

Professional Paper

## KVALITATIVNE I KVANTITATIVNE METODE ANALIZE GAMA-HIDROKSIBUTIRATA (GHB)

Maja Jelena PETEK<sup>1</sup> i Ana LUCIĆ VRDOLJAK<sup>2</sup>

Centar za kriminalistička vještačenja "Ivan Vučetić", Ministarstvo unutarnjih poslova<sup>1</sup>, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada<sup>2</sup>; Zagreb, Hrvatska

Primljeno u lipnju 2006.  
Prihvaćeno u listopadu 2006.

Gama-hidroksibutirat (GHB) supstancija je koja se prirodno sintetizira u organizmu sisavaca. Pretpostavlja se da posjeduje svojstva neurotransmitora. Prvi put GHB je sintetiziran *in vitro* 1960. godine. Pri tom su otkriveni njegovi sedativni i hipnotički učinci na središnji živčani sustav pa se GHB u 60-im godinama prošlog stoljeća počinje rabiti kao anestetik, a naknadno i kao sredstvo za jačanje mišića. Međutim, nakon što je dokazano da izaziva ovisnost te uzrokuje brojne opasne nuspojave, GHB se povlači iz uporabe i stavlja na popis zabranjenih supstancija. Unatrag zadnjih desetak godina GHB se počinje zlouporabljati kao psihoaktivno sredstvo. Ilegalno se nabavlja u obliku tekućine ili bijelog praha. Jednostavno se priprema iz svog prekursora gama-butirolaktona (GBL). Zbog rastućeg broja prometnih nesreća i kriminalnih djela počinjenih pod njegovim utjecajem GHB zadnjih desetak godina postaje važan analitički objekt forenzičkih i biomedicinskih laboratorija. U ovom radu prikazan je kratak pregled analitičkih metoda razvijenih za detekciju i kvantifikaciju GHB-a u ilegalnim pripravcima i mokraći.

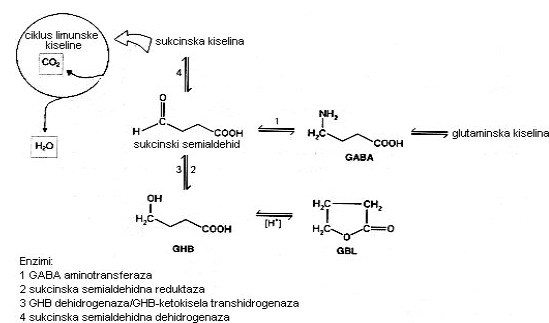
**KLJUČNE RIJEČI:** *infracrvena spektroskopija, kolorimetrija, mikroskopija, nuklearna magnetska rezonancija, plinska kromatografija-spektrometrija masa, tekućinska kromatografija*

Gama-hidroksibutirat (GHB) ili gama-hidroksima-slačna kiselina prirodna je supstancija prisutna u središnjem živčanom sustavu i perifernim tkivima sisavaca. Sporedni je metabolit i prekursor inhibicijskog neurotransmitora gamaaminomaslačne kiseline (GABA) u metabolizmu glutaminske kiseline (slika 1); posredstvom oksidativnih enzima aminoskupina GABA-e zamjenjuje se alkoholnom skupinom GHB-a (1-3).

Mehanizam djelovanja GHB-a u organizmu još nije potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da posjeduje svojstva neurotransmitora i neuromodulatora, a neka istraživanja navode da se GHB u mozgu koristi GABA-receptorima; na njima ima slabu agonističku aktivnost kojom uzrokuje promjene u prijenosu dopamina (1). Drugi autori smatraju da u mozgu postoji receptor baš za GHB, različit od GABA-receptora (2, 3).

Budući da GHB lako prelazi krvno-moždanu barijeru, pretpostavljeno je da bi mogao postići

sintezu GABA-e u mozgu (1). Da bi se to i dokazalo, GHB je 1960. godine prvi put sintetiziran *in vitro*, u obliku natrijeve soli ( $C_4H_7O_3Na$ ) te su se njime tretirale eksperimentalne životinje (1). Utvrđeno je da egzogeni GHB ne izaziva pojačanu sintezu GABA-e u mozgu, ali pri tome je otkriven njegov snažan sedativni i hipnotički učinak na središnji živčani sustav, odnosno njegova



Slika 1 Metabolizam glutaminske kiseline (4)

farmakološka svojstva potencijalnog anestetika (1). U tu svrhu počinje se i rabiti šezdesetih godina prošlog stoljeća, ali ne i zadugo, jer se pokazalo da već pri normalnim dozama uzrokuje nagle prijelaze iz svjesnog u besvjesno stanje. Unatoč tomu, u nekim europskim zemljama i danas se rabi kao anestetik, hipnotik, kao terapija pri liječenju alkoholizma i apstinencijskog sindroma kod opijatne ovisnosti te pri narkolepsiji i fibromialgiji (1-3).

