



# Semikwantitatieve analyse van GHB met GC-FID bij gelijktijdige analyse van alcoholen in serum

H.P. de Jong\* en J.P. Yska

Klinisch Farmaceutisch Laboratorium  
Medisch Centrum Leeuwarden  
Postbus 888, 8901 BR Leeuwarden

\* correspondentie

## Samenvatting

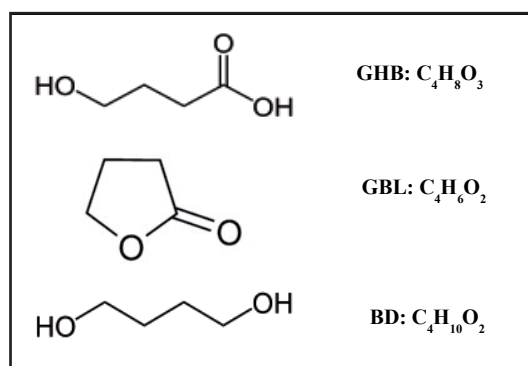
Gamma-hydroxyboterzuur (GHB) is een lichaamseigen stof die tevens wordt gebruikt als partydrug. Klinische effecten van GHB en zijn chemische voorlopers GBL en BL zijn onder andere euforie, ontremming, ademhalingsdepressie en coma. Het klinische beeld van een GHB-intoxicatie lijkt daarbij op een alcoholintoxicatie. Met de bestaande GC-FID methode voor alcoholen en glycolen is een methode ontwikkeld, waarbij naast de kwantitatieve analyse van ethanol, semikwantitatief GHB bepaald kan worden. Dit kan een belangrijk hulpmiddel zijn bij het stellen van een diagnose bij comateuze patiënten.

## Sleutelwoorden

GHB, alcohol, toxicologie, analyse, GC-FID

## Inleiding

Gamma-hydroxyboterzuur (GHB) is een lichaamseigen stof die in het verleden werd gebruikt als narcosemiddel. Tegenwoordig staat GHB bekend als partydrug en date rape drug. De belangrijkste risicofactor van het gebruik van GHB is de relatief smalle therapeutische breedte. In lage doseringen geeft GHB euforie, ontremming en het heeft een seksueel stimulerende werking.



Figuur 1 Structuurformules van gamma-hydroxyboterzuur (GHB), gamma-butyrolacton (GBL) en 1,4-butaandiol (BD)

Hogere doseringen kunnen al snel leiden tot bewusteloosheid en ademhalingsdepressie [1,2].

Als alternatief voor GHB worden ook gamma-butyrolacton (GBL) en 1,4-butaandiol (BD) gebruikt (zie figuur 1 voor structuurformules).

GBL en BD zijn industriële oplos- en verdunningsmiddelen die eenvoudig verkrijgbaar zijn via het internet.

In het lichaam worden GBL en BD in de lever snel gemetaboliseerd tot GHB [1]. GBL wordt tevens gebruikt als grondstof voor het produceren van GHB. Omdat GHB vaak zelf wordt gemaakt, is de ingenomen dosis meestal onduidelijk, omdat de exacte concentratie van de oplossing niet bekend is. Daarnaast kan de GHB van wisselende kwaliteit zijn en worden vermengd in drankjes. Dit kan resulteren in ernstige en potentieel dodelijke GHB vergiftigingen [2,3].

Op de spoedeisende hulp (SEH) worden regelmatig patiënten binnengebracht met verschijnselen die mogelijk kunnen wijzen op een GHB-intoxicatie.

Het probleem hierbij is dat het klinische beeld van een GHB-intoxicatie lijkt op een alcohol-intoxicatie [4]. Indien alcohol en GHB gelijktijdig worden ingenomen, wordt eerst de alcohol in de lever omgezet door alcoholdehydrogenase; dit leidt tot stapeling van GHB en toename van de toxiciteit [2].

