

Zur Verbreitung von Kratom (*Mitragyna speciosa*) in (il)legalen Kräutermischungen

Stefanie Schröfel¹, Alexander Hupp¹, Volker Auwärter², Torsten Arndt¹

¹Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, D-55218 Ingelheim

²Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg

Abstract

Aim: Kratom (*Mitragyna speciosa*), growing in Southeast Asia, is traditionally used as a herbal drug. Kratom leaves contain a series of alkaloids with in part opiate- and cocaine-like effects. Kratom is prohibited e. g. in Thailand and Australia but not in most of the European countries incl. Germany. As a consequence, a broad range of “Kratom” products is available e. g. via the internet. The aim of this study was to investigate the role of Kratom as a recurring herbal additive of these herbal incense or tea mixtures. We wanted to give an estimate of the prevalence of Kratom in (il)legal herbal mixtures and answer the question if the Kratom alkaloid-pattern in the extracts rather points to the addition of Kratom leaves/extracts or to spiking of the herbal mixtures with single Kratom alkaloids.

Methods: LC-MS/MS was used for the measurement of 5 Kratom alkaloids (mitragynine, speciogynine, speciociliatine, mitraciliatine and paynantheine) in methanolic extracts of aliquots of 194 herbal mixtures. Mitragynine, speciociliatine and paynantheine were quantified on the basis of a 6 point calibration curve, whereas speciogynine and mitraciliatine were determined qualitatively due to missing crystalline reference substances for calibration.

Results: Altogether 41 herbal mixtures were tested positive for Kratom alkaloids. In each of these cases, all of the 5 monitored alkaloids were detectable. The alkaloid content (mitragynine + speciociliatine + paynantheine) of the mixtures varied considerably between < 0.1 mg/g and approx. 80 mg/g. In each of the 41 Kratom-positive mixtures, mitragynine was the main alkaloid followed by speciociliatine.

Discussion: The prevalence of Kratom in the 194 mixtures was 21%. Since we only analysed random samples of the herbal mixtures (approx. 100 mg without homogenisation), it cannot be ruled out that even a higher prevalence would have been found after homogenisation of the total packet content (usually 2-3 g) using a powder mill before sampling. The paynantheine/mitragynine content ratio was relatively constant (6,3% – 13,1%), whereas the speciociliatine/mitragynine ratio varied considerably between 9,7% – 95,2%. The reason for this finding remains unclear, but it may be speculated that the origin of the plant material, the mode of extraction and/or the age of the harvested plants may play a role. The presence of 5 alkaloids in plausible concentration ratios rather points to the presence of Kratom leaves or extracts in the herbal mixtures but not to spiking of these products with (single) Kratom alkaloids.

Conclusion: Kratom seems to be added to (il)legal herbal mixtures quite often. Due to this fact, analysing e. g. urine for Kratom alkaloids could be suggested as a supplemental tool to targeting synthetic additives for detection of herbal mixture abuse.

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren erreichten uns zunehmend Nachfragen nach einer Nachweismöglichkeit des Konsums von Räuchermischungen, insbesondere „Spice“, aber auch zu „Krypton“, „King B“ etc. Obwohl diese Kräutermischungen vom Hersteller häufig als rein herbal deklariert werden und laut Gebrauchsanweisung ausdrücklich nur zum

Verräuchern und nicht zur Einnahme vorgesehen sind, wurden nicht selten synthetische Zusatzstoffe mit psychoaktiven Eigenschaften in diesen Präparaten gefunden. Eine umfangreiche Analyse der synthetischen Zusatzstoffe von ca. 140 Kräutermischungen wurde jüngst von der Arbeitsgruppe um Auwärter vom Institut für Rechtsmedizin der Universität Freiburg publiziert [1]. Danach handelt es sich zumeist um Zusätze synthetischer Cannabinoide aus der Gruppe der Aminoalkylindole und/oder der Cyclohexylphenole [1], in Einzelfällen auch um den Zusatz von O-Desmethyltramadol [1,2]. Diese Substanzen werden aufgrund fehlender Testsysteme im immunologischen Drogenscreening nicht erfasst und wegen des Fehlens von Vergleichsspektren in den gängigen Massenspektrenbibliotheken auch mit diesen Analysenmethoden häufig nicht erkannt. In der Folge bleibt der Konsum von Räuchermischungen deshalb bisher zumeist unentdeckt.