Početak osamdesetih godina prošlog stoljeća u Sjedinjenim Američkim Državama, nakon što je navodno dokazano da stimulira lučenje hormona rasta, GHB se prodaje pod raznim imenima (npr. Hydroxybutyrate, Gamma Hydrate, Somatomax) kao dodatak hrani namijenjen održavanju tjelesne težine i jačanju mišića (2). Posebno je popularan među *body builderima* kao alternativa za steroidne hormone. Međutim, ubrzo postaje očito da je GHB opasna supstancija jer stvara ovisnost, a apstinencijski sindrom se očituje u anksioznosti, vrtoglavici, konfuziji, tremoru, nesanicima, paranoidnom ponašanju, vidnim i slušnim halucinacijama, psihozi, tahikardiji i hipertenziji.

Zadnjih desetak godina prošlog stoljeća GHB se počinje zlorabljati kao psihoaktivno sredstvo (1). U Republici Hrvatskoj Ministarstvo zdravstva 2002. godine stavlja GHB na Popis opojnih droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti opojna droga (5).

GHB se ilegalno nabavlja u obliku bijelog praha (koji je najčešće natrijeva sol NaGHB) ili, češće, kao prozirna slankasta tekućina (1, 6). Ilegalno se vrlo jednostavno priprema iz svog analoga i metaboličkog prekursora gamabutirolaktona (GBL, slika 1). GBL u organizmu vrlo brzo prelazi u GHB, dajući isti učinak. Nažalost, do danas GBL nije zabranjena supstancija; može se naći u trgovinama kao industrijsko otapalo za sintezu poliuretana, pesticida, elastičnih vlakana, farmaceutika te kao sredstvo za čišćenje akvarija, mrlja od tinte, kao skidač laka za nokte i dr. Zaluživanjem i grijanjem industrijskog otapala (GBL) te zatim mijenjanjem pH npr. octenom kiselinom, dobiva se tekući pripravak GHB-a spreman za konzumiranje. Ako se u pripravak doda aceton te se potpuno osuši, dobiva se praškasti GHB (1, 6, 7).

GHB se uzima oralno, najčešće pomiješan s pićem, a dozira u čajnoj žličici u uobičajenoj količini od 1 g do 5 g. Učinci se javljaju 15 min do 30 min nakon konzumacije te traju 3 do 6 sati. Poluvijek u plazmi mu je 27 minuta (1, 3). Oko 5 % oralne doze GHB-a može se detektirati u mokraći u nepromijenjenu obliku.

Ostalih 95 % izlučuje se plućima u obliku ugljikova dioksida. Jedan gram konzumiranog GHB-a djeluje kao relaksans; opušta mišiće, poboljšava raspoloženje te pospješuje otvorenost u društvu. Količina od 1 g do 2 g usporava disanje i rad srca te utječe na cirkulaciju, motoričke sposobnosti i ravnotežu. Stoga je vrlo opasno voziti pod utjecajem GHB-a. Više doze, od 2 g do 4 g, uzrokuju teškoće u govoru, a mogu prouzročiti i duboki san sličan komi iz kojeg se ponekad nije moguće probuditi. Alkohol dodatno stimulira učinke GHB-a, koji dovode do depresije centra za disanje, nesvijesti, kome, pa konačno i smrti (6, 7). GHB se naziva i "klupskom drogom"; mladež ga na noćnim zabavama konzumira (najčešće s alkoholom) radi postizanja euforičnog raspoloženja, ali i kao sedativ koji reducira učinke stimulansa (npr. kokaina, efedrina, metamfetamina). Također, GHB ima i mnogo ozloglašeniije ime - droga za silovanje, tj. *rape drug*. Silovatelji ga zbog sedacijskog učinka stavljaju žrtvi u piće. Pod utjecajem GHB-a žrtva postaje fizički nemoćna te ima tzv. "rupe" u pamćenju, zbog čega se ponekad ne sjeća da je silovana (6, 7).

