

Beitrag zur Bewertung von γ -Hydroxybuttersäure (GHB) – Konzentrationen im Blut lebender Personen sowie in postmortalen Blutproben

H. Steinecke

Auf dem Brodsack 11, 99198 Erfurt/Büßleben

Einleitung

Obwohl inzwischen die messtechnischen Voraussetzungen geschaffen wurden, auch niedrige GHB-Konzentrationen in biologischen Flüssigkeiten zu erfassen [1,2], haben diese noch keinen allgemeinen Eingang in die klinisch-toxikologische und forensische Analytik gefunden. Daraus resultieren u. a. die Probleme bei der Interpretation der Messergebnisse. Die Schwierigkeiten in der GHB-Analytik sind außerdem zum einen in der schnellen Elimination ($t_{1/2}$ 20 – 45 min) [3] begründet, so dass nur ein enges Zeitfenster zwischen Ingestion und Blutentnahme für die Analytik exogen aufgebauter Konzentrationen zur Verfügung steht, und zum anderen ist GHB eine im Säugetierorganismus natürlich vorkommende Verbindung, deren Konzentration sich exkorporal durch Lagerungseinflüsse sowie durch postmortale Neubildung verändern kann.

Pharmakologie

Der wichtigste Syntheseweg von GHB im Säugetierorganismus verläuft über die Verstoffwechslung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) und findet in verschiedenen Bezirken des Gehirnes statt [4,5]. Des Weiteren kann GHB durch Serumlactonase katalytisch aus γ -Butyryllacton (GBL) synthetisiert werden. GBL wird im Muskelgewebe gebildet. Seine Konzentration ist abhängig von der Dauer der Muskelkontraktion [6]. Dieser periphere metabolische Vorgang stellt die Ursache für die mögliche in-vitro-Bildung von GHB dar. Während in-vivo die systemisch gebildete GHB innerhalb sehr kurzer Halbwertszeiten stufenweise bis zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert und ausgeschieden wird, ist dieser Prozess in-vitro nicht mehr möglich. Deshalb kann es – in Abhängigkeit von der Konzentration des GBL und des Enzyms Serumlactonase – zu einer Erhöhung der physiologischen GHB-Konzentration kommen. Enzymatisch katalysierte Vorgänge laufen aber nur bei Körpertemperatur optimal ab.

Untersuchungen zur Bestimmung endogener GHB - Blutspiegel

SHIMA et al. [1] bestimmten die endogenen Blut-GHB-Konzentrationen von 24 gesunden Menschen sofort nach der Entnahme. Die Blutspiegel reichen von 0,005 – 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (Mittelwert: 0,0069 $\mu\text{g/ml}$, Standardabweichung (s): 0,0020 $\mu\text{g/ml}$). Die Messungen wurden mittels einer optimierten GC/MS Methode hoher Präzision und einer Nachweisgrenze von 0,003 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. ABANADES et. al. [2] ermittelte im Plasma von 5 Probanden unter analogen Bedingungen eine endogene GHB-Konzentration von 0,04 $\mu\text{g/ml} \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$.

In Veröffentlichungen älteren Datums sowie deutscher Autoren wurden die endogenen Blut-GHB-Spiegel generell höher angegeben. So findet GIBSON [7] eine durchschnittliche Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (s= 0,3 $\mu\text{g/ml}$), während andere Autoren Konzentrationen von 0,17 – 1,51 $\mu\text{g/ml}$ [8], 0,11 – 1,56 $\mu\text{g/ml}$ [9] sowie $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ [10], $\leq 2,5 \mu\text{g/ml}$ [11] bis 4 $\mu\text{g/ml}$ [12] und $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ [13]) angeben.

