

Bestimmung von endogenen GHB-Konzentrationen in Haaren

Ricarda Kegler¹, Christine Lehmann^{1,2}, Daniel Rentsch¹, Marie Blömker¹, Andreas Büttner¹

¹Institut für Rechtsmedizin, Universitätsmedizin Rostock, St.-Georg-Straße 108, 18055 Rostock; ricarda.kegler@med.uni-rostock.de

²Brandenburgisches Landesinstitut f. Rechtsmedizin, Lindstedter Chaussee 6, 14469 Potsdam

1. Einleitung

Gammahydroxybuttersäure (GHB) zählt neben Alkohol, Medikamenten wie Benzodiazepinen und einigen weiteren betäubenden Mitteln zu jenen Substanzen, welche als sogenannte K.O.-Mittel verwendet werden. Hervorgerufen wird dieser Umstand durch die bewusstseinsbeeinträchtigte bzw. -verlierende Wirkung von GHB. Darüber hinaus wird GHB bzw. sein Prodrug Gammabutyrolacton (GBL) in der Drogenszene als euphorisierendes und enthemmendes Mittel konsumiert. So wird GHB unter anderem neben den klassischen Drogen Cannabis, Amphetamine und Cocain seit Jahren im Rahmen der medizinischen Notfallversorgung in Blutproben nachgewiesen, die während eines Musikfestivals entnommen wurden [1-2].

Während es für den Nachweis von GHB in Blut und Urin mit 4 µg/mL bzw. 10 µg/mL etablierte Richtwerte [3-4] gibt, ab deren Überschreitung von einer exogenen Aufnahme ausgegangen werden kann, fehlen umfassende Daten für die Einschätzung von GHB-Konzentrationen in Haaren weitestgehend. In der Fachliteratur sind bis dato nur wenige Publikationen bekannt, die sich mit dieser Problematik beschäftigt haben [4-9]. Dabei schwankte das Kontingent an Probanden zur Bestimmung von GHB-Basalwerten in Haaren zwischen 12 [8] und 150 [7]. Bertol et al. [5] untersuchten die Haarproben von 30 Probanden, die kein GBL bzw. GHB konsumiert haben, während Vaiano et al. [7] und Shi et al. [9] in umfangreicheren Studien 150 bzw. 66 Haarproben analysierten.

Ziel der hier vorgestellten Studie soll es sein, durch Analysen von einer größeren Zahl an Probanden die Datenlage über endogene GHB-Konzentrationen zu erweitern und somit Aussagen hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen GHB-Konzentrationen zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Haarproben

Die Haarproben stammten von freiwilligen Probanden, die sich zu einer Haarprobenentnahme bereit erklärt haben. Von den Probanden sollten zur besseren Einordnung der Ergebnisse das Geschlecht, das Alter, mögliche Haarbehandlungen (Färbungen, Tönungen, spezielle kosmetische Behandlungen) sowie ein nicht bewusst durchgeführter Konsum von GBL- und/oder GHB-haltigen Zubereitungen dokumentiert werden. Von den untersuchten Haarproben stammten 28 aus dem Archiv einer forensisch-toxikologisch arbeitenden Abteilung, wobei die Aufbewahrungsfristen für die Haare abgelaufen waren. Die Proben wurden ursprünglich im Rahmen von Sorgerechtsstreitigkeiten und Fahreignungsnachweisen entnommen und hinsichtlich klassischer Drogen und Medikamente analysiert. Aussagen bezüglich eines möglichen Konsums von GHB bzw. GBL der Probanden waren im Nachgang nicht mehr möglich.

Segmentielle Haaraufarbeitungen (16 Haarsträhnen mit mindestens drei Haarsegmenten) erfolgten nach individueller Begutachtungen der einzelnen Haarsträhnen und ergaben in Abhängigkeit von der verfügbaren Masse überwiegend Haarsegmentlängen zwischen 1 und 6 cm.

Von 28 willkürlich ausgewählten Sektionsfällen des Institutes für Rechtsmedizin Rostocks aus den letzten zwei Jahren wurden ebenfalls asservierte Haarsträhnen untersucht.

