

KWAS γ -HYDROKSYMASŁOWY (GHB) I JEGO LAKTON (GBL) – GROŻNE ZWIĄZKI PSYCHOAKTYWNE. METODY ROZDZIAŁU I IDENTYFIKACJI GC/MS I FTIR

**Bogdan Szukalski¹, Dariusz Blachut², Marta Bykas², Sławomir Szczepańczyk²,
Ewa Taracha¹**

¹Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

²Zakład Kryminalistyki i Chemii Specjalnej Urzędu Ochrony Państwa

**γ -HYDROXYBUTYRIC ACID (GHB), AND ITS LACTONE (GBL) – DANGEROUS
PSYCHOACTIVE SUBSTANCES. METHODS OF SEPARATION AND IDENTIFICATION –
GC/MS AND FTIR.**

ABSTRACT – γ -Hydroxybutyric acid (GHB) and its lactone (GBL) are dangerous psychoactive substances, which have lately gained increased popularity on American and European illicit drug markets. The only method of separation and identification of these compounds, which is sufficiently selective and sensitive, to be applied to biological fluids, is gas chromatography followed by mass spectrometry (GC/MS). Under some circumstances, infrared spectroscopy (FTIR) may also be used. In our work, we derivatized analyzed compounds with a silylating reagent (Silyl 991), and used capillary columns (BP1.25 m x 0.22 mm x 0.225 μ m) for the chromatographic analysis. Effectiveness of the proposed procedure was checked by analyzing the mixtures of GHB and GBL in a soft drink and in urine.

Key words: γ -hydroxybutyric acid (GHB), γ -hydroxybutyrolactone (GBL), gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS), FTIR, derivatization.

WSTĘP

Niebezpieczne właściwości kwasu γ -hydroksymasłowego (GHB) oraz wzrost jego rozpowszechnienia na nielegalnym rynku narzucają konieczność opracowania szybkich i wiarygodnych metod wykrywania i oznaczania tego związku (16). Metody te powinny także umożliwiać rozdzielenie mieszaniny GHB i towarzyszącego mu często laktonu (GBL) oraz przeprowadzenie identyfikacji obu substancji.

Obecnie brak jest dostatecznie czułych, prostych i specyficznych testów barwnych umożliwiających przeprowadzenie wstępnej analizy na obecność kwasu w warunkach polowych i laboratoryjnych, a standardowe testy barwne stosowane powszechnie we wstępnej analizie substancji narkotycznych tj. testy Marquis'a i Simona nie dają charakterystycznej reakcji barwnej z GHB i jego laktonem. Niedawno zaproponowano

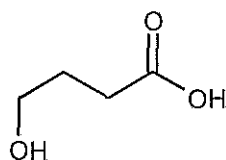
(10,15) jedynie cztery testy barwne o składzie: 5 % roztwór chlorku żelazowego, nasycony roztwór dwuchromianu potasu, roztwór azotanu kobaltu, układ toluen/tiocyanian kobaltu. Trzy pierwsze odczynniki dają reakcje barwną z GHB a czwarty z GBL, jednak duża liczba związków chemicznych (m. in. alkohole, jony chlorkowe) wywołuje podobne reakcje barwne. Ponadto czynności wstępne i wykonanie analizy są dość skomplikowane a wyniki, zwłaszcza przy niższych stężeniach oznaczanych substancji, nie w pełni miarodajne.

Lepszą selektywnością względem GHB charakteryzują się zaproponowane przez Andera i współprac. (1) testy mikrokryształiczne wykorzystujące azotan miedzi i azotan srebra. Jednak i w tym przypadku czułość analizy nie jest dostateczna.

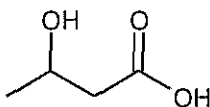
Do oznaczania kwasu GHB i laktonu stosowano różnorodne metody instrumentalne, m. in. chromatografię gazową z detekcją FID (8), ECD (4) a także sprzężoną z detektorem masowym (7,13). Dla względnie czystych próbek, charakteryzujących się dużym stężeniem GBL, GHB i jego soli sodowej stosowano spektrofotometrię w podczerwieni (FTIR) oraz węglowy (^{13}C NMR) i protonowy (^1H NMR) rezonans magnetyczny (11). Metoda ta pozwala ustalić lub potwierdzić strukturę związku, ale wymaga użycia czystych substancji. Do analizy GHB stosowano również HPLC z detekcją UV oraz MS (14). Poważnym ograniczeniem w tym przypadku jest niski współczynnik absorpcji GHB w nadfiolecie, co wpływa niekorzystnie na poziom detekcji tej substancji w płynach ustrojowych.

Ogólnie można powiedzieć, że przy analizie GHB i GBL stosuje się zwykle dwa schematy postępowania. Pierwszy polega na ilościowym przekształceniu kwasu GHB w GBL w środowisku kwaśnym, wykonaniu ekstrakcji ciecz-ciecz i oznaczeniu GBL za pomocą odpowiedniej techniki instrumentalnej (17). Druga opiera się na izolacji GHB, który w postaci pochodnej disililowej oznacza się metodą GC-FID lub GC-MS (5). Stosując technikę SIM z monitorowaniem jonów m/e 233, 234 i 235 oraz standard wewnętrzny, deuterowany kwas GHB (γ -GHB- d_6), oznaczano stężenie GHB w moczu w zakresie od 5 do 6100 $\mu\text{g/ml}$. Opublikowano również metody wykorzystujące w przygotowaniu próbki technikę SPE (Solid Phase Extraction) (9) oraz SPME (Solid Phase Microextraction). Metoda SPME-GC/MS umożliwiła analizę GHB w moczu przy stężeniu rzędu nanogramów na mililitr ($\text{LOQ}=200$ ng/ml) (2). Alternatywą dla technik ekstrakcyjnych jest technika head-space, która w połączeniu z analizą GC-FID i GC-MS pozwoliła na oznaczenie GHB w moczu i krwi w zakresie stężeń od 1 do 1000 $\mu\text{g/ml}$ (8).