Einfluss von Lagerungsbedingungen auf die Neubildung von GHB im Blut lebender Personen

Die in-vitro-GHB-Produktion im Vollblut lebender gesunder Personen wurde von SHIMA [1] in Abhängigkeit von Zeit, Temperatur und der Zugabe von Antikoagulantien und Konservierungsmitteln systematisch untersucht. Dabei wurde auf Keimfreiheit bei der Abnahme der Blutproben sowie auf sterile und luftdicht verschlossene Aufbewahrungsgefäße geachtet. Bei einer Lagerzeit von 14 Tagen wurden ohne Zugabe von Konservierungsmitteln in Abhängigkeit von den Lagertemperaturen folgende Konzentrationen gemessen: Bei -20 °C: 0,017 µg/ml, bei 4 °C: 0,020 µg/ml, bei Raumtemperatur: 0,052 µg/ml. Nach Zugabe von Natriumazid (NaN₃) (0.1 %) und 4 °C ergaben sich 0,016 µg/ml. Die Langzeitstudie über 16 Monate ergab für das Nativblut bei -20 °C eine Konzentration von 0,03 µg/ml und bei 4 °C eine Konzentration von 0,4µg/ml GHB. Die Konzentration nach Lagerung bei Raumtemperatur wurde im gleichen Zeitraum mit 1,8 µg/ml ermittelt. Keinen wesentlichen Effekt hatte die Zugabe von NaN₃. Bei beiden Studien betrug die Ausgangskonzentration 0,008 µg/ml (gemessen unmittelbar nach Blutentnahme)

Die postmortale Neubildung von GHB

Besondere Vorsicht ist bei der Interpretation von Analyseergebnissen aus postmortalen Blutproben geboten. Offensichtlich ist in diesen eine signifikant höhere Neubildung von GHB als im Blut lebender Personen möglich. In der Literatur wird über Konzentrationen im Bereich von 0 bis 197 µg/ml berichtet [14,9,15,16,17,18]. In allen Fällen wurde Blut Verstorbener untersucht, von denen keine Drogeneinnahme bekannt war. MORIYA et. al.[16] und ELLIOTT et. al. [19] führen die hohe GHB-Konzentration in postmortalen Blutproben auf den Einfluss von Bakterien zurück. ELLIOTT [19] identifizierte in fäulnisveränderten postmortalen Blutproben folgende Mikroorganismen: Clostridia spp., Escherichia coli, Proteus vulgaris, Enterococcus faecalis und Aeromonas spp. Unkonserviertes Pferdeplasma, Humanblut und Urin wurden mit diesen Erregern inokuliert und bei 22° C einen Monat inkubiert. Die Vergleichsproben (sowohl mit NaF versetzt, als auch unkonserviert) wiesen Konzentrationen unter 1µg/ml auf, während die mit Erregern versetzten Proben 2,30 µg/ml GHB enthielten.

Es wurden keine Relationen zwischen den "Fäulnismarkern" Tryptamin und Phenyl-2-ethylamin und der GHB-Konzentration beobachtet [19].

Diskussion

Endogene GHB- Blutspiegel

Die Unterschiede bei der Bestimmung von endogenen GHB-Blutspiegeln sind offensichtlich abhängig von der Nachweisgrenze und Präzision der angewandten Messverfahren. Die von BASELT et al. [10], MOFFAT et al. [12], MERCKEL et al. [13] und ELLIOTT et al. [11] angewandten Methoden haben Nachweisgrenzen, welche die physiologischen GHB-Konzentrationen überhaupt nicht erfassen. Obwohl bei ERDMANN et al. [9] aus der vorliegenden Veröffentlichung keine Angaben zur Nachweisgrenze und Präzision ersichtlich sind, muss davon ausgegangen werden, dass hier der gleiche Sachverhalt vorliegt (1. Kalibrierungspunkt bei 10 µg/ml). Mit Hilfe dieser Messmethoden gewonnenen Daten über endogene GHB-Blutspiegel sind nicht repräsentativ und können nicht die Grundlage für die Festlegung eines Grenzwertes zwischen endogenen und exogen aufgebauten Blutspiegeln bilden. Messdaten mit der notwendigen Präzision in diesem Grenzbereich sind nur mit Verfahren zu ermitteln, deren Nachweisgrenze wesentlich tiefer liegen. Bei dem von SHIMA et. al [1] angewandten

Verfahren wird eine Kalibrierungsfunktion verwendet, welche von 0,003 – 3,0 µg/g mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,999 im linearen Bereich liegt.