2.2. Probenvorbereitung und -extraktion

Die Haarproben wurden nacheinander mit einer verdünnten Detergenzlösung, dreimal mit destilliertem Wasser sowie anschließend mit Methanol, Aceton und Diethylether gewaschen. Nach Trocknung wurden die Haare gegebenenfalls segmentiert und anschließend mittels Kugelmühle fein zerkleinert. Proben von 20 bis 30 mg gemahlene Haar wurden mit 2 ng/mg GHB-d6 als internen Standard versetzt und mit 1 mL Acetonitril unter Ultraschalleinwirkung 4 h extrahiert. Nach Zentrifugation und Einengung der flüssigen Phase mittels Druckluft wurde der Rückstand in 50 µL Acetonitril rekonstituiert und zentrifugiert. Insgesamt 10 µL des finalen Extraktes wurden zur Analyse in die LC-MS/MS injiziert.

2.3 Instrumentelle Analytik

Die quantitativen Bestimmungen von GHB-Konzentrationen in den Haarproben wurden mittels einer UHPLC (Nexera X2, Shimadzu) gekoppelt mit einem MS/MS 8050 (Shimadzu) durchgeführt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte an einer Shim-pack FC-ODS Säule, die bei 40°C gehalten wurde. Der Eluent bestehend aus (A) 10 mmol/L Ammoniumformiat in Wasser und (B) Acetonitril wurde mit einer Flussrate von 0,3 mL/min als Gradient (30-100 % B) gepumpt. Das MS/MS mit einer ESI-Quelle operierte im negativen MRM-Modus für GHB (m/z 103.0 \rightarrow 57.00; 103.00 \rightarrow 84.80) und den deuterierten Standard GHB-d6 (m/z 109.20 \rightarrow 61.10). Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Haarproben von 124 Probanden, die nach eigenen Angaben kein GBL und/oder GHB konsumiert haben, wurden hinsichtlich der endogenen GHB-Konzentrationen unter Verwendung einer LC-MS/MS-Methode analysiert. Für weitere 28 Probanden, deren Haarproben aus dem Archiv einer forensisch-toxikologisch arbeitenden Abteilung stammten, war im Nachgang eine Befragung bezüglich einer möglichen Aufnahme von GHB bzw. GBL nicht mehr möglich, aber auch nicht als Anfangsverdacht bekannt. Insgesamt wurden somit 152 Haarproben von Personen hinsichtlich des Gehaltes an GHB untersucht. Die wichtigsten Kenngrößen der Haare spendenden Probanden waren: 69 Teilnehmer, 82 Teilnehmerinnen sowie eine gepoolte Haarprobe vom Friseur, in einem Altersbereich von 2 bis 74 Jahre (Median: 31 Jahre, Mittelwert: 32,5 Jahre, ermittelte Angaben von insgesamt 125 Personen, von 27 Probanden waren keine Altersangaben verfügbar). Die Längen der Haarsträhnen schwankten zwischen 1 cm und 43 cm und beinhalteten sowohl ungefärbte/ungetönte als auch gefärbte Haare verschiedenster Farbnuancen beider Geschlechter.

In den Haarproben von den 152 Probanden wurden Konzentrationen an GHB von 0,08 ng/mg bis 2,71 ng/mg ermittelt. In 140 Fällen (92,1 %) waren die GHB-Konzentrationen kleiner als 2,00 ng/mg im Haar, während Konzentrationen an GHB von kleiner als 1,50 ng/mg bei 123 Probanden (80,9 %) gemessen wurden (Abb. 1). Für über die Hälfte der Probanden (94 Personen, 61,8 %) resultierten Ergebnisse von weniger als 1,00 ng/mg GHB im Haar. Im Haar von keinem der 152 Probanden wurden GHB-Konzentrationen größer als 3,00 ng/mg nachgewiesen, sodass anhand der Datenlage eine GHB-Konzentration im Haar oberhalb von 3,00 ng/mg als hinweisgebend auf eine exogene Aufnahme von GHB bzw. GBL angesehen werden könnte.

