

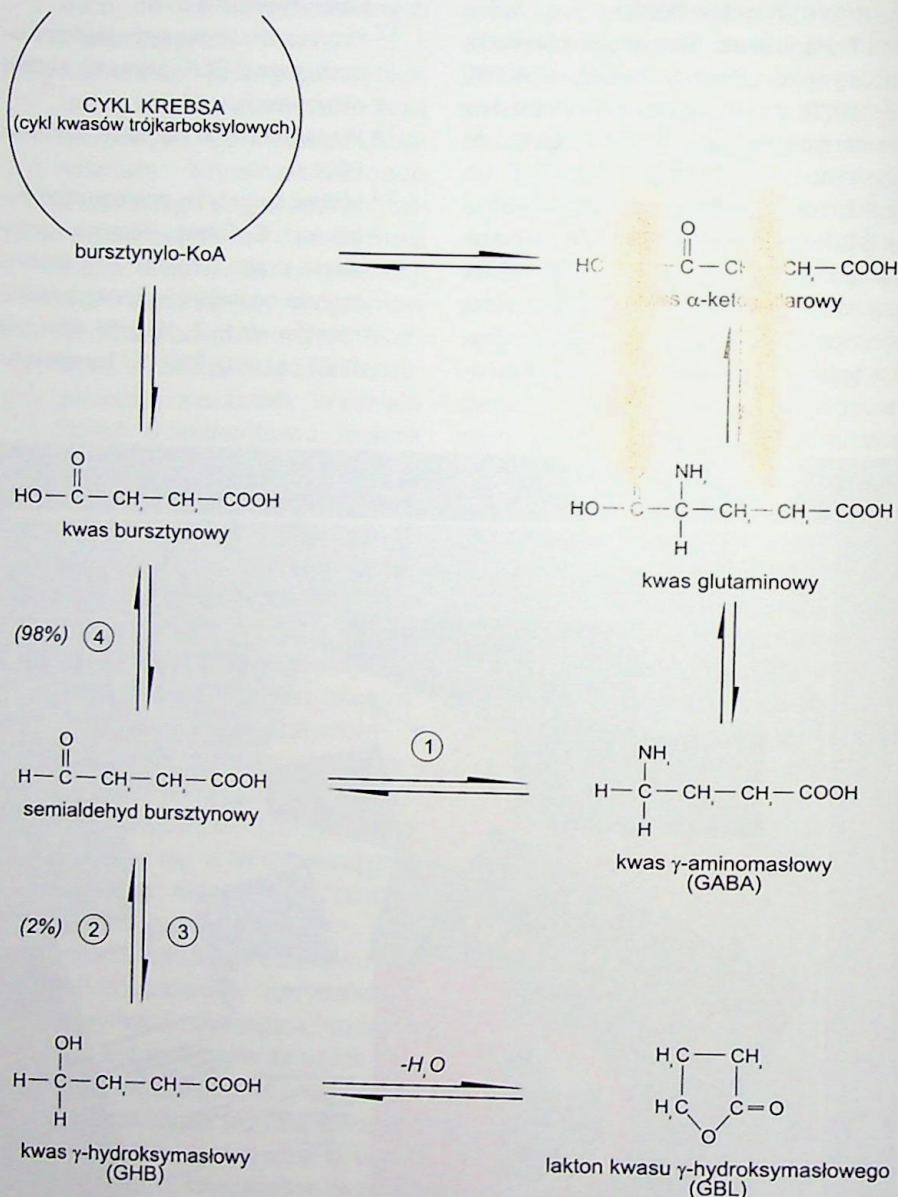
Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) i jego analogi strukturalne



W ostatnich latach obserwuje się w USA i krajach Europy Zachodniej coraz częstsze stosowanie, zwłaszcza przez młodzież, narkotyków o szczególnych, bardzo niebezpiecznych właściwościach, pozwalających wykorzystywać je do celów przestępczych – głównie do dokonywania zgwałceń i kradzieży. Do najczęściej stosowanych narkotyków tego typu należy kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) oraz szereg podobnie działających jego analogów strukturalnych.

Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) jest hydroksypochodną krótkołańcuchowego kwasu tłuszczowego występującą w mózgu ssaków. Jego stężenie w różnych częściach ludzkiego mózgu waha się od 2 do 20 nmoli/g tkanki [9]. Największe jest w hipokampie, zwojach podstawy, podwzgórzu i substancji szarej. Przyjmuje się, że GHB spełnia w organizmie rolę neuroprzekaźnika lub neuromodulatora. Jego źródłem w mózgu jest kwas γ -aminomasłowy (GABA), z którego GHB tworzy się w wyniku dwóch procesów: dezaminacji do semialdehydu bursztynowego i redukcji semialdehydu do kwasu γ -hydroksymasłowego. Są to procesy odwracalne, a więc możliwa jest również przemiana GHB w kwas γ -aminomasłowy. Proces redukcji zachodzi pod wpływem cytosolowego enzymu – reduktazy semialdehydu bursztynowego z udziałem NADPH, ale ulega jej tylko ok. 2% semialdehydu, a 98% przekształca się w kwas bursztynowy i wchodzi do cyklu Krebsa [16] – ryc. 1.

Alternatywnymi źródłami GHB, które mogą odgrywać rolę w utrzymaniu jego stałego stężenia, są: lakton kwasu γ -hydroksymasłowego



Ryc. 1. Powstawanie i metabolizm kwasu γ -hydroksymasłowego (GHB). Enzymy:

1. Aminotransferaza GABA.
2. Dehydrogenaza GHB.
3. Reduktaza semialdehydu bursztynowego.
4. Dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego.

Fig. 1. Metabolic pathway for γ -hydroxybutyric acid (GHB) synthesis and degradation

- Enzymes:
1. GABA aminotransferase.
 2. GHB dehydrogenase.
 3. Succinic semialdehyde reductase.
 4. Succinic semialdehyde dehydrogenase.

(GBL), który pod wpływem laktazy łątwo i nieodwracalnie przekształca się w GHB oraz alifatyczny alkohol – 1,4-butandiol (BDO), również ulegający w organizmie przemianie w kwas γ -hydroksymasłowy. Źródła te mogą mieć istotne znaczenie dla obwodowego układu nerwowego, w którym GABA w ogóle nie występuje lub jego ilość jest znikoma. Stężenia GBL i 1,4-butandiolu w mózgu są 10-krotnie mniejsze niż GHB.

