



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Τίτλος μεταπτυχιακής εργασίας:

**Η ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ GHB ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΕΣ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΤΑ
ΠΛΑΙΣΙΑ ΒΙΑΣΜΟΥ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥΡΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ GHB.**

Δουϊνούδη Ελένη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρ. Κοβάτση Λήδα

Θεσσαλονίκη 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

PMS TOXICOLOGY

Title:

**THE ANALYSIS OF GHB IN HAIR AS AN INDICATOR OF
ADMINISTRATION IN CONTEXTS OF SEXUAL ASSAULT. THE ROLE
OF THE GLUCURONIDE OF GHB.**

Douinoudi Eleni

Supervising professor: Dr. Kovatsi Leda

Thessaloniki 2023

Τριμελής επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών –
Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοβάτση Λήδα, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας

Σκαπέρδα Ζωή – Βασιλική, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
Εισαγωγή.....	9
Κεφάλαιο 1	
1.1.Φαρμακολογία, Φαρμακοδυναμική, Φαρμακοκινητική του GHB.....	14
1.2.Απορρόφηση (Absorption).....	18
1.3.Κατανομή (Distribution).....	19
1.4.Η πορεία των εναλλακτικών πηγών του GHB, GBL και 1,4BD.....	19
Κεφάλαιο 2 - Προσδιορισμός του GHB στα βιολογικά υγρά και την τρίχα. Δυσκολίες στο έργο της ανάλυσης και προκλήσεις.....	22
2.1. Βιολογικά υλικά για την ανάλυση του GHB και επιλογή αυτών.....	26
Κεφάλαιο 3 - Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του GHB.....	30
3.1. LC- υγρή χρωματογραφία, HPLC- Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης Φασματομετρία Μαζών (MS).....	31
3.2. Συνδυασμός Υγρής Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας Μαζών (LC/MS και HPLC/MS).....	32
3.3. Εφαρμογές μεθόδων.....	32
3.4. Ο ρόλος του γλυκουρονιδίου του GHB στην ανάλυση (GHB-Gluc).....	33
Κεφάλαιο 4- Δυσκολίες και επιπλοκές που προκύπτουν από την επεξεργασία της τρίχας.....	37
Κεφάλαιο 5- Case Reports.....	41
Κεφάλαιο 6- Συμπεράσματα.....	43
Βιβλιογραφία.....	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γ- υδροξυβουτυρικό οξύ (GHB) είναι ουσία η οποία ανήκει στην κατηγορία των καταθλιπτικών και αποτελεί πρόδρομο μόριο του GABA. Κυκλοφορεί συχνότερα στη μορφή του άλατος του γ- υδροξυβουτυρικού οξέος (οξυβικό νάτριο) και η χρήση εκτός θεραπευτικών πλαισίων είναι απαγορευμένη. Παρόλα αυτά η χρήση των οργανικών διαλυτών του, γ- βουτυρολακτόνη (GBL) και 1,4 βουτανοδιόλη (BD) είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη καθώς αφενός η χρήση τους δεν είναι απαγορευμένη, αφετέρου εντός του οργανισμού υπόκεινται βιομετατροπή σε GHB ταχύτατα μετά τη λήψη. Το GHB δρα ανάλογα με τη δόση. Σε μικρές δόσεις παρατηρούνται αγχολυτικές ιδιότητες, χαλάρωση, ηρεμία και ευθυμία, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις έχουν παρατηρηθεί συμπτώματα όπως έμετος, δυσφορία, απώλεια μνήμης, δυσλειτουργίες του αναπνευστικού συστήματος, μέχρι και κόμα το οποίο μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο. Η επικινδυνότητα της δόσης αυξάνεται γραμμικά κατά την παράλληλη χρήση και άλλων διεγερτικών ή αντικαταθλιπτικών ουσιών. Αρχικά το GHB χρησιμοποιήθηκε ως διεγερτική ουσία για ψυχαγωγικούς σκοπούς στα πάρτι (club drugs) τη δεκαετία του 1980. Μετά το 1990 χρησιμοποιήθηκε ως αναβολικό μέσο στο body building λόγω της πρόκλησης απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης. Κατάχρηση του GHB επίσης παρατηρήθηκε και ως υπνωτικού μέσου. Στην κατάλληλη δόση το GHB προκαλεί υπνηλία και απώλεια μνήμης, γεγονός που έχει επιφέρει πολλές αναφορές σεξουαλικών επιθέσεων και εγκλημάτων, δίνοντάς του τον κοινώς χρησιμοποιούμενο τίτλο «το χάπι του βιασμού». Σύμφωνα με αναφορές, τα θύματα σεξουαλικής επίθεσης και βιασμού δηλώνουν κενό μνήμης ύστερα από την κατανάλωση ενός αλκοολούχου ποτού.

Δυστυχώς, ο βραχύς χρόνος ημιζωής του GHB και ο γρήγορος μεταβολισμός του εντός του οργανισμού προκαλεί δυσκολίες στην εργαστηριακή του ανίχνευση στο αίμα, τα ούρα και το σάλιο, αφού περιορίζει σημαντικά το χρονικό περιθώριο της ιδανικής δειγματοληψίας. Αντιθέτως, η ανάλυση της τρίχας δίνει ένα πολύ μεγαλύτερο χρονικό περιθώριο ανίχνευσης, καθώς περιέχει ιστορικό όλων των ουσιών που έχουν ληφθεί από

το θύμα, ενώ το χρονικό περιθώριο καθορίζεται από το μήκος της, από τη ρίζα έως την άκρη. Οι περιορισμοί που παρουσιάζονται κατά την ανάλυση της τρίχας είναι αρκετοί, και ποικίλουν από την ύπαρξη ενδογενών συγκεντρώσεων GHB στον οργανισμό, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται σε ένα εύρος, έως και την αισθητική κατεργασία της τρίχας, ειδικά στην περίπτωση των γυναικών, όπως η χρήση θερμότητας ή χημικών μέσων και βαφών και προϊόντων αποχρωματισμού, οι οποίες ελαττώνουν την ποιότητα της τρίχας και δυσχεραίνουν την ποιότητα της ανάλυσης.

Σε περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα των αναλύσεων είναι αμφίβολα, και όπου οι ενδογενείς συγκεντρώσεις του GHB αυξάνονται λόγω κακής συντήρησης των δειγμάτων, υπάρχει σύγχυση ως προς την διεξαγωγή συμπερασμάτων. Γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε το γλυκουρονίδιο του GHB (GHB-Gluc) ως βιοδείκτης για την παρουσία αυξημένης εξωγενούς συγκέντρωσης της ουσίας στον οργανισμό, καθώς ο ρυθμός απέκκρισής του γλυκουρονιδίου είναι μεγαλύτερος από την αρχική ουσία (GHB).

ABSTRACT

γ -hydroxybutyric acid (GHB) is a substance that belongs to the category of depressants and is a precursor molecule of GABA. It is most often found in the form of the salt of γ -hydroxybutyric acid (sodium oxybate) and its use outside the therapeutic context is prohibited. On the contrary, the use of its organic solvents, γ -butyrolactone (GBL) and 1,4 butanediol (BD) is widely used as on one hand their use is not prohibited and on the other hand, they biotransform into GHB within the body quickly after intake. GHB is dose dependent. There have been observed various symptoms after GHB intake. In small doses, anxiolytic properties, relaxation, calmness, and cheerfulness have been observed, while in larger doses there have been observed symptoms such as vomiting, discomfort, memory loss, respiratory system dysfunctions, even coma, which can finally lead to death. The risk of the dose increases linearly with the concomitant use of other stimulants or antidepressants. Initially GHB was used as a stimulant for recreational purposes in parties (club drugs) in the 1980s. After the 1990s it was used as an anabolic agent in bodybuilding due to the release of growth hormone. GHB has also been abused as a hypnotic agent. At the right dose, GHB causes drowsiness and memory loss, which has led to many reports of sexual assault and crime, and that is the reason the substance got the commonly used title, "date rape drug". According to reports, victims of sexual assault and rape report memory loss after consuming an alcoholic beverage.

Unfortunately, the short half-life of GHB and its rapid metabolism within the body cause difficulties in the detection of the substance in blood, urine, and saliva since it significantly limits the time frame of ideal sampling. In contrast, hair analysis gives much longer window of detection as it contains a history of all substances consumed by the victim and the time frame is determined by the length of the hair, from root to tip. The limitations concerning hair analysis are several and vary from the existence of endogenous GHB concentrations in the body, to the cosmetic treatment of the hair, especially in the case of women, such as the use of heat, chemical means, dyes, and

bleaching products, which reduce the quality of the hair and make the quality of the analysis even worse.

In cases where the results of the analysis are equivocal and the endogenous concentrations of GHB are increased due to poor preservation of the samples, coming to conclusions is confusing. For this exact reason, the glucuronide of GHB (GHB-Gluc) was used as a biomarker for the presence of an increased exogenous concentration of the substance since the excretion rate of the glucuronide is greater than the excretion rate of the original substance (GHB).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γ- υδροξυβουτυρικό οξύ (GHB, ή 4 υδροξυβουτανοϊκό οξύ), είναι ένα λιπαρό οξύ βραχείας αλυσίδας, το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο του βασικού νευροδιαβιβαστή ανασταλτικού τύπου (GABA) και ενδογενώς παράγεται στον εγκέφαλο των θηλαστικών [1],[2],[3],[4]. Το GHB είναι μία ουσία του ΚΝΣ η οποία ανήκει στην κατηγορία των καταθλιπτικών και ανευρίσκεται στο αίμα, στα ούρα, στις τρίχες, στον περιφερικό ιστό και τον εγκέφαλο [5],[6]. Ο αρχικός σκοπός σύνθεσής του ως εξωγενή ουσία τη δεκαετία του 1960, ήταν για την παραγωγή ενός ενδοφλέβιου αναισθητικού[7]. Η χρήση του όμως ως αναισθητικό περιορίστηκε καθώς προέκυψαν αρκετά περιστατικά επιληπτικών κρίσεων και έμετου[8]. Στην πορεία, και κατά τη δεκαετία του 1980, το GHB χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά σε πάρτι ως ψυχαγωγικό και διεγερτικό μέσο, αλλά και στον αθλητισμό, και συγκεκριμένα στο body building, ως υποκατάστατο στεροειδές [9],[10]. Η ευφορία και η χαλάρωση, σε συνδυασμό με την ερωτική διέγερση και τη βραχεία αμνησία που προκαλεί το GHB σε ορισμένες συγκεντρώσεις, το έκανε να αποτελεί μέσο για εγκληματικές ενέργειες όπως ο βιασμός και η σεξουαλική παρενόχληση, και έτσι ονομάστηκε, «το χάπι του βιασμού»[11],[12],[13],[14]. Το GHB κυκλοφορεί ονομαστικά στα κλαμπ ως G, υγρή έκσταση, σαπούνι (soap), σέσουλα (scoop), νίτρο (nitro) και αλμυρό νερό (salty water)[15].

Σε πολλές χώρες της Ευρώπης η χρήση του GHB είναι περιορισμένη, καθώς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει ακόμη και θάνατο. Παρόλα αυτά, οι οργανικοί διαλύτες του GHB, γ-βουτυρολακτόνη (GBL) και 1,4-βουτανοδιόλη (1,4 BD) χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον ίδιο σκοπό όπως το GHB, καθώς αφενός δεν αποτελούν απαγορευμένες ουσίες, αφετέρου μετατρέπονται σε GHB ταχύτατα μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό[16]. Σήμερα, η νόμιμη ιατροφαρμακευτική χρήση του GHB περιορίζεται στη θεραπεία της ναρκοληψίας, της καταπληξίας και της εξάρτησης από το αλκοόλ[17],[18],[19],[20],[21],[22] και τα οπιοειδή[23].

Κατά τη χρήση του GHB παρατηρούνται διάφορες αλλαγές στη διάθεση, όπως ευθυμία, αυξημένη θέληση για κοινωνικοποίηση, ηρεμία, χαλάρωση, αλλά και αλλαγές στην κίνηση, καθώς ο χρήστης δεν έχει πλήρως τον έλεγχο των κινήσεών του και οι ικανότητές του ελαττώνονται. Έτσι, έχουμε την εικόνα ενός ατόμου που μοιάζει να έχει καταναλώσει μία μέτρια ποσότητα αλκοόλ. Η δόση που μπορεί να λάβει κάποιος και θεωρείται υψηλότερη από αυτή που λαμβάνει κάποιος θεραπευτικά, ξεκινά από 2g και φτάνει έως τα 6g GHB, όπου κατατάσσεται ως καταχρηστική και αντιστοιχεί σε 25 έως 75 mg/kg σωματικού βάρους[24]. Έχει παρατηρηθεί πως κατά τη χρήση του GHB, της GBL και της BD, η επίδραση που έχουν στο χρήστη μπορεί να είναι είτε ηρεμιστική, είτε διεγερτική, και αυτή συνδέεται άμεσα με τη δόση. Ηρεμία και ευθυμία επιτυγχάνεται κατά τη λήψη μίας μόνο δόσης 1 ή 2g με από του στόματος χορήγηση. Σε μέτριες σχετικά δόσεις όπως είναι από 2,5 έως 3g είναι πολύ πιθανή η πρόκληση έμετου και δυσφορίας, δόσεις που κυμαίνονται από 3 έως 4g, σύμφωνα με τις αναφορές που έχουν γίνει, μπορεί να προκαλέσουν αμνησία και απώλεια συνείδησης, ενώ δόσεις μεγαλύτερες των 4g μπορούν να επιφέρουν αναπνευστική καταστολή, κώμα, ακόμη και θάνατο. Ακόμη, όσο για τις θανάσιμες περιπτώσεις, τα περιστατικά που έχουν καταγραφεί αφορούν αυτούσια της κατάχρησης GHB αλλά και την παράλληλη χρήση με αλκοόλ ή έκσταση[25],[26]. Συνεπώς, το GHB μπορεί πολύ εύκολα να μετατραπεί από ψυχαγωγικό και θεραπευτικό μέσο, σε μέσο πρόκλησης ακραίων και ανεπιθύμητων καταστάσεων.

Η λεπτή γραμμή μεταξύ της δόσης για σκοπούς διασκέδασης και της δόσης που ξεπερνούν τα όρια αυτής είναι και ο λόγος για τον οποίο η λήψη υπερβολικών δόσεων GHB είναι πολύ κοινή και το καθιστά επικίνδυνο για χρήση εκτός θεραπευτικού πλαισίου[27],[28],[29]. Όπως αναφέρθηκε, κώμα που προκλήθηκε πάνω από μία φορές από την υπερβολική χρήση GHB έδειξε να επηρεάζει τη λειτουργία του ιππόκαμπου και έτσι να ελαττώνει τη γνωστική λειτουργία του εγκεφάλου[30],[31],[32] σε αντίθεση με την άποψη των ίδιων των χρηστών του GHB, οι οποίοι διαφωνούν με την πρόκληση επιπλοκών στην εγκεφαλική και γνωστική τους λειτουργία, τονίζοντας πως το GHB τους προσφέρει κυρίως θετικές επιδράσεις[33],[34],[35]. Παρόλο που σε σχέση με άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται παράνομα για λόγους διασκέδασης το GHB δεν είναι τόσο

σύνηθες, το 2017 έλαβε την 4^η θέση στις 20 ουσίες που χρησιμοποιούνται περισσότερο, σύμφωνα με το ευρωπαϊκό κέντρο ελέγχου ουσιών και εξάρτησης[36].

Τη δεκαετία του 1980, το GHB έγινε γνωστό σαν συμπλήρωμα διατροφής για αθλητές και body builders, ως εναλλακτικό μέσο για την λήψη στεροειδών ουσιών, προκειμένου να υποκατασταθεί η ανάγκη για αυξητικές ορμόνες, γεγονός που οδήγησε στον εθισμό αλλά και σε άλλες κακοποιητικές χρήσεις. Η χρήση του GHB και άλλων «ναρκωτικών ουσιών» στα πάρτι έχει ως δεδομένη την παράλληλη κατανάλωση αλκοόλ, αφού διαλύεται εύκολα σε αυτό και δεν προκαλεί ιδιαίτερη αλλαγή στη γεύση του. Τα αποτελέσματα μίας μελέτης που διεξήχθη σε 131 χρήστες GHB έδειξαν πως ο κίνδυνος νοσηλείας αυξήθηκε πολύ σε άτομα που έκαναν ταυτόχρονη λήψη GHB και αλκοόλ, με το συντριπτικό ποσοστό του 58% να κάνει χρήση και των δύο ουσιών ταυτόχρονα[37]. Παράλληλη χρήση GHB και κεταμίνης σημειώθηκε επίσης από το 30% των χρηστών [37], ενώ έχει αναφερθεί η ταυτόχρονη χρήση και οπιοειδών[38],[39]. Το MDMA είναι ακόμη ένα διεγερτικό φάρμακο για το οποίο έχουν γίνει αναφορές για ταυτόχρονη χρήση με το GHB[40].

Η χρήση του GHB ως θεραπευτικό φάρμακο σε περιστατικά ναρκοληψίας ή απεξάρτησης από το αλκοόλ έχει κάνει πιο εύκολη την πρόσβαση σε αυτό, με τον κίνδυνο λήψης υπερβολικής δόσης από αμέλεια να εγκυμονεί, και από τους ίδιους τους ασθενείς αλλά και από τη χρήση του σε εγκληματικές ενέργειες, όπως είναι ο βιασμός[38],[41]. Σε έρευνα που διεξήχθη το 2018 στο Λονδίνο, η οποία εξέτασε τα ποσοστά θανάτων που προέκυψαν λόγω υπερβολικής δόσης GHB, έδειξε πως το 2015 οι θάνατοι αυξήθηκαν κατά 119% σε σχέση με το 2014. Συγκρίσεις έγιναν και με άλλες ουσίες που έχουν παρόμοια χρήση. Κατά το έτος αυτό η αύξηση θανάτων λόγω λήψης κοκαΐνης ήταν μόλις στο 25%, ενώ λόγω λήψης MDMA η αύξηση έφτασε το 10%[42]. Άλλη πρόσφατη μελέτη, η οποία ανέλυσε τα ποσοστά χρήσης του GHB και των οργανικών του διαλυτών GBL και 1,4-BD από την αρχή της δεκαετίας του 1990, έδειξε πως αυτή ήταν η δεκαετία που η ουσία έγινε ευρέως γνωστή σε συγκεντρώσεις της κοινότητας των ΛΟΑΤ+ (LGBT+), για σκοπούς διασκέδασης, καλώντας τα πάρτι αυτά ως «chemsex parties»[43]. Η ιδιότητα του GHB να ενισχύει τη σεξουαλική διάθεση και διέγερση έκανε τη χρήση του ακόμη πιο συχνή, σε γκέι και bisexual άτομα[44].

Σε σύγκριση με άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό, όπως διεγερτικά (πχ αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA/έκσταση, κοκαΐνη), ή άλλες ψυχοδραστικές ουσίες όπως η κεταμίνη, η PCP, η δεξτρομεθορφάνη, το GHB (και το GBL) είναι μια σχετικά νέα ουσία, και γι αυτό η έρευνα που έχει διεξαχθεί πάνω σε αυτό είναι περιορισμένη[45]. Εκτός από αυτό όμως, η διεξαγωγή μιας αντιπροσωπευτικής έρευνας για το GHB, θα είχε ως προϋπόθεση τη λήψη μεγάλων ποσοτήτων της ουσίας, πολλές φορές μέσα σε μία ημέρα ή μία εβδομάδα, ώστε η μελέτη να προσομοιάσει την παράνομη χρήση, και αυτό την καθιστά αδύνατη[46],[47],[48]. Αντιθέτως, οι μελέτες που έχουν γίνει αφορούν κυρίως άτομα με ναρκοληψία, τα οποία λαμβάνουν έτσι κι αλλιώς την ουσία σε θεραπευτικό πλαίσιο, με τη μορφή του οξυβικού νατρίου, ενεργού συμπλόκου του GHB (Xyrem® ή Somsanit®)[49].