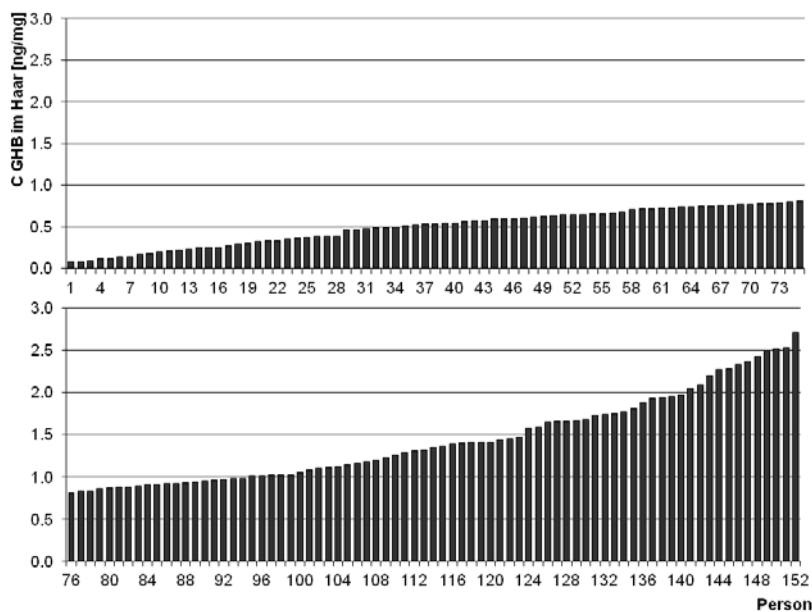
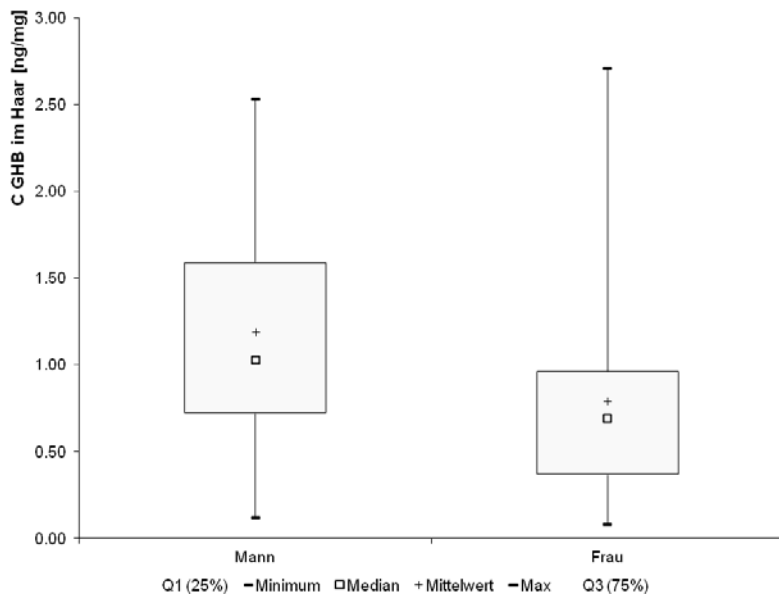


Abb. 1. GHB-Konzentrationen in Haaren von 152 Personen (69 Männer, 82 Frauen, eine gepoolte Haarprobe vom Friseur (Nr. 65)), von denen kein GHB- bzw. GBL-Konsum bekannt war.

Segmentielle Haaranalysen von 16 längeren Haarsträhnen (bis zu 43 cm) mit mindestens drei Haarsegmenten lieferten überwiegend keine oder nur geringfügige Unterschiede zwischen den Einzelsegmenten. Für die Segmente wurden dabei Haarlängen in Abhängigkeit von der verfügbaren Masse zwischen 1 cm und 6 cm verwendet. Getrennte Betrachtungen für weibliche und männliche Probanden ergaben dagegen deutliche Unterschiede (Abb. 2).



Die Mittelwerte und Mediane der GHB-Konzentrationen im Haar betragen 0,79 und 0,69 ng/mg für Frauen sowie 1,19 und 1,02 ng/mg für Männer.