Stężenie endogennego GHB w osoczu ludzi zdrowych, nieprzyjmujących narkotyku, nie przekracza 1 $\mu\text{g/ml}$, a w moczu 0,9–3,5 $\mu\text{g/ml}$ (średnio 1,6 $\mu\text{g/ml}$). Jedynie w moczu pacjentów cierpiących na rzadką wrodzoną chorobę acidurię 4-hydroksy-pirolidynowej, której przyczyną jest deficyt lub brak dehydrogenazy aldehydowej semialdehydowej, stężenie GHB może być bardzo wysokie, powyżej 200 $\mu\text{g/ml}$, a więc około 100 razy wyższe niż u osób zdrowych [15]. Wartość cutoff, której przekroczenie jest uznawane za dowód przyjęcia egzogenego GHB, ustalono na 10 $\mu\text{g/ml}$ [30].

LeBeau i wsp. [14] badali wpływ warunków przechowywania pobranych próbek moczu (czasu, temperatury, stopnia oziębienia, wielokrotnego rozmrażania i zamrażania itp.) na zawartość endogenego GHB. Wzrasta ona przy długotrwałym przechowywaniu, najwięcej w temperaturze pokojowej (do 400%), a najmniej w stanie zamrożenia (ok. 100%), jednak w żadnej z badanych próbek stężenie GHB nie zbliżyło się do wartości cutoff (10 $\mu\text{g/ml}$), a więc wzrost stężenia związany z przechowywaniem materiału biologicznego nie może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich przy kontroli abstynencji od GHB. Dawka GHB 10 mg/kg (0,7 g dla osoby o wadze 70 kg) wywołuje krótkotrwałą amnezję, dawka 30–35 mg/kg (2,1–2,5 g dla osoby o wadze 70 kg) powoduje senność, bradykardię i depresję oddychania, a dawka przekraczająca 50 mg/kg – śpiączkę.

Okres półtrwania GHB wynosi ok. 1 godzinę, a więc przyjęty narkotyk szybko znika z krwi oraz moczu i dla-

tego można go wykryć w osoczu tylko przez 8 godzin, a w moczu przez 12 godzin po spożyciu [3].

Działanie GHB na organizm

Syntetyczny GHB otrzymano w roku 1960 i był on początkowo stosowany jako środek usuwający ból, do leczenia narkolepsji [17] oraz uzależnienia od alkoholu [23]. W latach 80. zaczęto go stosować jako dodatek do żywności mający podnosić jej walory odżywcze. Kulturyści wykorzystywali go jako substytut steroidów anabolicznych, gdyż wywołuje rozrost tkanki mięśniowej i eliminację tłuszczu z ustroju. Ta druga właściwość stała się podstawą stosowania go jako środka odchudzającego. Rzeczywiście stwierdzono, że GHB stymuluje uwalnianie hormonu wzrostu z przysadki, ponieważ przedłuża wolnofalową fazę snu, a właśnie w tej fazie sekrecja somatotropiny jest największa. Sen po przyjęciu GHB różni się od wywołanego przez klasyczne środki uspokajające i nasenne, takie jak benzodiazepiny, które hamują REM i sen wolnofalowy. Jednak nie ma przekonujących dowodów, że krótkotrwała stymulacja sekrecji somatotropiny wywołuje wzrost masy mięśniowej.

GHB jest sprzedawany na ulicach pod wieloma nazwami, jak: Ciekły Ecstasy, Soap (mydło), Georgia Home Boy, Salty Water (słona woda), Liquid X i in. Przyczyną nadużywania GHB są efekty, jakie mu się przypisuje: euforia, „odhamowanie” i podwyższona wrażliwość seksualna. Przyjmowanie małych dawek GHB wywołuje, zdaniem narkomanów, uczucie odprężenia, zmniejszenie częstości oddechów i uderzeń serca, uczucie uspokojenia i „odświeżenia”. Efekty te pojawiają się po 15 minutach i utrzymują przez 3–6 godzin. Jednak oprócz stanów euforycznych GHB wywołuje wiele nieprzyjemnych, a nawet groźnych efektów: senność, zawroty głowy, stany splątania, upośledzenie pamięci i zaburzenia widzenia. Przedawkowanie GHB wywołuje oczopląs, zwężenie źrenic, ataksję, bezdech, upośledzenie kon-

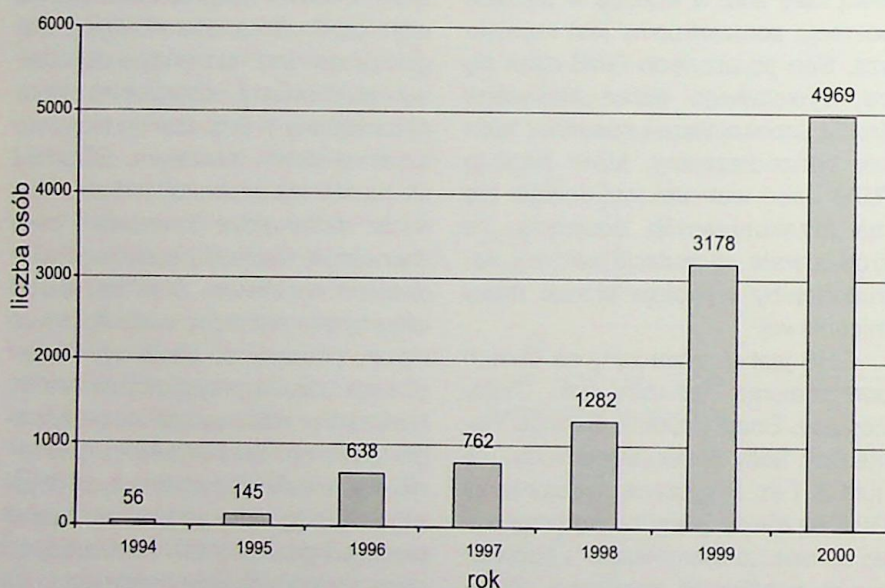
trol mięśni, wymioty, hipotermię, bradykardię, hipotonię, nietrzymanie moczu, depresję układu oddechowego, drgawki i śpiączkę. Wymaga to natychmiastowej hospitalizacji ze względu na depresyjne działanie na układ oddechowy i sercowo-naczyniowy oraz możliwość wystąpienia drgawek i śpiączki. Do roku 2000 w 45 stanach USA zanotowano 5700 przypadków przedawkowania GHB, z czego 67 zakończyło się śmiercią. Również w Europie zdarzały się śmiertelne zatrucia kwasem γ -hydroksymasłowym: w W. Brytanii 4, w Szwecji 4, w Finlandii 2 i w Danii 1. Nie ma swoistego antidotum na intoksykację GHB, bo nie są dokładnie znane mechanizmy jego działania.

