

Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Büttner

**Bestimmung der endogenen Konzentration von
Gammahydroxybuttersäure (GHB) im Haar mittels an
Flüssigkeitschromatographie gekoppelter
Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Katharina Franciska Freiin von Pelden genannt Cloudt
geboren am 22.02.1993 in Berlin-Tempelhof

Freiburg, den 08.01.2024

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Büttner
Universitätsmedizin Rostock, Institut für Rechtsmedizin

PD Dr. med. Sven Hartwig
Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institut für Rechtsmedizin

PD Dr. med. Udo Walther
Universitätsmedizin Rostock, Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Datum der Einreichung: 08.01.2024

Datum der Verteidigung: 18.03.2025

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Gleichungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 γ -Hydroxybuttersäure	1
1.1.1 Vorkommen und Bildung	1
1.1.2 Pharmakodynamik	3
1.1.3 Pharmakokinetik.....	4
1.1.4 Wirkung.....	4
1.1.5 Toxikologische und medizinische Relevanz	5
1.1.6 Nachweismöglichkeiten.....	6
1.1.7 Rechtliche Aspekte	7
1.2 Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie	7
1.3 Zielsetzung der Arbeit	9
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Reagenzien und Standardsubstanzen.....	12
2.2 Übersicht verwendeter Geräte.....	12
2.3 Instrumentelle Analytik: LC-MS/MS-Bedingungen und Software	13
2.4 Probengut	13
2.5 Probenvorbereitung.....	14
2.6 Extraktionsverfahren	15
2.7 Linearität von GHB-Konzentrationen	15
2.8 Berechnung der endogenen GHB-Konzentrationen im Haar	15
2.9 Ermittlung der optimalen Extraktionszeit.....	15
2.10 Rückstellproben der Waschlösungen	16
2.11 Lagerungsversuch über mehrere Wochen.....	16
2.12 Verteilung der GHB-Konzentrationen im postmortalen Haar.....	17
2.13 GHB-Konzentrationen im Haar von KonsumentInnen.....	20
2.14 Äußere Faktoren als möglicher Einfluss auf endogene GHB-Konzentrationen	20
2.14.1 Substanzeanalyse von Betäubungsmitteln	20
2.15 Statistische Auswertung	21

3	Ergebnisse	22
3.1	Linearität von GHB-Konzentrationen	22
3.2	Ermittlung der optimalen Extraktionszeit.....	22
3.3	Grundstatistik	23
3.4	GHB-Konzentrationen über mehrere Haarsegmente	28
3.5	GHB-Rückstände in organischen Waschlösungen	29
3.6	GHB-Konzentrationen im Haar bei Lagerung über mehrere Wochen	30
3.7	Verteilung der GHB-Konzentrationen im postmortalen Haar.....	30
3.8	GHB-Konzentrationen im Haar von KonsumentInnen.....	32
3.9	Äußere Faktoren als möglicher Einfluss auf endogene GHB-Konzentrationen	35
3.9.1	Substananalyse – Toxikologische Befunde	35
4	Diskussion.....	37
4.1	Methoden	37
4.2	Grundstatistik	38
4.3	Postmortale GHB-Konzentrationen im Haar	40
4.4	GHB-Konzentration von Konsumenten.....	40
4.5	Einflussfaktoren auf endogene GHB-Konzentrationen.....	43
5	Zusammenfassung.....	46
6	Literatur.....	47
	Anhang.....	i
	Standard operating procedures (SOPs).....	i
	Fragebogen zur Haarprobe.....	ii
	Thesen	iii
	Danksagung	iv
	Selbstständigkeitserklärung.....	v

Abkürzungsverzeichnis

AMG	Arzneimittelgesetz
BAK	Blutalkoholkonzentration
BDO	1,4-Butandiol
BE	Benzoylcegonin
BeSH	Tributylsulfoniumhydroxid
BtM	Betäubungsmittel
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
EME	Ecgoninmethylester
ESI	Elektrospray-Ionisation
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBL	γ -Butyrolacton
GC	Gaschromatographie (engl. <i>gas chromatography</i>)
GHB	γ -Hydroxybuttersäure
h	Stunde (lat. <i>hora</i>)
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
ISTD	interner Standard
i. v.	intravenös
K.O.-Mittel	knock out-Mittel
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LSD	Lysergsäurediethylamid
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin
MeOH	Methanol
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS(/MS)	(Tandem-)Massenspektrometrie
OSV-Blut	Oberschenkelvenen-Blut
PM	post mortem
PrEP	Präexpositionsprophylaxe
s	Sekunde
SoHT	<i>Society of Hair Testing</i>
SSA	Succinyl-Semialdehyd
SSADHD	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz
SSR	Succinyl-Semialdehyd-Reduktase

TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
UAK	Urinalkoholkonzentration
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
UHPLC	Ultrahochauflösende Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i>)
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/s	Umdrehungen pro Sekunde
Z. n.	Zustand nach
ZNS	zentrales Nervensystem/Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturformel GHB	2
Abb. 2	Metabolismus von GHB	2
Abb. 3	GBL und BDO	3
Abb. 4	Die GABA/GHBergische Synapse	3
Abb. 5	Beispielfoto Haarprobe	14
Abb. 6	Linearität von GHB-Konzentrationen	22
Abb. 7	Extraktionsbedingungen über die Zeit; Fall 1 und 2 (oben), Fall 3 (unten)	23
Abb. 8	GHB-Konzentrationen im Haar der 321 ProbandInnen	24
Abb. 9	GHB-Konzentrationen im Haar in Abhängigkeit vom Geschlecht der ProbandInnen	25
Abb. 10	GHB-Konzentrationen im Haar unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht der ProbandInnen	26
Abb. 11	Abnahme der GHB-Konzentrationen im Haar über mehrere Segmente	29
Abb. 12	GHB-Konzentrationen im Haar nach 0, 1, 2, 3 und 4 Wochen Lagerung	30
Abb. 13	GHB-Konzentrationen im Haar von 40 Verstorbenen	31
Abb. 14	Fall 4: GHB-Konzentrationen im Haar über 6 Segmente	33
Abb. 15	Fall 4: Konzentrationen psychoaktiver Substanzen im Haar über 6 Segmente	34
Abb. 16	Abnahme der GHB-Konzentration im Haar einer 20-jährigen Probandin bei gebleichten Haarspitzen	35

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Referenzstandards	12
Tab. 2	Geräte, welche zur Bearbeitung des Promotionsverfahrens verwendet wurden	12
Tab. 3	Messparameter der ESI-Quelle	13
Tab. 4	Angaben zu den Personendaten, Todesursachen und toxikologischen Befunden der ausgewählten Probanden für eine postmortale Haaranalyse auf GHB	17
Tab. 5	Anzahl der pro Fall generierten Haarsegmente, aufgeteilt nach Frauen und Männern	28
Tab. 6	Länge der untersuchten Haarsegmente [cm]	28

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1	Berechnung der Konzentration von GHB in Haaren	15
-------------	------------------------------------------------	----

1 Einleitung

1.1 γ -Hydroxybuttersäure

Im Jahr 1874 wurde γ -Hydroxybuttersäure (GHB) erstmalig vom russischen Chemiker Alexander M. Saytzeff isoliert (1, 2). Beim Versuch, ein die Blut-Hirn-Schranke überwindendes GABA-Analogon herzustellen, wurde GHB im Jahr 1960 vom Franzosen Henri Laborit zum ersten Mal synthetisiert (3–5). Das physiologische/endogene Vorhandensein der Säure war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Infolgedessen wurde GHB als intravenöses (i.v.) Narkotikum eingesetzt (5, 6), musste im Verlauf jedoch aufgrund der aus der geringen therapeutischen Breite resultierenden häufigen unerwünschten Wirkungen (Myoklonien, Krampfanfälle), schlechter Steuerbarkeit und geringer analgetischer Wirkung geeigneteren Alternativen (z. B. Propofol, Ketamin) weichen (7). In den 1980er Jahren wurde es aufgrund positiver Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel, der gesteigerten Freisetzung von Wachstumshormonen und einer anabolen Wirkung vermehrt in der Bodybuilder-Szene eingesetzt (8–10). Nach einer Reihe von Intoxikationen wurde der freie Verkauf in den USA Ende 1990 von der *Food and Drug Administration* (FDA) verboten (11, 12). Dennoch stieg die Beliebtheit der Substanz als Freizeitdroge in den weiteren Jahren in der jugendlichen Musikszene an (7). In Deutschland ist GHB seit der am 1. März 2002 in Kraft getretenen 16. Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften im Betäubungsmittelgesetz (BtMG) gelistet (8, 13). Medizinische Anwendung findet GHB heute bei der Behandlung der Narkolepsie mit Kataplexie (Xyrem®), als i.v.-Narkosemittel (Somsanit®) und bei der Therapie des (Opiat- und) Alkoholentzugssyndroms (7, 8, 13). Die zunehmende forensische Relevanz ergibt sich aus einer Häufung von Fällen, in denen GHB missbräuchlich als sogenannte *date rape drug* (K.O.-Mittel) eingesetzt wird (14). Des Weiteren existieren Szenen, in denen GHB sowie seine Vorläufersubstanzen γ -Butyrolacton (GBL) bzw. 1,4-Butandiol (BDO) als Rauschmittel (15) oder auch im Zusammenhang mit *chemsex*¹ verwendet werden (18, 19).

1.1.1 Vorkommen und Bildung

GHB (Summenformel: $C_4H_8O_3$, Strukturformel siehe Abbildung 1) ist eine kurzkettige Fettsäure, physiologisch vorkommend als Neurotransmitter und -modulator im zentralen Nervensystem (ZNS) von Mensch und Säugetier (20). Sie ist sowohl Vorläufersubstanz als

¹ Unter *chemsex* wird der menschliche Sexualverkehr unter dem Einfluss synthetischer Drogen (*chems*) verstanden – häufig verwendete Substanzen sind GHB/GBL, Mephedron, Ketamin, Methamphetamin und Poppers (16, 17).

auch Metabolit der inhibitorisch wirksamen γ -Aminobuttersäure (GABA) (20, 21). Im Gehirn nachgewiesen werden konnte GHB vor allem im Hypothalamus, den Basalganglien, dem Hippocampus und der Substantia nigra (7, 22, 23). In Blut (<5,0 mg/l), Urin (<10,0 mg/l) und peripheren Geweben ist die Säure ebenfalls zu finden (24–26).

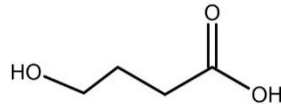


Abbildung 1: Strukturformel GHB
Quelle: eigene Darstellung

Im Gehirn entsteht aus GABA über die mitochondriale GABA-Transaminase das Succinyl-Semialdehyd (SSA), welches im weiteren Schritt mittels Succinyl-Semialdehyd-Reduktase (SSR) zu GHB umgesetzt wird (22, 27). Hierbei werden lediglich 0,1% des SSA zu GHB reduziert, mit 99,9% entsteht zum Großteil Succinat (28, 29). Umgekehrt katalysiert die GHB-Dehydrogenase die Umwandlung von GHB zu SSA, aus welchem wiederum GABA oder auch Succinat entstehen (22). Letzteres findet Einzug in den Citratzyklus und wird zu Wasser und Kohlendioxid verstoffwechselt (7, 22). Schematisch dargestellt ist der Metabolismus von GHB in Abbildung 2.

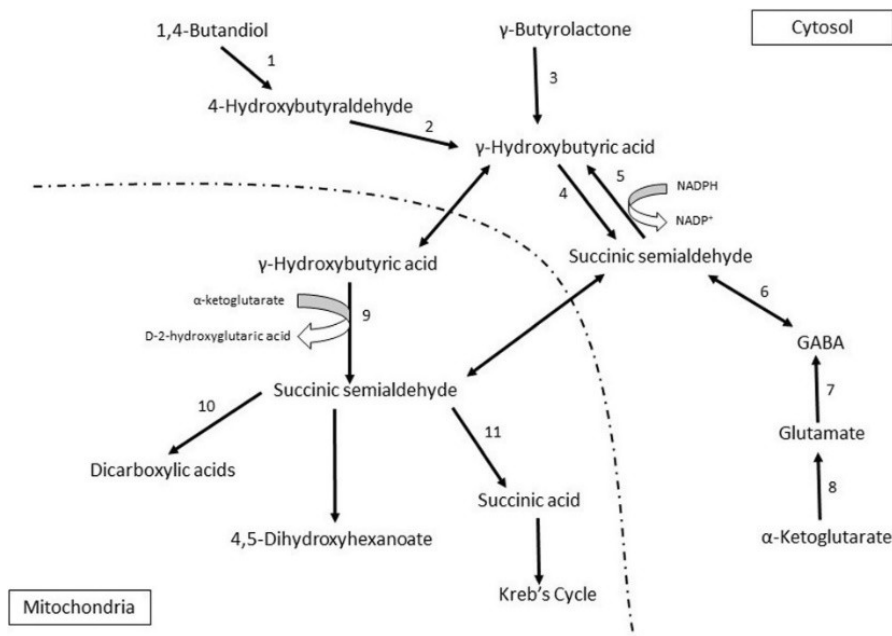


Abbildung 2: Metabolismus von GHB

Enzyme: 1 Alkohol-Dehydrogenase, 2 Aldehyd-Dehydrogenase, 3 Serumlactonase, 4 GHB-Dehydrogenase, 5 Succinyl-Semialdehyd-Reduktase, 6 GABA-Transaminase, 7 Glutamat-Decarboxylase, 8 Glutamat-Dehydrogenase, 9 GHB-Dehydrogenase, 10 β -Oxidation, 11 Succinyl-Semialdehyd-Dehydrogenase
Quelle: Felmler et al. (30)

Außerhalb des ZNS wird GHB mittels des Enzymes Serumlactonase aus dem ebenfalls endogen vorhandenen GBL gebildet. Wird dem Körper GBL als Prodrug zugeführt, erfolgt die Metabolisierung zu GHB gleichermaßen über die Serumlactonase (27).

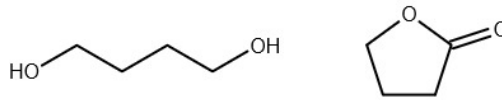


Abbildung 3: Strukturformeln von GBL (links) und BDO (rechts)
Quelle: eigene Darstellung

Auch BDO konnte in Geweben von Säugetieren nachgewiesen werden (31). Von außen zugeführtes BDO wird über die Alkohol-Dehydrogenase zu Gamma-Hydroxybutyraldehyd und anschließend mithilfe der Aldehyd-Dehydrogenase zu GHB umgesetzt (27).

1.1.2 Pharmakodynamik

GHB scheint vorrangig an folgenden Rezeptoren im Gehirn zu wirken – in physiologischen, mikromolaren Konzentrationsbereichen an GHB- und GABA_A-Rezeptoren, in höheren, millimolaren Konzentrationen am GABA_B-Rezeptor (2, 10, 32). Die Wirkung am GABA_B-Rezeptor ließe sich herbei zum einen direkt durch GHB, zum anderen indirekt durch (aus GHB) synthetisiertes GABA erklären (33). Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt, wie durch GABA auch, eine Abnahme des Calciumioneneinstroms, Öffnung von Kaliumkanälen und reduziert/hemmt somit die Freisetzung von Neurotransmittern (24).

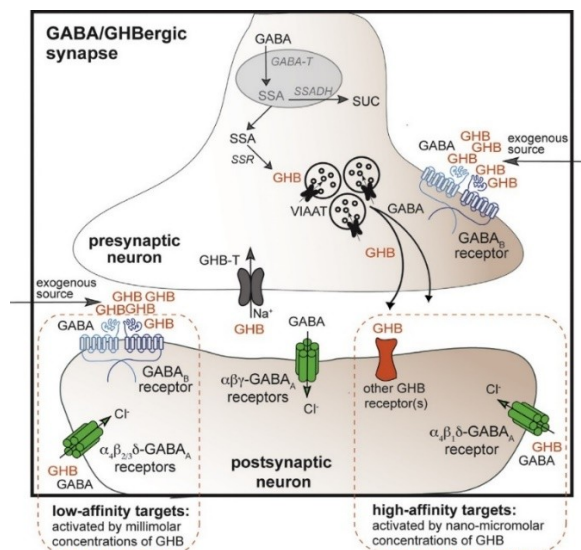


Abbildung 4: Die GABA/GHBergische Synapse
Quelle: Bay et al. (4)

Des Weiteren beeinflusst GHB das cholinerge (über GABA_B-Rezeptoren) und dopaminerge System (23). Bei zuletzt genanntem System überwiegt initial eine Hemmung der Freisetzung, bei chronischer Anwendung hingegen eine Hochregulation von Dopamin-Rezeptoren (2, 7, 22, 33). Zudem steigert GHB die Sekretion von Wachstumshormonen und potenziert den Serotonin-Umsatz, wirkt auf Neurosteroiden und indirekt auf endogene Opioiden (24).

1.1.3 Pharmakokinetik

GHB wird nach peroraler Einnahme rasch resorbiert, mit maximalen Plasmaspiegelkonzentrationen nach 25–45 min, die orale Bioverfügbarkeit ist mit 25–40 % in Abhängigkeit von der Magenfüllung (34) jedoch verhältnismäßig gering. Die Plasma-Eliminationshalbwertszeit beträgt 40–60 min (10, 27). Die Verteilung im Körper folgt einem Zwei-Kompartimente-Modell (10). „Sowohl Resorption als auch Elimination sind dosisabhängig, so dass bei hohen Dosen verzögerte Resorption und verlangsamte Elimination eintreten können“ (27). GHB ist hydrophil und wird kaum an Plasmaproteine gebunden (34). Die Ausscheidung erfolgt über metabolische Umsetzung, wobei der Großteil über Succinat in den Citratzyklus eingeschleust und infolge als Kohlenstoffdioxid abgeatmet wird (27). Weniger als 5 % werden direkt über den Urin ausgeschieden, wobei sich bei Intoxikationen die renale Clearance erhöht (27).

1.1.4 Wirkung

Die genaue Wirkung der endogen vorkommenden γ -Hydroxybuttersäure ist bis heute nicht völlig geklärt (33), man gehe von “[...] Funktionen im Bereich kognitiver Aufgaben, der Regulation des Hirnstoffwechsels, der Schlafregulation, aber auch im Zusammenhang mit der Emotionskontrolle [aus]”(8).

Das irreführenderweise auch als *liquid ecstasy* bezeichnete GHB hat strukturell nichts mit dem als Ecstasy bekannten 3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin (MDMA) oder 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDA) gemein (10, 35). Lediglich die Wirkung von GHB ist bei niedriger Dosierung (1–2 g GHB) mit der von Ecstasy und Alkohol vergleichbar – als entaktogen, euphorisierend und aphrodisierend wird sie beschrieben (7, 13, 20). Dieser stimmungsaufhellenden und stimulierenden Wirkung steht bei Erhöhung der Dosis (2–3 g GHB) ein schlafinduzierender und narkotisierender Effekt entgegen (13). Bei Überdosierungen (ab 3 g GHB) sind Übelkeit, Erbrechen, Verlust der Körperkontrolle, Krampfanfälle, Bewusstlosigkeit, anterograde Amnesien, Komata bis hin zur Atemdepression oder Aspiration mit letalem Ausgang (ab 4 g GHB) dokumentiert (10, 18).

1.1.5 Toxikologische und medizinische Relevanz

Nachdem GHB in den 1980er Jahren vorrangig in der Bodybuilder-Szene zur Leistungssteigerung eingenommen wurde, gewann es im darauffolgenden Jahrzehnt unter den Namen *liquid ecstasy*, *Soap* und *G* (engl. gesprochen) zunehmende Beliebtheit und Verbreitung als Partydroge. Bis heute findet GHB Verwendung als Rauschmittel und führt infolge der geringen therapeutischen Breite wiederkehrend zu akuten Intoxikationen (36). Leitsymptom ist hierbei die Veränderung des Bewusstseinszustandes (Euphorie – Koma). Des Weiteren kann es zu Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Schwindel, Bradykardie, Herzrhythmusstörungen, Atemdepression, Myoklonien, Krämpfen, Hypothermie, Abfall der Sauerstoffsättigung und Azidose, im schlimmsten Fall zum Tode (37–39), kommen. Betroffene präsentieren sich hierbei häufig mit Bewusstlosigkeit, aus welcher sie im Verlauf abrupt erwachen. Dieses Phänomen wird als „*fast-in, fast-out*“-Effekt bezeichnet (7). Aufgrund fehlendem Vorhandenseins eines Antidots erfolgt die Therapie symptomatisch, im Vordergrund stehen hierbei die (intensiv-)medizinische Überwachung und Stabilisierung von Kreislauf- und Vitalfunktionen, sowie (bei hoher Aspirationsgefahr und möglicher Atemdepression) die Bereitschaft zur endotrachealen Intubation (10, 40). Weitere Relevanz erfahren GHB und ihre Vorläufersubstanzen im Zusammenhang mit *chemsex*, welcher vor allem in Kreisen von Männern, die Sex mit Männern (MSM, engl. für *men who have sex with men*) haben, verbreitet ist (19). Auch hier kommt es immer wieder zu unbeabsichtigten Todesfällen (18, 41, 42). Dem gelegentlichen Konsum von GHB und seinen Vorläufersubstanzen GBL und BDO gegenüberzustellen ist der chronische Missbrauch. Aufgrund des schnellen Metabolismus und der somit notwendigen häufigen Einnahme von GHB-haltigen Gemischen zur Aufrechterhaltung eines wirkungsvollen Serumspiegels ist eine Abhängigkeitsentwicklung nicht die Regel (7), jedoch anhand von diversen Fallberichten dokumentiert (13, 43). „Bei GHB-Abhängigkeit sind mehrfach tägliche GHB-Einnahmen üblich, die meist in 2- bis 4-stündigem Abstand und auch nachts erfolgen“ (7, 43). Hierbei zeigt sich eine starke psychische und physische Abhängigkeit, einhergehend mit einer ausgeprägten Entzugssymptomatik, welche innerhalb weniger Stunden (1–6 h) nach der letzten GHB-Einnahme auftritt (43). Agitiertheit, Tachykardie, Hypertonie, Tremor, akustische und optische Halluzinationen, Paranoia und Schlaflosigkeit zählen zu den Symptomen (12, 43) und dauern im Schnitt 5–15 Tage, vereinzelt bis zu 21 Tage an (2). Ein allgemein gültiges Entzugsprotokoll hat sich bis dato nicht etabliert, Medikation der Wahl sind Benzodiazepine, falls nötig in Kombination mit Barbituraten, Antipsychotika und Baclofen (2). Zuweilen wird von Todesfällen im Zusammenhang mit schweren Entzugsverläufen berichtet (43).

