

DETERMINATION OF GAMMA-HYDROXYBUTYRATE (GHB) IN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY WITH POSITIVE CHEMICAL IONISATION (PCI-GC-MS)

Katarzyna KASPRZAK², Piotr ADAMOWICZ¹, Maria KAŁA¹

¹ Institute of Forensic Research, Krakow

² Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow

Abstract

-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous compound naturally occurring in the human body. It is a minor metabolite and precursor of γ -aminobutyric acid (GABA). GHB is pharmacologically active and has some therapeutic uses. Moreover, in recent years GHB and its derivatives have been gaining popularity as recreational and club drugs because of their euphoric and stimulant effects. It has also been implicated as an agent in drug-facilitated sexual assault. Detection of GHB in urine is important for forensic testing and could be of clinical benefit in overdose management. In this context a sensitive and specific gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) positive chemical ionisation (PCI) method has been developed for the quantification of the target analyte in urine. The method has the following validation parameters [$\mu\text{g/ml}$]: $LOD - 0.045$, $LOQ - 0.074$, $LOLs - 0.1 - 10$ and $10 - 100$. It was applied to the determination of endogenous concentrations of GHB in random intravital and *post mortem* urine samples and to study the effect of storage time and temperature on these concentrations. The results showed that GHB concentrations ranged between $0.05 - 0.35 \mu\text{g/ml}$ (average 0.21 ± 0.09 and median $0.21 \mu\text{g/ml}$) in intravital samples ($n = 12$) and between $0.12 - 14.50 \mu\text{g/ml}$ (5.82 ± 5.50 and $4.11 \mu\text{g/ml}$) in *post mortem* samples ($n = 12$). The studies indicated that the GHB urine concentrations did not change significantly when stored for two months in a freezer (-20°C). Considerable increases in GHB concentrations were observed in urine samples that were stored at room temperature.

Key words

GHB; Endogenous; Exogenous; Date-rape drugs; GC-MS.

Received 23 September 2006; accepted 3 October 2006

1. Introduction

γ -hydroxybutyric acid, GHB (Figure 1) is an endogenous compound naturally occurring in the organism of every human. It has a number of features of a neurotransmitter. It is formed from the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA), into which it can itself transform. In the organism it undergoes biotransformation to succinic acid and further transformations in the Krebs Cycle. It was synthesised for the first time in 1961 by French researcher Dr H. Laborit who

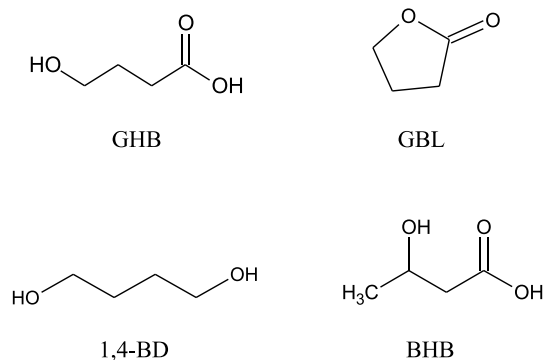


Fig. 1. GHB, GBL, 1,4-BD and BHB structures.

was investigating the effects caused by GABA in the brain [28].

In the beginning, GHB was used for medical purposes as an anaesthetic agent. Because of side effects, its use was limited to treatment of narcolepsy (United States) and alcohol abuse (Italy) [15]. In some youth circles it is propagated and sold as a substitute for anabolic steroids, supposed to increase muscle mass, and in others, contrarily, it is recommended as a natural product causing reduction of body weight. GHB is also promoted as an agent for insomnia treatment, preventing ageing, going bald, improving mood, eliminating anxiety and depression, increasing sexual efficiency [5, 20]. Since the nineties of the twentieth century GHB abuse for recreational purposes as a club drug – in order to induce a state of intoxication – has risen dramatically. GHB and its analogues (and at the same time precursors), i.e. γ -hydroxybutyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD) also belong to the group of date-rape drugs that are used to facilitate sexual assault. Sexual assaults are committed when the victim is under the influence of the drug, taken intentionally or unknowingly. In the latter case, the substance is usually added unnoticed into the drink of a potential victim. Effects caused by these drugs are, among other things, loss of consciousness, amnesia and reduced psychological inhibition. The fact that the course of the incident is remembered unclearly results in victims of rapes most frequently reporting to the police only after a long period has elapsed. Due to the natural presence of GHB in the organism, rapid elimination of the administered dose (it is detected up to 8 hours in the blood and up to 12 hours in the urine), and lapse of a time from consumption, it is often practically impossible to prove use of GHB as a date-rape drug [1, 2, 3].

The critical issue is establishing the limit of endogenous GHB concentrations in biological material. While some researchers cite insignificant levels – about 0.1 g/ml in plasma and about 2.5 g/ml in urine – materials collected from living persons [28], others publish values of 2–3 g/ml for blood and 5–6 g/ml for urine [11], and even propose a limit of concentration of 10 g/ml in urine [20]. Acceptance of a such value for the threshold of concentration differentiating between GHB of exogenous and endogenous origin meant that after a single therapeutic dose (50 mg/kg) in 12.5%, 81.3% and 100% of urine samples collected in the following time ranges: 3–6 h, 6–12 h and 12–24 h, respectively, the concentration of this compound was below the proposed limit [15]. After consumption of higher doses, up to 7 g (~100 mg/kg), its concentration in blood and urine reaches values that are hard to interpret after 8 and 12 h [5]. From numerous data obtained

from the literature [5, 8, 10, 13, 17, 29] it transpires that, according to current knowledge, establishment of an unambiguous threshold value is still open to discussion. Values of GHB concentrations in biological material change and depend on many factors. The influence of sex, race, age, health conditions, treatment [20] and diet, and especially drinking of alcohol and smoking tobacco [23, 24], and lowered pH of urine on concentration of endogenous GHB in body fluids was studied intravitaly. A large variability in concentration of this compound in *post mortem* material was ascertained depending on the kind of material, and even place of collection of the blood from the corpse [5], conditions and duration of storage of collected material and manner of its preservation [6, 19].

Consumption of lower GHB doses causes feelings of euphoria, relaxation, intoxication, drowsiness, loss of balance and hallucinations. Higher doses lead to dyspnoea and loss of consciousness. In turn, very high GHB doses cause deep coma and amnesia [5, 25, 30]. The narrow range of therapeutic concentrations leads to ease of overdosing and poisonings. One of the main reasons for overdosing is not knowing the content of pure GHB in the consumed substance and interactions with other substances, especially antidepressants, benzodiazepines, barbiturates or alcohol.

GHB is usually taken orally but it can also be intravenously injected. It occurs mostly as a sodium salt in the form of a white powder, tablets or capsules. It also comes in the form of a colourless, odourless liquid with a slight salty taste. Before extramedical use it is dissolved in water, juices, alcohol beverages in which is imperceptible and unnoticeable.

GHB taken orally is quickly absorbed, metabolised, and excreted with urine. However, only 5% of the taken dose passes into the urine in unchanged form. GHB half-life is 30–60 minutes. Taken in a large dose it is detected in blood up to 8 hours, and in urine even up to 12 hours [5].