In de praktijk kan er bij een intoxicatie op twee manieren worden gehandeld [5].

**1.** Afhankelijk van een mogelijke verdenking van overmatig alcoholgebruik kan de behandelend arts besluiten om eerst een ethanol spiegel aan te vragen. Alleen als de anamnese op alcohol gebruik negatief is en er na 6 uur observatie nog geen klinische verbetering optreedt, kan de arts alsnog besluiten om een GHB spiegel te laten bepalen.

**2.** Ondanks de discussie over het al of niet zinvol zijn van het bepalen van een GHB-spiegel, kan de behandelend arts besluiten direct GHB te laten bepalen, zonder daarnaast een ethanol spiegel aan te vragen. De reden voor de aanvraag is dan dat de arts wil weten of het klinisch beeld kan worden verklaard door een GHB intoxicatie.

In het Medisch Centrum Leeuwarden (MCL) is in de afgelopen jaren meerdere keren, bij de analyse van ethanol, bij toeval een GHB intoxicatie aangetoond. Nadere kwantificering met een kwantitatieve GHB analysemethode [6] moest dan nog uitsluitel geven. Helaas is dit een meer

bewerkelijke methode en de daarvoor benodigde extra tijd is voor de aanvrager niet wenselijk. Daarom is de mogelijkheid onderzocht of het GHB gehalte gelijktijdig met ethanol bepaald kan worden.

In de literatuur is reeds een soortgelijke kwalitatieve methode beschreven [1]. Hierin staat vermeld dat door de omzetting van GHB naar GBL in aanwezigheid van warmte er geen directe analyse met GC mogelijk is. Kwantitatieve analyse lijkt dus problemen te geven, maar semikwantitatief kan er mogelijk wel een goede indicatie van het GHB gehalte worden gegeven.

## Doel

Het opstellen van een eenvoudige, snelle semikwantitatieve analysemethode voor de bepaling van GHB in serum van comateuze patiënten, door gebruik te maken van de GC-FID methode voor de analyse van alcoholen en glycolen.

## Methode ontwikkeling

Voor de analyse is gebruik gemaakt van een bestaande GC methode voor de analyse van alcoholen en glycolen. Voor het (semi)kwantificeren van GHB is een ijklijn gemaakt en er zijn oude en nieuwe patiëntenmonsters, die ook zijn geanalyseerd met de reeds aanwezige kwantitatieve GHB analysemethode, gebruikt als referentiemateriaal. Daarnaast is gebruik gemaakt van het KKG (Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelenanalyse en Toxicologie) controleserum voor GHB als onafhankelijke referentie.

Op basis van de literatuur en uit eerder testen is gebleken, dat deze nieuwe bepalingsmethode niet geschikt is voor kwantitatieve analyse [1]. Er kan echter semikwantitatief een goede indicatie worden gegeven van de concentratie GHB. Ter onderbouwing van de betrouwbaarheid van de resultaten, is ervoor gekozen de methode beperkt te valideren, waarbij de parameters: lineariteit, specificiteit, selectiviteit, juistheid, bepalings- en detectiegrens zijn onderzocht [7].

## Materialen en methoden

### Reagentia

Natrium-4-hydroxybutyraat: (Bufa art.nr. 142010);  
1-propanol p.a. (Merck art. nr. K1.00997);  
Blanco (newborn) kalfs serum (Invitrogen life technologies art.nr. 16010-159);  
1-Butanol, spoelvlloeistof GC (Lab-scan art. nr A29A11X);  
KKG controle ALCOHOLEN 2010;  
KKG controle 2010 GHB 100,1 mg/L.