Zbog rastućeg broja prometnih nesreća i kriminalnih djela počinjenih pod utjecajem GHB-a te zbog neistraženosti ove nove droge, GHB zadnjih desetak godina postaje važan analitički objekt forenzičkih i biomedicinskih laboratorija. Razvija se niz analitičkih metoda za detekciju i kvantifikaciju GHB-a u ilegalnim pripravcima i biološkim uzorcima od kojih valja istaknuti kolorimetrijske i mikrokristalne testove, infracrvenu (IR) spektroskopiju, tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC), vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) i, u najnovije vrijeme, <sup>1</sup>H nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR) (1).

#### Metode analize gama-hidroksibutirata

Analiza GHB-a podrazumijeva njegovu detekciju i kvantifikaciju u krutim ili tekućim pripravcima i u biološkim uzorcima. Zbog najpogodnijih fizikalnih svojstava i najjednostavnijeg uzimanja za biološki uzorak najradije se odabire mokraća. Osim toga, detekcija droge u mokraći moguća je u duljem razdoblju nakon konzumacije nego na primjer u krvi (1, 2, 7).

Postoje direktne metode određivanja GHB-a u uzorku i one koje zahtijevaju njegovu prethodnu ekstrakciju (7). U tjelesnim tekućinama (i općenito u otopinama) dio GHB-a uvijek se nalazi u obliku

laktone (GBL). Omjer tih dvaju oblika ovisi o vrsti i pH otopine. U krvi dominira GHB oblik, jer krv sadržava enzim laktonazu koja pretvara GBL u GHB (slika 1). Općenito će u otopinama koje imaju pH manji od 4,72 prevladavati oblik GBL, dok će pri pH-vrijednostima većim od 4,72 zastupljeniji biti oblik GHB (1, 2, 8, 9). Budući da je GHB malena i polarna molekula koju je teško izolirati iz otopine, tekući uzorci se pri analizi najčešće zakiseljavaju s ciljem da se cjelokupan GHB prevede u lakton. U takvim slučajevima ne može se razlikovati GHB od GBL-a. Nakon ekstrakcije, nekim metodama se detektira GBL (1), dok druge hidroliziraju GBL i detektiraju GHB (8, 9).

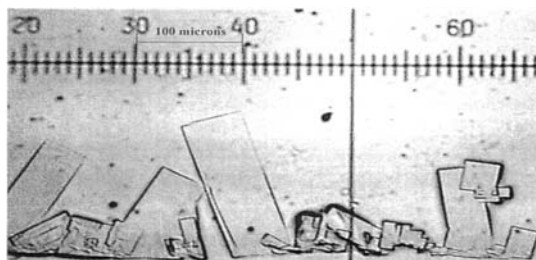
Metode analize GHB-a mogu se podijeliti na pregledne *screening* i na potvrdne (instrumentne) metode (6). Pregledne metode nisu visokospecifične, ali mogu brzo i jednostavno direktno detektirati prisutnost droge u uzorku te usmjeriti analitičara na daljnji tijek analize. Najčešće se temelje na reakciji nastajanja kompleksa ili reakciji kristalizacije između određenog sastojka iz analita i pogodnog reagensa (10). Prisutnost GHB-a u uzorku pretpostavljena preglednom metodom dokazuje se potvrdnom (visokospecifičnom) metodom. Neke instrumentne metode samo detektiraju GHB u uzorku, kao na primjer IR spektroskopija, dok ga druge i kvantificiraju (HPLC i GC-MS) (8, 11, 12).

#### Analiza GHB-a u ilegalnim pripravcima

Kao pregledna metoda za analizu GHB-a u ilegalnim pripravcima predlaže se mikrokemijska metoda (13). Potvrdne metode podrazumijevaju IR spektroskopiju, HPLC s UV/VIS detektorom i vezani sustav tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-spektrometrija masa (HPLC-MS). IR i HPLC-MS rabe se kao detekcijske metode, a HPLC-UV/VIS i kao kvantitativna (11, 12).

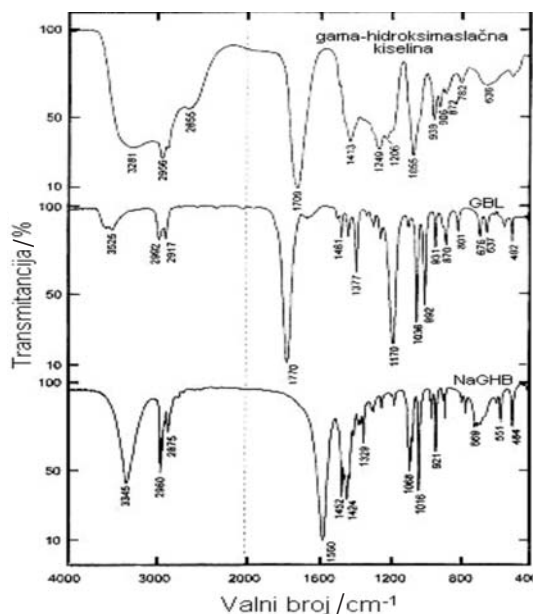
Mikrokemijska metoda temelji se na kristalizaciji GHB-a iz ilegalnog pripravka u prisutnosti srebrova i bakrova nitrata kao reagensa (13). Nastali zelenkasti i pravokutni kristali (slika 2) specifični su za GHB (13, 14).