Compounds used for manufacturing GHB, i.e. GBL and 1,4-BD, were widely available until recently. These substances are easily transformed to GHB in the human organism, which causes an increase in its concentration in blood and in the brain, and the appearance of the same symptoms as after consumption of GHB [29]. That is why GBL and 1,4-BD, and recently even GVL (γ -valerolactone) are often used as substitutes for GHB [27].

GHB is controlled by law in many countries, e.g. Canada (since 1998), in some countries of the European Union, Japan (2001), Switzerland and the United States (2002). GHB analogues are not classified as illicit substances. The Directive of the European Parlia-

ment and of the Council of Europe of 11 February 2004 on drug precursors does not mention these substances either. In Poland, according to the Drug Addiction Counteraction Act of July 29, 2005, GHB is classified on the list of psychotropic substances of group IV-P. Its derivatives are not classified, but comply with the definition of a substitute.

GHB was determined in biological material by different instrumental methods, including gas chromatography with electron capture detection [9] and mass detection [12, 21, 26], high performance liquid chromatography with UV and mass detection [22]. In methods that use the GC-MS technique, GHB analysis is generally based on changing this compound into GBL or derivatisation by a silylating agent. After derivatisation, GHB was determined in urine in the range from 5 to 6100 g/ml [7, 19] and in blood in the range from 1 to 200 g/ml [11]. Application of the LC-MS technique in GHB determination is less popular even though it does not require a derivatisation step [14, 32]. Limits of detection for GHB by LC-MS are 1 g/ml. The low specific absorption coefficient influences determination of GHB in body fluids by the HPLC-UV technique and has an effect on the limit of quantification of that method, which is 10 g/ml [31]. A rapid colorimetric test for GHB detection in urine was also elaborated. The test allows detection of 100 GHB in a one-millilitre sample of urine in the form of a purple complex with iron, which is formed in the presence of hydroxylamine and after changing GHB into GBL. The influence of endogenous GHB on a positive result of a test can be omitted at such a limit of detection [4].

In the context of the issues presented above, development of a method of GHB determination and estimation of endogenous GHB concentrations in urine samples collected from living and deceased persons appears appropriate. Estimation of the stability of endogenous GHB in urine samples stored under various conditions was also an essential element.

2. Material and methods

2.1. Biological material

Randomly selected urine samples taken from living persons and dead bodies were used as material for analyses. Samples freshly collected from living, healthy, non-takers of drugs and GHB were used as control material in developing the method and for determining physiological GHB concentrations. Endogenous GHB concentrations were also determined in

urine samples collected during autopsies from corpses of persons in which use of this compound could be excluded on the grounds of circumstances of the incident and results of toxicological analysis. These samples were taken from material evidence sent to the Institute of Forensic Research in Krakow in order to carry out chemical-toxicological analysis.

The same intravital and *post mortem* urine samples were also used for the study of stability of GHB stored under different time and temperature conditions according to established research procedure.

2.2. Chemicals

GHB (sodium salt) and GHB-D₆ were from Cerilliant, 1,4-BD and GBL from Aldrich, ethyl acetate (HPLC purity) from Merck, -hydroxybutyric acid (BHB) (sodium salt) and derivatization agent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% addition of trimethylchlorosilane (BSTFA + 1% TMCS) from Sigma.

2.3. Extraction

200 l of urine and 20 l of GHB-D₆ internal standard solution (100 g/ml) were added to an Eppendorf vial, achieving a concentration of 10 g/ml in urine. Samples were vortexed followed by addition of 200 l of citrate buffer (pH 2) and 1 ml of ethyl acetate. The mixture was shaken for 10 min with the use of a shaker and then centrifuged (4000 rpm). After centrifugation, an aliquot of 800 l (4 200 l) organic layer was transferred to another Eppendorf vial and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40°C. 50 l of ethyl acetate and 20 l of derivatisation agent (BSTFA + 1% TMCS) were added to the dry extract. Samples were vortexed and derivatised for 30 minutes at 60°C and after cooling to room temperature were analysed by the GC-MS method.

2.4. Apparatuses and analysis conditions

After derivatisation, extracts were analysed using the gas chromatography-mass spectrometry method with positive chemical ionisation (PCI-GC-MS).

Agilent Technologies 6890 gas chromatograph equipped with a 5973 mass selective detector (MSD) with possibility of optional use of chemical ionisation (CI), and 6890 autosampler were applied to analysis. Separation was performed using a DB-5MS (30 m 0.25 mm 0.25 m, J & W Scientific) capillary column in gradient temperature mode. The initial oven temperature was 55°C for 1 min, then raised at a rate of

20°C/min to 280°C and held for 5 min. The injection port was set at 240°C and quadrupole at 106°C. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.2 ml/min and methane was used as an ionisation gas at a flow rate of 20 ml/min. The injection volume was 2 μ l.

3. Results and discussion

Carrying out preliminary research in total ion current mode allows registration of the full mass spectra of GHB, GHB-D₆, GBL, 1,4-BD and BHB, and selection of the most intensive ions for further analysis in selected ion monitoring mode (SIM). Mass spectra of GHB and GHB-D₆ are shown in Figures 2 and 3.

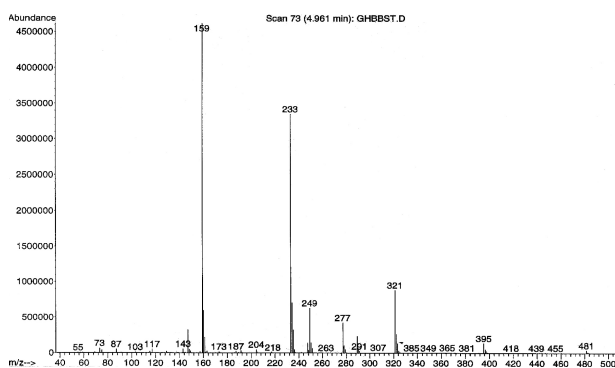


Fig. 2. GHB mass spectrum obtained by the PCI-GC-MS method after BSTFA+1%TMCS derivatisation.

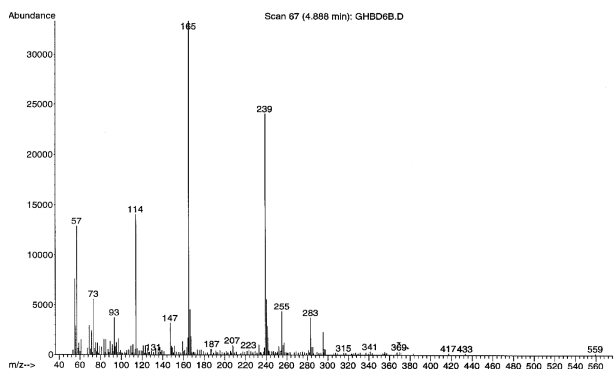


Fig. 3. GHB-D₆ trimethylsilyl mass spectrum obtained by the PCI-GC-MS method

The studied compounds, i.e. GHB, GHB-D₆, and GBL, 1,4-BD, and BHB, as potentially able to interfere with analytes, were identified on the basis of retention times and selected ions (Table I). Ions at m/z 159 and 165 were used for quantification of GHB and GHB-D₆. Chromatograms of these ions in urine extracts with addition of GHB and GHB-D₆ at a concen-

tration of 10 μ g/ml as trimethylsilyl derivatives are shown in Figure 4.