### Apparatuur en instellingen

Gaschromatograaf : CP 3800 Varian;  
Auto injector: CP 8410 Varian;  
Kolom: CP-WAX 57 CB for alcohols an glycols; WCOT fused

silica 25 m x 0.53 mm x 0.50 µm, catno. 7617 (Varian);  
Injector Temperatuur: 220 0C;  
Kolom flow: 10 mL/min (Electronic Flow Control);  
Detector FID temperatuur: 220 0C;  
Dragergas: Helium;  
Injectievolume 1 µL;  
Split ratio: 10;  
Kolom Oven: 45 0C(0,75min) -> 180 0C, 20 0C/min (totaal 7,5 min);  
Runtijd 7,5 min.

Voor het 'smeren' van de injectiespuit van de GC wordt als spoelvlloeistof onder andere 1-butanol gebruikt. Butanol geeft in het chromatogram een 'spoelpiek' op  $R_t = 2,4$  min.

## Oplossingen en monstervoorbewerking

### Interne standaard (I.S.):

Stockoplossing I.S. 1-propanol (1000 mg/L):  
Weeg 100 mg 1-propanol af in een maatkolf van 100 mL en vul aan met water.

Werkoplossing I.S. 1-propanol (100 mg/L) :  
Pipetteer 100 µL stockoplossing in een maatkolf van 100 mL en vul aan met water.

## GHB stockoplossing ijklijn

### Stockoplossing GHB:

Weeg 1211 mg Na-4-hydroxybutyraat af in een maatkolf van 100 mL en vul aan met water tot de maatstreep en meng. Dit komt overeen met 10.000 mg/L GHB.  
Molmassa Na-4-hydroxybutyraat 129,09 g/mol  
Molmassa gamma-hydroxyboterzuur 104,10 g/mol

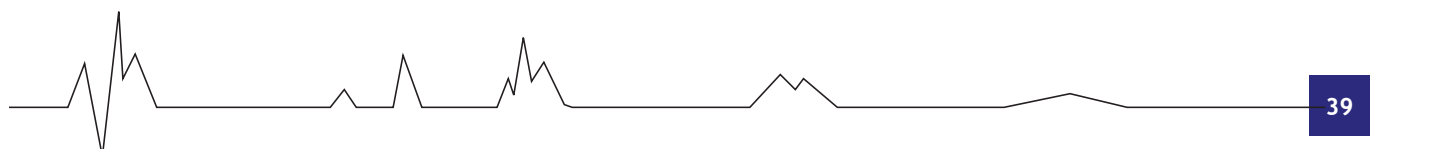
### Ijkreeks

Reeks 1: Pipetteer uit de stockoplossing GHB achtereenvolgens in duplo: 0; 0,250 mL; 0,500 mL; 1,00 mL; 2,00 mL en 5,00 mL in een maatkolf van 10 mL. Vul aan met water tot de maatstreep en meng.

Reeks 2: Verdun reeks 1 door van elke verdunning 1,00 mL te pipetteren in maatkolven van 10 mL. Vul aan met blanco kalfs serum tot de maatstreep en meng.  
Pipetteer achtereenvolgens in autosampler vials, 1000 µL werkoplossing I.S. 1-propanol en uit elke maatkolf 200 µL van reeks 2. Vortex 5 sec.

### Serummonsters

Pipetteer in een autosampler vial: 1000 µL werkoplossing I.S. 1-propanol + 200 µL serum. Vortex 5 sec.



## Validatie

### IJKlijn

De lineariteit van de analysemethode is bepaald door op 1 dag, 5 verschillende concentraties van de werkzame stof in duplo te analyseren met als matrix blanco kalfs-serum. Het bereik van deze methode is gebaseerd op referentiewaarden van GHB, zoals aangegeven in tabel 1 [5].

