

Aus dem Arbeitskreis Qualitätskontrolle

Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen¹

Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyte

2. Untersuchung von Haarproben

F. Mußhoff, Bonn; H. Sachs, München; D. Thieme, München

I. Vorwort

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

Bei der Analyse von Haarproben und der Interpretation der Ergebnisse sind im Vergleich zur Analyse von anderen biologischen Matrices viele Besonderheiten zu berücksichtigen, bedingt durch uneinheitliche Einflüsse wie Heterogenität der Matrix, Stabilität von Analyten und mögliche Einflüsse der Probenvorbereitung. Daher erscheint es notwendig, dass spezielle Empfehlungen zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Haaruntersuchungen gegeben werden. Grundsätzlich ist auf die Richtlinien der Fachgesellschaft (GTFCh) sowie die DIN EN ISO/IEC 17025 (kurz: ISO 17025) hinzuweisen. In den vorliegenden Empfehlungen werden bestimmte Anforderungen bzgl. der Untersuchung von Haarproben konkretisiert.

II. Anforderungen an das Laboratorium

In Bezug auf die Anforderungen bei den Räumlichkeiten, Personal und Sicherheit wird Bezug auf die bestehenden Regelungen der GTFCh genommen. Insbesondere ist darauf zu achten, dass Stoffproben und Haarproben zum Ausschluss einer Kontamination u.a. in voneinander getrennten Laborräumen untersucht werden. Es müssen abschließbare Aufbewahrungsmöglichkeiten vorhanden sein, damit die Proben vor und nach der Untersuchung sachgerecht bei Raumtemperatur gelagert werden können.

Es müssen Geräte vorhanden sein, die eine eindeutige Identifizierung von Einzelstoffen und eine Bestimmung der Substanzkonzentration erlauben. Die eingesetzten Geräte müssen regelmäßig gewartet und in funktionstüchtigem Zustand gehalten werden. Die Betriebsanweisungen der Hersteller sind zu beachten. Die Führung von Gerätelogbüchern ist nach ISO 17025 Pflicht.

¹ Toxichem + Krimtech 65 (1): 18-24 (1998)

III. Anmerkungen zu Probennahme, Versand, Eingang, Lagerung, Analysenstrategie

Das Untersuchungslabor teilt dem Auftraggeber Art, Menge, Lagerungs- und Transportbedingungen des für die Fragestellung erforderlichen Probenmaterials mit, damit eine ordnungsgemäße Untersuchung gewährleistet ist. Die Probenentnahme für die Untersuchungen kann entweder durch das Laboratorium selbst erfolgen oder durch andere qualifizierte Institutionen. Auch hier ist eine Kontamination durch Stoffproben durch strikte räumliche Trennung auszuschließen. Da die Gewinnung einer Haarprobe nicht-invasiv erfolgt, muss sie nicht von einem Arzt vorgenommen werden.

Haarproben in einer geeigneten Menge sollten vom Hinterhauptshöcker in Form eines oder mehrerer Haarstränge gewonnen werden, die direkt an der Kopfhaut abgeschnitten werden. Die stehen gebliebene Restlänge ist zu dokumentieren; die gewonnene Haarsträhne ist mit einem Faden zu fixieren, um ein Verschieben von Segmenten zu verhindern. Der wurzelnahe (proximale) Teil ist zu bezeichnen. Für Versand und Lagerung muss eine geeignete Form gewählt werden (z.B. Alufolie in Briefumschlag). Der Auftraggeber ist auf die eindeutige und vollständige Kennzeichnung der Probe und des Untersuchungsauftrages hinzuweisen. Im Untersuchungsauftrag sollen zusätzlich Datum der Probennahme, Entnahmestelle und die gewünschte Untersuchung mit Fragestellung und Vorgeschichte angegeben werden.

Alternative Körperbehaarung (z.B. Schamhaar oder Achselhaar) kann ersatzweise oder zusätzlich gewonnen werden; bei Kontrolluntersuchungen (z.B. Fahreignung) sollten nur Kopfhare verwendet werden. Die Abnahmestellen sind genau zu bezeichnen, ansonsten ist – soweit die Haarlänge dies erlaubt – in analoger Weise zu verfahren. Die Identität des Probanden ist sicherzustellen (z.B. Fingerabdruck, Lichtbild).

