

Nachweis von Doping-Substanzen im HUMANHAAR

Abb. 1: Prominentes Beispiel eines idealen Probanden für Haaranalytische Studien. Das Beispiel macht auf eine alternative Quelle für keratinhaltiges Untersuchungsmaterial aufmerksam.

Ein Beitrag von
Marc Machnik
Wilhelm Schänzer
Institut für Biochemie

G Grundlagen

Bereits 1857 wurde der Nachweis von Giftstoffen im Haar in Caspers berühmtem Buch „Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin“ erwähnt. Damals wurde an einem Leichnam eine Haarprobe entnommen, die Arsen enthielt, und die Frage diskutiert, ob dieses Metall vor Todeseintritt aufgenommen worden war. Knapp 100 Jahre später wurden die ersten organischen Verbindungen im Haar von Meerschweinchen detektiert. Durch die stetige Verbesserung der Analysemethoden (z. B. Einführung der Gaschromatographie in Verbindung mit der Massenspektrometrie, GC/MS) wurden die Voraussetzungen geschaffen für den Nachweis zahlreicher Substanzen von forensischer und toxikologischer Bedeutung.

Seit Anfang der Achtzigerjahre sind verschiedene Publikationen erschienen, die über den Nachweis von Amphetaminen und Opiaten im Haar berichten. Aus diesen Publikationen geht hervor, dass die Haaranalytik sehr empfindliche Nachweismethoden erfordert, da die Stoffe in sehr geringen Konzentrationen vorliegen können (Tabelle 1).

Der Aufbau eines Haares geschieht in der Haarwurzel, in der eine bestimmte Proteinstruktur, genannt α -Keratin, gebildet wird. Die Haarwurzel wird dazu mit den

notwendigen Bausteinen (u. a. Aminosäuren) über die Blutbahn versorgt. Dabei können fast alle Stoffe mit dem Haar in Berührung kommen, die sich im Blut befinden, also auch exogen zugeführte Substanzen. Entscheidend für den Eintritt in die Matrixzellen der Haarwurzeln und damit für die Einlagerung in den Haarschaft sind neben substanzspezifischen Eigenschaften, wie molekulare Größe, Lipophilität und Basizität, auch Faktoren, die das Milieu an der Haarwurzel betreffen, wie pH-Gradient und Konzentrations-

Substanz	Konzentration in ng/mg	Substanz	Konzentration in ng/mg
Testosteronundecanoat	bis 15	Codein	0,1 bis 3
Nandrolon	bis 5	Morphin	0,1 bis 38
Amphetamin	1 bis 13	Nikotin	0,9 bis 38
Clenbuterol*	0,005 bis 0,25	Secobarbital	21 bis 59
Kokain	0,1 bis 6	Phencyclidin	0,5 bis 2
Benzoyllecgonin	1 bis 4	Cannabinoide	0,2 bis 3

Tab. 1: Konzentrationen ausgewählter Fremdstoffe in Haaren (Literaturdaten).
*: Eigene Ergebnisse

gradient der betreffenden Substanz. Eine Schlüsselrolle beim Übergang vom Blut ins Haar kommt Melanin zu, dem Pigment, das für die Haarfarbe verantwortlich ist. Melanin scheint eine Art Carrierfunktion zu übernehmen, wobei sich die Substanz an die polyanionische Struktur von Melanin anlagert und durch die Membran transportiert wird.

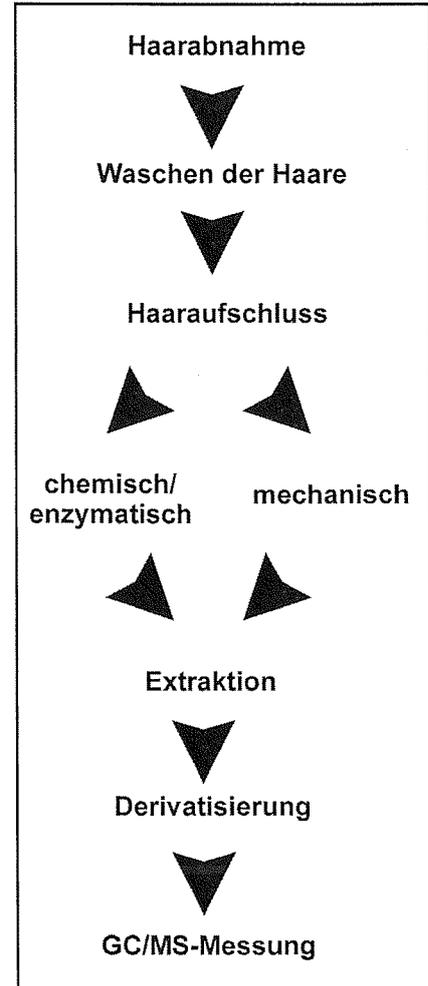
In der Proteinstruktur der Haare eingebunden sind die Stoffe vor weiterer Metabolisierung durch Enzyme geschützt und werden bis zur Analyse quasi konserviert. Dadurch erscheint der Nachweis der Substanzen über einen langen Zeitraum möglich. Untersucht man die Haare abschnittsweise, so lassen sich unter Berücksichtigung der Haarwachstumsrate innerhalb gewisser Grenzen Einblicke in die Drogenkarriere des Untersuchten gewinnen.