Ein möglicher Alternativansatz zum Nachweis eines Konsums von Kräutermischungen kann unter Beachtung der herbalen Zusammensetzung durch den Nachweis entsprechender Pflanzeninhaltsstoffe in Blut(präparaten) und/oder Urin gegeben sein.

Oft enthalten die Mischungen laut Angaben auf den Verpackungen getrocknete Pflanzen wie Helmkraut (*Scutellaria lateriflora*), Löwenohr (*Leonotis leonurus*) oder Blauer Lotus (*Nymphaea caerulea*). Deren Inhaltsstoffe (s. hierzu [3]) sollen meist eine beruhigende, z. T. cannabisartige Wirkung haben und sind nicht dem Betäubungsmittelgesetz unterstellt. Wie Dresen et al. [1] und Arndt et al. [2] zeigen konnten, enthalten einige Präparate auch Kratom (*Mitragyna speciosa*), d. h. Blätter oder Extrakte einer in Südostasien beheimateten Pflanze. Die psychoaktiven Bestandteile der Kratomblätter sind Alkaloide mit opiat- bzw. cocain-ähnlichem Wirkungsspektrum [4]. Kratom und Kratom-Alkaloide gehören in Deutschland und in großen Teilen Europas nicht zu den kontrollierten Substanzen. Die quantitativ wichtigsten Kratom-Alkaloide sind die Stereoisomere Mitragynin, Speciogynin, Speciociliatin und Mitraciliatin sowie das Alkaloid Paynanthein (Strukturformeln in Abb. 1). Zum Metabolismus von Mitragynin, Speciogynin und Paynanthein siehe [5-7].

Mit der Bestimmung dieser Alkaloide in Körperflüssigkeiten wie z. B. Urin könnte sich also ein Alternativweg zum Nachweis eines Kräutermischungsmissbrauchs (in Ergänzung zur Detektion möglicher synthetischer Zusatzstoffe) eröffnen. Dabei ergeben sich folgende Fragen, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren: Welche Prävalenz hat Kratom in den über Headshops und andere Bezugsquellen vertriebenen Kräutermischungen? Werden Kratom-Alkaloide in einem natürlich vorkommenden Mengenverhältnis gefunden, was ein Hinweis auf den Zusatz von Kratomblättern/-extrakten wäre oder lässt die Zusammensetzung auf eine Dotierung von Kratom-freien Kräutermischungen mit einzelnen Kratom-Alkaloiden schließen? Zur Beantwortung dieser Fragen analysierten wir methanolische Extrakte von Kräutermischungen, die von der Rechtsmedizin Freiburg zur Verfügung gestellt wurden (194 Einzelproben) mit LC-MS/MS auf die Präsenz der Kratom-Alkaloide Mitragynin, Paynanthein, Speciociliatin (quantitative Analyse) und Speciogynin und Mitraciliatin (qualitative Analyse wg. fehlender kristalliner Reinstsubstanz). Im Ergebnis konnte ein überraschend hoher Anteil an Kratom-haltigen Kräutermischungen festgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Extraktion der Alkaloide aus Räuchermischungen

Die zur Untersuchung gelangten Proben stammten größtenteils aus privaten Ankäufen, die zum Zwecke eines Produkt-Monitorings getätigt wurden, aber auch aus polizeilichen

