

**Untersuchungen zum Metabolismus und Nachweisfenster
von γ -Hydroxybuttersäure in biologischem Material**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Lena-Maria Katharina Mehling

aus Würzburg

Bonn September, 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Madea
2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Lamprecht

Tag der Promotion: 16.02.2018

Erscheinungsjahr: 2018

**Bescheidenheit schickt sich für den Gelehrten, aber nicht für die Ideen,
die in ihm wohnen und die er verteidigen soll.**

Marie Curie (1867-1934)

Inhaltsverzeichnis

Eidesstaatliche Erklärung.....	I
Publikationen.....	II
Zusammenfassung.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 GHB-Vorkommen, Verwendung, Missbrauch.....	1
1.2 GHB-Biosynthese.....	3
1.3 Physiologie und Pharmakologie von GHB.....	4
1.3.1 Pharmakodynamik.....	4
1.3.2 Pharmakokinetik.....	6
1.4 Toxikologie.....	8
1.5 Metabolismus.....	9
1.6 Forensische Relevanz.....	10
1.6.1 Endogene Konzentrationen.....	11
1.6.2 Interaktionen und Stabilität von GHB in Blut- und Urinproben.....	12
1.6.3 Konzentrationen post mortem.....	13
1.6.4 Stabilität in postmortalen Proben.....	15
1.6.5 Mögliche Einflüsse auf postmortale GHB-Konzentrationen.....	15
1.6.6 Lagerung von postmortalen Proben.....	16
1.6.7 Chemische Stabilität.....	17
1.7 GHB in Haaren.....	18
1.8 Fallberichte.....	20
1.9 Analytik.....	20
2 Zielsetzung der Dissertation.....	22
3 Drogenassoziierte Sexualstraftat mit tödlichem Ausgang: GHB-Intoxikation bei einem sechs Jahre alten Mädchen.....	24
3.1 Einleitung.....	24

3.2	Zusammenfassung.....	33
4	Bestimmung von GHB und dessen Stoffwechselprodukt GHB- β - <i>O</i> -Glucuronid in Haaren von drei Narkolepsie-Patienten - Vergleich zwischen Einzelaufnahme und chronischer GHB Exposition	34
4.1	Einleitung.....	34
4.2	Zusammenfassung.....	42
5	Entwicklung und Validierung einer HPLC-QTOF-MS Methode für die Bestimmung von GHB- β - <i>O</i> -Glucuronid und GHB-4-Sulfat in Plasma und Urin.....	43
5.1	Einleitung.....	43
5.2	Zusammenfassung.....	54
6	Konzentrationen von GHB und GHB- β - <i>O</i> -Glucuronid vor und nach GHB-Einnahme in Blut und Urin	56
6.1	Einleitung.....	56
6.2	Supplementary Material	70
6.3	Zusammenfassung.....	73
7	Das Potential von GHB-4-Sulfat zur Ergänzung aktueller Ansätze für den Nachweis einer GHB-Einnahme	75
7.1	Einleitung.....	75
7.2	Zusammenfassung.....	99
8	Veränderung der Genexpression nach der Einnahme von GHB – eine Pilotstudie.....	101
8.1	Einleitung.....	101
8.2	Supplementary Material	113
8.3	Zusammenfassung.....	117
9	Diskussion.....	119
9.1	Case Report	119
9.2	Haaranalyse.....	120
9.3	Methodenentwicklung, Validierung und Stabilität.....	124
9.3.1	Methodenentwicklung und Validierung.....	124
9.3.2	Stabilität.....	125

9.3.3	GHB-Isomere und weitere Glucuronide	126
9.4	Ausscheidungsexperiment und endogene Konzentrationen.....	127
9.4.1	Endogene Konzentrationen.....	127
9.4.2	Konzentrationen nach GHB-Einnahme.....	129
9.5	Metabolomics	132
9.5.1	Referenzpopulations-basierende Ergebnisse.....	132
9.5.2	Anwendung im Ausscheidungsversuch.....	133
9.5.3	Die Zuordnung von F320 als β -Citryl Glutaminsäure.....	134
9.5.4	Langzeit-Stabilität von GHB-Gluc/F320	134
9.6	Pilotstudie: Veränderung der Genexpression nach GHB-Gabe.....	136
9.7	Limitierungen der Studie	139
10	Ausblick.....	140
11	Abbildungsverzeichnis	142
12	Literaturverzeichnis.....	143
13	Tabellenverzeichnis	161
	Danksagung.....	X

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel zur Anfertigung dieser Arbeit benutzt habe.

Bonn, September 2017

Lena-Maria Katharina Mehling

Publikationen

Die der vorliegenden kumulativen Dissertationsschrift zugrunde liegenden Arbeiten, die am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Bonn, an der Deutschen Sporthochschule Köln sowie am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Kopenhagen entstanden sind, wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht:

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.

Mehling LM, Piper T, Dib J, Pedersen DS, Madea B, Hess C, Thevis M. Development and validation of a HPLC-QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine. *Forensic Toxicol.* (2017) 35: 77. doi:10.1007/s11419-016-0339-4

Mehling LM, Piper T, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea M, Thevis M, Hess C. GHB-O- β -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake. *Forensic Toxicol.* (2017) 35: 263. doi:10.1007/s11419-016-0352-7

Mehling LM, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, Hess C, Courts C. Alterations in gene expression after gamma-hydroxybutyric acid intake - a pilot study. *Int. J. Legal Med.* 2017. doi: 10.1007/s00414-017-1609-3.

Mehling LM, Wang X., Johansen SS., Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, Hess C. Determination of GHB and GHB- β -O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients—Comparison between single and chronic GHB exposure. *Forensic Sci. Int.* 2017.

Piper T, Mehling LM, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea M, Hess C, Schänzer W, Thevis M. Potential of GHB-4-sulfate to complement current approaches in GHB post administration detection. *Forensic Sci. Int.* 2017.

Weitere Publikationen die aus diesem Projekt entstanden und in dieser Arbeit nicht enthalten sind:

Lott S, Piper T, Mehling LM, Spottke A, Maas A, Thevis M, Madea B, Hess C. Measurement of exogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in urine using isotope ratio mass spectrometry (IRMS). *Toxichem Krimtech* 82 (2015): 264.

Publikationen

Mehling LM, Piper T, Lott S, Wang X, Dib J, Pedersen DS, Heiderbreder A, Young P, Spottke A, Madea B, Johansen SS, Courts C, Thevis M, Hess C. Several possible toxicological and genetic tools for the extension of the detection window after GHB intake. Toxichem Krimtech 2017

Zudem wurden Teile der Arbeit auf folgenden nationalen und internationalen Kongressen als Vortrag oder Poster präsentiert:

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) in Heringsdorf, Usedom, Germany 2014: L.-M. Mehling, B. Madea, F. Mußhoff, C. Heß-Distribution von Gamma-Hydroxybuttersäure und dessen Glucuronid-Metabolit in biologischem Material post mortem in einem Tötungsdelikt (Vortrag)

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) in Heringsdorf, Usedom 2014: L.M. Mehling, B. Madea, F. Musshoff, C. Hess-Endogene Konzentrationen und Stabilität von GHB-*O*- β -Glucuronid in biologischem Material (Poster)

Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) Nord in Köln, Germany: Lena-Maria Mehling, Alexandra Maas, Burkhard Madea, Frank Mußhoff, Annika Spottke, Cornelius Heß- GHB- β -*O*-Glucuronid – Bestimmung von endogenen Konzentrationen in Serum und Urin, Bewertung einer klinischen Studie (Vortrag)

XIX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) in Mosbach, Germany 2015: L.-M. Mehling, A. Maas, B. Madea, F. Mußhoff, A. Spottke, C. Heß-GHB- β -*O*-glucuronide – Determination of endogenous concentrations in plasma and urine samples and estimation of a clinical trial (Vortrag)

XIX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) in Mosbach, Germany 2015: Susanne Lott, Thomas Piper, Lena-Maria Mehling, Annika Spottke, Alexandra Maas, Mario Thevis, Burkhard Madea, Cornelius Hess-Measurement of exogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in urine using isotope ratio mass spectrometry (IRMS) (Vortrag)

Congress of the International Association of Forensic Toxicology (TIAFT) Florenz, Italy 2015: L.-M. Mehling, S. Lott, A. Maas, B. Madea, F. Mußhoff, T. Piper, M. Thevis, A. Spottke, C. Heß-GHB and its newly described metabolite GHB- β -*O*-glucuronide-Discrimination exogenous/endogenous via LC/MS/MS and GC/C/IRMS (Vortrag)

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) in Heidelberg, Germany 2016: Lena-Maria Mehling, Thomas Piper, Annika Spottke, Burkhard Madea, Mario Thevis, Cornelius Hess- GHB metabolites: GHB- β -*O*-glucuronide and GHB-4-sulfate – Can they help in the detection of GHB intake? An excretion study (Vortrag)

Publikationen

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) in Heidelberg, Germany 2016: Lena-Maria Mehling, Eva Sauer, Annika Spottke, Burkhard Madea, Cornelius Courts, Cornelius Hess- Influence of GHB intake on the expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG* and *PEA15* (Vortrag)

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) in Heidelberg, Germany 2016: Lena-Maria Mehling, Thomas Piper, Josef Dib, Daniel Sejer Pedersen, Burkhard Madea, Cornelius Hess, Mario Thevis-Development and validation of a HPLC-QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine (Poster)

XX. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) in Mosbach, Germany 2017: Lena-Maria Mehling, Thomas Piper, Susanne Lott, Xing Wang, Josef Dib, Daniel Sejer Pedersen, Anna Heiderbreder, Peter Young, Anna Spottke, Burkhard Madea, Sys Stybe Johansen, Cornelius Courts, Mario Thevis, Cornelius Hess, Several possible toxicological and genetic tools for the extension of the detection window after GHB intake (Vortrag)

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden interdisziplinäre Untersuchungen durchgeführt, um die Nachweisbarkeitsdauer nach einer Gamma-Hydroxybuttersäure-(GHB)-Gabe in biologischen Matrices zu verlängern. Es sollten biologische Marker gefunden, Grenzwerte festgelegt und geeignete Strategien zur Identifizierung einer GHB-Einnahme entwickelt werden, die die bisherigen forensischen Beweise bei der Aufklärung einer GHB-assoziierten Straftat ergänzen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass diese vielversprechenden Ansätze weder auf toxikologischer noch auf genetischer Ebene eine eindeutige Verlängerung der Nachweisbarkeitsdauer erzielen konnten.

Um eine Einführung in das Thema zu geben und die Problematik des forensischen Nachweises einer GHB-Einnahme zu verdeutlichen, wurde zunächst der tödlich verlaufende Fall einer GHB-assoziierten Sexualstraftat an einem 6-jährigen Mädchen geschildert. Erste Untersuchungen widmeten sich anschließend der Analyse von GHB in Haarproben von Narkolepsie-Patienten, die entweder regelmäßig mit GHB behandelt wurden oder die Therapie mit GHB starteten. Der Vergleich der Konzentrationen erlaubte keine Unterscheidung zwischen einer regelmäßigen therapeutischen Einnahme und einer GHB-Einzelgabe. Anschließend wurden bisher veröffentlichte Ansätze zum Nachweis einer GHB-Exposition an den Ergebnissen der Haaranalyse angewendet. Trotz der vielfältigen Möglichkeiten, die GHB-Konzentrationen im Haar zu interpretieren, konnte keine Methode den eindeutigen Beweis für die Einnahme von GHB in den Proben dieser Patienten erbringen.

Anschließend wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Metabolite GHB- β -*O*-Glucuronid (GHB-Gluc) und GHB-4-Sulfat (GHB-Sulf) in Plasma und Urin entwickelt. Die Methode wurde nach den Richtlinien der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) validiert und die Stabilität wurde in den biologischen Proben getestet. Die Untersuchungen garantierten stabile Konzentrationen für GHB-Gluc und GHB-Sulf in Plasma- und Urinproben bei einer Lagerungstemperatur von -20°C über einen Zeitraum von 31 Tagen.

Des Weiteren wurde ein Ausscheidungsexperiment durchgeführt und endogene Konzentrationen der GHB-Stoffwechselprodukte in Plasma und Urin bestimmt. Die Erstellung der pharmakokinetischen Profile aller Patienten demonstrierten, dass das Nachweisfenster für eine GHB-Gabe in Plasma (<4 h) und Urin (<6 h) sehr eng ist und eine

Zusammenfassung

Verlängerung der Nachweisbarkeit anhand der Konzentrationen der Stoffwechselprodukte nicht möglich ist. GHB-Gluc und GHB-Sulf eigneten sich somit nicht als Marker für eine GHB-Einnahme. Diese Ergebnisse wurden jedoch weiter untersucht, indem eine geeignete Normalisierung für die Konzentrationen im Urin gefunden werden sollte. Es wurde eine zunächst unbekannte endogene Komponente in allen Urinproben gesucht, die mit beiden Metaboliten gut korrelierte. Die Substanz wurde als β -Citryl-Glutaminsäure identifiziert und ermöglichte die Angleichung der pharmakokinetischen Profile der mit GHB regelmäßig behandelten Patienten. Des Weiteren zeigte sich, dass sich die Bestimmung eines intra-individuellen Grenzwertes für die Interpretation der Urinkonzentrationen des Therapieeinsteigers geeignet war, um eine einmalige GHB-Gabe nachzuweisen.

Letztendlich wurde auf genetischer Ebene eine robuste Methode mit empirisch geprüfter Normalisierungsstrategie entwickelt, mit der die Expression der Gene *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG* und *PEA15* nach GHB-Einnahme untersucht wurde. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die Exposition mit GHB die Expression dieser Gene nicht signifikant beeinflusste. Daher konnte auf diese Weise kein geeigneter Surrogatmarker zum Nachweis einer GHB-Gabe identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden robuste und validierte Methoden entwickelt, neue Strategien zur Normalisierung etabliert und vielversprechende Ansätze getestet, die in weiteren Forschungsexperimenten näher untersucht werden sollten.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
±	Plus/Minus
≅	Entspricht
°C	Grad Celsius
AHB	Alpha-Hydroxybuttersäure (<i>α-Hydroxybutyric acid</i>)
AMG	Arzneimittelgesetz
BHB	Beta-Hydroxybuttersäure (<i>β-Hydroxybutyric acid</i>)
BMI	Body-Mass-Index
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary Desoxyribonucleic acid</i>)
cm	Zentimeter
DEA	Drogenvollzugsbehörde (<i>Drug Enforcement Administration</i>)
DFC	drogenassoziierte Verbrechen (<i>Drug facilitated crime</i>)
DFSA	drogenassoziierte Sexualstraftat (<i>Drug facilitated sexual assault</i>)
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FADD	<i>Fas-associated protein with Death Domain</i>
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (<i>Gamma-Aminobutyric acid</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
GBL	Gamma-Butyrolacton
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (<i>Gaschromatography Mass Spectrometry</i>)
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure (<i>Gamma-Hydroxybutyric acid</i>)
GHB-Gluc	GHB- β -O-Glucuronid (<i>GHB- β-O-glucuronide</i>)
GHB-Sulf	GHB-4-Sulfat (<i>GHB-4-sulfate</i>)
GOI	Zielgen (<i>Gene of Interest</i>)
GTFCh	Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie
h	Stunde
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (<i>hydrophilic interaction chromatography</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC-QToF-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie (<i>High Performance Liquid Chromatographie Quadrupole Time-of-flight-Mass Spectrometry</i>)
Hrsg. (Eds.)	Herausgeber (<i>Editors</i>)
k.o.-Mittel	<i>Knock-out-Mittel</i>
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (<i>Liquid Chromatographie Tandem-Mass spectrometry</i>)
LOD	Nachweisgrenze (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>Limit of Quantification</i>)
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
min	Minute
ml	Milliliter
m/z	Masse-zu-Ladung
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm
NP	Normalphase (<i>normal phase</i>)
PMI	Postmortem-Intervall
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
SD	Standardabweichung (<i>Standard deviation</i>)
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSAD	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
SSADHD	Succinat Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel (<i>Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency</i>)
SSAR	Succinat-Semialdehyd-Reduktase
u. a.	unter anderem
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
USA	United States of America
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 GHB-Vorkommen, Verwendung, Missbrauch

Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) oder auch 4-Hydroxybutansäure wurde zum ersten Mal 1874 von Alexander Sytzeff synthetisiert und beschrieben [1]. Im Organismus wird GHB endogen aus dem Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) mit Hilfe der Enzyme GABA-Transaminase und Succinat-Semialdehyd-Reduktase (SSAR) gebildet [2–4]. GHB kommt nicht nur im menschlichem Organismus vor [5], sondern kann auch in anderen höheren Eukaryoten wie z. B. Pflanzen und Ratten nachgewiesen werden [6,7]. In der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wird GHB eine regulatorische Funktion bei der Tolerierung von oxidativem Stress zugesprochen [6].

Neben dem natürlichen Vorkommen als endogene Substanz wurde GHB in den 1960er Jahren als Anästhetikum verwendet, heutzutage wird es hauptsächlich zur medikamentösen Behandlung der Krankheit Narkolepsie eingesetzt [8–10]. Das Arzneimittel wird hierbei in therapeutischen Dosierungen von 4,5-9 g Natriumoxybat (das Natriumsalz der GHB) verabreicht [11]. Dosen im Bereich von 75 mg/kg bis 100 mg/kg GHB eignen sich gut als Hypnotikum [12]. Neben der Behandlung von Patienten mit Narkolepsie wird es auch zur Therapie des Alkoholentzugs in Dosen von 50 mg/kg bis 100 mg/kg Körpergewicht und zur Therapie des Opiatentzugs in Dosen von 25 mg/kg Körpergewicht eingesetzt [13–15].

Bekannte Medikamente sind die Produkte Xyrem® und Somsanit®. Diese sind farblos flüssige Arzneiformen, die als Wirkstoff das Natriumsalz des GHB enthalten [11]. Xyrem® ist eine Lösung zur oralen Anwendung, Somsanit® dient als Narkotikum und Sedativum, welches intravenös appliziert wird. Im Jahre 1977 fand man heraus, dass GHB die Freisetzung von Wachstumshormonen stimuliert [16]. Daraufhin wurde es von Bodybuildern missbräuchlich als Dopingsubstanz verwendet. Seit 1994 berichtete die britische nationale Giftinformationszentrale über den Konsum von GHB als Freizeitdroge in den Nachtclubs von London [17] und auch in der Gay Szene wurde GHB immer bekannter [18]. Außerdem wurde es von HIV-positiven Personen konsumiert, die eine Energiesteigerung durch dessen Konsum beschrieben [19].

Seit dem 1 März 2002 ist GHB der dritten Anlage des Betäubungsmittelgesetzes unterstellt. Eine Ausnahme stellen jedoch Injektionslösungen wie das Arzneimittel Somsanit® dar,

Einleitung

welches der einfachen Verschreibungspflicht unterliegt [20]. Aufgrund seiner schnellen pharmakologischen Wirkung innerhalb von 30 min - abhängig von der eingenommenen Dosis- und seinem schnellem Katabolismus, wird es auch als k.o.-Mittel beim Begehen von Verbrechen insbesondere von sexuellen Übergriffen eingesetzt [21,22]. Auch über den illegalen Gebrauch von GHB zur Gewichtskontrolle wird in der Literatur berichtet [23]. Dennoch gehört GHB nicht zu den Drogen, die häufig konsumiert werden. So zeigte eine Studie des *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, dass die Lebenszeitprävalenz des Gebrauchs von GHB je nach Zielgruppe und Studie bei ca. 3 bis 19 % lag [24].

Anderson et al. veröffentlichen einen Artikel über die globale epidemiologische Perspektive der Toxikologie von Drogen, die bei Sexualdelikten eingesetzt wurden. Hierbei wurden verschiedene Studien aus unterschiedlichen Ländern untersucht, die dokumentierten, welche Drogen häufig im Rahmen von DFSA detektiert wurden [25]. Nur in Kanada und in den USA wurde GHB jeweils zu 1,1 und 3 % in solchen Fällen aufgefunden. In den übrigen Studien wurde GHB gar nicht aufgelistet. Entgegen der populistischen Auffassung, dass mit Drogen versetzte Getränke ein hohes Risiko darstellen, scheint Alkohol in Kombination mit freiwillig genommenen Drogen der größte Risikofaktor zu sein, um Opfer einer Sexualstraftat zu werden. Aufgrund der schnellen Metabolisierung von GHB und den häufig großen Zeiträumen zwischen Tatzeit und Blutentnahme, könnte die Gabe dieser Substanz in solchen Studien unterschätzt werden [26].

Je nach Konsumgruppe und welcher Wirkzustand mit der Einnahme von GHB erreicht werden sollte, entstanden unterschiedliche Synonyme für die eigentliche Droge GHB. Die bekanntesten Abkürzungen für die Substanz Gamma-Hydroxybuttersäure sind wohl „GHB“ oder „G“. Aufgrund seiner euphorisierenden Wirkung wird es auch „liquid X“, „liquid E“ oder „liquid ecstasy“ genannt. Jedoch ist GHB auch unter dem Synonym „growth hormone booster“ oder „woman viagra“ bekannt, da es sowohl die Freisetzung von Wachstumshormonen fördert als auch die Libido steigern kann. Im Zusammenhang mit seiner bewussteinmindernden Wirkung wird es auch als k.o.-Tropfen bezeichnet und kann auch unter den Begriffen „natural sleep 500“, „grievous bodily harm“ und „easy lay“ beschrieben werden. Weitere Synonyme sind „fantasy“, „cherry meth“, „scoop“ und „Georgia home boy“. Auf Grund seines salzigen Geschmacks wird GHB auch als „soap“ oder „salty water“ bezeichnet [24].

1.2 GHB-Biosynthese

GHB entsteht endogen durch die Degradation des Neurotransmitters GABA. Mit Hilfe der GABA-Transaminase wird das Substrat zu Succinat-Semialdehyd (SSA) umgewandelt [2,27], dieses wird anschließend über das Enzym Succinat-Semialdehyd-Reduktase (SSAR) zu GHB reduziert [3] (siehe Abbildung 1). NADPH dient hier als Cofaktor [28]. Das Gen *AKR7A2* codiert für dieses Enzym, gehört der Subfamilie AKR7 an und wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert [29,30]. Der größte Anteil des gebildeten SSAs wird jedoch über das Enzym Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) zu Succinylsäure (Bernsteinsäure) oxidiert und über den Zitronensäurezyklus metabolisiert [31]. Das Enzym *ALDH5A1* codiert für das Enzym SSADH [32]. Nur 0,15 % des Anteils an gebildetem SSA werden im Rattenhirn zu GHB synthetisiert [33].

Liegt ein Mangel des Enzyms SSADH vor, so kann eine erhöhte Konzentration an GHB im Urin und in anderen Körperflüssigkeiten festgestellt werden [4,34]. Die Krankheit wird als *Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency* (SSADHD) bezeichnet. Zwei *Exon skipping* - Mutationen innerhalb des Gens *ALDH5A1* verursachen eine verminderte Aktivität dieses Enzyms und führen zu einer Akkumulation der Neurotransmitter GABA und GHB [35]. Die Erkrankung äußert sich phänotypisch in verzögerter Intelligenz-, Bewegungs-, Sprech- und Sprachentwicklung [34]. Außerdem können Bluthochdruck und etwas seltener Krämpfe und Ataxien beobachtet werden [36]. Es ist ein seltener angeborener genetischer Defekt [36] mit bisher ca. 200 gemeldeten Patienten [37].

Ob eine exogene GHB-Gabe Einfluss auf die Genexpression unterschiedlicher Gene haben könnte, untersuchte Larson et al. im Jahre 2007. Hierfür wurden Mäusen Natriumoxybat in einer Dosis von 1 g/kg injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene *PEA-15* und *EREG* bis zu 96 h signifikant höher in behandelten Mäusen als in einer Kontrollgruppe exprimiert wurden.

Epiregulin ist ein Mitglied der „epidermal growth factor“-Familie [38] und wird auf peripheren Leukozyten detektiert [39]. Das korrespondierende Gen (*EREG*) wird hauptsächlich in der Plazenta exprimiert. Das Expressionsniveau von Epiregulin ist in normalen Geweben gering. Epiregulin ist ein Signalmolekül und als Ligand des „epidermal growth factor“-Rezeptors und verschiedener Tyrosinkinase-Rezeptoren an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt.

Einleitung

Pea-15 ist ein 15 kDa schweres Protein, das zunächst in großen Mengen im Cytoplasma von Astrocyten im Gehirn detektiert wurde [40]. *Pea-15* wird darüber hinaus in vielen Geweben exprimiert und reguliert zahlreiche zelluläre Funktionen durch vielfältige Interaktionen u. a. mit Phospholipase D1, Caspase 8, *Mitogen-activated protein kinase 1* (MAPK1) und *Fas-associated protein with Death Domain* (FADD).

Des Weiteren wurden in einer Posterpräsentation von Abdullah und Ellis die Ergebnisse von *Expression Arrays* vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass auch Einzeldosen von GHB zu hochsignifikanten Veränderungen in der Expression von 584 Genen in humanen monozytären Leukämiezellen (THP-1) führen [41].

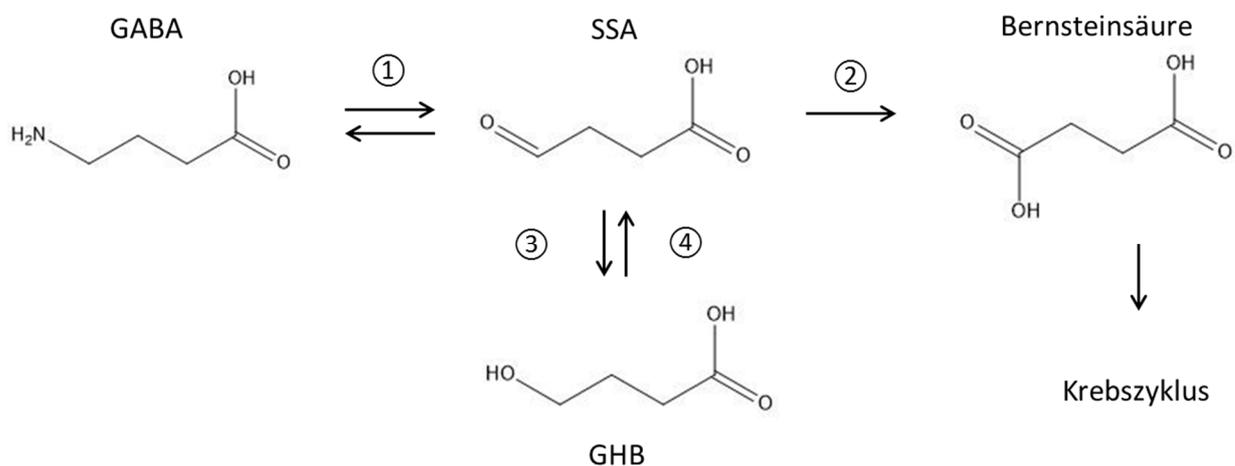


Abbildung 1 Synthese von Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) aus Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Degradation von Succinat-Semialdehyd (SSA) zu Bernsteinsäure; ① GABA-Transaminase, ② Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Gen: *ALDH5A1*); ③ Succinat-Semialdehyd-Reduktase (Gen: *AKR7A2*); ④ GHB-Dehydrogenase

1.3 Physiologie und Pharmakologie von GHB

1.3.1 Pharmakodynamik

Die zuvor beschriebene unterschiedliche Nutzung von GHB zum einem als k.o.-Mittel, zum anderen als Freizeitdroge bzw. als therapeutische Medikation kann anhand der Dosis-abhängigen pharmakologischen Wirkung dieser Substanz erklärt werden. In geringen Mengen bis zu 1,5 g verursacht GHB einen euphorischen Zustand und hat einen angstlösenden Effekt, der eine sozial öffnende Wirkung verursacht. In höheren Dosen bis zu 2,5 g führt GHB zur Stimmungs- und Antriebssteigerung sowie zur Erhöhung des sexuellen Verlangens, während die Einnahme von großen Dosen einen plötzlichen Tiefschlaf verursachen kann.

Einleitung

Kombinationen von GHB mit anderen Medikamenten und Alkohol können zu Übelkeit und Erbrechen führen [21]. Die Nebenwirkungen dieses zentral wirksamen Mittels sind in klinischen Studien und Fallberichten beschrieben und können 15 min nach Einnahme auftreten [23,42]. Dazu gehören u. a. Kopfschmerzen, Erhöhung des Bluthochdrucks, Benommenheit; Psychomotorische Störungen und viele andere [42]. Weitere Nebenwirkungen werden in dem Kapitel Toxikologie beschrieben.

Abanades et al. [43] untersuchten die physiologischen und subjektiven Variablen sowie die psychomotorischen Leistungen von Probanden nach der Einnahme von GHB in unterschiedlichen Dosierungen. Es konnten Veränderungen der psychomotorischen Leistung sowie der physiologischen und subjektiven Wirkung abhängig von der eingenommenen Dosis und dem Plasmaspiegel festgestellt werden. GHB zeigte ein stimulierendes-sedatives Wirkungsmuster in einem zweiphasigen Zeitprofil ähnlich wie die zentral wirksamen Mittel Cannabis und Alkohol [44,45]. In der ersten Stunden nach Einnahme dominierten psychostimulierende Effekte, während sedative Effekte erst zwei Stunden nach Einnahme eintraten [43]. Zur Therapie von Narkolepsie wird GHB eingesetzt, weil es kataplektische Anfälle verhindert, die übermäßige Tagesmüdigkeit verringert, die REM-Schlafphase verlängert und somit die Nachtruhe des Patienten verbessert [46–49]. Zur Therapie der Alkohol- und Opiatabhängigkeit wird es aufgrund der Minderung der Entzugssymptomatik eingesetzt [13,14].

Diese pharmakologischen Effekte werden vermittelt durch den Agonismus von GHB am GABA_B-Rezeptor. Durch die Bindung von GHB an diesen Rezeptor wird eine zentral dämpfende Wirkung im zentralen Nervensystem verursacht [50,51]. Obwohl der exakte pharmakologische Effekt von GHB noch nicht komplett erforscht ist, werden niedrige und hohe Bindungsaffinitäten von GHB an diesem Rezeptor beschrieben. Rezeptoren mit hohen Bindungsaffinitäten für GHB wie zum Beispiel bestimmte GABA_A-Rezeptoren und GHB-Rezeptoren werden aktiviert durch Konzentrationen im nanomolaren Bereich wie z. B. endogene Konzentrationen. Diese Rezeptoren befinden sich post- und präsynaptisch im zentralen Nervensystem. Exogene Konzentration von GHB, welche gewöhnlich im millimolaren Bereich liegen, binden an Rezeptoren mit niedriger Bindungsaffinität. Auch diese Rezeptoren sind im prä- und postsynaptischen Bereich des zentralen Nervensystems zu finden und vermitteln die hauptsächliche pharmakologische Wirkung durch Bindung an bestimmte GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren [51] (siehe Abbildung 2).

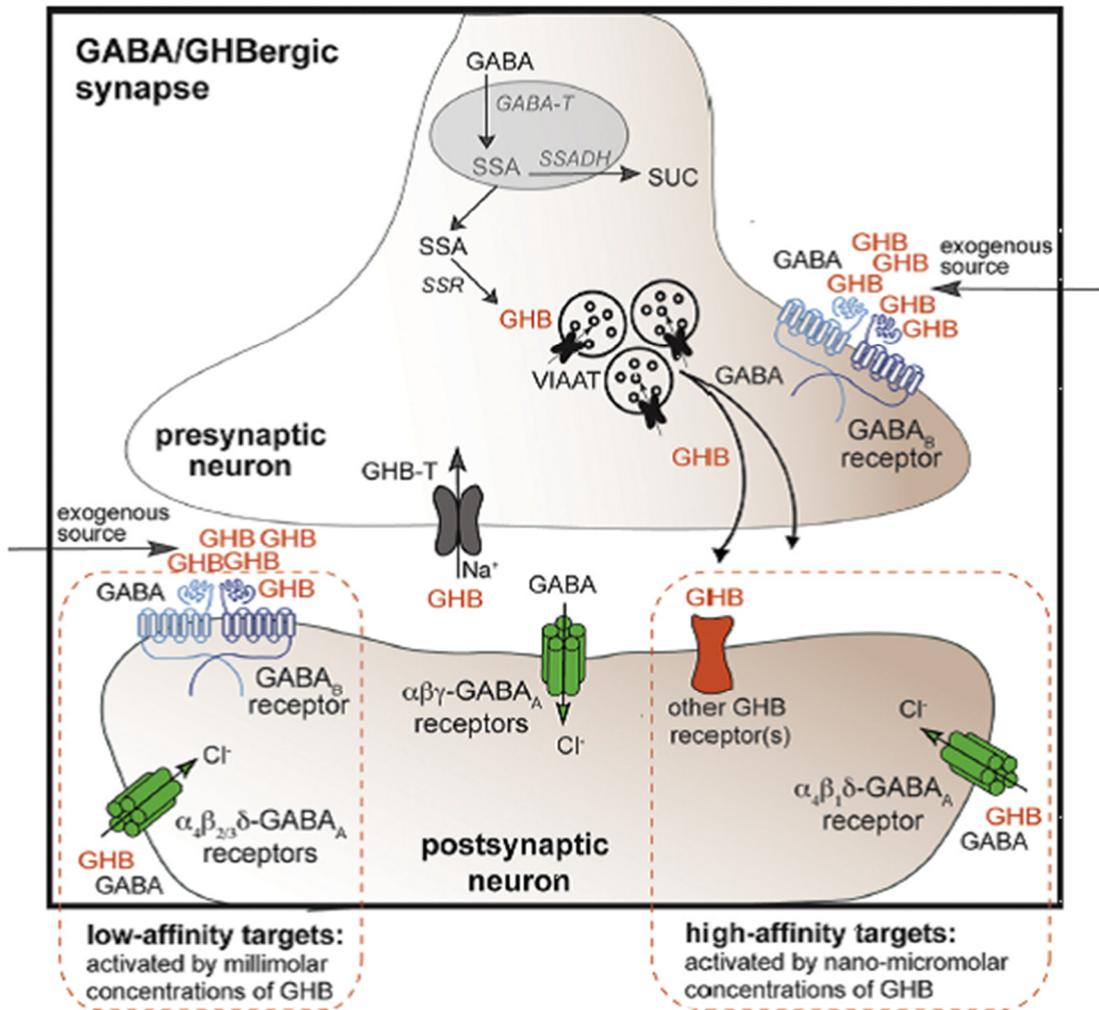


Abbildung 2 Bay et al. 2014 [51]. Pharmakologische Angriffspunkte von GHB an der GABA/GHBergic Synapse

Die Bindung von GHB an diese Rezeptoren moduliert direkt und indirekt die Aktivität des gabaergen, opioiden, serotonergen oder dopaminergen Systems [52]. Andere pharmakologische Wirkungsweisen werden durch den Agonismus von GHB zum GABA_B-Rezeptor induziert und können zu einer Atemdepression führen, wenn eine Überdosis von GHB eingenommen wurde [53].

1.3.2 Pharmakokinetik

Bis heute wurden zahlreiche Ausscheidungsexperimente nach GHB-Einnahme veröffentlicht. Einzelne orale oder ansteigende Dosen von GHB wurden an ein Kollektiv von Freiwilligen verabreicht, um pharmakokinetische Profile in Plasma und Urin zu erhalten [22,43,54–57]. Im Jahre 1993 veröffentlichten Palatini et al. die pharmakokinetischen Parameter von GHB in acht gesunden männlichen Probanden. Diese nahmen Dosen zwischen 12,5 und 50 mg/kg GHB ein [57]. Zuvor hatten Ferrara et al. diese Daten in alkohol-abhängigen Individuen nach

Einleitung

GHB- Einnahme beschrieben [15]. Brenneisen et al. [22] führten einen Ausscheidungsversuch mit acht gesunden Freiwilligen durch, die eine einzelne Dosis von 25 mg/kg GHB erhielten, und erstellten ein pharmakokinetisches Profil in Blut, Urin und Speichel. Abanedes et al. [43] führten eine doppel-verblindete, randomisierte, crossover und kontrollierte Studie durch, in der acht Teilnehmern ansteigende Einzeldosen (40, 50, 60, 72 mg/kg) von Natriumoxybat verabreicht wurden, um dosisabhängige pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkungen zu beschreiben [43]. Borgen et al. untersuchte die Wirksamkeit von GHB in der Behandlung der Narkolepsie an 13 Patienten, welche über Nacht und in den folgenden acht Wochen eine Natriumoxybat-Lösung (4 g in 120 mL Wasser) einnahmen [55]. Anschließend wurden die pharmakokinetischen Parameter von GHB mit Hilfe der gesammelten Blutproben der Narkolepsie-Patienten bestimmt. In einem beobachteten Zeitraum bestimmten Haller et al. die GHB Konzentrationen im Urin von 16 Freiwilligen, die eine Dosis von 50 mg/kg GHB alleine und in Kombination mit Alkohol einnahmen [54].

In diesen Studien wurden folgende pharmakokinetische Daten erfasst. Nach oraler Absorption können abhängig von der eingenommene Dosis maximale Plasmakonzentrationen von GHB mit Werten bis zu 130 mg/L innerhalb von einer Stunde erreicht werden [43]. Die Absorption ist geschlechtsunspezifisch und wird durch die Aufnahme von Nahrung nicht signifikant beeinflusst [58]. Aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit hat GHB ein geringes Verteilungsvolumen im Bereich von 0,2-0,4 L/kg. Die Verteilung von GHB im ganze Körper geschieht sehr schnell und folgt einem Zwei-Kompartiment-Modell [22,59]. Die Halbwertszeit beträgt 0,3-1,0 h [60]. GHB zeigt keine signifikante Plasmaproteinbindung und das Blut / Plasma-Verhältnis beträgt 1,2 [57,60]. Die mittlere renale *Clearance* liegt bei ca. $17,8 \pm 13,1$ mL/min und wird nicht durch den Co-Konsum von Alkohol beeinflusst [54]. Die Elimination von GHB folgt einer nicht-linearen Kinetik sowohl in Menschen als auch in Tieren, die sich in einer dosis-abhängigen kapazitätslimitierten Elimination sowohl in Narkolepsie-Patienten als auch in gesunden Probanden äußert [56,57,61,62]. Das bedeutet, dass der Konzentrationsabfall pro Zeit nach Einnahme von GHB nicht konstant ist, sondern sich proportional zu der im Moment vorliegenden Plasmakonzentration verhält. So kann GHB abhängig von der eingenommenen Dosis im Serum bis zu <6 h und im Urin bis zu <12 h in Konzentrationen oberhalb des endogenen Bereichs nachgewiesen werden [22,63]. Brenneisen et al. bestimmten GHB-Konzentrationen jeweils bis zu 76,3 mg/L und bis zu 840 mg/L in den gesammelten Plasma- und Urinproben. In dieser Studie sanken die Konzentrationen nach 2.5 h und 12 h wieder unterhalb der verwendeten Grenzwerte von

4 mg/L und 10 mg/L in Plasma und Urin [22]. In einer weiteren Studie von Abanades et al. nahmen insgesamt fünf Probanden eine GHB-Dosis von 50 mg/kg ein. Maximale Plasmakonzentrationen wurden nach 30 min erreicht mit einer mittleren Konzentration von 83,1 mg/L. Nach 6 h sanken die Werte im Durchschnitt auf 0,9 mg/L. Im Urin wurden lediglich 2 % der ursprünglich eingenommenen Dosis ausgeschieden [63].

Eine Toleranzentwicklung gegenüber GHB nach einer chronischen Einnahme über acht Wochen konnte nicht festgestellt werden [55]. Die pharmakokinetischen Parameter von GHB in gesunden Probanden, Narkolepsie-Patienten und alkohol-abhängigen Probanden mit Lebererkrankungen zeigten keine signifikanten Unterschiede [55–57].

1.4 Toxikologie

Die Wirkdauer bei GHB-Intoxikation kann je nach eingenommener Dosis ca. 1-7 h betragen [23,59]. In dieser Zeit treten erwünschte und unerwünschte Wirkungen auf. Die Symptome einer Vergiftung mit GHB äußern sich in dosisabhängigen Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Schwindel sowie Sprachstörungen - sie ähneln teilweise einer Alkoholvergiftung. Bei höheren Konzentrationen kommt es zur Bradykardie, Krämpfen, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma und Atemdepressionen bis hin zum Atemstillstand. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören Relaxation, Enthemmung, Gefühl der Trunkenheit, Ataxie, Desorientierung, Schwindel, Euphorie, Verwirrtheit, Halluzinationen, Schläfrigkeit, undeutliche Sprache, Übelkeit, Miosis und Hypothermie [50]. Außerdem sprechen die Patienten nicht auf die Antidote Flumazenil und Naloxon an, welche jeweils zur Behandlung von Benzodiazepin- und Opioid-Vergiftungen verabreicht werden [59,64–66].

Patienten, die nach GHB Einnahme in der Klinik eingeliefert wurden, zeigten eine typische Bewusstseinsstrübung, welche nach einiger Zeit nachließ und zum Erwachen führte. Die Nachwirkungen der GHB-Einnahme dauerten nicht lange an, wodurch sich die Patienten schnell wieder fit fühlten und das Klinikum bald wieder verlassen wollten. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „*fast in, fast out*“-Effekt bezeichnet [59]. Patienten (n=54), die in Washington mit einer GHB-Überdosierung in eine Klinik eingeliefert wurden, hatten ein Durchschnittsalter von 28 Jahre (Altersbereich: 17-59 Jahren), wobei die Mehrzahl männlich war [67].

In der Klinik werden derzeit Intoxikationen typischerweise durch eine allgemeine Notfallversorgung und mit gegebenenfalls einer intensivmedizinisch symptomatischen Therapie behandelt [68]. Solange keine anderen Drogen gleichzeitig eingenommen wurden,

sind laut Literatur Überdosen von GHB relativ unproblematisch [21]. Am häufigsten wird GHB mit Alkohol konsumiert, was in 85 % der Fälle in einem Kollektiv von GHB-Intoxikationen gezeigt werden konnte [64]. Andere berauschende Mittel, die mit GHB konsumiert wurden, sind u. a. 3-Methylmethcathinon, Kokain, Cannabis, Benzodiazepine und Amphetamin / Ecstasy [26,69–71].

1.5 Metabolismus

GHB ist ein kleines Molekül, welches aus vier Kohlenstoffatomen besteht. Es ist eine mittelstarke bis starke Säure mit einem pKs-Wert von 4,72 [60]. Aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit sind keine bis nur geringe metabolische Veränderungen nötig, um die Elimination dieser Substanz zu ermöglichen [72]. Der größte Anteil des Neurotransmitters wird über den Zitronensäurezyklus metabolisiert und als CO₂ abgeatmet [54]. Einen sekundären Stoffwechselweg stellt die β -Oxidation dar. Jedoch gibt es Uneinigkeiten darüber, ob dieser signifikant ist [73]. Weniger als 5 % der eingenommenen GHB Dosis wird unverändert über den Urin ausgeschieden [54,74,75].

Während des Phase II Metabolismus der Biotransformation wird GHB in zwei weitere Metabolite konjugiert. Im Jahr 2013 wurde der Metabolit GHB- β -O-glucuronide (GHB-Gluc) von Petersen et al. [76] in Urinproben beschrieben. Wang et al. [77] bestätigten das Vorkommen des Glucuronid-Konjugats in Haaren.

Hanisch et al. [78] erbrachten den qualitativen Nachweis von GHB-4-Sulfat (GHB-Sulf) im Urin. Ähnlich wie die Konjugation von Ethanol zu den Alkoholmarkern Ethylglucuronid und Ethylsulfat, die zum Nachweis des Alkoholkonsums dienen, könnte auch GHB mit Hilfe der Enzyme UDP-Glucuronosyltransferase und Sulfotransferase jeweils glucuronidiert bzw. sulfatiert werden [79,80]. Welche Enzyme an diesem Prozess genau beteiligt sind, ist bisher noch nicht bekannt. Die Strukturformeln der Konjugate sind in Abbildung 3 dargestellt.

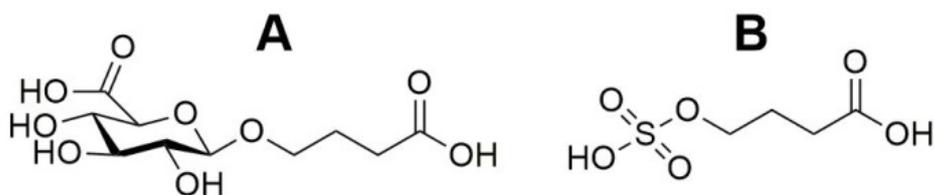


Abbildung 3 Stoffwechselprodukte von Gamma-Hydroxybuttersäure: (A) GHB- β -O-Glucuronid und (B) GHB-4-Sulfat

1.6 Forensische Relevanz

GHB wird nicht nur medizinisch angewendet sondern auch als Freizeitdroge konsumiert und als k.o.-Mittel bei *drug facilitated crimes* (DFCs) verabreicht. Handelt es sich um eine Gabe zur Begehung eines Sexualdelikts, benennt man das Verbrechen als *drug facilitated sexual assault* (DFSA) und das verwendete Mittel als eine *date-rape drug* (k.o.-Mittel). Neben GHB gibt es noch einige andere Substanzen, die als k.o.-Mittel eingesetzt werden, wie Alkohol oder Benzodiazepine (Flunitrazepam, Rohypnol®).

In Deutschland ist GHB seit dem 1 März 2002 der dritten Anlage des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) unterstellt. Der Besitz von GHB oder der Handel ohne Befugnis ist somit eine Straftat. Als Fertigarzneimittel Xyrem® (Natriumsalz des GHB) ist es unter Vorlage eines Betäubungsmittelrezeptes in Apotheken erhältlich und somit verkehrs- und verschreibungsfähig. Eine Ausnahme stellen Injektionslösungen wie das Arzneimittel Somsanit® dar, welches der einfachen Verschreibungspflicht unterliegt [20]. In den USA ist GHB bereits seit März 2000 dem Suchtmittelgesetz unterstellt und unterliegt dort der strengsten Kategorisierung (Schedule I) [81,82].

Eine legale Alternative mit gleichem Wirkspektrum wie GHB ist die Substanz 1,4-Butandiol. Es wird mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase zu GHB oxidiert [83,84]. Eine Aufnahme von 1,4-Butandiol ins Arzneimittelgesetz (AMG) bzw. BtMG ist aufgrund der verbreiteten Anwendung als Lösungsmittel und der damit verbundenen Konsequenzen für die chemische Industrie bisher noch nicht erfolgt. Seit 2002 besteht jedoch ein freiwilliges Monitoring-System des Bundeskriminalamtes [59]. Ein weiteres Prodrug ist das Lacton von GHB: Gammabutyrolacton (GBL). Es wird mit Hilfe einer endogenen Lactonase im Blut zu GHB decyclisiert [85] und stellte bisher auch eine legale Alternative zu GHB da. Seit dem Urteil vom 08.12.2009 (Landgericht Nürnberg/Fürth) des Bundesgerichtshofs (1 StR 277/09) ist der Handel mit GBL jedoch nicht mehr straffrei. Es wurde als „bedenkliches Arzneimittel“ eingestuft und unterliegt somit § 95 Abs. 1 Nr.1 des AMG [86]. Die chemische Industrie hat sich angesichts der Missbrauchsgefährdung für eine freiwillige Selbstkontrolle (Monitoring) entschieden [87]. Aufgrund der Umsetzung beider Prodrugs zu GHB im Körper, zeigen diese ähnliche Wirkung und Nebenwirkungen. Als unsachgemäße Nutzung von k.o.-Mitteln ist GHB und auch dessen Prodrugs GBL und 1,4-Butandiol strafbar bzw. können das Strafmaß erhöhen.

Aus forensischer Sicht ist die Erbringung von Beweismitteln zur Aufklärung eines DFSA, in dem GHB verabreicht wurde, sehr schwierig, da die Opfer zum Teil Gedächtnislücken aufweisen. Dies bezeichnet man als GHB induzierte anterograde Amnesie [88]. Außerdem stellt der Nachweis einer GHB-Aufnahme aufgrund des kurzen Nachweisfensters eine chemisch-toxikologische Herausforderung dar. Des Weiteren handelt es sich bei GHB um eine körpereigene Substanz, die in vielen biologischen Matrices in endogenen Bereichen nachgewiesen werden kann, wie zum Beispiel auch in Muttermilch [89–92]. Ein weiteres Problem sind hohe inter- und intra-individuellen Schwankungen der endogenen GHB-Konzentrationen innerhalb der Bevölkerung [93]. Daher ist es schwer, einen allgemeinen Grenzwert (sogenannten cut-off-Wert) in niedrigen Konzentrationsbereichen festzulegen, der eine exogene GHB-Gabe von endogenem Vorkommen unterscheidet.

1.6.1 Endogene Konzentrationen

Zur Festlegung eines geeigneten Grenzwerts zur Unterscheidung endogen/exogen wurden die endogenen Konzentrationsbereiche von GHB in Blut und Urinproben von lebenden Individuen untersucht. Die erste Studie zur Untersuchung des endogenen Konzentrationsbereiches von GHB führte A. Elian an der Universität von Massachusetts (USA) durch. Er bestimmte die endogenen GHB-Konzentrationen von 240 Blut- (0,17-1,15 mg/L) und 670 Urinproben (0,34-5,75 mg/L) und legte die ersten Grenzwerte zum Nachweis einer exogenen GHB-Einnahme in Serum (5 mg/L) und Urin (10 mg/L) fest [94]. Andresen et al. untersuchte die endogenen GHB Konzentration von jeweils 50 Serum- und Urinproben. Im Serum bewegten sich die GHB-Konzentrationen im Bereich von 0,62-3,2 mg/L. Im Urin lagen die Werte der GHB-Konzentrationen zwischen 0,64-4,2 mg/L [91]. Ebenso zeigten Erdmann et al., dass GHB-Konzentrationen von lebenden Individuen in einem Bereich von 0,11-1,56 mg/L liegen [95]. Elliot et al. analysierten 119 Urinprobe und erhielten Konzentrationen der endogenen Substanz bis max. 3 mg/L [74]. Aufgrund dieser Untersuchungen werden aktuell cut-off-Werte von 4 mg/L im Serum und von 6 mg/L im Urin von lebenden Individuen empfohlen [91]. In Tabelle 1 sind beschriebene endogene Konzentrationsbereiche von GHB in den Matrices Plasma, Blut und Urin aufgelistet.

Einleitung

Tabelle 1 endogene Konzentrationsbereiche von GHB in biologischen Matrices von lebenden Individuen

Biologische Matrix	Anzahl Studienteilnehmer (n)	Konzentrationsbereich	Literatur
Plasma	50	0,62-3,2 mg/L	[91]
Blut	50	0,11-1,56 mg/L	[95]
Blut	240	0,17-1,51 mg/L	[94]
Urin	50	0,64-4,2 mg/L	[91]
Urin	74	0,09-1,8 mg/L	[96]
Urin	119	max. 3 mg/L	[74]
Urin	670	0,34-5,75 mg/L	[94]
Urin	1126	<LOD-5,5 mg/L	[97]

1.6.2 Interaktionen und Stabilität von GHB in Blut- und Urinproben

Jedoch sollte bei der Interpretation von GHB Konzentrationen in antemortem Proben auch die gleichzeitige Einnahme von Arzneimitteln berücksichtigt werden. So führt die Einnahme von Valproat zu einer Hemmung des Enzyms GHB-Dehydrogenase, welches GHB in Succinat-Semialdehyd (SSA) oxidiert (Abbildung 1). Dies kann zu erhöhten Konzentrationen in Blut- und Urinproben führen [91,98,99].

Ein weiterer wichtiger Punkt, der bei der Interpretation von GHB-Konzentrationen in biologischen Matrices beachtet werden muss, ist die Stabilität der Substanz. Zeigt sich eine Substanz wenig stabil, so werden bestimmte Lagerungsbedingungen oder die Zugabe von Stabilisatoren empfohlen. Dazu gehören zum Beispiel Natriumfluorid (NaF), welches den Abbau durch Enzyme im biologischen Material hemmt, oder Ascorbinsäure, welches als Antioxidans fungiert. Mit NaF stabilisierte Realproben (Vollblut; n= 27) von lebenden Individuen wurden in einer Studie bei -20 °C gelagert und nach einem bestimmten Zeitraum erneut vermessen. Eine Langzeitstabilität von GHB konnte bis zu 7 Jahre bestätigt werden.

Einleitung

Die Abweichungen von den ursprünglichen Werten lagen im Bereich von -32,4 bis 21,0 % [100]. Eine gute Stabilität konnte für GHB auch in Plasmaproben demonstriert werden. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 9 Monaten bei -20 °C gelagert und monatlich vermessen (Anzahl der Proben pro Messpunkt n=3). Zusätzlich wurde die Stabilität dieser Proben bei Raumtemperatur bis zu 48 h bestätigt (Abweichung vom ursprünglichen Wert <11 %). Einfrier-Auftau-Zyklen zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Konzentration von GHB in den untersuchten Plasmaproben (Abweichung vom ursprünglichen Wert <10 %) [101]. Aufgrund der Ergebnisse der Stabilitätsstudie von Busardo et al. wird empfohlen, Blut- und Urinproben, die auf GHB untersucht werden sollen, bei -20 °C zu lagern und die Analyse innerhalb von 3 Tagen nach Eingang durchzuführen [102]. Informationen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Untersuchungen zur Stabilität von GHB in Proben von lebenden Personen

Dauer der Untersuchung	Stabilität	Temperatur	Stabilisator	Biologische Matrix	Literatur
48 h	48 h	RT	-	Plasma	[101]
9 Monate	9 Monate	-20 °C	-	Plasma	[101]
Bis zu 5,7 Jahre	Bis zu 5,7 Jahre	-20 °C	NaF	Vollblut	[100]
4 Wochen	4 Wochen	-20 °C	-	Blut und Urin	[102]

h Stunden; *NaF* Natriumfluorid; *RT* Raumtemperatur

1.6.3 Konzentrationen post mortem

GHB wird in postmortalen Proben bestimmt, wenn der Verdacht einer GHB-Einnahme vor dem Tode besteht. Folgende Studien untersuchten die Konzentrationen von GHB nach dem Todeseintritt. Andresen et al. zeigten endogene Konzentrationsbereiche von GHB in Femoralvenenblut (n=61; <0,6-28,7 mg/L), Herzblut (n=56, <0,6 65,3 mg/L), Glaskörperflüssigkeit (n=54, <0,6 39,0 mg/L), Cerebrospinalflüssigkeit (n=52, <0,6-24,0 mg/L) und Urin (n=56, <0,6-25,1 mg/L). Eine GHB Exposition wurde bei allen biologischen Proben ausgeschlossen [90]. Ähnliche GHB Konzentrationen (n=189) bestimmten auch Thomsen et al. in Femoralvenenblut (4,8–45,4 mg/L) und Gehirngewebe

Einleitung

(nicht detektiert-9,8 mg/kg). Sie empfehlen einen cut-off-Wert von 10 mg/kg für GHB in Hirngewebe [103].

Zusammenfassend wird bei postmortalem Femoralvenenblut-, Urin- und Cerebrospinalflüssigkeit ein cut-off-Wert von 30 mg/L empfohlen, wenn die Proben kurz nach der Obduktion auf GHB analysiert oder direkt bei -20 °C gelagert wurden [90]. Für Hirngewebe wird ein cut-off-Wert von 10 mg/kg empfohlen [103]. Kintz et al. schlagen - unter Berücksichtigung der GHB-Konzentrationen in anderen biologischen Matrices - einen cut-off-Wert von 50 mg/L vor, wenn es sich um eine Analyse in postmortalem Herzblut oder Glaskörperflüssigkeit handelt [104]. Die aktuell empfohlenen cut-off-Werte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3 Empfohlene cut-off-Werte für GHB in postmortalen biologischen Matrices

Biologische Matrix	cut-off-Wert	Literatur
Femoralvenenblut	30 mg/L*	[90]
Herzblut	50 mg/L	[104]
Cerebrospinalflüssigkeit	30 mg/L*	[90]
Hirngewebe	10 mg/kg	[103]
Glaskörperflüssigkeit	50 mg/L	[104]
Urin	30 mg/L*	[90]

* Die empfohlenen cut-off-Werte gelten nur, wenn die Proben direkt nach der Obduktion analysiert wurden oder direkt bei -20 °C gelagert wurden.

1.6.4 Stabilität in postmortalen Proben

Im Allgemeinen konnte kein Zusammenhang zwischen Todesursache und GHB Konzentrationen festgestellt werden [105]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass je größer der Abstand zwischen Todeszeitpunkt und Obduktion (Postmortem-Intervall) ist, desto höher die aufgefundenen GHB Konzentration in postmortalen Blut- und Urinproben sind. Der Einfluss des PMI ist dennoch nicht signifikant [106].

Fortgeschrittene Fäulnis und Probenlagerung müssen berücksichtigt werden, wenn GHB-Konzentrationen in postmortalem biologischem Material bestimmt werden sollen. Diese Faktoren können die Ursache dafür sein, dass GHB-Konzentrationen in postmortalen Proben erhöht sind, besonders, wenn die Proben ohne die Zugabe des Stabilisators Natriumfluorid gelagert wurden [107,108]. Berankova et al. untersuchten die GHB-Produktion sowohl in Proben von lebenden Individuen als auch in postmortalen Serum- und Urinproben. Über einen Zeitraum von 8 Monaten wurden die Proben bei -20 °C oder bei 4 °C mit und ohne Stabilisator NaF gelagert. Es konnte gezeigt werden, dass die GHB-Konzentrationen in Serumproben von lebenden Individuen nicht den endogenen Wert von < 3 mg/L überschritten. Keine wesentlichen GHB-Konzentrationen wurden über diese Zeit der Lagerung in den Proben gebildet [107]. Die Untersuchungen in postmortalen Proben zeigten, dass Urinproben weniger empfindlich bzgl. der GHB-Produktion gegenüber den Femoralvenenblutproben sind. In gekühlten Blutproben, besonders ohne Zusatz des Stabilisator NaF, konnte zunächst ein Anstieg der GHB-Konzentration beobachtet werden, bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Degradation von GHB überwog. Diese Beobachtungen untermauern die Vorstellung, dass der Anstieg der GHB-Konzentration in postmortalen Proben einer mikrobiellen Produktion zugrunde liegt [107].

1.6.5 Mögliche Einflüsse auf postmortale GHB-Konzentrationen

Zahlreiche Gründe für den Konzentrationsanstieg von GHB in postmortalem biologischem Material wurden schon diskutiert. Moriya und Hashimoto [109] lagerten Blutproben von 43 Obduktionen, bei denen eine GHB-Exposition ausgeschlossen werden konnte, mit und ohne Zugabe eines Stabilisators bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (4°C und -20 °C) und fanden heraus, dass eine große Menge an endogenem GHB im Körper eher zwischen Todeszeitpunkt und Obduktion als während der Probenlagerung gebildet wurde. Nach einem weiteren Experiment wurde angenommen, dass eine bakterielle Glykolyse die endogene Produktion von GHB erhöhen könnte. Snead et al. zeigten, dass im Gehirn von Ratten eine

Einleitung

Erhöhung von GHB durch die enzymatische Produktion des Neurotransmitter GABA aus dem biogenem Amin Putrescin entstehen kann, welches eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellteilung, -differenzierung und -reifung im menschlichen Körper hat [110,111]. Als eine weitere mögliche Quelle für erhöhte postmortale GHB-Konzentrationen zeigte sich die endogene Substanz 1,4-Butandiol im Rattenhirn [111]. Erhöhte GHB-Konzentrationen können auch durch eine erniedrigte Aktivität des Zitronensäurezyklus entstehen [112]. Roth et al. äußerten die Hypothese, dass die Synthese von neuem GHB in Sauerstoff-freiem Gewebe entsteht [113]. Eine weitere Möglichkeit für den Anstieg der GHB-Konzentrationen nach dem Todeszeitpunkt könnte die Hydrolyse der GHB-Konjugate und die daraus resultierende Freisetzung von GHB sein.

1.6.6 Lagerung von postmortalen Proben

Über die Stabilität von GHB in postmortalen Proben gibt es zahlreiche Studien. Marinetti et al. zeigten in einer wiederholten Analyse von Blut- und Urinproben eines GHB positiven Falls, dass nach einer Lagerung von insgesamt 30 Monaten, (Lagerung: 2 Monate bei 4 °C, 28 Monate bei -15 °C) die GHB-Konzentrationen stabil blieben, sobald die Probe in einem Kühlschrank gelagert wurden [114]. Fjeld et al. bestimmten die GHB-Konzentrationen in Proben aus Femoralvenenblut mit Zugabe von NaF, welche 7 Jahre lang bei -20 °C gelagert wurden. Hierbei wichen die GHB-Konzentration bis max. $\pm 40\%$ vom ursprünglichen Wert ab und waren insgesamt unter diesen Bedingungen sehr stabil [100]. Busardo et al. bestätigten diese Beobachtungen über die GHB-Konzentrationen in Blut- und Urinproben ohne Stabilisator über einen Zeitraum von 4 Wochen unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C) [102]. Keine signifikante Unterschiede zeigte auch GHB in Femoralvenenblut- und Herzblutproben bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C über 24 Monate [90]. Die Stabilität für GHB in postmortalen Proben ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Einleitung

Tabelle 4 Stabilität für GHB in postmortalen Proben

Untersuchungs- zeitraum	Stabilität	Temperatur	Stabilisator	Biologische Matrix	Literatur
24 M	24 M	-20 °C	-	Femoralvenenblut und Herzblut	[90][102]
30 M	30 M	4°C (2 M) und -15°C (28 M)	-	Blut und Urin	[114]
Bis zu 7 J	Bis zu 7 J	-20 °C	NaF	Femoralvenenblut	[100]
4 Wochen	4 Wochen	-20 °C	-	Blut und Urin	[102]

M Monate; *J* Jahre; *NaF* Natriumfluorid

1.6.7 Chemische Stabilität

Ein weiterer Punkt, der bei der Analyse von GHB beachtet werden sollte, ist die Abhängigkeit der Stabilität der Substanz vom pH-Wert der Probe. Bei pH-Werten < 4,72 entsteht in einer Veresterungsreaktion mit Ringbildung aus der Carboxylsäure GHB unter Wasserabspaltung das Lacton GBL. Da im Blut normalerweise ein physiologischer pH-Wert im Bereich zwischen 7,36-7,44 herrscht und zudem eine endogene Lactonase diese Bindungen im Blut spaltet, liegt in dieser biologischen Matrix hauptsächlich die Säure vor [85,115]. Im Mageninhalt und auch in manchen Urinproben ist der pH-Wert niedriger als 4,72. Hier entsteht aus GHB durch Dehydratation das Laktone GBL [98]. Daher sollte auch bei der Extraktion und dem finalen Extrakt während der forensischen Analyse von GHB auf den pH-Wert geachtet werden, da das bei niedrigem pH-Wert gebildete GBL das Analyseergebnis der eigentlichen GHB-Konzentration verfälschen könnte. Um dies zu verhindern, können biologische Proben mit einem pH-Wert < 4,75 für 30 min auf pH 14 alkalisiert werden, so dass das gebildete GBL in GHB umgewandelt werden kann [114].