Analiza tekućeg ilegalnog pripravka infracrvenom (IR) spektroskopijom zahtijeva ekstrakciju GHB-a u obliku gamahidroksimaslačne kiseline iz vodene otopine u etil-acetat. Ekstrakcija nije potpuna, jer solvatacija GHB-a snažno ovisi o potencijalu otapala da s njim stvara vodikove veze zbog čega je favorizirano njegovo otapanje u vodi, a ne u etil-acetatu. Stoga se ova metoda može rabiti samo kao



Slika 2 Fotomikrograf GHB kristala, snimljen kamerom "Kodak DC-120 Zoom Digital Camera" na polarizacijskom mikroskopu "Olympus BH-2" (13)

detekcijska, a ne i kvantitativna. Na slici 3 prikazan je IR spektar GHB-a (u obliku karboksilne kiseline) i, za usporedbu, spektri GBL-a i NaGHB-a. Za razliku od spektara GBL-a i NaGHB-a, spektar hidroksimaslačne kiseline karakteriziraju relativno široki pikovi, što valja i očekivati zbog jakih međumolekularnih (a vjerojatno i unutamolekularnih) vodikovih veza između karbonilnih i hidroksilnih skupina u karboksilnim kiselinama (13, 15).



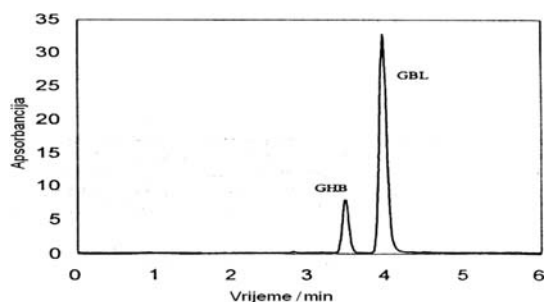
Slika 3 IR transmisijski spektri GHB-a, GBL-a i NaGHB-a, snimljeni na instrumentu "Nicolet Avatar 360" pri razlučivanju od 4 cm<sup>-1</sup> (11)

Isti princip ekstrakcije primjenjiv je i na izolaciju GHB-a iz matrica kompliciranijih od vodene otopine (npr. Coca-Cola, Sprite, pivo, vino) (11).

Budući da je GHB malena i polarna molekula, na HPLC koloni obrnutih faza ima vrlo kratko vrijeme zadržavanja, a UV/VIS detekcija mu nije optimalna zbog nedostatka snažnog kromofora. Iako ova

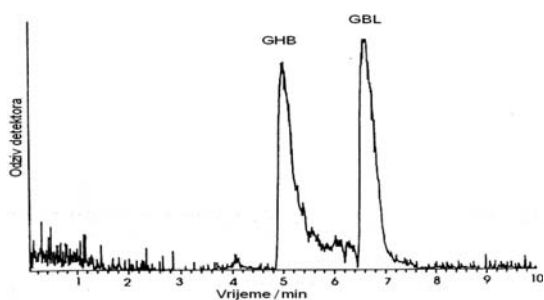
metoda nema veliku osjetljivost, može se primijeniti pri detekciji i kvantifikaciji GHB-a, jer je njegov volumni udio u ilegalnim pripravcima velik; izražava se u postotcima. Metoda ne zahtijeva ekstrakciju GHB-a te može razlikovati GHB i GBL (12).

Slika 4 prikazuje kromatogram uzorka ilegalnog pripravka koji sadržava GHB i GBL.



Slika 4 HPLC/UV-VIS kromatogram ilegalnog pripravka, razrijeđenog u metanolu. Instrument: Hewlett Packard, kolona (Waters): C-18, pokretna faza: fosfatni pufer (pH = 30%) metanol (30%), protok: 1 mL min<sup>-1</sup>, apsorbanacija: 215 nm, volumen iniciranja: 2 µL (12)

U tekućinskoj kromatografiji zamjena UV-VIS detektora spektrometrom masa (HPLC/MS) osigurava veću osjetljivost metode (12). Ionizacija se provodi termoraspršenjem, jer se na taj način uzorci ioniziraju direktno iz tekuće faze. Kao pokretna faza rabi se acetatni pufer te se u spektru masa dobivaju izraženi pseudomolekularni ioni (M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (13, 18). Na slici 5 prikazan je potpuni ionski kromatogram (TIC) uzorka ilegalnog pripravka koji sadržava GHB i GBL (12).



