

Article original / Original article

Interprétation des concentrations de GHB mesurées dans les cheveux

Interpretation of GHB concentrations in hair

Vincent Cirimele^{1*}, Markus Baumgartner², Emilie Vallet¹, Mathieu Duez¹

¹ Laboratoire ChemTox, Parc d'Innovation, 3, rue Grüninger, 67400 Illkirch, France

² Institut de Médecine Légale, Kurvenstrasse 17, 8006, Zurich, Suisse

Résumé – Objectifs : Afin de pallier la très courte demi-vie du GHB dans le sang, l'analyse de cheveux a connu, ces dernières années, un intérêt croissant pour la mise en évidence d'une exposition unique au GHB. Cet article fait le point sur les concentrations en GHB rapportées dans les cheveux chez des sujets témoins, des consommateurs réguliers de GHB et des victimes d'agression dans un contexte de soumission chimique. **Méthodes :** Pour son dosage, la mèche de cheveux est décontaminée par du dichlorométhane et segmentée. Après un broyage fin à l'aide de ciseaux, 5 à 30 mg sont incubés dans de la soude en présence de GHB-d₆ utilisé en tant qu'étalon interne. Le milieu est ensuite acidifié et extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est évaporée et l'extrait sec dérivé par silylation. Les analyses sont réalisées sur un couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse en tandem à l'aide d'une source utilisée en mode ionisation par impact électronique. La détection est réalisée en mode MRM après collision induite. **Résultats :** Dans le cas de consommateurs réguliers de GHB ($n = 4$), les concentrations en GHB variaient de 9,2 à 229,1 ng/mg, alors que les concentrations physiologiques variaient de 0,2 et 12 ng/mg ($n = 423$) avec une prévalence de celles comprises entre 0,5 et 5 ng/mg. Dans les cas d'exposition unique ($n = 4$), la solution réside en l'utilisation des cheveux de l'intéressé comme son propre témoin avec une augmentation significative de la concentration en GHB dans le segment couvrant la période des faits. Dans ces situations ($n = 4$), une élévation de la concentration en GHB d'un facteur 1,7 à 4,3 a été observée par rapport aux concentrations physiologiques mesurées chez ces mêmes sujets. **Conclusion :** Les concentrations physiologiques de GHB varient de 0,2 et 12 ng/mg (avec une prévalence de celles comprises entre 0,5 et 5 ng/mg) et entre 9,2 et 229 ng/mg chez des consommateurs réguliers. Dans le cadre d'une exposition unique (soumission chimique), il est observé une élévation de la concentration basale de GHB de l'ordre de 170 à 430 %.

Mots clés : GHB, cheveux, CPG-SM/SM, usage détourné, soumission chimique

Abstract – Objective: Due to the fact that the half-life of GHB is very short in blood, the potential use of hair to document GHB exposure has been increasingly investigated for many years. The goal of this work is to determine GHB concentrations in controlled subjects, chronic GHB abusers and victims of GHB-facilitated crimes. **Methods:** For GHB testing, hair strands are decontaminated in methylene and segmented. After grinding the specimen thinly and weighing it (5 to 30 mg), the specimen is incubated in sodium hydroxide in the presence of GHB-d₆ used as an internal standard. After cooling, the homogenate is acidified and extracted with ethylacetate. The organic phase is evaporated to dryness before silylation. Analyses are performed on a gas chromatography/tandem mass spectrometry system operating in the electron-impact mode of ionisation. Detection is achieved in MRM mode after induced collision with argon and specific offset voltage. **Results:** In cases of GHB chronic abuse ($n = 4$), the observed concentrations ranged from 9.2 to 229.1 ng/mg, when physiological GHB concentrations in head hair were in the range 0.2 to 12 ng/mg (with a prevalence for those between 0.5 and 5 ng/mg). In drug-facilitated crimes, the solution is to use each subject as his/her own control with an increase in GHB concentration in the segment corresponding to the period of the offence. In drug-facilitated crimes ($n = 4$), the increase in GHB concentration in the section covering the offence period generally ranged from 1.7 to 4.3 times the physiological GHB concentration of the subject. **Conclusion:** Physiological GHB concentrations in head hair are in the range 0.2 to 12 ng/mg (with a prevalence for those between 0.5 and 5 ng/mg) and 9.2 to 229 ng/mg

* Correspondance : Vincent Cirimele, vcirimele@labochemtox.com

for chronic GHB abusers. In drug-facilitated crimes under the influence of GHB, an increase in GHB physiological concentrations of about 170 to 430% is observed.