Sicherstellungen. Wenn möglich wurden jeweils ca. 100 mg der Räuchermischung (ohne Homogenisierung des gesamten Packungsinhalts) in Glasgefäße eingewogen und mit jeweils 1 mL Methanol versetzt. Von 32 Mischungen war nur sehr wenig Material vorhanden, in diesen Fällen wurden 25-50 mg eingewogen. Nach 1,5 h im Ultraschallbad wurde der flüssige Überstand von den festen Pflanzenteilen abgetrennt. Hierzu wurde die methanolische Lösung mit einer Pipette, deren Spitze an den Boden des Glases angedrückt wurde, aufgenommen und in neue Glasgefäße überführt. Anschließend wurden die Extrakte 2 min bei 2.000 U/min (ca. 450 g) zentrifugiert (Hettich Rotixa/RP). Danach wurde der Überstand abgenommen, in zum Einfrieren geeignete Kunststoffgefäße mit Dichtring überführt und bis zur Analyse bei -22°C aufbewahrt.

2.2. LC-MS/MS-Analyse auf Kratom-Alkaloide

Probenvorbereitung: Es wurden Verdünnungen der Extrakte hergestellt, die 20% (v/v) Methanol und 80% (v/v) Wasser enthielten. Begonnen wurde mit 1:1000 Verdünnungen (entsprechend 100 µg Kräutermischung/mL), um eine zu starke Kontamination des Analysensystems mit u. U. sehr hohen Kratom-Alkaloid-Mengen zu vermeiden. Nach dieser ersten Analysenserie konnten Proben mit Werten >1000 ng/mL erneut in einer 1:10000 Verdünnung und Proben mit <10 ng/mL in einer 1:100 Verdünnung analysiert werden. Diese Vorgehensweise stellte sicher, dass auch Kräutermischungen mit geringem Kratom-Alkaloid-Gehalt als Kratom-positiv erkannt werden konnten. 200 µL der jeweiligen Verdünnung wurden in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße pipettiert. Anschließend wurden in jedes Probengefäß 200 µL des Internen Standards (250 ng/mL Citalopram-d6 in Wasser) und 200 µL Acetonitril zugegeben. Alle Proben wurden 1 min gemischt und anschließend in die Vertiefungen einer 96-Deep-Well-Mikrotiterplatte (1,2 mL) pipettiert. 15 µL wurden durch den Autosampler in das LC-MS/MS-System injiziert.

LC: ThermoFinnigan Surveyor MS Pump Plus; 200 µL/min; Gradient (alle Daten v/v) 0-1 min: 55% Wasser (0,1% v/v HCOOH), 45% Methanol (0,1% v/v HCOOH); 7,5-8 min: 22,5% Wasser (0,1% v/v HCOOH), 77,5% Methanol (0,1% v/v HCOOH); 8,1-9 min: 55% Wasser (0,1% v/v HCOOH), 45% Methanol (0,1% v/v HCOOH); 9 min Laufzeit; Säule: Thermo BioBasic-18, 100 mm x 2.1 mm, 5 µm; Säulenofen: 28°C (MayLab MistraSwitch, Wien, Austria); Probengeber: PAL HTC (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) 16°C, Full-Loop-Modus, Überfüllung mit 20 µL bei 15 µL Probenschleife.

In jeder Analysenserie wurden Kalibrationslösungen mit 5, 10, 25, 100, 500 und 1000 ng/mL und zwei Kontrollproben mit je 15 ng/mL und 150 ng/mL Mitragynin, Speciociliatin und Paynanthein sowie mit ca. 15 ng/mL bzw. 150 ng/mL Speciogynin und Mitraciliatin (Ausgangslösung ca. 0,1 mg/mL, s. Referenzsubstanzen) analysiert. Die Nachweisgrenze der Methode betrug 5 ng/mL, die untere Berichtsgrenze 10 ng/mL.

MS/MS: ThermoFisher Scientific Quantum Ultra Triple-Quadrupol-Massenspektrometer; positiver ESI-Modus; Kollisionsgas: Argon; Software: XCALIBUR 2.0.7.