Wird GBL anstelle von GHB in alkoholische Getränke gemischt, so kann es zur Ringöffnung und somit zur Umwandlung zu GHB kommen. Dies ist abhängig vom pH-Wert des Getränks. Außerdem kann durch den vorliegenden Alkohol eine Umesterung von GBL zu den Methyl- und Ethylestern des GHB stattfinden. Dies ist ebenfalls abhängig vom pH-Wert

und zusätzlich von der Art des vorliegenden Alkohols. Hennessy et al. beobachteten die optimalsten Bedingungen für eine Umesterung von GBL zum GHB-Methyl- bzw. GHB-Ethylester ab einem pH-Wert <3 mit einem Alkoholgehalt ab 9 %. In Weinen, die aufgrund des Herstellungsverfahrens natürliches GBL beinhalten, konnte keine Umesterung beobachtet werden. Heiße Getränke wie Tee oder Kaffee zeigten keine Umwandlung von GHB zu GBL oder umgekehrt. Die Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass die Umwandlung zumindest in Getränken sehr langsam stattfindet (höchster Wert an gebildetem GHB (30% aus GBL) nach 30 Tagen Lagerung in Bacardi- oder Vodka-Cola) [116].

1.7 GHB in Haaren

Wenn aufgrund einer verspäteten Strafanzeige die Analyse in gewöhnlich untersuchten biologischen Proben wie Blut und Urin keine Aussicht mehr auf einen positiven Nachweis verspricht, stellt die Analyse einer Haarprobe eine nützliche Alternative dar. Haarproben können keine Aussage darüber treffen, ob ein Individuum zur Tatzeit unter dem Einfluss stand, jedoch können sie qualitativ eine Substanzaufnahme nachweisen. Durch die Blutzirkulation und Blutversorgung der Haarwurzel mit wichtigen Nährstoffen, können eingenommenen Xenobiotika in das Haar eingelagert werden (siehe Abbildung 4). Hierbei spricht man von Inkorporation. Das monatliche Haarwachstum beträgt ungefähr 0,7-1,4 cm. So kann in einem Haarsegment von ca. 1 cm, der Konsum von einem Monat untersucht werden. Um den Haarabschnitt zur Tatzeit zu erfassen, muss das drogenhaltige Segment aus der Kopfhaut austreten. Dies geschieht erst 7-14 Tage nach dem Konsum [117].

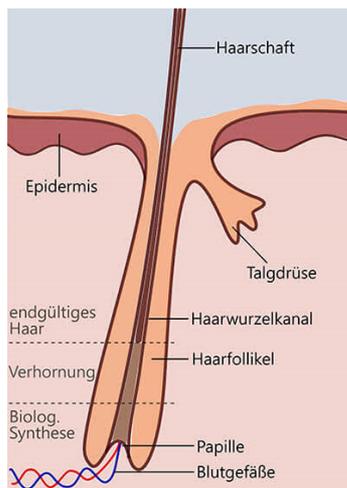


Abbildung 4 Anatomie des Haares; Versorgung des Haares durch arteriellen Zugang [186]

Einleitung

Erste Ergebnisse zu GHB Konzentrationen in Haaren veröffentlichten Ferrara et al. im Jahre 1995. Sie untersuchten die Haare von insgesamt 30 weiblichen und männlichen Kaukasiern [118]. Die mittlere Konzentration von endogenem GHB im Haar betrug $0,53 \pm 0,2$ ng/mg und zeigte keine Unterschiede bezüglich Geschlecht und Haarfarbe. Kintz et al. untersuchten im Zusammenhang mit einem forensischen Fall die Haare von 24 Freiwilligen, die kein GHB eingenommen hatten. Es zeigte sich, dass die individuellen Konzentrationen innerhalb dieses Kollektivs sehr streuten 0,5-12 ng/mg [119]. Die individuellen GHB Konzentrationen entlang des Haarstrangs zeigten sich im Gegensatz zu denen des Kollektivs als sehr konstant. In einer anderen Publikation von Gouille et al. [120] wurden die Haarproben von 61 Testpersonen untersucht. Sie bestimmten die endogenen Konzentrationen (GHB: 0,35-1,54 ng/mg) und bestätigten ebenfalls, dass die GHB Konzentrationen in Haaren von der Haarfarbe unabhängig sind. Vaiano et al. [121] demonstrierten anhand eines Probenkollektivs von 150 weiblichen (n=75) und männlichen Testpersonen (n=75) (GHB: 0.28-2.84 ng/mg), dass die GHB Konzentrationen in Haaren von weiblichen Individuen signifikant geringer sind als die von männlichen, besonders wenn diese unter 30 Jahre alt sind. Dies könnte daran liegen, dass sich junge Frauen häufiger die Haare färben. Haarbehandlung wie Bleichen können die Substanzkonzentrationen im Haar verändern [122].

In der Haaranalytik spielen auch die Metabolite eine Rolle, für weitere forensisch relevante Substanzen werden normalerweise eher die lipophileren Muttersubstanzen im Haar eingelagert [123]. Wang et al. untersuchten sowohl die endogenen Konzentrationen von GHB und dessen Metaboliten GHB-Gluc in Haaren, als auch die Konzentrationen dieser Analyten in Haarproben von GHB-abhängigen Personen [77]. Die endogenen Konzentrationen von GHB-Gluc lagen in einem Bereich von 1,7-3,4 ng/mg. Über die Konzentrationsbereiche von GHB und GHB-Gluc in Haarproben von Patienten die an Narkolepsie erkrankt sind, berichtete Busardo et al. [124].

Sowohl Busardo et al. als auch Kintz et al. zeigten, dass schon eine einmalige GHB-Aufnahme im Haar nachgewiesen werden kann [119,125]. Dennoch wird empfohlen Haaranalysen vor Gericht nur als einen ergänzenden Beweis zu bewerten, weil GHB als endogene Substanz im Haar immer nachgewiesen wird und aufgrund des endogenen breiten Konzentrationsbereichs kein eindeutiger cut-off-Wert in Haaren festgelegt werden kann.

Derzeit gibt es drei Ansätze um eine mögliche GHB-Aufnahme im Haar zu identifizieren. Auf die Richtlinien des *United Nations Office of Drugs and Crime* (UNODC), dem Ansatz nach Bertol et al. und der Hypothese von Kintz wird im Laufe dieser Arbeit noch näher eingegangen [126–128].

1.8 Fallberichte

Caldicott et al. beschreiben einige Fallberichte mit insgesamt acht tödlichen Intoxikationen, die auf eine GHB-Einnahme zurückzuführen sind. Die Konzentrationen von GHB wurden in diesen Fällen bestimmt und lagen im Bereich von 77 bis 370 mg/L in postmortalen Blutproben [129]. Eine andere tödliche GHB-Intoxikation nach einer einzelnen Exposition wurde von Kintz et al. berichtet. In dem beschriebenen Fall wurde ein Mann Tod in der Wohnung liegend aufgefunden. Pharmakologische Effekte wurden nicht beschrieben, jedoch wurden ungewöhnlich hohe GHB-Konzentrationen in den asservierten Proben gefunden [130]. Eine weitere Fallserie von 226 GHB assoziierten Todesfällen wurde in den Vereinigten Staaten von Amerika recherchiert. In 78 Fällen konnte GHB in Konzentration von 18-4400 mg/L in postmortalen Blutproben von Leichen bestimmt werden, bei denen eine Ko-Intoxikation mit anderen Drogen ausgeschlossen werden konnte [42].

1.9 Analytik

Eine häufig angewendete Methodik zum Nachweis von GHB stellt die Analyse mittels Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie dar. Analytische Methoden zur Analyse von GHB mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurden in der Literatur beschrieben [96,131–133].

Als Probenaufarbeitung wurde für GHB häufig eine Fällung mit Acetonitril oder Methanol in Serumproben angewendet [133,134]. Im Urin wurde die „*Dilute and Shoot*“-Methode für GHB beschrieben [133]. Aufarbeitungen wie Festphasenextraktion [135] und Flüssig-Flüssig-Extraktion [136] sind häufig zeit- und kostenintensiver und konnten ebenfalls in der Literatur gefunden werden.

Die chromatographische Trennung erfolgt allgemein durch die Interaktion des Analyten mit der stationären Phase und der mobilen Phase [137]. Dies wurde für GHB häufig mit Hilfe eines sogenannten Reversed-Phase- (RP- oder Umkehr-) Mechanismus erzielt [133,136,138]. Im Gegensatz zum Normal-Phasen- (NP-) Mechanismus, trennt die RP-

Einleitung

Chromatographie die Analyten mittels einer hydrophoben stationären Phase auf. Eine besondere Form der Normal-Phase, ist die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC: *hydrophilic interaction liquid chromatography*), welche auch zur Analyse von GHB eingesetzt wurde [70,139].

Probleme, die bei der Methodenentwicklung und Validierung auftreten können, sind u. a. gleichzeitig eluierende Matrixkomponenten, die das Signal von GHB bei der Detektion vermindern oder verstärken. Diese unerwünschten Matrixeffekte können durch den Zusatz eines deuterierten internen Standards der untersuchten Substanz minimiert werden. Des Weiteren kann eine aufwendige Probenaufarbeitung die Anzahl der Fremdbestandteile in der analysierten Probe verringern. Dadurch kann jedoch auch die Extraktionsausbeute minimiert werden, was wiederum zu hohen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und einem Verlust an Sensitivität führen kann. Des Weiteren kann die Selektivität der gewählten Massenübergänge nicht ausreichend überprüft werden, da GHB als körpereigene Substanz in allen biologischen Matrices vorhanden ist. Eine Trennung von Substanzen mit identischen Massen bzw. Fragmenten ist nur chromatographisch möglich.

Ein Beispiel hierfür ist die Trennung der physiologisch vorkommenden GHB-Isomere AHB (α -Hydroxybuttersäure) und BHB (β -Hydroxybuttersäure). Signalstörungen oder eine fehlerhafte Quantifizierung können die Folgen sein, wenn die analytische Unterscheidung der Isomere von GHB nicht gewährleistet ist. Die chromatographische Trennung sollte vor allem bei der Analyse via LC-MS/MS überprüft werden, da bei einer Quantifizierung mittels GC-MS die Isomere anhand ihrer unterschiedlichen Siedetemperaturen klar getrennt werden können (AHB: 260 °C; BHB: 118-120 °C; GHB: 178-180 °C). Eine massenspektrometrische Unterscheidung der Isomere ist aufgrund der gleichen Muttermasse und der unzureichenden Fragmentierung besonders schwierig. Durch die Bildung eines Addukts mit anschließender MS³-Detektion konnte GHB mit höherer Intensität und Spezifität detektiert werden [140].

2 Zielsetzung der Dissertation

Gamma-Hydroxybuttersäure fungiert im menschlichen Gehirn als Neurotransmitter und wird auch als Arzneimittel zur Therapie der Schlafkrankheit Narkolepsie eingesetzt. Neben der klinischen Anwendung wird die Substanz auch als Freizeitdroge konsumiert oder von Tätern bei dem Begehen von Verbrechen an Opfer verabreicht, um diese widerstandsunfähig zu machen. Auf Grund des endogenem Vorkommens und des engen Nachweisfensters von GHB in Blut und Urin ist der Nachweis eines Konsums zeitlich begrenzt, was für die Beweiserbringung eine Herausforderung darstellt.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, neue potentielle Ansätze für den Nachweis einer Gamma-Hydroxybuttersäure-Gabe zu finden und dadurch das Nachweisfenster zu erweitern. Hierfür wurde eine Studie mit Narkolepsie-Patienten durchgeführt, die therapeutisch entweder das Arzneimittel Xyrem® oder Somsanit® einnehmen, deren Wirkstoff das Salz der Gamma-Hydroxybuttersäure ist. Blut-, Urin- und Haarproben dieser Patienten wurden vor und nach GHB-Einnahme nach einem bestimmten Zeitplan gesammelt und untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit den Werten von Freiwilligen verglichen, die noch nie GHB eingenommen haben. Als neue Lösungsansätze für die Verlängerung der Nachweisbarkeit von GHB wurden sowohl chemisch-toxikologische als auch genetisch-molekularbiologischer Methoden getestet.

Zu Beginn wird das Tötungsdelikt eines sechsjährigen Mädchens vorgestellt, welches mit GHB betäubt und anschließend sexuell missbraucht wurde, um so die forensische Relevanz dieses Themas darzustellen. Des Weiteren sollen die Konzentrationen von GHB und GHB-Glucuronid in Haaren von chronischen Narkolepsie-Patienten und einem Therapieeinsteiger verglichen werden. Anschließend wird die Entwicklung und Validierung einer geeigneten Methode beschrieben, welche die GHB-Stoffwechselprodukte GHB-Gluc und GHB-Sulf im Plasma und Urin bestimmen soll. Anhand der Methoden soll auch die Stabilität der Metabolite überprüft werden. Es folgt die Untersuchung der Pharmakokinetik von GHB und dessen Stoffwechselprodukte GHB-Gluc und GHB-Sulf nach GHB-Gabe in Blut und Urinproben der Narkolepsie-Patienten. Die gemessenen Konzentrationen werden anschließend mit dem Kontrollkollektiv ohne GHB Exposition verglichen. Anschließend wird auf dem Gebiet der Metabolomik eine geeignete Normalisierungsstrategie für die Bestimmung eines individuellen Grenzwerts im Urin dargestellt. Abschließend soll auf genetisch-molekularbiologischer Ebene

Zielsetzung der Dissertation

untersucht werden, ob die GHB-Einnahme Einfluss auf die Genexpressionen von Genen hat, welche entweder direkt in den Stoffwechselweg von GHB involviert sind oder bereits eine Veränderung der Genexpression nach GHB-Gabe gezeigt haben.

3 Drogenassoziierte Sexualstraftat mit tödlichem Ausgang: GHB-Intoxikation bei einem sechs Jahre alten Mädchen

3.1 Einleitung

K.o.-Mittel sind in der Regel zentral wirksame Substanzen, die narkotisierend wirken. Häufig werden diese therapeutisch als Schlaf- oder Beruhigungsmittel eingesetzt. Im Zusammenhang mit Sexualstraftaten, aber auch Eigentumsdelikten wie z. B. Raubüberfällen, werden solche Substanzen verabreicht, um die Opfer zu betäuben oder sie gefügiger zu machen. Handelt es sich um eine drogenassoziierte Straftat mit sexuellem Übergriff spricht man von „*drug facilitated sexual assault*“ (DFSA). Hierbei werden den Opfern die Substanzen unbemerkt in ein Getränk oder unter die Nahrung gemischt. Der Täter kann eine dem Opfer völlig unbekannt Person sein. Häufig handelt es sich jedoch um einen Bekannten, einen Freund, einen ehemaligen oder aktuellen Partner oder sogar ein Familienmitglied [141].

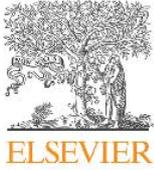
GHB kann aufgrund seiner pharmakologischen Wirkung als ein solches k.o.-Mittel eingesetzt werden und wird laut Studie eher selten nachgewiesen [25]. Die Dunkelziffer könnte jedoch weitaus größer sein, da aus forensischer Sicht die Erbringung von Beweismitteln zur Aufklärung eines DFSA, in dem GHB verabreicht wurde, sehr schwierig ist. Aufgrund einer GHB induzierten anterograden Amnesie weisen die Opfer Gedächtnislücken auf und können sich somit an die Tat kaum erinnern [88]. Zusätzlich stellt der Nachweis einer GHB-Aufnahme aufgrund des kurzen Nachweisfensters eine chemisch-toxikologische Herausforderung dar [22,63].

Besonders schwierig ist es, eine GHB-Gabe nachzuweisen, wenn es in Folge einer GHB-Intoxikation zum Tod gekommen ist. Zum einen, weil es sich bei GHB um eine körpereigene Substanz mit einem individuellen endogenen Konzentrationsbereich handelt und zum anderen, weil die GHB-Konzentrationen nach dem Todeszeitpunkt im Blut und Urin weiter ansteigen können [94,107,108]. Tödliche Intoxikationen, die auf eine GHB-Einnahme zurückzuführen sind, weisen Konzentrationen im Bereich von 77-370 mg/L bzw. 18-4400 mg/l in postmortalen venösem Blut auf [42,129]. Aktuelle Grenzwerte für GHB, die bei der Interpretation von Todesfällen nach GHB-Einnahme helfen sollen, sind u. a. 50 mg/L

in Herzblut, 50 mg/L in Glaskörperflüssigkeit, 30 mg/L in Femoralvenenblut und/ oder Urin sowie 10 mg/kg in Hirngewebe [90,103,104].

Problematisch ist auch die häufig fehlende medizinische Fachkenntnis der Täter, da Überdosierungen von GHB vor allem in Kombination mit weiteren atemdepressiv wirksamen Substanzen, allen voran Ethanol, zu einer Atemdepression bis hin zum Tode führen können.

Im Folgenden wurde ein Fall untersucht, in dem GHB vorsätzlich an ein 6-jähriges Mädchen verabreicht wurde, um dies zu betäuben und im Anschluss sexuell zu missbrauchen. Postmortale Proben wurden mittels LC-MS/MS-Methode analysiert und die GHB-Konzentrationen in Hirn-, Leber- und Nierengewebe sowie in Herzblut und Glaskörperflüssigkeit bestimmt. Femoralvenenblut und Urin stand nicht zur Verfügung. Anschließend wurden die Befunde zusammen mit den Obduktionsbefunden und der Aktenlage zur Festlegung der Todesursache interpretiert. Der vorliegende Fall wurde als *Case Report* mit dem Titel "*Drug facilitated sexual assault with lethal outcome: GHB intoxication in a six-year-old girl*" im Journal *Forensic Science International* veröffentlicht.



Case report

Drug facilitated sexual assault with lethal outcome: GHB intoxication in a six-year-old girl



Lena-Maria Mehling^a, Sys Stybe Johansen^b, Xin Wang^b, Elke Doberentz^a,
Burkhard Madea^a, Cornelius Hess^{a,*}

^aInstitute of Forensic Medicine, University of Bonn, Stiftsplatz 12, D-53111 Bonn, Germany

^bDepartment of Forensic Medicine, University of Copenhagen, Frederik V's Vej 11, DK-2100 Copenhagen, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2015

Received in revised form 17 December 2015

Accepted 29 December 2015

Available online 7 January 2016

Keywords:

Gamma hydroxybutyric acid

Drug facilitated sexual assault

Hair analyses

Post mortem

ABSTRACT

A very serious case of DFSA (drug facilitated sexual assault) is presented, in which a six-year-old girl died following sedation with γ -hydroxybutyric acid (GHB). She had been sexually abused by a relative. Samples of cardiac blood, bile, vitreous humour, liver, kidney, brain tissues and hair were analysed by a LC–MS/MS method. The following GHB concentrations were determined: cardiac blood: 150 mg/l; bile: 292 mg/l; vitreous humour: 58 mg/l; liver: 100 mg/kg; kidney: 124.5 mg/kg; brain: 110 mg/kg. Very high GHB levels were found in the proximal part of the hair sample (about 40.9 ng/mg). In distal segments of hair – up to 12 cm distant from the hair scalp – GHB concentrations were higher than the overall found endogenous range of 2–3 ng/mg. Police investigations revealed that the uncle had also administered GHB to the older half-sister. Therefore, a sample of her hair was analysed accordingly, but unremarkable results were obtained. Comparing our toxicological results with police investigations and the offender's statements it can be assumed that the 6-year-old girl had ingested GHB. By exclusion of other causes of death a lethal intoxication with GHB could be confirmed.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a central nervous system depressant which is generated endogenously originating from the neurotransmitter GABA (gamma-aminobutyric acid) via the enzymes GABA-transaminase and succinat-semialdehyde-reductase [1–3]. Apart from its natural occurrence, GHB was used as an anesthetic in the early 1960s, but its medical application today is mostly treatment of narcolepsy [4,5]. The therapeutic dose in treatment of narcolepsy ranges from 4.5 g to 9 g [6]. In the early 1990s, exogenous GHB gained popularity as a doping substance and a recreational drug [7–10]. Due to its fast pharmacological effects within 30 min, depending on the ingested dose, and its rapid metabolism, its use emerged as a so-called knockout-drug for drug facilitated sexual assault (DFSA) [11], [12].

Uncovering DFSAs related to GHB has proven difficult, due to the fact that DFSA victims commonly report an anterograde

amnesia induced by GHB consumption. Detection of exogenous GHB seems to be a challenge in itself due to the very narrow detection window in plasma (6 h) and urine (12 h) [13] depending on the ingested dose as well as on the greatly inter- and intra-individual variations in endogenous concentrations [11,14].

Commonly used cut-off values in ante mortem samples – 4 mg/l for plasma and 10 mg/l for urine – are supported and recommended by several references. Andresen et al. determined endogenous GHB concentrations in 50 plasma- and urine-samples in a range of 0.62–3.2 mg/l and 0.64 to 4.20 mg/l, respectively [15]. Elliot et al. measured 119 urine specimens and showed maximal GHB concentrations of 3 mg/l [16]. Erdmann et al. determined endogenous GHB concentrations in ante mortem blood in a range of 0.11–1.56 mg/l [17].

Advanced putrefaction and sample storage must be considered with interpretation of GHB concentrations determined in biological specimens. These factors can induce increased concentrations in post mortem samples, especially when samples are not stored with a preservative like sodium fluoride [18]. A number of reasons for an increase have been discussed. Moriya and Hashimoto stored blood samples from 43 autopsies without GHB intake under different storage conditions (4 °C and –20 °C) with and without preservation, and found out that a large portion of endogenous

* Corresponding author at: Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, Forensische Toxikologie, Stiftsplatz 12, D-53111 Bonn, Germany.
Tel.: +49 228 73 8316; fax: +49 228 73 8368.

E-mail address: cohess@uni-bonn.de (C. Hess).

GHB was produced in the body between death and autopsy rather than during sample storage. These investigations showed that glycolysis by bacteria may enhance endogenous GHB production [19]. Snead et al. found that an elevation of GHB could occur in the brain through the enzymatic production from the neurotransmitter GABA, from the biogenic amine putrescine – which plays an important role in the regulation of cell division, differentiation and maturation in the human body – or from endogenous 1,4-butanediol levels [20], [21]. Rising GHB concentrations could originate from decreased activity of the citric acid cycle after death and the shuttling of some of the succinic semialdehyde arising from GABA transamination to GHB [22]. Roth et al. proposed that synthesis of new GHB occurs in anoxic tissues [23].

The previously described different usage of GHB as a knockout and recreational drug on one side and therapeutical medication on the other could be explained by dose-depending pharmacological effects. In low amounts of up to 1.5 g, GHB induces euphoria and has an anxiolytic effect, causing a socially potentiating effect. At higher doses of up to 2.5 g, GHB has been described as leading to heightening of mood and drive and sexual desire, while the intake of large amounts of GHB induces sudden deep sleep. Combining consumption of GHB with other medications or alcohol can result in vomiting and nausea [11]. Side effects described in clinical studies and case reports after GHB intake include headache, blood pressure increase, dizziness, psychomotor impairment and many more [24].

These pharmacological effects are mediated by agonism of the GABA_B receptor, where GHB induces a depressant effect in the central nervous system [2,25]. Although the exact pharmacological mechanism is not known completely, low and high affinity binding sites for GHB are described [1]. Low affinity binding sites like certain GABA_A receptors and GHB receptors were activated by a concentration in the nanomolar range like endogenous amounts and can be found post- and presynaptic in the central nervous system. Exogenous concentrations of GHB, which were usually in the millimolar range, bind to high affinity binding sites, which are also located pre- and postsynaptic and mediated the major pharmacological effects by GABA subtype_B receptors [25]. Binding of GHB at these receptor types modulates the activation of gabaergic, opioid or dopaminergic systems directly and indirectly [1].

Another pharmacological effect induced by GABA_B receptor agonism of GHB is respiratory depression occurring when a fatal GHB overdose was ingested [26]. Caldicott et al. described several case reports with eight fatal intoxications related to GHB intake and determined concentrations in a range of 77–370 mg/l in post mortem blood [27]. Another fatal GHB intoxication after single exposure is described by Kintz et al., where a man was found dead in his flat. Therefore, pharmacological effects were not known, but unusually high concentrations could be found in biological specimen [28]. A further case series of 226 GHB associated deaths was developed in the United States. In 78 cases, co-intoxication with other drugs could be excluded and GHB was found in a concentration range of 18–4400 mg/l in post mortem blood [24].

For the herein presented case, we aimed to consider all results and investigations to create a complete picture of the incident.

2. Case history

A six-year old girl was sedated with GHB and sexually abused by her uncle. Investigations revealed the abuse was ongoing over several months. The uncle admitted the first assault in September 2012 – nine months before the final incident – with repeated abuse taking place in November, February and March of the following year (Fig. 1). The last DFSA with lethal outcome happened in April.



Fig. 1. Timeline of the several sexual abuses with GHB intake.

For his plan the perpetrator purchased a liquid on the internet and had a self-produced salt at his disposal. Following the instructions from an Internet page the offender synthesised solid GHB-salt from the precursor gamma-butyrolactone (GBL) and sodium hydroxide. The necessary equipment had been ordered from an Internet shop and a pharmacy.

On the day of the fatal intoxication, the girl stayed with her uncle by her own choice. According to the uncle's statement, he prepared her spaghetti with bolognese sauce for dinner at seven o'clock in the evening, into which he mixed solid GHB covered with shellac (15% volume of the solid GHB) to mask an unpleasant flavor. To avoid a GHB intoxication the uncle calculated the amount of GHB to be administered based on the body weight of the girl. Under the assumption that she should receive 0.08 g GHB per kilogram of body weight and an estimated body weight of 30 kg, he mixed 3 g of the shellac masked GHB (according to the uncle's statements the masked GHB equated 1.5 g total GHB) into the meal, which he weighed out using a micro-scale. He gave her a small portion to avoid vomiting, because he had observed this reaction at a previous overnight stay and came to the conclusion that GHB in combination with proteins can lead to nausea and vomiting. Before the girl went to bed she was given an apple juice also spiked with GHB between 9:00 p.m. and 9:20 p.m. The uncle was not entirely sure about the chronological order. In the beverage the purchased liquid GHB was used. The apple juice contained approximately 12 ml of liquid GHB, which he dispensed with a syringe and corresponded to 4 g of the knockout drug. The anesthetic effect occurred after ingestion, but the exact time-point was not reported. According to the uncle's statements, GHB usually took effect within 30 minutes. After ingestion of almost the whole juice (about 80% corresponding to 3.2 g GHB), the uncle brought her to bed and read the content of four book pages aloud, and then the girl fell asleep. In the course of the following night the uncle sexually abused the girl several times and videotaped his sexual acts. The first recording was taped at about 10:45 p.m. and showed the sexual abuse of the minor. According to the uncle's statements the girl began to vomit suddenly after using an anal spray on her. This fact can be confirmed by the videotape recording at 10:53 p.m. It can be seen that the girl vomited and the uncle took her into the bath room and back. He also reported that she defecated in the bed. The uncle cleared her mouth repeatedly in order to allow her breathing. At 11:26 p.m. he noticed for the first time that she was not breathing and then attempted to resuscitate her. Out of desperation he slapped her on the back and in her face at irregular intervals throughout the next hour. It is also included in the case file that the girl's breathing was unregular and that she gurgled after mouth to mouth resuscitation (temporal classification: at about 11:26 p.m.). It is recorded on the videotape that he noticed her blue coloured lips at 11:33 p.m. At 11:31 p.m., after recognizing that her pulse had stopped, the uncle checked her blood pressure with a blood pressure gauge and measured a value of 33 mm Hg. When questioned by the police, the offender recognised this fact as point of death. More resuscitation attempts finished unsuccessfully. The emergency doctor who was called at about 08:13 a.m. in the morning could only pronounce the girl dead.

According to the offender's statements, he had also sexually abused the older half-sister after sedating her with GHB. The timeline of reported assaults is plotted as shown in (Fig. 2). Further information was not available.



Fig. 2. Timeline of the five sexual abuses of the older sister with GHB intake.

3. Materials and methods

3.1. Chemicals

Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Solutions of GHB (1 mg/ml) and the internal standard (IS) GHB- d_6 (1 mg/ml) in methanol were obtained from Sigma (Seelze, Germany). A solution of sodium hydroxide and salt of ammonium acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dihydrogen phosphate was obtained from AppliChem (Darmstadt, Germany).

3.2. Analyses

Autopsy took place between 8.5 h and 12 h after death. Biological specimens including cardiac blood, vitreous humour, liver, brain and kidney tissues and hair were collected during autopsy. GHB was measured in all of these specimens. If measured concentrations were higher the calibration range dilution with water HPLC grade was done. Post mortem femoral venous blood and urine were not available.

GHB concentrations in hair samples were determined by Wang et al. [29]. The limit of quantification (LOQ) was 0.32 ng/mg in hair for GHB and linearity up to 50 ng/mg. Extraction recoveries were 62–92% for the analyte, and the accuracy was between 90–108%. Precision values expressed as relative standard deviations (%) obtained from daily controls were 9.1–11.3% for GHB. Matrix effects for low concentrations (5 mg/l) were $45\% \pm 8.9\%$ and $(-32\%) \pm 4.4\%$ for high concentrations (25 mg/l).

All hair samples were analysed by LC-MS/MS [29]. From the hair sample available, overall 27 cm in length, 16 cm being closest to the scalp have been selected due to the timeframe of interest. The first 4 cm of the hair sample distant from the scalp were cut into sections of 2 cm, while the segments of the next 12 cm had a length of 1 cm. These segments were analysed separately.

Regarding the uncle's statement he had also sexually abused the older sister; a hair sample was also collected in the course of investigations and analysed accordingly. This hair sample had a length of 18 cm and displayed the time-period of the relevant past.

For the extraction the hair sample was cut into segments of 1 cm and all analysed separately via LC-MS/MS.

Besides these toxicological investigations, alcohol concentrations in blood were analysed and systematic toxicological analyses with unknown screenings by GC-MS and LC-MS/MS were conducted in biological specimens and in other sources of evidence collected during the police investigations.

3.2.1. Sample preparation

For the extraction of tissues, cardiac blood and vitreous humour a protein precipitation with acetonitrile was used. For the determination of GHB in organ tissues 1 g of the respective tissue was diluted with 4 ml of a buffer solution (sodium-dihydrogen-phosphate buffer, pH 6.0) and shredded by an immersion blender. After centrifugation at 8000 rpm for 8 min, 100 μ l of the solution were fortified with the internal standard GHB- d_6 (10 μ l, concentration: 100 mg/l). 100 μ l of cardiac blood, bile and vitreous humour (previously diluted 1:5 with water) were fortified with 10 μ l of the internal standard GHB- d_6 , respectively. For protein precipitation 200 μ l acetonitrile were added to each sample. After vortexing and centrifugation at 11 000 rpm for 10 minutes the supernatant was transferred into a micro-vial and 5 μ l were injected into the LC-MS/MS system.

3.2.2. Chromatographic conditions

Chromatographic separation (Fig. 3) was achieved using a HILIC column (E125/2) 125 mm \times 2 mm and a particle size of 3 μ m (Macherey Nagel, Düren, Germany). An isocratic elution of 80% pure acetonitrile and 20% purified water (HPLC grade) with a salt content of 5 mM ammonium acetate was required. A chromatogram of the separation of the cardiac blood sample is shown in Fig. 3.

3.2.3. LC-MS/MS

GHB in biological matrices except hair was analysed by a previously published method [30] with an LC-MS/MS system consisting of a Shimadzu LC series coupled with an AB Sciex API 4000 Qtrap operated in multiple reaction monitoring mode (MRM) using an electrospray ionisation source (ESI). Full runtime was 15 min. The following MRM transitions were used for the detection of GHB: target transition 103 \rightarrow 57; qualifier transition 103 \rightarrow 85 and for its internal standard target transition 109 \rightarrow 61 and qualifier transition 109 \rightarrow 90. The linear range was established between 2 mg/l and 50 mg/l. The limit of detection was 0.11 mg/l and the limit of quantification was 0.34 mg/l. Internal quality

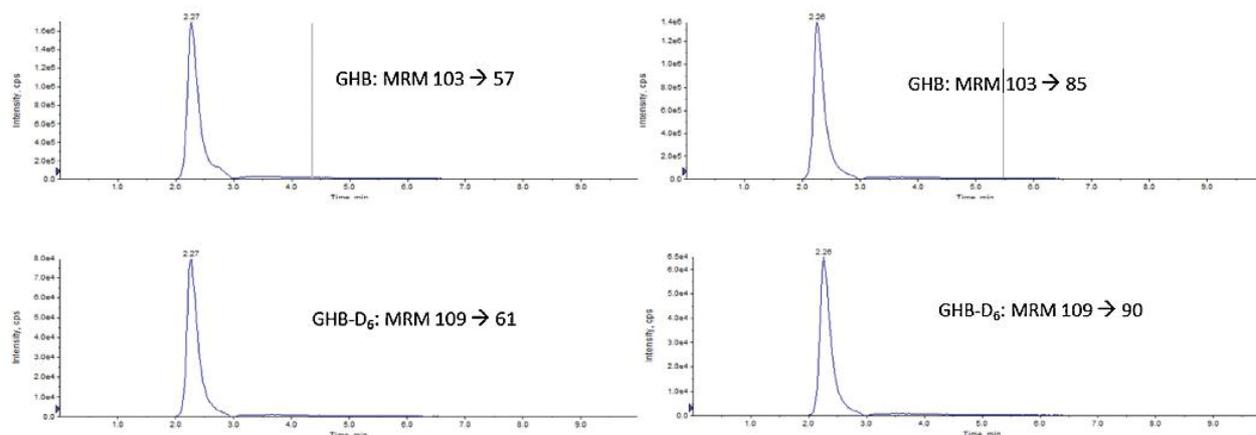


Fig. 3. Chromatographic separation of GHB and the internal standard GHB- D_6 in cardiac blood of the described case.

Table 1
GHB concentrations determined in biological specimens from the 6-year-old girl.

Tissue	Concentration
Cardiac blood	150 mg/l
Bile	292 mg/l
Vitreous humour	58 mg/l
Liver	100 mg/kg
Kidney	125 mg/kg
Brain	110 mg/kg

controls were measured at low (5 mg/l) and high concentrations (25 mg/l). Intraday precision was 3.4% at 5 mg/l and 1.6% at 25 mg/l. Interday precision was 7.3% at 5 mg/l and 4.9% at 25 mg/l (each $n = 2$ at eight consecutive days). Matrix effects for low concentrations (5 mg/l) was 103% and 109% for high concentrations (25 mg/l).

4. Results

4.1. Autopsy findings

Prior to the autopsy a crime scene investigation was carried out. A rectal temperature of 25 °C and an ambient temperature of 19.1 °C were recorded. Based on the temperature-time-of-death-nomogram, taking into account a corrective factor of 2.0 the time of death could be estimated between 8.5 h and 12 h before the investigation. During the crime scene investigation, blood stains were already visible on the underwear and in the sleeping trousers as well as on the sheet.

The following macroscopic findings were recorded at the autopsy:

Body of a 6-year-old girl. Body weight 20.2 kg, body length 104 cm.

Genital and anal region smeared with dried blood. In the vaginal introitus blood and mucosal haemorrhages. Dilated hymenal orifice, reddening anal some abrasions of the mucosa. The mucosa of the vagina without injuries.

Gaping anus. Reddening of the mucosa. Around the anus superficial tears of the mucosa and the skin.

Brain oedema. Epicardial haemorrhages. Tardieu's spots. Slight pulmonary emphysema. Aspiration of stomach content.

Oral, vaginal and anal swabs negative for sperms.

4.2. Chemical–toxicological analyses

Table 1 shows the concentrations of gamma-hydroxybutyric acid in cardiac blood, bile, vitreous humour, liver, kidney and brain tissue. The results of the hair analyses show that the highest concentrations of GHB were found in the proximal hair segments

(segment 1–7 corresponding to 1–7 months before death) with concentrations of up to 40.9 ng/mg (Fig. 4). In other sources of evidence collected during the police investigations (oily liquid and plastic bottle) GHB could also be detected, but exact concentrations were not determined. It remained unknown based on failed documentation, which of the content was ingested by the girl.

The concentrations of GHB in hair samples of the older half-sister did not range above the commonly used endogenous range of 2–3 ng/mg [31] and showed no significant differences (Fig. 5). The highest determined concentration was seen at 0.88 ng/mg in the last segment and the lowest measured value was 0.38 ng/mg.

Additionally, the synthetic opioid piritramide and the sedative antihistamine diphenhydramine were detected in the head hair of the half-sister, but could not be confirmed with a statement of the uncle.

Blood alcohol analysis came out negative. The sedative midazolam was found in other sources of evidence (a syringe, a plastic bottle and an amber bottle found in the flat), but could not be detected in other biological fluids including hair.

5. Discussion

We present the case of a six-year old girl who died after being sedated with gamma-hydroxybutyric acid and sexually abused by her uncle. Confirming GHB intoxication as cause of death is not a trivial task. Several bits of evidence have to be provided including the results of police investigations and of toxicological findings.

In the described case concentrations of GHB in tissues from brain, liver and kidney as well as in cardiac blood, bile and vitreous humour was determined, while venous blood and urine was not available. Autopsy and toxicological analysis were performed contemporaneously and storage conditions without NaF preservation were obtained. Therefore, during the medico-legal investigations an increase of GHB in the samples could be almost entirely excluded.

The commonly used cut-off value for GHB in post mortem venous blood is 30 mg/l. Andresen et al. examined different body fluids from 64 autopsies in subjects with the cause of death excluding GHB exposure. The samples were stored at –20 °C immediately after autopsy and considering putrefaction a cut off value of 30 mg/l was recommended for venous blood, urine and cerebrospinal fluid [32].

For cardiac blood a higher cut-off value of 50 mg/l is common. Kintz et al. measured GHB concentrations in cardiac blood in 71 corpses excluding GHB consumption in a range of 0.4–409 mg/l. They recommended to include GHB concentrations in other biological specimens in the interpretation [33]. Andresen et al. discussed that a cut-off value of 50 mg/l in cardiac blood is not sufficient to differentiate between endogenous and exogenous GHB [32]. In four reported GHB fatalities cardiac blood concentrations

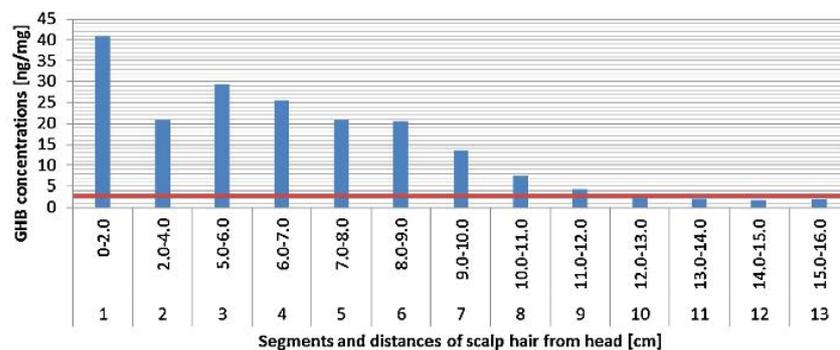


Fig. 4. Results of hair analysis of GHB in head hair (endogenous range: 2–3 ng/mg, distance 4.0–5.0 cm from hair scalp was lost in sample preparation).

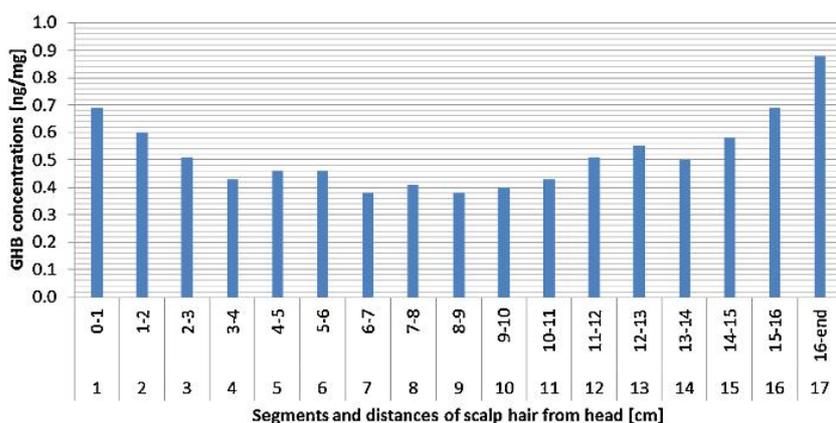


Fig. 5. Results of hair analyses in head hair of the older sister.

ranged from 66 mg/l to 1250 mg/l [34]. Apart from inappropriate storage, post mortem redistribution could also cause a substance increase in cardiac blood samples. Kintz et al. calculated the redistribution of GHB in connection with a case report. The deceased was a 43-year-old man, who was a known drug abuser, particularly for club drugs. GHB concentrations were found up to 3385 mg/l in cardiac blood and 2937 mg/l in femoral blood, and a femoral blood/cardiac blood ratio of 1.15 indicating a weak distribution was calculated [28]. In contrast to this Mazarr-Proo et al. reported another accidental GHB fatality which revealed GHB in femoral blood and cardiac blood at concentrations of 461 mg/l and 276 mg/l, respectively, with a femoral blood/cardiac blood ratio of 1.67 [35]. In the actual case the GHB concentration in cardiac blood was 150 mg/l. It would have been difficult to point the death to GHB intoxication if other sources of evidence wouldn't have existed.

Tissues like liver or kidney could be used as a substitute, in case other body fluids are not available. Mazarr-Proo et al. determined GHB concentrations in liver (52 mg/kg) and brain (102 mg/kg) of their reported case [35]. Duer et al. described a case with GHB concentrations of 50 mg/kg in brain tissue. In the presented case of the six-year-old girl GHB concentrations were found to be 125 mg/kg in kidney, 100 mg/kg in liver and 110 mg/kg in brain. Lenz et al. reported a case, in which a 38-year-old man was found lifeless at home and an empty plastic bottle marked "glue remover" was found. The content of the plastic bottle was 99.92% GBL (gamma-butyrolactone), a GHB precursor, which is converted into gamma-hydroxybutyric acid through metabolism. Herein GHB concentrations found in brain, kidney and liver tissue were up to 826 mg/kg, 2222 mg/kg and 1215 mg/kg, respectively. Bile was also collected during autopsy, analysed by LC-MS/MS and a value of 292 mg/l was determined. Kintz et al. investigated 7 cases where GHB exposure could be excluded and GHB concentrations in bile were determined in a range of 6.1 to 238 mg/l [33]. In case reports with GHB exposure concentrations in bile ranged from 57 mg/l to 1800 mg/l [28], [36]. High liver and brain tissue as well as bile GHB concentrations could underline suspicion of lethal GHB intoxication.

Another helpful substitute could be vitreous humour. There are two studies, which have investigated GHB concentrations in vitreous humour post mortem. Andresen et al. determined GHB concentrations in 54 vitreous humour samples in a range of <0.6–39 mg/l. Kintz et al. investigated vitreous humour in six cases, where GHB exposure could be excluded. The endogenous concentration of the substance was within 3.9–21.4 mg/l. In case reports with GHB intake concentrations humour were 35 mg/l, 48 mg/l and 2856 mg/l in vitreous humour [28,35,37]. In our case

the GHB concentrations was 58 mg/l. So it ranged between the determined GHB concentrations in case reports and were above the values of samples, where GHB exposure could be excluded.

Hair matrix as a complementary matrix to blood can show a drug ingestion over a period of time. But similar problems arise due to the endogenous presence of GHB. On average, hair grows between 0.7 and 1.4 cm per month. Incorporation of drugs into the hair follicle can happen via bloodstream, sweat and external contamination [38,39]. Kintz et al. determined endogenous GHB concentrations in 12 male and female subjects in a range of 0.5–12 ng/mg. After single exposure of 25 mg/kg bodyweight, slightly increased GHB amounts could be detected in the relevant segments [40]. Gouille et al. reported a raped woman under the influence of GHB. GHB concentrations in the proximal hair were in the range of 3.1–5.3 ng/mg. The ratios of these concentrations to basal level (0.71 ng/mg) were a factor of 4.4–7.5 [31]. Bertol et al. created a study with 12 healthy volunteers, who ingested a GHB dose of 25 mg/kg. Hair samples were collected initially, one and two months later. Two ratios (4.45:1 and 3.75:1) were achieved for the latter two hair samples calculated by the concentrations in the hair segment related to GHB exposure to basal level in other segments. The ratio slightly decreased after one month later. Bertol et al. recommend to use these ratios to obtain positive identification of a GHB intake [41]. It has been shown that a single GHB exposure could be determined in hair four weeks after intake [40], [41].

Nevertheless, Hari et al. reported that no single exposure could be confirmed by determination of GHB in head hair and beard hair after ingestion of a dose of GHB which corresponded to 27 mg/kg bodyweight and 28 mg/kg bodyweight, respectively. [42]. Whereas Wang et al. investigated concentrations of GHB in head hair after long-term abuse and found, highly elevated GHB levels (461–591 ng/mg) [29]. Though, determination of GHB ingestion in head hair after a single dose of GHB is a challenge.

GHB concentrations in the six-year-old girl hair are higher than the reported endogenous levels 0.5–12 ng/mg [40]. Meanwhile, the concentrations are increasing from 9 cm distant from the hair scalp to the proximal hair segment, but showed no peak concentrations. This could be due to the long segments size up to 2 cm, which was limited by minimum hair sample weight up to 10 mg hair per segment. The uncle had admitted to have given her GHB beginning 8 months before death, so elevated GHB concentrations and statement of the perpetrator were in accordance. GHB concentrations in the proximal hair were in the range of 13.6–40.8 ng/mg. The ratios of these concentrations to basal level (2.1 ng/mg) were a factor of 6.5–19.4. In the first hair

segments elevated GHB levels could also be due to contamination with sweat as reported in literature [31,40] or by vomiting during agony, but the videotapes did not give any evidence for this contamination. Nevertheless it could not be fully excluded. However, all of the segments of the older half-sister showed GHB concentrations within the endogenous range, and no elevated GHB were observed although according to the offender's statement he had given her GHB several times. The results indicate that there are inter-individual differences between GHB incorporation in hair. Further investigation is necessary to affirm this. Therefore, hair analysis is still a good supplementation to other matrices, but comparing the results in further biological matrices is still relevant.

The ingested GHB dose according to the uncle's statement was approximately 1.5 g and 3.2 g, meaning about 4.7 g within 2 h according to the uncle's statement. Pharmacological effects like respiratory depression could occur when GHB intake exceeds 4 g in adults [11]. However, important information about metabolism of GHB in children is still lacking. Suchard et al. reported a case in which children ingested a popular toy (Aqua dots) containing the GHB precursors 1,4-butandiol, a precursor, which is converted into GHB during metabolism. The age of the children ranged between 14 months and 10 years. Elevated GHB levels could be found in biological samples from the children and pharmacological effects like ataxia, vomiting, seizures and self-limited coma were reported after ingestion of several dozens of aqua dots beads [43]. In addition, a study on eight children (ages ranged from 9 to 16 years) received off-label treatment with 3–7 g per day GHB against narcolepsy-cataplexy 3 and 28 months was reported. Side effects occurred, like e.g. terminal insomnia in 25% of the patients, but did not appear to be disabling. Side effects which were found in GHB treatment of adults, like obstructive sleep apnoea, enuresis, sleep walking and bed wetting or headache were not observed [44].

In the presented case the assault was videotaped and the pharmacological effects of GHB on the victim could be observed in retrospect. After a certain time-point it can be seen and be heard on the videotape that the girl's breathing became pathological. The culprit also recognised this development and started resuscitation attempts, but unsuccessfully.

6. Conclusion

It can be assumed that the cause of death in the present case was attributed to GHB intoxication based on the toxicological investigations, autopsy findings and police investigations. It would have been difficult to confirm a fatal GHB intoxication only by determined results without inclusion of other sources of evidence like testimonies or samples of the ingested substance itself. Additionally, death by suffocation as consequence of GHB intoxication could be also not fully excluded, because stomach content was found in the central section of the respiratory tract. Venous blood and urine are recommended for determining GHB exposure. Additionally, vitreous humour has also been described as a suitable matrix [33]. Hair analysis always seems to be a good supplement, but does not replace other biological specimens.

References

- [1] C.D. Cash, Gammahydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18 (June (2)) (1994) 291–304.
- [2] F.P. Busardò, A.W. Jones, GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome, *Curr. Neuropharmacol.* 13 (January (1)) (2015) 47–70.
- [3] K.M. Gibson, G.F. Hoffmann, A.K. Hodson, T. Bottiglieri, C. Jakobs, 4-hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism, *Neuropediatrics* 29 (1) (1998) 14–22.
- [4] Y. Dauvilliers, I. Arnulf, E. Mignot, Narcolepsy with cataplexy, *Lancet (London, England)* 369 (February (9560)) (2007) 499–511.
- [5] M. Mamelak, M.B. Scharf, M. Woods, Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings, *Sleep* 2 (January) (1986) 285–289.
- [6] Fachinformation, Xyrem® 500 mg/ml Lösung zum Einnehmen Xyrem® 500 mg/ml Lösung zum Einnehmen.
- [7] J. Takahara, S. Yunoki, W. Yakushiji, J. Yamauchi, Y. Yamane, Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44 (May (5)) (1977) 1014–1017.
- [8] P.C.A. Kam, F.F.Y. Yoong, Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug, *Anaesthesia* 53 (December (12)) (1998) 1195–1198.
- [9] J.M. Stell, J.M. Ryan, Ecstasy and neurodegeneration, gamma-Hydroxybutyrate is a new recreational drug that may lead to loss of consciousness, *BMJ* 313 (August (7054)) (1996) 424.
- [10] H. Laborit, Sodium 4-hydroxybutyrate, *Int. J. Neuropharmacol.* 3 (September (4)) (1964) 433–438.
- [11] B. Madea, F. Musshoff, Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (May (20)) (2009) 341–347.
- [12] R. Brenneisen, M.a. Elsohly, T.P. Murphy, J. Passarelli, S. Russmann, S.J. Salamone, D.E. Watson, Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects, *J. Anal. Toxicol.* 28 (8) (2004) 625–630.
- [13] S. Abanades, M. Farré, M. Segura, S. Pichini, A. Pastor, R. Pacifici, M. Pellegrini, R. de la Torre, Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and non-conventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 29 (February (1)) (2007) 64–70.
- [14] M.A. LeBeau, R.H. Christenson, B. Levine, W.D. Darwin, M.A. Huestis, Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate, *J. Anal. Toxicol.* 26 (September (6)) (2002) 340–346.
- [15] H. Andresen, N. Sprys, A. Schmoldt, A. Mueller, S. Iwersen-Bergmann, Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations, *Forensic Sci. Int.* 200 (July (1–3)) (2010) 93–99.
- [16] S.R. Elliott, Further Evidence for the Presence of G HB in Postmortem Biological Fluid: Implications for the Interpretation of Findings, vol. 28, February 2004, pp. 20–26.
- [17] F. Erdmann, D. Zandt, J. Auch, H. Schütz, G. Weiler, M.A. Verhoff, Investigations concerning the threshold value between endogenous and exogenous GHB (liquid ecstasy), *Arch. Kriminol.* 217 (5–6) (2003) 129–136.
- [18] K. Beránková, K. Mutnanská, M. Balíková, Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine, *Forensic Sci. Int.* 161 (September (2–3)) (2006) 158–162.
- [19] F. Moriya, Y. Hashimoto, Endogenous gamma-hydroxybutyric acid levels in postmortem blood, *Leg. Med. (Tokyo)* 6 (March (1)) (2004) 47–51.
- [20] O.C. Snead, C.C. Liu, L.J. Bearden, Studies on the relation of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) to gamma-aminobutyric acid (GABA). Evidence that GABA is not the sole source for GHB in rat brain, *Biochem. Pharmacol.* 31 (December (23)) (1982) 3917–3923.
- [21] Z. Zdrojewicz, M. Lachowski, The importance of putrescine in the human body, *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 68 (January) (2014) 393–403.
- [22] J.D. Doherty, S.E. Hattox, O.C. Snead, R.H. Roth, 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.* 207 (October (1)) (1978) 130–139.
- [23] R.H. Roth, Formation and regional distribution of gamma-hydroxybutyric acid in mammalian brain, *Biochem. Pharmacol.* 19 (December (12)) (1970) 3013–3019.
- [24] D.L. Zvosec, S.W. Smith, T. Porrata, A.Q. Strobl, J.E. Dyer, Case series of 226 γ -hydroxybutyrate-associated deaths: lethal toxicity and trauma, *Am. J. Emerg. Med.* 29 (March (3)) (2011) 319–332.
- [25] T. Bay, L.F. Eghorn, A.B. Klein, P. Wellendorph, GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites, *Biochem. Pharmacol.* 87 (January (2)) (2014) 220–228.
- [26] B.L. Morse, N. Vijay, M.E. Morris, γ -Hydroxybutyrate (GHB)-Induced Respiratory Depression: Combined Receptor-Transporter Inhibition Therapy for Treatment in GHB Overdose, vol. 82, no. 2, 2012, pp. 226–235.
- [27] D.G.E. Caldicott, F.Y. Chow, B.J. Burns, P.D. Felgate, R.W. Byard, Fatalities associated with the use of gamma-hydroxybutyrate and its analogues in Australasia, *Med. J. Aust.* 181 (September (6)) (2004) 310–313.
- [28] P. Kintz, M. Villain, A.L. Pélassier, V. Cirimele, G. Leonetti, Unusually high concentrations in a fatal GHB case, *J. Anal. Toxicol.* 29 (September) (2005) 582–585.
- [29] X. Wang, K. Linnet, S.S. Johansen, Development of a UPLC-MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases, *Forensic Toxicol.* (2015) 1–10.
- [30] S. Lott, F. Musshoff, B. Madea, Estimation of gamma-hydroxybutyrate (GHB) consumption in serum samples of drivers positive for amphetamine or ecstasy, *Forensic Sci. Int.* 221 (September (1–3)) (2012) 98–101.
- [31] J.P. Goullé, M. Chêze, G. Pépin, Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J. Anal. Toxicol.* 27 (8) (2003) 574–580.
- [32] H. Andresen-Streichert, P. Jensen, J. Kietzerow, M. Schrot, N. Wilke, E. Vettorazzi, A. Mueller, S. Iwersen-Bergmann, Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs, *Int. J. Legal Med.* (2014) 57–68.
- [33] P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, B. Ludes, GHB in postmortem toxicology: discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens, *Forensic Sci. Int.* 143 (2–3) (2004) 177–181.
- [34] J. Marinetti, D.S. Isenschmid, B.R. Hepler, S. Kanluen, Analysis of GHB and 4-Methyl-GHB in Postmortem Matrices after Long-Term Storage, vol. 29, February 2005, pp. 41–47.

- [35] S. Mazarr-proo, S. Kerrigan, Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose 29 (August) (2005) 398–400.
- [36] S.D. Ferrara, L. Tedeschi, G. Frison, A. Rossi, Fatality due to gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and heroin intoxication, *J. Forensic Sci.* 40 (May (3)) (1995) 501–504.
- [37] W.C. Duer, K.L. Byers, J.V. Martin, Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol, *J. Anal. Toxicol.* 25 (7) (2001) 576.
- [38] P. Kintz (Ed.), *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, CRC Press, 2006.
- [39] B. Madea (Ed.), *Haaranalytik Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzteverlag, 2004.
- [40] P. Kintz, V. Cirimele, C. Jamey, B. Ludes, Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault, *J. Forensic Sci.* 48 (1) (2003) 195–200.
- [41] E. Bertol, F. Mari, F. Vaiano, G. Romano, S. Zaami, G. Baglìo, F.P. Busardò, Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases, *Drug Test. Anal.* 7.5 (2015) 376–384.
- [42] Y. Hari, S. König, A. Schröck, P. Coro, V. Auwärter, A. Thierauf, W. Weinmann, LC-MS/MS of GHB in Head Hair and Beard, vol. 80, 2013, pp. 224–227.
- [43] J. Suchard, S. Nizkorodov, S. Wilkinson, 1,4-Butanediol content of aqua dots children's craft toy beads, *J. Med. Toxicol.* 5 (3) (2009 Sep) 120–124.
- [44] H. Murali, S. Kotagal, Off-label treatment of severe childhood narcolepsy-catalepsy with sodium oxybate, *Sleep* 29 (August (8)) (2006) 1025–1029.

3.2 Zusammenfassung

In dem *Case Report* mit dem Titel "*Drug facilitated sexual assault with lethal outcome: GHB intoxication in a six-year-old girl*" wurden die Befunde einer GHB-assoziierten Sexualstraftat an einem 6-jährigen Mädchen zusammengefasst und interpretiert. In dem vorliegenden Fall ist davon auszugehen, dass bezüglich des Todeseintritts eine GHB-Intoxikation im Vordergrund gestanden hat. Die in den Herzblut-, Glaskörperflüssigkeit- und Gehirngewebsproben aufgefundenen Konzentrationen liegen oberhalb der in der Literatur beschriebenen Grenzwerte (Gehirngewebe: 10 mg/kg; Herzblut: 50 mg/L; Glaskörperflüssigkeit: 50 mg/L) und sprechen somit dafür, dass das Mädchen zum Zeitpunkt des Todes unter der Einwirkung dieses zentral wirksamen Mittels stand. Die Aussage des Täters, dass er GHB aus GBL und Natriumhydroxid selbst synthetisiert und dem Mädchen sowohl in die Bolognese Sauce als auch in den Apfelsaft gemischt habe, komplementiert den Sachverhalt. Der Tatbestand, dass das Mädchen häufiger GHB verabreicht bekommen habe, konnte durch die Ergebnisse der Haaranalyse bestätigt werden. Es wurden Konzentrationen bis zu 40,9 ng/mg aufgefunden.

Wie achtsam man jedoch mit der Interpretation eines Haaranalyseergebnis sein sollte, zeigte sich in der Bestimmung der Haarprobe der älteren Schwester. Trotz Aussage des Täters, auch die ältere Schwester mit GHB betäubt und anschließend missbraucht zu haben, konnten in den zeitlich übereinstimmenden Haarsegmenten keine über das Maß des endogenen Konzentrationsbereiches erhöhten GHB-Konzentrationen ermittelt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in dieser Publikation der Fall einer drogenassoziierte Sexualstraftat mit tödlicher GHB-Intoxikation bei einem 6-jährigen Mädchen anhand von Aktenlage, Obduktionsbefunden und chemisch-toxikologischen Untersuchungen rekonstruiert werden konnte. Nicht immer stehen den Ermittlern viele Indizien zur Verfügung, um den genauen Tathergang und die Todesursache zu ermitteln. Daher ist es wichtig, über solche seltenen Fälle zu berichten. Zusätzlich stellt bei mangelnder Kenntnis über weitere Ermittlungsergebnisse die Interpretation der chemisch-toxikologischen Untersuchungen eine Herausforderung dar, da es bisher keine genauen Richtlinien gibt, um eine GHB-Intoxikation eindeutig zu identifizieren.

Zukünftige Untersuchungen und Studien sollten sich daher mit der Verlängerung der Nachweisbarkeitsdauer sowie mit der Suche nach geeigneten Markern zur Identifizierung einer GHB-Gabe beschäftigen. Einige neue Ansätze sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4 Bestimmung von GHB und dessen Stoffwechselprodukt GHB- β -O-Glucuronid in Haaren von drei Narkolepsie-Patienten - Vergleich zwischen Einzelaufnahme und chronischer GHB Exposition

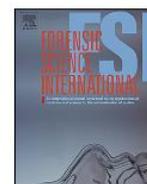
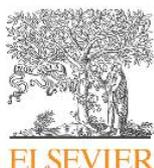
4.1 Einleitung

Um eine Substanz-Einnahme nach einem längeren Zeitraum noch nachweisen zu können, wird oft eine Analyse in Haaren empfohlen. Durch die arterielle Versorgung der Haarpapille mit Nährstoffen können körpereigene und körperfremde Substanzen in die Haarmatrix eingelagert werden. Dies bezeichnet man als Inkorporation. Die Haarmatrix ist somit inhomogen und kann je nach Abschnitt unterschiedliche Substanzen in verschiedenen Konzentrationen beinhalten. Je nach Länge des Haarabschnitts kann ein bestimmter Zeitraum untersucht werden. [117]. Für einen Nachweis nach k.o.-Mittel-Einnahme bzw. GHB-Gabe bietet dies die Möglichkeit, verspätet Proben abzunehmen, da sich Geschädigte nach einer Sexualstraftat oft spät dafür entscheiden, eine Anzeige zu erstatten.