Key words: GHB, hair, GC-MS/MS, abuse, rape case under drug influence

Reçu le 6 mai 2010, accepté après modifications le 27 août 2010

Publication en ligne le 24 septembre 2010

1 Introduction

L'acide gamma-hydroxybutyrique est une petite molécule produite naturellement au niveau du système nerveux central et des tissus des mammifères. Synthétisé à partir de l'acide gamma aminobutyrique, le GHB intervient au niveau des jonctions synaptiques en tant que neurotransmetteur ou neuromodulateur [1].

En thérapeutique, il est utilisé depuis les années 1960 par voie intraveineuse comme anesthésique à la dose habituelle de 60 mg/kg de poids corporel. Il est également proposé dans le traitement de la narcolepsie aux posologies intraveineuses recommandées ou *per os* de 20 à 30 mg/kg, et finalement dans le traitement des dépendances à l'alcool et aux opiacés [2].

Un usage détourné a été observé dans le monde du culturisme car il augmenterait la libération d'hormone de croissance, hypothèse non vérifiée à ce jour. La propriété de « brûleur de graisse » est également avancée pour ce produit. Dans le cercle des « raveurs », il est utilisé pour ses effets euphorisants. De par ses propriétés amnésiantes, il a été utilisé récemment à des fins délictueuses dans des cas de soumission chimique.

De nos jours, sa mise en évidence par analyse d'échantillons biologiques ne pose pas de problèmes analytiques particuliers, mais la présence physiologique de cette substance, sa demi-vie très courte (moins de 6 heures), son élimination rapide et complète des urines (moins de 12 heures), ainsi que sa formation *post-mortem* rendent parfois l'interprétation des concentrations mesurées très délicate. Ces limitations sont à l'origine de l'utilisation croissante des cheveux depuis plusieurs années afin de mieux documenter les cas d'exposition unique ou répétée au GHB.

L'objectif de cet article est de présenter les différentes interprétations possibles des concentrations en GHB mesurées dans les cheveux.

2 Matériel et méthodes

2.1 Échantillons

Les cheveux analysés avaient trois origines différentes. Ils étaient collectés sur des individus témoins non exposés au GHB, sur des consommateurs réguliers de GHB et sur des victimes dans le cadre d'une suspicion de soumission chimique par GHB.

2.2 Préparation-extraction

La méthode est basée sur un article précédemment publié par les auteurs [3] avec quelques adaptations. La mèche de

cheveux est décontaminée par deux bains successifs de dichlorométhane (5 ml pour 100 mg de cheveux environ) puis segmentée spécifiquement selon le cadre dans lequel s'inscrit le dosage de GHB. Une segmentation avec des sections de 3 mm est réalisée dans les cas d'exposition unique suspectée, alors que des segments de 1 à 3 (voire 6) centimètres sont réalisés pour la mise en évidence d'une consommation répétée. Les segments sont alors finement coupés (< 1 mm) à l'aide de ciseaux. Dans le cadre d'une soumission chimique, 5 à 10 mg de poudre de cheveux sont pesés, alors que pour la recherche d'un abus chronique, 20 à 30 mg constituent la prise d'essai habituelle. La poudre ainsi obtenue est incubée dans 0,5 ml de NaOH 0,01N, 16 heures à 56 °C en présence de GHB-d₆ (10 ng) utilisé en tant qu'étalon interne. Après retour à température ambiante, le milieu est neutralisé et acidifié pour être extrait par de l'acétate d'éthyle sous agitation horizontale (15 minutes à 95 cycles par minute). Après centrifugation (10 minutes à 3500 RPM), la phase organique est prélevée et évaporée dans un tube Chromacol. Finalement, l'extrait sec est dérivé par silylation en présence de 35 µl de BSTFA + 1 % de TMCS, 30 minutes à 70 °C.