Weitere Bekanntheit gewann GHB mit Beginn der 2000er Jahre unter der Begrifflichkeit der „K.O.-Tropfen“. Als farb- und geruchlose Flüssigkeit lässt es sich als sogenannte *date rape drug* leicht unbemerkt in Getränke mischen und ist dabei, ob des physiologischen

Vorhandenseins, im Nachhinein schwer nachweisbar (44). Das potentielle Opfer wird betäubt, wehrlos gemacht, infolge ausgeraubt und/oder vergewaltigt und kann sich, aufgrund der häufig auftretenden anterograden Amnesie, nur in wenigen Fällen an Einzelheiten erinnern (14, 45). Auch wenn Alkohol als Vergewaltigungsdroge Nummer eins gilt, gefolgt von einigen weiteren häufig verwendeten K.O.-Mitteln (z. B. Benzodiazepine, Ketamin, Antihistaminika, Anticholinergika, Opioide, Zopiclon/Zolpidem), stellt sich die Frage, ob der GHB-Nachweis wegen des schnellen Metabolismus schlichtweg seltener gelingt (45).

Obgleich die autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Defizienz (SSADHD) äußerst selten auftritt (ca. 450 dokumentierte Fälle weltweit), sollte sie im Zusammenhang mit GHB und seinem Nachweis Erwähnung finden. Durch den Mangel des namensgebenden Enzyms kommt es zu einem merklichen Anstieg von GABA und GHB im ZNS. Die Erkrankung führt zu neurologischen Auffälligkeiten, eine kurative Therapie ist bis heute nicht bekannt. (23, 46, 47)

1.1.6 Nachweismöglichkeiten

Da GHB nicht nur eine endogen vorkommende Substanz ist, sondern bei exogener Zufuhr auch einem sehr zeitnahen Metabolismus und einer schnellen Elimination unterliegt, gestaltet sich der Nachweis einer externen Applikation schwierig. Proben sollten daher rasch entnommen und entsprechend (gekühlt) gelagert werden. Die Zeitfenster für einen Nachweis nach erfolgter exogener Aufnahme liegen im Blut bei bis zu 6 h, im Urin bei bis zu 12 h (23). Häufig wenden sich Personen, welche eine exogene Zufuhr von GHB-haltigen oder zu GHB metabolisierenden Zubereitungen erfahren haben, erst nach Stunden oder Tagen an beispielsweise die Ermittlungsbehörden, wodurch der Nachweis deutlich erschwert oder sogar verhindert wird. In der forensischen Praxis haben sich zur Unterscheidung zwischen endogen vorhandener oder exogen zugeführter GHB-Konzentrationen Richtwerte von 4 µg/ml (Blut) und 10 µg/ml (Urin) etabliert (48, 49). Grundsätzlich lassen sich GHB-Konzentrationen auch in anderen Körperflüssigkeiten (z. B. Speichel, Schweiß, Liquor cerebrospinalis) nachweisen, diese scheinen für die Praxis jedoch eher ungeeignet (50). Die invasive Entnahme von Liquor bei Blut und Urin als alternative Matrices würde schwierig zu rechtfertigen, eine ausreichende Menge Schweiß zu erhalten problematisch sein.

Für eine Analytik von GHB aus Blut oder Urin geeignete Verfahren basieren auf an Gaschromatographie bzw. Flüssigkeitschromatographie gekoppelte (Tandem-) Massenspektrometrie (GC- bzw. LC-MS(/MS)), wobei sich Unterschiede in Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen zeigen (24, 34). Des Weiteren existiert ein enzymatischer Schnelltest (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz) zum Nachweis von GHB, wohingegen ein Test auf immunologischer Basis nicht vorliegt (10).

Haarsträhnen als zu analysierendes Probenmaterial stellen eine ergänzende Matrix zum Nachweis von GHB dar, zumal sie im Gegensatz zur Blutanalyse nicht mit einem invasiven körperlichen Eingriff verbunden sind (51, 52). Forensische Fragestellungen befassen sich hierbei nicht mit akuten Situationen, sondern mit dem retrospektiven Nachweis bei z. B. einer ungewollten Verabreichung von K.O.-Mitteln oder dem regelmäßigen Konsum über eine längere Zeitspanne (53–55). Letzteres lässt sich an segmentierten Strähnen über Monate und ggf. auch Jahre zeigen, ein einmaliger Konsum hingegen erfordert eine sehr feine Segmentierung der Haarprobe und ist bis dato nicht in der Routineanalytik existent (21, 56–58). Als Analyseverfahren finden ebenfalls GC- und LC-MS/MS Verwendung (55).

Zum qualitativen Nachweis von GHB in Flüssigkeiten (Getränke) eignen sich Farbttests wie beispielsweise das K.O.-Tropfen Schutz-Armband der Firma Xantus (59).

1.1.7 Rechtliche Aspekte

GHB und ihre Salze unterliegen in Deutschland seit dem 1. März 2002 dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG), in welchem sie unter Anlage III gelistet sind. Somit stellt GHB ein verschreibungs- und verkehrsfähiges Betäubungsmittel dar, Besitz und Handel gelten hingegen als Straftat (10).

Die beiden Vorläufersubstanzen von GHB, GBL und BDO, sind jedoch aufgrund ihrer weit verbreiteten Anwendung in der industriellen Produktion (Lösungsmittel) gesetzlich nicht reguliert und können somit legal erworben werden. Sie unterliegen lediglich einem seit 2002 bestehenden freiwilligen europäischen Monitoring-System des Bundeskriminalamts (10). Für Konsumenten und Privatpersonen ist es somit relativ problemlos möglich diese Substanzen, welche in vivo rasch zu GHB umgesetzt werden (siehe Kapitel 1.1.1) und die gleichen Wirkungen besitzen, zu erwerben. Darüber hinaus ist ein Kauf im Internet bei Kosten von ca. 50€ pro 500 ml (entspricht ca. 200–1000 Einzeldosen à 0,5–2,5 ml) recht günstig (13). Rechtsrelevant wird das Arzneimittelgesetz (AMG) hierbei nur im Falle des missbräuchlichen Konsums, der Erwerb selbst ist straffrei (13).

1.2 Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Bei der Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) findet eine Kopplung zweier verschiedener Techniken miteinander statt. Die Flüssigkeitschromatographie (engl. *liquid chromatography*, LC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren in der Analytik, bei dem Substanzen anhand ihrer chemischen Eigenschaften (Polarität, Lipophilie etc.) aufgetrennt werden (vgl. 60). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein UHPLC-System (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) verwendet, bestehend aus zwei

Pumpen, einem Autosampler mit Probeninjektionssystem, einem Säulenofen, einer Trennsäule und einem Tandemmassenspektrometer als Detektor. Die LC folgt dem Prinzip der Säulen- bzw. Dünnschichtchromatographie. Mittels Injektor wird ein definiertes Volumen des sich in Lösung befindlichen Analyten in die sogenannte mobile Phase (Lösungsmittel (-gemische)) injiziert und über die Trennsäule (stationäre Phase) zum Detektor transportiert. In der Trennsäule interagieren die Analyten in Abhängigkeit von ihren physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich stark mit dem Säulenmaterial, wodurch der Durchfluss mehr oder weniger verlangsamt wird. Die Retentionszeit, nach der ein solches Signal in Form eines spezifischen Substanzpeaks am Detektor erscheint, ist für einzelne Stoffe in Abhängigkeit der gewählten Analysenparameter charakteristisch und die Fläche des Signals proportional zur Menge des Stoffes. (60, 61)

Ein Einlasssystem, eine Ionenquelle, ein Massenanalysator und ein Detektor sind die Bestandteile eines Massenspektrometers (MS). Die zu analysierende Probe wird dem MS über das Interface zugeführt, das Lösungsmittel verdampft und die in der LC separierten Verbindungen werden im Vakuum mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert. Hierbei wird die Analytlösung aus einer feinen Kapillare in ein starkes elektronisches Feld (3–5 kV) versprüht, wodurch die flüssige Probe vernebelt und ionisiert wird. Als Analysator fungierte in dieser Arbeit ein Triple-Quadrupol, welcher eine Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ermöglicht. Über die Quadrupole werden ausgewählte Moleküle durch Anlegen von Spannungen beschleunigt. Im ersten Quadrupol werden aus dem gesamten Massenbereich substanzspezifische und intensitätsstarke Molekülionen selektiert, welche im zweiten Quadrupol (Stoßkammer) mittels eines Kollisionsgases (meist Argon) fragmentiert werden. Anschließend erfolgt im dritten Quadrupol die Selektion der entstehenden, spezifischen Bruchstücke nach dem jeweiligen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z). (61) Durch eine Konversionsdynode werden die Ionensignale in Messsignale umgewandelt und die spezifischen *multiple reaction monitoring* (MRM)-Signalintensitäten zur Auswertung mittels entsprechender Computersoftware zur Verfügung gestellt.

Die LC-MS/MS bietet die Möglichkeit der Identifizierung und Quantifizierung von Reinsubstanzen und Substanzgemischen, vorteilhaft dabei ist die hohe Empfindlichkeit der Methode, das Senken von Nachweisgrenzen und die Schnelligkeit des Verfahrens. In der medizinischen Analytik wird die LC-MS/MS beispielsweise zur Bestimmung von Arzneimitteln und deren Metaboliten (Therapeutisches Drug Monitoring), Betäubungsmitteln, endogenen Stoffwechselprodukten und Vitaminen angewendet. Des Weiteren findet sie Verwendung in der Umweltanalytik (z. B. Pestizidnachweis), der pharmazeutischen (z. B. Prozesskontrolle bei der Herstellung von Arzneistoffen) und der rohstoffverarbeitenden Industrie (Lösungsmittelgemischanalytik). (62)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Während die Forensische Medizin in vielen Fällen durch die Obduktion eindeutige Beweise zur Einordnung der Todesart und -ursache liefern kann, greift die Forensische Toxikologie als ein weiterer Arbeitsbereich der Rechtsmedizin unter anderem dann ein, wenn eine Klärung nicht rückhaltlos möglich ist (63). Mittels chemisch-toxikologischer Untersuchungen werden menschliche Probenmaterialien (Obduktionsasservaten, z.B. Blut, Urin, Liquor cerebrospinalis, Organgewebe, Haare u.v.m.) in Hinblick auf potentielle Stoffwechselentgleisungen, Medikamenteneinnahmen/-überdosierungen, Vergiftungen oder allgemeine Beeinflussung durch körperfremde Substanzen analysiert (53). Darüber hinaus befasst sich die Forensische Toxikologie mit der Identifizierung und Quantifizierung von Betäubungsmitteln und deren Nachweis in beispielsweise Körperflüssigkeiten lebender Personen, womit die Analyse auf GHB und seine Vorläufersubstanzen impliziert ist (53).

Bei den sonst für akute Intoxikationen gängigen Matrices Blut und Urin ergeben sich angesichts des schnellen Metabolismus sowie des physiologischen Vorhandenseins von GHB kurze Nachweisenfenster von 6–12 h (64). Zu einem späteren Zeitpunkt ist eine potentiell ungewollte Verabreichung demnach nicht mehr zweifelsfrei feststellbar. Das menschliche Haar als alternatives und/oder ergänzendes Probenmaterial zeichnet sich wegen der langfristigen Einlagerung von Substanzen in die Haarmatrix, über die Zeitspanne der gewachsenen Haarlänge hinweg, besonders für die Offenlegung eines chronischen Missbrauchs und den retrospektiven Nachweis einer Aufnahme aus (54, 55, 64, 65). Weiterhin erfolgt eine Entnahme von Proben nicht-invasiv, Transport und Lagerung gestalten sich unkompliziert, wodurch Ergebnisse nicht leicht verfälschen (51, 52, 54). Zusätzlich kann eine Haarprobe (im Gegensatz zu Blut/Urin) auch noch mehrere Stunden oder Tage nach einer möglichen exogenen Zufuhr entnommen werden, sowie gegebenenfalls eine weitere Probe, bei beispielsweise einem Verlust von Material im Rahmen der Aufarbeitung (66). Somit gewann die Haaranalyse im Laufe der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung, auch wenn sich noch kein einheitlicher Standard bei der Durchführung und Interpretation ihrer Ergebnisse etabliert hat (55, 65). Am Rostocker Institut für Rechtsmedizin ergab sich die Relevanz des GHB-Nachweises im Haar in vollem Ausmaß im Jahr 2013, als sich ein 42-jähriger Berufskraftfahrer zur freiwilligen Entgiftung bei chronischer GBL-Abhängigkeit in eine Klinik begab (13). Über mehrere Haarsegmente wurden bei dem Busfahrer GHB-Konzentrationen von 7,54–17,8 ng/mg nachgewiesen (13). Aufgrund der zu dem Zeitpunkt mäßigen wissenschaftlichen Datenlage zu endogenen GHB-Konzentrationen im Haar entschloss man sich in der Abteilung der Forensischen Toxikologie zur Generierung eines Haarpoools. Dieser wurde über die Jahre gespeist und sodann im Kontext dieser Arbeit aufgestockt und umfassend analysiert.

Im Rahmen des Dissertationsvorhabens sollte der Aufgabenstellung nachgegangen werden, ob es möglich ist, in Analogie zu Blut und Urin einen Richtwert an GHB-Konzentrationen in Haaren zu ermitteln und zu etablieren, welcher eine Unterscheidung zwischen endogen vorhandenen und exogen zugeführten GHB-Konzentrationen erlaubt.

Um eine Datenbasis für die Variabilität endogener Konzentrationen zu schaffen, sollte von einer möglichst großen Anzahl an Personen, welche nie zuvor GHB bzw. dessen Vorläufersubstanzen GBL und BDO wissentlich konsumiert haben, die endogenen Haarlevel an GHB quantifiziert werden.

Eine segmentielle Haaranalyse sollte, falls möglich, zur Beurteilung der Gleichmäßigkeit intraindividuelle GHB-Haarkonzentrationen erfolgen.

Die statistische Auswertung der erzielten Ergebnisse sollte in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Personen und ggf. bestimmten Einflussfaktoren (Haarbehandlung, Ernährung, Rauchen, Rotweinkonsum, BtM-Konsum, Medikamenteneinnahme) diskutiert werden.

Postmortal entnommene Haarproben zufällig ausgewählter Sektionsfälle sollten auf ihre GHB-Konzentrationen und mögliche Zusammenhänge zur Auffindezeit untersucht werden.

Des Weiteren sollten Haarproben von Personen auf GHB untersucht werden, die in der Vergangenheit freiwillig GHB (-haltige Gemische) konsumiert hatten, um ggf. eine Differenzierung zu exogen zugeführten Konzentrationen an GHB im Haar ermöglichen zu können.

Im Folgenden sind die Arbeitsthese des Dissertationsvorhabens aufgelistet:

- Männer weisen tendenziell höhere endogene GHB-Haarkonzentrationen auf als Frauen.
- Intra-individuelle endogene GHB-Konzentrationsunterschiede (zwischen benachbarten Haarsegmenten) sind vernachlässigbar gering.
- Probanden, welche psychoaktive Substanzen konsumieren, fallen durch erhöhte GHB-Konzentrationen im Haar auf.
- Beim zur Haarprobenaufarbeitung zugehörigen Waschvorgang wird keine relevante Konzentration an GHB durch die verwendeten organischen Lösungsmittel herausgewaschen.
- Sich vegetarisch ernährende Personen haben tendenziell niedrigere endogene GHB-Level im Haar.
- Bei jüngeren lassen sich im Haar höhere endogene GHB-Konzentrationen nachweisen als bei älteren Personen.
- Rauchende Personen weisen höhere endogene GHB-Konzentrationen auf.
- Das Färben und/oder Bleichen von Haaren hat einen Einfluss auf gemessene endogene GHB-Konzentrationen.
- Ein regelmäßiger Konsum von GHB oder seinen Vorläufersubstanzen bedingt deutlich erhöhte GHB-Konzentrationen im Haar.
- Eine Einmalgabe von GHB oder seinen Vorläufersubstanzen ist im Haar nicht zwingend von endogenen GHB-Konzentrationen abgrenzbar.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Standardsubstanzen

In Tabelle 1 sind die verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel und Referenzstandards mit Angabe des Herstellers zusammengefasst.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Referenzstandards

Substanz	Hersteller
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua dest.	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
BeSH	Hergestellt im Rahmen der Dissertation von Herrn Robert Steinhagen (67)
Diethylether	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GHB	Cerilliant Analytical Reference Standards, Texas, USA
GHB-d6	Cerilliant Analytical Reference Standards, Texas, USA
HFIP	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR International bvba, Leuven, Belgien
Natriumhydroxid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat und Phosphorsäure für Puffer (pH = 6)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol(THC)-d3	Lipomed, Arlesheim, Schweiz
TFAA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.2 Übersicht verwendeter Geräte

Die eingesetzten Geräte und Gerätesysteme sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Geräte, welche zur Bearbeitung des Promotionsverfahrens verwendet wurden

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	MC1 Analytic AC 210S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Ultraschallbäder	Sonorex TK 52 /Sonorex Digitec, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Fresco 21 Heraeus Centrifuge, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
TurboVap	TurboVap LV Evpaorator, Zymark
Vortexer	VXR basic Vibrax/MS2-Minishaker, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Kugelmühle	MM200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland
verschiedene Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vials	IVA Analysentechnik GmbH & Co. KG, Meerbusch, Deutschland
LC-MS/MS-Anlage	Shimadzu, Kyoto, Japan

2.3 Instrumentelle Analytik: LC-MS/MS-Bedingungen und Software

Für die Bestimmung der GHB-Konzentrationen im Haar wurde eine bereits im Arbeitsbereich Forensische Toxikologie etablierte Methode verwendet (68–70).

Die quantitativen Bestimmungen von GHB-Konzentrationen in den Haarproben wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC Nexera X2, Shimadzu) gekoppelt mit einem Tandemmassenspektrometer (MS/MS 8050, Shimadzu) durchgeführt. Das flüssigchromatographische System bestand aus zwei LC Pumpen (Shimadzu LC-30AD), der Degasser Unit (DGU-20A5r), dem Autosampler (SIL-30AC), der Steuerereinheit (CBM-20A) und dem Säulenofen (CTO-20AC). Die chromatographische Auftrennung erfolgte an einer Shim-pack FC-ODS Säule (Shimadzu; 2,0 mm I.D. x 150 mm Länge, 3 µm), wobei der Säulenofen bei 40 °C gehalten wurde. Als Auswertesoftware fungierte LabSolution Version 5.16. Der Eluent bestehend aus (A) 10 mmol/l Ammoniumformiat in Wasser und (B) Acetonitril wurde mit einer Flussrate von 0,3 ml/min als Gradient (30–100 % B) durch die Säule geleitet. Die Messparameter der ESI-Quelle sind Tabelle 3 zu entnehmen. Als Zerstäubungs- und Trocknungsgas fand Stickstoff Verwendung. Das MS/MS operierte im negativen Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) – Modus für GHB (m/z 103.00 → 57.00; 103.00 → 84.80) und den deuterierten Standard GHB-d6 (m/z 109.20 → 61.10). Zur Quantifizierung von GHB wurde der Übergang m/z 103.00 → 57.00 verwendet. Als Kollisionsgas wurde Argon eingesetzt. Die Messzeit pro Messung betrug 9 min. (68–70)

Tabelle 3: Messparameter der ESI-Quelle

Parameter	Wert
Zerstäubungsgas Fließgeschwindigkeit	3 l/min
Heizgas Fließgeschwindigkeit	5 l/min
Interface Temperatur	300 °C
Desolvation Line Temperatur	250 °C
Heizblock Temperatur	400 °C
Trockengas Fließgeschwindigkeit	15 l/min

2.4 Probengut

Die Entnahme und Aufarbeitung der Haarproben folgte den Richtlinien der *Society of Hair Testing* (SoHT) (71).

Alle Haarproben stammten von freiwilligen, nicht vorselektierten ProbandInnen. Zur Probenentnahme wurde jeweils eine etwa bleistiftdicke Haarsträhne aus der Okzipitalregion entnommen, möglichst kopfnah abgeschnitten und in einem Kunststoffütchen aufbewahrt. Gleichzeitig füllten die ProbandInnen anonymisiert einen Fragebogen (siehe Anhang Seite iii) mit Angaben zum Alter, Geschlecht, Haarbehandlung, Rauchverhalten in der Wohnung,

Rotweinkonsum, Medikamenteneinnahme, GHB-Konsum, Einnahme anderer Substanzen und Fleischkonsum aus, welcher der jeweiligen Haarprobe beigefügt wurde.

Das Untersuchungsgut umfasste 338 Haarproben. Insgesamt 152 Proben wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt (2014–2017) gesammelt und analysiert. Weitere 57 stammten von TeilnehmerInnen eines Musikfestivals, die restlichen Proben von FreundInnen, Verwandten und KundInnen eines Friseursalons.

Zusätzlich erfolgte die Aufarbeitung der postmortal entnommenen Haare von 40 Verstorbenen, die im Institut für Rechtsmedizin Rostock obduziert wurden, willkürlich ausgewählt aus den Jahren 2016 bis 2018.

2.5 Probenvorbereitung

Von den einzelnen Proben wurden Haarfarbe und -länge dokumentiert. Je nach Länge wurden die Haarproben entweder als Strähne oder, bei sehr kurzen Haaren, im Teebeutel zusammengefasst und in verdünnter Detergenzlösung für die Dauer von etwa 30 s gewaschen. Dieser Vorgang wurde infolgedessen dreimal mit destilliertem Wasser und je einmal mit Methanol, Aceton und Diethylether wiederholt, um eine mögliche von außen stattgehabte Kontamination der Haare zu entfernen. Anschließend trockneten die Proben für wenigstens 12 h bei Raumtemperatur auf Filterpapier, wurden hiernach vermessen und bei genügend vorhandenem Material in mehrere Segmente (proximal ab 1,5 cm, distal bis zu 22,0 cm), in Abhängigkeit von der Haarsträhndicke zur Erlangung von ausreichend Masse, unterteilt. Es folgte die Zerkleinerung der Haare mittels Kugelmühle für 60–90 s bei 30,0 U/s und das anschließende Überführen der fein gemahlene Haarprobe in ein verschließbares Gefäß.