Für den Transport muss das Probenmaterial sicher verpackt und dicht verschlossen sein, insbesondere hinsichtlich des Ausschlusses von Feuchtigkeit und Licht.

Vor Beginn der Untersuchung ist der Zustand der Haare (Länge, Gewicht, Zustand, Farbe etc.) festzuhalten. Die Identität der Probe und der daraus hergestellten Folgeprodukte müssen während des gesamten Untersuchungsganges durch korrekte Kennzeichnung sichergestellt sein. Eine lückenlose Dokumentation aller Zwischenprodukte und Untersuchungsgänge muss gewährleistet sein. Laborinterne Abkürzungen müssen eine eindeutige Identifikation ermöglichen. Die Probe und die daraus hergestellten Folgeprodukte müssen so gehandhabt und gelagert werden, dass keine Beeinflussung der Ergebnisse durch Kontamination oder Degradationsprozesse stattfindet. Wenn Untersuchungen nicht alsbald in Angriff genommen werden können, sind Proben bis zum Untersuchungsbeginn trocken, dunkel und bei Raumtemperatur zu lagern. Es sind Maßnahmen zu treffen, damit Unbefugte keinen Zugang zu den Proben haben und diese nicht verfälscht oder manipuliert werden können.

Zu Beginn einer Untersuchung bestimmt die Laborleiterin / der Laborleiter oder der / die Stellvertreter/in die Untersuchungsstrategie. Entsprechend der Fragestellung wird dabei insbesondere eine Segmentierung des Haarstranges festgelegt und dokumentiert. Eine unsegmentierte Rückstellprobe sollte erhalten bleiben.

IV. Spezielle Anmerkungen zur Analyse

IV.1 Dekontamination

Haarproben müssen vor der eigentlichen Analyse bzw. Probenaufbereitung auf Kontamination überprüft werden oder es muss zumindest die Möglichkeit geschaffen werden, diese Kontamination nachträglich auszuschließen oder zu bestätigen. Ein Konsens bzgl. eines optimalen Dekontaminationsverfahrens existiert nicht. Grundsätzlich ist abzuwägen, inwieweit bei Durchführung von verschiedenen Waschschrritten die Dekontamination ausreicht oder schon

eine Extraktion aus den Haaren einsetzen kann. Waschlösungen sind ggf. auf die Anwesenheit der entsprechenden Analyten zu überprüfen. Da die Behandlung mit Lösungsmitteln im Rahmen einer Dekontamination auch Einflüsse auf die Haarmatrix und somit auf die spätere Extraktionseffizienz haben kann, muss sie auch bei der Interpretation von Analysenbefunden berücksichtigt werden, insbesondere wenn quantitative Ergebnisse verglichen werden sollen.

IV.2 Haaraufschluss, Extraktion, und Clean-up

Haaraufschluss bzw. Extraktion und Clean-up können selbständig vom Labor gewählt werden. Bei der Interpretation ist aber darauf zu achten, dass unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Verfahren erwartet werden. Vergleiche quantitativer Messergebnisse mit unterschiedlichen Methoden sind daher problematisch. Beim Haaraufschluss bzw. der Extraktion von Analyten aus der Matrix Haar sind die spezifischen Stoffeigenschaften zu beachten. So ist insbesondere der Ausschluss einer Hydrolyse von relevanten Verbindungen sowie der verwendeten internen Standards bei Verwendung einer Methode darzulegen.

IV.3 Kriterien für immunologische Tests

Immunochemische Tests können lediglich als Entscheidungskriterien für die Durchführung von Bestätigungsanalysen dienen. Bei immunochemischen Vortesten ist darauf zu achten, dass es durch die Probenvorbereitung nicht zu einer Denaturierung der zu verwendenden Antikörper kommt. Kalibratoren und Kontrollen sollten mit Leerhaaren hergestellt werden. Idealerweise sollte dabei auf den jeweiligen Hauptanalyten der getesteten Substanzklasse zurückgegriffen werden. Quantitative Befunde sind nicht zu erlangen; generell sind Ergebnisse von Immunoassays nur als Vorbefunde zu verwerten und bedürfen einer Bestätigungsanalyse mit einer zweiten unabhängigen Methode. Bei einigen Substanzklassen kann für einen Vortest die Hydrolyseempfindlichkeit von Analyten ausgenutzt werden, um durch entsprechende Probenbehandlung die für Haaranalysen notwendige Sensitivität zu erlangen. Man analysiert dann sog. „Äquivalent“ bezogen auf das Hydrolyseprodukt.