SRM (Kollisionsenergie V): Mitragynin, Speciociliatin, Speciogynin, Mitraciliatin: 399,2→159,1 (43), 399,2→174,1 (34), 399,2→226,2 (25), 399,2→238,2 (25); Paynanthein: 397,2→159,0 (46), 397,2→174,1 (30), 397,2→224,2 (25), 397,2→236,0 (25), 397,2→365,0 (25), 397,2→380,0 (25); Citalopram-d6: 331,2→109,1 (40), 331,2→265,0 (19).

Referenzsubstanzen: Citalopram-d6 von Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Mitragynin, Speciociliatin und Paynanthein von Promochem (Wesel, Germany). Methanolische Lösungen (ca. 0,1 mg/mL) von Speciogynin und Mitraciliatin waren ein Geschenk von A. Philipp und H. Maurer (Homburg/Saar, Germany).

3. Ergebnisse und Diskussion

Aus kriminaltechnischen Gründen werden die Klarnamen der Produkte hier nicht genannt.

Die Kratom-Alkaloide Mitragynin, Speciogynin, Mitraciliatin und Speciociliatin sind Diastereomere, die in der LC-MS/MS identische Massenübergänge generieren und deshalb nur nach vorheriger chromatographischer Trennung über die Retentionszeit sicher zu differenzieren sind. Abbildung 1 zeigt die Strukturformeln dieser Kratom-Alkaloide, Abbildung 2 repräsentative Chromatogramme, die die vollständige Trennung der Analyte dokumentieren.

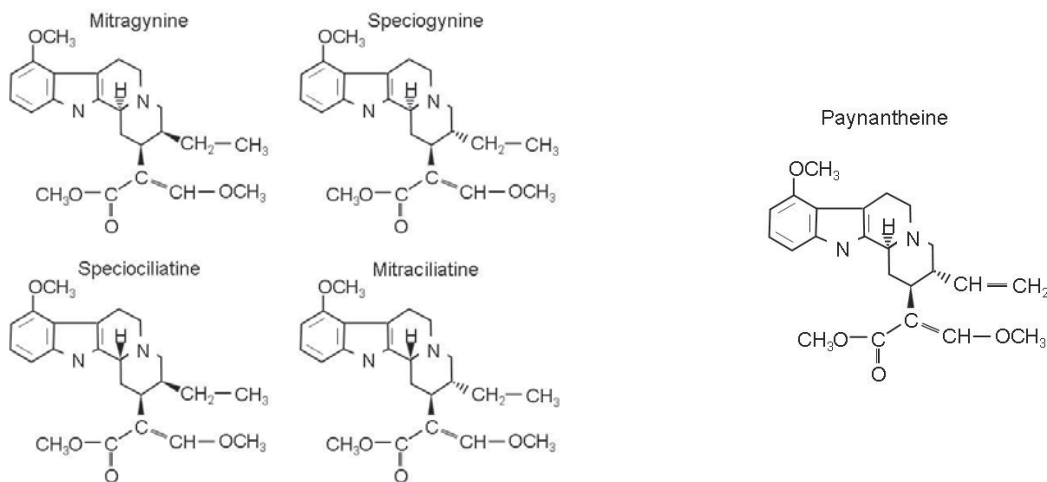


Abb. 1. Strukturformeln der quantitativ wichtigsten Kratom-Alkaloide, der Diastereomere Mitragynin, Speciogynin, Speciociliatin und Mitraciliatin sowie von Paynanthein (aus [2]).