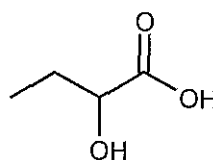
W niniejszej pracy przedstawiono metodykę rozdziału i identyfikacji γ -butyrolaktonu, kwasu γ -hydroksymasłowego (GHB) oraz jego α - i β - hydroksyregioizomerów t.j. kwasu α -hydroksymasłowego i β -hydroksymasłowego.



kwas γ -hydroksymasłowy



kwas β -hydroksymasłowy



kwas α -hydroksymasłowy

Ryc. 1. Wzory strukturalne regioizomerów kwasu hydroksymasłowego.

Zastosowano chromatografię gazową z detekcją FID (Flame Ionization Detektor) i detekcją MS. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano ogólny schemat postępowania z próbką materiału ciekłego lub stałego mogącego zawierać GBL oraz GHB, zarówno w postaci wolnej, jak i soli sodowej. Opracowaną metodykę testowano na próbkach symulujących materiał z dystrybucji nielegalnej. Przedstawiono również wynik jakościowej analizy moczu zawierającego kwas γ -hydroksymasłowy w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$.

MATERIAŁ I METODY

Wzorce i odczynniki

Wzorce soli sodowych kwasu α -hydroksymasłowego (AHB) i β -hydroksymasłowego (BHB) pochodziły z firmy Aldrich. γ -butyrolakton pochodził z firmy Sigma Chemicals. Analityczną próbkę soli sodowej kwasu γ -hydroksymasłowego otrzymano w reakcji hydrolizy zasadowej laktonu tego kwasu i oczyszczano ją przez dwukrotną krystalizację z bezwodnego etanolu. Strukturę otrzymanego związku potwierdzono metodą spektrometrii mas (MS) oraz spektrofotometrii w podczerwieni (FTIR).

Odczynnik do derywatyzacji, Silyl 991 (BSA/TMCS), zakupiono w firmie Machery-Nagel, Germany. Pozostałe związki chemiczne pochodziły z firm Sigma Chemicals oraz Fluka i używane były bez dodatkowego oczyszczania.

Przygotowanie próbek do analizy

Roztwór GHB w popularnym napoju orzeźwiającym otrzymano rozpuszczając 300 mg soli sodowej GHB w 10 ml napoju.

Mocz zawierający GHB w stęż. 50 $\mu\text{g/ml}$ otrzymano rozpuszczając odpowiednią ilość soli sodowej kwasu GHB w moczu zdrowej osoby.

Derywatyzacja odczynnikiem silanującym Silyl 991: do naważek po 0,5 mg soli sodowej kwasu α -, β - i γ -hydroksymasłowego dodano 0,5 ml suchej pirydyny i 0,5 ml odczynnika Silyl 991, a następnie ogrzewano w temperaturze 80°C przez 30 min. Otrzymany roztwór, po ochłodzeniu, używano do analizy GC-FID i GC-MS.

Próbkę moczu (2 ml) zakwaszono do pH 4, ekstrahowano układem octan etylu-izopropanol 5:1. Po odwirowaniu, ekstrakt organiczny ostrożnie odparowano w temp. pokojowej w strumieniu azotu do objętości kilkunastu mikrolitrów. Pozostałość poddano derywatyzacji i analizowano metodą GC-MS.

Aparatura

Pomiary widm IR przeprowadzono na spektrometrze podczerwieni z transformacją Fouriera firmy BRUKER (Niemcy), model IFS 113v z przystawką mikroskopową. Substancję wzorcową lub próbkę badaną nakładano na kryształ KRS-5 (transmisja) i mierzono widmo w podczerwieni w zakresie 4000 – 600 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} . W celu dobrego uśrednienia szumów zbierano 64 skany.

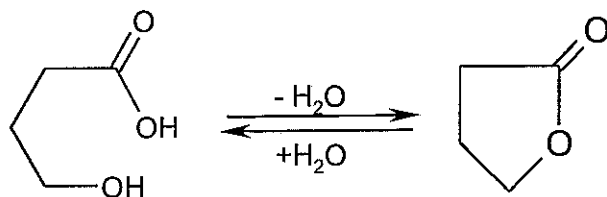
Próbkę ciekłą po naniesieniu na KRS-5 odparowywano w strumieniu gazu obojętnego w temperaturze pokojowej. Suchą pozostałość, bezpośrednio na kryształach zadawano acetonem w celu wyodrębnienia poszczególnych substancji. Próbkę stałą po analizie FTIR używano po derywatyzacji do badań GC-MS i GC-FID.