In vitro-GHB-Bildung in Blutproben lebender Personen

Da in den wenigsten Fällen die Messung sofort nach der (sterilen) Blutentnahme möglich ist, hat die Behandlung der Blutprobe in dem Zeitraum bis zur Messung einen entscheidenden Einfluss auf das Messergebnis. Folgende Einflussgrößen sollten beachtet werden:

1. Sterilität bei Abnahme und Lagerung
2. Lagerungstemperatur
3. Konservierungsmittel
4. Erkrankungen

Zu 1. Sterilität bei Abnahme und Lagerung

Da die bakterielle Produktion von GHB bewiesen werden konnte [16,19], muss eine mikrobielle Kontamination bei der Abnahme und Lagerung des Blutes ausgeschlossen werden (Verwendung eines sterilen Abnahmebesteckes und von sterilen und luftdicht verschlossenen Aufbewahrungsgefäßen). Die Ursachen für die bakterielle GHB-Neubildung sind nicht bekannt, anzunehmen ist aber eine Induktion der Serumlaktonase.

Zu 2. Lagerungstemperatur

Mit steigender Temperatur nimmt die in-vitro-Bildung von GHB zu. Die Ursachen hierfür wurden im Abschnitt“ Pharmakologie“ dieser Arbeit dargelegt. Das sofortige Einfrieren bei -20° C unterbindet diesen Prozess wirksam und kann dann empfohlen werden, wenn die Probe länger als 2 Wochen gelagert werden muss. Bei kürzeren Lagerzeiten und voraussichtlich hohen GHB-Spiegeln (≥ 1 µg/ml) ist eine Kühlschrankschlagerung bei 4° C ausreichend.

Zu 3. Konservierungsmittel

Antikoagulantien und Konservierungsmittel wie Natriumcitrat, EDTA, Heparin und Natriumoxalat beschleunigen die Neubildung von GHB im Vollblut, wobei die Konzentration durch Natriumcitrat und Heparin bei einer Lagerung von 14 Tagen bei 4 °C auf das 5-fache der Ausgangskonzentration anstieg [1]. Das Konservierungsmittel der Wahl stellt bei einer 14-tägigen Lagerung NaN_3 dar. Der Konzentrationsanstieg liegt noch unter dem bei -20 °C. Der Zusatz von NaN_3 führt offensichtlich zu einer Inhibierung der bakteriellen Aktivität bezüglich der Induktion von Serumlaktonase. Bei der 16-monatigen Lagerung bringt dessen Zusatz allerdings keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der Lagerung bei 4 °C ohne Zugabe. Hier bleibt die Lagerung bei -20 °C die wirksamste Maßnahme.

Zu 4. Erkrankungen

Bakterielle Erkrankungen sowie die außerordentlich seltene Stoffwechselerkrankung SSADH-Defekt (GHB-aciduriae) können eine Erhöhung der GHB-Konzentration herbei führen, wobei letztere einen GHB-Spiegel über 200 µg/ml verursachen kann [9]. Beide Erkrankungen sind vor Durchführung der Messungen auszuschließen.

Außer in messmethodischen Ursachen können die im Vergleich zu [1,2] in [7-13] signifikant höheren physiologischen GHB-Spiegel auch in der in vitro-Bildung begründet liegen, deren Ursachen in den Punkten 1-4 diskutiert wurden.