Die Extremwerte waren für beide Geschlechter ähnlich. Sie lagen bei 0,08 und 2,71 ng/mg für Frauen sowie bei 0,12 und 2,53 ng/mg für Männer.

Abb. 2. GHB-Konzentrationen in Haaren von 151 Personen (69 Männer und 82 Frauen), von denen jeweils kein Konsum von GHB bzw. GBL bekannt war.

Bezüge zwischen den Konzentrationen an GHB und dem Alter der Probanden zeigten bedingt Unterschiede in den GHB-Konzentrationen zwischen Männern und Frauen in den einzelnen Altersgruppen (Abb. 3). In fast allen Altersgruppen scheinen die Frauen verglichen mit den Männern tendenziell (leicht) niedrigere GHB-Konzentrationen aufzuweisen. Besonders deutlich stellen sich die Unterschiede in den Altersgruppen der Minderjährigen und der 40 bis 49-Jährigen dar. Allerdings sollten die Ergebnisse aufgrund der geringen Probandenzahlen in den einzelnen Altersgruppen nicht überbewertet, sondern lediglich als hinweisgebend verstanden werden. Für Männer über 50 Jahre und Frauen über 60 Jahre lagen nur sehr wenige Messungen vor, sodass eine Interpretation nicht vorgenommen wird.