Abbildung 5: Beispielfoto Haarprobe
Quelle: eigene Darstellung

2.6 Extraktionsverfahren

Insgesamt 25–30 mg der pulverisierten Haare wurden in ein 2 ml Probengefäß eingewogen und die genaue Masse notiert, dann 1 ml Acetonitril und 40 µl GHB-d6 (1 µg/ml) als interner Standard (ISTD) hinzugegeben. Nachdem die Proben für 4 h im Ultraschallbad extrahiert wurden, erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 14 000 U/min. Die obere flüssige wurde von der unteren festen Phase abgetrennt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und diese dann bei 40 °C unter Druckluft bis zur Trockene eingengt. Anschließend erfolgte die Rekonstitution in 50 µl Acetonitril, Vortexen, erneute Zentrifugation und letztlich die Injektion von je 10 µl des Extrakts zur Analyse in die LC-MS/MS.

2.7 Linearität von GHB-Konzentrationen

Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhanges des detektieren GHB-Signals von der Konzentration wurde das gemahlene Haar dreier ProbandInnen genutzt, deren endogene GHB-Haarspiegel zuvor mittels LC-MS/MS bestimmt worden waren. Jeweils 25–30 mg der Probe wurden eingewogen, 1 ml Acetonitril, 40 µl einer 1 µg/ml GHB-d6-Lösung sowie unterschiedliche Volumina an GHB-Lösungen (5–400 µl einer 1 µg/ml GHB-Lösung), um finale Konzentrationen von 5–400 ng/ml zu erreichen, hinzugegeben und vermischt. Im Anschluss erfolgte die Extraktion wie unter 2.6 aufgeführt.

2.8 Berechnung der endogenen GHB-Konzentrationen im Haar

Gleichung 1 wurde genutzt, um die endogenen GHB-Konzentrationen im Haar der ProbandInnen anhand des Signals von GHB und dem ISTD (→ GHB-d6) zu berechnen.

$$\frac{\text{Signal GHB}}{\text{Signal GHB-d6}} \times C_{\text{GHB-d6}} = X$$

$$\frac{X}{\text{Einwaage [mg]}} = C_{\text{GHB}}$$

Gleichung 1: Berechnung der Konzentration von GHB in Haaren

2.9 Ermittlung der optimalen Extraktionszeit

Zur Überprüfung der Extraktionszeit mittels Ultraschall wurden proximale Haarsegmente von drei verschiedenen ProbandInnen mit hohen GHB-Konzentrationen (Bestimmung im Vorfeld) verwendet. Es erfolgte die Extraktion wie unter 2.6 erläutert, wobei von jeder der drei Proben

sieben Einwaagen (25–30 mg) abgefüllt wurden. Im Anschluss erfolgte die Extraktion unter Verwendung von Ultraschall für sieben unterschiedliche Zeiträume (0,5–6 h), gefolgt von der Analyse von je 10 µl der Extrakte mittels LC-MS/MS.

Im ersten Fall stammte das Haar von einem 21-jährigen männlichen Probanden. Er gab an einmal im Monat Rotwein zu konsumieren, in der Wohnung zu rauchen, täglich Cannabis und unregelmäßig Amphetamin zu konsumieren. Der Konsum von Amphetamin bestätigte sich bei der Untersuchung auf Betäubungsmittel (0,2 ng/mg). Das braune Kopfhair mit einer Länge von 7 cm wurde in zwei Segmente unterteilt (proximal 2,5 cm, distal 4,5 cm). Die Messungen mittels LC-MS/MS ergaben für das proximale Segment 10,1 ng/mg GHB im Haar.

Im zweiten Fall stammte das Haar von einer 36-jährigen weiblichen Probandin. Der Konsum von Rotwein und Betäubungsmitteln wurde verneint, als Medikation gab sie die Verwendung eines Asthmasprays an. Das dunkelblonde Kopfhair mit gefärbten Spitzen mit einer Länge von 15 cm wurde in 5 Segmente unterteilt (Länge der proximalen Segmente 2,0–3,0 cm, distales Segment 7,0 cm). Die GHB-Konzentration im proximalen Segment betrug 3,6 ng/mg. Beim dritten Fall waren Angaben zum Alter, Geschlecht und Konsumverhalten nicht vorhanden. Im Haar wurde eine GHB-Konzentration von 8,2 ng/mg ermittelt.

2.10 Rückstellproben der Waschlösungen

Um sicher zu stellen, dass während des mehrstufigen Waschvorganges mittels Detergenzlösung, destilliertem Wasser, Methanol, Aceton und Diethylether kein GHB in relevanten Konzentrationen aus den Haarproben „herausgewaschen“ wurde, wurde von sämtlichen Waschlösungen der Haarproben Nr. 161 - 338 jeweils eine Rückstellprobe von 1 ml gesammelt. Je 30 µl dieser Lösungen (mit Ausnahme von Detergenz- und erster sowie zweiter destillierter Wasserlösungen) wurden in ein Vial überführt und mittels LC-MS/MS vermessen, der Rest mittels Druckluft bei 40 °C bis zur Trockene eingengt, mit 50 µl Acetonitril rekonstituiert, vermischt und in ein weiteres Vial überführt. Anschließend erfolgte die Injektion (10 µl) in die LC-MS/MS.

2.11 Lagerungsversuch über mehrere Wochen

Um eine mögliche Zu- oder Abnahme der GHB-Konzentrationen der Haarproben über die Zeit aufzeigen zu können, wurde ein Lagerungsversuch durchgeführt. Das Material hierfür stammte von einem 30-jährigen männlichen Probanden, dessen Haare auf mehrere kleine Kunststofftüten verteilt und über definierte Zeiträume aufbewahrt wurden. Eine erste Extraktion mit anschließender Messung erfolgte sofort, die weiteren nach 1, 2, 3 und 4 Wochen. Im

Folgenden wurden die Haarproben, wie in Kapitel 2.6 angegeben, extrahiert und mittels LC-MS/MS vermessen.

2.12 Verteilung der GHB-Konzentrationen im postmortalen Haar

Zusätzlich zu den 338 Haarproben freiwilliger ProbandInnen wurden insgesamt 40 Haarproben von Verstorbenen auf die postmortal vorhandenen GHB-Haarkonzentrationen untersucht. Das Material stammte aus Sektionsfällen der Jahre 2016 bis 2018 des Instituts für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock. Die Aufarbeitung und Durchführung des Extraktionsverfahrens erfolgten wie unter 2.6 beschrieben. Um die ermittelten GHB-Konzentrationen besser einordnen zu können, wurden die verfügbaren Personendaten (Geschlecht, Alter), die Todesursache und toxikologische Befunde mit angeführt (68). Eine Aussage hinsichtlich eines möglichen Konsums von GHB oder den Vorläufersubstanzen zu Lebzeiten war nicht mehr möglich, ein Verdacht dahingehend jedoch auch nicht vorhanden. Tabelle 4 bildet die fallbezogenen Angaben der postmortal gemessenen Haarproben ab.

Tabelle 4: Angaben zu den Personendaten, Todesursachen und toxikologischen Befunden der ausgewählten Probanden für eine postmortale Haaranalyse auf GHB

Fall-Nr.	Personendaten	Todesursache	Toxikologische Befunde
PM 1	weiblich 58 Jahre	Ertrinken	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 2	weiblich 29 Jahre	Schwere, stumpfe Gewalteinwirkung (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 3	weiblich 92 Jahre	Koronarinsuffizienz bei schweren Vorerkrankungen des Herzens	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 4	weiblich 84 Jahre	Schweres, stumpfes Schädel-Hirn-Trauma (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 5	weiblich 84 Jahre	Polytrauma (Verkehrsunfall); in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 6	weiblich 64 Jahre	Polytrauma (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 7	weiblich 82 Jahre	Hirnmassenblutung	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 8	weiblich 96 Jahre	Akutes und chronisches Funktionsversagen des Herzens und der Nieren; in Klinik verstorben	<u>OSV-Blut</u> Metamizol, Morphin (87,2 ng/ml) BAK < 0,10 ‰ Aceton 34,4 mg/l <u>Mageninhalt</u> Metamizol, Morphin
PM 9	weiblich 54 Jahre	Strangulation; ca. eine Stunde nach Todeseintritt aufgefunden	<u>OSV-Blut</u> Omeprazol BAK < 0,10 ‰ Aceton 25 mg/l <u>Urin</u> UAK < 0,10 ‰

			Aceton 29 mg/l <u>Herzblut</u> Omeprazol, Cinnarizin + Metabolite, Tilidin- Metabolite <u>Mageninhalt</u> Omeprazol, Naloxon, Tilidin- Metabolite
PM 10	männlich 54 Jahre	Unterkühlung und Stoffwechsellentgleisung	BAK 0,85 ‰ UAK 0,96 ‰ Aceton je 285 mg/l
PM 11	weiblich 5 Jahre	Schwere, stumpfe Gewalteinwirkung (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 12	weiblich 72 Jahre	Infektexazerbierte COPD; wenige Stunden nach Todeseintritt aufgefunden	Acetonbestimmung und Ketonkörper unauffällig
PM 13	weiblich 58 Jahre	Septisches Multiorganversagen bei Rezidiv-Perforation des Sigma mit bakterieller Peritonitis; vorbekannter Diabetes mellitus Typ II; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 14	männlich 52 Jahre	Todesursache nicht sicher feststellbar bei starker Fäulnisveränderung mit Teilskelettierung; ca. ein Monat zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen zu Lebzeiten	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 15	männlich 9 Jahre	Schweres Schädelhirn- und Thoraxtrauma (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 16	männlich 58 Jahre	Ketoazidose bei bekanntem Diabetes mellitus und Alkoholabusus; drei Tage zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen	<u>OSV-Blut</u> BAK < 0,10 ‰ Aceton 46,3 mg/l Blutzucker 7,07 mmol/l Ketonkörper 2,8 mmol/l
PM 17	weiblich 82 Jahre	massives Thoraxtrauma, Polytrauma (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 18	männlich 56 Jahre	beidseitige Lobärpneumonie bei Z. n. Apoplex mit Tetraplegie; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 19	weiblich 68 Jahre	Multiorganversagen nach Sturz; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 20	männlich 74 Jahre	Schwere, stumpfe Gewalteinwirkung (Verkehrsunfall)	BAK < 0,10 ‰
PM 21	weiblich 51 Jahre	Malignes Hirnödem nach Intubationsnarkose, Kolonkarzinom mit Metastasen in Leber und Lunge; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 22	weiblich 87 Jahre	Akute Koronarinsuffizienz; in Klinik verstorben	<u>OSV-Blut</u> Morphin (91,3 ng/ml) Quetiapin (1,49 µg/ml) Metamizol (28,3 µg/ml)
PM 23	männlich 52 Jahre	Todesursache aufgrund starker Fäulnisveränderungen nicht sicher feststellbar; Liegezeit unbekannt	keine Untersuchungen durchgeführt

PM 24	weiblich 68 Jahre	Akute Koronarinsuffizienz bei stenosierender Koronarsklerose, Hypertonie	BAK 0,85 ‰ UAK 0,96 ‰
PM 25	männlich 54 Jahre	Akute Koronarinsuffizienz mit Herzpumpversagen bei Vorschädigungen des Herzens durch massives Überschreiten der kritischen Herzmasse (1077 g); Reanimation	BAK 2,34 ‰ UAK 2,37 ‰
PM 26	männlich 67 Jahre	Sturz aus Höhe (Fallschirmabsturz)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 27	männlich 79 Jahre	Linksherzversagen bei ausgedehntem Weichteilhämatom bei Z. n. Schenkelhalsfraktur; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 28	männlich 67 Jahre	Akute Koronarinsuffizienz	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 29	männlich 63 Jahre	Akute Koronarinsuffizienz bei hochgradig stenosierender Koronarsklerose in Kombination mit Tracheobronchitis; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 30	weiblich 63 Jahre	Mischintoxikation mit Tramadol und Trazodon, in Wohnung verstorben; nach zwei Tagen lebend/tot auf Fußboden liegend aufgefunden	<u>OSV-Blut</u> BAK < 0,10 ‰ Aceton 21,4 mg/l Tramadol (1,01 µg/ml) Trazodon (2,21 µg/ml) Lorazepam (59,3 ng/ml)
PM 31	männlich 85 Jahre	Pneumonie nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma (Sturz im Garten); in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 32	männlich 59 Jahre	Schwere kombinierte Verletzungen (Sturz aus Höhe)	BAK < 0,10 ‰ UAK < 0,10 ‰
PM 33	weiblich 63 Jahre	Todesursache aufgrund starker Fäulnisveränderungen und Mumifizierung nicht sicher feststellbar; ca. vier Monate zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 34	männlich 77 Jahre	traumatisches Subduralhämatom und Subarachnoidalblutung; in Klinik verstorben	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 35	männlich 51 Jahre	Schweres, stumpfes Schädel-Hirn-Trauma (Sturz)	BAK < 0,10 ‰ UAK < 0,14 ‰
PM 36	männlich 59 Jahre	Schweres, stumpfes Schädel-Hirn-Trauma (Überrollung durch Fahrzeug)	BAK < 0,10 ‰ UAK < 0,10 ‰
PM 37	männlich 49 Jahre	Schwere kombinierte Verletzungen (Sturz aus Höhe)	BAK < 0,10 ‰ UAK < 0,10 ‰
PM 38	männlich 75 Jahre	Lungenarterienembolie bei Z. n. OP	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 39	männlich 48 Jahre	Schwere, kombinierte Verletzungen (Verkehrsunfall)	BAK < 0,10 ‰ UAK < 0,10 ‰
PM 40	weiblich 73 Jahre	Rauchgasvergiftung nach Wohnungsbrand	<u>OSV-Blut</u> Cyanid 0,82 µg/ml COHb 62,7 % Sättigung

Quelle: entsprechende Sektionsberichte der Verstorbenen, Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock (72)

2.13 GHB-Konzentrationen im Haar von KonsumentInnen

Insgesamt zehn ProbandInnen gaben auf dem zur Haarprobe gehörigen Fragebogen einen Konsum von GHB an. Das Haarmaterial wurde wie in Kapitel 2.5 und 2.6 dargestellt aufgearbeitet und die jeweiligen Extrakte mittels LC-MS/MS analysiert. Acht dieser zehn ProbandInnen gaben zusätzlich einen Konsum psychoaktiver Substanzen an, woraufhin ebenfalls eine Testung zum Nachweis dieser Betäubungsmittel erfolgte.

2.14 Äußere Faktoren als möglicher Einfluss auf endogene GHB-Konzentrationen

Um eine mögliche Beeinflussung endogener GHB-Konzentrationen im Haar durch äußere Faktoren aufzuzeigen, wurden mit jeder Haarprobe Angaben zur Haarbehandlung, Rauchverhalten, Rotweinkonsum, Medikamenteneinnahme und der Ernährungsweise (vegan/vegetarisch/Fleischkonsum) erhoben. Bei Fällen mit GHB-Haarkonzentrationen > 2 ng/mg erfolgte eine statistische Auswertung dieser Angaben.

2.14.1 Substananalyse von Betäubungsmitteln

Sofern ProbandInnen auf dem zur Haarprobe gehörigen Fragebogen Angaben zum Konsum anderer Substanzen getätigt hatten, wurden bei ausreichend vorhandener Menge Haarsubstanz verschiedene Untersuchungen zum Nachweis von Betäubungsmitteln durchgeführt. Die eingesetzten Methoden zählen zum Standardrepertoire eines forensisch-toxikologischen Labors und haben für das Promotionsvorhaben lediglich ergänzenden Charakter. Die konkreten Aufarbeitungsschritte sind daher dem Anhang (siehe Seite i) zu entnehmen.

2.14.1.1 Psychostimulanzien und andere relevante Betäubungsmittel

Zum (quantitativen) Nachweis von Amphetamin, Metamphetamin, 3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin (MDMA), 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), Morphin, Codein, Kokain, Ecgoninmethylester (EME), Methadon, Ketamin und Benzoylecgonin (BE) wurden die gemahlene Haare eingewogen, im Ultraschallbad exponiert, einer Festphasenextraktion unterzogen, derivatisiert und mittels GC-MS gemessen.

2.14.1.2 Cannabis

Von Proben, bei denen ein regelmäßiger Cannabiskonsum angegeben worden war, wurde eine Extraktion der Haare zum Nachweis von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) durchgeführt. Das gemahlene Haar wurde eingewogen, hydrolysiert, extrahiert, derivatisiert und mittels GC-MS gemessen.

2.15 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit SigmaPlot 13.0. Anhand von Boxplot- und Balkendiagrammen wurden die Ergebnisse dargestellt. Die jeweilige Box im Boxplot wurde vom 1. und 3. Quartil begrenzt und beinhaltete somit die Hälfte der Messwerte. Weiterhin erfolgte die Darstellung der Lage des Medians als Linie. Die jeweiligen Minima/Maxima wurden gekennzeichnet.

Zur Ermittlung der Unterschiede zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht der gleichen Altersklasse wurde als nicht-parametrischer Test der Man-Whitney-U-Test herangezogen. Ein p-Wert $\leq 0,05$ galt als Grenze für statistische Relevanz, ein p-Wert $\leq 0,01$ als hochsignifikant.

Weiterhin wurden die GHB-Konzentrationen im Haar auf das dazugehörige Geschlecht, Alter und die jeweilige Geschlecht-Alter-Subgruppe bezogen, um mögliche Zusammenhänge dieser Parameter auf die Konzentration des endogenen GHBs im Haar ermitteln zu können.

Sofern nicht anders gekennzeichnet erfolgte die Angabe des arithmetischen Mittelwerts mit \pm der Standardabweichung vom Mittelwert.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Programme entstammten dem Microsoft 365, Office 2019 Paket (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Chemische Strukturen wurden mit Hilfe der Website fishersci.de (73) gezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Linearität von GHB-Konzentrationen

Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs der extrahierten GHB-Konzentrationen von den eingesetzten Konzentrationen wurden Kalibrierfunktionen aufgezeichnet. Diese zeigten eine lineare Proportionalität, was für die Berechnung der GHB-Konzentration über den internen Standard eine Grundvoraussetzung darstellt (Abbildung 6).

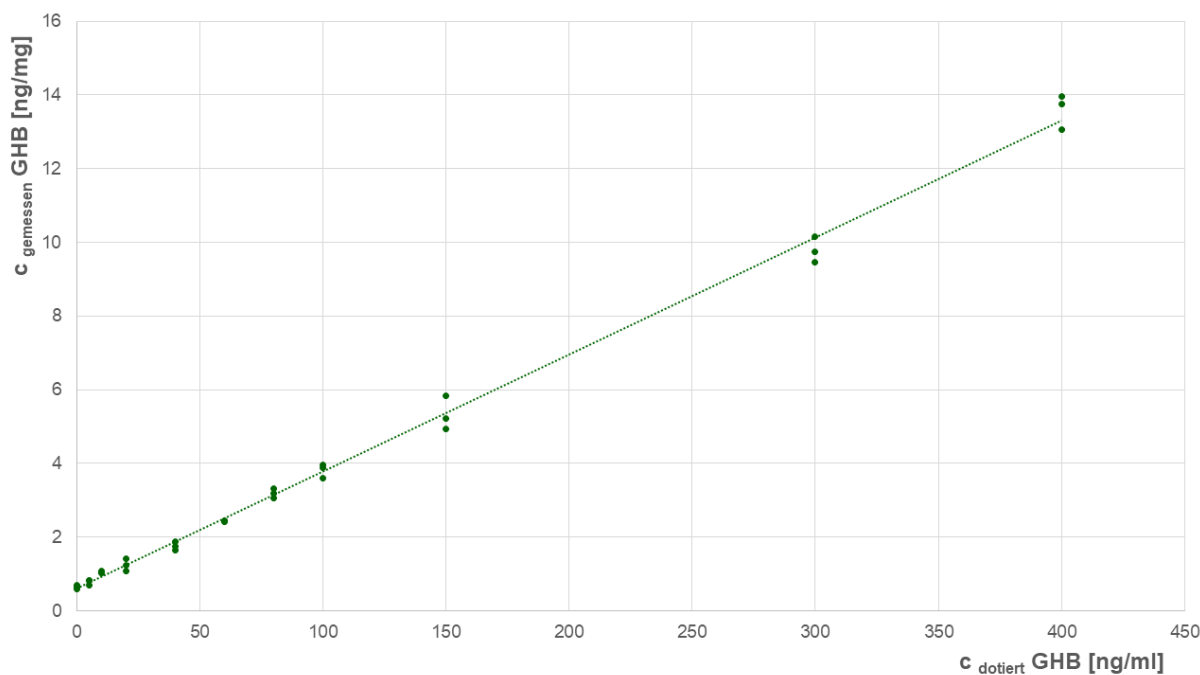


Abbildung 6: Linearität von dotierten und nach Extraktion aus Haaren gemessenen GHB-Konzentrationen

3.2 Ermittlung der optimalen Extraktionszeit

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, stiegen die GHB-Konzentrationen der Realfälle 1 und 2 innerhalb der ersten 2 h während der Extraktion im Ultraschallbad nahezu linear an, um nach 3–4 h ein Plateau an extrahierten GHB-Konzentrationen zu erreichen. Auch nach 5 beziehungsweise 6 h war keine relevante Zunahme der extrahierten Konzentrationen an GHB feststellbar. Der Realfall 3 hingegen zeigte in den ersten Stunden keinen linearen Zusammenhang, jedoch fand sich hier nach 2–4 h ebenfalls ein Plateau, welches infolge keine Konzentrationszunahme aufwies. Somit ist die Wahl von 4 h Extraktionszeit für die quantitative Bestimmung von GHB als ausreichend zu betrachten. Darüber hinaus stellt eine Extraktionszeit von 4 h eine im Laboralltag gut umsetzbare Probenvorbereitungszeit dar.

