

Bestimmung von Gamma-Hydroxybuttersäure und Gamma-Hydroxybuttersäure-Metaboliten im Haar und deren forensische Bedeutung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

im Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

durchgeführt im

Institut für Rechtsmedizin Gießen

Abteilung Forensische Toxikologie

vorgelegt von

Annika Johanna Nebel (M. Sc. Chemie)

aus Marburg

2022

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Hamscher
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. Dettmeyer
Institut für Rechtsmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Kurzzusammenfassung

Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) steht aufgrund ihres endogenen Vorkommens im menschlichen Körper und zugleich sedierender Eigenschaften bei gewollter oder ungewollter Aufnahme seit langem im Fokus wissenschaftlicher Forschungsarbeiten. Die Abgrenzung zwischen möglichen endogenen GHB-Konzentrationen und denjenigen, die nach (einmaliger) Aufnahme von GHB im Haar nachweisbar wären, ist dabei von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden Extraktionsverfahren und analytische LC-MS/MS-Methoden für den Nachweis von GHB und den GHB-Metaboliten Glycolsäure, 2,4-Dihydroxybuttersäure (2,4-DHB), 3,4-Dihydroxybuttersäure (3,4-DHB) und GHB-4-Sulfat (GHB-Sulf) aus der Matrix Haar entwickelt. Nach der Validierung der Methoden wurden Haarproben von Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme vermessen, um für jede Substanz einen endogenen Referenzbereich zu definieren. Anschließend wurden Proben von Personen nach einmaliger oder regelmäßiger Aufnahme von GHB untersucht.

Die GHB-Konzentrationen von 928 Haarproben von Personen ohne GHB-Aufnahme lagen dabei zwischen $< 0,1$ und $6,3$ ng/mg. Lediglich 29 Proben enthielten Konzentrationen über $3,0$ ng/mg. Im Gegensatz dazu ergaben zwischen zwei und acht Jahre gelagerte Haarproben signifikant höhere GHB-Konzentrationen von $1,5$ bis 130 ng/mg. Dabei lagen die Konzentrationen von 48 der 52 vermessenen Segmente oberhalb von $3,0$ ng/mg. Die Lagerung scheint einen größeren Einfluss auf die GHB-Konzentrationen im Haar zu haben als die aufgenommene Menge GHB. So lagen von 136 untersuchten Haarsegmenten nach täglicher Aufnahme von 3 bis 9 g GHB nur 25 der bestimmten Konzentrationen oberhalb von $3,0$ ng/mg und nur drei Konzentrationen lagen außerhalb des zuvor ermittelten endogenen Referenzbereichs. Es konnte nur ein sehr schwacher Zusammenhang zwischen eingenommener GHB-Menge und der ermittelten GHB-Konzentration im Haar festgestellt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch in den Haarproben nach einmaliger Aufnahme von GHB kein Anstieg der GHB-Konzentration beobachtet werden. Alle Konzentrationen lagen im unteren Bereich des zuvor ermittelten endogenen Referenzbereichs.

Für die vier untersuchten GHB-Metaboliten konnten folgende endogene Referenzbereiche (mit Ausreißern) ermittelt werden: Glycolsäure $0,39 - 11$ (24) ng/mg, GHB-Sulf $< 0,40 - 1,7$ (12) ng/mg, 3,4-DHB $< 0,10 - 0,63$ (4,7) ng/mg und 2,4-DHB $< 0,20 - 0,45$ (0,65) ng/mg. Im Gegensatz zu den ermittelten GHB-Konzentrationen in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme, konnte in jeder Haarsträhne im Durchschnitt mindestens ein Metabolit als erhöht, also oberhalb des endogenen Referenzbereichs, nachgewiesen werden. In vier der elf Haarsträhnen lagen sogar alle vier Metaboliten oberhalb des jeweiligen endogenen Referenzbereichs. Jedoch konnte auch hier kein statistisch signifikanter

Zusammenhang zwischen eingenommener GHB-Dosis und den gemessenen Konzentrationen ermittelt werden. Die nach einmaliger Aufnahme von GHB untersuchten Haarsegmente enthielten zum Teil ebenfalls erhöhte Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten. Bei den Segmenten handelte es sich jedoch nicht in jedem Fall um die Segmente, die bei einem Haarwachstum von 1 cm/Monat erwartungsgemäß die erhöhten Konzentrationen aufweisen müssten.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die externe Zufuhr von GHB nicht grundsätzlich zu einer erhöhten GHB-Konzentration im Haar führt. Die alleinige Bestimmung der GHB-Konzentration im Haar vermag daher vermutlich nicht eine eindeutige Entscheidung bei der Frage einer möglichen Aufnahme von GHB zu liefern. Folglich ist mit den hier entwickelten Verfahren eine rechtssichere Analytik auch in Zukunft nicht möglich. In Kombination mit einem Nachweis einer oder mehrerer erhöhter Metaboliten-Konzentrationen scheint eine bessere Einschätzung möglich.

Abstract

Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) has been subject of scientific research due to its endogenous occurrence in humans and at the same time sedating effect after exogenous uptake, whether intentional or not. Of particular interest in this context is the distinction between possible endogenous GHB-concentrations and those that were in hair after a (single) exogenous uptake.

In the present study, methods of extraction and quantification by LC-MS/MS for GHB and its metabolites glycolic acid, 2,4-dihydroxybutanoic acid (2,4-DHB), 3,4-dihydroxybutanoic acid (3,4-DHB) and 4-(sulfoxy)butanoic acid (GHB-sulf) were established. After validation of those methods, hair samples of persons without known exogenous GHB uptake were analysed to define an endogenous reference range for each substance. Subsequently hair samples were analysed after single or regular uptake of GHB.

GHB-concentrations of 928 hair samples from persons without known uptake of GHB were between < 0.1 and 6.3 ng/mg. Only 29 samples showed concentrations higher than 3.0 ng/mg. Interestingly, hair samples that were stored for two to eight years showed significantly higher GHB-concentrations between 1.5 and 130 ng/mg, with 48 of 52 analysed segments showing concentrations above 3.0 ng/mg. Thus, storing seems to have a greater effect on the observed GHB-concentration than the quantity of GHB taken. In accordance with that, of 136 analysed hair samples of persons with a daily uptake of 3 to 9 g GHB, only 25 of the measured concentrations were above 3.0 ng/mg and only three outside of the prior defined endogenous reference range. The association between the quantity of exogenous GHB-uptake and the observed GHB-concentration in hair was found to be very weak. In agreement with those results, no raise in GHB-concentration was observed in hair samples after a single uptake of GHB. All concentrations were in the lower range of the prior defined endogenous reference range.

Regarding the four analysed GHB-metabolites, the following endogenous reference ranges (including outliers) were defined: glycolic acid $0.39 - 11$ (24) ng/mg, GHB-sulf $< 0.40 - 1.7$ (12) ng/mg, 3,4-DHB $< 0.10 - 0.63$ (4.7) ng/mg and 2,4-DHB $< 0.20 - 0.45$ (0.65) ng/mg. In hair samples from persons with regular uptake of GHB, at least one metabolite was found to be elevated (i.e., above the prior defined endogenous reference range) in the average of each hair strand, in contrast to the observed GHB-concentrations. In four of eleven hair strands even all four metabolites were above their endogenous reference range. Nevertheless, no statistically significant association between the quantity of GHB-uptake and the observed concentration in hair was found. Hair strands examined after a single GHB-uptake partially showed elevated concentrations of GHB-metabolites. The elevated segments, however, were

not in each case those one would expect assuming the average hair growth rate of 1 cm/month.

In the present study, it was shown that the exogenous uptake of GHB does not necessarily result in an elevated GHB-concentration in hair. Thus, the sole quantification of GHB will most likely not allow a clear decision whether or not GHB has been taken up exogenously. Thus, the here developed analytical methods do not yield legal certainty. However, in combination with the detection of one or more elevated GHB-metabolite concentrations, a better evaluation of this issue seems possible.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
1 Einleitung	1
1.1 Gamma-Hydroxybuttersäure – vom Medikament zur Droge	1
1.2 (Bio-) Synthese	3
1.2.1 Biosynthese	3
1.2.2 Industrielle Synthese	3
1.2.3 Illegale Herstellung	5
1.3 Pharmakologie	5
1.3.1 Pharmakodynamik	6
1.3.2 Pharmakokinetik	8
1.3.3 Endogene Konzentrationen	9
1.4 Metabolismus	10
1.5 Medizinische Relevanz	12
1.6 Toxikologische und forensische Relevanz	13
1.6.1 Diagnostik	14
1.6.2 Entwicklung der GHB-Analytik	15
1.7 Haaranalytik	17
1.7.1 Aufbau der Haare (Anatomie, Physiologie, Wachstumszyklen)	17
1.7.2 Einlagerung von Drogen und Medikamenten	19
1.7.3 Einflussfaktoren (Haarkosmetik, Alterung und Lagerung der Haarproben)	21
1.7.4 Bedeutung der Haaranalytik in der Forensik	22
1.8 Haaranalytik von GHB und Interpretation der Befunde	24
1.8.1 Grundlagen der Einlagerung von GHB in das Haar und deren Extraktion	24
1.8.2 Entwicklung der Haaranalytik	26
1.8.3 Endogene GHB-Konzentration in Haaren	30
1.9 Grundlagen der verwendeten Analytik	30
1.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	31
1.9.2 Massenspektrometrie	32
2 Motivation und Aufgabenstellung	34
3 Materialien und Methoden	36
3.1 Chemikalien und Reagenzien	36
3.2 Probengewinnung	36
3.3 Statistik	39

3.4 GHB-Analytik	39
3.4.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB in Haaren	39
3.4.2 Methodvalidierung	42
3.4.3 Messungen zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren.....	47
3.4.4 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB	47
3.4.5 Methodenvergleich zweier Aufarbeitungsmethoden.....	49
3.4.6 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB	50
3.5 GHB-Metaboliten-Analytik.....	50
3.5.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB-Sulf, Glycolsäure, 2,4-Dihydroxybuttersäure und 3,4-Dihydroxybuttersäure in Haaren.....	50
3.5.2 Methodvalidierung	54
3.5.3 Messungen zu endogenen GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren	57
3.5.4 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB.....	57
3.5.5 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB.....	58
4 Ergebnisse	60
4.1 GHB-Analytik	60
4.1.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB in Haaren	60
4.1.2 Methodvalidierung	61
4.1.3 Messungen zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren.....	65
4.1.4 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB	71
4.1.5 Methodenvergleich	74
4.1.6 Messungen zu GHB-Konzentrationen nach Einmalgabe von GHB	76
4.2 GHB-Metaboliten-Analytik.....	77
4.2.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB- Metaboliten in Haaren	77
4.2.2 Methodvalidierung	79
4.2.3 Messungen zu endogenen GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren	85

4.2.4 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB	90
4.2.5 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB	96
5 Diskussion	101
5.1 GHB-Analytik	101
5.1.1 Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB in Haaren.....	101
5.1.2 Messungen zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren.....	103
5.1.3 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB	107
5.1.4 Methodenvergleich	113
5.1.5 Messungen zu GHB-Konzentrationen nach Einmalgabe von GHB	114
5.2 GHB-Metaboliten-Analytik.....	117
5.2.1 Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB-Metaboliten in Haaren.....	118
5.2.2 Messungen zu endogenen GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren	118
5.2.3 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB	122
5.2.4 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB.....	129
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	132
7 Literaturverzeichnis	136
8 Anhang	151
Tabellen A1 bis A7	151
Abkürzungsverzeichnis	161
Abbildungsverzeichnis	165
Tabellenverzeichnis.....	168
Eidesstattliche Erklärung.....	170
Danksagung.....	171
Veröffentlichungen	173

1 Einleitung

1.1 Gamma-Hydroxybuttersäure – vom Medikament zur Droge

Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) ist eine endogen im Körper vorkommende Substanz, die darüber hinaus seit Jahren im Spannungsfeld zwischen medizinischer Nutzung und illegalem Gebrauch als Droge existiert. 1874 wurde GHB vom Chemiker *Alexander Saytzev* erstmals im Rahmen seiner Grundlagenforschung zu Fettsäuren aus Succinylchlorid synthetisiert.^[1] Als Reinstoff liegt GHB bei Raumtemperatur als ein farbloses Pulver mit einem leicht salzigen Geschmack vor. Physiologisch betrachtet ist GHB eine endogene kurzkettige Fettsäure und ein natürliches Analogon zum wichtigen Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA), der 1950 im zentralen Nervensystem entdeckt wurde.^[2–5] Man geht heute davon aus, dass GHB im menschlichen Körper aus GABA gebildet wird. Dabei wird GABA durch Transaminierung zum Succinat-Semialdehyd umgewandelt und anschließend zu GHB reduziert.^[6] GHB kommt unter anderem im zentralen Nervensystem (Hippocampus, Hypothalamus und Cerebellum) vor,^[7] dort wurde sie 1963 entdeckt.^[8] Seit den 1960er Jahren befasst sich die Forschung intensiv mit der Substanz GHB und ihren Eigenschaften. Auf der Suche nach einem GABA Analogon, welches die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, erforschte *Laborit* 1964 das Natriumsalz der GHB, Natrium 4-Hydroxybutyrat.^[9] Die damals durchgeführten Versuche ließen erahnen, welches Potential GHB für die Medizin haben könnte. In den folgenden Jahren wurden diese Anwendungsgebiete weiter erforscht. Dabei wurde zu Beginn vor allem aufgrund der sedierenden Eigenschaft, ohne das Herz-Kreislauf-System zu destabilisieren, eine Verwendung als Anästhetikum bei Kindern erprobt.^[9–11] Die häufig beobachteten Nebenwirkungen, wie Erbrechen und mehr oder weniger starke epileptische Anfälle, führten jedoch dazu, dass diese Anwendung wieder an Bedeutung verlor.^[12–14] Seit 1970 wird GHB jedoch, ebenfalls dank seiner sedierenden Wirkung und der damit verbundenen Linderung von Krankheitssymptomen, erfolgreich zur Behandlung von Narkolepsie eingesetzt.^[15,16] Im gleichen Jahrzehnt wurde propagiert, dass GHB das Potential besäße, die Wirkung von Steroiden und die Freisetzung von Wachstumshormonen zu steigern. Dies führte dazu, dass die Substanz von Bodybuildern zur Unterstützung beim Muskelaufbau eingenommen wurde, obwohl diese Wirkung wissenschaftlich nicht bestätigt werden konnte.^[17–20]

In jüngerer Vergangenheit wurde GHB ähnlich den Benzodiazepinen im Alkoholentzug eingesetzt, nachdem beobachtet wurde, dass die Verabreichung der Vorläufersubstanz Gamma-Butyrolacton (GBL) das Verlangen nach Alkohol reduziert.^[21–23] Außerdem wurde GHB in Verbindung mit dem Opiatentzug,^[24] der Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie^[7] und zur Gewichtskontrolle^[25] eingesetzt. Alle Anwendungen hatten trotz des zunächst vermuteten Potentials nur mäßigen Erfolg. Eine Ausnahme bleibt die erfolgreiche medizinische Anwendung zur Behandlung von Narkolepsie.^[26,27]

Während immer weiter an der medizinischen Nutzung von GHB geforscht wurde, gelangte die Substanz mehr und mehr in den Fokus des Gebrauchs als Droge und wurde, neben illegalen Anwendungen als muskelmassensteigerndes, gewichtsreduzierendes oder schlafinduzierendes Hilfsmittel, immer mehr zur Freizeitdroge. Das hohe Missbrauchspotential als Party- oder Freizeitdroge beruht auf der euphorisierenden und enthemmenden Wirkung von GHB. Zum ersten Mal bekannt wurde der illegale Gebrauch zum Zwecke der Euphorisierung 1990 in den USA. Dabei kam es zu mehreren Berichten über epileptische Anfälle und Bewusstlosigkeit im Zusammenhang mit einer gewünschten berauschenden Wirkung von GHB.^[25,28] Seitdem ist der Gebrauch als Freizeitdroge erheblich angestiegen und die Droge GHB wird auf sogenannten *rave* Partys zum Beispiel unter den Namen *Liquid Ecstasy*, *Liquid*, *Liquid E*, *Liquid X*, *Fantasy*, *Gamma*, *Soap*, *Georgia Home Boy*, *Scoop*, *Cherry Meth*, *Blue Nitro* oder einfach *G* beworben und angeboten.^[25] Seit 2000 ist GHB daher in den USA eine durch die *Drug Enforcement Administration* (DEA) kontrollierte Substanz der Anlage I (Substanzen ohne genehmigten medizinischen Nutzen und hohem Missbrauchspotential) und damit gleichgesetzt mit anderen "harten" Drogen wie LSD, Ecstasy oder Heroin. Als durch die *Food and Drug Administration* (FDA) genehmigte Substanz finden GHB-haltige Präparate, wie zum Beispiel *Xyrem*[®], allerdings auch in den USA als Substanz der Anlage III medizinischen Nutzen.^[29] In Deutschland unterliegt die Substanz seit 2002 ebenfalls dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG) nach Anlage III und gehört somit zu den verkehrsfähigen und verschreibungsfähigen Stoffen. Je nach Dosis können bei GHB sehr unterschiedliche Effekte eintreten. So wurde GHB trotz der Regulierung durch das BtMG aufgrund ihrer einfachen Darreichungsform und des bei hohen Dosierungen schnell eintretenden sedierenden Effekts, als sogenannte *Knock-out*-Tropfen (K.o.-Tropfen) zu einer der bekanntesten Substanzen in Zusammenhang mit Sexualdelikten.^[30,31] Diese Assoziation scheint jedoch zunächst irreführend, wenn man die im Zusammenhang mit Sexualstraftaten nachgewiesenen Substanzen genauer betrachtet.^[32] So hat eine Studie von *Anderson et al.* 2017, die Studienergebnisse aus Nordamerika, Kanada, Australien, England und Frankreich zusammenfasst, gezeigt, dass nur in maximal 3 % der erfassten Fälle GHB nachgewiesen werden konnte.^[33] Auch andere Studien aus den Jahren 1999 bis 2001 aus den USA kamen zu dem Ergebnis, dass lediglich 3 % bis 4,4 % der Sexualdelikte nachweisbar im Zusammenhang mit GHB standen.^[31,32,34] Aufgrund der kurzen Nachweisbarkeitsdauer der Substanz ist jedoch von einer hohen Dunkelziffer in Studien dieser Art auszugehen, da Substanzen mit sehr kurzer Halbwertszeit, wie GHB, mit denen einer deutlich längeren Halbwertszeit verglichen werden.

1.2 (Bio-) Synthese

1.2.1 Biosynthese

GHB, auch 4-Hydroxybuttersäure ist eine Hydroxycarbonsäure, die im menschlichen zentralen Nervensystem, im Blut, im Urin und im Gewebe sowie in vielen weiteren Organen aber auch in anderen Organismen und in Früchten oder Wein in kleinen Mengen vorkommt.^[35]

Bessman et al. postulierten 1963 GHB als Metaboliten im Gehirn, der aus GABA durch Transaminierung entsteht und konnten im gleichen Zuge auch dessen Existenz im Gehirn von Ratten, Tauben und auch Menschen nachweisen.^[8]

Die Biosynthese (Abbildung 1) verläuft dabei zunächst über die Decarboxylierung von Glutaminsäure mittels Glutamat-Decarboxylase (GAD) zur GABA^[4,5] und anschließend über die Umsetzung der Aminosäure durch die GABA-Transaminase (GABA-T) zum Succinat-Semialdehyd (SSA). Durch Reduktion über das Enzym Succinat-Semialdehyd-Reduktase (SSAR) wird schließlich GHB synthetisiert.^[35,36] Dabei fungieren NADPH und NADH als Cofaktoren.^[37]

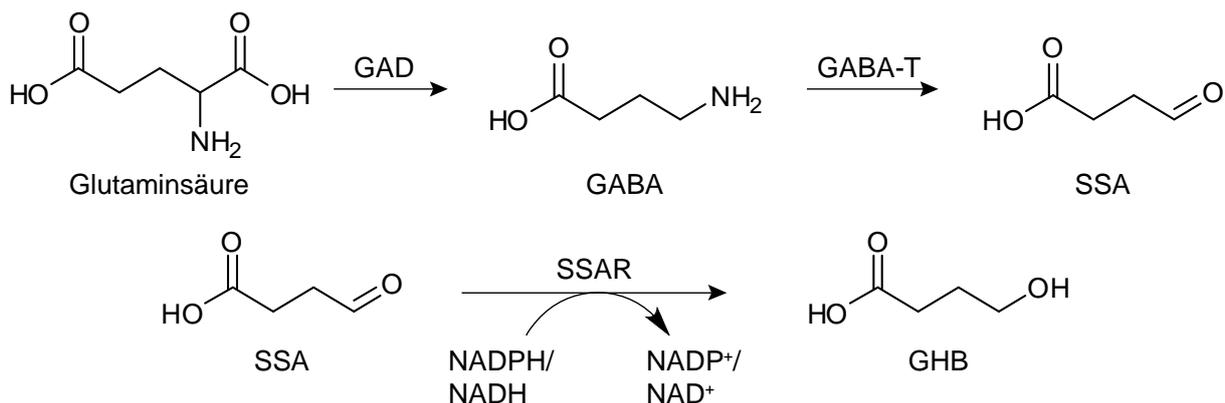


Abbildung 1: Der Biosyntheseweg von GHB ausgehend von Glutaminsäure.

1.2.2 Industrielle Synthese

Kommerziell ist GHB vor allem in Form von Natrium- oder Kaliumsalzen erhältlich, die wasser- und alkohollöslich sind. Die Salze sind farblos und geruchsneutral mit einem leicht salzigen Geschmack. Das erste Mal synthetisch hergestellt und dokumentiert wurde GHB von *Alexander Saytsew* 1874.^[1] Damals gelang ihm über die reduktive Zyklisierung von Succinylchlorid mit Natriumamalgam die Synthese von GBL. Das wiederum hydrolysiert mit Barium- und Natriumhydroxid zu einem der GHB-Salze. Der Syntheseweg ist in Abbildung 2 dargestellt.

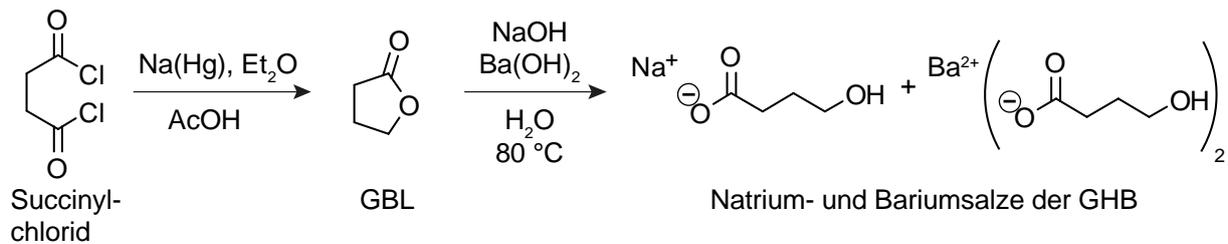


Abbildung 2: Die GHB-Synthese über GBL von *Alexander Saytsew*.

Das unter dem Namen *Xyrem*[®] medizinisch genutzte Natriumsalz von GHB wird heute meist noch auf einem sehr ähnlichen Weg hergestellt. Für die großtechnische Synthese hat es sich etabliert, die Herstellung von GBL und dessen Umwandlung zu GHB in zwei Prozesse zu trennen. Dabei wird GHB durch hydrolytische Spaltung der Esterbindung aus GBL gewonnen. In Ethanol oder Wasser wird unter Wärmezufuhr mittels einer Base, meist Natriumhydroxid, die Esterbindung des Laktons in eine Hydroxycarbonsäure gespalten. Die von *Jazz Pharmaceuticals* und weiteren Unternehmen patentierte Synthese von GHB-Salzen ist in *Abbildung 3* gezeigt.^[38,39]

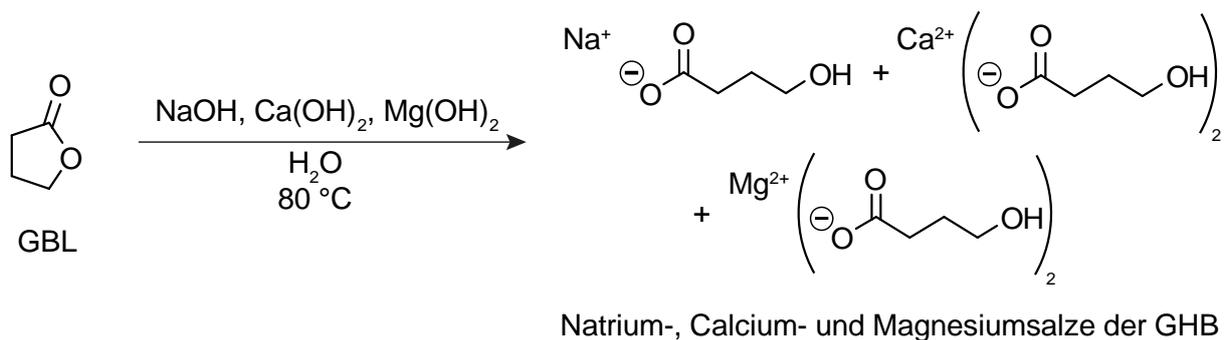


Abbildung 3: Patentierte Synthesen der GHB-Salze ausgehend von GBL.

Die Ausgangssubstanz dieser Synthese, GBL, wird beispielsweise bei der BASF industriell in einem separaten Verfahren hergestellt, indem Kohlenstoffmonoxid und Acetylen mittels eines Rhodium-Katalysators unter hohem Druck zyklisiert werden, wie in *Abbildung 4* dargestellt.^[40]

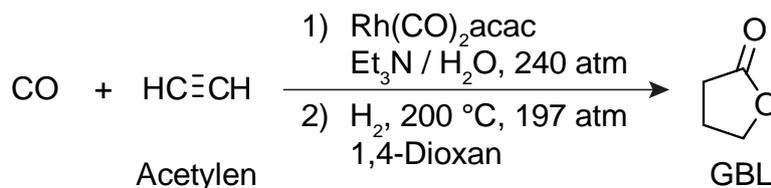


Abbildung 4: Industrielle Synthese der Vorläufersubstanz GBL.

1.2.3 Illegale Herstellung

Im Internet ist eine Vielzahl an detaillierten Vorschriften für die GHB-Herstellung in der eigenen Küche zu finden. Dabei geht man, wenn möglich, wie in der kommerziellen Synthese, von der verhältnismäßig einfach zu beschaffenden Vorläufersubstanz GBL aus. GBL ist zum Beispiel in Reinigungs- und Lösungsmitteln enthalten und unterliegt nicht dem BtMG. Da die Umsetzung von GBL zu GHB keine besonders aufwendigen Bedingungen erfordert, ist für die Reaktion zum Beispiel lediglich ein Topf, destilliertes Wasser und etwas Natriumhydroxid nötig.^[41] Eine Fülle an weiteren Synthesewegen findet man zum Beispiel auf der heute nur noch archiviert erreichbaren Seite des ehemaligen Forums *The Hive*.^[42]

GBL zählt seit kurzer Zeit in einigen Ländern ebenfalls zu den kontrollierten Substanzen mit hohem Missbrauchspotential. In diesem Fall ist für die illegale Herstellung von GHB zunächst die Herstellung von GBL nötig. Die industriell genutzte Syntheseroute ist für die meisten Untergrundlabore ungeeignet, da hierfür einerseits ein sehr hoher Druck während der Reaktion nötig ist und andererseits der verwendete Rhodium-Katalysator schwierig zu beschaffen ist. Eine einfache GHB-Syntheseroute führt dann über die Herstellung von GBL mittels der Oxidation von Tetrahydrofuran (THF) mit Calciumhypochlorid und anschließender Hydrolyse zu GHB beziehungsweise Salzen der GHB.^[43] Als Oxidationsmittel können auch eine Vielzahl verschiedener Peroxide und Übergangsmetallkomplexe eingesetzt werden.^[44] Die gute Verfügbarkeit der Syntheseeedukte macht diese Route wesentlich unauffälliger, da weniger Regularien zu beachten sind.

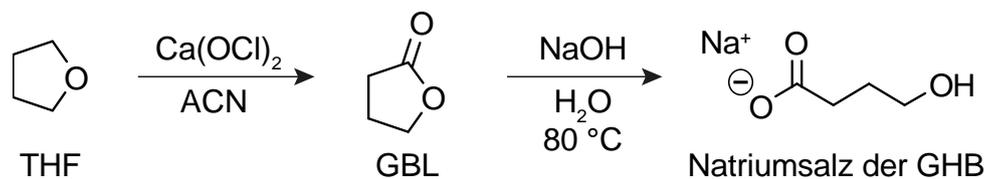


Abbildung 5: Illegale Herstellung von GHB-Salzen über die Synthese von GBL aus THF.

1.3 Pharmakologie

Im folgenden Abschnitt werden sowohl pharmakodynamische als auch pharmakokinetische Eigenschaften der Substanz GHB erläutert. Der Metabolismus von GHB wird dabei in einem eigenen Kapitel (1.4) behandelt, da er für die vorliegende Arbeit eine entscheidende Rolle spielt.

Für GHB wird eine Wirkung als Neurotransmitter im GABA-System des zentralen Nervensystems postuliert. Dies beruht insbesondere auf den Erkenntnissen der endogenen Synthese durch spezifische Enzyme und der damit verbundenen heterogenen Verteilung im Gehirn sowie auf der Wechselwirkung mit spezifischen Rezeptoren im zentralen

Nervensystem.^[12,45–47] Obwohl die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können, ungewöhnlich für einen Neurotransmitter ist,^[45,48] überwiegen mittlerweile die gewonnenen Erkenntnisse, die für diese Funktion sprechen. So ist die Substanz zum Beispiel an unterschiedlichen Stellen im Gehirn aufgrund der spezifischen Bindung an neuronales Gewebe unterschiedlich stark konzentriert.^[49,50] Zudem sind die pharmakologischen Effekte reversibel und können durch Antagonisten unterdrückt werden.^[51,52] Die genaue physiologische Funktion von endogener GHB im menschlichen Organismus ist zwar noch nicht vollständig geklärt, es gibt aber einige Forschungsarbeiten zu den pharmakologischen Wirkprofilen von endogener und von außen zugeführter GHB und den damit verbundenen Wechselwirkungen der Substanz mit dem zentralen Nervensystem.

1.3.1 Pharmakodynamik

Die pharmakologische Wirkung auf den Organismus unterscheidet sich neben der verwendeten Dosis und der dadurch erreichten Blutkonzentration auch abhängig davon, ob GHB als Einmalgabe oder als Dauermedikation verabreicht wird.

In niedrigen Dosen zwischen 1 und 2 g (etwa 10–30 mg/kg) hat GHB einen angstlösenden, euphorisierenden, stimmungssteigernden und enthemmenden Effekt. Es kann jedoch auch je nach Verlauf bei Gaben bis zu 2,5 g zu Benommenheit, Schwindel, Übelkeit oder Erbrechen kommen. Höhere Dosierungen von 3 bis 4 g (etwa 30–60 mg/kg) können unter anderem zu Bewusstlosigkeit führen, über 4 g (etwa 60–100 mg/kg) sind Atemdepression und Koma ein potenzielles Risiko.^[20,53]

Pharmakodynamisch beruht die dosisabhängig dämpfende, euphorisierende oder auch stimulierende Wirkung von GHB auf der Bindungsmöglichkeit von GHB sowohl an GABA_B- als auch an spezifische GHB-Rezeptoren.^[35,54] Dabei geht man heute davon aus, dass die dämpfenden Effekte von einer schwachen Interaktion von GHB als Agonist am GABA_B-Rezeptor ausgelöst werden,^[55–57] wohingegen die stimulierende Wirkung durch eine starke Wechselwirkung am GHB-Rezeptor vermittelt wird.^[56]

GABA_B-Rezeptoren haben relativ niedrige Bindungsaffinitäten und werden erst von höheren GHB-Konzentrationen im millimolaren Bereich aktiviert, also vor allem durch die Aufnahme von GHB. Werden diese G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert, kommt es, genau wie unter dem Einfluss von GABA, zu einem verringerten Einstrom von Ca²⁺ Ionen in die präsynaptische Zelle und zur Öffnung von K⁺ Kanälen in der postsynaptischen Zelle. Die dadurch ausgelöste Hyperpolarisation der Zellen führt zu einer verringerten Ausschüttung von Neurotransmittern und somit zu den dämpfenden, alkoholähnlichen Symptomen wie Enthemmung, Ataxie oder Schwindel.^[35,58–60]

Je nach Dosis kann GHB neben dämpfenden Effekten auch stimulierend wirken. Diese zunächst widersprüchlich klingenden Effekte beruhen auf der Wechselwirkung mit

spezifischen GHB-Rezeptoren. Die endogenen oder durch geringe Mengen zugeführte GHB leicht erhöhten GHB-Konzentrationen im nano- bis mikromolaren Bereich aktivieren Rezeptoren mit hohen Bindungsaffinitäten wie die GABA_A- und GHB-Rezeptoren. Glutamat wird aus der Zelle freigesetzt und führt zu exzitatorischen Symptomen und den damit verbundenen stimulierenden Effekten.^[35,59]

Alle genannten Rezeptoren befinden sich im post- und präsynaptischen Bereich des zentralen Nervensystems im Hippocampus, in der Großhirnrinde und der Amygdala des Gehirns.^[12,53,54,56] In Abbildung 6 sind die Wechselwirkungen von GHB an den GABA_B-, GABA_A- und den spezifischen GHB-Rezeptoren dargestellt.

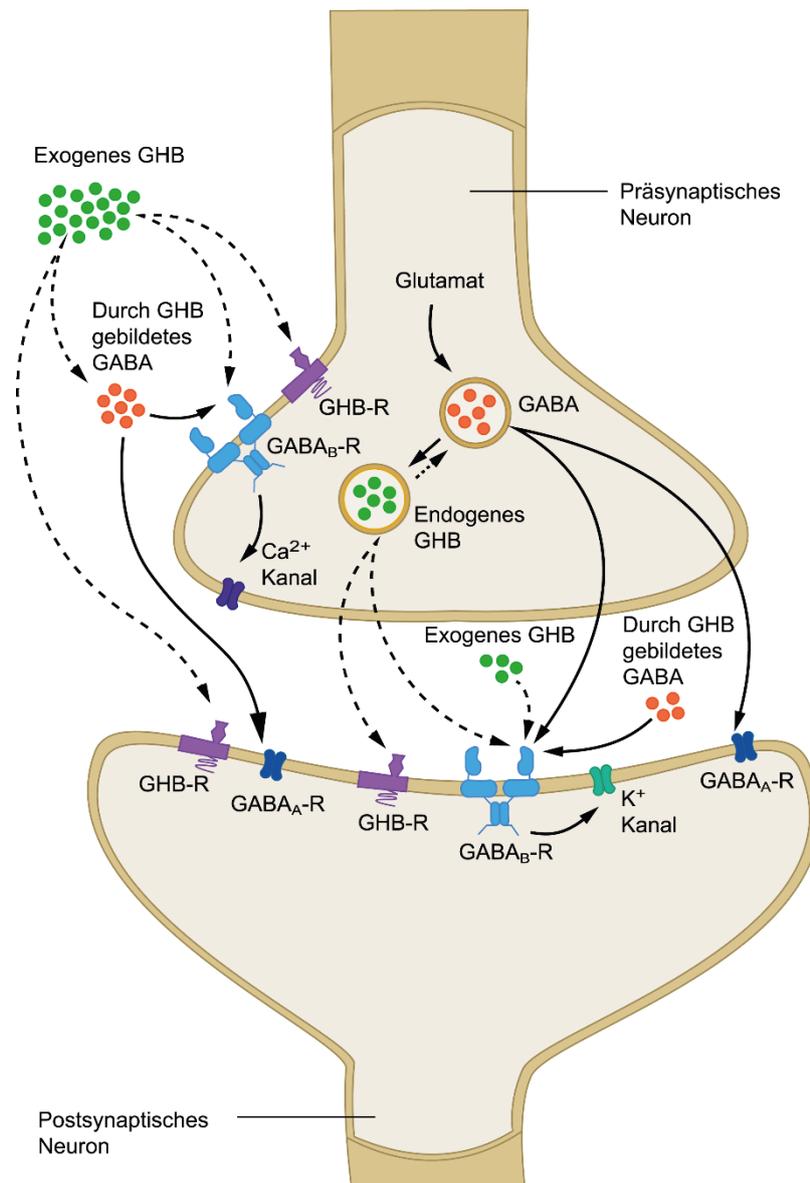


Abbildung 6: Wechselwirkung von GHB und GABA an den spezifischen GHB-Rezeptoren (GHB-R), den GABA_A-Rezeptoren (GABA_A-R) und den GABA_B-Rezeptoren (GABA_B-R) am prä- und postsynaptischen Neuron (Abbildung verändert nach *Snead et al.*^[59]).

Verschiedene ältere Studien diskutieren daneben einen eventuellen Einfluss von GHB auf das dopaminerge, serotonerge, cholinerge und eventuell auch opioide System.^[53,61,62] So könnte es zum Beispiel durch GHB zur Regulation der Serotonin und Dopamin Level sowie zur Ausschüttung von Wachstumshormonen und Neurosteroiden kommen.^[60,61,63] Die tatsächlichen Wirkmechanismen von GHB auf die physiologischen Systeme des menschlichen Körpers sind jedoch auch nach jahrelanger Forschung noch nicht abschließend geklärt. Fest steht lediglich, dass GHB aufgrund ihres breiten Wirkspektrums medizinisch vielfältig angewendet und erprobt wird.

Zusammenfassend besitzt GHB das Potential, je nach Dosis sehr unterschiedliche Effekte auszulösen, wobei auch die Aufnahmeform und der eventuelle Mischkonsum mit anderen dämpfenden Substanzen die Art der Wirkung deutlich beeinflussen kann.

Wird GHB in der Medizin zur Schlafinduktion bei Personen, die an Narkolepsie leiden, als Dauermedikation eingesetzt, kommen tägliche Dosen zwischen 1,4 und 9 g jeweils aufgeteilt auf zwei Gaben pro Tag in Betracht. Für Narkosen wurden in der Regel zwischen 2,5 und 7 g verabreicht. Die bei diesen Anwendungen genutzte sedierende Eigenschaft ist auf die agonistische Wechselwirkung von GHB mit den GABA_B-Rezeptoren zurückzuführen. Dabei gibt es sowohl die Möglichkeit der direkten Interaktion von GHB mit dem Rezeptor, als auch der indirekten, durch GHB vermittelten Bildung von GABA und anschließenden Wechselwirkung mit dem GABA_B-Rezeptor.^[59,60]

1.3.2 Pharmakokinetik

Aufgrund des endogenen Charakters von GHB ist für eine analytische Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen Konzentrationen die Etablierung von Referenzwerten in verschiedenen Matrices nötig. Für die Definition eines solchen Referenzwerts sind detaillierte Kenntnisse der Pharmakokinetik von GHB unerlässlich. GHB beginnt bereits wenige Minuten nach der Aufnahme zu wirken (nach 15 bis 30 min). Die höchsten Plasmakonzentrationen werden nach etwa 20 bis 45 min erreicht und die Wirkung hält je nach Dosis für ein bis sechs Stunden an. Mit einer Halbwertszeit von 20 bis 60 min gehört GHB zu den Substanzen, die bereits nach wenigen Stunden im Blut und auch im Urin nicht mehr nachweisbar sind.^[12,64,65] Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit der Substanz liegen die GHB-Konzentrationen bei einer quantitativen Analyse im Serum höher als im Vollblut.^[64] GHB verteilt sich im gesamten Körperwasser und zeigt eine zu vernachlässigende Bindungsaffinität zu Plasmaproteinen von unter 1 %.^[12] Der Konzentrationsanstieg im Serum folgt dabei keiner linearen Kinetik, wobei diese auch abhängig von der Dosis ist. Zugleich ist auch der Zusammenhang zwischen Dosis und Plasmakonzentration nicht linear. So ergibt sich zum Beispiel bei einer Verdopplung der Dosis von 4,5 auf 9 g eine 2,4- bis 2,9-fache maximale Plasmakonzentration.^[66] Wie bei anderen Substanzen auch, verlangsamt sich die Aufnahme ins Blut und der Plasmaspiegel

bleibt niedriger, wenn GHB mit einer Mahlzeit zusammen aufgenommen wird. Die Halbwertszeit bleibt davon jedoch unverändert.^[67] GHB akkumuliert nicht im Blutplasma und die Halbwertszeiten bleiben auch bei regelmäßiger Aufnahme von GHB konstant.^[27]

Die beiden Vorläufersubstanzen GBL und 1,4-Butandiol (1,4-BD) werden nach Aufnahme in den Körper mit einer Halbwertszeit von 1 min in GHB umgewandelt. Wie in Abbildung 7 gezeigt, wird GBL durch Serum-Lactonasen oxidiert und so in GHB umgewandelt, während 1,4-BD zunächst durch eine Alkoholdehydrogenase zu Gamma-Hydroxybutyraldehyd und dann durch eine Aldehyd-Dehydrogenase zu GHB oxidiert wird.^[68–70]

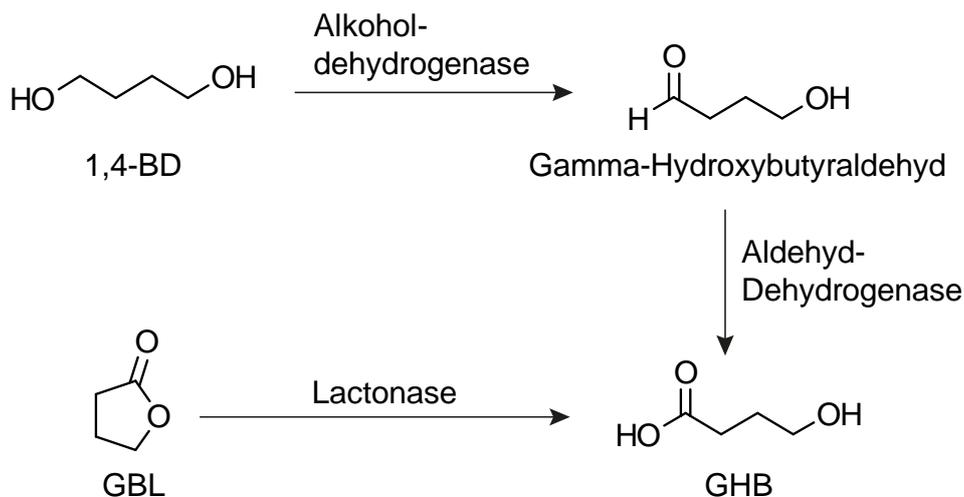


Abbildung 7: Umwandlung von 1,4-BD und GBL zu GHB innerhalb des Körpers.

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, ist es eher ungewöhnlich, dass ein Neurotransmitter die Blut-Hirn-Schranke überwindet, hinzu kommen bei GHB die Eigenschaften einer polaren negativ geladenen Substanz, welche auch für eine erschwerte Diffusion durch die Barriere zwischen Blutkreislauf und dem zentralen Nervensystem im Gehirn spricht. Dennoch liegen mittlerweile Forschungsergebnisse vor, die belegen, dass GHB durch den Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) und zu einem wesentlich geringeren Anteil auch über passive Diffusion ins Gehirn gelangt.^[71]

1.3.3 Endogene Konzentrationen

Eines der grundlegenden Ziele der Forschung auf dem Gebiet der GHB-Analytik bestand schon früh in der Bestimmung endogener Konzentrationen in verschiedenen Matrices wie Speichel, Blut, Urin und Organen, da es ohne deren Kenntnis nicht möglich ist, externe GHB-Aufnahmen nachzuweisen. *Fieler et al.* veröffentlichten 1998 eine Studie, in der in Blut- und Urinproben von lebenden Personen keine relevanten GHB-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Nachdem dies rasch von weiteren Studien widerlegt wurde, geht es inzwischen unter forensischen Aspekten vorrangig darum, einen Referenzwert für die

Abgrenzung zwischen endogenen und potenziell zugeführten GHB-Mengen zu finden.^[72]

Die erste Studie, die einen größeren Stichprobenumfang an Blut- und Urinproben zum Zwecke der Bestimmung eines solchen Referenzwertes untersucht, wurde 2002 von *Elia et al.* publiziert. Dort wurden über 600 Urin- und über 200 Blutproben analysiert. Die gefundenen Konzentrationen lagen dabei für Urinproben durchschnittlich bei 3,1 mg/L, jedoch nie über 6 mg/L, und für die gemessenen Blutproben bei durchschnittlich 0,7 mg/L, jedoch nie über 2 mg/L. Darauf basierend wurden *Cut-off*-Werte von 10 mg/L für Urin und 5 mg/L für Blut zum ersten Mal vorgeschlagen.^[73] Dem folgten weitere Studien, zumindest in Bezug auf den Referenzwert für Urinproben.^[74,75] *Crookes et al.* untersuchten 50 Urinproben von Frauen zwischen 14 und 52 Jahren. Die erhaltenen GHB-Konzentrationen lagen zwischen 0,1 und 1,46 mg/L, woraufhin ein *Cut-off*-Wert von 5 mg/L empfohlen wurde.^[76] Einen angepassten Vorschlag für einen *Cut-off*-Wert im Urin bei Lebenden lieferten *Andresen et al.* mit 6 mg/L.^[77] Für Blutproben von Lebenden wurden neben dem *Cut-off*-Wert von *Elia et al.* (5 mg/L) weitere Werte von 10 mg/L^[74,78] und 4 mg/L^[77] oder bei entsprechender Lagerung sogar von 1 mg/L^[79] genannt.

Aktuell haben sich *Cut-off*-Werte von 4 mg/L im Blut und 10 mg/L im Urin etabliert, um endogene Werte von einer GHB-Aufnahme abzugrenzen.^[80–82]

1.4 Metabolismus

Im Gegensatz zu vielen anderen Substanzen besitzt GHB keine aktiven Metaboliten und wird aufgrund ihrer einfachen Struktur zu ebenfalls strukturell einfachen Metaboliten verstoffwechselt, die in vielen Körperfunktionen eine tägliche Rolle spielen. Lediglich ein kleiner Teil, bis maximal 5 %, wird unmetabolisiert über die Nieren ausgeschieden, dabei verläuft die Eliminationskinetik von GHB nach Aufnahme von therapeutischen Dosen vermutlich nicht linear.^[12,66,83]

GHB wird auf verschiedenen Wegen metabolisiert, sodass sich eine individuelle endogene Konzentration im Körper einstellt. Aufgrund unterschiedlicher Reaktionskinetiken tragen diese Metabolismuswege unterschiedlich stark zum Abbau von GHB bei.

Auf zweien dieser Wege verläuft der Metabolismus zunächst über die Oxidation durch das Enzym GHB-Dehydrogenase zum Succinat-Semialdehyd, wie in Abbildung 8 dargestellt. Dieses wird, katalysiert durch die SSA-Dehydrogenase, zu Succinat umgewandelt und dann über den Citratzyklus zu Kohlenstoffdioxid und Wasser verstoffwechselt.^[84–86] Alternativ könnte die GABA-Produktion minimal erhöht werden, indem ein kleiner Teil des Succinat-Semialdehyds durch die GABA-Transaminase zurück zu GABA umgewandelt wird.^[53,87] Die Umwandlung zu GABA wird nach heutigem Erkenntnisstand jedoch als minimal betrachtet, da die GABA-Transaminase eine deutliche Präferenz zur Umwandlung von GABA in SSA hat und nicht umgekehrt.^[53,88]

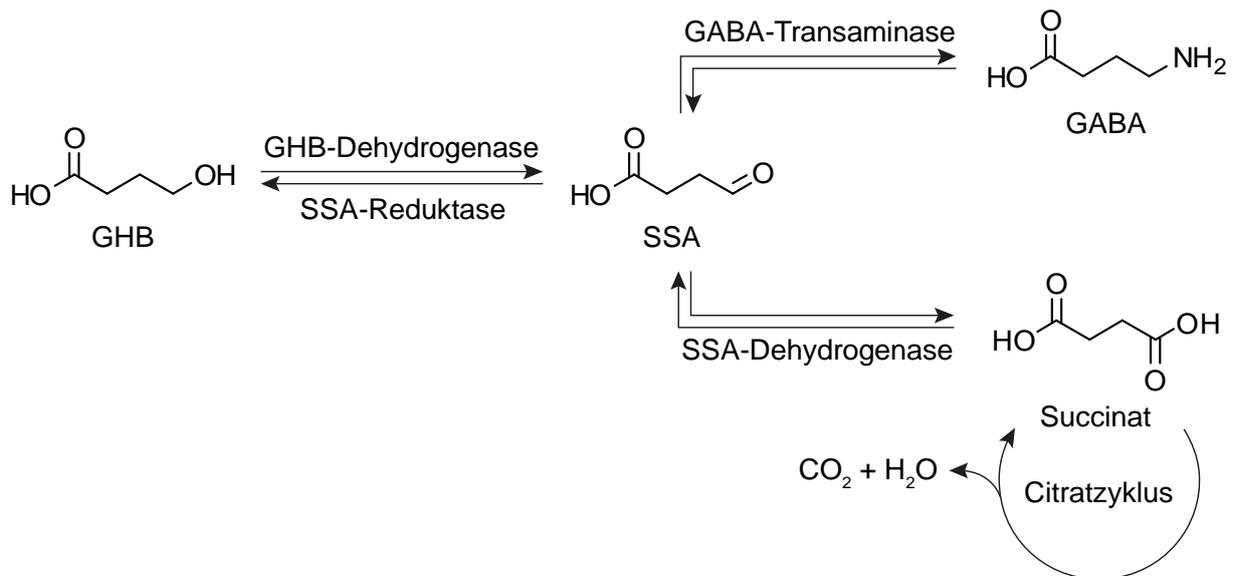


Abbildung 8: Metabolismus von GHB über das Succinat Semialdehyd.

Es existieren bereits seit den 1970er Jahren Hinweise für weitere mögliche Wege der Metabolisierung über die Alpha- und Beta-Oxidation der Fettsäure GHB, bei denen verschiedene Hydroxy- und Ketosäuren gebildet werden.^[59,89–91] Unter anderem kommt es durch Alpha-Oxidation zur Bildung von 2,4-Dihydroxybuttersäure (2,4-DHB) und durch oxidative Decarboxylierung zur 3-Hydroxypropionsäure. Durch die Beta-Oxidation entstehen 3,4-Dihydroxybuttersäure (3,4-DHB) und Glycolsäure, die als Metaboliten von GHB zum Beispiel im Urin nachgewiesen werden können.^[89,92] Über den Zwischenschritt der Glyoxylsäure entsteht bei der Beta-Oxidation anschließend Oxalsäure, die über den Urin ausgeschieden wird.

Dieser in Abbildung 9 dargestellte Abbaupfad gewinnt insbesondere dann an Bedeutung, wenn der Abbau von GHB über Succinat als Zwischenprodukt eingeschränkt ist. Im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel von GHB kann es zu einer seltenen autosomal-rezessiven Krankheit kommen, bei der vermehrt GHB, GABA und SSA im Urin ausgeschieden werden.^[62,89,93] Dabei handelt es sich um eine Mangelfunktion der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase, was der Krankheit den Namen *Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency* (SSADHD) gegeben hat.^[89,74] Da somit der Abbau von GHB über den Citratzyklus gehemmt ist, findet ein vermehrter Abbau über die Beta-Oxidation statt.

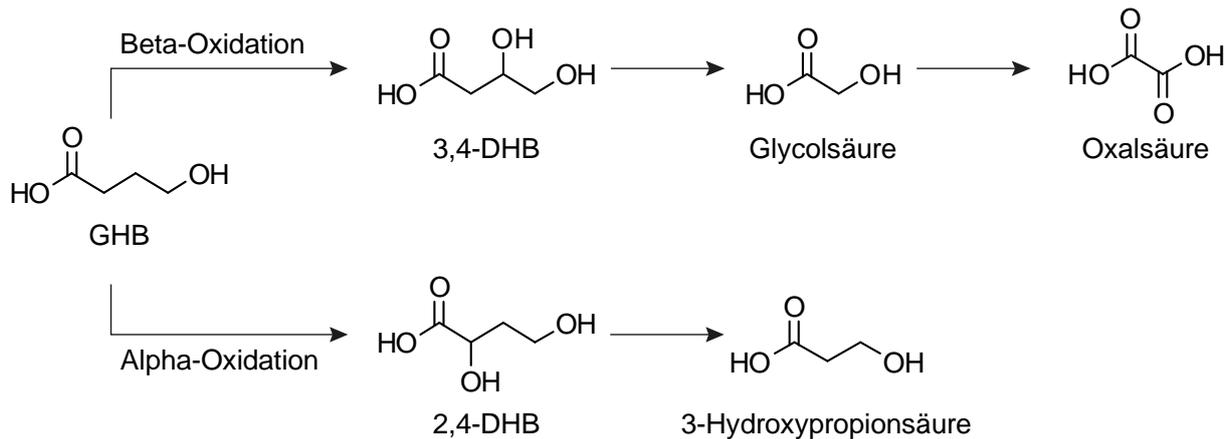


Abbildung 9: Alpha- und Beta-Oxidation von GHB, bei der unter anderem als Zwischenprodukte 2,4-Dihydroxybuttersäure, 3,4-Dihydroxybuttersäure und Glycolsäure entstehen.

Aufgrund der schnellen Elimination von GHB wurde, in Anlehnung an den Metabolismus von Alkohol und dessen ebenfalls rascher Elimination, in jüngerer Vergangenheit nach den glucuronidierten und sulfatierten sekundären GHB-Metaboliten (Abbildung 10) gesucht.

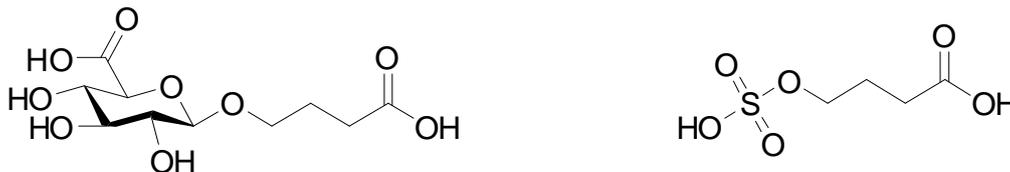


Abbildung 10: Die beiden GHB-Metaboliten GHB-beta-O-Glucuronid (links) und GHB-4-Sulfat (rechts).

Sowohl GHB-beta-O-Glucuronid (GHB-Gluc) als auch GHB-4-Sulfat (GHB-Sulf) konnten in biologischen Proben wie Serum oder Urin nachgewiesen werden.^[94,95] Die postulierte Bildung des Glucuronids von GHB geschieht über die Uridindiphosphat (UDP)-Glucuronosyltransferase,^[96] die des Sulfats über Sulfotransferasen.^[97]

1.5 Medizinische Relevanz

Wie einleitend bereits erwähnt, hat GHB im Laufe der Jahre auch medizinisch an Bedeutung gewonnen. GHB wurde anfangs wegen ihrer dämpfenden Wirkung auf das zentrale Nervensystem unter dem Namen *Somsanit*[®] für die Narkoseeinleitung eingesetzt. Aufgrund der unvorhersehbaren Wirkungsdauer, der lediglich sehr schwachen analgetischen Wirkung und letztendlich wegen eines potenziell Anfälle auslösenden Effektes, wurde GHB auf diesem Gebiet aber nicht weiter verwendet. Andere Studien haben gezeigt, dass die Einnahme von GHB bei alkohol- oder opiatabhängigen Personen zu einer reduzierten Abhängigkeit und geringeren Entzugssymptomen führen kann.^[21,24,98] Gleichzeitig kann es bei längerer

Einnahme jedoch zu Abhängigkeiten gegenüber GHB kommen.^[99] Aus diesem Grund ist GHB unter dem Namen *Alcover*[®] zur Anwendung im Alkohol- und Opiatentzug nur in wenigen Ländern zugelassen.^[20]

Neben diesen weniger gebräuchlichen Anwendungen hat GHB unter den Namen *Natriumoxybat* beziehungsweise *Xyrem*[®] den größten Nutzen in der Behandlung von Personen bewiesen, die an einer Form von Tagesschläfrigkeit, Kataplexie oder Schlafstörung im Zusammenhang mit Narkolepsie leiden. Dabei handelt es sich um eine neurologische Krankheit, die mit 0,1 % Betroffenen häufiger auftritt, als zum Beispiel die wesentlich besser erforschte Krankheit Multiple Sklerose.^[16]

In den 1970er Jahren wurde bekannt, dass GHB den Tiefschlaf (*Rapid Eye Movement* (REM)-Schlaf) verstärkt und die Häufigkeit des Aufwachens und den weniger erholsamen Non-REM-Schlaf reduziert. Seitdem forschte man intensiv an den positiven Auswirkungen von GHB auf die Schlafkrankheit Narkolepsie, bei der es, durch einen unruhigen Schlaf und Schlafstörungen in der Nacht, tagsüber zu Anfällen von Kataplexie und Tagesschläfrigkeit kommen kann. Der durch GHB induzierte Schlaf wurde ähnlich dem natürlichen, physiologischen Schlafmechanismus beschrieben, bei dem man morgens erholt aufwacht.^[100] Diese Wirkung führt auch bei an Narkolepsie leidenden Personen zu einem regelmäßigeren Schlaf, wodurch Symptome der Krankheit verringert werden.^[101] Seit 2002 ist GHB in den USA als Medikament für diese Anwendung zugelassen und seit 2005 auch in Europa.^[102] Bisher durchgeführte Studien zeigen eine gute Verträglichkeit und keine sich verändernde Pharmakokinetik auch bei Langzeitmedikation.^[27,103] Dosierungen von etwa 30 mg/kg führen dabei zu einer regelmäßigen Schlafphase von etwa zwei bis drei Stunden. Um einen erholsamen Schlaf während der gesamten Nacht zu erreichen, wird GHB daher meistens zweimal pro Nacht in Dosierungen zwischen 2,25 g und 4,5 g pro Dosis eingenommen. Da Personen, die an Narkolepsie leiden, innerhalb von 24 Stunden durchschnittlich nicht mehr schlafen als ein gesunder Mensch, führt der geregelte Schlaf in der Nacht zu deutlich weniger Tagesschläfrigkeit.^[16] Die genaue Ursache für Narkolepsie ist bisher nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass eine Mutation eines Rezeptors des Hypocretin-Systems beteiligt sein könnte. Erstaunlicherweise ist keine Interaktion von GHB mit dem Hypocretin-System bekannt und dennoch ist GHB in der Behandlung von Narkolepsie ein wirksames Präparat.^[60]

1.6 Toxikologische und forensische Relevanz

Durch den immer populärer gewordenen Gebrauch von GHB als Partydroge hat die Substanz auch toxikologisch mittlerweile einen hohen Stellenwert. So ist es sowohl für Mediziner als auch für Toxikologen von entscheidender Bedeutung, detaillierte Kenntnisse über die Aufnahmeformen, erwünschten und unerwünschten Wirkungen sowie mögliche Wechselwirkungen mit anderen Substanzen zu haben. Die Substanz wird bei illegalem

Gebrauch vor allem oral in flüssiger Form, häufig mit Getränken gemixt, konsumiert. Teilweise werden auch Kapseln eingenommen, die meist das Natriumsalz von GHB enthalten. Die extrem kurze Resorptionszeit – maximale Plasmakonzentrationen werden bereits nach etwa 20 bis 45 min erreicht ^[14] – und die kurze Wirkungsdauer von ein bis vier Stunden – die Halbwertszeit beträgt zwischen 20 und 60 min – führen dazu, dass nach einem anfänglich schnellen Eintritt der bewusstseinsbeeinträchtigenden Wirkung eine schnelle Erholung ohne andauernde Nebenwirkungen erfolgt. Diesen Effekt bezeichnet man als „fast-in, fast-out“ Effekt.^[60] Wird GHB als Freizeitdroge konsumiert, erhofft man sich vor allem einen euphorisierenden, enthemmenden und angstlösenden Effekt. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite von GHB kommt es jedoch häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Sprachstörungen oder Schwindel. Eine GHB-Intoxikation äußert sich darüber hinaus in vielen Fällen durch Atemdepression und Krampfanfälle in Verbindung mit Bewusstlosigkeit bis hin zum Koma.

1.6.1 Diagnostik

Die unspezifischen Symptome machen das Erkennen einer GHB-Intoxikation schwierig. Die auftretenden Effekte beruhen dabei vor allem auf der Wirkung auf das zentrale Nervensystem, das respiratorische System und, wenn auch weniger ausschlaggebend, auf einem Einfluss auf das Herz-Kreislauf- und das Magen-Darm-System.^[63] Trotz der Ähnlichkeit der postulierten Wirkmechanismen von GHB und Benzodiazepinen und den beobachteten Wechselwirkungen zwischen dem Opiat-Antagonist Naloxon und den von GHB ausgelösten Effekten, sprechen die Betroffenen im Gegensatz zu Vergiftungen mit Benzodiazepinen oder Opiaten bei GHB-Intoxikationen nicht auf die Gabe der Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil oder Naloxon an. Ein erprobtes Gegenmittel für eine GHB-Intoxikation liegt bisher nicht vor, da mittlerweile aber der Wirkmechanismus von GHB an dem GABA_B-Rezeptoren besser erforscht ist, werden für die Zukunft Antagonisten des GABA_B-Rezeptors für eine Gabe bei GHB-Intoxikationen erforscht.^[14,60]

Liegt, wie in vielen Fällen, neben dem Konsum von GHB auch ein Konsum weiterer Substanzen vor, wird die Diagnostik anhand der Symptome weiter erschwert. So kommt es zum Beispiel in Verbindung mit Alkohol zu einer Verstärkung der zentralnervösen Wirkung. Zudem wurde, aufgrund des sich überschneidenden Metabolismus von Alkohol und GHB, vermutet, dass es zu einem verlangsamten Abbau der beiden Substanzen kommen kann.^[12,55,104]

Zusätzlich erschwert wird das Erkennen einer Vergiftung durch GHB durch fehlende rasche und zuverlässige Analytik, zum Beispiel mittels eines immunologischen Schnelltests. GHB ist im Rahmen einer Blut- oder Urin-Analyse mittels Massenspektrometrie nachweisbar, jedoch ist diese Analyse zeitaufwendig und erfordert eine professionelle Laborausstattung. Der

Nachweis ist jedoch nur dann möglich, wenn die Proben zeitnah zur Aufnahme abgenommen werden. Im Blut ist GHB nach heutigem Forschungsstand maximal etwa fünf bis acht Stunden nachweisbar und im Urin maximal zwölf Stunden.^[61] Die entscheidende Herausforderung der GHB-Analytik besteht dabei in der rechtssicheren Bewertung endogener und möglicherweise von außen zugeführter GHB-Konzentrationen.

1.6.2 Entwicklung der GHB-Analytik

Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass GHB Anwendung als illegale Substanz findet, besteht im Rahmen der forensischen Analytik bereits seit langem Interesse daran, Nachweismethoden für GHB in verschiedensten Matrices zu entwickeln und zu verbessern. Der Weg von den Anfängen der GHB-Analytik bis hin zu aktuell angewendeten Analyseverfahren soll im Folgenden genauer betrachtet werden.

Nach der Entdeckung der Fettsäure GHB im Gehirn, Blut und Urin verschiedenster Lebewesen, wurden die Nachweise in den 1960er Jahren zunächst mittels ein- und zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie sowie mittels enzymatischer Methoden durchgeführt.^[8,36] Die erste gaschromatographische Bestimmung von GHB wurde 1964 veröffentlicht, wobei GHB zu GBL umgewandelt wurde.^[105] Ende der 1960er Jahre wurden quantitative Bestimmungen mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Radioaktivitätszählern durchgeführt.^[6] Eine frühe Arbeit zur spektrophotometrischen Quantifizierung kommt aus dem Jahr 1970.^[106] Seit den 1970er Jahren wurden für die Quantifizierung in der GHB-Analytik verschiedenste gaschromatographische Verfahren getestet.^[107,108] Mit diesen Methoden war es möglich, Konzentrationen im Nanogramm-Bereich zu quantifizieren und die Analytik somit für die Bestimmung von endogener GHB einzusetzen. In diesen Methoden wurde jedoch GHB nicht direkt detektiert, sondern durch Umwandlung mittels einer starken Säure in GBL überführt und dieses anschließend extrahiert und entweder spektrophotometrisch oder chromatographisch mit anschließender Elektroneneinfang- oder Flammenionisationsdetektion quantifiziert. Der Nachweis von GHB im Blut und Urin durch Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie ist seit den späten 1970er Jahren bekannt.^[109–111]

In den 1990er Jahren wurden die ersten Fälle von GHB-Missbrauch in den USA berichtet. Seitdem ist die Suche nach geeigneten Screening- und Bestätigungs-Methoden intensiviert und weiter vorangetrieben worden. Es wurden sowohl kolorimetrische als auch eine Kombination von kolorimetrisch-enzymatischen Screening-Schnelltests entwickelt, bei denen jedoch die Hauptprobleme eine schlechte Sensitivität und fehlende Quantifizierungsmöglichkeiten waren. So konnten Konzentrationen ab 10 µg/mL oder teilweise erst ab 500 µg/mL im Urin nachgewiesen werden ohne genauere Aussagen zur Konzentration machen zu können.^[112–115] 2009 wurde ein enzymatisches Testsystem auf den Markt gebracht, welches sowohl schnell und sensitiv als auch semiquantitativ arbeitet, wobei innerhalb von

10 min mit 10 µL Probenmaterial und einem *Cut-off* von etwa 10 µg/mL im Serum und 15 µg/mL im Urin GHB quantifiziert werden konnte.^[116–118] Weitere Ansätze waren Screening-Methoden mittels *Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry* (NMR-Spektrometrie), *Ion Mobility Spectrometry* (IMS) oder *Capillary Zone Electrophoresis* (CZE) mit UV-Detektion.^[119–123] Auch die wesentlich zeitaufwendigeren gas- oder flüssigchromatographischen Methoden wurden als Screening-Methode für die Bestimmung von GHB in verschiedenen Matrices getestet und teilweise etabliert.^[124–127] Dabei konnten zunächst für den klinischen Gebrauch entwickelte Methoden forensisch genutzt werden.^[128]

In den meisten Fällen wird GHB jedoch von den gebräuchlichen *Unknown*-Screening-Verfahren nicht erfasst, da die Extraktionsmethoden eher auf lipophile organische Moleküle ausgerichtet sind und GHB aufgrund ihrer hohen Polarität nicht mitextrahiert wird. Aus diesem Grund wird in den meisten Fällen eine gezielte Analyse zur Bestätigung und Quantifizierung der Substanz GHB eingesetzt. Auch dazu sind, gerade in den Jahren nach 1990, eine Vielzahl an Methoden, inklusive Probenvorbereitungs- und Extraktionsverfahren, für die jeweiligen Matrices entwickelt und optimiert worden. Hier folgend erwähnt sind nur die gängigsten Probenvorbereitungsmethoden. Angefangen mit der schnellsten und einfachsten, der Probenverdünnung („*dilute-and-shoot*“),^[129–131] über Proteinpräzipitationstechniken mittels organischer Lösungsmittel,^[78,79,132] Salzen,^[133] organischer Säuren^[134] oder einer Kombination aus diesen,^[135–137] bis hin zu Flüssig-Flüssig-^[74,138,76,139–141] oder Festphasenextraktionen^[111,130,142–145] wurden verschiedene Methoden für die Extraktion von GHB aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten erprobt. Die eigentliche Analyse und Detektion der Substanz GHB findet seit den 1990er Jahren hauptsächlich über gas- oder flüssigchromatographische Verfahren gekoppelt mit Massenspektrometrie oder Tandemmassenspektrometrie statt. Die frühen Anfänge der GC-MS- (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) Methoden wurden bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt. Seitdem wurden von vielen Forschungsgruppen eine ganze Reihe unterschiedlicher Methoden für verschiedenste Matrices entwickelt. Eine Übersicht der wichtigsten seit 1990 publizierten GC-MS-Methoden und ihrer Vorteile sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt.

Eine der frühesten LC-MS- (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) Methoden war die 1998 von *Mesmer et al.* publizierte Flüssigchromatographie-Methode gekoppelt mit Thermospray Massenspektrometrie.^[146] Bei der Thermospray-Ionisation wird, im Gegensatz zur Elektrospray-Ionisation, die flüchtige Pufferlösung, in der sich der Analyt befindet, durch eine beheizte Kapillare in einer beheizten Kammer verdampft. Der Analyt bildet mit den Ionen aus dem Puffersalz Addukte.^[147] In den folgenden Jahren wurden verschiedene mit HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) gekoppelte Verfahren entwickelt. So haben 2001 *Vriendt et al.* eine mit UV-Detektion gekoppelte LC-Methode entwickelt, um GHB in Plasmaproben von Ratten zu bestimmen, sie erzielten eine Nachweisgrenze von 10 µg/mL.

Die Werte unterschieden sich dabei nicht signifikant von denen, die mittels GC-MS ermittelt wurden.^[143] 2003 haben *Borgen et al.* zur Bestimmung von GHB-Konzentrationen im Blut nach Einnahme des Natriumsalzes von GHB (*Xyrem*[®]) eine LC-MS API- (*Atmospheric Pressure Ionisation*) Methode verwendet, bei der die Nachweisgrenze bei 5 µg/mL lag.^[67] Niedrigere Nachweisgrenzen, mit denen von vorherigen GC-MS-Methoden vergleichbar, von 0,1 µg/mL konnten erstmals 2004 *Fung et al.* mit einer LC-MS-APCI- (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) Methode erreichen, die zur Bestimmung endogener GHB-Konzentrationen im Gehirn und in Blutproben von Ratten entwickelt wurde.^[145] Seit dieser Zeit haben die entwickelten LC-MS-Methoden die vorher gängigen GC-MS-Verfahren abgelöst. Neu entwickelte Verfahren beruhen seitdem fast ausschließlich auf LC-MS-Verfahren, da wesentlich geringere Probenmengen notwendig sind und gleichzeitig keine Umwandlung von GHB in GBL oder ein chemisches Derivat des GHB nötig ist. So sind in den Jahren von 2003 bis heute zahlreiche LC-MS basierte Methoden entwickelt worden, die zum Beispiel die gleichzeitige Analyse von GHB und GHB-Vorläufern in Urin^[129,148] und Blut,^[131] deutlich schnellere Analysen,^[129,130] immer geringere Nachweisgrenzen^[142,149] oder den Nachweis von GHB-Metaboliten ermöglichten.^[150,151] Die wichtigsten LC-MS-Methoden und ihre Vorteile gegenüber anderen schon bestehenden Methoden sind in Tabelle A2 im Anhang zusammengefasst.