Slika 5 HPLC-MS kromatogram potpune ionske struje (Total Ion Current, TIC) uzorka ilegalnog pripravka razrijeđenog u metanolu. Instrument: Hewlett Packard, pokretna faza: acetatni pufer (pH=4, 85%) i metanol (15%), protok: 0,75 mL min<sup>-1</sup>. MS (Hewlett Packard) uvjeti: ionski izvor: 250 °C, kvadrupol: 100 °C, termoraspršenje: 115 °C (12)

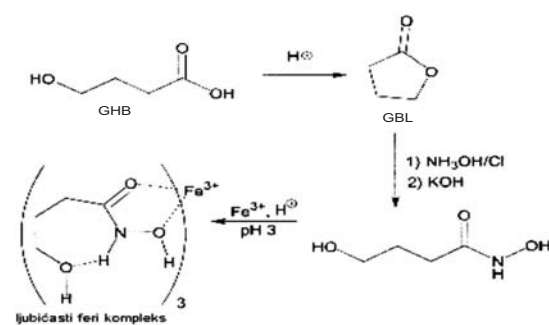
U spektru masa GHB-a dobiva se ion m/z = 122<sup>+</sup>, koji odgovara masi iona (M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> GHB-a, zatim ion m/z = 104<sup>+</sup>, koji odgovara masi iona (M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> laktone GHB-a te ion m/z = 105<sup>+</sup> koji najvjerojatnije

odgovara masi iona (M + H)<sup>+</sup> GHB-a. Prisutnost iona GBL-a u spektru GHB-a potječe od konverzije GHB-a u GBL u ionskom izvoru (12). Metoda razlikuje GHB od GBL-a.

#### Analiza GHB-a u mokraći

Kao pregledna metoda za detekciju GHB-a u mokraći primjenjuje se kolorimetrijska metoda za estere (11). Potvrдна metoda analize GHB-a u mokraći mora biti visokoosjetljiva i kvantifikacijska. Naime, koncentracije GHB-a u mokraći mogu biti endogenog ili egzogenog podrijetla, što potvrдна metoda mora razlučivati (1, 4). U tu svrhu najčešće se rabe GC-MS metoda, uz izolaciju GHB-a iz mokraće ekstrakcijom na čvrstoj fazi (solid phase extraction, SPE) i mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (solid phase microextraction, SPME) te nuklearna magnetska rezonancija (<sup>1</sup>H NMR) (8, 16, 17).

Kolorimetrijska metoda za detekciju GHB-a je modificirani željezo-hidroksamatni test za organske estere i laktone, pa postupak uključuje konverziju GHB-a u GBL (slika 6) (10). Prisutnost GHB-a u mokraći rezultira ljubičastim obojenjem koje potječe od kompleksnog željezo (III) iona nastalog u reakciji (10, 18).

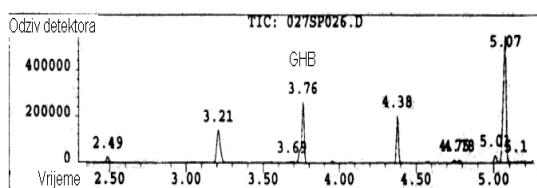


Slika 6 Reakcija nastajanja ljubičastog željezova (III) kompleksa, kad je u mokraći prisutan GHB (10)

Analiza GHB-a metodom GC-MS zahtijeva njegovu ekstrakciju iz mokraće koja se može provesti SPE ili SPME metodama. Obje metode ekstrakcije su kvantitativne (kao unutarnji standard rabi se GHB-d<sub>6</sub>). Pogodan SPE sorbens za GHB je kopolimer koji sadržava hidrofobne i ionskoizmjenjivačke funkcionalne skupine, a SPME vlakno polidimetilsiloksan (8, 16). Da bi bio pogodan za analizu na nepolarnoj GC koloni, izolirani GHB se derivatizira, tj. prevodi u nepolaran i termički stabilniji oblik. Kad se ekstrakcija GHB-a provodi SPE metodom, GHB se derivatizira nakon ekstrakcije, i to di-(trimetilsilil)-trifluoroacetamidom

(BSTFA) kao derivatizacijskim sredstvom. Pri SPME ekstrakciji GHB se derivatizira heksil-kloroformatom direktno u mokraći, odnosno prije ekstrakcije (8, 16).