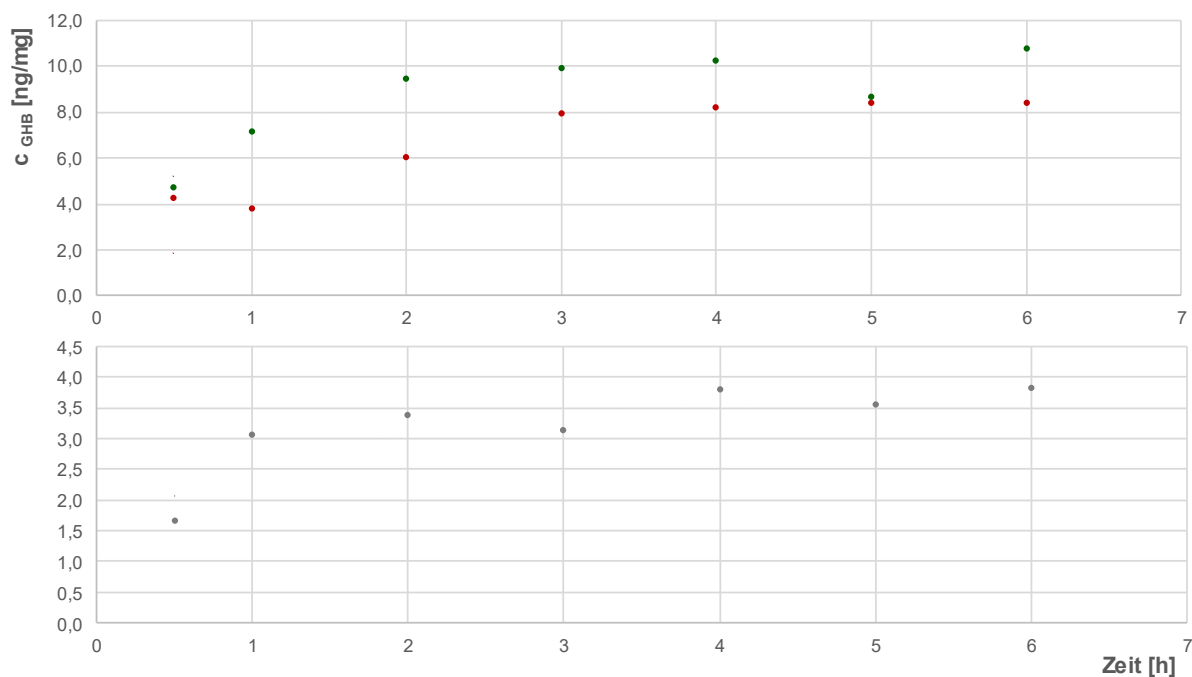


Abbildung 7: Extraktionsbedingungen über die Zeit; Fall 1 und 2 (oben), Fall 3 (unten)

3.3 Grundstatistik

Die GHB-Konzentrationen von 338 Haarproben wurden mittels einer LC-MS/MS-Methode bestimmt. Insgesamt zehn ProbandInnen gaben einen Konsum von GHB an, weswegen ihre Ergebnisse separat im Kapitel 3.8 GHB-Konzentrationen im Haar von KonsumentInnen vorgestellt werden. Haarproben von 17 ProbandInnen mussten von der Wertung ausgenommen werden – Gründe hierfür waren unter anderem nicht verwertbare Messergebnisse der LC-MS/MS (matrixgestörte Chromatographie, Intensitätsverhältnisse der Übergänge m/z außerhalb des zulässigen Bereichs) oder zu wenig Haarmaterial (beispielsweise für Kontrollmessungen bei eingangs nicht verwertbaren Messergebnissen der LC-MS/MS). Von den 321 in die Statistik eingehenden Proben stammten 124 von männlichen (38,7%) und 196 von weiblichen (61,3%) ProbandInnen, eine weitere Probe entstammte einem Friseur-Haarpool. Bei 294 der 321 Haarproben (91,6%) wurde eine Angabe zum Alter getätigt. Hier reichte das Alter der Männer von zwei bis 90 Jahren, der Median lag bei 30 Jahren (Mittelwert = 34 Jahre). Bei den Frauen zeigte sich eine Altersverteilung zwischen sieben und 85 Jahren, der Median lag hier bei 33 Jahren (Mittelwert = 38 Jahre). Die ermittelten Konzentrationen an GHB im Haar der 321 ProbandInnen sind Abbildung 8 zu entnehmen.

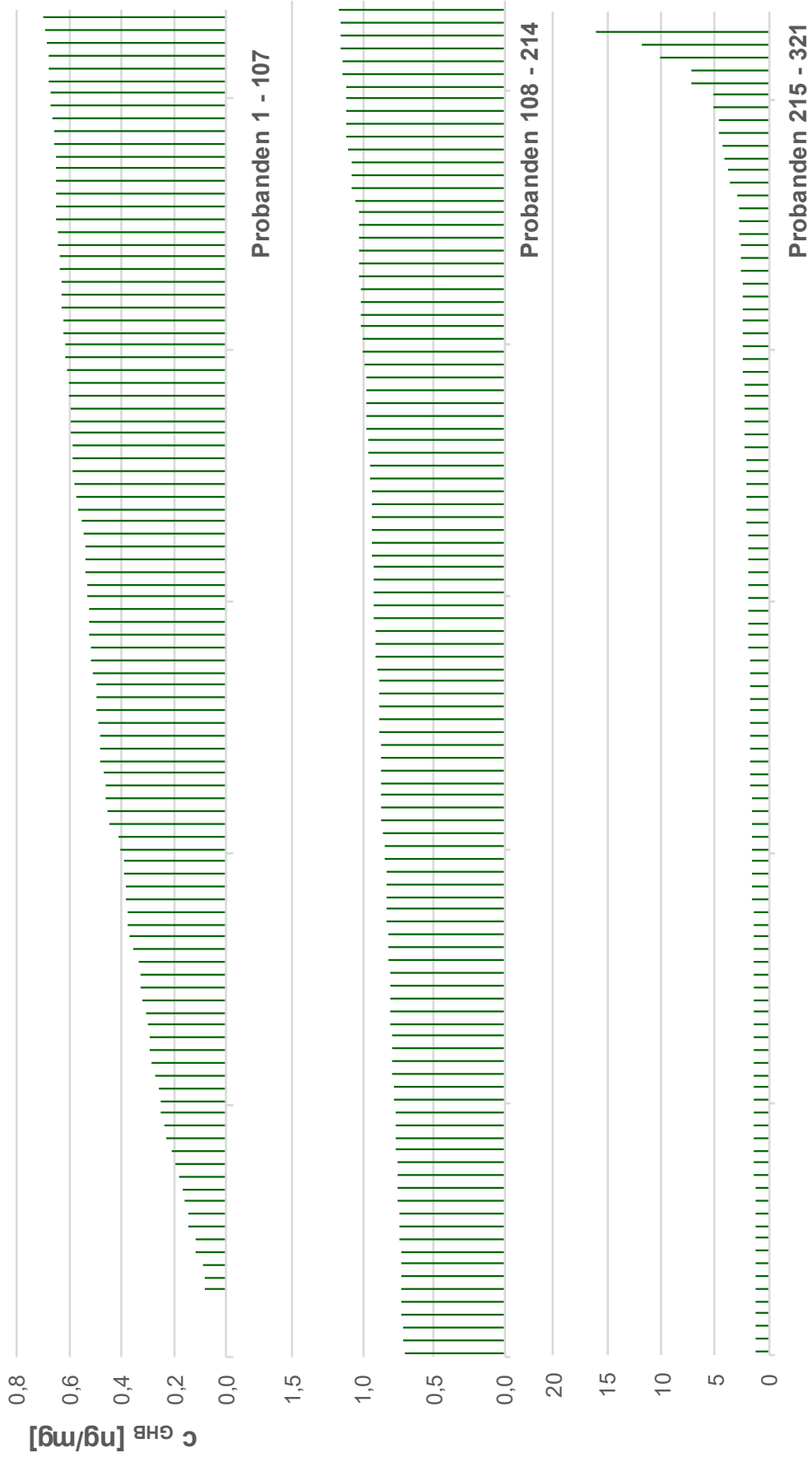


Abbildung 8: GHB-Konzentrationen im Haar der 321 ProbandInnen

Die endogenen GHB-Haarkonzentrationen betragen im Mittel $1,25 \pm 1,48$ ng/mg, der Median lag bei 0,89 ng/mg und die Spannweite aller Proben reichte von 0 bis 16,13 ng/mg. Bei fünf (1,6%) der 186 ProbandInnen war kein GHB-Signal detektierbar, hier wurde somit eine GHB-Konzentration von annähernd 0 ng/mg ermittelt. In 186 Fällen (57,9%) wurden GHB-Konzentrationen < 1 ng/mg Haar gemessen. Bei 251 Haarproben (78,2%) lag die GHB-Konzentration im Haar $< 1,5$ ng/mg. Konzentrationen von bis zu 2 ng/mg GHB im Haar wurden in 281 Proben (87,5%) ermittelt. Des Weiteren ist ersichtlich, dass in 308 Fällen (95,9%) (inkl. dem Friseur-Haarpool) GHB-Konzentrationen < 3 ng/mg Haar gemessen wurden. In insgesamt sechs Fällen wurden Konzentrationen zwischen 3 und 5 ng/mg ermittelt. Von den 321 Proben wurde nur in sieben Fällen (2,2%) eine GHB-Konzentration > 5 ng/mg nachgewiesen. Spitzenwerte von > 10 ng/mg erreichten drei ProbandInnen (0,9%). Für einen 21-jährigen männlichen Probanden wurde eine GHB-Konzentration von 10,1 ng/mg Haar ermittelt, es folgten mit 11,8 ng/mg GHB im Haar eine 20-jährige weibliche Probandin und der mit 16,1 ng/mg höchste Wert eines 28-jährigen männlichen Probanden.

Ein Vergleich aller Ergebnisse in Abhängigkeit vom Geschlecht der ProbandInnen ergab, dass männliche Studienteilnehmer tendenziell höhere GHB-Konzentrationen aufwiesen als Frauen (siehe Abbildung 9). Aus Übersichtsgründen dargestellt sind alle ProbandInnen mit Konzentrationen GHB < 5 ng/ml ($n = 113$). Die übrigen sieben Fälle sowie der Friseur-Haarpool wurden mit besprochen, jedoch nicht in Abbildung 9 (und Abbildung 10) abgebildet.

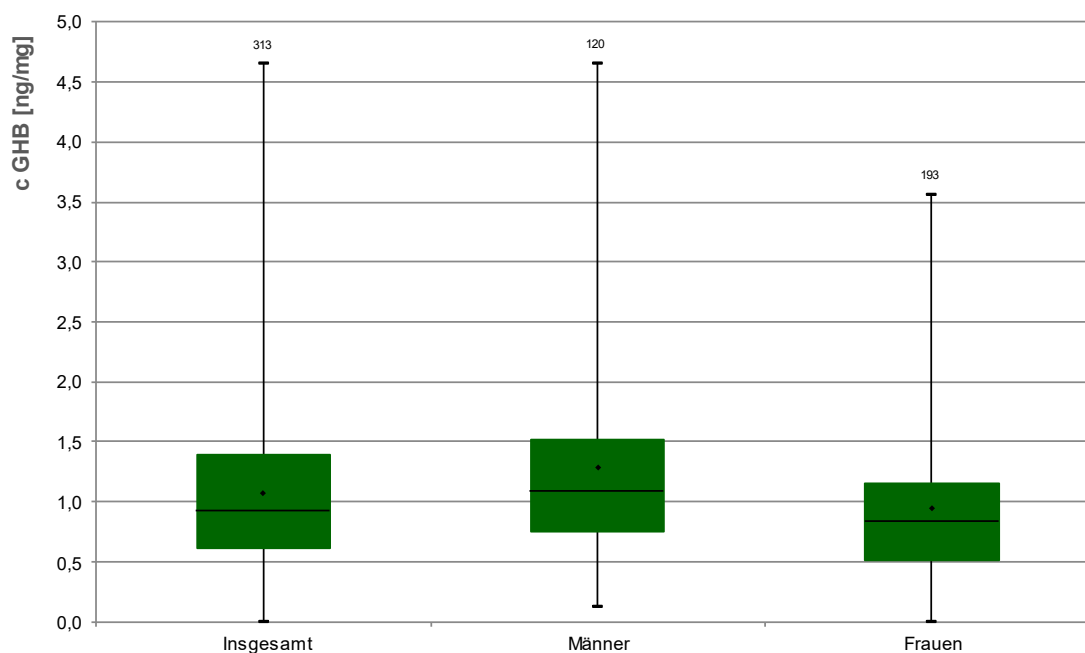


Abbildung 9: GHB-Konzentrationen im Haar in Abhängigkeit vom Geschlecht der Probanden ($n_{\text{gesamt}} = 313$, $n_{\text{Männer}} = 120$, $n_{\text{Frauen}} = 193$)

GHB-Haarkonzentrationen reichten bei den Männern von 0,12 bis 16,1 ng/mg, bei den Frauen von 0 bis 11,8 ng/mg. Der Median lag beim männlichen Geschlecht bei 1,09 ng/mg, beim weiblichen Geschlecht bei 0,79 ng/mg GHB im Haar. Die durchschnittliche GHB-Konzentration im Haar der Männer betrug $1,55 \pm 1,85$ ng/mg, die der Frauen $1,05 \pm 1,15$ ng/mg. Bei den Männern wurde in acht Fällen eine GHB-Konzentration im Haar > 3 ng/mg ermittelt, vier davon zeigten Werte > 5 ng/mg und für zwei der Fälle hiervon wurden Konzentrationen > 10 ng/mg ermittelt. Bei den Frauen hingegen wiesen nur vier der Fälle eine GHB-Konzentration > 3 ng/mg auf, drei davon > 5 ng/mg und nur eine Frau mit mehr als 10 ng/mg. Somit zeigte sich bei Frauen eine hochsignifikant geringere endogene GHB-Konzentration im Haar als beim männlichen Geschlecht ($p < 0,001$).

Um die Ergebnisse der Personen hinsichtlich der GHB-Konzentrationen unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht zu betrachten, wurden sie in acht Altersklassen (≤ 19 Jahre, 20–29 Jahre, 30–39 Jahre, 40–49 Jahre, 50–59 Jahre, 60–69 Jahre, 70–79 Jahre, 80–89 Jahre) unterteilt. Für jede der Klassen wurden jeweils die Gesamtergebnisse sowie die Ergebnisse für Frauen und Männer separat gegenübergestellt (siehe Abbildung 10).

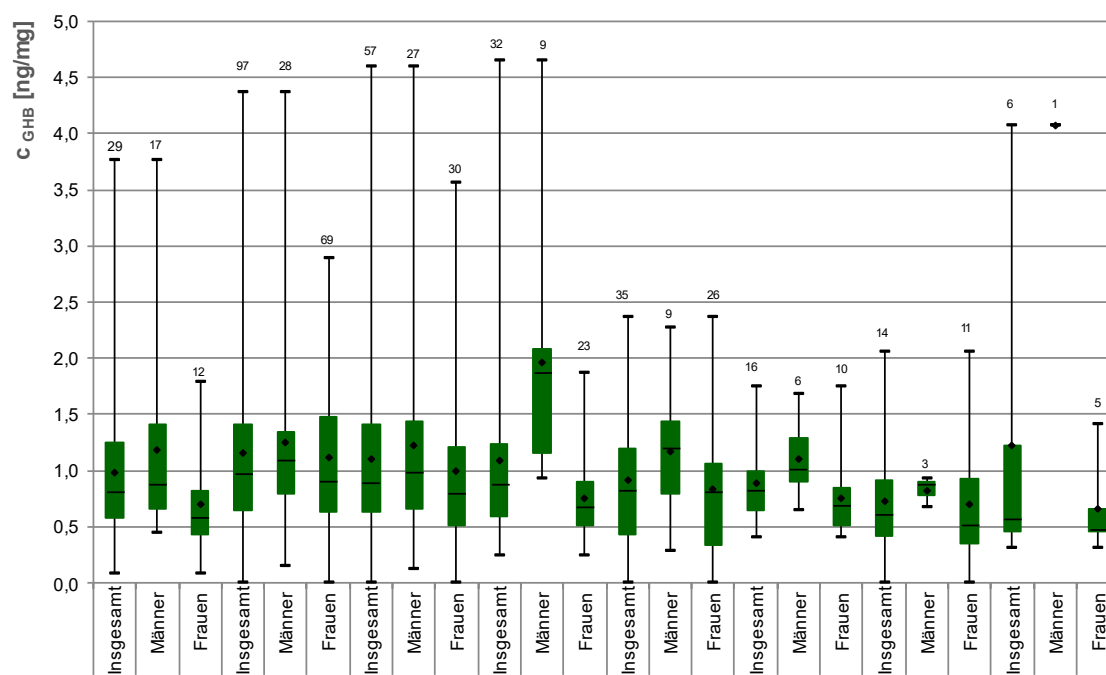


Abbildung 10: GHB-Konzentrationen im Haar unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht der Probanden (GHB-Konzentrationen > 5 ng/mg wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt)

Die Kohorte ≤ 19 Jahre setzte sich zusammen aus zwölf Proben weiblicher und 17 Proben männlicher Probanden (gesamt 29). Mittels LC-MS/MS gemessene endogene GHB-Konzentrationen verteilten sich bei den Frauen zwischen 0,08 ng/mg und 1,79 ng/mg, bei den Männern zwischen 0,45 und 3,76 ng/mg. Der Median des weiblichen Geschlechts lag bei

0,58 ng/mg, der des männlichen Geschlechts bei 0,88 ng/mg GHB im Haar. Die Unterschiede der GHB-Konzentrationen im Haar von Männern und Frauen dieser Kohorte waren statistisch signifikant ($p = 0,035$).

Die Kohorte mit der größten Probandenanzahl war die der 20–29-jährigen, bestehend aus 71 Proben weiblicher und 32 Proben männlicher Probanden (gesamt 103). Konzentrationen an GHB im Haar reichten hier bei den Frauen von 0 bis 11,85 ng/mg, bei den Männern von 0,15 bis 16,13 ng/mg. Der Median der Frauen lag bei 0,93 ng/mg, der der Männer bei 1,26 ng/mg. Ermittelte Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,085$).

Zweitgrößte Kohorte mit 57 Proben war die Gruppe der 30–39-jährigen. Insgesamt 30 weibliche und 27 männliche Probanden wiesen GHB-Konzentrationen im Haar von 0 bis 3,56 ng/mg (Frauen) bzw. 0,12 bis 4,6 ng/mg (Männer) auf, der Median lag bei den Frauen bei 0,8 ng/mg, bei den Männern bei 0,99 ng/mg. Auch hier waren Unterschiede zwischen den Geschlechtern statistisch nicht signifikant ($p = 0,167$).

Insgesamt 33 Proben zählte die Gruppe der 40–49-jährigen, bestehend aus 24 weiblichen und neun männlichen Probanden. GHB-Konzentrationen im Haar von 0,24 bis 5,19 ng/mg beim weiblichen und von 0,93 bis 4,66 ng/mg beim männlichen Geschlecht wurden hier verzeichnet. Der Median lag bei den Frauen bei 0,67 ng/mg, bei den Männern bei 1,88 ng/mg. Hier zeigte sich wiederum ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = <0,001$).

In der Kohorte der 50–59-jährigen waren 26 Frauen und neun Männer vertreten (gesamt 35). Es wurden Werte von 0 bis 2,37 ng/mg bei den Frauen und 0,29 bis 2,27 ng/mg bei den Männern verzeichnet. Der Median der Frauen lag bei 0,81 ng/mg, der der Männer bei 1,2 ng/mg. Errechnete Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,126$).

In den älteren Kohorten ließen sich aufgrund geringer Probandenanzahl keine aussagekräftigen Signifikanzen ermitteln. In den Kohorten der über 60- bis 90-jährigen wurden in fast allen Fällen GHB-Konzentrationen im Haar <2 ng/mg gemessen. Ausnahmen waren mit 2,06 ng/mg GHB im Haar eine 77-jährige Frau und mit 4,07 ng/mg ein 85-jähriger Mann.

Der mit 90 Jahren älteste Proband war männlich, seine gemessene endogene GHB-Konzentration betrug 0,4 ng/mg, die älteste Frau war 85 Jahre alt mit einer Konzentration von 0,3 ng/mg GHB im Haar.

Von 26 ProbandInnen war das Alter nicht bekannt, diese wurden daher nicht in Abbildung 10 berücksichtigt.

Es wurden Haarlängen von 0,5 bis 46 cm beim weiblichen und 0,5 bis 40 cm beim männlichen Geschlecht dokumentiert. Im Median betrug die Haarlänge bei den Frauen 15,0 cm, bei den Männern 6,0 cm. Neben ungefärbten Haaren fanden sich gefärbte, getönte, gesträhte und gebleichte Haare unterschiedlichster Farbnuancen bei beiden Geschlechtern.

3.4 GHB-Konzentrationen über mehrere Haarsegmente

In 138 Fällen wurden die Haarproben segmentiert (72 x 2 Segmente, 34 x 3 Segmente, 22 x 4 Segmente, 5 x 5 Segmente, 3 x 6 Segmente, 1 x 7 Segmente, 1 x 8 Segmente), wobei 111 der Haarproben von Frauen und 27 von Männern stammten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Anzahl der pro Fall generierten Haarsegmente, aufgeteilt nach Frauen und Männern

	gesamt	Frauen	Männer
Anzahl Segmente	138	111	27
2 Segmente	72	54	18
3 Segmente	34	28	6
4 Segmente	22	20	2
5 Segmente	5	5	0
6 Segmente	3	3	0
7 Segmente	1	0	1
8 Segmente	1	1	0

Die einzelnen Segmente maßen eine Länge von 1,5–22,0 cm, bedingt durch die Dichte der abgenommenen Haarsträhnen und der somit zur Verfügung stehenden Probenmenge (siehe Tabelle 6). Im Median wiesen die Segmente der Frauen eine Länge von 6,0 cm, die der Männer eine Länge von 4,5 cm auf.

Tabelle 6: Länge der untersuchten Haarsegmente [cm]

1. Segment	1,5 – 11,0
2. Segment	2,0 – 19,0
3. Segment	2,0 – 17,0
4. Segment	2,0 – 22,0
5. Segment	3,0 – 8,0
6. Segment	6,0 – 8,0
7. Segment	6,0 – 10,0
8. Segment	8,0

Von 66 segmentierten Haarproben mit ≥ 3 Segmenten hat die Konzentration an GHB in 50 Fällen (75,8%) über die einzelnen Segmente in einem Bereich $\pm 0,5$ ng/mg GHB weder merklich zu- noch abgenommen. In zwei Fällen nahm die Konzentration von proximal nach distal zu, in acht Fällen ab. Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Abnahme endogener GHB-Konzentrationen im Haar anhand von vier Haarproben. Bei sechs der 66 Proben schwankten die intraindividuellen GHB-Konzentrationen in Bereichen $> 0,5$ ng/mg GHB.