1.7 Haaranalytik

Seit einigen Jahren spielt die Haaranalytik in der forensischen Wissenschaft eine zunehmend bedeutende Rolle. So haben viele Labore ihre Methoden um die der Haaranalytik erweitert, da sie aufgrund der langen Nachweisbarkeit von zum Teil sehr geringen Substanzkonzentrationen entscheidend zur Beantwortung vieler forensischer Fragestellungen beitragen kann. Dabei galt Haaranalytik zunächst als ein sehr spezialisiertes, zeitintensives und teures Verfahren, das nur wenige Labore durchführten. Inzwischen ist, aufgrund der moderneren analytischen Methoden und dem besseren Verständnis der Einlagerung von Drogen, Medikamenten oder anderen Fremdstoffen in das Haar, die Haaranalytik zu einem festen Bestandteil der Untersuchungsroutine geworden, zum Beispiel bei drogenassoziierten Todesfällen, Sexualstraftaten, Kindeswohlgefährdungen oder bei Abstinenznachweisen.^[152]

1.7.1 Aufbau der Haare (Anatomie, Physiologie, Wachstumszyklen)

Ein erwachsener Mensch besitzt etwa fünf Millionen Haare, eine Million davon befinden sich auf dem Kopf und im Gesicht. Bei Haaren handelt es um eine hoch komplexe Matrix, deren Bildung mehrere Phasen umfasst. Zur Interpretation und zum Verständnis von Ergebnissen der Haaranalytik ist eine gute Kenntnis der Strukturen und der Wachstumsphasen des Haares von Bedeutung.

Das Haar wird ausgehend vom Haarfollikel, der über Blutkapillaren versorgt wird, gebildet. Dabei werden im Wachstumsbereich durch Zellteilung Follikel gebildet, diese wachsen und kommen so in die so genannte Keratinisierungszone. Dort wird von den Zellen das Pigment Melanin synthetisiert und eingelagert. Ab diesem Zeitpunkt beginnt das Haar zu verhornen oder zu keratinisieren. So entstehen mehrere zylindrisch angeordnete Zellstränge, die zum Schutz von einer Hülle, der sogenannten Cuticula, einer Schuppenschicht, umgeben sind, die ebenfalls zu einem großen Teil aus schwefelreichem Keratin besteht. Tritt das Haar in die Aushärtungszone ein, sterben die Zellen unter Verlust des Zellkerns und von Wasser ab.

Das Haar besteht also, wie in Abbildung 11 schematisch dargestellt, in seiner ausgehärteten Form aus der äußeren etwa 4 µm dicken Cuticula, die für den Schutz des Haares sorgt und für Form und Glanz verantwortlich ist, dem Cortex, der etwa 100 µm lange Keratinfasern enthält und Dicke und über Melanineinlagerungen die Farbe des Haares bestimmt, und der inneren Medulla, dem Markstrang des Haares.^[153]

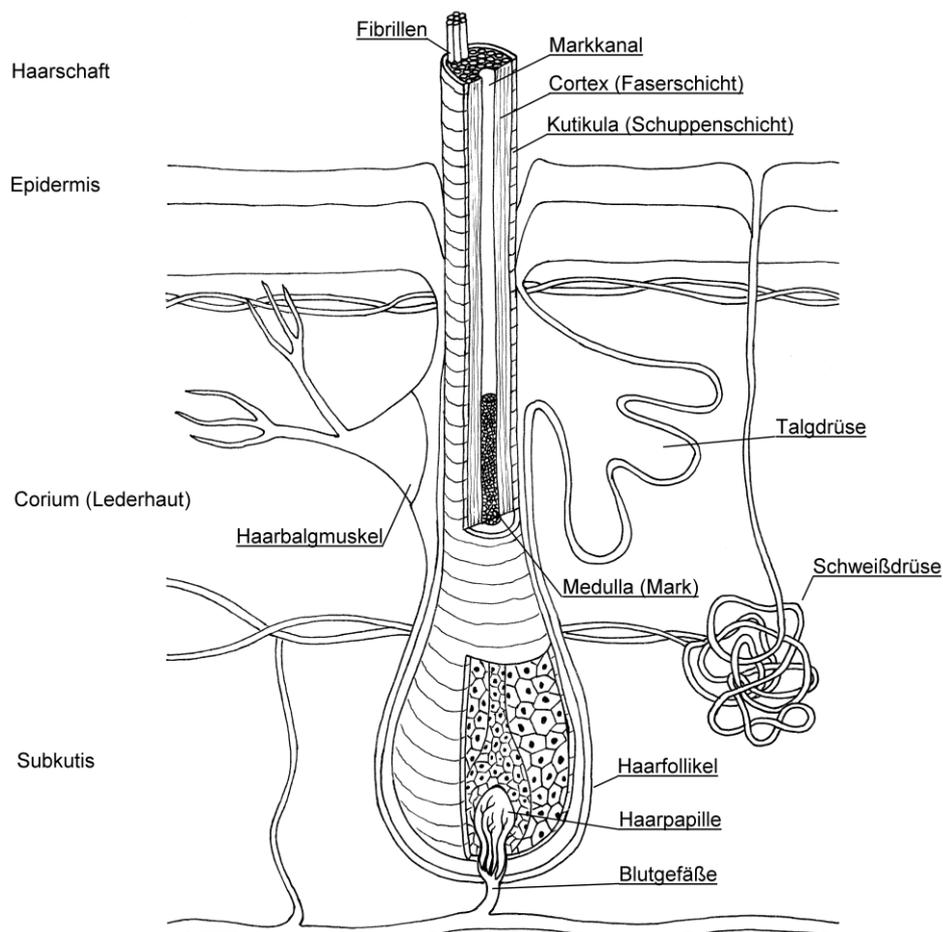


Abbildung 11: Aufbau des Haares und Anbindung an den Blutkreislauf (gezeichnet *M. Nebel*).

Ein Haar durchläuft während seiner Lebensdauer auf dem Körper drei Phasen. Die Bildung und das Wachstum des Haares bezeichnet man als Anagenphase, diese dauert bei

Kopfhareen zwischen fünf bis sieben Jahren und es befinden sich etwa 85 bis 90 % der Haare in diesem Stadium. Anschließend wird die Keratinisierung und somit auch das Wachstum eingestellt, dieser Prozess dauert einige Wochen und nennt sich Katagenphase. Nur etwa 1 bis 3 % der Haare befinden sich in dieser Phase. In der letzten Phase, der Telogenphase der Haare, dauert es dann noch etwa sechs Monate, bis das Haar durch ein sich neu bildendes Haar aus der Haarwurzel geschoben wird. In der Telogenphase befinden sich etwa 7 bis 9 % der Haare.

Je nach Körperregion laufen diese drei Phasen unterschiedlich schnell ab, wodurch die Haare so unterschiedliche Längen erreichen. Daher sind diese zum Zwecke der forensischen Analytik nicht direkt miteinander vergleichbar. Bei Kopfhareen wurden im Mittel Wachstumsraten im Bereich zwischen 0,6 und 1,4 cm im Monat beobachtet, wobei die wahrscheinliche durchschnittliche Haarwachstumsgeschwindigkeit 1,1 +/- 0,2 cm im Monat beträgt.^[153,154]

1.7.2 Einlagerung von Drogen und Medikamenten

Wie gut eine Substanz in das Haar eingelagert wird hängt unter anderem von ihrer Lipophilie, ihrer Melaninaffinität, ihrer Polarität und ihrer Basizität ab.^[152,154] Dadurch führt eine hohe Blutkonzentration nicht zwangsläufig zu einer hohen Konzentration im Haar. Für die Einlagerung von Fremdsbstanzzen ins Haar kommen prinzipiell mehrere Aufnahmewege in Betracht. Eine einfache Einlagerung in das wachsende Haar findet über passive Diffusion aus dem Blutkreislauf in die Haarwurzel statt.^[155,156] Um in die Haarmatrix zu gelangen, muss die Substanz zunächst die Zellmembran überwinden. Dabei gelangen ausschließlich Substanzen durch die Membran, die nicht an Proteine gebunden sind. Zudem durchdringen polare Substanzen die Zellmembranen langsamer als unpolare. Daraus folgt, dass in den Haaren ein größerer Anteil an unpolaren Muttersbstanzzen als an polaren Metaboliten zu finden ist, da während des Metabolismus der meisten Stoffe die Stoffwechselprodukte polarer werden.^[155]

Die Aufnahme in das Haar ist außerdem von der Basizität abhängig. Basische Stoffe häufen sich aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Zytoplasma von Melanozyten an und werden somit vermehrt zusammen mit den dort gebildeten Pigmenten in das Haar eingelagert. Besteht dann noch, wie bei positiv geladenen Substanzen, eine erhöhte Bindungsaffinität an Melanin, kommt es zu einem permanenten Einstrom an basischen Substanzen in die Melanozyten und somit zur vermehrten Einlagerung der Fremdsbstanzzen in die Matrixzellen der Haare. Dieser Mechanismus erklärt, warum stärker pigmentiertes Haar teilweise höhere Fremdstoffkonzentrationen enthält als weniger stark pigmentiertes Haar.^[154,157–159]

Nur während der Anagenphase, der Wachstumsphase, werden die Matrixzellen über Blutkapillaren mit Bausteinen für die Haarproduktion versorgt. Eine Einlagerung von Fremdsbstanzzen über den Blutkreislauf ist also auch nur in dieser Phase möglich. Da sich, wie bereits dargestellt, etwa 85 bis 90 % der Kopfharee in der Anagenphase befinden, hat dies

zur Konsequenz, dass sich bei einer Haaranalyse etwa 10 bis 15 % der Haare in einem Wachstumsstadium befinden, in dem keine Fremdsubstanzen über den Blutkreislauf eingelagert werden können. Folglich können die dort nachgewiesenen Substanzen nicht mit denen im noch wachsenden Haar verglichen werden. Vielmehr kann durch die Dauer der Telogenphase ein Versatz von etwa sechs Monaten entstehen, wodurch ein zeitnäherer Konsum suggeriert werden kann als tatsächlich stattgefunden hat.

Erfolgte die Einlagerung nur über den Blutkreislauf, müsste die im Haar festgestellte Konzentration an Fremdstoffen und deren Metaboliten proportional zu der Konzentration im Blut sein. Dass dies aber nicht der Fall ist, ist bereits ein Hinweis darauf, dass es auch andere Einlagerungswege in das Haar geben muss.^[152,155] Heute ist bekannt, dass auch durch ausschließlich externen Kontakt Metaboliten von einigen Fremdsubstanzen in das Haar eingelagert werden können. Das galt lange als unmöglich und der Nachweis eines Metaboliten in der Haarmatrix wurde als ein sicheres Zeichen für die Aufnahme der jeweiligen Substanz und deren Körperpassage angesehen.^[160] Folglich wurde angenommen, dass durch bloßes Waschen Haare von allen nicht während des Wachstums eingelagerten Kontaminationen befreit werden können, und dass so durch einen Aufschluss der Haarmatrix ausschließlich durch den Körper aufgenommene Fremdsubstanzen nachweisbar sind. Im heute verwendeten komplexeren Inkorporationsmodell wird dagegen angenommen, dass Substanzen, zusätzlich zur Aufnahme über den Blutkreislauf, auch durch Diffusion aus Schweiß und Talg in das noch wachsende und auch in das bereits keratinisierte Haar gelangen oder Gase und Stäube von außen eingelagert werden können.^[155,157] Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass die Einlagerung von Fremdsubstanzen über den Kopf verteilt sehr unterschiedlich sein kann^[161], was ebenfalls für eine Kombination der unterschiedlichen Einlagerungswege spricht. Der Anteil der einzelnen Inkorporationswege an der Gesamteinlagerung von Fremdsubstanzen in das Haar ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Jedoch ist der Stellenwert der jeweiligen Route auch individuell und substanzabhängig verschieden.

Eine häufige Zielsetzung der forensischen Analytik ist die Klärung der Aufnahmezeitpunkte von Fremdsubstanzen. In dieser Hinsicht ist die Inkorporation über den Blutkreislauf der bedeutendste Weg, da hier diskrete Banden mit den jeweiligen Substanzen in der Haarmatrix entstehen können, die in Verbindung mit der Wachstumsrate des Haars einem bestimmten Zeitpunkt zugeordnet werden können. Diese diskreten Banden können in der Realität jedoch durch die gleichzeitige Aufnahme in das Haar über einen oder mehrere der anderen Einlagerungswege verwischt werden, wodurch sich das Nachweisfenster verbreitert.^[157,158] Folglich ist eine genauere Bestimmung des Aufnahmezeitpunkts insbesondere für jene Substanzen möglich, bei denen die Inkorporation über den Blutkreislauf dominiert. Dies gilt vermutlich für basische Substanzen wie Kokain, Amphetamin oder Opiate. Zusammenfassend

geht man davon aus, dass eine zeitliche Interpretation für basische Substanzen verlässlicher möglich ist als für neutrale und saure Fremdstoffe.^[158]

Eine weitere Fragestellung beschäftigt sich mit einer möglichen Korrelation zwischen zugeführter Dosis und gefundener Konzentration in Blut, Urin oder Haar. Im Haar wird die Interpretation zum einen durch die verschiedenen möglichen Einlagerungswege erschwert und ist nur eingeschränkt möglich. Zum anderen werden Substanzen, wie oben bereits erwähnt, abhängig von ihren Eigenschaften besser oder schlechter in das Haar eingelagert. Speziell für basische Substanzen muss zudem in Betracht gezogen werden, dass eine Einlagerung in stark pigmentiertes Haar im Vergleich zu weniger pigmentiertem Haar bevorzugt passiert.^[154] Alles in allem ist eine Interpretation der Konsumhäufigkeit und Konsummenge nur als Abschätzung auf Grundlage einer großen Anzahl an Haarproben möglich und sollte nur als Richtwert angesehen werden.^[162]

1.7.3 Einflussfaktoren (Haarkosmetik, Alterung und Lagerung der Haarproben)

Die Haaranalytik bietet grundsätzlich die Möglichkeit, über einen längeren Zeitraum als im Blut oder im Urin, Fremdstoffe nachzuweisen. Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass, je nach Umwelteinflüssen, kosmetischer Behandlung oder auch Lagerung der Haare, die Ergebnisse verfälscht werden und die Interpretation nicht mehr uneingeschränkt möglich ist. Den stärksten Effekt haben dabei tägliche Einflüsse, wie zum Beispiel die regelmäßige Haarwäsche und -pflege.

Haare sind eine stark hygroskopische Matrix, die in der Lage ist Wasser aufzunehmen. So können Haare durch die Aufnahme von Wasser bis zu 2 % in der Länge und bis zu 14 % im Durchmesser quellen.^[163] Dabei ist das tatsächliche Ausmaß abhängig von der vorherigen Behandlung des Haares, dem pH-Wert und der Temperatur. Haare, die unter Hitzeeinwirkung getrocknet wurden, enthalten weniger Wasser und können auch weniger Wasser aufnehmen, als Haare, die bei Raumtemperatur getrocknet wurden.^[164] Erst ab pH-Werten größer 9 kommt es zu einem erhöhten Haardurchmesser durch Quellung.^[165] Die so veränderten Maße und Massen der Haare können bei einer normiert durchgeführten Analyse die Ergebnisse beeinflussen. Einen stärkeren Einfluss hat jedoch, dass häufiges Haarewaschen Fremdstoffe aus dem Haar auswäscht und dadurch Analysen verfälscht werden können.^[152] Dass diese Gefahr besteht, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und dem Farbstoff Rhodamin B nachgewiesen^[165] und zum Beispiel auch für die Substanzen Carbamazepin, einige Opiate und trizyklische Antidepressiva beobachtet.^[166-168] Zusätzlich kann das verwendete Haarpflegemittel Einfluss auf die Stabilität des Fremdstoffes im Haar haben.

Viele Forschungsgruppen haben sich außerdem mit der Stabilität verschiedener Substanzen im Haar unter Einfluss von kosmetischen Behandlungen, wie Bleichen, Färben oder der

Schädigung durch Hitze befasst.^[169] Je nach Substanz sind die Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt, im Allgemeinen führt das Bleichen der Haare jedoch zu größeren Substanzverlusten als das Färben oder die Einwirkung von Hitze.^[170,171] Dabei sind zum Beispiel oxidationsempfindliche Substanzen durch Bleichen wesentlich stärker betroffen als hydrolyseempfindliche.

Auch natürliche Strahlung durch Sonnenlicht kann zur Schädigung der Haarmatrix führen und somit zum signifikanten Einflussfaktor für die Fremdstoffkonzentration im Haar werden. Besonders bei Cannabis wurde dieser Effekt mehrfach beobachtet, da in positiven Haarproben nach der Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht kein Tetrahydrocannabinol (THC) mehr nachgewiesen werden konnte.^[154,172,173]

Alle Effekte, die durch eine Schädigung der Haarmatrix zu einem erhöhten Verlust an Fremdschubstanzen führen, können auf gleichem Wege die Aufnahme dieser Substanzen aus der Umwelt, dem Schweiß oder durch andere externe Einflüsse erleichtern. Aufgrund dieser und weiterer Erfahrungen gelten für forensische Haaranalysen Richtlinien, die einen Nachweis von Drogen in einem proximalen Segment bis maximal 6 cm und dem Alkoholmetaboliten Ethylglucuronid (EtG) bis maximal 3 cm als sinnvoll erachten.^[174]

1.7.4 Bedeutung der Haaranalytik in der Forensik

Die Forensik oder genauer die forensische Toxikologie beschäftigt sich mit der Aufklärung von Straftaten, die unter Einfluss oder mittels des Einsatzes von Fremdschubstanzen begangen wurden. Dabei kommt es vor allem auf den sicheren Nachweis einer Aufnahme dieser Substanzen und damit einer Beeinflussung zum Tatzeitpunkt an. Wichtig ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass der alleinige analytische Nachweis einer Substanz keine Aussage über die Intensität der Beeinflussung einer Person zum Tatzeitpunkt erlaubt.

Die gängigsten Untersuchungsmaterialien stellen dabei Blut- und/oder Urinproben dar. In diesen Matrices ist der Nachweis von Fremdschubstanzen mit relativ geringem Aufwand möglich und die erhaltenen Werte und Ergebnisse lassen sich am besten mit bereits bestehenden Daten vergleichen und somit am besten interpretieren. In einigen Fällen ist ein solcher Nachweis aus dem Blut oder Urin jedoch nicht möglich oder nicht zielführend. Etwa wenn die Frage nach einem länger zurückliegenden Zeitpunkt gestellt wird aber zu diesem Zeitpunkt keine Proben asserviert wurden. Aber auch für eine Untersuchung, die einen längeren Zeitraum abdecken soll, sind Blut- und Urinalysen nicht geeignet.

Die Untersuchungsmatrix Haar bietet in diesen Fällen den Vorteil, dass eventuelle Aufnahmen von Drogen, Arzneimitteln oder anderen Fremdschubstanzen im Haar über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind als im Blut oder Urin. Es ist daher, bei ausreichender Haarlänge, zum Teil auch später noch möglich, Substanzen, die zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt konsumiert wurden, nachzuweisen. In diesen Fällen können auch noch nach Monaten Daten

erhoben werden, die darüber Auskunft geben, ob eine Person zu einer bestimmten Zeit Drogen aufgenommen hat oder nicht.^[175–177] Generell finden Haaranalysen vor allem Anwendung im Rahmen von verschiedensten Eignungsfragen und für juristische oder klinische Fragestellungen. Eine Übersicht über mögliche Anwendungsgebiete der Haaranalytik in der forensischen Toxikologie ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Anwendungsgebiete der Haaranalytik in der Forensik.

Eignungsfragen	Juristische Fragestellungen	Klinische Fragestellungen
Fahreignung (Medizinisch psychologische Untersuchung (MPU))		Nachweis chronischer Exposition (z. B.: Vergiftung)
Sorgerecht (Jugendamt, Gericht)		Patientenmonitoring
Berufliche Eignung (<i>Workplace Drug Testing</i>)	Eigenkonsum bei Verstoß gegen das Betäubungsmittelgesetz	Dopingnachweis
Schule	Bewährungsüberwachung	Diagnostik bei Neugeborenen
Eignung im Gaststätten- und Waffenrecht	Schuldfähigkeitsbeurteilung	Transplantationsdiagnostik

Rechtliche Grundlagen für weitere juristische Fragestellungen finden sich auch im Strafgesetzbuch. Exemplarisch sei hier etwa die Vergiftung genannt, die in einer Körperverletzung durch Beibringung von Giften (§ 224 Strafgesetzbuch) bis hin zur Tötung (§ 211 ff Strafgesetzbuch) resultieren kann. Insbesondere beim Mord ist hierbei die Arg- und Wehrlosigkeit des Opfers rechtlicher Anknüpfungspunkt, die zum Beispiel durch die Beibringung von Substanzen herbeigeführt werden kann. Eine so herbeigeführte Wehrlosigkeit kann darüber hinaus aber auch für andere (Sexual-)Straftaten ausgenutzt werden und ist entsprechend unter Strafe gestellt (zum Beispiel § 177 Strafgesetzbuch).

Eine der häufigsten Anwendungen der Haaranalytik ist jedoch die der Abstinenzüberwachung für die Fahreignungsdiagnostik. So haben Personen, die an einem Abstinenzprogramm im Rahmen einer medizinisch psychologischen Untersuchung teilnehmen, grundsätzlich die Möglichkeit, ihre Abstinenz über eine Haaranalytik nachzuweisen. Auch im Rahmen der Ermittlungen zu Kindeswohlgefährdungen finden Haaranalysen Einsatz, wenn der Verdacht eines regelmäßigen Konsums von z. B. Drogen oder Alkohol besteht. Des Weiteren kann der Nachweis eines chronischen Substanzkonsums auch in der psychiatrischen Diagnostik hilfreich sein, um zu beurteilen, ob eine Persönlichkeitsveränderung durch Fremdsubstanzen ausgelöst worden sein könnte.

Um die mittels Haaranalyse erhobenen Daten vergleichbar zu machen und zum Beispiel vor Gericht verwenden zu können, gibt es Richtlinien, die jedes akkreditierte Labor zu befolgen hat. Die Richtlinien für Haaranalytik werden von der *Society of Hair Testing* (SoHT)

zusammengetragen, überwacht und aktualisiert.^[178,179] Die Gesellschaft besteht aus Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen aus der ganzen Welt, die sich auf das Thema Haaranalytik spezialisiert und es sich zum Ziel gesetzt haben, Haaranalytik vergleichbarer zu machen, um die Möglichkeiten dieser Analytik zu erweitern.

Diese Richtlinien sehen zum Beispiel vor, dass nur unbehandelte Haare bis zu einer Länge von 3 cm auf Alkohol und bis zu 6 cm auf Drogen untersucht werden sollen. Des Weiteren sollen bevorzugt Haare von der Vertex-Region des Kopfes verwendet werden, da hier das schnellste Wachstum beobachtet wurde und dort die meisten Haare in der Anagenphase, also in der sich noch im Wachstum befindenden Phase, sind. Bei der Interpretation der Analyseergebnisse ist, in Bezug auf die Abschätzung des Aufnahmezeitpunktes eventuell nachgewiesener Substanzen, zu beachten, dass es neun bis vierzehn Tage dauert, bis ein sich neu bildendes Haar die Kopfoberfläche erreicht.^[175,176]

Zusätzlich zu den regelmäßig genutzten Haaranalysen auf Drogen, Medikamente und Alkohol in den oben genannten Fällen, gibt es mittlerweile immer mehr Labore, die sich im Rahmen wissenschaftlicher Forschung mit der Entwicklung einzelner neuer Analyseverfahren zum Nachweis außergewöhnlicher Substanzen im Haar befassen. So ist es zusätzlich gelungen, Analyseverfahren für den Nachweis von Schwermetallen, einer Vielzahl von Arzneimitteln, einigen Pestiziden und Umweltgiften, Dopingsubstanzen und anderen Stoffklassen im Haar zu entwickeln.^[160]

1.8 Haaranalytik von GHB und Interpretation der Befunde

1.8.1 Grundlagen der Einlagerung von GHB in das Haar und deren Extraktion

Beschäftigt man sich mit dem Nachweis einer bestimmten Substanz aus der Haarmatrix, sind zunächst einige Fragen zu klären, um eine erfolgreiche Analytik durchzuführen.^[180,181]

- Ist GHB überhaupt eine Substanz, die in das Haar eingelagert wird?
- Kommen passive Kontaminationen in Frage?
- Wie extrahiert man GHB aus der Haarmatrix, ohne die Substanz zu zerstören?

Grundlage zur Beantwortung all dieser Fragen ist ein Verständnis dafür, wie Substanzen in das Haar eingelagert werden. In Kapitel 1.7 wurde diese Frage bereits allgemein behandelt, speziell für GHB existieren dazu bisher keine konkreten Forschungsergebnisse. Eine erhöhte Melaninaffinität ist für die acide GHB nicht anzunehmen, wodurch eine Einlagerung nicht begünstigt wird.^[158] Die Zeit, die GHB im Blutkreislauf verbringt, ist durch die extrem kurze Halbwertszeit so begrenzt, dass eine Einlagerung über das Blut oder den Schweiß nur in einem sehr kleinen Zeitfenster geschehen kann. Orientiert man sich an diesen Überlegungen und an allgemeingültigen chemischen und strukturellen Gegebenheiten kommt man zu dem Schluss, dass GHB wahrscheinlich aufgrund ihrer Acidität und polaren hydrophilen Struktur zu den Substanzen gehört, die zu einem eher geringen Anteil in das Haar eingelagert werden.

Neben der Frage, wie viel von der zu analysierenden Substanz in das Haar eingelagert wird, spielt auch die Frage, wie viel der Substanz sich aus dem Haar extrahieren lässt, eine entscheidende Rolle. Der kritische Punkt bei der Haaranalytik ist die Probenvorbereitung und der Aufschluss der Haarmatrix. Dabei sollen während des Waschschruttes der Haare zum einen äußere Verunreinigungen vom Haar entfernt werden, aber gleichzeitig möglichst keine Substanzen aus dem Haar herausgelöst werden.^[152] Dazu wählt man meist, nach den Richtlinien der SoHT, zunächst ein organisches Lösungsmittel, anschließend eine oder mehrere wässrige Waschlösungen und abschließend erneut ein organisches Lösungsmittel.^[178] Eine Waschprozedur, die ausschließlich das Haar reinigt, aber keinerlei Substanzen aus dem Haar herauswäscht, ist bis heute nicht bekannt. Daher werden das Volumen der Waschlösung und die Zeit des Waschvorgangs so angepasst, dass das Verhältnis zwischen Dekontamination von externen Verunreinigungen und dem Herauslösen von Substanzen aus dem Haar möglichst günstig ist.^[152]

Für GHB wurden in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren einige Waschprozeduren erprobt. In fast allen wurde als organisches Lösungsmittel Dichlormethan oder eine Kombination aus Dichlormethan und Methanol verwendet. Zusätzlich wurde häufig mit kaltem oder heißem entionisiertem Wasser oder einem wässrigen Puffer gewaschen. Da GHB sowohl in Methanol als auch in Wasser gut löslich ist, sollte die Waschzeit möglichst kurz gehalten werden und die Waschlösungen ebenfalls immer auf die jeweilige Substanz hin untersucht werden. Nach dem Waschen homogenisiert man die Haarprobe, je nach vorhandener Menge an Material, entweder durch das Schneiden möglichst kleiner Segmente oder durch Pulverisierung in einer Kugelmühle. Dabei wird die Oberfläche der Haare so vergrößert, dass eine anschließende Extraktion der Substanzen erleichtert wird. Bei gemahlenden Haaren kann die anschließende Extraktion von GHB aus dem Haar durch Einwirken von Methanol oder Wasser über mehrere Stunden in einem Ultraschallbad erreicht werden. Diese Methode ist vor allem bei alkalisch instabilen Substanzen zu empfehlen, führt allerdings auch zu einer geringeren Ausbeute als die alkalische Hydrolyse.^[152,154] Diese bietet sich an, wenn die Haare zu kurzen Segmenten geschnitten wurden, da hier das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen ungünstiger ist. Dabei werden die Haare zunächst in einer alkalischen Lösung (meistens eine wässrige Natronlauge) aufgelöst und nach Einstellen eines sauren pH-Wertes (meist durch wässrige Salzsäure) die Gamma-Hydroxybuttersäure mittels Ethylacetat extrahiert.^[152]

Bei der Interpretation von quantitativen und auch qualitativen Haaranalysen sollte man sich immer auch Gedanken über mögliche externe Kontaminationswege machen – also Möglichkeiten, wie die Substanz in das Haar gelangen könnte, ohne den Körper passiert zu haben. Für GHB gibt es bisher noch keine Studien, ob ein unwissentlicher Umgang mit der Substanz zu positiven Haarbefunden führen kann. Da sehr wahrscheinlich ein Teil der

Einlagerung von GHB über Schweiß stattfindet, ist dieser Weg der Kontamination durchaus plausibel und bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse zu berücksichtigen.

1.8.2 Entwicklung der Haaranalytik

Neben der Extraktion, die dazu dient, im Haar eingelagerte Substanz in Lösung zu bringen, ist die Analytik zum Nachweis der gelösten Substanz von ebenso entscheidender Bedeutung zur Beantwortung forensischer Fragestellungen.

Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von GHB kommt es in vielen Fällen mit forensischer Fragestellung in den Matrices Blut und Urin zu keinem Nachweis oberhalb endogener Konzentrationsbereiche. Dann stellt sich die Frage, war die Substanz GHB nicht, aufgrund fehlender Aufnahme der Substanz, oder nicht mehr, aufgrund der bereits verstrichenen Zeit und dem damit verbundenen Abbau der Substanz, in höheren Konzentrationen nachweisbar? Wie bereits beschrieben, kann der Nachweis von länger zurückliegendem Konsum oder länger zurückliegenden Aufnahmen von Fremdstoffen in vielen Fällen über die Matrix Haar ermöglicht werden, da Substanzen innerhalb des Haares eingelagert werden und somit auch noch Monate später nachweisbar sind. Gerade im Hinblick auf Substanzen mit geringer Halbwertszeit ist ein Nachweis aus dieser Matrix besonders interessant, denn bei diesen gelingt ein Nachweis über Blut oder Urin häufig bereits nach kurzer Zeit nicht mehr, während, nach einigen Tagen oder Wochen, Methoden der Haaranalytik Nachweise ermöglichen. Bezogen auf GHB wäre dadurch die Aufnahme von K.o.-Tropfen auch bei einer zeitlichen Verzögerung zwischen Vorfall und Probengewinnung unter Umständen beweisbar.

Nach Anstieg der Sexualdelikte im Zusammenhang mit GHB wurde das Interesse an Haaranalysen für GHB immer größer.^[31,182] Einen ersten Versuch, GHB-Konzentrationen in Haaren zu bestimmen, unternahm *Frison/Ferrara et al.*, laut Zitaten aus verschiedenen Tagungsbeiträgen, bereits in den 1990er Jahren, damals sollen sowohl GHB-Konzentrationen von Langzeiteinnahmen als auch endogene Konzentrationen per GC-MS analysiert worden sein. Damals wurden 50 mg beziehungsweise 300 mg Probenmaterial für eine Analyse verwendet.^[183]

Die erste publizierte Methode zur Bestimmung von GHB aus Haaren stammt von *Kalasinsky et al.* aus dem Jahr 2001. In einem Fallbericht nach tödlicher GHB-Einnahme wurden Haare segmentweise per GC-MS auf GHB untersucht. Laut dieser Studie konnten damals aufgrund der geringen Probenmenge von 10 mg keine endogenen GHB-Spiegel nachgewiesen werden. Lediglich in den untersuchten Wurzeln der Haare fanden sich erhöhte GHB-Konzentrationen.^[184]

In den folgenden Jahren wurden weitere GC-MS-Methoden zur Bestimmung endogener GHB-Konzentrationen in Haaren oder auch GHB-Konzentrationen in Haaren nach chronischem Konsum, kontrollierten Einmalgaben unterschiedlichster Konzentrationen oder bei

Verdachtsfällen auf Sexualdelikte in Zusammenhang mit GHB veröffentlicht.^[18,183,185–188]

Zeitgleich wurden auch LC-MS-Methoden entwickelt, die meist eine etwas weniger zeitaufwendige Probenvorbereitung erfordern. Die erste publizierte LC-MS-Methode wurde von *Stout et al.* 2010 zur Bestimmung endogener Konzentrationen im Haar veröffentlicht. Die Methode erreichte eine Nachweisgrenze von 0,2 ng/mg bei einer Probenmenge von 25 mg Haar.^[189] Auch hier wurden in den folgenden Jahren weitere Methoden für die Bestimmung endogener GHB-Konzentrationen,^[190–192] GHB-Konzentrationen nach chronischem Konsum,^[151,193–195] GHB-Konzentrationen nach kontrollierten Einmalgaben ^[190] und GHB-Konzentrationen nach Sexualdelikten im Zusammenhang mit GHB ^[191,196,197] im Haar entwickelt.

Erst kürzlich wurden zusätzlich Methoden für die Bestimmung von GHB-Vorläufern und GHB-Metaboliten im Haar, ebenfalls mittels LC-MS, entwickelt.^[151,194,198] In Tabelle 2 sind die wichtigsten Analysemethoden zum Nachweis von GHB im Haar zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht der wichtigsten Analysemethoden zur Bestimmung von GHB aus Haaren. Aufgelistet sind (wenn beschrieben) Publizierende mit Jahr, Methode, Probenvolumen und Segmentierung (s. = segmentiert, n. s. = nicht segmentiert), Extraktionsmethode, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (*Limit of Detection* (LoD) / *Limit of Quantification* (LoQ) / n. b. = nicht bestimmt) und Anmerkungen zur Methode/Studie.

Publizierende /Jahr	Methode	Proben- menge, s./n. s.	Extraktionsmethode	Nachweis- /Bestimmungs- grenze	Anmerkung
<i>Kalasinsky et al.</i> 2001 ^[184]	GC-MS	10 mg, s.	Denaturierung und Festphasenextraktion	LoD: 1 ng/mg	Endogene Werte konnten nicht bestimmt werden
<i>Gouille et al.</i> 2003 ^[183]	GC- MS/MS	5 mg, s./ n. s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	n. b.	Mehrfache Aufnahme nachgewiesen
<i>Kintz et al.</i> 2003 ^[18]	GC- MS/MS	5-10 mg, s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,1 ng/mg; LoQ: 0,2 ng/mg	Einmalige Aufnahme nachgewiesen
<i>Rossi et al.</i> 2009 ^[185]	GC-MS	20 mg, s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,01 ng/mg; LoQ: 0,1 ng/mg	Mehrfache Aufnahme nachgewiesen (DFSA)
<i>Stout et al.</i> 2010 ^[189]	LC- MS/MS	25 mg	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,2 ng/mg; LoQ: 0,4 ng/mg	Erste LC Methode für den Nachweis endogener Konzentrationen
<i>Paul et al.</i> 2011 ^[186]	GC- MS/MS	20 mg, s.	Anionenaustausch- Festphasenextraktion	n. b.	EtG wird detektiert

Publizierende /Jahr	Methode	Proben- menge, s./n. s.	Extraktionsmethode	Nachweis- /Bestimmungs- grenze	Anmerkung
<i>Bertol et al.</i> 2012 ^[193]	GC-MS, LC- MS/MS	25 mg, s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,4 ng/mg (GC), 0,5 ng/mg (LC); LoQ: 0,6 ng/mg	Vergleich GC und LC Methode an chronischem GHB- Konsumenten
<i>Hari et al.</i> 2013 ^[190]	LC- MS/MS	20 mg, s.	Ultraschall- Extraktion, Online- Festphasenextraktion	n. b.	Endogene Konzentrationen in Kopf- und Barthaar
<i>Schröck et al.</i> 2014 ^[199]	LC- MS/MS	20 mg, s.	Ultraschall- Extraktion, Online- Festphasenextraktion	n. b.	Kein Nachweis nach einmaliger Aufnahme von GBL
<i>Bertol et al.</i> 2015 ^[191]	LC- MS/MS	25 mg, s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,3 ng/mg; LoQ: 0,5 ng/mg	12 einmalige GHB-Aufnahmen nachgewiesen
<i>Jagerdeo et al.</i> 2015 ^[192]	LC- MS/MS	25 mg, n. s.	Pulverisierung, Denaturierung, Flüssig-Flüssig- Extraktion, Festphasenextraktion	LoD: 0,33 ng/mg; LoQ: 1,2 ng/mg (beides errechnet bzw. festgelegt)	Sehr aufwendige Extraktion, hohe endogene Werte gemessen
<i>Shi et al.</i> 2016 ^[187]	GC- MS/MS	20 mg, n. s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,02 ng/mg; LoQ: 0,05 ng/mg	66 endogene GHB- Konzentrationen bestimmt
<i>Vaiano et al.</i> 2016 ^[188]	GC-MS	25 mg, s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,05 ng/mg; LoQ: 0,19 ng/mg	150 endogene GHB- Konzentrationen bestimmt
<i>Wang et al.</i> 2016 ^[198]	LC- MS/MS	10 mg, s.	Pulverisierung, Extraktion mittels Lösungsmittel im Ofen	LoQ: 0,32 ng/mg (GHB), 0,48 ng/mg (GHB-Gluc)	GHB-Gluc Metabolit wird detektiert, sehr hohe Werte für chronische GHB- Konsumenten

Publizierende /Jahr	Methode	Probenmenge, s./n. s.	Extraktionsmethode	Nachweis-/Bestimmungsgrenze	Anmerkung
<i>Busardo et al.</i> 2017 ^[151]	LC- MS/MS	25 mg, s.	Extraktionsmedium, Verdünnung	LoD: 0,2 ng/mg (GHB, GHB-Gluc), 0,3 ng/mg (GABA, GBL); LoQ: 0,5 ng/mg (GHB, GHB-Gluc), 1,0 ng/mg (GABA, GBL)	GHB-Gluc, GABA und GBL werden detektiert
<i>Mehling et al.</i> 2017 ^[194]	LC- MS/MS	10 mg, s.	Pulverisiert mit Extraktionsmedium	LoQ: 0,32 ng/mg (GHB), 0,48 ng/mg (GHB-Gluc)	GHB-Gluc in Haaren nach chronischer und einmaliger Aufnahme
<i>Kegler et al.</i> 2018 ^[80]	LC- MS/MS	20–30 mg, s./ n. s.	Pulverisiert und Ultraschall-Extraktion	n. b.	152 endogene GHB-Konzentrationen (teils segmentiert)
<i>Van Elsue et al.</i> 2018 ^[195]	GC- MS/MS	-	Ultraschallbad und Festphasenextraktion	-	Haare von GHB abhängigen Personen
<i>Da Chagas et al.</i> 2019 ^[200]	GC-MS	10 mg	Pulverisiert, Extraktionsmedium	LoQ: 0,6 ng/mg	AHB, BHB werden detektiert
<i>Del Ramirez et al.</i> 2019 ^[201]	LC- MS/MS	10 mg, s.	Pulverisiert, Extraktionsmedium	-	Einfluss von Bleichen und Glätten der Haare
<i>Martz/Nebel et al.</i> 2019 ^[202]	LC- MS/MS	10 mg, s.	Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,1 ng/mg; LoQ: 0,3 ng/mg	88 endogene GHB-Konzentrationen bestimmt, einmalige GHB-Aufnahme wurde nicht nachgewiesen
<i>Liu et al.</i> 2020 ^[203]	GC-MS	0,3 mg, n. s.	-	LoD: 0,3 ng/mg; LoQ: 1,0 ng/mg	Nur ein Haar wird benötigt
<i>Lloyd et al.</i> 2020 ^[204]	LC- MS/MS	10 mg, s.	Pulverisierung, Denaturierung und Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,4 ng/mg, LoQ: 0,4 ng/mg	Synthetische Haarmatrix zur Validierung
<i>Meng et al.</i> 2020 ^[205]	GC- MS/MS	-	Dispersive Flüssig- Flüssig- Mikroextraktion	LoD: 0,01 ng/mg	

1.8.3 Endogene GHB-Konzentrationen in Haaren

Wie bereits erwähnt, geht es bei der Forschung zur GHB-Analytik vorrangig um die Differenzierung zwischen endogenen und den nach Aufnahme von GHB erreichten Konzentrationen. Nachdem in Kapitel 1.6 der Stand der aktuellen Forschung in humanem Probenmaterial Blut und Urin behandelt wurde, befasst sich dieser Abschnitt kurz mit dem zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Forschungsstand der endogenen GHB-Konzentrationen im Haar. Weitere Informationen zu Forschungsarbeiten zum Thema GHB-Analytik in Haaren, wie Haaranalysen nach regelmäßiger oder einmaliger Aufnahme von GHB oder Haaranalysen zu Metaboliten von GHB werden im Laufe dieser Arbeit ausführlich diskutiert.

Im Vergleich zu anderen Matrices gibt es relativ wenige Publikationen zu endogenen GHB-Konzentrationen im Haar. Die ersten Studien dazu publizierten 2003 *Kintz et al.* und *Gouille et al.*^[18,183] Die endogenen Konzentrationen variierten von 0,31 ng/mg für segmentierte Haarproben bei *Gouille et al.*^[183] bis zu 12 ng/mg bei unsegmentierten Haarproben bei *Kintz et al.*^[18] Der Großteil der analysierten Proben lag dabei unterhalb von 2 ng/mg, jedoch mit einigen signifikant höheren Ausreißern. 2014 veröffentlichten *Schröck et al.* und 2015 *Bertol et al.* erneut Studien zu endogenen GHB-Konzentrationen im Haar. Die ermittelten Konzentrationen lagen dabei bei *Schröck et al.* für 27 Haarproben zwischen Werten kleiner der Nachweisgrenze von 0,1 ng/mg und 1,3 ng/mg^[18] und bei *Bertol et al.* für 30 Haarproben zwischen nahezu nicht nachweisbarer GHB bis zu Konzentrationen von 5,09 ng/mg.^[191] Ein Jahr später wurde eine wesentlich größere Studie von *Vaiano et al.* veröffentlicht, in der 150 Haarproben auf ihre endogene GHB-Konzentration hin untersucht wurden. Die Konzentrationen lagen in einem engen Konzentrationsbereich von 0,27 ng/mg bis 2,84 ng/mg.^[188] Eine weitere Studie aus dem Jahr 2016 von *Shi et al.* kam bei der Analyse von 66 Haarproben zu einem sehr ähnlichen Konzentrationsbereich zwischen 0,28 ng/mg und 4,91 ng/mg GHB.^[187] Einen Hinweis darauf, dass die Konzentrationen an GHB im Haar im Gegensatz zu GHB-Konzentrationen in Blut und Urin in postmortalen Proben nicht erhöht sind, lieferten *Castro et al.* ebenfalls 2016 in einer Studie von 32 postmortalen Haarproben. Auch in dieser Studie lagen die ermittelten GHB-Konzentrationen im Haar zwischen 0,16 ng/mg und 3,12 ng/mg, wobei die GHB-Konzentrationen derselben Personen im Blut deutlich angestiegen waren.^[206]

1.9 Grundlagen der verwendeten Analytik

Die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der Messsysteme für den Nachweis endogener Substanzen in der komplexen Matrix Haar sind hoch. Nach der Extraktion gibt es verschiedene Möglichkeiten der qualitativen und quantitativen Analyse. Im Rahmen des Nachweises von GHB im Haar haben sich dafür die Methoden der Gaschromatographie (GC) und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC oder LC) jeweils gekoppelt mit

Massenspektrometrie (MS) oder Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bewährt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Substanzen nach der Extraktion aus Haarproben mittels HPLC-ESI-QQQ-MS/MS (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Elektrospray-Ionisation und Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie) analysiert. Hierzu wurde eine *Shimadzu LC20 UFLC* und ein *AB Sciex API 4000 Qtrap* Tandem-Massenspektrometer verwendet. Die instrumentellen Grundlagen des hier verwendeten LC-MS/MS-Systems werden im Folgenden näher erläutert.

1.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die aus der jeweiligen Matrix extrahierten Substanzen müssen für eine erfolgreiche Analyse zunächst in einer flüssigen Phase aufgenommen werden. Bei dieser handelt es sich in den meisten Fällen um den Eluenten für die anschließende LC-MS/MS-Analyse. Mittels dieses Eluenten, auch mobile Phase genannt, werden die gelösten Substanzen in einem Lösungsmittelfluss durch ein Pumpensystem der HPLC Anlage auf eine chromatographische Säule injiziert. Diese Säule enthält eine stationäre Phase, meist chemisch modifiziertes Kieselgel, an der die zu analysierenden Substanzen je nach Stärke der Wechselwirkung unterschiedlich retardiert werden. Je stärker eine Substanz an einer Säule retardiert wird, desto später eluiert diese von der Säule. Dadurch können die Analyten im besten Fall vollständig voneinander getrennt werden und anschließend separat mittels Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert werden.

Die durch die chromatographische Säule erreichte Retardierung beruht auf der Interaktion der zu trennenden Substanzen mit den funktionellen Gruppen des Säulenmaterials durch Adsorptions- und Desorptionsmechanismen. Die mobile Phase konkurriert mit der gebundenen Substanz um die Bindestellen an der Säule. Das bedeutet, die gebundene Substanz wird dann eluiert, wenn die Polarität der mobilen Phase so verändert wurde, dass diese Interaktion überwiegt und die vorher gebundene Substanz von den Bindestellen verdrängt wird. In vielen Fällen erreicht man durch langsame Veränderung der Polarität der mobilen Phase, auch Gradientenelution genannt, eine Basislinientrennung der Substanzen aus einer Probe. Um die erwünschte Trennung verschiedener Substanzen zu erreichen, gibt es viele Variablen, die berücksichtigt werden können. Eine der einfachsten Möglichkeiten ist die Anpassung der Polarität des Laufmittels durch Änderung der Zusammensetzung oder Tauschen der Lösungsmittel. Ein, hinsichtlich der Polarität, der stationären Phase ähnelndes Laufmittel, führt zu einer schnelleren Elution der mit der Säule wechselwirkenden Substanzen und umgekehrt ein stärkerer Polaritätsunterschied zu einer späteren Elution. Zudem kann über den Zusatz von Säuren oder Basen der pH-Wert des Laufmittels verändert werden, um eine Protonierung oder Deprotonierung der zu analysierenden Substanz und somit eine veränderte Wechselwirkung mit der stationären Phase der HPLC-Säule zu erreichen. Zwei weitere

Variablen mit geringerem Einfluss auf die Trennleistung sind die Flussrate und die Temperatur während der Trennung. In Einzelfällen kann durch Variation einer dieser Parameter der entscheidende Schritt zur Basislinientrennung gemacht werden, insofern sollte die Möglichkeit zur Beeinflussung dieser beiden Komponenten nicht prinzipiell ausgeschlossen werden. Die wichtigste Entscheidung stellt jedoch die Wahl der Säule dar, da eine Trennung von Substanzen nicht möglich ist, wenn keine Interaktion mit dem Säulenmaterial stattfindet. Daher gilt es zunächst festzulegen, auf der Grundlage welcher Wechselwirkungen die Substanzen getrennt werden sollen. 80 % aller chromatographischen Trennungen werden mittels C18/C8 Umkehrphasen (höhere Polarität der mobilen Phase im Vergleich zur stationären Phase) gemacht, es gibt jedoch auch die Möglichkeiten der Normalphasentrennung (höhere Polarität der stationären Phase im Vergleich zur mobilen Phase), der Größenausschlusschromatographie und der Ionenaustauschchromatographie.^[207]

1.9.2 Massenspektrometrie

Der schematische Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers ist in Abbildung 12 dargestellt.

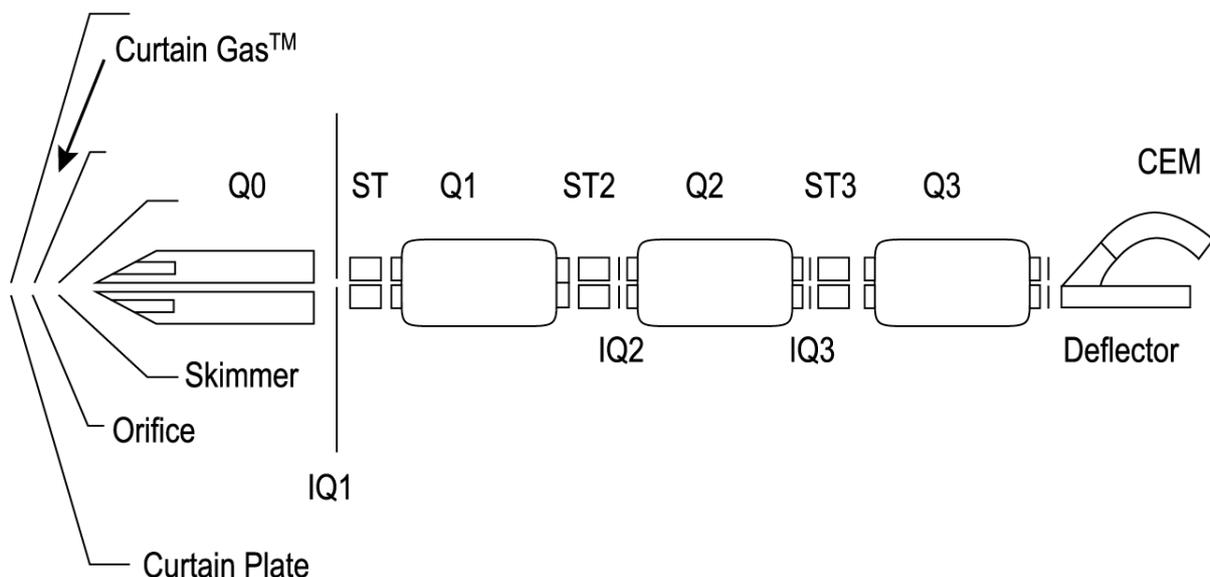


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers (verändert nach *AB Sciex API 4000 Hardware Manual* ^[208]).

Die aufgetrennten Analyten werden mittels Eluent zur Ionenquelle transportiert. Im Falle der Elektrospray-Ionisation (ESI) wird durch eine Nadel, an deren Spitze eine elektrische Spannung mit positiver oder negativer Polarität angelegt ist, ein feines Spray erzeugt. Die Ionen werden im elektrischen Feld Richtung Gegenelektrode (*Curtain Plate*) beschleunigt. Hohe Temperaturen in der Quelle sorgen dafür, dass das Lösungsmittel verdampft, dadurch

kommt es zur Abstoßung der geladenen Teilchen und schließlich durch Coulombexplosionen zur Bildung von Mikrotröpfchen.^[209] Ein Teil dieser Mikrotröpfchen wird dann durch die angelegte Spannung an der *Curtain Plate* durch das *Orifice* und den *Skimmer* fokussiert und in den ersten Quadrupol Q0 geleitet. Zwischen *Curtain Plate* und *Orifice* liegt ein Stickstoffstrom, das sogenannte *Curtain Gas*, an. Dieses Gas und der nachgeschaltete Skimmer verhindern, dass nicht geladene Teilchen oder andere Verunreinigungen in das Innere des Massenspektrometers gelangen. Darüber hinaus werden die noch verbliebenen Lösungsmitteltröpfchen vollständig verdampft, sodass nur noch geladene Teilchen übrigbleiben. Nach dem *Skimmer* gelangen die zu analysierenden Molekülonen in das Hochvakuum. Das Innere eines Triple Quadrupol Massenspektrometers besteht aus drei linear hintereinander angeordneten Quadrupolen. Quadrupole sind Massenanalytoren mit vier parallel und quadratisch angeordneten zylindrischen Elektroden, von denen jeweils die zwei gegenüberliegenden Elektroden dieselbe Polarität aufweisen. Diese Polarität kann in sehr kurzen Zeitabständen hin und her gewechselt werden, wodurch Ionen, die jeweils von zwei Elektroden abgestoßen und von den anderen zwei Elektroden angezogen werden, sich spiralförmig durch den Quadrupol bewegen. Diese Flugbahn beschreiben jedoch nur Ionen, die sich bei der jeweils angelegten Spannung durch ihr spezifisches Masse-zu-Ladungsverhältnisses stabil im elektrischen Feld bewegen können. Andere Ionen werden so durch den Massenanalysator aussortiert und gelangen nicht durch den Quadrupol hindurch. Der Quadrupol Q0 direkt am Eingang des Massenspektrometers dient lediglich zur Fokussierung der Ionen und lässt alle Ionen unabhängig von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis passieren. Im Quadrupol Q1 und Q3 werden dagegen Ionen selektiert und nur bei einem bestimmten, wählbaren Masse-zu-Ladungsverhältnis durchgelassen. Der Q2-Quadrupol dient in der Mitte der beiden Massenfilter als Kollisionszelle, in der, durch Stöße mit Gasmolekülen des *Collisionally Activated Dissociation* (CAD) Gases, Fragmente aus den vorher im Q1 selektierten Ionen erzeugt werden können. Die zwischen den Quadrupolen befindlichen *Stubbies* (ST, ST2, ST3) und *Interquad Lenses* (IQ1, IQ2, IQ3) dienen der Fokussierung und Weiterleitung der Ionen. Am Ausgang des Massenspektrometers befindet sich zur Signalerzeugung der Detektor, häufig bestehend aus einem Deflektor und einer Elektronenvervielfacherröhre (*Channel Electron Multiplier*, CEM). Der Deflektor sammelt die Ionen ein und leitet sie zur Öffnung des CEM, dort wird durch eine Kollision eines energiereichen Teilchens mit der Oberfläche des Detektors aus dessen Oberfläche eine Kaskade von Sekundärelektronen ausgelöst und das Signal somit um ein Vielfaches verstärkt.^[147,208]

2 Motivation und Aufgabenstellung

GHB ist seit vielen Jahren ein kontrovers betrachteter analytischer Parameter. GHB kann endogen gebildet werden und findet als Wirkstoff Anwendung in der Medizin zum Beispiel zur Behandlung der neurologischen Erkrankung Narkolepsie. Abseits medizinischer Anwendungen wird GHB neben dem illegalen Eigengebrauch für eine Rauschwirkung auch für Straftaten verwendet, in denen durch Beibringung von GHB oder GBL, welches dann im Körper zu GHB umgewandelt wird, das Opfer sediert und widerstandsunfähig gemacht wird. Aufgrund der einfachen Handhabung und der fehlenden Regulierung durch das BtMG wurde GHB in vielen solcher Fälle durch die Vorläufersubstanz GBL abgelöst.^[199,210] Der sichere Nachweis einer GHB/GBL-Aufnahme ist aus diesen Gründen unter anderem für die forensische Toxikologie und die Rechtsprechung in vielen Fällen entscheidend. In einem solchen Fall kann es sein, dass das Ergebnis einer Haaranalyse der einzige greifbare Befund ist, der auf eine K.o.-Mittel-Gabe hinweist. Erschwert wird die Beurteilung eines positiven Nachweises jedoch durch mehrere Faktoren. So muss sichergestellt werden, dass die ermittelte GHB-Konzentration tatsächlich durch von außen zugeführte GHB zu erklären ist und es sich nicht nur um die endogenen GHB-Konzentrationen der jeweiligen Person handelt, da die GHB-Produktion von Individuum zu Individuum sehr unterschiedlich sein kann. Zudem macht die kurze Halbwertszeit und somit auch kurze Nachweisbarkeitsdauer von GHB einen Nachweis aus dem Blut oder Urin in vielen Fällen schwierig bis unmöglich. Die Haaranalytik für GHB besitzt das Potenzial dieses Problem der kurzen Nachweisbarkeitsdauer zu umgehen. Bisher findet sich zur Nachweisbarkeit einer GHB-Aufnahme im Haar jedoch nur wenig Literatur.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, zunächst eine leistungsfähige Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung endogener GHB-Konzentrationen im Haar zu entwickeln. Diese Methode soll, nach vollständiger Validierung, zur Bestimmung endogener GHB-Konzentrationen im Haar genutzt werden. Die ermittelten Werte sollen anschließend statistisch ausgewertet werden, um so, auch durch Vergleiche mit anderen Studien, einen Bereich der endogenen GHB-Konzentrationen im Haar genauer definieren zu können. Der Vorteil einer Zusammenführung von Messdaten mehrerer Studien besteht vor allem in der so erhaltenen großen Probenanzahl, wodurch ein aussagekräftigerer Referenzbereich gebildet werden kann und auch andere statistische Größen vergleichbarer werden. Diese Arbeit soll darüber hinaus mittels statistischer Auswertung intraindividuelle Unterschiede der vermessenen Haarproben aufzeigen. Dazu werden Haarproben in möglichst kleine Segmente unterteilt, einzeln aufgearbeitet und die Konzentration an GHB bestimmt. Die segmentweise Analyse der Haare soll ebenfalls Aufschluss darüber geben, ob die GHB-Konzentrationen zum proximalen oder distalen Ende hin ansteigen oder gleichmäßig verteilt sind. Darüber hinaus soll in den vermessenen Haarproben getestet werden, welche Faktoren die ermittelten GHB-

Konzentrationen im Haar beeinflussen können. Untersucht werden soll zum einen der Einfluss unterschiedlicher Extraktionsmethoden und zum anderen die Lagerungszeit der Haarproben. Die entscheidende, bisher kontrovers diskutierte Frage im Rahmen der GHB-Haaranalytik ist, inwiefern es möglich ist, eine einmalige Aufnahme von GHB nachzuweisen. Für ein Modell, das einen solchen Nachweis erlaubt, wird durch die Bestimmung und Eingrenzung möglicher endogener GHB-Konzentrationen im Haar der Konzentrationsbereich definiert, der ohne eine zusätzliche externe Aufnahme von GHB möglich oder aufgrund statistischer Tests wahrscheinlich ist. Möchte man sich dem Konzentrationsbereich im Haar nähern, in dem eine einmalige Aufnahme von GHB einzuordnen wäre, ist es außerdem sinnvoll, auch den Bereich eines möglichen oberen Referenzwerts zu kennen, der durch die externe Aufnahme von hohen Dosen an GHB im Haar erreicht werden kann. Dazu sollen in der vorliegenden Arbeit Haarproben von Personen untersucht werden, die mit dem Medikament *Xyrem*[®] behandelt werden. Da es sich bei dem Wirkstoff von *Xyrem*[®] um das Natriumsalz der Gamma-Hydroxybuttersäure handelt, ermöglicht die Haaranalyse dieser Personen eine Eingrenzung der zu erwartenden GHB-Konzentrationen im Haar bei täglicher Einnahme von hohen Dosen GHB. Diese verabreichten Dosen liegen typischerweise in einem Bereich, der auf nicht an GHB gewöhnte Personen bewusstseinsbeeinträchtigend wirken würde. Die Haarproben sollen ebenfalls segmentweise untersucht werden, da so verlässlichere Mittelwerte gebildet werden können und eine Verteilung der GHB-Konzentrationen über das Haar bei regelmäßiger Aufnahme beurteilt werden kann.

Angesichts des herausfordernden GHB-Nachweises gibt es bereits einige Ansätze, das Nachweisfenster für GHB im Blut oder Urin zu verlängern. Dies geschieht auch bei anderen Substanzen mit kurzer Halbwertszeit bevorzugt über den Nachweis der langlebigeren Metaboliten der eigentlichen Substanz. Auch für GHB gibt es in dieser Richtung bereits einige Bemühungen. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher auch untersucht werden, ob sich verschiedene Metaboliten von GHB, etwa durch eine längere Verweildauer im Blut oder veränderte chemische Eigenschaften, in der Haarmatrix vermehrt einlagern und dadurch eine deutlichere Unterscheidung zwischen dem endogenen und nach Aufnahme erreichten GHB-Level möglich ist. Ist dies der Fall, könnte auf diesem Weg ein Nachweis einer einmaligen GHB-Aufnahme vereinfacht werden. Dafür ist es Ziel dieser Arbeit sowohl für die organischen Säuren Glycolsäure, 2,4-Dihydroxybuttersäure (2,4-DHB) und 3,4-Dihydroxybuttersäure (3,4-DHB, die als Phase-I-Metaboliten von GHB untersucht werden, als auch für den Phase-II-Metaboliten GHB-4-Sulfat (GHB-Sulf) eine analytische Methode zum Nachweis in der Matrix Haar zu entwickeln und diese anschließend zu nutzen, um bei vorhandenen, bereits auf GHB untersuchten Proben, die Konzentrationsbereiche der Metaboliten zu bestimmen. Dabei sollen sowohl endogene Konzentrationen in Haaren als auch die Konzentrationen in den Haarproben nach Einmalgabe und nach regelmäßiger Einnahme von GHB untersucht werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Reinheit/Konzentration	Firma
Acetonitril	<i>LiChrosolv</i> [®]	<i>Merck/Supelco</i> (Darmstadt, Deutschland)
Dichlormethan	<i>EMSURE</i> [®]	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Ethylacetat	<i>LiChrosolv</i> [®]	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure	1 M wässrige Lösung	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge	1 M wässrige Lösung	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Wasser	<i>LiChrosolv</i> [®]	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Gamma-Hydroxybuttersäure Lösung in Methanol (Na-Salz)	1 mg/mL	<i>Lipomed</i> (Arlesheim, Schweiz)
Gamma-Hydroxybuttersäure-D ₆ Lösung in Methanol (Na-Salz)	100 µg/mL	<i>Cerilliant</i> (Round Rock, Texas)
Beta-Hydroxybuttersäure (BHB)	95 %	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Ameisensäure	<i>HiPerSolv CHROMANORM</i> [®]	<i>VWR</i> (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	<i>LiChrosolv</i> [®]	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumformiat	Analytische Qualität (>99 %)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumacetat	kristallin, für Analyse	<i>Riedel-de Haën</i> (Seelze, Deutschland)
Ammoniak	25 % <i>EMSURE</i> [®]	<i>Merck/Supelco</i> (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	<i>Pufferan</i> [®] ≥ 99 %	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Glycolsäure	<i>ReagentPlus</i> [®]	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
2,4-Dihydroxybuttersäure (Li-Salz)	≥ 95 %	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
3,4-Dihydroxybuttersäure (Li-Salz)	≥ 95 %	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
GHB-4-Sulfat		Sporthochschule (Köln, Deutschland)

Für den Glycin-Puffer wurden 0,38 g Glycin in 65 mL Wasser gelöst und 10 mL Salzsäure (1 M) hinzugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natronlauge (1 M) auf 2,6 eingestellt.

3.2 Probengewinnung

Für diese Arbeit wurden nach Genehmigung durch die zuständige Ethik-Kommission (*University of British Columbia*: CREB NUMBER: H11-01495, Universitätsklinikum Bonn: AZ 370/13, Justus-Liebig-Universität Gießen: AZ 243/18) und nach unterzeichneter Einverständniserklärung zum einen Proben von Freiwilligen gesammelt, die keine GHB konsumiert hatten und bei denen auch von keiner GHB-Aufnahme auszugehen war. Zum anderen wurden Freiwilligen, die unter Narkolepsie leiden und mit dem Medikament *Xyrem*[®] behandelt wurden, im Rahmen einer Behandlung im Schlaflabor Haare abgenommen. Die

Haarproben für die Untersuchung der endogenen Konzentrationen wurden anonym in einem Friseursalon nach dem Schneiden der Haare eingesammelt. Bei den untersuchten Haarproben handelte es sich demnach nicht um Proben die direkt über der Kopfhaut abgenommen wurden, sondern um die im Rahmen des gewünschten Haarschnittes abgeschnittenen distalen Haare. Dabei wurde weder das Geschlecht noch das Alter oder die Haarbehandlung notiert. Es wurde lediglich vermerkt, ob die Haare vor dem Schneiden länger als etwa 10 cm lang waren oder kürzer.

Die Haarproben für die GHB-Analytik nach regelmäßiger und nach einmaliger Aufnahme von GHB wurden den Freiwilligen wenn möglich am Hinterkopf in der *posterior vertex* Region abgeschnitten. Dabei wurde jeweils eine bleistiftdicke Strähne 1 mm über der Kopfhaut entnommen. Anschließend wurden die Haare nach gültigen Vorgaben bei Raumtemperatur in Aluminiumfolie gelagert. Ebenfalls nach Genehmigung durch die zuständige Ethik-Kommission (Universitätsklinikum Bonn: AZ 370/13, Justus-Liebig-Universität Gießen: AZ 243/18) und unterschriebener Einverständniserklärung wurden für diese Arbeit Freiwilligen, die unter Narkolepsie leiden und mit dem Medikament *Xyrem*[®] behandelt wurden, im Rahmen einer Behandlung im Schlaflabor in Münster (3 Proben) unter der Leitung von *PD Dr. Anna Heidbreder* oder im Schlaflabor in Treysa (16 Proben) unter der Leitung von *Prof. Geert Mayer* Haare abgenommen. Haarproben aus Münster wurden im Zeitraum 2017/2018 gesammelt und Haarproben aus Treysa im Zeitraum zwischen Februar 2019 und August 2019. Die Haarproben aus Münster wurden Anfang 2019 vermessen und die Haarproben aus Treysa jeweils ein bis vier Wochen nach der Entnahme der Probe. Alle Freiwilligen der vorliegenden Arbeit, die unter Narkolepsie leiden, wurden vor der Haarabnahme zwischen 1,5 Monaten und zwölf Jahren unterbrechungsfrei mit dem Medikament *Xyrem*[®] behandelt. Die jeweilige Dosis betrug dabei zwischen 5 und 9 g pro Nacht. Die Proben wurden zur Auswertung in verschiedene Gruppen unterteilt, wofür neben der eingenommenen GHB-Dosis auch die Haarfarbe, das Alter und das Geschlecht der Personen dokumentiert wurden. In Tabelle 4 sind neben Alter, Geschlecht, Haarfarbe, Dauer der *Xyrem*[®]-Behandlung und der *Xyrem*[®]-Dosis soweit bekannt auch die Comedikation aufgelistet.

Tabelle 4: Gesammelte Daten der 19 Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation.

Nummer	Alter [Jahren]	Männlich/ weiblich	Haar- farbe	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der <i>Xyrem</i> [®] - Einnahme vor Proben- entnahme [Monate]	Comedikation
P 01	28	m	braun	9	78,3	> 48	Venlafaxin
P 02	25	w	blond	6	83,3	~ 96	Clomipramin, Methylphenidat

Nummer	Alter [Jahren]	Männlich/ weiblich	Haar- farbe	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der <i>Xyrem</i> [®] - Einnahme vor Proben- entnahme [Monate]	Comedikation
P 03	18	w	braun	7	~100	~ 72	n.b.
P 04	26	w	blond	6	82,2	~ 108	n.b.
P 05	17	w	schwarz	5	79,4	~ 1-2	n.b.
P 06	17	w	blond	9	162,5	~ 9	n.b.
P 07	22	w	braun	6	45,5	~ 9	Methylphenidat
P 08	44	w	braun	5,25	41,0	~ 9	n.b.
P 09	59	m	schwarz/ grau	8	86,5	~ 80	n.b.
P 10	45	w	braun	5	54,3	> 1	n.b.
P 11	37	m	braun	7,5	51,7	~ 30	Ramipril, Bisoprolol, Ephedrin, Paroxetin, Metformin, L-Thyroxin
P 12	21	w	braun	7	118,6	> 13	n.b.
P 13	45	m	braun	6	51,3	~ 148	Pitolisant, Ramipril, Citalopram, Simvastatin, Budesonid, Lercanidipin, Gastrozepin, Metformin, Azulfidine, Rotigotin
P 14	29	m	schwarz	5,5	93,2	~ 145	n.b.
P 15	55	w	grau	9	92,3	~ 140	Anafranil, Ephedrin, Omeprazol, ASS, Metformin, Ramipril, Topiramat, Lercanidipin, Furosemid, Allopurinol, MCP, Salbutamol, Huminsulin
P 16	52	w	schwarz	7,5	114,5	~ 23	Pitolisant, Venlafaxin
P 17	51	w	rot	3	31,0	~ 91	Ephedrin, Modafinil
P 18	47	w	blond	3	35,3	~ 148	Pitolisant, Venlafaxin
P 19	22	w	braun	8	119,4	~ 12	n.b.

3.3 Statistik

Alle Werte wurden, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwert mit Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Für statistische Vergleiche von zwei Gruppen ähnlicher Varianz wurde ein *t*-Test durchgeführt. Für statistische Vergleiche von zwei Gruppen unterschiedlicher Varianz wurde ein *Welch*-Test durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Post-Hoc Varianzanalyse (ANOVA) mit *Student-Newman-Keuls* Test durchgeführt. Ein *p*-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.4 GHB-Analytik

3.4.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB in Haaren

Zu Beginn wurde eine verdünnte methanolische GHB-Lösung und GHB-D₆-Lösung (beide 10 ng/mL) hergestellt und mittels direkter Injektion über eine Spritze unter Verwendung der Software *Analyst 1.6.1* ein automatisches Tuning der optimalen massenspektrometrischen Parameter der Substanzen durchgeführt. Die so erhaltene Methode enthielt zunächst lediglich die substanzspezifischen Parameter wie *Declustering Potential* (DP), *Entrance Potential* (EP), *Collision Energy* (CE) und *Collision Cell Exit Potential* (CXP). Zur Optimierung dieser und der gerätespezifischen Parameter wie *Curtain Gas* (CUR), *Ion Spray Voltage* (IS), Temperatur (Temp), Gas 1 (GS1) und Gas 2 (GS2) wurde anschließend nach Kopplung mit einer HPLC-Anlage über die *Flow Injection Analysis* (FIA) eine GHB/GHB-D₆-Lösung mit 1,0 ng/mL zunächst ohne analytische Säule für die Optimierung eingesetzt. Die Optimierung wurde mehrfach wiederholt und sowohl automatisch als auch manuell durchgeführt, um die besten Bedingungen für die GHB-Analytik zu finden.

Neben der Ionisation mit *Electrospray Ionisation* (ESI) wurde auch die Ionisation mittels *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI) getestet.

Die ESI Messungen wurden im negativen *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Modus mit den folgenden, auch in Tabelle 5 dargestellten, Quellen- und Gas-Parametern durchgeführt. IS -4200 V, CUR (N₂) 30 psi, GS1 und GS2 (N₂) 40 psi und 70 psi, DP -50 V, EP -10 V und Temperatur 650 °C.