2.3 Analyse par CPG-SM/SM sur un couplage Agilent 6890 – MicroMass QuattroMicro

Une aliquote (1 µL) de l'extrait dérivé est introduit dans un injecteur en mode sans division chauffé à 270 °C. La séparation s'opère sur une colonne apolaire 1-MS de 30 mètres (0,25 mm i.d. × 0,25 µm) à l'aide d'un débit d'hélium de 1 mL/min et d'une rampe de température de four allant de 70 °C (maintenue 1 minute) à 160 °C avec une pente de 15 °C/min, puis 40 °C/min jusqu'à 295 °C, température finale maintenue 5 minutes.

L'ionisation est réalisée dans une source fonctionnant en impact électronique à 70 eV. La détection est réalisée en mode MRM, à l'aide de 3 transitions spécifiques du GHB et une seule pour son analogue deutéré. Chacune des transitions est obtenue après collision induite par de l'argon à une pression de 3 mTorr dans la cellule et une énergie de collision spécifique.

3 Résultats et discussion

3.1 Validation

La méthode est validée en termes de linéarité (0,2 à 20 ng/mg, $n = 3$) avec des R^2 allant de 0,989 à 0,998. La précision intra-jour ($n = 8$) est de 11,8 % à la concentration de 0,66 ng/mg, 10,4 % à 1,30 ng/mg et 8,9 % à 2,45 ng/mg. Le taux de récupération ($n = 3$) est proche de 82 % (81,8 %) avec