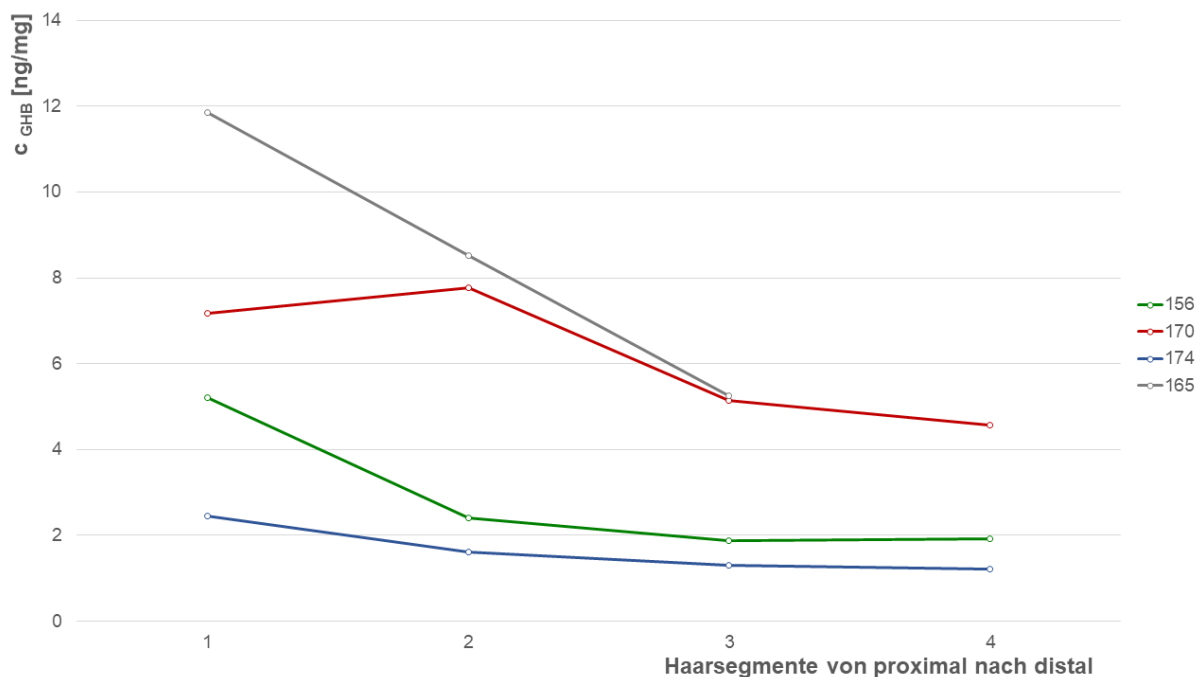


Abbildung 11: Abnahme der GHB-Konzentrationen im Haar über mehrere Segmente

3.5 GHB-Rückstände in organischen Waschlösungen

Von 178 Haarproben (ProbandInnen 161 bis 338) wurden während des Waschvorgangs Rückstellproben gesammelt. Mittels LC-MS/MS wurde jeweils eine unkonzentrierte/direkte und eine aufkonzentrierte Probe von der dritten destillierten Wasserlösung, Methanol, Aceton und Diethylether gemessen. Die ersten beiden destillierten Wasserlösungen wurden zum Schutz der Geräte vor potentiellen Rückständen der Detergenzlösung nicht analysiert.

Bei zwei der nicht aufkonzentrierten Waschproben mit Wasser konnten geringe Signale an GHB detektiert werden. Dies entsprach einem prozentualen Anteil von 1,1 %. Bei den stark aufkonzentrierten Waschlösungen (Faktor 20) ergab sich für weitere vier Fälle die Detektion eines GHB-Signals. Somit wurde bei insgesamt sechs Fällen GHB in der dritten Waschlösung nachgewiesen (3,4 %). In den nicht aufkonzentrierten Rückstellproben des Methanols wurde in sieben Fällen (3,9 %) ein GHB-Signal gemessen. Mit 35 Proben (19,7 %) fanden sich bei den aufkonzentrierten Methanol-Lösungen bei einem beträchtlichen Anteil messbare GHB-Rückstände. In zwei (1,1 %) der nicht aufkonzentrierten und zwölf (6,7 %) der aufkonzentrierten Acetonwaschlösungen war ein GHB-Signal messbar. Bei den Rückstellproben des nicht aufkonzentrierten Diethylethers hingegen konnte in keine der Proben ein Signal von GHB detektiert werden. In den aufkonzentrierten Diethylether-Lösungen war in zwei Fällen (1,1 %) ein Rückstand nachweisbar.

3.6 GHB-Konzentrationen im Haar bei Lagerung über mehrere Wochen

Es sollte untersucht werden, inwieweit die Lagerungsbedingungen der Haarproben (bei Raumtemperatur, lichtgeschützt, jeweils in einer Plastiktüte aufbewahrt) einen Einfluss auf die messbare Konzentration an GHB im Haar besitzen. Dazu wurde das Haar eines männlichen Probanden über mehrere Wochen regelmäßig beprobt und analysiert (siehe Abbildung 12).

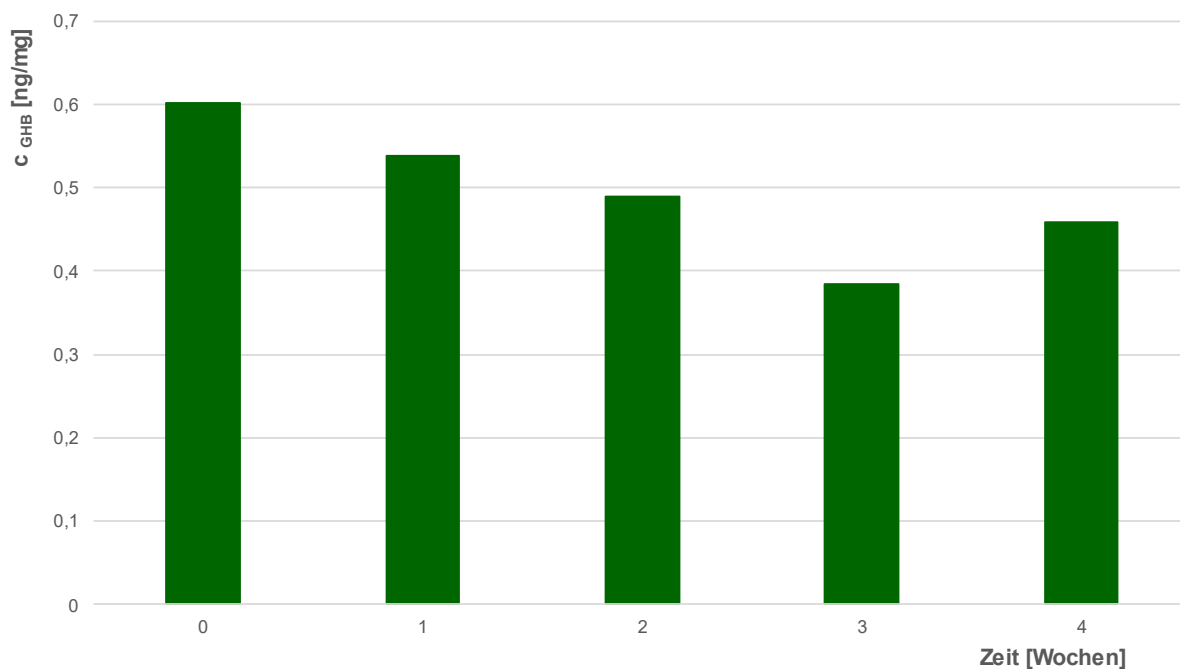


Abbildung 12: GHB-Konzentrationen im Haar nach 0, 1, 2, 3 und 4 Wochen Lagerung

Bei der initialen Messung zeigte sich eine endogene GHB-Konzentration von 0,6 ng/mg. Die folgenden vier Messungen im Abstand von jeweils einer Woche ergaben Konzentrationen von 0,54 ng/mg, 0,49 ng/mg, 0,38 ng/mg und 0,46 ng/mg. Dies entspricht Abnahmen an GHB von 10–37 % (und liefert erste Anhaltspunkte dafür, dass die Haarproben zügig analysiert werden sollten).

Auch bei diesem Versuch wurden von den jeweiligen Waschlösungen Rückstellproben erstellt, um mögliche vorhandene GHB-Konzentrationen mittels LC-MS/MS nachweisen zu können. Hierbei war in keiner der Proben ein GHB-Signal detektierbar.

3.7 Verteilung der GHB-Konzentrationen im postmortalen Haar

Ermittlungen der postmortalen GHB-Konzentrationen in Haaren aus 40 Sektionsfällen ergaben Konzentrationen von 0,15 ng/mg bis 7,9 ng/mg (siehe Abbildung 13). Der Median lag bei 1,86 ng/mg, der Mittelwert bei $2,13 \pm 1,7$ ng/mg. In zehn Haarproben (25 %) wurden GHB-

Konzentrationen im Haar < 1 ng/mg und in 16 Haarproben (40 %) $< 1,5$ ng/mg gemessen. Bei 23 Fällen (57,5 %) wurden Werte < 2 ng/mg Haar ermittelt. In 31 von 40 Fällen (77,5 %) war die Konzentration niedriger als 3,0 ng/mg, weitere sieben Fälle wiesen Konzentrationen $< 5,0$ ng/mg auf. Insgesamt wiesen somit 38 der 40 Verstorbenen (95 %) GHB-Konzentrationen im Haar $< 5,0$ ng/mg auf. Bei zwei Haarproben (5 %) wurden Werte > 5 ng/mg gemessen. Von den 40 Verstorbenen waren 20 Männer und 20 Frauen. Die Altersverteilung der Frauen lag bei 5–96 Jahren, die der Männer bei 9–85 Jahren. Der Altersdurchschnitt der Frauen lag bei 66,7 Jahren, der der Männer bei 59,4 Jahren. Im Median wurden die Frauen 68 und die Männer 58,5 Jahre alt. Die Haarproben von vier weiteren Verstorbenen konnten nicht in die Wertung mit einbezogen werden – Gründe hierfür waren nicht verwertbare Messergebnisse der LC-MS/MS (matrixgestörte Chromatographie, Intensitätsverhältnisse der Übergänge m/z außerhalb des zulässigen Bereichs).

Rückschlüsse auf die Liegezeit der Verstorbenen oder eventuell vorhandene ketotische Stoffwechsellagen zu Lebzeiten (mit daraus resultierenden potentiellen Einflüssen auf die Messung der GHB-Konzentrationen im Haar mittels LC-MS/MS aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Ketonkörpers β -Hydroxybutyrat) ließen sich anhand des im Rahmen der Dissertation analysierten Datenpools nicht ziehen. Des Weiteren konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Haarmatrix einzelner Haarproben Verstorbener von außen stark mit Fäulnismaterial kontaminiert worden war und somit möglicherweise Spuren von GHB oder anderen Fäulnisprodukten ins Haar eingelagert wurden, welche sich ggf. auch durch den mehrstufigen Waschvorgang der Probenvorbereitung nicht abwaschen haben lassen.

Weiterführende Untersuchungen zu diesem Aspekt sollten perspektivisch erfolgen.



Abbildung 13: GHB-Konzentrationen im Haar von 40 Verstorbenen

3.8 GHB-Konzentrationen im Haar von KonsumentInnen

Von den zehn Haarproben stammten drei von weiblichen und sieben von männlichen Probanden. Es zeigte sich eine Altersverteilung von 24–28 Jahren bei den Frauen und 18–38 Jahren bei den Männern. Das Durchschnittsalter lag bei 26,3 Jahren, der Median bei 25,5 Jahren. Haarlängen von 7–40 cm wurden dokumentiert und bis auf einen der Fälle wurden alle der Proben segmentiert (5 x 2 Segmente, 1 x 3 Segmente, 2 x 5 Segmente, 1 x 6 Segmente). Fünf ProbandInnen sagten aus, in der Wohnung zu rauchen, zwei sich vegetarisch zu ernähren. Als Medikation erfolgte einmal die Angabe der Verwendung eines Antihistaminikums, ein anderes Mal zur HIV-Präexpositionsprophylaxe (HIV-PrEP). Insgesamt acht ProbandInnen machten Angaben zum Konsum weiterer Betäubungsmittel, genannt wurden MDMA (7x), Amphetamin (5x), Kokain (5x), Cannabis (3x), Ketamin (3x), LSD (3x), 2C-B (1x) und DMT (1x). Dabei waren Mehrfachangaben feststellbar. Nachgewiesen wurden Amphetamin, MDMA, Ketamin und Kokain in acht von acht, MDA in fünf, Methamphetamin in vier, EME und BE in drei bzw. acht Fällen. Im Mittel betragen die GHB-Konzentrationen im Haar $3,52 \pm 3,14$ ng/mg, der Median lag 1,56 ng/mg bei einer Spannweite der Messergebnisse von 1,16 bis 9,81 ng/mg. Fünf von zehn Proben wiesen hierbei eine GHB-Konzentration im Haar von < 3 ng/mg auf, eine schwankte je nach Segment mit Werten von 1,5–3,0 ng/mg GHB, vier weitere zeigten Werte deutlich > 3 ng/mg GHB. Jene vier Fälle wurden im Detail betrachtet, es folgen zunächst die vorhandenen zugehörigen Informationen in Kurzform.

Fall 1 (Proband 191): männlich, 38 Jahre. Haarlänge 7 cm, braune Haarfarbe. Weitere BtM: Amphetamin, MDMA, Kokain. GHB-Konsum: täglich. Mittels LC-MS/MS gemessene GHB-Konzentrationen betragen 9,2 ng/mg – 10,2 ng/mg. Nachweis von: Amphetamin (6,1 ng/mg), Methamphetamin (6,9 ng/mg), MDMA (1,0 ng/mg), Kokain (3,8 ng/mg), Ecgoninmethylester (EME, 0,1 ng/mg), Ketamin (4,4 ng/mg), Benzoylcegonin (BE, 1,2 ng/mg).

Fall 2 (Proband 284): männlich, 25 Jahre. Haarlänge 8 cm, 2 Segmente (2 x 4 cm), schwarze Haarfarbe. Medikation: *Truvada* (PrEP), *Kamagra* (Sildenafil). Weitere BtM: MDMA. GHB-Konsum: monatlich. Für das erste Segment ergaben sich Messwerte von 3,2–4,8 ng/mg. Das zweite Segment etwas niedriger mit 3,5 – 4,1 ng/mg. Nachweis von: Amphetamin (1,8/2,2 ng/mg), Methamphetamin (0,02/0,03 ng/mg), MDMA (6,0/7,7 ng/mg), MDA (0,1/0,2 ng/mg), Kokain (0,5/0,8 ng/mg), Ketamin (6,8/6,5 ng/mg), BE (0,1/0,2 ng/mg).

Fall 3 (Proband 287): männlich, 27 Jahre: Haarlänge 7 cm, 2 Segmente (2 x 3,5 cm), schwarze Haarfarbe. Weitere BtM: Kokain, LSD, Amphetamin, MDMA. GHB-Konsum: nicht spezifiziert. 3,6–3,8 ng/mg GHB im ersten Segment, 2,2–2,6 ng/mg im zweiten Segment. Nachweis von: Amphetamin (0,2/0,3 ng/mg), MDMA (0,6/1,2 ng/mg), MDA (0,1 ng/mg), Kokain (0,4/0,8 ng/mg), Ketamin (1,9/3,9 ng/mg), BE (0,3 ng/mg).

Fall 4 (Probandin 288): weiblich, 28 Jahre. Haarlänge 40 cm, 6 Segmente (3,5 cm/4,0 cm/5,0 cm/6,0 cm/8,0 cm/13,5 cm), schwarze Haarfarbe mit lila gefärbten Spitzen. Weitere BtM: MDMA, Amphetamin, Kokain, 2C-B, DMT, Cannabis und LSD. GHB-Konsum: 1–4x wöchentlich. Die GHB-Konzentrationen über die sechs Segmente zeigt Abbildung 16. Nachweis von (jeweils in sämtlichen Segmenten): Amphetamin (5,9 – 14,3 ng/mg), Methamphetamin (0,04–0,1 ng/mg), MDMA (4,0–14,3 ng/mg), MDA (0,2–0,5 ng/mg), Kokain (6,4–23,8 ng/mg), EME (0,06–0,3 ng/mg), Ketamin (15,8–31,5 ng/mg), BE (2,8–16,4 ng/mg) – siehe Abbildung 17.

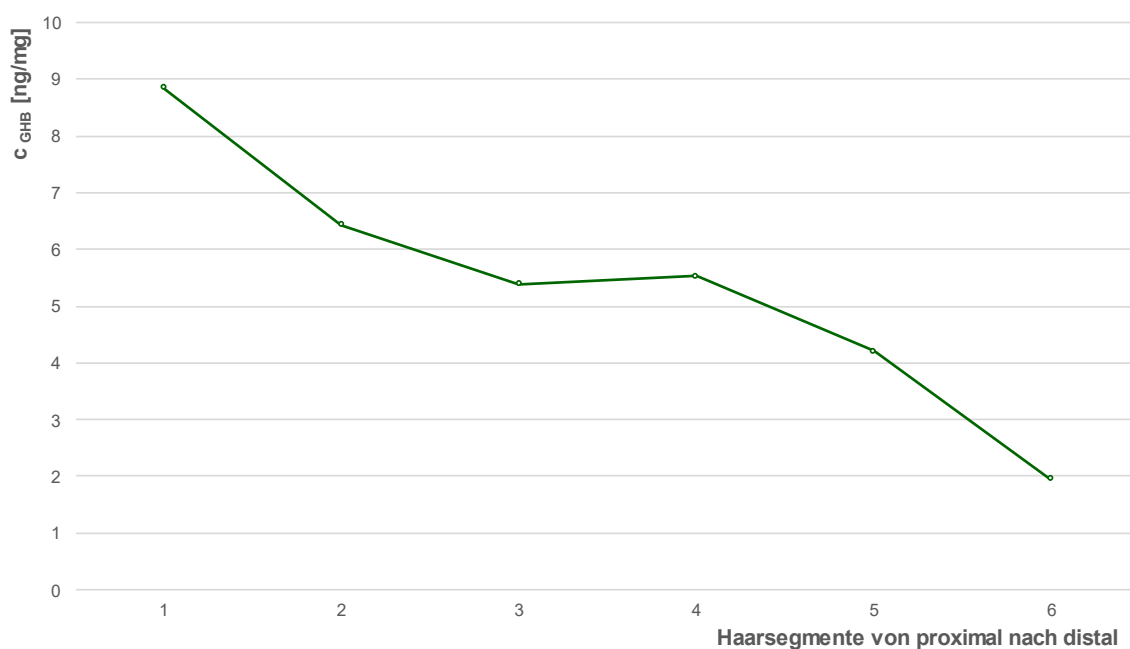


Abbildung 14: Fall 4; GHB-Konzentrationen im Haar über 6 Segmente

Abbildung 14 zeigt die Abnahme der GHB-Konzentration von proximal nach distal im segmentierten Haar einer 28-jährigen Probandin, welche angab, 1–4x wöchentlich GHB zu konsumieren. Während das proximale Segment eine GHB-Konzentration von 8,86 ng/mg im Haar aufwies, fiel diese bis zum distalen Segment kontinuierlich bis auf eine Konzentration von 1,95 ng/mg ab. Dies entsprach einer Konzentrationsabnahme von proximal nach distal um 78%. Nimmt man eine Haarwachstumsgeschwindigkeit von ca. 1 cm pro Monat an (71), war das 40 cm lange Haar der Probandin an seiner Spitze bis zu 3,3 Jahre alt. Die stetig abnehmende GHB-Konzentration im Haar ließe auf eine Intensivierung ihres Konsumverhaltens über die Jahre rückschließen. Im Anbetracht der Tatsache, dass die Haare über diese Zeitspanne hinweg jedoch auch einer Vielzahl äußerer Einflüsse unterlagen (UV-Lichteinstrahlung, häufiges Waschen, ggf. thermisches Glätten u. s. w.) und die Spitzen eine lila Färbung aufwiesen (was bei schwarzer Grundfarbe ein vorheriges Bleichen voraussetzt),

ließ sich keine eindeutige Folgerung aus der Konzentrationszunahme über die Zeit ziehen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um eine Kombination mehrerer Faktoren handeln könnte.

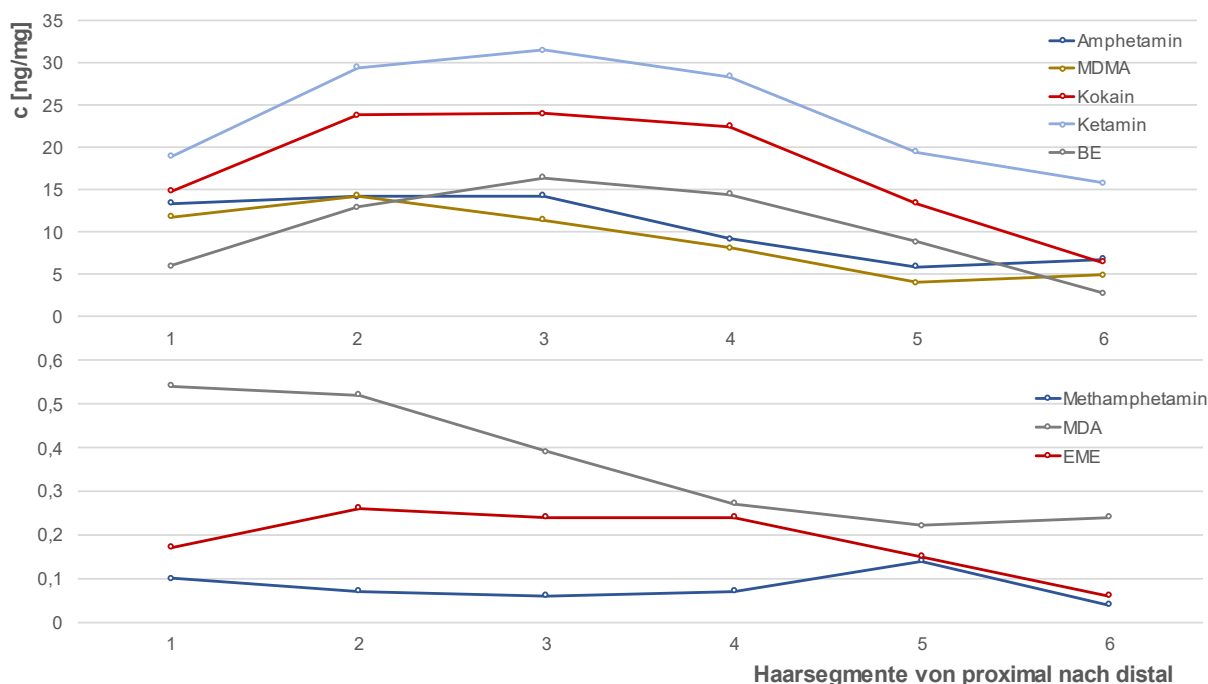


Abbildung 15: Fall 4; Konzentrationen psychoaktiver Substanzen im Haar über 6 Segmente

Abbildung 15 zeigt die Konzentrationen diverser Betäubungsmittel im Haar der 28-jährigen Probandin über sechs Segmente bzw. einen Zeitraum von ungefähr 3,3 Jahren. Es ist ersichtlich, dass die Substanzen Amphetamin, Kokain, Benzoyllecgonin, Ketamin und MDMA ihre höchsten Konzentrationen im zweiten bis vierten Segment aufwiesen und gemessene Konzentrationen in den Segmenten (und somit auch in den Zeiträumen) davor und danach abnahmen. Ein ähnlicher Verlauf ist beim Ecgoninmethylester zu verzeichnen. Die Konzentrationen von Methamphetamin sowie MDA nahmen mit der Zeit und nach proximal hingegen leicht zu. Demnach ist zu schlussfolgern, dass die Probandin im Zeitraum von vor siebeneinhalb Monaten bis anderthalb Jahre vor Entnahme der Haarprobe eine Phase gesteigerten Substanzkonsums durchlebte. Wie bereits erwähnt, lässt sich jedoch ein „Herauswaschen“ und auch ein Anhaften von außen an die Haare im Laufe der Zeit nicht ausschließen.