TABLE I. ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF ANALYSED COMPOUNDS

Compound	Ion [m/z]	Retention time t_r [h]
GHB	159, 233, 321, 395	6.00
GHB-D ₆	165, 239, 327, 401	6.10
GBL	341	10.50
1,4-BD	299, 315	6.41
BHB	233, 321, 395	5.50

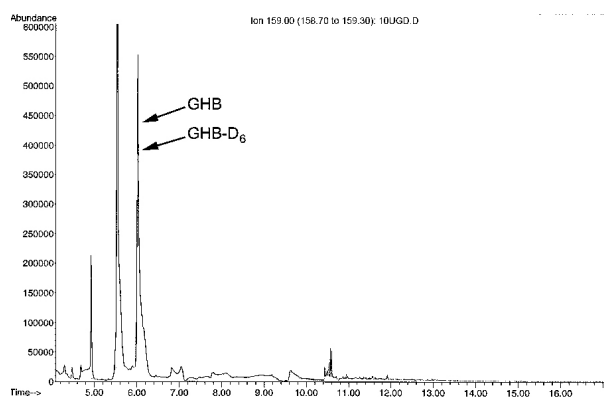


Fig. 4. Selected ion (m/z 159 and 165) chromatograms of extracted urine with addition of GHB and GHB-D₆ at 10 μ g/ml derivatised with BSTFA+1% TMCS.

GHB was extracted from urine by liquid-liquid extraction. The influence of 8 kinds of solvents (n-butyl chloride, chloroform, methylene chloride, diethyl ether, diisopropyl ether, ethyl acetate, n-hexane, n-heptane) (Figure 5) and 6 kinds of buffering of extraction mediums (2 M H₂SO₄, 10% HCl, buffers: phosphate at pH 2, 3 and 7.4, and citrate at pH 2) (Figure 6) on GHB recovery was examined during optimisation of the method of extraction. These recoveries fluctuated depending on conditions from 0.17% to 40%. The most optimal conditions turned out to be extraction by ethyl acetate from citrate buffer pH 2 medium, in which the recovery of the process was 40% at a concentration of 10 μ g/ml.

Because of the presence of endogenous GHB in urine, calibration of the method was carried out by the standard addition method. A series of 10 samples, 1 ml each, was prepared from a urine sample taken from one source. GHB in rising concentrations of 0; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2; 5; 10; 50 and 100 μ g/ml was added to

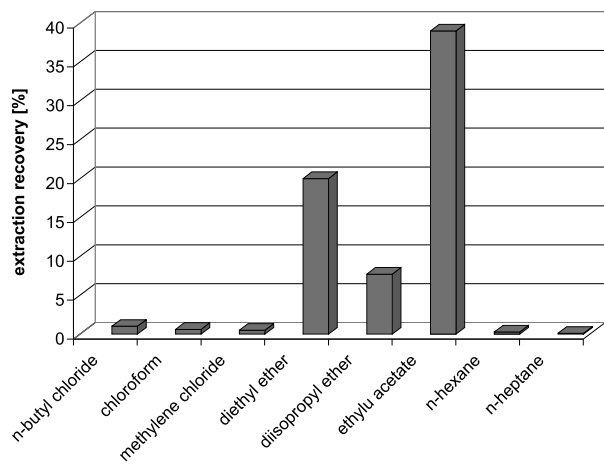


Fig. 5. Influence of used extractant on efficiency of GHB extraction.

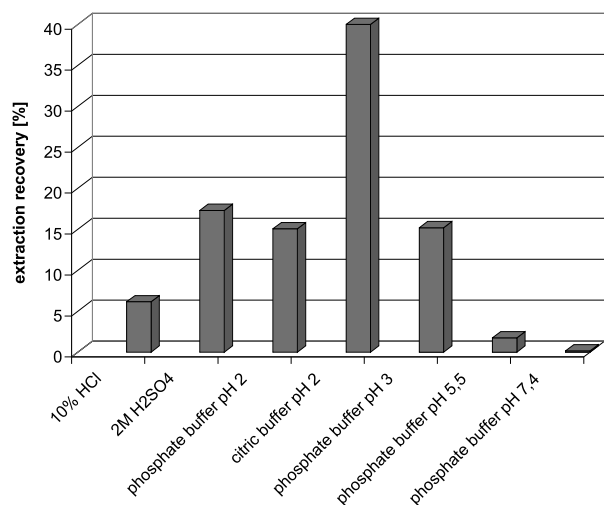


Fig. 6. Influence of kind of buffering medium on efficiency of GHB extraction.

successive samples. A calibration curve was plotted on the basis of the ratio of areas of peaks originating from GHB and GHB-D₆ as a function of GHB concentration. On the basis of 10-point calibration curves it was ascertained that the PCI-GC-MS method was linear in two working ranges: 0.1–10 g/ml and 10–100 g/ml. Values of correlation coefficients characterising linear regression equations for calibration curves obtained during six independent analyses of urine samples collected from different persons were 0.9992 and 0.9963, respectively.

Endogenous GHB concentrations in urine samples used for preparation of the calibration curve were determined by extrapolation of obtained rectilinear dependencies to the intersection point with axis of concentrations. It should be added that many authors have used synthetic urine that is free from bacteria and many compounds that are present in real urine, includ-

ing GHB, for calibration of the method of GHB determination. The limit of detection (*LOD*) was determined as the concentration for which the value of the analytical signal (peak height) derived from GHB exceeds by three times the noise signal value. The limit of quantification (*LOQ*) was accepted as the concentration at which the height of the GHB peak was 6 times greater than the height of the noise peak. In this manner *LOD* and *LOQ* estimated for GHB in urine were about 0.045 and 0.075 g/ml, respectively. Intra-group and intergroup precision determined on one day and on different days during the week on the basis of analyses of four different urine samples with addition of GHB at a concentration of 10 g/ml, expressed as RSD, were 1.2% and 13%, respectively.

For the purpose of control of method precision, and because of inaccessible commercial reference material containing GHB, three control urine samples collected from different persons with addition of GHB at a concentration of 10 g/ml were prepared. Average analyte concentrations were estimated from both calibration curves. They were 10.18, 0.13 g/ml and 9.22, 1.14 g/ml. The relative accuracy of the method, calculated according to the formula [(mean concentration – target concentration) / target concentration] × 100%, did not exceed 8% of the target value.

Two intravital and *post mortem* urine samples with addition of GHB, GBL, 1,4-BD and BHB at concentrations of 10 g/ml were subjected to the analytical process for the purpose of verification of method specificity. It was ascertained that there is no interference of the selected analytes with GHB determination. The selection of compounds for specificity tests was fully justified by the possibility of their co-occurrence in urine samples originating from persons taking GHB for different purposes. Validation parameters of the method were not estimated for GBL and 1,4-BD, but a 9-point calibration curve for BHB was prepared that was linear in the ranges 0.1–100 g/ml and 10–100 g/ml. Determination of BHB in urine has essential importance because it is recognised as an indicator of alcoholic ketoacidosis, especially in investigations of the cause of death of persons that misuse alcohol [16].