Rozdział pochodnych mieszaniny regioizomerów kwasu hydroksymasłowego oraz analizę ekstraktu moczu wykonano na chromatografii gazowej HP 6890 sprzężonej z detektorem masowym HP 5973. Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C. Gazem nośnym był hel, objętość przepływu wynosiła 0,6 ml/min. Rejestrację całkowitego prądu jonowego prowadzono w zakresie mas od 40 do 400 amu. Analizę w opcji SIM (ekstrakt moczu) prowadzono monitorując jony 117, 147 i 233. Temperaturę pieca programowano następująco: początkową temperaturę, 50°C utrzymywano przez 1 minutę, następnie podwyższano o 10°C/min do temperatury 290°C, którą utrzymywano przez 3 minuty. Analizę wzorców prowadzono w opcji nastrzyku split 1:20, a ekstraktu moczu – w opcji nastrzyku splitless. Objętość nastrzyku $V=0,4 \mu\text{l}$. Rozdział wykonywano na kolumnie kapilarnej BP-1, 25 m x 0,22 mm x 0,25 μm . Analizę próbki napoju orzeźwiającego wykonano na chromatografii gazowej HP 5890 seria II, wyposażonym w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C, a detektora 280°C. Używano kolumny kapilarnej OV-1, 25 m 0,32 mm x 0,5 μm . Opcja nastrzyku: split 1:10, objętość nastrzyku $V=0,5 \mu\text{l}$. Program temperaturowy zastosowano identyczny, jak w przypadku analizy GC-MS.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Metoda produkcji kwasu γ -hydroksymasłowego polega na reakcji hydrolizy laktonu tego kwasu (γ -butyrolaktonu) w środowisku zasadowym. Pochodzący z nielegalnego źródła, źle oczyszczony produkt końcowy może zawierać nieprzereagowany lakton i nadmiar zasady lub kwasu służącego do zobojętniania. Należy podkreślić, że w skrajnych przypadkach, gdy odczyn roztworu będzie znacząco różnił się od pH 7, spożycie produktu może prowadzić do poparzenia jamy ustnej, przełyku oraz uszkodzeń śluzówki żołądka.

Kwasy karboksylowe wykazują dużą tendencję do adsorpcji nieodwracalnej na kolumnie chromatograficznej, a także ulegają często dekarboksylacji w temperaturze panującej w komorze nastrzykowej. W przypadku GHB wysoka temperatura powoduje, że ulega on częściowo wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji przechodząc w γ -butyrolakton.

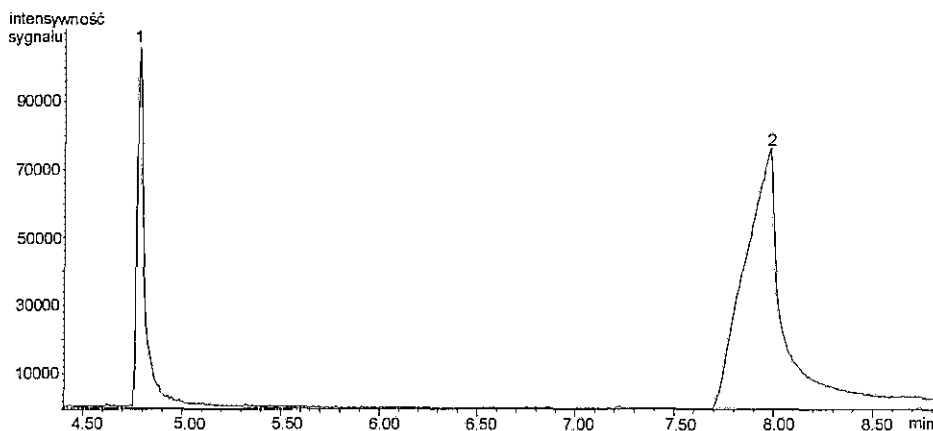


Ryc. 2. Reakcja wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji kwasu γ -hydroksymasłowego do jego laktonu.

Ponieważ nielegalnie produkowany GHB, obok szeregu innych zanieczyszczeń, zawiera często nieprzereagowany lakton, nie można stwierdzić, czy jego obecność

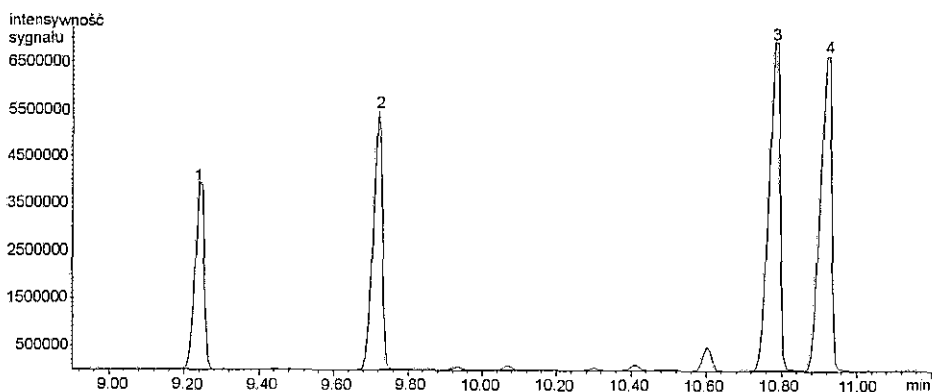
wynika z nieprawidłowo prowadzonej syntezy, czy też jest wynikiem tworzenia się tego związku podczas analizy metodą chromatografii gazowej.

Aby ustalić, czy podczas zaproponowanych warunków analizy GHB tworzy się GBL, wykonano ekstrakcję wolnego kwasu GHB z zakwaszonego roztworu wodnego do rozpuszczalnika aprotowego i ekstrakt poddano badaniu metodą GC-MS.



Ryc. 3. Chromatogram GC-MS ekstraktu kwaśnego wodnego roztworu soli sodowej GHB. Oznaczenia: (1) GBL; (2) GHB.