In der Medizin wird die Bestimmung von anorganischen Mineralien und Schwermetallen im Haar zur Diagnose von Mineralstoffmangelerscheinungen bzw. zur Erkennung erhöhter Schwermetallbelastungen genutzt.

Die oben besprochene endogene oder physiologische Aufnahme ist von der exogenen grundsätzlich zu unterscheiden. Bei der exogenen Aufnahme gelangt der Fremdstoff aus der Umgebung in das Haar. In der Regel lassen sich solche exogenen Kontaminationen durch Waschschritte mit organischen Lösungsmitteln und Detergenzien entfernen. Viele pharmakologische Substanzen werden vom Körper verstoffwechselt und gelangen als charakteristische Metabolite ins Haar. Ihr Nachweis gilt als Indiz zur Unterscheidung zwischen endogener Aufnahme und exogener Kontamination.

Haarabnahme und Probenvorbereitung

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, erfolgt die Entnahme am Hinterhauptshöcker (Occiput) direkt an der Kopfhaut. Die etwa 5 mm dicken Haarstränge werden mit Klebeband oder Bindfaden gegen Verrutschen fixiert und bis zur Analyse in Aluminiumfolie oder Glasbehältern aufbewahrt. Pro Analyse werden 25 bis 100 mg Haarmaterial benötigt. Die so erhaltene Haarprobe muss in mehreren chemischen



Substanz der Messung zugänglich zu machen, muss er aus dem Haar wieder freigesetzt, d. h. die Proteinstruktur des Haares zerstört werden. Grob unterteilt gibt es zwei Arten von Haaraufschlussverfahren:

1. chemische/enzymatische und
2. mechanische Aufschlussverfahren.

Bestimmte Chemikalien (Guandin, z. T. auch Harnstoff) haben denaturierende Wirkung auf Proteine. Durch Zugabe von Dithiothreitol werden die im α -Keratin zahlreichen Disulfidbrücken reduziert und das Protein zusätzlich destabilisiert. Eine homogene Solubilisierung (vollständige Auflösung) des Haares kann man durch starke Säuren oder Basen bei gleichzeitiger Hitzeeinwirkung erreichen. Derartige Methoden haben den Nachteil, dass sie auch den Analyt angreifen können. Als Beispiel seien hier erwähnt, die Hydrolyse von Steroidestern und die Um-