Όσο μεγάλη πρόκληση μπορεί να είναι η διεξαγωγή μελέτης, άλλο τόσο πρόκληση αποτελεί η ανίχνευση του GHB στο αίμα και στα ούρα. Ο χρόνος ημιζωής του $t_{1/2}$ είναι 20-60 λεπτά, που σημαίνει ότι μπορεί να ανιχνευθεί από 4 έως 6 ώρες στο αίμα ή τον ορό και σε 10 έως 12 ώρες στα ούρα[50],[51],[52],[53],[54]. Το GHB, πέρα από φάρμακο που λαμβάνεται εξωγενώς είναι και ενδογενές μόριο, και ανιχνεύεται φυσιολογικά στον οργανισμό σε ορισμένες συγκεντρώσεις. Έτσι, η ανίχνευση του εξωγενούς μορίου δυσχεραίνεται ακόμη περισσότερο. Το ενδογενές μόριο του GHB, σύμφωνα με μελέτες, ανιχνεύεται έως ένα συγκεκριμένο όριο, τα 4 mg L^{-1} [55],[56], και έτσι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ουσίας στο αίμα θεωρούνται εξωγενούς προέλευσης. Εφόσον όμως η δειγματοληψία αίματος ή ούρων στις περιπτώσεις κακοποίησης δεν συμβαίνει πάντα εντός των περιθωρίων ανίχνευσης, γεγονός που είναι πολύ συχνό, η λήψη τριχών μπορεί να αποτελέσει πολυσήμαντο βιολογικό υλικό, καθώς απεικονίζει την λήψη ουσιών με μεγάλο χρονικό εύρος για τα περισσότερα φάρμακα[57].

Η χρήση της τρίχας για τον προσδιορισμό ουσιών και φαρμάκων που έχουν καταναλωθεί, παραδείγματος χάρη σε μελέτες που πραγματοποιούνται την ανάπτυξη και τη δοκιμασία φαρμάκων, προγράμματα απεξάρτησης για τον έλεγχο της αποχής από ουσίες, ή για τον έλεγχο πιθανής σεξουαλικής επίθεσης και βιασμού, έχει αποτελέσει

πολυσήμαντο εργαλείο, καθώς μπορεί να μελετηθεί η χρήση φαρμάκων σε ένα μεγάλο εύρος χρόνου. Σε αντίθεση με άλλα βιολογικά υλικά όπως το αίμα και τα ούρα, τα οποία λαμβάνονται μετά την επίδραση του μεταβολισμού του οργανισμού, η τρίχα διατηρεί το ιστορικό της λήψης φαρμάκων, δίνοντας τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών αυτών. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις και ειδικά σε δείγματα γυναικών, τα δείγματα τρίχας παρουσιάζουν επιπλοκές. Η χρήση θερμότητας, βαφών και μεθόδων αποχρωματισμού (ντεκαπάζ) των μαλλιών για αισθητικούς λόγους, αλλοιώνουν την ποιότητά της, επηρεάζοντας το αποτέλεσμα της εργαστηριακής διερεύνησης. Οι πρώτες προσεγγίσεις σε προσδιορισμό ουσιών στην τρίχα ξεκίνησαν περίπου 20 χρόνια πριν [58].

Όπως προαναφέρθηκε, το GHB αποτελεί ουσία που υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό, και ο ποσοτικός προσδιορισμός του για λόγους υποψίας εξωγενούς παράνομης χρήσης θα πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά, ώστε να διαχωρίζονται οι ενδογενείς φυσιολογικές από τις αυξημένες πολλές φορές εξωγενούς προέλευσης συγκεντρώσεις. Το ίδιο ισχύει και για τις πρόδρομες ενώσεις και μεταβολίτες του GHB, GBL και 1,4-BD[59]. Συγκεντρώσεις GHB μετά από λήψη της ουσίας με μία μόνο δόση, είτε στα πλαίσια ψυχαγωγίας, είτε εγκλήματος, έχουν επιβεβαιωθεί επιτυχώς με μεθόδους GC-MS ή LC-MS σε δείγματα τρίχας[60],[61],[57],[62],[63]. Ακόμη, έχουν γίνει προσδιορισμοί σε χαμηλή δόση, στα πλαίσια θεραπείας, μετά από μία και μοναδική λήψη του φαρμάκου[57], παρόλο που αρκετές μελέτες έχουν φτάσει στο συμπέρασμα πως η λήψη μίας μόνο δόσης σε θεραπευτικά πλαίσια δεν ανιχνεύεται πάντα κατά την ανάλυση της τρίχας[64],[65],[66]. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε άτομα που λαμβάνουν το φάρμακο σε θεραπευτικές δόσεις και κυρίως σε χρόνια βάση, έδειξαν ήπιες αυξήσεις στη συγκέντρωση του GHB σε σχέση με τις συνήθεις ενδογενείς συγκεντρώσεις της ουσίας[67],[68]. Η δυσκολία προσδιορισμού και ανίχνευσης εξωγενών συγκεντρώσεων GHB, έφερε τους ερευνητές σε θέση αναζήτησης για νέες μεθόδους, με χρήση κυρίως μεταβολιτών. Το 2013 περιγράφηκε για πρώτη φορά, από τους Petersen et al.[69], η συμβολή του γλυκουρονιδίου του GHB (GHB-Gluc) με προσδιορισμό του φαρμάκου στα ούρα. Στη συνέχεια οι Wang et al. [70] διενέργησαν προσδιορισμό του GHB-Gluc σε δείγματα τρίχας ατόμων με προηγούμενη λήψη GHB

εξωγενώς, αλλά παράλληλα και σε άτομα που δεν έλαβαν το φάρμακο ξανά. Το GHB-Gluc έδειξε να επιβεβαιώνει την λήψη του φαρμάκου εξωγενώς παρόλο που ο προσδιορισμός της κύριας ουσίας (GHB) είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς οι μεταβολίτες του όπως το GHB-Gluc αποβάλλονται από τον οργανισμό με πιο αυξημένους ρυθμούς.

Κεφάλαιο 1

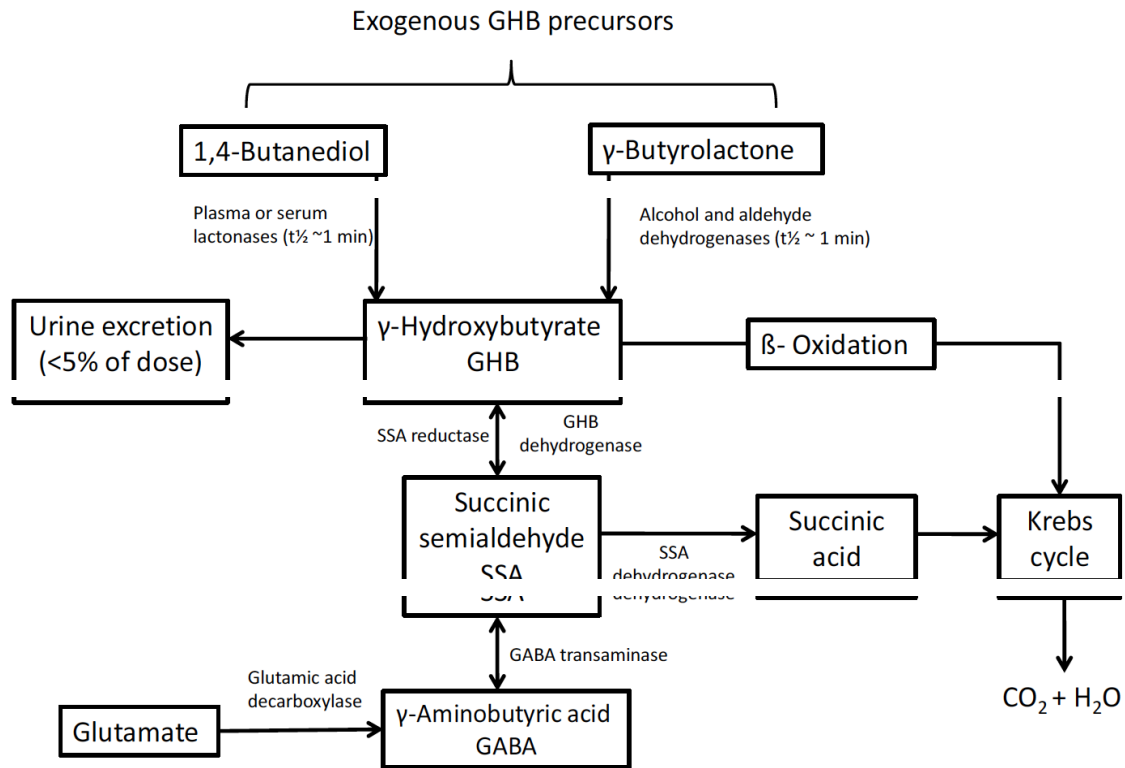
1.1. Φαρμακολογία, Φαρμακοδυναμική, Φαρμακοκινητική του GHB

Σε επίπεδο φαρμακολογίας το GHB κατατάσσεται στην ομάδα των κατασταλτικών του ΚΝΣ. Αποτελεί μεταβολίτη και παράλληλα πρόδρομη ένωση του GABA, του βασικού ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή, και εκκρίνεται σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων στον εγκέφαλο. Συνδέεται με δύο τουλάχιστον διαφορετικούς υποδοχείς στον εγκέφαλο, χαμηλής και υψηλής συγγένειας, ενώ κατά την πρόκληση φυσιολογικών συμπτωμάτων που έχουν περιγραφεί, το GHB συνδέεται με τον δικό του υποδοχέα ο οποίος ανήκει στην ομάδα των GABA_A υποδοχέων[71],[72],[73]. Όμως, παρόλο που ο υποδοχέας του GHB φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στις επιδράσεις που έχει το GHB φαρμακολογικά, οι έρευνες στρέφουν την προσοχή στους υποδοχείς του GABA_B, όσον αφορά φαρμακολογικές, τοξικολογικές και συμπεριφορικές επιδράσεις του φαρμάκου[74],[75],[76]. Το GHB μπορεί να θεωρηθεί αγωνιστής του GABA_B. [73],[77] Οι υποδοχείς του GHB εντοπίζονται σε προ- και μετα- συναπτικά κύτταρα σε περιοχές όπως ο υπόκαμπος, ο φλοιός και η αμυγδαλή, στις περιοχές δηλαδή που γίνεται απελευθέρωση GABA από τους νευρώνες αλλά και όπου υπάρχει υψηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες G των υποδοχέων[78],[79],[80].

Κατά τη θεραπεία της ναρκοληψίας, η λήψη του GHB προκαλεί βαθύ ύπνο χωρίς επίδραση στο στάδιο του REM[81]. Από την άλλη πλευρά, σε τοξικολογικό επίπεδο, το GHB και οι οργανικοί του διαλύτες, GBL και 1,4-BD προκαλούν συμπτώματα όπως υποθερμία, υπνηλία, καταστολή της αναπνευστικής ικανότητας, ακόμη και θάνατο. Οι επιπλοκές αυτές φαίνεται να αποδίδονται στους αγωνιστές των υποδοχέων του GABA_B[73],[82],[83],[84] και το GHB είναι εν μέρει ένας από αυτούς, παρόλο που το

χαρακτηρίζει χαμηλότερη συγγένεια (affinity) από τον ίδιο του τον υποδοχέα[85],[86],[87],[88].

Οι συγκεντρώσεις του GHB που παράγονται ενδογενώς στον εγκέφαλο κυμαίνονται από 2 έως 5 μM [74], οι οποίες είναι πολύ χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις μετά της λήψη GHB εξωγενώς. Ο μεταβολισμός φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς σχετική μελέτη έδειξε πως μετά από λήψη θεραπευτικών δόσεων GHB, αποβάλλεται λιγότερο από το 2% του φαρμάκου από τα ούρα[89]. Περαιτέρω πληροφορίες για τον μεταβολισμό του GHB στο σώμα υποδεικνύουν ότι το GHB διασπάται από διάφορα ένζυμα τα οποία ανευρίσκονται στα μιτοχόνδρια και στο κυτοσόλιο. Όσο για το εξωγενές GHB, έρευνα έδειξε πως ο μεταβολισμός του ήπατος πιθανώς να αποτελεί βασική οδό για τον μεταβολισμό του εξωγενούς φαρμάκου, καθώς η δεϋδρογονάση του GHB (AKR1A1) εκφράζεται με μεγάλη συχνότητα στο ήπαρ[90]. Εντός του κυτοσολίου, το GHB μετατρέπεται σε ηλεκτρική ημιαλδεΐδη (SSA, Succinic semialdehyde) με την επίδραση της δεϋδρογονάσης του GHB[91], η οποία στη συνέχεια μπορεί να έχει δύο διαφορετικές πορείες. Στην πρώτη περίπτωση μπορεί να απορροφηθεί από τα μιτοχόνδρια, ενώ στη δεύτερη, είναι δυνατό να μετατραπεί σε GABA μέσα στο κυτοσόλιο. Αντιστρόφως, το GABA μεταβολίζεται μέσω της τρανσαμινάσης του σε SSA, η οποία μέσω της αναγωγής SSA προάγει την παραγωγή ενδογενούς GHB[92],[93]. Το GHB, όπως προαναφέρθηκε, σχηματίζεται μέσα στον οργανισμό και από τις πρόδρομες ενώσεις- μεταβολίτες του, GBL και 1,4-βουτανδιόλη[94],[95],[96]. Το GBL καταλήγει σε GHB συνήθως με την παράλληλη λήψη μίας ισχυρής βάσης, ενώ η 1,4-BD μετατρέπεται αρχικά σε 4- υδροξυβουταραλδεΐδη από την ADH (alcohol dehydrogenase), η οποία στην πορεία σχηματίζει το GHB με τη βοήθεια της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης[97]. Εντός των μιτοχονδρίων, η διεργασία που πραγματοποιείται περιλαμβάνει τον μεταβολισμό της SSA σε ηλεκτρικό οξύ από την αφυδρογονάση της SSA (ALDH5A1)[98]. Κατά την απουσία της αφυδρογονάσης SSA, προκύπτει συσσώρευση του GHB, κάτι που τονίζει το πόση σημαντική είναι η διαδικασία μετατροπής του GHB σε SSA και η ένταξή του στον κύκλο του Krebs για τον μεταβολισμό του[94],[93],[99].



Εικόνα 1: Μεταβολισμός GHB και των πρόδρομων ενώσεών του και η πορεία του GABA (παραγωγή και μεταβολισμός)[112]

Οι μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς πρωτονίου και νατρίου (MCTs και SMCTs αντίστοιχα) παίζουν σημαντικό ρόλο στη φαρμακοκινητική του GHB, καθώς εμπλέκονται στην πρόσληψη και αποβολή του GHB σε όργανα όπως οι νεφροί, το έντερο, αλλά και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός[100]. Ο ρόλος των μεταφορέων αυτών τονίζεται ιδιαίτερα λόγω της pKa του GHB η οποία ισούται με 4.7, κάτι που σημαίνει ότι σε φυσιολογικό pH το φάρμακο θα ιονίζεται πλήρως. Επιπλέον, ο λόγος του MCT προς το SMCT (MCT/SMCT) εκφράζει την έκταση της απέκκρισης GHB από τους νεφρούς, την απορρόφηση και την κατανομή του στον εγκέφαλο και τους ιστούς (ADME)[101],[102],[103],[104].

Στον άνθρωπο έχουν δοθεί σαφείς περιγραφές για την φαρμακοκινητική του GHB μετά από μεγάλο αριθμό ερευνών, στο επίπεδο του θεραπευτικού παράγοντα. Ακόμη και σε

θεραπευτικές συγκεντρώσεις, λοιπόν, το GHB παρουσιάζει δοσοεξαρτώμενη φαρμακοκινητική[105],[106],[107]. Η κινητική του GHB θεωρείται μη γραμμική και για αυτό ευθύνονται η απορρόφηση που γίνεται από το στόμα, ο μεταβολισμός και η επαναρρόφηση που διενεργούν οι νεφροί και γίνονται σε κορεσμένο επίπεδο[108],[109]. Μια τέτοια εικόνα φαρμακοκινητικής του GHB στον άνθρωπο έχει περιγραφεί για ζώα όπως ο αρουραίος και ο μπαμπούινος[110],[111].

Κατά τη μελέτη της φαρμακοκινητικής (PK) μιας ουσίας όπως το GHB, τίθενται τρεις σημαντικοί παράγοντες, c_{max} , t_{max} και $t_{1/2}$, οι οποίοι υπολογίζονται σύμφωνα με τη συνάρτηση συγκέντρωσης και χρόνου[112]. Οι μελέτες που έχουν επικεντρωθεί στην φαρμακοκινητική του GHB υποδεικνύουν πως το GHB απορροφάται με γρήγορους ρυθμούς από το έντερο, όσο επίσης γρήγορα απεκκρίνεται και από το σώμα, με χρόνο ημιζωής μόλις 30-50 λεπτά, πράγμα που σημαίνει ότι μετά το πέρας 150-250 λεπτών ($5 \times t_{1/2}$) από τη λήψη του φαρμάκου, η ανίχνευσή του στο πλάσμα αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση, αν όχι ακατόρθωτη προσπάθεια[113]. Όσο για την κατανομή (distribution), το GHB προσομοιάζει την κατανομή της αλκοόλης, καθώς η συγκέντρωση και των δύο ουσιών είναι υψηλότερη στον ορό ή το πλάσμα παρά στο ολικό αίμα, είναι και τα δύο εντελώς υδατοδιαλυτά, δεν δεσμεύονται με τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο πλάσμα, και έτσι ο ορός ή το πλάσμα χρησιμοποιούνται για να περιγραφούν οι αναλογίες κατανομής (distributional ratios)[114],[115]. Δοσοεξαρτώμενη είναι επίσης και η φαρμακοκινητική του GABA. Φαίνεται πως κατά τη χρήση μεγάλων δόσεων GHB τα μεταβολικά ένζυμα έρχονται σε κορεσμό με το υπόστρωμα και οι συγκεντρώσεις του GHB στο πλάσμα αυξάνονται σε μεγάλο βαθμό. Στις περιπτώσεις χρήσης μικρότερων δόσεων, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται σε ψυχαγωγικά πλαίσια, και όταν η c_{max} στο πλάσμα είναι μικρότερη των 100 mg/L, μπορεί να γίνει περιγραφή της σχέσης c-t από την κινητική 1^{ης} τάξης, αφού έτσι διαφαίνεται το τι συμβαίνει μετά την απορρόφηση της ουσίας από τον οργανισμό[116]. Αντίθετα, στην περίπτωση λήψης υψηλών δόσεων του φαρμάκου ή των οργανικών του διαλυτών, όταν τα ηπατικά ένζυμα βρίσκονται σε φάση κορεσμού, η περιγραφή της σχέσης c-t είναι προτιμότερο να γίνεται από την κινητική μηδενικής τάξης[117].

