

# **Organische Säuren als Biomarker zur Detektion von Gamma-Hydroxybuttersäure in der Forensik**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und  
Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

**Pouria Jarsiah**

geb. in Teheran

Mainz, 2021

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Publikationen .....	VII
Zusammenfassung .....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 GHB-Vorkommen, Verwendung, Missbrauch.....	1
1.2 Precursor von GHB und chemische Stabilität.....	2
1.3 GHB-Biosynthese und Metabolismus .....	3
1.4 Physiologie und Pharmakologie von GHB.....	5
1.4.1 Pharmakodynamik .....	5
1.4.2 Pharmakokinetik, endogene Konzentrationen und Nachweisfenster in Blut und Urin .....	6
1.5 (Prä)Analytik von GHB und ihren Precursor und Stabilität in Blut und Urin ....	9
1.6 Metabolite .....	10
1.6.1 Phase 1 Metaboliten (Organische Säuren als Metaboliten) .....	10
1.6.2 Phase 2 Metaboliten .....	12
1.7 Toxikologie .....	13
1.8 GHB post mortem.....	14
1.9 Weitere Ansätze zum (längeren) Nachweis von GHB .....	17
1.9.1 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie .....	17
1.9.2 Molekulargenetische Untersuchungen.....	18
1.9.3 Analyse von GHB und GBL in alkoholischen Getränken .....	18
1.9.4 Nachweis von GHB (und dessen Metaboliten) im Haar .....	19
1.10 Analytik.....	21
1.10.1 GCMS .....	22

2	Zielsetzung der Dissertation .....	24
3	Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid–validated quantification using GC–MS and description of endogenous concentration ranges ..	26
3.1	Einleitung.....	26
3.2	Originalpublikation.....	28
3.3	Zusammenfassung.....	37
4	GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results.....	39
4.1	Einleitung.....	39
4.2	Originalpublikation.....	41
4.3	Zusammenfassung.....	50
5	GHB related acids are useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases .....	52
5.1	Einleitung.....	52
5.2	Originalpublikation.....	53
5.3	Zusammenfassung.....	59
6	Limitierungen der Studie .....	61
7	Ausblick .....	62
8	Literaturverzeichnis.....	64
9	Danksagung.....	77
10	Akademischer Lebenslauf .....	78
11	Versicherung an Eides statt.....	81



## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
%	Prozent
±	Plus/Minus
°C	Grad Celsius
2,4-OH-BA	2,4-Dihydroxybuttersäure
3,4-OH-BA	3,4-Dihydroxybuttersäure
BD	1,4 Butandiol
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Cm	Zentimeter
Cut-off	Toleranzgrenze
DFC	drogenassoziierte Verbrechen ( <i>Drug facilitated crime</i> )
DFSA	drogenassoziierte Sexualstraftat ( <i>Drug facilitated sexual assault</i> )
E4HB	Ethyl-4-hydroxybutyrat
eV	Electronvolt
G	Gramm
GA	Glykolsäure
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (Gamma-Aminobutyric acid)
GBL	Gamma-Butyrolacton
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Gaschromatography Mass Spectrometry)
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure (Gamma-Hydroxybutyric acid)
GHB-Gluc	GHB-β-O-Glucuronid (GHB- β-O-glucuronide)
GHB-Sulf	GHB-4-Sulfat (GHB-4-sulfate)
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTFCh	Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie
H	Stunde
IRMS	isotope ratio mass spectrometry
k.o.-Mittel	Knock-out-Mittel
Kg	Kilogramm
L	Liter
LOD	Nachweisgrenze ( <i>Limit of Detection</i> )

LOQ	Bestimmungsgrenze ( <i>Limit of Quantification</i> )
m/z	Masse-zu-Ladung
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
NaF	Natriumfluorid
Ng	Nanogramm
pKa	Säurekonstante
QTOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer
REM-Schlaf	rasche Augenbewegung ( <i>rapid eye movement</i> )- Schlaf
SA	Bernsteinsäure
SIM	single ion monitoring Modus ( <i>Selective Ion Monitoring</i> )
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSADH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
SSADHD	Succinat Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel ( <i>Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency</i> )
SSAR	Succinat-Semialdehyd-Reduktase
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
vs.	gegen
w/v	Gewicht nach Volumen ( <i>Weight by Volume</i> )
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege von GHB. 1- GABA-Transaminase 2- Succinat-Semialdehyd Reduktase 3- GHB-Dehydrogenase 4- Succinat-Semialdehyddehydrogenase 5- UDP-Glucuronosyltransferase 6- Sulfotransferase 7- Serumlactonase 8- Alkoholdehydrogenase 9- Aldehyd-Dehydrogenasen.....	4
Abbildung 2 [56]: Pharmakologische Angriffspunkte von GHB an der GABA/GHBergic Synapse.....	6
Abbildung 3: Reaktion der Derivatisierung von GHB.....	22

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische Strukturen von GHB und GABA .....	2
Tabelle 2: Strukturen der GHB Precursor GBL und 1,4-Butandiol.....	3
Tabelle 3: Chemische Strukturen von GHB related acids.....	11
Tabelle 4 [106, 107]: Dosis Wirkungsbeziehung von GHB .....	14

## Publikationen

Die der vorliegenden kumulativen Dissertationsschrift zugrundeliegenden Arbeiten, die am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Mainz, an der ÜBAG Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Eberhard & Partner Dortmund entstanden sind, wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht:

- Jarsiah, P., et al., Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid–validated quantification using GC–MS and description of endogenous concentration ranges. 2020. 12(8): p. 1135-1143.
- Jarsiah, P., et al., GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results. 2020. 316: p. 110536.
- Jarsiah, P., et al., GHB related acids are useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases. 2021: p. 110833.

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

- Küting T., et al., Detection of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid-related acids in blood plasma and urine: Extending the detection window of an exogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid intake? Drug Test Anal. 2021 May 14. doi: 10.1002/dta.3097. Epub ahead of print. PMID: 33991073.

Zudem wurden Teile der Arbeit auf folgendem internationalen Kongress als Vortrag präsentiert:

**XXII. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) in Mosbach, Germany 2021:** Pouria Jarsiah, Theresa Kueting, Bianca Schneider, Michael Krämer, Joerg Roehrich, Tanja Germerott, Daniela Wissenbach, Walter Martz, Stefan Toennes, Stefan Scholtis, Franziska Krumbiegel, Anna Heidbreder, Cornelius Hess, Usefulness of quantification of GHB related acids in routine casework of suspected GHB intoxication cases ante- and post-mortem

## Zusammenfassung

Bei Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) handelt es sich um eine forensisch relevante Substanz, welche als Freizeitdroge und zur Betäubung in k.o.-Mittel Fällen eingesetzt wird. Der Missbrauch von GHB, insbesondere bei sexuellen Übergriffen durch *date rape sexual assaults*, hat in den letzten Jahren zugenommen.

Die Schwierigkeit des Nachweises einer GHB-Aufnahme liegt hauptsächlich darin begründet, dass GHB schnell metabolisiert und ausgeschieden wird und daher ihr Nachweisfenster in Körperflüssigkeiten auf wenige Stunden nach der Einnahme begrenzt ist. Darüber hinaus entstehen durch das endogene Vorhandensein der Substanz in Körperflüssigkeiten Probleme bei der Interpretation von Befunden.

Diese Arbeit wurde einerseits mit dem Ziel durchgeführt, die Nachweisbarkeitsdauer nach einer GHB-Gabe in biologischen Matrices zu verlängern, andererseits die forensische Interpretation von Befunden ante und post mortem zu erleichtern.

Organische Säuren sind eine Gruppe von Monocarbonsäuren mit gesättigten oder ungesättigten Derivaten, Hydroxyl-, Phenol- und Multicarbonsäurevarianten und werden allgemein als Fettsäuren, flüchtige Fettsäuren oder Carbonsäuren bezeichnet. Eine Reihe von organischen Säuren wie 2,4-Dihydroxybuttersäure (2,4-OH-BA), 3,4-Dihydroxybuttersäure (3,4-OH-BA), Glykolsäure (GA) und Bernsteinsäure (SA) wurden in dieser Arbeit untersucht.

Hierfür wurde zunächst eine einfache und präzise GC-MS-Methodik entwickelt, die zur Bestimmung von GHB und diesen sogenannten GHB-related acids (Organischen Säuren) in biologischen Matrices geeignet ist. Die entwickelte Methode wurde nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert, um die Gerichtsverwertbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Validierung zeigte eine ausreichende Sensitivität der Methodik, < 1% für 2,4-OH-BA, < 1% für 3,4-OH-BA, 62% für GHB, 11% für SA und 0% für GA der endogenen Proben in Serum lagen unterhalb der LoDs. 0% für 2,4-OH-BA, 0% für 3,4-OH-BA, 16% für GHB, 0% für SA und 0% für GA der endogenen Proben in Urin lagen unterhalb der LoDs. (LoDs waren 0,12 mg/L für 2,4-OH-BA, 0,13 mg/L für 3,4-OH-BA, 0,03 mg/L für GHB, 0,28 mg/L für SA, 0,19 mg/L für GA und LoQs waren 0,39 mg/L für 2,4-OH-BA, 0,42 mg/L für 3,4-OH-BA, 0,11 mg/L für GHB, 0,98 mg/L für SA, 0,63 mg/L für GA).

Die Linearität der Kalibrierung war vom LoQ bis zu 20 mg/L für alle Analyten in Wasser gegeben und die lineare Regression zeigte Korrelationskoeffizienten  $R^2$  immer  $> 0,99$ . Die Impräzisionsdaten und der Bias der Methode betragen immer weniger als 15 % bei niedrigen (2 mg/L) und hohen (17 mg/L) Qualitätskontrollproben.

Die Stabilität wurde in den extrahierten Proben im Autosampler bei Raumtemperatur für 40 Stunden nach der Extraktion getestet und der Rückgang der detektierten Peakflächen betrug bei allen Analyten weniger als 10 %. Die Stabilität der Analyten in Serum- und Urinproben wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  über den Zeitraum von einem Monat getestet. Die Konzentrationen der Bernsteinsäure änderten sich während der Lagerung erheblich. Im Gegensatz dazu schienen GHB und seine weiteren related acids in Serum und Urin sehr stabil zu sein und die mittleren Abweichungen von der ersten Messung veränderten sich nach der Lagerung nie mehr als 16 %.

Mittels der validierten Methode wurden endogene Konzentrationsbereiche von GHB, SA, GA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA in Serum ( $n = 101$ ) und Urin ( $n = 132$ ) Lebender und in Oberschenkelvenenblut ( $n = 103$ ) und Urin ( $n = 80$ ) Verstorbener bestimmt und definiert.

Desweiteren wurde getestet, inwiefern die einzelnen organischen Säuren nach Aufnahme von GHB als Arzneimittel bei Narkoleptikern in erhöhten Konzentrationen in Serum und Urin auftreten und eventuell das Nachweisfenster verlängern könnten. Wir sammelten Blut- und Urinproben von Narkolepsiepatienten ( $n = 5$ ), die mit Arzneimitteln behandelt wurden, die GHB-Natriumsalz enthielten (1.86 – 3.72 g GHB als freie Säure pro Dosis). Obwohl GHB nur bis zu 4 Stunden in Konzentrationen oberhalb der üblicherweise verwendeten Grenzwerte im Blutplasma nachweisbar war, konnte 3,4-Dihydroxybuttersäure bis zu 12 Stunden im Blutplasma in, im Vergleich zu den Basalwerten des Patienten, erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Im Urin konnten GHB-Konzentrationen oberhalb der üblichen Cut-off-Werte 4,5 – 9,5 Stunden nach GHB-Aufnahme beobachtet werden. Durch Kreatinin standardisierte Anfangskonzentrationen wurden für GA, 3,4-OH-BA und 2,4-OH-BA 6,5 – 22, 11,5 – 22 bzw. 8,5 – 70 Stunden nach GHB-Einnahme wieder erreicht. Dieser Teil der Arbeit wurde in einer Publikation genutzt, ist jedoch nicht Teil der vorliegenden Promotionsschrift.

Daneben wurden auch die Routinefälle mit drug facilitated crime Hintergrund (DFC) bei denen die GHB-Ergebnisse oberhalb der Cut-offs Grenze für GHB ( $< 4\text{ mg/L}$  in

Serum und < 10 mg/L in Urin) lagen (n = 17, 10 Serumproben und 7 Urinproben) und Fälle mit Verdacht auf GHB-Aufnahme (n = 40, 21 Serumproben und 19 Urinproben) trotz negativen GHB-Ergebnissen aus routinemäßigen Fallarbeiten auf GHB related acids getestet. Erhöhte Konzentrationen von den GHB related acids wurden in allen Serumproben und in den meisten Urinproben, die positiv auf GHB waren, nachgewiesen. In einigen GHB-negativen Fällen, insbesondere in Serumproben, gaben die Konzentrationen von GHB related acids, trotz unauffälligem GHB-Ergebnis, Hinweise darauf, dass GHB tatsächlich eingenommen wurde.

Diese Ergebnisse zeigten einerseits die Überlegenheit der Serumanalyse gegenüber der Urinanalyse bei der Untersuchung von Verdachtsfällen einer GHB-Intoxikation und, dass eine zusätzliche Analyse von GA, 2,4- und 3,4-OH-BA das Nachweisfenster einer GHB-Aufnahme vergrößern kann. Für eine sicherere Interpretation einer möglichen exogenen Aufnahme empfehlen wir neben der Analyse von GHB in mehreren Matrices folgende Cut-offs: 3,4-OH-BA: > 3 mg/L im Serum und > 50 mg/L im Urin; 2, 4-OH-BA: > 2 mg/L im Serum und > 25 mg/L im Urin; GA: > 5 mg/L im Serum und > 400 mg/L im Urin.

Daneben wurden auch postmortale Körperflüssigkeiten untersucht. Es wurde geprüft, ob die Bestimmung der Konzentrationen dieser GHB related acids in post mortem Oberschenkelblut und Urin bei der Interpretation der post mortem Ergebnisse hilfreich sein könnte. Anhand der Methode sollte zuerst die Stabilität der Metabolite in post mortem Proben überprüft werden. Die Ergebnisse zeigten keine Abnahme der Konzentrationen >20 % bei Lagerung bei -20 °C, mit Ausnahme von SA (58,7 %, 7 Tage nach der Autopsie).

Es wurden danach die Proben von Verstorbenen ohne bekannte GHB-Exposition gesammelt, um die endogenen Konzentrationen von GHB, SA, GA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA in Blut (Oberschenkelblut: n = 103) und Urin (n = 80) in post mortem Proben zu bestimmen. Abschließend wurden Proben von Todesfällen mit GHB-Aufnahme vor dem Tod analysiert.

Bei Todesfällen mit nachgewiesener GHB-Einnahme (n = 11) waren die Konzentrationen von GHB related acids im Vergleich zu Fällen ohne bekannte GHB-Exposition (Urin: n = 80; Femurblut: n = 103) erhöht. So waren die Konzentrationen im Urin für GA in 7 von 10 Fällen und bis 391 mg/L, für 2,4-OH-BA in 9 von 10 Fällen und bis 144 mg/L und für 3,4-OH-BA in 7 von 10 Fällen und bis zu 665 mg/L erhöht. Im



Blut waren die Konzentrationen für GA in 6 von 11 Fällen und bis 34 mg/L, für 2,4-OH-BA in 11 von 11 Fällen und bis zu 9,1 mg/L und für 3,4-OH-BA in 11 von 11 Fällen und bis zu 19 mg/L erhöht. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass insbesondere die Analyse von hydroxylierten Metaboliten von GHB, aber auch die Analyse von GA bei der Interpretation der GHB-Ergebnisse post mortem hilfreich sein kann.

# 1 Einleitung

## 1.1 GHB-Vorkommen, Verwendung, Missbrauch

Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) ist eine kurzkettige Fettsäure mit zwei polaren Substituenten (1-3). GHB kommt als farblose und geruchlose Flüssigkeit, weißes Pulver, Kapseln oder Tabletten vor. Üblicherweise ist GHB als Natriumsalz in einer transparenten Lösung erhältlich (4-7). In Tabelle 1 sind die Strukturformeln von GHB und seinem Vorläufer Gamma-Aminobuttersäure (GABA) aufgelistet.

GHB wird einerseits therapeutisch genutzt. Erstmals 1874 von Alexander Sytzeff synthetisiert und beschrieben (8), wurde sie dann in den 60er Jahren als Anästhetikum eingesetzt (5). Daneben wurde sie bei Insomnie, Alkohol- oder Opioidenzugssymptomen oder cerebrovaskulären Krankheiten eingesetzt (9, 10). Zurzeit wird GHB unter den Handelsnamen Xyrem® oder Somsanit® bei der Behandlung der Narkolepsie und Kataplexie eingesetzt (10, 11). Bei diesen Patienten moduliert GHB das Schlafverhalten (12) und kann alle narkoleptischen Symptome erheblich reduzieren. Es kann auch den nächtlichen REM-Schlaf bei diesen Patienten stabilisieren (13).

Im Allgemeinen liegt die verschriebene therapeutische Dosis zur Behandlung von Narkolepsie im Bereich von 4,5 g bis 9 g/Tag (14, 15). In Europa wird es daneben zur Behandlung des Alkoholentzugssyndroms mit dem Handelsnamen Alcover® in Dosen von 50 mg/kg bis 100 mg/kg Körpergewicht (10) und als Hypnotikum (Somsanit®) verwendet (4, 16).

GHB wird endogen durch Abbau des inhibitorischen Neurotransmitters GABA gebildet (12). Obwohl die genaue Funktion von GHB noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es Hinweise darauf, dass es möglicherweise als Neuromodulator oder Neurotransmitter in Blut, Urin sowie im peripherem Nervensystem und Hirngewebe wirkt (17-19). Bei den meisten Säugetierspezies und auch in Pflanzen kann GHB nachgewiesen werden. Laut neuerer Erkenntnisse, zeigte sich die Anhäufung in Pflanzen als Reaktion auf Hypoxie (12, 20).

Zusätzlich wird GHB zu mehreren Zwecken missbräuchlich angewendet: bei Bodybuildern wurde GHB ein anaboler Effekt nachgesagt, es kann weiterhin die Freisetzung des humanen Wachstumsfaktors stimulieren (21, 22). Daneben wird GHB – abhängig von der Dosis – als Partydroge (Straßenname "Liquid Ecstasy") oder

sogenanntes k.o.-Mittel eingesetzt. Diese verschiedenen Anwendungen können auf die dosisabhängigen pharmakologischen Effekte zurückgeführt werden. Geringe Dosen bis 1,5 g führen zu Euphorie und haben einen anxiolytischen Effekt. Dosen bis 2,5 g führen zu einer Stimmungsaufhellung, zu einer Steigerung der sexuellen Aktivität. Höhere Dosen führen allerdings zu einem plötzlichen Tiefschlaf mit anschließender anterograden Amnesie. Besonders in Fällen von „drug facilitated sexual assaults“ (DFSA) wird die Substanz so verabreicht, um das Opfer zu betäuben und Folgestraftaten wie Vergewaltigung, Körperverletzung oder Diebstahl zu begehen (3, 23, 24).

DFSA unter Beibringung von GHB stellt ein aktuelles wie stabiles Phänomen überall in Europa dar (3, 22). In den meisten Fällen wird GHB mit Alkohol kombiniert (25). In Studien zur Prävalenz von k.o.-Mitteln spielt GHB eine eher untergeordnete Rolle (0,02 % der Fälle bei Bosman et al. 2013 in den Niederlanden (26); 1,1 % der Fälle bei Du Mont et al. in Kanada (27); 4,1 % der Fälle bei ElSohly & Salamone 1999 (28) in den Vereinigten Staaten). Aufgrund des großen Angebots von GHB und dessen Precursor Gamma-butyrolacton (GBL) und 1,4-Butandiol (BD) im Internet und aufgrund der extrem kurzen Halbwertszeit der Substanz, verglichen mit anderen im Rahmen von DFSA eingesetzten Substanzen, kann davon ausgegangen werden, dass die Dunkelziffer der Nutzung in derartigen Fällen sehr hoch ist.

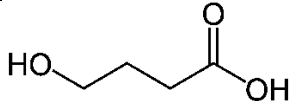
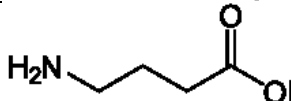
Substanz	Strukturformel
GHB	
GABA	

Tabelle 1: Chemische Strukturen von GHB und GABA

## 1.2 Precursor von GHB und chemische Stabilität

1,4-Butandiol und Gammabutyrolacton (GBL) stellen zwei GHB-Prodrugs mit gleichem Wirkspektrum dar. Die klinischen Wirkungen, einschließlich Schläfrigkeit, Euphorie und sinnliches Gefühl, die durch GBL und BD hervorgerufen werden, entsprechen den Wirkungen von exogen verabreichtem GHB. 1,4-Butandiol wird mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase zu GHB oxidiert. GBL ist der zyklische Ester von GHB. Es wird durch eine endogene Lactonase, die in Leber und Serum, aber nicht im Gehirn vorhanden ist, in GHB umgewandelt (29, 30).

Tatsächlich existiert in der Lösung GHB im Gleichgewicht mit GBL. Das Verhältnis der beiden Formen hängt immer von der Matrix und dem jeweiligen pH-Wert ab. Beispielsweise ist im Blut die Form der Säure die vorherrschende, da die endogene Lactonase jegliches Lacton umwandelt, das vorhanden sein kann (4). Die beiden Formen erreichen jedoch im Urin oder Mageninhalt, in denen keine Lactonase vorhanden ist, ein chemisches Gleichgewicht, wobei beide vorhanden sind. Da der physiologische Blut-pH zwischen 7,36 und 7,44 liegt und Laktone im Blut durch endogene Laktasen gespalten werden, ist GHB im Blut ziemlich stabil (31). pH von Mageninhalt oder einigen Urinproben sind allerdings  $< 4,72$ , sodass GBL aus GHB entsteht. Selbst wenn nur GHB konsumiert wurde, abhängig von der Zeit nach der Einnahme, der Temperatur und dem pH-Wert der Matrix, kann GBL im Magen- oder Uringehalt nachgewiesen werden (4).

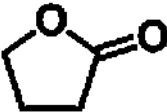
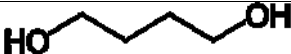
Substanz	Strukturformel
GBL	
1,4-Butandiol	

Tabella 2: Strukturen der GHB Precursor GBL und 1,4-Butandiol

### 1.3 GHB-Biosynthese und Metabolismus

GHB ist ein endogenes Molekül, welches im Stoffwechsel der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) entsteht (Abbildung 1) und das in mikromolaren Konzentrationen im Blut gefunden wird. Bemerkenswert ist, dass GHB sowohl als Vorläufer als auch als Metabolit von GABA angesehen werden kann (32). GABA entsteht aus der Aminosäure Glutamat (23). Mittels des Enzyms GABA-Transaminase wird GABA in den Mitochondrien zu Succinat-Semialdehyd (SSA) abgebaut (23, 33, 34).

Ein kleiner Teil der SSA, etwa 1 bis 2% (35), kreuzt das Cytosol und wird dann katalysiert durch das Enzym Succinat-Semialdehyd-Reduktase (SSAR) zu GHB reduziert (36-38). Es wurde gezeigt, dass im Rattengehirn nur 0,15 % der SSA in GHB umgewandelt wird (39).

Der größere Anteil SSA wird mittels der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) allerdings zu SA und weiter im Zitronensäurezyklus metabolisiert, um in

Kohlendioxid und Wasser umgewandelt zu werden. Dabei treten weitere Metaboliten wie die Glykolsäure auf (40) (Abbildung 1). Neuronen, die GABA freisetzen und in denen GHB gefunden wird, befinden sich hauptsächlich im Hippocampus, Cortex und Amygdala des Gehirns (32).

Ein Mangel des Enzyms SSADH (*Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency* (SSADHD)) führt zu erhöhten endogenen Konzentrationen von GHB im Urin und weiteren Körperflüssigkeiten (41, 42). Zwei Mutationen innerhalb des Gens *ALDH5A1* sind verantwortlich für die Akkumulation von GABA und GHB (43).

Die Biosynthese erfolgt ebenfalls über periphere Lactonase aus GBL und mittels der Alkoholdehydrogenase aus BD nach oraler Aufnahme (44). Daher werden die weniger kontrollierten Substanzen wie GBL und BD ebenfalls missbraucht.

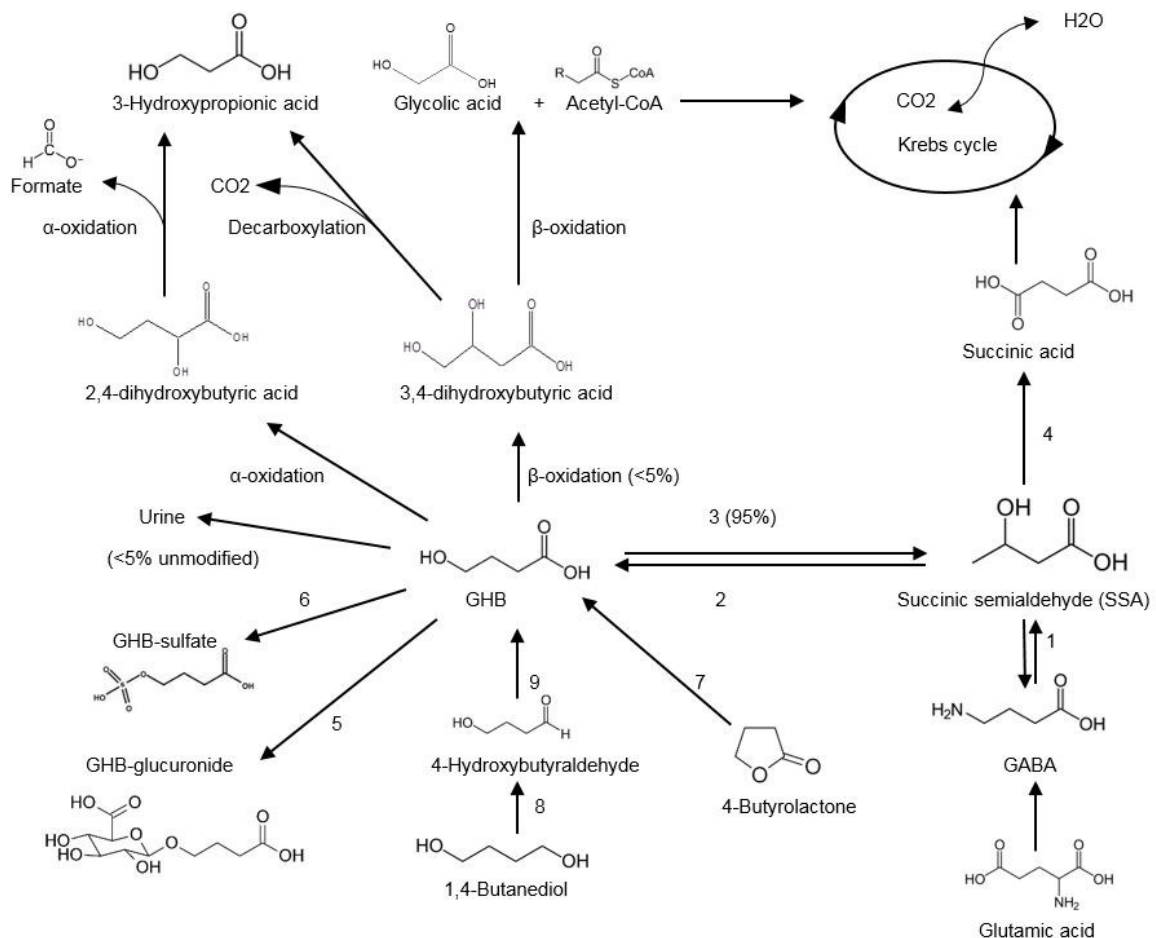


Abbildung 1: Stoffwechselwege von GHB. 1- GABA-Transaminase 2- Succinat-Semialdehyd Reduktase 3- GHB-Dehydrogenase 4- Succinat-Semialdehyd-dehydrogenase 5- UDP-Glucuronosyltransferase 6- Sulfotransferase 7- Serumlactonase 8- Alkoholdehydrogenase 9- Aldehyd-Dehydrogenasen

## 1.4 Physiologie und Pharmakologie von GHB

### 1.4.1 Pharmakodynamik

GHB als Freizeitdroge bzw. als therapeutische Medikation kann anhand der dosisabhängigen pharmakologischen Wirkungsmechanismen dieser Substanz erklärt werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen ZNS-Depressiva (z. B. Ethanol, Benzodiazepine), die über den GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkomplex wirken, um die neuronale Aktivität zu dämpfen, entfaltet GHB die meisten seiner Wirkungen durch die Bindung an den GABA<sub>B</sub>-Rezeptorkomplex und GHB-Rezeptoren (32, 45, 46).

Wenn GHB in niedriger Konzentration im Körper vorhanden ist (endogene Konzentration), bindet es an entsprechende GHB-Rezeptoren. Es wurden im menschlichen Gehirn spezifische Bindungsstellen für GHB gefunden. Heute wird angenommen, dass es eine Familie von präsynaptischen G-Protein-gekoppelten GHB-Rezeptoren gibt, an denen GHB als Agonist schon in den endogenen GHB-Konzentrationen Wirkungen hervorruft. Diese scheinen in die Regulation der Ausschüttung von GABA und Glutamat eingebunden zu sein (45, 47). GHB-Rezeptoren sind stärker im Hippocampus, Cortex und Amygdala, in prä- und postsynaptischen Zellen und in dopaminergen Bereichen exprimiert (4, 48-50). Dies führt zu einer Verminderung der GABA-Ausschüttung bei gleichzeitiger Erhöhung des Dopaminspiegels in den Nervenenden, wodurch es zu den verstärkenden Wirkungen der GHB führt.

In endogenen Konzentrationen aktiviert GHB bereits GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren selbst oder durch Umwandlung in GABA und hemmt dadurch den Zufluss von Ca<sup>2+</sup> und öffnet K<sup>+</sup>-Kanäle, wie dies GABA tut (Abbildung 2). Da es sich bei GABA um einen hemmenden Neurotransmitter handelt, ist so der durch GHB-Gabe ausgelöste dämpfende Effekt zu erklären. Es wird vermutet, dass GHB nach exogener Aufnahme sowohl als GABA<sub>B</sub>- als auch als GHB-Rezeptor Agonist fungiert (3, 23, 32, 51-55). Daher stellt es einen Doppelwirkungsmechanismus dar (7, 50).

Auch Studien an der Ratte legen nahe, dass drei Phänomene eine Rolle im Wirkungsmechanismus von GHB spielen könnten (38). Das erste Phänomen ist, dass GHB an präsynaptische GHB-Rezeptoren bindet und so die Freisetzung von GABA und Dopamin für bis zu 20 Minuten hemmt. Infolgedessen tritt eine Periode der Desensibilisierung der GHB-Rezeptoren auf, was zu einer Depolarisation des Neurons und einem ungewöhnlich hohen Anstieg der Freisetzung von GABA und Dopamin

führt. Das zweite Phänomen ist, dass GHB bei hohen Dosen ein Agonist von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren wird und die gleichen Wirkungen wie GABA erzeugt. Das dritte Phänomen wäre, dass eine minimale Konzentration von GHB in Neuronen zu SSA oxidieren könnte und ein Teil davon durch GABA-Transaminase in GABA umgewandelt würde. Somit würde dieser Anstieg von GABA erneut GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren stimulieren (38).