IV.4 Kriterien für chromatographische Verfahren

Die Bestätigungsanalyse muss zum sicheren Nachweis der Einzelstoffe führen. In der Regel kommen dabei nur eine GC- oder eine HPLC-Methode in Verbindung mit einem massenspezifischen Detektor bzw. Tandem-MS-System in Betracht. Notwendige Identitätskriterien sind die Übereinstimmung der chromatographischen Retentionszeit (z.B. GC mit Abweichung bis zu 1 %) und eine Übereinstimmung der (Massen)Spektren.

Als Kriterium für die Auswertbarkeit eines chromatographischen Signals gilt allgemein, dass seine Peakhöhe das mittlere Grundliniensignal (Rauschen) um das Dreifache übersteigt. Regeln für die Berechnung dieses Peak-zu-Rausch-Verhältnisses sind zu spezifizieren.

Für die Bewertung der Übereinstimmung der Massenspektren von unbekannter und Referenzprobe gilt, dass eine mathematische Korrektur („Background Subtraction“) zu akzeptieren ist, jedoch im Einzelfall spezifiziert werden muss.

Die Bewertung eines Massenspektrums sollte sich im Idealfall auf den gesamten Massenbereich („full scan“) beziehen. Im Realfall werden aber nur ausgewählte Ionen untersucht („selected ion recording“) und bewertet, was das Analysenspektrum zugunsten der Sensitivität auf die ausgewählten Substanzen beschränkt.

Ansonsten gelten die in den Richtlinien der GTFCh festgelegten Kriterien zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Analysen.

V. Qualitätssicherung bei Analysen

Bei der Analyse von Haarproben sind Besonderheiten zu berücksichtigen, bedingt durch uneinheitliche Einflüsse wie Heterogenität der Matrix, Stabilität von Analyten und mögliche Einflüsse der Probenvorbereitung. Daher sind einige spezielle Empfehlungen zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Haaruntersuchungen zu beachten.

V.1 Validierung von Methoden zur Haaranalytik

In Anbetracht der Tatsache, dass Haaranalysen eher als semiquantitative Verfahren anzusehen sind, ist es vertretbar, mit aufgestockten Haarproben lediglich eine Basisvalidierung durchzuführen:

1. Linearität der Kalibration

Im Grundsatz gilt Anhang C1 der Anlagen zu den Richtlinien der GTFCh². Die Anzahl der Kalibratoren kann jedoch auf 4 und die der Wiederholbestimmungen pro Kalibrator auf 5 verringert werden.

2. Wiederholpräzision und Laborpräzision

Im Grundsatz gilt der Anhang C1 zu den Richtlinien der GTFCh². Die Anzahl der Tage kann jedoch auf 5 verringert werden. Die Präzisionsdaten können mit gängigen Softwarepaketen (z.B. Valistat^{*}) direkt aus den Messwerten berechnet werden.

3. Stabilität

Angaben über Stabilitäten und Lagerungsbedingungen sind notwendig. Das betrifft die Stabilität von Reagenzien, Standards und Proben. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit einiger speziell bei Haaranalysen charakteristischer Substanzen muss unbedingt die Stabilität der Analyten bzw. der verwendeten internen Standards bei der Probenvorbereitung überprüft werden.

V.2 Interne Qualitätskontrolle

Die interne Qualitätskontrolle umfasst die korrekte Durchführung des gesamten Arbeitsablaufs vom Auftragseingang bis zur Ergebnismitteilung. Die laborinterne Qualitätskontrolle mit Kontrollproben ist bei der Haaranalytik erschwert. Der Einbau von Substanzen in die heterogene Matrix kann durch Aufstocken einer leeren Haarprobe nicht annähernd modelliert werden. Umgekehrt stellt eine Festlegung von Extraktionsmethoden und Dekontaminationsverfahren nur ein willkürliche Konvention dar, die keinen Anspruch auf einen „wahren Wert“ beanspruchen kann. Für die interne Qualitätskontrolle ist es daher ausreichend, bei jeder Analysensequenz mit aufgestockten Proben aufzuzeigen, dass bei der Probenaufbereitung keine Degradation von Analyten stattgefunden hat und die Substanzen im Bereich der Bestimmungsgrenze trotz mitextrahierter Matrixbestandteile in einem festgelegten Retentionszeitfenster zu detektieren sind sowie die Massenfragmente in ihren Signalintensitäten in den festgelegten Bereichen übereinstimmen. Die Ergebnisse sind wie bei anderen Analyseverfahren auf Kontrollkarten zu dokumentieren.

