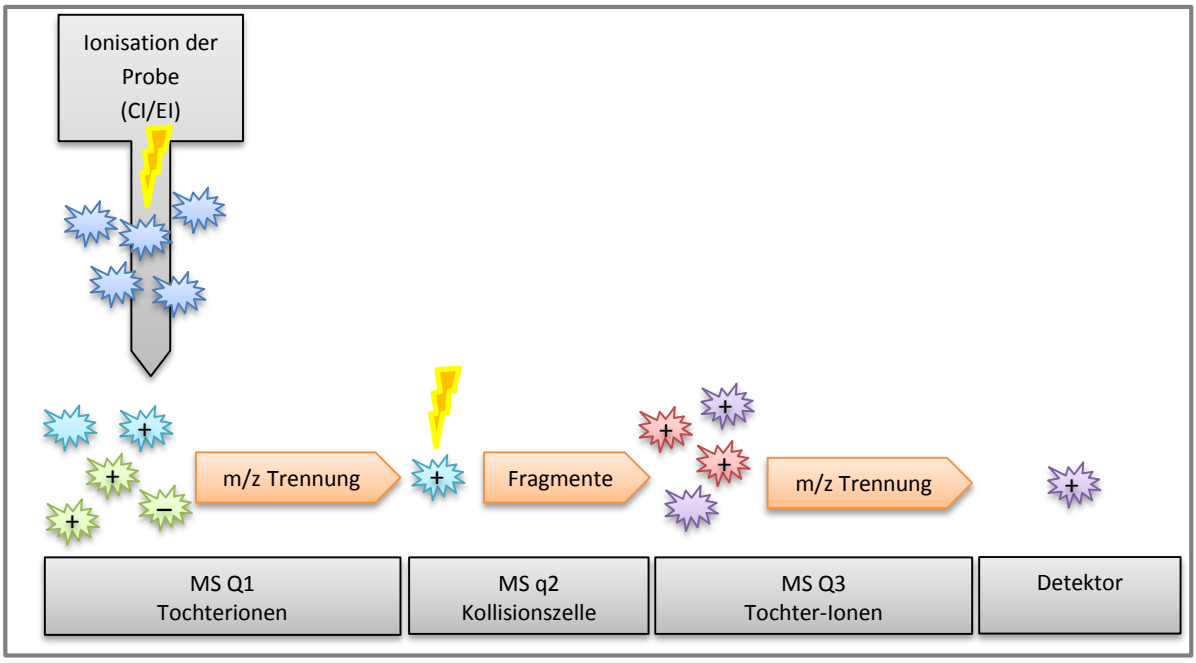


Abbildung 39 : Ablauf des „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)

2.5.3.2.1 Bestimmung der Precursor-Ionen

Je nach Einstellung der Massenspektrometer Q1 und Q3 kann man die Precursor-Ionen oder die Produkt-Ionen eines Analyten bestimmen.

Zum Bestimmen der Tochterionen (siehe Abbildung 40) wird der gesuchte Analyt als Reinstoff in das erste MS eingebracht, welches im SIM (Selected Ion Monitoring) verwendet wird. Das eingestellte m/z-Verhältnis entspricht dem aus der Literatur (Maurer, Pfleger, & Weber, 2011) erwarteten Wert. Im q2 werden die Ionen fragmentiert und Q3 bereitet die Ionen im SCAN-Modus vor, damit der Detektor ein vollständiges Massenspektrum in eingestellten Bereich, meist von 200 u bis 800 u aufzeichnet. So erhält man die Information welche Ionen (Precursor) aus den Analyten entstehen.

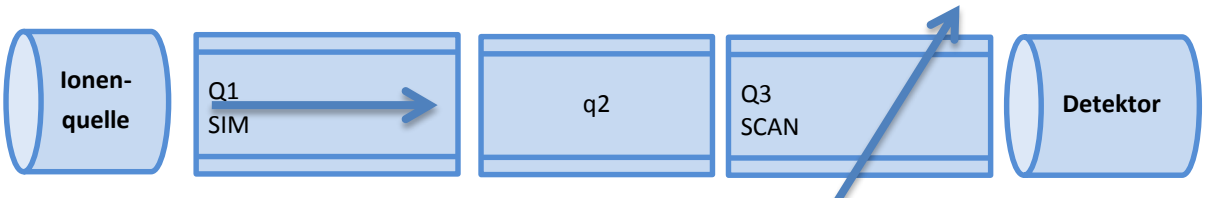


Abbildung 40: Bestimmung der Percursor-Ionen im MRM-Modus

Im folgenden Schritt wird dann die Kollisionsenergie bestimmt, um das bestmögliche Signal zu erhalten. Höhere Kollisionsenergie erzeugen bevorzugt kleinere Fragmente, da die Analyt-Moleküle stärker zerfallen.

2.5.4 Ionenquellen

Neben den verschiedenen Modi der Datenaufnahme, ist ein Massenspektrometer durch seine Ionenquelle charakterisiert. In der GC/MS werden hauptsächlich die Elektronenstoß-Ionisierung (EI) und die chemische Ionisierung (CI) als Ionisierungsverfahren eingesetzt.

2.5.4.1 Elektronenstoßionisation (EI)

Die Ionenquelle besteht aus einem geheizten Wolfram- oder Rhenium-Draht (Kathode), welcher Elektronen ausstößt. Diese werden zur Anode hin beschleunigt und kollidieren mit den gasförmigen Molekülen in der Ionenquelle. Um zu gewährleisten, dass die Elektronen nur auf gasförmige Moleküle der zu untersuchenden Probe treffen, liegt in der Ionenquelle ein Hochvakuum (10^{-5} Pa) und eine Temperatur von 250°C an. Die Energie der ionisierenden Elektronen beträgt 70 eV, welche durch eine Potentialdifferenz von 70 V zwischen Kathode und Anode erhalten wird.

Bildung der Ionen:

$$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2\,e^-$$

M steht hier für das Analytmolekül, $M^{+\bullet}$ für das Molekülion, wobei es sich um ein Radikalkation handelt, das die gleiche Masse wie das Molekül hat. Die gebildeten Ionen werden durch einen Spalt in den Massenspektrometer geleitet. (Abbildung 41)

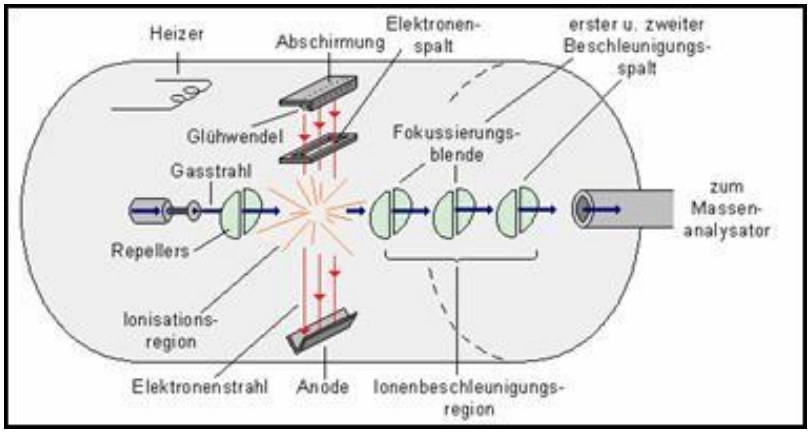


Abbildung 41: Elektronenstoß-Ionenquelle (Skoog & Leary, 1996)

Die so erhaltenen positiv geladenen und energetisch angeregten Molekül-Ionen zerfallen und bilden Fragmente. Die Fragmentierung ist bei der EI besonders stark, da die Molekül-Ionen in hochangeregten Zuständen zurückbleiben, dies erklärt die große Zahl der positiven Ionen unterschiedlicher Masse. Das Molekül-Ion sowie seine Fragmente gelangen anschließend zum Detektor. Das EI Massenspektrum gibt das Muster der Fragmentierung wieder, welches sich zur Identifizierung von Verbindungen eignet. (Skoog & Leary, 1996)

Die Vorteile der EI sind:

- einfache Anwendung;
- höhe Ionenströme, die eine hohe Empfindlichkeit ermöglichen;
- umfangreiche Fragmentierung, d.h. eine hohe Signalanzahl welche die Identifizierung einer Substanz ermöglicht.

Die Nachteile sind, dass:

- das Molekülsignal oft von geringer Internsität ist, da die Fragmentierung zu stark ist;
- die EI nur bis Molekülmasse < 1000 u anwendbar, da der Analyt flüchtig sein muss.

2.5.4.2 Chemische Ionisation (CI)

Bei der chemischen Ionisierung findet die Ionisation durch Kollision der gasförmigen Probe mit Ionen statt, die durch Elektronenbeschuss eines im Überschuss vorliegenden Reaktantgases (Methan, Ammoniak…) erzeugt werden. Dabei entstehen Ionen der zu untersuchenden Substanzen. Diese Ionisierungsmethode ist weicher als die EI-Methode, was die Methode nützlich zur Bestimmung von unbekannten Drogen macht, da hauptsächlich Molekülpeaks beobachtet werden können. Man unterscheidet, je nach Art der erzeugten Ionen, zwischen der positiven chemischen Ionisation (PCI) und der negativen chemischen Ionisation (NCI).

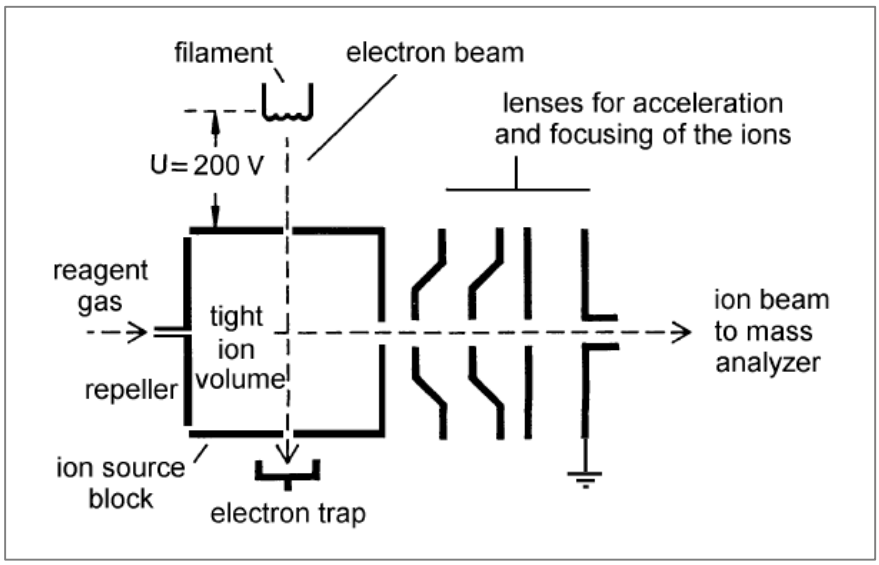


Abbildung 42 : schematischer Aufbau einer CI-Zelle (Gross, 2011)

Die PCI-Methode:

Die PCI Arbeitsweise wird bevorzugt dann eingesetzt, wenn das EI Massenspektrum keine, oder nur unzureichende Information über die molare Masse des Analyten liefert. Das Messergebnis der PCI wird primär mit der Wahl des Reaktantgases entschieden. Im PCI Modus ist die Messempfindlichkeit häufig niedriger als im Vergleich zur EI Messung. Dieser Nachteil kann durch Einsatz der SIM (Selected Ion Monitoring) Messung größtenteils kompensiert werden.

Die am häufigsten verwendeten Reaktantgase sind Methan, i-Butan und Ammoniak.

Bei der Verwendung von Methan wurde bereits eine Vielzahl von möglichen Teilreaktionen beschrieben, hier sind die wichtigsten Reaktionen des Methans:

$$CH_4 + e^- \rightarrow CH_4^+ , \; CH_3^+$$

$$CH_4 + CH_4^+ \rightarrow CH_5^+ + CH_3 \bullet$$

$$CH_3^+ + CH_4 \rightarrow C_2H_5^+ + H_2$$

Das Reaktantgas wird durch Reaktion mit den in die Reaktionskammer eintretenden Elektronen ionisiert. Von besonderer Bedeutung ist das CH_5^+-Ion, das als Protonendonator zur Verfügung steht und mit dem Molekül-Ion das protonisierte Mol-Ion liefert. Zusätzlich werden die für die Methanreaktion charakteristischen Mol-Addukte gebildet:

$$CH_5^+ + MH \rightarrow MH_2^+ + CH_4 \qquad \textit{mz M+1} \qquad \textit{Protonentransfert}$$

$$C_2H_5^+ + MH \rightarrow M^+ + C_2H_6 \qquad \textit{mz M–1} \qquad \textit{Hydridtransfert}$$

Bei einem Protonentransfert steigt die Masse der Ionen (M+1), während beim Hydridtransfert ein Ion der Masse (M-1) erzeugt wird. Bei manchen Verbindungen ist auch ein Peak mit der Masse (M+29) anzutreffen, welcher die Folge der Übertragung des Ions $C_2H_5^+$ auf den Analyten ist.

$$C_2H_5^+ + MH \rightarrow MH\text{-}C_2H_5^+ \qquad \textit{mz M+29}$$

Diese Prozesse werden mit dem Begriff der Protonaffinität (P_A) beschrieben. Die P_A ist die thermochemisch bedingte Eigenschaft der Reaktionspartner Protonen zu übertragen. Für die Bildung des protonierten Mol-Ions muss die P_A des Analyten grösser sein, als die des Reaktantgases. Die P_A liegen im Bereich von 180 kcal/mol bis 240 kcal/mol. Häufig ist jedoch die P_A der analytisch relevanten Substanzen nicht bekannt und die erfolgreiche PCI Reaktion ist im Einzelfall zu erproben. (Agilent, 2001) (Skoog & Leary, 1996)

Die NCI-Methode:

Der Vorteil der NCI Methode ist die noch höhere Nachweisempfindlichkeit, die man bei Stoffen mit hoher Elektronenaffinität erhält.

Die Bedeutung der NCI liegt in der Möglichkeit, die für diese Reaktion geeigneten organischen Verbindungen im Ultraspurenbereich (ppt-Konzentration, parts per trillon, 10^{-12}) selektiv nachzuweisen. Die Probenmatrix reagiert für gewöhnlich nicht und wird in diesem Fall messtechnisch ausgeblendet, deshalb ist die Empfindlichkeit im Vergleich zur EI-Methode nicht

selten um das zehnfache höher. Die für NCI geeigneten Analyten weisen eine hohe Elektronenbindungskapazität bzw. Elektronenaffinität (E_A) auf. (Agilent, 2001)

Moleküle, welche viele stark elektronegative Atome enthalten, eignen sich sehr gut und zeigen bei der Detektion im NCI-Modus eine höhere spezifische Intensität als durch eine EI-Ionisierung. Ein Elektron ionisiert hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit das in höherer Konzentration vorliegende Methanmolekül nach folgendem Mechanismus:

$$CH_4 + e^-(70eV) \rightarrow CH_4^+ + 2\,e^-(\text{thermisch})$$

Die gebildeten thermischen Elektronen (0 eV bis 2 eV) haben eine geringere Energie als die Elektronen, die durch das Filament freigesetzt werden und bilden durch eine Elektronen-Einfang-Reaktion mit den zu analysierenden Molekülen Radikalanionen:

$$MX + e^- (\text{thermisch}) \rightarrow MX^-$$ *Resonanzelektroneneinfangreaktion*

Analyten mit hoher Elektronenaffinität, das heißt mit einer großen Anzahl an elektronegativen Atomen, bilden stabile Molekülanionen MX^- und liefern sehr einfache Spektren, da sie stabile, negative Ionen bilden. Diese Reaktion wird als Resonanzelektroneneinfangreaktion oder als ECNI (engl.: Electron Capture Negative Ionization) bezeichnet. In der Umgangssprache wird der Begriff NCI gebraucht. Elektronen mit höherem Energiegehalt (>15 eV) bevorzugen eine dissoziative Reaktion:

$$MX + e^- \rightarrow M + X^-$$ *dissoziative Reaktion*

Die aus dieser Reaktion resultierenden Massenspektren zeigen eine mehr oder minder intensive Fragmentierung. Welcher Analyt für die NCI Messung geeignet ist, kann nur schwer prognostiziert werden, allerdings sind es oft mehrfach halogenierte Verbindungen, solche die Nitrogruppen, Doppelbindung und allgemein Heteroatome in der Molekülstruktur aufweisen. Bietet die Substanz die Möglichkeit der Derivatisierung, ist diese durch geeignete, meist fluorierte, Reagenzien vorzunehmen, um die E_A in das Molekül zu implementieren. (Agilent, 2001)

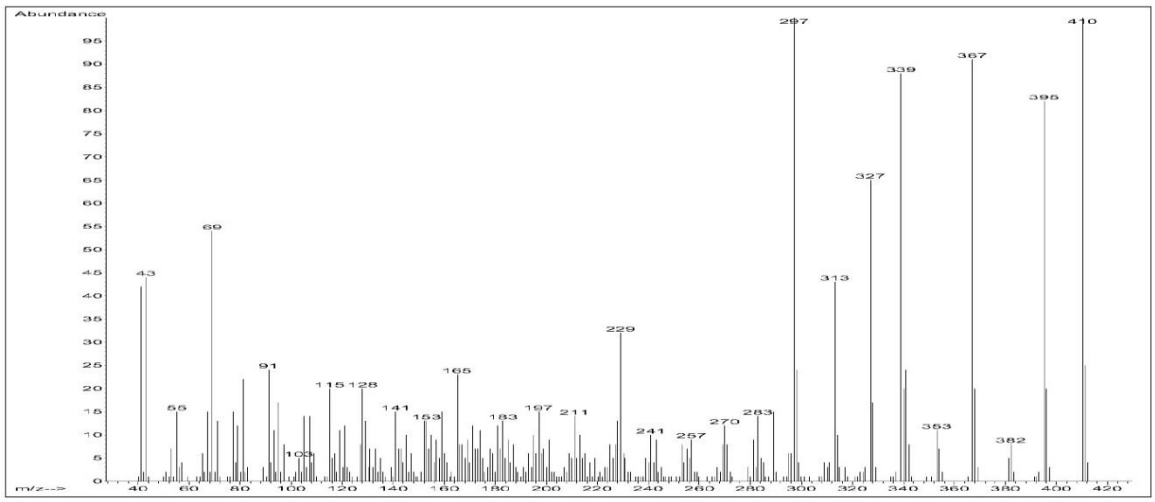


Abbildung 43: Tetrahydrocannabinol, Trifluoroacetylderivat; mit EI-Ionisation (Agilent, 2001)

Der Vergleich der Massenspektren der TFA-Derivate von THC die je nach Ionisation erhalten werden sind in Abbildung 43 (EI) und in Abbildung 44 (NCI) wiedergegeben.

In Abbildung 43 sieht man wie stark die EI das Molekül fragmentiert. In den beiden Spektren sind die Massenpeak wohl zu finden (m/z = 410), jedoch kann im EI der Massenpeak genauso gut vollständig verschwinden, wenn die Verbindung labil ist. In Abbildung 44 sieht man, dass das Molekül kaum fragmentiert wird.

Abbildung 44: Tetrahydrocannabinol, Trifluoroacetylderivat; mit NCI-Ionisation (Agilent, 2001)

Außerdem hat die NCI-Methode im Vergleich zur positiven chemischen Ionisierung (PCI) eine erhöhte Empfindlichkeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die gebildeten thermischen Elektronen bei gleicher Energie eine höhere Geschwindigkeit besitzen als die schweren positiv geladenen Reaktantmoleküle (CH_5^+). Der Elektroneneinfang ist somit 100-1000fach empfindlicher als eine durch Diffusion begrenzte Ionen-Molekül-Reaktion. (Hübschmann, 1996)

2.5.5 Gegenüberstellung MS vs MS/MS

In folgendem Abschnitt möchte ich kurz die Vor- und Nachteile der beiden Geräte zusammenstellen. Da es sich bei beiden um Quadrupol-Geräte handelt, sind sie nur bis zu m/z-Verhältnissen bis zu 1000 u sinnvoll, da die Probe gasförmig vorliegen muss.

Vorteile der Quadrupol-Massenspektrometer:

- Günstig in der Anschaffung, da nur ein Quadrupol eingebaut ist;
- Methodenentwicklung weniger aufwendig;
- gute Qualifizierung und Quantifizierung bei einfachen Matrizen und nicht zu geringen (> 1 pg/g Boden) Analyt-Konzentrationen. (Palmiotto, Colombo, & Davoli, 2014)

Nachteile der Quadrupol-Massenspektrometer:

- durch Matrixeinfluss kann es zur Bestimmung von falschen Negativbefunden kommen, da bei der SIM-Methode meist nur drei Ionen verfolgt werden. Wird zu einem Stoff A ein Stoff B miteluiert, so kann es sein dass das Signal eines m/z-Verhältnisses zu hoch ist und somit

wird das Signal als negativer Befund gewertet, da das Verhältnis der m/z 200, 300 und 400 ebenfalls berücksichtigt wird um ein Signal als positiven Befund zu werten. (Abbildung 45)

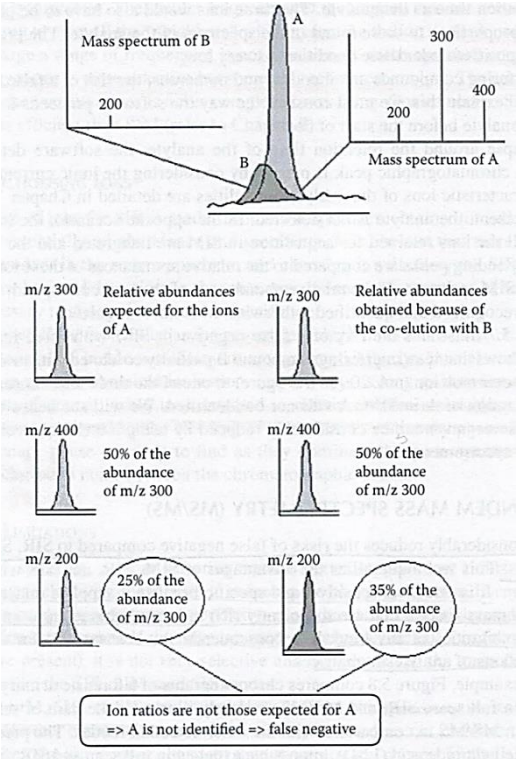


Abbildung 45: Schematische Erklärung des Risikos von "falschen Negativbefunden“ beim SIM mit drei Ionen (Buchonnet, 2013)

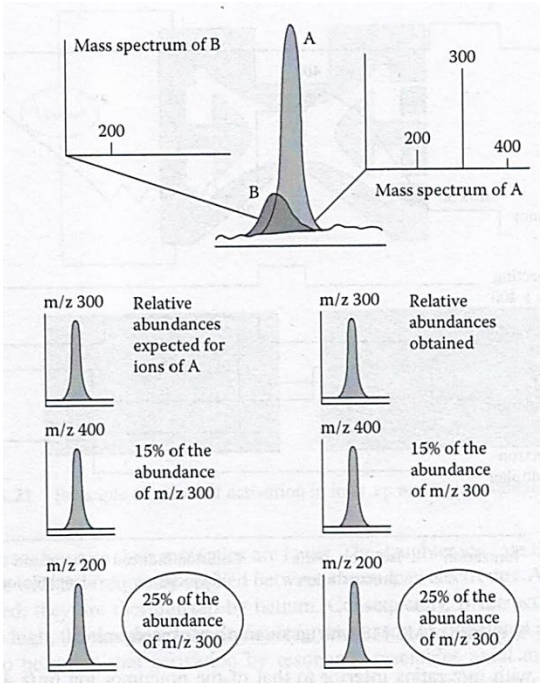
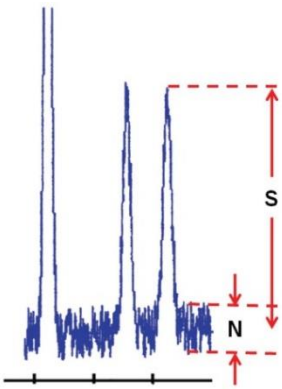


Abbildung 46: Schematische Erklärung des Verhindern von "falschen Negativbefunden“ mittels MRM (Buchonnet, 2013)

- Das Signal-Rausch-Verhältnis (Signal-to-Noise Ratio, SNR) ist schlechter, d.h. er gibt mehr Rauschen, als in der MRM-Methode, da im SIM-Modus alle Ionen im einem bestimmten m/z-Verhältnis berücksichtigt werden, auch solche die von der Matrix stammen. Somit erhält man keine ebene Basislinie im Chromatogramm, sondern eher eine „Zick-Zack-Linie“. Hierdurch geht die Empfindlichkeit der Methode verloren, da „kleine Signale“ in der Basislinie „verschwinden“ und somit nicht mehr als Signal erkennbar sind.(Abbildung 47, Abbildung 48)



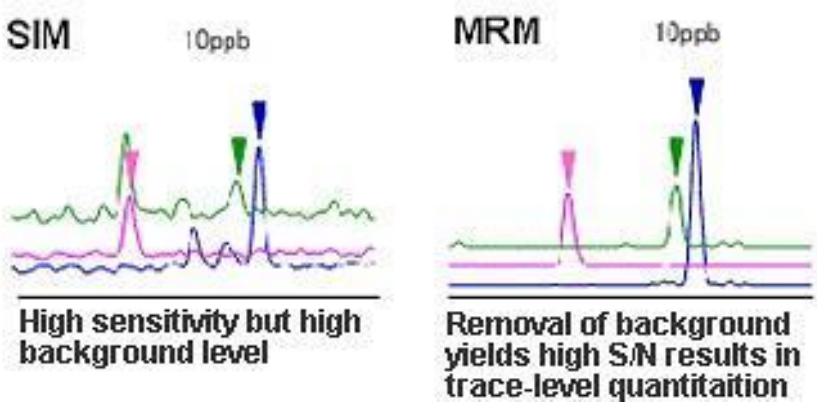


Abbildung 47: Signal-Rausch-Verhältnis (Dolan, 2015)

Abbildung 48 : Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnis im SIM und im MRM-Modus (SHIMADZU, 2015)

Betrachten wir nun die Vor- und Nachteile des Triple Quadrupols Massenspektrometers.

Vorteile des Tandem-Massenspektrometers:

- Besitzt eine größere Anzahl an Analysemöglichkeiten (Full scan, SIM, MRM, Precursor-Ionen-Bestimmung, Tochter-Ion-Bestimmung…) als Quadrupol;
- Größere Effizienz als MS im SIM-Modus, da viel kleineres Risiko von falschen Negativbefunden. Bei der MRM-Methode kann man einen (oder verschiedene) m/z-Ion wählen und verknüpft diese mit einem Produkt-Ion welches nach der Kollision in der Kollisionszelle entsteht. Hierdurch wird die Analyse viel zuverlässiger und falsche Negativbefunde können vermieden werden. (Abbildung 46)
- Da die MRM-Methode beim Tandem-Massenspektrometer nur ein Ion durch das erste Quadrupol lässt und dieses anschließend fragmentiert, erhält man ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Auch wenn die Probe zufällig zwei Ionen der gleichen m/z enthält, so ist es doch recht unwahrscheinlich, dass auch die gleichen Ionen durch die Fragmentierung des Precursor-Ions erzeugt werden. Somit erhält man in MRM-Chromatogrammen meist „Linien“ als Basislinie die es ermöglichen Analyten in Konzentrationsbereichen noch zu bestimmen, welche im SIM-Modus im Rauschen versteckt waren. (Abbildung 48)

Nachteile des Tandem-Massenspektrometers:

- Teuer in der Anschaffung, da es drei Quadrupolgeräte enthält, auch wenn die Preise günstiger werden, durch die stärkere Verbreitung der Geräte;
- Die Entwicklung einer neuen Messmethode ist recht aufwendig, da erst Precursor-Ionen, dann Produkt-Ionen mit der passenden Kollisionsenergie bestimmt werden müssen.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Triple Quadrupol Geräte den größten Vorteil in der Spurenanalytik aufweisen, wohingegen einfache Quadrupol-Geräte gut Arbeit leisten bei einer ausreichend „hohen“ Analyt-Konzentration.

2.6 Validierung von Ergebnissen

Die Validierung einer Methode umfasst mehrere Schritte:

- Aufstellen einer Kalibrierungsgerade (Linearität) und Arbeitsbereich
- Berechnung der Extraktionsausbeute (Rendement)
- Bestimmung der Nachweisgrenze (engl.: Limit of detection, LOD) und der Bestimmungsgrenze (engl.: Limit Of Quantification, LOQ)
- Robustheit
- Spezifizität
- Präzision

Eine *Kalibrierungsgerade* zur quantitativen Bestimmung der in Proben enthaltenen Substanzen wird mit Hilfe von internen deuterierten Standards aufgestellt. Diese Gerade gibt das Verhältnis der Konzentrationen zwischen internem Standard und der zu bestimmenden Substanz wieder.

$$\frac{\text{Konzentration des Analyts}}{\text{Konzentration des internen Standards}} = k \cdot \frac{\text{Fläche des Peaks des Analyts}}{\text{Fläche des Peaks des internen Standards}}$$

Wobei *k* die Steigung der Geraden ist.