Wielokrotne przyjmowanie GHB może prowadzić do wytworzenia tolerancji i uzależnienia, chociaż rozwijają się one trudniej niż po etanolu. Dotyczy to osób, które stosowały GHB stale przez okres kilku miesięcy. Nagłe przerwanie przyjmowania GHB wywołuje objawy odstawienne, które pojawiają się 1–6 godzin po przyjęciu ostatniej dawki narkotyku. Składają się na nie: lęk, niepokój, mdłości, wymioty, tachykardia, hipertonia i bezsenność, a niekiedy halucynacje słuchowe i wzrokowe. Stan ten może utrzymywać się przez wiele dni i jest bardzo podobny do stanu wywołanego przerwaniem przyjmowania innych narkotyków działających depresyjnie na OUN, np. benzodiazepin. Leczenie ma na celu złagodzenie tych objawów i polega na podawaniu leków przeciwdrgawkowych, obniżających ciśnienie krwi, antydepresyjnych i, jeśli trzeba, antypsychotycznych.

Uzależnienie od GHB i jego analogów może być również wynikiem spożywania produktów żywnościowych z dodatkiem tych analogów, reklamowanych jako wartościowe uzupełnienia diety. Osoby spożywające takie produkty są najczęściej nieświadome ich szkodliwego działania i tego, że w organizmie przekształcają się one w GHB. Często jednak związki te są stosowane z pełną świadomością w celach „rekreacyjnych”, w postaci rozpuszczonej w różnych napojach.

Miniepidemie nadużywania GHB pojawiały się już pod koniec lat 80., ale naprawdę szybki wzrost liczby osób stosujących ten narkotyk nastąpił na początku lat 90. dzięki popularności w klubach, dyskotekach i na tzw. raving parties (ang. rave – szaleć, majaczyć), całonocnych imprezach tanecznych z szybką, żywiołową muzyką. Jest on tam stosowany jako tzw. narkotyk rekreacyjny, mający opinię środka wywołującego euforię i halucynacje bez konsekwencji w postaci kaca.

O szybko wzrastającej liczbie przypadków nadużywania GHB i jego analogów świadczą dane Substance Abuse and Mental Health Services Administration, przedstawiające liczby osób korzystających z pomocy lekarskiej z powodu stosowania GHB w latach 1994–2000 (dane pochodzą z 22 dużych miast USA) – ryc. 2.



Ryc. 2. Liczba przypadków nadużywania GHB w latach 1993–2001.

Fig. 2. Number of cases of GHB abuse reported annually for the time period 1993 through 2001. (Data based on reports from the Substance Abuse and Mental Health Services Administration, compiled from various sources).

GHB ma kilka cech wyróżniających go spośród innych narkotyków: jest naturalnym składnikiem organizmu, wiąże się w mózgu z miejscami (receptorami) wykazującymi do niego (ale nie do innych narkotyków) bardzo duże powinowactwo i ma właściwości niepodobne do innych narkotyków. Istnieją wprawdzie pewne podobieństwa z narkotykami działającymi

depresyjnie na OUN, jednak od klasycznych depresantów różni się on tym, że obok działania depresyjnego może, w wysokich dawkach, wywoływać efekt stymulujący i drgawki. Ponadto jego cechy pozwalają wykorzystywać go w celach przestępczych. Jest to więc narkotyk nowego typu, o odmiennym sposobie nadużywania i zagrożenia związane z jego stosowaniem wymagają szczególnie wnikliwych badań.

GHB wyraźnie osłabia sprawność psychomotoryczną kierowców [8]. Couper i Logan [27] opisali 13 przypadków zatrzymania kierowców za nierespektowanie znaków drogowych i sygnałów policji drogowej, prowadzenie pojazdów w sposób zagrożający bezpieczeństwu ruchu drogowego, a także za spowodowanie kolizji i wypadków drogowych. Badanie krwi tych kierowców na obecność

substancji psychoaktywnych wykazało obecność wysokich stężeń kwasu γ -hydroksymasłowego. W ośmiu przypadkach GHB był jedynym wykrytym narkotykiem, a w pięciu pozostałych, obok GHB, wykryto niewielkie ilości alkoholu, kannabinoidów lub diazepamu.

Jednak największe niebezpieczeństwo związane z GHB polega na

wykorzystywaniu go w celach przestępczych.

Receptory kwasu γ -hydroksymasłowego

W mózgu występują receptory GHB, tj. miejsca wykazujące bardzo wysokie powinowactwo do [3 H]-GHB i znikome powinowactwo lub zupełny jego brak do innych narkotyków. Największą gęstość tych receptorów stwierdzono w hipokampie, korze mózgowej i wzgórzu, a najniższą w mózdzku. Nie wykryto ich natomiast poza ośrodkowym układem nerwowym. Należą one do grupy receptorów sprzężonych z białkami G. GHB wiąże się również z receptorami GABA_B, ale o ok. 1000 razy mniejszym powinowactwem ($K_d = 80\text{--}120\text{ }\mu\text{M}$) niż GABA, a więc endogenny kwas γ -hydroksymasłowy, którego stężenie jest bardzo małe, nie wywiera na tej drodze żadnego efektu. Natomiast egzogenne GHB, zwłaszcza przyjmowane w dużych dawkach, może działać nie tylko poprzez swoje receptory, ale także za pośrednictwem receptorów GABA_B, aktywując je albo bezpośrednio, albo pośrednio – po ewentualnym przekształceniu się w GABA. Dlatego niektóre efekty GHB mogą ulegać osłabieniu lub eliminacji pod wpływem antagonistów receptorów GABA_B. Warto dodać, że GABA nie wykazuje do receptorów GHB żadnego powinowactwa.

W roku 2003 Adriamampandru i wsp. [1] sklonowali receptor GHB ulegający aktywacji pod wpływem tego narkotyku i związany z białkami G, ale nie wykazujący żadnego powinowactwa do preparatu NCS-382, specyficznego antagonisty receptora GHB, który wypiera GHB z kompleksu z receptorem i odwraca jego efekty [21]. Może to wskazywać na istnienie dwóch typów receptorów GHB o odmiennych właściwościach. Aktywacja receptora GHB wywołuje najpierw zmiany w układzie przekazywania II rodzaju polegające na wzroście poziomu c-GMP i intensyfikacji obrotu fosforanu inozytolu w hipokampie, a następnie modulację ak-

tywności różnych układów przekąźnikowych. Jednym z pierwszych efektów GHB i jego strukturalnych analogów jest modulacja neurotransmisji dopaminergicznej i wzrost poziomu dopaminy w mózgu.