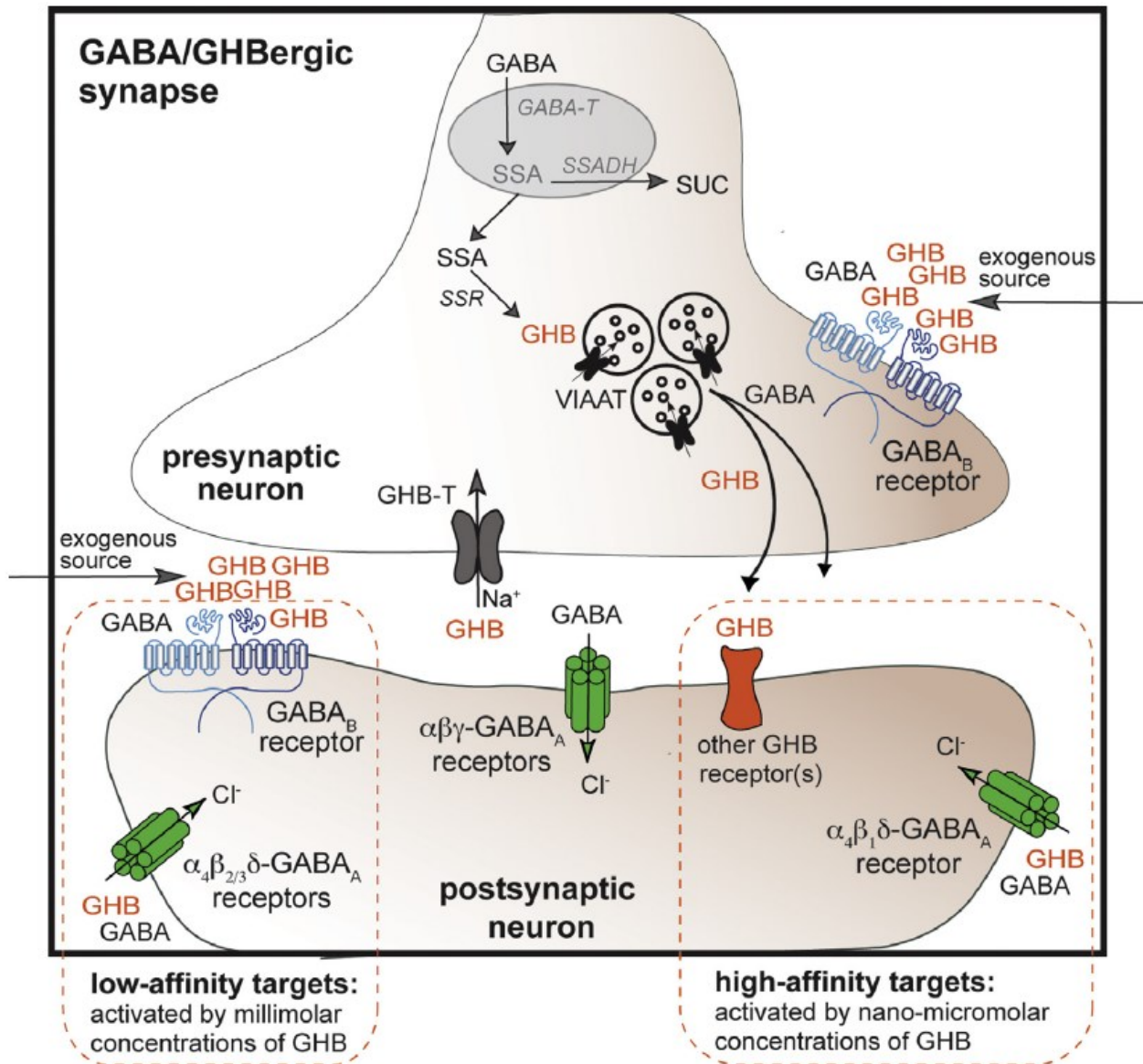


Abbildung 2 (56): Pharmakologische Angriffspunkte von GHB an der GABA/GHBergic Synapse

#### 1.4.2 Pharmakokinetik, endogene Konzentrationen und Nachweisenfenster in Blut und Urin

Die endogene Anwesenheit von GHB in Serum und Urin (sowie im Haar) stellt eine erhebliche Schwierigkeit für die forensische Interpretation dar. Es gibt zahlreiche Studien zur Quantifizierung von endogenen Konzentrationen: Elian zeigte endogene

GHB Konzentrationen in 240 Blutproben (0,17 - 1,51 mg/L) und 670 Urinproben (0,34 - 5,75 mg/L) (57). Andresen et al. zeigten Plasmakonzentrationen zwischen 0,62 und 3,2 mg/L (n = 50) und Urinkonzentrationen zwischen 0,64 und 4,2 mg/L (n = 50) (18). Erdmann et al. zeigten Blutkonzentrationen zwischen 0,11 und 1,56 mg/L (58). Elliot analysierte 119 Urinproben und bestimmte endogene Konzentrationen immer mit < 3 mg/L (59). Kang et al. (60) zeigten Urinkonzentrationen zwischen 0.09 und 1.8 mg/L bei 74 Personen während Brailsford (61) GHB im Urin von 1126 Frauen quantifizierte und eine Maximalkonzentration von 5.5 mg/L fand. Aufgrund dieser Studien wird aktuell empfohlen, folgende Cut-offs für die Differenzierung endogen/exogen zu nutzen: < 4 mg/L im Plasma und < 10 mg/L im Urin (59, 62).

Einige Ausscheidungsversuche zur Aufnahme pharmakokinetischer Profile in Blut und Urin nach GHB-Einnahme sind publiziert (63-68). Die Absorption von exogener GHB ist geschlechtsabhängig und wird nicht durch die gleichzeitige Aufnahme von Essen beeinflusst (66). Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit der Substanz hat GHB ein kleines Verteilungsvolumen (0,2 - 0,4 L/kg). GHB verteilt sich schnell im Körper, die Verteilung kann mittels eines 2-Kompartiment-Modells beschrieben werden (64). GHB bindet nicht an Plasmaproteine, das Verhältnis Blut zu Plasma liegt bei 1,2 (68, 69). Nach oraler Aufnahme von 40, 50, 60 oder 72 mg GHB/kg Körpergewicht konnten maximale Konzentrationen von 130 mg/L 1 Stunde nach Aufnahme festgestellt werden (63). Busardo et al. zeigten Konzentrationen zwischen 8,1 und 32,3 mg/L in Plasma und bis zu 86,5 mg/L in Urin 1,5 - 2 Stunden nach der Aufnahme von 2,5 - 4 g GHB (70). Die Nachweisbarkeitsdauer der Muttersubstanz GHB ist dann aber nur sehr kurz. Dies gestaltet sich als sehr problematisch, da Opfer von DFSA die Vorfälle meist verspätet der Polizei melden, sodass wertvolle Zeit vergeht, in der der Wirkstoff bereits eliminiert wird. Abhängig von der aufgenommenen Dosis kann exogenes GHB über die Analytik auf die Muttersubstanz maximal 6 Stunden in Plasma und 12 Stunden in Urin nachgewiesen werden. Brenneisen et al. (64) zeigten maximale GHB-Konzentrationen bis zu 76,3 mg/L im Serum und bis zu 840 mg/L im Urin, die Konzentrationen fielen nach 2,5 Stunden im Serum und nach 12 Stunden im Urin unter die Cut-offs. In einer weiteren Studie von Abanades et al. (63) nahmen 5 Patienten 50 mg GHB/kg Körpergewicht. Die mittleren GHB-Plasmakonzentrationen nach 30 Minuten betragen 83,1 mg/L. Nach 6 Stunden waren die Plasmakonzentrationen im Mittel bereits bei 0,9 mg/L. Die mittlere Clearance liegt bei  $17,8 \pm 13,1$  mL/min und wird durch den Co-Konsum von Alkohol nicht beeinflusst (65). Die Halbwertszeit liegt bei



0,3 - 1,0 Stunden (69). Die Elimination der GHB folgt einer nicht-linearen, dosisabhängigen Kinetik, der Konzentrationsabfall pro Zeiteinheit ist nicht konstant aber proportional zur gerade vorherrschenden Plasmakonzentration (67, 68). Weiterhin unterscheiden sich pharmakokinetische Eigenschaften der Substanz nicht zwischen Gesunden, Narkoleptikern oder alkoholabhängigen Patienten mit Lebererkrankungen (66-68). Es konnte aber gezeigt werden, dass die gleichzeitige Aufnahme Valproinsäure-haltiger Arzneimittel zu einer Inhibition des Enzyms GHB-Dehydrogenase führt und höhere Blut- und Urinkonzentrationen an GHB hervorrufen kann (71).

GBL und BD werden im Körper zu GHB metabolisiert bzw. werden bereits vor der Aufnahme in GHB umgewandelt, entweder durch die Dealer oder die Konsumenten selbst. Nur GHB wird in Deutschland im Betäubungsmittelgesetz aufgeführt.

Für GBL und BD sind weniger humane Ausscheidungsversuche publiziert. GBL zeigt potentiell einen höheren intestinalen Flux nach oraler Administration und einen schnelleren Wirkeintritt. Guidotti et al. konnten höhere GHB-Konzentrationen im Rattenhirn zeigen, wenn statt GHB GBL verabreicht wurde (72). Lettieri et al. zeigten, dass orales GBL viel schneller als orales GHB absorbiert wird. Dadurch unterliegt es weniger einem first-pass Metabolismus und höhere Plasmakonzentrationen an GHB werden erreicht (73). Schröck et al (74) untersuchten die GHB-Kinetik nach der oralen Aufnahme von 1,5 mL GBL. Unter der Annahme, dass das GBL komplett zu GHB metabolisiert wird, entspricht diese Menge GBL einer Dosis von 2,1 g GHB. Maximale GHB-Konzentrationen im Serum wurden 20 Minuten nach Aufnahme erreicht (95 mg/L und 106 mg/L bei 2 Patienten). Schon 4-5 Stunden nach Aufnahme waren die GHB-Konzentrationen im Serum bereits unter die Nachweisgrenze (1 mg/L) gefallen. Im Urin wurden die maximalen Konzentrationen 1-2 Stunden nach Aufnahme gemessen (140 mg/L und 120 mg/L). Nach 8-10 Stunden waren die GHB-Konzentrationen unter die Nachweisgrenze (1 mg/L) gefallen.

Der neutral aliphatische Alkohol BD ist weniger polar als die korrespondierende Carbonsäure GHB, weshalb die gastrointestinale Absorption von BD schneller verläuft. Thai et al. (75) verabreichten eine orale Einfachdosis BD (25 mg/kg Körpergewicht) an 8 Freiwillige. BD wurde schnell absorbiert und eliminiert ( $t_{max} = 24 \pm 12$  min; Eliminationshalbwertszeit  $39 \pm 11$  min). BD wurde extensiv in GHB umgewandelt, mittlere maximale Plasmakonzentrationen an GHB lagen bei  $45.6 \pm 19.7$  mg/L und wurden  $39.4 \pm 11.2$  min nach BD-Aufnahme erreicht. Die GHB-Halbwertszeit lag bei

32.3 ± 6.6 Minuten.  $T_{max}$  für GHB war ein wenig kürzer als bei einer vergleichbaren Studie nach Aufnahme von 50 mg Xyrem®/kg Körpergewicht (57.2 ± 12.5 Minuten). In Proben, welche 180 Minuten nach der Aufnahme von BD genommen wurden, waren die GHB-Plasmakonzentrationen bereits unter den 4 mg/L Cut-off in Serum gefallen (75). In einem Einzelfall lag die Zeit bis zur maximalen GHB-Plasmakonzentration nach intravenöser BD-Aufnahme bei 2 Minuten (76). Die Plasma-Konzentration-Zeit-Kinetik für GHB nach intravenöser BD-Gabe war vergleichbar mit der nach intravenöser Gabe derselben Dosis GHB. Der in-vivo Metabolismus von BD ist dem des Ethanols ähnlich. Die zweistufige Umwandlung von BD in GHB verläuft via der hepatischen Alkoholdehydrogenase (zu Gamma-hydroxybutyraldehyd) und der Aldehyddehydrogenase (77, 78). So wird der Metabolismus von BD kompetitiv durch Ethanol blockiert (78).

## 1.5 (Prä)Analytik von GHB und ihren Precursor und Stabilität in Blut und Urin

Es ist wichtig, die Stabilität von GHB bei der Interpretation analytischer Ergebnisse miteinzubeziehen. Blutproben, welche mit Natriumfluorid (NaF) stabilisiert wurden (n = 27 Lebende), wurden gelagert und auf GHB untersucht. Langzeitstabilität konnte über einen Zeitraum von 7 Jahren demonstriert werden, die Abweichung von der ursprünglichen Konzentration lag zwischen -32.4 % und 21.0 % (79). Auch in Plasmaproben ohne Stabilisierung konnte Stabilität gezeigt werden. Plasmaproben wurden über 9 Monate bei -20°C gelagert und innerhalb dieses Zeitraums monatlich dreifach gemessen. Die Stabilität bei Raumtemperatur war lediglich über einen Zeitraum von 48 Stunden gegeben (maximale Abweichung 11%) (80). Dies erlaubt die Möglichkeit eines Posttransfers der Probe zwischen Polizeistation und analytischem Labor. Drei Einfrier- und Auftau-Zyklen hatten ebenfalls keinen Einfluss auf gemessene Konzentrationen (maximale Abweichung 11 %) (80). Jones et al. (81) untersuchten die Stabilität von 50 Vollblutproben von Fahrzeugführern, die bei 4°C für bis zu 1 Jahr gelagert worden waren. Stabilität von Blut-GHB-Konzentrationen bei 4°C war für bis zu 6 Monate gegeben. Beránková et al (82) untersuchten die Stabilität von GHB in Blut und Urin mit oder ohne Zusatz von Natriumfluorid (1 % w/v) bei 4 und -20°C für bis zu 8 Monate. Ante mortem Proben zeigten keine signifikante GHB-Veränderung, während post mortem Proben einen erheblichen GHB-Anstieg zeigten (siehe Kapitel post mortem).

Allerdings ergaben weitere Studien vor Kurzem ebenfalls Hinweise auf Instabilität von GHB in ante mortem Proben. Busardo et al. (83) untersuchten die Stabilität bei -20°C, 4°C und 20°C. Blutproben zeigten eine Verringerung der GHB-Konzentrationen < 10 % lediglich nach 3 Lagerungstagen bei -20°C und bei +4°C (bei +20°C gelagerte Blutproben zeigten eine mittlere Abnahme von 10,4 %). Nach 4 Wochen Lagerungszeit konnte bei allen Lagerungstemperaturen eine Abnahme > 20 % festgestellt werden. Ante mortem Urinproben zeigten eine Abnahme der GHB-Konzentrationen > 10 % schon 3 Tage nach Lagerungsbeginn unabhängig von der Lagerungstemperatur. Nach 4 Wochen Lagerung lag die mittlere Abnahme bei allen Lagerungstemperaturen > 25 %. Busardo et al. empfahlen daher zur Vermeidung von Verlust an GHB-Konzentrationen durch Lagerung die GHB-Analytik in Blut und Urin innerhalb von 3 Tagen nach Probennahme (83). Weiterhin könnte der Probentyp Einfluss auf die GHB-Konzentration haben: LeBeau et al. (31) vermuteten, dass die Konzentration an GHB durch Citrat-Puffer erhöht sein könnte.

Bei GHB handelt es sich um ein kleines Molekül, welches aus 4 Kohlenstoffatomen besteht und eine mittelstarke bis starke Säure mit einem pK<sub>a</sub> von 4,72 darstellt (69). Daher stellt die chemische Stabilität von GHB abhängig vom pH einen wichtigen Punkt dar. Bei pH-Werten < 4,72 entsteht aus GHB das Lacton GBL durch Veresterung unter Elimination von Wasser. Infolgedessen ist während der Probenvorbereitung und innerhalb des finalen Extrakts auf einen neutralen bis basischen pH zu achten, da GBL, welches bei niedrigem pH aus GHB gebildet werden kann, die GHB-Ergebnisse verfälschen kann. Um die Bildung von GBL in biologischem Material mit pH < 4,7 zu verhindern, können diese für ca. 30 Minuten bei pH 14 alkalisiert werden, sodass das gebildete GBL in GHB zurückverwandelt wird (84).

## 1.6 Metabolite

### 1.6.1 Phase 1 Metaboliten (Organische Säuren als Metaboliten)

Einige organische Säuren wurden als Teil des GHB-Metabolismus beschrieben. Nur ein geringer Teil intravenöses oder intraperitoneales [1-14C]- und [4-14C]-GHB wurde in Ratten und Katzen zu SA metabolisiert (85, 86). Aus diesen Ergebnissen schlugen Walkenstein und Mitarbeiter (85) einen  $\beta$ -oxidativen Signalweg vor. Möhler et al. konnten dann zeigen, dass nach intravenöser Gabe von [1-14C]-GHB im Gehirn GHB über Succinat oxidiert wird und nicht über eine  $\beta$ -Oxidierung (87). Dies schloss eine

$\beta$ -Oxidierung in anderen Organen allerdings nicht aus, und Lee et al. konnten dann zeigen, dass 3,4-OH-BA ein Intermediat der  $\beta$ -Oxidierung von GHB darstellt (88). Lee et al. gaben ebenfalls 1g GBL an 4 gesunde Patienten, was zu einer Erhöhung der Urinkonzentrationen an 3,4-OH-BA (und GA) führte. 4-Hydroxy-3-oxobutyrat wurde als ein weiteres Zwischenprodukt vorgeschlagen. In Tabelle 3 sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit untersuchten GHB related acids aufgelistet.

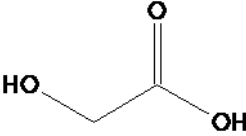
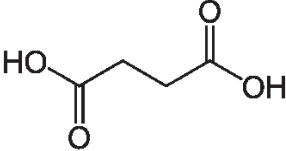
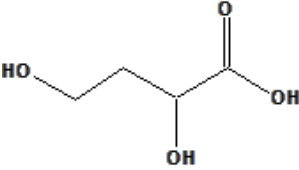
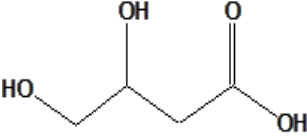
Substanz	Strukturformel
Glykolsäure	
Bernsteinsäure	
2,4-Dihydroxybuttersäure	
3,4-Dihydroxybuttersäure	

Tabelle 3: Chemische Strukturen von GHB related acids

Wie bereits zuvor beschrieben, führt ein Mangel des Enzyms SSADH (Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (SSADHD) zu erhöhten GHB-Konzentrationen in Urin und weiteren Körperflüssigkeiten (41, 42). Shinka et al. (89) und Brown et al. (90) erhielten Urinproben von einem (89) bzw. drei (90) Patienten, die unter dieser Erkrankung litten. Bei diesen Patienten konnte eine erhöhte Exkretion von 3,4-OH-BA, 4-Hydroxy-3-oxobutyrat (91), aber ebenso von GA, ein weiteres Produkt der  $\beta$ -Oxidierung von 3,4-OH-BA, gezeigt werden. Metaboliten, welche eine  $\alpha$ -Oxidierung von GHB anzeigen (2,4-OH-BA) wurden bei diesen Patienten ebenfalls nachgewiesen, aber in einem geringeren Ausmaß (90). Die Oxidierung von 2,4-OH-BA zur 2-oxo-Säure und die oxidative Decarboxylierung führt zu 3-Hydroxypropionsäure, die ebenfalls manchmal in Urinproben gefunden wurde (90). Eine außergewöhnlich hohe Konzentration der Adipinsäure wurde ebenfalls bei diesen Patienten festgestellt, konnte aber nicht mit dem GHB-Metabolismus zusammengebracht werden. Shinka et al. fanden außerdem zusätzlich 4,5-Dihydroxyhexansäure (89).

Diese organischen Säuren könnten potentiell auch analytische Targets in Humanproben nach Aufnahme von GHB sein. Palomino et al. (92) suchten nach Metaboliten nach GHB Konsum mittels eines Metabolomics Ansatzes mit NMR Spektroskopie. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von GA und SA 1 Stunde nach der Aufnahme anstiegen. 12 Freiwillige hatten 25 mg GHB/kg Körpergewicht aufgenommen. Während die GHB- und SA-Konzentrationen schnell wieder auf endogene Konzentrationen absanken (beim Zeitpunkt 6 Stunden nach Aufnahme), was jedoch nicht genauer quantifiziert wurde, konnte bzgl. der Glykolat-Konzentrationen sogar noch 24 Stunden nach Aufnahme ein geringer Unterschied zu endogenen Konzentrationen festgemacht werden.

Im Rahmen der Studie von Steuer et al. an 20 Freiwilligen wurden Urinproben 4,5 Stunden nach GHB-Aufnahme untersucht, um mögliche neue Marker mit Hilfe einer nicht zielgerichteten hochauflösend massenspektrometrischen Analyse (MS-QTOF) zu identifizieren. Es wurden drei neue GHB-Konjugate identifiziert, nämlich GHB-Carnitin, GHB-Glutamat und GHB-Glycin. Darüber hinaus wurden signifikante Änderungen der Konzentrationen von Glykolat und Succinylcarnitin beobachtet (93).

#### 1.6.2 Phase 2 Metaboliten

2013 wurde das GHB- $\beta$ -O-glucuronid zum ersten Mal beschrieben, die Glucuronidierung von GHB findet in Hydroxy-Position statt. Petersen et al. hatten die Anwesenheit des Glucuronids in Urinproben gezeigt (n = 50; Konzentrationen zwischen < LoQ (0,1 mg/L) und 5,0  $\mu$ g/mL; Mittelwert 1,3  $\mu$ g/mL) (94). Wang et al. (2) wiesen das GHB-Glucuronid auch in Haarproben nach. Petersen et al. machten ebenfalls nasschemische Stabilitätsexperimente (95): ein Puffersystem wurde genutzt, welches den normalen pH-Wert des Urins imitieren sollte (pH = 4,6 - 8). Die genutzten Temperaturen lagen zwischen 18 und 90 °C. GHB- $\beta$ -O-glucuronid war stabil über die gesamte Bandbreite der Temperaturen. Außerdem wurde eine wässrige Lösung des GHB- $\beta$ -O-glucuronids (10 mg/L) unter stark alkalische (3M NaOH) oder saure (4M HCl) Bedingungen gebracht, danach einer 15-minütigen Autoklavbehandlung unterzogen. GHB- $\beta$ -O-glucuronid war unter alkalischen Bedingungen stabil, allerdings unter sauren Bedingungen instabil. Hanisch et al. (96) beschrieben danach das GHB-4-Sulfat in Urinproben.

In Studien von Mehling et al. und Piper et al. wurden GHB-Phase-II-Metaboliten wie GHB-Gluc und GHB-Sulf untersucht. Plasma- und Urinproben von Patienten (n = 3), die therapeutisch Natriumoxybat (GHB-Natriumsalz) einnahmen, wurden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Einnahme entnommen. Allgemein zeigten die GHB-Gluc-Konzentrationen keinen zeitabhängigen Anstieg nach GHB-Aufnahme im Serum und Urin. Die GHB-Gluc-Konzentrationen von 2 der 3 Patienten lagen im Bereich der Kontrollgruppe. Für den dritten Patienten zeigte sich, dass die GHB-Gluc-Konzentrationen im Urin und Plasma oberhalb der maximalen Konzentration der Kontrollgruppe lagen. Jedoch lag die GHB-Gluc-Konzentration von diesem Patienten bereits vor der GHB-Verabreichung über dem Höchstwert der Kontrollgruppe.

Aufgrund der Feststellung einer großen interindividuellen Variabilität der Konzentrationen in der Referenzpopulation war auch GHB-4-Sulfat selbst nicht geeignet, die Nachweiszeiten für GHB-Anwendungen zu verlängern, selbst wenn Werte mit korrigierter spezifischer Dichte verwendet wurden. So weisen weder GHB-Gluc noch GHB-Sulf Charakteristika auf, welche sie als einen geeigneten Marker verwenden ließen, um eine GHB-Aufnahme nachweisen zu können (97, 98).

## 1.7 Toxikologie

Tier- und Humantoxizitätsstudien zeigen, dass die Toxizität von GHB von der Dosis, dem Verabreichungsweg und der individuellen Verträglichkeit gegenüber GHB abhängig ist (4, 99). Tabelle 3 fasst die Wirkungen von GHB in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis zusammen.

Aufgrund der geringen Kosten von GHB im Vergleich zu vielen anderen Freizeitdrogen wechseln Jugendliche, die mit übermäßigem Alkoholkonsum beginnen, auf die Einnahme von GHB um, da die berauschende Wirkung in mancher Hinsicht ähnlich ist, einschließlich Hemmungsverlust, Euphorie usw. (32).

In Missbrauchsfällen ist die Dosis von GHB ungewiss und sie wird häufig zusammen mit anderen Substanzen konsumiert. Dies kann die Interpretation der Ergebnisse von GHB erschweren. Die GHB-Toxizität wird durch Alkohol, Opioide, Barbiturate oder Benzodiazepine verstärkt, wodurch die Auswirkungen auf die Atemwege und das Zentralnervensystem verstärkt werden (99-102).

Die Wirkungen von GHB treten 15 bis 30 Minuten nach der Einnahme auf und der Konzentrationspeak wird ungefähr 60 Minuten nach der Einnahme erreicht (4, 103-105). Ihre Halbwertszeit entspricht etwa 30 Minuten (105), was eine geschätzte Dauer der Wirkung einer Dosis darstellt, die 4 bis 6 Stunden nicht überschreitet (4, 50).

Die GHB-Konzentration im Gehirn erreicht in etwa 30 Minuten ein Gleichgewicht mit den Konzentrationen in anderen Geweben, wobei das GHB die Plazentaschranke mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie die Blut-Hirn-Schranke überschreitet. Im Gegensatz dazu weist die Verteilung in der Cerebrospinalflüssigkeit passive Diffusionseigenschaften auf, da die Verzögerungszeit zum Erreichen des Gleichgewichts unvergleichlich länger ist (5 Minuten im Plasma, 10 Minuten im Gehirn, 170 Minuten in Cerebrospinalflüssigkeit) (4).

Eine chronische Exposition gegenüber GHB kann zu körperlicher Abhängigkeit führen, insbesondere bei Menschen mit psychiatrischen Erkrankungen oder Drogenkonsum in der Vorgeschichte (100).

<b>Einzeldosis</b>	<b>Effekt</b>
0,5 - 1,5 g	Zunehmende Euphorie, soziale Öffnung, Beeinträchtigung der Motorik, anxiolytischen Effekt
1,5 - 2,5 g	Libidosteigerung, Antriebssteigerung, Stimmungsaufhellung und
> 2,5 g	Übelkeit, Schwindel, Bradykardie, Somnolenz, Bewusstlosigkeit, Amnesie
> 4 g	Atemdepression, Koma (vor allem gefährlich bei Mischkonsum mit anderen Drogen)

*Tabelle 4 (106, 107): Dosis Wirkungsbeziehung von GHB*

## 1.8 GHB post mortem

Die postmortale Bestimmung einer GHB-Aufnahme stellt sich als sehr schwierig dar, da postmortal ein Konzentrationsanstieg endogener GHB-Konzentrationen berichtet wurde. Zahlreiche Gründe für diesen Konzentrationsanstieg wurden bereits diskutiert. Moriya und Hashimoto (108) lagerten Blutproben von 43 Obduktionen, bei denen eine GHB-Exposition ausgeschlossen werden konnte, mit und ohne Zugabe eines Stabilisators (Natriumfluorid) 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. Weitere Hypothesen nannten die erhöhte Glykolyse durch

Bakterienbefall, die Bildung von GABA aus dem biogenen Amin Putrescin oder das endogene 1,4-Butandiol im Rattenhirn als Quelle (109, 110). Erhöhte GHB-Konzentrationen können auch durch eine erniedrigte Aktivität des Zitronensäurezyklus entstehen (111). Roth et al. äußerten die Hypothese, dass die Synthese von neuem GHB in sauerstofffreiem Gewebe stattfindet (112).

Der Stabilisator Natriumfluorid (NaF) kann während der Lagerung die postmortale Bildung von GHB reduzieren (82, 113). 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 in dieser Publikation herangezogenen endogenen Wert von < 4 mg/L überschritten. Keine wesentlichen GHB-Konzentrationen wurden über diese Zeit der Lagerung in den Proben zusätzlich gebildet (82). 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 Stabilisators 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 (82).

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 (84). 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 (79). 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) (83). Keine signifikanten Unterschiede zeigte auch GHB in Femoralvenenblut- und Herzblutproben bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C über 24 Monate (114).



Endogene Konzentrationen von GHB nach dem Todeseintritt wurden von einigen Arbeitsgruppen beschrieben. 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 (114). Ähnliche GHB-Konzentrationen (n = 189) bestimmten auch Thomsen et al. in Femoralvenenblut (4,8 - 45,4 mg/L) und Gehirngewebe (nicht detektiert-9,8 mg/kg). Sie empfahlen einen Cut-off-Wert von 10 mg/kg für GHB in Hirngewebe (115). Wenn die Proben kurz nach der Obduktion auf GHB analysiert oder direkt bei -20 °C gelagert wurden, sind die aktuell empfohlenen Cut-off-Werte 30 mg/L bei Femoralvenenblut, Urin und Cerebrospinalflüssigkeit (114), 50 mg/L bei Herzblut und Glaskörperflüssigkeit (116). Gleichzeitig ist die Sensitivität und Spezifität dieser Cut-offs in keinem Fall 100 %, sodass bei alleiniger Heranziehung dieser Grenzwerte immer mit Fehldiagnosen gerechnet werden muss.

Kintz et al. haben - um die Genauigkeit eines vorgeschlagenen postmortalen Blut-Cut-offs von 50 mg/l zu überprüfen - 71 Autopsie-Fälle von Probanden, bei denen der Tod durch eine GHB-Einnahme ausgeschlossen werden konnte, getestet. In 14 Fällen wurde eine Konzentration > 50 mg/l im Herzblut beobachtet, dies wurde als postmortale Bildung angesehen. Um diese Kontamination zu unterscheiden, wurden Femoralvenenblut, Galle oder/und Glaskörper untersucht. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten: Herzblut (55 - 409 mg/L) vs. Galle (6,1 - 238 mg/L) in sieben Fällen; Herzblut (51 - 409 mg/L) vs. Femoralvenenblut (17 - 44 mg/L) in fünf Fällen und Herzblut (51 - 409 mg/L) vs. Glaskörper (3,9 - 2 mg/L) in sechs Fällen. Es hat sich gezeigt, dass die Gallenflüssigkeit nicht die Voraussetzungen für eine valide Diskriminierung zeigte und dass das Femoralvenenblut und vor allem der Glaskörper von besonderem Interesse sein kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte (> 50 mg/L) postmortale GHB-Blutkonzentration nicht allein die GHB-exposition untermauern kann und dass es wesentlich ist, in einem Fall mehrere Asservate zu untersuchen, einschließlich des peripheren Blutes und des Glaskörpers (116). Metaboliten der GHB wurden postmortal in der Literatur noch nicht quantifiziert.

## 1.9 Weitere Ansätze zum (längeren) Nachweis von GHB

### 1.9.1 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Eine Möglichkeit, zwischen endogener Substanz und exogener Aufnahme derselben Substanz zu unterscheiden, bietet die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS = isotope ratio mass spectrometry). Routinemäßig wird z.B. in der Dopinganalytik das Isotopenverhältnis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  genutzt, um zwischen der exogenen Aufnahme von anabolen Steroiden (Testosteron, Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron) und endogenen Steroiden zu unterscheiden. Das Isotopenverhältnis (IR) synthetischer Steroidhormone, welche aus pflanzlichen Precursor isoliert und modifiziert wurden, unterscheidet sich signifikant ( $\delta^{13}\text{C}$  Werte  $> \pm 1\text{‰}$ ) von den im Körper endogen synthetisierten Hormonen (117, 118).