Diese Kalibrierungsgeraden müssen für jeden zu bestimmenden Stoff erstellt werden. Anhand der Kalibrierungsgeraden wird der Analytgehalt in den unbekannten Proben festgelegt. Diese Auswertung erfolgte mittels der Software MassHunter von Agilent.

Bei jeder Analyse erfolgt zudem der Abgleich mit einem internen Standard, um von der Apparatur oder dem Bediener bedingte Abweichungen bei der Durchführung zu erkennen.

Zur Validierung einer Methode werden folgende Parameter bestimmt:

- Die **Nachweisgrenze LOD**, die einem Signal entspricht, das dreimal so hoch ist wie das Hintergrundsignal (SNR).
- Die **Quantifizierungsgrenze LOQ**, die einem Signal entspricht, das zehnmal so hoch ist wie das Hintergrundsignal (SNR).
- Die **Extraktionsausbeute** wird bestimmt, indem zwei Extraktionen durchgeführt werden. Einer Probe wird vor der Extraktion die zu untersuchende Substanz zugegeben, bei der anderen Probe erfolgt dies nach der Extraktion. Beide Proben erhalten nach der Extraktion den internen Standard. Das Verhältnis der Konzentrationen der beiden Proben ergibt die Extraktionsausbeute. Die Ausbeute sollte möglichst dicht an 100 % sein und die Extraktion sollte innerhalb ± 15 % reproduzierbar sein.
- Die **Wiederholpräzision an einem Tag (fr.: répétabilité intrajour**) erfolgt aus der Berechnung von zehn Messungen an einem Tag ;
  Die **Wiederholpräzision an aufeinanderfolgenden Tagen (fr.: répétabilité interjour**) erfolgt aus der Berechnung von sechs Messungen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Hierzu wird der Variationskoeffizient (fr.: coefficient de variation; CV) nach folgender Formel berechnet:

$$CV = \frac{Standardabweichung}{Mittelwert} \cdot 100\ \%$$

Falls der CV kleiner als 15 % ist, so erfüllt die Methode die Wiederholpräzision und gilt als robust. (UNODC, 2009)

2.7 Standardadditionsverfahren (SAV)

Das Standardadditionsverfahren ist eine alternative Methode der Kalibrierung. Anhand dieser Methode sollen instrumentelle Fehler und Matrixeffekte minimiert werden, insbesondere bei der Messung im Spurenbereich. Das SAV ist sinnvoll, wenn das analytische Signal der Probe beeinflusst wird durch eine unbekannte, sehr komplexe oder häufig wechselnde Probenmatrix.

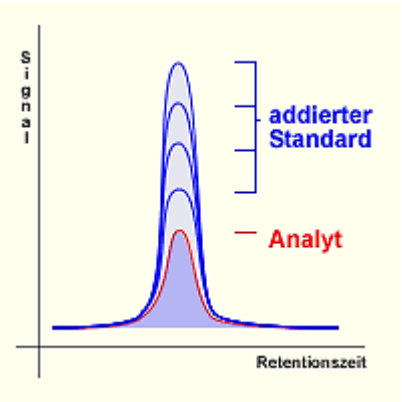


Abbildung 49: Chromatogramm zeigt den Zuwachs des Signals bei schrittweiser Zugabe einer bekannten Menge Analyt (www.chemgapedia.de, 2014)

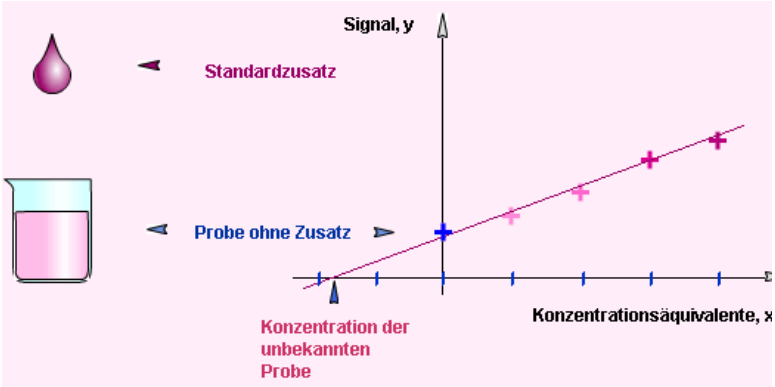


Abbildung 50 : Darstellung einer Kalibrierungsgerade mit Mehrfachzusatz (www.chemgapedia.de, 2014)

Die zu untersuchende Probe wird mit verschiedenen, bekannten Mengen des Analyten versetzt und jeweils wird ein Messwert aufgenommen. Auf der Abszisse wird die Konzentration nach Zusatz aufgetragen, der Nullwert entspricht dem Messwert der Probe. Durch Verlängerung der erhaltenen Kalibriergerade wird ein Schnittpunkt mit der Abszisse erhalten, an dem die Ausgangskonzentration des Analyten abgelesen werden kann (nach Umkehrung des negativen Vorzeichens), bzw. durch verwenden der Regressionsgleichung unter der Annahme, dass die Probe ohne Zugabe eine Konzentration von null hat.

$$y_{a+s} = c_s \cdot b_1 + b_0 \quad \Leftrightarrow \quad b_1 = \frac{y_{a+s} - b_0}{c_s}$$

Wenn gilt: $c_s = 0$, dann: $b_0 = y_a$

Somit ist:

$$y_a = b_0 = b_1 \cdot c_a$$

$$\Leftrightarrow \quad c_a = \frac{b_0}{b_1}$$

Die Analyt-Konzentration c_a ergibt sich somit aus dem Quotienten des Achsenabschnitts b_0 und der Steigung b_1 der Regressionsgerade. (www.chemgapedia.de, 2014)

3 Ethanol, EtG und Haaranalytik

Der Konsum von Alkohol ist im Vergleich zum Konsum von anderen Drogen stark unterschiedlich, da Alkohol in viel größeren Mengen (siehe Kapitel 1.1.1.1) konsumiert wird. Ein weiterer Punkt ist, dass Alkohol im Körper recht schnell metabolisiert wird und somit nach wenigen Stunden nicht mehr als reiner Ethanol im Blut, Urin oder Schweiß nachweisbar ist. (Cabarcos et al., 2015) Um das Trinkverhalten einer Person besser einschätzen zu können, wurde die Bevölkerung grob in vier Klassen (Madea & Mußhoff, 2004) eingeteilt:

- Abstinenzler (< 1 g Ethanol /Tag)
- schwache Trinker (zwischen 1–10 g Ethanol/Tag)
- sog. „Normaltrinker“ („Social drinkers“, 11–60 g Ethanol/Tag)
- Exzessive Alkoholkonsumenten und Alkoholiker (> 60 g Ethanol/Tag)

3.1 Toxikologische Bestimmung des Alkoholkonsums

Bei der Bestimmung des Alkoholkonsums gibt es mehrere Möglichkeiten. So können *indirekte Marker* bestimmt werden, welche die Neigung der Person zum Alkoholkonsum belegen oder die *direkten Marker*, welche das Trinkverhalten charakterisieren. Da die indirekten Marker auch durch Medikamente oder Krankheiten beeinflusst werden können und vom Geschlecht und Alter der Person abhängig sind, so eignen sich diese weniger für toxikologische Analysen. Deshalb werden im folgenden Abschnitt nur die direkten Marker näher betrachtet.

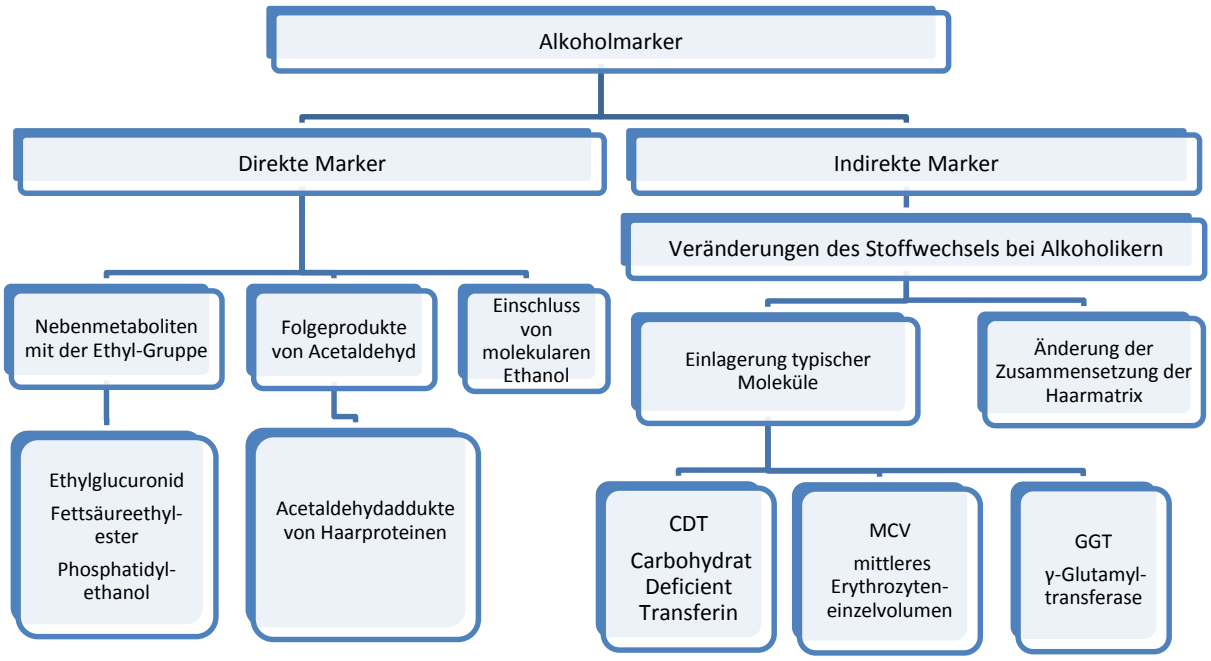


Abbildung 51: Überblick über mögliche Alkoholmarker im Haar

3.1.1 Faktoren, welche den Konsum von Ethanol charakterisieren

Die direkten Marker haben den Vorteil, dass sie aussagekräftiger sind als die indirekten Marker und dass es sensible Methoden zur Bestimmung dieser Stoffe gibt.

Im Blut kann man Phosphatidylethanol (PEth), im Serum und im Urin Ethylsulfat (EtS) und Ethylglucuronid (EtG) und in den Haaren Ethylglucuronid und Fettsäureethylester (FSEE) bestimmen. EtG und FSEE bieten sich auf Grund ihrer Anwesenheit in den Haaren an, um Aussagen über den Alkoholkonsum von Patienten über einen größeren Zeitraum hinweg zu treffen. In einer vergleichenden Studie zwischen EtG und FSEE konnte gezeigt werden, dass beide Marker geeignet, allerdings sollten idealerweise beide Marker bestimmt werden. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen den gemessenen Werten an EtG und FSEE in den Haarproben gefunden werden, was möglicherweise am Mechanismus der Aufnahme ins Haar der beiden liegt. (Yegles et al., 2004) Studien von Appenzeller (Appenzeller, Agirman, Neuberg, Yegles, & Wennig, 2007) und Crunelle (Crunelle, et al., 2014) zeigen eine Korrelation zwischen dem Alkoholkonsum und der EtG-Konzentration in den Haaren. Die Inkorporation von EtG ins Haar scheint über das Blut beim Haarwachstum zu erfolgen, wohingegen die Fettsäureethylester über den Talg ins Haar gelangen. (Cabarcos et al., 2015)

3.1.2 Der Stoffwechsel von Ethanol

Der größte Teil (ca. 90% der aufgenommenen Menge) des Abbaus von Ethanol findet beim Menschen in der Leber statt, durch Oxidation durch die Alkoholdehydrogenase (ADH). Als Zwischenprodukt wird das toxische Acetaldehyd gebildet, welches dann weiter zum Acetat-Ion oxidiert wird. Die in der Leber gebildeten Acetat-Ionen werden in den Blutkreislauf eingeschleust und im Laufe des Zitronensäurezyklus zu Kohlenstoffdioxid und Wasser weiteroxidiert. (Kintz, Traité de Toxicologie Médico-Judiciaire, 2012) Zu den nicht oxidativen Abbaumethoden zählen die enzymatischen Bildungen von Fettsäureester (FSEE) oder die Anbindung an Glucuronsäure (etwa 0,5 %) unter Bildung von Ethylglucuronid. (Dahl et al, 2002) (Wurst, Kempter, Seidl, & Alt, 1999) Zudem werden Teile des Alkohols noch über die Atemluft, Haut oder über die Nieren ausgeschieden.

3.1.3 Ethylglucuronid

Im Stoffwechsel des Menschen dienen Phase II Biotransformationen dazu Giftstoffe oder Arzneimittel durch Verbindung mit Glucuronsäure in wasserlösliche Verbindungen zu überführen, welche danach leichter ausgeschieden werden können. Diese Reaktionen erfolgen hauptsächlich in der Leber. (Dahl et al, 2002)

Die Bildung von Ethylglucuronid erfolgt durch die Verbindung von Ethanol mit Glucuronsäure, welche durch Uridindiphosphat (UDP-Glucuronsäure) aktiviert wird, durch das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) nach folgender Reaktion (Abbildung 52):

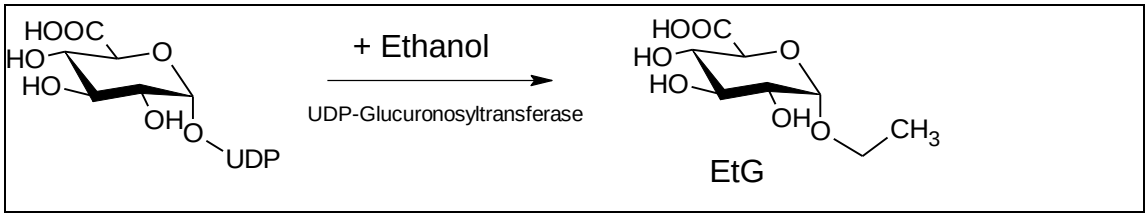


Abbildung 52: Synthesereaktion von Ethylglucuronid ausgehend von Ethanol

Ethylglucuronid ist ein recht kleines, stabiles, nicht flüchtiges, wasserlösliches Molekül welches sich gut in keratinierten Haaren bindet aufgrund seiner hydrophilen und seiner saureren (pK_s=3,21) Eigenschaften (Cabarcos et al., 2015)

Im Haupthaar befinden sich je nach Alkoholkonsum unterschiedliche Konzentrationen an EtG. Im Jahr 2014 hat die Society of Hair Testing sich auf folgenden Konsens geeinigt: (SoHT, 2014)

- bei weniger als 7 pg EtG/mg Haar wird auf Abstinenz, bzw. auf einen gelegentlichen Alkoholkonsum geschlossen;
- bei 7 bis 30 pg EtG/mg Haar ist von einem moderatem, „normalem“ Alkoholkonsum auszugehen;
- oberhalb von 30 pg EtG/mg Haar ist der Bereich des chronischen, exzessiven Alkoholkonsums.

3.1.4 Stand der Wissenschaft

Im Jahre 1952 wurde das erste Mal Ethylglucuronid (EtG) als Metabolit von Ethanol gefunden. (Kamil et al., 1952) Viele Jahre später konnte Skopp eine Methode (GC-MS-EI) vorstellen, die es erlaubt EtG ausgehend von 50 mg Haar (LOD: 5000 pg/mg) zu bestimmen. (Skopp et al., 2000) Um die Bestimmung von EtG in ein Zeitintervall zu setzen, einigte sich die Society of Hair Testing sich 2004 auf die Hypothese, dass das Haupthaar im Durchschnitt 1 cm pro Monat wächst (Society of Hair Testing, 2004). Unter dieser Annahme können nun sogar Segmentierungen durchgeführt werden und es kann der Alkoholkonsum historisch über einen Zeitraum von einem Monat bestimmt werden.

Dekontamination und Haarextraktion

Bei der Dekontamination werden die Haare üblicherweise mit Wasser und anschließend mit Aceton oder Diethylether gewaschen, um anhaftende lipophile Stoffe von den Haaren zu waschen. Einige Institute pulverisieren anschließend die Haarproben, andere zerkleinern die Haare lediglich mit einer Schere.

Die Haarextraktion erfolgt entweder über längere Zeit (3 bis 5 Stunden bei 20 bis 50°C) mit Wasser im Ultraschallbad, oder über Nacht (12 h) mit Methanol, andere kombinieren beide Methoden.

Extraktionsreinigung und Derivatisierung

Einige Arbeitsvorschriften kommen ohne einen Extraktionsschritt aus, andere filtrieren die Probe von überschüssigen Haarresten ab und auch eine Festphasenextraktion mittels SPE wird genutzt.

Bei der Derivatisierung gibt es zwei große Trends: die Silylierung und die Acetylierung. Die Silylierung erfolgt meist mit den gängigen Silylierungsreagenzien wie N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) und N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA). Für die Acetylierung werden Carbonsäureanhydride verwendet, u.a. Trifluoroacetanhydrid (TFAA), Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) oder Heptafluorobuttersäureanhydrid (HFBA). Diese reichen im Allgemeinen aus für die Analyse in einem GC-MS-EI oder einem LS-MS-EI. Erfolgt die Ionisation mittels NCI, so erfolgt die Derivatisierung meist mit einem Gemisch aus Pentafluorpropionsäureanhydrid und Pentafluorpropanol (PFPA–PFPOH) oder Heptafluorobuttersäureanhydrid und Heptafluorobutanol (HFBA–HFBOH) da so die Nachweisgrenze auf einen LOD von 2 ng/mg (mit GC-MS-NCI) (Yegles et al., 2004) gesteigert werden kann.

Interner Standard, Chromatographie und Detektion

Als interner Standard wird entweder Methylglucuronid oder deuteriertes Ethylglucuronid (EtG–D5) verwendet, wobei letztes zu bevorzugen ist, da es fast gleichzeitig mit Ethylglucuronid eluiert wird.

Bei der Chromatographie wird sowohl die Flüssigkeitschromatographie (LC) als auch die Gaschromatographie (GC) verwendet. Hier ist zurzeit nicht absehbar, welche Methode die beste Trennung erreicht.

In der LC-MS/MS wird entweder eine Elektrospray-Ionisation (ESI) oder eine chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) verwendet. Hier werden LOD-Werte von 2 pg/mg (Morini et al., 2005), bzw. von 40 pg/mg erreicht. (Klys et al., 2005)

In der Gaschromatographie wird meist ein GC-MS-System verwendet, wo mittels Elektronenstoß-Ionisation (EI) LOD von 25 pg/mg erreicht wurden (Jurado et al., 2004) und anhand der negativen chemischen Ionisation (NCI) wurde die LOD zu 2 pg/mg bestimmt. (Yegles et al., 2004)

4 Cannabinoide und Haaranalytik

Das European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction hat eine Analyse zum Drogenkonsum und der damit verbundenen Schädigungen durchgeführt und hat festgestellt, dass es hilfreich ist drei Gruppen von Substanzen zu unterscheiden: Cannabisprodukte, verschiedene Stimulanzien und Opiate.

- Die Zahl der Konsumenten, die sich einer Behandlung wegen cannabisbedingter Probleme unterziehen, ist in den letzten Jahren gestiegen. Die Krankheitshäufigkeit liegt beim Cannabiskonsum etwa fünf mal höher als beim Konsum von anderen Substanzen.
- Obwohl Heroin und andere Opioide nach wie vor relativ selten konsumiert werden, sind diese Drogen noch immer diejenigen mit den höchsten Behandlungskosten und der höchsten Todesfolge im Zusammenhang mit Drogenkonsum in Europa. (EMCDDA, 2015)

Wie aus Abbildung 53 hervorgeht ist die Verbreitung von Cannabis am ehesten mit dem Konsum von Alkohol und Tabak zu vergleichen als mit dem Konsum von XTC, Heroin oder Amphetaminen die lediglich bei von einigen wenigen % den Jugendlichen konsumiert wurden. Ähnliche Resultat zeigen auch die Party MAG-Net Umfragen des CEPT der Jahre 2012 bis 2014 [2012 (Origer, 2014), 2013 (Duscherer & Paulos, 2014), 2014 (Duscherer & Paulos, 2015)] (siehe Kapitel 1.2.3)

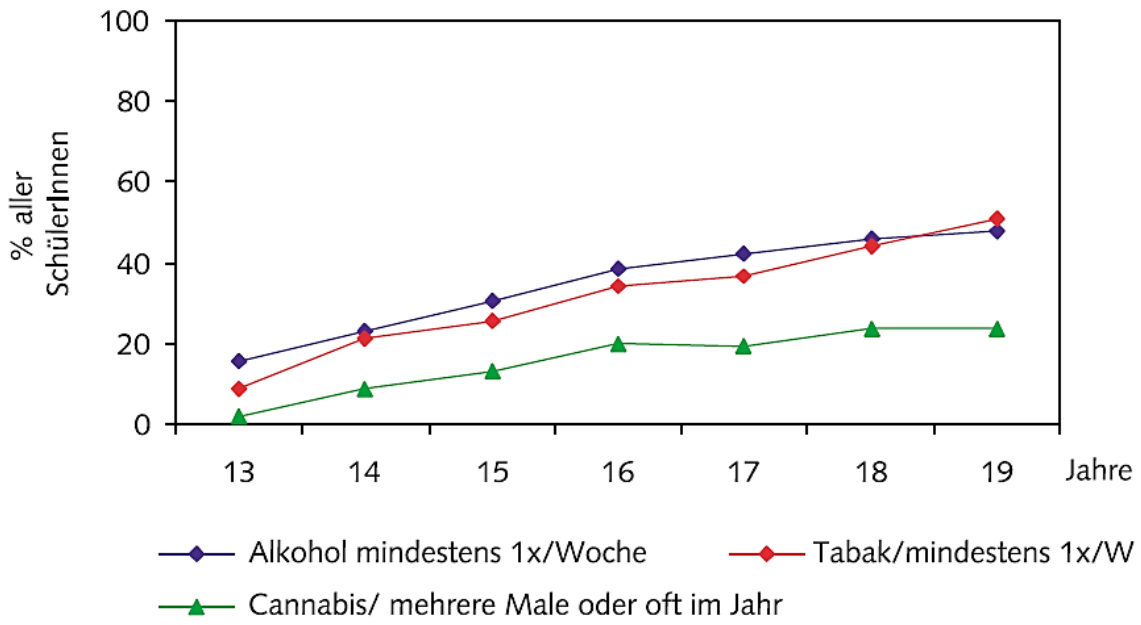


Abbildung 53: Konsum nach Alter von Tabak, Alkohol und Cannabis (Wagener, 2002)

4.1 Toxikologische Bestimmung des Cannabiskonsums

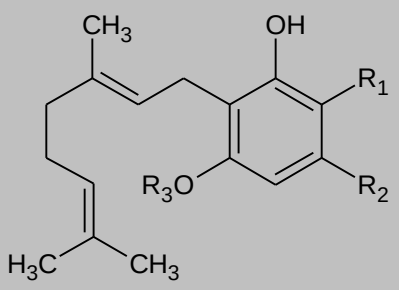
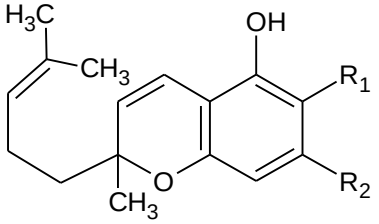
Da Cannabis die am häufigsten konsumierte illegale Droge ist, so ist es wichtig eine aussagekräftige, zuverlässige und leicht durchzuführende Bestimmungsmethode für diesen Suchtstoff zu besitzen. Im Blut ist Tetrahydrocannabinol dosisabhängig 5 bis 6 Stunden lang nachweisbar, im Urin kann THC bis zu einigen Wochen nachgewiesen werden. (Madea & Mußhoff, 2004) Der Nachweis der Cannabinoide im Haar stellt die Analytik vor zwei Probleme:

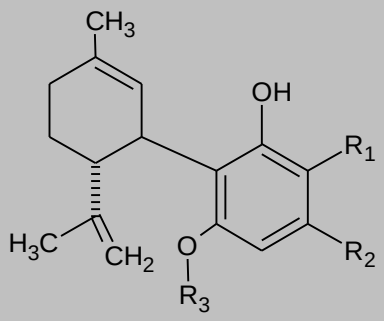
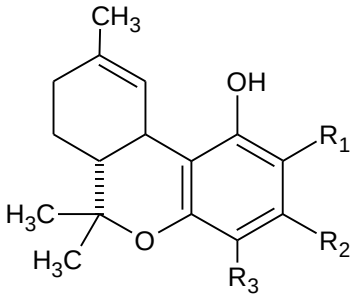
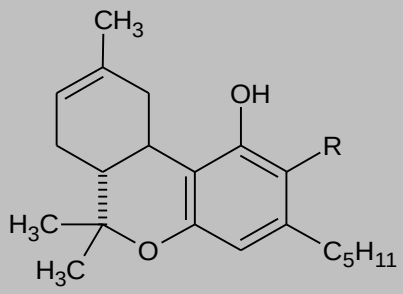
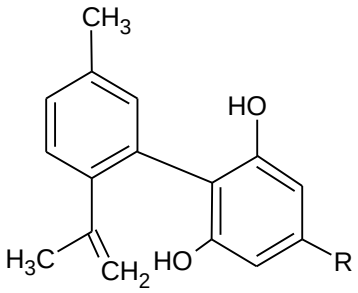
- Zum einem die geringen Substanzkonzentrationen in den Haaren, da Cannabis nur in kleinen Mengen konsumiert wird (10–20 mg THC pro Joint), wobei nur ein Teil vom Körper aufgenommen wird (1–4 mg THC) (Iversen, 2008) (Madea & Mußhoff, 2004)
- Zum anderen kann es leicht zu Kontaminationen der Haare durch den Rauch kommen, wenn Cannabis geraucht wird. (Madea & Mußhoff, 2004)

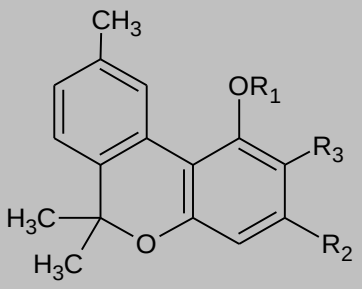
4.1.1 Chemische Bestandteile von Cannabis

Die Cannabinoide sind die charakteristischste und spezifischste Klasse von Bestandteilen, die nur in der Cannabispflanze vorkommen und deren Name von der botanischen Bezeichnung herrührt. Man unterscheidet bis heute mehr als sechzig verschiedene natürlichen Cannabinoide, welche im Hanf enthalten sind. Diese wurden in verschiedene Subklassen eingeteilt welche aus Tabelle 3 zu entnehmen sind.