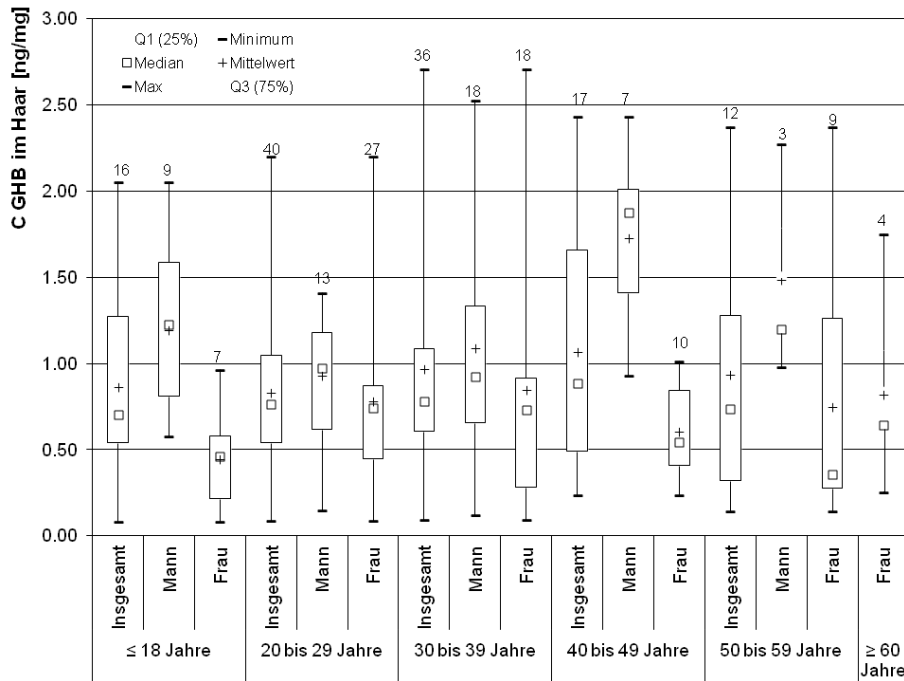


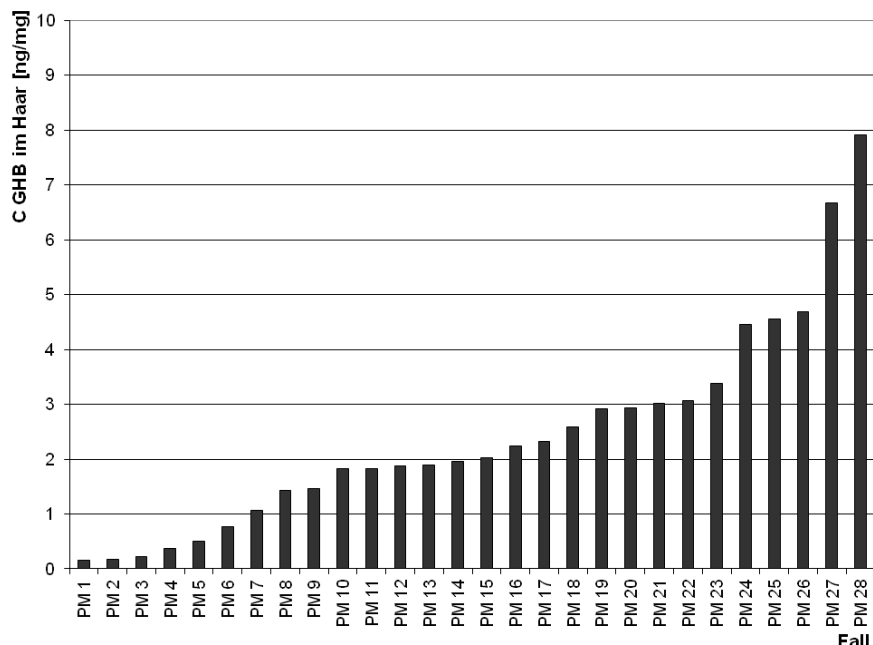
Abb. 3. GHB-Konzentrationen nach Geschlecht und Alter der 125 Probanden, von denen das Alter bekannt war.

Darüber hinaus wurden Haarsträhnen von Verstorbenen (n = 28) untersucht, um den Gehalt von GHB in Haaren *post-mortem* zu ermitteln. Dabei wurden GHB-Konzentrationen im Haar von 0,15 bis 7,90 ng/mg gefunden (Abb. 4). In einem zu lebenden Probanden vergleichbaren Bereich lagen die GHB-Konzentrationen von 20 verstorbenen Personen (0,15 bis 2,93 ng/mg).

Für weitere 6 Personen wurden GHB-Konzentrationen im Haar von 3,00 bis 4,69 ng/mg gemessen.

Zwei deutlich von den anderen Daten differierende GHB-Werte wurden für die Fälle PM27 und PM28 erhalten. Sie lagen bei 6,67 und 7,90 ng/mg.

Abb. 4. GHB-Konzentrationen im Haar von 28 verstorbenen Personen aus dem Rostocker Sektionsgut.



Detaillierte Betrachtungen der verfügbaren Personendaten (Alter, Geschlecht), Todesumstände und Liegezeitangaben wurden zur besseren Einordnung der ermittelten GHB-Haarkonzentrationen durchgeführt und sind neben den anderen toxikologischen Befunden in Tabelle 1 wiedergegeben. Bezüge zwischen den Einzelfalldaten und den ermittelten GHB-Konzentrationen *post-mortem* waren mit dem vorliegenden Datensatz nicht ableitbar.

Castro et al. [4] untersuchten ebenfalls Haarproben von verstorbenen Personen (23 Männer und 9 Frauen) und fanden in diesen 32 Fällen GHB-Haarkonzentrationen zwischen 0,16 und 3,12 ng/mg. In einem ähnlichen Konzentrationsbereich lagen die ermittelten GHB-Werte in 22 der 28 untersuchten *post-mortem* Fälle in der hier präsentierten Studie.

Tab. 1. Fallbezogene Angaben (Alter und Geschlecht der Verstorbenen, Todesumstände und toxikologische Befunde) der 28 Personen, von denen *post-mortem* Haaranalysen durchgeführt wurden.