Das Potential von Gas Chromatography/Verbrennung/IRMS (GC-C-IRMS) für den Nachweis exogenen GBLs wurde zunächst durch Marclay et al. (119) gezeigt: Sie zeigten eine hohe Wiederholbarkeit von  $\delta^{13}\text{C}$  Messungen von GBL-haltigen Asservaten und eine große Bandbreite an  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (-23.1 bis -45.8 ‰) von 19 GBL Lots von unterschiedlichen Chemikalienherstellern aus verschiedenen Ländern (119). Saudan et al. 2005 (120) wiesen auf Änderungen im IR nach intramolekularer Veresterung von GHB in GBL hin. Die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Verhältnisse von synthetischem GHB von verschiedenen Chemikalienherstellern bewegte sich zwischen -38.6 und -45.5 ‰, die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Verhältnisse von GHB in beschlagnahmten Material (n = 5) lag zwischen -34.5 und -45.8 ‰. Die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Verhältnisse von GHB in einzelnen Urinproben nach Aufnahme von GHB lagen zwischen -32.1 und -42.1 ‰, während Urinproben, welche lediglich den endogenen Gehalt an GHB aufwiesen (< 10 mg/L) zwischen -23.5 und -27.0 ‰ lagen. Es habe aber zwei Proben gegeben, welche trotz einer GHB-Konzentration < 10 mg/L im Urin mittels IRMS als positiv auf GHB gewertet worden wären. Marclay et al. (121) wandten ihre Methodik auf sechs Freiwillige an und sammelten acht Urinproben 6 - 8 Stunden nach der Aufnahme einer Natriumoxybat-Lösung (Xyrem<sup>®</sup>, 30 mg/kg Körpergewicht). Ein sehr enges Fenster an  $\delta^{13}\text{C}$  Werten wurde detektiert, von -24.81‰ bis -25.06‰, was dem IR von Xyrem<sup>®</sup> (mittleres  $\delta^{13}\text{C}$  = -24.99‰) in etwa entsprach. Die Ergebnisse von Lott et al. zeigen, dass GC/C/IRMS sich als geeignete Methode zur Unterscheidung von exogenem und endogenem GHB erwiesen hat. Dennoch konnte aufgrund seiner schnellen Elimination die GHB-Aufnahme in dieser Studie nicht länger als 4 Stunden mit GC/C/IRMS eindeutig nachgewiesen werden (122).

### 1.9.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Larson et al. untersuchten, ob die Injektion von 1g GHB/kg Körpergewicht bei Mäusen einen Einfluss auf die Genexpression hat (123). Nach Injektion dieser hohen Dosis wurden die Gene PEA-15, welches in zahlreichen Geweben exprimiert wird und viele Zellfunktionen reguliert (124) und EREG, welches in der Plazenta exprimiert wird und zur Biosynthese von Epiregulin (125), einem Mitglied der epidermal growth factor – Familie, führt, signifikant mehr exprimiert als bei Kontrollmäusen. Dieser Anstieg konnte bis zu 96 Stunden nach der Injektion beobachtet werden. Daneben zeigte eine Poster Präsentation durch Abdullah und Ellis Ergebnisse von Expressions-Arrays. Nach einer Einfachdosis GHB auf humane monocytische leukämische Zellen (THP-1) konnten signifikante Veränderungen in der Expression von 584 Genen beobachtet werden. Die Expression dieser Gene konnte in Humanmaterial noch nicht gezeigt werden (126).

Gene, welche direkt in den Metabolismus von GHB involviert sind, sind ALDH5A1, welches für die Succinatsemialdehyd-dehydrogenase kodiert (127) und AKR7A2, welches für die Succinatsemialdehyd-Reduktase kodiert (41). In einer genetischen Studie von Mehling et al. wurde zur Identifizierung potenzieller Biomarker für den Nachweis der GHB-Aufnahme in menschlichen peripheren Blutproben untersucht, ob sich die Expression von ALDH5A1-, AKR7A2-, EREG- und PEA15-Genen, die an GHB-Stoffwechselwegen beteiligt sind oder durch GHB-Aufnahme erhöht werden, ändert. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe.

### 1.9.3 Analyse von GHB und GBL in alkoholischen Getränken

Es kann eine Transveresterung von GBL und Ethanol oder Methanol in alkoholischen Getränken vonstattengehen, sodass GHB-Ethyl- oder GHB-Methylester aus GBL und Ethanol/Methanol entstehen. Bei Zugabe von GHB zu alkoholischen Getränken passiert dies nicht. Dies hängt ebenfalls vom pH-Wert und der Alkoholquelle ab. Hennessy et al. beobachteten, dass die besten Bedingungen für eine Bildung der Ester aus GBL pH < 3 und ein Ethanolgehalt > 9 % darstellen. In Weinen, die aufgrund des Herstellungsprozesses natürlicherweise GBL enthielten, konnte eine Transveresterung nicht festgestellt werden (128). Hennessy et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Umwandlung von GBL nach Zugabe von GHB in alkoholische

Getränke sehr langsam vonstattengeht (der höchste Wert an gebildetem GHB (30 % aus GBL) wurde 30 Tage nach Lagerungsbeginn in Bacardi Cola oder Vodka Cola erreicht) (128). In humanen Proben wurden diese Ester bislang nicht beschrieben.

Küting et al. suchten nach einem alternativen Weg, um eine exogene GHB/GBL-Administration durch Nachweis von Methyl- und Ethyl-4-hydroxybutyrat nachzuweisen, die in alkoholischen Lösungen nach Spiken mit GHB/GBL entstehen könnten. Die Ergebnisse zeigten natürlich vorkommendes Ethyl-4-hydroxybutyrat (E4HB) in alkoholischen Getränken, hauptsächlich in Weinproben. Die Aufnahme von ca. 1,5 mg E4HB (natürlich in einem Rotwein enthalten) in einem freiwilligen Aufnahmeexperiment, führte nicht zu einem Nachweis von E4HB in Blutserum und Urin (129).

Elliott et al. zeigten natürliche Vorkommen von GHB und GBL in denjenigen Getränken, deren Herstellung eine Fermentierung von weißen und roten Trauben beinhaltet. Kein GHB oder GBL wurde in anderen Getränken wie Bier, Säften, Likören oder Spirituosen detektiert. GHB wurde z.B. in Wermut (8.2 mg/L), Sherry (9.7 mg/L), Rotwein (4.1 – 21.4 mg/L) und Weißwein (< 3 – 9.6 mg/L) und GBL in Portwein (detektiert aber nicht quantifiziert, LOD = 5 mg/L) gefunden. Die Anwesenheit von GHB/GBL schien nicht durch den Alkoholgehalt oder den pH-Wert des Getränks beeinflusst zu sein (130). Tonic Water und Tonic Water Zitrone enthielten ebenfalls geringe Mengen GHB (0.089 - 0.145 mg/L) (131). Collison et al. (132) zeigten ähnliche Ergebnisse wie Elliott mit GHB-Konzentrationen in Rotwein (2 - 23 mg/L) und Weißwein (0,65 - 9,5 mg/L), in Essig (0,83 - 11,2 mg/L), Sojasauce (2,7 - 18,1 mg/L), Likören (< 0,25 - 4,2 mg/L), nicht destillierten Drinks (1,88 - 6,6 mg/mL), Bier (< 0,25 - 2,1 mg/L) und Kaffee (0,5 - 2,0 mg/L). In destillierten Alkoholika und einigen Säften war kein GHB nachweisbar. Grundsätzlich sind Konzentrationen in diesen Getränken allerdings sehr gering verglichen mit den Dosen, die in Fällen von drug facilitated crimes gegeben werden müssten, um eine Symptomatik hervorzurufen.

#### 1.9.4 Nachweis von GHB (und dessen Metaboliten) im Haar

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 normalerweise die Analyse einer Haarprobe eine nützliche Alternative dar. Haarproben können zwar keine Aussage darüber treffen, ob

ein Individuum zur Tatzeit unter dem Einfluss stand oder den genauen Zeitrahmen eingrenzen, gleichwohl ist aber ein qualitativer Nachweis einer Substanz im Haar möglich. Das monatliche Haarwachstum beträgt ungefähr 0,7 - 1,4 cm. So kann bei 1 cm-Segmentierung von Haarsträngen der entsprechende Konsum in diesem 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 (133).

Ferrara et al. untersuchten endogene GHB-Konzentrationen im Haar. Sie zeigten  $0,53 \pm 0,2$  ng GHB/mg Haar und zeigten keine Unterschiede bezüglich Geschlecht und Haarfarbe (134). Innerhalb eines Kollektivs von Kintz et al. streuten die endogenen Konzentrationen stark: 0,5 - 12 ng/mg (135). Die individuellen GHB-Konzentrationen entlang des Haarstrangs zeigten sich im Gegensatz zu denen des Kollektivs als sehr konstant. Gouille et al. (136) bestimmten endogene GHB-Konzentrationen (0,35 - 1,54 ng/mg) und bestätigten, dass die GHB-Konzentrationen in Haaren von der Haarfarbe unabhängig sind. Vaiano et al. (137) demonstrierten anhand eines Probenkollektivs von weiblichen (n = 75) und männlichen (n = 75) Testpersonen (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 als Männer. Haarbehandlungen wie Bleichen können die Substanzkonzentrationen im Haar verändern (138). Wie genau sich GHB-Konzentrationen durch Färben oder Bleichen verändern können, geht aus der Literatur nicht hervor.

Bei anderen forensisch relevanten Substanzen werden normalerweise eher die lipophileren Muttersubstanzen im Haar eingelagert (139). Doch auch das GHB-Gluc ist in Haarproben nachweisbar. Wang et al. zeigten endogene GHB-Konzentrationen  $< 1,0$  ng/mg und endogene GHB-Gluc-Konzentrationen von  $< 1.2$  ng/mg. Bei zwei regelmäßigen GHB-Konsumenten war GHB stark erhöht (461 – 591 ng/mg), während GHB-Gluc in einem der Patienten leicht erhöht war (1.7 – 3.1 ng/mg), im anderen aber unter der LoQ lag (2). Busardo et al. zeigten GHB- und GHB-Gluc-Haarkonzentrationen bei einem mit GHB behandelten Narkoleptiker (70). Die GHB-Konzentrationen in den ersten 6 Segmenten, in welchen der Patient GHB erhalten hatte (7,3 - 9,2 ng/mg) lagen signifikant höher ( $p < 0,001$ ) als in den zuvor gewachsenen Segmenten (0,8 - 2,8 ng/mg). Die GHB-Gluc-Konzentrationen (0,3 - 0,8

ng/mg) im Haar zeigten keinen Anstieg in den Segmenten, welche zu den Zeitpunkten gewachsen waren, als der Patient unter GHB-Therapie stand.

Sowohl Busardo et al. als auch Kintz et al. zeigten, dass schon eine einmalige GHB-Aufnahme im Haar nachgewiesen werden kann (70, 135-139). 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 einige Ansätze um eine mögliche GHB-Aufnahme im Haar zu identifizieren (Richtlinien des *United Nations Office of Drugs and Crime* (UNODC), Ansatz nach Bertol et al. und Hypothese von Kintz ) (140-142).

## 1.10 Analytik

Die Analyse von GHB in verschiedenen biologischen Matrices (84, 108, 143) wurde beschrieben. Es wurden Methoden beschrieben, die eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (62, 105, 144-146), Festphasenextraktion (SPE) (113, 147, 148) und Festphasen-Mikroextraktion (SPME) (147, 149) beinhalten können.

Nach der Extraktion kann eine Analyse mit Screening-Methoden wie kolorimetrisch (150), enzymatisch (151), elektrophoretisch (152-154) und massenspektrometrisch (direkte Analyse in Echtzeit AccuTOF-DART) (155) oder die Identifizierung und eindeutige Bestimmung von Substanzen wie chromatographische Methoden und Kernspinresonanzspektroskopie (156) durchgeführt werden.

Die am häufigsten angewandte Methodik zum Nachweis von GHB stellt die Analyse mittels Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie dar. In der Literatur wurden analytische Methoden zur Analyse von GHB mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LCMS/MS) beschrieben (57, 60, 157-159).

Da GHB ein kleines, polares und thermisch instabiles Molekül ist, muss es zur Analyse durch GC-MS in GBL (unpolarer) umgewandelt oder derivatisiert werden, beispielsweise mit Trimethylsilylderivaten, die weniger polar sind.

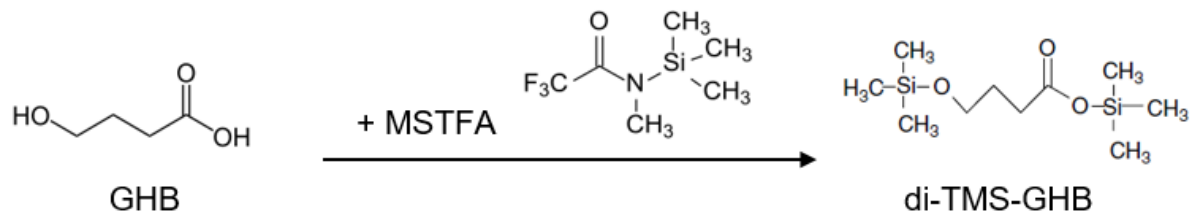


Abbildung 3: Reaktion der Derivatisierung von GHB.

### 1.10.1 GCMS

Die bis heute gebräuchlichste instrumentelle Methode zur Bestimmung von GHB, hauptsächlich in Urin- und Vollblutproben, ist die GC-MS mit einem einfachen Quadrupoldetektor.

Ein Substanzgemisch bzw. Extrakt wird nach Injektion verdampft und über eine Kapillarsäule mittels der mobilen Phase (inertes Gas, z.B. Helium) transportiert. Durch Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase (z.B. Dimethylpolysiloxan) erfolgt die Trennung. Die Verdampfbarkeit der Substanzen ist unabdingbar für die Analyse mittels GC. Im Zweifelsfall kann dies durch vorhergehende Derivatisierung erreicht werden. Die Säule befindet sich in einem Ofen, der auf verschiedene Temperaturprogramme eingestellt werden kann. Die eluierenden Substanzen gelangen am Ende der Säule an den Detektor (160).

Grundsätzlich besteht der Ablauf der Massenspektrometrie aus drei Vorgängen: die Ionisation der Moleküle einschließlich einer eventuellen Fragmentierung, eine Massen-Fokussierung und die Registrierung im Massenspektrum. Das bedeutet, dass aus dem Zerfall eines ionisierten Moleküls unterschiedliche strukturspezifische Fragmente resultieren, die nach ihrem Masse/ Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) in einem elektromagnetischen Feld gespalten und im Spektrum registriert werden.

Bei der Elektronenstoßionisation (EI) wird das Molekül im Gaszustand mit Energie (üblich sind 70 eV) beschossen, es kommt zu einer Ionenbildung und einer oft ausgeprägten Fragmentierung. Der Ionenstrahl wird zum Quadrupol-Analysator befördert, wo er in Längsrichtung zwischen vier parallel angeordnete Metallstäbe geleitet wird. An diesen Metallstäben wird ein elektromagnetisches Feld angelegt. Die Bahn der Ionen hängt bei einer gegebenen Spannung von ihrer Masse ab; nur Teilchen mit einer bestimmten Masse können passieren. Bei Veränderung der Spannung, kann

die nächsthöhere Masse den Austrittspalt erreichen (160). Die Aufzeichnung im Massenspektrum erfolgt daraufhin.



## 2 Zielsetzung der Dissertation

GHB-Vergiftungsfälle werden häufig aufgrund folgender Merkmale unterdiagnostiziert. Zum einen weist die Substanz eine sehr kurze Halbwertszeit und schnellen Metabolismus auf, wodurch es nur sehr kurz in gängigen forensischen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden kann. Zum anderen liegt GHB in allen Untersuchungsmaterialien endogen vor und in der Unterscheidung von endogenen Konzentrationen und Konzentrationen, welche auf eine exogene Gabe hindeuten, besteht eine weitere Schwierigkeit. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass die GHB-Konzentrationen nach dem Todeszeitpunkt im Blut und Urin weiter ansteigen können und dadurch die Unterscheidung von endogenen Werten und exogener Konzentrationen, die sich aus der Aufnahme ergeben, schwer zu interpretieren sind.

Das Hauptziel dieser Dissertation ist es, die Möglichkeiten der Analytik auf SA, GA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA in Patientenmaterial ante mortem als auch in postmortalen Körperflüssigkeiten sowohl im Hinblick auf eine sicherere Diagnose einer GHB-Aufnahme als auch im Hinblick auf ein potentiell längeres Nachweisfenster im Vergleich zur GHB-Analytik selbst zu überprüfen.

Weitere Unterziele sind:

- 1- Die Entwicklung und Validierung einer einfachen und präzisen Methode mittels GC-MS, die zur exakten Bestimmung von GHB und GHB-Stoffwechselprodukten (SA, GA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA) in biologischen Matrices geeignet ist.
- 2- Die Bestimmung von endogenen Konzentrationsbereichen dieser Substanzen in ante mortem Blut und Urin und postmortalem Femoralvenenblut und Urin.
- 3- Die Überprüfung der Pharmakokinetik der Substanzen und des Nachweisfensters nach kontrollierter Aufnahme von GHB. Dazu stehen Blut- und Urinproben von Patienten zur Verfügung, welche therapeutisch GHB im Rahmen ihrer Narkolepsie-Erkrankung erhalten.
- 4- Die Analyse dieser GHB related acids in Blut- und Urinproben Lebender und die Beurteilung, ob diese Substanzen auch geeignete Biomarker darstellen

können. Zu diesem Zweck werden GHB-positive Proben und Fälle mit Verdacht auf drogenbedingte Straftaten und negative GHB-Ergebnisse aus routinemäßigen Fallarbeiten auf GHB related acids getestet.

- 5- Die Überprüfung, ob die Bestimmung der Konzentrationen dieser GHB related acids in post mortem Oberschenkelvenenblut und Urin bei der Interpretation der Todesursache hinsichtlich einer GHB-Intoxikation hilfreich sein könnte.

### 3 Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid—validated quantification using GC–MS and description of endogenous concentration ranges

#### 3.1 Einleitung

In klinischen Labors werden GHB-Metaboliten bereits zur Diagnose von Erbkrankheiten wie Fumarase-Mangel, Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel (SA) oder primärer Hyperoxalurie Typ II (GA) eingesetzt. Insgesamt wurden ca. 50 Erkrankungen beschrieben, bei denen ein vererbter Einzelenzymdefekt eine hohe Konzentration an sauren Stoffwechselprodukten im Blut oder Urin verursacht. Aber auch bei Ethylenglykolvergiftungen kann die Bestimmung von GA einen Wert haben. Derzeit werden die GHB related acids in Blut- und Urinproben in forensischen Labors nicht quantitativ bestimmt und somit wurden noch keine endogenen Konzentrationen in der Literatur beschrieben, weshalb auch die Einstellung des Kalibrierbereiches der zu validierenden Methodik schwierig war.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Nachweis dieser Metaboliten (GA, SA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA) in biologischen Proben zu ermöglichen und mit Hilfe des Kalibrierbereichs einen möglichst großen Anteil der endogenen Konzentrationen mit ausreichender Sensitivität zu erfassen. Daher ist eine Routinemethode zur Quantifizierung von GHB und seinen Isomeren 2-Hydroxybutyrat, 3-Hydroxybutyrat und 3-Hydroxyisobutytrat sowie von organischen Säuren im GHB-Stoffwechsel (GA, SA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA) mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) im single ion monitoring Modus (SIM) mit einer optimierten und einfachen Derivatisierung mit MSTFA entwickelt und nach den GTFCh Richtlinien validiert worden. Die Linearität und Sensitivität der Methode wurden in Wasser getestet. Selektivität und Spezifität, Genauigkeit, Präzision und Stabilität der Analyten wurden sowohl im Serum als auch im Urin bewertet. Jedoch wurden auch GHB-Isomere (2-Hydroxybutyrat, 3-Hydroxybutyrat und 3-Hydroxyisobutytrat) in das Verfahren einbezogen, um eine chromatographische Trennung der Isomere von GHB zu zeigen.

Es wurden mit Hilfe dieser Methode authentische Serum- (n=101) und Urinproben (n=132) aus einer gemischten Population (Serum: 55 Männer, 46 Frauen und Urin: 77 Männer, 55 Frauen) ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Forschungsartikel im Journal Drug Testing and Analysis unter dem Titel „*Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid–validated quantification using GC–MS and description of endogenous concentration ranges*“ veröffentlicht.

# Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid—validated quantification using GC–MS and description of endogenous concentration ranges

Pouria Jarsiah<sup>1,2</sup> | Joerg Roehrich<sup>1</sup> | Marek Wyczynski<sup>2</sup> | Cornelius Hess<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany

<sup>2</sup>Special Laboratory, Medical Care Centers Dr. Eberhard & Partner, Dortmund, Germany

## Correspondence

Cornelius Hess, Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, Johannes Gutenberg University Mainz, Am Pulverturm 3, 55131 Mainz, Germany.  
Email: hess@uni-mainz.de

## Abstract

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a sedative drug used in drug-facilitated crimes. Its detection window is very short. GHB undergoes intensive phase I metabolism to organic acids (glycolic acid, succinic acid, dihydroxybutyric acids). These could be potential analytical targets to broaden the detection window. The aim of the present study was to enable the detection of endogenous levels of these metabolites in biological samples (blood and urine). A gas chromatographic–mass spectrometric method using liquid–liquid extraction and derivatization with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide was developed for the quantification. Validation results were consistent with international guidelines, and the method was able to quantify endogenous levels of the substances in both urine and blood. Endogenous concentrations were shown to be <0.03–4.92 mg/L for glycolic acid, <0.03–1.28 mg/L for GHB, <0.28–18.1 mg/L for succinic acid, <0.12–1.38 mg/L for 2,4-dihydroxybutyric acid, and <0.13–2.59 mg/L for 3,4-dihydroxybutyric acid in serum samples of 101 volunteers. Urinary endogenous concentrations were shown to be 1.30–400 mg/L for glycolic acid, <0.03–1.94 mg/L for GHB, 1.17–2.73 mg/L for succinic acid, 0.72–26.2 mg/L for 2,4-dihydroxybutyric acid, and 1.88–122 mg/L for 3,4-dihydroxybutyric acid in urine samples of 132 volunteers. These endogenous concentrations represent a basis to which concentrations after the intake of GHB can be compared to in order to prove the intake of this substance.

## KEYWORDS

detection window, dihydroxybutyric acid, endogenous concentrations, gamma-hydroxybutyric acid, gas chromatography–mass spectrometry

## 1 | INTRODUCTION

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB), a low-molecular-weight substance, is a short-chain fatty acid that is naturally found in most mammalian species.<sup>1,2</sup> GHB is an endogenous substance produced through the degradation of the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric

acid; so far, its natural function has not been fully elucidated.<sup>3</sup> GHB is a central nervous system depressant capable of producing heavy sedative effects.<sup>4–6</sup>

GHB was used as an anesthetic in the early 1960s,<sup>7,8</sup> but its application was stopped because of its adverse effects.<sup>9</sup> It is also used to treat alcoholism and opiate withdrawal syndrome.<sup>10,11</sup> It is

-----  
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

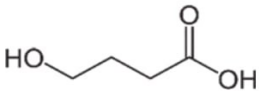
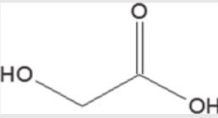
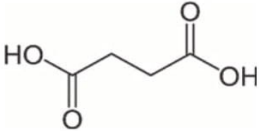
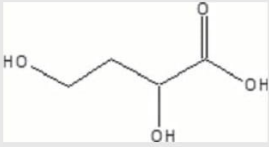
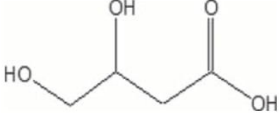
© 2020 The Authors. Drug Testing and Analysis published by John Wiley & Sons Ltd

now widely used in the treatment of sleep disorders.<sup>12,13</sup> However, in nontherapeutic use, GHB is frequently used by youth and bodybuilders or as a weight-loss supplement.<sup>14,15</sup>

The effects of GHB include sedation, drowsiness, forgetfulness, and muscle relaxation. In addition, because it is colorless and nearly odorless, its detection is difficult, and thus, it is used as a knockout drug in cases of drug-facilitated sexual assaults.<sup>16–18</sup> Therefore, GHB is currently a highly controlled substance worldwide, and its possession, sale, import, and export are prohibited.<sup>19,20</sup>

Because GHB is an endogenous substance, it is important to distinguish the uptake from endogenous concentrations in biological samples in forensic cases.<sup>21,22</sup> However, because of the relatively short half-life, detection windows in blood and urine are maximum 6 and 12 h, respectively.<sup>23,24</sup> In addition, the lack of useful metabolites as biomarkers leads to difficulties in detection of this substance.<sup>25</sup>

**TABLE 1** Chemical structures of analyzed organic acids

Substance	Chemical structures
Gamma-hydroxybutyric acid	
Glycolic acid	
Succinic acid	
2,4-Dihydroxybutyric acid	
3,4-Dihydroxybutyric acid	

Recent results from measuring concentrations of both GHB phase II metabolites, GHB-glucuronide and GHB-4-sulfate, indicate that these markers are not reliable and appropriate for expanding the detection window after GHB use or forensic toxicology.<sup>26–28</sup>

GHB is quickly metabolized to succinic semialdehyde by gamma-hydroxybutyric acid-dehydrogenase and to succinic acid, "a mediator of the citric acid cycle," by succinic semialdehyde dehydrogenase.<sup>25</sup> It has been observed that the levels of the number of alpha and beta metabolites of GHB increase after GHB consumption,<sup>29,30</sup> namely, organic acids 2,4-dihydroxybutyric acid, 3,4-dihydroxybutyric acid, and 4,5-dihydroxyhexanoic acid that have been described as part of phase I GHB metabolism. Chemical structures of these organic acids are shown in Table 1.

In clinical laboratories, GHB metabolites are already used for the diagnosis of hereditary illnesses like fumarase deficiency,<sup>31</sup> succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency<sup>29</sup> (succinic acid), or primary hyperoxaluria type II<sup>32</sup> (glycolic acid). Overall, approximately 50 diseases have been described in which an inherited single-enzyme defect causes a high concentration of acidic metabolites in the blood or urine.<sup>33</sup> However, the determination of glycolic acid can also have a value in ethylene glycol poisonings.<sup>34</sup>

Currently, the phase I metabolites of GHB have not been quantitatively determined in blood and urine samples in forensic laboratories. The aim of the present study was to enable the detection of these metabolites in biological samples and to describe endogenous reference ranges. Therefore, a routine method for the quantification of GHB and its isomers 2-hydroxybutyrate, 3-hydroxybutyrate, and 3-hydroxyisobutyrate, and of organic acids within GHB metabolism (glycolic acid, succinic acid, 2,4-dihydroxybutyrate, and 3,4-dihydroxybutyrate) using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) had to be developed and validated.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals and reagents

GHB sodium salt, glycolic acid, 2-hydroxybutyrate (alpha-hydroxybutyric acid) and 3-hydroxybutyrate (beta-hydroxybutyric acid), 3-hydroxyisobutyrate, succinic acid, 2,4-dihydroxybutyrate, and 3,4-dihydroxybutyrate were provided by Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). All standard stock solutions (10 mg/mL) were prepared using methanol.

The deuterated internal standard (GHB-d<sub>6</sub>, 1.0 mg/mL in methanol) was purchased from Cerilliant (Round Rock, Texas, USA) and was diluted with methanol to obtain a stock solution of 500 µg/mL. *N*-methyl-*N*-tri-methylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) was purchased from CS-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Germany). Hydrochloric acid was purchased from J. T. Baker (Deventer, The Netherlands), hydrochloric acid 0.1 mol/L in 2-propanol from Merck (Darmstadt, Germany), and ethyl acetate from Fisher Scientific (Loughborough, UK). All chemicals used in the present study were of analytical grade and were stored according to the instructions provided by the supplier.



## 2.2 | Biological material for control samples

It is not possible to obtain blank serum and urine because all of the analytes detected here are of endogenous origin. Serum and urine samples were provided by six different patients referred to the MVZ Dr. Eberhard & Partner in Dortmund, Germany, and were used for selectivity studies and production of spiked serum and urine samples for validation. To avoid bacteria contamination in the urine samples, two to three droplets of chloroform were added, and all samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use.

## 2.3 | Liquid-liquid extraction

Urine or serum (1 mL) was added to 40  $\mu\text{L}$  of the internal standard GHB- $\text{d}_6$  (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). An amount of 100  $\mu\text{L}$  of 6M hydrochloric acid was added to adjust the pH to 1–2. Finally, the analytes were extracted using 5 mL of ethyl acetate. The mixture was thoroughly shaken for 1 min and centrifuged at 3000 rpm for 3 min. The supernatant was carefully transferred to another glass test tube. Then, 100  $\mu\text{L}$  of HCl (0.1 mol/L in 2-propanol) was added, and the supernatant was dried under a gentle stream of nitrogen at room temperature. The dried residue was derivatized and trimethylsilylated using 500  $\mu\text{L}$  of MSTFA at  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 min. The reaction mixture was transferred to an autosampler vial, and 2  $\mu\text{L}$  was injected into the GC-MS system.

## 2.4 | GC-MS conditions

GC-MS was accomplished using an MSD 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipped with a 7890A GC (Agilent) and a 7683B autosampler (Agilent). The capillary column used was a TG-55ILMS (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25- $\mu\text{m}$  film thickness) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The GC was operated in the split mode (1/20 split ratio), and the injector and detector temperatures were set at  $280^{\circ}\text{C}$  and  $230^{\circ}\text{C}$ , respectively. The temperature program used was as follows: an increase of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  from  $80^{\circ}\text{C}$  to  $300^{\circ}\text{C}$ , with the initial temperature maintained for 2 min and the final temperature maintained for 3 min. High-purity helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.9 mL/min.

The compounds were ionized by an electron impact of 70 eV. The mass selective detector was used in selected ion monitoring mode for quantitative analysis. The following ions were monitored (using a dwell time of 20 ms): GHB:  $m/z$  233 (target), 204; GHB- $\text{d}_6$ :  $m/z$  239 (target), 206; glycolic acid:  $m/z$  205 (target), 147; 2-hydroxybutyrate:  $m/z$  131 (target), 190; 3-hydroxybutyrate:  $m/z$  191 (target), 192, 204; 3-hydroxyisobutyrate:  $m/z$  177 (target), 218; succinic acid:  $m/z$  247 (target), 218, 262; 2,4-dihydroxybutyrate:  $m/z$  219 (target), 321; and 3,4-dihydroxybutyrate:  $m/z$  233 (target), 321.

## 2.5 | Assay validation for serum and urine analyses

The GC-MS procedure was validated for the quantification of the aforementioned organic acids in accordance with an international

guideline.<sup>35</sup> For drawing the calibration curves and for performing the quantitative measurements, the ratios of the peak area of the target ion of the organic acids to the peak area of the internal standard GHB- $\text{d}_6$  were applied.

The linearity and sensitivity of the method were tested in water. The comparison of calibration curves within the matrix water and those within the matrices serum or urine revealed the validity of the matrix water (comparable incline of the calibration curves). The method's selectivity and specificity, accuracy, precision, and stability of the analytes were evaluated in both serum and urine.

### 2.5.1 | Selectivity

Because every single analyte detected by the described method is endogenously present in serum and urine samples, usual selectivity studies are not possible. Nevertheless, six different sources of serum and urine samples were analyzed for peaks interfering (peak shoulders, wrong ratio of peak area of the target to peak area of the qualifier ion) with the signals of the analytes or the internal standard.

### 2.5.2 | Linearity

Linearity was studied by analyzing a seven-point calibration using the concentrations of 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, and 20 mg/L of all analytes in water. The curve was created six times on different days.

### 2.5.3 | Accuracy and precision

Quality control samples were prepared using pooled blank serum or urine and spiked to provide two final concentrations ( $\sim 2$  and  $\sim 17$  mg/L for each analyte). The quality controls of each concentration were measured twice on eight consecutive days. The concentrations of the analytes were assayed against a linear regression model. The program Valistat (version 2.0, Arvecon, Walldorf, Germany) was used. The calculated values at each concentration were averaged, and the percentage bias was calculated to estimate accuracy. The intra- and inter-day precision (relative standard deviation) was assessed from the comparison of the analysis of two control samples at each concentration on eight consecutive days. One-way ANOVA was used for precision calculations.

### 2.5.4 | Limits of the method

The limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) were determined using a calibration curve in the low-concentration range according to DIN 32646. A seven-point calibration using the concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, and 2.0 mg/L of all analytes in water was recorded. Only those calibration points where S/N ratio was  $>3$  were used (minimum five calibration points).