Analogi strukturalne GHB

W USA Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration) podjęła 13 marca 2000 r. decyzję o zaliczeniu kwasu γ -hydroksymasłowego do I grupy związków objętych kontrolą, co oznacza zakaz jego przepisywania, syntezy i sprzedaży. Nie odniosło to jednak oczekiwanego skutku, gdyż na czarnym rynku związek ten jest nadal stosunkowo łatwo dostępny. Ponadto zakaz ten jest bez znaczenia dla dilerów, którzy sprzedają gotowe chemiczne zestawy (ang. chemical kits) zawierające prekursor GHB (GBL i 1,4-BDO) z dołączonym opisem sposobów przekształcania ich w GHB [21]. Bardzo szybko również pojawiły się na rynku analogi strukturalne GHB, wykazujące podobne lub identyczne właściwości. Są to:

- GBL = lakton kwasu γ -hydroksymasłowego, ulegający w organizmie szybkiej przemianie w GHB. Jest on stosowany jako rozpuszczalnik w przemyśle polimerów, farmaceutycznym i rolnictwie.

- BDO = 1,4-butandiol, który również może przekształcać się w GHB [11].

- GHV = kwas γ -hydroksywalerianowy albo kwas metylo- γ -hydroksymasłowy (metylo-GHB), działający tak samo jak GHB.

- GVL = lakton kwasu γ -hydroksywalerianowego. Jest on nadużywany zamiast GHB, ponieważ przekształca się w GHV, który wywołuje takie same efekty jak GHB (tabela 1). GBL i BDO przekształcają się w ustroju w GHB, a ponadto GBL jest prekursorem używanym do produkcji GHB.

Opracowano również stosunkowo proste metody syntezy GBL z tetrahydrofuranu (THF) i 1,4-butandiolu (BDO) [19]. THF jest pospolitym rozpuszczalnikiem używanym w laboratoriach chemicznych, a 1,4-butandiol

jest również dostępny, gdyż nie podlega kontroli. W przeciwieństwie do objętego kontrolą GHB analogi te są legalnie dostępne jako rozpuszczalniki przemysłowe używane do produkcji poliuretanu, pestycydów, włókien sztucznych i innych produktów. Istnieje tylko zakaz ich sprzedaży do celów konsumpcyjnych. Dilerzy kupują więc te związki legalnie jako rozpuszczalniki, a rozprowadzają nielegalnie na dyskotekach, koncertach zespołów młodzieżowych, w klubach nocnych, szkołach i na kampusach uniwersyteckich. Cena wynosi ok. 10 USD za łyżeczkę do herbaty. Oczywiście rzadko wiadomo, jaki analog jest przedmiotem tych transakcji. Analogi można również zamówić przez Internet i wówczas są one przesyłane do nabywców pocztą, zwykle z ostrzeżeniem, że nie nadają się do konsumpcji, ale z etykietami informującymi w sposób zakamuflowany o rzeczywistym składzie preparatu. Np. etykieta z napisem: Warning! Accidental ingestion of [product] will produce GHB in your body (Ostrzeżenie!

uzależnienia od alkoholu i opiatów, działające nasennie itp. GBL i BDO reklamuje się jako płyny do czyszczenia zbiorników na ryby, wywabiacze plam atramentu, zmywacze lakieru do paznokci itp. po kilkadziesiąt USD za butelkę, a więc wielokrotnie więcej, niż wynosi cena produktów o takim zastosowaniu. Zainteresowani wiedzą o co chodzi i nie narzekają na wysoką cenę.

Przestępcze wykorzystywanie GHB

GHB wywołuje oszołomienie (ang. drugging) oraz amnezję i dlatego jest wykorzystywany jako środek ułatwiający dokonanie zgwałcenia (ang. drug-facilitated sexual assault, acquaintance rape drug lub date-rape drug²⁾) i kradzieży. Jest on dodawany do napoju i podawany osobie, na której planuje się dokonanie przestępstwa. Osoba, której podano taki związek, budzi się często w nieznanym miejscu, niekompletnie ubrana, z niejasną świadomością uczestniczenia

Tabela 1

Analogi GHB i produkty ich interkonwersji
GHB analogs and their interconversions

Analog	Nazwa chemiczna	Prekursor dla:	Ulega przemianie w:
GBL	Lakton kwasu γ -hydroksymasłowego	GHB	GHB
BDO	1,4-butandiol (glikol butylenowy)	GBL	GHB
GHV	Kwas γ -hydroksywalerianowy	*/	*/
GVL	Lakton kwasu γ -hydroksywalerianowego	GHV	GHV

*) GHV nie jest prekursorem i nie ulega metabolizmowi w inne narkotyki

Przypadkowe spożycie produktu spowoduje jego przemianę w GHB) informuje nabywcę, że produkt ten wywołuje efekty właściwe GHB. Wiele preparatów ma etykietę z napisem Great Household Bargain (pierwsze litery GHB), aby zwrócić uwagę osób poszukujących GHB i jego analogów [24]. Analogi są również sprzedawane nielegalnie jako środki anaboliczne, przeciwdziałające otyłości, opóźniające proces starzenia, przyspieszające wzrost, łagodzące objawy

w akcie seksualnym, ale bez możliwości przypomnienia sobie czegokolwiek. I właśnie przestępcze wykorzystywanie GHB i jego analogów w celu dokonania gwałtu stanowi obecnie największe zagrożenie. Na dyskotekach narkotyk ten jest najczęściej oferowany w postaci wodnych roztworów w plastikowych buteleczkach lub fiolkach. Haust takiego roztworu kosztuje 5–10 \$.

W USA, wg danych FBI UCP (Uniform Crime Report), w 2001 r. zareje-

strowano 90 491 przypadków zgwałceń (31,8 na 100 000 mieszkańców), jednak dość powszechne jest przekonanie, że rzeczywiste liczby są przynajmniej o 60% wyższe. W części tych przestępstw (nie wiadomo dokładnie, jak dużej) użyte były date-rape drugs, a wśród nich GHB. El-Sohly i Salamone [10] zbadali 1179 próbek moczu pobranego od ofiar zgwałceń. W 60% próbek wykryto przynajmniej jeden narkotyk (lub metabolit narkotyku). GHB wykryto u 4% badanych, benzodiazepiny w 8% próbek (flunitrazepam tylko w 0,5%). Wyniki te nie potwierdzają wprawdzie opinii, że większość zgwałceń dokonywana jest przy użyciu date-rape drugs, jednak czułość metod stosowanych w tych badaniach mogła być niewystarczająca do wykrycia narkotyków w moczu po ich jednorazowym podaniu, niektóre próbki mogły więc zawierać narkotyk lub jego metabolit, ale poniżej granicy wykrywalności stosowanej metody.