Fall-Nr.	Personendaten	Todesursache Quellen: forensisch-medizin. Fallgutachten	toxikologische Befunde
PM 1	weiblich 58 Jahre	Ertrinken wenige Stunden zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen zu Lebzeiten	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 2	weiblich 29 Jahre	schwere, stumpfe Gewalteinwirkung infolge eines Verkehrsunfalls	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 3	weiblich 92 Jahre	Koronarinsuffizienz bei schweren Vorerkrankungen des Herzens	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 4	weiblich 84 Jahre	schweres stumpfes Schädel-Hirn- Trauma (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 5	weiblich 82 Jahre	Hirnmassenblutung	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 6	männlich 54 Jahre	Unterkühlung und Stoffwechsellentgleisung	BAK 0,85 ‰ UAK 0,96 ‰ Aceton je 285 mg/l
PM 7	weiblich 5 Jahre	schwere, stumpfe Gewalteinwirkung (Verkehrsunfall)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 8	männlich 52 Jahre	Tod nicht sicher feststellbar aufgrund starker Fäulnisveränderungen mit Teilskelettierung ~1 Monat zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen zu Lebzeiten	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 9	männlich 58 Jahre	Ketoazidose bei Diabetes mellitus und bekanntem Alkoholabusus, 3 Tage zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen zu Lebzeiten	OSV-Blut: BAK <0,10 ‰ Aceton 46,3 mg/l Blutzucker 7,07 mmol/l Ketokörper 2,8 mmol/l
PM 10	weiblich 68 Jahre	Multiorganversagen nach Sturz verstarb in Klinik	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 11	männlich 74 Jahre	schwere, stumpfe Gewalteinwirkung (Verkehrsunfall)	BAK <0,10 ‰
PM 12	weiblich 51 Jahre	malignes Hirnödeme nach Intubations- narkose, Colonkarzinom mit Metastasen in Leber und Lunge verstarb in Klinik	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 13	weiblich 87 Jahre	akute Koronarinsuffizienz verstarb in Klinik	OSV-Blut: Morphin (91,3 ng/ml) Quetiapin (1,49 µg/ml) Metamizol (28,3 µg/ml)
PM 14	männlich 52 Jahre	Tod nicht sicher feststellbar aufgrund starker Fäulnisveränderungen Liegezeit unbekannt	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 15	weiblich 68 Jahre	akute Koronarinsuffizienz bei stenosierender Koronarsklerose, Hypertonie	BAK 0,85 ‰ UAK 0,96 ‰
PM 16	männlich 67 Jahre	Sturz aus der Höhe (Fallschirmabsturz)	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 17	männlich 67 Jahre	akute Koronarinsuffizienz	keine Untersuchungen durchgeführt

Fall-Nr.	Personendaten	Todesursache Quellen: forensisch-medizin. Fallgutachten	toxikologische Befunde
PM 18	männlich 63 Jahre	akute Koronarinsuffizienz bei hochgradig stenosierender Koronarsklerose in Kombination mit Tracheobronchitis verstarb in Seniorenpflegeheim	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 19	weiblich 63 Jahre	Mischintoxikation durch Tramadol und Trazodon verstarb in Wohnung zwei Tage lebend/tot auf Fußboden liegend	OSV-Blut: BAK <0,10‰ Aceton 21,4 mg/l Tramadol (1,01 µg/ml) Trazodon (2,21 µg/ml) Lorazepam (59,3 ng/ml)
PM 20	männlich 85 Jahre	Pneumonie nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma (Sturz im Garten) verstarb in der Klinik	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 21	männlich 59 Jahre	schwere kombinierte Verletzungen (Sturz aus Höhe)	BAK <0,10 ‰ UAK <0,10 ‰
PM 22	weiblich 63 Jahre	nicht sicher feststellbar aufgrund starker Fäulnisveränderungen und Mumifizierung ~4 Monate zwischen Auffinden und letztmaligem Sehen zu Lebzeiten	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 23	männlich 51 Jahre	schweres, stumpfes Schädel-Hirn-Trauma (Sturz)	BAK <0,10 ‰ UAK 0,14 ‰
PM 24	männlich 59 Jahre	schweres, stumpfes Schädel-Hirn-Trauma (Überrollung durch Fahrzeug)	BAK <0,10 ‰ UAK <0,10 ‰
PM 25	männlich 49 Jahre	schwere kombinierte Verletzungen (Sturz aus Höhe)	BAK <0,10 ‰ UAK <0,10 ‰
PM 26	männlich 75 Jahre	Lungenarterienembolie bei Zustand nach OP	keine Untersuchungen durchgeführt
PM 27	männlich 48 Jahre	schwere, kombinierte Verletzungen (Verkehrsunfall)	BAK <0,10 ‰ UAK <0,10 ‰
PM 28	weiblich 73 Jahre	Rauchgasvergiftung nach Wohnungsbrand	OSV-Blut: Cyanid 0,82 µg/mL COHb 62,7% Sättigung