Tabelle 3: Natürliche Cannabinoide-Klassen (Grotenhernen, 2004)

Cannabinoide:	Allgemeine Struktur
Cannabigeroltyp (CBG): Es gibt 6 Cannabinoide von CBG-Typ. CBG war der erste identifizierte Cannabinoid.	 R_1 = H oder COOH R_2 = C_3 oder C_5-Seitenkette R_3 = H oder CH_3
Cannabichromen-Typ (CBC): Insgesamt sind fünf Abkömmlinge bekannt, welche vor allem eine C_5- und in geringem Ausmaß eine C_3-Seitenkette besitzen	 R_1 = H oder COOH R_2 = C_3 oder C_5-Seitenkette

<u>Cannabidiol-Typ (CBD):</u> Es wurden sieben dem Cannabidiol verwandte Cannabinoide identifiziert welche Seitenketten überwiegend eine C_5-Seitenkette enthalten. Das in der Arbeit untersuchte **CBD** hat folgende Reste: R_1 = H R_2 = C_5–Seitenkette R_3 = H	 R_1 = H oder COOH R_2 = C_1-, C_3-, C_4- oder C_5-Seitenkette R_3 = H oder CH_3
<u>Delta-9-Tetrahydrocannbinol-Typ (Δ^9-THC):</u> Bislang wurden neun Cannabinoide mit Seitenketten von 1, 3, 4 und 5 Kohlenstoffen in dieser Gruppe identifiziert. Das in der Arbeit untersuchte **THC** hat folgende Reste: R_1 = H, R_2 = C_5–Seitenkette, R_3 = H und **THCA-A** (2-COOH-THC) hat folgende Reste:¨ R_1 = COOH, R_2 = C_5–Seitenkette, R_3 = H	 R_1 oder R_3 = H oder COOH R_2 = C_1-, C_3-, C_4- oder C_5-Seitenkette
<u>Delta-8-Tetrahydrocannbinol (Δ^8-THC):</u> Zu dieser Gruppe gehören nur Δ^8-THC und sein Vorläufer. Sie werden als Artefakte durch die Wanderung der Doppelbindung von der 9, 10-Position zur thermodynamisch stabileren 8, 9-Position angesehen. Δ^8-THC weist etwa 80 % der Aktivität von Δ^9-THC auf	 R = H oder COOH
<u>Cannabinodiol-Typ :</u> Dies sind die vollständig aromatisierten Abkömmlinge von THC, bzw. CBD. Sind werden als Artefakte, durch Luftoxidation, angesehen.	 R = C_3- oder C_5-Seitenkette

<u>Cannabinol-Typ:</u> Dies sind die vollständig aromatisierten Abkömmlinge von THC, bzw. CBD. Sind werden als Artefakte, durch Luftoxidation, angesehen. Das in der Arbeit untersuchte **CBN** hat folgende Reste: R_1 = H R_2 = C_5–Seitenkette R_3 = H	 R_1 = H oder C_3-Seitenkette R_2 = C_1-, C_3-, C_4- oder C_5-Seitenkette R_3 = H oder COOH

Cannabisprodukte sind komplexe Naturprodukte mit einer Vielzahl von Bestandteilen. Dies stellt die Analyseverfahren vor besondere Anforderungen, aber ebenfalls sollte man dies in Anbetracht ziehen bevor man Cannabis als Medikament zulässt. Während THC und andere Cannabinoide möglicherweise als Reinstoffe nützliche Medikamente darstellen, so sollte gerauchtes Marihuana nicht zum Einsatz kommen, da diese Gemenge in ihrer Zusammensetzung stark variieren können und somit kann auch die Wirkung stark variieren. (Grotenhernen, 2004)

4.1.2 Toxikologisch relevante Cannabinoide

Die Hauptkomponente des Cannabis ist der Wirkstoff Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC, Abbildung 54 oben links), welcher zum größten Teil für die psychoaktive Wirkung von Cannabis verantwortlich ist. Der andere psychoaktive Wirkstoff ist Cannabinol (CBN), dieser hat hauptsächlich eine muskelrelaxierende Wirkung.

Nach neuesten Studien (Hill, Williams, Whalley, & Stephens, 2011) wirkt Cannabidiol (CBD) dem THC-Effekt entgegen und schwächt somit dessen Wirkung. Er sorgt gleichzeitig für eine längere Wirkungsdauer des Gesamteffekts auf die körperlichen Prozesse. Ein hoher CBD-Anteil schwächt den allgemeinen psychoaktiven Effekt und führt zu einer eher sedierenden Wirkung, anstatt zu einer „bewusstseinserweiternden“ Erfahrung. Allerdings wurde CBD lange nicht in der Forschung berücksichtigt, da es keine psychoaktive Wirkung aufweist, wie THC oder CBN.

Weiterer relevante Wirkstoffe sind die Metaboliten dieser Stoffe, da sie es ermöglichen zu unterscheiden ob ein Stoff verstoffwechselt wurde oder ob es sich lediglich um eine Verunreinigung handelt. Wie man in Abbildung 54 erkennt ist das erste Produkt der Oxidation von THC, das 11-Hydroxy- Δ^9-THC (11-OH-THC, Abbildung 54 oben rechts). Dieses ist nur in geringen Konzentration im Blut vorhanden, da es zu 11-Nor-9-Carboxy-THC (THC-COOH, Abbildung 54 unten rechts) weiteroxidiert wird. THC-COOH ist der wichtigste nicht psychoaktive Wirkstoff von THC, von dem man lange glaubte, dass er keine pharmakologische Wirkung hat, allerdings konnte eine entzündungshemmende Wirkung nachgewiesen werden. (Grotenhernen, 2004)

4.1.3 Stoffwechsel von Tetrahydrocannabinol und seine Metaboliten

Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC) wird rasch zu 11-Hydroxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) in der Leber verstoffwechselt und anschließend zu 11-Nor-9-Carboxy-Tetrahydrocannabinol (THC-COOH). (Abbildung 54) Über die Eliminierungszeit von THC sind keinen präzisen Informationen erhältlich, da das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Plasma und Fettgewebe zu langsam erreicht wird. In der Literatur findet man eine Plasmahalbwertszeit von einem bis vier Tagen. (Grotenhernen, 2004)

11-OH-THC entsteht durch enzymatische Hydroxylierung durch CYP2C9 an der Methyl-Gruppe an C-11 von THC und ist ebenfalls eine stark psychotrope Substanz. Die Lebenszeit dieses Metaboliten ist allerdings so klein und die Konzentration im Plasma so gering, dass seine Wirkung insgesamt als sehr gering eingestuft wird. (Mazur, et al., 2009)

Das gebildete 11-OH-THC wird dann, ebenfalls enzymatisch, zu 11-Nor-9-Carboxy-Tetrahydrocannabinol oxidiert. THC-COOH ist nicht psychoaktiv und entsteht bereits wenige Minuten nach Beginn des Cannabiskonsums.

Bei den Produkten des Phase II-Metabolismus scheint es sich überwiegend um Derivate der Phase I zu handeln, welche unter Mithilfe des Enzyms UDP-Glucuronosyltransferase mit aktivierter UDP-Glucuronsäure reagiert haben. Diese Reaktion kann bei THC-COOH sowohl als O-Ester-Glucuronid auftreten, als auch als Glucuronid an der Phenol-Gruppe (Abbildung 54 unten links). Toxikologisch relevant scheint das Glucuronid der Carbonsäure zu sein (THC-COOH-glu), da es sich in einer höheren Konzentration im Haar befindet als THC-COOH (Pichini, et al., 2015) (Mazur, et al., 2009)

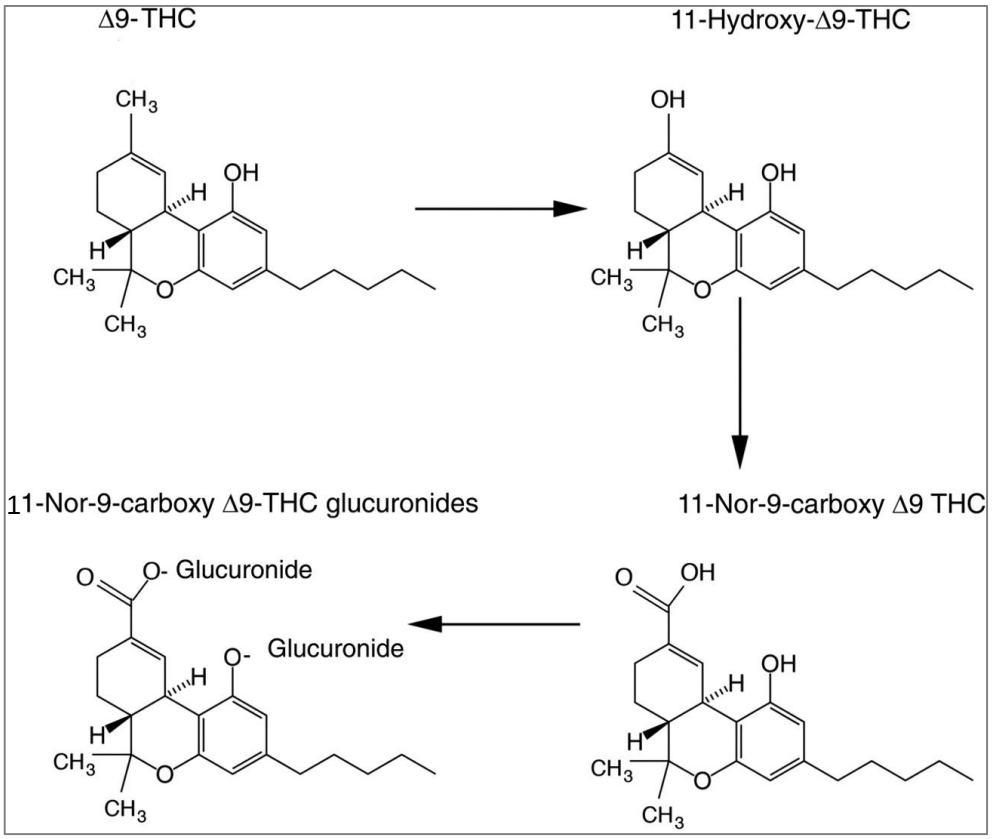


Abbildung 54 : Stoffwechsel von Δ^9-Tetrahydrocannabinol

Wie bereits in 4.1.2 beschrieben haben sich die Cannabinoide THC, CBD, CBN und zum Nachweis der Metabolisierung von THC ebenfalls THC-COOH als relevant herausgestellt. Allerdings hat die SoHT (Society of Hair Testing, 2011) nur Cut-Off-Werte für die LOQ von THC und THC-COOH festgesetzt:

- THC: 50 pg / mg Haar
- THC-COOH: 0,2 pg / mg Haar

Insbesondere der Nachweis von 200 Femtogramm pro mg Haar stellt die Analytik vor eine technische Herausforderung, wie in 4.1.4 ersichtlich wird.

4.1.4 Stand der Wissenschaft

Im Folgenden werde ich den Stand der Wissenschaft für die analytische Bestimmung der Cannabinoide darlegen.

Bevor es zu einer Haaranalyse kommt wird in der Regel ein Schnelltest durchgeführt, da THC allerdings nicht wasserlöslich ist und somit nicht im Speichel vorkommt, so wird meist eine Urinprobe durchgeführt. Ist diese positiv, so erfolgt eine Blutanalyse.

Als Vorprobe kann ebenfalls der Schweiß analysiert werden. Hier bietet u.a. die Firma PharmChem ein „PharmChek Sweat Patch“ an, welcher mindestens 1 Tag getragen werden muss. Dieser Patch ermöglicht es neben Cannabis-Konsum auch den Konsum von Cocain, Opiaten, Amphetaminen festzustellen. Der Vorteil dieses Patches ist, dass neben dem Hauptwirkstoff auch Metaboliten detektiert werden können. (PharmChem, 2015)

Dekontamination

Die Kontamination der Haare durch Haschischrauch ist, ins besonders bei Cannabis, eine nicht zu vernachlässigende Quelle einer positiven Haaranalyse. Da sowohl THC, als auch CDN und CBN im Rauch enthalten sein können, ist der Nachweis einer der Metaboliten von THC unabdingbar um ein zuverlässiges Analysenresultat zu erhalten. Bei der Reinigung der Haare ist ein Trend zu Dichlormethan oder anderen polaren Lösungsmitteln (u.a. n-Hexan, Petrolether) erkennbar. Strano-Rossi & Chiarotti konnten zeigen, dass Waschen mit Petrolether dem Waschen mit Dichlormethan oder von Wasser mit Detergenzien vorzuziehen ist. (Strano-Rossi & Chiarotti, 1999) (Madea & Mußhoff, 2004)

Extraktion

Die Extraktion der Cannabinoide erfolgt entweder durch alkalische Hydrolyse des Haars, durch methanolische Extraktion oder durch enzymatische Reaktionen.

Die alkalische Hydrolyse erfolgt meist mit Natronlauge in einer Konzentration von einer bis zehn Mol pro Liter. Alternativ wird Kalilauge derselben Konzentration verwendet. (vgl. Tabelle 4)

Tabelle 4: Übersicht zur Extraktion und Aufreinigung einer Haarprobe für die Bestimmung der Cannabinoide

Lauge	Konzentration	Wirkdauer	Temperatur	Cleanup	Referenz
NaOH	1M	1h	80°C	SPE	(Jones, Jones, Plate, & Lewis, 2013)
NaOH	2M	k.A.	95°C	LLE	(Sachs & Dressler, 2000)
NaOH	10M	k.A.	k.A.	SPE	(Cairns, Kippenberger, Scholtz, & Baumgartner, 1995)
KOH	10M	0,5h	80°C	SPE	(Schräder, Nadulski, & Pragst, 2008)
KOH /MeOH	10M (1:1; v/v)	0,5h	60°C	SPE	(Uhl & Sachs, Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption, 2004)
MeOH	/	18h	RT	-	(Paterson, McLachlan-Troup, Cordero, Dohnal, & Carman, 2001)

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) wird überwiegend ein Gemisch aus Ethylacetat und n-Hexane (1:9, v/v) verwendet, wobei das Mischungsverhältnis nicht bei allen Gruppen gleich ist. (Sachs & Dressler, 2000) (Jurado, et al., 1996)

Bei der Festphasenextraktion (SPE) werden häufig spezifische THC-Säulen verwendet wie die ZSTHC020 (United Chemical Technologies), Narc-1 (Bakerbond), Oasis Max (Waters), C18 oder Drug I & II (Chromabond), Clean-Screen CSDAU133 oder CSTHC131 (UCT). (Madea & Mußhoff, 2004) Es handelt sich hier überwiegend um kombinierte Anionenaustauscher mit Umkehrphase Säulen.

Einige wenige Gruppen versuchen eine Extraktion mit beta-Glucuronidase und Arylsulfatase während 2 Stunden bei 40°C und reinigen anschließend mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion auf. (Baptista, et al., 2002) (Madea & Mußhoff, 2004)

Derivatisierung

Die Wahl des Derivatisierungsmittels für die Cannabinoide ist abhängig von der Ionisationsmethode für die Massenspektrometrie.

So wird für die *Elektronenstoß-Ionisation (EI)* hauptsächlich BSTFA (Collins, Easson, Hansen, Hodda, & Lewis, 1997), MTBSTFA (Paterson, McLachlan-Troup, Cordero, Dohnal, & Carman, 2001) und MSTFA (Musshoff, Junker, Lachenmeier, Kroener, & Medea, 2002) verwendet.

Bei der *negativen chemischen Ionisation (NCI)* von THC-COOH wird bevorzugt PFPA/PFPOH (Kintz, Cirimel, & Mangin, 1995), PFPA/HFIP (Agilent, 2001) sowie TFAA/HFIP (Moore et al., 2006) verwendet. Sollen nur THC, CBD und CBN bestimmt werden, so werden lediglich die Anhydride (PFPA, HFBA, TFAA (Agilent, 1999)) genutzt.

Auch die Methylierung mit Methyliodid wurde von einer Gruppe zur Derivatisierung von THC-COOH verwendet. (Thieme, Sachs, & Uhl, 2014)

Chromatographie

Ende der Siebziger Jahre erfolgte die Analyse der Cannabinoide lediglich im Urin, da die Forschung keine andere Möglichkeit besaß. In den Achtziger Jahre wurden immunochemische Methoden entwickelt, welche die heutigen Schnelltests ermöglichten. Es dauerte aber bis Ende der Neunziger Jahre ehe THC und seine Metaboliten in Blut, Speichel, Urin und Haaren nachgewiesen werden konnten. Der Hauptwirkstoff der in den Haaren von Kintz (1996) bestimmt wurde war THC, den Gehalt von THC-COOH bestimmte er zu weniger als einem Prozent (Sachs &Kintz, 1998). Auch CBN und CBN konnten in Jahr 1996 durch Cirimele in Haaren bestimmt werden. Analog zu der Bestimmung von EtG, können die Haare ebenfalls bei der Bestimmung von THC segmentiert werden, um so ein Profil des Cannabiskonsums zu erstellen (Klein et al., 2000). Da die Gehalte der Cannabinoide sich in einem Bereich von nur einigen ng/mg Haar ansiedeln, so bedarf es leistungsfähiger, chromatographischer Analyseverfahren. Die überwiegende Anzahl der Forscher bedienen sich der GC-MS mit Elektronenstoß-Ionisation (EI), aber auch die negative chemische Ionisation (NCI) wird in einigen Fällen verwendet. (Uhl, Determination of cannabinoids in humain hair, 2007) 2001 gelang es Moore mittels GC-MS-NCI THC-COOH mit einer LOD von 0,4 pg/mg zu bestimmen (Moore, Guzaldo, & Donahue, 2001) und 2002 konnte Monsanto et al. THC-COOH mittels GC-MS-NCI und einer Derivatisierung mit PFPA/PFPOH nachweisen (Monsanto, 2002). Allerdings war es trotz der Injektion großer Volumina (25 µl) nicht möglich den Cut-Off-Wert der SoHT zu unterschreiten. Erst im Jahr 2006 gelang es mittels GC/GC-MS-NCI THC-COOH in einem Bereich von 0,05 pg/mg zu bestimmen. (Moore et al., 2006) Eine andere Methode zur Bestimmung geringer Konzentrationen ist die GC-MS/MS. Hier konnten Wicks und Tsanaclis 2005 ein Methode entwickeln welche es erlaubt THC, CBN, CBD, 11-OH-THC und THC-COOH simultan zu bestimmen mit einer LOD von 1 pg/mg für die Metaboliten. (Wicks & Tsanaclis, 2005) (Inserm, 2001)

Huestis gelang es 2007 THC (LOD von 1 pg/mg) und THC-COOH (LOD von 0,1 pg/mg) mittels GC-MS/MS und einer Derivatisierung mit PFPA/HFIP zu bestimmen. (Huestis, et al., 2007). Im Jahr 2011 konnte erstmals eine Analyse die von der SoHT anvisierte LOQ von 0,05 pg/mg mittels GC-MS/MS und einer Derivatisierung mit PFPA und PFPOH erreichen. (Kim, Cheong, Lee, & In, 2011)

Es wurde auch versucht mittels LC-MS und LC-MS/MS die Cannabinoide und ihre Metaboliten zu bestimmen, allerdings konnten diese Methoden nicht mit den gaschromatographischen Ergebnissen mithalten. So haben Roth et al für THC, CBD und CDN lediglich eine LOQ von 20 pg/mg erhalten. THC-COOH wurde nicht bestimmt, da nicht zu erwarten war, dass sie diesen bestimmen konnten, deshalb wurde THCA-A mit einer LOD von 2,5 pg/mg bestimmt. THCA-A ist die nicht psychoaktive Vorstufe von THC und Hauptbestandteil in der Pflanze. (Roth, Moosmann, & Auwärter, 2013) Im Jahr 2014 gelang es einer Forschergruppe THC-COOH mittels LC-MS/MS (LOQ von 0,1 pg/mg) nach Methylierung mit Methyliodid zu bestimmen. (Thieme, Sachs, & Uhl, 2014)

Bislang galt THC-COOH als wichtigstes Indiz für den Konsum von THC, da es das Produkt des Metabolismus von THC ist. Im Jahr 2015 versuchte eine Gruppe um Pichini et al. ein anderes Metabolit zu bestimmen: THC-COOH-glu. Dieses ist ein Phase II Metabolit und wurde zuvor bereits

in anderen biologischen Matrizen bestimmt. Mit UHPLC-MS/MS konnte THC-COOH-glu mit einer LOD von 0,25 pg/mg bestimmt werden. (Pichini, et al., 2015)

5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen zwei Methoden zur Bestimmung von Suchtstoffen in Haaren mittels GC-MS/MS entwickelt werden.

Im ersten Schritt soll eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt EtG in einer Haarprobe mittels GC-MS/MS zu bestimmen. Die Extraktionsmethode konnte von der GC-MS-Methode übernommen werden, sodass für diese Methode nur die MRM-Methode entwickelt werden musste.

Im zweiten Schritt soll eine Methode zur Bestimmung von THC-COOH entwickelt werden, um die maximale Empfindlichkeit der GC-MS/MS auszureizen und um möglicherweise den von der SoHT angestrebten Cut-off für die LOQ von THC-COOH zu unterschreiten. Hierzu muss eine Methode entwickelt werden um THC-COOH aus der Haarprobe zu extrahieren und für die GC-MS/MS vorzubereiten.

Ein dritter Schritt ist eine Methode zu bestimmen, die es erlaubt THC, CBD, CBN und THC-COOH gleichzeitig zu bestimmen. Hier musste eine Methode entwickelt werden, um alle Stoffe aus den Haaren zu lösen und um sie quantitativ mittels GC-MS/MS zu bestimmen.

Bei den beiden letzten Schritten war die Extraktion aus den Haaren und die Aufarbeitung der Proben zu entwickeln, sowie die relevanten Massen für die Massenspektrometrie mit der jeweiligen Ionisation zu bestimmen.

6 Chemikalien, Material und Methoden

6.1 Handelsübliche Chemikalien

Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFPA), Heptafluorobuttersäureanhydrid (HFBA), Pentafluoropropan-1-ol (PFPOH), Heptafluorobutan-1-ol (HFBOH) stammen von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

N-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA), *N*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA), *N*-Methyl-bis(trifluoro-acetamid) (MBTFA) stammen von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Methanol, Ethylacetat, n-Hexan, Acetonitril, Ammoniak (25%), Salzsäure (37%), Essigsäure (>99%), Ameisensäure (98–100%) und Aceton wurden bei Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) bestellt.

Alle Salze (Natriumhydroxid, Natriumacetat-Trihydrat, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit.

6.2 Standardlösungen

Ethyl-β-D-glucuronid (EtG, 1 mg/ml), Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC, 1 mg/ml), 11-Nor-9-Carboxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol (THC-COOH, 1 mg/ml), Cannabidiol (CBD, 1 mg/ml), Cannabinol (CBN, 1 mg/ml) und die internen Standards Ethyl-β-D-glucuronid-D_5 (EtG-D_5, 1 mg/ml), Δ^9-Tetrahydrocannabinol–D_3 (THC –D_3, 0,1 mg/ml), Cannabidiol-D_3 (CBD-D_3, 0,1 mg/ml), Cannabinol-D_3 (CBN-D_3, 0,1 mg/ml), 11-nor-9-Carboxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol-D_3 (THC-COOH-D_3, 0,1 mg/ml) in Methanol wurde bei LGC Standards (Middlessex, UK) oder Ceriliant (Texas, USA) bezogen.

Die Reinstoffe liegen als methanolische Lösungen vor. Von diesen wurden verdünnte Lösungen, sogenannte Arbeitslösungen erstellt, welche durch Verdünnung mit Methanol erzielt wurden.

Verdünnen von 1 mg/ml auf 0,01 ng/µl:

10 µl der Stammlösung (1 mg/ml) werden mit 1990 µl Methanol verdünnt und mit dem Vortex-Mischer gemischt. Die erhaltene Lösung hat eine Konzentration von 5 ng/µl.

Von dieser werden 10 µl entnommen und mit 4990 µl Methanol verdünnt, nach Mischen wird die 0,01 ng/µl Lösung bei –20°C aufbewahrt.

Verdünnen von 0,1 mg/ml auf 0,05 ng/µl:

50 µl der Stammlösung (0,1 mg/ml) werden mit 950 µl Methanol verdünnt und mit dem Vortex-Mischer gemischt. Die erhaltene Lösung hat eine Konzentration von 5 ng/µl.

Von dieser werden 10 µl entnommen und mit 990 µl Methanol verdünnt, nach Mischen wird die 0,05 ng/µl Lösung bei –20°C aufbewahrt.

THC-mix-D3 (0,1 ng/µl Mischung aller Cannabinoide)

Zur Herstellung der Stammlösung (2 ng/µl) benötigt man von jedem Stoff die in Tabelle 5 angegebene Menge und gibt 920 µl Methanol hinzu. Nach Mischen werden 50 µl der 2 ng/µl Lösung mit 950 µl Methanol verdünnt und gemischt. Beide Lösungen werden bei –20°C aufbewahrt.

Tabelle 5 : Benötigte Volumina der internen Standards für THC-mix-D3

Volumen [µl]	interner Standard
20 µl	Δ^9-Tetrahydrocannabinol–D_3 (THC –D_3, 0,1 mg/ml)
20 µl	Cannabidiol-D_3 (CBD-D_3, 0,1 mg/ml)
20 µl	Cannabinol-D_3 (CBN-D_3, 0,1 mg/ml)
20 µl	11-nor-9-Carboxy-Δ^9-Tetrahydrocannabinol-D_3 (THC-COOH-D_3, 0,1 mg/ml)

Carbonat-Puffer ($NaHCO_3$/Na_2CO_3, 50 mM)

In einen 1 Liter Messkolben werden 5,3 g (50 mmol) Natriumcarbonat und 4,2 g (50 mmol) Natriumhydrogencarbonat eingewogen, mit dest. Wasser aufgefüllt und gemischt.

Acetat-Puffer, Konzentration 100 mmol/l:

In einen 1 Liter Messkolben werden 13,6 g (100 mmol) Natriumacetat-Trihydrat eingewogen und mit dest. Wasser aufgefüllt. Anschließend fügt man zur erhaltenen Lösung 52,6 ml Methanol (abs.) hinzu und mischt.

6.3 Instrumente

Extraktion:

Zum Zerkleinern der Haarproben wird eine Kugelmühle vom Typ MM2 (Retsch, Haan, Germany). Zur Extraktion wird ein Ultraschallbad ELMA TI-H-15 der Firma Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG (Singen, Germany) verwendet, sowie eine Sigma Zentrifuge (Osterode am Harz, Germany). Der Vortex-Mischer stammt von Heidolph (Deutschland) Typ REAX 2000.

Außerdem wurde ein Supelco VisiprepTM SPE Vacuum Manifold (Bellefonte, CA, USA) mit 24 Plätzen verwendet um die Proben aufzugeben und zum Trocknen der Extraktionssäulen. Extraktionssäulen Oasis MAX (60 mg, 3 ml) vom Waters (New Bedford, MA, USA), Clean Screen CSDAU133 (130 mg, 3 ml) von UCT (Bristol, USA) und DRUG II (200 mg, 3 ml) von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Zum Trocknen im Stickstoffstrom wurde ein Pierce Reacti-Therm III Heating Module (Rockford, IL, USA) verwendet.

Gaschromatographie – Massenspektrometrie:

Sowohl die GC–MS-NCI/EI als auch die GC-MS/MS-NCI/EI Analysen wurden auf einem GC-MS/MS System durchgeführt, welches aus einem Gaschromatograph 7890A mit einem automatischem Injektor AS 7693 sowie einem Triple Quadrupol Massenspektrometer 7000C (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) besteht.

Die chromatographische Trennung erfolgte durch eine HP-5 MS (5% phenyl methyl siloxane) Kolonne (Länge 30 m x innerer Durchmesser 0,25 mm x Filmdicke 0,25 µm) sowie ein hochtemperaturbeständige Kolonne VF-5ht (Länge 30 m x innerer Durchmesser 0,25 µm x Filmdicke 0,10 µm) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

6.4 Arbeitsvorschriften

Die Optimierung der Arbeitsvorschriften wird im Kapitel 7 – Resultate und Diskussion beschrieben.

6.4.1 Bestimmung von EtG in einer Haarprobe

6.4.1.1 Probenvorbereitung

Die Haare werden erst eine Minute in dest. Wasser, dann in Aceton gewaschen und getrocknet durch Abtupfen. Anschließend werden sie mit einer Schere im Metallgefäß der Schwingmühle grob zerkleinert. Nach Zugabe einer kleinen Metallkugel werden die Haare fünf bis zehn Minuten zerkleinert. Das Haarpulver wird dann in ein Kunststoffreagenzglas abgefüllt. Für die Analyse werden zwischen 20 und 30 mg Haarpulver abgewogen, mit 2 ml Wasser versetzt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Proben werden 90 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Nun werden die Proben mit 500 pg (10 µl einer 0,05 ng/µl Arbeitslösung) internem Standard EtG-D5 versetzt. Die Mischung erfolgt mit einem Vortex-Mischer für einige Sekunden. Die Proben werden dann 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert.

6.4.1.2 Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und Derivatisierung

Die Festphasen-Extraktion erfolgt mit einer Oasis Max–Säule. Jede Säule wird vor den Gebrauch mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser konditioniert. Dann wird die überstehende klare Flüssigkeit von der zentrifugierten Probenlösung aufgegeben. Die Säule wird mit 1 ml von einem Gemisch aus dest. Wasser und Ammoniak (5 Vol%, in Wasser) und mit 2 ml Methanol gewaschen und während 10 Minuten im Vakuum trocken gesaugt. Die Elution erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer 2 Vol% Ameisensäure-Lösung in Methanol. Die Probe wird mit Stickstoffgas bei 38°C getrocknet. Der Rückstand wird mit 100 µl HFBA versetzt und während 30 Minuten bei 60°C derivatisiert. Anschließend wird das überschüssige HFBA im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand wird in 50 µl Ethylacetat aufgenommen und in die Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

6.4.1.3 GC-MS/MS-Einstellungen

Für die Bestimmung werden drei Fragmentierungen benötigt, zwei für die nicht deuterierte Verbindung und eine für den internen Standard (EtG-D5). Diese sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 : Transitionen von EtG•2HFB mit Retentionszeit und Dwell-Zeit

RT [min]		Transitionen		Kollisionsenergie [eV]	Dwell-time [min]
6,20	EtG•2HFB	596 → 213	Quantifier	7	30
		397 → 213	Qualifier	10	30
6,18	EtG •2HFB-D5	601 → 213	Quantifier	10	30

Zur Analyse werden je 4 µl in die auf 250°C erwärmte Injektionskammer injektiert. Zur Trennung wird der GC-Ofen erst 2 Minuten auf 100°C halten, um das Lösungsmittel (Ethylacetat) von der GC-Kapillar zu evakuieren. Dann wird der GC-Ofen mit 10°C pro Minute erhitzt bis auf 170°C, dann mit 40°C/min auf 300°C. Diese Temperatur wird für 3 Minuten gehalten, um sicher zu stellen, dass alle aufgegebenen Analyten die GC-Säule verlassen haben. In Abbildung 55 ist das Ofenprogramm graphisch dargestellt.