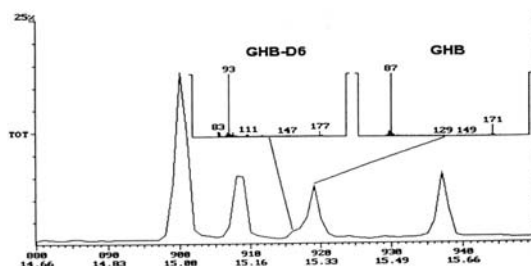
Spektar masa GHB-di-TMS-a (tj. GHB-a derivatiziranog BSTFA sredstvom) pri ionizaciji udarom elektrona (EI) sadržava ione  $m/z = 73^+$ ,  $133^+$ ,  $147^+$ ,  $204^+$ ,  $233^+$  i  $235^+$ . Iako je ion  $m/z = 147^+$  najjačeg intenziteta, on se ne odabire za GC-MS snimanje u načinu "pojedinačnih iona" (Single Ion Monitoring, SIM) zbog interferencije ureje-TMS iz mokraće, koja u svom spektru masa sadržava isti ion. Pri interpretaciji GC-MS spektra mokraće također treba uzeti u obzir interferencije koje potječu od endogenih produkata sličnih GHB-u (npr.  $\beta$ -hidroksimaslačna kiselina koja se u velikim količinama izlučuje u mokraći dijabetičara). Navedene interferencije mogle bi se izbjeći kemijskom ionizacijom (2, 8). Na slici 7 prikazan je GC-MS kromatogram GHB-di TMS-a izoliranog iz mokraće SPE metodom.



Slika 7 GC-MS kromatogram GHB-di-TMS-a izoliranog iz mokraće SPE metodom, snimljen na instrumentu GC-MS (Hewlett Packard) Uvjeti: temperaturni raspon na metil siloksanskoj koloni (HP-1MS): 65 °C do 300 °C (brzina zagrijavanja 15 °C/min), temperatura spoja GC-MS: 290 °C, temperatura injektora: 260 °C, protok plina nosioca (helija): 1,60 mL/min, ionizacija: EI (100 eV), SIM ioni: 204<sup>+</sup>, 233<sup>+</sup>, 235 (8)

Spektar masa GHB-kloroformata (tj. GHB-a derivatiziranog heksil-kloroformatom) pri EI ionizaciji sadržava ion  $m/z = 171^+$  koji potječe od dekarboksiliranog i dehidratiziranog oblika GHB-kloroformata te ion  $m/z = 87^+$  koji potječe od GBL-a nastalog iz GHB-a u ionskom izvoru. Na slici 8 prikazan je GC-MS kromatogram GHB-kloroformata i unutarnjeg standarda GHB-d<sub>6</sub>-kloroformata ekstrahiranih SPME vlaknom iz uzorka mokraće (16).

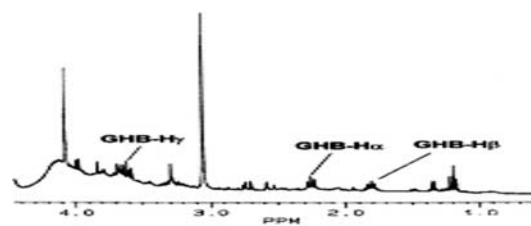
Zbog visoke osjetljivosti, GC-MS metoda rabi se pri određivanju koncentracije endogenog GHB-a u mokraći. Utvrđeno je da se koncentracije GHB-a endogenog podrijetla u mokraći zdravih ljudi kreću od 0,25 mg L<sup>-1</sup> do 7 mg L<sup>-1</sup>. Iznimka je rijetka bolest "4-hidroksimaslačna acidurija", pri kojoj je zbog nedostatka enzima sukcininske semialdehidne



Slika 8 GC-MS kromatogram potpune ionske struje (Total Ion Current, TIC) i spektri masa GHB-a i GHB-d<sub>6</sub>, instrument Varian Saturn 4D GC-MS. Uvjeti: temperaturni raspon na koloni (DB5-MS): 60 °C do 270 °C (zagrijavanje 9 °C min<sup>-1</sup>), injektor: 270 °C, plin nositelj (helij): 12 psi, ionizacija: EI, struja filameta: 25  $\mu$ A, napon multiplikatora elektrona: 2500 V, analizator: kvadrupolna ionska stupica (16)

reduktaze (slika 1) lučenje GHB-a povećano, pa se u mokraći kod ljudi koji pate od te bolesti može naći GHB u koncentracijama i do 200 mg L<sup>-1</sup> (4, 19-21). U posljednje vrijeme, nakon niza ispitivanja, u toksikološkim laboratorijima je kao granična vrijednost uzeta koncentracija GHB-a u mokraći od 10 mg L<sup>-1</sup>. Koncentracija GHB-a viša od granične pripisuje se egzogenom GHB-u, odnosno zlorporabi (4).