Ein Vergleich der GHB-Haarkonzentrationen von 152 Probanden mit bereits publizierten Studien ergab einen ähnlichen Konzentrationsbereich. So berichten Vaiano et al. [7] von 150 Probanden endogene GHB-Haarkonzentrationen zwischen 0,27 und 2,84 ng/mg. Bertol et al. [5] stellten im Haar der Probanden endogene GHB-Konzentrationen von $1,27 \pm 0,73$ ng/mg fest, während Goullé et al. [6] Konzentration an GHB im Haar in einem Bereich von 0,32 bis 1,86 ng/mg ermittelten, wobei sie keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Haarfarben feststellen konnten. Unterschiede zwischen einzelnen Haarfarbnuancen konnten mit dem hier vorgestellten Datensatz ebenfalls nicht herausgearbeitet werden.

Vaiano et al. [7] konnten anhand ihres großen Datensatzes signifikant erhöhte durchschnittliche GHB-Konzentrationen bei Männern gegenüber Frauen feststellen. Die Unterschiede in den durchschnittlichen GHB-Konzentrationen zwischen Männern und Frauen wurden auch durch die Arbeit von Shi et al. [9] aufgezeigt, welche bei männlichen Probanden (n=35) im Mittel 2,95 ng/mg GHB im Haar und bei Frauen (n=31) eine mittlere GHB-Haarkonzentration von 0,77 ng/mg bestimmt haben. Allerdings wurden als Extremwert für Männer bis zu 4,91 ng/mg GHB im Haar gemessen [9].

Schwankungen in den endogenen Haarkonzentrationen zwischen einzelnen Probanden können sicherlich interindividuell bedingt sein, aber gegebenenfalls auch durch häufige kosmetische Behandlungen der Haare (Waschen, Tönen, Färben) mit beeinflusst werden.

4. Literatur

1. Kegler R, Büttner A, Nowotnik J, Rücker G, Rentsch D (2014) Trends in drug consumption at a music festival over five years. *Rechtsmedizin* 24 (4): 366-367
2. Kegler R, Büttner A, Nowotnik J, Rücker G, Rentsch D (2013) Konsumtrends von illegalen Substanzen während eines Musikfestivals von 2009 bis 2012. *Mosbacher Symposium*
3. Andresen-Streichert H, Jensen P, Kietzerow J, Schrot M, Wilke N, Vettorazzi E, Mueller A, Iwersen-Bergmann S (2014) Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. *Int J Legal Med* 129: 57-68
4. Castro AL, Dias M, Reis F, Teixeira HM (2014) Gamma-hydroxybutyric acid endogenous production and post-mortem behaviour – The importance of different biological matrices, cut-off reference values, sample collection and storage conditions. *J Forensic Legal Med* 27: 17-24
5. Bertol E, Mari F, Vaiano F, Romano G, Zaami S, Baglio G, Busardò FP (2015) Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases. *Drug Test Anal* 7 (5): 376-384
6. Goullé JP, Chèze M, Pépin G (2003) Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J Anal Toxicol* 27 (8): 574-580
7. Vaiano F, Serpelloni G, Furlanetto S, Palumbo D, Mari F, Fioravanti A, Bertol E (2016) Determination of endogenous concentrations 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. *J Pharm Biomed Anal* 118: 161-165
8. Busardò FP, Pichini S, Zaami S, Pacifici R, Kintz P (2018) Hair testing of GHB: an everlasting issue in forensic toxicology. *Clin Chem Lab Med* 56 (2): 198-208
9. Shi Y, Cui X, Shen M, Xiang P (2016) Quantitative analysis of the endogenous GHB level in hair of the Chinese population using GC/MS/MS. *J Forensic Legal Med* 39:10-15