

*Beitrag aus dem Arbeitskreis Klinische Toxikologie:*

## **$\gamma$ -Hydroxybuttersäure (GHB) in notfallmedizinischen Proben: Bestimmung durch HS-SPME/GC-MS und Fallbeispiele**

---

C. Merckel, V. Auwärter, D. Simmert und F. Pragst

---

*Institut für Rechtsmedizin der Charité, Hannoversche Straße 6, D-10115 Berlin*

### **1. Einleitung**

Der Missbrauch von  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure (GHB) hat auch in Deutschland in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Dieses spiegelt sich auch im Untersuchungsgut der toxikologischen Notfalldiagnostik wider und fordert die Vorhaltung einer einfachen Methode zum schnellen Nachweis und zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung. Neben der vorsätzlichen Einnahme zu berauschenden Zwecken muss auch mit einer kriminellen Beibringung als K.o.-Mittel gerechnet werden. Die übliche Applikation ist die orale Aufnahme der Lösung des Natriumsalzes, jedoch könnte auch die Inhalation der versprühten Lösung eine Rolle spielen, wie der in Abb. 1 dargestellte und mit hochprozentiger GHB-Lösung gefüllte Sprayer vermuten lässt, der bei einem Notfallpatienten gefunden wurde.

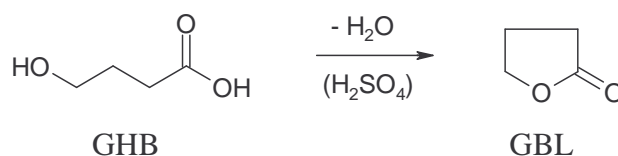


Abb. 1. Sprayer mit hochprozentiger GHB-Lösung, der bei einem Notfallpatienten gefunden wurde

In diesem Beitrag berichten wir über unsere Erfahrungen mit der Anwendung der Headspace-Festphasenmikroextraktion in Kombination mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HS-SPME/GC-MS) zur semiquantitativen Bestimmung von GHB in klinischen Proben und über einige Fallbeispiele.

## 2. Analyse von GHB mittels HS-SPME und GC-MS in Blut-, Urin- und Substanzproben

Von den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung von GHB [1-10] erschien uns die sauer katalysierte Zyklisierung zum  $\gamma$ -Butyrolacton (GBL) und Anwendung der Headspace-Festphasenmikroextraktion in Kombination mit GC-MS unter Verwendung von D<sub>6</sub>-GHB als innerem Standard sowohl bezüglich der Analysendauer als auch hinsichtlich des manuellen Aufwandes als die günstigste Variante. Zum Ausschluss von bereits vorher vorhandenem GBL kann die Probe ohne Säurezusatz mit SPME untersucht werden.



Die Massenspektren von GBL und D<sub>6</sub>-GBL sind in Abb. 2 dargestellt. Die Hauptfragmente entstehen durch Abspaltung von CO<sub>2</sub> oder Formaldehyd (CH<sub>2</sub>=O bzw. CD<sub>2</sub>=O). Analyt und innerer Standard unterscheiden sich demnach um 6 bzw. 4 Masseneinheiten voneinander (Fragmentierungsschem s. Abb. 3). Man erkennt, dass die Masse 42 auch im Spektrum von D<sub>6</sub>-GHB vorkommt. Das Peakverhältnis 42/48 ist daher für die Quantifizierung weniger geeignet.