V.3 Externe Qualitätskontrollen

Die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Ringversuche. Aufgrund der dargelegten Besonderheiten bei Haaranalysen erscheinen zur Überprüfung eines Einzellabors regelmäßige Inter-

² Toxichem + Krimtech, 71 (3): 146-154 (2004)

^{*} G. Schmitt, M. Herbold, F. Peters, Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor. ARVECON GmbH, Walldorf, Germany (2003)

laborvergleiche am sinnvollsten, bei denen unter Bezug auf Referenzmethoden die Reproduzierbarkeit objektiviert und die Abweichung des Einzellabors vom konventionellen Wert aller Laboratorien (bzw. von Referenzlaboratorien) festgestellt werden kann. Für die Gewinnung von geeignetem Ringversuchsmaterial sind in Kooperation von Ringversuchsorganisationen mit ausgewählten Laboratorien authentische Haarproben von Fällen mit positivem Befund zu sammeln. Die Haare sind auf eine Größe von ca. 3-5 mm zu zerkleinern und der gesamte Haarpool mechanisch über mehrere Stunden zu vermischen. Methodenabhängige Referenzwerte in Ringversuchsproben bzw. die Auswertung von Ringversuchen sind von den Ringversuchsorganisationen zu ermitteln (z.B. auf der Grundlage der von Referenzlaboratorien erhaltenen Messergebnisse) bzw. mit statistischen Verfahren nach anerkannten Regeln der Technik aus den Ringversuchsergebnissen abzuleiten.

VI. Spezielle Analyte

Bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen von Haarproben geht es in der Mehrzahl der Fälle um den Nachweis oder Ausschluss eines Konsums von illegalen Betäubungsmitteln. Für die gängigsten Vertreter werden im folgenden Empfehlungen zur Ausführung entsprechender Analysen gegeben. Diese Empfehlungen gelten für das wurzelnahe (proximale) Segment (< 6 cm).

VI.1 Heroin

Bei immunchemischen Vortesten sollte eine Morphin oder 6-MAM-Konzentration, die beim Bestätigungsverfahren zu einer Konzentration von 0,2 ng/mg führt, immer ein positives immunchemisches Ergebnis bei den Opiaten anzeigen. Dabei ist es unwesentlich, ob dieses Ziel durch die Summe der Kreuzreaktionen mit allen Morphinderivaten oder eine besondere Empfindlichkeit einer der Wirkstoffe zustande kommt. Es muss nur Sorge getragen werden, dass neben dem Heroinkonsum auch die regelmäßige, ausschließliche Aufnahme von Morphin und auch von Codein erkannt wird.

Zum Nachweis eines vorausgegangenen Heroin-Konsums dient bei Bestätigungsanalysen die Detektion des charakteristischen Metaboliten 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) als Leitsubstanz.

Die verwendete Bestätigungsmethode sollte mindestens so empfindlich sein, dass ein Wert von 0,2 ng/mg für die Einzelanalyten erfasst wird.

Bei der Probenaufbereitung besteht die Gefahr einer Hydrolyse von 6-MAM zu Morphin, besonders unter sauren aber auch unter alkalischen Bedingungen. Ein Hinweis darauf ist ein Metabolitenverhältnis 6-MAM/Morphin < 1,3.

VI.2 Cocain

Bei immunchemischen Vortesten sollte eine Cocain-Konzentration, die beim Bestätigungsverfahren zu einer Konzentration von 0,2 ng/mg führt, immer ein positives immunchemisches Ergebnis anzeigen. Dabei ist es unwesentlich, ob dieses Ziel durch eine besondere Empfindlichkeit gegenüber der Muttersubstanz oder die Summe der Kreuzreaktionen mit Vertretern der Substanzklasse zustande kommt (z.B. als Benzoyllecgonin-Äquivalent).