Tabelle 5: Optimierte MS/MS-Bedingungen für die GHB-Analytik im Haar.

Substanz (Massenübergänge [m/z])	IS [V]	CUR [psi]	GS1/GS2 [psi]	DP [V]	EP [V]	Temp [°C]	Verweilzeit [ms]	CE [V]	CXP [V]
GHB_T (103 zu 57)							700	-20	-1
GHB_Q (103 zu 85)							700	-14	-5
GHB-D ₆ _T (109 zu 61)	-4200	30	40/70	-50	-10	650	150	-20	-1
GHB-D ₆ _Q (109 zu 90)							150	-14	-1

Chromatographische Trennung

Im Anschluss an die Optimierung der MS-Bedingungen wurden verschiedenste Laufmittelzusammensetzungen und analytische Säulen getestet, um eine gute Retention (> 1 min) der Substanz GHB zu erreichen. Die getesteten Säulen und Laufmittelzusammensetzungen waren:

<i>Allure PFPP</i>	5 µm 50 x 2,1 mm	<i>Restek</i>
<i>Luna C18(2)</i>	5 µm 100 Å 100 x 2 mm	<i>Phenomenex</i>
<i>Nucleoshell RP 18 plus</i>	2,7 µm EC 100 x 2 mm	<i>Macherey Nagel</i>
<i>Nucleoshell Bluebird RP18</i>	2,7 µm EC 100 x 2 mm	<i>Macherey Nagel</i>
<i>Nucleodur PFP</i>	5 µm EC 50 x 2 mm	<i>Macherey Nagel</i>
<i>Symmetry C18</i>	3,5 µm 4,6 x 75 mm	<i>Waters</i>

10% MeOH	90% H ₂ O (+ 2 mL AS / NH ₃ / 1 mM Ammoniumacetat)
50% MeOH	50% H ₂ O (+ 1 mM Ammoniumacetat)
90% MeOH	10% H ₂ O
10% ACN (+ 2 mL AF, 2 mL AS)	90% H ₂ O (+ 2 mL AF, 2 mL AS)
90% ACN	10% H ₂ O

Die chromatographische Trennung wurde letztendlich mittels der *Symmetry* 3,5 µm C18 Säule (4,6 x 75 mm) von *Waters* (Eschborn, Deutschland) mit einer Vorsäule *EC 4/2 Universal RP* von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) erreicht. Die Proben wurden von einem *Shimadzu Sil-20A HT Autosampler* mit zwei *LC-20AT* Pumpen injiziert. Die mobile Phase bestand aus 10 % Acetonitril (B) und 90 % Wasser (A), beides mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min, zunächst wurde mit 10 % Lösung B über 3 min gestartet. Anschließend wurde über 2 min auf 95 % B erhöht, für 1 min 95 % gehalten und dann direkt auf 10 % B zurückgesetzt. Am Ende des Programms wurde für 4 min mit 10 % von Lösung B gespült. Der gewählte Laufmittelgradient ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Gewählter Laufmittelgradient für die GHB-Analytik im Haar.

Flussrate [mL/min]	Anteil Laufmittel B [%]	Laufzeit [min]
0,3	10	3
0,3	95	2
0,3	95	1
0,3	10	-
0,3	10	4

Die quantitative Analyse wurde mittels linearer Regression durch die Software *Analyst (Applied Biosystems)* in den Versionen 1.6.1 und 1.7 durchgeführt.

Dekontamination der Haarproben

Für die Dekontamination der Haarproben wurden die vorgeschlagenen Richtlinien der *Society of Hair Testing* befolgt. Alle Waschlösungen der einzelnen Schritte wurden auf ausgewaschene GHB getestet. Die verwendeten Waschlösungen waren:

1. Methanol 5 min
2. etwa 60 °C heißes Wasser 5 min
3. etwa 60 °C heißes Wasser 5 min
4. Dichlormethan 5 min

Da Wasser und Methanol die Haarmatrix aufquellen lassen und somit mutmaßlich zu Auswascheffekten führen können, wurde außerdem eine Probenvorbereitung ohne die Waschlösung mit heißem Wasser und eine nur mit Dichlormethan getestet.

Die gewaschenen Haare wurden anschließend bei 55 °C über Nacht getrocknet und anschließend gegebenenfalls vom proximalen Ende zum distalen Ende hin in Segmente unterteilt. Für die folgende Extraktion wurden zwei mögliche Extraktionsmethoden getestet.

Pulverisierung und Ultraschall-Extraktion

Für die Extraktion mittels Ultraschall wurden die abgeteilten Segmente zusammen mit kleinen Stahlkugeln in eine Pulvermühle überführt und für 30 min mit einer Frequenz von 30 Hz geschüttelt. Von dem erhaltenen Pulver wurden etwa 10 mg in ein Spitzglas präzise eingewogen. Anschließend wurde der interne Standard GHB-D₆ (10 ng/mg) und 0,5 mL Methanol zu dem Haarpulver gegeben und das Glas für zwei Stunden im Ultraschallbad belassen. Die Probe wurde 10 min bei 2500 x g zentrifugiert und der organische Überstand abgenommen und im Stickstoffgegenstrom bei Raumtemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde in 70 µL der mobilen Phase (90 % Wasser, 10 % Acetonitril jeweils mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt) aufgenommen. 10 µL der so vorbereiteten Probe wurden über das LC System in das Massenspektrometer injiziert.

Denaturierung durch Natronlauge und Flüssig-Flüssig-Extraktion

Für die alkalische Hydrolyse mittels Natronlauge wurden zunächst etwa 10 mg Haare präzise in ein Glasröhrchen eingewogen und anschließend 0,5 mL Natronlauge (1 M) und der interne Standard (10 ng/mg) hinzugegeben. Die Probe wurde für 30 min bei 100 °C im Ofen inkubiert, bis sich die Haare vollständig aufgelöst hatten und eine klare Flüssigkeit entstanden war. Nach 5 min, in denen die Probe auf Raumtemperatur abkühlte, wurden 0,5 mL Salzsäure (1 M),

0,5 mL Glycin-Puffer (0,2 M, pH 2,6) und 0,5 mL gesättigte Natriumchlorid-Lösung zugegeben. Nach der Zugabe von 3 mL Ethylacetat wurde die Probe für 2 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 2500 x g zentrifugiert. Der organische Überstand wurde abgenommen, bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 70 µL der mobilen Phase, bestehend aus 90 % Wasser und 10 % Acetonitril beides mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt, aufgenommen. 10 µL der so vorbereiteten Probe wurden über das LC System in das Massenspektrometer injiziert.

Reinigung des Haarextraktes mittels Festphase

Zur Aufreinigung des Haarextraktes nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion und um die im LC-MS/MS-Chromatogramm auftretenden Störpeaks zu verringern, wurden verschiedene Reinigungsschritte an der Festphase getestet. Dabei wurden verschiedene für die GHB-Analytik prinzipiell geeignete Typen an Festphasensäulen getestet. Dabei handelte es sich unter anderem um eine *Clean-Up® CUQAX156* Säule der Firma *UCT* (Bristol, England) mit quartären Aminen und Chlorid Ionen im Sorbens. Diese Art der Säule ist geeignet, um Anionen zu extrahieren. Außerdem wurde eine *Isolute® HCX* Säule der Firma *Biotage* (Uppsala, Schweden) mit gemischten Säulenmaterialien verwendet, wobei sowohl nicht polare C₈-Gruppen als auch starke Kationenaustauscher-Gruppen mit SO₃-Gruppen enthalten sind. Diese Art der Festphase wird vor allem für die Extraktion von basischen Analyten empfohlen. Zusätzlich wurden zwei speziell für die GHB-Analytik empfohlene SPE-Säulen getestet, für die jedoch vom Hersteller keine genaueren Angaben über die verwendeten Materialien des Sorbens vorlagen. Dabei handelte es sich um die Säulen *Clean Screen® GHB* der Firma *UCT* (Bristol, England) und *Novum™ SLE* der Firma *Phenomenex* (Aschaffenburg, Deutschland). Alle Extraktionsverfahren wurden auf die Extraktion von GHB aus Haaren angepasst, da keine der Säulen speziell für die Haaranalytik eine Extraktionsvorschrift zur Verfügung stellte.

3.4.2 Methodvalidierung

Die Validierung wurde nach den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen durchgeführt, unter Beachtung der Anhänge B (Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden) und C (Anforderung an die Untersuchung von Haarproben). Die Validierungsdaten wurden unter Verwendung des Programmes *Valistat® 2.0* (*Arvecon GmbH*, Walldorf, Deutschland) gesammelt, ausgewertet und beurteilt.

Leermatrix

Für die Leermatrix wurden initial Proben von verschiedenen Personen gemessen, um möglichst substanzfreie Proben zu finden. Haarproben, in denen die GHB-Konzentration unterhalb des Detektionslimits lag, wurden anschließend als Leermatrix definiert und für die Validierung genutzt. Da GHB immer auch endogen vorliegt, ist es für diesen Analyten nicht möglich, eine analytenfreie Leermatrix zu erhalten.

Selektivität und Spezifität

Es wurden sechs der zuvor als Leermatrix definierten Proben mit verschiedenen Aufarbeitungsmethoden auf Peaks analysiert, die die Detektion von GHB stören könnten. Es wurden diese sechs Proben als Nullmatrix (mit internem Standard) untersucht, um eine Störung durch den internen Standard auszuschließen. Zur Überprüfung der Spezifität der Methode wurden Proben mit Beta-Hydroxybuttersäure (BHB) versetzt, da dies einen ebenfalls endogen im Haar vorkommenden Analyten darstellt, der aufgrund seiner ähnlichen Struktur zu Interferenzen führen könnte. Zudem wurden mögliche Interferenzen mit dem verwendeten Glycin-Puffer überprüft.

Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden acht Kalibratoren mit den Konzentrationen 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20 und 50 ng/mg hergestellt. Dazu wurden methanolische Lösungen von GHB und GHB-D₆ zu 10 mg Aliquoten Leermatrix gegeben und 10 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Zum Nachweis der Linearität wurde von jedem Standard sechs Wiederholungsmessungen durchgeführt. Anschließend wurden die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren aufgetragen und diese mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveaus: 95 % und 99 %) überprüft. Der Test auf Varianzhomogenität erfolgte mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Signifikanz: 99 %). Bei gegebener Varianzhomogenität (Homoskedastizität) erfolgte eine einfache lineare Regression, deren Ergebnis mittels Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz: 99 %) geprüft wurde.

Genauigkeit

Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden homogene Pools mit Leermatrix von drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt, niedrig (0,25 ng/mg), mittel (2,5 ng/mg) und hoch (25 ng/mg) im Vergleich zum Kalibrationsbereich. Die Pools wurden zu jeweils fünf einzelnen Proben aliquotiert, unter normalen Bedingungen gelagert und an fünf verschiedenen Tagen jeweils doppelt analysiert. Aus den erhaltenen Werten jeder Konzentration wurde der

Mittelwert bestimmt und zur Bestimmung des systematischen Fehlers wurde der Bias in Prozent herangezogen. Bias-Werte innerhalb eines Intervalls von $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ nahe der Bestimmungsgrenze) galten als akzeptabel.

Der Bias wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Bias [\%] = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} * 100 \%$$

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

μ Sollwert

Die Laborpräzision wurde durch Messen der Proben an unterschiedlichen Tagen ermittelt, wodurch der Zeitfaktor „Tag“ variiert wurde.

Dazu wurde die relative Standardabweichung nach folgender Formel berechnet:

$$RSD_{(T)}[\%] = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{X}} * 100 \%$$

$RSD_{(T)}$ tagesverschiedene Laborpräzision

s_r^2 Wiederholvarianz

$s_r^2 = MS_{wg}$ MS_{wg} mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Tage

s_t^2 Varianz zwischen den Tagen

$s_t^2 = \frac{MS_{bg} - MS_{wg}}{n}$ MS_{bg} mittleres Abweichungsquadrat zwischen den Tagen

MS_{wg} mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Tage

n Anzahl der Wiederholungen pro Tag

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

Die Wiederholpräzision wurde durch Doppelbestimmung der oben beschriebenen Proben nach der folgenden Formel berechnet:

$$RSD_{(R)}[\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{X}} * 100 \%$$

$RSD_{(R)}$ Wiederholpräzision

s_r^2 Wiederholvarianz

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen

RSD-Werte von $\leq 15\%$ (20% nahe der Bestimmungsgrenze) galten als akzeptabel.

Stabilität

Zur Überprüfung der Stabilität von aufgearbeiteten Proben wurde jeweils Leermatrix, versetzt mit einer niedrigen (1,0 ng/mg) und einer hohen (25 ng/mg) Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich, sechsmal aufgearbeitet, die Proben anschließend vereinigt und wieder auf sechs Aliquote aufgeteilt. Die erhaltenen Aliquote wurden dann über einen gängigen Zeitraum einer Analysenserie von fünf Stunden (eine Probe pro Stunde) analysiert. Die erhaltenen absoluten Peakflächen wurden mittels linearer Regressionsanalyse miteinander verglichen.

Eine signifikant negative Steigung der Regressionsgeraden weist auf Instabilität des entsprechenden Analyten in aufgearbeiteten Proben hin. Die maximal akzeptable Abnahme der Peakflächen über den Testzeitraum betrug bei Verwendung deuterierter Standards 25 %. Des Weiteren wurden die sechs Proben von jeder Konzentration anschließend für 20 Stunden eingefroren und wieder aufgetaut, dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die Proben danach erneut analysiert. Der Mittelwert der so gemessenen Proben wurde mit dem Mittelwert der ohne Behandlung analysierten Proben verglichen.

Der Mittelwert der Stabilitätsproben sollte innerhalb von 90–110 % des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes, das 90 % Konfidenzintervall der Stabilitätsproben innerhalb 80–120 % des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes liegen.

Matrixeffekte und Wiederfindung

Es wurden fünf verschiedene Leermatrixproben auf folgende Art und Weise aufgearbeitet:

1. Aufarbeitung und Extraktion nach Zusatz von einer niedrigen (1,0 ng/mg) und einer hohen (25 ng/mg) Konzentration bezogen auf den Kalibrationsbereich.
2. Aufarbeitung und Extraktion, anschließender Zusatz von einer niedrigen (1,0 ng/mg) und einer hohen (25 ng/mg) Konzentration.
3. Zusatz von einer niedrigen (1,0 ng/mg) und einer hohen (25 ng/mg) Konzentration zur methanolischen Lösung (ohne Matrix).

Die Matrixeffekte wurden als Verhältnis der absoluten Peakflächen der gespikten Extrakte (2.) zu den Peakflächen der methanolischen Lösungen (3.) berechnet. Das Akzeptanzintervall lag bei ± 25 %. Bei der Standardabweichung des Matrixeffektes galten bei Verwendung deuterierter interner Standards 25 % als akzeptabel. Die Wiederfindung wurde als Verhältnis der absoluten Peakflächen der gespikten Haare (1.) zu den Peakflächen der gespikten Extrakte (2.) berechnet. Die Extraktion sollte reproduzierbar und mit hohen Wiederfindungsraten beziehungsweise Extraktionsausbeuten, möglichst größer als 50 % erfolgen.

Zusätzlich wurden die Matrixeffekte für den internen Standard bei der verwendeten Konzentration von 10 ng/mg berechnet.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) ist definiert als die kleinste Konzentration, die im Rahmen der Analytik einer Substanz noch bestimmt werden kann, sodass die Identifizierungskriterien eingehalten werden. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) ist definiert als die kleinste Konzentration, die mit einem akzeptablen Bias ($\pm 20\%$) und akzeptablen Präzisionsdaten ($RSD \leq 20\%$) bestimmt werden kann.

Für die Bestimmung dieser beiden Größen wurde in der vorliegenden Arbeit nach DIN 32645 gearbeitet.^[211]

Für die Bestimmung des LoD und LoQ wurden fünf verschiedene Kalibratoren (inklusive 10 mg Leermatrix) hergestellt, alle im Bereich der zu erwartenden Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Die Nachweisgrenze wurde zuvor mittels Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt. Nach Analyse der Kalibratoren wurden für die Nachweisgrenze die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) des schwächsten Ions (*Qualifier*-Ion) und für die Bestimmungsgrenze die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) des *Target*-Ions gegen die Sollkonzentration des Kalibrators aufgetragen. Nach linearer Regression konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$X_{NG} = s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}} \quad X_{BG} = k * s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

s_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung	Q_x	Summe der Abweichungsquadrate
n	Anzahl der Kalibrationsniveaus	t	Quantil der t-Verteilung
m	Anzahl der Messungen	X	Gehaltsgröße
k	relative Ergebnisunsicherheit (3)	α	Signifikanzniveau (0,01)
NG	Nachweisgrenze	BG	Bestimmungsgrenze

Ionenverhältnis

Das Ionenverhältnis der Ionenübergänge im MRM Modus vom 2. Ionenübergang (*Qualifier*) zum 1. Ionenübergang (*Target*) wurde überprüft, indem für jeden Kalibrationsstandard ein Mittelwert des relativen Ionenverhältnisses aus sechs Einzelbestimmungen ermittelt wurde.

Bei einem relativen Ionenverhältnis von

- > 50 % wurde ein 20 % Toleranzintervall, bei
- > 20–50 % ein 25 % Toleranzintervall, bei
- > 10–20 % ein 30 % Toleranzintervall und bei
- $\leq 10\%$ ein 50 % Toleranzintervall,

bezogen auf das ermittelte Ionenverhältnis in Realproben, akzeptiert.

3.4.3 Messungen zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren

Zu Beginn wurden 58 gesammelte Haarproben von Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme zeitnah auf ihre endogenen GHB-Konzentration hin untersucht. Die verwendeten Haarproben G1 bis G67 wurden nicht direkt am Kopf entnommen, es handelte sich um distale Haarabschnitte. Für die Proben G13, G18, G22, G23, G31, G34, G43, G45 und G59 stand kein ausreichendes Probenmaterial zur Verfügung.

Die Haare wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren zunächst gewaschen und getrocknet. Die Haare wurden präzise eingewogen und dann nach der ebenfalls oben beschriebenen Extraktionsmethode durch Denaturierung und anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion zusammen mit jeweils einer Leermatrixprobe, einer niedrigen und einer hohen Kontrolle aufgearbeitet und per LC-MS/MS analysiert. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit einem Kollektiv von 96 weiteren Haarproben von freiwilligen Probanden, die kein GHB eingenommen hatten und die in einer Studie unter derselben Leitung an der British Columbia Universität in Kanada gesammelt und segmentweise analysiert wurden, ausgewertet. Von den 96 Profilen wurden neun vor der Auswertung verworfen, da mehr als drei Segmente für die Auswertung fehlten. Die verbliebenen 87 Haarprofile enthielten 61 Haarproben weiblicher Probandinnen und 26 Haarproben männlicher Probanden.

Lagerungsstabilität von GHB in Haarproben

Es wurden einige der im Labor vorhandenen zwei bis acht Jahre gelagerten Rückstellproben, nach vorheriger Aufreinigung, segmentweise untersucht. Diese Proben wurden ursprünglich nicht zu diesem Zweck entnommen und wurden dementsprechend bei Abnahme nicht auf ihre endogenen GHB-Konzentrationen untersucht.

Zusätzlich wurde eine dickere etwa 20 cm lange Haarsträhne (nicht direkt am Kopf entnommen) in schmalere Strähnen geteilt. Diese Haarsträhnen wurden zunächst jeweils im Abstand von etwa einem Monat und später in größeren Abständen segmentweise untersucht. Die jeweilige Strähne wurde dabei immer erst einen Tag vor der Aufarbeitung durch die Waschschriffe gereinigt, sodass eventuelle externe oberflächliche Kontaminationen durch die Lagerung entfernt wurden.

3.4.4 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB

Es wurden Haarproben von 19 Personen die alle mit dem Medikament *Xyrem*[®] behandelt wurden, im Bereich des Hinterkopfes direkt an der Kopfhaut abgeschnitten und anschließend in Aluminiumfolie bei Raumtemperatur gelagert. Drei der Freiwilligen kamen aus dem Schlaflabor des Uniklinikums in Münster, die Proben dort wurden in den Jahren 2017/2018 gesammelt. Die anderen 16 Freiwilligen kamen aus dem Schlaflabor in Treysa und die Proben

wurden dort zwischen Februar 2019 und August 2019 gesammelt. Die Analysen der Haarproben aus Münster wurden innerhalb eines Jahres, die der Haarproben aus Treysa innerhalb eines Monats nach der Entnahme durchgeführt. Neben dem Alter, Geschlecht, Körpergewicht und der Haarbehandlung der Probanden wurden auch die aktuelle tägliche *Xyrem*[®]-Dosis und die Dauer der *Xyrem*[®]-Einnahme dokumentiert. In Tabelle 7 sind zusätzlich die untersuchte gesamte Haarlänge und die Anzahl und Länge der untersuchten Segmentabschnitte gezeigt.

Tabelle 7: Gesammelte Daten der 19 Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation inklusive der untersuchten Haarlänge und der untersuchten Segmente.

Nummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der <i>Xyrem</i> [®] - Einnahme vor Probenentnahme [Monaten]	Untersuchte Haarlänge [cm]	Untersuchte Segmente
P01	28	m	9	78,3	> 48	6	S1–6: 10 mm
P02	25	w	6	83,3	~ 96	5	S1–10: 5 mm
P03	18	w	7	~100	~ 72	3	S1–10: 3 mm
P04	26	w	6	82,2	~ 108	3	S1–10: 3 mm
P05	17	w	5	79,4	~ 1-2	1,5	S1–5: 3 mm
P06	17	w	9	162,5	~ 9	3	S1–6: 5 mm
P07	22	w	6	45,5	~ 9	6,2	S1: 7 mm, S2–6: 5 mm, S7–9: 10 mm
P08	44	w	5,25	41,0	~ 9	3	S1: 10 mm, S2: 20 mm
P09	59	m	8	86,5	~ 80	15	S1: 10 mm, S2–3: 20 mm, S4: 30 mm, S5: 70 mm
P10	45	w	5	54,3	> 1	1,5	S1–3: 5 mm
P11	37	m	7,5	51,7	~ 30	3	S1–2: 3 mm, S3: 4 mm, S4–7: 5 mm
P12	21	w	7	118,6	> 13	3	S1-6: 5 mm
P13	45	m	6	51,3	~ 148	1	S1: 10 mm
P14	29	m	5,5	93,2	~ 145	3	S1–10: 3 mm
P15	55	w	9	92,3	~ 140	3	S1–10: 3 mm
P16	52	w	7,5	114,5	~ 23	9	S1–3: 30 mm
P17	51	w	3	31,0	~ 91	5	S1–5: 10 mm
P18	47	w	3	35,3	~ 148	3	S1–10: 3 mm
P19	22	w	8	119,4	~ 12	6	S1–2: 5 mm, S3–7: 10 mm

Die Dosen reichten dabei insgesamt von 3 bis 9 g *Xyrem*[®] pro Nacht. Die gesammelten Haarproben waren zwischen 1 und mehr als 15 cm lang. Aufgrund der geringen Menge an zu Verfügung stehendem Probenmaterial, konnten die Analysen in der Regel nur einmal durchgeführt werden. In zwei Fällen (P08 und P13) waren die entnommenen Haarsträhnen so dünn, dass nur maximal ein bis zwei Segmente erhalten werden konnten. Die 19 Haarsträhnen beinhalteten Proben von 14 Frauen und fünf Männern. Von diesen 19 Personen erhielten zwei (P05 und P10) das Medikament *Xyrem*[®] erst zwischen ein und zwei Monaten. Daher wurden in diesen Fällen lediglich die Ergebnisse der ersten 1,5 cm für die Auswertung der Mittelwerte verwendet.

3.4.5 Methodenvergleich zweier Aufarbeitungsmethoden

Für den Vergleich zweier unterschiedlicher Aufarbeitungsmethoden wurden die von den Haarproben der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation vorhandenen Rückstellproben zunächst nach dem gleichen Schema gewaschen wie zuvor. Die geschnittenen Haarsegmente wurden dann mittels Kugelmühle zu Pulver gemahlen und anschließend wie unter 3.4.1 beschrieben über eine Ultraschallextraktion aufgearbeitet. Die dabei untersuchten Segmentabschnitte sind in Tabelle 8 gezeigt. Die Länge der Segmente musste dabei an die Aufarbeitungsmethode angepasst werden, sodass die Länge der Segmente hier nicht immer denen der vorherigen Aufarbeitungsmethode entsprach.

Tabelle 8: Daten der Personen, deren Rückstellproben erneut mit einer zweiten Extraktionsmethode auf GHB untersucht wurden.

Nummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der <i>Xyrem</i> [®] - Einnahme vor Probenentnahme [Monaten]	Untersuchte Haarlänge [cm]	Untersuchte Segmente
P05	17	w	5	79,4	~ 1-2	1,5	S1–5: 3 mm
P06	17	w	9	162,5	~ 9	3	S1–6: 5 mm
P07	22	w	6	45,5	~ 9	6	S1–4: 5 mm, S5–8: 10 mm
P08	44	w	5,25	41,0	~ 9	2	S1: 20 mm,
P10	45	w	5	54,3	> 1	2,5	S1: 10 mm, S2: 15 mm
P11	37	m	7,5	51,7	~ 30	3	S1–2: 5 mm, S3–4: 10 mm
P12	21	w	7	118,6	> 13	5	S1–5: 10 mm
P14	29	m	5,5	93,2	~ 145	5,5	S1–4: 5 mm, S5: 10 mm, S6: 15 mm

Nummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der Xyrem®- Einnahme vor Probenentnahme [Monaten]	Untersuchte Haarlänge [cm]	Untersuchte Segmente
P15	55	w	9	92,3	~ 140	5,5	S1: 5 mm, S2-4: 10 mm, S5: 20 mm
P16	52	w	7,5	114,5	~ 23	4	S1-2: 20 mm
P18	47	w	3	35,3	~ 148	6,5	S1: 5 mm, S2-4: 10 mm, S5: 30 mm
P19	22	w	8	119,4	~ 12	8	S1-2: 15 mm, S3: 20 mm, S4: 30 mm

3.4.6 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB

Einem freiwilligen Probanden wurden zweimal im Abstand von 7,5 Wochen jeweils etwa 2,4 g Na-GHB (*Somsanit*TM) verabreicht (Einverständniserklärung liegt vor). Diese Menge entspricht bei einem Körpergewicht von 76,5 kg einer Dosis von 31,4 mg/kg Körpergewicht und damit einer niedrigen therapeutischen Dosis, wie zum Beispiel zur Behandlung von Personen mit Narkolepsie. Es wurden Haarproben vor der Einnahme, eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme entnommen. Die Proben wurden wie bereits beschrieben gewaschen und segmentiert (außer die vor der Einnahme als individuelle Referenzprobe entnommenen Haare), anschließend mittels Hydrolyse durch Natronlauge aufgearbeitet und analysiert. Dabei wurden die kopfnahen 3 oder 5 cm in möglichst kleine Abschnitte unterteilt, sodass mindestens 10 mg Probenmaterial pro Segment gewonnen werden konnte. Für die Haaranalyse der Referenzprobe vor der GHB-Einnahme wurden abgeschnittene Haarspitzen sehr klein zerteilt, homogenisiert und analysiert.

3.5 GHB-Metaboliten-Analytik

3.5.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB-Sulf, Glycolsäure, 2,4-Dihydroxybuttersäure und 3,4-Dihydroxybuttersäure in Haaren

Zu Beginn wurde eine verdünnte methanolische Lösung der verschiedenen Metaboliten (10 ng/mL) hergestellt und mittels direkter Injektion über eine Spritze injiziert und mit der Software *Analyst 1.7* ein automatisches Tuning der Substanzen durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde anschließend nach Kopplung mit einer HPLC-Anlage über

die FIA eine Lösung der verschiedenen Metaboliten (1,0 ng/mL – 1,0 µg/mL) zunächst ohne analytische Säule für die Optimierung eingesetzt. Die Optimierung wurde mehrfach wiederholt, um die am besten aufeinander abgestimmten Bedingungen zu finden. Die ESI Messungen wurden für GHB-Sulf im negativen MRM Modus unter anderem mit den folgenden Quellen- und Gas-Parametern durchgeführt. IS -4200 V, CUR (N₂) 30 psi, GS1 und GS2 (N₂) 40 psi und 70 psi, EP -10 V, DP -50 V und Temperatur 650 °C.

Precursor- und Produktionen wurden für die anderen Metaboliten im negativen MRM Modus unter anderem mit den folgenden Quellen- und Gas-Parametern gemessen. IS -4500 V, CUR (N₂) 12 psi, GS1 und GS2 (N₂) 65 psi und 50 psi, EP -10 V und Temperatur 650 °C. Die Quellen- und Gas-Parameter sind in den Tabellen 9 und 10 im Detail dargestellt, wobei jeweils für GHB-Sulf die Massenübergänge von 182,8 zu 96,9 und 79,8, für 2,4-DHB die Massenübergänge von 119 zu 101 und 72,9, für 3,4-DHB die Massenübergänge von 119 zu 59 und 100,9 und für Glycolsäure die Massenübergänge von 74,8 zu 46,8 und 44,9 detektiert wurden und für GHB-D₆ die Massenübergänge von 109 zu 61 und 90. Die quantitative Auswertung wurde mittels linearer Regression und der Software *Analyst 1.7* durchgeführt.

Tabelle 9: Optimierte MS/MS-Bedingungen für die GHB-Sulf-Analytik im Haar.

Substanz (Massenübergänge [m/z])	IS [V]	CUR [psi]	GS1/GS2 [psi]	EP [V]	DP [V]	Temp [°C]	Verweilzeit [ms]	CE [V]	CXP [V]
GHB-Sulf_T (182,8 zu 96,9)							250	-22	-3
GHB-Sulf_Q (182,8 zu 79,8)							150	-68	-3
GHB-D ₆ _T (109 zu 61)	-4200	30	40/70	-10	-50	650	100	-20	-1
GHB-D ₆ _Q (109 zu 90)							100	-14	-1

Tabelle 10: Optimierte MS/MS-Bedingungen für die Analytik von Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB im Haar.

Substanz (Massenübergänge [m/z])	IS [V]	CUR [psi]	GS1/GS2 [psi]	EP [V]	Temp [°C]	DP [V]	Verweilzeit [ms]	CE [V]	CXP [V]
Glycolsäure_T (74,8 zu 46,8)						-40	250	-17	-5
Glycolsäure_Q1 (74,8 zu 44,9)						-40	250	-17	-5
2,4-DHB_T (119 zu 101)						-40	250	-16	-8
2,4-DHB_Q (119 zu 72,9)						-45	250	-16	-3
3,4-DHB_T (119 zu 59)	-4500	12	65/50	-10	650	-35	250	-17	-3
3,4-DHB_Q (119 zu 100,9)						-35	250	-12	-4
GHB-D ₆ _T (109 zu 61)						-50	150	-20	-1
GHB-D ₆ _Q (109 zu 90)						-50	150	-14	-1

Chromatographische Trennung

Anschließend an die Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen wurden verschiedene analytische Säulen getestet, um eine gute Retention (> 1 min) und Basislineintrennung der Substanzen zu erreichen. Dabei wurden die folgenden analytischen Säulen getestet.

<i>Allure PFPP</i>	5 µm 50 x 2,1 mm	<i>Restek</i>
<i>Luna C18(2)</i>	5 µm 100 Å 100 x 2 mm	<i>Phenomenex</i>
<i>Nucleoshell RP 18 plus</i>	2,7 µm EC 100 x 2 mm	<i>Macherey Nagel</i>
<i>Nucleoshell Bluebird RP18</i>	2,7 µm EC 100 x 2 mm	<i>Macherey Nagel</i>
<i>Nucleodur PFP</i>	5 µm EC 50 x 2 mm	<i>Macherey Nagel</i>
<i>Symmetry C18</i>	3,5 µm 4,6 x 75 mm	<i>Waters</i>
<i>Nucleodur Hilic</i>	3 µm EC 4 x 2 mm	<i>Macherey-Nagel</i>

Die beste chromatographische Trennung wurde für die Metaboliten Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB letztendlich mittels der *Nucleodur Hilic* Säule 3 µm EC 125/2 von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) mit einer Vorsäule *Nucleodur Hilic* 3 µm EC 4/2 von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) erreicht. Die Proben wurden von einem *Shimadzu Sil-20A HT* Autosampler mit zwei *LC-20AT* Pumpen injiziert. Die mobile Phase bestand zu Beginn zu 95 % aus Acetonitril (B) und zu 5 % aus Wasser (A), beides mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min, zunächst wurde mit 95 % Lösung B über 4 min gestartet. Anschließend wurde über 1 min der Anteil der Lösung B auf 50 % herabgesetzt, für 2 min 50 % B gehalten und dann direkt auf 95 % B zurückgesetzt. Am Ende des Programms wurde für 3 min mit 95 % von Lösung B gespült. Der Laufmittelgradient ist in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Laufmittelgradient für die chromatographische Trennung von Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB.

Flussrate [mL/min]	Anteil Laufmittel B [%]	Laufzeit [min]
0,3	95	4
0,3	95 → 50	1
0,3	50	2
0,3	50 → 95	-
0,3	95	3

Die chromatographische Trennung für den Metaboliten GHB-Sulf wurde wie unter 3.4.1 beschrieben analog zur Trennung von GHB durchgeführt. Die gewählten LC-Bedingungen für die GHB-Sulf-Analytik sind in Tabelle 12 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 12: Optimierte LC-Bedingungen für die GHB-Sulf-Analytik im Haar.

Modul	Optimierte Bedingung	Begründung
Laufmittel Startbedingungen	ACN/Wasser 10/90 (+ 0,2 % AF & AS)	Beste Retentionszeit und Abtrennung von Störpeaks
Säule	Symmetrie 3,5 µm C18 (4,6 x 75 mm))	Retentionszeit 4,4 min

Die quantitative Analyse wurde mittels linearer Regression durch die Software *Analyst 1.7* (*Applied Biosystems*) durchgeführt.

Dekontamination der Haarproben

Für die Dekontamination der Haarproben wurden wie auch für die GHB-Analytik die vorgeschlagenen Richtlinien der *Society of Hair Testing* befolgt. Zunächst wurden die Haare für 5 min mit Methanol gewaschen, anschließend zweimal für 5 min mit etwa 60 °C heißem Wasser und abschließend für 5 min mit Dichlormethan. Die gewaschenen Haare wurden anschließend bei 55 °C über Nacht getrocknet und anschließend zerkleinert.

Pulverisierung und Ultraschall-Extraktion

Für die Extraktion mittels Ultraschall wurden die Haarproben zusammen mit kleinen Stahlkugeln zunächst in eine Pulvermühle überführt und für 30 min bei 30 Hz geschüttelt. Von dem erhaltenen Pulver wurde etwa 10 mg in ein Spitzglas präzise eingewogen. Anschließend wurde der interne Standard GHB-D₆ (10 ng/mg) und 0,5 mL Methanol zu dem Pulver gegeben und das Glas für zwei Stunden im Ultraschallbad inkubiert. Die Probe wurde 10 min bei 2500 x g zentrifugiert und der organische Überstand abgenommen und im Stickstoffgegenstrom bei Raumtemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde in 70 µL der mobilen Phase (90 % Wasser und 10 % Acetonitril für GHB-Sulf oder 95 % Acetonitril und 5 % Wasser für Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB) aufgenommen. Wasser und Acetonitril waren jeweils mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt. Für die Analytik von GHB-Sulf wurden 10 µL und für die Analytik der anderen drei Metaboliten 5 µL der so vorbereiteten Probe über das LC System in das Massenspektrometer injiziert.

Denaturierung durch Natronlauge und Flüssig-Flüssig-Extraktion

Für die alkalische Hydrolyse durch Natronlauge wurden zunächst 0,5 mL Natronlauge (1 M) und der interne Standard GHB-D₆ (10 ng/mg) in ein Glasröhrchen pipettiert. Die Probe wurde für 30 min bei 100 °C im Ofen erwärmt. Anschließend wurden 0,5 mL Salzsäure (1 M), 0,5 mL Glycin-Puffer (0,2 M, pH 2,6) und 0,5 mL gesättigte Natriumchlorid-Lösung zugegeben. Nach der Zugabe von 3 mL Ethylacetat wurde die Probe für 2 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 2500 x g zentrifugiert. Der organische Überstand wurde abgenommen, bei

Raumtemperatur im Stickstoffgegenstrom eingedampft und der Rückstand in 70 µL der mobilen Phase, bestehend aus 90 % Wasser und 10 % Acetonitril, beides mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt, aufgenommen. 10 µL der so vorbereiteten Probe wurden über das LC System in das Massenspektrometer injiziert.

3.5.2 Methodvalidierung

Zur Teilvalidierung der LC-MS/MS-Methoden wurden methanolische Lösungen von allen Metaboliten und GHB-D₆ zu 10 mg Aliquoten an Leermatrix gegeben. Wenn keine Leermatrix für den jeweiligen Metaboliten zur Verfügung stand, wurden die reinen methanolischen Lösungen ohne den Zusatz von Haaren verwendet.

Die Teilvalidierung wurde nach den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen durchgeführt, unter Beachtung der Anhänge B (Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden) und C (Anforderung an die Untersuchung von Haarproben). Die Validierungsdaten wurden mittels des Programmes *Valistat*[®] 2.0 (Arvecon GmbH, Walldorf, Deutschland) gesammelt, ausgewertet und beurteilt.

Leermatrix

Für die Leermatrix wurden initial Proben von verschiedenen Personen gemessen, um möglichst substanzfreie Proben zu finden. Haarproben, in denen GHB-Sulf unterhalb des Detektionslimits nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend als Leermatrix definiert und für die Validierung genutzt. Da GHB und ihre Metaboliten immer auch endogen vorliegen, ist es für diese Analyten nicht möglich, tatsächliche Leermatrix zu erhalten. Für die Metaboliten Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB waren zum Validierungszeitpunkt keine Proben mit Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits verfügbar. Für die während eines Analysenlauf verwendeten niedrigen und hohen Kontrollproben wurde in jedem Lauf die für diese Kontrollen verwendete Haarmatrixprobe zu Beginn als Leerprobe gemessen. Die dann ermittelte GHB-Konzentration wurde von den gespikten Kontrollen abgezogen.

Selektivität und Spezifität

Da es sich bei den untersuchten Metaboliten um endogene Substanzen handelt, war eine klassische Testung der Leermatrix auf störende Effekte nicht möglich. Es wurden jedoch verschiedene Haarproben auf veränderte relative Ionenverhältnisse der Massenübergänge, Retentionszeitverschiebungen und Peakschultern untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität der Methode wurden Proben mit 2,4-DHB und 3,4-DHB versetzt, da es sich bei diesen beiden Substanzen um Isomere handelt und bei der Fragmentierung gleiche Massenfragmente entstehen können.

Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden sechs beziehungsweise sieben Kalibratoren hergestellt. Dazu wurden methanolische Lösungen von GHB-Sulf und GHB-D₆ zu 10 mg Leermatrix gegeben und diese für 10 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Da keine Leermatrix für 2,4-DHB, 3,4-DHB und Glycolsäure zur Verfügung stand, wurden für diese Metaboliten die reinen methanolischen Lösungen ohne den Zusatz von Haaren verwendet. Jeder Kalibrator wurde dabei sechsmal analysiert. Anschließend wurden die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) gegen die Sollkonzentrationen der Kalibratoren aufgetragen und diese mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95 %) überprüft. Der Test auf Varianzenhomogenität erfolgte mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Signifikanz: 99 %). Bei gegebener Varianzhomogenität (Homoskedastizität) erfolgte eine einfache lineare Regression und die Anpassung mittels Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz: 99 %). War die Varianzenhomogenität nicht gegeben, wurde ein statistischer Anpassungstest eines gegebenenfalls gewichteten Kalibrationsmodells durchgeführt.

Stabilität

Zur Überprüfung der Stabilität von aufgearbeiteten Proben wurden jeweils Leer(matrix)proben, versetzt mit einer niedrigen (Glycolsäure: 1,0 ng/mg, GHB-Sulf: 1,0 ng/mg, 2,4-DHB: 0,3 ng/mg, 3,4-DHB: 0,5 ng/mg) und einer hohen (Glycolsäure: 25 ng/mg, GHB-Sulf: 25 ng/mg, 2,4-DHB: 1,0 ng/mg, 3,4-DHB: 5,0 ng/mg) Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich, sechsmal aufgearbeitet, die Proben anschließend vereinigt und wieder auf sechs Aliquote aufgeteilt. Die erhaltenen Aliquote wurden dann über einen gängigen Zeitraum einer Analysenserie von fünf Stunden (eine Probe pro Stunde) analysiert. Die erhaltenen absoluten Peakflächen wurden mittels linearer Regressionsanalyse miteinander verglichen.

Eine signifikant negative Steigung der Regressionsgeraden weist auf Instabilität des entsprechenden Analyten in aufgearbeiteten Proben hin. Die maximal akzeptable Abnahme der Peakflächen über den Testzeitraum betrug bei Verwendung deuterierter Standards 25 %. Des Weiteren wurden die sechs Proben von jeder Konzentration anschließend eingefroren, nach einem Monat wieder aufgetaut und die Proben danach erneut analysiert. Der Mittelwert der so gemessenen Proben wurde mit dem Mittelwert der frischen analysierten Proben verglichen.

Der Mittelwert der Stabilitätsproben sollte innerhalb von 90–110 % des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes, das 90 % Konfidenzintervall der Stabilitätsproben innerhalb 80–120 % des entsprechenden Kontrollprobenmittelwertes liegen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) ist definiert als die kleinste Konzentration, die im Rahmen der Analytik einer Substanz noch bestimmt werden kann, sodass die Identifizierungskriterien eingehalten werden. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) ist definiert als die kleinste Konzentration, die mit einem akzeptablen Bias ($\pm 20\%$) und akzeptablen Präzisionsdaten ($RSD \leq 20\%$) bestimmt werden kann.

Für die Bestimmung dieser beiden Größen wurde in der vorliegenden Arbeit nach DIN 32645 gearbeitet.^[211]

Für die Bestimmung des LoD und LoQ wurden fünf verschiedene Kalibratoren (für GHB-Sulf inklusive 10 mg Leermatrix) hergestellt, alle im Bereich der zu erwartenden Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Die Nachweisgrenze wurde zuvor mittels Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt. Nach Analyse der Kalibratoren wurden für die Nachweisgrenze die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) des schwächsten Ions (*Qualifier*-Ion) und für die Bestimmungsgrenze die Peakflächenverhältnisse (Analyt/IS) des *Target*-Ions gegen die Sollkonzentration des Kalibrators aufgetragen. Nach linearer Regression konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$X_{NG} = s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{Q_x}} \quad X_{BG} = k * s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - \bar{X})^2}{Q_x}}$$

s_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung	Q_x	Summe der Abweichungsquadrate
n	Anzahl der Kalibrationsniveaus	t	Quantil der t-Verteilung
m	Anzahl der Messungen	X	Gehaltsgröße
k	relative Ergebnisunsicherheit (3)	α	Signifikanzniveau (0,01)
X_{NG}	Nachweisgrenze	X_{BG}	Bestimmungsgrenze

Ionenverhältnis

Das Ionenverhältnis der Ionenübergänge im MRM Modus von dem 2. Ionenübergang (*Qualifier*) zu dem 1. Ionenübergang (*Target*) wurde für alle verwendeten Kalibrationsstandards überprüft, indem für jeden Kalibrationsstandard ein Mittelwert des relativen Ionenverhältnisses aus sechs Einzelbestimmungen ermittelt wurde. Bei einem relativen Ionenverhältnis von

- > 50 % wurde ein 20 % Toleranzintervall, bei
- > 20–50 % ein 25 % Toleranzintervall, bei
- > 10–20 % ein 30 % Toleranzintervall und bei
- $\leq 10\%$ ein 50 % Toleranzintervall,

bezogen auf das ermittelte Ionenverhältnis in Realproben, akzeptiert.

3.5.3 Messungen zu endogenen GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren

65 gesammelte Haarproben wurden auf ihre endogenen Konzentrationen der GHB-Metaboliten hin untersucht. Die verwendeten Haarproben wurden nicht direkt am Kopf entnommen, es handelte sich um distale Haarabschnitte. Die Proben G1 bis G67 stammten von denselben Personen, wie die in Kapitel 3.4.3 erwähnten Proben, die nach der Validierung der Methode bereits auf GHB untersucht wurden. Für die Untersuchung der Proben G05 und G08 stand kein ausreichendes Probenmaterial zur Verfügung. Die Haare wurden nach dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Verfahren zunächst gewaschen und getrocknet und anschließend zerkleinert. Anschließend wurden etwa 10 mg präzise eingewogen und dann nach der ebenfalls unter 3.5.1 beschriebenen Ultraschallmethode aufgearbeitet und zusammen mit jeweils einer Leermatrixprobe, einer niedrigen und einer hohen Kontrolle per LC-MS/MS analysiert.

3.5.4 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB

Die bereits für den Methodenvergleich im Rahmen der GHB-Analytik per Ultraschall aufgearbeiteten Proben der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation (Kapitel 3.4.5) wurden gefroren gelagert und anschließend auch auf die Metaboliten von GHB untersucht. Da für die verschiedenen Metaboliten zwei unterschiedlich polare Säulen verwendet wurden (Normalphase und RP) unterschieden sich somit auch die verwendeten Laufmittel stark in ihrer Zusammensetzung. Da besonders bei den Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation nicht genügend Material zur Verfügung stand, um die Proben für jede Analyse neu aufzuarbeiten, wurden die zum Lösen der bereits zuvor aufgearbeiteten und eingedampften Probe verwendeten Laufmittel nach dem ersten Analysenlauf wieder eingedampft und der Rückstand erneut in dem Laufmittel der anderen Zusammensetzung aufgenommen. Dieses Vorgehen wurde zunächst an Kontrollproben getestet. Die untersuchten Haarproben mit zugehöriger *Xyrem*[®]-Dosis sind erneut in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13: Haarproben der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation, die auf die GHB-Metaboliten untersucht wurden.

Nummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der <i>Xyrem</i> [®] - Einnahme vor Probenentnahme [Monate]	Untersuchte Haarlänge [cm]	Untersuchte Segmente
P06	17	w	9	162,5	~ 9	3	S1–6: 5 mm
P07	22	w	6	45,5	~ 9	6	S2–4: 5 mm, S5–8: 10 mm
P08	44	w	5,25	41,0	~ 9	2	S1: 20 mm

Nummer	Alter [Jahren]	Geschlecht	Dosis/ Nacht [g]	Dosis/ Nacht [mg/kg]	Dauer der Xyrem®- Einnahme vor Probenentnahme [Monate]	Untersuchte Haarlänge [cm]	Untersuchte Segmente
P10	45	w	5	54,3	> 1	2,5	S1: 10 mm, S2: 15 mm
P11	37	m	7,5	51,7	~ 30	3	S1–2: 5 mm, S3–4: 10 mm
P12	21	w	7	118,6	> 13	5	S1–5 10 mm
P14	29	m	5,5	93,2	~ 145	5,5	S1–4: 5 mm, S5: 10 mm, S6: 15 mm
P15	55	w	9	92,3	~ 140	5,5	S1: 5 mm; S2–4: 10 mm, S5: 20 mm
P16	52	w	7,5	114,5	~ 23	4	S1–2: 20 mm
P18	47	w	3	35,3	~ 148	6,5	S1: 5 mm, S2–4: 10 mm, S5: 30 mm
P19	22	w	8	119,4	~ 12	8	S1–2: 15 mm, S3: 20 mm, S4: 30 mm

Die Dosen reichten dabei insgesamt von 35,3 mg/kg bis 162,5 mg/kg Xyrem® pro Nacht. Die untersuchten Haarproben waren zwischen 2 und mehr als 8 cm lang. Aufgrund der geringen Menge an zur Verfügung stehendem Probenmaterial, konnten die Analysen in der Regel nur einmal durchgeführt werden. Die elf Haarproben stammten von neun Frauen und zwei Männern.

3.5.5 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB

Im Rahmen des Experimentes zur Einmalgabe wurden einem freiwilligen Probanden, nach unterschriebener Einverständniserklärung, zweimal im Abstand von 7,5 Wochen jeweils etwa 2,4 g Na-GHB (*Somsanit*™) verabreicht. Es wurden Haarproben vor der Einnahme, eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme entnommen, dabei wurden zeitgleich jeweils zwei Haarsträhnen abgenommen. Jeweils eine Haarsträhne wurde, wie bereits beschrieben, für den Nachweis von GHB aufgearbeitet. Die andere Haarsträhne wurde nach der beschriebenen Methode für den Nachweis der Metaboliten gewaschen und anschließend wie ebenfalls beschrieben per Pulvermühle und Ultraschallbad aufgearbeitet. Aufgrund des Probenverlustes

bei der Pulverisierung und der mindestens benötigten Probenmenge von 10 mg konnten nur Segmente von 1 beziehungsweise 1,5 cm untersucht werden.

Für die bessere Vergleichbarkeit wurden Kontrollproben mit Haaren gemessen, die bei derselben Person vor der ersten Einnahme von GHB abgenommen wurden. Eine Probe wurde als Referenzprobe (ohne Zusatz der Metaboliten) und zwei weitere als Kontrollproben mit jeweils niedrigen und hohen zugesetzten Konzentrationen der Metaboliten verwendet. Dazu wurden den Kontrollproben die folgenden Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten zugesetzt. Kontrollprobe 1: Glycolsäure 1,0 ng/mg, 2,4-DHB 0,2 ng/mg, 3,4-DHB 0,5 ng/mg, GHB-Sulf 0,5 ng/mg; Kontrollprobe 2: Glycolsäure 25 ng/mg, 2,4-DHB 1,0 ng/mg, 3,4-DHB 5,0 ng/mg, GHB-Sulf 25 ng/mg.

4 Ergebnisse

4.1 GHB-Analytik

4.1.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB in Haaren

Optimierung der LC-MS/MS-Bedingungen

Mit den meisten getesteten Säulen und Laufmittelzusammensetzungen konnte entweder keine ausreichende Retention von mehr als 1 min erreicht werden oder der direkt hinter dem GHB-Signal auftauchende, durch die Matrix Haar verursachte, Störpeak nicht vollständig von dem GHB-Peak getrennt werden. Eine gute Retention von etwa 1,5 min und eine Basislinientrennung der beiden beschriebenen Peaks konnte mit der *Symmetry C18* Säule von *Waters* und der Laufmittelzusammensetzung 10 % Acetonitril und 90 % Wasser, beides mit 0,2 % Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure versetzt, erreicht werden.

Die Ionisation mittels APCI führte zu einem höherem Hintergrundrauschen als die mittels ESI.

Optimierung der Probenvorbereitung und der Extraktionsbedingungen

Alle Waschlösungen der einzelnen Schritte wurden auf ausgewaschene GHB getestet. Nur die Waschlösung aus Wasser enthielt Spuren an GHB (< 0,20 ng/mL). Die Haare in dieser Arbeit wurden, soweit möglich, immer als ganze Strähne gewaschen und erst anschließend segmentiert.

Zur Optimierung der Denaturierungsbedingungen wurden verschiedene Ofentemperaturen, Verweilzeiten im Ofen und Natronlauge-Konzentrationen getestet. Die Startbedingungen mit 1 M NaOH für 15 min bei 85 °C im Ofen lieferten kein zufriedenstellendes Ergebnis, die Haare waren nach 15 min nicht vollständig aufgelöst. Wurde die Verweildauer im 85 °C heißen Ofen auf drei Stunden verlängert, waren die Haare anschließend zwar aufgelöst, der direkt hinter dem GHB-Signal auftauchende Störpeak wurde jedoch wesentlich größer, sodass eine Basislinientrennung von GHB-Peak und Störpeak nicht mehr möglich war. Mildere Denaturierungsbedingungen mit 0,01 M NaOH und 16 Stunden bei 55 °C konnten die Haarmatrix jedoch nicht auflösen. Letztendlich konnten mit den Bedingungen, 1 M NaOH für 30 min bei 100 °C, ein guter Mittelweg gefunden werden, bei dem sich die Haare vollständig auflösten und der Störpeak verhältnismäßig klein blieb, sodass eine Basislinientrennung vom GHB-Peak möglich war.

Für die anschließende Neutralisation und Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat wurden ebenfalls verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt. Um Störeffekte zu minimieren, wurde die Aufarbeitung sowohl mit und ohne Glycin-Puffer getestet. Da sich jedoch keine Unterschiede im Hinblick auf störende Effekte durch das zur GHB strukturell ähnliche Glycin ergaben und der Glycin-Puffer zur Einstellung des richtigen pH-Wertes benötigt wurde, wurde

dieser für die Aufarbeitung verwendet. Um die Extraktionsausbeute zu erhöhen, wurde statt Wasser gesättigte Natriumchlorid-Lösung verwendet. Der Versuch, die Extraktionsausbeute durch zweimaliges Ausschütteln mit Ethylacetat weiter zu erhöhen, brachte keine Verbesserung. Ethylacetat führt zwar nicht zur effizientesten Extraktion, ist aber aufgrund seiner leichteren Verdampfbarkeit, als beispielsweise n-Butanol, dennoch besser geeignet.^[212]

Reinigung des Haarextraktes

Nach der Aufreinigung mittels *Solid Phase Extraction* (SPE) konnte bei keiner der getesteten Säulen anschließend GHB oder GHB-D₆ im LC-MS/MS-Chromatogramm detektiert werden. Um dennoch größere Störpartikel aus der Matrix für die Messung mittels LC-MS/MS zu entfernen, wurden die mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeiteten Proben durch einen Vorsatzspritzenfilter *CHROMAFIL® CA 20/15 MS* filtriert. Auch nach dieser einfachen Filtration an einer hydrophilen Celluloseacetat-Membran konnte anschließend keine GHB mehr detektiert werden. In dieser Arbeit wurde daher für die Aufarbeitung der auf GHB analysierten Haarproben vollständig auf eine Reinigung des Haarextraktes über eine Festphase verzichtet.

4.1.2 Methodvalidierung

Precursor- und Produkt-Ionen wurden im MRM-Modus aufgenommen, wobei jeweils für GHB die Massenübergänge bei einem Masse zu Ladungsverhältnis von 103 zu 57 und 103 zu 85, und für GHB-D₆ die Massenübergänge bei einem Masse zu Ladungsverhältnis von 109 zu 61 und 109 zu 90 detektiert wurden. Das relative Ionenverhältnis von *Qualifier* zu *Target* wurde für alle verwendeten Kalibrationsstandards berechnet. Dabei waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen nicht größer als die Schwankungen innerhalb der sechs Messungen zu einer Konzentration. Für GHB wurde daher ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $78 \pm 5,8 \%$ und für GHB-D₆ ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $66 \pm 4,9 \%$ von *Qualifier* zu *Target* über alle Konzentrationen angenommen. Die Realproben wurden entsprechend der Richtlinien bei einem Verhältnis $> 50 \%$ auf das akzeptable relative Toleranzintervall von 20% überprüft. Die quantitative Auswertung wurde mittels linearer Regression und der Software *Analyst 1.7* durchgeführt. Zuvor wurde, wie bereits erwähnt, die strukturell ähnliche Substanz Glycin und das ebenfalls endogen vorkommende GHB-Isomer Beta-Hydroxybuttersäure (BHB) daraufhin untersucht, ob sie potenzielle Interferenzen zeigen und somit die GHB-Analytik stören würden. Bei einer Injektion von 10 ng/mg BHB zeigte sich eine mögliche Interferenz mit dem Produkt-Ion 57 von GHB (blaue Linie im Chromatogramm in Abbildung 13). Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, war der BHB-Peak jedoch vollständig vom GHB-Peak getrennt. Bei dem zusätzlichen Peak bei etwa 4,5 min handelte es sich um einen Störpeak bedingt durch die Matrix Haar, der jedoch anhand der Retentionszeit und dem Verhältnis der beiden Massenübergänge deutlich von dem GHB-Peak zu unterscheiden war.

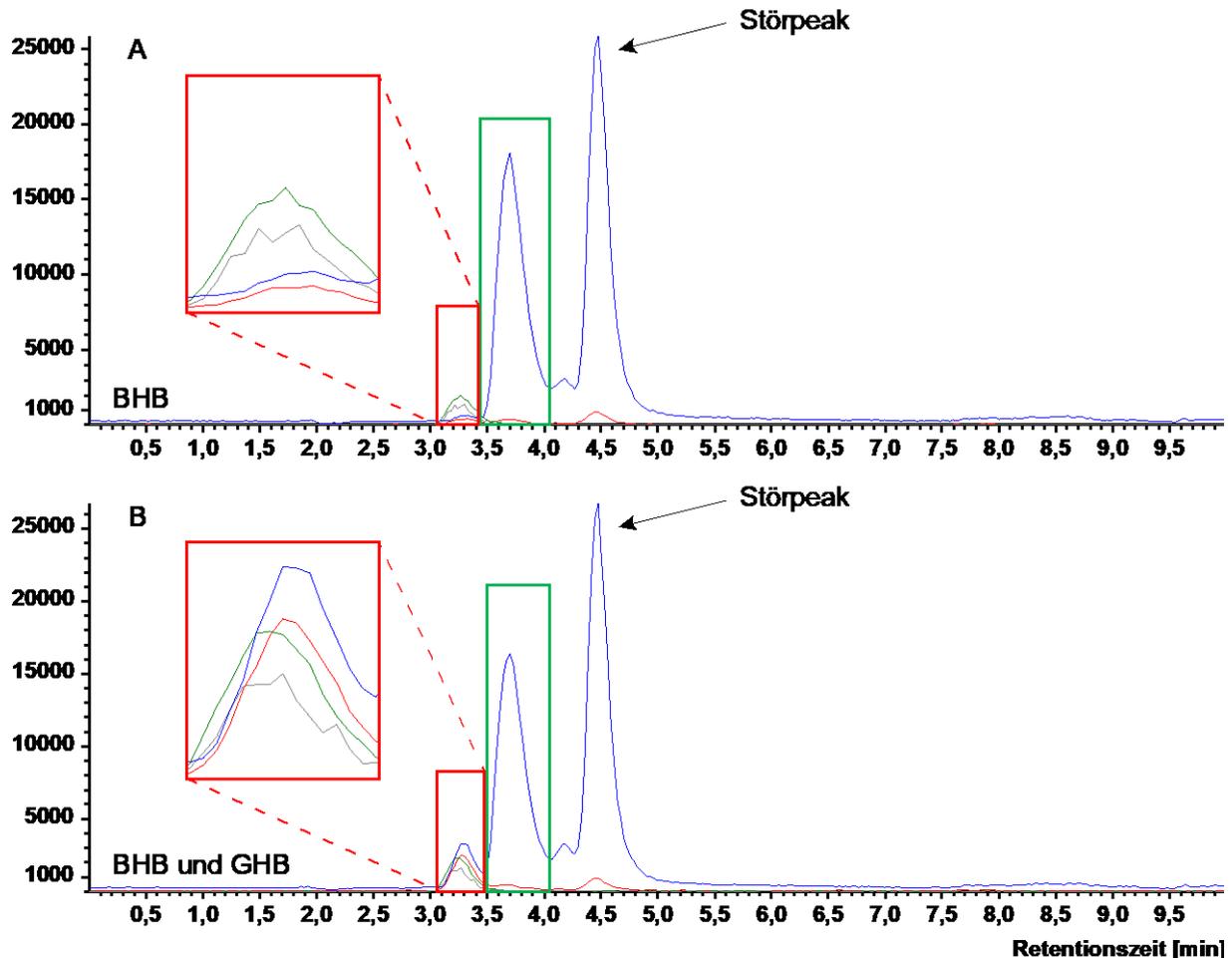


Abbildung 13: (A) Chromatogramm einer aufgearbeiteten Leermatrixprobe, die mit 10 ng/mg BHB (grüner Kasten) und dem internen Standard GHB-D₆ (roter Kasten) versetzt wurde. Die Massenübergänge für GHB sind in dunkelblau (103 zu 57) und rot (103 zu 85) dargestellt und die für GHB-D₆ in grün (109 zu 61) und grau (109 zu 90). (B) Chromatogramm einer Leermatrixprobe die mit 10 ng/mg GHB, dem internen Standard (beides roter Kasten) und 10 ng/mg BHB (grüner Kasten) versetzt wurde (Verändert nach *Martz/Nebel et al.*^[202]).

Für beide Massenübergänge wurde die Linearität zwischen 0,25 und 50 ng/mg gezeigt. Eine lineare Regressionsanalyse ergab einen R-Wert von 0,9997 in diesem Bereich für den ersten Übergang und einen R-Wert von 0,9995 für den zweiten Übergang. Die beiden Kalibrationskurven sind in Abbildung 14 dargestellt. Der höchste Kalibrator wurde mit 50 ng/mg festgelegt, da auch im Falle von therapeutischen GHB-Einnahmen bisher im Durchschnitt keine höheren Werte gemessen wurden. Die Bestimmungsgrenze wurde bei 0,20 ng/mg ermittelt, die Nachweisgrenze bei 0,10 ng/mg. Der Bias für alle Konzentrationen wurde mit kleiner 5 % bestimmt. Die Laborimpräzision und die Wiederholimpräzision wurden als relative Standardabweichung mit kleiner 7 % berechnet. Die 95 % β -Toleranzintervalle der Genauigkeit liegen für alle Konzentrationen im Bereich von -12,68 % bis 20,92 %.

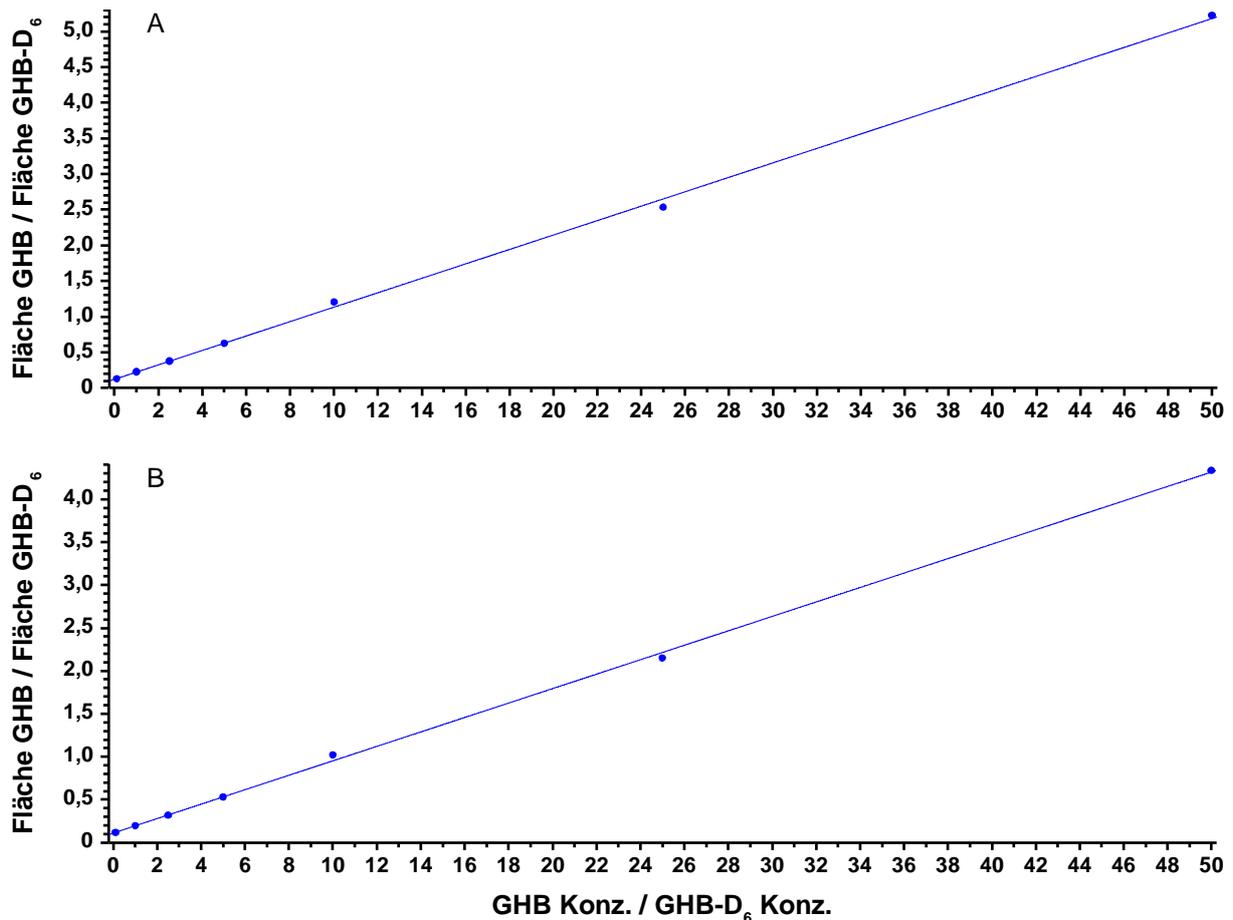


Abbildung 14: GHB-Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, *Target*, 103 zu 57, $R = 0,9997$) und den zweiten Übergang (B, *Qualifier*, 103 zu 85, $R = 0,9995$). Kalibrationspunkte waren 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20 und 50 ng/mg (Abbildung verändert nach Martz/Nebel et al.^[202]).

Die Wiederfindung für 1,0 und 25 ng/mg GHB wurde jeweils mit 23 % und 13 % mit einer Standardabweichung von 3,5 % und 3,2 % berechnet. Die niedrige Wiederfindungsrate ist durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat begründet, welches sich in der Vergangenheit dennoch als am besten geeignet für die Extraktion erwiesen hat.^[212] Bei Ermittlung der Matrixeffekte für 1,0 und 25 ng/mg GHB wurde eine Unterdrückung des Signals um 23 % und 11 % mit einer Standardabweichung von 11 % und 17 % berechnet. Für den internen Standard GHB-D₆ konnte im Durchschnitt weder eine Unterdrückung noch eine Erhöhung des Signals beobachtet werden. Die Standardabweichung wurde mit 24 % berechnet. Die Stabilität wurde ebenfalls an einer niedrigen (1,0 ng/mg) und einer hohen (25 ng/mg) Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich ermittelt. Die Abweichung der gemessenen Proben betrug jeweils 15 % und 23 % und somit in beiden Fällen weniger als die zulässigen 25 %. Zusätzlich wurde die Einfrier-/Auftaustabilität überprüft. Die im Abstand von jeweils etwa 20 Stunden dreimal eingefrorenen und wieder aufgetauten Stabilitätsproben lagen bei 100,8 % des Mittelwerts der nicht eingefrorenen Kontrollproben mit einem 90 % Konfidenzintervall von 99,2 % bis 102,5 % für 1,0 ng/mg und bei 103,6 % mit einem 90 %

Konfidenzintervall von 100,6 % bis 106,6 % für 25 ng/mg. In Tabelle 14 sind die Validierungsdaten für GHB zusammengefasst. Ein Beispiel-Chromatogramm für 10 ng/mg GHB mit und ohne Matrix ist in Abbildung 15 gezeigt.

Tabelle 14: Validierungsdaten für die GHB-Analytik.

	Bias	Labor- impräzision	Wiederhol- impräzision	Wiederfin- dung	Matrixeffekte	Stabilität
0,25 ng/mg	< 5 %	< 7 %	< 7 %			
1,0 ng/mg				23 % ± 3,5 %	77 % ± 11 %	15%
2,5 ng/mg	< 5 %	< 7 %	< 7 %			
25 ng/mg	< 5 %	< 7 %	< 7 %	13 % ± 3,2 %	89 % ± 17 %	23%

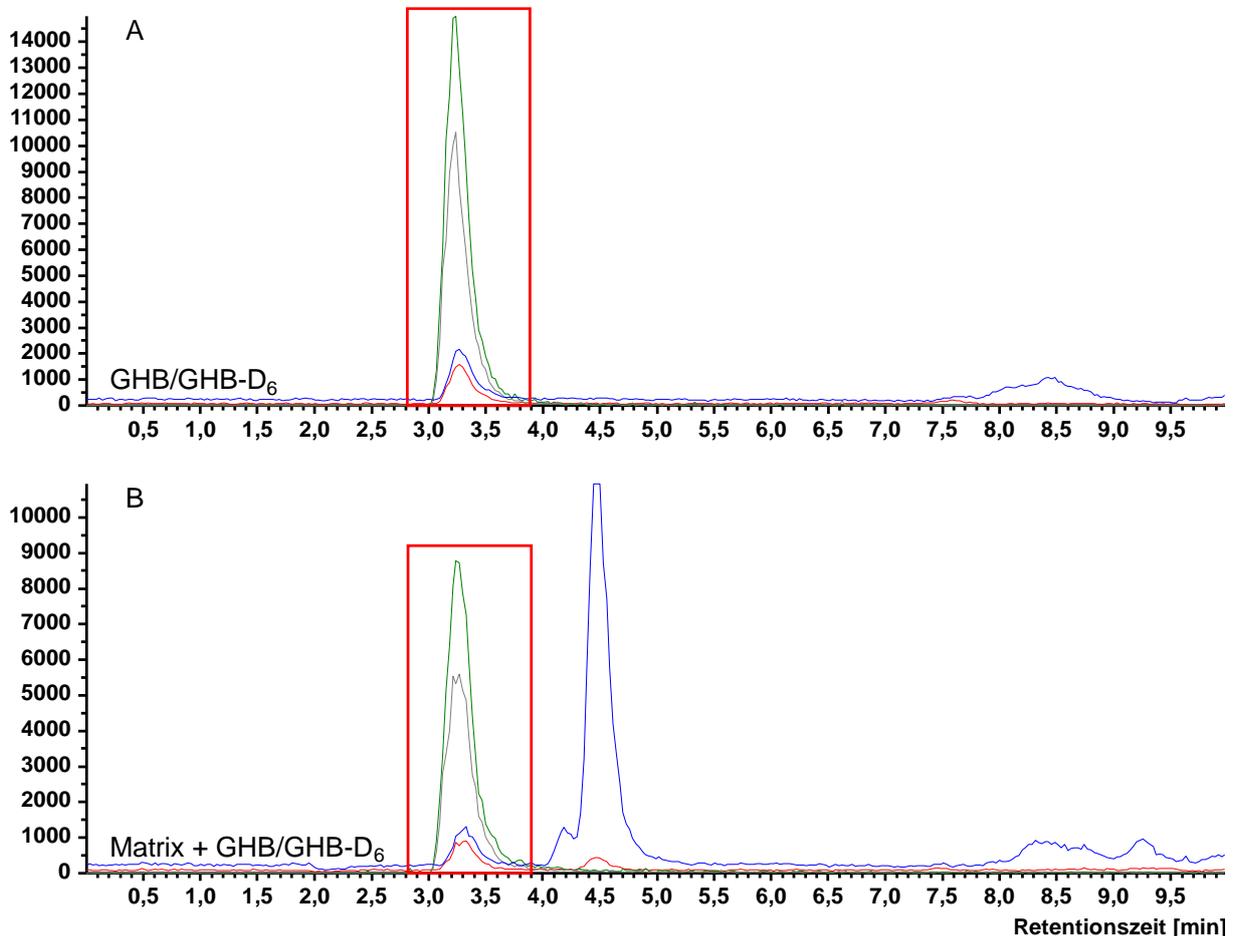


Abbildung 15: (A) Chromatogramm von 10 ng/mg GHB und GHB-D₆ ohne Matrix. (B) Chromatogramm von 10 ng/mg GHB und GHB-D₆ inklusive 10 mg Haare. Die Peaks für GHB und GHB-D₆ sind durch die roten Boxen markiert. Die Massenübergänge für GHB sind in dunkelblau (103 zu 57) und rot (103 zu 85) dargestellt und die für GHB-D₆ in grün (109 zu 61) und grau (109 zu 90). Die Elutionszeiten der beiden Substanzen liegen bei 3,48 und 3,47 min. Die anderen Peaks des Chromatogramms sind durch Matrixeffekte und Hintergrundrauschen verursacht (Abbildung verändert nach Martz/Nebel et al.^[2021]).