It can be accepted that the validation parameters of the PCI-GC-MS method of GHB determination in urine guarantee its usefulness. The procedure of sample preparation is not complicated and can be applied to routine work in the majority of laboratories.

Efforts to develop an EI-GC-MS method of GHB determination in urine did not produce satisfactory results on account of higher *LOD* and *LOQ* values amounting to 4 g/ml and 7 g/ml, respectively.

The validated PCI-GC-MS method was applied to the determination of endogenous concentrations of GHB in intravital and *post mortem* urine samples. Intravital samples were analysed immediately after collection. Urine from autopsies was analysed at different times after death, i.e. after 34–380 days (Table II).

TABLE II. STORAGE TIME OF POST MORTEM SAMPLES OF URINE BEFORE DETERMINATION OF ENDOGENOUS GHB

No.	Time intervals [days]		CGHB [g/ml]
	Death-autopsy	Autopsy-analysis	
1	4	30	15.04
2	6	100	0.54
3	6	123	0.12
4	1	154	7.62
5	5	71	11.54
6		349	2.79
7	1	64	8.84
8	6	374	14.50
9		108	3.66
10		138	4.57
11		195	0.52
12		50	0.15

“ ” Unknown.

The fundamental criterion of material selection was exclusion of the possibility of taking GHB before death. Determined GHB concentrations ranged from 0.05–0.35 g/ml (average 0.21 ± 0.09 , median 0.21 g/ml) in urine collected from living persons ($n = 12$) and 0.12–14.50 g/ml (5.82 ± 5.50 ; 4.11 g/ml) in urine from autopsies ($n = 12$) (Figure 7).

Each of the above mentioned analysed urine samples was divided into nine parts and put into hermetically sealed vials. Three samples from each source were stored at -18°C , $+3^{\circ}\text{C}$ and room temperature (about 20°C). GHB was determined in individual samples after 2, 4 and 8 weeks of storage (Figure 8).

Endogenous concentrations of GHB in *post mortem* urine samples were higher than in samples taken from living persons. Values of these concentrations did not change in material that was stored at low temperatures, but an increase in GHB concentration was

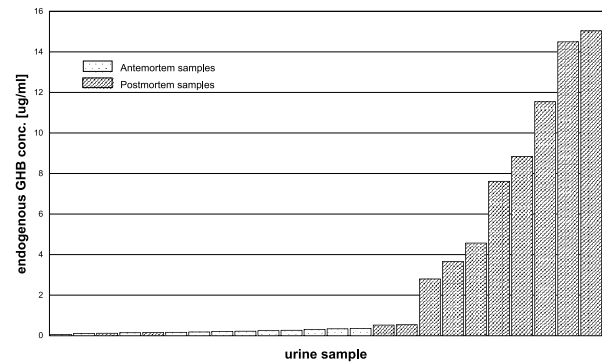


Fig. 7. Endogenous GHB concentrations in urine samples.

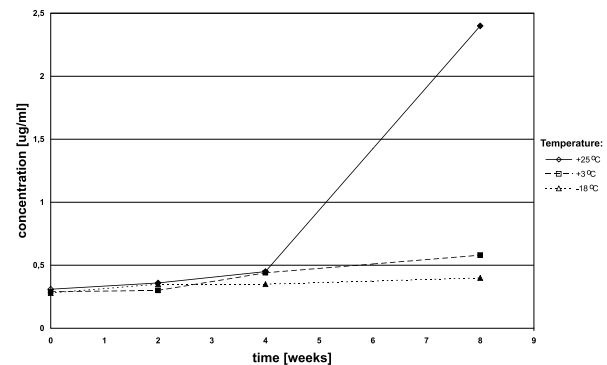


Fig. 8. Changes of GHB concentration during storage in different conditions.

observed in urine samples that were stored at room temperature.

Endogenous (0.05–0.035 g/ml) GHB concentrations determined in intravital samples in this study are lower than those established by other authors. Concentrations determined by LeBeau [20] in urine samples collected from 207 persons ranged from 0.00–2.70 g/ml (more precisely from the *LOQ* value of 0.20 g/ml) with median 0.24 g/ml. In his earlier research [18], GHB concentrations were as high as 6.63 g/ml in a group of 8 persons from whom 425 urine samples were collected during one week and indicated statistically significant intraindividual variation. For comparison, it is necessary to quote GHB concentration determined in urine samples ($n = 21$) collected from alleged victims of rapes with use of GHB which fluctuated from 2.3 up to 6100 g/ml, the median being only 15 g/ml [21].

Determined GHB concentrations (0.12–14.50 g/ml) in *post mortem* urine samples were decidedly higher than those revealed in intravital material. Comparison of them with data from the literature is difficult. Results of research published so far are characterised by a broad range. Some researchers [6] present evidence that values of GHB concentrations in intravital and post mortem urine samples are comparable and do not

change significantly during storage of material with NaF addition at low temperature. A decided majority maintains that storage of the material at room temperature without sodium fluoride addition can cause formation of GHB concentration even up to 433 g/ml in the blood and significantly lower in the urine. Analysis of 13 cases of deaths not associated with GHB consumption showed comparable GHB concentrations in blood (range: 0–197 g/ml, average: 57 g/ml) and urine (0–217 g/ml; 56 g/ml) [5]. One of the causes of occurrence of higher GHB concentrations in autopsy material can be the biogenic amine – putrescine, which arises as a result of albumin degradation (e.g. putrefaction processes) and is one of the sources of GHB produced after death. Another cause can be accumulation of too much succinic acid as a result of stopping the Krebs Cycle, which is in turn transformed to GHB. Therefore, in order to correctly interpret determined GHB concentration for the purpose of confirmation or exclusion of its consumption, it is necessary to remember about factors that can have an influence on GHB concentration in analysed biological material.

4. Summary

The elaborated PCI-GC-MS method for determination of GHB in urine enables identification of this compound at low concentrations, so it is useful both for forensic and clinical toxicology.

Difficulties associated with interpretation of results of determination of GHB in biological material relating to its possible consumption result mainly from the natural presence of this compound in the organism and its changes during storage of the material.