Παράδειγμα ενός μοντέλου προφίλ $c - t$ για το GHB θα μπορούσε να αποδοθεί σύμφωνα με τα δεδομένα μελέτης, που διεξήχθη στις αρχές του 20^{ου} αιώνα[118] σε υγιή άτομα και των δύο φύλων, στα οποία χορηγήθηκαν 4,5gr του φαρμάκου, με τη μορφή του οξυβικού νατρίου. Και στα δύο φύλα, παρατηρήθηκε άμεση απορρόφηση, όπως και ότι για 1 – 2 ώρες μετά το πέρας της κορυφής της, η καμπύλη σταθεροποιείται, αφού ο ρυθμός αποβολής της ουσίας φαίνεται να διατηρεί σταθερό ρυθμό σε συνάρτηση με τον χρόνο. Κατά την ελάττωση της συγκέντρωσης του GHB στο πλάσμα, η μορφή της συνάρτησης αλλάζει και μετατρέπεται προς μια εκθετική συνάρτηση, με κινητική 1^{ης} τάξης. Έτσι, ο χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$ περιγράφει πλέον την απέκκριση της ουσίας από τον οργανισμό. Παρόλα αυτά, το φαρμακοκινητικό προφίλ της ουσίας θα ήταν καλό να συμπληρώνεται και από μελέτες στις οποίες να γίνεται χρόνια χρήση της ουσίας, όπου στην περίπτωση του GHB θα μπορούσαν να γίνουν με την βοήθεια ανθρώπων που λαμβάνουν το φάρμακο σε καθημερινή βάση.

Σε χρόνια μελέτη, στην οποία έλαβαν μέρος ασθενείς με ναρκοληψία, έγινε έλεγχος πριν και μετά από 8 εβδομάδες μη διακοπτόμενης χορήγησης (με λήψη 4,5gr GHB πριν τον ύπνο)[119]. Η μέση κορυφή στη συγκέντρωση του GHB έφτασε στο μέγιστο, ύστερα από 8 εβδομάδες θεραπείας ($p < 0,05$) με μέγιστη συγκέντρωση $C_{max} = 104 \pm 31$ mg/L, συγκριτικά με τη συγκέντρωση που επιτεύχθηκε κατά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης, $c_1 = 90 \pm 31$ mg/L. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μελέτη δεν έφτασε σε κάποιο συμπέρασμα για την συσσώρευση του GHB στο πλάσμα μετά από επανειλημμένες καθημερινές δόσεις, όπως ομοίως και άλλες έρευνες[120], οι οποίες περιέγραψαν την C_{max} , χωρίς όμως δεδομένα συσσώρευσης μετά από χρόνια λήψη του φαρμάκου.

1.2. Απορρόφηση (Absorption)

Η από του στόματος χορήγηση του GHB προκαλεί σχετικά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στον οργανισμό και η οποία αντιστοιχεί στο 25-40%. Βέβαια, υπάρχει διαφορά στην βιοδιαθεσιμότητα στην περίπτωση φαρμάκου με άδειο στομάχι και στη λήψη μετά από κάποιο γεύμα[118]. Τα στοιχεία υποδεικνύουν πως το GHB είναι μια

ουσία, η οποία σε γενικές γραμμές απορροφάται γρήγορα από το έντερο, η μέγιστη συγκέντρωση της στο πλάσμα επιτυγχάνεται στα πρώτα 20-40 λεπτά μετά την κατάποση, και αυτό οφείλεται στο ότι έχει μικρό μοριακό βάρος, είναι ευδιάλυτη στο νερό και επίσης δεν συνδέεται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος[112]. Σε έρευνα που δημοσιεύθηκε το 2012 [121] όπου έλαβαν μέρος 12 υγιείς εθελοντές (6 άνδρες και 6 γυναίκες) και έλαβαν 25mg/kg της ουσίας στη μορφή οξυβικού νατρίου, ύστερα από επαρκή αριθμό δειγμάτων αίματος, οι ερευνητές ήλθαν στο συμπέρασμα πως η απορρόφηση του GHB συμβαίνει με γοργούς ρυθμούς, με την μέγιστη συγκέντρωση (c_{max}) να επιτυγχάνεται ύστερα από 24,6 λεπτά, και σε συγκέντρωση ίση με 59,4+/- 10,2 mg/L.

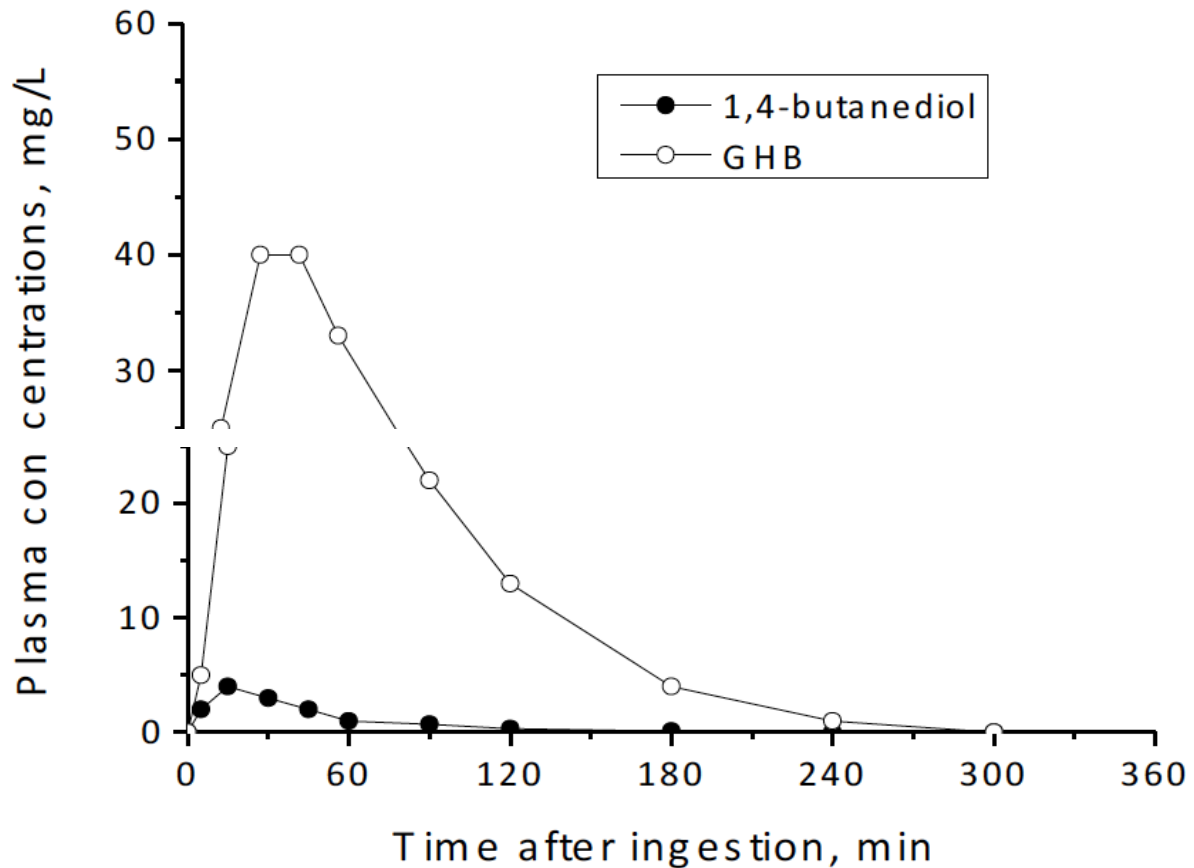
1.3. Κατανομή (Distribution)

Το γεγονός ότι το GHB συνδέεται αμελητέα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος σημαίνει πως η κατανομή του GHB στους ιστούς και τα υγρά του σώματος στηρίζεται κυρίως στο πως γίνεται η κατανομή του νερού στο σώμα. Ύστερα από πολυάριθμες μελέτες, έχει υπολογιστεί πως ο όγκος κατανομής (V_d) του GHB σε υγιή άτομα κυμαίνεται μεταξύ 0,19 και 0,33 L/kg, ενώ σε ασθενείς με ναρκοληψία ή ηπατική ανεπάρκεια, παρατηρήθηκε ένα όχι και τόσο διαφορετικό εύρος τιμών για τον V_d (0,23-0,32 L/Kg), σε σχέση με τα άτομα που αποτέλεσαν τα υγιή controls. Από την στιγμή, λοιπόν, που το GHB κατανέμεται στον οργανισμό σύμφωνα με την κατανομή του νερού, θα ήταν εύλογο να υποθέσουμε ότι ο V_d θα έπρεπε να είναι υψηλότερος στους άντρες από ότι στις γυναίκες, λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης νερού που υπάρχει στο σώμα των ανδρών φυσιολογικά, σε σύγκριση με τις γυναίκες. Η υπόθεση αυτή βέβαια, θα πρέπει πρώτα να αποδειχθεί σε ερευνητικό επίπεδο, ώστε να γίνει αντικειμενικά αποδεκτή[112].

1.4. Η πορεία των εναλλακτικών πηγών του GHB, GBL και 1,4BD

Το GBL αποτελεί μια λακτόνη η οποία με τη βοήθεια λακτονασών του αίματος μετατρέπεται άμεσα σε GHB. Έτσι η διαθεσιμότητα του GBL στον οργανισμό είναι ελάχιστη, και εν τέλει η ουσία που ανιχνεύεται είναι το GHB σύμφωνα με έρευνες που

έχουν γίνει σε αρουραίους και μπαμπούνους[122]. Από την άλλη πλευρά, η 1,4 BD έδειξε να προκαλεί μετρήσιμες συγκεντρώσεις GHB σε αρουραίους, μπαμπούνους και ανθρώπους. Παρόλα αυτά η BD παρουσιάζει δωσοεξαρτώμενη φαρμακοκινητική, μη γραμμική παράλληλα επιτυγχάνεται ολοκληρωμένη μετατροπή της BD σε GHB μέσω των διεργασιών αλδεϋδικής και της αλκοολικής αφυδρογονάσης. Σε όλες τις δόσεις BD που χορηγήθηκαν, η T_{max} επιτεύχθηκε πολύ γρήγορα[123],[124].



Διάγραμμα 1: Το προφίλ c-t του GHB στο πλάσμα 8 υγιών ατόμων μετά την κατανάλωση 25 mg/kg 1,4 BD διαλυμένης σε χυμό πορτοκαλιού. Το διάγραμμα προέρχεται αυτούσιο από τη μελέτη των D. Thai et al. (2007) [125].

Έρευνα περιγράφει λεπτομερώς την άμεση και εκτεταμένη βιομετατροπή της 1,4 BD σε GHB, στην οποία έλαβαν μέρος 8 υγιείς εθελοντές και οι οποίοι έλαβαν 25 mg/kg 1,4-Βουτανοδιόλης, αναμιγμένο σε χυμό πορτοκάλι ή κράνμπερι. Από τα δεδομένα των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν προφίλ c-t και απεικονίζονται στο παραπάνω γράφημα.

Η μέγιστη συγκέντρωση του GHB στο πλάσμα ήταν $45,6 \pm 19,7$ mg/L, η οποία επιτεύχθηκε σε χρονικό περιθώριο $39,4 \pm 11,2$ λεπτά αφότου έγινε η λήψη της ουσίας. Ο μέσος χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$ του GHB που υπολογίσθηκε μετά την λήψη της BD, ήταν $32,3 \pm 6,6$ λεπτά[125].

Κεφάλαιο 2

Προσδιορισμός του GHB στα βιολογικά υγρά και την τρίχα. Δυσκολίες στο έργο της ανάλυσης και προκλήσεις

Στα εργαστήρια κλινικής τοξικολογίας ο σκοπός ανίχνευσης ουσιών σε ένα ή περισσότερα βιολογικά δείγματα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην εξιχνίαση εγκλημάτων (DFSA, Drug Facilitated Sexual Assault), αλλά και την υποστήριξη του ασθενούς με την κατάλληλη θεραπεία για τη δηλητηρίαση που δυνητικά έχει υποστεί. Το GHB, έχοντας τόσο βραχύ χρόνο ημιζωής, $t_{1/2}=30-50$ λεπτά, μεταβολίζεται λίαν συντόμως στον οργανισμό και τα συμπτώματα που προκαλεί υποχωρούν, αφού η συγκέντρωση του φαρμάκου ελαττώνεται γρήγορα στον οργανισμό του ασθενούς. Συγκεκριμένα για το GHB δεν υπάρχει κάποιο αντίδοτο το οποίο να αντιστρέφει τα συμπτώματα της υπερβολικής δόσης.

Όπως αρχικά αναφέρθηκε, το GHB μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα του ασθενούς-θύματος εντός των πρώτων 4-6 ωρών, ενώ στα ούρα εντός 12 ωρών. Σε περιπτώσεις όπου είναι δυνατή η λήψη αυτών των δύο υγρών, όταν δηλαδή δεν υπάρχει καθυστέρηση στην δειγματοληψία, γίνεται λήψη και των δύο υγρών, ενώ σίγουρα προτιμώμενο βιολογικό υγρό αποτελούν τα ούρα. Σε περιστατικά DFSA όμως, όπου έχουν συνήθως μεσολαβήσει αρκετές ώρες μέχρι ο ασθενής να ανακτήσει τις αισθήσεις του και να συνειδητοποιήσει τι του έχει συμβεί και πως πρέπει να κινηθεί, η ανάλυση αίματος και ούρων είναι σχεδόν μάταιη. Έτσι, γίνεται σύσταση για ανάλυση δείγματος μαλλιών του θύματος, με άμεση δειγματοληψία, αλλά και δειγματοληψία έναν μήνα και δύο μήνες μετά, με παράκληση να μην χρησιμοποιηθούν αισθητικά μέσα κατά το διάστημα αυτό, όπως θερμότητα, βαφές και προϊόντα αποχρωματισμού μαλλιών, τα οποία πρόκειται να αλλοιώσουν την ποιότητα της τρίχας και να επηρεάσουν τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

Κατά την ανάλυση βιολογικών υλικών για την ανεύρεση ουσιών προκύπτουν διάφορες επιπλοκές, οι οποίες μπαίνουν εμπόδιο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στην

περίπτωση του GHB και των μεταβολιτών του, GBL και 1,4 BD, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στις ήδη υπάρχουσες ενδογενείς συγκεντρώσεις της ουσίας στον οργανισμό, καθώς κάνουν πιο δύσκολη τη διάκρισή τους από συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται από εξωγενή πρόσληψη[126],[127]. Έτσι, λοιπόν, εφόσον το GHB είναι προϊόν μεταβολισμού του οργανισμού οι ερευνητές έχουν καταφέρει να προσδιορίσουν τις συνήθεις συγκεντρώσεις GHB σε άτομα που δεν έχουν λάβει ποτέ την ουσία εξωγενώς αλλά και άτομα που λαμβάνουν συστηματικά την ουσία σε θεραπευτικά πλαίσια. Οι ενδογενείς συγκεντρώσεις του GHB που ανευρίσκονται στα ούρα βρίσκονται εντός του εύρους 0,5 – 2 mg/L, ενώ σε πιο σπάνιες περιπτώσεις ανέρχονται έως και τα 5 mg/L[128],[129]. Στην τρίχα, οι ενδογενείς συγκεντρώσεις του GHB είναι αρκετά χαμηλές, της τάξης των ng, και διαφέρουν από άτομο σε άτομο, με εύρος 1 – 12 ng/mg, ενώ η συγκέντρωση της ουσίας τείνει να παραμένει σταθερή σε όλο το μήκος της τρίχας στην πλειοψηφία των ανθρώπων, με την προϋπόθεση ότι η τρίχα δεν έχει υποστεί χημική επεξεργασία ή δεν έχει εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία[130]. Έτσι, για τον τοξικολόγο που θα αναλάβει την ανάλυση, είναι σημαντικός ο ορθός διαχωρισμός των ενδογενών από τις εξωγενείς συγκεντρώσεις της ουσίας και η χρήση ενός πρακτικού ορίου cut-off (κατώτατο όριο, όριο πάνω από το οποίο το δείγμα θεωρείται θετικό σε εξωγενή χρήση της ουσίας)[131].

Κατά την αποθήκευση των δειγμάτων αίματος και ούρων στο εργαστήριο έχουν αναφερθεί αυξήσεις των συγκεντρώσεων του GHB, κάτι που αποτελεί σημαντικό πρόβλημα καθώς προκαλεί σύγχυση στη διάκριση της ενδογενούς συγκέντρωσης με τις συγκεντρώσεις που προκλήθηκαν από πιθανή εξωγενή χρήση[132]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ακέραιη συντήρηση των δειγμάτων είναι κυρίως η θερμοκρασία και το μεγάλο χρονικό διάστημα συντήρησης, ενώ στην περίπτωση των ούρων επηρεάζουν ακόμη και τυχόν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος[133]. Έχει γίνει πρόταση για φύλαξη των δειγμάτων των ούρων στους -20°C μέχρι αυτά να αναλυθούν, θερμοκρασία κατάλληλη για την ακέραιη διατήρηση των δειγμάτων[134],[135],[136]. Επιπλέον, οι ενδογενείς συγκεντρώσεις GHB σε ζώντα και αποθανόντα άτομα είναι διαφορετικές. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας σε ζώντα άτομα είναι υψηλότερες στα ούρα από ό,τι στο αίμα, ενώ σε θανόντες ισχύει το ακριβώς αντίθετο. Έτσι στα δείγματα από αυτοψίες θα πρέπει

να χρησιμοποιούνται διαφορετικά, υψηλότερα cut-off όρια για τις ενδογενείς συγκεντρώσεις σε αίμα και ούρα[137],[138],[139].

Το σάλιο είναι ένα ακόμη βιολογικό υλικό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του GHB στον οργανισμό, και το οποίο περιέχει περίπου τις ίδιες συγκεντρώσεις ενδογενούς GHB με τα ούρα, με εύρος συγκεντρώσεων 0,15-3,33 mg/L[140].

Ο προσδιορισμός ουσιών, όπως φαρμάκων ή «ναρκωτικών ουσιών», αποτελεί πρόκληση καθώς για την ανίχνευσή τους στα βιολογικά υλικά απαιτούνται πληροφορίες (ήδη υπάρχουσες γνωστές ουσίες, με γνωστό τρόπο δράσης και φαρμακολογικό προφίλ). Για να προσδιοριστεί η ακριβής ώρα λήψης θα πρέπει να γίνει προσδιορισμός της ποσότητας της ουσίας και να συγκριθεί με την ανευρεθείσα συγκέντρωση. Η μέθοδος προσδιορισμού θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν ακόμη και πολύ μικρές ποσότητες της ουσίας, αφού ακόμη και αυτές μπορεί να έχουν σοβαρές, ανεπιθύμητες παρενέργειες. Πρόκληση αποτελεί, παράλληλα, και το ότι πρέπει στον ίδιο χρόνο να γίνει προσδιορισμός παραπάνω από 50 φαρμάκων, τα οποία είναι ύποπτα για χρήση σε περιστατικά σεξουαλικών εγκλημάτων, όπως στην περίπτωση μας το GHB[141]. Σε τεχνικό επίπεδο, το GHB προκαλεί δυσκολίες στη διαδικασία της χρωματογραφικής ανάλυσης λόγω του μικρού του μεγέθους αλλά και της αυξημένης πολικότητάς του. Έτσι, είναι απαραίτητη η χρήση μεθόδων αυξημένης ευαισθησίας για την ανίχνευσή του[142].