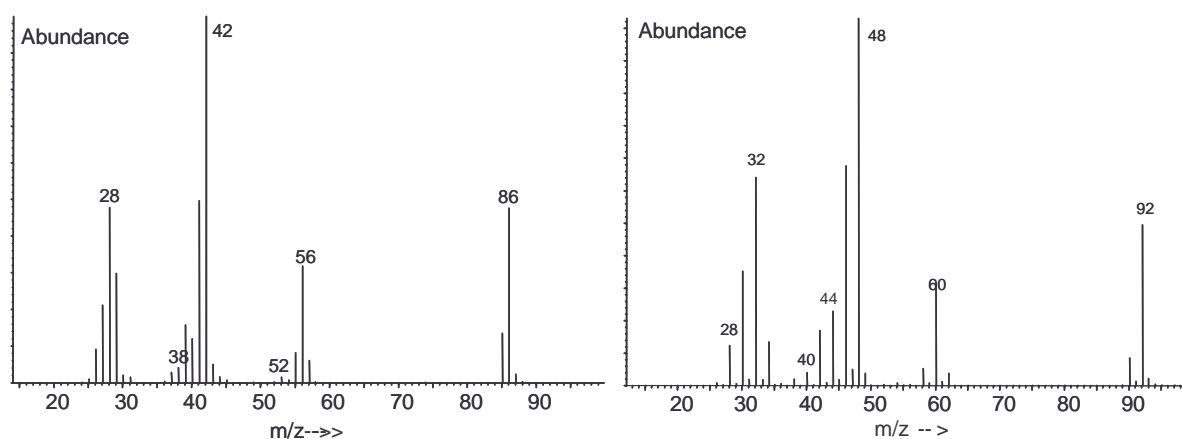


Abb. 2. EI-Massenspektren von GBL und D<sub>6</sub>-GBL

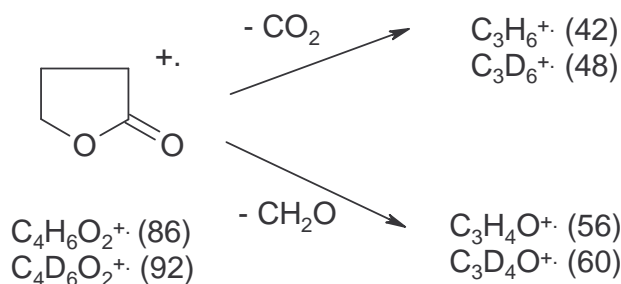


Abb. 3. Massenspektrometrische Fragmentierung von GBL und D<sub>6</sub>-GBL

Für die praktische Durchführung wurde folgende Vorschrift verwendet:

### **Reagenzien**

- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (wasserfrei)
- 25%-ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **GHB-Standards**

- *GHB, Na-Salz, M = 126,09*: HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COONa  
(1 mg/mL in Methanol, Promochem, Produkt-Nr. G-001)
- *D<sub>6</sub>-GHB, Na-Salz, M = 132,04*: HO-CD<sub>2</sub>-CD<sub>2</sub>-CD<sub>2</sub>-COONa  
(1 mg/mL in Methanol, Promochem, Produkt-Nr. G-006)

Da Methanol bei der SPME stören kann, ist es sinnvoll, die in der Ampulle gelieferten Standard-Lösungen (1 ml) vollständig einzudampfen und in 1 ml Wasser zu lösen. Hierdurch wird gleichzeitig das Problem der Konzentrationszunahme durch Verdunstung des Lösungsmittels bei häufigem Öffnen der Fläschchen minimiert.

### **Geräte**

- GC-MS (Agilent GmbH, GC 6890, MS 5873) mit MultiPurpose Sampler MPS2 (Gerstel GmbH). Die Analyse kann mit gleichem Erfolg auch mit dem manuellen Faserhalter durchgeführt werden.

### **Probenvorbereitung**

- 1ml Blut oder Serum bzw. 50µl Urin werden mit 50µg d<sub>6</sub>-GHB (50 µl der wässrigen Standard-Lösung, s. o.), 0.5g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 1 ml 25%-iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt.
- Substanzproben (GHB-verdächtige Lösungen) werden 1:1000 verdünnt und wie die Blutproben untersucht.

### **HS-SPME**

- Faser: bevorzugt Carboxen-PDMS. PDMS-DVB ist mit geringerer Effektivität ebenfalls möglich.
- 3 min temperieren (65°C)
- 15 min bei 65°C mit PDMS-DVB-Faser unter Schütteln (250 rpm, 30s on, 30s off) extrahieren.
- 4 min desorbieren im Injektions-Port. Injektion splitless, split nach 2 min öffnen.