Prednost <sup>1</sup>H nuklearne magnetske rezonancije pred drugim metodama je mogućnost direktne analize GHB-a u mokraći, bez ekstrakcije i derivatizacije (17). Zasad se primijenila samo na "umjetne" uzorke mokraće, tj. uzorke u koje su dodane poznate koncentracije GHB-a (17). Slika 9. prikazuje <sup>1</sup>H homonuklearni NMR spektar GHB-a u mokraći (17).



Slika 9 <sup>1</sup>H NMR spektar GHB-a iz mokraće. Uvjeti instrumenta (Bruker AM 300 MHz): Vrijeme prezasićenosti signalom vode: 3s, spektralna širina: 6 kHz, kut: 80°, trajanje analize: 5 min (17)

<sup>1</sup>H NMR-signal GHB-a potječu od H $\alpha$ , H $\beta$  i H $\gamma$ -jezgara (slika 9). H $\beta$  su najzasjenjenije vodikove jezgre, a H $\gamma$  zbog hidroksilne skupine najodsjenjenije te u spektru imaju najveći kemijski pomak (17, 22).

Na tablici 1 prikazane su granice detekcije metoda analize GHB-a. Za metode IR spektroskopije (11) i HPLC/MS (12) autori ne navode granicu detekcije.

Tablica 1 Granice detekcije metoda analize GHB-a

Metoda	Vrsta metode	Granica detekcije GHB-a / mg L <sup>-1</sup>	Vrsta analita
kolorimetrijska	pregledna	100	mokraća
mikrokemijska	pregledna	2000	ilegalni pripravak
HPLC/UV-VIS	potvrđna	30	ilegalni pripravak
SPE/GC-MS	potvrđna	0,2	mokraća
SPME/GC-MS	potvrđna	2	mokraća
<sup>1</sup> H NMR	potvrđna	50	mokraća

## ZAKLJUČAK

Najnovija statistička ispitivanja pokazuju da se pri analizi mokraće žrtava silovanja i počinitelja prometnih prekršaja GHB pronađe samo u 6 % istraženih slučajeva. Razlog tomu, nažalost, nije rijetka uporaba ove droge, nego nedostatak rutinskih metoda za njeno dokazivanje te također nedovoljno znanje o učincima ove droge, koji se često zbog sličnosti pripisuju alkoholu. Iz navedenih razloga toksikološki se laboratoriji nastoje što više educirati o GHB-u i što prije uvesti metode za njegovu identifikaciju i kvantifikaciju u ilegalnim pripravcima i biološkim uzorcima. Pregledne ("screening") metode prvi su korak pri utvrđivanju prisutnosti droge u uzorku. Ako pregledna metoda daje negativan rezultat, daljnje se analize ne provode. Pregledne metode, dakle, moraju biti pouzdane; ne smiju davati lažno negativan rezultat. Dok je za ostale droge detekcija u biološkim uzorcima važnija od kvantifikacije (jer sama detekcija droge ili nekog njezina metabolita upućuje na to da je osoba konzumirala drogu), kod GHB-a je kvantifikacija nužna, jer se on proizvodi i endogeno. Potvrđna metoda stoga mora biti kvantitativna. Kao endogena supstancija u normalnim fiziološkim procesima i kao moćni terapeutik, GHB je jedinstvena i vrlo interesantna tvar vrijedna istraživanja. Procjenjuje se da njegova zlouporaba neće iščeznuti u skorijoj budućnosti.