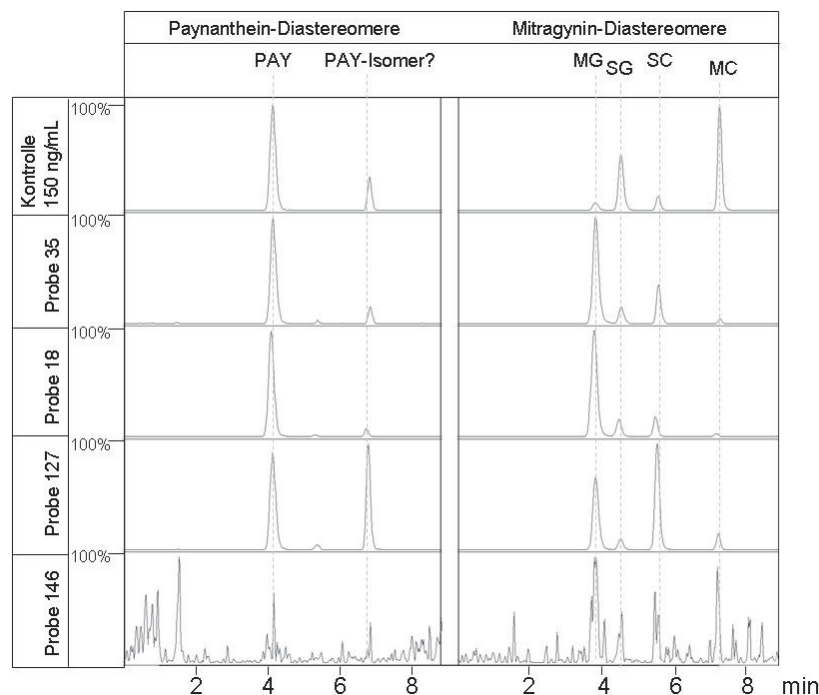


Abb. 2. LC-MS/MS-Ionenchromatogramme zum Nachweis der Kratom-Alkaloide in methanolischen Kräutermischungsextrakten. MG-Mitragynin, SG-Speciogynin, SC-Speciociliatin, MC-Mitraciliatin, PAY-Paynanthein. Im Vergleich zeigen die Proben 127, 18 und 35 deutlich variierende Alkaloidverhältnisse (auch zwischen Paynanthein und einem vermuteten Paynanthein-Isomer). Probe 146 ist eine Kratom-Alkaloid-negative Probe.

Insgesamt 41 Kräutermischungen wurden positiv auf Kratom-Alkaloide getestet. Der Anteil an Kratom-positiven Proben beträgt somit 21%. Dieser Wert sollte eher die Untergrenze der tatsächlichen Prävalenz darstellen, da zur Vermeidung von Verschleppung (und zur Bewahrung ausreichenden Asservierungsmaterials) nicht die kompletten Kräutermischungen in einer Kräutermühle homogenisiert, sondern jeweils nur ein Anteil von ca. 100 mg (in 32 Fällen wegen unzureichender Asservatmenge sogar weniger) aus der Kräutermischung entnommen, methanolisch extrahiert und mit LC-MS/MS analysiert wurde. Eine Folge hiervon ist, dass es durch Probeninhomogenitäten zu einer geringeren Anzahl an positiven Ergebnissen kommen kann. Zudem lag ein nicht unbedeutender Teil der Proben nicht in der Originalverpackung, sondern in Sekundärverpackungen vor und es wurden bereits im Vorfeld der hier vorgestellten Untersuchungen Teilmengen aus den Originalpackungen entnommen. Für neun Mischungen erhielten wir Kratom-Alkaloid-Signale unterhalb der unteren Berichtsgrenze von 10 ng/mL. Diese wurden in die Bilanz nicht einbezogen. Nach weiterer Optimierung der Analysenmethode und Absenkung der Nachweis- bzw. unteren Berichtsgrenze könnten ggf. einige weitere Kräutermischungen Kratom-positiv getestet werden. Auch aus diesem Grund betrachten wir die im vorliegenden Untersuchungsgut ermittelte Prävalenz Kratom-positiver Kräutermischungen von 21% als Minimalwert.

In den einzelnen Kräutermischungen wurden stark variierende Gehalte an Kratom-Alkaloiden gefunden (Abb. 3). Im Maximum ergab sich ein Kratom-Alkaloid-Gehalt (Mitragynin + Speciociliatin + Paynanthein) von ca. 80 mg/g. Bei einem Konsum von 2-3 g Kräutermischung (entsprechend dem Inhalt einer Packung) würden demnach maximal ca. 240 mg der quantifizierten Kratom-Alkaloide aufgenommen.