### 2.5.5 | Stability

Stability was tested in the extracted samples within the autosampler (at room temperature) and in serum and urine samples.

The stability of the extracts within the autosampler was evaluated for 40 h after extraction. Six control samples each for low (2 mg/L) and high (17 mg/L) concentrations were extracted, connected, and aliquoted again into six extracts. These extracts were injected into the device at 0, 4, 10, 15, 24, and 40 h after extraction and derivatization and were analyzed using the validated method.

In a second step, the stability of the analytes in serum and urine samples was tested by storing 20 measured real serum and urine samples at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After 1 month, the samples were re-extracted, analytes were reexamined, and the observed results were compared.

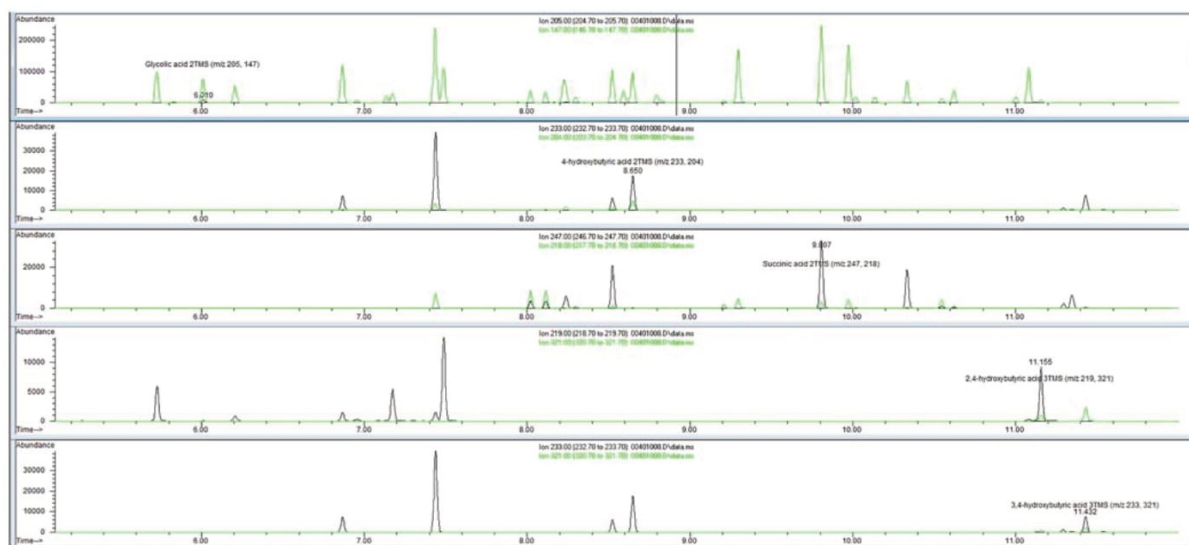
### 2.6 | Detection of endogenous concentrations

After the method was validated, it was used to determine the endogenous levels of the organic acids: GHB, succinic acid, glycolic acid, 2,4-dihydroxybutyric acid, and 3,4-dihydroxybutyric acid. Authentic serum ( $n = 101$ ) and urine ( $n = 132$ ) samples taken from a mixed population (serum: 55 men, 46 women; urine: 77 men, 55 women) were evaluated. The intake of GHB or related substances was excluded among these patients using a questionnaire after informed consent. After the samples were received, the serum was quickly separated from the red blood cells, and serum and urine samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis, which was a maximum of 7 days after blood or urine sampling.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

This method was specifically designed for the quantitative evaluation of GHB and endogenous organic acids within GHB phase I metabolism in serum and urine samples. The method involves an easy liquid-liquid extraction step and then derivatization using MSTFA and gas chromatographic mass spectrometric detection in selected ion monitoring mode. The important analytes to quantify for forensic purposes were GHB, glycolic acid, succinic acid, 2,4-dihydroxybutyric acid, and 3,4-dihydroxybutyric acid. However, GHB isomers—2-hydroxybutyrate, 3-hydroxybutyrate, and 3-hydroxyisobutyrate—were also included in the method to show chromatographic separation of the isomers and no interference of these substances with GHB detection. A chromatogram of the ions of all analytes within a quality control sample is shown in Figure 1. No peak shoulders or wrong ion ratios (compared to methanolic solutions) were detected when urine or serum samples were analyzed for selectivity studies.

The method was validated according to the international guideline. Accordingly, the linearity, LoD and LoQ, intra- and inter-assay precision, accuracy, stability in the extract, and long-term stability in serum and urine samples were evaluated. The statistical analysis of the results showed linearity of all analytes in the range 1–20 mg/L. The linear regression showed correlation coefficients always as  $R^2 > 0.99$ . Linearity and variance homogeneity were demonstrated within the working range using Fisher's test (significant 99%) and Cochran's test (significant 99%), respectively. Weighing of the calibration curves was not necessary. The concentration of 20 mg/L was selected as the highest calibrator. For none of the analytes real serum sample analytes with concentrations higher than 20 mg/L were detected. Therefore, the linearity range was considered to be the



**FIGURE 1** A quality control sample containing 2 mg/L of each of the described analytes as trimethylsilyl derivatives. Both ions (target and qualifier) for each analyte are shown [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



concentration range detected in real serum samples. However, urine samples showed concentrations >20 mg/L for some analytes. In these cases, samples had to be diluted before extraction. The method's imprecision and bias were always less than 15% and compliant with the guideline. Bias and precision data were reported in RSD% and are presented in Table 2.

The analytical limits of the method determined by a calibration curve in the low-concentration range according to DIN 32646 are shown in Table 3. The method showed limits of detection that were <0.3 mg/L and limits of quantification that were <1 mg/L for all analytes. Because most of the analytes could be detected at concentrations >1 mg/L (however, for GHB only 36.3% of the cases in urine and 0.9% of the cases in serum were >1 mg/L; for 2,4-dihydroxybutyric acid, basic concentrations in serum were mostly ~1 mg/L, in urine higher), the sensitivity of the method is considered to be sufficient. Regarding GHB, the analytical methods published<sup>23,36</sup> showed similar or higher analytical limits.

The stability of the derivatized analytes was determined at both high (17 mg/L) and low (2 mg/L) concentrations so that the extracted sample was injected into the device six times consecutively over a time period of 40 h. The decline of the detected peak areas was less than 10% for all analytes. Therefore, the stability of the derivatized substances within the extracts was considered to be acceptable.

The stability of these substances in serum or urine samples for forensic studies could be a major problem because all of the substances are of endogenous origin, and for some analytes, some pathways can lead to biosynthesis or degradation. To determine the stability and variation extent of the analytes in serum and urine samples, 20 serum and urine samples were collected from the laboratory directly and, after the initial measurements, the parameters were remeasured 1 month after the first measurement.

It is well known that GHB concentrations can change during storage. Results of some studies, however, differ. Blood samples stabilized with NaF (n = 27 living individuals) were stored at -20°C and measured for GHB. Long-term stability could be demonstrated over a period of 7 years, and the deviation to the primary

**TABLE 3** Analytical limits of the method

Substance	Limit of detection (mg/L)	Limit of quantification (mg/L)
Gamma-hydroxybutyric acid	0.03	0.11
Glycolic acid	0.19	0.63
Succinic acid	0.28	0.98
2,4-Dihydroxybutyric acid	0.12	0.39
3,4-Dihydroxybutyric acid	0.13	0.42

concentrations ranged between -32.4% and 21.0%.<sup>37</sup> A good stability could also be demonstrated for serum samples without stabilization. Samples were stored for 9 months at -20°C and measured monthly in triplicates. In addition, stability at room temperature was retained over the test period of 48 h (maximum deviation 11%).<sup>38</sup> This provides the possibility of maintaining stability during postal transfer between the police department and analytical laboratory. Three freeze-thaw cycles did not have an influence on the measured GHB concentrations (maximum deviation 11%).<sup>38</sup> Jones et al.<sup>39</sup> investigated the stability of 50 whole blood samples from impaired drivers, stored at 4°C for up to 1 year. The results obtained indicated that blood GHB levels are stable when stored at 4°C for up to 6 months. Beránková et al.<sup>40</sup> studied the GHB stability in blood and urine with and without sodium fluoride (1% w/v) at 4°C and -20°C for up to 8 months. Ante-mortem samples showed no significant GHB production.

However, recently a study showed the instability of GHB in serum samples: Busardo et al.<sup>41</sup> determined the stability at -20°C, 4°C, and 20°C. Blood samples showed a decrease in GHB levels only after 3 days of storage at -20°C and at +4°C (decrease was always less than 10%; samples stored at +20°C showed a mean decrease of 10.4%). After 4 weeks of storage, the mean decrease in GHB concentrations was higher than 20% at all storage temperatures. Urine samples showed a decrease in GHB levels higher than 10% after just 3 days of storage for samples kept at all tested temperatures. After 4 weeks of storage, the mean decrease in GHB

**TABLE 2** Bias and precision data of the analytical method

Substance	Concentration (mg/L)	Bias (%)	Intra-day precision (%)	Inter-day precision (%)
Gamma-hydroxybutyric acid	2	-4.3	6.6	7.8
	17	0.82	2.5	3.8
Glycolic acid	2	0.90	6.6	11.0
	17	0.39	1.4	5.7
Succinic acid	2	-8.5	8.3	10.4
	17	0.81	3.7	4.9
2,4-Dihydroxybutyric acid	2	5.7	7.1	7.1
	17	-1.3	5.3	5.2
3,4-Dihydroxybutyric acid	2	13.0	1.8	2.5
	17	-0.36	3.1	4.2

concentrations was higher than 25% at all storage temperatures. According to their findings, Busardo et al. recommended the analysis of GHB in blood and urine within 3 days of sampling and the storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $4^{\circ}\text{C}$  to avoid instability issues.<sup>41</sup> During validation experiments, we tested GHB stability at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 1 month. GHB concentrations were always less than LoQ in serum. In urine, the mean deviation from the first measurement was  $-9.6\%$  ( $-27\%$  to  $+5.6\%$ ).

The hydroxylated metabolites of GHB seemed to be very stable and did not change a lot after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a month. 2,4-Dihydroxybutyric acid concentrations showed little deviation from the first measurement in serum (mean:  $-0.6\%$ , range:  $-10\%$  to  $+9.6\%$ ) and in urine (mean:  $-10\%$ , range:  $-26\%$  to  $+4.2\%$ ). 3,4-Dihydroxybutyric acid concentrations showed little deviation from the first measurement in serum (mean:  $-2.7\%$ , range:  $-17\%$  to  $+14\%$ ) and in urine (mean:  $-10\%$ , range:  $-26\%$  to  $+4.2\%$ ). Glycolic acid concentrations decreased with a mean of 16% (decrease of 11%–28%) in serum and with a mean of 11% (decrease of 28% to an increase of  $-25\%$ ) in urine samples. These data are within the accuracy of the method and can be considered to be acceptable. Therefore, it is assumed that 2,4-dihydroxybutyric acid, 3,4-dihydroxybutyric acid, and glycolic acid concentrations are stable up to 1 month when stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

In contrast, the concentrations of succinic acid changed considerably during storage. Within serum samples, the concentrations increased with a mean of 190% (decrease of 2% to an increase of 716%). In urine, an increase or decrease could be observed (mean: decrease of 11%; minimum  $-91\%$ , maximum  $+52\%$ ). Therefore, it is assumed that succinic acid concentrations are very unstable, and it is recommended to measure succinic acid right after sampling. Concentrations measured in samples stored for some time even at  $-20^{\circ}\text{C}$  are not usable.

Overall, the validation showed suitable selectivity, sensitivity, accuracy, precision, and linearity, which were in the range from the

LoQ to 20 mg/L; all the mentioned parameters indicate the reproducibility and repeatability of this method and its suitability for quantitative analysis. The stability of succinic acid in serum as well as in urine samples seemed to be a problem; however, the stability of all other analytes over 1 month at  $-20^{\circ}\text{C}$  was acceptable.

To confirm the applicability of the method and to determine endogenous concentrations of the parameters in human serum and urine, the levels of GHB, 3,4-dihydroxybutyrate, 2,4-dihydroxybutyrate, succinic acid, and glycolic acid were measured using the validated method in the collective. Table 4 presents the minima, maxima, median, and mean values of the concentrations of the organic acids detected in serum samples ( $n = 101$ ). Table 5 presents the minima, maxima, median, and mean values of the concentrations of the organic acids detected in urine samples ( $n = 132$ ).

As other studies have shown, GHB could be detected at concentrations  $<1.28$  mg/L in serum and  $<2$  mg/L in urine. Eljan<sup>42</sup> showed endogenous GHB concentrations in 240 blood (0.17–1.51 mg/L) and 670 urine samples (0.34–5.75 mg/L). Andresen et al.<sup>43</sup> showed plasma concentrations of 0.62–3.2 mg/L ( $n = 50$ ) and urine concentrations of 0.64–4.2 mg/L ( $n = 50$ ). Erdmann et al. showed blood concentrations of 0.11–1.56 mg/L.<sup>44</sup> Elliot<sup>45</sup> analyzed 119 urine samples and determined the endogenous concentrations to be  $<3$  mg/L. Kang et al.<sup>46</sup> showed urinary concentrations between 0.09 and 1.8 mg/L in 74 subjects, whereas Brailsford et al.<sup>47</sup> determined GHB in urine of 1126 females and showed concentrations of up to 5.5 mg/L. Because LeBeau et al.<sup>48</sup> had shown that GHB can also be built during storage, the recommendations for endogenous/exogenous cutoffs are  $<4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  in serum and  $<6$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  in urine.<sup>43</sup>

Phase II metabolites of GHB have been described (GHB-O-glucuronid and GHB-4-sulfate in Petersen et al.<sup>49</sup> and Shima et al.,<sup>21</sup> respectively); however, they could not be detected in higher concentrations after the intake of GHB. Therefore, the aim of our research was to determine if phase I metabolites of GHB can be

**TABLE 4** Mean endogenous serum concentrations of the analytes in the collective ( $n = 101$ )

	Mean	Median	Maximum	Minimum	Standard deviation
Gamma-hydroxybutyric acid (mg/L)	$<0.11$	$<0.11$	1.28	Not detected	0.17
Glycolic acid (mg/L)	1.28	1.33	4.92	0.39	0.46
Succinic acid (mg/L)	2.66	2.75	18.14	Not detected	2.30
2,4-Dihydroxybutyric acid (mg/L)	0.95	0.92	1.38	Not detected	0.14
Standard deviation:	1.33	1.27	2.59	Not detected	0.33

**TABLE 5** Mean endogenous urine concentrations of the analytes in the collective ( $n = 132$ )

	Mean	Median	Maximum	Minimum	Standard deviation
Gamma-hydroxybutyric acid (mg/L)	0.40	0.35	1.94	Not detected	0.37
Glycolic acid (mg/L)	46.0	26.8	400	1.30	64.0
Succinic acid (mg/L)	27.0	15.6	273	1.17	35.8
2,4-Dihydroxybutyric acid (mg/L)	5.25	4.35	26.2	0.72	4.09
Standard deviation:	21.6	13.4	122	1.88	21.4



detected in higher concentrations after the uptake of GHB and if elevated concentrations above the endogenous level can be detected longer for the metabolites than for GHB itself. For this aim, a reference range for endogenous concentrations of these substances has to be established in typical forensic body fluids such as blood and urine.

Some organic acids have been described to be part of GHB metabolism. The incorporation into succinic acid of label from [1-14C]- and [4-14C]-GHB given intravenously or intraperitoneally to rats and cats accounts for only a small proportion of the metabolized compound.<sup>50,51</sup> This result led Walkenstein and coworkers<sup>50</sup> to propose a  $\beta$ -oxidative pathway. Möhler et al.<sup>52</sup> then demonstrated that the labeling pattern in mouse brain after an intravenous injection of [1-14C]-GHB can be explained by the oxidation of GHB by succinate but not by  $\beta$ -oxidation. This did not rule out  $\beta$ -oxidation in other organs, and Lee<sup>48</sup> could show that 3,4-dihydroxybutyric acid is an intermediate within the  $\beta$ -oxidation of GHB. Lee also gave 1 g of gamma-butyrolactone, a precursor of GHB, to four healthy patients, which led to substantial increases in urinary 3,4-dihydroxybutyric acid concentrations in all subjects following an increase in glycolic acid. 4-Hydroxy-3-oxobutyrate was supposed to be a transient intermediate.<sup>53</sup>

A lack of the enzyme SSADH, called succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD), leads to increased concentrations of GHB in urine and other body fluids.<sup>54</sup> Shinka et al.<sup>30</sup> and Brown et al.<sup>29</sup> received urine samples from one and three patients, respectively, suffering from this disease. An increased excretion of 3,4-dihydroxybutyric, 4-hydroxy-3-oxobutyrate,<sup>54</sup> and glycolic acid, a further product of  $\beta$ -oxidation of 3,4-dihydroxybutyric, has been shown in these patients. Metabolites representing  $\alpha$ -oxidation of GHB (2,4-dihydroxybutyric acid) have also been found increased, however, to a lesser extent.<sup>29</sup> Oxidation of 2,4-dihydroxybutyric acid to 2-oxo-acid and oxidative decarboxylation led to 3-hydroxypropionic acid, which was also sometimes found in the urine samples.<sup>29</sup> An unusually large excretion of adipic acid was found in these excretion experiments, however, was not brought together with GHB metabolism. Shinka et al. additionally found 4,5-dihydroxyhexanoic acid.<sup>30</sup>

Palomino-Schätzlein et al.<sup>55</sup> searched for metabolites associated with GHB consumption using a metabolomics approach by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results showed that concentrations of glycolate and succinate increased after 1 h of drug ingestion. Twelve volunteers consumed 25 mg GHB/kg body weight. Whereas GHB and succinate concentrations decreased rapidly to an endogenous level (at 6 h) which was, however, not quantified exactly, glycolate concentration decreased slowly, and even after 24 h, a small difference could be observed. Steuer et al.<sup>56</sup> identified small but significant differences in glycolate levels in urine samples taken 4 h after the intake of 50 mg/kg body weight in an untargeted metabolomics approach. However, a quantification of these substances and a description of their endogenous concentration range have, to the best of our knowledge, never been conducted at least in forensic laboratories.

We concentrated on glycolic acid, succinic acid, 2,4-dihydroxybutyric acid, and 3,4 hydroxybutyric acid because these substances

are commercially available and could be potential target analytes after the intake of GHB.

In our study, 2,4-dihydroxybutyrate and 3,4-dihydroxybutyrate could be detected in serum at concentrations ranging from less than LoD to 1.38 mg/L and less than LoD to 2.59 mg/L, respectively. It could be confirmed that  $\beta$ -oxidation of GHB is preferred over  $\alpha$ -oxidation.<sup>29</sup> Within urine samples, concentrations were clearly higher (0.72–26.3 and 1.88–122 mg/L, respectively). The results of a Shapiro–Wilk test indicated that the distribution of data in urine and serum for both parameters was not normal ( $P < 0.05$ ). Fell et al.<sup>57</sup> had also determined 3,4-dihydroxybutyrate concentrations in urine of 21 adults and showed a range of 23–104 mg per 24 h. Serum concentrations of 3,4-dihydroxybutyrate were also reported for four samples in the range of 0.144–0.264 mg/L. Moreover, Bouatra et al.<sup>58</sup> conducted a study on human metabolites in the urine of 22 healthy adult volunteers and found that the concentrations of 3,4-dihydroxybutyrate and 2,4-dihydroxybutyrate were 21.9–56.1  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinine and 0.3–1.8  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  creatinine, respectively. The results of these studies were consistent with those determined in our study. However, Keyfi et al.<sup>33</sup> determined 2,4-dihydroxybutyric acid and 3,4-dihydroxybutyric acid concentrations in the urine of 251 healthy volunteers and defined reference ranges with  $<4$  mmol/mol creatinine for 2,4-dihydroxybutyric acid and  $<7$  mmol/mol creatinine for 3,4-dihydroxybutyric acid. In our study, the mean values were 13 mmol/mol creatinine and 47 mmol/mol creatinine and were clearly higher than those within this reference population in Iran.<sup>33</sup> However, Keyfi et al.<sup>33</sup> did not provide any details on the method to quantify organic acids and on the method validation. Furthermore, Zhou et al.<sup>59</sup> have shown that increased urinary 3,4-dihydroxybutyrate and 2,4-dihydroxybutyrate levels may be associated with bladder cancer.

The endogenous concentrations of succinic acid in our study were less than LoD to 18.1 mg/L in serum and 1.17–273 mg/L in urine. Nordmann and Nordmann had shown concentrations of 0.05–0.07 mg/L in blood, and 2–12 mg of succinic acid were excreted in the urine over 24 h.<sup>60</sup> Asano et al. showed a maximum urinary concentration of 3.7 mg/L ( $n = 5$ ).<sup>61</sup> Keyfi et al. showed urinary concentrations in 251 healthy individuals and defined a reference range of  $<200$  mmol/mol creatinine in urine.<sup>33</sup> In our study the mean concentration in urine was 66 mmol/mol creatinine; however, there were some patients with higher urinary concentrations of succinic acid. However, the instability of succinic acid in stored samples must be considered. Within our study, samples were always measured within 1 week after sampling.

Glycolid acid could be detected at concentrations of 0.39–4.92 mg/L in serum and 1.3–400 mg/L in urine. Keyfi et al.<sup>33</sup> defined the reference range of urinary concentrations in 251 healthy individuals to be  $<16$  mmol/mol creatinine in urine. In our study, the mean concentration of glycolic acid in urine was 104 mmol/mol creatinine, and many patients had higher concentrations than the reference range defined by Keyfi et al. Again it should be mentioned that Keyfi et al.<sup>33</sup> did not provide any details on the method to quantify organic acids and on the validation data of the method.

## 4 | CONCLUSIONS

A method was developed and validated to quantify GHB and its phase I metabolites, namely succinic acid, glycolic acid, 2,4-dihydroxybutyric acid, and 3,4 dihydroxybutyric acid, in human serum and urine. The endogenous concentration ranges for these analytes in urine and serum were defined. In a future study, these metabolites must be determined in samples of patients who chronically or uniquely take GHB for medical reasons or in forensic cases after the known intake of GHB to evaluate if these parameters could be useful biomarkers with regard to the detection of a GHB intake.

### ORCID

Cornelius Hess  <https://orcid.org/0000-0001-8405-4417>

### REFERENCES

- Roth R, Giarman N. Natural occurrence of gamma-hydroxybutyrate in mammalian brain. *Biochem Pharmacol.* 1970;19:1087-1093.
- Kam P, Yoong F. Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. *Anaesthesia.* 1998;53(12):1195-1198.
- Busardo FP, Jones AW. GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(1):47-70.
- Cash CD. Gammahydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994;18(2):291-304.
- Carai MA, Colombo G, Brunetti G, et al. Role of GABAB receptors in the sedative/hypnotic effect of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. *Eur J Pharmacol.* 2001;428(3):315-321.
- Giarman N, Schmidt K. Some neurochemical aspects of the depressant action of  $\gamma$ -butyrolactone on the central nervous system. *Br J Pharmacol Chemother.* 1963;20(3):563-568.
- Laborit H. Sodium 4-hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol.* 1964; 3(4):433-IN8.
- Blumenfeld M, Suntay RG, Harmel MH. Sodium gamma-hydroxybutyric acid: a new anesthetic adjuvant. *Anesth Analg.* 1962;41(6):721-726.
- Winters WD, Spooner CE. Various seizure activities following gamma-hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol.* 1965;4(4):197-IN1.
- Caputo F, Vignoli T, Tarli C, et al. A brief up-date of the use of sodium oxybate for the treatment of alcohol use disorder. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(3):290-295.
- Gallimberti L, Cibin M, Pagnin P, et al. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology.* 1993;9(1):77-81.
- Brown MA, Guilleminault C. A review of sodium oxybate and baclofen in the treatment of sleep disorders. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(15):1430-1435.
- Broughton R, Mamelak M. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci.* 1979;6(1): 1-6.
- Busardo F, Kyriakou C, Napoletano S, Marinelli E, Zaami S. Clinical applications of sodium oxybate (GHB): from narcolepsy to alcohol withdrawal syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19(23):4654-4663.
- Tunncliffe G. Sites of action of gamma-hydroxybutyrate (GHB)—a neuroactive drug with abuse potential. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1997; 35(6):581-590.
- Rossi R, Lancia M, Gambelunghe C, Oliva A, Fucci N. Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2009;186(1-3):e9-e11.
- Drasbek KR, Christensen J, Jensen K. Gamma-hydroxybutyrate—a drug of abuse. *Acta Neurol Scand.* 2006;114(3):145-156.
- Teter CJ, Guthrie SK. A comprehensive review of MDMA and GHB: two common club drugs. *Pharmacotherapy.* 2001;21(12):1486-1513.
- Wood DM, Brailsford AD, Dargan PI. Acute toxicity and withdrawal syndromes related to gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its analogues gamma-butyrolactone (GBL) and 1, 4-butanediol (1, 4-BD). *Drug Test Anal.* 2011;3(7-8):417-425.
- Smith KM, Larive LL, Romanelli F. Club drugs: methylenedioxy-methamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(11):1067-1076.
- Shima N, Miki A, Kamata T, Katagi M, Tsuchihashi H. Endogenous level and in vitro production of GHB in blood from healthy humans, and the interpretation of GHB levels detected in antemortem blood samples. *J Health Sci.* 2005;51(2):147-154.
- Bertol E, Argo A, Procaccianti P, et al. Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 70:518-522.
- Pyo JS, Lee HS, Kwak J-H, Choe S. Determination of gamma-Hydroxybutyric acid in urine by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Lett.* 2016;49(2):217-225.
- Wang X, Linnet K, Johansen SS. Development of a UPLC-MS/MS method for determining  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicol.* 2016;34(1):51-60.
- Wang S-M, Giang Y-S, Lu M-J, Kuo T-L. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by simultaneous extraction and chemical derivatization followed by GC-MS. *Forensic Sci J.* 2006;5(1):41-54.
- Mehling L-M, Piper T, Spottke A, et al. GHB-O- $\beta$ -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake. *Forensic Toxicol.* 2017;35(2):263-274.
- Mehling L-M, Wang X, Johansen S-S, et al. Determination of GHB and GHB-b-O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients—comparison between single and chronic GHB exposure. *Forensic Sci Int.* 2017;278:e8-e13.
- Piper T, Mehling L-M, Spottke A, et al. Potential of GHB phase-II-metabolites to complement current approaches in GHB post administration detection. *Forensic Sci Int.* 2017;279:157-164.
- Brown G, Cromby C, Manning N, Pollitt R. Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of  $\alpha$ -oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *J Inher Metab Dis.* 1987;10(4):367-375.
- Shinka T, Inoue Y, Ohse M, et al. 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.* 2002;776(1): 57-63.
- Prasad C, Napier MP, Rupar CA, Prasad C. Fumarase deficiency: a rare disorder on the crossroads of clinical and metabolic genetics, neurology and cancer. *Clin Dysmorphol.* 2017;26(2):117-120.
- Jiang D, Geng H. Primary hyperoxaluria. *N Engl J Med.* 2017; 376(15):e33.
- Keyfi F, Lukacs Z, Varasteh A. A description of reference ranges for organic acids in urine samples from a pediatric population in Iran. *Rep Biochem Mol Biol.* 2017;6(1):40-50.
- Hewlett TP, McMartin KE, Lauro AJ, Ragan FA. Ethylene glycol poisoning. The value of glycolic acid determinations for diagnosis and treatment. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1986;24(5):389-402.
- Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007;165(2-3):216-224.
- Liu J, Deng Z, Zhu Z, et al. Determination of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in human urine samples by ion exclusion and ion exchange two-



- dimensional chromatography system. *J Chromatogr A*. 2017;1528:35-40.
37. Fjeld B, Burns ML, Karinen R, Larssen B, Smith-Kielland A, Vindenes V. Long-term stability of GHB in post-mortem samples and samples from living persons, stored at -20 degrees C, using fluoride preservatives. *Forensic Sci Int*. 2012;222:47-51.
  38. Chen M, Andrenyak DM, Moody DE, Foltz RL. Stability of plasma gamma-hydroxybutyrate determined by gas chromatography-positive ion chemical ionization-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2003;27:445-448.
  39. Jones AW, Gladh SA, Windberg CN, Johansen SS. Stability of gamma-Hydroxybutyrate in blood samples from impaired drivers after storage at 4 degrees C and comparison of GC-FID-GBL and LC-MS-MS methods of analysis. *J Anal Toxicol*. 2015;39:294-299.
  40. Beránková K, Mutnanska K, Balikova M. Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. *Forensic Sci Int*. 2006;161:158-162.
  41. Busardo FP, Zaami S, Baglio G, et al. Assessment of the stability of exogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) in stored blood and urine specimens. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19:4187-4194.
  42. Elian AA. Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood. *Forensic Sci Int*. 2002;128(3):120-122.
  43. Andresen H, Sprys N, Schmoltdt A, Mueller A, Iwersen-Bergmann S. Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Sci Int*. 2010;200(1-3):93-99.
  44. Erdmann F, Zandt D, Auch J, Schütz H, Weiler G, Verhoff M. Investigations concerning the threshold value between endogenous and exogenous GHB (liquid ecstasy). *Archiv Fur Kriminologie*. 2006;217(5-6):129-136.
  45. Elliott SP. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production. *Forensic Sci Int*. 2003;133(1-2):9-16.
  46. Kang S, Oh SM, Chung KH, Lee S. A surrogate analyte-based LC-MS/MS method for the determination of  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) in human urine and variation of endogenous urinary concentrations of GHB. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;98:193-200.
  47. Brailsford AD, Cowan DA, Kicman AT. Urinary  $\gamma$ -hydroxybutyrate concentrations in 1126 female subjects. *J Anal Toxicol*. 2010;34(9):555-561.
  48. LeBeau MA, Miller ML, Levine B. Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine. *Forensic Sci Int*. 2001;119(2):161-167.
  49. Petersen IN, Tortzen C, Kristensen JL, Pedersen DS, Breindahl T. Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide. *J Anal Toxicol*. 2013;37(5):291-297.
  50. Walkenstein SS, Wiser R, Gudmundsen C, Kimmel H. Metabolism of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj*. 1964;86(3):640-642.
  51. Roth RH, Giarmann NJ. Preliminary report on the metabolism of gamma-BUTYROLACTONE and gamma-HYDROXYBUTYRIC acid. *Biochem Pharmacol*. 1965;14:177-178.
  52. Möhler H, Patel A, Balazs R. Gamma-hydroxybutyrate degradation in the brain in vivo: negligible direct conversion to GABA. *J Neurochem*. 1976;27(1):253-258.
  53. Lee C. Evidence for the  $\beta$ -oxidation of orally administered 4-hydroxybutyrate in humans. *Biochem Med*. 1977;17(3):284-291.
  54. Gibson K, Hoffmann C, Hodson A, Bottiglieri T, Jakobs C. 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics*. 1998;29(01):14-22.
  55. Palomino-Schätzlein M, Wang Y, Brailsford AD, et al. Direct monitoring of exogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in body fluids by nmr spectroscopy. *Anal Chem*. 2017;89(16):8343-8350.
  56. Steuer AE, Raeber J, Steuer C, et al. Identification of new urinary gamma-hydroxybutyric acid markers applying untargeted metabolomics analysis following placebo-controlled administration to humans. *Drug Test Anal*. 2019;11(6):813-823.
  57. Fell V, Lee C, Pollitt R. The occurrence of (S)-3, 4-dihydroxybutyrate in human blood and urine. *Biochem Med*. 1975;13(1):40-45.
  58. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e73076.
  59. Zhou Y, Song R, Ma C, et al. Discovery and validation of potential urinary biomarkers for bladder cancer diagnosis using a pseudotargeted GC-MS metabolomics method. *Oncotarget*. 2017;8(13):20719-20728.
  60. Nordmann J, Nordmann R. Organic acids in blood and urine. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 1961;4:53-120.
  61. Asano K, Miyamoto I, Matsushita T, et al. Succinic acidemia: a new syndrome of organic acidemia associated with congenital lactic acidosis and decreased NADH-cytochrome c reductase activity. *Clin Chim Acta*. 1988;173(3):305-312.