Znane są również przypadki wykorzystywania GHB do okradania kont bankowych. Oszłomionej ofierze zabiera się karty kredytowe, a ona sama zdradza numery PIN. Złodzieje oczyszczają konto z pieniędzy i zwracają karty właścicielowi, który nic nie pamięta. Skala zjawiska i stopień zagrożenia związanego z przestępczym stosowaniem GHB, jego analogów i innych środków z grupy date-rape drugs okazała się w USA na tyle poważna, że wydano specjalny akt prawny „Drug Induced Rape Prevention and Punishment Act of 1996”, który stanowi, że za podawanie w celach przestępczych środków pozostających pod kontrolą grozi kara do 20 lat więzienia [25].

W roku 1998 podczas dorocznego spotkania zorganizowanego przez Amerykańską Akademię Nauk Sądowych w San Francisco powołano komitet (Drug-Facilitated Rape Committee), który dwa lata później przekształcono w stały Komitet Towarzystwa Toksykologów Sądowych. W 2002 roku podczas dorocznego zebrania towarzystwa w Deaborn (Michigan) powołano trzy podkomitety, z których jeden zajął

się identyfikacją wszystkich substancji psychoaktywnych wykrytych w moczu ofiar zgwałceń. Na liście tej, ułożonej w kolejności alfabetycznej, znalazły się następujące związki: alprazolam, amitryptylina (nortryptylina), amobarbital, amfetamina, butalbital, karyzoprodol, cytalo-
pram, chlorfeniramina, wodzian chloralu, chlordiazepoksyd, klonazepam (7-aminoklonazepam), klonidyna, kokaina (benzoiloeogonina), kodeina, flexeril, dekstrometorfan, diazepam (nordiazepam), difenhydramina, doksepina, doksyamina, etanol, flunitrazepam (7-aminoflunitrazepam), GHB, 1,4-BDO, hydrokodon, hydromorfon, imipramina (dezipramina), ketamina, lorazepam, THC-COOH, MDMA, meproamat, metadon, metamfetamina, morfina, oksazepam, oksykodon, paroksetyna, PCP, pentobarbital, fenobarbital, fluoksetyna, skopolamina, sekobarbital, triazolam, kwas walproinowy, zolpidem i seltralina [20].

Ostatnio Negrusz i wsp. [20] z University of Illinois rozpoczęli systematyczne badania zjawiska przestępczego wykorzystywania narkotyków w celu dokonania zgwałcenia. Będą one polegały na zebraniu w pięciu regionach kraju grupy 130 osób, które padły ofiarą tego typu przestępstwa, pobranie od nich moczu, a po tygodniu – moczu i włosów i wnikliwej analizie pobranego materiału pod kątem obecności narkotyków i ich metabolitów.

Metody wykrywania GHB i jego analogów

Pojawianie się na czarnym rynku coraz to nowych narkotyków syntetycznych stawia laboratoria toksykologiczne przed nowymi wyzwaniami. Do skutecznego wypełnienia swej roli laboratoria te muszą dysponować szerokim zestawem metod analitycznych, przy czym potrzebne są zarówno bardzo czułe instrumentalne metody wykrywania tych narkotyków w moczu, osoczu i włosach, jak i proste testy pozwalające wykrywać narkotyki w napojach chłodzących i drinkach.

Opracowano wiele metod analizy GHB w płynach biologicznych i tkankach. W większości z nich w pierwszej fazie przekształca się GHB w GBL przez ogrzewanie w środowisku mocnego kwasu, a następnie przeprowadza ekstrakcję GBL benzenem, chloroformem lub chlorkiem metylenu. W innych procedurach analitycznych izolowanie GHB z materiału biologicznego odbywa się metodą ekstrakcji ciecz-ciało stałe (solid-phase extraction-SPE), zwaną także ekstrakcją sorpcyjną. Po dokonaniu chemicznej derywatyzacji składników ekstraktu otrzymane pochodne poddaje się analizie metodą chromatografii gazowej (GC) z zastosowaniem jednego z trzech detektorów: płomieniowo-jonizacyjnego (FID), wychwytu elektronów (ECD) lub najczęściej spektrometru mas (MS) [7, 9, 13].

Do analizy GHB stosowano również wysokoszczelną chromatografię cieczową (HPLC) z detektorem UV, ale pewnym ograniczeniem w tym przypadku jest niski współczynnik absorpcji GHB w nadfiolecie, co wpływa niekorzystnie na poziom detekcji tej substancji w płynach ustrojowych. Do analizy względnie czystych próbek charakteryzujących się dużym stężeniem GBL, GHB i jego soli sodowej można stosować spektrometrię w podczerwieni (FTIR). Przystawka mikroskopowa spektrofotometru umożliwia wykonanie widm odbiciowych i transmisyjnych. Jej użycie przyspiesza wykonanie analizy, gdyż nie wymaga pracochłonnego przygotowywania pastylek KBr [6, 18, 28]. Ostatnio do analizy GHB i analogów stosowano również metodę elektroforezy kapilarnej [4, 12, 22].

Wykrywanie GHB i jego analogów w napojach jest trudne. Prosty, ale z pewnością bardzo zawodny test na ich obecność ma polegać na energicznym wstrząśnięciu płynu, który – jeśli zawiera GHB lub jego analogi – staje się mętny.

Amerykańska firma Drink Safe Technologies wypuściła tekturowe podstawki wysycone odczynnikami mającymi wykrywać GHB i ketaminę (narkotyk wykorzystywany, podobnie

jak GHB, w celach przestępczych). W barach i klubach stawia się na nich szklanki z napojami i kufle z piwem. Kropla piwa lub innego napoju nanie-siona na oznaczone pole – jeśli zawiera GHB lub ketaminę – powoduje zabarwienie pola na niebiesko. Jednak wyniki testu z użyciem napojów o intensywnych barwach, jak czerwone wino czy coca-cola, są trudne do odczytania. Ponadto zmiana barwy, mająca według deklaracji producenta nastąpić po 30 sekundach, występuje często dużo później, po kilkunastu a nawet kilkudziesięciu minutach lub nie następuje wcale. Chociaż producent twierdzi, że podstawki są stale udoskonalane i będą coraz bardziej niezawodne – ten sposób wykrywania GHB trzeba uznać, przynajmniej na razie, za dość mało wiarygodny.