In Haaren finden sich endogene GHB-Konzentrationen bis zu 3 ng/mg [121]. Im proximalen Bereich nahe der Haarwurzel können durch die Kontamination von Schweiß auch höhere Konzentrationen bis zu 12 ng/mg endogen nachgewiesen werden [119]. Haarbehandlungen wie Färben oder Blondieren können die Substanzkonzentrationen im Haar beeinflussen [117]. Eine allgemeine Richtlinie für einen eindeutigen Nachweis nach GHB-Einnahme gibt es nicht. Auch ein allgemeiner Grenzwert / cut-off-Wert konnte bisher nicht festgelegt werden. Daher wird empfohlen, jede zu untersuchende Haarprobe als eigene individuelle Kontrolle zu nutzen. Hierbei sollen Haarabschnitte, die außerhalb des Tatzeitraums liegen ebenfalls analysiert werden und somit den individuellen endogenen Konzentrationsbereich widerspiegeln [119]. Auf diese Basis aufbauend empfiehlt das *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) dann von einer GHB-Gabe auszugehen, wenn die Konzentration im betroffenen Haarabschnitt („*Target-Segment*“) das Zehnfache der endogenen Konzentrationen übersteigt [126]. Bertol et al. sehen ein mögliches Indiz für eine GHB-Einnahme, wenn die Haarprobe ein Verhältnis von 4,45:1 (einen Monat nach der Tat)

und / oder 3,35:1 (zwei Monate nach der Tat) zwischen *Target-Segment* und endogenem Bereich aufweist [127]. Kintz nutzte die Kontamination mit Schweiß als Hilfsmittel zur Identifizierung einer GHB Exposition im Haar [128]. Die Ansätze von Bertol et al. und Kintz et al. wurden entwickelt und getestet bei der Untersuchung von GHB-Konzentrationen in Haarproben nach einmaliger Exposition [127,128]. Der Nachweis einer GHB-Einzelgabe konnte anhand dieser Methoden erbracht werden. In welchen Bereichen die GHB-Konzentrationen in Haaren liegen, wenn GHB chronisch in therapeutischen Konzentrationen eingenommen wurde, ist bisher nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, GHB und dessen Stoffwechselprodukt GHB-Gluc in Haarproben von Narkolepsie-Patienten nachzuweisen und deren Konzentrationen zu untersuchen, um den möglichen Nachweis nach einer GHB-Gabe im Haar zu erbringen, einen möglichen Unterschied zwischen chronischer Einnahme und einmaliger Exposition zu finden und um bisherige Konzepte zum Nachweis einer GHB-Gabe im Haar auf ihre Anwendbarkeit zu prüfen. Insgesamt haben sich drei Patienten zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt. Zwei der drei Patienten nahmen GHB chronisch seit 6 und 9 Jahren ein. Der dritte Patient war Therapieeinsteiger und nahm GHB erstmalig ein. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als *Case Report* im Journal Forensic Science International unter dem Titel „*Determination of GHB and GHB-β-O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients - Comparison between single and chronic GHB exposure*“ veröffentlicht.



Case Report

Determination of GHB and GHB- β -O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients—Comparison between single and chronic GHB exposure

Lena-Maria Mehling^{a,*}, Xin Wang^b, Sys-Stybe Johansen^b, Annika Spottke^c, Anna Heidbreder^d, Peter Young^d, Burkhard Madea^a, Cornelius Hess^{a,**}

^a Institute of Forensic Medicine, University Hospital Bonn, Stiftsplatz 12, 53111 Bonn, Germany

^b Department of Forensic Medicine, University of Copenhagen, Frederik V's Vej 11, 2100 Copenhagen, Denmark

^c Department of Neurology, University Hospital Bonn, Signund-Freud-Straße 25, 53127 Bonn, Germany

^d Department of Neurology, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Straße 1, 48149 Münster, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2017

Received in revised form 21 July 2017

Accepted 23 July 2017

Available online xxx

Keywords:

GHB

GHB- β -O-glucuronide

Hair analysis

Single GHB exposure

Chronically GHB treatment

Narcoleptic patients

ABSTRACT

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) can be used as a knock-out drug in drug facilitated crime (DFC). Due to its rapid metabolism and resulting narrow detection window, uncovering GHB use in DFC still constitutes a problem. In this experiment we determined the GHB and GHB- β -O-glucuronide (GHB-Gluc) concentrations in hair samples after single and chronic GHB exposures. Hair samples of three narcoleptic patients therapeutically taking sodium oxybate (GHB-sodium-salt) were collected. Patients 1 (P1) and 2 (P2) took the medication for nine and six years, respectively. P1 took daily the pharmaceutical Xyrem[®] in a total dose of 5.78 g GHB at bed time (2.89 g) and four hours (2.89 g) later. P2 took a dose of 3.10 g GHB at bed time and an additional dose of 2.68 g GHB four hours later. Patient 3 (P3) was newly diagnosed with narcolepsy and started his therapy with oral dose of 6 g (divided in three portions of 2 g GHB) within 24 h. The hair samples were extracted both with and without forerunning washing steps. GHB and GHB-Gluc were determined by a published ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using GHB- d_6 and GHB-Gluc- d_4 as internal standards. GHB and GHB-Gluc concentrations in unwashed hair samples of P1 and P2 were determined in a range of 0.56–1.30 ng/mg and <0.48–0.85 ng/mg, respectively. In washed hair samples of P1 and P2 the concentrations were in a range of <0.32–0.68 ng/mg and <0.48–1.20 ng/mg for GHB and GHB-Gluc, respectively. The determined concentrations were within the published endogenous range. The confirmed results showed that the washing procedure before extraction causes a minor decrease of GHB concentrations in hair (difference: <1 ng/mg). The investigations showed that a single GHB exposure might not be determined by hair analysis of GHB and GHB-Gluc. The chronic intake of therapeutic sodium oxybate with doses up to 7 g per night was also not confirmed by hair analysis maybe due to hair treatments. Therefore, GHB hair analysis should be assessed critically and determined negative results could not exclude GHB exposures.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Gamma-hydroxy butyric acid (GHB) is a short chained molecule with four carbon atoms. The medications Xyrem[®] and Somsanit[®] contain the sodium salt and are used as a colourless liquid for the

treatment of narcolepsy [1,2]. In general, the therapeutic dose ranges from 4.5 g to 9 g Xyrem[®] per day [1]. Beside the application as a pharmaceutical, GHB occurs endogenous as central nervous system depressant, which is generated originating from the neurotransmitter GABA (gamma-aminobutyric acid) [3,4]. Due to its fast pharmacological effects within 30 min, depending on the ingested dose, and its rapid metabolism, its use emerged as a so-called knock-out drug for drug facilitated crimes (DFCs) [5,6]. Detection of exogenous GHB remains challenging because of its very narrow detection window in plasma (<6 h) and urine (<12 h)

* Corresponding author. Fax: +49 228738368.

** Corresponding author.

E-mail addresses: lena-maria.mehling@ukbonn.de (L.-M. Mehling), cohess@uni-bonn.de (C. Hess).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foresciint.2017.07.027>

0379-0738/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

[6,7] depending on the ingested dose as well as on the large inter- and intra-individual variations in endogenous concentrations [5,8]. Uncovering DFCs related to GHB is difficult, due to the fact that DFC victims commonly report anterograde amnesia induced by GHB consumption.

Hair was suggested as a valuable specimen in situations where, as a result of a delay in reporting the crime, natural processes have eliminated drugs from typical biological specimens. Hair testing can prolong the detection window due to incorporation of taken drugs and hair growth of 0.7–1.4 cm per month [9]. Endogenous GHB concentrations in hair are reported in a wide range (0.35 ng/mg–1.86 ng/mg [10] and 0.5–12 ng/mg [11]), therefore, a cut-off value for GHB in hair should be chosen cautiously [11,12]. It is recommended to use each subject as the control to determine its own endogenous range [11,13]. In 2013, the GHB metabolite GHB- β -*O*-glucuronide (GHB-Gluc) has been first described by Petersen et al. [14] in urine samples. Wang et al. [15] determined GHB-Gluc concentrations in hair samples with and without GHB abuse. Although the parent compound is generally the major substance that is incorporated in hair, the metabolites might improve confirmation of GHB consumption due to a longer elimination rate. In this case report we determined GHB and GHB-Gluc concentrations in hair samples of three narcoleptic patients after single and chronic GHB exposures.

2. Material and methods

2.1. Patients and sample collection

The experimental design was approved by the regional ethics committee of the University Hospital of Bonn according to the declaration of Helsinki (number: 370/13). The patients were informed about the risks of the experiment and given written informed consent. Participants of the experiment were diagnosed with the neurological disease narcolepsy ($n=3$). The first two volunteers daily took the pharmaceutical Xyrem[®] for nine and six years, respectively. Patient 1 (P1; female; age = 36; body mass index (BMI): 22.1) took the pharmaceutical Xyrem[®] in a daily dose of 2×3.5 g sodium oxybate (be equivalent to 2×2.89 g GHB) at bed time and four hours later. P1 stopped taking the medication three days before hair sampling. Patient 2 (P2; female; age = 18; BMI: 24.9) took a dose of 3.75 g sodium oxybate (≈ 3.10 g GHB) at bed time and an additional dose of 3.25 g (≈ 2.68 g GHB) four hours later. P2 lastly took the medication 18 h before sample collection. Chronical GHB exposures were investigated by segmented hair analysis of their hair samples. Hair samples were collected from the back of the head from each patient and stored at room temperature. The hair sample of P1 was 37 cm long and bleached; original hair colour was dark blond and the natural hairline (1–2 cm) was visible. P2 had 50 cm long, brown hair; the original hair colour was light brown. The distal 20–25 cm of the hair strand was dyed with brown hair colour and was not involved in the experiment.

Patient 3 (P3; male; age = 47; BMI: 26.3) started his therapy for the treatment of narcolepsy with a single dose administration of 10 ml sodium oxybate solution (2.423 g sodium oxybate, equivalent to 2 g GHB; at 10:00 p.m.) and had never taken this medication before. The hair of P3 was black and without hair treatment (hair length: 6 cm). The first sample was collected 12 h (10:00 a.m.) after GHB exposure before hair washing. In the following night the patient took an additional dose of 2 g GHB at bedtime (10:00 p.m.) and 2 g GHB again four hours later (02:00 a.m.). After the total ingestion of 6 g GHB he stopped taking the medication. An additional hair sample of P3 was collected four weeks after GHB ingestion.

2.2. Chemicals and reagents

2.2.1. Chemicals

GHB and GHB- d_6 were obtained from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). GHB-glucuronide (GHB-Gluc) and the internal standard GHB-glucuronide- d_4 (GHB-Gluc- d_4) were provided by Petersen et al. [16]. All of the reference standards were $\geq 98\%$ pure. Water, methanol, acetonitrile of LC-MS grade and isopropanol of HPLC gradient grade were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Formic acid and ammonium formate were obtained from Sigma-Aldrich (Fluka Analytical, Selze, Germany). Xyrem[®] (500 mg/ml sodium oxybate) was purchased from UCB Pharma GmbH (Monheim, Germany); Somsanit[®] (242 mg/ml sodium oxybate) from Dr. Franz Köhler Chemie GmbH (Alsbach-Hähnlein, Germany).

2.2.2. Stock and working solutions

Stock solutions (1000 mg/l) containing GHB and GHB-Gluc as well as a mixed working standard solution (20 mg/l for each compound) were prepared with methanol. The internal standard working solution of GHB- d_6 and GHB-Gluc- d_4 had a concentration of 2 mg/l and was prepared with methanol. The working solutions for the preparation of internal quality control hair samples containing GHB and GHB-Gluc were prepared at a concentration of 10 mg/l in methanol. All solutions were stored at -20°C .

2.3. Methods – hair analysis

Hair sample preparation including washing procedure was precisely described by Wang et al. [15]. Hair was washed after segmentation with 1 ml of isopropanol and then twice with 0.5 ml of water for 5 min. The last wash water was analysed to check for external contamination. Hair samples from P1 and P2 were both analysed unwashed and washed, while the hair samples from P3 were analysed unwashed according to recent recommendations [17].

Hair samples were cut in 1 cm segments and numbered in ascending order from the hair scalp to the tip. Segments no. 1–10 of the unwashed hair samples of P1 and P2 were investigated. The washed hair sample of P1 was cut in 1 cm segments up to segment no. 5 and then cut in 2 cm segments. In total 11 cm of this hair sample of P1 was investigated and separated in 8 segments. The washed hair sample of P2 was also cut in 1 cm segments up to segment no. 6 and then cut in 2 cm segment so in total 10 cm of the hair sample divided in 8 segments were investigated. Segment no. and segment size vary due to the length of the hair sample. The hair samples of P3 with a length of 6 cm were collected after 12 h and 4 weeks. The first sample was divided in 6 segments of 1 cm and the second in 3 segments of 1 cm. There was not enough hair matrix to analysis the distal hair segments no. 4–6 of the second hair sample of P3.

A sample weight of about 10 mg was added to a 2 ml Precellys reinforced tube and 500 μl of the extraction medium as used by Nielsen et al. [18] [a mixture of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate (8% acetonitrile, pH 5.3)] and 25 μl of the internal standard mixture (2 mg/l) were added and grinded by a Precellys 24 tissue homogenizer. GHB and GHB-Gluc in hair were determined with an ultra-high performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) system consisting of a Waters ACQUITY UPLC system coupled with an Xevo TQS (Waters) tandem mass spectrometer operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode using an electrospray ionisation source (ESI) in the negative ionisation mode. Chromatographic separation was achieved using an ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 \times 2.1 mm, 1.8 μm). An isocratic elution of 0.1% formic acid solution (95%) and methanol (5%) was performed at

0.5 ml/min with a total runtime of 2.5 min [15]. The limits of quantitation (LOQs) were 0.32 and 0.48 ng/mg for GHB and GHB-Gluc, respectively, and linearity up to 50 ng/mg for both. The daily calibration curves were constructed by spiking hair samples of non-GHB users for GHB and GHB glucuronide, respectively, plus the corresponding endogenous concentrations. The intermediate precision was below 13% for GHB and 18% for GHB-Gluc.

3. Results

In unwashed hair sample of P1 GHB concentrations ranged from 0.83 to 1.30 ng/mg and the unwashed hair sample of P2 showed similar results (GHB: 0.56–0.83 ng/mg). The metabolite GHB-Gluc was found between <LOQ to 0.85 ng/mg and 0.69–0.76 ng/mg for P1 and P2, respectively. The results are shown in Figs. 1 and 2. In the washed hair, GHB concentrations of P1 ranged from <LOQ to 0.68 ng/mg (Fig. 3) in the first eight hair segments distant from the scalp representing in total 11 cm. Segments no. 1–8 of hair sample of P2 representing totally 10 cm showed similar results (GHB: <LOQ–0.53 ng/mg, Fig. 4). The metabolite GHB-Gluc was found between <LOQ to 0.89 ng/mg and <LOQ–1.2 ng/mg for P1 and P2, respectively. The last wash fraction did not show any external contamination of any of the segments from both patients.

In the first hair sample of P3 – collected 12 h after a single ingestion (2 g GHB) – GHB concentrations were determined between 0.48–0.65 ng/mg in unwashed hair sample divided in six segments (1 cm), and the metabolite GHB-Gluc was found between 0.57–0.69 ng/mg (Fig. 5). Four weeks after the intake of 6 g GHB in total, investigated compounds were found in a concentration range of 0.45–0.64 ng/mg GHB and 0.99–1.01 ng/mg GHB-Gluc in unwashed hair segments no. 1–3 (Fig. 6).

4. Discussion

In the presented investigation, GHB and GHB-Gluc concentrations of three narcoleptic patients were determined in hair samples via UHPLC/MS-MS. Chronical (P1, P2) and single (P3) GHB exposures were investigated in washed and unwashed hair samples. The difference between unwashed and washed hair concentrations was very small (<1 ng/mg).

Surprisingly, the results of the two chronical exposed patients as well as the single exposed patient was all in the normal endogenous range as described in other studies [10–12,15]. GHB concentrations after chronical abuse were investigated by Wang et al. [15] with the same extraction and analytical method as described in this experiment and highly elevated GHB levels (461–591 ng/mg) were found [15]. Busardò et al. [19] published GHB and GHB-Gluc concentrations in hair sample of a narcoleptic patient (age = 45 years old; treatment with sodium oxybate for 6 month). The length of the hair strand was in a total of 10 cm divided in

10 × 1 cm segments. In the first six proximal segments GHB concentrations were significantly higher (8.06–9.23 ng/mg) than in the last four segments (0.89–2.82 ng/mg). GHB-Gluc concentrations were in the same range (0.32–0.86 ng/mg) as our investigations. However, hair treatment like bleaching or colouring has an influence on the drug concentrations in this matrix [20]. The hair of P1 was 37 cm long and only some hair bleached with a visible hair line. Information about the time span between hair treatment and sample collection or which bleaching product was used is not known. Hair of P2 was also treated, but the dyed part was not involved in the investigations. Therefore, hair treatment might explain the lack of elevated GHB levels in hair of P1, but could not explain the determined low GHB hair concentrations of P2. For P1 higher GHB hair concentrations could not be excluded, if the hair sample had not been treated.

Vaiano et al. [12] determined endogenous GHB concentrations in a range of 0.279–2.839 ng/mg in the hair of 150 volunteers without GHB exposure. They showed that the average GHB hair levels are higher in males than in females, especially, if the persons were under 30 years old. However, the results in the three narcoleptic patients investigated here were not consistent with the conclusion of Vaiano et al. It might be because of the large intra-individual variations on the GHB concentrations in hair or because of differences in influence due to age and sex. Furthermore, a different washing media was used for sample pretreatment (5 ml dichloromethane for 2 min). Another explanation could be that women treat their hair more often than men, which causes lower GHB hair concentrations in hair. Information about the cosmetically hair treatment of the investigated samples by Vaiano et al. [12] was not given. Kintz et al. [11] determined endogenous GHB levels (0.5–12 ng/mg) in hair samples of 24 healthy volunteers. They found out that the wide distribution of individual concentrations implement to choose a cut-off cautiously and to use each subject as its own control, because physiological concentrations are stable along the hair shaft, except at the root part. They observed no differences in GHB levels between sex and hair of various colours. Goullé et al. [10] investigated endogenous GHB levels in hair ($n = 61$) depending on the hair colour. The substance was determined in a range of 0.35–1.54 ng/mg with unremarkable differences between black and brown although somewhat between black or brown and blond hair colour when t-tested. The low number of participants was, among other things, a limitation of this investigation. For the patients P1 and P2, the endogenous concentration is not known and the concentrations measured reflect chronic use of prescribed GHB at low concentrations.

The discrimination between a single and chronical exposure can be investigated by analysing multiple segments of the hair strand. A single spot of exposure must be present in the segment corresponding to the time-frame of the DFC, called as “target

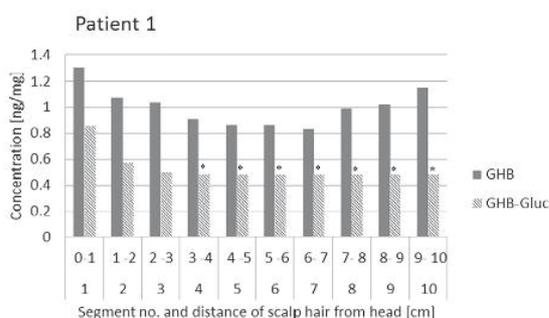


Fig. 1. Unwashed hair concentrations of GHB and GHB-Gluc of patient P1; *GHB-Gluc concentrations were below the LOQ from segment no. 4 to no. 10.

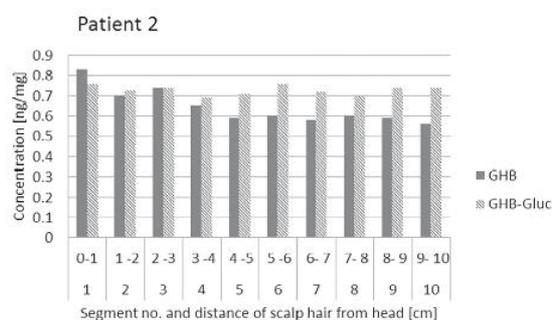


Fig. 2. Unwashed hair concentrations of GHB and GHB-Gluc of patient P2.

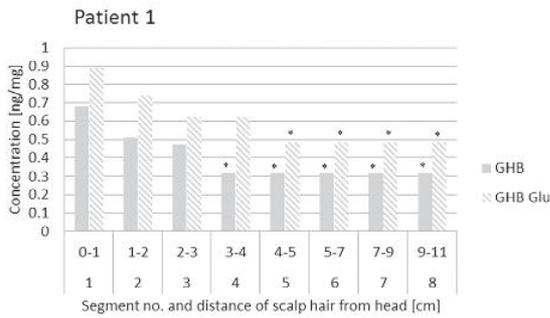


Fig. 3. Washed hair concentrations of GHB and GHB-Glu of patient 1; *GHB concentrations were below the LOQ from segment no. 4 to no. 8; *GHB-Glu concentrations were below the LOQ in segments no. 5–no. 8.

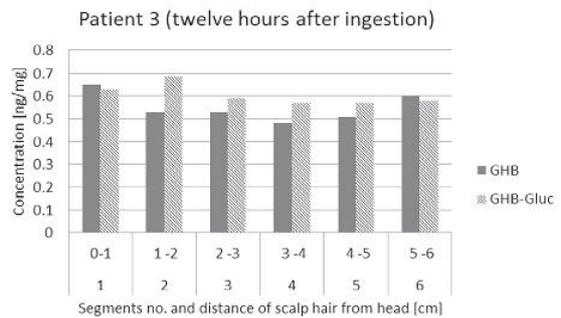


Fig. 5. Unwashed hair concentrations of GHB and GHB-Glu of patient P3, the hair was taken twelve hours after GHB ingestion.

segment” [9]. In several publications it has been shown that a single GHB exposure could be determined in hair four weeks after the intake [9,11,13,21]. Nevertheless, Hari et al. [22] reported that no single exposure could be confirmed by determination of GHB in head hair and beard hair of two volunteers after ingestion of a dose of GHB which corresponded to 27 mg/kg bodyweight and 28 mg/kg bodyweight, respectively. For assessing a single GHB exposure in hair, it requires the determination of individual endogenous GHB hair level of the affected person and an elevated concentration in the “target segment”.

The Forensic Guidelines of the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) describe that a GHB concentration in the target segment, which is ten times higher than the endogenous concentrations in the other segments, is mandatory in order to prove a single GHB exposure [23]. Bertol et al. [21] recommended application of two ratios (4.45:1 and 3.35:1, with a confidence interval of 95%), calculated by the concentrations in the hair segment related to GHB exposure to basal level in other segments, to disclose positive identification of a single GHB exposure (GHB dose of 25 mg/kg) one and two months later. These ratios were applied to a documented DFC by Busardò et al. [13]. They determined ratios of 5.56:1 and 4.37:1 in the first and second month after a single dose administration of 37.04 mg/kg GHB in a sexual assault, respectively. However, the value of this ratio is still open for discussion. No secure ratio was found applicable to all cases.

Twelve hours and four weeks after the first GHB ingestion of P3 (a total dose of 6g GHB) concentrations were determined in unwashed hair samples between 0.48–0.65 ng/mg and 0.45–0.64 ng/mg, respectively. For our investigations of single GHB exposure we also wanted to calculate the ratio for the second hair sample of P3 collected four weeks after the GHB intake. According to the determination of Bertol et al. [21] the individual endogenous

GHB hair concentration of P3 was 0.64 ng/mg determined in the third segment. The GHB hair concentration in the target segment was 0.48 ng/mg and therefore differences in concentrations were negligible. According to the guidelines of the UNODC [23] and to the procedure of Bertol et al. [21] no single GHB exposure has been confirmed. However, the administered dosage of 21.7 mg/kg was lower than in the designed studies by Bertol et al. [21] (25 mg/kg) and Kintz et al. [11] (25 mg/kg) as well as in the documented DFC by Busardò et al. (37.04 mg/kg) described above in detail [13], but not such as low that it could explain the estimated ratio of P3. The determined results are in line with the investigations of Hari et al. [22].

Recently, a novel approach to document a single GHB exposure was published by Kintz et al. [17] following the hypothesis that the taken GHB might be excreted in sweat or sebum, contaminations of these biological specimens increase the GHB concentrations mostly in the first proximal hair segment. In addition, sebum is spread along the hair shaft, so it could also contaminate other hair segments. Assuming that in the normal population endogenous GHB hair levels are lower than 20 ng/mg concentrations in the proximal segment above this endogenous value might reveal a single GHB exposure – comply with the condition that the investigated hair sample should not be washed or showered before sample collection and no wash protocol during sample preparation. Kintz et al. [17] showed that increased GHB hair levels could be determined in the first proximal segment of a volunteer (GHB: 1040 ng/mg), who had taken a dose of 25 mg/kg GHB, and in the first centimeter of the hair strand of a victim of a rape (850 ng/mg). According to Kintz et al. [17], we collected a hair sample of P3 twelve hours after a single dose administration excluding hair washing and showering by the patient and without wash procedure during sample preparation. The GHB concentration was 0.65 ng/mg in the first proximal segment and 0.48–0.60 ng/mg

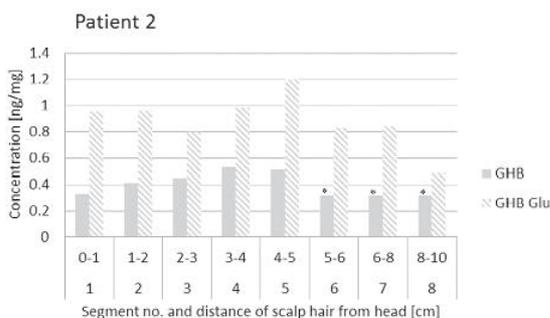


Fig. 4. Washed hair concentrations of GHB and GHB-Glu of patient 2; *GHB hair concentrations were below the LOQ from segment no. 6 to no. 8.

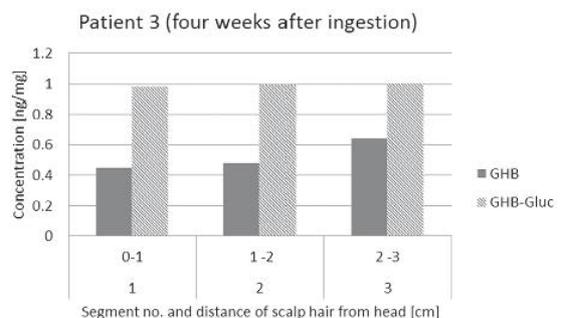


Fig. 6. Unwashed hair concentrations of GHB and GHB-Glu of patient P3, the hair was taken four weeks after GHB ingestion.

(mean 0.53 ng/mg) in the other segments in the unwashed hair of P3. The concentration of GHB was much lower than 20 ng/mg and meanwhile the difference between the first segment and the other segments is very small and therefore a single GHB exposure would not have been confirmed by using Kintz et al. [17] hypothesis neither. These results show that the determination of single GHB exposure in head hair is still a challenge and not possible in every case. A limitation of this investigation was that the ingested dose of GHB was low (21.7 mg/kg). Suggested administered GHB doses in instances of rape were in a range from 30 to 50 mg/kg [11].

Although the parent compound is generally the major analyte that is incorporated in hair [24], GHB metabolite might indicate a GHB intake or even distinguish between single or chronic GHB exposure. Currently there are two metabolites of GHB known the glucuronidated [14] and the sulfonated conjugations [25,26]. Wang et al. [15] investigated GHB-Gluc levels in hair of a control group ($n = 10$). They determined GHB-Gluc concentrations in the control group between <0.48 and 1.23 ng/mg. They described that the hair GHB-Gluc levels of drug rape cases ($n = 8$) were slightly higher than those of the controls. Additionally, they investigated two hair samples with reported GHB abuse for 6 and 3–4 months, respectively. GHB-Gluc concentrations were determined in a range of 1.7–3.1 ng/mg. As it is described above, the GHB-Gluc levels were in the same range like the control group [15]. The hair samples of P1 and P2 showed no increased GHB-Gluc concentrations in range from <LOQ to 0.89 ng/mg. After single GHB exposure the GHB-Gluc concentration doubled from the first to the second collected hair sample of P3, whereby GHB concentration were constant between these two samples. However, GHB-Gluc levels were within the determined endogenous range researched by Wang et al. [15] and in agreement with the results of Busardò et al. [19]. In the above described study of Busardò et al. [19] the GHB concentrations were ten times higher than the concentrations of GHB-Gluc. They showed that GHB would be incorporated in hair and that this could be determined in the relevant hair segments. We could not confirm these results. GHB and GHB-Gluc concentrations were in the same range in all patients whether after chronic or single GHB intake. In addition, we only investigated the glucuronidated compound, which conjugates with the alcoholic moiety. Further investigations of the GHB metabolite glucuronidated at the carboxyl moiety and the sulfonated compound and of other degradation products should be provided. Finally, hair is not a homogeneous matrix. Thus one limitation of hair analysis is that extraction recovery reported in the paper was not in authentic samples. There are no proficiency tests on the assay of GHB in hair at present. Better understanding of the methodologies and result interpretation will be obtained if international proficiency tests for the analysis of hair for GHB are provided.

5. Conclusions

In summary, the reported results of the hair samples of three narcoleptic patients showed that a single GHB exposure of P3 and chronic intake of P2 up to 0.1 g/kg per night over six years were not revealed by hair analysis of GHB and GHB-Gluc. However, hair treatment of P1 possibly influenced the analyte concentrations, so it could not be excluded that the levels of P1 might be higher without bleaching. In addition, analysing both washed and unwashed hair samples did not demonstrate any GHB consumption and sweat contamination as the difference was spare. Finally, GHB concentrations in hair should be interpreted cautiously and hair analysis should only be an additional adjuvant to prove GHB administration.

Conflict of interest

None.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

The authors would like to thank Daniel Sejer Pedersen for providing GHB-Gluc and its internal standard and all volunteers for taking part in the experiment.

References

- [1] UCB Pharma, Fachinformation Xyrem[®] 500 mg/ml Lösung zum Einnehmen, Xyrem[®] 500 mg/ml Lösung zum Einnehmen, (2016) <http://www.fachinfo.de/pdf/013032>. (Accessed 10 August 2016).
- [2] H. Cousto, Fachinformation: GHB, (Gamma-Hydroxybutyrat) – Mischkonsum, (2011) <http://www.drogenkult.net/index.php/GHB.pdf?file=GHB&view=pdf>. (Accessed 20 December 2016).
- [3] S.P. Bessman, W.N. Fishbein, Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite, *Nature* 200 (1963) 1207–1208, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/2001207a0>.
- [4] S.P. Bessman, J. Rossen, E.C. Layne, Gamma-aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain, *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 385–391 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13044808>. (Accessed 22 February 2017).
- [5] B. Madea, F. Musshoff, Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (2009) 341–347, doi:<http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2009.0341>.
- [6] R. Brenneisen, M.A. Elsohly, T.P. Murphy, J. Passarelli, S. Russmann, S.J. Salamone, D.E. Watson, Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 625–630, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/28.8.625>.
- [7] S. Abanades, M. Farré, M. Segura, S. Pichini, A. Pastor, R. Pacifici, M. Pellegrini, R. de la Torre, Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 29 (2007) 64–70, doi:<http://dx.doi.org/10.1097/FTD.0b013e31831807e5e>.
- [8] M.A. LeBeau, R.H. Christenson, B. Levine, W.D. Darwin, M.A. Huestis, Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 340–346 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220015>. (Accessed 23 June 2015).
- [9] P. Kintz, M. Villain, B. Ludes, Testing for the undetectable in drug-facilitated sexual assault using hair analyzed by tandem mass spectrometry as evidence, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 211–214.
- [10] J.P. Goullé, M. Chêze, G. Pépin, Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 574–580 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670136>. (Accessed 25 September 2013).
- [11] P. Kintz, V. Cirimele, C. Jamey, B. Ludes, Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault, *J. Forensic Sci.* 48 (2003) 195–200.
- [12] F. Vaiano, G. Serpelloni, S. Furlanetto, D. Palumbo, F. Mari, A. Fioravanti, E. Bertol, Determination of endogenous concentration of γ -hydroxybutyric acid (GHB) in hair through an ad hoc GC–MS analysis: a study on a wide population and influence of gender and age, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 161–166, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.036>.
- [13] F.P. Busardò, F. Vaiano, G. Mannocchi, E. Bertol, S. Zaami, E. Marinelli, Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault, *Drug Test. Anal.* 9 (2017) 953–956.
- [14] I.N. Petersen, C. Tortzen, J.L. Kristensen, D.S. Pedersen, T. Breindahl, Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 291–297, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt027>.
- [15] X. Wang, K. Linnet, S.S. Johansen, Development of a UPLC–MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases, *Forensic Toxicol.* 34 (2016) 51–60.
- [16] I.N. Petersen, J. Langgaard Kristensen, C. Tortzen, T. Breindahl, D.S. Pedersen, Synthesis and stability study of a new major metabolite of γ -hydroxybutyric acid, *Beilstein J. Org. Chem.* 9 (2013) 641–646, doi:<http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.9.72>.
- [17] P.A. Kintz, Novel approach to document single exposure to GHB: hair analysis after sweat contamination, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 563–564, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkw052>.
- [18] M.K.K. Nielsen, S.S. Johansen, P.W. Dalsgaard, K. Linnet, Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of

- abuse in hair using UPLC–TOF–MS, *Forensic Sci. Int.* 196 (2010) 85–92, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.027>.
- [19] F.P. Busardò, C. Kyriakou, E. Marchei, R. Pacifici, D. Sejer Pedersen, S. Pichini, Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: application to clinical and forensic cases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137 (2017) 123–131, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.022>.
- [20] B. Madea, F. Mußhoff, *Haaranalytik: Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzteverlag, Köln, 2004, pp. 50–55.
- [21] E. Bertol, F. Mari, F. Vaiano, G. Romano, S. Zaami, G. Baglio, F.P. Busardò, Determination of GHB in human hair by HPLC–MS/MS: development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 376–384, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/dta.1679>.
- [22] Y. Hari, S. König, A. Schröck, P. Coro, V. Auwärter, A. Thierauf, W. Weinmann, LC–MS/MS of GHB in head hair and beard, *Toxicchem Krimtech* 80 (2013) 224–227.
- [23] The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *Guidelines for the Forensic Analysis of Drugs Facilitating Sexual Assault and Other Criminal Acts*, United Nations, New York, 2011.
- [24] E.J. Cone, Mechanisms of Drug Incorporation into Hair. *Ther. Drug Monit.*, 18th ed., (1996) . <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.22.1b/ovidweb.cgi>.
- [25] S. Hanisch, N. Stachel, G. Skopp, A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid, *Int. J. Leg. Med.* 130 (2016) 411–414, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00414-015-1235-x>.
- [26] L.M. Mehling, T. Piper, J. Dib, D.S. Pedersen, B. Madea, B.C. Hess, M. Thevis, Development and validation of a HPLC–QTOF–MS method for the determination of GHB– β –O–glucuronide and GHB–4–sulfate in plasma and urine, *Forensic Toxicol.* 35 (2017) 77–85, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11419-016-0339-4>.

4.2 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass ein eindeutiger Nachweis für eine GHB-Exposition im Haar immer noch eine Herausforderung darstellt. Weder die GHB - Konzentrationen der Patienten mit chronischer GHB-Einnahme noch die des Therapieeinsteigers überschritten die in der Literatur beschriebenen endogenen Konzentrationsbereiche im Haar. Die Konzentrationen des Stoffwechselprodukt GHB-Gluc konnten ebenfalls als unauffällig eingeordnet werden.

Der Vergleich der beiden Probenaufarbeitungen mit und ohne Waschschrift zeigte, dass durch die Waschung die GHB Konzentrationen in den untersuchten Haarabschnitten der beiden chronischen Patienten sanken. Die GHB-Gluc Konzentrationen zeigten sich als relativ stabil in Bezug auf die Art der Probenaufarbeitung. Die Interpretation der ermittelten Werte der Haarprobe des ersten Patienten war aufgrund deren Haarbehandlung (Blondierung) limitiert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Nicht-Behandlung die Konzentrationen in einem höheren Bereich gelegen hätten. Die ermittelten Konzentrationen der zweiten Patientin untermauern jedoch die Annahme, dass eine chronische GHB-Einnahme in therapeutischen Dosierungen zu unauffälligen Konzentrationen im Haar führen kann.

Die Überprüfung der Anwendbarkeit der drei unterschiedlichen Konzepte zum Nachweis einer GHB-Gabe im Haar nach einem DFC, zeigte, dass auch hier keine eindeutige Umsetzung möglich war. Weder die Richtlinien der UNODC, die vorgeben, dass das *Target-Segment* das Zehnfache der endogenen Konzentration überschreiten muss, konnten erfüllt, noch die beiden Verhältnisse von 4,45:1 (einem Monat nach der Tat) und / oder 3,35:1 (zwei Monate nach der Tat) nach Bertol et al. konnten bestimmt werden [126,127]. Letztendlich zeigte sich, dass auch das Konzept von Kintz mit der Zuhilfenahme der Schweißkontamination keinen erwünschten Beweis für eine GHB-Einnahme erbrachte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit vermeintlich positiven Befunden achtsam umgegangen werden muss, da es bisher noch keine einheitlichen Kriterien bzw. Richtlinien zum Nachweis einer GHB Exposition gibt. Haaranalysen sollten daher immer als zusätzliches unterstützendes Beweismittel und nicht als eindeutiges Indiz betrachten werden. Aufgrund der vielfältigen Meinungen und unterschiedlichen Ansätze bzw. Konzepte, sind weitere Untersuchungen und Studien notwendig, um beweissichere Ergebnisse zu erhalten und eine einheitliche Interpretation von Analyseergebnissen zu ermöglichen.

5 Entwicklung und Validierung einer HPLC-QTOF-MS Methode für die Bestimmung von GHB- β -O-Glucuronid und GHB-4-Sulfat in Plasma und Urin

5.1 Einleitung

Durch die Biotransformation werden Arzneimittel im Körper u. a. strukturell so verändert, dass diese wasserlöslicher werden und somit besser ausgeschieden werden können. Diese metabolischen Vorgänge sind in zwei Phasen unterteilt. Oxidations-, Reduktions- und Hydrolyse-Reaktionen finden in der Phase I der Biotransformation statt, Konjugations-Reaktionen sind Teil der zweiten Phase [142]. Jedoch muss nicht jedes Xenobiotikum beide Phasen durchlaufen, dies ist abhängig von dessen chemischer Struktur und Wasserlöslichkeit. GHB besitzt eine hohe Wasserlöslichkeit, daher sind keine bis nur geringe metabolische Veränderungen nötig, um die Elimination dieser Substanz zu ermöglichen [72]. Der größte Anteil des Neurotransmitters wird über den Zitronensäurezyklus metabolisiert und als CO₂ abgeatmet [54].

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit (0,3-1,0 h) von GHB ist das Detektionsfenster sehr eng und stellt somit ein Problem für die Nachweisbarkeit einer Einnahme dar. Metabolite, die während der Verstoffwechslung gebildet werden, können eine längere Nachweisbarkeit ermöglichen [60]. Im Jahre 2013 wurde der Metabolit GHB-Gluc von Petersen et al. in Urinproben beschrieben [76]. Wang et al. bestätigten das Vorkommen des Glucuronid-Konjugats in Haaren [77]. Hanisch et al. beschrieben den qualitativen Nachweis von GHB-Sulf im Urin [78]. Dies stellt einen neuen Ansatz dar, wie eine GHB-Gabe bzw. k.o.-Mittel-Einnahme bei DFSA länger detektiert werden könnte. Hierfür bedurfte es zunächst der Entwicklung einer Methode für beide Metabolite, welche deren Konzentrationen quantitativ erfasst. Eine ausführliche Validierung im Anschluss ermöglicht den Erhalt von gesicherten Ergebnissen.

Ein weiteres Problem, das bei der Untersuchung von DFSA auftritt, ist die Stabilität der in der Probe befindlichen Substanzen. Wie schon in einigen Studien belegt, ist GHB bei Raumtemperatur bis zu 48 h und tiefgefroren (-20 °C) von 4 Wochen bis zu 9 Monaten stabil [101,102]. Die Stabilität der beschriebenen GHB-Metabolite GHB-Gluc und GHB-Sulf wurde bisher noch nicht untersucht. Im Allgemeinen sind Sulfate instabiler als Glucuronide, da sich

aufgrund der Resonanzstabilisation der Sulfat-Rest als hervorragende Abgangsgruppe eignet [143]. In vivo ist das endogen vorkommende Enzym β -Glucuronidase hauptsächlich für die Spaltung der Glucuronid-Konjugate verantwortlich [144]. Während der Lagerung können pH-Wert, Temperatur- und Lichtbedingungen die Stabilität dieser Konjugate beeinflussen. Daher ist es essentiell, die Stabilität während der Validierung einer analytischen Methodik zu untersuchen. Wenn dies nicht berücksichtigt wird, könnten die Messwerte der Konjugate während der Quantifizierung unterschätzt und die des Degradationsprodukt GHB überschätzt werden. Bisher ist jedoch nichts über die Konzentrationen von GHB-Sulf in Urinproben und GHB-Gluc in Blutproben bekannt.

In der nun folgenden Publikation wurde die Methodenentwicklung zum Nachweis von GHB-Gluc und GHB-Sulf mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Quadrupol-*Time-of-flight*-Massenspektrometrie (HPLC-QTOF-MS) in Plasma- und Urinproben beschrieben. Anschließend wurde die Methode nach den Richtlinien der GTFCh validiert [145]. Nach dem Erfüllen der Kriterien der Validierungsrichtlinien wurde die Stabilität von GHB-Gluc und GHB-Sulf in Plasma- und Urinproben überprüft. Hierfür wurde sowohl Plasma und Urin mit einer bestimmten Konzentration der Metabolite versetzt sowie reale Proben, die nachweislich hohe Konzentrationen beinhalteten, analysiert. Anschließend wurden diese Proben bei Raumtemperatur, 4 °C und -20 °C gelagert und in einem dokumentierten Zeitabstand vermessen. Die Ergebnisse sind in der Arbeit *Development and validation of a HPLC-QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine* in *Forensic Toxicology* veröffentlicht worden.

Development and validation of a HPLC–QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine

Lena-Maria Mehling¹ · Thomas Piper² · Josef Dib² · Daniel Sejer Pedersen³ · Burkhard Madea¹ · Cornelius Hess¹ · Mario Thevis²

Received: 7 July 2016 / Accepted: 6 September 2016
© Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer Japan 2016

Abstract Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is used as a so-called knock-out drug in drug-facilitated sexual assault. Due to GHB's short detection window in blood and urine, crime verification remains problematic in many cases. Phase II metabolites can enhance the detectability and prolong the detection window of some lower-molecular-mass molecules, as exemplified by ethanol. GHB- β -O-glucuronide (GHB-Gluc) was recently introduced as one phase II metabolite, and GHB-4-sulfate (GHB-Sulf) was also postulated to represent a urinary metabolite of exogenous GHB. To unambiguously verify the presence of GHB-Sulf in urine, the reference standard material of GHB-Sulf was synthesized, together with its deuterated analogue, GHB-Sulf- d_6 . This reference standard material, together with GHB-Gluc and GHB-Gluc- d_4 , was employed to develop and validate a quantitative method for determining both target analytes in plasma and urine samples. Compounds were separated by high-performance liquid chromatography on a Hypercarb column and detected by electrospray ionization time-of-flight-mass spectrometry.

Calibration curves were linear over the entire calibration range up to 20 mg/L, and quantification limits of <0.01 mg/L were achieved. Accuracy and interday and intraday precision fulfilled all forensic guidelines criteria. In plasma, only GHB-Gluc was detected, while both metabolites were clearly identified in urine, even in real human specimens. Stability was investigated under different temperature conditions for up to 4 weeks, and both phase II metabolites were found to be stable under refrigerated conditions. This method proved to be suitable for this purpose, and allowed for the first time the analysis and quantification of two different GHB metabolites from plasma and urine samples.

Keywords GHB-4-sulfate · GHB- β -O-glucuronide · HPLC–QTOF-MS · Stability · Validation

Introduction

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a short-chain molecule with four carbon atoms. Because of its high water solubility, only minor metabolic changes are likely to be necessary for elimination. Due to its rapid pharmacological effects, within 30 min (depending on the ingested dose), and its rapid metabolism, it has been abused as a so-called knock-out drug in connection with drug-facilitated sexual assault (DFSA) [1, 2]. Uncovering DFSA related to GHB has been difficult, as DFSA victims commonly report anterograde amnesia induced by GHB consumption. Furthermore, detection of exogenous GHB remains challenging given its very narrow detection window in plasma (<6 h) and urine (<12 h) [3], depending on the ingested dose, as well as on the large inter- and intra-individual variation in endogenous concentrations [1, 4]. Extension of the detection window

L.-M. Mehling and T. Piper contributed to this work equally.

✉ Lena-Maria Mehling
lena-maria.mehling@ukb.uni-bonn.de

✉ Thomas Piper
t.piper@biochem.dshs-koeln.de

¹ Institute of Forensic Medicine, University of Bonn, Stiftsplatz 12, 53111 Bonn, Germany

² Center for Preventive Doping Research, Institute of Biochemistry, German Sport University Cologne, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Cologne, Germany

³ Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Science, University of Copenhagen, Jagtvej 162, 2100 Copenhagen, Denmark

may improve the detection of DFSA after GHB intake. Because of the elongated excretion through metabolic pathways, the detection window for generated phase II metabolites may be wider than that for GHB.

Ethyl glucuronide and ethyl sulfate are common markers of alcohol intake, even if only small amounts of ethanol are converted to sulfonated and glucuronated metabolites [5, 6]. Hence, conjugation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase and by sulfotransferase could also be expected for GHB. In general, sulfates are less stable than glucuronides due to resonance stabilization, making the sulfate moiety an excellent leaving group [7]. In vivo, the endogenous β -glucuronidase is mostly responsible for cleaving glucuronide conjugations [8]. During storage, pH, temperature and light conditions can influence the stability of these conjugates. Therefore, investigation of these validation parameters within the analytical process is essential. If this is not taken into account, the conjugates may be underestimated and the degradation product GHB overestimated during quantification.

GHB- β -*O*-glucuronide (GHB-Gluc) (Fig. 1) was recently described by Petersen et al. [9] in urine samples. Sulfonated GHB was first detected by Hanisch et al. [10], but quantitative evidence with reference substances and internal standards has not been provided until now. GHB-Gluc concentrations have also been determined in hair [11], but to date nothing has been known regarding concentrations in plasma. To the best of our knowledge, no analytical methods have been reported for both GHB-Gluc and GHB-4-sulfate (GHB-Sulf). The aim of this study was to develop and validate a method for the quantification of GHB-Gluc and GHB-Sulf in plasma and urine, with a particular focus on their stability.

Materials and methods

Chemicals and their preparation

GHB-Gluc was purchased from ReseaChem GmbH (Burgdorf, Switzerland). The internal standard GHB-Gluc-

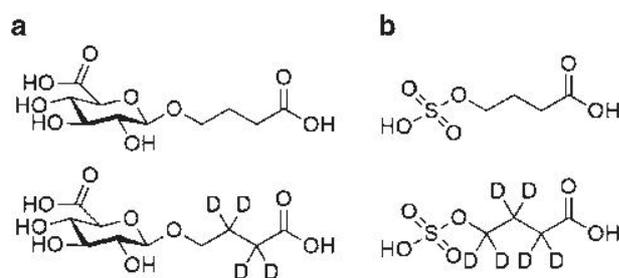


Fig. 1 Structures of **a** gamma-hydroxybutyric acid- β -*O*-glucuronide (GHB-Gluc) and its deuterated internal standard, and **b** gamma-hydroxybutyric acid-4-sulfate (GHB-Sulf) and its deuterated counterpart

d_4 was synthesized according to Petersen et al. [12]. GHB-Sulf and its internal standard GHB-Sulf- d_6 were synthesized as described below. Acetonitrile and formic acid (98 %) were obtained from Honeywell Specialty Chemicals (Seelze, Germany) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. Urea was purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Germany). All chemicals were of the highest analytical grade. Water was purified by arium[®] pro UV Ultrapure Water Systems (Sartorius AG, Göttingen, Germany).

Stock solutions of GHB-Gluc and GHB-Sulf, as well as working standards used for calibration and the internal standard mixture, were prepared with purified water. Internal quality controls (QCs) were prepared by spiking appropriate amounts of GHB-Gluc or GHB-Sulf into plasma and urine samples with measured endogenous concentrations, which were subtracted afterwards. The concentration of each internal standard working solution of GHB-Gluc- d_4 and GHB-Sulf- d_6 was 10 mg/L.

Synthesis of GHB-Sulf and its deuterated internal standard

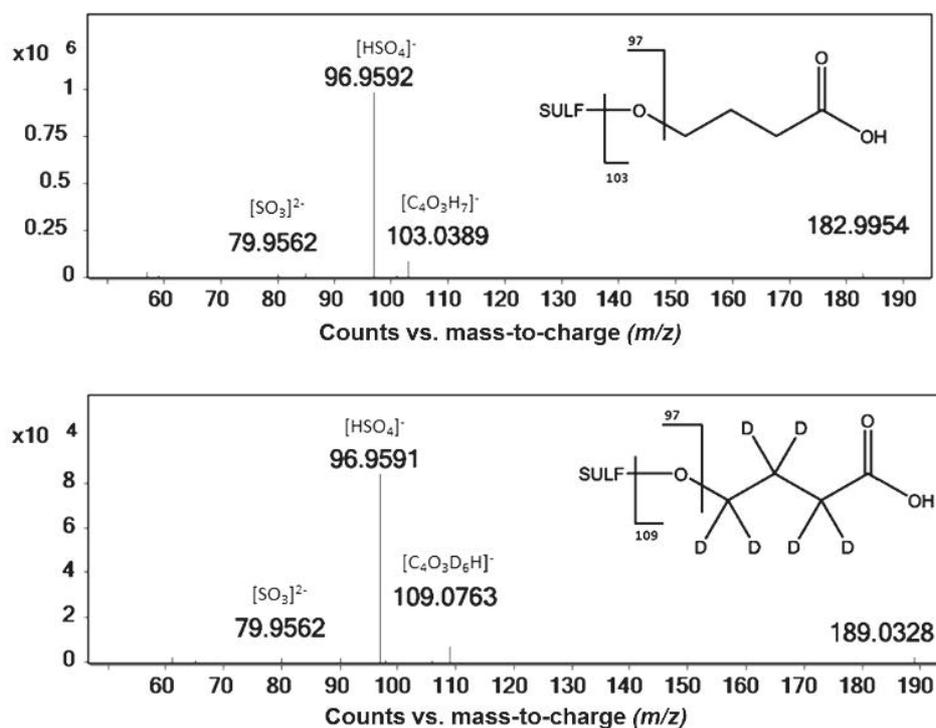
Sulfation of GHB (1.0 mg, 9.7 μ mol, 1.0 equiv.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and hexa-deuterated GHB (1.0 mg, 9.2 μ mol, 1.0 equiv.; LGC Standards, Teddington, UK) was accomplished by incubating the respective substance with a sulfur trioxide pyridine complex (5.0 equiv.; Sigma-Aldrich) in dimethylformamide for 1 h. The reaction was terminated by 1.5-fold dilution with deionized water. The resulting solutions were analyzed by high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight-mass spectrometry (HPLC–QTOF-MS), showing almost full conversion of the starting material to the desired products (Fig. 1b). Figure 2 depicts the product ion spectra of GHB-Sulf and GHB-Sulf- d_6 detected in negative ionization mode via tandem mass spectrometry.

Sample pretreatment

For protein precipitation of plasma, 10 μ L internal standard working solution and 200 μ L acetonitrile were added to each 100 μ L of a plasma sample. The samples were vortexed for 30 s and centrifuged for 10 min at 13,250 \times g. Then, 200 μ L of the supernatant was transferred into a new Eppendorf tube and evaporated at 45 $^{\circ}$ C for 20 min in an Eppendorf concentrator. Concentrated samples were diluted with 100 μ L of 0.1 % formic acid and transferred into a vial.

To 100 μ L of urine, 30 μ L internal standard working solution was added, and the mixture was vortexed and then injected directly into the HPLC system.

Fig. 2 Product ion spectra of GHB-Sulf (m/z 182.9954) and GHB-Sulf- d_6 (m/z 189.0328) detected in negative ionization mode via high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight-mass spectrometry (HPLC–QTOF-MS) in the tandem mode; precursor ions were selected by unit resolution



HPLC–QTOF-MS conditions

Analyses were performed on an Agilent 1290 Infinity HPLC device connected to an Agilent G6550A accurate-mass QTOF-MS instrument with an electrospray ion source (DUAL AJS ESI) in the negative mode (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The instrumental conditions were as follows: gas temperature 225 °C; gas flow 13 L/min; nebulizer 20 psig; sheath gas temperature 275 °C; sheath gas flow 12 L/min. The parameters of the TOF mode were as follows: scan speed 5 scans/s; mass range m/z 50–500; dynamic range 2 GHz. Ions were extracted by accurate mass analyses using the following mass numbers: GHB-Sulf m/z 182.9969; GHB-Sulf- d_6 m/z 189.0345; GHB-Gluc m/z 279.0722; GHB-Gluc- d_4 m/z 283.0973, with mass errors of ± 20 ppm. The instrument was calibrated directly before each sequence. The calibrated mass range was m/z 50–1800.

Chromatographic separation was achieved on a Hypercarb column (50×1 mm i.d.) with a particle size of 3 μm (Thermo Scientific, Dreieich, Germany). The mobile phase consisted of water containing 0.1 % formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1 % formic acid (solvent B). A flow rate of 0.15 mL/min was used, along with the following gradient program: 30 % solvent B for 5 min; then switching to 98 % B and holding 98 % B for 4 min. A post-run equilibration at starting conditions (duration 4 min) was conducted. The injection volume was 5 μL . The collected data were analyzed with the MassHunter software (version B.06.00; Agilent Technologies). The LC-

QTOF-MS chromatograms of the metabolites in plasma and urine samples are shown in Figs. 3 and 4, respectively. Retention times of GHB-Gluc differed slightly between plasma (3.0 min) and urine samples (2.8 min).

Validation

The method was validated for plasma and urine according to common forensic guidelines [13]. Thus, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), linearity and matrix effects, as well as accuracy, interday and intraday precision, and stability were tested. For QCs, samples at low and high concentration levels were spiked into plasma and urine samples. Due to the natural occurrence of both compounds in plasma and urine, endogenous concentrations were determined in blank matrices before use for validation. The relative peak areas or area ratios of blank matrices were then subtracted from those of spiked samples to determine matrix effects, accuracy, interday and intraday precision, and stability. The collected data were evaluated statistically with Valistat software (Excel program for the calculation of the analytical limits according to DIN 32645, version 2.0; Arvecon GmbH, Walldorf, Germany).

Selectivity and specificity

Because GHB-Gluc and GHB-Sulf represent endogenous substances, no blank matrices were available. Hence, for

Fig. 3 Extracted-ion chromatograms of **a** GHB-Gluc and **b** its internal standard, GHB-Gluc-*d*₄, in a high quality control plasma sample (concentration 0.4 mg/L) obtained by HPLC-QTOF-MS

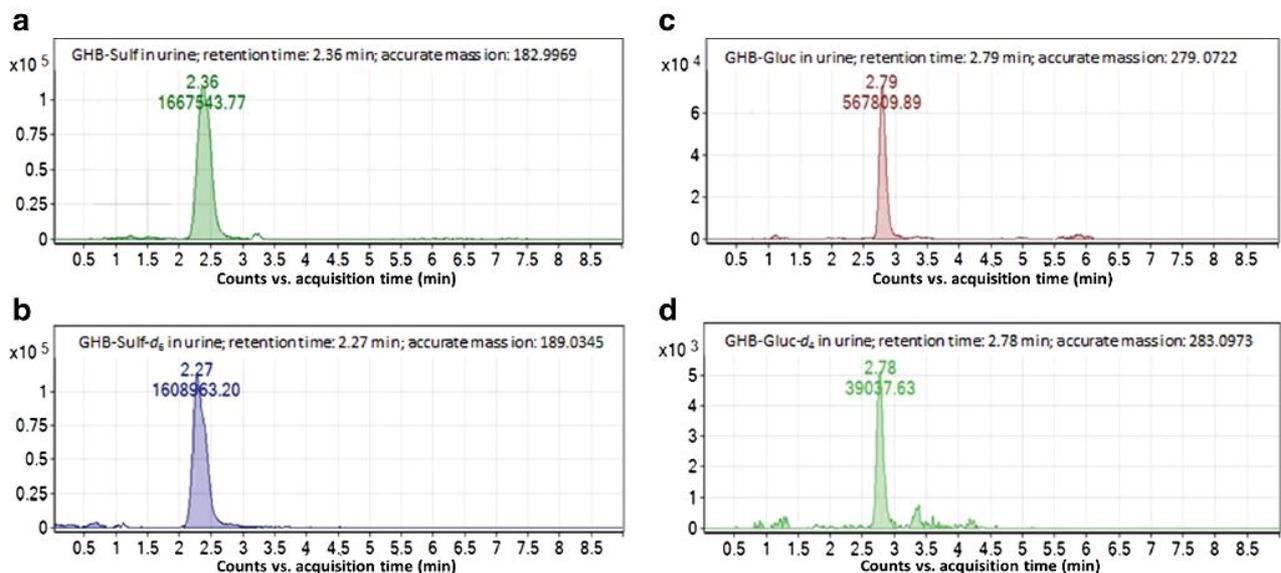
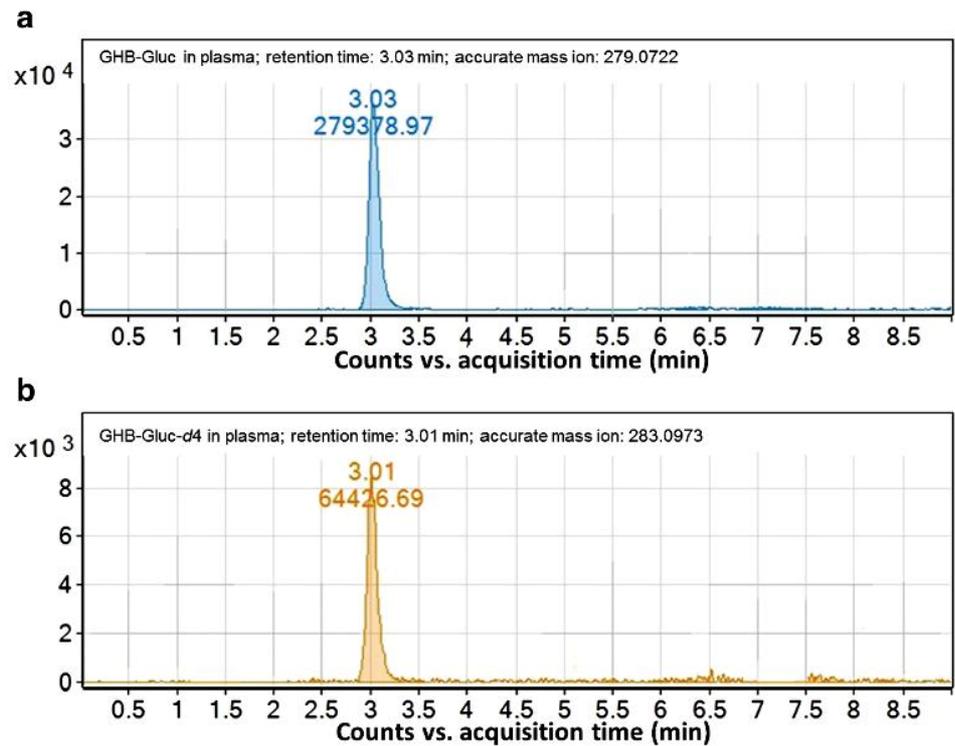


Fig. 4 Extracted-ion chromatograms of **a** GHB-Sulf and **c** GHB-Gluc, and their internal standards **b** GHB-Sulf-*d*₆ and **d** GHB-Gluc-*d*₄ in a real urine specimen. GHB-Gluc and GHB-Sulf concentrations were 0.98 and 4.9 mg/L, respectively

evaluation of the method, it was necessary to find an alternative matrix for plasma and urine in order to avoid incorrect results caused by basic levels of GHB-Gluc and GHB-Sulf. Calibrators for plasma and urine were measured in water and in water containing 10 mg/L urea,

respectively. The ratios of the samples prepared in serum and urine were compared to those of the alternative solvents. No differences were observed, and LODs, LOQs, and linearity were evaluated in water samples and in water samples containing urea instead of organic specimens.

Linearity

Initial measurements showed that separate calibration ranges for plasma and urine and for the different metabolites were necessary. Because only GHB-Gluc was detected at low concentrations in plasma, the concentrations of GHB-Gluc in their calibrators were 0.01, 0.025, 0.5, 0.75, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.5 mg/L. GHB-Sulf was unable to be detected in plasma samples of volunteers without GHB intake.

In urine, both metabolites were found in samples of volunteers without GHB intake. Therefore, the concentrations of GHB-Sulf in the spiked solvent samples used for its calibration were 0.01, 0.025, 0.5, 0.75, 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L; those in GHB-Gluc calibrators were 0.025, 0.05, 1.0, 2.5, 5, 10, 15 and 20 mg/L. Linearity was evaluated by analyzing six replicates of spiked solvent calibrations.

Limits of detection and quantification

The LOD and LOQ were established by determining area ratios of each target compound to its deuterated internal standard after measuring a dilution series lower than the calibrator ranges. Concentration series ranged from 0.001 to 0.01 mg/L for both compounds. Samples were prepared in the solvent solutions replacing plasma and urine matrices.

Recoveries and matrix-related ionization effects

In both matrices, extraction recoveries of GHB-Sulf and GHB-Gluc were determined by comparing the analyte responses of pre-extraction and post-extraction spiked samples. Samples at low (plasma: GHB-Gluc 0.04 mg/L; urine: GHB-Sulf 0.4 mg/L, GHB-Gluc 2 mg/L) and high (plasma: GHB-Gluc 0.4 mg/L; urine: GHB-Sulf 0.8 mg/L, GHB-Gluc 6 mg/L) concentrations were analyzed in five different plasma and urine matrices, respectively. Area ratios were calculated and compared.

In accordance with the procedure described by Matuszewski et al. [14], matrix-related ionization effects were evaluated by comparing the analyte responses in post-extraction spiked samples to those of non-matrix prepared samples representing 100 % recovery. Samples at low (plasma: GHB-Gluc 0.04 mg/L; urine: GHB-Sulf 0.4 mg/L, GHB-Gluc 2 mg/L) and high (plasma: GHB-Gluc 0.4 mg/L; urine: GHB-Sulf 0.8 mg/L, GHB-Gluc 6 mg/L) concentrations were analyzed in five different plasma and urine matrices. Relative peak areas were calculated and compared.

Precision and accuracy

Interday and intraday precision and accuracy were determined by measured QCs at low and high concentrations for GHB-Gluc (plasma 0.04 and 0.4 mg/L; urine 4 and 8 mg/L)

and GHB-Sulf (urine 0.04 and 0.4 mg/L) in both specimens. For the determination of intraday and interday precision, two replicates at each concentration level were analyzed on eight different days.