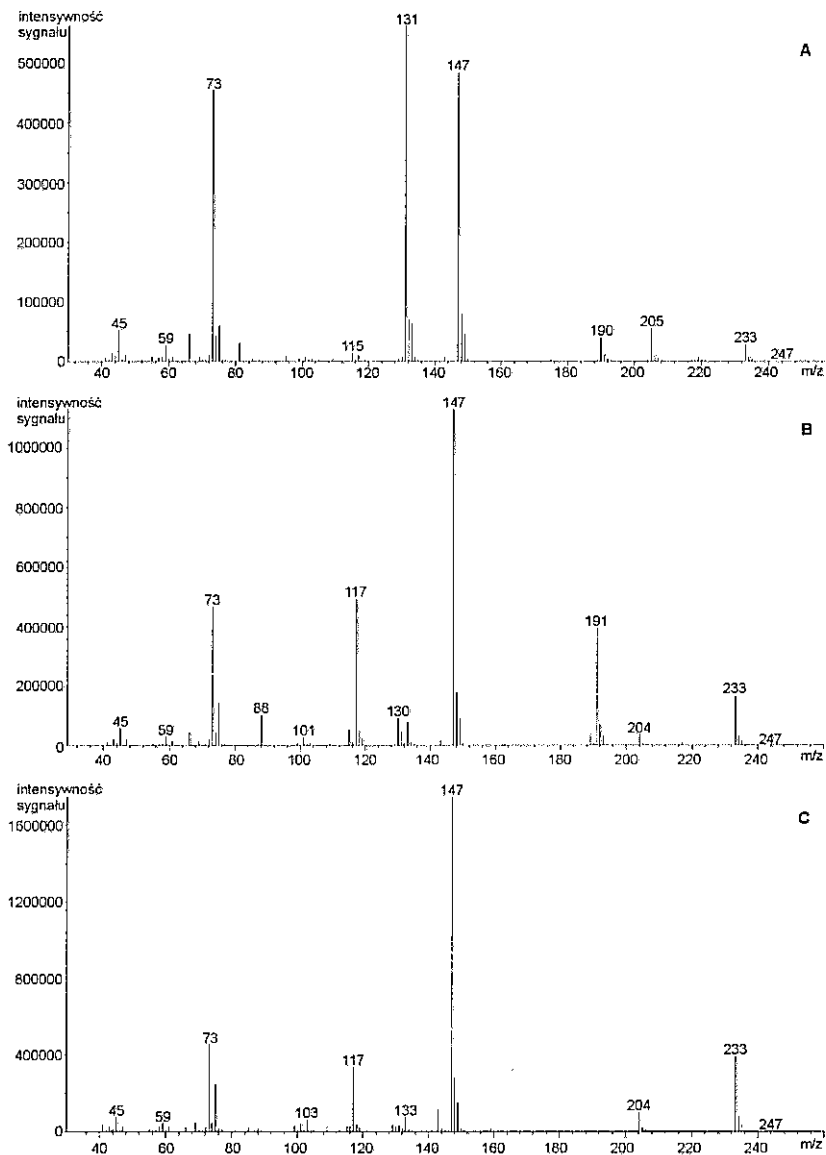
W ekstrakcie stwierdzono obecność GHB ($t_r=8,0$ min) oraz GBL ($t_r=4,8$ min). Obecność laktonu wskazuje, że powstaje on w trakcie analizy chromatograficznej lub na etapie ekstrakcji. Kwaśny odczyn środowiska sprzyja procesowi wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji GHB do laktonu. Kształt piksu GHB świadczy, że ulega on silnej adsorpcji na kolumnie kapilarnej. Podczas prowadzonej w identycznych warunkach ekstrakcji GBL z fazy wodnej nie rejestruje się obecności GHB.



Ryc. 4. Chromatogram GC-MS mieszaniny disililowych pochodnych regioizomerów kwasu hydroksymasłowego. Oznaczenia: (1) kwas α -hydroksymasłowy (AHB), (2) kwas β -hydroksymasłowy (BHB), (3) kwas γ -hydroksymasłowy (GHB).

Na ryc.4 przedstawiono wynik analizy GC-MS pochodnych disillilowych kwasu α -, β - i γ -hydroksymasłowego (AHB, BHB i GHB).

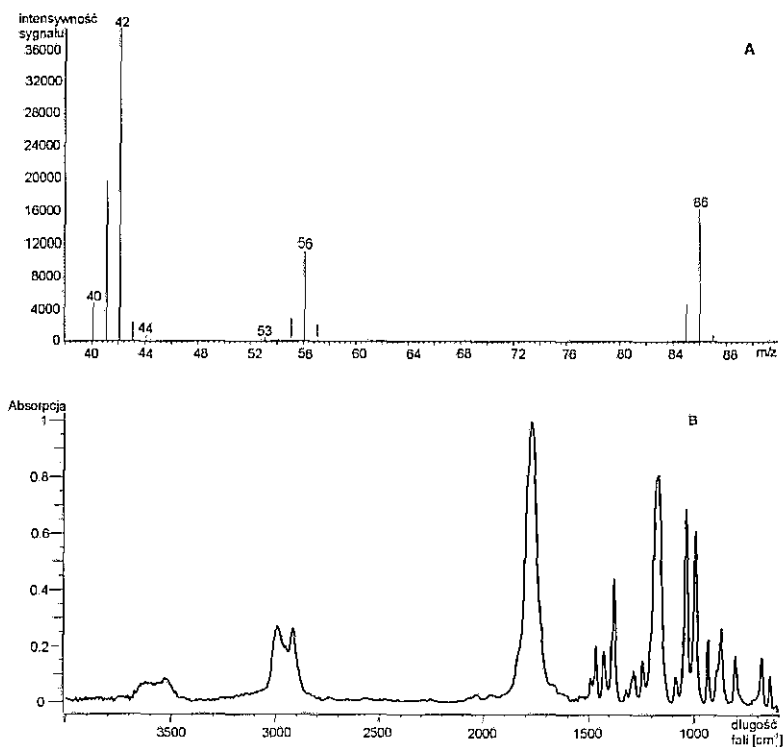
Reakcja derywatywacji hydroksykwasów układem reagentów BSA/TMCS (1 %) w pirydynie zachodzi ilościowo w ciągu 20 min, a otrzymane pochodne posiadają bardzo dobre właściwości chromatograficzne. Są one stabilne przez około 24 godzin i w zastosowanych warunkach chromatograficznych ulegają pełnemu rozdzielaniu.