Οι μέθοδοι που έχουν μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του GHB είναι πολυάριθμοι και περιλαμβάνουν διάφορους συνδυασμούς μεθόδων. Στα πλαίσια της δικανικής τοξικολογίας, προτείνεται η χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID), (GC-FID), ή στην καλύτερη περίπτωση σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (MS)[143]. Κατά τη χρήση της GC-MS, ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται δευτεριωμένο d₆-GHB [144],[145]. Παρόλα αυτά είναι εξίσου συχνή η χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS) σε εργαστήρια εγκληματολογίας[146],[147].[148]. Συνδυασμοί

μεθόδων όπως GC-MS/MS και LC-MS/MS αποτελούν τις πλέον πιο ευαίσθητες και ακριβείς μεθόδους για χρήση σε προσδιορισμό ουσιών[149],[150],[151]. Ένα εξίσου χρήσιμο εργαλείο στον γρήγορο έλεγχο και το οποίο συνοδεύεται από τεχνικές επαλήθευσης του αποτελέσματος για τοξικές ουσίες είναι η χρήση υγρής φασματομετρίας μάζας με Time of Flight ToF (LC-TOF-MS), καθώς έτσι επιτυγχάνεται ο ακριβής προσδιορισμός της μάζας[147],[152].

Για δείγματα αίματος και ούρων έχουν περιγραφεί μέθοδοι οι οποίες έχουν πιστοποιηθεί και περιλαμβάνουν GC-MS[153]. Στην περίπτωση τοξικών ουσιών, είναι σημαντικό η μέθοδος που χρησιμοποιείται να μπορεί να υποστηρίξει ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών ουσιών, και αυτό προϋποθέτει μέθοδο υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, όπως η UPLC-MS/MS[146]. Βέβαια, το κόστος αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας. Γι' αυτό και έχουν περιγραφεί αρκετά οικονομικότερες και απλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του GHB σε βιολογικά υγρά και αυτές περιλαμβάνουν οξείδωση με την αφυδρογονάση του GHB και την χρήση NAD^+ που ανάγεται σε NADH , και το οποίο χρησιμοποιείται για ποσοτικό προσδιορισμό με UV στα 340nm[154]. Η εταιρία Thermo Scientific ανέπτυξε μία μέθοδο ανοσοπροσδιορισμού φαρμάκων σε βιολογικά υλικά, όπως είναι το αίμα, τα ούρα και το υαλοειδές σώμα του οφθαλμού (Thermo Scientific MGC-240 auto-analyzer), η οποία υπόσχεται γρήγορο προσδιορισμό ουσιών (εντός μίας ώρας) σε 240 διαφορετικά δείγματα ταυτόχρονα[155]. Οι ερευνητές, έχοντας περάσει από διάφορα στάδια δοκιμών για τις μεθόδους προσδιορισμού του GHB, κάνουν πρόταση για αρχική χρήση ανοσοενζυμικής μεθόδου, και στην πορεία τον συνδυασμό της με LC-MS ή GC-MS, στην περίπτωση θετικών δειγμάτων, για την επιβεβαίωση και περαιτέρω ανάλυση, ώστε να περιοριστεί ο χρόνος και το κόστος των μεθόδων.

Όσο για δείγματα τρίχας, έχουν περιγραφεί μέθοδοι όπως εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE, Liquid- liquid extraction) η οποία ακολουθείται από HPLC-MS/MS, μέθοδος διαπιστευμένη για την ανίχνευση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων του GHB[64], καθώς όπως προαναφέρουμε οι ενδογενείς συγκεντρώσεις του φαρμάκου στην τρίχα είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με τα άλλα βιολογικά υλικά. Παρόλα αυτά οι πιο συνήθεις μέθοδοι για δείγματα τρίχας είναι η GC-MS/MS αλλά και η LC-MS/MS. Η τρίχα κόβεται από την

ρίζα του θύματος, το νωρίτερο ένα μήνα μετά το έγκλημα και τμηματοποιείται σε μικρά κομμάτια μήκους 3-5mm, ενώ κατά την ανάλυση γίνεται προσπάθεια για τον προσδιορισμό του ενδογενούς αλλά και του εξωγενούς GHB που δυνητικά υπάρχει στο δείγμα.

Πολλές φορές, τα αποτελέσματα αναλύσεων είναι αμφίβολα, αφού συχνά ανιχνεύονται οι ενδογενείς συγκεντρώσεις της ουσίας και υπάρχει σύγχυση με τις συγκεντρώσεις αυτής μετά από πιθανή εξωγενή λήψη. Η κακή συντήρηση των δειγμάτων (θερμοκρασία, αυξημένος χρόνος συντήρησης) μπορεί να αυξήσουν τις ενδογενείς συγκεντρώσεις του GHB, και έτσι να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα δειγμάτων. Έτσι, παρατηρούμε ότι η ανίχνευση της βασικής ουσίας ενδιαφέροντος δεν είναι αρκετή ώστε να επιβεβαιωθεί η χρήση της ουσίας εξωγενώς. Αυτό που θα μπορούσε να επιβεβαιώσει αυτό το πόρισμα είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση μεταβολιτών της ουσίας. Στην περίπτωση του GHB, η ιδέα προήλθε από τους Petersen et al το 2013[156]. Το GHB προσδιορίστηκε σε δείγμα ούρων και το μόριο του βρέθηκε συζευγμένο με γλυκουρονικό οξύ[157]. Στην ουσία το γλυκουρονίδιο του GHB (GHB-Gluc) χρησιμοποιείται σαν βιοδείκτης για την επιβεβαίωση της χρήσης εξωγενούς GHB, ακριβώς όπως ευρέως χρησιμοποιείται το αιθυλικό γλυκουρονίδιο ως βιοδείκτης για την επιβεβαίωση της χρήσης αιθυλικής αλκοόλης[158],[157].

2.1. Βιολογικά υλικά για την ανάλυση του GHB και επιλογή αυτών

Για την επιβεβαίωση της λήψης GHB εξωγενώς, ένα μόνο δείγμα δεν είναι αρκετό. Συνήθως, σε ιατροδικαστικά ζητήματα, όπως το σεξουαλικό έγκλημα (DFC) ή η κατάχρηση για διάφορους λόγους, ζητείται δείγμα αίματος συνοδευόμενο από δείγμα ούρων, εφόσον οι δειγματοληψίες βρίσκονται σε χρονικό περιθώριο εντός των ορίων ανίχνευσης[159]. Οι αποδείξεις που απαιτούνται σε τέτοιες περιπτώσεις αφορούν την ποσοτικοποίηση του GHB στο αίμα ή στο πλάσμα, ενώ η ποσοτικοποίηση του στη τρίχα[67],[160],[162], τον ιδρώτα και το σάλιο[140], κηλίδες αίματος[163],[164] αλλά και το υαλοειδές τμήμα του οφθαλμού[166],[166],[167] αποτελούν εναλλακτικές πηγές δείγματος και όσο αυξάνονται οι μελέτες[159] πάνω σε αυτό, τόσο περισσότερα υποσχόμενα θεωρούνται στο χώρο των DFCs. Τα δείγματα τρίχας, παρόλο που

αποτελούν πολύπλοκο μέσο για τον προσδιορισμό μιας ουσίας λόγω της μεγάλης πληροφορίας που εμπεριέχουν σε σχέση με το αίμα και τα ούρα, έχουν συμβάλει στις έρευνες με επιτυχία, ειδικά όπου υπάρχουν διαθέσιμα σύγχρονα όργανα με χρήση μεθόδων υψηλής ευαισθησίας[67],[168],[169].

Το δείγμα ούρων περιέχει σε μεγάλο ποσοστό αριθμό μεταβολιτών της ουσίας που έχει καταναλωθεί. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι που εκμεταλλεύεται η δικανική τοξικολογία, σε περιπτώσεις βιασμού και λοιπών DFSAs. Η δειγματοληψία των ούρων, παρόλα αυτά, δεν θα πρέπει να γίνεται μετά το πέρας 96 ωρών από την υποτιθέμενη πρόσληψη της ουσίας[170]. Η ιδανική ποσότητα ούρων για να γίνει πλήρης ανάλυση ναρκωτικών ουσιών αλλά και για να μείνει διαθέσιμο υλικό στο εργαστήριο για μετέπειτα αναλύσεις που ίσως χρειαστούν είναι τα 100ml[170],[171]. Η συντήρηση των ούρων περιλαμβάνει ψύξη ή κατάψυξη του δείγματος, όμως όπως έχει αναφερθεί η συντήρηση στους -20°C θεωρείται θερμοκρασία κατάλληλη ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε αλλοίωση στις συγκεντρώσεις των ουσιών και των μεταβολιτών τους. Πρόσφατα, άρχισαν να αναφέρονται μέθοδοι πιο αποτελεσματικής συντήρησης και αυτοί περιλαμβάνουν την προσθήκη στα ούρα φθοριούχου νατρίου, ειδικά στις περιπτώσεις όπου η δειγματοληψία απέχει κατά πολύ χρονικά από την εργαστηριακή ανάλυση για οποιοδήποτε λόγο[172]. Για τα δείγματα αίματος, είναι απαραίτητη η δειγματοληψία το συντομότερο δυνατό, καθώς 24 ώρες μετά τη λήψη της ουσίας δεν μπορεί πλέον να ανιχνευθεί, και έτσι το δείγμα φέρει μόνο GHB σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις της ενδογενούς ουσίας. Στις περιπτώσεις όμως που γίνει δειγματοληψία εντός ολίγων ωρών, το δείγμα αίματος είναι προτιμότερο να συνοδεύεται και από ένα δείγμα ούρων προκειμένου να επιβεβαιωθεί ένα υποθετικό δείγμα και από δεύτερο βιολογικό υλικό. Στα σωληνάρια συλλογής αίματος προτείνεται να περιέχουν και αυτά φθοριούχο νάτριο, και σε ποσότητα περίπου 10ml[170].

Στις περισσότερες περιπτώσεις ένα θύμα DFSA δεν εμφανίζεται άμεσα στο εργαστήριο ιατροδικαστικής για οποιοδήποτε λόγο και έτσι τα δείγματα αίματος και ούρων δεν αποτελούν ιδανικές επιλογές. Έτσι το θύμα καλείται ένα μήνα μετά και πολλές φορές και δύο μήνες μετά την αναφορά και περιγραφή του περιστατικού για την δειγματοληψία μαλλιών. Η ανάλυση της τρίχας προϋποθέτει βασικά βήματα προετοιμασίας. Αρχικά, οι τρίχες κόβονται από την περιοχή της οπίσθιας κορυφής του

κεφαλιού και διατηρούνται μέσα σε στεγνό αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του Society of Hair Testing (SoHT)[173]. Στη συνέχεια κάθε τρίχα κόβεται σε μικρά κομμάτια των 5mm συνήθως, και έτσι τμηματοποιούνται σε τεμάχια τα οποία ξεκινούν από την ρίζα της τρίχας και καταλήγουν στην άκρη της[57]. Τα τμήματα τρίχας απολυμαίνονται αρχικά για 5 λεπτά με τη βοήθεια μεθανόλης, και στην πορεία πλένονται επί δύο φορές με πολύ ζεστό νερό για 5 λεπτά. Το τελευταίο βήμα της απολύμανσης περιλαμβάνει χρήση διχλωρομεθανίου για 5 λεπτά[64]. Στην περίπτωση όπου για την απολύμανση των δειγμάτων τρίχας ακολουθούνται οι οδηγίες τους Society of Hair Testing [173] η διαδικασία περιλαμβάνει μόνο δύο στάδια πλύσης με 5ml διχλωρομεθάνιο για 2 λεπτά. Η απολύμανση ακολουθείται από στέγνωμα των δειγμάτων όπου συνήθως αφήνονται ολόκληρο το βράδυ στους 55°C. Η τμηματοποίηση της ολόκληρης τρίχας σε τμήματα των 3-5mm μπορεί να γίνει πριν ή μετά την απολύμανση και ξήρανση [64]. Για την πέψη του δείγματος της τρίχας συνήθως χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο (IS), GHB-d6. Ύστερα το δείγμα εισέρχεται σε υψηλή θερμοκρασία (100°C) για μισή ώρα. Αφού αφεθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (1M), κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου με σκοπό την αλατοποίηση, ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης και τέλος αιθανικός αιθυλεστέρας. Ακολουθεί καλή ανάμειξη του δείγματος για τουλάχιστον 2 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται, εξατμίζεται σε θερμοκρασία δωματίου και υπόκειται ανασύσταση προκειμένου να αποτελέσει τμήμα της κινητής φάσης η οποία αποτελείται από 10% ακετονιτρίλιο και 90% νερό. Το δείγμα τελικά εμβολιάζεται στο σύστημα της LC. Η παραπάνω διαδικασία προετοιμασίας δείγματος τρίχας για ανάλυση ουσιών περιγράφηκε από τους W.Martz et al το 2019[64].

Στην έρευνα των Bertol et al [57] βρέθηκαν τμήματα τρίχας τα οποία είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις GHB σε σχέση με τα υπόλοιπα, κάτι που δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί από την μελέτη των W.Martz et al[64]. Για τον λόγο αυτό, προτάθηκε να ληφθεί υπόψη η διαδικασία απολύμανσης του δείγματος της τρίχας, αρχικό βήμα που περιλαμβάνεται στην προετοιμασία για ανάλυση, και κυρίως τα διαλύματα πλυσίματος που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό[162], καθώς η διαδικασία πλυσίματος που ακολουθείται σε κάθε εργαστήριο διαφέρει αρκετά. Ο P.Kintz [174] πρότεινε να μην χρησιμοποιηθούν καθόλου πλυστικά και απολυμαντικά μέσα για την τρίχα, πρόταση

όμως που είναι αρκετά απαιτητική, αφού απαιτεί την ανάλυση της τρίχας εντός 12 μόλις ωρών από τη λήψη της από το θύμα, αλλά και το θύμα να μην προχωρήσει σε λούσιμο του τριχωτού της κεφαλής μέχρι να δοθεί το δείγμα μαλλιών για ανάλυση. Η αποφυγή εφαρμογής πλύσεων στην τρίχα παρόλα αυτά θα βοηθούσε στο να μην αποβληθεί GHB από το δείγμα και θα διατηρούσε ανέπαφες τις συγκεντρώσεις του σε αυτό.

Κεφάλαιο 3

Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του GHB

LC- υγρή χρωματογραφία, HPLC- Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία (LC, Liquid Chromatography) ή HPLC (υψηλής απόδοσης) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού προϊόντων, η οποία περιλαμβάνει την κατανομή των προϊόντων μέσα σε μείγμα, σε δύο διαφορετικές φάσεις οι οποίες δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους, την σταθερή και την κινητή. Ανάλογα με τους μηχανισμούς της LC, διακρίνονται πέντε διαφορετικά είδη χρωματογραφίας. Αυτές περιλαμβάνουν, την χρωματογραφία προσροφήσεως (absorption chromatography), την χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography), την χρωματογραφία ιον-ανταλλαγής (ion-exchange chromatography), την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography) και την χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography). Στις περισσότερες περιπτώσεις χρωματογραφικής ανάλυσης, γίνεται χρήση της παραλλαγής της αντίστροφης φάσης χρωματογραφίας (RP, reverse phase)[175]. Κατά τη χρήση κοινών στηλών υγρής χρωματογραφίας όπου η διάμετρος της στήλης είναι σχετικά μεγάλη και το πληρωτικό υλικό της στήλης αυξημένο, παρατηρούνται μεγάλοι χρόνοι έκλουσης, καθώς οι ταχύτητες ροής στην κινητή φάση είναι αρκετά μικρές. Ο χρόνος διαχωρισμού ουσιών ελαττώθηκε σημαντικά με την πολύ μικρότερης διαμέτρου και ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μεγάλη ομοιομορφία, ταχύτητα και πυκνότητα πληρώσεως. Παρόλα αυτά η αυξημένη πυκνότητα πληρώσεως ελατώνει σημαντικά το χρόνο ροής αφού τα σωματίδια που κινούνται μέσα στη στήλη έχουν πολύ μικρό μέγεθος, και έτσι προκαλείται μεγάλου βαθμού αντίσταση. Έτσι, η ταχύτητα ροής βελτιώθηκε σημαντικά με εφαρμογή υψηλής πίεσης στην κινητή φάση. Η HPLC καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό πολύπλοκων μειγμάτων με ουσίες ποικίλης προελεύσεως και έτσι χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι η κάθε ένωση, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της, θα εκλουστεί από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο, αλλά παράλληλα σύμφωνα και με την κατανομή της κινητής με την στατική φάση[176].

Μία παραλλαγή της HPLC και μεταγενέστερη της, η UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των ουσιών από

βιολογικά υλικά, και οποία προσδίδει μεγαλύτερη απόδοση στον διαχωρισμό και την ανάλυση. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει χρήση στηλών πληρωμένες με σωματίδια πυριτίου με μικρότερο μέγεθος (~1,7 μm σε διάμετρο) και η λειτουργία της απαιτεί πιέσεις της τάξης των 310000-775000torr (6000-15000psi).

3.1. Φασματομετρία Μαζών (MS)

Στην Αναλυτική Χημεία η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και προσδιορισμό μιας ακτινοβολίας και γι' αυτό δεν κατηγοριοποιείται στις φασματοσκοπικές τεχνικές. Το φάσμα που δημιουργεί κάθε ουσία είναι μοναδικό χαρακτηριστικό της και με τον τρόπο αυτό γίνεται δυνατή η ταυτοποίηση της μέσα από πολυάριθμες άλλες ενώσεις. Η φασματομετρία μαζών βρίσκει εφαρμογές σε διάφορες οργανικές συνθετικές αλλά και φυσικές ενώσεις, στην εξακρίβωση και διερεύνηση της δομής τους, αλλά και στην ποσοτική τους ανάλυση. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την παραγωγή ιόντων, τον διαχωρισμό των παραχθέντων ιόντων σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) και σε τελικό στάδιο την ανίχνευση και καταγραφή τους με χρήση Η/Υ. Έτσι, θα μπορούσαμε να πούμε πως η MS μετρά την αναλογία m/z ιόντων (φορτισμένων σωματιδίων)[177]. Ο καθορισμός του λόγου m/z συνήθως γίνεται με τη χρήση ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, όπου γίνεται έλεγχος της κίνηση των παραχθέντων ιόντων[178].

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος περιλαμβάνει ηλεκτρόνια, υψηλής σχετικά ενεργειακής στάθμης, τα οποία κατά την πρόσκρουση τους στα μόρια μιας ένωσης που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε υψηλού κενού συνθήκες, μετατρέπονται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σε ιόντα με θετικό φορτίο. Στην συνέχεια, με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί παρατάσσονται σε ευθεία και μετατρέπονται σε μία λεπτή δέσμη. Η δέσμη αυτή διαπερνά ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και κατά το βήμα αυτό κάθε ιόν ξεχωριστά, σύμφωνα με τον λόγο (m/z) μάζας προς ηλεκτρικό φορτίο, αποκλίνει από την κατεύθυνση που αρχικά είχε. Με τη βοήθεια ειδικού ανιχνευτή προσμετράται το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχει κάθε διαφορετικό ιόν[175].

Η MS αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών και φυσικών ενώσεων και έχει εισαχθεί σε αναλυτικά εργαστήρια ως βασική μέθοδος[179].