Stability

Stability was investigated for spiked plasma and urine samples and in real specimens. GHB-Gluc was added to pooled plasma samples at concentrations of 0.04 and 0.4 mg/L, respectively. Pooled urine samples were fortified with GHB-Gluc and GHB-Sulf, reaching concentrations of approximately 4 and 8 mg/L (GHB-Gluc) and 0.4 and 0.8 mg/L (GHB-Sulf), respectively. The spiked matrix pools and real specimens were aliquoted in 100 μ l volumes. Samples were subsequently stored in the dark at different temperatures (room temperature, 4 and -20 °C) and were analyzed in duplicate on the first day and on days 3, 10, 17, 24 and 31 after spiking. Mean values were calculated. Due to limited sample amounts, the stability experiment of the real plasma specimens at 0.04 mg/L of GHB-Gluc was achieved only for a period of 17 days.

Results

Linearity

For determination of the substances in question in urine and plasma samples, the eight-point calibration curves, fitted by least squares regression, were linear over the whole range, with a regression coefficient of $R^2 > 0.99$ for all calibrators.

Limits of detection and quantification

For the GHB-Sulf accurate mass ion (m/z 182.9969), LOD and LOQ were 0.002 and 0.006 mg/L, and for the GHB-Gluc accurate mass ion (m/z 279.0722), they were 0.003 and 0.008 mg/L, respectively.

Extraction recoveries and matrix-related ionization effects

In plasma, ion enhancement was observed while checking matrix-related ionization effects of GHB-Gluc, whereas in urine, ion suppression was determined for GHB-Gluc and GHB-Sulf. Due to equally observed matrix effects of their internal standards, a significant influence on the results could be excluded. All results are shown in Table 1.

Precision and accuracy

For both compounds, the results for interday and intraday precision and for accuracy fulfilled the criteria of the

Table 1 Data for recoveries and matrix-related ionization effects with their relative standard deviation (RSD, %) of gamma-hydroxybutyric acid- β -*O*-glucuronide (GHB-Gluc) and gamma-hydroxybutyric acid-4-sulfate (GHB-Sulf) in plasma and urine

	Recovery (%)		Matrix effect (%)	
	Low	High	Low	High
GHB-Gluc in plasma (low 0.04 mg/L, high 0.4 mg/L)	57.3 (RSD 1.4 %)	51.7 (RSD 17.2 %)	174 (RSD 44.2 %)	163 (RSD 31.6 %)
Area ratio (GHB-Gluc/GHB-Gluc- <i>d</i> ₄) in plasma	108 (RSD 8.2 %)	102 (RSD 2.3 %)	93 (RSD 5.4 %)	98.4 (RSD 3.1 %)
GHB-Gluc in urine (low 2 mg/L, high 6 mg/L)	100	100	14 (RSD 5.8 %)	10 (RSD 0.3 %)
Area ratio (GHB-Gluc/GHB-Gluc- <i>d</i> ₄) in urine			109 (RSD 22.4 %)	92.7 (RSD 13.1 %)
GHB-Sulf in urine (low 0.4 mg/L, high 0.8 mg/L)	100	100	60.3 (RSD 19.5 %)	52.0 (RSD 21.1 %)
Area ratio (GHB-Sulf/GHB-Sulf- <i>d</i> ₆) in urine			75.1 (RSD 9.4 %)	78.3 (RSD 14.1 %)

Table 2 Precision and accuracy data for GHB-Gluc in plasma, and GHB-Sulf and GHB-Gluc in urine

	GHB-Gluc in plasma		GHB-Sulf in urine		GHB-Gluc in urine	
	Low QC 0.04 mg/L	High QC 0.4 mg/L	Low QC 0.04 mg/L	High QC 0.4 mg/L	Low QC 4 mg/L	High QC 8 mg/L
Mean (mg/L)	0.040	0.434	0.040	0.393	4.05	8.02
SD (mg/L)	0.003	0.028	0.004	0.045	0.4	0.55
RSD (%)	7.0	6.6	10.4	11.4	9.8	6.8
Accuracy						
Bias (%)	0.3	8.6	-0.7	-1.6	1.3	0.3
Interday precision						
RSD (%)	7.1	4.3	4.6	6.1	4.2	4.8
Intraday precision						
RSD (%)	5.6	6.7	10.7	11.7	10.1	7

QC quality control, SD standard deviation

“Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie” GTFCH guidelines in plasma and urine. The data obtained are shown in Table 2.

Stability

A 1-month stability study was carried out for both plasma and urine samples. GHB-Gluc concentrations were found to vary between 80 and 120 % of the initial value (Fig. 5), even at room temperature. Thus, GHB-Gluc showed high stability under different storage conditions in darkness for up to 4 weeks in spiked plasma and urine samples. In real plasma, stable specimen concentrations were observed within the 17 days studied.

GHB-Sulf showed poorer stability than GHB-Gluc under various storage conditions over the entire time period (Fig. 6). At room temperature, concentrations of GHB-Sulf decreased below 50 % after 10 days. The highest stability was observed at -20 °C, where stable concentrations of GHB-Sulf varied between 80 and 120 % of the initial value. At 4 °C, a difference in stability was observed between low and high concentration levels. Urine samples at a GHB-Sulf concentration of 0.4 mg/L showed a slight

decrease, whereas spiked urine samples at 0.8 mg/L and real urine specimens were stable over the studied period at 4 °C. On day 31, outliers were observed for samples stored at 4 °C and at -20 °C.

Discussion

In this work, we established a fully validated method for determining the GHB metabolites GHB-Gluc and GHB-Sulf in body fluids (plasma and urine), with a focus on stability under different temperature conditions for up to 4 weeks.

GHB is an endogenous neurotransmitter in the central nervous system, but it is also administered therapeutically to narcolepsy patients. In recent years, GHB has become a popular recreational drug, and is used as a so-called knock-out drug in DFSA. Due to the dose-dependent pharmacological effects of GHB, it is utilized in different ways. At low doses (up to 1.5 g), GHB induces euphoria and has anxiolytic effects. At higher doses (up to 2.5 g), GHB has been described as leading to heightening of mood, drive and sexual desire, while the intake of large amounts of GHB induces sudden deep sleep [1].

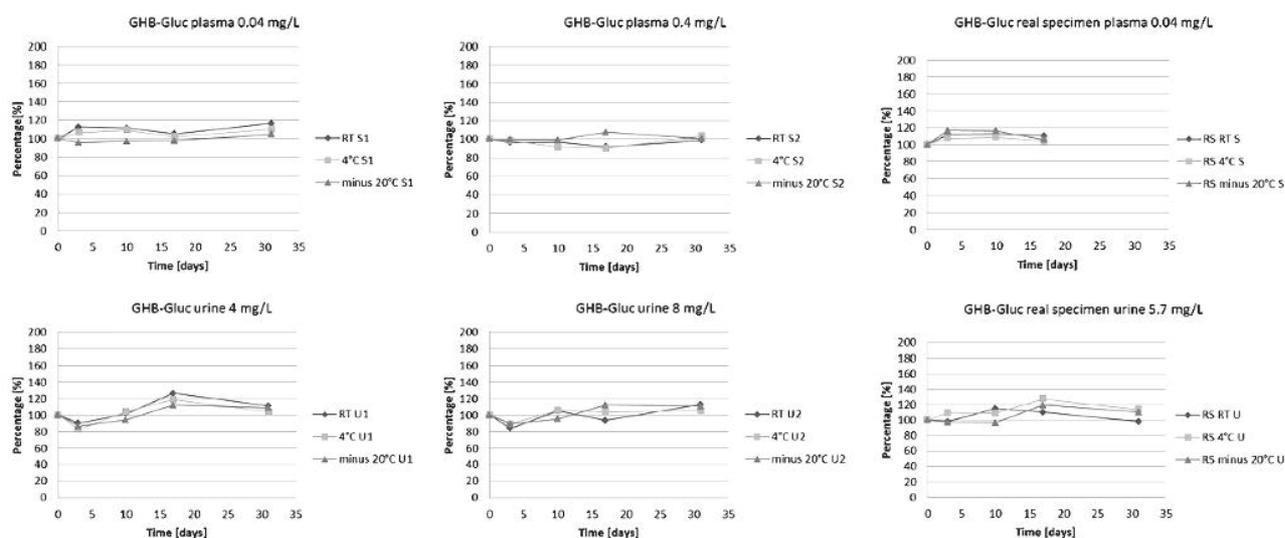


Fig. 5 Stability of GHB-Gluc at room temperature (RT), 4 and -20°C in urine and plasma samples. *RS* real specimen

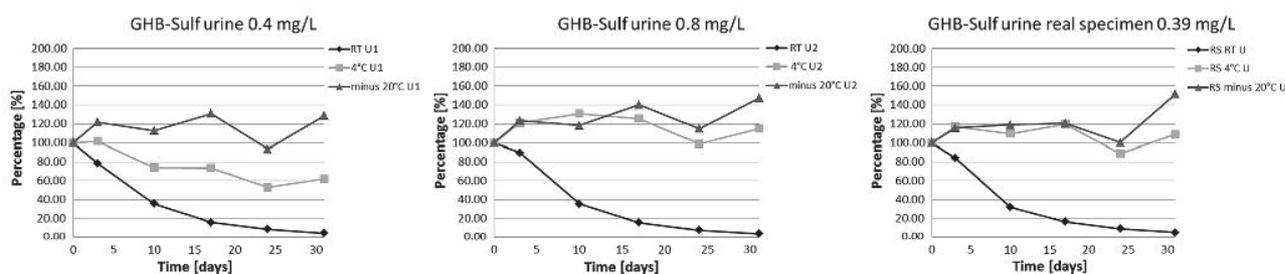


Fig. 6 Stability of GHB-Sulf at RT, 4 and -20°C in urine samples

However, the determination of exogenous GHB and uncovering DFSA remain problematic because of the short detection window in plasma (<6 h) and urine (<12 h) [3]. To address these issues, we investigated two phase II metabolites, GHB-Gluc and GHB-Sulf, with the aim of extending the window of detection for GHB after exogenous application. In general, glucuronidation and sulfonation occur during the phase II metabolic biotransformation in the endoplasmic reticulum of liver cells. Sulfonation occurs largely in the periportal region of the liver, whereas glucuronidation takes place in the centrilobular region [8]. The conjugation of GHB with glucuronic acid is catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase [9, 15], and sulfotransferases are responsible for sulfonation [16].

GHB isomers AHB (alpha-hydroxy butyric acid) and BHB (beta-hydroxy butyric acid) are likely to be glucuronidated to a much a lower extent (on the alcohol residue), because they are secondary alcohols, and as such, are poorer substrates for UDP-glucuronosyltransferase [17]. However, no experiments regarding the separation of these potential conjugates have been performed.

Additionally, both the carboxylic and the alcohol residue of GHB may be glucuronidated, and even the bis-glucuronidated species could be present. One of the reasons for synthesizing the metabolite glucuronidated at the alcohol residue rather than the glucuronidated version of the carboxylic residue of GHB is the lower stability of acyl-glucuronidated versions and propensity for acyl migration. Synthesis would lead to a mixture of up to four acyl-glucuronides.

Due to a longer duration of metabolic biotransformation, glucuronides and sulfates may be better analytical targets for detecting drug intake in forensic cases. Ethyl glucuronide in particular plays a major role as a marker for alcohol abuse, whereas sulfonated compounds are less common [18–20].

To date, no method has been reported for the simultaneous determination of GHB-Gluc and GHB-Sulf in plasma and urine samples. The best parameters for QTOF-MS were set by a tuning process. Method validation was carried out according to the guidelines of the GTFCH [13]. However, these guidelines are designed for methods performed by tandem mass spectrometry and not for QTOF-

MS, and some modifications were made. LOD and LOQ as well as linearity were assessed by accurate mass ion and not by target and qualifier ions via multiple reaction monitoring mode.

Petersen et al. [9] selected a linear concentration range of 0.1–10 mg/L for the determination of GHB-Gluc in urine. The initial measurements of samples from volunteers without GHB intake showed that the concentrations of GHB-Gluc in urine samples ranged from below 0.1 mg/L to higher than 10 mg/L (data not shown). To account for this, we extended our calibration range to 0.025–20 mg/L. The concentrations of GHB-Sulf for calibrators used for its determination were 0.01–1.0 mg/L. In plasma, GHB-Gluc was only detected at low concentrations, and calibrator solutions ranging from 0.01 to 0.5 mg/L were sufficient. GHB-Sulf was not detected in plasma.

Parameters linearity, LOD, LOQ, accuracy, interday and intraday precision, and matrix effects were assessed. Good results for linearity were obtained, with LOQs of 0.006 and 0.008 mg/L for GHB-Sulf and GHB-Gluc in urine, respectively. Petersen et al. [9] assessed the LOQ via signal-to-noise ratio and set the criterion at $S/N > 3$ for all six qualifying ions of the analyzed GHB-Gluc in urine. For their method, the LOQ was determined at 0.1 mg/L, and a value of 0.025 mg/L was validated for the LOD.

Recoveries and matrix-related ionization effects were also tested using the procedure published by Matuszewski et al. [14]. Recoveries showed results from 51.7 to 108 % for all compounds at low and high concentration levels in plasma and urine samples (criteria according to guidelines: recovery > 50 %). However, the results obtained during investigation of matrix effects were not good. As prescribed in forensic guidelines, peak areas were compared between post-extracted spiked samples and non-matrix-prepared spiked samples. High matrix effects of 174 and 164 % were observed for low and high GHB-Gluc concentrations in plasma, respectively, which demonstrated ion enhancement caused by co-eluting matrix compounds. In contrast, in urine, ion suppression was observed, with matrix effects of 14 and 10 % for GHB-Gluc and 60.3 and 52 % for GHB-Sulf at low and high concentrations, respectively (Table 1). High relative standard deviation (RSD) values suggest variations in matrix composition for each analyzed sample. In urine, the “dilute and shoot” sample preparation method did not appear to be effective for minimization of matrix compounds in the injected samples. However, the method was suitable for high-yielding sample preparation of polar substances, which constitutes a challenge. To circumvent these problems, we used the deuterated internal standards GHB-Sulf- d_6 and GHB-Gluc- d_4 , which co-eluted and compensated for the alteration in signal intensities. The effect was demonstrated

by recalculating matrix effects using area ratios of GHB-Gluc and GHB-Sulf to their respective deuterated internal standards (Table 1). Here, matrix effects fulfilled the criteria according to GTFCH guidelines (matrix effects: > 75 , < 125 %). The same observation was previously described by Petersen et al. [9].

Precision and accuracy were assessed by internal quality controls for low and high concentrations of GHB-Gluc and GHB-Sulf in plasma and urine. According to the guidelines of the GTFCH, the criteria for precision and accuracy were an RSD at < 15 or < 20 % near lower LOQ; and bias within ± 15 % of the accepted reference value, or within ± 20 % near lower LOQ. These criteria were satisfactorily met (Table 2). High standard deviations were measured in high QCs of GHB-Gluc in plasma and GHB-Sulf in urine samples. In addition, high level plasma samples showed a high bias, which reflects the accuracy value (Table 2). A possible explanation for the observation in GHB-Gluc in plasma could be multiplied ionization, leading to increased detection; however, we did not observe this phenomenon in urine samples.

Plasma and urine samples collected in forensic cases often cannot be analyzed directly after sampling, and thus assessing the stability of the metabolites during sample storage is essential. Petersen et al. [9, 12] previously reported a stability study for GHB-Gluc using a buffer system that simulated the normal pH range for urine (pH = 4.6–8) at 18–90 °C. The stability of GHB-Gluc was monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy, which showed that the GHB-Gluc was stable in both buffer systems over the entire temperature range [12]. Petersen et al. [12] also evaluated the stability of GHB-Gluc by autoclaving a 10 mg/L aqueous calibration standard under strong alkaline (3 M sodium hydroxide) and acidic (4 M hydrochloric acid) conditions for 15 min. GHB-Gluc was stable under basic conditions, but was completely degraded under acidic autoclaving conditions.

To date, however, the stability of these metabolites in plasma and urine samples has not been investigated. Thus, we evaluated the stability of GHB-Gluc under different temperature conditions in spiked plasma and urine samples and in real urine specimen for up to 4 weeks (Figs. 5, 6). The real plasma specimens at 0.04 mg/L of GHB-Gluc were only investigated for up to 17 days, due to insufficient sample amounts. Collectively, the experiments showed that GHB-Gluc remained completely stable for 31 days in spiked matrices and for at least 17 days in real urine and plasma specimens at a low concentration. However, decreased GHB-Sulf concentrations were observed at room temperature in spiked urine samples as well as in real specimens. For low GHB-Sulf concentration levels, extensive degradation was observed at room temperature, and some degradation was also observed over time at 4 °C.

However, when samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, good stability was observed for up to 1 month. These observations are in agreement with the general stability of sulfonated phase II metabolites [8].

Conclusions

We developed and validated a method for the determination of the GHB metabolites, GHB-Gluc and GHB-Sulf, in plasma and urine according to forensic guidelines, and all validation parameters were fulfilled. In addition, the stability of GHB-Gluc and GHB-Sulf in these matrices was investigated. GHB-Gluc displayed excellent stability in both spiked samples and real specimens. GHB-Sulf exhibited low stability at room temperature, somewhat better stability at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and good stability at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. To fully assess the potential of the phase II metabolites GHB-Gluc and GHB-Sulf in uncovering DFSA after GHB intake, further studies with excretion experiments after GHB intake and determination of reference population-based cut-offs are required, and will be reported in due course.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in this study involving human participants, who provide small amounts of blood and urine, were in accordance with the ethical standards of the institutional review board and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

References

- Madea B, Musshoff F (2009) Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection. *Dtsch Arztebl Int* 106:341–347
- Brenneisen R, Elsohly MA, Murphy TP, Passarelli J, Russmann S, Salamone SJ, Watson DE (2004) Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J Anal Toxicol* 28:625–630
- Abanades S, Farré M, Segura M, Pichini S, Pastor A, Pacifici R, Pellegrini M, de la Torre R (2007) Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Ther Drug Monit* 29:64–70
- LeBeau MA, Christenson RH, Levine B, Darwin WD, Huestis MA (2002) Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate. *J Anal Toxicol* 26:340–346
- Foti RS, Fisher MB (2005) Assessment of UDP-glucuronosyl-transferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* 153:109–116
- Schneider H, Glatt H (2004) Sulpho-conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulphotransferase forms in vitro. *Biochem J* 383:543–549
- Huxtable RJ (1986) *Biochemistry of sulfur*. Springer Science + Business Media, New York, pp 293–345
- Trontelj J (2012) Quantification of glucuronide metabolites in biological matrices by LC-MS/MS. In: Prasain JK (ed) *Tandem mass spectrometry—applications and principles*. InTech, Rijeka, pp 531–558. doi:10.5772/30923
- Petersen IN, Tortzen C, Kristensen JL, Pedersen DS, Breindahl T (2013) Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide. *J Anal Toxicol* 37:291–297
- Hanisch S, Stachel N, Skopp G (2016) A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid. *Int J Legal Med* 130:411–414
- Wang X, Linnet K, Johansen SS (2016) Development of a UPLC-MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicol* 34:51–60
- Petersen IN, Kristensen JL, Tortzen C, Breindahl T, Pedersen DS (2013) Synthesis and stability study of a new major metabolite of γ -hydroxybutyric acid. *Beilstein J Org Chem* 9:641–646
- Peters FT, Drummer OH, Musshoff F (2007) Validation of new methods. *Forensic Sci Int* 165:216–224
- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75:3019–3030
- King C, Rios G, Green M, Tephly T (2000) UDP-glucuronosyl-transferases. *Curr Drug Metab* 1:143–161
- James MO, Ambadapadi S (2013) Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics. *Drug Metab Rev* 45:401–414
- Jurowich S, Sticht G, Käferstein H (2004) Glucuronidation of aliphatic alcohols in human liver microsomes in vitro. *Alcohol* 32:187–194
- Hädener M, Weinmann W, Schürch S, König S (2016) Development of a rapid column-switching LC-MS/MS method for quantification of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in whole blood for assessing cannabis consumption frequency. *Anal Bioanal Chem* 408:1953–1962
- Martin R, Schürenkamp J, Pfeiffer H, Lehr M, Köhler H (2014) Synthesis, hydrolysis and stability of psilocin glucuronide. *Forensic Sci Int* 237:1–6
- Klingmann A, Skopp G, Pedal I, Pötsch L, Aderjan R (2000) Distribution of morphin and morphin glucuronides in body tissue and fluids—postmortem findings in brief survival. *Archiv für Kriminologie* 206:38–49

5.2 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode mittels HPLC-QToF-MS entwickelt und voll validiert, die die beiden GHB-Metabolite GHB-Gluc und GHB-Sulf quantitativ erfasst. Über eine Hypercarb Säule wurden die beiden Analyten mit Hilfe eines Lösemittel-Gradienten chromatographisch getrennt. Anschließend wurden die Analyten mittels Elektronenspray-Ionisation (ESI) ionisiert und schließlich im Tandem-Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) sortiert und detektiert.

Die Parameter Linearität, Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen, Wiederfindungsrate, Richtigkeit und Genauigkeit erfüllten die Kriterien der Validierungsrichtlinien. Es konnten gute Ergebnisse für die Linearität bis zu 20 mg/L (GHB-Gluc) und 1 mg/L (GHB-Sulf) mit LOQs von 0,006 mg/L für GHB-Sulf und 0,008 mg/L für GHB-Gluc bestimmt werden. Die Wiederfindungsrate lag für alle Verbindungen bei niedrigen und hohen Konzentrationen in Plasma- und Urinproben zwischen 51,7 und 108 %. Bei der Bewertung von Präzision und Genauigkeit wurden hohe Standardabweichungen für die internen Qualitätskontrollen mit hohen Konzentrationen für GHB-Gluc in Plasma und für GHB-Sulf in Urin beobachtet. Insbesondere bei Untersuchungen zur Genauigkeit konnte eine leichte Verschiebung der eigentlichen Werte der Qualitätskontrollen mit hohen GHB-Gluc Konzentration im Plasma festgestellt werden.

Bei der Durchführung der Prüfung auf Matrixeffekte konnte im Plasma ein „Ion-Enhancement“ (Signalsteigerung) und im Urin eine „Ionen-Suppression“ (Signalminderung) festgestellt werden. Dieser Effekt entsteht durch gleichzeitig eluierende Matrixkomponenten und konnte auch für den jeweils genutzten deuterierten Standard GHB-Gluc- d_4 und GHB-Sulf- d_6 gezeigt werden. Dadurch, dass die internen Standards gleichzeitig eluieren und denselben Matrixeffekten unterworfen sind, konnte die Methodik als voll validiert angesehen werden.

Die nachfolgenden Untersuchungen ergaben, dass der Metabolit GHB-Gluc sowohl in Plasma als auch in Urinproben quantifiziert werden konnte. GHB-Sulf konnte aufgrund mangelnder Sensitivität der Methode nur in Urinproben nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der Stabilität zeigten, dass GHB-Gluc sowohl in Plasma als auch in Urin bei Raumtemperatur, 4 °C und -20 °C über einen Zeitraum von 31 Tagen stabil war. GHB-Sulf zeigte innerhalb des beobachteten Zeitraums (31 Tage) eine gute Stabilität bei -20 °C. Durch

die Lagerung bei Raumtemperatur nahmen die Konzentrationen von GHB-Sulf stets ab und wurden nach 3 Tagen in Konzentrationen unter 80 % des Ausgangswertes bestimmt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine robuste validierte Methode zur Bestimmung der GHB-Metabolite GHB-Gluc und GHB-Sulf in Plasma und Urin entwickelt wurde. Die Konzentrationen der Metabolite blieben in gespikten Plasma- und Urinproben sowie in realen Proben über einen Zeitraum von 31 Tagen sehr stabil, wenn diese bei -20 °C gelagert wurden.

Weiterführende Untersuchungen sollten sich nun mit den endogenen Konzentrationen dieser Metabolite sowie mit den Konzentrationen nach GHB-Gabe in Blut und Urin beschäftigen, um eventuell geeignete Marker für den Nachweis einer GHB-Einnahme zu finden.

6 Konzentrationen von GHB und GHB- β -O-Glucuronid vor und nach GHB-Einnahme in Blut und Urin

6.1 Einleitung

GHB ist eine körpereigene Substanz. Daher kann nach einem positiven Nachweis in biologischen Matrices nicht automatisch von einer GHB-Exposition ausgegangen werden. Hierfür müssen Konzentrationen erreicht werden, die einen bestimmten Grenzwert (cut-off-Wert) überschreiten und somit oberhalb des endogen vorkommenden Konzentrationsbereichs liegen. Diese Grenzwerte wurden zum ersten Mal von Albert A. Elian nach der Vermessung von 240 Blut- und 670 Urinproben bestimmt. Wenn GHB einen Wert von 5 mg/L im Blut und 10 mg/L im Urin überschreitet, könne von einer exogenen Gabe ausgegangen werden [94]. Andresen et al. überprüften diese Grenzwerte in jeweils 50 Blut- und Urinproben und empfahlen die Grenzwerte auf 4 mg/L in Blut und 6 mg/L in Urin zu senken [91].

Doch nicht nur die Festlegung eines geeigneten Grenzwertes stellt sich als schwierig dar, sondern auch die rechtzeitige Sammlung der Proben innerhalb des Nachweisfensters. Aufgrund der schnellen Elimination von GHB sind erhöhte Konzentrationen im Blut dosisabhängig maximal bis zu 6 h und im Urin maximal bis zu 12 h nachweisbar [22,63]. Nach der Identifizierung des GHB-Metaboliten GHB-Gluc im Jahre 2013 [76] eröffnete sich eine neue Möglichkeit, um evtl. das Nachweisfenster nach einer GHB-Gabe zu vergrößern. Während der zweiten Phase der Biotransformation wird GHB mit Hilfe des Enzyms UDP-Glucuronyltransferase mit der Glucuronsäure konjugiert. Durch die Dauer der Umsetzung der Substanz verweilt der Metabolit länger im Körper, was zu einer verlängerten Nachweisbarkeit führen könnte. Dies konnte schon für die Ethanol-Metabolite Ethylglucuronid und Ethylsulfat bewiesen werden [146]. Um geeignete Grenzwerte festzulegen, sollte die Umsetzung außerdem zu einer zeitabhängig Konzentrationssteigerung führen.

Für die Untersuchung dieser Theorie wurden Ausscheidungsversuche mit Patienten durchgeführt, die erstmalig oder regelmäßig das Medikament Xyrem® einnahmen, welches zur Therapie der Narkolepsie eingesetzt wird [9,11,147]. Drei Patienten hatten sich zur Verfügung gestellt, von denen zwei das Medikament chronisch einnahmen und einer die

Therapie mit Xyrem® startete. Es wurden Blut- und Urinproben dieser Patienten nach einem bestimmten Zeitplan gesammelt und die Konzentrationen von GHB und GHB-Gluc jeweils via LC-MS/MS und LC-QTOF-MS bestimmt. Anschließend wurde ein pharmakokinetisches Profil der untersuchten Substanzen erstellt.

Zum Vergleich der erhaltenen Ergebnisse und für die Diskussion der Festlegung möglicher Grenzwerte wurden zusätzlich Blut- und Urinproben von insgesamt 49 Freiwilligen gesammelt. Auch von diesen wurden die GHB und GHB-Gluc Konzentrationen in Blut und Urin bestimmt. Die Probanden bestätigten, dass sie eine vorherige Einnahme von GHB ausschließen konnten. Die Ergebnisse dieser Studie sind in der Arbeit *GHB-O- β -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake* in *Forensic Toxicology* veröffentlicht worden.

GHB-*O*- β -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake

Lena-Maria Mehling¹ · Thomas Piper² · Annika Spottke³ · Anna Heidbreder⁴ · Peter Young⁴ · Burkhard Madea¹ · Mario Thevis² · Cornelius Hess¹

Received: 23 November 2016 / Accepted: 20 December 2016
© Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer Japan 2017

Abstract Because of its small detection window, uncovering drug-facilitated crime after gamma-hydroxybutyric acid (GHB) intake remains a problem. The aim of this experiment was to determine endogenous concentrations of GHB and GHB-*O*- β -glucuronide (GHB-Gluc) in plasma and urine samples and to compare them with concentrations after GHB intake in humans. Plasma and urine samples of volunteers ($n = 50$) who had never taken GHB during their lifetime (control group) were collected, and endogenous concentrations of GHB and GHB-Gluc were determined. In addition, plasma and urine samples of patients ($n = 3$) therapeutically taking sodium oxybate (GHB-sodium salt) were collected prior to and at different time points after the intake. GHB was determined via a liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry system operated in multiple reaction monitoring mode. GHB-Gluc was detected by

LC–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. In plasma and urine samples of the control group ($n = 50$), endogenous concentrations of GHB-Gluc ranged from 0.011 to 0.067 mg/L and from 0.16 to 7.1 mg/L, respectively, while unconjugated GHB concentrations were less than 2 mg/L in both matrices. In contrast, after sodium oxybate administration, GHB concentrations increased markedly, and fell to below the commonly used cutoff value (plasma 4 mg/L and urine 10 mg/L) after 6–8 h in all patients. GHB-Gluc concentrations showed no significant time-dependent increase in plasma samples. In urine, GHB-Gluc concentrations increased after GHB intake, but were generally not higher than the endogenous concentrations of the control group. Therefore, it can be concluded that GHB-Gluc concentrations are not a suitable marker for extending the detection window after GHB intake.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11419-016-0352-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Lena-Maria Mehling
lena-maria.mehling@ukb.uni-bonn.de

✉ Cornelius Hess
cohess@uni-bonn.de

- ¹ Institute of Forensic Medicine, University Hospital, University of Bonn, Stiftsplatz 12, 53111 Bonn, Germany
- ² Center for Preventive Doping Research, Institute of Biochemistry, German Sport University Cologne, Cologne, Germany
- ³ Department of Neurology, University Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany
- ⁴ Division of Sleep Medicine and Neuromuscular Disorders, Department of Neurology, University Hospital, University of Münster, Münster, Germany

Keywords Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) · GHB- β -*O*-glucuronide · Excretion study · Endogenous concentrations · Utility of GHB- β -*O*-glucuronide · Detection window

Introduction

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a central nervous system depressant which is generated endogenously, originating from the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) via the enzymes GABA-transaminase and succinic semialdehyde reductase [1–3]. Apart from its natural occurrence, GHB was used as an anesthetic in the early 1960s, but its medical application today is largely limited to treatment of narcolepsy [4, 5]. In general, the therapeutic dose in narcolepsy treatment ranges from 4.5 to 9 g per day [6]. In the early 1990s, exogenous GHB was

occasionally taken as a doping substance and a recreational drug [7–10]. Because of its rapid pharmacological effects within 30 min, depending on the ingested dose, and its rapid metabolism, it emerged as a so-called knockout-drug for drug-facilitated crimes (DFCs) [11, 12]. The different uses of GHB as a knockout and recreational drug on one hand and therapeutic medication on the other can be explained by its dose-dependent pharmacological effects. In low amounts of up to 1.5 g, GHB induces euphoria and has an anxiolytic effect, increasing social interaction. At higher doses of up to 2.5 g, GHB has been described as leading to heightened mood, drive and sexual desire, while the intake of large amounts of GHB induces sudden deep sleep [11].

These pharmacological effects are mediated by agonism of the GABA_B receptor, where GHB induces a depressant effect in the central nervous system [2, 13]. Although the exact pharmacological mechanism is not known, low- and high-affinity binding sites for GHB have been described [1]. High-affinity binding sites such as certain GABA_A and GHB receptors are activated by a GHB concentration in the nanomolar range, such as endogenous amounts, and can be found post- and presynaptic in the central nervous system. Exogenous concentrations of GHB, which are usually in the millimolar range, bind to low-affinity binding sites, which are also located at pre- and post-synaptic neuronal membranes and mediate the major pharmacological effects by GABA_B receptors [13].

Uncovering DFCs related to GHB has been difficult, because DFC victims commonly report anterograde amnesia induced by GHB consumption. Furthermore, detection of exogenous GHB remains challenging due to its very narrow detection window in plasma (<6 h) and urine (<12 h) [14], depending on the ingested dose as well as on the large inter- and intra-individual variations in endogenous concentrations [11, 15]. Commonly used cutoff values in antemortem samples are 4 mg/L for plasma and 10 mg/L for urine, which are supported and recommended by several references [16–18].

To date, several excretion experiments after GHB intake have been published. Single oral doses or increasing doses of GHB were administered to groups of volunteers in order to obtain plasma and urine profiles after GHB intake [12, 19, 20]. Brenneisen et al. [12] performed excretion experiments with eight healthy volunteers ingesting a single oral dose of 25 mg/kg GHB to obtain plasma, urine and oral fluid profiles for GHB. Abanedes et al. [19] designed a double-blind, randomized crossover and controlled study, where increasing doses of sodium oxybate were given to eight volunteers, and pharmacological effects depending on different administered doses were described. In a studied time period, Haller et al. [20] determined GHB concentrations in urine samples of 16 volunteers taking a single

dose of 50 mg/kg GHB alone and combined with ethanol, and showed that co-ingestion did not significantly influence renal clearance of GHB.

The GHB metabolite GHB- β -*O*-glucuronide (GHB-Gluc) in urine samples was recently described by Petersen et al. [21]. Wang et al. [22] also found GHB-Gluc concentrations in hair samples of individuals with and without GHB abuse. A recently published paper described a method for determining GHB-Gluc and GHB-4-sulfate in plasma and urine samples [23]. It is presumed that the metabolite GHB-Gluc is generated from GHB through conjugation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase during its phase II metabolism. Due to the elongated excretion through metabolic pathways, the detection window for generated phase II metabolites may be extended compared to that for GHB, and might improve the ability to uncover DFCs after GHB intake.

The aim of the present study was to determine GHB and GHB-Gluc concentrations in plasma and urine samples of humans after GHB intake and to compare them with endogenous concentrations in volunteers without GHB exposure. Further documented parameters such as sex, age, body mass index (BMI), disease, co-medication, alcohol abstinence and preexisting conditions were also included in the interpretation of the results.

Materials and methods

Chemicals

GHB and GHB-*d*₆ were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and GHB-Gluc from Resea-Chem GmbH (Burgdorf, Switzerland). The internal standard GHB-Gluc-*d*₄ was received from the group of Petersen et al. [24]. Acetonitrile and formic acid (98%) were purchased from Honeywell Specialty Chemicals (Seelze, Germany) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively, and ammonium acetate and urea were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals were of the highest analytical grade. Water was purified by an arium[®] pro UV Ultrapure Water System from Sartorius (Göttingen, Germany). Xyrem[®] was purchased from UCB Pharma GmbH (Monheim, Germany) and Somsanit[®] from Dr. Franz Köhler Chemie GmbH (Alsbach-Hähnlein, Germany).

Stock and working solutions

Stock solutions of GHB and GHB-Gluc, as well as working standards used for calibration and each internal standard, were prepared with methanol and purified water, respectively. Internal quality controls were prepared by spiking

each reference standard into plasma and urine samples in which measurements of endogenous concentrations had been determined beforehand, and were subtracted afterwards. The internal standard working solutions had concentrations of 100 mg/L for GHB-*d*₆ and 10 mg/L for GHB-Gluc-*d*₄, respectively.

GHB analysis

Collected whole blood samples were centrifuged for 10 min at 5600 *g* to obtain plasma. Before analysis, biological specimens (plasma and urine) were frozen in aliquots at -20 °C. GHB in plasma and urine was analyzed by a previously published method [25]. For the extraction of GHB from plasma and urine, a protein precipitation with acetonitrile was used. A 100-μL volume of the plasma or urine was fortified with the internal standard GHB-*d*₆ (10 μL, concentration 100 mg/L), and 200 μL acetonitrile was added to each sample. After mixing and centrifugation at 13,250 *g* for 10 min, the supernatant was transferred into a micro-vial, and 5 μL was injected into the liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) system consisting of a Shimadzu LC series (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled with an AB Sciex API 4000 QTrap (AB Sciex, Framingham, MA, USA) operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode using an electrospray ionisation (ESI) source. Chromatographic separation was achieved using a HILIC column (E125/2, 125 mm × 2 mm i.d., particle size 3 μm; Macherey–Nagel, Düren, Germany). An isocratic elution of 80% pure acetonitrile and 20% purified water [high-performance liquid chromatography (HPLC) grade] with a salt content of 5 mM ammonium acetate was conducted. Full run time was 15 min. The following MRM transitions were used for the detection of GHB: target transition *m/z* 103 → 57; qualifier transition *m/z* 103 → 85, and for its internal standard target transition *m/z* 109 → 61 and its qualifier transition *m/z* 109 → 90. The collected data was analyzed with the Analyst® software (Version 1.6.2, AB Sciex, Darmstadt, Germany).

The linear range was established between 2 and 50 mg/L. The limit of detection (LOD) was 0.11 mg/L and the limit of quantification (LOQ) was 0.34 mg/L. Quality controls were measured at low (5 mg/L) and high concentrations (25 mg/L) in plasma and urine. For GHB in plasma, intraday precision was 3.4% at 5 mg/L and 1.6% at 25 mg/L; interday precision was 7.3% at 5 mg/L and 4.9% at 25 mg/L (each *n* = 2 at eight consecutive days). Matrix effects were calculated to be 103 and 109% for low (5 mg/L) and high (25 mg/L) concentrations, respectively. For GHB in urine, intraday precision was 2.2% at 5 mg/L and 3.3% at 25 mg/L; interday precision was 7.3% at 5 mg/L and 7.9% at 25

mg/L (each *n* = 2 at eight consecutive days). Matrix effects were determined to be 56.2 and 64.9% for low (5 mg/L) and high concentration levels (25 mg/L), respectively.

GHB-Gluc analysis

GHB-Gluc was analyzed using our previously published method [23]. For the extraction of GHB-Gluc from plasma, 10 μL of the internal standard working solution (GHB-Gluc-*d*₄ concentration 10 mg/L) and 200 μL of acetonitrile were added to each 100 μL of a plasma sample. The samples were mixed for 30 s and were centrifuged for 10 min at 13,250 *g*. Then, 200 μL of the supernatant was transferred to a new Eppendorf tube and evaporated for 20 min at 45 °C in an Eppendorf concentrator. Concentrated samples were diluted with 100 μL of 0.1% formic acid and transferred into a vial. For urine, a 100 μL-aliquot was mixed with 30 μL of the internal standard working solution, vortexed and injected into the HPLC-system directly.

Analyses were performed on an Agilent 1290 Infinity HPLC connected to an Agilent G6550A accurate-mass quadrupole time of flight-mass spectrometry (QTOF-MS) instrument with an electrospray ion source (DUAL AJS ESI) in the negative mode (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Ions were detected by accurate mass analyses using the following data: GHB-Gluc: *m/z* 279.0722; GHB-Gluc-*d*₄: *m/z* 283.0973.

Chromatographic separation was achieved using a Hypercarb column (50 × 1 mm i.d.) with a particle size of 3 μm (Thermo Scientific, Dreieich, Germany). The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B). A flow rate of 0.15 mL/min was used, along with the following gradient program: 30% solvent B for 5 min; then switching to 98% B and holding 98% B for 4 min. A post-run equilibration at starting conditions (duration 4 min) was conducted. The injection volume was 5 μL. The collected data were analyzed with MassHunter software (version B.06.00, Agilent Technologies).

The LOD and LOQ were 0.003 and 0.008 mg/L, respectively, for GHB-Gluc, and linearity up to 0.5 and 20 mg/L was confirmed in plasma and urine, respectively. For GHB-Gluc in plasma, intraday precisions were 5.6% at 0.04 mg/L and 6.7% at 0.4 mg/L; interday precisions were 7.1% at 0.04 mg/L and 4.3% at 0.4 mg/L (each *n* = 2 on eight different days). When determining matrix effects for plasma, an ion enhancement was observed with values of 174 and 164% for low (0.04 mg/L) and high (0.4 mg/L) concentration levels, respectively. For GHB-Gluc in urine, intraday precisions were 10.1% at 4 mg/L and 7% at 8 mg/L; interday precisions were 4.2% at 4 mg/L and 4.8%

at 8 mg/L (each $n = 2$ on eight different days). In urine, ion suppression was observed; matrix effects of 14 and 10% were found for low and high concentrations (4 and 8 mg/L), respectively. The deuterated standard was able to compensate for these matrix effect problems.

Creatinine in urine samples was determined on an Olympus AU 400 system (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) with linearity range of 1–300 mg/dL.

Excretion study design

The excretion study design was approved by the regional ethics committee of the University Hospital of Bonn according to the Declaration of Helsinki (number 370/13). The volunteers were informed about the risks of the study and gave their written informed consent. Biological specimens were collected from volunteers with (case group, $n = 3$) and without (control group, $n = 50$) GHB intake. Test persons 1 (P1) and 2 (P2) of the case group were therapeutically received the medication Xyrem® containing the pharmaceutical sodium oxybate, the sodium salt of GHB before this trial. Test person 3 (P3) took a sodium oxybate solution (Somsanit®) as therapy for the first time.

Control group

Plasma and urine samples were collected from volunteers ($n = 50$) who had never taken GHB in their lifetime, and were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The demographic data [sex, age, body mass index (BMI)] were collected as well as chronic diseases, alcohol abstinence, co-medication and preexisting conditions. BMI values were classified into four groups according to the BMI classification of the World Health Organization (WHO): underweight (<18.5), normal range (18.5–25); overweight (25–30), and obese (>30). All volunteers stopped alcohol consumption 20 h before sampling. The blood sample of volunteer N6 and urine sample of person N32 were not available. No significant difference was found between the control group and the three cases in age ($p > 0.05$) or BMI ($p > 0.05$), using the Mann–Whitney U test. Table 1 in the supplementary material shows data for the control group.

Case group

Participants were patients suffering from narcolepsy ($n = 3$). The first two volunteers had been taking the pharmaceutical Xyrem® daily for more than 5 years. Test persons 1 and 2 stopped taking the medication 3 days and 18 h before the experiment started, respectively. For the excretion study, P1 and P2 took Xyrem® at a dose of 2.25 g. Subsequently, whole blood and urine samples were collected just prior to the administration and at 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and

72 h after the administration, and were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. For urine samples of P1 and P2, the time points at 0.5, 1 and 1.5 h were omitted, because sample collection was not possible due to unconsciousness. After 2 h, regular sample collection was resumed according to the above schedule.

Test person 3, diagnosed with narcolepsy, was drug-free before participating in the trial. Plasma and urine samples of P3 were collected after a single-dose administration of 2.42 g sodium oxybate solution (volume 10 mL) according to the protocol described above. Sample collection for P3 finished 24 h after GHB exposure. Table 1 summarizes the information collected regarding the narcolepsy patients.

Statistical analysis

Results were statistically evaluated with IBM SPSS® statistical software (version 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Statistical significance was assumed when $p < 0.05$.

Results

We investigated GHB and GHB-Gluc concentrations in plasma and urine samples of 50 control subjects and compared these results with plasma and urine samples of three patients taking GHB for the indication of narcolepsy.

Endogenous concentrations

For all samples of the control group, GHB plasma and urine concentrations were determined to be lower than the first linear calibrator of the validated method ($<2\text{ mg/L}$; Table 2).

Endogenous concentrations of GHB-Gluc in plasma samples of the control group were found in a range from 0.011 to 0.067 mg/L. After excluding the outliers, maximum plasma concentration was determined to be 0.045 mg/L. The results are displayed in Table 2. The median was 0.021 mg/L and the arithmetic average was 0.024 mg/L. The Shapiro–Wilk normality test showed no normal distribution for GHB-Gluc in plasma ($W = 0.8443$, $p = 1.294\text{e}-05$).

In urine, GHB-Gluc concentrations for the control group were found to be between 0.16 and 7.1 mg/L by LC-QTOF-MS (Table 2), with the concentration of 7.1 mg/L determined as outlier. Therefore, the maximum GHB-Gluc concentration was 5.09 mg/L. The median was 2.01 mg/L and the arithmetic average was 2.24 mg/L. No normal distribution for GHB-Gluc concentrations was found by the Shapiro–Wilk normality test ($W = 0.9347$, $p = 0.009267$).

Results of the GHB-Gluc concentrations of the 50 volunteers (control group) were evaluated statistically in plasma and urine. We tested whether the demographic data

Table 1 Information about the narcolepsy patients participating in this study

Information	Test person 1	Test person 2	Test person 3
Sex	Female	Female	Male
Age (years)	36	18	47
BMI	22.1	24.9	26.3
Dose of sodium oxybate taken	2.25 g	2.25 g	2.42 g
Additional medication	Venlafaxine (37.5 mg/day); NuvaRing® (etonogestrel/ethinyl estradiol)	Modafinil (100 mg four times per day)	None
Duration of abstinence from Xyrem®	3 days before the start	18 h before the start	None
History of taking Xyrem®	Since 2006; daily (3.5 and 3.5 g)	Since 2010; daily (3.25 and 3.75 g)	None

BMI body mass index

(sex, age, BMI), alcohol abstinence, co-medication and preexisting conditions had an influence on endogenous GHB-Gluc concentrations in plasma and urine of the control group using the Mann–Whitney *U* test, assuming non-Gaussian distribution. In plasma, no significant differences in GHB-Gluc concentrations were shown for the documented data. Statistically significant differences ($p < 0.05$) in GHB-Gluc concentration were observed within the control group for the parameters sex ($p = 0.043$) and BMI ($p = 0.049$) in urine samples. The other parameters were unremarkable in this group. No Pearson correlation was observed for age or BMI value versus GHB-Gluc concentration in urine of the control group.

Concentrations after GHB intake

For the three positive cases, an excretion diagram was built by plotting GHB concentrations in the collected samples against time after GHB administration for plasma and urine (Figs. 1, 2). The maximum GHB concentrations were found at the early collected time-points in plasma and urine. For test person 1 (P1), the maximum plasma concentration was 73.1 mg/L after 0.5 h; in urine, the highest concentration was measured after 2 h (254 mg/L). For test person 2 (P2), the maximum plasma concentration was 64 mg/L, and the highest GHB concentration in urine was 34 mg/L. Test person 3 (P3) showed maximum concentrations of 47 and 118 mg/L in plasma and urine, respectively. GHB plasma concentrations subsequently decreased in all patients and fell below the commonly used cutoff value of 4 h after ingestion (Fig. 1). In urine, GHB concentrations were measured below the cutoff value of 10 mg/L after 6 h in P1 and P3 and after 8 h in P2 (Fig. 2).

Figure 3 displays the GHB-Gluc concentration–time profiles for plasma of the three test persons (P1–3). In the background, lines were drawn to depict the range of

determined endogenous plasma GHB-Gluc concentrations of the control group. In general, GHB-Gluc concentrations showed no time-dependent increase after GHB intake (Fig. 3). GHB-Gluc concentrations of P2 and P3 were in the same range as that of the control group. P1 showed higher GHB-Gluc concentrations in plasma, which were above the maximum of the 49 volunteers of the control group. The GHB-Gluc concentration of P1 even before GHB administration was above the maximum level of the control group.

Figure 4 shows the GHB-Gluc concentrations of the case group (P1–3) and the ranges of endogenous GHB-Gluc concentrations without GHB intake in urine samples in the background. Urinary GHB-Gluc concentrations normalized by creatinine concentrations are also depicted. For P1, GHB-Gluc concentrations were found to be above the maximum concentration of the control group (5.09 mg/L). The measured concentrations of P2 and P3 were almost within the endogenous concentration range in urine samples. Before GHB ingestion, GHB-Gluc concentrations of 11.56, 3.12 and 1.34 mg/L were found for P1, P2 and P3, respectively. After GHB intake, GHB-Gluc concentrations increased in all test persons, but the elevated levels were almost within the studied range of the control group without GHB exposure. Maximum GHB-Gluc concentrations were found after 6 h (P1, P3) and 8 h (P2). After normalization with creatinine concentrations, the values for GHB-Gluc of P1 were above the third quartile but largely below the maximum endogenous concentration in the control group. An increase in GHB-Gluc values in urine was also observed in P1 and P3 when normalized by creatinine concentrations, contrary to P2, where no increase was observed when normalized by creatinine. Due to relatively large volumes of water consumed after taking the drug, the urine samples of P2 at the time points 2 and 4 h were highly diluted. Therefore, lower

Table 2 Endogenous levels of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and GHB-*O*- β -glucuronide (GHB-Gluc) in plasma and urine samples of 50 volunteers

Volunteer number	Plasma		Urine				
	GHB (mg/L)	GHB-Gluc (mg/L)	GHB (mg/L)	GHB-Gluc (mg/L)	GHB-Gluc (μ mol/L)	Creatinine (mmol/L)	GHB-Gluc/creatinine (μ mol/mmol)
N1	<2	0.013	<2	3.27	11.7	39.5	0.30
N2	<2	0.020	<2	3.67	13.1	22.4	0.58
N3	<2	0.042	<2	0.63	2.24	2.41	0.93
N4	<2	0.016	<2	1.40	5.00	13.8	0.36
N5	<2	0.028	<2	2.57	9.16	8.27	1.11
N6	NSC	–	<2	0.83	2.97	8.04	0.37
N7	<2	0.021	<2	2.51	8.96	18.2	0.49
N8	<2	0.017	<2	2.04	7.29	11.7	0.62
N9	<2	0.032	<2	0.71	2.55	2.55	1.00
N10	<2	0.019	<2	1.17	4.18	8.27	0.51
N11	<2	0.034	<2	2.14	7.62	14.7	0.52
N12	<2	0.024	<2	4.36	15.6	22.9	0.68
N13	<2	0.011	<2	2.01	7.16	21.1	0.34
N14	<2	0.045	<2	2.88	10.3	6.05	1.70
N15	<2	0.019	<2	2.85	10.2	15.8	0.64
N16	<2	<LOQ	<2	3.22	11.5	8.79	1.31
N17	<2	0.035	<2	1.69	6.03	17.2	0.35
N18	<2	0.013	<2	1.33	4.73	19.8	0.24
N19	<2	0.017	<2	3.17	11.3	35.0	0.32
N20	<2	0.025	<2	4.76	17.0	12.3	1.38
N21	<2	0.016	<2	0.70	2.51	4.11	0.61
N22	<2	0.015	<2	0.57	2.02	4.57	0.44
N23	<2	0.028	<2	1.59	5.66	4.90	1.15
N24	<2	0.030	<2	7.10	25.3	28.6	0.89
N25	<2	0.020	<2	0.99	3.54	6.14	0.58
N26	<2	0.017	<2	3.64	13.0	19.8	0.66
N27	<2	0.020	<2	2.26	8.07	11.5	0.70
N29	<2	0.014	<2	0.16	0.58	3.04	0.19
N30	<2	0.060	<2	3.19	11.4	11.8	0.97
N31	<2	0.014	<2	1.12	3.99	7.73	0.52
N32	<2	0.027	<2	NSC	–	–	–
N33	<2	0.024	<2	2.43	8.69	9.28	0.94
N34	<2	0.018	<2	1.78	6.35	9.90	0.64
N35	<2	0.021	<2	0.86	3.07	4.90	0.63
N36	<2	0.046	<2	3.73	13.3	9.41	1.41
N37	<2	0.030	<2	4.04	14.4	18.4	0.78
N38	<2	0.016	<2	2.88	10.3	14.7	0.70
N39	<2	0.028	<2	1.98	7.07	11.4	0.62
N40	<2	0.029	<2	1.54	5.50	6.69	0.82
N41	<2	0.015	<2	0.70	2.50	5.53	0.45
N42	<2	0.019	<2	5.09	18.2	25.2	0.72
N43	<2	0.018	<2	1.14	4.07	9.79	0.42
N44	<2	0.016	<2	0.46	1.64	3.50	0.47
N45	<2	0.013	<2	<LOQ	–	3.50	Not determined
N46	<2	0.015	<2	<LOQ	–	2.44	Not determined

Table 2 continued

Volunteer number	Plasma		Urine				
	GHB (mg/L)	GHB-Gluc (mg/L)	GHB (mg/L)	GHB-Gluc (mg/L)	GHB-Gluc ($\mu\text{mol/L}$)	Creatinine (mmol/L)	GHB-Gluc/creatinine ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
N47	<2	0.012	<2	<LOQ	–	3.02	Not determined
N48	<2	0.031	<2	1.37	4.89	5.61	0.87
N49	<2	0.035	<2	1.49	5.32	5.76	0.92
N50	<2	0.025	<2	<LOQ	–	1.45	Not determined
N51	<2	0.067	<2	2.89	10.3	5.86	1.76
Mean	–	0.024	–	2.24	–	11.6	0.73
Range	–	0.011–0.067	–	0.16–7.10	–	1.45–39.5	0.19–1.76
SD	–	0.01	–	1.42	–	8.52	0.36
Median	–	0.02	–	2.01	–	9.28	0.64

The “N28” was excluded due to less sample amounts

NSC no sample collected, LOQ limit of quantification

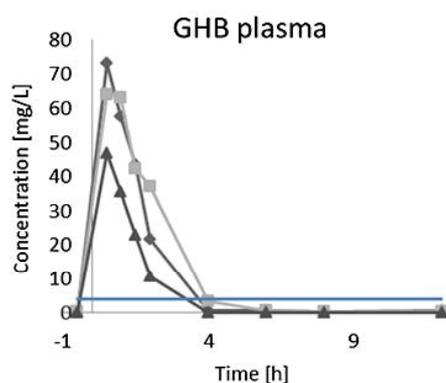
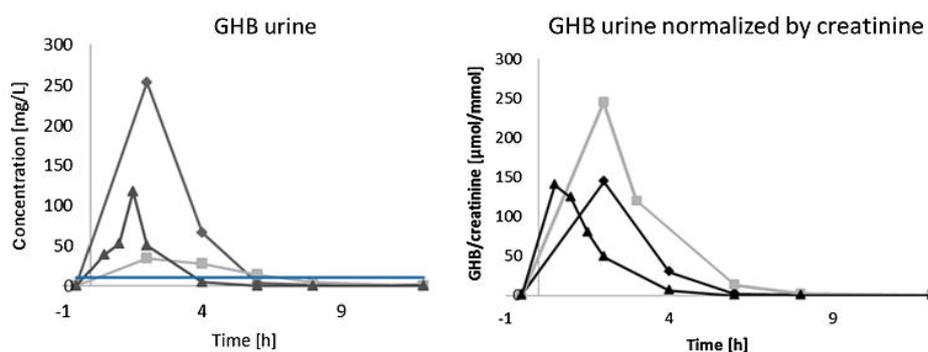


Fig. 1 Plasma gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations for the three test persons after the ingestion of sodium oxybate plotted against collected time points. The blue line marks the commonly used cutoff values in plasma (<4 mg/L). P1 first test person (filled diamond), P2 second test person (filled square), P3 third test person (filled triangle) (color figure online)

Fig. 2 Urine GHB concentrations of the three test persons after the ingestion of sodium oxybate with (right) and without (left) normalization by creatinine plotted against collected time points. The blue line marks the commonly used cutoff values in urine (<10 mg/L). The plot shapes are specified in Fig. 1 (color figure online)



GHB, GHB-Gluc and creatinine concentrations were found in these urine samples.

Discussion

In this study we determined GHB and GHB-Gluc concentrations in plasma and urine samples with and without GHB intake. No significant time-dependent increase in GHB-Gluc concentration was observed in plasma or urine after GHB exposure (Figs. 3, 4).

GHB is an endogenous fatty acid containing four carbon atoms, with neurophysiological properties, and is widely distributed in mammalian tissues, including the human brain, but it is also administered therapeutically to narcolepsy patients. At a pharmacological dosage, it has a depressant effect predominantly on the central nervous system [26]. In 1970, sodium oxybate was administered for

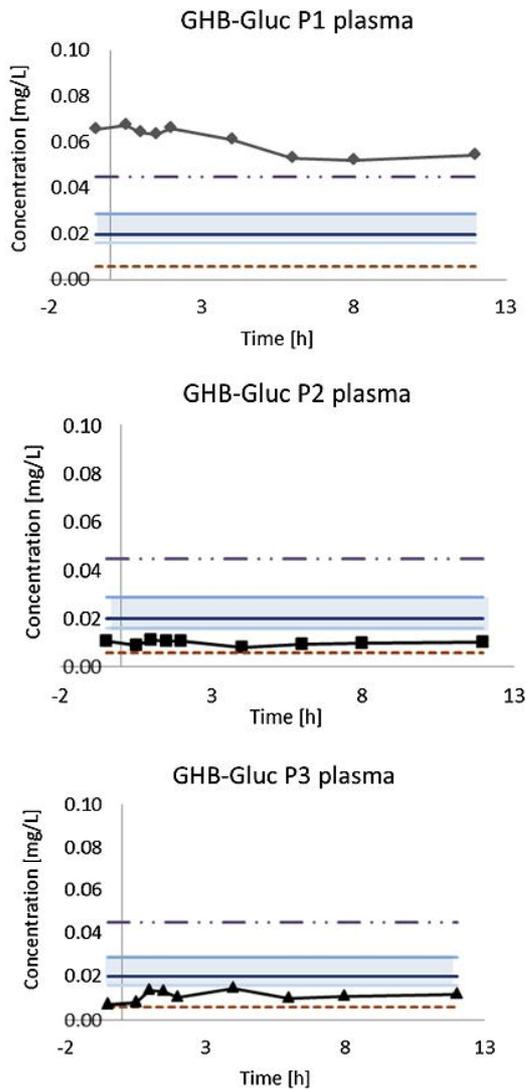


Fig. 3 Gamma-hydroxybutyric acid-*O*- β -glucuronide (GHB-Gluc) concentrations in plasma samples of the three test persons compared to endogenous plasma concentrations of the control group. The blue area shows the endogenous concentrations between the first and third quartile [$Q1$ = first quartile (light blue line); $Q3$ = third quartile (light blue thick line)] of the control group. Below and above the blue area, lines for minimum (broken line) and maximum (solid dotted line) of the endogenous plasma concentrations are drawn and also the median (dark blue line) is displayed as a dark blue line in the middle of the diagram; the P1–P3 is explained in Fig. 1 (color figure online)

the first time orally as a treatment for narcolepsy to normalize the fragment sleep architecture characteristic of narcoleptic patients [27, 28]. The therapeutic dose in treatment of narcolepsy ranges from 4.5 to 9 g per day [6]. In general, therapy with sodium oxybate starts with a first-time application dosage of 2.25 g given two times per night (at bedtime and 4 h later). Depending on the treatment process, the following doses will be adjusted as needed for

the desired effect. For our excretion experiment, the patients of the case group took 2.25–2.42 g sodium oxybate, which corresponds to approximately 2 g GHB. Considering that GHB leads to unconsciousness at doses of 3–4 g, it can be assumed that the given doses in DFCs are higher than the amount taken in this experiment, which constitutes a limitation of this excretion study [11].

Determination of exogenous GHB and uncovering DFCs remain problematic because of the short detection window in plasma (<6 h) and urine (<12 h) [3]. Commonly used cutoff values in antemortem samples (4 mg/L for plasma and 10 mg/L for urine) are supported and recommended by several references. Andresen et al. [16] found endogenous GHB concentrations in 50 plasma and urine samples in a range of 0.62–3.2 and 0.64–4.20 mg/L, respectively. Elliot et al. [17] measured 119 urine specimens and showed maximal GHB concentrations of 3 mg/L. Erdmann et al. [18] determined endogenous GHB concentrations in antemortem blood in a range of 0.11–1.56 mg/L. We investigated GHB concentrations of 50 volunteers without GHB intake and found values below the lowest calibrator (2 mg/L) in all plasma and urine samples.

We also investigated the phase II metabolite GHB-Gluc with the possible aim of extending the window of detection for GHB after exogenous application. In general, glucuronidation occurs during the phase II metabolism of biotransformation in the endoplasmic reticulum of liver cells. The conjugation of GHB with glucuronic acid is catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase [21, 29]. Due to a longer duration of metabolic biotransformation, glucuronides can be better analytical targets for disclosing intake of a drug in forensic cases. In particular, ethyl glucuronide plays a major role as a marker for alcohol abuse [30]. In 2013, Petersen et al. [21] first described the newly identified metabolite GHB-Gluc in urine samples, determining endogenous concentrations between 0.11 and 5 mg/L. These results are in agreement with the GHB-Gluc concentrations that we determined in urine samples of the control group (0.16–7.1 mg/L; Table 2). Endogenous GHB-Gluc concentrations were found in a range of 0.011 to 0.067 mg/L in plasma samples ($n = 49$; Table 2).