References

- Adamowicz P., Analiza toksykologiczna w sprawach o ułatwienie dokonania zgwałcenia przez podanie środka farmakologicznego, *Problemy Kryminalistyki* 2005, 248, 26–30.
- Adamowicz P., Kała M., Drugs and alcohol as agents used for facilitation of sexual assault, *Problems of Forensic Sciences* 2004, 58, 79–90.
- Adamowicz P., Kała M., Date-rape drugs scene in Poland, *Przegląd Lekarski* 2005, 62, 572–575.
- Alston II W. C., Ng K., Rapid colorimetric screening test for γ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine, *Forensic Science International* 2002, 126, 114–117.
- Baselt R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Biomedical Publications, Foster City 2000.
- Beránková K., Mutňanská K., Balíková M., Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine, *Forensic Science International* 2006, 161, 158–162.
- 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, *Journal of Forensic Sciences* 2001, 46, 688–693.
- Doherty J. D., Hattox S. E., Snead O. C. [et al.], Identification of endogenous γ -hydroxybutyrate in human and bovine brain and its regional distribution in human, *Journal of Pharmacology* 1978, 25, 241–256.
- Doherty J. D., Snead O. C., Roth R. H., A sensitive method for quantitation of γ -hydroxybutyric acid and γ -butyrolactone in brain by electron capture gas chromatography, *Analytical Biochemistry* 1975, 69, 268–277.
- Dyer J. E., Gablo M. J., Andrews K. M., 1,4-Butanediol, “pine needle oil”: overdose mimics toxic profile of GHB, *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 1997, 35, 554.
- Elian A. A., GC-MS determination of endogenous GHB levels in antemortem urine and blood, *Forensic Science International* 2002, 128, 120–122.
- Ferrara S. D., Tedeschi L., Frison G. [et al.], Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Pharmacology Biomedical and Analytical* 1993, 11, 483–487.
- Frison G., Tedeschi L., Maietti S. [et al.], Determination of γ -hydroxybutyric acid (GHB) in plasma and urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/positive ion chemical ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2000, 14, 2401–2407.
- Fung H. L., Haas E., Raybon J. [et al.], Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of endogenous gamma-hydroxybutyrate concentrations in rat brain regions and plasma, *Journal of Chromatography B* 2004, 807, 287–291.
- Haller C., Thai D., Jacob III P. [et al.], GHB urine concentrations after single-dose administration in humans, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 360–379.
- Iten P.X., Meier M., Beta-hydroxybutyric acid – an indicator for an alcoholic ketoacidosis as cause of death in deceased alcohol abusers, *Journal of Forensic Sciences* 2000, 45, 624–632.
- Kalasinsky K. S., Dixon M. M., Schmunk G. A. [et al.], Blood, brain and hair GHB concentrations following fatal ingestion, *Journal of Forensic Sciences* 2001, 46, 728–730.
- LeBeau M. A., Christenson R. H., Levine B. [et al.], Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, 26, 340–346.

19. LeBeau M. A., Miller M. L., Levine B., Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine, *Forensic Science International* 2001, 119, 161–167.
20. LeBeau M. A., Montgomery M. A., Morris-Kukoski C. [et al.], A comprehensive study on the variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB), *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 98–105.
21. McCusker R. R., Paget W. H., Chronister C. W. [et al.], Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 1999, 23, 301–305.
22. Mesmer M. Z., Satzger R. D., Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gammabutyrolactone by HPLC/UV-VIS spectrometry and HPLC/thermospray mass spectrometry, *Journal of Forensic Sciences* 1998, 43, 489–492.
23. Moriya F., Hashimoto Y.: Endogenous γ -hydroxybutyric acid levels in postmortem blood, *Legal Medicine* 2004, 6, 47–51.
24. Moriya F., Nishimura H., Furumiya J. [et al.], Effects of drinking and smoking on endogenous levels of urinary γ -hydroxybutyric acid. A preliminary study, *Legal Medicine* 2006, 8, 231–234.
25. Palatini P., Tedeschi L., Frison G., Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers, *Journal of Clinical Pharmacology* 1993, 45, 353–356.
26. Paul R., Tsanaclis L., Kingston R. [et al.], GC-MS-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in blood and urine, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 375–379.
27. Rambourg-Schepens M. O., Buffet M., Durak C. [et al.], Gamma butyrolactone poisoning and its similarities to gamma hydroxybutyric acid: two case reports, *Veterinary and Human Toxicology* 1997, 39, 234–235.
28. Roth R. H., Giarman N. J., γ -Butyrolactone and γ -hydroxybutyric acid – I. Distribution and metabolism, *Biochemical Pharmacology* 1996, 15, 1333–1348.
29. Salomone S., Benzodiazepines and GHB. Detection and pharmacology, Humana Press, New Jersey 2001.
30. Scharf M. B., Lai A. A., Branigan B. [et al.], Pharmacokinetics of γ -hydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients, *Sleep* 1998, 21, 507–514.
31. Vriendt C. A., Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of GHB in rat plasma, *Journal of Chromatography B* 2001, 752, 85–90.
32. Wood M., Laloup M., Samyn N. [et al.], Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2004, 1056, 83–90.

Corresponding author

Piotr Adamowicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: padamowicz@ies.krakow.pl

OZNACZANIE KWASU GAMMA-HYDROKSYMASŁOWEGO (GHB) W MOCZU METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ SPRĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS Z DODATNIĄ JONIZACJĄ CHEMICZNĄ (PCI-GC-MS)

1. Wstęp

Kwas γ -hydroksymasłowy, GHB (rycina 1), jest związkiem endogennym obecnym w organizmie każdego człowieka. Posiada on szereg cech neuroprzekaznika. Powstaje w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) z neuroprzekaznika kwasu γ -aminomasłowego (GABA), w który sam może się przekształcić. W organizmie ulega biotransformacji do kwasu bursztynowego i dalszym przemianom w cyklu Krebsa. Po raz pierwszy zsyntetyzowany został w 1961 roku przez francuskiego naukowca dra H. Laborita, który badał skutki, jakie powoduje GABA w mózgu [28].

Początkowo GHB stosowano w celach medycznych jako środek znieczulający. Ze względu na efekty uboczne, jakie wywoływał, ograniczono jego zastosowanie do leczenia narkolepsji (Stany Zjednoczone) i uzależnienia od alkoholu (Włochy) [15]. W niektórych kręgach młodzieżowych bywa propagowany i sprzedawany jako substytut sterydów anabolicznych mający powodować przyrost masy mięśniowej, a w innych przeciwnie, jest polecany jako naturalny produkt powodujący obniżenie masy ciała. GHB jest również reklamowany jako środek leczący bezsenność, zapobiegający starzeniu się, łysieniu, poprawiający nastrój, znoszący niepokój i depresję oraz podnoszący wydolność seksualną [5, 20]. Od lat dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku gwałtownie wzrasta nadużywanie GHB w celach „rekreacyjnych” jako tzw. „narkotyku klubowego”, czyli stosowanego w celu wprowadzenia się w stan odurzenia. GHB oraz jego analogi, a zarazem prekursorzy do produkcji, tj. lakton kwasu γ -hydroksymasłowego (GBL) i 1,4-butanodiol (1,4-BD) należą także do grupy środków określanych nazwą *date-rape drugs*, które stosowane są w celu ułatwienia wykorzystania seksualnego. Do zgwałceń dochodzi wówczas, kiedy ofiara znajduje się pod działaniem świadomie lub nieświadomie przyjętego środka. W tym drugim przypadku substancja jest zazwyczaj dodawana niepostrzeżenie do napoju potencjalnej ofiary. Skutki, jakie wywołują te środki, to m.in. utrata świadomości, amnezja i obniżony poziom zahamowania psychicznego. Niejasno zapamiętany przebieg zdarzenia sprawia, że ofiary zgwałceń zgłaszają się na policję najczęściej po upływie dłuższego czasu. Ze względu na naturalną obecność GHB w organizmie, szybką eliminację przyjętej dawki (jest wykrwany do 8 godzin z krwi i do 12 godzin z moczu) i wpływ czasu od jej przyjęcia, często staje się praktycznie nie-

możliwe udowodnienie użycia GHB jako środka ułatwiającego dokonanie zgwałcenia [1, 2, 3].