3.2. Συνδυασμός Υγρής Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας Μάζων (LC/MS και HPLC/MS)

Κατά τον συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας η HPLC με φασματομετρία μάζας (LC/MS ή HPLC/MS) επιτυγχάνεται φυσικός διαχωρισμός των ενώσεων ενός μείγματος, ενώ παράλληλα δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης της μάζας. Η τεχνική λειτουργία με τρόπο συνδυαστικό και συνεργατικό και έτσι αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό η ακρίβεια και η ευαισθησία κατά τον διαχωρισμό ενώσεων σε μείγματα που περιέχουν πολλαπλά συστατικά και την ταυτοποίηση τους με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με τις ιδιότητες της μεθόδου, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης οργανικών, ανόργανων και βιοχημικών ενώσεων σε δείγματα με υψηλή πολυπλοκότητα, πχ δείγματα βιολογικής προέλευσης, όπως στην παρούσα διερεύνηση είναι το γ-υδροξυβουτυρικό οξύ[175].

Λόγω της ασυμβατότητας των δύο συστημάτων, LC και MS, η μεταφορά των συστατικών που έχουν διαχωριστεί με τη βοήθεια της στήλης της LC στο σύστημα της MS απαιτεί μία ενδιάμεση διάταξη η οποία να έχει δυνατότητα σύζευξης των δύο συστημάτων. Ο λόγος είναι ότι στην LC, η κινητή φάση αποτελεί υγρό το οποίο λειτουργεί υπό πίεση, ενώ αντιθέτως το σύστημα της MS λειτουργεί υπό υψηλό κενό ($\sim 10^{-6}$ Torr). Η ενδιάμεση αυτή διάταξη ονομάζεται διάταξη σύζευξης (interface), είναι ένα σχετικά απλό σύστημα σε μηχανικό επίπεδο, και κατά την μεταφορά της ουσίας που ένα αναλυθεί στο σύστημα της LC, αφαιρεί το μεγαλύτερο κομμάτι της κινητής φάσης της LC και διατηρεί ανέπαφα τις χημικές ιδιότητες των προϊόντων της χρωματογραφίας[175].

3.3. Εφαρμογές μεθόδων

Οι δυνατότητες της LC σε συνδυασμό με την MS σε αναλυτικά εργαστήρια είναι γνωστές και αποτελούν την συνήθη προτίμηση βιο- και άλλων επιστημόνων, αφού

καθιστούν δυνατό τον διαχωρισμό πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων και φαρμακευτικών προϊόντων με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα[180]. Οι περισσότερες φυσικές ενώσεις οι οποίες καλούνται να διαχωριστούν είναι ουσίες με μεγάλη πολυπλοκότητα και θερμική αστάθεια. Για τον λόγο αυτό, παρόλο που η GC-MS απαντάται στα περισσότερα εργαστήρια, καθιστά αδύνατη την ανάλυση τους, η LC-MS/MS φαίνεται να επικρατεί τα τελευταία χρόνια σύμφωνα με τις δημοσιευμένες έρευνες διατηρώντας την ευαισθησία της μεθόδου (παρόμοια LOQs), και αυτό ευθύνεται στο ότι απαιτεί λιγότερο χρονοβόρα προετοιμασία του δείγματος[181]. Όσο για τον προσδιορισμό στην τρίχα GHB συγκεκριμένα, η βιβλιογραφία περιλαμβάνει αφενός GC-MS και αφετέρου LC-MS/MS (Liquid chromatography tandem mass spectrometry)[57],[61],[65],[67],[70],[150],[182-184] και ενώ λόγω της υψηλής πολικότητας του GHB η GC θα ήταν πιο εύχρηστη, το γεγονός κακής συγκράτησης του μορίου από την στήλη αντίστροφης φάσης υπερνικάται από την πλέον αυξημένη ευαισθησία της LC συνοδευόμενη από την μείωση χρήσης τοξικών διαλυτών και χρόνο επεξεργασίας του δείγματος. Η MS/MS έχει βοηθήσει στην απλοποίηση όλης αυτής της διαδικασίας[146], αφού για την λειτουργία της δεν απαιτεί περαιτέρω μετατροπές της αρχικής ουσίας για την ανάλυση της. Ένα βήμα ακόμα πιο μπροστά, βρίσκεται η Ultra High Performance LC (UHPLC) η οποία σε συνδυασμό με μεθόδους προετοιμασίας του δείγματος με αυτόματο τρόπο, έχουν την μέγιστη απόδοση[146],[185]. Τέλος, υψίστης αναλυτικής ικανότητας θεωρείται η HPLC-MS για δείγματα πρωτεωμικής [186-189] και φαρμακευτικής προέλευσης[187].

3.4. Ο ρόλος του γλυκουρονιδίου του GHB στην ανάλυση (GHB-Gluc)

Το GHB δρα στον ανθρώπινο οργανισμό μέσα στα 30 πρώτα λεπτά μετά την λήψη του σαν φάρμακο ή ως μέσο για την διάπραξη σεξουαλικού εγκλήματος (DFC). Στην δεύτερη περίπτωση, αυτή των DFCs, προκαλεί διεγερτικές και υπνωτικές επιδράσεις σε συνδυασμό με αμνησία μικρής διάρκειας, όπου το θύμα δυσκολεύεται να θυμηθεί τι συνέβη κατά την διάρκεια της επίδρασης του φαρμάκου στον οργανισμό του [190,191]. Λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της ουσίας, η ανίχνευση του GHB

αποτελεί μία πρόκληση, αφού ανευρίσκεται στο πλάσμα για λιγότερο από 6 ώρες, και στα ούρα για λιγότερο από 12 ώρες [191,192] και αυτό εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως η ποσότητα της ουσίας που έλαβε εξωγενώς το θύμα, αλλά και τα επίπεδα του ενδογενούς GHB που προϋπήρχε φυσιολογικά στον οργανισμό του, καθώς από άτομο σε άτομο δεν είναι σταθερό, και κυμαίνεται μεταξύ ενός εύρους συγκεντρώσεων [190-193]. Κατά την ανίχνευση των ενδογενών και μη συγκεντρώσεων στα ούρα, η αρχική ένωση του GHB είναι η βασική ένωση που θα πρέπει να ανιχνεύεται. Παρόλα αυτά, οι μεταβολίτες του, όπως το γλυκουρονίδιο του GHB, ανιχνεύονται παράλληλα στα βιολογικά δείγματα και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση της εξωγενούς λήψης GHB, αφού έχουν αυξημένο ρυθμό αποβολής και γι' αυτό το λόγο μπορούν να ανιχνευτούν σε μεγαλύτερο χρονικό περιθώριο. Η απαρχή για τη χρήση μεταβολιτών στην ανάλυση έγινε από τους Petersen et al [156] το 2013 σε δείγματα ούρων, μετά από την παρατήρησή τους ότι κατά τον προσδιορισμό του GHB στα ούρα, αυτό βρέθηκε συζευγμένο με γλυκουρονικό οξύ [157]. Το σύμπλοκο αυτό, εν ονόματι γλυκουρονίδιο του GHB, προτάθηκε για χρήση ως βιοδείκτης, με τον ίδιο τρόπο που έχει χρησιμοποιηθεί το γλυκουρονίδιο της αιθυλικής αλκοόλης, για την εξακρίβωση της ύπαρξης της αρχικής της ένωσης σε βιολογικά δείγματα [158,57].

Διάφορες μελέτες κατέδειξαν την συγκέντρωση του GHB-Gluc στον οργανισμό στα βιολογικά δείγματα. Στα ούρα η συγκέντρωση του βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 0,11-5mg/L, με μέσο όρο τα 1,3 mg/L σε έρευνα που έγινε σε 50 άτομα [157], ενώ στην τρίχα σε άτομα controls η συγκέντρωση του GHB-Gluc βρέθηκε με μέγιστη συγκέντρωση τα 1,2ng/mg. Σε άτομα που έκαναν χρήση GHB, η συγκέντρωση του GHB-Gluc στην τρίχα εμφάνισε μόνο μία μικρή σχετικά αύξηση (1,7-3,1ng/mg) και αυτό σε ένα μόνο από τα δύο άτομα που έκαναν χρήση GHB, σε αντίθεση με την συγκέντρωση του GHB, η οποία με την χρήση του φαρμάκου αυξήθηκε δραματικά (461-591ng/mg)[194].

Μελέτη η οποία εστίασε σε άτομα με ναρκοληψία (NT1) και τα οποία λαμβάνουν οξυβικό νάτριο σε θεραπευτικά πλαίσια, ανέλυσε τις συγκεντρώσεις του GHB-Gluc στο πλάσμα και το ENY, προκειμένου να εξακριβωθεί εάν το φάρμακο διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [195]. Το GHB-Gluc βρέθηκε σε ίχνη σε όλα τα άτομα που έλαβαν μέρος στη μελέτη (άτομα με NT1 και υγιή controls) και δεν παρουσίασε καμία

διακύμανση στη συγκέντρωση του καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης (πριν και μετά τη λήψη GHB με την μορφή οξυβικού νατρίου), γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκέντρωση του GHB-Gluc στο πλάσμα δεν επηρεάζεται από την εξωγενή λήψη GHB. Όσο για τα δείγματα ENY, 6 ώρες μετά τη λήψη οξυβικού νατρίου από τους ασθενείς NT1, η αύξηση συγκεντρώσεων GHB ήταν εμφανώς μεγάλη. Αντιθέτως, το GHB-Gluc που μετρήθηκε στο ENY, βρέθηκε στα δύο εκ των τριών δειγμάτων απόμων με NT1 και στο τρίτο άτομο ανιχνεύθηκε σε ίχνη. Παρόλα αυτά, οι συγκεντρώσεις GHB-Gluc που ανιχνεύθηκαν στα δύο πρώτα δείγματα ENY ήταν αρκετά χαμηλές. Στα υγιή controls, το GHB-Gluc ανιχνεύθηκε στα δύο εκ των τριών δειγμάτων, σε εξίσου χαμηλές συγκεντρώσεις (ίχνη). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως ο μεταβολίτης αυτός πιθανότατα δεν έχει τη δυνατότητα να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έτσι, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης εξωγενούς πρόσληψης GHB σε δείγματα ENY.

Σε μελέτη η οποία έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης GHB και GHB-Gluc στον ορό του αίματος ασθενούς ο οποίος μεταφέρθηκε στα επείγοντα νοσοκομείου σε κώμα, μετά από δηλητηρίαση με άγνωστη ουσία/ παράγοντα, τα ευρήματα ήταν εξαιρετικού ενδιαφέροντος [196]. Στο δείγμα ορού ανιχνεύθηκαν 171mg/L GHB και 13,7mg/L μεταβολίτη του GHB, GHB-Gluc. Αυτή ήταν μία από τις λίγες μελέτες στις οποίες έγινε ανίχνευση του GHB-Gluc και επιτεύχθηκε η ποσοτικοποίηση του (13,7mg/L). Σύμφωνα με τον Busardo et al, αποτελέσματα ερευνών που διερεύνησαν τις συγκεντρώσεις GHB-Gluc σε NT1 ασθενείς, υπό τη θεραπευτική αγωγή με οξυβικό νάτριο, κατέδειξαν συγκεντρώσεις GHB-Gluc οι οποίες βρίσκονται ανάμεσα στο LOD (0,2 mg/L) και το LOQ (0,5mg/L) σε σχέση με τις ενδογενείς συγκεντρώσεις [197]. Παράλληλα, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η μελέτη διεξήχθη κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, με τις ποσότητες των ουσιών που λήφθηκαν να βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα, ακολουθώντας την σύσταση των θεραπευτικών δόσεων, όπου οι συγκεντρώσεις του ίδιου του φαρμάκου κινήθηκαν μεταξύ 8,12-32,35mg/L, σε σχέση με την συγκέντρωση GHB που προσμετρήθηκε στο παραπάνω περιστατικό δηλητηρίασης (171mg/L). Τα πορίσματα της παραπάνω μελέτης είναι αρχικά όπως η ανίχνευση του μεταβολίτη GHB-Gluc εξαρτάται από τη δόση GHB που λαμβάνεται, και δεύτερον πως κατά πάσα

πιθανότητα μπορεί να θεωρηθεί ένας βιοδείκτης για την επιβεβαίωση της δηλητηρίασης από GHB ή γενικότερα της εξωγενούς πρόσληψης GHB[196].

Η χρησιμότητα του γλυκουρονιδίου του GHB μένει να αποδειχθεί από αρκετές μελέτες, καθώς μέχρι στιγμής είναι αρκετές αυτές στις οποίες έχει γίνει προσδιορισμός του και δεν έχει ανιχνευθεί, σε διάφορα δείγματα [197, 198, 199-201]. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, το GHB-Gluc δεν σχετίζεται με εξωγενή πρόσληψη GHB, και έτσι δεν παρέχει κάποια διαγνωστική πληροφορία σε επίπεδο βιοδείκτη [197, 199-201].

Κεφάλαιο 4

Δυσκολίες και επιπλοκές που προκύπτουν από την επεξεργασία της τρίχας

Το GHB βρίσκεται στις τρίχες του ανθρώπου φυσιολογικά, σε ορισμένες φυσιολογικές συγκεντρώσεις, φυσιολογικά βρίσκεται και στα υπόλοιπα βιολογικά δείγματα που έχουν μελετηθεί. Παράλληλα, κάθε άτομο έχει διαφορετικές φυσιολογικές συγκεντρώσεις GHB στην τρίχα και γι' αυτό είναι σημαντικός ο καθορισμός ενός φυσιολογικού εύρους ενδογενούς GHB. Σύμφωνα με μελέτη που ανέλυσε τις συγκεντρώσεις GHB που υπάρχουν ενδογενώς στην τρίχα 54 υγιών εθελοντών, βρέθηκε συγκέντρωση μεταξύ 0,2 έως 6ng/mg ενδογενούς GHB [181]. Στην περίπτωση DFASC (Drug Facilitated Sexual Assault Cases), ο κύριος στόχος είναι η ανίχνευση μιας αυξημένης συγκέντρωσης GHB, η οποία θα διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τις ενδογενείς συγκεντρώσεις, αφού η δόση που θα προκαλέσει βραχυπρόθεσμη αμνησία στο θύμα είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με τις συγκεντρώσεις GHB που υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό. Για τον σκοπό αυτό, η τρίχα που λαμβάνεται από το θύμα τμηματοποιείται σε κομμάτια μήκους 3mm-5mm και κάθε μικρό κομμάτι αναλύεται ξεχωριστά για την παρουσία και τον προσδιορισμό της ουσίας. Αρχικά, γίνεται προσδιορισμών των ενδογενών συγκεντρώσεων GHB από το δείγμα τρίχας του θύματος και αυτό χρησιμοποιείται σαν control κατά την ανάλυση όλων των τμημάτων της υπόλοιπης τρίχας. Κάθε απότομη μεταβολή στην συγκέντρωση του GHB (μεγάλη αύξηση) σε κάποιο τμήμα τρίχας υποδηλώνει εξωγενή πρόσληψη του φαρμάκου. Όσο μεγαλύτερη η απόκλιση, τόσο μεγαλύτερη και η δόση καταναλώθηκε, καθώς το GHB ακολουθεί δοσοεξαρτώμενη μεταβολή. Σύμφωνα με το «United Nations Office on Drugs and Crime» στα πλαίσια διερεύνησης Σεξουαλικών και άλλων Εγκλημάτων, προτείνουν ότι κατά την ανάλυση της τρίχας, και για να εξακριβωθεί η πρόσληψη της ουσίας εξωγενώς, η συγκέντρωση της ουσίας θα πρέπει να είναι 10 φορές μεγαλύτερη από τις ανευρισκόμενες ενδογενείς συγκεντρώσεις [202].

Οι συγκεντρώσεις GHB που έχουν ανευρεθεί στην τρίχα είναι αρκετά χαμηλές κάτι που συμβαίνει γενικότερα στον πληθυσμό, και βρίσκονται μεταξύ 1-12ng/mg, σύμφωνα με περαιτέρω μελέτες. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του ενδογενούς GHB κατανέμονται ομοιόμορφα κατά μήκος της τρίχας και παραμένουν σταθερά σε κάθε

άτομο, με την προϋπόθεση ότι η τρίχα δεν έχει υποστεί κάποια επεξεργασία [61], καθώς παρόλο που η ουσία διατηρεί την σταθερότητα της κατά μήκος της τρίχας, ενέργειες που επηρεάζουν την ποιότητα της, κατά πάσα πιθανότητα προκαλούν ελάττωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε αυτήν [203-205]. Έχουν γίνει αναφορές για την δημιουργία πόρων στην τρίχα, οι οποίοι προκαλούνται από τεχνικές αισθητικής παρέμβασης στα μαλλιά, όπως είναι η χρήση θερμότητας (ίσιωμα κλπ), η χρήση βαφών αλλά και τεχνικών αποχρωματισμού των μαλλιών (ντεκαπάζ) και άλλων χημικών παρεμβάσεων. Οι τεχνικές αυτές βρέθηκαν να ελαττώνουν την συγκέντρωση της ουσίας που επρόκειτο να προσδιοριστεί [206], [207].

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί τα προηγούμενα χρόνια και αφορούν σε «ναρκωτικές ουσίες» και στον προσδιορισμό τους στην τρίχα, όπως η κάνναβη, η κοκαΐνη και το γλυκουρονίδιο της αιθυλικής αλκοόλης, κατέδειξαν την άμεση σχέση της ελάττωσης των συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών στην τρίχα με την χρήση θερμότητας και λοιπόν χημικών μέσων [203-205], [208], [209], έως και 80%.

Με γνώμονα το γεγονός ότι μεγάλο ποσοστό ατόμων που έχουν πέσει θύματα DFSA κάνουν χρήση θερμότητας και χημικών μέσων για αισθητικούς λόγους στα μαλλιά, προέκυψε η ανάγκη για προσδιορισμό ενδογενών ενώσεων GHB σε κατεργασμένα, μερικώς κατεστραμμένα μαλλιά. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι πιθανώς να υπάρχουν τμήματα της τρίχας που έχουν υποστεί, αλλά και τμήματα που δεν έχουν υποστεί κατεργασία για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων [181].