4.1.3 Messungen zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren

Die gesammelten Daten der segmentweise analysierten Haarproben aus Kanada sind in Tabelle A3 im Anhang gezeigt. In Abbildung 16 ist ein Überblick über die Ergebnisse der endogenen GHB-Konzentrationen aller 87 Haarproben gezeigt.

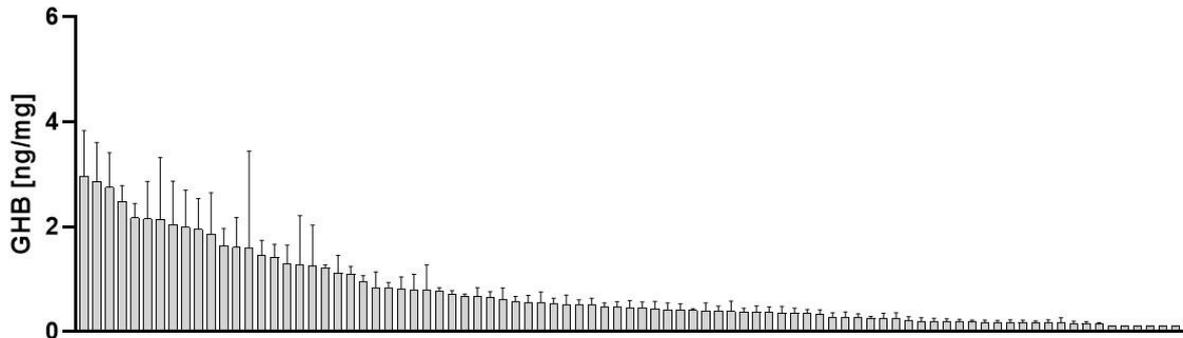


Abbildung 16: Endogene GHB-Konzentrationen der segmentiert gemessenen Haarproben. Die Balken repräsentieren den individuellen Mittelwert der GHB-Konzentration über alle analysierten Segmente. Die Fehlerbalken zeigen die +1 Standardabweichung (Abbildung verändert nach *Martz/Nebel et al.*^[202]).

Die segmentweise Haaranalyse ergab keine signifikanten Unterschiede für die Mittelwerte von Haarproben weiblicher und männlicher Personen ($p=0,21$). Der Mittelwert der 26 männlichen Haarprofile lag bei 0,94 ng/mg GHB. Der Mittelwert der 61 weiblichen Haarprofile lag bei 0,67 ng/mg.

Neuere Studien haben gezeigt, dass in vielen Fällen das erste kopfnahes Segment deutlich höhere GHB-Konzentrationen enthält als der Rest der Haarsträhne.^[18,191,213] Daher wurden ebenfalls Mittelwerte ohne das erste Segment berechnet. Dabei ergab sich für die männlichen Profile ein Mittelwert von 0,93 ng/mg GHB und für die weiblichen Profile ein Mittelwert von 0,68 ng/mg. In der vorliegenden Arbeit war, im Gegensatz zu den erwähnten Studien, folglich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,9$) zwischen den berechneten Mittelwerten des ersten Segmentes und der übrigen Segmente zu beobachten, wie auch in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

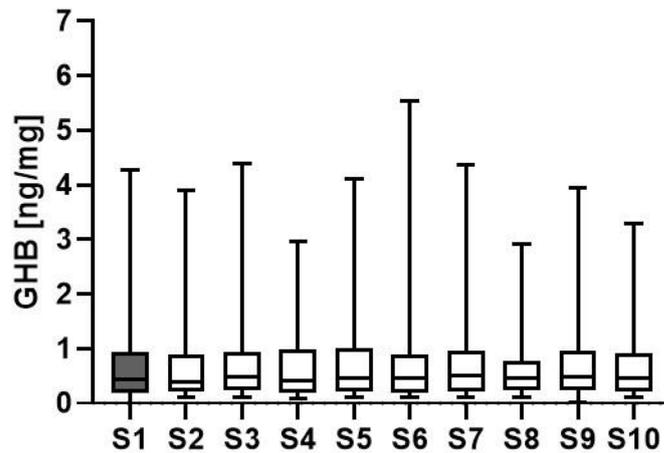


Abbildung 17: GHB-Konzentrationen des ersten kopfnahen Segmentes (S1) im Vergleich zu den GHB-Konzentrationen aller anderen Segmente (S2–S10) (Abbildung verändert nach *Martz/Nebel et al.*^[202]).

In Tabelle 15 sind die berechneten Mittelwerte mit und ohne das erste Segment für die beiden Geschlechter sortiert nach Altersgruppen zusammengefasst. Aufgrund der teilweise kleinen Anzahl an Proben in einigen Kategorien sind die Ergebnisse nur eingeschränkt beurteilbar. Der für alle 870 analysierten Segmente erhaltene Mittelwert für endogene GHB-Konzentrationen lag bei 0,75 ng/mg, der ermittelte Referenzbereich der Mittelwerte bei < 0,1 bis 3,0 ng/mg und der ermittelte Referenzbereich aller Segmente bei < 0,1 bis 5,5 ng/mg.

Tabelle 15: Durchschnittliche GHB-Konzentrationen inklusive Standardabweichung und Referenzbereich (Minimum – Maximum) der segmentweise analysierten Haarproben, der analysierten ersten kopfnahen Segmente und der Segmente ohne Berücksichtigung des ersten kopfnahen Segmentes, zusätzlich gruppiert nach Alter und Geschlecht.

Geschlecht	Alter [Jahre] (n = Anzahl an Proben)	Durchschnittliche GHB-Konzentration ± SD [ng/mg]	Durchschnittliche GHB-Konzentration ohne das erste Segment ± SD [ng/mg]	Durchschnittliche GHB-Konzentration des ersten Segments ± SD [ng/mg]
Männlich	19 – 29 (n = 13)	0,77 ± 0,75 (0,10 – 2,8)	0,77 ± 0,74 (0,10 – 2,8)	0,70 ± 0,83 (< 0,10 – 2,6)
	30 – 59 (n = 13)	1,1 ± 0,98 (0,10 – 3,0)	1,1 ± 0,99 (0,10 – 2,8)	1,2 ± 1,4 (0,10 – 4,3)
	19 – 59 (n = 26)	0,94 ± 0,89 (0,10 – 3,0)	0,93 ± 0,86 (0,10 – 2,8)	0,97 ± 1,2 (< 0,10 – 4,3)
Weiblich	20 – 29 (n = 46)	0,62 ± 0,57 (0,10 – 2,2)	0,62 ± 0,58 (0,10 – 2,2)	0,58 ± 0,52 (0,10 – 2,4)
	30 – 60 (n = 15)	0,84 ± 0,70 (0,17 – 2,5)	0,83 ± 0,70 (0,18 – 2,5)	0,86 ± 0,74 (0,10 – 2,6)
	20 – 60 (n = 61)	0,67 ± 0,61 (0,10 – 2,5)	0,68 ± 0,62 (0,10 – 2,5)	0,65 ± 0,59 (0,10 – 2,6)

Geschlecht	Alter [Jahre] (n = Anzahl an Proben)	Durchschnittliche GHB- Konzentration \pm SD [ng/mg]	Durchschnittliche GHB- Konzentration ohne das erste Segment \pm SD [ng/mg]	Durchschnittliche GHB-Konzentration des ersten Segments \pm SD [ng/mg]
Alle Personen	19 – 60 (n = 87)	0,75 \pm 0,72 (0,10 – 3,0)	0,75 \pm 0,71 (0,10 – 2,8)	0,74 \pm 0,82 (< 0,10 – 4,3)
Alle Segmente	n = 870	0,75 \pm 0,72 (< 0,10 – 5,5)	0,75 \pm 0,71 (< 0,10 – 5,5)	0,74 \pm 0,82 (< 0,10 – 4,3)

In Abbildung 18 ist die Verteilung der Mittel- und Extremwerte von weiblichen und männlichen Personen gegenübergestellt und der Verlauf der Mittelwerte über die Segmente abgebildet. Die Mittelwerte überschritten in keinem der Fälle den diskutierten *Cut-off*-Wert von 3,0 ng/mg, der endogene GHB-Konzentrationen von Konzentrationen nach potenziellen GHB-Aufnahmen abgrenzen könnte. Betrachtet man die einzelnen Segmente lagen 18 der 870 analysierten Segmente über 3,0 ng/mg GHB im Haar.

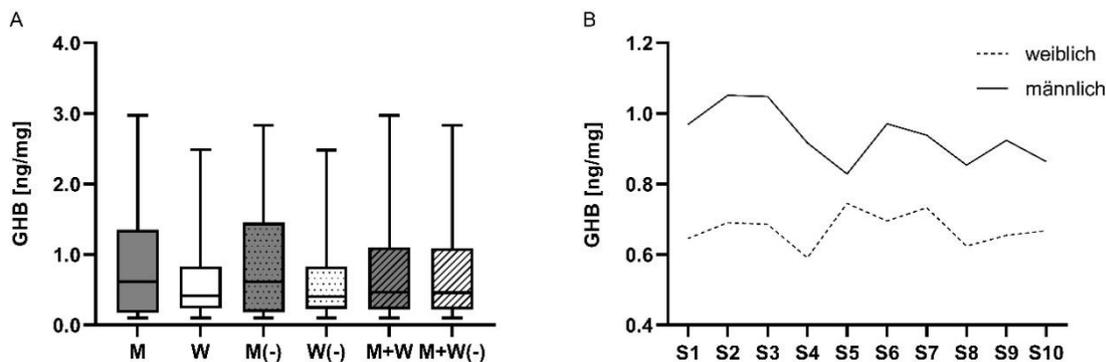


Abbildung 18: (A) Mittlere GHB-Konzentrationen und Quartile für männliche Probanden (M), weibliche Probandinnen (W), männliche Probanden ohne das erste Segment (M-), weibliche Probandinnen ohne das erste Segment (W-), männliche und weibliche Personen zusammen (M+W) und männliche und weibliche Personen zusammen ohne das erste Segment (M+W-); (B) Verlauf der GHB-Konzentrationen über die einzelnen Segmente (S1–10) aufgeteilt nach weiblichen und männlichen Personen (Abbildung verändert nach *Martz/Nebel et al.*^[202]).

Der Mittelwert und der Referenzbereich aus der Studie in Kanada mit 87 segmentweise analysierten Haarsträhnen wurden mit den Ergebnissen der 58 Haarproben verglichen, die anschließend an die vollständige Methodvalidierung zur Überprüfung der Methode im Rahmen dieser Arbeit unsegmentiert vermessen wurden. Die gesammelten Daten dieser 58 analysierten Haarproben sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Es sollte überprüft werden, ob die methodisch äquivalent durchgeführten Extraktionen und LC-MS/MS-Verfahren auf zwei baugleichen Geräten zu vergleichbaren endogenen GHB-Konzentrationen gelangen.

Tabelle 16: Ermittelte GHB-Konzentrationen von 58 unsegmentierten Haarproben von Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme nach der vollständigen Validierung der Methode (n. b. = nicht bestimmt). Da in fast allen Fällen mehr als 10 mg Probenmaterial zur Verfügung stand und die Ergebnisse anschließend auf eine Einwaage von 10 mg Haar umgerechnet wurden, werden auch Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,20 ng/mg angegeben.

Proben-Nummer	Endogene GHB-Konzentration [ng/mg]	Proben-Nummer	Endogene GHB-Konzentration [ng/mg]
G01	3,2	G35	0,91
G02	0,90	G36	< 0,10
G03	< 0,10	G37	0,80
G04	< 0,10	G38	0,45
G05	4,4	G39	0,25
G06	0,80	G40	0,70
G07	2,8	G41	2,8
G08	< 0,10	G42	3,7
G09	< 0,10	G43	n. b.
G10	1,2	G44	3,9
G11	1,0	G45	n. b.
G12	< 0,10	G46	2,1
G13	n. b.	G47	6,3
G14	1,5	G48	0,10
G15	< 0,10	G49	2,3
G16	2,4	G50	1,5
G17	1,6	G51	1,8
G18	n. b.	G52	3,9
G19	0,20	G53	0,95
G20	0,49	G54	2,5
G21	0,26	G55	3,0
G22	n. b.	G56	2,4
G23	n. b.	G57	0,73
G24	1,6	G58	3,1
G25	1,2	G59	n. b.
G26	0,34	G60	3,1
G27	0,30	G61	1,7
G28	0,11	G62	4,6
G29	< 0,10	G63	2,9
G30	0,38	G64	5,8
G31	n. b.	G65	1,4
G32	2,5	G66	2,7
G33	< 0,10	G67	4,7
G34	n. b.	Mittelwert ± SD	1,7 ± 1,6

Die ermittelten endogenen GHB-Konzentrationen der unsegmentierten Proben lagen im Durchschnitt bei 1,7 ng/mg mit einer Standardabweichung von 1,6 ng/mg. Dadurch ergibt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für endogene GHB-Konzentrationen in Haaren ein Referenzbereich von < 0,10 bis 6,3 ng/mg. Bei 11 der 58 Proben lag die ermittelte GHB-Konzentration über 3,0 ng/mg. Die ermittelten endogenen Konzentrationen der segmentierten Proben werden in Abbildung 19 graphisch mit den ermittelten endogenen Konzentrationen der unsegmentierten Proben gegenübergestellt.

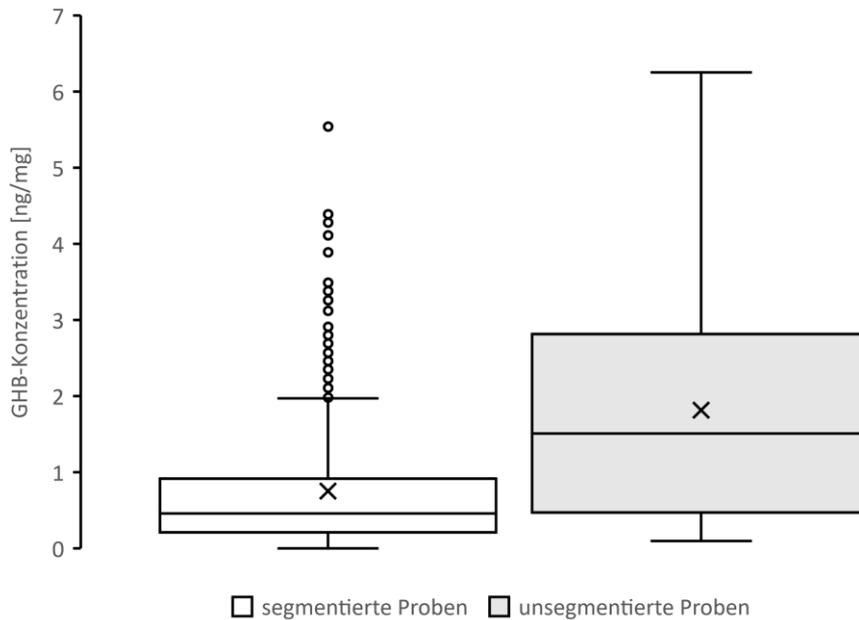


Abbildung 19: Gegenüberstellung der endogenen GHB-Konzentrationen von segmentiert vermessenen und unsegmentiert vermessenen Haarproben.

Lagerungsstabilität von GHB in Haarproben

Bei der Messung von bereits zwei bis acht Jahre gelagerten Haarproben waren deutlich höhere Analyseergebnisse bei nahezu allen untersuchten Segmenten verglichen mit den zeitnah zur Entnahme analysierten Haarsträhnen zu beobachten. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse zusammengefasst, in Tabelle A4 im Anhang sind die Ergebnisse für jedes einzelne Segment gezeigt. Bei 48 von 52 untersuchten Segmenten der gelagerten Haarproben lag die ermittelte GHB-Konzentration oberhalb von 3,0 ng/mg, bei 39 der 52 Segmente sogar oberhalb des in dieser Arbeit ermittelten Maximalwertes von Haarproben ohne bekannte GHB-Aufnahme von 6,3 ng/mg. Der Mittelwert aller 52 Segmente lag bei 36 ng/mg GHB. Die untersuchten Proben wurden dabei alle nach den Richtlinien der SoHT im Dunklen, bei Raumtemperatur und in unterschiedlichen Materialien wie Aluminiumfolie, Briefumschlägen oder Plastiktüten verpackt gelagert.

Tabelle 17: Ergebnisse der zwei bis acht Jahre alten Haarproben. Anzahl und Länge der analysierten Segmente (gesamte untersuchte Länge), durchschnittliche GHB-Konzentration über alle Segmente, Anzahl Segmente oberhalb von 3,0 ng/mg GHB, Anzahl Segmente oberhalb von 6,3 ng/mg GHB.

Probe (-Lagerdauer)	Anzahl und Länge der analysierten Segmente (gesamte untersuchte Länge)	Durchschnittliche GHB-Konzentration über alle Segmente [ng/mg]	Anzahl Segmente oberhalb von 3 ng/mg GHB	Anzahl Segmente oberhalb von 6,3 ng/mg GHB
1 (8 Jahre)	8*5 mm (4 cm)	40	8	8
2 (8 Jahre)	10*3 mm (3 cm)	110	10	10
3 (7 Jahre)	3*3 mm (9 mm)	10	3	3
4 (7 Jahre)	8*5 mm (4 cm)	20	8	8
5 (6 Jahre)	3*3 mm (9 mm)	30	3	3
6 (5 Jahre)	3*3 mm (9 mm)	28	3	3
7 (4 Jahre)	3*3 mm (9 mm)	3,8	3	0
8 (3 Jahre)	8*5 mm (4 cm)	3,8	4	1
9 (3 Jahre)	3*3 mm (9 mm)	4,7	3	0
10 (2 Jahre)	3*3 mm (9 mm)	21	3	3
Alle Segmente	52	36	48	40

Trägt man, wie in Abbildung 20 zu sehen, die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Messwerte der zeitnah nach der Entnahme vermessenen Haarproben (P) und der gelagerten Proben von anderen Personen (RP) gegeneinander auf, zeigte sich, dass sich die ermittelten endogenen GHB-Konzentrationen in den direkt vermessenen Haarproben nur in einem kleinen Bereich mit denen der gelagerten Proben überschneiden.

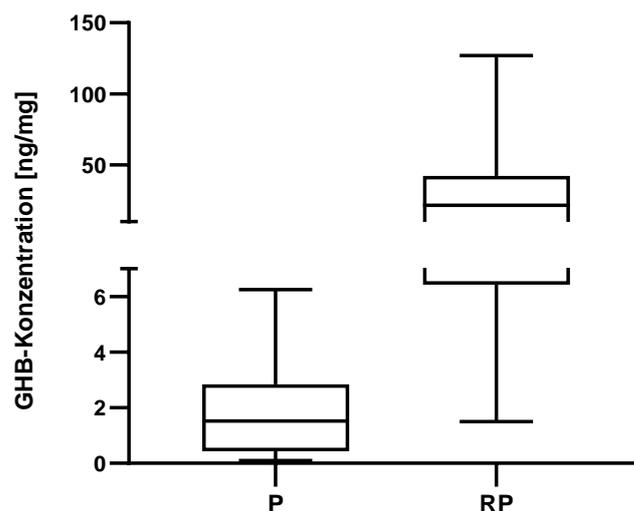


Abbildung 20: Median und Quartile der endogenen GHB-Konzentrationen der zeitnah zur Entnahme vermessenen Proben (P) und der gelagerten Haarproben (RP). Die Haare der direkt vermessenen Proben und die Haare der gelagerten Proben stammen dabei nicht von den selben Personen.

Um das Phänomen der deutlich erhöhten GHB-Konzentrationen in länger gelagerten Haarproben zu untersuchen, wurde eine dicke Haarsträhne jeweils im Abstand von etwa einem Monat und später in größeren Abständen segmentweise untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: GHB-Konzentrationen der regelmäßig über ein Jahr und zwei Monate segmentweise untersuchten Haarsträhne und der pro Strähne erhaltene Mittelwert (MW). Alle Konzentrationen sind in [ng/mg] angegeben.

Monate nach der Entnahme	GHB- Konz. S1	GHB- Konz. S2	GHB- Konz. S3	GHB- Konz. S4	GHB- Konz. S5	GHB- Konz. S6	GHB- Konz. S7	GHB- Konz. S8	GHB- Konz. S9	GHB- Konz. S10	MW
0	0,4	0,3	0,6	0,4	0,6	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,48
1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5	0,4	0,5	0,29
2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,8	0,42
3	0,4	0,4	0,4	0,7	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	1,0	0,57
4	0,5	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,34
6	0,8	0,8	1,0	0,7	0,6	0,9	0,7	2,0	0,7	1,0	0,92
7	0,8	0,3	0,6	0,4	0,4	0,3	0,5	1,0	0,4	0,7	0,54
10	0,3	0,3	0,2	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	0,49
14	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0,5	0,26

4.1.4 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB

Die Messwerte für alle Segmente sind im Anhang in Tabelle A5 gezeigt. Abbildung 21 zeigt eine Übersicht über alle untersuchten Haarproben und die erhaltenen Mittelwerte der GHB-Konzentrationen sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis. Dabei wird deutlich, dass kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen *Xyrem*[®]-Dosis und gemessener GHB-Konzentration zu bestehen scheint. Zudem lagen mit Ausnahme von drei Werten alle Konzentrationen in dem zuvor ermittelten endogenen Referenzbereich von < 0,1 bis 6,3 ng/mg.

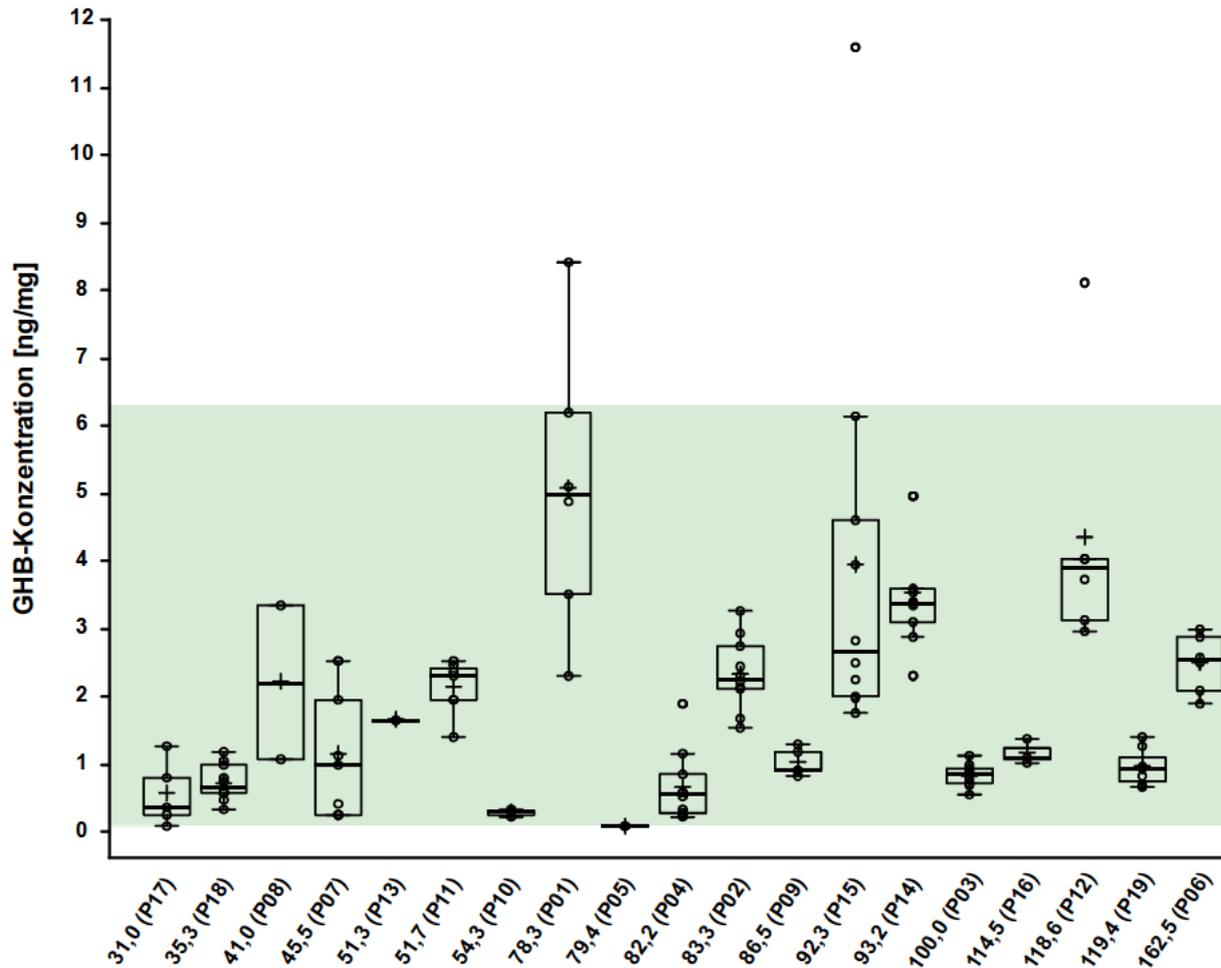


Abbildung 21: Gemessene GHB-Konzentrationen, Mittelwert, Median, Quartile und Ausreißer der 19 Personen sortiert nach aufsteigender Xyrem®-Dosis in mg/kg Körpergewicht. In grün ist der endogene Referenzbereich ohne Ausreißer dargestellt. Es wurden zwischen ein und zehn Segmenten untersucht.

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Haarproben nach regelmäßiger Aufnahme von GHB zusammengefasst. Der Mittelwert der Haarproben von männlichen Probanden lag bei $2,7 \pm 1,5$ ng/mg, der Mittelwert der Haarproben der weiblichen Probandinnen bei $1,6 \pm 1,3$ ng/mg. Der Mittelwert aller Personen lag bei $1,9 \pm 1,4$ ng/mg und der Mittelwert über alle analysierten Segmente bei $1,9 \pm 1,8$ ng/mg.

Tabelle 19: GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB der Männer, Frauen, aller Personen und aller Segmente. Ebenfalls dargestellt sind die Mittelwerte ohne Berücksichtigung der gefärbten Haare.

	Alter [Jahre]	Durchschnittliche GHB- Konzentration \pm SD [ng/mg] (Minimum – Maximum)	Durchschnittliche GHB-Konzentration ohne gefärbte Haare \pm SD [ng/mg] (Minimum – Maximum)
Männer	28-59	$2,7 \pm 1,5$ (n = 5) (1,0 – 5,1)	
Frauen	17-55	$1,6 \pm 1,3$ (n = 14) (< 0,10 – 4,4)	$1,7 \pm 1,1$ (n = 8) (0,68 – 4,0)

	Alter [Jahre]	Durchschnittliche GHB- Konzentration \pm SD [ng/mg] (Minimum – Maximum)	Durchschnittliche GHB-Konzentration ohne gefärbte Haare \pm SD [ng/mg] (Minimum – Maximum)
Alle Personen	18-59	1,9 \pm 1,4 (n = 19) ($<$ 0,10 – 5,1)	2,1 \pm 1,3 (n=13) (0,68 – 5,1)
Alle Segmente		1,8 \pm 1,8 (n = 136) ($<$ 0,10 – 12)	2,2 \pm 1,8 (n = 94) (0,25 – 12)

Da bekannt ist, dass kosmetische Haarbehandlungen die Konzentrationen an Fremdsubstanzen im Haar beeinflussen können, wurden die fünf, in Abbildung 22 in grau gekennzeichneten, Haarproben von Personen mit gefärbtem Haar für eine zusätzliche Auswertung ausgeklammert. Bildet man den Mittelwert aller nicht gefärbten Haarproben indem zunächst der Mittelwert für jede Probe aus den gemessenen Segmenten ermittelt wird, lag der Durchschnitt bei $2,1 \pm 1,3$ ng/mg. Bildet man den Mittelwert anhand aller nicht gefärbten einzelnen Segmente, lag dieser bei $2,2 \pm 1,8$ ng/mg. In beiden Fällen lag der Mittelwert somit höher als der Mittelwert inklusive der gefärbten Haarproben, wie auch in Tabelle 13 zu sehen.

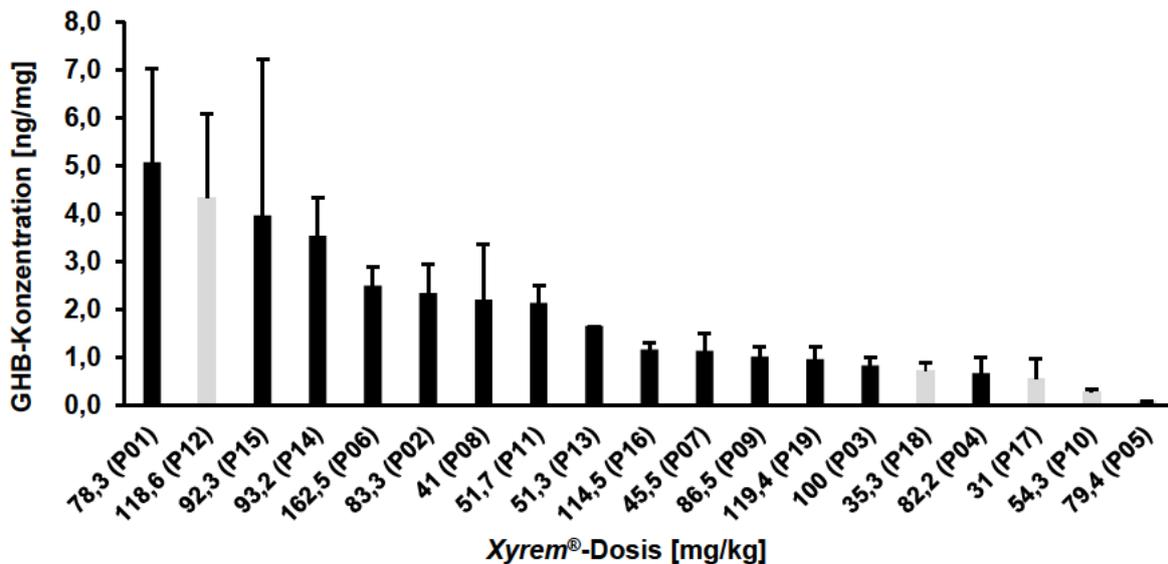


Abbildung 22: Absteigende mittlere GHB-Konzentrationen der untersuchten Haarproben von Personen nach regelmäßiger Aufnahme von GHB mit in grau markierten gefärbten Haarproben (Abbildung verändert nach *Nebel et al.*^[214]).

Betrachtet man die Verteilung der GHB-Konzentrationen über die verschiedenen Segmente einer Haarsträhne, konnte kein einheitlicher Trend beobachtet werden. In den meisten Haarproben war die Verteilung schwankend (mal an- und mal absteigend) (P02, P03, P04, P09, P10, P11, P14, P15, P17, P18). Einige Haarproben wiesen jedoch auch einen ansteigenden (P01, P06, P07, P19) oder absteigenden (P12, P16) Trend in der GHB-Konzentration entlang des Haares auf, wie in Abbildung 23 zu sehen.

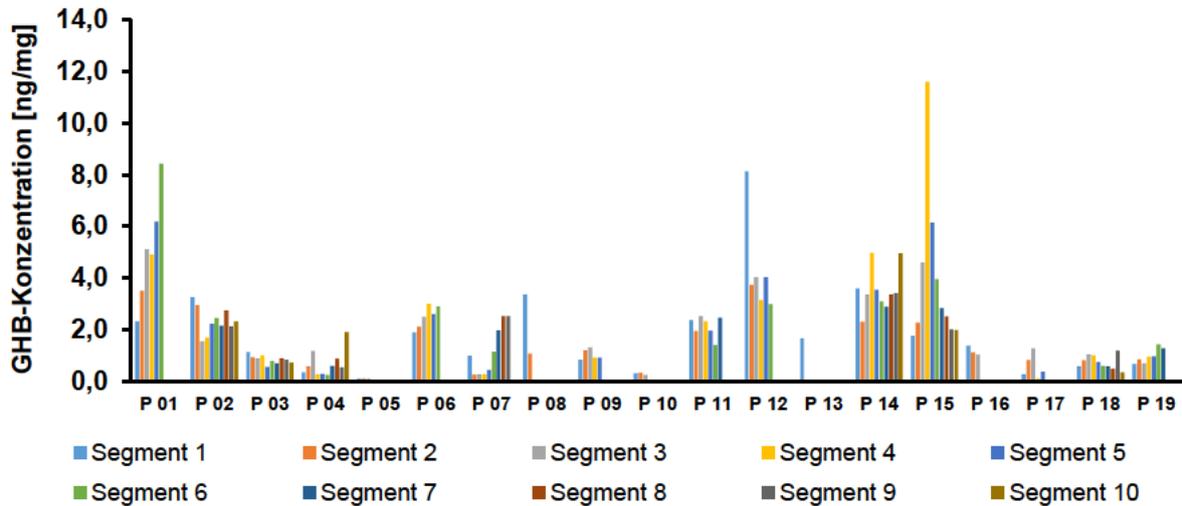


Abbildung 23: Verteilung der GHB-Konzentration in den verschiedenen Segmenten entlang des Haares (Abbildung verändert nach *Nebel et al.*^[214]).

4.1.5 Methodenvergleich

Auf dem Gebiet der GHB-Analytik in Haaren wird eine Abhängigkeit der Analysenergebnisse von der jeweiligen Extraktionsmethode diskutiert. Mit den bereits durch basische Denaturierung und anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeiteten Haarproben von Personen nach regelmäßiger Aufnahme von GHB sollte ein Methodenvergleich durchgeführt werden, um diese Extraktion mit einer methanolischen Extraktion mittels Ultraschall zu vergleichen. Die Messwerte der einzelnen Segmente sind im Anhang in Tabelle A6 gezeigt.

Die erhaltenen Ergebnisse der zwölf Haarproben sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Zur besseren Einordnung sind zusätzlich die durchschnittlichen Konzentrationen und die Abweichung vom Sollwert der Kontrollproben gezeigt. Die durch Ultraschall-Extraktion erhaltenen GHB-Konzentrationen lagen in allen Gruppen etwas niedriger als die nach Denaturierung der Haare gemessenen Konzentrationen.

Tabelle 20: Gegenüberstellung der, mit zwei unterschiedlichen Extraktionsverfahren ermittelten, GHB-Konzentrationen in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme.

	Durchschnittliche GHB-Konzentration ± SD [ng/mg] nach Denaturierung durch NaOH (Minimum – Maximum)	Durchschnittliche GHB-Konzentration ± SD [ng/mg] nach methanolischer Aufarbeitung im Ultraschallbad (Minimum – Maximum)		
Männer	2,7 ± 1,5 (n = 5) (1,0 – 5,1)	2,1 ± 1,8 (n = 2) (0,30 – 3,8)		
Frauen	1,6 ± 1,3 (n = 14) (0,10 – 4,4)	1,4 ± 0,67 (n = 10) (0,15 – 2,5)		
Alle Personen	1,9 ± 1,4 (n = 19) (0,10 – 5,1)	1,5 ± 0,98 (n = 12) (0,15 – 3,8)		
Alle Segmente	1,8 ± 1,8 (n = 136) (0,10 – 12)	1,6 ± 1,1 (n = 59) (0,13 – 4,8)		
Durchschnittliche Abweichung der niedrigen und hohen Kontrollproben				
Sollwert [ng/mg]	0,25	5,0	0,25	2,5
Istwert [ng/mg]	0,26	5,3	0,15	2,6
Abweichung [%]	2,4	6,9	-40	5,0

Graphisch dargestellt, wie in Abbildung 24, sieht man, dass die beiden Extraktionsmethoden je nach individueller Haarsträhne mal höhere und mal niedrigere GHB-Konzentrationen ergaben. Es ließ sich kein genereller Trend beobachten, der auf eine höhere oder niedrigere Extraktionsausbeute mittels der ein oder anderen Methode schließen lässt.

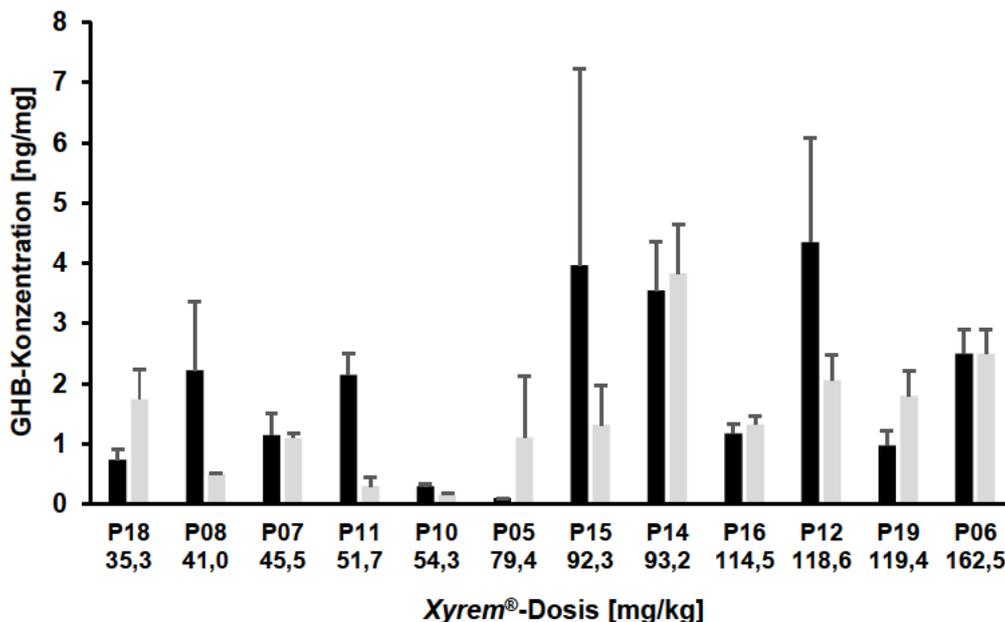


Abbildung 24: Gegenüberstellung der mit zwei unterschiedlichen Extraktionsverfahren ermittelten GHB-Konzentrationen inklusive + 1 Standardabweichung in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme. In schwarz dargestellt sind die Ergebnisse der mittels Denaturierung erhaltenen Ergebnisse und in grau die mittels Ultraschall-Extraktion erhaltenen Ergebnisse.

4.1.6 Messungen zu GHB-Konzentrationen nach Einmalgabe von GHB

Bei der Einnahme von 2,4 g beziehungsweise 31,4 mg/kg Na-GHB (*Somsanit™*) wurden keine starken Nebenwirkungen beobachtet, lediglich leichte Kopfschmerzen, etwas Schwindel und Durst am nächsten Morgen wurden nach der ersten jedoch nicht nach der zweiten Einnahme berichtet. Die Ergebnisse der drei anschließend entnommenen und auf ihre GHB-Konzentrationen untersuchten Haarsträhnen, sind graphisch in Abbildung 25 zu sehen. Die nicht segmentierte vor der Einnahme entnommene Haarprobe ergab eine GHB-Konzentration von 1,2 ng/mg. Für die beiden Entnahmen nach der ersten Einnahme von GHB lagen alle ermittelten GHB-Konzentrationen zwischen < 0,10 ng/mg und 0,70 ng/mg und somit in dem Bereich der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen endogenen GHB-Konzentrationen, aber sogar niedriger als die vor der Einnahme analysierte Haarprobe derselben Person. Die GHB-Konzentrationen der Segmente der Haarsträhne, die nach der zweiten Einnahme von GHB entnommen wurde, lagen alle unterhalb der Nachweisgrenze von 0,10 ng/mg.

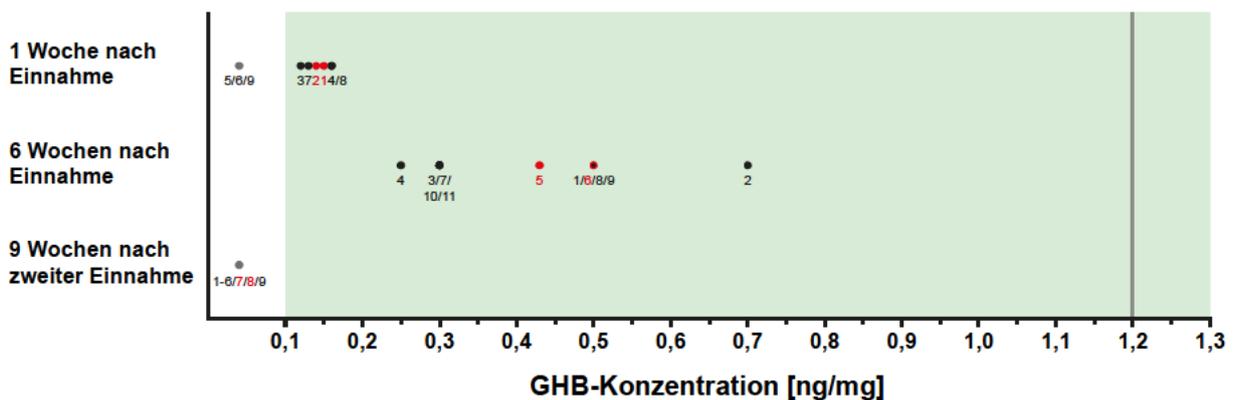


Abbildung 25: GHB-Konzentrationen im Haar eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. Der grüne Bereich stellt den ermittelten endogenen Referenzbereich ohne die Ausreißer dar. Die graue Linie markiert das vor der Einnahme gemessene individuelle endogene Level der Person. In rot sind die Segmente dargestellt, in denen bei einer Wachstumsrate von 1 cm/Monat die erhöhten Konzentrationen erwartet würden.

4.2 GHB-Metaboliten-Analytik

4.2.1 Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB-Metaboliten in Haaren

Für die untersuchten Metaboliten von GHB, Glycolsäure, 2,4-DHB, 3,4-DHB und GHB-Sulf, wurden zunächst zwei mögliche Extraktionsmethoden getestet. Die Probenvorbereitung wurde an einer, mit den vier zu untersuchenden Metaboliten versetzten, Matrixprobe (10 mg Haare) getestet. Die durch Denaturierung und anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Chromatogramme wiesen im Falle der Metaboliten Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB verschiedene Störpeaks auf, wodurch eine quantitative Auswertung nicht möglich war. Im Falle der sulfatierten GHB konnte mit dieser Aufarbeitung in Anwesenheit der Matrix Haar keine Substanz detektiert werden. Sowohl für die sulfatierte GHB als auch für die anderen drei untersuchten GHB-Metaboliten erbrachte die Aufarbeitung mittels Pulverisierung und Ultraschall-Extraktion bessere Ergebnisse.

Bei der Optimierung der Extraktionsbedingungen wurde getestet, ob im Gegensatz zur Extraktion von GHB, die Filtration durch einen Spritzenaufsatzfilter einen Vorteil bietet. Der Einsatz des Filters führte zu deutlich geringerem Untergrundrauschen und klarer definierten Peaks, sodass im Falle der GHB-Metaboliten-Analytik für alle neu aufgearbeiteten Proben eine Filtration durch einen 15 mm Filter mit einer Porengröße von 0,2 μm (*Chromafil® CA 20/15 MS, Macherey-Nagel*) im letzten Schritt durchgeführt wurde. In Abbildung 26 sind Beispielchromatogramme der Metaboliten mit dem internen Standard GHB-D₆ nach Methodenoptimierung abgebildet.

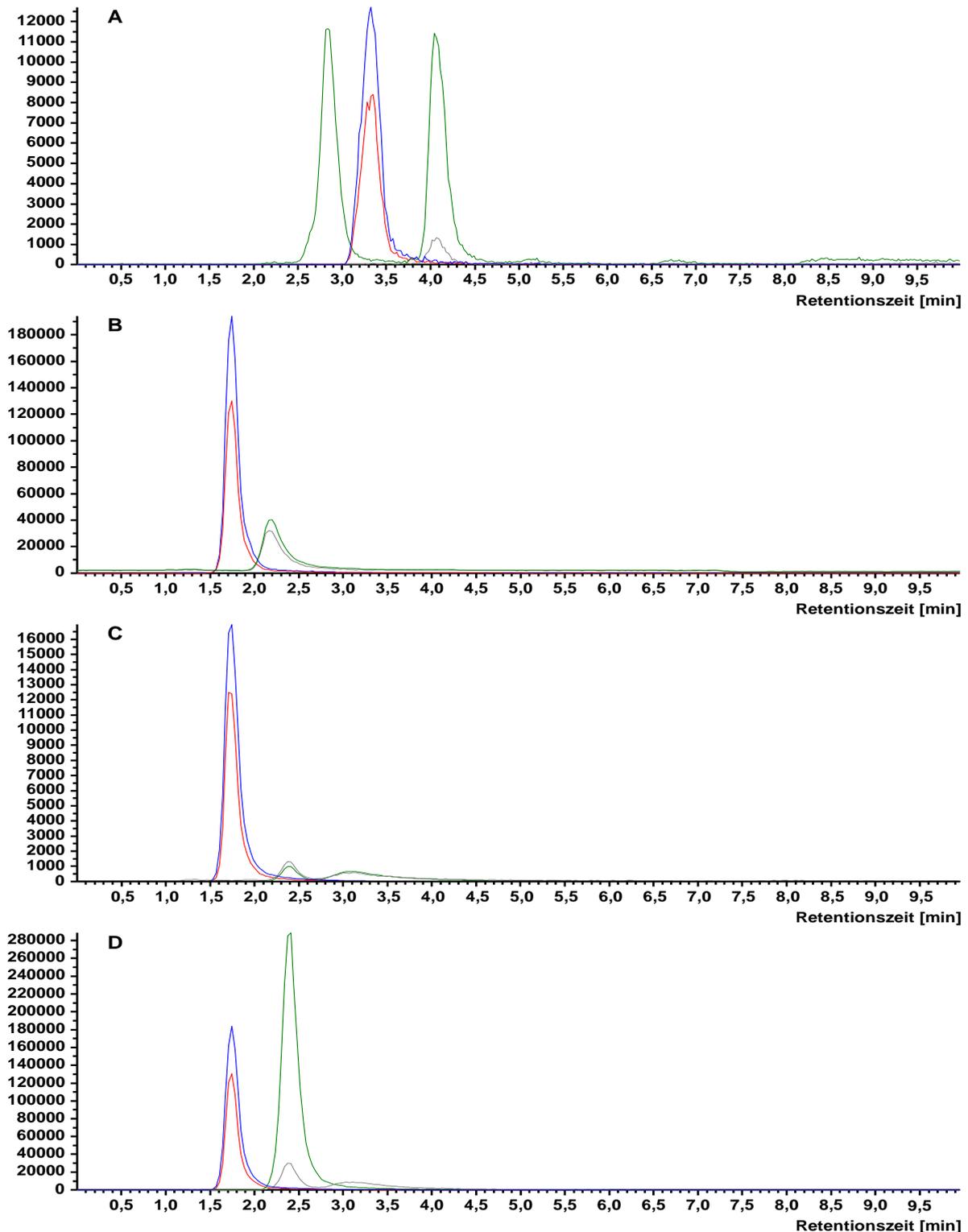


Abbildung 26: Chromatogramme der GHB-Metaboliten inklusive internem Standard GHB-D₆. Die Massenspuren für die Metaboliten sind in grün und grau und die für GHB-D₆ in blau und rot dargestellt. (A) Für GHB-Sulf (10 ng/mg) lag die Retentionszeiten bei 4,1 und für GHB-D₆ bei 3,35 min. (B) Für Glycolsäure (5,0 ng/mg) lag die Retentionszeit bei 2,2 min und die für GHB-D₆ bei 1,75 min. (C) Für 2,4-DHB (0,30 ng/mg) lag die Retentionszeit bei 3,1 min und die für GHB-D₆ bei 1,75 min. (D) Für 3,4-DHB (2,5 ng/mg) lag die Retentionszeit bei 2,4 min und die für GHB-D₆ bei 1,75 min.

4.2.2 Methodenvalidierung

GHB-4-Sulfat

Die Kalibrationskurve für GHB-Sulf wurde mit den Kalibrationsstandards 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 und 50 ng/mg mit jeweils 10 mg Leermatrix erstellt. Die Kurve wurde an verschiedenen Tagen sechsmal erstellt. Für beide Massenübergänge wurde dabei eine quadratische Abhängigkeit zwischen 0,50 und 50 ng/mg festgestellt, mit einem Gewichtungsfaktor von $1/x$. Die Regressionsanalyse ergab einen R Wert von 0,999 für den ersten und 0,999 für den zweiten Übergang in diesem Bereich. Das relative Ionenverhältnis von *Qualifier* zu *Target* wurde für alle verwendeten Kalibrationsstandards berechnet. Dabei waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen nicht größer als die Schwankungen innerhalb der sechs Messungen zu einer Konzentration. Für GHB-Sulf wurde daher ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $13 \pm 2,0 \%$ und für GHB-D₆ ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $66 \pm 1,3 \%$ von *Qualifier* zu *Target* über alle Konzentrationen angenommen. Die Realproben wurden entsprechend der Richtlinien bei einem Verhältnis $> 10\text{--}20 \%$ auf das akzeptable relative Toleranzintervall von 30% überprüft. Die Bestimmungsgrenze wurde bei 0,50 ng/mg, die Nachweisgrenze bei 0,40 ng/mg ermittelt. Bei Ermittlung der Stabilität in der aufgearbeiteten Probe über fünf Stunden betrug die Abweichung der gemessenen Proben mit niedriger Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 20% und die der Proben mit hoher Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 24% und somit in beiden Fällen weniger als die zulässigen 25% . Zusätzlich wurde die Langzeitstabilität überprüft. Die eingefrorenen und nach einem Monat wieder aufgetauten niedrigen Stabilitätsproben lagen für 0,5 ng/mg bei 92% des Mittelwerts der nicht eingefrorenen niedrigen Kontrollproben mit einem 90% Konfidenzintervall von 91% bis 93% . Die hohen Stabilitätsproben lagen für 25 ng/mg bei 127% mit einem 90% Konfidenzintervall von 124% bis 130% . In Abbildung 27 ist die Kalibrationskurve des *Target*-Massenübergangs und des *Qualifier*-Massenübergangs zu sehen.

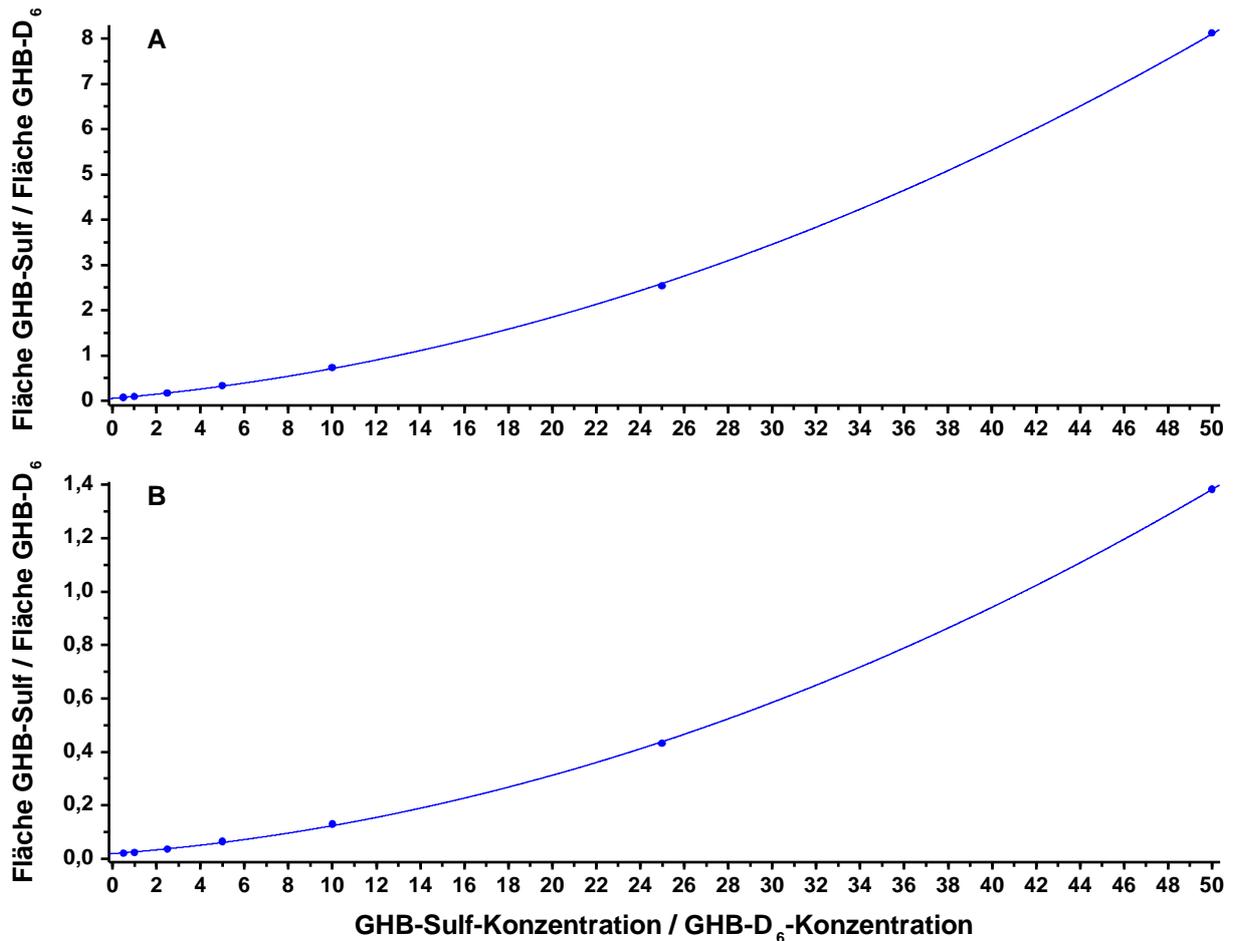


Abbildung 27: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, *Target*, 182,8 zu 96,9, R = 0,999) und den zweiten Übergang von GHB-Sulf (B, *Qualifier*, 182,8 zu 79,8, R = 0,999). Kalibrationspunkte waren 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 und 50 ng/mg.

Glycolsäure

Die Kalibrationskurve für Glycolsäure wurde mit den Kalibrationsstandards 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 und 50 ng/mg erstellt. Die Kurve wurde an verschiedenen Tagen sechsmal erstellt. Für die ersten beiden Massenübergänge wurde die Linearität zwischen 1,0 und 50 ng/mg gezeigt. Eine lineare Regressionsanalyse ergab einen R Wert von 0,998 für den ersten und 0,998 für den zweiten Übergang in diesem Bereich. Das relative Ionenverhältnis von *Qualifier* zu *Target* wurde für alle verwendeten Kalibrationsstandards berechnet. Dabei waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen nicht größer als die Schwankungen innerhalb der sechs Messungen zu einer Konzentration. Für Glycolsäure wurde daher ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $62 \pm 4,0 \%$ und für GHB-D₆ ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $66 \pm 0,9 \%$ von *Qualifier* zu *Target* über alle Konzentrationen angenommen. Die Realproben wurden entsprechend der Richtlinien bei einem Verhältnis > 50 % auf das akzeptable relative Toleranzintervall von 20 % überprüft. Die Bestimmungsgrenze wurde bei

1,0 ng/mg ermittelt, die Nachweisgrenze bei 0,30 ng/mg. Bei Ermittlung der Stabilität in der aufgearbeiteten Probe über fünf Stunden betrug die Abweichung der gemessenen Proben mit niedriger Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 13 % und die der Proben mit hoher Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 12 % und somit in beiden Fällen weniger als die zulässigen 25 %. Die eingefrorenen und nach einem Monat wieder aufgetauten niedrigen Stabilitätsproben lagen für 10 ng/mg bei 99 % des Mittelwerts der nicht eingefrorenen niedrigen Kontrollproben mit einem 90 % Konfidenzintervall von 98 % bis 100 %. Die hohen Stabilitätsproben lagen für 25 ng/mg bei 115 % mit einem 90 % Konfidenzintervall von 111 % bis 119 %. In Abbildung 28 ist die Kalibrationskurve des *Target*-Massenübergangs und des *Qualifier*-Massenübergangs zu sehen.

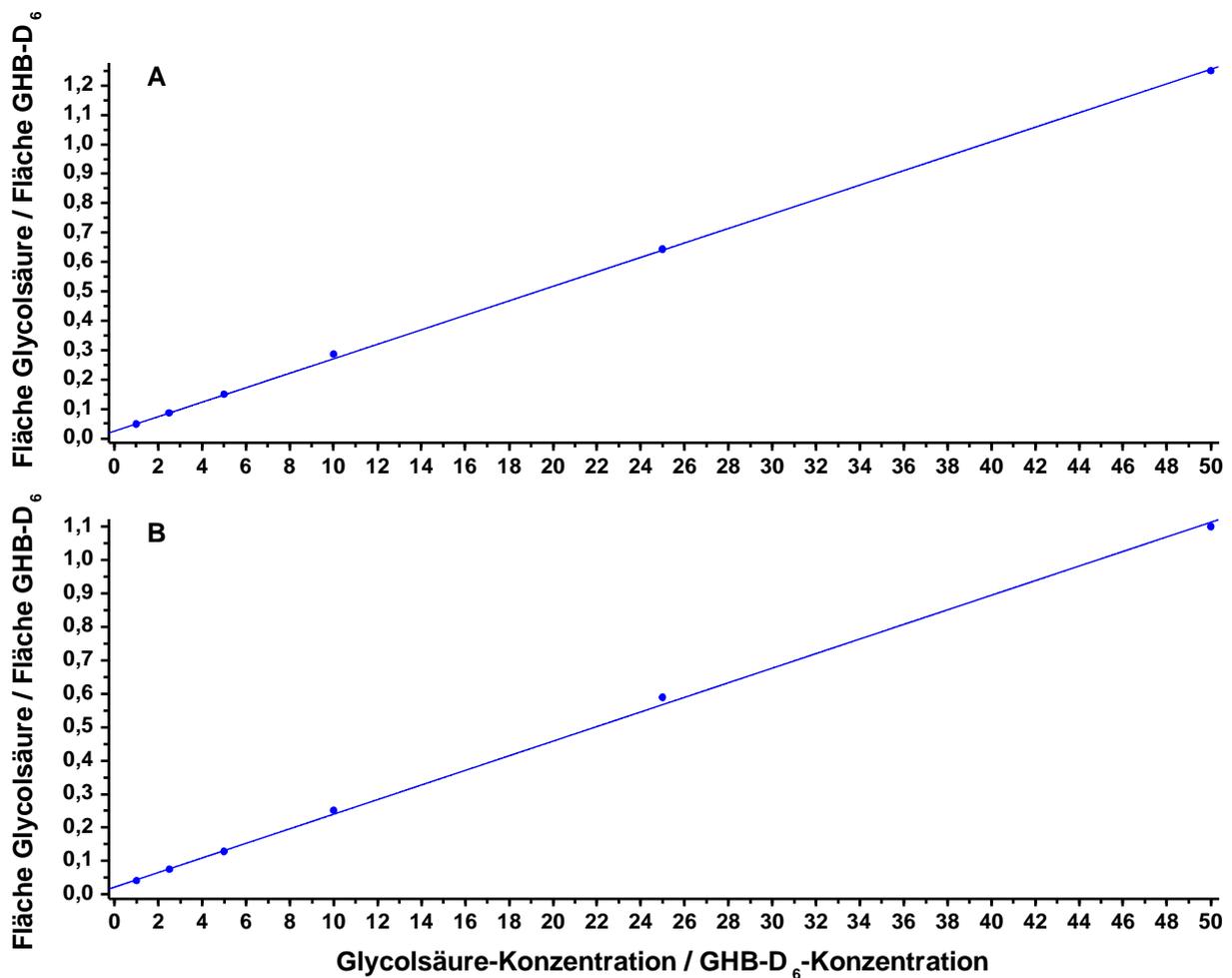


Abbildung 28: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, *Target*, 74,8 zu 46,8, R = 0,998) und den zweiten Übergang von Glycolsäure (B, *Qualifier* 1, 74,8 zu 44,9, R = 0,998). Kalibrationspunkte waren 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 und 50 ng/mg.

2,4-Dihydroxybuttersäure

Die Kalibrationskurve für 2,4-DHB wurde mit den Kalibrationsstandards 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,75; 1,0; und 2,5 ng/mg erstellt. Die Kurve wurde an verschiedenen Tagen sechsmal erstellt. Für beide Massenübergänge wurde die Linearität zwischen 0,20 und 2,5 ng/mg gezeigt. Eine lineare Regressionsanalyse ergab einen R Wert von 0,997 für den ersten und 0,995 für den zweiten Übergang in diesem Bereich. Das relative Ionenverhältnis von *Qualifier* zu *Target* wurde für alle verwendeten Kalibrationsstandards berechnet. Dabei waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen nicht größer als die Schwankungen innerhalb der sechs Messungen zu einer Konzentration. Für 2,4-DHB wurde daher ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $66 \pm 10 \%$ und für GHB-D₆ ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $66 \pm 1,0 \%$ von *Qualifier* zu *Target* über alle Konzentrationen angenommen. Die Realproben wurden entsprechend der Richtlinien bei einem Verhältnis $> 50 \%$ auf das akzeptable relative Toleranzintervall von 20% überprüft. Die Bestimmungsgrenze wurde bei 0,20 ng/mg ermittelt, die Nachweisgrenze lag ebenfalls bei 0,20 ng/mg. Bei Ermittlung der Stabilität in der aufgearbeiteten Probe über fünf Stunden betrug die Abweichung der gemessenen Proben mit niedriger Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 16% und die der Proben mit hoher Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 19% und somit in beiden Fällen weniger als die zulässigen 25% . Bezüglich der Selektivität kam es zu keinen Interferenzen mit dem Isomer 3,4-DHB, da trotz teilweise gleicher Massenfragmente eine Unterscheidung mittels chromatographischer Trennung der beiden Substanzen möglich war. Die eingefrorenen und nach einem Monat wieder aufgetauten niedrigen Stabilitätsproben lagen für 0,20 ng/mg bei 100% des Mittelwerts der nicht eingefrorenen niedrigen Kontrollproben mit einem 90% Konfidenzintervall von 88% bis 112% . Die hohen Stabilitätsproben lagen für 1,0 ng/mg bei 126% mit einem 90% Konfidenzintervall von 122% bis 130% . In Abbildung 29 ist die Kalibrationskurve des *Target*-Massenübergangs und des *Qualifier*-Massenübergangs zu sehen.

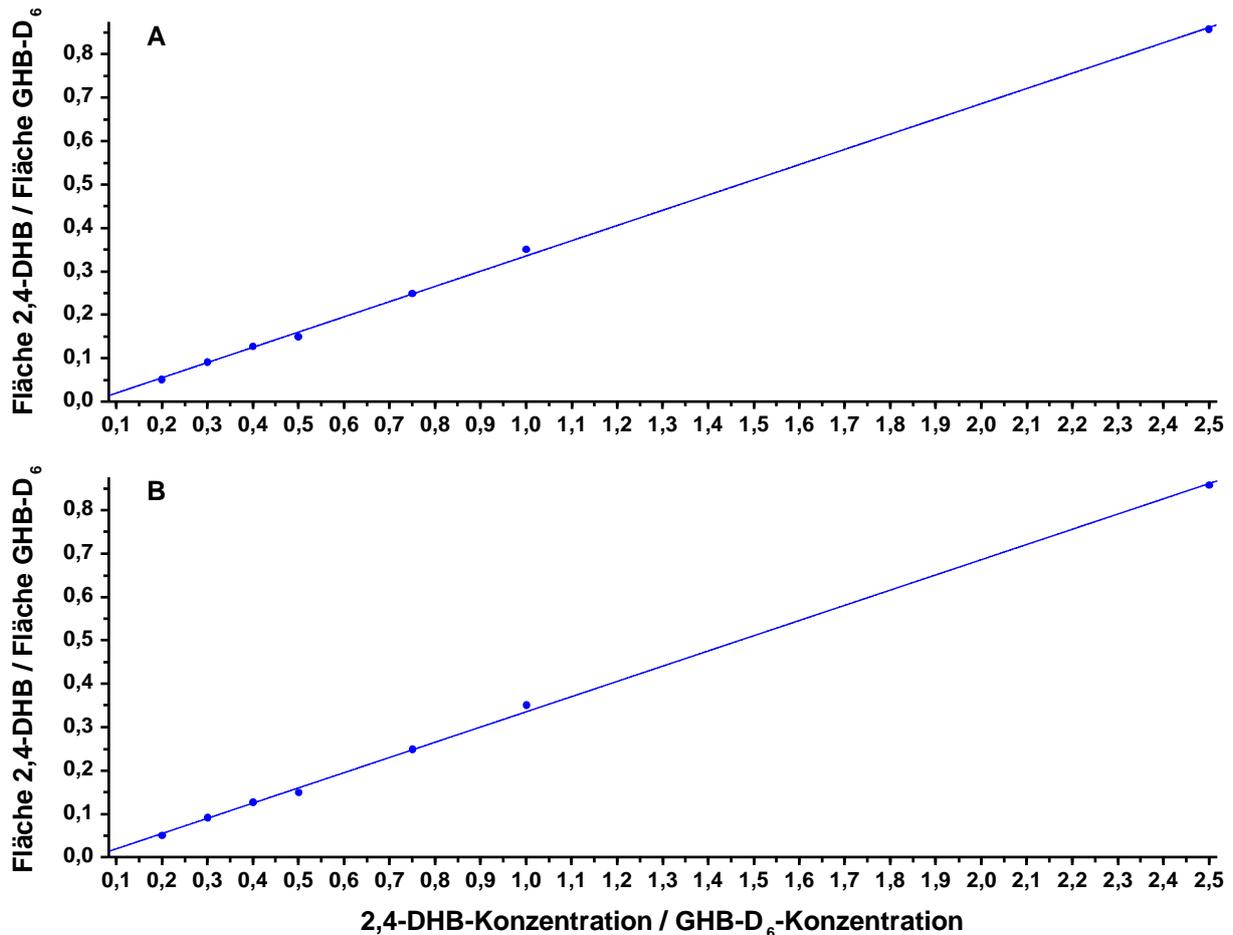


Abbildung 29: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, *Target*, 119 zu 101, $R = 0,997$) und den zweiten Übergang von 2,4-DHB (B, *Qualifier*, 119 zu 72,9, $R = 0,995$). Kalibrationspunkte waren 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,75; 1,0 und 2,5 ng/mg.

3,4-Dihydroxybuttersäure

Die Kalibrationskurve für 3,4-DHB wurde mit den Kalibrationsstandards 0,50; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0 und 10 ng/mg erstellt. Die Kurve wurde an verschiedenen Tagen sechsmal erstellt. Für beide Massenübergänge wurde die Linearität zwischen 0,50 und 10 ng/mg gezeigt. Eine lineare Regressionsanalyse ergab einen R Wert von 0,998 für den ersten und 0,999 für den zweiten Übergang in diesem Bereich. Das relative Ionenverhältnis von *Qualifier* zu *Target* wurde für alle verwendeten Kalibrationsstandards berechnet. Dabei waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen nicht größer als die Schwankungen innerhalb der sechs Messungen zu einer Konzentration. Für 3,4-DHB wurde daher ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $9,6 \pm 0,7 \%$ und für GHB-D₆ ein mittleres relatives Ionenverhältnis von $66 \pm 0,9 \%$ von *Qualifier* zu *Target* über alle Konzentrationen angenommen. Die Realproben wurden entsprechend der Richtlinien bei einem Verhältnis $< 10 \%$ auf das akzeptable relative Toleranzintervall von 50 % überprüft. Die Bestimmungsgrenze wurde bei 0,40 ng/mg ermittelt, die Nachweisgrenze bei 0,10 ng/mg. Bei Ermittlung der Stabilität in der aufgearbeiteten Probe

über fünf Stunden betrug die Abweichung der gemessenen Proben mit niedriger Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 5 % und die der Proben mit hoher Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich 10 % und somit in beiden Fällen weniger als die zulässigen 25 %. Bezüglich der Selektivität kam es zu keinen Interferenzen mit dem Isomer 2,4-DHB, da trotz teilweise gleicher Massenfragmente eine Unterscheidung mittels chromatographischer Trennung der beiden Substanzen möglich war. Die eingefrorenen und nach einem Monat wieder aufgetauten niedrigen Stabilitätsproben lagen für 0,5 ng/mg bei 107 % des Mittelwerts der nicht eingefrorenen niedrigen Kontrollproben mit einem 90 % Konfidenzintervall von 103 % bis 111 %. Die hohen Stabilitätsproben lagen für 5,0 ng/mg bei 139 % mit einem 90 % Konfidenzintervall von 136 % bis 142 %. In Abbildung 30 ist die Kalibrationskurve des *Target*-Massenübergangs und des *Qualifier*-Massenübergangs zu sehen.