3.9 Äußere Faktoren als möglicher Einfluss auf endogene GHB-Konzentrationen

Insgesamt 40 ProbandInnen wiesen GHB-Konzentrationen im Haar >2 ng/mg auf. Hiervon bejahten vier weibliche Probanden eine Haarbehandlung (1x Henna, 1x Farbe, 1x gefärbte Spitzen, 1x blondierte Spitzen). In der letztgenannten, segmentierten Haarprobe ließ sich eine Konzentrationsabnahme von proximal nach distal von 11,8 auf 5,26 ng/mg GHB feststellen (siehe Abbildung 16).

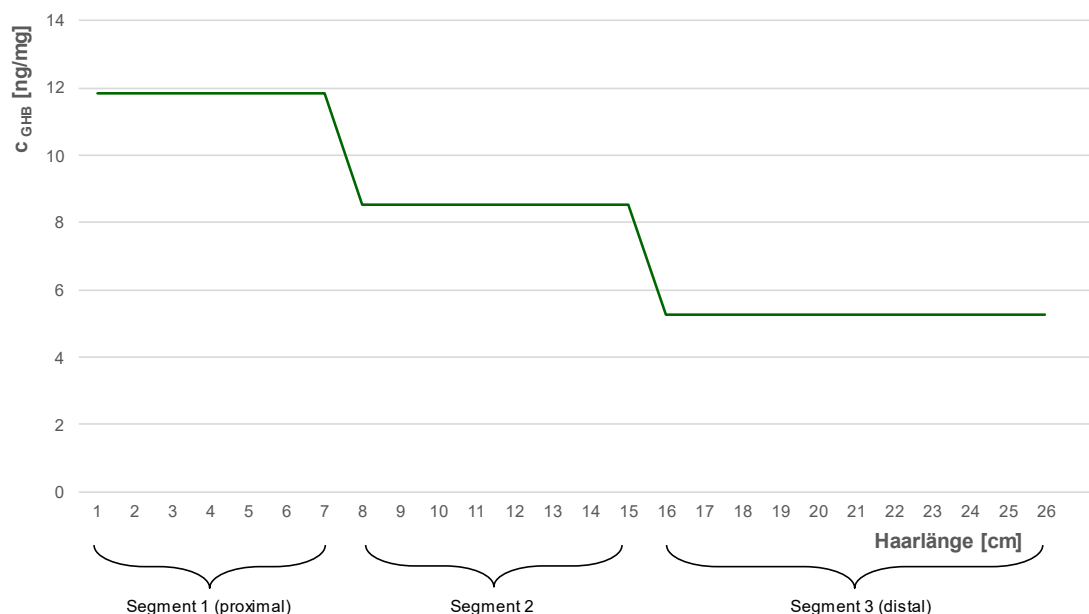


Abbildung 16: Abnahme der GHB-Konzentration im Haar einer 20-jährigen Probandin bei gebleichten Haarspitzen

Sieben (von insgesamt 44) ProbandInnen gaben an zu rauchen. Es fiel auf, dass diese sieben, neben sieben weiteren ProbandInnen, ebenfalls einen Cannabiskonsum aufführten. Zum Genuss von Rotwein fanden sich unterschiedlichste Angaben (täglich, wöchentlich, monatlich, selten), ein statistischer Zusammenhang konnte hier nicht festgestellt werden. Elf ProbandInnen führten eine Medikamenteneinnahme auf (insgesamt fand sich in 43 Fällen eine positive Medikamentenanamnese; genannt wurden u. a. orale Kontrazeptiva, Analgetika, Antihistaminika, Asthmatherapeutika und Medikation ohne nähere Bezeichnung) und weitere zehn (von insgesamt 22 VegetarierInnen und 3 VeganerInnen) gaben zudem an, sich vegetarisch zu ernähren.

3.9.1 Substanzanalyse – Toxikologische Befunde

Insgesamt 47 der 321 ProbandInnen (14,6 %) gaben einen Substanzkonsum an. Mit absteigender Häufigkeit fanden folgende Betäubungsmittel Erwähnung: Cannabis (33x), MDMA (20x), Amphetamin (18x), Kokain (7x), Ketamin (6x), LSD (6x), Pilze (5x),

Methamphetamin (1x), N,N-Dimethyltryptamin (DMT, 1x), Morphin (1x), Heroin (1x) und 25I-NBOMe (1x). Sechs TeilnehmerInnen bejahten einen Konsum, spezifizierten ihre Angabe jedoch nicht. In 14 Fällen wurde ausschließlich eine Substanz genannt, in je zehn Fällen fanden zwei bzw. drei Betäubungsmittel Erwähnung. Drei der ProbandInnen gaben den Konsum von vier, weitere zwei von fünf verschiedenen Substanzen an. Jeweils ein/eine TeilnehmerIn führte sechs bzw. acht Betäubungsmittel auf. Zur Häufigkeit erfolgten Angaben von ein oder wenige Male jährlich bis hin zur täglichen Einnahme.

Von den BtM-konsumierenden ProbandInnen wurden 22 Haarproben dem Testverfahren auf Psychostimulanzien und anderen relevanten Betäubungsmitteln unterzogen, wovon neun der 22 auch den Konsum von GHB bejahten und daher in Auszügen im dazugehörigen Kapitel behandelt wurden. Bei den restlichen 13 ProbandInnen wurde Amphetamin in zehn, MDMA in acht, Kokain in sechs, dessen Abbauprodukte EME bzw. BE in einem bzw. sechs, Ketamin in sechs, MDA, Methamphetamin und Morphin in jeweils einem Fall nachgewiesen. Fünf der ProbandInnen machten hierbei übereinstimmende Angaben zu ihrem Konsumverhalten, in einem Fall konnten Spuren von zwei Substanzen zusätzlich detektiert werden und bei fünf weiteren Probanden fanden sich weniger Nachweise als angegeben worden waren oder sogar gar keine. Weitere zehn Haarproben wurden bei Angabe zum regelmäßigen Konsum von Cannabis einem Testverfahren auf THC unterzogen, wobei in nur einem Fall ein positiver Nachweis erbracht werden konnte.

18 der 47 ProbandInnen mit positiver BtM-Anamnese wiesen endogene GHB-Haarkonzentrationen > 2 ng/mg auf, aufgeführt wurden: Cannabis (14x), MDMA (9x), LSD und Amphetamin (jeweils 6x), Kokain (4x), Ketamin und Pilze (jeweils 3x).

4 Diskussion

Während Blut und Urin sich als bewährte Matrizes zum Nachweis akuter Intoxikationen erweisen, stellt das menschliche Haar eine Möglichkeit dar, sowohl chronischen Missbrauch über längere Zeit als auch (einmalige) ungewollte Verabreichungen von Substanzen retrospektiv nachweisen zu können. Da GHB und dessen Vorläufersubstanzen in den erstgenannten Probenmaterialien bei exogener Zufuhr nur sehr kurze Zeit (bis zu 6 bzw. 12 h) nachweisbar sind, jedoch zur Detektion im Haar bis dato vergleichbar wenig umfassende Studien existieren, wurde mit den 321 im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens analysierten Haarproben ein umfangreicher Datenpool für die Variabilität endogener GHB-Konzentrationen im Haar geschaffen. In etwa 96 % der mittels LC-MS/MS analysierten Fälle wurden GHB-Konzentrationen im Haar $< 3 \text{ ng/mg}$ gemessen, ein Indiz für einen endogen vorhandenen Konzentrationsbereich von GHB im menschlichen Haar. Weiterhin scheint es, als seien intraindividuelle GHB-Konzentrationsschwankungen im Haar als gering zu erachten, sodass man von einer stabilen individuellen Baseline ausgehen kann. Im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung ließ sich feststellen, dass sowohl eine zeitnahe Analytik der Haarprobe als auch das mögliche Herauswaschen geringer Spuren von GHB aus dem Haar berücksichtigt werden müssen.

4.1.1 Methoden

Ein wichtiges Ziel in der Forensischen Toxikologie stellt die Identifikation von unbekanntem Substanzen, Substanzgemischen und -spuren in verschiedenen Matrizes dar, für deren Analytik sich verschiedene Messverfahren etabliert haben. Zur Bestimmung der GHB-Konzentrationen im Haar im Rahmen dieser Dissertation wurde eine bereits im Arbeitsbereich Forensische Toxikologie der Universitätsmedizin Rostock etablierte Methode verwendet und die Messungen mittels LC-MS/MS durchgeführt (68–70). Wie eingangs bereits dargestellt, bietet die LC-MS/MS Vorteile beispielsweise hinsichtlich eines hohen Datendurchlaufs bei vergleichsweise kurzen Laufzeiten, weniger aufwendiger Probenvorbereitung sowie kleinen Probenvolumina (62, 100). In den hier zitierten Arbeiten wurden Proben sowohl mit Gas- als auch Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten Verfahren analysiert und diese Ergebnisse unabhängig vom Messverfahren dargestellt und diskutiert. Hierbei ist von einer validen Vergleichbarkeit der Messwerte auszugehen (85).

Es ist bekannt, dass GHB-Konzentrationen im Urin und Blut bei unsachgemäßer Lagerung (ungekühlt) zu- oder abnehmen können (23, 74, 75). LeBeau et al. (74) maßen eine Zunahme endogener GHB-Konzentrationen im Urin von 88 bis 404 % und Zörntlein et al. (75) verzeichneten Konzentrationszunahmen bei der Lagerung von Blut über längere Zeiträume. Vergleichbare Studien im Zusammenhang mit der Lagerung von Haarproben sind nicht

existent und das Ergebnis des Lagerungsversuches über die Dauer von vier Wochen daher nicht mit anderen Publikationen vergleichbar. Aufgrund der kurzen Zeitspanne und der Haaranalyse lediglich eines Probandes ergibt sich zumindest ein Hinweis darauf, dass zu untersuchende Haarproben möglichst zeitnah aufgearbeitet und vermessen werden sollten. Weiterführende Untersuchungen sollten hierzu perspektivisch unternommen werden und möglichst einen Zeitraum von mehreren Monaten abdecken, damit der in der forensischen Toxikologie auftretbare Fall einer zeitverzögerten Nachuntersuchung von Rückstellproben widergespiegelt würde. Oftmals asservieren forensisch-toxikologische Labore ihre Proben bis zu zwei Jahre – eine Aussage hinsichtlich Veränderungen der GHB-Konzentrationen im Haar über diesen Zeitraum sind mit der untersuchten kurzen Zeitspanne von vier Wochen nicht möglich. Kritisch anzumerken für derartige Langzeitstudien bleibt zudem der Fakt, dass ausreichend Probenmaterial von mehreren Spendern ($n = 10$ oder größer) gewonnen werden müsste. Auch bliebe die Frage offen, ob das Haar insgesamt vor Beginn der Lagerung zu reinigen/waschen wäre (Entfernung äußerer Anhaftungen) oder jeweils erst zum Untersuchungszeitpunkt. Beide Lagerungsvarianten (gewaschen, unbehandelt) müssten parallel in einer Langzeitstudie berücksichtigt werden.

4.2 Grundstatistik

Die endogenen GHB-Konzentrationen der analysierten Haare betragen im Durchschnitt $1,25 \pm 1,48$ ng/mg (Median 0,89 ng/mg), wobei die Spannweite aller Proben von 0 bis 16,1 ng/mg reichte. Die umfangreiche Stichprobenanzahl (321 ProbandInnen), welche zum Zeitpunkt der Verschriftlichung der Dissertation ohnegleichen ist, ist hervorzuheben. Ähnliche Studiengrößen wiesen lediglich Thomas et al. (56) mit 214 ProbandInnen und Vaiano et al. (21) mit 150 ProbandInnen auf. Bei allen aufgeführten Studien war die Verneinung einer Einnahme von Betäubungsmitteln und GHB (-haltiger Zubereitungen) Voraussetzung zur Teilnahme. Die von Thomas et al. (56) ermittelten endogenen GHB-Konzentrationen im Haar betragen 0,16 bis 5,47 ng/mg (97,5% der Fälle < 2 ng/mg), bei Vaiano et al. (21) lagen die Werte in einem Bereich von 0,27 bis 2,84 ng/mg. Schröck et al. (76) ermittelten die endogenen GHB-Konzentrationen im Haar von 27 ProbandInnen mit Werten von 0,1 bis 1,3 ng/mg. Es zeigten sich demnach vergleichbare Konzentrationsbereiche. Äquivalent zu den Messergebnissen in dieser Arbeit fanden sich auch bei Thomas et al. (56) und Vaiano et al. (21) beim männlichen Geschlecht tendenziell höhere endogene GHB-Level im Haar. Vaiano et al. (21) fanden die höchsten Konzentrationen an GHB im Haar beim männlichen Geschlecht in der Altersgruppen < 30 Jahre, wohingegen die Konzentrationen an GHB im Haar der Frauen über die verschiedenen Altersgruppen hinweg gleichbleibend niedrig waren. Bei beiden Geschlechtern zeigte sich mit steigendem Alter eine Abnahme der Spannweite der endogenen

GHB-Konzentrationen (21). Die erzielten Ergebnisse waren mit den Studien vergleichbar. Männer in der Altersklasse 20–29 Jahre wiesen die höchsten endogenen GHB-Konzentrationen auf, bei tendenziell niedrigeren Werten mit Zunahme des Alters. Thomas et al. (56) argumentierten, dass die höheren GHB-Konzentrationen im Haar der Männer ebenso mit der kürzeren Haarlänge zusammenhängen könnten, da sich auch bei Frauen mit kurzen Haaren höhere endogene GHB-Level feststellen ließen. Auch Shi et al. (77) ermittelten signifikant höhere GHB-Konzentrationen bei den Männern ($p < 0,01$) als bei den Frauen. Sie maßen die endogenen GHB-Konzentrationen im Haar von 66 chinesischen ProbandInnen, welche bei einem Mittelwert von $1,93 \pm 1,40$ ng/mg Konzentrationen von 0,92 bis 4,9 ng/mg aufwiesen (77). Als eine mögliche Erklärung führten Shi et al. (77) den höheren Nikotinkonsum unter der männlichen Bevölkerung an, da Studien einen Hinweis auf erhöhte GHB-Level bei Rauchern lieferten. Weiterhin scheinen somit die endogenen GHB-Haarkonzentrationen verschiedener Ethnien miteinander vergleichbar; Thomas et al. (56) konnten gleichermaßen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Europäern, Afroamerikanern und Asiaten herausarbeiten. Gouille et al. (78) berichteten bei einer Stichprobenanzahl von 61 über endogene GHB-Level im Haar in Bereichen von 0,32 bis 1,86 ng/mg. Statt nach Geschlechtern sortierten sie nach Haarfarben und fanden hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Farbtönen (blond, brünett, schwarz) (78). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Bertol et al. (57) bei der Analyse von 30 Haarproben unterschiedlicher Farbnuancen (jeweils zehn Proben blond, brünett und schwarz). Bei endogenen GHB-Konzentrationen von 0 bis 5,09 ng/mg ließen sich keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Haarfarben sowie beim Geschlecht und Alter der ProbandInnen feststellen (57). Zum Erhalt der großen Stichprobe in dieser Arbeit wurde die unterschiedliche Anzahl an ProbandInnen in den Altersklassen und die ungleiche Verteilung von Männern und Frauen in eben diesen vernachlässigt. Dieser Umstand begrenzt die statistische Betrachtung. In der Studie von Thomas et al. (56) waren die Gruppengrößen ebenfalls nicht einheitlich, bei Vaiano et al. (21) hingegen schon (75 Männer und 75 Frauen, eingeteilt in jeweils drei gleich große Altersklassen).

Um potentielle intraindividuelle Konzentrationsunterschiede aufzeigen zu können, wurden die Haarproben in Abhängigkeit von der verfügbaren Masse segmentiert. Hier zeigten sich in mehr als 75 % der Fälle GHB-Konzentrationschwankungen $< 0,5$ ng/mg zwischen den einzelnen Segmenten. Dies stimmt mit den Ergebnissen Stricklands et al. (79) überein, welche in 97,1 % aller von ihnen analysierten benachbarten Haarsegmente Konzentrationsunterschiede von höchstens $\pm 0,5$ ng/mg GHB im Haar feststellten. Strickland et al. (79) schnitten ihre Proben in sehr feine Segmente von 3 bis 5 mm Länge und richteten sich damit nach den *Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts* des *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) (80), wohingegen im Rahmen dieser Arbeit aus

Mangel an Haarmaterial Segmente in verschiedensten Längen analysiert wurden. Martz et al. (58) und Bertol et al. (57) nahmen ihre Segmentierungen ebenfalls in Größenordnungen bis zu 5 mm vor. Demnach sind die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Zusammenhänge trotz unterschiedlicher Segmentlängen kongruent.

4.3 Postmortale GHB-Konzentrationen im Haar

Die postmortal ermittelten GHB-Konzentrationen im Haar ($n = 40$) ergaben Werte von 0,15 ng/mg bis 7,9 ng/mg, im Mittel $2,13 \pm 1,7$ ng/mg (Median = 1,86 ng/mg). Hier ergab sich die Stichprobenanzahl zu gleichen Teilen aus Frauen und Männern. Castro et al. (81) ermittelten für 32 Verstorbene GHB-Konzentrationen im Haar von 0,16 bis 3,12 ng/mg (Median = 0,92 ng/mg). Weiterhin fanden sie – wie es die eigenen Untersuchungen auch zeigten – keine Bezüge zu den Faktoren Alter, Geschlecht, Todesursache, Nachweis/Abwesenheit anderer Substanzen und der Liegezeit bis zum Auffinden der Verstorbenen (81).

Moriya und Hashimoto (82) stellten fest, dass sich eine Zunahme der endogenen GHB-Konzentrationen im Blut hauptsächlich in den ersten Stunden nach Todeseintritt zeigt, statt während sachgemäßer Lagerung bis zur Analyse des postmortal entnommenen Blutes. Mögliche Ursachen hierfür seien eine durch Bakterien verursachte Glykolyse (Glukose – Succinat – SSA – GHB) und/oder auch eine enzymatische Umwandlung von GABA und Succinat zu GHB (82, 83). Gegebenenfalls müsste man diese und mögliche weitere Vorgänge zusätzlich bei postmortal entnommenen Haarproben beachten, alsbald die Zeitspanne zwischen Auffinden der Leiche und Obduktion mehrere Stunden oder auch Tage überschreitet.