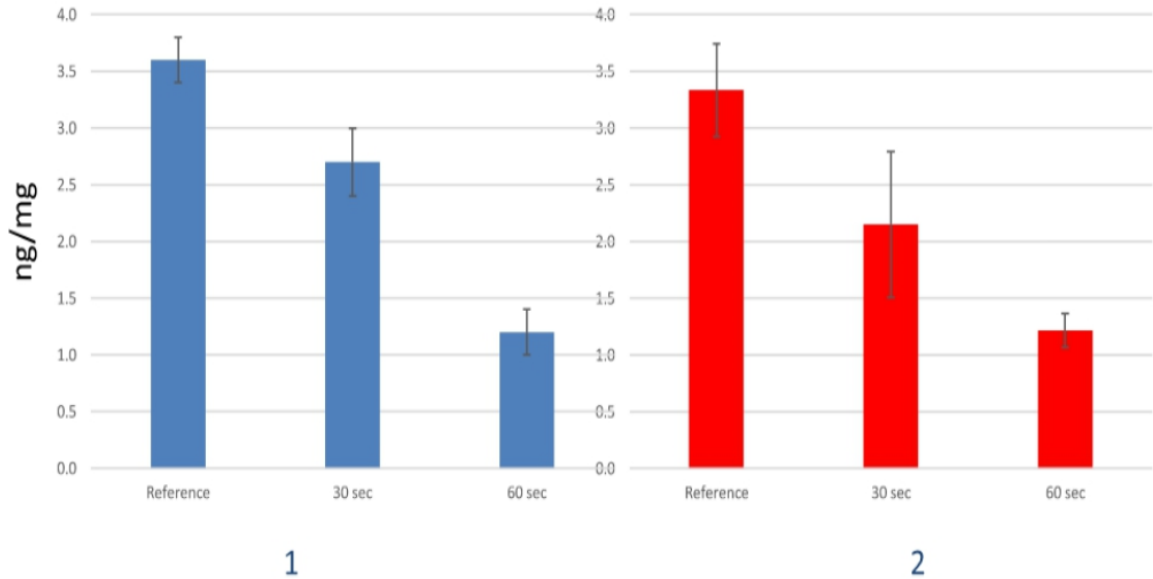
Τα αποτελέσματα της μελέτης των Fernandez et al [181] έδειξαν πως η κατεργασία της τρίχας σε υψηλή θερμοκρασία (210°C), όπως για παράδειγμα το ίσιωμα με ισιωτικό σίδερο μαλλιών επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την τρίχα και συγκεκριμένα ελαττώνουν την συγκέντρωση του ενδογενούς GHB σε αυτήν κατά 67%, ποσοστό το οποίο αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση του χρόνου χρήσης της θερμότητας. Συμπερασματικά, όσο μεγαλύτερος ο χρόνος επίδρασης με την υψηλή θερμοότητα, τόσο μεγαλύτερη η ελάττωση της συγκέντρωσης του ενδογενούς GHB στο δείγμα της τρίχας. Η ίδια μελέτη διερεύνησε και την μεταβολή της ενδογενούς συγκέντρωσης GHB σε μαλλιά που έχουν επεξεργαστεί χημικά με αποχρωματιστικά μέσα μαλλιών (ντεκαπάζ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τα δείγματα μαλλιών 15 ατόμων (n=15), μόνο στα τρία

από αυτά δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μείωση στη συγκέντρωση του GHB. Παρόλα αυτά, οι συγκεντρώσεις κινούνταν εντός ενός εύρους από άτομο σε άτομο, ακόμη και στα τμήματα μαλλιών που επεξεργάστηκαν με υψηλή θερμότητα και ντεκαπάζ. Αυτό το φαινόμενο είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει διότι η ποιότητα της τρίχας κάθε ανθρώπου είναι φυσιολογικά διαφορετική, η οποία μπορεί να έγκειται στο βαθμό της πορώδους φύσης της, στο πάχος που έχει φυσιολογικά, ακόμα και στο αν εξ αρχής είναι ταλαιπωρημένη ή κατεστραμμένη [181], όπως πρότειναν οι ερευνητές. Παρόμοια πορίσματα εκτιμήθηκαν και από μελέτη στην οποία διερευνήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης κοκαΐνης και κανναβινοειδών στην τρίχα [205]. Σύμφωνα με μελέτες που διερεύνησαν την μεταβολή του γλυκουρονιδίου της αιθυλικής αλκοόλης μετά την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας με ισωτικά μέσα και ύστερα από επίδραση με χημική επεξεργασία (ντεκαπάζ) κατέδειξαν ότι οι τεχνικές αυτές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το στρώμα κερατίνης της τρίχας, γεγονός που δυσχεραίνει την διατήρηση των όξινων στοιχείων σε αυτή, και έτσι τα στοιχεία αυτά αποβάλλονται από την τρίχα με ένα απλό πλύσιμο [204], [208], [209].

Ένα ακόμα ζήτημα στο οποίο θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την ανάλυση των δειγμάτων τρίχας είναι το ότι όλα τα τμήματα τρίχας από ένα δείγμα θα πρέπει να επεξεργάζονται με τον ίδιο τρόπο ώστε να μην προκύπτουν τμήματα πιο κατεστραμμένα από κάποια άλλα. Μια τέτοια κακή διαχείριση του δείγματος τρίχας θα μπορούσε να καταλήξει σε ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα εάν το τμήμα τρίχας που αντιστοιχεί στην περίοδο πιθανής κατανάλωσης της ουσίας λάβει διαφορετική επεξεργασία σε σχέση με τα τμήματα της τρίχας που θα χρησιμοποιηθούν ως controls, αφού στις αναλύσεις δειγμάτων τρίχας σε περιστατικά DFSA όπου αναμένεται να ανιχνευθεί μία και μόνο υψηλή συγκέντρωση της ουσίας, τμήματα της τρίχας που βρίσκονται μακριά από το χρονικό περιθώριο κατανάλωσης χρησιμοποιούνται ως controls και σε αυτά προσμετρώνται οι ενδογενείς φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση όμως που η τρίχα σε όλο της το μήκος κατεργάζεται με τον ίδιο τρόπο, το παραπάνω ζήτημα δεν θα αποτελεί πλέον πρόβλημα [181].

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η συγκέντρωση του ενδογενούς GHB στην τρίχα δύο διαφορετικών ατόμων κατά την επίδραση με υψηλή θερμότητα (210°C)

για 30sec και 60 sec. Στην πρώτη περίπτωση [181] δεν υπάρχει καθόλου επίδραση με θερμότητα και το τμήμα μαλλιών χρησιμοποιείται σαν control.



Διάγραμμα 2: Η συγκέντρωση του ενδογενούς GHB στην τρίχα δύο ατόμων μετά την επίδραση με υψηλή θερμότητα (210°C) για 30 και 60 sec. Το διάγραμμα προέρχεται αυτούσιο από τη μελέτη των M. Fernández et al. [181].

Μια άλλη μελέτη εξέτασε τις ενδογενείς συγκεντρώσεις του GHB στην τρίχα 30 ατόμων (n=30), χωρίζοντας τα δείγματα με βάση το χρώμα των μαλλιών (μαύρα, ξανθά και βαμμένα μαλλιά), το φύλο και την ηλικία των συμμετεχόντων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων σε συνάρτηση με τα χαρακτηριστικά που λήφθηκαν υπόψη[57]. Οι σχετικές ενδογενείς συγκεντρώσεις του GHB στην τρίχα στην μελέτη αυτή κινήθηκαν από ίχνη έως και 5,09 ng/mg ενδογενούς GHB.

Κεφάλαιο 5

Case Reports

Case Report 1: ένας 29χρονος άνδρας εισήχθη στα επείγοντα περιστατικά νοσοκομείου λόγω υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ σε συνδυασμό με GHB, όπου τη χρήση GHB δήλωσε πως έκανε για πρώτη φορά. Έγινε αρχικά λήψη δείγματος αίματος καθώς η εισαγωγή του στο νοσοκομείο υπολογίστηκε πως έγινε εντός περίπου 4 ωρών από τη λήψη των ουσιών. Η ανάλυση κατέδειξε συγκεντρώσεις 1,77g/L για την αλκοόλη, και 39mg/L για το GHB. Για να γίνει σύγκριση των επιπέδων GHB από την υπερβολική δόση σε σχέση με τις ενδογενείς συγκεντρώσεις GHB έγινε λήψη δείγματος μαλλιών, παράλληλα με τη λήψη του αίματος. Δείγμα μαλλιών δόθηκε από τον ασθενή ξανά, περίπου έναν μήνα μετά (32 ημέρες) και μετά από τρεις μήνες (84 ημέρες).

Η ανάλυση της τρίχας έδειξε πως οι ενδογενείς συγκεντρώσεις στο δείγμα μαλλιών του ασθενούς βρίσκονται σε επίπεδο $1,47 \pm 0,07 \text{ ng/mg}$. Στο δείγμα που συλλέχθηκε έναν μήνα μετά τη λήψη του φαρμάκου ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση GHB, συγκεκριμένα στο δεύτερο κομμάτι τρίχας, με συγκέντρωση $4,96 \text{ ng/mg}$. Το πρώτο τμήμα τρίχας (εγγύτερο στη ρίζα) εξαιρέθηκε για ευνόητους λόγους, αφού τα τμήματα που κόπηκαν είχαν μήκος το πολύ 5mm, και η αναλογία GHB που βρέθηκε στο δεύτερο τμήμα σε σχέση με τα υπόλοιπα υπολογίστηκε στο 3,7:1. Στο δείγμα μαλλιών που συλλέχθηκε τρεις μήνες μετά το συμβάν, παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση στο 6^ο τμήμα της τμηματοποιημένης για ανάλυση τρίχας, με συγκέντρωση $3,95 \text{ ng/mg}$, ενώ η αναλογία υπολογίστηκε στο 2,5:1 [57].

Case Report 2: 26χρονη γυναίκα βρέθηκε σε πάρτι μαζί με τον πρώην σύντροφό της και ανέφερε την κατανάλωση μερικών αλκοολούχων ποτών. Σε σύντομο χρονικό διάστημα από την κατανάλωση του αλκοόλ αναφέρει πως άρχισε να νυστάζει και ένιωσε τον πρώην σύντροφο της να την πλησιάζει με έντονο τρόπο. Η κοπέλα κατάφερε να φτάσει στο αυτοκίνητο της, όπου κοιμήθηκε και το επόμενο πρωί έσπευσε σε νοσοκομείο, καθώς υποπτεύθηκε ότι ο άνδρας είχε πιθανώς ρίξει κάποια ουσία στο αλκοολούχο ποτό της, κρυφά από εκείνη. Η δήλωση της κοπέλας ήταν ότι δεν είχε κάνει χρήση GHB ποτέ, όμως βίωσε το ίδιο περιστατικό στο σπίτι του πρώην συντρόφου της

δυόμισι περίπου μήνες πριν. Τα δείγματα αίματος και ούρων μετά από ανάλυση έδειξαν συγκεντρώσεις GHB οι οποίες βρίσκονται εντός των φυσιολογικών συγκεντρώσεων του ενδογενούς GHB, και άρα θεωρήθηκαν αρνητικά στην πιθανή εξωγενή πρόσληψη του φαρμάκου. Στο αίμα η συγκέντρωση υπολογίστηκε στα 3,32mg/L ενώ στα ούρα στα 4,21mg/L.

Η κοπέλα έδωσε επίσης δείγματα μαλλιών, ένα την ίδια χρονική στιγμή με τη δειγματοληψία αίματος και ούρων, για να προσδιοριστεί η ενδογενής φυσιολογική συγκέντρωση του GHB στον οργανισμό της αλλά και για τον έλεγχο πιθανής χρήσης GHB εξωγενώς κατά το προηγούμενο διάστημα που αναφέρθηκε το περιστατικό (δυόμισι μήνες πριν), και ένα ακόμη δείγμα μαλλιών ένα μήνα μετά. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση GHB για το πρώτο δείγμα μαλλιών εντοπίστηκε στο 6^ο τμήμα της τρίχας, με συγκέντρωση 4,3ng/mg. Το πρώτο τμήμα (εγγύτερο στη ρίζα) εξαιρέθηκε από την ανάλυση, και η αναλογία της συγκέντρωσης που βρέθηκε στο 6^ο τμήμα προς τη συγκέντρωση σε όλα τα υπόλοιπα τμήματα τρίχας ήταν 2,2:1. Τέλος, κατά την ανάλυση του δείγματος που λήφθηκε έναν μήνα μετά το συμβάν, η μεγαλύτερη συγκέντρωση GHB εντοπίστηκε στο δεύτερο τμήμα με συγκέντρωση 6,41ng/mg, και η αναλογία του δεύτερου προς τα υπόλοιπα τμήματα τρίχας ήταν 3,5:1 [57].

Κεφάλαιο 6

Συμπεράσματα

Οι μελέτες που επικεντρώνονται στην ανίχνευση του GHB έχουν αρχίσει εδώ και περίπου 20 χρόνια. Το GHB μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με διάφορες μεθόδους και συνδυασμό αυτών στα διάφορα βιολογικά δείγματα, ενώ η εργαστηριακή ανάλυση θα πρέπει να διεξάγεται με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς οι ήδη υπάρχουσες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στον άνθρωπο (ενδογενείς συγκεντρώσεις GHB) μπορεί να προκαλέσουν συγχύσεις στις εκτίμησις των αποτελεσμάτων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο προσδιορισμός GHB και των οργανικών των διαλυτών, GHL και 1,4BD, δεν ανήκουν στην συνήθη εργαστηριακή ανάλυση σε περιπτώσεις δηλητηριάσεων και εγκλημάτων όπως η ανίχνευση κανναβινοειδών, οπιούχων και αμφεταμινών. Στην περίπτωση περιστατικών DFSA υποπτεύεται συνήθως το GHB και οι μεταβολίτες του και πολλές φορές γίνονται αναφορές για βραχεία αμνησία με διάρκεια λίγων ωρών μετά την κατανάλωση της ουσίας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως στα εργαστήρια δικανικής τοξικολογίας για τον προσδιορισμό του GHB στα διάφορα βιολογικά δείγματα περιλαμβάνουν μεθόδους όπως LC-MS, GC-MS αλλά και UPLC-MS/MS, οι οποίες επιτρέπουν την μέγιστη ακρίβεια και ευαισθησία ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού. Τα τελευταία χρόνια (από το 2013 και ύστερα) γίνεται λόγος για την πιθανή συμβολή του γλυκουρονιδίου του GHB (GHB-Gluc) στην ανάλυση, όπως ακριβώς χρησιμοποιούνται οι αντίστοιχοι μεταβολίτες σε άλλες «ναρκωτικές ουσίες», αφού με βάση τη φύση των μεταβολιτών να ανιχνεύονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα βιολογικά υλικά σε σχέση με την αρχική ουσία, θα μπορούσε να επιβεβαιώσει την εξωγενή πρόσληψη της ουσίας. Παρόλα αυτά, οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής απαιτούν κι άλλες αποδείξεις για τη συμβολή του GHB-Gluc έμπρακτα στην ανάλυση. Οι μελέτες που έχουν στραφεί στην ποσοτικοποίηση του GHB στην τρίχα έχουν δείξει σημαντικά αποτελέσματα και δίνουν ελπιδοφόρα μηνύματα για την εξιχνίαση σεξουαλικών εγκλημάτων (DFSAs), καθώς τα δείγματα αίματος και ούρων, δυστυχώς, δεν είναι πάντα ικανά να δώσουν σαφή αποτελέσματα της λήψης ουσιών από θύματα κακοποίησης, λόγω του γρήγορου μεταβολισμού του φαρμάκου από τον οργανισμό. Αντιθέτως, το δείγμα τρίχας διατηρεί «ανέπαφο» το ιστορικό πρόσληψης

των περισσότερων ουσιών και φαρμάκων, ειδικά στις περιπτώσεις όπου η τρίχα δεν έχει υποστεί οποιαδήποτε κατεργασία, όπως για παράδειγμα η επίδραση με υψηλής θερμοκρασίας ισιωτική μαλλιών, αλλά και χημική επίδραση με ντεκαπάζ (αποχρωματισμό μαλλιών).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. S.P. Bessman, W.N. Fishbein, Gamma-Hydroxybutyrate, a normal brain metabolite, *Nature* 200 (1963) 1207–1208, <https://doi.org/10.1038/2001207a0>
2. R.A. Anderson, R.F. Ritzmann, B. Tabakoff, Formation of gamma-hydroxybutyrate in brain, *J. Neurochem.* 28 (1977) 957–966, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10435.x>
3. C.G.T. Wong, K.F.Y. Chan, K.M. Gibson, O.C. Snead, γ -Hydroxybutyric acid: neurobiology and toxicology of recreational drug, *Toxicol. Rev.* 23 (1) (2004) 3–20.
4. C.G.T. Wong, K.M. Gibson, O.C. Snead, From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid, trends in pharmacological, *Science* 25 (2004) 29–34, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.11.001>
5. R.H. Roth, N.J. Giarman, Natural occurrence of gamma-hydroxybutyrate in mammalian brain, *Biochemical Pharmacology* 19 (1970) 1087–1093, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(70\)90370-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(70)90370-9)
6. J.D. Doherty, S.E. Hattox, O.C. Snead, R.H. Roth, Identification of endogenous gamma-hydroxybutyrate in human and bovine brain and its regional distribution in human, guinea pig and rhesus monkey brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207 (1978) 130–139
7. H. Laborit, Sodium 4-hydroxybutyrate, *Int. J. Neuropharmacol.* 3 (1964) 433–451, [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(64\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(64)90074-7)
8. Kam, P. C., & Yoong, F. F. (1998). Gamma-hydroxybutyric acid: An emerging recreational drug. *Anaesthesia*, 53 (12), 1195–1198
9. R.L. Chin, K.A. Sporer, B. Cullison, J.E. Dyer, T.U. Wu, Clinical course of gammahydroxybutyrate overdose, *Ann. Emerg. Med.* 31 (1998) 716–722
10. J.E. Dyer, Gamma-hydroxybutyrate: a health food product producing coma and seizure-like activity, *Am. J. Emerg. Med.* 9 (1991) 321–324, [https://doi.org/10.1016/07356757\(91\)90050-T](https://doi.org/10.1016/07356757(91)90050-T)

11. M.A. Elsohly, S.J. Salamone, Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 141–146, <https://doi.org/10.1093/jat/23.3.141>
12. Degenhardt, L., Darke, S., & Dillon, P. (2002). GHB use among Australians: Characteristics, use patterns and associated harm. *Drug and Alcohol Dependence*, 67 (1), 89–94
13. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2018). European drug report 2018: Trends and developments. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
14. Nicholson, K. L., & Balster, R. L. (2001). GHB: A new and novel drug of abuse. *Drug and Alcohol Dependence*, 63 (1), 1–22
15. Smith KM. Drugs used in acquaintance rape. *J Am Pharm Assoc.* 1999; 39:519-25
16. R.B. Palmer, γ -Butyrolactone and 1,4-butanediol abused analogues of γ - hydroxybutyrate, *Toxicol. Rev.* 23 (2004) 21–31, <https://doi.org/10.2165/00139709-200423010-00003>
17. Boscolo-Berto, R., Viel, G., Montagnese, S., Raduazzo, D. I., Ferrara, S. D., & Dauvil- liers, Y. (2012). Narcolepsy and effectiveness of gamma-hydroxybutyrate (GHB): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sleep Medicine Reviews*, 16 (5), 431–443. 10.1016/j.smr.2011.09.001
18. L.P. Carter, W. Koek, C.P. France, Behavioral analyses of GHB: receptor mechanisms, *Pharmacol. Ther.* 121 (2009) 110–114, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.10.003>.
19. F.P. Busardo, A.W. Jones, GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome, *Curr. Pharmacol.* 13 (2015) 47–70, <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210215423>
20. X.M. Xu, Y.D. Wei, Y. Liu, Z.X. Li, Gamma-hydroxybutyrate (GHB) for narcolepsy in adults: an updated systematic review and meta-analysis, *Sleep Med.* 64 (2019) 62–70, <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2019.06.017>