### **GC-MS**

- Injektortemperatur: 260°C
- Säule: HP-5MS, 25m, flow 1ml/min
- Ofen: 45°C für 2 min, mit 20°/min auf 150°C, dann mit 30°/min auf 280°C für 2 min
- Transfer line: 280°C
- MS Quad: 150°C
- MS Source: 230°C
- SIM : m/z für GBL: 42, 56, 86; m/z für d<sub>6</sub>-GBL: 48, 60, 92
- Solvent-Delay: ≤ 3 min

### **Kalibrierung**

- Gespikete Proben, Durchführung wie bei der Analyse.
- Konzentrationen:
  - Serum: 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 200 µg/ml
  - Urin: 10, 20, 50, 100, 200 und 500 µg/ml
- Peakflächenverhältnis 86/92 gegen C<sub>GHB</sub> korrelieren

### **Nachweisgrenze**

- Aus dem Peak/Rauschverhältnis von 3 in praktischen Proben wurde eine Nachweisgrenze von 0,6 µg/ml im Blut und von 5 µg/ml im Urin abgeschätzt. Die Methode ist somit ausreichend empfindlich für den Nachweis bei akuten Vergiftungen

### **Näherungsweise Konzentrationsangabe in dringenden Fällen:**

Blut:  $C_{\text{GHB-Na}} (\mu\text{g/ml}) = 50 \times \text{Peakfläche (m/z 86)} / \text{Peakfläche (m/z 92)}$

Urin:  $C_{\text{GHB-Na}} (\mu\text{g/ml}) = 1000 \times \text{Peakfläche (m/z 86)} / \text{Peakfläche (m/z 92)}$

Kontrolle mit den Massenpaaren 42/48 und 56/60 durchführen

### **Bewertung:**

- Natürliche Konzentrationen: im Blut < 4 µg/ml; im Urin < 10 µg/ml
- Ab 50 µg/ml: Müdigkeit, leichter Schlaf, Desorientiertheit, Konfusion
- Ab 150 µg/ml: Tiefer Schlaf oder Bewusstlosigkeit
- Ab 260 µg/ml: Todesfälle bekannt
- Halbwertszeit: 0,3 – 1 h

Das SIM-Chromatogramm der Blutprobe in einem Fall mit 79 µg/ml ist in Abb. 4 dargestellt.