4.4 GHB-Konzentration von Konsumenten

Die GHB-Konzentrationen im Haar der zehn GHB-KonsumentInnen betragen $3,52 \pm 3,14$ ng/mg (Median = 1,56 ng/mg), bei einer maximalen Konzentration von 9,81 ng/mg. Port et al. (13) konnten im Fall eines GBL-abhängigen Busfahrers im Haar Konzentrationen von 7,54 bis 17,9 ng/mg ermitteln. Kintz et al. (39) analysierten das Schamhaar eines an einer Überdosis GHB verstorbenen Mannes und konnten in den jeweils 8 mm messenden Segmenten GHB-Konzentrationen von 19,4 bis 25,0 ng/mg nachweisen, was ebenfalls auf einen chronischen Missbrauch rückschließen ließe. Von einem ähnlichen Fall berichteten Küting et al. (18), in welchem sogar GHB-Konzentrationen von 49,2 bis 134 ng/mg im Haar ermittelt werden konnten. Wie Mehling et al. (84) berichteten, konnten im Fall einer letalen Intoxikation eines 6-jährigen Mädchens GHB-Konzentrationen im Haar von bis zu 40,9 ng/mg nachgewiesen werden; der sexuelle Missbrauch hatte sich nach Aussage des Täters über den Zeitraum mehrerer Monate hingezogen. Bertol et al. (85) analysierten das Haar eines 40-

jährigen, welcher bis zu dem Zeitpunkt, an dem er einen Hausarrest auferlegt bekam, regelmäßig GHB konsumiert hatte. Zu den zeitlichen Angaben passend fanden sich GHB-Konzentrationen in Bereichen von 1,26 bis 9,15 ng/mg (85). Jamey et al. (86) maßen im Haar eines 69-jährigen Verstorbenen eine GHB-Haarkonzentration von 96,3 ng/mg und mutmaßten einen chronischen Missbrauch zu Lebzeiten.(86) Im 2 cm langen Haarsegment eines Bodybuilders, welcher täglich einen Teelöffel GHB eingenommen hatte, ermittelten Goulle et al. (78) eine GHB-Konzentration von 14,0 ng/mg. Alle genannten Studien berichteten von GHB-Konzentrationen im Haar, welche deutlich über dem Großteil der ermittelten physiologischen Werte liegen und zweifellos mit den vier im Kapitel 3.8 detailliert vorgestellten Fällen chronischen Konsums mit Konzentrationen > 3 ng/mg korrelieren. Einen Richtwert zur Unterscheidung von endogenen Haarkonzentrationen und Konzentrationen an GHB im Haar nach (mehrmaliger) exogener Aufnahme bei 3 ng/mg festzulegen wäre demnach denkbar. Nichtsdestotrotz dürfen die 13 ProbandInnen (4,1 %) nicht unerwähnt bleiben, bei denen ebenfalls GHB-Konzentrationen im Haar (deutlich) > 3 ng/mg gemessen wurden, welche jedoch einen GHB-Konsum verneint hatten. Das wahrheitsgemäße Ausfüllen des zur Haarprobe gehörigen Fragebogens vorausgesetzt, würden Ausreißer wie diese bei Festlegen eines Richtwertes als positiv gewertet. Obgleich sich die meisten endogenen GHB-Konzentrationen im Haar in Bereichen < 3 ng/mg zu befinden scheinen, ermittelten Kintz et al. (87) bei der Analyse von 24 Haarproben ebenfalls erhöhte endogene GHB-Konzentrationen von bis zu 12 ng/mg. Durch das Zusammenführen einzelner Studien ließe sich durch die damit einhergehende größere Stichprobenanzahl ein unverkennbarer Richtwert ermitteln. Beachtet werden müsste hierbei jedoch additional unter anderem die unterschiedliche Messmethodik mit einerseits der Nutzung von LC- und andererseits GC-MS. Bertol et al. (85) beispielsweise analysierten den Fall eines GHB-Konsumenten sowohl mittels GC- als auch LC-MS; die Ergebnisse waren vergleichbar, jedoch nicht deckungsgleich. Des Weiteren müssten verschiedene Abläufe im Rahmen der Probengewinnung/-vorbereitung und gegebenenfalls auch der Einfluss regionaler Gebiete berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zum Nachweis eines chronischen Missbrauchs von GHB oder den zugehörigen Vorläufersubstanzen gestaltet sich der einer einmaligen Verabreichung als diffiziler. Schröck et al. (76) konnten den einmaligen Konsum von 1,5 ml GBL zweier Freiwilliger nach vier bis fünf Wochen im segmentierten Haar nicht nachweisen; die GHB-Konzentrationen reichten von 0,1 bis 0,6 ng/mg und zeigten keinen Anstieg nach exogener Zufuhr. Kintz et al. (87) hingegen gelang die Detektion im Haar nach einmaliger Einnahme. Bei GHB-Konzentrationen von 0,6 bis 0,8 ng/mg zeigte sich ein Anstieg auf 2,4 ng/mg im Haar nach einem Monat, passend zum Zeitpunkt der Einnahme (87). Goulle et al. (78) beschrieben den Fall einer 29-jährigen Afroamerikanerin, welche unter dem Einfluss von GHB vergewaltigt worden war. Sowohl in ihrem Getränk als auch im analysierten Haar konnte ein Nachweis von GHB erbracht werden.

Während ihre endogene GHB-Konzentration im Haar bei $0,71 \pm 0,17$ ng/mg lag, ermittelte man in den zeitlich zum Vorfall passenden Segmenten Konzentrationen von 3,5 bis 5,3 ng/mg GHB (78). Bertol et al. (57) verabreichten zwölf Freiwilligen unter kontrollierten Bedingungen eine Dosis GHB à 25 mg/kg Körpergewicht. Eine Haarprobe wurde jeweils kurz vor der Verabreichung, eine nach einem Monat und eine weitere nach insgesamt zwei Monaten bei einer 5 mm Segmentierung der Haare gewonnen. Es wurden endogene Level von $1,27 \pm 0,73$ ng/mg gemessen, nach einem Monat fanden sich im jeweils zweiten Haarsegment GHB-Konzentrationen von im Durchschnitt $5,35 \pm 1,36$ ng/mg (57). Hier zeigte sich eine Ratio von 4,45:1 zwischen dem Mittel des zweiten und dem der anderen Segmente. Nach dem zweiten Monat zeigte das vierte Haarsegment die höchsten GHB-Konzentrationen ($4,62 \pm 1,69$ ng/mg) bei einer Ratio von 3,35:1 (57). In den *Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts* (57, 80) des UNODC wird eine um das Zehnfache erhöhte GHB-Konzentration eines Segments im Vergleich zu den anderen zum Nachweis einer möglichen GHB-Verabreichung vorgeschlagen, wohingegen Bertol et al. (57) in Anbetracht ihrer gewonnenen Daten eine niedrigere Ratio vorschlugen. Ihre neue Erkenntnis wandten sie sogleich bei zwei realen Fällen an, in welchen sich Ratios von 3,7:1 und 3,5:1 ergaben, womit eine exogene Zufuhr, wie von den Betroffenen geschildert, als sehr wahrscheinlich erachtet werden könne (57). Busardo et al. (88) konnten im Fall einer ungewollten Einnahme von GHB nach einem Monat eine Ratio von 5,6:1, nach sechs Monaten von 3,6:1 feststellen. Während die durchschnittliche GHB-Konzentration im Haar der Betroffenen $0,73 \pm 0,03$ ng/mg betrug, maß man nach einem bzw. sechs Monaten Konzentrationen von 4,3 ng/mg bzw. 2,65 ng/mg in dem betreffenden Haarsegment (88).

Zusammenfassend liefert die Forschung somit Hinweise auf konstante GHB-Konzentrationen im Haar mit relativ geringen intraindividuellen Schwankungen. Dies gilt jedoch nur für den Zeitpunkt der Probenentnahme – dass sich die individuelle Baseline einer Person mit den Jahren respektive Lebensstiländerungen verschieben kann, ist nicht ausgeschlossen. Weiterhin ist entgegen früherer Annahmen der Nachweis im Haar auch nur einer einzigen Einnahme von GHB(haltigen Gemischen) durchaus möglich. Einen allgemein gültigen Richtwert festzulegen scheint demnach obsolet, vielmehr sollten die eigenen Haarsegmente, sofern eine gewisse Haarlänge vorhanden ist, zur Feststellung der individuellen Baseline als Referenz zum Beweis einer Fremdbeibringung genutzt werden (77, 88–90).

Einen neuartigen Ansatz zum Nachweis von GHB im Haar nach einer einmaligen Verabreichung zeigten Kintz et al. (90) auf: statt die Haarprobe vor der Analyse mittels Waschvorgang zu dekontaminieren, wurde das möglichst kopfnah abgetrennte proximale Segment direkt vermessen und mit den anderen Segmenten verglichen. Es konnten im betreffenden Haarsegment zweier Probanden deutlich erhöhte GHB-Konzentrationen ermittelt werden (1040 und 850 ng/mg) (90). Während man die proximalen 5 mm eines Haarstranges

aufgrund des Einflusses von Schweiß und Sebum (50) normalerweise von einer Messung ausnimmt, machten sich Kintz et al. (90) diesen Umstand zu Nutze und somit den Nachweis einer akuten Intoxikation mit GHB im Haar möglich.

4.5 Einflussfaktoren auf endogene GHB-Konzentrationen

Substanzen treten auf verschiedenen Wegen ins Haar ein – einerseits über passive Diffusion des den Haarfollikel versorgenden Blutes mit ggf. einer Konzentrationszunahme der Substanz über Bindung an das Haarpigment Melanin, andererseits über Sekretion der Talg- und Schweißdrüsen, Einlagerung durch umliegendes Gewebe und zusätzlich durch Anlagerung von außen (z.B. kontaminierte Hände, Rauch, Partikel) (55, 91). Durch verschiedene Einflüsse, wie beispielsweise UV-Licht, Wasser, mechanischen Stress, Waschen, Färben, Bleichen und Glätten der Haare, nimmt die Konzentration eines Stoffes im Haar, mit zunehmender Länge und somit höherem Alter des Haares, wiederum ab (55). Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich, bis auf wenige Ausnahmen, im Zusammenhang mit einer möglichen Haarbehandlung keine statistisch signifikante Korrelation ermitteln. Als ursächlich könnte unter anderem eine wenig spezifische Erhebung dieser Daten erachtet werden. Eine der Haarbehandlung entsprechende Konzentrationsabnahme von GHB über die einzelnen Segmente wurde im Fall einer Probe mit blondierten Haarspitzen ermittelt (siehe Kapitel 3.9). Im detailliert dargestellten Fall der GHB-Konsumentin traf dies ebenfalls zu (siehe Kapitel 3.8); ob die Haarbehandlung oder das möglicherweise zu diesem Zeitpunkt weniger regelmäßige Konsummuster ursächlich für die distal niedriger gemessene Konzentration war, ließ sich rückblickend nicht differenzieren. Bereits Cirimele (92) und Jurado et al. (93) konnten eine Abnahme verschiedener BtM-Konzentrationen im Haar nach chemischem Bleichen dokumentieren. Eine Blondierung mittels Wasserstoffperoxid hat eine teilweise oder vollständige Erniedrigung der natürlichen Haarpigmente zufolge, wodurch eine Veränderung der Komponenten im Haar, an welche Substanzmoleküle unter anderem binden, bewirkt wird (94). Diese strukturelle Veränderung kann einerseits eine Abnahme bereits inkorporierter Substanzkonzentrationen verursachen, andererseits ein leichteres Eindringen von außen einwirkender Faktoren ermöglichen (93, 94). Skopp et al. (94) beschäftigten sich alsdann mit der Frage, ob gebleichtes Haar Substanzspuren aus Schweiß und Sebum besser inkorporieren würde als unbehandeltes Haar und demnach sogar höhere Konzentrationsnachweise bedingen könnte. Bei den in-vitro Versuchen zeigte sich eine geringgradig erhöhte Aufnahme, durch Schweiß mehr als durch Sebum, diverser BtM in kosmetisch vorbehandeltes Haar, indes das Risiko eines möglicherweise falsch-positiven Nachweises bei einer derart niedrigen Substanzeinlagerung als sehr niedrig erachtet werden könne (94). Während eine Beeinflussung von BtM-Konzentrationen im Haar nach

kosmetischer Haarbehandlung als gesichert gilt, untersuchten Ramírez Fernández et al. (95) den Einfluss von Bleichen und Glätten auf die GHB-Konzentration im Haar. In ihrem in-vitro Experiment verglichen sie die endogenen GHB-Konzentrationen im Haar von 15 ProbandInnen, nachdem je ein Teil der Haare geglättet, ein anderer gebleicht und ein weiterer geglättet und gebleicht worden war. In jeder der Proben war eine signifikante Abnahme der GHB-Konzentrationen zu verzeichnen (95). Zudem zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen Dauer der Hitzeeinwirkung beim Glätten und Abnahme der GHB-Konzentration, sowie große interindividuelle Unterschiede der beiden Verfahren auf die jeweiligen endogenen GHB-Konzentrationen im Haar (95). Auch Thomas et al. (56) konnten in ihrer Studie eine Abnahme der GHB-Konzentrationen im chemisch und/oder thermisch behandelten Haar von 73 Probandinnen aufzeigen. Bei einem Suchtmittelnachweis im Haar sollte eine kosmetische Behandlung des zu analysierenden Haares folglich immer mit abgefragt und gegebenenfalls bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Einen möglichen Einfluss von Nikotin auf endogene GHB-Konzentrationen untersuchten Moriya et al. (96). Im Urin der rauchenden Probanden maßen sie vergleichsweise höhere Konzentrationen als in der Vergleichsgruppe ($0,52 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$ vs. $0,28 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$) und mutmaßten eine gesteigerte nächtliche GHB-Bildung durch stimulierende Effekte des Nikotins im ZNS (96). Aufgrund der relativ kleinen Stichprobenzahl ($n = 20$) sind Ergebnisse nicht als allgemein gültig zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit hatten die ProbandInnen von sieben der zehn höchsten gemessenen endogenen GHB-Konzentrationen einen Konsum von Nikotin und/oder Cannabis bejaht, wobei bei letzterem eine in den meisten Fällen inhalative Aufnahme, in der Regel in Kombination mit Tabak, anzunehmen ist. Dies würde die von Moriya et al. (96) aufgestellte Theorie unterstützen. Shi et al. (77) hatten bei höheren endogenen GHB-Konzentrationen ihrer Probanden ebenfalls einen Zusammenhang mit dem Nikotinkonsum vermutet, da in China hauptsächlich Männer rauchen würden. Ein Zusammenhang zwischen dem regelmäßigen Konsum von Tabak(-mischungen) und höheren endogenen GHB-Konzentrationen im Haar scheint demnach nicht ausgeschlossen und sollte weiter beforscht werden.

Elliot (97) und Tucci et al. (98) konnten einen Nachweis von natürlich vorkommendem GHB in diversen (nicht-/)alkoholischen Getränken erbringen, hohe Konzentrationen fanden sich bei möglicher Produktion im Rahmen von Fermentationsprozessen vor allem in Proben von Rot- und Weißwein ($<21,4 \text{ mg/l}$; $<12000 \text{ ng/ml}$) . Um eine mögliche, damit zusammenhängende Erhöhung endogener GHB-Level im Haar zu detektieren, wurde demzufolge mit Annahme der Haarprobe ein Konsum von Rotwein abgefragt; es zeigte sich hierbei jedoch keine signifikante Korrelation. Eine möglicherweise sogar gegenteilige Wirkung eines regelmäßigen Alkoholkonsums zeigten hingegen Moriya et al. (96) auf – im Urin trinkender ProbandInnen fanden sie vergleichsweise niedrigere endogene GHB-Konzentrationen vor und

schlussfolgerten, dass die depressive Wirkung des Ethanols im ZNS ggf. die endogene GHB-Produktion hemmt.

43 der 338 ProbandInnen gaben eine Medikamenteneinnahme an, wobei kein Medikament aufgeführt worden ist, welches beispielsweise über einen Wirkmechanismus via GABA (z. B. Valproat, Vigabatrin, Benzodiazepine, Barbiturate, Propofol, Etomidat) einen Einfluss auf endogene GHB-Level erklären hätte können. Weiterhin sind keine exakten Daten hinsichtlich Einnahmedauer und Dosierungen miterfasst worden; um hier mögliche Zusammenhänge aufzudecken, wären umfangreichere Studien vonnöten.

Da GHB auch im Säugetier physiologisch vorkommt (26), könnte ein regelmäßiger Fleischkonsum durch demzufolge gesteigerte Aufnahme von in Fleisch vorhandenem GHB die endogenen GHB-Konzentrationen anheben – die GHB-Haarlevel bei Veganern und Vegetariern wären im Umkehrschluss tendenziell als niedriger zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit wiesen die Haarproben der drei sich vegan sowie von zwölf der 22 sich vegetarisch ernährenden ProbandInnen GHB-Konzentrationen $> 2 \text{ ng/mg}$ auf. Oben aufgezeigte These ließ sich somit, bei statistisch eingeschränkter Beurteilbarkeit aufgrund der niedrigen Stichprobenanzahl, weder be- noch widerlegen. Zu berücksichtigen gilt weiterhin, dass die Ernährungsgewohnheiten bei den ersten 152 ProbandInnen nicht mit abgefragt wurden und zu den zugehörigen Haarproben somit keine Daten vorlagen. Um den möglichen Einfluss von Ernährungsgewohnheiten auf endogene GHB-Haarkonzentrationen aufzuzeigen, müssten folglich weitere Untersuchungen stattfinden.

Als eine weitere Fragestellung wurde untersucht, ob der Konsum von BtM möglicherweise einen Einfluss auf endogene GHB-Konzentrationen im Haar habe. Es zeigte sich, dass 18 der 40 ProbandInnen mit Haarkonzentrationen $> 2 \text{ ng/mg}$ einen Substanzkonsum bejaht hatten; unter den zehn höchsten gemessenen Konzentrationen waren es sogar acht. Führende Substanzen waren Cannabis, welches generell am häufigsten genannt worden war, und LSD. Der Konsum von LSD wurde insgesamt nur sechs Mal aufgeführt, fünf der KonsumentInnen wiesen im Haar GHB-Konzentrationen $> 4 \text{ ng/mg}$ auf. LSD wirkt primär über verschiedene 5-HT-Rezeptoren auf das Serotonin-System (99) und zählt zur Gruppe der halluzinogenen Psychedelika. Studien zum Zusammenhang zwischen dem Konsum von LSD und dessen Beeinflussung endogener GHB-Konzentrationen existieren bis dato nicht, demnach kann ohne weitere Forschung nur gemutmaßt werden.

Die Studie stellt einen Beitrag zur Bestimmung von endogenen GHB-Haarkonzentrationen dar. Gemeinsam mit anderen Studiendaten lassen sich ggf. künftig Werte definieren, deren Überschreitung für eine exogene Aufnahme sprechen. Eine absolute Sicherheit wird es angesichts abweichender Einzelfälle dennoch nie geben können.

5 Zusammenfassung

GHB ist eine analytisch nicht triviale Substanz, die zudem endogen gebildet wird. Das Haar als Matrix kann eine bereits mehrere Tage und ggf. bis Monate zurückliegende Einnahme beziehungsweise Verabreichung von GHB, bei unkomplizierter, nicht-invasiver Probengewinnung, quantitativ nachweisen.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, die Variabilität endogener GHB-Konzentrationen im menschlichen Haar zu validieren und hierzu vorhandene Daten zu ergänzen. Darauf aufbauend hätte ein Richtwert definiert werden sollen, ab dem eine physiologisch-endogene Konzentration mit überwiegender Wahrscheinlichkeit verneint werden kann. Eine forensische Relevanz ergibt sich durch die Möglichkeit, perspektivisch einerseits falsche Anschuldigungen widerlegen und andererseits bei Tatbestand Aufklärung und Aufarbeitung stattfinden lassen zu können.

Zu jeder gesammelten Haarprobe wurden anamnestisch Begleitumstände, welche die physiologische GHB-Konzentration theoretisch beeinflussen könnten, erhoben und hinsichtlich ihrer Relevanz betrachtet.

Insgesamt 338 Haarproben lebender und 40 Haarproben verstorbener ProbandInnen wurden von 2014 bis 2019 gesammelt und nach Aufarbeitung mittels LC-MS/MS analysiert. GHB-Haarkonzentrationen $< 3,0 \text{ ng/mg}$ präsentierten sich in knapp 96 % der untersuchten endogenen Fälle ($n = 321$; Mittelwert $1,25 \pm 1,48 \text{ ng/mg}$), wohingegen der Mittelwert bei KonsumentInnen ($n = 10$) bei $3,52 \pm 3,14 \text{ ng/mg}$ lag. Mit Festlegen eines Richtwerts bei $3,0 \text{ ng/mg}$ ließe sich somit ein chronischer Missbrauch GHB-haltiger Substanzen relativ zuverlässig detektieren. Es zeigte sich jedoch, dass bei einmaliger Verabreichung häufig GHB-Konzentrationen im Haar kleiner 3 ng/mg gemessen wurden und ein Nachweis in einem solchen Fall nur dann zu führen wäre, wenn die individuelle Baseline und der sich hierzu demonstrierende Konzentrationsunterschied als Referenz genutzt würden.

Weiterhin lieferte die Auswertung der Einflussfaktoren Hinweise darauf, dass sie bei der Betrachtung endogener GHB-Haarkonzentrationen berücksichtigt werden sollten.

Weitere Studien mit größerer Stichprobenanzahl, einheitlicher Aufarbeitung und Segmentierung, Beachtung von Haarfarbe, -behandlung, Konsum-/Ernährungsgewohnheiten sowie Lagerungsversuchen über längere (realitätsnahe) Zeiträume müssten durchgeführt werden. Zusätzlich sollten, um das praktische Vorgehen bei Verdacht auf GHB-Konsum oder -Verabreichung zu vereinheitlichen, perspektivisch allgemein gültige SOPs entwickelt werden.

6 Literatur

1. Saytzeff AM. 4. Ueber die Reduction des Succinylchlorids. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1874; 171:258–90.
2. Marinelli E, Beck R, Malvasi A, Lo Faro AF, Zaami S. Gamma-hydroxybutyrate abuse: pharmacology and poisoning and withdrawal management. *Arh Hig Rada Toksikol* 2020; 71(1):19–26.
3. Laborit H. Sodium 4-Hydroxybutyrate. *Int Neuropharmacol* 1964; 3:433–52.
4. Bay T, Eghorn L, Klein A, Wellendorph P. GHB receptor targets in the CNS: Focus on high-affinity binding sites. *Biochem Pharmacol* 2014; 87(2):220–8.
5. Maitre M, Klein C, Mensah-Nyagan AG. Mechanisms for the Specific Properties of γ -Hydroxybutyrate in Brain. *Med Res Rev* 2016; 36(3):363–88.
6. Drakontides AB, Schneider JA, Funderburk WH. some effects of sodium GHB on the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 1962; 135:275–84.
7. Trendelenburg G SA. γ -hydroxybuttersäure - Neurotransmitter, Medikament und Droge. *Nervenarzt* 2005; 76(7):832-838.
8. Zepf FD, Holtmann M, Duketis E, Maier J, Radeloff D, Schirman S, Wagner A et al. Entzugsdelir nach Missbrauch von GHB-(Gamma-Hydroxybutyrat) und seiner Vorstufen: Grundlagen und Bedeutung für die Kinder- und Jugendpsychiatrie. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* 2009; 37(5):413–20.
9. Couper FJ LBK. Determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) in Biological Specimens by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000; 24:1–7.
10. Andresen H, Stimpfl T, Sprys N, Schnitgerhans T, Müller A. Liquid ecstasy - a significant drug problem. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105(36):599–603.
11. Centers of Disease Control. Multistate Outbreak of poisonings associated with illicit use of GHB. *J Am Med Assoc* 1991; 265(4):447f.
12. Craig K, Gomez HF, McManus JL, Bania TC. Severe gamma-hydroxybutyrate withdrawal: a case report and literature review. *J Emerg Med* 2000; 18(1):65–70.
13. Port A, Olszewski H, Walther U, Büttner A, Rentsch D. Nachweis von γ -Hydroxybuttersäure bei γ -Butyrolacton-Abhängigkeit: Körperflüssigkeiten- vs. Haaranalyse. *Rechtsmedizin* 2014; 24(5):412–7.
14. Busardo. Drug-facilitated sexual assaults (DFSA): a serious underestimated issue. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23 2019:10577–87.
15. Stein LAR, Lebeau R, Clair M, Martin R, Bryant M, Storti S, Monti P. A web-based study of gamma hydroxybutyrate (GHB): patterns, experiences, and functions of use. *Am J Addict* 2010; 20(1):30–9.
16. Giorgetti R, Tagliabracci A, Schifano F, Zaami S, Marinelli E, Busardò FP. When "Chems" Meet Sex: A Rising Phenomenon Called "ChemSex". *Curr Neuropharmacol* 2017; 15(5):762–70.
17. McCall H, Adams N, Mason D, Willis J. What is chemsex and why does it matter? *BMJ* 2015; 351:h5790.
18. Küting T, Krämer M, Bicker W, Burkhard M, Hess C. Case report: Another death associated to γ -hydroxybutyric acid intoxication. *Forensic Sci Int* 2019; 299:34–40.