Ryc. 5. Widma masowe (EI=70 eV) disillilowych izomerów kwasu hydroksymasłowego. Oznaczenia: (A) AHB, (B) BHB, (C) GHB. <

Na ryc.5 przedstawiono widma MS pochodnych trzech hydroksykwasów. Charakteryzują się one obecnością niewielkiego pików molekularnego m/e 248. Widmo GHB odróżnia się od widma BHB brakiem pików o wartości m/e 191. Pochodna kwasu α -hydroksymasłowego charakteryzuje się, w odróżnieniu od GHB i BHB intensywnym pikiem o wartości m/e 131 (tzw. base peak). Wyraźne różnice w widmach masowych, a ponadto różne wartości czasu retencji podczas analizy chromatograficznej, umożliwiają jednoznaczną identyfikację trzech regioizomerów kwasu hydroksymasłowego.

Widmo masowe laktonu kwasu γ -hydroksymasłowego charakteryzuje się obecnością pików o innych wartościach m/e , co pozwala na jednoznaczne odróżnienie go od pochodnych kwasowych.

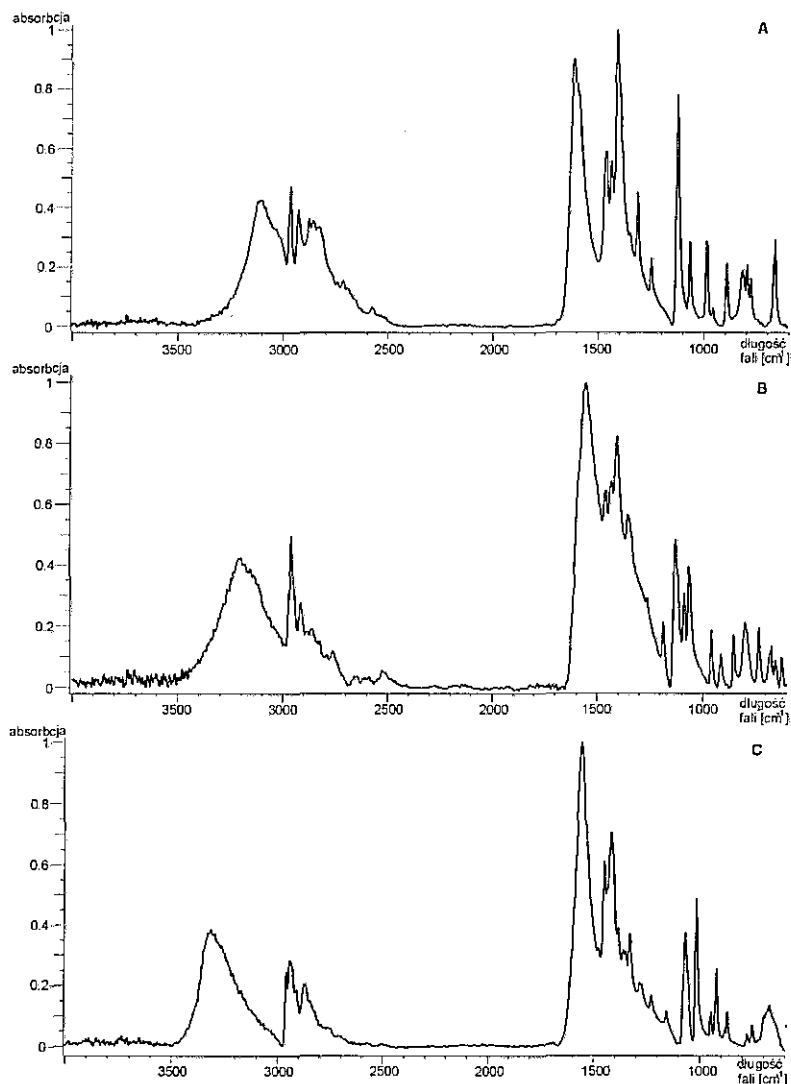


Ryc. 6. Widma MS (A) i IR (B) laktonu kwasu γ -hydroksymasłowego.

Regioizomery α i β można zaproponować jako wzorce wewnętrzne w oznaczaniu ilościowym metodą GC lub HPLC próbek GHB pochodzących z nielegalnego rynku. Natomiast przy analizie GHB w próbkach krwi i moczu nie można użyć jako wzorca wewnętrznego kwasu β -hydroksymasłowego, gdyż powstaje on *in vivo*, a jego stężenie jest u osób dotkniętych cukrzycą (12) oraz nadużywających alkoholu znacznie podwyższone (6). Może być natomiast użyty do tego celu AHB, który może zastąpić bardzo drogą pochodną deuterową (γ -GHB- d_6).

Przystawka mikroskopowa spektrofotometru w podczerwieni umożliwia wykonanie widm odbiciowych i transmisyjnych. Jej użycie znacznie przyspiesza i ułatwia

wykonanie analizy, gdyż nie wymaga pracochłonnego przygotowywania pastylek KBr. Oznaczaną substancję mierzy się bezpośrednio na lusterku (odbicie) lub na kryształach KRS-5 (transmisja). Ponieważ mikroskop umożliwia obserwację wizualną z powiększeniem 150-krotnym, możliwe jest wybranie optymalnego miejsca próbki do uzyskania widma. Pozwala to na pracę z próbkami stanowiącymi mieszaniny. Analiza FTIR na lusterku lub kryształach KRS-5 nie powoduje destrukcji próbki, którą można użyć do dalszych badań, np. metodą GC-MS, TLC lub NMR.



Ryc. 7. Widma w podczerwieni (IR) soli sodowych regioizomerów kwasu hydromasłowego. Oznaczenia: (A) AHB-Na, (B) BHB-Na, (C) GHB-Na.