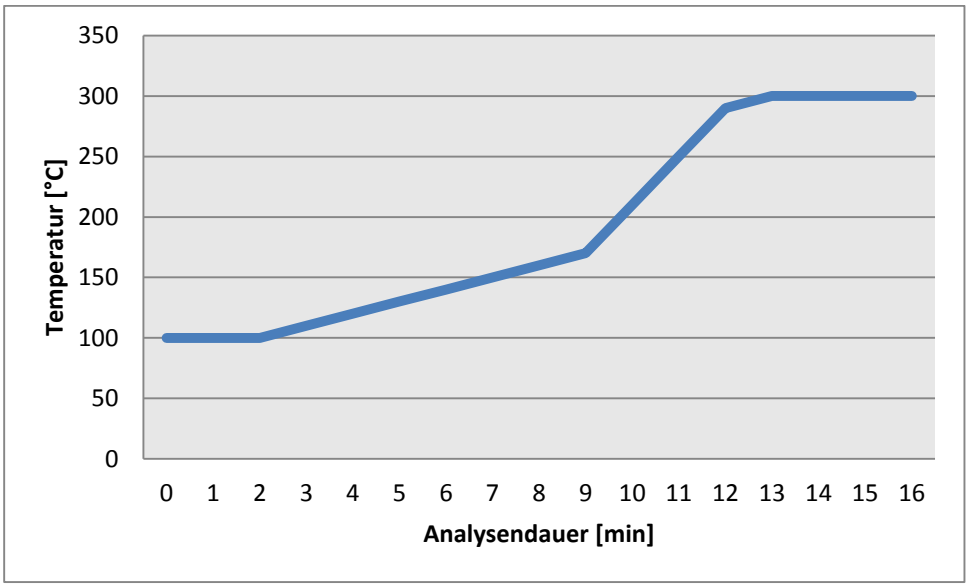


Abbildung 55: Temperaturprofil des GC zur Bestimmung von EtG

6.4.2 Bestimmung von THC-COOH mittels NCI

6.4.2.1 Probenvorbereitung

Bei der Entwicklung der Methode zur Bestimmung von THC-COOH wurde sowohl die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) als auch die Festphasen-Extraktion (SPE) als Extraktionsvariante untersucht. Diese werden in den folgenden Abschnitten besprochen.

Allgemein werden die Haare erst eine Minute in dest. Wasser, dann in Aceton gewaschen und getrocknet durch Abtupfen. Anschließend werden sie mit einer Schere im Metallgefäß der

Schwingmühle grob zerkleinert. Nach Zugabe einer kleinen Metallkugel werden die Haare fünf bis zehn Minuten zerkleinert. Das Haarpulver wird dann in ein Kunststoffreagenzglas abgefüllt.

6.4.2.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die LLE erfolgte nach einer Arbeitsvorschrift von Jurado (Jurado, et al., 1996). Für die Analyse werden zwischen 20-30 mg Haarpulver abgewogen, 1 ml 2,5 M Natronlauge und 20 µl internem Standard (THC-COOH-D3, 0,1 ng/µl) versetzt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Proben werden 20-30 Minuten bei 60°C in den Trockenschrank gestellt und gelegentlich geschüttelt. Dann neutralisiert man mit 1 ml 2,5 M Salzsäure und gibt 1 ml Carbonat-Puffer hinzu (pH = 6). Die zentrifugierte (6 Minuten bei 5000 Umdrehung/Minute) Analyt-Lösung wird mit 5 ml von einem n-Hexan-Ethylacetat-Gemisch (9:1, v/v) extrahiert. Die organische Phase wird anschließend mit 1 ml 0,1 N NaOH und dann mit 1 ml 0,1 M HCl gewaschen, bevor die organische Phase mit Stickstoff bei 38°C getrocknet wird. Die Probe wird anschließend mit einer Mischung von 100 µl HFBA und 70 µl HFBOH bei 60°C für 30 min derivatisiert. Anschließend wird das überschüssige HFBA/HFBOH-Gemisch im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand wird mit 50 µl Acetonitril aufgenommen und in die Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

6.4.2.1.2 Festphasenextraktion und Derivatisierung

Für die Analyse werden zwischen 20-30 mg Haarpulver abgewogen, mit 500 µl Methanol, 400 µl 10 M Natronlauge und 2 ng internem Standard (THC-COOH-D3, 20 µl einer 0,1 ng/µl) versetzt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Proben werden 20-30 Minuten bei 60°C in den Trockenschrank gestellt und gelegentlich geschüttelt. Nach Abkühlen gibt man 500 µl Essigsäure (konz.) hinzu und prüft ob der pH der Lösung sich zwischen 4,5 und 6,5 befindet. Dann gibt man 600 µl Acetat-Puffer (100 mM) hinzu und mischt die Probe. Die Probe wird dann 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert.

Die Festphasen-Extraktion erfolgt mit einer DRUG II –Säule. Jede Säule wird vor dem Gebrauch zweimal mit je 2 ml Methanol und 2 ml Acetat-Puffer (100 mM) konditioniert. Dann wird die überstehende klare Flüssigkeit der zentrifugierten Probenlösung aufgegeben. Die Säule wird mit 1 ml Ammoniak (5 Vol%, in Wasser) und mit 2 ml Methanol gewaschen und während 10 Minuten im Vakuum trocken gesaugt. Die Elution erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer n-Hexan/Ethylacetat/Essigsäure-Lösung (75:25:1, v/v). Die Probe wird mit Stickstoff bei 38°C getrocknet. Der Rückstand wird mit 100 µl HFBA und 70 µl HFBOH versetzt und während 30 Minuten bei 60°C derivatisiert. Anschließend wird das überschüssige HFBA/HFBOH-Gemisch im Stickstoffstrom bei 38°C entfernt und der Rückstand wird mit 50 µl Acetonitril aufgenommen und in die Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

6.4.2.2 GC-MS/MS-Einstellungen

Für die Bestimmung werden drei Fragmentierungen benötigt, zwei für die nicht deuterierte Verbindung und eine für den internen Standard (THC-COOH-D3), vgl. Tabelle 7.

Tabelle 7 : Transitionen von THC-COOH•2HFB mit Retentionszeit und Dwell-Zeit

RT [min]		Transitionen		Kollisionsenergie [eV]	Dwell-time [min]
5.986	THC-COOH•2HFB	704 → 525	Quantifier	15	27,4
		525 → 298	Qualifier	25	44,1
5.981	THC-COOH •2HFB-D3	707 → 528	Quantifier	5	20,3

Zur Analyse werden je 2 µl in die auf 270°C erwärmte Injektionskammer injektiert. Da nur ein Analyt zu erwarten ist, verbleibt der GC-Ofen erst eine Minute bei 70°C, dann wird mit 30°C/min auf 300°C erhitzt und 3 Minuten bei dieser Temperatur gehalten, um Verunreinigungen zu entfernen. Anfangs wurde auch die Hochtemperaturkolonne verwendet, welche bis 350°C erhitzt wurde.

In der Folge hat sich dies als unnötig herausgestellt, da THC-COOH bereits nach 6 Minuten eluiert, was einer Temperatur von etwa 200°C entspricht. Deshalb wurde nur noch bis 300°C erhitzt und 4 min bei dieser Temperatur gehalten.

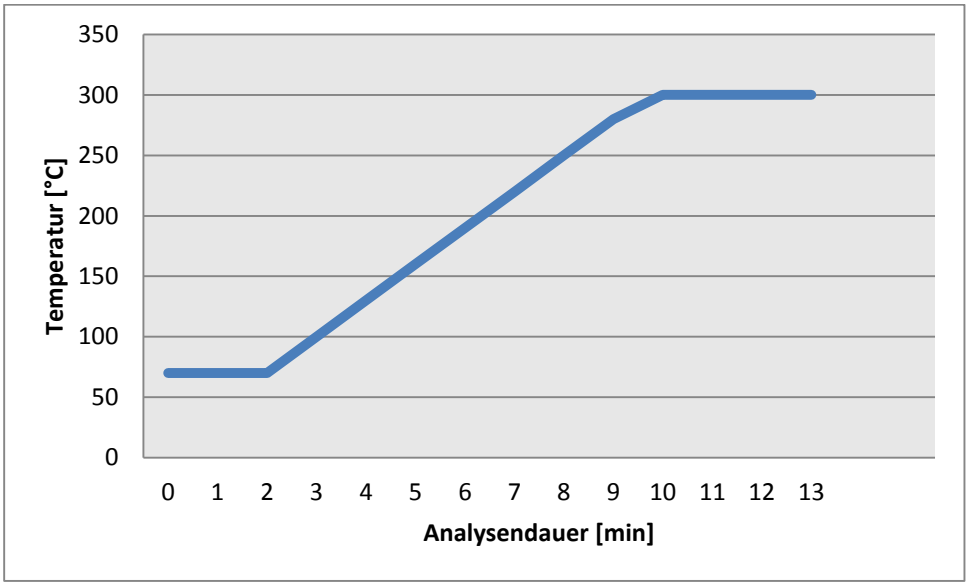


Abbildung 56 : Temperaturprofil des GC zur Bestimmung von THC-COOH•2HFB im NCI

6.4.3 Bestimmung von THC, CBD, CBN und THC-COOH mittels EI

6.4.3.1 Probenvorbereitung

Die Haare werden erst eine Minuten in dest. Wasser, dann in Aceton gewaschen und getrocknet durch Abtupfen. Anschließend werden sie mit einer Schere im Metallgefäß der Kugelmühle grob zerkleinert. Nach Zugabe einer kleinen Metallkugel werden die Haare fünf bis zehn Minuten zerkleinert. Das Haarpulver wird dann in ein Kunststoffreagenzglas abgefüllt.

Für die Analyse werden zwischen 20-30 mg Haarpulver abgewogen, mit 500 µl Methanol, 400 µl 10 M Natronlauge und internem Standard (THC-mix-D3, 20 µl einer 0,1 ng/µl Lösung) versetzt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Proben werden 20-30 Minuten bei 60°C in den Trockenschrank gestellt und gelegentlich geschüttelt. Nach Abkühlen gibt man 500 µl Essigsäure (konz.) hinzu und prüft ob der pH der Lösung sich zwischen 4,5 und 6,5 befindet. Dann gibt man 600 µl Acetat-Puffer (100 mM) hinzu und mischt die Probe. Die Probe wird 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert.

6.4.3.2 Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und Derivatisierung

Die Festphasen-Extraktion erfolgt mit einer DRUG II–Säule. Jede Säule wird vor dem Gebrauch zweimal mit je 2 ml Methanol und 2 ml Acetat-Puffer (100 mM) konditioniert. Dann wird die überstehende klare Flüssigkeit der zentrifugierten Probenlösung aufgegeben. Die Säule wird mit 1 ml Ammoniak (5 Vol%, in Wasser) und mit 2 ml Methanol gewaschen und während 10 Minuten im Vakuum trocken gesaugt. Die Elution erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer n-Hexan/Ethylacetat/Essigsäure-Lösung (75:25:1, v/v). Die Probe wird mit Stickstoff bei 38°C getrocknet.

Bildung der TMS-Derivate

Der trockene Rückstand wird mit 50 µl MSTFA versetzt und 20 Minuten bei 60°C derivatisiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in ein Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

Bildung der TBDMS-Derivate

Der trockene Rückstand wird mit 50 µl MBDSTFA versetzt und 20 Minuten bei 60°C derivatisiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in ein Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

6.4.3.3 GC-MS/MS-Einstellungen

Für die Bestimmung sind je drei Fragmentierungen je Cannabinoid notwendig, zwei für die nicht deuterierte Verbindung und eine für den internen Standard.

Tabelle 8 : Transitionen der MSTFA-Derivate von THC, CBD, CBN und THC-COOH sowie aller optimierter Parameter mittels GC-MS/MS-EI

RT [min]		Transitionen		Dwell-time [ms]	Kollisions-energie [eV]
7,24	CBD•2TMS	458 → 351	Quantifier	10	10
		458 → 268	Qualifier	10	25
7,23	CBD •2TMS-D3	392 → 229	Quantifier	18,7	35
7,64	THC•TMS	386 → 371	Quantifier	10	15
		386 → 305	Qualifier	10	25
7,63	THC •TMS-D3	389 → 374	Quantifier	10	15
7,94	CBN•TMS	382 → 367	Quantifier	10	15
		382 → 310	Qualifier	10	40
7,93	CBN •TMS-D3	385 → 370	Quantifier	10	30
8,99	THC-COOH•2TMS	473 → 355	Quantifier	10	25
		473 → 297	Qualifier	10	25
9,00	THC-COOH •2TMS-D3	373 → 292	Quantifier	28,8	30

Tabelle 9 : Transitionen von THC, CBD, CBN und THC-COOH sowie der alle optimierter Parameter nach Derivatisierung mit MBDSTFA im EI

RT [min]		Transitionen		Dwell-time [ms]	Kollisions-energie [eV]
8,34	THC•TBDMS	371 → 249	Quantifier	10	20
		371 → 289	Qualifier	10	10
8,33	THC •TBDMS-D3	374 → 252	Quantifier	15,6	20
8,58	CBD•2TBDMS	474 → 417	Quantifier	112,6	10
		474 → 343	Qualifier	63,9	20
8,57	CBD •2TBDMS-D3	420 → 346	Quantifier	286,7	10
8,73	CBN•TBDMS	408 → 337	Quantifier	224,7	30
		408 → 281	Qualifier	32,6	25
8,72	CBN •TBDMS-D3	427 → 412	Quantifier	42,1	15
11,35	THC-COOH•2TBDMS	514 → 355	Quantifier	17	20
		514 → 147	Qualifier	13	35
11,34	THC-COOH •2TBDMS-D3	517 → 358	Quantifier	14,8	15

Die Einstellung des Gaschromatograph ist unabhängig von der Derivatisierungsmethode (MSTFA oder MBDSTFA). Zur Analyse werden 1 µl der derivatisierten Proben in das auf 270°C erwärmte Inlet injektiert. Der GC-Ofen wird eine Minute bei 70°C gehalten um das Lösungsmittel Acetonitril von der GC-Säule zu evakuieren. Anschließend wird mit 40°C/min bis auf 250°C geheizt um dann mit 20°C/min auf 300°C zu erwärmen, dann noch 5 Minuten bei 300°C halten. (vgl. Abbildung 57)

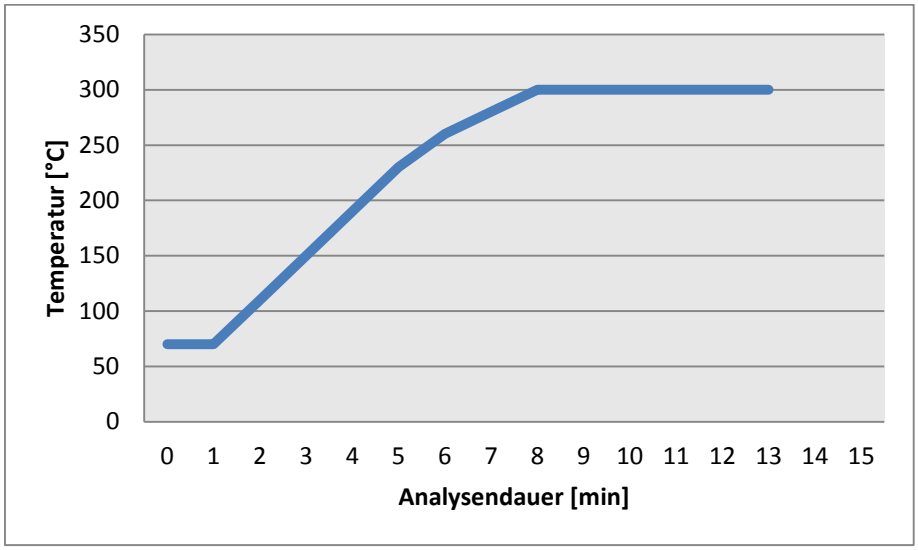


Abbildung 57 : Temperaturprofil des GC zur Bestimmung von allen Cannabinoiden in GC-MS/MS-EI

6.4.4 Bestimmung von THC, CBD, CBN mittels EI und THC-COOH mittels NCI

6.4.4.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist identisch mit der in Punkt 6.4.3.1 beschriebenen Methode.

6.4.4.2 Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und Derivatisierung

Die Festphasen-Extraktion erfolgt mit einer DRUG II–Säule. Jede Säule wird vor dem Gebrauch zweimal mit je 2 ml Methanol und 2 ml Acetat-Puffer (100 mM) konditioniert. Dann wird die überstehende klare Flüssigkeit der zentrifugierten Probenlösung aufgegeben. Die Säule wird mit 1 ml Ammoniak (5 Vol%, in Wasser) und mit 2 ml Methanol gewaschen und während 10 Minuten im Vakuum trocken gesaugt.

Elution von THC, CBD, CBN:

Die Elution erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer n-Hexan/Ethylacetat-Lösung (95:5, v/v). Die Probe wird mit Stickstoff bei 38°C getrocknet. Der Rückstand wird mit 50 µl MSTFA versetzt und 20 Minuten bei 60°C derivatisiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in ein Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

Elution von THC-COOH:

Die Elution erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer n-Hexan/Ethylacetat/Essigsäure-Lösung (75:25:1, v/v). Die Probe wird mit Stickstoff bei 38°C getrocknet. Der Rückstand wird mit 100 µl HFBA und 70 µl HFBOH versetzt und während 30 Minuten bei 60°C derivatisiert. Anschließend wird das überschüssige HFBA/HFBOH-Gemisch im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand wird mit 50 µl Acetonitril aufgenommen und in die Injektionsfläschchen (Vial) für die GC überführt.

6.4.4.3 GC-MS/MS-Einstellungen

Die Bestimmung aller Analyten erfolgt in zwei Phasen:

Bestimmen von THC-COOH•2HFB:

Die Einstellungen der GC-MS/MS entsprechen jenen in Punkt 6.4.2.2 beschriebenen Einstellungen zur Bestimmung von THC-COOH•2HFB.

Bestimmen von THC•TMS, CBD•2 TMS, CBN• TMS:

Die Einstellung der GC-MS/MS entsprechen größtenteils jenen aus Punkt 6.4.3.3, außer dass THC-COOH•*2TMS* nicht mehr bestimmt wird. (Siehe Tabelle 10*)* Alle anderen Einstellungen der GC-MS/MS sind mit Punkt 6.4.3.3 identisch.

Tabelle 10 : Transitionen von THC, CBD und CBN im GC-MS/MS-EI

RT [min]		Transitionen		Dwell-time [ms]	Kollisions-energie [eV]
7,23	CBD•2TMS	458 → 351	Quantifier	10	10
		458 → 268	Qualifier	10	25
7,23	CBD •2TMS-D3	392 → 229	Quantifier	18,7	35
7,63	THC•TMS	386 → 371	Quantifier	10	15
		386 → 305	Qualifier	10	25
7,62	THC •TMS-D3	389 → 374	Quantifier	10	15
7,93	CBN•TMS	382 → 367	Quantifier	10	15
		382 → 310	Qualifier	10	40
7,92	CBN •TMS-D3	385 → 370	Quantifier	10	30

7 Resultate und Diskussion

7.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von EtG in Haaren

Die Probenvorbereitung und -aufarbeitung sowie die Derivatisierung konnten von der GC-MS-NCI Methode (Kerekes & Yegles, 2013) übernommen werden, sodass lediglich die MS/MS-Methode entwickelt werden musste.

Bestimmen der relevanten Ionen und ihrer Retentionszeiten

Um die Massen (m/z) der relevanten Ionen zu bestimmen, wurden zunächst von den Reinstoffen (EtG und EtG-D5) eine Analyse im Scan-Modus durchgeführt. Hierzu wurden 20 µl einer 10 ng/µl EtG-Lösung mit HFBA nach Vorschrift derivatisiert. Das erhaltene Chromatogramm hat ein sehr hohes Signal für EtG. Mit der Software des Massenspektrometers wird das Massenspektrum visualisiert. Für EtG wurden die Massen 596 und 397 gewählt und für EtG-D5 die Masse 601 (Abbildung 58). 596 und 601 entsprechen der molaren Masse von EtG und seinem internen Standard EtG-D5 nach der Derivatisierung mit HFBA. Die Masse 397 wurde gewählt, da sie das zweitgrößte Signal im Massenspektrum von EtG darstellt.

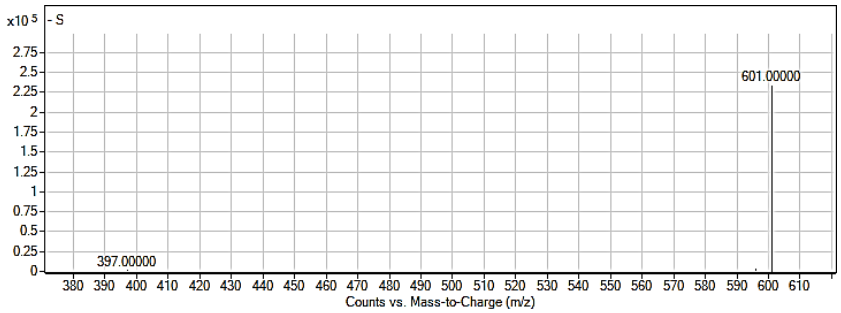


Abbildung 58: Massenspektrum (SIM) von EtG-D5

Anschließend wurden die Proben nochmals mit einer anderen Einstellung des Triple Quadrupol vermessen, dem sogenannten „Tochterionen Scan“. Hierbei wird der erste Massenspektrometer auf eine vorgegebene Masse, in unserem Fall 596, 397 und 601, eingestellt und diese Ionen werden in der Kollisionszelle fragmentiert (Kollisionsenergie: 20 eV). Dies erlaubt es, die typischen Fragmente zu bestimmen, welche im Folgenden benötigt werden für die MRM.

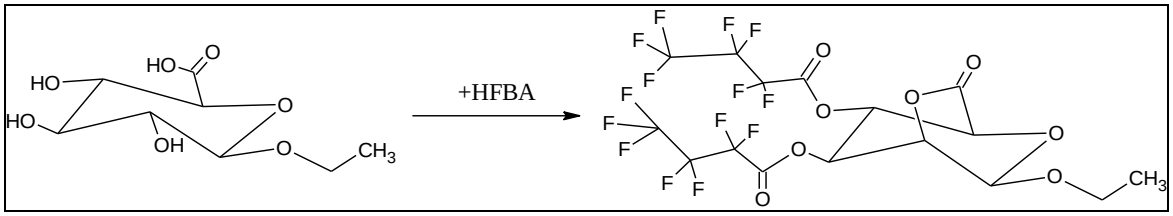


Abbildung 59: Acetylierung mit Cyclisierung von Ethylglucuronid zweifach derivatisiert (m/z = 596)

Da die Kollisionsenergie beliebig gewählt wurde, wird im folgenden Schritt eine Optimierung der Kollisionsenergie für jede Transition durchgeführt. Wie in Abbildung 60 zu erkennen ist wurden mehrere Kollisionsenergie (3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 eV) auf die unterschiedlichen Transition angewendet und das Optimum für die MRM-Methode übernommen. Für die Transition von 397 nach 213 liefern 10 eV das höchste Signal, somit ist dies die optimale Kollisionsenergie und für 596 zu 213 sind 7 eV optimal. Analog wurden auch für EtG-D5 verfahren, hier erwiesen sich 10 eV als Optima.

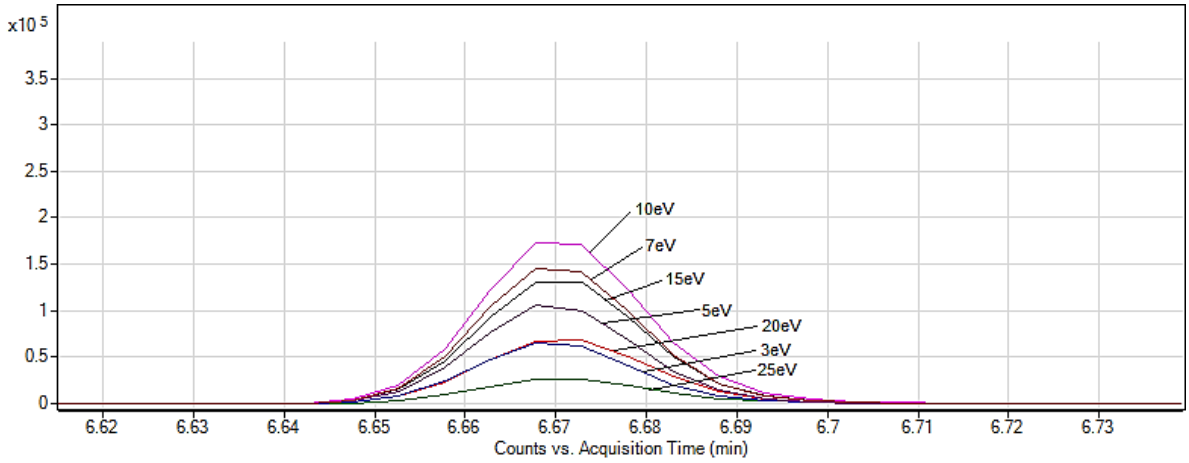


Abbildung 60: Einfluss der Kollisionsenergie auf die Peakhöhe bei der Transition 397 → 213

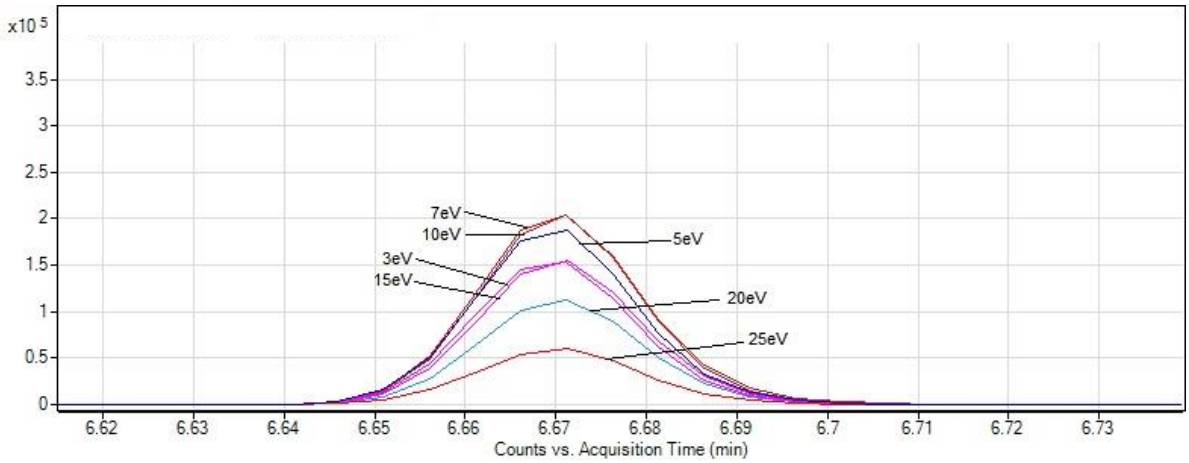


Abbildung 61: Einfluss der Kollisionsenergie auf die Peakhöhe bei der Transition 596 → 213

Anschließend konnte das erste MRM-Spektrum aufgenommen werden. In Abbildung 62 sind die Signale für die drei Transitionen zu sehen:

- EtG-D5: rot (601→ 213),
- EtG: grün (596→ 213),
- EtG: blau (397 → 213)

Der Auszug des Chromatogramms stammt von einer Probe von 500 pg EtG und 1000 pg EtG-D5. Gut zu erkennen ist, dass die Peakhöhe von EtG-D5 etwa doppelt so hoch ist, wie die von EtG (grün). Der blaue Peak wird nur zur Bestätigung benötigt, dass es sich wirklich um EtG handelt.