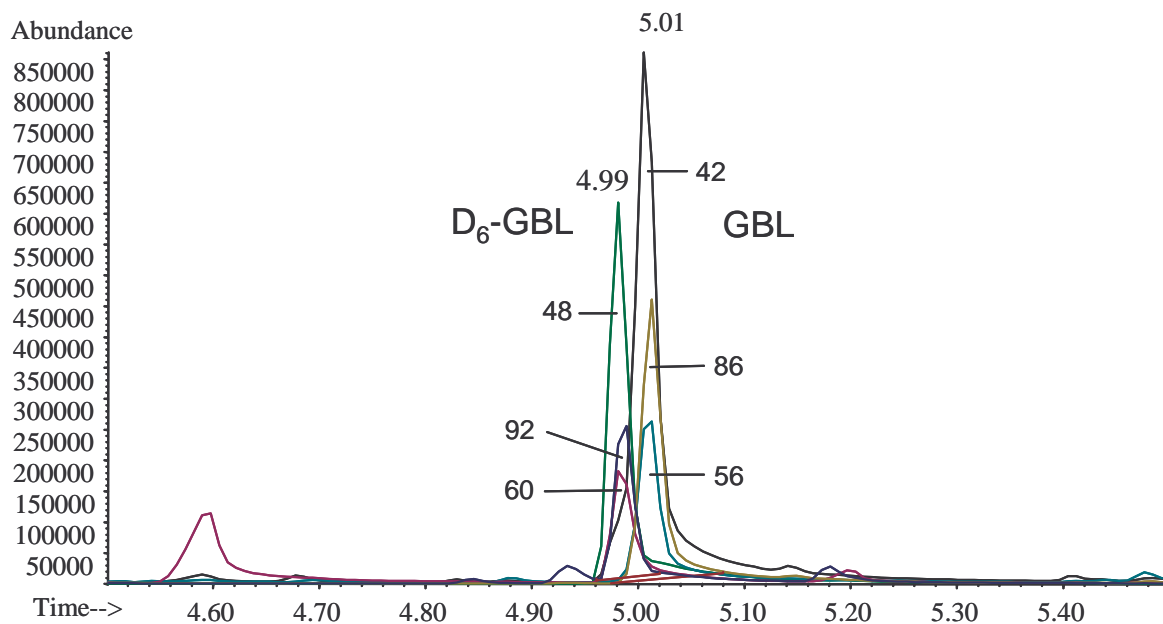


Abb. 4. GC-MS-SIM-Chromatogramm der GHB-Bestimmung in der Blutprobe einer 25jährigen Patientin, die während der Love Parade 2003 mit erloschenen Schutzreflexen aufgefunden wurde. GHB-Konzentration 79 µg/ml.

Störungen durch andere Matrixbestandteile wurden im Retentionszeitbereich des GBL nicht beobachtet. Allerdings trat in einer Probe ein relativ starker Peak bei höherer Retentionszeit auf, der ebenfalls die charakteristischen  $m/z$ -Werte des GBL belegte, jedoch mit verändertem Peakflächenverhältnis. Chromatogramm und im Scan-Modus gemessenes Spektrum sind in Abb. 5 dargestellt. Aus der Bibliothekssuche (Wiley) und aus der Auswertung der Fragmentationen geht hervor, dass es sich wahrscheinlich um 3-Methyl-2-oxo-pentansäuremethylester handelt. Da in diesem Fall die methanolische Lösung von  $D_6$ -GHB verwendet wurde, ist der Methylester wahrscheinlich unter der Wirkung der Schwefelsäure aus dem Methanol der Standardlösung und der entsprechenden Säure gebildet worden. Mit geringerer Intensität wurde dieser Peak auch bei anderen Proben festgestellt, was darauf hindeutet, dass es sich um ein endogenes Molekül handelt. Eine falsche Zuordnung zum GBL ist bei Verwendung des deuterierten Standards ausgeschlossen.

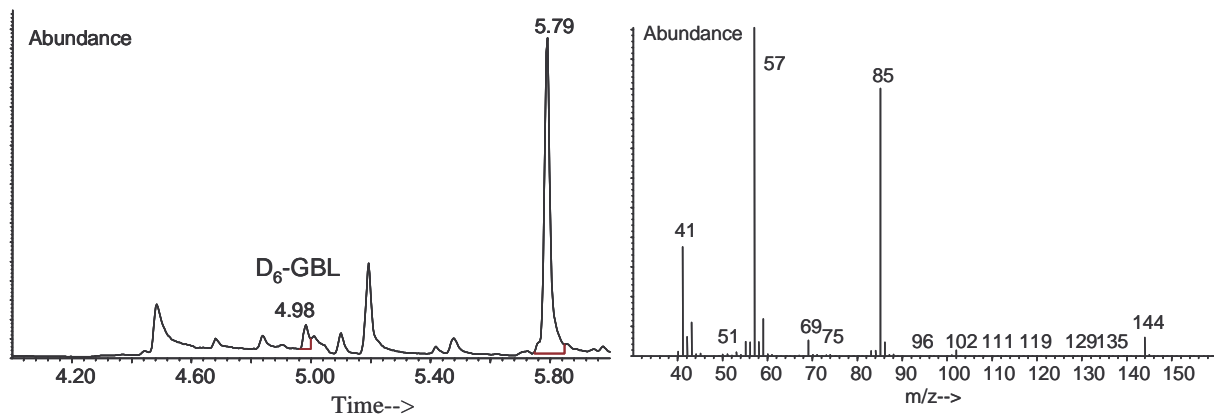


Abb. 5. Chromatogramm (links) und Massenspektrum des Peaks bei 5,79 min (rechts) bei einer Urinprobe, die mit Verdacht auf GHB untersucht wurde. Bei dem Peak handelt es sich wahrscheinlich um 3-Methyl-2-oxo-pentansäuremethylester, der durch Veresterung der endogenen Carbonsäure mit dem Methanol aus der  $D_6$ -GHB-Standardlösung gebildet wurde.