Conc. in serum/plasma	klinische beeld
< 50 mg/L	wakker
50 - 150 mg/L	slaap, af en toe openen van ogen en spontane bewegingen
150 - 250 mg/L	coma, reageert op knijpen
> 250 mg/L	diep coma, niet reageren op pijnprikkels

Tabel 1 Referentiewaarden GHB

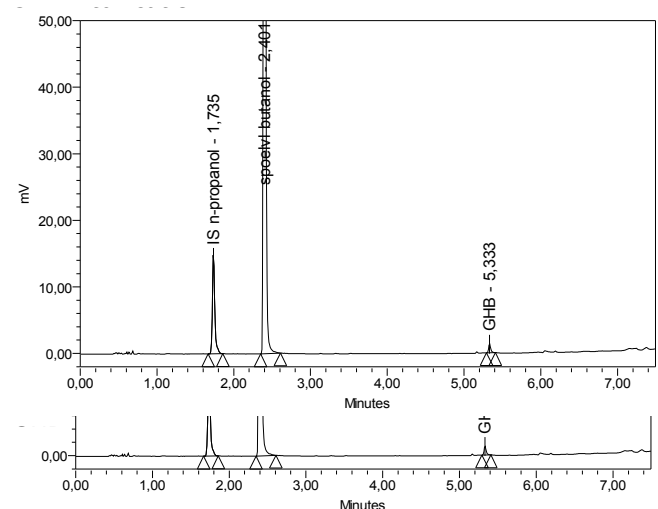
Voor de specificiteit zijn 6 onafhankelijke blanco matrices opgewerkt als serummonster. Dit om te kijken in hoeverre stoorpieken een vals positieve uitslag voor GHB geven. Als matrix is gebruik gemaakt van blanco kalfs-serum. De selectiviteit is aangetoond door het KKGt controleserum alcoholen 2010 te spiken met GHB om te kijken hoe GHB zich verhoudt tot de andere alcoholen en glycolen. De juistheid is verkregen door oude patiëntenmonsters te gebruiken, waarin direct na afname, met een kwantitatieve GHB analysemethode, GHB is aangetoond. Deze monsters zijn vervolgens ingevroren en naderhand gebruikt voor de validatie van de semikwantitatieve analysemethode voor GHB. Daarnaast zijn er twee patiëntenmonsters gebruikt, waarin na afname, op dezelfde dag, zowel kwantitatief als semikwantitatief GHB is bepaald. De resultaten van beide methodes zijn vergeleken met behulp van de gepaarde T-Toets. In Excel is dubbelzijdig met een betrouwbaarheidsinterval van  $\alpha=0,05$  gekeken of de  $H_0$  hypothese wordt geaccepteerd ( $H_0$ : beide groepen metingen zijn gelijk indien  $p>\alpha$ ). Naast de patiëntenmonsters is gebruik gemaakt van een onafhankelijk referentiemonster van de KKGt: KKGt controle 2010 GHB. De concentraties zijn berekend aan de hand van de eerder genoemde ijklijn. Ten slotte kan op basis van de gevonden resultaten een conclusie worden getrokken over bepaling- en detectiegrens. De validatieberekeningen zijn uitgevoerd met Excel en Regres [7,8,9].

## Resultaten en Discussie

### Methodeontwikkeling

De analyse betreft een bepalingmethode in serum. De serummonsters worden zonder verdere voorbereiding, afgezien van toevoeging van 1000  $\mu$ L interne standaard,

direct op de kolom geïnjecteerd. In geval van een GHB intoxicatie wordt met deze analysemethode een duidelijke piek in het chromatogram waargenomen. Ter illustratie wordt in figuur 2 een voorbeeld chromatogram getoond van een patiëntenmonster met een GHB intoxicatie.