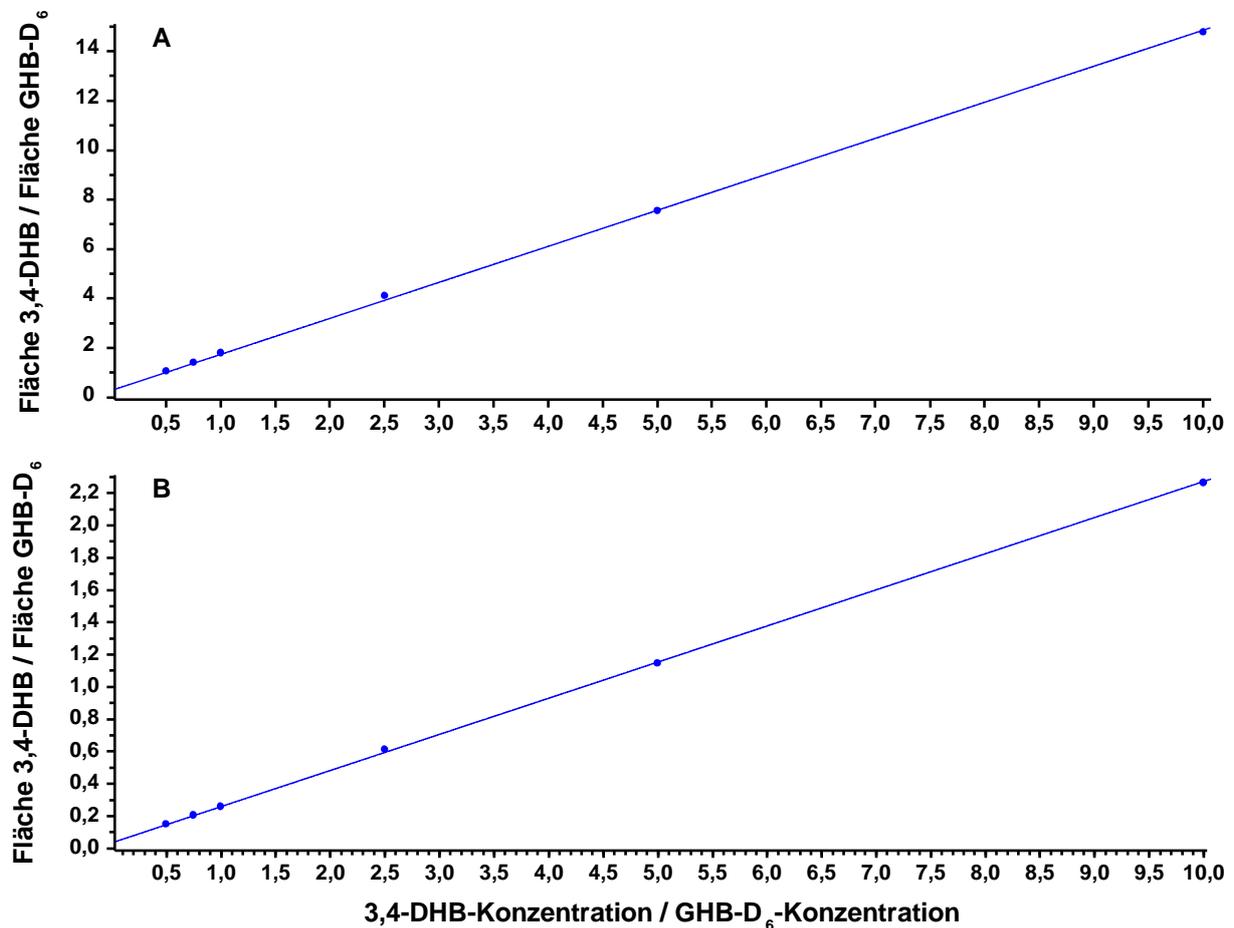


Abbildung 30: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, *Target*, 119 zu 59, $R = 0,998$) und den zweiten Übergang von 3,4-DHB (B, *Qualifier*, 119 zu 100,9; $R = 0,999$). Kalibrationspunkte waren 0,50; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0; und 10 ng/mg.

4.2.3 Messungen zu endogenen GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren

Die Ergebnisse der 65 auf die endogenen Konzentrationen der Metaboliten Glycolsäure, 2,4-DHB, 3,4-DHB und GHB-Sulf untersuchten Haarproben sind in Tabelle 21 zusammengefasst und in den Abbildung 31–34 graphisch dargestellt. Konzentrationen, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden als unterhalb der Nachweisgrenze angegeben. Lag der Wert zwischen der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze, wurde er mit unterhalb der Bestimmungsgrenze angegeben. Da für die Messung in den meisten Fällen deutlich mehr als 10 mg Haare zu Verfügung standen und der ermittelte Wert anschließend auf die für die Kalibration verwendeten 10 mg normiert wurde, sind in der Tabelle 19 in solchen Fällen auch Werte unterhalb der jeweiligen Nachweis- oder Bestimmungsgrenze angegeben.

Tabelle 21: Endogene Konzentrationen der GHB-Metaboliten Glycolsäure, 2,4-DHB, 3,4-DHB und GHB-Sulf von 65 Haarproben von Personen ohne bekannte Aufnahme von GHB (n.b. = nicht bestimmt). Bei in **fett** gedruckten G-Nummern stammte die entnommene Haarprobe von Haaren die länger als 10 cm waren.

Nummer	Endogene Glycolsäure-Konzentration [ng/mg]	Endogene 2,4-DHB-Konzentration [ng/mg]	Endogene 3,4-DHB-Konzentration [ng/mg]	Endogene GHB-Sulf-Konzentration [ng/mg]
G01	1,6	< 0,20	< 0,10	< 0,40
G02	< 1,0	< 0,20	< 0,40	< 0,40
G03	5,5	< 0,20	0,40	< 0,40
G04	11	0,20	0,90	< 0,40
G05	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
G06	15	0,60	4,7	< 0,40
G07	4,7	< 0,20	< 0,40	0,70
G08	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
G09	9,3	0,20	1,1	< 0,40
G10	8,9	< 0,20	0,60	< 0,40
G11	1,3	< 0,20	< 0,10	< 0,50
G12	< 1,0	< 0,20	< 0,10	< 0,40
G13	3,2	< 0,20	< 0,40	3,7
G14	< 1,0	< 0,20	< 0,10	0,94
G15	0,79	0,33	0,84	0,61
G16	0,65	< 0,20	< 0,40	0,16
G17	0,60	< 0,20	< 0,10	< 0,40
G18	7,8	< 0,20	< 0,40	12
G19	2,3	< 0,20	< 0,40	0,38
G20	0,72	< 0,20	< 0,40	3,2
G21	5,1	0,26	0,31	< 0,40
G22	5,3	0,18	0,28	0,27

Nummer	Endogene Glycolsäure- Konzentration [ng/mg]	Endogene 2,4-DHB- Konzentration [ng/mg]	Endogene 3,4-DHB- Konzentration [ng/mg]	Endogene GHB- Sulf-Konzentration [ng/mg]
G23	13	< 0,20	< 0,40	2,5
G24	2,7	< 0,20	0,19	< 0,40
G25	0,73	< 0,20	< 0,40	0,46
G26	3,9	0,45	0,29	0,97
G27	1,1	< 0,20	< 0,40	1,1
G28	0,52	< 0,20	< 0,10	1,4
G29	< 1,0	< 0,20	< 0,10	0,72
G30	2,2	< 0,20	0,21	0,36
G31	4,5	0,19	0,30	0,86
G32	< 1,0	< 0,20	< 0,10	0,90
G33	2,9	< 0,20	0,16	0,20
G34	0,77	< 0,20	0,14	0,36
G35	0,39	< 0,20	< 0,40	0,14
G36	4,7	0,26	0,29	0,37
G37	2,2	< 0,20	< 0,40	0,18
G38	1,5	< 0,20	0,23	0,72
G39	20	0,65	2,3	1,1
G40	2,6	0,07	0,13	0,62
G41	0,65	< 0,20	< 0,40	0,78
G42	5,6	0,06	0,28	0,38
G43	2,8	< 0,20	0,12	0,29
G44	1,5	< 0,20	< 0,40	< 0,40
G45	6,3	0,18	0,63	1,1
G46	5,7	0,16	0,41	0,22
G47	3,4	< 0,20	0,15	0,74
G48	4,0	< 0,20	0,17	0,52
G49	6,4	< 0,20	< 0,40	3,7
G50	5,9	0,19	0,40	0,48
G51	2,6	< 0,20	< 0,40	0,17
G52	3,0	< 0,20	< 0,40	0,32
G53	24	0,06	0,52	0,57
G54	2,4	< 0,20	< 0,40	0,48
G55	2,2	< 0,20	0,19	0,38
G56	6,2	0,10	0,29	1,7
G57	1,6	< 0,20	0,19	1,6
G58	4,7	0,11	0,25	0,98
G59	6,1	0,16	0,22	< 0,50
G60	4,2	0,09	0,21	0,20
G61	2,0	0,07	0,37	0,31
G62	3,9	0,06	0,32	0,48

Nummer	Endogene Glycolsäure-Konzentration [ng/mg]	Endogene 2,4-DHB-Konzentration [ng/mg]	Endogene 3,4-DHB-Konzentration [ng/mg]	Endogene GHB-Sulf-Konzentration [ng/mg]
G63	6,9	0,09	0,38	0,32
G64	7,3	0,05	0,43	0,44
G65	9,7	0,43	2,3	1,1
G66	2,3	0,06	0,13	0,60
G67	2,1	< 0,20	< 0,40	1,6
Mittelwert ± SD	4,7 ± 4,5	0,20 ± 0,16	0,56 ± 0,84	1,1 ± 1,7

Für den Metaboliten 2,4-DHB lagen nur 26 der 65 Messwerte oberhalb der Nachweis- beziehungsweise der Bestimmungsgrenze von 0,20 ng/mg. Der Mittelwert der Proben, deren Konzentrationen oberhalb der Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen, lag bei $0,20 \pm 0,16$ ng/mg. Der Konzentrationsbereich aller gemessenen Proben inklusive der beiden Ausreißer betrug dabei 0,05 bis 0,65 ng/mg. Der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Berücksichtigung der Ausreißer lag für 2,4-DHB zwischen 0,05 und 0,45 ng/mg. Die Verteilung der gemessenen Konzentrationen ist in Abbildung 31 dargestellt.

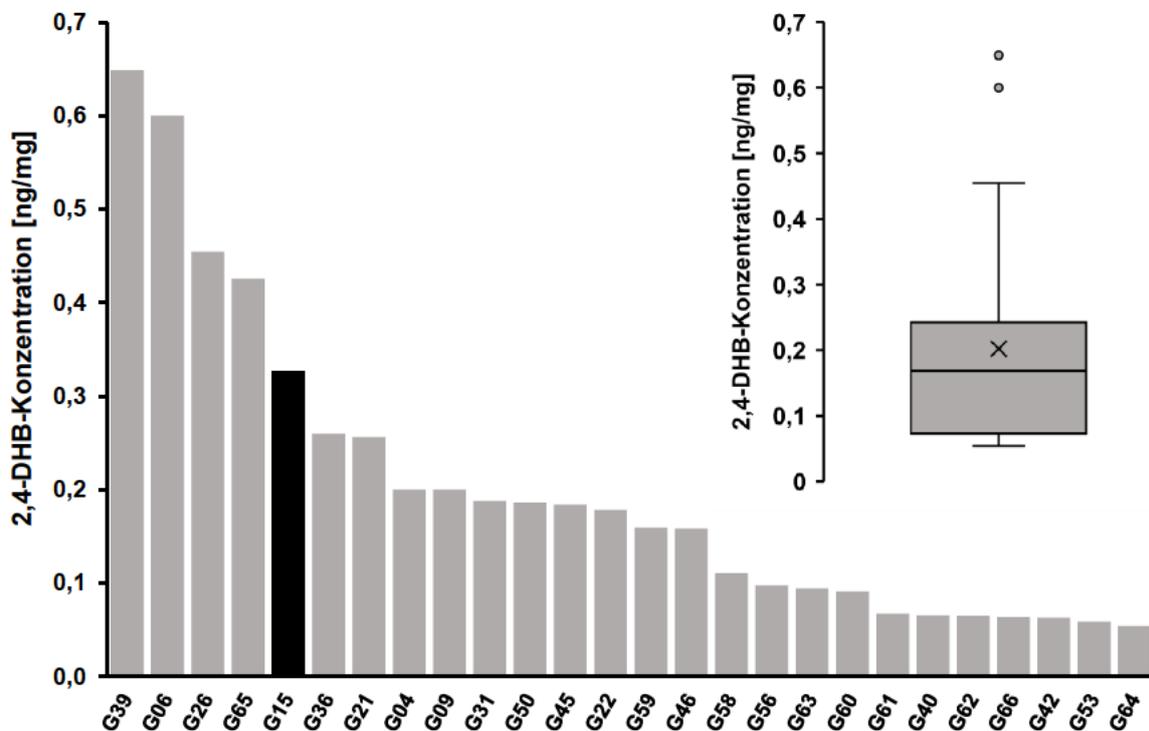


Abbildung 31: Endogene Konzentration von 2,4-DHB von 26 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration. In schwarz ist die Probe dargestellt, die von Haaren länger als 10 cm stammte. Zusätzliche Auftragung der Messwerte mit Mittelwert, Median, Quartilen und Ausreißern.

Für den Metaboliten 3,4-DHB lagen 57 Messwerte oberhalb der Nachweisgrenze von 0,10 ng/mg. Der Mittelwert der 38 Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,40 ng/mg lag bei $0,56 \pm 0,84$ ng/mg. Der Konzentrationsbereich aller gemessenen Proben inklusive der Ausreißer lag zwischen 0,12 und 4,7 ng/mg. Der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Berücksichtigung der Ausreißer lag für 3,4-DHB zwischen 0,12 und 0,56 ng/mg. Die Verteilung der gemessenen Konzentrationen ist in Abbildung 32 dargestellt.

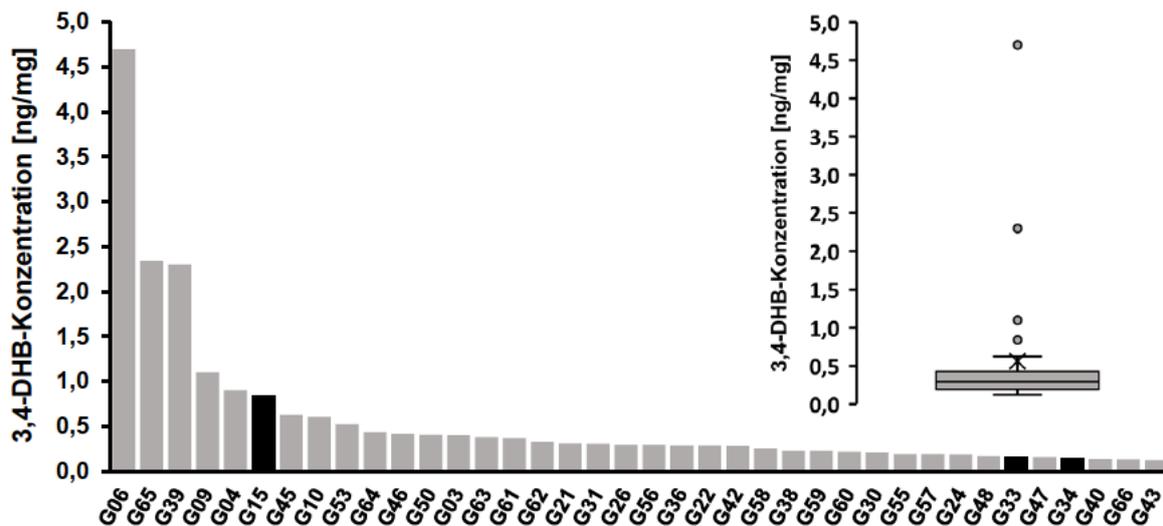


Abbildung 32: Endogene Konzentration von 3,4-DHB von 38 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration. In schwarz sind die Proben dargestellt, die von Haaren länger als 10 cm stammen. Zusätzliche Auftragung der Messwerte mit Mittelwert, Median, Quartilen und Ausreißern.

Für GHB-Sulf konnte in 52 Fällen eine Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze von 0,40 ng/mg ermittelt werden. In einem Fall lag der Messwert oberhalb der Nachweisgrenze aber unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,50 ng/mg. Der Mittelwert der übrigen 51 Haarproben lag bei $1,1 \pm 1,7$ ng/mg und damit etwa in dem Bereich der auch für endogene GHB üblichen Konzentrationen. Der Konzentrationsbereich aller gemessenen Proben inklusive der Ausreißer lag zwischen 0,14 und 12 ng/mg. Der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Berücksichtigung der Ausreißer lag für GHB-Sulf zwischen 0,12 und 1,7 ng/mg. Die Verteilung der gemessenen Konzentrationen ist in Abbildung 33 dargestellt.

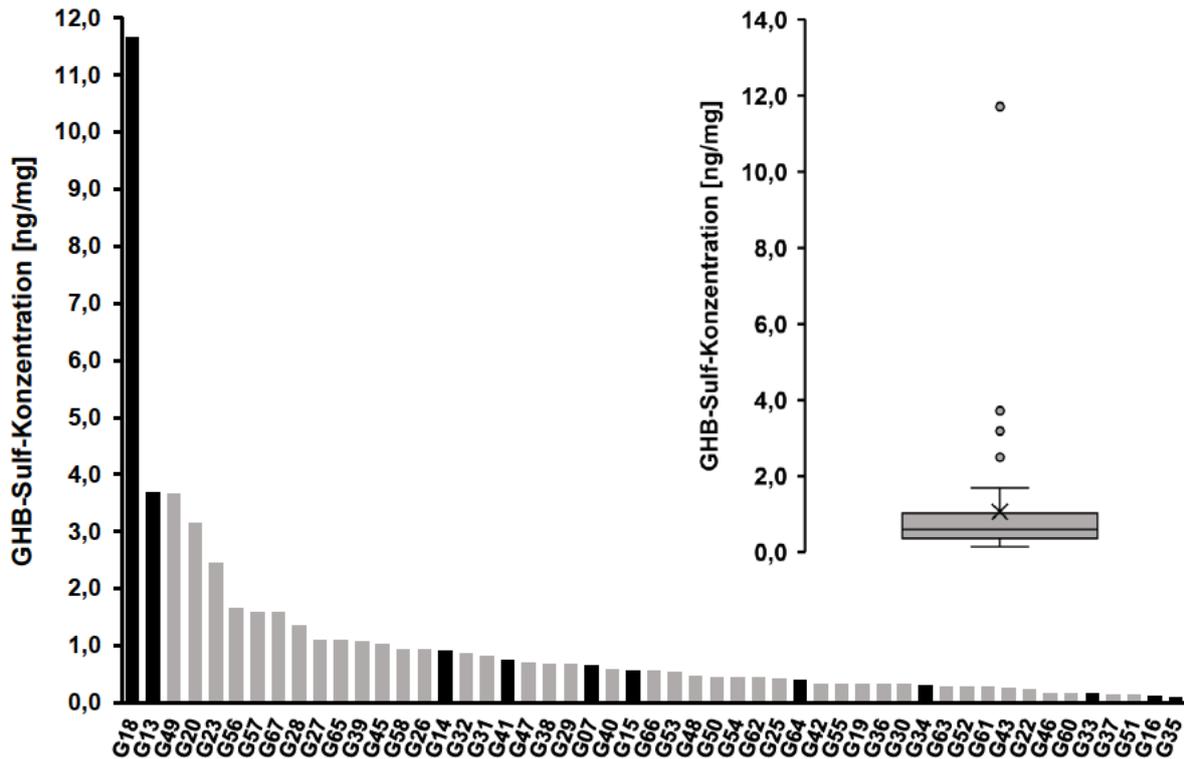


Abbildung 33: Endogene Konzentration von GHB-Sulf von 51 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration. In schwarz sind die Proben dargestellt, die von Haaren länger als 10 cm stammten. Zusätzliche Auftragung der Messwerte mit Mittelwert, Median, Quartilen und Ausreißern.

Die höchsten Messwerte konnten für Glycolsäure ermittelt werden, bei der lediglich fünf Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze von 1,0 ng/mg lagen. Der Mittelwert für die 60 Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze lag bei $4,7 \pm 4,5$ ng/mg und damit deutlich oberhalb des Konzentrationsbereichs für endogene GHB. Der Konzentrationsbereich aller gemessenen Proben inklusive der Ausreißer lag zwischen 0,39 und 24 ng/mg. Der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Berücksichtigung der Ausreißer lag für Glycolsäure zwischen 0,39 und 11 ng/mg. Die Verteilung der gemessenen Konzentrationen ist in Abbildung 34 dargestellt.

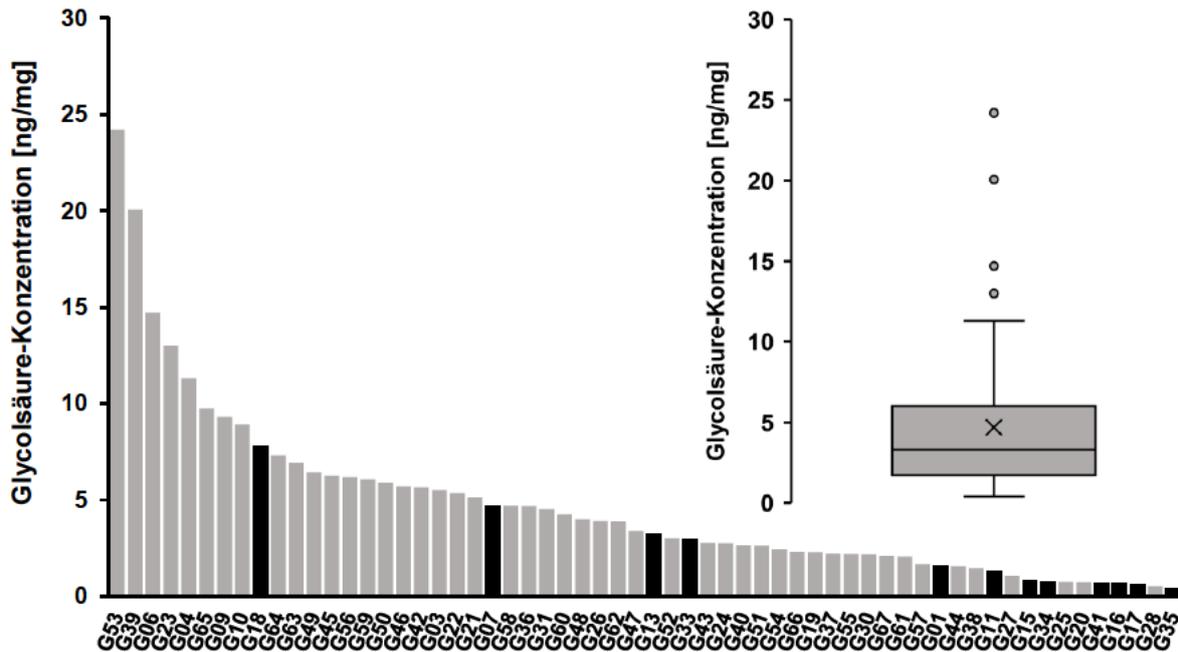


Abbildung 34: Endogene Konzentration von Glycolsäure von 60 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration. In schwarz sind die Proben dargestellt, die von Haaren länger als 10 cm stammten. Zusätzliche Auftragung der Messwerte mit Mittelwert, Median, Quartilen und Ausreißern.

Die Haarproben von langen Haaren (länger als 10 cm) enthielten im Durchschnitt niedrigere Konzentrationen der Metaboliten als die Haarproben von kurzen Haaren. Bei allen Metaboliten gab es jedoch lange Haarproben sowohl mit hohen als auch niedrigen Konzentrationen relativ zum Messbereich aller Proben. Alle Messwerte lagen innerhalb des für den jeweiligen Metaboliten gewählten Kalibrationsbereichs.

4.2.4 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB

Im Anhang in Tabelle A7 sind die gemessenen Konzentrationen für jedes einzelne Segment dargestellt. Hier lagen jeweils über 90 % der ermittelten Konzentrationen innerhalb des gewählten Kalibrationsbereichs (2,4-DHB: ~ 98 %, 3,4-DHB: 100 %, Glycolsäure: ~ 91 %, GHB-Sulf: ~ 93 %). Die Werte oberhalb der Kalibrationskurve wurden mittels Extrapolation ermittelt. Lediglich einer der Messwerte für Glycolsäure lag weit außerhalb des Kalibrationsbereichs und wurde für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. In Tabelle 22 werden die Ergebnisse der elf segmentweise untersuchten Haarproben nach regelmäßiger Aufnahme von GHB gezeigt und mit den jeweiligen Referenzbereichen verglichen.

Tabelle 22: Durchschnittliche GHB- und GHB-Metaboliten-Konzentrationen der Haarproben von Personen nach regelmäßiger Aufnahme von GHB. Konzentrationen, die oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzbereichs ohne Ausreißer lagen, wurden mit einem Pfeil (↑) markiert. Proben, die oberhalb des Referenzbereichs inklusive der Ausreißer lagen, wurden mit zwei Pfeilen (↑↑) markiert.

		GHB- Konz. [ng/mg]	Glycolsäure- Konz. [ng/mg]	GHB-Sulf- Konz. [ng/mg]	2,4-DHB- Konz. [ng/mg]	3,4-DHB- Konz. [ng/mg]
Referenzbereich	Minimum	< 0,10	0,39	< 0,40	< 0,20	< 0,10
	Maximum ohne Ausreißer	3,2	11	1,7	0,45	0,63
	Maximum mit Ausreißer	6,3	24	12	0,65	4,7
	Mittelwert	1,1	4,7	1,1	0,20	0,56
	Standardabweichung	1,2	4,5	1,7	0,16	0,84
P-Nummer (Anzahl an Segmenten)						
	P06 (n = 6)	2,5	40 (↑↑)	26 (↑↑)	0,36	1,4 (↑)
	P07 (n = 8)	1,1	40 (↑↑)	42 (↑↑)	0,54 (↑)	1,9 (↑)
	P08 (n = 1)	0,51	67 (↑↑)	15 (↑↑)	1,0 (↑↑)	2,1 (↑)
	P10 (n = 5)	0,17	28 (↑↑)	6,6 (↑)	0,33	2,8 (↑)
	P11 (n = 4)	0,30	44 (↑↑)	6,1 (↑)	0,95 (↑↑)	1,4 (↑)
	P12 (n = 5)	2,1	37 (↑↑)	19,9 (↑↑)	0,39	1,2 (↑)
	P14 (n = 6)	3,8 (↑)	15 (↑)	4,6 (↑)	0,48 (↑)	1,4 (↑)
	P15 (n = 5)	1,3	11 (↑)	1,5	0,43	1,8 (↑)
	P16 (n = 2)	1,3	5,3	0,90	0,05	1,0 (↑)
	P18 (n = 5)	1,7	13 (↑)	3,7 (↑)	0,15	0,42
	P19 (n = 4)	1,8	9,9	6,9 (↑)	0,08	0,28

In Tabelle 23 sind die Daten zu den GHB-Metaboliten nochmal zusammengefasst und neben den Mittelwerten und Konzentrationsbereichen für alle Personen und alle Segmente auch die Ergebnisse jeweils nach Geschlecht der Personen gruppiert gezeigt.

Tabelle 23: Durchschnittliche, minimale und maximale Konzentrationen der GHB-Metaboliten nach regelmäßiger GHB-Einnahme gruppiert nach Geschlecht.

	Alter (Anzahl)	Durchschnittliche GHB-Sulf- Konzentration \pm SD [ng/mg] (Minimum - Maximum)	Durchschnittliche Glycolsäure- Konzentration \pm SD [ng/mg] (Minimum - Maximum)	Durchschnittliche 2,4-DHB- Konzentration \pm SD [ng/mg] (Minimum - Maximum)	Durchschnittliche 3,4-DHB- Konzentration \pm SD [ng/mg] (Minimum - Maximum)
Männer	29-37 (n = 2)	5,3 \pm 0,74 (4,6 – 6,1)	30 \pm 15 (15 – 44)	0,71 \pm 0,25 (0,48 – 0,95)	1,4 \pm 0,0 (1,4 – 1,4)
Frauen	17-55 (n = 9)	14 \pm 13 (0,90 – 42)	28 \pm 19 (5,3 – 67)	0,37 \pm 0,28 (< 0,20 – 1,0)	1,5 \pm 0,77 (< 0,40 – 2,8)
Alle Personen	17-55 (n = 11)	12 \pm 12 (0,90 – 42)	28 \pm 18 (5,3 – 67)	0,43 \pm 0,30 (< 0,20 – 1,0)	1,4 \pm 0,70 (< 0,40 – 2,8)
Alle Segmente	n = 50	15 \pm 18 (< 0,50 – 75)	26 \pm 17 (3,4 – 68)	0,40 \pm 0,42 (< 0,20 – 2,6)	1,4 \pm 0,76 (< 0,40 – 3,3)

Abbildungen 35 bis 38 zeigen eine Übersicht der Ergebnisse aller untersuchten Haarproben und die erhaltenen Mittelwerte, Mediane, Quartile und Ausreißer der Konzentrationen an GHB-Metaboliten sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis. Zur besseren Einordnung ist zusätzlich der in dieser Arbeit ermittelte endogene Referenzbereich mit und ohne Ausreißer eingezeichnet.

Für Glycolsäure wurden, gemittelt über alle 50 Segmente, Konzentrationen von 26 \pm 17 ng/mg gemessen, wobei die niedrigste Konzentration bei 3,4 ng/mg und die höchste Konzentration bei 68 ng/mg lag. Für GHB-Sulf wurden Konzentrationen zwischen < 0,50 und 75 ng/mg gemessen mit einem Mittelwert von 15 \pm 18 ng/mg für alle Segmente. Bei 3,4-DHB lagen die gemessenen Konzentrationen zwischen < 0,40 und 3,3 ng/mg und der Mittelwert bei 1,4 \pm 0,76 ng/mg. Die niedrigsten Konzentrationen wurden für 2,4-DHB ermittelt. Dort lagen die Ergebnisse zwischen < 0,20 und 2,6 ng/mg mit einem Mittelwert von 0,40 \pm 0,42 ng/mg.

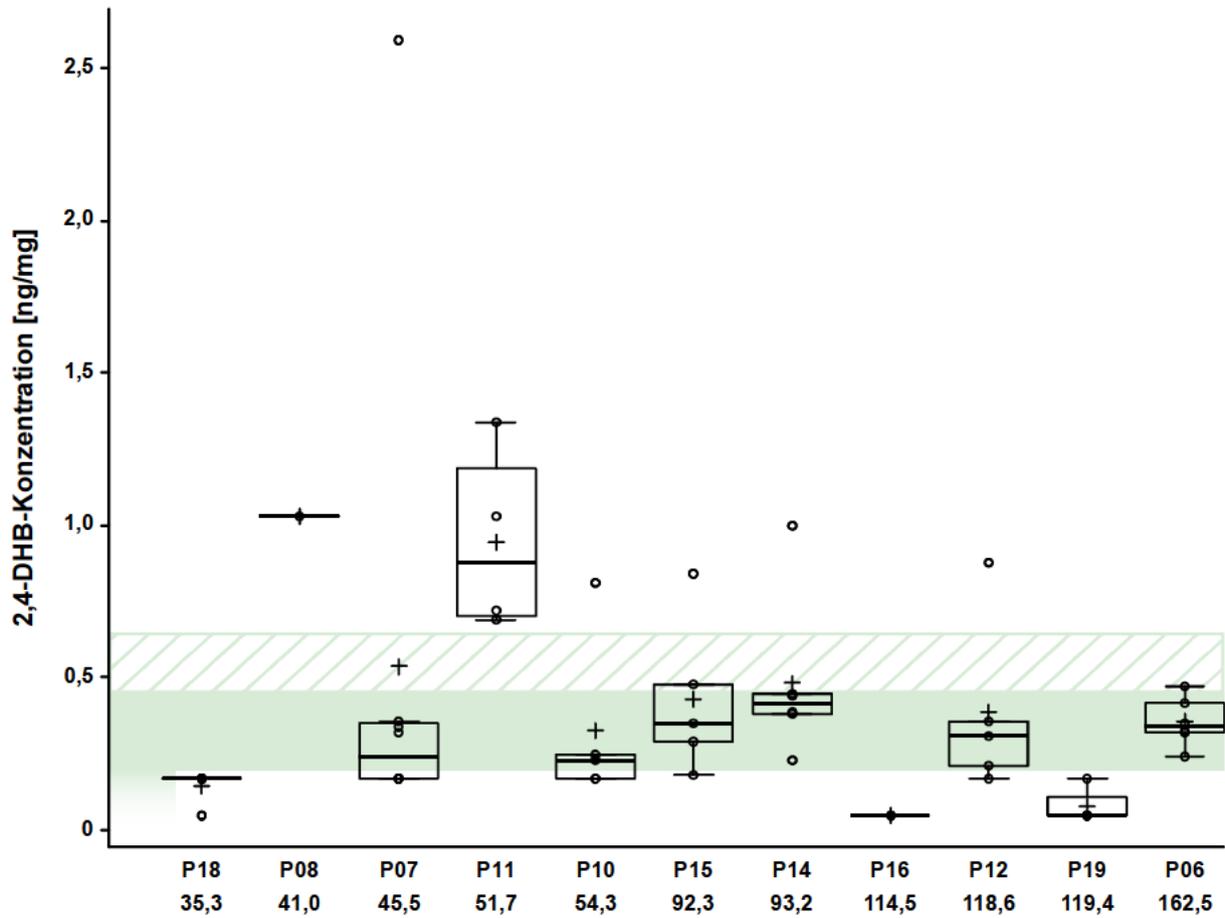


Abbildung 35: Gemessene 2,4-DHB-Konzentrationen, Mittelwert, Median, Quartile und Ausreißer der elf Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis in mg/kg Körpergewicht. In grün ist der endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive der Ausreißer dargestellt. Es wurden zwischen ein und acht Segmente untersucht.

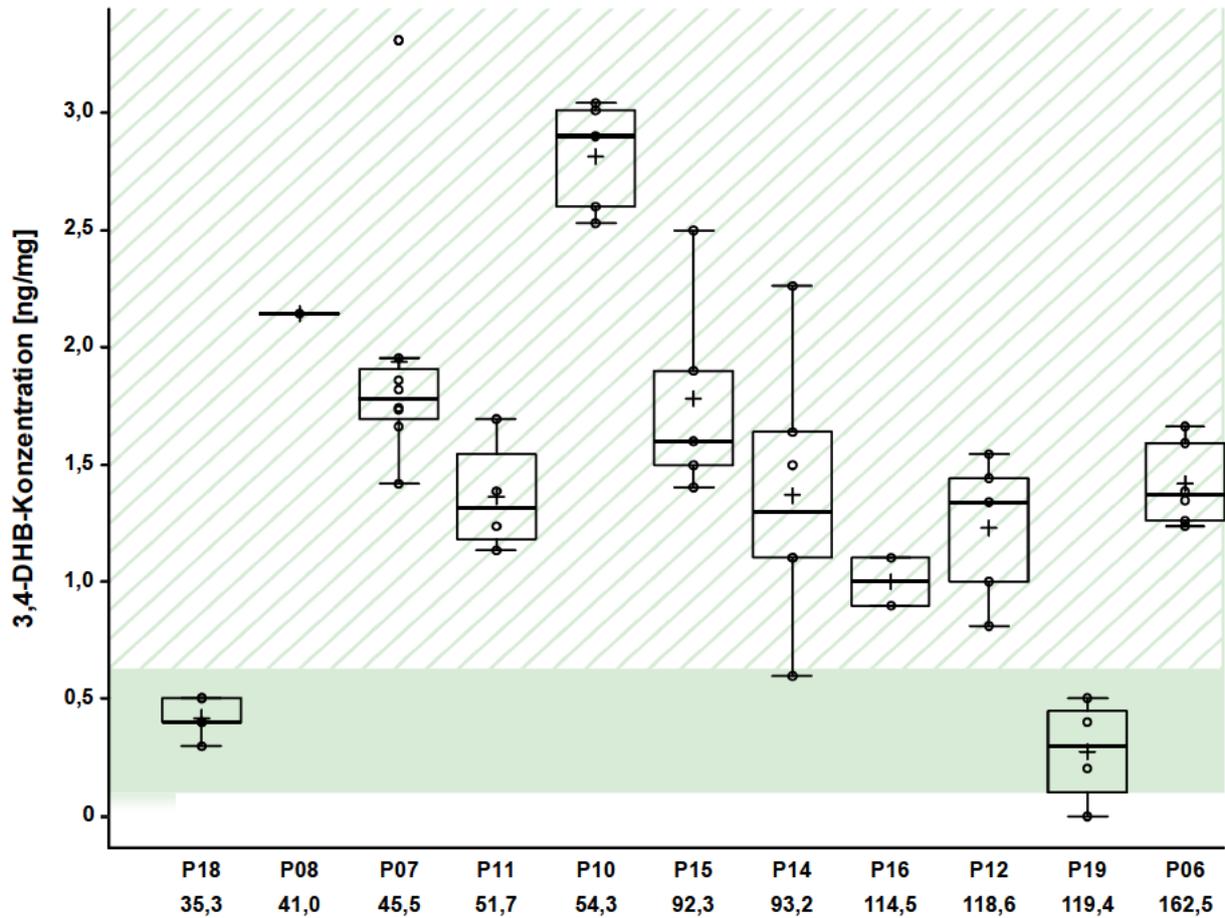


Abbildung 36: Gemessene 3,4-DHB-Konzentrationen, Mittelwert, Median, Quartile und Ausreißer der elf Haarproben von Personen mit Xyrem®-Medikation sortiert nach aufsteigender Xyrem®-Dosis in mg/kg Körpergewicht. In grün ist der endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive der Ausreißer dargestellt. Es wurden zwischen ein und acht Segmente untersucht.

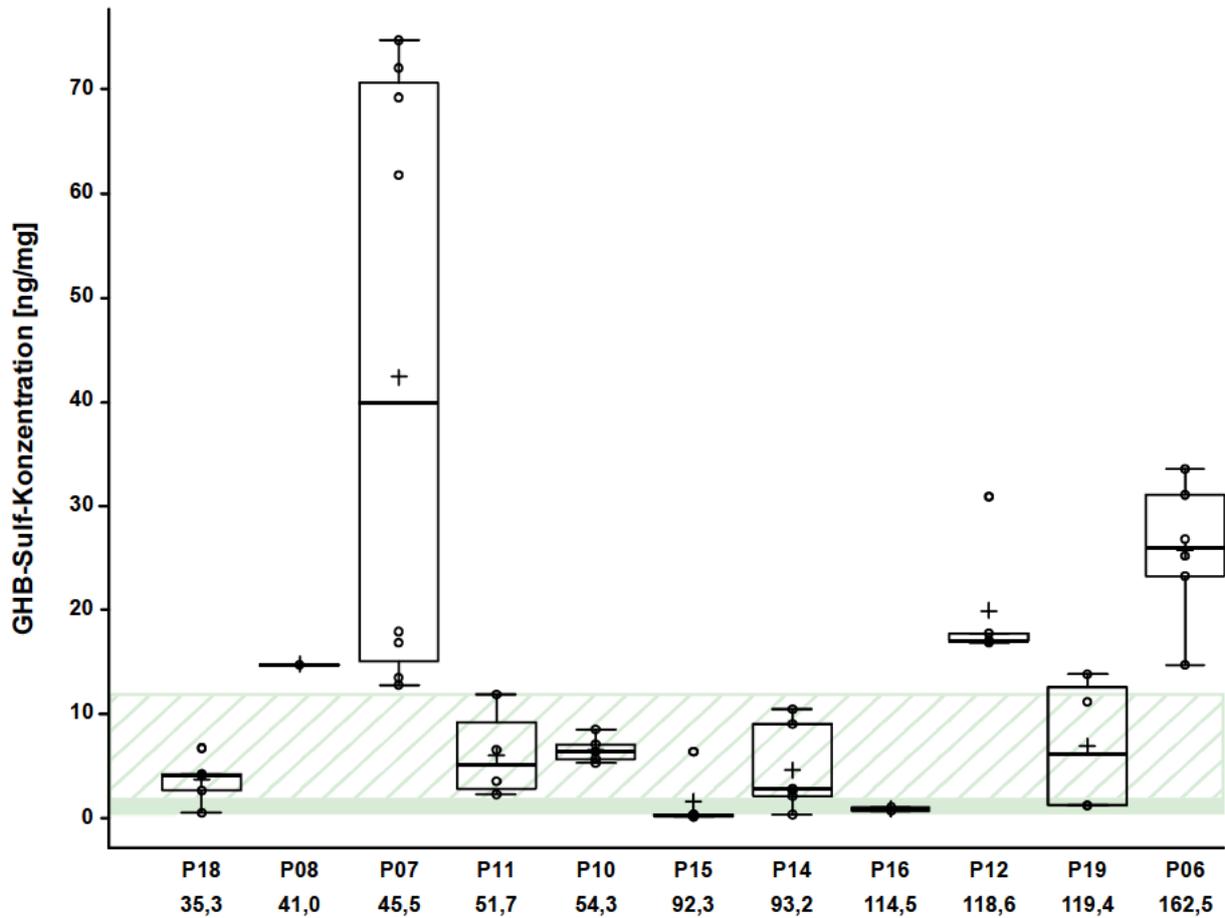


Abbildung 37: Gemessene GHB-Sulf-Konzentrationen, Mittelwert, Median, Quartile und Ausreißer der elf Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis in mg/kg Körpergewicht. In grün ist der endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive der Ausreißer dargestellt. Es wurden zwischen ein und acht Segmente untersucht.

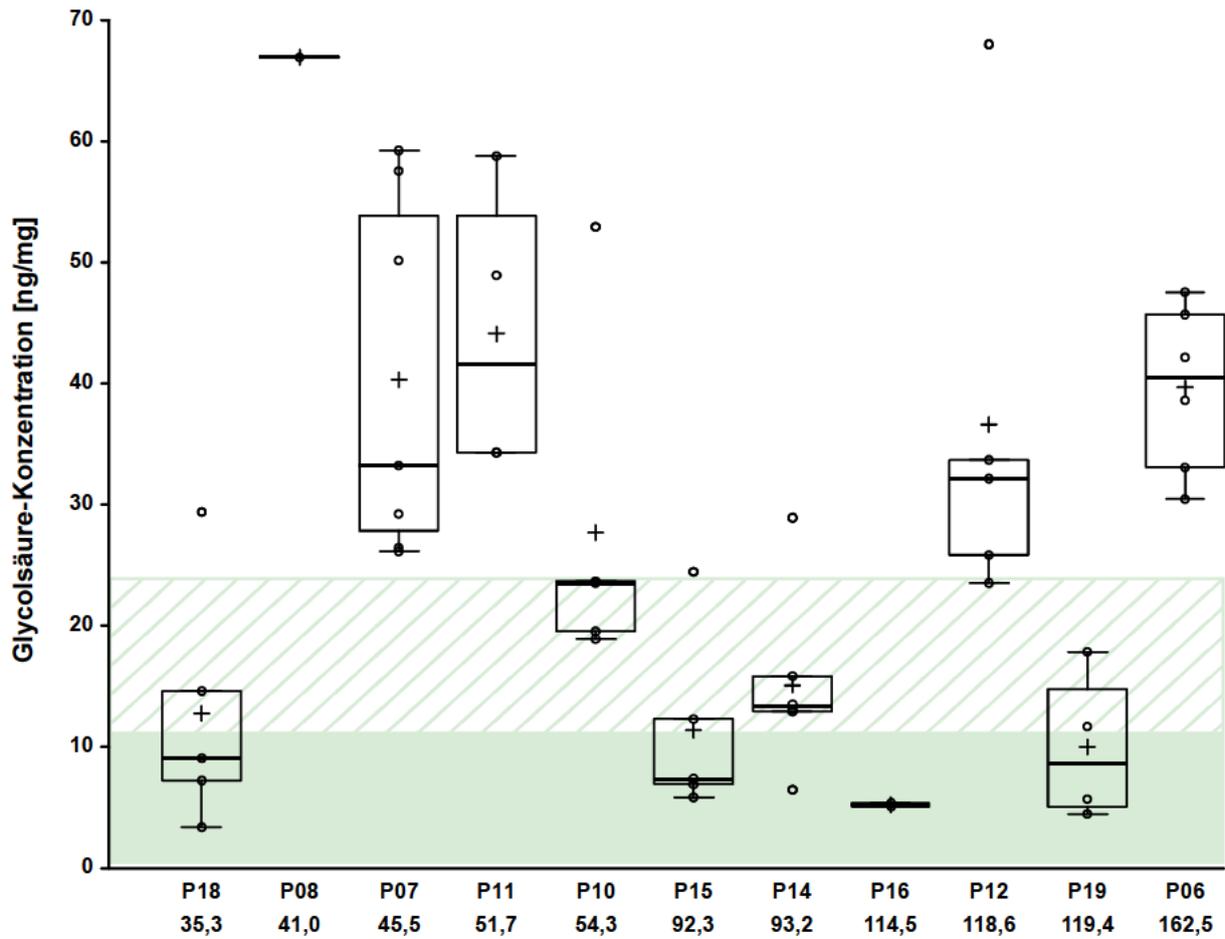


Abbildung 38: Gemessene Glycolsäure-Konzentrationen, Mittelwert, Median, Quartile und Ausreißer der elf Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis in mg/kg Körpergewicht. In grün ist der endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive der Ausreißer dargestellt. Es wurden zwischen ein und acht Segmente untersucht.

4.2.5 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB

Die bestimmten GHB-Konzentrationen der vor der GHB-Einnahme genommenen Haarprobe, der zwei Kontrollproben und der Haarproben nach Einmalgabe sind in Tabelle 24 zu sehen. Die Konzentrationen bei 3,4-DHB waren, wie auch anhand der gemessenen Werte der Kontrollproben zu sehen, nur eingeschränkt beurteilbar, da teilweise bereits in Leerproben (ohne Matrix) die beiden Massenübergänge detektiert wurden und die ermittelten Konzentrationen somit nicht den tatsächlichen Konzentrationen entsprachen. Für 3,4-DHB konnte daher lediglich ein Trend beurteilt werden, jedoch keine konkreten Konzentrationen.

Tabelle 24: Ermittelte Konzentrationen von GHB-Sulf, Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB in einer Haarprobe vor der Einnahme von GHB, einer hohen und einer niedrigen Kontrollprobe und den Haarproben nach Einmalgabe von 2,4 g beziehungsweise 31,4 mg/kg Na-GHB (*Somsanit*TM). Konzentrationen, die oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzbereichs ohne Ausreißer lagen, wurden mit einem Pfeil (↑) markiert. Proben, die oberhalb des Referenzbereichs inklusive der Ausreißer lagen, wurden mit zwei Pfeilen (↑↑) markiert.

Probe	GHB-Sulf-Konz. [ng/mg]	Glycolsäure-Konz. [ng/mg]	2,4-DHB-Konz. [ng/mg]	3,4-DHB-Konz. [ng/mg]
Ermittelter endogener Referenzbereich ohne Ausreißer	< 0,40 – 1,7	0,39 – 11	< 0,20 – 0,45	< 0,10 – 0,63
Ermittelter endogener Referenzbereich mit Ausreißern	< 0,40 – 12	0,39 – 24	< 0,20 – 0,65	< 0,10 – 4,7
Probe vor GHB-Einnahme	< 0,40	7,8	< 0,20	0,40
Kontrollprobe 1 (Sollwert)	0,50 (0,50)	1,2 (1,0)	0,26 (0,20)	1,1 (0,50)
Kontrollprobe 2 (Sollwert)	31 (25)	27 (25)	1,0 (1,0)	11 (5,0)
1 Woche nach Einnahme Seg. 1: 0-1 cm	1,3	15 (↑)	0,52 (↑)	1,1 (↑)
1 Woche nach Einnahme Seg. 2: 1-2 cm	0,31	11	0,56 (↑)	1,4 (↑)
1 Woche nach Einnahme Seg. 3: 2-3 cm	< 0,50	11	0,93 (↑↑)	1,5 (↑)
6 Wochen nach Einnahme Seg. 1: 0-1,5 cm	0,51	19 (↑)	1,3 (↑↑)	2,5 (↑)
6 Wochen nach Einnahme Seg. 2: 1,5-2,5 cm	5,3 (↑)	28 (↑↑)	0,77 (↑↑)	1,3 (↑)
6 Wochen nach Einnahme Seg. 3: 2,5-3,5 cm	12 (↑)	30 (↑↑)	0,45	0,76 (↑)
6 Wochen nach Einnahme Seg. 4: 3,5-5 cm	11 (↑)	31 (↑↑)	0,38	0,74 (↑)
9 Wochen nach zweiter Einnahme Seg. 1: 0-1 cm	0,82	14 (↑)	1,3 (↑↑)	2,0 (↑)
9 Wochen nach zweiter Einnahme Seg. 2: 1-2 cm	0,72	13 (↑)	0,71 (↑↑)	2,4 (↑)
9 Wochen nach zweiter Einnahme Seg. 3: 2-3 cm	5,4 (↑)	24 (↑)	0,41	1,2 (↑)

Die ermittelten GHB-Sulf-Konzentrationen in den eine Woche nach der ersten Einnahme entnommenen Haarproben lagen, wie auch in Abbildung 39 zu sehen, für alle Segmente im

Bereich der in der vorliegenden Arbeit bei Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme gemessenen Konzentrationen. Die Konzentrationen des zweiten und dritten Segmentes lagen dabei sehr dicht an der zuvor ermittelten individuellen endogenen Konzentration. Die ermittelten Konzentrationen in den sechs Wochen nach der ersten Einnahme entnommenen Haarproben lagen für GHB-Sulf zwischen 0,51 und 12 ng/mg. Wobei die Segmente 2, 3 und 4 mit den Abschnitten von 1,5 bis 5 cm deutlich oberhalb des endogenen Referenzbereichs lagen. Die Konzentration des ersten Segmentes lag im Bereich der individuellen endogenen Konzentration. Die ermittelten GHB-Sulf-Konzentrationen in den neun Wochen nach der zweiten Einnahme entnommenen Haarproben lagen zwischen 0,72 und 5,4 ng/mg. Dabei wurde die höchste und einzige oberhalb des endogenen Referenzbereichs liegende Konzentration im kopfernen Segment 3 (2 – 3 cm) nachgewiesen.

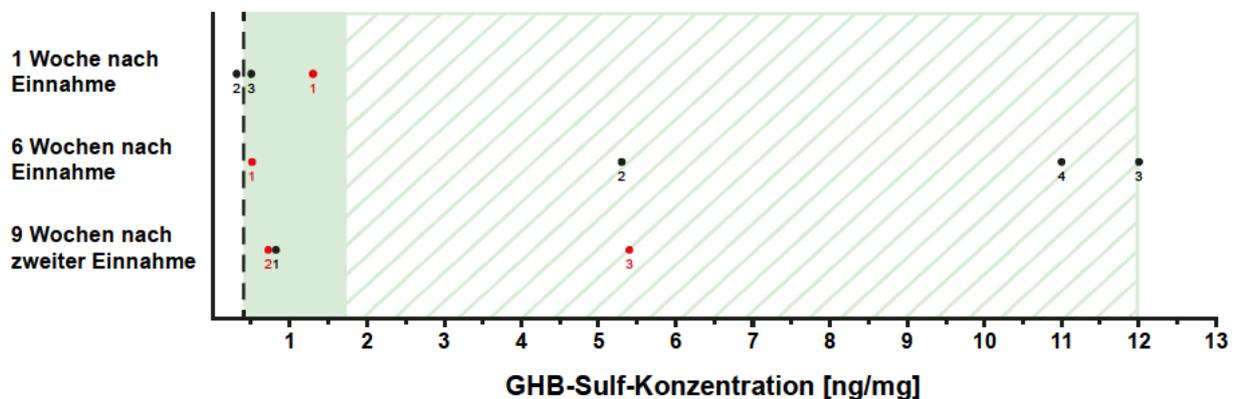


Abbildung 39: Konzentrationen an GHB-Sulf im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. In grün ist der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive Ausreißer dargestellt. Die eingezeichnete gestrichelte Linie stellt die individuelle endogene Konzentration dar, die vor der ersten Einnahme von GHB bei der Person ermittelt wurde. In rot sind jeweils die Segmente dargestellt, die bei einer Wachstumsrate der Haare von 1 cm/Monat die erhöhten Konzentrationen enthalten könnten.

Wie in Abbildung 40 zu sehen, lagen die Konzentrationen für Glycolsäure alle, mit Ausnahme des zweiten und dritten Segmentes der Entnahme eine Woche nach der ersten Einnahme, oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ohne Ausreißer als endogen ermittelten Bereichs. Alle ermittelten Konzentrationen lagen oberhalb des individuellen endogenen Wertes, der vor der ersten Einnahme ermittelt wurde. Genauso wie bei GHB-Sulf lagen auch bei Glycolsäure die Konzentration der sechs Wochen nach der ersten Einnahme entnommenen Haarprobe am höchsten, gefolgt von der neun Wochen nach der zweiten Einnahme entnommenen Haarprobe. Für Glycolsäure lagen die Werte sechs Wochen nach der ersten Einnahme zwischen 19 und 31 ng/mg und die Werte neun Wochen nach der zweiten Einnahme zwischen 13 und 24 ng/mg.

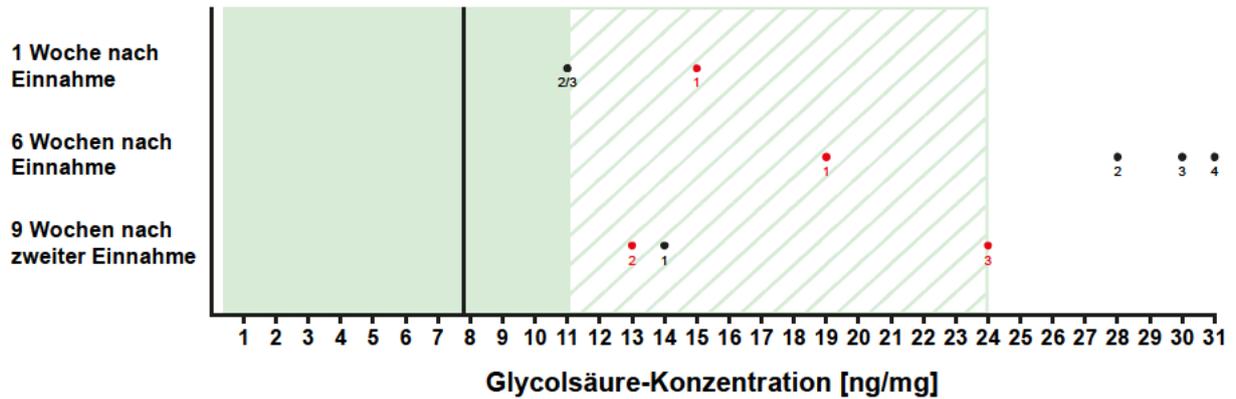


Abbildung 40: Konzentrationen an Glycolsäure im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. In grün ist der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive Ausreißer dargestellt. Die eingezeichnete Linie stellt die individuelle endogene Konzentration dar, die vor der ersten Einnahme von GHB bei der Person ermittelt wurde. In rot sind jeweils die Segmente dargestellt, die bei einer Wachstumsrate der Haare von 1 cm/Monat die erhöhten Konzentrationen enthalten könnten.

Für den GHB-Metaboliten 2,4-DHB lagen, wie in Abbildung 41 zu sehen, die ermittelten Konzentrationen aller Segmente im Vergleich mit der vor der Einnahme individuell ermittelten Konzentration höher. Die Konzentrationen eine Woche nach der ersten Einnahme lagen alle über dem hier ohne Ausreißer ermittelten endogenen Referenzbereich. Für die beiden anderen Entnahmen, sechs Wochen nach der ersten und neun Wochen nach der zweiten Einnahme, verliefen die Konzentrationen absteigend. Die ersten beiden kopfnahen Segmente, und vorrangig das erste Segment, enthielten dabei höhere Konzentrationen der Metaboliten.

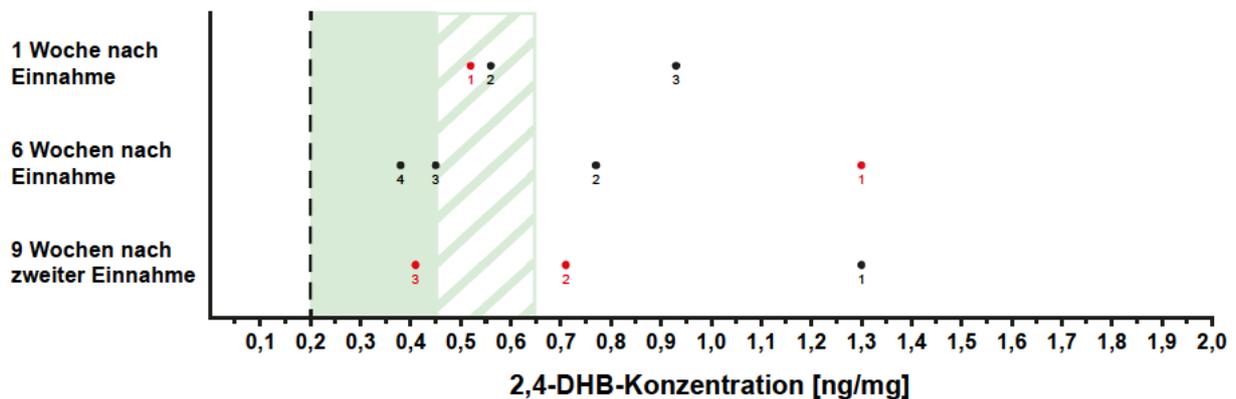


Abbildung 41: Konzentrationen an 2,4-DHB im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. In grün ist der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive Ausreißer dargestellt. Die eingezeichnete gestrichelte Linie stellt die individuelle endogene Konzentration dar, die vor der ersten Einnahme von GHB bei der Person ermittelt wurde. In rot sind jeweils die Segmente dargestellt, die bei einer Wachstumsrate der Haare von 1 cm/Monat die erhöhten Konzentrationen enthalten könnten.

Für die Substanz 3,4-DHB lagen alle Konzentrationen oberhalb der individuellen endogenen Konzentration und des endogenen Referenzbereichs ohne Ausreißer. Wie in Abbildung 42 zu sehen, waren die Konzentrationen, genau wie bei 2,4-DHB, in der eine Woche nach der ersten Einnahme entnommenen Haarprobe von den proximalen zu den distalen Segmenten hin ansteigend und für die anderen beiden Haarproben eher absteigend.

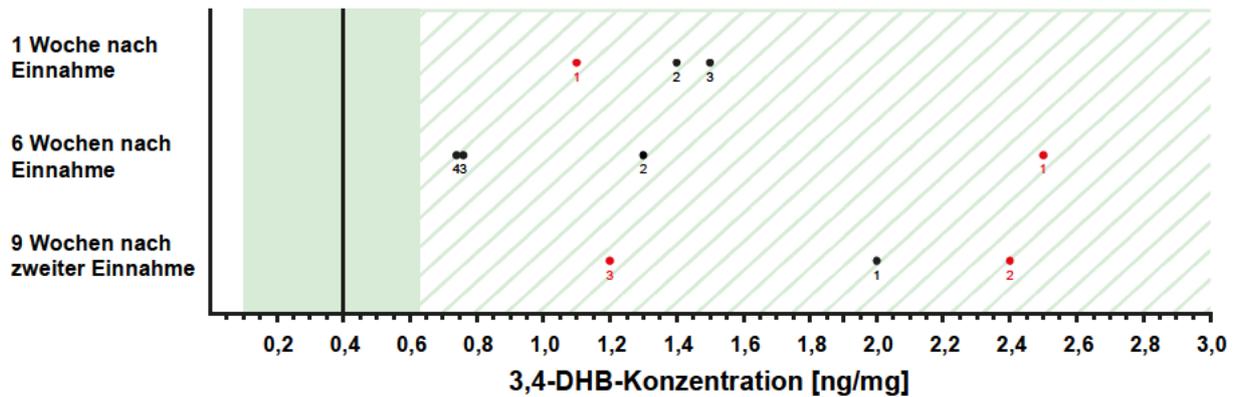


Abbildung 42: Konzentrationen an 3,4-DHB im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. In grün ist der ermittelte endogene Referenzbereich ohne Ausreißer und in grün schraffiert inklusive Ausreißer dargestellt. Die eingezeichnete Linie stellt die individuelle endogene Konzentration dar, die vor der ersten Einnahme von GHB bei der Person ermittelt wurde. In rot sind jeweils die Segmente dargestellt, die bei einer Wachstumsrate der Haare von 1 cm/Monat die erhöhten Konzentrationen enthalten könnten.

5 Diskussion

5.1 GHB-Analytik

5.1.1 Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB in Haaren

Die Genauigkeit der analytischen Methode lag mit -12,68 % bis 20,92 % innerhalb der akzeptablen ± 30 %. Dabei gilt es zu beachten, dass die Messunsicherheit der Bestimmung nur zum Teil von der analytischen Genauigkeit, die sich aus Präzision und systematischem Fehler ergibt, bestimmt wird. Entscheidend ist vielmehr auch, dass für das individuell verschiedene Haarwachstum lediglich Modelle verwendet werden, die von durchschnittlichen Wachstumsraten ausgehen. Da die analytische Genauigkeit der verwendeten Methode verglichen hiermit bereits deutlich höher war, würde eine weitere Verbesserung in dieser Hinsicht lediglich einen geringen Vorteil bieten. Ein weiterer limitierender Faktor der Haaranalytik ist die Probenmenge pro Segment. Die hier entwickelte Methode benötigte mindestens 10 mg Haare, wodurch die Länge eines Segmentes auf etwa 3 mm begrenzt wurde, da ansonsten eine unverhältnismäßig dicke Strähne entnommen werden müsste, bei der eine genaue Segmentierung deutlich erschwert wäre. Eine Segmentierung in kleinere Segmente als 3 mm verspricht jedoch generell keinen weiteren Erkenntnisgewinn zu liefern, da jedes Haar einen individuellen Wachstumszyklus durchläuft und sich somit, wie bereits einleitend beschrieben, benachbarte Haare nicht zwingend in derselben Wachstumsphase befinden. Mit einem täglichen Wachstum von 0,3 bis 0,4 mm ^[215] variiert das Haarwachstum um bis zu 30 %. Diese Einschränkungen und die damit verbundene Begrenzung auf 3 mm könnte wegfallen, sobald die aktuell im Forschungsinteresse stehende Ein-Haar-Analytik auch für GHB möglich ist.^[216,217] Bisher gibt es jedoch keine Publikationen, die daraufhin deuten, dass dies für GHB bald routinemäßig möglich sein wird.

Die niedrige Extraktionsausbeute der hier vorgestellten Methode basiert auf der eher schlechten Extraktionsfähigkeit von Ethylacetat für GHB. Dennoch erscheint Ethylacetat laut Literaturangaben in diesem Fall als das geeignetste Extraktionsmittel, bei dem eine anschließende Verdampfung des Lösungsmittels ohne größeren Aufwand möglich ist.^[212] Um die Extraktionsausbeute dennoch etwas zu erhöhen, wurde, wie ebenfalls in der Literatur vorgeschlagen, eine gesättigte Kochsalz-Lösung anstatt Wasser als Zusatz nach der basischen Denaturierung verwendet. Der zugegebene Glycin-Puffer mit einem pH-Wert von 2,6 wiederum sorgt für die nahezu vollständige Umwandlung in die nicht-ionisierte Form (pKs 4,6) und verhindert die Umwandlung von GHB in GBL bei niedrigeren pH-Werten, wie in Abbildung 43 gezeigt.^[212]

ebenfalls keine endogenen GHB-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Ob ein Nachweis aus Kontrollproben möglich war, geht aus der Veröffentlichung nicht hervor.^[184]

5.1.2 Messungen zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren

Im Vergleich zu endogenen GHB-Konzentrationen im Blut (bis zu 5 mg/L) und im Urin (bis zu 10 mg/L)^[73] gibt es für endogene GHB-Konzentrationen im Haar immer noch vergleichsweise wenig Daten. In Übereinstimmung mit anderen publizierten Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit aus 870 Segmenten von 87 Haarsträhnen eine mittlere endogene GHB-Konzentration von 0,75 ng/mg und aus 58 nicht segmentierten Haarproben eine mittlere endogene GHB-Konzentration von 1,7 ng/mg bestimmt werden.^[187,188] Der höhere Mittelwert der nicht segmentierten Proben könnte durch die Herkunft der Haarproben, den kleineren Stichprobenumfang oder die eventuell laborbedingten methodischen Unterschiede beim Waschen und Extrahieren begründet sein. Außerdem könnte die unterschiedlich erfolgte Probennahme einen Einfluss auf das Messergebnis haben. Bei den segmentierten Proben wurden die Haarsträhnen direkt am Kopf entnommen, bei den nicht segmentierten Proben handelt es sich um distale Haarabschnitte. Des Weiteren sollte eine höhere Dichte an direkt vor der Entnahme kosmetisch behandelten Haaren in der Gruppe der nicht segmentierten Haare in Betracht gezogen werden, was ebenfalls Auswirkungen auf die GHB-Konzentration in Haaren haben kann. Den größten Einfluss haben jedoch vermutlich die für die Analyse verwendeten Waschschriffe und Extraktionsbedingungen. Auch wenn sich die beiden erhaltenen Mittelwerte deutlich unterscheiden, ist in Abbildung 19 zu sehen, dass die gemessenen GHB-Konzentrationen dennoch in einem sehr ähnlichen Bereich lagen. Die Maximalwerte lagen jeweils bei 5,5 ng/mg für die segmentierten und bei 6,3 ng/mg für die nicht segmentierten Proben. In Kombination aller gemessenen Segmente aus beiden Probenkollektiven ergab sich somit in Übereinstimmung mit bekannten endogenen GHB-Konzentrationen ein Referenzbereich von < 0,10 bis 6,3 ng/mg.

In der Literatur sind endogene GHB-Konzentrationen in Haaren von kleiner 0,1 ng/mg bis zu größer als 10 ng/mg beschrieben.^[18,191,199] In Tabelle 25 sind alle relevanten Literaturstellen zur Bestimmung von endogener GHB in Haaren zusammengefasst. *Gouille et al.* analysierten 61 nicht segmentierte Haarsträhnen und erhielten dabei endogene GHB-Konzentrationen von 0,32 bis 1,86 ng/mg. In der gleichen Arbeit wurden ebenfalls zwölf segmentierte Haarsträhnen untersucht, bei denen Konzentrationen zwischen 0,31 und 8,4 ng/mg nachgewiesen werden konnten.^[183] Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die meisten Werte unterhalb von 2,0 ng/mg liegen (> 98 %), es aber in Einzelfällen (vor allem in einzelnen Segmenten) zu Ausreißern kommen kann. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von *Gouille et al.* und denen anderer Arbeiten.^[183,191] In der erst kürzlich veröffentlichten Studie von *Strickland*

und *Thomas et al.* lagen ebenfalls mehr als 97 % der analysierten Segmente unterhalb von 2,0 ng/mg.^[218,219]

Tabelle 25: Relevante Literaturstellen zur Bestimmung endogener GHB-Konzentrationen in Haaren und die jeweils verwendeten Waschlösungen und Extraktionsmethoden.

Publizierende /Jahr	Analysierte Probenzahl	Endogene GHB- Konzentrationen [ng/mg]	Waschlösungen	Extraktionsmethode
<i>Kintz et al.</i> 2003 ^[18]	24 (nicht segmentiert)	0,5 – 12	2 x DCM, 2 min	Denaturierung in 0,01 M NaOH, 16 Stunden, 56 °C
<i>Goullè et al.</i> 2003 ^[183]	61 (nicht segmentiert) 12 (segmentiert)	0,32 – 1,86 0,31 – 8,4	1 x MeOH, 2 min; 2 x heißes Wasser, 3 min; 2 x DCM, 3 min	Denaturierung in 1 M NaOH, 15 min, 95 °C
<i>Hari et al.</i> 2013 ^[190]	27 (nicht segmentiert)	< 0,2 – 1,28	Wasser, Aceton, DCM	Wässrige Extraktion im Ultraschallbad für 2 Stunden
<i>Schröck et al.</i> 2014 ^[199]	27 (segmentiert)	< 0,1 – 1,3	Wasser, Aceton, DCM	Wässrige Extraktion im Ultraschallbad für 2 Stunden
<i>Bertol et al.</i> 2015 ^[191]	30 (segmentiert)	< 0,1 – 5,09	2 x DCM, 2 min	Denaturierung in 1 M NaOH, 15 min, 90 °C
<i>Jagerdeo et al.</i> 2015 ^[192]	20 (nicht segmentiert)	< 1,2 – 4,4	1 x MeOH, 1 min; 1 x DCM, 1 min; 1 x MeOH, 1 min	Pulverisiert, Denaturierung in 1 M NaOH, 30 min, 90 °C
<i>Vaiano et al.</i> 2016 ^[188]	150 (nicht segmentiert)	0,27 – 2,84	2 x DCM, 2 min	Deanturierung in 1 M NaOH, 20 min, 90 °C
<i>Shi et al.</i> 2016 ^[187]	66 (nicht segmentiert)	0,28 – 4,91	Wasser, Aceton	Deanturierung in 1 M NaOH, 10 min, 90 °C
<i>Martz et al.</i> 2019 ^[202]	87 (segmentiert)	< 0,1 – 5,54	1 x MeOH, 5 min; 2 x heißes Wasser, 5 min; 1 x DCM, 5 min	Denaturierung in 1 M NaOH, 30 min, 100 °C
<i>Thomas et al.</i> <i>Strickland et al.</i> 2020 ^[218,219]	214 (segmentiert)	< 0,4 – 5,47	1 x MeOH, 1 x DCM, 1 x MeOH	Pulverisiert, Denaturierung in 1 M NaOH, 45 min, 75 °C

Bertol und *Busardo et al.* analysierten 30 segmentierte Haarproben nach Haarfarben sortiert und konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Haarfarben, dem Geschlecht oder dem Alter feststellen. Die Konzentrationen lagen dabei zwischen kleiner 0,1 ng/mg und 5,09 ng/mg.^[191] Die Daten der vorliegenden Arbeit der segmentierten Haarproben zeigten ebenfalls keinen signifikanten ($p = 0,26$) Unterschied bezüglich der durchschnittlichen

endogenen GHB-Konzentrationen in Haarproben von Frauen und Männern, obwohl der etwas niedrigere Mittelwert der Haarproben von Frauen sich mit den Ergebnissen der von *Vaiano et al.*, *Shi et al.* und auch der von *Strickland/Thomas et al.* publizierten Daten zu endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren deckt.^[187,188,218,219] Der etwas niedrigere Mittelwert aller segmentiert analysierten Proben von 0,75 ng/mg im Vergleich mit anderen Studien könnte somit eventuell eine Folge aus der hohen Anzahl an Teilnehmerinnen sein, die verglichen mit männlichen Teilnehmern mehr als doppelt so hoch war. Die niedrige Anzahl an Personen in der jeweiligen Gruppe und auch die in der vorliegenden Studie ungleiche Verteilung zwischen den Gruppen macht eine verlässliche statistische Auswertung zu alters- oder geschlechtsspezifischen Unterschieden von endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren jedoch schwierig.