### 3. Fallbeispiele

Die Methode wurde in einer Reihe von kürzlich untersuchten Fällen aus den Rettungsstellen der Charité angewendet, bei denen aus der Symptomatik oder zusätzlichen Informationen die Einnahme von GHB denkbar war. Die Ergebnisse in drei positiven Fällen sind in Tab. 1 angegeben.

Tab. 1. Untersuchung von Proben aus klinischen Fällen auf GHB

Fall-Nr.	Angaben zum Fall	Probenmaterial	GHB-Nachkonzentration
1	25jährige Patientin, mit erloschenen Schutzreflexen während der Love Parade aufgefunden. Zusätzlich festgestellt: BAK 1,3 %, MDMA 40 ng/ml, MDE 60 ng/ml, MDA 10 ng/ml	Blut	79 µg/ml
2	28jährige Patientin, komatös in die Rettungsstelle eingeliefert, gibt nach dem Erwachen Einnahme von GHB an. Zusätzlich: BAK 0,6 %, positiver Amphetaminbefund durch EMIT	Blut Urin	70 µg/ml 4400 µg/ml
3	Unbekannte Patientin, keine weiteren Angaben zur Vorgeschichte bekannt. Zusätzlich festgestellt: BAK 1,1 %, positiver Cannabisbefund durch EMIT	Blut Urin	21 µg/ml 380 µg/ml
4	Patient im Alkoholentzug, der sich zuvor mit selbst aus GBL hergestelltem GHB therapiert hatte	Farblose Flüssigkeit	0,44 g/ml

Wegen der kurzen Halbwertszeit und der allgemein schnellen Erholung der Patienten war in den meisten Fällen der qualitative Nachweis für die weitere Verfahrensweise wichtiger als das quantitative Ergebnis. Die Patientin 1, bei der außer GHB noch Alkohol und Ecstasy-Wirkstoffe nachgewiesen wurden, musste zunächst mit Midazolam und Thiopental ruhiggestellt werden.

Tab. 1 enthält weiterhin eine Flüssigkeitsprobe eines Patienten, der sich in der psychiatrischen Klinik zur Alkoholentzugsbehandlung befand und nach eigenen Angaben vorher GBL über das Internet bestellt hatte. Daraus hatte er sich durch Hydrolyse mit NaOH nach Bedarf GHB hergestellt. Vor der Einnahme wurde der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls neutralisiert. Er hatte nach eigenen Angaben alle 90 bis 120 Minuten 2 g der Substanz eingenommen. Die uns übergebene Flüssigkeit enthielt 0,44 g/ml GHB-Na.

## Literatur

- [1] Blair S, Song M, Hall B, Brodbelt J. Determination of gamma-hydroxybutyrate in water and human urine by solid phase microextraction-gas chromatography/quadrupole ion trap spectrometry. *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 688-693.
- [2] Frison G, Tedeschi L, Maietti S, Ferrara SD. Determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in plasma and urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/positive ion chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 2401-2407.
- [3] Bosman IJ, Luthof KJ. Forensic cases involving the use of GHB in The Netherlands. *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 17-21.
- [4] Elian AA. GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. *Forensic Sci. Int.* 122 (2001) 43-47.
- [5] LeBeau MA, Montgomery MA, Miller ML, Burmeister SG. Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 421-428.
- [6] Villain M, Cirimele V, Ludes B, Kintz P. Ultra-rapid procedure to test for gamma-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 792 (2003) 83-7.
- [7] de Vriendt CA, van Sassenbroeck DK, Rosseel MT, van de Velde EJ, Verstraete AG, Vander Heyden Y, Belpaire FM. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of gamma-hydroxybutyric acid in rat plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752 (2001) 85-90.
- [8] Baldacci A, Theurillat R, Caslavská J, Pardubská H, Brenneisen R, Thormann W. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 990 (2003) 99-110.
- [9] Duer WC, Byers KL, Martin JV. Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol. *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 576-582.
- [10] Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F, Gallimberti L, Giorgetti R, Gessa GL, Palatini P. Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 483-487.