In addition, the influence of demographics such as sex, age, BMI, co-medication, alcohol abstinence and pre-existing conditions on endogenous GHB-Gluc concentrations were investigated in plasma and urine samples. The statistical evaluation showed no significant differences in plasma concentrations based on these parameters. In urine, statistically significant differences could be observed within the control group for the parameters sex and BMI using the Mann–Whitney U test, but no difference could be observed between case and control groups. A trend toward significance was shown by comparing high BMI levels (>25) with low BMI levels in urine. However, a Pearson

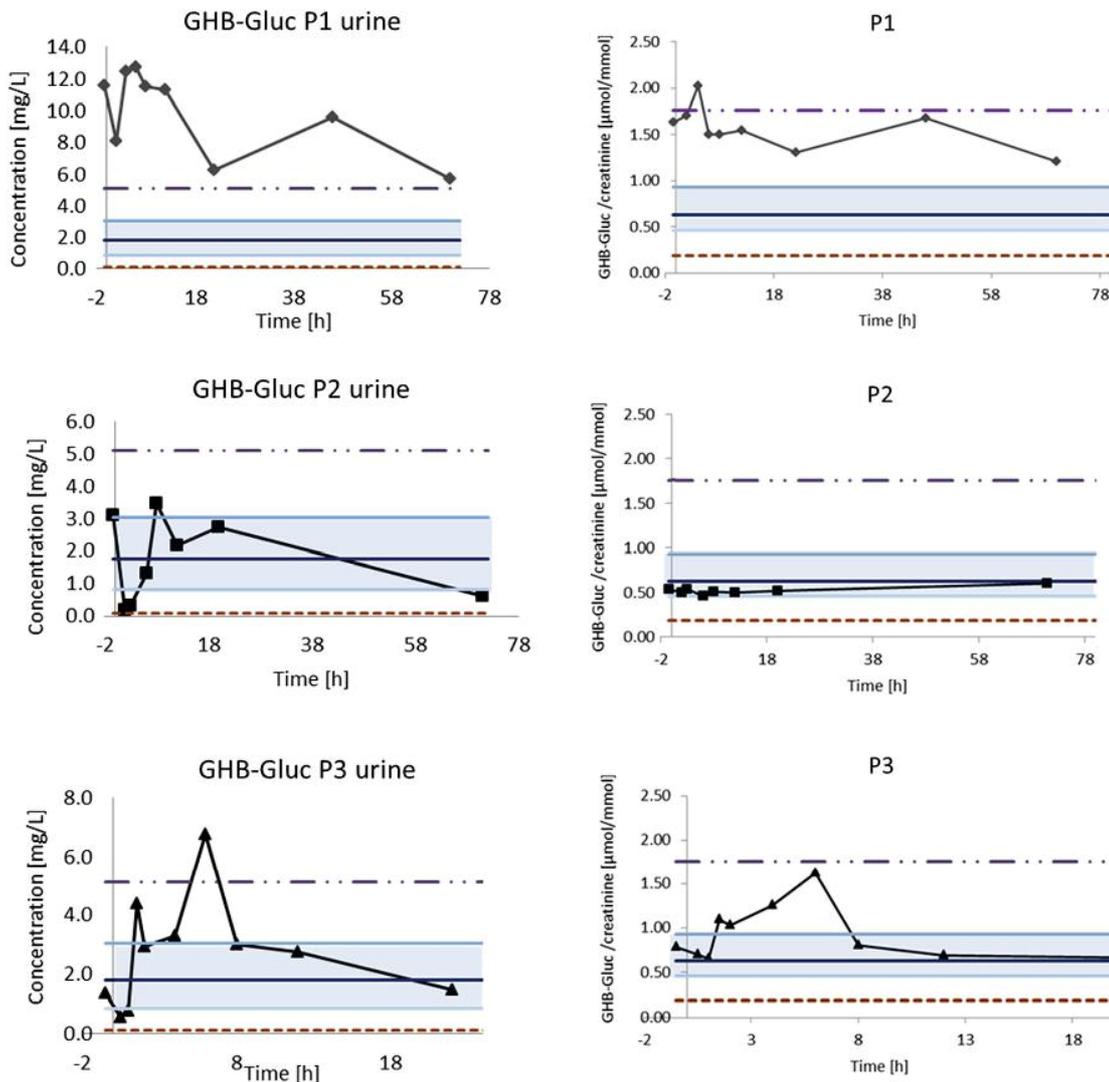


Fig. 4 GHB-Gluc concentrations in urine samples of the three test persons compared to endogenous urine concentrations in the control group with (right) and without (left) normalization by creatinine. The blue area shows the endogenous concentrations between the first and third quartile [Q1 = first quartile (light blue line); Q3 = third quartile

(light blue thick line)] of the control group. Below and above the blue area, lines for minimum (broken line) and maximum (solid dotted line) of the endogenous urine concentrations are drawn, and also the median is displayed as a dark blue line in the middle of the diagram; the P1–P3 is explained in Fig. 1

correlation test did not confirm this ($r = 0.36$; $p = 0.11$). These results are in agreement with the observations of Crunelle et al. [31], who described the influence of BMI on ethyl glucuronide concentrations and showed that BMI above a value of 25 led to higher concentrations of ethyl glucuronide in hair samples.

The pharmacokinetics of GHB is described in several studies. Brenneisen et al. [12] performed an excretion experiment with eight healthy volunteers ingesting a single oral dose of 25 mg/kg GHB and detected GHB concentrations up to 76.3 and 840 mg/L in plasma and urine samples, respectively. Extensive metabolism and rapid elimination of GHB was revealed in urine. The plasma

GHB concentrations were below the cutoff (4 mg/L) after 2.5 h and urine GHB concentrations were below 10 mg/L after 12 h in all human subjects [12]. The main finding of Abanedes et al. [19] found that GHB-mediated physiological and subjective effects were dose-dependent and related to GHB plasma concentrations. The authors also reported that GHB showed a mixed stimulant/sedative pattern, with a biphasic time profile, as described for other sedatives such as alcohol or cannabis. Elimination of GHB was described as linear, and less than 2% of the administered doses were recovered in urine samples during the collection period [19]. In a studied time period, Haller et al. [20] determined GHB concentrations in urine samples of

16 volunteers taking a single dose of 50 mg/kg GHB alone and combined with ethanol. Peak urine concentrations of up to 150–200 mg/L were found, and 81.3% of the samples collected from 6 to 12 h were below the common cutoff of 10 mg/L. Results showed that such co-ingestion did not significantly influence renal clearance of GHB [20].

Borgen et al. [26] studied the pharmacokinetics of GHB in plasma and urine samples of 13 adult narcolepsy patients after single and chronic administration of 2.25 g sodium oxybate at bedtime and 4 h later. Plasma and urine samples were then collected until 7 h after ingestion. The patients followed this nightly treatment for 8 weeks and returned to the research laboratory to repeat the single-dose experiment. The results of this study showed that the pharmacokinetics of sodium oxybate in patients with narcolepsy did not appear to differ from that seen in the control group. No clinically significant differences were found between acute and chronic dosing conditions for any of the pharmacokinetic measurements. GHB plasma concentrations were below the plasma cutoff (4 mg/L) after 5–6 h [26].

The results of our excretion experiment are in agreement with these studies. Increased GHB concentrations of up to 73.1 and 254 mg/L in plasma and urine samples, respectively, were found after sodium oxybate intake of 2.25 g. GHB concentrations subsequently decreased according to first-order elimination kinetics, and fell below the commonly used cutoff value after 4 h in plasma and after 6 h in urine samples (Figs. 1, 2). No pharmacokinetic differences could be observed between narcoleptic patients taking sodium oxybate for up to 6 or 9 years (P1 and P2, respectively) and patient P3, who started the therapy for the first time.

For GHB-Gluc concentrations in patients with narcolepsy therapeutically taking sodium oxybate, no significant time-dependent increase could be observed in plasma after GHB exposure (Fig. 3). In P2 and P3, GHB-Gluc plasma concentrations were between 0.008 and 0.015 mg/L, and were similar in range to concentrations in volunteers without GHB intake (Table 2). P1 showed higher GHB-Gluc concentrations than the control group in both matrices. In urine, the values for GHB-Gluc of P1 were above the third quartile but below the maximum endogenous concentrations in the control group after normalization with creatinine (Fig. 4). These results might be explained by high enzyme activity of UDP-glucuronosyltransferase in this subject. This is also underpinned by high GHB-Gluc concentrations in plasma and urine samples prior to GHB intake, although P1 had stopped taking the medication 3 days before. P2 was also chronically treated with a sodium oxybate dosage of 7 g per night, and last took the medication 18 h before the experiment started. However, P2

showed no increased GHB-Gluc concentrations in the studied plasma samples before and after the GHB intake, which may have been caused by taking GHB until 18 h before participating in the excretion experiment. Creatinine-normalized plasma and urine concentrations for P2 (Figs. 3, 4; middle panels) were found to be stable over the entire time period. Without creatinine normalization, an increase in GHB-Gluc values was observed after GHB intake in urine samples of all test persons (Fig. 4). Maximum concentrations in urine samples for P1 and P3 were found after 6 h. Due to relatively large volumes of water consumed after GHB exposure, the urine samples of P2 at 2 and 4 h were highly diluted, and lower amounts of GHB-Gluc and creatinine were found in these samples.

Although an increase in GHB-Gluc could be observed in urine samples of the three test persons (Fig. 4), the concentrations found were generally in a range similar to the endogenous GHB-Gluc values of the volunteers without GHB exposure (Table 2). Therefore, these results do not constitute suitable proof for forensic investigation of DFCs. To indicate a GHB intake by GHB-Gluc concentrations, the determined values should be higher than the endogenous concentrations of the control group in order to provide a suitable cutoff value for GHB-Gluc as is commonly used for GHB. The increase in GHB-Gluc concentrations after GHB intake confirms that GHB-Gluc is a metabolite of GHB, but would be generated as a secondary product during GHB metabolism. It is possible that elevation of the GHB dose taken leads to higher GHB-Gluc concentrations by saturation of the GHB elimination pathways, but this requires further investigation.

Conclusions

We conducted an excretion experiment to assess endogenous GHB-Gluc concentrations in 50 volunteers without GHB intake and three test persons therapeutically taking sodium oxybate. With regard to the endogenous plasma GHB-Gluc concentrations of the control group, no significant differences could be observed for the studied parameters (sex, age, body weight, body height, alcohol abstention, additional medication and general health). The GHB-Gluc concentrations in plasma and urine determined for the three test persons showed no marked differences compared to those of the control group. Almost no time-dependent increase in GHB-Gluc concentrations exceeding the maximum level of the control group were determined in plasma and urine of P2 and P3 after GHB intake. Therefore, the GHB-metabolite GHB-Gluc does not appear to be a suitable marker in plasma and urine for extending the

detection window after GHB intake. However, further experiments with higher doses of GHB are needed, though such human experiments would be difficult from the ethical point of view.

Acknowledgements The authors would like to thank Ms. Alexandra Maas for making sample collection possible, Dr. Daniel Sejer Pedersen for providing the internal standard, and all volunteers for taking part in this study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in this study involving human participants, who provided small amounts of blood and urine, were in accordance with the ethical standards of the institutional review board of the universities of Bonn and Münster and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

- Cash CD (1994) Gammahydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent. *Neurosci Biobehav Rev* 18:291–304. doi:10.1016/0149-7634(94)90031-0
- Busardò FP, Jones AW (2015) GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Curr Neuropharmacol* 13:47–70. doi:10.2174/1570159X13666141210215423
- Gibson KM, Hoffmann GF, Hodson AK, Bottiglieri T, Jakobs C (1998) 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics* 29:14–22. doi:10.1055/s-2007-973527
- Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E (2007) Narcolepsy with cataplexy. *Lancet* 369:499–511. doi:10.1016/S0140-6736(07)60237-2
- Mamelak M, Scharf MB, Woods M (1986) Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings. *Sleep* 9:285–289 (PMID: 3704454)
- Jazz Pharmaceuticals (2015) Highlights of prescribing information. https://www.xyremrems.com/documents/XYREM_Prescribing_Information.pdf. Accessed 13 Dec 2016
- Takahara J, Yunoki S, Yakushiji W, Yamauchi J, Yamane Y (1977) Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 44:1014–1017
- Kam PCA, Yoong FFY (1998) Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. *Anaesthesia* 53:1195–1198. doi:10.1046/j.1365-2044.1998.00603.x
- Stell JM, Ryan JM (1996) Ecstasy and neurodegeneration. gamma-Hydroxybutyrate is a new recreational drug that may lead to loss of consciousness. *BMJ* 313(7054):424
- Laborit H (1964) Sodium 4-hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol* 3:433–451. doi:10.1016/0028-3908(64)90074-7
- Madea B, Musshoff F (2009) Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection. *Dtsch Arztebl Int* 106:341–347. doi:10.3238/arztebl.2009.0341
- Brenneisen R, Elsohly MA, Murphy TP, Passarelli J, Russmann S, Salamone SJ, Watson DE (2004) Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J Anal Toxicol* 28:625–630. doi:10.1093/jat/28.8.625
- Bay T, Eghorn LF, Klein AB, Wellendorph P (2014) GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. *Biochem Pharmacol* 87:220–228. doi:10.1016/j.bcp.2013.10.028
- Abanades S, Farré M, Segura M, Pichini S, Pastor A, Pacifici R, Pellegrini M, de la Torre R (2007) Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Ther Drug Monit* 29:64–70. doi:10.1097/FTD.0b013e3180307e5e
- LeBeau MA, Christenson RH, Levine B, Darwin WD, Huestis MA (2002) Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate. *J Anal Toxicol* 26:340–346. doi:10.1093/jat/26.6.340
- Andresen H, Sprys N, Schmoltdt A, Mueller A, Iwersen-Bergmann S (2010) Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Sci Int* 200:93–99. doi:10.1016/j.forsciint.2010.03.035
- Elliott SR (2004) Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid : implications for the interpretation of findings. *J Anal Toxicol* 28:20–26. doi:10.1093/jat/28.1.20
- Erdmann F, Zandt D, Auch J, Schütz H, Weiler G, Verhoff MA (2006) Investigations concerning the threshold value between endogenous and exogenous GHB (liquid ecstasy) (in German with English abstract). *Arch Kriminol* 217:129–136 (PMID: 16910296)
- Abanades S, Farré M, Segura M, Pichini S, Barral D, Pacifici R, Pellegrini M, Fonseca F, Langohr K, De La Torre R (2006) Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann N Y Acad Sci* 1074:559–576. doi:10.1196/annals.1369.065
- Haller C, Thai D, Jacob III P, Dyer JE (2006) GHB urine concentrations after single-dose administration in humans. *J Anal Toxicol* 30:360–364. doi:10.1093/jat/30.6.360
- Petersen IN, Tortzen C, Kristensen JL, Pedersen DS, Breindahl T (2013) Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide. *J Anal Toxicol* 37:291–297. doi:10.1093/jat/bkt027
- Wang X, Linnet K, Johansen SS (2016) Development of a UPLC–MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicol* 34:51–60. doi:10.1007/s11419-015-0285-6
- Mehling L-M, Piper T, Dib J, Pedersen DS, Madea B, Hess C, Thevis M (2016) Development and validation of a HPLC–QTOF–MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine. *Forensic Toxicol*. doi:10.1007/s11419-016-0339-4
- Petersen IN, Kristensen JL, Tortzen C, Breindahl T, Pedersen DS (2013) Synthesis and stability study of a new major metabolite of γ -hydroxybutyric acid. *Beilstein J Org Chem* 9:641–646. doi:10.3762/bjoc.9.72
- Lott S, Musshoff F, Madea B (2012) Estimation of gamma-hydroxybutyrate (GHB) co-consumption in serum samples of drivers positive for amphetamine or ecstasy. *Forensic Sci Int* 221:98–101. doi:10.1016/j.forsciint.2012.04.009
- Borgen LA, Okerholm RA, Lai A, Scharf MB (2004) The pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution following acute and chronic administration to narcoleptic patients. *J Clin Pharmacol* 44:253–257. doi:10.1177/0091270003262795
- Mamelak M, Escriu JM, Stokan O (1977) The effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep. *Biol Psychiatry* 12:273–288

28. Broughton R, Mamelak M (1980) Effects of nocturnal gamma-hydroxybutyrate on sleep/waking patterns in narcolepsy-cataplexy. *Can J Neurol Sci* 7:23–31. doi:10.1017/S0317167100023659
29. King C, Rios G, Green M, Tephly T (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 1:143–161. doi:10.2174/1389200003339171
30. Foti RS, Fisher MB (2005) Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* 153:109–116. doi:10.1016/j.forsciint.2004.12.003
31. Crunelle CL, Neels H, Maudens K, De Doncker M, Cappelle D, Matthys F, Dom G, Fransen E, Michielsens P, De Keukeleire S, Covaci A, Yegles M (2016) Influence of body mass index on hair ethyl glucuronide concentrations. *Alcohol Alcohol*. doi:10.1093/alcal/agw079

6.2 Supplementary Material

Table 1 Documented parameters of the control group (n=50)

Volunteers ID	Sex	Age	BMI	Disease	Alcohol Abstinence	Co-medication	Preexisting conditions
N1	Male	23	22.1	Gilbert`s Syndrome	> 48 h	Bisoprolol 2.5 mg	Healthy
N2	Male	24	27.3	None	> 48 h	None	Healthy
N3	Male	20	22.0	Asthma	> 48 h	Symbicort; Cetirizine	Healthy
N4	Female	23	24.2	None	> 24 h	Birth Control Pill	No Info
N5	Female	21	21.9	None	> 24 h	Birth Control Pill	No Info
N6	Female	21	18.9	None	> 24 h	Birth Control Pill	Healthy
N7	Male	28	30.9	None	> 48 h	None	Healthy
N8	Female	20	17.8	None	never consumed	Birth Control Pill	Iron Deficiency
N9	Female	21	17.9	None	> 20 h	Birth Control Pill	Healthy
N10	Female	22	25.2	None	> 48 h	Birth Control Pill	Healthy
N11	Male	27	19.8	Gilbert`s Syndrome	> 48 h	No Info	No Info
N12	Male	27	23.9	None	No Info	No Info	No Info
N13	Male	47	22.9	No Info	>48 h	No Info	No Info
N14	Female	23	21.0	No Info	>48 h	No Info	No Info
N15	Male	25	24.7	No Info	>48 h	No Info	No Info
N16	Female	23	20.8	No Info	>48 h	No Info	No Info
N17	Female	30	28.7	No Info	No Info	Birth Control Pill	Cold
N18	Female	28	18.6	None	>48 h	No Info	Cough

Volunteers ID	Sex	Age	BMI	Disease	Alcohol Abstinence	Co-medication	Preexisting conditions
N19	Male	38	26.3	No Info	never consumed	No Info	Healthy
N20	Female	20	21.4	No Info	>48 h	Birth Control Pill	no info
N21	Female	20	21.1	No Info	>48 h	Birth Control Pill	Cold
N22	Female	24	15.6	No Info	>48 h	Venlafaxine [150 mg/d]	Healthy
N23	Female	19	22.2	No Info	never consumed	Birth Control Pill	Cold
N24	Female	24	24.2	Hyperthyroidism	>48 h	Birth Control Pill, L-Thyroxin	Healthy
N25	Female	27	29.7	No Info	>48 h	Birth Control Pill	No Info
N26	Female	23	28.4	No Info	>48 h	Birth Control Pill	No Info
N27	Female	19	26.0	No Info	>48 h	None	Healthy
N29	Female	62	22.6	Hypertension, Atherosclerosis	>48 h	Thyroxine, Enalapril, Metoprolol	No Info
N30	Female	30	20.8	Hyperthyroidism	> 24 h	Amitriptylin 25 mg, l-Thyroxin 25 mg	Healthy
N31	Female	46	21.3	No Info	>48 h	Iron	Healthy
N32	Male	33	34.9	No Info	>48 h	No Info	No Info
N33	Female	48	20.3	No Info	> 24 h	None	No Info
N34	Female	33	22.8	No Info	>48 h	No Info	No Info
N35	Female	36	19.3	No Info	>48 h	No Info	Cold
N36	Female	29	27.0	No Info	>48 h	Birth Control Pill	Cold

Volunteers ID	Sex	Age	BMI	Disease	Alcohol Abstinence	Co-medication	Preexisting conditions
N37	Female	29	22.2	No Info	>48 h	Nuvaring® (Etonogestrel/ Ethinylestradiol)	Cold
N38	Male	32	28.1	No Info	>48 h	No Info	Healthy
N39	Female	24	19.8	No Info	>48 h	Birth Control Pill	Healthy
N40	Female	25	22.5	No Info	>48 h	Birth Control Pill	Healthy
N41	Male	24	25.8	No Info	>48 h	No Info	No Info
N42	Male	23	27.5	No Info	>48 h	No Info	Healthy
N43	Female	30	19.7	No Info	> 48 h	No Info	No Info
N44	Female	25	22.3	Factor-V- deficiency	> 48 h	Birth Control Pill	No Info
N45	Female	23	22.1	No Info	> 48h	Birth Control Pill	Healthy
N46	Male	24	19.6	Gilbert`s Syndrome, Marfan Syndrome	> 48h	No Info	No Info
N47	Female	28	22.3	No Info	No Info	No Info	Lip Herpes
N48	Female	38	22.1	Epilepsy, Schizophrenia	> 48h	Lamotrigine, Arpiprazole , Quetiapine	Cold
N49	Female	20	25.0	No Info	> 48h	Birth Control Pill	Healthy
N50	Male	52	24.1	No Info	No Info	No Info	No Info
N51	Female	24	21.5	Migraine	>48h	Birth Control Pill	tired

6.3 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die GHB und GHB-Gluc Konzentrationen von Narkolepsie-Patienten nach GHB-Einnahme in Blut- und Urinproben bestimmt und diese mit endogenen Konzentrationen von freiwilligen Personen, bei denen eine GHB-Einnahme ausgeschlossen werden konnte, verglichen. Hierbei wurde GHB-Gluc sowohl in Blut als auch in Urinproben detektiert und zeigte eine breite Streuung endogener Konzentrationen. Im Blut wurden Konzentrationen von 0,011-0,067 mg/L bestimmt und im Urin von 0,16-7,1 mg/L. Die Konzentrationen der Muttersubstanz GHB wurden alle unterhalb eines Wertes von 2 mg/L bestimmt und lagen somit innerhalb des bereits publizierten endogenen Konzentrationsbereichs.

Anschließend wurden die Konzentrationen von GHB und GHB-Gluc in humanen Proben der Narkolepsie-Patienten ausgewertet. Zwei der drei Narkolepsie-Patienten nahmen das Arzneimittel Xyrem® (Wirkstoff: Natrium-Salz von GHB) seit 6 und 9 Jahren ein. Die Durchführung der Studie mit dem dritten Patienten war gleichzeitig auch dessen Therapieeinstieg. Er versicherte GHB vorher noch nie eingenommen zu haben. Die Proben wurden sowohl vor der Einnahme als auch bis zu 72 h nach Einnahme gesammelt, sofern dies möglich war. Im Plasma konnte der Anstieg der GHB-Konzentrationen bis zu maximalen Werten von 73,1 mg/L festgestellt werden und auch im Urin war ein deutlicher Anstieg der GHB Exkretion (bis zu 254 mg/L) zu beobachten. Die cut-off-Konzentrationen zur Unterscheidung endogen/exogen wurden nach 4 h im Plasma und nach 6 h im Urin wieder unterschritten.

Im Gegensatz zu den GHB-Konzentrationen konnte kein zeitabhängiger Anstieg der Konzentrationen des Metaboliten gezeigt werden. Im Plasma blieben die Werte bei allen Patienten relativ konstant. Im Urin war zunächst ein Anstieg zu beobachten jedoch zeigte sich nach Normalisierung auf Kreatinin, dass auch hier die Werte relativ konstant blieben. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen den mit GHB regelmäßig behandelten Patienten und dem Therapieeinsteiger festgestellt werden. Eine Gewöhnung konnte daher weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Untersuchungen zeigen konnten, dass GHB-Gluc anscheinend kein geeigneter Marker zum Nachweis einer GHB-Einnahme darstellt. Sicherlich sind hierfür weitere Untersuchungen notwendig, wie zum Beispiel die

Entwicklung einer intraindividuelle Normalisierungsstrategie oder die Durchführung der Studie nach der Einnahme höherer/ansteigender GHB-Dosen.

7 Das Potential von GHB-4-Sulfat zur Ergänzung aktueller Ansätze für den Nachweis einer GHB-Einnahme

7.1 Einleitung

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass GHB-Gluc kein geeigneter Marker für den Nachweis einer GHB-Einnahme ist. Weder im Plasma noch im Urin wurden nach Einnahme Konzentrationen aufgefunden, die oberhalb des endogenen Bereichs lagen, was zum einen daran liegen könnte, dass GHB-Gluc nur als sekundärer Metabolit auftritt oder eine geeignete Normalisierung der Urinkonzentrationen benötigt wird. Neben dem glucuronidierten Stoffwechselprodukt wurde auch eine sulfonierte Verbindung von GHB im Urin beschrieben [78].

Da die Konzentrationen im Urin abhängig sind vom ausgeschiedenen Volumen, wurden diese häufig auf die spezifische Dichte der Probe oder auf eine konstant ausgeschiedene Substanz wie zum Beispiel Kreatinin normalisiert [97,148]. Mögliche Korrelationen zwischen den GHB-Metaboliten und der spezifischen Dichte sowie die Korrelation zueinander sollten untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, um die Konzentrationen von endogenen Substanzen im Urin zu relativieren und so eine zusätzliche Einnahme zu identifizieren, ist eine Analyt-spezifische Normalisierung der gemessenen Konzentrationen. Dies ist eine gängige Methode bei der Kontrolle auf dopingrelevante Substanzen, um z. B. hohe nicht-physiologische Konzentrationen von Testosteron in den analysierten Proben von Athleten aufzudecken [149,150]. Hierfür wird eine bisher unbekannte endogene Komponente im Urin benötigt, die mit beiden Metaboliten gut korreliert.

Wie auch schon in der Haaranalytik gezeigt werden konnte, erweist sich die Festlegung eines geeigneten Grenzwerts für eine GHB-Exposition aufgrund des physiologischen Vorkommens von GHB als äußerst schwierig. Bei der Interpretation von Haaranalysen wird daher, die Bestimmung eines intra-individuellen Grenzwertes empfohlen [126,127]. Neben der Normalisierung der Ergebnisse, könnte dies auch ein weiterer Ansatz sein, um die Konzentrationen im Urin nach einer möglichen GHB-Gabe zu beurteilen.

Das Ziel dieser Arbeit war es endogene Konzentrationsbereiche von GHB-Sulf zu bestimmen und diese mit Konzentrationen nach GHB-Einnahme im Urin zu vergleichen. Des Weiteren sollte eine geeignete Normalisierungsstrategie entwickelt werden, um die ermittelten Konzentrationen beider Stoffwechselprodukte auf die Ausscheidungsrate zu relativieren. Zum Schluss wurde die Anwendbarkeit der Analyt-spezifische Normalisierung anhand des Ausscheidungsexperimentes getestet und die Festlegung eines möglichen intra-individuellen Grenzwertes überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Verlängerung der Nachweisbarkeit von GHB wurden in der Arbeit „*Potential of GHB-4-sulfate to complement current approaches in GHB post administration detection*“ im *Journal Forensic Science International* veröffentlicht.

Potential of GHB phase-II-metabolites to complement current approaches in GHB post administration detection

Thomas Piper^{1*}, Lena-Maria Mehling², Annika Spottke³, Anna Heidbreder⁴, Peter Young⁴, Burkhard Madea², Cornelius Hess², Wilhelm Schänzer¹, Mario Thevis¹

- 1) German Sport University Cologne, Center for Preventive Doping Research
Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln, Germany
- 2) Institute of Forensic Medicine, University of Bonn
Stiftsplatz 12, 53111 Bonn, Germany
- 3) Department of Neurology, University Hospital, University of Bonn,
Sigmund-Freud-Straße 25, 53127 Bonn, Germany
- 4) Division of Sleep Medicine and Neuromuscular Disorders, Department of Neurology,
University Hospital, University of Münster,
Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster, Germany

*Corresponding author

E-mail: t.piper@biochem.dshs-koeln.de

Tel: +49 221 4982 4931

Highlights

- GHB phase-II-metabolites do not prolong the detection of GHB
- GHB phase-II-metabolites concentrations were determined in a reference population
- The ratio between GHB_GLUC and F320 provides an interesting diagnostic feature
- Individual reference limits improve GHB detection

Abstract

Recently, phase-II-metabolites of γ -hydroxybutyric acid (GHB), namely GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate, were implemented in the scope of drug testing methods. The clearance of GHB from the circulation is extremely fast due to its incorporation into the metabolic pathway of the citrate cycle. The elimination half-life of GHB from blood was

reported to be dose dependent between 30 and 50 min resulting in narrow detection windows of less than 12 hours after illicit administration or cases of drug facilitated sexual assault regardless of the biological matrix used. As sulfated metabolites tend to show prolonged half-lives and slower elimination kinetics compared to unmodified or glucuronidated drugs, the potential of GHB-4-sulfate in prolonging the detection of GHB administration was assessed. Its urinary concentrations were determined in $n = 100$ samples from athletes and $n = 50$ samples from sport students, and the resulting data were used to calculate a preliminary reference population-based threshold for urinary GHB-sulfate concentration. The threshold was then compared to concentrations found in post-administration urine samples collected from 3 volunteers who administered GHB within the setting of a clinical trial. Due to the large inter-individual variability of concentrations found in the reference population, GHB-4-sulfate itself was not suitable to prolong the detection times for GHB applications, even when specific gravity-corrected values were used.

Therefore, a metabolomics-based approach was applied to the reference population samples and evaluated regarding other urinary metabolites that potentially correlate with the urinary excretion of GHB-4-sulfate and GHB- β -O-glucuronide in order to find a suitable marker to normalize urinary concentrations. The most promising candidate was found at a molecular mass of 321.0696 and was preliminarily identified as β -citryl-glutamic acid.

Keywords

γ -hydroxybutyric acid (GHB), GHB-4-sulfate, GHB- β -O-glucuronide, metabolomics, excretion study

Introduction

More than 50 years ago, γ -hydroxybutyric acid (GHB) was introduced as an intravenous anesthetic.[1] Due to its varying duration of effectiveness it never became well-recognized and was soon after substituted by other anesthetics. In the 1980s, it was clinically approved for the treatment of the alcohol withdrawal syndrome and narcolepsy.[2,3] From the 1990s on until today however it attracted more and more attention as a recreational drug and is known to be used as the active agent in so called drug-facilitated sexual assaults (DFSA).[4,5] Due to the endogenous nature of GHB and its rapid elimination, proving the ingestion of GHB and, thus, its exogenous origin, has been a challenging task for drug testing laboratories.[6-9] The

currently and commonly used approach is to apply a cut-off level of 10 µg/mL of GHB in urine and 5 µg/mL in blood as derived from population-based studies.[10,11] The relatively high cut-off levels are due to a large inter-individual variability found for GHB concentrations. In urine, also a specific gravity correction applied to all measured concentrations did not result in a more narrow distribution of endogenous levels.[11] This variability together with an average half-life of GHB of 20 to 53 min results in detection windows of not more than 6 h after application.[7,9,12] One recent attempt to enable the retrospective detection of GHB administration was to use alternative biological matrices such as hair samples.[13-17] Despite promising first results regarding the sensitivity of this approach, its usefulness in cases of DFSA is still under investigation.

In 2013 the first phase-II-metabolite of GHB, GHB-β-O-glucuronide (GHB_GLUC) was described and characterized.[18,19] Two years later the sulfoconjugated analog was also described and, in 2016, characterized as GHB-4-sulfate (GHB_SULF).[20,21] A method for the combined determinations of plasma and urinary concentrations of both phase-II-metabolites was developed and validated.[21] While the potential to extend the detection window after GHB administrations of GHB_GLUC was already investigated and published, herein the prospects of GHB_SULF will be described.[22]

A reference population encompassing n = 100 healthy male and female athletes was investigated regarding their urinary concentrations and tested for gender specific or sports related differences and possible adjustments of measured values to a normalized specific gravity. To ensure that a high workload of athletic activity is not a significant parameter another population of n = 50 students was analyzed and compared. The found urinary concentrations were furthermore compared to GHB excretion studies carried out with n = 3 different individuals. As the GHB_SULF concentrations after GHB administration were still found in the endogenous range, a different approach was tested. Via a metabolomics tool, urinary features significantly correlated with the concentrations of GHB_GLUC and GHB_SULF were identified and tested for their ability to normalize the largely scattering urinary concentrations. The most promising feature was further investigated and characterized by in-house synthesis. As still a population based cut-off value seemed questionable, longitudinal studies in n = 5 individuals were carried out to test the hypothesis of individual reference ranges may be superior to population based values.

Material and methods

Reagents and chemicals

GHB_SULF and six-fold deuterated GHB_SULF were synthesised in-house starting from GHB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and GHB-²H₆ (LGC Standards, Teddington, UK) as described elsewhere.[21] GHB-GLUC was purchased from ReseaChem (Burgdorf, Switzerland) and the internal standard GHB-glucuronide-²H₄ was provided by Petersen et al. [18]. L-Glutamic acid dimethyl ester hydrochloride was obtained from Sigma-Aldrich and 1,5-dimethylcitrate from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Xyrem[®] was purchased from UCB Pharma GmbH (Monheim, Germany); Somsanit[®] from Dr. Franz Köhler Chemie GmbH (Alsbach-Hähnlein, Germany). All solvents and reagents were of analytical grade.

Reference Population

One hundred doping control samples were arbitrarily chosen from the large number of samples investigated at the Institute of Biochemistry at the Sports University Cologne. Starting from a defined sample, the next 100 consecutive samples were selected including only those samples for which athletes gave consent for using their aliquots for scientific purposes and that were tested negative for routinely analyzed prohibited substances. Specific urinary gravity and gender were also recorded. This population was first investigated regarding urinary concentrations of GHB_GLUC and SULF and secondly used for the metabolomics studies.

The 50 samples from students were taken from a larger pool of samples collected and investigated for a different study and stored frozen at -20°C until then.[23] This population was only investigated regarding the urinary concentrations of GHB metabolites.

Excretion studies

Urine samples from n = 3 volunteers were collected after controlled administration of 2.25 g Xyrem[®] (equals 1.86 g of GHB) or 10 mL of Somsanit (equals 2 g of GHB), respectively. A detailed description of the volunteers can be found elsewhere.[22] In brief, volunteers 1 and 2

(V1 and V2) were frequent GHB users due to narcolepsy and stopped administration 3 days (V1) and 18 h before the trial. Volunteer 3 (V3), also suffering from narcolepsy, was given GHB for the first time. Urine samples were collected before and up to 72 h after administration. The study was approved by the local ethical committee of the University Hospital Bonn according to the declaration of Helsinki (number: 370/13) and written consent was given by all participants.

Long-term stability of urinary concentrations

Three volunteers (1 male, 2 females) from the Institute of Biochemistry agreed to collect 6 spot urine sample at different time point of the day over a period of 10 days. Another 2 male volunteers collected 20 morning urines each on 20 consecutive days. All samples were stored frozen at -20°C until analysis.

GHB_SULF and GHB_GLUC determinations

Urinary concentrations of GHB metabolites were determined by a previously described method using a straightforward dilute-and-inject approach using deuterated internal standards.[21] The method was fully validated with found LODs < 10 ng/mL covering a linear range up to 1 µg/mL (GHB_SULF) and 20µg/mL (GHB_GLUC). Samples falling outside the validated linear range of the method were appropriately diluted. All samples were analyzed on an Agilent 1290 Infinity HPLC (Waldbronn, Germany) coupled to an Agilent G6550A accurate-mass quadrupole time of flight mass spectrometer (QTOF-MS) with an electrospray ion source (DUAL AJS ESI) operated in negative ionization mode. Chromatographic separation was achieved on a HYPERCARB column (3 µm, 1 x 50 mm) from Thermo Scientific (Dreieich, Germany).

Metabolomics approach

All samples from the excretion studies and the athlete reference population were reanalyzed on the same mass spectrometer under different chromatographic conditions. Now an Agilent

Eclipse XDB C¹⁸ column (5 µm, 4.6 x 150 mm) protected by a guard column (4.6 x 4 mm) was used. The mobile phase was water (A) and acetonitrile (B) both containing 0.1 % formic acid. The gradient started with 100 % A held for 5 min, then within 5 min to 80 % A, then switching to 100 % B held for 4 min followed by re-equilibration at 100 % A for 4 min. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 20 µL of urine. Data was collected at a scan speed of 3 spectra/s covering a mass range from *m/z* 50 to *m/z* 800 using Agilent Mass Hunter Workstation Software B.06.00. All samples were injected twice, first in negative and then in positive ionization mode.

Data deconvolution was performed under Agilent Profinder B.06.00 and statistical evaluation of detected features was done using Agilent Mass Profiler Professional 14.0. Initially, the reference population samples were investigated regarding features visible in all 100 samples to ensure the endogenous origin of the analyte. Then the response (peak area) of these features was compared to the response of GHB metabolites and to the measured urinary concentrations of these metabolites. Features showing a significant correlation (Pearson, $r > 0.5$ and $p < 0.05$) were further investigated using the excretion study samples.

Statistical evaluation

All statistical tests were done using R version 2.11.1.[24] Urinary concentrations and diagnostic ratios obtained for the reference population were tested for Gaussian and log-normal distribution using Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). Generalized linear models were used to test for significant correlations. Reference limits were calculated parametrically where appropriate following the guidelines of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).[25-27]

Results and discussion

Urinary GHB_SULF and GHB-GLUC concentrations

In all samples of the reference population, GHB_SULF was detectable above the method's LOQ of 6 ng/mL. Found concentrations ranged from 9 to 11,500 ng/mL and were not Gaussian

distributed (Figure 1). GHB-GLUC was also detectable in all samples ranging from 500 to 19,800 ng/mL, which may be noteworthy as in a recent publication GHB_GLUC was reported as difficult to detect.[28]

No significant differences between female and male samples was found (Wilcoxon rank sum test), allowing to combine all samples for further investigations. After performing logarithmic transformation, the data were Gaussian-distributed and a 99.7 % reference limit could be calculated parametrically by adding the three-fold standard deviation to the mean value resulting in 66 µg/mL for GHB_SULF and 41 µg/mL for GHB_GLUC.

In order to test for a possible influence of high physical workloads on urinary GHB_SULF and GHB_GLUC concentrations, the athlete population results were compared to those generated from a population derived from students including both genders. No significant differences were detected.

According to literature, density correction using the specific gravity does not improve or narrow the distribution of urinary GHB concentrations.[11] A different picture was found for GHB_SULF and GHB_GLUC concentrations within this reference population. In both cases small but highly significant correlations were observed with $R^2 = 0.13$, $p < 0.001$ for GHB_SULF and $R^2 = 0.30$, $p < 0.001$ for GHB_GLUC. Applying the density correction to the calculated reference limits modified it for GHB_SULF to 56 µg/mL and for GHB_GLUC from 41 to 24 µg/mL. Specific gravity correction were calculated applying formula 1:

$$CONC_{corrected} = CONC_{measured} \frac{(1.02-1)}{(density_{measured} - 1)}$$

Therefore further investigations herein were conducted applying the specific gravity corrected concentrations. As both phase-II-metabolites were correlated to urinary density, it was also expected to find a correlation in-between GHB_GLUC and GHB_SULF concentrations. Interestingly, as shown in Figure 2, this was not the case. The found R^2 equals zero with a p-value exceeding 0.4. Both phase-II-metabolites of other small polar molecules like ethanol are excreted in parallel showing a good correlation.[29] And also for other endogenous compounds such as steroids, especially androsterone and etiocholanolone, the found correlation is highly significant.[30,31 and unpublished results] Currently, with the data at hand this finding cannot be explained.

Excretion studies

The administration of more than 2 g of sodium oxybate results in a significant increase of urinary GHB_SULF concentrations in all 3 volunteers (Figure 3a). Compared to the found pre-administration concentration, the urinary amount of GHB_SULF doubled (V2) or was even 10 to 14-times the initial value (V3 and V1, respectively). For both frequent users (V1 and V2) the maximum urinary concentration was found between 6 and 8 h after application while the first time user V3 showed an instant increase in GHB-SULF.

The initial concentration within the volunteers ranged from 100 to 1000 ng/mL. Unfortunately, even in V3 showing the highest post-administration concentration with 7700 ng/mL, the calculated population-based threshold was not exceeded. Also within the reference population, i.e. among individuals not receiving GHB, comparable amounts of GHB_SULF were occasionally detected. So despite being obviously a GHB metabolite, GHB_SULF does not provide the desirable characteristics of a suitable marker complementing current approaches in the detection of illicit GHB administrations. Comparable observations could be made for GHB_GLUC (Figure 3b). After administration the urinary concentrations showed some fluctuations but did not exceed the defined thresholds.

Metabolomics approach

As neither GHB_GLUC nor GHB_SULF demonstrated the ability to prolong the detection after GHB administration a different approach was tested.[22] The correction for specific gravity allowed to improve the calculated thresholds by narrowing the found distributions of urinary concentrations. Alternatively, an endogenous urinary compound that appropriately correlates with GHB_GLUC and GHB_SULF could allow for a more analyte-specific normalization of the measured concentrations. This analyte-specific normalization is well established in sports drug testing as a screening tool to detect non-physiologically high concentrations of e.g. testosterone, where the measured concentration of testosterone is evaluated as the absolute figure as well as the ratio with the concentration of epitestosterone.[32,33] As diagnostic ratios like testosterone over epitestosterone may be

influenced also by confounding variables they are not able to directly proof testosterone administration unambiguously. Nevertheless, they are a valuable tool to identify those samples that have to be further investigated by confirmation procedures.

Similarly to epitestosterone, herein the aim was to identify possible endogenous candidates within the reference population that show good and highly significant correlations to both GHB phase-II-metabolites, and to test the utility of these features by applying them to the available excretion studies.

Reference population based investigations

Within the reference population, more than 10,000 features (i.e. chromatographic peaks with a defined mass and retention time) were detected by the software in all samples. By aligning all samples less than 100 features remained to be present in all 100 samples – a prerequisite as only an endogenous substance could be considered. All features were preliminarily identified using the Metlin_AM_PCDL database from Agilent and by calculating chemical formulae using the measured accurate masses. After excluding known endogenous compounds such as selected steroidal agents, 15 features remained for further investigations regarding their proportion to GHB_GLUC and GHB_SULF.

The most promising correlation was found for a feature with a measured mass-to-charge ratio of m/z 320.0618 (F320) eluting at 6.1 min and showing significant correlations for both GHB_GLUC and GHB_SULF as depicted in Figure 4. In both cases the results were similar when using the calculated urinary concentrations or the measured peak areas. Hence, for the sake of convenience, the areas were used in the following. The found correlation was weak ($r = 0.28$) but significant ($p < 0.01$) for GHB_SULF and well pronounced ($r = 0.57$, $p < 0.001$) for GHB_GLUC. As the area under the peak was always larger for F320, the calculated ratios were multiplied by 100 to allow for an easier handling of the numbers.

Within the reference population especially the ratio of GHB_GLUC/F320 was found Gaussian-distributed after log-transformation of the data as shown in Figure 5. The narrow distribution allowed for calculating a 99.7 % reference limit at a value of 40.8. Due to the bimodal distribution found for GHB_SULF/F320 a similar approach was not possible. Just to give an idea about the variability here, values ranged from 1.8 to 525 even within the investigated population.

Application to excretion studies

As mentioned above for GHB_SULF and demonstrated in a former publication for GHB_GLUC, the urinary concentrations of both metabolites are not directly applicable to detect GHB administrations while GHB itself only shows elevated levels for less than 8 hours.[22]

For GHB_SULF/F320 an increase in the ratio is visible for all volunteers as shown in Figure 6 (upper part). In parallel to the found urinary concentrations, again volunteer 3 showed the most pronounced increase while both frequent GHB-users showed extremely low values for this ratio. However, even after administration, all found ratios were well in-between the range spanned by the reference population samples.

Applying the ratio of GHB_GLUC/F320 gave an interesting but ambiguous result as also shown in Figure 6 (lower part). For both frequent users the excretion profiles after administration parallelized with a maximum value found 12 h after administration exceeding even the population-based threshold (at 40.8) with a value of > 45. The detectability of GHB administration using GHB concentrations in urine or plasma was 4 to 6 hours in both volunteers and was not possible using GHB_GLUC concentrations alone (Figure 3b).[22]

The third volunteer applying GHB for the first time showed a considerably different profile with only a moderate increase until 8 h after application and no value fell above the threshold. As both frequent users showed a similar excretion pattern it was hypothesized that F320 may be somehow involved in the endogenous GHB metabolism leading to a more in-depth investigation of this feature.

Assigning F320 as β -citryl glutamic acid

The first steps in identifying F 320 were calculating possible molecular compositions starting from the measured ion at m/z 320.0618 (attributed to the deprotonated molecule) and generating Q-TOF product ion mass spectra at different collision energies. In Figure 7, the high resolution MS/MS-spectra obtained with a collision energy of 15 eV is shown. Obviously the analyte contains nitrogen and several hydroxyl-functions (loss of 18 Da) and eliminates carbon dioxide at least twice (2 x 44 Da). The formula calculated for the molecular ion was $C_{11}H_{15}NO_{10}$ and a structure search in PubChem resulted in β -citryl glutamic acid (PubChem

CID 189741) as the most promising candidate, matching also the observed collision-induced dissociation pattern. The natural occurrence of β -citryl glutamic acid in human urine has already been described.[34,35]

Its biological function was reported in the early 1980s and has recently recurred as compound of interest.[36-38] With regards to GHB it is noteworthy that L-glutamate is a metabolic precursor of GHB. L-Glutamate is converted to succinate semi-aldehyde via GABA (4-aminobutanoate) according to the KEGG metabolic pathway of the butanoate metabolism as described in literature. [12,39,40] This might be an explanation for the significant correlation found between both metabolites concerning their urinary concentrations, which potentially provides an explication for the detected differences in response of the ratio GHB_GLUC/F320 after GHB administration between frequent and first-time GHB users. By frequent GHB administrations, feed-back mechanisms within the L-glutamate metabolism can be evoked or diminished leading to varying metabolic patterns. This is of course only a hypothesis and further research would be necessary to clarify the factors influencing this diagnostic ratio.

Long-term stability of GHB_GLUC/F320

As this diagnostic ratio did not improve the detectability in the first-time GHB user (volunteer 3, Figure 6) a different approach was additionally investigated. As both GHB_GLUC and β -citryl glutamic acid were found well correlated in the investigated population, the questioned arose if this ratio might also be stable over time intra-individually. This long-term stability of individual markers is commonly employed in sports drug testing and used for both hematological and steroidal parameters.[32,33,41] The results obtained on 5 individuals are listed in Table 1. Even after specific gravity correction applied, the urinary concentrations of GHB_GLUC show distinct scatter with coefficients of variation (CV) up to 69 %. In all individuals, the CV is found significantly reduced when the ratio GHB_GLUC/F320 is under consideration. All CVs fall below 30 %, a value also found for urinary steroids for example that allows for application of thus ratios in sports drug testing.[33]

One possible scenario for DFSA would be the comparison of the initial urinary ratio found in the first urine sample collected as soon as possible after the criminal offence to samples collected during the following days. These follow-up samples would create an individual threshold and compared to this the initial urine can be evaluated. If and how this could work in practice is difficult to assess with the few number of observations at hand. Unfortunately, for

volunteer 1 and 2 no baseline samples are available as both are frequent therapeutic GHB users. In volunteer 3, the approach proved applicable as shown in Figure 8. The 3 unsuspecting samples had a mean ratio of 6.55 ± 1.23 resulting in the depicted thresholds. Compared to the urinary GHB concentrations the detection window for the exogenous GHB doubles to 8 h for this approach while it was < 4 h for the direct GHB determination in both urine and plasma.[22] Despite being preliminary, the data so far demonstrates the possible benefits of the described approach and demand further research in this direction as it is for a more or less parallel approach using hair.[14,16,17] Here the individual baseline concentrations are used, too, but for a timely detection of DFSA the urinary matrix should be beneficial.

Conclusion

Both phase-II-metabolites of GHB were not found suitable to improve GHB detection straightforwardly. Especially for GHB_SULF the inter-individual variability was large impeding the use of reference population based thresholds and less pronounced similar results were obtained for GHB_GLUC.

As the correction for urinary specific gravity improved the threshold for GHB_GLUC considerably, a metabolomics approach was used to identify other urinary compounds showing significant correlation to the GHB_GLUC excretion. The most promising candidate F320 was further investigated and could be identified to be β -citrull glutamic acid. The ratio build by GHB_GLUC and this molecule, most probably linked to GHB metabolism by L-glutamate, parallelized the excretion pattern in both investigated long-term users of GHB with the strongest response visible after 12 h. The first-time GHB user responded in a completely different manner. Here the application of an individual threshold for the ratio was a promising tool to prolong GHB detectability.

Further research on the suggested approach using a diagnostic ratio and intra-individual instead of inter-individual thresholds will be necessary to evaluate if this course of action may substantially contribute to what has recently been described as “The everlasting issue of GHB cut-offs in biological samples”.[42]

Conflict of interests

None

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Daniel Sejer Pedersen for providing the internal standard, and all volunteers for taking part in this study.

References

- 1) H. Laborit, J. Jovany, J. Gerard, F. Fabiani, Résumée d'une étude expérimentale et Clinique sur un substrat métabolique à action centrale inhibitrice: le 4-hydroxy-butyrate de Na⁺, *Presse Méd* 50 (1960) 1867-1869.
- 2) L. Gallimberti, G. Canton, N. Gentile, M. Ferri, M. Cibin, S.D. Ferrara, F. Fadda, G.L. Gessa, Gamma-hydroxybutyric acid for the treatment of alcohol withdrawal syndrome, *Lancet* 2 (1989) 787-789.
- 3) M.B Scharf, A.A. Lai, B. Branigan, R. Stover, D.B. Berkovitz, Pharmacokinetics of gammahydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients, *Sleep* 21 (1998) 507-514.
- 4) K.L. Nicholson, R.L. Balster, GHB: a new and novel drug of abuse, *Drug Alcohol Depend* 63 (2001) 1-22.
- 5) L. Degenhardt, S. Darke, P. Dillon, The prevalence and correlates of gamma-hydroxybutyrate (GHB) overdose among Australian users, *Addiction* 98 (2003) 199-204.
- 6) F.J. Couper, B.K. Logan, Determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) in Biological Specimens by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J Anal Toxicol* 24 (2000) 1-7.
- 7) R. Brenneisen, M.A. ElSohly, T.P. Murphy, J. Passarelli, S. Russmann, S.J. Salamone, D.E. Watson, Pharmacokinetics and Excretion of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Healthy Subjects, *J Anal Toxicol* 28 (2004) 625-630.
- 8) S.S. Johansen, C.N. Windberg, Simultaneous Determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) and its Analogues (GBL, 1,4-BD, GVL) in Whole Blood and Urine by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *J Anal Toxicol* 35 (2011) 8-14.
- 9) A.D. Brailsford, D.A. Cowan, A.T. Kicman, Pharmacokinetic properties of γ -hydroxybutyrate (GHB) in whole blood, serum and urine, *J Anal Toxicol* 36 (2012) 88-95.
- 10) A.A. Elian, Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood, *Forensic Sci Int* 128 (2002) 120-22.
- 11) A.D. Brailsford, D.A. Cowan, A.T. Kicman, Urinary gamma-hydroxybutyrate concentrations in 1126 female subjects, *J Anal Toxicol* 34 (2010) 555-561.
- 12) P.E. Mason, W.P. Kerns II, Gamma Hydroxybutyric Acid (GHB) Intoxication, *Acad Emerg Med* 9 (2002) 730-739.
- 13) R. Paul, L. Tsanaclis, R. Kingston, A. Berry, A. Guwy, Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS, *Drug Test Analysis* 3 (2011) 201-205.

- 14) E. Bertol, F. Mari, F. Vaiano, G. Romano, S. Zaami, G. Baglio, F.P. Busardo, 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 Analysis* 7 (2015) 376-384.
- 15) E. Jagerdeo, M.A. Montgomery, M.A. LeBeau, An Improved Method for the Analysis of GHB in Human Hair by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *J Anal Toxicol* 39 (2015) 83–88.
- 16) F.P. Busardo, F. Vaiano, G. Mannocchi, E. Bertol, S. Zaami, E. Marinelli, Twelve month monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault, *Drug Test Analysis* (2016) DOI 10.1002/dta.2100.
- 17) X. Wang, K. Linnet, S.S. Johansen, Development of a UPLC–MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases, *Forensic Toxicol* (2016) DOI 10.1007/s11419-015-0285-6.
- 18) I. N. Petersen, J.L. Kristensen, C. Tortzen, T. Breindahl, D.S. Pedersen, Synthesis and stability study of a new major metabolite of gamma-hydroxybutyric acid, *Beilstein J Org Chem* 9 (2013) 641-646.
- 19) I.N. Petersen, C. Tortzen, J.L. Kristensen, D.S. Pedersen, T. Breindahl, Identification of a new metabolite of GHB: Gamma-Hydroxybutyric acid glucuronide, *J Anal Toxicol* 37 (2013) 291-297.
- 20) S. Hanisch, N. Stachel, G. Skopp, A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid, *Int J Legal Med* 130 (2016) 401-414.
- 21) L.M. Mehling, T. Piper, J. Dib, D.S. Pedersen, B. Madea, C. Hess, M. Thevis, Development and validation of a HPLC–QTOF-MS method for the determination of GHB- β -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine, *Forensic Toxicol* (2016) DOI 10.1007/s11419-016-0339-4
- 22) L.M. Mehling, T. Piper, A. Spottke, A. Heidbreder, P. Young, B. Madea, M. Thevis, C. Hess, GHB-O- β -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake, *Forensic Toxicol* (2016) DOI 10.1007/s11419-016-0352-7.
- 23) T. Piper, A. Thomas, N. Baume, T. Sobolevsky, M. Saugy, G. Rodchenkov, W. Schänzer, M. Thevis, Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1 β -D-ribofuranoside (AICAR), *Rapid Commun Mass Spectrom* 28 (2014) 1194–1202.

- 24) R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- 25) H.E. Solberg, Approved Recommendation (1986) on the Theory of Reference Values. Part 1. The Concept of Reference values. *J clin chem clin biochem* 25 (1987) 337-342.
- 26) H.E. Solberg, C. PetitClerk, Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimen for the production of reference values. *Clin Chim Acta* 177 (1988) S1-S12.
- 27) H.E. Solberg, Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values. Part 5. Statistical Treatment of Collected Reference Values. Determination of Reference limits. *J clin chem clin biochem* 25 (1987), 645-656.
- 28) F.P. Busardò, C. Kyriakou, E. Marchei, R. Pacifici, D.S. Pedersen, S. Pichini, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for determination of GHB and metabolites in different specimens: application to clinical and forensic cases. *J Pharm Biomed Anal* (2017) DOI 10.1016/j.jpba.2017.01.022.
- 29) C.C. Halter, S. Dresen, V. Auwaerter, F.M. Wurst, W. Weinmann, Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake, *Int J Legal Med* 122 (2008) 123–128.
- 30) L. Dehennin, P. Lafarge, P. Dailly, D. Bailloux, J.P. Lafarge, Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: a simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry, *J Chrom B* 687 (1996) 85-91.
- 31) T. Piper, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids excreted as sulpho conjugates. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (2010) 3171–3181.
- 32) M. Donike, K. R. Bärwald, K. Klostermann, W. Schänzer, J. Zimmermann, Nachweis von exogenem Testosterone, in: H. Heck, W. Hollmann, H. Liesen, R. Rost (Eds.), *Sport: Leistung und Gesundheit*, Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 1983, pp. 293–298.
- 33) U. Mareck, H. Geyer, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *J Mass Spectrom* 43 (2008) 877-891.
- 34) M. Miyake, H. Morino, M. Mizobuchi, Y. Kakimoto, N-Acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl- α -L-aspartyl-L-glutamic acid and β -citryl-L-glutamic acid in human urine. *Clin Chimica Acta* 120 (1982) 119-126.

- 35) M. Miyake, Y. Kakimoto, M. Sorimachi, A Gas Chromatographic Method for the Determination of N-Acetyl-L-Aspartic Acid, N-Acetyl- α -Aspartylglutamic Acid and β -Citryl-L-Glutamic Acid and Their Distributions in the Brain and Other Organs of Various Species of Animals. *J Neurochemistry* 36 (1981) 804-811.
- 36) M. Miyake, Y. Kakimoto, M. Sorimachi, Isolation and identification of β -citryl-L-glutamic acid from newborn rat brain. *Biochim Biophys Acta* 544 (1978) 565-666.
- 37) M. Hamada-Kanazawa, M. Kouda, A. Odani, K. Matsuyama, K. Kanazawa, T. Hasegawa, M. Narahara, M. Miyake, β -Citryl-L-glutamate Is an Endogenous Iron Chelator That Occurs Naturally in the Developing Brain. *Biol Pharm Bull* 33 (2010) 729-737.
- 38) F. Collard, V. Stroobant, P. Lamosa, C.N. Kapanda, D.M. Lambert, G.G. Muccioli, J.H. Poupaert, F. Opperdoes, E. Van Schaftingen, Molecular Identification of N-Acetylaspartylglutamate Synthase and β -Citrylglutamate Synthase. *J Biol Chem* 285 (2010) 29826-29833.
- 39) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Butanoate Metabolism. http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa00650. Accessed 14.06.2017
- 40) S. D. Yelamanchi, S. Jayaram, J. K. Thomas, S. Gundimeda, A. A. Khan, A. Singhal, T. S. K. Prasad, A. Pandey, B. L. Somani, H. Gowda, A pathway map of glutamate metabolism. *J Cell Commun Signal* 10 (2016) 69–75.
- 41) P. E. Sottas, N. Robinson, O. Rabin, M. Saugy, The Athlete Biological Passport. *Clinical Chemistry* 57 (2011) 7969–7976.
- 42) F.P. Busardò, S. Pichini, The everlasting issue of GHB cut-offs in biological samples: How important it is to be careful when interpreting values, *Forensic Sci. Int.* (2017), DOI 10.1016/j.forsciint.2017.02.022.

Figures

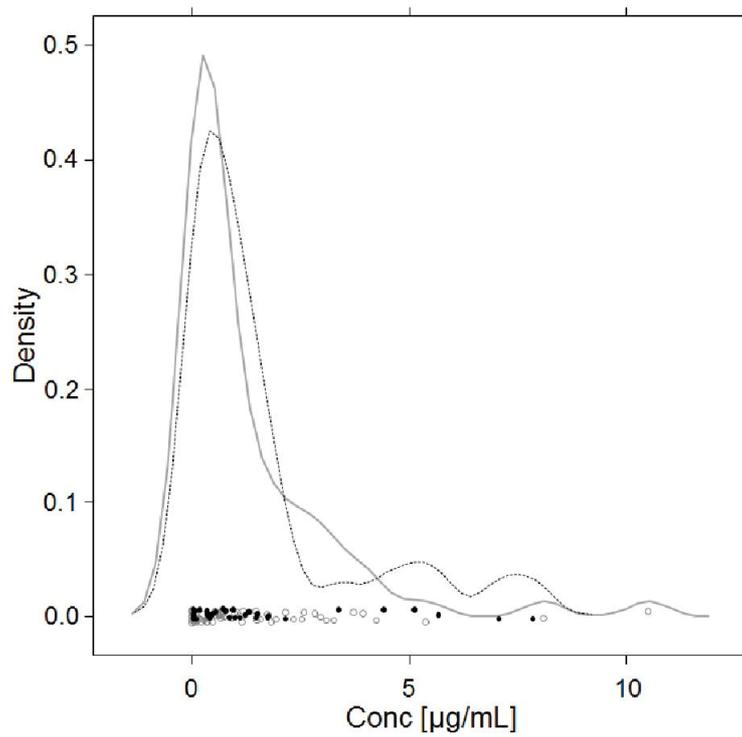


Figure 1: Density plot of urinary GHB_SULF concentrations found in n = 66 male sample (solid grey line, open circles) and n = 34 female samples (dashed black line, black circles).

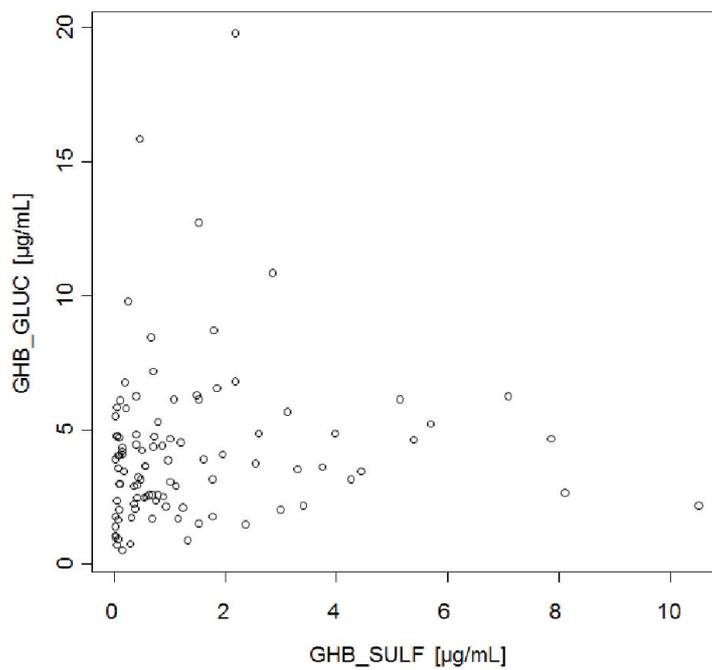


Figure 2: Scatter plot of measured individual GHB_SULF versus GHB_GLUC concentrations in urine after correction for specific gravity.

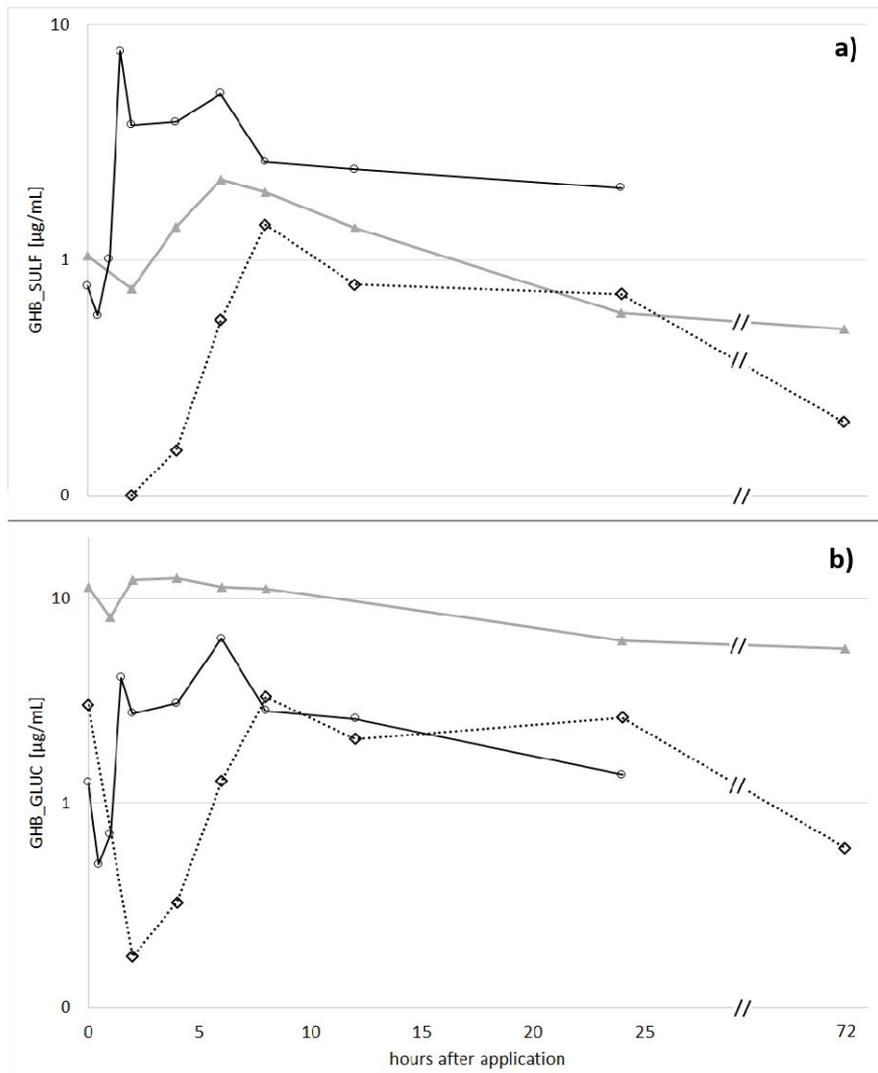


Figure 3: Urinary GHB_SULF (upper part) and GHB-GLUC (lower part) concentrations (corrected for specific gravity) after administration of GHB at t=0. Volunteer 1 (grey triangles, grey line), volunteer 2 (open diamonds, dashed line) and volunteer 3 (open circles, black line).