Krytycznym problemem jest ustalenie granicy stężeń endogennego GHB w materiale biologicznym. Gdy jedni badacze przytaczają nieznaczące jego poziomy w osoczu (około 0,1 g/ml) i moczu (około 2,5 g/ml), materiałach, które pobrane są od osób żywych [28], inni podają wartości 2–3 g/ml dla krwi i 5–6 g/ml dla moczu [11], a nawet proponują przyjęcie granicznego stężenia 10 g/ml w moczu [20]. Przyjęcie takiej wartości granicznej dla rozróżnienia egzo- i endogennego pochodzenia GHB spowodowała, że po podaniu jednorazowej terapeutycznej jego dawki (50 mg/kg) w 12,5%, 81,3% i 100% próbek moczu pobranych odpowiednio w przedziałach 3–6 h, 6–12 h i 12–24 h stężenie związku znajdowało się poniżej proponowanej granicy [15]. Po przyjęciu wyższych dawek, do 7 g (~100 mg/kg), jego stężenie we krwi i w moczu osiągało wartości trudne do zinterpretowania po 8 i 12 h [5]. Z licznych danych uzyskanych z piśmiennictwa [5, 8, 10, 13, 17, 29] wynika, że według obecnie posiadanej wiedzy, wyznaczenie jednoznacznej granicznej wartości jest ciągle dyskusyjne. Wartości stężeń GHB w materiale biologicznym zmieniają się i zależą od wielu czynników. Przyżyciowo badano wpływ płci, rasy, wieku, warunków zdrowotnych, leczenia [20] i diety, a szczególnie picia alkoholu i palenia tytoniu [23, 24] oraz obniżonego pH moczu na stężenie endogennego GHB w płynach ustrojowych. W materiale sekcyjnym dużą zmienność w stężeniu tego związku stwierdzono w zależności od rodzaju materiału, a nawet miejsca pobrania krwi ze zwłok [5], warunków i czasu przechowywania pobranego materiału oraz sposobu jego konserwacji [6, 19].

Przyjmowanie GHB w mniejszych dawkach wywołuje euforię, odprężenie, odurzenie, senność, zachwianie równowagi i halucynacje. Większe dawki prowadzą do zaburzeń oddychania i utraty przytomności. Z kolei efektem przyjęcia dużych dawek GHB jest głęboka śpiączka i amnezja [5, 25, 30]. Wąski przedział stężeń terapeutycznych sprawia, że łatwo dochodzi do przedawkowania i zatrucia. Jednym z głównych powodów przedawkowania jest nieznajomość zawartości czystego GHB w przyjętej substancji oraz interakcje z innymi środkami, szczególnie przeciwdepresyjnymi, benzodiazepinami, barbituranami, bądź też z alkoholem.

GHB zazwyczaj przyjmowany jest doustnie, ale może być również wstrzykiwany dożylnie. Przeważnie występuje jako sól sodowa w postaci białego proszku, tabletek

lub kapsulek. Spotykany jest również w postaci bezbarwnej, bezwonnej cieczy o lekko słonawym smaku. Przed pozamedycznym użyciem rozpuszczany jest w wodzie, sokach, napojach alkoholowych, w których jest niewyczuwalny i niezauważalny.

GHB przyjęty doustnie ulega szybkiemu wchłanianiu, metabolizowaniu i wydalaniu z moczem. Jednak tylko 5% przyjętej dawki przechodzi do moczu w postaci niezmienionej. Okres półtrwania GHB wynosi 30–60 minut. Przyjęty w dużej dawce jest wykrywany we krwi do 8 godzin, a w moczu nawet do 12 godzin [5].

Do niedawna składniki używane do wytwarzania GHB, tj. GBL i 1,4-BD, były powszechnie dostępne. Związki te w organizmie ludzkim łatwo przekształcają się do GHB, co powoduje wzrost jego stężenia we krwi i w mózgu oraz wystąpienie takich samych objawów działania, jak po przyjęciu GHB [29]. Dlatego też GBL, 1,4-BD, a ostatnio nawet GVL (-walerolakton), są często stosowane jako zamienniki GHB [27].

GHB jest objęty kontrolą prawną w wielu krajach, np. w Kanadzie (od 1998 r.), w niektórych krajach Unii Europejskiej, Japonii (2001), Szwajcarii i w Stanach Zjednoczonych (2002). Analogi GHB nie są zaliczane do związków nielegalnych. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady Europy z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie prekursorów narkotykowych również nie wymienia tych związków. W Polsce, zgodnie z ustawą z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii, GHB jest zaliczany do substancji psychotropowych grupy IV-P. Jego pochodne wprawdzie nie są wymieniane, ale spełniają definicję środka zastępczego.

Do oznaczania GHB w materiale biologicznym stosowano różne metody instrumentalne, m.in. chromatografię gazową z detekcją wychwyty elektronów [9] oraz z detekcją mas [12, 21, 26], wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją UV oraz mas [22]. W metodach wykorzystujących technikę GC-MS analiza GHB polega najczęściej na przekształceniu tego związku w GBL lub poddaniu derywatacji odczynnikiem silylującym. Po derywatacji oznaczano GHB w moczu w zakresie stężeń od 5 do 6100 g/ml [7, 19] oraz we krwi w zakresie od 1 do 200 g/ml [11]. Zastosowanie techniki LC-MS w oznaczaniu GHB jest mniej popularne, pomimo że nie wymaga ona przeprowadzania analitu w pochodne [14, 32]. Granice oznaczalności GHB metodami LC-MS wynoszą 1 g/ml. Na oznaczanie GHB w płynach ustrojowych techniką HPLC-UV ma wpływa niski współczynnik absorpcji właściwej, skutkiem czego granica oznaczalności w tej metodzie wynosi 10 g/ml [31]. Opracowano również szybki kolorymetryczny test do wykrywania GHB w moczu. Test umożliwia wykrycie 100 g GHB w jednomililitrowej próbce moczu w postaci purpurowego kompleksu z żelazem tworzącego się w obecności hydroksylaminy i po przekształceniu GHB

do GBL. Przy takiej granicy wykrywalności wpływ endogenego GHB na dodatni wynik testu można pominąć [4].

W kontekście wyżej przedstawionych zagadnień wydawało się celowe opracowanie metody oznaczania GHB oraz wyznaczenie zakresów stężeń endogenego GHB w próbkach moczu pobranych od osób żywych oraz ze zwłok. Istotnym elementem była również ocena trwałości endogenego GHB w próbkach moczu przechowywanych w różnych warunkach.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiły losowo wybrane próby moczu pochodzące od osób żywych i ze zwłok. Próbkę świeżo po pobraniu od żywych, zdrowych, nieprzyjmujących leków i GHB osób, używano jako materiał kontrolny do opracowania metody oraz do wyznaczania stężeń fizjologicznego GHB. Stężenia endogenego GHB wyznaczono również w próbkach moczu sekcyjnego pobranego ze zwłok osób, u których przyjęcie tego związku przed zgonem można było wykluczyć na podstawie okoliczności zdarzenia i wyników analizy toksykologicznej. Materiał ten stanowiły dowody rzeczowe nadesłane do Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie w celu przeprowadzenia analizy chemiczno-toksykologicznej.