▲ Figuur 2 Chromatogram patiënt GHB ± 165 mg/L GHB

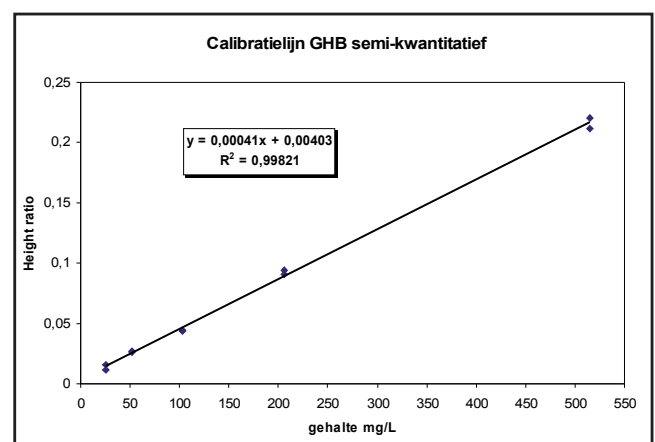
### Lineariteit

In tabel 2 staan de niveaus weergegeven die zijn gebruikt voor de ijklijn [7].

Validatie niveaus	Concentratie GHB mg/L
LLQ	25,77
X1	51,55
X2	103,1
X3	206,19
HLQ	515,48

◀ Tabel 2 niveaus ijklijn

Hiermee is een ijklijn gemaakt zoals weergegeven in figuur 3.



▲ Figuur 3 IJKlijn GHB semikwantitatief

De lineariteit is getest met ANOVA. De resultaten staan samengevat in tabel 3.

Parameter	GHB semikwantitatief
As afsnede	geen significante afwijking t.o.v. "0"
Correlatiecoëfficiënt	0,99916
Goodness of fit	significatie GOF
Lack of Fit	geen LOF
Residuplot	willekeurig verdeeld om nul

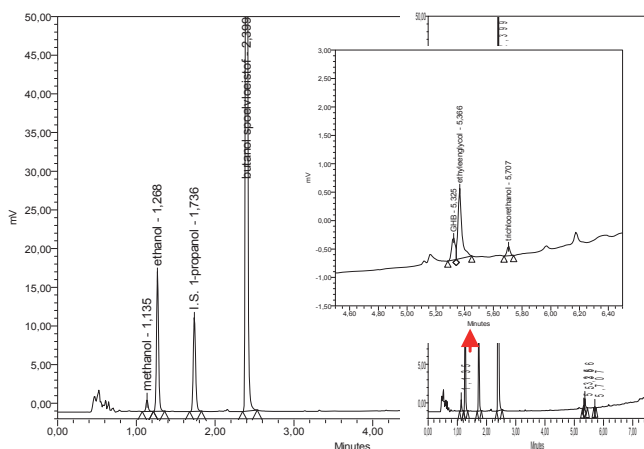
▲ Tabel 3 Samenvatting resultaten lineariteit

### Specificiteit

Door injectie van niet voorbereide serummonsters treedt vervuiling op van de kolom. Dit kan veel ruis en stoorpieken geven. Deze vervuiling wordt zoveel mogelijk weggevangen door de liner. Regelmatig uitstoken van de GC en vervangen van de liner helpt dit probleem grotendeels te voorkomen. Een ethanolbepaling geeft hoge spiegels, die weinig last zal hebben van deze vervuiling, maar GHB kan hier wel wat hinder van ondervinden, vooral bij concentraties < 50 mg/L. Praktisch zal dit echter weinig problemen geven, omdat alleen een spiegel met een concentratie van > 50 mg/L een arts relevante informatie geeft (zie tabel 1). Daarnaast is bij injectie van 6 blanco matrices (kalfsserum) gebleken dat bij het juist instellen van de minimum height de eventuele vervuiling geen vals positieve GHB spiegels geeft. Zie tevens detectie en bepalinggrens.

### Selectiviteit

Uit het chromatogram in figuur 4 blijkt dat GHB (Rt 5.325 min) en Ethyleenglycol (Rt 5.366 min), met een resolutie (Rs) van 1, niet basislijn zijn gescheiden. Voor de kwantificering (height) levert dit geen problemen op en de kans deze samen in een patiëntenmonster aan te treffen is erg klein.



▲ Figuur 4 Chromatogram KKGK controle Alcoholen 2010 + KKGK controle 2010 GHB 100,1 mg/L.