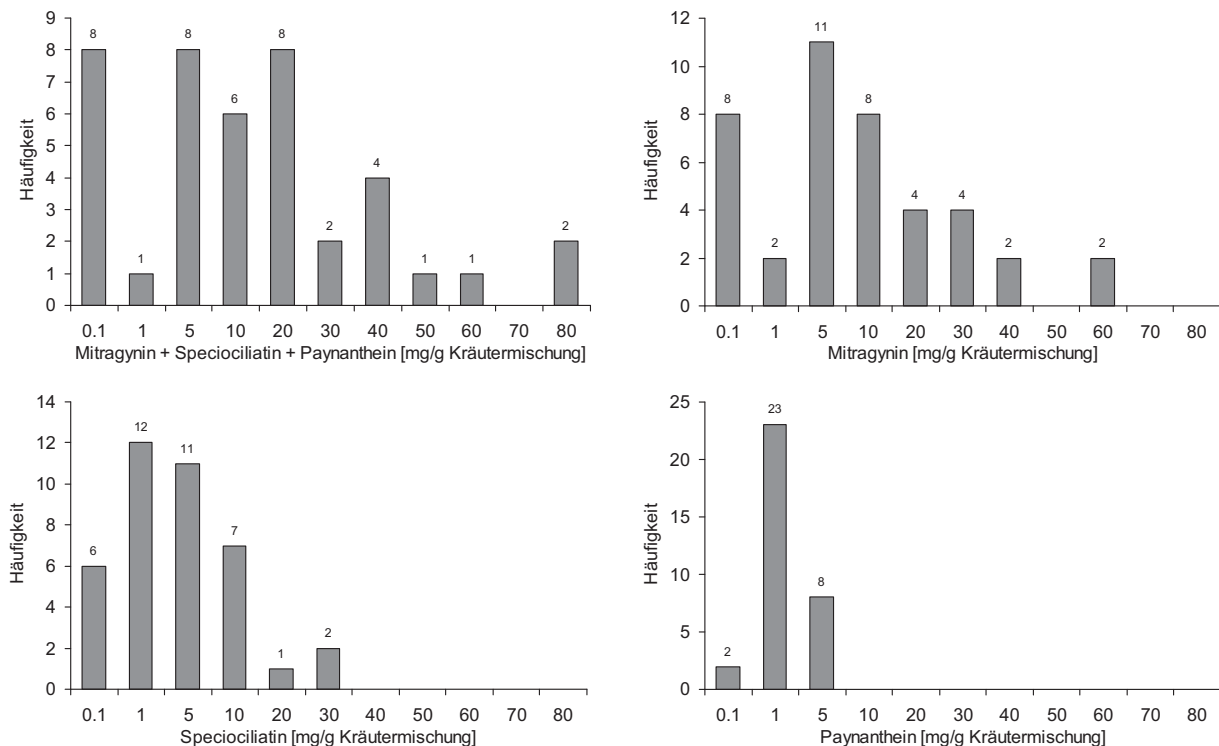


Abb. 3. Häufigkeitshistogramme der Kratom-Alkaloide in den 41 Kratom-positiv getesteten Kräutermischungen. In den Grafiken wurden nur Kräutermischungen mit einer zugehörigen Alkaloidkonzentration größer 10 ng/mL im Pflanzenextrakt berücksichtigt, also 41 für Mitragynin, 39 für Speciociliatin und 33 für Paynanthein sowie 41 für die Summe dieser Alkaloide. Die einzelnen Kategorien sind als 0,01 bis < 0,1; 0,1 bis < 1; 1 bis < 5 etc. zu lesen.

Der prozentuale Anteil der quantitativ bestimmten Alkaloide Mitragynin, Speciociliatin und Paynanthein an deren Summe ist in Abbildung 4 dargestellt.