## LITERATURA

- Couper FJ, Marinetti LJ.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate (GHB) - effects on human performance and behavior. *Forensic Sci Rev* 2002;14:101-21.
- Kerrigan S. GHB and precursors (part II): Management and analysis. *C&FT News* 2001;6:1-8.
- Definis-Gojanović M, Kovačić Z, Lacković Z, Sakoman S, Topić E, Trkulja V. Nove spoznaje o farmakologiji droga. Zagreb: Medicinska naklada; 2001.
- Elliot SP. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production. *Forensic Sci Int* 2003;133:9-16.
- Popis opojnih droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti opojna droga. *Narodne novine* 2002;(27).
- Executive Office of the President Office of National Drug Control Policy (ONDCP). Gamma Hydroxybutyrate (GHB) [pristup 02. veljače 2006.] Dostupno na <http://www.whitehousedrugpolicy.gov/publications/factsht/gamma/>
- Hornfeldt CS, Lothridge K, Upshaw Downs JC. Forensic science update: Gamma hydroxybutyrate (GHB). *Forensic Sci Comm* 2002;4.
- McCusker RR, Paget-Wilkes H, Chronister CW, Goldberger BA. Analysis of gamma hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999;23:301-4.
- Ciolino LA, Mesmer MZ, Satzger RD, Machal AC, McCauley HA, Morhaus AS. The chemical interconversion of GHB and GBL: forensic issues and implications. *J Forensic Sci* 2001;46:1315-23.
- Alston WC, Karno N. Rapid colorimetric screening test for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine. *Forensic Sci Int* 2002;126:114-7.
- Chappell JS, Meyn AW, Ngim KK. The extraction and infrared identification of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) from aqueous solutions. *J Forensic Sci* 2004;49:52-9.
- Mesmer JZ, Duane Satzger R. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-sutyrolactone (GBL) by HPLC/UV-VIS spectrophotometry and HPLC/thermospray mass spectrometry. *J Forensic Sci* 1998;43:489-92.
- Andera KM, Evans HK, Wojcik CM. Microchemical identification of gamma-hydroxybutyrate (GHB). *J Forensic Sci* 2000;45:665-8.
- Fulton CC. *Modern Microcrystal Tests for Drugs*. New York: John Wiley & Sons; 1969.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. New York: John Wiley; 1991.
- Blair S, Song M, Hall B, Brodbelt J. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in water and human urine by solid phase microextraction-gas chromatography/quadrupole ion trap spectrometry. *J Forensic Sci* 2001;46:688-93.

17. Del Signore AG, McGregor M, Cho BP. <sup>1</sup>H NMR analysis of GHB and GBL: Further findings on the interconversion and a preliminary report on the analysis of GHB in serum and urine. *J Forensic Sci* 2005;50:1-6.
18. Badcock NR, Zotti R. Rapid screening test for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB, Fantasy) in urine. *Ther Drug Monit* 1999;21:376.
19. Fieler EL, Coleman DE, Baselt RC.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate concentrations in pre- and postmortem blood and urine. *Clin Chem* 1998;44:692.
20. Rahbeeni Z, Ozand PT, Rashed M, Gascon GG, Nasser M. 4-Hydroxybutyric aciduria. *Brain Dev* 1994;16:64-71.
21. Le Beau MA, Christenson RH, Levine B, Darwin WD, Huestis MA. Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate. *J Anal Toxicol* 2002;26:340-6.
22. Pine SH, Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS. *Organska kemija*. Zagreb: Školska knjiga; 1984.

### Summary

#### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE GAMMA-HYDROXYBUTYRATE ANALYSIS

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is a naturally occurring compound present in the brain and peripheral tissues of mammals. It is a minor metabolite and precursor of gamma-aminobutyric acid (GABA). Just as GABA, GHB is believed to play a role in neurotransmission. GHB was first synthesized *in vitro* in 1960, when it revealed depressive and hypnotic effects on the central nervous system. In 1960s it was used as an anaesthetic and later as an alternative to anabolic steroids, in order to enhance muscle growth. However, after it was shown that it caused strong physical dependence and severe side effects, GHB was banned. For the last fifteen years, GHB has been abused for its intoxicating effects such as euphoria, reduced inhibitions and sedation. Illicitly it is available as white powder or as clear liquid. Paradoxically GHB can easily be manufactured from its precursor gamma-butyrolactone (GBL), which has not yet been banned. Because of many car accidents and criminal acts in which it is involved, GHB has become an important object of forensic laboratory analysis. This paper describes gas and liquid chromatography, infrared spectroscopy, microscopy, colourimetry and nuclear magnetic resonance as methods for detection and quantification of GHB in urine and illicit products.

**KEY WORDS:** *colourimetry, gas chromatography-mass spectrometry, infrared spectroscopy, liquid chromatography, microscopy, nuclear magnetic resonance*

#### REQUESTS FOR REPRINTS:

Maja Jelena Petek, dipl. ing.  
Centar za kriminalistička vještačenja "Dr. Ivan Vučetić"  
Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske  
Ilica 335, HR-10000 Zagreb  
E-mail: [mpetek@mup.hr](mailto:mpetek@mup.hr)