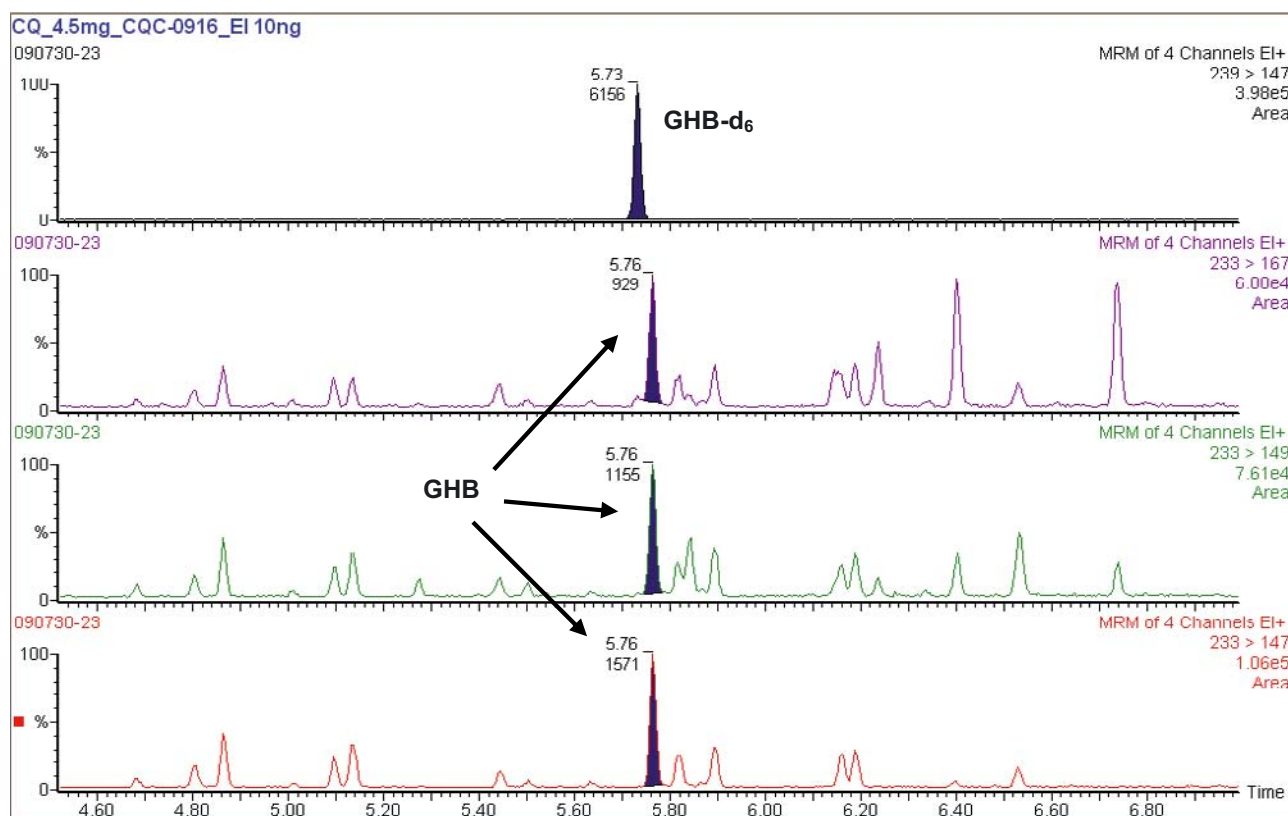


Fig. 1. Tracé chromatographique d'un échantillon de cheveux utilisé comme contrôle interne. La concentration de GHB mesurée est de 0,95 ng/mg.

des limites de détection et de quantification respectives de 0,1 et 0,2 ng/mg.

La figure 1 illustre un tracé typique en CPG/SMSM d'un échantillon de cheveux utilisé comme témoin contrôle interne.

3.2 Application

Depuis 2003, 431 échantillons de cheveux ont été analysés pour le GHB dont 45 provenaient de volontaires sains. L'analyse de cheveux (segments d'une longueur de 0,3 à 6 cm) a permis de mesurer des concentrations physiologiques en GHB variant de 0,2 à 12 ng/mg avec une prévalence des concentrations comprises entre 0,5 et 5,0 ng/mg. Aucune corrélation n'a pu être établie en fonction de la couleur des cheveux. Ces résultats sont en accords avec les travaux déjà rapportés par d'autres auteurs [3,4].

L'analyse de mèches de cheveux de la racine vers la pointe, après segmentation de 3 mm, montre de façon quasi-constante des concentrations supérieures sur le premier, voire les deux premiers segments proximaux, pour se stabiliser autour d'une concentration physiologique de base dans les segments suivants. Ce profil chez des sujets naïfs serait attribuable au résultat d'une incorporation supplémentaire par le biais de la sueur non encore totalement éliminée par les soins hygiéniques classiques.

Dix-huit échantillons de cheveux, collectés chez des « raveurs », ont été analysés pour la mise en évidence d'une

Tableau I. Concentrations de GHB chez des consommateurs avérés de GHB.

N° Cas	Concentrations en GHB (analyse segmentaire)
1	25,1 à 19,0 ng/mg
2	17,4 à 47,3 ng/mg
3	55,7 à 229 ng/mg
4	9,2 à 28,2 ng/mg

consommation répétée de GHB. L'analyse de segments de cheveux, d'une longueur comprise entre 0,4 à 2 cm, a permis de mesurer des concentrations en GHB variant de 0,3 à 229 ng/mg. La répartition était la suivante :

- concentrations de GHB inférieures à 5 ng/mg dans 13 cas pouvant être considérée comme physiologiques ;
- concentrations de GHB comprises entre 5 et 12 ng/mg dans 1 cas unique, l'analyse segmentaire ayant révélé des concentrations comprises entre 7,7 et 10,1 ng/mg ;
- concentrations de GHB supérieures à 12 ng/mg sur au moins un des segments analysés dans 4 cas où l'abus de GHB a pu être confirmé.