Szybkie testy, pozwalające wykrywać „markoty” poza laboratorium, w warunkach „półowych”, opierają się głównie na reakcjach barwnych. Jednak reakcje z klasycznymi odczynnikami wywołująymi reakcje barwne (tabela 2) są za mało czułe, aby można je wykorzystać do wykrywania GHB i jego analogów, gdy istnieje podejrzenie popełnienia przestępstwa. Dopiero w roku 2002 opublikowano dwie prace, w których przedstawiono cztery spełniające te warunki testy barwne. Zostaną one krótko opisane, ponieważ niski koszt odczynników i prostota wykonania stwarzają warunki do szerszego ich wykorzystania.

Smith i Bozenko [26] są autorami 3 testów opartych na reakcjach pospolitych barwników z GHB i GBL.

Odczynniki

- Zmodyfikowany odczynnik Schweppesa:
Roztwór A–2 g dekstrozy rozpuścić w 20 ml wody.
Roztwór B–2,4 g chlorowodorku aniliny rozpuścić w 20 ml etanolu.
Zmieszać roztwory A i B i dopełnić do 80 ml metanolem.
- Odczynnik z purpurą bromokrezolową: 0,04 g purpury bromokrezolowej rozpuścić w 100 ml

wody i doprowadzić pH do 7,0 za pomocą 0,1 N NaOH.

- Odczynnik chlorofenolowy: 0,04 g czerwieni chlorofenolowej rozpuścić w 100 ml wody i doprowadzić pH do 7,0 za pomocą 0,1 N NaOH.
- Odczynnik bromotymolowy: 0,04 g błękitu bromotymolowego rozpuścić w 100 ml wody i doprowadzić do pH 7,0 za pomocą 0,1 N NaOH.
- Odczynnik z zielenią bromokrezolową: 0,03 g zieleni bromokrezolowej rozpuścić w 100 ml mieszaniny metanolu i wody w stosunku 4:1. Doprowadzić do pH 7,0 za pomocą 0,1 N NaOH.
- Odczynnik z oranżem metylowym: 0,01 g oranżu metylowego rozpuścić w 100 ml metanolu i doprowadzić do pH 7 za pomocą 0,1 N NaOH.

wa powinna być żółta. Jeśli jest pomarańczowa, należy przygotować świeży odczynnik.

● Test 2

Zmieszać odczynnik zawierający purpurę bromokrezolową i odczynnik bromotymolowy w stosunku 1:1, a następnie do 7 objętości tej mieszaniny dodać 1 objętość zmodyfikowanego odczynnika Schweppesa. Dalsze postępowanie przebiega tak samo jak przy teście 1. Pojawienie się purpurowego zabarwienia świadczy o obecności GHB. Poprzedzająca właściwe badanie próba z wodą z kranu powinna dać zabarwienie pomarańczoworóżowe. Jeśli jest czerwone, należy przygotować świeże odczynniki.

● Test 3

Zmieszać odczynnik zawierający zielen bromokrezolową i odczynnik metylooranżowy w stosunku 1:1 i do 3 objętości otrzymanej mieszaniny

Tabela 2

Reakcje barwne GHB i jego analogów z pospolitymi odczynnikami
Colour screening tests with GHB and analogs

Odczynnik	GHB	GBL	BDO	GHV	GVL
Marqulsa	---	---	jasnobrązowa	---	---
Azotan kobaltu	fioletowa	---	---	fioletowa	---
Mandeliana	---	---	brązowa	---	---
Rodanek kobaltu	---	niebieska	---	---	jasnoniebieska

Wykonanie testów

● Test 1

Zmieszać odczynnik chlorofenolowy i zmodyfikowany odczynnik Schweppesa w stosunku 3:1

Wykonanie: 0,5 ml badanego roztworu lub małej ilości sproszkowanej substancji umieścić w próbówce, doprowadzić zawartość do pH 5–8 za pomocą 0,1 N NaOH, dodać 3 krople świeżo przygotowanego odczynnika i delikatnie zamieszać. Roztwór GHB o stężeniu 0,5 mg/ml daje barwę pomarańczową, bardziej stężony – czerwoną. W przypadku braku GHB barwa roztworu pozostaje żółta. Jako próbę kontrolną należy wykonać badanie z wodą z kranu, uzyskana bar-

dodać jedną objętość zmodyfikowanego odczynnika Schweppesa, a następnie doprowadzić mieszaninę do odczynu obojętnego lub lekko kwaśnego. Dalej postępuje się jak przy wykonywaniu testu 1. Pojawienie się zielonego zabarwienia świadczy o obecności GHB. Wstępna próba odczynnika z wodą z kranu powinna dać zabarwienie różowopomarańczowe. Jeśli dodanie wody z kranu powoduje ciemnienie roztworu należy przygotować świeże odczynniki.

Czułość tych testów wynosi 3 mg/ml.

Alston i Ng [2] opracowali i opublikowali w roku 2002 test barwny oparty na innej zasadzie. Wykorzystuje on purpurowe zabarwienie, jakie daje

GHB i GBL z hydroksylaminą i chlorkiem żelazowym (ryc. 3). Wykonanie testu trwa ok. 5 minut.

Granica wykrywalności (LOD-Limit of Detection) wynosi 0,5 mg/ml, gdy użyje się 0,3 ml badanego roztworu, a 0,1 mg/ml, gdy objętość roztworu wynosi 1 ml.

Wykonanie badania:

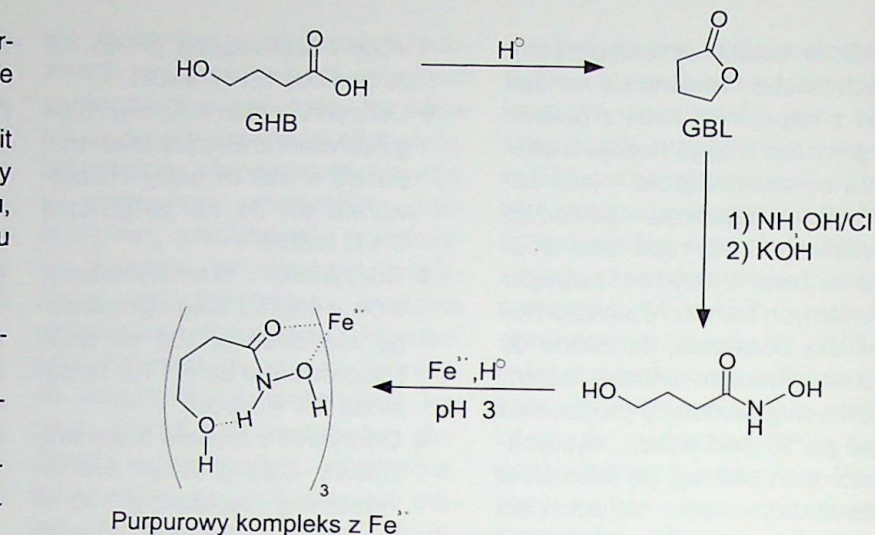
Do badanej próbki dodaje się kolejno:

- 0,5 ml stęż. H_2SO_4 (przeprowadza on GHB w GBL),
- 1 ml 0,5 M chlorowodoru hydroksylaminy (tworzy z GBL kwas hydroksamowy),
- 2 ml 12 M NaOH (pH 10),
- 0,4 ml stęż. H_2SO_4 (pH ok. 2),
- 0,2 ml 0,7 M $FeCl_3$ (tworzy się kompleks o barwie purpurowej).