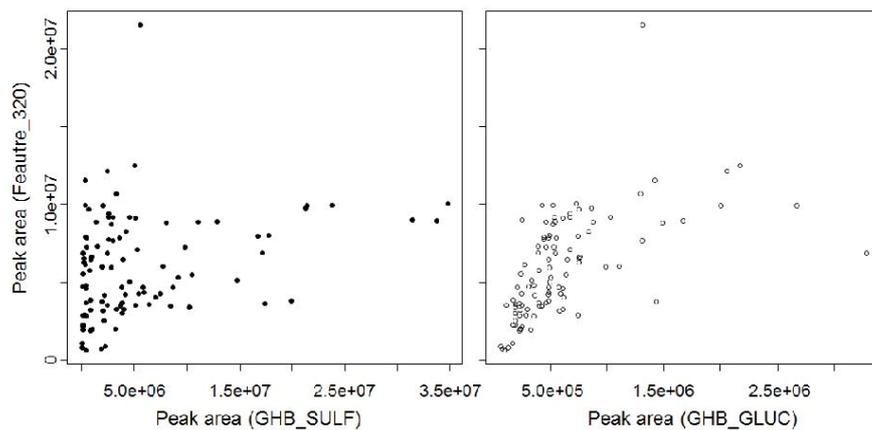


Figure 4: Scatter plot of peak areas measured for GHB_SULF (left) and GHB_GLUC (right) against the peak areas found for F320.

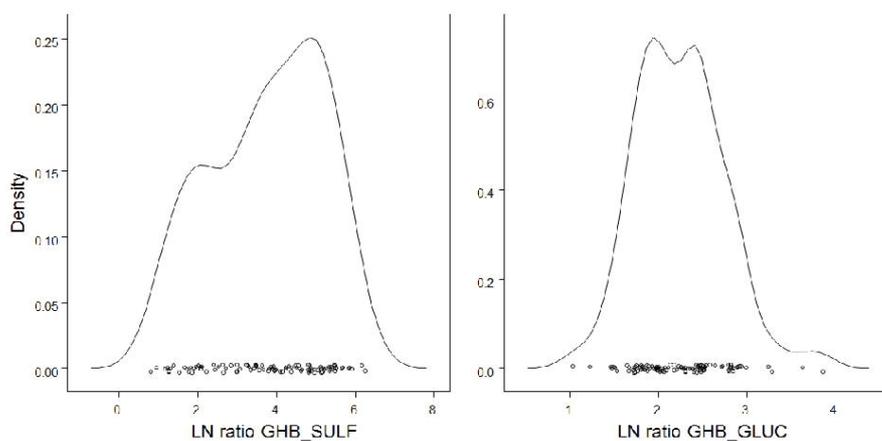


Figure 5: Density plot of the logarithmized ratios of GHB_SULF (left) and GHB_GLUC (right) calculated by dividing the respective area under the peak by the peak area of F320.

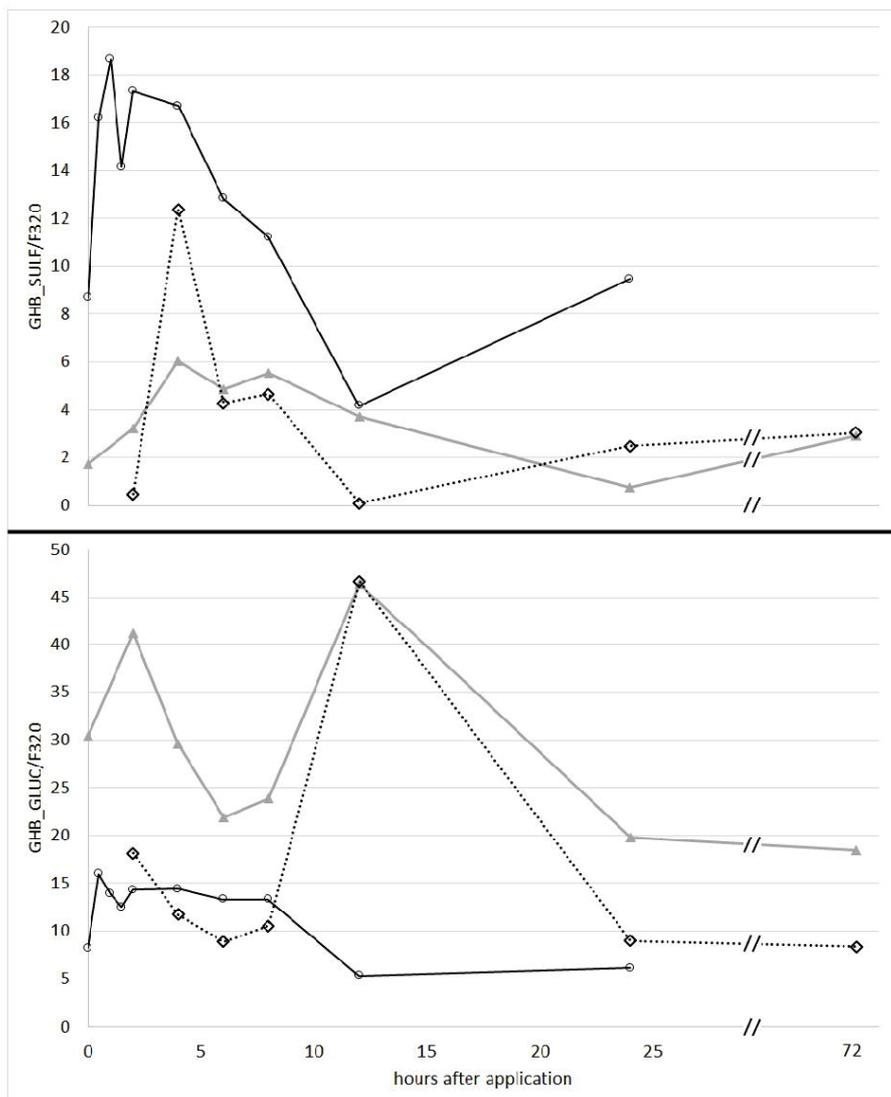


Figure 6: Ratio of the area under the peak of GHB_SULF and F320 (upper part) and GHB_GLUC divided by F320 (lower part) after administration of GHB at 0 h. Volunteer 1 (grey triangles, grey line), volunteer 2 (open diamonds, dashed line) and volunteer 3 (open circles, black line). The population based reference limit for GHB_GLUC was found at 40.8.

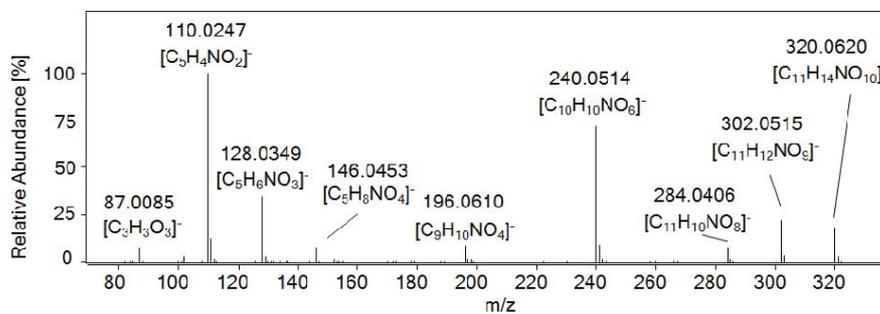


Figure 7: QTOF product ion mass spectrum of F320. Suggested product ion formulae were calculated with a mass error < 4 ppm. Further information in the text.

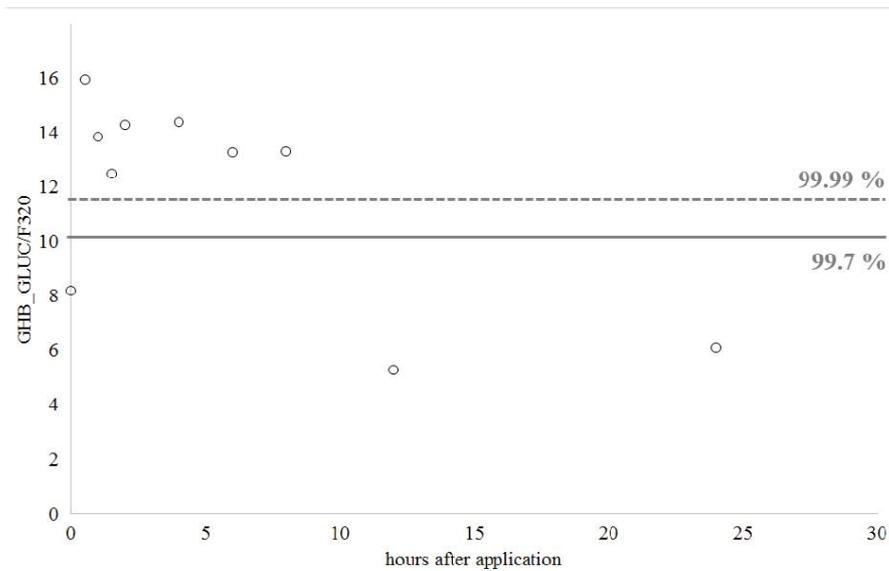


Figure 8: Values obtained for the ratio of urinary GHB_GLUC/F320 in volunteer 3 never administered GHB before. The shown thresholds were calculated by adding the 3- and 4-fold standard deviation to the mean value of the 3 unsuspecting urines.

Tables

Table 1: Long-term stability of urinary GHB_GLUC concentrations (corrected for specific gravity) and the proposed ratio GHB_GLUC/F320. SD – standard deviation, CV – coefficient of variation.

volunteer	n	GHB_GLUC			GHB_GLUC/F320		
		Mean [ng/mL]	SD	CV [%]	Mean	SD	CV [%]
P1	6	4421	1593	36	18,7	3,7	20
P2	6	262	60	23	14,1	1,9	13
P3	8	407	279	69	7,2	1,1	15
P4	20	2023	830	41	15,6	4,3	28
P5	20	1526	414	27	17,5	3,7	21

7.2 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die GHB-Sulf Konzentrationen von Narkolepsie-Patienten nach GHB-Einnahme in Urinproben bestimmt und diese mit endogenen Konzentrationen von freiwilligen Personen, bei denen eine GHB-Einnahme ausgeschlossen werden konnte, verglichen. Das Kontrollkollektiv wurde aus den Urinproben von Athleten (n=100) zusammengestellt, die endogenen Konzentrationen wurden in einem Bereich von 0,009-11,5 mg/L bestimmt. Die Konzentrationen von GHB-Sulf nach der Einnahme von GHB zeigten in den Urinproben der Narkolepsie-Patienten einen signifikanten Anstieg der Konzentrationen in allen drei Patienten. Verglichen mit den ermittelten Urinkonzentrationen vor der Aufnahmen waren diese (P2) doppelt oder sogar zehn bis 14-mal so hoch wie die initialen Werte (P3 und P1). Maximale Konzentrationen wurden für P1 und P2 zwischen 6 und 8 h nach Applikation ermittelt, während in den Proben des Therapieeinsteigers (P3) der sofortige Anstieg der GHB-Sulf-Konzentrationen beobachtet werden konnte. Obwohl in den Urinproben der Narkolepsie-Patienten maximale Konzentrationen z. B. bis zu 7,7 mg/L (P3) erreichten wurden, überstiegen diese nicht den Bereich, der auch im Kontrollkollektiv aufgefunden werden konnte.

Anschließend wurde untersucht wie die endogenen Konzentrationen von GHB-Sulf mit der spezifischen Dichte und mit den ermittelten Konzentrationen des GHB-Metaboliten GHB-Gluc in den jeweiligen Urinproben korrelieren. Die Korrelation der spezifischen Dichte zu beiden Metaboliten war gering, jedoch hoch signifikant. Der Wert für den Korrelationskoeffizienten zwischen den beiden Metaboliten ging gegen null, was für eine schlechte Korrelation spricht. Daraufhin wurde in den Proben des Kontrollkollektivs nach bisher nicht in Zusammenhang mit dem GHB-Metabolismus gebrachten endogenen Substanzen gesucht, die parallel zu den Metaboliten eliminiert werden und gut mit beiden Stoffwechselprodukten korrelieren. Diese Moleküle sollten eine Normalisierung der Proben ermöglichen. Die Analyse der Datenbank konnte das Feature F320 in allen untersuchten Proben finden. Später konnte es als β -Citryl-Glutaminsäure identifiziert werden. Die Konzentration der Substanz korrelierte gut mit den Konzentrationen der beiden Metaboliten, wobei die Korrelation mit GHB-Gluc signifikanter war. Anschließend wurden die Verhältnisse in den Urinproben der Narkolepsie-Patienten berechnet. Die Bildung der Verhältnisse GHB-Sulf/F320 zeigte weiterhin einen deutlichen Anstieg der Werte in allen drei Patienten, jedoch innerhalb des Bereichs, in dem sich die Werte des Kontrollkollektivs befanden. Die Eliminationskurven der Patienten P1 und P2, die regelmäßig GHB einnahmen,

glichen sich einander an, nachdem das Verhältnis GHB-Gluc/F320 gebildet wurde. Den Graphen war zu entnehmen, dass 12 h nach GHB-Einnahme ein maximaler Wert erreicht wurde, der den Bereich des Kontrollkollektivs überschritt. Das Ausscheidungsprofil von P3 zeigte für das Verhältnis GHB-Gluc/F320 einen moderaten Anstieg. Daher wurde für den Patienten P3 getestet, ob auch eine intra-individuelle Bestimmung eines Grenzwertes für den Quotienten GHB-Gluc/F320 möglich war. Es wurden drei Proben mit unauffälligen Werten ausgewählt und ein Mittelwert gebildet. Dieser stellte den intra-individuellen Grenzwert dar. Eine GHB-Gabe konnte mit Hilfe dieser Methode bis zu 8 h nach Einnahme nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten die Untersuchungen zeigen, dass, wie bereits für GHB-Gluc gezeigt, GHB-Sulf anscheinend kein geeigneter Marker zum Nachweis einer GHB-Einnahme darstellt. Die Korrelation mit der Substanz β -Citryl-Glutaminsäure zeigte eine gute Korrelation zu beiden Metaboliten mit einer hohen Signifikanz für GHB-Gluc. Der Einfluss der Substanz auf den Stoffwechselweg von GHB konnte in den Ausscheidungsprofilen der chronischen Patienten beobachtet werden, indem sich deren Verläufe nach der Bildung des Verhältnisses GHB-Gluc/F320 anpassten. Die Verwendung dieser Substanz als intra-individueller Standard konnte anschließend am Beispiel der Konzentrationen des Patienten P3 demonstriert werden. Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Untersuchungen geben Anlass, die Substanz β -Citryl-Glutaminsäure und dessen Funktion im GHB-Stoffwechsel weiter zu untersuchen, um das Nachweisfenster nach GHB-Gabe zu verlängern.

8 Veränderung der Genexpression nach der Einnahme von GHB – eine Pilotstudie

8.1 Einleitung

Die physiologische Wirkung von GHB als Neurotransmitter wurde bisher nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass es direkt und indirekt die Aktivität des gabaergen, opioiden, serotonergen oder dopaminergen Systems moduliert [52]. Hieraus resultieren verschiedene medizinische Anwendungsgebiete für GHB, diese sind u. a. die Behandlung der Alkohol- und Opiatabhängigkeit sowie die Therapie der Narkolepsie [13,14,147]. Im zentralen Nervensystem wird GHB aus dem Neurotransmitter GABA mit Hilfe der Enzyme GABA-Transaminase und Succinat-Semialdehyd-Reduktase gebildet [2,3]. Hierbei entsteht das Zwischenprodukt Succinat-Semialdehyd, welches alternativ auch mit Hilfe des Enzyms Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu Bernsteinsäure oxidiert werden kann [31]. Die Gene *ALDH5A1* und *AKR7A2* codieren jeweils für die beiden Enzyme [29,32]. Ob und in welchem Maße die Expression dieser beiden Gene endogen reguliert wird, wenn die GHB-Konzentration exogen erhöht wird, wurde bisher noch nicht untersucht. Das Überangebot an GHB im Körper lässt vermuten, dass die GHB-Biosynthese herunterreguliert und stattdessen Succinat-Semialdehyd vermehrt in Bernsteinsäure umgewandelt wird. Dies hätte zur Folge, dass das Gen *AKR7A2* geringer und das Gen *ALDH5A1* stärker exprimiert wird.

Bereits Larson et al. untersuchten die Genexpression nach GHB-Gabe im Mausmodell und stellten fest, dass die Gene *EREG* und *PEA-15* nach intraperitonealer Verabreichung im peripheren Blut stärker exprimiert wurden. Hierbei wurde die Genexpression mittels Micro Array und qRT-PCR gemessen [151]. Des Weiteren wurden in einer Poster-Präsentation von Abdullah und Ellis die Ergebnisse von Expressions-Arrays vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass auch Einzeldosen von GHB zu signifikanten Veränderungen in der Expression von 584 Genen in humanen monozytären Leukämiezellen (THP-1 Zellen) führen [41].

Viele neue Ansätze zum Nachweis einer GHB-Gabe wurden bereits veröffentlicht, jedoch konnte bisher kein Ansatz das Nachweisfenster vergrößern und damit die Chance für eine eindeutige Beweislage erhöhen. Die Untersuchung der Veränderung der Genexpression nach GHB Exposition stellte daher einen neuen und vielversprechenden Untersuchungsansatz dar. Im Rahmen dieser Studie wurden die Veränderung der Expression der *Genes of Interest*

(GOI, Zielgene), die entweder direkt in die Biosynthese von GHB involviert sind (*AKR7A2*, *ALDH5A1*) oder für die bereits eine Beeinflussung durch GHB nachgewiesen worden war (*EREG* und *PEA-15*), in humanen peripheren Vollblutproben untersucht. Ziel war es, potentielle biologische Marker zum forensischen Nachweis einer GHB-Einnahme im Zusammenhang mit der Aufklärung von DFCs zu identifizieren.

Die Studie wurde entsprechend den ethischen Richtlinien der Erklärung von Helsinki erstellt (letzte Fassung Okt. 2013). Es wurden Blutproben von zwei Personengruppen gesammelt. Die erste Gruppe, das Fallkollektiv, umfaßte drei Patienten, die GHB zur Behandlung der Narkolepsie therapeutisch einnahmen. Den Patienten wurde sowohl vor als auch nach der GHB-Einnahme Blut entnommen, welches zur Stabilisierung der RNA in PaxGene-Röhrchen gesammelt und bei -80°C gelagert wurde. Die zweite Gruppe bestand aus 49 Personen, die laut Selbstauskunft noch nie GHB eingenommen hatten. Sie bildeten das Vergleichskollektiv, die sogenannte Kontrollgruppe. Anschließend wurde eine Methode entwickelt und eine Normalisierungsstrategie etabliert. Die Dokumentation und Publikation der qPCR-Prozeduren und -ergebnisse erfolgte gemäß den MIQE-Richtlinien, [152]. Die Normalisierungsstrategie entsprach dem allgemein anerkannten Goldstandard, indem aus einem Panel von 7 Kandidaten-Genen unter Anwendung der Algorithmen geNorm, Normfinder und BestKeeper die bestgeeigneten Referenzgene (*FPGS* und *PPIB*) für die Datennormalisierung ausgewählt wurden. Diese Strategie wurde zur Normalisierung der im Rahmen der Studie generierten qPCR-Daten eingesetzt. Gemessen wurde hier die Expression der GOIs *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG* und *PEA-15*. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Softwares GenEx (Version 6; Multid Analyses, Göteborg, Sweden) und SPSS (Version 22.0, IBM Corp. Armonk, NY, USA) ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der Arbeit *Alterations in gene expression after gamma-hydroxybutyric acid intake – a pilot study* im *International Journal of Legal Medicine* veröffentlicht.

Alterations in gene expression after gamma-hydroxybutyric acid intake—A pilot study

Lena-Maria Mehling¹ · Annika Spottke² · Anna Heidbreder³ · Peter Young³ · Burkhard Madea¹ · Cornelius Hess¹ · Cornelius Courts⁴

Received: 13 February 2017 / Accepted: 4 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) acts as an agonist of the GABA_B receptor, where GHB induces a depressant effect in the central nervous system. Besides its therapeutic application, GHB is also used as a date rape drug. However, the detection of GHB ingestion proves to be difficult due to its narrow detection window. The aim of this pilot study was to assess differential gene expressions after GHB intake to identify potential biomarkers for the detection of GHB intake. To this aim, alteration in gene expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG*, and *PEA15* was investigated via quantitative PCR (qPCR). Data normalization was based on a previously established and empirically derived normalization strategy. Blood samples of patients ($n = 3$) therapeutically taking sodium oxybate solution (GHB) and of donors without GHB intake ($n = 49$) were analyzed and compared. All qPCR procedures and results are reported according to the MIQE guidelines. Investigation of suitable reference genes using established algorithms suggested *PP1B* and *FPGS* as

best-suited normalizers. Alterations in gene expression relating to GHB intake could not be confirmed to a forensically sufficient degree. However, significant differences in expression of *EREG* in the control group were observed, when time-point of sample collection was considered, indicating circadian rhythm. The study's main limitation is the small number of study subjects. Herein, we are first to present an empirically derived strategy for a robust normalization of qPCR data from the analysis of GHB-induced gene expression in human blood. We present results of the analysis of differential expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG*, and *PEA15* in the GHB-negative population. Finally, we report our findings on the effect of GHB intake on the expression of these genes and their presumable potential as GHB biomarkers.

Keywords GHB exposure · Gene expression · *ALDH5A1* · *AKR7A2* · *EREG* · *PEA15*

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00414-017-1609-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

- ✉ Lena-Maria Mehling
lena-maria.mehling@ukbonn.de
- ✉ Cornelius Courts
cornelius.courts@uksh.de

¹ Institute of Forensic Medicine, University Hospital Bonn, Stiftsplatz 12, 53111 Bonn, Germany

² Department of Neurology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Straße 25, 53127 Bonn, Germany

³ Department of Neurology, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Straße 1, 48149 Münster, Germany

⁴ Department of Forensic Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Germany

Introduction

At present, gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is used as a medication against the sleeping disorder narcolepsy [1]. In 1960, its first application was as an anesthetic in surgery [2]. Subsequently, it was reportedly being occasionally misused as a doping substance as well as a recreational drug [3–5]. In the forensic community, GHB attained more attention for its use as knockout drug (also known as ‘date rape drug’) in drug-facilitated crime (DFC) [6] although Anderson et al. recently published a systematic review of global epidemiological perspectives on drugs used in drug-facilitated sexual assaults (DFSA) where they argue that GHB is not as frequently used in DFSA as suggested by populist perceptions. Due to its fast metabolism and usually long time spans between instances of

DFSA and self-report by the victims, this drug of abuse might go undetected, when it has been given in DFSA [7].

This is due to GHB's narrow window of detection in plasma (<6 h) and urine (<12 h) [8, 9]. To date, only few studies applying alternative methodologies to verify GHB exposure and to widen the window of detection are available. Saudan et al. [10] employed gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS) to determine the differences in isotope composition between exogenous and endogenous GHB in blood samples of human subjects. Mehling et al. [11] investigated the concentrations of the metabolite GHB- β -*O*-glucuronide, produced by the enzyme UDP-glucuronosyltransferase during phase II metabolism, in blood and urine samples of narcoleptic patients treated with sodium oxybate solutions using high-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-QToF-MS). Furthermore, hair analyses of human subjects after GHB intake were investigated by several research groups [12–14]. The conclusions of all investigations are in agreement that the proof of GHB intake is very challenging and that results should be considered with caution.

In a poster presentation, Abdullah and Ellis reported expression array results showing that even single doses of GHB lead to highly significant alterations in the expression of 584 genes in human monocytic leukemia TH-P1 cells [15]. More specifically, then, Gibson et al. [16] in their study on succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency reported that patients showed elevated GHB concentrations due to impaired conversion of succinic semialdehyde to succinic acid. Two exon-skipping mutations in *ALDH5A1* caused reduced activity of the enzyme succinic semialdehyde dehydrogenase (Fig. 1) [17]. The resulting accumulated concentrations of gamma-aminobutyric acid (GABA) and succinic semialdehyde were converted by GABA-transaminase and succinic semialdehyde reductase into GHB [18], which acts as an endogenous neurotransmitter in the central nervous system [19].

A new approach was conducted by Larson et al. [20] with the aim to identify a surrogate marker for GHB intake. They investigated the expression variation of several genes in mouse models (DBA/2J) using a gene expression microarray after intraperitoneal injection of sodium oxybate solution. They showed that *PEA-15* and *EREG* encoding for phosphoprotein enriched in astrocytes 15 [21] and epiregulin [22], respectively, were significantly higher expressed in treated mice as compared to the control group up to 96 h after GHB injection. Based on these findings, we quantified the expression of *EREG* and *PEA-15* after GHB intake in leucocytes of peripheral blood samples. Additionally, we investigated whether chronic intake of GHB or single-dose GHB exposure can influence the expression of *AKR7A2* (succinic semialdehyde reductase) [23] and *ALDH5A1* (succinic semialdehyde dehydrogenase) [24]. To ensure valid data by quantitative PCR (qPCR), we employed an empirically established

strategy of normalization based on reference genes as is considered gold standard in qPCR analysis [25–27].

The aim of this pilot study was to investigate if the differential expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG*, and *PEA15* after chronic and single-dose GHB exposure might be able to widen the window of detection, and to identify potential surrogate markers to provide evidence for GHB intake. The main limitation of the study is the as yet limited number of participating narcoleptic patients, who were treated with sodium oxybate.

Material and methods

Adherence to MIQE guidelines

To facilitate reliable and unequivocal interpretation of the qPCR results reported herein, all information that is rated 'essential' according to the MIQE guidelines is reported, where applicable [28].

Study design and sample collection

Blood samples were collected from volunteers with (case group, $n = 3$) and without (control group, $n = 49$) GHB intake. A total of 2 mL of the collected blood samples were added to PAXgene blood RNA tubes (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Switzerland) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to ensure RNA stability until extraction. All volunteers had been informed about the risks of the study and provided their written informed consent. The study design was approved by the ethics committee of the University Hospital of Bonn according to the Declaration of Helsinki (most recent version, Oct. 2013).

Control group

Parameters of each test person like gender, age, body mass index (BMI), and time-point of blood collection [morning 07:00–10:00 ($n = 23$); midday 14:05–16:30 ($n = 11$); evening 17:30–19:00 ($n = 15$)] were documented. All volunteers abstained from alcohol consumption for at least 20 h before sampling and had never been exposed to GHB.

Case group

All test persons had been diagnosed with narcolepsy ($n = 3$). Test persons one (P1; female, 36 years old; BMI 22.1) and two (P2; female, 18 years old, BMI 24.9) of the case group had been therapeutically administered Xyrem® (UCB Pharma, Monheim, Germany) containing the pharmaceutical sodium oxybate, the sodium salt of gamma-hydroxybutyric acid (GHB). The third test person (P3; male, 47 years old; BMI

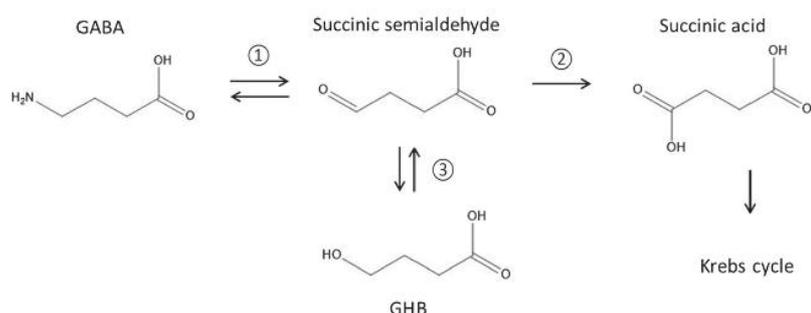


Fig. 1 According to the figure of Chambliss et al. [17]. Synthesis of 4-hydroxybutyric acid (GHB) from gamma-aminobutyric acid (GABA) and degradation of succinic semialdehyde to succinic acid; ① GABA-

transaminase, ② succinic semialdehyde dehydrogenase (gene: *ALDH5A1*), ③ succinic semialdehyde reductase (gene: *AKR7A2*)

26.3) took a sodium oxybate solution (Somsanit®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Germany).

P1 and P2 daily took Xyrem® for 9 and 6 years, respectively. P1 and P2 had stopped taking the drug 3 days and 18 h before the first samples were taken, respectively. For the investigations, P1 and P2 took Xyrem® in a dose of 2.25 g. Subsequently, whole blood samples were collected prior to and after 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, and 72 h and were stored at -80°C .

P3 had not been on medication before participating in the study. Blood samples of P3 were collected after administration of a single dose of 2.423 g sodium oxybate solution according to the protocol described above. Sample collection of P3 finished 24 h after GHB exposure. All samples of the case group were mostly collected in the night (22:00–08:00).

RNA extraction and quantification

All surfaces, devices, and machines utilized in the extraction procedure were cleaned using Roti®-Nukleinsäurefrei (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) and RNase-Zap™ (Ambion, Austin, TX, USA) to remove ambient DNases as well as RNases, and only reagents and consumables certified as “RNase-free” were used. Total RNA was extracted using the Direct-zol™ Mini Prep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the protocol for PAXgene tubes. A total of 1 or 1.5 mL of the blood sample (depending on the received total RNA amount) were transferred to a 2 mL tube and centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min. The supernatant was removed, and the pellet was re-suspended in 50 μL of 2 \times Digestion buffer (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and 50 μL of DNA/RNA shield (Zymo Research, Irvine, CA, USA). After addition of 10 μL Protein kinase K solution (\approx ca. 5 Units), samples were slightly mixed and incubated at 55°C for 30 min. Total RNA was extracted using 100 μL TRIzol solution included in the kit. After several purification steps, total mRNA of each blood sample was eluted in a final step adding 30 μL of RNase-free water and centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 s.

Afterwards, to remove potential traces of genomic DNA, DNA digestion was performed with the Turbo DNase-free™ kit following the manufacturer’s protocol. Total RNA yield was determined using the Quant-iT™ RNA assay on a Qubit fluorometer (both from Invitrogen, Darmstadt, Germany). Total RNA extracts were stored at -80°C until further processing.

Selection of candidate reference genes

A panel of seven reference genes was selected based on surveys of the literature and the publicly available Genevestigator® database. The genes *TRAP1*, *FPGS*, *DECR*, and *PPIB* had been shown to be suitable to normalize gene expression data in peripheral blood by Stamova et al. [29]. In addition, *TGFBRAPI*, *ARHGAP32*, and *PEX16* were selected as potential reference genes based on a Genevestigator search that was parameterized for small expression variation and expression levels similar to the genes of interest (GOI) as measured via microarray analysis for blood samples.

Reverse transcription qPCR (RT-qPCR)

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as per manufacturer’s protocol. Each 40 μL reaction volume contained 5 ng of total RNA, 1 \times reverse transcription buffer, 1 \times random primers, 0.1 M dNTP Mix, and 50 U MultiScribe™ Reverse Transcriptase. RT reactions were run in a T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) with the following thermo-profile: 25°C for 10 min, 37°C for 120 min, and 85°C for 5 min. RT products were then stored at -20°C . Negative controls (RT $^{-}$, with no reverse transcriptase added) and H₂O controls (with water instead of RNA extract) were performed to exclude contamination with genomic DNA. All reactions were conducted in duplicates.

qPCR reactions were performed using target-specific TaqMan™ Assays (Table 1) and the TaqMan™ Universal Master Mix as per manufacturer's protocol. A total of 2 μ L of the appropriate RT reaction product were added to an 18 μ L reaction volume, containing 1 \times TaqMan™ Universal PCR Master Mix and 1 \times specific TaqMan™ Assay. All sample assay combinations were run in duplicates. The internal PCR control from the PowerQuant™ system for human DNA quantification (Promega, Madison, WI, USA) was used as interplate calibrator as it generates predefined C_q values at given cycling conditions. PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min and then 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. qPCR was performed on an ABI Prism 7500 (Life Technologies). C_q values calculated automatically by the SDS software (threshold value = 0.2, baseline settings: cycles 3–15) were exported along with raw fluorescence data (R_n values) for further analyses. The C_q value was chosen as the cycle at which the amplification has its maximum.

Data analysis and software-based selection of endogenous reference genes

Raw data of the qPCR reactions were extracted and analyzed using LinRegPCR software to calculate efficiency to receive optimized C_q values for each gene in each sample [30]. Analysis of qPCR data including pre-processing was then performed using the GenEx software version 6 (Multid Analyses, Göteborg, Sweden) into which LinReg and SDS spreadsheet-exported data was imported, respectively. Pre-processing of qPCR encompassed the following steps in the given order: interplate calibration, efficiency correction, and

averaging of technical qPCR and RT replicates. Analysis of gene expression stability to determine the most suitable reference genes was then performed by combining the rankings put out by the three different and well-established algorithms geNorm, NormFinder, and BestKeeper [25, 26, 31].

Data analysis and software-based evaluation of GOI

For the data analysis of C_q values received by qPCR, raw data were extracted and processed by LinRegPCR and GenEx software as described above. Normalized C_q values (ΔC_q) were then calculated per sample by subtracting the averaged C_q value of the chosen reference genes from the C_q values of the gene of interest. Results were statistically evaluated using SPSS software (version 22.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

Quantity of total RNA and amplification efficiency

Quantity of total RNA varied between 15.57 and 93.55 ng/ μ L in the analyzed blood samples of the control group ($n = 49$; Supplementary data Table 1).

PCR amplification efficiency, E , was determined using LinRegPCR software, with $\ln \frac{X_q}{X_0} - 1 = E$

where $E = 1$ equaling 100% (X_q PCR product amount after q cycles, X_0 template starting amount). Calculated efficiencies ranged between 75 and 94% with low standard deviations. Results are depicted in Supplementary data Table 2.

Table 1 Specifications of the RNA assays used in this study

Role	Official gene symbol	Gene name	Ref-Seq	TaqMan™ assay ID
GOI	<i>ALDH5A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 5 family member A1	NM_001080.3 NM_170740.1	Hs00542442_m1
GOI	<i>AKR7A2</i>	Aldo-keto reductase family 7 member A2	NM_003689.3	Hs00761005_s1
GOI	<i>EREG</i>	Epiregulin	NM_001432.2	Hs00914313_m1
GOI	<i>PEA15</i>	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	NM_003768.3	Hs00269428_m1
RefGen	<i>FPGS</i>	Folypolyglutamate synthase	NM_004957.4	Hs00191956_m1
RefGen	<i>PP1B</i>	Peptidylprolyl isomerase B	NM_000942.4	Hs00168719_m1
RefGen can	<i>ARHGAP32</i>	Rho GTPase-activating protein 32	NM_001142685.1 NM_014715.3	Hs01009797_m1
RefGen can	<i>TGFBRAP1</i>	Transforming growth factor beta receptor-associated protein 1	NM_001142621.1 NM_004257.4	Hs1093265_m1
RefGen can	<i>PEX16</i>	Peroxisomal biogenesis factor 16	NM_004813.2 NM_057174.2	Hs00191337_m1
RefGen can	<i>DECRI</i>	2,4-Dienoyl-CoA reductase 1	NM_001359.1	Hs00154728_m1
RefGen can	<i>TRAP1</i>	TNF receptor-associated protein 1	NM_016292.2	Hs00212476_m1

GOI gene of interest, RefGen reference gene, RefGen can reference gene candidate

Table 2 Ranking order of the most suitable reference gene

Ranking order	geNorm	NormFinder	BestKeeper	Mean ranking values
1	PPIB, FPGS	PPIB	PEX16	PPIB (1.3)
2	TRAP1	TGFBRAP1	PPIB	
3	TGFBRAP1	FPGS	DECR	TGFBRAP1 (3.0), FPGS (3.0)
4	DECR	DECR	TGFBRAP1	DECR (3.7)
5	ARHGAP32	ARHGAP32	FPGS, TRAP1	TRAP1 (4.3)
6	PEX16	TRAP1	ARHGAP32	PEX16 (4.7)
7		PEX16		ARHGAP32 (5.3)

Determination of the most suitable reference gene

Blood samples ($n = 15$; bolded in Supplementary data Table 1) of the control group were used to determine the most suitable out of a panel of potential reference genes. A graphical representation of the rankings by the different algorithms is included in the Supplementary data (Fig. 1).

geNorm calculates the geometric mean (M value) and presents the results as anti- \log_2 [26]. The genes *FPGS* (M value 0.211) and *PPIB* (M value 0.211) exhibited the lowest M value and were ranked as most suitable genes for normalization in blood. BestKeeper calculates the standard deviation [25] and put out *PEX16* ($SD \pm 0.31$) as the best reference gene. NormFinder determines the standard deviation displayed in the unit “ \log_2 ” and the accumulative standard deviation [31]. The gene with the lowest value and thus best reference gene was determined to be *PPIB* ($SD 0.0106$). Additionally, the accumulative standard deviation showed that a higher number of reference genes made the results of normalization more stable. Therefore, the two genes *PPIB* and *FPGS* were chosen as reference genes for our normalization strategy. Results are shown in Table 2.

Alterations in gene expression after GHB intake

Control group

The average age of volunteers was 28.2 years, and the average BMI was 23.3. More woman ($w, n = 35$) were participating in the study than man ($m, n = 14$). The control group did not differ significantly from the three test cases in regard to age (average age case group 27 years, control group 28.2 years) and BMI (average BMI case group 24.4, control group 23.3).

ΔC_q values of the four GOI were determined in all samples of the control group ($n = 49$). Values for ΔC_q average and median were close to one other, indicating only few statistical outliers. High standard deviations were observed for every GOI, and the minimum and maximum values document a broad variance of expression in the normal population. Shapiro–Wilk normality test showed normal distribution for ΔC_q values of *ALDH5A1*, *EREG*, and *PEA15* ($p > 0.05$)—no normal distribution was determined for ΔC_q values of

AKR7A2 ($p < 0.05$; $p = 0.006$). Results are shown in Table 3 and as boxplot diagrams in Fig. 2.

Moreover, the influence of the parameters sex (m/w), age (years), BMI, and time of day of blood collection [morning 07:00–10:00 ($n = 23$); midday 14:05–16:30 ($n = 11$); evening 17:30–19:00 ($n = 15$)] on gene expression was tested. No significant differences were observed for sex, age, and BMI. However, for *EREG*, a significant difference was apparent between the time-points of blood collection according to a Mann–Whitney U test ($p < 0.05$, $p = 0.001$; see Supplementary data Fig. 2).

Case group

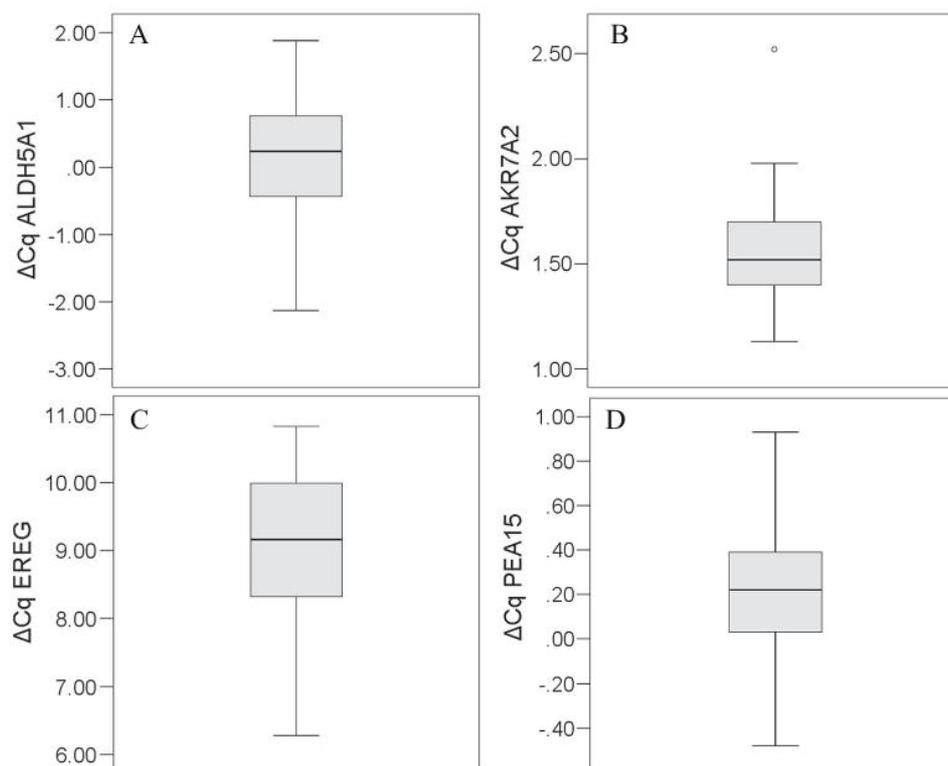
Blood samples of the test persons P1, P2, and P3 were analyzed, and the mean values for each time-point were calculated. Results are depicted in Fig. 3. For P2 and P3, no samples could be collected between 24 and 72 h, so ΔC_q values depicted at 24, 48, and 72 h represent P1 alone. ΔC_q values of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, and *PEA15* exhibited considerable variation over the studied time-period, whereas expression of *EREG* varied less. These results were compared with ΔC_q values of the control group (Fig. 3). Expression of each GOI lays within ± 2 SD of its respective expression in volunteers without GHB exposure. ΔC_q values of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, and *PEA15* oscillated around the ΔC_q mean of the control group, whereas expression of *EREG* was slightly increased, but still not beyond 2 SDs.

In contrast, samples of the case group were mostly collected during the night (22:00–08:00). We compared ΔC_q values of the case group with the distribution of values of the control group, divided into the three groups “morning,” “midday,” and “evening.” The results showed that the ΔC_q values of *EREG* oscillated around the demarcation of $+2$ SDs, when compared to the distribution of values from the “morning”

Table 3 ΔC_q values of the control group

	ALDH5A1	AKR7A2	EREG	PEA15
Average	0.16	1.55	9.05	0.20
SD	0.77	0.25	1.11	0.30

Fig. 2 Boxplot diagrams of ΔC_q values of genes of interest in the control group ($n = 49$); **a** ALDH5A1; **b** AKR7A2; **c** EREG; **d** PEA15



classification (Fig. 4). This effect was not observed when compared to the distribution of values in the other two classifications “midday” and “evening.”

The GOI most strongly influenced by GHB intake were *ALDH5A1* and *AKR7A2* which are directly involved in GHB metabolism. Therefore, we investigated alteration in the

expression of both genes in all test persons until 12 h after GHB exposure. The high observed variation notwithstanding it could be observed that the initial *ALDH5A1* level of P1, P2, and P3 showed higher ΔC_q values than after 12 h, indicating a sustained increase in gene expression after GHB intake. Results are depicted in Fig. 5. The contrary was observed

Fig. 3 Mean ΔC_q values of the genes of interest in the three test persons ($n = 3$) in relation to the control group ($n = 49$) [ΔC_q average (—), ± 1 SD (—), ± 2 SD (—)]

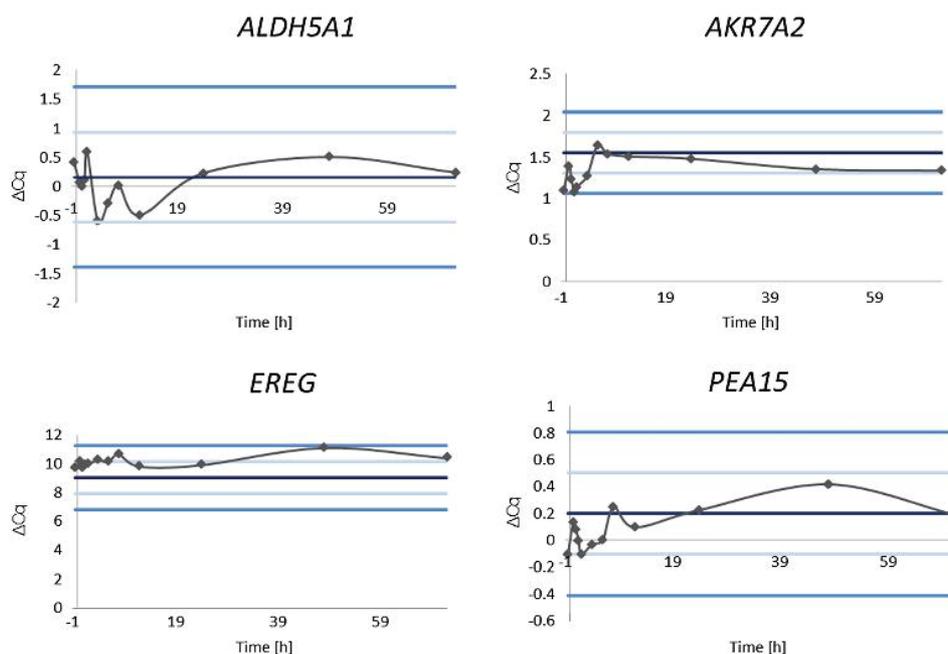
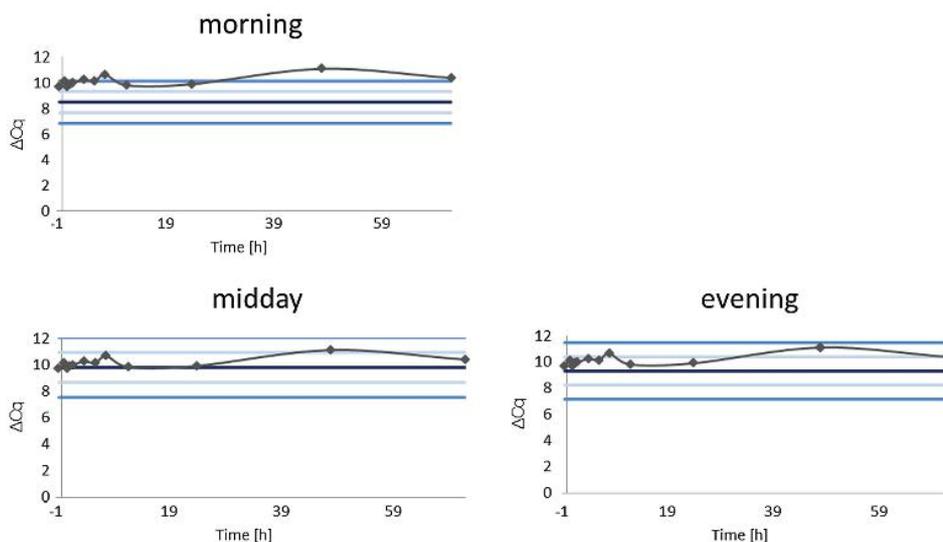


Fig. 4 Mean ΔC_q values of *EREG* in the three test persons ($n = 3$) in relation to the control group ($n = 49$) depending on time-point of sample collection [morning 07:00–10:00 ($n = 23$); midday 14:05–16:30 ($n = 11$); evening 17:30–19:00 ($n = 15$)] [ΔC_q average (—), ± 1 SD (—), ± 2 SD (—)]



for *AKR7A2* (Fig. 6). After 12 h, the determined levels of P1 and P2 were higher than the initial levels when testing started. For P3, less alteration in gene expression of *AKR7A2* was recorded.

Discussion

The aim of this study was to investigate the differential expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG*, and *PEA15* after chronic and single-time GHB exposure to widen the window of detection and to identify potential surrogate markers to provide evidence for GHB intake. The rationale was to assess whether expression of these genes related to GHB metabolism would increase or decrease significantly after GHB exposure. While the results suggest that a single-time GHB intake cannot be proven to a forensically sufficient degree by determining expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG*, and *PEA15*, it remains an important task to investigate new and alternative approaches for the detection of GHB intake given its frequent involvement in DFC and the persistent want of reliable forensic toxicological methods of GHB detection.

Therefore, additional value of this study lies in the development of a plausible and rigorous method to quantitate the expression of genes directly involved in the GHB metabolism. Its rigor is accomplished not only by strict adherence to the

MIQE guidelines [28] but also by the employment of an empirically established normalization strategy based on unbiased selection of reference genes which represents the gold standard of qPCR data analysis. The most suitable reference genes for the experimental setting at hand were determined to be *PPIB* and *FPGS*. Both genes had already been shown to be suitable to normalize gene expression data in peripheral blood by Stamova et al. [29]. In contrast, the reference gene candidates *TGFBRAP1*, *ARHGAP32*, and *PEX16* that were preselected based on a database search parameterized for small expression variation and expression levels similar to the GOI proved to be not suitable according to integrated analysis by three different algorithms [25, 26, 31].

In 2007, Larson et al. [20] conducted a new approach to identify a surrogate marker for GHB intake. A sodium oxybate solution with a concentration of 1 g/kg body weight was injected intraperitoneally into mice (DBA/2J). Animals were sacrificed on days 1, 2, 4, or 7, and peripheral blood samples were collected. Gene expression of *PEA-15* and *EREG* encoding for phosphoprotein enriched in astrocytes 15 [21] and epiregulin [22], respectively, was firstly investigated employing microarray analysis and then confirmed using semi-quantitative RT-PCR experiments with β -actin as control. The results demonstrated increased gene expression through day 2 as compared to controls that returned to control levels by day 4. Based on these findings, we

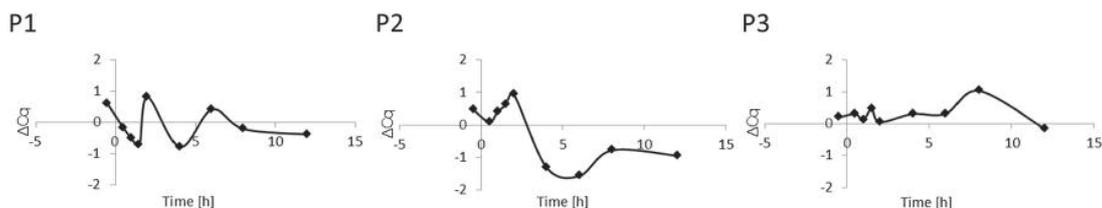


Fig. 5 ΔC_q values of *ALDH5A1* of P1, P2, and P3 at the collected time-points

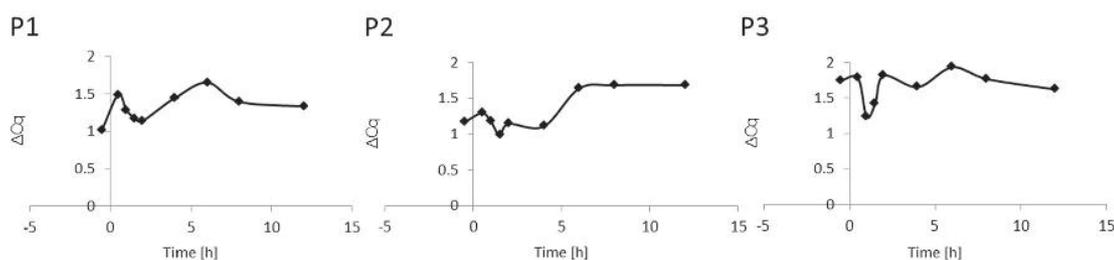


Fig. 6 ΔC_q values of *AKR7A2* of P1, P2, and P3 at the collected time-points

quantified the expression of *EREG* and *PEA-15* after GHB intake in leucocytes of peripheral blood samples. The resulting normalized ΔC_q values are inversely proportional to gene expression with higher values representing decreased gene expression and vice versa. We established the distribution of ΔC_q values, i.e., of *EREG* and *PEA-15* expression in individuals of the control group (Fig. 3). Gene expression of *EREG* was slightly decreased in the case group as demonstrated by ΔC_q values between the third quartile and the maximum values of the control group. Therefore, we could not replicate the findings of Larson et al. [20] in human subjects. A possible explanation could be differences in metabolism and regulation of gene expression between mouse and human subjects. Another reason may be the lack of proper data normalization in Larson's study as they uncritically used β -actin as a normalizer which has long been shown to be unsuitable as a reference gene [32] which in turn can lead to skewed and even faulty results.

Statistical evaluation of the influence of the documented parameters sex, age, time-point of blood collection, and BMI on the expression of *ALDH5A1*, *AKR7A2*, and *PEA15* showed no significant results in the control group. Circadian rhythm of gene expression and its influence on physiology and pathology are well-known [33], but no obvious correlation between the expression of *EREG* and time of day had been reported until now. Further experiments including investigations on the protein level may be required to elucidate this relation.

Only small fractions of SSA produced by transamination of GABA are reduced to GHB; however, as only 0.15% of SSA undergoes this reductive pathway as shown in rat brain experiments [34]. Notably, elevated GHB levels in human urine are observed when an SSA deficiency exists [35, 36]. Therefore, we investigated whether GHB intake can influence gene expression of *ALDH5A1* and *AKR7A2*. We hypothesized that after a GHB exposure, its metabolic pathway will become saturated and expression of *ALDH5A1*, encoding for succinic semialdehyde dehydrogenase [24], may be increased, whereas expression of *AKR7A2* encoding succinic semialdehyde reductase which is mostly responsible for synthesizing endogenous GHB [37] would decrease. Firstly, we calculated the mean ΔC_q values of both genes, respectively, for all individuals in the case group and compared them with the determined

range of expression in the control group without GHB exposure. ΔC_q values of *ALDH5A1* in the control group exhibited broad variance (Table 3) with a large gap between minimal and maximal values (Fig. 3). The range of ΔC_q values of *AKR7A2* was less wide with lower standard deviations. Comparing case group with control group, no significant discrimination is possible between GHB ingestion and GHB abstinence based on gene expression levels.

We then assessed the expression of these two genes separately for each test person prior to and up to 12 h after GHB intake. We found that initial *ALDH5A1* expression of P1, P2, and P3 was lower (i.e., higher ΔC_q values) than after 12 h (Fig. 5), indicating a sustained increase of gene expression after GHB intake. This finding is in favor of our hypothesis that *ALDH5A1*, which converts SSA to succinic acid, is expressed more strongly when the GHB metabolic pathway is saturated by feeding in external GHB.

Additionally, the expression of *AKR7A2* in P1 and P2 changed in the opposite direction during the studied time-period (Fig. 6), which also supports the hypothesis that after GHB ingestion endogenous GHB synthesis will be down-regulated.

Buzzi et al. [38] demonstrated that GABA_(B)ergic subunit alterations take place in a murine knockout model of SSADH deficiency, in which GHB is chronically elevated. For future studies, the alterations in the structure of GABA_(B) receptor, which is mostly involved in GHB-induced pharmacological effects [39], should be investigated after single and chronic GHB intake.

In summary, these findings may point to a possible approach for forensic detection of GHB intake in the context of DFC: the expression levels of *ALDH5A1* and *AKR7A2* or any other GHB-induced genes determined in the victim directly after the potential DFC event could be compared to the victim's normal expression levels of these genes, e.g., 48 h later, that are no longer influenced by external GHB in the victim's system. A significant increase or decrease could then indicate external GHB intake. One limitation of our study is the small number of study subjects which we acknowledge may well not be representative. Therefore, we consider this a pilot study to test a concept and to establish a methodological framework for further research comprising larger collectives.

Conclusion

This is the first investigation of differential expression of genes that are directly involved in GHB metabolic pathways (*ALDH5A1*, *AKR7A2*) or induced by GHB intake (*EREG*, *PEA15*) in human subjects to identify surrogate markers for the detection of GHB exposure in the context of DFC. While a plausible and robust methodological framework could be established, no significant differences in gene expression between peripheral blood samples in case and control groups were observed. Therefore, further research including more potential genetic markers and dependence on circadian rhythm including specific documented sample collection and GHB administration is required.

Acknowledgement The authors would like to thank Ms. Alexandra Maas for her help with sample collection, Ms. Eva Sauer for her training in laboratory procedures, Ms. Melanie Grabmüller for introducing into software handling, and all volunteers for kindly taking part in the study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in this study involving human participants, who provide small amounts of blood and urine, were in accordance with the ethical standards of the institutional review board and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in this article.