**How to cite this article:** Jarsiah P, Roehrich J, Wyczynski M, Hess C. Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid—validated quantification using GC-MS and description of endogenous concentration ranges. *Drug Test Anal*. 2020;12:1135–1143. <https://doi.org/10.1002/dta.2820>

### 3.3 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode, speziell für die quantitative Detektion von GHB und GHB related acids (GA, SA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA) in Serum- und Urinproben entwickelt und voll validiert. Das Verfahren impliziert einen einfachen Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritt, gefolgt von einer Derivatisierung mit MSTFA und gaschromatographisch-massenspektrometrischer Detektion im single ion monitoring Modus. Die GHB-Isomere 2-Hydroxybutyrat, 3-Hydroxybutyrat und 3-Hydroxyisobutyrat wurden jedoch ebenfalls in das Verfahren einbezogen, um eine chromatographische Trennung der Isomere und keine Interferenz dieser Substanzen mit dem GHB-Nachweis zu erreichen.

Die Herstellung des Derivats hat den Vorteil der einfacheren Extraktion in organische Lösungsmittel und der besseren chromatographischen Trenneigenschaften mit scharfen Peaks und guter Linearität. Die Validierung zeigte eine Linearität aller Analyten im Bereich zwischen 1 – 20 mg/L. Die lineare Regression zeigte Korrelationskoeffizienten immer  $R^2 > 0,99$ . Die Impräzision und Bias der Methode betrug immer  $< 15\%$  (bei 2 mg/L und 17 mg/L) und entsprach der GTFCh Richtlinie. Das Verfahren zeigte Nachweisgrenzen von  $< 0,3$  mg/L und Bestimmungsgrenzen von  $< 1$  mg/L für alle Analyten. Die Stabilität der derivatisierten Analyten wurde über einen Zeitraum von 40 Stunden bestimmt. Die Abnahme der detektierten Peakflächen betrug für alle Analyten weniger als 10%.

Die Stabilität dieser Substanzen in Serum- oder Urinproben für forensische Studien könnte ein großes Problem sein, da alle Substanzen endogenen Ursprungs sind und bei einigen Analyten einige Wege zur Biosynthese oder zum Abbau führen können. Um die Stabilität und das Ausmaß der Variation der Analyten in Serum- und Urinproben zu bestimmen, wurden nach den anfänglichen Messungen der Proben die Parameter einen Monat nach der ersten Messung erneut gemessen. Die Stabilität von SA sowohl in Serum- als auch in Urinproben schien ein Problem zu sein, jedoch war die Stabilität aller anderen Analyten über einen Monat bei  $-20^{\circ}\text{C}$  akzeptabel.

Um die Anwendbarkeit des Verfahrens zu bestätigen und die endogenen Konzentrationen der Parameter in Humanserum und -urin zu bestimmen, wurden die Konzentrationen von GHB und GHB related acids durch die validierte Methode bei Freiwilligen (Serum: 55 Männer, 46 Frauen und Urin: 77 Männer, 55 Frauen) gemessen. Es wurde gezeigt, dass die endogenen Konzentrationen in Serumproben

von 101 Freiwilligen < 0.03 – 4.92 mg/L für GA, < 0.03 – 1.28 mg/L für GHB, < 0.28 – 18.1 mg/L für SA, < 0.12 – 1.38 mg/L für 2,4-OH-BA, and < 0.13 – 2.59 mg/L für 2,4-OH-BA betragen. Es wurde auch gezeigt, dass die endogenen Konzentrationen in Urinproben von 132 Freiwilligen 1,30 – 400 mg/L für GA, < 0,03 – 1,94 mg/L für GHB, 1,17 – 2,73 mg/L für SA, 0,72 – 26,2 mg/l für 2,4-OH-BA und 1,88 – 122 mg/L für 3,4-OH-BA betragen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine robuste validierte Methode zur Bestimmung der GHB und GHB related acids in Serum und Urin entwickelt wurde. Endogene Konzentrationsbereiche für diese Analyten in Urin und Serum wurden beschrieben.

## 4 GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results

### 4.1 Einleitung

Der Nachweis der Aufnahme von GHB oder eines seiner Vorläufer post mortem ist eine Herausforderung. Häufig verwendete Grenzwerte in Ante-Mortem-Proben - 4 mg/L für Serum und 10 mg/L für Urin - können nicht in Post-Mortem-Material verwendet werden (161). Die GHB-Konzentrationen können in Obduktionsproben ansteigen, insbesondere wenn den Proben kein Stabilisator wie NaF zugegeben wurde (114). Dementsprechend sind in der Post-Mortem-Toxikologie höhere Cut-off-Konzentrationen notwendig, um die falsche Schlussfolgerung zu vermeiden, dass eine Person während der unmittelbaren Ante-Mortem-Phase GHB aufgenommen hatte (32, 116).

Der häufig verwendete Grenzwert für GHB im peripheren Blut, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit nach dem Tod beträgt 30 mg/L (161). Für Herzblut ist ein höherer Grenzwert von 50 mg/L üblich. Die Konzentrationen von Leichen nach GHB-Exposition überschneiden sich üblicherweise jedoch mit Konzentrationen von Verstorbenen ohne GHB-Exposition. Um die post mortalen Ergebnisse besser beurteilen zu können wird einerseits empfohlen, die GHB-Konzentrationen aus mehreren biologischen Proben in die Interpretation einzubeziehen. Andererseits könnten für eine sicherere Diagnose einer GHB-Aufnahme post mortem auch andere Biomarker verwendet werden.

Ziel dieser Studie war es zu testen, ob die Bestimmung der Konzentrationen der GHB related acids in post mortem Femoralvenenblut (Serum) und Urin bei der Interpretation der post mortem Ergebnisse hilfreich sein könnte, ob es Unterschiede in Fällen mit und ohne GHB-Aufnahme vor dem Tod gibt und ob für diese Analyten eindeutige Grenzwerte empfohlen werden könnten.

Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen der GHB related acids in 103 Femoralvenenblutproben und 80 Urinproben von Verstorbenen, bei denen eine Aufnahme von GHB vor dem Tod ausgeschlossen werden konnte, quantifiziert. Desweiteren wurden 11 Todesfälle, bei denen laut Vorgeschichte GHB oder GBL in engem zeitlichen Zusammenhang zum Todeseintritt konsumiert wurden, untersucht, um herauszufinden, ob GHB related acids geeignete Biomarker zum Nachweis einer Aufnahme von GHB oder eines seiner Vorläufer sind.



Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Forschungsartikel im Journal Forensic Science International unter dem Titel „*GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results*“ veröffentlicht.



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/forsciint](http://www.elsevier.com/locate/forsciint)

## GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results



Pouria Jarsiah<sup>a,b</sup>, Theresa Kuetting<sup>c</sup>, Joerg Roehrich<sup>a</sup>, Tanja Germerott<sup>a</sup>, Daniela Remane<sup>d</sup>, Stefan W. Toennes<sup>e</sup>, Stefan Scholtis<sup>f</sup>, Franziska Krumbiegel<sup>g</sup>, Cornelius Hess<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany

<sup>b</sup> Special Laboratory, Medical Care Centers Dr. Eberhard & Partner, Dortmund, Germany

<sup>c</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University of Bonn, Germany

<sup>d</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University of Jena, Germany

<sup>e</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University of Frankfurt, Germany

<sup>f</sup> Governmental Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Forensic Toxicology, Berlin, Germany

<sup>g</sup> Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Forensic Toxicology, Charité - University Medicine Berlin, Berlin, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 2 October 2020

Available online 8 October 2020

#### Keywords:

Gamma hydroxy butyric acid

Metabolites

Post mortem

Endogenous

Hydroxylation

Glycolic acid

### ABSTRACT

Post mortem gamma hydroxy butyric acid (GHB) concentrations should be interpreted with caution since GHB concentrations can increase after death. Post mortem concentrations after the intake of GHB ante mortem do overlap with concentration ranges in cases without known exposure to GHB and make an interpretation challenging. GHB is known to undergo intensive metabolism to related acids (glycolic acid (GA), succinic acid (SA), 2,4- and 3,4-dihydroxy butyric acid (2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA)). GHB and these related acids were analyzed using a validated gas chromatographic mass spectrometric (GC-MS) method after liquid liquid extraction and trimethylsilylation. SA concentrations were not usable post mortem due to instability. Concentrations in cases without known exposure to GHB (urine: n = 80; femoral blood: n = 103) were: for GA 4.6–121 mg/L in urine and 1.6–11.2 mg/L in blood, for 2,4-OH-BA < LoD-25.3 mg/L in urine and < LoD-3.7 mg/L in blood and for 3,4-OH-BA < LoD-54.3 mg/L in urine and < LoD-5.3 mg/L in blood. In death cases involving GHB (n = 11) concentrations of GHB related acids were increased compared to these levels (for GA in 7/10 cases and up to 391 mg/L in urine, in 6/11 cases and up to 34 mg/L in blood; for 2,4-OH-BA in 9/10 cases and up to 144 mg/L in urine, in 11/11 cases and up to 9.1 mg/L in blood; for 3,4-OH-BA in 7/10 cases and up to 665 mg/L in urine, in 11/11 cases and up to 19 mg/L in blood). Therefore, the concentrations of these GHB related acids can aid in a more reliable differentiation of GHB exposure in post mortem toxicology. We recommend to add the analysis of 2,4-OH-BA, 3,4-OH-BA and GA in femoral blood for the diagnosis of a GHB intake post mortem. Post mortem femoral blood concentrations > 4 mg/L for 2,4-OH-BA, > 5 mg/L for 3,4-OH-BA and > 12 mg/L for GA give hints for a GHB intake.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

$\gamma$ -hydroxy butyric acid (GHB) is an endogenous substance also used in modern medicine. In the 60 s it was used as an anaesthetic, afterwards it has been used for the treatment of insomnia, symptoms of alcohol or opioid withdrawal or cerebrovascular diseases [1,2]. Recently, GHB is marketed under the product names Xyrem<sup>®</sup> or Somsanit<sup>®</sup> for the treatment of narcolepsy and cataplexy. In these patients, GHB modulates the sleep behaviour [3]. In addition, GHB is misused for several reasons: in

bodybuilders GHB stimulates the release of human growth factors [4]. Furthermore - dependant on the dosage - GHB is taken as a party drug (street name "Liquid Ecstasy") or knock out drug [5]. These different applications are due to dose dependent pharmacological effects [6]. Low doses up to 1.5 g lead to an euphoric condition and have an anxiolytic effect. Higher doses up to 2.5 g lead to an increase in mood, impulse and sexual activity while the intake of higher doses lead to a sudden deep sleep. The substance is given to numb the victim and to commit crimes like rape, criminal assaults or robbery but especially in cases of drug facilitated sexual assaults "(DFSA).

DFSA using GHB depicts a recent and stable phenomenon in all over Europe [7]. In studies about the prevalence of knock out drugs GHB plays a minor role (0.02% of the cases of Bosman et al. 2013 in

\* Corresponding author.

E-mail address: [hess@uni-mainz.de](mailto:hess@uni-mainz.de) (C. Hess).

the Netherlands [8]; 1.1% of the cases of Du Mont et al. in Canada [9]; 4.1% of the cases of ElSohly & Salamone 1999 in the United States (10)). However, due to the large offer of GHB and its precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4 butanediol (BD) in the internet and due to the short detection window of GHB compared to other substances used in DFSA, the dark figure is supposed to be much higher. Recently it has been shown that GBL almost totally replaced GHB in recreational settings. Busardo et al. always detected GBL in 30 illicit preparations generally sold as "G" [11].

The detection of the intake of GHB or one of its precursors post mortem is challenging. Commonly used cut-off values in ante mortem samples – 4 mg/L for serum and 10 mg/L for urine – cannot be used in post mortem material [12]. GHB concentrations can increase in post mortem samples, especially when samples are not stored with a preservative like sodium fluoride [13]. The commonly used cut-off value for GHB in post mortem peripheral blood is 30 mg/L. Andresen-Streichert et al. examined different body fluids from 64 autopsies in subjects with the cause of death excluding GHB exposure. The samples were stored immediately after autopsy and considering putrefaction a cut off value of 30 mg/L was recommended for peripheral blood, urine and cerebrospinal fluid [12]. For cardiac blood a higher cut-off value of 50 mg/L is common. However, concentrations of corpses after GHB exposure overlap

with concentrations of deceased without GHB exposure. Kintz et al. measured GHB concentrations in cardiac blood of 71 corpses excluding GHB consumption and showed concentrations in a range of 0.4–409 mg/L. Some samples without any history of GHB showed concentrations higher than the recommended cut-off values [14]. Therefore it is recommended to include GHB concentrations in several biological specimens in the interpretation.

For a safer diagnosis of a GHB intake post mortem, other biomarkers could also be used. GHB is quickly metabolized to succinic semialdehyde by gamma-hydroxybutyric acid-dehydrogenase and to succinic acid (SA), "a mediator of the citric acid cycle" by succinic semialdehyde dehydrogenase. It has also been observed that the levels of a number of alpha and beta metabolites of GHB increase after GHB consumption, such as 2,4-dihydroxybutyric acid (2,4-OH-BA), 3,4-dihydroxybutyric acid (3,4-OH-BA) or glycolic acid (GA) (see metabolism of GHB in Fig. 1) [15,16].

Aim of this study was to test if the determination of concentrations of these GHB related acids in post mortem femoral blood (serum) and urine could be helpful in the interpretation of post mortem results, if there were differences in cases with and without GHB intake before death and if clear cut offs could be recommended for these analytes.

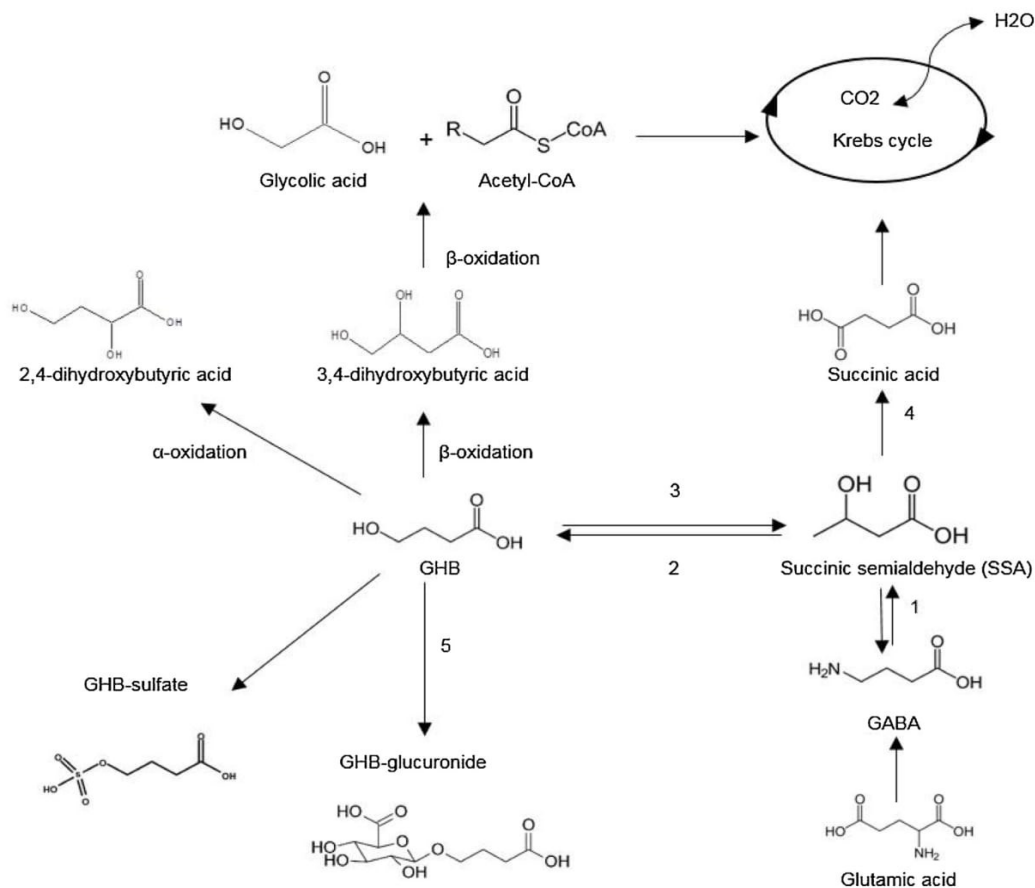


Fig. 1. Metabolism of GHB: 1 - GABA transaminase; 2 - Succinic semialdehyde reductase; 3 - GHB dehydrogenase; 4 - Succinic semialdehyde dehydrogenase; 5 - UPD-glucuronosyltransferase.

**Table 1**  
Case history and chemical toxicological findings of the death cases involving GHB.

Case No.	Case history	Chemical toxicological findings next to GHB	Post mortem interval (time between death and autopsy)
1	A woman (age: 32) was seen mixing alcohol with a cleaning liquid (later identified as GHB) in the early morning by her suitor. He woke up the early forenoon and found the woman with no life signs.	ethanol (2.8‰) tilidine (30 ng/mL) nortilidine (10 ng/mL) bisnortilidine (9 ng/mL) ibuprofen (positive, not quantified)	7 days
2	A man was known to be a drug consumer (cannabis, methamphetamine, GBL). When having consumed he was known to be very numbed and would easily lose consciousness. Once he was seen drugged walking against a driving car. He was found dead in a river. Cause of death was drowning.	methamphetamine (21 ng/mL) amphetamine (5 ng/mL) doxepin (27 ng/mL) nordoxepin (58 ng/mL)	3 days
3	A deceased (age: 36) was found naked on the floor of his hotel room. Underneath the corpse an USB-stick was found. On the right lower leg, a skin change suspected to be originated from a bite was detected. In a closed safe personal papers and a lot of cash was found. On the floor in front of the bathroom a penile ring, lubricant and a bottle of Super Rush "(Poppers) was found. Several glasses and bottles were found in the room including a clear liquid, later identified as GHB.	Methamphetamine (50 ng/mL) Sildenafil (130 ng/mL)	4 days
4	The deceased (age: 44) was found dead in his room by his brother. According to his brother he had regularly consumed liquid ecstasy since ten years. From time to time he tried to withdraw from GHB and sometimes ended up in delirium and had to be treated in intensive care units. In the room a bottle, later identified as GHB, was found.	cocaine not detectable benzoylecgonin (140 ng/mL) ecgoninmethylester (10 ng/mL)	7 days
9	The deceased (age: 41) was going to bed at 2 a.m. after having consumed alcohol with a friend. He was known to be an alcohol and drug user. In the early morning he was found dead by his friend.	ethanol (0.3‰) MDMA (510 ng/mL) MDA (20 ng/mL)	5 days
6	A 50 year old man was found dead. He was an alcoholic and had misused GBL. He had used GBL several times in the hours before death.	citalopram (70 ng/mL) doxepin (13 ng/mL) lamotrigine (8100 ng/mL) valproic acid (450 ng/mL)	6 days
7	A woman was known to be a drug consumer (methamphetamine, GBL). An emergency was called at 5 a. m. in the morning. The woman was found with a connected infusion (electrolyte solution which was nearly empty) and died in the ambulance vehicle.	methamphetamine (710 ng/mL) amphetamine (40 ng/mL) quetiapine and metabolite only detected in urine	2 days
8	A man was living in a psychiatric hospital in a single room. At 6 p.m. he was found dead on the floor in his room next to his wheelchair. The deceased was known to be a drug consumer with a suicide attempt in his personal history which had led to the paraplegia.	lamotrigin (4500 ng/mL) pregabalin (5700 ng/mL) ibuprofene (positive, not quantified)	6 days
9	The 31 year old deceased was found lifeless in a forest. Next to the deceased a backpack, an empty 1.5 L PET bottle and a plastic bottle (250 mL) filled with a clear liquid was found. During the autopsy a clear liquid was coming out of the mouth of the deceased.	blood ethanol 1.74‰	4 days
10	A 26 year old man was found lifeless in the flat of a friend in the morning hours. According to the friend, the deceased had been cheerful and confused several times in the days prior to his death. Three days before he had claimed that the president of the United States wanted to kill all homosexuals and he had to clean "Catwomans" house. He had to be hospitalized, however, was rapidly dismissed from the hospital. The friend had seen him the day before his death at 11.50 p.m. for the last time. In the night, at about 3.30 p.m. the friend had heard him snoring. The friend also stated that the deceased had consumed GBL prior to his death.	metamizole metabolite (positive, not quantified) paracetamol (positive, not quantified)	1 day
11	A 27 year old man was found cramping on the footway. A bottle of the cleaning agent Magic Cleaner "(GBL) was found next to the man. When the emergency physician arrived, the man was comatose. He was brought to a hospital where he died. A metabolic acidosis, an acute renal failure, a coagulopathia and heart rhythm disturbances were shown. According to witnesses, the deceased regularly took GHB. At the day of his death he had also consumed speed and ketamine.	fentanyl (3 ng/mL), norfentanyl not detectable cocaine (10 ng/mL) benzoylecgonin (220 ng/mL) ecgoninmethylester (40 ng/mL) cocaethylen (7 ng/mL) lidocaine (30 ng/mL) amphetamine (70 ng/mL) MDMA (5 ng/mL) ketamine (1900 ng/mL) norketamine (900 ng/mL)	8 days



## 2. Materials and methods

### 2.1. Analytical method

The used validated gas chromatographic mass spectrometric method for the quantification of GHB and its related acids 2,4-OH-BA, 3,4-OH-BA, SA and GA was published elsewhere [17]. Briefly, 0.5 mL of (serum from) femoral blood or urine was liquid liquid extracted with ethyl acetate and derivatized with *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA). The extract was separated using a capillary column TG-5SILMS (30m\*0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) on a 7890A GC (Agilent, USA) and detected using a MSD 5975 C mass spectrometer operated in single ion monitoring mode (Agilent, USA). Validation parameters in serum and urine were as follows: Limits of detection were 0.12 mg/L for 2,4-OH-BA, 0.13 mg/L for 3,4-OH-BA, 0.03 mg/L for GHB, 0.28 mg/L for SA and 0.19 mg/L for GA. Limits of quantification (LoQ) were 0.39 mg/L for 2,4-OH-BA, 0.42 mg/L for 3,4-OH-BA, 0.11 mg/L for GHB, 0.98 mg/L for SA and 0.63 mg/L for GA. Linearity of calibration was given from the LoQ up to 20 mg/L. Due to the fact that in post mortem material some deceased showed higher concentrations than the calibration range, these samples were diluted with water before analysis and measured again to fit into the calibration range. To show the validity of measuring post mortem material real femoral blood samples were spiked to reach final concentrations of 2 mg/L, 12 mg/L and 17 mg/L. Precision data of these samples (each 2 measurements at 8 consecutive days) showed an imprecision of maximum 9.2%. With the use of this analytical method endogenous levels of all analytes in serum and urine of living had been determined in a previous study [17].

### 2.2. Stability of post mortem concentrations of the analytes in blood and urine

Femoral blood and urine of 3 deceased without known exposure to GHB prior to death were taken at autopsy, aliquoted and extracted and measured directly and 1 day (1d), 7d, 14d and 28d after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Stability of the extracts

3 urine samples and 3 femoral blood samples were extracted according to the above described protocol and the extracts were

directly measured. One week later the same extracts were re-measured after storage at  $4^{\circ}\text{C}$ . Furthermore the extracts were re-measured 12 h and 24 h after storage in the autosampler at room temperature.

### 2.4. Samples of deceased without known exposure to GHB

Femoral blood samples were taken from 103 deceased, urine was taken from 80 deceased at autopsy. None of the cases had any history of GHB intake prior to death, therefore it was assumed that these were cases without GHB exposure. Mean post mortem interval was 4.6 days and 4.8 days for blood and urine samples, respectively (range 1–10 days for blood and urine samples, one deceased with a post mortem interval of 55 days and exhumation did not show noticeable results). Mean age of the deceased was 59.1 years and 58.6 years for blood and urine samples, respectively (range 1–96 years for blood and urine samples). All of the samples were analyzed by the above described method. No preservative was used to stabilize the samples.

### 2.5. Death cases involving GHB

11 death cases (mean post mortem interval 4.8 days) involving GHB consumption prior to death were analyzed by the described method. The involvement of GHB or GBL in these cases was identified by the case history (see Table 1) and additionally femoral blood (serum) concentrations of GHB > 50 mg/L. The cases are described in detail in Table 1. In some cases (cases 1, 3–6 and 8–11) femoral blood was centrifuged directly after the autopsy to receive serum. In some cases whole blood from the femoral vein was available (cases 2 and 7). In all of the cases but case 11 an additional urine sample was available.

## 3. Results

The used gas chromatographic mass spectrometric method was also applicable to post mortem material. Stability in the extracts of post mortem femoral blood or urine was given over the examined time interval. With the use of 3 fresh femoral blood and 3 urine samples it could be shown that mean concentrations of GHB, 2,4-OH-BA, 3,4-OH-BA and GA slightly decreased within the time interval of one month, however showed no decrease of concentrations > 20% when storing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Therefore the analytes were considered to be stable. As we had already shown in ante mortem

**Table 2**

Concentrations of GHB related acids detected in femoral blood samples of the cases without known GHB exposure ( $n = 103$ ) and in the 11 death cases involving GHB intake with increasing GHB blood concentration. Arrow(s): concentration higher than the maximum within the cases without known GHB exposure including (↑) and excluding outliers (↑).

Case no.	matrix	GHB [mg/L]	GA [mg/L]	SA [mg/L]	2,4-OH-BA [mg/L]	3,4-OH-BA [mg/L]	
Cases without known exposure to GHB	Minimum	2.6	1.6	52.2	< LoD	< LoD	
	Maximum	74.5	11.2	3405	3.7	5.3	
	Median	11.2	3.4	214	3.2	< LoD	
	Mean value	15.3	3.7	303	2.0	0.7	
	Standard deviation	13.3	1.2	397	1.5	1.7	
Positive cases	1	Serum from femoral blood	198 (↑)	5.4	1412	33.2 (↑)	8.0 (↑)
	2	Femoral blood	264 (↑)	5.5	344	5.4 (↑)	14.7 (↑)
	3	Serum from femoral blood	394 (↑)	8.2	839	79.9 (↑)	15 (↑)
	4	Serum from femoral blood	679 (↑)	23.2 (↑)	940	8.3 (↑)	16.1 (↑)
	5	Serum from femoral blood	973 (↑)	11.3 (↑)	431	35.3 (↑)	13.1 (↑)
	6	Serum from femoral blood	978 (↑)	15.4 (↑)	1429	10.1 (↑)	19.4 (↑)
	7	Femoral blood	979 (↑)	34.2 (↑)	105	4.0 (↑)	13.2 (↑)
	8	Serum from femoral blood	1204 (↑)	6.1	283	7.1 (↑)	7.9 (↑)
	9	Serum from femoral blood	1355 (↑)	5.3	405	4.2 (↑)	7.0 (↑)
	10	Serum from femoral blood	1359 (↑)	19.4 (↑)	757	5.5 (↑)	11.3 (↑)
	11	Serum from femoral blood	1850 (↑)	14.2 (↑)	697	25.5 (↑)	11.7 (↑)

material [17] mean SA concentrations decreased up to 58.7% already 7 days after autopsy.

3.1. Blood results

The femoral blood concentrations detected in the cases without known exposure to GHB are shown in Table 2. GHB concentrations in 6 of the 103 femoral blood samples of deceased without known GHB exposure were > 30 mg/L (74.5 mg/L, 44.5 mg/L, 46.6 mg/L, 68.6 mg/L, 66.4 mg/L and 72.1 mg/L). The concentrations of GHB and its related acids in blood within samples of the GHB intoxication cases 1–11 are also shown in Table 2. Fig. 2a shows boxplots of the concentrations of SA in femoral blood (serum), Fig. 2b of GA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA in femoral blood (serum).

3.2. Urine results

The urinary concentrations detected in the deceased without known exposure to GHB are shown in Table 3. GHB concentrations

in 3 of the 80 urine samples of the cases without known GHB exposure were > 50 mg/L (57.4 mg/L, 64.7 mg/L and 55.8 mg/L). The concentrations of GHB and its related acids in urine of samples of the GHB intoxication cases 1–10 are also shown in Table 3. Fig. 3 shows boxplots of the GHB related acids in urine.

4. Discussion

Post mortem concentrations of GHB and its related acids were described to see if these metabolites could be useful biomarkers for an improved post mortem diagnosis of a GHB intake.

Advanced putrefaction and sample storage must be considered with interpretation of GHB concentrations alone determined in biological specimens post mortem. These factors can induce increased concentrations in post mortem samples. The results from Busardò et al. showed that the post mortem interval strongly affects the post mortem production of GHB and should therefore also affect metabolite production [18]. In our study, post mortem intervals of both examined subgroups did not differ. Another

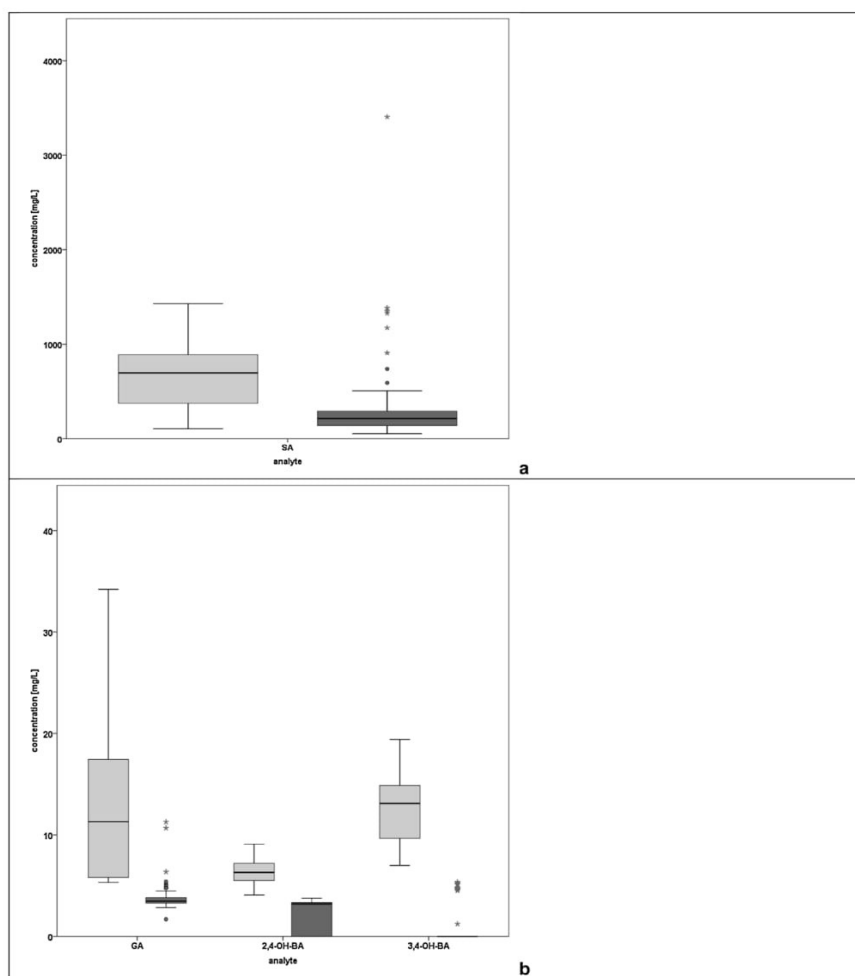
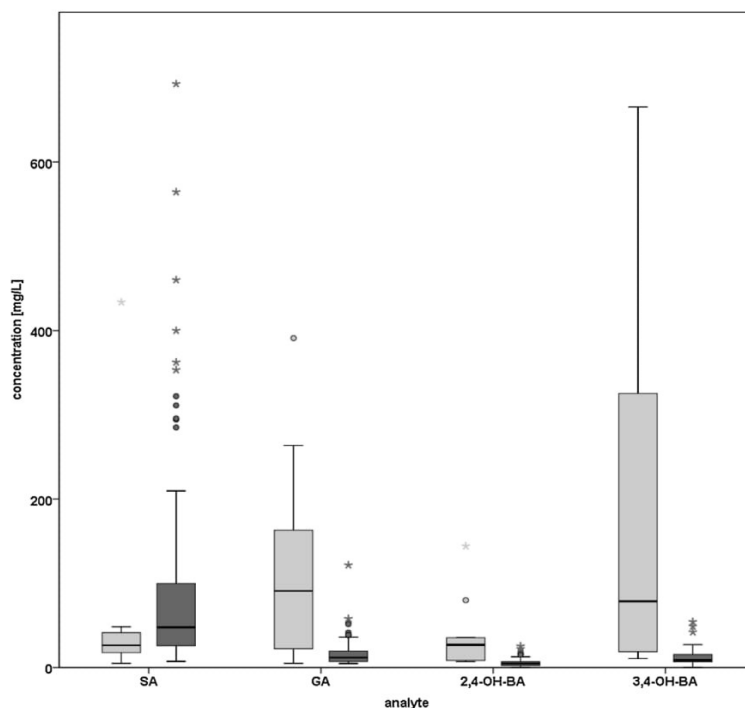


Fig. 2. Boxplots of concentrations of GHB related acids (Fig. 2a: SA, Fig. 2b: GA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA) detected in femoral blood (serum) samples of the cases without known exposure to GHB (n = 103; dark colour) and in the death cases involving GHB intake (n = 11, light colour). Horizontal lines show the median concentrations. Whiskers represent all samples within median ± 1.5 times the interquartile range (box). Outliers with ratios outside of median ± 1.5 times the interquartile range are shown as circles (o), extreme values greater than ± 3.0 times the interquartile are shown as stars (\*).