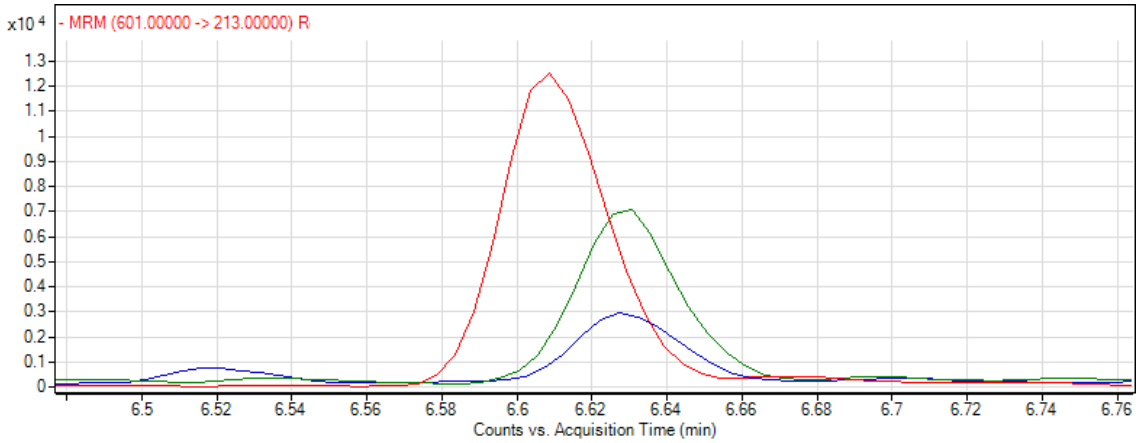


Abbildung 62: EtG und EtG-D5 Spektrum im MRM-Modus

Anschließend wird die Dwell-Zeit optimiert. Dies ist die Zeit die verwendet wird um ein Signal während eines Scans aufzuzeichnen. Je länger die Dwell-Zeit ist, umso länger misst das Massenspektrometer pro Masse, allerdings hat dies einen negativen Einfluss, da die Probe sich nur eine begrenzte Zeit im Massenspektrum befindet. Zu kurz sollte die Dwell Zeit auch nicht sein, da sonst die Analyse an Empfindlichkeit verliert. Die Dwell-Zeit sollte auf keinen Fall unter 0,5ms betragen. (University of Colorado, 2009) Die optimierten Parameter sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

7.2 *Validierung* der EtG-Methode

Das Erstellen der Kalibiergerade erfolgt, mit Hilfe des internen Standards. Die Konzentration von EtG wird über das Flächenverhältnis mit dem internen Standard EtG-D5 (IS) ermittelt:

$$\frac{Konzentration\ Analyt}{Konzentration\ IS} = k \cdot \frac{Fläche\ des\ Peaks\ des\ Analyts}{Fläche\ des\ Peaks\ IS}$$

Durch den Vergleich, mit dem in jeder Probe vorhandenen internen Standard, wird die Analyse unabhängig von Apparatur- oder manipulationsbedingten Abweichungen. Die Steigung k der Kalibiergerade für EtG entspricht 0,0308.

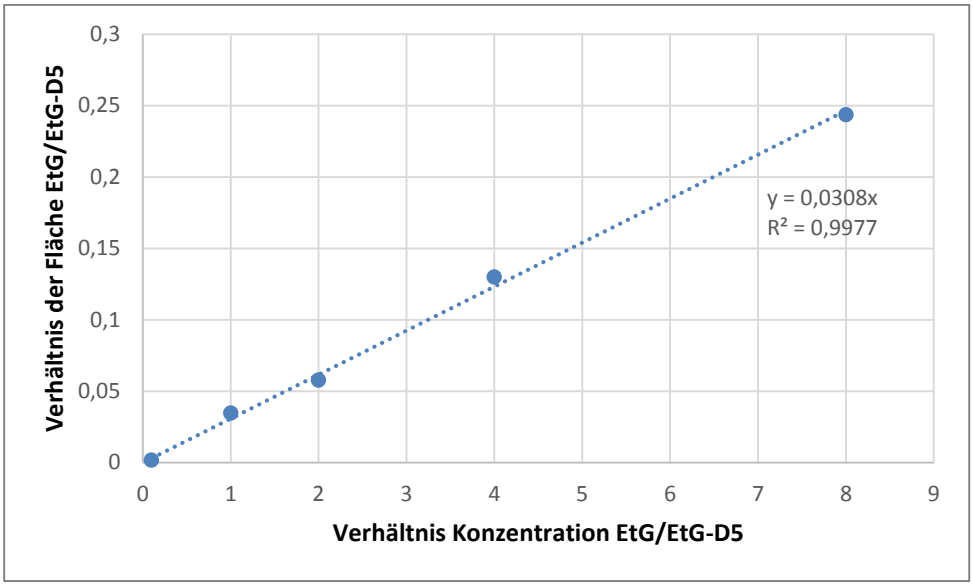


Abbildung 63: Kalibriergerade EtG-HFB

Aus Abbildung 63 erkennt man, dass die Analyse in einem Bereich von 0,2 bis 400 pg/mg linear ist und ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,998 erfüllt, was von einem linearen Verhalten der Regressionsgerade zeugt.
Die Exktraktionsausbeute (recovery) beträgt 98%. Sie ermittelt sich aus dem Verhältnis der Menge des Analyten mit Probenvorbereitung (Extraktion mit SPE) und ohne diese Vorbereitung.
Bei der Reproduzierbarkeit (500 ng absolut) wird unterschieden zwischen der Reproduzierbarkeit an einem Tag (intraday precision) und über einen Zeitraum von 5 Tagen (interday precision). Da die Variationskoeffizienten sowie die Reproduzierbarkeiten 15% unterschreiten, so gilt die Methode als reproduzierbar.

Tabelle 11 : Validierung der EtG-Methode

Tag	Mittelwert [ng]	Variationskoeffizient [%]	Reproduzierbarkeit [%]
1 (intraday)	508,7	3,30	1,73
2	538,8	7,49	7,77
3	508,8	1,07	1,76
4	535,9	7,32	7,18
5	508,5	0,96	1,71
Wochenmittel (Interday)	518,2	5,47	3,64

Die Mittelwert der Detektionsgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOD) berechnen sich zu 0,05 pg/mg und 0,2 pg/mg.
Somit konnte die LOD 2 ng/mg von Yegles et al., welche mittels einer GC-MS-NCI-Methode ermittelt wurde, wesentlich unterschritten werden. (Yegles et al., 2004) (Cappelle, et al., 2015) Leider bliebt die LOD noch recht weit über den Wert von 4 fg für Octafluoronaphthalen die Agilent im Datenblatt des Triple Quadrupol als Referenz angibt, um die ordnungsgemäße Funktion des Quadrupols zu

überprüfen, allerdings sind die Bedingungen nicht vergleichbar, da bei der Referenz ohne Extraktion des Reinstoffs gearbeitet wird. (Agilent, 2013)
Um die LOD weiter zu senken wurde untersucht inwiefern die verwendeten Reagenzien einen Einfluss auf die Analysenergebnisse haben. So konnte gezeigt werden, dass alle Lösungsmittel und verwendeten Lösungen zur Extraktion der Haarproben als Quelle für die Einbringung von EtG in die Probe ausgeschlossen werden können. Als letzte Quelle für EtG in der Probe wurde nun EtG-D5 herangezogen. In der Routinemethode für die Bestimmung von EtG mittels GC-MS-NCI wurden 2000 pg EtG-D5 verwendet. Es wurde in der Folge mit einer geringen Menge an internem Standard Versuche unternommen. In Tabelle 12 sind die erhaltenen Peakflächen angegeben. Auch wenn auf den ersten Blick 125 pg EtG-D5 ausreichen würden, so haben ich mich doch für 500 pg entschieden, da so höhere Peakflächen erzeugt werden, was zu einer höheren Robustheit der Methode beiträgt. Des Weiteren fällt auf dass in der 125 pg Probe mehr EtG enthalten ist was unlogisch ist, sodass wir uns bei 250 pg sicher schon in einem Bereich befinden, der dem Rauschen zuzuordnen ist. Zudem hat es sich im Laufe der Arbeit oft als hilfreich erwiesen hohe Peakflächen für den internen Standard zu haben, da so Verschmutzungen des Detektors noch zu brauchbaren Ergebnissen führen, auch wenn das Signal kleiner wird.

Tabelle 12 : Peakfläche in Abhängigkeit den EtG-D5 Masse

Abs. Masse EtG-D5 [pg]	Peakfläche EtG-D5	Peakfläche EtG
1000	33012	410
500	2151	164
250	839	30
125	531	46

Da alle Proben trotzdem noch immer Spuren von EtG aufwiesen, obwohl es sich bei den Haaren für die Blindproben um die Haare eines Kleinkindes handelte, wurde versucht anhand der Standardadditionsmethode der Gehalt der Kleinkindhaarprobe zu bestimmen.
Es wurden vier Haarproben mit unterschiedlichen Massen an EtG versetzt (Tabelle 13) und eine Blindprobe wurde mit GC-MS/MS-NCI vermessen.

Tabelle 13: Daten zur Standardaddition von EtG

EtG-Zugabe [pg]	EtG-Konzentration, absolut [pg]	EtG-Konzentration, [pg/mg]	Masse [mg]
0	21,45	0,77	50,8
30	89,31	3,14	48,8
60	147,91	5,01	50,2
120	259,72	7,66	50,2
150	318,75	9,22	50,9

Die lineare Regression hat ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,999 und ist somit linear über den betrachteten Bereich. Aus der Gleichung der Regression ergibt sich die Konzentration der Blindprobe zu: $c_{EtG} = \frac{b_0}{b_1} = \frac{26.69}{1.9547} = 13.65\,pg$ absolut, bei einer Haarprobe von etwa 50 mg entspricht dies einer Konzentration von 0,273 pg/mg. Ein Teil dieser fast 273 fg/mg Haar stammt sicherlich vom endogenen Alkohol, allerdings scheint es mir eher unwahrscheinlich, dass 0,1 bis 0,2

mg Ethanol pro Liter Blut, die als Richtwert für den Gehalt an endogenem Alkohol diskutiert werden, hierfür verantwortlich sind. (Schütz, 2014)

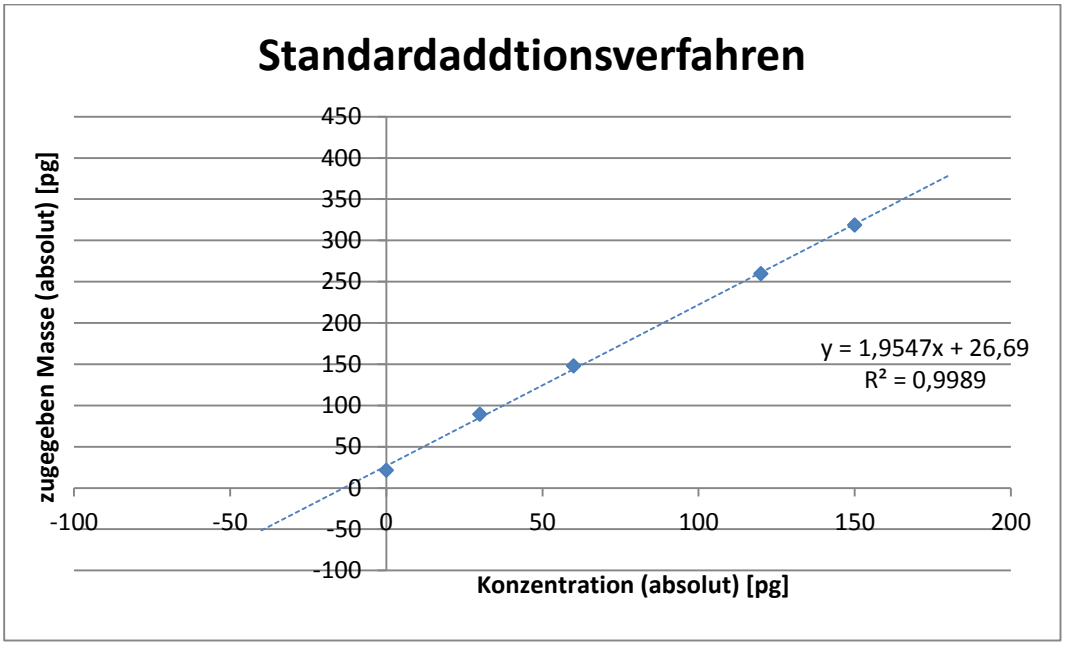


Abbildung 64: Standardadditionsverfahren zur Bestimmung der EtG-Konzentration in der Haarprobe eines Kleinkindes

Die somit aufgestellte Methode zur Quantifizierung von EtG in Haarproben wurde anschließend einem ersten Praxistest unterzogen. Hierzu wurden die aktuellen Haarproben des LNS doppelt vermessen, d.h. sie wurden einerseits mit der GC-MS-NCI-Methode und zudem mit der neuen GC-MS/MS-NCI-Methode bestimmt. (Abbildung 65)

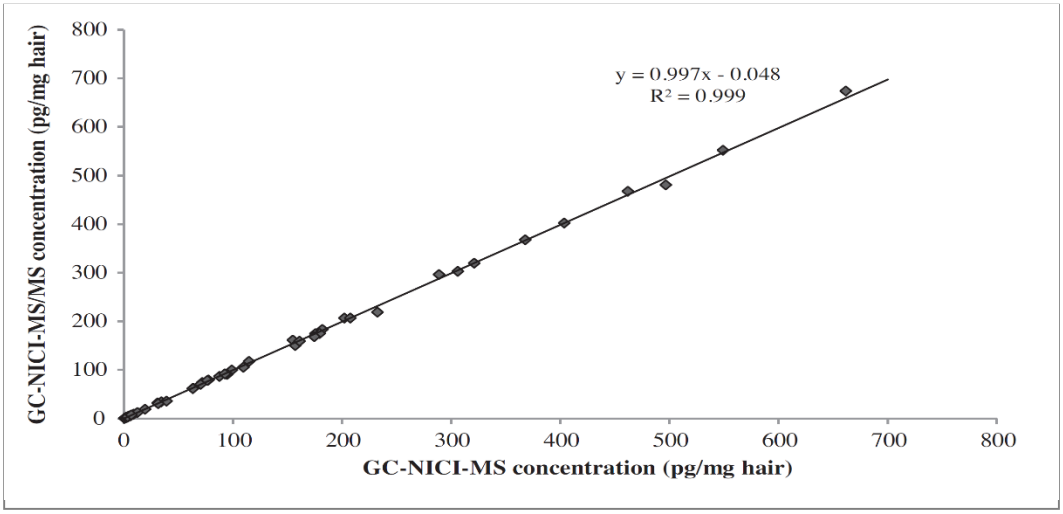


Abbildung 65 : Vergleich von EtG Konzentationen in Haaren von Alkoholkonsumenten (Abstinenzler, moderater Konsum und starker Konsum) erhalten mittels GC-MS-NCI und GC-MS/MS-NCI

Erst in einem Bereich von weniger als 30 pg/mg ist die Empfindlichkeit der GC-MS/MS-NCI Methode der GC-MS-NCI-Methode überlegen, bei höheren Konzentrationen lieferten beide Methoden gleich gute Ergebnisse.

Tabelle 14 : EtG-Konzentration in Haarproben bei unterschiedlichem Alkoholkonsum erhalten mit GC-MS und GC-MS/MS

Trinkverhalten	Konzentration mit GC-MS-NCI [pg/mg]		Konzentration mit GC-MS/MS-NCI [pg/mg]	
	Mittelwert ± Standard-abweichung	Bereich	Mittelwert ± Standard-abweichung	Bereich
Abstinenzler (n=2)	0,9 ± 0,4	0,6 – 1,1	0,8 ± 0,2	0,7 – 1,0
moderater Konsum (n =20)	5,4 ± 4,4	1,2 – 19,6	5,4 ± 4,4	1,0 – 19,4
Vieltrinker (n=36)	193 ± 159	31,2 – 667	192 ± 160	30,7 – 674

Da beide Methoden fast identische Ergebnisse liefern, wurde die Methode in die Praxis des LNS übernommen.

7.3 Methodenentwicklung zur Extraktion von Cannabinoiden aus Haaren

Zur Bestimmung der Cannabinoide werden in der Literatur nur wenige Methoden beschrieben die es erlauben THC-COOH in Haaren zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde ebenfalls auf GC-MS-Verfahren zurückgegriffen, da die Probenvorbereitung, Extraktion und Derivatisierung bei GC-MS-Verfahren ebenfalls durchgeführt werden.

7.3.1 Bestimmen der relevanten Ionen der Cannabinoide und ihrer Retentionszeiten

Begonnen habe ich mit der Bestimmung der Massen (m/z), welche ich für die MRM-Methode benötige. Hierzu wurden die Reinstoffe und ihre internen Standards bestellt. Wie bei der Methode für EtG wurde für jeden Stoff (THC, CBD CBN und THC-COOH) je ein Scan mit 100 ng (20 µl einer 5 ng/µl-Arbeitslösung) Analyt durchgeführt, welche zuvor derivatisiert wurde. Da in der Literatur unterschiedliche Derivatisierungsmittel verwendet wurden, so entschied ich mich dazu verschiedene Kombinationen von PFPA/HFBA/PFPOH/HFBOH zu verwenden. (Tabelle 15) Die Ionisation sollte anfangs mittels NCI erfolgen, da NCI im Allgemeinen eine höhere Empfindlichkeit als EI besitzt, sodass in einer ersten Phase die Acetylierung der Cannabinoide untersucht wurde.

Tabelle 15 : Derivatisierung der Cannabinoide

N°	THC mit…	THC-COOH mit…	CBD mit…	CBN mit…
1	PFPA	PFPA	PFPA	PFPA
2	PFPA und PFPOH	PFPA und PFPOH	PFPA und PFPOH	PFPA und PFPOH
3	PFPA und HFBOH	PFPA und HFBOH	PFPA und HFBOH	PFPA und HFBOH
4	HFBA	HFBA	HFBA	HFBA
5	HFBA und PFPOH	HFBA und PFPOH	HFBA und PFPOH	HFBA und PFPOH
6	HFBA und HFBOH	HFBA und HFBOH	HFBA und HFBOH	HFBA und HFBOH

Nach Betrachten der Chromatogramme wurde gleich ein Problem deutlich. Eine Methode die THC und CBD gleichzeitig bestimmen kann, kann mittels NCI nicht gefunden werden, da CBD und THC nach Derivatisierung ein fast identisches Chromatogramm aufweisen, zumindest für alle intensiven Signale, wie die Abbildung 66 und Abbildung 67 belegen.

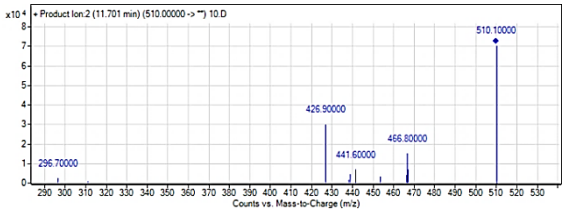


Abbildung 66 : Massenspektrum von THC-HFB

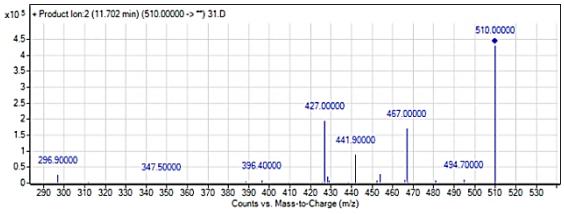


Abbildung 67 : Massenspektrum von CBD-HFB

Welche Reaktion genau ablaufen ist unklar. Zum einen wird in der Literatur ein Ringschluss, durch künstlichen Magensaft, von CBD diskutiert der zur Bildung von THC führt (vgl. Abbildung 68) (Watanabe, et al., 2007).

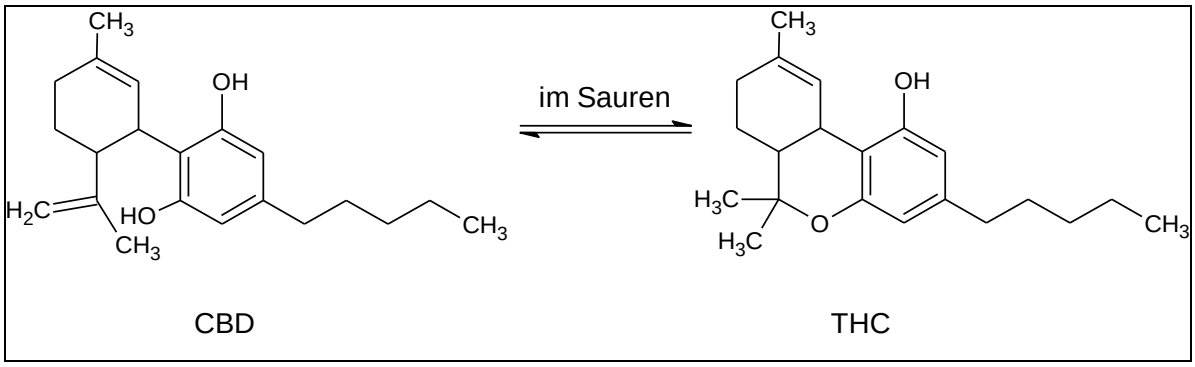


Abbildung 68: Ringschluss im Sauren von CBD zu THC

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die OH-Gruppe nicht in der Lage ist zu acetylieren. Gegen diese Behauptung spricht, dass eine doppelte Silylierung bei CBD sehr wohl möglich ist. (Andrews, 2011) Silylgruppen sind sterisch weniger anspruchsvoll, dafür sind stark fluorierte

Acetylgruppen sehr reaktiv (vgl. Abbildung 69), was eher für die den Ringschluss im sauren Medium spricht.

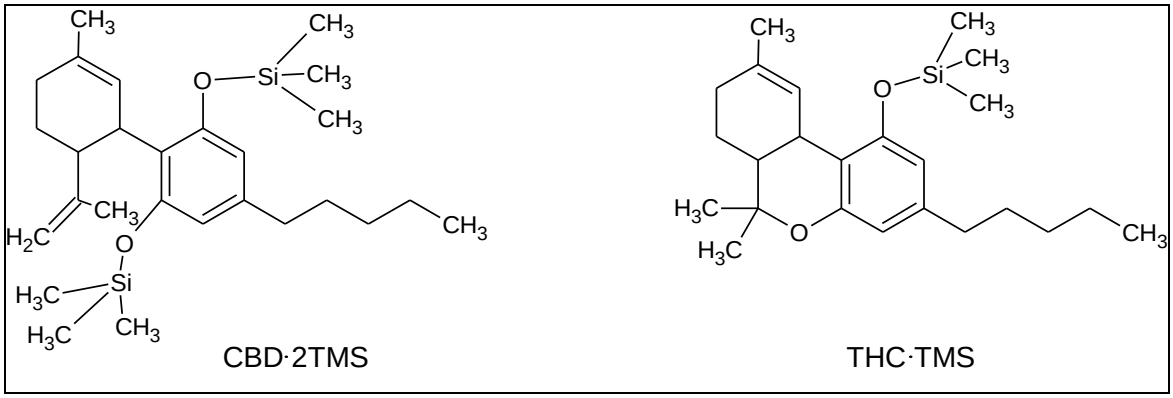


Abbildung 69: Derivate der Silierung mit MSTFA von CBD und THC

Welches Molekül A oder B (Abbildung 70) ursprünglich ist für dasselbe m/z-Verhältnis (510 u) nach der Acetylierungsreaktion mit HFBA ist, ist ohne NMR-Analyse nicht eindeutig zu bestimmen, allerdings müssten hierzu viel größere Mengen (10-20 mg) hergestellt werden.

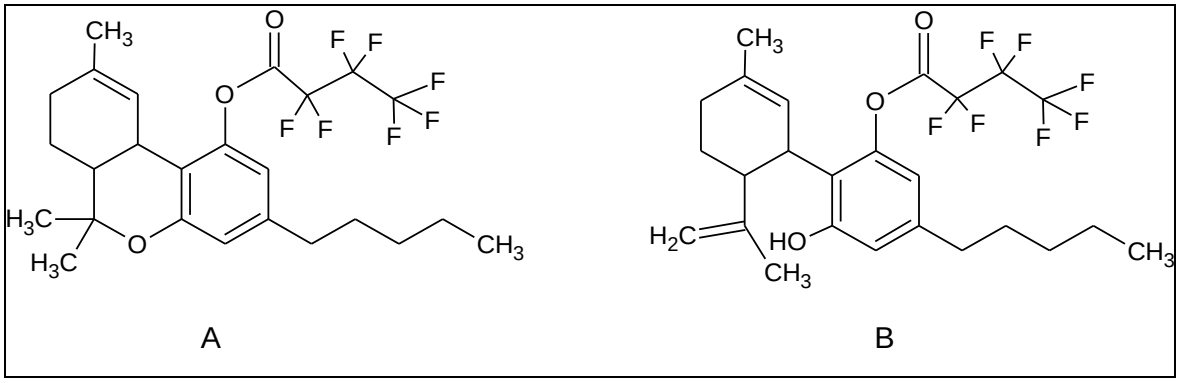


Abbildung 70: Mögliche Produkte der Derivatisierung von CBD mit HFBA

Bestimmung von THC-COOH in NCI-Modus:

Da die NCI-Methode für THC-COOH brauchbar war, so wurde das Augenmerkt in einer ersten Phase stärker auf THC-COOH und seine Derivatisierung gerichtet.

Nachdem der Scan für die vier Derivate erfolgt war, wurden die intensiven Signale im Chromatogramm gewählt und die Tochterionen (Kollisionsenergie: 15 eV) bestimmt. Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, lieferte die Derivatisierung mit HFBA und HFBOH die größten Signale, bzw. Peakflächen und somit wurde dieses Derivatisierungsgemisch aus 100 µl HFBA und 70 µl HFBOH zurückbehalten.

Tabelle 16 : Derivate von THC-COOH mit Transitionen und Peak-Eigenschaften

Derivate	Transition	Intensität	Peakfläche
THC-COOH•2PFP	623 → 472	450	-
	623 → 432	900	5000
THC-COOH•HFB-PFPOH	672 → 472	1000	-
	672→ 432	1500	6400
THC-COOH•PFP-HFBOH	672 → 521	600	-
	672→ 482	2200	9400
THC-COOH•2HFB	723 → 523	2500	-
	723 → 482	4000	13400

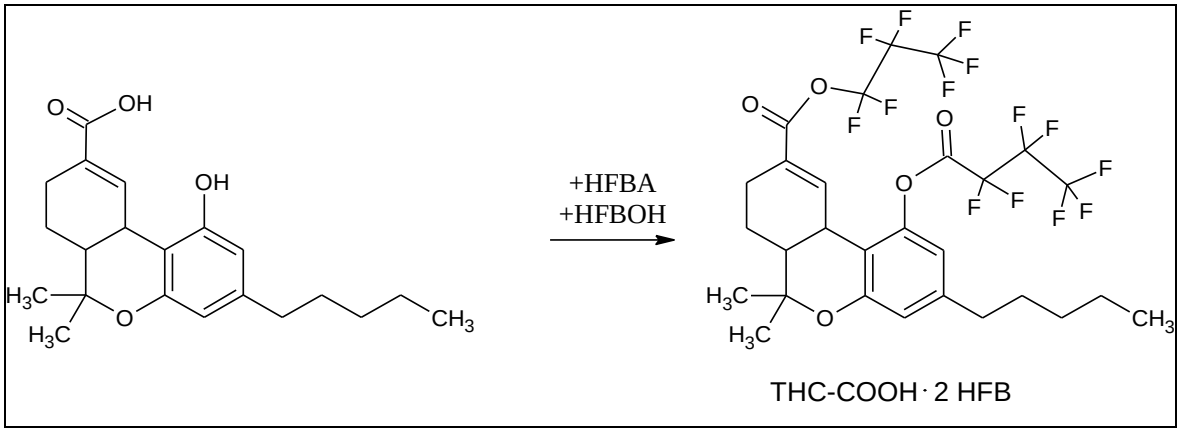


Abbildung 71: Derivatisierung von THC-COOH mittels HFBA und HFBOH

Nachdem die Transitionen ermittelt waren, wurde die Kollisionsenergie (5, 10, 15, 20, 25, 30 eV) für die jeweilige Transition bestimmt. Die gleiche Arbeit wurde nochmals für den internen Standard (THC-COOH-D3) wiederholt, auch wenn hier nur eine Transition benötigt wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17 : Transitionen von THC-COOH•2HFB und IS mit Retentionszeit und Dwell-Zeit

RT [min]		Transitionen		Kollisionsenergie [eV]	Dwell-time [min]
7,56	THC-COOH•2HFB	704 → 525	Quantifier	15	27,4
		525 → 298	Qualifier	25	44,1
7.55	THC-COOH •2HFB-D3	707 → 528	Quantifier	5	20,3

THC, THC-COOH, CBD und CBN im EI-Modus:

Da mit den gängigen Derivatisierungsmitteln des NCI-Modus keine Möglichkeit bestand die Cannabinoide gemeinsam zu bestimmen, so wurde nach einer Alternative gesucht. In der GC-MS-Literatur (Maurer, Pfleger, & Weber, 2011) wurde eine Methode zur Acetylierung vorgeschlagen welche auf den ersten Blick vielversprechend aussah, da sie die aufgetreten Probleme umgehen würde.