References

- UCB Pharma (2016) Fachinformation Xyrem® 500 mg/ml Lösung zum Einnehmen <http://www.fachinfo.de/pdf/013032>. Accessed: 10.08.2016
- Laborit H (1964) Sodium 4-hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol* 3:433–IN8. doi:10.1016/0028-3908(64)90074-7
- Takahara J, Yunoki S, Yakushiji W, Yamauchi J, Yamane Y (1977) Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 44:1014–1017
- Kam PCA, Yoong FFY (1998) Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. *Anaesthesia* 53:1195–1198. doi:10.1046/j.1365-2044.1998.00603.x
- Stell JM, Ryan JM (1996) Ecstasy and neurodegeneration. Gamma-hydroxybutyrate is a new recreational drug that may lead to loss of consciousness. *BMJ* 313:424
- Madea B, Musshoff F (2009) Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection. *Dtsch Arztebl Int* 106(20):341–347. doi:10.3238/arztebl.2009.0341
- Anderson LJ, Flynn A, Pilgrim JL (2017) A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: a systematic review. *J Forensic Legal Med* 47:46–54. doi:10.1016/j.jflm.2017.02.005
- Abanades S, Farré M, Segura M, Pichini S, Pastor A, Pacifici R, Pellegrini M, de la Torre R (2007) Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Ther Drug Monit* 29:64–70. doi:10.1097/FTD.0b013e3180307e5e
- Brenneisen R, Elshohly M a, Murphy TP, Passarelli J, Russmann S, Salamone SJ, Watson DE (2004) Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J Anal Toxicol* 28:625–630. doi:10.1093/jat/28.8.625
- Saudan C, Augsburger M, Mangin P, Saugy M (2007) Carbon isotopic ratio analysis by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry for the detection of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) administration to humans. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:3956–3962. doi:10.1002/rcm.3298
- Mehling L-M, Piper T, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, Thevis M, Hess C (2017) GHB-O-β-glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake. *Forensic Toxicol*. doi:10.1007/s11419-016-0352-7
- Wang X, Linnet K, Johansen SS (2015) Development of a UPLC–MS/MS method for determining γ-hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicol*. doi:10.1007/s11419-015-0285-6
- Bertol E, Mari F, Vaiano F, Romano G, Zaami S, Baglio G, Busardó FP (2014) 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*. doi:10.1002/dta.1679
- Kintz P, Cirimele V, Jamey C, Ludes B (2003) Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J Forensic Sci* 48:195–200
- Abdullah A, Ellis E (2012) Gene expression signature of gamma hydroxybutyric acid (GHB) exposure in human monocytic leukemia THP-1 cells. In: *Proceedings of the Physiological Society*. The Physiological Society
- Gibson KM, Sweetman L, Nyhan WL, Jakobs C, Rating D, Siemes H, Hanefeld F (1983) Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism. *Clin Chim Acta* 133:33–42
- Chambliss KL, Hinson DD, Trettel F, Malaspina P, Novelletto a, Jakobs C, Gibson KM (1998) Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria). *Am J Hum Genet* 63:399–408. doi:10.1086/301964
- Gibson KM, Hoffmann GF, Hodson AK, Bottiglieri T, Jakobs C (1998) 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics* 29:14–22. doi:10.1055/s-2007-973527
- Cash CD (1994) Gammahydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent. *Neurosci Biobehav Rev* 18:291–304. doi:10.1016/0149-7634(94)90031-0
- Larson SJ, Putnam E a, Schwanke CM, Pershouse M a (2007) Potential surrogate markers for gamma-hydroxybutyrate administration may extend the detection window from 12 to 48 hours. *J Anal Toxicol* 31(1):15–22
- Hwang S, Kuo WL, Cochran JF, Guzman RC, Tsukamoto T, Bandyopadhyay G, Myambo K, Collins CC (1997) Assignment of HMAT1, the human homolog of the murine mammary transforming gene (MAT1) associated with tumorigenesis, to 1q21.1, a region frequently gained in human breast cancers. *Genomics* 42:540–542
- Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S (1997) Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially

- expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 326:69–75
23. Ireland LS, Harrison DJ, Neal GE, Hayes JD (1998) Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. *Biochem J* 332(1): 21–34
 24. Trettel F, Malaspina P, Jodice C, Novelletto A, Slaughter CA, Caudle DL, Hinson DD, Chambliss KL, Gibson KM (1997) Human succinic semialdehyde dehydrogenase. Molecular cloning and chromosomal localization. *Adv Exp Med Biol* 414:253–260
 25. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
 26. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 RESEARCH0034
 27. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(T))} method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
 28. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
 29. Stamova BS, Apperson M, Walker WL, Tian Y, Xu H, Adamczyk P, Zhan X, Liu D-Z, Ander BP, Liao IH, Gregg JP, Turner RJ, Jickling G, Lit L, Sharp FR (2009) Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Med Genet* 2:49. doi:10.1186/1755-8794-2-49
 30. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Mooman AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45–e45. doi:10.1093/nar/gkp045
 31. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
 32. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siebert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313:856–862
 33. Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ (2010) Circadian rhythms in gene expression: relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Deliv Rev* 62:904–917. doi:10.1016/j.addr.2010.05.009
 34. Gold BI, Roth RH (1977) Kinetics of in vivo conversion of gamma-[3H]aminobutyric acid to gamma-[3H]hydroxybutyric acid by rat brain. *J Neurochem* 28:1069–1073. doi:10.1111/j.1471-4159.1977.tb10670.x
 35. Gibson KM, Sweetman L, Nyhan WL, Lenoir G, Divry P (1984) Defective succinic semialdehyde dehydrogenase activity in 4-hydroxybutyric aciduria. *Eur J Pediatr* 142:257–259
 36. Jakobs C, Bojasch M, Mönch E, Rating D, Siemes H, Hanefeld F (1981) Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism. *Clin Chim Acta* 111:169–178
 37. Bessman SP, Fishbein WN (1963) Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite. *Nature* 200:1207–1208. doi:10.1038/2001207a0
 38. Buzzi A, Wu Y, Frantseva MV, Velazquez JLP, Cortez MA, Liu CC, Shen LQ, Gibson KM, Snead OC (2006) Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: GABA B receptor-mediated function. *Brain Res* 1090(1):15–22
 39. Bay T, Eghorn LF, Klein AB, Wellendorph P (2014) GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. *Biochem Pharmacol* 87(2):220–228

8.2 Supplementary Material

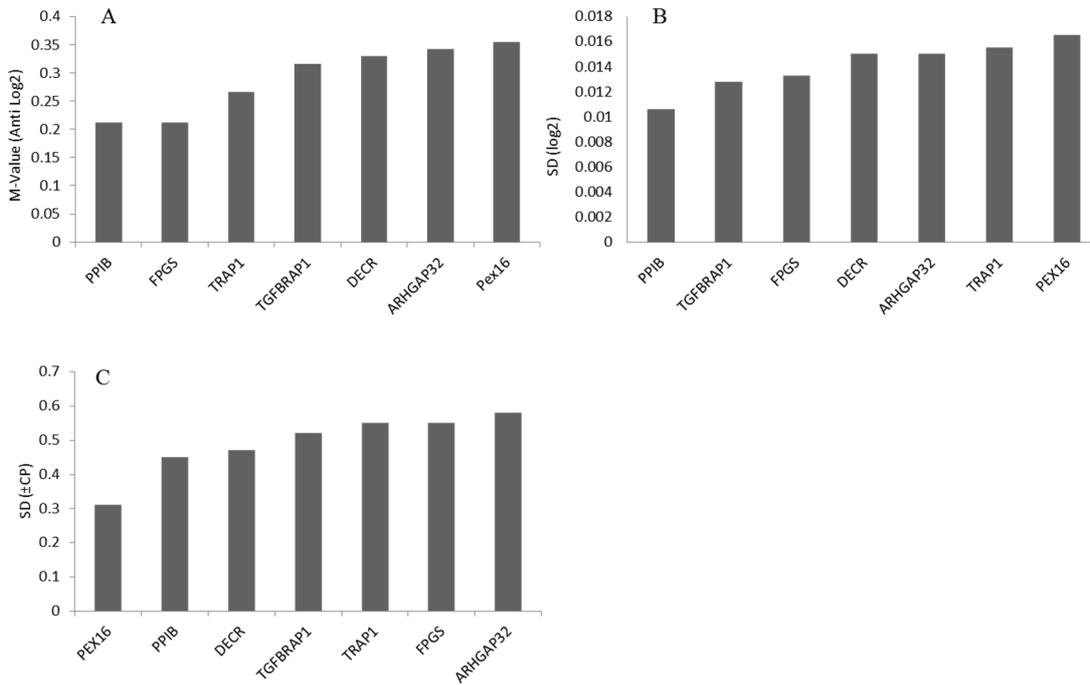


Fig 1 Ranking of the potential reference genes according to the algorithms of geNorm (A), NormFinder (B) and Bestkeeper (C); *SD* standard deviation, *M*-value (geometric mean), *CP* crossing point

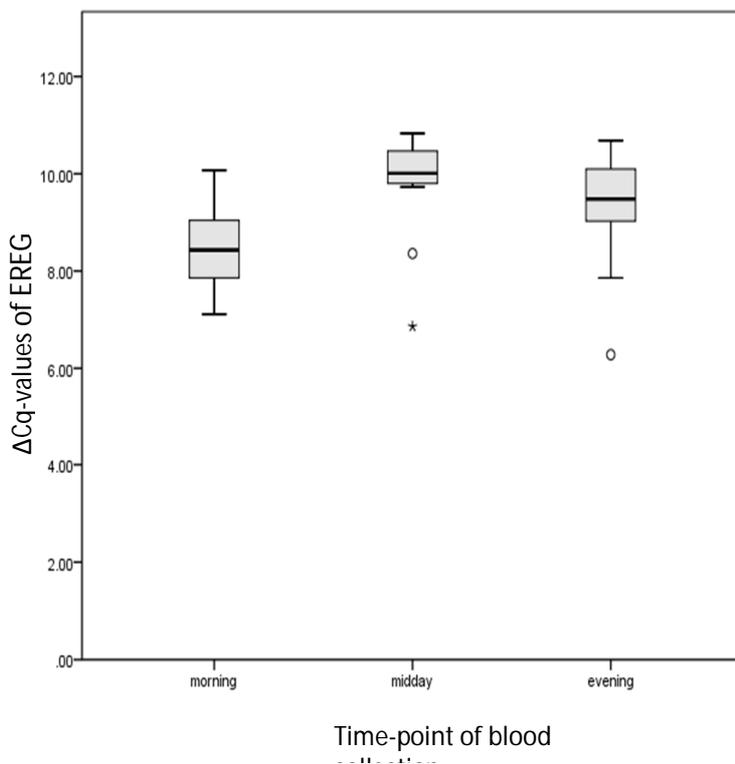


Fig 2 Boxplot diagrams of ΔCq -values of *EREG* vs. time point of blood collection; morning (07:00-14:05; $n=23$); midday (15:00-16:30; $n=11$); evening (17:00-20:00; $n=15$); \circ outlier; * extreme outliers

Table 1 Total RNA amounts and information about the control group

Proband	Sex	Age	BMI	Total RNA [ng/ μ l]	SD
N49	Female	20	24.98	91.1	0.1
N25	Female	27	29.73	68.4	0.5
<i>N18</i>	Female	28	18.59	63	0
N32	Male	33	34.88	58	1
N10	Female	22	25.16	55.5	0.5
<i>N12</i>	Male	27	23.88	52	2
N7	Male	28	30.93	51.5	0.5
N24	Female	24	24.22	49.5	0.5
<i>N11</i>	Male	27	19.75	49	1
N53	Female	23	20.3	48.5	1.5
N54	Female	22	26.8	48	1
N50	Male	52	24.07	47.5	0.5
N23	Female	19	22.23	45	0
N2	Male	24	27.25	44.5	0.5
N3	Male	20	21.97	44.5	0.5
<i>N21</i>	Female	20	21.11	44	1
<i>N13</i>	Male	47	22.94	43.5	1.5
N33	Female	48	20.28	42.5	0.5
N40	Female	25	22.49	40	2
N47	Female	28	22.31	40	0
<i>#12_2</i>	Female	28	18.6	38.6	0
N4	Female	23	24.22	38.5	0.5
N35	Female	36	19.27	38	0
<i>#43</i>	Female	28	25.6	38	0.25
N5	Female	21	21.87	37	0
N31	Female	46	21.3	36	0
N9	Female	21	17.9	35.5	0.5
N48	Female	38	22.15	35	0
<i>N14</i>	Female	23	21.01	33.85	1.15
N41	Male	24	25.83	32.95	0.05
N39	Female	24	19.84	32.6	0.6
N36	Female	29	26.99	32.05	0.25
N45	Female	23	22.07	31.95	0.15
N26	Female	23	28.4	31.2	0.1
N52	Male	19	18.72	31	0

Proband	Sex	Age	BMI	Total RNA [ng/ μ l]	SD
N37	Female	29	22.23	29.95	0.55
N51	Female	24	21.48	27.65	0.15
<i>N16</i>	Female	23	20.83	27.3	0.5
N44	Female	25	22.34	23.9	0.3
<i>#7</i>	Female	unknown	unknown	23.6	0.1
N42	Male	23	27.47	23.55	0.25
N43	Female	30	19.71	23.45	0.35
<i>#8_2</i>	Female	30	28.7	23.35	0.15
<i>N15</i>	Male	25	24.67	23.2	0
N34	Female	33	22.79	23.2	0.1
<i>#40</i>	Female	23	23.7	23.2	0.1
N29	Female	62	22.65	22.4	0.2
N46	Male	24	19.6	22	0.4
N1	Male	23	22.16	21.5	0.45
<i>N17</i>	Female	30	28.73	20.4	0.4
N38	Male	32	28.06	18.85	0.95
N22	Female	24	15.57	18.7	0.1
<i>N19</i>	Male	38	26.3	17.1	0

Bold: extract volume was 1.5 ml; *italicized:* used for normalization; samples *#40* and *#7*, *N15*, *N19* were only used for normalization; *SD* standard deviation

Table 2 Amplification efficiencies calculated by LinRegPCR software

Assay	Normalization		Expression of target genes	
	Mean value	SD	Mean value	SD
<i>TGFBRAP1</i>	0.84	0.035	n/a	n/a
<i>PEX16</i>	0.83	0.018	n/a	n/a
<i>ARHGAP32</i>	0.81	0.028	n/a	n/a
<i>TRAP1</i>	0.88	0.018	n/a	n/a
<i>FPGS*</i>	0.77	0.015	0.77	0.019
<i>DECR</i>	0.79	0.013	n/a	n/a
<i>PPIB*</i>	0.94	0.040	0.92	0.038
<i>ALDH5A1</i>	n/a	n/a	0.75	0.026
<i>AKR7A2</i>	n/a	n/a	0.79	0.027
<i>EREG</i>	n/a	n/a	0.86	0.049
<i>PEA15</i>	n/a	n/a	0.81	0.045

SD standard deviation; bold: gene of interest; *: selected for normalization; n/a: does not apply

8.3 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde erstmals die Expression relevanter Zielgene nach GHB-Einnahme in humanen Proben untersucht. Jene wurden entweder aufgrund ihrer direkten Beteiligung an der Verstoffwechslung von GHB ausgewählt (*ALDH5A1*, *AKR7A2*), oder weil bereits ein Einfluss auf ihre Expression durch die Gabe von GHB beobachtet worden war (*EREG*, *PEA-15*). Die Ausgangshypothese war, dass sich nach GHB-Einnahme signifikante Unterschiede bei der Genexpression zwischen Fallkollektiv und Kontrollkollektiv feststellen lassen. Insgesamt war das Ziel der Untersuchung, biologische Surrogatmarker in humanen Vollblutproben zu identifizieren, die als unterstützende Beweismittel zur Aufklärung von DFCs dienen können.

Es wurde eine robuste Methode mit zwei geeigneten Referenzgenen entwickelt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression der untersuchten *GOIs* *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG* und *PEA-15* im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Bereits in der Kontrollgruppe zeigten die ΔC_q -Werte der untersuchten Gene breite Streuungen mit hohen Standardabweichungen. Die ΔC_q -Werte des Fallkollektivs wurden alle innerhalb des Wertebereichs der zweiten Standardabweichung (± 2 SD) vom Mittelwert des Kontrollkollektivs ermittelt. Während die Expression des Gens *EREG* über den untersuchten Zeitraum der Probenentnahme relativ stabil oberhalb des Mittelwerts des Kontrollkollektivs lag, konnte für die übrigen Gene eine Schwankung um den ΔC_q -Mittelwert beobachtet werden. Die Unterteilung des Kontrollkollektivs anhand des Zeitpunkts der Probenentnahme (morgens/ mittags/ abends) zeigte, dass *EREG* einem circadianem Rhythmus unterliegt und somit je nach Probenentnahmezeitpunkt höher oder niedriger exprimiert wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven konnte trotz Differenzierung nach Probenentnahmezeitpunkt dennoch nicht nachgewiesen werden.

Außerdem wurde die Expression der beiden Gene, die direkt in die Biosynthese von GHB involviert sind, genauer untersucht. Die ΔC_q -Werte wurden für jeden Patienten einzeln in einem Konzentration-Zeit-Diagramm dargestellt. Die Ausgangshypothese war, dass durch die hohen GHB-Konzentrationen im Blut das Substrat Succinat-Semialdehyd vermehrt in Bernsteinsäure umgewandelt und daher weniger körpereigenes GHB gebildet wird. Die zuständigen Enzyme würden daher vermehrt bzw. vermindert synthetisiert und die hierfür zuständigen Gene stärker bzw. schwächer exprimiert werden. Dies hätte zur Folge, dass das Expressionsniveau des Gens *AKR7A2* sinken und im Gegensatz dazu das Expressionsniveau des Gens *ALDH5A1* steigen würde. Im Allgemeinen zeigten die ermittelten ΔC_q -Werte der

untersuchten Gene in allen drei Patienten eine Schwankung über den beobachteten Zeitraum. Jedoch konnte gezeigt werden, dass nach einem Zeitraum von 12 h die Genexpression in allen Patienten für das Gen *AKR7A2* sank und für das Gen *ALDH5A1* im Vergleich zum Ausgangsniveau vor der GHB-Einnahme stieg.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass diese Untersuchung auf dem transdisziplinären Gebiet der Toxikogenomik einen potentiellen neuen Ansatz zu Erbringung eines komplementierenden forensischen Nachweises einer GHB-Einnahme darstellt. Es konnte eine robuste Methode mit empirisch geprüfter Normalisierungsstrategie entwickelt werden. Leider zeigten sich die Ergebnisse der ersten Experimente noch als unzureichend. Dennoch erscheinen weitere Untersuchungen mit anderen Genen und einem größeren Fallkollektiv sinnvoll, um einen geeigneten Marker für eine GHB-Aufnahme zu finden. Hierbei sollte eine Probenentnahme schnellstmöglich nach der Einnahme sowie 48 h später erfolgen, wenn normale Genexpressionslevels wieder erreicht wurden.

9 Diskussion

In der hier vorliegenden interdisziplinären Arbeit wurden unterschiedliche Ansätze (sowohl chemisch-toxikologische als auch genetische Untersuchungen) genutzt, um Möglichkeiten zu finden, das Nachweisfenster nach GHB-Gabe zu verlängern.

9.1 Case Report

Zunächst wurde jedoch ein *Case Report* vorgestellt. Ein 6-jähriges Mädchen wurde von ihrem Onkel mit GHB betäubt und sexuell missbraucht. Das Mädchen verstarb an den Folgen der Tat. Dieser Fall zeigte bereits, dass die Bestätigung einer GHB-Intoxikation post mortem eine Herausforderung darstellt. Zahlreiche Beweise müssen vorliegen, die u.a. polizeiliche Untersuchungen und chemisch-toxikologische Befunde beinhalten.

Die chemisch-toxikologischen Untersuchungen wurden in den Matrices Gehirn, Leber, Niere, Galle, Herzblut und Glaskörperflüssigkeit durchgeführt. Femoralvenenblut und Urin standen leider nicht zur Verfügung. Die Proben wurden während der Obduktion gesammelt und zeitnah vermessen. Obwohl eine Lagerung ohne den Stabilisator Natriumfluorid erfolgte, konnte dennoch ein Anstieg der GHB-Konzentrationen in den unterschiedlichen Matrices aufgrund der unmittelbaren Analyse weitestgehend ausgeschlossen werden. Sowohl die Konzentrationen im Herzblut (150 mg/L), im Gehirngewebe (110 mg/kg) als auch in der Glaskörperflüssigkeit (58 mg/L) überschritten aktuelle Grenzwerte [103,104]. Kintz et al bestimmten die GHB-Konzentrationen im Herzblut von 71 Leichen, bei denen eine GHB-Intoxikation als Todesursachen ausgeschlossen werden konnte. Es wurden Werte im Bereich von 0,4-409 mg/L aufgefunden. Weiterführend bestimmten sie auch die GHB-Konzentrationen in den Matrices Glaskörperflüssigkeit und Galle. Letztendlich wurde empfohlen, die GHB-Konzentrationen in mehreren Matrices für die Interpretation der Todesursache zu betrachten. Sie legten die Grenzwerte für Herzblut und Glaskörperflüssigkeit bei 50 mg/L in postmortalen Proben fest [104]. Andresen et al. beurteilten die Festlegung des Grenzwertes für Herzblut bei 50 mg/L als unzureichend [90], da auch eine postmortale Redistribution zu leicht erhöhten GHB-Konzentration in Herzblut führen kann, wie es in bereits veröffentlichtem Fällen demonstriert wurde [130,153]. Andere aus der Literatur beschriebene GHB-assoziierte Todesfälle wiesen GHB-Konzentrationen von 66 mg/L bis 1250 mg/L im Herzblut auf [114]. In dem hier vorliegenden Fall zeigte sich, dass eine GHB-

Konzentration von 150 mg/L in Herzblut ohne die Ergebnisse der Konzentrationen aus anderen Matrices nicht eindeutig für eine GHB-Intoxikation sprechen würde.

Andere Matrices, die noch zur Interpretation hinzugezogen wurden, sind Gehirn-, Leber-, Nierengewebe sowie Gallen- und Glaskörperflüssigkeit, wobei für die beiden letzten bereits festgelegte Grenzwerte empfohlen wurden [103,104]. In dem hier vorliegenden Fall wurden Konzentrationen von 125 mg/kg in Nierengewebe, 100 mg/kg in Lebergewebe und 110 mg/kg in Gehirngewebe aufgefunden. Der empfohlene cut-off-Wert von 10 mg/kg für Gehirngewebe wurde somit überschritten [103]. Für die Gewebe Niere und Leber sowie für Gallenflüssigkeit wurden bisher keine Grenzwerte festgelegt, jedoch zeigten sich die ermittelten Konzentrationen in Bereichen von bereits beschriebenen GHB-assoziierten Todesfällen [130,153,154]. Hohe GHB-Konzentrationen in anderen Geweben können den Verdacht einer Einnahme vor dem Tode unterstreichen.

9.2 Haaranalyse

Zur Ergänzung der Ermittlungsergebnisse und / oder zur Begutachtung eines längeren Zeitraums kann als alternative Matrix das Haar des Betroffenen auf Drogen oder Medikamente untersucht werden [117]. Durch Schweiß oder externe Kontaminationsquellen können Drogen und / oder Medikamente ebenfalls ins Haar eingelagert werden [117,155]. Die Haarmatrix ist inhomogen und kann je nach Abschnitt unterschiedliche Substanzen in verschiedenen Konzentrationen beinhalten. Je nach Länge des untersuchten Haarsegments kann ein bestimmter Zeitraum vor dem Konsum untersucht werden.

GHB als körpereigene Substanz ist sowohl in Kopf- als auch in Bart- oder Schamhaaren auffindbar [118,130,156]. In Kopfharen finden sich endogene GHB-Konzentrationen bis zu 3 ng/mg [121]. Eine allgemeine Richtlinie für einen eindeutigen Nachweis nach GHB-Einnahme gibt es nicht und auch ein allgemeiner Grenzwert / cut-off-Wert konnte bisher nicht festgelegt werden. Es zeigte sich, dass endogene GHB-Konzentrationen inter-individuelle Schwankungen aufweisen, jedoch intra-individuell relativ stabil sind [119]. Daher wurde empfohlen, jedes Individuum als seine eigene Kontrolle zu verwenden. Aus den Haarsegmenten, die außerhalb des möglichen Tatzeitraums liegen, könnten demzufolge endogene Konzentrationen des Untersuchten bestimmt werden [119].

In der Literatur wurden bereits Fälle als auch Studien beschrieben, in denen der Nachweis einer GHB-Exposition im Haar erbracht werden konnte [119,120,125,130,157].

Anhand der Konzentrationsverhältnisse in den jeweiligen Abschnitten schienen sogar Einzelgaben bis zu 4 Wochen nach der Tat im Haar nachweisbar [119,127]. Wang et al. untersuchten die Konzentrationen von GHB in Kopfharen nach Langzeitkonsum von missbräuchlichen Mengen und fanden Werte im Bereich von 461-591 ng/mg [77]. Andererseits gibt es auch Untersuchungen die zeigen, dass eine GHB-Aufnahme (n=2; GHB-Dosis: 27 und 28 mg/kg) im Haar nicht eindeutig nachweisbar ist [156]. Im Haar ermittelte Konzentrationen lagen hier im endogenen Bereich (<0,4 ng/mg) und zeigten sich in den untersuchten Abschnitten als relativ stabil.

Im Fall des sechsjährigen Mädchens waren die aufgefundenen Konzentration höher als die aus der Literatur entnommenen endogenen Konzentrationen [119,121]. Konzentrationen von 13,6-40,8 ng/mg wurden in den proximalen Abschnitten im Abstand von 0 bis 9 cm von der Kopfhaut bestimmt. In den distalen Segmenten sanken die GHB-Konzentrationen. Die Aussage des Onkels, er habe angefangen dem Mädchen 8 Monate vor dem Todeszeitpunkt GHB zu geben, stimmt so mit den chemisch-toxikologischen Untersuchungen überein. Die Haaranalyse konnte dies im Falle der älteren Schwester jedoch nicht bestätigen. Auch hier hatte der Onkel ausgesagt, ihr GHB verabreicht zu haben. In den betroffenen Abschnitten lagen die GHB-Konzentrationen jedoch alle innerhalb des endogenen Bereichs (< 0,9 ng/mg).

Im Zuge der durchgeführten Studie wurden auch die Haarproben der Narkolepsie-Patienten gesammelt und deren GHB-Konzentrationen bestimmt. Hier konnten keine Konzentrationen außerhalb des endogenen Bereichs detektiert werden. Weder die regelmäßig mit GHB behandelten Patienten, die seit 6 und 9 Jahren GHB einnahmen, noch der Therapie-Einsteiger zeigten vier Wochen nach GHB-Exposition erhöhte Werte in den untersuchten Haarabschnitten.

Da es bisher nicht möglich war, einen festen Grenzwert für die Bestätigung einer GHB-Exposition im Haar festzulegen, mussten hierfür andere Wege gefunden werden, um den Verdacht einer Aufnahme zu bestätigen. Derzeit gibt es drei Ansätze für die mögliche Interpretation einer Haaranalyse auf GHB. Das *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) empfiehlt dann von einer GHB-Gabe auszugehen, wenn die Konzentration im betroffenen Haarabschnitt („*Target-Segment*“) das Zehnfache der endogenen Konzentrationen übersteigt [126]. Bertol et al. sehen ein mögliches Indiz für eine GHB-Einnahme, wenn die Haarprobe ein Verhältnis von 4,45:1 (einen Monat nach der Tat; Konfidenzintervall 95 %)

und / oder 3,35:1 (zwei Monate nach der Tat; Konfidenzintervall 95 %) zwischen *Target-Segment* und endogenem Bereich aufweist [127]. Sie untersuchten die Haarproben von 12 Freiwilligen, welche GHB-Dosen von 25 mg/kg einnahmen. Haarproben wurden direkt sowie ein und zwei Monate später gesammelt. Anschließend wurde die Methode an einem realen Fall angewendet. Kintz nutzte die Kontamination mit Schweiß als Hilfsmittel zur Identifizierung einer GHB Exposition im Haar [128]. Er postulierte, dass das eingenommene GHB möglicherweise durch Schweiß oder Talg an das Haar abgesondert wird, dadurch eine Kontamination in den ersten proximalen Abschnitten nahe der Kopfhaut verursacht und in diesen Segmenten zu erhöhten GHB-Konzentrationen führt. Jedoch kann Talg auch über den Haarstrang verteilt werden und auch andere Abschnitte kontaminieren. Nun sollten speziell in den proximalen Abschnitten die durch Kontamination erhöhten GHB-Konzentrationen für eine GHB-Gabe sprechen. Daher durfte die Haarprobe für diese Untersuchungen weder nach der Einnahme noch während der Probenaufarbeitung gewaschen werden. Ein Grenzwert wurde bei 20 ng/mg festgelegt. Kintz konnte anhand dieses Ansatzes die Einnahme von GHB nach Einzelgabe (GHB: 25 mg/kg) und im Falle eines Vergewaltigungsopfers in den jeweiligen Haarproben nachweisen [128].

In dem uns vorliegenden Fall des missbrauchten Mädchens wurde die GHB-Einnahme durch die Richtlinien der UNODC bestätigt, indem das zehnfache der endogenen Konzentrationen in den proximalen Segmenten ermittelt wurde, und auch das Verhältnis nach Bertol et al. konnte anhand des Basallevels (2,1 ng/mg) und der Target-Segmente berechnet werden (Bereich der berechneten Verhältnisse: 6,5-19,4) [126,127]. Zusätzlich wurde nach der Hypothese von Kintz der empfohlene Grenzwert von 20 ng/mg in den ersten sechs Haarsegmenten überschritten [128]. Die hohen Konzentrationen in den ersten Segmenten könnten daher auch auf eine Schweiß- bzw. Talgkontamination zurückgeführt werden [119,120].

Im Gegensatz dazu zeigte sich weder in den Haarproben der Narkolepsie-Patienten noch in der Haarprobe der älteren Schwester des Missbrauchs-Opfers eine Anwendbarkeit dieser drei Ansätze. Die GHB-Konzentrationen wurden in allen Segmenten im endogenen Bereich detektiert. Außerdem konnte die Berechnung der Verhältnisse nach Bertol et al. oder auch die Bestimmung der Kontaminationen nach Kintz die GHB-Einnahme nicht bestätigen [127,128]. Im Falle der Narkolepsie-Patienten schien es als würde eine GHB-Einnahme in therapeutischen Dosen nicht zu einer Erhöhung der Konzentrationen in den Haarproben der Patienten führen. Die Ergebnisse zeigten auch, dass vermutlich inter-individuelle Unterschiede

bei der Inkorporation von GHB in Haaren existieren. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig um dies zu bestätigen.

Zusätzlich wurde anhand der Haarproben der Narkolepsie-Patienten überprüft, ob Unterschiede in den Konzentrationen des Stoffwechselprodukts GHB-Gluc zwischen chronischer GHB-Einnahme und Einmalgabe existieren. Hierfür wurden die Konzentrationen des GHB-Stoffwechselprodukts GHB-Gluc in den Haarproben bestimmt. Die Konzentrationen von GHB-Gluc lagen innerhalb des aus der Literatur beschriebenen endogenen Bereichs $< 0,48-1,23$ ng/mg [77] und bestätigten die Ergebnisse von Busardo et al., welche auch die GHB-Gluc Konzentrationen eines Narkolepsie-Patienten nach GHB-Einnahme im Haar bestimmten [124]. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen von GHB-Gluc zwischen chronischer GHB-Einnahme und GHB-Einzelgabe festgestellt werden. Des Weiteren wurde untersucht, ob mögliche Waschschriffe die Analyse beeinflussen. Die Haarproben wurden daher sowohl mit als auch ohne vorherigen Waschschriff aufgearbeitet. Es zeigte sich, dass durch das Waschen der Haarproben während der Probenaufarbeitung, die GHB-Konzentrationen leicht sanken. Die Konzentrationen von GHB-Gluc blieben stabil. Die Untersuchungen demonstrierten, dass die Analyse von Haarproben die Ermittlungsbefunde ergänzen können, jedoch mit den Ergebnissen aus anderen Matrices verglichen werden sollten.

9.3 Methodenentwicklung, Validierung und Stabilität

Die von Auftraggebern für forensisch-toxikologische Untersuchungen am häufigsten verwendeten Matrices sind Plasma und Urin. Innerhalb der Studie sollten gesammelte Plasma- und Urinproben der Narkolepsie-Patienten auf die Konzentrationen der GHB-Stoffwechselprodukte GHB-Gluc und GHB-Sulf untersucht werden, um zu überprüfen, ob anhand der aufgefundenen Konzentration die Nachweisbarkeitsdauer einer GHB-Einnahme verlängert werden kann.

9.3.1 Methodenentwicklung und Validierung

Für die Bestimmung von GHB-Gluc und GHB-Sulf musste zunächst eine Methode in diesen Matrices erstellt und validiert werden. Die Methode wurden an einem LC-QTOF-MS Gerät entwickelt und nach den Richtlinien der GTFCh validiert [145]. Da die Richtlinien konzipiert wurden, um Methoden an einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) zu validieren, musste für die Validierung einer QToF-MS Methode an manchen Stellen Änderungen vorgenommen werden. So wurden Bestimmungs- (LOQ) und Nachweisgrenzen (LOD) sowie Linearität nicht anhand von *Target* und *Qualifier* Ionen im *multiple reaction monitoring mode* bestimmt, sondern anhand des Peaks der exakten protonierten Muttersubstanz.

Bereits Petersen et al beschrieben den Metaboliten GHB-Gluc und bestimmten dessen Konzentrationen in Urinproben [76]. Sie bestätigten die Linearität in einem gewählten Konzentrationsbereich von 0,1-10 mg/L. Erste Messungen zeigten jedoch, dass endogene Konzentrationen von GHB-Gluc diesen Bereich unter- bzw. überschritten. Daher wurde für diese Methode ein Konzentrationsbereich von 0,025-20 mg/L untersucht und auf Linearität validiert. Für die Bestimmung von GHB-Sulf im Urin deckten die Kalibratoren einen Konzentrationsbereich von 0,1-1,0 mg/L ab. In den Plasmaproben wurde lediglich GHB-Gluc in geringen Konzentrationen detektiert. Hier wurde ein Konzentrationsbereich von 0,01-0,5 mg/L untersucht und dessen Linearität bestätigt. GHB-Sulf konnte vermutlich aufgrund von ungenügender Sensitivität im Plasma nicht detektiert werden.

Die Parameter Linearität, LOD und LOQ, Genauigkeit, Labor- und Wiederholpräzision sowie Matrixeffekte wurden in Plasma- und Urinproben bestimmt. Es konnten gute Ergebnisse für die Linearität mit LOQs von 0,006 mg/L für GHB-Sulf und 0,008 mg/L für GHB-Gluc ermittelt werden. Petersen et al bestimmten die Nachweisgrenze anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses und erhielten einen Wert von 0,1 mg/L [76].

Wiederfindungsrate und Matrix-Effekte wurden nach dem Verfahren von Matuszweski et al. getestet [158]. Die Wiederfindungsrate konnte zwischen 51,7 und 108 % für alle Verbindungen bei niedrigen und hohen Konzentrationen in Plasma- und Urinproben bestimmt werden. Ein sogenanntes „*Ion Enhancement*“ mit hohen Matrixeffekten von 174 bis 164 % konnte für niedrige und hohe Konzentrationen in Plasmaproben beobachtet werden. Im Urin wurde eine „*Ion Suppression*“ mit niedrigen Matrixeffekten von 14 und 10 % für GHB-Gluc sowie 60,3 und 52 % für GHB-Sulf beobachtet. Die Ergebnisse von Petersen et al wurden hiermit bestätigt [76]. Ermittelte hohe relative Standardabweichungen ließen auf große Unterschiede der Matrixeffekte zwischen den unterschiedlichen Seren oder Urinen schließen. Für die Aufarbeitung von Urinproben wurde die „*dilute and shoot*“-Methode gewählt. Diese hatte den Nachteil, dass die Anzahl der Fremdbestandteile nicht minimiert wurde, sondern die Probe lediglich verdünnt wurde. Dennoch war diese Methode gut geeignet, um eine Aufarbeitung mit hoher Ausbeute zu erhalten, was bei polaren Substanzen immer eine Herausforderung darstellt. Um das Problem der Matrixeffekte zu umgehen, wurden deuterierte interne Standards der Analyten verwendet. Diese zeigten die gleichen Matrixeffekte und kompensierten somit die Veränderungen der Signalintensität.

Präzision und Genauigkeit wurden anhand von internen Qualitätskontrollen mit niedrigen und hohen Konzentrationen von GHB-Gluc und GHB-Sulf überprüft und lagen innerhalb der vorgegebenen Bereiche gemäß den Richtlinien der Fachgesellschaft GTFCh.

9.3.2 Stabilität

Ein weiterer wichtiger Punkt während der Validierung einer Methode ist die Überprüfung der Stabilität der Komponenten in der Matrix. Da Plasma- und Urinproben nicht immer direkt nach der Abnahme analysiert werden können, ist es essentiell zu testen wie stabil die Substanzen unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen sind. Petersen et al. untersuchten bereits die Stabilität des Metaboliten GHB-Gluc unter nasschemischen Bedingungen [159]. Hierfür wurde ein Puffersystem genutzt, welches den normalen pH-Bereich im Urin widerspiegeln sollte (pH=4,6-8). Die Temperaturen variierten zwischen 18 und 90 °C. Die Stabilität wurde mit Hilfe eines NMR-Spektrometers überwacht. Es zeigte sich, dass GHB-Gluc in der Puffer-Lösung über den gesamten Temperaturbereich stabil war [159]. Außerdem untersuchte Petersen et al. die Stabilität einer wässrigen GHB-Gluc-Lösung (10 mg/L) unter stark alkalischen (3 M Natriumhydroxid) sowie sauren (4 M Salzsäure) Bedingungen. Die Lösung wurde zusätzlich 15 min lang autoklaviert. GHB-Gluc war unter den alkalischen

Bedingungen stabil, wurde jedoch im sauren Milieu nach Autoklavierung komplett degradiert [159].

Die Stabilität der Metabolite wurde sowohl in Plasma als auch in Urinproben, die mit GHB-Gluc und GHB-Sulf versetzt wurden, sowie in realen Blut- und Urinproben, welche hohe Konzentrationen der Metabolite aufwiesen, untersucht und über einen Zeitraum von 31 Tagen überwacht. Die Proben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur, 4 °C und -20 °C gelagert. Hierbei erwies sich GHB-Gluc über den gesamten Zeitraum unabhängig von den Lagerungsbedingungen und der Matrix als äußerst stabil. Die Konzentrationen von GHB-Sulf waren am stabilsten, wenn die Proben bei -20 °C gelagert wurden. Eine beträchtliche Degradation dieser Substanz konnte während der Lagerung bei Raumtemperatur und in niedrigen Konzentrationen bei 4 °C festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmten mit der generell dokumentierten Stabilität von sulfatierten Phase-II-Metaboliten überein [143].

9.3.3 GHB-Isomere und weitere Glucuronide

Neben GHB existieren physiologisch noch zwei andere Isomere der Hydroxybuttersäure: AHB (α -Hydroxybuttersäure) und BHB (β -Hydroxybuttersäure). AHB ist eine organische Säure, die beim Katabolismus der Aminosäuren Methionin und Threonin sowie beim Anabolismus von Glutathion entsteht. Es wird aus α -Ketobutyrat gebildet und zu Propionyl-CoA und Kohlenstoffdioxid verstoffwechselt [160]. BHB ist ein Ketonkörper und wird vermehrt bei diabetischen Stoffwechselentgleisungen gebildet [161]. Ob diese Substanzen die Quantifizierung von GHB beeinflussten bzw. störten, wurde überprüft, indem gespikete Serumproben mit derselben Methode vermessen wurden. Unterschiedliche Retentionszeiten im Serum (AHB: 3,31 Min; BHB: 3,45 Min; GHB: 3,92 Min) und die vollständige Validierung der Methode schlossen eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch die Isomere AHB und BHB aus [70].

Eine weitere Überlegung war, ob diese Isomere endogen auch in glucuronidierter Form vorkommen. Allgemein sind sekundäre Alkohole für das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase schlechtere Substrate. Daher würde eine Glucuronidierung dieser Isomere am alkoholischen Rest nur in einem geringeren Anteil erfolgen [162]. Dennoch wurde kein Experiment durchgeführt, welches die chromatographische Trennung dieser potentiellen Konjugate erfasste.

Zusätzlich könnten für GHB noch andere Glucuronide existieren, da sowohl der alkoholische als auch der carboxylische Rest glucuronidiert werden könnte und auch eine

zweifach glucuronidiert Form von GHB wäre möglich, die massenspektrometrisch unterschieden werden könnten. Da Acyl-Glucuronide jedoch weniger stabil sind und zur Migration innerhalb des Moleküls neigen, würde vermutlich eher der alkoholische Rest von GHB glucuronidiert werden. Die Synthese könnte zu einem Mix aus bis zu vier Acyl-Glucuroniden führen [163]. In diesem Ausscheidungsexperiment wurden jedoch nur Konjugate untersucht, die mit dem alkoholischen Rest verbunden sind. Weitere Untersuchungen könnten sich mit Acyl-Glucuroniden von GHB, weiteren sulfonierten Verbindungen sowie anderen Degradationsprodukten beschäftigen.

9.4 Ausscheidungsexperiment und endogene Konzentrationen

Interessant war es nun zu untersuchen, in welchen Bereichen die endogenen Konzentrationen von GHB und dessen Metaboliten GHB-Gluc und GHB-Sulf in Plasma- und Urinproben liegen und wie diese sich verhalten, wenn GHB therapeutisch eingenommen wurde. Hierfür wurden die Proben von Narkolepsie-Patienten, die therapeutisch GHB einnehmen, und von 49 Freiwilligen, die versicherten, noch nie GHB eingenommen zu haben, untersucht.

9.4.1 Endogene Konzentrationen

In der Literatur wurden endogene Konzentrationen von GHB jeweils bis zu 3,2 mg/L und bis zu 5,75 mg/L in Plasma- und Urinproben bestimmt (Andresen et al. 2010; Elian 2002). In dem von uns zusammengestellten Kontrollkollektiv wurden endogene GHB-Konzentrationen von 2 mg/L in beiden Matrices nicht überschritten. Die Untersuchung der Proben des Kontrollkollektivs (n=49) auf den Phase-II-Metaboliten GHB-Gluc ergaben, dass dessen endogene Plasmakonzentrationen im Bereich von 0,11-0,67 mg/L lagen. Bisher wurden keine weiteren endogenen Konzentrationen von GHB-Gluc in Plasmaproben veröffentlicht. Endogene Konzentrationen des Metaboliten im Urin konnten zwischen 0,16-7,1 mg/L bestimmt werden. Die aufgefundenen Werte sind kongruent mit den Untersuchungen von Petersen et al., welche endogene GHB-Gluc Konzentrationen im Bereich von 0,11-5 mg/L in Urinproben (n=50) beschrieben.

Zusätzlich wurde der Einfluss der gesammelten demographischen Daten (Geschlecht, Alter, BMI, Ko-Medikation, Alkoholabstinenz und aktueller gesundheitlicher Zustand) auf die endogenen Konzentrationen von GHB-Gluc in Plasma- und Urinproben des Kontrollkollektivs untersucht. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den ermittelten Plasmakonzentrationen abhängig von den getesteten Parametern. Im Urin konnte ein statistisch signifikanter Unterschied für die Parameter

Geschlecht und BMI bei Ausführung des Mann-Whitney-U-Test innerhalb der Kontrollgruppe beobachtet werden, jedoch konnte kein Unterschied beim Vergleich zwischen Kontrollkollektiv und Fallkollektiv gezeigt werden. Einen Trend zur Signifikanz ließ sich beim Vergleich zwischen hohen BMI-Werten (>25) und kleinen BMI-Werten im Urin erkennen. Allerdings konnte der Pearson Korrelationstest dies nicht bestätigen ($r=0.36$; $p=0.11$). Die Ergebnisse sind mit den Beobachtungen von Crunelle et al. konform, welche den Einfluss des BMI auf die Ethylglucuronid-Konzentrationen beschreiben und zeigen, dass BMI-Werte über 25 zu höheren Konzentrationen in Haarproben führen können [164].

Für die Untersuchungen der endogenen Konzentrationen von GHB-Sulf wurde ein Kontrollkollektiv aus den Urinproben von Athleten ($n=100$) zusammengestellt. Die ermittelten Werte lagen alle oberhalb der Bestimmungsgrenze von $0,006$ mg/L und in einem Bereich von $0,009$ bis $11,5$ mg/L. Die Konzentrationen von GHB-Gluc wurden ebenfalls in den Proben der Athleten detektiert und in einem Bereich von $0,5$ bis $19,8$ mg/L bestimmt. Wie auch schon für GHB-Gluc gezeigt, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den GHB-Sulf-Konzentrationen abhängig vom Geschlecht festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test). Um den möglichen Einfluss der hohen körperlichen Arbeitsbelastung der Athleten auf die GHB-Sulf-Konzentrationen im Urin zu testen, wurden die ermittelten Werte der Athleten mit den Werten von weiblichen und männlichen Studenten ($n=49$; $<LOQ=13,8$ mg/L) verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die ermittelten Werte für GHB-Sulf zeigten zunächst keine Normalverteilung. Diese wurde schließlich erzielt, indem eine logarithmische Transformation durchgeführt wurde. Durch die Addition der dreifachen Standardabweichung zu dem berechneten Mittelwert des Kontrollkollektivs konnte schließlich ein $99,7$ %iges Referenzlimit bei einem Wert von 66 mg/L für GHB-Sulf im Urin berechnet werden, was bedeutet das $99,7$ % der aufgefundenen GHB-Sulf Konzentrationen der Stichproben einer Grundgesamtheit unterhalb dieses Werts liegen.

Brailsdorf et al. normalisierten die aufgefundenen GHB-Konzentrationen auf die spezifische Dichte in einem Kollektiv von 1126 weiblichen Probanden, um den Einfluss der Urinverdünnung auf die GHB-Konzentrationen zu untersuchen. Es konnte nur eine geringe Veränderung des Mittelwerts und des Konzentrationsbereichs beim Vergleich der Werte vor und nach der Dichtekorrektur beobachtet werden [97]. In dem Kontrollkollektiv der Athleten wurden geringe jedoch hoch signifikante Korrelationen zwischen der spezifischen Dichte und der Konzentrationen der Metabolite mit Werten von $R^2=0,13$, $p<0,001$ für GHB-Sulf und $R^2=0,30$, $p<0,001$ für GHB-Gluc beobachtet. Nach der Normalisierung der Konzentrationen

auf die spezifische Dichte wurden die Referenzlimits (99,7 %) neu berechnet. Für GHB-Sulf ergab sich nun ein Wert von 56 mg/L und für GHB-Gluc konnte das Referenzlimit von 41 auf 24 mg/L gesenkt werden. Für die weiteren Untersuchungen auf dem Gebiet der Metabolomics wurden daher die nach der spezifischen Dichte-korrigierten Konzentrationen verwendet.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Konzentrationen der beiden Phase-II-Metabolite nicht nur gut mit der Dichte der Urinprobe, sondern auch gut miteinander korrelieren. Interessanterweise war dies nicht der Fall. Die ermittelten R^2 waren gleich null mit einem p-Wert $> 0,4$. Im Gegensatz dazu, ist aus der Literatur zu entnehmen, dass die beiden Phase-II-Metaboliten anderer kleiner Moleküle wie Ethanol gut korrelierten [165]. Auch für andere endogene Komponente wie Steroide, besonders Androsteron und Etiocholanolon, konnte eine hohe Signifikanz ermittelt werden [166,167]. Die schlechte Korrelation zwischen GHB-Sulf und GHB-Gluc, konnte mit den hier vorliegenden Daten bisher nicht erklärt werden.

9.4.2 Konzentrationen nach GHB-Einnahme

Die Pharmakokinetik von GHB wurde in einigen Studien bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.3.2 Pharmakokinetik) [22,43,54,55,57]. Busardo et al. untersuchten die Plasma- (n=4) und Urinproben (n=3) von insgesamt sieben unterschiedlichen Narkolepsie-Patienten auf die Substanzen GHB, GABA, GBL und GHB-Gluc. Die eingenommene Menge an Natriumoxybat lag zwischen 2,5 und 4 g. Plasma- und Urinproben wurden jeweils 1,5 h und 2 h nach GHB-Einnahme gesammelt. Die ermittelten GHB-Konzentrationen lagen zwischen 8,15-32,35 mg/L im Plasma. Im Urin wurden Konzentrationen bis zu 86,5 mg/L aufgefunden. Die Substanzen GABA und GBL wurden in Spuren oder unterhalb der LOD bestimmt. Das Stoffwechselprodukt GHB-Gluc wurde nur in einer Urinprobe mit einer Konzentration von 0,62 mg/L detektiert. In den restlichen Plasma- und Urinproben sei GHB-Gluc schwer zu detektieren gewesen, was sicherlich auch an den höheren LODs (0,2 mg/L) und LOQs (0,5 mg/L) der verwendeten Methode lag [124].

Die Ergebnisse unseres Ausscheidungsexperiments stimmten mit den Ergebnissen dieser Studie überein. Konzentrationen von GHB und dessen Glucuronid wurden nach Einnahme von Natriumoxybat (P1 und P2: 1,86 g bzw. P3: 2 g GHB; GHB bezogen auf das Körpergewicht P1: 29,06 mg/kg, P2: 27,76 mg/kg, P3: 21,7 mg/kg) untersucht. Hierfür wurden Plasma- und Urinproben vor und bis zu 72 h nach der Einnahme gesammelt.

Diskussion

Maximale GHB-Konzentrationen wurden in Höhe von 73,1 und 254 mg/L in Plasma- und Urinproben bestimmt. Anschließend sanken die Konzentrationen entsprechend einer Eliminationskinetik erster Ordnung. Nach 4 und 6 h wurden GHB-Konzentrationen unterhalb der üblichen Grenzwerte in den gesammelten Plasma- und Urinproben aufgefunden. Alle Testpersonen zeigten die gleichen pharmakokinetischen Profile.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Konzentrationen des Phase-II-Metaboliten GHB-Gluc nach GHB-Einnahme in Plasma- und Urinproben verhielten, mit dem Ziel, das Nachweisfenster anhand ansteigender und aufgrund der Metabolisierung später eliminierte GHB-Gluc Konzentrationen zu verlängern. Im Gegensatz zu den bereits oben beschriebenen Ergebnissen von Busardò et al. [124], konnte die Substanz GHB-Gluc in allen Plasma- und Urinproben des Ausscheidungsexperiments detektiert werden. Leider konnte kein signifikanter zeit-abhängiger Anstieg der GHB-Gluc-Konzentrationen nach GHB-Exposition in den Proben der Patienten festgestellt werden. Die Konzentrationen der Narkolepsie-Patienten P2 und P3 lagen innerhalb des endogenen Bereichs des Kontrollkollektivs mit Werten jeweils in Bereichen von 0,008-0,015 mg/L und 0,19-6,74 mg/L in Plasma und Urin. Die Konzentrationen, die in den Proben des Patienten P1 bestimmt wurden, lagen höher als die Werte der Kontrollgruppe, sowohl in Plasma- als auch in den Urinproben (Plasma: 0,044-0,068 mg/L; Urin: 5,71-12,72 mg/L). Anschließend wurden die aufgefundenen GHB-Gluc-Konzentrationen im Urin der Narkolepsie-Patienten auf die Werte der körpereigenen Substanz Kreatinin in den jeweiligen Proben des Kontrollkollektivs normalisiert. Nun lagen die GHB-Gluc-Werte von P1 innerhalb der Werte des Kontrollkollektivs, genau genommen oberhalb von 75 % der ermittelten Konzentrationen, jedoch unterhalb der gemessenen maximalen Konzentrationen. Bereits vor der GHB-Einnahme zeigte die Narkolepsie-Patientin P1 erhöhte GHB-Gluc-Konzentrationen in Plasma- und Urinproben, obwohl diese drei Tage vor dem Experiment auf die Einnahme des Medikaments verzichtete. Diese Ergebnisse könnten auf eine hohe Aktivität des Enzyms UDP-Glucuronosyltransferase zurückgeführt werden.

Patientin P2 wurde ebenfalls regelmäßig mit Natriumoxybat behandelt und nahm eine Gesamtdosis von 7 g (\pm 6,51 g GHB; 97,1 mg/kg) aufgeteilt in zwei Portionen pro Nacht ein. 18 h vor der Teilnahme an dem Ausscheidungsexperiment verzichtete sie auf die Einnahme. P2 zeigte keine erhöhten GHB-Gluc-Konzentrationen in den untersuchten Plasmaproben. Die ermittelten Konzentrationen von P2 waren über den beobachteten Zeitraum in den

Plasma- und den normalisierten Urinproben stabil. Wurden die Konzentrationen ohne die Normalisierung auf Kreatinin im Urin betrachtet, konnte man einen leichten Anstieg der GHB-Gluc-Konzentrationen in den Urinproben des Fallkollektivs beobachten. Maximale Konzentrationen wurden in den Proben der Patienten P1 und P3 nach 6 h beobachtet. Aufgrund einer großen Wasseraufnahme waren die Urinproben des Patienten P2 zu den Zeitpunkten „2 und 4 h nach Einnahme“ stark verdünnt, was zu geringen Konzentrationen von GHB-Gluc und Kreatinin in diesen Proben führte. Obwohl ein Anstieg der GHB-Gluc-Konzentrationen in den Urinproben der drei Narkolepsie-Patienten festgestellt werden konnte, lagen die Konzentrationen nach Normalisierung innerhalb des endogenen Konzentrationsbereichs des Kontrollkollektivs ohne GHB-Exposition.

Die Untersuchungen von GHB-Sulf nach der Einnahme von 2,25 g Natriumoxybat in den Urinproben der Narkolepsie-Patienten zeigten einen signifikanten Anstieg der Konzentrationen in allen drei Patienten. Verglichen mit den ermittelten Urinkonzentrationen vor der Aufnahmen, waren diese (P2) doppelt oder sogar zehn bis 14-mal so hoch wie die initialen Werte (P3 und P1). In beiden Patienten mit chronischer Einnahme (P1 und P2) wurden maximale Konzentrationen zwischen 6 und 8 h nach Applikation aufgefunden, während in den Proben des Therapieeinsteiger (P3) der sofortige Anstieg der GHB-Sulf-Konzentrationen beobachtet werden konnte. Die initiale Konzentration der Narkolepsie-Patienten vor der Aufnahme reichten von 0,1 bis 1,0 mg/L. Obwohl die höchste ermittelte Konzentration nach GHB-Gabe, aufgefunden in P3, einen Werte von 7,7 mg/L hatte, überstieg diese nicht das aus dem Kontrollkollektiv berechnete Referenzlimit von 56 mg/L und den endogenen Konzentrationsbereich von 0,009-11,5 mg/L. Auch innerhalb der Kontrollgruppe - der Personen die kein GHB erhalten haben - konnte vergleichbare Konzentrationen von GHB-Sulf gelegentlich detektiert werden.

Die in den nach der Einnahme asservierten Probenmaterialien Plasma und Urin ermittelten Konzentrationen von GHB-Gluc und GHB-Sulf stellten sich somit als Beweismittel für die Klärung einer GHB-assoziierten Straftat als schwierig bis ungeeignet dar. Um eine GHB-Einnahme anhand der ermittelten Konzentrationen nachzuweisen, hätten die Werte oberhalb der endogenen Konzentrationen des Kontrollkollektivs liegen müssen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte kein geeigneter Grenzwert für die Metabolite in Plasma und Urin festgelegt werden. Der Anstieg der Konzentrationen von GHB-Gluc und GHB-Sulf nach GHB-Einnahme bestätigten jedoch die Identifikation als Stoffwechselprodukte von GHB. Die Substanzen werden vermutlich als sekundäre Stoffwechselprodukte während der

Metabolisierung von GHB gebildet. Aufgrund des deutlichen Anstiegs von GHB-Sulf nach GHB-Einnahme ist auch hier die Bestimmung eines individuellen Grenzwertes, wie schon im Bereich Haaranalytik vorgeschlagen, anhand des Vergleichs der Urin-Konzentrationen zeitnah zum Vorfall mit endogenen GHB-Sulf-Konzentrationen aufgefunden in später gesammelten Urinproben der betroffenen Person, eine Überlegung wert.

9.5 Metabolomics

Nachdem die Konzentrationen beider Phase-II-Metaboliten sich zur Verlängerung des Nachweisfensters nach GHB-Gabe nicht ausreichend eigneten, wurde ein anderer Ansatz getestet. Wie die Untersuchungen demonstrierten, wurde durch die Korrektur mit der spezifischen Dichte die Verteilung der aufgefundenen Konzentrationen im Urin verbessert und die Referenzlimits der Kontrollgruppe gesenkt. Alternativ wurde nun überprüft, ob eine endogene Komponente im Urin, welche entsprechend gut mit GHB-Gluc und GHB-Sulf korreliert, eine mehr Analyt-spezifische Normalisierung der gemessenen Konzentrationen ermöglichen könnte. Diese Methode hat sich bereits bei der Kontrolle auf dopingrelevante Substanzen bewährt, z. B. um hohe nicht-physiologische Konzentrationen von Testosteron in den analysierten Proben aufzudecken [149,150]. Das Ziel der Untersuchung war es, einen endogenen Kandidaten innerhalb der Referenzpopulation (= Kontrollgruppe) zu finden, welcher eine gute und hoch-signifikante Korrelation zu beiden GHB-Metaboliten zeigt. Anschließend wurde die Anwendbarkeit dieses Features an dem hier vorliegenden Ausscheidungsversuch getestet. Für diese Untersuchung bildeten die bereits erwähnten Urinproben der Athleten (n=100) die Referenzpopulation mit endogenen Konzentrationen jeweils in Bereichen von 0,009 bis 11,5 mg/L (GHB-Sulf) und von 0,5 bis 19,8 mg/L (GHB-Gluc).

9.5.1 Referenzpopulations-basierende Ergebnisse

Innerhalb der Referenzpopulation wurden mehr als 10.000 Features, d.h. chromatographische Peaks mit einer definierten Masse und Retentionszeit, in allen Proben ermittelt. Beim Abgleich aller Proben blieben weniger als 100 Features übrig, die in allen Proben präsent waren - eine Grundvoraussetzung war, dass nur endogenen Substanzen betrachtet wurden. Alle Features wurden vorübergehend durch die Anwendung der Metlin_AM_PCDL Datenbank von Agilent und durch die Berechnung der chemischen Formeln anhand der gemessenen akkuraten Massen identifiziert. Nachdem die bisher bekannten endogenen Komponenten wie zum

Beispiel Steroide vorher ausgeschlossen wurden, blieben 15 Features für weitere Untersuchungen bezüglich deren Proportionen zu GHB-Gluc und GHB-Sulf übrig.

Die vielversprechendste Korrelation war das Feature mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) von 320,0618 (F320), welche bei einer Retentionszeit von 6, min eluierte und eine signifikante Korrelation zu beiden Metaboliten zeigte. Hierbei wurden entweder die Konzentrationen im Urin oder die gemessenen Peakflächen zur Berechnung verwendet. Die Ergebnisse waren jedoch in beiden Fällen ähnlich. Zur Vereinfachung wurden die Fläche verwendet. Die ermittelten Korrelation von GHB-Sulf zu F320 war schwach ($r=0,28$), aber signifikant ($p<0,01$); die Korrelation von GHB-Gluc zu F320 war ausgeprägter ($r=0,57$, $p<0,001$). Innerhalb der Referenzpopulation zeigte das Verhältnis GHB-Gluc/F320 eine Normalverteilung nach Logarithmierung der Daten. Die enge Verteilung erlaubte die Berechnung des Referenzlimits (99,7 %) mit einem Wert von 40,8. Die ermittelten Werte des Verhältnisses GHB-Sulf/F320 waren bimodal verteilt. Sie zeigten eine hohe Variabilität und reichten von 1,8 bis 525 innerhalb der untersuchten Population. Daher war eine ähnliche Berechnung des Referenzlimits hier nicht möglich.

9.5.2 Anwendung im Ausscheidungsversuch

Wie bereits oben erwähnt, eignen sich die Konzentrationen der GHB-Metabolite in Plasma und in Urin nicht zum Nachweis einer GHB-Einnahme. Auch GHB lässt sich in diesem Ausscheidungsexperiment nur bis zu 4 und 6 h in erhöhten Konzentrationen im Plasma und Urin nachweisen. Nach Berechnung der Verhältnisse GHB-Sulf zu F320 lässt sich in den Proben aller Narkolepsie-Patienten einen Anstieg der Werte beobachten. Hierbei zeigte Patient P3 den deutlichsten Anstieg, wie auch schon bei der Bestimmung der Konzentrationen im Urin gesehen werden konnte. Im Gegensatz dazu waren die Werte der chronischen GHB-Patienten eher gering. Dennoch waren alle aufgefundenen Verhältnisse auch nach der Applikation innerhalb des ermittelten Bereichs der Kontrollgruppe.

Die Anwendung der Verhältnisse GHB-Gluc/F320 demonstrierte ein interessantes, jedoch zweideutiges Ergebnis. Die Ausscheidungsprofile der Personen, die häufig GHB einnahmen, glichen sich nach der Einnahme von GHB bis zu einem maximalen Wert nach 12 h an und überschritten auch den Populations-basierenden Grenzwert von >45 . In Plasma und Urin konnte über diese Methodik die GHB-Einnahme nur 4 bis 6 h nach der Applikation in beiden Patienten nachgewiesen werden. Der dritte Patient nahm GHB zum ersten Mal ein und zeigte ein deutlich anderes Profil mit einem moderaten Anstieg der Werte bis zu 8 h nach

Applikation. Außerdem wurde kein Wert oberhalb des Grenzwertes (>45) ermittelt. Beide Patienten mit regelmäßiger GHB-Einnahme zeigten ein ähnliches Ausscheidungsprofil. Die Hypothese war nun, dass F320 in den endogenen Metabolismus von GHB involviert sei, was zu einer weiteren Untersuchung dieses Features führte.

9.5.3 Die Zuordnung von F320 als β -Citryl Glutaminsäure

Der erste Schritt, der zur Identifikation von F320 führte, war die Berechnung der möglichen molekularen Zusammensetzung. Ausgehend vom deprotonierten Molekül mit dem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) 320,0618 wurden QToF-Massenspektren der Produktionen bei verschiedenen Kollisionsenergien erstellt. Anhand des Masseunterschieds zwischen dem deprotonierten Molekül und der Produktionen war zu erkennen, dass das Molekül Stickstoff und einige Hydroxy-Gruppen enthielt. Des Weiteren konnte eine Elimination von Kohlenstoffdioxid beobachtet werden. $C_{11}H_{15}NO_{10}$ wurde als Molekülformel berechnet und die Suche nach der Struktur in der Datenbank PubChem ergab als vielversprechendsten Kandidaten die Substanz β -Citryl-Glutaminsäure [168]. Diese Substanz zeigte auch das gleiche durch Kollision induzierten Dissoziationsmuster [169,170].

Aus der Literatur war zu entnehmen, dass L-Glutamat eine metabolische Vorstufe von GHB ist und gemäß dem KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms*) über den Butanoat-Metabolismus über GABA zu SSA umgewandelt wird [171–173]. Dies könnte ein möglicher Grund für die aufgefundene signifikante Korrelation der beiden Metabolite zur Substanz F320 sein. Außerdem könnte es die beobachteten unterschiedlichen Verläufe des Verhältnisses GHB-Gluc zu F320 nach der Einnahme von GHB zwischen den chronischen Patienten und dem Therapieeinsteiger erklären. So könnte durch die chronische Einnahme von GHB ein negativer oder positiver Rückkopplungsmechanismus innerhalb des L-Glutamat-Stoffwechsels induziert werden, der zu Veränderungen in den metabolischen Abläufen führt. Dies stellt nur eine Hypothese dar und weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Einflussfaktoren dieses diagnostischen Verhältnisses zu klären.

9.5.4 Langzeit-Stabilität von GHB-Gluc/F320

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass GHB-Gluc und β -Citryl-Glutaminsäure in den untersuchten Proben miteinander gut korrelierten. Zusätzlich wurde überprüft, ob das berechnete Verhältnis auch über einen längeren Zeitraum intra-individuell stabil ist. Die Langzeitstabilität solcher individueller Marker wird häufig bei der Testung auf dopingrelevante Substanzen angewandt und sowohl für hämatologische als auch steroidale Parameter genutzt

[149,150,174]. Die Untersuchungen wurden in den Urinproben von 5 freiwilligen Probanden durchgeführt. Der Urin wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen unabhängig von der Tageszeit (n=3) oder am Morgen von 20 aufeinanderfolgenden Tagen (n=2) gesammelt. Nachdem eine Korrektur der Urinkonzentrationen durch die Normalisierung auf die spezifischen Dichte erfolgte, wurde eine ausgeprägte Streuung der Werte mit einem Variationskoeffizienten (CV) von bis zu 69 % beobachtet. Dieser Koeffizient konnte signifikant reduziert werden, wenn das Verhältnis von GHB-Gluc und F320 gebildet wurde. Alle Variationskoeffizienten lagen anschließend unterhalb von 30 % - ein Wert der ebenso für Steroide im Urin gezeigt wurde und die Anwendung solcher Verhältnisse bei der Bewertung von Dopinganalysen erlaubt [150].

Eine Anwendung dieses Ansatzes könnte im Falle eines DFSA so aussehen, dass das Verhältnis GHB-Gluc/F320 in der Urinprobe zeitnah zum Tatgeschehen mit dem Wert in einer Urinprobe verglichen wird, die in den darauffolgenden Tagen gesammelt wurde. Aus den aufgefundenen Verhältnissen in den Urinproben der nachfolgenden Tage, könnte ein individueller Grenzwert berechnet werden, welche mit dem Wert aus der initialen Probe verglichen werden kann. Auf Grund der geringen Zahl der Narkolepsie-Patienten ist es jedoch schwer zu beurteilen, wie dies in der Praxis umgesetzt werden könnte. Für die Patienten P1 und P2 konnte keine Basisprobe gesammelt werden, da diese das Medikament chronisch einnahmen und auf die Einnahme von GHB 3 Tage bzw. 18 h vor dem Experiment verzichteten. Es ist daher nicht gesichert, ob die Werte vor der Einnahme endogene Verhältnisse widerspiegeln. Für den dritten Patienten zeigte sich der Ansatz als anwendbar. Es wurden drei Proben mit unauffälligen Werten ausgewählt. Hieraus wurde ein Mittelwert von $6,55 \pm 1,23$ gebildet, der den individuellen Grenzwert darstellen sollte. Durch die Anwendung des neuen Ansatzes könnte das Nachweisfenster nach GHB-Einnahme auf 8 h verdoppelt werden, während die Interpretation der Konzentrationen nach den üblichen cut-off-Werten eine Nachweisbarkeit von <4 h in Plasma und Urin ergab.

Obwohl die Bildung dieses Verhältnisses die Nachweisbarkeit nach einer GHB-Gabe nicht verbesserte, wurde hier dennoch ein weiterer neuer Ansatz untersucht, der trotz geringer Datenlagen mögliche Vorteile aufweist und nach weiteren Untersuchungen in diese Richtung verlangt. Die Idee der Bestimmung eines individuellen endogenen Grenzwerts wurde, wie bereits beschrieben, schon bei der Analyse von GHB in Haaren angewendet [125,127]. Dennoch erscheint die Erbringung eines Nachweises nach einem DFSA in der Matrix Urin

aufgrund der einfachen, nicht-invasiven und direkten Probenentnahme vorteilhafter als in Haaren.