Komplizierte Bio-Fabrik

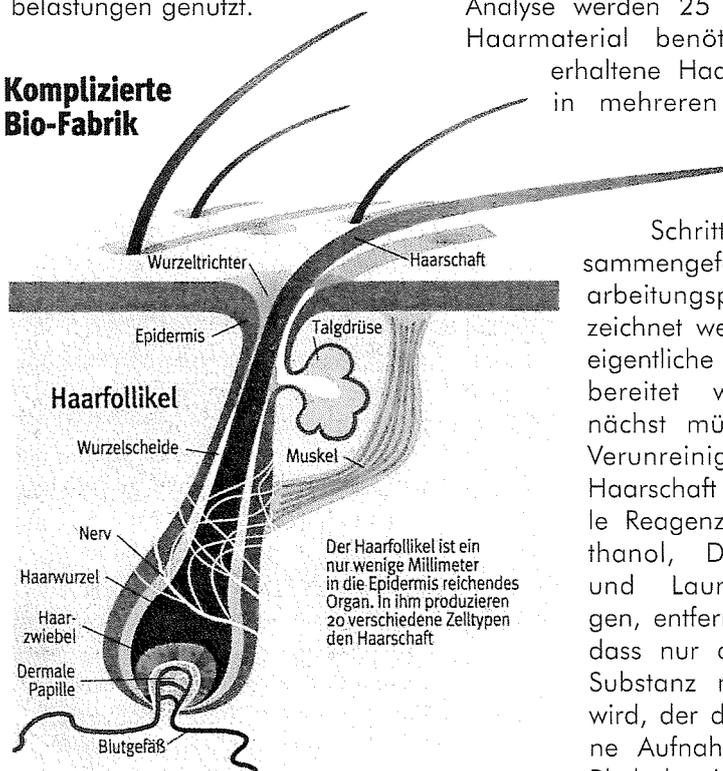


Abb. 1: Schematische Darstellung der Haarfollikelmorphologie.

Schritten, die zusammengefasst als Aufarbeitungsprozedur bezeichnet werden, für die eigentliche Messung vorbereitet werden. Zunächst müssen externe Verunreinigungen am Haarschaft durch spezielle Reagenzien, wie Methanol, Dichlormethan und Laurylsulfatlösungen, entfernt werden, so dass nur der Anteil an Substanz nachgewiesen wird, der durch endogene Aufnahme über die Blutbahn in das Innere des Haares gelangt ist. Um diesen Anteil an

wandlung von Kokain zu Benzoyl-ecgonin, einem natürlichen Metabolit von Kokain. Dadurch kann man die durch das körpereigene Enzymsystem entstandene Menge an Benzoyl-ecgonin nach Kokainkonsum nicht mehr verifizieren. Ein schonenderer Aufschluss kann durch enzymatische Verfahren erreicht werden, bei denen bestimmte Proteasen die Peptidbindungen im Proteinmolekül spalten. Auch der Einsatz von Kugelmøhlen, bei dem das Haar mechanisch pulverisiert wird, ohne den Analyten zu zerstören, hat sich bewährt.

Nach dem Aufschluss der Haare schließt sich ein Extraktionsschritt mit einem geeigneten organischen Solvens (Methanol, Ether) an, um die gesuchte Substanz aus dem Haarhydrolysat zu isolieren. Dabei soll die Extraktionsausbeute für den Analyt möglichst groß und für störende Begleitsubstanzen möglichst gering sein, so dass eine optimale Nachweisempfindlichkeit resultiert. In weiteren Aufarbeitungsschritten wird die Probe getrocknet, derivatisiert und schließlich im GC/MS-Verfahren gemessen.

Haaranalytik am Beispiel von Clenbuterol

Bei der GC/MS-Methode werden die isolierten Substanzen nach einer vorhergehenden gaschromatographischen Trennung mit Elektronen beschossen. Dabei zerfällt die Verbindung in charakteristische Molekülfragmente, die ein substanzspezifisches Massenspektrum liefern und

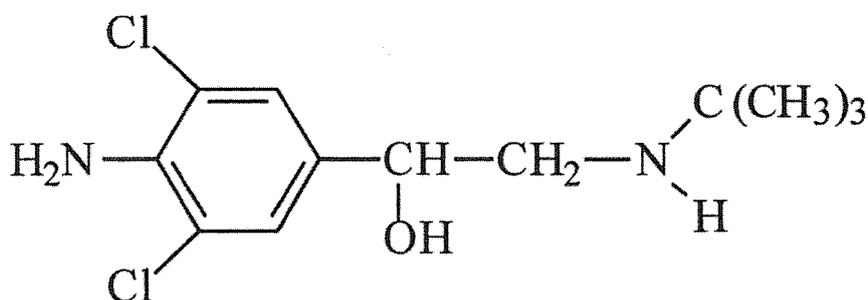


Abb. 3: Chemische Struktur von Clenbuterol.

Haaransatz	Konzentration an Clenbuterol /ng/g	Wachstumszeitraum
10 - 30 mm	0	2,5 - 7,5 Wo.
30 - 50 mm	0	7,5 - 12,5 Wo.
50 - 70 mm	u. N.	12,5 - 17,5 Wo.
70 - 90 mm	16	17,5 - 22,5 Wo.
90 - 110 mm	15	22,5 - 27,5 Wo.
110 - 130 mm	u. N.	27,5 - 32,5 Wo.
130 - 160 mm	0	32,5 - 40,0 Wo.