Die Proben sollen in einem ersten Schritt mit MSTFA silyliert werden, um sie dann anschließend mit MBTFA zu acetylieren (Abbildung 72). Die Besonderheit von MBTFA ist, dass es sich nicht um ein Carbonsäureanhydrid handelt und somit keine Säure als Nebenprodukt zur Acetylierung erzeugt wird, sondern es entsteht ein Carbonsäureamid. (vgl. Abbildung 73)

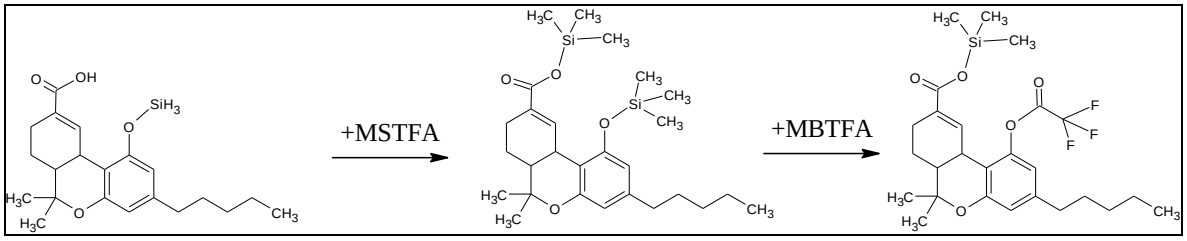


Abbildung 72: Derivatisierungsvorschlag von THC-COOH mit MSTFA und anschließend mit MBTFA

Da die Literatur recht ungenau hinsichtlich der Reaktionsbedingungen war, so wurden mehrere Reaktionsdauern und Reaktionstemperaturen versucht, allerdings konnte keine zuverlässige Methode entwickelt werden, welche eine Acetylierung alle Cannabinoide ermöglicht hätte.

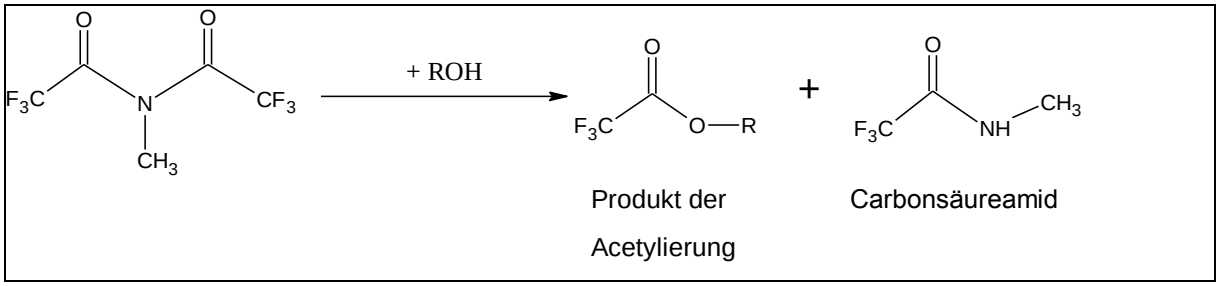


Abbildung 73: vereinfachte Reaktion von MBTFA mit einem Alkohol (ROH)

So wurde eine Alternative zur Acetylierung gesucht: die Silylierung. Allerdings gibt es keine Silierungsreagenzien die eine NCI-Methode ermöglichen, sodass die Ionisation mittels EI erfolgen musste.

Es wurde mit MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid) und MBDSTFA (N-Methyl-N-tert-Butyldimethylsilyl-trifluoroacetamid) Silierungsversuche unternommen.

- MSTFA hat den Vorteil, dass es sehr zuverlässig Trimethylsilyl-Gruppe überträgt, den Detektor nicht nennenswert verschmutzt und eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit aufweist. Allerdings sind die TMS-Derivate feuchtigkeitsempfindlich.
- MBDSTFA ist noch reaktionsfreudiger und erzielt Ausbeuten von bis zu 96% und erzeugt Nebenprodukte die neutal und flüchtig sind, was für die GC-Trennung vorteilhaft ist. Ausserdem sind die erzeugten Fragmente (+ 42 u) schwerer als ihre TMS-Geschwister, was Vorteile bei der quantivativen Bestimmung hat. Zudem sind die TBDMS-Derivate weniger hydrolyse empfindlich. Von Nachteil ist allerdings, dass sterisch gehindert Hydroxylgruppen praktisch nicht derivatisierbar sind. Dennoch konnten alle Cannabinoide derivatisiert werden.

Für beide Derivatisierungsmittel wurde ein Scan der Reinstoffe, sowie ihrer internen Standards durchgeführt und die m/z, welche der molaren Masse bzw. dem höchsten Signal (je nach Intensität des Massenpeaks) entsprechen, für einen Tochterionen-Scan verwendet (Kollisionsenergie 20 eV). Für einige Reinstoffe war der Molpeak so klein, dass er nicht verwendet werden konnte, da die Ionisationsenergie bereits zur Fragmentierung der Moleküle geführt hat. Die für die MRM-Methode benötigten Transitionen wurden bestimmt und die Kollisionsenergie und die Dwell-Zeit wurden optimiert. In Tabelle 18 sind die optimieren Transitionen für die TMS-Derivate, in Tabelle 19 sind die Transitionen für die TBDMS-Derivate.

Tabelle 18 : Transitionen von THC, CBD, CBN, und THC-COOH sowie der alle optimierter Parameter nach Derivatisierung mit MSTFA im EI

RT [min]		Transitionen		Dwell-time [ms]	Kollisions-energie [eV]
7,710	CBD•2TMS	458 → 351	Quantifier	10	10
		458 → 268	Qualifier	10	25
7,714	CBD •2TMS-D3	392 → 229	Quantifier	18,7	35
8,161	THC•TMS	386 → 371	Quantifier	10	15
		386 → 305	Qualifier	10	25
8,153	THC •TMS-D3	389 → 374	Quantifier	10	15
8,469	CBN•TMS	382 → 367	Quantifier	10	15
		382 → 310	Qualifier	10	40
8,459	CBN •TMS-D3	385 → 370	Quantifier	10	30
9,592	THC-COOH•2TMS	473 → 355	Quantifier	10	25
		473 → 297	Qualifier	10	25
9,586	THC-COOH •2TMS-D3	373 → 292	Quantifier	28,8	30

Bedingt durch die unterschiedlichen Derivatisierungsmittel ändern sich die Retentionszeiten und die Reihenfolge der Analyte, THC eluiert vor CBD bei den TBDMS-Derivaten.

Tabelle 19 : Transitionen von THC, CBD, CBN, und THC-COOH sowie der alle optimierter Parameter nach Derivatisierung mit MBDSTFA im EI

RT [min]		Transitionen		Dwell-time [ms]	Kollisions-energie [eV]
8,34	THC•TBDMS	371 → 249	Quantifier	10	20
		371 → 289	Qualifier	10	10
8,33	THC •TBDMS-D3	374 → 252	Quantifier	15,6	20
8,58	CBD•2TBDMS	474 → 417	Quantifier	112,6	10
		474 → 343	Qualifier	63,9	20
8,57	CBD •2TBDMS-D3	420 → 346	Quantifier	286,7	10
8,73	CBN•TBDMS	408 → 337	Quantifier	224,7	30
		408 → 281	Qualifier	32,6	25
8,72	CBN •TBDMS-D3	427 → 412	Quantifier	42,1	15
11,35	THC-COOH•2TBDMS	514 → 355	Quantifier	17	20
		514 → 147	Qualifier	13	35
11,34	THC-COOH •2TBDMS-D3	517 → 358	Quantifier	14,8	15

Allerdings zeigten bereits die ersten Chromatogramme die von den TBDMS-Derivaten aufgenommen wurden, dass die Peakhöhen kleiner als jene der TMS-Derivate waren, so dass die MBDSTFA-Route nicht mehr weiter verfolgt wurde.

Die LOD, LOQ und der Extraktionsausbeute wurden für jedes TMS-Cannabinoid bei einer Konzentration von 50 pg/mg bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Leider konnte die sehr tiefen LOD/LOQ-Werte nicht in realen Proben bestätigt werden, aber immerhin zeigten die Ergebnisse der Ringversuche, dass die Methode recht gut arbeitet, auch wenn die Bestimmung von CBD systematisch zu tief ausfällt. (siehe Tabelle 21) In diesem Bereich bedarf es noch etwas Abstimmungsbedarf bei der Methode, doch aus Zeitgründen wurde hier nicht weiter geforscht.

Tabelle 20 : LOD, LOQ und Extraktionsausbeute bei der GC-MS/MS-EI-TMS-Methode

	CBD [pg/mg]	THC [pg/mg]	CBN [pg/mg]	THC-COOH [pg/mg]
LOD	0,24	0,31	0,40	0,24
LOQ	0,81	1,02	1,33	0,81
Extraktionsausbeute	64%	40%	40%	88%

Als beachtlichen Erfolg kann aber die gute Bestimmung von THC-COOH in den Ringversuchen (Tabelle 21) angesehen werden. Die Konzentration von THC-COOH bewegt sich im Bereich von 28 bis 97 pg/mg und zumindest in diesem Bereich liefert die Analysenmethode zuverlässige Werte.

Tabelle 21 : Vergleich der Ergebnisse der Ringversuche mittel GC-MS/MS-EI

	CBD [ng/mg]	THC [ng/mg]	CBN [ng/mg]	THC-COOH [ng/mg]
DMF 1-14	*0,075 !!!*	0,709	0,619	0,0966
Zielbereich	0,203-0,455	0,501-1,009	0,338-0,710	0,0422 – 0,1170
DMF 2-14	*0,061 !!!*	0,257	0,191	0,0289
Zielbereich	0,133-0,313	0,221-0,489	0,141-0,333	0,0243-0,0739
DMF 3-14	*0,058 !!!*	0,122	0,139	0,0473
Zielbereich	0,075-0,191	0,081-0,209	0,092-0,232	0,0265-0,0797

THC, CBN, CBD im EI und THC-COOH im NCI

Da die Empfindlichkeit im NCI für THC-COOH höher war als im EI, so wurde eine kombinierte EI/NCI-Methode entwickelt. Hierzu musste die Probe lediglich in einen Teil mit THC-COOH und einen ohne THC-COOH getrennt und unterschiedlich derivatisiert werden. Diesen Teil werde ich in Punkt 7.3.3.2 erläutern.

7.3.2 Probenvorbereitung

Die Haare werden erst eine Minuten in dest. Wasser, dann eine Minute in Aceton gewaschen, und getrocknet durch Abtupfen. Anschließend werden sie mit einer Schere im Metallgefäß der

Schwingmühle grob zerkleinert. Nach Zugabe einer kleinen Metallkugel werden die Haare fünf bis zehn Minuten zerkleinert. Das Haarpulver wird dann in ein Kunststoffreagenzglas abgefüllt.

Für die Analyse werden zwischen 20 und 30 mg Haarpulver abgewogen und mit 500 µl Methanol vermischt, da Methanol das Haar aufquellen lässt. Außerdem wurden 400 µl einer 10 M Natronlauge zugesetzt, diese zersetzt das Haar, sodass alle Stoffe die möglicherweise im Haar enthalten sind herausgelöst werden. Anschließend wird der interne Standard (THC-COOH-D3 oder THC-mix-D3 je nach verwendeter Methode) hinzugefügt. Die Proben werden 20 bis 30 Minuten bei 60°C in den Trockenschrank gestellt und gelegentlich geschüttelt.

Um eine gute Adsorption bei der Extraktion der Analyte zu gewährleisten, muss der pH zwischen 4,5 und 6,5 eingestellt sein, da THC-COOH einen pKs von 4,5 aufweist und somit fast vollständig als Carboxylat vorliegt. Dieses kann sich so an die Ammonium-Gruppen des Anionenaustauschers binden. Die anderen Cannabinoiden werden an der Umkehrphase gebunden.

Die ersten Versuche die Probe in diesen pH-Bereich zu überführen, erfolgten über eine Neutralisation mit Salzsäure und anschließender Zugabe eines Carbonat-Puffers ($NaHCO_3/Na_2CO_3$, 50 mM). Allerdings erwies sich dieser Weg als nicht zuverlässig und der pH musste für jede Probe bestimmt werden und meist angepasst werden.

Die Neutralisation mit Eisessig erwies sich als äußert praktisch, da der pH sich auf Anhieb in den gewünschten Bereich verschob und dies so zuverlässig dass die pH-Kontrolle sich zunehmend als überflüssig herausstellte. Sicherheitshalber gibt man 600 µl eines 100 mM Acetat-Puffer (Natriumacetat in Methanol – siehe Abschnitt 6.2) hinzu und mischt die Probe. Die Probe wird dann 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen/min zentrifugiert um die verbleibenden Schwebeteilchen von der Probelösung abzutrennen.

7.3.3 Extraktion

Da in der Literatur sowohl die Flüssig-Flüssig-Extraktion als auch die Festphasenextraktion angewendet wurde, so wurden beide Verfahren untersucht. Für die Extraktion von THC-COOH wurden unterschiedliche Methoden verwendet, zum einen die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und zu anderen die Extraktion mit Festphasen (SPE).

7.3.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die LLE erfolgte nach einer Arbeitsvorschrift von Jurado. Hierzu wird die mit Natronlauge behandelte Analyt-Lösung mit 5 ml von einem n-Hexan-Ethylacetat (9:1, v/v) extrahiert. Die organische Phase wird anschließend mit 1 ml 0,1 M NaOH und dann mit 1 ml 0,1 M HCl gewaschen, bevor die organische Phase mit Stickstoff bei 38°C getrocknet wird. Die Probe wird anschließend mit einer Mischung von HFBA/HFBOH und von PFPA/PFPOH bei 60°C für 30 min derivatisiert. (Jurado, et al., 1996)

Tabelle 22 : Zusammenfassung der Ergebnisse der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Derivatisierung mit…	Ausbeute	Bemerkungen
HFBA/HFBOH	33%	Die Probe wurde stark durch die Haare braun gefärbt.
PFPA/PFPOH	n.b.	Die Probe wurde stark durch die Haare braun gefärbt.

Von den Proben die mit PFPA/PFPOH derivatisiert wurden konnte keine Ausbeute bestimmt werden da die Derivatisierung nicht reproduzierbar war.

Da die Proben nach der SPE meist farblos sind und somit weniger stark mit Farbstoffen verunreinigt sind und zudem die Ausbeute ebenfalls höher (33 % gegenüber 103 % für die SPE (Drug II)) ist, so wurde in der Folge auf die LLE verzichtet.

7.3.3.2 Festphasenextraktion

THC-COOH im NCI

Die Festphasenextraktion von THC und THC-COOH wurde bereits durch Kerger (Kerger, 2015) untersucht wurde. Er hat herausgefunden, dass die stark alkalischen Proben bevor sie extrahiert werden, in einen pH-Bereich von 5 bis 7 überführt werden müssen, da sonst THC-COOH nicht mit den anderen Cannabinoiden zusammen extrahiert werden kann. So hatte Kerger bereits Versuche unternommen mit Salzsäure, Essigsäure und Natriumdihydrogencarbonat (NaH_2PO_4) die alkalische Lösung zu neutralisieren. Allerdings war es ihm nicht gelungen THC-COOH•2HFB mittels NCI zu bestimmen.

Da aber im LNS eine Methode zur Bestimmung von THC und THC-COOH in Blutanalysen existiert, auch wenn hier wesentlich höhere Konzentrationen vorliegen, so habe ich diesen Weg nochmals untersucht. Nach der alkalischen Hydrolyse der Haare mit 2,5 M Natronlauge wird die Probe mit 2,5 M Salzsäure neutralisiert und mit Carbonat-Puffer auf pH 6 gebracht. Die Clean-Screen-Säule wird mit Methanol und Wasser konditioniert. Nach Aufbringen der Probe wird diese mit Wasser und Essigsäure gewaschen und mit Dichlormethan (CH_2Cl_2) und Aceton im Verhältnis 1:1 eluiert. Nach Trocknen im Stickstoffstrom wird mit HFBA/HFBOH derivatisiert.

Nach einer Recherche habe ich eine andere SPE-Kolonne DRUG II von Macherey-Nagel gefunden. Sie soll laut Hersteller besonders geeignet sein zur Extraktion von THC und THC-Derivaten. Die Arbeitsvorschrift sieht vor mit 10 M Lauge zu hydrolysieren und dann mit Eisessig zu neutralisieren.

Wie aus Tabelle 23 hervorgeht, hat jede Methode ihre Stärken, so ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Methode 1 am kleinsten, Methode 2 erzielt die bessere LOD und Methode 3 hat mit über 100% Ausbeute quasi keinen Analyt-Verlust. Die Extraktionsausbeute ist ein wichtiger Faktor, wenn es um die Nachweisbarkeit von Analyten in fg-Bereich geht. Aus diesem Grund wurde die dritte Methode weiter verfolgt, auch wenn die LOD hier nicht so tief war.

Tabelle 23 : Vergleich der Extraktionsmethoden von THC-COOH GC-MS/MS-NCI

	Methode	Extraktions -ausbeute	Signal/Rausch Verhältnis	LOD [pg/mg]
1	Clean-Screen, wie für Blutanalysen	45%	***0,3***	7,8
2	Clean-Screen, mit 10 M NaOH und Eisessig	79%	0,8	***1,6***
3	Drug II, mit 10 M NaOH und Eisessig	***103%***	2,9	2,8

Die LOD, LOQ und Extraktionsausbeute sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Auch wenn rein rechnerisch die LOQ unter dem Wert des Cut-Offs der SoHT liegt, so konnte dieser Wert nicht bestätigt werden. Beim Versuch Proben mit einem THC-COOH-Gehalt unterhalb von 1 pg/mg zu messen, musste ich feststellten dass die Messungen nicht mehr korrekt waren, da das Verhältnis Quantifier/Qualifier nicht mehr stimmte.

Tabelle 24: mittelere LOD, LOQ und Extraktionsausbeute für die Bestimmung von THC-COOH•2HFB mit GC-MS/MS-NCI

	THC-COOH	Cut-Off
LOD [fg/mg]	15,4	-
LOQ [fg/mg]	51,4	200
Extraktionsausbeute	103%	-

Um eine Aussage treffen zu können ob die entwickelte Methode korrekte Messergebnisse liefert wurde THC-COOH einer Probe eines Ringversuchs ermittelt. Der Vorteile der Ringversuche ist, dass man so seine Ergebnisse mit denen von anderen Laboratorien vergleichen kann und man zudem einen Sollwert für die Analyse erhält. Der gemessene Wert von 80 pg/mg Haar ist mittig im Zielbereich und somit kann man davon ausgehen, dass die Methode richtige Messergebnisse liefert.

Tabelle 25 : Ergebnis des Ringversuches mittels GC-MS/MS-NCI

	CBD [ng/mg]	THC [ng/mg]	CBN [ng/mg]	THC-COOH [pg/mg]
DMF 1-14	**n.b.**	**n.b.**	**n.b.**	**80,0**
Zielbereich	0,203-0,455	0,501-1,009	0,338-0,710	42,2 – 117,0

Angetrieben von diesem Erfolg, wurde dieselbe Extraktionsmethode nun ebenfalls auf THC, CBD und CBN. Nach Optimierung der Extraktion konnten die folgenden Ergebnisse erzielt werden. (Tabelle 26)

Tabelle 26 : Extraktion aller untersuchten Cannabinoide mit der DRUG II-Methode und GC-MS/MS-EI

Cannabinoide	Ausbeute	LOD [pg/mg]	LOQ [pg/mg]
THC	61%	0,31	0,81
CBD	90%	0,24	1,02
CBN	50%	0,40	1,33
THC-COOH	93%	0,24	0,81

Die LOD von THC-COOH wurde noch zehnmal kleiner, aber da die LOQ im EI nicht so tief (LOQ: 0,81 pg/mg) war wie im NCI (LOQ: 0,15 pg/mg), so wurde versucht beide Methoden miteinander zu verbinden, d.h. THC-COOH bestmöglich zu bestimmen und zudem die drei anderen Cannabinoide zu bestimmen.

THC, CBN, CBD im EI und THC-COOH im NCI

Für Haarproben wurde in der Literatur keine vergleichbare Methode beschrieben, allerdings fand ich bei meiner Recherche eine Methode zur Bestimmung von THC und THC-COOH in Blut. (Agilent, 2010). Agilent hatte erkannt dass THC, THC-COOH und 11-OH-THC sich nicht gemeinsam eluieren lassen, deshalb eluieren sie THC mit einem Gemenge von n-Hexan/Ethylacetat (95:5, v/v). Die anderen beiden werden mit n-Hexan/Ethylacetat und 1% Essigsäure von der SPE-Kolonne eluiert. Die Essigsäure hilft in diesem Fall die Ionen vom Anionenaustauscher zu lösen.

Die Probenvorbereitung wurde wie in Punkt 7.3.2 durchgeführt. Die Durchführung der SPE erfolgt wie in 6.4.4.2 beschrieben. Da die Literatur keine Angaben über das Verhalten von CBD und CBN macht, so wurde das Verhalten dieser beiden Stoffe untersucht.

Es stellt sich heraus, dass CBD und CBN ebenfalls in der ersten Fraktion (n-Hexan/Ethylacetat) enthalten waren. Da THC und CBD nur im EI gemeinsam bestimmbar sind, so stand fest dass THC, CBD und CBN mit MSTFA derivatisiert und im GC-MS/MS-EI bestimmt werden. Die zweite Fraktion enthält nur THC-COOH und kann somit im empfindlicheren NCI-Modus bestimmt werden, nach Derivatisierung mit HFBA und HFBOH.

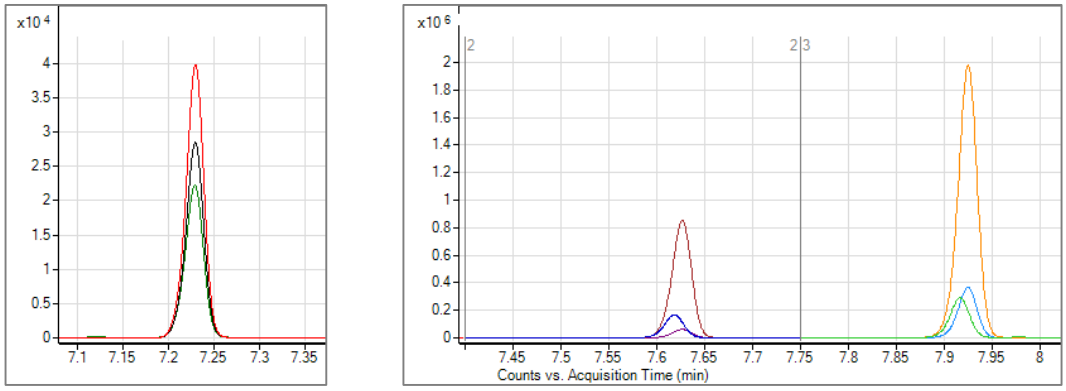


Abbildung 74 : Chromatogramm von CBD•2TMS (links), THC•TMS (Mitte) und CBN•TMS (rechts) im GC-MS/MS-EI nach getrennter SPE

Abbildung 74 zeigt einen Ausschnitt des MRM-Chromatogramms, es handelt sich je um 2 ng IS sowie 10 ng Analyt. CBD•2TMS hat eine Retention von 7,3 Minuten und erzeugt im Vergleich zu THC•TMS und CBN•TMS ein kleineres Signal. Dies liegt möglicherweise daran, dass das CBD sich weniger gut ionisieren lässt, da immerhin eine Extraktionsausbeute von 90% erzielt wird. THC•TMS folgt mit einer Retention von 7,6 Minuten und CBN•TMS bei 7,9 Minuten.

Tabelle 27 : Fragmente von THC, CBD, CBN (EI) und THC-COOH (NCI) sowie der alle optimierter Parameter

RT [min]		Transitionen		Dwell-time [ms]	Kollisions-energie [eV]
7,23	CBD•2TMS	458 → 351	Quantifier	10	10
		458 → 268	Qualifier	10	25
7,23	CBD •2TMS-D3	392 → 229	Quantifier	18,7	35
8,63	THC•TMS	386 → 371	Quantifier	10	15
		386 → 305	Qualifier	10	25
8,62	THC •TMS-D3	389 → 374	Quantifier	10	15
8,93	CBN•TMS	382 → 367	Quantifier	10	15
		382 → 310	Qualifier	10	40
8,92	CBN •TMS-D3	385 → 370	Quantifier	10	30
7,56	THC-COOH•2HFB	704 → 525	Quantifier	27,4	15
		525 → 298	Qualifier	44,1	25
7,55	THC-COOH •2HFB-D3	707 → 528	Quantifier	20,3	5

Die Bestimmung von THC-COOH•2HFB erfolgt nach Derivatisierung des zweiten Eluats mit HFBA und HFBOH mittels GC-MS/MS-NCI. Das dazugehörige Chromatogramm ist in Abbildung 75 wiedergegeben. Es handelt sich um 2 ng IS (rot, 7,56) sowie 10 ng THC-COOH.

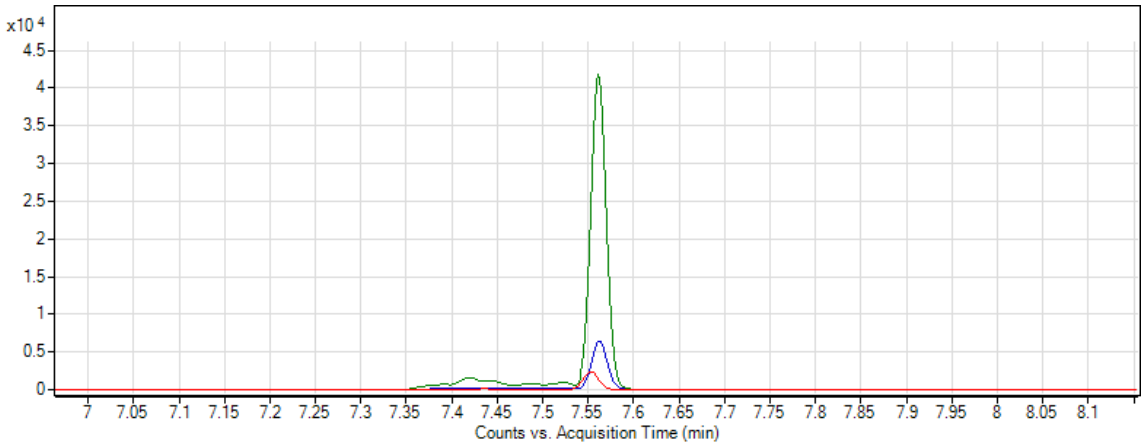


Abbildung 75 : Chromatogramm von THC-COOH•2HFB nach getrennter SPE

Mittels der Methode wurde eine Probe eines Ringversuchs bestimmt. Alle Analyte konnten bestimmt werden und die erzielten Ergebnisse waren alle im Zielbereich des Ringversuchs.

Tabelle 28 : Vergleich der Ergebnisse der Ringversuche mittel GC-MS/MS EI und NCI

	CBD [ng/mg]	THC [ng/mg]	CBN [ng/mg]	THC-COOH [ng/mg]
DMF 2-14	**0,188**	**0,349**	**0,252**	**0,0421**
Zielbereich	0,133-0,313	0,221-0,489	0,141-0,333	0,0243-0,0739

Tabelle 29 : LOD, LOQ und Extraktionsausbeute bei der GC-MS/MS EI sowie NCI Methode

	CBD [pg/mg]	THC [pg/mg]	CBN [pg/mg]	THC-COOH [pg/mg]
LOD	0,04	0,01	0,01	0,14
LOQ	0,13	0,02	0,02	0,48
Cut-Off	k.A.	50	k.A.	0,2
Extraktionsausbeute	75%	61%	64%	92%

Da der von der SoHT eingeforderter Cut-off Wert für die LOQ von 0,2 pg/mg nicht erreicht wurde, so wurde darauf verzichtet die Methode zu validieren. In der Literatur wurde der Cut-off-Wert mittels GCxGC-MS und mit einer GC-MS/MS mit PTV-Inlet („programmed temperature vaporizer“) unterschritten. Insbesondere die letzte Möglichkeit ist am bestehenden GC-MS/MS umrüstbar. So würde das Anbringen eines PTV‘s es ermöglichen größere Mengen Analyt aufzugeben, da das überschüssige Lösungsmittel nicht schlagartig verdampft, wie in einem split/splitless-Inlet (Temperatur üblicherweise zwischen 250-290°C). Diese Maßnahme sollte es ermöglichen THC-COOH unterhalb des Cut-offs zu bestimmen, erst dann macht der Aufwand einer Validierung der Methode Sinn.

8 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit wurden vier GC-MS/MS Methoden entwickelt und zum Teil validiert.

Die erste Methode dient zu Bestimmung von EtG in Haarproben und wurde im Forensic Science International 2015 publiziert(siehe Punkt 10.3). Die validierte Methode erlaubt eine Bestimmung von 0,5 pg EtG/mg Haar, was ein Ergebnis ist welches weit unter der von der SoHT (7 ng/mg) für Abstinenzler liegt. Mittels des Standardadditionsverfahrens konnte ein Gehalt von 300 fg/mg in einer Haarprobe eines Kinders von 2 Jahren nachgewiesen werden. Ob es sich hier bereits um die Schwelle des endogenen Alkohols handelt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden.