GHB – Spiegel in postmortalen Blutproben

Die Kontamination der postmortalen Blutproben mit Bakterien stellt offensichtlich die Hauptursache für die Neubildung von GHB dar, wobei deren Konzentration vom Ausmaß der Kontamination abhängig ist. Da die Degeneration des Blutes und die damit verbundene bakterielle Verseuchung unmittelbar nach Todeseintritt beginnt, weisen Leichenblute oft schon vor der Abnahme erhöhte endogene GHB-Spiegel auf. Die weiter oben aufgeführten Maßnahmen

(Pkt. 1-4) kämen in diesen Fällen zu spät. Durch Zugabe von NaN_3 könnte aber zumindest eine weitere bakterielle Neubildung gestoppt werden. Bei nicht bakteriell kontaminierten Leichenbluten ist die Zugabe von NaN_3 und Aufbewahrung bis zur Messung bei mindestens $4\text{ }^\circ\text{C}$ innerhalb von 14 Tagen die Methode der Wahl. Andererseits ist nach Zugabe von Natriumcitrat bzw. Heparin mit einer Erhöhung der bakteriellen GHB-Produktion zu rechnen. Die von ELLIOTT [15] in postmortalen Blutproben ermittelten GHB-Konzentrationen bis zu $197\text{ }\mu\text{g/ml}$ wurden in Citrat-Blutproben ermittelt.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

In der toxikologischen Notfallanalytik und zum Nachweis therapeutischer und toxischer Blutspiegel innerhalb von ca. 6 h [20] haben die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Verfahren durchaus ihre Bedeutung. Will man jedoch weiter zurückliegende Applikationen nachweisen, welche entsprechend der kurzen Halbwertszeit mit Konzentrationen $\leq 1\text{ }\mu\text{g/ml}$ verbunden sind, bzw. im Grenzbereich zwischen exogenen und endogenen GHB-Konzentrationen angesiedelt sind, müssen Messverfahren eingesetzt werden, deren Nachweisgrenzen auch die Erfassung der physiologischen Konzentrationen ermöglichen (z.B. die Methode nach SHIMA). Um die in vitro-GHB-Bildung in möglichst engen Grenzen zu halten, sollten bei steriler Abnahme und 14-tägiger Lagerung die Blutproben entweder sofort bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, oder – was in diesem Falle auch ausreichend ist – bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Messung aufbewahrt werden. Die unter diesen Bedingungen gemessenen Konzentrationen liegen im Falle der Blutproben Lebender nach 14-tägiger Lagerung bei $0,052\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($20\text{ }^\circ\text{C}$), $0,016\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($4\text{ }^\circ\text{C-NaN}_3$), $0,020\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($4\text{ }^\circ\text{C}$) und nach 16-monatiger Lagerung bei $0,03\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) sowie $0,4\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($4\text{ }^\circ\text{C}$) (Ausgangskonzentration: $0,008\text{ }\mu\text{g/ml}$).

Durch Zugabe von NaN_3 kann auch in postmortalen Blutproben die hier hauptsächlich vorliegende bakteriell bedingte GHB-Produktion gestoppt werden. Wenn schon bei der Abnahme fäulnisverändertes Blut vorliegt, kommt diese Maßnahme jedoch zu spät. Die Bewertung von Messwerten aus postmortalen Blutproben wird deshalb immer mit Unsicherheiten behaftet sein. Die Empfehlung eines Grenzwertes zur Unterscheidung von endogen bedingten und exogen aufgebauten GHB-Blutspiegeln kann deshalb nicht vorgeschlagen werden. Anders stellt sich die Lage bei Blutproben gesunder lebender Personen dar. Entsprechend neuerer Untersuchungen ergibt sich bezüglich des Konzentrationsbereiches der endogenen GHB-Konzentrationen sowie der in vitro-Neubildung bei fachgerechter Lagerung ein völlig neues Bild, welches den bisher verwendeten cutoff – Wert von $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ (ERDMANN et al.) bzw. $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ (ELLIOTT) viel zu hoch erscheinen lässt. Würde man – in Ermangelung der nicht angegebenen Standardabweichung [1] – das 3-fache des Durchschnittswertes nach 14-tägiger Lagerung bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ ($0,02\text{ }\mu\text{g/ml}$) bzw. des Durchschnittswertes nach 16-monatiger Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ($0,03\text{ }\mu\text{g/ml}$) zugrunde legen, so ergäbe sich immer noch eine Konzentration unter $1\text{ }\mu\text{g/ml}$. Ein Grenzwert von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ wäre also gut geeignet, eine sichere Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen GHB-Blutkonzentrationen vornehmen zu können, zumal auch die (versehentliche) 14-Tage-Lagerung bei Raumtemperatur nur ein Anwachsen der Konzentration auf $0,052\text{ }\mu\text{g/ml}$ GHB zur Folge hätte.