**Table 3**

Concentrations of GHB related acids detected in urine samples of the cases without known GHB exposure (n = 80) and in the death cases involving GHB intake. (†): concentration higher than the maximum within the cases without known GHB exposure including (††) and excluding outliers (†). In case 11 no urine sample was available.

Case no.	matrix	GHB [mg/L]	GA [mg/L]	SA [mg/L]	2,4-OH-BA [mg/L]	3,4-OH-BA [mg/L]
Cases without known exposure to GHB						
	Minimum	< LoD	4.6	7.3	< LoD	< LoD
	Maximum	64.7	121	692	25.3	54.3
	Median	7.4	11.8	47.7	4.5	8.8
	Mean value	10.2	17.2	101	5.5	12.0
	Standard deviation	11.5	16.7	133	4.8	9.3
Positive cases						
1	Urine	79 (††)	12.2	433 (†)	9.9 (†)	10.5
2	Urine	463 (††)	92.2 (†)	17.7	144 (††)	665 (††)
3	Urine	2337 (††)	263 (††)	12.4	26.2 (††)	325 (††)
4	Urine	2442 (††)	391 (††)	41.2	79.9 (††)	446 (††)
5	Urine	1412 (††)	70.8 (†)	48.8	10.1 (†)	51.9 (†)
6	Urine	2084 (††)	96.9 (†)	32.1	25.5 (††)	105 (††)
7	Urine	3506 (††)	163 (††)	22.2	33.2 (††)	123 (††)
8	Urine	41	4.8	4.8	8.3 (†)	12.9
9	Urine	778 (††)	22.2	28.7	6.8	18.8
10	Urine	5656 (††)	89.2 (†)	23.9	28.1 (††)	48.9 (†)



**Fig. 3.** Boxplots of concentrations of GHB related acids detected in urine samples of the cases without known exposure to GHB (n = 80; dark colour) and in the death cases involving GHB intake (n = 10, light colour). Horizontal lines show the median concentrations. Whiskers represent all samples within median  $\pm$  1.5 times the interquartile range (box). Outliers with ratios outside of median  $\pm$  1.5 times the interquartile range are shown as circles (o), extreme values greater than  $\pm$  3.0 times the interquartile are shown as stars (\*).

influence could be storage temperature, however, the difference in GHB concentrations after storage at 20 °C compared to -20 °C was not statistically in a recent study [18]. A storage at -20 °C is recommended [18], therefore the samples in our study were stored at -20 °C until analysis. Furthermore, in the herein measured cases no preservative was added, although of a preservative was shown to stabilize post mortem GHB concentrations [13].

A number of reasons for an increase in GHB concentrations have been discussed. Moriya and Hashimoto stored blood samples from 43 autopsies without GHB intake under different conditions (4 °C and -20 °C) with and without preservation, and found out that a large portion of endogenous GHB might be produced in the body between death and autopsy rather than during samples 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 or from endogenous 1,4- butanediol levels [20,21]. Furthermore, rising GHB concentrations could originate from decreased activity of the citric acid cycle after death and the shuttling of some succinic semialdehyde arising from GABA transamination to GHB [22]. Roth et al. proposed that synthesis of new GHB mainly occurs in anorexic tissues [23]. Using only 3 femoral blood and 3 urine samples in this study we could not show an increase of post mortem GHB concentrations during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a month, concentrations were quite stable.

#### 4.1. Post mortem GHB concentrations

Our study confirmed former studies on post mortem GHB concentrations. These were 2.6–74.5 mg/L in femoral blood ( $n = 103$ ) and  $< \text{LoD} - 64.7$  mg/L in urine ( $n = 80$ ). There were some blood as well as urine samples which showed higher concentrations than the usually used cut offs 30 mg/L for femoral blood and 50 mg/L for urine [12]. This again shows that concentrations are overlapping and an interpretation based on GHB concentrations alone can be difficult. In these cases, the observation of only post mortem blood or urine concentrations would have led to the assumption that GHB was taken (because concentrations were higher than the recently used cut offs). Andresen-Streichert et al. had recommended to analyze GHB concentrations in various matrices to assure the intake of GHB in post mortem material [12]. Another possibility could be the additional analysis of further metabolites or GHB related acids.

#### 4.2. GHB phase II metabolites post mortem

Besides the acids determined within this study, phase II metabolites of GHB have been described starting with GHB- $\beta$ -O-glucuronide (GHB-gluc) in 2013 [24,25]. Two years later the sulfoconjugated analog was also described and, in 2016, characterized as GHB-4-sulfate (GHB-sulf) [26,27]. These conjugates have seldomly been examined in cases involving GHB intake post mortem. In one case presented by Busardo et al. [28], post-mortem urinary GHB concentration was two orders of magnitude higher than the cut-off used by Busardo et al. (10 mg/L). GHB-Gluc was quantified at 0.55 mg/L. Although the GHB concentration was higher than the proposed cut-off level for discrimination between endogenous production and exogenous intake, GHB-Gluc concentration was within the endogenous range presented by Busardo et al. In a study with the controlled intake of up to 9 g GHB we had shown that GHB-gluc and GHB-sulf were not suitable tools for the extension of the detection window [28–30]. The stability of these substances also seems to be a problem [25]. Therefore both phase II metabolites are not expected to provide additional diagnostic information with regard to GHB exposure post mortem.

#### 4.3. GHB related acids post mortem

Some acids have been described to be part of GHB metabolism. The incorporation into succinic acid (SA) of label from  $[1-^{14}\text{C}]$ - and  $[4-^{14}\text{C}]$ -GHB given intravenously or intraperitoneally to rats and cats was shown to account for a small proportion of the metabolized compound [31,32]. Walkenstein and co-workers [31] proposed a  $\beta$ -oxidative pathway for GHB. However, Möhler et al. afterwards demonstrated that the labeling pattern in mouse brain after an intravenous injection of  $[1-^{14}\text{C}]$ -GHB could be explained by oxidation of GHB via succinate, but not by  $\beta$ -oxidation [33]. This did not rule out  $\beta$ -oxidation in other organs and Lee et al. could show that 3,4-OH-BA is an intermediate within the

$\beta$ -oxidation of GHB [15]. Lee et al. also gave 1 g of GBL to four healthy patients which led to substantial increases in urinary 3,4-OH-BA concentrations in all subjects. 4-hydroxy-3-oxobutyrate was supposed to be a transient intermediate [15]. A metabolite representing  $\alpha$ -oxidation of GHB (2,4-OH-BA) have also been found increased, however, to a lower amount, in patients suffering from enzyme deficits and having higher endogenous GHB concentrations [34]. Next to an increase in these substances Lee et al. [15] had also shown an increase in GA, a further product of the  $\beta$ -oxidation of 3,4-OH-BA, in patients after the intake of GBL. This was confirmed by other studies [35].

Those GHB related acids could be potential target analytes to examine a GHB intake. Palomino-Schätzlein et al. [36] searched for metabolites associated with GHB consumption using a metabolomics approach by NMR spectroscopy. Results showed that concentrations of GA and SA increased 1 h after drug ingestion. 12 volunteers took 25 mg GHB/kg body weight. While GHB and SA concentrations dropped rapidly to an endogenous level (at the time point of 6 h after the intake) which was, however, not quantified exactly, GA concentrations decreased much slower, and even after 24 h, a small difference could be observed compared to  $t_0$  levels. Steuer et al. conducted a randomized, placebo-controlled, crossover study in 20 healthy male volunteers which took GHB. Urine samples obtained 4.5 h post-administration were submitted to untargeted quadrupole time of flight mass spectrometry analysis to identify possible new markers of GHB intake. Next to the detection of conjugates of amino acids both with GHB and SA, GA concentrations were significantly increased in the GHB group. However, again this was only a metabolomics approach without exact quantification [37].

Therefore we had decided to develop and validate a method for the quantification of GHB, SA, GA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA in blood and urine [17] and to determine if these acids could help in the interpretation of post mortem results. Post mortem concentrations of the determined acids were generally higher ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney-U-test) for all determined acids and in both matrices than the ante mortem reference concentrations determined in a former study [17].

We had shown that SA concentrations were not stable in ante mortem material [17]. Since SA concentrations additionally seem to increase enormously after death like GHB concentrations do and regarding the instability aspect of SA, we had already suspected that analysis on SA concentrations would not be a helpful tool in post mortem interpretation of GHB results. In none of the cases in which GHB contributed to the cause of death SA concentrations higher than the post mortem subgroup without known GHB exposure – neither in blood nor in urine – could be detected. Therefore SA is supposed not to be a helpful biomarker to detect GHB intoxications.

In contrast, analysis on GA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA mainly in blood samples post mortem can give an additional benefit. In 6 of the 11 measured femoral blood samples and in 7 of 10 urine samples from deceased due to GHB intoxication GA concentrations higher than the maximum of the cases without exposure to GHB were detected (excluding outliers). We had shown that beta hydroxylation to 3,4-OH-BA is preferred over alpha hydroxylation to 2,4-OH-BA [17]. In all of the 11 cases with a history of GHB use femoral blood concentrations of both 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA were higher than the maximum of the cases without known GHB exposure. In urine, 9 of 10 cases (for 2,4-OH-BA) and 7 of 10 cases (for 3,4-OH-BA) showed higher concentrations than the maximum of the cases without known GHB exposure (excluding outliers). Therefore – additionally to the analysis of GHB and to increased GHB concentrations in several matrices post mortem – we recommend to add the results of the analysis of 2,4-OH-BA, 3,4-OH-BA and GA in femoral blood into the interpretation of



suspected GHB intoxication cases post mortem. Femoral blood concentrations > 4 mg/L for 2,4-OH-BA, > 5 mg/L for 3,4-OH-BA (both with sensitivities of 100% in the herein examined collective) and > 12 mg/L for GA give hints for a GHB intake. Our data on urine analysis on these analytes and the comparison of data from living people to data from deceased show that urinary concentrations might not be as valuable as blood concentrations are. Urinary concentrations might be more valuable when referring to creatinine. However, since recommended cut-offs for GHB in the living [12] do not refer to creatinine concentrations and it has not been shown that creatinine is a good reference for post mortem material, we decided to not integrate creatinine into the results of this study. Nevertheless, urinary results of post mortem GA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA analysis could also help in the diagnosis.

## 5. Conclusion

Herein we presented post mortem concentrations of GHB related acids in cases without known exposure to GHB and concentrations in 11 cases with a history of GHB use prior to death. Preliminary results of these analytes show that especially analysis of hydroxy metabolites of GHB, but also analysis on glycolic acid can help in the interpretation of GHB results post mortem. We recommend to add the analysis of 2,4-OH-BA, 3,4-OH-BA and GA in femoral blood for the diagnosis of a GHB intoxication post mortem. Femoral blood concentrations > 4 mg/L for 2,4-OH-BA, > 5 mg/L for 3,4-OH-BA and > 12 mg/L for GA give hints for a GHB intoxication.

## CRedit authorship contribution statement

**Pouria Jarsiah:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Theresa Kuetting:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing - original draft. **Joerg Roehrich:** Data curation, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Tanja Germerott:** Data curation, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing - original draft. **Daniela Remane:** Data curation, Visualization, Writing - original draft. **Stefan W. Toennes:** Data curation, Visualization, Writing - original draft. **Stefan Scholtis:** Data curation, Visualization, Writing - original draft. **Franziska Krumbiegel:** Data curation, Visualization, Writing - original draft. **Cornelius Hess:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

## Declaration of Competing Interest

None.

## References

- L.K. Sørensen, J.B. Hasselstrøm, 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 (1-3) (2012) 352–359.
- L. Gallimberti, N. Gentile, M. Cibin, F. Fadda, G. Canton, M. Ferri, et al., Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome, *Lancet* 334 (8666) (1989) 787–789.
- G. Lammers, J. Arends, A. Declerck, M. Ferrari, G. Schouwink, J. Troost, Gamma-hydroxybutyrate and narcolepsy: a double-blind placebo-controlled study, *Sleep* 16 (3) (1993) 216–220.
- J. Takahara, S. Yunoki, W. Yakushiji, J. Yamauchi, Y. Yamane, T. Ofuji, Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44 (5) (1977) 1014–1017.
- P. Kam, F. Yoong, Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug, *Anaesthesia* 53 (12) (1998) 1195–1198.
- S. Abanades, M. Farre, M. Segura, S. Pichini, D. Barral, R. Pacifici, et al.,  $\gamma$ -Hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074 (1) (2006) 559–576.
- F. Sjöqvist, M. Garle, A. Rane, Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society, *Lancet* 371 (9627) (2008) 1872–1882.
- I.J. Bosman, M. Verschraagen, K.J. Lusthof, Toxicological findings in cases of sexual assault in the Netherlands, *J. Forensic Sci.* 56 (6) (2011) 1562–1568.
- J. Du Mont, S. Macdonald, N. Rotbard, D. Bainbridge, E. Asllani, N. Smith, et al., Drug-facilitated sexual assault in Ontario, Canada: toxicological and DNA findings, *J. Forensic Leg. Med.* 17 (6) (2010) 333–338.
- M.A. Elsohly, S. Salamone, Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault, *J. Anal. Toxicol.* 23 (3) (1999) 141–146.
- F.P. Busardò, M. Gottardi, A. Tini, A. Minutillo, A. Sirignano, E. Marinelli, S. Zaami, Replacing GHB with GBL in recreational settings: a new trend in Chemsex, *Curr. Drug Metab.* 19 (13) (2018) 1080–1085.
- H. Andresen-Streichert, P. Jensen, J. Kietzerow, M. Schrot, N. Wilke, E. Vettorazzi, et al., 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.
- K. Beřanková, K. Mutnanská, M. Balíková, Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine, *Forensic Sci. Int.* 161 (2-3) (2006) 158–162.
- 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.
- C. Lee, Evidence for the  $\beta$ -oxidation of orally administered 4-hydroxybutyrate in humans, *Biochem. Med.* 17 (3) (1977) 284–291.
- K. Gibson, C. Hoffmann, A. 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 (01) (1998) 14–22.
- P. Jarsiah, J. Roehrich, M. Wyczynski, C. Hess, Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid-validated quantification by GC-MS and description of endogenous concentration ranges, *Drug Test. Anal.* (2020).
- 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.
- F. Moriya, Y. Hashimoto, Endogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid levels in postmortem blood, *Leg. Med.* 6 (1) (2004) 47–51.
- O.C. Snead III, 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 (23) (1982) 3917–3923.
- Z. Zdrojewicz, M. Lachowski, The importance of putrescine in the human body, *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 68 (2014) 393–403.
- J. Doherty, S. Hattox, O.C. Snead, R. 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 (1) (1978) 130–139.
- R.H. Roth, Formation and regional distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in mammalian brain, *Biochem. Pharmacol.* 19 (12) (1970) 3013–3019.
- 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 (5) (2013) 291–297.
- 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 (1) (2013) 641–646.
- L.-M. Mehling, T. Piper, J. Dib, D.S. Pedersen, B. Madea, C. Hess, et al., Development and validation of a HPLC-QTOF-MS method for the determination of GHB- $\beta$ -O-glucuronide and GHB-4-sulfate in plasma and urine, *Forensic Toxicol.* 35 (1) (2017) 77–85.
- 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.
- 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, precursors and metabolites in different specimens: application to clinical and forensic cases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137 (2017) 123–131.
- L.-M. Mehling, T. Piper, A. Spottke, A. Heidbreder, P. Young, B. Madea, et al., GHB- $\beta$ -O-glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake, *Forensic Toxicol.* 35 (2) (2017) 263–274.
- T. Piper, L.-M. Mehling, A. Spottke, A. Heidbreder, P. Young, B. Madea, et al., Potential of GHB phase-II-metabolites to complement current approaches in GHB post administration detection, *Forensic Sci. Int.* 279 (2017) 157–164.
- S.S. Walkenstein, R. Wiser, C. Gudmundsen, H. Kimmel, Metabolism of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* 86 (3) (1964) 640–642.

- [32] R.H. Roth, N.J. Giarman, Preliminary report on the metabolism of gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid, *Biochem. Pharmacol.* 14 (1965) 177.
- [33] H. Möhler, A. Patel, R. Balazs, Gamma-hydroxybutyrate degradation in the brain in vivo: negligible direct conversion to GABA, *J. Neurochem.* 27 (1) (1976) 253–258.
- [34] G. Brown, C. Cromby, N. Manning, R. Pollitt, Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of  $\alpha$ -oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation, *J. Inherit. Metab. Dis.* 10 (4) (1987) 367–375.
- [35] 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.
- [36] M. Palomino-Schätzlein, Y. Wang, A.D. Brailsford, T. Parella, D.A. Cowan, C. Legido-Quigley, M. P'rez-Trujillo, Direct monitoring of exogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in body fluids by NMR spectroscopy, *Anal. Chem.* 89 (16) (2017) 8343–8350.
- [37] A.E. Steuer, J. Raeber, C. Steuer, M.I. Boxler, D.A. Dornbierer, O.G. Bosch, et al., Identification of new urinary gamma-hydroxybutyric acid markers applying untargeted metabolomics analysis following placebo-controlled administration to humans, *Drug Test. Anal.* 11 (6) (2019) 813–823.

### 4.3 Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir post mortem Konzentrationen von GHB related acids in Fällen ohne bekannte GHB-Exposition im Vergleich zu 11 Fällen mit einer Vorgeschichte von GHB-Konsum vor dem Tod vorgestellt.

Einige Validierungsparameter wurden auch für post mortem Material untersucht. Die Stabilität in den Extrakten von post mortem Femoralvenenblut und Urin war über das untersuchte Zeitintervall gegeben. Es zeigte sich keine Abnahme der Konzentrationen > 20% bei Lagerung bei -20 °C, mit Ausnahme von SA (58,7%, 7 Tage nach der Autopsie). Daher wurden die weiteren Analyte als stabil angesehen.

Von 103 Verstorbenen wurde Oberschenkelblut entnommen, von 80 Verstorbenen wurde bei der Autopsie Urin entnommen. Keiner der Fälle hatte vor dem Tod eine GHB-Aufnahme in der Vorgeschichte, daher wurde angenommen, dass es sich um Fälle ohne GHB-Exposition handelte. Das mittlere Post-Mortem-Intervall betrug 4,6 Tage und 4,8 Tage für Blut- bzw. Urinproben (Bereich 1 - 55 Tage für Blut- und Urinproben). Das Durchschnittsalter der Verstorbenen betrug 59,1 Jahre für Blutproben und 58,6 Jahre für Urinproben (Bereich 1 - 96 Jahre für Blut- und Urinproben). Zur Stabilisierung der Proben wurde kein Stabilisator verwendet. Die Konzentrationen in Fällen ohne bekannte GHB-Exposition betragen: für GHB < LoD – 64,7 mg/L im Urin und 2,6 – 74,5 mg/L im Blut, für GA 4,6 – 121 mg/L im Urin und 1,6 – 11,2 mg/L im Blut für 2,4-OH-BA < LoD - 25,3 mg/L im Urin und < LoD - 3,7 mg/L im Blut und für 3,4-OH-BA < LoD - 54,3 mg/L im Urin und < LoD - 5,3 mg/L im Blut.

Desweiteren wurden 11 Todesfälle (mittleres Post-Mortem-Intervall 4,8 Tage) mit GHB-Aufnahme vor dem Tod nach der beschriebenen Methode analysiert. Die Beteiligung von GHB oder GBL in diesen Fällen wurde anhand der Anamnese und zusätzlich der Konzentrationen von GHB im Oberschenkelblut (Serum) von > 50 mg/L identifiziert. In diesen Fällen waren die Konzentrationen von GHB related acids im Vergleich zu den Fällen ohne bekannte GHB-Exposition erhöht.

GA war in 6 von 11 Fällen in Serum (in Fall 7 bis zu 34 mg/L) und in 7 von 10 Fällen in Urin (in Fall 4 bis zu 391 mg/L) erhöht (höher als das Maximum der Referenzpopulation). 2,4-OH-BA war in 11 von 11 Fällen in Serum (in Fall 3 bis zu 79,9 mg/L) und in 9 von 10 Fällen in Urin (in Fall 2 bis zu 144 mg/L) erhöht (höher als das Maximum der Referenzpopulation). 3,4-OH-BA war in 11 von 11 Fällen in Serum (in Fall 6 bis zu 19 mg/L) und in 7 von 10 Fällen in Urin (in Fall 2 bis zu 665 mg/L)

erhöht (höher als das Maximum der Referenzpopulation). In keinem der Fälle, in denen GHB zur Todesursache beitrug, konnten SA Konzentrationen über der Post Mortem Referenzpopulation - weder im Blut noch im Urin - nachgewiesen werden. Daher scheint SA kein hilfreicher Biomarker zum Nachweis von GHB-Vergiftungen zu sein.

Zusammenfassend konnten die Untersuchungen zeigen, dass insbesondere die Analyse von hydroxylierten Metaboliten von GHB, aber auch die Analyse von GA bei der Interpretation der GHB-Ergebnisse post mortem hilfreich sein kann. Wir empfehlen, die Analyse von 2,4-OH-BA, 3,4-OH-BA und GA im Oberschenkelblut für die Diagnose einer GHB-Intoxikation nach dem Tod ergänzend zu einer GHB-Quantifizierung in mehreren Körperflüssigkeiten. Oberschenkelblut mit den Konzentrationen > 4 mg/L für 2,4-OH-BA, > 5 mg/L für 3,4-OH-BA und > 12 mg/L für GA geben Hinweise auf eine GHB-Aufnahme vor dem Tod.

## 5 GHB related acids are useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases

### 5.1 Einleitung

Wir hatten gezeigt, dass GHB related acids wie GA, 3,4-OH-BA und 2,4-OH-BA bei der Interpretation von Post-Mortem-Ergebnissen bei GHB-Vergiftungen hilfreich sein können (161). Weiterhin nahmen Konzentrationen dieser Analyten nach Einnahme relativ niedriger GHB-Dosen zu und zeigten ein Nachweisfenster, das teilweise länger war als das Nachweisfenster der Muttersubstanz (162).

In dieser Studie wollten wir herausfinden, ob GHB related acids geeignete Biomarker zum Nachweis einer Aufnahme von GHB oder eines seiner Vorläufer sind und ob die zusätzliche Analyse von GHB related acids im Vergleich zur Analyse von GHB in der täglichen forensisch-toxikologischen Fallarbeit zusätzlichen Nutzen bietet.

Zu diesem Zweck wurden (a) GHB-positive Proben und (b) Fälle mit Verdacht auf Drug Facilitated sexual assaults sowie negativen GHB-Ergebnissen aus der routinemäßigen Fallarbeit, auf GHB related acids getestet.

GHB related acids (einschließlich GA, SA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA) wurden in insgesamt 17 Fällen, in denen durch eine erhöhte GHB-Konzentration ( $>4$  mg GHB/L im Serum oder  $>10$  mg GHB/L im Urin) eine GHB-Aufnahme nachgewiesen worden war, quantifiziert. In 7 Fällen stand nur Urin, in 10 Fällen nur Serum zur Verfügung. Um das Potenzial organischer Säuren als geeignete Biomarker (wenn der GHB-Spiegel selbst bereits im endogenen Bereich liegt) zu untersuchen, wurden daneben in 40 Fällen, bei denen aufgrund der Vorgeschichte zumindest der Verdacht auf eine DFC bestand, aber ein negatives GHB-Ergebnis vorlag (GHB-Werte im endogenen Bereich:  $<4$  mg GHB/L im Serum bzw.  $<10$  mg GHB/L im Urin), die GHB related acids quantifiziert. In 19 Fällen stand nur Urin, in 21 Fällen nur Serum zur Verfügung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Forschungsartikel im Journal Forensic Science International unter dem Titel „*GHB related acids are useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases*“ veröffentlicht.





Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/forsciint](http://www.elsevier.com/locate/forsciint)

## GHB related acids are useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases



Pouria Jarsiah<sup>a,b</sup>, Joerg Roehrich<sup>a</sup>, Theresa Kuetting<sup>c</sup>, Walter Martz<sup>d</sup>, Cornelius Hess<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany

<sup>b</sup> Special Laboratory, Medical Care Centers Dr. Eberhard & Partner, Dortmund, Germany

<sup>c</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University of Bonn, Germany

<sup>d</sup> Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, University of Gießen, Gießen, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 January 2021

Received in revised form 7 May 2021

Accepted 11 May 2021

Available online 14 May 2021

#### Keywords:

GHB

Dihydroxy butyric acids

Biomarkers

$\beta$ -oxidation

$\alpha$ -oxidation

### ABSTRACT

GHB related acids (3,4-dihydroxy butyric acid, 2,4-dihydroxy butyric acid and glycolic acid) are produced through oxidative GHB metabolism. These analytes could be potential biomarkers to ensure the diagnosis of a GHB intoxication and even prolong the detection window. Within this study, forensic routine cases were measured to consider the potential of additional gas chromatographic mass spectrometric analysis on these acids. 17 GHB positive real cases (10 serum samples and 7 urine samples) and 40 cases with suspicion of drugging in DFC cases and negative GHB results (21 serum samples and 19 urine samples) were evaluated. Increased GHB related acid concentrations were detected in all serum and most urine samples positive on GHB. In some GHB negative cases, especially in serum samples, concentrations of GHB related acids gave hints that GHB actually was taken. We recommend to use the following cut-offs for a more reliable interpretation of potential GHB intoxication cases: 3,4-OH-BA: >3 mg/L in serum and >50 mg/L in urine; 2,4-OH-BA: >2 mg/L in serum and >25 mg/L in urine; GA: >5 mg/L in serum and >400 mg/L in urine.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Due to the rapid uptake of gamma hydroxy butyric acid (GHB) after oral intake, its fast pharmacologic effects (euphoria, reduced inhibitions, sedation, muscle relaxation and amnesia) within 30 min and its short half-life [1], the substance is often used in cases of drug facilitated sexual assaults (DFSA) [2]. However, GHB is also an endogenous substance, a short-chain fatty acid which acts as central nervous system depressant. Although the exact pharmacological mechanism of GHB is not quite clear, it has been shown that it has partial agonistic activity at GABA<sub>B</sub> receptors at higher than physiological concentrations [3–5]. The effects of GHB depend on the consumed dose. The consumption of GHB in doses between 0.5 and 1.5 g has inter alia stimulating, anxiolytic and euphoric effects. Doses of up to about 2.5 g result inter alia in aphrodisiac effect and sexual desire. Higher dosages can produce heavy sedation and a narcotic sleep and are therefore mostly used in DFSA cases [6,7]. It was described that GBL (gamma butyrolactone) has replaced GHB in illicit

preparations in the context of gay discos and chemsex parties [8]. GBL is rapidly converted into GHB after intake.

Cut-off values to distinguish endogenous GHB concentrations from an intake of the drug (or GBL) are discussed controversially. In some publications cut offs were recommended to be 4 mg/L in serum and 10 mg/L in urine [9–12], however, preanalytical conditions (the time between sampling and analysis, the storage conditions (temperature and presence/absence of preservatives)) have to be taken into account [13]. The main problem of detection of an intake of exogenous GHB, however, is its narrow detection window in the usually taken specimens blood (maximum 6 h) and urine (maximum 12 h) [14–16].

Therefore, the search for potential new biomarkers had increased recently. Previously, GHB phase II metabolites such as GHB-glucuronide and GHB-4-sulfate have been studied but the results illuminated that these analytes cannot be suitable biomarkers to extend the detection window [17]. We had shown that GHB related acids like glycolic acid (GA), 3,4-dihydroxy butyric acid (3,4-OH-BA) and 2,4-dihydroxy butyric acid (2,4-OH-BA) (see Fig. 1) can help in the interpretation of post mortem results in cases of GHB intoxication [18]. Furthermore concentrations of these analytes increased after the intake of relative low doses (single intake of up to 2 g or

\* Correspondence to: Am Pulverturm 3, 55131 Mainz, Germany.  
E-mail address: [hess@uni-mainz.de](mailto:hess@uni-mainz.de) (C. Hess).

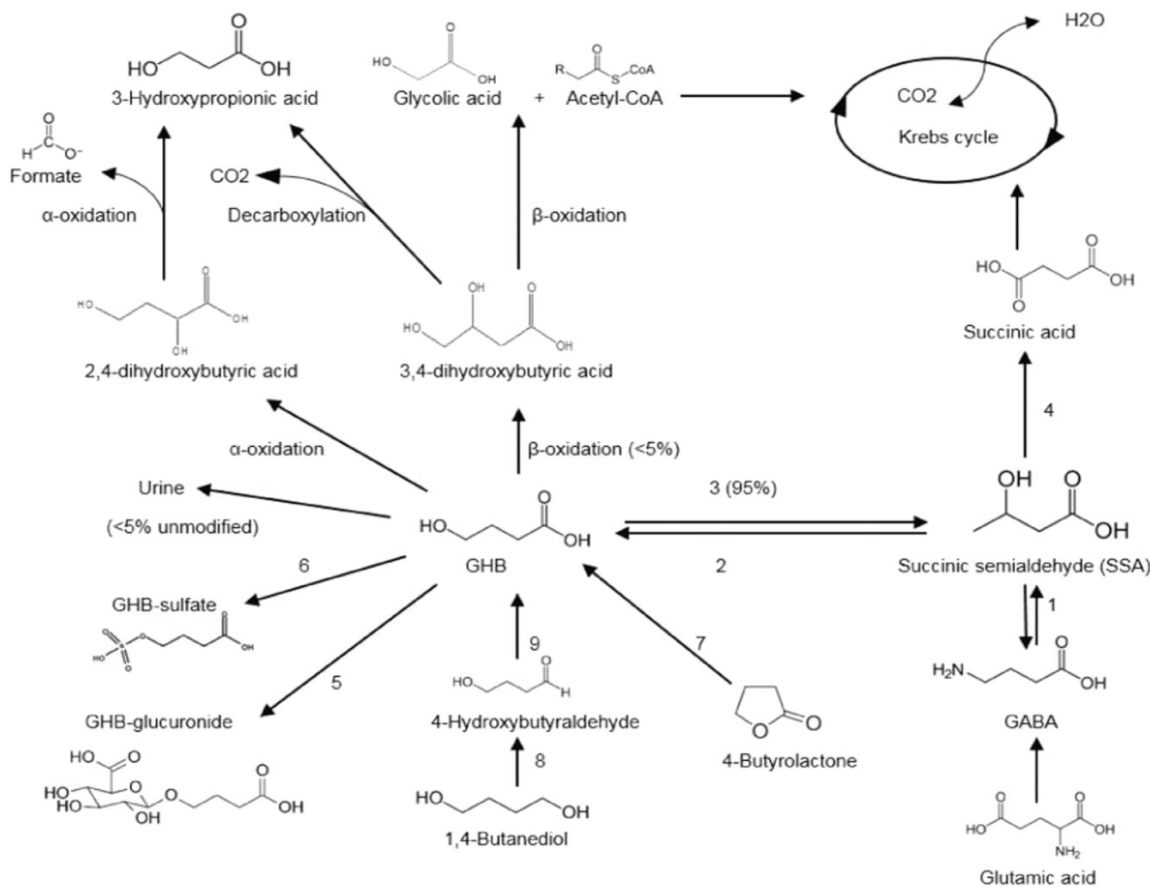


Fig. 1. metabolic pathways of GHB. 1- GABA transaminase 2- Succinic semialdehyde reductase 3- GHB dehydrogenase 4- Succinic semialdehyde dehydrogenase 5- UDP- glucuronosyltransferase 6- Sulfotransferase 7- Serum lactonase 8- Alcohol dehydrogenase 9- Aldehyde dehydrogenase.