Bravo i wsp. [5] opracowali i opublikowali w roku 2004 enzymatyczną metodę wykrywania GHB. Opiera się ona na sprzężeniu reakcji utleniania kwasu γ -hydroksymasłowego pod wpływem dehydrogenazy izolowanej z bakterii *Ralstonia eutropha*, z redukcją barwnika tetrazolowego MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenylo-tetrazolowy). Obecność GHB inicjuje reakcję oksydo-redukcyjną, w wyniku której pojawia się intensywne purpurowe zabarwienie. Autorzy nazwali tę metodę Dipstick Assay (ang. Dipstick = wskaźnik pomiaru oleju). Granica wykrywalności GHB wynosi 50 $\mu g/ml$. GHB może być tą metodą wykrywany zarówno w moczu i krwi, jak i w różnych napojach chłodzących i alkoholowych, gdy zachodzi podejrzenie przestępczego podania narkotyku. Ponieważ alkohol jest alternatywnym substratem dla dehydrogenazy, przed badaniem napojów alkoholowych należy go usunąć (odparować), wykorzystując znacznie większą lotność alkoholu niż GHB.

Wykonanie badania:

10 μl moczu lub napoju nakrapla się na krążek bibuły i ogrzewa przez 2 minuty w kuchenie mikrofalowej a następnie dodaje 10 μl odczynnika zawierającego dehydrogenazę i barwnik tetrazolowy. W przypadku



Ryc. 3. Powstawanie barwnego kompleksu GHB z hydroksylaminą i jonem żelazowym
Fig. 3. Ferric hydroxamate GHB colourimetric assay reaction sequence

obecności GHB pojawia się intensywna purpurowa barwa.

Obecność GHB i jego analogów w różnych napojach, do których jest dodawany w celach przestępczych, można również wykryć metodą osmotyczną [29], która sprawdziła się w laboratoriach szpitalnych

steczki są znacznie większe (c. cz. od 300–400 dm³/m³). Rozpuszczenie mola nieekstolitu w litrze wody wywołuje obniżenie temperatury zamrażania o 1,86 °C oraz wzrost ciśnienia osmotycznego do 17 000 mm słupa rtęci (22,7 atm). Osmolalność takiego roztworu wynosi 1 Osmol/kg

Tabela 3
Osmolalność 1% i 10% roztworu GHB i jego analogów (wg 29)
Estimated osmolality values of GHB and analogs

Narkotyk	Ciężar cząsteczkowy	Roztwór 1%	Roztwór 10%
GBL	86,09	116 mOsm/kg	1161 mOsm/kg
1,4-BDO	90,11	110 mOsm/kg	1110 mOsm/kg
GHB	104,11	96 mOsm/kg	961 mOsm/kg
Metylo-GHB	118,13	85 mOsm/kg	846 mOsm/kg

i kontrolujących jakość produktów żywnościowych. Wykorzystuje ona wzrost ciśnienia osmotycznego spowodowany rozpuszczeniem w wodzie różnych substancji. Ciśnienie osmotyczne jest proporcjonalne do molarnej stężenia roztworu i dodanie niskocząsteczkowych substancji (do 100 daltonów) wyraźnie zmienia jego osmolalność. Metoda ta nadaje się więc jako skryningowa technika wykrywania obecności GHB i jego analogów, natomiast nie może być wykorzystywana do badania klasycznych narkotyków, takich jak kokaina, heroina czy lizergid, których czą-

lub 1000 miliosmoli/kg (1000 mOsm/kg). Dla porównania osmolalność surowicy ludzkiej wynosi 280–296 mOsm/kg.

Wesley [29] użył do pomiarów specjalnego typu osmometru model 3D3 (Advanced Instrument Incorporation, Norwood, MA) pozwalającego dokonywać pomiarów od 0–4000 mOsm/kg (bardziej stężone roztwory trzeba rozcieńczyć). W ciągu godziny można wykonać 30 oznaczeń, a więc jedno oznaczenie trwa ok. 2 minut. Objętość próbki badanej wynosi 0,25 ml i może być ona później użyta do innych analiz.

W tabeli 3 zestawiono wartości osmolalności 1 i 10 procentowych roztworów GHB i jego analogów.

Tabela 4 zawiera wartości ciśnienia osmotycznego różnych stężeń GBL i 1,4-butandiolu w napoju o wysokiej osmolalności, a tabela 5 – o niskiej osmolalności.

przypuszczalnego stężenia GHB w badanym napoju, można więc je wykorzystywać do badania napojów lub drinków w przypadkach podejrzenia o próbę popełnienia przestępstwa.

Metoda osmometryczna pozwala wykrywać GHB i jego analogi w stę-

wiednika tych angielskich terminów. Używany przez niektórych dziennikarzy termin „pigulka gwałtu” jest chyba niezbyt fortunny, a w dodatku nieścisły, ponieważ niektóre date-rape drugs (np. GHB) są cieczami.

BIBLIOGRAFIA

1. **Adriamampandry C., wsp:** Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuro-modulator gamma-hydroxybutyrate (GHB), „FASEB J.” 2003, 17, 1691.
2. **Alston W.C., Ng K.:** Rapid colorimetric screening test for γ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine, „Forensic Sci. Intern.” 2002, 26, 114.
3. **Baselt R.C., Cravey R.H.:** Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 5th edition, Foster City, CA, Chemical Toxicology Institute, 2000, 386-388.
4. **Bishop S.C., McCord B.R., Svec F.:** Analysis of GHB and its analogs by capillary electrochromatography, „Proc. Am. Acad. Forensic Sci.” 2002, 8, 268.
5. **Bravo D.T., Harris D.O., Parsons S.M.:** Reliable, Sensitive, Rapid and Quantitative Enzyme-Based Assay for Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB), „J. Forensic Sci.” 2004, 49, 379.
6. **Catterton A.J.:** Identification of Sodium Gamma-Hydroxybutyrate (NaGHB) by Infrared Spectroscopy, Utilizing a 3 Bounce Diamond ATR Element, „Microgram” 2001, 34, 15.
7. **Couper F.J., Logan B.K.:** Determination of gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Biological Specimens by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, „J. Anal. Toxicol.” 2000, 24, 1.
8. **Couper F.J., Logan B.K.:** GHB and Driving Impairment, „J. Forensic Sci.” 2001, 46, 919.
9. **Elliott S.P.:** Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factor affecting endogenous production, „Forensic Sci. Internat.” 2003, 133, 9.
10. **ElSahly M.A., Salamone S.J.:** Prevalence of Drug Used in Cases of Alleged Sexual Assault, „J. Anal. Toxicol.” 1999, 23, 141.
11. **Garcia A.D., Lurie I.S., Hulett L., Almiro J.R.:** Quantitation of gamma-hydroxybutyric acid and gamma-butyrolactone using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography.