21. F. Mari, L. Politi, C. Trignano, M.G. di Milia, M. di Padua, E. Bertol, What constitutes a normal ante-mortem urine GHB concentration? *J. For. Legal Med.* 16 (2009) 148–151, <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2008.08.014>
22. F. Caputo, T. Vignoli, I. Maremmani, M. Bernardi, G. Zoli, Gamma hydroxybutyric acid (GHB) for the treatment of alcohol dependence: A review, *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 6 (2009) 1917–1929, <https://doi.org/10.3390/ijerph6061917>
23. Carter LP, Pardi D, Gorsline J and Griffiths RR. Illicit gamma-hydroxybutyrate (GHB) and pharmaceutical sodium oxybate (Xyrem): differences in characteristics and misuse. *Drug Alcohol Depend* 2009, 104 (1-2):1-10
24. Abanades S, Farre M, Segura M, Pichini S, Barral D, Pacifici R, Pellegrini M, Fonseca F, Langohr K, De La Torre R. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1074:559-576
25. Zvosec DL, Smith SW, Porrata T, Strobl AQ, Dyer JE. Case series of 226 γ -hydroxybutyrate– associated deaths: lethal toxicity and trauma. *Am J Emerg Med* 2011, 29 (3):319-332
26. Andresen H, Stimpfl T, Sprys N, Schnitgerhans T, Müller A. Liquid ecstasy - a significant drug problem. *Dtsch Arztebl Int* 2011, 105 (36):599-603
27. Abanades, S., Farre, M., Barral, D., Torrens, M., Closas, N., Langohr, K., et al. (2007). Relative abuse liability of gamma-hydroxybutyric acid, flunitrazepam, and ethanol in club drug users. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 27 (6), 625–638. 10.1097/jcp.0b013e31815a2542
28. Abanades, S., Farre, M., Segura, M., Pichini, S., Barral, D., Pacifici, R., et al. (2006). Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074 , 559–576. 10.1196/an-nals.1369.065
29. Miotto, K. , Darakjian, J. , Basch, J. , Murray, S. , Zogg, J. , & Rawson, R. (2001). Gamma-hydroxybutyric acid: Patterns of use, effects and withdrawal. *The American Journal on Addictions*, 10 (3), 232–241

30. Raposo Pereira, F., McMaster, M. T. B., de Vries, Y., Polderman, N., van den Brink, W., & van Wingen, G. A. (2019). Influence of gamma-hydroxybutyric acid-use and gamma- hydroxybutyric acid-induced coma on affect and the affective network. *European Ad- diction Research*, 25 (4), 173–181.
10.1159/000497381
31. Raposo Pereira, F., McMaster, M. T. B., Polderman, N., de Vries, Y., van den Brink, W., & van Wingen, G. A. (2018a). Adverse effects of GHB-induced coma on long- term memory and related brain function. *Drug and Alcohol Dependence*, 190, 29–36. 10.1016/j.drugalcdep.2018.05.019
32. Raposo Pereira, F., McMaster, M. T. B., Polderman, N., de Vries, Y., van den Brink, W., & van Wingen, G. A. (2018b). Effect of GHB-use and GHB-induced comas on dorso- lateral prefrontal cortex functioning in humans. *NeuroImage. Clinical*, 20, 923–930. 10.1016/j.nicl.2018.09.022
33. Raposo Pereira, F., McMaster, M. T. B., de Vries, Y., Polderman, N., van den Brink, W., & van Wingen, G. A. (2019). Influence of gamma-hydroxybutyric acid-use and gamma- hydroxybutyric acid-induced coma on affect and the affective network. *European Ad- diction Research*, 25 (4), 173–181
34. Miotto, K. , Darakjian, J. , Basch, J. , Murray, S. , Zogg, J. , & Rawson, R. (2001). Gamma-hydroxybutyric acid: Patterns of use, effects and withdrawal. *The American Journal on Addictions*, 10 (3), 232–241
35. Beurmanjer, H., Asperslag, E. M., Oliemeulen, L., Goudriaan, A. E., De Jong, C. A. J., Schellekens, A. S. A., et al. (2019). A qualitative approach in understanding illness perception and treatment needs in patients with gamma hydroxybutyrate use disorder. *European Addiction Research*, 25 (5), 248–255. 10.1159/000500807
36. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2018). *European drug report 2018: Trends and developments*. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
37. Kim SY, Anderson IB, Dyer JE, Barker JC, Blanc PD. High-risk behaviors and hospitalizations among gamma hydroxybutyrate (GHB) users. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2007;33(3):429–38

38. White CM. Pharmacologic, pharmacokinetic, and clinical assessment of illicitly used gamma-hydroxybutyrate. *J Clin Pharmacol.* 2017;57(1):33–9.
39. Liakoni E, Walther F, Nickel CH, Liechti ME. Presentations to an urban emergency department in Switzerland due to acute gamma-hydroxybutyrate toxicity. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2016;24(1):107.
40. Britt GC, McCance-Katz EF. A brief overview of the clinical pharmacology of “club drugs”. *Subst Use Misuse.* 2005;40(9–10):1189–201
41. Carter LP, Pardi D, Gorsline J, Griffiths RR. Illicit gamma-hydroxybutyrate (GHB) and pharmaceutical sodium oxybate (Xyrem): differences in characteristics and misuse. *Drug Alcohol Depend.* 2009;104(1–2):1–10
42. Hockenull J, Murphy KG, Paterson S. An observed rise in gamma-hydroxybutyrate-associated deaths in London: evidence to suggest a possible link with concomitant rise in chemsex. *Forensic Sci Int.* 2017;270:93–7
43. Busardo FP, Gottardi M, Tini A, Minutillo A, Sirignano A, Marinelli E, et al. Replacing GHB with GBL in recreational settings: a new trend in chemsex. *Curr Drug Metab.* 2018;19(13):1080–5
44. Hammoud MA, Bourne A, Maher L, Jin F, Haire B, Lea T, et al. Intensive sex partying with gamma-hydroxybutyrate: factors associated with using gamma-hydroxybutyrate for chemsex among Australian gay and bisexual men-results from the Flux Study. *Sex Health.* 2018;15(2):123–34
45. Betzler, F., Ernst, F., Helbig, J., Viohl, L., Roediger, L., Meister, S., et al. (2019). Substance use and prevention programs in Berlin’s party scene: Results of the SuPrA-study. *European Addiction Research*, 25 (6), 283–292
46. P. Kintz, V. Cirimele, C. Jamey, B. Ludes, Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault, *J. Forensic Sci.* 48 (2003) 202–209
47. B.G. Stephens, R.C. Baselt, Driving under the influence of GHB? *J. Anal. Toxicol.* 18 (1994) 357–358
48. L.P. Carter, D. Pardi, J. Gorsline, R.R. Griffiths, Illicit gamma-hydroxybutyrate (GHB) and pharmaceutical sodium oxybate (Xyrem®): differences in characteristics and misuse, *Drug Alcohol Depend.* 104 (2009) 1–10

49. A. Nebel, G. Mayer, C. Hess, A. Heidbreder, W. Martz, F. Veit. Levels of GHB in hair after regular application. *Forensic Science International*. Volume 325. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110885>
50. Schröck A, Hari Y, König S, Auwärter V, Schürch S, Weinmann W. Pharmacokinetics of GHB and detection window in serum and urine after single uptake of a low dose of GBL - an experiment with two volunteers. *Drug Test Anal.* 2014 Apr;6(4):363-6. doi: 10.1002/dta.1498. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23733593
51. S.D. Ferrara, S. Zotti, L. Tedeschi, G. Frison, F. Castagna, L. Gallimberti, G.L. Gessa, P. Palatini, Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses, *Br. J. Clin. Pharmacol* 34 (1992) 231–235, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1992.tb04129.x>
52. P. Palatini, L. Tedeschi, G. Frison, R. Padrini, R. Zordan, R. Orlando, L. Gallimberti, G.L. Gessa, S.D. Ferrara, Dose-dependent absorption and elimination of gammahydroxybutyric acid in healthy volunteers, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45 (1993) 353–356, <https://doi.org/10.1007/BF00265954>
53. R. Brenneisen, M.A. Elsohly, T.P. Murphy, J. Passarelli, S. Russmann, S. J. Salamone, D.E. Watson, Pharmacokinetics and excretion of gammahydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 625–630, <https://doi.org/10.1093/jat/28.8.625>
54. M. LeBeau, W. Andollo, W.L. Hearn, R. Baselt, E. Cone, B. Finkle, D. Fraser, A. Jenkins, J. Mayer, A. Negrusz, A. Poklis, H.C. Walls, L. Raymon, M. Robertson, J. Saady, Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults, *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 227–230
55. S.P. Elliott, Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 9–16, [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00043-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00043-4)
56. H. Andresen, N. Sprys, A. Schmoldt, A. Mueller, S. Iwersen-Bergmann, Gammahydroxybutyrate in urine and serum: Additional data supporting current cut-off recommendations, *For. Sci. Int.* 200 (2010) 93–99, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.035>

57. E. Bertol, F. Mari, F. Vaiano, G. Romano, S. Zaami, G. Baglìo, F.P. Busardò, Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 376–384
58. K.S. Kalasinsky, M.M. Dixon, G.A. Schmunk, S.J. Kish, Blood, brain, and hair GHB concentrations following fatal ingestion, *J. Forensic Sci.* 46 (2001)15032J
59. A. Nebel, G. Mayer, C. Hess, A. Heidbreder, W. Martz, F. Veit. Levels of GHB in hair after regular application. *Forensic Science International*. Volume 325. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110885>
60. P. Kintz, V. Cirimele, C. Jamey, B. Ludes, Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault, *J. Forensic Sci.* 48 (2003) 202–209
61. Y. Shi, X. Cui, M. Shen, P. Xiang, Quantitative analysis of the endogenous GHB level in the hair of the Chinese population using GC/MS/MS, *J. Forensic Leg. Med.* 39 (2016) 10–15.
62. F.P. Busardò, F. Vaiano, G. Mannocchi, E. Bertol, S. Zaami, E. Marinelli, Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault, *Drug Test. Anal.* 9 (2016) 953–956
63. R. Paul, L. Tsanaclis, R. Kingston, A. Berry, A. Guwy, Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS, *Drug Test. Anal.* 3 (2011) 201–205
64. W. Martz, A. Nebel, F. Veit, Variation of intraindividual levels of endogenous GHB in segmented hair samples, *Forensic Sci. Int.* 302 (2019) 109913
65. L.-M. Mehling, X. Wang, S.-S. Johansen, A. Spottke, A. Heidbreder, P. Young, B. Madea, C. Hess, Determination of GHB and GHB- β -O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients-comparison between single and chronic GHB exposure, *Forensic Sci. Int.* 278 (2017) e8–e13.
66. Y. Hari, S. König, A. Schröck, P. Coro, V. Auwärter, A. Thierauf, W. Weinmann, LC- MS/MS of GHB in head hair and beard, *Toxichem Krimtech* (2013) 224
67. J.P. Goullé, M. Chèze, G. Pépin, Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration

- through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 574–580.
68. E. Bertol, A. Argo, P. Procaccianti, F. Vaiano, M.G. Di Milia, S. Furlanetto, F. Mari, Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 518–522
69. I.N. Petersen, C. Tortzen, J.L. Kristensen, D.S. Pedersen, T. Breindahl, Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 291–297, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt027>
70. X. Wang, K. Linnet, S.S. Johansen, Development of a UPLC–MS/MS method for determining g-hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases, *Forensic Toxicol.* 34 (2016) 51–60
71. Bay T, Eghorn LF, Klein AB, Wellendorph P. GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. *Biochem Pharmacol.* 2014;87(2):220–8.
72. Absalom N, Eghorn LF, Villumsen IS, Karim N, Bay T, Olsen JV, et al. Alpha4betadelta GABA(A) receptors are high-affinity targets for gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(33):13404–9
73. Carai MA, Colombo G, Brunetti G, Melis S, Serra S, Vacca G, et al. Role of GABA(B) receptors in the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *Eur J Pharmacol.* 2001;428(3):315–21
74. Gobaille S, Hechler V, Andriamampandry C, Kemmel V, Maitre M. Gamma-hydroxybutyrate modulates synthesis and extracellular concentration of gamma-aminobutyric acid in discrete rat brain regions in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290(1):303–9.
75. Castelli MP, Ferraro L, Mocci I, Carta F, Carai MA, Antonelli T, et al. Selective gamma-hydroxybutyric acid receptor ligands increase extracellular glutamate in the hippocampus, but fail to activate G protein and to produce the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *J Neurochem.* 2003;87(3):722–32

76. Hechler V, Gobaille S, Bourguignon JJ, Maitre M. Extracellular events induced by gamma-hydroxybutyrate in striatum: a microdialysis study. *J Neurochem.* 1991;56(3):938–44
77. Crunelli, V., Emri, Z., Leresche, N. Unravelling the brain targets of gamma-hydroxybutyric acid. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2006**, 6 (1), 44-52
78. Carai, M.A., Colombo, G., Reali, R., Serra, S., Mocci, I., Castelli, M.P., Cignarella, G., Gessa, G.L. Central effects of 1,4-butanediol are mediated by GABA-b receptors via its conversion into gammahydroxybutyric acid. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 441 (3), 157-63. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01502-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01502-9)
79. Chalifoux, J.R., Carter, A.G. GABA-B receptor modulation of synaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2011, 21 (2), 339-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.004>
80. Snead, O.C., 3rd. The ontogeny of gabaergic enhancement of the gamma-hydroxybutyrate model of generalized absence seizures. *Epilepsia*, 1990, 31 (4), 363-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1157.1990.tb05489.x>
81. Dornbierer DA, Baur DM, Stucky B, Quednow BB, Kraemer T, Seifritz E, et al. Neurophysiological signature of gamma-hydroxybutyrate augmented sleep in male healthy volunteers may reflect biomimetic sleep enhancement: a randomized controlled trial. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(11):1985–93
82. Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, Sansig G, Klebs K, et al. Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 2003;18(10):2722–30
83. Morse BL, Vijay N, Morris ME. Gamma-hydroxybutyrate (GHB)-induced respiratory depression: combined receptor-transporter inhibition therapy for treatment in GHB overdose. *Mol Pharmacol.* 2012;82(2):226–35
84. Carai MA, Lobina C, Maccioni P, Cabras C, Colombo G, Gessa GL. Gamma-aminobutyric acidB (GABAB)-receptor mediation of different in vivo effects of gamma-butyrolactone. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(2):199–207

85. Ito Y, Ishige K, Zaitso E, Anzai K, Fukuda H. Gamma-hydroxybutyric acid increases intracellular Ca²⁺ concentration and nuclear cyclic AMP-responsive element- and activator protein 1 DNA-binding activities through GABAB receptor in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 1995;65(1):75–83.
86. Mathivet P, Bernasconi R, De Barry J, Marescaux C, Bittiger H. Binding characteristics of gamma-hydroxybutyric acid as a weak but selective GABAB receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1997;321(1):67–75
87. Ishige K, Aizawa M, Ito Y, Fukuda H. Gamma-butyrolactone-induced absence-like seizures increase nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities in mouse brain. *Neuropharmacology.* 1996;35(1):45–55
88. Bernasconi R, Lauber J, Marescaux C, Vergnes M, Martin P, Rubio V, et al. Experimental absence seizures: potential role of gamma-hydroxybutyric acid and GABAB receptors. *J Neural Transm Suppl.* 1992;35:155–77
89. Brenneisen R, Elsohly MA, Murphy TP, Passarelli J, Russmann S, Salamone SJ, et al. Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J Anal Toxicol* 2004;28(8):625–30
90. O'Connor T, Ireland LS, Harrison DJ, Hayes JD. Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J.* 1999;343(Pt 2):487–504
91. Kaufman EE, Nelson T. An overview of gamma-hydroxybutyrate catabolism: the role of the cytosolic NADP(+)-dependent oxidoreductase EC 1.1.1.19 and of a mitochondrial hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase in the initial, rate-limiting step in this pathway. *Neurochem Res.* 1991;16(9):965–74
92. Vayer P, Mandel P, Maitre M. Conversion of gamma-hydroxybutyrate to gamma-aminobutyrate in vitro. *J Neurochem.* 1985;45(3):810–4
93. Snead OC 3rd, Furner R, Liu CC. In vivo conversion of gamma-aminobutyric acid and 1,4-butanediol to gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. Studies using stable isotopes. *Biochem Pharmacol.* 1989;38(24):4375–80
94. Roth RH, Giarman NJ. Gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid I: distribution and metabolism. *Biochem Pharmacol.* 1966;15:1333–48

95. Wong CG, Gibson KM, Snead OC 3rd. From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(1):29–34
96. Struys EA, Verhoeven NM, Jansen EE, Ten Brink HJ, Gupta M, Burlingame TG, et al. Metabolism of gamma-hydroxybutyrate to d-2-hydroxyglutarate in mammals: further evidence for d-2-hydroxyglutarate transhydrogenase. *Metabolism.* 2006;55(3):353–8
97. Liakoni E, Gugelmann H, Dempsey DA, Wiegand TJ, Havel C, Jacob P, et al. Butanediol conversion to gamma-hydroxybutyrate markedly reduced by the alcohol dehydrogenase blocker fomepizole. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(5):1196–203
98. Gibson KM, Nyhan WL. Metabolism of [U-14C]-4-hydroxybutyric acid to intermediates of the tricarboxylic acid cycle in extracts of rat liver and kidney mitochondria. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1989;14(1):61–70
99. Pearl PL, Gibson KM, Cortez MA, Wu Y, Carter Snead O 3rd, Knerr I, et al. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: lessons from mice and men. *J Inherit Metab Dis.* 2009;32(3):343–52
100. Morris ME, Felmlee MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J.* 2008;10(2):311–21
101. Roiko SA, Vijay N, Felmlee MA, Morris ME. Brain extracellular gamma-hydroxybutyrate concentrations are decreased by L-lactate in rats: role in the treatment of overdoses. *Pharm Res.* 2013;30(5):1338–48
102. Bhattacharya I, Boje KM. GHB (gamma-hydroxybutyrate) carrier-mediated transport across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(1):92–8
103. Felmlee MA, Morse BL, Follman KE, Morris ME. The drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid exhibits tissue-specific nonlinear distribution. *AAPS J.* 2017;20(1):21

104. Morse BL, Vijay N, Morris ME. Mechanistic modeling of monocarboxylate transporter-mediated toxicokinetic/toxicodynamic interactions between gamma-hydroxybutyrate and L-lactate. *AAPS J.* 2014;16(4):756–70
105. Scharf MB, Lai AA, Branigan B, Stover R, Berkowitz DB. Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients. *Sleep.* 1998;21(5):507–14
106. Palatini P, Tedeschi L, Frison G, Padrini R, Zordan R, Orlando R, et al. Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;45(4):353–6
107. Ferrara SD, Zotti S, Tedeschi L, Frison G, Castagna F, Gallimberti L, et al. Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses. *Br J Clin Pharmacol.* 1992;34(3):231–5
108. Vijay N, Morse BL, Morris ME. A novel monocarboxylate transporter inhibitor as a potential treatment strategy for gamma-hydroxybutyric acid overdose. *Pharm Res.* 2015;32(6):1894–906
109. Morris ME, Hu K, Wang Q. Renal clearance of gamma-hydroxybutyric acid in rats: increasing renal elimination as a detoxification strategy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(3):1194–202
110. Palatini P, Tedeschi L, Frison G, Padrini R, Zordan R, Orlando R, et al. Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;45(4):353–6
111. Lettieri JT, Fung HL. Dose-dependent pharmacokinetics and hypnotic effects of sodium gamma-hydroxybutyrate in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979;208(1):7–11
112. Busardò FP, Jones AW. GHB Pharmacology and Toxicology: Acute Intoxication, Concentrations in Blood and Urine in Forensic Cases and Treatment of the Withdrawal Syndrome. *Current Neuropharmacology* 2015, 13: 47-70
113. Hefele, B., Naumann, N., Trollmann, R., Dittrich, K., Rascher, W. Fast-in, fast-out. *Lancet*, **2009**, 373 (9672), 1398. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)60570-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60570-5)