Von *Kintz et al.* und *Bertol/Busardo et al.* wurde die Vermutung aufgestellt, dass bei einer Analyse segmentierter Haarproben die ersten 0,5 cm vom kopfnahen Ende höhere GHB-Konzentrationen durch die Kontamination über Schweiß aufweisen könnten.^[18,191] Daraufhin wurde in der Veröffentlichung vorgeschlagen, bei der Auswertung das erste Segment zu verwerfen und von der Auswertung auszuschließen.^[213] Diese These und der damit verbundene Vorschlag konnte von den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen nicht gestützt werden. Wie auch in Abbildung 17 zu sehen, waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einer Konzentration von 0,74 ng/mg im Durchschnitt keine erhöhten Werte des ersten Segmentes nachweisbar.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse segmentierter Haarproben zeigte, dass die Verteilung von endogener GHB innerhalb einer Haarsträhne meistens nahezu gleichbleibend ist, wobei die Konzentration von Haarsträhne zu Haarsträhne von jeweils derselben Person sich deutlich unterscheiden kann. Dies könnte aufgrund von externen Kontaminationen, wie Schweiß, der Fall sein oder ebenfalls durch unterschiedliche Auswascheffekte, wie die tägliche Haarpflege und die im Labor durchgeführten Dekontaminationsschritte, begründet sein. Eine mögliche Erklärung für das breite Spektrum an endogenen GHB-Konzentrationen können zum Beispiel die verwendeten unterschiedlichen Waschlösungen sein, die einen Einfluss auf die ermittelten GHB-Konzentrationen haben.

Folgt man einem Vorschlag von *Kintz et al.*, sollte vollständig auf das Waschen der Haare verzichtet werden und die Haare des potentiellen Opfers einer GHB-Verabreichung innerhalb von zwölf Stunden analysiert werden, wobei wichtig sei, dass die Haare bis zur Entnahme ebenfalls nicht gewaschen werden.^[213] Der Vorteil wäre in diesem Fall, dass ein Auswaschen und somit der Verlust von GHB vollständig verhindert würde. In diesem Fall scheint jedoch die Analyse einer Urinprobe innerhalb dieser zwölf Stunden den gleichen Nutzen zu haben. Festzuhalten ist, sollte eine Methode mit vorherigem Waschen der Haare verwendet werden, sollte auf jeden Fall eine parallele Analyse der Waschlösungen auf GHB stattfinden, um einen

zu hohen Verlust durch Auswascheffekte auszuschließen. Eine weitere Erklärung für das breite Spektrum an möglichen endogenen GHB-Konzentrationen könnte neben den oben genannten Faktoren auch die verwendete Extraktionsmethode sein. In den meisten Fällen wird entweder eine Denaturierungsmethode mit Natronlauge oder eine wässrige Extraktion im Ultraschallbad durchgeführt. Bei einer Gegenüberstellung der zur Bestimmung von endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren verwendeten Extraktionsmethoden und der in der jeweiligen Studie gemessenen endogenen Konzentrationen fällt auf, dass die beiden Studien von *Hari et al.* ^[190] und *Schröck et al.* ^[199] GHB-Konzentrationen in einem relativ schmalen Bereich von weniger 0,1 ng/mg bis kleiner 1,5 ng/mg ermittelt haben. In beiden Studien wurde im Vergleich zu allen anderen aufgeführten Studien eine Extraktion mittels wässriger Lösung im Ultraschallbad durchgeführt. Eine genauere Betrachtung dieser Ergebnisse findet in Kapitel 5.1.4 statt.

Die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit auf endogene GHB vermessenen Haarproben mit einer Lagerzeit zwischen zwei und acht Jahren erbrachten für 52 Segmente einen Mittelwert von 36 ng/mg. Die ermittelten Konzentrationen waren dabei signifikant höher ($p = 0,03$) als die Konzentrationen der frischen vermessenen Proben. Nur zwei der vermessenen Segmente enthielten GHB-Konzentrationen unter 2,0 ng/mg. Eine Erklärung für erhöhte Konzentrationen in länger gelagerten Proben könnten Veränderungen durch Bakterien sein. Bereits 2004 veröffentlichten *Elliott et al.* eine Studie in der in fäulnisveränderten Proben Mikroorganismen identifiziert wurden. Nach Inokulation von Blut- und Urinproben mit verschiedenen Mikroorganismen kam es zu einem Anstieg der GHB-Konzentrationen im Vergleich zu den nicht mit Mikroorganismen inokulierten Proben. ^[138]

Alle Proben wurden nach den Richtlinien der SoHT im Dunklen bei Raumtemperatur gelagert und erst kurz vor der Analyse mit der beschriebenen Waschmethode gewaschen, sodass eventuelle Kontaminationen durch Schweiß oder Talg vor der Lagerzeit nicht von den Haaren entfernt wurden. Eine weitere Erklärung für die erhöhten GHB-Konzentrationen könnten daher Kontaminationseffekte durch Anhaftungen an den Haaren sein, die über die Jahre in die Haarmatrix diffundieren und dann nicht mehr durch einfaches Waschen entfernt werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein einheitlicher Trend beobachtet werden, dass länger gelagerte Proben höhere GHB-Konzentrationen enthalten als kürzer gelagerte Proben. Das lässt den Schluss zu, dass vermutlich nicht allein die Lagerzeit ursächlich für die erhöhten GHB-Konzentrationen ist.

Die über 14 Monate gelagerte und regelmäßig vermessene Haarprobe zeigte ebenfalls keinen Trend, der darauf schließen lässt, dass es allein durch eine längere Lagerung zu einem solchen Effekt kommt. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass auch nach weiteren zwei Jahren Lagerzeit keine wesentlich höheren GHB-Konzentrationen in den Haaren zu erwarten wären, eine Überprüfung dieser Theorie müsste jedoch noch erfolgen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der regelmäßig vermessenen Haarsträhne und den Rückstellproben mit erhöhten

GHB-Konzentrationen ist jedoch, dass die frische Haarsträhne nicht direkt an der Kopfhaut abgenommen wurde. Es handelte sich um einen etwa 20–30 cm von der Kopfhaut entfernt abgeschnittenen Zopf, bei dem folglich die Haare keinen direkten Kontakt zur Kopfhaut mehr hatten. Daher kann ein Unterschied während der Lagerung zu den direkt an der Kopfhaut entnommenen Haarproben zum Beispiel bezüglich Anhaftungen wie Schweiß, Talg oder auch Bakterien nicht ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie der Kontamination über Schweiß und Talg, die hauptsächlich direkt an der Kopfhaut stattfindet.

5.1.3 Messungen zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB

Um abschätzen zu können, wie viel beziehungsweise zu welchem Anteil GHB bei einer externen Aufnahme überhaupt in das Haar eingelagert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit 19 Haarproben von Personen untersucht, die aufgrund von Narkolepsie regelmäßig GHB in Form des Medikamentes *Xyrem*[®] eingenommen haben. Die dabei eingenommenen Dosen reichten von 3 bis 9 g *Xyrem*[®] pro Nacht, wobei es sich dabei um Mengen handelt, die eine nicht an die Einnahme von GHB gewöhnte Person vermutlich handlungsunfähig machen würden.^[220] Eingeschränkt wird die Interpretation der ermittelten Konzentrationen dadurch, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Messung der individuellen endogenen GHB-Konzentration möglich war, da alle Personen bereits vor der Teilnahme an der Studie das Medikament *Xyrem*[®] regelmäßig eingenommen haben. Die analysierte Haarlänge wurde so gewählt, dass eine gleichbleibende GHB-Dosis für alle analysierten Segmente angenommen werden konnte.

Im Vergleich der in der vorliegenden Arbeit unsegmentiert ermittelten endogenen GHB-Konzentrationen, die mittels derselben Wasch-, Extraktions- und Analyseverfahren erhalten wurden, mit den GHB-Konzentrationen in Haaren von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation und somit regelmäßiger Aufnahme von GHB, fällt der große überlappende Bereich auf, wie in Abbildung 44 zu erkennen ist. Mit einer maximalen Konzentration von 5,1 ng/mg lag keine der ermittelten durchschnittlichen GHB-Konzentrationen außerhalb des endogenen Referenzbereichs inklusive der Ausreißer (bis 6,3 ng/mg). Lediglich drei einzelne Segmente von drei unterschiedlichen Personen lagen oberhalb dieser Konzentrationen. Dementsprechend ist nahezu kein Unterschied der beiden Mittelwerte und Mediane feststellbar ($p = 0,74$).

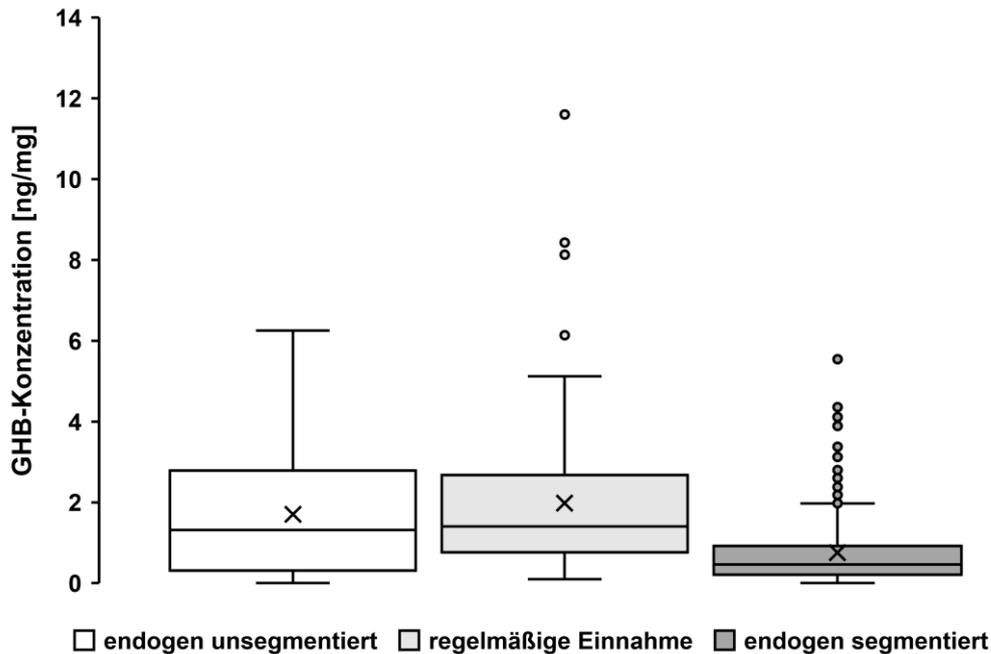


Abbildung 44: Gegenüberstellung der in der vorliegenden Arbeit unsegmentiert und segmentiert gemessenen endogenen GHB-Konzentrationen im Haar mit den GHB-Konzentrationen im Haar nach regelmäßiger Einnahme von GHB. Auftragung der Messwerte mit Median, Mittelwert, Quartilen und Ausreißern.

Im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten endogenen Werten segmentierter Haarproben konnte allerdings ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) der durchschnittlichen GHB-Konzentrationen nach regelmäßiger Einnahme festgestellt werden. Mit einem tatsächlichen Unterschied von 1,9 ng/mg zu 0,75 ng/mg ist die forensische Relevanz jedoch fraglich, da eine durchschnittliche Konzentration von 1,9 ng/mg immer noch deutlich im Bereich der als endogen geltenden Konzentrationen liegt. Alle bisher vorgeschlagenen *Cut-offs* zur Unterscheidung zwischen endogenen und nicht endogenen Konzentrationen liegen deutlich über diesen 1,9 ng/mg.

Auffällig ist, dass der Mittelwert der männlichen Probanden mit 2,7 ng/mg ($n = 5$) fast doppelt so hoch war wie der der Probandinnen mit 1,6 ng/mg ($n = 14$). Eine mögliche Erklärung neben der Einschränkung durch die deutlich geringere Probenanzahl an Haarproben von Männern wäre der Einfluss von kosmetischen Haarbehandlungen. Wie auch in Abbildung 22 gezeigt, hatten vier der fünf kosmetisch behandelten Haarproben von Frauen eine durchschnittliche GHB-Konzentration von unter 1,0 ng/mg. Hätte der Konzentrationsunterschied biologische Ursachen und würde durch eine unterschiedliche Produktion von endogener GHB verursacht, müsste sich dieser Effekt ebenfalls in anderen Proben wie Blut und Urin zeigen. Es gibt jedoch mindestens vier Studien, die genau wie andere Studien in Haaren auch in Blut und Urin, keinen signifikanten Unterschied zwischen GHB-Spiegeln von Männern und Frauen feststellen konnten.^[221–224]

Trotz der eingenommenen relativ hohen GHB-Mengen, die in der hier durchgeführten Studie untersucht wurden, konnten nur in 25 der insgesamt 136 untersuchten Segmente Werte über 3,0 ng/mg festgestellt werden. Das heißt, etwa 18 % der untersuchten Segmente wären bei Ansetzen eines *Cut-offs* von 3,0 ng/mg als nicht endogen interpretiert worden. Bei einem denkbaren *Cut-off* von 5,0 ng/mg waren es mit sechs Segmenten sogar nur etwa 5 %, die oberhalb dieses Wertes lagen und das obwohl in jedem Fall täglich mindestens 3 g *Xyrem*[®] eingenommen wurden. Konkret konnten bei 15 von 19 Personen Mittelwerte zwischen kleiner 0,10 ng/mg und 3,0 ng/mg ermittelt werden. Innerhalb dieser Gruppe lagen nur drei der 104 analysierten Segmente oberhalb von 3,0 ng/mg. Bei dem denkbaren Referenzwert von 5,0 ng/mg lag der Mittelwert sogar bei 18 der 19 Personen unter diesem Wert. Dabei lagen lediglich drei der 130 Segmente dieser 18 Personen über dem Wert von 5,0 ng/mg und 20 Segmente über 3,0 ng/mg. Im Gegensatz dazu konnten während der Analyse von 928 Haarsegmenten beziehungsweise Haarproben von Personen ohne GHB-Aufnahme in 3,1 % der Fälle (29 Segmenten) endogene Konzentrationen über 3,0 ng/mg nachgewiesen werden und in drei Fällen sogar Werte über 5,0 ng/mg. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus der Studie von *Mehling et al.*, die nach GHB-Einnahmen von fast 6 g pro Tag bei zwei Personen mit Narkolepsie ebenfalls nur GHB-Konzentrationen von etwas unter 1,0 ng/mg im Haar nachweisen konnten.^[194] Auch *Ferrara et al.* konnten nach der Einnahme von bis zu 14 g GHB nur leicht erhöhte GHB-Konzentrationen von 3,0 bis 5,0 ng/mg nachweisen.^[225] Die bisher in der Literatur bekannten Studien zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Einnahme sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: In der Literatur bekannte Studien zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme.

Publizierende /Jahr	Verwendung	GHB-Dosis	Anzahl an Proben	Endogene GHB-Konz. [ng/mg]	GHB-Konz. nach Aufnahme [ng/mg]	Extraktionsmethode
<i>Ferrara et al.</i> 1995 ^[225]	therapeutisch	3,5 – 14 g	nicht bekannt	nicht bekannt	3-5	nicht bekannt
<i>Gouille et al.</i> 2003 ^[183]	Freizeitdroge	nicht bekannt	1	nicht bekannt	14	Denaturierung in 1 M NaOH, 15 min, 95 °C
<i>Cirimele et al.</i> 2010 ^[226]	Freizeitdroge	nicht bekannt	4	nicht bekannt	9,2 – 229	Denaturierung in 0,01 M NaOH, 16 Stunden, 56 °C
<i>Bertol et al.</i> 2012 ^[193]	Freizeitdroge	nicht bekannt	1	1,26	4,56 – 9,15	Denaturierung in 1 M NaOH, 40 min, 75 °C

Publizierende /Jahr	Verwendung	GHB-Dosis	Anzahl an Proben	Endogene GHB-Konz. [ng/mg]	GHB-Konz. nach Aufnahme [ng/mg]	Extraktionsmethode
Wang et al. 2016 [198]	Freizeitdroge	nicht bekannt	2	~ 27 – 82	~ 100 – 594	Wässrige/ methanolische Extraktion bei 37 °C für 90 min
Busardo et al. 2017 [151]	therapeutisch	nicht bekannt	1	0,89 – 2,82	7,35 – 9,23	Saure Denaturierung, 60 min, 100 °C
Mehling et al. 2017 [194]	therapeutisch	5,78 g	2	nicht bekannt	< LoQ – 0,68	Wässrige/ methanolische Extraktion bei 37 °C für 90 min
Van Elsué et al. 2018 [195]	Freizeitdroge	30 – 336 mL/Tag (keine weiteren Informationen)	10	nicht bekannt	6,3 – 239,6	Wässrige Extraktion im Ultraschallbad für 90 min

Eine Erklärung für den beobachteten geringen Anstieg der GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger GHB-Aufnahme könnte die kurze Halbwertszeit (20 bis 60 min) von GHB sein. Die Rolle der Halbwertszeit bei der Einlagerung von GHB in die Haare ist bisher nicht genauer untersucht worden, man kann jedoch davon ausgehen, dass Substanzen mit kurzer Halbwertszeit weniger in das Haar eingelagert werden, als Substanzen, die länger im Blutkreislauf vorhanden sind und somit mehr Zeit haben in das Haar eingelagert zu werden. Dass auch Substanzen mit kurzer Halbwertszeit, wie Zolpidem (zwei bis drei Stunden [227]) oder Ketamin (etwa 45 min [228]) bereits nach einer einmaligen Aufnahme im Haar nachweisbar sind, [229,230] schließt diese Erklärung nicht zwangsläufig aus. Der Nachweis einer Substanz nach (einmaliger) Aufnahme ist deutlich einfacher, wenn diese Substanz nicht endogen vorkommt und somit ein einfacher qualitativer Nachweis ausreicht, um eine Aufnahme nachzuweisen. Dagegen ist die Unterscheidung zwischen dem individuellen endogenen Level einer körpereigenen Substanz und einer durch zusätzliche Aufnahme hervorgerufenen Konzentration deutlich schwieriger.

Bisher ist nicht abschließend geklärt, in welchem Maß GHB vom Körper gebildet wird und welche Faktoren die Bildung von GHB beeinflussen. Eine aufgenommene Menge GHB kommt nur für einen sehr kurzen Zeitraum zu der bereits bestehenden Menge an endogener GHB hinzu. Die Konzentration im Blut ist somit auch nur für eine sehr kurze Zeit erhöht. [12,135] Maximale Blutspiegel wurden nach der Aufnahme von 1,75 g oder 5,25 g jeweils nach etwa einer halben bis zwei Stunden beobachtet. [231] Diese Zeit reicht eventuell nicht aus, um zu

einer vermehrten Einlagerung von GHB über das Blut in die Haare beizutragen.

In der bereits erwähnten Studie von *Van Elsué et al.* gibt es jedoch einen Hinweis darauf, dass vielmehr die Häufigkeit der Aufnahme eine Rolle spielen könnte als die Höhe der Dosis.^[195] Dies scheint plausibel, da viele kleine Dosen den Blutspiegel längerfristig erhöhen würden und eine Einlagerung ins Haar über das Blut somit wahrscheinlicher stattfinden und länger andauern würde. Kleine aber häufigere Dosen wären somit besser im Haar nachweisbar als eine einzelne größere Dosis. Nach einer einzelnen Aufnahme pro Tag ist die Menge an aufgenommener GHB im Vergleich zu der im Körper vorkommenden GHB also vermutlich sehr gering. Zudem gehört GHB nicht zu den Substanzen die gut in das Haar eingelagert werden. Lipophile und basische Eigenschaften und die Bindung an Melanin helfen bei der Einlagerung. Eine weniger lipophile und saure Substanz wie GHB, die keine Affinität zu Melanin zeigt, dürfte demnach weniger gut in das Haar eingelagert werden.

Geht man davon aus, dass sich die aufgenommene GHB-Menge in der gemessenen Konzentration im Haar widerspiegelt, müsste man bei einer regelmäßigen Einnahme der gleichen Menge GHB sowohl eine gleichmäßige Verteilung von GHB innerhalb einer Haarsträhne sehen als auch eine Korrelation zwischen eingenommener Dosis *Xyrem*[®] und ermittelter GHB-Konzentration im Haar. Die Tatsache, dass nur eine geringe Abhängigkeit zwischen der Dosis und der gemessenen GHB-Konzentration besteht, ist in Abbildung 45 dargestellt und wird durch einen Korrelationskoeffizienten von 0,3 ebenfalls deutlich.

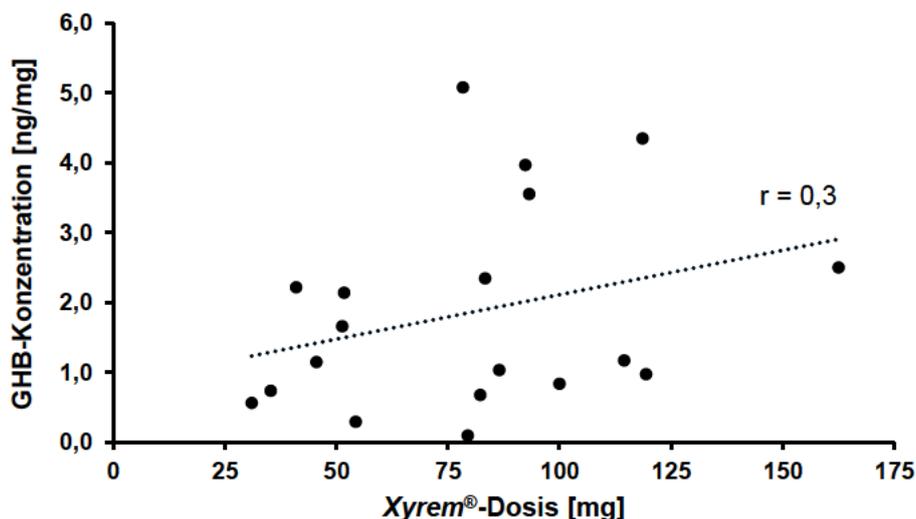


Abbildung 45: Korrelation zwischen eingenommener *Xyrem*[®]-Dosis und der ermittelten GHB-Konzentration im Haar (r = Korrelationskoeffizient) (Abbildung verändert nach *Nebel et al.*^[214]).

Teilweise hatten Personen mit hohen *Xyrem*[®]-Dosierungen niedrige GHB-Konzentrationen in den Haaren von unter 0,10 ng/mg. Im Gegensatz dazu gab es auch Personen mit niedrigen *Xyrem*[®]-Dosierungen und relativ hohen GHB-Konzentrationen im Haar. Die Beobachtung, dass eine höhere Dosis GHB nicht zwangsläufig mit höheren GHB-Konzentrationen im Haar

einhergeht, deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von *Van Elsué et al.*, bei der ebenfalls keine Korrelation festgestellt werden konnte.^[195]

Die Dauer der Aufnahme vor der Probenentnahme scheint dabei keine Rolle zu spielen, da hier nahezu keine Korrelation zwischen gemessener GHB-Konzentration und der Dauer der *Xyrem*[®]-Einnahme festgestellt werden konnte ($r = 0,1$), wie in Abbildung 46 gezeigt.

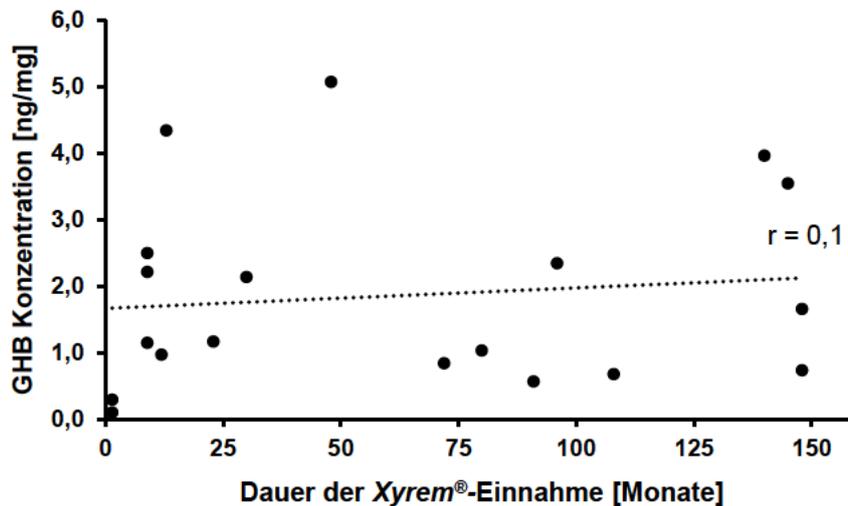


Abbildung 46: Korrelation zwischen Dauer der *Xyrem*[®]-Einnahme und gemessener GHB-Konzentration im Haar ($r =$ Korrelationskoeffizient) (Abbildung verändert nach *Nebel et al.* ^[214]).

Gestützt werden diese Ergebnisse außerdem durch die Analyse der Haarsträhnen von den Personen 05 und 10, in beiden Fällen wurden zunächst lediglich 1,5 cm untersucht, da eine regelmäßige Einnahme von GHB nur für diesen Zeitraum bekannt war. In beiden Fällen war die Haarsträhne jedoch länger, sodass weitere Segmente untersucht werden konnten. Entgegen den Erwartungen waren die GHB-Konzentrationen in den distalen Segmenten jedoch nicht niedriger als in den proximalen. Für Person 05 lagen alle untersuchten Segmente unter dem LoD von 0,10 ng/mg und für Person 10 konnten in den drei proximalen Segmenten Konzentrationen zwischen 0,31 und 0,34 ng/mg ermittelt werden während in den sieben distalen Segmenten Konzentrationen zwischen 0,21 und 0,94 ng/mg GHB gemessen wurden. Generell konnte für die Verteilung innerhalb einer Haarsträhne kein einheitlicher Trend beobachtet werden. Sind die Konzentrationen der endogenen GHB-Spiegel innerhalb einer Haarsträhne relativ konstant, so folgt dies bei zusätzlich aufgenommenem GHB keinem Trend. Es gab sowohl Haarsträhnen mit ansteigenden GHB-Konzentrationen vom proximalen zum distalen Ende hin als auch Haarsträhnen mit abfallenden oder stark schwankenden Konzentrationen der einzelnen Segmente, wie in Abbildung 23 dargestellt. Eine mögliche Erklärung für solche Beobachtungen könnte eine nachträgliche externe Einlagerung über Schweiß, Talg oder regelmäßigen Kontakt mit der Substanz sein.

5.1.4 Methodenvergleich

Ein Grund für die großen Variationen zwischen den endogenen Werten verschiedener Personen und vor allem verschiedener Studien liegt vermutlich wie bereits erwähnt in den Auswascheffekten durch wässrige Lösungen oder Methanol. Je nach Dauer und verwendeter Menge an Waschlösung, ist dieser Effekt vorrausichtlich unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein weiterer Faktor, der zu einem breiten Spektrum an ermittelten GHB-Konzentrationen in Haaren beitragen kann, ist die Art der verwendeten Blank-Matrix für die Validierung. Dabei kommen aufgrund des endogenen Charakters von GHB synthetische Haare, Haare mit GHB-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, Haare, die so lange gewaschen wurden, dass keine GHB mehr nachweisbar ist oder die Standardadditionsmethode in Frage. Zudem kommt eine Beeinflussung des Ergebnisses durch die verwendete Extraktionsmethode ebenfalls in Betracht.

Die am häufigsten verwendeten Extraktionsmethoden sind eine alkalische Denaturierung mit Natronlauge oder eine meist wässrige oder wässrig/methanolische Extraktion mittels Ultraschallbad. Bei den in Tabelle 25 zusammengefassten Studien wurde von *Hari et al.* ^[190] und *Schröck et al.* ^[199] die Aufarbeitung mittels wässriger Lösung durchgeführt. In beiden Studien liegen die ermittelten endogenen Werte bezogen auf die anderen Studien in einem vergleichsweise engen Bereich. Überträgt man diese Beobachtung auf die in Tabelle 26 zusammengefassten Studien zu regelmäßiger Aufnahme von GHB, ist jedoch kein Muster zu erkennen. Es gibt Studien, die nach regelmäßiger Aufnahme von GHB, sowohl nach der Aufarbeitung durch wässrige Lösungen ^[195,198] als auch durch alkalische Hydrolyse, ^[226] sehr hohe GHB-Konzentrationen (> 200 ng/mg) in Haaren nachweisen konnten. Andererseits gibt es auch Studien die nach wässriger Aufarbeitung ^[194] oder Denaturierung durch Natronlauge ^[183,193] keine oder nur sehr moderate Erhöhungen an GHB-Konzentrationen festgestellt haben. Um die angesprochenen Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen und auszuschließen, dass die unwesentliche Erhöhung der Messwerte in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme nicht bloß auf die verwendete Extraktionsmethode zurückzuführen ist, wurden die zwölf Haarproben der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation, von denen Rückstellproben vorhanden waren, zusätzlich zur basischen Denaturierung erneut mittels methanolischer Ultraschall-Extraktion aufgearbeitet. Für den Vergleich wurden keine Haare von Personen ohne GHB-Aufnahme gewählt, da die Vergleichbarkeit bei höheren Konzentrationen im Haar aussagekräftiger ist als bei endogenen GHB-Spiegeln, von denen viele unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Im direkten Vergleich der einzelnen Haarsträhnen lagen die ermittelten durchschnittlichen GHB-Konzentrationen nach der Ultraschall-Extraktion niedriger als die GHB-Konzentrationen nach basischer Denaturierung. Vergleicht man die Mittelwerte aller analysierten Segmente, lagen die Werte um etwa 14 % niedriger als die mittels Natronlauge extrahierten Segmente. Jede

einzelne Haarsträhne miteinander verglichen lieferte jedoch kein einheitlich niedrigeres Ergebnis wie auch in Abbildung 24 gezeigt ist. Es wurden sowohl Haarsträhnen mit höheren als auch mit niedrigeren Konzentrationen gemessen. Der Anteil lag bei etwa der Hälfte für jedes Szenario. Die Abweichungen betragen ca. 1 ng/mg (10-fach) höheren bis zu etwa 1,8 ng/mg (8,6-fach) niedrigeren Konzentrationen nach der Ultraschall-Extraktion. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den bereits zuvor diskutierten Ergebnissen anderer Studien und sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die ermittelten GHB-Konzentrationen im Haar sehr wahrscheinlich abhängig von der Extraktionsmethode sind, dies jedoch nicht der einzige Faktor sein kann, der das Ergebnis beeinflusst. Die Abweichungen der bei der jeweiligen Analyse mitgelaufenen hohen (2,5 beziehungsweise 5,0 ng/mg) Kontrollproben lagen bei etwa 5 % Erhöhung über dem Sollwert für die Ultraschall-Extraktion und etwa 7 % Erhöhung für die Extraktion durch basische Denaturierung. Bei den niedrigen Kontrollproben (0,25 ng/mg) lagen die Abweichungen für die Extraktion durch basische Denaturierung mit etwa 2 % Erhöhung sogar noch etwas niedriger. Auffällig ist die relativ hohe Abweichung der niedrigen Kontrollproben von fast 40 % nach unten für die Ultraschall-Extraktion. Durch diese Ergebnisse könnten die niedrigeren GHB-Konzentrationen nach Ultraschall-Extraktion relativiert werden. Dagegen spricht jedoch, dass sich die ermittelten Konzentrationen in Realproben eher im Bereich der hohen Kontrollproben befanden, die eine sehr geringe Abweichung zwischen den beiden Aufarbeitungsmethoden aufgewiesen haben.

5.1.5 Messungen zu GHB-Konzentrationen nach Einmalgabe von GHB

Verschiedene Studien untersuchten neben den individuellen endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren bereits auch die Möglichkeit eine einmalige Aufnahme von GHB in den Haaren nachzuweisen. Eine Zusammenfassung der dazu durchgeführten Studien ist in Tabelle 27 gezeigt.

Tabelle 27: In der Literatur bekannte Studien zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach einmaliger Aufnahme von GHB.

Publizierende /Jahr	Aufnahme	GHB-Dosis	Anzahl an Proben	Endogene GHB-Konz. [ng/mg]	GHB-Konz. Nach der Aufnahme [ng/mg]	Aufnahme nachgewiesen
<i>Kintz et al.</i> 2003 ^[18]	DFC freiwillig	unbekannt 25 mg/kg	1 1	~0,5 ~3	~2,5 ~4	Ja (Ja)
<i>Goulle et al.</i> 2003 ^[183]	DFC freiwillig	unbekannt 30,45,45,60 mg/kg	1 1	0,71 0,62	3,1 – 5,3 1,22 – 1,66	Ja Ja
<i>Paul et al.</i> 2011 ^[186]	Freizeitdroge	unbekannt	1	0,1 – 0,3	3,81 – 4,5	Ja

Publizierende /Jahr	Aufnahme	GHB-Dosis	Anzahl an Proben	Endogene GHB-Konz. [ng/mg]	GHB-Konz. Nach der Aufnahme [ng/mg]	Aufnahme nachgewiesen
<i>Hari et al.</i> <i>Schröck et al.</i> 2013 ^[190,199]	freiwillig	27/28 mg/kg	2	~ 0 – 0,3	Keine Veränderung	Nein
<i>Bertol et al.</i> 2015 ^[191]	freiwillig	25 mg/kg	12	0 – 3,21	1,4 – 7,12	Ja
	Freizeitdroge /DFC	unbekannt	2	1,19 – 2,80	3,85 – 6,41	Ja
<i>Busardo et al.</i> 2017 ^[197]	DFC/ Freizeitdroge	2 g	1	0,73	4,3	Ja
<i>Shi et al.</i> 2016 ^[187]	DFC	unbekannt	1	~ 1	4,31	Ja
<i>Mehling et al.</i> 2017 ^[194]	therapeutisch	6 g	1	0,48 – 0,65	Keine Veränderung	Nein

Hari et al. ^[190], *Schröck et al.* ^[199] und *Mehling et al.* ^[194] kamen zu dem Schluss, dass sich eine einmalige Aufnahme nicht in den Haaren nachweisen lässt. Andere Studien dagegen beschrieben signifikante Unterschiede nach freiwilliger oder unfreiwilliger Aufnahme von GHB zwischen analysierten Segmenten, die endogene Werte abbilden sollten und Segmenten, die vom Wachstum im beschriebenen Aufnahmezeitraum liegen sollten. ^[18,183,187,191,197] Betrachtet man die in diesen Studien nachgewiesenen Konzentrationen genauer, fällt jedoch auf, dass sich ein Großteil der ermittelten Werte in einem Bereich befindet, in dem durchaus auch Werte von endogenen GHB-Konzentrationen liegen können (bis zu 3,0 oder sogar 5,0 ng/mg). Selbst innerhalb einer Studie wurden teilweise deutlich höhere endogene Konzentrationen bei derselben Person gemessen. ^[18] Zudem haben zwei der Studien eine erhöhte Konzentration bereits nach etwa einer Woche und lediglich im ersten kopfnahen Segment nachgewiesen. ^[183,186] Dabei stellt sich die Frage, ob das entscheidende Segment bereits nach einer Woche an der Kopfoberfläche angekommen ist und ein Nachweis somit überhaupt möglich war. Zudem wird in einigen Studien die Meinung vertreten, dass im ersten kopfnahen Segment die Werte nicht verwertbar sind, da dort über Schweiß ebenfalls Kontaminationen auftreten können und die dort gemessenen Werte deutlich höher liegen als im Rest des Haares. ^[18,191,213] Eindeutigere Ergebnisse lieferten, abgesehen von der Studie von *Bertol et al.* ^[191], lediglich Studien, in denen es um mögliche Fälle von sexuellem Missbrauch unter dem Einfluss von Betäubungsmitteln ging. In diesen Fällen ist die genaue Dosis an GHB nicht bekannt und liegt eventuell deutlich über den in den Studien mit Freiwilligen verabreichten Dosen, wodurch ein Nachweis wahrscheinlicher werden würde. Ein Unterschied der Studie an Freiwilligen von *Bertol et al.* ^[191] zu den Studien, die nach freiwilliger Aufnahme keine erhöhten GHB-Konzentrationen feststellen konnten, ist die verwendete Waschlösung, die bei *Bertol et*

al. ^[191] lediglich aus Dichlormethan bestand und bei den anderen Studien entweder einen Waschschrift mit Wasser ^[190,194,199] oder Methanol ^[186] enthielten. GHB ist in Dichlormethan im Gegensatz zu Wasser und Methanol nicht löslich, wodurch zwar externe Kontaminationen am Haar schlechter entfernt werden können, ein Auswaschen der Substanz aus dem Haar jedoch vermieden wird. Bisher wurden Auswascheffekte nur an Haarproben mit endogenem GHB-Gehalt getestet. Der Effekt ist dort jedoch vermutlich wesentlich geringer ausgeprägt beziehungsweise kann nicht genau abgeschätzt werden, da bei niedrigeren Konzentrationen oder sogar Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze eine Abnahme unbemerkt bleibt beziehungsweise einen sehr geringen Stellenwert besitzt. Bei Proben nach GHB-Aufnahme könnte dieser Effekt jedoch eine wesentlich bedeutendere Rolle für die anschließend durchgeführte Analytik spielen.

In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls versucht, einmalige GHB-Aufnahmen in Haaren nachzuweisen. Dazu wurden einem freiwilligen Probanden im Abstand von etwa sieben Wochen zweimal etwa 2,5 g GHB-Natriumsalz verabreicht. Obwohl bisher keine Korrelation zwischen eingenommener Dosis und gemessener Konzentration in Haaren beobachtet werden konnte, wurde, auf Grundlage bisheriger Studien, bei Einnahme von etwa 2,5 g GHB mit keinem bis zu einem sehr geringen Effekt auf die GHB-Konzentrationen in Haaren gerechnet. In allen untersuchten Haarproben konnte anschließend, bezogen auf die vor der Einnahme vermessene GHB-Konzentration im Haar, nach der Einnahme kein Anstieg der GHB-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Ab welcher Konzentration man von einem Anstieg und somit einem Nachweis sprechen kann, ist ebenfalls Thema von aktuellen Studien und Diskussionen innerhalb der Fachgesellschaften. Die SoHT gibt aktuell keinen *Cut-off* oder einen prozentualen Anstieg im Vergleich zu anderen Segmenten vor, um von einer Aufnahme von GHB ausgehen zu können. In den Richtlinien des Büros der Vereinten Nationen für Drogen- und Verbrechensbekämpfung (UNDOC) wird für die forensische Analytik von „*Drug Facilitating Sexual Assault and Other Criminal Acts*“ vorgeschlagen, dass die GHB-Konzentration 10-mal so hoch wie die der anderen Segmente liegen muss, um von einer Aufnahme ausgehen zu können.^[232] Bertol et al. dagegen haben, basierend auf einer Studie mit zwölf Freiwilligen, die alle 25 mg/kg GHB eingenommen haben, ein Verhältnis von 4,45:1 nach einem Monat und ein Verhältnis von 3,35:1 nach zwei Monaten vorgeschlagen, um eine (einmalige) Aufnahme eindeutig zu belegen.^[191] Basierend auf den in der Literatur bekannten Fällen scheint das Kriterium eines 10-fach erhöhten Segmentes zu streng,^[233] mit Ausnahme des Berichts von Paul et al. ^[186] erfüllt keiner der beschriebenen Fälle dieses Kriterium. Sinnvoller erscheint es zum Beispiel eine Erhöhung zweier benachbarter Segmente zu berücksichtigen und als Kriterium heranzuziehen.

5.2 GHB-Metaboliten-Analytik

Prinzipiell ist der Nachweis von polaren Metaboliten im Gegensatz zu den häufig unpolaren Muttersubstanzen im Haar zunächst nicht Erfolg versprechend, da polare Substanzen schlechter in das Haar eingelagert werden als unpolare. Dennoch kann im Fall von kleinen, polaren und hydrophilen Molekülen, wie GHB, die Verstoffwechslung unter Umständen dazu führen, dass die gebildeten Metaboliten durch veränderte chemische Eigenschaften oder eine längere Halbwertszeit leichter in die Haarmatrix eingelagert werden.

2,4-DHB, 3,4-DHB, Glycolsäure und GHB-Sulf sind Stoffwechselprodukte bei der Metabolisierung von GHB.^[90,91] Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von GHB und den damit verbundenen häufig falsch negativen Tests nach einer Aufnahme von GHB, wird seit einiger Zeit nach einer Möglichkeit gesucht, das Nachweisfenster von GHB in Blut und Urin deutlich zu verlängern. Dazu wurden bereits verschiedene chemisch-toxikologische oder auch genetisch-molekularbiologische Ansätze verfolgt.^[94,150,194,234] Einer der vielversprechenderen Wege zielt auf den Nachweis von langlebigeren Metaboliten von GHB ab. Da GHB ein sehr kleines Molekül ist und rasch über den Citratzyklus abgebaut wird, gibt es nicht viele Abbauprodukte, die spezifisch für GHB sind. Bei den hier gewählten Metaboliten handelt es sich nach derzeitigem Erkenntnisstand um Stoffwechselprodukte von GHB, die abgesehen von einer endogenen Produktion durch den Metabolismus von GHB, im Falle von 3,4-DHB zum Beispiel auch über die Nahrung aufgenommen werden können.^[235] Ein weiterer Grund für erhöhte 3,4-DHB-, 2,4-DHB- oder Glycolsäure-Konzentrationen können pharmakogenetische Einflüssen durch Krankheiten wie die einleitend bereits erwähnte *Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency* sein, bei der der Stoffwechsel über den Citratzyklus gehemmt ist.^[89] Ein weiteres Beispiel für mögliche Ursachen einer erhöhten Produktion von Glycolsäure ist die Verstoffwechslung nach einer Vergiftung mit Ethylenglykol.^[236] Das bedeutet, eine erhöhte Konzentration dieser Metaboliten deutet nicht zwangsläufig auf eine erhöhte Konzentration an GHB hin, sind die Metaboliten-Konzentrationen nach einer Aufnahme von GHB jedoch erhöht, kann man von einem Zusammenhang ausgehen.

Bereits in den 1980er Jahren konnten *Lee et al.* zeigen, dass durch die Aufnahme von GBL vermehrt 3,4-DHB im Urin ausgeschieden wird.^[90] Zudem konnte von *Brown et al.* und *Shinka et al.* gezeigt werden, dass ein gestörter Abbau von GHB über den Citratzyklus ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration an 2,4-DHB, 3,4-DHB und Glycolsäure im Urin führt.^[91,237] Die bisher bekannten Phase-II-Metaboliten von GHB, GHB-Gluc und GHB-Sulf, wurden erst wesentlich später mit dem Stoffwechsel von GHB in Verbindung gebracht.^[95,97] Aufgrund der generell längeren Halbwertszeiten von Glucuroniden und den noch längeren Halbwertszeiten von sulfatierten Metaboliten wurden auch diese im Hinblick auf ein verlängertes Nachweisfenster von GHB untersucht. Da es bereits Studien zum Nachweis von GHB-Gluc in der Matrix Haar gibt und dort keine erhöhten Substanzkonzentrationen nach GHB-Aufnahme

nachgewiesen werden konnten,^[198] wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich zu 2,4-DHB, 3,4-DHB und Glycolsäure nur GHB-Sulf untersucht.

5.2.1 Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von GHB-Metaboliten in Haaren

Die bei der Methodenentwicklung aufgetretenen Schwierigkeiten sind zum einen durch den endogenen Charakter der Substanzen begründet, wodurch eine Validierung und Kalibration für 2,4-DHB, 3,4-DHB und Glycolsäure nur ohne Matrix möglich war. Zum anderen handelt es sich bei den beiden Dihydroxysäuren um Isomere, die flüssigkeitschromatographisch mit den zunächst getesteten Bedingungen nicht zu trennen waren. Bei der letztendlich verwendeten *Hillic* Säule handelt es sich um eine Phase, welche speziell für die Trennung von hydrophilen Substanzen wie polaren organischen Säuren entwickelt wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Stellung der Hydroxygruppe haben die beiden Dihydroxysäuren eine unterschiedliche Polarität. Der näherungsweise mit der Software *ChemDraw Ultra 10.0* berechnete Verteilungskoeffizient in *n*-Octanol/Wasser (CLogP) ist bei 2,4-DHB höher als bei 3,4-DHB. Passend dazu wurde 2,4-DHB stärker retardiert. Die leicht unterschiedliche Retention war ausreichend, um die Substanzen chromatographisch zu trennen.

Während der Messung traten in einigen Proben vor allem im Zusammenhang mit 3,4-DHB (auch in Leerproben) Störpeaks auf, die eine quantitative Auswertung der Konzentrationen nur eingeschränkt oder überhaupt nicht zuließen. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung wäre die von *Fell et al.* bereits bei Raumtemperatur beschriebene Umwandlung von einigen Zuckern (z. B. Maltose) in 3,4-DHB unter alkalischen Bedingungen.^[235] Diese Umwandlung wäre auch geeignet, die während dieser Arbeit aufgetretenen Störpeaks beziehungsweise den fehlenden Nachweis einiger der Metaboliten nach der Aufarbeitung durch Denaturierung (alkalische Hydrolyse) zu erklären. Die auf ihre Langzeitstabilität überprüften Proben lagen für die niedrigen Kontrollen jeweils in dem geforderten Bereich. Die hohen Stabilitätsproben lagen für alle vier Metaboliten etwas oberhalb des akzeptablen Bereichs.

5.2.2 Messungen zu endogenen GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren

Bereits seit einigen Jahren werden GHB-Metaboliten in Blut- und Urinproben und teilweise auch in Haaren quantitativ untersucht. Dennoch existieren nur sehr wenige Daten in der Literatur zu möglichen endogenen Konzentrationsbereichen. Die dazu bisher in der Literatur bekannten Studien sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Dabei lagen in allen Studien die ermittelten endogenen Konzentrationen von 2,4-DHB niedriger als die von 3,4-DHB und diese wiederum niedriger als die von Glycolsäure. Zu endogenen Konzentrationen der Metaboliten GHB-Gluc und GHB-Sulf gibt es ebenfalls nur sehr wenige Publikationen. Die GHB-Sulf-

Konzentrationen im Urin wären nach diesen in etwa im Bereich der Konzentrationen von 2,4-DHB und 3,4-DHB oder sogar noch darunter einzuordnen. Eine Ausnahme bilden die Messwerte der Studie von *Piper et al.*, bei der die Konzentrationen für GHB-Gluc und GHB-Sulf im Urin deutlich oberhalb der Messwerte der anderen Studien lagen und demnach oberhalb der beiden Metaboliten 2,4-DHB und 3,4-DHB einzuordnen wären.^[94]

Tabelle 28: Studien zu GHB-Metaboliten und deren endogenen Konzentrationen in Blut, Urin und Haaren.

Publizierende /Jahr	Probenanzahl	Matrix	Metabolit	Konzentration
<i>Bouatra et al.</i> 2013 ^[238]	22	Urin	2,4-DHB	0,3 – 1,8 mmol/mol Creatinin
			3,4-DHB	21,9 – 56,1 mmol/mol Creatinin
			Glycolsäure	2,9 – 78,1 mmol/mol Creatinin
<i>Petersen et al.</i> 2013 ^[95]	50	Urin	GHB-Gluc	0,11 – 5 mg/L (Ø 1,3 ± 1,2 mg/L)
<i>Wang et al.</i> 2016 ^[198]	10	Haare	GHB-Gluc	< 0,48 – 1,23 ng/mg
<i>Keyfi et al.</i> 2017 ^[239]	251	Urin	2,4-DHB	< 4 mmol/mol Creatinin
			3,4-DHB	< 7 mmol/mol Creatinin
			Glycolsäure	< 16 mmol/mol Creatinin
<i>Piper et al.</i> 2017 ^[94]	150	Urin	GHB-Gluc	5 – 198 mg/L (Ø 66 mg/L)
			GHB-Sulf	0,09 – 115 mg/L (Ø 41 mg/L)
<i>Mehling et al.</i> 2017 ^[240]	50	Blut	GHB-Gluc	0,011 – 0,067 mg/L
	50	Urin	GHB-Guc	0,16 – 7,1 mg/L
<i>Jarsiah et al.</i> 2020 ^[92]	101	Blut	2,4-DHB	< 0,12 – 1,38 mg/L
			3,4-DHB	< 0,13 – 2,59 mg/L
			Glycolsäure	< 0,03 – 4,92 mg/L
	132	Urin	2,4-DHB	0,72 – 26,2 mg/L (Ø 13 mmol/mol Creatinin)
			3,4-DHB	1,88 – 122 mg/L (Ø 47 mmol/mol Creatinin)
			Glycolsäure	1,3 – 400 mg/L (Ø 104 mmol/mol Creatinin)

Die in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Bestimmung des endogenen Konzentrationsbereichs der GHB-Metaboliten gemessenen 65 Haarproben konnten aufgrund der Probengewinnung nicht segmentweise untersucht werden. Für jede Haarprobe konnte demnach nur ein Wert erhalten werden.

Die im Haar festgestellten Konzentrationen der untersuchten GHB-Metaboliten wiesen, entsprechend den bekannten endogenen Konzentrationen in Blut und Urin, ebenfalls die folgende Konzentrationsverteilung auf: 2,4-DHB < 3,4-DHB < GHB-Sulf < Glycolsäure. Betrachtet man die in der Einleitung in Kapitel 1.4 angesprochenen zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen der Alpha- und Beta-Oxidation, können die erhaltenen Konzentrationen durch diese Abläufe teilweise eingeordnet und interpretiert werden. Die Beta-Oxidation stellt im Normalfall den bevorzugten Weg beim Abbau von geradzahligen, gesättigten Fettsäuren dar. Ist diese Reaktion durch einen Rest am Beta-C-Atom gehemmt, überwiegt stattdessen die Alpha-Oxidation. Liegen keine Gründe gegen den Abbau über die Beta-Oxidation vor, findet die Alpha-Oxidation dennoch zu einem kleinen Teil statt. Demnach sollten beim Abbau der geradzahligen, gesättigten Fettsäure GHB die Konzentrationen an 3,4-DHB im Vergleich zur 2,4-DHB erhöht sein.^[91] Generell gewinnt der Abbau über diese beiden Wege jedoch nur dann an Relevanz, wenn der Abbau über die Oxidation durch GHB-Dehydrogenase und somit über den Citratzyklus gehemmt ist, zum Beispiel aufgrund eines Enzymmangels an Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase.^[91]

Für den Metaboliten 2,4-DHB konnten in dieser Arbeit nur 26 der 65 Proben quantitativ ausgewertet werden. Der Mittelwert lag dabei mit 0,20 ng/mg deutlich unterhalb des für GHB typischen endogenen Bereichs von etwa 1,0 ng/mg. Da es sich bei der Konzentration von 0,20 ng/mg auch um die Bestimmungsgrenze handelt, liegt der tatsächliche Mittelwert vermutlich deutlich niedriger. Für den Metaboliten 3,4-DHB lagen 38 der 65 gemessenen Konzentrationen im quantifizierbaren Bereich und der erhaltene Mittelwert lag mit 0,56 ng/mg in etwa dreimal so hoch wie der Mittelwert für 2,4-DHB. Wobei auch hier aufgrund der hohen Anzahl an Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze mit einem niedrigeren Mittelwert gerechnet werden sollte. Der niedrigere Mittelwert für 2,4-DHB passt zu der Annahme, dass die Beta-Oxidation bei GHB bevorzugt vor der Alpha-Oxidation stattfindet. Die generell eher niedrigen Messwerte passen ebenfalls zu den vermuteten Abläufen während des Metabolismus von GHB, da die Verstoffwechslung über die Oxidation zu den Dihydroxysäuren bei gesunden Menschen nur einen sehr kleinen Teil des GHB-Abbaus ausmachen sollte.

Die Glycolsäure-Konzentrationen von durchschnittlich 4,7 ng/mg lagen deutlich über den ermittelten Konzentrationen der anderen drei GHB-Metaboliten. Glycolsäure entsteht über den Zwischenschritt der 3,4-DHB auch auf dem Weg der Beta-Oxidation und wird weiter umgesetzt zu Oxalsäure. Die deutlich höheren Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Metaboliten könnten, zumindest zum Teil, durch das natürliche Vorkommen von Glycolsäure in verschiedenen Lebensmitteln wie Trauben, Zuckerrüben und Rosmarin begründet sein.

Analog zum Ethanol-Metabolismus wird auch bei der Hydroxycarbonsäure GHB während des Metabolismus ein Sulfat-Addukt gebildet. Wenn der Metabolismus von GHB vergleichbar ist

mit dem von Ethanol, könnte man annehmen, dass weniger als 0,1 Prozent der vorhandenen GHB zu GHB-Sulf metabolisiert werden.^[241] Außerdem wäre dann auch anzunehmen, dass die Konzentrationen von GHB-Gluc und GHB-Sulf vergleichbar wären, beziehungsweise die von GHB-Sulf sogar noch etwas niedriger liegen würden. In Übereinstimmung mit dieser Annahme liegen zum Beispiel die von *Piper et al.* erhaltenen Daten zu GHB-Gluc- und GHB-Sulf-Konzentrationen im Urin, wobei die Spanne der Messwerte innerhalb der Studie sehr groß war.^[94] Mit 1,1 ng/mg lag die durchschnittliche Konzentration an GHB-Sulf in der vorliegenden Arbeit etwa im Bereich der endogenen GHB-Konzentrationen. Vergleicht man die erhaltenen Konzentrationen an GHB-Sulf mit den einzigen in der Literatur bekannten Messwerten zu endogenen Konzentrationen von GHB-Gluc, fällt auf, dass die Werte der hier durchgeführten Studie in etwa im selben Bereich lagen wie die Messwerte von *Wang et al.*^[198] (< 0,48–1,23 ng/mg), wobei entgegen der obigen Vorüberlegung die endogenen Konzentrationen an GHB-Sulf etwas über den GHB-Gluc-Konzentrationen zu liegen scheinen. Dies kann jedoch aufgrund der wenigen Messdaten und der nicht innerhalb einer Studie gewonnenen Daten nicht als aussagekräftige Beobachtung gewertet werden.

Um einen eventuell bestehenden Unterschied der Metaboliten-Konzentrationen in Abhängigkeit der Haarlänge zu diskutieren, wurden die Haare wie bereits erwähnt zusätzlich in zwei Gruppen aufgeteilt (Haarproben von Haaren mit einer Gesamtlänge kürzer als 10 cm und Proben von Haaren länger als 10 cm). Bei Glycolsäure und GHB-Sulf lagen die Konzentrationen von 13 der 15 langen Haarproben unterhalb des jeweiligen Mittelwertes. Bei 2,4-DHB und 3,4-DHB waren es 14 der 15 langen Haarproben, die unterdurchschnittliche Konzentrationen aufwiesen. Für den Metaboliten 2,4-DHB konnte lediglich für eine (7 %) der 15 längeren Haarproben ein Messwert oberhalb der Bestimmungsgrenze erhalten werden, wobei 25 (50 %) der 50 kürzeren Haarproben eine quantifizierbare Konzentration aufwiesen. Für 3,4-DHB lagen die Konzentrationen von drei (20 %) der langen und 35 (70 %) der kurzen Haarproben oberhalb der Bestimmungsgrenze. Für Glycolsäure konnten bei zwölf (80 %) langen und 48 (96 %) kurzen Haarproben Konzentrationen ermittelt werden.

Für GHB-Sulf konnten bei elf der 15 längeren Haarproben (73 %) Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze ermittelt werden, bei den kürzeren Haarproben waren es 40 von 50 Haarproben (80 %). Damit war bei GHB-Sulf im Vergleich zu den anderen untersuchten Metaboliten der Anteil bezüglich langer und kurzer Haare am ähnlichsten. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass sich GHB-Sulf im Vergleich mit den anderen untersuchten Metaboliten weniger stark aus dem Haar auswäscht beziehungsweise in der Haarmatrix stabiler ist. Dies würde durch die Beobachtungen gestützt, dass es sich bei den Haarproben mit den höchsten ermittelten Messwerten für GHB-Sulf um längere Haarproben handelt und kein Trend bei den längeren Haarproben zu niedrigeren Konzentrationen ersichtlich war. Vielmehr erscheinen die Konzentrationen bezogen auf die Haarlänge zufällig verteilt.

5.2.3 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB

Die in dieser Arbeit bereits auf GHB untersuchten Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation wurden nach der Aufarbeitung für den Methodenvergleich (siehe Kapitel 3.4.5 und 4.1.5) eingefroren und anschließend auf die vier im Rahmen dieser Arbeit untersuchten GHB-Metaboliten 2,4-DHB, 3,4-DHB, Glycolsäure und GHB-Sulf analysiert. Dabei standen bereits aufgearbeitete Proben von elf Personen zu Verfügung, die vor der Haarprobenentnahme täglich zwischen 3 und 9 g GHB eingenommen haben.

Es ist nicht auszuschließen, dass die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Messwerte durch die Lagerzeit und den Wechsel des Laufmittels beeinflusst wurden. Die ermittelten Daten sollten daher zurückhaltend interpretiert werden. Zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Metaboliten gibt es in der Literatur bisher wenig Daten zu Konzentrationen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme bei Lebenden. Die bisher in der Literatur verfügbaren Daten zu Konzentrationen der hier untersuchten GHB-Metaboliten und des GHB-Metaboliten GHB-Gluc nach regelmäßiger Aufnahme von GHB sind in Tabelle 29 zusammengefasst. Dabei handelt es sich zum Teil um Daten zu *post mortem* Fällen von Personen, bei denen ein GHB-Missbrauch in der Vergangenheit bekannt war und während der toxikologischen Untersuchungen erhöhte GHB-Konzentrationen festgestellt wurden. Bei den anderen Fällen handelt es sich um Proben von Personen mit regelmäßiger *Xyrem*[®]-Medikation oder im Falle der Studie von *Wang et al.* um Personen, die regelmäßig missbräuchlich GHB konsumieren. Auffällig bei den bisher in der Literatur bekannten Studien ist, dass die Konzentrationen von GHB-Gluc in Haaren bei Personen mit regelmäßiger GHB-Aufnahme mit bis zu 3,1 ng/mg ^[198] deutlich niedriger liegen als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konzentrationen an GHB-Sulf (bis 75 ng/mg). Auch bei dieser Beobachtung ist es nicht auszuschließen, dass die Lagerung und der Wechsel des Lösungsmittels nach der Extraktion einen Einfluss auf die ermittelten Konzentrationen gehabt haben.

Tabelle 29: Studien zu Konzentrationen von GHB-Metaboliten in Blut, Urin und im Haar nach regelmäßiger Aufnahme von GHB.

Publizierende /Jahr	Matrix	Proben-anzahl	Metabolit	Konzentration
<i>Wang et al.</i> 2016 ^[198]	Haare	28 Seg	GHB-Gluc	1,7 – 3,1 ng/mg
<i>Busardo et al.</i> 2017 ^[151]	Urin (<i>post mortem</i>)	3 (1)	GHB-Gluc	Spuren – 0,62 mg/L (0,55 mg/L)
	Haare	10 Seg.	GHB-Gluc	0,32 – 0,86 ng/mg
	Blut	4	GHB-Gluc	nur Spuren
<i>Mehling et al.</i> 2017 ^[194]	Haare gewaschen	16 Seg.	GHB-Gluc	< 0,48 – 1,2 ng/mg
	Haare ungewaschen	20 Seg	GHB-Gluc	< 0,48 – 0,85 ng/mg

Publizierende /Jahr	Matrix	Proben-anzahl	Metabolit	Konzentration
Tittarelli et al. 2017 [242]	Plasma	3	GHB-Gluc	nur Spuren
	Liquor		GHB-Gluc	nur Spuren
Küting et al. 2021 [243]	Plasma	5	2,4-DHB	Bis zu ~ 1 mg/L
			3,4-DHB	Bis zu ~ 8 mg/L
	Urin	5	2,4-DHB	Bis zu ~ 100 mg/L (35 mmol/mol Creatinin)
			3,4-DHB	Bis zu ~ 250 mg/L (100 mmol/mol Creatinin)
			Glycolsäure	Bis zu ~ 200 mg/L (300 mmol/mol Creatinin)

Eine weitere Studie, die Ergebnisse zu Konzentrationen der hier untersuchten Metaboliten nach GHB-Aufnahme liefert, ist die in Tabelle 30 zusammengefasste, von *Jarsiah et al.* 2020 veröffentlichte, Studie zu *postmortalen* Konzentrationen von 2,4-DHB, 3,4-DHB und Glycolsäure im Urin und im Femoralvenenblut bei zu Lebzeiten bekanntem missbräuchlichem GHB-Konsum. GHB-Konzentrationen liegen bekanntermaßen bei *postmortalen* Proben deutlich höher als endogene GHB-Konzentrationen bei Lebenden, es ist daher davon auszugehen, dass auch die Konzentrationen der Metaboliten in *postmortalen* Proben deutlich über den Konzentrationen bei Lebenden liegen können. Die ebenfalls in Tabelle 30 dargestellten und innerhalb der gleichen Studie gewonnen Daten zu *postmortalen* Konzentrationen von Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme legen dies zumindest für Femoralvenenblut nahe. Passend dazu liegen die *postmortalen* Konzentrationen ohne bekannte GHB-Aufnahme ebenfalls in einem Bereich, der in der Studie von *Küting et al.* für Lebende nach regelmäßiger Aufnahme von GHB beschrieben wurde.

Tabelle 30: Studie zu *postmortalen* Konzentrationen von GHB-Metaboliten.

Publizierende /Jahr	Matrix	Probenanzahl	Metabolit	Konzentration
Jarshia et al. 2020 [244]	Femoralvenenblut (<i>post mortem</i>)	103	2,4-DHB	< 0,12 – 3,7 mg/L
			3,4-DHB	< 0,13 – 5,3 mg/L
			Glycolsäure	1,6 – 11,2 mg/L
	Urin (<i>post mortem</i>)	80	2,4-DHB	< 0,12 – 25,3 mg/L
			3,4-DHB	< 0,13 – 54,3 mg/L
			Glycolsäure	4,6 – 121 mg/L
Jarsiah et al. 2020 [244]	Femoralvenenblut (<i>post mortem</i>) nach GHB-Aufnahme	11	2,4-DHB	4,0 – 9,1 mg/L
			3,4-DHB	7,0 – 19,4 mg/L
			Glycolsäure	5,3 – 34,2 mg/L
	Urin (<i>post mortem</i>) nach GHB-Aufnahme	10	2,4-DHB	6,8 – 144 mg/L
			3,4-DHB	10,5 – 665 mg/L
			Glycolsäure	4,8 – 391 mg/L

Die in *postmortalen* Proben gemessenen maximalen und durchschnittlichen Konzentrationen lagen für die Matrix Blut in allen drei Fällen in etwa doppelt so hoch wie die bei Lebenden gemessenen Konzentrationen (Tabelle 28).^[92,244] Für die Matrix Urin konnte diese Beobachtung jedoch nicht gemacht werden, hier lagen die maximalen und auch die durchschnittlichen Konzentrationen der *postmortalen* Proben unter denen der Lebenden. Auch unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse liegen die Konzentrationen nach GHB-Aufnahme in den *postmortalen* Proben deutlich über denen der Personen ohne vermutete GHB-Aufnahme. Dies wiederum legt einen Anstieg der GHB-Metaboliten-Konzentrationen nach GHB-Aufnahme auch bei Lebenden Personen nahe.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Konzentrationen in den Haarproben der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation waren, deckungsgleich mit der Reihenfolge der Metaboliten-Konzentrationen der Haarproben von Personen ohne GHB-Aufnahme ebenfalls bei 2,4-DHB am niedrigsten, gefolgt von 3,4-DHB und GHB-Sulf. Glycolsäure lieferte auch hier mit Abstand die höchsten Konzentrationen.

Betrachtet man die Ergebnisse jeder Person für sich, fällt auf, dass im Gegensatz zu den GHB-Konzentrationen deutlich mehr Messwerte oberhalb des ermittelten endogenen Referenzbereichs lagen und somit als erhöht gelten könnten. Für GHB war das bei lediglich einer (P14) von elf durch methanolische Ultraschall-Extraktion aufgearbeiteten Haarproben und bei vier (P01, P12, P14, P15) der 19 durch basische Denaturierung aufgearbeiteten Haarproben im Durchschnitt der Fall. Bezieht man die Ausreißer in den endogenen Referenzbereich mit ein, lag keine der durchschnittlich gemessenen GHB-Konzentrationen oberhalb dieses Bereichs. Im Gegensatz dazu lagen neun der elf Mittelwerte für Glycolsäure, GHB-Sulf und 3,4-DHB und vier der elf Mittelwerte für 2,4-DHB oberhalb des endogenen Referenzbereichs ohne Ausreißer. In vier der elf Haarsträhnen (P07, P08, P11, P14) konnten für alle vier Metaboliten erhöhte Konzentrationen oberhalb des endogenen Referenzbereichs ermittelt werden. Bei weiteren drei (P06, P10, P12) waren immer noch drei der vier Metaboliten erhöht. In jeder Haarsträhne lag aber mindestens einer der vier Metaboliten oberhalb des endogenen Referenzbereichs ohne Ausreißer.

Betrachtet man bei einer Gegenüberstellung der Messwerte von Haarproben ohne bekannte GHB-Aufnahme und Haarproben von Personen mit regelmäßiger *Xyrem*[®]-Einnahme die Verteilung der Messwerte in Abbildung 47 genauer, fällt auf, dass diese für die Haarproben der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation sehr weit gestreut sind, sich aber für die meisten Metaboliten nur einige der ermittelten Konzentrationen in einem Bereich befinden, der auch für die Haarproben ohne GHB-Aufnahme erreicht wurde (Hinweis: Ein Ausreißer für Glycolsäure in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB bei 230 ng/mg wurde nicht graphisch dargestellt). Lediglich die Ausreißer der endogenen Konzentrationen liegen innerhalb des Interquartilbereichs, also innerhalb der mittleren 50 % der Konzentrationen, die

in Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation ermittelt wurden. Eine Ausnahme bilden die Konzentrationen des Metaboliten 2,4-DHB, hier überschneidet sich der komplette Bereich der endogenen Proben mit dem Interquartilbereich der Narkolepsie-Proben. Im Falle von 3,4-DHB liegt der ermittelte Durchschnittswert aufgrund der hohen Ausreißer außerhalb des Interquartilbereichs. Einige Ausreißer des endogenen Konzentrations-Bereichs von 3,4-DHB liegen sogar oberhalb der Ausreißer der Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation.

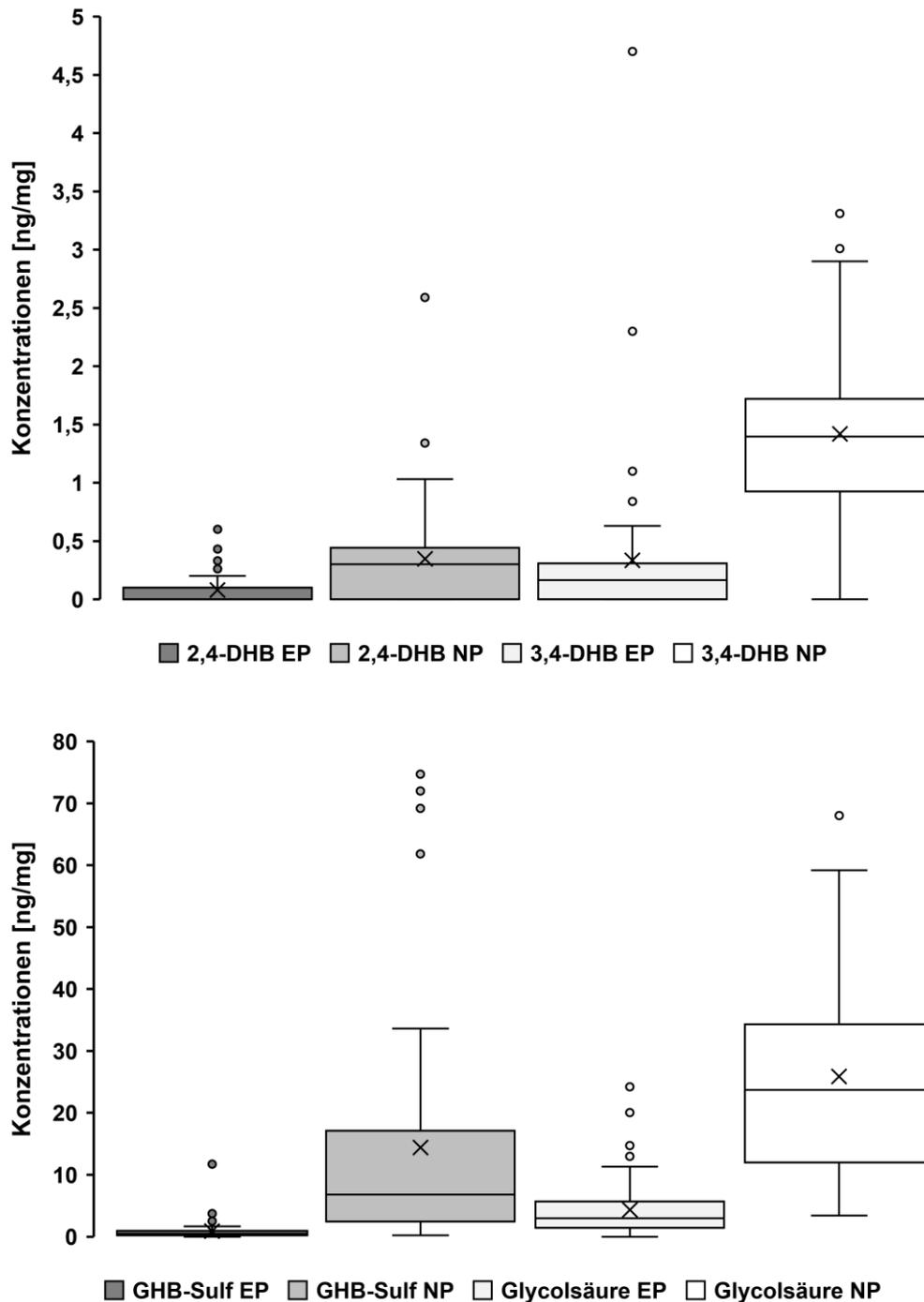


Abbildung 47: Verteilung der Metaboliten-Konzentrationen in Haaren von Personen ohne GHB-Aufnahme (EP) und in Haaren von Personen mit regelmäßiger GHB-Aufnahme (NP). Auftragung der Quartile, Mittelwert, Median und Ausreißer.