Ryc. 7 przedstawia widma IR soli sodowych kwasów α -, β - i γ -hydroksymasłowych. W widmie soli sodowej GHB widoczne jest przy 1557 cm^{-1} silne asymetryczne drganie jonu karboksylowego CO^{-2} . Pasma położone przy 1451 cm^{-1} pochodzi od nożycowych drgań grup metylenowych sąsiadujących z jonem karboksylowym, a pasmo położone przy 1419 cm^{-1} może być przypisane do nakładających się zginających drgań O-H i drgań rozciągających anionu karboksylowego. Pasma położone przy 1016 cm^{-1} można przypisać do rozciągających drgań C-O alkoholi pierwszorzędowych. W zakresie od ok. 2960 do ok. 2800 cm^{-1} obserwuje się pasma pochodzące od drgań rozciągających C-H, natomiast pasmo przy 3317 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających O-H (11).

Wykonując serię pomiarową dla soli sodowych kwasów AHB, BHB i GHB obserwowano zmianę położenia drgania rozciągającego O-H w kierunku mniejszych częstotliwości. Taki efekt może być spowodowany powstawaniem wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego. Obserwowane przesunięcie asymetrycznego drgania CO^{-2} z położenia 1557 cm^{-1} (sól sodowa kwasu GHB) do położenia 1609 cm^{-1} dla analogicznej soli kwasu AHB może być spowodowane obecnością elektroujemnego atomu tlenu bezpośrednio w sąsiedztwie grupy CO^{-2} .

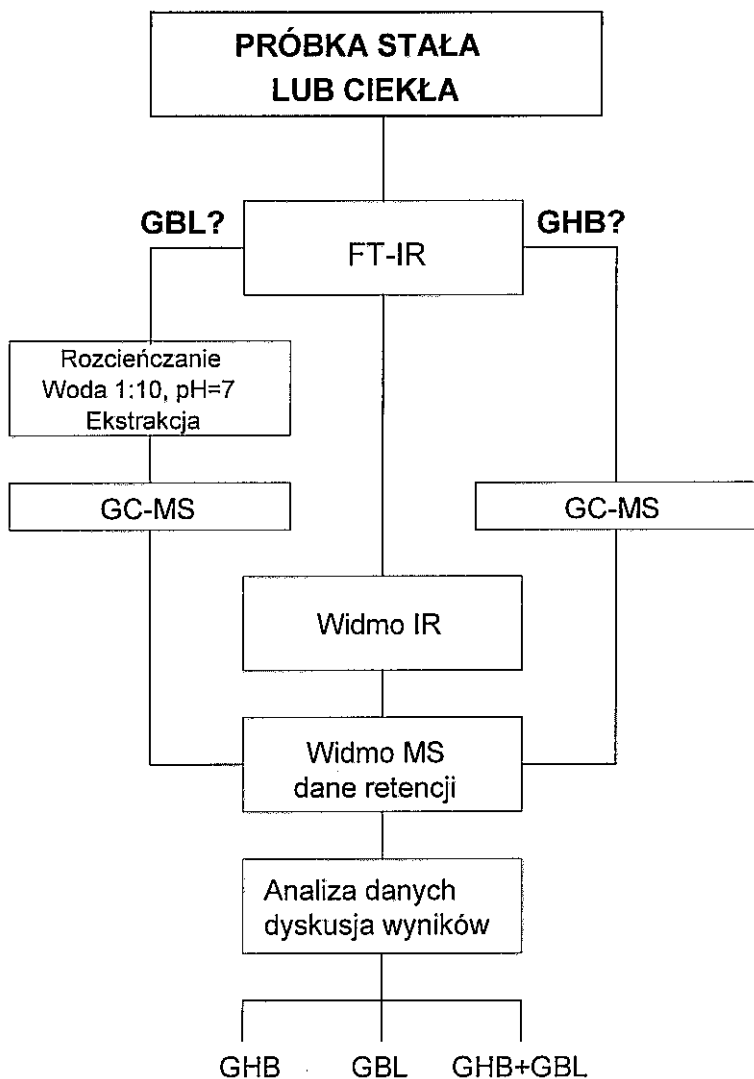
W widmie GBL uzyskany w tych samych warunkach obserwuje się położone przy 1772 cm^{-1} silne pasmo drgań rozciągających grupy karbonylowej i pasmo drgań grupy C-O położone przy 1169 cm^{-1} (ryc.6).

GHB występuje na rynku narkotykowym jako sól sodowa w postaci czystej lub zawierającej różnorodnie domieszki. Należy się liczyć z możliwością napotkania preparatów w innej formie, np. roztworów soli sodowej w wodzie lub napojach chłodzących. Uproszczone procedury syntezy stosowane w nielegalnych laboratoriach prowadzą do otrzymania roztworów soli sodowej GHB, której nie wydziela się do postaci stałej. Otrzymane w ten sposób preparaty mogą zawierać, oprócz docelowego produktu, także różne ilości jego prekursora – GBL.

Metodyka analizy obejmująca procedurę przygotowania próbki oraz stosowane metody instrumentalne – FTIR, GC-MS oraz GC-FID powinny uwzględniać wszystkie przedstawione wyżej czynniki.