2 × 3.72 g) of GHB and illuminated a detection window even longer than the detection window of the mother substance [19].

Within this study, we wanted to determine if GHB related acids were suitable biomarkers to detect an intake of GHB or one of its precursors and if the additional analysis on GHB related acids gives additional benefit comparing to analysis on GHB. For this purpose, [1] GHB positive samples and [2] cases with suspected drug facilitated crimes and negative GHB results from routine case work were tested for GHB related acids.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and pharmaceuticals

All chemicals were of highest analytical grade (manufacturer see [19]). Water was purified by an MediTower 60-140-AFT Water System from Thermo scientific (Waltham, USA).

2.2. Analytical method

The validated gas chromatographic mass spectrometric method was published elsewhere [20]. Briefly 1 mL of serum or urine was liquid extracted with ethyl acetate and afterwards trimethylsilylated. The extract was separated using a capillary column TG-5SILMS

(30 m \* 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) on a 7890A GC (Agilent, USA) and detected using a MSD 5975 C mass spectrometer operated in single ion monitoring mode (Agilent, USA). Validation parameters were as follows: Limits of detection were 0.12 mg/L for 2,4-OH-BA butyric acid, 0.13 mg/L for 3,4-OH-BA, 0.03 mg/L for GHB, 0.28 mg/L for succinic acid (SA) and 0.19 mg/L for GA, respectively. Limits of quantification were 0.39 mg/L for 2,4-OH-BA, 0.42 mg/L for 3,4-OH-BA, 0.11 mg/L for GHB, 0.98 mg/L for SA and 0.63 mg/L for GA. Linearity of calibration was given from the limit of quantification up to 20 mg/L for all analytes. Precision and bias data was < 10% for all analytes at 2 mg/L and 17 mg/L. With the used analytical method endogenous levels of all analytes had been determined in a previous study [20].

2.3. Forensic real cases

2.3.1. GHB positive real cases

GHB related acids (including GA, SA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA) were quantified in overall 17 cases. In 7 cases, only urine was available, in 10 cases only serum was available. In all of these cases GHB results higher than the cut offs used within this study (>4 mg GHB/L in serum or >10 mg GHB/L in urine) were detected. Serum was received by centrifugation of whole blood samples without



**Table 1**

Concentrations of GHB related acids in GHB positive cases in urine (n = 7). (†): concentration higher than the maximum within the reference range including (††) and excluding (†††) outliers. GHB: gamma hydroxy butyric acid; GA: glycolic acid; SA: succinic acid; 2,4-OH-BA: 2,4-dihydroxy butyric acid; 3,4-OH-BA: 3,4-dihydroxy butyric acid.

		GHB (mg/L)	GA (mg/L)	SA (mg/L)	2,4-OH-BA (mg/L)	3,4-OH-BA (mg/L)
Reference range [19]	Minimum	n.d.	1.3	1.17	0.72	1.8
	Maximum without outliers	1.48	105	46.1	13.6	47.1
	Maximum with outliers	1.94	400	273	26.2	122
	Median	0.33	24.5	12.6	4.2	11.7
	Mean value	0.37	29.7	16.1	4.8	15.3
	Std. Deviation	0.33	27.1	10.7	2.9	11.2
	Case no.	Matrix				
Sample 1	urine	479 (††)	243 (†)	5.60	27.4 (††)	539 (††)
Sample 2	urine	4176 (††)	348 (†)	1.95	32.5 (††)	300 (††)
Sample 3	urine	14.2 (†)	25.5	< LoD	4.9	10.1
Sample 4	urine	9.7 (†)	19.4	< LoD	3.8	6.3
Sample 5	urine	1528 (††)	509 (††)	4.70	93.3 (††)	496 (††)
Sample 6	urine	3009 (††)	1777 (††)	5.75	319 (††)	846 (††)
Sample 7	urine	427 (††)	138 (†)	6.96	41.7 (††)	260 (††)

preservative. Both serum and urine samples (without preservative) were analyzed within 2 days after the entrance into our laboratory.

### 2.3.2. Cases with suspicion of drugging in DFC cases and negative GHB results

In 40 cases with suspicion of drugging in DFC cases and a negative GHB result (GHB levels within endogenous range: <4 mg GHB/L in serum or <10 mg GHB/L in urine), GHB related acids were also quantified. In 19 cases, only urine was available, in 21 cases only serum was available. Serum was received by centrifugation of whole blood samples without preservative. Both serum and urine samples (without preservative) were analyzed within 2 days after the entrance into our laboratory.

## 3. Results

### 3.1. GHB positive cases

17 cases with a positive GHB test result (7 urines and 10 serum samples) were collected, and the level of organic acids in the samples, compared to the endogenous levels, were evaluated (see urine results in Table 1, see serum results in Table 2).

### 3.2. Cases with suspicion of drugging in DFC cases and negative GHB results

To investigate the potential of organic acids as suitable biomarkers (when the GHB level itself is already in the endogenous range), overall 40 cases (19 urine and 21 serum samples) were

collected from persons who were suspected to be drugged in cases of drug facilitated crime. Urine results are depicted in Table 3, serum results in Table 4.

## 4. Discussion

Due to the short half-life but also due to a long time between uptake of a substance in DFC cases and reporting to the police by victims, the frequency of false negatives in GHB cases can be high [21]. Further factors such as sample age and storage conditions can affect the interpretation of results. Thus, finding biomarkers that can facilitate the interpretation of GHB results and enhance the detection window is important. GHB is converted directly into 3,4-OH-BA and GA by  $\beta$ -oxidation which are then entered into the Krebs cycle [22,23]. It has been previously observed that a small fraction of GHB can also be converted to 2,4-OH-BA, 3-hydroxypropionyl-CoA and formate by  $\alpha$ -oxidation [22]. Urinary excretion of GHB related acids and dicarboxylic aciduria probably reflects the secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation by succinic semialdehyde or its metabolites. This has already been reported by other researchers [22,24].

Analysis on these organic acids, especially on 3,4-OH-BA in serum samples, had shown promising results as potential biomarkers to prolong the detection window after the oral GHB intake of up to 7.44 g GHB (minimum 1.86 g GHB, n = 5) in our first study [18]. SA concentrations had been shown to be unstable in ante mortem and post mortem material [17, 18, 20] and no increase in concentrations after the controlled intake of GHB could be shown. Within this study SA concentrations were also unremarkable in all cases.

**Table 2**

Concentrations of GHB related acids in GHB positive cases in serum (n = 10). (†): concentration higher than the maximum within the reference range including (††) and excluding (†††) outliers. GHB: gamma hydroxy butyric acid; GA: glycolic acid; SA: succinic acid; 2,4-OH-BA: 2,4-dihydroxy butyric acid; 3,4-OH-BA: 3,4-dihydroxy butyric acid.

		GHB (mg/L)	GA (mg/L)	SA (mg/L)	2,4-OH-BA (mg/L)	3,4-OH-BA (mg/L)
Reference range [19]	Minimum	n.d.	0.39	n.d.	0.83	1.0
	Maximum without outliers	0.25	1.9	7.3	1.13	1.9
	Maximum with outliers	1.28	4.92	18.1	1.38	2.59
	Median	0	1.3	2.7	0.92	1.2
	Mean value	0.05	1.2	2.5	0.94	1.2
	Std. Deviation	0.07	0.27	1.6	0.07	0.17
	Case no.	Matrix				
Sample 8	serum	7.6 (††)	7.4 (††)	< LoD	3.2 (††)	11.8 (††)
Sample 9	serum	823 (††)	15.7 (††)	< LoD	5.1 (††)	13.4 (††)
Sample 10	serum	33.9 (††)	6.4 (††)	< LoD	3.2 (††)	5.1 (††)
Sample 11	serum	371 (††)	11.0 (††)	< LoD	3.6 (††)	11.4 (††)
Sample 12	serum	153 (††)	30.2 (††)	< LoD	14.7 (††)	25.0 (††)
Sample 13	serum	616 (††)	21.8 (††)	< LoD	4.3 (††)	13.7 (††)
Sample 14	serum	65.2 (††)	29.5 (††)	< LoD	14.5 (††)	22.7 (††)
Sample 15	serum	33.4 (††)	6.1 (††)	15.05 (††)	5.7 (††)	7.6 (††)
Sample 16	serum	267 (††)	17.7 (††)	12.50 (††)	6.3 (††)	13.8 (††)
Sample 17	serum	90.6 (††)	7.3 (††)	< LoD	6.1 (††)	9.1 (††)



**Table 3**

urine samples from patients with suspected drug facilitated crimes and negative GHB results (n = 19). (†): concentration higher than the maximum within the reference range including (††) and excluding (†) outliers. GHB: gamma hydroxy butyric acid; GA: glycolic acid; SA: succinic acid; 2,4-OH-BA: 2,4-dihydroxy butyric acid; 3,4-OH-BA: 3,4-dihydroxy butyric acid.

		GHB (mg/L)	GA (mg/L)	SA (mg/L)	2,4-OH-BA (mg/L)	3,4-OH-BA (mg/L)
Reference range [19]	Minimum	n.d.	0.39	n.d.	0.83	1.0
	Maximum	1.48	105	46.1	13.6	47.1
	Maximum without outliers					
	Maximum with outliers	1.94	400	273	26.2	122
	Median	0.33	24.5	12.6	4.2	11.7
Mean value		0.37	29.7	16.1	4.8	15.3
	Std. Deviation	0.33	27.1	10.7	2.9	11.2
Case no.	Matrix					
Sample 18	urine	0.42	27.1	1.02	2.83	9.70
Sample 19	urine	0.39	38.0	16.3	7.28	30.0
Sample 20	urine	0.76	14.0	10.3	11.6	18.5
Sample 21	urine	0.50	10.8	2.96	7.36	17.6
Sample 22	urine	0.47	16.7	12.9	5.50	15.3
Sample 23	urine	0.33	23.0	7.07	6.15	12.2
Sample 24	urine	0.37	14.3	1.36	4.23	5.12
Sample 25	urine	0.20	13.3	1.08	3.26	3.65
Sample 26	urine	0.22	5.26	1.09	2.05	2.81
Sample 27	urine	0.25	31.4	9.09	4.80	9.09
Sample 28	urine	0.27	13.9	1.71	3.58	4.85
Sample 29	urine	0.31	12.1	2.78	2.68	4.27
Sample 30	urine	0.45	30.0	7.80	5.29	13.8
Sample 31	urine	0.20	3.3	0.10	1.42	1.90
Sample 32	urine	0.53	18.4	4.91	3.44	7.50
Sample 33	urine	0.53	25.9	8.00	3.55	5.02
Sample 34	urine	0.45	24.0	3.47	7.36	14.2
Sample 35	urine	0.76	32.0	12.6	4.21	11.6
Sample 36	urine	0.23	51.0	0.60	3.10	5.78

Herein, we describe 10 GHB positive cases detected by serum analysis (GHB > 4 mg/L). GHB serum concentrations in these cases were in a range of 7.6–616 mg/L. In all of these cases the three GHB related acids GA, 3,4-OH-BA and 2,4-OH-BA were increased compared to the described reference population. Even in a case (serum no. 8) with a GHB concentration only relatively low but increased (7.6 mg/L) in which doubts about the intake of GHB or one of its precursors could have been arisen, GA (7.6 mg/L), 3,4-OH-BA (3.2 mg/L) and 2,4-OH-BA (11.8 mg/L) concentrations were increased and support a GHB uptake. In these cases, additional analysis on these GHB related acids could at least help for a more reliable interpretation.

We also described 7 GHB borderline/positive cases in urine. Urinary GHB concentrations in these cases were 9.7 mg/L (slightly lower than the recommended cut-off (10 mg/L) for urine analysis in case no. 4) and up to 4176 mg/L. In 5 of these 7 cases (cases no. 1,2,5,6,7) the three GHB related acids GA, 3,4-OH-BA and 2,4-OH-BA were increased compared to the described reference population. In case 3 and 4 doubts arose during this study if GHB was actually taken although urine samples showed GHB concentrations slightly lower (9.7 mg/L, case no. 4) or slightly higher (14.2 mg/L, case no. 3) than the recommended cut-off. In these two cases none of the further GHB related acids were increased, results were even or smaller than the median concentrations of the reference population. Therefore, in case no. 4 a reliable conclusion that GHB was taken is not given. In case no. 3 at least GHB related acids could not support the conclusion that GHB was taken. Again this shows the usability of additional analysis on GHB related acids.

We also conclude from these results that – expecting at least some GBL intakes within the overall 16 positive cases (6 serum samples plus 10 urine samples) measured – that GHB related acids are also increased after the intake of GBL.

In addition we herein showed cases of suspected drug facilitated crime (suspected uptake of GHB or GBL) with a negative GHB result in serum (n = 21, 0.20 mg/L – 0.44 mg/L) and in urine (n = 19; 0.20 mg/L – 0.76 mg/L). Information in these cases are limited to the

**Table 4**

serum samples from patients with suspected drug facilitated crimes and negative GHB results (n = 21). (†): concentration higher than the maximum within the reference range including (††) and excluding (†) outliers. GHB: gamma hydroxy butyric acid; GA: glycolic acid; SA: succinic acid; 2,4-OH-BA: 2,4-dihydroxy butyric acid; 3,4-OH-BA: 3,4-dihydroxy butyric acid.

		GHB (mg/L)	GA (mg/L)	SA (mg/L)	2,4-OH-BA (mg/L)	3,4-OH-BA (mg/L)
Reference range [19]	Minimum	n.d.	0.39	n.d.	0.83	1.0
	Maximum without outliers	0.25	1.9	7.3	1.13	1.9
	Maximum with outliers	1.28	4.92	18.1	1.38	2.59
	Median	0	1.3	2.7	0.92	1.2
	Mean value	0.05	1.2	2.5	0.94	1.2
	Std. Deviation	0.07	0.27	1.6	0.07	0.17
	Case no.	Matrix				
Sample 37	serum	0.44	2.08 (†)	0.70	1.92 (††)	2.90 (†)
Sample 38	serum	0.22	1.35	0.34	1.00	1.49
Sample 39	serum	0.20	1.22	0.24	1.00	1.50
Sample 40	serum	0.21	1.23	0.24	0.93	1.59
Sample 41	serum	0.22	1.14	0.42	0.96	1.45
Sample 42	serum	0.21	1.25	0.49	1.06	1.83
Sample 43	serum	0.21	1.24	0.32	0.97	1.48
Sample 44	serum	0.19	1.22	0.29	0.93	1.55
Sample 45	serum	0.24	1.36	0.69	0.94	1.49
Sample 46	serum	0.20	1.27	0.41	0.94	1.47
Sample 47	serum	0.38	2.26 (†)	0.20	1.80 (††)	2.86 (†)
Sample 48	serum	0.21	1.38	0.45	1.03	1.56
Sample 49	serum	0.24	1.31	0.52	0.93	1.48
Sample 50	serum	0.21	1.44	0.80	0.96	1.61
Sample 51	serum	0.25	1.31	0.54	0.93	1.49
Sample 52	serum	0.21	5.28 (††)	1.32	2.65 (††)	4.25 (††)
Sample 53	serum	0.21	1.30	0.21	0.98	1.62
Sample 54	serum	0.30	1.21	0.34	0.90	1.48
Sample 55	serum	0.36	2.10 (†)	0.00	1.80 (††)	2.82 (†)
Sample 56	serum	0.40	5.64 (††)	1.98	3.32 (††)	5.24 (††)
Sample 57	serum	0.38	2.26 (†)	0.20	1.88 (††)	2.86 (†)

fact that we do not know if GHB or one of its precursors were actually given. In all of the urine samples none of the GHB related acids were increased compared to the reference population. In most of the serum samples none of the GHB related acids were increased compared to the reference population. However, there were 6 of 21 serum samples in which all of the examined GHB related acids were increased (cases no. 37, 47, 52, 55, 56 and 57). GA concentrations were higher than the reference population with eliminated outliers in these 6 cases and even without eliminated outliers in case no. 52 (5.28 mg/L) and case no. 56 (5.64 mg/L). 3,4-OH-BA concentrations were higher than the reference population with eliminated outliers in these 6 cases and even without eliminated outliers in case no. 52 (4.25 mg/L) and case no. 56 (5.24 mg/L). 2,4-OH-BA concentrations were higher than the reference population with eliminated outliers in these 6 cases and even without eliminated outliers in case no. 52 (2.65 mg/L) and case no. 56 (3.32 mg/L). We conclude that at least in cases no. 52 and 56 GHB or one of its precursors were taken even though in these cases GHB concentrations themselves were low (0.21 mg/L in case no. 52 and 0.40 mg/L in case no. 56). In cases no. 37, 47, 55 and 57 an intake of GHB or one of its precursors at least could be suspected by all of the three GHB related acids being increased.

These results show on the one hand the superiority of serum analysis over urine analysis examining suspected cases of GHB intoxication. We had already shown that analysis in blood serum would give more information than analysis in urine in post mortem cases [17]. Various studies have shown that the metabolic analysis of urine samples is valuable in identifying a wide variety of potential biomarkers. However, the metabolic composition of the urine is influenced by many factors such as diet, health status, gender, and especially urine dilution. Reference to creatinine concentration could help, however, was not integrated into GHB analysis in literature yet.

On the other hand, at least the results of cases 52 and 56 show that additional analysis on GA, 2,4- and 3,4-OH-BA may increase the detection window of an GHB intake. In a controlled study with 5 patients receiving GHB we could already show that at least 3,4-OH-BA concentrations in serum and GA, 2,4- and 3,4-OH-BA concentrations in urine (especially when referred to the creatinine concentrations) were increased longer than the mother substance itself and up to 8–12 h after the intake of relatively low doses of GHB (in the three of five cases only receiving a single dose during the course of the study: 1.86 g, 1.86 g and 2.0 g GHB) [18]. Other studies had also shown benefit of these acids at least in non-quantitative approaches before: Palomino-Schätzlein et al. [25] searched for metabolites associated with GHB consumption using a metabolomics approach by NMR spectroscopy. Results showed that concentrations of GA and SA increased 1 h after drug ingestion. 12 volunteers took 25 mg GHB/kg body weight. While GHB and SA dropped rapidly to an endogenous level (at the time point of 6 h after the intake), GA concentrations decreased much slower, and even after 24 h, a small difference could be observed compared to  $t_0$  levels. Steuer et al. conducted a randomized, placebo-controlled, crossover study in 20 healthy male volunteers which took GHB. Urine samples obtained 4.5 h post-administration were submitted to untargeted quadrupole time of flight mass spectrometry analysis to identify possible new markers of GHB intake. Next to the detection of conjugates of amino acids both with GHB and SA, GA concentrations were significantly increased in the GHB group. Dihydroxy BAs were not investigated [26].

Therefore, we recommend to include the analysis of GA, 2,4- and 3,4-OH-BA concentrations in serum and urine in cases of suspected GHB or GBL intake. Reference concentrations in urine ( $n = 132$ ) and serum ( $n = 101$ ) [19] were suggested. We measured real cases after the controlled single or twice intake of low to middle doses of GHB. Additionally real positive cases after the intake of GHB or GBL were

analyzed. Using these information we recommend to use the following cut-offs for a more reliable interpretation of potential GHB intoxication cases ante mortem: 3,4-OH-BA: >3 mg/L in serum and >50 mg/L in urine; 2,4-OH-BA: >2 mg/L in serum and >25 mg/L in urine; GA: >5 mg/L in serum and >400 mg/L in urine. If GHB concentrations are higher than the cut offs (>4 mg/L in serum and/or >10 mg/L in urine), the concentrations of related acids should also be increased. If GHB is around cut-off or even very low, all of the used organic acid concentrations should be increased to conclude an intake of GHB or GBL. It should be noted that endogenous concentrations in post mortem material differ slightly from those in ante mortem material. Therefore, for post mortem material, different cut-offs were recommended before (18). Furthermore, comparison of GHB and related acids results in several matrices (if available) could be helpful. Another approach in interpreting GHB results could be the comparison of the results of GHB with the samples of the same subject, instead of comparing it with endogenous levels of the control group. By taking several samples from a subject, the median endogenous concentration of this subject can be compared with the concentration within the sample of interest. This approach could also be used for GHB related acids.

Limitations of the study are as follows: It should be noted that these reference ranges and cut offs were installed using our gas chromatographic mass spectrometric method and should be tested in other laboratories using other methods before adopting the cut-offs. Furthermore, samples within this study were taken from routine cases and we do not know if GHB or one of its precursors were indeed taken. Future studies with the controlled intake of GHB or one of its precursors should also focus on analysis on GHB related acids. Another point is the fact that samples used within this study were not spiked with a preservative and were analyzed rapidly after the entrance into our laboratory. Stability of GA, 2,4-OH-BA and 3,4-OH-BA could be shown in serum and urine samples stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (without preservative) for at least one month. Nevertheless, preanalytical aspects should also be taken into account when analyzing GHB related acids.

## 5. Conclusion

We showed that GHB related acids may be useful in routine casework of suspected GHB intoxication cases. We recommend to integrate analysis of 3,4-OH-BA, 2,4-OH-BA and GA in cases of suspected drug facilitated crimes. Cut offs for the differentiation to endogenous concentration ranges are recommended, comparison of the results to samples from the same subject is also possible.

## CRedit authorship contribution statement

**Pouria Jarsiah:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Joerg Roehrich:** Data curation, Sample selection, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Theresa Kueting:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing - original draft. **Walter Martz:** Data curation, Sample selection, Writing - original draft. **Cornelius Hess:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

## Conflicts of interest

For all authors: none.



## References

- [1] 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.
- [2] K.R. Drasbek, J. Christensen, K. Jensen, Gamma-hydroxybutyrate—a drug of abuse, *Acta Neurol. Scand.* 114 (3) (2006) 145–156.
- [3] K. Lingenhoehl, R. Brom, J. Heid, P. Beck, W. Froestl, K. Kaupmann, B. Bettler, J. Mosbacher,  $\gamma$ -Hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABAB receptors, *Neuropharmacology* 38 (11) (1999) 1667–1673.
- [4] M.A. Carai, G. Colombo, G. Brunetti, S. Melis, S. Serra, G. Vacca, S. Mastinu, A.M. Pistuddi, C. Solinas, G. Cignarella, G. Minardi, G.L. Gessa, Role of GABAB receptors in the sedative/hypnotic effect of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, *Eur. J. Pharmacol.* 428 (3) (2001) 315–321.
- [5] 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.
- [6] L.J. Schep, K. Knudsen, R.J. Slaughter, J.A. Vale, B. Megarbane, The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1, 4-butanediol, *Clin. Toxicol.* 50 (6) (2012) 458–470.
- [7] J. Li, S.A. Stokes, A. Woeckener, A tale of novel intoxication: a review of the effects of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid with recommendations for management, *Ann. Emerg. Med.* 31 (6) (1998) 729–736.
- [8] F.P. Busardò, M. Gottardi, A. Tini, A. Minutillo, A. Sirignano, E. Marinelli, S. Zaami, Replacing GHB with GBL in recreational settings: A New Trend in Chemsex, *Curr. Drug Metab.* 19 (2018) 1080–1085.
- [9] 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 (1–3) (2010) 93–99.
- [10] S.P. Elliott, Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production, *Forensic Sci. Int.* 133 (1–2) (2003) 9–16.
- [11] D.T. Yeatman, K. Reid, A study of urinary endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB) levels, *J. Anal. Toxicol.* 27 (1) (2003) 40–42.
- [12] A.A. Elian, Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood, *Forensic Sci. Int.* 128 (3) (2002) 120–122.
- [13] F.P. Busardo, C. Kyriakou, GHB in biological specimens: which cut-off levels should be taken into consideration in forensic toxicological investigation? *Recent Pat. Biotechnol.* 8 (3) (2014) 206–214.
- [14] C. Haller, D. Thai, P. Jacob Iii, J.E. Dyer, GHB urine concentrations after single-dose administration in humans, *J. Anal. Toxicol.* 30 (6) (2006) 360–364.
- [15] A.G. Verstraete, Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid, *Ther. Drug Monit.* 26 (2) (2004) 200–205.
- [16] 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 (1) (2007) 64–70.
- [17] T. Piper, L.M. Mehling, A. Spottke, A. Heidebreder, P. Young, B. Madea, C. Hess, W. Schänzer, M. Thevis, GHB-O- $\beta$ -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake, *Forensic Toxicol.* 35 (2) (2017) 263–274.
- [18] P. Jarsiah, T. Kueting, J. Roehrich, T. Germerott, D. Remane, S.W. Toennes, S. Scholtis, F. Krumbiegel, C. Hess, GHB related acids (dihydroxy butyric acids, glycolic acid) can help in the interpretation of post mortem GHB results, *Forensic Sci. Int.* 316 (2020) 110536.
- [19] T. Kueting, B. Schneider, A. Heidebreder, M. Krämer, B. Madea, C. Hess, Search for potential biomarkers to prolong the detection window of an exogenous GHB intake, *Submitt. Drug Test. Anal.* (2020).
- [20] P. Jarsiah, J. Roehrich, M. Wyczynski, C. Hess, Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid-validated quantification by GC-MS and description of endogenous concentration ranges, *Drug Test. Anal.* 12 (8) (2020) 1135–1143.
- [21] 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.
- [22] G. Brown, C. Cromby, N. Manning, R. Pollitt, Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: Evidence of  $\alpha$ -oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation, *J. Inher. Metab. Dis.* 10 (4) (1987) 367–375.
- [23] S.S. Walkenstein, R. Wiser, C. Gudmundsen, H. Kimmel, Metabolism of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, *Biochim. Et. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* 86 (3) (1964) 640–642.
- [24] 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 (1) (2002) 57–63.
- [25] M. Palomino-Schätzlein, Y. Wang, A.D. Brailsford, M. Pérez-Trujillo, Direct monitoring of exogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in body fluids by NMR spectroscopy, *Anal. Chem.* 89 (16) (2017) 8343–8350.
- [26] A.E. Steuer, J. Raeber, C. Steuer, M.I. Boxler, D.A. Dornbierer, O.G. Bosch, B.B. Quednow, E. Seifritz, T. Kraemer, Identification of new urinary gamma-hydroxybutyric acid markers applying untargeted metabolomics analysis following placebo-controlled administration to humans, *Drug Test. Anal.* 11 (6) (2018) 813–823.

### 5.3 Zusammenfassung

In dieser Arbeit beschreiben wir 10 GHB-positive Fälle, bei denen die GHB-Aufnahme durch Serumanalyse nachgewiesen wurde (GHB > 4 mg/L). Die GHB-Serumkonzentrationen lagen in diesen Fällen im Bereich von 7,6 bis 616 mg/L. In all diesen Fällen waren die drei GHB related acids GA, 3,4-OH-BA und 2,4-OH-BA im Vergleich zur beschriebenen Referenzpopulation erhöht.

In Serum-Fall Nr. 8 mit einer relativ niedrigen, aber erhöhten GHB-Konzentration (7,6 mg/L), hätten aufgrund der grenzwertigen GHB-Befunde Zweifel an der Aufnahme von GHB oder einem seiner Vorläufer bestehen können. Die Konzentrationen von GA (7,6 mg/L), 3,4-OH-BA (3,2 mg/L) und 2,4-OH-BA (11,8 mg/L) waren erhöht und unterstützten eine GHB-Aufnahme. In solchen Fällen könnte eine zusätzliche Analyse dieser GHB related acids zumindest zu einer zuverlässigeren Interpretation beitragen.

Wir haben auch 7 GHB-positive Fälle im Urin beschrieben. Die GHB-Konzentrationen im Urin betragen in diesen Fällen 9,7 mg/L (etwas niedriger als der empfohlene Grenzwert) und bis zu 4176 mg/L. In 5 dieser 7 Fälle waren die drei GHB related acids GA, 3,4-OH-BA und 2,4-OHBA im Vergleich zur beschriebenen Referenzpopulation erhöht. In den Fällen 3 und 4 traten während dieser Studie Zweifel auf, ob GHB tatsächlich eingenommen wurde, obwohl die GHB-Konzentrationen im Urin im Bereich der empfohlenen Cut-offs lagen (9,7 mg/L für Fall 4, 14,2 mg/L für Fall 3). In diesen beiden Fällen war keine der weiteren GHB related acids erhöht, die Ergebnisse waren gleich oder kleiner als die Mediankonzentrationen der Referenzpopulation. Daher ist im Fall Nr. 4 eine zuverlässige Schlussfolgerung, dass GHB eingenommen wurde, nicht gegeben. Im Fall Nr. 3 konnten die GHB related acids die Annahme, dass GHB eingenommen wurde, nicht bestätigen. Dies zeigt erneut die Verwendbarkeit einer zusätzlichen Analyse von GHB related acids.

Weiterhin schließen wir aus diesen Ergebnissen, dass – in Erwartung zumindest einiger GBL-Aufnahmen innerhalb der insgesamt 16 positiv gemessenen Realfälle aus der Routineanalytik (6 Serumproben plus 10 Urinproben) – auch GHB related acids nach der Einnahme von GBL erhöht sind.

Zusätzlich zeigten wir hier Fälle mit Verdacht auf DFC (Verdacht auf Aufnahme von GHB oder GBL) mit einem negativen GHB-Ergebnis im Serum (n = 21; 0,20 – 0,44 mg/L) und im Urin (n = 19; 0,20 – 0,76 mg/L). In allen Urinproben war keine der GHB related acids im Vergleich zur Referenzpopulation erhöht. In 6 von 21 Serumproben

dagegen waren die GHB related acids im Vergleich zur Referenzpopulation erhöht. Wir schließen daraus, dass zumindest in diesen Fällen GHB oder einer seiner Vorläufer eingenommen wurde, obwohl in diesen Fällen die GHB-Konzentrationen selbst niedrig waren. Diese Ergebnisse zeigen zum einen die Überlegenheit der Serumanalyse gegenüber der Urinanalyse bei der Untersuchung von Verdachtsfällen einer GHB-Intoxikation. Zum anderen zeigen die Ergebnisse insbesondere der Fälle 52 und 56 der Studie, dass eine zusätzliche Analyse von GA, 2,4- und 3,4-OH-BA das Nachweisfenster einer GHB-Aufnahme vergrößern kann.

Wir empfehlen folgende Cut-offs für eine zuverlässigere Interpretation möglicher GHB-Intoxikationsfälle ante mortem: 3,4-OH-BA: >3 mg/L im Serum und >50 mg/L im Urin; 2,4-OH-BA: >2 mg/L im Serum und >25 mg/L im Urin; GA: >5 mg/L im Serum und >400 mg/L im Urin. Wenn GHB-Konzentrationen über den Grenzwerten (>4 mg/L im Serum und/oder >10 mg/L im Urin) liegen, sollten auch die Konzentrationen der GHB related acids erhöht sein. Wenn GHB um den Cut-off oder sogar sehr niedrig liegt, sollten alle GHB related acids Konzentrationen erhöht sein, um auf eine Einnahme von GHB oder GBL zu schließen.