Haarspitzen

Abb. 4: Clenbuterolkonzentrationen in Haaren, die 6 Monate nach Beenden der Applikation genommen wurden (Zeitraum der Applikation: 19.02.'97 bis 26.03.'97, Dosierung: 3x 20 µg/d, Datum der Haarentnahme: 23.09.'97), u.N.: unter Nachweisgrenze.

so die eindeutige Identifizierung der Substanz gewährleisten. Mittels einer Weiterentwicklung dieser Methode, der hochauflösenden Massenspektrometrie, gelang 1998 in einer eigenen Studie der Nachweis von Clenbuterol im Humanhaar nach Einnahme therapeutischer Dosen. Clenbuterol gehört zur Gruppe der β₂-Agonisten und kann als synthetisches Derivat der natürlich vorkommenden Katecholamine angesehen werden.

Clenbuterol (z. B. Spiropent®) ist in der Humanmedizin als Bronchodilatator und Tokolytikum (Wehenhemmer) zugelassen. In fünf- bis zehnfach höherer als der therapeutischen Dosierung ist in Tierexperimenten eine gesteigerte Lipolyse und anabole Wirkung nachgewiesen worden. Diese Effekte haben dazu geführt, dass Clenbuterol in der Tiermast zur Erhöhung der Fleischproduktion verbottenerweise eingesetzt wurde.

Im Humanbereich wird durch den Missbrauch von Clenbuterol versucht, die Muskelmasse zu steigern und gleichzeitig den Fettanteil zu minimieren. Daher wird Clenbuterol von Athleten in kraftbetonten Disziplinen, wie Bodybuilding, Leichtathletik und Gewichtheben, verwendet. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von Clenbuterol im Körper ist der Nachweis im Urin nur kurze Zeit möglich (24 Stunden bis wenige Tage). Die von uns entwickelte Methode zum Nachweis von Clenbuterol im Humanhaar ist geeignet, die Substanz über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten nachzuweisen, wie in Abbildung 4 zu erkennen ist.

Die Daten stammen aus einer Studie, in der Clenbuterol als Tokolytikum eingesetzt wurde. Haarbündel wurden 5 bis 10 mm von der Kopfhaut entfernt über die gesamte Länge genommen und abschnittsweise (20-mm-Abschnitte) untersucht. Bei Annahme eines wöchentlichen Haarlängenwachstums von durchschnittlich 4 mm lag das Ende der Applikation zum Zeitpunkt der Haarabnahme mindestens 17,5 Wochen zurück, und die Therapie erstreckte sich über einen Zeitraum von höchstens zehn Wochen. Diese Berechnungen stimmen annähernd mit den tatsächlichen Therapiedaten überein. Um eine feinere Zeitauflösung zu erhalten, muss die Länge der zu untersuchen

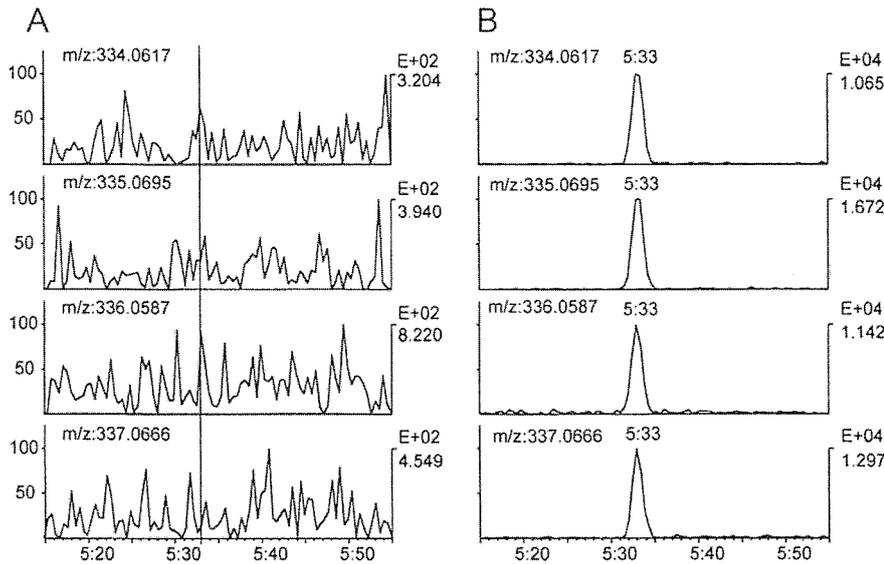


Abb. 5: Clenbuterol-charakteristische Ionenspuren (Selected Ion Monitoring) nach Analyse von Haarmaterial. 4A: Leerwertprobe zu Beginn der Clenbuterol-Therapie, 4B: Clenbuterol-positive Probe 2 Monate nach Beendigung der Therapie.

chenden Haarsegmente entsprechend verkürzt werden.