Tabela 4
Osmolalność różnych stężeń GBL i 1,4-BDO w napoju o wysokiej osmolalności (wg 29)

Osmotic pressure of GBL and 1,4-BDO in solution with high osmolality

Stężenie	GBL (mOsm/kg)	1,4-BDO (mOsm/kg)
10%	1856	---
5%	1378	1376
2%	1042	1036
1%	930	925
0,5%	868	867
Napój o wysokiej osmolalności	805	805

Tabela 5

Osmolalność różnych stężeń GBL i 1,4-BDO w napoju o niskiej osmolalności (wg 29).

Osmotic pressure of GBL and 1,4-BDO in solution with low osmolality

Stężenie	GBL (mOsm/kg)	1,4-BDO (mOsm/kg)
10%	1332	1358
5%	699	671
2%	299	279
1%	168	152
0,5%	100	91
Napój o niskiej osmolalności	33	33

W celach przestępczych stosuje się zwykle GHB i jego analogi w dawce 2,5 do 3 g (tj. ok. 35–40 mg na kg wagi ciała), rozpuszczonej w szklance (ok. 200 ml) napoju. W 1 ml takiego napoju znajduje się więc ok. 10 mg GHB (2 g = 2000 mg w 200 ml, to w 1 ml 10 mg). Trzy pierwsze testy pozwalają wykryć GHB w stężeniu 3 mg/ml, a test z hydroksylaminą 0,5 mg/ml, to jest, odpowiednio, ponad trzykrotnie i aż 20-krotnie niższym od

żeniu 5 mg/ml, a więc dwukrotnie niższym niż przypuszczalne stężenie narkotyku w podejrzanym napoju.

PRZYPISY

- ¹ Ki (stała inhibicji) charakteryzuje powinowactwo liganda do receptora. Im niższa wartość Ki, tym większe powinowactwo,
- ² Nie ma dotychczas satysfakcjonującego, krótkiego polskiego odpo-

graphy, „Proc. Am. Acad. Forensic Sc.” 2001, 7, 28.

12. **Garcia A.D., Catterton B.S.:** 1,4-butanediol (BD)-Forensic Profile, „Microgram Journal” 2003, 1, 44.

13. **Kalasinsky K.S., Dixon M.M., Schmunk G.A., Kish S.J.:** Brain and Hair GHB Concentrations Following Fatal Ingestion, „J. Forensic Sci.” 2001, 46, 728.

14. **LeBeau M., Miller M.L., Levine B.:** Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine, „Forensic Sci. Internat.” 2001, 119, 161.

15. **LeBeau M.A., Christensen R., Levine B., Darwin W.D., Huestis M.A.:** Intra- and interindividual variation in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate, „J. Anal. Toxicol.” 2002, 26, 340.

16. **Maitre M.:** The γ -hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and function implications, „Prog. Neurobiol.” 1997, 51, 337.

17. **Mamelak M., Scharf M.B., Woods M.:** Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings, „Sleep” 1986, 9, 285.

18. **Morris J.:** Extraction of GHB for FTIR Analysis and a New Color Test for gamma-Butyrolactone (GBL), „Microgram J.” 1999, 32, 215.

19. **Morris J. A.:** Potential for gamma-butyrolactone synthesis from tetrahydrofuran and 1,4-butanediol, „Microgram” 2000, 33, 321.

20. **Negrusz A., Gaensslen R.:** Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault, „Anal. Bioanal. Chem.” 2003, 376, 1192.

21. **Nicholson K.L., Balster R.L.:** GHB: a new and novel drug of abuse, „Drug Alcohol Depend.” 2001, 63, 1.

22. **Northrop D.M.:** GHB analysis by capillary electrophoresis, „Proc. Am. Acad. Forensic Sc.” 2001, 7, 27.

23. **Polodrugro F., Addolorato G.:** The role of gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcoholism: from animal to clinical studies, „Alcoholism” 1999, 34, 15.

24. **Selected Intelligence Brief, Information Bulletin:** GHB Analogs: GBL, BD, GHV and GVL, „Microgram” 2003, 36, 98.

25. **Smith K.M.:** Drugs used in acquaintance rape, „J. Am. Pharm. Assoc.” 1999, 39, 519.

26. **Smith P.R., Bozenko J.S.:** Presumptive Tests for GHB, „Microgram” 2002, 35, 10.

27. **Stephens B.G., Baselt R.C.:** Driving under the influence of GHB?, „J. Anal. Toxicol.” 1999, 18, 357.

28. **Szukalski B., Błachut D., Bykas M., Szczepańczyk S., Taracha E.:** Kwas gamma-hydroxymasłowy (GHB) i jego lakton (GBL)-groźne związki psychoaktywne. Metody rozdzielania i identyfikacji GC/MS i FTIR, „Alkoholizm i Narkomania” 2001, 14, 341.

29. **Wesley J.F.:** Osmolality – A Novel and Sensitive Tool for Detection of Tampering of Beverages Adulterated with Ethanol, Gamma-Butyrolactone and 1,4-butanediol, „J. Anal. Toxicol.” 2003, 27, 1.

30. **Yeatman J.T., Rees K.:** A Study of Urinary Endogenous Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) Levels, „J. Anal. Toxicol.” 2003, 27, 98.

**Biblioteka
CLK KGP
zaprenumerowała
na 2005 rok
następujące
czasopisma
zagraniczne**

Archiv für Kriminologie
Computers and Security
Fingerprint Whorld
Forensic Science International
Forensic Science Review
Foto Magazin
Guns and Ammo
International Journal of Legal Medicine
Internationales Waffen-Magazin – Visier
International Defense Review
Journal of Forensic Identification
Journal of Forensic Sciences
Kriminalistik
Masterruzhie
Science and Justice
Verkehrsunfall und Fahrzeugtechnik
Wirtschaftsschutz und Sicherheitstechnik