Literaturverzeichnis

- [1] Shima N, Miki A, Tooru K, Munehiro K, Hitoshi T Endogenous Level and in Vitro Production of GHB in Blood from Healthy Humans, and the Interpretation of GHB Levels Detected in Antemortem Blood Samples. Journal of Health Science. 2005; 51: 147 – 154
- [2] Abanades S. et. al. γ – Hydroxybuterate (GHB) in Humans. Ther Drug Monit 2007; 29: 64 - 70
- [3] Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, et al. Therapeutic gamma – hydroxybutyric acid Monitoring in plasma and urine by gas chromatography – mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 1993; 11: 483-487
- [4] Doherty JD, Hattox SE, Snead OC, Roth RH Identifikation of endogenous γ - hydroxybuterate in human and

bovine brain and its regional distribution in human guinea pig and rhesus monkey brain J Pharmacol Exp Ther 1978; 207:130-9

[5] Roth RH, NJ Giarman Conversion in vivo of GABA to GHB in mammalian brain. Biochem. Pharmacol. 1969; 3: 247-250

[6] Roth RH, NJ Giarman GBL und GHB - distribution and metabolism, Biochem Pharmakol 1966; 15: 1333 – 1337

[7] Gibson K M, Aramaki S, Sweetman L, et al. Stable isotope dilution analysis of 4 – hydroxy – butyric acid: an accurate method for quantification in physiological fluids and the prenatal diagnosis of 4 – hydroxybutyric aciduria Biomed Environ Mass Spectrom 1990;19: 89 – 93

[8] Elian AA Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood. Forensic Sci Int 2002; 128:120 – 122

[9] Erdmann F, Zandt D, Auch J, Schütz H, Weiler G, Verhoff MA Untersuchungen zum Grenzwert zwischen endogener und exogener γ – Hydroxybuttersäure GHB/Liquid Ecstasy). Archiv für Kriminalogie 2006; 217: 129 – 136

[10] Baselt RC Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 2002. 6.ED.

[11] Elliott S Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production. Forensic Scins International 2003;133: 9-16

[12] Moffat AC, Osseltin M.D. Widdop B. (Eds) Clarke`s Analysis of Drugs and Poisons, 3 edn., Pharmaceutical Press (London/Chicago), p 1072(2004)

[13] Merckel C, Auwärter V, Simmert D, Pragst F γ -Hydroxybuttersäure (GHB) in notfallmedizinischen Proben: Bestimmung durch HS-SPME/GC-MS und Fallbeispiele. Toxichem + Krimtech (T+K) 2003; 70: 93 - 98

[14] Elliott S The presence of gamma – hydroxybutyrate (GHB) in postmortem biological fluids. J. Anal. Tox. 2001; 25: 152

[15] Fieles Colemann DE and Baselt RC. GHB concentrations in pre and postmortem blood and urine (letter) 1998; clin. Chem.: 44, 692

[16] Moriya F and Hashimoto Y Endogenous γ -Hydroxybutyric acid in postmortem blood; Leg. Med. 2004; 6, 47-51

[17] Sekurada K, Kobayashi M, Iwase H, Yoshino M, Mukoyama H, Takatori, T and Yoshida K Production of gamma-hydroxybutyric acid in postmortem liquid increases with time after death. Toxicol.Lett. 2002; 129, 207-217

[18] Berankowa K, Mutnanska K, Belikowa M Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. Forensic Science International 2006; 161: 158-162

[19] Elliott S, Lowe P and Symonds A The possible influence of Microorganisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. Forensic Scins International 2004;139,183-190

[20] Steinecke H, Hein C, Stein U, Klein A, Hentschel H. Intoxikation mit Liquid Ecstasy. Rechtsmed 2002; 12: 357 - 377