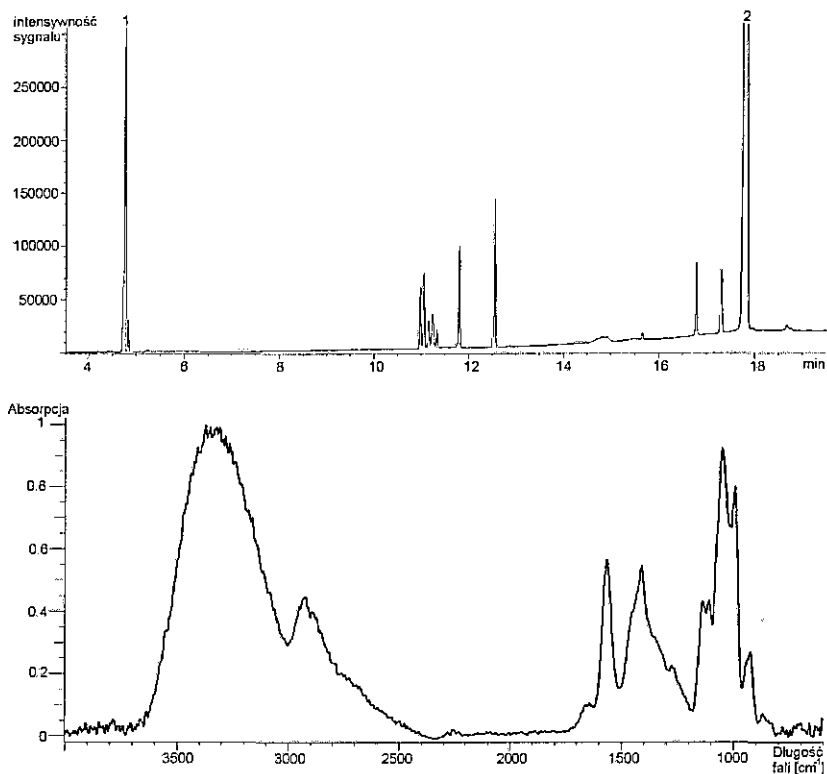
Po wykonaniu serii analiz modelowych próbek zawierających różne stężenia soli sodowej GHB oraz jego laktonu w różnorodnych matrycach ciekłych i stałych zaproponowano ogólny schemat postępowania (ryc. 8).

Próbka stała lub cieka poddawana jest wstępnej analizie metodą FTIR, która wskazuje na obecność GHB–Na, GBL lub obu składników razem. Na tym etapie analizy otrzymuje się również informację dotyczącą ewentualnej obecności innych substancji i środków o właściwościach psychotropowych lub odurzających. Stałą pozostałość po analizie FTIR (dla próbek ciekłych) lub próbkę pierwotną (jeśli była w postaci stałej) poddaje się derywatywacji odczynnikami silanizującymi i badaniu metodą GC-MS lub GC-FID, które potwierdza lub wyklucza obecność GHB. W celu potwierdzenia obecności GBL w próbce ciekłej, rozcieńcza się ją wodą w stosunku 1:10, a następnie ekstrahuje rozpuszczalnikiem aprotynowym (np. chloroform, octan etylu) i analizuje ekstrakt metodą GC-MS lub GC-FID.



Ryc. 8. Schemat postępowania analitycznego.

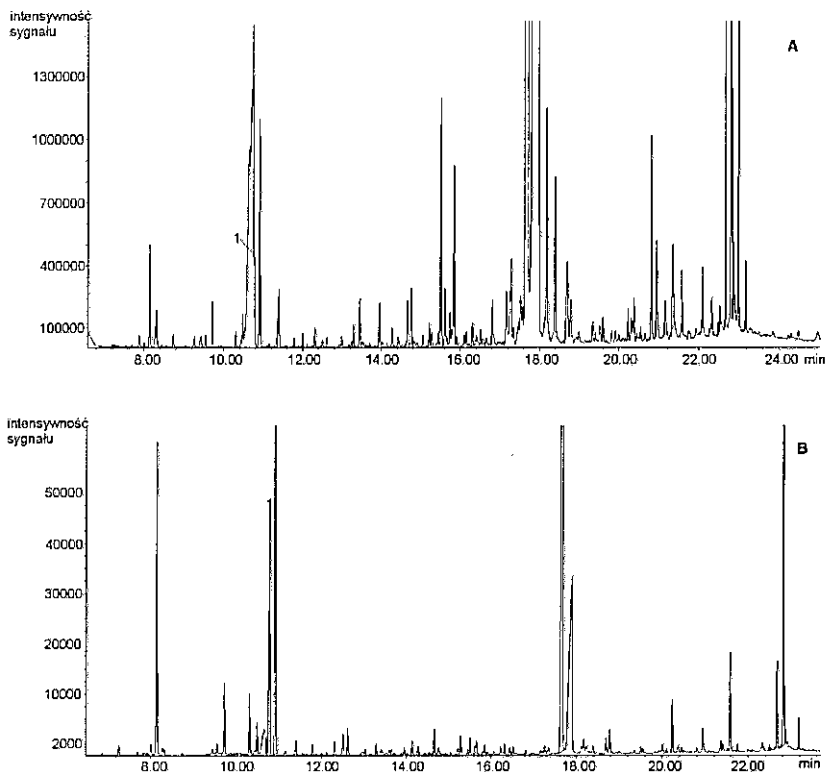
Na ryc. 9 przedstawiono wyniki analizy próbki popularnego napoju orzeźwiającego zawierającego GHB-Na w ilości 30 mg/ml. Widmo IR (B) zawiera bardzo dobrze wykształcone pasma soli kwasu GHB na tle sygnałów matrycy składającej się z sacharozy i substancji smakowych. Obecność GHB potwierdzono również metodą GC-FID (A).



Ryc. 9. Wyniki analizy GC-FID (A) i FTIR (B) popularnego napoju chłodzącego, zawierającego GHB-Na w stężeniu 30 mg/ml. Oznaczenia na chromatogramie: (1) pochodna disililowa GHB, (2) pochodna sililowa sacharozy.