Te same próbki moczu pobranego przyżyciowo i podczas sekcji służyły również do oceny trwałości GHB przechowywanego w różnych czasie i temperaturze, według ustalonej procedury badań.

2.2. Odczynniki

GHB (w postaci soli sodowej) i GHB-D₆ pochodziły z firmy Cerilliant, 1,4-BD i GBL z firmy Aldrich, octan etylu (o czystości do HPLC) z firmy Merck, kwas -hydroksymasłowy (BHB) (w postaci soli sodowej) oraz odczynnik derywatacyjny N,O-bis(trimetylosililo)tri-fluoroacetamid z dodatkiem 1% trimetylochlorosilanu (BSTFA + 1% TMCS) z firmy Sigma.

2.3. Ekstrakcja

Do fiolki Eppendorfa wlało 200 l moczu i 20 l roztworu wzorca wewnętrznego GHB-D₆ (100 g/ml), osiągając stężenie 10 g/ml w moczu. Próbkę mieszano za pomocą wortexu, a następnie dodawano 200 l buforu cytrynianowego o pH 2 oraz po 1 ml octanu etylu. Mieszankę wytrząsano za pomocą wytrząsarki przez 10 minut, po czym odwirowywano przy 4000 obr/min. Po odwirowaniu pobierano 800 l (4 200 l) fazy organicznej do kolejnej fiolki Eppendorfa i odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Na-

stępie do suchej pozostałości dodawano po 50 l octanu etylu i 20 l odczynnika derywatyżującego (BSTFA + 1% TMCS). Próbkę mieszano za pomocą wortexu i poddawano derywatacji przez 30 minut w temperaturze 60°C, a po oziębieniu do temperatury pokojowej analizowano metodą GC-MS.

2.4. Aparatura i warunki analizy

Ekstrakty po derywatacji analizowano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z pozytywną chemiczną jonizacją (PCI-GC-MS).

Do badań zastosowano chromatograf gazowy (GC) firmy Agilent Technologies serii 6890 wyposażony w selektywny detektor mas (MSD) serii 5973 z możliwością opcjonalnego stosowania jonizacji chemicznej (CI) oraz automatyczny podajnik próbek serii 6890. Rozdział prowadzono na kolumnie kapilarnej typu DB-5MS (30 m 0,25 mm 0,25 m, J & W Scientific) w programowanym gradientem temperatury. Początkowa temperatura pieca wynosiła 55°C i utrzymywana była przez 1 minutę, po czym wzrastała o 20°C/min do temperatury 280°C, którą utrzymywano przez 5 minut. Temperatura zaworu nastrzykowego wynosiła 240°C, a kwadrupola 106°C. Gazem nośnym był hel, przepływający przez kolumnę z szybkością 1,2 ml/min, a jonizującym metan, którego przepływ wynosił 20 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 2 l.

3. Wyniki i dyskusja

Przeprowadzenie badań wstępnych w trybie zbierania całkowitego prądu jonowego pozwoliło na rejestrację pełnych widm masowych GHB, GHB-D₆, GBL, 1,4-BD i BHB oraz wybranie najintensywniejszych jonów do dalszych badań w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM). Widma masowe GHB i GHB-D₆ przedstawiono na rycinie 2 i 3.

Objęte badaniami związki, czyli GHB, GHB-D₆ oraz GBL, 1,4-BD i BHB, jako mogące potencjalnie interferować z analitami, identyfikowano na podstawie czasów retencji i wybranych jonów (tabela I). W analizie ilościowej dla GHB i GHB-D₆ stosowano odpowiednio jony o m/z 159 i 165. Chromatogramy tych jonów w ekstrakcie moczu z dodatkiem GHB i GHB-D₆ w stężeniu 10 g/ml w postaci trimetylosililowych pochodnych przedstawiono na rycinie 4.

GHB ekstrahowano z moczu w układzie ciecz-ciecz. Optymalizując metodę ekstrakcji, zbadano wpływ 8 rodzajów rozpuszczalników (chlorek n-butyłu, chloroform, chlorek metylenu, eter dietylowy, eter diizopropylowy, octan etylu, n-heksan, n-heptan) (rycina 5) oraz 6 rodzajów buforowania środowiska ekstrakcji (2 M H₂SO₄, 10% HCl, bufor: fosforanowy o pH 2, 3 i 7,4 oraz cy-

trynianowy o pH 2) (rycina 6) na wydajność wyosabniania GHB. Wydajności te w zależności od warunków wahały się w granicach od 0,17% do 40%. Najbardziej optymalnymi warunkami okazała się ekstrakcja octanem etylu ze środowiska buforu cytrynianowy o pH 2, w których wydajność procesu wyznaczona przy stężeniu 10 g/ml wynosiła 40%.

Ze względu na obecność endogennego GHB w moczu, wzorcowanie metody przeprowadzono techniką dodatku wzorca. Z próby moczu pobranej z pojedynczego źródła przygotowano serię 10 próbek po 1 ml każda. Do kolejnych próbek dodawano GHB we wzrastającym stężeniu, tj. 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50 i 100 g/ml. Wykreślono krzywą kalibracyjną na podstawie stosunku pól powierzchni pików pochodzących od GHB i GHB-D₆ w funkcji stężenia GHB. Na podstawie 10-punktowych krzywych kalibracyjnych stwierdzono, że metoda PCI-GC-MS była liniowa w dwóch zakresach roboczych: 0,1–10 g/ml i 10–100 g/ml. Wartości współczynników korelacji charakteryzujących równania regresji liniowej dla krzywych kalibracji, a otrzymanych podczas sześciu niezależnych analiz próbek moczu pochodzących od różnych osób, wynosiły odpowiednio 0,9992 i 0,9963.

Ekstrapolując otrzymane prostoliniowe zależności do punktu przecięcia się z osią stężeń, wyznaczano stężenie endogennego GHB w próbkach moczu użytych do sporządzenia krzywej. Należy dodać, że wielu autorów do wzorcowania metody oznaczania GHB używało syntetycznego moczu wyprodukowanego w warunkach laboratoryjnych, który jest wolny od bakterii i wielu związków obecnych w moczu rzeczywistym, w tym GHB.

Granice wykrywalności (*LOD*) wyznaczono jako stężenie, dla którego wartość sygnału analitycznego (wysokość pików) pochodzącego od GHB trzykrotnie przewyższała wartość sygnału szumów. Za granicę wykrywalności (*LOQ*) przyjęto stężenie, przy którym wysokość pików GHB była 6-krotnie wyższa od wysokości pików szumów. W ten sposób wyznaczone *LOD* i *LOQ* dla GHB w moczu wynosiły odpowiednio około 0,045 i 0,075 g/ml.

Precyzja wewnątrzgrupowa i międzygrupowa oznaczona w jednym dniu i w różnych dniach w ciągu tygodnia na podstawie analizy czterech różnych próbek moczu z dodatkiem GHB w stężeniu 10 g/ml, wyrażona przez *RSD*, wynosiła odpowiednio: 1,2% i 13%.