19. Bohn A, Sander D, Köhler T, Hees N, Oswald F, Scherbaum N, Deimel D, Shecke H. Chemsex and Mental Health of Men Who Have Sex With Men in Germany. *Front Psychiatry* 2020; 11:1–10.
20. Bosch OG, Eisenegger C, Gertsch J, von Rotz R, Dornbierer D, Gachet MS, Heinrichs M, Wetter TC, Seifritz E, Quednow BB. Gamma-hydroxybutyrate enhances mood and prosocial behavior without affecting plasma oxytocin and testosterone. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 62:1–10.
21. Vaiano F, Serpelloni G, Furlanetto S, Palumbo D, Mari F, Fioravanti A, Bertol E. 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* 2016; 118:161–6.
22. Nicholson KL BRL. GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Dep* 2001; 63:1–22.
23. Castro AL, Dias M, Reis F, Teixeira HM. 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* 2014; 27:17–24.
24. Andresen H, Aydin BE, Mueller A, Iwersen-Bergmann S. An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results. *Drug Test Anal* 2011; 3(9):560–8.
25. Elian AA. Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood. *Forensic Sci Int* 2002; 128:120–2.
26. Nelson T, Kaufman E, Kline J, Sokoloff L. The Extraneural Distribution of γ -Hydroxybutyrate. *J Neurochem* 1981; 37(5):1345–8.
27. Briese BH. Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB), Liquid Ecstasy - Aussagekraft von GHB-Konzentrationen beim Menschen: Eine Beitrag zur Einschätzung der Aussagekraft von GHB-Konzentrationen und festgelegten Entscheidungsgrenzwerten zur Differenzierung von endogener und exogener Gamma-Hydrobuttersäure in Körperflüssigkeiten des Menschen. 1. Aufl. Göttingen: Cuvillier; 2011.
28. Kobilinsky LF, Hrsg. FORENSIC CHEMISTRY HANDBOOK. Hoboken N.J.: John Wiley & Sons; 2012.
29. Maitre M. The γ -hydroxybutyrate signalling system in brain: organisation and functional implications. *Prog Neurobiol* 1997; 51:337–61.
30. Felmlee MA, Morse BL, Morris ME. γ -Hydroxybutyric Acid: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Toxicology. *AAPS J* 2021; (23:22):1–16.
31. Barker S, Snead O, Poldrugo F, Liu C, Fish F, Settine R. Identification and quantitation of 1,4-butanediol in mammalian tissues: an alternative biosynthetic pathway for gamma-hydroxybutyric acid. *Biochem Pharmacol* 1985; (Vol. 34, No. 10.):1849–52.
32. Absalom N et al. $\alpha\beta\delta$ GABA(A) receptors are high-affinity targets for γ -hydroxybutyric acid (GHB). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(33):13404–9.
33. Wong CGT, Gibson KM, Snead OC. From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(1):29–34.
34. Busardò FP, Jones AW. GHB Pharmacology and Toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome 2015. *Curr Neuropharmacol* 13: 47-70.

35. van Elsué N, Crunelle CL, Verbrugge CA, van Baarle K, Rodrigues A, Neels H, Yegles M. Gammahydroxybutyrate in hair of non-GHB and repeated GHB users: A new and optimized method. *Forensic Sci Int* 2018; 291:193–8.
36. Miró Ò, Galicica M, Dargan P, Dines AM, Giraudon I, Heyerdahl F et al. Intoxication by gamma hydroxybutyrate and related analogues: clinical characteristics and comparison between pure intoxication and that combined with other substances of abuse. *Toxicol Lett* 2017; 277:84–91.
37. Zvosec DL, Smith SW, Porrata T, Strobl AQ, Dyer JE. Case series of 226 γ -hydroxybutyrate-associated deaths: lethal toxicity and trauma. *Am J Emerg Med* 2011; 29(3):319–32.
38. Knudsen K, Jonsson U, Abrahamsson J. Twenty-three deaths with γ -hydroxybutyrate overdose in western Sweden between 2000 and 2007. *Acta Anaesthesiol Scand* 2010; 54(8):987–92.
39. Kintz P, Villain M, Pelissier AL, Cirimele V, Leonetti G. Unusually high concentrations in a fatal GHB case. *J Anal Toxicol* 2005; Vol. 29:582–5.
40. van Helmond LPFM GF. Safety of withholding intubation in gamma-hydroxybutyrate- and gamma-butyrolactone-intoxicated coma patients in the emergency department. *Eur J Emerg Med* 2020; 27(3):223–7.
41. Hockenull J, Murphy KG, Paterson S. An observed rise in γ -hydroxybutyrate-associated deaths in London: Evidence to suggest a possible link with concomitant rise in chemsex. *Forensic Sci Int* 2017; 270:93–7.
42. Corkery JM, Loi B, Claridge H, Goodair C, Schifano F. Deaths in the Lesbian, Gay, Bisexual and Transgender United Kingdom Communities Associated with GHB and Precursors. *Curr Drug Metab* 2018, 19(13):1086-1099.
43. Dyer JE, Roth B, Hyma BA. Gamma-hydroxybutyrate withdrawal syndrome. *Ann Emerg Med* 2001; 37(2):147–53.
44. Loddo CM, Beike J, Rothschild MA. γ -Hydroxybuttersäure (GHB) als K.O.-Mittel und sexuelle Delinquenz. *Forensische Psychiatrie, Psychologie, Kriminologie* 2009; 3(4):287–93.
45. Madea B MF. Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(20):341–7.
46. Dr. Masha Parviz, Dr. Phillip Pearl. Orphanet: Succinat Semialdehyd Dehydrogenase Mangel; 2016 [Stand: 08.03.2021]. Verfügbar unter: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=de&Expert=22.
47. Phakey S, Rego T, Gaillard F et al. OCD symptoms in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency: a case report. *BMC Psychiatry* 2020; 20(395):1–5.
48. LeBeau MA, Christenson RH, Levine B, Darwin WD, Huestis MA. Intra- and Interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate. *J Anal Toxicol* 2002; Vol. 26:340–6.
49. Andresen-Streichert H, Jensen P, Kietzerow J et al. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. *Int J Legal Med* 2015; 129:57–68.
50. Abanades S, Farre M, Segra M, Pichini S, Pastor A, Pacifici R et al. Disposition of GHB in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2007; Vol 29(1):64–70.

51. Jagerdeo E, Montgomery MA, LeBeau MA. An improved method for the analysis of GHB in human hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2015; 39(2):83–8.
52. Xiang P, Shen M, Drummer OH. Review: Drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes. *J Forensic Leg Med* 2015; 36:126–35.
53. Prof. Dr. med. habil. Britta Bockholdt. Institut für Rechtsmedizin: Forensische Toxikologie und Alkoholanalytik; 2021 [Stand: 08.03.2021]. Verfügbar unter: <http://www2.medizin.uni-greifswald.de/rechtsmed/forensische-toxikologie-und-alkoholanalytik/>.
54. LeBeau MA, Montgomery MA, Brewer JD. The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Sci Int* 2011; 210(1-3):110–6.
55. Pragst F BMA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 2006; 370(1-2):17–49.
56. Thomas JL, Strickland EC, Lloyd EW et al. Endogenous GHB in Segmented Hair Part I: Inter-individual Variation for Group Comparisons. *J Anal Toxicol* 2020; 00:1–9.
57. Bertol E, Mari F, Vaiano F et al. 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* 2014; 7(5):376–84.
58. Martz W, Nebel A, Veit F. Variation of intraindividual levels of endogenous GHB in segmented hair samples. *Forensic Sci Int* 2019; 302:1–9.
59. Kietzerow J A-SH. Xantus Drinkcheck Armband - Bericht über eine erste Anwendungsstudie. *Toxichem Krimtech* 2019; 86(3):202–4.
60. Ritgen U. Analytische Chemie I. Berlin: Springer Spektrum; 2019.
61. Schwedt G. Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008.
62. Dr. med. Hanns-Georg Klein. Massenspektrometrie: (LC-MS/MS): Medicover; 2021 [Stand: 08.03.2021]. Verfügbar unter: <https://www.medizinische-genetik.de/diagnostik/allgemeine-informationen/methoden/massenspektrometrie>.
63. Prof. Dr. med. habil. Britta Bockholdt. Institut für Rechtsmedizin: Forensische Medizin; 2021 [Stand: 08.03.2021]. Verfügbar unter: <http://www2.medizin.uni-greifswald.de/rechtsmed/forensische-medizin/>.
64. Alexandra Maas. Forensisch-toxikologische Analysen — Institut für Rechtsmedizin; 2021 [Stand: 08.03.2021]. Verfügbar unter: <https://www.rechtsmedizin.uni-bonn.de/dienstleistungen/forensische-toxikologie/forensisch-toxikologische-analysen>.
65. Hartwig S. Haaranalytik; 2021 [Stand: 08.03.2021]. Verfügbar unter: <https://rechtsmedizin.charite.de/forschung/haaranalytik/>.
66. Kintz P, Villain M, Ludes B. Testing for the Undetectable in Drug-Facilitated Sexual Assault Using Hair Analyzed by Tandem Mass Spectrometry as Evidence. *Ther Drug Monit* 2004; Vol. 26, Number 2:211–4.
67. Robert Steinhagen. Trialkylsulfoniumhydroxide und höhere Alkylidide - Innovative Alkylierungsmethoden zum Cannabinoidnachweis aus verschiedenen Matrices. Rostock: Universitätsmedizin Rostock; 2016.
68. Kegler R, Lehmann C, Rentsch D, Blömker M, Büttner A. Bestimmung von endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren. *Toxichem Krimtech* 2018; 85((3)):110–6.

69. Kegler R, Blömker M, Rentsch D, Lehmann C, Andresen-Streichert H, Büttner A. Quantitative analysis of GHB in hair samples by a highly sensitive LC-MS/MS method; September 2017, 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, [Poster].
70. Marie Blömker. Aufbau einer LC-MS/MS-Methode zum quantitativen Nachweis von Gamma-Hydroxybuttersäure aus biologischen Matrices. Sankt Augustin: Bonn-Rhein-Sieg; 2016.
71. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* 2012; 218(1-3):20–4.
72. Institut für Rechtsmedizin. Entsprechende Sektionsberichte der Verstorbenen. Universitätsmedizin Rostock; 2016-2018 2016-2018.
73. Fisher Scientific GmbH. Fisher Scientific: Chemische Struktursuche: Thermo Fisher Scientific Inc.; 2021 [Stand: 10.03.2021]. Verfügbar unter: <https://www.fishersci.de/de/de/search/chemical/substructure.html>.
74. LeBeau MA, Miller ML, Levine B. Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine. *Forensic Sci Int* 2001; 119:161–7.
75. Zörntlein SW, Kopp A, Becker J, Kaufmann TJ, Röhrich J, Urban R. In vitro production of GHB in blood and serum samples under various storage conditions. *Forensic Sci Int* 2012; 214(1-3):113–7.
76. Schröck A, Hari Y, König S, Auwärter V, Schürch S, Weinmann W. 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* 2014; 6(4):363–6.
77. Shi Y, Cui X, Shen M, Xiang P. Quantitative analysis of the endogenous GHB level in the hair of the Chinese population using GC/MS/MS. *J Forensic Leg Med* 2016; 39:10–5.
78. Goulle JP, Cheze M, Pepin G. Determination of endogenous levels of GHB in human hair.: Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of DFSA? *J Anal Toxicol* 2003; 27:574–80.
79. Strickland EC, Thomas JL, Lloyd EW, Smith MA, LeBeau MA, Montgomery MA, Karas RP, Peters EM, Miller ML. Endogenous GHB in Segmented Hair Part II: Intra-individual Variation for Exogenous Discrimination. *J Anal Toxicol* 2020:1–14.
80. United Nations Office on Drugs and Crime. Guidelines for the Forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts; 2021 [Stand: 17.03.2021]. Verfügbar unter: https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidelines-for-the-forensic-analysis-of-drugs-facilitating-sexual-assault-and-other-criminal-acts_new.html.
81. Castro AL, Tarelho S, Dias M, Reis F, Teixeira HM. Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval. *Int J Legal Med* 2016; 130(4):959–65.
82. Moriya, F, Hashimoto Y. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid levels in postmortem blood. *Leg Med (Tokyo)* 2004; 6(1):47–51.
83. Doherty JD, Hattox SE, Snead OC, Roth RH. Identification of endogenous Gamma-hydroxybutyrate in human and bovine brain and its regional distribution in human, guinea pig and rhesus monkey brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 207:130–9.
84. Mehling LM, Johansen SS, Wang X, Doberentz E, Madea B, Hess C. Drug facilitated sexual assault with lethal outcome: GHB intoxication in a six-year-old girl. *Forensic Sci Int* 2016; 259:e25-31.

85. Bertol E, Argo A, Procaccianti P, Vaiano F, Di Milia, MG, Furlanetto S, Mari F. 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* 2012; 70:518–22.
86. Jamey C, Kintz P, Martrille L, Raul JS. Fatal Combination with 3-Methylmethcathinone (3-MMC) and Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB). *J Anal Toxicol* 2016; 40(7):546–52.
87. Kintz P, Cirimele V, Jamey C, Ludes B. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J Forensic Sci* 2003; 48(1):195–200.
88. Busardò FP, Vaiano F, Mannocchi G, Bertol E, Zaami S, Marinelli E. Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault. *Drug Test Anal* 2017; 9(6):953–6.
89. Busardò FP, Pichini S, Zaami S, Pacifici R, Kintz P. Hair testing of GHB: an everlasting issue in forensic toxicology. *Clin Chem Lab Med* 2017; 56(2):198–208.
90. Kintz P. A Novel Approach to Document Single Exposure to GHB: Hair Analysis After Sweat Contamination. *J Anal Toxicol* 2016; 40(7):563–4.
91. Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int* 1993; 63:19–29.
92. Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Drug Concentrations in Human Hair after Bleaching. *J Anal Toxicol* 1995; 19:331f.
93. Jurado C, Kintz P, Menendez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int J Legal Med* 1997; 110:159–63.
94. Skopp G, Pötsch L, Moeller MR. On cosmetically treated hair - aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int* 1997; 84:43–52.
95. Ramírez Fernández MM, Wille S, Di Fazio V, Samyn N. Influence of bleaching and thermal straightening on endogenous GHB concentrations in hair: An in vitro experiment. *Forensic Sci Int* 2019; 297:277–83.
96. Moriya F, Nishimura H, Furumiya J, Hashimoto Y. Effects of drinking and smoking on endogenous levels of urinary γ -hydroxybutyric acid, a preliminary study. *Leg Med (Tokyo)* 2006; 8(4):231–4.
97. Elliott S BV. The presence of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic and non-alcoholic beverages. *Forensic Sci Int* 2005; 151(2-3):289–92.
98. Tucci M, Stocchero G, Pertile R, Favretto D. Detection of GHB at low levels in non-spiked beverages using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Toxicol Anal Clin* 2017; 29(2):225–33.
99. Passie T, Halpern JH, Stichtenoth DO, Emrich HM, Hintzen A. The pharmacology of lysergic acid diethylamide: a review. *CNS Neurosci Ther* 2008; 14(4):295–314.
100. Leung, Kelvin Sze-Yin; Fong, Bonnie Mei-Wah (2014). LC–MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? *Anal Bioanal Chem*, 406(9-10), 2289–2301.
101. Arbeitsbereich Forensische Toxikologie IfRM Rostock, Hrsg. Laboreigene Standard Operating Procedures (SOPs).

Anhang

Standard operating procedures (SOPs)

Analyse basischer Substanzen

- ca. 20 – 50 mg der Probe in ein Schliffreagenzglas geben (genaue Masse notieren)
- Zugabe von 50 µl des ISTD
- Zusatz von 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 6) aus dem Dispenser (Haare müssen bedeckt sein)
- Schliffreagenzröhrchen 4 – 5 h im Ultraschallbad exponieren
- Zentrifugation für 3 min bei 4000 U/min
- Konditionierung der Festphasenextraktionssäulen:
 - o Zugabe von 2 ml 2-Propanol, mit Überdruck durchlaufen lassen
 - o Zugabe von 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 6), mit Überdruck durchlaufen lassen
- Auftragung der Probenlösung, ggf. mit geringem Überdruck langsam durchlaufen lassen
- Reagenzglas mit 3 ml Phosphatpuffer nachspülen, vortexen, zentrifugieren und auf Säule auftragen
- Waschen der Säule:
 - o Zugabe von 2 ml 0,1 N Essigsäure, mit Überdruck durchlaufen lassen
 - o Zugabe von 2 ml 2-Propanol, mit Überdruck durchlaufen lassen
- 10 min Trockensaugen der Säule bei maximalem Überdruck
- Zentrifugenröhrchen unter den Säulen positionieren
- Elution der Analyten mit 2 ml „DIA“ (langsam)
- DIA Zusammensetzung:
 - 40 ml Dichlorethan
 - 10 ml 2-Propanol
 - 1 ml 25% Ammoniak
- Leersaugen der Säule (Eluate im Zentrifugenröhrchen)
- Eluate bei 40° C unter Druckluft bis zur Trockene einengen
- Zugabe von 100 µl TFAA und 5 µl HFIP
- Vortexen
- Überführen der Lösung in GC-MS-Vials und verschließen
- Inkubation der Lösung für 30 min bei 80° C im Trockenschrank
- Derivatisierungsreagenz bei 40° C unter Druckluft bis zur Trockene einengen
- Zugabe von 50 µl Ethylacetat
- Verschließen und Vortexen
- Proben messen

Quelle: (101)

THC-Extraktion

- ca. 50 mg der Probe in ein 10 ml Plastikvial geben (genaue Masse notieren)
- Zugabe von 50 µl des ISTD (10 µl Verdünnung -> 10 ng THCd3)
- Zugabe von 1 ml N NaOH/Natronlauge
- Inkubation der Lösung für 30 min bei 80° C im Trockenschrank
- Überführen der Lösung in ein Schliffreagenzglas
- Zugabe von 4 ml Butylchlorid (1-Chlorbutan)
- Extraktion für 15 min auf dem Rüttler
- Überführen der organischen Phase in ein Zentrifugenglas
- Lösungsmittel unter Druckluft bei 40° C bis zur Trockene einengen
- Zugabe von 50 µl BESH
- Vortexen
- Überführen der Lösung in GC-MS-Vials und verschließen
- Inkubation der Lösung für 3 min in der Mikrowelle
- Proben messen

Quelle: (101)

Fragebogen zur Haarprobe

Zutreffendes bitte ankreuzen:
(bei * Häufigkeit pro Woche angeben)

Alter _____

Geschlecht m w

Haarbehandlung

nein ja: _____

Raucher in der Wohnung

nein ja

Rotwein

nein ja*: _____

Medikamente

nein ja: _____

GHB-Konsum

nein ja*: _____

andere Substanzen

nein ja*: _____

Fleischkonsum

vegan

vegetarisch

ja*: _____

Thesen

- Männer weisen tendenziell höhere endogene GHB-Haarkonzentrationen auf als Frauen.
- Intra-individuelle endogene GHB-Konzentrationsunterschiede (zwischen benachbarten Haarsegmenten) sind vernachlässigbar gering.
- Probanden, welche psychoaktive Substanzen konsumieren, fallen durch erhöhte GHB-Konzentrationen im Haar auf.
- Beim zur Haarprobenaufarbeitung zugehörigen Waschvorgang wird keine relevante Konzentration an GHB durch die verwendeten organischen Lösungsmittel herausgewaschen.
- Sich vegetarisch ernährende Personen haben tendenziell niedrigere endogene GHB-Level im Haar.
- Bei jüngeren lassen sich im Haar höhere endogene GHB-Konzentrationen nachweisen als bei älteren Personen.
- Rauchende Personen weisen höhere endogene GHB-Konzentrationen auf.
- Das Färben und/oder Bleichen von Haaren hat einen Einfluss auf gemessene endogene GHB-Konzentrationen.
- Ein regelmäßiger Konsum von GHB oder seinen Vorläufersubstanzen bedingt deutlich erhöhte GHB-Konzentrationen im Haar.
- Eine Einmalgabe von GHB oder seinen Vorläufersubstanzen ist im Haar nicht zwingend von endogenen GHB-Konzentrationen abgrenzbar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen einen großen Dank aussprechen, welche mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Büttner für die Möglichkeit, als Doktorandin am Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock für dieses interessante und relevante Thema forschend tätig gewesen sein zu dürfen.

Weiterhin an Frau Dr. rer. hum. Dipl.-Chem. Ricarda Kegler für die außerordentliche und umfassende Betreuung, sowie an die MitarbeiterInnen der Rostocker Forensischen Toxikologie – vielen lieben Dank, dass ich ein Teil eures Teams sein durfte und ihr mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standet.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. rer. nat. Daniel Rentsch für viele anregende Gespräche, Denkanstöße und geteiltes Wissen. Ich wünschte du hättest die Resultate dieser Arbeit miterleben und -diskutieren können.

Ein großes Dankeschön ferner meinen Eltern, dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt und allezeit hinter mir und meinen Entscheidungen steht.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen FreundInnen – ohne eure moralische Unterstützung während unzähliger, gemeinsam in der Bibliothek verbrachter Stunden wäre diese Arbeit wohl noch nicht vollendet worden.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Bestimmung der endogenen Konzentration von Gammahydroxybuttersäure (GHB) im Haar mittels an Flüssigkeitschromatographie gekoppelter Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken dem Wort oder dem Sinn nach entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Die Dissertation ist weder zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch in der Vergangenheit bei einer anderen Fakultät eingereicht worden.

Freiburg, den 08.01.2024

Katharina von Pelden