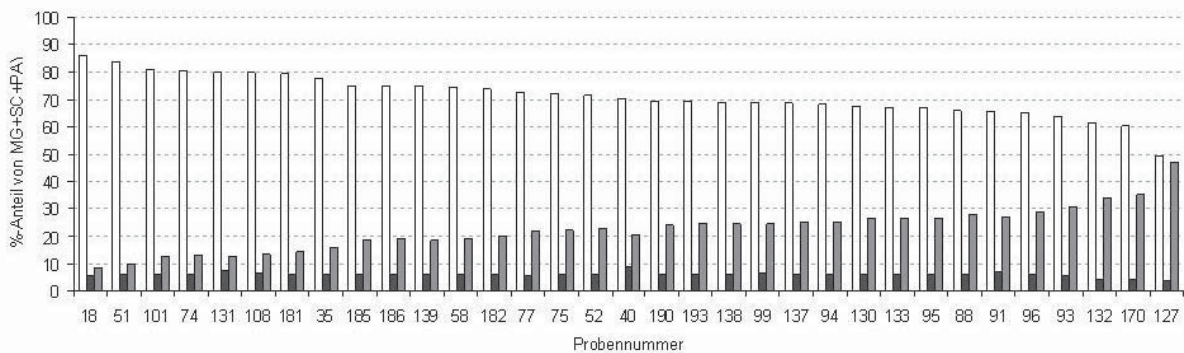


Abb. 4. Prozentualer Anteil von Mitragynin (MG, weiße Balken), Speciociliatin (SC, graue Balken) und Paynanthein (PAY, schwarze Balken) an der Summe aus MG+SC+PAY. Berücksichtigt wurden nur Mischungen mit Alkaloidkonzentrationen von jeweils > 10 ng/mL im methanolischen Extrakt, d. h. nur 33 der 41 Kratom-positiv getesteten Kräutermischungen.

In allen Kräutermischungen war Mitragynin das Hauptalkaloid, gefolgt von Speciociliatin. Paynanthein, Speciogynin und Mitraciliatin (die beiden letztgenannten wurden nur qualitativ erfasst) sind demnach als Nebenalkaloide einzustufen. Die Paynanthein/Mitragynin-Gehaltsquotienten waren vergleichsweise konstant (6,3% – 13,1%), während das Speciociliatin/Mitragynin-Konzentrationsverhältnis stark variierte (9,7% – 95,2%). Diese Unterschiede in den Alkaloid-Konzentrationsverhältnissen könnten auf einer unterschiedlichen Herkunft der Kratomblätter oder auch auf einem unterschiedlichen Alter der Kratomblätter beruhen. So sollen einerseits Kratomblätter aus Thailand ca. 66% Mitragynin enthalten, solche aus Malaysia dagegen nur ca. 12% [4].

Die Tatsache, dass in den von uns als Kratom-positiv erkannten Kräutermischungen stets alle 5 der analytisch erfassten Kratom-Alkaloide gefunden wurden (Mitragynin 41x > 10 ng/mL im Extrakt, Speciociliatin 39x > 10 ng/mL im Extrakt und 2 in Spuren unter der unteren Berichtsgrenze, Paynanthein 33x > 10 ng/mL und 8x in Spuren unter der unteren Berichtsgrenze, Speciogynin und Mitraciliatin qualitativ detektiert), spricht gegen eine Dotierung mit einzelnen Alkaloiden und stattdessen für eine Zugabe von Kratomprodukten zu den Mischungen. Dafür sprechen auch die mit Literaturangaben weitgehend übereinstimmenden relativen Kratom-Alkaloid Gehalte, wonach Mitragynin das Hauptalkaloid der Kratomblätter ist [4]. Außergewöhnlich erscheint das Ergebnis für die Kräutermischung mit einem Mitragynin/Paynanthein-Mengenverhältnis von ca. 1. Die Ursache hierfür ist unklar.