W celu kontroli dokładności metody, a z powodu komercyjnie niedostępnego materiału odniesienia zawierającego GHB, sporządzono trzy próbki kontrolne moczu pochodzące od różnych osób, z dodatkiem GHB w stężeniu 10 g/ml. Średnie stężenie analitu wyznaczano z obu krzywych kalibracyjnych. Wynosiły one 10,18 g/ml i 9,22 1,14 g/ml. Relatywna dokładność metody, obliczona wg wzoru [(średnie stężenie – stężenie odniesienia) / stężenie odniesienia] 100%, nie przekraczała 8% wartości odniesienia.

Weryfikację specyficzności metody przeprowadzono, poddając pełnemu procesowi analitycznemu po dwie próby moczu przyżyciowego i sekcyjnego z dodatkiem GHB, GBL, 1,4-BD i BHB również w stężeniu 10 g/ml każdy. Nie stwierdzono interferencji wybranych analitów na oznaczanie GHB. Wybór związków do badania specyficzności był wysoce uzasadniony możliwością ich współobecności w próbkach moczu pochodzących od osób przyjmujących GHB w różnych celach. Nie wyznaczano parametrów walidacyjnych metody dla GBL i 1,4-BD, ale sporządzono 9-punktową krzywą kalibracyjną dla BHB, która zachowywała liniowość w zakresach 0,1–10 g/ml oraz 10–100 g/ml. Oznaczanie BHB w moczu ma istotne znaczenie, ponieważ jest on uznany jako wskaźnik alkoholowej kwasicy ketonowej, szczególnie w badaniach przyczyny zgonu osób nadużywających alkoholu [16].

Można przyjąć, że parametry walidacyjne metody PCI-GC-MS oznaczania GHB w moczu gwarantują jej użyteczność. Procedura przygotowania próbki nie jest skomplikowana i może być stosowana do rutynowej pracy w większości laboratoriów.

Próby opracowania metody EI-GC-MS oznaczania GHB w moczu nie przyniosły zadowalających wyników ze względu na wyższe wartości *LOD* i *LOQ* wynoszące odpowiednio 4 g/ml i 7 g/ml.

Zwalidowaną metodą PCI-GC-MS wyznaczano stężenia endogenne GHB w próbkach moczu pochodzących od osób żywych i ze zwłok. Probki pobrane przyżyciowo poddawano analizie natychmiast po pobraniu. Mocz sekcyjny badano w różnym czasie od zgonu, tj. po 34–380 dniach (tabela II).

Zasadniczym kryterium wyboru tego materiału stanowiło wykluczenie możliwości przyjęcia GHB przed zgonem. Wyznaczone stężenia GHB mieściły się w granicach 0,05–0,35 g/ml (średnia $0,21 \pm 0,09$; mediana 0,21 g/ml) w moczu pobranym od osób żywych ($n = 12$) i 0,12–14,50 g/ml ($5,82 \pm 5,50$; 4,11 g/ml) w moczu sekcyjnym ($n = 12$) (rycina 7).

Każdą z wyżej badanych prób moczu podzielono na dziewięć części i umieszczono w szczelnie zamkniętych buteleczkach. Po trzy próbki z każdego źródła przechowywano w temperaturze -18°C , $+3^{\circ}\text{C}$ i pokojowej (około 20°C). W pojedynczych próbkach oznaczano GHB po 2, 4 i 8 tygodniach przechowywania (rycina 8).

Stężenia endogenne GHB w próbkach moczu pobranych ze zwłok były wyższe niż u osób żywych. Wartości tych stężeń nie ulegały zmianie w materiale przechowywanym w niskich temperaturach, natomiast zaobserwowano wzrost stężenia GHB przy przechowywaniu moczu w temperaturze pokojowej.

Oznaczone w niniejszej pracy stężenia endogenne (0,05–0,35 g/ml) GHB w próbkach moczu pochodzących od osób żywych są niższe od wyznaczonych przez innych autorów. Stężenia wyznaczone przez LeBeau [20]

w próbkach moczu pochodzących od 207 osób mieściły się w granicach 0,00–2,70 g/ml (a ściślej od wartości *LOQ* wynoszącej 0,20 g/ml) z medianą 0,24 g/ml. W jego wcześniejszych badaniach [18] stężenia GHB sięgały 6,63 g/ml w grupie 8 osób, od których pobrano 425 próbek moczu w ciągu 1 tygodnia, przy czym wskazywały one znamienne statystycznie wewnątrzosobniczą zmienność. Dla porównania należy przytoczyć stężenia GHB oznaczone w próbkach moczu ($n = 21$) pobranych od domniemanych ofiar zgonów z użyciem GHB, które wahały się w granicach od 2,3 do 6100 g/ml, przy czym mediana wynosiła tylko 15 g/ml [21].

Oznaczone stężenia (0,12–14,50 g/ml) GHB w moczu pobranym ze zwłok były zdecydowanie wyższe od wykazanych w materiale pobranym przyżyciowo. Porównanie ich z danymi zawartymi w piśmiennictwie jest trudne. Dotychczas opublikowane wyniki badań cechuje duża rozpiętość. Jedni badacze [6] dowodzą, że wartości stężeń GHB w próbkach moczu przyżyciowego i sekcyjnego są porównywalne i nie ulegają istotnym zmianom w czasie przechowywania materiału z dodatkiem NaF i w niskiej temperaturze. Zdecydowana większość utrzymuje, że przechowywanie materiału w temperaturze pokojowej bez dodatku fluorku sodu może spowodować wytworzenie się GHB w stężeniu nawet do 433 g/ml we krwi i znacznie mniejsze w moczu. Z analizy 13 przypadków zgonów niezwiązanych z przyjęciem GHB wykazano porównywalne stężenia GHB we krwi (zakres: 0–197 g/ml, średnia: 57 g/ml) i w moczu (0–217 g/ml; 56 g/ml) [5]. Jedną z przyczyn występowania wyższych stężeń GHB w materiale sekcyjnym może być biogenna amina – putrescyna, która, powstając w wyniku rozpadu białek (np. procesach gnilnych), stanowi jedno ze źródeł GHB wytwarzanego po zgonie. Inną przyczyną może być nagromadzenie się zbyt dużej ilości kwasu bursztynowego w wyniku zahamowania cyklu Krebsa, który z kolei jest przekształcany do GHB. Dlatego też, aby dokonać właściwej interpretacji wyznaczonego stężenia GHB w celu potwierdzenia lub wykluczenia jego przyjęcia, należy pamiętać o czynnikach, które mogą mieć wpływ na stężenie GHB w badanym materiale biologicznym.

4. Podsumowanie

Opracowana metoda PCI-GC-MS do oznaczania GHB w moczu umożliwia wykrycie tego związku w niskich stężeniach, czyli jest przydatna zarówno dla potrzeb toksykologii sądowej, jak i klinicznej.

Trudności związane z interpretacją wyników oznaczania GHB w materiale biologicznym w odniesieniu do ewentualnej jego konsumpcji wynikają z głównie z naturalnej obecności tego związku w organizmie oraz przemian, jakim ulega podczas przechowywania materiału.