Durch die weite Streuung der Messergebnisse wird die Aussagekraft der erhöhten Werte nach regelmäßiger Aufnahme von GHB eingeschränkt, wobei auch in früheren Studien zu GHB-Metaboliten aufgrund einer großen Streuung der ermittelten Konzentrationen die Aussagekraft der Metaboliten-Konzentrationen als eingeschränkt beurteilt wurde.^[94,240]

Nicht auszuschließen ist außerdem auch eine Veränderung der Konzentrationen innerhalb der verlängerten Lagerzeit bei -20 °C, da die Proben im Rahmen des Methodenvergleichs bereits aufgearbeitet und dann gefroren gelagert wurden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Stabilitätstest während einer Lagerung bei -20 °C über einen Monat ergaben zumindest für die niedrigen Kontrollproben eine hohe Stabilität. Bei den hohen Kontrollproben kam es bei allen vier Metaboliten zu etwas stärkeren Abweichungen nach oben, also zu einer Zunahme der Konzentrationen während der Lagerung. Die Konzentrationen der Metaboliten in den Haarproben von Personen mit regelmäßiger Aufnahme von GHB lagen für alle vier Metaboliten im Schnitt eher in dem Bereich der hohen verwendeten Stabilitätsproben. Ein Einfluss der Lagerung auf die erhaltenen Konzentrationen der zuvor gelagerten Proben sollte also in Betracht gezogen werden. *Jasiah et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Metaboliten 2,4-DHB, 3,4-DHB und Glycolsäure bei einer Lagertemperatur von -20 °C in Urin- und Serumproben über einen Monat stabil bleiben.^[92]

Die bereits für GHB durchgeführte Berechnung der Abhängigkeiten zwischen den ermittelten Konzentrationen und der eingenommenen Dosis GHB wurde auch für die vier Metaboliten durchgeführt. Außer GHB-Sulf (nahezu keine Korrelation) zeigen die Metaboliten alle eine schwach negative Korrelation, wobei die Aussagekraft aufgrund der geringen Probenanzahl stark eingeschränkt ist. Die Korrelationskoeffizienten sind $r = 0,03$ für GHB-Sulf, $r = -0,3$ für Glycolsäure, $r = -0,3$ für 3,4-DHB und $r = -0,5$ für 2,4-DHB. Die Korrelationskurven der Metaboliten mit der *Xyrem*[®]-Dosis sind in Abbildung 48 dargestellt. Wodurch diese schwach negative Korrelation begründet sein könnte, bleibt ungeklärt. Aufgrund des komplexen Zusammenhangs und vieler ungeklärter Einflussfaktoren bei der Einlagerung der Substanzen in die Haare, wird die Ursache für diese Beobachtung schwer zu ergründen sein.

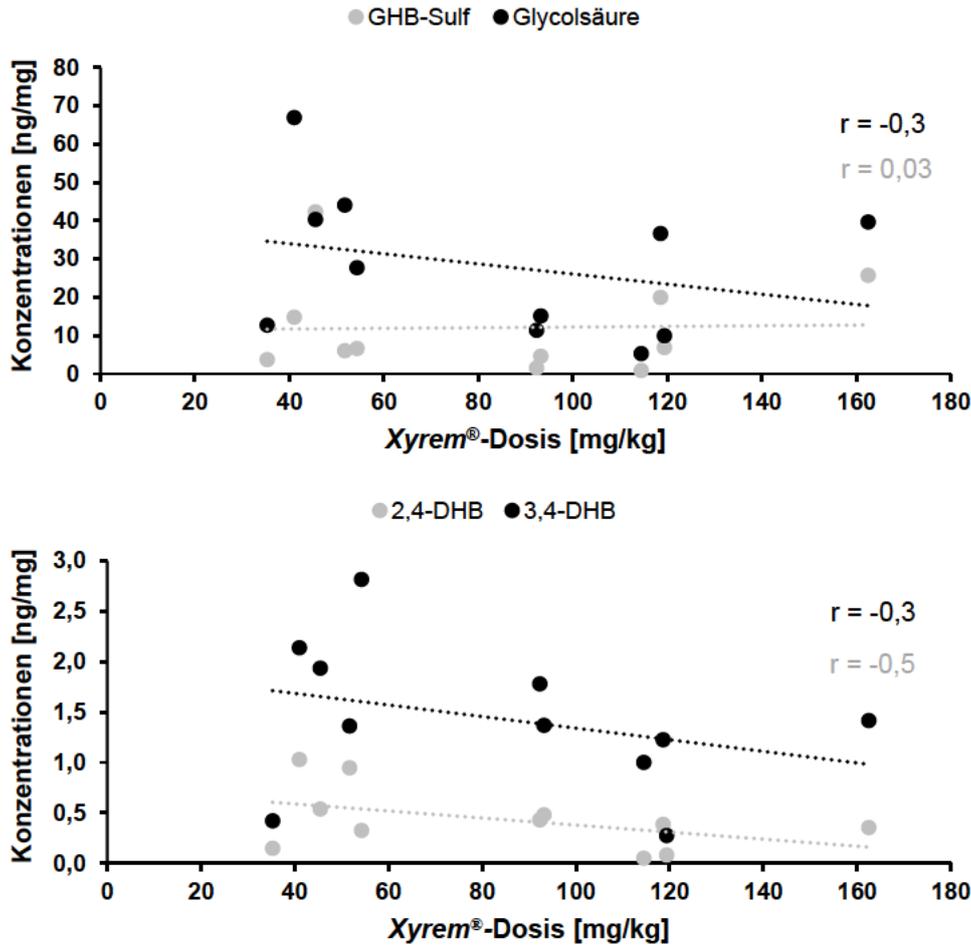


Abbildung 48: Korrelationskurven zwischen den Metaboliten und der eingenommenen Xyrem®-Dosis und zugehörige Korrelationskoeffizienten r .

Ebenfalls interessant ist eine mögliche Abhängigkeit der Konzentrationen der einzelnen Metaboliten voneinander beziehungsweise der Konzentrationen der Metaboliten von der erhaltenen GHB-Konzentration. Anhand von Korrelationskoeffizienten quantifiziert, ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen einigen der Metaboliten-Konzentrationen, wie in Tabelle 31 zu sehen. Besonders hoch sind die Abhängigkeiten zwischen Glycolsäure und den Metaboliten GHB-Sulf und 2,4-DHB. Warum die Korrelation, bei gleichzeitig schwacher Korrelation zur GHB-Konzentration, zwischen Glycolsäure und 2,4-DHB oder GHB-Sulf so hoch ist, lässt sich zunächst nicht erklären. Die Beobachtung legt jedoch nahe, dass, wenn auch keine direkte Beziehung zwischen GHB-Dosis oder gemessener GHB-Konzentration und den Metaboliten-Konzentrationen zu bestehen scheint, eine Verknüpfung zwischen den Metaboliten über den Stoffwechsel besteht.

Tabelle 31: Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Metaboliten von GHB.

	Glycolsäure	GHB-Sulf	2,4-DHB	3,4-DHB	GHB
Glycolsäure	-	0,7	0,6	0,3	0,1
GHB-Sulf	0,7	-	0,3	0,3	< 0,1
2,4-DHB	0,6	0,3	-	0,5	0,2
3,4-DHB	0,3	0,3	0,5	-	< 0,1
GHB	0,1	< 0,1	0,2	< 0,1	-

Diese Abhängigkeit wird auch innerhalb einer Haarsträhne deutlich, da die Konzentration der verschiedenen Metaboliten in den vermessenen Segmenten häufig fast parallel verläuft, wie in Abbildung 49 am Beispiel der Haarsträhne von Person 06 dargestellt. Vor allem die beiden Metaboliten mit höheren Konzentrationen, Glycolsäure und GHB-Sulf, haben einen nahezu deckungsgleichen Verlauf innerhalb des vermessenen 3 cm langen Abschnittes. Diese Beobachtung deckt sich mit dem berechneten Korrelationskoeffizienten von 0,7 und ist besonders hervorzuheben, da diese beiden Metaboliten mit unterschiedlichen Methoden analysiert wurden und das Laufmittel nach der ersten Analyse eingedampft wurde. Ein eventuell störender Effekt durch dieses Vorgehen wird durch die ähnlichen Konzentrationsverläufe unwahrscheinlich.

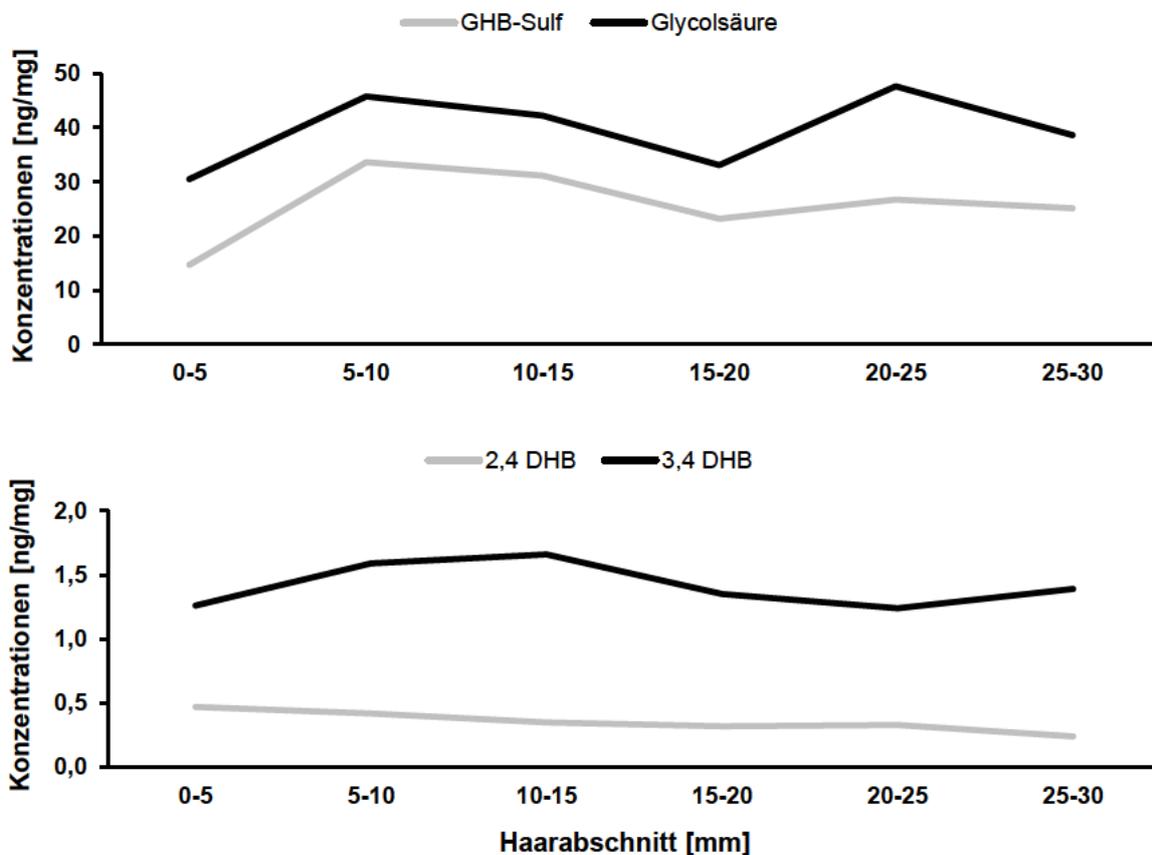


Abbildung 49: Verlauf der Konzentrationen der GHB-Metaboliten entlang einer Haarsträhne am Beispiel von Person 06. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde Glycolsäure mit GHB-Sulf und 2,4-DHB mit 3,4-DHB zusammen dargestellt.

5.2.4 Messungen zu GHB-Metaboliten-Konzentrationen in Haaren nach Einmalgabe von GHB

Die eigentliche Fragestellung bei der Suche nach verlängerten Nachweisfenstern von GHB ist die des möglichen Nachweises einer einmaligen Aufnahme von GHB. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch zwei Haarsträhnen nach einmaliger Aufnahme von jeweils 31,4 mg/kg GHB auf die bereits genannten Metaboliten untersucht. Aufgrund der geringen Probenanzahl und Probenmenge und der daraus resultierenden großen Segmente von mindestens 1 cm Länge, ist die Beurteilbarkeit dieser Ergebnisse jedoch eingeschränkt. Es existieren sehr wenige Vergleichsstudien zu Metaboliten-Konzentrationen nach einmaliger GHB/GBL-Aufnahme. Zu Haaren ist lediglich eine einzige Studie von *Mehling et al.* bekannt, in der Haarproben nach einmaliger Aufnahme von 6 g Na-GHB auf den Metaboliten GHB-Gluc untersucht wurden. Dabei hatten sich die Konzentrationen zwar in allen untersuchten Segmenten in etwa verdoppelt, lagen jedoch immer noch deutlich in dem möglichen endogenen Bereich.^[194] Studien zu anderen Matrices erbrachten sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich eines möglichen Anstiegs der jeweils untersuchten Metaboliten-Konzentrationen. Vor allem in Bezug auf die Phase-II-Metaboliten von GHB besteht eine große Diskrepanz der Ergebnisse, die jedoch durch die sehr geringe Probenanzahl der einzelnen Studien begründet sein könnte. Für die Phase-I-Metaboliten Glycolsäure und 3,4-DHB konnten in allen Studien erhöhte Werte beobachtet werden. Diese werden jedoch immer relativiert durch die starken Schwankungen der endogenen Konzentrationen. Die in der Literatur bisher bekannten Studien zum Nachweis von GHB-Metaboliten nach einmaliger Aufnahme von GHB sind in Tabelle 32 aufgeführt. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit relevanten Metaboliten ist für die Studie von *Steuer et al.* der Metabolit GHB-Carnitin aufgeführt. Dieser wurde im Rahmen der genannten Studie als der vielversprechendste Metabolit angesehen, da er nach Aufnahme von GHB am deutlichsten erhöht war. Eine Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit war jedoch nicht möglich, da diese Substanz nicht zur Verfügung stand.

Tabelle 32: Studien zum Nachweis von GHB-Metaboliten in unterschiedlichen Matrices nach der einmaligen Aufnahme von GHB/GBL. Teilweise wurden in den Studien weitere potentielle Metaboliten untersucht, in der Tabelle aufgelistet sind die für diese Arbeit relevanten Metaboliten.

Publizierende /Jahr	Aufgenommene GHB/GBL-Menge	Matrix	Probenanzahl	Metabolit	Konzentration
<i>Lee et al.</i> 1977 ^[90]	1 g GBL	Urin	4	3,4-DHB	erhöht
				Glycolsäure	erhöht
<i>Mehling et al.</i> 2017 ^[194,240]	6 g Na-GHB	Haare	1	GHB-Gluc	verdoppelt
	2,42 g Na-GHB	Urin	1	GHB-Gluc	(1,34 mg/L vor Aufnahme) ~ 7 mg/L
<i>Piper et al.</i> 2017 ^[94]	2,42 g Na-GHB	Urin	1	GHB-Sulf	10 mal so hoch

Publizierende /Jahr	Aufgenommene GHB/GBL- Menge	Matrix	Probenanzahl	Metabolit	Konzentration
<i>Palomino- Schätzlein et al.</i> 2017 ^[123]	25 mg/kg GHB	Urin	12	Glycolsäure	erhöht
<i>Steuer et al.</i> 2019 ^[245]	50 mg/kg Na-GHB	Urin	20	GHB-Gluc	nicht erhöht
				GHB-Sulf	nicht erhöht
				GHB-Carnitin	erhöht
				Glycolsäure	schwach erhöht

Ein weiterer Ansatz zur Beurteilung von Messergebnissen in Realproben nach vermuteter einmaliger Aufnahme von GHB stellt die Studie von *Jarsiah et al.* dar, in der zunächst aus 17 GHB positiven Fällen (zehn Serumproben und sieben Urinproben) ein Bereich für erhöhte Konzentrationen der Metaboliten 2,4-DHB (Serum: 3,2–14,7 mg/L, Urin: 3,8–319 mg/L), 3,4-DHB (Serum: 5,1–25 mg/L, Urin: 6,3–846 mg/L) und Glycolsäure (Serum: 6,1–30,2, Urin: 19,4–1777 mg/L) bestimmt wurde. Aus diesen Ergebnissen wurde für jeden der drei Metaboliten in Serum und Urin ein Cut-off definiert ab wann eine erhöhte Konzentration vorliegt (2,4-DHB: Serum > 2 mg/L, Urin > 25 mg/L., 3,4-DHB: Serum > 3 mg/L, Urin > 50 mg/L, Glycolsäure: Serum >5 mg/L, Urin > 400 mg/L). Anschließend wurden 40 Fälle, bei denen es im Rahmen von drogenassoziierten Sexualdelikten um eine mögliche Aufnahme von GHB ging, bei denen jedoch kein GHB mehr im Serum oder Urin detektiert werden konnte, auf die Metaboliten untersucht. In sechs Fällen waren alle drei Metaboliten erhöht und lagen in dem vorher bei GHB-positiven Fällen gemessenen Bereich. Bei zwei der Proben lagen alle drei Metaboliten sogar über dem definierten Cut-off und legten eine tatsächlich erfolgte GHB-Aufnahme nahe.^[246] Diese Ergebnisse machen einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn durch die Analyse der Metaboliten auch in Fällen, in denen bereits kein GHB mehr nachgewiesen werden kann, sehr wahrscheinlich.

Die in der vorliegenden Arbeit eine Woche nach der ersten Einnahme für GHB-Sulf und Glycolsäure ermittelten Konzentrationen im ersten kopfnahen Segment lagen im Vergleich zu den zwei kopffernen Segmenten deutlich höher. Zu erwarten wäre in diesem Segment jedoch eigentlich noch keine vermehrt eingelagerte GHB oder dessen Metaboliten, da bei einer Einlagerung über den Blutkreislauf sich die Substanzen zunächst für etwa zwei Wochen nicht in dem sichtbaren und damit hier untersuchten Teil des Haares befinden. Das Haar wächst etwa zwei Wochen unter der Kopfhaut und durch diese hindurch bevor der im Bereich der Haarwurzel gebildete Abschnitt oberhalb der Kopfhaut sichtbar wird. Erhöhte Werte in den kopfnahen Segmenten können jedoch immer auch die Folge einer Einlagerung von außen über Schweiß sein. Betrachtet man jedoch die sechs Wochen nach der ersten Einnahme ermittelten Konzentrationen des ersten Segmentes, welches bei einer Wachstumsrate von

1 cm/Monat etwas von der eingelagerten GHB beziehungsweise deren Metaboliten enthalten müssten, lagen für GHB-Sulf und Glycolsäure die Konzentrationen im Vergleich zu den kopffernerer Segmenten niedriger, für 2,4-DHB und 3,4-DHB jedoch höher. Auch bei den neun Wochen nach der zweiten Einnahme ermittelten Konzentrationen des zweiten Segmentes, welches bei einer Wachstumsrate von 1 cm/Monat etwas von der eingelagerten GHB beziehungsweise deren Metaboliten enthalten müsste, lagen die Konzentrationen für GHB-Sulf und Glycolsäure im Vergleich zu den kopffernerer Segmenten niedriger. Die höchste Konzentration wurde dagegen im kopffernen dritten Segment nachgewiesen. GHB-Sulf und Glycolsäure zeigten einen entgegengesetzten Trend zu GHB, 2,4-DHB und 3,4-DHB. Lagen die Konzentrationen von GHB, 2,4-DHB und 3,4-DHB im Verlauf über die Haarsträhne in einem Segment eher niedriger, waren bei den Metaboliten GHB-Sulf und Glycolsäure im Vergleich mit den anderen Segmenten die Konzentrationen eher höher. Also anders ausgedrückt, wenn die Konzentrationen für GHB, 2,4-DHB und 3,4-DHB anfangen zu sinken, stiegen sie dagegen bei Glycolsäure und GHB-Sulf ab diesem Segment eher an. Auch hier scheint, wie bei den Konzentrationen in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme, eine deutliche Korrelation zwischen den Metaboliten GHB-Sulf und Glycolsäure zu bestehen.

Wenn man die erhöhten Segmente dennoch durch eine vermehrte Einlagerung der Substanzen erklären möchte und nicht durch analysenbedingte Unterschiede während der Aufarbeitung, Lagerung und Messung, wäre eine Erklärung für die Verschiebung zum Beispiel ein schnelleres Haarwachstum von beispielsweise 1,5 cm pro Monat. Unter diesen Voraussetzungen lägen die maximalen Konzentrationen näher an, beziehungsweise in, dem erwarteten Bereich. Es liegen jedoch keine Daten zur Wachstumsgeschwindigkeit der verwendeten Haarprobe vor. Bei der Geschwindigkeit von 1,5 cm pro Monat handelt es sich statistisch gesehen um einen Extremwert.^[160] Eine weitere Erklärung für die Verschiebung der Segmente mit erhöhten Konzentrationen könnte eine maßgebliche Einlagerung über Schweiß sein, wodurch etwa 0,5 cm Versatz entstehen, die daraus resultieren, dass, bei einer Einlagerung über den Blutkreislauf es etwa zwei Wochen dauert, bis die in das Haar eingelagerte Substanz durch Wachstum durch die Haut an der Oberfläche angekommen ist.

Aufgrund der geringen Probenanzahl und der großen Segmentgröße lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen keine eindeutige Entscheidung treffen, ob eine einmalige Aufnahme von GHB über die Metaboliten besser nachweisbar sein könnte. Die Tatsache, dass jedoch zumindest für Glycolsäure und GHB-Sulf ein zum Einnahme-Verlauf passender Trend der gemessenen Konzentrationen beobachtet werden konnte und die unter Umständen entscheidenden Segmente Konzentrationen oberhalb der individuellen endogenen Konzentration und auch oberhalb des ermittelten endogenen Referenzbereichs enthielten, legt einen Zusammenhang mit den erfolgten Aufnahmen von GHB nahe.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Extraktionsverfahren und analytische LC-MS/MS-Methoden entwickelt, um GHB und die GHB-Metaboliten Glycolsäure, 2,4-Dihydroxybuttersäure, 3,4-Dihydroxybuttersäure und GHB-4-Sulfat in Haaren von Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme, in Haaren von Personen nach regelmäßiger Aufnahme von GHB und in Haaren von einer Person nach einmaliger GHB-Aufnahme nachzuweisen. Dabei war eine relativ geringe Probenmenge von 10 mg erforderlich, sodass eine segmentweise Analyse der Haare meistens in 3 bis 5 mm Abschnitten möglich war. Die Methoden wurden nach den Richtlinien der GTFCh (teil)validiert. Die dabei bestimmten Parameter, wie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, Linearität, Genauigkeit und Präzision, eigneten sich für den Nachweis endogener Konzentrationen von GHB und GHB-Metaboliten in Haaren. In Übereinstimmung mit anderen Studien lag der ermittelte Durchschnittswert an endogener GHB in Haaren je nach Probenkollektiv im Bereich von 1 ng/mg. Die individuellen Schwankungen der endogenen GHB-Konzentrationen innerhalb einer segmentiert vermessenen Haarsträhne waren dabei so gering, dass sie kleiner waren als die Impräzision der analytischen Methode. In keiner der untersuchten Haarsträhnen wurde eine punktuell erhöhte GHB-Konzentration nachgewiesen, die fälschlicherweise eine Aufnahme von GHB angezeigt hätte.

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation, die täglich zwischen 3 und 9 g GHB aufgenommen hatten mit den ermittelten Werten der endogenen GHB-Konzentrationen, erhält man einen forensisch nicht relevanten Anstieg der GHB-Konzentrationen im Haar. Mehr als 70 % der gemessenen Werte lagen im Bereich der festgestellten endogenen GHB-Konzentrationen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Studien zu regelmäßiger GHB-Aufnahme insofern, dass die regelmäßige Aufnahme von GHB nicht unbedingt zu erhöhten GHB-Konzentrationen in Haaren führt. In dieser Arbeit konnte weder eine deutliche Korrelation zwischen der gemessenen GHB-Konzentration in Haaren und der eingenommenen Menge GHB festgestellt werden noch zwischen der Dauer der GHB-Einnahme und der ermittelten GHB-Konzentration in Haaren.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Haarproben nach regelmäßiger Einnahme konnte bei einem Freiwilligen auch nach einer einmaligen Aufnahme von etwa 2 g GHB keine Veränderung der Konzentrationen an GHB im Haar festgestellt werden.

Die unterschiedlichen Extraktions- und Waschmethoden beeinflussen mit großer Wahrscheinlichkeit das Ergebnis, sodass ermittelte GHB-Konzentrationen in Haaren zwischen unterschiedlichen Laboren nur schwer zu vergleichen sind und ein Vergleich nur dann sinnvoll erscheint, wenn die gleichen Waschschrte sowie Extraktions- und Validierungsmethoden verwendet wurden.

Die Möglichkeit, eine (regelmäßige) GHB-Aufnahme nachzuweisen, hängt wahrscheinlich von einer Reihe an Faktoren ab, wie zum Beispiel dem individuellen endogenen GHB-Level, der Aufnahmerate von GHB in das Haar aus dem Blutkreislauf oder aus Schweiß, der kosmetischen Haarbehandlung und auch den verwendeten Wasch- und Extraktionsmethoden. Betrachtet man alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu Messungen der GHB-Konzentrationen im Haar, erscheint es plausibel, dass aufgrund der großen Schnittmenge zwischen endogenen GHB-Konzentrationen und Konzentrationen nach Aufnahme von GHB und aufgrund der vielen Einflussgrößen auf die Analytik, eine einzelne Aufnahme von GHB nicht zwangsläufig einen messbaren Unterschied verursacht. Aktuell ist es unmöglich vorherzusagen, in welchem Fall ein Nachweis einer einmaligen Aufnahme von GHB gelingt und wann nicht.

Wie aus den Forschungsergebnissen dieser und anderer Arbeiten hervorgeht und auch in den Richtlinien der SoHT beschrieben, ist somit der alleinige Nachweis von GHB im Haar nicht ausreichend, um eine Aufnahme von GHB zu belegen. Zusätzlich zu einer erhöhten Konzentration im Vergleich mit benachbarten Haarsegmenten ist außerdem die Übereinstimmung mit den zeitlichen Gegebenheiten zu prüfen. Das Segment beziehungsweise die Segmente mit erhöhter GHB-Konzentration sollten dabei ungefähr an der Stelle im Haar liegen, die durch Berechnung auf Grundlage einer Wachstumsgeschwindigkeit von etwa 1 cm pro Monat ermittelt wird. Zusätzlich ist es von Vorteil, die Segmente bei ausreichend Material so kurz zu wählen, dass mehr als ein Segment und somit zwei benachbarte Segmente die erhöhte GHB-Konzentration widerspiegeln würden, um auszuschließen, dass es sich um ein Segment mit zufällig erhöhter GHB-Konzentration handelt. Der Einfluss von einzelnen Segmenten mit zufällig erhöhten GHB-Konzentrationen aufgrund von Messungenauigkeiten ist bisher noch nicht genauer untersucht worden, stellt aber statistisch eine reelle Gefahr dar. Die Alternative zu einem solchen individuellen, segmentvergleichenden Ansatzes stellt die Definition eines allgemeinen *Cut-off* dar, bei der Konzentration, ab der eine zufällige Erhöhung ausreichend unwahrscheinlich ist. Betrachtet man die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, fällt jedoch auf, dass die Festlegung eines solchen *Cut-off*-Wertes wenig praktikabel ist, da selbst bei regelmäßiger Aufnahme von GHB die Konzentrationen im Haar im Vergleich mit den möglichen endogenen Werten oft nicht wesentlich erhöht sind und damit fälschlicherweise als negatives Ergebnis gewertet würden. In der Gesamtschau aller bis heute vorhandenen Studienergebnisse kann zum jetzigen Zeitpunkt kein zuverlässiger allgemeiner *Cut-off* bestimmt werden. Werte oberhalb von 5 ng/mg weisen aber auf eine externe Aufnahme von GHB hin.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist eine Interpretation und Einordnung der eventuell stattgefundenen Geschehnisse allein anhand der GHB-Konzentrationen im Haar, nach derzeitigem Stand der Forschung, nicht empfehlenswert beziehungsweise nicht möglich.

Bezieht man die in dieser Arbeit zusätzlich untersuchten GHB-Metaboliten mit ein, ergibt sich ebenfalls kein eindeutiges Bild. Die ersten Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf keinen direkten Zusammenhang zwischen den ermittelten Metaboliten-Konzentrationen und der im Körper vorhandenen GHB-Menge hin. Die höchsten Messwerte lieferte der Metabolit Glycolsäure. Die deutlichsten Veränderungen zwischen Metaboliten-Konzentrationen in Haarproben von Personen ohne und mit GHB-Aufnahme konnten indes für den Metaboliten GHB-Sulf nachgewiesen werden. Es konnte jedoch bei allen untersuchten Metaboliten eine deutlich größere Streuung der Messwerte als bei GHB beobachtet werden, was eine Interpretation der Ergebnisse schwierig macht. Die Messwerte der Metaboliten-Konzentrationen nach regelmäßiger Einnahme von GHB lagen zwar in allen Fällen deutlich höher als die endogenen Referenzbereiche, einige der endogenen Konzentrationen lagen jedoch aufgrund der großen Streuung ebenfalls in dem Bereich der Konzentrationen nach regelmäßiger Aufnahme. Unter Umständen könnte die Kombination einer Analytik auf GHB und deren Metaboliten zu einem verlässlicheren Befund führen. Für eine bessere Einschätzung des Nutzens einer solchen Analyse sollten aber zunächst Proben von einem größeren Freiwilligenkollektiv zeitgleich auf die Muttersubstanz GHB und ihre Metaboliten untersucht und auch hier der Einfluss einer längeren Lagerzeit und verschiedener Extraktionsmethoden auf die Konzentrationen der Metaboliten überprüft werden.

Zusammengefasst führt die Aufnahme von GHB nicht zwangsläufig zu erhöhten Konzentrationen der GHB-Metaboliten 2,4-DHB, 3,4-DHB, Glycolsäure und GHB-Sulf. Eine erhöhte Konzentration einer dieser Metaboliten kann jedoch, unter Umständen in Kombination mit einer erhöhten Konzentration an GHB und einer passenden Vorgeschichte, ein weiterer Hinweis auf eine tatsächlich erfolgte Aufnahme von GHB sein. Bei gleichzeitig erhöhten Konzentrationen für mehr als einen Metaboliten und GHB in dem passenden Segment wird der Beleg einer solchen Aufnahme dementsprechend wahrscheinlicher.

Die zusätzliche Betrachtung eines oder mehrerer Metaboliten zusätzlich zu GHB könnte also zur besseren Beurteilbarkeit einer möglichen GHB-Aufnahme beitragen. Weitere Metaboliten von GHB könnten dabei ebenfalls eine interessante Rolle spielen, wie beispielsweise der bisher nur wenig untersuchte Metabolit 4-Palmitoyloxy Butyrat (GHB-Pal), der in einer ersten Studie von *Krämer et al.* vielversprechende Ergebnisse lieferte.^[247]

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wird klar, dass eine rechtssichere Analytik auf Grundlage der hier verwendeten Methoden auch in Zukunft nicht möglich sein wird. Die Schwankungen innerhalb der endogenen Konzentrationen, die fehlende Korrelation zwischen eingenommener Dosis GHB und gemessener Konzentration und die bisher ungeklärten hohen GHB-Konzentrationen in länger gelagerten Haarproben machen eine eindeutige Aussage unmöglich und sollten im Hinblick auf eventuelle Fehlinterpretationen auch nicht getätigt werden. Zusätzlich sollte stets beachtet werden, dass selbst beim Vorliegen eines positiven

analytischen Nachweises, dieser allein keine Einschätzung der Intensität der Beeinflussung einer Person zulässt.

Das Thema GHB-Analytik in Haaren wirft auch nach etwa 20 Jahren Forschung immer noch viele Fragen auf und bietet für zukünftige Forschungsarbeiten noch viele neue Ansätze. So wäre es sicherlich sehr interessant, sich dem Phänomen der hohen Werte in den einige Jahre gelagerten Haarproben zu widmen. Dabei könnten, wie auch in Blut- und Urinproben, Bakterien oder auch Pilze möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen. Eine Bakterienkultur mit solchen Rückstellproben als Nährboden könnte eventuell Aufschluss über eine solche Vermutung geben. Eine andere Herangehensweise wäre es, dem bereits in dieser Arbeit verfolgten Versuch der monatlich vermessenen Haarprobe weiter nachzugehen und eine Lagerung von zwei, drei oder sogar mehr Jahren von unterschiedlichen Haarproben zu untersuchen. Außerdem wäre es von Interesse, die erwähnten Rückstellproben zusätzlich auf die hier untersuchten Metaboliten zu analysieren.

Auch die Frage möglicher externer Kontaminationen durch GHB/GBL-haltige Bleich- und Waschmittel könnte in Zukunft Forschungsthema sein.

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit aufgekommene Idee zum einfacheren Nachweis von erhöhten Mengen an GHB wäre der Nachweis über bildgebende Massenspektrometrie (*Mass Spectrometric Imaging*, MSI). Der große Vorteil dieser bereits für andere Substanzen wie Kokain oder Methamphetamin getesteten Methode wäre der Nachweis aus einem einzigen Haar, was eine "Vermischung" mit den GHB-Konzentrationen aus benachbarten Haaren in anderen Wachstumszyklen verhindern würde.^[248,249] Durch den semiquantitativen Charakter der Methode wären zwar keine exakten Konzentrationsbestimmungen möglich, ein Anstieg der GHB-Konzentration wäre aber unter Umständen durchaus sichtbar.

7 Literaturverzeichnis

1. Saytzeff, A. (1874) *Ueber die Reduction des Succinylchlorids*, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 171, 258–290.
2. Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R., Seale, B. (1950) *Free gamma-aminobutyric acid in brain*, *J. Biol. Chem.* 187, 35–39.
3. Roberts, E., Frankel, S. (1950) *Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid*, *J. Biol. Chem.* 187, 55–63.
4. Wingo, W. J., Awapara, J. (1950) *Decarboxylation of L-glutamic acid by brain*, *J. Biol. Chem.* 187, 267–271.
5. Bessman, S. P., Rossen, J., Layne, E. C. (1953) *Gamma-aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain*, *J. Biol. Chem.* 201, 385–391.
6. Roth, R. H., Giarmann, N. J. (1969) *Conversion in vivo of γ -aminobutyric to γ -hydroxybutyric acid in the rat*, *Biochem. Pharmacol.* 18, 247–250.
7. Mamelak, M. (1989) *Gammahydroxybutyrate: An endogenous regulator of energy metabolism*, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13, 187–198.
8. Bessman, S. P., Fishbein, W. N. (1963) *Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite*, *Nature* 200, 1207–1208.
9. Laborit, H. (1964) *Sodium 4-hydroxybutyrate*, *Int. J. Neuropharmacol.* 3, 433–452.
10. Vickers, M. D. (1968) *Gamma hydroxybutyric acid. Clinical pharmacology and current status*, *Proc. R. Soc. Med.* 61, 821–824.
11. Hunter, A. S., Long, W. J., Ryrie, C. G. (1971) *An evaluation of gamma-hydroxybutyric acid in paediatric practice*, *Br. J. Anaesth.* 43, 620–628.
12. Busardo, F., Jones, A. (2015) *GHB pharmacology and toxicology: Acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome*, *Curr. Neuropharmacol.* 13, 47–70.
13. Kam, P. C. A., Yoong, F. F. Y. (1998) *Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug*, *Anaesthesia* 53, 1195–1198.
14. Wood, D. M., Brailsford, A. D., Dargan, P. I. (2011) *Acute toxicity and withdrawal syndromes related to γ -hydroxybutyrate (GHB) and its analogues γ -butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD)*, *Drug Test. Anal.* 3, 417–425.
15. Mamelak, M., Scharf, M. B., Woods, M. (1986) *Treatment of narcolepsy with γ -hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings*, *Sleep* 9, 285–289.
16. Broughton, R., Mamelak, M. (1979) *The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate*, *Can. J. Neurol. Sci.* 6, 1–6.
17. Takahara, J., Yunoki, S., Yakushiji, W., Yamauchi, J., Yamane, Y., Ofuji, T. (1977) *Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44, 1014–1017.
18. Kintz, P., Cirimele, V., Jamey, C., Ludes, B. (2003) *Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault*, *J. Forensic Sci.* 48, 2002209.
19. Stein, M. S. (2003) *Stellungnahme zur nicht geringen Menge von γ -Hydroxybuttersäure*, *Toxichem Krimtech* 70, 87.
20. World Health Organisation, Expert Committee on Drug Dependence (2012) *Gamma-hydroxybutyric acid (GHB). Critical review report*.
21. Gallimberti, L., Gentile, N., Cibin, M., Fadda, F., Canton, G., Ferri, M., Ferrara, S., Gessa, G. L. (1989) *Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome*, *The Lancet* 334, 787–789.

22. Addolorato, G., Balducci, G., Capristo, E., Attilia, M. L., Taggi, F., Gasbarrini, G., Ceccanti, M. (1999) *Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in the treatment of alcohol withdrawal syndrome: A randomized comparative study versus benzodiazepine*, *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* 23, 1596–1604.
23. Fadda, F., Colombo, G., Mosca, E., Gessa, G. L. (1989) *Suppression by gamma-hydroxybutyric acid of ethanol withdrawal syndrome in rats*, *Alcohol Alcohol. (Alcohol and Alcoholism)* 23, 447–451.
24. Gallimberti, L., Cibirin, M., Pagnin, P., Sabbion, R., Pani, P. P., Pirastu, R., Ferrara, S. D., Gessa, G. L. (1993) *Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome*, *Neuropsychopharmacology* 9, 77–81.
25. Centers for Disease Control (1991) *Multistate outbreak of poisonings associated with illicit use of gamma-hydroxybutyrate*, *JAMA* 265, 447.
26. Scharf, M. B., Lai, A. A., Branigan, B., Stover, R., Berkowitz, D. B. (1998) *Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients*, *Sleep* 21, 507–514.
27. Borgen, L. A., Okerholm, R. A., Lai, A., Scharf, M. B. (2004) *The pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution following acute and chronic administration to narcoleptic patients*, *J. Clin. Pharmacol.* 44, 253–257.
28. Centers for Disease Control (1990) *Multistate outbreak of poisonings associated with illicit use of gamma hydroxy butyrate*, *MMWR* 39, 861–863.
29. Department of Justice/Drug Enforcement Administration *Drug Fact Sheet: GHB*. <https://www.dea.gov/factsheets/ghb-gamma-hydroxybutyric-acid>. 20.07.2022.
30. Schwartz, R. H., Milteer, R., LeBeau, M. A. (2000) *Drug-facilitated sexual assault ('date rape')*, *South. Med. J.* 93, 558–561.
31. El Sohly, M. A., Salamone, S. J. (1999) *Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault*, *J. Anal. Toxicol.* 23, 141–146.
32. Hindmarch, I., El Sohly, M., Gambles, J., Salamone, S. (2001) *Forensic urinalysis of drug use in cases of alleged sexual assault*, *J. Clin. Forensic Med.* 8, 197–205.
33. Anderson, L. J., Flynn, A., Pilgrim, J. L. (2017) *A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review*, *J. Forensic Leg. Med.* 47, 46–54.
34. Németh, Z., Kun, B., Demetrovics, Z. (2010) *The involvement of gamma-hydroxybutyrate in reported sexual assaults: a systematic review*, *J. Psychopharmacol.* 24, 1281–1287.
35. Trombley, T. A., Capstick, R. A., Lindsley, C. W. (2019) *DARK classics in chemical neuroscience: Gamma-hydroxybutyrate (GHB)*, *ACS Chem. Neurosci.*
36. Fishbein, W. N., Bessman, S. P. (1964) *Gamma-hydroxybutyrate in mammalian brain. Reversible oxidation by lactic dehydrogenase*, *J. Biol. Chem.* 239, 357–361.
37. Hoffman, P. L., Wermuth, B., Wartburg, J. P. von (1980) *Human brain aldehyde reductases: relationship to succinic semialdehyde reductase and aldose reductase*, *J. Neurochem.* 35, 354–366.
38. Allphin, C. P., DesJardin, M. (2017) *Methods of making a mixture of salts of gamma-hydroxybutyrate* US 9,555,017 B2 United States Patent.
39. Klosa, J. (1983) *Production of nonhygroscopic salts of 4-hydroxybutyric acid* 4,393,236 United States Patent.
40. Brunner, M., Rahn, R. T., Rheude, U., Henkelmann, J. (1999) *Method for producing butyrolactones* WO 99/62895 Patent Cooperation Treaty (PCT).
41. *Chem-R-Us NaGHB Synthesis*. <http://timestream.org/ghb/ghb-r-de.txt>. 20.07.2022.
42. *Archiv des Internetforums the hive*. <https://the-hive.archive.ero.wid.org/>. 20.07.2022.

43. von Seebach, M., Kozhushkov, S. I., Schill, H., Frank, D., Boese, R., Benet-Buchholz, J., Yufit, D. S., Meijere, A. de (2007) *Stereoselective preparation of six diastereomeric quatercyclopropanes from bicyclopropylidene and some derivatives*, *Chemistry* 13, 167–177.
44. Gonzalez-de-Castro, A., Robertson, C. M., Xiao, J. (2014) *Dehydrogenative α -oxygenation of ethers with an iron catalyst*, *J. Am. Chem. Soc.* 136, 8350–8360.
45. Beardsley, P. M., Balster, R. L., Harris, L. S. (1996) *Evaluation of the discriminative stimulus and reinforcing effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB)*, *Psychopharmacology* 127, 315–322.
46. Wong, C. G. T., Chan, K. F. Y., Gibson, K. M., Snead, O. C. (2004) *Gamma-hydroxybutyric acid: neurobiology and toxicology of a recreational drug*, *Toxicol. Rev.* 23, 3–20.
47. Tunnicliff, G. (1992) *Significance of γ -hydroxybutyric acid in the brain*, *Vascul. Pharmacol.* 23, 1027–1034.
48. Cash, C. D. (1994) *Gammahydroxybutyrate: An overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent*, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18, 291–304.
49. Vayer, P., Ehrhardt, J.-D., Gobaille, S., Mandel, P., Maitre, M. (1988) *Gamma hydroxybutyrate distribution and turnover rates in discrete brain regions of the rat*, *Neurochem. Int.* 12, 53–59.
50. Hösli, E., Hösli, L. (1983) *Binding sites for [3 H] γ -hydroxybutyrate on cultured neurones of rat cerebellum and spinal cord*, *Neurosci. Lett.* 42, 145–148.
51. Maitre, M., Hechler, V., Vayer, P., Gobaille, S., Cash, C. D., Schmitt, M., Bourguignon, J. J. (1990) *A specific gamma-hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 657–663.
52. Hechler, V., Gobaille, S., Bourguignon, J. J., Maitre, M. (1991) *Extracellular events induced by gamma-hydroxybutyrate in striatum: a microdialysis study*, *J. Neurochem.* 56, 938–944.
53. Bernasconi, R. (1999) *Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential?*, *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 135–141.
54. Snead, O. C. (2000) *Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor*, *J. Neurochem.* 75, 1986–1996.
55. Nicholson, K. L., Balster, R. L. (2001) *GHB: a new and novel drug of abuse*, *Drug Alcohol Depend.* 63, 1–22.
56. Bay, T., Eghorn, L. F., Klein, A. B., Wellendorph, P. (2014) *GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites*, *Biochem. Pharmacol.* 87, 220–228.
57. Mathivet, P., Bernasconi, R., Barry, J. de, Marescaux, C., Bittiger, H. (1997) *Binding characteristics of γ -hydroxybutyric acid as a weak but selective GABA_B receptor agonist*, *Eur. J. Pharmacol.* 321, 67–75.
58. Oliveto, A., Gentry, W. B., Pruzinsky, R., Gonsai, K., Kosten, T. R., Martell, B., Poling, J. (2010) *Behavioral effects of gamma-hydroxybutyrate in humans*, *Behav. Pharmacol.* 21, 332–342.
59. Snead, O. C., Gibson, K. M. (2005) *Gamma-hydroxybutyric acid*, *New Engl. J. Med.* 352, 2721–2732.
60. Drasbek, K. R., Christensen, J., Jensen, K. (2006) *Gamma-hydroxybutyrate – a drug of abuse*, *Acta. Neurol. Scand.* 114, 145–156.
61. Andresen, H., Aydin, B. E., Mueller, A., Iwersen-Bergmann, S. (2011) *An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results*, *Drug Test. Anal.* 3, 560–568.

62. Gibson, K. M., Hoffmann, G. F., Hodson, A. K., Bottiglieri, T., Jakobs, C. (1998) *4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism*, *Neuropediatrics* 29, 14–22.
63. Mason, P. E., Kerns, W. P. (2002) *Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) intoxication*, *Acad. Emerg. Med.* 9, 730–739.
64. Brailsford, A. D., Cowan, D. A., Kicman, A. T. (2012) *Pharmacokinetic properties of γ -hydroxybutyrate (GHB) in whole blood, serum, and urine*, *J. Anal. Toxicol.* 36, 88–95.
65. Brenneisen, R., Elsohly, M. A., Murphy, T. P., Passarelli, J., Rusmann, S., Salamone, S. J., Watson, D. E. (2004) *Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects*, *J. Anal. Toxicol.* 28, 625–630.
66. Palatini, P., Tedeschi, L., Frison, G., Padrini, R., Zordan, R., Orlando, R., Gallimberti, L., Gessa, G. L., Ferrara, S. D. (1993) *Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45, 353–356.
67. Borgen, L. A., Okerholm, R., Morrison, D., Lai, A. (2003) *The influence of gender and food on the pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution in healthy subjects*, *J. Clin. Pharmacol.* 43, 59–65.
68. Goodwin, A. K., Brown, P. R., Jansen, E. E. W., Jakobs, C., Gibson, K. M., Weerts, E. M. (2009) *Behavioral effects and pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD) in baboons*, *Psychopharmacology* 204, 465–476.
69. Couper, F. J., Marinetti, L. J. (2002) *γ -Hydroxybutyrate (GHB) - Effects on human performance and behavior*, *Forensic Sci. Rev.* 14, 101–121.
70. Zvosec, D. L., Smith, S. W., McCutcheon, J. R., Spillane, J., Hall, B. J., Peacock, E. A. (2001) *Adverse events, including death, associated with the use of 1,4-butanediol*, *New Engl. J. Med.* 344, 87–94.
71. Bhattacharya, I., Boje, K. M. K. (2004) *GHB (gamma-hydroxybutyrate) carrier-mediated transport across the blood-brain barrier*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 92–98.
72. Fieler, E. L., Coleman, D. E., Baselt, R. C. (1998) *γ -Hydroxybutyrate concentrations in pre- and postmortem blood and urine*, *Clin. Chem.* 44, 692.
73. Elian, A. A. (2002) *Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood*, *Forensic Sci. Int.* 128, 120–122.
74. Elliott, S. P. (2003) *Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production*, *Forensic Sci. Int.* 133, 9–16.
75. Kerrigan, S. (2002) *In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples*, *J. Anal. Toxicol.* 26, 571–574.
76. Crookes, C. E., Faulds, M. C., Forrest, A., Galloway, J. H. (2004) *A reference range for endogenous gamma-hydroxybutyrate in urine by gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.* 28, 644–649.
77. Andresen, H., Sprys, N., Schmoltdt, A., Mueller, A., Iwersen-Bergmann, S. (2010) *Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations*, *Forensic Sci. Int.* 200, 93–99.
78. Villain, M., Cirimele, V., Ludes, B., Kintz, P. (2003) *Ultra-rapid procedure to test for γ -hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chrom. B* 792, 83–87.
79. Shima, N., Miki, A., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2005) *Endogenous level and in vitro production of GHB in blood from healthy humans, and the interpretation of GHB levels detected in antemortem blood samples*, *J. Health Sci.* 51, 147–154.
80. Kegler, R., Lehmann, C., Rentsch, D., Blömker, M., Büttner, A. (2018) *Bestimmung von endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren*, *Toxichem Krimtech* 85, 110.

81. Castro, A. L., Dias, M., Reis, F., Teixeira, H. M. (2014) *Gamma-hydroxybutyric acid endogenous production and post-mortem behaviour - the importance of different biological matrices, cut-off reference values, sample collection and storage conditions*, *J. Forensic Leg. Med.* 27, 17–24.
82. Andresen-Streichert, H., Jensen, P., Kietzerow, J., Schrot, M., Wilke, N., Vettorazzi, E., Mueller, A., Iwersen-Bergmann, S. (2015) *Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs*, *Int. J. Leg. Med.* 129, 57–68.
83. Ferrara, S. D., Zotti, S., Tedeschi, L., Frison, G., Castagna, F., Gallimberti, L., Gessa, G. L., Palatini, P. (1992) *Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses*, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34, 231–235.
84. Kaufman, E. E., Nelson, T. (1991) *An overview of gamma-hydroxybutyrate catabolism: the role of the cytosolic NADP⁺-dependent oxidoreductase EC 1.1.1.19 and of a mitochondrial hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase in the initial, rate-limiting step in this pathway*, *Neurochem. Res.* 16, 965–974.
85. Walkenstein, S. S., Wisner, R., Gudmundsen, C., Kimmel, H. (1964) *Metabolism of γ -hydroxybutyric acid*, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 86, 640–642.
86. Möhler, H., Patel, A. J., Balázs (1976) *Gamma-hydroxybutyrate degradation in the brain in vivo: negligible direct conversion to GABA*, *J. Neurochem.* 27, 253–258.
87. Caputo, F., Vignoli, T., Maremmani, I., Bernardi, M., Zoli, G. (2009) *Gamma hydroxybutyric acid (GHB) for the treatment of alcohol dependence: a review*, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 1917–1929.
88. Della Pietra, G., Illiano, G., Capano, V., Rava, R. (1966) *In vivo conversion of gamma-hydroxybutyrate into gamma-aminobutyrate*, *Nature* 210, 733–734.
89. Jakobs, C., Bojasch, M., Mönch, E., Rating, D., Siemes, H., Hanefeld, F. (1981) *Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism*, *Clin. Chim. Acta* 111, 169–178.
90. Lee, C. R. (1977) *Evidence for the β -oxidation of orally administered 4-hydroxybutyrate in humans*, *Biochem. Med.* 17, 284–291.
91. Brown, G. K., Cromby, C. H., Manning, N. J., Pollitt, R. J. (1987) *Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of alpha-oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial beta-oxidation*, *J. Inherit. Metab. Dis.* 10, 367–375.
92. Jarsiah, P., Roehrich, J., Wyczynski, M., Hess, C. (2020) *Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid -validated quantification by GC-MS and description of endogenous concentration ranges*, *Drug Test. Anal.* 12, 1135–1143.
93. Johansen, S. S., Wang, X., Sejer Pedersen, D., Pearl, P. L., Rouillet, J.-B., Ainslie, G. R., Vogel, K. R., Gibson, K. M. (2017) *Gamma-hydroxybutyrate (GHB) content in hair samples correlates negatively with age in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency*, *JIMD Reports* 36, 93–98.
94. Piper, T., Mehling, L.-M., Spottke, A., Heidbreder, A., Young, P., Madea, B., Hess, C., Schänzer, W., Thevis, M. (2017) *Potential of GHB phase-II-metabolites to complement current approaches in GHB post administration detection*, *Forensic Sci. Int.* 279, 157–164.
95. Petersen, I. N., Tortzen, C., Kristensen, J. L., Pedersen, D. S., Breindahl, T. (2013) *Identification of a new metabolite of GHB: Gamma-hydroxybutyric acid glucuronide*, *J. Anal. Toxicol.* 37, 291–297.
96. Nymann Petersen, I., Langgaard Kristensen, J., Tortzen, C., Breindahl, T., Sejer Pedersen, D. (2013) *Synthesis and stability study of a new major metabolite of γ -hydroxybutyric acid*, *Beilstein J. Org. Chem.* 9, 641–646.

97. Hanisch, S., Stachel, N., Skopp, G. (2016) *A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid*, *Int. J. Leg. Med.* 130, 411–414.
98. Bowles, T. M., Sommi, R. W., Amiri, M. (2001) *Successful management of prolonged gamma-hydroxybutyrate and alcohol withdrawal*, *Pharmacotherapy* 21, 254–257.
99. van Sassenbroeck, D. K., Paepe, P. de, Belpaire, F. M., Buylaert, W. A. (2003) *Characterization of the pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between gamma-hydroxybutyrate and ethanol in the rat*, *Toxicol. Sci.* 73, 270–278.
100. Maitre, M. (1997) *The γ -hydroxybutyrate signalling system in brain: Organization and functional implications*, *Prog. Neurobiol.* 51, 337–361.
101. Scrima, L., Hartman, P. G., Johnson, F. H., Thomas, E. E., Hiller, F. C. (1990) *The effects of gamma-hydroxybutyrate on the sleep of narcolepsy patients: a double-blind study*, *Sleep* 13, 479–490.
102. Andresen, H., Stimpfl, T., Sprys, N., Schnitgerhans, T., Müller, A. (2008) *Liquid ecstasy - a significant drug problem*, *Dtsch. Arztebl. Int.* 105, 599–603.
103. Meyer, S., Kleinschmidt, S., Gottschling, S., Gortner, L., Strittmatter, Matthias (2005) *Gamma-hydroxybuttersäure: Neurotransmitter, Sedativum und Droge*, *Wien. Med. Wochenschr.* 155, 315–322.
104. Thai, D., Dyer, J. E., Benowitz, N. L., Haller, C. A. (2006) *Gamma-hydroxybutyrate and ethanol effects and interactions in humans*, *J. Clin. Psychopharmacol.* 26, 524–529.
105. Giarman, N. J., Roth, R. H. (1964) *Differential estimation of gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid in rat blood and brain*, *Science* 145, 583–584.
106. Guidotti, A., Ballotti, P. L. (1970) *Relationship between pharmacological effects and blood and brain levels of gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyrate*, *Biochem. Pharmacol.* 19, 883–894.
107. Doherty, J. D., Snead, O., Roth, R. H. (1975) *A sensitive method for quantitation of γ -hydroxybutyric acid and γ -butyrolactone in brain by electron capture gas chromatography*, *Anal. Biochem.* 69, 268–277.
108. Pol, W., Kleijn, E., Lauw, M. (1975) *Gas chromatographic determination and pharmacokinetics of 4-hydroxybutyrate in dog and mouse*, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 3, 99–113.
109. Ehrhardt, J. D., Vayer, P., Maitre, M. (1988) *A rapid and sensitive method for the determination of gamma-hydroxybutyric acid and trans-gamma-hydroxycrotonic acid in rat brain tissue by gas chromatography/mass spectrometry with negative ion detection*, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 15, 521–524.
110. Gibson, K. M., Aramaki, S., Sweetman, L., Nyhan, W. L., DeVivo, D. C., Hodson, A. K., Jakobs, C. (1990) *Stable isotope dilution analysis of 4-hydroxybutyric acid: an accurate method for quantification in physiological fluids and the prenatal diagnosis of 4-hydroxybutyric aciduria*, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 19, 89–93.
111. McCusker, R. R., Paget-Wilkes, H., Chronister, C. W., Goldberger, B. A. (1999) *Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.* 23, 301–305.
112. Ingels, A.-S. M. E., Wille, S. M. R., Samyn, N., Lambert, W. E., Stove, C. P. (2014) *Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids*, *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3553–3577.
113. Badcock, N., Zotti, R. (1999) *Rapid screening test for gamma-hydroxybutyric acid (GHB, Fantasy) in urine*, *Ther. Drug Monit.* 21, 376.
114. Alston, W. C., Ng, K. (2002) *Rapid colorimetric screening test for γ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine*, *Forensic Sci. Int.* 126, 114–117.
115. Bravo, D. T., Harris, D. O., Parsons, S. M. (2004) *Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB)*, *J. Forensic Sci.* 49, 1–9.

116. Sciotti, M. A., Hasan, L., Scholer, A., Jermann, T. M., Weber, J. M., Gyax, D. (2010) *Development and characterization of an enzymatic method for the rapid determination of gamma hydroxybutyric acid*, *Chimia* 64, 793–798.
117. Hasan, L., Jermann, T. M., Weber, J. M., Abrahamsson, L., Sciotti, M.-A., Böttcher, M., Jöchle, W., Gyax, D., Scholer, A. (2011) *An enzymatic method to determine γ -hydroxybutyric acid in serum and urine*, *Ther. Drug Monit.* 33, 757–765.
118. Grenier, V., Huppé, G., Lamarche, M., Mireault, P. (2012) *Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices*, *J. Anal. Toxicol.* 36, 523–528.
119. Grootveld, M., Algeo, D., Silwood, C. J. L., Blackburn, J. C., Clark, A. D. (2006) *Determination of the illicit drug gamma-hydroxybutyrate (GHB) in human saliva and beverages by ^1H NMR analysis*, *Biofactors* 27, 121–136.
120. Del Signore, A. G., McGregor, M., Cho, B. P. (2005) *^1H NMR analysis of GHB and GBL: Further findings on the interconversion and a preliminary report on the analysis of GHB in serum and urine*, *J. Forensic Sci.* 50, 1–6.
121. Mercer, J., Shakleya, D., Bell, S. (2006) *Applications of ion mobility spectrometry (IMS) to the analysis of gamma-hydroxybutyrate and gamma-hydroxyvalerate in toxicological matrices*, *J. Anal. Toxicol.* 30, 539–544.
122. Gottardo, R., Bortolotti, F., Trettene, M., Paoli, G. de, Tagliaro, F. (2004) *Rapid and direct analysis of γ -hydroxybutyric acid in urine by capillary electrophoresis–electrospray ionization ion-trap mass spectrometry*, *J. Chrom. A* 1051, 207–211.
123. Palomino-Schätzlein, M., Wang, Y., Brailsford, A. D., Parella, T., Cowan, D. A., Legido-Quigley, C., Pérez-Trujillo, M. (2017) *Direct monitoring of exogenous γ -hydroxybutyric acid in body fluids by NMR spectroscopy*, *Anal. Chem.* 89, 8343–8350.
124. LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., Miller, M. L., Burmeister, S. G. (2000) *Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS*, *J. Anal. Toxicol.* 24, 421–428.
125. Forni, S., Pearl, P. L., Gibson, K. M., Yu, Y., Sweetman, L. (2013) *Quantitation of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots: feasibility assessment for newborn screening of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency*, *Mol. Genet. Metab.* 109, 255–259.
126. Rasanen, I., Viinamäki, J., Vuori, E., Ojanperä, I. (2010) *Headspace in-tube extraction gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of hydroxylic methyl-derivatized and volatile organic compounds in blood and urine*, *J. Anal. Toxicol.* 34, 113–121.
127. Adamowicz, P., Kała, M. (2010) *Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry*, *Forensic Sci. Int.* 198, 39–45.
128. Stove, C. (2013) *Quantitation of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots in newborn screening*, *Mol. Genet. Metab.* 110, 195.
129. Wood, M., Laloup, M., Samyn, N., Morris, M. R., Bruijn, E. A. de, Maes, R. A., Young, M. S., Maes, V., Boeck, G. de (2004) *Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chrom. A* 1056, 83–90.
130. Dahl, S. R., Olsen, K. M., Strand, D. H. (2012) *Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB), β -hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and γ -butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS*, *J. Chrom. B* 885-886, 37–42.
131. Johansen, S. S., Windberg, C. N. (2011) *Simultaneous determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) and its analogues (GBL, 1,4-BD, GVL) in whole blood and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.* 35, 8–14.

132. Meyer, M. R., Weber, A. A., Maurer, H. H. (2011) *A validated GC-MS procedure for fast, simple, and cost-effective quantification of glycols and GHB in human plasma and their identification in urine and plasma developed for emergency toxicology*, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 411–414.
133. Ingels, A.-S. M. E., Neels, H., Lambert, W. E., Stove, C. P. (2013) *Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biofluids using a one-step procedure with "in-vial" derivatization and headspace-trap gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chrom. A* 1296, 84–92.
134. Ferrara, S. D., Tedeschi, L., Frison, G., Castagna, F., Gallimberti, L., Giorgetti, R., Gessa, G. L., Palatini, P. (1993) *Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography—mass spectrometry*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 483–487.
135. Abanades, S., Farré, M., Segura, M., Pichini, S., Barral, D., Pacifici, R., Pellegrini, M., Fonseca, F., Langohr, K., La Torre, R. de (2006) *Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074, 559–576.
136. Paul, R., Tsanaclis, L., Kingston, R., Berry, A., Guwy, A. (2006) *GC-MS-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in blood and urine*, *J. Anal. Toxicol.* 30, 375–379.
137. Abanades, S., Farré, M., Segura, M., Pichini, S., Pastor, A., Pacifici, R., Pellegrini, M., La Torre, R. de (2007) *Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring*, *Ther. Drug Monit.* 29, 64–70.
138. Elliott, S., Lowe, P., Symonds, A. (2004) *The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid*, *Forensic Sci. Int.* 139, 183–190.
139. Kankaanpää, A., Liukkonen, R., Ariniemi, K. (2007) *Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its precursors in blood and urine samples: a salting-out approach*, *Forensic Sci. Int.* 170, 133–138.
140. Couper, F. J., Logan, B. K. (2000) *Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.* 24, 1–7.
141. Mazarr-Proo, S., Kerrigan, S. (2005) *Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose*, *J. Anal. Toxicol.* 29, 398–400.
142. Elian, A. A., Hackett, J. (2011) *Anion exchange SPE and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in GHB analysis*, *J. Chrom. B* 879, 3752–3758.
143. Vriendt, C. A. de, van Sassenbroeck, D. K., Rosseel, M. T., van de Velde, E. J., Verstraete, A. G., Vander Heyden, Y., Belpaire, F. M. (2001) *Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of γ -hydroxybutyric acid in rat plasma*, *J. Chrom. B* 752, 85–90.
144. Sørensen, L. K., Hasselstrøm, J. B. (2012) *A hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of γ -hydroxybutyrate and its precursors in forensic whole blood*, *Forensic Sci. Int.* 222, 352–359.
145. Fung, H.-L., Haas, E., Raybon, J., Xu, J., Fung, S.-M. (2004) *Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of endogenous γ -hydroxybutyrate concentrations in rat brain regions and plasma*, *J. Chrom. B* 807, 287–291.
146. Mesmer, M. Z., Duane Satzger, R. (1998) *Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by HPLC/UV-VIS spectrophotometry and HPLC/thermospray mass spectrometry*, *J. Forensic Sci.* 43, 16174J.
147. Gross, J. H. (2013) *Massenspektrometrie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

148. Kaufmann, E., Alt, A. (2007) *Determination of GHB in urine and serum by LC/MS using a simple one-step derivative*, *Forensic Sci. Int.* 168, 133–137.
149. Dziadosz, M. (2015) *γ -Hydroxybutyrate analysis in human serum with liquid chromatography–tandem mass spectrometry on the basis of MS3 mass transition*, *J. Chrom. B* 986–987, 8–11.
150. Mehling, L.-M., Piper, T., Dib, J., Pedersen, D. S., Madea, B., Hess, C., Thevis, M. (2017) *Development and validation of a HPLC–QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine*, *Forensic Toxicol.* 35, 77–85.
151. Busardò, F. P., Kyriakou, C., Marchei, E., Pacifici, R., Pedersen, D. S., Pichini, S. (2017) *Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137, 123–131.
152. Cooper, G. A. A. (2011) *Hair testing is taking root*, *Ann. Clin. Biochem.* 48, 516–530.
153. Harkey, M. R. (1993) *Anatomy and physiology of hair*, *Forensic Sci. Int.* 63, 9–18.
154. Pragst, F., Balikova, M. A. (2006) *State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse*, *Clin. Chim. Acta* 370, 17–49.
155. Henderson, G. L. (1993) *Mechanisms of drug incorporation into hair*, *Forensic Sci. Int.* 63, 19–29.
156. Pötsch, L., Skopp, G., Moeller, M. R. (1997) *Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation*, *Forensic Sci. Int.* 84, 25–35.
157. Kintz, P. (2017) *Hair analysis in forensic toxicology: An updated review with a special focus on pitfalls*, *Curr. Pharm. Des.* 23, 5480–5486.
158. Kintz, P. (2007) *Analytical and practical aspects of drug testing in hair*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton [u.a.].
159. Knörle, R., Schniz, E., Feuerstein, T. J. (1998) *Drug accumulation in melanin: an affinity chromatographic study*, *J. Chrom. B* 714, 171–179.
160. Madea, B. (2004) *Haaranalytik* Technik und Interpretation in Medizin und Recht, Deutscher Ärzteverlag, Köln.
161. Dussy, F., Carson, N., Hangartner, S., Briellmann, T. (2014) *Is one hair lock really representative?*, *Drug Test. Anal.* 6 Suppl 1, 5–8.
162. Tsanaclis, L., Wicks, J. F. C. (2007) *Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample*, *Forensic Sci. Int.* 170, 121–128.
163. Robbins, C. R. (2012) *Chemical and physical behavior of human hair*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
164. Rook, A., Dawber, R. (1991) *Diseases of the hair and scalp*. 2nd ed., Blackwell Scientific, Oxford.
165. Pötsch, L., Moeller, M. R. (1996) *On pathways for small molecules into and out of human hair fibers*, *J. Forensic Sci.* 41, 13907J.
166. Saris, L. A., Brekelmans, G. J., van der Linden, G. J., Rademaker, R. V., Edelbroek, P. M. (1997) *High-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and metabolites in human hair*, *J. Chrom. B* 691, 409–415.
167. Baumgartner, W. A., Hill, V. A., Bland, W. H. (1989) *Hair analysis for drugs of abuse*, *J. Forensic Sci.* 34, 12787J.
168. Pragst, F., Rothe, M., Hunger, J., Thor, S. (1997) *Structural and concentration effects on the deposition of tricyclic antidepressants in human hair*, *Forensic Sci. Int.* 84, 225–236.
169. Dawber, R. (1996) *Hair: Its structure and response to cosmetic preparations*, *Clin. Dermatol.* 14, 105–112.
170. Jurado, C., Kintz, P., Menéndez, M., Repetto, M. (1997) *Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing*, *Int. J. Leg. Med.* 110, 159–163.

171. Skopp, G., Pötsch, L., Moeller, M. R. (1997) *On cosmetically treated hair — aspects and pitfalls of interpretation*, *Forensic Sci. Int.* 84, 43–52.
172. Skopp, G., Pötsch, L., Moeller, M. R. (1997) *Zum Suchtmittelnachweis in Haaren V. Auswirkung von Sonne, Regen und Wind auf den Drogengehalt in Kopfharen von Drogenkonsumenten – ein Pilotprojekt*, *Rechtsmedizin* 7, 176–179.
173. Skopp, G., Pötsch, L., Mauden, M. (2000) *Stability of cannabinoids in hair samples exposed to sunlight*, *Clin. Chem.* 46, 1846–1848.
174. (September 2013) *Urteilsbildung in der Fahreignungsbegutachtung* Beurteilungskriterien. 3rd ed., Kirschbaum Verlag, Bonn.
175. Musshoff, F. (2019) *Aktuelles zur forensisch-toxikologischen Haaranalytik*, *Rechtsmedizin* 29, 137–153.
176. Musshoff, F., Madea, B. (2016) *Forensisch-toxikologische Eignungsuntersuchungen*, *Rechtsmedizin* 26, 149–165.
177. Musshoff, F., Madea, B. (2016) *Forensisch-toxikologische Eignungsuntersuchungen*, *Rechtsmedizin* 26, 237–250.
178. Cooper, G. A., Kronstrand, R., Kintz, P. (1997) *Society of hair testing*, *Forensic Sci. Int.* 84, 3–6.
179. Cooper, G. A., Kronstrand, R., Kintz, P. (2012) *Society of hair testing guidelines for drug testing in hair*, *Forensic Sci. Int.* 218, 20–24.
180. Fritz Pragst (2004) *Pitfalls in hair analysis*, *Toxichem Krimtech* 71, 69.
181. Musshoff, F., Madea, B. (2007) *Analytical pitfalls in hair testing*, *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1475–1494.
182. LeBeau, M. A., Andollo, W., Hearn, W. L., Baselt, R., Cone, E., Finkle, B., Fraser, D., Jenkins, A., Mayer, J., Negrusz, A., Poklis, A., Walls, H. C., Raymon, L., Robertson, M., Saady, J. (1999) *Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults*, *J. Forensic Sci.* 44, 1444–2J.
183. Goullé, J. P., Chèze, M., Pépin, G. (2003) *Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault?*, *J. Anal. Toxicol.* 27, 574–580.
184. Kalasinsky, K. S., Dixon, M. M., Schmunk, G. A., Kish, S. J. (2001) *Blood, brain, and hair GHB concentrations following fatal ingestion*, *J. Forensic Sci.* 46, 1503–2J.
185. Rossi, R., Lancia, M., Gambelunghe, C., Oliva, A., Fucci, N. (2009) *Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault*, *Forensic Sci. Int.* 186, e9–e11.
186. Paul, R., Tsanaclis, L., Kingston, R., Berry, A., Guwy, A. (2011) *Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS*, *Drug Test. Anal.* 3, 201–205.
187. Shi, Y., Cui, X., Shen, M., Xiang, P. (2016) *Quantitative analysis of the endogenous GHB level in the hair of the chinese population using GC/MS/MS*, *J. Forensic Leg. Med.* 39, 10–15.
188. Vaiano, F., Serpelloni, G., Furlanetto, S., Palumbo, D., Mari, F., Fioravanti, A., Bertol, E. (2016) *Determination of endogenous concentration of γ -hydroxybutyric acid (GHB) in hair through an ad hoc GC–MS analysis: A study on a wide population and influence of gender and age*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118, 161–166.
189. Stout, P. A., Simons, K. D., Kerrigan, S. (2010) *Quantitative analysis of gamma-hydroxybutyrate at endogenous concentrations in hair using liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *J. Forensic Sci.* 55, 531–537.
190. Yvonne Hari, Stefan König, Alexandra Schröck, Patrizia Coro, Volker Auwärter, Annette Thierauf, Wolfgang Weinmann (2013) *LC-MS/MS of GHB in head hair and beard*, *Toxichem Krimtech* 80, 224–228.