Les concentrations rapportées dans le tableau I ont pu être mesurées dans ces cas.

Depuis 2003, seuls 4 échantillons de cheveux se sont révélés positifs dans le cadre d'une administration unique, parmi

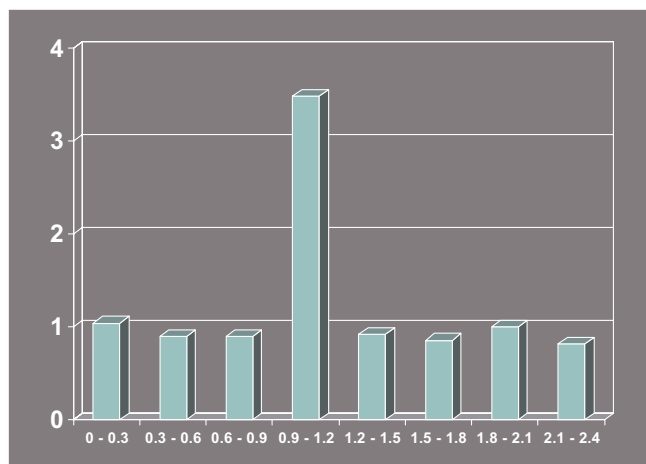


Fig. 2. Concentrations en GHB dans le cadre d’une analyse segmentaire de GHB (8 segments de 0,3 cm) prélevé chez une victime d’une soumission chimique.

lesquels trois se sont révélés être des cas de soumission chimique. Le premier cas présentait une concentration basale moyenne de GHB dans les segments distaux de 0,6 ng/mg alors que la concentration s’élevait à 2,6 ng/mg dans le segment couvrant la période des faits. Pour le deuxième cas, la concentration basale moyenne de GHB dans les segments distaux était de 0,9 ng/mg alors que sa concentration était de 3,5 ng/mg dans le segment couvrant les faits (figure 2).

Pour le troisième cas, il s’agissait d’une étude d’administration contrôlée à un individu sain de 25 mg de GHB par kg de poids corporel. La concentration basale de GHB dans les segments distaux était de 3,0 ng/mg alors que sa concentration était de 5,1 ng/mg dans le segment couvrant l’administration.

Pour les quatre cas rencontrés, il a été observé une élévation de la concentration en GHB d’un facteur 1,7 à 4,3 par rapport aux concentrations physiologiques mesurées chez ces mêmes sujets.

4 Conclusion

Le dosage de GHB sur plus de 400 échantillons de cheveux depuis 2003 a permis d’approcher ce composé dans trois situations distinctes :

- sujets témoins n’ayant jamais été exposés au GHB ;
- sujets adeptes des « rave parties » et consommant régulièrement du GHB ;
- victimes chimiquement battues.

Dans le groupe témoin, les concentrations physiologiques de GHB étaient comprises entre 0,2 et 12 ng/mg, avec une prévalence de celles comprises entre 0,5 et 5 ng/mg.

Pour le groupe de consommateurs réguliers de GHB, les concentrations de GHB étaient comprises entre 9,2 et 229 ng/mg (4 cas sur 18 dépistés).

Dans les cas de soumission chimique, comme dans le cas unique d’administration, il a été observé une élévation approximative de la concentration en GHB de 170 à 430 % par rapport à la concentration basale enregistrée chez ces mêmes sujets.

Conflit d’intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d’intérêt.

Références

1. Nicholson KL, Balster RL. GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug alcohol depend.* 2001; 63 : 1–22.
2. Baselt RC. Gamma-hydroxybutyrate. In : *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* Foster City, CA, 2008 : 680–684.
3. Kintz P, Cirimele V, Jamey C, B. Ludes. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure: Application to document sexual assault. *J. Forensic Sci.* 2003; 48: 195–200.
4. Frison G, Tedeschi L, Brusini G, Castagna F, Ferrara SD. GC/MS analysis of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in human hair. 2nd international meeting on clinical and forensic aspects of hair analysis, 6–8 juin 1994, Genova.