### Juistheid

De resultaten van de patiëntenmonsters staan samengevat in tabel 4.

Kwantitatief mg/L	Semikwantitatief duplo mg/L		gem. mg/L	Recovery % to.v. kwantitatief
	1	2		
190	209	221	215	<b>113</b>
165	190	172	181	<b>109</b>
214	238	249	243	<b>114</b>
228	257	261	259	<b>114</b>
324	335	363	349	<b>108</b>
426	502	470	486	<b>114</b>
188	169	199	184	<b>98</b>
281*	282*	328*	305	<b>109</b>
153*	171*	150*	161	<b>105</b>

▲ Tabel 4 Resultaten vergelijking patiëntenmonsters kwantitatief vs. semikwantitatief (\*analyse op dezelfde dag)

Statistische vergelijking van beide methodes met behulp van de gepaarde T-toets levert op dat  $p = 0,0037$ . Ondanks dat  $p < \alpha (0,05)$  is, vinden wij de resultaten acceptabel voor een semikwantitatieve bepaling. De gemiddelde recoveries van de geteste monsters liggen, ten opzichte van de kwantitatieve analysemethode, binnen de +/-15 %. Als 'veilige' marge houden wij hiervoor +/- 20 % aan.

Het verschil tussen de duplo bepaling van de semikwantitatieve analysemethode is max. 15 %. Een oorzaak voor dit verschil is niet direct aanwijsbaar, mogelijk dat spikes van invloed zijn.

De laatste 2 resultaten uit de tabel zijn van patiëntenmonsters welke op dezelfde dag met beide methodes zijn gemeten. Hiermee is onder andere de invloed van het invriezen op de patiënten monsters bepaald, die voor deze validatie zijn gebruikt. Op grond van de gevonden recoveries lijkt het vriezen en ontdooien van deze monsters van weinig invloed te zijn op het GHB gehalte.

In tabel 5 staan de resultaten van het onafhankelijk KKGK controle serum.

Gehalte volgens KKGK	Gehalte kwantitatief	Semikwantitatief		
		duplo		gem
		1	2	
<b>100,1 mg/L</b>	87,9 mg/L	92 mg/L	89 mg/L	90 mg/L
Recovery t.o.v. gedeclaree rd.	<b>87,8 %</b>			<b>90,1 %</b>

▲ Tabel 5 Resultaten kwantitatieve en semikwantitatieve analyse van GHB in 'KKGK controle 2010 GHB'.

## Detectie- en bepalingsgrens

De detectie- en bepalingsgrens zijn alleen proefondervindelijk vastgesteld. Omdat een uitslag van GHB < 50 mg/L voor een arts niet klinisch relevant is (tabel 1), is besloten de bepalingsgrens vast te stellen op 50 mg/L. Concentraties lager dan 50 mg/L worden dan ook gerapporteerd als GHB: < 50 mg/L, ook als deze ogenschijnlijk niet aantoonbaar zijn. De LLQ in de ijklijn is 25 mg/L en wordt aangehouden als detectiegrens.

## Discussie

Met de ontwikkelde methode wordt een indicatie gegeven van het GHB-gehalte in serum/plasma. Bij deze methode is niet specifiek gekeken naar het verschil tussen plasma en serum. De analyse is, al naar gelang wat geprikt was, uitgevoerd op zowel serum- als plasmamonsters. Er wordt nadrukkelijk geen kwantitatieve uitslag gegeven maar een semikwantitatief resultaat. In de praktijk is het in veel gevallen voldoende te weten of er sprake is geweest van GHB gebruik en is het exacte resultaat minder van belang. Mocht er sprake zijn van een GHB intoxicatie dan wordt over het algemeen symptomatisch behandeld en volgt herstel vaak 2-6 uur na inname [5]. Bij de uitslag wordt vermeld dat het een semikwantitatieve bepalingsmethode betreft. Bij twijfel, zowel van de aanvrager als de analist, moet altijd worden uitgeweken naar de kwantitatieve GHB analysemethode.