In Abb. 5B ist ein sogenanntes „Selected Ion Monitoring-Chromatogramm“ gezeigt, das nach Analyse einer Haarprobe registriert wurde, die zwei Monate nach Beendigung der Clenbuteroltherapie (Dauer der Therapie 35 Tage) gewonnen wurde. Das Chromatogramm enthält vier charakteristische Ionenspuren zur Retentionszeit von Clenbuterol. Die Signalintensitäten entsprechen einer Konzentration von ca. 90 ng Clenbuterol pro g Haar. Zum Vergleich ist in Abb. 5A eine Leerwerthaarprobe derselben Probandin, die jedoch vor der Therapie genommen wurde, gezeigt.

Ausblick

Die Haaranalyse liefert in erster Linie ergänzende Informationen zur Urinanalyse und kann einen Beitrag

zur Interpretation von auffälligen Urinproben leisten. Durch die abschnittsweise Untersuchung von Haarmaterial lassen sich unter Berücksichtigung der individuellen Haarwachstumsraten Zeitraum und Dauer der Applikation rekonstruieren. Mit Hilfe einer Haaruntersuchung besteht die Möglichkeit, zwischen chronischem Abusus, der nötig ist, um anabole Effekte zu erzielen, und einmaliger medizinisch indizierter Applikation zu unterscheiden, da die einmalige Einnahme eines Medikaments nicht zu einer signifikanten Akkumulation im Haar führt. Ergebnisse aus Haaruntersuchungen könnten zukünftig zur Klärung der Frage beitragen, ob ein positiver Urinbefund durch unbeabsichtigte Aufnahme einer verbotenen Substanz, z. B. durch kontaminierte Nahrungsmittel, oder durch vorsätzliche wiederholte Einnahme von Dopingmitteln zustande gekommen ist.

mittel, oder durch vorsätzliche wiederholte Einnahme von Dopingmitteln zustande gekommen ist.

Die Analyse von Haaren lässt in bestimmten Fällen auch Rückschlüsse auf die applizierte Ausgangsverbindung zu. So ist im Gegensatz zur Urinanalyse die Einnahme von Steroidestern im Haar nachweisbar. Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Melanin-abhängigen Substanzkonzentration, was bedeutet, dass der Nachweis einer Substanz bei dunkelhaarigen Athleten länger geführt werden kann als bei hellhaarigen. Einfluss auf das Ergebnis einer Haaranalyse können bestimmte Behandlungsmethoden der Haare haben, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Unter Beachtung der physiko-chemischen Eigenschaften einer Substanz, die ihre Einlagerung ins Haar begünstigen, wird die Haaranalyse dennoch in Zukunft auch für andere phar-

Dr. Marc Machnik, geb. 1968 in Grevenbroich, studierte Chemieingenieurwesen mit Fachrichtung Biotechnologie an der FH Aachen. Im Februar letzten Jahres promovierte er an der Deutschen Sporthochschule Köln in den Fächern Biochemie und Trainings- und Bewegungslehre. Seit März 2000 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie.
e-mail: marc@biochem.dshs-koeln.de



Prof. Dr. Wilhelm Schänzer, geb. 1951 in Spellen, studierte Chemie an der Universität zu Köln und Sportwissenschaft an der Deutschen Sporthochschule. 1984 promovierte er an der Deutschen Sporthochschule in den Fächern Biochemie und Physiologie (bei Prof. M. Donike) und schloss 1995 seine Habilitation mit dem Arbeitsschwerpunkt „Identifizierung und Synthese von Anabolikametaboliten“ ab. Seit 1997 ist er Leiter des Instituts für Biochemie an der Deutschen Sporthochschule Köln.

- Glatze, extreme Kurzhaarschnitte
- Perücke
- Haarbleichung bzw. -färbung
- Häufige Dauerwellenbehandlung
- Evt. „Wash-out-Effekt“ durch häufige Haarwäsche mit starken Detergenzien
- Unvollständiger Haaraufschluss

Tab. 2: Zusammenfassung der Manipulationsmöglichkeiten bei Haaranalysen.