Zusammenfassend empfehlen wir, die Analyse von 3,4-OHBA, 2,4-OH-BA und GA im Serum und Urin bei Verdacht auf DFC zu integrieren.

## 6 Limitierungen der Studie

Es ist zu beachten, dass diese Referenzbereiche und Grenzwerte mit unserer gaschromatographisch - massenspektrometrischen Methode installiert wurden und in anderen Labors mit anderen Methoden getestet werden sollten, bevor die Grenzwerte übernommen werden. Darüber hinaus wurden Proben in dieser Studie aus Routinefällen entnommen und wir wissen nicht, ob GHB oder einer seiner Vorläufer tatsächlich eingenommen wurde. Zukünftige Studien mit kontrollierter Einnahme von GHB oder einem seiner Vorläufer sollten sich auch auf die Analyse von GHB related acids konzentrieren.

Ein weiterer Punkt ist die Tatsache, dass die in dieser Studie verwendeten Proben nicht mit einem Stabilisator versetzt waren und nach Eingang in unser Labor schnell analysiert wurden. Die Stabilität von GA, 2,4-OH-BA und 3,4-OH-BA konnte in Serum- und Urinproben nachgewiesen werden, die bei -20 °C (ohne Stabilisator) für mindestens einen Monat gelagert wurden. Dennoch sollten bei der Analyse von GHB related acids auch präanalytische Aspekte berücksichtigt werden.

Eine weitere Limitierung der nicht in dieser Arbeit beschriebenen, aber parallel angefertigten Publikation unter meiner Mitarbeit mit kontrollierter Einnahme von GHB, war die geringe Anzahl an Teilnehmern (fünf Patienten), die mit GHB gegen Narkolepsie behandelt wurden. Desweiteren wurden die Proben bereits 2014 in einer Studie von Frau Mehling, Uni. Bonn, gesammelt und uns zur Verfügung gestellt. Die längere Lagerung und das wiederholte Auftauen, könnte eventuell einen Einfluss auf die Qualität der Proben gehabt haben.

## 7 Ausblick

Es wurden bereits einige vielversprechende Ansätze zur Verlängerung des Nachweisfensters nach einer GHB-Einnahme getestet. Weiterführende Versuche könnten sich mit der Metabolomik-Forschung im GHB-Stoffwechselweg beschäftigen. Die Metabolomik-Forschung konzentriert sich auf die Hochdurchsatz-Identifizierung einer Vielzahl von Molekülen mit geringem Molekulargewicht in einer einzigen Probe. Die Kartierung der biochemischen Veränderungen nach GHB-Exposition kann traditionelle Ansätze ergänzen, indem zeit- und dosisabhängig neue Metaboliten entdeckt werden. Es wurden wenige metabolomische Studien durchgeführt, um die zugrundeliegenden Mechanismen der pharmakologischen Wirkung von GHB weiter zu bewerten oder schließlich nützliche Biomarker für seinen Konsum zu finden.

So beobachteten beispielsweise Palomino-Schätzlein et al. einen signifikanten Anstieg von Glykolat sowie Succinat im Urin nach kontrollierter Verabreichung von GHB an Menschen unter Verwendung von kernmagnetischer Resonanz (NMR)-basierter Metabolomik (92). Luca et al. fanden bis zu siebenfach höhere Glykolatspiegel – die aus der  $\beta$ -Oxidation von GHB stammen – im Gehirn und in der Leber von Mäusen (163). Piper et al. wandten Massenspektrometrie (MS)-basierte Metabolomik bei der Suche nach endogenen Metaboliten im Urin an, die möglicherweise mit der Urinausscheidung von GHB-Sulfat und GHB-Glucuronid korrelieren, um einen geeigneten Marker zur Normalisierung der Urinkonzentrationen zu finden (98). Ebenfalls führten Steuer et al. eine Metabolomik-Studie mittels MS-QTOF durch, um mögliche neue Marker der GHB-Aufnahme zu identifizieren. Von den resultierenden 42 interessanten Verbindungen wurden schließlich 8 identifiziert, darunter Konjugate von GHB mit Carnitin, Glutamat und Glycin sowie die endogenen Verbindungen Glykolat und Succinylcarnitin (93). Es wäre interessant, diese neu detektierten potentiellen Biomarker zu synthetisieren, als Referenzmaterial in quantitativen Analysemethoden einzusetzen, endogene Referenzbereiche zu bestimmen und auf die Nutzbarkeit als Biomarker für den Nachweis einer GHB-Aufnahme (evtl. sogar mit längerem Nachweisfenster) zu testen.

Interessant wäre auch die Detektion der hier untersuchten GHB related acids in Haarproben, die Bestimmung ihrer endogenen Konzentrationsbereiche und die Untersuchung, ob eine GHB-Aufnahme evtl. mit erhöhten Konzentrationen dieser Metabolite im Haar einhergeht.

Ebenfalls sollten die Konzentrationen der weiteren Substanzen, die bei SSADHD-Patienten oder im Falle einer DFC, die im Rahmen dieser Doktorarbeit als erhöht identifiziert wurden, in den Plasma- und Urinproben des Fallkollektivs bestimmt werden. Eine Quantifizierung dieser Substanzen und der Vergleich mit endogenen Konzentrationen könnte ebenfalls neue Möglichkeiten eröffnen. Unter anderem zählen zu diesen Substanzen Acyl-Glucuronide, weitere sulfonierte Verbindungen sowie andere Degradationsprodukte und Konjugate von GHB mit Carnitin, Glutamat, Glycin, Taurin und Pentose (Ribose).



## 8 Literaturverzeichnis

1. Carter LP, Pardi D, Gorsline J, Griffiths RRJD, dependence a. Illicit gamma-hydroxybutyrate (GHB) and pharmaceutical sodium oxybate (Xyrem®): Differences in characteristics and misuse. 2009;104(1-2):1-10.
2. Wang X, Linnet K, Johansen SSJFT. Development of a UPLC–MS/MS method for determining  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. 2016;34(1):51-60.
3. Abanades S, Farré M, Segura M, Pichini S, Barral D, Pacifici R, et al.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. 2006;1074(1):559-76.
4. Couper F, Marinetti LJFsr. gamma-Hydroxybutyrate(GHB)-- Effects on Human Performance and Behavior. 2002;14(1):101-21.
5. Freese TE, Miotto K, Reback CJJJosat. The effects and consequences of selected club drugs. 2002;23(2):151-6.
6. Rodgers J, Ashton C, Gilvarry E, Young AJTBJoP. Liquid ecstasy: a new kid on the dance floor. 2004;184(2):104-6.
7. Cook CD, Biddlestone L, Coop A, Beardsley PMJP. Effects of combining ethanol (EtOH) with gamma-hydroxybutyrate (GHB) on the discriminative stimulus, locomotor, and motor-impairing functions of GHB in mice. 2006;185(1):112-22.
8. Saytzeff AJJLAdC. 4. Ueber die Reduction des Succinylchlorids. 1874;171(2):258-90.
9. Kam P, Yoong FJA. Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. 1998;53(12):1195-8.
10. Gallimberti L, Gentile N, Cibir M, Fadda F, Canton G, Ferri M, et al. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. 1989;334(8666):787-9.
11. Lammers G, Arends J, Declerck A, Ferrari M, Schouwink G, Troost JJS. Gammahydroxybutyrate and narcolepsy: a double-blind placebo-controlled study. 1993;16(3):216-20.
12. Pyo JS, Lee HS, Kwak J-H, Choe SJAL. Determination of Gamma-Hydroxybutyric Acid in Urine by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. 2016;49(2):217-25.

13. Sleep UXMSGJ. A 12-month, open-label, multicenter extension trial of orally administered sodium oxybate for the treatment of narcolepsy. 2003;26(1):31-5.
14. Mehling L-M, Wang X, Johansen S-S, Spottke A, Heidbreder A, Young P, et al. Determination of GHB and GHB- $\beta$ -O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients—Comparison between single and chronic GHB exposure. 2017;278:e8-e13.
15. Robinson DM, Keating GMJCD. Sodium oxybate. 2007;21(4):337-54.
16. Carter LP, Koek W, France CPJP, therapeutics. Behavioral analyses of GHB: receptor mechanisms. 2009;121(1):100-14.
17. Andresen H, Stimpfl T, Sprys N, Schnitgerhans T, Müller AJDÄI. Liquid ecstasy—a significant drug problem. 2008;105(36):599.
18. Andresen H, Sprys N, Schmoltdt A, Mueller A, Iwersen-Bergmann SJFsi. Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations. 2010;200(1-3):93-9.
19. Stout PA, Simons KD, Kerrigan SJJofs. Quantitative analysis of gamma-hydroxybutyrate at endogenous concentrations in hair using liquid chromatography tandem mass spectrometry. 2010;55(2):531-7.
20. Breitzkreuz KE, Allan WL, Van Cauwenberghe OR, Jakobs C, Talibi D, André B, et al. A novel  $\gamma$ -hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. 2003;278(42):41552-6.
21. Takahara J, Yunoki S, Yakushiji W, Yamauchi J, Yamane Y, Ofuji TJJJoCE, et al. Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans. 1977;44(5):1014-7.
22. Sjöqvist F, Garle M, Rane AJTL. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. 2008;371(9627):1872-82.
23. Andresen H, Aydin B, Mueller A, Iwersen-Bergmann SJDt, analysis. An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results. 2011;3(9):560-8.
24. Negrusz A, Gaensslen RJA, chemistry b. Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault. 2003;376(8):1192-7.
25. Hillebrand J, Olszewski D, Sedefov RJEMCFD, Drug Addiction L. GHB and its precursor GBL: an emerging trend case study. 2008.
26. Bosman IJ, Verschraagen M, Lusthof KJJJofs. Toxicological findings in cases of sexual assault in the Netherlands. 2011;56(6):1562-8.

27. Du Mont J, Macdonald S, Rotbard N, Bainbridge D, Asllani E, Smith N, et al. Drug-facilitated sexual assault in Ontario, Canada: toxicological and DNA findings. 2010;17(6):333-8.
28. Elsohly MA, Salamone SJJ. Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault. 1999;23(3):141-6.
29. M Brunt T, GC van Amsterdam J, van den Brink WJC. GHB, GBL and 1, 4-BD Addiction. 2014;20(25):4076-85.
30. Wong CGT, Chan KF, Gibson KM, Snead OCJ.  $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid. 2004;23(1):3-20.
31. LeBeau MA, Montgomery MA, Jufer RA, Miller MLJJ. Elevated GHB in citrate-buffered blood. 2000;24(5):383-4.
32. P Busardo F, W Jones AJC. GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. 2015;13(1):47-70.
33. MAITRE MJP. The  $\gamma$ -hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. 1997;51(3):337-61.
34. Bessman SP, Rossen J, Layne ECJJ.  $\gamma$ -Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. 1953;201:385-91.
35. Maitre M, Andriamampandry C, Kemmel V, Schmidt C, Hodé Y, Hechler V, et al. Gamma-hydroxybutyric acid as a signaling molecule in brain. 2000;20(3):277-83.
36. Park J, Osei Y, Churchich JJ. Isolation and characterization of recombinant mitochondrial 4-aminobutyrate aminotransferase. 1993;268(11):7636-9.
37. Ferrara SD, Frison G, Tedeschi L, LeBeau M. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) and related products: Academic Press, San Diego, CA; 2001.
38. Maitre M, Humbert J-P, Kemmel V, Aunis D, Andriamampandry CJMS. A mechanism for gamma-hydroxybutyrate (GHB) as a drug and a substance of abuse. 2005;21(3):284-9.
39. Gold B, Roth RJJ. KINETICS OF IN VIVO CONVERSION OF  $\gamma$ -[3H] AMINOBUTYRIC ACID TO  $\gamma$ -[3H] HYDROXYBUTYRIC ACID BY RAT BRAIN 1, 2. 1977;28(5):1069-73.
40. Jakoby WB, Scott EMJJ. Aldehyde oxidation: III. Succinic semialdehyde dehydrogenase. 1959;234(4):937-40.
41. Gibson K, Hoffmann C, Hodson A, Bottiglieri T, Jakobs CJN. 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. 1998;29(01):14-22.

42. Jakobs C, Jaeken J, Gibson KJJoimd. Inherited disorders of GABA metabolism. 1993;16(4):704-15.
43. Chambliss KL, Hinson DD, Trettel F, Malaspina P, Novelletto A, Jakobs C, et al. Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria). 1998;63(2):399-408.
44. Palmer RBJTr.  $\gamma$ -Butyrolactone and 1, 4-Butanediol. 2004;23(1):21-31.
45. Snead III OCJJon. Evidence for a G protein-coupled  $\gamma$ -hydroxybutyric acid receptor. 2000;75(5):1986-96.
46. Tabakoff B, Hoffman PLJPB, Behavior. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history. 2013;113:20-37.
47. Hämmig R, editor GHB als natürliche Substanz, Droge und Medikament. Swiss Medical Forum; 2011: EMH Media.
48. Britt GC, McCance-Katz EFJSu, misuse. A brief overview of the clinical pharmacology of "club drugs". 2005;40(9-10):1189-201.
49. Dimitrijevic N, Dzitoyeva S, Satta R, Imbesi M, Yildiz S, Manev HJEjop. Drosophila GABAB receptors are involved in behavioral effects of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB). 2005;519(3):246-52.
50. Uys JD, Niesink RJJ, review a. Pharmacological aspects of the combined use of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and gamma-hydroxybutyric acid (GHB): a review of the literature. 2005;24(4):359-68.
51. Carai MA, Colombo G, Brunetti G, Melis S, Serra S, Vacca G, et al. Role of GABAB receptors in the sedative/hypnotic effect of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. 2001;428(3):315-21.
52. Crunelli V, Emri Z, Leresche NJCoip. Unravelling the brain targets of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. 2006;6(1):44-52.
53. Schep LJ, Knudsen K, Slaughter RJ, Vale JA, Mégarbane BJCT. The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1, 4-butanediol. 2012;50(6):458-70.
54. Im Folgenden sollen Pharmakologie T, Wirkungen N. Stellungnahme zur Nicht Geringen Menge von  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure.
55. Drasbek KR, Christensen J, Jensen KJAns. Gamma-hydroxybutyrate—a drug of abuse. 2006;114(3):145-56.
56. Bay T, Eghorn LF, Klein AB, Wellendorph PJBp. GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. 2014;87(2):220-8.

57. Elian AAJFsi. Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood. 2002;128(3):120-2.
58. Erdmann F, Zandt D, Auch J, Schütz H, Weiler G, Verhoff MAJAFK. Investigations concerning the threshold value between endogenous and exogenous GHB (liquid ecstasy). 2006;217(5-6):129-36.
59. Elliott SPJFsi. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production. 2003;133(1-2):9-16.
60. Kang S, Oh SM, Chung KH, Lee SJJop, analysis b. A surrogate analyte-based LC–MS/MS method for the determination of  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) in human urine and variation of endogenous urinary concentrations of GHB. 2014;98:193-200.
61. Brailsford AD, Cowan DA, Kicman ATJJoat. Urinary  $\gamma$ -hydroxybutyrate concentrations in 1126 female subjects. 2010;34(9):555-61.
62. Bosman IJ, Lusthof KJJFsi. Forensic cases involving the use of GHB in The Netherlands. 2003;133(1-2):17-21.
63. Abanades S, Farré M, Segura M, Pichini S, Pastor A, Pacifici R, et al. Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. 2007;29(1):64-70.
64. Brenneisen R, ElSohly MA, Murphy TP, Passarelli J, Rusmann S, Salamone SJ, et al. Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. 2004;28(8):625-30.
65. Haller C, Thai D, Jacob Iii P, Dyer JEJJoat. GHB urine concentrations after single-dose administration in humans. 2006;30(6):360-4.
66. Borgen LA, Okerholm RA, Lai A, Scharf MBJTJoCP. The pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution following acute and chronic administration to narcoleptic patients. 2004;44(3):253-7.
67. Scharf MB, Lai AA, Branigan B, Stover R, Berkowitz DBJS. Pharmacokinetics of gammahydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients. 1998;21(5):507-14.
68. Palatini P, Tedeschi L, Frison G, Padrini R, Zordan R, Orlando R, et al. Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers. 1993;45(4):353-6.
69. Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 1978.
70. Busardò FP, Kyriakou C, Marchei E, Pacifici R, Pedersen DS, Pichini SJJop, et al. 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. 2017;137:123-31.

71. Hechler V, Ratomponirina C, Maitre MJJoP, Therapeutics E.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. 1997;281(2):753-60.

72. Guidotti A, Ballotti PLJBp. Relationship between pharmacological effects and blood and brain levels of gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyrate. 1970;19(3):883-94.

73. Lettieri J, Fung HJRcicp, pharmacology. Improved pharmacological activity via pro-drug modification: comparative pharmacokinetics of sodium gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone. 1978;22(1):107-18.

74. Schröck A, Hari Y, König S, Auwärter V, Schürch S, Weinmann WJDt, et al. Pharmacokinetics of GHB and detection window in serum and urine after single uptake of a low dose of GBL—an experiment with two volunteers. 2014;6(4):363-6.

75. Thai D, Dyer J, Jacob P, Haller CJCP, Therapeutics. Clinical pharmacology of 1, 4-butanediol and gamma-hydroxybutyrate after oral 1, 4-butanediol administration to healthy volunteers. 2007;81(2):178-84.

76. Vree T, Van Dalen R, Van der Kleijn E, Gimbrere J. Pharmacokinetics of butanediol 1, 4 and 4-hydroxybutyric ethylester in man, rhesus monkey and dog. *Neue Untersuchungen mit Gamma-Hydroxibuttersäure*: Springer; 1978. p. 66-73.

77. Bessman SP, McCabe III ERJBp. 1, 4-Butanediol—a substrate for rat liver and horse liver alcohol dehydrogenases. 1972;21(8):1135-42.

78. Poldrugo F, Snead III OCJA. 1, 4 Butanediol and ethanol compete for degradation in rat brain and liver in vitro. 1986;3(6):367-70.

79. Fjeld B, Burns ML, Karinen R, Larssen B, Smith-Kielland A, Vindenes VJFsi. Long-term stability of GHB in post-mortem samples and samples from living persons, stored at– 20° C, using fluoride preservatives. 2012;222(1-3):47-51.

80. Chen M, Andrenyak DM, Moody DE, Foltz RLJJoat. Stability of plasma gamma-hydroxybutyrate determined by gas chromatography-positive ion chemical ionization-mass spectrometry. 2003;27(7):445-8.

81. Jones AW, Gladh S-Å, Windberg CN, Johansen SSJJoat. Stability of  $\gamma$ -Hydroxybutyrate in Blood Samples from Impaired Drivers after Storage at 4° C and Comparison of GC–FID–GBL and LC–MS-MS Methods of Analysis. 2015;39(4):294-9.

82. Beránková K, Mutňanská K, Balíková MJFsi. Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. 2006;161(2-3):158-62.
83. Busardò F, Zaami S, Baglio G, Indorato F, Montana A, Giarratana N, et al. Assessment of the stability of exogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) in stored blood and urine specimens. 2015;19(21):4187-94.
84. Marinetti LJ, Isenschmid DS, Hepler BR, Kanlueen SJJJoat. Analysis of GHB and 4-methyl-GHB in postmortem matrices after long-term storage. 2005;29(1):41-7.
85. Walkenstein SS, Wiser R, Gudmundsen C, Kimmel HJBeBA-GS. Metabolism of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. 1964;86(3):640-2.
86. RH R, NJ GJBp. PRELIMINARY REPORT ON THE METABOLISM OF GAMMA-BUTYROLACTONE AND GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID. 1965;14:177-8.
87. Möhler H, Patel A, Balazs RJJJon. Gamma-hydroxybutyrate degradation in the brain in vivo: negligible direct conversion to GABA. 1976;27(1):253-8.
88. Lee CJBm. Evidence for the  $\beta$ -oxidation of orally administered 4-hydroxybutyrate in humans. 1977;17(3):284-91.
89. Shinka T, Inoue Y, Ohse M, Ito A, Ohfu M, Hirose S, et al. 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. 2002;776(1):57-63.
90. Brown G, Cromby C, Manning N, Pollitt RJJJoimd. Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of  $\alpha$ -oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation. 1987;10(4):367-75.
91. Jakobs C, Bojasch M, Mönch E, Rating D, Siemes H, Hanefeld FJCCA. Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism. 1981;111(2-3):169-78.
92. Palomino-Schatzlein M, Wang Y, Brailsford AD, Parella T, Cowan DA, Legido-Quigley C, et al. Direct monitoring of exogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in body fluids by nmr spectroscopy. 2017;89(16):8343-50.
93. Steuer AE, Raeber J, Steuer C, Boxler MI, Dornbierer DA, Bosch OG, et al. Identification of new urinary gamma-hydroxybutyric acid markers applying untargeted metabolomics analysis following placebo-controlled administration to humans. 2019;11(6):813-23.

94. Petersen IN, Tortzen C, Kristensen JL, Pedersen DS, Breindahl TJJoat. Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide. 2013;37(5):291-7.
95. Petersen IN, Kristensen JL, Tortzen C, Breindahl T, Pedersen DSJBjooc. Synthesis and stability study of a new major metabolite of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid. 2013;9(1):641-6.
96. Hanisch S, Stachel N, Skopp GJIjlm. A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid. 2016;130(2):411-4.
97. Mehling L-M, Piper T, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, et al. GHB-O- $\beta$ -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool for the extension of the detection window after GHB intake. 2017;35(2):263-74.
98. Piper T, Mehling L-M, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, et al. Potential of GHB phase-II-metabolites to complement current approaches in GHB post administration detection. 2017;279:157-64.
99. Dahlén J, Vriesman TJFsi. Simultaneous analysis of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid,  $\gamma$ -butyrolactone, and 1, 4-butanediol by micellar electrokinetic chromatography. 2002;125(2-3):113-9.
100. Bernasconi R, Mathivet P, Bischoff S, Marescaux CJTips. Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential? 1999;20(4):135-41.
101. Nicholson KL, Balster RLJD, dependence a. GHB: a new and novel drug of abuse. 2001;63(1):1-22.
102. Okun MS, Boothby LA, Bartfield RB, Doering PLJJPPS. GHB: an important pharmacologic and clinical update. 2001;4(2):167-75.
103. Weir EJC. Raves: A review of the culture, the drugs and the prevention of harm. 2000;162(13):1843-8.
104. Gahlinger PMJAfp. Club drugs: MDMA, gamma-hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and ketamine. 2004;69(11):2619-26.
105. Elian AAJFsi. GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. 2001;122(1):43-7.
106. Madea B, MUßHOFF FJDÄI. Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection. 2009;106(20):341.
107. Hagenbuch F. GBL/GHB-der neue Kick? Das Wichtigste für die Praxis im Überblick. 2015.



108. Moriya F, Hashimoto YJLM. Endogenous  $\gamma$ -hydroxybutyric acid levels in postmortem blood. 2004;6(1):47-51.
109. Zdrojewicz Z, Belowska-Bień KJPHMD. Radon i promieniowanie jonizujące a organizm człowieka Radon and ionizing radiation in the human body. 2004;58:150-7.
110. Snead III OC, Liu C-C, Bearden LJJbP. 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. 1982;31(23):3917-23.
111. Doherty J, Hattox S, Snead OC, Roth RJJbP, Therapeutics E. Identification of endogenous gamma-hydroxybutyrate in human and bovine brain and its regional distribution in human, guinea pig and rhesus monkey brain. 1978;207(1):130-9.
112. Roth RHJbP. Formation and regional distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in mammalian brain. 1970;19(12):3013-9.
113. Richard D, Ling B, Authier N, Faict TW, Eschaliere A, Coudoré FJAc. GC/MS profiling of  $\gamma$ -hydroxybutyrate and precursors in various animal tissues using automatic solid-phase extraction. Preliminary investigations of its potential interest in postmortem interval determination. 2005;77(5):1354-60.
114. Andresen-Streichert H, Jensen P, Kietzerow J, Schrot M, Wilke N, Vettorazzi E, et al. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. 2015;129(1):57-68.
115. Thomsen R, Rasmussen BS, Johansen SS, Linnet KJFsi. Postmortem concentrations of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in peripheral blood and brain tissue—differentiating between postmortem formation and antemortem intake. 2017;272:154-8.
116. Kintz P, Villain M, Cirimele V, Ludes BJFsi. GHB in postmortem toxicology: Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens. 2004;143(2-3):177-81.
117. Brand WAJJoms. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. 1996;31(3):225-35.
118. Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament MM, Casabianca H, James PJRCiMS. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. 1994;8(4):304-8.
119. Marclay F, Pazos D, Delemont O, Esseiva P, Saudan CJFsi. Potential of IRMS technology for tracing gamma-butyrolactone (GBL). 2010;198(1-3):46-52.
120. Saudan C, Augsburger M, Mangin P, Saugy MJRCiMSAJDttRDoUttMRiMS. Carbon isotopic ratio analysis by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass

spectrometry for the detection of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) administration to humans. 2007;21(24):3956-62.

121. Marclay F, Saudan C, Vienne J, Tafti M, Saugy MJA, chemistry b. Source inference of exogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) administered to humans by means of carbon isotopic ratio analysis: novel perspectives regarding forensic investigation and intelligence issues. 2011;400(4):1105-12.

122. Lott S, Piper T, Mehling L-M, Spottke A, Maas A, Thevis M, et al. Measurement of exogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in urine using isotope ratio mass spectrometry (IRMS). 2015;82:264-6.

123. Larson SJ, Putnam EA, Schwanke CM, Pershouse MAJJoat. Potential surrogate markers for gamma-hydroxybutyrate administration may extend the detection window from 12 to 48 hours. 2007;31(1):15-22.

124. Araujo H, Danziger N, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss HJJoBC. Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. 1993;268(8):5911-20.

125. TOYODA H, KOMURASAKI T, UCHIDA D, MORIMOTO SBJ. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. 1997;326(1):69-75.

126. Abdullah A, Ellis E. Gene expression signature of Gamma hydroxybutyric acid (GHB) exposure in Human monocytic leukaemia THP-1 cells2012.

127. Picklo Sr MJ, Olson SJ, Hayes JD, Markesbery WR, Montine TJJBr. Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. 2001;916(1-2):229-38.

128. Hennessy SA, Moane SM, McDermott SDJJoFS. The reactivity of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic solutions. 2004;49(6):JFS2003340-10.

129. Küting T, Beier N, Krämer M, Madea BJJJoAT. Methyl-4-Hydroxybutyrate and Ethyl-4-Hydroxybutyrate as Potential Markers for Simultaneous Consumption of GHB/GBL and Alcohol: Preliminary Investigations. 2020;44(8):818-28.

130. Elliott S, Burgess VJFsi. The presence of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic and non-alcoholic beverages. 2005;151(2-3):289-92.

131. Elliott SP, Fais PJFsi. Further evidence for GHB naturally occurring in common non-alcoholic beverages. 2017;277:e36-e8.

132. Collison K, Houg D, Eck D, Kott R, editors. GHB concentrations in a variety of alcoholic and non alcoholic beverages and liquid food products. Proceedings of the Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists and the International Association of Forensic Toxicologists Washington, USA; 2004.
133. Madea B. Haaranalytik: Technik und Interpretation in Medizin und Recht: Deutscher Ärzteverlag; 2004.
134. Ferrara S, Tedeschi L, Frison G, editors. Endogenous substances in hair. Proceedings of the 1995 international conference and workshop for hair analysis in forensic toxicology; 1995.
135. Kintz P, Cirimele V, Jamey C, Ludes BJJofS. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. 2003;48(1):1-6.
136. Goullé JP, Chèze M, Pépin GJJoa. 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? 2003;27(8):574-80.
137. Vaiano F, Serpelloni G, Furlanetto S, Palumbo D, Mari F, Fioravanti A, et al. Determination of endogenous concentration of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) in hair through an ad hoc GC–MS analysis: A study on a wide population and influence of gender and age. 2016;118:161-6.
138. Cirimele V, Kintz P, Mangin PJJoa. Drug concentrations in human hair after bleaching. 1995;19(5):331-2.
139. Cone EJJTdm. Mechanisms of drug incorporation into hair. 1996;18(4):438-43.
140. Drugs UNOo, Crime. Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. 2011.
141. Bertol E, Mari F, Vaiano F, Romano G, Zaami S, Baglio G, et al. Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases. 2015;7(5):376-84.
142. Kintz PJJoa. A novel approach to document single exposure to GHB: hair analysis after sweat contamination. 2016;40(7):563-4.
143. LeBeau MA, Miller ML, Levine BJFsi. Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine. 2001;119(2):161-7.
144. McCusker RR, Paget-Wilkes H, Chronister CW, Goldberger BA, EISohly MAJJoa. Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry. 1999;23(5):301-5.

145. Duer W, Byers K, Martin JJJoat. Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1, 4-butanediol. 2001;25(7):576-82.
146. Elliott S, Lowe P, Symonds AJFsi. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. 2004;139(2-3):183-90.
147. Frison G, Tedeschi L, Maietti S, Ferrara SDJRcims. Determination of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) in plasma and urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/positive ion chemical ionization mass spectrometry. 2000;14(24):2401-7.
148. Wood M, Laloup M, Samyn N, Morris MR, de Bruijn EA, Maes RA, et al. Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. 2004;1056(1-2):83-90.
149. Meyers JE, Almirall JRJJoFS. Analysis of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in spiked water and beverage samples using solid phase microextraction (SPME) on fiber derivatization/gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). 2005;50(1):JFS2003280-6.
150. Alston II WC, Ng KJFsi. Rapid colorimetric screening test for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine. 2002;126(2):114-7.
151. Bravo DT, Harris DO, Parsons SMJJoFS. Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB). 2004;49(2):1-9.
152. Baldacci A, Theurillat R, Caslavská J, Pardubská H, Brenneisen R, Thormann WJJoCA. Determination of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. 2003;990(1-2):99-110.
153. Bishop SC, Lerch M, McCord BRJFsi. Micellar electrokinetic chromatographic screening method for common sexual assault drugs administered in beverages. 2004;141(1):7-15.
154. Gottardo R, Bortolotti F, Trettene M, De Paoli G, Tagliaro FJJoCA. Rapid and direct analysis of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in urine by capillary electrophoresis–electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. 2004;1051(1-2):207-11.
155. Bennett MJ, Steiner RRJJoFs. Detection of gamma-hydroxybutyric acid in various drink matrices via AccuTOF-DART. 2009;54(2):370-5.

156. Del Signore AG, McGregor M, Cho BPJJoFS. 1 H NMR Analysis of GHB and GBL: Further Findings on the Interconversion and a Preliminary Report on the Analysis of GHB in Serum and Urine. 2005;50(1):JFS2004179-6.
157. Kankaanpää A, Liukkonen R, Ariniemi KJFsi. Determination of  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) and its precursors in blood and urine samples: a salting-out approach. 2007;170(2-3):133-8.
158. Ferrara S, Tedeschi L, Frison G, Castagna F, Gallimberti L, Giorgetti R, et al. Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography—mass spectrometry. 1993;11(6):483-7.
159. Johansen SS, Windberg CNJJoat. Simultaneous determination of  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) and its analogues (GBL, 1.4-BD, GVL) in whole blood and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. 2011;35(1):8-14.
160. Rücker G, Neugebauer M, Willems GJG, Stuttgart. Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl. 2001:403.
161. Busardò FP, Gottardi M, Tini A, Minutillo A, Sirignano A, Marinelli E, et al. Replacing GHB with GBL in recreational settings: a new trend in chemsex. 2018;19(13):1080-5.
162. Jarsiah P, Roehrich J, Wyczynski M, Hess CJDt, analysis. Phase I metabolites (organic acids) of gamma-hydroxybutyric acid—validated quantification using GC–MS and description of endogenous concentration ranges. 2020;12(8):1135-43.
163. Luca G, Vienne J, Vaucher A, Jimenez S, Tafti MJS. Central and peripheral metabolic changes induced by gamma-hydroxybutyrate. 2015;38(2):305-13.

## 9 Danksagung

## 10 Akademischer Lebenslauf







## 11 Versicherung an Eides statt

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.

Mainz, 2021

Pouria Jarsiah