Ebenfalls konnte eine Methode entwickelt werden, die eine THC-COOH-Bestimmung mittels GC-MS/MS-NCI ermöglicht. Die vorliegende Methode erlaubt es THC-COOH-Gehalte von 1 pg/mg Haar zu bestimmen, obwohl die LOD und LOQ-Werte noch Hoffnung machten, dass die von der SoHT-Grenzwerte erreicht werden könnten, zeigten die Ergebnisse von Ringversuchen, dass dies leider nicht möglich war. Ein Ausblick ist hier sicherlich, dass der verwendete GC-MS/MS so umgebaut werden kann, dass dieser Grenzwert unterschritten werden sollte. Erst dann macht eine Validierung dieser Methode Sinn, dann wenn der Grenzwert nicht erreicht wird, dann kann die Methode nicht für toxikologische Proben herangezogen werden.

Des Weiteren wurden Extraktionsmethoden entwickelt zur gleichzeitigen Extraktion von THC, CBD, CBN und THC-COOH aus einer Haarprobe. Eine Analyse erlaubt, wenn auch weniger empfindlich, mittels GC-MS/MS-EI alle Cannabinoide gemeinsam zu bestimmen oder alternativ mit einer höheren Empfindlichkeit in einer kombinierten GC-MS/MS-EI (THC, CBD, CBN) und GC-MS/MS-NCI (THC-COOH) Methode diese getrennt zu bestimmen.

Weitere hoffnungsvolle Entwicklung ist die Bestimmung von THC-COOH-glu die erst nach der Zeit im Labor veröffentlicht wurde. Dieser Weg erweist sich als interessant, da die Konzentration von THC-COOH-glu höher ist als die des nicht glucuronidierten THC-COOH und somit wär es nicht notwendig 0,2 pg/mg THC-COOH in den Haaren zu bestimmen, sondern Werte zwischen 1 bis 10 pg/mg Haar. Auch wenn dieser Unterschied nur sehr klein erscheint, so kann er jedoch für eine Analyseapparatur eine unüberwindbare Hürde darstellen.

Im Laufe der Arbeit wurde zudem herausgefunden, dass eine Bestimmung von CBD und THC nicht nach Derivatisierung mit PFPA oder HFBA erfolgen sollte, da die entstehenden Derivate nicht mehr voneinander zu unterschieden sind. Es konnte leider nicht bestimmt werden, was hier genau passiert, allerdings sollt dies mittels einer ^{1}H- und ^{13}C-NMR herauszufinden sein.

9 Literaturverzeichnis

Agilent. (1999). *Determining Cannabinoids in Blood using electron capture negative chemical ionization with the 5973 CI MSD.* Agilent Pub. Nr. 5967-6331. Von www.agilent.com. abgerufen

Agilent. (2001). Analyse pharmakologisch relevanter Substanzen mit GC-MSD - EI/PCI/NCI. Deutschland.

Agilent. (2010). *Solid phase extraction of THC, THC-COOH and 11-OH-THC from whole blood.* Agilent pub. Nr. A02465.

Agilent. (2013). *Agilent 7000C Triple Quadruplole GC/MS System.* Agilent Pub. Nr. 5991-2972EN.

Andrews, R. (2011). Production of identical retention time and mass spectrum for Δ9-THC and CBD following derivatisation with trifluoracetic anhydride (TFAA). *Joint meeting of The Society of Forensic Toxicologists (SOFT) and The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT).* San Francisco: Imperial College.

Appenzeller, B., Agirman, R., Neuberg, P., Yegles, M., & Wennig, R. (2007). Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: A pilot study. *Forensic Sci. Int.*, 87-92.

Auwärter, V. (2006). *Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums - Analytische Bestimmung im Haar und in Hautoberflächenlipiden mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie.* Berlin: Disseration.

Bach, A., & Bayer, J. (1997). *Quacks & Co.* Aachen: Skript zur WDR-Sendereihe.

Baptista, M., Monsanto, P., Pinho Marques, E., Bermejo, A., Avila, S., Castanheira, A., . . . Vieira, D. (2002). Hair analysis for delta(9)-THC, delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci. Int.*, S. 66-78.

Baumgartner, W., & Hill, V. B. (1989). Hair Analysis for Drugs of Abuse. *J. Forensic Sci. 34*, S. 1433-1453.

Bhatnagar, V., Anjaiah, S., Prui, N., & Ramaihah, A. (1993). pH of melanosomes of B16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.*, S. 183-192.

Biologie. (2013). Abgerufen am 16. April 2015 von www.digitalefolien.de: http://www.digitalefolien.de/biologie/mensch/sinne/

Buchonnet, S. (2013). *Introduction to GC-MS coupling.* Boca Raton: CRC Press.

Bumb, C. (2014). Mit Vorsicht genießen. *Luxemburger Wort*, S. 2.

Bumb, C., Thiel, M., & Remesch, S. (2014). Auf dem Weg zur Entkriminalisierung. *Luxemburger Wort*, S. 2-4.

Cabarcos et al., P. (2015). Determination of direct alcohol makers: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*

Cairns, T., Kippenberger, D., Scholtz, H., & Baumgartner, W. (1995). Determination of Carboxy-THC in Hair by Tandem Mass Spectrometry. *International Conference and Workshop on Hair Analysis in Forensic Toxicology.* Abu Dhabi, United Arab Emirates.

Cappelle, D., Neels, H. Y., Paulus, J., van Nuijs, A., Cavaci, A., & Crunelle, C. (2015). Gas chromatographic determination of ethyl glucuronide in hair: Comparison between tandem mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Forensic Sci.Int.*, S. 20-24.

chromacademy.com. (2015). Von GC-MS Analysis: www.chromacademy.com abgerufen

Clarke, R. (2004). Hashish! In F. GROTENHERNEN, *Cannabis und Cannabinoide.* Bern: Hans Huber Verlag.

Collins, M., Easson, J., Hansen, G., Hodda, A., & Lewis, K. (1997). GC-MS-MS confirmation of unusually high delta 9-tetrahydrocannabinol levels in two postmortem blood samples. *J. Anal. Toxicol.*, S. 538-542.

Crunelle, C., Cappelle, D., Covaci, A., Van Nuijs, A., Maudens, K., Sabbe, B., . . . Neels, H. (2014). Hair ethyl glucuronide as a biomarker of alcohol consumption in alcohol-dependent patients: Role of gender differences. *Drug and Alcohol dependence*, 163-166.

Dahl et al, H. (2002). Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *J. Anal. Toxicol.*, S. 201-204.

Der Aufbau des Haares. (2015). Abgerufen am 16. April 2015 von www.Rausch.ch: http://www.rausch.ch/beratung/alles-ueber-haut-und-haar/der-aufbau-des-haares.html

DHS. (2012). *Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V.* Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.dhs.de: http://www.dhs.de/fileadmin/user_upload/pdf/Broschueren/Basisinfo_Cannabis.pdf

Di Bartolomeo, M., Junker, J., Lux, L., Wiseler, C., & Frieden, L. (2009). *Loi du 1er juillet 2009, Dépistage de drogues*. Abgerufen am 1. Februar 2015 von www.legilux.lu: http://www.legilux.public.lu/leg/a/archives/2009/0154/a154.pdf

Dolan, J. (2015). *Importance of Signal-to-noise*. Von www.sepscience.com : http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/690-/HPLC-Solutions-4-The-Importance-of-Signal-to-Noise abgerufen

Drogenberatung_Berlin. (2014). *Cannabis Indica, Sativa, Ruderalis*. Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.drogen-info-berlin.de: http://www.drogen-info-berlin.de/htm/cannabis_indica_sativa_ruderalis.htm

Dudenredaktion. (2003). *Deutsches Universalwörterbuch.* Mannheim: Dudenverlag.

Duscherer, K., & Paulos, C. (2014). *partymagnet.* Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.partymagnet.lu: http://partymagnet.lu/wp-content/uploads/2014/05/brochure_party_mag_2013_web.pdf

Duscherer, K., & Paulos, C. (2015). *partymagnet.* Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.partymagnet.lu: http://partymagnet.lu/wp-content/uploads/2015/01/Party-MagNet-2014.pdf

EMCDDA. (2015). *Europäischer Drogen Report.* Luxemburg: Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht.

Europäische_Kommission. (2014). *Verbrauchsteuersätze in den Mitgliederstaaten der EU.* Abgerufen am 2. Februar 2014 von http://ec.europa.eu/taxation_customs/resources/documents/taxation/excise_duties/alcoholic_beverages/rates/excise_duties-part_i_alcohol_en.pdf

Gross, J. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook.* Heidelberg: Springer. Von www.ms-textbook.com/1st/downloads/chap7.pdf abgerufen

Grotenhernen, F. (2004). *Cannabis und Cannabinoide.* Bern: Hans Huber Verlag.

guichet.lu. (2014). *Die wichtigsten gesetzlichen Neuerungen im Jahr 2015 auf einen Blick*. Abgerufen am 10. Februar 2015 von guichet.lu: http://www.guichet.public.lu/citoyens/de/actualites/2014/12/27-changements-2015/index.html

Harkey, M. (1993). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.*, S. 9-18.

Henderson, G. (1993). Mechanism of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.*, S. S. 19-29.

Hill, A., Williams, C., Whalley, B., & Stephens, G. (09 2011). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology*, S. in Press.

Hübschmann, H. (1996). *Handbuch der GC/MS: Grundlagen und Anwendung.* Weinheim: Wiley-VCH.

Huestis, e. a. (1992). Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THC-COOH during and after smoking marijuana. *J. Anal. Toxicol.*, S. 276-282.

Huestis, M., Gustafson, R., Moolchan, E., Barnes, A. B., Sweeney, S., Hayes, E., . . . Smith, M. (2007). Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic. Sci. Int.*, S. 129-136.

Inserm. (2001). *Cannabis - Quels effets sur le comportement et la santé?* Paris: Les éditions Inserm.

Iversen, L. (2008). *The science of marijuana.* New York: Oxford University Press.

Jones, J., Jones, M., Plate, C., & Lewis, D. (2013). The Detection of THCA Using 2-Dimensional Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Human Fingernail Clippings: Method Validation and Comparison with Head Hair. *Am. J. Anal. Chem.*, S. 1-8.

Jurado et al., C. (2004). Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. *Forensic Sci. Int.*, S. 161-166.

Jurado, C., Menendez, M., Repetto, M., Kintz, P., Cirimele, V., & Mangin, P. (1996). Hair Testing for Cannabis in Sapin and France: Is there a difference in consumption? *J. Anal. Toxicol.*, S. 111-115.

Kamil et al., I. (1952). A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl-glucuronide. *Biochemical Journal*, S. 32-33.

Kerekes, I., & Yegles, M. (2013). Coloring, Bleaching, and Perming: Influence on EtG Content in Hair. *Ther. Drug Monit.*, S. 527-529.

Kerger, C. (2015). *Bestimmung von Cannabis und Amphetaminen in Haarproben mittels GC/MS im NCI-Modus.* Travail de candidature.

Kim, J., Cheong, J., Lee, J., & In, M. (2011). Improved gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometric method for determination of 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using mechanical pulverization and bead-assisted liquid-liquid extraction. *Forensic Sci. Int.*, S. 99-102.

Kintz, P. (2012). *Traité de Toxicologie Médico-Judiciaire.* Issy les Moulineaux: Elsevier Masson.

Kintz, P., Cirimel, V., & Mangin, P. (1995). Testing humain hair for cannabis. II Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof. *J. Forensic Sci.*, S. 619-622.

Klys et al., M. (2005). A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: application of postmortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC/APCI/MS. *Leg. Med. Tokyo*, S. 319-325.

Macherey-Nagel. (2015). Chromatographie - Säulen und Zubehör Katalog. Düren.

Madea, B., & Mußhoff, F. (2004). *Haaranlytik - Technik und Interpretation in Medizin und Recht.* Köln: Deutscher Ärte-Verlag.

Maurer, H., Pfleger, K., & Weber, A. (2011). *Mass Spectral an GC Data - Volume 1.* Weinheim: Wiley-VCH.

Mazur, A., Lichti, C., Prather, P., Zielinska, A., Bratton, S., Gallus-Zawada, A., . . . Moran, J. (2009). Characterization of Human Hepatic and Extrahepatic UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes Involved in the Metabolism of Classic Cannabinoids. *Drug Metabolism and disposition*, S. 1496-1504.

Mieczkowski, T. (1997). Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Sci Int.*, S. 87-111.

Monsanto, P. e. (2002). Hair analysis for delta(9)-THC, delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci. Int.*, S. 66-78.

Moore et al., C. (2006). Application of two-dimensional gas chromatography with electron capture chemical ionization mass spectrometry to the detection of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair. *J. Anal.Toxicol.*, S. 171-177.

Moore, C., Guzaldo, F., & Donahue, T. (2001). The Determination of 11-nor-Δ9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid (THC-COOH)in Hair using Negative Ion Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Volume Injection. *J. Anal. Toxicol.*, S. 555-558.

Morini et al., L. (2005). Direct determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, S. 1321-31.

Mura, A., & Piriou, P. (1998). Cannabis. In P. KINTZ, *Toxicologie et Pharmacologie Médicolégales* (S. 543-554). Elsevier.

Musshoff, F., Junker, H., Lachenmeier, D., Kroener, L., & Medea, B. (2002). Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, S. 554-560.

Origer, A. (2014). *The state of the drugsproblem in the grand duchy of Luxemburg.* Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.sante.public.lu: http://www.sante.public.lu/publications/rester-bonne-sante/drogues-illicites-dependances/etat-phenomene-drogue-gdl-rapport-annuel-relis/etat-drogue-gdl-rapport-relis-2014-fr-en.pdf

Palmiotto, M., Colombo, A., & Davoli, E. (2014). *A comparison of GC/MS-MS using the Agilent 7000 GC-QQQ and GC/HRMS for the trace level analysis of Dioxins in Environmental Samples.* Von Agilent: www.chem.agilent.com abgerufen

Paterson, S., McLachlan-Troup, N., Cordero, R., Dohnal, M., & Carman, S. (2001). Qualitative Screening for Drugs of Abuse in Hair using GC-MS. *J. Anal. Toxicol.*, S. 203-208.

PharmChem. (2015). *www.Pharmchem.com*. Von Overview: http://www.pharmchem.com/default.asp?page=overview abgerufen

Pichini, S., Marchei, E., Martello, S., Gottardi, M., Pellegrini, M., Svaizer, F., . . . Pacifici, R. (2015). Identification and quantification of 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid glucuronide (THC-COOH-glu) in hair by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential hair biomarker of cannabis use. *Forensic. Sci. Int.*, S. 47-51.

Pötsch, L., Skopp, G., & Möller, M. (1997). Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci. Int.*, S. 25-35.

Pötsch, L., Skopp, G., & Möller, M. (1997). Zum Suchtmittelnachweis in Haaren. *Rechtsmedizin 8*, S. 2-6.

Pragst, F., Rothe, M., Spiegel, K., & Sporkert, F. (1998). Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments – a time table of drug exposure? *Forensic Sci. Rev.*, S. 81-111.

retsch.de. (2015). Schwingmühle. www.retsch.de.

Robbins, C. (1994). *Chemical and Physical Behavior of Human Hair.* New York: Springer Verlag.

Roth, N., Moosmann, B., & Auwärter, V. (2013). Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Δ9-tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair. *J. Mass. Spectrom.*, S. 227-233.

Sachs, H., & Dressler, U. (2000). Detection of THC-COOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up. *Forensic Sci. Int.*, S. 239-47.

Santé, M. d. (2015). Abgerufen am 26. Mai 2015 von www.sante.public.lu: http://www.sante.public.lu/fr/catalogue-publications/rester-bonne-sante/drogues-illicites-dependances/strategie-plan-drogues-2015-2019/index.html

Schräder, J., Nadulski, T. L., & Pragst, F. (2008). Nichtwässrige derivative Headspace Festphasenmikroextraktion in Verbin- dung mit GC-MS in der Haaranalyse - eine sensitive Methode zur Bestimmung von Cannabis und Alkoholmissbrauch . *Aktuelle Beiträge zur Forensischen und Klinischen Toxikologie* (S. 393-402). Bad Vibel: Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie.

Schütz, H. (2014). Beeinflusst der endogene Blutalkoholspiegel die Fahrtauglichkeit? *Das PTA Magazin*, 35.

SHIMADZU. (2015). *LCMS-8030*. Von www.shimadzu.com: http://www.shimadzu.com/an/lcms/lcms8030/8030-8.html abgerufen

Skoog, D., & Leary, A. (1996). *Instrumentelle Analytik.* Berlin: Springer Verlag.

Skopp et al., G. (2000). Ethyl Glucuronide in Humain hair. *Alcohol and Alcoholism*, S. 283-285.

Society of Hair Testing. (2011). *www.soht.com*. Von Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair: http://www.soht.org/index.php/statements/9-nicht-kategorisiert/85-statement-2011 abgerufen

Society of Hair Testing, S. (2004). Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci. Int.*, S. 83-84.

SoHT. (2014). 2014 Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption. Bordeaux: Society of hair testing.

Sporkert, F. (2001). *Anwendungen der Headspace-Festphasenmikroextraktion in der forensischen Analytik unter besonderer Berücksichtigung der Haaranalytik.* Berlin: Dissertation.

Steil, S. (2010). *Ministère de la santé.* Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.ms.public.lu: http://www.ms.public.lu/fr/ministere/cns2006-2012-juin/2010/04-Simone-Steil.pdf

Strano-Rossi, S., & Chiarotti, M. (1999). Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *J. Anal.Toxicol.*, S. 7-10.

Thieme, D., Sachs, H., & Uhl, M. (2014). Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography- tandem and multistage mass spectrometry. *Drug Test Anal.*, S. 112-118.

Uhl, M. (2007). Determination of cannabinoids in humain hair. In P. Kintz, *Analytical and practical aspects of drug testing in hair* (S. 127-142). Boca Raton: CRC Press.

Uhl, M., & Sachs, H. (2004). Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci. Int.*, S. 143-147.

Ujváry, I., & Grotenhermen, F. (2014). 11-Nor-9-carboxy-Δ9-tetrahydrocannabinol – a ubiquitous yet underresearched cannabinoid. A review of the literature. *Cannabinoids*, S. S.1-8.

University of Colorado. (2009). *http://clas.ucdenver.edu/sasl/.* Von university of colorado Denver: http://clas.ucdenver.edu/sasl/Instrumentation/Organic/LCMS/LC%20Training/05%20Quadrupole%20Scan%20Modes.pdf abgerufen

UNODC, U. N. (2009). *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens.* New York: United Nations.

Villas-Bôas, S., Smart, K., Sivakumaran, S., & Lane, A. (2011). Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites*, S. S. 3-20. Von http://www.mdpi.com/metabolites/metabolites-01-00003/article_deploy/html/images/metabolites-01-00003f1-1024.png abgerufen

Wagener, Y. (2002). *Wohlbefinden der Jugendlichen in Luxemburg.* Luxemburg: Ministère de la santé et MENFP.

Wageningenur. (2015). Von https://www.wageningenur.nl/en/product/UPLCtriple-quad-mass-spectrometer-for-targeted-quantitative-LCMS-detection.htm abgerufen

Watanabe, K., Itokawa, Y., Yamaori, S., Funahashi, T., Kimura, T., Kaji, T., . . . Yamamoto, I. (2007). Conversion of cannabidiol to Δ9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicol.*, S. 16-21.

WHO. (2012). *Management of substance abuse: Alcohol*. Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.who.int: http://www.who.int/substance_abuse/facts/alcohol/en/

WHO. (2014). *Country Profiles.* Abgerufen am 10. Februar 2015 von http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msb_gsr_2014_2.pdf?ua=1

WHO. (2014). *Global status report an alcohol and health.* Geneva (CH): World Health Organization.

Wicks, J., & Tsanaclis, L. (2005). Hair analysis for assessing cannabis use: where is the cut-off? *Ann.Toxicol. Anal.*

Wikipedia. (2015). Abgerufen am 12. März 2015 von www.wikipedia.org: http://de.wikipedia.org/wiki/Drogentest

Wikipedia. (2015). *Cannabis als Arzneimittel*. Abgerufen am 10. Februar 2015 von www.wikipedia.de: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Cannabis_als_Arzneimittel&action=history

Wurst, F., Kempter, C., Seidl, S., & Alt, A. (1999). Ethyl glucuronide--a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol and Alcoholism*, S. 71-77.

www.chemgapedia.de. (2014). Von Kalibierung - Standardadditionsverfahren: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/kalibrierung.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/datenauswertung/quantitativ/standardaddition/standardadditionm80ht0801.vscml.html abgerufen

Yegles et al., M. (2004). Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci. Int.*, S. 167-173.

10 Verzeichnisse

10.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Registrierter Alkoholkonsum pro Kopf (15+) in Zeitraum von 1961 bis 2010(WHO, Global status report an alcohol and health, 2014) 13
Abbildung 2: Verteilung der alkoholverschuldeten Todesfälle, in % bezogen auf alle durch Alkohol verursachten Todesfälle(WHO, Global status report an alcohol and health, 2014)..... 14
Abbildung 3: Gesamtalkoholkonsum pro Kopf (15+Jahre, in Liter reinem Alkohol) in 2010 (WHO, Global status report an alcohol and health, 2014) 15
Abbildung 4: Verbreitung der illegalen Drogen. Anteil an der Gesamtschüleranzahl (in %) (Origer, 2014) 17
Abbildung 5: Die vier wichtigsten Cannabispools ausgehend von Cannabis sativa und Cannabis indica 18
Abbildung 6: Zusammenfassung der Befragung "Welche Suchtstoffe hast du in den letzten 14 Tagen konsumiert?" von Festivalbesuchern durch CEPT [2012(Origer, 2014), 2013 (Duscherer & Paulos, 2014), 2014 (Duscherer & Paulos, 2015)] 19
Abbildung 7: mittlere (6 Probanden, Abstinenzler) Plasmakonzentration von THC und Metaboliten (11-OH-THC und THC-COOH) nach Rauchen eines Joints mit 34 mg THC (Huestis e. a., 1992)..... 20
Abbildung 8 : Δ^9-Tetrahydrocannabinol (Dibenzopyran-Nummerierung) 21
Abbildung 9: Glucuronid von 11-Nor-Δ9-Tetrahydrocannabinol-9-Carbonsäure (THC-COOH-glu). 21
Abbildung 10: Vergleich der Nachweisfenster je nach Untersuchungsmatrix (Wikipedia, 2015) ... 22
Abbildung 11: Schematischer Schnitt durch die Haut mit Haarfollikel, Haarschaft, Haarbalgmuskel und Talgdrüse (Der Aufbau des Haares, 2015) 24
Abbildung 12: Schematischer Darstellung des Aufbaus eines Haares (Biologie, 2013)..... 25
Abbildung 13: Haarzyklus : a) Anagenphase; b) Katagenphase; c) Telogenphase..... 26
Abbildung 14: Aufnahmewege von Drogen in Haarproben 27
Abbildung 15: Schwingmühle (retsch.de, 2015) 29
Abbildung 16: Festphasenextraktion (Macherey-Nagel, 2015) 30
Abbildung 17: Struktur der festen Phase der OASIS®MAX Säule..... 31
Abbildung 18: Ethylglucuronid (EtG)..... 31
Abbildung 19: Struktur der festen Phase der DRUG II-Säule von (Macherey-Nagel, 2015) 32
Abbildung 20: allgemeine Silylierungsreaktionen mit MSTFA (Villas-Bôas, Smart, Sivakumaran, & Lane, 2011)..... 33
Abbildung 21: Strukturformel von BSTFA 34
Abbildung 22: Strukturformel von MSTFA 34
Abbildung 23: Strukturformel von MBDSTFA 34
Abbildung 24: allgemeine Acetylierungsreaktion mit Trifluoracetanhydrid (TFA) 34
Abbildung 25: Strukturformel von PFPA 35
Abbildung 26: Strukturformel von HFBA..... 35
Abbildung 27: allgemeine Reaktionsgleichung der Decarboxylierung..... 36
Abbildung 28: Strukturformel von PFPOH 36
Abbildung 29: Strukturformel von HFIP 36
Abbildung 30: Strukturformel von HFBOH..... 36

Abbildung 31: GC Agilent 7890A 37
Abbildung 32: Schema Gaschromatograph 37
Abbildung 33: klasischer Aufbau einer GCxGC 38
Abbildung 34: Chromatogramm GCxGC 38
Abbildung 35: split/splitless Injektor 38
Abbildung 36: Kaltaufgabeinjektor (PTV) 38
Abbildung 37: Schema eines Gaschromatographen mit Massenspektrometer (GC-MS) (chromacademy.com, 2015) 39
Abbildung 38: Schema Triple Quadrupol Massenspektrometer (Wageningenur, 2015) 40
Abbildung 39 : Ablauf des „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) 41
Abbildung 40: Bestimmung der Percursor-Ionen im MRM-Modus 42
Abbildung 41: Elektronenstoß-Ionenquelle (Skoog & Leary, 1996) 42
Abbildung 42 : schematischer Aufbau einer CI-Zelle (Gross, 2011) 43
Abbildung 43: Tetrahydrocannabinol, Trifluoroacetylderivat; mit EI-Ionisation (Agilent, 2001) ... 45
Abbildung 44: Tetrahydrocannabinol, Trifluoroacetylderivat; mit NCI-Ionisation (Agilent, 2001).. 46
Abbildung 45: Schematische Erklärung des Risikos von "falschen Negativbefunden“ beim SIM mit drei Ionen (Buchonnet, 2013) 47
Abbildung 46: Schematische Erklärung des Verhindern von "falschen Negativbefunden“ mittels MRM (Buchonnet, 2013) 47
Abbildung 47: Signal-Rausch-Verhältnis (Dolan, 2015) 48
Abbildung 48 : Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnis im SIM und im MRM-Modus (SHIMADZU, 2015) 48
Abbildung 49: Chromatogramm zeigt den Zuwachs des Signals bei schrittweiser Zugabe einer bekannten Menge Analyt (www.chemgapedia.de, 2014) 50
Abbildung 50 : Darstellung einer Kalibrierungsgerade mit Mehrfachzusatz (www.chemgapedia.de, 2014) 50
Abbildung 51: Überblick über mögliche Alkoholmarker im Haar 51
Abbildung 52: Synthesereaktion von Ethylglucuronid ausgehend von Ethanol 53
Abbildung 53: Konsum nach Alter von Tabak, Alkohol und Cannabis (Wagener, 2002) 55
Abbildung 54 : Stoffwechsel von Δ^9-Tetrahydrocannabinol 59
Abbildung 55: Temperaturprofil des GC zur Bestimmung von EtG 70
Abbildung 56 : Temperaturprofil des GC zur Bestimmung von THC-COOH•2HFB im NCI 72
Abbildung 57 : Temperaturprofil des GC zur Bestimmung von allen Cannabinoiden in GC-MS/MS-EI 75
Abbildung 58: Massenspektrum (SIM) von EtG-D5 77
Abbildung 59: Acetylierung mit Cyclisierung von Ethylglucuronid zweifach derivatisiert (m/z = 596) 77
Abbildung 60: Einfluss der Kollisionsenergie auf die Peakhöhe bei der Transition 397 → 213 78
Abbildung 61: Einfluss der Kollisionsenergie auf die Peakhöhe bei der Transition 596 → 213 78
Abbildung 62: EtG und EtG-D5 Spektrum im MRM-Modus 79
Abbildung 63: Kalibriergerade EtG-HFB 80
Abbildung 64: Standardadditionsverfahren zur Bestimmung der EtG-Konzentration in der Haarprobe eines Kleinkindes 82

Abbildung 65 : Vergleich von EtG Konzentationen in Haaren von Alkoholkonsumenten (Abstinenzler, moderater Konsum und starker Konsum) erhalten mittels GC-MS-NCI und GC-MS/MS-NCI 82
Abbildung 66 : Massenspektrum von THC-HFB 84
Abbildung 67 : Massenspektrum von CBD-HFB 84
Abbildung 68: Ringschluss im Sauren von CBD zu THC 84
Abbildung 69: Derivate der Silierung mit MSTFA von CBD und THC 85
Abbildung 70: Mögliche Produkte der Derivatisierung von CBD mit HFBA 85
Abbildung 71: Derivatisierung von THC-COOH mittels HFBA und HFBOH 86
Abbildung 72: Derivatisierungsvorschlag von THC-COOH mit MSTFA und anschließend mit MBTFA 87
Abbildung 73: vereinfachte Reaktion von MBTFA mit einem Alkohol (ROH) 87
Abbildung 74 : Chromatogramm von CBD•2TMS (links), THC•TMS (Mitte) und CBN•TMS (rechts) im GC-MS/MS-EI nach getrennter SPE 93
Abbildung 75 : Chromatogramm von THC-COOH•2HFB nach getrennter SPE 94