Einige Räuchermischungen lagen offenbar in verschiedenen Chargen vor, die z. T. unterschiedliche Analyseergebnisse lieferten. So waren unter 8 verschiedenen Päckchen der Räuchermischung mit dem Namen „Forest Humus“ nur 3 Kratom-positive Proben, die auch hinsichtlich der enthaltenen synthetischen Cannabinoide (hier CP-47,497-C8 und JWH-073) Übereinstimmung zeigten. Dies belegt die Hypothese, dass einige Kräutermischungsrezepturen von Charge zu Charge variiert wurden (vgl. hierzu auch Dresen et al. [1]).

Von den 41 Kratom-positiv getesteten Räuchermischungen wurden in 31 keine synthetischen Zusatzstoffe festgestellt. 10 Mischungen enthielten synthetische Zusatzstoffe (3x O-desmethyltramadol, 2x CP-47,497-C8, 1x JWH-073, 1x JWH-250 und 3x CP-47,497-C8 und JWH-073) und Kratom. Auffallend ist, dass in den Mischungen, die synthetische Cannabinoide enthielten, vergleichsweise niedrige Konzentrationen an Kratom-Alkaloiden festgestellt wurden (0,03-2,39 mg/g).

Mit der in dieser Studie angewandten LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Kratom-Alkaloiden können nicht nur Extrakte von Räuchermischungen, sondern - wie bereits zuvor gezeigt [2] - auch Urinproben untersucht werden. Unter der Annahme, dass die von uns gefundene Prävalenz von 21% Kratom-positiven Kräutermischungen repräsentativ ist, wäre mit dem Nachweis von Kratom-Alkaloiden im Urin in einem erheblichen Teil der Fälle von Kräutermischungsmisbrauch eine Nachweismöglichkeit gegeben, die unabhängig von der Präsenz und Nachweisbarkeit synthetischer Zusatzstoffe ist.

4. Schlussfolgerung

Kratom ist ein häufiger Bestandteil (il)legaler Kräutermischungen. Der Nachweis von Kratom-Alkaloiden kann bei Verdacht auf Konsum von Kräutermischungen eine sinnvolle Ergänzung zur Analytik auf potentiell vorhandene, u. U. aber noch strukturell unbekannt und in kristalliner Reinstform zumeist nicht verfügbare synthetische Zusatzstoffe und ihre Metabolite sein.

5. Literatur

- [1] Dresen S, Ferreirós N, Pütz M, Westphal F, Zimmermann R, Auwärter V. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *J Mass Spectrom* 2010;45:1186-1194.
- [2] Arndt T, Claussen U, Güssregen B, Schröfel S, Stürzer B, Werle A, Wolf G. Kratom alkaloids and O-desmethyltramadol in urine of a „Krypton“ herbal mixture consumer. *Forensic Sci Int* 2010; in press; DOI 10.1016/j.forsciint.2010.10.025.
- [3] Giebelmann R, Riedl KH, Logemann E. Kulturgeschichtliches zu Pflanzen im Spice. *Toxichem Krimtech* 2010;77:4-7.
- [4] Takayama H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceae plant, *Mitragyna speciosa*, *Chem Pharm Bull* 2004;52:916-928.
- [5] Philipp AA, Wissenbach DK, Zoerntlein SW, Klein ON, Kanogsunthornrat J, Maurer HH. Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug Kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry, *J Mass Spectrom* 2009;44:1249-1261.
- [6] Philipp AA, Wissenbach DK, Weber AA, Zapp J, Maurer HH. Phase I and II metabolites of speciogynine, a diastereomer of the main Kratom alkaloid mitragynine, identified in rat and human urine by liquid chromatography coupled to low- and high-resolution linear ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2010;45:1344-1357.
- [7] Philipp AA, Wissenbach DK, Weber AA, Zapp J, Zoerntlein SW, Kanogsunthornrat J, Maurer HH. Use of liquid chromatography coupled to low- and high-resolution linear ion trap mass spectrometry for studying the metabolism of paynantheine, an alkaloid of the herbal drug Kratom in rat and human urine. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:2379-2391.