114. Charlebois, R.C., Corbett, M.R., Wigmore, J.G. Comparison of ethanol concentrations in blood, serum, and blood cells for forensic application. *J. Anal. Toxicol.*, 1996, 20 (3), 171-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/20.3.171>
115. Iffland, R., West, A., Bilzer, N., Schuff, A. Zur zuverlässigkeit der blutalkohol bestimmung. Das verkeilungsverhältnis des wassers zwischen serum und vollblut. *Rechtsmedizin*, 1999, 9, 123-130. <http://dx.doi.org/10.1007/s001940050094>
116. Abanades, S., Farre, M., Segura, M., Pichini, S., Barral, D., Pacifici, R., Pellegrini, M., Fonseca, F., Langohr, K., De La Torre, R. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, 1074, 559-76. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1369.065>
117. Jones, A.W., Eklund, A., Kronstrand, R. Concentration-time profiles of gamma-hydroxybutyrate in blood after recreational doses are best described by zero-order rather than first-order kinetics. *J. Anal.Toxicol.*, 2009, 33 (6), 332-5. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/33.6.332>
118. Borgen, L.A., Okerholm, R., Morrison, D., Lai, A. The influence of gender and food on the pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.*, 2003, 43 (1), 59-65. <http://dx.doi.org/10.1177/0091270002239707>
119. Borgen, L.A., Okerholm, R.A., Lai, A., Scharf, M.B. The pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution following acute and chronic administration to narcoleptic patients. *J. Clin. Pharmacol.*, 2004, 44 (3), 253-7. <http://dx.doi.org/10.1177/0091270003262795>
120. Ferrara, S.D., Zotti, S., Tedeschi, L., Frison, G., Castagna, F., Gallimberti, L., Gessa, G.L., Palatini, P. Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1992, 34 (3), 231-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.1992.tb04129.x>

121. Brailsford, A.D., Cowan, D.A., Kicman, A.T. Pharmacokinetic properties of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in whole blood, serum, and urine. *J. Anal. Toxicol.*, 2012, 36 (2), 88-95. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkr023>
122. Giarman NJ, Roth RH. Differential estimation of gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid in rat blood and brain. *Science*. 1964;145(3632):583-4
123. Fung HL, Tsou PS, Bulitta JB, Tran DC, Page NA, Soda D, et al. Pharmacokinetics of 1,4-butanediol in rats: bioactivation to gamma-hydroxybutyric acid, interaction with ethanol, and oral bioavailability. *AAPS J.* 2008;10(1):56-69
124. Goodwin AK, Brown PR, Jansen EE, Jakobs C, Gibson KM, Weerts EM. Behavioral effects and pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD) in baboons. *Psychopharmacology*. 2009;204(3):465-76
125. Thai, D., Dyer, J.E., Jacob, P., Haller, C.A. Clinical pharmacology of 1,4-butanediol and gamma-hydroxybutyrate after oral 1,4-butanediol administration to healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2007, 81 (2), 178-84. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.clpt.6100037>
126. Mari F, Politi L, Trignano C, Di Milia MG, Di Padua M, Bertol E. What constitutes a normal ante-mortem urine GHB concentration? *J. Forensic Leg Med.* 2009, 16 (3): 148-151
127. Bessman SP, Fishbein WN. Gamma-hydroxybutyrate, a normal brain metabolite. *Nature* 1963, 200: 1207-1208
128. Crookes, C.E., Faulds, M.C., Forrest, A.R., Galloway, J.H. A reference range for endogenous gamma-hydroxybutyrate in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2004, 28 (8), 644-9. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/28.8.644>
129. Elian, A.A. Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood. *Forensic Sci. Int.*, 2002, 128 (3), 120-2. [http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738\(02\)00183-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738(02)00183-4)

130. Y. Shi, X. Cui, M. Shen, P. Xiang, Quantitative analysis of the endogenous GHB level in the hair of the Chinese population using GC/MS/MS, *J. Forensic Leg. Med.* 39 (2016) 10–15, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2016.01.002>
131. Kintz, P., Villain, M., Cirimele, V., Ludes, B. GHB in postmortem toxicology. Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens. *Forensic Sci Int* 2004, 143 (2-3), 177-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.036>
132. Andresen H, Sprys, N, Schmoltdt A, Mueller A, Iwersen-Bergmann S. Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum Additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Sci. Int.* 2010, 200 (1-3): 93-99
133. Elliott, S., Lowe, P., Symonds, A. The possible influence of microorganisms and putrefaction in the production of GHB in postmortem biological fluid. *Forensic Sci. Int.*, 2004, 139 (2-3), 183-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.10.018>
134. Andresen H, Stimpfl T, Sprys N, Schnitgerhans T, Müller A. Liquid ecstasy - a significant drug problem. *Dtsch Arztebl Int* 2011, 105 (36):599-603
135. Andresen-Streichert H, Jungen H, Gehl A, Müller A, Iwersen-Bergmann S. Uptake of gamma-valerolactone--detection of gamma-hydroxyvaleric acid in human urine samples. *J Anal Toxicol* 2013, 37 (4): 250-254
136. LeBeau MA, Montgomery MA, Morris-Kukoski C. Further evidence of in vitro production of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine samples. *Forensic Sci Int.* 2007, 169:152-156
137. Yeatman, D.T., Reid, K. A study of urinary endogenous gammahydroxybutyrate (GHB) levels. *J Anal Toxicol* 2003, 27 (1), 40-2. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/27.1.40>
138. Shima, N., Miki, A., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H. Urinary endogenous concentrations of GHB and its isomers in healthy humans and diabetics. *Forensic Sci. Int.*, 2005, 149 (2-3), 171-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.017>

139. Lebeau, M.A., Christenson, R.H., Levine, B., Darwin, W.D., Huestis, M.A. Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate. *J. Anal. Toxicol.*, 2002, 26 (6), 340-6. PMID: 12220015
140. De Paoli, G., Walker, K.M., Pounder, D.J. Endogenous gammahydroxybutyric acid concentrations in saliva determined by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **2011**, 35 (3), 148-52. <http://dx.doi.org/10.1093/anatox/35.3.148>
141. Καραπέτσα, Μ. (2019) Προσδιορισμός του γ-υδροξυβουτυρικού οξέος σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά, αίμα ή ούρα, με υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (Μεταπτυχιακή εργασία) Διαθέσιμο από: <http://ikee.lib.auth.gr/record/317118/files/GRI-2020-27017.pdf>
142. Zacharis CK, Raikos N, Giouvalakis N, Papadopoulou H, Theodoridis GA. A new method for the HPLC determination of gammahydroxybutyric acid (GHB) following derivatization with a coumarin analogue and fluorescence detection. Application in the analysis of biological fluids. *Talanta* 2008, 75: 356-361
143. 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), 1-7. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/24.1.1>
144. Ingels, A.S., Neels, H., Lambert, W.E., Stove, C.P. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biofluids using a one-step procedure with "in-vial" derivatization and headspace-trap gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1296, 84-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.023>
145. Elian, A.A. GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. *Forensic Sci. Int.*, **2001**, 122 (1), 43-7. [http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00441-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00441-8)
146. Dahl, S.R., Olsen, K.M., Strand, D.H. Determination of gammahydroxybutyrate (GHB), beta hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine

- samples by UPLC-MSMS. *J Chromatogr B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, 2012, 885-886, 37-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.009>
147. Elian, A.A., Hackett, J. Anion exchange SPE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in GHB analysis. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, 879 (31), 3752-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.018>
148. Sorensen, L.K., Hasselstrom, J.B. A hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of gamma-hydroxybutyrate and its precursors in forensic whole blood. *Forensic Sci. Int.*, **2012**, 222 (1-3), 352-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.07.017>
149. Blair, S., Song, M., Hall, B., Brodbelt, J. Determination of gamma-hydroxybutyrate in water and human urine by solid phase microextraction-gas chromatography quadrupole ion trap spectrometry. *J. Forensic. Sci.*, 2001, 46 (3), 688-93. PMID:11373009
150. Stout, P.A., Simons, K.D., Kerrigan, S. Quantitative analysis of gamma-hydroxybutyrate at endogenous concentrations in hair using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Forensic Sci.*, 2010, 55 (2), 531-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01304.x>
151. Johansen, S.S., Windberg, C.N. Simultaneous determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its analogues (GBL, 1,4-BD, GVL) in whole blood and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2011, 35 (1), 8-14. <http://dx.doi.org/10.1093/anatox/35.1.8>
152. Kaufmann, E., Alt, A. Determination of GHB in urine and serum by LC/MS using a simple one-step derivative. *Forensic Sci. Int.* **2007**, 168 (2-3), 133-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.002>
153. Meyer, M.R., Weber, A.A., Maurer, H.H. A validated GC-MS procedure for fast, simple, and cost-effective quantification of glycols and GHB in human plasma and their identification in urine and plasma developed for emergency toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400 (2), 411-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-4760-6>

154. 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* (2), 379-87. PMID:15027565
155. Grenier, V., Huppe, G., Lamarche, M., Mireault, P. Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices. *J. Anal. Toxicol.* 2012, *36* (7), 523-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bks053>
156. Mehling LM, Wang X, Johansen SS, Spottke A, Heidbreder A, Young P, Madea B, Hess C. Determination of GHB and GHB- β -O-glucuronide in hair of three narcoleptic patients-Comparison between single and chronic GHB exposure. *Forensic Sci Int.* 2017 Sep;278:e8-e13. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.07.027. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28811136.
157. Petersen, I.N., Tortzen, C., Kristensen, J.L., Pedersen, D.S., Breindahl, T. Identification of a new metabolite of GHB: Gammahydroxybutyric acid glucuronide. *J. Anal. Toxicol.*, 2013, *37* (5), 291-7. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt027>
158. Crunelle, C.L., Cappelle, D., Covaci, A., Van Nuijs, A.L., Maudens, K.E., Sabbe, B., Dom, G., Michielsen, P., Yegles, M., Neels, H. Hair ethyl glucuronide as a biomarker of alcohol consumption in alcohol-dependent patients: Role of gender differences. *Drug Alcohol Depend.*, 2014, *141*, 163-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.05.014>
159. Schep LJ, Knudsen K, Slaughter RJ, Vale JA, Mégarbane B. The clinical toxicology of γ -hydroxybutyrate, γ -butyrolactone and 1,4-butanediol. *Clinical Toxicology* 2012, *50* (6): 458–70.
160. Bertol, E., Argo, A., Procaccianti, P., Vaiano, F., Di Milia, M.G., Furlanetto, S., Mari, F. Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: Validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, *70*, 518-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.07.009>
161. Mion, G., Tourtier, J.P., Diraison, Y. Gamma-hydroxybutyric acid in hair. *N. Engl. J. Med.*, 2006, *354* (1), 96-7. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc053116>

162. Kintz, P., Cirimele, V., Jamey, C., Ludes, B. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J. Forensic. Sci.*, 2003, 48 (1), 195-200. PMID:12570228
163. Stove, C.P., Ingels, A.S., Lambert, W.E. Quantitation of gammahydroxybutyric acid in dried blood spots in newborn screening. *Mol. Genet. Metab.*, 2013, 110 (1-2), 195. PMID: 23871245
164. Ingels, A.S., Lambert, W.E., Stove, C.P. Determination of gammahydroxybutyric acid in dried blood spots using a simple GC-MS method with direct "on spot" derivatization. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398 (5), 2173-82. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4183-9>
165. Marinetti, L.J., Isenschmid, D.S., Hepler, B.R., Kanluen, S. Analysis of GHB and 4-methyl-GHB in postmortem matrices after long-term storage. *J. Anal. Toxicol.*, **2005**, 29 (1), 41-7. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/29.1.41>
166. Mazarr-Proo, S., Kerrigan, S. Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose. *J. Anal. Toxicol.*, **2005**, 29 (5), 398-400. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/29.5.398>
167. Moriya, F., Hashimoto, Y. Site-dependent production of gammahydroxybutyric acid in the early postmortem period. *Forensic Sci. Int.*, **2005**, 148 (2-3), 139-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.002>
168. Negrusz A, Bowen A.M, Moore CM. Deposition of 7- aminoclonazepam and clonazepam in hair following a single dose of Klonopin. *J Anal Toxicol.* 2002, 26: 471-478
169. Frison G, Favretto D, Tedeschi L, Detection of thiopental and pentobarbital in head and pubic hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2003, 133:171-174
170. LeBeau M, Andollo W, Hearn WL. Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults. *J Forensic Sci.* 1999, 44: 227-230
171. Kerrigan S. In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples. *J Anal Toxicol.* 2002, 26:571-574

172. LeBeau MA, Montgomery MA, Morris-Kukoski C. Further evidence of in vitro production of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine samples. *Forensic Sci Int.* 2007, 169:152-156.
173. G.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci. Int.* 2012, 218, 20
174. P. Kintz, A novel approach to document single exposure to GHB: hair analysis after sweat contamination, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 563–564.
175. Dass C (2007-01-01). *Hyphenated Separation Techniques. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry.* John Wiley & Sons, Inc, 2007: 151–194
176. Ardrey RE. Introduction. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Analytical Techniques in the Sciences (AnTS).* John Wiley & Sons, Ltd, 2003: 1–5.
177. J. Throck Watson and O. David Sparkman “Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation” 4th Edition, John Wiley & Sons, 2007
178. Roberts G. *Encyclopedia of Biophysics – Springer*, 2013
179. Sharp TR. (2009-01-01). "Mass Spectrometry". In Nassar, Ala F.; Collegiateessor, Paul F. Hollenberg; VP, JoAnn Scatina (eds.). *Drug Metabolism Handbook.* John Wiley & Sons, Inc., 2009: 167–227.
180. Widmer L, Watson S, Schlatter K, Crowson A. Development of an LC/MS method for the trace analysis of triacetone triperoxide (TATP). *The Analyst* 2002, 127 (12): 1627–1632.
181. Ramírez Fernández MDM, Wille SMR, Di Fazio V, Samyn N. Influence of bleaching and thermal straightening on endogenous GHB concentrations in hair: An in vitro experiment. *Forensic Sci Int.* 2019 Apr;297:277-283. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.02.027. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30851604.
182. R. Rossi, M. Lancia, C. Gambelunghe, A. Oliva, N. Fucci, Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault, *Forensic Sci. Int.* 186 (2009) e9–e11
183. E. Jagerdeo, M.A. Montgomery, M.A. LeBeau, An improved method for the analysis of GHB in human hair by liquid chromatography tandem mass

- spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 39 (2015) 83–88,
doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/bku130>.
184. F.P. Busardò, S. Pichini, R. Giorgetti, Considerations regarding the development and validation of chromatographic mass spectrometric methods for GHB analysis in forensic toxicology, *Forensic Sci. Int.* 288 (2018) e27–e28, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.020>
185. Forni S, Pearl PL, Gibson KM, Yu Y, Sweetman L. Quantitation of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots: feasibility assessment for newborn screening of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Mol Genet Metab* 2013, 109 (3): 255-259
186. Wysocki VH, Resing KA, Zhang Q, Cheng G, Zhang Q, Cheng G. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* 2005, 35 (3): 211–222
187. Sudhakar P, Latha P, Reddy PV. *Phenotyping Crop Plants for Physiological and Biochemical Traits*. Academic Press, 2016. ISBN 9780128041109
188. Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID. (January 2014). Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014, 87: 12–25.
189. Jorge TF, Rodrigues João A, Caldana C, Schmidt R, van Donge, Joost T, Thomas-Oates Jane, António C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews* 2016, 35 (5): 620–649.
190. B. Madea, F. Musshoff, Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (2009) 341–347, doi:<http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2009.0341>
191. R. Brenneisen, M.A. Elsohly, T.P. Murphy, J. Passarelli, S. Russmann, S.J.Salamone, D.E. Watson, Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 625–630, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/28.8.625>.

192. S. Abanades, M. Farré, M. Segura, S. Pichini, A. Pastor, R. Pacifici, M. Pellegrini, R. de la Torre, Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring, *Ther. Drug Monit.* 29 (2007) 64–70, doi:<http://dx.doi.org/10.1097/FTD.0b013e3180307e5e>.
193. M.A. LeBeau, R.H. Christenson, B. Levine, W.D. Darwin, M.A. Huestis, Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gammahydroxybutyrate, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 340–346
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220015>. (Accessed 23 June 2015).
194. X. Wang, K. Linnet, S.S. Johansen, Development of a UPLC–MS/MS method for determining g-hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases, *Forensic Toxicol.* 34 (2016) 51–60.
195. R. Tittarelli, S. Pichini, D. S. Pedersen, R. Pacifici, M. Moresco, F. Pizza, F. P. Busardò, G. Plazzi, Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of GHB, GHB-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of narcoleptic patients under sodium oxybate treatment, *Forensic Science International* 274 (2017) 70–74
196. A. L. Castro, A. S. Dias, P. Melo, S. Tarelho, J. M. Franco, H. M. Teixeira, Quantification of GHB and GHB-GLUC in an 1,4-butanediol intoxication: A case report, *Forensic Science International* 297 (2019) 378–382
197. F.P. Busardò, C. Kyriakou, E. Marchei, R. Pacifici, D.S. Pedersen, S. Pichini, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: application to clinical and forensic cases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137 (2017) 123–131
198. A. Dias, A. Castro, P. Melo, S. Tarelho, P. Domingues, J. Franco, A fast method for GHB-GLUC quantitation in whole blood by GC–MS/MS (TQD) for forensic purposes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 150 (2018) 107–111.
199. T. Mehling, A. Piper, A. Spottke, P. Heidbreder, B. Young, B. Madea, M. Thevis, C. Hess, GHB-O- β -glucuronide in blood and urine is not a suitable tool

- for the extension of the detection window after GHB intake, *Forensic Toxicol.* 2(2017) 1–12.
200. R. Tittarelli, S. Pichini, D.S. Pedersen, R. Pacifici, M. Moresco, F. Pizza, F.P. Busardò, G. Plazzi, Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of GHB, GHB-glucuronide in plasma and cerebrospinal fluid of narcoleptic patients under sodium oxybate treatment, *Forensic Sci. Int.* 274 (2017) 70–74.
201. F.P. Busardò, M. Gottardi, A. Tini, C. Mortali, R. Giorgetti, S. Pichini, Ultra-high-Performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry assay for determination of endogenous GHB and GHB-Glucuronide in nails, *Molecules* 23 (2018) 2686.
202. UNODC,
(n.d.).https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analysis_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf.
203. M. Yegles, Y. Marson, R. Wennig, Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair, *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 87–92.
204. C.L. Crunelle, M. Yegles, M. De Doncker, G. Dom, D. Cappelle, K.E. Maudens, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, H. Neels, Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients, *Forensic Sci. Int.* 247 (2015) 18–22.
205. J. Ettlinger, M. Yegles, Influence of thermal hair straightening on cannabis and cocaine content in hair, Special Issue 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists TIAFT 265 (2016) 13–16, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.002>.
206. V. Hill, E. Loni, T. Cairns, J. Sommer, M. Schaffer, Identification and analysis of damaged or porous hair, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 42–54.
207. T. Cairns, V. Hill, M. Schaffer, W. Thistle, Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 97–108.
208. I. Kerekes, M. Yegles, Coloring, bleaching, and perming: influence on EtG content in Hair, *Ther. Drug Monit.* 35 (2013) 527–529.

209. L. Morini, A. Zucchella, A. Polettini, L. Politi, A. Groppi, Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment, *Forensic Sci. Int.* 198 (2010) 23–27, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.11.005>.