9.6 Pilotstudie: Veränderung der Genexpression nach GHB-Gabe

Das Ziel dieser Studie war es, die unterschiedliche Expression der Gene *ALDH5A1*, *AKR7A2*, *EREG* und *PEA15* nach regelmäßiger und einmaliger GHB Exposition zu untersuchen, um bei veränderter Expression eventuell das Nachweisfenster von GHB zu vergrößern und geeignete Surrogat-Marker für den Beweis einer GHB-Einnahme zu identifizieren. Das Grundprinzip bestand darin zu beurteilen, ob die Expression dieser Gene nach GHB-Einnahme signifikant ansteigen oder absinken würde. Obwohl die Ergebnisse nicht belegten, dass eine einmalige GHB-Einnahme eine Expressionsveränderung der hier untersuchten Gene bewirkt, bleibt es eine wichtige Aufgabe, neue und alternative Ansätze für den Nachweis einer externen GHB-Zufuhr zu finden. Daher liegt ein zusätzlicher Nutzen dieser Pilotstudie in der Entwicklung und Evaluierung einer plausiblen und robusten Methode zur Quantifizierung der Expression von Genen, die in den Metabolismus von GHB involviert oder auf andere Weise mit seinen metabolischen Wirkungen assoziiert sind. Die Exaktheit wird hierbei nicht nur durch die strikte Einhaltung der MIQE-Richtlinie herbeigeführt, sondern auch durch die Entwicklung einer empirisch gesicherten Normalisierung-Strategie basierend auf die unvoreingenommene Auswahl von Referenzgenen, was den Goldstandard der Datenanalyse im Bereich qRT-PCR darstellt [152].

Für das experimentelle Verfahren erwiesen sich als best-geeignete Referenz Gene *PPIB* und *FPGS*. Beide Gene erwiesen sich bereits als passend für die Normalisierung der Genexpressionsdaten in peripheren Blutproben [175]. Im Gegensatz dazu, zeigten sich die Referenz Gen-Kandidaten *TGFBRAP1*, *ARHGAP32* und *PEX16* gemäß der integrierten Analyse von drei verschiedenen Algorithmen als weniger geeignet [176–178]. Diese Gene wurden mit Hilfe einer Datenbankrecherche ausgewählt, die auf geringe Expressionsvariationen und ähnliche Expressionslevel wie die *Genes of Interest* parametrisiert wurde.

Im Jahre 2007 führten Larson et al. einen neuen Ansatz durch, um neue Surrogatmarker für die Einnahme von GHB zu identifizieren. Hierbei wurden Mäusen (DBA/2J) eine Natriumoxybat-Lösung mit einer Konzentration von 1 g/kg intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden anschließend nach 1, 2, 4 oder 7 Tagen getötet und periphere Blutproben wurden gesammelt. Die Genexpression der Gene *PEA-15* und *EREG* wurde erstmals mittels Micro

Array Analyse untersucht und anschließend in semi-quantitativen RT-PCR Experimenten mit β -Aktin als Kontrolle bestätigt [39,179]. Die Ergebnisse zeigten, dass die Genexpression verglichen mit den Kontrollen innerhalb von zwei Tage anstiegen und nach Tag 4 wieder auf die Werte in den Kontrollen zurückkehrten [151]. Basierend auf dieser Feststellung quantifizierten wir die Expression der Gene *EREG* und *PEA-15* nach GHB-Einnahme in Leukozyten von peripheren Blutproben. Die resultierten normalisierten ΔC_q -Werte waren umgekehrt proportional zur Genexpression - höhere Werten stellten also eine verminderte Genexpression dar und umgekehrt. Zunächst wurde die Verteilung der ΔC_q -Werte und somit die Genexpression von *EREG* und *PEA-15* in den Proben der Kontrollgruppe bestimmt. Im Fallkollektiv war die Genexpression von *EREG* gegenüber dem Kontrollkollektiv gering vermindert. Die Werte des Fallkollektivs wurden zwischen dem dritten Quartil und dem maximalen Wertebereich des Kontrollkollektivs bestimmt. Die Ergebnisse von Larson et al. konnten also nicht repliziert werden [151]. Eine mögliche Erklärung könnte der Unterschied im Metabolismus und der Genexpression zwischen den Arten Mensch und Maus sein. Ein weiterer Grund könnte der Mangel einer angemessenen Normalisierungsstrategie in der Studie von Larson et al. sein. Diese verwendeten β -Aktin zur Normalisierung, was sich als eher unbrauchbares Referenzgen erwies, und dessen Anwendung zu verzerrten und sogar fehlerhaften Ergebnisse führen könnte [180].

Die statistische Auswertung des Einflusses der dokumentierten Parameter Geschlecht, Alter, Zeitpunkt der Probenentnahme und BMI auf die Expression der Gene *ALDH5A1*, *AKR7A2* und *PEA15* zeigte innerhalb der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Für die Expression des Gens *EREG* konnte abhängig vom Zeitpunkt der Probenentnahme ein zirkadianer Rhythmus beobachtet werden. Zirkadiane Rhythmen der Genexpression und dessen Einfluss auf die Physiologie und Pathologie sind bereits bekannt [181], aber über eine offensichtliche Korrelation zwischen der Expression von *EREG* und dem Zeitpunkt der Probenentnahme wurde bisher noch nicht berichtet. Weitere Experimente, welche die Proteinebene mit einschließen, werden vermutlich benötigt, um diesen Zusammenhang zu verdeutlichen.

Als nächstes wurde die Veränderung der Expression der Gene nach GHB-Einnahme untersucht, die direkt in den Stoffwechselwegen von GHB involviert sind. GHB kann endogen aus SSA gebildet werden, doch nur ein Bruchteil (0,15 %) des durch die Transaminierung von GABA gebildetem SSA wird zu GHB reduziert, was in einem Experiment in Rattenhirnen gezeigt werden konnte [33]. Insbesondere erhöhte GHB-

Konzentrationen werden in humanen Urinproben beobachtet, wenn die Erkrankung SSADHD vorliegt [182,183]. Daher wurde untersucht, ob die Einnahme von GHB die Expression der Gene *ALDH5A1* und *AKR7A2* beeinflusst. Die Hypothese wurde aufgestellt, dass nach einer GHB-Exposition dieser metabolische Stoffwechselweg gesättigt ist und die Expression des Gens *ALDH5A1*, welches für das Enzym SSADH codiert [32], ansteigt, wohingegen die Expression des Gens *AKR7A2*, welches für das SSAR codiert und hauptsächlich für die endogene GHB-Produktion zuständig ist, absinkt [3,29]. Zunächst berechneten wir die mittleren ΔC_q -Werte beider Gene für alle Personen der Fallgruppe und verglichen sie mit den ermittelten Bereichen der Expression in der Kontrollgruppe. Die ΔC_q -Werte des Gens *ALDH5A1* der Kontrollgruppe wiesen eine breite Varianz mit einem großen Abstand zwischen minimalen und maximalen Werten auf. Der Bereich der ΔC_q -Werte des Gens *AKR7A2* war enger und hatte eine geringere Standardabweichung. Der Vergleich der beiden Gruppen Fallkollektiv und Kontrollkollektiv zeigte keinen signifikanten Unterschied in den Werten der Genexpression.

Anschließend betrachteten wir die Expression der beiden Gene *ALDH5A1* und *AKR7A2* vor und bis zu 12 h nach der Aufnahme von GHB für jeden Patienten einzeln. Wir fanden heraus, dass die initiale Expression des Gens *ALDH5A1* in den Patienten P1, P2 und P3 geringer ist (also höhere ΔC_q -Werte aufweist) als nach 12 h. Diese Feststellung bestärkt die Hypothese, dass *ALDH5A1* höher exprimiert wird, wenn der Stoffwechselweg von GHB durch eine exogene Gabe gesättigt ist. Parallel dazu sank die Expression des Gens *AKR7A2* in den Proben der Patienten P1 und P2 während des beobachteten Zeitraums und wies nach 12 h niedriger Werte als vor der Einnahme auf. Diese Feststellung unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass nach GHB-Einnahme die endogene GHB-Synthese runterreguliert wird.

Vergleicht man nun die Expression der Gene *ALDH5A1* und *AKR7A2* in der Probe, die zeitnah zur Tat gesammelt wurde, mit den normalen Expressionsniveaus dieser Gene, wenn der Organismus des Konsumenten durch die Einnahme von GHB nicht weiter beeinflusst wird (z. B. 48 h nach der Tat), so könnte ein signifikanter Anstieg oder Abfall eine exogene GHB-Gabe indizieren. Obwohl aufgrund der geringen Anzahl der Patienten, die Ergebnisse nicht repräsentativ sind, wurde hier eine robuste Methode mit empirisch geprüfter Normalisierungsstrategie für die Bestimmung der Expression von Genen in forensischem Probenmaterial entwickelt. Der Vergleich der Genexpression der Opfer vor und nach der Tat stellt, somit einen weiteren möglichen Ansatz auf dem Gebiet der Toxikogenomik dar, der bei der Aufklärung einer drogenassoziierten Straftat angewendet werden könnte.

9.7 Limitierungen der Studie

Eine Limitierung dieser Studie war die geringe Anzahl an Teilnehmern. Generell war es schwierig, Personen zu finden, die speziell mit GHB gegen Narkolepsie behandelt wurden (aktuelle Zahl erkrankter Personen in Deutschland: 40 000; <http://www.dng-ev.de/narkolepsie/krankheitsbild/>, abgerufen 11.08.2017). Zusätzlich waren die Patienten mit der Teilnahme an der Studie einem gewissen Leidensdrucks ausgesetzt. Durch die Probenentnahme über Nacht konnte den Patienten kein ruhiger, durchgehender Schlaf gesichert werden und durch den Verzicht auf die Medikamenteneinnahme (3 Tage vor dem Experiment) lag meist vorher schon ein Schlafdefizit vor. Dennoch haben sich drei Patienten bereit erklärt, an der Studie teilzunehmen. In diesem Rahmen wurden neue Methoden etabliert und neue Konzepte getestet, um für die nachfolgende weiterführende Forschung vielversprechende Ansätze an einem größeren Kollektiv zu untersuchen.

Eine weitere Limitierung waren die im Vergleich zu DFSA geringen Dosierungen/Konzentrationen von GHB (1,86 g bzw. 2 g GHB bzw. P1: 29,06 mg/kg, P2: 27,76 mg/kg, P3: 21,7 mg/kg). Obwohl es keine öffentlichen Zahlen gibt, geht man davon aus, dass bei DFSA die verabreichten Konzentrationen im Bereich von 30 bis 50 mg/kg liegen [119]. In den Studien von Bertol et al und Kintz et al. wurden jeweils Konzentrationen von 25 mg/kg untersucht [119,127]. In einem DFC wurde eine verabreichte Dosierung von 37,04 mg/kg beschrieben [125]. Therapeutische Dosierungen bei der Behandlung von Narkolepsie-Patienten liegen zwischen 4,5 bis 9 g pro Tag [11]. Bereits bei Erwachsenen können Dosierungen über 4 g GHB zu pharmakologischen Effekten wie Bewusstlosigkeit bis hin zum Koma und Atemdepressionen bis hin zum Atemstillstand führen [21,59]. Wie bereits bei Wang et al. berichtet, konnte der Konsum von missbräuchlichen Konzentrationen eindeutig in Haaren nachgewiesen werden und auch in dem Fall des missbrauchten Mädchens wurden hohe Konzentrationen in den Matrices Haare, Herzblut, Gehirngewebe und Glaskörperflüssigkeit nachgewiesen [77]. Laut Aussage des Täters wurden dem Mädchen Dosen von 75-160 mg/kg verabreicht. Eine aus den höheren Dosen resultierende Sättigung der Stoffwechselwege würde möglicherweise zu bemerkenswerteren Beobachtungen in den toxikologischen und genetischen Untersuchungen führen

10 Ausblick

Es wurden bereits einige vielversprechende Ansätze zur Verlängerung der Nachweisbarkeit nach einer GHB-Einnahme getestet. Weiterführende Versuche an einem größeren Fallkollektiv könnten sich mit der Substanz β -Citryl-Glutaminsäure und dessen Rolle im GHB-Stoffwechselweg beschäftigen. Ebenfalls sollten die Konzentrationen der Substanzen, die in SSADHD-Patienten erhöht sind, in den Plasma- und Urinproben des Fallkollektivs bestimmt werden. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem 3,4-Dihydroxybutansäure, 2,4-Dihydroxybutansäure und 4,5-Dihydroxybutansäure. In SSADHD-Patienten scheint die Bildung dieser sekundären Metabolite über alternative Stoffwechselwege wichtig zu sein, um erhöhte GHB-Konzentrationen in den Körperflüssigkeiten zu verringern. Diese Substanzen könnten auch im Falle einer GHB-assoziierten Straftat physiologisch vermehrt gebildet werden. Eine Quantifizierung dieser Substanzen und der Vergleich mit endogenen Konzentrationen könnte die Nachweisbarkeitsdauer verlängern. Weitere Substanzen, die von diesen Patienten in hohen Mengen ausgeschieden werden, sind u. a. Glutaminsäure, Adipinsäure, Korksäure und Sebacinsäure [148]. Zusätzlich könnten weitere Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Acyl-Glucuronide, weitere sulfonierte Verbindungen sowie andere Degradationsprodukte nach einer GHB-Gabe in Plasma und Urin untersucht werden. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wird beschrieben, wie mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nach weiteren möglichen Metaboliten von GHB gesucht wurde. Es stellte sich heraus, dass nach GHB-Einnahme das Glycolat in höheren Konzentrationen länger nachweisbar ist als GHB selbst oder das GHB-Vorläuferprodukt Succinat [184].

Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob die in alkoholischen Lösungen aus GHB gebildeten Ethyl- und Methylester von GHB auch in physiologischen Matrices aufgefunden werden können [116]. Nach Ausschluss von endogenem Vorkommen könnte ein positiver Nachweis der Methyl- bzw. Ethylester ein Indiz für eine GHB-Einnahme in Kombination mit Alkohol sein. Die Erhöhung der GHB-Konzentrationen in postmortalen Proben wurde ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Wieso es nach dem Todeseintritt zu einem Konzentrationsanstieg kommt und ob die Hydrolyse der Konjugate damit zu tun hat, stellt eine weitere Ansatzmöglichkeit dar.

Auf molekularbiologische Ebene zeigten Buzzi et al., dass bei Knock-out Mäusen, die an dem Defizit SSADHD litten und daher erhöhte GHB-Konzentrationen aufwiesen, die

Ausblick

Expression der GABA_(B)erge Untereinheit auf Proteinebene verändert war [185]. Zukünftige Studien sollten die Veränderung der Struktur des GABA_(B)-Rezeptors, welcher hauptsächlich die pharmakologischen Effekte von GHB induziert, nach chronischer und einmaliger Einnahme von GHB untersuchen [51].

Diese und noch weitere Ansätze, die sich mit den Bereichen postmortale Toxikologie, Toxikogenomik und Metabolomics beschäftigen, sollten in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Synthese von Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) aus Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Degradation von Succinat-Semialdehyd (SSA) zu Bernsteinsäure	4
Abbildung 2 Bay et al. 2014 [51]. Pharmakologische Angriffspunkte von GHB an der GABA/GHBergic Synapse	6
Abbildung 3 Stoffwechselprodukte von Gamma-Hydroxybuttersäure	9
Abbildung 4 Anatomie des Haares [186]	18

12 Literaturverzeichnis

- [1] A. Saytzeff, 4. Ueber die Reduction des Succinylchlorids, *Justus Liebig's Ann. Der Chemie.* 171 (1874) 258–290.
- [2] S.P. Bessman, J. Rossen, E.C. Layne, Gamma-Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain., *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 385–391.
- [3] S.P. Bessman, W.N. Fishbein, Gamma-Hydroxybutyrate, a normal brain metabolite., *Nature.* 200.4912 (1963) 1207–1208. doi:10.1038/2001207a0.
- [4] K.M. Gibson, L. Sweetman, W.L. Nyhan, C. Jakobs, D. Rating, H. Siemes, F. Hanefeld, Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism., *Clin. Chim. Acta.* 133 (1983) 33–42.
- [5] M. Schaller, M. Schaffhauser, N. Sans, B. Wermuth, Cloning and expression of succinic semialdehyde reductase from human brain. Identity with aflatoxin B1 aldehyde reductase.. *Eur. J. Biochem.* 265 (1999) 1056–1060.
- [6] K.E. Breitkreuz, W.L. Allan, O.R. Van Cauwenberghe, C. Jakobs, D. Talibi, B. Andre, B.J. Shelp, A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41552–41556.
- [7] C. Andriamampandry, J.C. Siffert, M. Schmitt, J.M. Garnier, A. Staub, C. Muller, S. Gobaille, J. Mark, M. Maitre, Cloning of a rat brain succinic semialdehyde reductase involved in the synthesis of the neuromodulator gamma-hydroxybutyrate., *Biochem. J.* 334.1 (1998) 43–50.
- [8] Y. Dauvilliers, I. Arnulf, E. Mignot, Narcolepsy with cataplexy., *Lancet (London, England).* 369 (2007) 499–511. doi:10.1016/S0140-6736(07)60237-2.
- [9] M. Mamelak, M.B. Scharf, M. Woods, Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings., *Sleep.* 9 (1986) 285–289.
- [10] H. Laborit, Sodium 4-hydroxybutyrate, *Int. J. Neuropharmacol.* 3 (1964) 433–IN8. doi:10.1016/0028-3908(64)90074-7.
- [11] Fachinformation: UCB Pharma GmbH, Xyrem ® 500 mg / ml Lösung zum Einnehmen, (2011).
- [12] M.J. Hoes, T.B. Vree, P.J. Guelen, Gamma-hydroxybutyric acid as hypnotic. Clinical and pharmacokinetic evaluation of gamma-hydroxybutyric acid as hypnotic in man., *L'Encéphale: Revue de psychiatrie clinique biologique et thérapeutique* (1980).

- [13] L. Gallimberti, G. Canton, N. Gentile, M. Ferri, M. Cibir, S.D. Ferrara, F. Fadda, G.L. Gessa, Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome, *Lancet* (London, England) 2 (1989) 787–789.
- [14] L. Gallimberti, M. Cibir, P. Pagnin, R. Sabbion, P.P. Pani, R. Pirastu, S.D. Ferrara, G.L. Gessa, Gamma-Hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome, *Neuropsychopharmacology*. 9 (1993) 77–81.
- [15] S.D. Ferrara, S. Zotti, L. Tedeschi, G. Frison, F. Castagna, L. Gallimberti, G.L. Gessa, P. Palatini, Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34 (1992) 231–235.
- [16] J. Takahara, S. Yunoki, W. Yakushiji, J. Yamauchi, Y. Yamane, Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44 (1977) 1014–1017.
- [17] J.M. Stell, J.M. Ryan, Ecstasy and neurodegeneration. gamma-Hydroxybutyrate is a new recreational drug that may lead to loss of consciousness., *BMJ*. 313 (1996) 424.
- [18] M.W. Ross, A.M. Mattison & D.R. Franklin, Club drugs and sex on drugs are associated with different motivations for gay circuit party attendance in men., *Subst. Use Misuse*. 38 (2003) 1173–1183.
- [19] A. Camacho, S.C. Matthews, J.E. Dimsdale, Use of GHB Compounds by HIV-Positive Individuals, *Am. J. Addict.* 13 (2004) 120–127.
- [20] Bundesgesetzblatt, zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften (Sechzehnte Betäubungsmittelrechts-Änderungsverordnung – 16 BtMÄndV), Bonn, 2002.
- [21] B. Madea, F. Musshoff, Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection., *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (2009) 341–347.
- [22] R. Brenneisen, M. a Elsohly, T.P. Murphy, J. Passarelli, S. Russmann, S.J. Salamone, D.E. Watson, Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects., *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 625–630.
- [23] P.C.A. Kam, F.F.Y. Yoong, Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug, *Anaesthesia*. 53 (1998) 1195–1198.
- [24] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), GHB and its precursor GBL: an emerging trend case study, Lisbon, 2008.
- [25] L.J. Anderson, A. Flynn, J.L. Pilgrim, A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review, *J Forensic Leg Med* 47 (2017) 46–54.
- [26] I. Hindmarch, M. ElSohly, J. Gambles, S. Salamone, Forensic urinalysis of drug use in cases of alleged sexual assault, *J. Clin. Forensic Med.* 8 (2001) 197–205.

- [27] J. Park, Y.D. Osei, J.E. Churchich, Isolation and characterization of recombinant mitochondrial 4-aminobutyrate aminotransferase., *J. Biol Chem* 268.11 (1993) 7636–7639.
- [28] P.L. Hoffman, B. Wermuth, J.-P. von Wartburg, Human brain aldehyde reductases: relationship to succinic semialdehyde reductase and aldose reductase, *J. Neurochem.* 35 (1980) 354–366.
- [29] L.S. Ireland, D.J. Harrison, G.E. Neal, J.D. Hayes, Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase, *Biochem J* 322.1 (1998) 21–34.
- [30] T. O'Connor, L.S. Ireland, D.J. Harrison, J.D. Hayes, reductase AKR1 family members, *Society.* 504 (1999) 487–504.
- [31] W.B. Jakoby, E.M. Scott, Aldehyde Oxidation III. Succinic Semialdehyde Dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 937–940.
- [32] F. Trettel, P. Malaspina, C. Jodice, A. Novelletto, C.A. Slaughter, D.L. Caudle, D.D. Hinson, K.L. Chambliss, K.M. Gibson, Human succinic semialdehyde dehydrogenase. Molecular cloning and chromosomal localization, *Adv Exp Med Biol* 414 (1997) 253–260.
- [33] B.I. Gold, R.H. Roth, Kinetics of in vivo conversion of gamma-[3H]aminobutyric acid to gamma-[3H]hydroxybutyric acid by rat brain., *J Neurochem* 28.5 (1977) 1069–1073.
- [34] C. Jakobs, J. Jaeken, K.M. Gibson, Inherited disorders of GABA metabolism, *J. Inherit. Metab. Dis.* 16 (1993) 704–715.
- [35] K.L. Chambliss, D.D. Hinson, F. Trettel, P. Malaspina, a Novelletto, C. Jakobs, K.M. Gibson, Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria), *Am J Hum Genet* 63 (1998) 399–408.
- [36] K.M. Gibson et al. The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-Hydroxybutyric Aciduria): case reports of 23 new patients, *Pediatrics.* 99.4 (1997) 567–574.
- [37] P. Malaspina, J.-B. Rouillet, P.L. Pearl, G.R. Ainslie, K.R. Vogel, K.M. Gibson, Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD): Pathophysiological complexity and multifactorial trait associations in a rare monogenic disorder of GABA metabolism, *Neurochem. Int.* 99 (2016) 72–84.
- [38] H. Toyoda, T. Komurasaki, D. Uchida, Y. Takayama, T. Isobe, T. Okuyama, K. Hanada, Epiregulin a novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes, *J Biol Chem* 270.13 (1995) 7495–7500.
- [39] H. Toyoda, T. Komurasaki, D. Uchida, S. Morimoto, Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family., *Biochem J* 326.1 (1997) 69–75.

- [40] H. Araujo, N. Danziger, J. Cordier, J. Glowinski, H. Chneiweiss, Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 5911–5920.
- [41] A. Abdullah, E. Ellis, Gene expression signature of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) exposure in human monocytic leukaemia THP-1 cells, in: *Proc. Physiol. Soc., Physiological Society, London, 2012: p. PC80.* <http://www.physoc.org/proceedings/abstract/Proc Physiol Soc 26PC80> (accessed July 20, 2017).
- [42] D.L. Zvosec, S.W. Smith, T. Porrata, A.Q. Strobl, J.E. Dyer, Case series of 226 γ -hydroxybutyrate-associated deaths: lethal toxicity and trauma., *Am. J. Emerg. Med.* 29 (2011) 319–332.
- [43] S. Abanades, M. Farré, M. Segura, S. Pichini, D. Barral, R. Pacifici, M. Pellegrini, F. Fonseca, K. Langohr, R. De La Torre, Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074 (2006) 559–76. doi:10.1196/annals.1369.065.
- [44] D. Davidson, K. Hutchison, C. Dagon, R. Swift, Assessing the stimulant effects of alcohol in humans, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72 (2002) 151–156.
- [45] S.J. Heshman, K. Arasteh, M.L. Stitzer, Comparative effects of alcohol and marijuana on mood, memory, and performance, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (1997) 93–101.
- [46] J. Black, D. Pardi, C.S. Hornfeldt, N. Inhaber, The nightly administration of sodium oxybate results in significant reduction in the nocturnal sleep disruption of patients with narcolepsy, *Sleep Med.* 10 (2009) 829–835.
- [47] J. Black, D. Pardi, C.S. Hornfeldt, N. Inhaber, The nightly use of sodium oxybate is associated with a reduction in nocturnal sleep disruption: a double-blind, placebo-controlled study in patients with narcolepsy., *J. Clin. Sleep Med.* 6 (2010) 596–602.
- [48] M. Mamelak, J. Black, J. Montplaisir, R. Ristanovic, A pilot study on the effects of sodium oxybate on sleep architecture and daytime alertness in narcolepsy., *Sleep.* 27 (2004) 1327–1334.
- [49] Xyrem International Study Group, A double-blind, placebo-controlled study demonstrates sodium oxybate is effective for the treatment of excessive daytime sleepiness in narcolepsy. *J. Clin. Sleep Med.* 1 (2005) 391–397.
- [50] F.P. Busardò, A.W. Jones, GHB Pharmacology and Toxicology: Acute Intoxication, Concentrations in Blood and Urine in Forensic Cases and Treatment of the Withdrawal Syndrome, *Curr. Neuropharmacol.* 13 (2015) 47–70.
- [51] T. Bay, L.F. Eghorn, A.B. Klein, P. Wellendorph, GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites, *Biochem Pharmacol* 87.2 (2014) 220–228.

- [52] C.D. Cash, Gamma-hydroxybutyrate: An overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent, *Neurosci Biobehav Rev* 18 (1994) 291–304.
- [53] B.L. Morse, N. Vijay, M.E. Morris, γ -Hydroxybutyrate (GHB)-Induced Respiratory Depression: Combined Receptor-Transporter Inhibition Therapy for Treatment in GHB Overdose, *82* (2012) 226–235.
- [54] C. Haller, D. Thai, P. Jacob, J.E. Dyer, GHB urine concentrations after single-dose administration in humans., *J. Anal. Toxicol.* 30 (2013) 360–364.
- [55] L.A. Borgen, R.A. Okerholm, A. Lai, M.B. Scharf, The pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution following acute and chronic administration to narcoleptic patients, *J. Clin. Pharmacol.* 44 (2004) 253–257.
- [56] M.B. Scharf, A.A. Lai, B. Branigan, R. Stover, D.B. Berkowitz, Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients., *Sleep* 21 (1998) 507–514.
- [57] P. Palatini, L. Tedeschi, G. Frison, R. Padrini, R. Zordan, R. Orlando, L. Gallimberti, G.L. Gessa, S.D. Ferrara, Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45 (1993) 353–356.
- [58] L.A. Borgen, R. Okerholm, D. Morrison, A. Lai, The influence of gender and food on the pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution in healthy subjects, *J. Clin. Pharmacol.* 43 (2003) 59–65.
- [59] H. Andresen, T. Stimpfl, N. Sprys, T. Schnitgerhans, A. Müller, Liquid ecstasy - a significant drug problem., *Dtsch. Arztebl. Int.* 105 (2008) 599–603.
- [60] R.C. (Randall C.) Baselt, *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, Biomedical Publications, 2011.
- [61] J.T. Lettieri, H.L. Fung, Dose-dependent pharmacokinetics and hypnotic effects of sodium gamma-hydroxybutyrate in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208 (1979) 7–11.
- [62] W. Pol, E. Kleijn, M. Lauw, Gas chromatographic determination and pharmacokinetics of 4-hydroxybutyrate in dog and mouse., *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 3 (1975) 99–113.
- [63] S. Abanades, M. Farré, M. Segura, S. Pichini, A. Pastor, R. Pacifici, M. Pellegrini, R. de la Torre, Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring., *Ther. Drug Monit.* 29 (2007) 64–70. doi:10.1097/FTD.0b013e3180307e5e.
- [64] E. Liakoni, F. Walther, C.H. Nickel, M.E. Liechti, Presentations to an urban emergency department in Switzerland due to acute γ -hydroxybutyrate toxicity, *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* 24.1 (2016) 107.

- [65] D.C. Lee, W.A. Satz, T. Dougherty, T. Greene, An investigation of flumazenil to antagonize gamma-hydroxybutyrate intoxication in a murine model., *J. Med. Toxicol.* 2 (2006) 68–70.
- [66] P. Devoto, G. Colombo, F. Cappai, G.L. Gessa, Naloxone antagonizes ethanol- but not gamma-hydroxybutyrate-induced sleep in mice., *Eur. J. Pharmacol.* 252 (1994) 321–324.
- [67] F.J. Couper, J.E. Thatcher, B.K. Logan, Suspected GHB overdoses in the emergency department., *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 481–484.
- [68] D. Müller & H. Desel, Ursachen, Diagnostik und Therapie häufiger Vergiftungen, 110 (2013). doi:10.3238/arztebl.2013.0690.
- [69] V.E. de Knegt, T. Breindahl, K.M. Harboe, G.L. Møller, M.L. Børresen, Gamma-hydroxybutyrate and cocaine intoxication in a Danish child, *Clin. Case Reports.* 4 (2016) 228–231.
- [70] S. Lott, F. Musshoff, B. Madea, Estimation of gamma-hydroxybutyrate (GHB) co-consumption in serum samples of drivers positive for amphetamine or ecstasy., *Forensic Sci. Int.* 221 (2012) 98–101. doi:10.1016/j.forsciint.2012.04.009.
- [71] C. Jamey, P. Kintz, L. Martrille, J.-S. Raul, Fatal combination with 3-methylmethcathinone (3-MMC) and gamma-hydroxybutyric acid (GHB), *J. Anal. Toxicol.* (2016). doi:10.1093/jat/bkw058.
- [72] National Center of Biotechnology Information, PubChem Compound Database, CID = 3037032, (2017).
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3037032#section=Boiling-Point> (accessed March 28, 2017).
- [73] O.C. Snead, K.M. Gibson, γ -Hydroxybutyric acid, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 2721–2732.
- [74] S.P. Elliott, Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 9–16.
- [75] J. Lettieri, H.L. Fung, Absorption and first-pass metabolism of ¹⁴C-gamma-hydroxybutyric acid., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 13 (1976) 425–437.
- [76] I.N. Petersen, C. Tortzen, J.L. Kristensen, D.S. Pedersen, T. Breindahl, Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide., *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 291–297. doi:10.1093/jat/bkt027.
- [77] X. Wang, K. Linnet, S.S. Johansen, Development of a UPLC–MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases, *Forensic Toxicol.* 34(1) (2016): 51-60.

- [78] S. Hanisch, N. Stachel, G. Skopp, A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid., *Int. J. Legal Med.* 130.2 (2016) 411–414. doi:10.1007/s00414-015-1235-x.
- [79] R.S. Foti, M.B. Fisher, Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs., *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 109–116. doi:10.1016/j.forsciint.2004.12.003.
- [80] H. Schneider, H. Glatt, Sulpho-conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulphotransferase forms in vitro., *Biochem. J.* 383 (2004) 543–549. doi:10.1042/BJ20040925.
- [81] Drug Enforcement Administration (DEA), Rules - 2000 - Addition of Gamma-Hydroxybutyric acid to Schedule I, (2000). https://www.deadiversion.usdoj.gov/fed_regs/rules/2000/fr0313.htm (accessed May 5, 2017).
- [82] Drug Enforcement Administration (DEA), Gamma Hydroxybutyric acid (Street Names: GHB, Liquid Ecstasy, Liquid X, Goop, Georgia Home Boy, Easy Lay), 2013. https://www.deadiversion.usdoj.gov/drug_chem_info/ghb.pdf (accessed May 5, 2017).
- [83] S.P. Bessman, E.R.B. McCabe, 1,4-butanediol—A substrate for rat liver and horse liver alcohol dehydrogenases, *Biochem. Pharmacol.* 21 (1972) 1135–1142.
- [84] F. Poldrugo, O.C. Snead, 1,4 Butanediol and ethanol compete for degradation in rat brain and liver in vitro, *Alcohol.* 3 (1986) 367–370.
- [85] H.T. Haffner, G. Skopp, M. Graw, eds. *Begutachtung im Verkehrsrecht: Fahrtüchtigkeit-Fahreignung-traumatomechanische Unfallrekonstruktion-Bildidentifikation.* Springer-Verlag, 2012.
- [86] Bundesgerichtshof, BGH 1 StR 277/09 - 8. Dezember 2009 (LG Nürnberg-Fürth) [hrr-strafrecht.de](http://www.hrr-strafrecht.de/hrr/1/09/1-277-09.php), (2009). <http://www.hrr-strafrecht.de/hrr/1/09/1-277-09.php> (accessed June 22, 2017).
- [87] F. Hagenbuch, GBL/GHB- noch der neue Kick?, *Landesärztekammer Baden-Württemb.* (2011). <https://www.aerztekammer-bw.de/10aerzte/05kammern/10laekbw/20ehrenamt/30ausschuesse/suchtmedizin/suchtmedizin/gbl-ghb.pdf> (accessed June 22, 2017).
- [88] R.H. Schwartz, R. Milteer, M.A. LeBeau, Drug-facilitated sexual assault ('date rape')., *South. Med. J.* 93 (2000) 558–561.
- [89] L. Tedeschi, M.A.M. Carai, G. Frison, D. Favretto, G. Colombo, S.D. Ferrara, G.L. Gessa, Endogenous γ -hydroxybutyric acid is in the rat, mouse and human gastrointestinal tract, *Life Sci.* 72 (2003) 2481–2488.

- [90] H. Andresen-Streichert, P. Jensen, J. Kietzerow, M. Schrot, N. Wilke, E. Vettorazzi, A. Mueller, S. Iwersen-Bergmann, Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs, *Int. J. Legal Med.* 129 (1) (2015) 57–68. doi:10.1007/s00414-014-1051-8.
- [91] H. Andresen, N. Sprys, A. Schmoltdt, A. Mueller, S. Iwersen-Bergmann, Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations., *Forensic Sci. Int.* 200 (2010) 93–99. doi:10.1016/j.forsciint.2010.03.035.
- [92] F.P. Busardò, G. Mannocchi, R. Tittarelli, F. Pantano, F. Vaiano, G. Baglio, C. Kyriakou, E. Marinelli, Determination of GHB levels in breast milk and correlation with blood concentrations, *Forensic Sci. Int.* 265 (2016) 172–181.
- [93] M.A. LeBeau, R.H. Christenson, B. Levine, W.D. Darwin, M.A. Huestis, Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate., *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 340–346.
- [94] A.A. Elian, Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 120–122. doi:10.1016/S0379-0738(02)00183-4.
- [95] F. Erdmann, D. Zandt, J. Auch, H. Schütz, G. Weiler, M.A. Verhoff, [Investigations concerning the threshold value between endogenous and exogenous GHB (liquid ecstasy)]., *Arch. Kriminol.* 217 (2003) 129–136.
- [96] S. Kang, S.M. Oh, K.H. Chung, S. Lee, A surrogate analyte-based LC-MS/MS method for the determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) in human urine and variation of endogenous urinary concentrations of GHB, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 193–200.
- [97] A.D. Brailsford, D.A. Cowan, A.T. Kicman, Urinary γ -Hydroxybutyrate Concentrations in 1126 Female Subjects, *J Anal Toxicol* 34.9 (2010): 555-561.
- [98] F.J. Couper & L.J. Marinetti, Gamma-hydroxybutyrate (GHB) - Effects on human performance and behavior., *Forensic Sci. Rev.* 14 (2002) 101–121.
- [99] P. Divry, P. Baltassat, M.O. Rolland, J. Cotte, M. Hermier, M. Duran, S.K. Wadman, A new patient with 4-hydroxybutyric aciduria, a possible defect of 4-aminobutyrate metabolism, *Clin. Chim. Acta.* 129 (1983) 303–309.
- [100] B. Fjeld, M.L. Burns, R. Karinen, B. Larssen, A. Smith-Kielland, V. Vindenes, Long-term stability of GHB in post-mortem samples and samples from living persons, stored at -20°C, using fluoride preservatives, *Forensic Sci. Int.* 222 (2012) 47–51.
- [101] M. Chen, D.M. Andrenyak, D.E. Moody, R.L. Foltz, Stability of Plasma Gamma-Hydroxybutyrate Determined by Gas Chromatography-Positive Ion Chemical Ionization-Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 445–448.

- [102] F.P. Busardò, S. Zaami, G. Baglio, F. Indorato, A. Montana, Assessment of the stability of exogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) in stored blood and urine specimens, (2015) 4187–4194.
- [103] R. Thomsen, B.S. Rasmussen, S.S. Johansen, K. Linnet, Postmortem concentrations of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in peripheral blood and brain tissue — differentiating between postmortem formation and antemortem intake, *Forensic Sci. Int.* (2017).
- [104] P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, B. Ludes, GHB in postmortem toxicology: Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens, *Forensic Sci. Int.* 143 (2004) 177–181.
- [105] A.L. Castro, S. Tarelho, M. Dias, F. Reis, H.M. Teixeira, Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval., *Int. J. Legal Med.* 130.4 (2016): 959-965.
- [106] F.P. Busardò, E. Bertol, F. Vaiano, G. Baglio, A. Montana, N. Barbera, S. Zaami, G. Romano, Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples., *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 144–148.
- [107] K. Beránková, K. Mutnanská, M. Balíková, Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine., *Forensic Sci. Int.* 161 (2006) 158–162. doi:10.1016/j.forsciint.2006.01.017.
- [108] D. Richard, B. Ling, N. Authier, T.W. Faict, A. Eschaliere, F. Coudoré, GC/MS profiling of γ -hydroxybutyrate and precursors in various animal tissues using automatic solid-phase extraction. Preliminary investigations of its potential interest in postmortem interval determination, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1354–1360.
- [109] F. Moriya, Y. Hashimoto, Endogenous gamma-hydroxybutyric acid levels in postmortem blood, *Leg. Med. (Tokyo)*. 6 (2004) 47–51. doi:10.1016/j.legalmed.2003.09.004.
- [110] Z. Zdrojewicz, M. Lachowski, [The importance of putrescine in the human body]., *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 68 (2014) 393–403. doi:10.5604/17322693.1098147.
- [111] O.C. Snead, C.C. Liu, L.J. Bearden, Studies on the relation of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) to gamma-aminobutyric acid (GABA). Evidence that GABA is not the sole source for GHB in rat brain., *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982) 3917–3923.
- [112] J.D. Doherty, S.E. Hattox, O.C. Snead, R.H. Roth, 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.* 207 (1978) 130–139.
- [113] R.H. Roth, Formation and regional distribution of gamma-hydroxybutyric acid in mammalian brain, *Biochem. Pharmacol.* 19 (1970) 3013–3019.
- [114] J. Marinetti, D.S. Isenschmid, B.R. Hepler, S. Kanluen, Analysis of GHB and 4-Methyl-GHB in postmortem matrices after long-term storage, 29 (2005) 41–47.

- [115] Steffen Schaal, Konrad Kunsch, Steffen Kunsch, *Der Mensch in Zahlen: Eine Datensammlung in Tabellen mit über 20000 Einzelwerten* - Steffen Schaal, Konrad Kunsch, Steffen Kunsch - Google Books, 4th ed., 2016. doi:10.1007/978-3-642-55399-8.
- [116] S. a Hennessy, S.M. Moane, S.D. McDermott, The reactivity of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic solutions., *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 1220–1229.
- [117] B. Madea & F. Mußhoff (Hrsg.) *Haaranalytik: Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Deutscher Ärzteverlag, Köln 2004.
- [118] S.D. Ferrara, L. Tedeschi, G. Frison, Endogenous substances in hair., in: In: de, E. Zeeuw RA, Al Hosani I, Al munthiri S, Maqbool A (Eds.), *Proc. 1995 Int. Conf. Work. Hair Anal. Forensic Toxicol.*, Abu Dhabi, United Arab Emirates. (1995) 19–23.
- [119] P. Kintz, V. Cirimele, C. Jamey, B. Ludes, Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault., *J Forensic Sci* 48 (2003) 195–200.
- [120] J.P. Goullé, M. Chèze, G. Pépin, Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault?, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 574–580.
- [121] F. Vaiano, G. Serpelloni, S. Furlanetto, D. Palumbo, F. Mari, A. Fioravanti, E. Bertol, Determination of endogenous concentration of γ -hydroxybutyric acid (GHB) in hair through an ad hoc GC–MS analysis: A study on a wide population and influence of gender and age, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 161–166. doi:10.1016/j.jpba.2015.10.036.
- [122] V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Drug concentrations in human hair after bleaching., *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 331–332.
- [123] Cone EJ, Mechanisms of Drug Incorporation into Hair. *Ther Drug Monit*, 18.4 (1996) 438-443.
- [124] F.P. Busardò, C. Kyriakou, E. Marchei, R. Pacifici, D. Sejer Pedersen, S. Pichini, Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137 (2017) 123–131. doi:10.1016/j.jpba.2017.01.022.
- [125] F.P. Busardò, F. Vaiano, G. Mannocchi, E. Bertol, S. Zaami, E. Marinelli, Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault, *Drug Test. Anal.* 9.6 (2017): 953-956. doi:10.1002/dta.2100.
- [126] The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *Guidelines for the Forensic Analysis of Drugs Facilitating Sexual Assault and Other Criminal Acts*, United Nations, New York (2011).

- [127] E. Bertol, F. Mari, F. Vaiano, G. Romano, S. Zaami, G. Baglio, F.P. Busardò, Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases., *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 376–384. doi:10.1002/dta.1679.
- [128] P. Kintz, A novel approach to document single exposure to GHB: hair analysis after sweat Contamination: Table I., *J. Anal. Toxicol.* 40.7 (2016): 563-564. doi:10.1093/jat/bkw052.
- [129] D.G.E. Caldicott, F.Y. Chow, B.J. Burns, P.D. Felgate, R.W. Byard, Fatalities associated with the use of gamma-hydroxybutyrate and its analogues in Australasia., *Med. J. Aust.* 181 (2004) 310–313.
- [130] P. Kintz, M. Villain, P. Anne-laure, V. Cirimele, G. Leonetti, L.C. Tox, F.- Iiikirch, D.M. L, Unusually high concentrations in a fatal GHB case, 29 (2005) 582–585.
- [131] A. Kankaanpää, R. Liukkonen & K. Ariniemi, Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) and its precursors in blood and urine samples: a salting-out approach, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 133–138.
- [132] S.D. Ferrara, G. Frison, F. Castagna, R. Giorgetti, G.L. Gessas, P. Palatin, L. Gallimberti, Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry., *J Pharm Biomed Anal* 11.6 (1993): 483-487.
- [133] S.S. Johansen, C.N. Windberg, Simultaneous determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) and its analogues (GBL, 1.4-BD, GVL) in whole blood and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry., *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 8–14.
- [134] S. Dresen, J. Kempf, W. Weinmann, Prevalence of γ -hydroxybutyrate (GHB) in serum samples of amphetamine, metamphetamine and ecstasy impaired drivers, *Forensic Sci. Int.* 173 (2007) 112–116.
- [135] H.L. Fung, E. Haas, J. Raybon, J. Xu, S.M. Fung, Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of endogenous γ -hydroxybutyrate concentrations in rat brain regions and plasma, *J. Chromatogr. B.* 807.2 (2004) 287–291.
- [136] E. Kaufmann, A. Alt, Determination of GHB in urine and serum by LC/MS using a simple one-step derivative, *Forensic Sci. Int.* 168 (2007) 133–137.
- [137] V.R. Meyer, Eds., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, WILEY-VCH, 2008.
- [138] M. Wood, M. Laloup, N. Samyn, M.R. Morris, E.A. De Bruijn, R.A. Maes, M.S. Young, V. Maes, G. De Boeck, Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1056 (2004) 83–90.

- [139] L.K. Sorensen & J.B. Hasselstrom, A hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of gamma-hydroxybutyrate and its precursors in forensic whole blood., *Forensic Sci. Int.* 222 (2012) 352–359.
- [140] M. Dziadosz, γ -Hydroxybutyrate analysis in human serum with liquid chromatography–tandem mass spectrometry on the basis of MS3 mass transition, *J. Chromatogr. B.* 986-987 (2015) 8–11.
- [141] F. Mußhoff & B. Madea, *K.-o.-Mittel, Rechtsmedizin.* 18 (2008) 205–224.
- [142] K.-H. Beyer, *Biotransformation der Arzneimittel, 2. Version* (1990).
- [143] R.J. Huxtable, *Biochemistry of Sulfur*, Springer Science & Business Media, 1986, 293-345.
- [144] J. Trontelj, Quantification of glucuronide metabolites in biological matrices by LC-MS/MS. In: Prasain, JK (ed) *Tandem mass spectrometry-applications and principles.* InTech. (2012) 531-558.
- [145] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, 165 (2007) 216–224..
- [146] A. Helander, M. Bottcher, C. Fehr, N. Dahmen, O. Beck, Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification, *Alcohol Alcohol.* 44 (2008) 55–61.
- [147] M. Mamelak, J.M. Escriu, O. Stokan, The effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep, *Biol. Psychiatry.* 12 (1977) 273–288.
- [148] T. Shinka, Y. Inoue, M. Ohse, A. Ito, M. Ohfu, S. Hirose, T. Kuhara, Rapid and sensitive detection of urinary 4-hydroxybutyric acid and its related compounds by gas chromatography–mass spectrometry in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, *J. Chromatogr. B.* 776 (2002) 57–63.
- [149] M. Donike, K. Bärwald, Klostermann K, Schänzer W, Zimmermann J, Nachweis von exogenem Testosteron, in: H. Heck, W. Hollmann, H. Liesen; R. Rost (Eds.), *Sport Leistung und Gesundheit* (1983) 293–298.
- [150] U. Mareck, H. Geyer, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Factors influencing the steroid profile in doping control analysis, *J. Mass Spectrom* 43 (2008) 877–891.
- [151] S.J. Larson, E. a Putnam, C.M. Schwanke, M. a Pershouse, Potential surrogate markers for gamma-hydroxybutyrate administration may extend the detection window from 12 to 48 hours, *J Anal Toxicol* 31 (2007) 15–22.

- [152] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin Chem* 55.4 (2009) 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- [153] S. Mazarr-Proo, S. Kerrigan, Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose, *Journal of analytical toxicology*, 29(5) (2005) 398-400.
- [154] S.D. Ferrara, L. Tedeschi, G. Frison, A. Rossi, Fatality due to gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and heroin intoxication., *J. Forensic Sci.* 40 (1995) 501–504.
- [155] P. Kintz, ed., *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, CRC Press, 2006.
- [156] Y. Hari, S. König, A. Schröck, P. Coro, V. Auwärter, A. Thierauf, W. Weinmann, LC-MS/MS of GHB in head hair and beard, 80 (2013) 224–227.
- [157] J. P. Goullé, M. Chèze, G. & Pépin, Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *Journal of Analytical Toxicology*, 27(8) (2003) 574–580.
- [158] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS., *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [159] I.N. Petersen, J.L. Kristensen, C. Tortzen, T. Breindahl, D. Sejer Pedersen, Synthesis and stability study of a new major metabolite of γ -hydroxybutyric acid., *Beilstein J. Org. Chem.* 9 (2013) 641–646. doi:10.3762/bjoc.9.72.
- [160] National Center for Biotechnology Information. CID=11266, PubChem Compound Database; CID=11266, (2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11266> (accessed August 14, 2017).
- [161] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database, CID=441, (2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441> (accessed August 14, 2017).
- [162] S. Jurowich, G. Sticht & H. Käferstein, Glucuronidation of aliphatic alcohols in human liver microsomes in vitro, *Alcohol*. 32 (2004) 187–194. doi:10.1016/j.alcohol.2004.01.007.
- [163] S.L. Regan, J.L. Maggs, T.G. Hammond, C. Lambert, D.P. Williams, B.K. Park, Acyl glucuronides: the good, the bad and the ugly., *Biopharm. Drug Dispos.* 31 (2010) 367–95.
- [164] C.L. Crunelle, H. Neels, K. Maudens, M. De Doncker, D. Cappelle, F. Matthys, G. Dom, E. Franssen, P. Michielsens, S. De Keukeleire, A. Covaci, M. Yegles, Influence of Body Mass Index on Hair Ethyl Glucuronide Concentrations, *Alcohol and Alcoholism* (2016) 1-5. doi:10.1093/alcalc/agw079.

- [165] C.C. Halter, S. Dresen, V. Auwaerter, F.M. Wurst, W. Weinmann, Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake, *Int. J. Legal Med.* 122 (2008) 123–128. doi: 10.1007/s00414-007-0180-8.
- [166] L. Dehennin, P. Lafarge, P. Dailly, D. Bailloux, J.-P. Lafarge, Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: a simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chroma B* 687 (1996) 85–91. doi:10.1016/S0378-4347(96)00131-4.
- [167] T. Piper, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids excreted as sulpho conjugates, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 3171–3181. doi:10.1002/rcm.4762.
- [168] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database, CID=189741, (2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/189741> (accessed August 11, 2017).
- [169] M. Miyake, Y. Kakimoto, M. Sorimachi, A gas chromatographic method for the determination of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl-alpha-aspartylglutamic acid and beta-citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals., *J. Neurochem* 36 (1981) 804–810.
- [170] M. Miyake, H. Morino, M. Mizobuchi, Y. Kakimoto, N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl-alpha-L-aspartyl-L-glutamic acid and beta-citryl-L-glutamic acid in human urine, *Clin. Chim. Acta.* 120 (1982) 119–126.
- [171] P.E. Mason, W.P. Kerns, Gamma Hydroxybutyric acid (GHB) Intoxication, *Acad Emerg Med* 9 (2002) 730–739. doi:10.1197/aemj.9.7.730.
- [172] KEGG Pathway: hsa00650, http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa00650 (accessed August 11, 2017).
- [173] S.D. Yelamanchi, S. Jayaram, J.K. Thomas, S. Gundimeda, A.A. Khan, A. Singhal, T.S. Keshava Prasad, A. Pandey, B.L. Somani, H. Gowda, A pathway map of glutamate metabolism, *J. Cell Commun. Signal.* 10 (2016) 69–75. doi:10.1007/s12079-015-0315-5.
- [174] P.-E. Sottas, N. Robinson, O. Rabin, M. Saugy, The athlete biological passport, *Clin. Chem.* 57 (2011) 7969–7976.
- [175] B.S. Stamova, M. Apperson, W.L. Walker, Y. Tian, H. Xu, P. Adamczyk, X. Zhan, D.-Z. Liu, B.P. Ander, I.H. Liao, J.P. Gregg, R.J. Turner, G. Jickling, L. Lit, F.R. Sharp, Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood, *BMC Med Genomics* 2.1 (2009) 49. doi:10.1186/1755-8794-2-49.
- [176] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29.9 (2001) e45.

- [177] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes., *Genome Biol.* 3.7 (2002) Research0034-1.
- [178] C.L. Andersen, J.L. Jensen, T.F. Ørntoft, Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets., *Cancer Res.* 64.15 (2004) 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- [179] S. Hwang, W.L. Kuo, J.F. Cochran, R.C. Guzman, T. Tsukamoto, G. Bandyopadhyay, K. Myambo, C.C. Collins, Assignment of HMAT1, the human homolog of the murine mammary transforming gene (MAT1) associated with tumorigenesis, to 1q21.1, a region frequently gained in human breast cancers., *Genomics.* 42 (1997) 540–542.
- [180] A. Radonić, S. Thulke, I.M. Mackay, O. Landt, W. Siegert, A. Nitsche, Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR., *Biochem Biophys Res Commun* 313.4 (2004) 856–862.
- [181] S. Sukumaran, R.R. Almon, D.C. DuBois, W.J. Jusko, Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action, *Adv Drug Deliv Rev* 62.9 (2010) 904–917. doi:10.1016/j.addr.2010.05.009.
- [182] K.M. Gibson, L. Sweetman, W.L. Nyhan, G. Lenoir, P. Divry, Defective succinic semialdehyde dehydrogenase activity in 4-hydroxybutyric aciduria., *Eur J Pediatr* 142.4 (1984) 257–259.
- [183] C. Jakobs, M. Bojasch, E. Mönch, D. Rating, H. Siemes, F. Hanefeld, Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism, *Clin Chim Acta* 111.2-3 (1981) 169–178.
- [184] M. Palomino-Schätzlein, Y. Wang, T. Parella, C. Legido-Quigley, M. Pérez-Trujillo, Direct monitoring of exogenous GHB in body fluids by NMR spectroscopy, *Anal. Chem.* (2017) DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01567.
- [185] A. Buzzi, Y. Wu, M. V. Frantseva, J.L. Perez Velazquez, M.A. Cortez, C.C. Liu, L.Q. Shen, K.M. Gibson, O.C. Snead, Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: GABA B receptor-mediated function, *Brain Res* 1090.1 (2006) 15–22.
- [186] https://www.google.de/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiZ8Ibsw_3YAhVMK1AKHUp4BcQQjRwIBw&url=https%3A%2F%2Fwww.dred.com%2Fde%2Fhaarwachstum.html&psig=AOvVaw2t3P6cuWUly_c3c_k-4_T8&ust=1517327571641656 (augerufen am 11.09.2017)

Weitere, in den Publikationen/dem Manuskript zitierte, in dieser Schrift nicht aufgeführte Referenzen:

K. M. Gibson, G. F. Hoffmann, a. K. Hodson, T. Bottiglieri, and C. Jakobs, 4-hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics*, 29.1 (1998) 14–22.

S. P. Elliott, Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid: implications for the interpretation of findings. *J. Anal. Toxicol.* 28.1 (2004) 20–26.

W. C. Duer, K. L. Byers, and J. V Martin, Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol. *J. Anal. Toxicol.* 25.7 (2001) 576-582.

J. Suchard, S. Nizkorodov, and S. Wilkinson, 1,4-Butanediol content of aqua dots children's craft toy beads. *J. Med. Toxicol.* 5.3 (2009) 120–124.

H. Murali and S. Kotagal, Off-label treatment of severe childhood narcolepsy cataplexy with sodium oxybate. *Sleep* 29.8 (2006) 1025–1029.

H. Cousto, Fachinformation: GHB (Gamma-Hydroxybutyrat) - Mischkonsum. <http://www.drogenkult.net/index.php/GHB.pdf?file=GHB&view=pdf>, 2011 (accessed: 20.12.2016).

P. Kintz, M. Villain, B. Ludes, Testing for the undetectable in drug-facilitated sexual assault using hair analyzed by tandem mass spectrometry as evidence. *Ther. Drug. Monit.* 26.2 (2004) 211–214.

M.K.K. Nielsen, S.S. Johansen, P.W. Dalsgaard, K. Linnet, Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF–MS. *Forensic Sci. Int.* 196.1 (2010) 85–92.

C.D. King, G. R. Rios, M. D. Green & T. R. Tephly, UDP-glucuronosyltransferases. *Curr. Drug Metab.* 1.2 (2000) 143–161.

M.O. James & S. Ambadapadi, Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 45.4 (2013) 401–414.

M. Hädener, W. Weinmann, S. Schürch, S. König, Development of a rapid column-switching LC-MS/MS method for the quantification of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in whole blood for assessing cannabis consumption frequency. *Anal. Bioanal. Chem.* 408.7 (2016) 1953–1962.

R. Martin, J. Schürenkamp, H. Pfeiffer, M. Lehr, H. Köhler, Synthesis, hydrolysis and stability of psilocin glucuronide. *Forensic Sci. Int.* 237 (2014) 1–6.

- A. Klingmann, G. Skopp, I. Pedal, L. Pötsch, R. Aderjan, Distribution of morphine and morphine glucuronides in body tissue and fluids--postmortem findings in brief survival. *Archiv für Kriminologie* 206.1-2 (2000) 38–49.
- Jazz Pharmaceuticals, Highlights of prescribing information., (2015) https://www.xyremrems.com/documents/XYREM_Prescribing_Information.pdf. data accessed 13.12.2016.
- R. Broughton & M. Mamelak, Effects of nocturnal gamma-hydroxybutyrate on sleep/waking patterns in narcolepsy-cataplexy. *Can. J. Neurol. Sci.* 7.1 (1980) 23–31.
- K.L. Nicholson & R.L. Balster, GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend.* 63.1 (2001) 1-22.
- L. Degenhardt, S. Darke & P. Dillon, The prevalence and correlates of gamma-hydroxybutyrate (GHB) overdose among Australian users. *Addiction* 98.2 (2003) 199-204.
- F.J. Couper & B.K. Logan, Determination of γ -Hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 24.1 (2000) 1-7.
- A.D. Brailsford, D.A. Cowan & A.T. Kicman, Pharmacokinetic properties of γ -hydroxybutyrate (GHB) in whole blood, serum and urine, *J. Anal. Toxicol.* 36.2 (2012) 88-95.
- R. Paul, L. Tsanaclis, R. Kingston, A. Berry, A. Guwy, Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS. *Drug Test. Analysis* 3.4 (2011) 201–205.
- E. Jagerdeo, M.A. Montgomery & M.A. LeBeau, An improved method for the analysis of GHB in human hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 39.2 (2014) 83–88.
- T. Piper, A. Thomas, N. Baume, T. Sobolevsky, M. Saugy, G. Rodchenkov, W. Schänzer, M. Thevis, Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1β -D-ribofuranoside (AICAR), *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28.11 (2014) 1194–1202.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- H.E. Solberg, Approved Recommendation (1986) on the Theory of Reference Values. Part 1. The Concept of Reference values. *J clin chem clin biochem* 25 (1987) 337-342.
- H.E. Solberg, C. PetitClerk, Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimen for the production of reference values. *J clin chem clin biochem* 26.9 (1988): 593-598.
- H.E. Solberg, Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J clin chem clin biochem* 25 (1987), 645-656.

- M. Miyake, Y. Kakimoto, M. Sorimachi, Isolation and identification of β -citryl-L-glutamic acid from newborn rat brain. *Biochim Biophys Acta* 544 (1978) 565-666.
- M. Hamada-Kanazawa, M. Kouda, A. Odani, K. Matsuyama, K. Kanazawa, T. Hasegawa, M. Narahara, M. Miyake, β -Citryl-L-glutamate is an endogenous iron chelator that occurs naturally in the developing brain. *Biol Pharm Bull* 33 (2010) 729-737.
- F. Collard, V. Stroobant, P. Lamosa, C.N. Kapanda, D.M. Lambert, G.G. Muccioli, J.H. Poupaert, F. Opperdoes, E. Van Schaftingen, Molecular Identification of N-Acetylaspartylglutamate Synthase and β -Citrylglutamate Synthase. *J Biol Chem* 285 (2010) 29826-29833.
- F.P. Busardò, S. Pichini, The everlasting issue of GHB cut-offs in biological samples: How important it is to be careful when interpreting values, *Forensic Sci. Int.* (2017), doi: 10.1016/j.forsciint.2017.02.022.
- C. Saudan, M. Augsburg, P. Mangin & M. Saugy, Carbon isotopic ratio analysis by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry for the detection of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) administration to humans. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21 (2007) 3956–3962.
- K.J. Livak & T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method. *Methods* 25 (2001) 402–408.
- J.M. Ruijter, C. Ramakers, W.M. H. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. B. van den Hoff, A. F. M. Moorman, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e45–e45.
- R.C. Lyon, S.M. Johnston, D.G. Watson, G. McGarvie, E. M. Ellis, Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *J Biol Chem* 282 (2007) 25986–25992.

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 endogene Konzentrationsbereiche von GHB in biologischen Matrices von lebenden Individuen	12
Tabelle 2 Untersuchungen zur Stabilität von GHB in Proben von lebenden Personen	13
Tabelle 3 empfohlene cut-off-Werte für GHB in postmortalen biologischen Matrices.....	14
Tabelle 4 Stabilität für GHB in postmortalen Proben.....	17

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Burkhard Madea vom Institut für Rechtsmedizin der medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit an seinem Institut anzufertigen, für die wertvollen Ratschläge sowie die gute Betreuung und die Begutachtung meiner Dissertation;

Herrn Prof. Dr. Alf Lamprecht vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn für die Übernahme der Zweitkorrektur;

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie und Herrn Prof. Dr. Walter Witke vom Lehrstuhl für Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für Ihre Bereitschaft an meiner Prüfungskommission teilzunehmen,

Dr. Cornelius Hess vom Institut für Rechtsmedizin, Funktionsbereich forensische Toxikologie für die Betreuung der Arbeit und das Korrekturlesen;

Dr. Thomas Pieper vom Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln für die gute Einarbeitung am QToF-MS-Gerät, die Beantwortung der vielen Fragen und die sehr gute Zusammenarbeit;

PD. Dr. Cornelius Courts vom Institut für Rechtsmedizin, Funktionsbereich für forensische Genetik für die Beantwortung der vielen Fragen, das Korrekturlesen und die sehr gute Zusammenarbeit;

Herrn Prof. Dr. Mario Thevis vom Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln sowie Frau Prof. Dr. Sys Stybe Johansen und Frau Dr. Xin Wang vom Institut für Rechtsmedizin in Kopenhagen für die sehr gute Kooperation;

Melanie Grabmüller vom Institut für Rechtsmedizin, Funktionsbereich forensische Genetik für das gute Einarbeiten in die Labortechnik sowie Software handling und zusammen mit Isabel Eydeler vom Insitut für Rechtsmedizin für die tägliche Portion Lachen und das viele Mut machen;

Danksagung

Allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin, besonders den Funktionsbereichen für forensische Toxikologie und Genetik für die gute Einarbeitung, die nette Arbeitsatmosphäre und die sehr gute Zusammenarbeit;

Allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie an der Spothochschule Köln für die freundliche Aufnahme, die nette Arbeitsatmosphäre und die sehr gute Zusammenarbeit;

Meinem Vater für die Unterstützung, Anregungen und die guten Ratschläge sowohl im Studium als auch während meiner Promotionsarbeit;

Meiner Mutter für die vielen Lösungen zu meinen Problemen und ihrer unermüdlichen Motivation;

Meinen Bruder und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt haben, mir Mut gemacht haben und zu jeder Tages- und Nachtzeit ein offenes Ohr hatten.