Zum Nachweis eines vorausgegangenen Cocain-Konsums dient bei Haaranalysen

1. die Detektion der Muttersubstanz (Leitsubstanz),
2. soweit die Cocainkonzentration nicht im Bereich des Cut-off-Wertes liegt die zusätzliche Detektion von Benzoyllecgonin (BE) bzw. auch Cocaethylen oder Norcocain.

Die verwendete Bestätigungsmethode sollte mindestens so empfindlich sein, dass ein Wert von 0,2 ng/mg für die Muttersubstanz und von 0,1 ng/mg für Cocainmetabolite erfasst wird.

Ein Hinweis auf eine externe Kontamination ist ein Konzentrationsverhältnis von Metabolit zu Wirkstoff von BE/Cocain < 0,05. In solchen Fällen ist auf jeden Fall die Waschflüssigkeit zu untersuchen.

VI.3 Cannabisprodukte

Bei immunchemischen Vortesten sollte eine THC-Konzentration, die beim Bestätigungsverfahren zu einer Konzentration von 0,1 ng/mg führt, immer ein positives immunchemisches Ergebnis bei den Cannabinoiden anzeigen.

Zum Nachweis einer vorausgegangenen Cannabisexposition dient bei Bestätigungsanalysen die Detektion des Hauptwirkstoffes Tetrahydrocannabinol (THC).

Ein Nachweis weiterer Cannabinoide (Cannabinol (CNB), Cannabidiol (CBD)) gilt als Plausibilitätskontrolle, beweist aber genauso wie der Nachweis von THC nicht zwingend eine Körperpassage. Zumindest bei einer diesbezüglich gegenteiligen Einlassung eines Betroffenen kann bei einem positiven THC-Befund daher die zusätzliche Bestimmung von THC-COOH in Betracht gezogen werden. Auch bei einem negativen THC-Befund und einer widersprechenden Einlassung kann diese Zusatzanalyse vorgenommen werden.

Die verwendete Methode sollte mindestens so empfindlich sein, dass THC bis zu einer Konzentration von mindestens 0,1 ng/mg nachgewiesen werden kann. Für den Nachweis von THC-COOH bedarf es einer Nachweisgrenze von bis zu 0,05 pg/mg.

VI.4 Amphetamin, Methamphetamin und synthetische Designeramphetamine (MDMA, MDEA, MDA)

Bei immunchemischen Vortesten sollte eine Amphetamin-Konzentration bzw. die Konzentration eines Vertreters aus dieser Stoffklasse (einschließlich der Designer-Amphetamine), die beim Bestätigungsverfahren zu einer Konzentration von 0,2 ng/mg führt, immer ein positives immunchemisches Ergebnis anzeigen.

Zum Nachweis oder Ausschluss eines vorausgegangenen Konsums von Amphetamin oder synthetischen Designeramphetaminen dient bei Bestätigungsanalysen die Detektion der Muttersubstanz selbst als Leitsubstanz. Die verwendete Bestätigungsmethode sollte mindestens so empfindlich sein, dass ein Wert von 0,2 ng/mg für die Einzelanalyten erfasst wird.

Referenzen

Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Toxichem + Krimtech 65(1):2-8 (1998)

Anhang A: Anforderungen an einzelne Analysenmethoden. 1. Gaschromatographie - Massenspektrometrie. Toxichem + Krimtech 67(1):13-16 (2000)

Anhang B1: Qualitätsstandards für spezielle Analyten. Toxichem + Krimtech 67(3):78-80 (2000)

Anhang B2: Qualitätsstandards für spezielle Analyten. Toxichem + Krimtech 69(1):32-34 (2002)

Anhang C1: Anforderungen an die Durchführung von Analysen. 1. Validierung. Toxichem + Krimtech 71(3): 146-154 (2004)

G. Schmitt, M. Herbold, F. Peters, Methodvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor. ARVECON GmbH, Walldorf, Germany (2003)

Inkrafttreten

Diese Anlage wurde gemäß Beschluss des Vorstandes der GTFCh vom 13.11.2004 genehmigt und in Kraft gesetzt.