Met deze methode kan geen onderscheid worden gemaakt tussen GHB en GBL. GBL geeft met deze methode in het chromatogram een piek met dezelfde retentietijd. Daarom is deze methode alleen geschikt voor analyse in serum of plasma en niet in oplossingen. Eventueel kan deze methode wel voor kwalificatie in urine worden gebruikt. GHB is in urine tot 8 uur na inname aantoonbaar. In serum is detectie alleen mogelijk bij bloedafname binnen 4-6 uren na inname [2,5]. Voor de analyse van alle drie componenten afzonderlijk, GHB, GBL en BD, is het verstandig voor een LC/MS methode of alternatief te kiezen.

Gezien het groeiende GHB probleem is er behoefte aan een snelle GHB bepaling. Inmiddels is een eenvoudige kwantitatieve enzymatische test beschreven voor GHB in bloed en urine [10]. Deze test heeft echter als beperking dat ethanol de test kan storen.

## Conclusie

Een praktische GC-FID methode is ontwikkeld voor de semi-kwantitatieve analyse van GHB, gelijktijdig met de kwantitatieve analyse van ethanol. Door gebruik te maken van de GC-FID methode voor alcoholen en glycolen, worden ook andere alcoholen, indien aanwezig, direct meebepaald. Hiermee kan snel uitsluitsel worden gegeven, of een comateuze patiënt wel of niet GHB, eventueel in combinatie met

ethanol, heeft gebruikt. Dit kan een belangrijk hulpmiddel zijn voor het stellen van een diagnose bij comateuze patiënten.

*Gebaseerd op onderzoek van H.P. de Jong in het kader van haar opleiding tot Specialist Klinische-Farmaceutische en -Toxicologische Analyse.*

## References

- 1 Lundquist P, "Analysis of  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) and  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) in liquids performed at national laboratory of forensic science (SKL), Sweden." *Problems of Forensic Science*, 2001; vol. XLVII: 345-357
- 2 Veerman SRT, Dijkstra HN, Lieftins-Kluft I, "Levensbedreigende onhoudingsverschijnselen door gammahydroxyboterzuur." *Tijdschrift voor psychiatrie*, 2010; 52: 6
- 3 Elliott S, Burgess V, "The presence of gamma-hydroxybutyric acid and gamma butyrolactone in alcoholic and non-alcoholic beverages." *Forensic Science International*, 2005; 151: 289-292
- 4 Kramers C, "Party drugs: gammahydroxyboterzuur (GHB)." *Geneesmiddelenbulletin nr. 4-01 mei 2006*, 48-49
- 5 Grouls RJE, Bindels AJGH, Roos A and Keizer K, Gamma-hydroxyboterzuur (GHB). Available from URL: [http://www.toxicologie.org/monografieen/ frametox.asp?ID=32](http://www.toxicologie.org/monografieen/frametox.asp?ID=32), geraadpleegd 03-10-2011
- 6 Van 't Veer NE and Lameijer W, Bepaling in serum Gammahydroxyboterzuur. *Pharm Weekbl* 2001; 136:104-5
- 7 Dictaat "Validatie van Bioassays" Onderdeel HBO opleiding specialist klinisch-farmaceutisch en toxicologisch analyse, 2004
- 8 Andries JPM, Vries AB de, "Chemometrie" 2de druk, Bohn Stafleu van Lochum, Houten/Diegem, 2001
- 9 Klaessens JWA, "Statistiek in het laboratorium met EXCEL", Syntax Media, Arnhem, 2009:52-55
- 10 Hasan L, Jermann TM, Weber JM, Abrahamsso L, Schiotti M-A, Böttcher M, Jöchle W, Gygas D, Scholer A, "An Enzymatic Method to Determine  $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid in Serum and Urine." *Ther Drug Monit*, 2011; 33: 757-765