10.2 Verzeichnis derTabellen

Tabelle 1: Nachweis von Stoffen in biologischen Matrizen (Kintz, Traité de Toxicologie Médico-Judiciaire, 2012) 23
Tabelle 2: Übersicht der Derivatisierungsmittel und ihre Anwendungsbereiche 32
Tabelle 3: Natürliche Cannabinoide-Klassen (Grotenhernen, 2004) 56
Tabelle 4: Übersicht zur Extraktion und Aufreinigung einer Haarprobe für die Bestimmung der Cannabinoide 61
Tabelle 5 : Benötigte Volumina der internen Standards für THC-mix-D3 68
Tabelle 6 : Transitionen von EtG•2HFB mit Retentionszeit und Dwell-Zeit 70
Tabelle 7 : Transitionen von THC-COOH•2HFB mit Retentionszeit und Dwell-Zeit 72
Tabelle 8 : Transitionen der MSTFA-Derivate von THC, CBD, CBN und THC-COOH sowie aller optimierter Parameter mittels GC-MS/MS-EI 74
Tabelle 9 : Transitionen von THC, CBD, CBN und THC-COOH sowie der alle optimierter Parameter nach Derivatisierung mit MBDSTFA im EI 74
Tabelle 10 : Transitionen von THC, CBD und CBN im GC-MS/MS-EI 76
Tabelle 11 : Validierung der EtG-Methode 80
Tabelle 12 : Peakfläche in Abhängigkeit den EtG-D5 Masse 81
Tabelle 13: Daten zur Standardaddition von EtG 81
Tabelle 14 : EtG-Konzentration in Haarproben bei unterschiedlichem Alkoholkonsum erhalten mit GC-MS und GC-MS/MS 83
Tabelle 15 : Derivatisierung der Cannabinoide 84
Tabelle 16 : Derivate von THC-COOH mit Transitionen und Peak-Eigenschaften 86
Tabelle 17 : Transitionen von THC-COOH•2HFB und IS mit Retentionszeit und Dwell-Zeit 86
Tabelle 18 : Transitionen von THC, CBD, CBN, und THC-COOH sowie der alle optimierter Parameter nach Derivatisierung mit MSTFA im EI 88
Tabelle 19 : Transitionen von THC, CBD, CBN, und THC-COOH sowie der alle optimierter Parameter nach Derivatisierung mit MBDSTFA im EI 88
Tabelle 20 : LOD, LOQ und Extraktionsausbeute bei der GC-MS/MS-EI-TMS-Methode 89
Tabelle 21 : Vergleich der Ergebnisse der Ringversuche mittel GC-MS/MS-EI 89
Tabelle 22 : Zusammenfassung der Ergebnisse der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) 91
Tabelle 23 : Vergleich der Extraktionsmethoden von THC-COOH GC-MS/MS-NCI 92
Tabelle 24: mittelere LOD, LOQ und Extraktionsausbeute für die Bestimmung von THC-COOH•2HFB mit GC-MS/MS-NCI 92
Tabelle 25 : Ergebnis des Ringversuches mittels GC-MS/MS-NCI 92
Tabelle 26 : Extraktion aller untersuchten Cannabinoide mit der DRUG II-Methode und GC-MS/MS-EI 93
Tabelle 27 : Fragmente von THC, CBD, CBN (EI) und THC-COOH (NCI) sowie der alle optimierter Parameter 94
Tabelle 28 : Vergleich der Ergebnisse der Ringversuche mittel GC-MS/MS EI und NCI 95
Tabelle 29 : LOD, LOQ und Extraktionsausbeute bei der GC-MS/MS EI sowie NCI Methode 95

10.3 Publikation

Forensic Science International 249 (2015) 20–24

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Gas chromatographic determination of ethyl glucuronide in hair: Comparison between tandem mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry☆

Delphine Cappelle [a,*], Hugo Neels [a,b], Michel Yegles [c], Jeff Paulus [c], Alexander L.N. van Nuijs [a], Adrian Covaci [a], Cleo L. Crunelle [a]

[a] Toxicological University of Antwerp, Universiteitsplein 1, B2610 Antwerp, Belgium
[b] Toxicology Laboratory, ZNA Stuivenberg Hospital, Lange Beeldekenstraat 267, B2060 Antwerp, Belgium
[c] Laboratoire National de Santé, Service de Toxicologie, 1, Louis Rech, L3555 Dudelange, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 23 December 2014

Keywords:
Ethyl glucuronide
Alcohol
Hair
GC–MS/MS
Negative ion chemical ionization
Validation

ABSTRACT

Ethyl glucuronide (EtG), a minor metabolite of ethanol, accumulates in hair and is currently used as a long-term marker for the detection of chronic and excessive alcohol consumption. Sensitive methods are required to differentiate teetotalers from moderate drinkers according to the established cut-off (i.e., 7 pg/mg hair). The aim of this study was to develop a sensitive method using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) operated in the negative ion chemical ionization (NICI) mode. The validated method was applied to hair samples from teetotalers, moderate and excessive alcohol consumers, and results were compared to a previously validated GC–NICI–MS method. The developed GC–NICI–MS/MS method showed linearity over a range from 2 to 400 pg/mg hair, with a limit of detection (LOD) of 0.05 pg/mg hair and a lower limit of quantification (LLOQ) of 0.2 pg/mg hair, compared to an LOD of 0.5 pg/mg hair and LLOQ of 1.5 pg/mg hair obtained with GC–NICI–MS. Furthermore, lower background noise was observed using GC–NICI–MS/MS. Comparison of results of hair samples ($n = 58$) obtained by GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS showed no significant difference between both methods (paired-sample t-test, $p > 0.05$; mean CV = 1.0%). The differences between both methods were larger for EtG concentrations < 30 mg/pg hair (mean CV = 1.7%) than for EtG concentrations > 30 mg/pg hair (mean CV = 0.7%). This suggests a higher selectivity of GC–NICI–MS/MS at lower concentrations. In conclusion, by using GC–NICI–MS/MS, a higher analytical selectivity and an improved signal to noise ratio, can be achieved. Although GC–NICI–MS would not change the interpretation of the EtG concentrations, the present GC–NICI–MS/MS method should preferentially be used for the determination of EtG in hair, especially when differentiating between teetotalers and moderate drinkers according to the current cut-off (i.e., 7 pg/mg hair).

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The abuse of alcohol is a worldwide problem associated with negative effects on health and society [1]. The detection of alcohol through direct and indirect alcohol markers can be seen as a useful tool to detect harmful and/or chronic alcohol consumption. Clinical and forensic applications for these alcohol markers are widespread: from the detection of alcohol dependence (e.g. in treatment settings and in forensic cases) to the monitoring of alcohol abstinence (e.g. during pregnancy, in child custody cases and in liver transplant procedures due to alcoholic liver failure).

Ethyl glucuronide (EtG) is a minor metabolite of ethanol that accumulates in hair and has proved to be a specific and sensitive long-term biomarker for the detection of chronic and excessive alcohol consumption [2]. The metabolization of ethanol to EtG represents approximately 0.05% of the total alcohol elimination [3]. Consequently, only small amounts of EtG accumulate in hair, providing EtG concentrations in the lower picogram range: >30 pg/mg hair in alcohol-dependent individuals [2,4], between 7 and 30 pg/mg hair for moderate alcohol consumers, and <7 pg/mg hair

☆ This paper is part of the special issue entitled "Proceedings of the SoHT Bordeaux 2014 meeting", June 11–13, 2014, Bordeaux, France. Guest edited by Dr Pascal Kintz.

* Corresponding author at: Toxicological Center, University of Antwerp, Campus Drie Eiken, Room S5.53, Universiteitsplein 1, B2610 Antwerp, Belgium.
Tel.: +32 3 265 27 43; fax: +32 32652722.
E-mail address: delphine.cappelle@uantwerpen.be (D. Cappelle).

http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.022
0379-0738/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

for teetotalers [5]. Sensitive analytical methods are thus required for the reliable determination of such low EtG concentrations. The current methods offer lower limits of quantification (LLOQs) varying between 2 and 5000 pg/mg depending on the method applied, with LLOQs generally higher (>10 pg/mg hair) for liquid chromatography (LC) methods compared to gas chromatography (GC) methods (<10 pg/mg hair; for a review see Crunelle et al. [2]). The use of negative ion chemical ionization (NICI) instead of electron impact (EI) improves the analytical sensitivity of GC methods, with LLOQs of 5000 [6] and 300 [7] pg/mg hair for EI compared to LLOQs of 6 [8] and 2.3 [9] pg/mg hair for NICI. Tandem mass spectrometry (MS/MS) minimizes background interferences and allows multiple reaction-monitoring (MRM) and should thus result in higher sensitivity and selectivity. Indeed, GC–MS/MS methods operated in EI mode showed an improved sensitivity [10,11], but this increase could not be observed between GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS methods [12,13].

In this article, we validated a GC–NICI–MS/MS method for the determination of EtG in hair after heptafluorobutyric anhydride (HFBA) derivatization. By analyzing hair samples from teetotalers, moderate, and excessive alcohol consumers, the applicability of the method should be demonstrated. In addition, the GC–NICI–MS/MS method was compared to a GC–NICI–MS method, in order to assess the possible advantages of MS/MS and MRM in the determination of EtG in hair from teetotalers, moderate and excessive alcohol consumers.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Hair samples together with self-reported data about alcohol consumption were obtained from 58 volunteers: teetotalers (no alcohol consumption; $n = 2$), moderate alcohol consumers (<60 g alcohol/day; $n = 20$) and excessive alcohol consumers (>60 g alcohol/day; $n = 36$). Samples were collected from the vertex posterior of the head, and the first 3 cm segment from the proximal end was used for further analysis.

2.2. Chemicals

Ethyl glucuronide (EtG) and the internal standard ethylglucuronide-D_5 (EtG-D_5) in methanol were purchased from Medichem (Stuttgart, Germany). Heptafluorobutyric anhydride (HFBA) was obtained from Sigma Aldrich (Bornem, Belgium). Methanol, ammonium hydroxide solution (25%), ethyl acetate, formic acid (98–100%), and acetone were supplied by Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). All chemical and reagents were of analytical purity grade.

2.3. Standard solutions

Stock solutions of EtG (1 mg/mL) and EtG-D_5 (0.2 mg/mL) were prepared in methanol. The working solutions were prepared in methanol by further dilution of the stock solutions. All solutions were stored at −20 °C.

2.4. Instrumentation

Oasis® MAX (60 mg, 3 mL) extraction cartridges were acquired from Waters (New Bedford, MA, USA). A ball mill of type MM2 (Retsch, Haan, Germany) was used for the pulverization of the hair samples. Extraction was performed with an ELMA TI-H-15 ultrasonication bath (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany) and centrifugation with a Sigma centrifuge (Osterode am Harz, Germany). A Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Bellefonte, CA, USA) with 24 ports was employed to load the hair samples and to dry the cartridges. Solvent evaporation was achieved with a Pierce Reacti-Therm III Heating Module (Rockford, IL, USA).

Both GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS analyses were carried out on a GC–MS/MS system consisting of a 7890A gas chromatograph, equipped with an automatic injector AS 7693 and coupled to a 7000C triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Chromatographic separation was achieved on a HP-5 MS (5% phenyl methyl siloxane) column (length 30 m × internal diameter 0.25 mm × film thickness 0.25 μm).

2.5. Sample preparation

Hair samples were processed according to a previously described method [14]. Briefly, the samples were washed with water and acetone, dried, cut into 1–2 mm pieces, and pulverized in a ball mill. Then, 2 mL of water was added to approximately 30 mg of the pulverized samples, and the samples were ultrasonicated for 1.5 h. Next, the samples were spiked with 2 ng of EtG-D_5 as internal standard, vortexed, and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. Solid-phase extraction was then performed by transferring the supernatant to the cartridges, previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. The columns were washed with 1 mL of water/ammonia (5%) solution and 2 mL of methanol, and subsequently dried for 5 min. Elution was performed using 2 mL of 2% formic acid in methanol and the eluate was evaporated to dryness under a nitrogen gas stream at 37 °C. The residues were derivatized with HFBA (30 min, 60 °C), dried under a nitrogen gas stream, and then reconstituted in 50 μL of ethyl acetate. Finally, the extracts were transferred to vials and 1 μL was injected twice into the GC–MS/MS system (for GC–NICI–MS analysis and for GC–NICI–MS/MS analysis).

2.6. GC–MS/MS conditions

The injector temperature was set at 250 °C. The carrier gas was helium with a flow rate of 1 mL/min. The oven was initially held at 100 °C for 2 min, heated to 170 °C at a rate of 10 °C/min and then programmed at a final temperature of 300 °C at 40 °C/min. The detector was operated in the negative ion chemical ionization (NICI) mode and the detector temperature was 280 °C. The GC–NICI–MS analyses were done as published elsewhere [14]. For the GC–NICI–MS/MS analyses data acquisition was performed in the multiple reaction-monitoring (MRM) mode. The monitored ion transitions were m/z 596 → 213 (quantifier) and 397 → 213 (qualifier) for EtG, and m/z 601 → 213 for EtG-D_5.

2.7. Validation

Validation of the analytical method was based on the international guidelines of the European Medicine Agency (EMA) and the Food and Drug Administration (FDA) [15,16]. The following quality criteria were taken into account: recovery, linearity, accuracy, precision and sensitivity limits (LLOQ, LOD).

The extraction recovery was calculated as the percentage response in extracted samples relative to samples where the standard was added after extraction. A calibration curve, consisting of blank samples spiked at 7 different concentrations (2, 4, 10, 50, 100, 200, 400 pg/mg), was constructed to evaluate linearity. Accuracy and precision were assessed for replicated quality control (QC) samples at a concentration of 25 pg/mg. Intra-day precision and accuracy were assessed by analyzing 10 QC samples in the same analytical run. Inter-day precision and accuracy were calculated on QC samples analyzed in 6 different runs, on separate

days. Acceptance criteria were (1) a bias less than 15% for accuracy, and (2) a coefficient of variation (CV) lower than 15% for precision [15,16].

The LLOQ was defined as the lowest concentration producing peaks with a signal to noise ratio of at least 10, and with an accuracy and precision within ±20% of the reference concentration. The LOD was calculated as the lowest concentration producing peaks with a signal to noise ratio of at least 3 [15,16].

2.8. Data analysis

Statistical analysis was performed using IBM® SPSS® Statistics version 22. The normality of the data was evaluated, followed by a parametric paired-sample *t*-test on the normally distributed data to assess the differences in concentrations obtained with GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS. Regression analysis was performed to evaluate the correlation between both methods. A *p*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

Mean overall extraction recovery was 98.8% ($n = 3$). The calibration curve (7-point model) was linear in the range from 2 to 400 pg/mg hair. As presented in Table 1, intra- and inter-day accuracy and precision for replicated QC samples at 25 pg/mg were within the acceptance criteria of 15%.

The LOD and LLOQ obtained for the GC–NICI–MS/MS method were 0.05 pg/mg and 0.2 pg/mg hair, respectively. Thus, when compared to GC–NICI–MS (LOD = 0.5 pg/mg; LLOQ = 1.5 pg/mg), the use GC–NICI–MS/MS enables the achievement of a lower LOD and LLOQ [14]. Furthermore, the LOD and LLOQ obtained with the presented GC–NICI–MS/MS method are lower than those reported by previously published GC–NICI–MS/MS methods with LLOQs of 8.4 pg/mg [13] and 2.8 pg/mg [12]. As a consequence, and in contrast to previous publications [12,13], the current method demonstrates the higher sensitivity of MS/MS.

3.2. Application to real hair samples

Hair samples, collected from teetotalers ($n = 2$), moderate ($n = 20$) and excessive ($n = 36$) alcohol consumers, were analyzed with the developed GC–NICI–MS/MS method and the results were compared with those obtained using the GC–NICI–MS method published by Kerekes and Yegles [14] (see Table 2).

Hair EtG concentrations obtained by GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS did not differ significantly from each other (paired-sample *t*-test, $p > 0.05$). Calculation of the coefficient of variation (CV) of the obtained EtG concentrations for each sample showed that the results were similar for both methods (mean CV = 1.0%). The concentrations of EtG obtained by GC–NICI–MS/MS were highly correlated to those obtained by GC–NICI–MS ($R^2 = 0.999$, $p < 0.01$, see Fig. 1). Thus, using one method instead of the other would not change the interpretation of the EtG concentrations regarding the differentiation between teetotalers, moderate and excessive alcohol consumers.

Table 1
Accuracy and precision measured at a concentration of 25 pg/mg.

	Accuracy (bias)	Precision (CV)
Intra-day ($n = 10$)	1.7%	3.3%
Inter-day ($n = 6$)	3.6%	5.5%

Table 2
Hair EtG concentrations for different drinking behaviors obtained with GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS.

Drinking behavior	Concentration obtained by GC–NICI–MS (pg/mg hair)		Concentration obtained by GC–NICI–MS/MS (pg/mg hair)	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Teetotalers ($n = 2$)	0.9 ± 0.4	0.6–1.1	0.8 ± 0.2	0.7–1.0
Moderate drinkers ($n = 20$)	5.4 ± 4.4	1.2–19.6	5.4 ± 4.4	1.0–19.4
Excessive drinkers ($n = 36$)	193 ± 159	31.2–667	192 ± 160	30.7–674

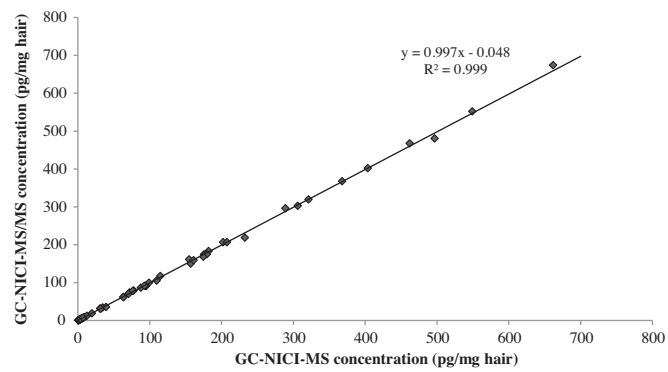


Fig. 1. Comparison of hair EtG concentrations of teetotalers, moderate and excessive alcohol consumers obtained by GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS.

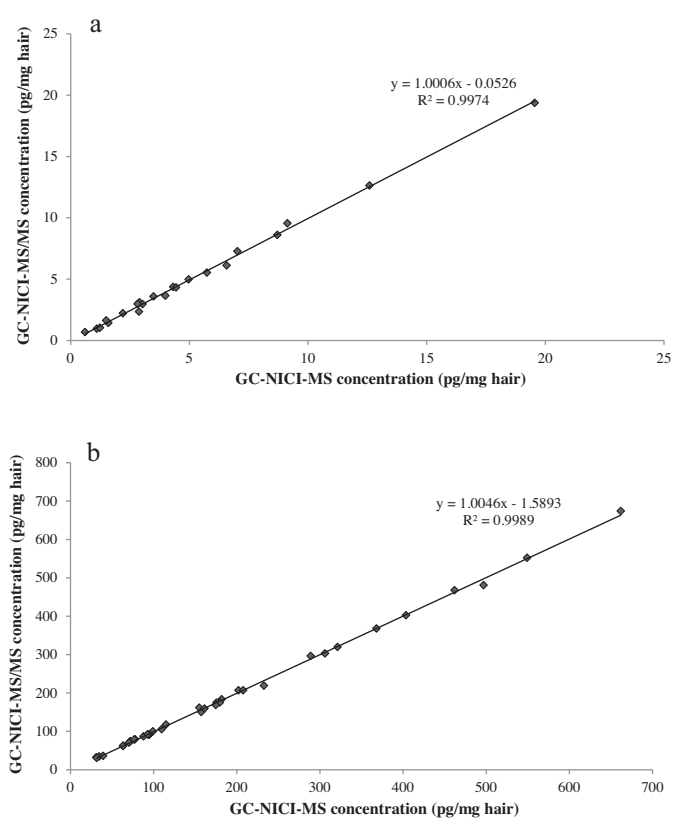


Fig. 2. Comparison of hair EtG concentrations obtained by GC–NICI–MS and GC–NICI–MS/MS. (a) Hair EtG concentrations of teetotalers and moderate alcohol consumers (concentrations < 30 pg/mg hair). (b) Hair EtG concentrations of excessive alcohol consumers (concentrations > 30 pg/mg hair).

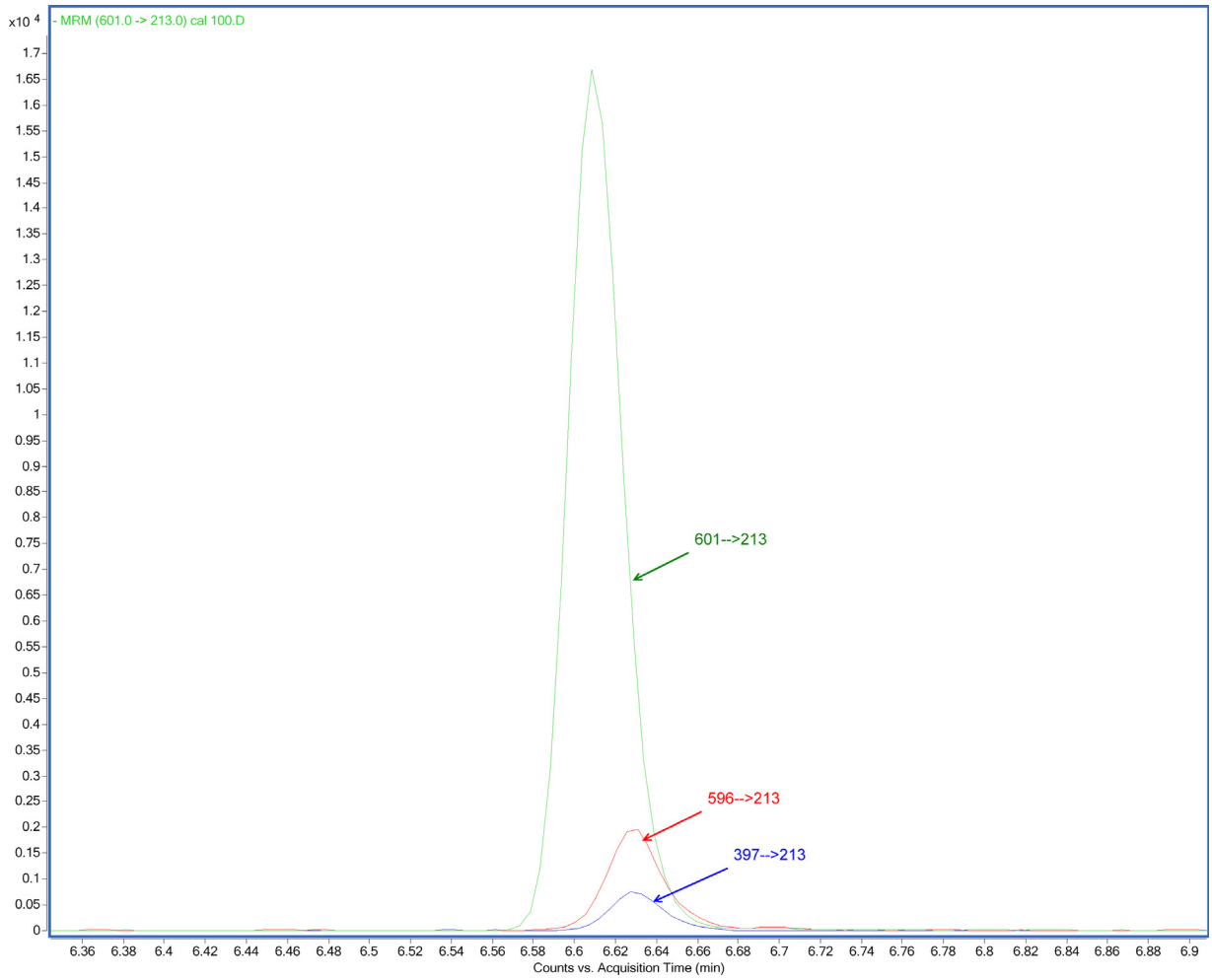


Fig. 3. Chromatogram obtained by GC–NICI–MS/MS at an EtG concentration of 4 pg/mg hair (m/z 596 → 213 (quantifier); 397 → 213 (qualifier)) and an EtG-D_5 concentration of 20 pg/mg hair (m/z 601 → 213).

The differences between both methods were larger for EtG concentrations < 30 pg/mg hair (mean CV = 1.7%; see Fig. 2a) than for EtG concentrations > 30 pg/mg hair (mean CV = 0.7%; see Fig. 2b). In contrast to GC–NICI–MS, using GC–NICI–MS/MS no decrease of sensitivity was observed at lower concentrations. These findings suggest a better selectivity of GC–NICI–MS/MS at lower concentrations.

Furthermore, a low background noise was observed using GC–NICI–MS/MS through the use of specific MRM transitions (see Fig. 3).

This higher selectivity of GC–NICI–MS/MS at lower concentrations in combination with its high sensitivity, underlines the usefulness of GC–NICI–MS/MS instead of GC–NICI–MS for the differentiation between teetotalers and moderate alcohol consumers.

4. Conclusions

A GC–NICI–MS/MS method for the determination of EtG in hair was validated, applied to hair samples, and compared to a previously published GC–NICI–MS method. Using the presented GC–NICI–MS/MS method, a better analytical selectivity and an improved signal to noise ratio were achieved, compared to earlier published methods. Therefore, this GC–NICI–MS/MS method provides sensitive and reliable results, and should preferentially be used for the determination of EtG in hair, especially when differentiating between teetotalers and moderate alcohol consumers according to the current cut-off (i.e., 7 pg/mg hair).

Acknowledgements

PhD student Delphine Cappelle is grateful to the University of Antwerp for her scholarship. Dr. Alexander van Nuijs acknowledges the Flanders Scientific Funds for Research (FWO) for his grant.

References

[1] World Health Organization, Global Status Report on Alcohol and Health, 2011 Retrieved from: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf (accessed 16.06.14).
[2] C.L. Crunelle, M. Yegles, A.L. van Nuijs, A. Covaci, M. De Doncker, K.E. Maudens, B. Sabbe, G. Dom, W.E. Lambert, P. Michielsen, H. Neels, Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: a review of the current state of the art, Drug Alcohol Depend. 134 (2014) 1–11.
[3] H. Dahl, N. Stephanson, O. Beck, A. Helander, Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide, J. Anal. Toxicol. 26 (4) (2002) 201–204.
[4] C.L. Crunelle, D. Cappelle, A. Covaci, A.L. van Nuijs, K.E. Maudens, B. Sabbe, G. Dom, P. Michielsen, M. Yegles, H. Neels, Hair ethyl glucuronide as a biomarker of alcohol consumption in alcohol-dependent patients: role of gender differences, Drug Alcohol Depend. 141 (2014) 163–166.
[5] Society of Hair Testing. Consensus on Alcohol Markers, 2011 Retrieved from: http://www.soht.org/index.php/consensus (accessed 16.06.14).
[6] G. Skopp, G. Schmitt, L. Pötsch, P. Drönner, R. Aderjan, R. Mattern, Ethyl glucuronide in human hair, Alcohol Alcohol. 35 (3) (2000) 283–285.

[7] I. Álvarez, A. Bermejo, M. Tabernero, P. Fernández, P. Cabarcos, P. López, Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography–mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 393 (4) (2009) 1345–1350.
[8] M. Yegles, A. Labarthe, V. Auwarter, S. Hartwig, H. Vater, R. Wennig, F. Pragst, Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers, Forensic Sci. Int. 145 (2–3) (2004) 167–173.
[9] I. Kerekes, M. Yegles, U. Grimm, R. Wennig, Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair, Alcohol Alcohol. 44 (1) (2009) 62–66.
[10] R. Paul, L. Tsanaclis, R. Kingston, A. Berry, A. Guwy, Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS, Drug Test. Anal. 3 (4) (2011) 201–205.
[11] Y. Shi, B. Shen, P. Xiang, H. Yan, M. Shen, Determination of ethyl glucuronide in hair samples of Chinese people by protein precipitation (PPT) and large volume injection-gas chromatography–tandem mass spectrometry (LVI-GC/MS/MS), J. Chromatogr. B 878 (30) (2010) 3161–3166.
[12] R. Agius, T. Nadulski, H.G. Kahl, J. Schrader, B. Dufaux, M. Yegles, F. Pragst, Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC–MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines, Forensic Sci. Int. 196 (1–3) (2010) 3–9.
[13] H. Kharbouche, F. Sporkert, S. Troxler, M. Augsburger, P. Mangin, C. Staub, Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology, J. Chromatogr. B 877 (23) (2009) 2337–2343.
[14] I. Kerekes, M. Yegles, Coloring, bleaching, and perming: influence on EtG content in hair, Ther. Drug Monit. 35 (4) (2013) 527–529.
[15] European Medicines Agency, Guideline on Bioanalytical Validation, Committee for medicinal products for human use, 2011 Retrieved from: www.ema.europe.eu (accessed 16.06.14).
[16] Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of health and human services, 2001 Retrieved from: www.fda.gov (accessed 16.06.14).