Na ryc. 10 przedstawiono wynik analizy moczu zawierającego kwas γ -hydroksymasłowy w stężeniu ok. 50 $\mu\text{g/ml}$. Mocz po zakwaszeniu do pH 4 poddano ekstrakcji typu cieczech-ciecz, a ekstrakt po odparowaniu i derywatywacji analizowano metodą GC-MS. Rejestrując chromatogram zastosowano technikę monitorowania całkowitego prądu jonowego (TIC) oraz technikę SIM.

W pierwszym przypadku (A) interpretacja jest utrudniona ze względu na bardzo liczne piki matrycy moczu, w skład której wchodzi m. in. pochodne kwasów karboksylowych. Zgodnie z oczekiwaniem, technika SIM (B) umożliwiła częściowe „odrzucenie” tła, lepszą separację piku disililowej pochodnej GHB od sygnałów matrycy i uzyskanie znacznie lepszego stosunku sygnał/szum dla piku kwasu.



Ryc. 10. Wynik analizy moczu zawierającego GHB w stęż. ok. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Oznaczenia: (A) chromatogram całkowitego prądu jonowego (TIC), (B) chromatogram SIM, 1 – pik GHB.

STRESZCZENIE

Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) i jego lakton (GBL) są groźnymi substancjami psychoaktywnymi, które w ostatnich latach zyskują wzrastającą popularność na amerykańskim i europejskim rynku narkotykowym. Jedyną wystarczająco czułą i selektywną metodą rozdzielania i identyfikacji tych narkotyków w materiale biologicznym jest chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią masową (GC/MS), a w pewnych warunkach również spektrometria w podczerwieni (FTIR). W naszej pracy zastosowano te metody derywatyzując badane związki w pierwszym etapie analizy chromatograficznej za pomocą odczynnika silylującego (Silyl 991) oraz używając kolumny kapilarne BPI, 25 m \times 0,22 mm \times 0,225 μm . Efektywność proponowanego postępowania sprawdzono poddając analizie mieszaninę GHB i GBL w napoju orzeźwiająjącym i w moczu.

Słowa kluczowe: kwas γ -hydroksymasłowy (GHB), γ -hydroksybutyrolakton (GBL), chromatografia gazowa (GC), spektrometria masowa (MS), FTIR, derywatywacja.

PIŚMIENNICTWO

1. Andera K. M.: *Microchemical Identification of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB)*. J. Forensic Sci., 45, 665-668, (2000).
2. Blair S. M., Song M., Brodbelt J. S.: *Detection of gammahydroxybutyrate using SPME-GC/MS (Poster Th PH245)*. The 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, 13-17 June, (1999).
3. Catterton A. J.: *Identification of Sodium Gamma-Hydroxybutyrate (NaGHB) by Infrared Spectroscopy*. Utilizing a 3 Bounce Diamond ATR Element, 34, 15-20, (2001).
4. 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*. Anal. Biochem., 69, 268-277, (1975).
5. Ehrhaerd D., Vayer Ph., Maître M.: *A rapid and sensitive method for the determination of γ -hydroxybutyric acid in rat brain tissue by gas chromatography/mass spectrometry with negative detection*. Biomed. Environ. Mass Spectrom., 15, 521-524, (1988).
6. Fulop M., Bock M., Ben Ezra J., Antony M., Danzing J., Gage J. S.: *Plasma lactate and 3-hydroxybutyrate levels in patients with acute ethanol intoxication*. Am. J. Med., 80, 191-194, (1986).
7. Giorgetti R., Gessa G. L., Palatini P.: *Therapeutic gamma-hydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry*. J. Pharm. Biomed. Anal., 11, 483-487, (1993).
8. Johansen S., Felby S.: *Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) by head-space-GC/MS (FID) in forensic samples*. Z Zagadnień Nauk Sądowych, XLIII, 126-130, (2000).
9. Kitchen C. J., August T.: *Product application: a solid phase extraction method for the determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine without conversion to gamma-butyrolactone (GBL)*. United Chemicals Technologies. Inc., Bristol, PA, 1999.
10. Koppenhaver D. J.: *GHB color test*. Microgram, 30, 130-135, (1997).
11. Krawczeniuk A.: *The occurrence of gamma hydroxybutyric acid (GHB) in a steroid seizure*. Microgram, 26, 160-166, (1993).
12. MacGillivray M. H., Li P. K., Lee J. T., Mills B. J., Vorhess M. L., Putnam T. I., Schaefer P. A.: *Elevated plasma beta-hydroxybutyrate concentrations without ketonuria in healthy insulin-dependent diabetic patients*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 54, 665-668, (1982).
13. Mc Cusker R. R., Paget W. H., Chronister C. W., Goldberger B. A., El Sohly M. A.: *Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry*. J. Anal. Toxicol., 23, 301-305, (1999).
14. Mesmer M. Z., Satzger R. D.: *Determination of gammahydroxybutyrate (GHB) and gammabutyrolactone by HPLC/UV-VIS spectrometry and HPLC/thermospray mass spectrometry*. J. Forensic Sci., 43, 489-492, (1998).

15. Morris A.: *Extraction of GHB for FTIR Analysis and a new color test for gamma-butyrolactone (GBL)*. Microgram, 32, 215-221, (1999).
16. Szukalski B., Błachut D., Bykas M., Szczepańczyk S., Taracha E.: *Kwas γ -hydroksymasłowy (GHB) i jego lakton (GBL) – groźne związki psychoaktywne. I. Własności i metabolizm*. Alkoholizm i Narkomania – w druku.
17. Vree T. B., van der Klein E., Knop H. J.: *Rapid determination of 4-hydroxybutyric acid (Gamma OH) and 2-propyl pentanonate (Depakine) in human plasma by means of gas-liquid chromatography*. J. Chromatogr., 121, 150-152, (1976).