191. Bertol, E., Mari, F., Vaiano, F., Romano, G., Zaami, S., Baglio, G., Busardò, F. P. (2015) *Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases*, *Drug Test. Anal.* 7, 376–384.
192. Jagerdeo, E., Montgomery, M. A., LeBeau, M. A. (2015) *An improved method for the analysis of GHB in human hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.* 39, 83–88.
193. Bertol, E., Argo, A., Procaccianti, P., Vaiano, F., Di Milia, Maria Grazia, Furlanetto, S., Mari, F. (2012) *Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: Validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70, 518–522.
194. Mehling, L.-M., Wang, X., Johansen, S. S., Spottke, A., Heidbreder, A., Young, P., Madea, B., Hess, C. (2017) *Determination of GHB and GHB- β -O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients—Comparison between single and chronic GHB exposure*, *Forensic Sci. Int.* 278, e8-e13.
195. van Elsué, N., Crunelle, C. L., Verbrugge, C. A., van Baarle, K., Rodrigues, A., Neels, H., Yegles, M. (2018) *Gammahydroxybutyrate in hair of non-GHB and repeated GHB users: A new and optimized method*, *Forensic Sci. Int.* 291, 193–198.
196. Mehling, L.-M., Johansen, S. S., Wang, X., Doberentz, E., Madea, B., Hess, C. (2016) *Drug facilitated sexual assault with lethal outcome: GHB intoxication in a six-year-old girl*, *Forensic Sci. Int.* 259, e25-e31.
197. Busardò, F. P., Vaiano, F., Mannocchi, G., Bertol, E., Zaami, S., Marinelli, E. (2017) *Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault*, *Drug Test. Anal.* 9, 953–956.
198. Wang, X., Linnet, K., Johansen, S. S. (2016) *Development of a UPLC-MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases*, *Forensic Toxicol.* 34, 51–60.
199. Schröck, A., Hari, Y., König, S., Auwärter, V., Schürch, S., Weinmann, W. (2014) *Pharmacokinetics of GHB and detection window in serum and urine after single uptake of a low dose of GBL - an experiment with two volunteers*, *Drug Test. Anal.* 6, 363–366.
200. Da Chagas, A. G. R., Spinelli, E., Souza, T. M., Pinto Junior, J. A., Pereira Netto, A. D. (2019) *Simultaneous determination of alpha-, beta- and gamma-hydroxybutyric acids in micro-pulverized human hair by GC-MS: Method development, validation and application*, *Talanta* 194, 576–584.
201. Del Ramírez Fernández, M. M., Wille, S. M. R., Di Fazio, V., Samyn, N. (2019) *Influence of bleaching and thermal straightening on endogenous GHB concentrations in hair: An in vitro experiment*, *Forensic Sci. Int.* 297, 277–283.
202. Martz, W., Nebel, A., Veit, F. (2019) *Variation of intraindividual levels of endogenous GHB in segmented hair samples*, *Forensic Sci. Int.* 302, 109913.
203. Liu, Y., Fan, Y., Huang, Z., Liu, H., Wang, L., Shen, Z., Watanabe, I. (2020) *Rapid determination of γ -hydroxybutyric acid in human hair by on-line pyrolytic methylation-gas chromatography/mass spectrometry*, *J. Anal. App. Pyrolysis* 151, 104920.
204. Lloyd, E. W., Thomas, J. L., Donnelly, C. C., Montgomery, M. A., Karas, R. P., LeBeau, M. A., Miller, M. L. (2020) *Evaluating endogenous GHB variation in hair with a synthetic hair matrix*, *J. Anal. Toxicol.* 51, 337.
205. Meng, L., Chen, S., Zhu, B., Zhang, J., Mei, Y., Cao, J., Zheng, K. (2020) *Application of dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS/MS for the determination of GHB in beverages and hair*, *J. Chrom. B* 1144, 122058.
206. Castro, A. L., Tarelho, S., Dias, M., Reis, F., Teixeira, H. M. (2016) *Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval*, *Int. J. Leg. Med.* 130, 959–965.

207. McMaster, M. C. (2007) *HPLCA practical user's guide*. 2nd ed., Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
208. AB SCIEX API 4000™ LC/MS/MS System Hardware Manual.
209. Kebarle, P., Tang, L. (1993) *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry*, *Anal. Chem.* 65, 972A-986A.
210. Madah-Amiri, D., Myrmel, L., Brattebø, G. (2017) *Intoxication with GHB/GBL: characteristics and trends from ambulance-attended overdoses*, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 25, 98.
211. DIN 32645:2008-11 *Chemische Analytik- Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen- Begriffe, Verfahren, Auswertung*, Beuth Verlag GmbH, Berlin.
212. Chappell, J. S., Meyn, A. W., Ngim, K. K. (2004) *The extraction and infrared identification of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) from aqueous solutions*, *J. Forensic Sci.* 49, 52–59.
213. Kintz, P. (2016) *A novel approach to document single exposure to GHB: Hair analysis after sweat contamination*, *J. Anal. Toxicol.* 40, 563–564.
214. Nebel, A., Mayer, G., Hess, C., Heidbreder, A., Martz, W., Veit, F. (2021) *Levels of GHB in hair after regular application*, *Forensic Sci. Int.* 325, 110885.
215. Pötsch, L. (1996) *A discourse on human hair fibers and reflections on the conservation of drug molecules*, *Int. J. Leg. Med.* 108, 285–293.
216. Wiedfeld, C., Skopp, G., Kuepper, U., Musshoff, F. (2021) *Application of single hair analysis reveals multiple administration of a drug mixture in a case of drug-facilitated sexual assault of a child*, *Drug Test. Anal.* 13, 1580–1584.
217. Wiedfeld, C., Skopp, G., Musshoff, F. (2021) *Single hair analysis: Validation of a screening method for over 150 analytes and application on documented single-dose cases*, *Drug Test. Anal.* 13, 817–832.
218. Strickland, E. C., Thomas, J. L., Lloyd, E. W., Smith, M. A., LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., Karas, R. P., Peters, E. M., Miller, M. L. (2020) *Endogenous GHB in segmented hair part II: Intra-individual variation for exogenous discrimination*, *J. Anal. Toxicol.* 44, 637–650.
219. Thomas, J. L., Strickland, E. C., Lloyd, E. W., Donnelly, C. C., Rankoth, A., Pieczonka, S. M., Colpoys, C., Smith, M. A., LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., Karas, R. P., Peters, E. M., Miller, M. L. (2020) *Endogenous GHB in segmented hair part I: Inter-individual variation for group comparisons*, *J. Anal. Toxicol.* 44, 628–636.
220. Madea, B., Musshoff, F. (2009) *Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection*, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106, 341–347.
221. Yeatman, D. T., Reid, K. (2003) *A study of urinary endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB) levels*, *J. Anal. Toxicol.* 27, 40–42.
222. Shima, N., Miki, A., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2005) *Urinary endogenous concentrations of GHB and its isomers in healthy humans and diabetics*, *Forensic Sci. Int.* 149, 171–179.
223. Shima, N., Miki, A., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2005) *Endogenous level and in vitro production of GHB in blood from healthy humans, and the interpretation of GHB levels detected in antemortem blood samples*, *J. Health Sci.* 51, 147–154.
224. LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., Morris-Kukoski, C., Schaff, J. E., Deakin, A., Levine, B. (2006) *A comprehensive study on the variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB)*, *J. Anal. Toxicol.* 30, 98–105.
225. Ferrara, S. D., Tedeschi, L., and Frison, G., Eds. (1995) *Endogenous substances in hair*. In: de Zeeuw RA, Al-Hosani I, Al-Munthiri S, Maqbool A, editors. *Proceedings of the 1995 International Conference and Workshop for Hair Analysis in Forensic Toxicology; 1995 Nov 19–23; Abu Dhabi, United Arab Emirates*.

226. Cirimele, V., Baumgartner, M., Vallet, E., Duez, M. (2010) *Interprétation des concentrations de GHB mesurées dans les cheveux*, *Ann. Toxicol. Anal.* 22, 161–164.
227. Terzano, M. G., Rossi, M., Palomba, V., Smerieri, A., Parrino, L. (2003) *New drugs for insomnia: comparative tolerability of zopiclone, zolpidem and zaleplon*, *Drug. Saf.* 26, 261–282.
228. Rosenbaum, S. B., Gupta, V., and Palacios, J. L. (2021) *Ketamin*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470357/>. 20.07.2022.
229. Villain, M., Chèze, M., Tracqui, A., Ludes, B., Kintz, P. (2004) *Windows of detection of zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults*, *Forensic Sci. Int.* 143, 157–161.
230. Xiang, P., Sun, Q., Shen, B., Shen, M. (2011) *Disposition of ketamine and norketamine in hair after a single dose*, *Int. J. Leg. Med.* 125, 831–840.
231. Baselt, R. C., Ed. (2020) *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, Biomedical Publications, Seal Beach California.
232. United Nations Office on Drugs and Crime *Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts*. https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidelines-for-the-forensic-analysis-of-drugs-facilitating-sexual-assault-and-other-criminal-acts_new.html. 20.07.2022.
233. Busardo, F. P., Kyriakou, C. (2014) *GHB in biological specimens: Which cut-off levels should be taken into consideration in forensic toxicological investigation?*, *Recent Pat. Biotechnol.* 8, 206–214.
234. Mehling, L.-M., Spottke, A., Heidbreder, A., Young, P., Madea, B., Hess, C., Courts, C. (2017) *Alterations in gene expression after gamma-hydroxybutyric acid intake-A pilot study*, *Int. J. Leg. Med.* 131, 1261–1270.
235. Fell, V., Lee, C. R., Pollitt, R. J. (1975) *The occurrence of (S)-3,4-dihydroxybutyrate in human blood and urine*, *Biochemical Medicine* 13, 40–45.
236. Wiener, H. L., Richardson, K. E. (1988) *The metabolism and toxicity of ethylene glycol*, *Res. Commun. Subst. Abuse* 9, 77–87.
237. Shinka, T., Inoue, Y., Ohse, M., Ito, A., Ohfu, M., Hirose, S., Kuhara, T. (2002) *Rapid and sensitive detection of urinary 4-hydroxybutyric acid and its related compounds by gas chromatography–mass spectrometry in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency*, *J. Chrom. B* 776, 57–63.
238. Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorn Dahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., Wishart, D. S. (2013) *The human urine metabolome*, *PLoS ONE* 8, e73076.
239. Keyfi, F., Lukacs, Z., Varasteh, A. (2017) *A description of reference ranges for organic acids in urine samples from a pediatric population in Iran*, *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 6, 40–50.
240. Mehling, L.-M., Piper, T., Spottke, A., Heidbreder, A., Young, P., Madea, B., Thevis, M., Hess, C. (2017) *GHB-O-β-glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake*, *Forensic Toxicol.* 35, 263–274.
241. Wurst, F. M., Dresen, S., Allen, J. P., Wiesbeck, G., Graf, M., Weinmann, W. (2006) *Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption*, *Addiction* 101, 204–211.
242. Tittarelli, R., Pichini, S., Pedersen, D. S., Pacifici, R., Moresco, M., Pizza, F., Busardò, F. P., Plazzi, G. (2017) *Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of GHB, GHB-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of narcoleptic patients under sodium oxybate treatment*, *Forensic Sci. Int.* 274, 70–74.

243. Küting, T., Schneider, B., Heidbreder, A., Krämer, M., Jarsiah, P., Madea, B., Hess, C. (2021) *Detection of γ -hydroxybutyric acid-related acids in blood plasma and urine: Extending the detection window of an exogenous γ -hydroxybutyric acid intake?*, *Drug testing and analysis* 13, 1635–1649.
244. Jarsiah, P., Kueting, T., Roehrich, J., Germerott, T., Remane, D., Toennes, S. W., Scholtis, S., Krumbiegel, F., Hess, C. (2020) *GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results*, *Forensic Sci. Int.* 316, 110536.
245. Steuer, A. E., Raeber, J., Steuer, C., Boxler, M. I., Dornbierer, D. A., Bosch, O. G., Quednow, B. B., Seifritz, E., Kraemer, T. (2019) *Identification of new urinary gamma-hydroxybutyric acid markers applying untargeted metabolomics analysis following placebo-controlled administration to humans*, *Drug Test. Anal.* 11, 813–823.
246. Jarsiah, P., Roehrich, J., Kueting, T., Martz, W., Hess, C. (2021) *GHB related acids are useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases*, *Forensic Sci. Int.* 324, 110833.
247. Kraemer, M., Broecker, S., Kueting, T., Madea, B., Maas, A. (2022) *Fatty acid esters as novel metabolites of γ -hydroxybutyric acid: A preliminary investigation*, *Drug Test. Anal.* 14, 690–700.
248. Porta, T., Grivet, C., Kraemer, T., Varesio, E., Hopfgartner, G. (2011) *Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging*, *Anal. Chem.* 83, 4266–4272.
249. Miki, A., Katagi, M., Kamata, T., Zaitso, K., Tatsuno, M., Nakanishi, T., Tsuchihashi, H., Takubo, T., Suzuki, K. (2011) *MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair*, *J. Mass Spectrom.* 46, 411–416.
250. Louagie, H. K., Verstraete, A. G., Soete, C. J. de, Baetens, D. G., Calle, P. A. (1997) *A sudden awakening from a near coma after combined intake of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and ethanol*, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 35, 591–594.
251. Elian, A. A. (2000) *A novel method for GHB detection in urine and its application in drug-facilitated sexual assaults*, *Forensic Sci. Int.* 109, 183–187.
252. Frison, G., Tedeschi, L., Maietti, S., Ferrara, S. D. (2000) *Determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in plasma and urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/positive ion chemical ionization mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2401–2407.
253. Duer, W. C., Byers, K. L., Martin, J. V. (2001) *Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol*, *J. Anal. Toxicol.* 25, 576–582.
254. Pan, Y. M., Gill, G. N., Tilson, C. S., Wall, W. H., McCurdy, H. H. (2001) *Improved procedure for the analysis of gamma-hydroxybutyrate and ethylene glycol in whole blood*, *J. Anal. Toxicol.* 25, 328–332.
255. LeBeau, M. A., Christenson, R. H., Levine, B., Darwin, W. D., Huestis, M. A. (2002) *Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate*, *J. Anal. Toxicol.* 26, 340–346.
256. Chen, M., Andrenyak, D. M., Moody, D. E., Foltz, R. L. (2003) *Stability of plasma gamma-hydroxybutyrate determined by gas chromatography-positive ion chemical ionization-mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.* 27, 445–448.
257. van Hee, P., Neels, H., Doncker, M. de, Vrydags, N., Schatteman, K., Uyttenbroeck, W., Hamers, N., Himpe, D., Lambert, W. E. (2004) *Analysis of gamma-hydroxybutyric acid, DL-lactic acid, glycolic acid, ethylene glycol and other glycols in body fluids by a direct injection gas chromatography-mass spectrometry assay for wide use*, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, 1341–1345.

258. Paoli, G. de, Bell, S. (2008) *A rapid GC-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in saliva*, *J. Anal. Toxicol.* 32, 298–302.
259. Lenz, D., Kröner, L., Rothschild, M. A. (2009) *Determination of gamma-hydroxybutyric acid in serum and urine by headspace solid-phase dynamic extraction combined with gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry*, *J. Chrom. A* 1216, 4090–4096.
260. Ingels, A.-S. M. E., Lambert, W. E., Stove, C. P. (2010) *Determination of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots using a simple GC-MS method with direct "on spot" derivatization*, *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2173–2182.
261. Elie, M. P., Baron, M. G., Birkett, J. W. (2012) *Injection port silylation of γ -hydroxybutyrate and trans-hydroxycrotonic acid: conditions optimisation and characterisation of the di-tert-butyltrimethylsilyl derivatives by GC-MS*, *Analyst* 137, 255–262.
262. Dziadosz, M., Weller, J.-P., Klintschar, M., Teske, J. (2013) *Adduct supported analysis of γ -hydroxybutyrate in human serum with LC-MS/MS*, *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6595–6597.

8 Anhang

Tabelle A1: Übersicht der wichtigsten GC-MS-Methoden seit 1990 zur Bestimmung von GHB aus Körperflüssigkeiten.

Publizierende /Jahr	Matrix (Probenvolumen)	Extraktionsmethode	Nachweis- /Bestimmungsgrenze	Neuerung
<i>Ferrara et al.</i> 1993 ^[134]	Blutplasma (2 mL) und Urin (2 mL)	Umwandlung zu GBL, Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 2 µg/mL	
<i>Louagie et al.</i> 1997 ^[250]	Serum (20 µL)	Präzipitation	LoD: 2 µg/mL	
<i>McCusker et al.</i> 1999 ^[111]	Urin (200 µL)	Festphasenextraktion	Nicht bestimmt (≤ 5 mg/L)	
<i>Couper et al.</i> 2000 ^[140]	Blut und Urin (1 mL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,5 mg/L (Blut und Urin), LoQ 1 mg/L (Blut);	Keine Umwandlung zu GBL nötig
<i>Elian et al.</i> 2000 ^[251]	Urin (50 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion		Keine Umwandlung zu GBL nötig, niedrige Probenmenge
<i>Frison et al.</i> 2000 ^[252]	Plasma und Urin (500 µL)	Umwandlung zu GBL, Festphasenmikroextrak- tion	LoD: 0,05 µg/mL (Plasma), 0,1 µg/mL (Urin)	Niedrige Nachweisgrenze, GC- PICI-MS
<i>LeBeau et al.</i> 2000 ^[124]	Blut und Urin (1 mL)	Teilweise Umwandlung zu GBL, Flüssig- Flüssig-Extraktion	LoD: 0,5 µg/mL	GHB und GBL werden detektiert
<i>Duer et al.</i> 2001 ^[253]	Blut, Urin, Glaskörperflüssigkeit, Gehirn (25 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 2 mg/L, LoQ: 6,5 mg/L	GHB, GBL, 1,4-BD werden detektiert
<i>Pan et al.</i> 2001 ^[254]	Blut und Urin (100 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion, Präzipitation	-	EtG wird detektiert
<i>Elian et al.</i> 2002 ^[73]	Blut und Urin (100 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	-	Endogene Level detektiert
<i>LeBeau et al.</i> 2002 ^[255]	Urin (5 mL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,06 µg/mL, LoQ 0,19 µg/mL	Schwankungen endogener Konzentrationen innerhalb einer Person
<i>Chen et al.</i> 2003 ^[256]	Plasma (100 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LLoQ: 2,5 µg/mL	Stabilität von GHB in Plasmaproben

Publizierende /Jahr	Matrix (Probenvolumen)	Extraktionsmethode	Nachweis- /Bestimmungsgrenze	Neuerung
<i>Brenneisen et al.</i> 2004 [65]	Plasma (500 µL), Urin (2 mL) und Speichel (1 mL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,2 µg/mL (Plasma), 0,1 µg/mL (Urin und Speichel); LoQ: 0,5 µg/mL (Plasma), 0,2 µg/mL (Urin), 0,1 µg/mL (Speichel)	Proben nach Einmalgabe von GHB (25 mg/kg)
<i>Crookes et al.</i> 2004 [76]	Urin (2 mL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,1 mg/L	Endogene Konzentrationen (n=50)
<i>Van hee et al.</i> 2004 [257]	Serum, Plasma und Urin (20 µL)	Keine Extraktion	LoD: 0,95 mg/L, LoQ: 3,15 mg/L	Keine Aufarbeitung nötig, Detektion von verschiedenen Glykolen
<i>Shima et al.</i> 2005 [79]	Blut (200 µL)	Präzipitation	Errechneter LoD: 0,03 µg/mL (scan), 0,03 µg/mL (SIM)	Niedrigere endogene Konzentrationen als bisher (n=24)
<i>Abanades et al.</i> 2006 [135]	Plasma und Urin (100 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoQ: 0,5 µg/mL	Proben nach Gabe von verschiedenen Dosen GHB
<i>Paul et al.</i> 2006 [136]	Blut und Urin (50 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LLoQ: 2,5 µg/mL	
<i>Abanades et al.</i> 2007 [137]	Plasma, Urin, Speichel (100 µL) und Schweiß	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LLoQ: 0,2 µg/mL	Speichel und Schweiß wurden untersucht, Proben nach Gabe von 50 mg/kg Na-GHB
<i>De Paoli et al.</i> 2008 [258]	Speichel (1 µL)	Keine Extraktion	LoD: 0,1 mg/L; LoQ: 0,5 mg/L	
<i>Lenz et al.</i> 2009 [259]	Serum und Urin (500 µL)	Dynamische Festphasenextraktion	LoD: 0,16 µg/mL (Serum); 0,17 µg/mL (Urin)	Ohne Lösungsmittel
<i>Ingels et al.</i> 2010 [260]	Blutstropfen, getrocknet (50 µL)	Keine Extraktion	LoD: 1 µg/mL, LLoQ: 2 µg/mL	“on spot“ Derivatisierung
<i>Meyer et al.</i> 2011 [132]	Plasma und Urin (50 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoQ: 0,05 g/L	Verschiedene Glykole werden detektiert
<i>Elie et al.</i> 2012 [261]	Urin (300 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 0,049 µg/mL; LoQ: 0,162 µg/mL	Derivatisierung direkt bei Injektion
<i>Ingels et al.</i> 2013 [133]	Blut, Serum, Plasma und Urin (100 µL)	Aussalzen	LLoQ: 5 g/mL (Urin), 2 µg/mL (Plasma), 3,5 µg/mL (Blut)	HS-trap GC-MS, Derivatisierung im Vial

Tabelle A2: Übersicht über die wichtigsten LC-MS-Methoden zur Bestimmung von GHB in Körperflüssigkeiten.

Publizierende /Jahr	Matrix (Probenvolumen)	Extraktionsmethode	Nachweis- /Bestimmungsgrenze	Neuerung
Mesmer <i>et al.</i> 1998 ^[146]	Präparierte Flüssigkeiten	-	-	Erste LC-MS- Methode für GHB
De Vriendt <i>et al.</i> 2001 ^[143]	Plasma von Ratten (60 µl)	Festphasenextraktion	LLoQ: 10 µg/mL	Vergleich mit GC- MS-Methode
Fung <i>et al.</i> 2004 ^[145]	Plasma und Gehirn von Ratten (100 µL)	Festphasenextraktion	LoQ: 0,1 µg/mL	Endogene GHB- Konzentrationen
Wood <i>et al.</i> 2004 ^[129]	Urin (250 µL)	Verdünnung	LoQ: 1 mg/L	GBL, 1-4-BD werden detektiert, sehr schnell, LC-MS/MS
Kaufmann <i>et al.</i> 2007 ^[148]	Serum und Urin (250 µL)	Flüssig-Flüssig- Extraktion	LoD: 1,3 µg/mL (Urin), 0,03 µg/mL (Serum); LoQ: 2,4 µg/mL (Urin), 0,6 µg/mL (Serum)	Pauli-Typ Ionenfalle, Vergleich mit GC-MS
Elían <i>et al.</i> 2011 ^[142]	Urin (50 µL)	Festphasenextraktion	LoD: 50 ng/mL; LoQ: 100 ng/mL	Anionenaustauscher- Säule, kleine Probenvolumina
Johansen <i>et al.</i> 2011 ^[131]	Blut (200 mg) und Urin (20 µL)	Präzipitation (Blut), Verdünnung (Urin)	LoD: 0,5 mg/kg (Blut), 0,2 mg/L (Urin); LoQ: 1 mg/kg (Blut), 1 mg/L (Urin)	GBL, 1-4-BD, GVL werden detektiert
Dahl <i>et al.</i> 2012 ^[130]	Blut und Urin (100 µL)	Präzipitation (Blut), Verdünnung (Urin)	LoD: 0,65 µg/mL; LoQ: 1,3 µg/mL	BHB, Pregabalin, 1,4-BD, GBL werden detektiert
Sörensen <i>et al.</i> 2012 ^[144]	Blut	Präzipitation, Filtration	LoD: 0,5 mg/L; LLoQ: < 1 mg/L	GBL, 1,4-BD werden detektiert
Dziadosz <i>et al.</i> 2013 ^[262]	Serum (100 µL)	Präzipitation	LoD/LoQ: 1 µg/mL	Adduktbildung
Forni <i>et al.</i> 2013 ^[125]	Blutstropfen, getrocknet	Flüssig-Flüssig- Extraktion	-	
Dziadosz <i>et al.</i> 2015 ^[149]	Serum (100 µL)	Präzipitation	LoD: 0,28 µg/mL; LoQ: 0,96 µg/mL	Adduktbildung, LC- MS/MS/MS
Busardo <i>et al.</i> 2017 ^[151]	Plasma, Urin und Liquor (20 µL)	Präzipitation	LoD: 0,2 µg/mL; LoQ: 0,5 g/mL	GHB-Gluc, GABA und GBL werden detektiert, Nachweis von chronischem oder akutem Konsum

Tabelle A3: GHB-Konzentrationen für alle segmentiert gemessenen Haarproben von Personen ohne GHB-Aufnahme. Alle Konzentrationen sind in ng/mg angegeben, das Alter in Jahren. Jedes Segment war 3 mm lang.

Alter	Geschlecht	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
46	w	0,69	0,31	0,41	0,40	0,50	0,46	0,56	0,38	0,44	0,51
22	w	0,14	0,10	0,15	0,22	0,20	0,18	0,16	0,23	0,20	0,19
56	w	0,41	0,39	0,39	0,39	0,34	0,39	0,41	0,45	0,43	0,45
20	w	0,25	0,24	0,24	0,20	0,24	0,24	0,25	0,31	0,32	0,21
21	w	0,69	0,83	0,91	0,81	0,88	0,70	0,96	0,67	0,87	0,96
23	w	0,79	0,77	0,74	0,74	0,75	0,76	0,81	0,73	0,81	0,91
21	w	2,0	2,2	1,8	2,0	2,2	2,2	1,8	2,6	2,5	2,4
21	w	0,30	0,40	0,34	0,29	0,20	0,26	0,14	0,18	0,25	0,27
21	w	0,45	0,33	0,56	0,22	0,25	0,37	0,54	0,50	0,58	0,41
20	w	0,55	0,67	0,44	0,59	0,48	0,62	0,54	0,40	0,36	0,48
25	w	0,16	0,26	0,28	0,17	0,28	0,19	0,22	0,12	0,12	0,16
25	w	0,53	0,62	0,58	0,52	0,51	0,52	0,56	0,58	0,63	0,25
22	w	0,19	0,31	0,46	0,58	0,55	0,54	0,61	0,45	0,44	0,5
20	w	1,2	1,2	1,3	0,98	1,3	1,1	0,91	1,1	0,98	0,92
21	w	1,2	1,6	1,4	1,6	1,6	2,1	1,1	1,4	1,2	1,5
20	w	0,35	0,30	0,28	0,45	0,45	0,57	0,50	0,56	0,38	0,64
22	w	0,79	0,90	0,90	1,0	1,2	0,92	1,0	0,95	0,81	1,0
24	w	0,24	0,18	0,21	0,21	0,15	0,22	0,15	0,11	0,14	0,16
21	w	0,29	0,15	0,22	0,20	0,14	0,14	0,23	0,23	0,16	0,15
21	w	0,19	0,23	0,40	0,46	0,29	0,23	0,5	0,25	0,57	0,39
23	w	1,4	1,6	1,6	1,9	2,0	1,9	1,2	2,0	1,1	1,7
21	w	0,62	0,74	0,62	0,61	0,46	0,47	0,48	0,58	0,31	0,74
22	w	0,31	0,38	0,33	0,42	0,21	0,39	0,50	0,29	0,47	0,22
31	w	0,57	0,58	0,42	0,41	0,42	0,46	0,46	0,28	0,31	0,21
37	w	0,14	0,18	0,16	0,11	0,21	0,18	0,25	0,15	0,20	0,26
30	w	0,14	0,23	0,22	0,16	0,15	0,19	0,18	0,19	0,23	0,13
29	w	0,13	0,15	0,18	0,23	0,34	0,22	0,22	0,24	0,16	0,10
24	w	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
26	w	0,19	0,11	0,13	0,15	0,15	0,13	0,16	0,20	0,2	0,23
20	w	0,43	0,32	0,46	0,33	0,43	0,20	0,36	0,29	0,29	0,32
39	w	0,77	0,71	0,66	0,62	0,62	0,69	0,77	0,75	0,80	0,77
47	w	0,51	0,51	0,64	0,72	0,89	0,64	0,62	0,72	0,67	0,61
32	w	1,6	1,9	1,1	1,2	1,3	1,8	1,0	1,0	0,94	1,2
31	w	2,6	2,8	2,7	2,7	2,8	2,2	2,2	2,4	2,5	2,0
59	w	0,27	0,32	0,35	0,34	0,37	0,17	0,25	0,19	0,16	0,35
60	w	0,10	0,26	0,14	0,16	0,20	0,17	0,17	0,13	0,23	0,16
20	w	0,21	0,18	0,14	0,13	0,11	0,13	0,13	0,22	0,20	0,12
27	w	0,24	0,22	0,13	0,20	0,28	0,20	0,22	0,32	0,26	0,11
30	w	0,33	0,49	0,61	0,37	0,23	0,56	0,57	0,62	0,58	0,86

Alter	Geschlecht	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
39	w	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3
26	w	0,47	0,44	0,53	0,20	0,36	0,47	0,35	0,41	0,4	0,37
26	w	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
21	w	2,4	2,6	1,9	1,9	3,4	2,1	2,4	1,7	2,0	0,10
22	w	0,10	0,37	0,58	0,56	0,47	0,32	0,38	0,44	0,52	0,31
25	w	0,93	0,77	0,97	0,10	0,79	0,59	0,90	0,74	1,2	1,0
23	w	0,63	0,73	0,89	0,10	0,80	0,65	0,55	0,51	0,55	0,74
24	w	0,84	0,70	1,1	1,1	1,1	0,10	0,69	0,77	1,1	0,92
21	w	0,43	0,38	0,47	0,21	0,36	0,44	0,33	0,36	0,40	0,40
21	w	0,46	0,27	0,23	0,37	0,35	0,24	0,46	0,55	0,40	0,33
22	w	0,32	0,10	0,29	0,28	0,25	0,10	0,37	0,15	0,35	0,27
25	w	0,56	0,10	0,64	0,64	0,10	0,3	0,47	0,33	0,34	0,37
26	w	0,23	0,15	0,22	0,16	0,17	0,19	0,12	0,17	0,01	0,18
23	w	0,41	0,37	0,53	0,54	0,49	0,27	0,23	0,36	0,18	0,34
24	w	0,31	0,46	0,30	0,26	0,21	0,17	0,35	0,43	0,30	0,44
25	w	0,76	0,31	0,42	0,29	0,42	0,49	0,45	0,23	0,48	0,48
21	w	1,7	2,7	2,5	1,4	1,8	2,0	2,3	0,78	2,6	1,9
52	w	1,6	1,0	1,5	1,2	1,6	1,2	1,5	1,8	1,4	1,3
21	w	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
28	w	0,33	0,39	0,89	0,08	0,82	5,5	4,4	1,2	0,76	1,7
25	w	1,5	1,7	2,7	1,3	2,6	2,0	3,3	1,3	1,3	2,4
33	w	2,0	3,5	1,2	1,2	4,1	0,28	2,0	1,5	2,5	3,2
53	m	0,14	0,59	1,4	0,57	1,0	1,1	2,9	2,9	1,2	0,85
19	m	0,18	1,4	0,72	1,4	0,40	0,62	1,5	0,27	0,67	0,84
55	m	4,3	2,7	4,4	2,0	2,3	3,5	2,3	2,8	2,1	3,3
24	m	2,6	2,3	3,5	2,8	2,2	2,0	2,9	2,0	4,0	3,3
22	m	1,1	3,0	1,9	0,45	0,45	0,89	0,88	1,7	0,66	1,5
59	m	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
22	m	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
32	m	0,15	0,16	0,21	0,17	0,15	0,17	0,12	0,20	0,11	0,10
23	m	1,3	0,76	0,56	0,91	0,56	0,59	0,72	0,79	1,0	0,87
21	m	0,12	0,23	0,24	0,16	0,26	0,44	0,40	0,24	0,20	0,39
50	m	2,4	2,1	2,4	3,0	2,6	2,9	1,2	1,5	2,6	1,0
31	m	0,72	0,66	0,63	0,65	0,75	0,69	0,63	0,63	0,62	0,74
20	m	0,11	0,15	0,21	0,12	0,18	0,17	0,15	0,26	0,23	0,15
21	m	0,42	0,44	0,45	0,40	0,56	0,53	0,46	0,47	0,62	0,41
20	m	0	0,11	0,21	0,40	0,18	0,19	0,14	0,10	0,15	0,12
20	m	0,50	0,64	0,48	0,75	0,59	0,56	0,45	0,49	0,53	0,71
23	m	0,10	0,17	0,28	0,23	0,21	0,18	0,18	0,26	0,40	0,47
21	m	0,33	0,49	0,40	0,70	0,71	0,51	0,54	0,39	0,58	0,47
41	m	0,39	0,31	0,51	0,3	0,47	0,63	0,67	0,76	0,96	0,52
54	m	0,84	0,81	0,94	0,57	0,42	0,62	0,64	0,71	0,69	0,41
34	m	0,15	0,11	0,18	0,12	0,15	0,12	0,16	0,17	0,14	0,15

Alter	Geschlecht	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
58	m	1,4	1,6	0,9	1,1	1,2	1,6	0,80	0,72	1,0	0,85
42	m	1,5	2,1	2,5	1,7	1,0	2,1	1,3	1,5	0,56	1,8
47	m	3,9	3,9	3,1	2,7	1,9	2,0	3,6	2,5	2,8	2,1
34	m	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
27	m	2,2	2,3	0,85	2,3	2,9	2,8	1,6	0,58	1,9	1,2

Tabelle A4: GHB-Konzentrationen für alle Segmente der zwei bis acht Jahre gelagerten Haarproben. Alle Abschnitte sind in mm und die Konzentrationen in ng/mg angegeben. Konzentrationen, die oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzbereichs ohne Ausreißer lagen, wurden mit einem Pfeil (↑) markiert. Konzentrationen, die oberhalb des Referenzbereichs inklusive der Ausreißer lagen, wurden mit zwei Pfeilen (↑↑) markiert.

Probe		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
Lagerdauer											
Nr. 1	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–25	25–30	30–35	35–40		
8 Jahre	Messwert	32	39	41	42	39	45	42	40		
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)		
Nr. 2	Abschnitt	0–3	3–6	6–9	9–12	12–15	15–18	18–21	21–24	24–27	27–30
8 Jahre	Messwert	85	110	100	110	130	100	110	110	98	100
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)
Nr. 3	Abschnitt	0–3	3–6	6–9							
7 Jahre	Messwert	11	9,2	9,5							
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)							
Nr. 4	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–25	25–30	30–35	35–40		
7 Jahre	Messwert	28	21	18	17	18	17	19	22		
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)		
Nr. 5	Abschnitt	0–3	3–6	6–9							
6 Jahre	Messwert	29	23	38							
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)							
Nr. 6	Abschnitt	0–3	3–6	6–9							
5 Jahre	Messwert	49	23	13							
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)							
Nr. 7	Abschnitt	0–3	3–6	6–9							
4 Jahre	Messwert	4,2	4,1	3,1							
		(↑)	(↑)								
Nr. 8	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–25	25–30	30–35	35–40		
3 Jahre	Messwert	11	5,5	3,1	2,4	1,6	1,5	2,4	3,2		
		(↑↑)	(↑)								
Nr. 9	Abschnitt	0–3	3–6	6–9							
3 Jahre	Messwert	4,8	4,6	4,6							
		(↑)	(↑)	(↑)							
Nr. 10	Abschnitt	0–3	3–6	6–9							
2 Jahre	Messwert	32	18	12							
		(↑↑)	(↑↑)	(↑↑)							

Tabelle A5: GHB-Konzentrationen für alle Segmente der Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation nach Denaturierung. Alle Abschnitte sind in mm und die Konzentrationen in ng/mg angegeben. Konzentrationen, die oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzbereichs ohne Ausreißer lagen, wurden mit einem Pfeil (↑) markiert. Konzentrationen, die oberhalb des Referenzbereichs inklusive der Ausreißer lagen, wurden mit zwei Pfeilen (↑↑) markiert.

Nummer		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
P01	Abschnitt	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60				
	Messwert	2,3	3,5 (↑)	5,1 (↑)	4,9 (↑)	6,2 (↑)	8,4 (↑↑)				
P02	Abschnitt	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	40-45	45-50
	Messwert	3,3 (↑)	3,0	1,6	1,7	2,2	2,5	2,2	2,8	2,1	2,3
P03	Abschnitt	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30
	Messwert	1,1	0,93	0,89	1,0	0,55	0,78	0,69	0,88	0,83	0,72
P04	Abschnitt	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30
	Messwert	0,35	0,58	1,2	0,26	0,28	0,24	0,60	0,87	0,53	1,9
P05	Abschnitt	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30
	Messwert	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
P06	Abschnitt	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30				
	Messwert	1,9	2,1	2,5	3,0	2,6	2,9				
P07	Abschnitt	0-7	7-12	12-17	17-22	22-27	27-32	32-42	42-52	52-62	
	Messwert	0,98	0,25	0,26	0,26	0,43	1,1	2,0	2,5	2,5	
P08	Abschnitt	0-10	10-30								
	Messwert	3,4 (↑)	1,1								
P09	Abschnitt	0-10	10-30	30-50	50-80	80-150					
	Messwert	0,83	1,2	1,3	0,91	0,92					
P10	Abschnitt	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-40	40-50	50-60	
	Messwert	0,31	0,34	0,23	0,62	0,21	0,88	0,75	0,77	0,94	
P11	Abschnitt	0-3	3-6	6-10	10-15	15-20	20-25	25-30			
	Messwert	2,4	2,0	2,5	2,3	2,0	1,4	2,5			
P12	Abschnitt	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30				
	Messwert	8,1 (↑↑)	3,7 (↑)	4,0 (↑)	3,1	4,0 (↑)	3,0				
P13	Abschnitt	0-10									
	Messwert	1,7									
P14	Abschnitt	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	8-21	21-24	24-27	27-30
	Messwert	3,6 (↑)	2,3	3,4 (↑)	5,0 (↑)	3,5 (↑)	3,1	2,9	3,4 (↑)	3,4 (↑)	5,0 (↑)
P15	Abschnitt	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30
	Messwert	1,8	2,3	4,6 (↑)	12	6,1 (↑)	4,0 (↑)	2,8	2,5	2,0	2,0
P16	Abschnitt	0-30	30-60	60-90							
	Messwert	1,4	1,1	1,0							
P17	Abschnitt	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50					
	Messwert	0,26	0,82	1,3	0,10	0,37					
P18	Abschnitt	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30
	Messwert	0,58	0,81	1,0	1,0	0,74	0,60	0,58	0,48	1,2	0,35
P19	Abschnitt	0-5	5-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60			
	Messwert	0,67	0,84	0,69	0,95	0,96	1,4	1,3			

Tabelle A6: GHB-Konzentrationen für alle Segmente der Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation nach Aufarbeitung durch Ultraschall. Alle Abschnitte sind in mm und die Konzentrationen in ng/mg angegeben. Konzentrationen, die oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzbereichs ohne Ausreißer lagen, wurden mit einem Pfeil (↑) markiert.

Nummer		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
P05	Abschnitt	0–3	3–6	6–9	9–12	12–15	15–18	18–21	21–24	24–27	27–30
	Messwert	3,2	0,70	0,50	0,60	0,6	0,70	0,90	1,1	1,1	0,90
P06	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–25	25–30				
	Messwert	1,9	2,1	2,5	3,0	2,6	2,9				
P07	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–30	30–40	40–50	50–60		
	Messwert	–	1,0	1,1	1,2	1,2	1,1	1,0	0,8		
P08	Abschnitt	0–20									
	Messwert	0,51									
P10	Abschnitt	0–10	10–25	25–40	40–55	55–70					
	Messwert	0,17	0,13	0,21	0,21	0,13					
P11	Abschnitt	0–6	6–10	10–20	20–30						
	Messwert	0,23	0,24	0,17	0,56						
P12	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–25					
	Messwert	2,9	1,9	1,7	2,1	1,8					
P14	Abschnitt	0–5	5–10	10–15	15–20	20–30	30–55				
	Messwert	4,4 (↑)	4,8 (↑)	3,9 (↑)	4,2 (↑)	3,4 (↑)	2,3				
P15	Abschnitt	0–5	5–15	15–25	25–35	35–55					
	Messwert	0,57	0,93	2,5	1,1	1,5					
P16	Abschnitt	0–20	2–40								
	Messwert	1,2	1,5								
P18	Abschnitt	0–5	5–15	15–25	25–35	35–65					
	Messwert	2,0	2,3	1,8	1,8	0,8					
P19	Abschnitt	0–15	15–30	30–50	50–80						
	Messwert	2,4	1,9	1,6	1,3						

Tabelle A7: Messwerte der Metaboliten für alle Segmente der Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation. Konzentrationen, die oberhalb des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzbereichs ohne Ausreißer lagen, wurden mit einem Pfeil (↑) markiert. Proben, die oberhalb des Referenzbereichs inklusive der Ausreißer lagen, wurden mit zwei Pfeilen (↑↑) markiert.

Nummer	Segment	Abschnitt [mm]	2,4-DHB- Konz. [ng/mg]	3,4-DHB- Konz. [ng/mg]	Glycolsäure- Konz. [ng/mg]	GHB-Sulf- Konz. [ng/mg]
P06	S 1	0–5	0,47 (↑)	1,3 (↑)	31 (↑↑)	15 (↑↑)
	S 2	5–10	0,42	1,6 (↑)	46 (↑↑)	34 (↑↑)
	S 3	10–15	0,35	1,7 (↑)	42 (↑↑)	31 (↑↑)
	S 4	15–20	0,32	1,4 (↑)	33 (↑↑)	23 (↑↑)
	S 5	20–25	0,33	1,2 (↑)	48 (↑↑)	27 (↑↑)
	S 6	25–30	0,24	1,4 (↑)	39 (↑↑)	25 (↑↑)
P07	S 1	0–5	2,6 (↑↑)	3,3 (↑)	230 (↑↑)	69 (↑↑)
	S 2	5–10	0,32	1,4 (↑)	59 (↑↑)	62 (↑↑)
	S 3	10–15	0,36	1,9 (↑)	58 (↑↑)	72 (↑↑)
	S 4	15–20	0,34	1,7 (↑)	50 (↑↑)	75 (↑↑)
	S 5	20–30	0,17	1,7 (↑)	26 (↑↑)	18 (↑↑)
	S 6	30–40	0,17	1,7 (↑)	27 (↑↑)	13 (↑↑)
	S 7	40–50	0,17	2,0 (↑)	33 (↑↑)	17 (↑↑)
	S 8	50–60	0,17	1,8 (↑)	29 (↑↑)	13 (↑↑)
P08	S 1	0–20	1,0 (↑↑)	2,1 (↑)	67 (↑↑)	15 (↑↑)
P10	S 1	0–10	0,81 (↑↑)	3,0 (↑)	53 (↑↑)	8,5 (↑)
	S 2	10–25	0,25	2,6 (↑)	24 (↑)	5,7 (↑)
	S 3	25–40	0,17	2,5 (↑)	20 (↑)	6,4 (↑)
	S 4	4–55	0,23	2,9 (↑)	24 (↑)	7,1 (↑)
	S 5	55–70	0,17	3,0 (↑)	19 (↑)	5,3 (↑)
P11	S 1	0–5	0,72 (↑↑)	1,2 (↑)	34 (↑↑)	2,2 (↑)
	S 2	5–10	1,3 (↑↑)	1,7 (↑)	59 (↑↑)	12 (↑)
	S 3	10–20	0,69 (↑↑)	1,1 (↑)	34 (↑↑)	3,5 (↑)
	S 4	20–30	1,0 (↑↑)	1,4 (↑)	49 (↑↑)	6,6 (↑)
P12	S 1	0–10	0,88 (↑↑)	1,4 (↑)	68 (↑↑)	17 (↑↑)
	S 2	10–20	0,36	1,0 (↑)	34 (↑↑)	31 (↑↑)
	S 3	20–30	0,21	0,81 (↑)	32 (↑↑)	18 (↑↑)
	S 4	30–40	0,31	1,5 (↑)	26 (↑↑)	17 (↑↑)
	S 5	40–50	0,17	1,3 (↑)	24 (↑)	17 (↑↑)
P14	S 1	0–5	0,45	1,1 (↑)	13 (↑)	2,7 (↑)
	S 2	5–10	0,38	1,6 (↑)	14 (↑)	2,2 (↑)
	S 3	10–15	1,0 (↑↑)	2,3 (↑)	29 (↑↑)	10 (↑)
	S 4	15–20	0,23	0,60	16 (↑)	9,0 (↑)
	S 5	20–30	0,44	1,1 (↑)	13 (↑)	2,8 (↑)
	S 6	30–55	0,39	1,5 (↑)	6,5	0,40

Nummer	Segment	Abschnitt [mm]	2,4-DHB- Konz. [ng/mg]	3,4-DHB- Konz. [ng/mg]	Glycolsäure- Konz. [ng/mg]	GHB-Sulf- Konz. [ng/mg]
P15	S 1	0–5	0,48 (↑)	1,9 (↑)	25 (↑↑)	6,4 (↑)
	S 2	5–15	0,35	1,4 (↑)	6,9	0,20
	S 3	15–25	0,84 (↑↑)	2,5 (↑)	12 (↑)	0,40
	S 4	25–35	0,29	1,6 (↑)	7,4	0,20
	S 5	35–55	0,18	1,5 (↑)	5,8	0,40
P16	S 1	0–20	0,05	0,90 (↑)	5,1	0,70
	S 2	20–40	0,05	1,1 (↑)	5,4	1,1
P18	S 1	0–5	0,17	0,50	29 (↑↑)	4,3 (↑)
	S 2	5–15	0,17	0,30	15 (↑)	6,8 (↑)
	S 3	15–25	0,17	0,40	9,0	4,1 (↑)
	S 4	25–35	0,05	0,40	7,2	2,7 (↑)
	S 5	35–65	0,17	0,50	3,4	0,50
P19	S 1	0–15	0,17	0,40	18 (↑)	14 (↑↑)
	S 2	15–30	0,05	0,20	12 (↑)	11 (↑)
	S 3	30–50	0,05	0,50	5,6	1,2
	S 4	50–80	0,05	0	4,5	1,3

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
%	Prozent
μ	mikro, Sollwert
1,4-BD	1,4-Butandiol
2,4-DHB	2,4-Dihydroxybuttersäure
3,4-DHB	3,4-Dihydroxybuttersäure
α	Signifikanzniveau (0,01)
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AF	Ammoniumformiat
AHB	Alpha-Hydroxybuttersäure
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
API	<i>Atmospheric Pressure Ionisation</i>
AS	Ameisensäure
atm	Atmosphäre(n)
BASF	<i>Badische Anilin- & Sodafabrik</i>
BG	Bestimmungsgrenze
BHB	Beta-Hydroxybuttersäure
°C	Grad Celsius
c	centi
C18	Octadecylsilan
C8	Octylsilan
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CEM	<i>Channel Electron Multiplier</i>
CLogP	Verteilungskoeffizient
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
DCM	Dichlormethan
DEA	<i>Drug Enforcement Administration</i>
DFC	<i>Drug Facilitated Crime</i>
DFSA	<i>Drug Facilitating Sexual Assault</i>
DIN	Deutsches Institut für Normung
DP	<i>Declustering Potential</i>
EP	<i>Entrance Potential</i> , Proben von Personen ohne GHB-Aufnahme (endogen)
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
EtG	Ethylglucuronid
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G01–G67	Gießener frische Proben Nr. 01–67
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GABA _A -R	Gamma-Aminobuttersäure _A -Rezeptoren

GABA _B -R	Gamma-Aminobuttersäure _B -Rezeptoren
GABA-T	Gamma-Aminobuttersäure-Transaminase
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GBL	Gamma-Butyrolacton
GC	Gaschromatographie
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure
GHB-Gluc	Gamma-Hydroxybuttersäure-beta-O-Glucuronid
GHB-Pal	4-Palmitoyloxy Butyrate
GHB-R	Gamma-Hydroxybuttersäure-Rezeptor
GHB-Sulf	Gamma-Hydroxybuttersäure-4-Sulfat
G-Protein	Guaninnucleotide-bindendes-Protein
GS1, GS2	Gas 1, Gas 2
GTFCh	<i>Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie</i>
GVL	Gamma-Valerolacton
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HS	<i>Headspace</i>
Hz	Hertz
IMS	<i>Ion Mobility Spectrometry</i>
IQ	<i>Interquad Lenses</i>
IS	<i>Ion Spray Voltage</i>
k	kilo, relative Ergebnisunsicherheit (3)
KO	<i>Knock-out</i>
L	Liter
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i>
LoD	<i>Limit of Detection</i>
LoQ	<i>Limit of Quantification</i>
LSD	Lysergsäurediethylamid
M	molar
m	Meter, milli, männlich
M	Männer
M(-)	Männer ohne das erste Segment
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MeOH	Methanol
min	Minuten
MPU	Medizinisch-Psychologische Untersuchung
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS _{bg}	mittleres Abweichungsquadrat zwischen den Tagen
MS _{wg}	mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Tage
MSI	<i>Mass Spectrometric Imaging</i>
MW	Mittelwert
n	nano, Anzahl an...
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na-GHB	Natriumsalz der Gamma-Hydroxybuttersäure
n. b.	nicht bestimmt

NG	Nachweisgrenze
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
n. n.	nicht nachgewiesen
NP	Proben von Narkolepsie-Patienten
n. s.	nicht segmentiert
p	Signifikanzwert
P	frische Proben
P01–P19	Proben der Narkolepsie-Patienten Nr. 01 – 19
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PICI	<i>Positive Ion Chemical Ionisation</i>
pKs	Säurekonstante
psi	<i>Pounds per Square Inch</i>
Q	<i>Qualifier</i> , Quadrupol
Q _x	Summe der Abweichungsquadrate
r, R	Korrelationskoeffizient nach <i>Pearson</i>
®	<i>Registered in Unites States Patent and Trademark Office</i>
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
Rh((CO) ₂)acac	Acetylacetonato(dicarbonyl)rhodium(I)
RP	<i>Reversed Phase</i> , Rückstellproben
RSD _(R)	Wiederholpräzision
RSD _(T)	tagesverschiedene Laborpräzision
RT	Retentionszeit
s.	segmentiert
s	Sekunden
s_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung
s_r^2	Wiederholvarianz
s_t^2	Varianz zwischen den Tagen
S1–S...	Segment Nr. 1 – Segment Nr....
Seg	Segmente
SD	Standardabweichung
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SoHT	<i>Society of Hair Testing</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSADHD	<i>Succinic-Semialdehyde-Dehydrogenase-Deficiency</i>
SSAR	Succinat-Semialdehyd-Reduktase
ST	<i>Stubbies</i>
t	Quantil der t-Verteilung
T	<i>Target</i>
Temp	Temperatur
THF	Tetra-Hydrofuran
™	<i>Trade Mark</i>
UDP	Uridindiphosphat
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UNDOC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	ultraviolett
V	Volt

$W(-)$	Frauen ohne das erste Segment
W	Frauen
w	weiblich
X	Gehaltsgröße
\bar{x}	Mittelwert aller Bestimmungen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Biosyntheseweg von GHB ausgehend von Glutaminsäure.	3
Abbildung 2: Die GHB-Synthese über GBL von <i>Alexander Saytsew</i> .	4
Abbildung 3: Patentierte Synthesen der GHB-Salze ausgehend von GBL.	4
Abbildung 4: Industrielle Synthese der Vorläufersubstanz GBL.	4
Abbildung 5: Illegale Herstellung von GHB-Salzen über die Synthese von GBL aus THF.	5
Abbildung 6: Wechselwirkung von GHB und GABA an den spezifischen GHB-Rezeptoren (GHB-R), den GABA _A -Rezeptoren (GABA _A -R) und den GABA _B -Rezeptoren (GABA _B -R) am prä- und postsynaptischen Neuron.	7
Abbildung 7: Umwandlung von 1,4-BD und GBL zu GHB innerhalb des Körpers.	9
Abbildung 8: Metabolismus von GHB über das Succinat Semialdehyd.	11
Abbildung 9: Alpha- und Beta-Oxidation von GHB, bei der unter anderem als Zwischenprodukte 2,4-Dihydroxybuttersäure, 3,4-Dihydroxybuttersäure und Glycolsäure entstehen.	12
Abbildung 10: Die beiden GHB-Metaboliten GHB-beta-O-Glucuronid und GHB-4-Sulfat.	12
Abbildung 11: Aufbau des Haares und Anbindung an den Blutkreislauf.	18
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers.	32
Abbildung 13: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Leermatrixprobe, die mit 10 ng/mg BHB und dem internen Standard GHB-D ₆ versetzt wurde. Chromatogramm einer Leermatrixprobe die mit 10 ng/mg GHB, dem internen Standard und 10 ng/mg BHB versetzt wurde.	62
Abbildung 14: GHB-Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, <i>Target</i> , 103 zu 57, R = 0,9997) und den zweiten Übergang (B, <i>Qualifier</i> , 103 zu 85, R = 0,9995).	63
Abbildung 15: Chromatogramm von 10 ng/mg GHB und GHB-D ₆ ohne Matrix. Chromatogramm von 10 ng/mg GHB und GHB-D ₆ inklusive 10 mg Haare.	64
Abbildung 16: Endogene GHB-Konzentrationen der segmentiert gemessenen Haarproben	65
Abbildung 17: GHB-Konzentrationen des ersten kopfnahen Segmentes im Vergleich zu den GHB-Konzentrationen aller anderen Segmente.	66
Abbildung 18: Mittlere GHB-Konzentrationen und Quartile für männliche Probanden und weibliche Probandinnen. Verlauf der GHB-Konzentrationen über die einzelnen Segmente aufgeteilt nach weiblichen und männlichen Personen.	67
Abbildung 19: Gegenüberstellung der endogenen GHB-Konzentrationen von segmentiert vermessenen und unsegmentiert vermessenen Haarproben.	69

Abbildung 20: Median und Quartile der endogenen GHB-Konzentrationen der zeitnah zur Entnahme vermessenen Proben und der gelagerten Haarproben.	70
Abbildung 21: Gemessene GHB-Konzentrationen der 19 Personen sortiert nach aufsteigender <i>Xyrem</i> [®] -Dosis in mg/kg Körpergewicht.	72
Abbildung 22: Absteigende mittlere GHB-Konzentrationen der untersuchten Haarproben von Personen nach regelmäßiger Aufnahme von GHB mit markierten gefärbten Haarproben.	73
Abbildung 23: Verteilung der GHB-Konzentration in den verschiedenen Segmenten entlang des Haares.	74
Abbildung 24: Gegenüberstellung der, mit zwei unterschiedlichen Extraktionsverfahren ermittelten, GHB-Konzentrationen in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme.	75
Abbildung 25: GHB-Konzentrationen im Haar eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB.	76
Abbildung 26: Chromatogramm der GHB-Metaboliten inklusive internem Standard GHB-D ₆ .	78
Abbildung 27: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, <i>Target</i> , 182,8 zu 96,9, R = 0,999) und den zweiten Übergang von GHB-Sulf (B, <i>Qualifier</i> , 182,8 zu 79,8, R = 0,999).	80
Abbildung 28: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, <i>Target</i> , 74,8 zu 46,8, R = 0,998) und den zweiten Übergang von Glycolsäure (B, <i>Qualifier</i> 1, 74,8 zu 44,9, R = 0,998).	81
Abbildung 29: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, <i>Target</i> , 119 zu 101, R = 0,997) und den zweiten Übergang von 2,4-DHB (B, <i>Qualifier</i> , 119 zu 72,9, R = 0,995).	83
Abbildung 30: Kalibrationskurven für den ersten Übergang (A, <i>Target</i> , 119 zu 59, R = 0,998) und den zweiten Übergang von 3,4-DHB (B, <i>Qualifier</i> , 119 zu 100,9; R = 0,999).	84
Abbildung 31: Endogene Konzentration von 2,4-DHB von 26 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration.	87
Abbildung 32: Endogene Konzentration von 3,4-DHB von 38 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration.	88
Abbildung 33: Endogene Konzentration von GHB-Sulf von 51 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration.	89
Abbildung 34: Endogene Konzentration von Glycolsäure von 60 Haarproben sortiert nach absteigender Konzentration.	90
Abbildung 35: Gemessene 2,4-DHB-Konzentrationen der elf Haarproben von Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation sortiert nach aufsteigender <i>Xyrem</i> [®] -Dosis in mg/kg Körpergewicht.	93
Abbildung 36: Gemessene 3,4-DHB-Konzentrationen der elf Haarproben von Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation sortiert nach aufsteigender <i>Xyrem</i> [®] -Dosis in mg/kg Körpergewicht.	94

- Abbildung 37:** Gemessene GHB-Sulf-Konzentrationen der elf Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis in mg/kg Körpergewicht. 95
- Abbildung 38:** Gemessene Glycolsäure-Konzentrationen der elf Haarproben von Personen mit *Xyrem*[®]-Medikation sortiert nach aufsteigender *Xyrem*[®]-Dosis in mg/kg Körpergewicht. 96
- Abbildung 39:** Konzentrationen an GHB-Sulf im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. 98
- Abbildung 40:** Konzentrationen an Glycolsäure im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. 99
- Abbildung 41:** Konzentrationen an 2,4-DHB im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. 99
- Abbildung 42:** Konzentrationen an 3,4-DHB im Haar entnommen eine Woche nach der ersten Einnahme, sechs Wochen nach der ersten Einnahme und neun Wochen nach der zweiten Einnahme von 2,4 g GHB. 100
- Abbildung 43:** pH abhängige Umwandlung von GHB in GBL und die ionisierte Form von GHB. 102
- Abbildung 44:** Gegenüberstellung der in der vorliegenden Arbeit unsegmentiert und segmentiert gemessenen endogenen GHB-Konzentrationen im Haar mit den GHB-Konzentrationen im Haar nach regelmäßiger Einnahme von GHB. 108
- Abbildung 45:** Korrelation zwischen eingenommener *Xyrem*[®]-Dosis und der ermittelten GHB-Konzentration im Haar. 111
- Abbildung 46:** Korrelation zwischen Dauer der *Xyrem*[®]-Einnahme und gemessener GHB-Konzentration im Haar. 112
- Abbildung 47:** Verteilung der Metaboliten-Konzentrationen in Haaren von Personen ohne GHB-Aufnahme und in Haaren von Personen mit regelmäßiger GHB-Aufnahme. 125
- Abbildung 48:** Korrelationskurven zwischen den Metaboliten und der eingenommenen *Xyrem*[®]-Dosis und zugehörige Korrelationskoeffizienten r . 127
- Abbildung 49:** Verlauf der Konzentrationen der GHB-Metaboliten entlang einer Haarsträhne am Beispiel von Person 06. 128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anwendungsgebiete der Haaranalytik in der Forensik.	23
Tabelle 2: Übersicht der wichtigsten Analysemethoden zur Bestimmung von GHB aus Haaren.	27
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	36
Tabelle 4: Gesammelte Daten der 19 Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation.	37
Tabelle 5: Optimierte MS/MS-Bedingungen für die GHB-Analytik im Haar.	39
Tabelle 6: Gewählter Laufmittelgradient für die GHB-Analytik im Haar.	40
Tabelle 7: Gesammelten Daten der 19 Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation inklusive der untersuchten Haarlänge und der untersuchten Segmente.	48
Tabelle 8: Daten der Personen, deren Rückstellproben erneut mit einer zweiten Extraktionsmethode auf GHB untersucht wurden.	49
Tabelle 9: Optimierte MS/MS-Bedingungen für die GHB-Sulf-Analytik im Haar.	51
Tabelle 10: Optimierte MS/MS-Bedingungen für die Analytik von Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB im Haar.	51
Tabelle 11: Laufmittelgradient für die chromatographische Trennung von Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB.	52
Tabelle 12: Optimierte LC-Bedingungen für die GHB-Sulf-Analytik im Haar.	53
Tabelle 13: Haarproben der Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation, die auf die GHB-Metaboliten untersucht wurden.	57
Tabelle 14: Validierungsdaten für die GHB-Analytik.	64
Tabelle 15: Durchschnittliche GHB-Konzentrationen der segmentweise analysierten Haarproben.	66
Tabelle 16: Ermittelte GHB-Konzentrationen von 58 unsegmentierten Haarproben von Personen ohne bekannte GHB-Aufnahme.	68
Tabelle 17: Ergebnisse der zwei bis acht Jahre alten Haarproben.	70
Tabelle 18: GHB-Konzentrationen der regelmäßig über ein Jahr und zwei Monate segmentweise untersuchten Haarsträhne.	71
Tabelle 19: GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Aufnahme von GHB.	72
Tabelle 20: Gegenüberstellung der, mit zwei unterschiedlichen Extraktionsverfahren ermittelten, GHB-Konzentrationen in Haarproben von Personen nach regelmäßiger GHB-Aufnahme.	75
Tabelle 21: Endogene Konzentrationen der GHB-Metaboliten Glycolsäure, 2,4-DHB, 3,4-DHB und GHB-Sulf von 65 Haarproben von Personen ohne bekannte Aufnahme von GHB.	85

Tabelle 22: Durchschnittliche GHB und GHB-Metaboliten-Konzentrationen der Haarproben von Personen nach regelmäßiger Aufnahme von GHB.	91
Tabelle 23: Durchschnittliche, minimale und maximale Konzentrationen der GHB-Metaboliten nach regelmäßiger GHB-Einnahme gruppiert nach Geschlecht.	92
Tabelle 24: Ermittelte Konzentrationen von GHB-Sulf, Glycolsäure, 2,4-DHB und 3,4-DHB in einer Haarprobe vor der Einnahme von GHB und den Haarproben nach Einmalgabe von 2,4 g beziehungsweise 31,4 mg/kg Na-GHB (<i>Somsanit</i> TM).	97
Tabelle 25: Relevante Literaturstellen zur Bestimmung endogener GHB-Konzentrationen in Haaren und die jeweils verwendete Waschlösung und Extraktionsmethode.	104
Tabelle 26: In der Literatur bekannte Studien zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach regelmäßiger Einnahme.	109
Tabelle 27: In der Literatur bekannte Studien zu GHB-Konzentrationen in Haaren nach einmaliger Aufnahme von GHB.	114
Tabelle 28: Studien zu GHB-Metaboliten und deren endogenen Konzentrationen in Blut, Urin und Haaren.	119
Tabelle 29: Studien zu Konzentrationen von GHB-Metaboliten in Blut, Urin und im Haar nach regelmäßiger Aufnahme von GHB.	122
Tabelle 30: Studie zu <i>postmortalen</i> Konzentrationen von GHB-Metaboliten.	123
Tabelle 31: Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Metaboliten von GHB.	128
Tabelle 32: Studien zum Nachweis von GHB-Metaboliten in unterschiedlichen Matrices nach der einmaligen Aufnahme von GHB/GBL.	129
Tabelle A1: Übersicht der wichtigsten GC-MS-Methoden seit 1990 zur Bestimmung von GHB aus Körperflüssigkeiten.	151
Tabelle A2: Übersicht über die wichtigsten LC-MS-Methoden zur Bestimmung von GHB in Körperflüssigkeiten.	153
Tabelle A3: GHB-Konzentrationen für alle segmentiert gemessenen Haarproben von Personen ohne GHB-Aufnahme.	154
Tabelle A4: GHB-Konzentrationen für alle Segmente der zwei bis acht Jahre gelagerten Haarproben.	156
Tabelle A5: GHB-Konzentrationen für alle Segmente der Haarproben von Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation nach Denaturierung.	157
Tabelle A6: GHB-Konzentrationen für alle Segmente der Haarproben von Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation nach Aufarbeitung durch Ultraschall.	158
Tabelle A7: Messwerte der Metaboliten für alle Segmente der Haarproben von Personen mit <i>Xyrem</i> [®] -Medikation.	159

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Dr. Walter Martz für die Chance bedanken, auf dem spannenden Gebiet der forensischen Toxikologie eine Dissertation anfertigen zu dürfen. Ohne Ihr Engagement wäre dies nicht möglich gewesen. Zudem bedanke ich mich für die Bereitstellung des spannenden und kontroversen Themas der GHB-Analytik in Haaren, die Betreuung während meiner Dissertationszeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein ebenso großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher, der es mir möglich gemacht hat, diese naturwissenschaftliche Doktorarbeit außerhalb des Fachbereichs anfertigen zu können. Ich danke Ihnen sehr für die Übernahme des Erstgutachtens, die wissenschaftliche Betreuung und Ihren fachlichen Rat.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Dettmeyer für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Rechtsmedizin durchführen zu können und für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Sie haben es mir neben der wissenschaftlichen Arbeit ermöglicht, in den letzten Jahren Erfahrung und Routine im spannenden Feld der forensischen Begutachtung zu erlangen und so meine Begeisterung für dieses Fachgebiet geweckt.

Herrn Prof. Dr. Geert Mayer danke ich sehr für sein wissenschaftliches Interesse an meinem Forschungsthema und die Bereitschaft, bei seinen Patienten und Patientinnen dafür zu werben. Ohne Ihren Einsatz und die Bereitstellung der Haarproben wäre ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau PD Dr. Anna Heidbreder danke ich ebenfalls für die Bereitstellung von Haarproben.

Herrn PD Dr. Cornelius Heß danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die Unterstützung, die vielen guten Ideen, das große Engagement für meine Forschung und die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Ohne deine Unterstützung wären viele Teile meiner Arbeit nicht möglich gewesen. Du hast mich mit deiner Zuversicht und Kreativität immer wieder motiviert und vorangebracht, danke dafür.

Ein sehr großer Dank gilt dir Flo, du warst da, wenn ich Unterstützung, einen Rat, jemanden zum Diskutieren oder einfach nur ein bisschen Ablenkung brauchte. Danke, dass ich mit wirklich jedem Anliegen zu dir kommen kann. Und natürlich danke ich auch dir sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Rechtsmedizin danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und den Rat und die Hilfe bei jeglichen Fragen. Meiner Praktikantin Ann-Sophie danke ich für Ihre engagierte Unterstützung beim nicht immer ganz problemlosen Entwickeln von Messmethoden. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kolleginnen aus der Toxikologie und dem Alkohollabor: Doreen, Sonja, Aileen, Julia, Tanja

und Silke, die stets für mich da waren und mich bei allen Problemen immer unterstützt haben. Vielen Dank für alles, ich habe mich bei euch von Anfang an sehr wohl gefühlt. Doreen, dir danke ich besonders für die Unterstützung in der Anfangsphase meiner Arbeit und darüber hinaus für die schöne Zeit bei unseren gemeinsamen Treffen.

Ein genauso großer Dank geht an dich Resi, ohne dich hätte ich die teilweise einsamen Nachmittage sicher nicht so gut überstanden. Marie-Lena, dir gilt ebenfalls ein sehr großer Dank, da du mir bei der Erstellung der ein oder anderen Abbildung eine große Hilfe warst und außerhalb der Arbeit sehr viel zu meinem Wohlbefinden beigetragen hast. Franzi dir danke ich sehr für dein Interesse an meiner Arbeit und für deine Unterstützung bei der Probensammlung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund Roman, ihr seid immer für mich da, unterstützt mich in allem was ich tue und verliert nie die Geduld. Ich bin unendlich dankbar eine so großartige Familie zu haben. Roman, dir danke ich von ganzem Herzen für deine bedingungslose Liebe, dein Verständnis und deine geduldige Unterstützung in den letzten Monaten und an jedem anderen Tag.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Martz W, Nebel A, Veit F. Variation of intraindividual levels of endogenous GHB in segmented hair samples. *Forensic Sci. Int.* 2019 Sep; 302:109913. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.109913.

Nebel A, Mayer G, Hess C, Heidbreder A, Martz W, Veit F. Levels of GHB in hair after regular application. *Forensic Sci. Int.* 2021 Jun 24; 325:110885. doi: 10.1016/j.forsciint.2021.110885.

Weitere Publikationen

Nebel A, Veit F, Lasczkowski G, Martz W. How significant is alcohol loss from baked food? – A case study. *Toxichem Krimtech* 2017; 84: 191.

Veit F, Gürler M, Nebel A, Birngruber C, Dettmeyer R, Martz W. Intentional ingestion of aconitin: Two cases of suicide. *Forensic Sci. Int. Reports* 2020 Dez; 2: 100158. doi: 10.1016/j.fsir.2020.100158.

Nebel A, Veit F, Weber A, Martz W, Lasczkowski G, Dettmeyer R. Liquid silicone embolism syndrome (SES) in lungs and liver - A case report. *Forensic Sci. Int.* 2021 Jun 13; 325:110872. doi: 10.1016/j.forsciint.2021.110872.

Tagungsbeiträge

Annika Nebel, Florian Veit, Gabriele Lasczkowski, Walter Martz. How significant is alcohol loss from baked food? - A case study, 10. GTFCh-Symposium, 2017 Mosbach.

Martz W, Nebel A. Nüchtern betrachtet – Alkohol in Lebensmitteln, 18. Expertenworkshop von ThermoFisher Scientific, Neue Aspekte und Entwicklungen in der Drogenanalytik, 2019 Speyer.

Poster

Liut J, Nebel A, Veit F, Lasczkowski G, Martz W. How significant is alcohol loss from baked food? – A case study, Science Day des Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2017 Gießen.

Martz W, Nebel A, Veit F. Intra-individual variation of endogenous levels of GHB in hair. 56th TIAFT (The international association of forensic toxicologist) conference, 2018 Ghent.

Veit F, Martz W, Nebel A, Birngruber C, Gürler M, Dettmeyer R. Two fatal cases of aconitine poisoning? 98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), 2019 Hamburg.